



4. Uluslararası Katılımlı Hücre Ölümü Araştırma Derneği Kongresi

**4th Congress of
Cell Death Research Society-Turkiye
with International
Participation**

**BİLDİRİ KİTABI
PROCEEDINGS BOOK**

ISBN NO: 978-605-73554-0-9

17-19 Mart 2022

ONLINE

www.celldeathturkiye2022.org



www.hucreolumu.org



4. Uluslararası Katılımlı Hücre Ölümü Araştırma Derneği Kongresi

4th Congress of
Cell Death Research Society-Turkiye
with International
Participation

BİLDİRİ KİTABI PROCEEDINGS BOOK

ISBN NO: 978-605-73554-0-9

17-19 Mart 2022

ONLINE

www.celldeathturkiye2022.org



www.hucreolumu.org

4. Uluslararası Katılımlı Hücre Ölümü Araştırma Derneği Kongresi Bildiri Kitabı

Editörler:

Prof. Dr. A. Semra Koçtürk, PhD

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

Prof. Dr. İşıl Kurnaz, PhD

Gebze Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Kocaeli, Türkiye

Prof. H. Seda VATANSEVER, MD, PhD

Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Manisa,
Türkiye

Kapak Tasarımı: NL M.I.C.E.

Yayınlayan: Hücre Ölümü Araştırma Derneği

Dil: Türkçe, İngilizce

ISBN 978-605-73554-0-9

İlk Baskı (elektronik): 31 Mart 2022

Tüm hakları Hücre Ölümü Araştırma Derneği Türkiye'ye aittir. Bu kitap tamamen veya kısmen izinsiz bir şekilde çoğaltılamaz. Bu kitabı elektronik kopyalarını dağıtmak telif hakkı ihlali teşkil edecekinden ihlal edeni cezai ve hukuki sorumluluğa tabii tutabilir.

4th Congress of Cell Death Research Society-Turkiye with International Participation Abstract Book

Editors:

Prof. Dr. A. Semra KOÇTÜRK, PhD

Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Department of Biochemistry, Izmir, Turkey

Prof. Dr. İşıl Kurnaz, PhD

Department of Molecular Biology and Genetics, Gebze Technical University, Kocaeli, Turkey

Prof. H. Seda VATANSEVER, MD, PhD

Manisa Celal Bayar University, Faculty of Medicine, Department of Histology-Embryology,
Manisa, Turkey

Cover Page Design: NL M.I.C.E.

Publisher: Cell Death Research Society-Turkey

Language: English

ISBN 978-605-73554-0-9

First Edition (electronic): 31 March 2022

All Rights reserved by Cell Death Research Society of Turkey. This book may not be reproduced in whole or part without permission. Making or distributing electronic copies of this book constitutes copyright infringement and could subject the infringer to criminal and civil liability.



DAVET

Sevgili meslektaşlarım,

Düzenleme kurulu adına, Hücre Ölümü Araştırma Derneği-Turkiye (HÖAD-Turkiye) tarafından 17-19 Mart 2022 tarihlerinde, Uluslararası Katılımlı Hücre Ölümü Araştırma Derneği 4. Kongresi'nin çevrimiçi olarak gerçekleştirileceğini duyurmaktan mutluluk duymaktayız.

Düzenleme kurulunun 2021 yılından bu yana kongreyi yüz yüze yapmak için çok çaba sarf ettiğini bildirmek isteriz. Ancak COVID-19'un ilerlemesi nedeniyle, kongrenin daha fazla ertelenmemesi için dernek yönetim kurulu kongreyi çevrimiçi olarak düzenlemeye karar vermiştir.

Kongre, dünyanın dört bir yanından hücre ölümü ve ilgili konular hakkında deneyimlerini ve araştırma sonuçlarını paylaşmak üzere önde gelen akademik bilim insanlarını, araştırmacıları ve araştırma uzmanlarını bir araya getirmeyi amaçlamaktadır.

Bilimsel hakemli kongremizin ana başlıklarları "Viral Determinantlar ve Hücre Ölümü", "Hücre Ölümü ve Hastalıkları", "Hücre ve Mikroçevre Bağlantısı", "3- Boyutlu Kültür ve Organoid Kültür Modelleri", "Biyoteknoloji ve İlaç" olacaktır.

Kongremize çok sayıda alanlarında uzman ve seçkin konuşmacı davet edilmiş olup ele alınan konularla ilgili en son araştırmalarını sunacak ve gelecek perspektiflerini tartışacaklardır. Kongre tüm sunumlar istege bağlı olarak İngilizce veya Türkçe yapılabilir.

Buna ek olarak,

- Kabul edilen tüm sözlü bildiriler tam metin olarak, kabul edilen tüm poster bildiriler ise özet olarak ISBN'li kongre kitabında yayınlanacaktır.
- **Kongremiz doçentlik dahil tüm akademik yükseltilme kriterlerine uygundur.**
- 19 Mart'ta seçkin konuşmacılar tarafından Organoid Modeller, Biyolojik Verilerin İstatistiksel Analizi ve LC-MS/MS-Proteomik konularında üç teorik kurs verilecektir. Kurs dili Türkçe'dir.
- Kongre programı süresince uzman firmalar tarafından ücretsiz Teknik Çalıştaylar düzenlenecektir.
- Bilimsel ve hakem kurulları tarafından en iyi üç sözlü ve poster bildiriye "En İyi Sözlü Bildiri/Poster Bildiri Ödülü" verilecektir.

Bu vesileyle, tüm araştırmacıları bu toplantıya katılmaya ve zengin bilimsel programın tadını çıkarmaya davet etmek istiyoruz.

Kongre Düzenleme Kurulu olarak 17-19 Mart 2022'de sizlerle buluşmayı dört gözle bekliyoruz.

Saygılarımla

Kongre Eş Başkanları

A. Semra KOÇTÜRK ve Işıl AKSAN KURNAZ



INVITATION

Dear Colleagues,

On behalf of the Organizing Committee, we are pleased to announce that the 4th Congress of Cell Death Research Society-Turkiye with International Participation will be held online on 17-19 of March 2022 by the Cell Death Research Society of Turkey (CDRS-Turkey/ HÖAD).

We would like to inform you that the organizing committee has spent much effort to hold the Congress face-to-face since 2021. However, due to the progress of COVID-19, the executive committee decided on not postponing it any longer and organizing it online.

The Congress aims to bring together leading academic scientists, researchers, and research scholars to exchange and share their experiences and research results about all aspects of cell death and related issues from around the world.

The main topics of the scientific refereed Congress will be focusing on "Viral Determinants and Cell Death", "Cell Death and Diseases", "Cell and Microenvironment Connection", "3-Dimensional Culture and Organoid Culture Models" and "Biotechnology and Drug Research".

Several distinguished speakers with expertise in the fields will present their cutting-edge research and discuss future perspectives relevant to the subjects covered in the present meeting. All presentations in the congress can be in either English or Turkish.

In addition,

- All accepted oral presentations will be published as full text and all accepted poster presentations will be published as abstracts in the congress book with ISBN.
- **Our congress complies with all academic promotion criteria, including associate professor.**
- On the 19th of March, three theoretical courses on the topics of Organoid Models, Statistical Analysis of Biological Data, and LC-MS/MS-Proteomics will be held by distinguished speakers. The course language is Turkish.
- During the Congress program, free Technical Workshops will be held by expert companies.
- The scientific and referee committees will offer "The Best Presentation Awards" to the three best oral and poster presentations.

We would like to take this opportunity to invite all researchers to attend this meeting and to enjoy the rich scientific program.

The Organization Committee of Congress is looking forward to meeting you on 17-19 on March 2022.

With our Best Regards,

Congress Co-Chairs

A. Semra Koçtürk and İşıl Aksan Kurnaz



KOMİTELER

Kongre Eş Başkanları

A. Semra KOÇTÜRK
İşil AKSAN KURNAZ

Bilimsel Sekreterya

H. Seda Vatansever

Organizasyon Komitesi

A. Semra Koçtürk (HÖAD Başkanı)
İşil Aksan Kurnaz (HÖAD Başkan Yardımcısı)
Betül Yılmaz (HÖAD Genel Sekreteri)
Zekiye S. Altun (HÖAD Saymanı)
H. Seda Vatansever (HÖAD Yönetim Kurulu Üyesi)
Serap Cılaker MICILI (HÖAD Yönetim Kurulu Üyesi)

Bilimsel Danışma Kurulu (Alfabetic sıra ile)

Ahmet Koç (İnönü Üniversitesi - Türkiye)
Ayşe Nalbantsoy (Ege Üniversitesi - Türkiye)
Başak Baykara (Dokuz Eylül Üniversitesi - Türkiye)
Betül Yılmaz (Marmara Üniversitesi – Türkiye)
Bünyamin Akgül (İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü - Türkiye)
David Hay (Edinburgh Üniversitesi - Birleşik Krallık)
Eda Altan Taraklı (Kaliforniya Üniversitesi - USA)
Eda Becer (Yakın Doğu Üniversitesi - KKTC)
Elgin Türköz Uluer (Ege Üniversitesi - Türkiye)
Esra Erdal (Dokuz Eylül Üniversitesi ve İzmir Biotip ve Genom Merkezi - Türkiye)
Feyzan Özdal Kurt (Manisa Celal Bayar Üniversitesi - Türkiye)
Gürler Akpınar (Kocaeli Üniversitesi - Türkiye)
Hana Algül (Münih Teknik Üniversitesi - Almanya)
Ilana Chefetz Menaker (Minnesota Üniversitesi - Amerika)
İşil Aksan Kurnaz (Gebze Teknik Üniversitesi – Türkiye)
İhsan Gürsel (Bilkent Üniversitesi - Türkiye)
İlhan Yayılm (İstanbul Üniversitesi - Türkiye)



İsmet Deliloğlu Gürhan (Ege Üniversitesi - Türkiye)
Kazım Yalçın Arga (Marmara Üniversitesi - Türkiye)
Kemal S. Korkmaz (Ege Üniversitesi – Türkiye)
Kemal Özbilgin (Manisa Celal Bayar Üniversitesi - Türkiye)
Levent Kurnaz (Boğaziçi Üniversitesi - Türkiye)
Luciano Saso (Sapienza Universita di Roma - İtalya)
Mehmet Sarıhan (Kocaeli Üniversitesi - Türkiye)
Mehtap Kutlu (Eskişehir Teknik Üniversitesi - Türkiye)
Melek Öztürk Sezgin (İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa – Türkiye)
Murat Kasap (Kocaeli Üniversitesi - Türkiye)
Özlem Gürsoy Doruk (Dokuz Eylül Üniversitesi - Türkiye)
Petek Ballar Kırmızıbayrak (Ege Üniversitesi - Türkiye)
Peter Vandenebeele (Ghent Üniversitesi - Belçika)
Pınar Akan (Dokuz Eylül Üniversitesi - Türkiye)
Saime Batırel (Marmara Üniversitesi - Türkiye)
Safiye Aktaş (Dokuz Eylül Üniversitesi - Türkiye)
H. Seda Vatansever (Manisa Celal Bayar Üniversitesi – Türkiye)
A. Semra Koçtürk (Dokuz Eylül Üniversitesi – Türkiye)
Serap Cılaker Mıcılı (Dokuz Eylül Üniversitesi – Türkiye)
Sibel Bozdağ Pehlivan (Hacettepe Üniversitesi - Türkiye)
Şermin Genç (İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi - Türkiye)
Şule Gök (Tınaztepe Üniversitesi - Türkiye)
Tuncay Demiryürek (Gaziantep Üniversitesi – Türkiye)
Tuncay Küme (Dokuz Eylül Üniversitesi - Türkiye)
Zekiye Altun (Dokuz Eylül Üniversitesi – Türkiye)



COMMITTEES

Congress Co-Chairs

A. Semra Koçtürk and İşil Aksan Kurnaz

Scientific Secretary

H. Seda Vatansever

Organization Committee

A. Semra Koçtürk (President of CDRS)

İşil Aksan Kurnaz (Vice President of CDRS)

Betül Yılmaz (General Secretary of CDRS)

Zekiye S. Altun (Treasurer of CDRS)

H. Seda Vatansever (Member of CDRS Executive Committee)

Serap Cılaker MICILI (Member of CDRS Executive Committee)

Scientific Advisory Board (in Alphabetic Order)

Ahmet Koç (İnönü University - Turkey)

Ayşe Nalbantsoy (Ege University - Turkey)

Başak Baykara (Dokuz Eylül University - Turkey)

Betül Yılmaz (Marmara University – Turkey)

Bünyamin Akgül (İzmir Institute of Technology - Turkey)

David Hay (University of Edinburgh - United Kingdom)

Eda Altan Tarakçı (California University - USA)

Eda Becer (Near East University - Cyprus)

Elgin Türköz Uluer (Ege University - Turkey)

Esra Erdal (Dokuz Eylül University and İzmir Biomedicine and Genom Center - Turkey)

Feyzan Özdal Kurt (Manisa Celal Bayar University - Turkey)

Gürler Akpınar (Kocaeli University - Turkey)

Hana Algül (Technical University of Munich - Germany)

Ilana Chefetz Menaker (Minnesota University - USA)

İşil Aksan Kurnaz (Gebze Technical University – Turkey)

İhsan Gürsel (Bilkent University - Turkey)

İlhan Yaylım (İstanbul University - Turkey)



İsmet Deliloğlu Gürhan (Ege University - Turkey)
Kazım Yalçın Arga (Marmara University - Turkey)
Kemal S. Korkmaz (Ege University – Turkey)
Kemal Özbilgin (Manisa Celal Bayar University - Turkey)
Levent Kurnaz (Boğaziçi University - Turkey)
Luciano Saso (Sapienza Universita di Roma - Italy)
Mehmet Sarıhan (Kocaeli University - Turkey)
Mehtap Kutlu (Eskişehir Technical University - Turkey)
Melek Öztürk Sezgin (İstanbul University Cerrahpaşa – Turkey)
Murat Kasap (Kocaeli University - Turkey)
Özlem Gürsoy Doruk (Dokuz Eylül University - Turkey)
Petek Ballar Kırmızıbayrak (Ege University - Turkey)
Peter Vandenabeele (Ghent University - Belgium)
Pınar Akan (Dokuz Eylül University - Turkey)
Saime Batırel (Marmara University - Turkey)
Safiye Aktaş (Dokuz Eylül University - Turkey)
H. Seda Vatansever (Manisa Celal Bayar University – Turkey)
A. Semra Koçtürk (Dokuz Eylül University – Turkey)
Serap Cılaker Mıcılı (Dokuz Eylül University – Turkey)
Sibel Bozdağ Pehlivan (Hacettepe University - Turkey)
Şermin Genç (İzmir Biomedicine and Genom Center - Turkey)
Şule Gök (Tinaztepe University - Turkey)
Tuncay Demiryürek (Gaziantep University – Turkey)
Tuncay Küme (Dokuz Eylül University - Turkey)
Zekiye Altun (Dokuz Eylül University – Turkey)



BİLİMSEL PROGRAM

17 MART 2022, PERŞEMBE

09:00-09:15	AÇILIŞ KONUŞMALARI Konusmacı: Semra Koçtürk
09:15-10:00	Oturum Başkanı: Semra Koçtürk Levent Kurnaz - İklim değişikliğinin canlılar üzerinde etkisi
10:00-10:15	Sorular ve Kahve Arası
10:15-12:10	VİRAL ETKENLER VE HÜCRE ÖLÜMÜ Oturum Başkanları: H. Seda Vatansever, İsmet Deliloğlu Gürhan
10:15-11:00	Semra Koçtürk - COVID 19 tedavi hedefini belirlemek için hücre ölüm mekanizmalarını anlamak
11:00-11:10	S1 - Damla Akoğulları Çelik - Endotel fonksiyon yetersizliğinin covid-19 hastalığında yeri
11:10-11:20	S2 - Gülsen Özduman - HN1 is phosphorylated by CDK1 in mitosis and its overexpression after G2 leads to an early exit from mitosis
11:20-11:30	S3 - Hüseyin İzgördü - İnsan hepatokarsinoma hücrelerinde seramidaz inhibisyonu bağlı hücre ölüm yollarının araştırılması
11:30-11:40	S4 - Arif Kamil Salihoglu - Travmatik beyin hasarında hücre ölümü modülasyonlarının etkilerinin <i>in silico</i> incelenmesi
11:40-11:50	S5 - Muhammet Burak Batır - İnsan kanser hücre hatlarında CRISPR/ESPCAS9 sistemi ile CIAP1 VE CIAP2 genlerinin dual nakartının apoptotik etkisinin incelenmesi
11:50-12:00	S6 - Ahmet Saracaloğlu - Verbenalin ve (+)-eudesminin insan nöroblastoma SH-SY5Y hücrelerinde 6-hidroksidopaminle indüklenen nörotoksiste üzerinde etkileri
12:00-12:10	S7 - Demet Cansaran Duman - Usnik asit ilaç adayı molekülünün üçlü-negatif meme kanseri hücre hattı (MDA-MB-231) üzerine mirna boyutunda terapötik etkinliğinin belirlenmesi
12:10-13:00	Öğle Yemeği Arası
13:00-13:30	POSTER OTURUMU-1 Oturum Başkanı: Serap Cilaker Mıçılı
	P1 - Gözde Öztan - Apoptotik genlerin kegg yoluğu üzerinden gen ontolojisinin ve hastalıkla ilişkisinin belirlenmesi P2 - Burcu Topaloğulları - Metiyonin yoksunluğu durumunda MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin hücresel sağkalım aracılıyanılarının MicroRNA-21 tarafından değiştirilmesi P3 - Hilal Cihankaya - CRISPR/CAS9 sistemini kullanarak farklı hücre hatlarına VPS54 knock-in mutasyonu ekleme P4 - Ayşe Semra Hız - KATNAL2 (KATANIN-LIKE2) genindeki yanlış anlam varyantı taşıyan hasta fibroblastlarından elde edilmiş iPSC'lerden nöral progenitor hücrelerin üretimi P5 - Tuğba Erkmen - Which reference genes are more suitable for aml cell lines in RT-QPCR studies? P6 - Gözde Öğütü - Astragalus türlerinden elde edilen sikloartan tipi saponinlerin MCF-7 ve MDA-MB-231 insan meme kanserihücrelerindeki proliferasyonu üzerine etkisi P7 - Tuğba Erkmen - Casticin: a promising candidate to develop a stem cell targeted strategy in aml treatment P8 - Pınar Mutlu - Drosophila nörojenezinde ets transkripsiyon faktör ailesi P9 - Abdullah Taşkin P10 - Gülşen Özdur - Epigallocateşin gallatin MCF-7 meme kanseri hücrelerindeki hücre canlılığı, hücre proliferasyonu ve hücre ölümü üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi P11 - Zülal Atlı Şekeroğlu - Seryum oksit nanopartiküllerinin MCF-7 hücre hattı üzerindeki antitümör etkileri P12 - Vedat Şekeroğlu - Yeni sentezlenen 4-N-[(1 metilpiroliden)amino]antipirin schiff bazi cu(II) kompleksinin meme kanserihücrelerindeki sitotoksik ve apoptotik etkileri P13 - Sevda Altun - Hücre döngüsü düzenleyici protein olan HN1'in SHSY-5Y hücrelerinde parkin ile antagonistik ilişkisi P14 - Çağdaş Aktan
13:30-14:00	Oturum Başkanı: Serap Cilaker Mıçılı
13:30-13:45	Altan Aslantaş, Katie Parzych - Cell death detection tools: Finding clues in morphology and biology - NOVAGENTEK/CAYMAN CHEMICAL
13:45-14:00	Aslı Sırmacı - Real-time monitoring of cellular processes - SACEM
14:00-15:55	HÜCRE ÖLÜMÜ VE HASTALIKLAR Oturum Başkanları: Damla Arısan, İlhan Yaylım
14:00-14:45	Peter Vandenabeele - Ferroptosis, an immunogenic cell death modality in the context of cancer?
14:45-15:15	İşıl Aksan Kurnaz - Elk-1 proteinlerinin nörodejenerasyon ve beyin tümörlerindeki rolü
15:15-15:25	S8 - Ceyda Okudu - Hipoksi koşullarda MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında LMAN2 gen baskılanması ve er stres ve apoptoz ilişkili genlerin düzenlenmesi
15:25-15:35	S9 - Mine Ensoy - Meme kanserinde Atranorin'in ferroptoz yoluğu ile ilişkili farmasötik etkinliğini belirlenmesi
15:35-15:45	S10 - Gizem Kaftan - İnsan nöroblastoma hücre hattında siklooksijenaz-2 inhibitörü aracılığıyla ferroptozun hedeflenmesi
15:45-15:55	S11 - Müjgan Kuşu - In vitro alzheimer model hücrelerinde narinjinin nöroprotektif etkilerinin değerlendirilmesi

15:55-16:15	POSTER OTURUMU-1 ve FİRMA TANITIM OTURUMU Soru-Cevap Oturumu
16:15-17:00	Oturum Başkanı: H. Seda Vatansever Ilana Chefetz Menaker - Interconnectivity of cell death pathways
18 MART 2022, CUMA	
09:15-10:00	Oturum Başkanı: Petek Ballar Kırmızıbayrak Ahmet Koç - Uzun yaşayan maya hücrelerinde mitokondrial fonksiyonların analizi
10:00-10:15	Sorular ve Kahve Arası
10:15-12:15	HÜCRE VE MİKROÇEVRE İLİŞKİSİ Oturum Başkanları: Zekiye S. Altun, Bünyamin Akgül
10:15-11:00 11:00-11:30 11:30-11:45 11:45-11:55 11:55-12:05	Mehtap Kutlu - Meme kanseri hücrelerinde seramidaz enzim inhibitörleri ve hücre ölümü Nicola Cahill - 10X Genomics: The power of single cell analysis in tumor microenvironment studies - GEN-ERA S12- Damla Akoğulları Çelik - In vitro inflamasyon modelinde pankreatik kanser kök hücrelerinin piroptotik süreci S13- İşil Yıldırım- Duktal ve invaziv meme karsinom dokularında LINC01209 ekspresyonunun analizi S14- Huda Abdırızak-Jama - Melanom kanseri tedavisinde yenilikçi strateji olarak Lobarik Asit'in terapötik etkinliğinin belirlenmesi
12:05-13:00	Öğle Yemeği Arası
13:00-13:30	POSTER OTURUMU-2 Oturum Başkanı: Eda Becer
	P15 - Elif İşel - Metastatik prostat kanseri gelişiminde kronik enfamatuar mikroçevre ile tetiklenen epitelyal mezenkimal geçiş veanoikis direnci P16 - Nazlı Can - Myomlarda otofaji belirtelarının immunohistokimyasal olarak incelenmesi P17 - Zehra Sena Bumin - Yumurtalık kanseri hücre hattı olan SKOV-3 hücrelerinde usnik asit molekülünün apoptotik etkisinin mRNA seviyesinde araştırılması P18 - Gamze Sevri Ekren Açıci P19 - Burçın Özbekle - Tuz stresi altında yetiştirilen cistus creticus L.'nin pankreatik kanser hücre hatlarında anti-kanser etkilerinin incelenmesi P20 - Gamze Zengin - Maternal sirkadiyen ritim değişikliğinin erişkin yavru ovaryum dokularında hücre proliferasyonu ve apoptoz üzerine epigenetik etkilerinin araştırılması P21 - Ali Üysel - Sessiz tümör süpresör gen mutasyonlarının mRNA işlenmesi üzerine etkilerinin minigene splicing assay ile saptanması P22 - Gizem Gamze Tas - Gebelik ve laktasyon süreçleri boyunca sirkadiyen ritim değişikliği ile maternal ovaryumdaki hücreproliferasyonu ve apoptoz ilişkisi P23 - Merve Tütüncü - Yeni tiyazolo[5,4-B]piridin türevlerinin DU-145 hücreleri üzerine etkileri; Ön çalışma P24 - Zekiye Altun - Smac mimetiğin apoptotik gen ekspresyonları üzerindeki etkisi P25 - Selen Kum Özşengezer - İnsan tümörlerinde SOX2'nin pan-kanser analizi ile onkojenik rolü P26 - Hamide Betül Gerik Çelebi - Kalıtsal meme ve/veya over kanseri sendromlu hastalarda yeni nesil dizileme ile saptanan BRCA ve NON-BRCA varyantlar P27 - Derya Göksu Helvacı - CD95 ligandının (FasL) primer insan makrofaj polarizasyonu üzerindeki etkisinin araştırılması P28 - Nalan Sümeysa Korkmaz - İlaç yeniden konumlandırma ile belirlenen aday ilaçların akut myeloid lösemi hücrelerinde proteazom inhibitörü ile kombinasyon tedavisinin incelenmesi
13:30-15:15	BİYOTEKNOLOJİ VE İLAÇ ARAŞTIRMALARI Oturum Başkanları: İşil Aksan Kurnaz, Şule Gök
13:30-14:15 14:15-14:45 14:45-15:15	David Hay - Building implantable human liver tissue from pluripotent stem cells Sibel Bozdağ Pehlivan - Glioblastomların tedavisi için hedeflendirilmiş nanopartikül ilaç taşıyıcı sistem stratejileri Serim Erdem - Terapötik proteinlerin endüstriyel yaklaşım ile üretimi ve fonksiyonel karakterizasyonu - ARVEN
15:15-15:30	POSTER OTURUMU-2 Soru-Cevap Oturumu
15:30-17:35	3 BOYUTLU KÜLTÜR- ORGANOİD KÜLTÜRLER Oturum Başkanları: Bora Garipcan, Betül Yılmaz
15:30-16:15 16:15-16:45 16:45-16:55	Luciano Saso - Pharmacological modulation of oxidative stress Esra Erdal - Hastalık modellemeleri ve kişiselleştirilmiş tip uygulamalarında organoid teknolojilerinin kullanımı S15 - Ekin Sönmez - Luhmes hücresi parkinson modelinde PEA3 transkripsiyon faktörü ailesinin potansiyel gen regulasyon ağının incelenmesi
16:55-17:05	S16 - Özge Özgen - T24 mesane kanseri hücre hattında vitamin D'nin regülatif etkisi, sisplatin dozunun azaltılmasına yardım edebilir mi?
17:05-17:15	S17 - Hilal Kabadayı Ensarioğlu - Tiazolidinon türevi uygulamasının hepatosellüler karsinoma hücrelerinde hücre ölüm mekanizmaları üzerinden etkisi
17:15-17:25 17:25-17:35	S18 - Serdar Batıkan Kavukcu - HEPG2 hücrelerinde ruteyum(II) aren komplekslerinin hücre ölüm kararı S19 - Beyzanur Erk - Triple negatif meme kanserinde sisplatin ve fotodinamik tedavinin kombin terapötik etkisinin araştırılması



17:35-17:45	KAPANIŞ KONUŞMALARI
19 MART 2022, CUMARTESİ	
09:00-18:45	UYGULAMAYA YÖNELİK TEORİK KURSLAR
09:00-12:00	ORGANOID MODELLER Oturum Başkanı: Serap Cilaker Mıcılı
	Kurs Eğitmenleri: Esra Erdal, Soheil Akbari, Emine Berna Bıçak <ul style="list-style-type: none"> ⌘ 3 Boyutlu sferoid ve organoid modelleri ⌘ Organoid modelleri kullanım alanları ⌘ Pluripotent kök hücre kaynaklı ve hasta kaynaklı organoid kültürü ⌘ Çip üstü organoid modelleri
12:00-12:30	Öğle Yemeği Arası
12:30-15:30	BİYOLOJİK VERİLERİN İSTATİSTİKSEL ANALİZİ Oturum Başkanı: Betül Yılmaz
	Kurs Eğitmeni: Kazım Yalçın Arga <ul style="list-style-type: none"> ⌘ İstatistiksel deneysel tasarım (Temel unsurlar, sıkça yapılan hatalar, iyi uygulama örnekleri) ⌘ Parametrik ve non-parametrik hipotez testleri (Fisher Exact Test, Kikare Testi, Kolmogorov-Smirnov testi, Student t-testi, Mann-Whitney U test, ANOVA, Kluskal-Wallis testi, vb.) ⌘ İstatistiksel sonuçların yorumlanması ⌘ Tez/Proje/Makale yazımında dikkat edilmesi gereken unsurlar, iyi uygulama örnekleri ⌘ Gen ve protein ekspresyon verileri üzerinden kategorik ve nümerik verilerin analizlerine yönelik örnek vaka çalışmaları ⌘ RT-PCR veri analizi (Livak yöntemi) ⌘ Korelasyon analizi
15:30-15:45	Kahve Arası
15:45-18:45	LC – MS/MS PROTEOMİKS Oturum Başkanı: Semra Koçtürk
15:45-16:30 16:30-17:15 17:15-18:00 18:00-18:45	Murat Kasap - Proteomik çalışmaları için örnek hazırlığı Gürler Akpınar - 2 boyutlu elektroforez ve MALDI-TOF/TOF Mehmet Sarıhan - LC-MS/MS ve işaretetsiz miktar ölçümü Murat Kasap - Western Blot Analizi ve proteomik verilerinin doğrulanması

SCIENTIFIC PROGRAMME

All hours given on the program is according to Turkey Time Zone (GMT/UTC+3).

17 MARCH 2022, THURSDAY

09:00-09:15	OPENING CEREMONY Speaker: Semra Koçtürk
09:15-10:00	Chair: Semra Koçtürk Levent Kurnaz - The effect of climate change on living beings
10:00-10:15	Questions and Coffee Break
10:15-12:10	VIRAL DETERMINANTS AND CELL DEATH Chairs: H. Seda Vatansever, İsmet Deliloğlu Gürhan
10:15-11:00	Semra Koçtürk - Understanding cell death mechanisms to identify COVID 19 treatment target O1 - Damla Akoğulları Çelik - The role of endothelial function failure in covid-19 disease O2 - Gülsen Özduman - HN1 is phosphorylated by CDK1 in mitosis and its overexpression after G2 leads to an early exit from mitosis O3 - Hüseyin İzgördü - Investigation of cell death pathways due to ceramidase Inhibition in human hepatocarcinoma cells O4 - Arif Kamil Salihoglu - In silico investigation of the effects of cell death modulations in traumatic brain injury O5 - Muhammet Burak Batır - Determination of the apoptotic effect of dual knockout of cIAP1 and cIAP2 genes by CRISPR/eSpCas9 system in human cancer cell lines O6 - Ahmet Saracaloğlu - Effects of verbenalin and (+)-eudesmin on 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells O7 - Demet Cansaran Duman - Determination of therapeutic effect of usnic acid drug candidate molecule on triple negative breast cancer cell (MDA-MB-231) at miRNA level
12:10-13:00	Lunch Break
13:00-13:30	POSTER SESSION-1 Chair: Serap Cilaker Mıcılı
	P1 - Gözde Öztan - Determination of gene ontology and disease relation of apoptotic genes via KEGG pathway P2 - Burcu Topaloğulları - Microna-21 alters cell survival mediated responses of MDA-MB-231 breast cancer cells in the state of methionine deprivation P3 - Hilal Cihankaya - Inserting Vps54 knock-in mutation into different cell lines by using CRISPR/Cas9 System P4 - Ayşe Semra Hız - Generation of neural progenitor cells from ipscs obtained from patient fibroblasts carrying the missense variant in the KATNAL2 (KATANIN-LIKE2) gen P5 - Tuğba Erkmen - Which reference genes are more suitable for aml cell lines in RT-QPCR studies? P6 - Gözde Öğütçü - The effect of cycloartane-type of saponins from astragalus species on the proliferation of MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells P7 - Tuğba Erkmen - Casticin: a promising candidate to develop a stem cell targeted strategy in aml treatment P8 - Pınar Mutlu - ETS transcription factor family in drosophila neurogenesis P9 - Abdullah Taşkın P10 - Gülsen Özdur - Evaluation of the effects of epigallocatechin gallate on cell viability, cell proliferation and cell death in MCF-7 breast cancer cells P11 - Zülal Atlı Şekeroğlu - Antitumor effects of cerium oxide nanoparticles on the MCF-7 cell line P12 - Vedat Şekeroğlu - Cytotoxic and apoptotic effects of a novel schiff base Cu (II) complexes derived 4-amino antipyrine on breast cancer cells P13 - Sevda Altun - HN1 is a cell cycle regulatory protein with antagonistic relationship with parkin in SHSY-5Y cells P14 - Çağdaş Aktan
13:30-14:00	Chair: Serap Cilaker Mıcılı
13:30-13:45	Altan Aslantaş, Katie Parzych - Cell death detection tools: Finding clues in morphology and biology - NOVAGENTEK/CAYMAN CHEMICAL
13:45-14:00	Aslı Sırmacı - Real-time monitoring of cellular processes - SACEM
14:00-15:55	CELL DEATH AND DISEASES Chairs: Damla Arısan, İlhan Yayılm



14:00-14:45	Peter Vandenabeele - Ferroptosis, an immunogenic cell death modality in the context of cancer?
14:45-15:15	İşil Aksan Kurnaz - The role of Elk-1 proteins in neurodegeneration and brain tumors
15:15-15:25	O8 - Ceyda Okudu - Dowregulation of LMAN2 and regulation of ER stress and apoptosis-related genes in MDA-MB-231 breast cancer cell line under hypoxia conditions
15:25-15:35	O9 - Mine Ensoy - Determination of the pharmaceutical efficacy of atranorin associated with the ferroptosis pathway in breast cancer
15:35-15:45	O10 - Gizem Kaftan - Targeting ferroptosis with a cyclooxygenase-2 inhibitor in human neuroblastoma cell line
15:45-15:55	O11 - Müjgan Kuş - In vitro alzheimer model hücrelerinde narinjinin nöroprotektif etkilerinin değerlendirilmesi
15:55-16:15	POSTER SESSION-1 and COMPANY PRESENTATION Q&A Session
16:15-17:00	Chair: H. Seda Vatansever Ilana Chefetz Menaker - Interconnectivity of cell death pathways
18 MARCH 2022, FRIDAY	
09:15-10:00	Chair: Petek Ballar Kırmızıbayrak Ahmet Koç - Analyses of mitochondrial functions in long-living yeast cells
10:00-10:15	Questions and Coffee Break
10:15-12:15	CELL AND MICROENVIRONMENT CONNECTION Chairs: Zekiye S. Altun, Bünyamin Akgül
10:15-11:00	Mehtap Kutlu - Ceramidase enzyme inhibition and cell death in breast cancer cells
11:00-11:30	Nicola Cahill - 10X Genomics: The power of single cell analysis in tumor microenvironment studies - GEN-ERA
11:30-11:45	O12 - Damla Akoğulları Çelik - Pyroptotic process of pancreatic cancer stem cells in an in vitro inflammation model
11:45-11:55	O13 - İşil Yıldırım - Analysis of LINC01209 expression invasive ductal and invasive breast carcinoma tissues
11:55-12:05	O14 - Huda Abdirizak-Jama - Determination of the therapeutic efficacy of lobarc acid as an innovative strategy in melanoma cancer treatment
12:05-13:00	Lunch Break
13:00-13:30	POSTER SESSION-2 Chair: Eda Becer
	P15 - Elif İşel - Epithelial mesenchymal transition and anoikis resistance induced in chronic inflammatory microenvironment in metastatic prostate cancer P16 - Nazlı Can - Immunohistochemical examination of autophagy markers in myomas P17 - Zehra Sena Bumın - Investigation of apoptotic effects of usnic acid in mRNA level in ovarian cancer SKOV-3 cell line P18 - Gamze Sevri Ekren Aşıcı P19 - Burçın Özbekle - Investigation of anti-cancer effects of cistus creticus l. Grown under salinity stress in pancreatic cancer cell lines P20 - Gamze Zengin - Investigation of the epigenetic effects of maternal circadian rhythm changes on cell proliferation and apoptosis in adult offspring ovarian tissues P21 - Ali Yüksel - Identification of possible effects of silent tumor suppressor gene mutations on mRNA processing by minigene splicing assay P22 - Gizem Gamze Tas - The relationship between circadian rhythm changes during pregnancy and lactation periods and cellular proliferation and apoptosis in the maternal ovary P23 - Merve Tütüncü - Effects of novel thiazolo[5,4-b]pyridine derivatives on DU-145 cells; A preliminary study P24 - Zekiye Altun - The effect of SMAC mimetic on apoptotic gene expressions P25 - Selen Kum Özsengezer - Pan-cancer analysis of the oncogenic role of sox2 in human tumors P26 - Hamide Betül Gerik Çelebi - BRCA and non-BRCA variants detected by next generation sequencing in patients with hereditary breast and/or ovarian cancer syndrome P27 - Derya Göksu Helvacı - Investigation of the impact of CD95 ligand (FasL) on primary human macrophage polarization P28 - Nalan Sümeysa Korkmaz - Investigation of combination therapy of candidate drug identified by drug repositioning with proteasome inhibitor in acute myeloid leukemia cells
13:30-15:15	BIOTECHNOLOGY AND DRUG RESEARCH Chairs: İşil Aksan Kurnaz, Şule Gök



13:30-14:15	David Hay - Building implantable human liver tissue from pluripotent stem cells
14:15-14:45	Sibel Bozdağ Pehlivan - Targeted nanoparticle drug delivery system strategies for the treatment of glioblastomas
14:45-15:15	Serim Erdem - Manufacturing of therapeutic proteins with Industrial approach and functional characterization of the product - ARVEN
15:15-15:30	POSTER SESSION-2 Q&A Session
15:30-17:35	3 DIMENSIONAL CULTURE AND ORGANOID CULTURE MODELS Chairs: Bora Garipcan, Betül Yılmaz
15:30-16:15	Luciano Saso - Pharmacological modulation of oxidative stress
16:15-16:45	Esra Erdal - Use of organoid technologies in disease models and personalized medicine applications
16:45-16:55	O15 - Ekin Sönmez - Investigation of the PEA3 transcription factor family potential gene regulation network in iuhmes cells parkinson model
16:55-17:05	O16 - Özge Özgen - Does the regulatory effect of vitamin D allow to reduce the cisplatin dose in T24 bladder cancer cell line?
17:05-17:15	O17 - Hilal Kabadayı Ensarioğlu - Effect of thiazolidinone derivative application on cell death mechanisms in hepatocellular carcinoma cells
17:15-17:25	O18 - Serdar Batıkan Kavukcu - Cell death decision of ruthenium(II) arene complexes in HepG2 cells
17:25-17:35	O19 - Beyzanur Erk - Investigation of combined therapeutic effect of photodynamic therapy and cisplatin on triple negative breast cancer
17:35-17:45	CLOSING CEREMONY

19 MARCH 2022, SATURDAY

09:00-18:45	UYGULAMAYA YÖNELİK TEORİK KURSLAR
09:00-12:00	ORGANOID MODELLER Oturum Başkanı: Serap Cilaker Micili
	Kurs Eğitmenleri: Esra Erdal, Soheil Akbari, Emine Berna Bışak <ul style="list-style-type: none"> ✿ 3 Boyutlu sferoid ve organoid modelleri ✿ Organoid modelleri kullanım alanları ✿ Pluripotent kök hücre kaynaklı ve hasta kaynaklı organoid kültürü ✿ Çip üstü organoid modelleri
12:00-12:30	Öğle Yemeği Arası
12:30-15:30	BİYOLOJİK VERİLERİN İSTATİSTİKSEL ANALİZİ Oturum Başkanı: Betül Yılmaz
	Kurs Eğitmeni: Kazım Yalçın Arga <ul style="list-style-type: none"> ✿ İstatistiksel deney tasarımı (Temel unsurlar, sıkça yapılan hatalar, iyi uygulama örnekleri) ✿ Parametrik ve non-parametrik hipotez testleri (Fisher Exact Test, Kikare Testi, Kolmogorov-Smirnov testi, Student t-testi, Mann-Whitney U test, ANOVA, Kluskal-Wallis testi, vb.) ✿ İstatistiksel sonuçların yorumlanması ✿ Tez/Proje/Makale yazımında dikkat edilmesi gereken unsurlar, iyi uygulama örnekleri ✿ Gen ve protein ekspresyon verileri üzerinden kategorik ve nümerik verilerin analizlerine yönelik örnek vaka çalışmaları ✿ RT-PCR veri analizi (Livak yöntemi) ✿ Korelasyon analizi
15:30-15:45	Kahve Arası
15:45-18:45	LC – MS/MS PROTEOMİKS Oturum Başkanı: Semra Koçtürk
15:45-16:30	Murat Kasap - Proteomik çalışmaları için örnek hazırlığı
16:30-17:15	Gürler Akpinar - 2 boyutlu elektroforez ve MALDI-TOF/TOF
17:15-18:00	Mehmet Saruhan - LC-MS/MS ve işaretsiz miktar ölçümü
18:00-18:45	Murat Kasap - Western Blot Analizi ve proteomik verilerinin doğrulanması



SPONSORS



➤ **KONUŞMALAR**
➤ **LECTURES**



İKLİM DEĞİŞİKLİĞİNİN CANLILAR ÜZERİNE ETKİSİ

Levent Kurnaz



COVID 19 TEDAVİ HEDEFİNİ BELİRLEMEK İÇİN HÜCRE ÖLÜM MEKANİZMALARINI ANLAMAK

Semra Koçtürk

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Çin'de pnömoni olan hastalarda daha önce bilinmeyen Beta Coronavirus'ün 2019 yılında belirlenmesinden sonra hastalarda hızla akut solunum yetmezliği ve çoklu organ yetmezliği gelişmesi ile virüs SARS-CoV-2 veya COVID-19 olarak isimlendirilmiştir. SARS-CoV-2 'nin ölüm oranları son yirmi yılda görülen SARS-CoV veya MERS-CoV virüsleri ile karşılaştırıldığında, ölüm oranının daha düşük (%3.4-%9.6) olduğu ancak bulaşıcılığının çok daha yüksek olduğu görülmektedir. Bulaşıcılığını sağlayan özelliklerin, membran proteinleri ve genomunda bulunan 10 adet açık okuma alanında (ORFs1-10) kodlanan proteinlere bağlı olduğu belirtilmektedir. SARS-CoV-2'nin konakçı hücreye girişi, konakçı hücrede çoğalma sürecini tamamlaması, çoğalma sürecini tamamladıktan sonra ise konakçı dokularında farklı hücre ölüm mekanizmalarını kullanması tedavisini güçləştiren özelliklerdir. Bugüne kadar yapılan araştırmalar, SARS-CoV-2'nin hücre ölüm mekanizmalarından apoptoz, nekroptoz, piroptoz, ferroptoz ve otofajiyi kendi çoğalma sürecinde ve daha sonra inflamasyonu ve yayılmasını artırmak amacıyla kullandığını ve bu mekanizmalar arasında çapraz etkileşimlerin olduğunu göstermektedir. SARS-CoV-2'ye yönelik tedavi hedeflerini belirlenmesi için kullandığı hücre ölüm mekanizmalarını belirlemek önem arz etmektedir ve bu alanda yapılacak araştırmalara gereksinim bulunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: COVID-19, apoptoz, nekroptoz, piroptoz, ferroptoz, otofajı

UNDERSTANDING CELL DEATH MECHANISMS TO IDENTIFY COVID 19 TREATMENT TARGET

Semra Koçtürk

Dokuz Eylül University School of Medicine Department of Medical Biochemistry

After the previously unknown Beta Coronavirus was identified in patients in China in 2019, the virus was named SARS-CoV-2 or COVID-19, with the rapid development of acute respiratory failure and multi-organ failure in patients. When the mortality rates of SARS-CoV-2 are compared with the SARS-CoV or MERS-CoV viruses seen in the last two decades, it is seen that the mortality rate is lower (3.4%-9.6%), but its contagiousness is much higher. It is stated that the features that provide contagion depend on the proteins encoded in membrane proteins and 10 open reading domains (ORFs1-10) in the genome. The features that make the treatment of SARS-CoV-2 difficult are the entry of SARS-CoV-2 into the host cell, completing the proliferation process in the host cell, and using different cell death mechanisms in the host tissues after completing the proliferation process. Studies conducted to date show that SARS-CoV-2 uses cell death mechanisms such as apoptosis, necroptosis, pyroptosis, ferroptosis, and autophagy in its own proliferation process and then in order to increase inflammation and spread, and there are cross-interactions between these mechanisms. It is important to determine the cell death mechanisms used to determine the treatment targets for SARS-CoV-2 and there is a need for further research in this area.

Key words: COVID-19, apoptosis, nekroptosis, piroptosis, ferroptosis, autophagy



FERROPTOSIS, AN IMMUNOGENIC CELL DEATH MODALITY IN THE CONTEXT OF CANCER?

Bartosz Wiernicki^{1,2}, Peter Vandenabeele^{1,2}

¹Unit of Molecular Signaling and Cell Death, VIB Center for Inflammation Research, Ghent, Belgium

²Department of Biomedical Molecular Biology, Cancer Research Institute Ghent (CRIG), Ghent University, Ghent, Belgium

Peter.Vandenabeele@irc.vib-ugent.be, Technologiepark 71, 9052 Gent

Ferroptosis was coined in 2012 and refers to an iron-dependent type of necrotic cell death, characterized by a disruption of the intracellular redox balance and excessive lipid peroxidation. Molecules that modulate iron metabolism and lipid peroxidation can induce or inhibit ferroptosis, such as glutathione peroxidase 4 (GPX4), the glutamate/cystine antiporter System Xc-, ferroptosis suppressor protein 1 (FSP1), nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2), or p53. Recently, ferroptosis has emerged as a powerful tool in anti-cancer therapy to bypass chemotherapy resistance and to eliminate metastatic tumors. Furthermore, newly developed ferroptosis inducers have been combined with nanotechnology-based targeting of tumor cells. Although killing by ferroptosis is a compelling strategy for anticancer therapy, its immunogenic potential is incompletely understood. Prophylactic vaccination with ferroptotic cancer cells does not elicit immunological protection against cancer challenge. To understand the latter, we designed an inducible model of ferroptosis revealing three phases – ‘initial’ associated with lipid peroxidation, ‘intermediate’ correlated with ATP release and ‘terminal’ recognized by HMGB1 release and loss of plasma membrane integrity. Co-culture of ferroptotic cancer cells with dendritic cells (DCs), revealed that ‘initial’ ferroptotic cells decrease maturation of DCs, engulfment of ferroptotic corpses and dampen antigen cross-presentation. DCs loaded with ferroptotic in contrast to necroptotic cancer cells failed to protect against tumor growth. Adding ferroptotic cancer cells to immunogenic apoptotic cells dramatically reduced their prophylactic vaccination potential. Although effective in killing tumor cells, ferroptosis negatively impacts the adaptive immune response, providing significant implications for ferroptosis in cancer therapy.



THE ROLE OF ELK-1 PROTEINS IN NEURODEGENERATION AND BRAIN TUMORS

Isil Aksan Kurnaz^{1,2*}

¹Department of Molecular Biology and Genetics, Gebze Technical University, Kocaeli, Turkey

²Institute of Biotechnology, Gebze Technical University, Kocaeli, Turkey

*Correspondence: ikurnaz@gtu.edu.tr; Tel.: +90-535-576-40-81

Abstract: E-twenty-six/erythroblast/E26-transformation-specific (ETS) domain superfamily of transcription factors play significant roles in the development as well as in tumorigenesis. Elk-1 belongs to the Ternary Complex Factor (TCF) subfamily that forms a ternary complex together with Serum Response Factor (SRF) and the Serum Response Element (SRE) on the target promoters. It has been shown to be a downstream target for extracellular signal regulated kinase / mitogen activated kinase (ERK/MAPK) pathway, as well as PI3K/Akt and PKC pathways, and more recently of the mitotic kinase Aurora A. Elk-1 was also recently shown to be upregulated in CD133+ cancer stem cell population of glioblastoma as well as neuroblastoma cells. On the other hand, in mature neurons Elk-1 was shown to be important for neuronal survival, regulating transcription of key survival genes such as Mcl-1 and SMN, and we have shown that overexpression of Elk-1 prior to mutant huntingtin (Htt) aggregation protected the neurons against aggregation in the first 12 hours, while others have shown that T417 phosphoform of Elk-1 is associated with Lewy bodies in a variety of neurodegenerative diseases. Here we present a dual role of Elk-1 in maintaining the balance between cell survival, proliferation and death.

Keywords: Elk-1, neuroprotection, neurodegeneration, brain tumors, mitotic kinases



INTERCONNECTIVITY OF CELL DEATH PATHWAYS

Ilana Chefetz-Menaker



**UZUN YAŞAYAN MAYA HÜCRELERİNDE MİTOKONDRIAL FONKSİYONLARIN
ANALİZİ**

**ANALYSES OF MITOCHONDRIAL FUNCTIONS IN LONG-LIVING YEAST
CELLS**

Ahmet Koç



MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE SERAMİDAZ ENZİM İNHİBİSYONU VE HÜCRE ÖLÜMÜ

Hatice Mehtap Kutlu

Eskişehir Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

hmkutlu@eskisehir.edu.tr

Giriş: Meme kanseri özellikle kadın sağlığını tehdit eden, yoğun tedavi süreci ile hasta ve yakınları tarafından kabul edilmesi zor olan önemli bir sağlık sorunudur. Meme kanseri akciğer kanserinden sonra kadınlarda en sık görülen kanser türüdür ve kanser sebepli ölümlerde ikinci sırada yer almaktadır. Tüm gelişmelere rağmen meme kanseri tedavisi için yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesi, kullanımı ve yeni anti kanser özellikli ilaçların geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

İnsan sağlığını tehdit eden en önemli hastalıklardan olan kanserler ile ilgili son yıllarda yapılan çalışmalarında sfingolipid metabolizması ve kanser ile ilişkisi oldukça dikkat çekmeye başlamıştır. Sfingolipidler, membran çift tabaklı lipid yapısında ve membranın akişkanlığını düzenleyen membran lipidleri ailesinin mensubudurlar. Sfingolipidler, sfingozin, seramid, sfingozin-1-fosfat (S1P) ve seramid-1-fosfat (C1P) gibi biyoaktif metabolitlerden oluşurlar. Bu moleküllerin hücre büyümesi, ölümü, yaşılanma, adezyon, göç, inflamasyon, anjiyogenez ve hücre içi mesajlaşma gibi birçok görevleri vardır. Ayrıca kanser patogenezi ve terapisinde apoptoz, hücre proliferasyonu, hücre migrasyonu, yaşılanma ya da inflamasyon gibi farklı açılardan fonksiyon gösteren biyoefektör moleküllerdir ve tümör supresör lipidler olarak da adlandırılmaktadırlar. Kanser tedavisi için yeni hedefler olarak bu moleküllerin baskılanması önemli bir biyoterapötik araç olarak gözükmelektedir.

Materyal ve Metotlar: Biz de çalışmamızda, bir asit seramidaz inhibitörü olan D-erythro-MAPP ve D-erythro-MAPP yüklü nanopartikül formülasyonunun meme kanseri hücrelerinde (MCF-7) hücre ölüm yollarından apoptotik yolakta meydana gelen değişimlerin hücrelerde meydana getirebileceği ince yapısal ve morfolojik değişiklikler de dahil neden olabilecekleri sitotoksik, antiproliferatif ve proapoptotik antikanser etkilerinin mekanizmalarının araştırdık.

Bulgular: D-erythro-MAPP ve D-erythro-MAPP yüklü nanopartikül formülasyonun MCF-7 hücreleri üzerinde düşük dozlarda sitotoksite gösterip, hücrelerin ince yapısını da değiştirerek apoptozu tetkilediği görülmüştür ve ayrıca sitotoksik, antiproliferatif ve proapoptotik etkileri de moleküller olarak belirlenmiştir.

Tartışma ve Sonuç: Tüm bulgular sonucunda, D-erythro-MAPP ve D-erythro-MAPP yüklü nanopartikül formülasyonun teranostik çalışmalarında araştırılmak üzere önerilmiş olup *in vitro* düzeyde MCF-7 hücrelerinde sitotoksitesi, antiproliferatif ve proapoptotik etkileri aydınlatılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Meme kanseri, Sfingolipid, D-erythro-MAPP, Apoptoz, Nanopartikül

Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 118Z943 nolu proje ve 2211/C kapsamında desteklenmiştir.



INVESTIGATION OF CELL DEATH PATHWAYS TRIGGERED BY CERAMIDASE ENZYME INHIBITION IN BREAST CANCER CELLS

Hatice Mehtap Kutlu

Eskisehir Technical University, Faculty of Science, Department of Biology,

hmkutlu@eskisehir.edu.tr

Introduction: Breast cancer is an important health problem that especially threatens women's health and is difficult to accept by patients and their relatives with its intensive treatment process. Breast cancer is the most common type of cancer in women after lung cancer and ranks second in cancer-related deaths. Despite all the advances, there is a need for the development and use of new therapeutic strategies for the treatment of breast cancer and the development of new anti-cancer drugs. In recent studies on cancer, which is one of the most important diseases threatening human health, sphingolipid metabolism and its relationship with cancer have started to draw attention. Sphingolipids are members of the membrane lipid family, which are in the lipid structure of the membrane bilayer and regulate the fluidity of the membrane. Sphingolipids are composed of bioactive metabolites such as sphingosine, ceramide, sphingosine-1-phosphate (S1P) and ceramide-1-phosphate (C1P). These molecules have many functions such as cell growth, death, senescence, adhesion, migration, inflammation, angiogenesis and intracellular messaging. In addition, they are bioeffector molecules that function in different aspects such as apoptosis, cell proliferation, cell migration, aging or inflammation in cancer pathogenesis and therapy, and they are also called tumor suppressor lipids. Suppression of these molecules as new targets for cancer therapy appears to be an important biotherapeutic tool.

Materials and Methods: In our study, we also investigated the reasons for the changes in the apoptotic pathway, which is one of the cell death pathways in breast cancer cells (MCF-7), of the nanoparticle formulation loaded with D-erythro-MAPP and D-erythro-MAPP, which is an acid ceramidase inhibitor, including the fine structural and morphological changes that may occur in the cells. We investigated the mechanisms of their cytotoxic, antiproliferative and proapoptotic anticancer effects.

Results: It was observed that the D-erythro-MAPP and D-erythro-MAPP loaded nanoparticle formulation showed cytotoxicity on MCF-7 cells at low doses, triggered apoptosis by changing the fine structure of the cells, and also its cytotoxic, antiproliferative and proapoptotic effects were determined molecularly.

Discussion and Conclusion: As a result of all the findings, D-erythro-MAPP and D-erythro-MAPP loaded nanoparticle formulation was proposed to be investigated in theranostic studies, and its cytotoxicity, antiproliferative and proapoptotic effects on MCF-7 cells in vitro were clarified.

Keywords: Breast cancer, Sphingolipid, D-erythro-MAPP, Apoptosis, Nanoparticle

This study was supported by the Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) within the scope of project 118Z943 and 2211/C.



BUILDING HUMAN LIVER TISSUE FROM PLURIPOTENT STEM CELLS

Prof David C. Hay

MRC Centre for Regenerative Medicine, University of Edinburgh

Liver disease is an escalating global health issue. While liver transplantation is an effective mode of therapy, it cannot meet clinical demand. Developing renewable sources of human liver tissue is therefore attractive. Pluripotent stem cell-derived liver tissue represents a potential alternative to cadaver derived hepatocytes and whole organ transplant. At present, two dimensional differentiation procedures deliver tissue lacking certain functions and is unstable in culture. Efforts to overcome these limitations include the engineering of three-dimensional (3D) liver spheres. Although enabling for the field, their widespread application and adoption is limited due to expense and experimental reproducibility. Our studies focus on developing 3D liver tissue under chemically defined conditions. We demonstrate that 3D derived tissue can be generated at scale, and implanted underneath the skin of mice. Excitingly, implanted human liver tissue provides support to mice with metabolic liver disease, including immunocompetent recipients. In addition to their clinical application, in vitro generated 3D tissues have important roles to play in developing safe and efficacious medicines to treat human disease. We demonstrate that stem cell derived 3D liver tissue exhibits liver cell phenotype for over one year, providing an attractive resource for long-term and repeated dosing studies. Our most recent tissue engineering advances will be discussed at the meeting.



GLİOBLASTOMLARIN TEDAVİSİ İÇİN HEDEFLENDİRİLMİŞ NANOPARTİKÜL ILAÇ TAŞIYICI SİSTEM STRATEJİLERİ

Sibel Bozdağ Pehlivan

Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, 06100, Ankara

Malign beyin tümörleri, kansere bağlı ölümlerin yaklaşık %2'sini oluşturmaktadır ve insidansı 7.19/100000/yıl olarak tespit edilmiştir. Günümüzde beyin tümörlerinin tedavisinde cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi tek başına veya kombinasyon halinde kullanılsa da sağ kalım oranı hala çok düşüktür. Özellikle, en yaygın primer malign beyin tümörü olan glioblastoma multiforme (GBM), sadece %5,1'lük bir beş yıllık sağkalım oranına sahiptir.

Kemoterapi, cerrahiye kıyasla daha az invaziv tedavilerden biri olarak gösterilmektedir. Bununla birlikte, bazı sınırlamalar nedeniyle, GBM hastalarında tedaviye yalnızca yardımcı olarak işlev görmektedir. Özellikle GBM, yüksek interstisyal basınç, düşük pH, düşük pO₂ ve infiltrasyon gibi periferik tümörlerle benzer özellikler gösterir ve bunların tümü tümöre etkili ilaç penetrasyonu için büyük zorluğa neden olmaktadır. Ayrıca, GBM'in benzersiz mikroçevresi, yani kan-beyin bariyerinin (BBB) ve kan-beyin tümörü bariyerinin (BBTB) aşırı düşük geçirgenliği ve yüksek heterojenliği, terapötik doz veya tümörde homojen ilaç dağılımını elde etmeyi daha da zorlaştırmaktadır ve bu nedenle yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesini gerekliliğe kılmaktadır. Bu nedenle, beyin tümörlerinin teşhis, araştırılması, görüntülenmesi ve tedavisi için nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler yoğun bir şekilde araştırılmaktadır. Birçok araştırma, polimer bazlı nanopartiküllerin kemoterapötik etken maddeleri beyin tümörlerine taşımada başarılı olduğunu göstermiştir. Ayrıca, nanopartiküllerin intranazal uygulanması, nanopartiküllerin yüzey özelliklerinin hedeflendirme veya kaplama maddeleri ile modifiye edilmesi veya hibrit nanopartiküllerdeki gibi bir nanopartiküler sisteme nanopayıların farklı özelliklerinin birleştirilmesi, ilaçların daha yüksek miktarda selektif olarak tümör bölgesine taşınmasını ve GBM'in etkin tedavisini sağlayabilir.



PHARMACOLOGICAL MODULATION OF OXIDATIVE STRESS

Luciano Saso



**HASTALIK MODELLEMELERİ VE KİŞİSELLEŞTİRİLMİŞ TIP
UYGULAMALARINDA ORGANOİD TEKNOLOJİLERİNİN KULLANIMI**

Esra Erdal



➤ SÖZLÜ BİLDİRİLER
➤ ORAL PRESENTATIONS



S3

İNSAN HEPATOKARSİNOMA HÜCRELERİİNDE SERAMİDAZ İNHİBİSYONA BAĞLI HÜCRE ÖLÜM YOLLARININ ARAŞTIRILMASI

Canan Vejselova Sezer, Hüseyin İzgördü, Hatice Mehtap Kutlu, Abdul Hafiz Majeedy

Eskişehir Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji, Türkiye

Giriş: Hepatosellüler karsinoma genel olarak kronik karaciğer hastalığı veya siroz zemininde gelişmekte olan ve dünya genelinde en yaygın ölüm nedeni olan karaciğerin primer bir tümördür. Günümüzde bu kanser tipi için etkili tedavi yöntemleri yeterli olmadığından yeni terapötik stratejlere ihtiyaç duyulmaktadır. Sfingolipidler kanser hücresi büyümeye ve ölümünde önemli rollere sahip olan ve bununla birlikte yeni kanser önleyici tedavilerin geliştirilmesinde kullanılan moleküllerdir. Sfingolipid enzimleri programlı hücre ölümünün düzenlenmesinde önemli rollere sahiptir. Birçok kanserin tedavisinde, seramidaz inhibitörlerinin terapötik potansiyelleri rapor edilmiştir. Kanser tedavisi araştırmalarında başarılı olabilmek için güvenli seramidaz inhibitörlerinin geliştirilerek, etki ve etkinlikleri ile ilgili daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır. Son yıllarda, güçlü seramidaz inhibitörlerinin geliştirilmesi konusunda önemli bir artış vardır. Günümüzde kemoterapi, immünoterapi, radyoterapi, cerrahi, hedeflenmiş terapiler, hormon terapisi ve gen terapi gibi biyolojik terapilerin birlikte ya da tek tek uygulanabilmesi gibi bazı standartlar belirlenmiş olsa da kanser türlerine özgü olarak farklı yaklaşım ve tedaviler gerekmektedir. Bu çalışmada seramidaz inhibitörü olan LCL521' karaciğer kanseri hücrelerinde neden olduğu sitotoksik, antiproliferatif etkilerin ve hücre ölüm şeklinin araştırılması gerçekleştirilmiştir.

Materyal ve Metotlar: HepG2 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkiler MTT testi ile saptanmıştır ve hücrelerde neden olduğu ölüm şeklinin tespiti akış sitometrisinde belirlenmiştir. Sonrasında konfokal mikroskopi yöntemi ile hücrelerdeki morfolojik değişiklikler saptanmıştır.

Bulgular: LCL521'in HepG2 hücreleri üzerinde MTT testi sonucunda düşük dozlarda sitotoksite gösterdiği tespit edilmiştir. LCL521'in hücrelerin morfolojisini etkileyerek apoptozu işaret eden değişikliklere yol açmıştır. Akış sitometrik analizler LCL521'in HepG2 hücrelerini apoptoz ile öldürdüğüünü göstermiştir.

Tartışma ve Sonuç: Tüm bulgular sonucunda, LCL521'in elde edilen IC₅₀ değeri yapılan benzer seramidaz inhibitörleri çalışmalarıyla uyumlu sonuçlar göstermeyece olup LCL521'in kanser tedavisi için kullanıma uygun yeni terapötik madde tasarlanması açısından yüksek potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir.

Bu çalışma Eskişehir Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri kapsamında 21LÖT149 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Sfingolipid, Apoptoz, HepG2, LCL521



O3

INVESTIGATION OF CELL DEATH PATHWAYS DUE TO CERAMIDASE INHIBITION IN HUMAN HEPATOCARCINOMA CELLS

Canan Vejselova Sezer, Hüseyin İzgördü, Hatice Mehtap Kutlu, Abdul Hafiz Majeedy

Eskişehir Technical University, Faculty of Science, Department of Biology

Introduction: Hepatocellular carcinoma is a primary tumor of the liver that generally develops on the basis of chronic liver disease or cirrhosis and is the most common cause of death worldwide. Today, new therapeutic strategies are needed because effective treatment methods are not sufficient for this type of cancer. Sphingolipids are molecules that have important roles in cancer cell growth and death, and are also used in the development of new anti-cancer therapies. Sphingolipid enzymes have important roles in the regulation of programmed cell death. The therapeutic potential of ceramidase inhibitors in the treatment of many cancers has been reported. In order to be successful in cancer treatment research, more studies on the effects and efficacy of safe ceramidase inhibitors are needed. In recent years, there has been a significant increase in the development of potent ceramidase inhibitors. Today, although some standards have been determined such as the use of biological therapies such as chemotherapy, immunotherapy, radiotherapy, surgery, targeted therapies, hormone therapy and gene therapy together or individually, different approaches and treatments are required specific to cancer types. In this study, the cytotoxic, antiproliferative effects and cell death pattern of ceramidase inhibitor LCL521' caused in liver cancer cells were investigated.

Materials and Methods: Cytotoxic effects on HepG2 cells were determined by MTT test, and the type of death caused in cells was determined by flow cytometry. Afterwards, morphological changes in the cells were determined by confocal microscopy method.

Results: It was determined that LCL521 showed cytotoxicity at low doses as a result of MTT test on HepG2 cells. LCL521 affected the morphology of cells, leading to changes indicating apoptosis. Flow cytometric analyzes showed that LCL521 killed HepG2 cells by apoptosis.

Discussion and Conclusion: As a result of all the findings, the IC₅₀ value of LCL521 shows results that are compatible with similar ceramidase inhibitor studies, and it has been shown that LCL521 has a high potential in terms of designing new therapeutic agents suitable for use in cancer treatment.

Keywords: Sphingolipid, Apoptosis, HepG2, LCL521



S6

VERBENALİN VE (+)-EUDESMİNİN İNSAN NÖROBLASTOMA SH-SY5Y HÜCRELERİNDE 6-HİDROKSİDOPAMİNLE İNDÜKLENEN NÖROTOKSİSITE ÜZERİNDE ETKİLERİ

**Ahmet Saracaloğlu¹, Ayşe Nur Demiryürek², Özge Göktürk², Şeniz Demiryürek³,
Abdullah Tuncay Demiryürek¹**

¹Gaziantep Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Ana Bilim Dalı, Türkiye

²Gaziantep Şahinbey Belediyesi, Bilim ve Sanat Merkezi, Türkiye

³Gaziantep Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Ana Bilim Dalı, Türkiye

Parkinson hastalığı (PD), substantia nigra'daki dopaminerjik nöronların ilerleyici dejenerasyonu ile karakterize nörodejeneratif bir hastalıktır. Oksidatif ve nitrozatif stresin PD semptomlarının patogenezi ve kötüleşmesi ile yakından ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmanın amacı, tıbbi bitki Verbena officinalis L.'de bulunan bir iridoid glikozit olan verbenalinin ve farklı bitki ailelerinden izole edilen bir furofuran lignan olan (+)-eudesminin insan nöroblastoma SH-SY5Y hücrelerinde 6-hidroksidopamin (6-OHDA) ile induklenen oksidatif hasarı azaltıp azaltamayacağını araştırmaktır.

SH-SY5Y hücreleri, 24 saat boyunca 35 µM 6-OHDA'ya maruz bırakıldı. Verbenalin ve (+)-eudesmin, 6-OHDA maruziyetinden bir saat önce farklı konsantrasyonlarda (1, 2.5, 5, 10, 20 ve 50 µM) uygulandı. 24 saat sonra hücre canlılığı ve nöroprotektif etki, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) testi ile değerlendirildi. Nitrozatif stres, nitrik oksit (NO) veperoksinitrit oluşumunun bir belirteci olan 3-nitrotirozin (3-NT) ölçümleriyle değerlendirildi.

MTT analizleri, verbenalin ve (+)-eudesmin ile ön tedavinin 6-OHDA maruziyetine bağlı toksisiteyi önemli ölçüde önlediğini gösterdi (sırasıyla P<0.01 ve P<0.05). 6-OHDA tedavisi NO seviyeleri üzerinde belirgin bir etki oluşturmamasına rağmen, yüksek konsantrasyonlarda (10-50 µM) (+)-eudesmin NO düzeylerini belirgin şekilde azalttı (P<0.01). SH-SY5Y hücrelerinde 6-OHDA maruziyeti ile 3-NT seviyelerinde önemli bir artış vardı. (+)-Eudesmin değil ama verbenalin ile ön tedavi, düşük konsantrasyonlarda (1-20 µM) 3-NT seviyelerini azalttı ve 6-OHDA'nın toksik etkisini önledi (P<0.01).

Genel olarak, bu sonuçlar, verbenalin ve (+)-eudesminin SH-SY5Y hücrelerinde antioksidan etkileri içeren mekanizmalar yoluyla 6-OHDA'nın neden olduğu hücre ölümüne karşı güçlü nöroprotektif etkiler sergilediğini göstermektedir. Ek olarak, bu çalışma verbenalinin bir peroksinitrit temizleyicisi olarak davranışabileceğini gösteren ilk rapordur. Çalışmamız, PD'yi önlemek ve/veya iyileştirmek için yeni bir olası strateji önermektedir.

Anahtar Kelimeler: antioksidan etki, 6-hidroksidopamin, nöronal hasar, nitrozatif stres, SH-SY5Y



06

EFFECTS OF VERBENALIN AND (+)-EUDESMIN ON 6-HYDROXYDOPAMINE-INDUCED NEUROTOXICITY IN HUMAN NEUROBLASTOMA SH-SY5Y CELLS

Ahmet Saracaloğlu¹, Ayşe Nur Demiryürek², Özge Göktürk², Şeniz Demiryürek³, Abdullah Tuncay Demiryürek¹

¹Gaziantep University, Faculty of Medicine, Department of Medical Pharmacology, 27310 Gaziantep

²Gaziantep Şahinbey Municipality Science and Art Center, 27470 Gaziantep

³Gaziantep University, Faculty of Medicine, Department of Physiology, 27310 Gaziantep

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder characterized by progressive degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra. Oxidative and nitrosative stress have been reported to be closely related to the pathogenesis and worsening of symptoms of PD. The purpose of this study was to investigate whether verbenalin, an iridoid glucoside found in medicinal herb *Verbena officinalis* L., and (+)-eudesmin, a furofuran lignan isolated from different plant families, can attenuate 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced oxidative damage in human neuroblastoma SH-SY5Y cells.

SH-SY5Y cells were exposed to 35 µM 6-OHDA for 24 hours. Verbenalin and (+)-eudesmin were administrated with different concentrations (1, 2.5, 5, 10, 20, and 50 µM) one hour before 6-OHDA exposure. After 24 hours, cell viability and neuroprotective effect were assessed with the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Nitrosative stress was assessed with measurements of nitric oxide (NO) and 3-nitrotyrosine (3-NT), a marker of peroxynitrite formation.

MTT analyses showed that pretreatment with verbenalin and (+)-eudesmin significantly prevented the toxicity due to 6-OHDA exposure ($P<0.01$ and $P<0.05$, respectively). Although 6-OHDA treatment produced no marked effects on NO levels, (+)-eudesmin at high concentrations (10-50 µM) markedly attenuated NO levels ($P<0.01$). There was a significantly increase 3-NT levels with 6-OHDA exposure in SH-SY5Y cells. Pretreatment with verbenalin, but not (+)-eudesmin, diminished 3-NT levels at low concentrations (1-20 µM) and prevented the toxic effect of 6-OHDA ($P<0.01$).

Overall, these results indicate that verbenalin and (+)-eudesmin exert potent neuroprotective effects against 6-OHDA-induced cell death in SH-SY5Y cells by mechanisms involving antioxidant effects. Additionally, this study is the first report showing that verbenalin may act as a peroxynitrite scavenger. Our study suggests a novel possible strategy to prevent and/or ameliorate PD.

Keywords: antioxidant effect, 6-hydroxydopamine, neuronal injury, nitrosative stress, SH-SY5Y



S8

HİPOKSİ KOŞULLARDA MDA-MB-231 MEME KANSERİ HÜCRE HATTINDA LMAN2 GEN BASKILANMASI VE ER STRES VE APOPTOZ İLİŞKİ GENLERİN DÜZENLENMESİ**Ceyda Okudu¹, Ayyub Ebrahimi², Gökhan Ağtürk³, Elif Kesim²**¹Haliç Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik, Türkiye²Haliç Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik, Türkiye³Haliç Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Türkiye

Hücre içi organizasyonda protein katlanması ve taşınmasında önemli role sahip olan kargo reseptör proteinlerinden biri olan VIP36, LMAN2 geni tarafından kodlanan reseptör proteinidir. Yanlış katılan ve ER' de kontrolden kaçan proteinlerin ER' ye tekrar getirilmesini sağlayarak hücrede protein katlanması ve taşınma süreçlerinde etkin rol oynayan bu proteinin prostat, mide ve yumurtalık kanserlerinde gen ifade düzeyinin arttığı bildirilmiştir. Literatürde LMAN2 ve kanser arasındaki ilişkiye odaklanan araştırmaların yoğun olmaması ve protein modifikasyonlarının kontrol kaybı ile oluşan hastalık türleri içinde kanserin de yer alması nedeniyle bu genin meme kanserindeki ifade düzeyinin incelenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca tümörleşmede ve metastazın oluşumunda önemli etkisi olan oksijen yetersizliği olarak bilinen hipoksi koşullarında LMAN2 gen ifade düzeyinin belirlenmesi ile hipoksi ve ER stresi arasındaki ilişkiye yeni bir veri kazandırmak amaçlanmıştır. Hipoksi koşullarda ER stresi oluşturulan hücrelerde LMAN2 geninin ifade düzeyindeki artış ya da azalışa göre bu yolaktaki rolünün ortaya konması hedeflenmektedir.

Çalışmada MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı ve CRL4010 sağlıklı meme hücre hattı kullanıldı. Normoksi (%5 CO₂ ve 37 0C) ve hipoksi (%5 O₂ , %5 CO₂ , %90 N₂ ve 37 0C) olmak üzere 2 farklı koşulda hücreler 48 saat büyütüldü. İnkübasyondan sonra MTT testi ile hücre canlılığı analizi ve RT-PCR yöntemi ile LMAN2 ve diğer ilişkili genlerin ifade analizleri yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre MDA-MB-231 hücre hattında normoksi koşullara kıyasla %32,4 hücre artışı gözlandı. Gen ifade analizi sonuçlarına göre LMAN2 geni ifadesinin MDA-MB-231 hücre hattında sağlıklı meme hücresine göre baskılantısı tespit edildi (%91 oranında baskılanmıştır). Hipoksi koşullarda ise normoksi koşulları ile kıyaslandığında LMAN2 geninin %24 ER stresi ilişkili gen CHOP' un %41 oranında baskılantısı tespit edildi. Bununla beraber antiapoptotik genler olan MCL-1 ve BIRC5 gen ifadeleri ise hipoksi koşullarda sırasıyla 2,58 ve 2,11 kat artışı tespit edildi.

LMAN2 kargo proteini gen ifadesi MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında baskılanmaktadır. Bununla beraber hipoksi koşullarla ER stresi oluşturulduğunda CHOP baskılanırken antiapoptotik genlerin uyarılması LMAN2 baskılanmasına eşlik etmiştir. Bu sebeple LMAN2 baskılanması ile apoptoz yoluğu arasında bir ilişki olduğu düşünülmektedir. LMAN2 baskılanması antiapoptotik genleri uyaran farklı yolaklarla ilişkili olabilir. LMAN2 proteininin hem ER stresindeki rolünü hem de apoptozdaki rolünün tam aydınlatılabilmesi için daha fazla çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, ER Stresi, Hipoksi, LMAN2

O8

DOWREGULATION OF LMAN2 AND REGULATION OF ER STRESS AND APOPTOSIS-RELATED GENES IN MDA-MB-231 BREAST CANCER CELL LINE UNDER HYPOXIA CONDITIONS

Ceyda Okudu¹, Ayyub Ebrahimi², Gökhan Ağtürk³, Elif Kesim²

¹Halic University, Healthy Science Faculty, Nutrition and Dietetic Department

²Halic University, Faculty of Science and Literature, Molecular Biology and Genetics Department

³Halic University, Medicine Faculty, Physiology Department

VIP36, one of the cargo receptor proteins that has an important role in protein folding and transport in intracellular organization, is the receptor protein encoded by the LMAN2 gene. It has been reported that the gene expression level of this protein, which plays an active role in protein folding and transport processes in the cell by bringing the misfolded and out of control proteins to the ER, increases in prostate, stomach and ovarian cancers. It was aimed to examine the expression level of this gene in breast cancer, since there is not a lot of research in the literature focusing on the relationship between LMAN2 and cancer, and cancer is among the types of diseases caused by loss of control of protein modifications. In addition, it was aimed to provide new data on the relationship between hypoxia and ER stress by determining the level of LMAN2 gene expression in hypoxia conditions known as oxygen deficiency, which has an important effect on tumorigenesis and formation of metastasis. It is aimed to reveal the role of the LMAN2 gene in this pathway according to the increase or decrease in the expression level in cells under ER stress under hypoxia conditions. MDA-MB-231 breast cancer cell line and CRL4010 healthy breast cell line were used in this study. Cells were grown for 48 hours under 2 different conditions, namely normoxia (5% CO₂ and 37 °C) and hypoxia (5% O₂ , 5% CO₂ , 90% N₂ and 37 °C). After incubation, cell viability analysis by MTT test and expression analysis of LMAN2 and other related genes were performed by RT-PCR method. According to the results obtained, 32.4% increase in cells was observed in MDA-MB-231 cell line compared to normoxia conditions. According to the results of gene expression analysis, it was determined that LMAN2 gene expression was suppressed in MDA-MB-231 cell line compared to healthy breast cells (91% suppressed). In hypoxia conditions, when compared to normoxia conditions, LMAN2 gene was found to be suppressed by 24% and ER stress-related gene CHOP was found to be suppressed by 41%. On the other hand, MCL-1 and BIRC5 gene expressions, which are antiapoptotic genes, were found to increase 2.58 and 2.11 times, respectively, under hypoxia conditions. LMAN2 cargo protein gene expression is suppressed in the MDA-MB-231 breast cancer cell line. However, when ER stress was induced under hypoxia conditions, CHOP was suppressed, while stimulation of antiapoptotic genes accompanied LMAN2 suppression. For this reason, it is thought that there is a relationship between LMAN2 suppression and apoptosis pathway. LMAN2 suppression may be associated with different pathways that stimulate antiapoptotic genes. Further studies are needed to fully elucidate the role of LMAN2 protein in both ER stress and apoptosis.

Keywords: Apoptosis, ER stress, Hypoxia, LMAN2



S19

TRİPLE NEGATİF MEME KANSERİNDE SİSPLATİN VE FOTODİNAMİK TEDAVİNİN KOMBİN TERAPÖTİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Beyzanur Erk¹, Gamze Güney Eskiler², Ali Furkan Kamanlı³

¹Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomedikal Mühendisliği, Türkiye

²Sakarya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tibbi Biyoloji, Türkiye

³Sakarya Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Teknoloji Fakültesi, Elektrik Elektronik Mühendisliği, Türkiye

Giriş: Triple negatif meme kanserleri (TNMK) tüm meme kanserlerinin yaklaşık %15-20'sini oluşturmmasına rağmen, heterojen yapısından dolayı mevcut tedavi seçeneklerine dirençli bir meme kanseri alt tipidir. Bu kapsamda TNMK tedavisinde yenilikçi tedavi seçeneklerine ihtiyaç bulunmaktadır. Fotodinamik tedavi (FDT), fotosensitizer, ışık ve oksijenin etkileşimiyle farklı kanser tiplerinde terapötik potansiyele sahip invaziv olmayan modern bir tedavi yöntemidir. 5-Aminolevulinik asit (5-ALA), FDT uygulamalarında klinikte en yaygın kullanılan fotosensitizer bir maddedir. Bu kapsamda mevcut çalışmada, kemoterapötik ajan olarak sisplatin ve 5-ALA temelli FDT'nin TNMK hücrelerinde kombin terapötik etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metotlar: Sisplatin ve 5-ALA'nın kombin etkisinin belirlenmesi için MDA-MB-231 TNMK hücrelerine öncelikle 5 ve 10 μ M sisplatin ve 1 mM 5-ALA uygulanmıştır. 4 saat inkübasyon sonunda 5-ALA hücrelerden uzaklaştırılmış ve 9 ve 12 J/cm² farklı güç yoğunlukları ile 635 nm dalga boyunda lazer diot ile ıştılmıştır. Işıltılma sonrasında 24 saat boyunca sisplatin ile inkübe edilen hücrelerde sitotoksik etki WST-1 ve apoptotik ölüm Anneysin V analizi ile belirlenmiştir.

Bulgular: WST-1 analizine göre 5 μ M sisplatin ve 1 mM 5-ALA kombin etkisinin her bir işime sonrasında tek başına sisplatin (%61.5) ve 5-ALA (6 J/cm²: %74.4 ve 9 J/cm²: %68.8) uygulamasına göre hücre canlılığını anlamlı bir şekilde azalttığı ve sinerjistik etki gösterdiği tespit edilmiştir (CI<1; p<0.05). 5 μ M sisplatin ile 1 mM 5-ALA uygulanan TNMK hücreleri 9 ve 12 J/cm² güç yoğunlığında ıştıldıklarında canlılık oranı sırasıyla %58.7 ve %52.3 olarak belirlenmiştir. Toplam apoptotik hücre ölümünün ise istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde sırasıyla %35.2 ve %41.5 arttığı analiz edilmiştir (p<0.05).

Tartışma ve Sonuç: Sonuç olarak, 5-ALA temelli FDT ve kemoterapi kombin uygulamasının TNMK hücrelerinde sinerjistik etki göstererek tek başına FDT veya kemoterapiye göre daha etkin olduğu ve erken apoptozu indüklediği belirlenmiştir. Ancak, 5-ALA ve sisplatin kombin tedavisinin hücrelerde neden olduğu apoptotik etkinin moleküller düzeyde aydınlatılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Triple negatif meme kanseri, Fotodinamik tedavi, Kemoterapi, 5-ALA



O19

INVESTIGATION OF COMBINED THERAPEUTIC EFFECT OF PHOTODYNAMIC THERAPY AND CISPLATIN ON TRIPLE NEGATIVE BREAST CANCER

Beyzanur Erk¹, Gamze Güney Eskiler², Ali Furkan Kamanlı³

¹Department of Biomedical Engineering, Institute of Natural Sciences, Sakarya University, Sakarya, Turkey

²Department of Medical Biology, Faculty of Medicine, Sakarya University, Sakarya, Turkey

³Department of Electric and Electronics Engineering, Faculty of Technology, Sakarya University of Applied Sciences, Sakarya, Turkey

Introduction: Triple negative breast cancers (TNBC) is a subtype of breast cancer resistant to current treatment options due to their heterogeneous structure although they constitute approximately 15-20% of all breast cancers. Therefore, there is a need for innovative treatment options in the treatment of TNBC. Photodynamic therapy (PDT) is a modern non-invasive treatment method with therapeutic potential in different types of cancer with the interaction of photosensitizer, light and oxygen. 5-Aminolevulinic acid (5-ALA) is the most widely used photosensitizer in PDT applications. In this context, we aimed to investigate the combined therapeutic effect of cisplatin and 5-ALA-based PDT on TNBC cells.

Materials and Methods: To determine the combined effect of cisplatin and 5-ALA, MDA-MB-231 cells were firstly treated with 5 and 10 µM cisplatin and 1 mM 5-ALA. After 4 hours of incubation, 5-ALA was removed from the cells, a laser diode at a wavelength of 635 nm with different power densities of 9 and 12 J/cm² was applied. After irradiation, the cells were incubated with cisplatin for 24 hours and the cytotoxic effects were determined by WST-1 and apoptotic death was determined by Annexin V analysis.

Results: According to WST-1 analysis, the combined effect of 5 µM cisplatin and 1 mM 5-ALA was more effective than cisplatin alone (61.5%) and 5-ALA (6 J/cm²: 74.4% and 9 J/cm²: 68.8%) at each irradiation. The cell viability significantly decreased and cisplatin and 5-ALA showed a synergistic effect (CI<1; p<0.05). When the TNMK cells were treated with 5 µM cisplatin and 1 mM 5-ALA and irradiated with 9 and 12 J/cm² energy, the viability rates were determined as 58.7% and 52.3%, respectively. The total apoptotic cell death significantly increased by 35.2% and 41.5%, respectively (p<0.05).

Discussion and Conclusion: As a result, it was determined that the combined application of 5-ALA-based PDT and chemotherapy with a synergistic effect on TNBC cells was more effective than PDT or chemotherapy alone, and induced early apoptosis. However, the apoptotic effects caused by the combined treatment of 5-ALA and cisplatin need to be clarified at the molecular level.

Keywords: Triple negative breast cancer, Photodynamic therapy, Chemotherapy, 5-ALA



➤ **POSTER BİLDİRİLERİ**
➤ **POSTER PRESENTATIONS**



P1

APOPTOTİK GENLERİN KEGG YOLAĞI ÜZERİNDEN GEN ONTOLOJİSİNİN VE HASTALIKLA İLİŞKİSİNİN BELİRLENMESİ

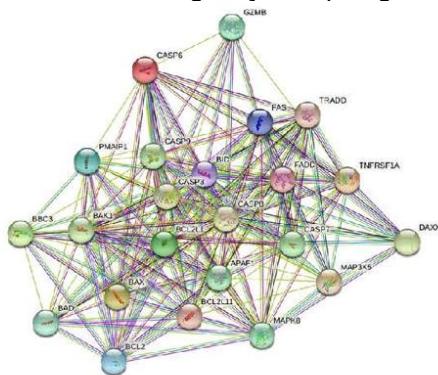
Gözde Öztan

İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji, Türkiye

Giriş: Apoptoz, kaspazları aktive ederek hasarlı veya fazla hücrelerin ortadan kaldırılması için genetik olarak programlanmış bir süreçtir (1). Apoptoz süreci (programlanmış hücre ölümü) çoğunlukla farklı morfolojik özellikler ve enerjiye bağlı biyokimyasal mekanizmalar tarafından belirlenir (2). Apoptozun deregülasyonu genellikle kanserden nörodejenerasyona kadar değişen hastalıklarla ilişkilidir (3).

Materyal ve Metotlar: Çalışmanın amacı, apoptozla ilişkili yolaklarda yer alan apoptotik genlerin tespit edilerek gen ontoloji (GO) analiziyle biyolojik süreçlerin ve moleküler fonksiyonlarının ortaya konulmasını ve hastalıklarla ilişkisinin belirlenmesidir. Çalışmada öncelikle KEGG yoluğu (4) üzerinden apoptozla ilişkili yolaklarda yer alan apoptotik genler tespit edilmiştir. Bu apoptotik genlerin TNF sinyalleşmesinde, ekstrinsik (reseptör aracılı), intrinsik (mitokondri aracılı) ve Granzyme B yollarında yer aldığı tespit edilmiştir.

Bulgular: TNF sinyalizasyon [TNFR1,DAXX,TRADD,FADD], ekstrinsik (reseptör aracılı) [FAS,FADD], intrinsik (mitokondri aracılı) [ASK1,BID,BAX,BAK,BIM,BCL2,BCL-XL,JNK,NOXA,APAF1,BAD] ve Granzyme B [GZMB,CASP6,CASP3,CASP7,CASP8,CASP9] sinyal yolaklarında bulunan apoptotik genler, STRING veritabanı (5) üzerinden gen ontoloji analizi için çalışmaya dahil edilmiştir. Buna göre STRING aracılığıyla 23 gen arasındaki olası etkileşimler belirlenerek ağ zenginleştirilmesi yapılmıştır (ort. yerel kümelenme katsayıısı:0.859, PPI zenginleştirme p değeri: < 1.0e-16) (Şekil 1).



Konak apoptotik sürecin virüs tarafından modülasyonu (GO:0039526), konak apoptotik sürecin virüs tarafından baskılanması (GO:0019050), apoptotik sürecin virüs tarafından pozitif düzenlenmesi (GO:0060139), B hücre negatif seçimi (GO:0002352), apoptotik sinyal yoluğunda yer alan mitokondriyal membrana protein yerleştirilmesini içeren (GO:0001844) biyolojik süreçte yer alan apoptotik genlerin bir alt grubunda Gene Ontoloji zenginleştirme analizi ile önemli bir zenginleşme tespit edilmiştir. Moleküler fonksiyon için kullanılan analizde, apoptozun yürütme fazında yer alan sistein tipi endopeptidaz aktivitesi (GO:0097200), ölüm efektör domain bağlama (GO:0035877), BH3 domain bağlama (GO:0051434), apoptotik süreçte yer alan sistein tipi endopeptidaz aktivitesi (GO:0097153), apoptotik sinyal yoluğunda yer alan sistein tipi endopeptidaz aktivitesinde (GO:0097199) bir gen alt setinin zenginleştirilmesi belirlenmiştir. Ayrıca KEGG yolağına göre karşılaştırıldığında bu apoptotik genlerden mikrosatellit instabilities (MSI) yoluğunda bulunan BCL2, NOXA, BIM, BAD, PUMA, BAX genlerinin, kolorektal kanserle (hsa05210) ilişkisi olduğu tespit edilmiştir.

Tartışma: Apoptozun altında yatan mekanizmanın ve ekstrinsik ve intrinsik apoptotik yolaktaki apoptoz modülatörlerin düzensizliğinin araştırılması, kanser hücrelerinde apoptozu indüklemek için yeni stratejiler geliştirilmesini sağlayabilir.

Sonuç: Apoptotik yolaklarda yer alan genlerin apoptotik süreç, hücresel yanıt ve mitokondriyal membran geçirgenliğinin düzenlenmesi gibi biyolojik süreçlerdeki genetik mekanizmaların belirlenerek bu genlerin hastalıklarla olan ilişkilerinin ortaya konulmasıyla apoptotik yolaklardaki işlevsel



zenginleştirmeler sayesinde hastalıkların moleküler patogenezinin aydınlatılmasına imkan sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: apoptoz, apoptotik genler, yolak

Referanslar:

1. KEGG Pathway Database: Available online: <https://www.genome.jp/kegg/pathway.html> (accessed on 19-02-2022).
2. Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 2007, 35, 495–516. DOI:<https://doi.org/10.1080/01926230701320337>. Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2117903/pdf/nihms33547.pdf> (accessed on 19- 02-2022).
3. Malladi, S.;Challa-Malladi, M.;Bratton, S.B. *Cellular and Molecular Toxicology. Comprehensive Toxicology*, 2nd ed.; McQueen,C.A., Eds.; Elsevier Science: Auburn University, Auburn, AL, USA, 2010; Volume 2, pp. 543-578.
4. KEGG Pathway Database: Available online: https://www.genome.jp/dbgetbin/www_bgt?pathway:map04210 (accessed on 19-02-2022)
5. STRING: functional protein association networks: Available online:<https://string-db.org/>(accessed on 19-02-2022).



P1

DETERMINATION OF GENE ONTOLOGY AND DISEASE RELATION OF APOPTOTIC GENES VIA KEGG PATHWAY

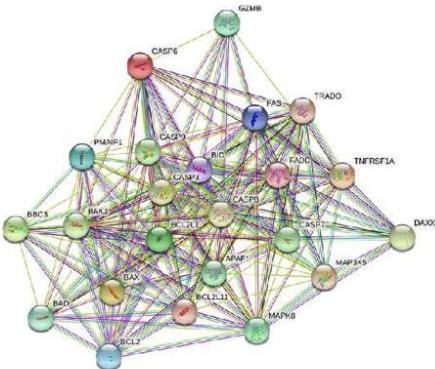
Gözde Öztan

Department of Medical Biology, Istanbul Faculty of Medicine, Istanbul, Turkey

Introduction: Apoptosis is a genetically programmed process of eliminating damaged or redundant cells by activating caspases (1). The process of apoptosis (programmed cell death) is mostly determined by different morphological features and energy-dependent biochemical mechanisms (2). There is a deregulation of apoptosis associated with many diseases, from cancer to neurodegeneration (3).

Materials and Methods: The aim of the study is to determine the apoptotic genes involved in apoptosis-related pathways and to reveal their biological processes and molecular functions by gene ontology (GO) analysis and to determine their relationship with diseases. In this study, first of all, apoptotic genes involved in apoptosis-related pathways were determined via the KEGG pathway (4). These apoptotic genes have been identified to be involved in TNF signaling, extrinsic (receptor mediated), intrinsic (mitochondria mediated), and Granzyme B pathways.

Results: Apoptotic genes in TNF signaling [TNFR1, DAXX, TRADD, FADD], extrinsic (receptor-mediated) [FAS, FADD], intrinsic (mitochondrial-mediated) [ASK1, BID, BAX, BAK, BIM, BCL2, BCL-XL, JNK, NOXA, APAF1, BAD] and Granzyme B signaling [GZMB, CASP6, CASP3, CASP7, CASP8, CASP9] pathways were included in the study for gene ontology analysis via the STRING database (5). Accordingly, possible interactions between 23 genes were determined through STRING and network enrichment was performed (avg. local clustering coefficient: 0.859, PPI enrichment p-value: < 1.0e-16) (Figure 1).



A significant enrichment was detected by Gene Ontology enrichment analysis in a subset of apoptotic genes involved in the biological process, including modulation by virus of host apoptotic process (GO:0039526), suppression by virus of host apoptotic process (GO:0019050), positive regulation of apoptotic process by virus (GO:0060139), B cell negative selection (GO:0002352), protein insertion into mitochondrial membrane involved in apoptotic signaling pathway (GO:0001844). In the analysis used for molecular function, enrichment of a gene subset in cysteine-type endopeptidase activity involved in execution phase of apoptosis (GO:0097200), death effector domain binding (GO:0035877), BH3 domain binding (GO:0051434), cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic process (GO:0097153), cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic signaling pathway (GO:0097199). In addition, BCL2, NOXA, BIM, BAD, PUMA, BAX genes in the microsatellite instability (MSI) pathway were found to be associated with colorectal cancer (hsa05210) when compared with the KEGG pathway.

Discussion: Investigating the mechanism underlying apoptosis and the dysregulation of apoptosis modulators in the extrinsic and intrinsic apoptotic pathway may lead to the development of new strategies to induce apoptosis in cancer cells.

Conclusion: By determining the genetic mechanisms in biological processes such as the apoptotic process, cellular response and regulation of mitochondrial membrane permeability of the genes



involved in apoptotic pathways, revealing the relationships of these genes with diseases, functional enrichments in apoptotic pathways will enable to elucidate the molecular pathogenesis of diseases.

Keywords: apoptosis, apoptotic genes, pathway

References:

1. KEGG Pathway Database: Available online: <https://www.genome.jp/kegg/pathway.html> (accessed on 19-02-2022).
2. Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 2007, 35, 495–516. DOI: <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>. Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2117903/pdf/nihms33547.pdf> (accessed on 19-02-2022).
3. Malladi, S.; Challa-Malladi, M.; Bratton, S.B. *Cellular and Molecular Toxicology. Comprehensive Toxicology*, 2nd ed.; McQueen,C.A., Eds.; Elsevier Science: Auburn University, Auburn, AL, USA, 2010; Volume 2, pp. 543-578.
4. KEGG Pathway Database: Available online:https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?pathway:map04210 (accessed on 19-02-2022)
5. STRING: functional protein association networks: Available online:<https://string-db.org/>(accessed on 19-02-2022)



P2

**METİYONİN YOKSUNLUĞU DURUMUNDA MDA-MB-231 MEME KANSERİ
HÜCRELERİNİN HÜCRESSEL SAĞKALIM ARACILI YANITLARININ MICRORNA-
21 TARAFINDAN DEĞİŞTİRİLMESİ****Burcu Topaloğulları¹, Pınar Uysal Oganer², Elif Damla Arısan¹**¹Biyoteknoloji Enstitüsü, Gebze Teknik Üniversitesi, Gebze, Kocaeli, Türkiye²Cancer Research Group, School of Life Sciences, University of Westminster, London UK

Giriş: Meme kanseri dünya çapında en yaygın kanser türlerinden biridir ve kansere bağlı ölümlerin en yaygın ikinci nedenidir. microRNA-21(miR-21) up regüle edilir ve çeşitli tümör tiplerinde metastazi destekler. Önceki çalışmalar, miR-21'in MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde hücre çoğalmasını ve göçünü indükleyebileceğini göstermiştir. Daha önceki çalışmalara göre, metiyonin önemli bir amino asittir ve metiyonin yoksunluğu, mTOR ve AMPK sinyalleme kaskadı yoluyla hücre çoğalmasını engellemektedir. Bu bilgilerden hareketle meme kanserinde miR-21 eksikliği durumunda hücrelerin metabolik tepkileri araştırıldı. Bu nedenle, bu çalışma, metabolizmayı hedef alan agresif MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde metiyonin yoksunluğu durumunda miR-21'in rolünü vurgulamaktadır.

Yöntemler: Metiyonin yoksunluğunun MDA-MB-231 dt ve miR-21/- hücrelerinde 24, 48, 72 saat boyunca hücre sağkalımı ve ölümü üzerindeki etkilerini incelemek için MTT analizi, koloni oluşumu, tripan mavisi ile boyama ve floresan boyama deneyleri yapıldı. Her iki hücre grubu için hücre sağkalım ve ölüm oranları tripan mavisiyle boyama ile elde edildi. Metiyonin içermeyen medium muamelesini takiben meme kanseri proliferasyonunu test etmek için koloni oluşumu gerçekleştirildi. Mumelenin ardından hücre canlılığını ve proliferasyonunu gözlelemek için ve hücresel metabolik aktiviteyi ölçmek için ise MTT analizi yapıldı. DiOC6 ve PI floresan boyaları kullanarak hücre canlılığı, DCFDA ve BODIPY kullanarak ise ile ROS ve lipid oluşumları incelendi. Hücre döngüsü değişikliklerini gözlelemek için akış sitometrisi kullanıldı.

Bulgular: Hücrelerin metiyonin besiyeri ile muamelesi sonrasında, sağlıklı kontrollere kıyasla miR-21/- MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında hücre canlılık oranının azaldığı gözlemlendi. En düşük hücre canlılığı oranı, miR-21/- MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde 72 saatlik muameleden sonra gözlemlendi. Ayrıca miR-21'in inhibisyonu, MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde sağkalım oranını ve koloni oluşumunu engelledi. Metiyonin eksikliğinin, meme kanseri hücrelerinde G1/S kontrol noktasında hücre döngüsünü durdurarak hücre çoğalmasının engelleyebildiği anlaşıldı.

Tartışma: Metiyonin yoksunluğu durumunda miR-21'in önemini açığa çıkarmamıza rağmen, yeni hedef genleri, moleküler mekanizmaları ve klinik potansiyeli hala daha fazla araştırmaya ihtiyaç duymaktadır.

Sonuç: miR-21, meme kanseri için faydalı ve umut verici bir hedef olabilir. Metiyonin yoksunluğunda hücre döngüsünün durması, hücre canlılığının azalması ve koloni oluşumunun azalması sonuçlarının elde edilmesi, metiyonin açığının meme kanseri üzerinde terapötik bir önemi olduğunu işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler: miR-21, metiyonin, meme kanseri



P2

MICRORNA-21 ALTERS CELL SURVIVAL MEDIATED RESPONSES OF MDA-MB-231 BREAST CANCER CELLS IN THE STATE OF METHIONINE DEPRIVATION

Burcu Topaloğulları¹, Pınar Uysal Oganer², Elif Damla Arısan¹

¹Institute of Biotechnology, Gebze Technical University, Gebze, 41400 Kocaeli, Turkey

²Cancer Research Group, School of Life Sciences, University of Westminster, London W1W 6UW, UK

Background: Breast cancer (BCa) is one of the most common types of cancer worldwide and is the second most common cause of cancer-related death. microRNA-21(miR-21) is upregulated and promotes metastasis in various tumor types. Previous studies showed that miR-21 can induce cell proliferation and migration in MDA-MB-231 breast cancer cells. According to earlier studies, methionine is a key amino acid, and methionine deprivation inhibits cell proliferation via mTOR/AMPK signaling cascade. Based on this information, the metabolic responses of cells in the case of miR-21 deficiency in selected breast cancer were investigated. Thus, this study highlights the role of miR-21 in the case of methionine deprivation in aggressive MDA-MB-231 BCa cells as metabolism targeted.

Methods: For examining the effects of methionine deprivation on cell survival /death in MDA-MB-231 wt and miR-21/- cells for 24,48,72 hours, MTT assay, colony formation, trypan blue staining, fluorescent staining were performed. Cell survival and death rates obtained by trypan blue staining for cell proliferation in both groups of cells. Colony formation was performed to test breast cancer proliferation following methionine-free media treatment. MTT assay was used to measure cellular metabolic activity to observe cell viability and proliferation after treatment. Cell viability was observed by using DiOC6 and PI while ROS and lipid formations examined with DCFDA and BODIPY fluorescent dyes. Flow cytometry was used to observe cell cycle changes.

Results: Cell viability rate was decreased in miR-21/- MDA-MB-231 BCa cell line compared with healthy controls after treatment. The least cell viability rate was observed after treatment for 72 hours in miR-21/- MDA-MB-231 BCa cells. Inhibition of miR-21 prevented cell survival and colony formation in MDA-MB-231 BCa. Methionine deficiency can inhibit proliferation by arresting the cell cycle at G1/S checkpoint in BCa.

Discussion: Although we highlighted the importance of miR-21 in methionine deprivation, its novel genes, molecular mechanisms, clinical potential still need further investigation.

Conclusion: miR-21 could be a useful target for BCa. Obtaining the results of cell cycle arrest, decreased cell viability and decreased colony formation in methionine deprivation indicates that methionine starvation has a therapeutic importance on breast cancer.

Keywords: breast cancer, methionine, miR-21



P3

CRISPR/CAS9 SİSTEMİNİ KULLANARAK FARKLI HÜCRE HATLARINA VPS54 KNOCK-IN MUTASYONU EKLEME**Hilal Cihankaya^{1,2}, Carsten Theiss^{1,2}, Veronika Matschke²**¹Ruhr Üniversitesi Bochum, Uluslararası Sinir Bilim Yüksek Okulu, Sinir Bilim, Almanya²Ruhr Üniversitesi Bochum, Tıp Fakültesi, Sitoloji Departmanı, Almanya

Giriş: Amyotrofik lateral skleroz (ALS), merkezi sinir sisteminde motor nöronların ölümü ile karakterize bir motor nöron hastalığıdır. Motor nöronların dejenerasyonuna genellikle mikroglial hücrelerin nöroinflamasyonu eşlik eder. Aktive edilmiş mikroglial hücreler, motor nöronlarla iletişim kurabilir ve motor nöron ile mikroglia arasındaki hücresel etkileşimleri etkileyebilir. ALS'de hücre-hücre iletişimimin önemini incelemek için wobbler fare modelini kullandık. Wobbler faresi, Vps54 geninde spontan bir nokta mutasyonuna sahiptir ve ALS hastalarıyla benzer hücresel kusurlar ve patolojik semptomlar gösterir. Bu çalışmada, hastalıklı durumda hücresel etkileşimleri araştırmak için CRISPR/Cas9 sistemini kullanarak motor nöron ve mikroglial hücrelere Vps54 mutasyonu yerleştirmeyi amaçladık.

Materyal ve Metotlar: CRISPR plazmidi, puromisin direncini ve eGFP ifadesini içerecek şekilde tasarlanmıştır. Vps54 mutasyonunu içeren tek sarmallı deoksünükleotit (ssODN), bir onarım şablonu olarak hizmet etmek üzere yapılandırılmıştır. Puromisin öldürme eğrileri, propidium iyodür ve DAPI boyaması kullanılarak belirlendi. CRISPR plazmiti ve ssODN'nin verilmesi, farklı transfeksiyon ajanları ve elektroporasyon kullanılarak gerçekleştirildi. Plazmit ve ssODN taşıınmasından sonra, seri seyreltme ile tek hücreli koloniler elde edildi ve bu hücreler kültürde çoğaltıldı. Mutasyonu doğrulamak için PCR ve restriksiyon enzimi kullanıldı.

Bulgular: Puromisin öldürme eğrilerine dayalı olarak, NSC-34 hücreleri için 2 gün süreyle 6 µg/µl puromisin ve N9 hücreleri için 2 gün süreyle 4 µg/µl puromisin seçildi. Lipofectamine 3000 kullanıldığından NSC-34 hücrelerinin transfeksiyonu başarılı oldu. Çeşitli transfeksiyon ajanlarının N9 hücrelerinde uygunluğuna saptanamadı ve bu hücrelerde plazmit taşıınması için transfeksiyon yerine elektroporasyon yönteminin tercih edilmesi tavsiye edilebilir.

Tartışma: CRISPR/Cas9 sistemi, homoloji ile yönlendirilmiş onarım mekanizmasını kullanarak nokta mutasyonlarını hücre içine iletmemizi sağlar. Lipofectamine 3000, CRISPR plazmitlerini NSC-34 hücrelerine vermek için kullanılabilir. N9 mikroglial hücrelerinin elektroporasyonu, çeşitli transfeksiyon yöntemlerine göre tercih edilir. Yüksek mortalite gözlenirse, CRISPR plazmitleri yerine ribonükleoprotein komplekslerinin elektroporasyonu da düşünülmelidir.

Sonuç: Genel olarak, CRISPR/Cas9 düzenlenmiş motor nöron ve mikroglial hücreleri kullanarak hücre-hücre iletişiminde Vps54 mutasyonunun rolünü çözmeye çalışıyoruz.

Anahtar Kelimeler: Vps54; amyotrofik lateral skleroz; motor nöron; mikroglia; CRISPR/Cas9



P3**INSERTING VPS54 KNOCK-IN MUTATION INTO DIFFERENT CELL LINES BY USING CRISPR/CAS9 SYSTEM**

Hilal Cihankaya^{1,2}, Carsten Theiss^{1,2}, Veronika Matschke¹

¹Department of Cytology, Faculty of Medicine, Ruhr-University Bochum, Germany

²International Graduate School of Neuroscience, Ruhr-University Bochum, Germany

Introduction: Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a motor neuron disease, which is characterized by the death of motor neurons in the central nervous system. Degeneration of motor neurons is generally accompanied by neuroinflammation of the microglial cells. Activated microglial cells can communicate with motor neurons and affect the cellular interactions between motor neuron and microglia. We adopted wobbler mouse model to examine the importance of the cell-to-cell communications in ALS. Wobbler mouse has a spontaneous point mutation in the Vps54 gene and shows similar cellular defects and pathological symptoms as ALS patients. In this study, we aim to insert Vps54 mutation into the motor neuron and microglial cells by using CRISPR/Cas9 system to investigate the cellular interactions in the diseased state.

Materials and Methods: CRISPR plasmid was designed to include puromycin resistance and eGFP expression. Single stranded deoxynucleotide (ssODN) containing the Vps54 mutation was constructed to serve as a repair template. Puromycin killing curves were determined by using propidium iodide and DAPI staining. Delivery of CRISPR plasmid and ssODN was performed by using several transfection reagents and electroporation. After the delivery, single cell colonies were obtained by serial dilution and cells were cultured until they reach confluence. To confirm the mutation, PCR and restriction digestion reaction were performed.

Results: Based on the puromycin killing curves, 6 mg/ml puromycin for 2-days was selected for NSC-34 cells and 4 mg/ml puromycin for 2-days was selected for N9 cells. Transfection of NSC-34 cells was successful when Lipofectamine 3000 was used. Transfection reagents aren't convenient for N9 cells and electroporation can be selected for plasmid delivery in these cells.

Discussion: CRISPR/Cas9 system allows us to introduce point mutations by using homology directed repair mechanism. Lipofectamine 3000 can be used to deliver CRISPR plasmids into the NSC-34 cells. Electroporation of N9 microglial cells is preferable over several transfection methods. Electroporation of ribonucleoprotein complexes instead of CRISPR plasmids should also be considered if high mortality is observed.

Conclusion: Overall, we try to unravel the role of Vps54 mutation in the cell-cell communications by using CRISPR/Cas9 edited motor neuron and microglial cells.

Keywords: Vps54; amyotrophic lateral sclerosis; motor neuron; microglia; CRISPR/Cas9



P4

**KATNAL2 (KATANIN-LIKE2) GENİNDEKİ YANLIŞ ANLAM VARYANTI TAŞIYAN
HASTA FİBROBLASTLARINDAN ELDE EDİLMİŞ iPSC'LERDEN NÖRAL
PROGENİTÖR HÜCRELERİN TÜRETİLMESİ**

**Ayşe Semra Hız¹, Ece Sönmezler², Burcu Ekinci², Tutku Yaraş², Ahmet Yaramış³,
Yavuz Oktay²**

¹Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Çocuk Nöroloji Bilim Dalı, Türkiye

²İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi (İBG), Türkiye

³Özel Çocuk Nöroloji Kliniği, Türkiye

Amaç: Pediyatrik birinci basamakta karşılaşılan en yaygın kronik tıbbi durumlardan olan nörogelişimsel hastalıklar bilişsel işlevler, motor beceriler, hafiza, iletişim ve davranış alanlarında bozukluklarla karakterlidir. Nöbetler ve beyin malformasyonları eşlik edebilir. Etiyolojiden sıklıkla genetik faktörler sorumludur, ancak çoğunla hastalık yapıcı mekanizmalar tam anlamamıştır. Bunun temel nedenlerinden biri, nörogelişimsel hastalıkların mekanizmalarını anlamada hayvan deneyleri veya postmortem incelemelerin, canlı nöronal hücrelerin yerini tutmamasıdır. Dolayısıyla bu yıkıcı hastalıkları iyileştirecek hedefe yönelik bireysel tedavilerin geliştirilmesi zorlaşmaktadır. Bu ihtiyaça yanıt olarak, günümüzde ulaşılan kök hücre ve yeniden programlama teknolojileri devrim yaratmıştır. Bu çalışmada, ileriye dönük fonksiyonel araştırmaların yapılmasına olanak sağlamak üzere, işlevi tam olarak bilinmeyen KATNAL2 geninde patojenik bir varyant saptadığımız nörogelişimsel gerilik bir hastanın fibroblastlarından Yamanaka faktörleri kullanarak ilk aşamada uyarılmış pluripotent kök hücreler (iPSC-KATNAL2_mut) geliştirilmiştir. İkinci aşamada ise ileriye dönük mikrotübül-ilişkili yapıların fonksiyonel analizlerini gerçekleştirmek üzere, mutant ve kontrol iPSC hücreleri, nöral progenitör hücrelere (NPC) farklılaştırılmıştır.

Yöntem: İlk olarak hasta dermal fibroblastlarının epizomal plazmid yöntemiyle yeniden programlanmaları sağlanmıştır. Elde edilen iPSC'lerin, fare embriyonik fibroblast (MEF) hücreleri üzerinde ve HESC medium varlığında çoğaltılarak uygun sayıya ulaşmaları sağlanmıştır. Her gün besiyeri değişikliği yapılan ve yeterli büyülükle ulaşan iPSC kolonileri MEF hücreleri üzerinden alınarak matrijel kaplı kuyucuklara aktarılmıştır. Farklılaştırma başlatmak için, yeterli sayıya ulaşan iPSC kolonileri "Monolayer Kültür Protokolü" ile tek hücrelere ayrılmış ve SMAD inhibisyonu ile nöral indükleme sağlayan "STEMdiff™ SMADi Neural Induction Kit" kullanılmıştır. İlk üç pasaj boyunca verilen nöral indüksiyon besiyeri ile merkezi sinir sistemi tipi nöral öncül hücreler indüklenmiş ve sonrasında "STEMdiff™ Neural Progenitor Medium"a geçilerek yeterli sayıda NPC elde edene kadar kültür devam ettirilmiştir. Üretilen NPC'lerin karakterizasyonu için, farklılaştırma süreci boyunca floresan mikroskop altında hücrelerin morfolojisini incelenmiş ve Pax6, Nestin, Sox1 ve Oct4 antikorları ile immunfloresan boyamaları gerçekleştirilmiştir.

Bulgular: Farklılaştırılan NPC'lerin uygun morfolojik özellikleri sağladığı ve pluripotensi belirteci olan Oct4 için negatif, nöral öncül hücre belirteci olan Nestin, Pax6 ve Sox1 için pozitif olduğu gösterilmiştir. iPSC-KATNAL2_mut hücreler ile yabanılı-tip NPC'ler arasında bu belirteçler için belirgin bir farklılık gözlenmemiştir.

Sonuç: Bu çalışmada ilk defa patojenik KATNAL2 mutasyonu taşıyan hasta hücrelerinden önce iPSC, daha sonra NPC hücre modelleri oluşturulmuştur. Devam eden ve gelecek çalışmalarında bu modeller kullanılarak KATNAL2'nin nörogelişimdeki rolü ve etkileşimleri daha iyi anlaşılabilecek, tedaviye yönelik olarak ilaç ve gen tedavi çalışmaları gerçekleştirilebilecektir. İnsan beyninin karmaşık yapısını tam anlamıyla temsil etmese de büyük miktarlarda üretim kolaylığı, daha az değişkenlik göstermesi ve üzerinde çok sayıda kontrollü test yapılabilir olması nedeniyle bu ve benzer modeller, nörogelişimsel hastalık mekanizmalarının anlaşılması sırasında ileri fonksiyonel çalışmaların yapılmasına olanak sağlayacak önemli araçlardır.

Bu araştırma TÜBİTAK tarafından desteklenmektedir (120S404)

Anahtar Kelimeler: KATNAL2, Nörogelişimsel gerilik, İki boyutlu NPC kültürü



P4

GENERATION OF NEURAL PROGENITOR CELLS FROM iPSCs OBTAINED FROM PATIENT FIBROBLASTS CARRYING THE MISSENSE VARIANT IN THE KATNAL2 (KATANIN-LIKE2) GENE

Ayşe Semra Hız¹, Ece Sönmezler², Burcu Ekinci², Tutku Yaraş², Ahmet Yaramış³, Yavuz Oktay²

¹Dokuz Eylül University Faculty of Medicine, Department of Pediatrics, Department of Pediatric Neurology, Izmir

²İzmir Biomedicine and Genome Center (İBG), İzmir

³Private Child Neurology Clinics, Diyarbakır

Objective: Neurodevelopmental diseases, one of the most common chronic medical conditions encountered in pediatric primary care, are characterized by disabilities in cognitive functions, motor skills, memory, communication and behavior. It may be accompanied by seizures and brain malformations. Genetic factors are often responsible for the etiology, but the pathogenic mechanisms in most of them are not fully understood. One of the main reasons for this is that animal experiments or postmortem studies are not a substitute for living neuronal cells in understanding the mechanisms of neurodevelopmental diseases. Therefore, it becomes difficult to develop targeted individual therapies to cure these devastating diseases. In response to this need, stem cell and reprogramming technologies reached today have revolutionized. In this study, first-stage induced pluripotent stem cells (iPSC-KATNAL2_mut) were developed using Yamanaka factors from the fibroblasts of a patient with neurodevelopmental retardation, in which we detected a pathogenic variant in the KATNAL2 gene, whose function is not fully understood, to allow future functional studies. In the second step, mutant and control iPSC cells were differentiated into neural progenitor cells (NPC) to perform prospective functional analyzes of microtubule-associated structures.

Method: First, the patient dermal fibroblasts were reprogrammed with the episomal plasmid method. Obtained iPSCs were replicated on mouse embryonic fibroblast (MEF) cells in the presence of HESC medium to reach the appropriate number. The iPSC colonies, whose medium was changed every day and reached sufficient size, were taken from MEF cells and transferred to matrigel-coated wells. To initiate differentiation, iPSC colonies reaching sufficient numbers were separated into single cells with the "Monolayer Culture Protocol" and the "STEMdiff™ SMADi Neural Induction Kit", which provides neural induction with SMAD inhibition, was used. Neural progenitor cells were induced with the neural induction medium given during the first three passages, and then the culture was continued until a sufficient number of NPCs was obtained by switching to "STEMdiff™ Neural Progenitor Medium". For the characterization of the NPCs, the morphology of the cells was examined under a fluorescent microscope during the differentiation process and immunofluorescent staining was performed with antibodies Pax6, Nestin, Sox1 and Oct4.

Results: It has been shown that differentiated NPCs provide appropriate morphological features and are negative for the pluripotency marker Oct4, and positive for the neural precursor cell marker Nestin, Pax6 and Sox1. No significant differences for these markers were observed between iPSC-KATNAL2_mut cells and wild-type NPCs.

Conclusion: In this study, first iPSC and then NPC cell models were created from patient cells with pathogenic KATNAL2 mutation for the first time. By using these models in future studies, the role and interactions of KATNAL2 in neurodevelopment will be better understood, and drug and gene therapy studies will be carried out. Although they do not fully represent the complex structure of the human brain, two-dimensional cell culture models are important tools that will enable further functional studies to be carried out in understanding the mechanisms of neurodevelopmental diseases, due to their ease of production in large quantities, less variability, and the possibility of many controlled tests on them.

This research is supported by TUBITAK (120S404)

Keywords: KATNAL2, Neurodevelopmental disorders, Two-dimensional NPC culture



P5

WHICH REFERENCE GENES ARE MORE SUITABLE FOR AML CELL LINES IN RT-QPCR STUDIES?

Tuğba Erkmen¹, Gizem Gülfidan², Kazım Yalçın Arga², Ayşe Semra Koçtürk³

¹Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya, Türkiye

²Marmara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Anabilim Dalı, Türkiye

³Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya, Türkiye

Giriş: Kuantitatif gerçek zamanlı revers transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR), tanı ve moleküler araştırmalarda kullanılan güçlü bir tekniktir. Güvenilir sonuçlar elde etmek için uygun referans genlerin seçimi önemli bir adımdır. Housekeeping geni, hücre hattı ile uyumlu olmalı ve düşük katsayılı varyasyon ($CV < 0.04$) ile farklı deney koşulları altında stabiliteti korumalıdır. Çalışmamız, AML hücre hatları için en uygun housekeeping gen/kombinasyonlarını belirlemeyi amaçlamaktadır.

Gereç ve Yöntemler: AML kök benzeri KG1a hücre hattı (FAB 0), nispeten daha olgun formu olan KG1 hücre hattı (FAB1) ve akut promyelositik lösemi HL-60 hücre hattı (FAB3) olmak üzere üç farklı AML hücre hattı kullanılmıştır. Lösemi için en stabil genler olarak önerilen beş gen (ACTB, UBE2D2, B2M, SRP14, RPL37A), hesaplanan katsayı varyasyon (CV) değerlerine göre değerlendirildi. Hücrelere polifenol uygulaması sonrasında, mRNA izolasyonu, cDNA sentezi ve ardından RT-qPCR analizi gerçekleştirildi. CV değerleri en az 4 farklı ölçümden hesaplandı ve $< 4\%$ kabul edilebilir değer olarak belirlendi (De Jonge ve ark., 2007). Farklılıkların analizi için Student t testi kullanıldı.

Sonuçlar: UBE2D2, B2M, SRP14 ve RPL37A genlerinin bireysel CV değerleri, AML kök hücre benzeri KG1a ve daha olgun formu KG1 hücre hatları için $> 4\%$ 'un altında bulunmuştur. KG1A hücreleri için $> 4\%$ 'un altında CV değeri gösteren tek kombinasyon olan B2M&RPL37A kombinasyonunun CV değeri 0.018 olarak hesaplanmıştır. KG1 hücreleri için 0,025 CV değerine sahip ACTB&UBE2D2&B2M&SRP14&RPL37A kombinasyonu ve 0,029 CV değerine sahip B2M&RPL37A kombinasyonları değerlendirilmiştir. Ek olarak, B2M dışındaki tüm bireysel genler ve tüm kombinasyonlar (UBE2D2 & RPL3A & UBE2D2 & RPL3A & SRP14; UBE2D2 & RPL3A & SRP14 & ACTIN; ACTB & UBE2D2 & B2M & SRP14 & RPL37A) HL-60 hücre hattı için $< 4\%$ ten düşük CV değerleri göstermiştir.

Sonuç: Çalışmamız UBE2D2, SRP14, RPL37A'nın, ayrı ayrı değerlendirildiğinde, KG1a, KG1, HL-60 hücre hatları için uygun housekeeping genleri olduğunu göstermiştir. B2M&RPL37A kombinasyonu, KG1a ve KG1 hücreleri için en uygun referans gen kombinasyonudur. Ayrıca ACTB&UBE2D2&B2M&SRP14&RPL37A kombinasyonu KG1 ve HL-60 hücre hatları için uygundur. RT-qPCR çalışmalarında güvenilir sonuçlar elde etmek için bu hücre hatları için mevcut genlerin/kombinasyonlarının kullanımının uygun olduğunu düşünmektedir.

Anahtar Kelimeler: Akut miyeloid lösemi, Kanser kök hücreleri, Housekeeping geni, RT- Qpcr



P5

WHICH REFERENCE GENES ARE MORE SUITABLE FOR AML CELL LINES IN RT-qPCR STUDIES?

Tuğba Erkmen¹, Gizem Gülfidan³, Kazım Yalçın Arga³, Semra Koçtürk²

¹Dokuz Eylül University, Health Science Institute, Department of Medical Biochemistry, Izmir, Turkey.

²Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Department of Medical Biochemistry, Izmir, Turkey

³Marmara University, Faculty of Engineering, Department of Bioengineering, İstanbul, Turkey

Introduction: Quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR) is a powerful technique in diagnosis and molecular research. To obtain reliable results, the selection of suitable reference genes is an important step. The housekeeping gene should be compatible with the cell line and maintain stability under different experimental conditions with low coefficient variation ($CV < 0.04$). This study aims to identify the most suitable housekeeping gene/combinations for AML cell lines.

Material and Methods: We used three different AML cell lines, which were AML stem-like KG1a cell line (FAB 0), its parental and relatively more mature form KG1 cell line (FAB1), and acute promyelocytic leukemia HL-60 cell line (FAB3). Five genes (ACTB, UBE2D2, B2M, SRP14, RPL37A), which are recommended as the most stable genes for leukemia, were evaluated according to Coefficient Variation (CV) values. Cells were treated with polyphenols and mRNA isolation, cDNA synthesis, then RT-qPCR analysis were performed. CV values were calculated from at least 4 different measurements and $< \%4$ were considered as acceptable (De Jonge et al., 2007). Student t-test was used to analyze differences.

Results: Individually CV values of UBE2D2, B2M, SRP14, and RPL37A genes were lower than $\%4$ for AML cancer stem-like KG1a and more mature KG1 cell lines. For KG1A cells, B2M&RPL37A combination's CV value was calculated as 0.018, which is the only combination that showed CV value lower than $\%4$. ACTB, UBE2D2, B2M, SRP14, RPL37A combination with 0.025 CV value and B2M&RPL37A combination with 0.029 CV value were evaluated for KG1 cells. Additionally, all individual genes except B2M and all combinations (UBE2D2 & RPL3A; UBE2D2 & RPL3A & SRP14; UBE2D2 & RPL3A & SRP14 & ACTIN; ACTB & UBE2D2 & B2M & SRP14 & RPL37A) showed CV values lower than $\%4$ for HL-60 cells.

Conclusion: Our study showed that UBE2D2, SRP14, RPL37A were individually suitable housekeeping genes for KG1a, KG1, HL-60 cell lines. B2M and RPL37A combination is the most suitable reference gene combination for KG1a and KG1 cells. Besides, ACTB&UBE2D2&B2M&SRP14&RPL37A combination can be used for KG1 and HL-60 cell lines. We suggest using these genes/combinations for these cell lines to obtain reliable results in RT-qPCR.

Keywords: Acute myeloid leukemia, Cancer stem cells, Housekeeping gene, RT- qPCR



P6

ASTRAGALUS TÜRLERİNDEN ELDE EDİLEN SİKLOARTAN TİPİ SAPONİNLERİN MCF-7 VE MDA-MB-231 İNSAN MEME KANSERİ HÜCRELERİNDEKİ PROLİFERASYONU ÜZERİNE ETKİSİ**Gözde Öğütçü¹, Pınar Tulay², İhsan Çalış³, Aysel Kükner⁴**¹Yakın Doğu Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji, KKTC²Yakın Doğu Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tibbi Genetik, KKTC³Yakın Doğu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi, KKTC⁴Yakın Doğu Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji, KKTC

Giriş: Kadınlarda kansere bağlı ölümlerde meme kanseri ikinci sırada yer almaktadır. Bazı destekleyici gıda ve biyoaktif bileşiklerin kullanımı, hastalık seyrini olumlu yönde etkilemeye ve meme kanseri hastalarının yaşam kalitesini artırabilmektedir. Astragalus L., Leguminosae familyasındaki en büyük çiçekli bitki cinslerinden biridir. Sikloartanel türevi saponinler, flavonoidler ve polisakkaritler Astragalus'un aktif bileşenleridir. Saponinler doğal veya sentetik formda farmasötik veya nutrasötik ajanlar olarak önemli bir potansiyele sahiptir. Farmakolojik çalışmalarında, Astragalus'un ham ekstreleri ve izole edilmiş bileşenleri, antiinflamatuar, immünostimülant, antioksidatif, antikanserojenik, antidiyabetik, kardiyoprotektif ve antiviral etkileri gösterilmiştir. Saponinlerin büyük bir kısmı tümör hücrelerinde apoptozu uyarmaktadır. Tümör hücrelerinin apoptoz ile ortadan kaldırılması, nekrozun oluşmaması hastalarda yan etkileri azaltmakta ve destekleyici tedavide kullanılmaktadır. Bu çalışmada Astragalus türlerinden elde edilen ve meme kanserindeki etkileri konusunda çalışılmamış olan saponinlerin farklı dozları meme kanseri hücre serilerine uygulanarak proliferasyon, sitotoksik ve apoptotoik etkileri araştırıldı.

Materyal ve Metot: Çalışmada, Astragalus türlerinden elde edilen beş farklı sikloartan tipi saponin (Astragaloside IV, Cyclocanthoside E, Astrasievianin X, Macrophylosaponin D, Macrophylosaponin B) kullanıldı. MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre serileri üzerinde saponinlerin hücre canlılığı / sitotoksitese aktivitesi Cell Counting Kit 8 (CCK 8) kullanılarak ölçüldü. Apoptoz analizi için, kullanılan 5 farklı saponin tipleri için her iki meme kanseri hücre serilerinde de 10µM ve 100µM konsantrasyonları seçildi ve 24-48 saat için TUNEL yöntemi ile değerlendirme yapıldı.

Bulgular: MDA-MB-231 hücrelerinde sitotoksitese verileri sonucunda, 24 saat için, 10 µM, 100µM ve 200µM konsantrasyonlarda, 48 saat için, 100µM ve 150µM konsantrasyonlarda ve 72 saat için ise, 10µM ve 100µM konsantrasyonlarda anlamlı değişiklik kabul edildi. MCF-7 hücrelerinde sitotoksitese testinde ise 24 saat için, kontrol ile verilen konsantrasyonlar arasında anlamlı bir fark gözlenmedi fakat 48 saat için, tüm konsantrasyonlarda (10µM, 100µM, 150µM, 200µM) ve 72 saat de ise 100µM konsantrasyonda anlamlı bir fark bulundu. MCF-7 hücreleri için apoptoz analizi sonucunda anlamlı farklılık gözlendi.

Tartışma ve Sonuç: Uygulanan düşük doz saponin ekstrelerinin, MCF7 hücrelerinde daha belirgin olmakla birlikte, MCF7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarının hücre canlılığını azalttığı ve MCF-7 hücrelerinde apoptozu artırdığı tespit edildi. Bu sonuçlar, saponinlerin, meme kanseri hücreleri üzerinde, antiproliferatif ve antiapoptotik etkilerini doza ve zamana bağlı olarak gerçekleştirebildiğini kanıtlamıştır.

Anahtar Kelimeler: Meme Kanseri, MDA-MB-231, Astragalus Saponinleri, MCF-7



P6

THE EFFECT OF CYCLOARTANE-TYPE OF SAPONINS FROM ASTRAGALUS SPECIES ON THE PROLIFERATION OF MCF-7 AND MDA-MB-231 BREAST CANCER CELLS

Gözde Öğütçü¹, Pınar Tülay², İhsan Çalış³, Aysel Kükner¹

¹Near East University, Faculty of Medicine, Department of Histology and Embryology, Nicosia, Cyprus

²Near East University, Faculty of Medicine, Department of Medical Genetics, Nicosia, Cyprus

³Near East University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy, Nicosia, Cyprus

Introduction: Breast cancer is the second leading cause of cancer-related deaths in women. The use of supplements and bioactive compounds increases the quality of life of breast cancer patients. Astragalus L. is one of the largest genus of flowering plants in the Leguminosae family. Cycloartane-derived saponins, flavonoids and polysaccharides are the active ingredients of Astragalus. Saponins have significant potential as pharmaceutical or nutraceutical agents in natural or synthetic forms, respectively. In pharmacological studies, raw extracts and isolated components of Astragalus have been shown to have anti-inflammatory, immunostimulant, antioxidative, anticancer, antidiabetic, cardioprotective and antiviral effects. Almost all saponins induce apoptosis in tumor cells. The elimination of tumor cells by apoptosis and the absence of necrosis reduce the side effects in cancer patients. In this study, different doses of saponins obtained from Astragalus species were applied to breast cancer cell lines and the cell proliferation, cytotoxicity and apoptotic effects were investigated.

Material and Method: In the study, five different cycloartane type saponins(Astragaloside IV, Cyclocanthoside E,Astrasieversianin X, Macrophylosaponin D, Macrophylosaponin B) obtained from Astragalus species were incubated with MCF 7 and MDA-MB-231 cells for 24,48 and 72hours.Cell cytotoxicity activity of these saponins on MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines was measured using Cell Counting Kit 8(CCK 8).For apoptosis analysis, TUNEL Assay Kit was used. Breast cancer cell lines were incubated for 24 and 48hours using two different concentrations of 10µM and 100µM extracted saponins (Astragaloside IV, Cyclocanthoside E, Astrasieversianin X, Macrophylosaponin D and Macrophylosaponin B).

Results: Significant changes in the cytotoxicity were obtained at concentrations of 10µM,100µM and 200µM for 24hours,at concentrations of 100µM and 150µM for 48hours, and at concentrations of 10µM and 100µM for 72hours in the MDA-MB-231 cells,respectively.In MCF-7 cells,no significant changes in the cell cytotoxicity were obtained between the control and administered concentrations for 24hours but the significant changes were obtained at all concentrations(10µM,100µM,150µM,200µM) for 48hours and at concentration of 100µM for 72hours.There was significant change in the apoptosis analysis for the MCF-7 cell lines.

Discussion and Conclusion: As a result of the study, it was determined that low dose saponin extracts decreased cell viability of MCF7 and MDA-MB-231 cell lines and increased apoptosis in MCF-7 cells. These results proved that saponins can exert their antiproliferative and antiapoptotic effects on breast cancer cells in a dose and time dependent manner.

Keywords: Breast Cancer, MCF-7, MDA-MB-231, Astragalus Saponins

P7

CASTICIN: A PROMISING CANDIDATE TO DEVELOP A STEM CELL TARGETED STRATEGY IN AML TREATMENT**Tuğba Erkmen¹, Belgin Sert Serdar¹, Halil Ateş², Pembe Keskinoglu³, Semra Koçtürk⁴**¹Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya, Türkiye²Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Onkoloji, Türkiye³Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı, Türkiye⁴Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya, Türkiye

Giriş: Akut miyeloid lösemi, genetik, epigenetik heterojenite gösteren en yaygın akut lösemidir. Mevcut terapötik ajanlar, başarılı remisyon sağlamasına rağmen, 5-yıllık sağkalım oranları hala düşüktür. Gelişen ilaç direnci ve hastalığın nüksünde ana neden olarak, lösemi kök hücrelerinin etkin bir şekilde hedeflenmemesi gösterilmektedir. Fitokimyasallar, hedefli ilaç araştırmaları için halen umut vaad eden bir kaynaktır. Çalışmalar, Casticin'in lösemi hücreleri üzerinde antiproliferatif etkileri olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, Casticin'in lösemi kök hücreleri üzerindeki etkileri bilinmemektedir. Çalışmamızda, Casticin'in kök hücre benzeri (KG1a) ve nispeten olgun (KG1) AML hücre hatları üzerindeki antiproliferatif kapasitesini sağlıklı periferal kan mononükleer hücreleriyle (PBMC) karşılaştırmalı olarak araştırmayı amaçladık.

Materyal ve Metot: Casticin'in KG1a, KG1, PBMC hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkileriyle IC50 değerleri MTT canlılık testiyle belirlendi. Casticin'in hücrelerdeki kaspaz 3/7 aktivitesine, apoptotik/nekrotik hücre ölümü üzerine etkileri, akış sitometri ve TUNEL analizleriyle değerlendirildi.

Bulgular: 2 μ M Casticin ile 24 saat gerçekleştirilen uygulama sonucunda, PBMC canlılığı belirgin ölçüde etkilenmezken, kök hücre-benzeri KG1a ve olgun KG1 proliferasyonu önemli ölçüde baskılanmıştır. Apoptoz ve kaspaz 3/7 aktivitesi, 2 μ M Casticin uygulaması sonucunda KG1 (%27,2; %17,30; p <0,01), KG1a (%21,6; %11,35; p <0,01) hücrelerinde artış gösterirken, nispeten düşük nekroz (%1,4; %0,3) gözlenmiştir. Casticin'in KG1 (%22,3; p<0,05), KG1a (%19,03; p<0,05) hücre hatlarında apoptozu anlamlı şekilde arttırdığı, TUNEL analiziyle de teyit edilmiştir. Casticin, PBMC hücrelerinde, apoptoz (%10,6), kaspaz 3/7 aktivitesi (%0,24), nekroz seviyesi (%0,6) açısından belirgin değişikliği sebep olmamıştır.

Tartışma: Casticin, sağlıklı hücrelerde hasara sebep olmaksızın hem lösemi kök hücre-benzeri (KG1a) hem de olgun lösemi (KG1) hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü tetikleyebilmektedir.

Sonuç: Casticin'in nihai AML tedavisinde geliştirilecek yeni terapötik stratejiler için umut vaad eden bir bileşik olduğunu düşünmektediyiz.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, Akut miyeloid lösemi, Casticin, Kanser kök hücreleri



P7

CASTICIN: A PROMISING CANDIDATE TO DEVELOP A STEM CELL TARGETED STRATEGY IN AML TREATMENT

Tuğba Erkmen¹, Belgin Sert Serdar¹, Halil Ateş², Pembe Keskinoglu³, Semra Koçtürk⁴

¹Department of Biochemistry, Health Sciences Institute, Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Izmir, Turkey

²Oncology Institute, Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Izmir, Turkey

³Department of Public Health, Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Izmir, Turkey

⁴Department of Biochemistry, Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Izmir, Turkey

Introduction: Acute myeloid leukemia is the most common form of acute leukemia with genetic and epigenetic heterogeneity. Although current chemotherapeutics provide successful remission, 5-year survival rates are still low. Insufficiency of targeting leukemia stem cells is considered as the main obstacle that causes drug resistance and relapse. Phytochemicals, especially polyphenols remain a promising source for targeted drug research. Studies showed that Casticin, which is a predominant polyphenolic component of the fruit of Vitex trifolia, has antiproliferative effects on leukemic cells, but its effects on leukemic stem cells are still unclear. In this study, we aimed to investigate the antiproliferative capacity of Casticin on acute myeloid leukemia stem-like (KG1a) cell line and its parental (KG1) cell line comparison with healthy peripheral blood mononuclear (PBMC) cell line.

Material and Methods: The antiproliferative effects of Casticin on cells and IC₅₀ values were determined by MTT test. The effects of Casticin on caspase 3/7 activity, apoptosis, and necrosis in cells were evaluated by flow cytometry and TUNEL assays.

Results: 2 µM Casticin treatment for 24 h was increased apoptosis, caspase 3/7 activation in KG1 (27,2%; 17,30%; p<0,01), KG1a (21,6%; 11,35%; p<0,01) with relatively low necrosis (1,4%; 0,3%) compared to their control groups. TUNEL assay also confirmed Casticin-induced apoptosis in KG1 (22,3%; p<0,05), KG1a cells (19,03%; p<0,05). There were no significant changes in apoptosis (10,6%), caspase 3/7 activity (0,24%), necrosis (0,6%) of PBMC compared to its control group.

Discussion: Casticin has the capacity to induce apoptosis in both leukemia stem-like KG1a and parental cells KG1 without significantly affecting healthy cells.

Conclusion: We think that Casticin can be a promising compound to develop novel therapeutic strategies for final AML treatment.

Keywords: Apoptosis, Acute myeloid leukemia, Casticin, Cancer stem cells



P8

DROSOPHILA NÖROJENEZİNDE ETS TRANSKRİPSİYON FAKTÖR AİLESİ

Pınar Mutlu¹, Ekin Sönmez², İşıl Kurnaz^{1,2}, Yiğit Koray Babal²

¹Gebze Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik, Türkiye

²Gebze Teknik Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Biyoteknoloji, Türkiye

Giriş: ETS transkripsiyon faktör ailesi, proliferasyon, farklılaşma, apoptoz ve hücre göçü gibi bazı hücresel süreçlerin düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir. Bu transkripsiyon faktör ailesi oldukça büyük bir ailedir ve üyeleri yaklaşık 85 amino asitten oluşan ETS bölgelerindeki benzerliklerine göre PEA3, ETS, ERG vb. şekilde gruplandırılır. ETS proteinleri ile hedef genlerin aktivasyonu spesifik protein-protein etkileşimleri ile oluşmasına rağmen, hedef gen seçiciliğinde ETS transkripsiyon faktörlerinin mekanizması tam olarak belirlenmemektedir. Bu çalışmada, biyoinformatik araçları birleştirerek Drosophila ETS transkripsiyon faktörünü ve nörojenezdeki hedef genlerini incelemeyi amaçladık.

Materyal ve Metotlar: Bu çalışmada, transkriptomik veri seti GEO veri tabanından elde edilmiştir. Galaxy platformu kullanılarak ham data analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen datadan R programlama dili kullanılarak gen ekspresyon analizi gerçekleştirilmiş ve data içerisinde incelenecek olan Typell nöroblast (NB), glia ve nöron grupları seçilmiştir. Typell NB'dan glia veya nörona giderken ETS genlerinin ekspresyon seviyeleri incelendi ve anlamlı değişenler belirlendi. Glia ve nöron setlerindeki genler karşılaştırılarak ortak genlerin Gen Ontoloji (GO) analizi yapılarak sinir sistemi ile ilgili olan genler belirlendi. Ayrıca ortak genlerin belirlenen ETS genleri tarafından nasıl regüle edildiğini belirlemek için Cytoscape kullanılarak aralarındaki ağ görselleştirildi. R programı üzerinden promoter analizi yapılarak ETS bağlanma bölgeleri olan genler belirlendi.

Bulgular: Drosophila ETS transkripsiyon faktörleri nörojenezdeki genleri düzenler. Promoter analizine göre, ETS genleri ve nörojenez ile ilgili hedef genleri arasında bir gen düzenleyici ağ oluşturulmuştur.

Tartışma ve Sonuç: Çalışmamız ETS transkripsiyon faktörlerinin, özellikle Ets65A'nın, Drosophila'da Typell NB'dan glia ve nöron oluşumunda rolü olduğunu göstermiştir. Bulgularımızın ışığında, düzenleyici ağımız memeli veri setleriyle karşılaştırılmalıdır. Bunun ardından farklı model sistemleri birleştirerek nörodejeneratif hastalık için terapötik bir yaklaşım geliştirilebilir.

Anahtar Kelimeler: Drosophila, ETS transkripsiyon faktörleri, nörojenez, Ets65A



P8

ETS Transcription Factor Family in *Drosophila* Neurogenesis

Pınar MUTLU¹, Ekin SÖNMEZ², Yiğit Koray BABAL², İşil KURNAZ^{1,2}

¹Department of Molecular Biology and Genetics, Gebze Technical University, Kocaeli

²Institute of Biotechnology, Gebze Technical University, Kocaeli

Objectives: ETS transcription factor family has an important role in regulation of some cellular processes such as proliferation, differentiation, apoptosis and cell migration. This transcription factor family is quite large and members are grouped according to their similarities in their ETS domain which is about 85 amino acids as PEA3, ETS, ERG etc. Although the activation of target genes by ETS proteins occurs through specific protein-protein interactions, the mechanism of ETS transcription factors in target gene selectivity cannot be fully determined. In this study, we aim to dissect *Drosophila* ETS transcription factor and their target genes in neurogenesis by combining bioinformatics tools.

Materials and Methods: In this study, transcriptomic dataset was obtained from GEO database. Raw data analysis performed by using Galaxy platform. By using R programming, differentially gene expressed analysis of data which obtained from Galaxy was performed and to be examined Typell neuroblast, glia and neuron groups were selected from data. Expression levels of ETS genes were examined in glia or neuron formation from Typell neuroblast and significantly changed genes were determined. By comparing genes on neuron and glia datasets, common genes detected and Gene Ontology (GO) analysis of these genes were performed. After the GO analysis, nervous system related genes were determined. Also, to determine how common genes are regulated by the selected ETS genes a network was created by using Cytoscape. By performing promoter analysis in R programming, genes that have ETS binding site were determined.

Results: *Drosophila* ETS transcription factors regulate the genes in neurogenesis. According to promoter analysis, a gene regulatory network was established between ETS genes and their neurogenesis related target genes.

Conclusion: Our study showed that, ETS transcription factors, specially Ets65A has role the formation of glia and neuron from Typell neuroblast in *Drosophila*. In light of our findings, our regulatory network should be compared with mammalian datasets then a therapeutic approach for neurodegenerative disease may developed by merging different model systems.

Keywords: *Drosophila*, ETS transcription factors, Ets65A, neurogenesis



P10

EPİGALLOKATEŞİN GALLATIN MCF-7 MEME KANSERİ HÜCRELERİNDEKİ HÜCRE CANLILIĞI, HÜCRE PROLİFERASYONU VE HÜCRE ÖLÜMÜ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Gülşen Özdurán¹, Eda Becer², Ergül Mutlu Altundağ³, Hafize Seda Vatansever⁴

¹Yakın Doğu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, KKTC

²Yakın Doğu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, KKTC

³Doğu Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tibbi Biyokimya Anabilim Dalı, KKTC

⁴Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Türkiye

Giriş: Epigallokateşin gallat, flavonoid ailesinden flavan-3-ol alt sınıflamasına ait, yeşil çayda en yüksek miktarda bulunan biyoaktif bir besin bileşenidir. Bu çalışmada, epigallokateşin gallatin MCF-7 meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığı, anti-proliferatif ve apoptotik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metotlar: MCF-7 meme kanseri hücrelerinin hücre büyümesi ve sitotoksitesi 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromür (MTT) testi ile rutin protokol uygulanarak değerlendirilmiştir. MCF-7 meme kanseri hücrelerine 24 saat ve 48 saat inkübasyon sürelerinde beş farklı konsantrasyonda ($10 \mu\text{M}$, $50 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$, $150 \mu\text{M}$ ve $200 \mu\text{M}$) epigallokateşin gallat uygulanmıştır. Epigallokateşin gallatin apoptotik ve anti-proliferatif etkileri Ki-67 antikor kullanılarak immünositokimya ve TUNEL analizi yöntemleri ile test edilmiştir. Elde edilen verilerin istatistiksel analizlerinde GraphPad Prism 9 programı kullanılmıştır. İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi $p<0.05$ olarak kabul edilmiştir.

Bulgular: MTT analizi sonrasında MCF-7 meme kanseri hücrelerinin hücre büyümesinin inhibisyonu için etkili dozun, 24 saat süresince uygulanan $100 \mu\text{M}$ epigallokateşin gallat olduğu belirlenmiştir. Epigallokateşin gallat uygulanmayan kontrol grubundaki MCF-7 meme kanseri hücrelerinin epigallokateşin gallat uygulanan hücrelere kıyasla Ki-67 immün boyama yoğunluğunun güçlü olduğu bulunmuştur. Ki-67 için H-SKOR değerleri sırasıyla; epigallokateşin gallat uygulanan grupta 106.52 ± 9.19 , kontrol grubu hücrelerinde ise 362.50 ± 53.03 olarak tespit edilmiştir. Gruplar arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlıdır ($p<0.001$). Epigallokateşin gallat uygulanan MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, TUNEL pozitif hücre sayısının kontrol grubu hücrelerinden daha yüksek olduğu da görülmüştür ($p<0.001$).

Sonuç: Epigallokateşin gallatin, MCF-7 meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığını azaltlığı, anti-proliferatif etki gösterdiği ve TUNEL pozitif hücre sayısında azalmaya neden olmasından dolayı meme kanseri hücreleri üzerinde etkili olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, Epigallokateşin gallat, Ki-67, MCF-7 meme kanseri, Tunel analizi



P10

EVALUATION OF THE EFFECTS OF EPIGALLOCATECHIN GALLATE ON CELL VIABILITY, CELL PROLIFERATION AND CELL DEATH IN MCF-7 BREAST CANCER CELLS

Gülşen Özdurán¹, Eda Becer^{2,3}, Ergül Mutlu Altundağ⁴, Hafize Seda Vatansever^{3,5}

¹Department of Nutrition and Dietetics, Faculty of Health Sciences, Near East University, Nicosia, Cyprus

²Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Near East University, Nicosia, Cyprus

³DESAM Institute, Near East University, Nicosia, Cyprus

⁴Department of Medical Biochemistry, Faculty of Medicine, Eastern Mediterranean University, Famagusta, Cyprus

⁵Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Manisa Celal Bayar University, Manisa, Turkey

Introduction: Epigallocatechin gallate is a bioactive nutritional component of the flavonoid family, belonging to the flavan-3-ol subclassification, which is found in the highest amount in green tea. The study aimed to investigate the cell viability, anti-proliferative and apoptotic effects of epigallocatechin gallate in MCF-7 breast cancer cells.

Materials and Methods: Cell growth and cytotoxicity of MCF-7 breast cancer cells were evaluated using the routine protocol with the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) test. Five different concentrations (10 µM, 50 µM, 100 µM, 150 µM and 200 µM) of epigallocatechin gallate were applied to MCF-7 breast cancer cells at 24 h and 48 h incubation times. The apoptotic and anti-proliferative effects of epigallocatechin gallate were tested by immunocytochemistry and TUNEL analysis methods using Ki-67 antibody. GraphPad Prism 9 program was used in the statistical analysis of the obtained data. The statistical significance level was accepted as p<0.05.

Results: After MTT analysis, the effective dose for cell growth inhibition of MCF-7 breast cancer cells was determined to be 100 µM epigallocatechin gallate administered for 24 hours. It was found that the Ki-67 immunostaining intensity of MCF-7 breast cancer cells in the control group was strong compared to the cells treated with epigallocatechin gallate. H-SCOR values for Ki-67 are respectively; It was determined as 106.52±9.19 in the epigallocatechin gallate group and 362.50±53.03 in control group cells. The difference between the groups was statistically significant (p<0.001). It was also observed that the number of TUNEL positive cells in MCF-7 breast cancer cells treated with epigallocatechin gallate was higher than the control group cells (p<0.001).

Conclusions: It was concluded that epigallocatechin gallate was effective on breast cancer cells because it decreased cell viability in MCF-7 breast cancer cells, showed anti-proliferative effects and caused a decrease in the number of TUNEL positive cells.

Keywords: Apoptosis, Epigallocatechin gallate, Ki-67, MCF-7 breast cancer, Tunnel analysis



P11

SERYUM OKSİT NANOPARTİKÜLLERİNİN MCF-7 HÜCRE HATTI ÜZERİNDEKİ ANTİTÜMÖR ETKİLERİ

Zülal Atlı Sekeroğlu, Vedat Sekeroğlu, Seval Kontaş Yedier

Ordu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik, Türkiye

Kemoterapi kanser tedavisinde kullanılan en etkin metotlardan biridir ancak kanser hücreleri yanında normal dokulara da zarar veriyor olması nedeni ile çoğu zaman tedaviyi sonlandırmaya kadar giden yan etkilere sahiptir. Seryum oksit nanopartiküllerinin anti tümör ve anti-anjiyojenik mekanizmalara sahip olduğu ve radyasyon terapisine maruz kalmış kanser hücrelerinin ölümüne neden olurken çevresel dokuları ve sağlıklı hücreleri oksidatif stres hasarından koruduğu ileri sürülmüştür. Ancak bu konuda yapılmış çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. Bu çalışmada; seryum oksit (CeO) nanopartikülleri ve abraksanın (AB) tek başlarına ve birlikte kullanıldıklarında meme kanseri hücrelerinin proliferasyonu, apoptozu ve migrasyonu üzerindeki etkileri araştırılmıştır. MCF-7 hücreleri 24, 48 ve 72 saatliğine 2 μ M ABS ve/veya 10,20 ve 30 mM CeO nanopartikülleri ile muamele edilmiştir. Hücre canlılığı, apoptoz ve hücre göçü değerleri, kontrol grubuna kıyasla tüm muamelelerde önemli ölçüde değişmiştir. 30 mM CeO hem tek başına hem de AB ile birlikte kullanıldığından hücre canlılığı tek başına AB'ye göre daha fazla azalmıştır. 20 mM hem de 30 mM CeO nanopartikülleri hem tek başlarına hem de AB ile birlikte kullanıldıklarında apoptozu AB'den daha fazla indüklemiştir. 30 mM CeO tek başına ve 20 ve 30 mM CeO AB ile birlikte kullanıldığından hücre göçü tek başına AB'ye göre daha fazla düşmüştür. Bu sonuçlar, AB'nin CeO nanopartikülleri ile birlikte muamelesinin, MCF-7 hücrelerinde sitotoksite ve apoptozu artırabileceğini ve hücre göçünü azaltabileceğini göstermiştir. Bu nedenle meme kanseri tedavisinde kullanılan antikanser ilaçların CeO nanoparçacıkları ile kaplanması daha etkili sonuçlar verebilir.

Bu çalışma Ordu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu (BAP) tarafından A-2014 proje numarası ile desteklenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Seryum oksit nanopartikülleri, Abraksan, Apoptoz, Migrasyon, Meme kanseri hücreleri



P11

ANTITUMOR EFFECTS OF CERIUM OXIDE NANOPARTICLES ON THE MCF-7 CELL LINE

Zülal Atlı Sekeroğlu, Vedat Sekeroğlu, Seval Kontaş Yedier

Department of Molecular Biology and Genetics, Faculty of Science and Letters, Ordu University,
Ordu, Turkey

Chemotherapy is one of the most effective methods used in cancer treatment, but it often has side effects that lead to termination of treatment because it damages normal tissues as well as cancer cells. It has been suggested that cerium oxide nanoparticles have anti-tumor and anti-angiogenic mechanisms, and they can cause the death of cancer cells exposed to radiation therapy, while protecting peripheral tissues and healthy cells from oxidative stress damage. However, the number of studies on this subject is very limited. In this study, we investigated the effects of cerium oxide (CeO) nanoparticles and abraxane (AB) on proliferation, apoptosis and migration of breast cancer cells when used alone or together. MCF-7 cells were treated with 2 μ M AB and/or 10, 20 and 30 mM CeO nanoparticles for 24, 48 and 72 hours. Cell viability, apoptosis and cell migration values were significantly altered in all treatments compared to the control. When 30 mM CeO was used both alone and with AB, cell viability was decreased more than AB alone. Both 20 mM and 30 mM CeO when used alone and with AB induced apoptosis more than AB alone. 20 mM and 30 mM CeO when used alone or with AB induced apoptosis more than AB alone. When 30 mM CeO was used alone, and 20 and 30 mM CeO were used with AB, cell migration reduced more than AB alone. These results showed that co-treatment of AB with CeO nanoparticles can increase cytotoxicity and apoptosis and reduce cell migration in MCF-7 cells. Therefore, coating of anticancer drugs used in breast cancer treatment with CeO nanoparticles may give more effective results.

This study was supported by the Scientific Research Funding of Ordu University (Turkey) with project number A-2014.

Keywords: Cerium oxide nanoparticles, Abraxane, Apoptosis, Migration, Breast cancer cells



P12

**YENİ SENTEZLENEN 4-N-[(1-METILPIROLİDEN)AMINO]ANTİPIRİN SCHIFF
BAZI CU(II) KOMPLEKSİNİN MEME KANSERİ HÜCRELERİNDEKİ SİTOTOKSİK
VE APOPTOTİK ETKİLERİ**

Vedat Sekeroğlu¹, Aliye Gediz Ertürk², Zülal Atlı Sekeroğlu¹

¹Ordu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik, Türkiye

²Ordu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya, Türkiye

İnsan kaynaklı çeşitli normal ve kanser hücrelerinde, farklı model organizmalarda yapılan çalışmalarda, Schiff bazımetal komplekslerinin sitotoksitesi, apoptoz, DNA hasarı gibi yollarla antitümöral potansiyellerinin olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu amaçla çalışmamızda yeni sentezlenen 4-N-[(1-metilpiroliden)amino]antipirin Schiff bazı Cu(II) kompleksinin (NMPAAP-Cu), adenokarsinomlu (MCF-7) meme hücre hattında sitotoksik ve apoptotik etkileri incelenmiştir. MTT deney sonuçları, NMPAAP-Cu kompleksinin (10-2000 µM) sitotoksitesi doza ve zamana bağlı bir şekilde arttığını göstermektedir. Bu artışlar, tüm muamele süreleri için 50 µM ve yukarıdaki konsantrasyonlarda önemli bulunmuştur. AO/EB boyama sonuçları, bu kompleksin (25-250 µM) MCF-7 hücrelerinde apoptozu önemli ölçüde arttığını ortaya koymuştur. Çalışma sonuçları, NMPAAP-Cu'nun MCF-7 karsinom hücrelerine karşı bir antikanser aktivitesine sahip olduğunu göstermiştir.

Bu çalışma Ordu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu tarafından BY-1723 ve TF-1634 proje numaraları ile desteklenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Schiff baz kompleksi, Sitotoksitesi, Apoptoz, Meme kanseri



P12

CYTOTOXIC AND APOPTOTIC EFFECTS OF A NOVEL SCHIFF BASE CU (II) COMPLEXES DERIVED 4-AMINO ANTIPYRINE ON BREAST CANCER CELLS

Vedat Şekeroğlu¹, Aliye Gediz Ertürk², Zülal Atlı Şekeroğlu¹

¹Department of Molecular Biology and Genetics, Faculty of Science and Letters, Ordu University,
Ordu, Turkey

²Department of Chemistry, Faculty of Science and Letters, Ordu University, Ordu, Turkey

Schiff base-metal complexes have been revealed to have antitumoral potentials such as cytotoxicity, apoptosis, and DNA damage in various normal and cancer cells of human origin and in different model organisms. Therefore, the study aimed to investigate the cytotoxic and apoptotic activities of a newly synthesized Schiff base-Cu (II) complex (4-N-[(1-methylpyrrolidine) amino] antipyrine) (NMPAAP-Cu) in adenocarcinoma (MCF-7) breast cell line. MTT results showed that NMPAAP-Cu (10-2000 μ M) significantly increased cytotoxicity in a concentration- dependent manner. These increases were found to be significant at 50 μ M and above concentrations for all treatment times. AO/EB staining results revealed that this complex (25-250 μ M) significantly increased apoptosis in MCF-7 cells. The study results indicated that the NMPAAP-Cu has an anticancer activity against MCF-7 carcinoma cells.

This study was supported by the Scientific Research Funding of Ordu University with project numbers BY-1723 and TF-1634.

Keywords: Schiff base complex, Cytotoxicity, Apoptosis, Breast cancer



P13

**HÜCRE DÖNGÜSÜ DÜZENLEYİCİ PROTEİN OLAN HN1'IN SHSY-5Y
HÜCRELERİNDE PARKIN İLE ANTAGONİSTİK İLİŞKİSİ****Sevda Altun**, Aadil Javed, Gülseren Özduzman, Kemal Sami Korkmaz

Ege Üniversitesi, Mühendislik, Biyomühendislik, Türkiye

Giriş: Prostat kanseri hücrelerinde y-tübulin ile etkileşime giren Hematolojik ve Nörolojik Eksprese 1 (HN1), hücre döngüsü ile ilişkili bir proteindir. Hematolojik ve nörolojik dokularda belirgin ifade gösternesinden sonra HN1 adını almıştır. SHSY-5Y, nöronlara farklılaşabilen bir nöroblastom hücre hattıdır. E3 Ubikitin ligaz olan Parkin, SHSY-5Y hücrelerinde hücre döngüsü düzenleyici proteinleri modüle eder. Hücre döngüsü düzenleyici protein olan HN1'in Parkin düzenleyicisi olarak hücre döngüsüne aracılık etmesindeki rolü henüz araştırılmamıştır.

Materyal ve Metotlar: SHSY-5Y hücrelerinde HN1'in yüksek ifadesini sağlamak için Tet-ON sistem kullanarak HN1-uyarılabilir SHSY-5Y-pCW57-HMHN1 ve SHSY-5Y-pCW57-HN1-Venus hücreleri (kontrol hücreleriyle birlikte) kurulmuştur. HN1 yüksek ifadesinin, SHSY-5Y hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkisi Tripan mavisi yöntemi ile belirlenmiştir. pCW57-HMHN1 hücrelerinde doksisiklin kullanılarak HN1 yüksek ifadesinin Parkin, Cyclin B1 ve Cdh1'in ekspresyonundaki faza özgü değişikliklerini anlamak için hücre döngüsü senkronizasyonları yapılarak seviyesel değişiklikler western blotlama yöntemiyle gösterilmiştir.

Bulgular: HM-HN1 ve HN1-Venus Tet-ON ifadeleri ektopik bantlar western blotlama yöntemiyle doğrulandı. HN1 ile uyarlanan SHSY-5Y hücrelerinde proliferasyon seviyesi, HN1 doğal ifadesi olan kontrol hücrelerine oranla daha düşük gözlandı. HN1 doğal ifadesinin seviyesinde, hücre döngüsünün S-fazında belirgin bir artış gözlandı. Ayrıca, HN1'in yüksek ifadesinin S, G2 ve mitozda Parkin seviyesinin azalmasına neden olurken, CDK1 inhibitörü ile muamele edilen hücrelerde azalma görülmeli. HN1'in yüksek ifadesi, Cdh1 ekspresyonunu önemli ölçüde stabilize ederken, G2 tutuklanmasıından sonra G1'e salınan hücrelerde Parkin ve Cyclin B1 seviyelerinin azalmasına neden olduğu gözlandı.

Tartışma: HN1 yüksek ifadesinin Parkin'nin koaktivatörü olan Cdh1'i stabilize etmesi, HN1'in Parkin üzerindeki etkisinin anlaşılmasımda kilit bir noktadır. HN1'in yüksek ifadesiyle S-fazında Parkin'in seviyesinin azalması, HN1'in Parkin ile antagonistik bir ilişkisi olduğunu gösterir.

Sonuçlar: SHSY-5Y hücrelerinde, hücre döngüsü düzenleyici protein olan HN1'in hücre döngüsünün farklı fazlarında farklı seviyelere sahip olan bir protein olduğu belirlenmiştir. HN1'in yüksek ifadesi Parkin koaktivatörü Cdh1 stabilize ederken, protein seviyesinin ise azalmasına neden olmaktadır.

Anahtar Kelimeler: HN1, Hücre Döngüsü, Parkin, Nöroblastom



P13

HN1 IS A CELL CYCLE REGULATORY PROTEIN WITH ANTAGONISTIC RELATIONSHIP WITH PARKIN IN SHSY-5Y CELLS

Sevda Altun, Aadil Javed, Gülsären Özduman, Kemal Sami Korkmaz

Cancer Biology Laboratory, Department of Bioengineering, Ege University, Bornova (35040), İzmir,
Turkey

Introduction: Hematological and Neurological Expressed 1 (HN1) is a cell cycle-related protein interacting with γ -tubulin in prostate cancer cells. It was named after showing significant expression in hematological and neurological tissues. SHSY-5Y is a neuroblastoma cell line capable of differentiating into neurons. The native expression of HN1 in SHSY-5Y cells has not been recorded. Parkin is an E3 Ubiquitin ligase active in SHSY-5Y, modulates the cell cycle regulatory proteins in SHSY-5Y cells. Since HN1 is a cell cycle regulatory protein, its role in mediating the cell cycle as a regulator of Parkin is yet to be investigated and is the aim of this study.

Materials and Methods: We established HN1-inducible SHSY-5Y-pCW57-HMHN1 and SHSY-5Y-pCW57-HN1-Venus cells (along with mock control cells) to overexpress HN1 in SHSY-5Y cells utilizing the All-in-one Tet-ON system. Trypan Blue assay was used to determine the effect of HN1 overexpression on the proliferation of SHSY-5Y cells. Cell cycle synchronizations were performed to understand the phase-specific changes in the expression of Parkin, Cyclin B1, and Cdh1 by HN1 induction using doxycycline in pCW57-HMHN1 cells and measured by western blot method.

Results: The distinct ectopic bands for HM-HN1 and HN1-Venus by western blotting validated the Tet-ON system. HN1 overexpression resulted in a significantly reduced proliferation rate in HN1-induced SHSY-5Y cells as compared to control cells. HN1 native expression fluctuates during the cell cycle with a sharp increase in S-phase. Furthermore, HN1 overexpression resulted in a decline of Parkin levels in S, G2, and mitosis but not in CDK1 inhibitor-treated cells. HN1 overexpression significantly stabilized Cdh1 expression, however, reduced the Parkin and Cyclin B1 levels in the cells released into G1 after G2 arrest.

Discussion: HN1 overexpression stabilizing Cdh1 is a key point in understanding the effect of HN1 on Parkin as Cdh1 is one of the co-activator of Parkin. HN1 overexpression resulting in depleted Parkin in S-phase shows that HN1 has an antagonistic relationship with Parkin.

Conclusions: HN1 is a cell cycle regulatory protein in SHSY-5Y cells with oscillating protein levels in different phases of the cell cycle. Its overexpression stabilizes the co-activator Cdh1 of Parkin but reduces its protein levels.

Keywords: HN1, Cell Cycle, Parkin, Neuroblastoma



P15

METASTATİK PROSTAT KANSERİ GELİŞİMİNDE KRONİK ENFLAMATUAR MİKROÇEVRE İLE TETİKLENEN EPİTELİYAL MEZENKİMAL GEÇİŞ VE ANOİKİS DİRENÇİ

Elif İşel¹, Bilge Debelep Bütüner²

¹Ege Üniversitesi/Kongre, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji, Türkiye

²Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Biyoteknoloji ABD, Türkiye

Giriş: Kronik enflamasyonun epitelyal mezenkimal geçiş (EMT) mekanizmasını tetikleyerek epitel hücrelerin mezenkimal karakter kazanmasını teşvik ettiği ve metastatik prostat kanseri (PCa) gelişimine katkı sağladığı bilinmektedir. Intravazasyon yapan mezenkimal karakterdeki tümör hücreleri, damar içerisinde seyahat ederken anoikis direnci olarak adlandırılan apoptozdan kaçma mekanizması ile hayatı kalır. Enflamatuar ortamda, prostat hücrelerine spesifik tümör baskılacak olan NKX3.1 proteininin, yıkama uğradığı ve migrasyonu tetiklediği bilinmektedir. NKX3.1 geninin kaybının EMT profili üzerindeki etkisi, bu genin tekrar hücrelere kazandırılması durumunda EMT değişimi ve anoikis direnci üzerindeki etkisi bilinmemektedir. Bu amaçla, NKX3.1 ekspresyonu olan ve olmayan in vitro kronik enflamatuar hücre kültürü modeli tasarlandı.

Materyal ve Metotlar: U937 monosit hücreleri makrofajlara farklılaştırıldı ve makrofajlar sitokin salımı için indüklenerek 'şartlandırılmış ortam' (CM) elde edildi. CM içerisindeki TNF- α ve TGF- β 1 sitokin konsantrasyonları Elisa yöntemiyle ölçüldü. Prostat kanseri lenf nodu metastazi hücre hattı LNCaP hücreleri, belirlenen dozlarda CM ortamında iki hafta kültür edilerek in vitro kronik enflamatuar bir hücre kültürü modeli oluşturuldu. Enflamatuar mikroçevrede tetiklenen EMT aktivasyonunun hücreler üzerindeki etkisi, morfolojik değişimin ışık mikroskopunda izlenmesiyle ve EMT ilişkili markerların immünlöjik işaretlemesiyle araştırıldı. Hücre canlılığı WST-1, anoikis direnci anoikis protokolü ile analiz edildi.

Bulgular: LNCaP hücreleri 2,5/250, 5/500, 10/1000 ve 20/2000 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 konsantrasyonlarına sahip CM ile 1-2 hafta kültür edildi. Hücrelerde mezenkimal-benzeri morfolojik değişim gözlandı. İmmünlöjik analizlere göre, artan TNF- α /TGF- β 1 konsantrasyonları ile doğru orantılı olarak vimentin ve α -SMA gibi EMT ilişkili belirteçlerin ekspresyonunun artışı saptandı. TNF- α /TGF- β 1 konsantrasyon artışına bağlı olarak hücrelerdeki canlılığın ve metabolik hızın azaldığı, NKX3.1 ekspresyonu kazandırılmasının da hücre canlılığını ve anoikis direncini baskıladığı gözlandı.

Tartışma: Tümör baskılacak fonksiyon gösteren NKX3.1, normal prostat hücrelerinde hücre canlılığını destekleyici bir rol oynarken, stres koşullarında hücre canlılığını baskıladığı ve kronik enfiamasyon ile artan anoikis direncini baskıladığı sonucuna varıldı.

Sonuç: Metastatik PCa gelişiminde kronik enflamatuar mikroçevre ile tetiklenen EMT ve anoikis direnci, NKX3.1 proteinin fonksiyonu ile ilişkilidir. EMT ilişkili başka belirteçlerin protein seviyelerindeki değişimini incelenmesini gerektiren ek çalışmalarla ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: prostat kanseri, enfiamasyon, EMT, anoikis



P15

EPIHELIAL MESENCHYMAL TRANSITION AND ANOIKIS RESISTANCE INDUCED IN CHRONIC INFLAMMATORY MICROENVIRONMENT IN METASTATIC PROSTATE CANCER

Elif İsel¹, Bilge Debelec Butuner²

¹Ege University, Dept. of Biotechnology, Bornova, 35100, Izmir, Turkey

²Ege University, Faculty of Pharmacy, Dept. of Pharmaceutical Biotechnology, Bornova, 35100, Izmir, Turkey

Introduction: Chronic inflammation triggers the epithelial-mesenchymal transition (EMT) mechanism, promoting the mesenchymal characterization of epithelial cells and contributing to the development of metastatic prostate cancer (PCa). Intravasating tumor cells with mesenchymal character survive through escaping from apoptosis, called anoikis resistance, while traveling through the vessel. The NKX3.1 protein, which is a tumor suppressor specific to prostate cells, is known to degrade in the inflammatory environment and trigger migration. Cellular effects of both NKX3.1 loss and its recovery on EMT change and anoikis resistance is still unknown. For this purpose, a unique *in vitro* chronic inflammatory cell culture model w/wo NKX3.1 overexpression has been established.

Materials and Methods: U937 monocyte cells were differentiated into macrophages, they were induced for cytokine release and conditioned media (CM) collected TNF- α and TGF- β 1 cytokine concentrations in CM were measured by Elisa. An *in vitro* chronic inflammatory cell culture model was established by culturing prostate cancer lymph node metastasis cell line LNCaP cells in CM medium at specified doses for 1-2 weeks. Cellular effects of EMT activation induced by inflammatory environment was investigated by visualizing morphological changes under light microscopy, and the immunofluorescent labeling of EMT-related markers. Metabolic rate and anoikis resistance of cells was analyzed by WST-1 assay and anoikis assay sequentially.

Results: LNCaP cells were cultured for 1-2 weeks with CM with TNF- α /TGF- β 1 concentrations of 2.5/250, 5/500, 10/1000 and 20/2000 pg/ml. Mezenchyme-like morphological changes were observed under microscope. According to the immunofluorescence analysis, levels of EMT-related markers such as vimentin and α -SMA was determined to increase in correlation with the increasing TNF- α /TGF- β 1 concentrations. At the end of two weeks, NKX3.1 was overexpressed into the cells. Depending on the increasing TNF- α /TGF- β 1 concentrations, the viability and metabolic rate of the cells were observed to decreased, however, cell viability and anoikis resistance were suppressed in the cells with restored NKX3.1 expression.

Discussion: It is suggested that NKX3.1, which is a tumor suppressor support cell survival in normal prostate cells, however, it suppresses cell proliferation and anoikis resistance in chronic inflammatory microenvironment.

Conclusion: EMT and anoikis resistance triggered by the chronic inflammatory microenvironment in metastatic PCa development are associated with the function of the NKX3.1 protein. Additional studies are needed to examine changes in protein levels of other EMT-related biomarkers.

Keywords: prostate cancer, inflammation, EMT, anoikis



P16

MYOMLARDA OTOFAJİ BELİRTEÇLERİNİN İMMUNOHİSTOKİMYASAL OLARAK İNCELENMESİ

Eren Akbaba, Nazlı Can

Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum AD, Türkiye

Giriş: Fizyopatolojik olarak miyometriumdan köken alan, değişen miktarda fibröz doku içeren iyi huylu düz kas tümörleridir. Myomların oluşum mekanizmaları programlı hücre ölüm mekanizmaları ile etkileşimleri birçok çalışmaya konumasına rağmen sağlıklı endometrial dokuda etkinliği daha önceki çalışmalarında gösterilmiş olan ve otofajı ve myomlarla ilgili literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Otofajı; hücrenin açılıyla karşılaşacağı fizyolojik koşullarda, ihtiyaç duyduğu besin öğelerini kazanabilmek için sitoplazmada bulunan bazı proteinlerin, hücreye ait organellerin ve diğer yapıların lizozomal kompartıman içinde yıkıma uğratıldığı hücresel bir yolağı da ifade etmektedir. Biz bu çalışmada, myom patogenezinde, otofajı mekanizmasında görev alan Beclin-1, Atg5, Atg12, Atg16, LC3 p62 belirteçlerinde olası değişiklikleri incelemeyi, myom patogenezinde, otofajı mekanizmasında meydana gelen değişiklikleri araştırmayı ve elde edilen verilerle yeni yapılacak olan çalışmalara ışık tutmayı hedeflemekteyiz.

Materyal Metod: Bu çalışmaya Muğla Eğitim Araştırma Hastanesi patoloji laboratuvarında doku blokları arşivlenen bireylere ait doku örnekleri dahil edilmiştir.

Grup1. Çalışma grubu (n=50); histopatolojik myom tanısı konan bireylere ait dokuların dahil edildiği grup

Grup2. Kontrol grubu (n=50); histopatolojik olarak histerektomi piesinde miyom saptanmayan bireylere ait dokuların dahil edildiği grup

Bulgular: Çalışmaya aldığımız olguların toplam sayısı 100 dır. Yaş dağılımı 25-88 arasında olup, ortalama yaş 45,67 dir. Otofajı belirteçleri ile yapılan immunohistokimyasal boyama sonrası elde edilen h skor değerleri ATG5,12,16 belirteçlerinde çalışma grubunda en yüksek düzeyde bulunurken ($p=0,000$). p62, LC3A/B, Beclin-1 belirteçlerinde de anlamlı artış gözlenmiştir. ($p\leq0,05$).

Tartışma: Endometrial miyomlar kadın nüfusunun büyük bir kısmını etkileyen günlük yaşıntıda aşırı kanama gibi semptomlar gösteren ve bireyin yaşam kalitesini düşüren ayrıca malinite yönünde ilerleyebilen benign oluşumlardır. Endometrial oluşumların moleküller mekanizmalarının çözümlenmesi otofajı mekanizmasında olabilecek olası değişiklıkların eski haline getirerek endometrial miyomları tedavi etmek için terapötik bir strateji olarak karşımıza çıkabileceği gibi yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinin ilk ayağıdır. Biz bu çalışma ile miyom dokusu ile histerektomi piesinde miyom saptanmayan bireylere ait endometriyum dokusu arasındaki otofajik değişimleri inceledik ve farklı sonuçlar elde ettik. Daha fazla olgu ile moleküller ve elektron mikroskopik tekniklerle destekleyecek çalışmalara ihtiyaç olduğu kanaatindeyiz.

Sonuç: Otofajının düzenlenmesindeki temel moleküller mekanizmaları ve otofajının tümör hücrelerindeki rolü tam olarak açıklanamamaktadır. Bununla birlikte, otofajının farmakolojik olarak düzenlenmesi yaklaşımı, tümörün yok edilmesinde yeni tedavi stratejileri için önemli klinik potansiyele sahiptir.

Anahtar Kelimeler: Miyom, otofajı, immunohistokimya



P16

IMMUNOHISTOCHEMICAL EXAMINATION OF AUTOPHAGY MARKERS IN MYOMAS

Eren Akbaba, Nazlı Can

Dept. of Obstetrics and Gynecology, Medicine Faculty, Muğla Sıtkı Koçman University, Muğla,
Turkey

Introduction: Physiopathologically, they are benign smooth muscle tumors originating from the myometrium and containing varying amounts of fibrous tissue. The formation mechanisms of fibroids and their interactions with programmed cell death mechanisms have been the subject of many studies. however, no study was found in the literature on autophagy and myomas. autophagy; It is a cellular pathway in which some proteins, cell organelles and other structures in the cytoplasm are destroyed in the lysosomal compartment in order to gain the nutrients it needs in physiological conditions where the cell faces hunger. In this study, we aim to examine the possible changes in Beclin-1, Atg5, Atg12, Atg16, LC3 p62 markers that are involved in the autophagy mechanism in myoma pathogenesis, to investigate the changes in the autophagy mechanism in the myoma pathogenesis, and to shed light on the new studies to be done with the data obtained.

Material and Method: Tissue samples of individuals whose tissue blocks were archived in the pathology laboratory of Muğla Training and Research Hospital were included in this study.

Group1. Study group (n=50); The group in which tissues belonging to individuals diagnosed with histopathological myoma are included

Group2. Control group (n=50); The group in which tissues belonging to individuals whose fibroids were not detected histopathologically in the hysterectomy pie were included

Results: The total number of cases included in the study is 100. The age distribution is between 25 and 88, and the mean age is 45.67. While the h score values obtained after immunohistochemical staining with autophagy markers were the highest in the study group for ATG5,12,16 markers ($p=0.000$). Significant increases were also observed in p62, LC3A/B, Beclin-1 markers ($p\leq0.05$).

Discussion: Endometrial fibroids are benign formations that affect a large part of the female population, show symptoms such as excessive bleeding in daily life, reduce the quality of life of the individual, and may progress towards malignancy. The analysis of the molecular mechanisms of endometrial formations may appear as a therapeutic strategy to treat endometrial fibroids by restoring possible changes in the autophagy mechanism, and is the first step in the development of new treatment methods. In this study, we examined the autophagic changes between the fibroid tissue and the endometrial tissue of individuals whose fibroids were not detected in the hysterectomy pie, and we obtained different results. We believe that there is a need for studies to support more cases with molecular and electron microscopic techniques.

Conclusion: The basic molecular mechanisms in the regulation of autophagy and the role of autophagy in tumor cells cannot be fully explained. However, the approach of pharmacological regulation of autophagy has significant clinical potential for new treatment strategies in tumor eradication.

Keywords: Myoma, autophagy, immunohistochemistry



P17

YUMURTALIK KANSERİ HÜCRE HATTI OLAN SKOV-3 HÜCRELERİNDE USNİK ASİT MOLEKÜLÜNÜN APOPTOTİK ETKISİNİN mRNA SEVİYESİNDE ARAŞTIRILMASI

Zehra Sena Bumin, Demet Cansaran Duman

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Türkiye

Kadınlarda en ölümcül jinekolojik kanser türlerinden biri olan yumurtalık kanseri, günümüzde geç evrelerde teşhis edilmektedir. Ovaryum kanserinde konvansiyonel tedavi yöntemleri ile henüz tam etkili bir tedavi yöntemi elde edilememiştir (1,2). Kemoterapötikler yumurtalık kanseri için standart bir tedavi yöntemi olarak kullanılır, ancak kemoterapötik tedavi yöntemleri ile elde edilen umut verici sonuçlar hastalığın erken evrelerinde gözlenmektedir (1,2). Hasta, yumurtalık kanserinin rutin tedavisinde kullanılan kemoterapötiklere zaman içerisinde direnç geliştirir (2). Ayrıca, geleneksel tedavilerde kullanılan moleküller, zamanla hasta üzerinde toksik etki gösterir (2,3). Usnik Asit (UA) likenlerde bol bulunan bir liken ikincil metabolittir (4). UA'nın anti-kanser, anti-enflamatuar ve antimikrobiyal özelliklere sahip olduğu yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (4,5). Bu çalışma, UA'nın terapötik etkilerini inceleyerek, toksik etkisi olmayan ve doğal bir aday ilaç molekülü olarak UA'nın yumurtalık kanseri tedavisindeki mevcut tedavilere ek yenilikçi bir tedavi yaklaşımı olarak kullanımını belirlemeyi amaçlamaktadır.

XCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analizi (xCELLigence RTCA) ile SKOV-3 ovaryum kanser hücrelerine ilaç aday molekülü UA uygulandıktan sonra sitotoksik etkisi ve sonrasında IC50 dozu belirlendi. Buna ek olarak, dört adet apoptoz yolu ile ilgili genin ifade seviyesi gerçek zamanlı kantitatif PCR (qRT-PCR) ile belirlendi. Bu çalışma sonucunda, UA molekülü uygulanması sonucu SKOV-3 hücrelerinde doz ve zamana bağlı olarak anti-proliferatif etki ve hücre canlılığında azalma gözlandı. UA molekülünün IC50 konsantrasyonu 8.75 μ M olarak belirlendi. UA molekülünün uygulandıktan 10 saat sonra istenilen etkiyi gösterdiği gözlandı. Ayrıca qRT-PCR deneylerinin sonuçları, UA uygulanmasının gen ifadesi düzeyini mRNA seviyesinde önemli ölçüde düzenlediği gösterilmiştir. Kaspaz 3, Kaspaz 8, Kaspaz 1 genlerinin ifade seviyesinde önemli bir artış ve Bcl-2 geninin ifade seviyesinde azalma gözlenmiştir. Bu çalışma literatürde UA'nın SKOV-3 yumurtalık kanseri hücreleri üzerindeki anti-proliferatif ve apoptotik etkisini belirleyen ilk çalışmıştır. UA'nın yumurtalık kanseri tedavisi için bir ilaç adayı molekül olarak kullanılma potansiyelini değerlendirmek için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

Referanslar:

1. Jayson GC, Kohn EC, Kitchener HC, Ledermann JA. Ovarian cancer. *The Lancet*. 2014;384(9951):1376–88.
2. Norouzi-Barough L, Sarookhani MR, Sharifi M, Moghbelinejad S, Jangjoo S, Salehi R. Molecular mechanisms of drug resistance in ovarian cancer. *Journal of Cellular Physiology*. 2018;233(6):4546–62.
3. Cho KR, Shih I-M. Ovarian cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2009;4(1):287–313.
4. Luzina OA, Salakhutdinov NF. Usnic Acid and its derivatives for pharmaceutical use: A Patent Review (2000–2017). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 2018;28(6):477–91.
5. Mayer M, O'Neill MA, Murray KE, Santos-Magalhães NS, Carneiro-Leão AM, Thompson AM, et al. Usnic acid: A non-genotoxic compound with anti-cancer properties. *Anti-Cancer Drugs*. 2005;16(8):805–9.

Anahtar Kelimeler: Yumurtalık Kanseri, Usnik Asit, Anti-proliferatif Etki, Apoptoz



P17

INVESTIGATION OF APOPTOTIC EFFECTS OF USNIC ACID IN mRNA LEVEL IN OVARIAN CANCER SKOV-3 CELL LINE

Sena Bumin, Demet Cansaran-Duman

Ankara University, Biotechnology Institute, Kecioren, Ankara, Turkey

Ovarian cancer, one of the deadliest types of gynecological cancer in women, is primarily diagnosed in late stages today, and fully effective treatment has not yet been obtained with the conventional treatment methods (1,2). Chemotherapeutics are used as a standard treatment method for ovarian cancer, but with chemotherapeutic treatment methods, promising results are obtained primarily in the early stages of the disease (1,2). The patient develops resistance to chemotherapeutics used in the routine treatment of ovarian cancer stage (2). Additionally, the molecules used in traditional treatments develop toxic effects on the patient over time (2,3). Usnic Acid (UA) is a lichen secondary metabolite abundant in lichenized fungi (4). UA has some biological effects as anti-cancer, anti-inflammatory and antimicrobial activities (4,5). This study aims to investigate the therapeutic effects of UA as a candidate drug molecule, which is a promising natural and innovative treatment option that has no toxic effect in the treatment of ovarian cancer in addition to existing therapies.

XCELLigence Real-Time Cell Analysis (xCELLigence RTCA) assay is performed to determine the anti-proliferative effect after applying the UA drug candidate molecule and IC₅₀ dose on SKOV-3 cells. In addition, the determination of the expression level of the four apoptosis pathway related genes is examined with real-time quantitative PCR (qRT-PCR) in UA-treated cells. As a result of this study, UA anti-proliferative effect was showed a dose- and time-dependent reduction of cell viability after UA exposure on SKOV-3 ovarian cancer cells. IC₅₀ concentration of UA is found at 8.75 µM and most effective upon 10 h of UA application. Moreover, the results of qRT-PCR experiments demonstrated that UA treatment significantly regulated gene expression level as increases in Caspase 3, Caspase 8, Caspase 1 and a decrease of Bcl-2 at mRNA level. This study is the first in the literature to determine the anti-proliferative and apoptotic effect of UA on SKOV-3 ovarian cancer cells. Further research needs to be conducted to assess the potential of UA as a drug candidate molecule for the treatment of ovarian cancer.

References:

1. Jayson GC, Kohn EC, Kitchener HC, Ledermann JA. Ovarian cancer. *The Lancet*. 2014;384(9951):1376–88.
2. Norouzi-Barough L, Sarookhani MR, Sharifi M, Moghbelinejad S, Jangjoo S, Salehi R. Molecular mechanisms of drug resistance in ovarian cancer. *Journal of Cellular Physiology*. 2018;233(6):4546–62.
3. Cho KR, Shih I-M. Ovarian cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2009;4(1):287–313.
4. Luzina OA, Salakhutdinov NF. Usnic Acid and its derivatives for pharmaceutical use: A Patent Review (2000–2017). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 2018;28(6):477–91.
5. Mayer M, O'Neill MA, Murray KE, Santos-Magalhães NS, Carneiro-Leão AM, Thompson AM, et al. Usnic acid: A non-genotoxic compound with anti-cancer properties. *Anti-Cancer Drugs*. 2005;16(8):805–9.

Keywords: Ovarian Cancer, Usnic Acid, Anti-Proliferative effect, Apoptosis



P19

TUZ STRESİ ALTINDA YETİŞTİRİLEN CISTUS RETICULUS L.'İN PANKREATİK KANSER HÜCRE HATLARINDA ANTI-KANSER ETKİLERİNİN İNCELEMESİ

Burçin Özbekle, Yağmur Arıkan, Bahar Yıldız Kutman, Elif Damla Arısan

Gebze Teknik Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Biyoteknoloji, Türkiye

Giriş: *C.creticus*, Türkiye'nin Akdeniz Bölgesi'nde doğal olarak yetişen tıbbi ve aromatik bitkilerden biridir. *C.creticus*, biyoaktif maddeler açısından oldukça zengindir ve 92 farklı terpen ve 12 farklı fenilpropanoid flavonoid içerir. Önceki çalışmalar, *C.creticus* özütünün meme kanseri hattı, rahim ağzı kanseri hattı, lösemi ve melanom hattı üzerinde etkili olduğunu göstermiştir. Bitkiler tuzluluk stresine maruz kaldıklarında; morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal değişiklikler meydana gelir. Pankreas duktal adenokarsinomu (PDAC), kanser ölümünün dördüncü onde gelen nedenidir. Bu nedenle, bu çalışma, artan tuzluluk stres koşullarına bağlı olarak pankreas kanseri hücre hatlarında *C.creticus* ekstraktlarının hücre sağkalımı, otofaji ve apoptoz üzerindeki anti-kanser etkilerini göstermektedir.

Materyal ve Metotlar: PANC-1, MIAPaCa-2 ve AsPC-1 hücrelerinde *C.creticus*'un hücre sağkalımı ve ölümü üzerindeki terapötik etkilerini incelemek üzere; metabolik aktiviteyi, hücre canlılığını ve proliferasyon ölçmek için 24 saatlik muameleden sonra MTT tahlili, koloni oluşturma tahlili, floresan boyama, immünoblotlama ve akış sitometrisi yapıldı. ROS oluşumu DCFDA boyası ile ölçüldü ve mitokondriyal değişiklikler MitoTracker RedCMXRos boyası ile gözlemlendi. Hücre döngüsü değişikliklerini gözlemlemek için akış sitometrisi kullanıldı. Otofaji ve apoptotik hücre ölüm yolu belirteçlerini araştırmak ve protein ekspresyonu miktarını ölçmek için Western blot yapıldı.

Bulgular: MIAPaCa-2 ve PANC-1 hücreleri için artan dozlardaki *C.creticus*'un etanol ekstraksiyonunun hücre canlılık oranı, su ekstraksiyon yöntemine göre önemli ölçüde azalmıştır. Hücrelerdeki mitokondri birikimi, *C.creticus*'un su ekstraktlarından ziyade üç hücre hattının tümü için etanol ekstraktlarının kullanılmasıyla önemli ölçüde azaldı. 150 µg/ml *C.creticus* konsantrasyonu kullanıldıktan sonra tüm hücre tiplerinin koloni oluşumu azaldı. Muameleye karşı hücrelerin ROS oluşumu, kontrol grubuna göre her üç hücre hattında da azaldı.

Tartışma ve Sonuç: *C.creticus*, PDAC için potansiyel olarak faydalı bir hedef olabilir. *C.creticus* bitkisinin etanol ekstraksiyonu pankreas kanseri hücrelerinde tedavi edici öneme sahip olduğu görülmüştür. EtOH, bitkilerden polifenol ekstraksiyonu için sudan daha iyi bir çözücü olduğundan, etanol ekstraksiyon yöntemi daha başarılı anti-kanser etkilere sahiptir. Deneysel verilerden sonra, artan *C.creticus* konsantrasyonunun hücre canlılığı, azaltılmış koloni oluşumu ve hücre proliferasyonu üzerinde önemli etkileri olmuştur. Ayrıca tedaviye karşı reaktif oksijen türlerinin azalması, *C.creticus*'un pankreas kanseri tedavisine karşı yararlı bir antioksidan olduğunu kanıtlamıştır.

Anahtar Kelimeler: Pankreatik duktal adenokarsinom, *Cistus creticus* L., hücre ölümü, hücre sağkalımı, tuzluluk stresi



P19

**INVESTIGATION OF ANTI-CANCER EFFECTS OF CISTUS RETICULUS L.
GROWN UNDER SALINITY STRESS IN PANCREATIC CANCER CELL LINES**

Burçin Özbekle, Yağmur Arıkan, Bahar Yıldız Kutman, Elif Damla Arısan

Institute of Biotechnology, Gebze Technical University, 41400 Kocaeli, Turkey

Introduction: *C.creticus* is one of the medicinal and aromatic plants that grows naturally in the Mediterranean Region of Turkey. *C.creticus* is very rich in bioactive substances and contains 92 different terpenes and 12 different phenylpropanoid flavonoids. Previous studies showed that the *C.creticus* extract is effective on breast cancer line, cervical cancer line, leukemia, and melanoma line. When plants are exposed to salinity stress; morphological, physiological and biochemical changes occur. Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is the fourth leading cause of cancer death. Thus, this study highlights the anti-cancer effects of *C.creticus* extracts on cell survival, autophagy and apoptosis in pancreatic cancer cell lines depending on the increased salinity stress conditions.

Materials and Methods: For examining the therapeutic effects of *C.creticus* on cell survival and death in PANC-1, MIAPaCa-2 and AsPC-1 cells; MTT assay, colony formation assay, fluorescent staining, immunoblotting and flow cytometry were performed after 24 hours of treatment to measure metabolic activity, cell viability and proliferation. ROS formation was measured by DCFDA dye and mitochondrial changes was observed by MitoTracker RedCMXRos dye. Flow cytometry was used to observe cell cycle changes. Western blotting was performed to measure the amount of protein expression to investigate autophagy and apoptotic cell death pathway markers.

Results: Cell viability rate was significantly decreased with increasing ethanol extraction of *C.creticus* doses for MIAPaCa-2 and PANC-1 cells than water extraction method. Mitochondria accumulation in cells was significantly decreased by using ethanol-extracts for all three cell lines than water-extracts of *C.creticus*. Colony formation of all cell types was reduced after using 150 µg/ml of *C.creticus* concentration. ROS formation of cells against treatment was decreased in all three cell lines in respect to control group.

Discussion and Conclusion: *C.creticus* could be a potential useful target for PDAC. Ethanol extraction of *C.creticus* plant has therapeutic importance in pancreatic cancer cells. Ethanol extraction method had more successful anti-cancer effects because EtOH is a better solvent for polyphenol extraction from plants than water. After experimental data, increasing concentration of *C.creticus* had significant effects on cell viability, reduced colony formation and cell proliferation. Also, reduced reactive oxygen species against treatment proved that *C.creticus* is an useful antioxidant against pancreatic cancer therapy.

Keywords: pancreatic ductal adenocarcinoma, *Cistus creticus* L., cell death, cell survival, salinity stress



P20

MATERNAL SİRKADİYEN RİTİM DEĞİŞİKLİĞİNİN ERİŞKİN YAVRU OVARYUM DOKULARINDA HÜCRE PROLİFERASYONU VE APOPTOZ ÜZERİNE EPIGENETİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**Gamze Zengin**, Gizem Gamze Tas, Leyla Satı

Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AD, Türkiye

Giriş: Üreme sistemi, fotoperiyodik işaretler ile aydınlichkeit/karanlık döngüsüne bağlı olan düzenli ve hassas bir ritmiklik sergiler. Maternal sirkadiyen ritim bozulmasının, anne de olduğu kadar yavru soylarda özellikle üreme sistemi ve metabolik sağlık açısından etkileri tam olarak bilinmemektedir. Çalışmamızda, gebelik ve laktasyon dönemlerinde maternal sirkadiyen ritim değişikliği ile erişkin dönemde gelen yavruların ovaryumlarındaki hücre ölümü ve proliferasyon arasındaki olası ilişkinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metotlar: Çalışmamızda gebelik ve laktasyon süreçlerinde anneler kontrol (12 saat aydınlichkeit/12 saat karanlık), kısa gün (KG; 8 saat aydınlichkeit/16 saat karanlık) ve uzun gün (UG; 16 saat aydınlichkeit/8 saat karanlık) periyotlarına bırakılmıştır. Annenin gebelik ve laktasyon dönemindeki koşularına bağlı olarak yavrular, kontrol, kısa gün gebelik (KG-G), kısa gün laktasyon (KG-L), kısa gün gebelik ve laktasyon (KG-G+L), uzun gün gebelik (UG-G), uzun gün laktasyon (UG-L), uzun gün gebelik ve laktasyon (UG-G+L) alt kategorilere ayrılmıştır ($n=5$ sıçan/grup). Postnatal 90. günde ovaryum dokuları alınarak immünohistokimya yöntemi ile ovaryum foliküllerindeki (primordiyal, primer, sekonder, preantral, antral), aktif kaspaz-3 (apoptoz belirteci) ve PCNA (proliferasyon belirteci) proteinlerinin ekspresyonları, boyanma şiddeti (0: boyanma yok, 1: zayıf, 2: orta, 3: güçlü) ve boyanma alanı (%50'den az ise 1, %50'ye eşit veya daha fazla ise 2) çarpımı skorlanarak değerlendirilmiştir.

Bulgular: PCNA proteini, KG-G grubunda sekonder, preantral ve antral foliküllerin granuloza hücrelerinde belirgin şekilde azalan bir ekspresyon göstermiştir ($p<0,05$). Aktif Kaspaz-3 proteini açısından ise tüm deney gruplarında özellikle primer ve antral foliküllerin granuloza hücrelerinde anlamlı bir artış izlenmiştir ($p<0,05$).

Tartışma: Granuloza hücreleri, ovaryumda folikül büyümesi ve ovulasyonda önemli rol oynar. Farklı doku ve sistemlerde sirkadiyen saat ile proliferasyon ve apoptoz arasındaki ilişkiyi gösteren çalışmalar mevcuttur. Çalışmamızda da deney gruplarında apoptozun özellikle primer ve antral foliküllerde arttığı gösterilmiştir.

Sonuç: Bulgularımız, gebelik ve laktasyon süreçlerindeki maternal sirkadiyen ritim değişikliğinin epigenetik olarak yavru ovaryumlarında hücre proliferasyonu ve apoptoz dengesini, ayrıca folikülogenezi etkileyebileceğini ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: Sirkadiyen ritim, Epigenetik, Ovaryum, Proliferasyon, Apoptoz



P20

INVESTIGATION OF THE EPIGENETIC EFFECTS OF MATERNAL CIRCADIAN RHYTHM CHANGES ON CELL PROLIFERATION AND APOPTOSIS IN ADULT OFFSPRING OVARIAN TISSUES

Gamze Zengin, Gizem Gamze Tas, Leyla Sati

Akdeniz University School of Medicine, Department of Histology and Embryology, Antalya, Turkey

Introduction: The reproductive system exhibits steady and critical rhythmicity that is dependent on the light/dark cycle with photoperiodic cues. However, the effects of maternal circadian rhythm disruption in offspring as well as in the mother are not fully known, especially in terms of reproductive system and metabolic health. Thus, we aimed to investigate the possible relationship between maternal circadian rhythm changes during pregnancy and lactation periods and, apoptosis and proliferation in the ovaries of the adult offspring.

Materials and Methods: Mothers were kept at control (12 hours light/12 hours dark), short day (SD; 8 hours light/16 hours dark) and long day (LD; 16 hours light/8 hours dark) conditions during pregnancy and lactation periods. The offspring were subcategorised as control, short-day pregnancy (SD-P), short-day lactation (SD-L), short-day pregnancy and lactation (SD-P+L), long-day pregnancy (LD-P), long-day lactation (LD-L), long-day pregnancy and lactation (LD-P+L) groups ($n=5$ rats/group) depending on the maternal light condition during pregnancy and lactation periods. Ovaries were collected at adulthood. Active caspase-3 (apoptosis marker) and PCNA (proliferation marker) expressions in the ovarian follicles (primordial, primary, secondary, preantral, antral) were evaluated by immunohistochemistry. The staining intensity (0: no staining, 1: weak, 2: moderate, 3: strong) and stained area percentage (1 for <50%; 2 for $\geq 50\%$) were multiplied to establish a weighted score.

Findings: PCNA expression was significantly decreased in the granulosa cells of secondary, preantral and antral follicles in the SD-P group ($p<0.05$). On the other hand, active caspase-3 expression was significantly increased in all experimental groups, particularly in granulosa cells of primary and antral follicles ($p<0.05$).

Discussion: Granulosa cells play an important role in follicle growth and ovulation. There are studies showing the relationship between the circadian clock and, proliferation and apoptosis in several tissues and systems. We observed that apoptosis was increased particularly in primary and antral follicles in our experimental groups.

Results: Our results demonstrated that maternal circadian rhythm changes during pregnancy and lactation periods can epigenetically affect the balance between cell proliferation and apoptosis, and folliculogenesis in adult offspring ovaries.

Keywords: Circadian rhythm, Epigenetics, Ovary, Proliferation, Apoptosis



P21

SESSİZ TÜMÖR SÜPRESÖR GEN MUTASYONLARININ mRNA İŞLENMESİ ÜZERINE OLASI ETKILERİNİN MINIGENE SPlicing ASSAY İLE SAPTANMASI

Ali Yüksel, Oğuz Altunöz

Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Türkiye

Giriş: Ökaryotik genlerin transkript ürünleri öncü bir mRNA (pre-mRNA) olarak sentezlenir ve 'Alternative splicing' ile genelde tek pre-mRNA'dan çok sayıda olgun-mRNA oluşturulur. Pre-mRNA'nın işlenmesinde klasik 5'-3' kesim motifleri ile birlikte diğer cis-etkili splicing düzenleyici elementler olan 'exonic veya intronic splicing enhancer ve silencer' motiflerinin (*Exonic Splicing Enhancer / Silencer: ESE/ESS; Intronic Splicing Enhancer / Silencer: ISE-ISS*) rolü büyüktür. Bu cis-etkili Splicing düzenleyici motifler trans-ektili proteinlerin özgül bağlanma domainleridir ve bu motiflerde oluşan mutasyonlar hatalı mRNA'lara veya pre-mRNA'nın tamamen yıkımına neden olur. Kanser türlerinde splicing mutasyonları ve abnormal splice varyantları daha fazla görülür. Bu çalışmada tümör süpresör genlerin (TSG) ESE veya ESS dizilerini bozan sessiz mutasyonların da tümör süpresörlerin fonksiyonlarını bozabileceğinden yola çıkarak bu durumun hücre bölünmesi kontrolünü bozabileceği, hasarlı hücrelerin kontrollü ölümden kaçarak çoğalabileceği ve sonuçta kansere evrilebileceğini öngördük.

Gereç ve Yöntem: COSMIC (*Catalogue of somatic mutations in cancer*) veri tabanında kanser hücrelerinde belirlenmiş sessiz TSG mutasyonlarını taradık ve bu mutasyonları *Human Splicing Finder* biyoinformatik analiz sisteminde test ettik. Analiz sonucu beş faklı TSG'de sekiz farklı sessiz ekzonik mutasyonu (CDKN2A: c.273G>A, c.339G>T, c.342C>G; TP53: c.793C>T, c.801G>T; BAI3: c.1419C>T; CABLES2: c.1002C>T; PTCH2: c.249A>G) seçtiğimizdir. Beş gene ait normal ekzon dizileri (CDKN2A: Ekzon2, TP53: Ekzon8, BAI3: Ekzon8, CABLES2: Ekzon8 ve PTCH2: Ekzon2) kontrol gurubunu oluşturmak üzere 'minigene-splicing assay' sisteminde kullanılan bir ekzon tutuklama vektörü olan pET01plazmidi içerisinde paketledik. Site-directed mutagenesis (SDM) protokolü ile sekiz mutant-plazmid'i oluşturduk. Kontrol ve mutant plazmidlerini HeLa hücreleri içerisinde transfekte ettik ve mutasyonların mRNA işleme mesesi üzerindeki etkilerini cDNA'ların dizi analizi sonuçları üzerinden değerlendirdik.

Sonuç: Seçtiğimiz sekiz TSG mutasyonunun 'minigene splicing assay' sonuçları, hiçbir mutasyonun mRNA işlenmesini bozmadığını göstermektedir. Dolayısıyla bu sekiz mutasyon da yolcu (passenger) mutasyon gibi görülmektedir.

Tartışma: Deneysel sonuçların biyoinformatik analiz sonuçları ile uyumlu olmadığı saptanmıştır. Bu durum biyoinformatik tahmin araçlarının geliştirilmeye muhtaç olduklarına işaret etmektedir. Bizim çalışmamız ve benzer deneysel çalışma sonuçları bu tarz araçların geliştirilmesine katkı sunacaktır. Ayrıca, elde edilmesi imkânsız veya zor olan dokularda var olduğu bilinen mutasyonların mRNA işleme mesesi üzerine etkisinin analizinde 'minigene-splicing assay' sisteminin kullanımı faydalı bir model olabilir.

Anahtar Kelimeler: Splicing Düzenleyici Elementler, Sessiz Mutasyonlar, Kanser, Tümör Süpresör Genler



P21

IDENTIFICATION OF POSSIBLE EFFECTS OF SILENT TUMOR SUPPRESSOR GENE MUTATIONS ON mRNA PROCESSING BY MINIGENE SPLICING ASSAY

Ali Yüksel, Oğuz Altunöz

Department of Medical Biology and Genetics, Institute of Health Sciences, Dokuz Eylül University,
35330 Balcova / İzmir Turkey

Background: The transcript products of eukaryotic genes are synthesized as a precursor mRNA (pre-mRNA), and alternative splicing produces various mature-mRNAs from a single pre-mRNA. Classical 5'-3' splice-site motifs as well as exonic/intronic splicing enhancer and silencer motifs (ESE/ESS and ISE/ISS), which are other cis-acting splicing regulatory elements (SRE), plays a major role in the processing of pre-mRNA. These cis-acting SRE motifs are specific binding domains for trans-acting proteins, and mutations in these sequences can lead to aberrant mRNA sequence or complete destruction of pre-mRNA. Splicing mutations and aberrant splice variant have commonly observed in cancers. In this study, based on the notion that silent mutations altering the ESE or ESS sequences in a tumor suppressor gene (TSG) may impair the tumor suppressor function; we hypothesized that this condition would disturb cell division control, allowing damaged cells to evade apoptosis and in turn eventually evolve into cancer.

Materials and Methods: We screened silent mutations of TSG identified for cancer cells in COSMIC database and analyzed these mutations using Human Splicing Finder bioinformatics tool. According to the results obtained by bioinformatic tools, we selected eight different silent exonic mutations in five different TSG (CDKN2A: c.273G>A, c.339G>T, c.342C>G; TP53: c.793C>T, c.801G>T; BAI3: c.1419C>T; CABLES2: c.1002C>T; PTCH2: c.249A>G). We cloned the reference exon sequences of five genes (CDKN2A: Exon2, TP53: Exon8, BAI3: Exon8, CABLES2: Exon8, and PTCH2: Exon2) into plasmid pET01, an exon trapping vector system used in the minigene-splicing assay to obtain the control group. Using the site-directed mutagenesis, we created eight mutant plasmids for described genes. Mutated and non-mutated plasmids were separately transfected into HeLa cells and the effects of mutations on mRNA splicing patterns were evaluated based on cDNA sequencing results.

Results: cDNA sequencing results showed that none of the sequence variations altered mRNA splicing transcript. Thus, these variations observed in tumors appear to be passenger mutations.

Discussion: Our experimental data were discordant with bioinformatic results. This suggests that bioinformatic tools for splice site prediction need to be improved. Our study, as well as other related studies, may help to improve these bioinformatic tools for splice site prediction. In addition, the use of the 'minigene-splicing assay' system can be a useful model in the analysis of the effect of known mutations on mRNA processing in tissues that are impossible or difficult to obtain.

Keywords: Splicing Regulatory Elements, Silent Mutation, Cancer, Tumor Suppressor Genes

P22

GEBELİK VE LAKTASYON SÜREÇLERİ BOYUNCA SİRKADIYEN RİTİM DEĞİŞİKLİĞİ İLE MATERNAL OVARYUMDAKİ HÜCRE PROLİFERASYONU VE APOPTOZ İLİŞKİSİ

Gizem Gamze Taş, Gamze Zengin, Leyla Satı

Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AD, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AD, Türkiye

Giriş: Gündüz ve gece uzunluğuna bağlı olarak fizyolojik reaksiyonların, üreme sisteminin düzenlenmesinde rol oynadığı ortaya konulmuştur. Bununla birlikte gebelik ve laktasyon süreçleri boyunca sirkadiyen ritim değişikliğinin anne ovaryum dokularındaki olası etkileri bilinmemektedir. Dolayısıyla çalışmamızda, gebelik ve laktasyon süreçleri boyunca değişen sirkadiyen şartlarda maternal ovaryum dokularındaki proliferasyon ve apoptoz süreçlerinin aydınlatılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metotlar: Gebelik (G) ve laktasyon (L) dönemleri boyunca, gebe ratlar kontrol (K) (12 saat aydınlichkeit/12 saat karanlık), kısa gün (KG; 8 saat aydınlichkeit/16 saat karanlık) ve uzun gün (UG; 16 saat aydınlichkeit/8 saat karanlık) koşullarında tutuldu. Sirkadiyen koşula göre deney grupları K-G+L, K-G, KG-G, KG-L, KG-G+L, UG-G, UG-L, UG-G+L (n=6 rat/grup) olarak alt kategorilere ayrıldı. Ovaryum dokuları alınarak immünohistokimya yöntemi ile ovaryum foliküllerindeki (primordiyal, primer, sekonder, preantral, antral), aktif kaspaz-3 (apoptoz belirteci) ve PCNA (proliferasyon belirteci) proteinlerinin ekspresyonları, boyanma şiddeti (0: boyanma yok, 1: zayıf, 2: orta, 3: güçlü) ve boyanma alanı (%50'den az ise 1, %50'ye eşit veya daha fazla ise 2) çarpımı skorlanarak değerlendirildi. TUNEL yöntemi ile de apoptotik indeks analiz edildi.

Bulgular: PCNA proteini açısından kontrol gruplarına kıyasla KG ve UG gruplarında primer, sekonder, preantral ve antral foliküllerde anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir ($p>0,05$). Kontrol gruplarına kıyasla, aktif kaspaz-3'ün, KG-G, KG-L, UG-G ve UG-L gruplarında özellikle sekonder ve preantral foliküllerde anlamlı derecede arttığı izlenmiştir ($p=<0,001$). TUNEL bulgularında ise aktif kaspaz-3 artışı gözlenen foliküllere ek olarak, UG-G+L gruplarında da sekonder ve preantral foliküllerde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p=0,020$, $p=<0,001$, sırasıyla).

Tartışma: Ovaryum foliküllerinin gelişimi, çeşitli modülatörlerin kontrolü altındaki hücrelerinin proliferasyonu, farklılaşması ve apoptozuya ilişkilidir. Birçok çalışma, sirkadiyen sistemin hücre proliferasyonu ve apoptozun regülasyonunda önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Bulgularımız göre, sirkadiyen ritim değişikliği nedeniyle, folikül tipleri arasında proliferasyon açısından herhangi bir fark gözlenmediği ancak özellikle sekonder ve preantral foliküllerde apoptozun arttığı izlenmiştir.

Sonuç: Çalışmamız, gebelik ve laktasyon döneminde sirkadiyen ritim değişikliğinin, ovaryumda hücre proliferasyonu, apoptoz ve foliküler gelişim üzerindeki olası etkilerini ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: Maternal sirkadiyen ritim, ovaryum, proliferasyon, apoptoz



P22

THE RELATIONSHIP BETWEEN CIRCADIAN RHYTHM CHANGES DURING PREGNANCY AND LACTATION PERIODS AND CELLULAR PROLIFERATION AND APOPTOSIS IN THE MATERNAL OVARY

Gizem Gamze Tas, Gamze Zengin, Leyla Sati

Akdeniz University School of Medicine, Department of Histology and Embryology, Antalya, Turkey

Introduction: It has been previously shown that physiological reactions depending on the length of day and night play a role in the regulation of reproductive system. However, the potential effects of circadian rhythm changes on mother's ovary during pregnancy and lactation are unknown. Thus, we aimed to evaluate the proliferation and apoptosis processes in ovarian tissues in varying circadian conditions during pregnancy and lactation periods.

Materials and Methods: Pregnant rats were kept at control (C) (12 hours light/12 hours dark), short day (SD; 8 hours light/16 hours dark) and long day (LD; 16 hours light/8 hours dark) conditions during pregnancy (P) and lactation (L) periods. The experimental groups were subcategorised as C-P+L, C-P, SD-P, SD-L, SD-P+L, LD-P, LD-L, LD-P+L ($n=6$ rats/group) depending on the circadian condition. Active caspase-3 (apoptosis marker) and PCNA (proliferation marker) were evaluated in the ovarian follicles (primordial, primary, secondary, preantral, antral) by immunohistochemistry. The staining intensity (0: no staining, 1: weak, 2: moderate, 3: strong) and stained area percentage (1 for <50%; 2 for $\geq 50\%$) were multiplied to establish a weighted score. Apoptotic index was analyzed with TUNEL method.

Findings: In terms of PCNA protein, no significant difference was detected for follicle types in the SD and LD groups compared to control groups ($p>0.05$). Active caspase-3 was significantly increased in the SD-P, SD-L, LD-P and LD-L groups, especially in the secondary and preantral follicles ($p=<0.001$). A significant increase was observed in the secondary and preantral follicles in the LD-P+L group by TUNEL analysis beside to follicle types with increased active caspase-3 expression ($p=0.020$, $p=<0.001$, respectively).

Discussion: The development of ovarian follicles is associated with cell proliferation, differentiation and apoptosis under control of various modulators. Several studies indicated that circadian system plays a role in the regulation of cell proliferation and apoptosis. According to our data, no difference was detected for proliferation, but increased apoptosis, particularly in secondary and preantral follicles was observed due to maternal circadian rhythm changes.

Result: Our study revealed the possible effects of circadian rhythm changes during pregnancy and lactation periods on the ovarian cell proliferation and apoptosis and also follicular development.

Keywords: Maternal circadian rhythm, ovary, proliferation, apoptosis



P23

YENİ TIYAZOLO[5,4-B]PIRIDIN TÜREVLERİNİN DU-145 HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ; ÖN ÇALIŞMA

Merve Tütüncü¹, Ahmet Özdemir², Mehlika Dilek Altintop², Zekiye Sultan Altun³

¹Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı, Türkiye

²Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, Türkiye

³Dokuz Eylül Üniversitesi , Tıp Fakültesi, Temel Onkoloji Anabilim Dalı, Türkiye

Giriş: Prostat kanseri dünyada erkeklerde en sık rastlanan kanser türlerinden biridir. Doisetaksel, prostat kanseri temel kemoterapötik ilacıdır. Doisetaksel ve lokal ve metastatik prostat kanseri sağ kalımları üzerine yapılan son çalışmalar, metastatik prostat kanserinde sağkalımda önemli bir değişim ortaya koymamıştır. Bu çalışmada, yeni tiyazolo[5,4-b]piridin türevlerinin metastatik prostat kanseri hücre hattı olan DU-145 hücre hattında hücre çoğalması üzerine etkilerini belirlemeyi amaçladık.

Materyal-Metot: DU-145 prostat kanser hücreleri RPMI 1640 besi yeri ile çoğaltıldı. Yeni tiyazolo[5,4-b]piridin türevleri Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı'nda sentezlendi. Doisetaksel ticari olarak elde edildi. 1-(4-Florofenil)-2-(tiyazolo[5,4-b]piridin-2-iltiyo)etan-1-on (3), 1-(4-siyanofenil)-2-(tiyazolo[5,4-b]piridin-2-iltiyo)etan-1-on (6) ve dosetakselin DU-145 hücre proliferasyonu üzerine etkileri WST-1 testi ile değerlendirildi. Sonuçlar SPSS 26 versiyonu; Mann-Whitney U testi kullanılarak değerlendirildi ve $p<0.05$ anlamlılık düzeyi esas alındı.

Bulgular: Bileşik 3 ve 6'nın LD50 dozlarını belirlemek için, 1000 μM ve 1 μM arası doz çalışması yapıldı ve 24 saatlik en iyi LD50 dozu her iki bileşik için de 400 μM olarak belirlendi. Bileşik 3 ve 6 DU145 üzerine 24 saat uygulandığında canlılık sırasıyla %51 ve %49 olarak saptandı ($p<0.05$). Dosetakselin 10-100 nM arası değişen dozlarda uygulamaları sonrası canlılık değerlendirildi ve 10 nM'da DU145 hücrelerinde %73 oranında hücre canlılığı saptandı.

Tartışma: Yapılan bir çalışmada (Foster ve ark, 2020), dosetaksel tek başına DU145 metastatik prostat kanser hücre hattında hücre ölüm mekanizmalarını az oranda indüklemiştir. Bu çalışmada da dosetaksel tek başına uygulandığında kontrole göre anlamlı olarak hücre ölümünü indüklemiştir; ancak bu oran Foster ve ark. (2020) tarafından yapılan çalışmadaki gibi düşük oranda görülmüştür. Bileşik 3 ve 6'nın dosetaksel ile karşılaşıldığında hücre proliferasyonunu anlamlı olarak inhibe ettiği gözlandı. Bu etkileri ile bileşik 3 ve 6 antikanser etki potansiyeli taşıyan moleküllerdir.

Sonuç: Bu ön çalışma ile, bileşik 3 ve 6 metastatik prostat kanseri için potansiyel antikanser ajanları olduğu belirlenmiştir; ancak antikanser etki mekanizmalarını aydınlatmak için ileri çalışmalarla ihtiyaç duyulmaktadır.

Kaynak:

Foster K, Oyenih O, Rademan S, Erhabor J, Matsabisa M, Barker J, Langat MK, Kendal-Smith A, Asemota H, Delgoda R. Selective cytotoxic and anti-metastatic activity in DU-145 prostate cancer cells induced by *Annona muricata* L. bark extract and phytochemical, annonacin. BMC Complement Med Ther. 2020 Dec 10;20(1):375. doi: 10.1186/s12906-020-03130-z. PMID: 33302945; PMCID: PMC7727144.



P23

EFFECTS OF NOVEL THIAZOLO[5,4-B]PYRIDINE DERIVATIVES ON DU-145 CELLS; A PRELIMINARY STUDY

Merve Tütüncü¹, Ahmet Özdemir², Mehlika Dilek Altintop², Zekiye Sultan Altun¹

¹Dokuz Eylül University, Oncology Institute, Department of Basic Oncology, İzmir, Turkey

²Anadolu University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, Eskişehir, Turkey

Introduction: Prostate cancer is one of the most common malignancies in men worldwide. Docetaxel is the main chemotherapeutic drug for the treatment of prostate cancer. Recent studies on docetaxel and survival rates in local and metastatic prostate cancer did not reveal a significant change in survival of metastatic prostate cancer. In this study, we aimed to determine the effects of new thiazolo[5,4-b]pyridine derivatives on cell proliferation in the metastatic prostate cancer cell line; DU-145.

Material-Method: DU-145 prostate cancer cells were cultured in RPMI 1640 medium. Novel thiazolo[5,4-b]pyridine derivatives were synthesized in Anadolu University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry. Docetaxel was acquired commercially. The effects of 1-(4-fluorophenyl)-2-(thiazolo[5,4-b]pyridin-2-ylthio)ethan-1-one (3), 1-(4-cyanophenyl)-2-(thiazolo[5,4-b]pyridin-2-ylthio)ethan-1-one (6) and docetaxel on DU-145 cell proliferation were evaluated using WST-1 assay. The results were analyzed using SPSS version 26 and Mann-Whitney U test and p<0.05 was regarded as statistically significant.

Results: A dose study between 1000 µM and 1 µM was performed to determine the LD50 doses of compounds 3 and 6, and the LD50 dose was determined as 400 µM for 24 hours after treatment for both compounds. When DU-145 cells were treated with compounds 3 and 6 for 24 h, cell viability was determined as 51% and 49% (p<0.05). The viability of DU-145 cells was evaluated after treatment of docetaxel at different doses between 10-100 nM, and cell viability was found as 73% when cells were treated with 10 nM of docetaxel.

Discussion: In a study carried out by Foster et al. (2020), docetaxel alone induced cell death mechanisms slightly on DU145 metastatic prostate cancer cell line. In this study, when docetaxel was applied alone, it induced cell death significantly compared to the control, but this induction was also weak as shown in the study of Foster et al. (2020). Compounds 3 and 6 were observed to inhibit cell proliferation significantly when compared to docetaxel. Due to their potency, compounds 3 and 6 have potential to be anticancer agents.

Conclusion: By means of this preliminary study, it was determined that compounds 3 and 6 are potential anticancer agents for metastatic prostate cancer, but further studies are required to elucidate their mechanism of anticancer action.

Reference:

Foster K, Oyenih O, Rademan S, Erhabor J, Matsabisa M, Barker J, Langat MK, Kendal-Smith A, Asemota H, Delgoda R. Selective cytotoxic and anti-metastatic activity in DU-145 prostate cancer cells induced by *Annona muricata* L. bark extract and phytochemical, annonacin. BMC Complement Med Ther. 2020 Dec 10;20(1):375. doi: 10.1186/s12906-020-03130-z. PMID: 33302945; PMCID: PMC7727144.

Keywords: Prostate Cancer, Cell Death, Thiazolo[5, 4-b]pyridine Derivatives



P24

SMAC MİMETİĞİN APOPTOTİK GEN EKSPRESYONLARI ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

Burçin Baran¹, Zekiye Altun¹, Hongling Yuan¹, Safiye Aktaş¹, Nur Olgun²

¹Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Onkoloji AD, İzmir, Türkiye

²Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Pediatrik Onkoloji AD, İzmir, Türkiye

Giriş: İnhibitör Apoptoz Proteinleri (IAP), hücre ölüm yolaklarının yürütülmesini engelleyen hem işlevsel hem de yapısal olarak ilişkili protein grubudur. IAP'nın aşırı ekspresyonu, pek çok kanser tipinde gösterilmiş ve kötü прогноз veya tedaviye direnç ile ilişkilendirilmiştir. Sekonder Mitokondriyal Kaspaz Aktivatörü (SMAC/DIABLO) proteinleri, hücrede mitokondriyal membran içerisinde bulunur ve apoptoz sırasında sitozele salınarak IAP'lere bağlanırlar. Bu sayede IAP'leri inhibe ederler. SMAC mimetikleri de SMAC proteinlerinin kimyasal yapısı üzerine geliştirilmiş ajanlardır. Kanser hücre hatları ve ksenograft fare modelleri kullanılarak yapılan pek çok pre-klinik çalışmada, hem SMAC mimetiklerin bazı hücrelerde tek başına hücre ölümünü tetiklediği hem de kemoterapi, radyoterapi etkinliğini artırdığı gözlenmiştir.

Bu çalışmada, SMAC mimetik LCL-161'in, SH-SY5Y nöroblastom hücrelerinde hücre ölümü ile ilişkili gen ekspresyon seviyelerini nasıl etkilediğinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Materyal – Methodlar: LCL-161, monovalent tipte SMAC mimetik olarak kullanılmıştır. SH-SY5Y insan nöroblastom hücreleri 50uM LCL-161 ile 48 saat inkube edilmiştir. RNA izolasyonu, kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. RNA'ların konsantrasyonu Nanodrop ile ölçülerek sonrasında cDNA'ya çevrilmiştir. Apoptotik ve nekroptotik genlerin ekspresyonları SYBR green master mix kullanılarak ilgili primerlerle Nano Real-time PCR cihazın'da çalışılmıştır. Sonuçlar istatiksel olarak analiz edilmiştir.

Bulgular: LCL-161 ile inkubasyon sonrasında SH-SY5Y hücrelerindeki apoptotik ve nekroptotik yolaklarla ilişkili olarak Kaspaz-8, Kaspaz-3, RIP1, RIP3, TRIB3, ATF4, ATF6, PERK, XBP1, IRE1, IAP1, IAP2, XIAP, CHOP gen ekspresyonlarındaki değişimler incelenmiştir. TRIB3 ve CHOP, XBP1 ve IRE1 ekspresyonunda istatiksel anlamlı bir değişim gözlenirken ($p<0.05$), RIP1, RIP3, Kaspaz-8, Kaspaz-3, XIAP, GADD34 ekspresyonunda anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. IAP1 ve IAP2 geninde istatiksel olarak anlamlı azalış saptanmıştır ($p<0.05$).

Tartışma: LCL-161 ile indüklenen nöroblastom hücrelerinde Kaspaz-8'in yer aldığı dışsal apoptotik ve nekroptotik yolak yerine, ER-stres aracılıklı ölüm yolağının daha önemli rol oynadığı belirlenmiştir.

Sonuç: SH-SY5Y nöroblastom hücrelerinde SMAC mimetik LCL-161'in apoptotik, nekroptotik gen ekspresyonları üzerindeki etkisi incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: SMAC mimetik, Nöroblastom, Apoptoz



P24

THE EFFECT OF SMAC MIMETIC ON APOPTOTIC GENE EXPRESSIONS

Burçin Baran¹, Zekiye Altun¹, Hongling Yuan¹, Safiye Aktaş¹, Nur Olgun²

¹Dokuz Eylül University, Department of Basic Oncology, İzmir, Türkiye

²Dokuz Eylül University, Department of Pediatric Oncology, İzmir, Türkiye

Introduction: Inhibitory Apoptosis Proteins (IAP) are a group of functionally and structurally related proteins that inhibit the execution of cell death pathways. Overexpression of IAP has been demonstrated in many cancer types and has been associated with poor prognosis or resistance to treatment. Secondary Mitochondrial Caspase Activator (SMAC/DIABLO) proteins are located in the mitochondrial membrane of the cell and are released into the cytosol during apoptosis and bind to IAPs. Hence, they inhibit IAPs. SMAC mimetics are agents, which developed on the chemical structure of SMAC proteins. In many pre-clinical studies using cancer cell lines and xenograft mouse models, it has been observed that both SMAC mimetics trigger cell death in some cells and increase the efficacy of chemotherapy and radiotherapy.

In this study, it was aimed to examine how the SMAC mimetic LCL-161 affects cell death-related gene expression levels in SH-SY5Y neuroblastoma cells.

Material - Methods: LCL-161 was used as a monovalent type SMAC mimetic. SH-SY5Y human neuroblastoma cells were incubated with 50µM LCL-161 for 48 hours. RNA isolation was performed using the kit. The concentration of RNAs was measured with Nanodrop and then translated into cDNA. Expressions of apoptotic and necroptotic genes were studied in Nano Real-time PCR device with relevant primers using SYBR green master mix. The results were analyzed statistically.

Results: Caspase-8, Caspase-3, RIP1, RIP3, TRIB3, ATF4, ATF6, PERK, XBP1, IRE1, IAP1, IAP2, XIAP, CHOP gene associated with apoptotic and necroptotic pathways in SH-SY5Y cells after incubation with LCL-161. The changes in their expression were examined. While a statistically significant change was observed in the expression of TRIB3 and CHOP, XBP1 and IRE1 ($p<0.05$), no significant change was observed in the expression of RIP1, RIP3, Caspase-8, Caspase-3, XIAP, GADD34. A statistically significant decrease was found in IAP1 and IAP2 genes ($p<0.05$).

Discussion: It has been shown that ER-stress mediated death pathway plays a more important role in LCL-161-induced neuroblastoma cells instead of the extrinsic apoptotic and necroptotic pathway involving Caspase-8.

Conclusion: The effect of SMAC mimetic LCL-161 on apoptotic and necroptotic gene expressions in SH-SY5Y neuroblastoma cells was studied.

Keywords: SMAC mimetic, Neuroblastoma, Apoptosis



P25

İNSAN TÜMÖRLERİNDE SOX2'NIN PAN-KANSER ANALİZİ İLE ONKOJENİK ROLÜ

Hongling Yuan, Zekiye Sultan Altun, Burçin Baran, Selen Kum Özsengezer

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Onkoloji, Türkiye

Giriş: Sox2 bir transkripsiyon faktöridür ve embriyonik gelişimde, hücre tipinin belirlenmesi ve differensiasyonu gibi pek çok farklı süreçte rol oynamaktadır. Pek çok farklı insan kanser tipinde SOX2 aşırı ekspresyonu ve gen amplifikasyonu, tümörde agresif davranış, metastaz, tedaviye direnç ve kanser hastalarında düşük sağ kalımla ilişkilendirilmektedir. Buna ilaveten, Sox2 pek çok sinyal yolu ile etkileşerek, pek çok önemli biyolojik süreçlerin de düzenlenmesini sağlar. Bu nedenle, potansiyel bir terapötik hedef olarak araştırılabilir. Sox2'nin işlevleri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır ve şu anda mevcut bir pan-kanser analizi bulunmamaktadır.

Materyal ve Method: TCGA ve GEO veri tabanlarında bulunan 33 tümör tipinin analizleri üzerinden, TIMER2 kullanılarak SOX2 gen ekspresyon analizleri yapıldı, devamında UALCAN portalı kullanılarak SOX2 promotör metilasyonu ile gen ekspresyonunun epigenetik düzenlenmesi değerlendirildi. Ek olarak, cBioPortal web kullanılarak Sox2 genetik değişimi değerlendirildi ve GEPIA2 kullanılarak sağ kalım durumları analiz edildi. Sox2 bağlayıcı genleri belirlemek için STRING aracı kullanıldı. Bağlayıcı ve etkileşen genlerden yola çıkılarak KEGG yolak analizi yapıldı.

Bulgular: Sox2, TCGA veri tabanında bulunan 16 kanser türünde yüksek oranda eksprese olduğu bulunmuştur. Yüksek oranda eksprese edilen Sox2, TCGA içinde Akciğer Skuomoz Hücreli Karsinom-LIHC, Sarkoma-SARC ve Renal Berrak Hücreli Karsinom-KIRC kanseri için düşük sağkalım ve kötü прогноз ile bağlantılıdır ($p<0.05$). 13 kanser türünde, tümör dokularında Sox2 promotör metilasyon seviyesi normal dokudan daha yüksek iken, sadece LUSC'de metilasyon seviyesi tümör dokusunda daha düşüktür. Ayrıca Sox2'de görülen genetik değişiklikler değerlendirildiğinde, en yüksek değişiklik durumu olarak saptanan 'Amplifikasyon', LUSC'da yaklaşık %40 oranında ve Ovaryen Seröz Kistadenokarsinom-OV'da %18 oranında gözlenmiştir. Sox2 bağlayıcı proteinleri ve ilgili genlerin fonksiyon analizi sonucunda, bu proteinlerin ön beyin gelişimi, glial hücre farklılaşması ve tiroid hormonu sinyal yolaklarında yer aldığı gösterilmiştir.

Tartışma: Birçok kanser türünde Sox2 yüksek ekspresyonunun daha detaylıca araştırılması gerekmektedir. Ayrıca Sox2 promotörünün hipermetilasyonu da Sox2 gen ekspresyonu için kritik bir epigenetik düzenleyici mekanizmadır.

Sonuç: Birçok kanser türünde Sox2 aşırı ekspresyonu gözlenmektedir, ancak mekanizması halen belirsizdir. Bu pan-kanser çalışması, farklı tümörigenez süreçlerinde Sox2'nin onkojenik rollerinin nispeten kapsamlı bir şekilde anlaşılmasını sağlamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Sox2, Pan-Kanser, Onkojenik



P25

PAN-CANCER ANALYSIS OF THE ONCOGENIC ROLE OF SOX2 IN HUMAN TUMORS

Hongling Yuan, Zekiye Altun, Burçin Baran, Selen Kum Özsengezer

Department of Basic Oncology, Institute of Oncology, Dokuz Eylul University, Izmir, TURKEY

Introduction: Sox2 is a transcription factor and plays an important role in various phases of embryonic development, including cell fate and differentiation. In many types of human cancer, overexpression and gene amplification of Sox2 has been associated with tumor aggression, metastasis, resistance to therapy and poor survival of cancer patients. Sox2 also cross-talks with multiple signaling pathways to ensure proper regulations of important biological processes. It can be potentially explored for a therapeutic target. Still their function remains mechanistically not fully elucidated, and there is no pan-cancer analysis available now.

Materials and Methods: Through analysis of thirty-three types of tumors based on the datasets of TCGA and GEO, we conduct the SOX2 gene expression analysis through TIMER2, then evaluate epigenetic regulation of gene expression by SOX2 promoter methylation using UALCAN portal. Sox2 genetic alteration evaluated by using cBioPortal web and survival status analyzed with GEPIA2. Using STRING tool to determine Sox2 binding proteins and based on binding and integrated genes, KEGG pathway was performed.

Results: Sox2 is highly expressed in 16 types cancers with TCGA dataset. Highly expressed Sox2 was linked to poor prognosis of overall Survival for cancers of Liver hepatocellular cancer-LIHC, Sarcoma-SARC, and Kidney Renal Clear Cell Carcinoma-KIRC within the TCGA ($p < 0.05$). In 13 types of cancer, Sox2 promoter methylation level were higher in tumor than normal tissue, while only in Lung Squamous Cell carcinoma-LUSC the methylation level is lower in tumor. Also, the genetic alteration status of Sox2 showed the highest alteration frequency of Sox2 (nearly 40%) appeared with LUSC with "Amplification" and nearly 18% in OV. Sox2 binding proteins and related genes function analysis showed these proteins involves in forebrain development, glial cell differentiation and thyroid hormone signaling pathway.

Discussion: Sox2 higher expression in many types of cancer need further investigate, and hypermethylation of Sox2 promoter appears to be a critical epigenetic event in regulatory mechanisms of Sox2 expression.

Conclusion: Sox2 overexpression in many types of cancer were observed, but its mechanism still remains to be answered. This pan-cancer study provides a relatively comprehensive understanding of the oncogenic roles of Sox2 in different tumorigenesis.

Keywords: Sox 2, Pan-cancer, Oncogenic



P26

KALITSAL MEME VE/VEYA OVER KANSERI SENDROMLU HASTALARDA YENİ NESİL DİZILEME İLE SAPTANAN BRCA VE NON-BRCA VARYANTLAR

Hamide Betül Gerik Çelebi¹, Hilmi Bolat²

¹Balıkesir Atatürk Şehir Hastanesi Tıbbi Genetik Kliniği, Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Tıbbi Genetik, Türkiye

²Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD., Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik, Türkiye

Giriş: Meme kanseri Dünya Sağlık Örgütü'nün 2020 verilerine göre, en sık görülen kanser türü olmuş ve en sık tanı alan akciğer kanserini geride bırakmıştır. Meme kanseri çoğunlukla sporadik olmakla birlikte %10-15'inde genetik faktörler önemli rol oynamaktadır. Tüm dünyada en sık görülen kanser türü olan meme kanseri değerlendirilirken, *BRCA* ve non-*BRCA* genlerinde mutasyona sahip olmak ileri derece artmış risk olarak görülmektedir. Meme kanseri ve/ veya over (yumurtalık) kanseri tanısıyla başvuran hastalardaki genetik yatkınlığı retrospektif olarak araştırdığımız bu çalışmamızda *BRCA* ve non-*BRCA* genlerinde saptadığımız varyantlar "Amerika Tıbbi Genetik Topluluğu (American College of Medical Genetics, ACMG)" kriterlerine göre sınıflandırılarak sunulmuştur.

Materyal ve Metodlar: 01.01.2019-01.12.2021 tarihleri arasında Balıkesir Atatürk Şehir Hastanesi Tıbbi Genetik polikliniğine başvuran Herediter Meme ve/ veya Over Kanseri moleküler genetik çalışma kriterlerini karşılayan 128 kadın hastadan öncelikle sırasıyla *BRCA1* ve *BRCA2* geni dizi analizi çalışılmıştır. *BRCA1/2* tüm gen dizi analizi yöntemiyle mutasyon tespit edilmeyen hastalardan *BRCA1* ve *BRCA2* geni delesyon dublikasyon analizi ve/ veya kansere yatkınlıkla ilişkilendirilen çoklu gen paneli çalışılmıştır.

Bulgular: Bu çalışmada 21 hastada *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde, 21 hastada ise başlıca *ATM*, *CHEK2*, *RAD50*, *RAD51D*, *SDHA*, *RB1*, *POLD1*, *SMAD4*, *CDH1*, *CDKN2* ve *STK11* gibi non-*BRCA* genlerinde mutasyon tespit edilmiştir.

Sonuç: Herediter Meme ve/ veya Over Kanseri ile ilişkili retrospektif olarak moleküler genetik yatkınlığın değerlendirildiği çalışmamızda *BRCA* ve non-*BRCA* genlerinde %32,81 pozitif varyant saptanmıştır. Bu çalışma ile *BRCA2* geninde iki; *ATM*, *RAD50*, *RAD51D*, *STK11* ve *POLD1* genlerinde birer varyant olmak üzere toplam yedi yeni varyant literatüre kazandırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *BRCA1* geni, *BRCA2* geni, meme kanseri, genetik yatkınlık



P26

BRCA AND NON-BRCA VARIANTS DETECTED BY NEXT GENERATION SEQUENCING IN PATIENTS WITH HEREDITARY BREAST AND/OR OVARIAN CANCER SYNDROME

Hamide Betül Gerik Çelebi¹, Hilmi Bolat²

¹Balıkesir Atatürk City Hospital, Department of Medical Genetics, Balıkesir, Türkiye

²Balıkesir Üniversitesi Faculty of Medicine, Department of Medical Genetics, Balıkesir, Türkiye

Introduction: Breast cancer is the most frequently diagnosed female cancer according to the 2020 data of the World Health Organization. It is mostly sporadic, 10-15% of which occur on the basis of genetic predisposition. In this study, we aimed to detect mutations in *BRCA* and non-*BRCA* genes in patients admitted with the diagnosis of breast cancer and/or ovarian cancer, and to identify mutations with increased frequency and variants specific to the Turkish population.

Materials and Methods: Between January 2019 and December 2021, 128 patients who applied to our clinic with hereditary Breast and/or Ovarian Cancer meeting the genetic test study criteria were included in the study. First, *BRCA1/2* genes next-generation sequencing were performed on these patients, respectively. *BRCA1* and *BRCA2* gene deletion duplication analysis and/or multiple gene panel associated with cancer susceptibility were studied from patients with no mutations.

Results: In this molecular genetic susceptibility study associated with Hereditary Breast and/or Ovarian Cancer, 32,81% positive variants were found in *BRCA* and non-*BRCA* genes. *BRCA1/2* mutations were detected in 21 patients. In addition, non-*BRCA* mutations (*ATM*, *CHEK2*, *RAD50*, *RAD51D*, *STK11*, *SDHA*, *RB1*, *POLD1*, *SMAD4*, *CDH1* and *CDKN22* genes) were detected in 20 patients. We identified a total of 7 new variants in the *BRCA2*, *ATM*, *RAD50*, *RAD51D*, *STK11* and *POLD1* genes.

Discussion: Clarification of risks specific to non-*BRCA* genes is necessary for a better understanding of the Hereditary Breast and/or Ovarian Cancer Syndrome (HBOC) genetic susceptibility spectrum. Therefore, multi-gene panel testing is needed after routine *BRCA* genes. In our study, most of the novel mutations were detected in non-*BRCA* genes. In addition, two novel *BRCA* variants have been reported. It also contributed to the identification of mutations specific to the Turkish population.

Keywords: *BRCA1* gene, *BRCA2* gene, Breast cancer, Genetic predisposition



P27

CD95 LİGANDININ (FASL) PRİMER İNSAN MAKROFAJ POLARİZASYONU ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Derya Göksu Helvacı¹, Resul Özbilgiç², Sinem Günalp³, Duygu Sağ⁴

¹Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmir/ İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi, İzmir, Tıp Fakültesi, Tıp Doktorluğu, Türkiye

²Laboratory of Pathogen Host Interactions UMR5235 - Université Montpellier, Moleküler Biyoloji ve Genetik, İmmünoloji, Fransa

³Dokuz Eylül Üniversitesi İzmir Uluslararası Biyotıp ve Genom Enstitüsü, İzmir, Genom Bilimleri ve Moleküler Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Genom Bilimleri ve Moleküler Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Türkiye

⁴Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir/ İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi, İzmir, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi/ İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi, Tıbbi Biyoloji, Türkiye

CD95 ligandının (CD95L, FasL) ekspresyonu, inflamatuar hastalıklarda, tümör mikroçevresinde ve hasta serumlarında artar. CD95L'nin TNF reseptörü süper ailesinin bir üyesi olan CD95'e (Fas) bağlanması, makrofajlarda apoptozdan ziyade apoptotik olmayan mekanizmaları başlatarak bazı pro-inflamatuar faktörlerin ekspresyonunu arttırmıştır. Bununla birlikte, CD95L'nin makrofajların M1/M2 polarizasyonu üzerindeki etkisi bilinmemektedir.

İmmün sistemimizde yer alan bir hücre grubu olan makrofajlar dokularımızda bulunurlar veya gerekli uyaranlar ile periferik kan monositlerinin dokuya yönelmesi ile bu monositlerden farklılaşabilirler. Makrofajlar M1 ve M2 olarak 2 ana gruba ayrırlar. M1 makrofajlar pro-inflamatuar ve anti-tümöral yanıt verirken, M2 makrofajlar anti-inflamatuar ve pro-tümöral yanıt gösterir. Ayrıca M2 makrofajlar kendi içerisinde M2a, M2b ve M2c olmak üzere 3 alt gruba ayrırlar. M1/M2 makrofaj polarizasyonu arasındaki dengenin bozulması; kanser, romatolojik hastalıklar, tip 2 diyabet gibi bir çok hastalığın прогнозunda önemli rol oynar. Bu nedenle makrofaj polarizasyonları arasındaki dengenin sağlanması ve bu konunun araştırılması önemlidir.

Biz bu çalışmamızda, CD95L'nin primer insan makrofaj polarizasyonu üzerindeki etkisini araştırmak için, sağlıklı donörlerin buffy coatlarından sırasıyla Ficoll ve Percoll yoğunluk gradient santrifüjleme teknigi ile monositleri izole ettik. Ardından monositler 7 gün boyunca monosit/makrofaj koloni stimülasyon faktör (MCSF) ile inkübe edilip makrofajlara dönüştürüldü. Ardından türetilen makrofajlar, çözünür CD95L ile uyarıldı ve aynı anda LPS+IFN-γ ile M1 fenotipine, IL-4 ile M2a fenotipine ve IL-10 ile M2c fenotiplerine polarize edildi. Ayrıca CD95L'nin uyarılmamış (M0) makrofajlarındaki etkisini incelenmek için bu makrofajlara yalnızca CD95L ile uyarım gerçekleştirildi. Ardından, makrofajlardaki M1 ve M2 belirteçlerinin ekspresyon seviyeleri, qPCR ve akış sitometrisi ile analiz edildi. Araştırmamızda CD95L stimülasyonunun polarize olmayan makrofajlarda M1 ve M2 belirteçlerinde değişime neden olmayıp, makrofaj yanıtını değiştirmeyi gösterdik. Bunun yanında M1 makrofajlarında CD95L uyarımının mRNA düzeyinde pro-inflamatuar belirteçlerin ekspresyonunu artırdığını gözlemledik. Ancak CD95L M1 makrofajlarında protein düzeyinde bir değişime neden olmadı. M2a makrofajlarında ise CD95L, protein seviyesinde M2a belirteci olan CD206'nın hücre yüzeyindeki ekspresyonunu önemli ölçüde azalttı. Ancak, M2c polarizasyonu CD95L'den etkilenmedi.

Biz bu çalışmamızda CD95L'nin M0 ve M2c makrofajlarına etki etmezken M1 ve M2a makrofajlarındaki pro-inflamatuar özellikleri artrabileceğini gösterdik. CD95L'nin bu özelliklerinden faydalanan makrofajlar için gelecek vaat edebilir. Sonuç olarak bu bulgularımız bize CD95L'nin primer insan makrofajlarında belli başlı fenotiplere etki ederek onları pro-inflamatuar fenotipe yönlendirebileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: hücre ölümü, CD95L, makrofaj polarizasyonu



P27

INVESTIGATION OF THE IMPACT OF CD95 LIGAND (FASL) ON PRIMARY HUMAN MACROPHAGE POLARIZATION

Derya Göksu Helvacı^{1,4}, Resul Özbilgiç², Sinem Günalp³, Duygu Sağ^{3,4,5}

¹Dokuz Eylül University Faculty of Medicine, Izmir, Turkey

²Laboratory of Pathogen Host Interactions UMR5235 - Université Montpellier, Montpellier, France

³Dokuz Eylül University Izmir International Biomedicine and Genome Institute, Izmir, Turkey

⁴Izmir Biomedicine and Genome Center, Izmir, Turkey

⁵Dokuz Eylül University Department of Medical Biology, Izmir, Turkey

The expression of CD95 ligand (CD95L, FasL) is increased in inflammatory diseases, tumor microenvironment, and patient sera. The binding of CD95L to CD95(Fas), a member of the TNF receptor superfamily, increases the expression of certain proinflammatory factors via initiating non-apoptotic mechanisms rather than apoptosis in macrophages. However, the effect of CD95L on M1/M2 polarization of macrophages is unknown.

Macrophage is a type of cell in our immune system and they are divided into 2 main groups as M1 and M2. M1 macrophages show pro-inflammatory and anti-tumoral responses, while M2 macrophages show anti-inflammatory and pro-tumoral responses. The balance between M1/M2 macrophage polarization plays an important role in the prognosis of many diseases such as cancer and rheumatological diseases. For this reason, it is important to enlighten this topic to regulate the balance of macrophage polarization.

In this study, to investigate the effect of CD95L on primary human macrophage polarization, we isolated buffy coats from healthy donors and isolated peripheral blood monocytes using Ficoll and Percoll density gradient centrifugation technique. Monocytes were then incubated with monocyte/macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) for 7 days and transformed into macrophages. Subsequently, the derived macrophages were stimulated with soluble CD95L and simultaneously polarized into M1 with LPS+IFN-γ, M2a with IL-4, or M2c phenotype with IL-10. Expression levels of M1 and M2 markers in macrophages were analyzed by qPCR and flow cytometry.

In our study, we showed that stimulation of CD95L did not cause a change in M1 and M2 markers in unpolarized macrophages therefore did not change macrophage response. Also, we observed that CD95L stimulation in M1 macrophages increased the expression of proinflammatory markers at the mRNA level. However, CD95L did not cause a change on protein level in M1 macrophages. On the other hand in M2a macrophages, CD95L significantly reduced the cell surface expression of the M2a marker "CD206" at the protein level. However, M2c polarization was not affected by CD95L.

In conclusion, these findings show us that CD95L has an impact on some phenotypes in primary human macrophages and leads them to a pro-inflammatory phenotype. Taking advantage of these properties of CD95L may be promising for immunotherapies.

Keywords: cell death, CD95L, macrophage polarization



P28

ILAÇ YENİDEN KONUMLANDIRMA İLE BELİRLENEN ADAY İLAÇLARIN AKUT MYELOİD LÖSEMI HÜCRELERİNDE PROTEAZOM İNHİBİTÖRÜ İLE KOMBİNASYON TEDAVİSİNİN İNCELENMESİ

Nalan Sümeye Korkmaz¹, Nurdan Keleşoğlu², Özlem Ateş Duru³, Beste Turanlı², Medi Kori²,
Ayşe Mine Yılmaz Göler¹, Kazım Yalçın Arğa², Betül Karademir Yılmaz¹

¹Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Türkiye

²Marmara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Türkiye

³Nişantaşı Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Yüksekokulu, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Türkiye

Akut miyeloid lösemi (AML), ileri yaşla birlikte artan bir insidans ile lösemisinin en yaygın şeklidir. AML, önemli ölçüde genetik, epigenetik ve fenotipik heterojeniteye sahip, oldukça karmaşık bir malignitedir, Proteazom inhibitörleri, artık Multipl Miyelom (MM) ve diğer plazma hücre bozuklukları olan çoğu hasta için standart bakım rejimlerine dahil edilmiştir. Bu yaklaşım, bu hastalar için önemli ölçüde iyileştirilmiş klinik yanıtlar ve genel sağkalım sağlamıştır. Yakın zamanda yapılan bir çalışma, proteazom inhibitörü Ixazomibin reaktif oksijen türlerini indüklediğini ve insan AML hücrelerinde bir miktar antilösemik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Ixazomib rejiminin iyi tolere edildiğini ve relaps/refrakter AML hastaları için yüksek klinik yanıt oranı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Geliştirilmiş tolere edilebilirlik profili, Ixazomib'li AML tedavisinde idame tedavisi veya diğer antilösemik ilaçlarla kombinasyon tedavisi için umut verici bir antilösemik ajan yapmaktadır. İlaçların yeniden konumlandırılması çalışmalarında kullanılan temel bilgi, gen-ilaç ilişkileridir. Bunun yanında ilaç ve etki mekanizması ile ilgili temel bilgilerinde var olması büyük önem taşımaktadır. Son yıllarda, rapor edilen gen-ilaç ilişki sayısı artmış ve bu bilgiler veri bankalarında toplanmaktadır. Hangi ilaçların hangi hastalıklar için hedef olabileceği ise biyoinformatik temelli yöntemler ile belirlenmeye çalışılmaktadır. AML'nin farklı terapötik ajanlara etkisini incelemek yeni tedavilere umut ışığı olabilir.

Bu çalışmada, ilaç yeniden konumlandırma ile seçilmiş aday ilaçların ve proteazom inhibitörü Ixazomib'in yetişkin AML hücrelerindeki etkileri incelenmiştir. Öncelikli olarak, AML hücrelerine 7 farklı aday ilaçın (Nortriptyline, Desipramine, Doxepin, Estramustine, Leucovorine, Risedronate, Hydrochlorothiazide) 24 saatlik uygulaması ardından 20S + 26S proteazom aktivitelerine bakılmıştır. Elde edilen ön veriler ışığında, Desipramine, Leucovorine ve Risedronate ilaçları proteazom inhibitörü Ixazomib ile kombin edilerek AML hücrelerinde canlılık testleri yapılmıştır. Çalışmamızda elde edilen canlılık testlerine göre AML hücrelerine uygulanan kombin ilaç tedavilerinden Desipramine ve Ixazomib kombinasyonu seçilerek, kombin ilaç uygulaması ardından 20S+26S proteazom aktivitesi ve apoptoz progresyonuna bakılmıştır.

Çalışmamızda AML hücrelerine kombin ilaç (Desipramine + Ixazomib) uygulamasının ardından 20S+26S proteazom aktivitesinde azalma görülmüştür. Hücrelerde kombinasyon grubunda kontrol, Desipramine ve Ixazomib grubuna kıyasla apoptoz progresyonu artış göstermiştir.

Çalışmadan elde edilen sonuçlar ışığında, daha kapsamlı analizler yapılması halinde proteazom inhibitörleri ve ilaç yeniden konumlandırma ile seçilmiş trisiklik antidepressan Desipramine AML tedavisinde destekleyici terapötik ajan olabilir.

Anahtar Kelimeler: akut miyeloid lösemi, ilaç yeniden konumlandırma, proteazomal system



P28

INVESTIGATION OF COMBINATION THERAPY OF CANDIDATE DRUG IDENTIFIED BY DRUG REPOSITIONING WITH PROTEASOME INHIBITOR IN ACUTE MYELOID LEUKEMIA CELLS

Nalan Sumeyra Korkmaz¹, Nurdan Kelesoglu², Ozlem Ates Duru³, Beste Turanli⁴, Medi Kori², Ayse Mine Yilmaz Goler¹, Kazim Yalcin Arga², Betul Karademir Yilmaz¹

¹Marmara University, Faculty of Medicine, Department of Medical Biochemistry/Genetic and Metabolic Diseases Research and Investigation Center, Istanbul, Turkey

²Marmara University, Faculty of Engineering, Department of Bioengineering, Istanbul, Turkey

³Nişantaşı University, School of Health Sciences, Department of Nutrition and Dietetics, İstanbul, Turkey

Acute myeloid leukemia (AML) is the most common form of leukemia, with an increasing incidence with advanced age. AML is a highly complex malignancy with significant genetic, epigenetic and phenotypic heterogeneity. Proteasome inhibitors are now included in standard care regimens for most patients with Multiple Myeloma (MM) and other plasma cell disorders. This approach resulted in significantly improved clinical responses and overall survival for these patients. A recent study showed that the proteasome inhibitor Ixazomib induces reactive oxygen species and has some antileukemic activity in human AML cells. The ixazomib regimen has been shown to be well tolerated and associated with a high clinical response rate for patients with relapsed/refractory AML. Its improved tolerability profile makes Ixazomib a promising antileukemic agent for maintenance therapy in the treatment of AML or for combination therapy with other antileukemic drugs. The basic information used in drug repositioning studies is gene-drug relationships. In addition, it is of great importance to have basic knowledge about the drug and its mechanism of action. In recent years, the number of reported gene-drug associations has increased and this information is collected in data banks. It is tried to determine which drugs can be targets for which diseases with bioinformatics-based methods. Examining the effect of AML on different therapeutic agents may be a glimmer of hope for new treatments.

In this study, the effects of drug repositioning selected candidate drugs and the proteasome inhibitor Ixazomib in adult AML cells were investigated. First of all, 20S + 26S proteasome activities were examined after 24 hours of application of 7 different candidate drugs (Nortriptyline, Desipramine, Doxepin, Estramustine, Leucovorine, Risedronate, Hydrochlorothiazide) to AML cells. In the light of the preliminary data obtained, viability tests were performed in AML cells by combining Desipramine, Leucovorine and Risedronate drugs with the proteasome inhibitor Ixazomib. According to the viability tests obtained in our study, the combination of Desipramine and Ixazomib was selected from the combined drug treatments applied to AML cells, then 20S+26S proteasome activities and apoptosis progression were examined after the combined drug administration.

In our study, 20S+26S proteasome activity decreased after combined drug (Desipramine + Ixazomib) administration to AML cells. Apoptosis progression was increased in the combination group compared to the control, Desipramine and Ixazomib groups.

In light of the results obtained from the study, proteasome inhibitors and drug repositioning, selected tricyclic antidepressant Desipramine may be a supportive therapeutic agent in the treatment of AML, if more comprehensive analyzes are performed.

Keywords: acute myeloid leukemia, drug repositioning, proteasomal system



- **SÖZLÜ BİLDİRİ TAM METİNLER**
- **FULL TEXTS OF ORAL PRESENTATIONS**



S1/O1

THE ROLE OF ENDOTHELIAL FUNCTION FAILURE IN COVID-19 DISEASE

Fatma YOLCU¹, Hilal KABADAYI ENSARIOGLU², Damla AKOGULLARI CELIK^{3*}, Hafize Seda VATANSEVER^{2,4}

¹ Faculty of Medicine, Department of Histology & Embryology, Manisa Celal Bayar University, Manisa, Turkey

² Faculty of Medicine, Department of Histology & Embryology, Manisa Celal Bayar University, Manisa, Turkey

³ Department of Histology & Embryology YÖK 100/2000 Stem Cell Studies Program PhD Student, Institute of Medical Sciences, Manisa Celal Bayar University, Manisa, Turkey

⁴ Experimental Health Sciences Research Center, Near East University, Nicosia, Northern Cyprus.

* Correspondence: daakogullari@gmail.com

† Presented at the the 4th Congress of Cell Death Research Society-Turkiye with International Participation, 17-19 March 2022.

Abstract: The SARS-CoV-2 virus penetrates the human cell through the ACE receptor located in the endothelial layer of the respiratory and circulatory tracts. Changes in endothelial function after SARS-CoV-2 infection are thought to cause symptoms of the disease. In this study, it was aimed to examine the effects of ACE inhibitor and activator on endothelial cells in an in vitro model like SARS-CoV-2. Human Umbilical Vein Endothelial (ECV304) cells were used in the study, and 50 ng/ml TNF- α and 100 ng/ml IFN- γ were administered for 48 hours for the model. ECV cells were divided into 6 groups;

Group 1: No treatment was made.

Group 2: TNF- α and IFN- γ treatment

Group 3: ACE activator treatment

Group 4: ACE inhibitor treatment

Group 5: Treatment of TNF- α + IFN- γ + ACE activator

Group 6: Treatment of TNF- α + IFN- γ + ACE inhibitor

After 48 hours of incubation, the groups were fixed with 4% paraformaldehyde and the immunoreactivities of CD31, caspase-1, caspase-3, eNOS and iNOS were evaluated by indirect immunoperoxidase method.

It was determined that CD31 immunoreactivity was decreased in group 2 compared to the control group, while it was highest in group 6. It was observed that increased caspase 1 and 3 immunoreactivity in group 2 decreased in groups 3, 5 and 6. While eNOS and iNOS immunoreactivities were low in groups 3 and 4, eNOS in group 5 and iNOS in group 6 were similar to group 2.

It was concluded that in the SARS-CoV-2 endothelial inflammation model created in vitro, both ACE activator and inhibitor protected CD31 release and suppressed endothelial inflammation by causing a decrease in caspase-1. It was reach the end of that the protection of ACE activator may be higher in endothelial damage, since the decrease in caspase-3 is mainly provided by ACE activator.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV2, Coronavirus, Endothelial dysfunction, ACE2

INTRODUCTION

Coronavirus disease 2019 (Covid-19) caused by severe acute respiratory syndrome with SARS-CoV-2 virus, is pandemic size since the start of 2020 [1-3]. It has been reported that SARS-CoV-2 virus uses the Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) protein in the endothelial layers of the body as a receptor and penetrates the cell through the spike proteins in its content [4-6]. Angiotensin Converting Enzyme (ACE) is responsible for the conversion of Angiotensin 1 to Angiotensin 2 [2,6,7]. ACE2 enzyme produces Angiotensin 2, which stands out with its vasoconstrictor, inflammatory and



fibrotic effects; It converts it to Angiotensin 1-7, which has anti-apoptotic and vasodilator effects [2,6,7]. Endothelial activation begins with the entry of SARS-CoV-2 into the cell, and as a result of the increase in immune system cells in the blood with the activation of the immune system, cytokines secreted more than necessary lead to a cytokine storm [8]. Along with this cytokine storm, the release of proinflammatory cytokines such as IL-6, IL-1 and TNF- α ultimately leads to severe endothelial damage, endothelial cell death and inflammation [9]. Nitric oxide (NO) synthesized by many cell types especially endothelial cells; It has vasodilator, anti-thrombotic and antiviral effects. SARS COV-2; it decreases NO secretion by causing an increase in ROS (Reactive Oxygen Species) and indirectly causes endothelial dysfunction [3,10]. Endothelial dysfunction; it is defined as impaired endothelium-dependent vasodilation with a decrease/destruction of NO release or an increase in the release of vasoconstrictor mediators. It results in permeability, vasoconstriction, inflammation, increased expression of cell adhesion molecules, loss of anti-coagulant properties, thrombosis, and deterioration of vascular homeostasis [3,10,11]. Changes in endothelial function after SARS-CoV-2 infection are thought to cause symptoms of the disease [3]. In this study, it was aimed to examine the effects of ACE inhibitor and activator on endothelial cells in an in vitro inflammation model like SARS-CoV-2 infection [2].

MATERIAL AND METHODS

In Vitro Inflammation Model

Human Umbilical Vein Endothelial (ECV304, ATCC® CRL-1998) cells were used in the study, the cells were cultured in Medium 199 (MA199-A, CAPRICORN) containing 10% fetal bovine serum (FBS) (FBS-11B, CAPRICORN) and 15 mm HEPES (HEP-B, CAPRICORN) and the medium was changed every 2 days and cultured at 37°C in 5% CO₂ and 95% air (Figure 1A). For in vitro inflammation model, ECV304 cells were treated with 50 ng/ml TNF- α (315-01A-50UG, PetroTech) and 100 ng/ml IFN- γ (315-05-100UG, PetroTech) for 48 hours [2] (Figure 1B).

Experimental Groups and Analysis

ECV304 cells were divided into 6 groups (Table 1); and they were cultured in 24-well plate so as to be 1x10⁴ cells in each well. After LPS administration they were fixed with 4% paraformaldehyde (1.04004.0800, MERCK, Darmstadt, Germany) in Phosphate-Buffered Saline (PBS, PBS404.100, Bioshop, Ontario, Canada) at room temperature for 30 min. After washing with PBS twice for 30 min., they were permeabilized with 0.1% Triton X-100 (A4975.0100, Applichem, Darmstadt, Germany) both in PBS at 4°C for 15 min., and then washed with PBS, endogenous peroxidase activity was quenched by incubation with 3% H₂O₂ (1.08597.2500, MERCK, Darmstadt, Germany) for 5 min at room temperature and they were washed with PBS. Cells were incubated with blocking solution (TA-125-UB, THERMOFISHER), for 30 min to block unspecific binding of the antibodies and incubated with anti-CD31 (rabbit polyclonal, bs-0468R, BİOSS, 1/50), anti-Caspase-1 (rabbit polyclonal, BT-AP01191, BT-LAB, dilution:1/100), anti-Caspase-3 (rabbit polyclonal, BT-AP01199, BT-LAB, dilution:1/100), anti-eNOS (rabbit polyclonal, RB-1711-P, Neomarkers, dilution: 1/100), and anti-iNOS (rabbit polyclonal, RB-1605-P, Neomarkers, dilution: 1/100), primary antibodies at 4°C for overnight. After washing with PBS, the cells were incubated with biotinylated goat anti rabbit/mouse IgG (TP-125-UB, THERMOFISHER) for 30 min, followed by three washes in PBS and then peroxidase-conjugated streptavidin (TS-125-UB, THERMOFISHER) were incubated for 30 min. After washing with PBS, diaminobenzidine (DAB, TA-125-HD, ThermoFisher Scientific, MA, USA) was applied to the cells as chromogen for 5 min. After washing with PBS, cells were counterstained with Mayer's hematoxylin (TA-125-MH, ThermoFisher Scientific, MA, USA) for 1 min. After washing with distilled water, they were covered with mounting medium (DMM-125, Spring Bioscience, CA, USA), then viewed under light microscope (Olympus BX43, Tokyo, JAPAN). Immunolabeling was evaluated semi-quantitatively using an additive immunoreactive score reflecting signal intensity, as negative (-), mild (+), moderate (++) and strong (+++).



Table 1. Experimental groups list of cell

Groups	Treatments	
1	No treatment was made.	
2	50 ng/ml TNF- α and 100 ng/ml IFN- γ / 48 hours	
3	7.5 μ g/ml ACE activator dexamethasone / 48 hours	
4	9 μ g/ml ACE inhibitor rethionic acid / 48 hours	
5	50 ng/ml TNF- α and 100 ng/ml IFN- γ / 48 hours	7.5 μ g/ml ACE activator dexamethasone / 48 hours
6	50 ng/ml TNF- α and 100 ng/ml IFN- γ / 48 hours	9 μ g/ml ACE inhibitor rethionic acid / 48 hours

RESULTS

Cell Culture

Treatment group ECV304 cells (Figure 1B) were cultured with 50 ng/ml TNF- α and 100 ng/ml IFN- γ for 48 hours, while the control group (Figure 1A) were cultured simultaneously.

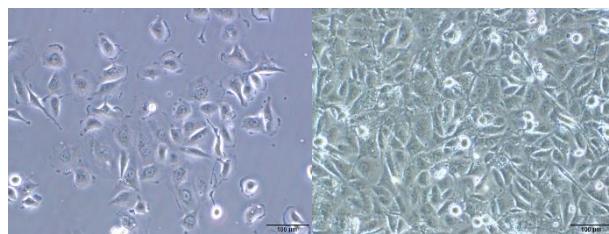


Figure 1. Representative images of ECV304 cell culture at 48 hours; control cells (A) and 50 ng/ml TNF- α and 100 ng/ml IFN- γ treated cells (B). Scale bar: 100 μ m.

Immunohistochemistry

It was determined that endothelial cell marker CD31 immunoreactivity was decreased in group 2 (Figure 2B1) compared to the control group (Figure 2 A1), while it was highest in group 6 (Figure 2 F1). It was observed that increased caspase 1 and 3 immunoreactivities in group 2 (Figure 2 B2 and B3, respectively) decreased in groups 3 (Figure 2 C2, C3), 5 (Figure 2 E2, E3) and 6 (Figure 2 F2, F3). While eNOS and iNOS immunoreactivities were low in groups 3 (Figure 2 C4 and C5, respectively) and 4 (Figure 2 D4 and D5, respectively), eNOS in group 5 (Figure 2 E4) and iNOS in group 6 (Figure 2 F5) were similar to group 2 (Figure 2 B4 and B5).



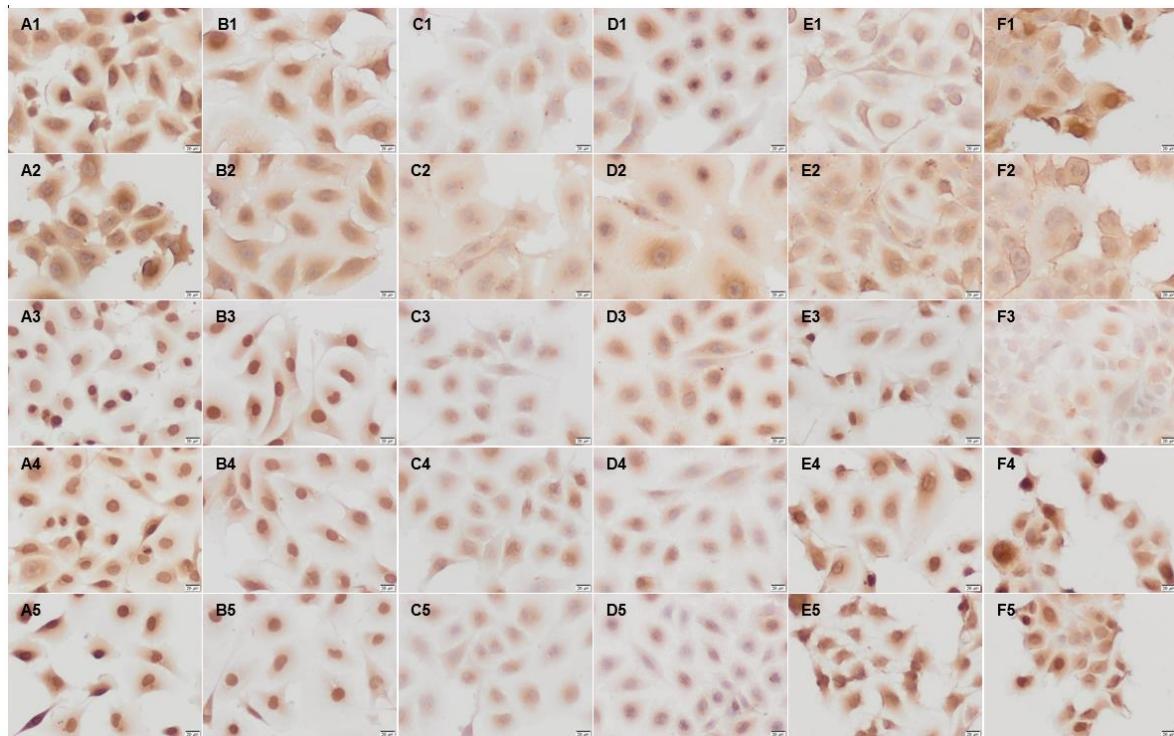


Figure 2. Immunoreactivity of CD31: (A1→F1), Caspase-1 (A2→F2), Caspase-3 (A3→F3), eNOS (A4→F4) and iNOS (A5→F5) in Group 1 (A1-A6), Group 2, (B1-B6), Group 3 (C1-C6), Group 4 (D1-D6), Group 5 (E1-E6) and Group 6 (F1-F6). Scale bars: 20μm.

Discussion & Conclusions

A clinical study with COVID-19 patients showed that mortality was significantly lower in patients using ACE inhibitors or angiotensin II type-I receptor blockers [2,13]. Sinha et al. reported that in mammalian lung and kidney cell lines, vorinostat and isotretinoin are the top up/down regulators of ACE2, and dexamethasone, a corticosteroid used in the treatment of severe acute respiratory syndrome and COVID-19, significantly upregulates ACE2 both in vitro and in vivo [2]. It has been reported that the vitamin A metabolite rethionic acid causes a decrease in blood pressure and attenuation of myocardial damage by upregulating the expression of ACE2 in spontaneously hypertensive rats [12]. RECOVERY trial of results demonstrated that low-dose dexamethasone treatment could reduced the death rate of patients that require respiratory support [12]. In our study, it was observed that CD31 secretion was protected by both ACE activator and inhibitor in the in vitro SARS-CoV-2 endothelial inflammation model. The decrease in caspase-1 was considered as an indicator of endothelial inflammation. The reduction in caspase-3 by ACE activator led to the conclusion that ACE activator would be more protective in endothelial damage. It was concluded that in the SARS-CoV-2 endothelial inflammation model created in vitro, both ACE activator and inhibitor protected CD31 release and suppressed endothelial inflammation by causing a decrease in caspase-1. It was reach the end of that the protection of ACE activator may be higher in endothelial damage, since the decrease in caspase-3 is mainly provided by ACE activator.

Author Contributions: All authors contributed to every stage of the study.

Acknowledgments: This study was supported by 2209A TUBİTAK Student Research Foundation.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Wu, Z., & McGoogan, J. M. (2020). Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72 314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA*, 323(13), 1239–1242. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.2648> Available online: URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32091533> (28.03.2022).

2. Sinha, S., Cheng, K., Schäffer, A. A., Aldape, K., Schiff, E., & Ruppin, E. (2020). In vitro and in vivo identification of clinically approved drugs that modify ACE2 expression. *Molecular systems biology*, 16(7), e9628. Available online: URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32729248> (28.03.2022).
3. Nägele, M. P., Haubner, B., Tanner, F. C., Ruschitzka, F., & Flammer, A. J. (2020). Endothelial dysfunction in COVID-19: Current findings and therapeutic implications. *Atherosclerosis*, 314, 58–62. Available online: URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33161318> (28.03.2022).
4. Del Turco, S., Vianello, A., Ragusa, R., Caselli, C., & Basta, G. (2020). COVID-19 and cardiovascular consequences: Is the endothelial dysfunction the hardest challenge?. *Thrombosis research*, 196, 143–151 Available online: URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32871306> (28.03.2022).
5. Hamming, I., Timens, W., Bulthuis, M. L., Lely, A. T., Navis, G., & van Goor, H. (2004). Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *The Journal of pathology*, 203(2), 631–637. <https://doi.org/10.1002/path.1570> Available online: URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15141377> (28.03.2022).
6. Amraei, R., & Rahimi, N. (2020). COVID-19, Renin-Angiotensin System and Endothelial Dysfunction. *Cells*, 9(7), 1652. Available online: URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32660065> (28.03.2022).
7. Vassiliou, A. G., Kotanidou, A., Dimopoulou, I., & Orfanos, S. E. (2020). Endothelial Damage in Acute Respiratory Distress Syndrome. *International journal of molecular sciences*, 21(22), 8793. Available online: URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33233715> (28.03.2022)
8. Marelli-Berg, F. M., & Jarmin, S. J. (2004). Antigen presentation by the endothelium: a green light for antigen-specific T cell trafficking?. *Immunology letters*, 93(2-3), 109–113. Available online: URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15158605> (28.03.2022).
9. Libby, P., & Lüscher, T. (2020). COVID-19 is, in the end, an endothelial disease. *European heart journal*, 41(32), 3038–3044. Available online: URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32882706> (28.03.2022).
10. Green S. J. (1995). Nitric oxide in mucosal immunity. *Nature medicine*, 1(6), 515–517. Available online: URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7585111> (28.03.2022).
11. Del Turco, S., Vianello, A., Ragusa, R., Caselli, C., & Basta, G. (2020). COVID-19 and cardiovascular consequences: Is the endothelial dysfunction the hardest challenge?. *Thrombosis research*, 196, 143–151 Available online: URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32871306> (28.03.2022).
12. Stephensen, C. B., & Lietz, G. (2021). Vitamin A in resistance to and recovery from infection: relevance to SARS-CoV2. *The British journal of nutrition*, 126(11), 1663–1672. Available online: URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33468263> (28.03.2022).
13. Zhang P, Zhu L, Cai J, Lei F, Qin J-J, Xie J, Liu Y-M, Zhao Y-C, Huang X, Lin Let al (2020) Association of inpatient use of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor blockers with mortality amongpatients with hypertension hospitalized with COVID-19. *Circ.Res*126:1671–1681. Availableonline:URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32302265> (28.03.2022).



S2/O2

HN1 IS PHOSPHORYLATED BY CDK1 IN MITOSIS AND ITS OVEREXPRESSION AFTER G2 LEADS TO AN EARLY EXIT FROM MITOSIS

Gulseren Ozduman¹, Aadil Javed², Sevda Altun³ and Kemal Sami Korkmaz^{4*}

¹ Department of Bioengineering, Faculty of Engineering, Ege University, Izmir, Turkey.
gulserenozduman238@gmail.com;

² Department of Bioengineering, Faculty of Engineering, Ege University, Izmir, Turkey.
adiljaved313@hotmail.com ;

³ Department of Bioengineering, Faculty of Engineering, Ege University, Izmir, Turkey.
sevdambg2012@gmail.com

⁴ Department of Bioengineering, Faculty of Engineering, Ege University, Izmir, Turkey.
ks_korkmaz@yahoo.com

* Correspondence: ks_korkmaz@yahoo.com; Tel.: +905383087613

† Presented at the 4th International Cell Death Research Congress, online platform, 17-19 March 2022

Abstract: Hematological and Neurological Expressed 1 gene encoded HN1 influences the cell cycle differently upon its overexpression in various cell lines. Its native expression level is critical for cell cycle regulation and has not been studied extensively. Hence, there are reports of HN1 being overexpressed in different cancers and there is no experimental evidence of HN1's post-translational modifications and its putative kinases, HN1's role in cancer cell survival remains elusive. Here we report that the HN1 is phosphorylated by Cdk1 kinase and its post-translational modification in the G2 phase of the cell cycle leads to augmented mitotic transition.

Keywords: Cell Cycle, Mitosis, Prostate Cancer and HN1

INTRODUCTION

Hematological and Neurological Expressed 1 (*HN1*) gene also known as Jupiter microtubule associated homolog 1 (*JPT1*), encodes 154 aa peptides corresponding to a small 18 kDa protein [1]. While it is ubiquitous, *HN1* mRNA was first cloned in mouse embryos, and the encoded protein HN1's functional role is still not clear in human cells [2,3]. Varisli and colleagues showed that HN1 overexpression decreased the interaction between β-catenin and E-cadherin, destroyed the F-actin distribution, and consequently increased cell migration in prostate cancer cell line PC-3 [4]. It was also reported that HN1 promotes the progression of breast cancer by enhancing MYC activity [5]. Also, recently our group reported that the HN1 expression is critical and important for centrosome maturation and cell cycle regulation [6]. Since HN1 expression level increases in various types of cancers and its native expression level is critical in the cell cycle, we studied its putative kinases and the post-translational modifications by inhibitor experiments. Here we showed that HN1 is phosphorylated by Cdk1 mitosis onset, and its overexpression promotes early exit from mitosis.

MATERIAL AND METHODS

Cell culture and treatments

RWPE-1, PC3, DU-145, LNCaP, MCF10A, MDA-MB231, SH-SY5Y, and HL-60 cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC), and cultured as ATCC recommended. Nocodazole (165 nM for 16-24 h) was used to arrest cells at the G2/M transition. Thereafter, the kinase inhibitors LY294002 (25 μM) for P13K, SB216763 for GSK3B, RO3306 (10 μM) for CDK1, Flavopiridol (50 nM) as pan CDKs, TAME (100 μM) for APC/C and TBCA (500 nM) for CK2 were used for the last 4 hours right before cells were harvested.



Lentiviral Tet-ON System

Briefly, the HN1 ORF sequence from pCDNA4-HM-HN1 vector cut by restriction enzymes, Sma1 and EcoRV, cloned into pCW57.1 plasmid. The resulting pCW57.1-HM-HN1 construct was transfected into HEK293T cells together with Lentivirus packaging plasmids for virus production. Then the collected Lentiviruses were used for infection, and puromycin selection was performed as reported previously [6]. Finally, HN1 inducible cell lines were treated with doxycycline (1 µg/ml) for various time points to have the inducible over-expression of HN1.

Immunoblotting

Briefly, cells were lysed with RIPA modified buffer and isolated proteins were quantified by a BCA kit (Sigma). 50 µg of total protein lysates were run on an SDS-PAGE for the separation of proteins. Immunoblotting experiments were carried out as previously reported [6].

Flow Cytometer

Cell-cycle distribution of HN1 overexpressed cells was studied by flow cytometry using BD Accuri 5. Briefly, the cells in PBS were fixed by adding 100% cold ethanol by mixing. The cells were permeabilized with 0,1 % triton X-100 and treated with RNase (20 µg/mL) and consequently stained with propidium iodide (5 µg/mL). The analysis was conducted using ModFit software and cell-cycle phases were shown as histograms.

RESULTS

HN1 is differentially expressed protein

Since the expression level might be related to the invasiveness of the cell lines, as suggested previously in prostate cancer [6] and melanoma [1], we performed immunoblotting experiments in different cell lines from varying origins. We observed that the HN1 expression is relatively higher in aggressive cell lines of prostate and mammary cancer, PC3 and MDA-MB-231 cells respectively, and moderate expression in prostate cell line DU-145, mammary epithelial cell line MCF-10A, and promylecytic leukemia HL-60, but clearly lower in normal prostate epithelial cell line RWPE-1 and Neuroblastoma cell line SHSY-5Y cells (figure 1).

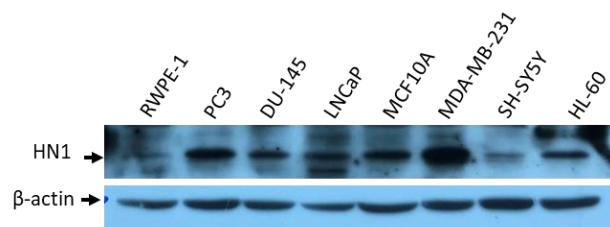


Figure 1. Some non-tumorigenic, moderate cancer, and aggressive cancer cell lines were grown standard culture conditions. Total cell lysates were probed with the HN1 and β-actin antibodies on Western blotting.

HN1 is phosphorylated by Cdk1

Since the cell cycle longevity is another parameter of growth and invasiveness of cell lines of interest, we explored HN1's involvement in mitosis transition. We treated PC3 cells with nocodazole to arrest the cells in the G2/M transition, and we found that the HN1 is phosphorylated in mitosis (data not shown). Then, we used various kinase inhibitors to identify the putative kinase for HN1 phosphorylation during mitosis. Our group demonstrated that HN1 is phosphorylated by GSK3β previously, therefore we used SB216763, a specific inhibitor of GSK3β as a positive control.

While inhibition of AKT and CKII stabilized HN1 phosphorylation, treatments with RO3306 (CDK1-specific inhibitor) and Flavopiridol (pan Cdk inhibitor) significantly blocked HN1's phosphorylation. As it is well recognized that the Cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1) is the major regulator of mitotic transition in the cell cycle, and its activation promotes entry and inactivation promotes exit from mitosis. Thus, the data consistently suggest that HN1 is phosphorylated by CDK1 during mitotic arrest induced by nocodazole treatment and its overexpression led to an early transition of the cells from mitosis (figure 2).

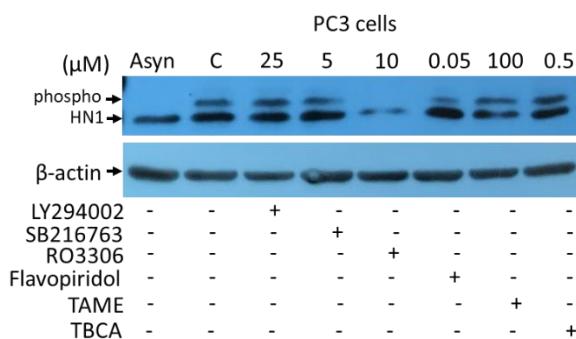


Figure 2. PC3 cells were treated with nocodazole (165 nM for 16 h) with/without various kinase inhibitors as indicated. The mitotic cells were harvested by mitotic shake-off and the lysates were subjected to western blotting with HN1 and β -actin antibodies.

When nocodazole arrested cells are released, G1 population increases by HN1 expression
HN1-inducible PC3 cells (pCW57.1-HMHN1-PC3) were synchronized in G2/M using nocodazole and washed with nocodazole-free media for up to 4 hours (figure 3a). When the inhibitor treatments were performed in nocodazole. HN1 overexpression upon doxycycline treatment did not result in a significant difference in cell cycle distribution after release from nocodazole.

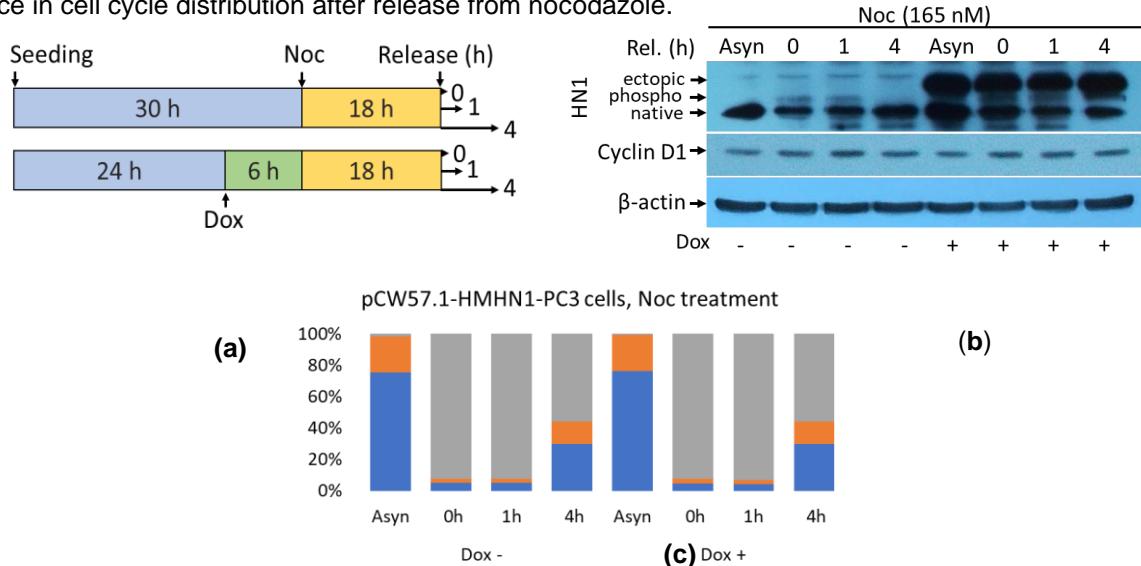
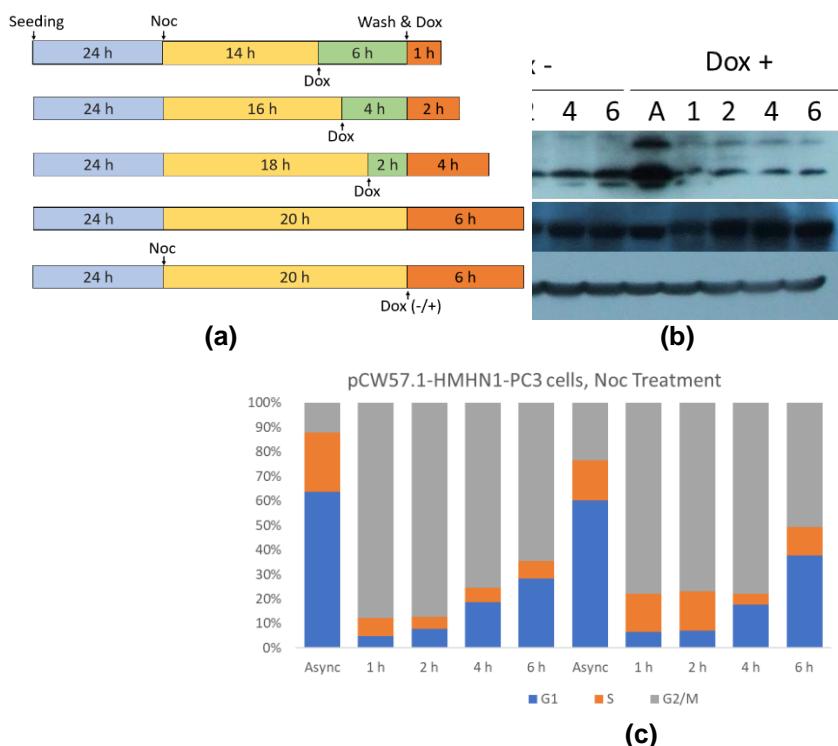


Figure 3.) pCW57.1-HMHN1-PC3 cells were synchronized at G2 (nocodazole treatment) by the presence or absence of doxycycline (dox) and released into G1 with nocodazole-free media for up to 4 hours. (a) Experimental design; (b) total cell lysate labeled with HN1, Cyclin D1, and β -actin antibodies; (c) The PI-stained cell populations were read by flow cytometry to determine cell cycle phases.

Another similar experiment was performed with a shorter burst of doxycycline induction of HN1, where a total of 6 hr treatment of doxycycline in all samples provided a G2 specific response of HN1 overexpression. We observed that the HN1 expressing cells promoted the mitotic exit, subsequently increasing the G1 population at 2 and 4 hours after release from nocodazole. Since mitotic cells are beginning to express the G1 hallmark Cdt1, we evaluated the M phase to G1 transition by Cdt1 expression [7]. Thus, HN1 overexpression stabilized the Cdt1 expression after release into G1 in nocodazole arrested pCW57.1-HMHN1-PC3 cells in comparison to control pCW57.1-HMHN1-PC3 cells without doxycycline induction.



DISCUSSIONS

HN1 protein expression is higher in aggressive cancer cell lines such as PC3 and MDA-MB231 as compared to non-tumorigenic epithelial RWPE-1 and MCF-10A cells, implying that *HN1* is a cancer-related gene. Further, HN1 phospho-form(s) being depleted upon CDK1 inhibitor RO3306 treatment suggests that HN1 is specifically phosphorylated at mitosis by CDK1. When HN1 overexpression stabilized the Cdt1 expression and resulted in a higher G1 population, the data suggest that the HN1 influences replication machinery or cell cycle through kinase-dependent pathway, where Cdk1 plays an important role that will be investigated in further studies.

Conclusions

HN1 is a cancer-related gene, and its encoded protein is specifically phosphorylated at mitosis onset by Cdk1, and overexpression leads to an early exit from mitosis.

Funding: This research was funded by EGE University Scientific Research Projects Coordination, grant number FGA-2021-21986.

REFERENCES

- Laughlin, K. M., Luo, D., Liu, C., Shaw, G., Warrington, K. H., Jr, Law, B. K., & Harrison, J. K. (2009). Hematopoietic- and neu-rologic-expressed sequence 1 (Hn1) depletion in B16.F10 melanoma cells promotes a differentiated phenotype that includes increased melanogenesis and cell cycle arrest. *Differentiation; research in biological diversity*, 78(1), 35–44.
- Varisli, L., Gonen-Korkmaz, C., Syed, H. M., Bogurcu, N., Debelec-Butuner, B., Erbaykent-Tepedelen, B., & Korkmaz, K. S. (2012). Androgen regulated HN1 leads proteosomal degradation of androgen receptor (AR) and negatively influences AR mediated transactivation in prostate cells. *Molecular and cellular endocrinology*, 350(1), 107-117.
- Liu, Z., Yang, D., Li, Y., Jiao, Y., & Lv, G. (2020). HN1 as a diagnostic and prognostic biomarker for liver cancer. *Bioscience Reports*, 40(7).
- Varisli, L., Ozturk, B. E., Akyuz, G. K., & Korkmaz, K. S. (2015). HN1 negatively influences the β-catenin/E-cadherin interaction, and contributes to migration in prostate cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 116(1), 170-178.
- Zhang, C., Xu, B., Lu, S., Zhao, Y., & Liu, P. (2017). HN1 contributes to migration, invasion, and tumorigenesis of breast cancer by enhancing MYC activity. *Molecular cancer*, 16(1), 1-10.

6. Varisli, L., Javed, A., Ozturk, B. E., Akyuz, G. K., Takir, G., Roumelioti, F. M., ... & Korkmaz, K. S. (2021). HN1 interacts with γ -tubulin to regulate centrosomes in advanced prostate cancer cells. *Cell Cycle*, 20(17), 1723-1744.
7. Tada S. (2007). Cdt1 and geminin: role during cell cycle progression and DNA damage in higher eukaryotes. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 12, 1629–1641.

S4/O4

IN SILICO INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF CELL DEATH MODULATIONS IN TRAUMATIC BRAIN INJURY

Arif Kamil Salihoğlu, MD, MRSB

Karadeniz Technical University, Faculty of Medicine, Department of Physiology
 61080, Trabzon, Turkey
aks@ktu.edu.tr

Cell Death Modulations in Traumatic Brain Injury

Introduction: Traumatic brain injury (TBI) is one of the common cause of adult permanent disability. As its physio-pathological mechanisms have yet to be elucidated; in addition to clinical studies, recent evidence indicates hope from *in silico* analysis. This study aimed to detect possible pathophysiological factors in TBI by examining the expression levels of genes, using bioinformatics tools.

Methods: Gene expression levels in the GSE23653 dataset obtained from Gene Expression Omnibus (GEO) database were re-analyzed in the R program for this research. In the dataset, $n=6$ control, $n=15$ mild TBI and $n=13$ severe TBI samples derived from Wistar rat cortical neurons were recruited and gene expression levels were measured. Gene set enrichment analyses were performed in Gene Ontology (GO) and ENRICHR tools. Based on Benjamini-Hochberg correction, adjusted p -values <0.05 were accepted as significant.

Results: Gene expression levels indicated that ATG4C, ATG101, ATG16L1, ATG4B [responsible for autophagy], UBA52, TOMM20 [responsible for mitophagy], CASP2, CASP3, CASP4, CASP12, FASLG, CYCS, MCL1, BCL2L12, BIRC2 [responsible for apoptosis], COL2A1, TRPV4, TNFRSF10B, TNFRSF11B, IFNGR1, IFNGR2 [responsible for necrosis] genes were down-regulated ($p<0.05$); and ATG9B, LAMP2 [responsible for autophagy], PINK1, OPTN, GABARAPL2, MAP1LC3B [responsible for mitophagy], CASP6, CASP9, CASP14, FAS, BCL2L11 [responsible for apoptosis], IL6R, MYLK2 [responsible for necrosis] were up-regulated ($p<0.05$) in severe TBI group, compared with the control and mild-TBI groups.

Conclusion: Results from this *in silico* analysis indicate imbalances in the expression levels (up- and down-regulation) of genes known to be involved in many cell death processes, implicating the involvement of impaired autophagic, mitophagic, apoptotic, and necrotic signaling in the pathophysiological mechanisms of TBI.

Keywords: traumatic brain injury, autophagy, apoptosis, necrosis, bioinformatics.

INTRODUCTION

Traumatic brain injury (TBI) is defined as brain damage caused by external mechanical force such as sudden acceleration or deceleration, impact, or blast waves.[1] TBI may be classified according to severity (from mild TBI to severe TBI), the mechanism (closed or penetrating head injury), or other features (eg occurring in a localized or a widespread area). TBI may result in physical, cognitive, social, emotional, and behavioral symptoms and may range from complete recovery to permanent disability or death. This study aimed to detect possible cellular pathophysiological factors in TBI by examining the expression levels of genes from TBI-modeled rats, using bioinformatics tools.

METHODS

Appropriate datasets were searched on the Gene Expression Omnibus (GEO) online database platform from the National Institute of Health (NIH). GSE23653 dataset was selected and re-analyzed in the biostatistics R program. In the dataset, $n=6$ control, $n=15$ mild TBI, and $n=13$ severe TBI samples derived from Wistar rat primary cortical neurons were recruited and gene expression levels were measured by Ng JM et al.[2]

In that study [2], microarray was performed on 34 arrays on Illumina Rat Ref12V1 expression beadchips; 6 control samples were adopted as universal controls, and $n=3$ was used for each time-points (0h, 8h, 15h, 24h, and 48h) for mild neurotrauma and (8h, 15h, 24h, and 48h) for severe neurotrauma modeling (Only one replicate was present for 0h -severe neurotrauma).

In our study, after reanalyzing the GSE23653 dataset in the R program; Benjamini-Hochberg correction analysis was performed, and adjusted $p<0.05$ values were accepted as «significant». Gene set enrichment analyses were performed in Gene Ontology (GO) and ENRICHR online tools.

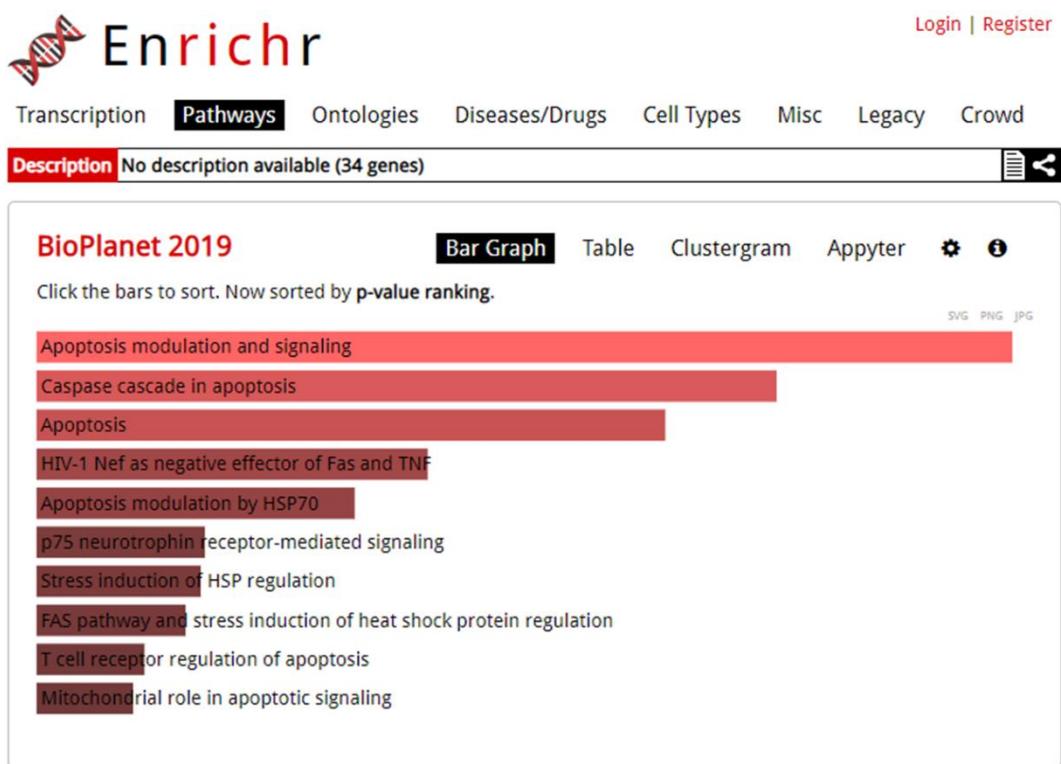
RESULTS

Gene expression levels indicated the following results: Autophagy related 4C cysteine peptidase (ATG4C), autophagy-related protein 101 (ATG101), autophagy related 16 like 1 (ATG16L1), autophagy related 4B cysteine peptidase (ATG4B) [responsible for autophagy], ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1 (UBA52), translocase of the outer mitochondrial membrane complex subunit 20 (TOMM20) [responsible for mitophagy], caspase 2 (CASP2), caspase 3 (CASP3), caspase 4 (CASP4), caspase 12 (CASP12), fas ligand (FASLG), somatic cytochrome C (CYCS), myeloid cell leukemia-1 (MCL1), B-cell lymphoma 2 like 12 (BCL2L12), baculoviral IAP repeat containing 2 (BIRC2) [responsible for apoptosis], collagen type II alpha 1 chain (COL2A1), transient receptor potential cation channel subfamily V member 4 (TRPV4), TNF receptor superfamily member 10b and 11b (TNFRSF10B, TNFRSF11B), interferon gamma receptor 1 and 2 (IFNGR1, IFNGR2) [responsible for necrosis] genes were down-regulated ($p<0.05$); and autophagy related 9B (ATG9B), lysosomal associated membrane protein-2 (LAMP2) [responsible for autophagy], phosphatase and tensin homolog-induced kinase-1 (PINK1), optineurin (OPTN), gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 2 (GABARAPL2), microtubule associated protein 1 light chain 3 beta (MAP1LC3B) [responsible for mitophagy], caspase 6 (CASP6), caspase 9 (CASP9), caspase 14 (CASP14), Fas cell surface death receptor (FAS), B-cell lymphoma 2 like 11 (BCL2L11) [responsible for apoptosis], interleukin 6 Receptor (IL6R), myosin light chain kinase 2 (MYLK2) [responsible for necrosis] were up-regulated ($p<0.05$) in severe TBI group, compared with the control and mild-TBI groups. (Table 1)

Gene symbol	Adjusted p value	Fold change	Microarray ID
Atg4c	5.14e-07	2.84e+01	ILMN_66693
Atg9b	6.81e-07	2.75e+01	ILMN_52361
Atg101	2.99e-04	1.30e+01	ILMN_56005
Atg16l1	1.38e-03	1.01e+01	ILMN_66048
Atg4b	1.78e-06	2.49e+01	ILMN_68388
Lamp2	3.03e-03	1.08e+01	ILMN_52067
Pink1	3.62e-12	8.23e+01	ILMN_53302
Map1lc3b	1.26e-06	2.58e+01	ILMN_58642
Optn	5.03e-03	1.07e+01	ILMN_67016
Uba52	3.13e-06	2.34e+01	ILMN_56729
Tomm20	3.67e-07	2.94e+01	ILMN_57174
Casp2	1.22e-03	1.03e+01	ILMN_66477
Casp9	1.55e-02	6.03e+01	ILMN_57734
Casp14	2.97e-02	5.02e+01	ILMN_59807
Casp12	1.51e-11	7.32e+01	ILMN_50964
Casp4	3.32e-11	6.85e+01	ILMN_55458
Casp6	5.39e-10	5.41e+01	ILMN_56824
Casp3	8.19e-09	4.24e+01	ILMN_50498
Fas	2.13e-02	1.05e+01	ILMN_51642
Faslg	4.52e-02	1.04e+01	ILMN_68070
Cycts	3.29e-02	1.04e+01	ILMN_69834
Bcl2l11	4.27e-03	8.12e+01	ILMN_68510
Mcl1	4.66e-05	1.69e+01	ILMN_50647
Bcl2l12	2.10e-14	1.25e+02	ILMN_62564
Tnfrsf10b	2.40e-04	1.34e+01	ILMN_55962
Birc2	4.53e-02	1.04e+02	ILMN_54243
Col2a1	4.15e-27	1.10e+03	ILMN_50488
Il6r	3.11e-04	1.29e+01	ILMN_64145
Trpv4	3.77e-12	8.21e+01	ILMN_68220
Tnfrsf11b	8.42e-14	1.11e+02	ILMN_60409
Ifngr2	5.23e-11	6.59e+01	ILMN_60094
Ifngr1	6.50e-06	2.15e+01	ILMN_60486
Mylk2	4.02e-09	4.53e+01	ILMN_53538
Tnfrsf10b	2.40e-04	1.34e+01	ILMN_55962

Table 1. Up-regulations (blue labels) and down-regulations (red-labels) of cell death processing genes in GSE23653 dataset

Gene set enrichment analyzes were also performed in Gene Ontology (GO) and ENRICHHR online tools and confirmed in agreement with these results.(Table 2 and 3)

Table 2. Gene Ontology (GO) tool results of selected genes in GSE23653 dataset**Table 3.** ENRICHR tool results of selected genes in GSE23653 dataset

CONCLUSION

The cellular pathogenesis of traumatic brain injury is not fully understood yet and there is no satisfactory treatment. Furthermore, clinical experiments are ongoing, and also recent evidence indicates hope from *in silico* analysis. Results from this *in silico* analysis indicate imbalances in the expression levels (up- and down-regulation) of genes known to be involved in many cell death processes, implicating the involvement of impaired autophagic, apoptotic, and necrotic signaling in the pathophysiological mechanisms of traumatic brain injury.

Acknowledgements: I would like to express my gratitude to my dear supervisor, Prof. Dr. Ahmet AYAR who has never withheld his scientific and spiritual support to me.

References:

- [1] Maas AI, Stocchetti N, Bullock R. Moderate and severe traumatic brain injury in adults. Lancet Neurol. 2008 Aug;7(8):728-41. doi: 10.1016/S1474-4422(08)70164-9. PMID: 18635021.
- [2] Ng JM, Chen MJ, Leung JY, et al. Transcriptional insights on the regenerative mechanics of axotomized neurons *in vitro*. J Cell Mol Med. 2012 Apr;16(4):789-811. doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01361.x. PMID: 21711447.

S5/O5

İNSAN KANSER HÜCRE HATLARINDA CRISPR/eSpCas9 SİSTEMİ ile cIAP1 ve cIAP2 GENLERİİN DUAL NAKAVTININ APOPTOTİK ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Muhammet Burak Batır ^{1*†}, Sevinç Batır ¹, Feyzan Özdal Kurt ¹, Fethi Sırı Çam ²

¹ Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Manisa, TÜRKİYE; soylevsevinc@gmail.com, feyzanozdalkurt@yahoo.com

² Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Bölümü, Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Manisa, TÜRKİYE; sirricam@gmail.com

*Sunucu Yazar: Muhammet Burak BATIR, buraks1@hotmail.com; Tel:05323550487

Kısa Başlık: cIAP1 ve cIAP2 GENLERİİN CRISPR/eSpCas9 SİSTEMİYLE DUAL NAKAVTI

†Uluslararası Katılımlı Hücre Ölümü Araştırma Derneği 4. Kongresi’nde Sunulmuştur, Çevirimiçi, 17-19 Mart 2022.

Özet:

Bu çalışmada, CRISPR/eSpCas9 sistemi ile gen düzenlenmesi araştırmalarına yeni bir perspektif katarak cIAP1 ve cIAP2 genlerine ait benzer nukleotid dizileri filogenetik analiz programı kullanılarak belirlenmiştir. Böylece, tek bir rehber RNA ile CRISPR/eSpCas9 sisteminin aynı anda hem cIAP1 hem de cIAP2 genlerini dual nakavt ederek kanser hücrelerinin apoptoza yönlendirilmeleri amaçlanmıştır. Bu çalışmada iskelet yapısında CRISPR/eSpCas9 sistemini taşıyan plazmidlerin rehber RNA bölgelerine sadece cIAP1, cIAP2 ve aynı zamanda her iki geninde 3. exon bölgesini aynı anda hedefleyen aralayıcı diziler klonlanmıştır. Elde edilen plazmidler kolon (HCT-116) ve serviks (HeLa) insan kanser hücre hatlarına transfekte edilmiş ve cIAP1 ve cIAP2 gen bölgelerinde meydana gelen gen düzenlenmesi T7 endonükleaz I ile belirlenmiştir. Hücrelerde gen ekspresyonlarında meydana gelen değişimler transkript seviyesinde RT-qPCR ile çalışılmıştır. Nakavt sonucu oluşan apoptotik hücreler akış sitometrisi yöntemi ile belirlenmiştir. HCT-116 ve HeLa hücre hatlarında, T7 endonükleaz I analizi sonucu hedef gen bölgelerinin yaklaşık %50 oranında nakavt edildiği görülmüştür. cIAP1 ve cIAP2 genlerinin nakavt sonucu hem HCT-116 hem de HeLa hücrelerinde bu genlerin ekspresyonu azalmış ve anti-apoptotik genlerin ekspresyonunda düşüş, pro-apoptotik genlerin ekspresyon seviyesinde ise artış belirlenmiştir. Özellikle, hücrelerde dual nakavt sağlayan sistemin cIAP1 ve cIAP2 genlerinin ekspresyonunu aynı anda düşürdüğü ve Bcl-xL ve Bad genleri dışında diğer tüm genlerin ekspresyonunda tek nakavt sistemlerine göre daha fazla farklılık meydana getirdiği belirlenmiştir. Ayrıca, yapılan flow sitometri analizi ile nakavt edilen hücrelerin apoptotik hücre oranında belirgin bir artış olduğu belirlenmiştir. Aynı anda cIAP1 ve cIAP2 gen bölgelerinin nakavtının etkili bir şekilde hücreleri apoptoza sürüklediği belirlenmiş olsa da, elde edilen sistemin virüsler aracılığıyla *in vivo* çalışmalarının yapılması planlanmaktadır. Sonuç olarak, CRISPR/eSpCas9 sistemi aracılığıyla özellikle aynı anda cIAP1 ve cIAP2 gen bölgelerinin nakavt edilmesinin tek bir gen bölgesi ile yapılan bir nakavt çalışmasına göre daha etkili bir şekilde kanser hücrelerini apoptoza sürüklediği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: CRISPR/eSpCas9, cIAP1, cIAP2, kanser, apoptoz

GİRİŞ

Apoptoz, hücrelerimizde belli yolaklar tarafından kontrol edilen yüksek oranda korunmuş bir hücre ölümü mekanizmasıdır. Bu mekanizmanın ayırt edici aşaması ise kaspazlar adı verilen aspartik aside özgü sistein proteazlarının aktivitelerini içerir [1, 2]. Normal süreçlerde hücre apoptozi kontrol altında tuttuğu en çok bilinen protein ailelerinden birisi apoptoz inhibitörü ailesi (IAP) proteinleridir. En çok çalışılan IAP ailesi üyeleri ise cIAP1, cIAP2 ve XIAP proteinleridir. Bu parolog proteinler içerisinde ise nukleotid diziliimi bakımından en fazla benzerlik gösteren aile üyeleri ise cIAP1 ve cIAP2 genleridir. cIAP1 ve cIAP2 proteinleri özellikle 2. ve 3. BIR bölgeleri ile prokaspaz-3, -7 ve -9'a bağlanarak apoptoz抑制yonunu gerçekleştirirler [3]. Yapılan çalışmalarla, farklı IAP proteinlerinin ayrı ayrı hedeflenmesinin kanser hücrelerini apoptotik süreçte sürüklediği görülmüştür. Ayrıca, IAP proteinlerini hedefleyen yöntemlerin diğer tedavi yöntemleriyle birlikte kullanılmasının tedaviye daha iyi yanıt verdiği göstermiştir [4].

Genom mühendisliğindeki yeni tekniklerden biri olan ve kümelenmiş düzenli aralıklı palindromik tekrarlarla ilişkili SpCas9 endonükleazi (CRISPR/SpCas9) olarak adlandırılan bir sistem bizlerin insan genomunda arzu edilen genomik düzenlemeleri meydana getirmemize olanak sağlar. Bir rehber RNA (sgRNA) eşliğinde CRISPR/SpCas9 sistemi bizlere istediğimiz hedef gen bölgesinde çift iplik kırığı oluşturarak, bu bölgenin hücrede tamiri esnasında rastgele nukleotid değişimlerini elde etmemizi ve böylece hedef genin nakavt olmasını sağlar [5].

Kolon ve serviks kanser hücrelerinde cIAP1 ve cIAP2 genlerinin tekli ya da dual nakavtının etkisi hakkında literatürde herhangi bir bilgi bulunmaktadır. Bu sebeple çalışmada, cIAP1 ve cIAP2 genlerinin CRISPR/eSpCas9 sistemiyle tekli veya dual nakavtının insan kolon kanser (HCT-116) ve insan serviks kanser (HeLa) hücre hatlarında apoptotik etkisi belirlenmiştir. Ayrıca, tekli veya çoklu gen nakavtının kolon ve serviks kanser hücrelerinin uzun süreli hücre sağ kalımı üzerine olan etkisi incelenmiştir.

MATERIAL VE METOT

Hücre Hatlarının Kültürü

HCT-116 ve HeLa hücre hatları %10 fetal sığır serumu (FBS), 1X Penicillin/Streptomisin ve 1X L-Glutamin içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) besi yerinde kuyucuk başına 25.000 hücre olacak şekilde 24 gözlü kültür kaplarına ekilmiştir. Tek hücre kültürü ise plazmid aktarımı ve puromisin seleksiyonu yapılan hücrelerin 96 gözlü kültür kaplarında 12 gün boyunca tam besi yeri ortamında kültürü yapılması ile gerçekleştirilmiştir.

Plazmidlerin Eldesi, cIAP1 ve cIAP2 Hedef Bölgesine Özgü sgRNA Aralayıcı Dizilerinin Dizaynı ve sgRNA Aralayıcı Dizilerinin KA2601_eSpCas9-G2P Plazmidine Klonlanması:

Çalışma için kullanılan KA2601_eSpCas9-G2P (Plasmid #124203) plazmidi Addgene firmasından tedarik edilen Escherichia coli bakterilerinden kültür sonrası miniprep plazmid izolasyon kiti (Zymo Research, A.B.D) ile elde edilmiştir. Çalışmada cIAP1 ve cIAP2 genlerinin aynı anda dual nakavtının sağlanabilmesi için her iki genin MEGA filogenetik analiz programında ClustalW aracılığıyla dizilemesi yapılmış ve 3. ekzonları üzerinde ortak nukleotid dizimleri bulunmuştur. Sentez ettirilen sgRNA aralayıcı dizilerine ait Forward ve Reverse primerleri plazmidlere Golden Gate yöntemi ile klonlanmıştır. Bunun soncunda, cIAP1 geni için sg1 ve sg2, cIAP2 geni için sg1 ve sg2, ortak dizili cIAP1/2 genleri için sg1 ve sg2 aralayıcı dizilerine sahip toplamda 6 plazmid ve de herhangi bir gen bölgesini hedeflemeyen non-target (NT) plazmidi elde edilmiştir.

HCT-116 ve HeLa Hücrelerine Plazmidlerin Transfeksiyonu:

HCT-116 ve HeLa hücrelerine en az 3 pasajlama işlemi sonrası farklı kuyuculkardaki hücrelerin üzerine tüm plazmidler ve X-tremeGENE™ HP DNA transfeksiyon ajanı (Sigma, A.B.D) ve 1:3 (w/v) oranlarında 50 µl opti-mem ile karıştırılır ve 20 dakika inkübe edilen plazmidler hücrelere transfekte edilmiştir.

Plasmid Transfeksiyonu Gerçekleştirilen HCT-116 ve HeLa Hücrelerinden DNA İzolasyonu ve T7 endonükleaz I Analizi

Herhangi bir transfeksiyon işleminin uygulanmadığı kontrol hücreleri ile plazmid transfeksiyonun ve puromisin seleksiyonun gerçekleştiği hücrelerden DNA izolasyonu QuickExtract™ DNA Extraction (Lucigen/A.B.D) solüsyonunun ilgili prosedürü ile gerçekleştirilmiştir. Ardından hücrelerden elde edilen DNA'lar ve hedef gen primerleri ile PCR çalışmaları gerçekleştirilmiş ve oluşan PCR ürünleri ile T7 endonükleaz I (T7E1) analizleri yapılmıştır.

Plasmid Transfeksiyonu Gerçekleştirilen HCT-116 ve HeLa Hücrelerinden RNA İzolasyonu ve RT-qPCR Analizi

Kontrol hücreleri, NT aralayıcı dizili, sg1 aralayıcı dizili cIAP1, sg1 aralayıcı dizili cIAP2 ve sg2 aralayıcı dizili cIAP1/2 plazmidi ile transfekte olan hücrelerde cIAP1, cIAP2, Bcl-2, Bcl-xL, caspase-3, Bad ve Bax genlerinin ekspresyonlarında meydana gelen değişimler incelenmiştir. EvaGreen master mix ve hedef gen primerleri kullanılarak Rotor-Gene Real-Time qPCR (Qiagen, A.B.D) cihazında analizler β-microtubulin (B2M) house keeping genine göre gerçekleştirilmiştir.

Plasmid Transfeksiyonu Gerçekleştirilen HCT-116 kolon ve HeLa Hücrelerinden RNA İzolasyonu ve Apoptozis Analizi

Apoptozis analizi, NT aralayıcı dizili, sg1 aralayıcı dizili cIAP1, sg1 aralayıcı dizili cIAP2 ve sg2 aralayıcı dizili cIAP1/2 plazmidi ile transfekte olan hücrelerde puromisine bağlı hücre ölümünden kaçınmak için puromisin seçimi olmadan 48 ve 72 saatlik transfeksiyon sonrası Muse Annexin V and Dead Cell kiti (Millipore, Billerica, MA, ABD, MCH100105) kullanılarak ilgili kitin prosedürüne göre yapılmıştır.

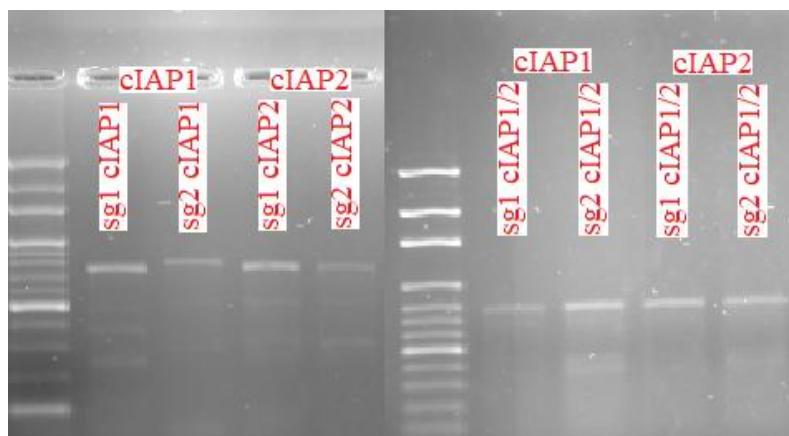
Istatistiksel Analizler

Gruplar arası farklılıkların analizi için SPSS (istatistiksel paket yazılım, Windows 23.0) kullanılmıştır.

SONUÇLAR

cIAP1 ve cIAP2 Gen Bölgelerini Hedef Alan sgRNA Aralayıcı Dizilerinin T7E1 Analizi

T7E1 analiz sonuçlarına göre cIAP1 gen bölgesi için sg1, cIAP2 gen bölgesi için sg1 ve cIAP1/2 dual gen bölgesi için sg2 sgRNA aralayıcı dizileri en iyi nakavt sonucunu vermiştir.



Şekil 1. cIAP1 ve cIAP2 gen bölgelerini hedef alan sgRNA aralayıcı dizilerinin T7E1 agaroz jel görüntüleri.

HCT-116 ve HeLa Hücrelerinde cIAP1, cIAP2, Anti-apoptotik ve Pro-apoptotik Genlerin Ekspresyon Seviyelerinin RT-qPCR Aracılığıyla Belirlenmesi

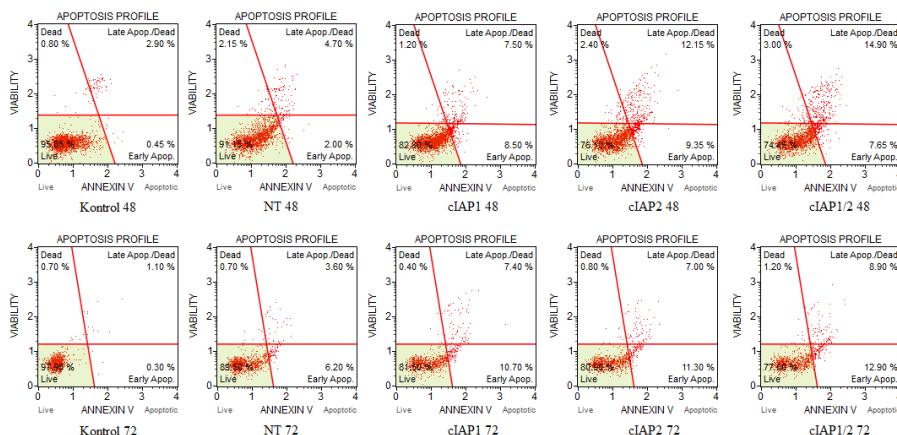
cIAP1, cIAP2 ve cIAP1/2 sistemlerinin aktarıldığı hem HCT-116 hem de HeLa hücrelerinde cIAP1 ve cIAP2 gen ekspresyon seviyesi negatif ve pozitif kontrol gruplarına göre 48. ve 72. saatlerde belirgin anlamlı bir düşüş göstermiştir ($p<0.0001$). Bcl-2, Bcl-xL, Bak, Bad ve caspase-3 gen ekspresyonları bakımından, her iki hücre hattında belirlenen Bcl-xL ve Bad gen ekspresyonları dışında, kontrollere göre en fazla anlamlı değişikliğe sebep olan cIAP1/2 sistemi olmuştur (Şekil 2).



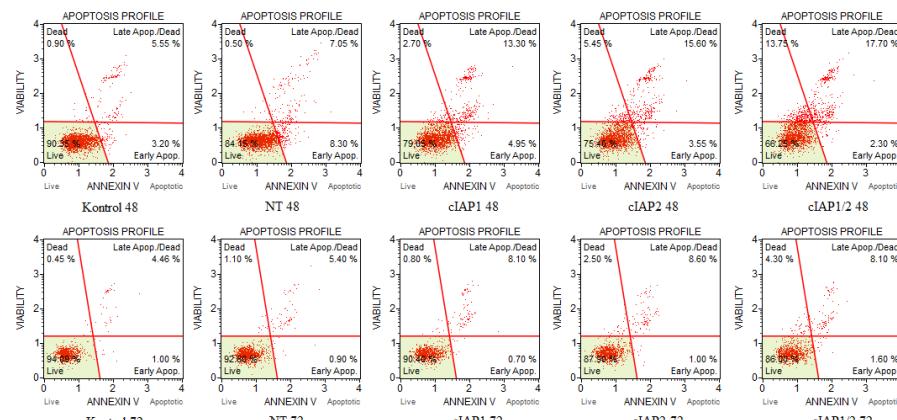
Şekil 2. HCT-116 ve HeLa hücrelerinin gruplarına ait relatif gen ekspresyon değerleri.

cIAP1, cIAP2 ve cIAP1/2 Sistemlerinin Transfekte Edildiği HCT-116 ve HeLa Hücrelerinde Apoptozis Analizi

CRISPR/eSpCas9 sistemi ile gen düzenlemesi sonucu HCT-116 ve HeLa hücrelerinde cIAP1 ve cIAP2 genlerinin nakavt edildiği hücrelerde flow sitometri yöntemi ile apoptozis analizi yapılmıştır. Post-transfeksiyon sonrasında 48. ve 72. saatlerde, cIAP1, cIAP2 ve cIAP1/2 sistemleri ile transfekte edilmiş HCT-116 hücrelerinden elde edilen apoptotik hücre oranı, pozitif kontrole ait hücrelere kıyasla (Şekil 3) anlamlı bir artış göstermiştir ($p<0,0001$, $<0,0001$, $<0,0001$). HeLa hücrelerinde ise post-transfeksiyon sonrasında 48. saatte cIAP1, cIAP2 ve cIAP1/2 sistemleri ile transfekte edilmiş hücrelerde elde edilen apoptotik hücre oranı bakımından, pozitif kontrole göre yalnızca dual nakavt etkisine sahip cIAP1/2 sistemi anlamlı bir artış sağlamıştır ($p=0,006$). Post-transfeksiyon sonrasında 72. saatte ise cIAP1, cIAP2 ve cIAP1/2 sistemleri ile transfekte edilmiş HeLa hücrelerinden elde edilen apoptotik hücre oranı, pozitif kontrole ait hücrelere kıyasla (Şekil 4) anlamlı bir artış göstermiştir ($p=0,049$, $p=0,012$, $p=0,008$).



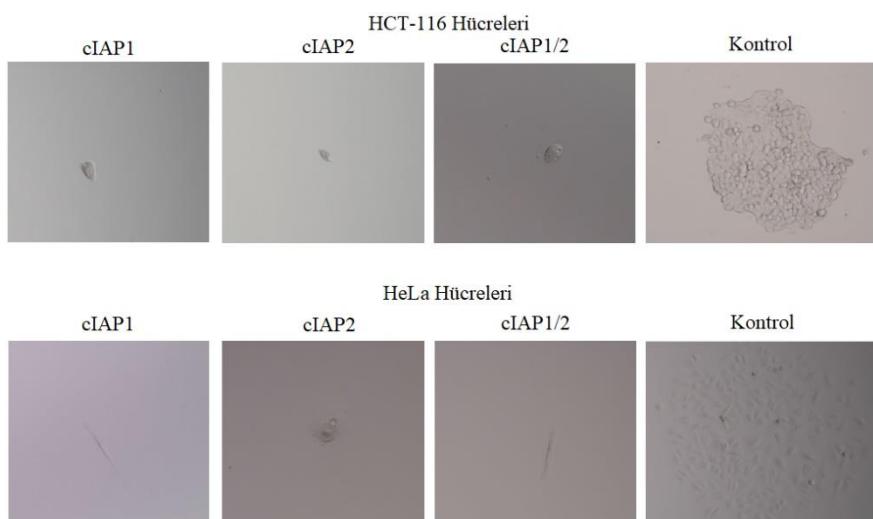
Şekil 3. HCT-116 hücrelerinin gruplarına ait apoptotik grafik değerleri.



Şekil 4. HeLa hücrelerinin gruplarına ait apoptotik grafik değerleri.

cIAP1, cIAP2 ve cIAP1/2 Sistemlerinin Transfekte Edildiği HCT-116 ve HeLa Hücrelerinin Tek Hücre Kütürleri

cIAP1, cIAP2 ve cIAP1/2 sistemlerinin transfekte edildiği ve puromisin seleksiyonu yapıldığı HCT-116 ve HeLa hücreleri 96 gözlü kültür kaplarına her kuyucukta bir hücre olacak şekilde aktarılmış ve 12 gün boyunca kültüre alınmışlardır. 12. gün sonunda cIAP1, cIAP2 ve cIAP1/2 sistemlerinin transfekte edildiği HCT-116 ve HeLa hücrelerinde herhangi bir proliferasyon belirlenmezken, herhangi bir işlemin yapılmadığı kontrol hücreleri çoğalarak koloni oluşturmuşlardır (Şekil 5).



Şekil 5. cIAP1, cIAP2 ve cIAP1/2 sistemlerinin transfekte edildiği HCT-116 ve HeLa hücrelerinin tek hücre kültür görüntüleri.

TARTIŞMA VE SONUÇ

cIAP1 ve cIAP2 genlerinin kanser hücrelerinde tek başlarına ve birlikte nakavtlarının, hücreleri etkili bir şekilde hem apoptoza sürüklendiğini hem de anti- ve pro-apoptotik genlerinin ekspresyonlarında kontrollere göre daha belirgin değişimlere sebep olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, cIAP1 ve cIAP2 genlerinin aynı anda nakavtının kanser hücrelerini apoptoza sürükleme bakımından daha etkili bir yöntem olduğu görülmüştür. Bu veriler ışığında elde edilen CRISPR/eSpCas9 sisteminin tümör spesifik promotor eşliğinde virüs aracılıklı olarak *in vivo* çalışmalarında tümör dokularına verilmesiyle birlikte tedaviye yönelik bir çalışmanın yapılması planlanmaktadır. Ayrıca, bu sistemin kanser hücreleri üzerindeki etkisinin TNF- α ve TRAIL ligandları ile kombine çalışması yapılması planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Verma AK, Ahmad I, Yadav P, Rahmani AH, Khan B, Alsahli MA, Joshi PC, Ahmad H, Ali Beg MM (2020) Expression and Correlation of Cell-Free cIAP-1 and cIAP-2 mRNA in Breast Cancer Patients: A Study from India. *J Oncol* 25: 3634825.
2. Silke J, Vucic D. (2014) IAP family of cell death and signaling regulators. *Methods Enzymol* 545: 35-65.
3. Ward GA, Lewis EJ, Ahn JS, Johnson CN, Lyons JF, Martins V, Munck JM, Rich SJ, Smyth T, Thompson NT, Williams PA, Wilsher NE, Wallis NG, Chessari G (2018) ASTX660, a Novel Non-peptidomimetic Antagonist of cIAP1/2 and XIAP, Potently Induces TNF α -Dependent Apoptosis in Cancer Cell Lines and Inhibits Tumor Growth. *Mol Cancer Ther* 17(7):1381-1391.
4. Finlay D, Vamos M, González-López M, Ardecky RJ, Ganji SR, Yuan H, Su Y, Cooley TR, Hauser CT, Welsh K, Reed JC, Cosford ND, Vuori K (2014) Small-molecule IAP antagonists sensitize cancer cells to TRAIL-induced apoptosis: roles of XIAP and cIAPs. *Mol Cancer Ther* 13(1): 5-15.
5. Batır MB, Şahin E, Çam FS (2019) Evaluation of the CRISPR/Cas9 directed mutant TP53 gene repairing effect in human prostate cancer cell line PC-3. *Mol Biol Rep* 46(6): 6471-6484.

S7/07

USNİK ASİT İLAÇ ADAYI MOLEKÜLÜNÜN ÜÇLÜ-NEGATİF MEME KANSERİ HÜCRE HATTI (MDA-MB-468) ÜZERİNE MİRNA BOYUTUNDA TERAPÖTİK ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ

Demet Cansaran-Duman^{1,*}, Mine Ensoy¹, Huda Abdırızak Jama¹

¹ Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Keçiören, Ankara, Türkiye

* dcansaran@yahoo.com, Tel: 0312 222 58 26

4. Uluslararası Katılımlı Hücre Ölümü Araştırma Derneği Kongresi, 17-19 Mart 2022

Özet: Meme kanseri tüm dünyada ölüme neden olan ciddi bir kanser türündür. Luminal A, Luminal B ve HER2'yi eksprese eden meme kanseri, normal benzeri ve bazal benzeri (üçlü negatif: TNBC) olarak sınıflandırılır ve tüm meme tümörü tipleri kemoterapi ile tedavi edilebilirken, ER ve PR eksprese eden tümörler de hormon üretimini veya tümör büyümeyi engelleyen ajanlarla tedavi edilir. Ancak TNBC için etkili bir tedavi yöntemi henüz geliştirilmemiştir. Bu nedenle alternatif terapötik moleküllerin araştırılması ve bunların anti-kanserojen etkilerinin moleküller karakterizasyonu, kanser hastalarının tedavisine katkıları için umut vermektedir. Doğal bileşiklerin anti-kanser özellikleri, mikroRNA (miRNA) ifadesinin düzenlenmesiyle bağlantılıdır. Sonuç olarak, doğal biyolojik organizmalardan elde edilen moleküller kullanılarak miRNA'ların profilini belirlemek kanser tedavisinde kritik öneme sahiptir. Çalışma kapsamında araştırılması amaçlanan ilaç adayı molekülü olarak usnik asit (UA), önemli biyolojik aktiviteleri olan bir metabolittir. Bu çalışmada, UA sekonder metabolitinin TNBC üzerindeki anti-kanserojen etkisi ve miRNA düzeyinde ifade seviyesi profillemesi yapılmıştır. UA'nın MDA-MB-468 ve normal meme epitel hücre dizisi (MCF-12A) üzerindeki etkisinin bir sonucu olarak yanıt veren miRNA'ları belirlemek için miRNA-mikrodizin analizi kullanılmıştır. Ayrıca, çeşitli biyoinformatik araçlar kullanılarak, UA'ya duyarlı miRNA'lar tarafından hedeflenen gen setleri ve yolak analizleri gerçekleştirildi. xCELLigence analizi kullanılarak MDA-MB-468 hücresinin analizi sonucunda, UA için IC₅₀ konsantrasyonu 50.34 μM olarak belirlendi ve zamana bağlı etki 31 h olarak belirlendi. UA (IC₅₀ konsantrasyonu) uygulamasının ardından miRNA analizi sonucunda, MDA-MB-468 hücrelerine özgü 85 miRNA belirlendi. miRNA zenginleştirme analizine göre miRNA hedeflerinin çoğunlukla PI3K/AKT/mTOR ve apoptoz yolaklarında rol oynadığı bulundu. Çalışma, UA liken sekonder metabolitinin miRNA düzeyinde en agresif meme kanseri hücresinde uygulanmasından sonra aktif olan sinyal yollarını belirleyen ilk çalışma oldu. UA'ya yanıt veren miRNA'ların TNBC'nin tedavi ve teşhisinde terapötik ve biyobelirteç olma potansiyelini belirlemek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Üçlü negative meme kanseri, usnik asit, miRNA

GİRİŞ

Meme kanseri dünya genelinde ölüme yol açan önemli bir kanser türündür [1]. Luminal A, Luminal B, HER2 ifade eden, normal-benzeri ve bazal-benzeri (üçlü-negatif (TNBC): ER-, PR-, HER2-) şeklinde moleküller tiplere ayrılan meme kanserinde, tüm meme tümörü tipleri kemoterapi ile tedavi edilebilirken, ER ve PR'yi ifade eden tümörler, hormon üretimine veya tümöre müdahale eden maddelerle de tedavi edilmektedir [1, 2]. Ancak TNBC meme kanseri için henüz etkin bir tedavi metodu geliştirilememiştir [3]. Bu nedenle alternatif terapötik özellikli moleküllerin araştırılması ve anti-kanserojen etkisinin moleküller boyutta karakterize edilmesi kanser hastaları için tedaviye olabilecek katkıları nedeniyle umut kaynağı olmaktadır. Doğal kökenli moleküllerin anti-kanser özellikleri, mikroRNA (miRNA) ifadesinin düzenlenmesi ile ilişkilidir. Bu nedenle doğal kaynaklı moleküller kullanılarak miRNA'ların profilinin değiştirilmesi kanser tedavisinde oldukça önemlidir [4]. Çalışma kapsamında araştırılması hedeflenen ilaç adayı molekül usnik asit, liken sekonder metabolitleri arasında yer alan önemli biyolojik aktivitelere sahip metabolittir [5, 6]. Gerçekleştirilen çalışmada usnik asit sekonder metabolitinin üçlü-negatif meme kanser üzerine olan anti-kanserojenik etkisi ve miRNA boyunda ifade profillemesi gerçekleştirılmıştır. Bu kapsamında usnik asitin MDA-MB-468 ve normal meme epitel hücre hattı (MCF-12A) üzerindeki etkisi sonucu yanıt veren miRNA'lar miRNA-mikrodizin analizi ile belirlenmiştir. Ayrıca farklı biyoinformatik araçlar kullanılarak usnik asite cevap veren miRNA'ların hedeflediği gen setleri ve yolak analizleri belirlenmiştir.

MATERİYAL VE METOD

Mikrodizin analizi

100 μ M usnic acid %0.05 DMSO konsantrasyonunda DMEM besiyeri içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. Usnik Asit'in 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13 ve 1.56 μ M olmak üzere farklı konsantrasyonları hazırlandı. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Cihazı ile hücre canlılığı ve proliferasyonu belirlendi. RTCA Software Lite yazılımı kullanılarak IC₅₀ değeri belirlendi. Usnik asitin IC₅₀ konsantrasyonunun uygulaması sonrası MDA-MB-468 hücrelerinden toplam RNA izolasyonu Trizol ile gerçekleştirılmıştır. Mikroarray Hibridizasyonu GeneChip 3' IVT Kit ile gerçekleştirılmıştır. Mikroarray yöntem basamakları; Poly-A Kontrollerin Hazırlanması, Total RNA / Poly-A Kontrol Karışımının Hazırlanması, Birinci Zincir cDNA Sentezi, İkinci Zincir cDNA Sentezi, In Vitro Transkripsiyon/aRNA İşaretleme, aRNA'nın Saflaştırılması, aRNA Fragmentasyon İşlemi, Hibridizasyon, Yıkama, boyama, tarama olarak gerçekleştirılmıştır.

İstatistiksel Analiz

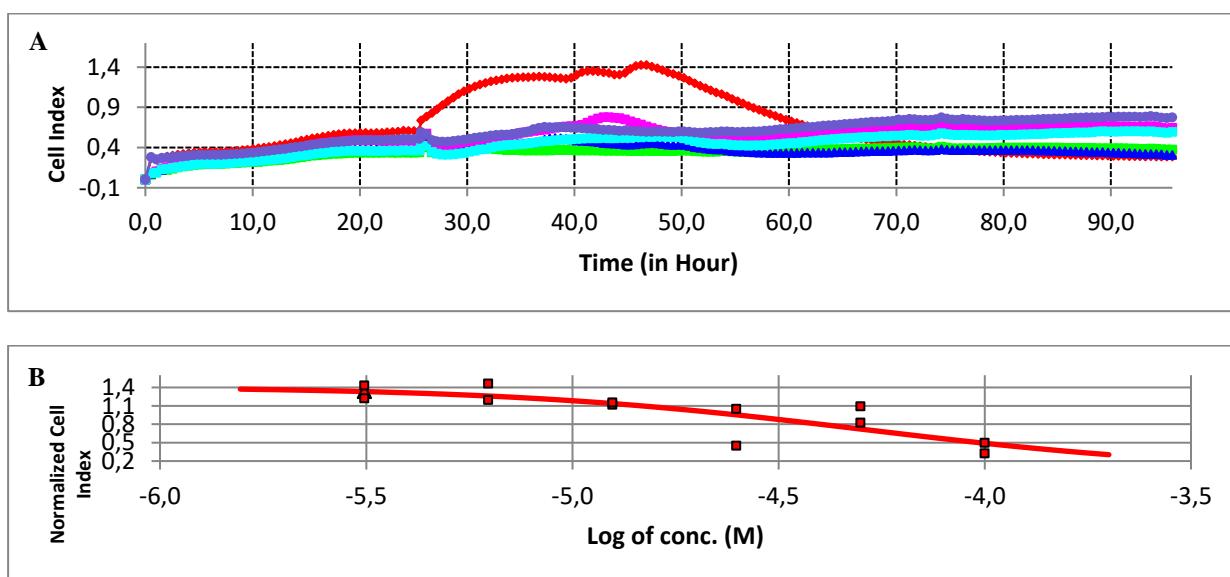
BRB Array Tools programı kullanılarak analiz edilmiştir. Her bir çipten elde edilen veriler öncelikle arka plan gürültüsünden kurtulmak ve bütün çipleri birbirleri ile kıyaslanabilir hale getirmek için Robust Multiarray Analysis (RMA) algoritması kullanılarak normalize edilmiştir. Normalizasyon sonrası elde edilecek çip verileri birbirleri ile kıyaslanarak usnik asit uygulanan hücrelerde DMSO ile muamele edilen hücrelere göre farklılık gösteren genler belirlenmiştir. İki grup birbiri ile kıyaslanırken t-test yöntemi kullanılacaktır ve farklılık gösteren gen setlerinin anlamlı olup olmadığına p değerine göre karar verilmiştir. p<0.05 olan genler anlamlı olarak farklılık gösteren genler olarak tespit edilmiştir.

Farklılık gösterdiği belirlenen miRNA'ların qRT-PCR ile doğrulanması

Usnik asit sekonder metabolitinin mikrodizin yöntemi uygulanması sonucunda elde edilen sonuçların doğrulanması qRT-PCR yöntemi ile yapılmıştır. Bu aşamada RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve qRT-PCR analizleri gerçekleştirılmıştır. qRT-PCR sonuçlarının analizi delta delta Ct metodu kullanılarak gerçekleştirılmıştır. Normalizasyon geni olarak RNU6 kullanılmıştır.

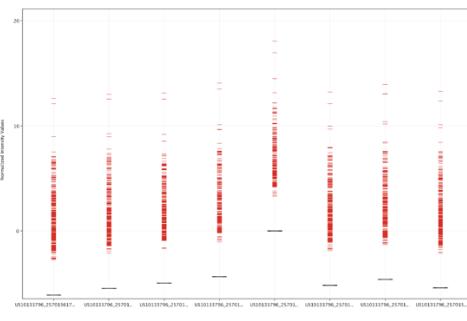
BULGULAR

MDA-MB-468 hücre hattının xCELLigence RTCA S16 cihazında analizi sonucunda usnik asit için IC₅₀ konsantrasyonu 50.34 μ M ve zamana bağlı etkisi de 31. saat olarak belirlenmiştir (Şekil 1A, 1B).



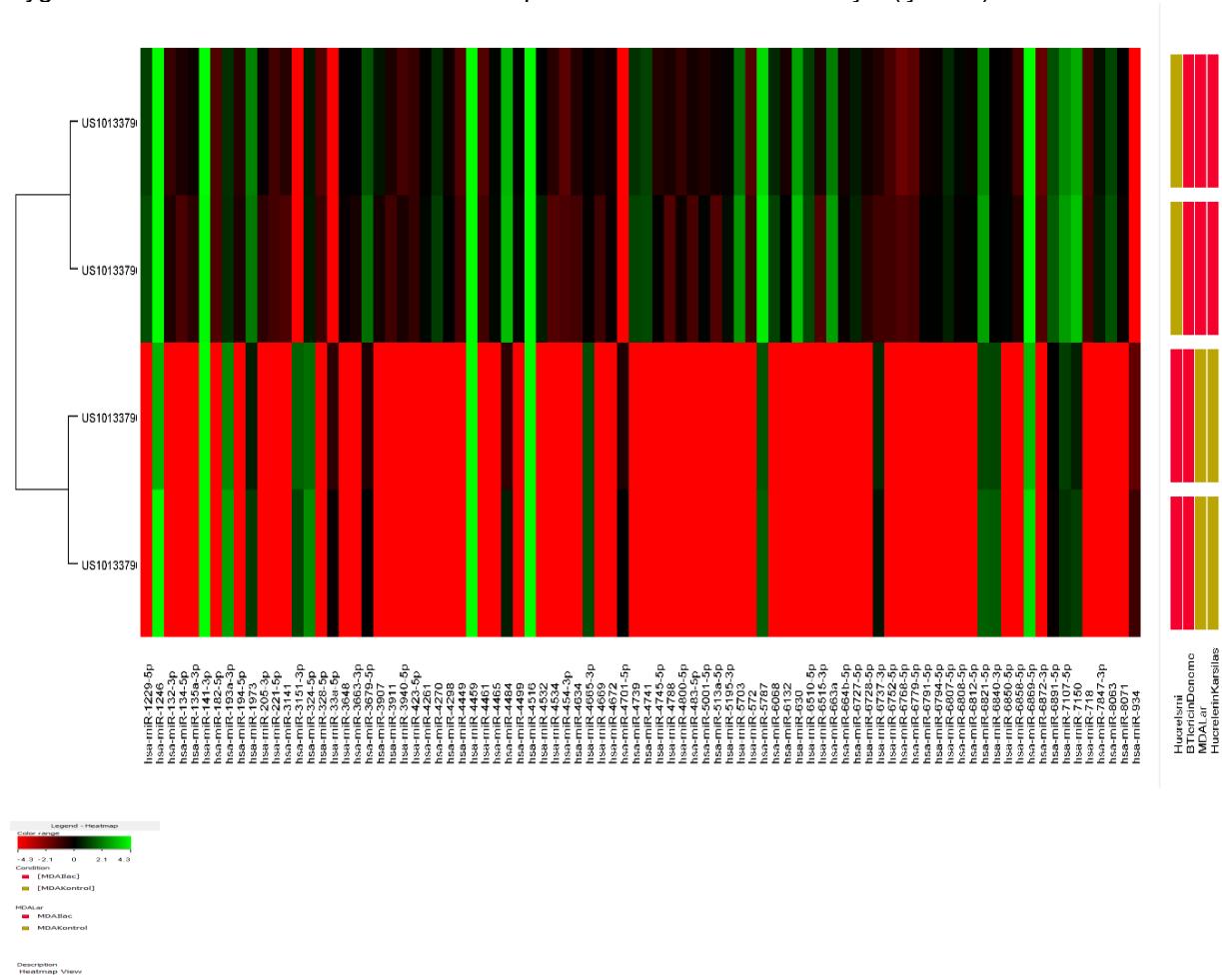
Şekil 1. Usnik asit uygulaması sonrası MDA-MB-468 hücre hattının xCELLigence RTCA S16 cihazında analizi (A) Usnik asitin farklı konsantrasyonlarda anti-proliferatif etkinliğinin belirlenmesi (B) Usnik asitin MDA-MB-468 hücresi üzerindeki etkinliğinin log tabanında gösterimi.

Usnik asit uygulanmış ve uygulanmamış (DMSO:çözücü) MDA-MB-468 hücreleri üç biyolojik tekrarlı olarak mikrodizin analizine (GeneChip™ Human Genome U133 Plus 2.0 Array, Agilent) alınmıştır. Elde edilen sonuçlar öncelikle normalizasyon işlemeye tabi tutulmuştur daha sonrasında istatistiksel analiz yapılmıştır (Şekil 2).



Şekil 2. Mikrodizin analizi sonuçlarının normalizasyon işlemi

Elde edilen sonuçlara Moderated T-Test uygulanmıştır ve Multiple Testing Correction (Corrected p-value) için Bonferroni FWER metodu seçilmiştir. Ayrıca kat değişimi >2 ve $p<0.05$ 'den küçük olanlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. miRNA analizi sonucunda ise usnik asit IC₅₀ konsantrasyonu uygulaması sonrası MDA-MB-468 hücresi spesifik 85 miRNA belirlenmiştir (Şekil 3).



Şekil 3. MDA-MB-468 (DMSO) vs MDA-MB-468 (Usnik asit) uygulaması sonrası ifade veren miRNA'ların heat-map analizi

Gerçekleştirilen mikrodizin ve istatistiksel analizi sonuçlarına göre meme kanseri ile ilişkilendirilebilecek 6 miRNA daha ileri analizler için belirlenmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. MDA-MB-468 hücresine usnik asit uygulaması sonrası hedeflenen 6 miRNA listesi

No	miRNA
1	hsa-miR-1229-5p
2	hsa-miR-4465
3	hsa-miR-4739
4	hsa-miR-5703
5	hsa-miR-6068
6	hsa-miR-8063

Benzer şekilde MDA-MB-468 hücresine cevap veren hsa-miR-132-3p 47 kat ifade seviyesi arttığı mikrodizin analizi sonrası belirlenmiştir. miR-132-3p ifade seviye düzeyini valide etmek amacıyla qRT-PCR analizi yapılmıştır ve analiz sonrası kontrole göre bu miRNA'nın ifade seviyesinin 21.9 kat arttığı tespit edilmiştir. miRNA zenginleştirme analizine göre miRNA hedeflerinin çoğunlukla PI3K/AKT/mTOR ve apoptoz yolaklarında rol oynadığı bulunmuştur.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışma sonucunda usnik asit liken sekonder metabolitinin en agresif meme kanseri hücresine uygulanması sonrasında aktifleşen sinyal yolaklarının miRNA düzeyinde belirlenmesi ilk defa gerçekleştirilmiştir. Üçlü-negatif kanser tedavisinde ve tanısında usnik asite cevap miRNA'ların terapötik ve biyobelirteç olabilme potansiyelleri ileri çalışmalarla desteklemesi ile mümkün gözükmelektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Ouyang, L.; Shi, Z.; Zhao, S.; Wang, F.-T.; Zhou, T.-T.; Liu, B.; Bao, J.-K. Programmed Cell Death Pathways in Cancer: A Review of Apoptosis, Autophagy and Programmed Necrosis. *Cell Prolif.*, **2012**, 45 (6), 487–498.
- [2] Hart, I. R.; Souhami, R. L.; Tannock, I.; Hohenberger, P.; Horiot, J. C. Metastasis. In *Oxford Textbook of Oncology Second Edition*; Oxford University Press: New York, **2002**; pp 103–113.
- [3] Kennecke, H.; Yerushalmi, R.; Woods, R.; Cheang, M. C. U.; Voduc, D.; Speers, C. H.; Nielsen, T. O.; Gelmon, K. Metastatic Behavior of Breast Cancer Subtypes. *J. Clin. Oncol.*, **2010**, 28 (20), 3271–3277.
- [4] Zhang, B.; Tian, L.; Xie, J.; Chen, G.; Wang, F. Targeting MiRNAs by Natural Products: A New Way for Cancer Therapy. *Biomed. Pharmacother.*, **2020**, 130, 110546.
- [5] Stanojković, T. Investigations of Lichen Secondary Metabolites with Potential Anticancer Activity. In *Lichen Secondary Metabolites*; Springer International Publishing: Cham, **2015**; pp 127–146.
- [6] Kim, H.; Kim, K. K.; Hur, J.-S. Anticancer Activity of Lichen Metabolites and Their Mechanisms at the Molecular Level. In *Recent Advances in Lichenology*; Springer India: New Delhi, **2015**; pp 201–208.

S9/O9**MEME KANSERİNDE ATRANORİN'İN FERROPTOZ YOLAĞI İLE İLİŞKİLİ FARMASÖTİK ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ****Mine Ensoy¹, Demet Cansaran-Duman^{1,*}**¹ Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Keçiören, Ankara, Türkiye

* dcansaran@yahoo.com, Tel: 0312 222 58 26

4. Uluslararası Katılımlı Hücre Ölümü Araştırma Derneği Kongresi, 17-19 Mart 2022

Özet: Meme kanseri dünyada kadınlar arasında en sık rastlanan kanser türüdür. Mevcut tedaviler meme kanseri hastaları için etkili bir çözüm oluşturamamaktadır. Dolayısıyla teşhis ve tedavi için yeni terapötik yaklaşımın geliştirilmesi, alternatif aday moleküllerin araştırılması gerekmektedir. Önemli bir liken sekonder metaboliti olan Atranorin'in (ATR) çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu bilinmektedir. Ferroptoz, demir-bağımlı lipid peroksitlerin ve reaktif oksijen türlerinin birikiminden kaynaklanan bir hücre ölüm şeklidir. Çalışmamızda bir liken sekonder metaboliti olan ATR'nin meme kanseri hücrelerinde ferroptoz yoluğu üzerinden anti-proliferatif ve ferroptotik etkinliğinin gen ifadesi seviyesinde belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla çalışmada MDA-MB-231 ve BT-474 meme kanseri hücrelerinin proliferasyonu MTT testi ve xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz cihazı ile belirlenmiştir. Ayrıca ferroptoz yoluğu ile ilişkili hedef genlerinin ifade seviyesi qRT-PCR ile belirlenmiştir. Çalışma sonucunda meme kanseri hücrelerine ATR uygulaması ile hücre canlılığında doza ve zamana bağlı bir azalma olduğu gösterilmiştir. Ayrıca kontrole kıyasla GPX4 gen ifade seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı değişimler olduğu qRT-PCR deneyleri ile tespit edilmiştir. Çalışmamız literatürde ilk defa ATR'nin meme kanseri üzerinde ferroptoz yoluğu üzerinden anti-proliferatif etkiye sahip olmasını ve ATR'nin meme kanseri tedavisinde ilaç adayı molekül olarak kullanım etkinliğini belirlemiştir.

Anahtar Kelimeler: Meme Kanseri; Atranorin; Ferroptoz Yoluğu**GİRİŞ**

Meme kanseri dünyada kadınlar arasında en sık rastlanan kanser türüdür [1]. Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre 2020'de yaklaşık 2,3 milyon yeni meme kanseri vakası rapor edilmiştir [2]. Meme kanseri farklı patolojik ve klinik etkilere sahip olan heterojen bir hastalıktır ve bu fenotipik çeşitliliğin hastalığın tanı, прогноз ve tedavisi önemlidir [3]. Meme kanseri temelde 5 ana alt tipe ayrılmaktadır; Lüminal A, Lüminal B, HER2-pozitif, Üçlü-negatif / basal benzeri (TNBC) ve Normal benzeri meme kanseri [4]. Meme kanserin tedavisinde şu anda birinci basamak tedavi stratejileri arasında cerrahi müdahale, adjuvan radyoterapi, hormon tedavisi, kemoterapi ve hedefe yönelik biyoterapi yer almaktadır [5]. Son yıllarda tanı ve tedavide gözle görülen ilerlemeye rağmen, meme kanseri olan hastaların klinik sonuçlarında nüks ve metastaz halen yüksek oranda görülmektedir [6]. Ayrıca rutin tedavide kullanılan kemoterapötiklerin sağlıklı hücrelere karşı toksik etki göstermesi, hastaların zaman içerisinde tedaviye direnç gelişirmesi meme kanseri hastaları için etkili bir çözüm oluşturamamaktadır [7]. Bu nedenle, teşhis ve tedavi için yeni hedeflerin ve yeni terapötik yaklaşımın geliştirilmesi, alternatif ve yenilikçi aday moleküllerin araştırılması gerekmektedir.

Likenler, fotobiyonlar ve mikrobiyonlar olarak hareket eden fotootrotifik algler veya sinobakterilerin mantarlar ile simbiyotik bir yaşam kurması sonucu oluşan organizmalardır [8]. Likenler çeşitli biyolojik aktiviteler sergilediği bildirilen sekonder metabolitler üretmektedir [8]. Likenlerdeki önemli sekonder metabolitlerden biri olan Atranorin'in (ATR) birçok biyolojik aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir [9]. ATR, moleküler formülü $C_{19}H_{18}O_8$ olan depsid molekülüdür [10]. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda ATR'nin önemli anti-mikrobiyal, anti-viral, anti-inflamatuar, antioksidan, anti-kanser ve anti-proliferatif özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir [9, 10].

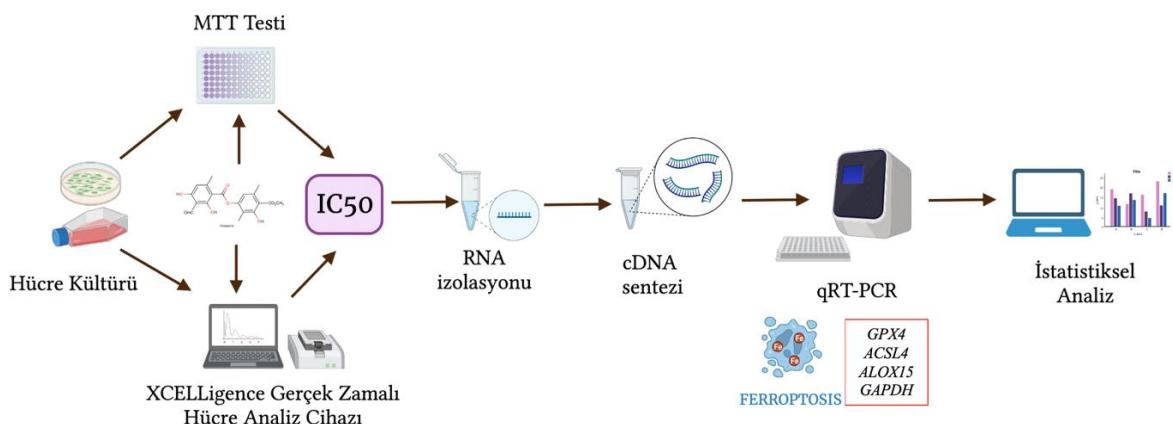
Ferroptoz; apoptoz, nekroz ve otofaji gibi diğer hücre ölüm yollarından önemli farklılıklar gösteren, demir-bağımlı lipid peroksitlerin ve reaktif oksijen türlerinin birikiminden kaynaklanan bir hücre ölüm şeklidir [11]. Ferroptoz, iskemi-reperfüzyon hasarı, nörolojik hastalıklar, inflamatuar hastalıklar ve kanser gibi diğer birçok hastalığın gelişimi ve tedavisinde önemli bir rol sahiptir [12]. ATR'nin birçok biyolojik aktivitesinin yanında güçlü bir antioksidan ve anti-inflamatuar özelliğe sahip olması onun kanser hücrelerinde ferroptozu baskılayarak antiproliferatif özellik göstereceğini düşündürmektedir. Gerçekleştirilen bu çalışmada bir liken sekonder metaboliti olan ATR'nin farklı alt tiplerdeki meme kanseri hücrelerinde ferroptoz yoluğu üzerinden anti-proliferatif ve ferroptotik etkinliğinin gen ifadesi seviyesinde belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERIAL VE METOT

İlaç adayı molekül ATR ticari olarak temin edilmiş, 100 μM ATR %0.05 DMSO konsantrasyonunda DMEM besiyeri içerisinde çözülmüş olarak hazırlanmıştır. İnsan meme kanseri hücre hatları MDA-MB-231 (ER-, PR-, HER2-) ve BT-474 (ER+, PR+, HER2+) %10 FBS (Fetal Sığır Serum), %1 pen/strep içeren DMEM yüksek glukoz besiyerinde kültüre edilmiştir. Farklı ATR konsantrasyonları kullanılarak MTT Testi ve xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Cihazı ile hücre canlılığı ve proliferasyonu belirlenmiştir. ATR uygulaması sonrası BT-474 hücrelerinden toplam RNA izolasyonu Trizol reaktifi ile gerçekleştirılmıştır. cDNA sentezi EURx sentez kiti ile gerçekleştirılmıştır. qRT-PCR deneyinde kullanılan reaksiyon koşulları ve hedef gen primer sekansları Şekil 1'de yer almaktadır (Şekil 1). Referans gen olarak GAPDH kullanılmıştır. Deney dizaynı Şekil 2'de gösterilmektedir (Şekil 2).

qRT-PCR Koşulları		a
Denaturation:	95°C 10 dk	
Cycling:	95°C 10 sn 60°C 45 sn 72°C 10 sn	45 cycle
Melting:	95°C 10 sn 65°C 10 sn 95°C continuous	
Cooling:	40°C 30 sn	
PRIMER	SEKANS 5'-3'	b
GPX4 F	ACAAGAACGGCTGCGTGGTGA	
GPX4 R	GCCACACACTGTGGAGCTAGA	
ACSL4 F	GCTATCTCCTCAGACACACCGA	
ACSL4 R	AGGTGCTCCAACCTGCCAGTA	
ALOX15 F	CAGACGTGGCTGTGAAAGAC	
ALOX15 R	AAGAGACAGGAAACCCTCGG	

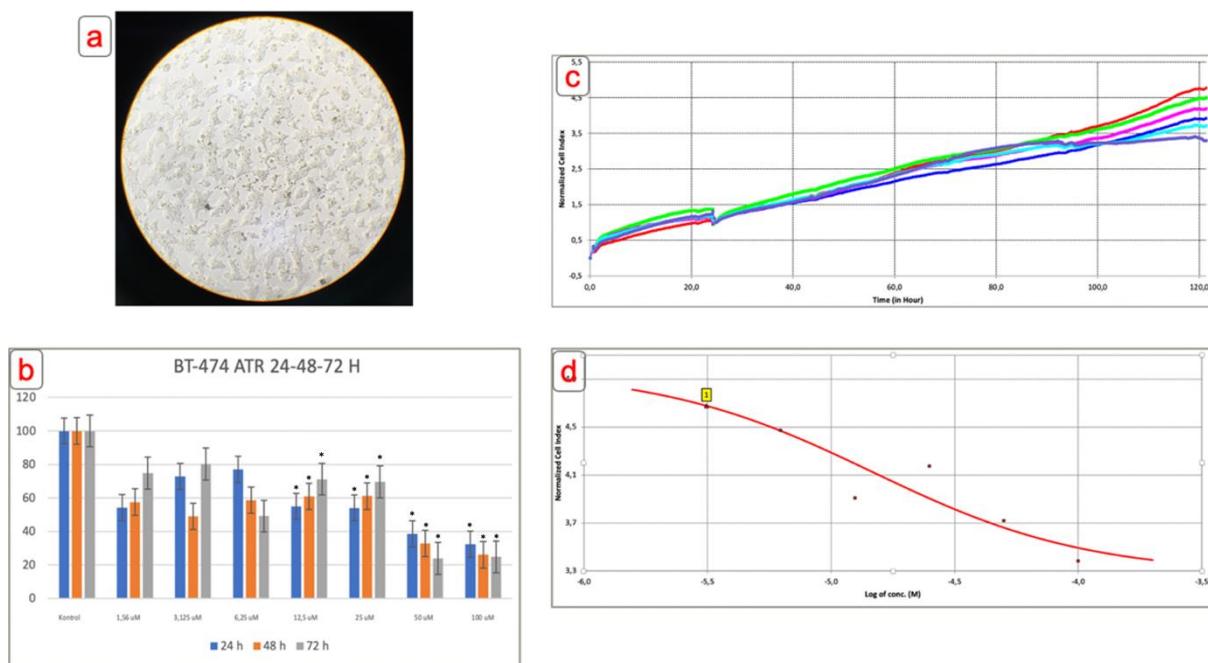
Şekil 1. qRT-PCR reaksiyon koşulları (a), hedef gen primer sekansları (b).



Şekil 2. Deney dizaynı

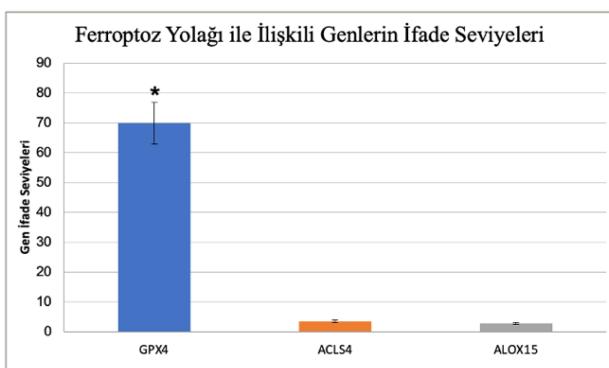
BÜLGÜRLER

MTT testi ve xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz cihazı ile MDA-MB-231 ve BT-474 hücre hatlarının hücre canlılığı ve proliferasyonu incelenmiş ve BT-474 hücrelerinde ATR uygulanmasından sonra hücre canlılığında doza ve zamana bağlı bir azalma olduğu belirlenmiştir (Şekil 3). Ancak MDA-MB-231 hücre proliferasyonunda BT-474 meme kanser hücresine göre anti-proliferatif etki düzeyi daha düşük gözlenmiştir. Sitotoksite testleri sonucunda BT-474 hücrelerinde ATR'nın IC₅₀ konsantrasyonu 48 saatte 14.7 μM olarak belirlenmiştir.



Şekil 3. BT-474 meme kanseri hücreleri görüntüsü (10x) (a), BT-474 hücrelerine ATR uygulaması ile MTT testi sonucu (b) ve BT-474 hücrelerine ATR uygulaması sonucu xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz cihazı sonucu (c, d). (* $P < 0.05$)

qRT-PCR deneyleri sonucunda IC_{50} konsantrasyonunda ATR uygulamasının BT-474 hücrelerinde *GPX4* gen ifade seviyesini ölçüde artırdığı belirlenmiştir. Ancak *ACSL4* ve *ALOX15* gen ifade seviyelerinde istatistiksel bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 4).



Şekil 4. Kontrole kıyasla ATR uygulaması sonrası BT-474 hücrelerindeki ferroptoz yolu ile ilişkili gen ifade seviyeleri. (* $P < 0.05$)

TARTIŞMA VE SONUÇ

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada ATR'nın farklı alt tiplerde yer alan meme kanseri hücreleri üzerindeki anti-proliferatif etkisi MTT testi ve xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz cihazı ile incelenmiştir. BT-474 meme kanseri hücrelerinde ATR uygulamasından sonra hücre canlılığında doza ve zamana bağlı bir azalma gözlenmiş ve IC_{50} konsantrasyonu 48 saatte $14.7 \mu\text{M}$ olarak belirlenmiştir. mRNA seviyesinde gerçekleştirilen çalışmalarla ATR'nın ferroptoz yolu ile ilişkili genlerin ifade seviyelerini düzenleyerek ferroptoz yolağını modüle ettiği belirlenmiştir. Kontrole kıyasla ATR'nın BT-474 hücrelerinde önemli bir ferroptoz önleyici gen olan *GPX4*'ün gen ifade seviyesini ölçüde artırdığı ve bu sayede ferroptozu önleyebileceğini belirlenmiştir. ATR'nın meme kanseri hücrelerinde ferroptoz yolu üzerindeki etkisinin tam olarak aydınlatılabilmesi için biyokimyasal testlerle, mRNA seviyesinde ve protein boyutunda daha fazla çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır.

Gerçekleştirdiğimiz çalışma ATR'nin BT-474 meme kanseri hücreleri üzerinde anti-proliferatif etkiye sahip olduğunu ve bu etkinin ferroptoz yolu ile ilişkili olduğunu gösteren literatürdeki ilk çalışma olması nedeniyle önemlidir. Çalışmamız ATR'nin BT-474 meme kanseri hücreleri üzerindeki anti-proliferatif etkisini ve meme kanseri tedavisinde potansiyel bir terapötik aday olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Potansiyel terapötik etkinin doğrulanması için *in vivo* çalışmaları ve klinik çalışmaları içeren ileri araştırmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- [1] Pilleron, S.; Soto-Perez-de-Celis, E.; Vignat, J.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Bray, F.; Sarfati, D. Estimated Global Cancer Incidence in the Oldest Adults in 2018 and Projections to 2050. *Int. J. Cancer*, **2021**, *148* (3), 601–608.
- [2] Siegel, R. L.; Miller, K. D.; Jemal, A. Cancer Statistics, 2020. *CA. Cancer J. Clin.*, **2020**, *70* (1), 7–30.
- [3] Song, D.; Cui, M.; Zhao, G.; Fan, Z.; Nolan, K.; Yang, Y.; Lee, P.; Ye, F.; Zhang, D. Y. Pathway-Based Analysis of Breast Cancer. *Am. J. Transl. Res.*, **2014**, *6* (3), 302–311.
- [4] Feng, Y.; Spezia, M.; Huang, S.; Yuan, C.; Zeng, Z.; Zhang, L.; Ji, X.; Liu, W.; Huang, B.; Luo, W.; et al. Breast Cancer Development and Progression: Risk Factors, Cancer Stem Cells, Signaling Pathways, Genomics, and Molecular Pathogenesis. *Genes Dis.*, **2018**, *5* (2), 77–106.
- [5] Liu, H.; Ye, H. Screening of the Prognostic Targets for Breast Cancer Based Co-Expression Modules Analysis. *Mol. Med. Rep.*, **2017**, *16* (4), 4038–4044.
- [6] Koboldt, D. C.; Fulton, R. S.; McLellan, M. D.; Schmidt, H.; Kalicki-Veizer, J.; McMichael, J. F.; Fulton, L. L.; Dooling, D. J.; Ding, L.; Mardis, E. R.; et al. Comprehensive Molecular Portraits of Human Breast Tumours. *Nature*, **2012**, *490* (7418), 61–70.
- [7] Nagini, S. Breast Cancer: Current Molecular Therapeutic Targets and New Players. *Anticancer. Agents Med. Chem.*, **2017**, *17* (2), 152–163.
- [8] Dar, T. U. H.; Dar, S. A.; Islam, S. U.; Mangral, Z. A.; Dar, R.; Singh, B. P.; Verma, P.; Haque, S. Lichens as a Repository of Bioactive Compounds: An Open Window for Green Therapy against Diverse Cancers. *Semin. Cancer Biol.*, **2021**, No. May.
- [9] Studzinska-Sroka, E.; Galanty, A.; Bylka, W. Atranorin - An Interesting Lichen Secondary Metabolite. *Mini-Reviews Med. Chem.*, **2017**, *17* (17), 1633–1645.
- [10] Harikrishnan, A.; Veena, V.; Lakshmi, B.; Shanmugavalli, R.; Theres, S.; Prashantha, C. N.; Shah, T.; Oshin, K.; Togam, R.; Nandi, S. Atranorin, an Antimicrobial Metabolite from Lichen *Parmotrema Rampoddense* Exhibited in Vitro Anti-Breast Cancer Activity through Interaction with Akt Activity. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **2021**, *39* (4), 1248–1258.
- [11] Dixon, S. J.; Lemberg, K. M.; Lamprecht, M. R.; Skouta, R.; Zaitsev, E. M.; Gleason, C. E.; Patel, D. N.; Bauer, A. J.; Cantley, A. M.; Yang, W. S.; et al. Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death. *Cell*, **2012**, *149* (5), 1060–1072.
- [12] Mao, H.; Zhao, Y.; Li, H.; Lei, L. Ferroptosis as an Emerging Target in Inflammatory Diseases. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **2020**, *155*, 20–28.
- [13] Solárová, Z.; Lisková, A.; Samec, M.; Kubatka, P.; Büsselberg, D.; Solár, P. Anticancer Potential of Lichens' Secondary Metabolites. *Biomolecules*, **2020**, *10* (1), 87.
- [14] Goga, M.; Elečko, J.; Marcinčinová, M.; Ručová, D.; Bačkorová, M.; Bačkor, M. Lichen Metabolites: An Overview of Some Secondary Metabolites and Their Biological Potential. In *Co-Evolution of Secondary Metabolites*; Mérillon, J.-M., Ramawat, K. G., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2020; pp 175–209.

S10/O10**İNSAN NÖROBLASTOMA HÜCRE HATTINDA SİKLOOKSJENAZ-2 İNHİBİTÖRÜ ARACILIĞIYLA FERROPTOZUN HEDEFLENMESİ****Fatma Birdemir¹, Gizem Kaftan¹, Güliz Armagan¹**

¹ Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye
Kısa Başlık: Nöroblastomada Ferroptozun Hedeflenmesi

Özet

Nöroblastoma çocukluk çağının kanserlerine bağlı ölümün %15'inden sorumlu bir tümördür. Prognozu kötü seyreden bu kanser tipinde COX-2, Bcl-2 ve GPX4 protein ekspresyonunda artış dikkat çekicidir. Yanı sıra kanser hücrelerinde yüksek düzeyde bulunan prostaglandinlerin tümör büyümeye ve gelişmesine katkı sağladığı gösterilmiştir. Bu durum kanserde siklooksijenaz (COX) enzimini ve beraberinde kaspazdan bağımsız hücre ölüm şekillerini (nekroptoz ve ferroptoz) hedef alan çalışmaların önünü açmıştır. Çalışmamızın amacı COX-2 inhibitörü bir ilaç olan selekksibi nöroblastoma tedavisinde ferroptozu hedefleyerek değerlendirmektir.

Çalışma kapsamında hücre canlılığında %50 inhibisyonu sağlayan konsantrasyonu belirlemek için farklı konsantrasyonlarda (0.1-100 μ M) selekksib insan nöroblastoma hücre hattına (SH-SY5Y) 48 ve 72 saat süre ile uygulanmış ve MTS yöntemi ile hücre canlılığı ölçülmüştür. Ardından, ferroptoz inhibitörü varlığında selekksibin hücre canlılığına etkisi değerlendirilmiştir. Seleksib uygulanmış hücrelerde ferroptoz parametrelerinden GPX4 ve lipid peroksidadyon ürünü 4- hidroksinonenal (4-HNE-modifiye protein aracılığıyla) düzeyleri Western Blot teknigi ile ölçülmüştür. Deney sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel analizi GraphPad Prism Version 5.0 programı kullanılarak yapılmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre, 48 saat uygulanan selekksib (1-50 μ M) nöroblastoma hücrelerinde canlılığı azaltmış ve IC50 değeri 13,01 μ M olarak bulunmuştur. Kontrol grubu ile karşılaşıldığında selekksib uygulamasının GPX4 protein düzeyini istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalttığı; 4-HNE düzeylerini ise anlamlı şekilde artttığı saptanmıştır ($p<0.05$).

Buna göre, COX-2 inhibitörü olarak görev yapan selekksib, nöroblastoma hücrelerinde ferroptotik hücre ölümünü indüklemektedir. Nonsteroidal antiinflamatuar ilaçların, kanser patogenezinde önemli bir paya sahip olduğu tespit edilen ferroptozda etkili olabileceği gösterilmiştir. Elde edilen bulgularla birlikte, ileri çalışmalar antiinflamatuar ilaçların antikanser aktivitesindeki moleküler mekanizmaların aydınlatılmasına katkı sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Kanser; Nöroblastoma; Seleksib; Ferroptoz

GİRİŞ

Nöroblastoma, doğumda ve erken çocukluk döneminde ortaya çıkabilecek bir çocukluk çağının tümördür. (Edsjo, 2007). Mevcut terapötik seçenekler, devam eden klinik araştırmalar ve temel bilim araştırmalarına rağmen, öngörülemeyen klinik seyri sebebiyle nöroblastomalar karmaşık bir hastalık olmaya devam etmektedir (Ishola, 2007). Ağrı, vücutun enfeksiyonu ve yaralanma durumlarında oluşturduğu doğal bir alarmdır. Çalışmalar, ağrıının fizyolojisini, inflamatuvar aracı "Siklooksijenaz" (COX) enzimi aracılığıyla gerçekleştigi ortaya çıkarmıştır. Nonsteroidal antiinflamatuar ilaçlar (NSAİ'lər) ilk kez 1960'ların başlarında sentezlenmiştir. Etki mekanizmaları COX enziminin COX-1 ve COX-2 olarak adlandırılan iki izoformunun inhibisyonu üzerindendir. Kanserde artan COX-2 seviyesi, karsinogenez sırasında tümör hücresi proliferasyonu, anjiojenezi, invazyon ve metastazi teşvik etmektedir (Brown, 2005, Ladetto, 2005, Ferrandina, 2002, Liu, 2009). Bu bağlamda COX-2 inhibitörleri ile prostaglandin sentezinin baskılanması antiinflamatuar ilaçların antikanser ajanları olarak da kullanılabilirliğini göstermektedir. Seleksib selektif COX-2 inhibitörü bir ilaçtır. Diğer NSAİ'lere benzer şekilde, seleksib, *in vitro* ve *in vivo* tümör başlangıcını ve tümör hücresi büyümeyi engeller (Phillips, 2002, Arber, 2006, Steinbach, 2000). Dolayısıyla, seleksib antikanser tedavi açısından ilgi çekici bir bileşik haline gelmektedir.

Hücre ölümü organizmanın gelişimi, homeostazı ve hastalıkların seyri için kritiktir. Özellikle son yıllarda yapılan çalışmalar ferroptoz adı verilen, demirin aktif rol aldığı, GPX4 ile regülle edilen bir hücre ölüm şecline yoğunlaşmıştır. Ferroptoz, morfolojik olarak bütünlüğünü korumuş bir hücre membranı, mitokondriyal hasar, oksitlenmiş çoklu doymamış yağ asitleri ve lipid peroksidasyon ürünlerinde artış ile karakterizedir (Lei vd, 2020). Metabolik yolaklar halen çalışılmakla birlikte son birkaç yıldır yapılan kapsamlı araştırmalar çeşitli düzenleyici mekanizmaların yanı sıra çok sayıda spesifik indukleyici ve inhibitör bileşinin ortaya çıkışmasını sağlamıştır (Han vd, 2020).

Son çalışmalar, ferroptozun hedeflenmesinin meme kanseri, renal hücreli karsinom, akciğer kanseri, pankreas kanseri, baş boyun skuamöz hücreli karsinomları ve hepatoselüler karsinomlar gibi kanser türlerinde etkili olduğunu göstermiştir (Wang, 2020). Dolayısıyla, ferroptozda görevli mekanizmaların kanserin ilerlemesinde veya kanserin baskılanmasında işlev görebileceği belirtilmiştir. Çalışmamızın amacı selekoksibin antikanser etkinliğini farklı bir hücre ölüm tipini ele alarak araştırmaktır. Nöroblastomalarda, tümör materyaline erişim sınırlıdır bu yüzden çalışmaların dokuda yapılması zordur. Bunun yerine, nöroblastoma hücre hatları *in vitro* modeller olarak kullanılmaktadır (Edsjö, 2007). Bu sebeple çalışmamızda nöroblastoma modeli olarak insan nöroblastoma hücre hattı (SH-SY5Y) kullanılmıştır.

METOD

Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Çalışma kapsamında insan nöroblastoma hücre hattı (SH-SY5Y) kullanılmıştır. Hücreler %10 fetal sığır serumu (FBS), 2 mM L-glutamin, 100 U/ml penisilin ve streptomisin içeren besi yeri (DMEM/F12) kullanılarak poli-L-lizin kaplı polistiren hücre kültür kaplarına ekilip %5 CO₂ ve 37°C'de inkübe edilerek çoğaltılmıştır. Altı- veya 96-kuyucuklu kültür kaplarına ekilmiştir. Protein analizi için hücreler, içerisinde proteaz inhibitörü bulunan lizis tamponu ile homojenize edilmiş ve protein miktar tayininde kullanılmıştır.

Hücre Canlılığı Analizi

Selekoksib için hücrelerin %50'si için toksik olan konsantrasyon (IC₅₀) ve uygulama süre belirlenmiştir. Hücreler 96 kuyucuklu kültür kaplarında 2X10³ hücre/kuyucuk/200µL olacak şekilde ekilmiş ve 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Hücrelerin adhere olmasını takiben selekoksib (0,1-50 µM) ortama ilave edilmiştir. Hücreler 48 veya 72 saat boyunca inkübe edilmiştir. Selekoksibin sebep olduğu hücre ölümünün ferroptotik süreçler aracılığıyla olup olmadığını araştırmak üzere selekoksibin hücre canlılığını etkisi ferroptoz inhibitörü ajan Liproxstatin (50nM) varlığında 1 saat ön uygulama yapılarak araştırılmıştır. Hücre canlılığını MTS testi ile ölçülmüştür.

GPX4 ve 4-HNE-Modifiye Protein Analizi

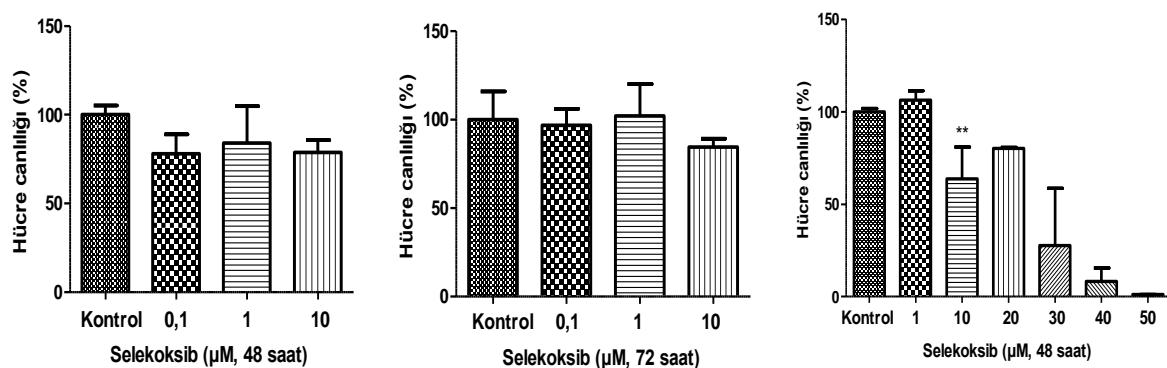
Protein analizi için hücreler (5x10⁵ hücre/kuyucuk) 6 kuyucuklu kültür kaplarında ekilmiş ve 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Hücrelerin adhere olmasını takiben selekoksib 10-40 µM konsantrasyonda 48 saat uygulanmıştır. Süre sonunda hücreler lizis tamponu ile muamele edilmiş, santrifüjün ardından supernatantta protein miktar tayini yapılmıştır. Toplam protein tayini için BCA Protein Tayin Kiti kullanılmıştır. Hücre içi GPX4 ve 4-HNE modifiye protein analizi Western Blot Yöntemi ile yapılmıştır.

Istatistiksel Değerlendirme

Deney gruplarında en az 3 kez çalışılmıştır. Sayısal değerlendirmelerde ortalama değerler ve standart sapmalar rapor edilmiştir. Deney grupları arasındaki istatistiksel farklar ANOVA (analysis of variance) yöntemi ile %95 güven aralığında değerlendirilerek, gruplar arasında ikili ilişkiler Tukey's post-hoc yöntemiyle saptanmıştır.

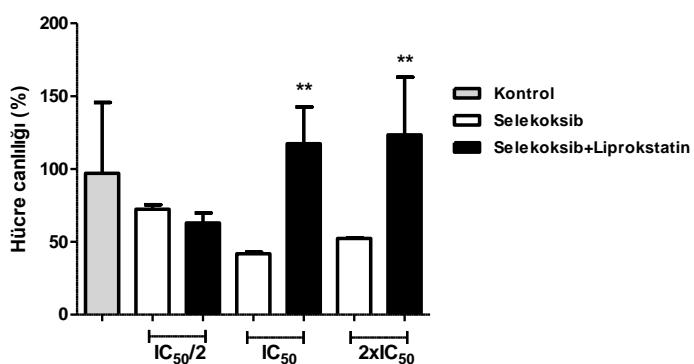
BULGULAR

Selekoksib için konsantrasyon ve sürenin belirlenmesi kapsamında farklı konsantrasyonda (0,1- 50µM) selekoksib 48 ve 72 saat süre ile hücrelere uygulanmıştır. Uygulamalar sonucunda selekoksib için IC₅₀ değeri 13,01 µM ve uygulama süresi 48 saat olarak belirlenmiştir (Şekil 1).



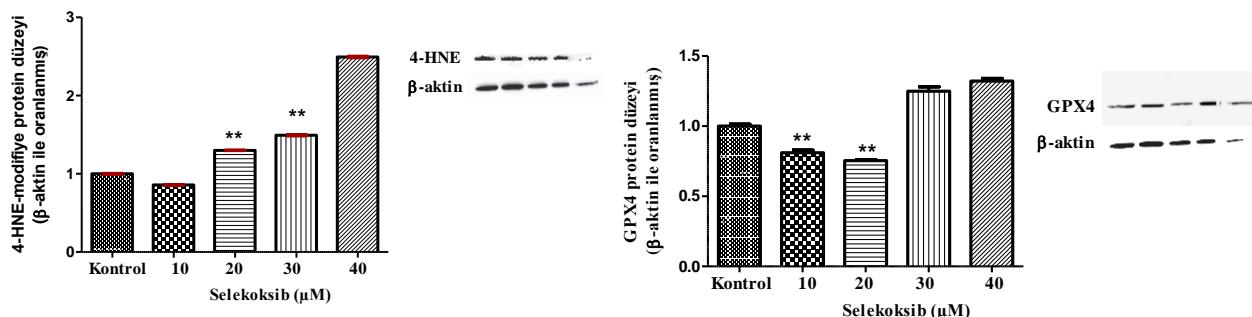
Şekil 1. İnsan nöroblastoma hücre hattında (SH-SY5Y) selekoksib için konsantrasyon ve sürenin tespiti. 48 ve 72 saat süre ile farklı dozlarda ($0,1$ - $50 \mu\text{M}$) uygulanmış selekoksibin MTS testi ile canlılığa etkisinin ölçümü. ** $p < 0,05$.

İnsan nöroblastoma hücre hattında selekoksib için IC_{50} değeri belirlendikten sonra selekoksibin hücre canlılığının etkisi ferroptoz inhibitörü ajan varlığında araştırılmıştır. Üç farklı konsantrasyonda selekoksib hücrelere uygulanmıştır. Ferroptoz inhibitörü olarak kullanılan Liproksatin, selekoksib uygulamasından 1 saat önce hücrelere uygulanmıştır. Liproksatin, IC_{50} ve $2 \times \text{IC}_{50}$ selekoksib uygulamasının neden olduğu hücre ölümünü istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaltmıştır (Şekil 2). Böylece, selekoksib aracılığı hücre ölümünde ferroptozun yeri gösterilmiştir.



Şekil 2. Selekoksib ve Ferroptoz inhibitörü varlığında hücre canlılığındaki değişim. Selekoksib $\text{IC}_{50}/2$, IC_{50} ve $2 \times \text{IC}_{50}$ konsantrasyonda 48 saat süreyle; Liproksatin (50 nM) ise selekoksib uygulamasından 1 saat önce uygulanmıştır. ** $p < 0,05$; tek başına selekoksib uygulanan hücrelerle karşılaştırıldığında anlamlı farklılık.

Ferroptoz için kritik göstergelerden biri lipid peroksidasyon ürünlerinde artış, GPX4 düzeyinde ise azalmadır. Lipid peroksidasyonun ölçümünde sıkılıkla kullanılan parametrelerden biri 4-HNE'dir. Şekil 3'te görüldüğü üzere hücrelere 48 saat süreyle selekoksib uygulaması sonrası 4-HNE-modifiye protein düzeyleri konsantrasyona bağlı olarak anlamlı şekilde artmaktadır. Lipid peroksidasyon ürünü radikallerin uzaklaştırılmasında görevli olan GPX4 enzimi hücreyi korumaktadır. Nöroblastoma hücrelerine 10 ve $20 \mu\text{M}$ konsantrasyonda selekoksib uygulaması sonrası GPX4 düzeylerinde anlamlı azalma tespit edilmiştir (Şekil 3). Diğer taraftan, selekoksib konsantrasyonu arttıkça GPX4 düzeyinin de arttığı dikkat çekmektedir.



Şekil 3. Farklı konsantrasyonlarda ($10-40 \mu\text{M}$) selekoksib uygulaması sonrası GPX4 ve 4-HNE-modifiye protein düzeylerindeki değişim. ** $p < 0,05$; ilaç uygulanmamış hücrelerle karşılaştırıldığında anlamlı farklılık.

SONUÇ ve TARTIŞMA

Elde edilen sonuçlara göre COX-2 inhibitörü olarak görev yapan selekoksib antikanser etkisini gösterirken ferroptozla ilişkili parametreleri etkilemektedir. Kanser patogenezinde önemli bir paya sahip olduğu tespit edilen ferroptozda, NSAİ'lar etkili olabilir. İleri çalışmalar, antiinflamatuar ilaçların antikanser aktivitesinin aydınlatılmasına katkı sağlayacaktır.

Teşekkür

Bu çalışma Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. (Proje Numarası: TLP-2021-23521). TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (TİDEB) 2211-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programına teşekkür ederiz.

REFERANS

- Arber, N., Eagle, C. J., Spicak, J., Rácz, I., Dite, P., Hajer, J., ... & Levin, B. (2006). Celecoxib for the prevention of colorectal adenomatous polyps. *New England Journal of Medicine*, 355(9), 885-895.
- Edsöj, A., Holmquist, L., & Pählman, S. (2007, June). Neuroblastoma as an experimental model for neuronal differentiation and hypoxia-induced tumor cell dedifferentiation. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 17, No. 3, pp. 248-256). Academic Press.
- Ferrandina, G., Lauriola, L., Distefano, M. G., Zannoni, G. F., Gessi, M., Legge, F., ... & Ranelli, F. O. (2002). Increased cyclooxygenase-2 expression is associated with chemotherapy resistance and poor survival in cervical cancer patients. *Journal of Clinical Oncology*, 20(4), 973-981.
- Han C, Liu Y, Dai R, Ismail N, Su W, Li B. 2020 "Ferroptosis and Its Potential Role in Human Diseases" *Front. Pharmacol.* 11:239. doi: 10.3389/fphar.2020.00239.
- Ishola, T. A., & Chung, D. H. (2007). Neuroblastoma. *Surgical oncology*, 16(3), 149–156.
- Ladetto, M., Vallet, S., Trojan, A., Dell'Aquila, M., Monitillo, L., Rosato, R., ... & Boccadoro, M. (2005). Cyclooxygenase-2 (COX-2) is frequently expressed in multiple myeloma and is an independent predictor of poor outcome. *Blood*, 105(12), 4784-4791.
- Lei J, Chen Z, Song S, Sheng C, Song S, Zhu J. 2020. "Insight Into the Role of Ferroptosis in Non-neoplastic Neurological Diseases" *Front. Cell. Neurosci.* 14:231. doi: 10.3389/fncel.2020.00231.
- Liu, H., Yang, Y., Xiao, J., Lv, Y., Liu, Y., Yang, H., & Zhao, L. (2009). Inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses lymph node metastasis via VEGF-C. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 292(10), 1577-1583.
- Phillips, R. K. S., Wallace, M. H., Lynch, P. M., Hawk, E., Gordon, G. B., Saunders, B. P., ... & Steinbach, G. (2002). A randomised, double blind, placebo controlled study of celecoxib, a selective

- cyclooxygenase 2 inhibitor, on duodenal polyposis in familial adenomatous polyposis. *Gut*, 50(6), 857-860.
- Steinbach, G., Lynch, P. M., Phillips, R. K., Wallace, M. H., Hawk, E., Gordon, G. B., ... & Kelloff, G. (2000). The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *New England Journal of Medicine*, 342(26), 1946-1952.
- Wang, Y., Wei, Z., Pan, K., Li, J., & Chen, Q. (2020). The function and mechanism of ferroptosis in cancer. *Apoptosis*, 1-13.

S11/O11

İN VİTRO ALZHEIMER MODEL HÜCRELERİNDE NARİNİNİN NÖROPROTEKTİF ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Müjgan Kuş^{1,*}, Eda Becer^{2,3}, Hafize Seda Vatansever^{3,4}, Sevinç Yücecan⁵

¹Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Yakın Doğu Üniversitesi, Lefkoşa, Kıbrıs

²Biyokimya Anabilim Dalı, Eczacılık Fakültesi, Yakın Doğu Üniversitesi, Lefkoşa, Kıbrıs

³DESAM Enstitüsü, Yakın Doğu Üniversitesi, Lefkoşa, Kıbrıs

⁴Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Tıp Fakültesi, Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Manisa, Türkiye

⁵Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Lokman Hekim Üniversitesi, Ankara, Türkiye

E-postalar: mujgankusi@hotmail.com, edabecer@yahoo.com, sedavatansever@yahoo.com, seviyu@gmail.com

*Sorumlu yazar: mujgankusi@hotmail.com; Tel:05428820945

†4. Uluslararası Katılımlı Hücre Ölümü Araştırma Derneği Kongresi, Online, 17-19 Mart 2022'de sunulmuştur.

Özet

Yaşlanan nüfusun artmasıyla birlikte Alzheimer hastalığı (AH) prevalansında da artış görülmüştür. Narinjin, portakal ve greyfurt gibi turunçillerde yüksek miktarda bulunan flavonoidlerdir. Yapılan çalışmalarla narinjinin antiinflamatuar ve antioksidatif özelliklere sahip olduğu saptanmıştır. Çalışmada, narinjinin SK-N-AS ve *in vitro* AH model hücrelerinde nöroprotektif etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada *in vitro* AH modelinin oluşturulması için SK-N-AS nöroblastom hücrelerinde farklı doz ve sürede A β ₂₅₋₃₅ uygulanmış ve amiloid oluşumu ThT boyaması ile yapılmıştır. Narinjin etkin dozu MTT analizi ile belirlenmiş olup SK-N-AS ve AH hücrelerine 48 saat süre ile uygulanmıştır. Narinjin uygulanmayan SK-N-AS ve AH hücreleri aynı sürede kültür vasatı ile kültüre edilmiştir. β -amiloid, tau ve α -sinüklein dağılımları her iki grup hücrelerinde immünositokimyasal yöntem ile değerlendirilmiştir. *In vitro* AH model için 1 μ M A β ₂₅₋₃₅'in 48 saat uygulanması sonrasında ThT boyamasının pozitif olmasından dolayı uygun doz olarak belirlenmiştir. β -amiloid immünonreaktivitesi, narinjin uygulanmayan *in vitro* AH model hücrelerinde SK-N-AS hücreleriyle benzer iken, narinjin uygulanmayan AH model hücrelerinde daha az olduğu saptanmıştır. Narinjin uygulanınan SK-N-AS hücrelerinde ise narinjin uygulanmayan gruba göre daha yüksek β -amiloid immünonreaktivitesi gözlenmiştir ($p<0.05$). Tau immünonreaktivitesinin narinjin uygulanınan AH model hücrelerinde narinjin uygulanınan SK-N-AS hücrelerine göre daha düşük olduğu saptanmıştır. Hem SK-N-AS hem de AH model hücrelerinde α -sinüklein immünonreaktivitesi incelendiğinde narinjin uygulanınan hücrelerde narinjin uygulanmayan hücrelere göre anlamlı derecede daha düşük olduğu görülmüştür ($p<0.05$). *In vitro* AH model hücrelerinde narinjin uygulanması sonrasında narinjin uygulanmayan hücrelere kıyasla her üç antikorda da azalma saptanırken; narinjin uygulanınan SK-N-AS hücrelerinde narinjin uygulanmayanlara göre daha düşük tau ve α -sinüklein immünonreaktivitesi saptanmıştır. Bu sonuçlar narinjinin AH'de nöronal koruyucu potansiyel etkisinin olabileceğiğini düşündürmüştür.

Anahtar Kelimeler: Narinjin; *in vitro* Alzheimer modeli; β -amiloid; SK-N-AS

GİRİŞ

Alzheimer hastalığı (AH), hipokampus ve korteksteki geri dönüşsüz nöron kaybı nedeniyle ortaya çıkan bilişsel ve hafıza bozukluklarını kapsayan nörodejeneratif bir hastalıktır [1]. AH, ekstraselüler amiloid-beta (A β) birikimi sonucu oluşan nöritik plak ve mikrotübül ilişkili taunun hiperfosforile filamentlerini içeren intraselüler nörofibriller yumaklar ile karakterizedir [1,2]. A β ve tau patolojisi dışında bozulmuş sinaptik fonksiyon, mikroglia aracılı inflamasyon ve α -sinüklein agregasyonu AH patogenezinde yer almaktadır [1,3]. AH patogenezindeki yetersiz bilgi ve tedavi için mevcut sınırlı yaklaşımlar kişileri doğal bileşiklere yönlendirmiştir [4,5]. Flavonoidler, sebze ve meyvelerde yaygın olarak bulunan, polifenolik yapıya sahip doğal bileşiklerdir [6]. Narinjin, portakal ve greyfurt gibi turunçillerde yoğun olarak bulunan flavonoidlerdir [7]. Yapılan birçok çalışmada narinjinin antikarsinojenik, antiinflamatuar, antioksidatif vb. özelliklerine rastlanmıştır [7,8,9]. Yapılan çalışmalarla narinjinin A β plak oluşumunu ve fosforile tau (p-tau) düzeylerini azalttığı saptanmıştır [5,10]. Çalışmada A β ₂₅₋₃₅ kullanılarak *in vitro* AH modeli oluşturulmuştur. Bu doğrultuda tau, β -amiloid ve α -sinüklein dağılımlarına bakılarak SK-N-AS ve *in vitro* AH model hücrelerinde narinjinin nöroprotektif etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

METOD

Hücre Kültürü ve *In Vitro* Alzheimer Modelinin Oluşturulması

Çalışmamızda SK-N-AS (ATCC: CRL-2137) insan nöroblastom hücre hattı, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Capricorn Scientific, DMEM-LPA) kültür vasatında iki günde bir vasat değişimi yapılarak 37°C ve %5 karbondioksit (CO_2) içeren atmosferde inkübe edilmiştir. Model oluşumu için; $\text{A}\beta_{25-35}$, ($\geq 97\%$ HPLC, A4559, St. Louis, MO, ABD) distile suda çözdirülerek agregasyon için beş gün 37 °C'de inkübe edilmiştir. Sonrasında $\text{A}\beta_{25-35}$, DMEM içerisinde seyreltilerek 1 ve 5 μM konsantrasyonlarda hazırlanmış ve siyah 96 kuyucuklu hücre kültür kabında bulunan SK-N-AS hücrelerine 24 ve 48 saat süreyle uygulanmıştır. Belirlenen süreler sonunda her kuyucuğa 200 μL tiyoflavin T (ThT) (T3516, St. Louis, MO, ABD) boyası eklenecek hücreler 60°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Amiloid oluşumunun izlemi için ThT floresan yoğunluğu 440 ve 482 nm'de SpectraMax M5 Multi-Mode Mikroplaka Okuyucu (Molecular Devices, LLC, CA, ABD) ile ölçülmüştür.

İmmunositokimya Analizi

İmmunositokimya analizi, Hoca ve arkadaşlarının çalışmasındaki protokole göre uygulanmıştır [11]. SK-N-AS hücrelerine, ThT boyama sonuçlarına göre belirlenen, 48 saat 1 μM dozda $\text{A}\beta_{25-35}$ uygulanarak *in vitro* AH model hücreleri oluşturulmuştur. Çalışma grupları SK-N-AS ve *in vitro* AH model hücreleri olarak ayrılmıştır. Her iki hücre grubunun kontrol grupları olan hücrelere narinjin uygulaması yapılmamıştır. SK-N-AS ve *in vitro* AH model hücreleri 24 kuyucuklu hücre kültür kabına 5×10^4 hücre/kuyucuk yoğunlığında ekilmiştir. Analiz için anti- α -sinüklein (sc-53955, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, ABD), anti- β -Amiloid (sc-28365, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, ABD) ile anti-tau proteini (sc-21796, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, ABD) primer antikorları kullanılmıştır. Boyama yoğunluğu Histolojik-Skor (H-SKOR) kullanılarak derecelendirilmiştir.

Istatistiksel Analiz

Veriler ortalama \pm standart sapma (SS) olarak verilmiştir. İki yönlü varyans analizi (ANOVA), gruplar arasındaki farkın istatistiksel analizi için kullanılmıştır. Tukey ve Sidak çoklu karşılaştırma testleri kullanılarak post-hoc analizler yapılmıştır. Sonuçlar, GraphPad Prism 9 yazılımı kullanılarak değerlendirilmiştir. $p < 0.05$ istatistiksel anlamlılık düzeyi olarak kabul edilmiştir.

Bulgular

Hücre Morfolojisi

SK-N-AS hücreleri, yapışkan epitel morfolojiye sahiptir. Narinjin uygulanmayan *in vitro* AH model hücrelerinde yuvarlaklaşma, şişme ve geri çekilme tespit edilmiştir. Hem SK-N-AS hem de *in vitro* AH model hücrelerinde narinjin uygulaması sonrasında benzer ve yapışkan epitel hücre morfolojisi gözlenmiştir.

In Vitro Alzheimer Modelinin Belirlenmesi

In vitro Alzheimer modeli oluşumu için SK-N-AS hücrelerine, 24 ve 48 saat boyunca 1 ve 5 μM $\text{A}\beta_{25-35}$ uygulanmıştır. Model oluşumunu izlemek amacıyla yapılan ThT boyaması analizleri sonucunda, zamana bağlı olarak amiloid oluşumunun arttığı gözlenmiştir. Bu nedenle model oluşumu için 48 saatte 1 μM doz $\text{A}\beta_{25-35}$ uygulanmasına karar verilmiştir.

İmmunositokimyasal Değerlendirme

Narinjin uygulanan SK-N-AS hücrelerinde (Şekil 1A), narinjin uygulanmayan SK-N-AS kontrol grubuna (Şekil 1B) göre daha düşük tau immunoreaktivitesi saptanmıştır ($p > 0.05$). *In vitro* AH model hücrelerinde de narinjin uygulanan (Şekil 1C) hücrelerde, narinjin uygulanmayan (Şekil 1D) kontrol hücrelerine kıyasla daha zayıf tau immunoboyaması gözlenmiştir ($p > 0.05$). SK-N-AS hücrelerinde narinjin uygulaması sonrasında (Şekil 1E), narinjin uygulanmayan kontrol gruba (Şekil 1F) göre anlamlı olarak daha güçlü β -amiloid immunoboyaması tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Narinjin uygulanan *in vitro* AH model hücrelerde (Şekil 1G), *in vitro* AH model kontrol gruba (Şekil 1H) göre daha düşük β -amiloid immunoreaktivitesi saptanmıştır ($p > 0.05$). Narinjin uygulaması yapılan (Şekil 1I) ve yapılmayan (Şekil 1J, kontrol grup) SK-N-AS hücrelerinde sırasıyla zayıf, güçlü derecede tau immunoboyaması tespit edilmiştir. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Narinjin uygulanan *in vitro* AH model hücrelerinde (Şekil 1K), narinjin uygulanmayan *in vitro* AH model kontrol hücrelerine (Şekil 1L) göre anlamlı derecede daha düşük α -sinüklein immunoreaktivitesi saptanmıştır ($p < 0.05$).

SK-N-AS		AH model	
Narinjin Kontrol		Narinjin Kontrol	
Tau	A	B	C
	309.09±37.37	338.33±53.6	D
β-amiloid	E	F	G
	276.31±18.32 ^a	120.83±25.00 ^{b,*}	H
α-sinüklein	I	J	K
	115.00±12.24 ^a	291.87±56.76 ^b	L
128.12±26.65 ^a 235.25±65.48 ^b			

Şekil 1. 48 saat boyunca 1 µM narinjin uygulanan hücrelerde ve standart kültür ortamında SK-N-AS ile *in vitro* AH model hücrelerinin tau, β-amiloid, α-sinüklein H-SKOR değerleri ve immünoreaktiviteleri (A-L, ölçuk=20 µm). Veriler ortalama±SS olarak gösterilmiştir. ^{a-b}: Farklı harfe sahip SK-N-AS ve *in vitro* AH model hücrelerinde narinjin ve kontrol grubu arasında anlamlı fark vardır ($p<0.05$). *:Narinjin uygulanan hücreler veya kontrol grubunda iki grup (SK-N-AS ve *in vitro* AH model) arasında anlamlı fark vardır ($p<0.05$).

TARTIŞMA

Alzheimer patogenezinde Aβ, tau ve α-sinüklein agregasyonu bulunmaktadır [1,3]. Narinjin, antioksidan ve antiinflamatuar özellikleri ile nörodejeneratif hastalıklara karşı etkili olabilmektedir [8,9]. Kaur ve arkadaşları, farklı narinjin dozları (40-80 mg/kg) verilen ratlarda Aβ₁₋₄₂ birikiminin anlamlı derecede azaltıldığını saptamıştır [10]. Çalışmamızda da narinjin uygulaması ile *in vitro* AH model hücrelerinde kontrol gruba göre Aβ yoğunluğu azaltılmıştır. Meng ve arkadaşları, farelerde nöroprotektif etkileri hidrokortizon modeli üzerinde araştırmıştır. Narinjin (100 mg/kg/gün) grubunda model grubuna kıyasla p-tau ekspresyonu ölçüde azalmıştır [5]. Yaptığımız çalışmada narinjinin hem SK-N-AS hem de *in vitro* AH model hücrelerinde tau immunoreaktivitesini azalttığı saptanmıştır. Flavonoidlerin antioksidatif özellikleri nedeniyle α-sinüklein agregasyonunu inhibe edebileceği gösterilmiştir [12]. Wang ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, LPS ile induklenen PC12 hücrelerinde reaktif oksijen türleri (ROT) artmıştır. Narinjin (200, 600 ve 1000 ng/ml), uygulanan hücrelerde anlamlı derecede ROT oluşumu azaltılmıştır ($p<0.05$). Yine oksidatif stresle ilişkili belirteçlere bakıldığından narinjinin, hem oksijenaz-1 (HO-1), nükleer faktör eritroid 2-ilişkili faktör 2 (Nrf2), süperoksit dismutaz (SOD)2 seviyelerinde anlamlı bir iyileşmeye neden olduğu görülmüştür [7]. Bu doğrultuda çalışmamızda narinjin, kontrol gruplarına göre hem SK-N-AS hem de *in vitro* AH model hücrelerde anlamlı derecede α-sinüklein yoğunluğunu azaltmıştır ($p<0.05$).

SONUÇ

Sonuç olarak *in vitro* AH model hücrelerinde kontrol grubuna göre her üç protein immunoreaktivitesinde de azalma saptanmıştır. SK-N-AS hücrelerinde ise narinjin uygulaması ile kontrol gruba göre A β immunoreaktivitesi artarken; tau ve α -sinüklein immunoreaktivitesinde azalma gözlenmiştir. Çalışmamızda narinjinin AH'ye karşı nöroprotektif etkileri gösterilmiş olup bu konuda ileriki çalışmaların yapılmasına ihtiyaç bulunmaktadır.

Teşekkür

Yakın Doğu Üniversitesi DESAM Enstitüsü ve Bilimsel Araştırma Projeleri (SAG-2019-2-025) birimine katkılarından dolayı teşekkür ederiz.

Yazar Katkıları

Çalışma tasarımcısı: Müjgan Kuşı, Eda Becer, H. Seda Vatansever, Sevinç Yücecan. Deneysel prosedür: Eda Becer, H. Seda Vatansever. Deneylerin yapılması: Eda Becer. Verilerin istatistiksel analizi: Müjgan Kuşı. Bildiri yazımı: Müjgan Kuşı, Eda Becer, H. Seda Vatansever, Sevinç Yücecan.

REFERANSLAR

1. Prasanna P, Rathee S, Rahul V, Mandal D, Chandra Goud MS, Yadav P, Hawthorne S, Sharma A, Gupta PK, Ojha S, Jha NK, Villa C, Jha SK (2021) Microfluidic platforms to unravel mysteries of Alzheimer's Disease: How far have we come?. *Life* 11(10):1-24.
2. Breijeh Z, Karaman R (2020) Comprehensive review on Alzheimer's disease: Causes and treatment. *Molecules* 25(24):5789.
3. Twohig D, Nielsen HM (2019) α -synuclein in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 14(1):1-19.
4. Dey A, Bhattacharya R, Mukherjee A, Pandey DK (2017) Natural products against Alzheimer's disease: Pharmaco-therapeutics and biotechnological interventions. *Biotechnol Adv* 35(2): 178-216.
5. Meng X, Fu M, Wang S, Chen W, Wang J, Zhang N (2021) Naringin ameliorates memory deficits and exerts neuroprotective effects in a mouse model of Alzheimer's disease by regulating multiple metabolic pathways. *Mol Med Rep* 23(5):1-13.
6. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR (2016) Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci* 5(47):1-15.
7. Wang H, Xu YS, Wang ML, Cheng C, Bian R, Yuan H, Wang Y, Guo T, Zhu LL, Zhou H (2017) Protective effect of naringin against the LPS-induced apoptosis of PC12 cells: Implications for the treatment of neurodegenerative disorders. *Int J Mol Med* 39(4):819-830.
8. Jung UJ, Leem E, Kim SR (2014) Naringin: a protector of the nigrostriatal dopaminergic projection. *Experimental Neurobiology* 23(2):124-129.
9. Jung UJ, Kim SR (2014). Effects of naringin, a flavanone glycoside in grapefruits and citrus fruits, on the nigrostriatal dopaminergic projection in the adult brain. *Neural Regeneration Research* 9(16):1514-1517.
10. Kaur G, Prakash A (2020) Involvement of the nitric oxide signaling in modulation of naringin against intranasal manganese and intracerebroventricular β -amyloid induced neurotoxicity in rats. *J Nutr Biochem* 76:108255.
11. Hoca M, Becer E, Kabadayı H, Yücecan S, Vatansever HS (2020) The effect of resveratrol and quercetin on epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer stem cell. *Nutr Cancer* 72(7):1231-1242.
12. Meng X, Munishkina LA, Fink AL, Uversky VN (2010) Effects of various flavonoids on the-synuclein fibrillation process. *Parkinson's Disease* 2010:1-16.

S12/O12

PYROPTOTIC PROCESS OF PANCREATIC CANCER STEM CELLS IN AN IN-VITRO INFLAMMATION MODEL

Zeynep Gulsum Güç¹, Damla Akogulları Celik^{2*}, Hafize Seda Vatansever^{3,4}

¹ Department of Medical Oncology, Izmir Katip Celebi University, Atatürk Training and Research Hospital, Izmir, Turkey

² Department of Histology & Embryology YÖK 100/2000 Stem Cell Studies Program PhD Student, Institute of Medical Sciences, Manisa Celal Bayar University, Manisa 45047, Turkey

³ Faculty of Medicine, Department of Histology & Embryology, Manisa Celal Bayar University, Manisa 45047, Turkey

⁴ Experimental Health Sciences Research Center, Near East University, Nicosia, Northern Cyprus

* Correspondence: daakogullari@gmail.com

† Presented at the the 4th Congress of Cell Death Research Society-Turkiye with International Participation, 17-19 March 2022.

Abstract:

Pancreatic ductal adenocarcinoma is a cancer type with high mortality and cancer stem cells in its heterogeneous cell population; It is one of the most important causes of tumor formation, metastasis, chemotherapy resistance and recurrence of the disease. In addition, interleukin, cytokine and chemokines, which are control molecules of the inflammatory process, play a role in the development of many cancer types. Pyroptosis is the process by which the inflammatory programmed cell pathway is activated with the help of various caspases. In this study, it was aimed to examine the pyroptotic process of pancreatic cancer stem cells in an in vitro inflammatory model.

The human pancreatic carcinoma cell line (PANC-1) was used in the study. CD133 positive PANC-1 cells were separated with MiniMacs. For the in vitro inflammatory study groups, 200µg/ml lipopolysaccharide (LPS) was treated to the cells for 1 week, and the control group cells were cultured with simultaneous culture medium. Cells of all groups were fixed with 4% paraformaldehyde after culture and immunoreactivity of IL-18 for inflammatory process and caspase-1 for pyroptosis were determined by two different observers by indirect immunoperoxidase method as weak (-), mild (+), moderate (++) and strong (+++) were scored. Caspase 1 immunoreactivity was observed to be strongly positive in all experimental groups. While IL-18 immunoreactivity was strong in PANC-1 cells, moderately positive in PANC-1 CD133+ cells, moderate/strongly positive in PANC-1 CD133- cells, it was strongly positive in all groups treated with LPS and this increase was statistically significant in PANC-1 CD133- cells. Caspase-1 is the key molecule in the pyroptotic cell death process. IL-18 is one of the inflammatory cytokines that induces pyroptosis. It was concluded that the significant increase of IL-18 in all groups after LPS treatment resulted in a successful in vitro inflammation model, but the similar observation of Caspase-1 in all experimental groups showed that the pyroptotic process was syntheses at similar levels in both pancreatic cancer and cancer stem cells.

Keywords: Cancer Stem Cell, Inflammation, Lipopolysaccharide, Pyroptosis

INTRODUCTION

Pancreatic ductal adenocarcinoma responsible for more than 80% of pancreatic cancers and is one of the tumors with the highest mortality [1,2]. Pancreatic ductal adenocarcinoma contains cancer stem cells, which are known to be one of the most important causes of tumor formation, metastasis, chemotherapy resistance and recurrence of the disease in heterogeneous cell population [1,2]. In addition, interleukin, cytokine and chemokines, which are the control molecules of the inflammatory process, also play a role in the development of many cancer types such as pancreatic cancers [1,2]. It has been reported that it directly affects the poor prognosis of pancreatic cancer in cell populations including cancer stem cells that express the surface marker CD133, which is frequently used in the diagnosis of pancreatic cancer [1,3,4].

Pyroptosis is an inflammatory programmed cell death process activated with caspases, especially Caspase-1, and cytokines such as IL-18 [5,6,7]. Pyroptosis can prevent tumor formation and development, on the contrary, it can provide a suitable microenvironment for tumor growth [5,6,7]. Therefore, the relationship between pyroptosis and cancer is still unknown [5,6,7]. Activation of

Caspase-1 induces classical pyroptosis cell death, which is observed as a result of swelling and bursting of the cell with the formation of small pores in the cell membrane [6,7]. IL-18, is a proinflammatory cytokine, induces cell-mediated immunity following infection with microbial products such as lipopolysaccharide (LPS) [6,7]. In this study, it was aimed to investigate the pyroptotic process of pancreatic cancer stem cells in an in vitro inflammatory model.

MATERIAL AND METHODS

Cell Culture

For cell culture studies, the Primary Human Pancreatic Cancer Cell Line (PANC-1, ATCC® CRL-1469) was used. PANC-1 cells cultured in DMEM culture medium containing of 10% FBS (FBS-11B, CAPRICORN), 2 mM L-glutamine (GLN-B, CAPRICORN), 1% penicillin-streptomycin (PS-B, CAPRICORN), and the medium was changed every 2 days and cultured at 37°C in 5% CO₂ and 95% air.

Isolation of CD133+ PANC-1 Cells

CD133+ cancer stem cells were isolated from PANC-1 cells using the MiniMACS isolation kit (130-100-857, Miltenyi Biotec). After the PANC-1 cells were confluent, they were incubated with antibody-labelled CD133 bead for 30 min at 37°C. Cells were collected at the end of the incubation and they were passed through the MiniMACS column and CD133- cells were collected in the bottom tube. CD133+ cells were remained in the column due to positive selection. The column was separated from magnetic field and washed with culture medium, and CD133+ cells were collected in a separate tube. After centrifugation, supernatant was discarded and they were cultured.

Experimental Model of Inflammation

For the experimental inflammation model, PANC-1 cells were cultured at 48 hours, 96 hours and 1 week by adding 200µg/ml lipopolysaccharide (LPS, L2630-10MG, SIGMA) to the culture medium. To determine the procedure, TNF-α and IL-8 levels in culture media collected at 48th hour, 96th hour and 1st week were analyzed by ELISA.

ELISA

Confirmation of the in vitro inflammation model was performed by determining TNF-α (201-12-0083, SunRedBio) and IL-8 (SRB-T-83151, SunRedBio) levels in culture media at 48 hours, 96 hours, and 1 week of LPS treatment to PANC-1 cells with an ELISA kit. Briefly, standards and culture media of control and LPS-treated PANC-1 cells at 48th hour, 96th hour and 1st week were added to 96 well plates in 3 replicates. Then, biotin-containing TNF-α/IL-8 antibodies and streptavidin-HRP were added, respectively, and incubated at 37°C for 60 minutes. At the end of the incubation, washing was done, chromagen A and B were added and incubated at 37°C for 10 minutes in the dark. Then, the reaction was stopped with a stop solution and the absorbance values were measured at 450nm and calculated. After calculating the density corresponding to the sample OD value according to the sample curve, the density corresponding to the standard curve was found, and the equation of the standard curve with the standard density and OD value, and the sample OD value and sample density in the equation were calculated.

In vitro Inflammation Model and Study Groups

For the in vitro inflammatory study groups, 200 µg/ml LPS was treated to the cells for 1 week, and the control group cells were cultured with simultaneous culture medium (Fig. 1).

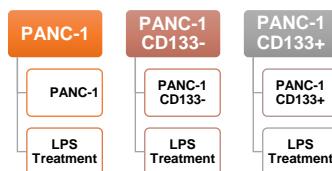


Figure 1. Schematic representation of study groups.

Immunohistochemistry

For immunocytochemistry, all study groups were cultured in 24-well plate 2x10³ cells in each well. All cells from all groups were fixed in 4% paraformaldehyde (1.04004.0800, MERCK, Germany) in Phosphate-Buffered Saline (PBS, PBS404.100, Bioshop, Canada) at room temperature for 30 min. After

washing with PBS twice for 30 min., they were permeabilized with 0.1% Triton X-100 (A4975,0100, Applchem, Germany) both in PBS at 4°C for 15 min. They were then washed with PBS and, endogenous peroxidase activity was quenched by incubation with 3% H₂O₂ (1.08597.2500, MERCK, Germany) for 5 min at room temperature. After washing with PBS the cells were incubated with blocking solution (TA-125-UB, THERMOFISHER), for 30 min to block unspecific binding of the antibodies and incubated with anti-caspase-1 (rabbit polyclonal, BT-AP01191, BT-LAB, dilution:1/100) and anti-IL-18 (rabbit polyclonal, 10663-1-AP, Proteintech, dilution:1/100) primary antibodies at 4°C for overnight. After washing with PBS, the cells were incubated with biotinylated goat anti rabbit/mouse IgG (TP-125-UB, THERMOFISHER) for 30 min, followed by three washes in PBS and then peroxidase-conjugated streptavidin (TS-125-UB, THERMOFISHER) were incubated for 30 min. After washing with PBS, diaminobenzidine (DAB, TA-125-HD, ThermoFisher Scientific, USA) was applied to the cells as chromogen for 5 min. After washing with PBS, cells were counterstained with Mayer's hematoxylin (TA-125-MH, ThermoFisher Scientific, USA) for 1 min. After washing with distilled water, they were covered with mounting medium (DMM-125, Spring Bioscience, USA), then viewed under light microscope (Olympus BX43, JAPAN). Immunolabeling was evaluated semi-quantitatively using an additive immunoreactive score reflecting signal intensity, as negative (), mild (+), moderate (++) and strong (+++).

RESULTS

Cell Culture

PANC-1, PANC-1 CD133- and PANC-1 CD133+ cells, on the 3rd day of the culture (Fig. 1A-C, respectively) it was epithelioid and adhered, while on the 7th day of the culture (Fig. 1D-F, respectively) it increased further and formed colonies.

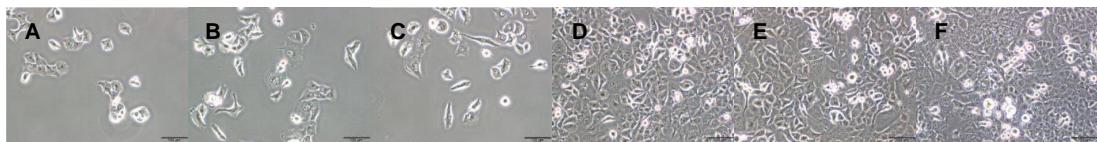


Figure 2. Cell culture images of 3th and 7th days of culture PANC-1 (A,D), PANC-1 CD133- (B,E) and PANC-1 CD133+ cells (C,F), respectively. Scale bars: 100µm

ELISA

According to ELISA results, the in vitro inflammation model was confirmed by observing the highest concentrations of both TNF-α (Fig. 3A) and IL-18 (Fig. 3B) compared to the control in 1 week of LPS treatment.

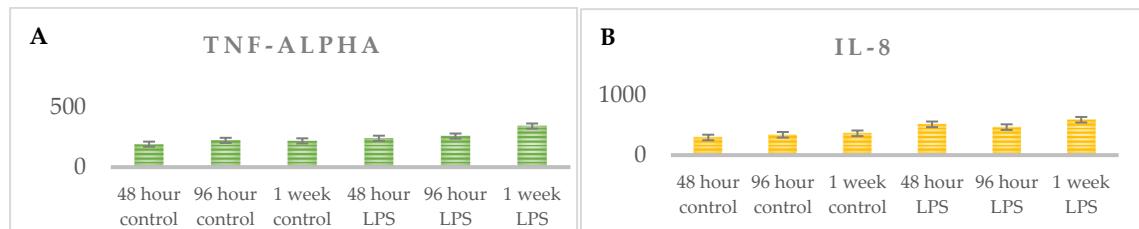


Figure 3. ELISA results. Column charts of TNF-α (A) and IL-18 (B) concentrations in PANC-1 cells culture media with or without LPS treatment.

Immunohistochemistry

Caspase 1 immunoreactivity was observed to be strongly positive in all experimental groups (Fig. 4).

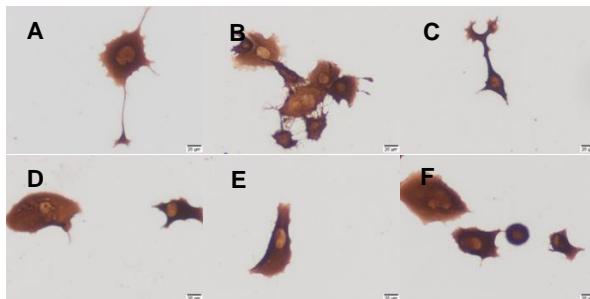


Figure 4. Caspase-1 immunoreactivity of PANC-1 (A, D), PANC-1 CD133- (B, E) and PANC-1 CD133+ (C, F) cells in control (A-C) and after LPS treatment (D-F). Scale bars: 20 μ m. While IL-18 immunoreactivity was strong in PANC-1 cells (Fig. 5A), moderately positive in PANC-1 CD133+ cells (Fig. 5C), moderate/strongly positive in PANC-1 CD133- cells (Fig. 5B), it was strongly positive in all groups treated with LPS (Fig. 5D-5F).

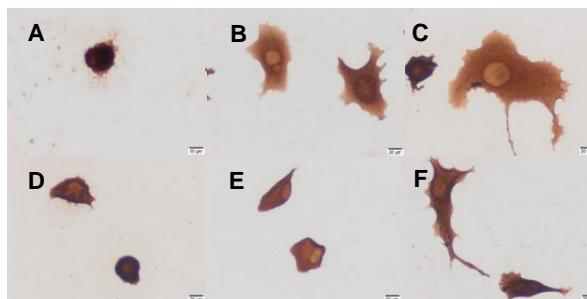


Figure 5. IL-18 immunoreactivity of PANC-1 (A, D), PANC-1 CD133- (B, E) and PANC-1 CD133+ (C, F) cells in control (A-C) and after LPS treatment (D-F). Scale bars: 20 μ m

DISCUSSION & CONCLUSIONS

LPS treatment causes the inflammatory process to start with the realization of cellular immunity and is used in many studies [6,8,9]. IL-18 is a proinflammatory cytokine that responds directly to LPS [6,8,9]. In our study, the significant increase of IL-18 in pancreatic cancer and cancer stem cells after LPS treatment indicates a successful in vitro inflammation model. On the other hand, similar caspase-1 observations in all experimental groups showed that the pyroptotic process was expressed at similar levels in both pancreatic cancer and cancer stem cells.

In recent years, the destruction of malignant cells by inducing cell death is an accepted alternative method in cancer treatment that can be accomplished by inducing pyroptosis as well as apoptosis [6,8,9]. In this study, it was shown that the inflammatory process induced by LPS treatment, especially in pancreatic cancer stem cells, triggers pyroptosis through IL-18 and caspase-1.

In conclusion, our study provides preliminary information for cell death-mediated therapy applications in the treatment of malignant cancers containing heterogeneous cell populations such as pancreatic cancer.

Author Contributions: All authors contributed to every stage of the study.

Acknowledgments: This study was supported by Turkish Society of Medical Oncology.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Gupta, S. ve Pramanik, D. (2016). Phytochemicals and Cancer Stem Cells: A Pancreatic Cancer Overview. *Current Chemical Biology*, 10(2), 98-108. Available online: URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30560046> (28.03.2022).
2. Heeschen, C. ve Sancho, P. (2016). More Challenges Ahead-Metabolic Heterogeneity of Pancreatic Cancer Stem Cells. *Molecular & Cellular Oncology*, 3(2), 1-3. Available online: URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27308630> (28.03.2022).
3. Lee, H. J., You, D. D., Choi, D. W., Choi, Y. S., Kim, S. J., Won, Y. S., & Moon, H. J. (2011). Significance of CD133 as a Cancer Stem Cell Markers Focusing on the Tumorigenicity of Pancreatic Cancer Cell Lines. *Journal of the Korean Surgical Society*, 81(4), 263-270. Available online: URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22111082> (28.03.2022).
4. Lonardo, E., Hermann, P. C., & Heeschen, C. (2010). Pancreatic cancer stem cells - update and future perspectives. *Molecular oncology*, 4(5), 431–442. Available online: URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20580623> (28.03.2022).
5. Shi, J., Gao, W., & Shao, F. (2017). Pyroptosis: Gasdermin-Mediated Programmed Necrotic Cell Death. *Trends in biochemical sciences*, 42(4), 245–254. Available online: URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27932073> (28.03.2022).
6. Xia, X., Wang, X., Cheng, Z., Qin, W., Lei, L., Jiang, J., & Hu, J. (2019). The role of pyroptosis in cancer: pro-cancer or pro-"host"? *Cell death & disease*, 10(9), 650. Available online: URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31501419> (28.03.2022).
7. Fang, Y., Tian, S., Pan, Y., Li, W., Wang, Q., Tang, Y., Yu, T., Wu, X., Shi, Y., Ma, P., & Shu, Y. (2020). Pyroptosis: A new frontier in cancer. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 121, 109595. Available online: URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31710896> (28.03.2022).
8. Nagarajan, K., Soundarapandian, K., Thorne, R. F., Li, D., & Li, D. (2019). Activation of Pyroptotic Cell Death Pathways in Cancer: An Alternative Therapeutic Approach. *Translational oncology*, 12(7), 925–931. Available online: URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31085408> (28.03.2022).
9. Qiu, Z., He, Y., Ming, H., Lei, S., Leng, Y., & Xia, Z. Y. (2019). Lipopolysaccharide (LPS) Aggravates High Glucose- and Hypoxia/Reoxygenation-Induced Injury through Activating ROS-Dependent NLRP3 Inflammasome-Mediated Pyroptosis in H9C2 Cardiomyocytes. *Journal of diabetes research*, 2019, 8151836. Available online: URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30911553> (28.03.2022).

S13/O13

ANALYSIS OF LINC01209 EXPRESSION INVASIVE DUCTAL AND INVASIVE BREAST CARCINOMA TISSUES

İşıl Yıldırım¹, Ali Şahin Küçükaslan² Bilge Aydin Türk³, Çağdaş Aktan²

¹ Beykent University, Vocational School, Pharmacy Services Program, 34500, Istanbul, Turkey

² Beykent University, Faculty of Medicine, Department of Medical Biology, 34500, Istanbul, Turkey

³ Adiyaman University, Faculty of Medicine, Department of Pathology, 02100, Adiyaman, Turkey

Abstract

Introduction: LncRNAs serve as important regulatory molecules of gene expression and protein functionality at multiple levels, and their deregulation play a key role in tumorigenesis including in breast cancer metastasis. Therefore, in this study, we aim to compare the expression of LINC01209 in the landscape of invasive ductal (IDC) and invasive lobular (ILC) breast carcinomas.

Material and Method: In this study breast biopsy materials taken from 16 female patients with IDC and at least 5 female patients with ILC were examined and the relationship of the obtained findings with histological, and pathological evaluations and lncRNA analysis was investigated. As a method, after the tissues were deparaffinized, RNA was isolated by the trizole method. cDNA synthesis was performed from the obtained RNAs. The obtained cDNAs were studied in the LightCycler 480 Real-Time PCR System, using validated primers to be designed specifically for the lncRNA our targeted and BlazeTaq SYBR Green Master Mix according to the kit protocol. GAPDH, B2M, and YWHAZ were used as validated housekeeping genes. The results were analyzed using IBM SPSS Statistics 25 version and Mann-Whitney U, and Microsoft excel.

Results: The mean age of the cases is 53 ± 15.81 . While 47.6% of the cases were pre-menopausal, 52.4% were postmenopausal. Significant statistical values between menopausal states between IDC and ILC were found as $p=0.017$. Hormonal positivity values of the cases were negative and positive Estrogen receptors showed 19% negative and 80% positivity according to their positivity, while 23.8% negative and 76.1% positivity for Progesterone receptor. Grade values of the cases were 14.3% Grade I, 66.7% Grade II, 14.3% Grade3, respectively. The tumor diameter values of the cases were found to be 38% T1, 47.6% T2, and 14.3% T3, respectively. Statistical results for LINC01209 were $p=0.869$.

Discussion: Intake care of results, in both breast carcinomas it was observed that cancer progressed, and tumor diameters increased with age. This indicates that the progression of cancer metastasis may be associated with relevant genes. Increasing the number of cases may increase the number of LINC01209 expressions and its relationship with metastasis can be determined.

Conclusion: If the potential applications of lncRNAs as biomarkers and therapeutic targets are documented, this can become a hot topic in breast cancer diagnosis, prognosis, and therapeutics.

Key words: Long non-coding RNA, invasive ductal carcinoma, invasive lobular carcinoma, breast clinical information.

INTRODUCTION

Long non-coding RNAs (lncRNA) are a type of RNA as defined by more than 200 nucleotides, and they are not translated into protein [1]. Despite accumulating evidence that the majority of long noncoding RNAs in mammals are likely to be functional [2,3] only a relatively small proportion has been demonstrated to be biologically relevant. These functional properties of lncRNAs depend on extensively reported to be involved in transcriptional regulation [4]. LncRNAs serve as important regulatory molecules of gene expression and protein functionality at multiple levels [5,6,7] and their deregulation plays a key role in tumorigenesis including in breast cancer metastasis [8,9,10,11]. Therefore, in this study, as a new target, we aimed to compare the expression of LINC01209 in the landscape of invasive ductal(IDC) and invasive lobular(ILC) breast carcinomas.

METHOD

Tissue Deparaffinization process

Briefly, the deparaffinization process was made modifier kit protocol [12]. Paraffin tissues were taken into 1.5 mL Eppendorf tubes. 1200 μ L of xylene was added, vortexed vigorously, and centrifuged for 5 minutes ($>13.000\times g$), and the supernatant was carefully removed. 1200 μ L of ethanol was added to the pellet and the supernatant was carefully removed by centrifugation for 5 minutes ($>13.000\times g$) to remove xylene. After repeating 3-4 times, Eppendorf tubes were incubated for 10-15 minutes with their lids open, ethanol was removed and the samples were prepared for isolation.

RNA isolation procedure trizole method

Briefly, the process was made by modifier kit protocol. [13]. Homogenized samples were incubated for 5 minutes at room temperature. 1 ml of trizole was added to the pellet tube, vortexed, and waited for 5 minutes. 200 μ L of chloroform was added and vortexed. After 3 minutes of centrifugation, the supernatant was transferred to another tube. 200 μ L of chloroform was added and vortexed. Waited for 3 minutes, after centrifugation 600 μ L was taken from the liquid phase and transferred to another tube. 200 μ L of chloroform was added and vortexed. Waited for 3 minutes, after centrifugation 500 μ L was taken from the liquid phase and transferred to another tube. 500 μ L isopropanol was added to it, and after the vortex was made, it was incubated at -20°C for 30 minutes. After centrifugation, isopropanol was removed and 1 ml of 80% cold ethanol was added. After centrifugation again, alcohol was removed and 1 ml of 80% cold ethanol was added, and after centrifugation, the ethanol was removed by keeping the lid of the tube open and kept at -80°C after adding 20 μ L of water.

cDNA synthesis

Transcription High-Capacity DNA Synthesis kit (A.B.T.TM) kit protocol was applied for cDNA synthesis[14] 100 ng of total RNA per sample, 1 μ L of primer (2.5 μ M) was placed in PCR tubes. 2 μ L of 10x Transcription High Fidelity Reverse Transcriptase Reaction Buffer (containing 1X and 8 mM MgCl₂) was added. 1 μ L of Random hexamer (50 μ M) was added to the contents of the tubes. 1 μ L of reverse transcriptase (200U/ μ L) was added. 0.5 μ L of RNase inhibitor was added. 3.5 μ L of RNase-free water was added. 10 μ L of RNase was added to the template. The total volume was made up to 20 μ L. Then the tubes were incubated in a PCR Thermal Cycler. The resulting cDNAs were used for amplification in the LightCycler 480 Real-Time PCR System.

Determination of Target Gene mRNA Expression levels by Real Time qPCR

The obtained cDNAs were studied in the LightCycler 480 Real-Time PCR System, using validated primers (Genecopoeia) to be designed specifically for the genes we targeted and BlazeTaq SYBR Green Master Mix (Genecopoeia) according to the kit protocol. Validated GAPDH, B2M, and YWHAZ (Genecopoeia) as housekeeping genes were used. Results were analyzed with the delta-delta CT method ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) as relative gene expression with Microsoft Excel.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed by using SPSS statics 25 version analysis program and Mann-Whitney U analysis for examines whether the mean of a population is statistically different. Statistically significant was considered at $p<0.05$. The number of cases was made by using the Microsoft Excel software program.

RESULTS

IDC gene frequency mean rank for age was found 9.64, while ILC gene frequency means rank was 14.70. Expressions LINC01209 for IDC and ILC associated with age were found 76.2%, 23.8% respectively. While 52% of the cases were in the postmenopausal period, 47.6% were in the premenopausal period.

Frequency of gene values for molecular subtype according to carcinoma types of cases were found as 9, 8, 2, 2 for Luminal B, Luminal A, Her2-rich, and triple-negative type, respectively.

The estrogen receptor-positive status of the cases was 80%, while Estrogen negative status was 19%. IDC gene frequency mean rank for Estrogen was found 10.25, while ILC mean gene frequency rank was 13.40. According to the immunohistochemistry staining degrees of the cases, the frequency ratios for weak, moderate, and strong estrogen receptor-positive states were found to be 4, 9, 2, respectively. Progesterone receptor-positive status of the cases was 76.1 %, while Progesterone negative status was 23.8 %. IDC's gene frequency mean rank for Progesterone was found 10.41, while ILC's gene frequency

mean rank was 12.90. According to the immunohistochemistry staining degrees of the cases, the gene frequency ratios for weak, moderate, and strong Progesterone receptor-positive states were found to be 7, 4, 5, respectively.

According to the immunohistochemistry staining degrees of the cases, the frequency ratios for Grade1, Grade2, and Grade3 states were found to be 2, 12, 2, respectively. Expressions LINC01209 mean rank for IDC and ILC were found 11.3, 10.66 respectively.

DISCUSSION

While the mean age rate was 9.64 for ductal carcinoma, it was 14.70 for lobular. This shows that lobular carcinoma cases are in the postmenopausal period.

For LINC01209 expression, there was no statistical difference in expression levels for estrogen and progesterone receptors between the two breast carcinomas.

Considering the results, it was seen that there was no difference between the two breast carcinomas for LINC01209 expression ($p=0.869$). Considering the types of carcinomas, it is seen that the gene does not differ according to the type, but according to other factors. For example, menopausal conditions between the two carcinomas showed a significant statistical difference between two carcinomas ($p=0.017$).

Conclusion

According to the results, it was observed that there were changes in hormonal values in both breast cancers, cancer progressed and the tumor diameters of the carcinoma grades increased with age. These genes were found to show expression for ductal and lobular breast carcinomas. This indicates that the progression of metastasis may be related to related genes. By increasing the number of cases, the number of LINC01209 expression can be increased and its relationship with metastasis can be determined. If the potential applications of lncRNAs as biomarkers and therapeutic targets are documented, this could become a hot topic in breast cancer diagnosis, prognosis, and therapeutics.

Acknowledgments

This study was performed by the Ethics Committee with a resolution of Adiyaman University Department of Pathology 2019 /1-28. Studies was carried out in the Beykent University, Department of Medical Biology. I thanks to all author. This submission accepted as oral presentation in to be held **4th Congress of Cell Death Research Society-Turkey with International Participation** between 17-19 March 2022. We thanks to Congress Board, all Organizing Committee, Scientific Committee, and others.

REFERENCES

- [1] Perkel JM. (2013) Visiting "noncodarnia". *BioTechniques* 54 (6): 301-303.
- [2] Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS (2009) Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat. Rev. Genet* 10(3): 155-159.
- [3] Dinger ME, Amaral PP, Mercer TR, Mattick JS (2009) Pervasive transcription of the eukaryotic genome: functional indices and conceptual implications. *Brief Funct Genomics* 8(6): 407–423
- [4] Ma L, Cao J, Liu L, Du Q, Li Z, Zou D, Bajic VB, and Zhang Z (2019) LncBook: a curated knowledgebase of human long non-coding RNAs. *Nucleic Acids Res* 47(D1): D128–D134.
- [5] Spizzo R, Almeida MI, Colombatti A, et al. (2012) Long non-codingRNAs and cancer: a new frontier of translational research? *Oncogene* 31: 4577–87.
- [6] Prensner JR, Chinnaiyan AM. (2011). The emergence of lncRNAs in cancer biology. *Cancer Discov* 1: 391–407
- [7] Gutschner T, Diederichs S. (2012) The hallmarks of cancer: a longnon-coding RNA point of view. *RNA Biol.* 9:703–19.
- [8] Shore AN, Herschkowitz JI, Rosen JM. (2012) Noncoding RNAs involved in mammary gland development and tumorigenesis: there's a long way to go. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 17: 43-58.
- [9] Vikram R, Ramachandran R, Abdul KS. (2014) Functional significance of long non-coding RNAs in breast cancer. *Breast Cancer* 21: 515–21.
- [10] Hansji H, Leung EY, Baguley BC, et al. (2014) Keeping abreast with long non-coding RNAs in mammary gland development and breast cancer. *Front Genet* 5: 379.
- [11] Liu Y, Sharma S, Watabe K. (2015). Roles of lncRNA in breast cancer. *Front Biosci (Schol Ed)* 7: 94-108.
- [12] <https://www.abcam.com/protocols/ihc-deparaffinization-protocol>.
- [13] <https://www.abpbio.com/wp-content/uploads/2019/12/FP312.pdf>.
- [14] http://abtlabind.com/datasheet/C03ABTcDNA_Synthesis_Kit_with_Rnase_inh_High_Capacity.pdf.

S14/O14**DETERMINATION OF THE THERAPEUTIC EFFICACY OF LOBARIC ACID AS AN INNOVATIVE STRATEGY IN MELANOMA CANCER TREATMENT****Huda Abdırızak Jama¹, Demet Cansaran-Duman^{1,*}**¹ Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Keçiören, Ankara, Türkiye* dcansaran@yahoo.com, Tel: 0312 222 58 26

4. Uluslararası Katılımlı Hücre Ölümü Araştırma Derneği Kongresi, 17-19 Mart 2022

Abstract

Melanoma cancer is considered to be one of the most death causing cancers in recent years. Malignant melanomas are lethal neoplastic cancers that arise from melanocytes, the cells that produce melanin in the lower epidermis and cause metastasis by spreading to the other parts of the body. Melanoma treatment methods used in routine treatment include surgical removal, radiation therapy and chemotherapy. However, there is no effective method for melanoma cancer treatment in the world. In recent years, the number of studies based on the search for complementary or new alternative molecules to reduce the risk of chemotherapy drugs has rapidly increased. These studies focused on determining the therapeutic efficacy of molecules obtained from different biological organisms as new drug candidates in the treatment of melanoma cancer. Lichens are symbiotic organisms formed by the combination of mycobiont and photobiont. Lobaric acid is a secondary metabolite derived from lichens that has antibiotic, antimycobacterial, antioxidant, antiviral, and anticancer properties. The purpose of this study was to determine the proliferative activity of lobaric acid in melanoma cancer cells, as well as the mRNA level of this activity's potential to induce apoptosis via mitochondrial and/or extrinsic pathways. The effect of different concentrations of lobaric acid on cell proliferation of A-375, MDA-MB-435 and G-361 melanoma cells was determined by MTT test and xCELLigence real-time cell analyzer. In addition, the expression level of five target genes associated with melanoma cancer and the apoptosis pathway was determined by real-time quantitative PCR (qRT-PCR). The result of MTT and xCELLigence tests determined that lobaric acid showed activity at a concentration of 12.15 µM in 48 h. The qRT-PCR results showed that *Bax*, *TP53*, *caspase 1*, *caspase 8* target gene expression levels increased while *Bcl-2* expression levels decreased. The antiproliferative effect of lobaric acid on various melanoma cancer cells by apoptotic pathway has provided a strong basis for its utility as a potential therapeutic agent for melanoma therapy.

Keywords: Melanom cancer; lobaric acid; antiproliferative effect; apoptosis**INTRODUCTION**

Skin cancer, also known as melanoma, is one of the most common malignancies that affect humans. It is most commonly found on parts of the skin that are exposed to ultraviolet (UV) radiation from the sun [1]. Skin cancers are classified into two types based on their cellular origin: melanoma, which is derived from melanocytes and epithelial cells [2]. Melanoma also is recognized as one of the most incident and mortality cause cancer which increased the last centuries. Malignant melanomas are lethal neoplastic cancers that arise from melanocytes, the cells that produce melanin in the lower epidermis. Skin cancer can be treated in a variety of ways, including surgical removal, radiation therapy, chemotherapy or cryosurgery [3, 4]. To reduce the risk of chemotherapy drugs, there has been a growing interest in the use of novel candidate molecules [5]. Natural compounds derived from plant and other organisms such as microorganisms, fungus and lichens have shown promising anti-cancer drug potential, and they have been discovered to serve as lead compounds in the synthesis of new drugs [6]. Lichens can be defined as a symbiotic organism those originated from fungus partner known as mycobiont and photobiont algae (photosynthetic organism). Secondary metabolites from lichens have been found to have a variety of biological activities, including antimicrobial, antioxidant, antitumor, antiviral, antigenotoxic, antidiabetic, and neuroprotective effects [7]. Lobaric acid is a lichen secondary metabolite which is extracted from the Antarctic lichen *Stereocaulon alpinum*, it contains biologically potent bioactive compounds with antibiotic, antimycobacterial, antioxidative, antiviral, and anticancer properties [8] (Figure 1A).

The purpose of this study was to determine the anti-proliferative effect of lobaric acid in different melanoma cancer cells and the mRNA level of this activity's potential to induce apoptosis via mitochondrial and/or extrinsic pathways.

MATERIAL AND METHOD

Lobaric acid was obtained commercially as a pure active ingredient. It was prepared by dissolving 100 μ M lobaric acid in DMEM medium with 0.05 % DMSO. A-375, G-361, and MDA-MB-435 melanoma cells used in this study. A-375 cell line was grown in DMEM (Gibco) medium containing 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin at 37°C. MDA-MB-435 and G-361 were cultured in DMEM medium with 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin, 1% L-Glutamine and 1% non-essential amino acid. Human melanoma A-375, G-361, WM-115, and MDA-MB-435 cells were seeded in 96-well plates at a density of 2×10^3 cells/ml and different concentrations of lobaric acid (1.56 μ M, 3.125 μ M, 6, 25 μ M, 12.5 μ M, 25 μ M, 50 μ M and 100 μ M) were treated and incubated for 24h and 48h. The cell viability was determined using the 3-(4,5-Dimethyl 2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide method (MTT). The plate was measured in the microplate reader at 570 nm. In the XCELLigence® Real-Time Cell Analysis, the cells were seeded in 16-well plates containing 100 μ l of medium at a density of 2×10^3 cells per well (ACEA Biosciences, San Diego, CA). The e-plate was kept in laminar flow for 30 min to allow the cells to settle on the e-plate base. After 24 h, the wells were treated with lobaric acid at various concentrations (1.56 μ M, 3.125 μ M, 6, 25 μ M, 12.5 μ M, 25 μ M, 50 μ M and 100 μ M). The cells were incubated for 120 h at 37°C in a % CO₂ incubator. The IC₅₀ values was calculated by using RTCA Software Lite software. Total RNA isolation from A-375 cells was performed with Trizol reagent. cDNA synthesis was carried out with the EURx synthesis kit. The reaction conditions and target gene primer sequences used in the qRT-PCR analysis. GAPDH was used as housekeeping genes for qRT-PCR normalization. Five apoptosis-related target genes were used to determine the apoptotic effect of lobaric acid at the mRNA level. Results were evaluated with the formula $2^{\Delta\Delta Ct}$.

RESULTS

Lobaric acid was treated with 3 different melanoma cancer cell lines (A-375, MDA-MB-435 and G-361) (Figure 1B). Then, proliferation of cells was determined by MTT test and xCELLigence cell analyzer (Figure 1C, 1D, 1E). Lobaric acid showed anti-proliferative effect from 3.125 to 100 μ M and IC₅₀ concentration of lobaric acid was determined 12.15 μ M in 48 h (Figure 1C, 1D). As a result of qRT-PCR experiments, it was determined that lobaric acid application at IC₅₀ concentration significantly increased the expression levels of *Bax*, *TP53*, *Caspase 1*, and *Caspase 8* target genes while *Bcl-2* expression levels decreased (Figure 2). These data determined that lobaric acid has cytotoxic effect on A-375 melanoma cancer cell and suppressed cell growth by apoptotic pathway and provided a strong basis for its utility as a potential therapeutic agent for melanoma therapy.

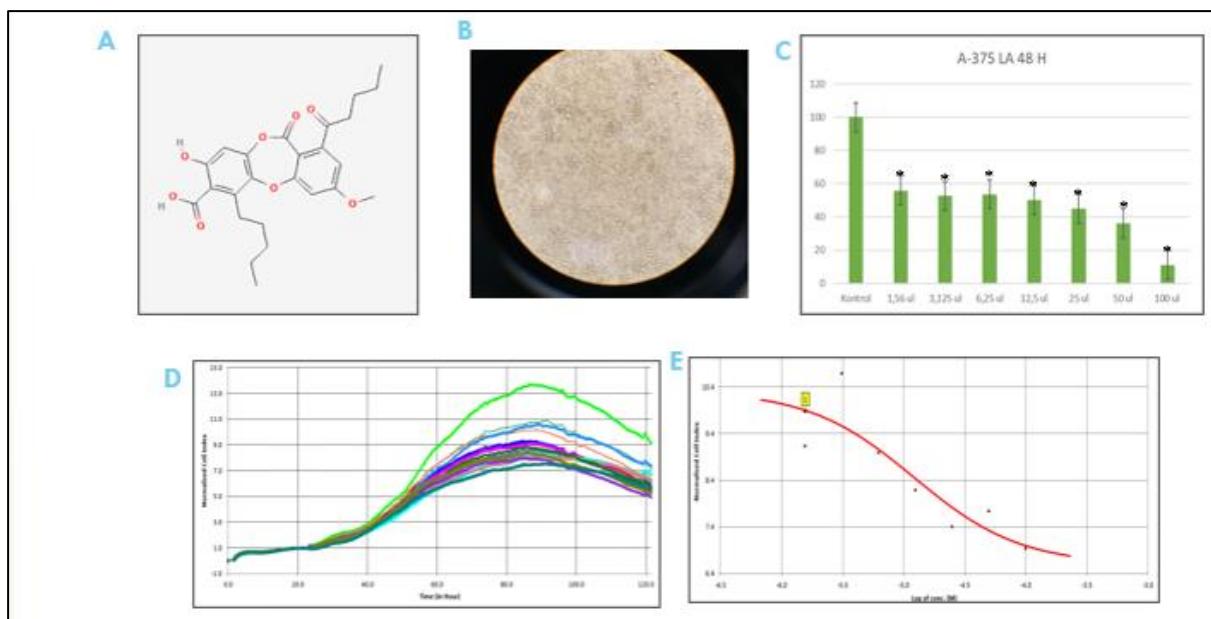


Figure 1. Lobaric acid structural formula (A) [9], A-375 melanoma cells (10X) (B), MTT assay result with lobaric acid application to A-375 cells (C), and xCELLigence real time cell analyzer result after lobaric acid application to A-375 cells (D, E). (*p<0.05)

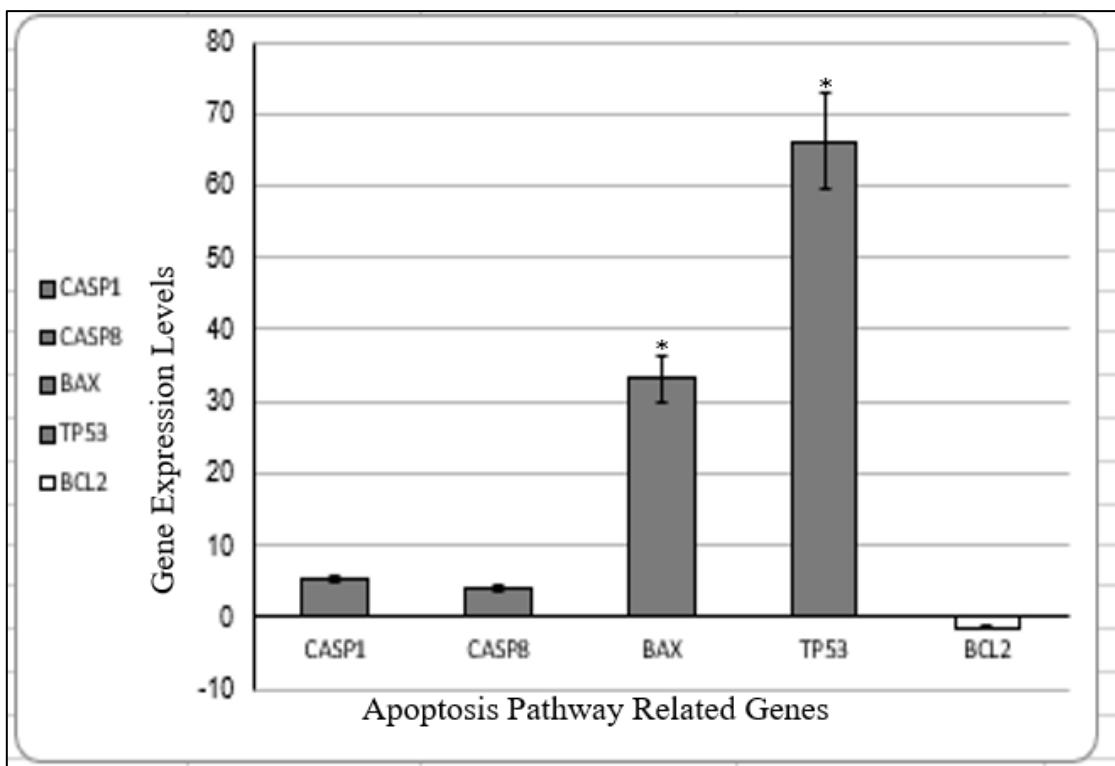


Figure 2. Apoptosis pathway-related gene expression levels in A-375 cells after lobaric acid application compared to the control (* $p<0.05$).

DISCUSSION AND CONCLUSION

In our study, the anti-proliferative effect of lobaric acid on melanoma cancer cells in different subtypes was examined using the MTT test and xCELLigence real-time cell analyzer. Lobaric acid application resulted in a dose- and time-dependent decrease in cell viability in A-375 melanoma cancer cells, with the IC₅₀ concentration determined for 12.15 μ M after 48 h. The gene expression level showed that lobaric acid modulates the apoptosis pathway by regulating the expression levels of genes associated with the apoptosis pathway compared to the control.

Our research is the first study to lobaric acid has an anti-proliferative effect on A-375 melanoma cancer cells and related to the apoptosis pathway. Our findings show that lobaric acid could be used as a potential therapeutic candidate in the treatment of melanoma cancer. The further studies as *in vivo* studies and clinical trials are confirmed the potential therapeutic effect of lobaric acid on melanoma cells.

REFERENCES

1. Madan, V., J.T. Lear, and R.-M. Szeimies, *Non-melanoma skin cancer*. The lancet, 2010. 375(9715): p. 673-685.
2. Sood, S., R. Jayachandiran, and S. Pandey, *Current advancements and novel strategies in the treatment of metastatic melanoma*. Integrative Cancer Therapies, 2021. 20: p. 1534735421990078.
3. Chinembiri, T.N., et al., *Review of natural compounds for potential skin cancer treatment*. Molecules, 2014. 19(8): p. 11679-11721.
4. Sweetman, S.C., *Martindale: the complete drug reference*. 2005.
5. Molassiotis, A., et al., *Use of complementary and alternative medicine in cancer patients: a European survey*. Annals of oncology, 2005. 16(4): p. 655-663.
6. Barnes, J. and M. Heinrich, *Fundamentals of pharmacognosy and phytotherapy*. 2004: Churchill Livingstone.
7. Ranković, B. and M. Kosanić, *Biotechnological substances in lichens*, in *Natural Bioactive Compounds*. 2021, Elsevier. p. 249-265.
8. Hong, J.-M., et al., *Anti-cancer activity of lobaric acid and lobarstin extracted from the antarctic lichen Stereocaulon alpinum*. Molecules, 2018. 23(3): p. 658.
9. Kim, S., et al., *PubChem substance and compound databases*. Nucleic acids research, 2016. 44(D1): p. D1202-D1213.

S15/O15**INVESTIGATION OF THE PEA3 TRANSCRIPTION FACTOR FAMILY POTENTIAL
GENE REGULATION NETWORK IN LUHMES CELLS PARKINSON MODEL†****Ekin Sönmez¹, Esra Nur Yiğit^{1,4}, Yiğit Koray Babal¹, Tunahan Çakır³, İşil Kurnaz^{1,2*}**¹Institution of Biotechnology, Gebze Technical University, Kocaeli, Turkey;²Department of Molecular Biology and Genetics, Gebze Technical University, Kocaeli, Turkey³Department of Bioengineering, Gebze Technical University, Kocaeli, Turkey, tcakir@gtu.edu.tr⁴Research Institute for Health Sciences and Technologies (SABITA), İstanbul Medipol University, İstanbul, Turkey

* Correspondence: ikurnaz@gtu.edu.tr

† Presented at the 4th International Cell Death Research Society Congress, Turkey, 17–19 March 2022.

Abstract

Parkinson's Disease (PD) is a neurodegenerative disease, which is characterized by dopaminergic cell death in substantia nigra. The studies showed that various mutations in SNCA gene are associated with early-onset of the disorder. Beside overexpressing wild type or mutant forms of SNCA, some neurotoxins can also be used to model PD pathology. Hydroxidopamine (6-OHDA) is a catecholaminergic neurotoxin that is widely used to model PD. In this study, we aim to use three different approaches for modelling PD using LUHMES cell line: overexpressing SNCA, 6-OHDA treatment and 6-OHDA treatment with SNCA overexpression to induce PD. We perform transcriptomic analysis and follow a bioinformatic approach to determine the gene regulatory network between PEA3 transcription factor family members and PD related genes. In PD models we constructed, there was a decrease in dopaminergic neuron markers and they were correlated with ETV1 and other PEA3 transcription factor family members such as ETV4 and ETV5. It has also been shown that genes in the dopaminergic pathway and genes related to PD, especially those related to mitochondria, are among the potential target genes of PEA3 proteins.

Keywords: Parkinson's disease; LUHMES; α-synuclein; 6-hydroxidopamine**INTRODUCTION**

The specific loss of dopaminergic neurons and Lewy body accumulation in substantia nigra are the characteristics of Parkinson's Disease (PD)[1]. The point mutations on SNCA gene are among the various gene mutations known to induce the PD pathology, causing the formation of toxic α-synuclein oligomers [2-3]. There are two major subtypes of PD models: neurotoxins and genetically induced models. 6-hydroxidopamine (6-OHDA) is one of the widely used neurotoxins to model PD, which causes toxicity by the oxidation and hydrogen peroxide formation in the cells [4]. Among the genetically induced models, overexpression of wildtype or mutant forms of alpha-synuclein (αSyn) to induce production of aggregates are also used widely to investigate the pathology of PD [5,6]. LUHMES cell line is of the cells that are used for modelling PD in cell culture. In our study, LUHMES cell lines were used as a PD model, where α-synuclein was overexpressed and the cells were exposed to 6-hydroxidopamine (6-OHDA). Transcriptomic data were collected from the PD model and control, and it was used for the construction of a regulatory network between transcription factors from PEA3 family and PD associated genes.

MATERIALS AND METHODS**Cell Culture and 6-OHDA Treatments**

Wildtype LUHMES cells or those overexpressing αSyn-overexpressing were gifts from Stefan Schildknecht (University of Konstanz, Germany). Cells were maintained in proliferation medium, which is DMEM:F12 supplemented with L-glutamine (2 mM), b-FGF (40 ng/ml) and N2 supplement (1%). The cells were counted and seeded into poly-L-ornithine/fibronectin coated flasks with proliferation medium for pre-differentiation (Day 0). After 24 hours, the proliferation medium was replaced with differentiation medium, which is DMEM:F12 containing L-glutamine (2 mM), N2 supplement (1%), GDNF (2 ng/ml), dbcAMP (100 μM), tetracycline (1 μg/ml), and the cells were incubated for 48 hours. The cells were

detached and seeded into new petri dishes with differentiation medium. After 48 hours of incubation, differentiation medium was renewed (day 4) and differentiation was completed after additional 48 hours (day 6). Differentiated LUHMES and LUHMES-aSyn cells were treated with 50 μ M 6-OHDA for 12h and collected for RNA isolation. Each experiments were replicated 4 times.

RNAseq and Bioinformatic Analysis

RNA isolation was performed by the manufacturer's instructions. RNA integrity (RIN) values were measured and library preparation was performed for sequencing. Raw sequenced data was analyzed with Kallisto [7], a pseudo-alignment algorithm, to get gene expression levels. The data object was prepared as *countdata* (a table with Raw count data) and *coldata* (a table with information about the samples). Genes with counts lower than 10 were prefiltered. Variance Stabilizing Transformation (vst) were used as a parametric fit for the dispersion to normalize the raw counts. To understand differences of transcriptomic profiles between samples, differential gene expression analysis was performed by using DESeq2 with 0.05 as p-adjusted value threshold and 0.6 as log2-fold change cutoff for determining up and down-regulated genes [8]. The results of the differential expression analyses were visualized by using EnhancedVolcano package of R. The differential expressed genes and samples were clustered to investigate, gene groups and its expression trend between sample groups by hierarchical clustering and visualized as heatmap [8,9]. ShinyGo web application was used to perform KEGG enrichment analysis for differentially expressed genes (DEGs) [10]. To investigate transcription factor binding site of the selected promoter sequences, genome-wide promoter analysis was performed by using FindM online tool [11]. Letter probability matrix of transcription factors were extracted from C/S-BP database [12] for human. Extracted letter probability matrix was used as an input for FindM tool. In this analysis, promoter sequence between -100 to 1000 Transcription Start Site (TSS) range was selected. Binding motifs were determined with 0.001 p-value thresholds and converted to TF-gene interaction table. After obtaining the TF-gene interaction list, TF- gene file and expression data were used in pandaR Bioconductor package for the construction of a regulatory network [13]. The correlation analysis was performed to determine the correlations between the expressions of genes of interest and PEA3 transcription factors in different groups. The correlation coefficients were filtered as R>0.75(positive) or R<-0.75(negative). The promoter sequences of the potential targets were retrieved from UCSC Genome browser such that the sequences 1000bp upstream and - 100bp downstream of TSS were retrieved. MotifDB Bioconductor package was used for transcription factor binding sequence motifs. Etv1/Er81, Etv4/Pea3 and Etv5/Erm binding sites were retrieved from Jaspar2018 database. Bioconductor package motifcounter was used for analyzing transcription factor binding sites (TFBSs) in target promoter sequences [14]. A false positive probability α was filtered as 0.001 for predicting TFBSs in a random sequence. The regulatory networks of potential targets and TFs were constructed by Cytoscape [15].

RESULTS

After the differential gene expression analysis, DEGs were filtered as upregulated ($\log_{2}fc > 0.6$) and downregulated ($\log_{2}fc < -0.6$) and significant ($padj < 0.05$). DEG analysis was performed between (i) 6-OHDA treated group vs control group, (ii) α -synuclein overexpression group vs control group, (iii) α -synuclein overexpressed and 6-OHDA treated group vs control group. For the comparison of 6-OHDA treated group and control group, 1908 genes were significantly upregulated and 2185 genes were significantly downregulated (Figure 1A). When α -synuclein overexpression group vs control group was compared, there were 113 genes that were significantly upregulated and 174 genes significantly downregulated (Figure 1B). The comparison between α -synuclein overexpressed and 6-OHDA treated group vs control group showed that there were 2376 significantly upregulated genes and 2274 downregulated genes (Figure 1C). α -synuclein overexpressed and 6-OHDA treated group vs control group DEG analysis showed that there were more significantly changed genes, and we decided to continue with this model of PD. *ETV1* gene of the PEA3 transcription factor family member was significantly downregulated with 6-OHDA treatments. Also, two other transcription factors from PEA3 subfamily, namely *ETV4* and *ETV5*, were downregulated significantly (Figure 1D). KEGG analysis was performed with significantly changed genes from α -synuclein overexpressed and 6-OHDA treated group vs control group, and it was observed that there were 88 PD related genes (Figure 1E).

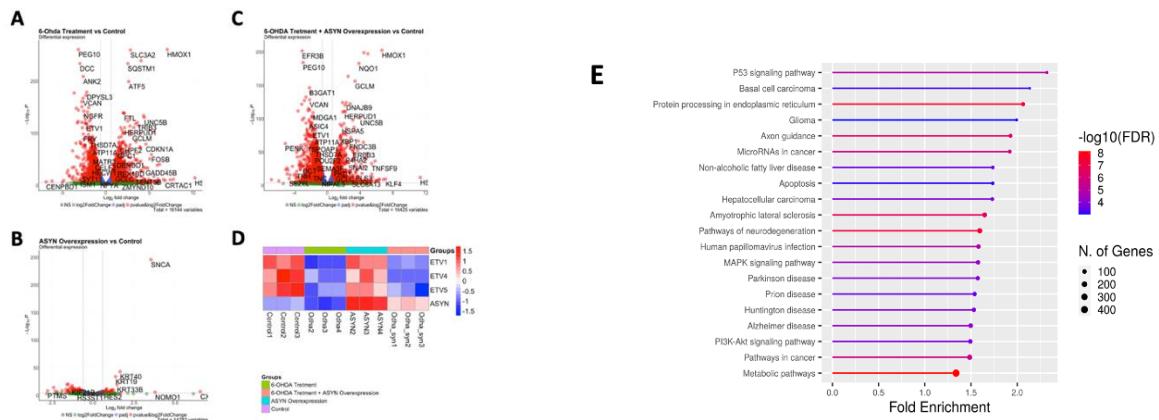


Figure 1 Differential gene expression analysis results. Corresponding differentially expressed genes (DEGs) were obtained from comparisons of (A) 6-OHDA treated group vs control group, (B) α -synuclein overexpression group vs control group, (C) α -synuclein overexpressed and 6-OHDA treated group vs control group by using DEseq2 package with a 0.6 absolute log2 fold change and p-adj <0.05 , which is indicated with red points. (D) Heatmap of PEA3 Transcription factors based on normalized counts. (E) KEGG analysis of differentially expressed genes for α -synuclein overexpressed and 6-OHDA treated group vs control group. KEGG analysis was performed by ShinyGO.

Genome-wide analysis, PANDA algorithm, correlation analysis and promoter analysis were performed to construct the gene regulatory network between PEA3 transcription factors and PD related 88 genes (Figure 2). The gene regulatory networks were then visualized by using Cytoscape software. In this network, the edge width shows the level of the weight score and the color of the edges shows the correlation between potential targets and TFs (Figure 2).

The downregulated genes were found to be related with mitochondria organization, oxidative phosphorylation and dopaminergic pathways. Those genes were positively correlated with PEA3 members and they were determined as potential targets. The upregulated genes were related with catabolic processes and they were negatively correlated with PEA3 proteins.

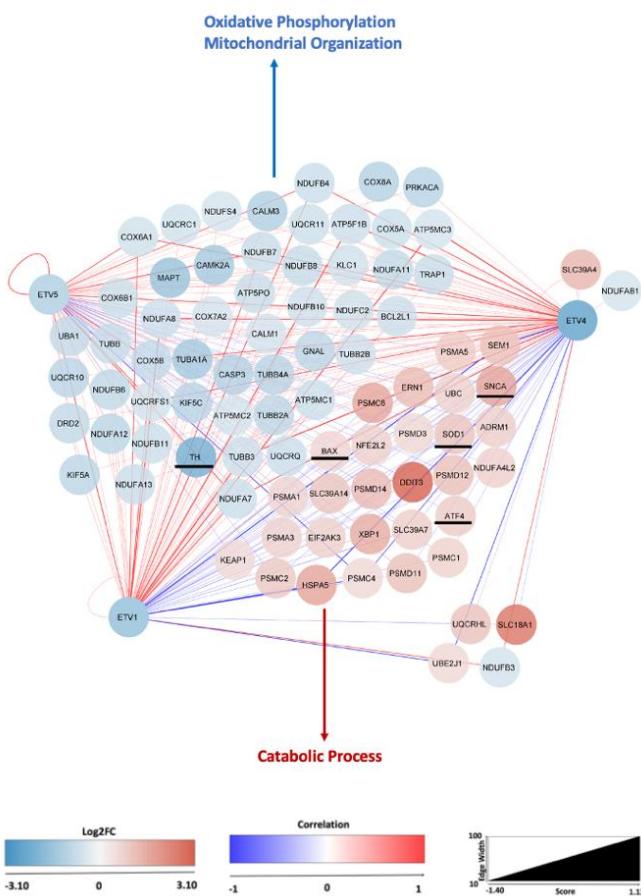


Figure 2 Gene regulatory network of ETV1, ETV4 and ETV5. The color of the circles represents the mean log₂ fold change resulting from differential gene expression analysis. Edge colors show the correlation, blue shows the negative correlation, red shows the positive correlation. Edge width shows the edge score (evidence of regulation) between TF and each target gene.

DISCUSSION

In previous studies, it has been observed that dopaminergic neuron differentiation fails in the absence of ETV1. Also, it was shown that mitochondrial membrane potential regulated Evt1 in macrophage cells, on the other hand it was shown that Evt1 repressed mitochondrial biogenesis[16,17,18]. In our PD model there was a decrease in dopaminergic neuron markers (*TH*) and they were correlated with ETV1. It was observed that there were possible regulations between PEA3 TFs. The expression levels of ETV4 and ETV5 decreased with correlation of ETV1 gene expression. At the same time, the expressions of genes that are related with aggregate formation, such as *SNCA* and *SOD1* gene expression, increased. The downregulation of ETV1 may cause the aggregate formation and affect the gene expression regulation of mitochondrial genes and cause the PD phenotype. These results show that PEA3 proteins can be used for therapeutic purposes to ameliorate dopaminergic neuron damage caused by PD.

Acknowledgements: This work was financially supported by TUBITAK, The Scientific and Technological Research Council of Turkey (Project Code: 315S302). We would like to further acknowledge Prof. Gürkan Öztürk and Medipol University Regenerative and Restorative Medicine Research Center (REMER) for technical assistance.

Author Contributions: All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, experimental analysis and data collection were performed by Isil Aksan Kurnaz, Esra Nur Yigit and Ekin Sonmez. Data analysis and bioinformatic analysis were carried out by Tunahan Cakir,

Ekin Sonmez, and Yiğit Koray Babal; funding and supervision were provided by Isil Aksan Kurnaz and Tunahan Cakir. Manuscript and figures were prepared and approved by all authors.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Dickson D. W., Braak H., Duda J. E., Duyckaerts C., Gasser T., Halliday G. M., et al., (2009), "Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria", *Lancet Neurol*, 8(12):1150-7.
2. Bertoncini C. W., Fernandez C. O., Griesinger C., Jovin T. M., Zweckstetter M., (2005), "Familial mutants of alpha-synuclein with increased neurotoxicity have a destabilized conformation", *J Biol Chem*, 280(35):30649-52.
3. Ulmer T. S., Bax A., Cole N. B., Nussbaum R. L., (2005), "Structure and dynamics of micelle-bound human alpha-synuclein", *J Biol Chem*, 280(10):9595-603.
4. Blum D., Torch S., Lambeng N., Nissou M., Benabid A. L., Sadoul R., et al., (2001), "Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease", *Prog Neurobiol*, 65(2):135-72.
5. Hasegawa T., Matsuzaki M., Takeda A., Kikuchi A., Akita H., Perry G., et al., (2004), "Accelerated alpha-synuclein aggregation after differentiation of SH- SY5Y neuroblastoma cells", *Brain Res*, 1013(1):51-9.
6. Tofaris G. K., Layfield R., Spillantini M. G., (2001), "alpha-synuclein metabolism and aggregation is linked to ubiquitin-independent degradation by the proteasome", *FEBS Lett*, 509(1):22-6.
7. Bray, N. L., Pimentel, H., Melsted, P., & Pachter, L. (2016). Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nature biotechnology*, 34(5), 525-527.
8. Love MI, Huber W, Anders S., (2014), "Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2.", *Genome Biol*, 15(12):550.
9. Blighe, K, S Rana, and M Lewis. 2018. "EnhancedVolcano: Publication-ready volcano plots with enhanced colouring and labeling." <https://github.com/kevinblighe/EnhancedVolcano>.
10. Steven Xijin Ge, Dongmin Jung, Runan Yao, (2020)," ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants", *Bioinformatics*, 36(8): 2628–2629.
11. Ambrosini, G., Praz, V., Jagannathan, V., & Bucher, P. (2003). "Signal search analysis server.", *Nucleic acids research*, 31(13):3618–3620.
12. Table of CIS-BP Motifs used by PWM Tools and SSA , https://ccg.epfl.ch/pwmtools/pwmbrowse_cis_bp.html, 2020
13. Glass K, Huttenhower C, Quackenbush J, Yuan GC., (2013), "Passing Messages Between Biological Networks to Refine Predicted Interactions", *PLoS One*, 31;8(5):e64832
14. Kopp W (2017). *motifcounter: R package for analysing TFBSSs in DNA sequences*. doi: [10.18129/B9.bioc.motifcounter](https://doi.org/10.18129/B9.bioc.motifcounter)., 2022
15. Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., & Ideker, T., (2003), "Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks.", *Genome research*, 13(11): 2498–2504.
16. Flames, N., & Hobert, O. (2009). "Gene regulatory logic of dopamine neuron differentiation. " *Nature*, 458(7240):885–889.
17. Sanin, D. E., Matsushita, M., Klein Geltink, R. I., Grzes, K. M., van Teijlingen Bakker, N., Corrado, M., Kabat, A. M., Buck, M. D., Qiu, J., Lawless, S. J., Cameron, A. M., Villa, M., Baixauli, F., Patterson, A. E., Hässler, F., Curtis, J. D., O'Neill, C. M., O'Sullivan, D., Wu, D., Mittler, G., ... Pearce, E. J., (2018), "Mitochondrial Membrane Potential Regulates Nuclear Gene Expression in Macrophages Exposed to Prostaglandin E2", *Immunity*, 49(6):1021–1033.e6
18. Yambire, K. F., Fernandez-Mosquera, L., Steinfeld, R., Mühle, C., Ikonen, E., Milosevic, I., & Raimundo, N., (2019), "Mitochondrial biogenesis is transcriptionally repressed in lysosomal lipid storage diseases" *eLife*, 8, e39598.

S16/O16

DOES THE REGULATORY EFFECT OF VITAMIN D ALLOW TO REDUCE THE CISPLATIN DOSE IN T24 BLADDER CANCER CELL LINE?

Özge Özgen¹, Güneş Özen Eroğlu¹, Özlem Küçükhuseyin¹, Nilgün Akdeniz², Ceylan Hepokur³, Serap Kurucu⁴, İlhan Yaylım¹

¹ Istanbul University, Aziz Sancar Institute of Experimental Medicine, Department of Molecular Medicine, Istanbul, Turkey

² Istanbul University, Aziz Sancar Institute of Experimental Medicine, Department of Immunology, Istanbul, Turkey

³ Cumhuriyet University, Faculty of Pharmacy, Department of Medical Biochemistry, Sivas, Turkey

⁴ Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine, Department of Physiology, Istanbul, Turkey

Address: Istanbul University, Aziz Sancar Institute of Experimental Medicine, Department of Molecular Medicine. Fatih-Capa/Istanbul **E-Mail:** drozgozgen@gmail.com

Abstract

1,25(OH)2D3 (Calcitriol, active form of Vitamin D), which is a broad regulatory molecule, plays a role in changing the efficacy of chemotherapeutic drugs. In bladder cancer, effectiveness of the treatment and reducing the resistance to chemotherapeutics and reduction of side effects due to chemotherapeutics such as cisplatin are of great importance. Cisplatin usage is one of a current standard chemotherapy regimen for bladder cancer. In our study T24, ECV-304 and HUVEC cell lines were treated with calcitriol and cisplatin individually and with combination. MTT assays were used for optimal dose determination. It was aimed to determine the possible potential of the combined use of cisplatin with calcitriol. Determined doses and combination treatments of calcitriol and cisplatin on all cell lines were evaluated for cytotoxicity, apoptosis and drug resistance. Also calcitriol and cisplatin interaction with p53 protein was assessed by molecular docking analysis. Data showed that combination treatment increased the anti-proliferative efficacy compared to cisplatin alone ($p=0.0108$) in T24 cells. Also it reduced the cytotoxicity in the HUVEC compared to cisplatin alone ($p<0.0001$). Combination treatment achieved slightly higher apoptosis rate in T24 cells than treatment of cisplatin alone ($p=0.0005$). It was determined that the rate of apoptosis and P-gp levels did not change significantly in the ECV-304 cells. However it decreased in HUVEC healthy control cell line ($p=0.0082$). P-gp ratios were increased in HUVEC ($p < 0.0001$) and decreased in T24 cells (74.47% $p<0.0001$) compare to control. The data obtained in this study show that the combination of calcitriol and cisplatin allows the use of cisplatin at lower doses.

Key Words: Bladder cancer, Calcitriol, Cisplatin,

INTRODUCTION

Bladder cancer is the 10th type of cancer in worldwide. Its incidence in men is three times higher than in women. It is known that environmental, demographic and genetic factors are effective in the development of bladder cancer. Although there are various difficulties in determining the rates of effect on disease development, it is known that the incidence of bladder cancer development is high in industrial societies (1). During the chemotherapeutic treatment of bladder cancer, agents such as valrubicin, gemcitabine, docetaxel, cabazitaxel, mitomycin C, cisplatin and their combinations are used (2). Various side effects associated with the use of these chemotherapeutics are undesirable systemic effects. Developed optimal treatment strategies may provide an advantage in reducing the side effects associated with chemotherapeutic usage. The pathogenesis of bladder cancer emerges with mutations in somatic cells and failure of protooncogenes and tumor suppressor genes to maintain their normal functions (6). P53 is one of the most commonly mutated tumor suppressor gene in cancer (7). Mutations in p53 are associated with cisplatin resistance in many cancer types and poor prognosis in bladder cancer (8- 9). Cisplatin damages the tumor through apoptosis by connecting with DNA and transduction pathways (calcium signaling, receptor signaling, activation of mitochondrial pathways, etc.). However, the most important problems in the use of cisplatin are the high systemic side effects experienced by the patients and the development of drug resistance and the decrease in the effectiveness of the treatment (10). Calcitriol (1,25-dihydroxyvitamin D3 (1,25D3)) the active form of vitamin D, may also be an option for the development of more effective treatment for bladder cancer (3,4,5). Calcitriol have several beneficial effects such as regulation of cell metabolism (>2000 gene), anti-proliferation, proapoptotic effects, anti-cell migration and anti-angiogenic activities.

Therefore, in our study, we aimed to evaluate the possible cytotoxic, apoptotic and drug resistance effects of combination therapy (cisplatin and calcitriol) on bladder cancer cell lines in vitro.

MATERIAL AND METHODS

T24, ECV-304, HUVEC cell lines used for MTT Assay, Apoptosis Assay with Annexin V-PI, P-glycoprotein Analysis and Docking Analysis. MTT, P-gp and Annexin V-PI values were statistically evaluated with the unpaired Student-T test using GraphPad Prism 5.04 Software. HEX 8.0.0 program was used in the evaluation of molecular docking datas. Analysis of apoptosis and P-gp expression by flow cytometry was performed with NovoExpress 1.3.0 software.

RESULTS

Optimal Cytotoxic Dosage Determination By MTT Assay

Cytotoxic evaluation for determination of optimum dose for calcitriol and cisplatin in T24, ECV-304, HUVEC cell lines was performed by MTT test. The cytotoxic effect of 25nM -1000 nM doses for calcitriol, 16.6 μ M - 166 μ M doses for cisplatin was evaluated in all cells at 24h, 48h, 72h. (Fig 1.)

As a result of MTT, 500nM were determined for calcitriol. The optimum dose of cisplatin 7.6 μ g/ml for 100% TDC (25.23 μ M) was reported in the literature (12). A level of 100% TDC is the approximate level of plasma peak concentrations of the chemotherapeutics (Andreotti et al., 1995)

The lower dose of cisplatin (16.6 μ M; 66% TDC) was evaluated by MTT and showed cytotoxic activity. According to the results, the combination treatment was maintained with 500 nM for calcitriol with 16.6 μ M for cisplatin for 24h (Fig. 1).

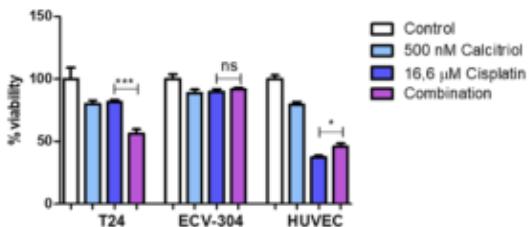


Figure 1: Comparison of MTT results. Control cells (non treated), 500 nM calcitriol, 16.6 μ M cisplatin and 500 nM calcitriol + 16.6 μ M cisplatin for combination treatment was evaluated for 24h. Triplicated applications were done for all samples. Data are mean \pm SEM (n = 3), (***) $p<0.001$, ** $p<0.01$, * $p<0.05$, ns: non significant).

Apoptosis Assay with Annexin V-PI

Apoptosis which was applied with Annexin V/PI staining, evaluated for 500nM calcitriol, 16.6 μ M cisplatin, and combination treatment (500nM calcitriol +16.6 μ M cisplatin) for 24 h. According to our results, combination treatment achieved a higher apoptosis rate in T24 cell line than treatment of cisplatin alone ($p=0.0005$). It was determined that the rate of apoptosis did not change significantly in the ECV-304 cell line. It was observed that the rate of apoptosis decreased in HUVEC healthy control cell line ($p=0.0082$) (Fig. 2).

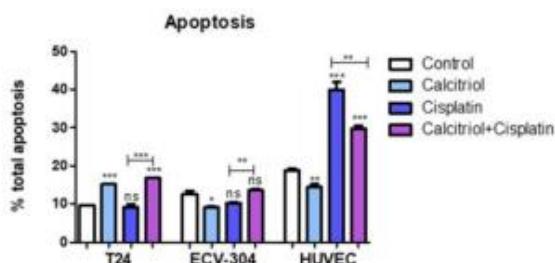


Figure 2: Annexin V/PI staining represented images for T24 , ECV-304 and HUVEC cell lines for 24h. Control cells (non treated), 500 nM calcitriol, 16.6 μ M cisplatin and 500 nM calcitriol +16.6 μ M cisplatin for combination treatment was evaluated. Total apoptosis results for T24, ECV-304 and HUVEC. Triplicated applications were done for all samples. Data are mean \pm SEM (n = 3), (***) $p<0.001$, ** $p<0.01$, * $p<0.05$, ns: non significant).

P-gP Levels

Examination of P-gp expression level evaluated for 500nM calcitriol, 16.6 μ M cisplatin, and combination treatment (500nM calcitriol +16.6 μ M cisplatin) for 24 h. We found that the P-gp expression level of the combination treatment in the T24 cell line decreased by $p<0.0001$ compared to the control and $p<0.0001$ compared to the treatment of only cisplatin and only calcitriol. In the HUVEC cell line, the expression rate of P-gp increased with calcitriol treatment compared to the control $p<0.0001$, while it decreased significantly with cisplatin treatment compared to the control ($p=0.0005$). P-gp expression levels in HUVEC cells, increased in combination treatment compared to control $p<0.0001$. In addition, no significant changes were observed in terms of P-gp expression rates in the ECV-304 cell line. When the cisplatin treatment was evaluated statistically compared to the combination treatment in the ECV-304 cell line, the significance value was $p=0.0616$ (Table 1).

<i>Cell lines</i>	<i>Control</i>	<i>Calcitriol (500nM)</i>	<i>Cisplatin (16.6 μM)</i>	<i>Calcitriol+ Cisplatin (500nM+ 16.6 μM)</i>
<i>T24</i>	74.47	79.22	80.65	68.33 ↓
<i>ECV-304</i>	97.64	99.18	98.05	97.47
<i>HUVEC</i>	87.08	92.50	86.09	92.16 ↑

Table 1: Percentage ratios of MFI (Mean Fluorescence Intensity) obtained from flow cytometric analysis of P-gp expressions levels in T24, ECV-304 and HUVEC cells.

Docking Analysis Results

According to docking analysis, calcitriol has higher binding energy with p53 molecule compared to cisplatin. It was evaluated simulatively with DNA Docking method in order to form the basis for future research.

CONCLUSION

In our experiments, we adjusted the optimum dose of cisplatin and calcitriol to remain below the 100% TDC (Test Drug Concentration) level. A level of 100% TDC is the approximate level of plasma peak concentrations of the chemotherapeutics (12). Because exceeding 100% TDC doses could come out systemic side effects when it comes to use in advanced clinical applications. The 100% TDC dose of cisplatin in the literature was (25.23 μ M) (12). Therefore, we chose the ratio below the 100% TDC dose and 66% TDC (16.6 μ M) as the combination dose for cisplatin in our experiments. According to the literature, the IC50 dose for calcitriol in T24 bladder cancer cells was 40 μ M (13). Based on our MTT data on calcitriol, we benefited from its anti-proliferative properties at much lower dose levels (25nM-500nM) of calcitriol. We have determined that calcitriol has a biphasic effect at the cellular level. Calcitriol induced dose-dependent variable responses (Fig. 1). Our study reveals that calcitriol increases the effectiveness of cisplatin in bladder cancer cells preclinically. It also provides data that can be considered in the development of viable pharmacokinetic models. Considering the side effects of cisplatin, revealing the data to be obtained from studies on combination treatments with important regulatory molecules such as vitamin D may enable to increase the survival and life quality of bladder cancer patients.

Acknowledgements

The present study was supported by a grant from the Scientific Research Projects Coordination Unit of Istanbul University (Doctorate Project no: TDK-2017-23523).

Thanks to Abdullah Yilmaz about flow cytometric analysis. Also we thanks to Assoc Prof Dr Nuray Varol for the material supplement.

REFERENCES

- 1- Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. (2021). Global Cancer Statistics, GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *A cancer Journal for Clinicians*, 71(3); 209-249 <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- 2-Urolojik Onkoloji Bülteni. Bladder Cancer 2018; 2(1):11-19 ISSN 2564-6699 <https://www.uroturk.org.tr/urolojiData/Books/587/tud-urolojik-onkoloji-bulteni-mesane-kanseri-mart-2018-cilt2-sayi-1.pdf>
- 3- Trump D.L.(2018). Calcitriol and cancer therapy: A missed opportunity. *Bone Reports*, 9; 110–119 doi:10.1016/j.bonr.2018.06.002
- 4- Studzinski G.P., Gocek E., Danilenko M. (2011). Vitamin D, Vitamin D Effects on Differentiation And Cell Cycle (3rd edition). Elsevier; 84; page:1625-1656

- 5- Genç, A., Sevim, D.G., Özen, A.T., Yılmaz, G., D.(2015). The Area of Usage of the Vitamin D in Different Diseases and Unknown Benefits. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası. 68(2). DOI:10.1501/Tıpfak_000000890.
- 6- Altaylı, E., Güneş, S. (2011). Mesane Kanseri Gelişiminde Moleküler Mekanizmaların Rolü. Türkiye Klinikleri Journal of Medical Science,31(1):191-205. doi: 10.5336/medsci.2009-13192
- 7- Slaton JW, Benedict WF, Dinney CP (2001). P53 in bladder cancer: mechanism of action, prognostic value and target for therapy. *Urology*, 57(5):852-9. doi: 10.1016/s0090-4295(01)00968-2.
- 8- Ma Y., Yu W.D., Trump D.L. ve Johnson C.S.(2010). 1,25D₃ Enhances Antitumor Activity of Gemcitabine and Cisplatin in Human Bladder Cancer Models; *Cancer*, 116(13): 3294–3303. doi: 10.1002/cncr.25059
- 9- Branch P, Masson M, Aquilina G, Bignami M, Karran P.(2000) Spontaneous development of drug resistance: mismatch repair and p53 defects in resistance to cisplatin in human tumor cells. *Oncogene*. 29;19(28):3138-45. doi: 10.1038/sj.onc.1203668.
- 10- Florea A.M., Büsselberg D.(2011). Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effect. *Cancers*. 3; 1351-1371 doi:10.3390/cancers3011351
- 11- Mossman T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 16;65(1-2):55-63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.7
- 12 -Oral A.Y., Oral B.H., Sarımahmut M., Cevatemre B., Özkaya G., Korkmaz Ş. ,Ulukaya E. (2017) Combination of esomeprazole with chemotherapeutics results in more pronounced cytotoxic effect via apoptosis on A549 nonsmall-cell lung cancer cell line. *Turk J Biol* 41: 231-241 © TÜBİTAK doi:10.3906/biy-1606-46)
- 13- Konety B.R., Lavelle J.P., Pirtskalaishvili G., Dühr R., Meyers S.A., Neguen T.S.T., et al. (2001). Effects of Vitamin D on Transitional Cell Carcinoma of The Bladder In Vitro and In Vivo. *J Urol*. 165(1):253-8. doi: 10.1097/00005392-200101000-00074.

S17/O17

EFFECT OF THIAZOLIDINONE DERIVATIVE APPLICATION ON CELL DEATH MECHANISMS IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA CELLS

Faika Başoğlu¹, Hilal Kabadayı Ensarioğlu², Eda Becer^{3,4}, Nuray Ulusoy Güzeldemirci⁵, Ebru Didem Coşar⁵, H. Seda Vatansever^{2,*}

¹European University of Lefke, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, Lefke, TRNC.

²Manisa Celal Bayar University, Faculty of Medicine, Department of Histology and Embryology, Manisa, TURKEY.

³Near East University, Faculty of Pharmacy, Department of Biochemistry, Nicosia, TRNC.

⁴DESAM Institute, Near East University, Nicosia, TRNC.

⁵Istanbul University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, İstanbul, TURKEY.

Emails: fabasoglu@eul.edu.tr, hilalkabadayi@yahoo.com, edabecer@yahoo.com, nurayulusoy@yahoo.com, didemcosar94@gmail.com.

* Correspondence: sedavatansever@yahoo.com, 00905325730820.

4th Congress of Cell Death Research Society with International Participation-Türkiye. 17-19 March 2022

Abstract

Introduction: Thiosemicarbazides/Thiosemicarbazones are drug candidate heterocyclic compounds due to their biological activities such as anti-tumor, anti-inflammatory, antimicrobial and antidiabetic. Because of these properties, designing and/or synthesizing new compounds is one of the current research topics. In this study, it was aimed to investigate the existence of necroptotic and apoptotic cell death mechanisms of thiosemicarbazones in hepatocellular carcinoma cell line.

Material and Methods: Thiazolidinone derivative structure was determined by NMR. HepG2 cells were cultured in RPMI-1640 culture medium containing 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin, 1% L-glutamine. The effective dose of thiazolidinone was determined by MTT analysis. After thiazolidinone untreated (control) and treated cells were fixed with 4% paraformaldehyde, the distributions of Bax, Bcl2, Caspase3, Caspase 8, Caspase 9, Ki67, RIP3, and RIPK1 were analyzed by indirect immunoperoxidase method.

Results: As a result of MTT analysis, it was determined that thiazolidinone administration at a dose of 10 µM and for 24 hours was appropriate. After thiazolidinone application, an increase was observed in Bax, Bcl2, Caspase3 immunoreactivities compared to the control group. In addition, Ki67 and Caspase9 immunoreactivities were decreased, while Caspase 8, RIP3 and RIPK1 immunoreactivities were similar to the control group.

Discussion and Conclusion: After application of Thiazolidinone to HepG2 cells, decreased Ki67 immunoreactivity and increased Caspase3 immunoreactivity suggested that while Thiazolidinone reduced proliferation in HepG2 cells, it triggered caspase-dependent cell death. It was concluded that Bcl2/Bax ratio and RIP3 and RIPK1 immunoreactivities were similar in Thiazolidinone and control groups, and that triggered cell death might be due to an apoptotic mechanism via extrinsic pathway rather than necrosis.

Keywords: Thiazolidinone, Hepatocellular carcinoma, Apoptosis, Necroptosis

INTRODUCTION

Hepatocellular carcinoma (HCC) is a liver malignancy that is the second cause of cancer-related death worldwide. It arises in the setting of chronic liver disease and is associated with a complex interaction between the host, environmental factors, and disease [1]. However, advanced hepatocellular carcinoma patients have poor prognoses and have few treatment options. One of the highly efficient methods to treat hepatocellular carcinoma is to terminate or control the uncurbed cell growth by the cell death mechanism [2]. Therefore, apoptosis targeting strategies have become attractive investigations to design new anticancer therapeutic agents. Currently, thiosemicarbazide derivatives are heterocyclic compounds that are used in medicinal chemistry and have shown a wide range of anticancer activities by triggering apoptosis. Also, thiosemicarbazide derivatives has been reported to induce apoptosis by

the caspase-3 activation and S-phase arrest [3]. Nevertheless, the pro-apoptotic and pro-necroptotic effects of thiosemicarbazide derivatives are limited in hepatocellular carcinoma. In the current work, we have prepared new thiosemicarbazide derivatives and evaluated their cytotoxicities, proapoptotic and pronecroptotic properties in HepG2, hepatocellular carcinoma cell line.

MATERIALS AND METHODS

Chemistry

Merck silica gel 60 F254 plates were used for analytical thin-layer chromatography (TLC). Melting points were determined using a Büchi Melting Point B-540. FT-IR spectra were recorded on a Shimadzu FT-IR-8400S spectrometer. ¹H-NMR spectra were recorded on a VarianUNITY INOVA 500 MHz spectrometer. Elemental analyses were determined by CHNS-932 (LECO).

General synthesis procedure for the compound:

2-Amino-3-[{4-methoxybenzoyl}methyl]-4-(ethoxycarbonylmethyl)thiazolium bromide (1)

0.005 mol of ethyl 2-aminothiazole-4-acetate dissolved in 10 ml of acetone is added to the solution of 0.005 mol of 4-methoxyphenacyl bromide in 10 ml of acetone. After standing at room temperature for a few days, the resulting 2-amino-3-[{4-methoxybenzoyl} methyl] -4- (ethoxycarbonylmethyl) thiazolium bromide is filtered off and dried.

Ethyl [6-(4-methoxyphenyl)imidazo[2,1-b]thiazol-3-yl]acetate hydrobromide (2)

2-Amino-3 - [{4-methoxybenzoyl} methyl] -4- (ethoxycarbonylmethyl) thiazolium bromide is boiled in absolute ethanol under reflux in a water bath for 20 minutes. At the end of the reaction, the precipitated substance is dried by filtration.

2-[6-(4-methoxyphenyl)imidazo[2,1-b]thiazol-3-yl]acetohydrazide (3)

0.025 mol of hydrazine hydrate (98%) is added onto the 30-40 ml etonal solution of 0.005 Mol 2 and it is heated in the water bath under the refluxing cooler for 5 hours. The reaction mixture is allowed to cool to room temperature and the precipitate formed is filtered. It is purified by washing with ethanol.

4-Allyl-1-[[6-(4-methoxyphenyl)imidazo[2,1-b]thiazol-3-yl]acetyl]thiosemicarbazide (4)

0.005 mol compound 3 is boiled in a water bath under reflux with 30 ml of ethanol until a clear solution is obtained. Add 0.005 mol from allyl isothiocyanate and heat for 3 hours. After the reaction mixture is cooled to room temperature on its own, the precipitated product is filtered off and purified by washing with hot ethanol (Figure 1).

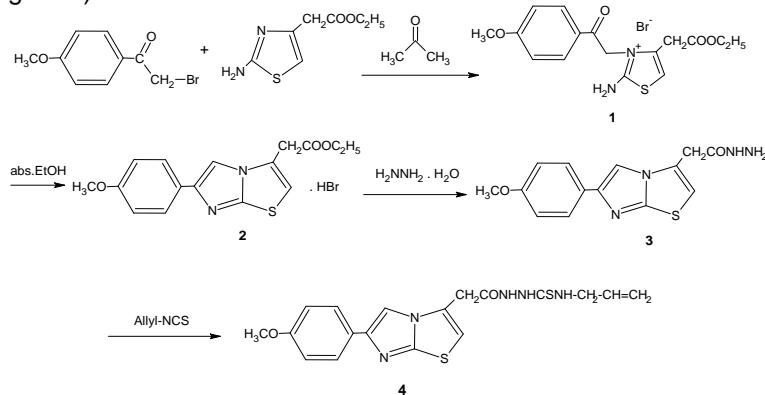


Figure 1: General Synthesis pathway of thiosemicarbazide derivative

4-Allyl-1-[[6-(4-methoxyphenyl)imidazo[2,1-b]thiazol-3-yl]acetyl]thiosemicarbazide (4)

White solid, mp 247°C, yield 72%, Anal. Calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}_2\text{S}_2$: C, 53.85; H, 4.77; N, 17.44%. Found: C, 53.72; H, 4.33; N, 17.10. IR ν_{max} (KBr, cm⁻¹): 3196 (N-H stretching), 3093, 3075, 3045 (ar. C-H stretching), 2985, 2954, 2891 (al. C-H asymmetrical and symmetrical stretching), 1703 (amide C=O stretching), 1556 (conjugated C=C stretching), 1170 (C=S stretching), 1156, 1145, 1409 (NH-C=S stretching). ¹H-NMR (500 MHz) (DMSO-d₆/TMS) δ (ppm): 10.18 (s, 1H, NH); 9.37 (s, 1H, NH); 8.31 (s, 1H, NH); 5.14 (dd, 1H, $J=17.08$ Hz; 1.46 Hz, allyl trans =C-H); 5.04 (dd, 1H, $J=10.25$ Hz; 1.46 Hz, allyl cis =C-H).

Cell culture

HepG2 (ATCC, HB-8065TM) cells were cultured in RPMI 1640 (capricorn scientific, RPMI-HA) culture medium that contains 10% FBS (gibco, 10270-106), 1% penicillin-streptomycin (capricorn scientific, PS-B) and 1% L-glutamine (capricorn scientific, GLN-B).

2.3. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) analysis

The effective dose was determined by MTT (3-(4,5-dimethylthiazol- 2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (Glentham life sciences, GC4568) analysis by applying different doses of the thiazolidinone to HepG2 cells for 24 and 48 hours. After the treatment of thiazolidinone, 10 μ l MTT solution was added into each well and incubated for 4 h at 37°C in 5% CO₂. Then, the medium was vacated and 50 μ l dimethylsulfoxide (DMSO) (Glentham life sciences, GK2245) was added to each well to dissolve the formazan crystals. The absorbance was immediately measured at 540 nm with an UV-visible spectrophotometer multiplate reader. All experiments were done in triplicate.

Immunocytochemistry analysis

After determining the appropriate dose HepG2 cells were seeded for immunocytochemistry analysis and thiazolidinone applied to the cells. Then the cells were fixed with 4% paraformaldehyde (merck, 30525) and washed three times with phosphate buffered saline (PBS, Bioshop, PBS404.100). Later the cells were treated with triton X-100 (Applichem, A4975) on ice for permeabilization and washed with PBS. Following H₂O₂ (Merck, 107209) were applied and cells were washed three times again and primary antibodies, which were Bax (santa cruz, sc-526), Bcl2 (santa cruz, sc-7382), caspase 3 (novus biologycals, NB-600-1235), caspase 8 (), caspase 9 (), RIP3 (santa cruz, sc-374639), RIPK1 (bioss antibodies, bs-5805R-TR) and Ki67 () were implemented. Next day secondary antibodies (thermo scientific, TP-125-HL) were administered and then diaminobenzidine (DAP, Thermo scientific, TA-125-HD) and Mayer's Hematoxylin (sigma aldrich, 1.07961.0100) were applied after washing in each step.

RESULTS

The target compound was synthesized from 2-[6-(4-methoxyphenyl)imidazo[2,1-b]thiazol-3-yl]acetohydrazide (3) by one-step synthesis as outline Figure 1. 4-methoxyphenacyl bromide and ethyl 2-aminothiazole-4-acetate were dissolved in acetone and mixed at room temperature. After standing up for 3-4 days, 2-Amino-3-[(4-methoxybenzoyl)methyl]-4-(etoxy carbonylmethyl)thiazolium bromide (1) was acquired. Following this step, Ethyl [6-(4-methoxyphenyl)imidazo[2,1-b]thiazol-3-yl]acetohydrazide (2) was obtained by boiling compound 1 in absolute ethanol under reflux in a water bath for 20 minutes. Thereafter, by heating in absolute ethanol the compound 2 and hydrazine hydrate in a water bath under the reflux for 5 hours, 2-[6-(4-methoxyphenyl)imidazo[2,1-b]thiazol-3-yl]acetohydrazide (3) was obtained. The compound 3 and allyl isothiocyanate were boiled for 3 hours in a water bath under the reflux and thus 4-Allyl-1-[[6-(4-methoxyphenyl)imidazo[2,1-b]thiazol-3-yl]acetyl]thiosemicarbazide (4). The reaction yield of the compound 4 was 72%. It was observed that the thiosemicarbazide scaffold onto the compound 4 was present by assessing the FT-IR and 1H-NMR spectroscopy. IR spectroscopy results, The sharp band at 1170 cm⁻¹ observed in the IR bands indicates the presence of the C=S functional group. Additionally, Strong vibrational coupling is operative in the case of the nitrogen-containing thiocarbonyl derivatives and three bands should seem to consistently appear in the regions 1395–1570 cm⁻¹, 1260–1420 cm⁻¹, 940–1140 cm⁻¹ due to the mixed vibrations. Accordingly, compound 6 shows similar 3 bands in the same regions- 1156, 1409, and 1145 cm⁻¹. In the 1H-NMR, 3 different Nitrogen peaks that arose from thiosemicarbazide and also two dd (doublet of doublets) that originated from allyl must be observed in the H-NMR graphic. According to this expectation, The presence of 3 different NH peaks around 10.18, 9.37, and 8.31 ppm that come from the thiosemicarbazide scaffold, and also 2 dd peaks around 5.11 and 5.04 due to the allyl structure indicate that compound 6 is obtained. All these observed bands and peaks from respectively IR and 1H-NMR spectroscopy were in compliance with the literature. Furthermore, there was no unacceptable side reactions.

Cell Morphology

HepG2 cells showed epitheloid, adhesive structure in standard cell culture condition (Figure 2A, B).

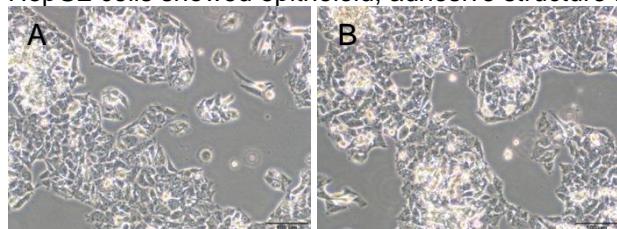


Figure 2: HepG2 cell culture. Day 5 (A) and day 7 (B). Scale bar: 100 μ m.

Cell viability and cytotoxicity

HepG2 cells were treated with five different dilutions ($5\text{ }\mu\text{M}$, $10\text{ }\mu\text{M}$, $25\mu\text{M}$, $50\text{ }\mu\text{M}$ and $100\mu\text{M}$). We found that $10\text{ }\mu\text{M}$ thiazolidinone treatment was more effective in HepG2 cell viability when compared with other dilutions for 24 h (Figure 3).

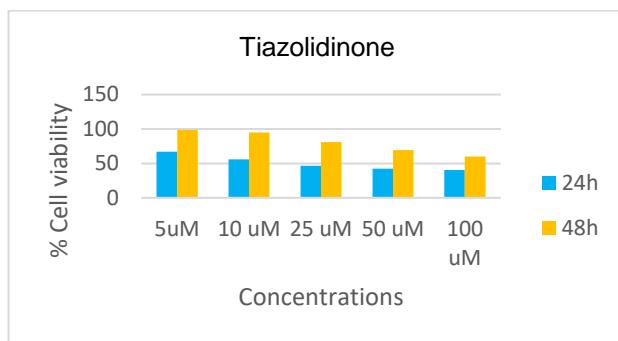


Figure 3: Effect of Tiazolidinone on cell viability of HepG2 cells. Viability was quantitated by the MTT assay. HepG2 cells were treated at different dilutions ($5\text{ }\mu\text{M}$, $10\text{ }\mu\text{M}$, $25\mu\text{M}$, $50\text{ }\mu\text{M}$ and $100\mu\text{M}$) for 24 and 48 h.

Immunohistochemical evaluation

After thiazolidinone application, an increase was observed in Bax, Bcl2, Caspase3 immunoreactivities compared to the control group. In addition, Ki67 and Caspase9 immunoreactivities were decreased, while Caspase 8, RIP3 and RIPK1 immunoreactivities were similar to the control group (Figure 4 and Figure 5).

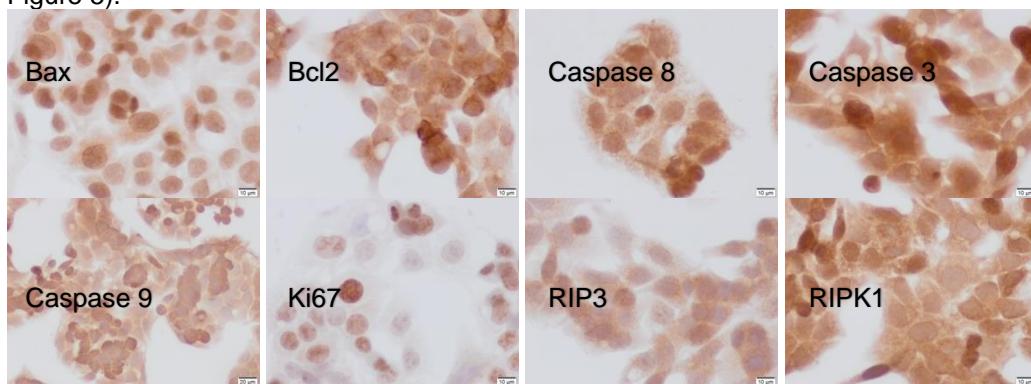


Figure 4: Immunoreactivity of Bax, Bcl2, Caspase 8, Caspase-3, Caspase 9, Ki-67 RIP3, RIPK1 in Tiazolidinone treated cells. Scale bar 10 μm .

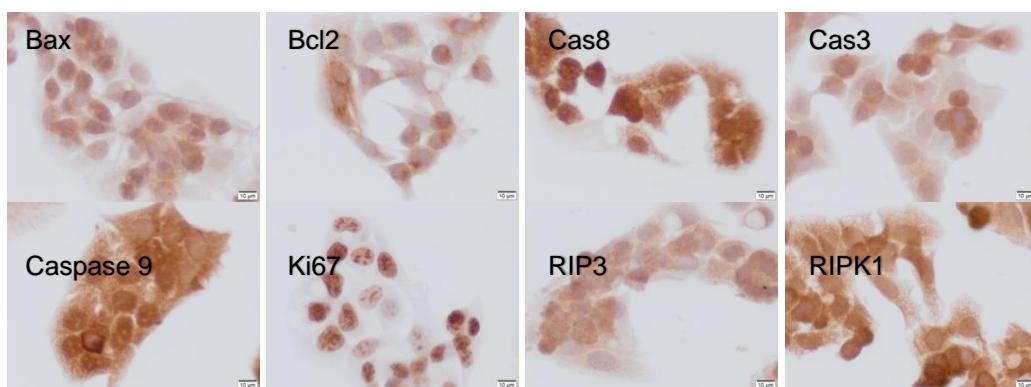


Figure 5: Immunoreactivity of Bax, Bcl2, Caspase 8, Caspase-3, Caspase 9, Ki-67 RIP3, RIPK1 in Tiazolidinone treated cells. Scale bar 10 μm .

DISCUSSION AND CONCLUSION

After application of Thiazolidinone to HepG2 cells, decreased Ki67 immunoreactivity and increased Caspase3 immunoreactivity suggested that while Thiazolidinone reduced proliferation in HepG2 cells, it triggered caspase-dependent cell death. It was concluded that Bcl2/Bax ratio and RIP3 and RIPK1 immunoreactivities were similar in Thiazolidinone and control groups, and that triggered cell death might be due to an apoptotic mechanism via extrinsic pathway rather than necroptosis.

REFERENCES

1. Wallace, M. C., Preen, D., Jeffrey, G. P., & Adams, L. A. (2015). The evolving epidemiology of hepatocellular carcinoma: a global perspective. *Expert review of gastroenterology & hepatology*, 9(6), 765-779.
2. Sim, Hao-Wen, and Jennifer Knox. "Hepatocellular carcinoma in the era of immunotherapy." *Current Problems in Cancer* 42.1 (2018): 40-48.
3. Allam, M., Bhavani, A. K. D., Mudiraj, A., Ranjan, N., Thippanna, M., & Babu, P. P. (2018). Synthesis of pyrazolo [3, 4-d] pyrimidin-4 (5H)-ones tethered to 1, 2, 3-triazoles and their evaluation as potential anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 156, 43-52.

S18/O18**CELL DEATH DECISION OF RUTHENIUM(II) ARENE COMPLEXES IN HEPG2 CELLS**

Serdar Batıkan Kavukcu¹, Hilal Kabadayı Ensarioğlu², Hafize Seda Vatansever^{2,3}, Hayati Türkmen¹

¹ Ege University, Faculty of Science, Department of Chemistry, İzmir, Turkey.

² Manisa Celal Bayar University, Faculty of Medicine, Department of Histology and Embryology, Manisa, Turkey.

³ Near East University, DESAM Institute, Nicosia, Cyprus.

Abstract

Platinum-based agents are one of the most widely used agents in chemotherapeutic treatment in recent years. However, interest in other metal complexes is increasing due to their toxicity and increased drug resistance by diseased cells. Some Ruthenium (Ru) compounds are highly selective for cancer cells and thus show low toxicity. In this study, we aimed to synthesize Ru(II) arene complexes with different aromatic and aliphatic groups and to investigate their effects on Vero and HepG2 cells through cell death mechanisms. An iridium complex was also synthesized for comparison. Consequently, two Ru(II) arene complexes (**Ru1** and **Ru2**) and one Ir(III) arene complex (**Ir1**) were used in this study. The complexes were characterized by ¹H-, ¹³C-, ¹⁹F- and ³¹P-NMR and FT-IR spectroscopic techniques. The effective dose was determined by MTT analysis by applying different doses of complexes to both cells for 24 and 48 hours. Vero and HepG2 cells were incubated with the complexes, DMSO and cisplatin. Bax, Bcl2, caspase 3, RIP3 and RIPK1 immunoreactivities were analyzed by indirect immunoperoxidase technique. **Ru1** was weak in Bax, Bcl2 and caspase 3 immunoreactivities in HepG2 cells and negative in Vero cells. **Ru2** was found to be moderate in caspase 3, RIP3 and RIPK1 immunoreactivities in both cells, while **Ir3** was mainly increase the RIPK1 immunoreactivity. It was observed that **Ru1** activates apoptosis especially in HepG2 cells, while **Ru2** and **Ir1** have an effect on activating necroptosis by increasing RIPK1 immunoreactivity in both cells.

Keywords: Ru(II) arene complexes, Apoptosis, Necroptosis.

INTRODUCTION

Liver malignancy is a challenging global health concern with increasing incidence worldwide. Hepatocellular carcinoma, which originates from hepatocytes, is the most common histological subtype, constituting 75%-90% of the total liver cancer cases diagnosed globally.^{1,2,3} After Rosenborg's discovery in 1965, cisplatin and its derivatives are still widely used in cancer treatment today.⁴ Due to the toxicity, drug resistance and non-selectivity of cisplatin, interest in other metal-based anticancer drugs has increased. Ruthenium (Ru), one of the platinum group metals, can be found in various oxidation steps (II, III, and IV) and is thought to be less toxic than platinum in terms of its transport and penetration mechanism into the cell.⁵ Ruthenium complexes can be transported by binding to biomolecules such as serum albumin and transferrin by mimicking iron in blood, and are highly selective for cancer cells. The Ru complex [RuCl₃(NH₃)₃] synthesized by Clarke was the pioneer for the anticancer activities of Ru complexes.⁶ Other Ru(III) complexes such as NAMI-A and KP1019 have been included in the clinical process with successful results. Sadler discovered the cytotoxic activity of Ru(II) arene complexes.⁷ Ru(II) arene complexes contain a hydrophobic arene group, a nitrogen or phosphorus donor ligand, and a halogen anion, and are divided into two classes as RAED ([Ru(η^6 -arene)(en)Cl]⁺ (en: ethylenediamine) and RAPTA ([Ru(η^6 -arene) (PTA)X₆] (PTA: 1,3,5-traza-7-phosphoadamantane).^{5,9} Promising results were obtained with RAED complexes against human ovarian cancer cells. Programmed cell death (PCD) plays critical roles in development, homeostasis, and both control and progression of a plethora of diseases, including cancer and neurodegenerative pathologies. Besides classical apoptosis, several different forms of PCD have now been recognized, including necroptosis. Apoptosis is an evolutionarily conserved process that is morphologically characterized by a variety of features, including pyknosis, membrane blebbing, nuclear fragmentation, nuclear condensation, and apoptotic body formation. Necroptosis is a form of PCD that, like extrinsic apoptosis, can be executed upon death receptor activation as well as upon activation of some Toll-like receptors (TLRs) and the intracellular sensor DAI/ZBP1. Necroptosis is both morphologically and mechanistically distinct from

faeapoptosis. Whereas extrinsic apoptosis depends on initiator and effector caspase activation, necroptosis is a kinase-mediated pathway.⁸ In this study, it was aimed to synthesize Ru(II) arene complexes with different aromatic and aliphatic groups and to investigate their effects on Vero and HepG2 cells through cell death mechanisms.

MATERIALS AND METHODS

Synthesis and Characterization of Complexes

The complexes were synthesized according the literature.¹⁰ **Ru1** and **Ru2** were prepared by the reaction of related ligands with $[\text{RuCl}_2(p\text{-cymene})]_2$ and NH_4PF_6 . **Ir1** was synthesized by the reaction of ligand with $[\text{IrCl}_2\text{Cp}^*]_2$. All complexes were characterized by ^1H -, ^{13}C -, ^{19}F -, and ^{31}P -NMR spectroscopy and FT-IR. ^1H -, ^{13}C -, ^{19}F - and ^{31}P -NMR spectra were recorded on a Varian 400 MHz spectrometer.

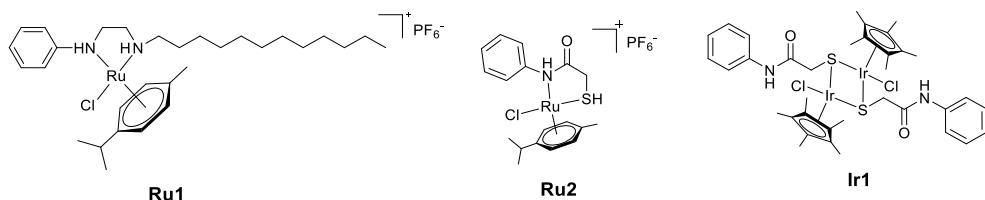


Figure 1. Structure of **Ru1**, **Ru2** and **Ir1** complexes.

Cell culture

HepG2 (ATCC, HB-8065TM) cells were cultured in RPMI 1640 (capricorn scientific, RPMI-HA) culture medium that contains 10% FBS (gibco, 10270-106), 1% penicillin-streptomycin (capricorn scientific, PS-B) and 1% L-glutamine (capricorn scientific, GLN-B) (Fig. 1). Vero (normal kidney) (ATCC, CCL-81TM) cells were cultured in DMEMF12 (sigma, D6421) culture medium containing 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin, 1% L-glutamine.

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) analysis

The effective dose was determined by MTT MTT (3-(4,5-dimethylthiazol- 2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (Glentham life sciences, GC4568) analysis by applying different doses of the complexes to both cells for 24 and 48 hours. Vero and HepG2 cells were incubated with the complexes, DMSO (Glentham life sciences, GK2245) and cisplatin. After the treatment of complexes, 10 μl MTT solution was added into each well and incubated for 4 h at 37°C in 5% CO₂. Then, the medium was vacated and 50 μl dimethylsulfoxide was added to each well to dissolve the formazan crystals. The absorbance was immediately measured at 540 nm with an UV-visible spectrophotometer multiplate reader. All experiments were done in triplicate.

Immunocytochemistry analysis

After determining the appropriate dose Vero and HepG2 cells were seeded for immunocytochemistry analysis and the **Ru1**, **Ru2** and **Ir1** complexes were applied to the cells. Then the cells were fixed with 4% paraformaldehyde (Merck, 30525) and washed three times with phosphate buffered saline (PBS, Bioshop, PBS404.100). Later the cells were treated with triton X-100 (Applichem, A4975) on ice for permeabilization and washed with PBS. Following H₂O₂ (Merck, 107209) were applied and cells were washed three times again and primary antibodies, which were Bax (Santa Cruz, sc-526), Bcl2 (Santa Cruz, sc-7382), caspase 3 (novus biologycals, NB-600-1235), RIP3 (Santa Cruz, sc-374639) and RIPK1 (bioss antibodies, bs-5805R-TR), were implemented. Next day secondary antibodies (Thermo Scientific, TP-125-HL) were administered and then diaminobenzidine (DAP, Thermo Scientific, TA-125-HD) and Mayer's Hematoxylin (Sigma Aldrich, 1.07961.0100) were applied after washing in each step.

RESULTS AND DISCUSSION

Synthesis and Characterization of Complexes

The complexes were obtained with high yields and they were an air- and moisture-stable yellow solids and soluble in polar solvents. **Ru1** and **Ru2** are a cationic structure that forms a chelate complex. Stability was ensured with PF₆⁻ anion. **Ir1** exhibited a dimer structure.

Cell Morphology

HepG2 cells showed epitheloid structure while Vero cells represented fibroblastic feature (Figure 2A, B).

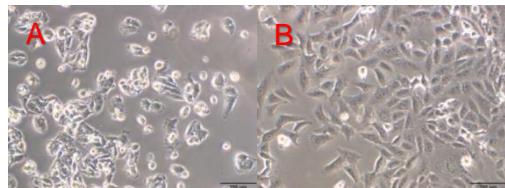


Figure 2. HepG2 (A) and Vero (B) cell culture.

Cell viability and cytotoxicity

As a result of MTT analysis, it was determined that the effective dose for all three complexes was 11.10 μM and the application time was 24 hours.

Immunohistochemical evaluation

After **Ru1** administration, weak Bax, Bcl2 and caspase 3 immunoreactivities were detected in HepG2 cells and negative in Vero cells. Caspase 3, RIP3 and RIPK1 immunoreactivities were found to be moderate in both cells after **Ru2** application and similar to cisplatin administration in HepG2 cells. In **Ir1** administration, mainly an

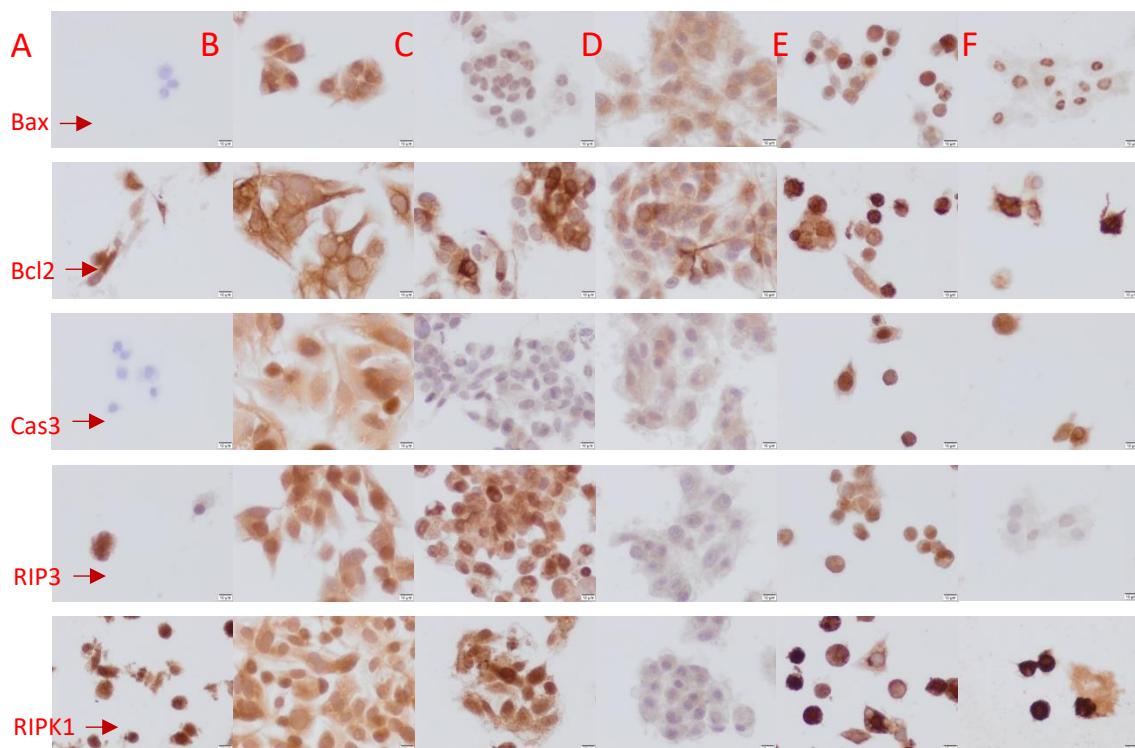


Figure 3. Bax, Bcl2, Cas3, RIP3, and RIPK1 immunoreactivities after DMSO (A), Control (B), Cisplatin (C), **Ru1** (D), **Ru2** (E), and **Ir1** (F) administration to HepG2 cells. Scale bar 10 μm .

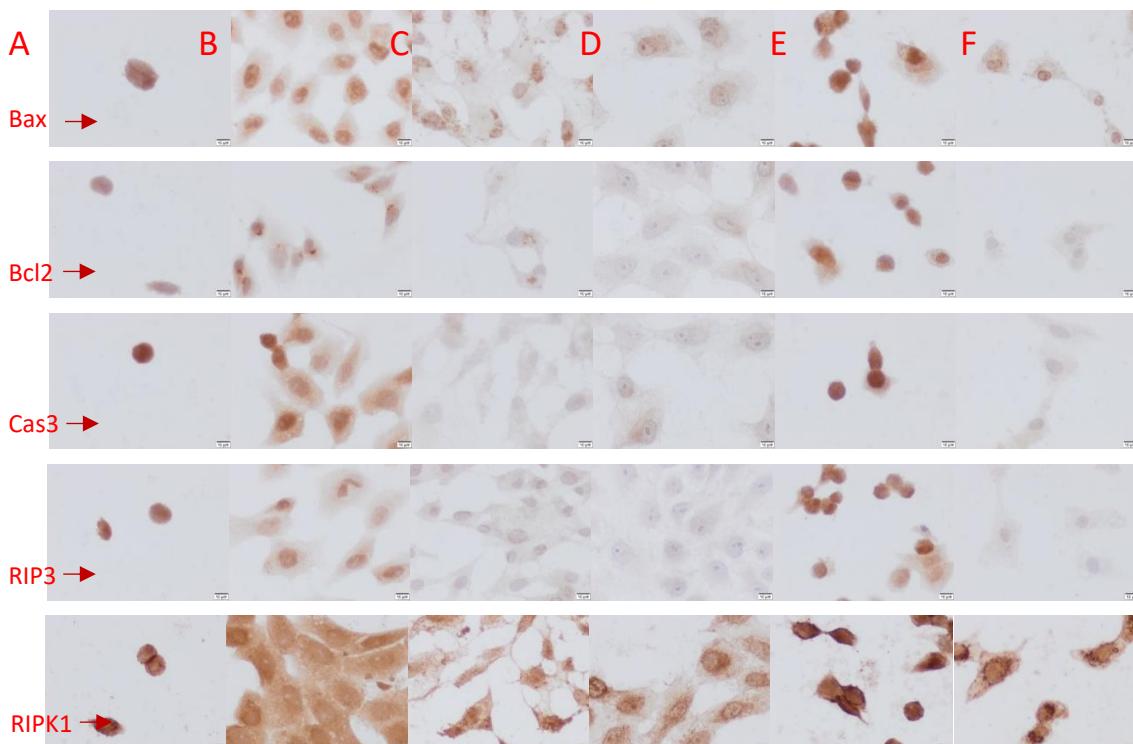


Figure 4. Bax, Bcl2, Cas3, RIP3, and RIPK1 immunoreactivities after DMSO (**A**), Control (**B**), Cisplatin (**C**), Ru1 (**D**), Ru2 (**E**), and Ir1 (**F**) administration to Vero cells. Scale bar 10 μ m.

increase in RIPK1 immunoreactivity was detected. Immunoreactivities were weak after control and DMSO applications (Figure 2 and Figure 3). It was observed that **Ru1** was activated apoptosis especially in HepG2 cells, while **Ru2** and **Ir1** have an effect on activating necroptosis by increasing RIPK1 immunoreactivity in both cells. N-N-donor Ru(II) complex (**Ru1**) activates the apoptosis mechanism, while the N-S-donor Ru(II) complex (**Ru2**) performed cell death via necroptosis. In particular, the direct effect of the straight chain hydrocarbon groups in the structure of **Ru1** on the activity is observed. The weaker activity of **Ru1** (especially Bax and Bcl2) in Vero cells may indicate that this complex is selective for cancer cells. Ruthenium complexes (**Ru1-2**) had better immunohistochemical activity than iridium complex (**Ir1**). In conclusion, Ru(II) arene complexes may be an alternative to platinum-based anticancer drugs.

Acknowledgments

This work was supported by The Scientific and Technological Research Council of Turkey (TÜBİTAK, Project no: 214Z098).

REFERENCES

1. Haghdoost, M., Golbaghi, G., Létourneau, M., Patten, S. A. and Castonguay, A., 2017. Lipophilicity-antiproliferative activity relationship study leads to the preparation of a ruthenium (II) arene complex with considerable in vitro cytotoxicity against cancer cells and a lower in vivo toxicity in zebrafish embryos than clinically approved cis-platin. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 132, 282-293.
2. Mangiapia, G., Vitiello, G., Irace, C., Santamaria, R., Colonna, A., Angelico, R., Radulescu, A., D'Errico, G., Montesarchio, D. and Paduano, L., 2013. Anticancer cationic ruthenium nanovectors: from rational molecular design to cellular uptake and bioactivity. *Biomacromolecules*, 14(8), 2549-2560.
3. Leijen, S., Burgers, S. A., Baas, P., Pluim, D., Tibben, M., van Werkhoven, E., Alessio, E., Sava, G., Beijnen, J. H. and Schellens, J. H., 2015. Phase I/II study with ruthenium compound NAMI-A and gemcitabine in patients with non-small cell lung cancer after first line therapy. *Investigational new drugs*, 33(1), 201-214.

4. Heckmann, B. L., Tummers, B. and Green, D.R., 2019. Crashing the computer: apoptosis vs. necroptosis in neuroinflammation. *Cell Death & Differentiation*, 26(1), pp.41-52.
5. Wang D and Lippard S.J., 2005. Cellular processing of platinum anticancer drugs, *Nat. Rev. Drug Discov.* 4, 307–320.
6. Therrien, B., Ang, W. H., Cherioux, F., Vieille-Petit, L., Juillerat-Jeanneret, L., Süß-Fink, G., and Dyson, P. J., 2007. Remarkable anticancer activity of triruthenium-arene clusters compared to tetraruthenium-arene clusters. *Journal of Cluster Science*, 18(3), 741-752.
7. Clarke M. J, 1980. Oncological implication of the chemistry of ruthenium, *Met. Ions Biol. Syst.*, 11, 231–283.
8. Morris, R. E., Aird, R. E., del Socorro Murdoch, P., Chen, H., Cummings, J., Hughes, N. D., Parsons, S., Parkin, A., Boyd, G., Jodrell, D. I. and Sadler, P. J., 2001. Inhibition of cancer cell growth by ruthenium (II) arene complexes. *Journal of medicinal chemistry*, 44(22), 3616-3621.
9. Scolaro, C., Bergamo, A., Brescacin, L., Delfino, R., Cocchietto, M., Laurenczy, G., Geldbach, T.J., Sava, G. and Dyson, P. J., 2005. In vitro and in vivo evaluation of ruthenium (II)-arene PTA complexes. *Journal of medicinal chemistry*, 48(12), 4161-4171.
10. Kavukcu, S.B., Şahin, O., Vatansever, H.S., Kurt, F.O., Korkmaz, M., Kendirci, R., Pelit, L. and Türkmen, H., 2020. Synthesis and cytotoxic activities of organometallic Ru (II) diamine complexes. *Bioorganic Chemistry*, 99, 103793.

ISBN: 978-605-73554-0-9