

## Meme kanseri hücrelerinde anastaz fenomeninin tanımlanması

### Identification of the phenomenon of anastasis in breast cancer cells

Bakiye Göker Bağca 

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye

#### ÖZ

**Amaç:** Çalışmada, dünya genelinde en yaygın kanser tiplerinden biri olan meme kanserinde, apoptoz ile ilişkili genlerin anastaz sürecindeki ifadesel değişimlerinin ve potansiyel rollerinin tanımlanması amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Farklı tipteki meme kanseri hücre hatları (MCF7 ve MDA-MB-231), meme kanseri kök hücreleri ve sağlıklı meme hücre hattı (MCF10A) kullanıldı. Apoptotik ve anastatik hücre yüzdeleri, akış sitometrisi aracılığıyla Annexin V testi ile belirlendi. Apoptotik hücrelere göre anastatik hücrelerin gen ekspresyon değişimleri qRT-PCR ve  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  yöntemi ile belirlendi. Anlamlı değişim gösteren genlerin görev aldıkları yolak ve biyolojik süreçler STRING v11.5 veri tabanı kullanılarak belirlendi.

**Bulgular:** Tüm hücre gruplarında etanol uygulaması sonucu kontrole göre apoptoz yüzdesinin arttığı ve apoptozu uyaran etmenin uzaklaştırılmasıyla apoptotik hücre yüzdesinin azaldığı belirlendi. Kontrol, apoptoz ve anastaz grupları arasında apoptotik hücre yüzdesindeki değişim en fazla MCF7 hücrelerinde belirlendi. Uyumlu şekilde bu hücre hattında en fazla sayıda gende ifade değişimi belirlendi. *CASP7* ve *APAF1* genleri tüm hücre hatlarında ekspresyon azalışı sergiledi. Tüm hücre gruplarında anastazın sistein tipi endopeptidaz aktivitesini (GO\_ID: 0043027) ve ilaç direnci ilişkili yolları (KEGG\_ID: hsa01524) ortak şekilde etkilediği belirlendi.

**Sonuç:** Hücrelerde anastaz fenomeninin apoptoz düzenleyici mekanizmalar ile etkileşiminin tanımlanması, hem sağlıklı hücrelerin onkojenik dönüşümünün hem de kanserde ilaç direnci mekanizmalarının aydınlatılabilmesi açısından önem taşımaktadır.

**Anahtar Sözcükler:** Anastaz, apoptoz, hücre ölümü, meme kanseri, kök hücre.

#### ABSTRACT

**Aim:** This study aimed to define the expression changes and potential roles of the apoptosis-related genes in the anastasis process in breast cancer, which is one of the most common cancer types.

**Materials and Methods:** Different types of breast cancer cell lines (MCF7 and MDA-MB-231), breast cancer stem cells, and healthy breast cell line (MCF10A) were used. Apoptotic and anastatic cell percentages were determined by the Annexin V test and flow cytometry. Gene expression changes in anastatic cells compared to apoptotic cells were determined by the qRT-PCR and  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. The pathways and biological processes of genes that show significant changes were determined using the STRING v11.5 database.

**Results:** In all cell groups, it was determined that the percentage of apoptosis increased as a result of ethanol application, and the percentage of apoptotic cells decreased with the removal of the apoptosis-inducing factor. The change in the percentage of apoptotic cells between the control, apoptosis, and anastasis groups was determined the most in MCF7 cells. Consistently, expression changes were determined in the largest number of genes in this cell line. *CASP7* and *APAF1* genes downregulated in all cell lines. In all cell groups, it was determined that anastasis affects Cysteine-type endopeptidase activity involved in execution phase of apoptosis (GO\_ID: 0043027), and drug resistance-related pathways (KEGG\_ID: hsa01524).

Sorumlu yazar: Bakiye Göker Bağca  
Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi  
Biyoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye  
E-posta: goker.bb@gmail.com  
Başvuru tarihi: 22.02.2022 Kabul tarihi: 22.03.2022

**Conclusion:** *The definition of the interaction of the anastasis phenomenon in cells with apoptosis regulatory mechanisms is important in terms of elucidating both the oncogenic transformation of healthy cells and the mechanisms of drug resistance in cancer.*

**Keywords:** *Anastasis, apoptosis, cell death, breast cancer, stem cell.*

## GİRİŞ

Global kanser istatistik verilerinin ışığında 2020 yılı itibarıyla meme kanserleri, dünya genelinde en yüksek insidansa sahip kanser sınıfını oluşturmaktadır. Yıllık insidansı yaklaşık iki milyon üç yüz bin ile tüm kanserlerin %12'sini, yıllık ölüm sayısı ise yaklaşık altı yüz seksen beş bin ile kansere bağlı ölümlerin %7'sini oluşturmaktadır (1). Meme kanserleri de diğer kanserler gibi farklı hücrelerden köken alan heterojen bir hastalık grubudur. Genellikle taşıdıkları hormon reseptörlerine göre sınıflandırılmaktadırlar. Bununla birlikte meme kanserinde de hem heterojenite hem de tedavi direnci ve nüksten sorumlu olan temel faktörlerden biri kanser kök hücrelerinin varlığıdır (2). Kanser tedavisinde en önemli stratejilerin başında kanser hücrelerini apoptoza yönlendirmek gelmektedir. Tip I hücre ölümü olarak da bilinen apoptoz, iç ve dış uyaranlara bağlı olarak sıkı şekilde denetlenen genetik süreçler bütünüdür. Temel olarak kaspaz ailesi proteazları ve Bcl2 ailesinin pro- ve antiapoptotik üyeleri tarafından kontrol edilmektedir. Apoptozun indüklenmesinin ardından bu sürecin geri dönüşümsüz olduğu ve apoptotik cisimlerin oluşumu ve DNA fragmentasyonu ile karakterize edilen bir morfoloji ile hücreyi ölüme götürdüğü kabul edilmektedir (3). Bununla birlikte Tang ve arkadaşları, apoptozu uyaran etmenin ortadan kaldırılmasının, apoptozu kesintiye uğrattığını ve "anastaz" adı verilen süreç ile apoptozun geri çevrildiğini göstermiş, hem sağlıklı hem de kanser hücrelerinde belirlenen bu sürecin, hücrelerin malign transformasyonunda rol oynayabileceğini önermişlerdir (4). Bununla birlikte bu fenomeni yöneten moleküler mekanizmalar hakkında bilinenler oldukça sınırlıdır. Ekibimiz tarafından daha önce gerçekleştirilen çalışmada, glioblastom ve beyin kanseri kök hücrelerinde anastaz fenomeni tanımlanmış, bu sürecin "köklülük" genlerinin ekspresyon seviyeleri üzerine gösterdiği etki araştırılmıştır (5). Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızda, farklı tipteki meme kanseri, sağlıklı meme ve meme kanseri kök hücre

hatlarında anastaz fenomeni tanımlanmış ve apoptoz ile ilişkili genlerin bu sürecin kontrolündeki potansiyel rolleri araştırılmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

### Hücre kültürü çalışmaları

Çalışmada kullanılan östrojen ve progesteron reseptörü pozitif meme adenokarsinomu hücre hattı (MCF7; ATCC Katalog No: HTB-22), reseptör negatif meme adenokarsinomu hücre hattı (MDA-MB-231; ATCC Katalog No: HTB-26), meme kanseri kök hücre (MKKH) hattı (Celprogen Katalog No: 36102-29) ve sağlıklı meme epitel hücre hattı (MCF10A; ATCC; Katalog No: CRL-10317) ticari olarak temin edildi. MCF7, MDA-MB-231 ve MCF10A hücreleri %10 FBS ile desteklenmiş; MKKH'leri ise %2 FBS ile desteklenmiş %1 L-Glutamin ve %1 Penisilin/Streptomisin içeren DMEM (Capricorn; Katalog No: DMEM-HA) besi yeri kullanılarak, 37°C sıcaklık, %95 nem ve %5 CO<sub>2</sub> koşullarını sağlayan hücre kültürü inkübatöründe (Thermo Electron Corporation's Class 100) çoğaltıldı. Hücrelerin canlılık takibinde tripan mavisi boyası (Biological Industries; Katalog No: 03-102-1B) testi kullanıldı.

### Apoptoz ve anastazın indüklenmesi

Apoptoz ve anastaz indüksiyonu, Tang ve arkadaşları tarafından yayınlanan makaleden uyarlanan protokol kullanılarak gerçekleştirildi (5, 6). Hücreler, her hücre hattı için kontrol, apoptoz ve anastaz gruplarını oluşturacak şekilde altı kuyucuklu plakalara, kuyucuk başına  $3,5 \times 10^5$  hücre / 3 ml besi yeri konsantrasyonunda ekilerek 24 saat boyunca kültüre edildi. Bu sürenin sonunda apoptoz ve anastaz gruplarındaki hücrelerin üzerindeki besi yeri uzaklaştırılarak apoptoz indüksiyon besi yeri eklendi. Apoptoz indüksiyon besi yeri, hacimce final konsantrasyonu %4 etanol (Merck; Katalog No: 1070172511) içeren; her hücre tipi için uygun miktarda FBS ile desteklenmiş, %1 L-Glutamin ve %1 Penisilin/Streptomisin içeren DMEM besi yeri kullanılarak hazırlandı. Apoptoz indüksiyon besi yeri ile 38 dakikalık inkübasyon periyodunun tamamlanmasının ardından, apoptoz grubunu oluşturan hücreler akış sitometrisi ve RNA

izolasyonunda kullanılmak üzere tripsinize edilerek diğer işlem basamaklarına geçilirken, anastaz grubunu oluşturan hücrelerin üzerinde bulunan apoptoz indüksiyon besisi yeri uzaklaştırıldı ve hücreler iki kez FBS içermeyen besisi yeri ile yıkandı. Anastazi indüklemek için hücreler, altı saat boyunca her hücre tipi için uygun miktarda FBS ile desteklenmiş, %1 L-Glutamin ve %1 Penisilin/Streptomisin içeren DMEM besisi yeri ile inkübe edildi. Bu periyodun tamamlanmasının ardından anastaz grubunu oluşturan hücreler akış sitometrisi ve RNA izolasyonunda kullanılmak üzere tripsinize edilerek diğer işlem basamaklarına geçildi. Herhangi bir uygulama yapılmayan hücreler ise kontrol grubu olarak kullanıldı.

### **Apoptoz ve anastazın validasyonu**

Kontrol, apoptoz ve anastaz gruplarını oluşturan hücreler, Annexin V testinde kullanılmak üzere tripsinize (Trypsin-EDTA; Capricorn; Katalog No: TRY-1B) edilerek 1200 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırılarak hücreler iki defa PBS ile yıkandı. Ardından hücreler 100 µl 1x Annexin V bağlama tamponu (BD Biosciences; Katalog No: 556547), 5 µl PI ve 5 µl FITC Annexin V (BD Biosciences; Katalog No: 556547) içerisinde homojenize edilerek 37°C'de 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon periyodunun ardından akış sitometrisinin (BD Accuri C6, BD Biosciences) FL1 ve FL2 kanalları aracılığıyla 10.000 hücre okutulmuş canlı, apoptotik ve nekrotik hücre yüzdesi belirlendi.

### **qRT-PCR ile gen ekspresyon değişimlerinin tanımlanması**

Kontrol, apoptoz ve anastaz gruplarını oluşturan hücreler, gen ekspresyon analizinde kullanılmak üzere tripsinize (Trypsin-EDTA; Capricorn; Katalog No: TRY-1B) edildi. Hücrelerden total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi sırasıyla RNeasy Mini Kit (Qiagen; Katalog No: 74104) ve RT2 First Strand Kit (Qiagen; Katalog No: 330401) kullanılarak gerçekleştirildi. Apoptoz ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerindeki değişimlerin belirlenmesi için *APAF1*, *DIABLO*, *BAD*, *FADD*, *BCL2*, *TRADD*, *CASP3*, *XIAP*, *CASP7*, *BID*, *FAS*, *BIRC3*, *TNF* ve *TP53* genlerine ait primerler, RealQ Plus 2x Master MixGreen reaksiyon karışımı (Ampliqon; Katalog No: A324402) ve LightCycler 480 (Roche) gerçek zamanlı kantitatif PCR cihazı kullanıldı, reaksiyonlar kit protokolüne uygun sıcaklık döngülerinde gerçekleştirildi. Normalizasyonda *ACTB* ve *GAPDH* referans genleri kullanıldı.

Anastatik hücrelerin apoptotik hücrelere göre gen ekspresyon değişimleri (Kat düzenlenmesi)  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  yöntemi kullanılarak belirlendi, Student'in T-testi kullanılarak  $p$  değerleri hesaplandı. Kat düzenlenmesi  $\geq \pm 2,00$  ve  $p < 0,05$  olanlar anlamlı olarak değerlendirildi.

### **İlişki analizleri**

Ekspresyon seviyesi anlamlı değişim gösteren genler (kat düzenlenmesi  $\geq \pm 2,00$ ;  $p < 0,05$ ) arasındaki KEGG yolak ve Gen Ontoloji (GO) analizleri STRING v11.5 veri tabanı (<https://string-db.org/>) kullanılarak gerçekleştirildi (7). İlişki analizlerinde güven skoru 0,7 ("interaction score high confidence") olarak seçildi. Her analiz için ilişki değeri en yüksek olan beş sonuç listelenerek FDR değeri 0,05'ten küçük olanlar anlamlı kabul edildi.

## **BULGULAR**

### **Apoptoz, apoptotik uyarının ortadan kaldırılmasıyla tersine dönebilmektedir**

MCF7, MDA-MB-231, MKKH ve sağlıklı MCF10A hücrelerinde apoptozun indüklenmesi ve ardından apoptozu uyarı faktörün ortadan kaldırılması ile apoptotik hücre yüzdesinin azaldığı ve canlı hücre yüzdesinin arttığı Annexin V testi ile belirlendi (Şekil-1, Şekil-2 ve Tablo-1). Apoptozun uyarıldığı hücreler değerlendirildiğinde, kontrole göre canlı hücre yüzdesinde en yüksek azalış %75,4 ile MCF7 hücrelerinde belirlendi. Tüm hücre hatlarında anastatik hücre gruplarında apoptotik hücre gruplarına göre apoptotik hücre yüzdesinin azaldığı ve en yüksek azalışın %67,3 ile MCF7 hücrelerinde olduğu belirlendi.

### **Anastatik hücrelerde apoptozu düzenleyen genlerin ekspresyonunda anlamlı değişim meydana gelmektedir**

Anastatik MCF7, MDA-MB-231, MKKH ve sağlıklı MCF10A hücrelerinde, apoptotik hücrelere göre meydana gelen gen ekspresyon değişimleri belirlendi (Şekil-3 ve Tablo-2). *APAF1*, *CASP7* genlerinin ekspresyonunun dört hücre hattında da anlamlı şekilde azaldığı belirlendi (kat düzenlenmesi  $\geq \pm 2,00$ ;  $p < 0,05$ ). En yüksek kat düzenlenmesi MDA-MB-231 hücrelerinin *TRADD* genin ekspresyonunda belirlendi (kat düzenlenmesi = -2164,77;  $p < 0,05$ ). En çok sayıda gende anlamlı değişim MCF7 hücrelerinde belirlendi. On bir gende anlamlı kat düzenlenmesi meydana geldiği belirlendi (kat düzenlenmesi  $\geq \pm 2,00$ ;  $p < 0,05$ ). Benzer şekilde anastatik MDA-MB-231 hücrelerinde de apoptotik gruba göre on genin ekspresyonunun anlamlı

şekilde düzenlendiği belirlendi (kat düzenlenmesi  $\geq \pm 2,00$ ;  $p < 0,05$ ). En az gende düzenlenme ise MKKH grubunda belirlendi, anastatik hücrelerde apoptotik hücelere göre dört genin ekspresyonunun anlamlı şekilde düzenlendiği belirlendi (kat düzenlenmesi  $\geq \pm 2,00$ ;  $p < 0,05$ ).

#### Anastaz, apoptozun sonlanma aşamasında yer alan sistein tipi endopeptidaz aktivitesini etkilemektedir

Anastatik MCF7, MDA-MB-231, MKKH ve sağlıklı MCF10A hücrelerinde, apoptotik hücelere göre anlamlı değişim belirlenen (kat düzenlenmesi  $\geq \pm 2,00$ ;  $p < 0,05$ ) genlerin yer aldığı gen ontoloji ve KEGG yolak analizleri ile anastazda etkilenen moleküler süreçler tanımlanarak, en yüksek ilişki

belirlenen en fazla beş yolak listelendi (Şekil-4, Tablo-3-5). Apoptoz - çoklu türler yolağı (KEGG\_ID: hsa04215) tüm hücelerde ortak şekilde belirlenerek, bu yolda yer alan toplam 30 genden sekiz tanesinin anastatik MCF7 hücelerinde ifade değişikliği gösterdiği tanımlandı. Apoptoz ilişkili yollara ek olarak, değerlendirilen tüm anastatik hücre grupları, platin ilaç direnci yolağı (KEGG\_ID: hsa01524) ile ilişkilendirildi. Gen ontoloji analizi sonuçları değerlendirildiğinde ise tüm anastatik hücre gruplarında "apoptozun sonlanma aşamasında yer alan sistein tipi endopeptidaz aktivitesinin (GO\_ID: 0043027) regüle edildiği belirlendi.

**Tablo-1.** Canlı, apoptotik ve nekrotik hücre yüzdeleri.

		Canlı hücre (%)	Apoptotik hücre (%)	Nekrotik hücre (%)
MCF7	Kontrol	93,00	6,00	1,00
	Apoptoz	17,60	76,80	5,60
	Anastaz	89,70	9,50	0,80
MDA-MB-231	Kontrol	98,50	1,30	0,20
	Apoptoz	52,70	46,70	0,60
	Anastaz	73,00	26,30	0,70
MKKH	Kontrol	98,90	0,60	0,50
	Apoptoz	34,90	65,00	0,10
	Anastaz	69,70	29,40	0,90
MCF10A	Kontrol	99,10	0,40	0,50
	Apoptoz	92,90	4,60	2,50
	Anastaz	98,20	0,30	1,50

**Tablo-2.** Anastatik hücelerin gen ekspresyonlarının apoptotik hücelere göre kat değişimleri

Genler		MCF10A	MKKH	MDA-MB-231	MCF7
Negatif regülatör	<i>BCL2</i>	9,29**	1,27**	47,50**	7,75**
	<i>BIRC3</i>	-3,62**	-1,22**	-1,09*	2,84**
	<i>XIAP</i>	-6,30**	-1,73**	-1,27**	3,31**
Pozitif regülatör	<i>APAF1</i>	-4,81**	-2,64**	-156,50**	-6,00**
	<i>BAD</i>	1,20**	1,29**	-19,29**	-1,52**
	<i>BID</i>	-3,26**	1,01**	1,12**	-3,62**
	<i>CASP3</i>	-1,94**	-2,00**	-4,72**	-1,71**
	<i>CASP7</i>	-2,51**	-5,50**	-6,41**	-3,22**
	<i>DIABLO</i>	-1,66**	-4,23**	-58,49**	-3,02**
	<i>FADD</i>	-7,54**	-1,54**	-1,34**	-10,82**
	<i>FAS</i>	-3,08**	1,41**	-4,08**	-3,77**
	<i>TNF</i>	1,53**	-1,25**	-33,59**	-1,21**
	<i>TP53</i>	23,51**	1,31**	-45,89**	-3,35**
	<i>TRADD</i>	-1,89**	-1,95**	-2164,77**	-3,40**

\*\* p <0,05; \* p <0,01

**Tablo-3.** Anastatik hücrelerde yolak analizlerinin istatistiksel değerlendirilmesi

	<b>MCF7</b>	<b>MDA-MB-231</b>	<b>MKKH</b>	<b>MCF10A</b>
<b>Ortalama kümeleme katsayısı</b>	0,949	0,896	1	0,663
<b>PPI* zenginleştirme p-değeri</b>	< 1,0e-16	1,11e-16	5,88e-07	< 1,0e-16

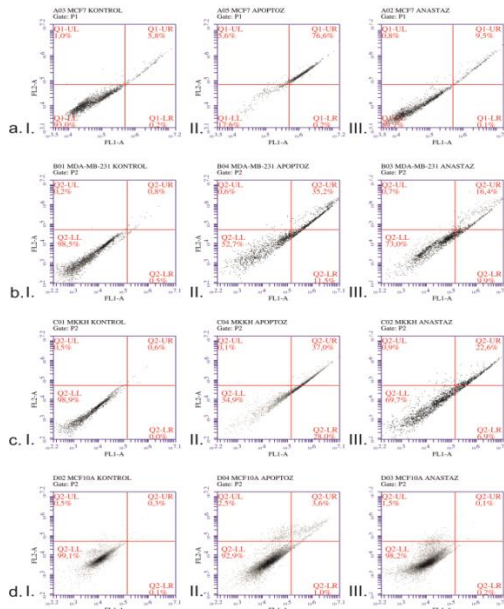
\*PPI: protein- protein interaction

**Tablo-4.** Anastatik hücrelerde ekspresyon değişimi belirlenen genlerin KEGG yolak analizi.

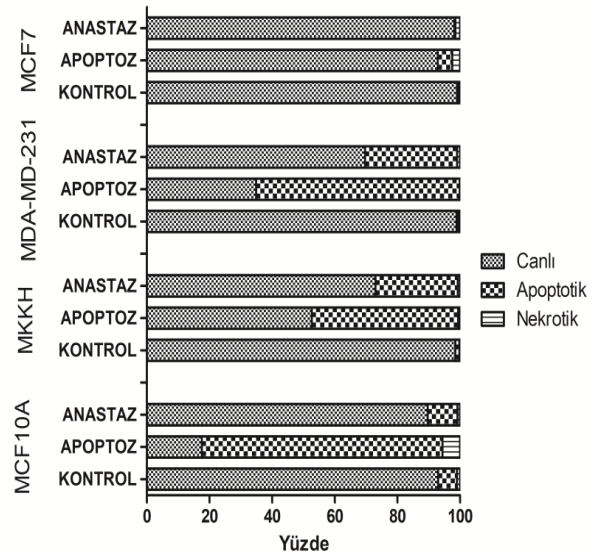
	<b>KEGG_ID</b>	<b>Tanım</b>	<b>Yolakla ilişkili gen sayısı</b>	<b>Yolakta bulunan toplam gen sayısı</b>	<b>İlişki</b>	<b>FDR</b>
<b>MCF7</b>	hsa04215	Apoptoz - çoklu türler	8	30	2,68	2,53E-18
	hsa01524	Platin ilaç direnci	8	70	2,31	8,03E-16
	hsa04210	Apoptoz	11	132	2,17	7,17E-22
	hsa04115	p53 sinyal yolu	5	72	2,09	1,14E-08
	hsa05222	Küçük hücreli akciğer kanseri	5	92	1,99	3,40E-08
<b>MCF10A</b>	hsa04215	Apoptoz - çoklu türler	7	30	2,71	1,90E-16
	hsa01524	Platin ilaç direnci	8	70	2,4	6,62E-17
	hsa04115	p53 sinyal yolu	5	72	2,18	3,84E-09
	hsa04210	Apoptoz	9	132	2,17	1,35E-17
	hsa05222	Küçük hücreli akciğer kanseri	5	92	2,07	1,02E-08
<b>MDA-MB-231</b>	hsa04215	Apoptoz - çoklu türler	5	30	2,51	1,63E-10
	hsa01524	Platin ilaç direnci	6	70	2,22	3,90E-11
	hsa04210	Apoptoz	10	132	2,17	9,82E-20
	hsa05134	Lejyonelloz	4	55	2,15	2,88E-07
	hsa04115	p53 sinyal yolu	5	72	2,13	6,88E-09
<b>MKKH</b>	hsa04215	Apoptoz - çoklu türler	4	30	2,81	2,55E-09
	hsa05134	Lejyonelloz	3	55	2,43	1,10E-05
	hsa04210	Apoptoz	4	132	2,17	3,75E-07
	hsa01524	Platin ilaç direnci	2	70	2,15	0,0049
	hsa04115	p53 sinyal yolu	2	72	2,13	0,0049

**Tablo-5.** Anastatik hücrelerde ekspresyon değişimi belirlenen genlerin gen ontoloji (GO) analizi.

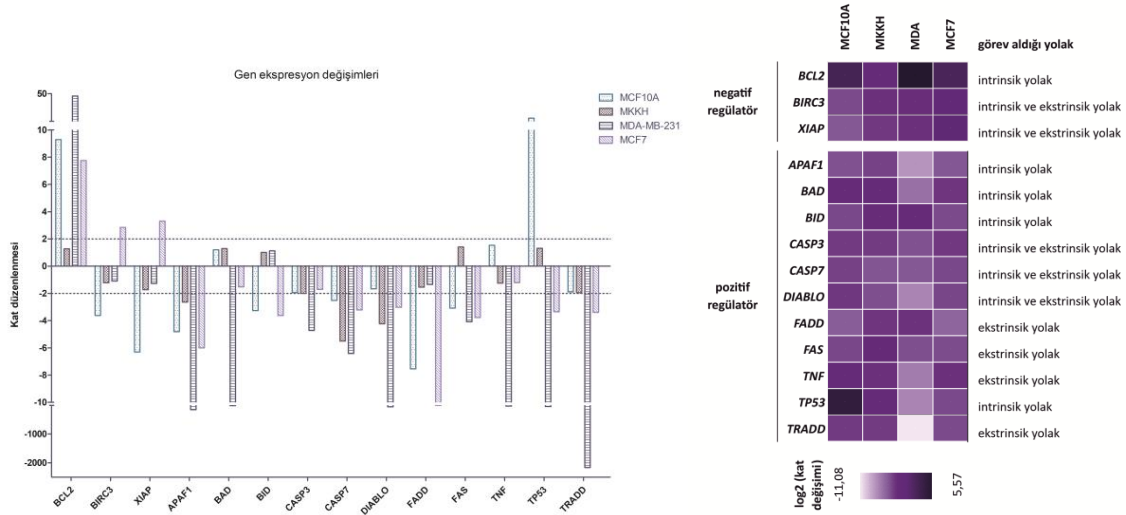
	GO_ID	Tanım	Yolakla ilişkili gen sayısı	Yolakta bulunan toplam gen sayısı	İlişki	FDR
MCF7	0043027	Apoptotik süreçte yer alan sistein tipi endopeptidaz inhibitör aktivitesi	2	25	2,15	0,0462
	0043028	Apoptotik süreçte yer alan sistein tipi endopeptidaz düzenleyici aktivite	3	44	2,08	0,0068
	0032813	Tümör nekroz faktörü reseptörü süper ailesi bağlanması	3	48	2,05	0,0068
	0002020	Proteaz bağlama	3	138	1,59	0,0374
	0042802	Proteaz bağlama	7	1896	0,82	0,0203
MCF10A	0005123	Ölüm reseptörü bağlanması	2	20	2,34	0,0482
	0043027	Apoptotik süreçte yer alan sistein tipi endopeptidaz inhibitör aktivitesi	2	25	2,24	0,0482
	0043028	Apoptotik süreçte yer alan sistein tipi endopeptidaz düzenleyici aktivite	3	44	2,17	0,0035
	0002020	Proteaz bağlama	3	138	1,67	0,0482
	0042802	Proteaz bağlama	6	1896	0,84	0,0482
MDA-MB-231	0097200	Apoptozun sonlanma aşamasında yer alan sistein tipi endopeptidaz aktivitesi	2	4	2,99	0,0038
	0070513	Ölüm alanı bağlama	2	11	2,55	0,0148
	0008656	Apoptotik süreçte yer alan sistein tipi endopeptidaz aktivatör aktivitesi	2	18	2,34	0,0205
	0005164	Tümör nekroz faktörü reseptörü bağlanması	2	31	2,10	0,037
	0032813	Tümör nekroz faktörü reseptörü süper ailesi bağlanması	3	48	2,09	0,0032
MKKH	0097200	Apoptozun sonlanma aşamasında yer alan sistein tipi endopeptidaz aktivitesi	2	4	3,39	0,0015



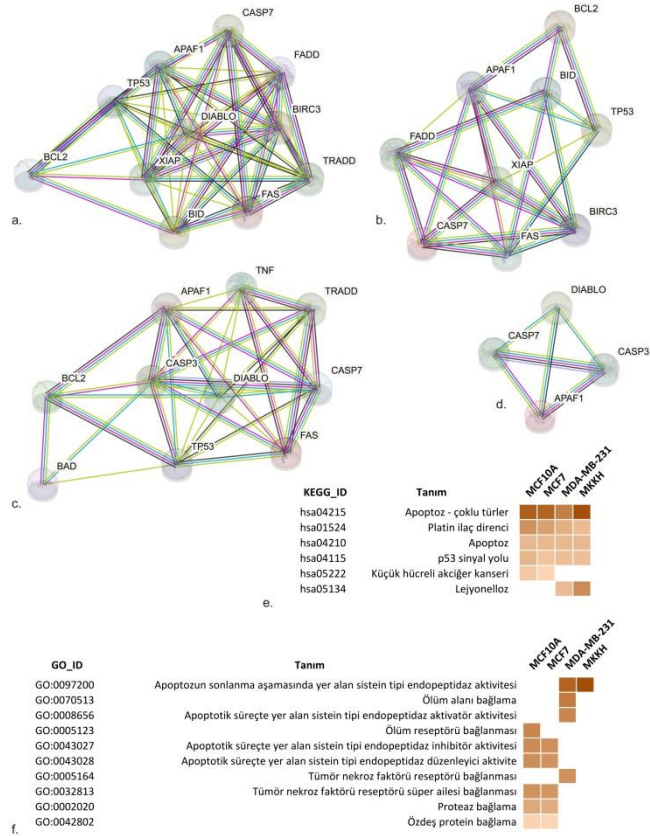
**Şekil-1.** Annexin V testi ile apoptoz ve anastazın valide edilmesi; a. MCF7, b. MDA-MB-231, c. MKKH, d. MCF10A hücreleri; I. Kontrol, II. Apoptoz, III. Anastaz grupları.



**Şekil-2.** Annexin V testi ile belirlenen canlı, apoptotik ve nekrotik hücrelerin dağılım yüzdeleri.



**Şekil-3.** Anastatik hücrelerin apoptotik hücelere göre gen ekspresyon değişimleri; a. Kat değişimi sütun grafiği, b. Kat düzenleme ısı haritası



**Şekil-4.** Anastatik hücrelerde anlamlı ifade değişimi belirlenen genlerin iliği analizleri; a. MCF7, b. MCF10A, c.MDA-MB-231, d.MKKH hüceleri; e. KEGG yolak analizi ısı haritası; f. GO analizi ısı haritası

## TARTIŞMA

Çalışmamızda, güncel veriler doğrultusunda en yaygın kanser tipilerinden biri olarak sınıflandırılan meme kanseri hücrelerinde,

anastaz fenomeni araştırılmıştır. Bu amaçla kanser heterojenitesi göz önünde bulundurularak iki farklı tipteki meme kanseri hücre hattı, anastaz fenomeninin ilaç direnci üzerindeki olası etkinliği

nedeniyle meme kanseri kök hücreleri (MKKH) ve onkojenik transformasyona etkisinin belirlenebilmesi amacıyla sağlıklı meme hücreleri çalışmanın *in vitro* modelleri olarak kullanılmıştır. Bu hücrelerde apoptoz ve anastaz indüklenmiş ve bu süreçler valide edilmiştir. Anastatik hücrelerdeki apoptoz ilişkili genlerin ekspresyon değişimleri, apoptotik hücrelere göre belirlenmiş, bu genlerin yolak analizleri gerçekleştirilerek anastazın etkili olabileceği temel mekanizmalar tanımlanmıştır.

Apoptoz indüksiyonunun ardından canlı hücre yüzdesinde en büyük azalış MCF7 hücrelerinde belirlenmiştir. Bu hücreleri sırasıyla MKKH'leri ve MDA-MB-231 hücreleri takip etmiş, etanol uygulamasına bağlı olarak en az canlılık azalışı ise sağlıklı MCF10A hücrelerinde belirlenmiştir. Bu sonuçlar, ekibimizin aynı hücre grubunu içeren farklı bir çalışmasının sonuçları ile karşılaştırıldığında, benzer şekilde, MDA-MB-231 hücrelerinin apoptotik uyarılardan MCF7 ve MKKH hücrelerine göre daha az oranda etkilendiği, MCF10A hücre hattının ise en düşük oranda apoptoza yöneldiği önerilebilmektedir (2). Ayrıca apoptoz uyarımı ile uyumlu şekilde, anastazın indüklenmesi ile apoptotik hücre yüzdesinde en yüksek azalış MCF7, en düşük azalış ise MCF10A hücre hattında belirlenmiştir. Bu sonuç, hücrelerde hem apoptoz uyarımı için gereken indükleyici faktör miktarı ve maruziyet süresinin hem de apoptozun tersine çevrilmesi için gereken sürenin hücre tipleri arasında farklılık sergileyebileceğini göstermektedir.

Elde edilen tüm gen ekspresyon sonuçları değerlendirildiğinde en yüksek ifade değişimi MDA-MB-231 hücrelerinin *TRADD* geninde belirlenmiştir (kat düzenlenmesi = -2164,77;  $p < 0,05$ ). En çok sayıda gende kat değişimi MCF7 hücrelerinde belirlenmiştir. Değerlendirilen on dört genden on bir tanesinde anlamlı kat düzenlenmesi meydana gelmiştir (kat düzenlenmesi  $\geq \pm 2,00$ ;  $p < 0,05$ ). Benzer şekilde anastatik MDA-MB-231 hücrelerinde de apoptotik gruba göre on genin ekspresyonu anlamlı şekilde düzenlenmiştir (kat düzenlenmesi  $\geq \pm 2,00$ ;  $p < 0,05$ ). Sitometrik ölçüm ile belirlenen apoptotik hücre yüzdesi değişimleri ile uyumlu olan bu sonuç, MCF7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarının belirtilen koşullardaki apoptoz - anastaz dönüşümüne çalışmadaki diğer hücrelere göre daha duyarlı olabileceğini göstermektedir. En az gende düzenlenme ise MKKH grubunda belirlenmiş, anastatik hücrelerde apoptotik

hücrelere göre dört genin ekspresyonu anlamlı şekilde düzenlenmiştir (kat düzenlenmesi  $\geq \pm 2,00$ ;  $p < 0,05$ ).

Apoptozun temel olarak kaspazlar ve Bcl2 ailesi üyeleri tarafından düzenlendiği bilinmektedir (8). Çalışmada Bcl2 ailesinin antiapoptotik üyelerinden *BCL2* geninin apoptoza göre anastaz gruplarındaki ekspresyon seviyesinin tüm hücre hatlarında arttığı belirlenmiştir. MKKH' lerindeki değişim 2 katın altında olmakla birlikte tüm gruplardaki değişimler istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0,05$ ). Etanolün farklı hücre hatlarında *BCL2* bağımlı yolak üzerinden apoptozu indüklediği farklı çalışmalar aracılığıyla gösterilmiştir (9). Bununla uyumlu olmakla birlikte çalışmamızda apoptotik gruba göre anastatik grupta anti-apoptotik *BCL2* geninin ekspresyon seviyesinin artışı, anastaz mekanizmasında da bu geninin ekspresyon seviyesinin kritik basamaklardan birini oluşturabileceğini önermemize neden olmaktadır.

*BAD* ve *BID* genleri Bcl2 ailesinin proapoptotik üyelerini kodlamaktadır. Bu genlerin *BCL2* geninin kodladığı protein ile antagonize şekilde mitokondriden sitokrom C salınımı mekanizmasıyla intrinsik apoptozu düzenlediği bilinmektedir (8). Çalışmamızda *BAD* geninin ekspresyon seviyesi yalnızca MDA-MB-231; *BID* geninin ekspresyon seviyesi ise MCF10A ve MCF7 hücrelerinde anlamlı azalış göstermiştir. Bu sonuç anastazda Bcl2 ailesinin proapoptotik üyelerinin temel rol oynamayabileceğini önermemize neden olmuştur. Mitokondriden salınan sitokrom C, *APAF1* geni tarafından kodlanan Apaf1 proteinine bağlanarak apoptozom kompleksini oluşturmaktadır (8). *APAF1* geni Casp9'un kofaktörü olarak işlev göstererek intrinsik apoptotik yolağın temel düzenleyicilerinden olan Apaf1 proteinini kodlamaktadır (10). Bu genin ekspresyon azalışının meme kanseri hücrelerinde apoptoz inhibisyonu ve ilaç direnci ile ilişkili olabileceği önerilmiştir (11). Çalışmamızda *APAF1* geninin ekspresyonu dört hücre hattında da anlamlı şekilde azalmıştır (kat düzenlenmesi  $\geq \pm 2,00$ ;  $p < 0,05$ ). Apaf1'in ve intrinsik apoptotik yolağın meme kanserinde anastaz mekanizması ile ilişkili olabileceğini önermekteyiz.

Apoptozun bir diğer mekanizması ise hücre dışı ligandların spesifik reseptörleri uyarması ile düzenlenen ekstrinsik apoptoz yolağıdır. Bu yolak hücre membranında yer alan ölüm reseptörlerine spesifik şekilde bağlanabilen ligandlar tarafından



uyarılarak ölüm sinyalini hücre içine aktarmakta ve hücreyi programlı şekilde ölüme yönlendirmektedir (12, 13). Bu süreçte yer alan *FAS* reseptörünün ekspresyon seviyesi MKKH dışında tüm gruplarda anlamlı azalış; *FAS* ilişkili adaptör proteini kodlayan *FADD* geni de benzer şekilde MCF10A ve MCF7'de anlamlı azalış göstermiştir (kat düzenlenmesi  $\geq \pm 2,00$ ;  $p < 0,05$ ). Bu yolda yer alan bir diğer reseptör - ligand ilişkisi de TNF - TNFR1 arasında bulunmaktadır. Bu süreçte yer alan aracı protein *TRADD* geni tarafından kodlanmaktadır. *FADD* ve *TRADD* genlerinin kodladığı aracı proteinlerin etkileşimi ile yolağın proteazı Kaspaz 8 aktive edilerek süreç devam ettirilmektedir (14). Çalışmamızda *TNF* geninin ekspresyon seviyesi sadece MDA-MB-231 hücre hattında, *TRADD* geninin ekspresyon seviyesi ise MCF7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında anlamlı azalış göstermiştir (kat düzenlenmesi  $\geq \pm 2,00$ ;  $p < 0,05$ ). Bütün olarak değerlendirildiğinde ekstrinsik yolağın MKKH'lerinde olmamakla birlikte MCF7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde anastaz sürecinde rol oynayabileceğini öngörmekteyiz.

İntrinsik ve ekstrinsik yolak farklı uyarılar aracılığıyla indüklenip farklı yolaklar halinde düzenlenmekle birlikte, bu iki süreçte de ortak sonlandırıcı kaspazlar yer almaktadır. *CASP3* ve *CASP7* tarafından kodlanan Kaspaz3 ve Kaspaz7 proteinleri sırasıyla hücreyi ölüme götüren sonlandırıcı kaspazlardır (15). Çalışmamızda *CASP3*'ün ekspresyon seviyesi sadece MKKH ve MDA-MB-231 hücrelerinde anlamlı azalış göstermiş olmakla beraber, *CASP7*'nin ekspresyon seviyesi tüm hücrelerde anlamlı şekilde azalmıştır (kat düzenlenmesi  $\geq \pm 2,00$ ;  $p < 0,05$ ). Bu durum anastazın farklı hücrelerde farklı yolaklar üzerinden başlatılabilmekle birlikte sonlandırıcı kaspazın ifade değişiminin ortak şekilde rol oynayabileceğinin gösterilmesi bakımından dikkat çekmektedir.

*XIAP* ve *BIRC3* apoptoz inhibitör proteinleri kodlamaktadır. Bu inhibitörlerin kodladığı proteinler kaspaz 3 ve kaspaz 7 ile etkileşim kurarak apoptozun sonlanmasını engellemektedir. Bu inhibitörlerin *DIABLO* geni tarafından kodlanan proapoptotik protein ile etkileşimi apoptoz inhibitörlerini engelleyerek apoptozun gerçekleştirilmesini sağlamaktadır (16). Çalışmamızda apoptoz inhibitörü proteinleri kodlayan *BIRC3* ve *XIAP* genlerinin sadece MCF7 hücrelerinde anlamlı şekilde artış

gösterdiği belirlenmiştir (kat düzenlenmesi  $\geq \pm 2,00$ ;  $p < 0,05$ ). Bu durum apoptozu indükleyen etmeden en yüksek oranda bu hücre grubunun etkilenmesi ile uyumlu görülmekte, apoptoz inhibitörlerinin anastaz sürecine katkı sağlayabileceğini düşündürmektedir. *DIABLO* geni ise sağlıklı MCF10A hücre hattı dışındaki tüm hücrelerde anlamlı azalış göstermiştir.

Çalışmamızın en dikkat çekici bulgularından birini ise *TP53* geni oluşturmaktadır. *TP53* geninin kodladığı tümör protein 53, hem intirinsik hem de ekstrinsik yolağın düzenlenmesinde rol oynamaktadır (17). Bu tümör baskılayıcı genin ekspresyon seviyesi MDA-MB-231 ve MCF7 hücrelerinde azalış gösterirken sağlıklı MCF10A hücrelerinde ise anlamlı artış göstermiştir (kat düzenlenmesi  $\geq \pm 2,00$ ;  $p < 0,05$ ). Benzer şekilde MKKH grubunda da artış belirlenmiş ancak bu artış anlamlı düzeyde bulunmamıştır (kat düzenlenmesi  $< \pm 2,00$ ). Bu sonuç sağlıklı MCF10A hücrelerinde apoptoz - anastaz dönüşümünün daha düşük seviyede kalmasının temelinde yer alan nedenlerden biri olarak görülebilecektir.

Anastazın indüklendiği tüm hücre gruplarında ortak şekilde apoptozun sonlanma aşamasında yer alan sistein tipi endopeptidaz aktivitesinin etkilendiği belirlenmiştir (GO\_ID: 0043028; FDR  $< 0,05$ ; ilişki  $> 2,00$ ). Apoptozun geri dönüşümsüz bir süreç olduğu genel kabulünün aksine, kaspaz kaskadının aktivasyonunun ardından bile hücrenin canlılığını geri kazanabileceği, anastaz alanında gerçekleştirilen öncül çalışmalarda belirlenmiştir (4). Bununla uyumlu olarak kaspaz aktivitesinin anastazda rol oynayabileceği çalışmamızdan elde edilen bulgularla desteklenmektedir. Ayrıca hücrelerde anastaz indüksiyonun, kanserde ilaç direnci ile ilişkili olabileceği (KEGG\_ID: hsa01524; FDR  $< 0,05$ ; ilişki  $\geq 2,00$ ) belirlenmiştir.

## SONUÇ

Sonuç olarak anastaz mekanizmasının farklı hücre hatlarında farklı genler tarafından düzenlenebileceği ancak özellikle *APAF1* ve *CASP7* genlerinin bu süreçte kilit rol oynayabileceğini önermekteyiz. Ayrıca *TP53* geninin ekspresyon artışının apoptoz - anastaz dönüşümünün engellenmesi açısından kritik bir süreci yürütebileceği de önerilmektedir. Kanser hücrelerinin programlı olarak ölüme yönlendirilmesi, tedavi stratejilerinin temelini

oluşturmaktadır. Apoptozun kesintiye uğrayarak hücre canlılığının geri kazanımı ise başta ilaç direnci gibi kötü prognoz ile ilişkili süreçlerin temelinde yer alan önemli fenomenlerden biri olarak dikkat çekmektedir. Bu süreci düzenleyen moleküler mekanizmaların aydınlatılmasının kanser araştırmaları için önemli bir dönüm noktası oluşturacağını önermekteyiz.

**Çıkar çatışması:** Herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

**Teşekkür:** Çalışmamı gerçekleştirmek için laboratuvar imkânlarını kullanmamı sağlayan Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Cumhuri Gündüz'e ve desteklerinden dolayı Doç. Dr. Çığır Biray Avcı'ya teşekkürlerimi sunarım.

## Kaynaklar

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-249. doi:10.3322/caac.21660
2. Kusoglu A, Goker Bagca B, Ozates Ay NP, Gunduz C, Biray Avcı C. Telomerase inhibition regulates EMT mechanism in breast cancer stem cells. *Gene.* Published online 2020. doi:10.1016/j.gene.2020.145001
3. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, et al. Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* Published online 2018. doi:10.1038/s41418-017-0012-4
4. Tang HL, Tang HM, Mak KH, et al. Cell survival, DNA damage, and oncogenic transformation after a transient and reversible apoptotic response. *Mol Biol Cell.* Published online 2012. doi:10.1091/mbc.E11-11-0926
5. INCEBOZ M, GOKER BAGCA B, CANER A, GÜNDÜZ C. Anastasis in Glioblastoma, Brain Cancer Stem, and Brain Stem Cells. *J Basic Clin Heal Sci.* Published online 2021. doi:10.30621/jbachs.854986
6. Tang HM, Tang HL. Anastasis: Recovery from the brink of cell death. *R Soc Open Sci.* Published online 2018. doi:10.1098/rsos.180442
7. Szklarczyk D, Gable AL, Nastou KC, et al. The STRING database in 2021: Customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic Acids Res.* Published online 2021. doi:10.1093/nar/gkaa1074
8. Campbell KJ, Tait SWG. Targeting BCL-2 regulated apoptosis in cancer. *Open Biol.* Published online 2018. doi:10.1098/rsob.180002
9. Liu Y, Zuo H, Wang Y, et al. Ethanol promotes apoptosis in rat ovarian granulosa cells via the Bcl-2 family dependent intrinsic apoptotic pathway. *Cell Mol Biol.* Published online 2018. doi:10.14715/cmb/2018.64.1.21
10. Soengas MS, Alarcón RM, Yoshida H, et al. Apaf-1 and caspase-9 in p53-dependent apoptosis and tumor inhibition. *Science (80- ).* Published online 1999. doi:10.1126/science.284.5411.156
11. Bakhshoudeh M, Mehdizadeh K, Hosseinkhani S, Ataei F. Upregulation of apoptotic protease activating factor-1 expression correlates with anti-tumor effect of taxane drug. *Med Oncol.* Published online 2021. doi:10.1007/s12032-021-01532-8
12. Siegmund D, Mauri D, Peters N, et al. Fas-associated Death Domain Protein (FADD) and Caspase-8 Mediate Up-regulation of c-Fos by Fas Ligand and Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL) via a FLICE Inhibitory Protein (FLIP)-regulated Pathway. *J Biol Chem.* Published online 2001. doi:10.1074/jbc.M100444200
13. Hsu H, Xiong J, Goeddel Dv. The TNF receptor 1 associated protein TRADD signals cell death and NF kappa B activation. *Cell.* Published online 1995.
14. Pobezinskaya YL, Liu Z. The role of TRADD in death receptor signaling. *Cell Cycle.* Published online 2012. doi:10.4161/cc.11.5.19300
15. Chandler JM, Cohen GM, MacFarlane M. Different subcellular distribution of caspase-3 and caspase-7 following Fas-induced apoptosis in mouse liver. *J Biol Chem.* Published online 1998. doi:10.1074/jbc.273.18.10815
16. Scott FL, Denault JB, Riedl SJ, Shin H, Renshaw M, Salvesen GS. XIAP inhibits caspase-3 and -7 using two binding sites: Evolutionary conserved mechanism of IAPs. *EMBO J.* Published online 2005. doi:10.1038/sj.emboj.7600544
17. Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B. A model for p53-induced apoptosis. *Nature.* Published online 1997. doi:10.1038/38525