

Araştırma Makalesi

Mersin Univ Sağlık Bilim Derg 2025; 18(2):183-193

doi: 10.26559/mersinsbd.1609536

Kemoterapi dirençli over kanseri hücrelerinde VPS28 geninin CRISPR-Cas9 yöntemi ile susturulmasının cisplatin yanıtı üzerine etkileri

 Hale Güler Kara¹,  Eda Doğan²,  Vildan Bozok²,  Şerif Şentürk^{3,4},  Buket Kosova²

¹ Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye.

² Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı, İzmir, Türkiye.

³ İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi, İzmir, Türkiye.

⁴ Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir Uluslararası Biyotıp ve Genom Enstitüsü, İzmir, Türkiye.

Öz

Amaç: Günümüzde yumurtalık (over) kanseri kadınlarda halen yaygın olarak görülmekte ve jinekolojik kansere bağlı ölüm nedenlerinin başında gelmektedir. Tedavisinde sıklıkla kemoterapötik bir ajan olan cisplatin kullanılmakla birlikte, zamanla hastalarda cisplatine karşı direnç gelişmekte ve direnç gelişiminde genetik faktörlerin sorumlu olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada multiveziküler cisim biyogeneğinde etkin ESCRT-I kompleks bileşeni VPS28 geninin, over kanseri cisplatin direncindeki olası rolünün belirlenmesi amaçlanmıştır. **Yöntem:** Cisplatin dirençli A2780 over kanseri hücre serisinde VPS28 geni CRISPR-Cas9 yöntemiyle susturulduktan sonra proliferasyon, cisplatin yanıtı, apoptoz ve hücre döngüsü üzerine etkileri araştırılmıştır. **Bulgular:** Yapılan fonksiyonel analizler sonucunda, cisplatin dirençli over kanseri hücrelerinde VPS28 geninin susturulması ile cisplatin duyarlılığının arttığı, apoptozun indüklendiği ve hücre döngüsü S evresinde mitotik katastrofa neden olduğu belirlenmiştir. **Sonuç:** VPS28 geninin A2780 over kanseri hücrelerindeki kazanılmış cisplatin direncinde etkili olduğu ve susturulmasının, tedavisinde kullanılan cisplatin ile birlikte sinerjistik etki yarattığı gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Over kanseri, cisplatin direnci, VPS28, CRISPR-Cas9

Yazının geliş tarihi: 31.12.2024

Yazının kabul tarihi: 06.03.2025

Sorumlu yazar: Hale Güler Kara; Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye. Tel: 0414 3181996; E-mail: hale.guler@harran.edu.tr.

Effects of CRISPR-Cas9 silencing of VPS28 gene on cisplatin response in chemotherapy-resistant ovarian cancer cells

Abstract

Aim: Today, ovarian cancer is still common in women and is the leading cause of deaths from gynecologic cancer. Although cisplatin, a chemotherapeutic agent, is frequently used in the treatment, resistance to cisplatin develops in patients over time and genetic factors are known to be responsible for the development of resistance. In this study, it was aimed to determine the possible role of the ESCRT-I complex component *VPS28* gene, which is active in multivesicular body biogenesis, in ovarian cancer cisplatin resistance. **Method:** After silencing the *VPS28* gene in cisplatin-resistant A2780 ovarian cancer cells using the CRISPR-Cas9 method, the effects on proliferation, cisplatin response, apoptosis and cell cycle were investigated. **Results:** Functional analyses revealed that *VPS28* gene silencing in chemotherapy-resistant ovarian cancer increased cisplatin sensitivity, induced apoptosis, and caused mitotic catastrophe by arresting the cell cycle in the S phase. **Conclusion:** The *VPS28* gene has been shown to be involved in acquired cisplatin resistance in A2780 ovarian cancer cells, and its silencing has a synergistic effect with the cisplatin used in treatment.

Keywords: Ovarian cancer, cisplatin resistance, *VPS28*, CRISPR-Cas9

Giriş

Over kanseri, dünya genelinde kadınlarda en sık görülen ikinci jinekolojik malignite ve beş yıllık düşük sağkalım oranıyla karakterize agresif bir kanser türüdür.¹ Küresel kanser istatistikleri (Global Cancer Observatory, GLOBOCAN) verilerine göre 2022 yılında 324,398 yeni vakaya over kanseri tanısı konmuş ve 206,839 kişi de over kanserine bağlı olarak hayatını kaybetmiştir.² Over kanserinin %95'ten fazlasını epitelyal kanserler ve geriye kalanlarını da germ hücreli, seks kord stromal ve küçük hücreli yumurtalık kanserlerinden gelişen non-epitelyal maligniteler oluşturmaktadır.³ Epitelyal over maligniteleri de düşük dereceli seröz, yüksek dereceli seröz, mukoza, berrak hücreli ve endometrioid over kanseri olmak üzere beş farklı histopatolojik alt tipe ayrılmaktadır.⁴ Over kanseri çoğunlukla ileri evrelerde tespit edilmekte ve ilk tedavi seçenekleri arasında cerrahi müdahale ve kemoterapi yer almaktadır. Başlangıçta, cisplatin gibi platin-bazlı kemoterapötik ajanlara duyarlı olan over kanseri çoğunlukla nüks etmekte ve bazı olgularda cisplatine karşı direnç gelişmektedir.⁵ Gelişen cisplatin direncinde farklı genetik faktörler ve hücresel mekanizmalar rol oynayabildiğinden, yeni tedavi stratejilerinin

geliştirilmesinden önce bunların belirlenmesi gerekmektedir.^{6,7}

Cisplatin, çeşitli kanser türlerinin tedavisinde yaygın olarak kullanılan oldukça etkin kemoterapötik bir ajandır.⁸ Birinci nesil cisplatin ajanındaki [cis-dichlorodiammine platinum (II)] platin atomu, özellikle DNA'daki pürin kalıntılarından guanin bazının imidazol halkasında yer alan N7 pozisyonuna bağlanarak, DNA zincirinin içinde ya da DNA-DNA zincirleri arasında çapraz bağlar oluşturmaktadır.⁹ Bu çapraz bağlar da hücre döngüsünü G2 evresinde durdurarak, DNA replikasyonunu bloke etmekte ve apoptozu indüklemektedir.¹⁰ Ancak, tedavi sırasında gelişen içsel ya da edinilmiş ilaç direnci ve/veya çoklu organ toksisitesi cisplatinin terapötik etkinliğini sınırlamaktadır.¹¹

Son yıllarda, hücre için multiveziküler cisimlerin (MVC) tümör büyümesi, bağışıklık yanıtı ve ilaç direnci gibi kanser progresyonundaki önemli aşamaları, eksozomal ve/veya endosomal salgı yollarını düzenleyerek etkiledikleri ortaya konmuştur.¹² MVC oluşumunda rol oynayan endozomal ayırma kompleksi (ESCRT) endositoz yoluyla plazma membran proteinlerini düzenleyip, yeni sentezlenen

membran proteinlerini trans-Golgi vezikülleriyle endozomlara, lizozomlara ya da plazma zarına yönlendirmektedir.¹³ ESCRT kompleksi işlevsel olarak beş farklı (ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III ve Vps4) membran protein kompleksinden oluşmaktadır.¹⁴ ESCRT-I kompleksi TSG101, VPS28, VPS37 ve MVB12 proteinlerinin meydana getirdiği bir heterotetramerdir. VPS28 alt birimi sitokinez, otofaji ve zar onarımını destekleyen hücresel süreçlerde kritik bir öneme sahiptir.¹⁵ Yakın zamanlarda, ESCRT kompleks bileşenlerinin kanser tedavisindeki kullanılabilirlikleri de araştırılmaya başlanmıştır; örneğin, *VPS28* gen ekspresyonunun çeşitli kanser türlerinde arttığı bilinmektedir.¹⁶ Bu nedenle, çalışmamızda over kanserindeki kazanılmış cisplatin direncinde *VPS28* geninin kemoterapötik hedef olarak kullanılabilirliğini ve susturulmasının cisplatin yanıtı üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Hücre kültürü

Over kanseri hücre modeli olarak cisplatine duyarlı A2780 (Sigma, #93112519), cisplatine dirençli A2780cis (Sigma, #93112517) ve lentivirüs üretimi ile paketlenmesi için insan embriyonik böbrek 293T hücre serisi hücreleri (HEK293T; CRL-3216™, ATCC) kullanılmıştır. Cisplatine dirençli A2780cis hücreleri CR-A2780 (Cisplatin Resistant - A2780) olarak adlandırılmıştır. A2780 ve CR-A2780 hücreleri için RPMI1640 (Gibco™) besiyeri kullanılırken, HEK293T hücreleri için DMEM (Gibco™) besiyeri kullanılmış, %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin ile %1 L-glutamin eklendikten sonra 37°C, %5 CO₂ ve % 95 nemli etüvde inkübe edilmiştir. Cisplatin (#13119, Cayman Chemical) ve puromisin (#ant-pr-1, Invivogen) temin edildikten sonra kullanılabildiği kadar -20°C'de saklanmıştır. Hücreler düzenli olarak Hoechst boyaması ile mikoplazma kontaminasyonu açısından kontrol edilmiştir.

Cisplatin direnç analizi

Cisplatine dirençli CR-A2780 hücrelerine 1-30 µM konsantrasyon

aralığında cisplatin uygulanarak cisplatin hatırlatması yapılmıştır. Cisplatinin, dirençli hücreler üzerine uzun süreli etkisini belirlemek amacıyla koloni oluşumu analizi gerçekleştirilmiştir. Bunun için, A2780 ve CR-A2780 hücreleri 7.5×10^3 hücre/kuyucuk olacak şekilde 6-kuyucuklu plakalara ekilmiş, ertesi gün 5-10-25-50-100 µM cisplatin dozları 48 saat süreyle uygulanmıştır. Ardından cisplatin içermeyen besiyeri verilen hücreler 14 gün boyunca koloni oluşumu için takip edilmiştir. Cisplatin uygulanmayan kontrol gruplarında yeterli sayıda koloni oluşumu gözlemlendiğinde üzerlerine soğuk asetik asit/metanol (1:3) ilave edilerek fikse edilmiş, %1'lik kristal viyole ile boyanarak manuel olarak koloni sayıları belirlenmiştir. A2780 ve CR-A2780 hücrelerinin hangi cisplatin konsantrasyonlarında koloni oluşumunun devam ettiği belirlenerek duyarlı ve dirençli hücreler arasındaki direnç kat-farkı değerlendirilmiştir.

Sitotoksikite analizi

Cisplatinin A2780 ve CR-A2780 hücreleri üzerine sitotoksik etkilerini ve hücrelerin %50'sini öldüren sitotoksik inhibitör konsantrasyonlarını (IC₅₀) belirlemek amacıyla sitotoksikite analizleri yapılmıştır. Bunun için, hücreler 6.2×10^3 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96-kuyucuklu plakalara ekilmiş, 24 saat inkübe edildikten ve besiyerleri aspire edildikten sonra, üzerlerine A2780 hücreleri için 1-150 µM ve CR-A2780 hücreleri için de 4-300 µM doz aralıklarında hazırlanan cisplatin konsantrasyonları 3-tekrarlı olacak şekilde eklenmiştir. Cisplatin uygulanmayan hücreler kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir. 24., 48. ve 72. saatte XTT eklenerek formazan boya oluşumu Allsheng AMR 100 cihazında ölçülmüş, Graphpad Prism 8.0.2 (GrapPad Software, Inc) analiz programı kullanılarak cisplatinin IC₅₀ sitotoksik dozları hesaplanmıştır.

VPS28 geninin CRISPR-Cas9 yöntemi ile CR-A2780 hücrelerinde susturulması

VPS28 geni için Brunello kütüphanesinden seçilen rehber RNA (guide RNA; gRNA) TGTCCTCAGGTACGACAACA ve negatif kontrol olarak insan genomunda

herhangi bir geni hedeflemeyen *RLuc* (*Renilla reniformis* luciferase) *gRNA* GTAGCGCGGTGTATTATACC dizileri LentiCRISPR V2 vektörüne (#52961, Addgene, USA) klonlandıktan sonra ısı-şoku yöntemiyle bakterilere transfekte edilmiştir. Koloni PCR ve Sanger dizi analizi yöntemleriyle klonlanan diziler doğrulandıktan sonra vektörler HEK293T hücrelerinde lentivirüslere paketlenerek üretilmiştir. Bunun için, klonlanan *VPS28* ve *Renilla gRNA*'ları içeren lentiCRISPR V2 vektörlerinin yanında, psPAX2 (#12260, Addgene, USA) ve pMD2.G (#12259, Addgene, USA) paketleme vektörleri HEK293T hücrelerine polietilenimin ajanı ile transfekte edilmiştir. Transfeksiyondan 48 saat sonra lentivirüslerin içinde bulunduğu süpernatant toplanarak 0.45 µM' lik SFCA filtresinden geçirilerek saflaştırılmış, izole edilen virüsler eşit hacimlere bölünerek -86°C'de saklanmıştır. Hücreleri transdükte edecek virüs enfeksiyon çokluk oranının (MOI) belirlenmesi için ise 4 x 10⁵ hücre/kuyu CR-A2780 hücresi 6 kuyulu plaklara ekilerek 24 saat inkübe edilmiştir. Transfeksiyon verimliliğini artırmak için hücelere polibren (8 mg/ml) (#9268, Sigma) ile birlikte 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80 oranında lentivirüs dilüsyonları eklenmiştir.¹⁷ 48 saatlik transdüksiyondan sonra hücreler PBS ile yıkanarak enfekte hücrelerin seçilimi için 3 gün puromisin (1.5 µg/ml) uygulaması yapılmıştır. Puromisin seçiminden sonra transdüksiyon yüzdesini hesaplamak için hücreler kaldırılarak sayılmış, kontrole göre hücreleri enfekte eden MOI=0,5 (1/10) olan optimal virüs titresi belirlenmiştir.

Proliferasyon ve sitotoksosite analizi

Parental, *VPS28* geni susturulmuş [knock-out, (KO)] ve *Renilla* enfekte [negatif kontrol, (NK)] CR-A2780 hücrelerinde *VPS28* geninin esansiyel olup olmadığı hücre çoğalma hızlarına bakılarak analiz edilmiştir. Öncelikle, hücreler 96 kuyulu plakalarda farklı başlangıç sayılarıyla (1250, 2500, 5000, 10000, 20000 hücre/kuyu) ekilmiş, 72 saatlik inkübasyondan sonra XTT eklenmiş, Allsheng AMR-100 mikropalak okuyucusu kullanılarak 450 ve 620 nm'de hücre canlılığı fotometrik olarak ölçülmüştür. Ayrıca

parental, KO ve NK hücrelerinin günlük çoğalma oranları tripan mavisi boyama ile belirlenmiştir. Bunun için hücreler 4 x 10⁵ hücre/kuyu olacak şekilde 3'lü tekrarlar halinde 6 kuyulu plaklara ekilerek inkübasyona bırakılmıştır. 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrası hücreler kaldırılmış ve tripan mavisi boyası ile boyanarak sayılmıştır.

VPS28 geninin susturulmasının, CR-A2780 hücrelerinde cisplatin duyarlılığı üzerine etkisini belirlemek amacıyla sitotoksosite analizi gerçekleştirilmiştir. Kontrol ve negatif kontrol olarak sırasıyla parental ve *Renilla* enfekte (NK) CR-A2780 hücreleri kullanılmıştır. Tüm hücreler 96 kuyulu plaklara ekilerek 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından hücelere 3 tekrarlı olacak şekilde 4 µM, 8,5 µM, 19 µM, 37,5 µM, 75 µM, 150 µM ve 300 µM cisplatin konsantrasyonları uygulanmıştır. 48. ve 72. saatte formazan boya oluşumu Allsheng AMR-100 mikropalak okuyucusunda, 450 ve 620 nm dalga boylarında kalitatif ve fotometrik olarak ölçülmüştür. GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software, Inc) analiz programı kullanılarak hücrelerin IC₅₀ dozları hesaplanmıştır.

Apoptoz ve hücre döngüsü analizi

CR-A2780 hücrelerinde susturulan *VPS28* geninin apoptoz ve hücre döngüsü üzerine etkisini belirlemek amacıyla apoptoz ve hücre döngüsü analizi gerçekleştirilmiştir. Apoptoz ve hücre döngüsü analizleri sırasıyla BD Pharmingen™ FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit (#556570, BD) ve BD Cycletest Plus DNA Reagent Kit (#340242, BD) kullanılarak yapılmıştır. Parental, *VPS28*-KO ve *Renilla* enfekte CR-A2780 hücreleri 4 x 10⁵ hücre/kuyu olacak şekilde 6-kuyucuklu plaklara ekilerek 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından hücreler cisplatinin IC₅₀ ve daha düşük dozu ile 48 saat tedavi edilmiştir. Tedavi edilmemiş parental ve *Renilla* enfekte CR-A2780 hücreleri kontrol grupları olarak kullanılmıştır. BD Accuri-C6 (BD Biosciences, Germany) akım sitometri analizinden elde edilen sonuçlar Cflow Plus v1.0.264.15 yazılımı ile değerlendirilmiştir.

İstatistiksel Analiz

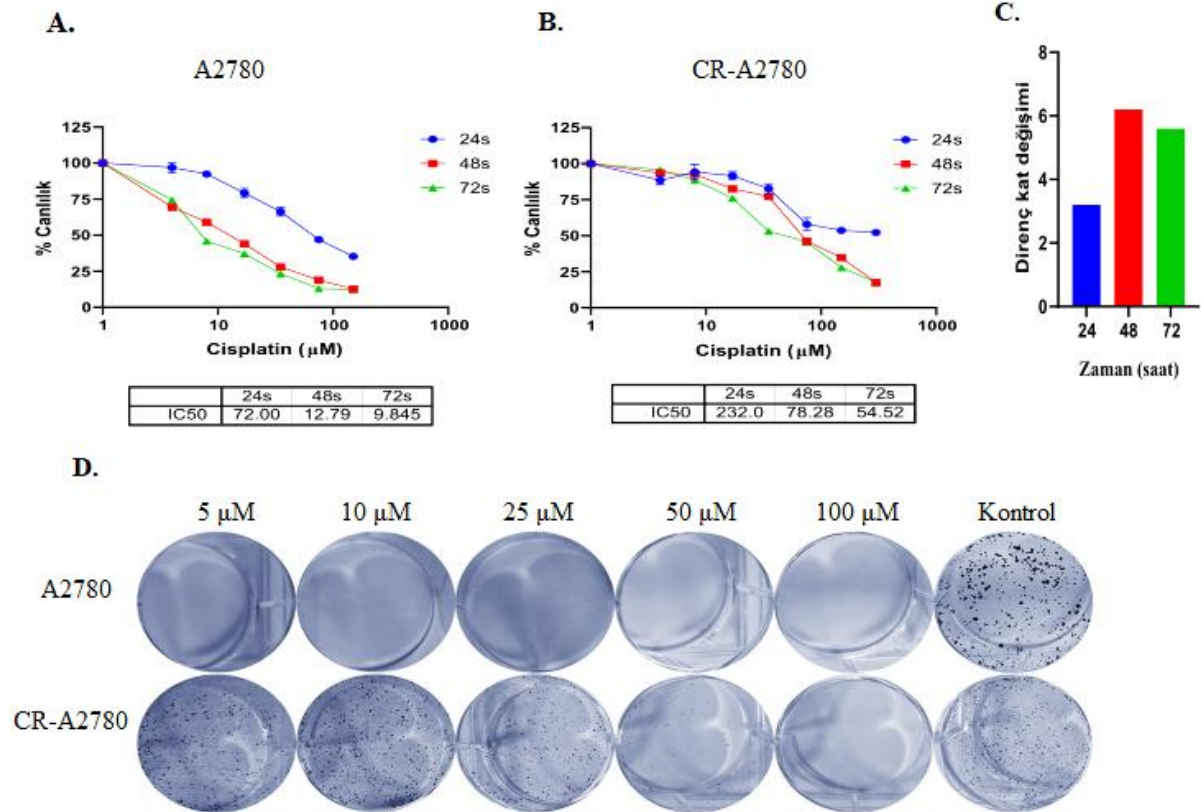
GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software, Inc.) analiz programı kullanılarak hücre gruplarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi (ortalama $\pm$ Standart sapma), Student's t-testi ve ANOVA testleri ile gerçekleştirilmiş, $p < 0,05$ olan veriler anlamlı kabul edilmiştir.

Bulgular

CR-A2780 hücrelerinin karakterizasyonu

A2780 hücre serisine 1 - 150 μM doz aralığında uygulanan cisplatin tedavisinin ardından cisplatinin A2780 hücreleri için belirlenen IC_{50} değerleri 24. saatte 72 μM , 48.

saatte 12,79 μM ve 72. saatte 9,8 μM iken 4-300 μM arasında değişen cisplatin konsantrasyonlarıyla tedavi edilen CR-A2780 hücreleri için elde edilen IC_{50} değerleri 24 saatte 232 μM , 48 saatte 78,28 μM ve 72 saatte 54,52 μM 'dır (Şekil 1 A-B). Buna göre, CR-A2780 hücrelerinin 24 saatte cisplatine 3,2- kat, 48 saatte 6,12- kat ve 72 saatte 5,5- kat daha dirençli olduğu görülmüştür (Şekil 1 C). Ayrıca CR-A2780 hücrelerinin direnç karakterizasyonu için yapılan koloni oluşum analizine göre; CR-A2780 hücrelerinin 50 μM cisplatin konsantrasyonuna bile dirençli olduğu ve sınırlı koloni oluşumunun devam ettiği belirlenirken duyarlı A2780 hücrelerinin ise hiç koloni oluşturmadığı görülmüştür (Şekil 1 D).



Şekil 1: CR-A2780 Hücrelerinin Cisplatin Direnç Karakterizasyonu. A) A2780 ve B) CR-A2780 hücrelerinin cisplatin tedavisi sonrası 24, 48 ve 72. saatlerde hücre canlılık grafiği. C) A2780 ve CR-A2780 hücreleri arasında 24, 48 ve 72. saatlerdeki cisplatin direnci kat farkı değişimi. D) 48 saat farklı cisplatin konsantrasyonları uygulanan A2780 ve CR-A2780 hücrelerinin koloni oluşumu

CR-A2780 hücrelerinde VPS28 geni esansiyel bir gen değildir

VPS28 geninin CR-A2780 hücrelerinde susturulmasının ardından ilgili genin esansiyel olup olmadığı hücre çoğalma hızlarına bakılarak analiz edilmiştir. Yapılan proliferasyon analiz sonuçlarına göre, CR-A2780 hücrelerinde VPS28 geninin proliferasyon hızı üzerine bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. (Şekil 2 A-B). Böylece VPS28 geninin over kanseri hücreleri için esansiyel bir gen olmadığı görülmüştür. Genomda herhangi bir yeri hedeflemeyen Renilla lentivirüsünün de proliferasyon üzerine etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.

CR-A2780 hücrelerinde VPS28 geninin susturulması cisplatin duyarlılığını artırır

CR-A2780 hücrelerinde VPS28 geninin susturulmasının cisplatin duyarlılığı üzerine etkisini belirlemek amacıyla sitotoksitesite testi gerçekleştirilmiştir. Parental CR-A2780, Renilla enfekte ve VPS28 KO CR-A2780 hücre serilerine 48 ve 72 saat süreyle 4 - 300 µM konsantrasyonlarında cisplatin tedavisi uygulanmasının ardından cisplatinin CR-A2780 hücre serisi üzerindeki IC₅₀ dozları; 48. saatte 72,62 µM, 72. saatte 52,73 µM, VPS28 KO CR-A2780 serisi üzerindeki IC₅₀ dozları 48. saatte 50,12 µM, 72. saatte 39,33 µM ve Renilla enfekte CR-A2780 serisi üzerindeki IC₅₀ dozları 48. saatte 74,97 µM, 72. saatte 56,76 µM olarak belirlenmiştir (Şekil 2 C). 48. ve 72. saat IC₅₀ sonuçlarına göre VPS28 geninin susturulmasının parental CR-A2780 hücrelerine göre cisplatin duyarlılığını sırasıyla 48 saatte ~1,45 -kat ve 72 saatte 1,34 -kat artırdığı belirlenmiştir. Genomda herhangi bir yeri hedeflemeyen Renilla lentivirüsünün sitotoksitesite üzerine etkisinin olmadığı görülmüştür.

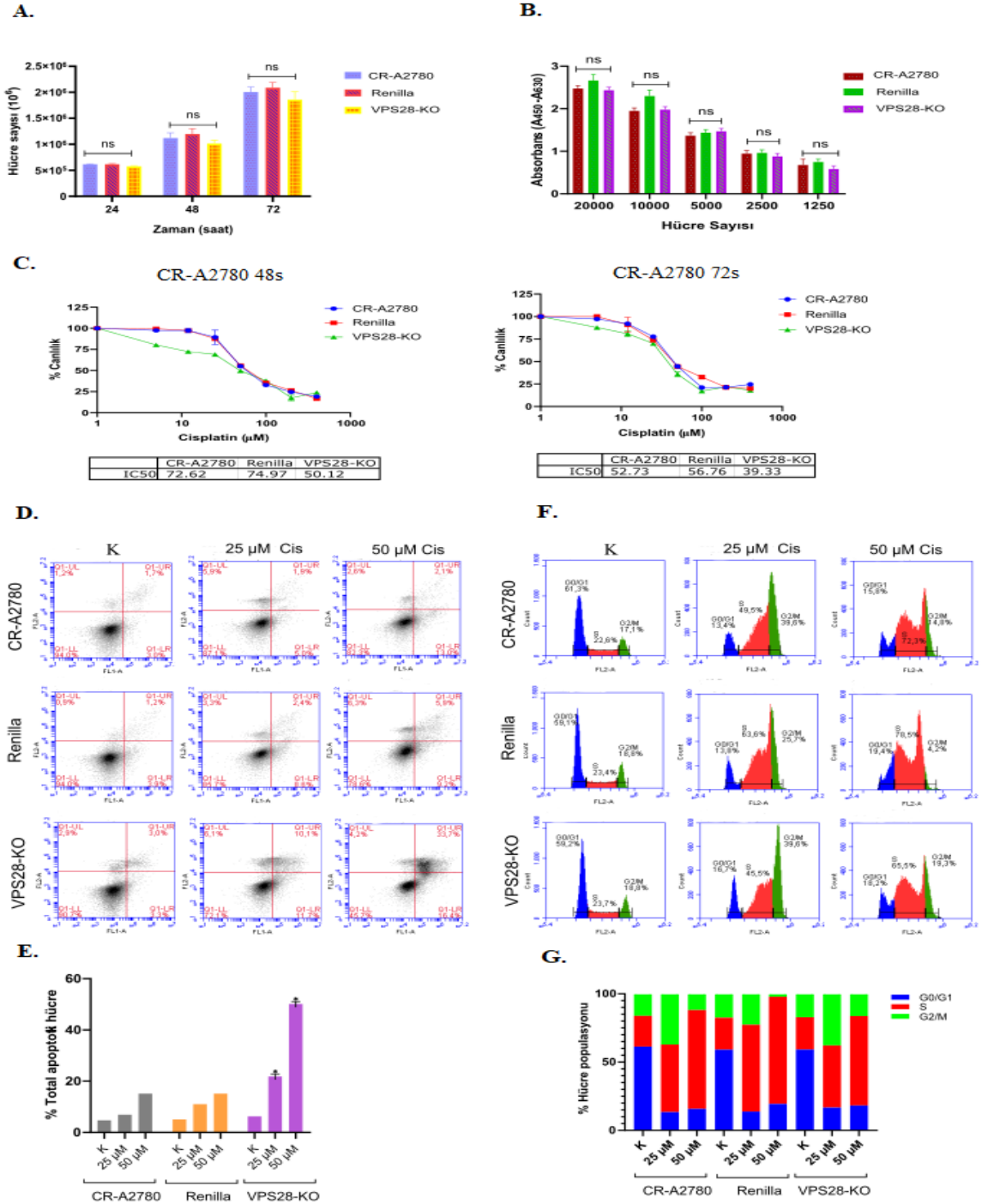
Cisplatin, VPS28 geni susturulmuş CR-A2780 hücrelerinde apoptozu indükler

CR-A2780 hücrelerinde susturulan VPS28 geninin apoptoz üzerine etkisini belirlemek amacıyla Annexin V - FITC yöntemi ile apoptoz analizi yapılmıştır. Yapılan analize göre; VPS28 KO CR-A2780 hücrelerinin apoptotik hücre oranı %6,3, Renilla enfekte hücrenin (NK) %5,1, parental

CR-A2780 hücrelerinin %4,7 olup sadece VPS28 geninin susturulmasının CR-A2780 hücrelerinde apoptoz üzerine bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Ancak 25 µM cisplatin tedavisi uygulanan VPS28 geni susturulmuş CR-A2780 hücrelerinin aynı doz ilaç uygulanmış parental hücre kontrolüne göre apoptotik hücre oranının 3,16-kat, ilaç uygulanmayan KO hücreye göre 3,46-kat arttığı belirlenmiştir. 50 µM cisplatin tedavisi uygulanan VPS28 KO CR-A2780 hücrelerinin aynı doz ilaç uygulanmış parental hücre kontrolüne göre apoptotik hücre oranının 3,32-kat, ilaç uygulanmayan KO hücreye göre ~8-kat arttığı belirlenmiştir (p<0,0001). Genomda herhangi bir yeri hedeflemeyen Renilla lentivirüsünün CR-A2780 hücrelerinde apoptoz üzerine etkisinin olmadığı görülmüştür (Şekil 2 D-E).

VPS28 geninin CR-A2780 hücrelerinde susturulması hücre döngüsü üzerine etkisizdir

CR-A2780 hücrelerinde susturulan VPS28 geninin hücre döngüsü üzerine etkisi hücre döngüsü analizi ile belirlenmiştir. Gerçekleştirilen hücre döngüsü analizlerinde cisplatin CR-A2780 hücrelerini hücre döngüsünün S evresinde durdurarak mitotik katastrofa neden olduğu ve bu durumun VPS28 geninin baskılanmasıyla değişmediği görülmüştür. VPS28 geninin susturulmasının ve genomda herhangi bir yeri hedeflemeyen Renilla lentivirüsünün CR-A2780 hücrelerinde hücre döngüsü üzerine bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 2 F-G).



Şekil 2: Over Kanseri Hücrelerinde VPS28 Geninin Validasyon Çalışmaları. A) CR-A2780, Renilla enfekte ve VPS28-KO CR-A2780 hücrelerinin günlük proliferasyon hızlarının tripan mavisi ile boyama sonuçları. B) CR-A2780, Renilla enfekte ve VPS28-KO CR-A2780 hücrelerinin 72. saat sonunda XTT ile absorbans ölçümü (ns: $p>0,05$). C) Cisplatin tedavisi sonrası VPS28-KO, Renilla enfekte ve parental CR-A2780 hücre serilerinin 48. ve 72. saat hücre canlılığı grafikleri. D) Annexin V yöntemine göre cisplatinin CR-A2780, Renilla enfekte ve VPS28-KO CR-A2780 hücre serileri üzerindeki apoptotik etkilerini gösteren akım sitometri görüntüleri (K: ilaç verilmeyen kontrol; LL: canlı hücre yüzde; LR: erken apoptotik hücre; UR: geç apoptotik hücre; UL: nekrotik hücre). E) Cisplatin uygulanmış CR-A2780, Renilla, VPS28-KO CR-A2780 hücrelerinde Annexin V yöntemine göre apoptotik etkileri gösteren kat değişim grafiği ($p<0,0001$). F) Cisplatinin CR-A2780, Renilla enfekte ve VPS28-KO CR-A2780 hücrelerinde hücre döngüsü üzerine etkilerini gösteren akım sitometri görüntüleri (K: ilaç verilmeyen kontrol grubu). G) CR-A2780, Renilla enfekte ve VPS28-KO CR-A2780 hücre serilerinde cisplatinin etkilediği hücre döngüsü evreleri ve yüzdeleri

Tartışma

Epitel, stroma veya germ hücreleri dahil olmak üzere overin farklı histolojik bölümlerinden kaynaklanan ve en sık görülen jinekolojik malignite türleri arasında yer alan over kanseri, geç tanı ve yüksek nüks ile karakterizedir.¹⁸ Over kanseri vakalarının %70'inden fazlası ileri evrede teşhis edilmekte olup evreye ve nedene bağlı 5 yıllık sağkalım oranları evre IV'te %20, evre III'te %40, evre II'de %70 ve evre I'de %90 arasında değişmektedir.¹⁹

Kanser tedavi yöntemleri arasında yer alan ve en sık kullanılan kemoterapide; hastalar ilk tedaviye yüksek oranda yanıt vermelerine rağmen zamanla tümör tekrar nüks etmekte ve standart tedavide kullanılan kemoterapötiğe karşı direnç gelişmektedir.²⁰ İçsel ve edinilmiş/kazanılmış olmak üzere iki şekilde gelişen ilaç direnci, kemoterapi başarısızlıklarının ana nedenini oluşturmaktadır.²¹ İçsel dirence sahip tümörler, başlangıçta kemoterapiye dirençli bir fenotip gösterirken, edinilmiş dirence sahip tümörlerin çoğu kemoterapiye yanıt vermekte ve daha sonra kullanılan ilaca karşı duyarsız hale gelmektedir. Bu yüzden içsel ve edinilmiş çoklu ilaç direnci, kemoterapinin etkinliğini sınırlamakta ve kanser tedavisinde ciddi sorunlara neden olmaktadır. Örneğin, over kanseri hastaların tedavisinde gelişen ilaç direnci ölümlerin ~%90'ından sorumludur.²² Cisplatin gibi platin bazlı bileşikler, over kanseri başta olmak üzere farklı kanser türlerinin tedavisinde ve adjuvan kemoterapide kullanılan kemoterapötiklerdir. Cisplatin DNA'da zincir içi ve zincirler arası çapraz bağların oluşumu nedeniyle replikasyonu bozmakta ve hücre döngüsünün durması ile birlikte apoptozun artmasına neden olmaktadır.²³ Cisplatin kanser vakalarında önemli yan etkiler oluştururken aynı zamanda gelişen ilaç direnci cisplatinin etkinliğinin düşmesine ve kanserin ilerlemesine sebep olmaktadır.⁴ Bu yüzden cisplatin direncinin üstesinden gelebilmek için dirençten sorumlu yeni genetik bileşenlerin belirlenmesi artmış tedavi aktivitesi ile sonuçlanacaktır.

CRISPR-Cas9 tabanlı genetik taramalar ile kanser hücrelerinin sağ kalımını arttıran, direnç oluşumuna neden olan ve yeni kemoterapötik hedef olarak kullanılacak genetik faktörler ve işlevleri belirlenebilmektedir.²⁴ Örneğin; "GeCKO kütüphanesi" kullanılarak yapılan tüm genom CRISPR-Cas9 genetik tarama çalışmasının sonucunda over kanserinde *SULF1* ve *ZNF587B* genlerinin cisplatin direnci gelişimine neden olduğu görülmüştür.²⁵ Malign plevral mezotelyoma kanser hücrelerinde tüm kinazları hedef alan bir CRISPR-Cas9 genetik tarama çalışması sonucunda hücre döngüsünde görevli *WEE1* kinaz inhibisyonunun cisplatin duyarlılığını artırdığı bildirilmiştir.²⁶ Bu şekilde yapılan CRISPR-Cas9 genetik taramalar ile farklı kanser türlerinde cisplatin direncine neden olan genetik bileşenler belirlenmiş ve bunların her kanser türünde farklılaştığı görülmüştür.

Son zamanlarda tüm hücre tipleri tarafından salınan ~20–1500 nm multiveziküller olan eksozomların anjiyogenez, migrasyon, hücre farklılaşması, invazyon, immun yanıt ve metastazı düzenleyerek kanser progresyonunda rol oynadıkları bilinmektedir.^{27,28} Ayrıca multiveziküler cisimlerin (MVC) aktif proteinler, RNA'lar ve diğer maddeleri içeren eksozomları seçici olarak yükleyerek hücreler arası ilaç direnci gelişiminde de etkili olduğu gösterilmiştir.¹² MCV'ler endolizozomal sistem yoluyla besinlerin, ligandların ve reseptörlerin taşınmasında görevli geç bir endozom türüdür. Membran yeniden şekillendirme olayını katalize eden ESCRT kompleksleri MCV biyogenezinde önemli bir fonksiyona sahiptir.²⁹ ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III ve Vps4 protein komplekslerinden oluşan ESCRT kompleksleri, lizozomlarda ubiquitinlenmiş membran proteinlerinin parçalanması için MCV oluşumunda, sitokinez sırasında orta cisim absisyonunda, viral tomurcuklanma sürecinde ve otofaji gibi birçok biyolojik yolakta rol oynamaktadır.^{30,31} ESCRT-I kompleksi, VPS23/TSG101, VPS28, VPS37 ve MVB12 alt birimlerinden oluşan bir heterotetramer yapıya sahiptir.³²

Kromozom 8q24.3 bölgesinde lokalize olan *VPS28*'in çeşitli kanserlerde kötü prognoza ilişkili olduğu bildirilmektedir.¹⁶ Kolorektal kanser hücrelerinde ESCRT-I kompleksini oluşturan TSG101 ve *VPS28* yokluğunun, MVC biyogenezinde ve kargo transportunda bozulmaya neden olarak endozomlarda ligand içermeyen sitokin reseptörlerinin birikmesine yol açtığı ve buna bağlı NF- κ B aracılı inflamatuvar yanıtı indüklediği gösterilmiştir.³³

Çalışmamızda cisplatin dirençli over kanseri hücresi olarak CR-A2780 kullanılmıştır. CR-A2780 hücrelerinde *VPS28* geni CRISPR-Cas9 gen düzenleme teknolojisi ile susturulmuştur. Bunun için *VPS28* genine özgü ekzon 5'i hedefleyen gRNA dizisi LentiCRISPR V2 plazmidine klonlanarak lentivirüslere paketlenmiş, ardından hücrelere transdükte edilmiştir. *VPS28* geni susturulan cisplatin dirençli hücrelerde *VPS28* geninin proliferasyon, cisplatin yanıtı, apoptoz, hücre döngüsü üzerine etkileri fonksiyonel analizlerle araştırılmıştır. Fonksiyonel çalışmalar sonucunda *VPS28* geninin susturulmasının over kanseri hücrelerinde cisplatin duyarlılığını artırdığı, cisplatin ile sinerjistik etki göstererek apoptozu indüklediği, hücre döngüsünün S evresinde durdurarak mitotik katastrofa neden olduğu belirlenmiştir.

Glioblastoma hücrelerinde GeCKO-V2 insan lentiviral kütüphanesi kullanılarak yapılan tüm genom CRISPR-Cas9 genetik tarama çalışmasında *VPS28*'in eksozom salgılanmasını artırarak hücre içi temozolomid konsantrasyonunu azalttığı ve buna bağlı temozolomid direnciyle ilişkili olduğu bildirilmiştir.³⁴ Elde edilen bulgular da over kanserinde *VPS28* baskılanmasının cisplatin yanıtını artırdığı görülmüştür. Bu yüzden *VPS28* geninin farklı kanser türlerinde farklı kemoterapötiklerle birlikte yeni tedavi seçeneği olabileceği düşünülmektedir. Ancak farklı biyolojik yolaklarda fonksiyon gösteren *VPS28*'in farklı kanserlerde cisplatin direnciyle ilişkisi henüz bilinmemektedir.

ESCRT-I kompleks bileşeni olan TSG101'in, enzimatik PARP1 aktivitesi ve

PAR'a bağlı DNA hasarı ile indüklenen NF- κ B aktivasyonu için gerekli olduğu belirlenmiştir. TSG101'e bağlı parilasyonun ve TSG101-PARP1 kompleks oluşumunun, TSG101'in ESCRT kompleksindeki rolünden bağımsız olduğu ve hücreleri DNA hasarına bağlı apoptozdan koruduğu gösterilmiştir. TSG101 eksikliği olan hücrelerde DNA onarımının ve apoptoz korumasının bozulduğu görülmüştür. TSG101 kaybının ayrıca meme kanserinde BRCA1/2 mutasyonları ile birlikte sentetik olarak öldürücü olduğu bildirilmiştir.³⁵ Buna göre TSG101 stabilizasyonunda görevli *VPS28*'inde onkogenik rolünün olabileceği düşünülmektedir. Yapılan başka bir çalışmada ise meme kanserinde miR-491-5p ile *VPS28* inhibisyonunun ardından apoptozun arttığı, hücre proliferasyonunun, invazyonunun ve migrasyonun baskılandığı görülmüştür. Bu nedenle *VPS28*'in meme kanser tedavinde onkojenik hedef olabileceği gösterilmiştir.¹⁶ Elde edilen sonuçlar doğrultusunda da over kanserinde *VPS28* geninin baskılanması apoptozu artırmaktadır. Sonuçlarımız literatürü destekler niteliktedir. Bu nedenle *VPS28* gibi ESCRT-I kompleks bileşenlerinin direnç mekanizmasının kırılabilmesi için yeni kemoterapötik hedefler olabileceği öngörülmektedir. *VPS28* geni ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmasından dolayı henüz kanserdeki etki mekanizması ve direnç gelişimindeki rolü net olarak bilinmemektedir. Bu yüzden özellikle direnç gelişimindeki rolünü tam olarak aydınlatılabilmek için in vitro ve in vivo araştırmalar planlanmaktadır.

Over kanseri tedavi sürecinde gelişen ilaç direnci hastalığın seyrini olumsuz etkilemektedir. Halen günümüzde direnç mekanizmasından sorumlu mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu yüzden yeni terapötik hedeflere ihtiyaç duyulmaktadır. Sonuç olarak yapılan çalışmada *VPS28* geninin over kanserinde cisplatin direncinin üstesinden gelebilecek, standart tedavide kullanılan anti-kanser ilaçları ile birlikte sinerjistik etki oluşturabilecek terapötik bir aday olabileceği düşünülmektedir. Kanserde *VPS28* geninin etki mekanizmasının ve

cisplatin direnci ile olan ilişkisinin daha net anlaşılabilmesi için transkriptom analizi, 3D-hücre kültürü ya da farklı model organizmalarda yapılacak in vivo çalışmalar gibi farklı çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

Yazar Katkısı: Fikir/Kavram: HGK, ED, BK, VB; Tasarım: HGK; Veri İşleme: HGK, ED; Analiz/Yorum: HGK, ED, BK, VB; Literatür İnceleme ve Makale Yazımı: HGK; Eleştirel İnceleme: BK, VB, ŞŞ.

Çıkar Çatışması: Yazarlar arasında çıkar çatışması yoktur.

Mali Destek: Bu çalışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 123Z193 Numaralı proje ile desteklenmiştir.

Teşekkür: Projeye verdiği destekten ötürü TÜBİTAK'a teşekkürlerimizi sunarız. Ayrıca laboratuvar çalışmalarında her türlü destek ve imkanı sağlayan Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Dr. Öğr. Üyesi Muzaffer Dükel'e teşekkür ederiz.

Kaynaklar

1. Solati A, Thvimi S, Khatami S, Shabaninejad Z, Malekzadegan Y, Alizadeh M, et.al. Non-coding RNAs in gynecologic cancer. *Clinica Chimica Acta*. 2023;551:117618.
2. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2024;74(3):229-63.
3. Lheureux S, Braunstein M, Oza AM. Epithelial ovarian cancer: evolution of management in the era of precision medicine. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2019;69(4):280-304.
4. Wang L, Zhao X, Fu J, Xu W, Yuan J. The role of tumour metabolism in cisplatin resistance. *Frontiers in molecular biosciences*. 2021;8:691795.
5. Köberle B, Tomicic MT, Usanova S, Kaina B. Cisplatin resistance: preclinical findings and clinical implications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*. 2010;1806(2):172-82.
6. Konstantinopoulos PA, Matulonis UA. Clinical and translational advances in ovarian cancer therapy. *Nature Cancer*. 2023;4(9):1239-57.
7. Zamwar UM, Anjankar AP. A etiology, epidemiology, histopathology, classification, detailed evaluation, and treatment of ovarian cancer. *Cureus*. 2022;14(10).
8. Makovec T. Cisplatin and beyond: molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer chemotherapy. *Radiology and oncology*. 2019;53(2):148-58.
9. Tchounwou PB, Dasari S, Noubissi FK, Ray P, Kumar S. Advances in our understanding of the molecular mechanisms of action of cisplatin in cancer therapy. *Journal of experimental pharmacology*. 2021;303-28.
10. Ranasinghe R, Mathai ML, Zulli A. Cisplatin for cancer therapy and overcoming chemoresistance. *Heliyon*. 2022;8(9).
11. Dasari S, Njiki S, Mbemi A, Yedjou CG, Tchounwou PB. Pharmacological effects of cisplatin combination with natural products in cancer chemotherapy. *International journal of molecular sciences*. 2022 ;23(3):1532.
12. Peng X, Yang L, Ma Y, Li Y, Li H. Focus on the morphogenesis, fate and the role in tumor progression of multivesicular bodies. *Cell Communication and Signaling*. 2020;18:1-5.
13. Liu CC, Liu YY, Zhou JF, Chen X, Chen H, Hu JH, et al. Cellular ESCRT components are recruited to regulate the endocytic trafficking and RNA replication compartment assembly during classical swine fever virus infection. *PLoS Pathogens*. 2022;18(2):e1010294.
14. Booth A, Marklew CJ, Ciani B, Beales PA. In vitro membrane remodeling by ESCRT is regulated by negative feedback from membrane tension. *Iscience*. 2019;15:173-84.
15. Minaidou A, Nicolaou P, Christodoulou K. Dereglulation of LRSAM1 expression impairs the levels of TSG101, UBE2N, VPS28, MDM2 and EGFR. *Plos one*. 2019;14(2):e0211814.
16. Shi W, Hu D, Xing Y, Zhuo R, Lao Q, Liu H, et al. Deciphering the oncogenic role of VPS28 modulated by miR-491-5p in breast cancer cells using in silico and functional analysis. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2021;8:634183.
17. Hu X, Wang Y. Protocol to identify receptors of secreted proteins through CRISPR-Cas9 whole-genome screening technology. *STAR protocols*. 2024; 20;5(4):103315.

18. O'Shea AS. Clinical staging of ovarian cancer. *Ovarian Cancer: Methods and Protocols*. 2022;3-10.
19. Garg V, Oza AM. Treatment of ovarian cancer beyond PARP inhibition: current and future options. *Drugs*. 2023;83(15):1365-85.
20. Ashrafizadeh M, Zarrabi A, Hushmandi K, Hashemi F, Moghadam ER, et al. Lung cancer cells and their sensitivity/resistance to cisplatin chemotherapy: Role of microRNAs and upstream mediators. *Cellular signalling*. 2021;78:109871.
21. Davodabadi F, Sajjadi SF, Sarhadi M, Mirghasemi S, Hezaveh MN, Khosravi S, et al. Cancer chemotherapy resistance: Mechanisms and recent breakthrough in targeted drug delivery. *European Journal of Pharmacology*. 2023;958:176013.
22. Eslami M, Memarsadeghi O, Davarpanah A, Arti A, Nayernia K, Behnam B. Overcoming chemotherapy resistance in metastatic cancer: A comprehensive review. *Biomedicines*. 2024 ;12(1):183.
23. Kryczka J, Kryczka J, Czarnecka-Chrebelska KH, Brzezińska-Lasota E. Molecular mechanisms of chemoresistance induced by cisplatin in NSCLC cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(16):8885.
24. Xue HY, Ji LJ, Gao AM, Liu P, He JD, Lu XJ. CRISPR-Cas9 for medical genetic screens: applications and future perspectives. *Journal of medical genetics*. 2016;53(2):91-7.
25. Ouyang Q, Liu Y, Tan J, Li J, Yang D, Zeng F, et al. Loss of ZNF587B and SULF1 contributed to cisplatin resistance in ovarian cancer cell lines based on Genome-scale CRISPR/Cas9 screening. *American journal of cancer research*. 2019;9(5):988.
26. Xu D, Liang SQ, Yang H, Bruggmann R, Berezowska S, Yang Z, et al. CRISPR screening identifies WEE1 as a combination target for standard chemotherapy in malignant pleural mesothelioma. *Molecular cancer therapeutics*. 2020;19(2):661-72.
27. Xu M, Ji J, Jin D, Wu Y, Wu T, Lin R, et al. The biogenesis and secretion of exosomes and multivesicular bodies (MVBs): Intercellular shuttles and implications in human diseases. *Genes & Diseases*. 2023;10(5):1894-907.
28. Hornung T, O'Neill HA, Logie S, Fowler KM, Duncan JE, Rosenow M, et al. ADAPT identifies an ESCRT complex composition that discriminates VCaP from LNCaP prostate cancer cell exosomes. *Nucleic acids research*. 2020;48(8):4013-27.
29. Fader CM, Colombo MI. Autophagy and multivesicular bodies: two closely related partners. *Cell Death & Differentiation*. 2009;16(1):70-8.
30. Mattissek C, Teis D. The role of the endosomal sorting complexes required for transport (ESCRT) in tumorigenesis. *Molecular membrane biology*. 2014;31(4):111-9.
31. Hurley JH. The ESCRT complexes. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. 2010;45(6):463-87.
32. Schmidt O, Teis D. The ESCRT machinery. *Current Biology*. 2012;22(4):R116-20.
33. Kolmus K, Erdenebat P, Szymańska E, Stewig B, Goryca K, Derezińska-Wołek E, et al. Concurrent depletion of Vps37 proteins evokes ESCRT-I destabilization and profound cellular stress responses. *Journal of cell science*. 2021;134(1):jcs250951.
34. Zhao J, Cui X, Zhan Q, Zhang K, Su D, Yang S, et al. CRISPR-Cas9 library screening combined with an exosome-targeted delivery system addresses tumorigenesis/TMZ resistance in the mesenchymal subtype of glioblastoma. *Theranostics*. 2024;14(7):2835.
35. Tufan AB, Lazarow K, Kolesnichenko M, Sporbert A, von Kries JP, Scheidereit C. TSG101 associates with PARP1 and is essential for PARylation and DNA damage-induced NF- κ B activation. *The EMBO Journal*. 2022;41(21):e110372