

Araştırma Makalesi

Mersin Üniv Sağlık Bilim Derg 2019;12(2):230-239

doi: 10.26559/mersinsbd.517361

Mitoz sırasında H₂O₂ ile indüklenen oksidatif strese karşı dirençte Yca1'in rolünün incelenmesi

Pınar Buket Atalay¹, Nur Kaluç¹

¹Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, İstanbul Türkiye

Öz

Amaç: Günümüzde başarıyla kullanılan antikanser ilaçlar antitümör etkilerini mikrotübüllerin yapısını bozup hücrelerde uzun süreli mitotik arreste yol açarak gösterirler. Uzun süreli mitotik arrestin sonuçlarından biri apoptozdur. Metakaspazlar, metazoan haricindeki canlılarda bulunan ve apoptozda önemli rol oynadıkları bilinen yapısal olarak kaspaz homologlarıdır. Bu çalışmada, *Saccharomyces cerevisiae*'de mikrotübülleri hedef alan antikanser ilaçlarla indüklenen mitotik arrestin oksidatif stres direncine etkisinin ve mayadaki tek metakaspaz olan Yca1'in bu etkideki olası rolünün araştırılması amaçlanmıştır. **Yöntem:** Bu amaç için, yabancı tip (YT) ve Yca1 delesyon mutant (*yca1Δ*) suşlarında mitotik arrest nocodazole veya carbendazim ile; G1-arrest ise alfa faktör ile tetiklenmiştir. Her iki suştaki protein agregat oluşumu ise cycloheximide muamelesi ile engellenmiştir. Bu koşullardan her biri altında 6 mM H₂O₂ ile indüklenen oksidatif stresin YT ve *yca1Δ* suşlardaki sağkalım üzerine etkisi koloni oluşturan birim (cfu) ve nokta ekim yöntemleriyle; reaktif oksijen türleri (ROT) birikimi üzerine etkisi ise H₂DCFDA yöntemiyle incelenerek karşılaştırılmıştır. **Bulgular:** Nocodazole veya carbendazim ile tetiklenen mitotik arrest YT *S.cerevisiae* hücrelerinde oksidatif stres direnci oluştururken, aynı koşullardaki *yca1Δ* suşunda ise direnç oluşturmadığı tespit edilmiştir. Diğer yandan, alfa faktörle tetiklenen G1-arrestin YT veya *yca1Δ* suşlarında oksidatif stres hassasiyeti üzerinde önemli bir etkisi olmadığı gözlenmiştir. Ayrıca, cycloheximide muamelesi ile protein agregat oluşumunun engellenmesinin *yca1Δ* suşunda YT suşa benzer şekilde mitotik arrest sonucu oksidatif stres direnci oluşmasına yol açtığı görülmüştür. **Sonuç:** Mikrotübülleri hedef alan antikanser ilaçlarla tetiklenen mitotik arrest YT *S.cerevisiae* hücrelerinde oksidatif stres direncine yol açar. Sadece mitozda gelişen bu dirençte Yca1'in protein agregat oluşumunu engelleme fonksiyonu önemli rol oynamaktadır. **Anahtar kelimeler:** Oksidatif stres direnci, mitotik arrest, Yca1, *Saccharomyces cerevisiae*

Yazının geliş tarihi: 24.01.2019

Yazının kabul tarihi:26.04.2019

Sorumlu Yazar: Dr.Öğr.Üyesi Pınar Buket Atalay, Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Marmara Eğitim Köyü 34857, Maltepe, İstanbul.

Tlf: 02166261050/2723, E-posta: pinar.demirel@maltepe.edu.tr

Investigating the role of Yca1 in resistance to H₂O₂-induced oxidative stress during mitosis

Abstract

Aim: The most successfully used anticancer drugs today exhibit their antitumor effects by causing a prolonged mitotic arrest through disrupting the structure of microtubules. One of the outcomes of the prolonged mitotic arrest is apoptosis. Metacaspases are the structural homologs of caspases that are found in living organisms other than metazoan and are known to play an important role in apoptosis. The aim of this study was to investigate the effect of mitotic arrest induced by microtubule-targeting anticancer drugs on oxidative stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae* and the possible role of Yca1, the only metacaspase in yeast, in this effect. **Methods:** For this purpose, mitotic arrest was induced by either nocodazole or carbendazim; G1-arrest was triggered by alpha factor in the wild type (WT) and Yca1 deletion mutant (*yca1Δ*) strains. Protein aggregation was prevented by cycloheximide treatment in both strains. Under each of these conditions, the effect of oxidative stress induced by 6 mM H₂O₂ on the viability of the WT and *yca1Δ* strains was evaluated by the colony forming unit (cfu) and spotting assays; accumulation of the reactive oxygen species (ROS) was evaluated and compared by the H₂DCFDA assay. **Results:** It was observed that mitotic arrest induced by nocodazole or carbendazim resulted in resistance to oxidative stress in WT *S.cerevisiae* cells, while the same conditions did not cause resistance to oxidative stress in *yca1Δ* cells. On the other hand, G1-arrest induced by alpha factor did not have a dramatic effect on the sensitivities of WT or *yca1Δ* strains to oxidative stress. Additionally, we observed that prevention of protein aggregation by the cycloheximide treatment led to oxidative stress resistance resulting from mitosis in the *yca1Δ* strain, similar to WT. **Conclusion:** Mitotic arrest induced by microtubule targeting anticancer drugs results in resistance to oxidative stress. In this resistance, which develops only in mitosis, function of Yca1 in the prevention of protein aggregation plays an important role.

Keywords: Oxidative stress resistance, Mitotic arrest, Yca1, *Saccharomyces cerevisiae*

Giriş

Günümüzde, kanser tedavisindeki en başarılı stratejilerden biri mitotik arrestin tetiklenmesidir. Kansere hücrelerinin mitoz evresinde arrest olmalarının sağlanması bu hücrelerin proliferasyonunu engeller. Ayrıca mitoz, hücrelerin radyasyon¹ ve çeşitli kimyasallar² gibi dış etkenlere karşı en hassas oldukları hücre döngüsü evresi olduğu için mitotik arrestin indüklenmesi, diğer bir deyişle hücrelerin mitozda geçirdikleri sürenin uzaması, kanser tedavisi açısından tercih edilen bir durumdur. Günümüzde akciğer, meme, yumurtalık, mesane, lenfoid ve baş-boyun kanserleri gibi birçok kanserin tedavisinde başarıyla kullanılan paklitaksel/ taxol, docetaxel ve vinka alkaloidleri (vinblastin, vinkristin) grubu antikanser ilaçlar antitümör etkilerini hücrelerde uzun süreli mitotik arreste yol açarak gösterirler.^{3, 4} Spesifik olarak, her iki grup antikanser ilaç da, iş ipliği

mikrotübüllerinin yapısını bozarak kinetokorlara doğru şekilde bağlanmalarını engeller. Bu durum hücrelerde mikrotübül-kinetokor bağlanmalarını denetleyen, mayadan insana kadar korunmuş ve “iş ipliği kontrol noktası (İKN)” denen majör bir kontrol noktasının sürekli aktivasyonuna yol açar.⁵ Antikanser ilaçla tetiklenen kronik İKN aktivasyonu ise hatalı bağlanmalar varlığında hücre bölünmesini (dolayısıyla yavru hücrelerde oluşabilecek anöploidiyi) engellemek için hata düzeltilene kadar hücrenin mitozda arrest olmasını sağlar.⁶

Hücrelerde üretilen reaktif oksijen türleri (ROT) ve antioksidan savunma mekanizmaları arasındaki dengenin, ROT üretimi lehine olacak şekilde bozulması oksidatif stres olarak tanımlanır.⁷ Pek çok kanser tipinde anormal derecede artan ROT üretimine bağlı olarak yüksek oksidatif stres oluştuğu bilinmektedir.⁸ Kansere hücrelerinde üretilen yüksek miktarlardaki ROT'nin proliferasyon, migrasyon ve sağ

kalım gibi önemli onkojenik özellikleri desteklediği gösterilmiştir.⁹ Ancak, antikanser ilaçlarla tetiklenen mitotik arrestin oksidatif stres direnci üzerine etkisiyle ilgili neredeyse hiçbir şey bilinmemektedir. Literatürde şimdiye kadar sadece bir çalışmada, carbendazim adı verilen antimotik ilaçla muamelenin *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerinde oksidatif strese karşı direnci Rad9'a bağlı olarak arttırdığı gösterilmiştir.¹⁰ Ancak, başka hangi proteinlerin, yolakların ya da hücresel süreçlerin direnç kazanımıyla ilişkili olduğunun ve/veya mitotik arrest ile oksidatif stres direnci arasındaki ilişkinin mekanizmasının araştırıldığı herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Kaspazlar, programlı hücre ölümünün düzenlenmesindeki önemli rolleriyle bilinen sistein proteazlar ailesine ait proteinlerdir.^{11,12} Tek hücreli canlılarda direkt olarak kaspaz homoloğu bulunmamakla birlikte, biyoinformatik analizler metazoan olmayan organizmalarda kaspazların yapısal homoloğu olan metakaspazların bulunduğunu ortaya koymuştur.¹³ Yca1, *S. cerevisiae*'de bulunan tek metakaspaz olarak tanımlanmıştır.¹⁴ Kaspazlara benzer şekilde, Yca1'in de programlı hücre ölümü uygulayıcı protein olmasının yanı sıra, bu görevinden bağımsız olarak kromozom segregasyonu ve yeniden düzenlenmesi, hatalı katlanmış/ zarar görmüş proteinlerin ortadan kaldırılarak protein homeostazının sağlanması gibi diğer vital fonksiyonları da bulunmaktadır.¹⁵⁻¹⁷ Yüksek ısı, ağır metaller ve oksidatif stres gibi çeşitli stres koşullarının proteinlerin hatalı katlanmasına sebep olduğu bilinmektedir. Hatalı katlanan proteinler ise anormal protein-protein etkileşimlerine girerek hücrede agregat oluşturur. Hatalı protein katlanmaları sonucu oluşan bu protein agregatları hücresel metabolizmayı ve protein dönüşümünü olumsuz etkiler. Protein agregatlarının oluşturduğu olumsuz etkiyi önlemek/ en aza indirmek için hücrelerde protein homeostazını koruyan çeşitli protein kalite kontrol mekanizmaları gelişmiştir. Protein kalite kontrol mekanizması elemanları öncelikle hatalı katlanmış proteini tekrar katlayarak tamir etmeyi hedefler, ancak hasar çok büyük ve geri çevrilemezse hatalı katlanmış proteinler

şaperonlar yardımıyla hızlıca degrade edilir.¹⁸ Protein kalite kontrol mekanizmasındaki bozuklukların hücre içinde protein agregat oluşumuna yol açarak nörodejenerasyon, tip 2 diyabet, demans, kistik fibroz, kanser ve kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok hastalığın oluşmasını veya ilerlemesini kolaylaştırdığı gösterilmiştir.¹⁹

Genomu ilk sekanslanan ökaryot olan *Saccharomyces cerevisiae*, insan genomuna gösterdiği yüksek homoloji, kültürünün hızlı ve düşük maliyetli oluşu, genetik manipülasyonunun kolay olması gibi nedenlerde DNA tamiri, yaşlanma, hücre döngüsü, otofaji, apoptoz, stres yanıtı gibi birçok önemli hücresel sürecin yanı sıra, antikanser ilaçlara direnç mekanizmaları ile moleküler ve hücresel kanser çalışmalarında yaygın olarak kullanılan, önemli ve avantajlı bir model olarak kabul edilmektedir.²⁰ Bu çalışmada literatürde ilk kez Yca1'in mitotik arrest sonucu oluşan oksidatif stres direnci üzerindeki etkisi ve bu etkinin Yca1'in hücredeki hangi rolü aracılığıyla gerçekleşiyor olabileceği *S. cerevisiae*'de araştırılmıştır. Bunun için öncelikle, iki farklı antimotik ilaç (nocodazole ve carbendazim) muamelesinin 6 mM H₂O₂ ile indüklenen oksidatif stres hassasiyetine etkisi ve bu etkinin mitotik arrest aracılığıyla olup olmadığı incelenmiştir. Daha sonra Yca1'in mitotik arreste bağlı olarak gelişen oksidatif stres direncindeki rolü araştırılmıştır. Son olarak ise Yca1'in mitotik arreste bağlı oksidatif stres direncindeki rolünün protein agregat oluşumunun engellenmesi aracılığıyla olup olmadığı test edilmiştir.

Yöntem

Suşlar ve kültür koşulları

Çalışmada kullanılan yabancıl tip (*MATa*; *his3Δ1*; *leu2Δ0*; *met15Δ0*; *ura3Δ0*; *PDS1-3HA-URA3*) ve *yca1Δ* mutant (*MATa*; *leu2Δ0*; *ura3Δ0*; *his3Δ0*; *met3Δ0*; *yca1::KANMX4*) *S. cerevisiae* suşları Dr. Daniel Burke (North Carolina State University, College of Sciences, Department of Biological Sciences) tarafından hediye edilmiştir. Maya hücreleri %2 (wt/vol) glukoz, %1 (wt/vol) maya özütü, %2

(wt/vol) pepton ve %2 (wt/vol) agar içeren YPD (Yeast Extract–Peptone–Dextrose) agar plaklarında muhafaza edilmiş, kültürleri ise sıvı YPD besiyeri (%2 (wt/vol) glukoz, %1 (wt/vol) maya özütü, %2 (wt/vol) pepton) içinde, 30°C’de ve 175 rpm’de çalkalanarak yapılmıştır.

Hücre döngüsü arresti ve oksidatif stres indüksiyonu

Mitotik arrest indüksiyonu için, erken mid-logaritmik faza kadar ($O.D_{600} \sim 0.3$) çoğaltılan YT ve *yca1Δ* suşlar 15 µg/ml nocodazole (Sigma-Aldrich) veya 35 µg/ml carbendazim (Sigma-Aldrich) ile mekanik çalkalayıcı üzerinde (175 rpm) 30°C’de üç saat (iki doubling time) inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda ışık mikroskobu altında %65’den fazla hücrenin “büyük tomurcuklu” fenotipi göstermesi durumunda mitotik arrest indüksiyonu başarılı sayılmıştır. G1 arrest indüksiyonu için ise, erken mid-log fazdaki yabancı YT ve *yca1Δ* suşlar asidik sıvı YPD besiyeri (pH=3.4) içerisinde 25 µg/ml alfa faktör ile 2.5 saat boyunca 30°C ve 175 rpm’de inkübe edilmiştir. Işık mikroskobunda %70’ten fazla hücrenin “tomurcuksuz” fenotipi göstermesi durumunda G1-arrest indüksiyonu başarılı sayılmıştır. Oksidatif stres indüksiyonu için ise nocodazole, carbendazim veya alfa faktörle muamele edilen ve edilmeyen YT ve *yca1Δ* kültürleri ($O.D_{600} \sim 0.8$) 3 saat boyunca 30°C ve 175 rpm’de 6 mM H₂O₂ ile inkübe edilmiş, aynı kültürlerin aynı süre 0 mM H₂O₂ inkübasyonları ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Protein translasyonu, dolayısıyla protein agregatlarının oluşması, 30 µg/ml cycloheximide (Sigma-Aldrich) ile bir saatlik inkübasyon sonucu engellenmiştir.

Reaktif oksijen türlerinin (ROT) tespiti

Intraselüler ROT seviyeleri H₂DCFDA ile daha önce belirtildiği gibi incelenmiştir.²¹ H₂DCFDA intraselüler peroksitlerin tespiti için yaygın olarak kullanılan bir ROT indikatörüdür. Hücreye pasif diffüzyon ile giren H₂DCFDA intraselüler ROT varlığında oksidasyona uğrayarak kuvvetli bir floresan olan DCF (dichlorofluorescein) e dönüşür²², dolayısıyla floresan mikroskop altında kolayca tespit edilebilir. H₂DCFDA ile intraselüler ROT seviyelerinin tespiti için

özetle, her bir örnekleme zamanında (0 ve 3 saat) toplanan 200 µl’lik örnekler, 200 µl taze YPD besiyeri içinde resüspanse edilmiştir. 10 µg/ml 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA; Molecular Probes) ile 30°C’de 40 dakika inkübe edilen örneklerden, inkübasyonun hemen ardından 5 µl alınarak mikroskop lamı üzerine damlatılmış ve floresan mikroskop altında (Leica DM1000 LED, Leica Microsystems, Germany) incelenmiştir. Her örnek için, her bir örnekleme zamanında en az 200 hücre incelenmiş ve “floresan” ve “floresan olmayan” olarak kategorize edilmiş, floresan DCF sinyali veren hücre yüzdeleri (%DCF pozitif hücre) grafiklenmiştir. Deney her suş için ikişer kez tekrar edilmiş ve ortalama %DCF pozitif sunulmuştur.

Nokta ekim ve koloni oluşturan birim (cfu) deneyleri

Nokta ekim deneyleri için her zamanlama noktasında her bir kültürün 10’ar kat seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Daha sonra her bir dilüsyondan alınan 5’er µl’lik örnekler YPD plaklara nokta şeklinde ekilmiş ve 30°C’de 2 günlük inkübasyonun ardından plakların fotoğrafları çekilmiştir. Her deney her bir suş için en az iki kere tekrar edilmiş ve temsili bir deneyin sonuçları rapor edilmiştir. Cfu belirlenmesi içinse, uygun dilüsyonlar YPD plaklara yayılarak ekilmiş ve 30°C’de iki günlük inkübasyonun ardından her bir plakta oluşan koloniler sayılmıştır. Her bir suştaki %cfu/ml her bir plaktaki cfu sayısı, dilüsyon faktörü ve plağa ekilen hacimle çarpılarak hesaplanmıştır. YT ve *yca1Δ* suşlarında 0 mM ve 6 mM H₂O₂ inkübasyonun 3. saatinde belirlenen %cfu/ml’in 0. saatte belirlenen %cfu/ml’e bölünerek cfu kat artışı belirlenmiş ve grafiklenmiştir. Deney her suş için ikişer kez tekrar edilmiş ve ortalama cfu kat artışı sunulmuştur.

Bulgular

Mitoz oksidatif strese karşı direnci artırır

Antikanser ilaçla tetiklenen mitotik arrestin, kanser hücrelerinde sıklıkla görülen artmış oksidatif strese karşı direnci etkileyip etkilemediğini araştırmak için, yabancı tip (YT) *Saccharomyces cerevisiae*

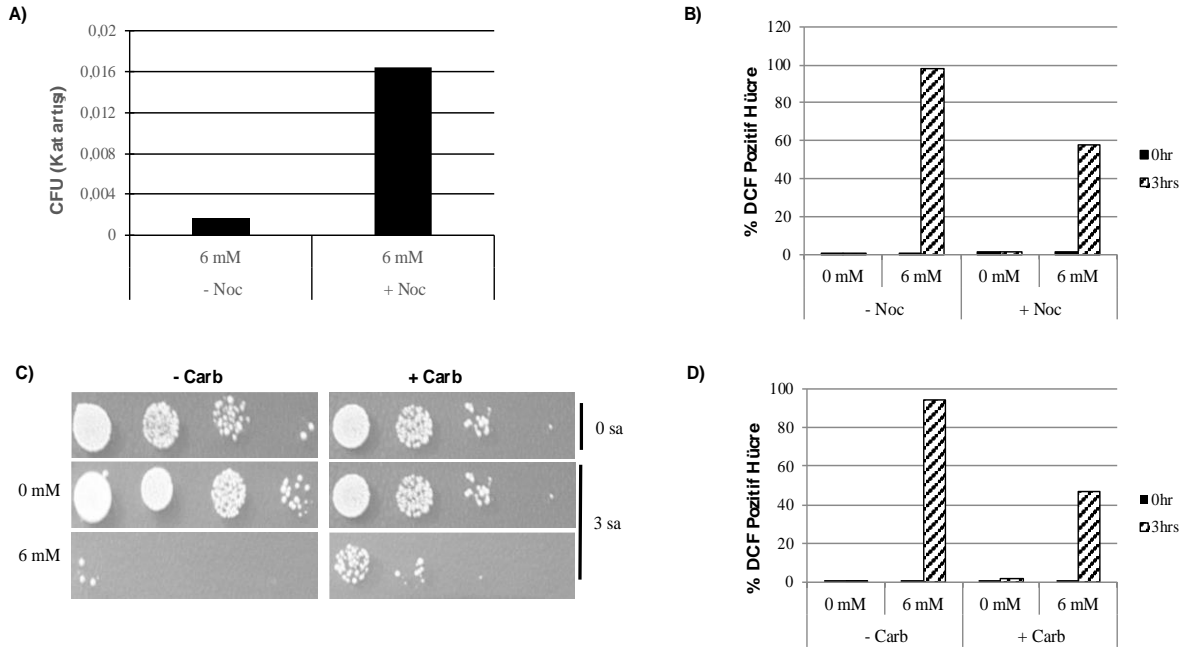
suşunda iki farklı antikanser ilaçla indüklenen mitotik arrestin 6 mM H₂O₂ ile tetiklenen oksidatif stres direnci üzerindeki etkisini inceledik (Şekil 1). Bunun için önce, erken mid-logaritmik faza kadar çoğaltılan YT *S. cerevisiae* kültürü ikiye bölünmüş ve nocodazole içeren (+Noc) ve içermeyen (-Noc) sıvı besiyeri içerisinde üç saat boyunca inkübe edilmiştir. +Noc ve -Noc inkübasyonlarının hemen ardından (0 sa), her iki kültür tekrar ikiye bölünerek 0 mM veya 6 mM H₂O₂ ile üç saat daha inkübe edilmiş ve kültürlerdeki sağ kalım oranları koloni oluşturan birim (cfu) deneyi ile incelenmiştir. Deney sonucunda, nocodazole muamelesi sonucu mitozda arrest olan kültürdeki cfu artışının (0.016), arrest olmayan kültürdekine kıyasla (0.0017) yaklaşık 10 kat daha fazla olduğu gözlenmiştir (Şekil 1A). Daha sonra +Noc ve -Noc ile muamele edilen kültürler ROT seviyeleri açısından H₂DCFDA deneyi ile incelenmiştir. Karboksi-H₂DCFDA, normalde floresan olmayan ancak ROT varlığında okside olarak floresan DCF ışımaya veren bir boyadır.²⁰ üç saatlik H₂O₂ muamelesinin ardından +Noc ve -Noc kültürlerdeki floresan DCF sinyali veren hücre yüzdeleri karşılaştırıldığında, cfu sonuçlarıyla uyumlu şekilde, +Noc kültürdeki %DCF pozitif oranının (%58.2) -Noc kültürdekine göre (%98) çok daha az olduğu gözlenmiştir (Şekil 1B).

Nocodazole muamelesinin sebep olduğu oksidatif stres direncinin ilacın kendisinden değil, mitotik arrest indüksiyonundan kaynaklandığını test etmek için, farklı bir antikanser ilaç olan carbendazim ile muamelesinin oksidatif stres direncine etkisini araştırdık. Bunun için yine erken mid-log faza çoğaltılan YT *S. cerevisiae* kültürü ikiye bölünmüş ve carbendazim içeren (+Carb) ve içermeyen (-Carb) sıvı besiyerleri içerisinde üç saat inkübe

edilmiştir. Inkübasyonları takiben (0 sa) her iki kültür tekrar ikiye bölünerek 0 mM veya 6 mM H₂O₂ varlığında üç saat daha inkübe edilmiştir (3 sa). Daha sonra, her kültürden hazırlanan 10'ar kat seri dilüsyonlar YPD plaklara nokta ekim yöntemiyle ekilmiştir. iki günlük inkübasyonun ardından kültürlerdeki sağkalım oranları incelendiğinde, carbendazim ile inkübe edilen kültürdeki (+Carb) oksidatif stres direncinin carbendazimle inkübe edilmemiş kültüre kıyasla (-Carb) arttığı gözlenmiştir (Şekil 1C). Oksidatif stres indüksiyonunun ardından +Carb ve -Carb kültürlerdeki ROT seviyeleri karşılaştırıldığında da, +Carb kültürdeki floresan DCF sinyali veren hücre oranının (%94.6) -Carb kültürdekine kıyasla (%46.6) çok daha az olduğu tespit edilmiştir (Şekil 1D).

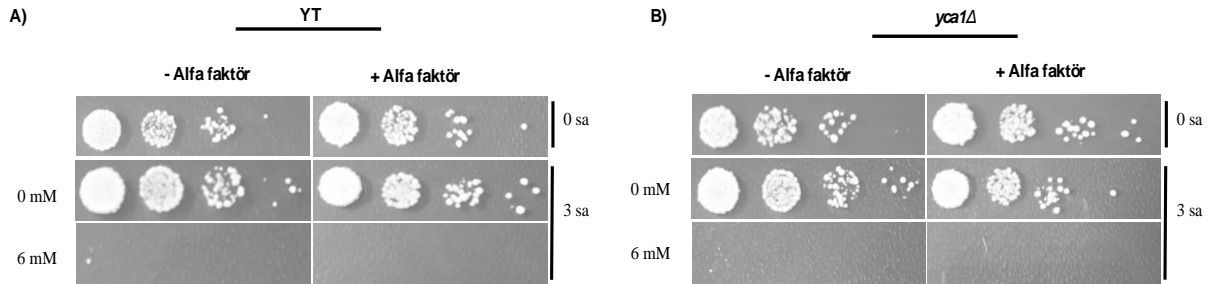
G1-arrest oksidatif stres direncine yol açmaz

Nocodazole veya carbendazim muamelesi sonucu oluşan oksidatif stres direncinin her iki ilahtan bağımsız olarak mitoz sonucu ortaya çıktığını teyit etmek için alfa faktör ile tetiklenen G1-arrestin YT ve *yca1Δ S. cerevisiae* suşlarında oksidatif stres hassasiyetine etkisini araştırdık (Şekil 2). Bunun için, erken mid-log faza kadar çoğaltılan YT ve *yca1Δ* kültürleri ikiye bölünerek alfa faktör içeren (+Alfa faktör) ve içermeyen (-Alfa faktör) besiyerinde iki saat inkübe edilmiştir. Inkübasyonların hemen ardından (0 sa) +Alfa faktör ve -Alfa faktör kültürleri ikiye bölünerek 0 mM veya 6 mM H₂O₂ ile üç saat daha inkübe edilmiştir (3 sa). üç saatlik inkübasyonun ardından YT ve *yca1Δ* suşlarından alınan örneklerdeki sağkalım nokta ekim yöntemi ile değerlendirilmiş, YT ve *yca1Δ* suşlarının her ikisinde de alfa faktör ile tetiklenen G1-arrestin 6 mM H₂O₂ ile indüklenen oksidatif stres hassasiyeti üzerinde önemli bir etkisi olmadığı gözlenmiştir (Şekil 2A, 2B).



Şekil 1. Mitotik arrestin oksidatif stres direncine etkisi.

A) 3 saatlik -NOC/+NOC inkübasyonunun ardından (0 sa), 3 saat boyunca 0 veya 6 mM H₂O₂ ile muamele edilen (3 sa) YT hücrelerdeki sağkalımın cfu yöntemi ile incelenmesi. B) +NOC/-NOC inkübasyonunun ardından (0 sa) 0 veya 6 mM H₂O₂ ile muamele edilen (3 sa) YT hücrelerdeki ROT seviyelerinin H₂DCFDA yöntemi ile incelenmesi. C) 3 saatlik -Carb/+Carb inkübasyonunun ardından (0 sa), 0 veya 6 mM H₂O₂ ile 3 saat muamele edilen (3 sa) YT hücrelerdeki sağkalımın nokta ekim yöntemi ile incelenmesi. D) -Carb/+Carb inkübasyonunu takiben (0 sa) 0 veya 6 mM H₂O₂ ile muamele edilen (3 sa) YT hücrelerdeki ROT birikiminin H₂DCFDA yöntemi ile incelenmesi.



Şekil 2. G1-arrestin oksidatif stres direncine etkisi.

2.5 saat alfa faktör ile muamelenin ardından (0 sa) 3 saat boyunca 0 mM veya 6 mM H₂O₂ ile inkübe edilen A) YT B) *yca1Δ* hücrelerdeki sağkalımların nokta ekim yöntemi ile incelenmesi

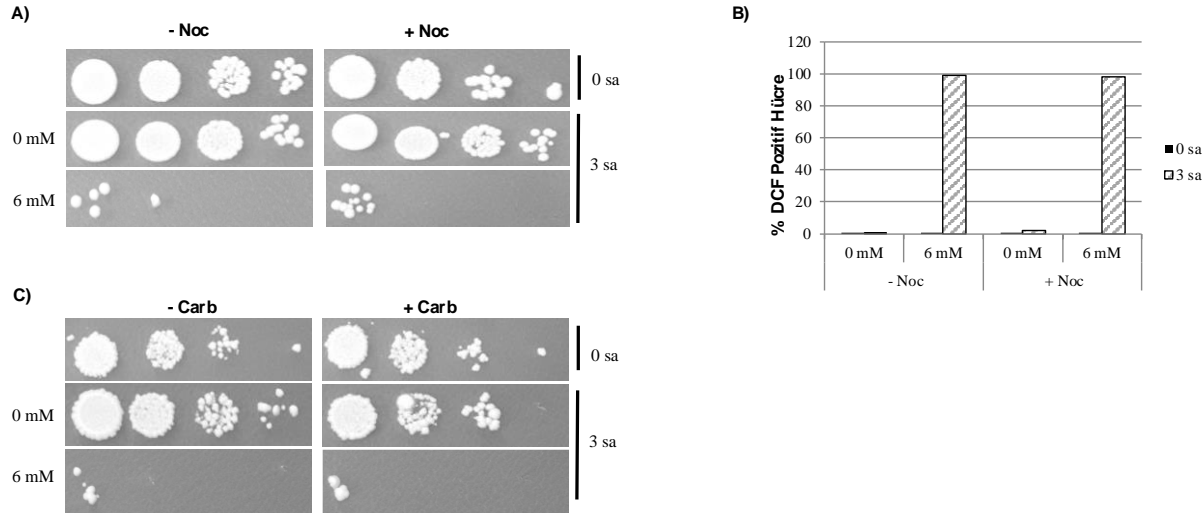
Mitotik arreste bağlı gelişen oksidatif stres direnci için Yca1 gereklidir

Carbendazim veya nocodazole ile tetiklenen mitotik arrestin oksidatif strese karşı direnci arttırdığını gözlemlememizin ardından, bu dirençte maya metakaspazı *Yca1*'in bir rolü olup olmadığını araştırdık (Şekil 3). Bunun için, erken mid-log fazdaki *yca1Δ* kültürü ikiye bölünmüştür. +Noc ve -Noc koşullarda üç saatlik inkübasyonun ardından (0 sa) her iki kültür de 0 mM veya

6 mM H₂O₂ varlığında üç saat daha inkübe edilmiştir. +Noc ve -Noc *yca1Δ* kültürlerindeki oksidatif stres varlığındaki sağkalım nokta ekim yöntemiyle karşılaştırıldığında, +Noc ve -Noc kültürlerde 6 mM H₂O₂ ile indüklenen oksidatif strese karşı dirençte önemli bir fark olmadığı gözlenmiştir (Şekil 3A). Benzer şekilde, +Noc ve -Noc kültürlerde ROT üreten hücre oranları açısından (sırasıyla, %98.3 ve %99.3) neredeyse hiçbir fark olmadığı belirlenmiştir (Şekil 3B). Aynı deney

dizaynında mitotik arrest bu kez carbendazim ile tetiklendiğinde de aynı şekilde +Noc ve -Noc kültürlerde oksidatif stres direnci açısından önemli bir fark olmadığı gözlenmiştir (Şekil 3C). YT hücrelerde mitotik arreste bağlı olarak

oluşan oksidatif stres direncinin (Şekil 1), aynı koşullar altındaki *yca1Δ* hücrelerde gözlenmemiş olması, Yca1'in mitotik arreste bağlı oksidatif stres direnci için gerekli olduğunu ortaya koymaktadır.



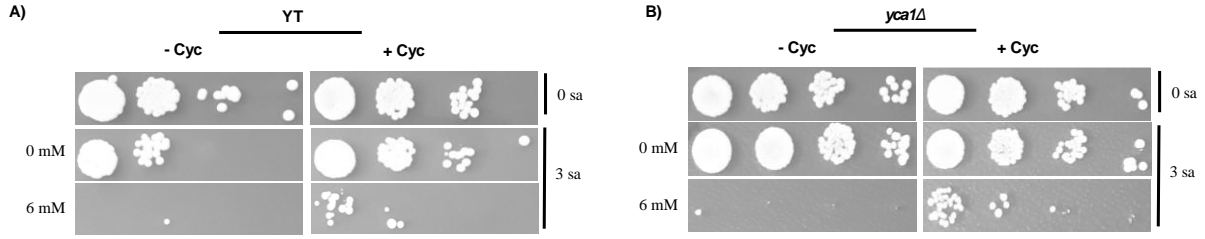
Şekil 3. Yca1'in mitotik arreste bağlı gelişen oksidatif stres direncine etkisi.

A) 3 saatlik nocodazole muamelesini (0 sa) takip eden 3 saatlik 0 veya 6 mM H₂O₂ inkübasyonunun (3 sa) *yca1Δ* hücrelerdeki sağkalma etkisinin cfu yöntemi ile incelenmesi. B) Nocodazole muamelesinin ardından (0 sa) 0 veya 6 mM H₂O₂ ile inkübe edilen (3 sa) *yca1Δ* hücrelerdeki ROT seviyelerinin H₂DCFDA yöntemi ile incelenmesi. C) 3 saatlik carbendazim muamelesini (0 sa) takip eden 0 veya 6 mM H₂O₂ inkübasyonunun (3 sa) *yca1Δ* hücrelerdeki sağkalma etkisinin nokta ekim yöntemi ile incelenmesi.

Mitotik arrest sonrasında protein sentezinin engellenmesi oksidatif stres direncini artırır.

Yca1'in mitotik arrest sırasında gelişen oksidatif stres direncindeki rolü, protein agregatlarını temizleme göreviyle ilişki olabilir. Bu olasılığı araştırmak için YT ve *yca1Δ* suşlarda protein agregatlarının oluşumunu cycloheximide inkübasyonu ile engelledik ve bu durumun mitozda gelişen oksidatif stres direnci üzerindeki etkisini değerlendirdik. Bunun için, mid-log YT ve *yca1Δ* kültürleri ikiye ayrılmış ve üç saat boyunca nocodazole ile mitozda arrest edilmiştir. Daha sonra her bir kültür ikiye bölünmüş ve cycloheximide varlığında (+Cyc) ve yokluğunda (-Cyc) bir saat daha inkübe edilerek protein translasyonu

engellenmiş (+Cyc) veya engellenmemiştir (-Cyc). Bir saatlik inkübasyonun hemen ardından (0 sa) ise tüm kültürler üç saat boyunca 0 mM ve 6 mM H₂O₂ ile inkübe edilmiştir (3 sa). 0. ve 3. saatlerde tüm kültürlerden alınan örneklerin 10'ar kat seri dilüsyonları YPD plaklara ekilmiş ve oksidatif strese karşı dirençleri nokta ekim yöntemiyle değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, cycloheximide inkübasyonunun (+Cyc) *yca1Δ* suşta gözlemlenen oksidatif stres hassasiyetini azaltarak YT suşa oldukça benzer şekilde oksidatif stres direncine yol açtığı gözlenmiştir (Şekil 4A, 4B). Bu bulgular, Yca1 tarafından protein agregasyonunun engellenmesinin, mitozda oluşan oksidatif stres direnci için önemli olduğunu göstermektedir.



Şekil 4. Mitotik arrest sonrasında protein sentezinin engellenmesinin oksidatif stres direncine etkisi.

Üç saatlik nocodazole muamelesinin hemen ardından (0 sa) cycloheximide varlığında (+Cyc) ve yokluğunda (-Cyc) 1 saat, sonrasında ise 0 mM ve ya 6 mM H_2O_2 ile 3 saat inkübasyonun (3 sa) A) YT B) *yca1Δ* hücrelerdeki sağkalım üzerine etkisinin nokta ekim yöntemi ile incelenmesi.

Tartışma

Bu çalışmada, *Yca1*'in mitotik arrest sonucu oluşan oksidatif stres direncine etkisi ve bu etkinin *Yca1*'in hangi hücrel süreçteki rolü aracılığıyla gerçekleşiyor olabileceği araştırılmıştır. Bunun için ilk önce YT *S.cerevisiae* hücrelerinde mitozun oksidatif stres direncine etkisi araştırılmış ve mitotik arresti tetiklediği bilinen iki farklı antikanser ilaçla (nocodazole ve carbendazim) muamelenin H_2O_2 ile indüklenen oksidatif strese karşı direnç sağladığı gözlenmiştir (Şekil 1). Bu bulgular, methyl 2-benzimidazol carbamate (carbendazim) muamelesinin *S.cerevisiae*'de oksidatif stres direncini arttırdığının gösterildiği literatürdeki tek çalışmayla uyumludur.¹⁰ Yine aynı çalışmayla uyumlu olarak, bu çalışmadan elde edilen bulgular da YT *S.cerevisiae* hücrelerinde G1-arrestin oksidatif strese karşı direnç oluşturmadığını ortaya koymuştur (Şekil 2A). Bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, YT hücrelerde hücre döngüsünün spesifik olarak mitoz evresinin H_2O_2 ile indüklenen oksidatif strese karşı direnci arttırdığı sonucuna varılabilir. İlave olarak bu çalışmayla literatürde ilk defa, *Yca1*'in G1-arrestin yol açtığı oksidatif stres hassasiyeti üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı da gösterilmiştir (Şekil 2B).

YT hücrelerde mitozun oksidatif stres direncini arttırdığının gözlenmesinin ardından, mayadaki tek metakaspaz olmasının yanı sıra farklı vital hücrel süreçlerde de görev aldığı bilinen *Yca1*'in, bu direnç oluşumunda görev alıp almadığı araştırılmıştır. YT hücrelerde mitotik arresti tetikleyerek oksidatif stres direncine yol

açan aynı iki antikanser ilaçla (nocodazole ve carbendazim) muamelenin *yca1Δ* mutant suşta oksidatif stres direncine yol açmadığının gözlenmesi, *Yca1*'in mitotik arrest sonucu oluşan oksidatif stres direnci için gerekli olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 3).

Yca1'in rol aldığı önemli hücrel süreçlerden biri protein kalite kontrolüdür. Protein kalite kontrolü, yüksek ısı ve oksidatif stres gibi çeşitli stres koşullarına bağlı olarak hatalı katlanan proteinlerin katlanmalarının düzeltilmesi ya da ortadan kaldırılması yoluyla protein agregat oluşumunu engelleyen önemli bir hücrel mekanizmadır.^{19,23} *Yca1*'in kaspaz fonksiyonundan bağımsız olarak hatalı katlanmış proteinlerin uzaklaştırılması yoluyla protein agregat oluşumunun önlenmesinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir.¹² Bu nedenle, çalışmamızda son olarak *Yca1*'in mitotik arrest sonucu oluşan oksidatif stres direncindeki rolünün arrest sırasında protein agregat oluşumunun engellenmesi üzerinden olup olmadığını araştırdık. Mitotik arrestin hemen ardından protein translasyonunu, dolayısıyla protein agregat oluşumunu, engellediğimizde *yca1Δ* mutant suşunda da, YT suşa benzer şekilde, mitozda oksidatif strese karşı direnç geliştiğini gözlemledik. Bu bulgularımız, mitotik arrest sonucu oluşan oksidatif stres direncinin kısmen protein agregat oluşumunun *Yca1* tarafından önlenmesine bağlı olarak geliştiğine işaret etmektedir (Şekil 4). Ancak, bulgularımızdaki dikkat çekici bir nokta, protein translasyonun engellenmesinin mitozda arrest olan YT ve *yca1Δ* suşlarda tam bir oksidatif stres

direncine yol açmamış olmasıdır. Bu durum, mitozda ortaya çıkan oksidatif stres direncinin sadece protein agregat oluşumunun engellenmesine bağlı olmadığına, direnç oluşumunda farklı süreçlerin ve proteinlerin rol alıyor olduğuna işaret etmektedir.

Günümüzde yaygın olarak kullanılan antikanser ilaçlarla tetiklenen mitotik arrestin, kanser hücrelerinin karakteristik özelliklerinden olan yüksek ROT üretimi sonucu oluşan oksidatif strese karşı direnç oluşturma mekanizmasının iyi ve kapsamlı olarak anlaşılması, kemoterapi etkinliğini arttırabilecek yeni stratejilerin geliştirilebilmesine, yeni kemoterapötik ajanların belirlenmesine katkı sağlayabilir. Dolayısıyla, mitozda oluşan oksidatif stres direncinin mekanizmasının daha iyi anlaşılabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Teşekkür

Çalışmada kullanılan YT ve *yca1Δ S. cerevisiae* suşlarını bize hediye eden Prof. Daniel Burke'e (North Carolina State University, College of Sciences, Department of Biological Sciences) çok teşekkür ederiz.

Yazarların katkısı: P.B.A : Çalışma tasarımı, Sonuçların analizi, Manuskript yazımı. **N.K :** Deneylerin yapılması, Sonuçların analizi

Çıkar çatışması: Makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederiz.

Kaynaklar

1. Stobbe CC, Park SJ, Chapman JD. The radiation hypersensitivity of cells at mitosis. *Int J Radiat Biol* 2002;78(12):1149-57.
2. Hughes AF. The effect of inhibitory substances on cell division; a study on living cells in tissue cultures. *Q J Microsc Sci* 1950;91(3):251-77.
3. Mukhtar E, Adhami VM, Mukhtar H. Targeting Microtubules by Natural Agents for Cancer Therapy. *Mol Cancer Ther* 2014;13, 275-284.
4. Dominguez-Brauer C, Thu KL, Mason JM, Blaser H, Bray MR, Mak TW. Targeting

Mitosis in Cancer: Emerging Strategies. *Mol Cell* 2015;60(4):524-36.

5. Lara-Gonzalez P, Westhorpe FG, Taylor SS. The spindle assembly checkpoint. *Curr Biol* 2012; 22(22):R966-80.

6. Scully R. The spindle-assembly checkpoint, aneuploidy, and gastrointestinal cancer. *N Eng J Med* 2010;363(27), 2665-6.

7. Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative Stress. *Annu Rev Biochem* 2017;86:715-748.

8. Pelicano H, Carney D, Huang P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Updat* 2004;7,97-110.

9. Liou GY, Storz P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic. Res* 2010; 44,10.3109/ 10715761003667554.

10. Flattery-O'Brien JA, Dawes IW. Hydrogen peroxide causes RAD9-dependent cell cycle arrest in G2 in *Saccharomyces cerevisiae* whereas menadione causes G1 arrest independent of RAD9 function. *J Biol Chem* 1998;273(15):8564-8571.

11. McArthur K, Kile BT. Apoptotic Caspases: Multiple or mistaken identities? *Trends Cell Biol* 2018;28(6):475-493.

12. Hill SM, Hao X, Liu B, Nyström T. Life-span extension by a metacaspase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 2014;344(6190):1389-1392.

13. Uren AG, O'Rourke K, Aravind LA, Pisabarro MT, Seshagiri S, Koonin EV, Dixit VM. Identification of paracaspases and metacaspases: Two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol Cell* 2000;6(4):961-967.

14. Madeo F, Herker E, Maldener C, Wissing S, Lächelt S, Herlan M, Fehr M, Lauber K, Sigrist SJ, Wesselborg S, Fröhlich KU. A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Mol Cell* 2002;9(4):911-917.

15. Lee RE, Puente LG, Kaern M, Megeney LA. A non-death role of the yeast metacaspase: Yca1p alters cell cycle dynamics. *PLoS One* 2008;3(8), e2956.

16. Shrestha A, Megeney LA. The non-death role of metacaspase proteases. *Front Oncol* 2012;2:78.
17. Hill SM, Nyström T. The dual role of a yeast metacaspase: What doesn't kill you makes you stronger. *BioEssays* 2015;37(5):525-31.
18. Amm I, Sommer T, Wolf DH. Protein quality control and elimination of protein waste: the role of the ubiquitin-proteasome system. *Biochim Biophys Acta* 2014;1843(1):182-196.
19. Hartl FU, Bracher A, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* 2011;475(7356):324-332.
20. Matuo R, Sousa FG, Soares DG, Bonatto D, Saffi J, Escargueil AE, Larsen AK, Henriques JA. *Saccharomyces cerevisiae* as a model system to study the response to anticancer agents. *Cancer Chemother Pharmacol* 2012;70(4):491-502.
21. Madeo F, Fröhlich, E, Ligr M, Grey M, Sigrist SJ, Wolf DH, Fröhlich KU. Oxygen stress: A regulator of apoptosis in yeast. *J Cell Biol* 1999;145 (4):757-767.
22. Wu D, Yotnda P. Production and Detection of Reactive Oxygen Species (ROS) in Cancers. *J Vis Exp* 2011;(57):3357.
23. Chen B, Retzlaff M, Roos T, Frydman J. Cellular strategies of protein quality control. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;3(8):a004374.