



# **Doksorubisin İlaç Dirençlilik Mekanizmalarının Genomik Yöntemlerle Tespit Edilmesi**

**Program Kodu: 1002**

**Proje No: 114Z701**

Proje Yürütücüsü:  
**Prof. Dr. Ahmet KOÇ**

Araştırmacı(lar):  
Ayşe Banu Demir

ARALIK 2015  
İZMİR



## ÖNSÖZ

Doksorubisin, birçok kanserin tedavisinde sıkça kullanılan bir ajanıdır. İlaç dirençliliği, kanser tedavilerinin etkinliğini olumsuz olarak etkileyen en önemli nedenlerdendir. Doksorubisin ile günümüze kadar yapılan birçok çalışma mevcuttur. Maya model organizması, birçok moleküler ve genetik araştırmada iyi bir grade-1 model oluşturduğundan, doksorubisin dirençliliği ile ilgili maya ile yapılan genom-taramaları da mevcuttur. Fakat yapılan genom düzeyi taramalar genellikle maya delesyon kütüphanesi kullanılarak gerçekleştirilmiştir ki, bu kütüphane maya genomunun yaklaşık %18'ini oluşturan esansiyel genleri içermemektedir. Bu çalışmada, doksorubisin dirençliliğinde rol oynayan genler ve yollar, maya genom kütüphanesi taraması ve tüm-genom mikroarray analizleri gerçekleştirilerek geniş kapsamlı olarak araştırılmış ve doksorubisin dirençliliğinde rol oynayan bazı genler bulunmuştur. Bulunan genlerin bir kısmının doksorubisin dirençliliğinde rol oynadığı bilinirken, dirençlilik ile ilgili daha önce rolü bilinmeyen yeni genler de tespit edilmiştir. Bu çalışma TUBİTAK tarafından Prof. Dr. Ahmet KOÇ adına verilen 114Z701 kodlu 1002 projesi ile desteklenmiştir.



## İÇİNDEKİLER

|  |     |
|--|-----|
| ŞEKİL LİSTESİ.....   | iv  |
| TABLO LİSTESİ.....   | v   |
| ÖZET .....   | vi  |
| ABSTRACT .....   | vii |
| 1. GİRİŞ .....   | 1   |
| 1.1 Genel Bilgi .....  | 1   |
| 1.2 Literatür özeti .....  | 2   |
| 2. GEREÇ VE YÖNTEM.....  | 4   |
| 2.1 Maya suşları, plazmitler ve hücre büyümesi.....  | 4   |
| 2.2. Spotlama yöntemi .....  | 4   |
| 2.3. RNA izolasyonu ve eş-zamanlı PCR Analizleri.....  | 5   |
| 2.4. Mikroarray Analizleri .....   | 5   |
| 2.5 İstatistiksel Analizler.....   | 5   |
| 3. BULGULAR.....   | 6   |
| 3.1 Doksorubisine karşı dirençlilik gösteren genlerin taranması ve detaylı analizleri.....                                 | 6   |
| 3.2 Doksorubisine karşı dirençlilik gösteren genlerin doksorubisin muamelesine karşı ekspresyon profillerinin Analizi..... | 18  |
| 3.3 Doksorubisin Yanıtında Global Ekspresyon Profili.....  | 19  |
| 5. SONUÇ .....   | 24  |
| KAYNAKLAR.....   | 25  |



## ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1. Hücre büyüme eğrileri. 0  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$  ve 300  $\mu\text{M}$  doksorubisinli (Doxo) besiyerinde (A) haploid ve (B) diploid maya suşlarının OD<sub>600</sub> değerleri. Her bir büyüme eğrisi 3 kez tekrarlanmış ve tabloda ortalama veri belirtilmiştir. .... 6
- Şekil 2. Dirençlilik sağlayan genomik ifadenme kasetleri. (Oklar ile belirtilen genler klonlanması gerçekleştirilmiş genlerdir.)..... 9
- Şekil 4. PDR5 aşırı-ekspresyonunun eş-zamanlı PCR ile confirmasyon analizi.....12
- Şekil 5. Sensitivite analizleri. Delesyon mutantlarının (A) haploid ve (B) diploid maya suşlarında doksorubisin sensitivite analizleri. ....13
- Şekil 6. Çoklu ilaç direncini belirleyen YOR1, SNQ2, PDR5 ve PDR1 genlerinin yokluğunda PDR5 aşırı ifadenmesinin doksorubisin varlığında A) haploid ve B) diploid maya suşlarındaki spot analizi. ....15
- Şekil 7. Çoklu ilaç direncini belirleyen YOR1, SNQ2, PDR5 ve PDR1 genlerinin yokluğunda PDR5 aşırı ifadenmesinin clatrimazole varlığında A) haploid ve B) diploid maya suşlarındaki spot analizi. ....16
- Şekil 8. Çoklu ilaç direncini belirleyen YOR1, SNQ2, PDR5 ve PDR1 genlerinin yokluğunda PDR5 aşırı ifadenmesinin cerulenin varlığında A) haploid ve B) diploid maya suşlarındaki spot analizi. ....17
- Şekil 9. Haploid AKL1 ve PDR5 mutantlarında sırasıyla PDR5 ve AKL1 aşırı ekspresyonunun A) doksorubisin, B) clatrimazole ve C) cerulenine karşı dirençliliklerinin spot analizi. ....18
- Şekil 10. Doksorubisine karşı dirençlilikte rol oynayan genlerin eş-zamanlı PCR analizleri. Her bir genin, doksorubisin muamelesi ile muamele edilmeyen durumlarına göre normalize edilmiş ekspresyon kat-değişimi değerleri. Herbir örnek 3 kere tekrarlanmış ve hata çubukları, ortalamaların standard sapma değerlerini belirtmektedir. ACT1 geni iç kontrol olarak kullanılmıştır. ....19



## TABLO LİSTESİ

|  |    |
|--|----|
| Tablo 1. Doksorubicin dirençliliğinde rol oynayan genomik sekansların bilgileri.....   | 9  |
| Tablo 2. MIPS fonksiyonu sınıflandırması. Doksorubisin muamelesi ile 2-kattan fazla upregüle olan genler (p değeri cutoff : 0.01).....     | 19 |
| Tablo 3. MIPS fonksiyonu sınıflandırması. Doksorubisin muamelesi ile 2-kattan fazla down-regüle olan genler (p degeri cut-off: 0.01). .... | 20 |



## ÖZET

Doksorubisin, çeşitli kanser türlerinin tedavisinde kullanılan en etkili anti-kanser ajanlarından biridir fakat ilacın etkisi, ilaç dirençliliği mekanizmalarından ve ilacın sitotoksitesinden etkilenmektedir. Bu çalışmada, doksorubisin dirençliliğinde rol oynayan genlerin tespiti amaçlı, yüksek-kopya genomik kütüphane tarama analizleri gerçekleştirilmiş ve dirençlilikte rol oynayan bazı genler (*CUE5*, *AKL1*, *CAN1*, *YHR177W* ve *PDR5*) bulunmuştur. Bu genler arasında, *PDR5* in aşırı ekspresyonu en güçlü dirençlilik fenotipini göstermiş ve aynı genin delesyonu ise ilaca karşı tolerans seviyesini düşürmüştür. Q-PCR analizleri, bu genlerin transkripsiyonel regülasyonlarının doxorubicin muamelesiyle artmadığını göstermiştir. Bunun üzerine maya hücrelerinin doksorubisin muamelesine bağlı global gen ekspresyon profilleri incelenmiş ve doksorubisin toleransında/toksitesinde rol oynayan gen ve yollar belirlenmiştir. Sonuçlarımız, birçok dışa-atım pompası ve DNA metabolizma genlerinin aktive olduğunu ve doksorubisin toleransı için gerekli olduğunu göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Doksorubisin, *Saccharomyces cerevisiae*, ilaç dirençliliği, genom-düzeyi tarama,



## ABSTRACT

Doxorubicin is one of the most potent anticancer drugs used in the treatment of various cancer types. The efficacy of doxorubicin is influenced by the drug resistance mechanisms and its cytotoxicity. In this study, we performed a high-copy screening analysis to find genes that play role in doxorubicin resistance and found several genes (*CUE5*, *AKL1*, *CAN1*, *YHR177W* and *PDR5*) that provide resistance. Among these genes, overexpression of *PDR5* provided a remarkable resistance, and deletion of it significantly rendered the tolerance level for the drug. Q-PCR analyses suggested that transcriptional regulation of these genes was not dependent on doxorubicin treatment. Additionally, we profiled the global expression pattern of cells in response to doxorubicin treatment and highlighted the genes and pathways that are important in doxorubicin tolerance/toxicity. Our results suggest that many efflux pumps and DNA metabolism genes are upregulated by the drug and required for doxorubicin tolerance.

**Keywords:** Doxorubicin, *Saccharomyces cerevisiae*, drug resistance, genome-wide screening



## 1. GİRİŞ

Kanser, tek bir hücreden meydana gelen ve deregülasyonlar sonucu o tek hücrenin büyüme avantajı ile ortaya çıkan klonal bir hastalıktır (Alberts vd., 2008). Tek bir hücrenin kontrol edilemeyen büyümesi sonucu 'tümör' adı verilen hücre kütleleri oluşur. Kanser, kontrol edilemeyen büyümesi olan hücrelerden kaynaklı hastalıklar grubu olarak da adlandırılmaktadır ve tedavisinde birçok yöntem kullanılmaktadır. Kemoterapi de yaygın olarak kullanılan kanser tedavilerindedir.

Kemoterapi, kanserli hücrelerini öldürme amaçlı, sitotoksik (anti-kanser ilaçlar) ilaçların kullanıldığı bir tedavi yöntemidir (Eldon ve Bailey, 2007). Kullanılan kemoteröpatik ilaçlar; DNA interkalasyonu, replikasyon inhibisyonu, oksidatif stress yaratılması gibi çeşitli mekanizmalar ile hücreyi öldürmeyi hedefler. Fakat, kanserli hücrelerin yanısıra normal hücreleri de etkiledikleri için, ilaçların yan etkileri de mevcuttur ve bu yan etkiler tedavi etkinliğini olumsuz etkilemektedir. İlaçların yan etkisi ile birlikte, çoklu ilaç direnci (MDR), metastatik kanser hastalarındaki tedavi başarısızlığının önemli bir nedeni olarak görülmektedir (Longley ve Johnston, 2005). Kemoteröpatik ajanların membran taşıyıcı proteinleri ile hücre dışına atımı, çoklu ilaç direncinin ana mekanizması olarak görülmektedir. Çoklu direnç mekanizmaları tam olarak açıklanamasa da, ilaç dirençliliği varlığından kurtulmak ve dirençliliği kontrol altına almak, kemoteröpatik tedavilerde önemli bir adım olacaktır.

### 1.1 Genel Bilgi

Kemoteröpatik ilaçlar, etki mekanizmalarına göre; alkilleyici ajanlar, antimetabolitler, doğal ürünler ve hedef ajanlar olmak üzere 4 temel genel gruba ayrılmaktadır (Takimoto, 2008; O'Connor vd., 2007). Doğal ürünler, doğada bulunan mantar, bitki ve çeşitli mikroorganizmalardan elde edilen ürünlerdir (Mondal vd., 2012). Doğal ürünler genel olarak; antitümör antibiyotikleri, antrasiklinler, epipodofillotoksinler, mikrotübül ajanları ve kamptotesin analogları olarak 5 alt gruba ayrılmaktadır (Takimoto, 2008).

Antrasiklinler, en etkili anti-kanser ajanlarından ve birçok kanserin tedavisinde kullanılmaktadır. Doksorubisin ve Daunorubisin, *Streptomyces peucetius*'dan izole edilen ilk antrasiklinlerdir (Minotti vd., 2004).

Doksorubisin, güçlü anti-kanser aktivitesi bulunan, antrasiklin grubundan bir ilaçtır. Etkisini, DNA interkalasyonu ile DNA/RNA sentezinin durdurulması, serbest radikal oluşturması, topoizomeraz II'nin aktivitesini engellemesi ve DNA zincir kırıkları oluşturması, membran özelliklerini değiştirmesi ve RNA helikaz aktivitesini durdurması gibi çeşitli mekanizmalar ile göstermektedir (Gewirtz, 1999; Zhu vd., 1999). Bu farklı etki mekanizmaları, ciddi yan etkileri de beraberinde getirmektedir. En belirgin yan etkisi kardiyo-





otoksisitedir (Simunek vd., 2009). Doksorubisin demir akümülyasyonuna neden olmakta ve mitokondriye zarar vererek kardiyak problemlere neden olan reaktif oksijen türlerinin üretimini sağlamaktadır (Ichikawa vd., 2014).

## 1.2 Literatür özeti

Doksorubisin ilaç dirençlilik mekanizmaları hem maya hem de memeli hücre hatlarında çalışılmıştır. Memelilerde bulunan dirençlilik mekanizmaları, öncelikle P-glikoprotein up-regülyasyonu ile ilacın hücre dışına atılması (Ueda vd., 1987), çoklu ilaç direnci proteini (MRP) (Cole vd., 1992), antrasiklin dirençliliği ile ilgili MRP6 proteini (Longhurst vd., 1996), meme kanseri dirençlilik proteini olan BCRP (Allen vd., 1999), ve akciğer dirençliliği ile ilgili olan LRP proteinlerinin (Slovak vd., 1995) etkilerini içermektedir. Ayrıca, topoizomeraz II ekspresyonundaki değişimler (Withoff vd., 1996), glutatyon S-transferaz (GST) aşırı-ifadelenmesi (Singh vd., 1989), ve ERK1/ERK2 proteinlerindeki değişimler (Shukla vd., 2010) de doksorubisine karşı dirençlilik sağlamaktadır.

*S. cerevisiae*, doksorubisin dirençlilik ve hassasiyeti ile ilgili genlerin belirlenmesinde değerli bir model organizmadır. Esansiyel olmayan genleri içeren maya delesyon kütüphanesi suşlarının taranması ve spesifik genlerle yapılan çalışmalar, mayada doksorubisin toleransında rol oynayan birçok gen ve yolağı ortaya çıkarmıştır (Westmoreland vd., 2009; Xia vd., 2007). Bunlar arasında, Ssl2 proteini (Furuchi vd., 2004), Bsd2 proteini (Takahashi vd., 2005), SUMO sinyal yolağı (Huang vd., 2007), ribozomlarda meydana gelen polipeptid-iliği kompleks aktivitesi (Takahashi vd., 2009), ekstrasellüler sinyal ile regüle olan *ERK1* ve *ERK2* kinazları (Shukla vd., 2010), endositik Ark/Prk kinazı (Takahashi vd., 2006), nitrojen permeaz regülyator 2 (*Npr2*) (Schenk vd., 2003), sitokrom oksidaz altünite IV geni (Kule vd., 1994), ve *CLN1*, *CLN2* ve *ERG13* aşırı ifadelenmesi (Takahashi vd., 2011) gibi mekanizmalar mevcuttur. Ek olarak, hücre döngüsünün G1 ve S fazlarındaki kontrol noktaları ve rekombinasyon fonksiyonları (Westmoreland vd., 2009) ile beraber DNA tamiri, RNA metabolizması, kromatin yeniden modellenmesi, amino asit matabolizması ve heat-shock yanıtı (Xia vd., 2007) gibi fonksiyonlar da mayada bulunan doksorubisin dirençliliği ile ilgili mekanizmalar arasındadır.

Kanser ilaç dirençliliğinde yeni genlerin belirlenmesinin, prognoz ile ilgili daha fazla bilgi sağlamaı nedeniyle, kemoterapilerin etkilerinin arttırılmasına ya da yeni kemoteröpatik ajanların geliştirilmesine yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada, doksorubisin varlığında yüksek-kopya genomik DNA kütüphanesi taraması yaparak, doksorubisin dirençliliğinde rol oynayan mekanizmaların belirlenmesi planlanmıştır. Yüksek dozda doksorubisine (500µM) karşı dirençlilik gösteren bazı genler bulunmuştur. Bu genler arasında PDR5 aşırı ifadelenmesi, fenotipik olarak en dirençli suşu oluşturmuştur. Aynı zamanda bu çalışmada doksorubisin muamelesine bağılı olarak gerçekleşen maya



genomundaki ekspresyon paterni değişimleri analiz edilmiş ve dirençlilik/detoksifikasyonda rol oynayan çeşitli genler ve yollar belirlenmiştir.



## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1 Maya suşları, plazmitler ve hücre büyümesi

Bu çalışmada *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 (MATa, *his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*) ve BY4743 (MATa, *his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0 LYS2/lys2Δ0 met15Δ0/MET15 ura3Δ0/ura3Δ0*) maya suşları kullanıldı. Genom kütüphanesi taramalarında, yüksek kopya maya genom kütüphanesi (ATCC No. 37323) kullanıldı. Maya transformasyonları standard LiAc metodu ile gerçekleştirilmiştir. Aksi belirtilmedikçe, bütün deneyler uygun amino asitlerin ve bazların sağlandığı Maya Nitrojen Bazı (Yeast Nitrogen Base (YNB), 2% Glukoz) kültür ortamında gerçekleştirildi.

Maya ekspresyon analizlerinde, genler Prof. Dr. Wenjun Guan'dan (Zhejiang Üniversitesi, Çin) alınan PDR5 plazmidi dışında, pAG426 plasmidine (Addgene) klonlandı. Plazmit izolasyonlarında, maya hücreleri izolasyondan önce litikaz (5u/ml) kullanılarak, Tris-EDTA (TE) solüsyonu içerisinde 30 dakika boyunca parçalandı ve plazmitler GeneJET Plazmid Miniprep kit (Thermo-Molecular Biology) kitinde, üretici tarafından tanımlanan şekilde gerçekleştirildi.

İzole edilen plazmitler, *E. coli* DH5α hücrelerinde çoğaltıldı ve vektöre özgü primerler kullanılarak İYTE Biyoteknoloji Merkezinde sekanslandı. Doksorubisin SABA ilaç firmasından temin edildi (Katalog Num.: 8699511796063 /Türkiye).

### 2.2. Spotlama yöntemi

Gradyan ilaç konsantrasyonuna sahip petri kapları, Szybalski ve Bryson (1952) tarafından tanımlandığı şekilde hazırlandı. Özetle, kare petri kaplarına iki katman agarlı besiyeri dökülmüştür. Alt katmanda ilaçsız seçici besiyeri döküldükten sonra, agarın gradyan olarak donması için kabın tek tarafı uygun açıda kaldırıldı. Alt katman donduktan sonra, petri kabı yataylaştırılıp, doksorubisin içeren ortam üst katman olarak eklendi. Aşağıya doğru difüzyon etkisiyle, doksorubisin agarın kalınlığıyla doğru orantılı olarak difüze oldu ve yaklaşık 0'µM'dan 500 µM'a kadar gradyan olarak değişen ilaç konsantrasyonu elde edildi (Szybalski ve Bryson, 1952). Plazmitleri taşıyan BY4741 ve BY4743 maya suşları, gece aşırı seçici besiyerinde büyütüldükten sonra büyüme fazında hücreleri elde etmek amaçlı, taze büyüme ortamı ile dilüe edilip 3 saat daha büyümeleri sağlandı. Hücreler distile su ile yıkandıktan sonra 600 nm'deki optik densite (OD<sub>600</sub>) değerleri 0.02'ye ayarlandı ve 5 µl hücre süspansiyonu her bir spot!a eşit olarak aktarıldı. Hücre büyümeleri, 30°C'de 2-3 gün inkübasyon sonrasında fotoğraflandı.



### 2.3. RNA izolasyonu ve eş-zamanlı PCR Analizleri

Eksponansiyel olarak büyüyen maya hücrelerinde total RNA örnekleri, RNeasy Mini Kit (Qiagen) kullanılarak elde edildi. Genomik DNA kontaminasyonu DNaz (Dnase RQ1, Promega) muamelesi ile elimine edildi. cDNA sentezi First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) kullanılarak, üretici firmanın önerdiği şekilde gerçekleştirildi. İzole edilen cDNAlar, seçilen genlerin iç kısımlarını çoğaltmak için kalıp olarak kullanıldı. *ACT1* geni iç kontrol olarak kullanıldı. Eş-zamanlı PCR analizleri IQ5 real-time PCR sistemi (BIO-RAD) kullanılarak gerçekleştirildi.

### 2.4. Mikroarray Analizleri

RNA örneklerinin konsantrasyonları ve saflığı, nanodrop spektrofotometre (Thermo Scientific) kullanılarak, 260/280nm'deki abzorbanları ölçülerek değerlendirildi. RNA kaliteleri, Agilent Bioanaliz cihazında, Agilent RNA 6000 Nano Kit kullanılarak değerlendirildi. Total RNA ve spike-in karışımları, en az 100ng total RNA ile spike-in kitini karıştırarak elde edildi. Total RNA örnekleri minimum 50ng/μl olacak şekilde nükleazdan arındırıldı, su içerisinde süspanse edildi ve T7 primer karışımı dilüe RNA'ların üzerine eklendi. Karışımın 65°C'de en az 10 dakika inkübasyonu ile denatürasyon sağlandı. cDNA master karışımı hazırlanıp RNA örnekleri üzerine eklendi. Karışım daha sonra sırasıyla 40°C'de 2 saat, 70°C'de 10 dakika ve buz üzerinde 5 dakika inkübe edildi. Cyanine-3 işaretli ve amplifiye RNA örnekleri (cRNA) saflaştırılmış ve kuantifikasyon nanodrop spektrofotometre (Thermo Scientific) kullanılarak yapılmıştır. Hibridizasyon için, cRNA örnekleri fragmentasyon solüsyonu ve gen ekspresyonu bloklayıcı ajan içerisinde 60°C'de 30 dakika inkübe edildi. Fragmente olan örnekler array'e yüklenmiş ve array lamları hibridizasyon fırınına yerleştirildi. Hibridizasyon reaksiyonu 65°C'de 18 saat boyunca gerçekleştirildi. Hibridizasyon aşamasından sonra örnekler yıkama solüsyonunda 3 kere yıkandı. Yıkamaların ilk ikisi oda sıcaklığında, üçüncüsü ise 37°C'de gerçekleştirildi. Yıkama aşamasından sonra slaytlar scan edildi ve sinyal yoğunlukları "feature extraction programı" ile elde edildi.

### 2.5 İstatistiksel Analizler

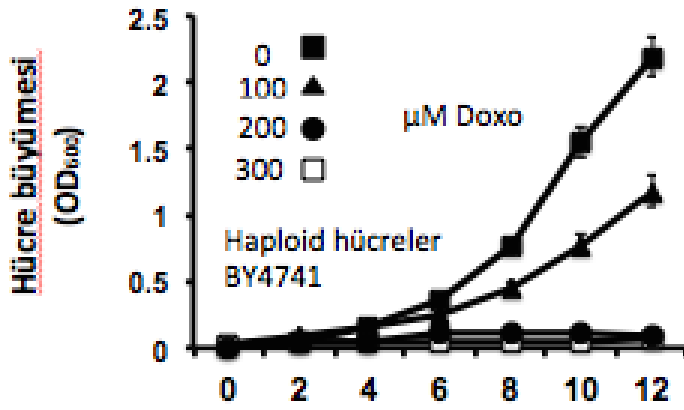
İstatistiksel analizler, eş-zamanlı PCR analizleri için Student's T-test kullanılarak, mikroarray veri analizleri için kat-değişimi analizleri kullanılarak gerçekleştirildi. P değeri 0.05'ten küçük olan olgular anlamlı olarak seçildi.

### 3. BULGULAR

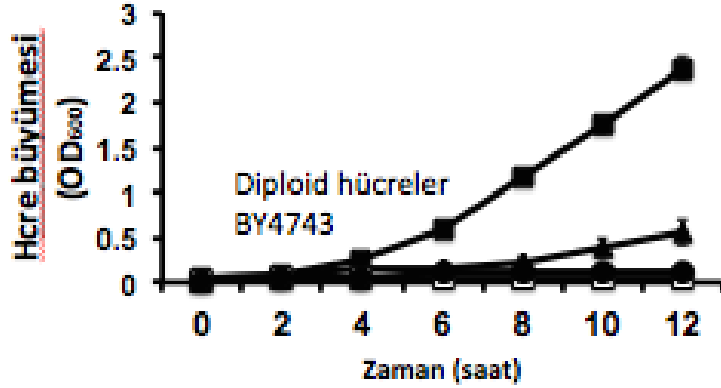
#### 3.1 Doksorubisine karşı dirençlilik gösteren genlerin taranması ve detaylı analizleri

Doksorubisine karşı dirençlilik gösteren genlerin belirlenmesi için, öncelikle suşlar için toksik olan ilaç seviyesi belirlendi. Farklı ilaç konsantrasyonları içeren ve içermeyen sıvı ortamda haploid (BY4741) ve diploid (BY4743) yabancı tip suşların büyüme hızları değerlendirildi. Her iki suşun da, 200  $\mu\text{M}$  ve daha yüksek ilaç konsantrasyonunda büyümelerinin durduğu gözlemlendi (Şekil 1).

A)



B)



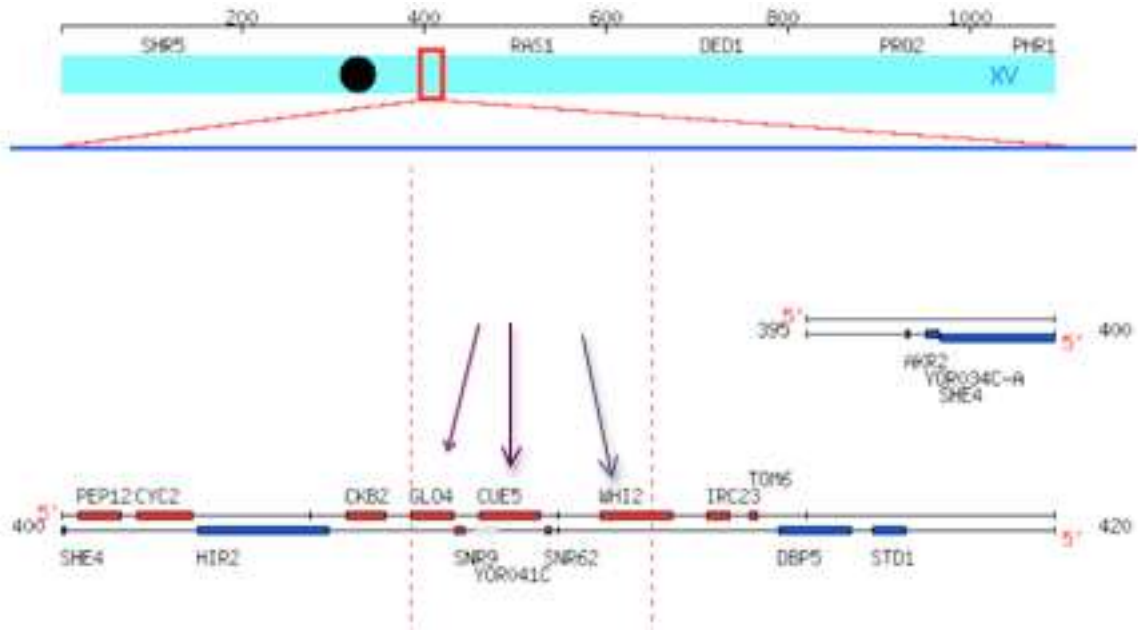
**Şekil 1. Hücre büyüme eğrileri.** 0  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$  ve 300  $\mu\text{M}$  doksorubisinli (Doxo) besiyerinde (A) haploid ve (B) diploid maya suşlarının OD<sub>600</sub> değerleri. Her bir büyüme eğrisi 3 kez tekrarlanmış ve tabloda ortalama veri belirtilmiştir.

Toksik ilaç seviyesi belirlendikten sonra yabancı tip BY4741 hücrelerimiz 2 $\mu$ -bazlı genomik ekspresyon kütüphanesi ile transforme edildi ve toksik ilaç seviyesinin 2 katı kadar ilaç konsantrasyonuna dirençlilik gösteren transformantlar seçildi. Transformantlardan izole

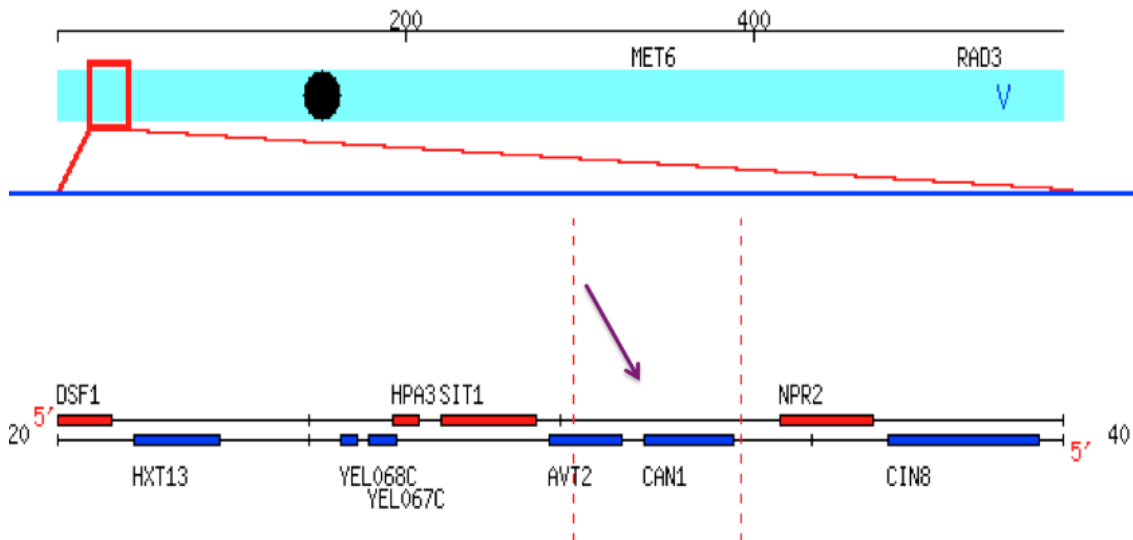
edilen plasmidler, *E. coli* kullanılarak amplifiye edildi ve konfirmasyon amaçlı taze yabancı tip suşların transformasyonunda kullanıldı. İzole edilen tüm plasmidler, yeni transforme edilen hücrelerde de dirençlilik sağladı. Bu nedenle görülen dirençliliğin plasmidlere ait olduğu teyit edildi.

Her bir plasmiddeki ekspresyon kaseti bölgelerinin nükleik asit sekanslamaları gerçekleştirildi. Bulunan kasetlerin, maya genomu üzerindeki bölgeleri BLAST ile bulunup, bu bölgelerde mevcut olan genlere ait anotasyon bilgileri belirlendi ve bu bölgelerde bulunan toplam 9 adet gen tespit edildi (Şekil 2 ve Tablo 1).

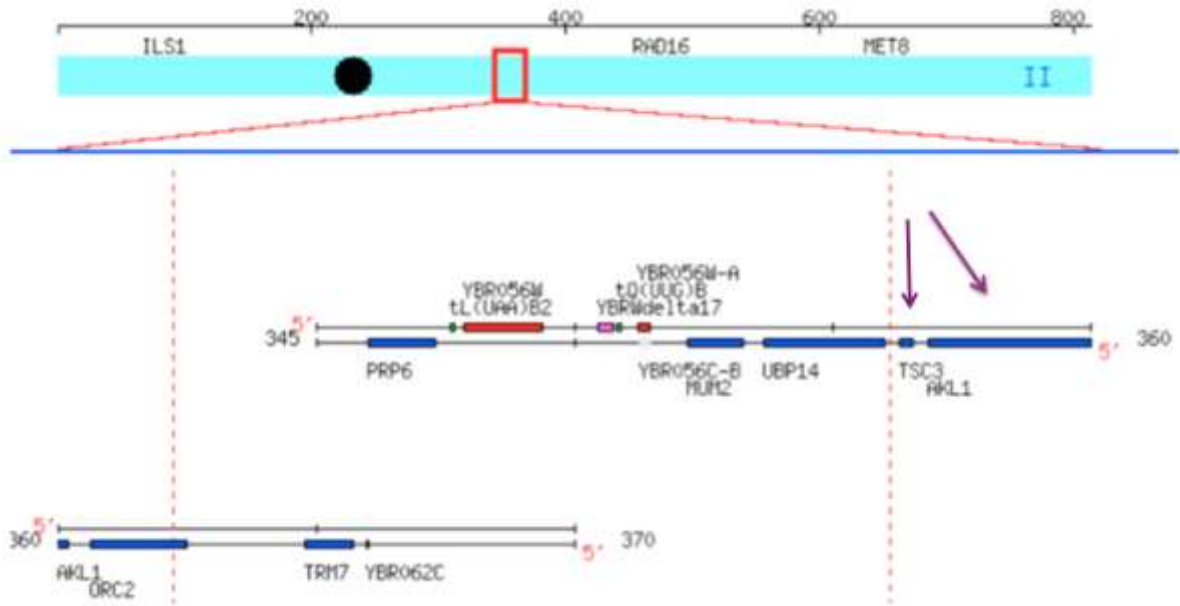
### Örnek No: 3E5



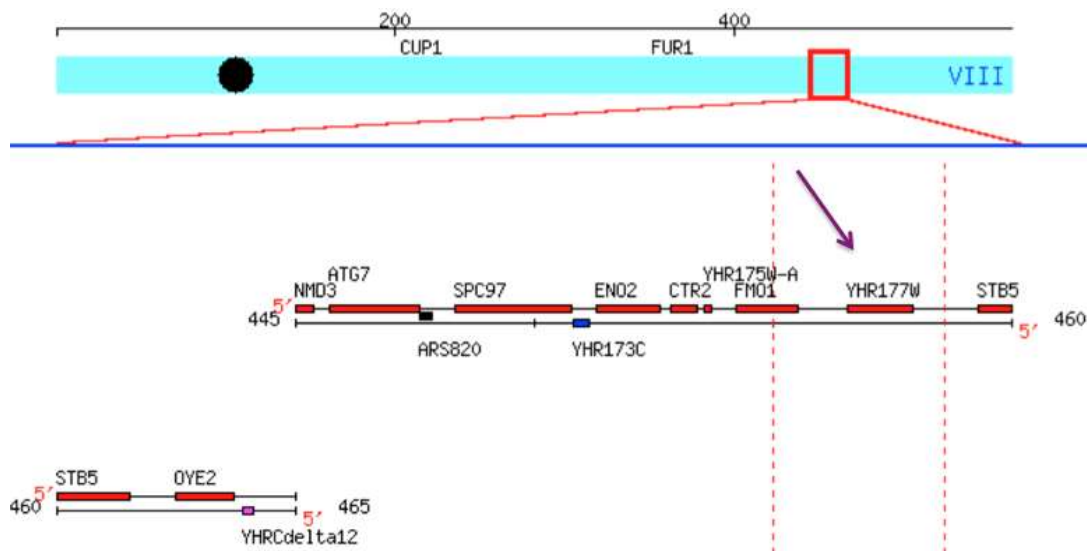
### Örnek No:16F2



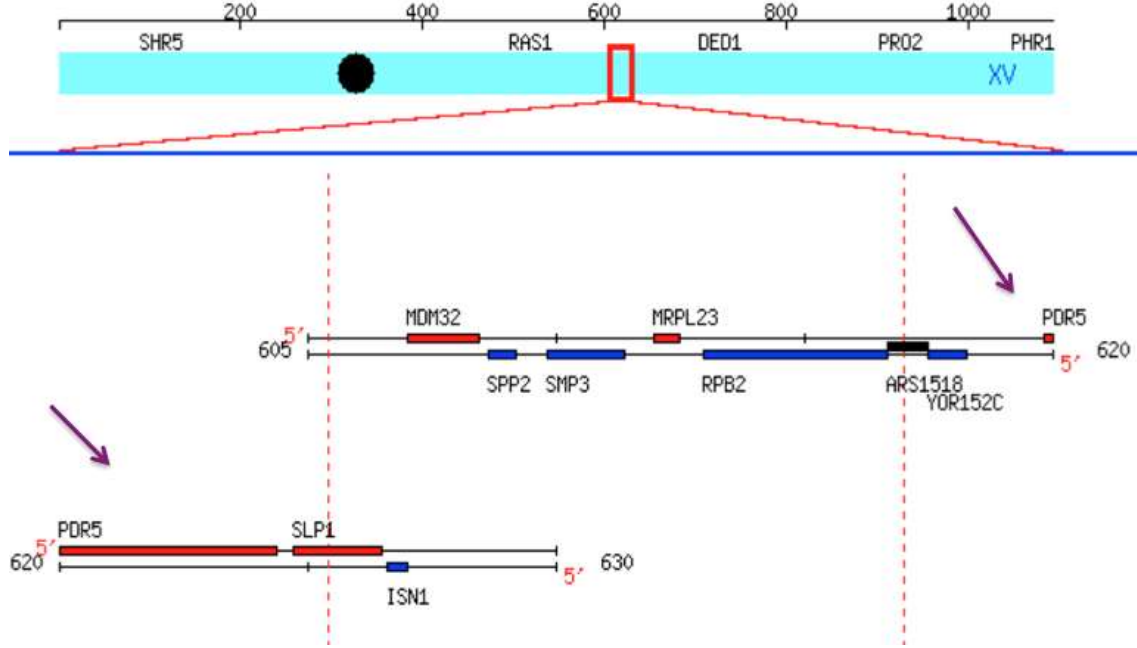
Örnek No: 10D5



Örnek No: 21H12



**Örnek No: 39A12**



**Şekil 2.** Dirençlilik sağlayan genomik ifadeneme kasetleri. (Oklar ile belirtilen genler klonlanması gerçekleştirilmiş genlerdir.)

**Tablo 1.** Doksorubicin dirençliliğinde rol oynayan genomik sekansların bilgileri.

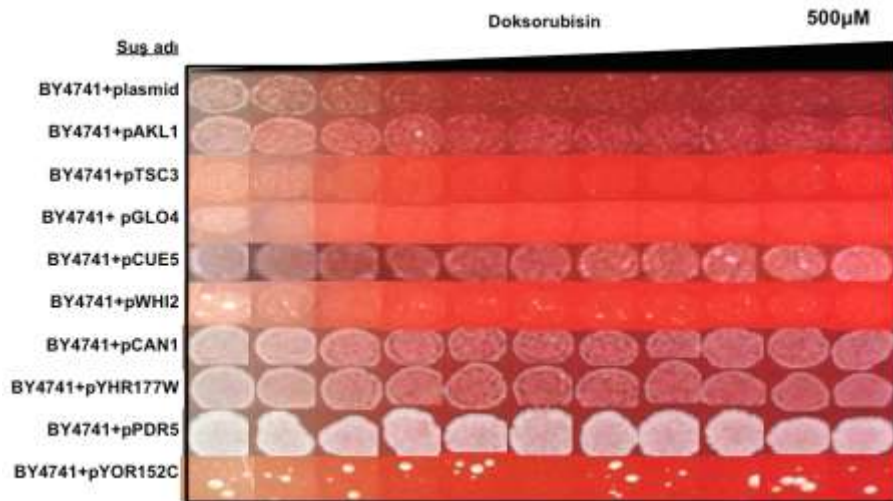
| Koloni Numarası | Kromozom Bilgisi                                   | Bölgenin İçerdiği Genler                       |
|-----------------|--|--|
| 1               | Kromozom XV<br>Kordinatlar: 407059 bp - 411911 bp  | GLO4, CUE5,<br>WHI2 geninin<br>büyük bir kısmı |
| 2               | Kromozom V<br>Kordinatlar: 30280 bp - 33605 bp     | CAN1   |
| 3               | Kromozom II<br>Kordinatlar:<br>346000 bp to 366000 | TSC3, AKL1                                     |
| 4               | Kromozom VII<br>Kordinatlar: 445000bp - 465000bp   | YHR177W  |
| 5               | Kromozom XV<br>Kordinatlar: 607000bp - 627000bp    | YOR152C, PDR5                                  |



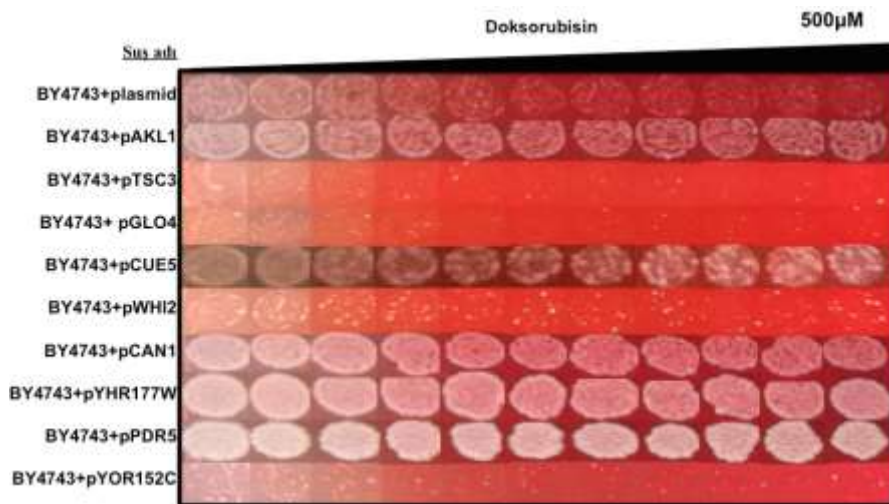


Bu genlerden hangisinin dirençlilikten sorumlu olduğunu bulmak için her bir gen ayrı ayrı pAG426GDP plasmitlerine klonlandı. Klonlamaların confirmasyonları restriksiyon analizleri ve sekanslamalar ile doğrulandı. Klonlanan bu genler haploid (BY4741) ve diploid (BY4743) yabancı tip hücrelere transforme edildi. Elde edilen transformantların büyüme karşılaştırmaları spot analizleri ile belirlendi (Şekil 3A ve 3B). Sadece *AKL1*, *CUE5*, *CAN1*, *YHR177w* ve *PDR5* genlerinin aşırı ifadenemesinin doksorubisine karşı dirençlilikte rol oynadığı belirlendi.

A)



B)

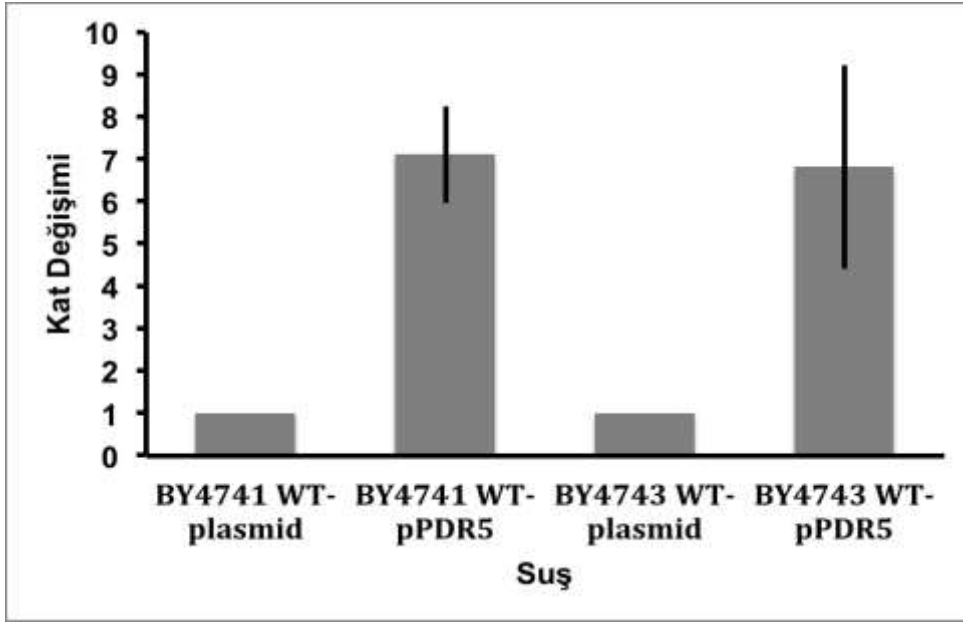


C)



**Şekil 3. Aşırı eksprese edilen genlerin spot analizi verileri.** Doksorubisin dirençliliğinde rol oynayan genler klonlandı ve (A) haploid ve (B) diploid yabancı tip maya suşlarında eksprese edildi. (C) *PDR5* geninin aşırı ifadenmesi, 2 mM doksorubisine karşı dirençlilik sağlamaktadır.

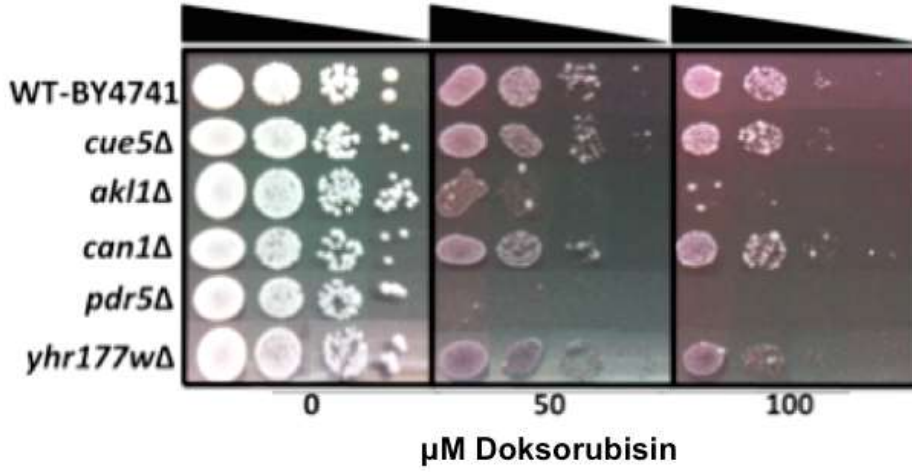
Özellikle, *PDR5* geninin aşırı ifadenmesi şimdiye kadar tespit edilmiş en yüksek (2 mM) doksorubisin dirençliliğini gösterdi (Şekil 3C). *PDR5*'in aşırı ifadenmesi, eş zamanlı PCR analizleri ile konfirme edildi (Şekil 4).



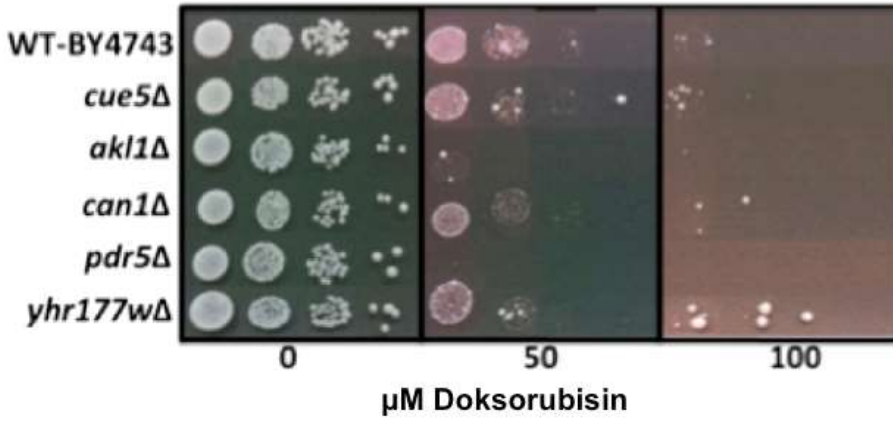
**Şekil 4. *PDR5* aşırı-ekspresyonunun eş-zamanlı PCR ile analizi.**

Bir sonraki adım olarak, dirençlilik sağlayan genlerin mutant formlarının doksorubisine karşı hassasiyetlerini haploid ve diploid maya suşlarında araştırıldı. Her iki suşta da *pdr5Δ* mutantları en hassas suş olarak bulundu ve bu suşun büyümesi 50  $\mu$ M doksorubisin konsantrasyonunda inhibe oldu. *pdr5Δ* mutantlarına ek olarak, *akl1Δ* mutanları da yabancı tip suş ile karşılaştırıldığında, doksorubisine karşı daha hassas bir fenotip sergiledi. Diğer mutantlar (*cue5Δ*, *can1Δ* ve *yhr177wΔ*) ise yabancı tip maya suşu ile benzer büyüme profili gösterdi (Şekil 5A and 5B).

A)



B)

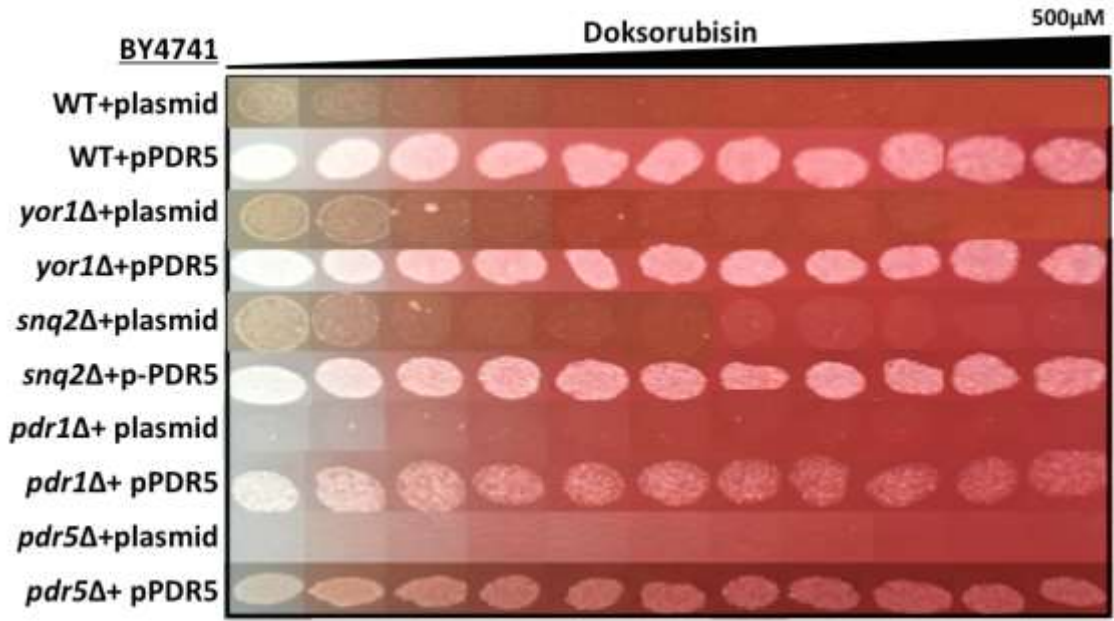


**Şekil 5. Duyarlılık analizleri.** Delesyon mutantlarının (A) haploid ve (B) diploid maya suşlarında doksorubisin sensitivite analizleri.

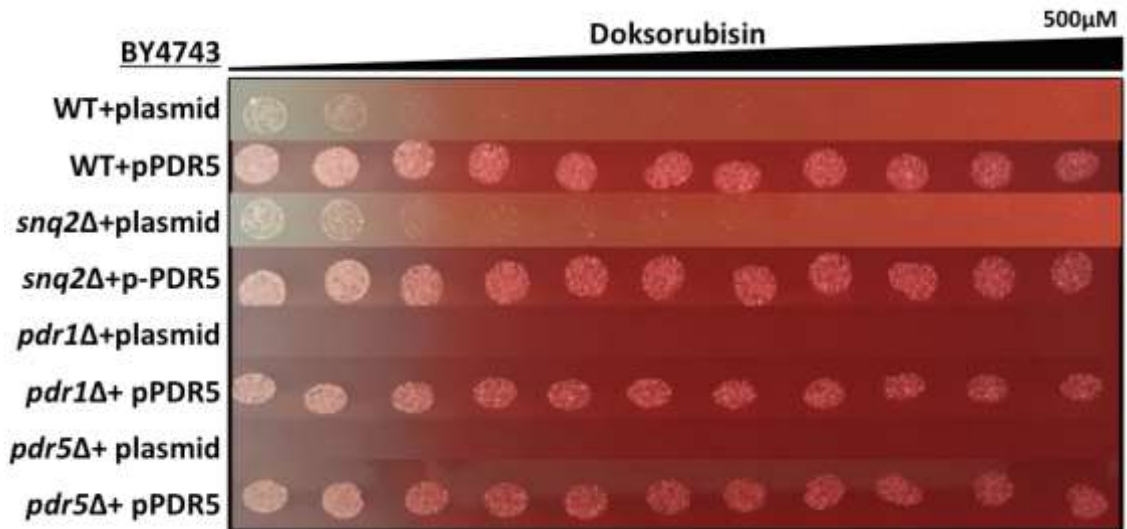
*PDR5*, *SNQ2* ve *YOR1* mayada çoklu-ilaç direncini belirleyen esas genlerdir ve bu genler *PDR1* tarafından regüle edilmektedir (Balzi vd., 1994; Decottignies vd., 1995; Katzmann vd., 1995). *PDR5* aşırı ifadelenmesinin bu genlerin yokluğunda da dirençlilik sağlayıp sağlamayacağını görmek amacıyla, bu suşlarda da *PDR5* geni aşırı eksprese edildi. Oluşturulan suşlar, doksorubisine ek olarak, her ikisinde Pdr5 substratı olduğu bilinen clatrimazole (mantarda ergosterol sentezini inhibe edici ajan (Yoshida ve Aoyama, 1991) )

ve cerulenin (yağ asidi sentezini inhibe edici ajan (Omura, 1981) ilaçlarında da denendi. *PDR5* aşırı ekspresyonu her 3 ilaca karşı hücre suşlarını dirençli kıldı. *Snq2Δ* ve *yor1Δ* mutantları yabancı tip ile benzer hassasiyeti gösterirken, *pdr1Δ* mutantı yabancı tipe göre daha hassas bir fenotip gösterdi. *pdr1Δ* mutantındaki *PDR5* aşırı-ekspresyonu, *PDR5*'i aşırı eksprese eden diğer suşlara göre daha az dirençlilik sağladı (Şekil 6, 7 ve 8)

A)

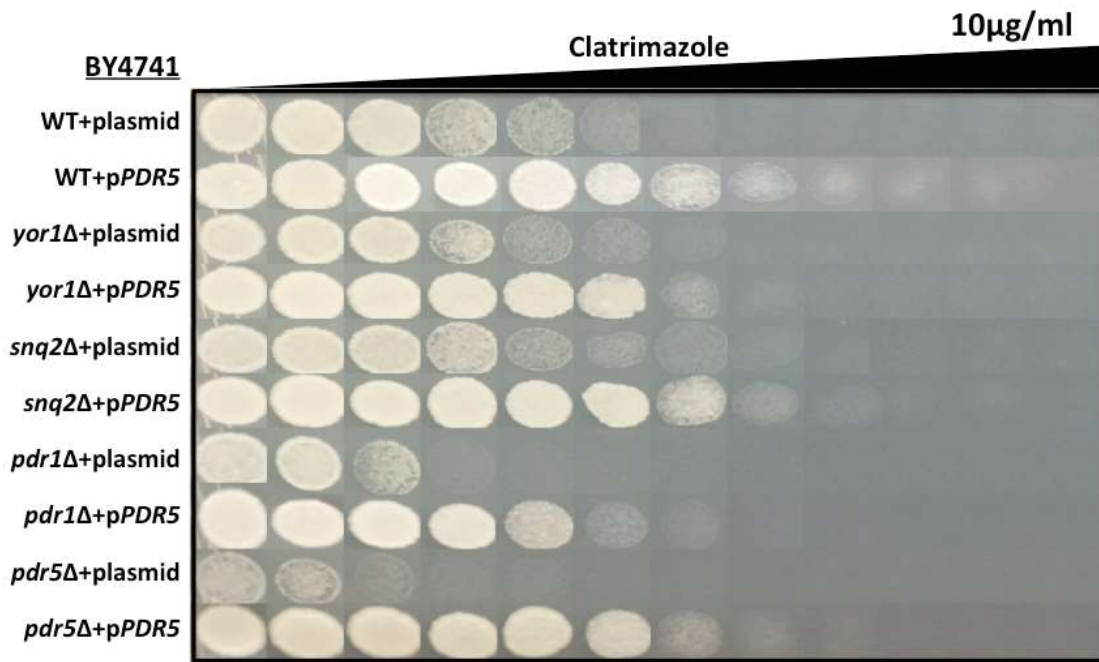


B)



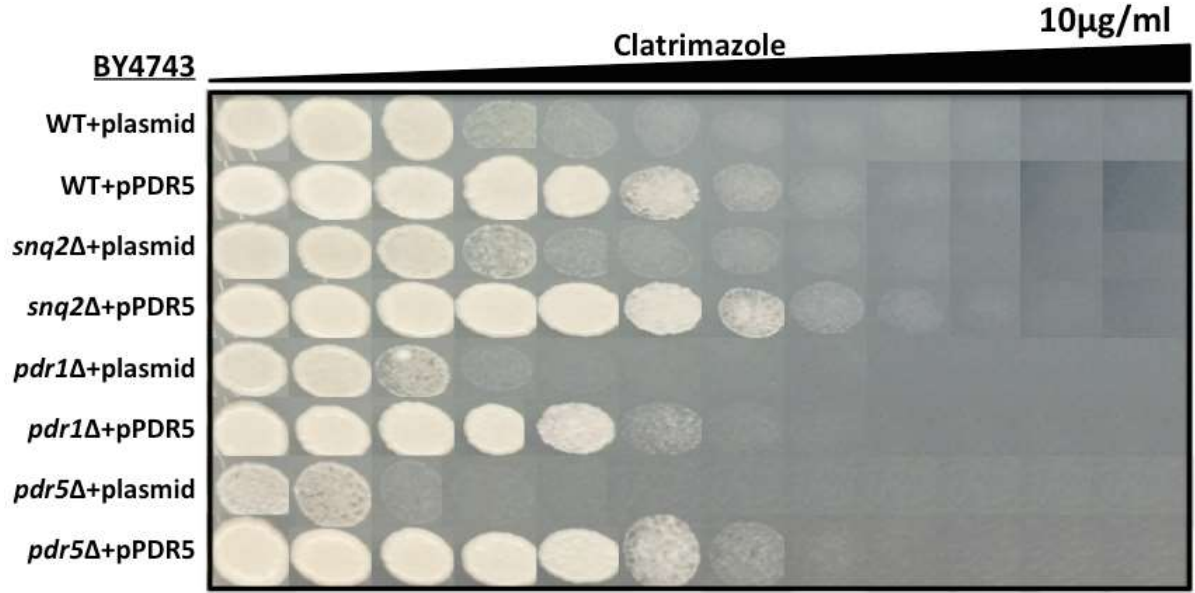
**Şekil 6.** Çoklu ilaç direncini belirleyen YOR1, SNQ2, PDR5 ve PDR1 genlerinin yokluğunda PDR5 aşırı ifadenmesinin doksorubisin varlığında A) haploid ve B) diploid maya suşlarındaki spot analizi.

A)



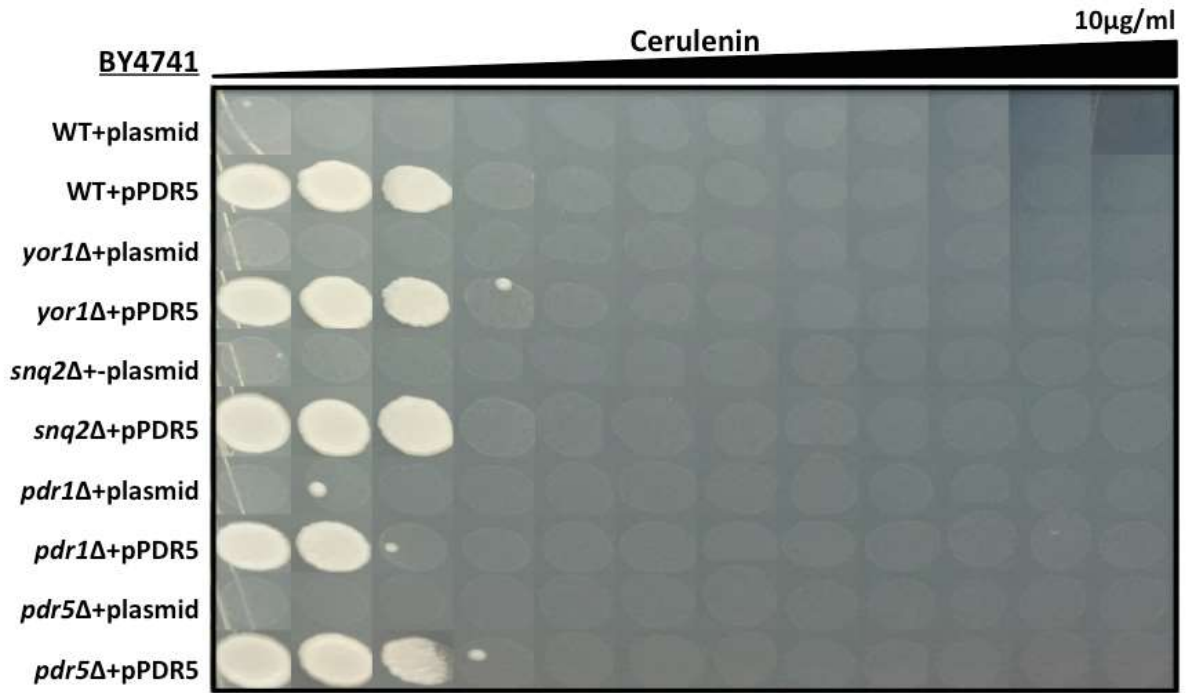
B)

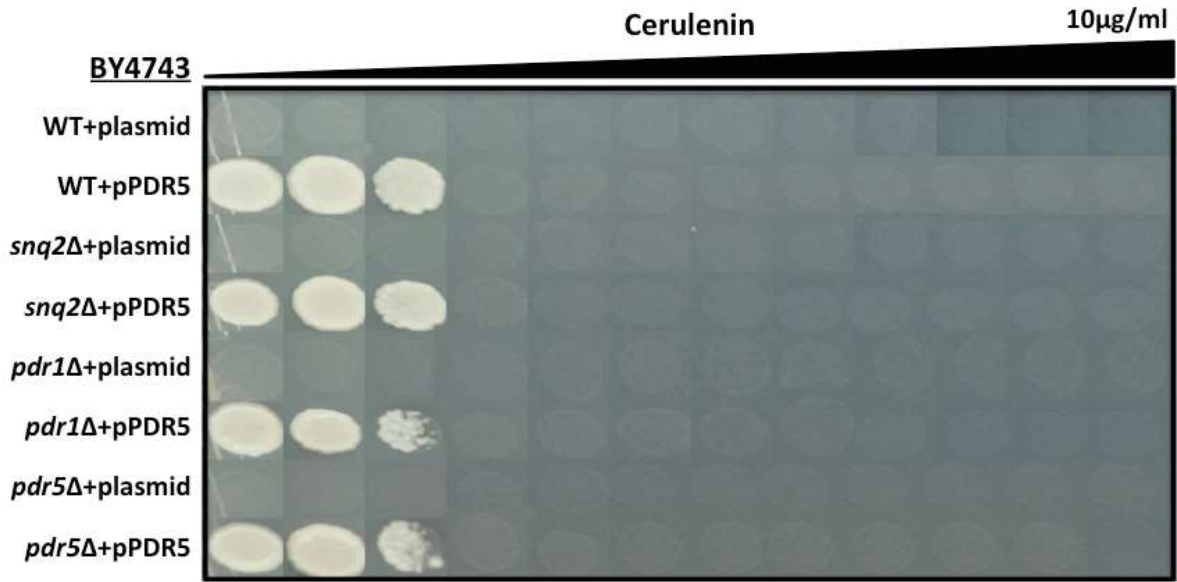




**Şekil 7.** Çoklu ilaç direncini belirleyen YOR1, SNQ2, PDR5 ve PDR1 genlerinin yokluğunda PDR5 aşırı ifadelenmesinin clatrimazole varlığında A) haploid ve B) diploid maya suşlarındaki spot analizi.

A)

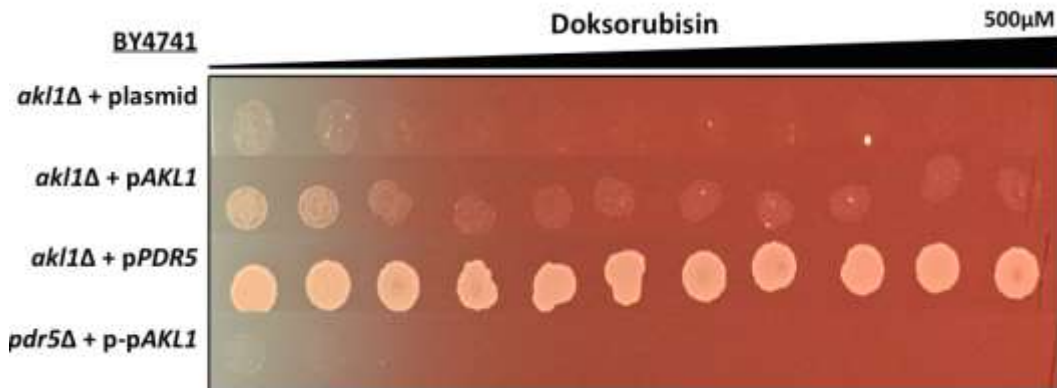




**Şekil 8.** Çoklu ilaç direncini belirleyen *YOR1*, *SNQ2*, *PDR5* ve *PDR1* genlerinin yokluğunda PDR5 aşırı ifadenmesinin cerulenin varlığında A) haploid ve B) diploid maya suşlarındaki spot analizi.

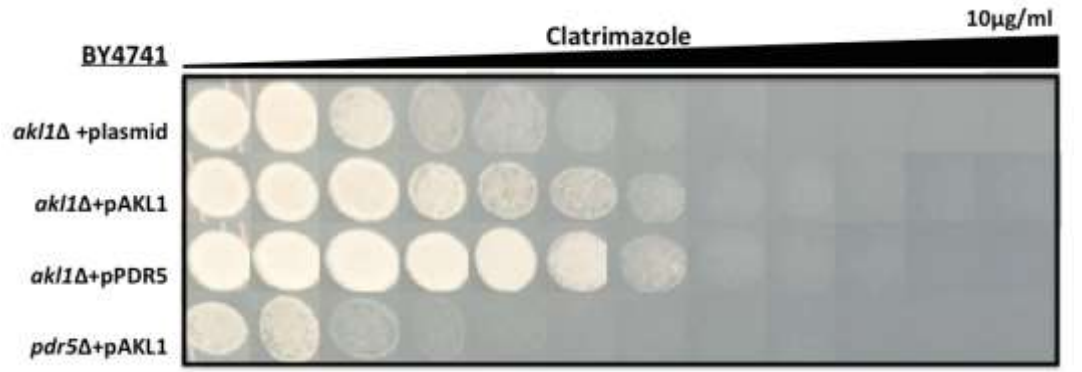
Doksorubisine karşı dirençlilik sağlayan bir diğer gen de *AKL1* geni olarak bulundu. *AKL1* geninin dirençliliği *PDR5* geni üzerinden gösterip göstermediğini araştırma amaçlı, *AKL1* geni *pdr5*Δ mutantlarında aşırı eksprese edildi ve *pdr5*Δ mutantlarında *AKL1*'in yabancı tipte olduğu gibi (Şekil 3A ve 3B) dirençlilik sağlayamadığı gösterildi (Şekil 9).

A)

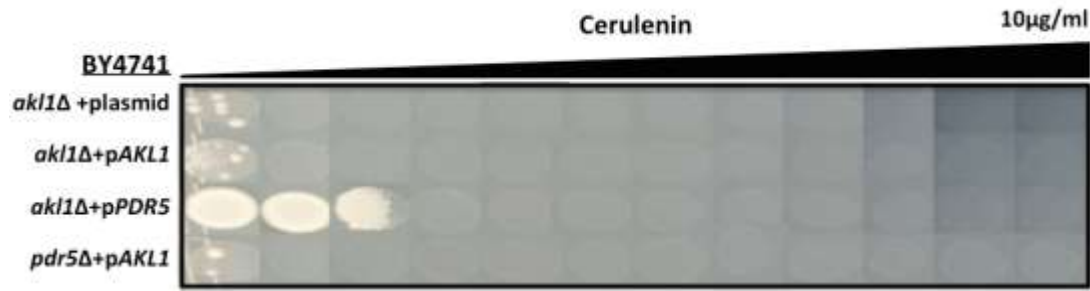


B)





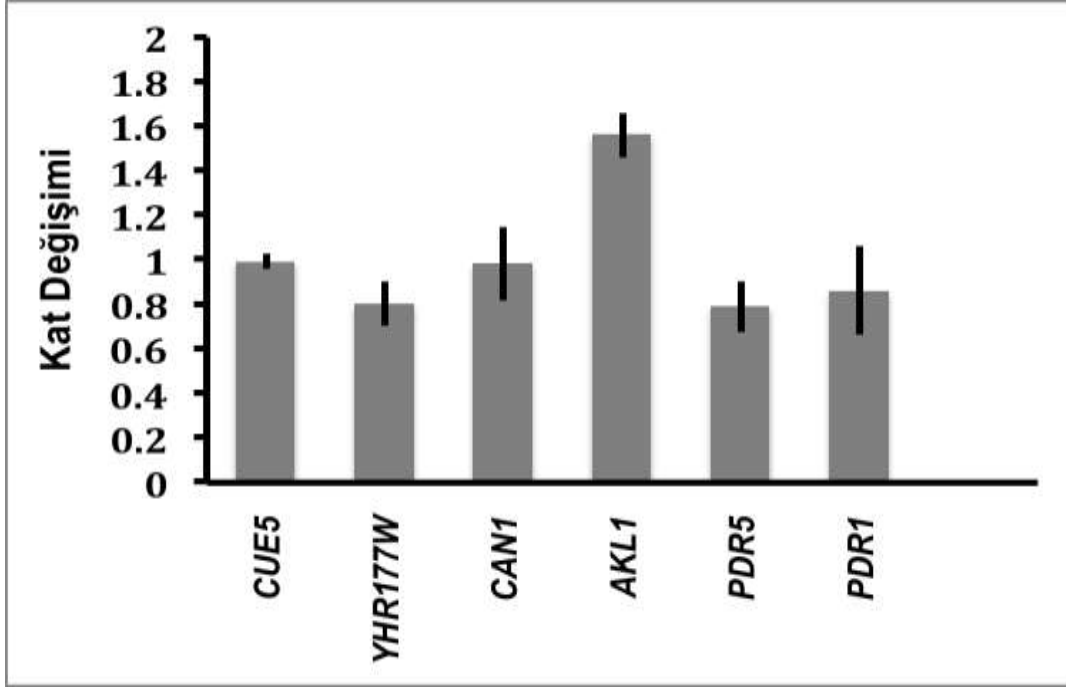
C)



**Şekil 9.** Haploid AKL1 ve PDR5 mutantlarında sırasıyla PDR5 ve AKL1 aşırı ekspresyonunun A) doksorubisin, B) clatrimazole ve C) cerulenine karşı dirençliliklerinin spot analizi.

### 3.2 Doksorubisine karşı dirençlilik gösteren genlerin doksorubisin muamelesine karşı ekspresyon profillerinin analizi

Genom düzeyi tarama analizleri, *PDR5*, *AKL1*, *CAN1*, *YHR177W* ve *CUE5* genlerinin doksorubisine karşı dirençlilikte rol oynadığını göstermektedir. Fakat bu genlerin doksorubisin varlığında aktive olup olmadığı bilinmemektedir. Bu genlerin ekspresyon durumlarını çalışmak için, yabani tip maya hücrelerini subletal doz (80 µM) ile 2 saat boyunca muamele edildi ve her bir genin transkript seviyesi eş-zamanlı PCR analizleri ile belirlendi (Figür 10). Bakılan genlerden sadece *AKL1* ekspresyonu 1,5 kat artmış olarak bulunurken, diğer genlerin doksorubisine karşı fizyolojik olarak anlamlı bir yanıt vermediği bulundu. Bu genlerin yanı sıra, *PDR1* geninin ekspresyonunun da doksorubisinden etkilenip etkilenmediğine bakıldı ve *PDR5* ile orantılı olarak *PDR1* geninde de, istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalış saptandı (Şekil 10). Dolayısı ile bu genlerin sadece ektopik olarak ifadelendiğinde doksorubisine karşı dirençlilik sağladığı gösterildi.



**Şekil 10. Doksorubisine karşı dirençlilikte rol oynayan genlerin eş-zamanlı PCR analizleri.** Her bir genin, doksorubisin muamelesi ile muamele edilmeyen durumlarına göre normalize edilmiş ekspresyon kat-değişimi değerleri. Herbir örnek 3 kere tekrarlanmış ve hata çubukları, ortalamaların standard sapma değerlerini belirtmektedir. *ACT1* geni iç kontrol olarak kullanılmıştır.

### 3.3 Doksorubisin Yanıtında Global Ekspresyon Profili

Doksorubisin dirençlilik ve toksisite mekanizmalarını daha fazla irdelemek için, maya hücrelerinin doksorubisin ile muamelesi sonucundaki global ekspresyon profilleri incelendi. 2 kattan daha fazla ekspresyon gösteren genler ( $p < 0.05$ ) ek tablo 1’de belirtildi. Mikroarray analizlerinin sonucuna göre, doksorubisinde dirençlilik gösteren genler eş-zamanlı PCR verileri ile paralel olarak, anlamlı bir artış gösterdi. Yaklaşık 6200 maya geninden 211’inin anlamlı olarak arttığı, 148’inin anlamlı olarak azaldığı gösterildi. Anlamlı olarak artış ve azalış gösteren genler, doksorubisin toleransında ve toksisitesinde rol oynayan yolların aydınlatılması için MIPS sınıflandırması ile kategorize edildi. (Tablo 2 ve 3).

Upregüle olan genlerin Funspec analizleri (Robinson vd., 2002), doksorubisin muamelesi ile transport-bağımlı detoksifikasyon sistemleri ve DNA restriksiyonu, integrasyonu ve rekombinasyonu gibi DNA metabolizması ile ilgili yolların upregüle olduğunu gösterdi. (Tablo 2.) .

**Tablo 2.** MIPS fonksiyonu sınıflandırması. Doksorubisin muamelesi ile 2-kattan fazla upregüle olan genler ( $p$  değeri cutoff : 0.01).



| Kategori                          | p-değeri  | Küme Kategorisi                          | k | f  |
|-----------------------------------|-----------|--|---|----|
| DNA restriksiyonu [10.01.09.03]   | 1.865e-05 | AI1 AI2 AI4 MMS4 MRE11                   | 5 | 12 |
| Detoksifikasyon [32.07]           | 0.003305  | ADH5 FZF1 TPO2 AZR1 YHK8 PDR18 PNT1 SVS1 | 8 | 80 |
| Mayoz bölünme [10.03.02.01]       | 0.006791  | REC104 MRE11 NDJ1                        | 3 | 13 |
| DNA integrasyonu [10.01.05.03.05] | 0.009102  | AI1 AI4                                  | 2 | 5  |

Taşıyıcılar (transportırlar) arasında (Ek Tablo 1 ve Tablo 2), poliamin taşıyıcısı *TPO2*, azol dirençlilik geni *AZR1*, ilaç:H(+) antiportör *YHK8*, pleotropik ilaç dirençlilik geni *PDR18* ve membran proteinleri *Pnt1* ve *Svs1*, doksorubisin varlığında upregüle oldu.

Doksorubisin muamelesi ile down-regüle olan genler fonksiyonel olarak kategorize edildiğinde, kategorize olan az sayıda gen bulundu (Tablo 3.). Genel olarak, demir taşıyıcılarının (*FIT1*, *FIT2* ve *FIT3*), şeker taşıyıcılarının (*HXT15*, *HXT13*, *HXT16* ve *HXT17*) ve proton bağımlı antiportırların (*KHA1* ve *ATO2*), doksorubisin muamelesi ile inhibe olduğu gösterildi.

**Tablo 3.** MIPS fonksiyonu sınıflandırması. Doksorubisin muamelesi ile 2-kattan fazla down-regüle olan genler (p değeri cut-off: 0.01).

| Kategori                                   | p-değeri  | Küme Kategorisi         | k | f  |
|--|-----------|-------------------------|---|----|
| iyon transportu [20.01.01]                 | 0.0003473 | FIT1 FIT2 FIT3          | 3 | 7  |
| şeker transportu [20.01.03.01]             | 0.004537  | HXT15 HXT13 HXT16 HXT17 | 4 | 31 |
| proton bağımlı antiportör [20.03.02.03.01] | 0.00948   | KHA1 ATO2               | 2 | 7  |

#### 4. TARTIŞMA

Bu çalışmada, maya model organizması kullanılarak, anti-kanser ajanı doksorubisine karşı dirençlilikte rol oynayan mekanizmaların aydınlatılması amaçlanmıştır. Yapılan analizler sonucu, 200µM doksorubisinden yüksek olan dozlar yabancı tip maya suşları için toksik olarak bulunmuştur. Maya genomik kütüphanesi ile yapılan taramalar, 300 µM, 400 µM ve 500 µM doksorubisin konsantrasyonlarında 4'er kere gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın, yüksek doz doksorubisin (500 µM) ile devam ettirilmesi ile, çok toksik doksorubisin seviyesinde dahi hücrelerin ilacı tolere edebilmesine neden olan genlerin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Genom düzeyinde taramalar sonucunda, 5 ayrı gen bölgesine ait 9 gen tespit edilmiştir. Bu genlerin ayrı ayrı klonlanıp, yabancı tip maya suşlarında yüksek seviyede eksprese edilmesi sonucu, yüksek doz doksorubisin dirençliliğinde rol oynayan genler *AKL1*, *CUE5*, *CAN1*, *YHR177w* ve *PDR5* olarak tespit edilmiştir.



*PDR5*, ATP-kaset taşıyıcı ailesine üyesi olup, birçok zenobiyotiğe, antifungal ilaca ve steroidlere karşı dirençlilikte rol oynamaktadır (Bauer vd., 1999; Leppert vd.,1990). İlaç stresinde olduğu kadar katyon dirençliliğinde de rol alan *PDR5* (Miyahara vd., 1996), aynı zamanda maya hücrelerinde lipid taşınmasında da görev almaktadır (Kihara ve Igarashi, 2004). *Pdr5*, memelilerdeki esas tümör dirençlilik faktörü olan *MDR1* geni ile benzerlik göstermektedir (ortoloğudur) (Gottesman, 2002). *PDR5* regülasyonu *PDR1* and *PDR3* transkripsiyon faktörleri ile regüle edilir. Bu faktörlerin delesyonları, *PDR5* ekspresyonunun kaybına neden olurken, *pdr1/3* fonksiyon kazanım mutasyonları *Pdr5* proteininin aşırı ekspresyonuna neden olmaktadır (Balzi vd., 1994; Gao vd., 2004; Katzmann vd., 1996).

Dışa atım pompası olarak *PDR5* geninin daha önce doksorubisin dirençliliğinde rol oynadığı gösterilmiştir. Golin ve arkadaşları, *pdr5Δ* mutantlarının 50μM Doksorubisin konsantrasyonunda büyüemediğini (Golin vd., 2003), Rogers ve arkadaşları ise *pdr5Δ* mutantlarının doksorubisine karşı hassas olduklarını göstermiştir. Kolaczowski ve arkadaşları (1996) *PDR5*'in aşırı ifadelendiği *pdr1-3* fonksiyon kazanımı mutantlarının, doksorubisin dirençli olduğunu ve *pdr5Δ* mutantlarının da ilaca hassasiyet gösterdiğini bulmuşlardır (Kolaczowski vd., 1996). Yeni yapılan bir çalışmada *pdr1-3* fonksiyon kazanım mutasyonunun, *PDR5* ile birlikte 26 geni upregüle ettiğini göstermiştir (DeRisi vd., 2000). Dolayısı ile bu mutantlardaki dirençlilik, diğer genlerin upregülasyonundan da kaynaklanabileceğini göstermektedir. Bu çalışmada, *PDR5* 'in direkt olarak aşırı ekspresyonunun doksorubisin dirençliliğini arttırdığı ve daha önceki çalışmaları da destekleyerek (Golin vd., 2003; Kolaczowski vd., 1996; Rogers vd., 2001), bu genin mutasyonunun, hücreleri daha hassas kıldığı gösterilmiştir. *PDR5*'in aşırı ifadelenmesi, tüm maya genomu tarandığında en dirençli fenotip olarak bulunmuştur.

Tüm genom düzeyi taramalarında, aşırı ifadelenmesinin doksorubisine karşı dirençlilik, yokluğunun ise doksorubisine karşı hassasiyet yarattığı bir diğer genin de *AKL1* olduğu bulunmuştur. Bir serin-treonin protein kinazı olan *Akl1*, endositozda ve aktin sitoskeletoninin organizasyonunda rol oynamaktadır (Henry vd., 2003). *Akl1*'in daha önce doksorubisin dirençliliğinde rol oynadığı gösterilmiştir (Westmoreland vd., 2009). *Sla1/Pan1/End3* kompleksi endositozda rol oynamakta ve *AKL1*'in aşırı ifadelenmesinden etkilenmektedir (Takahashi vd., 2006). *Akl1*, *Pan1* proteinini fosforlayarak, endositozda internalizasyon aşamasında rol oynayan maya *Sla1/Pan1/End3* kompleksinin ayrılmasına neden olmaktadır (Zeng vd., 2001). Kompleksin ayrılması, endositozun inhibisyonu ile sonuçlanmaktadır. Endositozdaki azalmanın, hücre içi doksorubisin birikiminde anlamlı bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir (Takahashi vd., 2006). Dolayısı ile, *Akl1p* aşırı ifadelenmesi sonucu oluşan doksorubisin direncinin, endositozdan başka bir mekanizma ile de sağlanıyor olabileceği düşünülmektedir. Örneğin, mayada *end4* endositoz mutantlarında, *Pdr5*



proteininin plazma membranında birikmesi (Egner vd., 1995; Kolaczowski vd., 1996), endositozdaki azalmanın, dirençlilikte indirekt etkilerinin olabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle, çalışmamızda, AKL1 aşırı ifadenmesinin yarattığı dirençliliğin Pdr5 proteininin varlığından etkilenip etkilenmeyeceği test edilmiş ve *pdr5Δ* mutantlarında AKL1'in aşırı ifadenmesinin doksorubisine karşı dirençlilik göstermediği bulunmuştur. Bu nedenle, daha fazla deney gerekmesine karşın, AKL1 geninin de doksorubisin dirençliliğinde PDR5 üzerinden etki edebileceği öngörülmektedir. Açık mekanizması tam bilinmemekle beraber, AKL1'in insan ortoloğu olan AAK1 geninin aşırı ifadenmesinin HeLa hücrelerinde doksorubisin dirençliliği sağlaması (Takahashi vd, 2006), AKL1'in doksorubisin dirençliliğindeki rolünün yüksek ökaryotlarda da korunduğunu düşündürmektedir.

*CAN1*, *YHR177W* ve *CUE5*, maya genomik kütüphanesi taraması sonucu, aşırı ekspresyonlarının doksorubisine dirençlilik sağladığı diğer genlerdir. Bu genlerin daha önce doksorubisin dirençliliği ile ilgisi literatürde gösterilmemiştir. Bu genlerin mutasyonlarının doksorubisine karşı hassasiyet sağlamaması, doksorubisine karşı dirençlilikte indirekt rollerinin olabileceğini düşündürmektedir. Örneğin, bir plazma membran permeazı, arjinin- H<sup>+</sup> simportırı olan Can1 proteini, özellikle lipid raft'lar ile assosiyedir (Malinska vd., 2003). *CAN1* geninin ifadenmesinin doksorubisin dirençliliğindeki rolü, plazma membranında filamental büyüme için gerekli genleri barındıran, ergosterolden zengin bölümlerde bulunmasından ötürü (Song ve Kumar, 2012), filamantal büyümeyi tetiklemesinden kaynaklı olabileceğini akla getirmektedir. Cue5 proteini, ubikütün bağlayan, intramoleküler monoubikütinasyonu sağlayan ve ubikütün-Atg8p adaptörü olarak ubikütün-bağımlı otofajide rol oynayan bir proteindir (Lu vd., 2014; Shih vd, 2003). Aynı zamanda Hsp70/Hsp104 bi-şaperon sistemi ile proteosomal degradasyon yada otofaji arası~da adaptör protein olarak da rol oynamaktadır (Miller vd., 2015). Dolayısı ile, *CUE5* kaynaklı doksorubisin dirençlilik mekanizması, proteozomal degradasyon yada otofaji üzerinden gerçekleşebileceği düşünülmektedir. *YHR177w*, aşırı ekspresyonunun hücre siklusu ertelenmesine yada durmasına yol açtığı, WOPR domainine sahip olan olası bir transkripsiyon faktörüdür (Lohse vd., 2014). WOPR domainine sahip proteinler, patogeneizde önem arz etmektedir (Lohse vd., 2014) ve *YHR177w* aşırı ifadenmesinin mayada invaziv büyümeye (psödohif oluşumu) yol açtığı gösterilmiştir (Shively vd., 2013). Dolayısı ile, *YHR177w* aşırı ekspresyonunun, invaziv büyümenin aktivasyonu ile doksorubisin dirençliliğinde rol oynayabileceği düşünülmektedir. Bazı dirençlilik mekanizmalarının bulunmasına karşın, bu proteinlerin doksorubisin dirençliliğindeki rollerinin anlaşılması için ileri çalışmalar gerekmektedir. Diğer yandan *pdr5Δ* ve *akl1Δ* mutantlarının doksorubisine karşı daha hassas bir fenotip sergilemeleri, bu genlerin bazal ekspresyon seviyelerinin de doksorubisin dirençliliğinde olası bir rol oynayabileceği düşünülmektedir.



*PDR5* aşırı ifadelenmesi en dirençli fenotipi oluşturduğundan, mayada çoklu-ilaç direncini belirleyen ve ortak bir protein tarafından regüle edilen *PDR5*, *SNQ2* ve *YOR1* genlerinin yokluğunda da *PDR5* aşırı ifadelenmesinin dirençlilik sağlayıp sağlamayacağı test edilmiştir. Oluşturulan suşlar, doksorubisine ile birlikte, Pdr5 substratı olduğu bilinen clatrimazole ve cerulenin ilaçlarında da denendi. *PDR5* aşırı ekspresyonu her 3 ilaca karşı hücre suşlarını dirençli kılmıştır. *Snq2Δ* ve *yor1Δ* mutantları yabancı tip ile benzer hassasiyeti gösterirken, *pdr1Δ* mutanlığı yabancı tipe göre daha hassas bir fenotip göstermiştir. *yor1Δ* mutantları daha önceki bir çalışmada doksorubisine karşı daha hassas olduğu bildirilmesine karşın (Rogers vd., 2001), bu çalışmada yapılan deneyler, *yor1Δ* mutantının yabancı tip ile benzer hassasiyette olduğunu göstermiştir. *pdr1Δ* mutanlığındaki *PDR5* aşırı-ekspresyonu, *PDR5*'i aşırı eksprese eden diğer suşlara göre daha az dirençlilik sağlamıştır. *pdr1Δ* mutantlarında *PDR5* ekspresyonu inhibe olduğundan, sadece plasmid üzerinden *PDR5* geni ekspresyonu sağlanmıştır. Bu nedenle, *PDR5*'i aşırı eksprese eden diğer suşlara göre daha az dirençli bir fenotip sergilemesi beklenen bir sonuç olarak değerlendirilmiştir.

Maya genom kütüphanesinin yanısıra, doksorubisin muamelesi ile regüle edilen genleri tüm maya genomunda belirlemek amaçlı mikroarray analizleri gerçekleştirilmiştir. Upregüle olan genlerden, Pdr18, membran taşıyıcı proteini olmasının yanısıra, membran sterol kompozisyonunu etkilemekte ve MDR fenotipinin oluşmasını sağlamaktadır (Cabrito vd., 2011). Upregüle genlerden *MRE1* (mayoz bölünme rekombinasyonu) ve *MMS4* (Metil Metan Sülfonat Sensitivitesi), DNA tamirinde rol oynamakta (Johzuka ve Ogawa, 1995; Xiao vd., 1998), ve doksorubisin hassasiyeti ile ilgili olduğu bilinen genlerdir (Brown vd., 2006; Xia vd., 2007). Downregüle olan genlere baktığımızda, demir metabolizması ile ilgili genler dikkat çekmektedir. Maya hücreleri, demir kısıtlamalarına, Aft1 transkripsiyon faktörünü aktive ederek *FIT1*, *FIT2* ve *FIT3* genlerinin ekspresyonu ile cevap vermektedir. Bu genler, hücre duvarına entegre olarak, siderophore-demir'i hücre duvarında tutmada görev yapmaktadır (Philpott vd., 2002). Demir, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimine neden olarak doksorubisin toksisitesinde rol oynadığından (Ichikawa vd., 2014); *FIT1*, *FIT2* ve *FIT3* genlerini inhibe ederek demir miktarını azaltmanın, doksorubisin toksisitesinde hücre için iyi bir defans sistemi olabileceği düşünülmektedir. Doksorubisin muamelesi ile down-regüle olan şeker taşıyıcıları genel olarak düşük affinite heksoz taşıyıcılarıdır ve ilaç yanıtındaki görevleri bilinmemektedir.

İyon taşıyıcıları olan *KHA1* ve *ATO2*, sırasıyla, K(+)/H(+) antiportörü ve amonya atıcısı olarak görev yapmaktadır (Maresova ve Sychrova, 2005; Vachova ve Palkova, 2005). *KHA1* inhibisyonu, K(+) birikimine neden olarak, membran potansiyelinin bozulmasına sebebiyet verebileceği ve doksorubisin taşınmasında yada savunmasında önem arz edebileceği düşünülmektedir. Ancak *kha1Δ* mutantlarında doksorubisin dirençliliğinin azaldığı bildirilmiştir





(Brown vd., 2006). Dolayısı ile *KHA1* geninin doksorubisin dirençliliğindeki rolü bilinmemektedir. Benzer olarak, amonyum aşırıya çıkması olan *ATO2* geninin transkripsiyon seviyesinin azalması ile doksorubisin dirençliliği arasındaki ilişki bilinmemektedir.

Bu çalışmada, maya genomik kütüphanesi kullanılarak yapılan genom-düzeyi taramalar ile mikroarray analizleri ile bulunan genler farklıdır. Mikroarray sonuçları ile yapılan eş-zamanlı PCR analizleri birbirini desteklemektedir. Her iki analizde de, genomik kütüphane taraması ile elde edilen genlerin ekspresyonları, doksorubisin muamelesi ile değişiklik göstermemektedir. Eş-zamanlı PCR ve mikroarray analizleri için hücreler, 80 µM Doksorubisin ile 2 saat muamele edilirken, genom-düzeyi taramalar 500 µM doksorubisin konsantrasyonunda gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin ilaca karşı fizyolojik yanıtları, ektopik gen ekspresyonu yanıtlarından farklı olabileceği için, farklı genlerin elde edilmesi çok şaşırtıcı bir sonuç değildir. Genomik kütüphane taramalarında bulunan genlerin, doksorubisinin minimum inhibe edici konsantrasyonu ile aktive olmamaları mümkündür. Diğer bir deyişle, mikroarray analizleri sonucu elde edilen genler, hücrelerin doksorubisine karşı verdiği ilk fizyolojik yanıtıdır. Daha uzun süreli yada daha yüksek konsantrasyonlarda ilaç muamelesinin, genom taramalarındaki genlerin yada bu genlerle ortak regülatörlere sahip farklı genlerin up-regüle ve down-regüle olmasına neden olabileceği düşünülmektedir.

## 5. SONUÇ

Bu çalışmada, doksorubisin dirençliliğinde rol oynayan genlerin bulunması amaçlanarak, maya genomik DNA kütüphanesi tarandı ve *PDR5* geninin, doksorubisin toleransında birincil olarak rol oynadığını gösterilmiştir. Yapılan taramalar ile, *AKL1*, *CAN1*, *YHR177W* ve *CUE5* gibi farklı genlerin de doksorubisin de rol oynadığını gösterilmiştir. Bulunan bu genlerin transkripsiyonel regülasyonlarının doksorubisine bağlı olmadığı ancak aşırı ekspresyonlarının *S. Cerevisiae* hücrelerini yüksek doz doksorubisine karşı dirençli kıldığı bulunmuştur. Maya genom kütüphanesi taramalarına ek olarak, maya hücrelerinin doksorubisin muamelesi sonucu global gen ekspresyonu profilleri analiz edilmiş ve doksorubisin toleransında/ toksisitesinde önem arz edebilecek genler ve yollar belirlenmiştir. Sonuçlar, doksorubisin varlığında DNA metabolizma ile ilgili genlerin upregüle



olduğunu ve bu genlerin doksorubisin detoksifikasyonu/toleransında fonksiyon gösterebileceğini göstermiştir.

Genom kütüphanesi taramalarından elde edilen genler göz önünde bulundurulduğunda, Cue5 dışındaki genlerin ortak mekanizmasının, membran asimetrisini etkilemeleri olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla, hücre membran kompozisyonunun değişiminin, hücrelerin yüksek doksorubisin seviyesine karşı temel yanıtı olabileceği düşünülmüştür.

Yapılan bu çalışma ile, doksorubisin dirençliliği ile ilgili olabilecek daha önce tanımlanan ve tanımlanmayan genler literatüre kazandırılmıştır. Bu genlerin bazılarının ilaç dirençliliğinde oynadığı roller bilinmemektedir. İleriki çalışmalar ile daha detayli analizler yapılarak, bu mekanizmalar aydınlatılabilir.

## EKLER

**Ek Tablo 1.** Doksorubisin muamelesi sonucu global maya genomu mikroarray analiz sonuçları.

## KAYNAKLAR

- Allen, J.D., Brinkhuis, R.F., Wijnholds, J., Schinkel, A.H. 1999. "The mouse Bcrp1/Mxr/Abcp gene: amplification and overexpression in cell lines selected for resistance to topotecan, mitoxantrone, or doxorubicin", *Cancer Res*, **59**(17), 4237-41.
- Balzi, E., Wang, M., Leterme, S., Van Dyck, L., Goffeau, A. 1994. "PDR5, a novel yeast multidrug resistance conferring transporter controlled by the transcription regulator PDR1", *J Biol Chem*, **269**(3), 2206-14.
- Bauer, B.E., Wolfger, H., Kuchler, K. 1999. "Inventory and function of yeast ABC proteins: about sex, stress, pleiotropic drug and heavy metal resistance", *Biochim Biophys Acta*, **1461**(2), 217-36.
- Brown, J.A., Sherlock, G., Myers, C.L., Burrows, N.M., Deng, C., Wu, H.I., McCann, K.E., Troyanskaya, O.G., Brown, J.M. 2006. "Global analysis of gene function in yeast by quantitative phenotypic profiling", *Mol Syst Biol*, **2**, 2006 0001.
- Bruce Alberts, A.J., Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter. 2008. "Cancer. in: *Molecular Biology of the Cell*", (Ed.) M.A. Sigrud Masson, Sherry Granum, Garland Science. UK.
- Cabrito, T.R., Teixeira, M.C., Singh, A., Prasad, R., Sa-Correia, I. 2011. "The yeast ABC transporter Pdr18 (ORF YNR070w) controls plasma membrane sterol composition, playing a role in multidrug resistance", *Biochem J*, **440**(2), 195-202.





- Chris H. Takimoto, E.C. 2008. Principles of Oncologic Pharmacotherapy,. 11<sup>th</sup> Ed. in: *Cancer Management: A Multidisciplinary Approach*. (Ed.) L.D.W. Daniel G. Haller, Kevin A. Camphausen, William J. Hoskins. UBM Medica.
- Cole, S.P., Bhardwaj, G., Gerlach, J.H., Mackie, J.E., Grant, C.E., Almquist, K.C., Stewart, A.J., Kurz, E.U., Duncan, A.M., Deeley, R.G. 1992. "Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line", *Science*, **258**(5088), 1650-4.
- Decottignies, A., Lambert, L., Catty, P., Degand, H., Epping, E.A., Moye-Rowley, W.S., Balzi, E., Goffeau, A. 1995. "Identification and characterization of SNQ2, a new multidrug ATP binding cassette transporter of the yeast plasma membrane", *J Biol Chem*, **270**(30), 18150-7.
- DeRisi, J., van den Hazel, B., Marc, P., Balzi, E., Brown, P., Jacq, C., Goffeau, A. 2000. "Genome microarray analysis of transcriptional activation in multidrug resistance yeast mutants", *FEBS Lett*, **470**(2), 156-60.
- Egner, R., Mahe, Y., Pandjaitan, R., Kuchler, K. 1995. "Endocytosis and vacuolar degradation of the plasma membrane-localized Pdr5 ATP-binding cassette multidrug transporter in *Saccharomyces cerevisiae*", *Mol Cell Biol*, **15**(11), 5879-87.
- Enger Eldon, F.R., David B. Bailey. 2007. Cell Division-Replication and Reproduction. 12th ed. in: *Concepts in Biology*, McGraw-Hill.
- Furuchi, T., Takahashi, T., Tanaka, S., Nitta, K., Naganuma, A. 2004. "Functions of yeast helicase Ssl2p that are essential for viability are also involved in protection from the toxicity of adriamycin", *Nucleic Acids Res*, **32**(8), 2578-85.
- Gao, C., Wang, L., Milgrom, E., Shen, W.C. 2004. "On the mechanism of constitutive Pdr1 activator-mediated PDR5 transcription in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for enhanced recruitment of coactivators and altered nucleosome structures", *J Biol Chem*, **279**(41), 42677-86.
- Gewirtz, D.A. 1999. "A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin", *Biochem Pharmacol*, **57**(7), 727-41.
- Golin, J., Ambudkar, S.V., Gottesman, M.M., Habib, A.D., Sczepanski, J., Ziccardi, W., May, L. 2003. "Studies with novel Pdr5p substrates demonstrate a strong size dependence for xenobiotic efflux", *J Biol Chem*, **278**(8), 5963-9.
- Gottesman, M.M. 2002. "Mechanisms of cancer drug resistance", *Annu Rev Med*, **53**, 615-27.
- Henry, K.R., D'Hondt, K., Chang, J.S., Nix, D.A., Cope, M.J., Chan, C.S., Drubin, D.G., Lemmon, S.K. 2003. "The actin-regulating kinase Prk1p negatively regulates Scd5p,



- a suppressor of clathrin deficiency, in actin organization and endocytosis", *Curr Biol*, **13**(17), 1564-9.
- Huang, R.Y., Kowalski, D., Minderman, H., Gandhi, N., Johnson, E.S. 2007. "Small ubiquitin-related modifier pathway is a major determinant of doxorubicin cytotoxicity in *Saccharomyces cerevisiae*", *Cancer Res*, **67**(2), 765-72.
- Ichikawa, Y., Ghanefar, M., Bayeva, M., Wu, R., Khechaduri, A., Naga Prasad, S.V., Mutharasan, R.K., Naik, T.J., Ardehali, H. 2014. "Cardiotoxicity of doxorubicin is mediated through mitochondrial iron accumulation", *J Clin Invest*, **124**(2), 617-30.
- Johzuka, K., Ogawa, H. 1995. "Interaction of Mre11 and Rad50: two proteins required for DNA repair and meiosis-specific double-strand break formation in *Saccharomyces cerevisiae*", *Genetics*, **139**(4), 1521-32.
- Katzmann, D.J., Hallstrom, T.C., Mahe, Y., Moye-Rowley, W.S. 1996. "Multiple Pdr1p/Pdr3p binding sites are essential for normal expression of the ATP binding cassette transporter protein-encoding gene PDR5", *J Biol Chem*, **271**(38), 23049-54.
- Katzmann, D.J., Hallstrom, T.C., Voet, M., Wysock, W., Golin, J., Volckaert, G., Moye-Rowley, W.S. 1995. "Expression of an ATP-binding cassette transporter-encoding gene (YOR1) is required for oligomycin resistance in *Saccharomyces cerevisiae*", *Mol Cell Biol*, **15**(12), 6875-83.
- Kihara, A., Igarashi, Y. 2004. "Cross talk between sphingolipids and glycerophospholipids in the establishment of plasma membrane asymmetry", *Mol Biol Cell*, **15**(11), 4949-59.
- Kolaczowski, M., van der Rest, M., Cybularz-Kolaczowska, A., Soumillon, J.P., Konings, W.N., Goffeau, A. 1996. "Anticancer drugs, ionophoric peptides, and steroids as substrates of the yeast multidrug transporter Pdr5p", *J Biol Chem*, **271**(49), 31543-8.
- Kule, C., Ondrejickova, O., Verner, K. 1994. "Doxorubicin, daunorubicin, and mitoxantrone cytotoxicity in yeast", *Mol Pharmacol*, **46**(6), 1234-40.
- Leppert, G., McDevitt, R., Falco, S.C., Van Dyk, T.K., Ficke, M.B., Golin, J. 1990. "Cloning by gene amplification of two loci conferring multiple drug resistance in *Saccharomyces*", *Genetics*, **125**(1), 13-20.
- Lohse, M.B., Rosenberg, O.S., Cox, J.S., Stroud, R.M., Finer-Moore, J.S., Johnson, A.D. 2014. "Structure of a new DNA-binding domain which regulates pathogenesis in a wide variety of fungi", *Proc Natl Acad Sci U S A*, **111**(29), 10404-10.
- Longhurst, T.J., O'Neill, G.M., Harvie, R.M., Davey, R.A. 1996. "The anthracycline resistance-associated (ara) gene, a novel gene associated with multidrug resistance in a human leukaemia cell line", *Br J Cancer*, **74**(9), 1331-5.
- Longley, D.B., Johnston, P.G. 2005. "Molecular mechanisms of drug resistance", *J Pathol*, **205**(2), 275-92.



- Lu, K., Psakhye, I., Jentsch, S. 2014. "Autophagic clearance of polyQ proteins mediated by ubiquitin-Atg8 adaptors of the conserved CUET protein family", *Cell*, **158**(3), 549-63.
- Malinska, K., Malinsky, J., Opekarova, M., Tanner, W. 2003. "Visualization of protein compartmentation within the plasma membrane of living yeast cells", *Mol Biol Cell*, **14**(11), 4427-36.
- Maresova, L., Sychrova, H. 2005. "Physiological characterization of *Saccharomyces cerevisiae* kha1 deletion mutants", *Mol Microbiol*, **55**(2), 588-600.
- Miller, S.B., Mogk, A., Bukau, B. 2015. "Spatially Organized Aggregation of Misfolded Proteins as Cellular Stress Defense Strategy", *J Mol Biol*.
- Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., Gianni, L. 2004. "Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity", *Pharmacol Rev*, **56**(2), 185-229.
- Miyahara, K., Mizunuma, M., Hirata, D., Tsuchiya, E., Miyakawa, T. 1996. "The involvement of the *Saccharomyces cerevisiae* multidrug resistance transporters Pdr5p and Snq2p in cation resistance", *FEBS Lett*, **399**(3), 317-20.
- O'Connor, R., Clynes, M., Dowling, P., O'Donovan, N., O'Driscoll, L. 2007. "Drug resistance in cancer - searching for mechanisms, markers and therapeutic agents", *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, **3**(6), 805-17.
- Omura, S. 1981. "Ceruleinin", *Methods Enzymol*, **72**, 520-32.
- Philpott, C.C., Protchenko, O., Kim, Y.W., Boretsky, Y., Shakoury-Elizeh, M. 2002. "The response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*: expression of siderophore-based systems of iron uptake", *Biochem Soc Trans*, **30**(4), 698-702.
- Robinson, M.D., Grigull, J., Mohammad, N., Hughes, T.R. 2002. "FunSpec: a web-based cluster interpreter for yeast", *BMC Bioinformatics*, **3**, 35.
- Rogers, B., Decottignies, A., Kolaczowski, M., Carvajal, E., Balzi, E., Goffeau, A. 2001. "The pleiotropic drug ABC transporters from *Saccharomyces cerevisiae*", *J Mol Microbiol Biotechnol*, **3**(2), 207-14.
- Schenk, P.W., Brok, M., Boersma, A.W., Brandsma, J.A., Den Dulk, H., Burger, H., Stoter, G., Brouwer, J., Nooter, K. 2003. "Anticancer drug resistance induced by disruption of the *Saccharomyces cerevisiae* NPR2 gene: a novel component involved in cisplatin- and doxorubicin-provoked cell kill", *Mol Pharmacol*, **64**(2), 259-68.
- Shih, S.C., Prag, G., Francis, S.A., Sutanto, M.A., Hurley, J.H., Hicke, L. 2003. "A ubiquitin-binding motif required for intramolecular monoubiquitylation, the CUE domain", *EMBO J*, **22**(6), 1273-81.



- Shively, C.A., Eckwahl, M.J., Dobry, C.J., Mellacheruvu, D., Nesvizhskii, A., Kumar, A. 2013. "Genetic networks inducing invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae* identified through systematic genome-wide overexpression", *Genetics*, **193**(4), 1297-310.
- Shukla, A., Hillegass, J.M., MacPherson, M.B., Beuschel, S.L., Vacek, P.M., Pass, H.I., Carbone, M., Testa, J.R., Mossman, B.T. 2010. "Blocking of ERK1 and ERK2 sensitizes human mesothelioma cells to doxorubicin", *Mol Cancer*, **9**, 314.
- Simunek, T., Sterba, M., Popelova, O., Adamcova, M., Hrdina, R., Gersl, V. 2009. "Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron", *Pharmacol Rep*, **61**(1), 154-71.
- Singh, S.V., Nair, S., Ahmad, H., Awasthi, Y.C., Krishan, A. 1989. "Glutathione S-transferases and glutathione peroxidases in doxorubicin-resistant murine leukemic P388 cells", *Biochem Pharmacol*, **38**(20), 3505-10.
- Slovak, M.L., Ho, J.P., Cole, S.P., Deeley, R.G., Greenberger, L., de Vries, E.G., Broxterman, H.J., Scheffer, G.L., Scheper, R.J. 1995. "The LRP gene encoding a major vault protein associated with drug resistance maps proximal to MRP on chromosome 16: evidence that chromosome breakage plays a key role in MRP or LRP gene amplification", *Cancer Res*, **55**(19), 4214-9.
- Song, Q., Kumar, A. 2012. "An Overview of Autophagy and Yeast Pseudohyphal Growth: Integration of Signaling Pathways during Nitrogen Stress", *Cells*, **1**(3), 263-83.
- Susmita Mondal, S.B., Mrinal K. Ghosh, Sibabrata Mukhopadhyay, Siddhartha Roy, Chitra Mandal. 2012. "Natural Products: Promising Resources for Cancer Drug Discovery", *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, **12**, 49-75.
- Szybalski, W., Bryson, V. 1952. "Genetic studies on microbial cross resistance to toxic agents. I. Cross resistance of *Escherichia coli* to fifteen antibiotics", *J Bacteriol*, **64**(4), 489-99.
- Takahashi, T., Furuchi, T., Naganuma, A. 2006. "Endocytic Ark/Prk kinases play a critical role in adriamycin resistance in both yeast and mammalian cells", *Cancer Res*, **66**(24), 11932-7.
- Takahashi, T., Furuchi, T., Naganuma, A. 2005. "A novel role for Bsd2 in the resistance of yeast to adriamycin" *J Cell Physiol*, **202**(1), 100-4.
- Takahashi, T., Hirose, K., Mizutani, E., Naganuma, A. 2009. "Dysfunctional nascent polypeptide-associated complex (NAC) activity in ribosomes enhances adriamycin toxicity in budding yeast", *J Toxicol Sci*, **34**(6), 703-8.
- Takahashi, T., Nakashima, S., Masuda, T., Yoneda, S., Hwang, G.W., Naganuma, A. 2011. "Overexpression of CLN1, CLN2, or ERG13 increases resistance to adriamycin in *Saccharomyces cerevisiae*", *J Toxicol Sci*, **36**(6), 855-7.



- Ueda, K., Clark, D.P., Chen, C.J., Roninson, I.B., Gottesman, M.M., Pastan, I. 1987. "The human multidrug resistance (mdr1) gene. cDNA cloning and transcription initiation", *J Biol Chem*, **262**(2), 505-8.
- Vachova, L., Palkova, Z. 2005. "Physiological regulation of yeast cell death in multicellular colonies is triggered by ammonia", *J Cell Biol*, **169**(5), 711-7.
- Westmoreland, T.J., Wickramasekara, S.M., Guo, A.Y., Selim, A.L., Winsor, T.S., Greenleaf, A.L., Blackwell, K.L., Olson, J.A., Jr., Marks, J.R., Bennett, C.B. 2009. "Comparative genome-wide screening identifies a conserved doxorubicin repair network that is diploid specific in *Saccharomyces cerevisiae*", *PLoS One*, **4**(6), e5830.
- Withoff, S., De Jong, S., De Vries, E.G., Mulder, N.H. 1996. "Human DNA topoisomerase II: biochemistry and role in chemotherapy resistance (review)", *Anticancer Res*, **16**(4A), 1867-80.
- Xia, L., Jaafar, L., Cashikar, A., Flores-Rozas, H. 2007. "Identification of genes required for protection from doxorubicin by a genome-wide screen in *Saccharomyces cerevisiae*", *Cancer Res*, **67**(23), 11411-8.
- Xiao, W., Chow, B.L., Milo, C.N. 1998. "Mms4, a putative transcriptional (co)activator, protects *Saccharomyces cerevisiae* cells from endogenous and environmental DNA damage", *Mol Gen Genet*, **257**(6), 614-23.
- Yoshida, Y., Aoyama, Y. 1991. "Sterol 14 alpha-demethylase and its inhibition: structural considerations on interaction of azole antifungal agents with lanosterol 14 alpha-demethylase (P-450(14DM)) of yeast", *Biochem Soc Trans*, **19**(3), 778-82.
- Zeng, G., Yu, X., Cai, M. 2001. "Regulation of yeast actin cytoskeleton-regulatory complex Pan1p/Sla1p/End3p by serine/threonine kinase Prk1p", *Mol Biol Cell*, **12**(12), 3759-72.
- Zhu, K., Henning, D., Iwakuma, T., Valdez, B.C., Busch, H. 1999. "Adriamycin inhibits human RH II/Gu RNA helicase activity by binding to its substrate", *Biochem Biophys Res Commun*, **266**(2), 361-5.

**TÜBİTAK  
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

|   |  |
|---|--|
| Proje Yürütücüsü:                       | Prof. Dr. AHMET KOÇ  |
| Proje No:                               | 114Z701  |
| Proje Başlığı:                          | Doksorubisin İlaç Dirençlilik Mekanizmalarının Genomik Yöntemlerle Tespit Edilmesi   |
| Proje Türü:                             | 1002 - Hızlı Destek  |
| Proje Süresi:                           | 12   |
| Araştırmacılar:                         |  |
| Danışmanlar:                            |  |
| Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: | İZMİR YÜKSEK TEKNOLOJİ ENS. FEN F. MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK B.  |
| Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:  | 15/11/2014 - 15/11/2015  |
| Onaylanan Bütçe:                        | 29927.0  |
| Harcanan Bütçe:                         | 28891.27   |
| Öz:                                     | <p>Doksorubisin, çeşitli kanser türlerinin tedavisinde kullanılan en etkili anti-kanser ajanlarından biridir fakat ilacın etkisi, ilaç dirençliliği mekanizmalarından ve ilacın sitotoksitesinden etkilenmektedir. Bu çalışmada, doksorubisin dirençliliğinde rol oynayan genlerin tespiti amaçlı, yüksek-kopya genomik kütüphane tarama analizleri gerçekleştirilmiş ve dirençlilikte rol oynayan bazı genler (CUE5, AKL1, CAN1, YHR177W ve PDR5) bulunmuştur. Bu genler arasında, PDR5 in aşırı ekspresyonu en güçlü dirençlilik fenotipini göstermiş ve aynı genin delesyonu ise ilaca karşı tolerans seviyesini düşürmüştür. Q-PCR analizleri, bu genlerin transkripsiyonel regülasyonlarının doxorubicin muamelesiyle artmadığını göstermiştir. Bunun üzerine maya hücrelerinin doksorubisin muamelesine bağlı global gen ekspresyon profilleri incelenmiş ve doksorubisin toleransında/toksitesinde rol oynayan gen ve yollar belirlenmiştir. Sonuçlarımız, birçok dışa-atım pompası ve DNA metabolizma genlerinin aktive olduğunu ve doksorubisin toleransı için gerekli olduğunu göstermiştir.</p> |
| Anahtar Kelimeler:                      | Doksorubisin, Saccharomyces cerevisiae, ilaç dirençliliği, genom-düzeyi tarama   |
| Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:  | Hayır  |