



ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



**BİLECİK ŞEYH EDEBALI
ÜNİVERSİTESİ**

**Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**KAFEİK ASİT FENETİL ESTER (CAPE)'İN, DNA METİL
TRANSFERAZ İNHİBİTÖRÜ (DNMTi) ZEBULARİN
KOMBİNASYONU İLE TETİKLENEN APOPTOTİK
MEKANİZMADAKİ EPİGENETİK DEĞİŞİMLERİN
MDA-MB-231 MEME KANSER HÜCRE HATLARINDA
ARAŞTIRILMASI**

**ELİF KARAÇOBAN
Yüksek Lisans**

**Tez Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. Onur EROĞLU**

BİLECİK, 2016

Ref. No: 10119060



ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



**BİLECİK ŞEYH EDEBALI
ÜNİVERSİTESİ**

**Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**KAFEİK ASİT FENETİL ESTER (CAPE)'İN, DNA METİL
TRANSFERAZ İNHİBİTÖRÜ (DNMTi) ZEBULARİN
KOMBİNASYONU İLE TETİKLENEN APOPTOTİK
MEKANİZMADAKİ EPİGENETİK DEĞİŞİMLERİN
MDA-MB-231 MEME KANSER HÜCRE HATLARINDA
ARAŞTIRILMASI**

**ELİF KARAÇOBAN
Yüksek Lisans**

**Tez Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. Onur EROĞLU**

BİLECİK, 2016

Bu çalışma BAP tarafından 2014-02-BİL.04.02 numaralı proje ile desteklenmiştir.



ANADOLU UNIVERSITY



**BILECIK SEYH EDEBALI
UNIVERSITY**

**Graduate School of Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics**

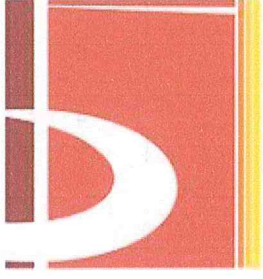
**INVESTIGATION OF CAFFEIC ACID PHENETHYL
ESTER (CAPE) AND DNA METHYL TRANSFERASE
INHIBITORS (DNMTi) COMBINATION INDUCED
EPIGENETIC MODIFICATION IN APOPTOTIC
MECHANISMS ON MDA-MB-231 BREAST CANCER
CELL LINE**

**Elif KARAÇOBAN
Master Of Science Thesis**

**Advisor
Asst. Prof. Onur EROĞLU**

BILECIK,2016

BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ



FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YÜKSEK LİSANS
JÜRİ ONAY FORMU**

Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulununtarih ve sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 29.06.2016 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Elif KARAÇOBAN'ın **"KAFFEİK ASİT FENETİL ESTER (CAPE)'İN, DNA METİL TRANSFERAZ İNHİBİTÖRÜ (DNMTi) ZEBULARIN KOMBİNASYONU İLE TETİKLENEN APOPTOTİK MEKANİZMADAKİ EPİGENETİK DEĞİŞİMLERİN MDA-MB-231 MEME KANSER HÜCRE HATLARINDA ARAŞTIRILMASI"** başlıklı tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak oy birliği/ oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Yrd. Doç. Dr. Onur EROĞLU

ÜYE: Doç. Dr. Cihan DARCAN

ÜYE : Yrd. Doç. Dr. Raif ZİLELİ

ÜYE : Yrd. Doç. Dr. Tuba YAĞCI

ÜYE: Prof. Dr. Mehtap KUTLU

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANI: Doç. Dr. Cihan DARCAN

ONAY

Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun/..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/ MÜHÜR

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca çalışmalarımın her basamağında bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen, düşünceleri ve yönlendirmeleriyle doğruya ulaştıran, maddi ve manevi yardımlarını eksik etmeyen, tez danışmanım değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Onur EROĞLU' na teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana destek olup, yükümü hafifletip benim iyi olmam için uğraşan, zorlu mücadelede beni en iyi anladığını düşündüğüm hocam Arş. Gör. Esin GÜVENİR ÇELİK'e, beni hiç yalnız bırakmayan, karşılık beklemeden desteklerini esirgemeyen, ekip arkadaşlarım Hacer KAYA, Merve ÇELEN, M. Ali NALBANT'a teşekkür ederim.

Hayatımın her anında benim yanımda olan, bana güvenen, benim için zorlu geçen her dönemde umutsuzluğa kapıldığımda onun desteği ile kendime geldiğim canım annem Hacer KARAÇOBAN'a, tez dönemim boyunca koşuşturmalarına kızsada üzüldüğümü, yorulduğumu görüp, bana kıyamayan desteğini esirgemeyen canım babam Sabri KARAÇOBAN'a, hayatımda iyi ki var dediğim kardeşim Melike KARAÇOBAN ve abim Murat KARAÇOBAN'a teşekkür ederim.

Hayatımda sürekli yanımda oldukları için mutluluk duyduğum ve her zorlu günümde desteklerini esirgemeyen Yüksek lisans eğitimim boyunca moral ve yardımlarıyla beni rahatlatan canım arkadaşlarım Özge CAN, Reyhan UYSAL, Ümran KARADAĞ'a teşekkür ederim. Tez sürem boyunca maddi, manevi desteğiyle yanımda olan Burhan KÖKÜTEMİZ'e teşekkür ederim.

ÖZET

Meme kanseri, kadınlar arasında dünya çapında kanser ölümlerinin başlıca nedenidir ve kadınlardaki tüm kanserlerin yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır. Kanser tedavisinde kullanılan bazı ilaçların etki mekanizmalarının, apoptoz aracılı tümör hücre ölümünü tetiklediği bilinmektedir. Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE), anti-bakteriyel, anti-viral, anti-oksidan, anti-inflamatuar ve anti-kanser gibi önemli biyolojik aktivitelere sahip olup, aynı zamanda apoptozun bir uyarıcısı olarak bilinmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda CAPE aracılı apoptozun, kaspaz-3'ün aktivasyonu ile BCL-2'nin gen anlatımının azalmasına ve insan lösemi HL-60 hücre hatlarında anti-apoptotik bir protein olan Bax'ın genel anlatımının artmasına yol açtığı görülmüştür. DNA metil transferaz inhibitörleri (DNMTi) tümör hücre ölümlerini önlemede klinik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

Zebularin (ZEB), nükleozit analoglarının deaminasyonunu önlemek için sitidin deaminaz inhibitörü olarak geliştirilen 2-(1H)- primidin halkası içeren bir sitidin analogudur. Düşük toksisitesinden dolayı zebularinin etkin dozlarda tek başına ya da diğer DNMT inhibitörleri ile kombine olarak uzun süreli uygulanmasına imkan vermekte ve bu durum kanser hücrelerinde epigenetik olarak susturulmuş genlerin yüksek oranda yeniden aktive olmasını sağlayabilmektedir.

Bu çalışma da, meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231 hücrelerine CAPE ve ZEB'in kombin olarak kullanılmasının öncelikle hücre canlılığı üzerine etkisi daha sonra apoptotik yolak üzerindeki indükleyici etkisini belirlemek hedeflenmiştir. Kaspaz-7, kaspaz-9 ve kaspaz-3 gibi apoptotik yolakla ilişkili olan proteinlerdeki epigenetik değişikliklerin belirlenip, incelenmesi bunun sonucu olarak apoptotik ve epigenetik mekanizmalar arasındaki ilişkinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler; Meme Kanseri; Apoptoz; Epigenetik; Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE); DNA metil transferaz inhibitörleri (DNMTi)

ABSTRACT

Breast cancer is the most common cause of cancer deaths among women in the world and makes up approximately 30% all other cancer types among women. It is well known that some of the drugs' mechanisms of action, which are used in cancer therapy, triggers apoptotic cell death. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) which is important in biological activities, such as anti-bacterial, anti-viral, antioxidant, anti-inflammatory and anti-cancer, is known as a stimulant of apoptosis. In the previous studies, it is seen that with the activation of caspase-3 CAPE mediated apoptosis causes decrease in gene expression of BCL-2 and causes increase in general expression of Bax which is an antiapoptotic protein in human leukemia HL-60 cell lines. DNA methyl transferase inhibitors (DNMTi) are commonly used for inhibiting tumor cell death in clinical studies. Zebularine (ZEB) is a cytidine analog which includes 2-(1H)-pyrimidonone ring and is developed as a cytidine deaminase inhibitor to inhibit deamination of nucleoside analogs. Because of its low toxicity, it enables zebularine to be used alone or it is combined with other DNMT inhibitors in the long term and this situation may enable epigenetically silenced genes to be reactive in a high level again in cancer cells.

In the study, it was aimed primarily to determine the effect of using CAPE and ZEB together on cell viability on MDA-MB-231 breast cancer cell line and later to determine the inductive effect on the apoptotic pathway. With the determination and examination of the epigenetic changes in the proteins like caspase-7, caspase-9 and caspase-3 which are related with apoptotic pathway, it was aimed to determine the relation between apoptotic and epigenetic mechanisms.

Keywords; Breast cancer; Apoptosis; Epigenetic changes; Caffeic acid phenethyl ester (CAPE); DNA methyltransferase inhibitors (DNMTi)

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

JÜRİ ONAY SAYFASI

TEŞEKKÜR

ÖZET.....I

ABSTRACT.....II

İÇİNDEKİLER.....III

ÇİZELGE VE ŞEKİLLER DİZİNİ.....VI

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....IX

1. GİRİŞ VE AMAÇ 1

1.1. Kanser 1

1.2. Meme Kanseri 1

2. GENEL BİLGİLER.....3

2.1. Meme Kanseri Biyolojisi 3

2.2. Meme Kanserinin Epidemiyoloji Ve Etiyolojisi.....3

2.3. Meme Kanserinin Patolojisi4

2.3.1. Meme kanseri genetiğinde etkili olan onkogenler4

2.4. Meme Kanseri Tanı Ve Tedavisi5

2.4.1. Kafeik asit fenetil ester (CAPE)6

2.4.1.1. CAPE moleküler yapısı6

2.5. Epigenetik Mekanizmalar7

2.5.1. Histon modifikasyonları8

2.5.2. RNA ile indüklenen sessizleşme (RNA-induced silencing).....8

2.5.3. DNA metilasyonu8

2.5.4. DNA metilasyonu kanser ilişkisi.....9

2.5.4. 1. DNA metil transferazlar (DNMT) 10

2.5.4.2. DNA metil transferaz inhibitörleri (DNMTi) 11

2.5.4.3. Zebularin..... 12

2.6. Apoptoz 14

2.6.1. Apoptozun düzenlenmesi	15
2.6.1.1. BCL-2 ailesi.....	15
2.6.1.2 P53	16
2.6.1.3. Fas (APO-1 veya CD95).....	16
2.6.1.4. Kaspazlar	16
2.6.2. Apoptoz mekanizmaları.....	18
2.6.2.1. İntrinsik ya da mitokondriyal yolu.....	18
2.6.2.2. Ekstrinsik ya da reseptör hücre ölümü yolu.....	19
3. MATERYAL VE METODLAR	21
3.1. Materyal	21
3.1.2. Hücre kültürü donanımları	21
3.1.3. Kullanılan cihazlar	21
3.1.4. Kullanılan çözelti ve tamponlar	21
3.1.5. Kullanılan primerler	22
3.2. Metodlar	22
3.2.1. Hücre kültürü.....	22
3.2.2. Hücre canlılık testi (MTT testi).....	23
3.2.3. Sağ kalım / Tripan mavisi boyama testi	23
3.2.4. Soft-agar koloni oluşum deneyi.....	23
3.2.5. Metastatik etkinin belirlenmesinde kullanılacak parametreler.....	24
3.2.5.1. Koloni oluşum testi.....	24
3.2.6. Anti-metastatik etkinin belirlenmesinde kullanılacak parametreler.....	24
3.2.6.1. Yara iyileşme analizi	24
3.2.7. Uygulanan ilaçların epigenetik üzerine etkisinin belirlenmesi	25
3.2.7.1. DNA izolasyonu	25
3.2.7.2. Bisülfid modifikasyon ve metilasyon spesifik PCR (MSP)	25
3.2.8. İmmunblot analizi.....	26
3.2.8. İstatistiksel analiz	27
4. BULGULAR	28

4.1. CAPE, ZEB, CAPE+ZEB Kombinasyonunun MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattında Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi	28
4.2. CAPE, ZEB, CAPE+ZEB Kombinasyonunun MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattında Hücre Metastaz Üzerine Etkisi.....	30
4.3. CAPE, ZEB, CAPE+ZEB Kombinasyonunun MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattında Hücre Anti-Metastaz Üzerine Etkisi	34
5. TARTIŞMA	40
5.1. Elde Edilen Verilerin Literatür Bilgileri ile Karşılaştırılması.....	40
5.1.1. CAPE'in MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattına etkilerinin literatürdeki diğer çalışmalar ile karşılaştırılması.....	40
5.1.2. Zebularin'in MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattına etkilerinin literatürdeki diğer çalışmalar ile karşılaştırılması.....	45
5.1.3. ZEB ve CAPE kombine ilaç terapisinin MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattına etkilerinin literatürdeki diğer çalışmalar ile karşılaştırılması.....	46
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	48
KAYNAKLAR	50
Ek-1: Hücre Kültür Donanımları.	60
Ek-2: Kullanılan Cihazlar.	61
Ek-3: Kullanılan Çözelti Ve Tamponlar.	62
Ek-4: Elektroforez Yürütme Jel İçeriği.....	63
Ek-5: Kullanılan Primerler.....	64

ÇİZELGE DİZİNİ**Sayfa No**

Çizelge 2.1. DNMT inhibitörleri, uygulama alanları ve klinik aşamalar.....	11
---	----



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Kafeik asit fenetil esterin molekül yapısı.....	6
Şekil 2.2. Epigenetik mekanizmalar.....	7
Şekil 2.3. Sitozin metilasyonu, demetilasyonu, sitozin ve 5-metilsitozin mutajenezi için biyokimyasal yolağın şematik gösterimi.....	9
Şekil 2.4. DNA metilasyonu ve kanser.....	10
Şekil 2.5. DNA metiltransferaz inhibitörlerinin etki mekanizmaları.....	12
Şekil 2.6. Zebularin molekül yapısı.....	13
Şekil 2.7. Zebularin etki mekanizması.....	14
Şekil 2.8. BCL-2 onkoproteininin apoptoz üzerine etkisi.....	15
Şekil 2.9. P53 proteininin apoptoz üzerine etkisi.....	16
Şekil 2.10. Apoptozun ana yolları ve apoptotik süreçte yer alan temel proteinler.....	20
Şekil 4.1. ZEB ve CAPE'nin MDA-MB-231 hücre hatlarında 24 saatteki hücre canlılığına etkisinin incelenmesi (0-160um).....	28
Şekil 4.2. CAPE ve ZEB'in kombine dozlarının MDA-MB-231 hücre hatlarında 24 saatteki hücre canlılığına etkisinin incelenmesi.....	29
Şekil 4.3. CAPE, ZEB ve kombine ilaç uygulanmasının MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin çoğalması üzerine etkisinin gösterilmesi.....	30
Şekil 4.4. CAPE, ZEB ve CAPE+ ZEB kombinesinin MDA-MB-231 hücre hattı hücrelerinin metastazı üzerindeki etkisinin belirlenmesi.....	31
Şekil 4.5. Hücrelerin yüzeye yapışmasının engellendiği ortamda hücrelerin büyüyebilme yeteneğinin ölçülmesi.....	32

Şekil 4.6. CAPE, ZEB, VE CAPE+ZEB kombinasyonun MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde lateral hücre hareketi üzerindeki etkilerinin belirlenmesi.....	33
Şekil 4.7. MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında kaspaz-9 geninin metile ve unmetile örneklerinin jel görüntüleri.....	35
Şekil 4.8. MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında kaspaz-8 geninin metile ve unmetile örneklerinin jel görüntüleri.....	36
Şekil 4.9. MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında kaspaz-3 geninin metile ve unmetile örneklerinin jel görüntüleri.....	37
Şekil 4.10. MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında TP53 geninin metile ve unmetile örneklerinin jel görüntüleri.....	38
Şekil 4.11. MDA-MB-231 meme kanser hücre hattında CAPE, ZEB ve CAPE+ZEB kombine terapisinin kaspaz-9 ve kaspaz-3/7 ekspresyonuna etkisi immunblotlama tekniği.....	39

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

bp : Bazçifti

gr : Gram

IC: İnhibitör Konsantrasyonu

ml: Mili Litre

pH: Hidrojenin Gücü

rpm: Dakikadaki Devir Sayısı

µg : Mikro Gram

µM : Mikro Molar

µl : Mikro Litre

Kısaltmalar

CAPE : Kafeik Asit Fenetil Ester

ZEB : Zebularin

DNMTi : DNA Metil Transferaz İnhibitörü

TÜİK : Türkiye İstatistik Kurumu

CIS : Karsinoma İn Sitü

İDK : İnvaziv Duktal Karsinom

İLK : İnvaziv Lobuler Karsinom

EGFR : Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü

HER2 : Human Epidermal Growth Factor Receptor 2

GSH : Düşük Glutasyon

NF- κ B : Nükleer Faktör Kappa B

HAT : Histone Asetil Transferaz

HMT : Histon Metil Transferaz

RNA : Ribonükleik Asit

DNA : Deoksiribonükleik Asit

miRNA : Mikro RNA

siRNA : Small İnterfering RNA

DNMT : DNA Metil Transferaz

FDA : Food and Drug Administration

EGCG : Epigallocatechin-3-gallate

AIF : Apoptoz İndükleyici Faktör

TNF : Tümör Nekrozis Faktör

KDa : Kilodalton

FADD : Fas-Associated protein with Death Domain

TRAIL : TNF-related apoptosis-inducing ligand

CSF : Koloni Uyarıcı Faktörler

NGF : Nöron Büyüme Faktörü

YGF : İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü

IL-2 : Interleukin-2

cAMP	: Siklik Adenozin Monofosfat
Smac	: Second mitochondria-derived Activator of Caspase
Endo-G	: Endonukleaz-G
IAF	: İnhibitör Apoptotik Faktör
Apaf-1	: Apoptotik Proteaz Aktive Eden Faktör
ATP	: Adenozin TriFosfat
ICAD	: İnaktif Kaspaz Aktive Edici DNaz
CAD	: Kaspaz Aktive Edici DNaz
TNFR	: Tumor Necrosis Factor Receptor
DISC	: Death İnducing Singnaling Complex
TBS	: Tris-Buffered Saline
SDS	: Sodium Dodecyl Sulphate
FBS	: Fetal Bowine Serum
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
APS	: Amonyum Persülfat
DTT	: Ditiotreitol
ATCC	: American Type Culture Collection
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute Medium
DMEM	: Dulbecco's modified Eagle's medium
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
PBS	: Phosphate Buffer Saline

EtOH : Etanol

TE : Tris- EDTA

EDTA : Etilen Diamin Tetra Asetik Asit

MSP : Metilasyon Spesifik PCR

ASC : Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD

PKR : Çift zincirli RNA bağımlı protein kinaz



1. GİRİŞ VE AMAÇ

1.1. Kanser

Kanser basitçe kontrolsüz hücre büyümesi ve anormal hücre yayılması şeklinde karakterize edilir. Kanser oluşumu ya da malign hücre kazanılması; kendi kendine çoğalma, anti-proliferatif sinyallere karşı duyarsızlık, apoptozdan kaçma, sınırsız replikasyon potansiyeli, malignite, doku invazyonu ve metastaz için vaskülarizasyon korunması gibi altı aşamada gerçekleşir (Wilting ve Dannenberg, 2012). Kanser çok aşamalı bir hastalık olup sadece bir tane aşamayı tanımak kanser tedavisinde yeterli olmayacaktır (Aapro, vd., 2008).

1.2. Meme Kanseri

Meme kanseri, kadınlar arasında dünya çapında kanser ölümlerinin başlıca nedenidir ve kadınlarda görülen tüm kanserlerin yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır. ABD'de her yıl 184 bin, Avrupa'da ise 180 bin yeni olgu saptanmakta olup dünya üzerinde bölgesel olarak farklı görülme sıklığına sahiptir. Türkiye'deki görülme sıklığı ise TÜİK'in verilerine göre 2004 yılında %34,7 iken bu oran 2011 yılında %45,1'e yükselmiştir. Ayrıca ülkemizde tüm kanserlerin %24,1'ini meme kanserinin oluşturduğu belirtilmektedir. Bu hastalık cerrahi yöntemler, kemoterapi ilaçları, hormon uygulamaları ve/veya radyoterapi ile tedavi edilmeye çalışılmaktadır (Hsieh, vd., 2014).

Kanser tedavisinde kullanılan bazı ilaç etki mekanizmalarının, apoptoz gibi tümör hücre ölümüne öncülük ettiği bilinmektedir. Apoptotik bir cevabın kusurlu bir şekilde düzenlenmesinde genetik veya epigenetik bozuklukların sonuçları potansiyel olarak ilaca toleranslı tümör hücreleriyle sonuçlanabilmektedir. Genetik kadar epigenetik mekanizmalar DNA veya histon düzeyinde modifikasyonlarla sonradan kazanılan ilaç direncinde, ilacın dışarı akışı, pro-apoptotik genlerin inaktivasyonu, apoptotik genlerin sessizleştirilmesi, bozuk DNA tamiri, ilaç hedeflerinde paralel veya downstream sinyal transdüksiyon yolları ve ikincil mutasyonları ile ilişkilidir (Wilting ve Dannenberg, 2012). Sitotoksik kemoterapi genellikle hormonlarla birlikte, geniş viseral veya hızlı ilerleyen hastalığı olan kadınlar için tercih edilen tedavi yöntemidir (Aapro, vd., 2008).

Bu çalışma da DNA metil transferaz inhibitörü olan Zebularin (ZEB) ile yeni nesil bir ilaç olan propolis özütü Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE)'in MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında öncelikle ilaçların ayrı ayrı kullanımı sonucu hangi dozlar da uygulama yapılmasının daha uygun olduğunu belirlemek için hücrelerin % 50 değer de canlı kalma seviyeleri (IC50) baz alınarak bu ilaçların kombinesi oluşturulacaktır. CAPE, ZEB ve kombine (CAPE+ZEB) ilaç uygulaması MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattına uygulanacaktır. CAPE, ZEB ve CAPE+ZEB kombine uygulamasının hücre canlılığı, hücre proliferasyonu, aynı zamanda apoptotik yolak üzerindeki etkilerinin protein düzeyinde belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun sonucunda apoptotik yolakla ilişkili olduğu proteinler olduğu bilinen kaspazların gen ifadesindeki değişimlerin araştırılması ve elde edilen verilere göre apoptoz ve epigenetik arasındaki ilişkinin ortaya konması hedeflenmiştir.

CAPE ve ZEB ilaçlarının farklı meme kanseri hücre hatlarında ayrı ayrı uygulanmalarının literatürde mevcut olmasına rağmen bu iki ilacın kombine kullanımına rastlanmamaktadır. Bu nedenle bu çalışmanın özgün değeri korunmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri Biyolojisi

Normal meme dokusunun kanser hücresine dönüşmesi çok aşamalı, karmaşık bir süreçtir (Merey, 2002; Ünver, 1998). Başlangıçta normal hücrelerde gerçekleşen ve nükleer ya da sitoplazmik onkogenleri aktiveştiren, transkripsiyonu düzenleyen mekanizmaları, sinyal moleküllerini etkileyen, büyüme faktörü ve reseptör etkileşimini bozan veya tümör supresör genlerin aktivitesini baskılayan çeşitli değişiklikler bu hücrelere belirli çoğalma avantajı sağlar. Buna paralel olarak ortaya çıkan yeni değişiklikler çok aşamalı meme karsinogenezinde komşu dokulara invaze olabilen, immün denetimden kaçan ve metastaz yapabilen klonlar oluşturur. Bu klonlar normal hücre çoğalmasını düzenleyen doğal sinyallere yanıt verme yeteneğini de kaybederek denetimsiz çoğalmaya başlar (Ünver, 1998). Kanser hücrelerinin kaynaklandığı yere lokalize olmasına karsinoma in situ (CIS), çevre doku ve organlara yerleşmesine invaziv karsinom, ana dokuyu terk ederek kan veya lenf yoluyla uzak organ ve dokuya yerleşmesine metastaz denir (Gökpınar, 2003).

2.2. Meme Kanserin Epidemiyoloji Ve Etiyolojisi

Meme kanseri etiyojisinde genetik, çevresel, hormonal, sosyal, biyolojik ve psikolojik pek çok faktör rol alır (Kaplan, 1997). Ailede genetik yatkınlık bulunan kadınlarda erken yaşlarda meme kanseri ortaya çıkma olasılığı artmasına rağmen genellikle yaşla birlikte risk faktörleri arttığı için olguların çoğu 50 yaşından sonra ortaya çıkmaktadır. Yapılan kontrollu araştırmalarda kadınların % 5-10'unda annesinde veya kız kardeşinde meme kanserine rastlanmıştır. Adet kanamasının 12 yaşından önce gerçekleşmesi bununla birlikte menopoiz sürecine 55 yaşından sonra girilmesi meme kanseri riskini arttırmaktadır. Doğum kontrol ilaçları kullanımı da bu riskin artışında etkilidir.

Yağlı besinler kullanımı, alkol kullanımı, fiziksel aktivitelerde azalma bununla birlikte ortaya çıkan kilo alımı ve şişmanlık yaşam şartlarının olumsuz etkilenmesi riski arttırma da etkilidir (Göcen, 2008).

2.3. Meme Kanserinin Patolojisi

Meme kanseri patolojisi tanı, hastalığın seyri ve tedaviyi belirlemede büyük önem arz etmektedir. Meme kanseri tiplerinden en yaygın olanı yaklaşık %80'lik dilimi kapsayan invaziv duktal karsinom (İDK), %5-14'lük paya sahip invaziv lobuler karsinom (İLK) olduğu saptanmıştır. Diğer tipleri daha iyi prognoza sahip olduğu bilinen meduller, tubuler, musinöz kanserlerdir ve diğerlerine oranla daha az görülme sıklığına sahiptir. Meme tarama ve tanı yöntemlerinin artışıyla birlikte non-invaziv (in-situ) kanserlerin görülme sıklığında artış tespit edilmiştir (Winchester, vd., 1998).

Lobuler karsinoma in situ (LCIS): İnsidansı tam olarak saptanamamakta olup, mikrobik lezyonlar içermektedir ve elle hissedebilen bir kitle gözlenmez. Tüm meme kanseri olgularının %1-6'luk dilimini kapsamakta iken, %30-50'sini non-invaziv karsinomlar oluşturmaktadır. Olguların %30-40'ında bilateral, %70'inde multisentriktrik (Engin, 2008).

Duktal karsinoma in situ (DCIS): Lezyonların heterojen bir karaktere sahip olduğu belirtilir (Pathefsky, vd., 1989). Malign karakterdeki hücrelerin ortak özelliği membranla çevrili boşluklar içerisinde sınırlı proliferasyon göstermeleridir. İyileşme oranı yüksektir.

İnvaziv duktal karsinom: En fazla görülen tipi olmakla beraber invaziv karsinomların diğer hiçbir tipine uymayan malign tümördür. Meme kanser olgularının %47-75'lik kısmını oluşturan tipidir (Tavassoli, 1999). İn situ komponentle birlikte görülmeleri mevcuttur. Kalsifikasyon oranı % 60 olarak bilinmektedir (Fisher, 1976).

Medullar karsinoma: Tüm meme kanser olgularının %5-7'lik dilimini oluşturur. Makroskopisine bakıldığında, yumuşak kıvamlı, kesit yüzeyi homojen ve gri renkte sınırları iyi görülen tümörlerdir. Klasik medüller karsinomlarda tümörün büyük boyutlu olmasına karşın prognozun iyi olduğu görülmektedir. Atipik medüller karsinomlarda İDK'ya benzer bir şekilde prognozun iyi olduğu bilinmektedir (Fisher, vd., 1990).

2.3.1. Meme kanseri genetiğinde etkili olan onkogenler

Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü (EGFR): EGFR, tirozin kinaz faaliyetine sahipliği olan hücre zarı reseptörüdür ve bu ailenin üyeleri; EGFR, HER2, HER3 ve HER4'dir. Bu üyelerin heterodimer yapılarının oluşturulması, değişik protein ailelerinin aktif olma durumları, bu üyelerin transfosforilasyonla uyarılması durumlarına bağlı olarak değişir.

Uyarılma gerçekleşince EGFR'in hücre içine girmesi ile EGFR otofosforile olmasını aynı zamanda başka substratların fosforile olmasını sağlar. Bunun sonucunda çekirdekte transkripsiyon faktörlerinin aktif olma durumları artar ve hücre bölünmeleri indüklenir (Germann, 1998; Klijn, 1992; Liao, 2000). EGFR'nin çok fazla üretilmesi meme kanserlerinin hemen hemen yarısında görülmekte iken amplifikasyon oranının %0-14 değerlerde olduğu bilinmektedir (Klijn, vd., 1992).

CerbB-2 (HER2/Neu): 17. kromozom q12'de bulunan HER-2/Neu geni, hücre bölünmesi, hücre farklılaşması gibi olayları katalizleyen onkogen olarak bilinmektedir. Buna rağmen gen amplifikasyonunda ve fazla miktarda ekspresyon neticesiyle meme ve diğer kanser tipleri için belirteç olarak kullanılmakta ve kanser patogenezinde önemli yere sahip olduğu bilinmektedir. CerbB-2 ya da p185 olarak isimlendirilir. HER2 yukarıdaki başlıkta bahsedilen EGFR gibi membran reseptörü olarak görev yapar (Yamamoto, vd., 1986). CerbB-2 amplifikasyonunun tek başına kullanılması, meme kanserinin tanı ve seyrinde yeterli olduğu yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (Allred, vd., 1992). CerbB-2 sinyal yolağının aktif hale getirilmesi HER2, HER1, HER3, HER4 gibi üyeler arasında ligand bağımlı heterodimerizasyon ile mümkündür. Meme kanserinde % 10-40 oranında HER2 geninin amplifikasyonu ve protein ekspresyonu artışı gözlemlenmiştir. Tümör şiddeti ile amplifikasyonun arasında doğru orantı olduğu tespit edilmiştir (Kurebayashi, 2001; Perren, 1991).

2.4. Meme Kanseri Tanı Ve Tedavisi

Genel olarak meme kanserlerinin tedavisinde cerrahi, radyoterapi, kemoterapi ve bu üç tedavi yönteminin kombinasyonları kullanılarak lokal ve sistemik kontrol sağlamak amaçlanır (Alptekin, 1999; Atılğan, 1999). Lokal kontrol, cerrahi girişimler ve radyoterapi ile mümkün iken, sistemik kontrol kemoterapi ve hormonal tedavi ile sağlanır (Atılğan, 1999).

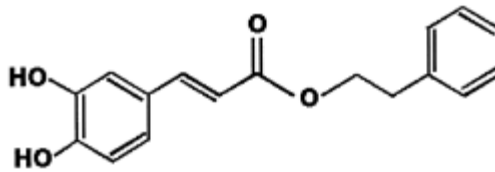
Klasik kemoterapötik ve diğer ilaçların tek başına veya kombinasyonlarının kullanımı ile meme kanseri hücrelerinin tedavisi yapılmaktadır (Newmann ve Cragg, 2004).

2.4.1. Kafeik asit fenetil ester (CAPE)

CAPE, 1998'de Kolombiya Üniversitesi'nde propolisten sentezlenmiş olup, potansiyel anti-kanser bileşiği olduğu bulunmuştur (Wu, 2011). Propolisi'nin antibakteriyel, anti-inflamatuar etkileri önceki yıllardan itibaren bilinmekte olup çoğu zaman tedavi için kullanılmaktadır. İyileştirme etkilerinin insanlar tarafından öğrenilmesiyle bu tedavi süreçleri de artmıştır (Bankova, vd., 2000). Propolis analoglarının birbirine benzer şekildeki kalitatif kompozisyonlarına karşılık CAPE'in farklılık seviyeleri yüksektir (Chen, vd., 2001). CAPE, in vitro ve in vivo olarak birçok çalışmada kullanılmıştır. CAPE transformasyon baskılanması gibi önleyici etkisi, düşük glutatyon (GSH) seviyesi ile ilgili olduğu sanılmaktadır (Totan, vd., 2001). Tümör hücrelerinde toksik etkisinin olması en kritik bulgudur.

CAPE, antibakteriyel, anti-viral, anti-oksidan, anti-inflamatör, ve anti-kanser gibi önemli biyolojik aktivitelere sahip olup, transkripsiyon faktörü nükleer faktör kappa B (NF-kB) kadar apoptozisin bir indükleyicisi olarak bilinmektedir (Wu, 2011). CAPE kökenli bileşiklerin oral kanseri önlemede önemli ajanlar oldukları ifade edilmiş ve aynı zamanda CAPE tarafından intestinal karsinogenezin baskılandığı belirtilmiştir (Mahmoud, vd., 2001). Kanser engelleyebilir olduğu, insan Hela, BEAS-2B, HL-60, MCF-7 ve sıçan ME 308 hücre hatları üzerinde yapılan deneyler sonucunda gösterilmiş ve oksidatif stresi azalttığı tespit edilmiştir (Bhimani, vd., 1993; Lee, vd., 1999).

2.4.1.1. CAPE moleküler yapısı



Şekil 2.1. Kafeik asit fenetil ester'in molekül yapısı (Philippe, 2007).

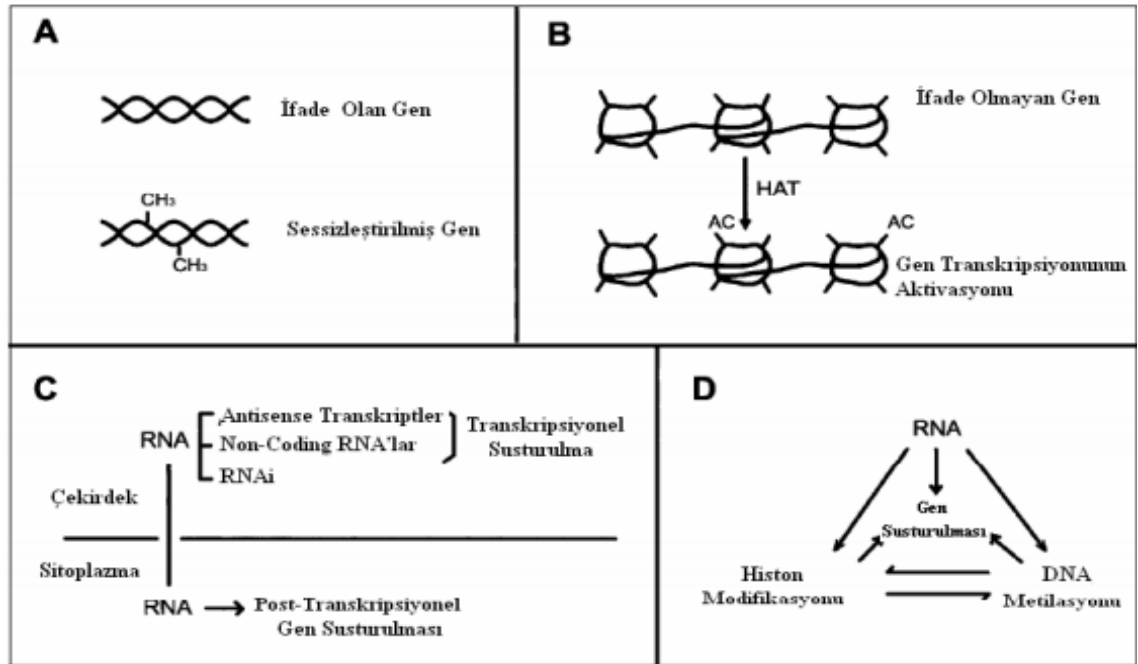
Yapıca flavonoidlere benzeyen CAPE'in iki halkasal yapısı vardır (Bkz. Şekil 2. 1) (Fesen, vd., 1994). Halkalardan bir tanesinde molekülün hemen hemen bütün kimyasal özelliklerini gösteren ve fonksiyonel olan iki "-OH" grubu vardır. Hidroksil grupları, aktif bir şekilde elektron alıp vererek oksitleyici ve redükleyici özellik gösterirler.

Çok uzun aromatik ve alifatik yapıda karbon grupları taşıdığı için aynı zamanda lipofilik özelliktedir (Russo, vd., 2002). Böylece molekülün kolayca hücre membran yapılarından geçmesi ve etki edeceği bölgeye ulaşması kolaylaşır. Hücre kültürü ve deney hayvanı araştırmalarında CAPE her türlü yoldan rahatlıkla verilebilmekte ve ilgili vücut bölgesine ulaşımı kolay olmaktadır (Cunha, vd., 2004).

2.5. Epigenetik Mekanizmalar

İlk olarak, 1950’lerde Conrad Waddington tarafından önerilen Epigenetik terimi günümüzde “DNA dizisinde değişim olmaksızın, mitoz ve/veya mayoz bölünme ile kalıtılabilen, gen fonksiyonundaki değişiklikler” olarak tanımlanmaktadır. Son on yılda yapılan araştırmalar sonucu, epigenetik olayların, özellikle yüksek organizasyonlu canlılarda oldukça önemli etkileri olduğu anlaşılmıştır (Orcan, 2006).

Epigenotip, epigenetik mekanizmalar ve çevresel faktörlerin birlikte etkileşimiyle oluşturulmaktadır. Genotipin epigenotip üzerinde etkisiyle de fenotip açığa çıkmaktadır (Jiang, vd., 2004).



- A. DNA Metilasyonunun sebep olduğu gen susturulması
- B. Kromatinde histonların deasetilasyonu yoluyla gen transkripsiyonunun susturulması
- C. RNA aracılığıyla transkripsiyonel ve post- transkripsiyonel gen susturulması
- D. Epigenetik mekanizma arasındaki ilişki

Şekil 2.2. Epigenetik mekanizmalar (Peedicayil, 2006).

2.5.1. Histon modifikasyonları

Epigenetik modifiye edici olarak bilinen histon modifikasyonları kromatin yapısını ve işlevini değiştirmektedir (Egger, vd., 2004). Histon proteinleri DNA paketlenmesinde görev yapmakta olup, post transkripsiyonel değişikliklere uğrayabilir bu değişikliklerin sık gözlenenleri asetilasyon ve metilasyondur. Asetillenme HAT (Histon asetil transferazlar) ile gerçekleşirken, metillenme HMT (Histon metil transferazlar) tarafından gerçekleştirilir. Asetillenme ve metillenme kromatin gevşek ya da sıkı olma durumlarını ayarlayarak gen anlatımını düzenler. H3 ve H4 histonları lizin rezidülerinden asetillenirse kromatini gevşetirken, deasetilasyon ile kromatin paketlenmesi artar ve kromatin kararlı hale gelerek gen ekspresyonu engellenir. Histondaki modifikasyonlar ve DNA metilasyonu birlikte çalışır ve gen ifadesi düzenlenir (Orcan, 2006).

2.5.2. RNA ile indüklenen sessizleşme (RNA-induced silencing)

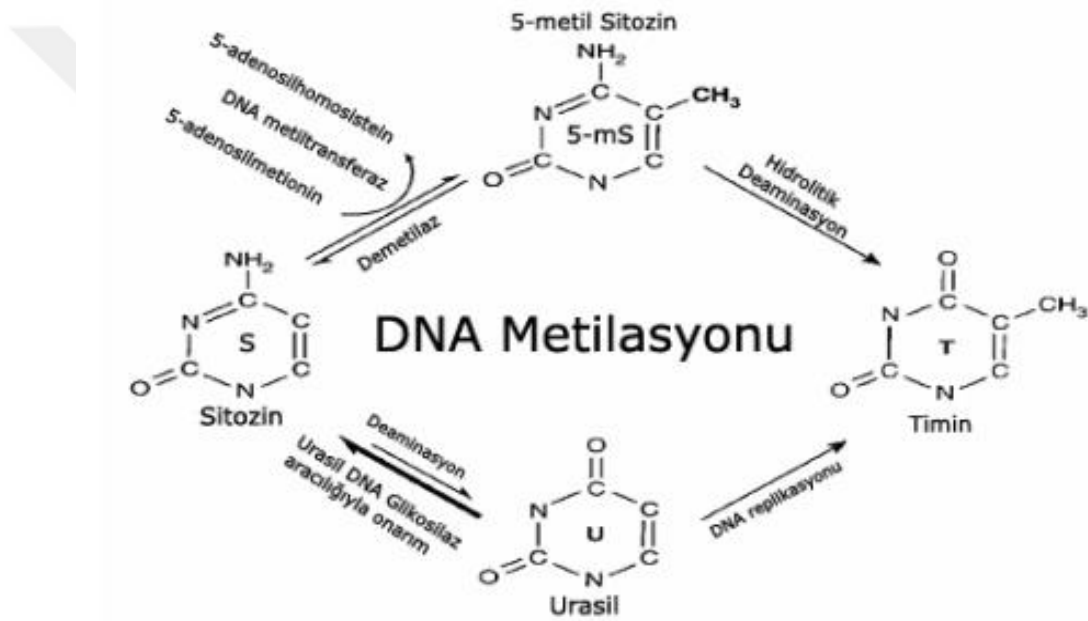
RNA desteği ile histon modifikasyonları ve DNA metilasyonu başlar. Bunun sonucunda heterokromatin bölge oluşturulması sağlanarak kalıtsal bir susturulma oluşturulduğu sanılmaktadır (Egger, vd., 2004). Epigenetik yaklaşım ve sürecin ilerlemesinde kodlanmayan RNA (non-coding RNA)'ların görev aldığı ifade edilmiştir. Buna örnek olarak miRNA (mikro RNA) ve siRNA (small-interfering RNA)'nın post transkripsiyon ve post translasyonda görevli oldukları bilinmektedir. Ayrıca XIST RNA ise X kromozomu in aktivasyonunda görevli olduğu bilinen molekülüdür. Bu moleküllerin RNA interferans olarak ifade edildiği bilinmektedir (Jiang, vd., 2004).

2.5.3. DNA metilasyonu

DNA Metilasyonu, embriyonik gelişim, transkripsiyon, kromatin yapısı, gen ifadesinin baskılanması, kromatin kararlılığı sağlanması ve korunması gibi olayları gerçekleştirdiği bilinen üzerinde en çok durulan epigenetik mekanizmadır (Robertson, 2004). Bu olay DNA metil transferaz (DNMT) enzimleri kullanılarak gerçekleşmektedir. DNA molekülünde genellikle CpG adacıklarının sitozin (C)'leri metillenir. Tekrar dizileri ve transpozonların yer aldığı CPG adacıklarında, heterokromatin bölgesinin metilasyonu fazladır.

Bu metilasyon fazlalığı ile transripsiyon baskılanmakta olup, transpozonların genom içinde ki hareketleri engellenerek kromozomun kararlılığı sağlanmaktadır (Egger, vd., 2004; Robertson, vd., 2002).

CpG adacıkları ise genlerin promotor bölgelerinde bulunan, yaklaşık 500 bazçifti uzunluğunda ve %55'ten fazla CG içeren, metilasyon oranı düşük olan korunmuş dizilerdir. DNA metilasyonunun, transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını engelleyerek veya metilli DNA'ya bağlanan protein kompleksleri sayesinde kromatin yapısını değiştirerek genlerin ifadesini baskıladığı düşünülmektedir (Egger, 2004).

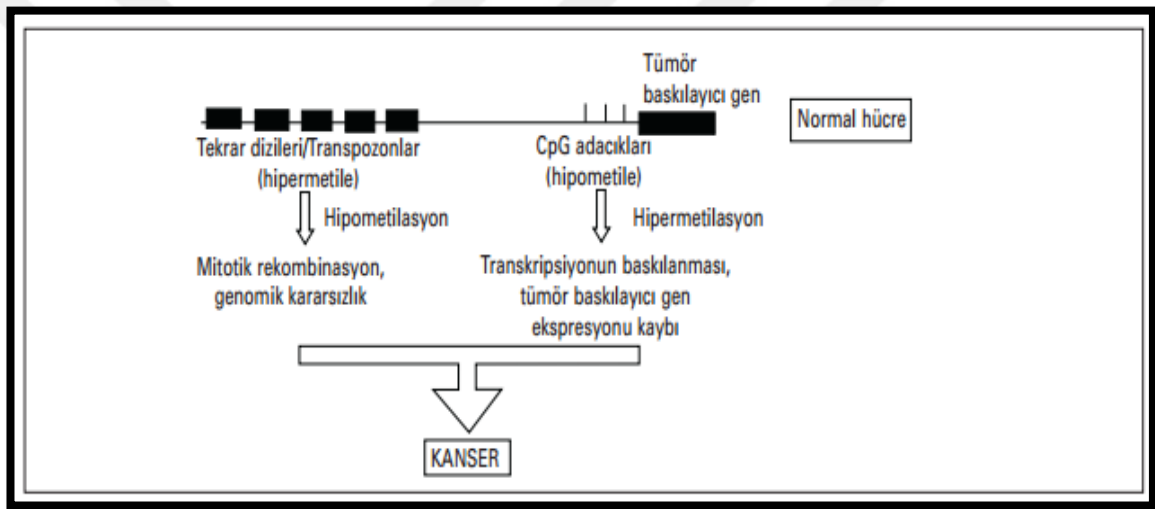


Şekil 2.3. Sitozin metilasyonu, demetilasyonu, sitozin ve 5-metilsitozin mutajenezi için biyokimyasal yolağın şematik gösterimi (Singal ve Ginder 1999).

2.5.4. DNA metilasyonu kanser ilişkisi

Kanser hücrelerinin genomlarının normal hücrelerinkine oranla hipometile olduğu ve genomdaki tekrar dizilerindeki düşük metilasyon oranı transpozonları aktif hale getirerek genomda kararsızlığa neden olmakta ve yeniden düzenlemeler yapılmaktadır (şekil 2. 4). Hipometilasyon, hastalık seyrinde ve metastazında önemli yere sahiptir (Orcan, 2006). Düşük metilasyon kadar yüksek metilasyon da kanser hücrelerinde görülmektedir. Gene özgü hipermetilasyonların gerçekleştiği yer sıklıkla CpG adalarıdır bu değişiklikler ile gen anlatımı baskılanmaktadır (şekil 2. 4).

Hücreyi kanserden koruyan, sinyal iletim yollarında, DNA onarımında, hücre döngüsünde ve kontrollü hücre ölümü olan apoptozda görevli olan tümör supresor genlerin promoter bölgedeki hipermetilasyonu ile bu genler susturulmaktadır. Bu susturulma ile kanser hücrelerinde büyüme ve proliferasyon artmaktadır. Bu susturulma ancak genlerdeki alellerin ikisinde susturulması ile gerçekleşmektedir. Çalışmalar sonucunda tümör süpresör genlerin bir alelinde mutasyon görülürken, diğer alelde hipermetilasyon ile susturulmaktadır (Jones ve Baylin, 2002). DNA metilasyon durumlarındaki değişiklikler hastalığın, prognoz, yatkınlık, ilaçların yan etkilerinin belirlenmesinde belirteç olarak kullanılabilir olduğu gösterilmektedir (Miyamoto, 2005; Laird, 2003).



Şekil 2.4. DNA metilasyonu ve kanser (Bora ve Yurter, 2007).

2.5.4.1. DNA metil transferazlar (DNMT)

DNA metilasyonu başlatılması ve devam ettirilmesi olayları DNMT'lar tarafından katalizlenir. İnsanlarda bugün itibari ile 5 DNMT tipi görülmektedir. Bu tipler; DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b ve DNMT3L olarak bilinmektedir. DNMT2 ve DNMT3L dışında kalanlarda enzimatik aktiviteler mevcuttur. Yarı-metillenmiş DNA kısımlarına bağlanan “maintenance metiltransferaz” bilinen DNMT1'dir. DNMT3a ve DNMT3b yarı metile olmuş ya da hiç metile olmamış kısımlara bağlanarak metilasyon oluşturulur. Bu grupta novo metil transferazlar olarak adlandırılırlar. DNMT2 ise diğerleri gibi önem teşkil eder fakat aktivitesine henüz rastlanılmamıştır (Robertson, 2005).

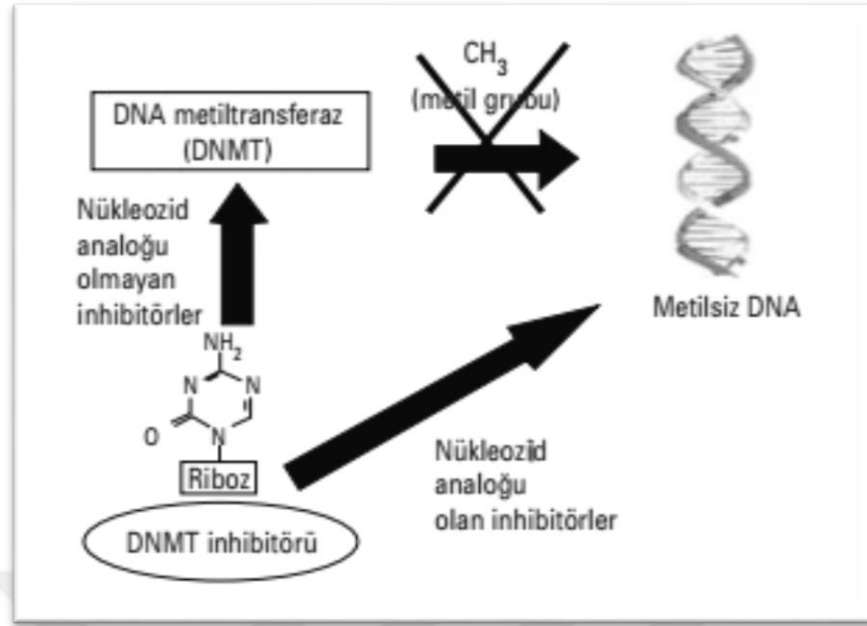
2.5.4.2. DNA metil transferaz inhibitörleri (DNMTi)

DNMT inhibitörleri etki mekanizmalarına göre, nükleozit analogu olan ve olmayan bileşikler olarak iki kategoriden oluşmaktadır (Çizelge 2. 1). Nükleozit analogları, DNA bazına benzer bir yapı gösterir ve replikasyon esnasında yeni sentezlenen zincirin yapısına katılır (Peedicayil, 2006). DNMT enzimleri ile kovalent bağlar kurulur ve bu enzimlerin inaktif hale gelmesi sağlanarak sentezlenmiş olan yeni zincirde hipometile durumlar oluştururlar (şekil 2. 4) (Egger, vd., 2004; Miyamoto ve Ushijima, 2005). 5-azasitidin de yukarıda anlatılan durumla eş değer etkiler göstererek, miyelodisplastik sendromun her tipinde kullanılması “Food and Drug Administration (FDA)” tarafından onaylanmıştır (Kaminkas, vd., 2005). Bu özelliklerine rağmen nükleozit analogu olan bileşiklerin toksik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir bu nedenle nükleozit analogu olmayan bileşikler geliştirilmesi artmıştır (Peedicayil, 2006). Bu amaçla yapılan çalışmalara en net örnek yeşil çaydaki polifenol olan EGCG [(-)-epigallocatechin-3-gallate] kanser hücrelerine verilmesi ile DNA metilasyon oranında azalma görülmüştür. EGCG gibi bileşikler metiltransferaz enzimine bağlanarak inaktif olmasını sağlar ve metilasyon azaltılır.

Çizelge 2.1. DNMT inhibitörleri, uygulama alanları ve klinik aşamalar (Bora ve Yurter, 2007).

	DNMT inhibitörleri	Hastalık	Klinik aşama
Nükleozid analogu olan bileşikler	5-azasitidin	Miyelodisplastik sendrom	FDA onaylı
	5-azasitidin	Solid tümörler	Faz II
	Desitabin	Miyelodisplastik sendrom	Faz II
	Desitabin	Lösemi	Preklinik
	Zebularin	Mesane kanseri	Preklinik
Nükleozid analogu olmayan bileşikler	Prokainamid	Prostat kanseri	Preklinik
	Prokain	Meme kanseri	Preklinik
	EGCG	Serviks kanseri	Preklinik
	(epigallocatechin-3-gallate)		

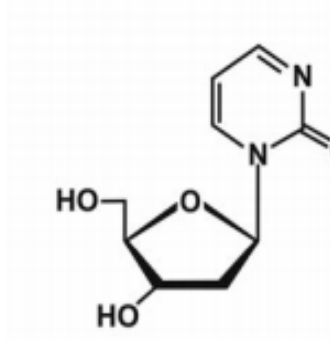
Prokain gibi antiaritmik ilaçlarda bu şekilde etki gösterip, hipermetilasyonu kaldırarak tümör süpresör genlerin aktif hale gelmesini sağladığı sanılmaktadır (Brueckner ve Lyko, 2004).



Şekil 2.5. DNA metiltransferaz inhibitörlerinin etki mekanizmaları (Bora ve Yurter 2007).

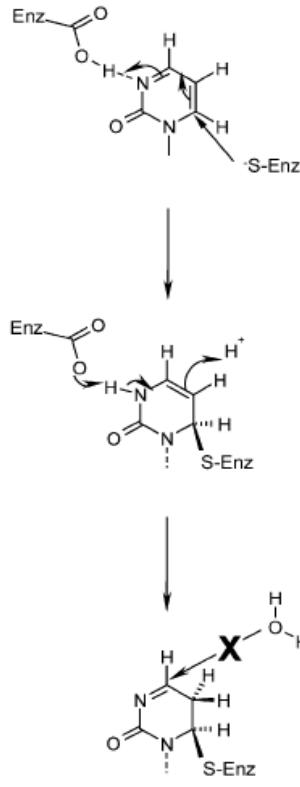
2.5.4.3. Zebularin

Öncelikle meme kanserinde çoklu mutasyonlar tespit edilmiştir ve bu mutasyonların üstesinden gelmek oldukça zordur (Wood, vd., 2007). Bunların aksine birçok epigenetik değişiklikler transkripsiyon sonrası gen dizilimini etkilemeyen tersinir olaylardır ve bu mekanizmaların engellenmesi teorik olarak meme kanserinin engellenmesinde yararlı olabilir (Baylin ve Ohm, 2006; Jones ve Baylin, 2007). Bunun bir sonucu olarak epigenetik düzenleyicilerden olan DNMTi ler meme kanseri tedavisinde değerlendirme altındadır. Zebularin, ilk olarak nükleozit analoglarının deaminasyonunu engelleyici olarak geliştirilen 2-(1H)- primidinon halka içeren sitidin analogudur (Marquez, vd., 1980). Zebularin ikinci nesil, tercihen mesane, prostat, akciğer, kolon ve pankreas karsinoma hücre hatlarında gösterildiği gibi, kanser hücrelerini hedefleyen, DNA metilasyonunun oldukça kararlı hidrofilik inhibitörüdür (Andersen, JB, vd., 2010; Cheng, JC, vd., 2004). Zebularin bir sitidin analogudur ve sitidin deaminaz inhibitörü olarak geliştirilmiştir (Cheng, vd, 2004).



Şekil 2.6. Zebularin moleküler yapısı (Gnyszka, vd, 2013).

Tümörijenizin, epatosellüler kanserlerin gelişiminde dahi erken ya da geç evrelerinde anormal metilasyon değişiklikleri göz önüne alındığında bu sürecin kanser risk değerlendirmesi, tedavisi ve kemoprevensiyon için kritik hedefi temsil edebilir (Calvisi, vd., 2007; Feinberg, vd., 2004). İlaç hematopoetik bozukluklara karşı etkili olmakla birlikte, çözümleri in vitro ve in vivo olarak toksisiteye sahip olduğundan kararsızdır (Beisler, 1978). Zebularin, hücre çoğalmasını engelleyici etkisi olup, apoptozu uyarak anti-tümör aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir (Andersen, 2010). HepG2 hücrelerinde zebularin, DNA metilasyonunda değişiklikler yaratarak hücre büyümesini engellediği ya da hücreleri apoptoza gönderdiği bulunmuştur (Nakamura, vd., 2010). Apoptoz süresince kaspazlar, çeşitli uyanlara yanıt olarak kendiliğinden kuvvetlenen hücre ölümünü başlatması ve ilerletmesi bakımından önemlidir. Zebularin DNA'ya eklendiğinde normal fibroblastlara göre kanser hücre hatlarında hücre döngüsü düzenleyici genlerin arttığını ve hücre büyümesini inhibe ettiği görülmüştür. Aynı zamanda T24, HCT15, CFPAC-1, SW48 ve HT-29 hücrelerde anormal susturulan p16 genini, Akata hücrelerinde E-cadherin geni; ve AML 193 hücrelerinde p15INK4B genlerini tekrar aktif ettiği gözlenmiştir (Leist, 1994).



Şekil 2.7. Zebularin etki mekanizması (Zhou, vd., 2002).

2.6. Apoptoz

Programlı hücre ölümü olan apoptoz; yüksek yapıli canlıların gelişimsel sürecin ihtiyaçı olan, görevlerini yapamayan hücrelerin ve ihtiyaç duyulmayan kısımların kontrollü yok edilmesidir (Cohen, 1998). Apoptoz olayındaki asıl olarak gerçekleşen olay nükleus kondensasyonu ve kısımlara ayrılması olarak bilinir. Kromatin, normal şartlarda yaygın olarak düzensiz yapıya sahiptir. Apoptoz olayında bu düzensizliklerin artışı söz konusudur ve floresan boyamalar yapıldığında DNA boncuklu yapı gösterir çünkü DNA nükleozomal bölgelerden 180-200 bp (bazçifti) olarak parçalara bölünür (Narula, vd., 1997). Onarım mekanizmaları ile hücredeki ard arda gerçekleşen 7 kırılma onarabilir fakat apoptoz olayında kırılma sayısı 300 000'i bulur ve hücre onarılamaz ve apoptoza gider (Gavrieli, vd., 1992).

2.6.1. Apoptozun düzenlenmesi

Kalsiyum, seramid, BCL-2 ailesi, P53, kaspazlar, sitokrom-c gibi proteinler ve mitokondriler apoptozun düzenlenmesinde görev yapar. Apoptoz süresince hücre içine sürekli kalsiyum girişi gerçekleşir. Hücreye giren kalsiyum iyonları; endonükleaz, proteaz ve transglutaminaz enzimlerini aktifleştirir, gen regulasyonu ve hücre iskeleti organizasyonunu sağlar (Coşkun, 2011).

2.6.1.1. BCL-2 ailesi

Hücrelerin apoptoza yakınlığı BCL-2 ailesine ait genlerin heterodimer ya da homodimer tipine göre değişmektedir. BCL-2 ailesinin zıt çalışan 2 formu mevcuttur;

- Proapoptotik üyeler
- Antiapoptotik üyeler

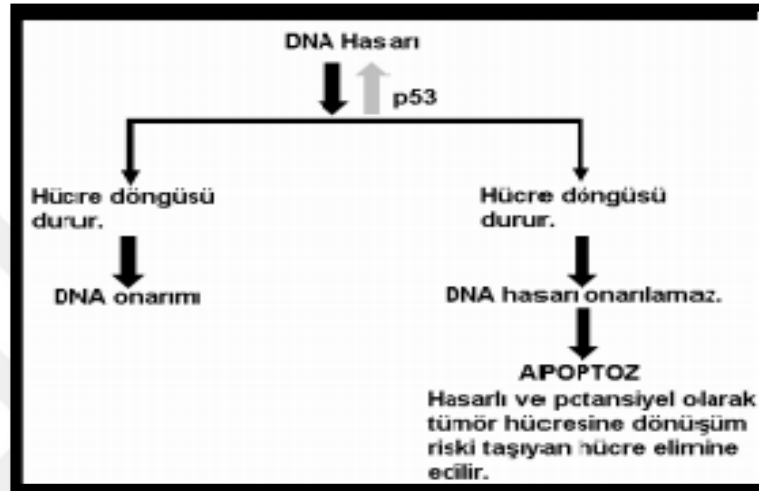
Eğer proapoptotik protein miktarı fazla ise hücre apoptoza yaklaşır. Bad, Bax, Bid, BclXs, Bak, Bim, Puma ve Nox proapoptotik proteinlerdir. Buna zıt olarak anti-apoptotik protein fazla ise hücre apoptozdan kaçır. BCL-2, BCL-Xl ve Mcl-1 bu tipe örnek oluşturur. Proapoptotik olanlar sitozolde bulunarak sitokrom-c ve AIF (Apoptoz indükleyici faktör) salınmasını artırır, böylece apoptoz tetiklenir. Zıt çalışma gösteren antiapoptotik proteinler ise mitokondri dış zarı, endoplazmik retikulum ve çekirdek zarında bulunarak por oluştururlar ve iyon geçişi sağlanır (örneğin Ca^{++}). Apoptoz da görev yaptıkları bilinen kaspazlar da aynı şekilde etki ederler (Coşkun,2011).



Şekil 2.8. BCL-2 onkoproteininin apoptoz üzerine etkisini göstermektedir (Coşkun, 2011).

2.6.1.2 P53

P53 geni, DNA hasarı oluştuğunda hücre döngüsünü G1 fazında durdurur, o hücreye onarım için süre tanıyan transkripsiyon faktörü olarak görev yapar. Eğer tamir gerçekleşmezse üst başlıkta ifade edildiği gibi proapoptotik proteinler olan Bax, Apaf-1 ve Fas sentezlenir, BCL-2 ve BCL-Xl gibi anti- apoptotik proteinleri engelleyerek apoptozu tetikler.



Şekil 2. 9. p53 proteininin apoptoz üzerine etkisi (Altunkaynak ve Özbek, 2008).

2.6.1.3. Fas (APO-1 veya CD95)

Tümör Nekrozis Faktör (TNF) reseptör ailesinin en iyi bilinen üyesi bağışıklık sisteminde görev yapar. Fas, sitotoksik T hücreleri ve naturel killer hücreleri üzerindedir ve hücre ölümü kontrol edilir. Hücre yüzeyinde kendi reseptörüne bağlanır ve trimerizasyon gerçekleşir reseptörler aktif hale gelir ve FADD ile bağlanarak prokaspazlar uyarılır ve apoptoz başlatılır. Buna benzer olarak TRAIL reseptörleri ile de apoptoz indüklenir (Coşkun, 2011).

2.6.1.4. Kaspazlar

Kaspazlar, aspartik asitten sonraki peptit bağına kıran sistein proteazlardır (Coşkun, 2011). Stoplazmada inaktif olan proenzimler proteolitik parçalanma ile birlikte aktifleşir. İlk önce mitokondri zarı zedelenir bunun sonucunda zar değişimleri, hücre iskeleti ve çekirdek değişimine sebep olan aksaklıklar oluşur. Sitokrom-c'nin prokaspaz inaktif enzimlerini aktif eder.

100 farklı hedef proteinler kesime uğratarak hücre zarı tomurcuklanmasını sağlarlar. Apoptoz başlatılır ve DNA da geri dönüşümü olmayan parçalanmalar başlar (Altunkaynak ve Özbek, 2008).

Kaspazların 3 tipi vardır:

Başlatıcı kaspazlar (Kaspaz 2, 8, 9, 10),

Efektör kaspazlar (Kaspaz 3, 6, 7),

İnflamatuar kaspazlar (Kaspaz 1, 4, 5, 11, 12, 13, 14).

Kaspaz-9: Kaspaz-9 sistein proteazların kaspaz ailesinin bir üyesidir, sitokin işlenmesi ve apoptozla ilişkisi olduğunu göstermektedir. Apoptotik uyarıcıdan hücreler mesaj aldıklarında mitokondriden sitokrom c salınır sonra dATP ile birlikte, memeli Ced-4 ile homolog, Apaf-1'e bağlanır. Sonuçta oluşan kompleks aktivasyonuna neden olan Kaspaz-9'a yardım eder. Aktive edilmiş Kaspaz-9 kaspaz kaskadını başlatan kaspaz-3, 6 ve 7 gibi aşağı yönde kaspazlar ile ayrılmaktadır. Homozigot Kaspaz-9'un çoğu erken beyin gelişimi boyunca apoptozisin redüksiyonu tarafından sonuçlanan kusurlu beyin ve önemli derecede genişletilmesiyle perinatal olarak fare ölümüne sebep olmaktadır. Kaspaz-9 fonksiyonu santral sinir sisteminin normal gelişimi süresince apoptoz için esastır. Kaspaz-9 aktivasyonu inhibe olursa nörodejenaratif hastalıklara, nörolojik hastalıklara sebep olur (Ghavami, vd., 2009).

Kaspaz-3: Kaspaz-3 çoğunlukla birkaç anahtar sellüler proteinlerin spesifik ayrımını katalizleyen, aktive olmuş ölüm proteazıdır. Apoptoz da bu kaspazların spesifik zorunluluğuna karşın şimdiye kadar büyük ölçüde bilinmeyen olarak kalmıştır. Kaspaz-3 aktivasyon yolağı belirlenmiştir ki kaspaz-9 fonksiyonuna ve mitokondriyal sitokrom c salınımına ya bağımlı ya da bağımsızdır. Kaspaz-3 normal beyin gelişiminde esastır ve dikkate değer doku, hücre tipi ve ya ölümü uyaran spesifik davranışı önemlidir. Kaspaz-3 apoptozisin birkaç tipik niteliği için gereklidir ve tüm hücre tiplerinde incelenmiş apoptik DNA fragmentasyonu ve kromatin kondensasyonu için zorunludur. Kaspaz-3 apoptotik cisim oluşumu ve hücrenin parçalarına ayrılmasıyla ilişkilendirilmiş belirli süreçler için temeldir. Ancak kaspaz-3, hücre yaşayabilirliğini kaybetmesiyle sorumluluğunu yaparken; ya o evrede ya da o evreden önce fonksiyonu mümkün olabilir (Ghavami, vd., 2009).

Kaspaz-7: Sistein proteazlarla ilişkili bir optimal peptit tanıma sekansı paylaşır ve genellikle birçok endojen substratlara sahiptir. Birkaç substratlar spesifik olarak kaspaz-7 tarafından bölünür. 303 aminoasite sahiptirler. Sitozolde bir homodimer olarak yer alırlar. 20 ve 11 kDa büyüklüğünde büyük ve küçük katalitik altbirimlere sahiptirler. Apoptoz ve inflamasyonda tanımlanmış Kaspaz-7'nin rolleri hastalığa katkı sağlayan hücre ölümü ve inflamasyon şartlarında Kaspaz-7 aktivasyon müdahalesi yarar sağlayabilir. Sepsis ve nörodejeneratif hastalıklarda potansiyel rolleri olan Kaspaz-7 geni ayrıca diyabet mellitus ve romatoid artrit ile de ilişkilidir (Ghavami, vd., 2009).

2.6.2. Apoptoz mekanizmaları

Programlı hücre ölümünde birbirini izleyen basamakların neler olduğu tam olarak bilinmemektedir. Hücrenin kendi otomatik saati olan genlerin aktivasyonu veya çevreden gelen sinyallerle apoptozis başlamaktadır. Apoptoz önceden hazır olan hücrelerde (primer) başlatılabilir ya da bir uyaran sonucu sekonder olarak gelişir. Hücre dışı uyaranlar (TNF), koloni uyarıcı faktörler (CSF), nöron büyüme faktörü (NGF), insülin benzeri büyüme faktörü (YGF), IL-2 gibi maddelerin ortamda azalması, glukokortikoidler, radyasyon, ilaçlar, çeşitli antijenler gibi pozitif uyaranlar olabilir.

Uyaranlar, hücre içinde Ca^{++2} artışına neden olmakta ve / veya Siklik Adenozin Monofosfat (cAMP) gibi hücre içi ikincil habercileri aktive etmektedir. Bu da “cascade” olarak isimlendirilen ve tam olarak açıklanamayan “şelale” sistemiyle hücre yapısında değişikliklere neden olan pek çok basamağı uyarmaktadır (Altunkaynak ve Özbek, 2008).

Bu güne kadar yapılan çalışmalarda iki temel apoptotik yol belirlenmiştir.

2.6.2.1. İntrinsik ya da mitokondriyal yolu

Hücre içi sinyaller alındığında proapoptotik protein Bid, Bcl-2'nin aktivitesini bloke ederken Bax ve Bak aktifleşir böylelikle daha önce bahsettiğim indükleyiciler gibi görev yaparak mitokondri zarında por oluşturulur ve iyon transportu sağlanır. Bu porlardan sitokrom-c, Smac (Second mitochondria-derived Activator of Caspase), Endo-G (Endonukleaz-G), Ca^{++} ve AIF salınır. Smac IAF (İnhibitör apoptotik faktör)'ü baskılar ve apoptoz hızı artar. IAF kaspaz-3 ve kaspaz-8' i inaktif eder. AIF çekirdeğe bağlanır ve çekirdek parçalanır.

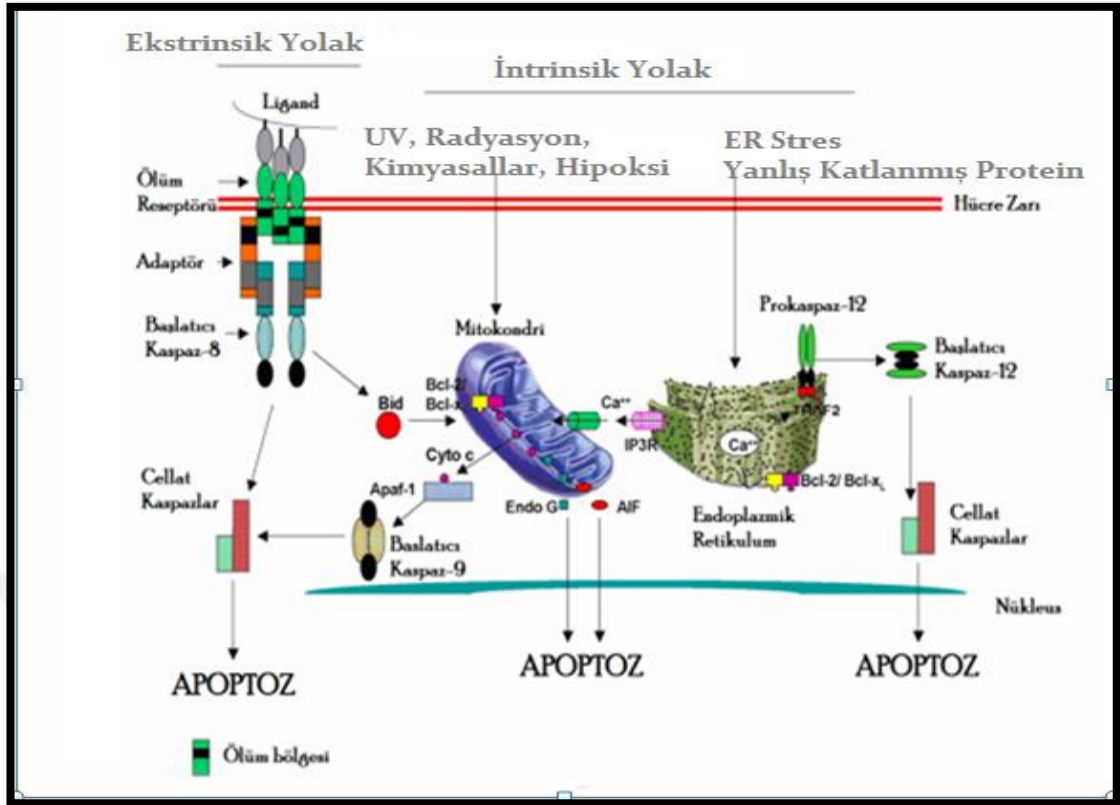
Endo- G ile DNA parçalanır. Mitokondriden sitokrom-c, Apaf-1 (Apoptotik proteaz aktive eden faktör), ATP katılarak Apoptozom oluşumu sağlanır. Apoptozom başlatıcı kaspaz olan kaspaz-9 keser ve efektör kaspaz olarak görev yapan kaspaz-3 'ü aktifleştirir böylelikle ICAD (İnaktif kaspaz aktive edici DNaz)'ın aktivitesi engellenerek CAD (Kaspaz aktive edici DNaz)'ı serbestleştirilir. Bu serbestleşmeyle kromatin yoğunlaşması sağlanır (Altunkaynak ve Özbek, 2008).

2.6.2.2. Ekstrinsik ya da reseptör hücre ölümü yolu

Hücre yüzeyinde bulunan Fas, TNFR, DR5 gibi ölüm reseptörlerine, FasL, TNF-alfa, TRAIL gibi ölüm faktörleri bağlanarak reseptörlerde timerik yapı oluşturulur. Bu yapı oluşumuyla prokaspazlar birleşir ve DISC (Death inducing singnaling complex) yapısı oluşturulur. Bunun sonucunda inaktif kaspaz-8 aktifleşir başlatıcı kaspazlardan olan aktif kaspaz-8 efektör olan kaspaz-3' aktif hale getirir bu aktifleştirme dolaylı ya da doğrudan olmak üzere iki yolla gerçekleşir. Başlatıcı olan kaspaz-8 doğrudan kaspaz-3'ü aktifleştirebildiği gibi dolaylı olarak, Bid'i keser ve instrinsik mekanizmada başlatıcı kaspaz-9'u aktif hale getirir bunun sonucunda kaspaz-3 aktif hale gelir. Sonuç olarak 2 yolla da CAD aktifleşir ve DNA fragmantasyonu sağlanır.

Hücre zarı yapı taşı olan sfingomyelin de ekstrinsik yol oluşturur. Bu yapı taşı sfingomyelinaz enzimi ile seramid' e dönüşümü sağlanır. Bu molekülde seramidaz enzimi ile sfingozine dönüştürülür bu molekül proapoptotik protein olan Bid miktarını arttırarak apoptoz indüklenir. Granzim- Perforin yolunda ise patojenler ve tümör hücrelerinin yok edilmesinde etkinlik gösterir.

Serin proteaz olan moleküller sitotoksik T lenfositler ve doğal katil hücrelerinin sitoplazmik salgı granüllerinde bulunmakta olup sitotoksik T lenfositlerin hücreye bağlanmasıyla perforinler serbestleşir ve por oluşturulur. Bu porlardan Ca^{++} geçişini fazlalaştırır. Bu Ca^{++} fazlalığı Granzim B'yi serbestleştirir. Kaspazların aktivitesiyle birlikte Granzim B, DNA parçalanması nedeniyle apoptoza sebep olur (Altunkaynak ve Özbek, 2008).



Şekil 2.10. Apoptozun ana yolları ve apoptotik süreçte yer alan temel proteinler (Raff, 1998)

3. MATERYAL VE METODLAR

3.1. Materyal

3.1.2. Hücre kültürü donanımları

Kullanılan Hücre Kültürü Donanımları ekler kısmında Ek-1 de gösterilmiştir.

3.1.3. Kullanılan cihazlar

Kullanılan cihazlar ekler kısmında Ek-2 de gösterilmiştir.

3.1.4. Kullanılan çözelti ve tamponlar

Kullanılan çözelti ve tamponlar ekler kısmında Ek-3 de gösterilmiştir.

10X TBS Hazırlanması

86,6 gr NaCl, 12,11 gr Tris- Baz karışımı pH: 8'e ayarlanır bunun ardından distile su ile 1000 µl'e tamamlanır. Hazırlanan 10X TBS kullanılmak üzere 1X TBS'e dönüştürülür.

Yürütme Jelinin Hazırlanması

Proteinlerin ağırlıklarına göre ayrılımları için %12'lik SDS poliakrilamid jelde yürütülür. Jel içeriği Ek-4 te gösterilmiştir.

Hücre Dondurma Medyasının Hazırlanması

1ml dimetilsülfoksit (DMSO) ile 9 ml Fetal sığır serumu (FBS) filtreden geçirilerek dondurma medyası hazırlanır. Bu medya ile hücrelerin uzun süre sıvı azot tankı içinde saklanması sağlanabilir.

Bradford Reagent Hazırlanması

100 mg Coomassie Blue 50 ml %95'lik etanol içinde çözündürülür. 100 µl %85'lik fosforik asit eklenir, distile su ile 1000 µl'e tamamlanır, süzülerek kullanıma hazır hale getirilir.

%10 APS Hazırlanması

100 mg Amonyum persülfat 1000 ml distile su ile çözündürülür.

%10 SDS Hazırlanması

10 g SDS, 90 ml distile su ile çözündürülür ve 1000 ml'e tamamlanır.

1,5 M Tris-HCl Hazırlanması

27,23 g Tris-baz 80 ml distile su ile çözündürülür. pH'ı 8,8'e ayarlanır ve distile su ile 150 ml'e tamamlanır.

0,5 M Tris-HCl Hazırlanması

6 g Tris-baz 60 ml distile su ile çözündürülür. pH'ı 6,8'e ayarlandıktan sonra distile su ile 100 ml'e tamamlanır.

3x SDS Loading Buffer Hazırlanışı

Cell Signaling Technology marka Blue Loading Buffer Pack kullanılarak hazırlanır. 3X Reducing SDS Loading Buffer üzerine 1/10 hacimde 30X ditiotritol (DTT) Reducing Agent eklenerek hazırlanır.

%5'lik Yağsız Süt Tozu Hazırlanışı

Cell Signaling Technology marka Nonfat Dry milk kullanılmıştır. 2,5 g yağsız süt tozu 50 ml distile su ile çözündürülür.

1x Tris-Glycine SDS Running Buffer

Cell Signaling Technology marka 10x Tris-Glycine SDS Running Buffer'dan 200 ml alınıp, 1800ml'ye tamamlanmıştır.

1x RIPA Buffer Hazırlanışı

10x RIPA Buffer'dan 100 µl alınıp üzerine 900 µl distile su eklenir.

3.1.5. Kullanılan primerler

Kullanılan primerler ekler kısmında Ek-5 te gösterilmiştir.

3.2. Metodlar

3.2.1. Hücre kültürü

DETAE Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'nde görev yapan Prof. Dr. Oğuz ÖZTÜRK tarafından hediye edilen MDA-MB-231 (ER-, PR-, HER2- metastatik adenokarsinom) insan meme kanseri hücre hattı kullanılacaktır. Epitelyal hücreler, hücre kültür ortamında büyütülerek çalışmamızın deneyleri için kullanılacaktır.

MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları %10 ısı ile inaktive olmuş FBS, 2mM L glutamin, 100 µg/ml penisilin-streptomisin içeren RPMI 1640 besiyerinde, 37°C de ve 5% CO₂'li inkübatörlerde büyütülmektedir.

3.2.2. Hücre canlılık testi (MTT testi)

MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin uygun besi yerlerinde % 5 CO₂ içeren 37°C’de nemli inkübatörde büyütülmesinin ardından, 3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) testi uygulanarak CAPE ve ZEB’in değişik konsantrasyonlarda zamana bağlı etkilerini göstermek üzere tespit edilmesi hedeflenmektedir. 1x10⁴ hücre/kuyu 96 kuyucuklu petri kaplarına ekildikten sonra gece süresince yapışmaları beklenecektir. Hücreler 0-160 µM ZEB ve 0-160 µM CAPE ile 24 saat boyunca muamele edilecektir. Hücreler MTT tetrazolium tuzu ile 4 saat bekletilir, bu bekleme sonucu kesilen formazan bileşiklerin canlı hücrelerin yüzeyinde birikmesi gerçekleşir. Bu nedenle örneklerin spektrofotometrik okuma sonucundan (Abs 570 nm) ilaç uygulanmamış kontrol örneklere oranlama yapılarak ilaçların bağıl hücre canlılığı üzerine etkisi belirlenecektir.

3.2.3. Sağ kalım / Tripan mavisi boyama testi

Sağ kalım testi ile uygulanan ilaçların belirli konsantrasyonda zamana bağlı etkisinin tespit edilmesi hedeflenmektedir. Bu amaç doğrultusunda MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı her bir kuyucukta 1x10⁵ hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu petrilere ekilir. Hücreler 24, 48, 72 ve 96 saat boyunca MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı için hücrelerin yarısının öldüğü değerlerde (IC₅₀ değeri) uygulanan ilaçlarla sırasıyla muamele edilir. Belirlenen saatlere göre hücreler, her 24 saatte bir olacak şekilde sayımları iki tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilir. Bu amaçla önce örnekler Fosfat Buffer Salin (PBS) ile yıkanıp ve tripsin ile kaldırılır. Hücreler santrifüj edilir, üzerine 50 µl 0.4 % (w/v) Tripan Mavisi ve 50 µl PBS konulur ve bu karışımdan 10 µl çekilerek Neubauer hemositometrede sayılır.

3.2.4. Soft-agar koloni oluşum deneyi

Hücrelerin yüzeye yapışmasının engellendiği ortamda hücrelerin büyüebilme yeteneğinin ölçülmesi amacı ile soft-agar koloni oluşum testi yapılacaktır. Hücreler ekilmeden önce 6 kuyucuklu petrilere %20 FBS içeren RPMI-1640 ile 1: 1 oranında % 0.5’lik agaroz ile kaplanır. 2,5X 10³ MDA-MB-231 meme kolon kanseri hücresi 6 kuyucuk olacak şekilde 1: 1 oranında %20 RPMI-1640 ile % 0.3 agaroz ve hücreler karıştırılıp, %0,5 agaroz ile kaplanan petrilere ekilir.

MTT testi sonucuna IC₅₀ değerlerine göre belirlenen doz uygulanan ilaçlar ve uygulanan ilaç konsantrasyonu ile aynı miktarda uygulanan ilaçların çözünmediği madde (DMSO gibi) ile 15 gün muamele edilir. Hücreleri beslemek için üst medya 2 günde 1 yeni medya ile değiştirilir. Oluşan kolonileri gözlemleyebilmek için %0,005'lik kristal viyole ile 20 dakika bekletilir. Soft-agarda hücrelerin oluşturduğu koloniler ışık mikroskobu ve floresan mikroskobunda 100X büyütme ile incelenir.

3.2.5. Metastatik etkinin belirlenmesinde kullanılacak parametreler

3.2.5.1. Koloni oluşum testi

Uygulanan ilaçların hücrelerdeki metastatik etkisini ve hücreler tek başına bırakıldığında nasıl davrandıklarını belirlemek için koloni oluşum testi yapılacaktır. 4X10³ MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri/kuyucuk olacak şekilde 6 kuyucuklu petrilere ekilir. Hücreler IC₅₀ değerlerine göre uygulanan ilaçlar ile 24, 48, 72 ve 96 saat muamele edildikten sonra ilaçsız medya ile değiştirilerek hücrelerin büyümesi incelenmektedir. 14 gün sonunda hücreler metanol asetik asit (3: 1) ile 5 dakika muamele edilerek fikse edilecektir. Hücreler %0,5'lik kristal viyole ile 20 dakika muamele edildikten sonra yıkanır ve morfolojik görüntüler trans UV ile çekilir.

3.2.6. Anti-metastatik etkinin belirlenmesinde kullanılacak parametreler

3.2.6.1. Yara iyileşme analizi

Uygulanan ilaçların MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde lateral hücre hareketi üzerindeki etkileri yara iyileşme analizi ile tespit edilmeye çalışılacaktır. Bu amaçla hücreler 6 kuyucuklu petri kaplarına ekilir. Ekimden önce petri kaplarının alt yüzeyleri birbirine paralel 15 adet çizgi ve bu çizgilere dik birbirine paralel 3 çizgi çizilerek hazırlanan çıkartma kağıtlar 6 kuyucuklu petrilerin altına yapıştırılır ve hücreler ekilir. Ekimden 24 saat sonra birbirine paralel uzanan 3 çizgi hizasındaki hücreler 200 µl'lik steril pipet ucu ile kazınarak yara oluşturulur. Birbirine paralel uzanan 15 çizgi ile yara çizgilerinin kesiştiği noktalardaki yara genişlikleri, invert mikroskopta görüntüleri çekilecek olup hemen ardından petrilere kontrol ve ilaçlı medya eklenecektir. Her gün aynı saatte görüntüleme yapılacak ve medya değiştirilecek olup, işleme 48 saat devam edilecektir.

3.2.7. Uygulanan ilaçların epigenetik üzerine etkisinin belirlenmesi

3.2.7.1. DNA izolasyonu

Uygulanan ilaçların metilasyon üzerine etkisini belirlenmesinde kullanılmak üzere MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinden total DNA izolasyonu yapılacaktır. 2×10^6 hücre/kuyucuk olacak şekilde hücreler T75 petrilere ekilir. 24 saat sonra ekilen hücrelere ilaç uygulanır.

İlaç uygulandıktan 24 saat sonra total DNA izolasyonu yapılır.

- Hücreler 1X PBS ile yıkanır, kazınır, toplandıktan sonra cell lysis buffer ile 40' buzdaki bekletilecektir.
- 13200 rpm de 10' santrifüj edildikten sonra üst faz yeni ependorfa toplanacaktır.
- RNA ve proteinlerden kurtulmak için 8 µl RNaz ve 6 µl Proteinaz K eklenir, 37°C'de 1 saat inkübe edilecektir.
- DNA'dan proteinleri ayırmak için 1:1 oranında Fenolkloroform eklendi ve 15' santrifüj edilecektir.
- Proteinleri çöktürmek için 200 µl amonyum asetat eklenir 20 saniye vortekslenir.
- Santrifüj yapıldıktan sonra üst faz yeni ependorfa alınacaktır.
- DNA'yı kimyasal olarak çöktürmek için 600µl izopropanol eklenecektir.
- Santrifüjle genomik DNA çöktürüldükten sonra 600 µl %70 etanol (EtOH) eklenerek DNA tekrar çöktürülür.
- Etanol kurutulduktan sonra 20 µl TE eklenerek gece boyunca oda sıcaklığında DNA çözündürülecektir.
- İzole edilen total DNA konsantrasyonları spektrofotometrede ölçülür.

3.2.7.2. Bisüfit modifikasyon ve metilasyon spesifik PCR (MSP)

Metile olmuş sitozinlerde her hangi bir değişiklik olmadan, unmetile sitozin rezidülerinin urasile dönüştürülmesi prosesidir. Genomik DNA'nın bisüfit dönüşümü için Zymo EZ DNA Methylation-Gold™ kit (D5005,Zymo Research Corp,Orange,CA) uygulanacaktır.

Orijinal sekans	Bisülfıt işlemi sonrası
Unmetile DNA A-C-G-A-C-G-A-C-G-A	A-U-G-A-U-G-A-U-G-A
Metile DNA A-C-G-A-C-G-A-C-G-A	A-C-G-A-C-G-A-C-G-A

Bu dönüşümlere uygun olarak oluşturulan metile ve unmetile primer çiftleri dönüşüm sonrası, farklı kalınlıkta ve büyüklükte bantlar vermektedir. Örnekler MSP uygulamasıyla, aynı örneğin metile ve unmetile primerleri ile iki ayrı reaksiyonu kurularak gerçekleştirilmesi planlanmaktadır. Bant kalınlıklarına göre ilgili dizinin metile veya unmetile durumu değerlendirilecektir.

DNA'nın bisülfıt dönüşümü için Millipore CpGenome Turbo DNA Modification Kit protokolü takip edilecektir.

Bisülfıt dönüşümü yapılmış olan DNA kalıp olarak kullanılıp kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 başta olmak üzere anlamlı sonuç elde edilen genlerin metilasyon durumunu belirlemek için MSP yöntemi uygulanacaktır.

PCR koşulları

95°C 5 dk başlangıç denatürasyonu, 40 döngü; 94°C-30s, 50°C- 30 s, 72°C-30s ve bitiş 72°C 7 dk, şeklinde yapılması ön görülmekte ve gerekli optimizasyonlar yapılacaktır. PCR sonuçları denatüre etmeyen jel üzerinde incelenecektir.

3.2.8. İmmunblot analizi

Hücrelere ilaçların farklı doz ve konsantrasyonlarda uygulamasının apoptotik düzenlenmeyle ve hücre döngüsüyle ilişkili proteinlerin ifade düzeylerinin gösterilebilmesi için total protein içerikleri özütlenerek, hedef proteinlerin ifade düzeyleri incelenecektir. Bu nedenle 4×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde 6 kuyucuklu hücre petrilere ekildikten ve ilaç uygulaması yapıldıktan sonra soğuk 1X PBS ile yıkanacaktır. Proteinlerin özütlenmesi için içerisinde 20 mM Tris-HCL (pH 7.5), 150 mM NaCL, NP-40 % 0.5, (v/v), 1mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 1 mM DTT, proteaz inhibitör (Complete EDTA-free, Roche) bulunan çözelti hazırlanacaktır. Kazıyıcı yardımı ile toplanan hücre kalıntıları, 1X PBS içerisinde 300 g'de 5 dakika santrifüj edilecektir. Üst sıvı atılır ve uygun miktarda protein özütleme çökeltisi eklenir. 20 dakika buz üzerinde bekletildikten sonra karışım 15 dakika boyunca, 13200 g' de 4°C' de santrifüj edilecektir. Üst sıvı yeni bir mikrofüj tüpüne alınacaktır.

Bradford yöntemi ile (Bradford çözeltisi, Biorad) protein konsantrasyonu BSA ile elde edilen standart eğriye göre belirlenecektir. Hazırlanan % 8-12'lik SDS-PAGE akrilamid jel'e yüklenen örnekler yürütüldükten sonra nitroselüloz membrana (Biorad) aktararak, uygun primer ve sekonder antikorlar ile inkübe edilecektir. (Kaspaz7, Kaspaz 9, Kaspaz3, gibi üst yolak protein ilişkilerine bakılacaktır). Hedef proteinlerin ifadesi kemilüminesans ajanlar ile (Lumi-Light Plus, Roche) inkübe edildikten sonra film (Roche) üzerine geçirilerek analiz edilecektir. Elde edilen sonuçlar antikorlarından arındırılan membranlarda yeniden inkübasyon ile β - aktin belirlemesinden sonra ImageJ programı ile değerlendirilerek sunulacaktır.

3.2.8. İstatistiksel analiz

Üç deney tekrarlarıyla elde edilen verilerin ortalaması alınarak sonuçlar oluşturulmuş olup bu elde edilen veriler Graph Pad 4.04 istatistik programı ile analizleri gerçekleştirilmiştir. Karşılaştırılmalarda bağımsız t testi kullanılmış olup anlamlı değişiklikler için p değeri < 0.05 belirlenmiştir.

$P > 0,05$

$P < 0,05$ önemli düzeyde farklılık

$P < 0,01$ çok önemli düzeyde farklılık

$P < 0,001$ ileri düzeyde farklılık olarak değerlendirilmiştir.

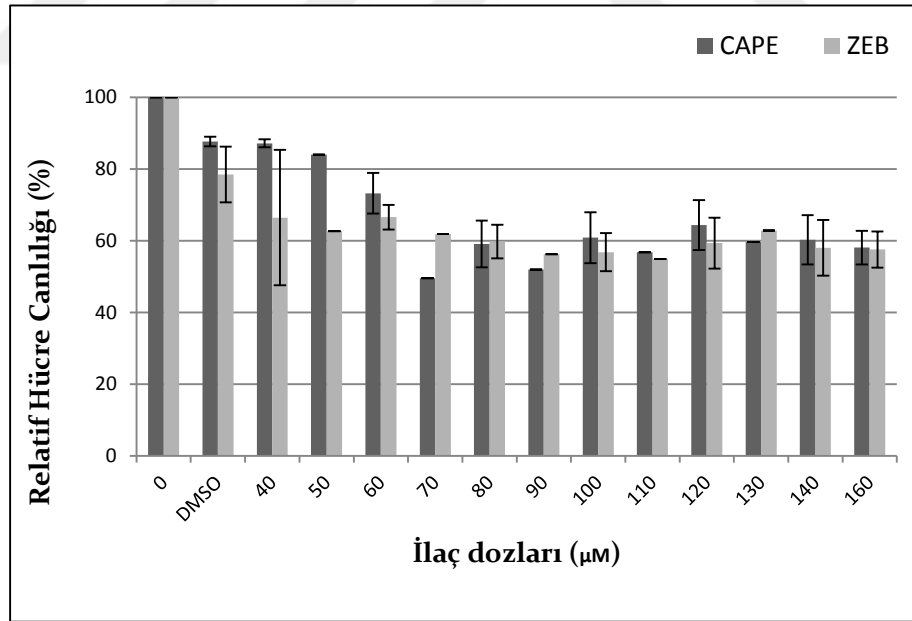
4. BULGULAR

4.1. CAPE, ZEB, CAPE+ZEB Kombinasyonunun MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattında Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

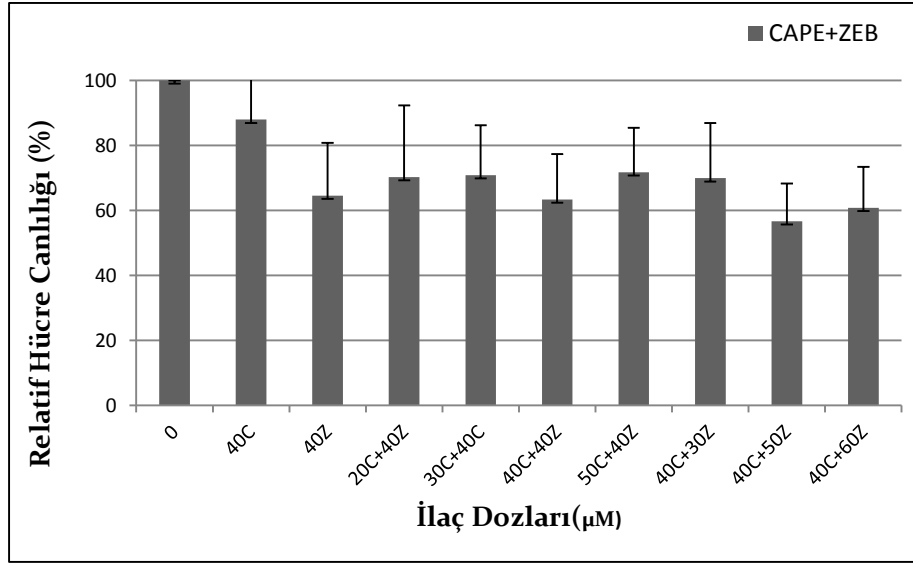
Amaç Farklı konsantrasyonlarda (0-160 μ M) CAPE ve ZEB ile muamele edilmeleri sonucunda MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında CAPE ve ZEB'in hücre canlılığı üzerine etkisini belirleyebilmek için MTT hücre canlılığı testi uygulanmıştır (şekil 4. 1).

0 μ M %100 kabul edilerek diğer örneklerle ait canlılık değerleri oransal olarak ortalama absorbans değerlerinden hesaplandı. Bulgular CAPE VE ZEB'in ayrı ayrı kullanımının MDA-MB-231 hücrelerinde hücre ölümüne neden olduğunu göstermektedir (şekil 4. 1).

CAPE için 70 μ M ZEB için 80 μ M % 50 hücre canlılığı görülmüştür. Bu nedenle ilaç dozları CAPE 70 μ M, ZEB 80 μ M olarak belirlenmiştir. CAPE+ZEB kombine uygulamada da ilaçların çeyrek dozları baz alınarak sonuçlar desteklenmiştir (şekil 4. 2).



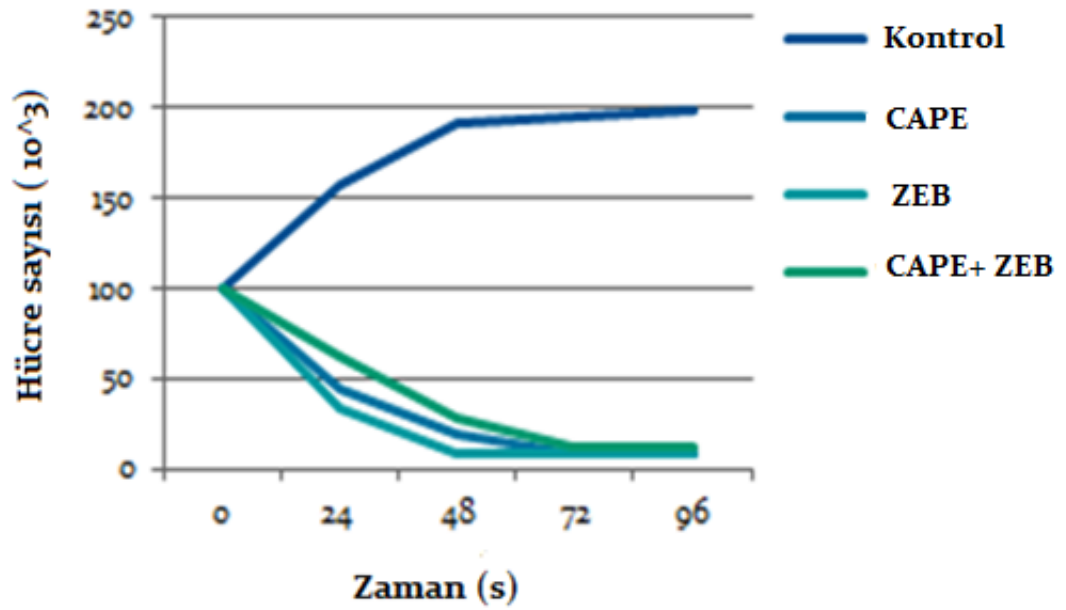
Şekil.4.1. ZEB ve CAPE'in MDA-MB231 hücre hatlarında 24 saatteki hücre canlılığına etkisinin incelenmesi (0-160 μ M). MDA-MB-231 hücre hatlarından 1×10^4 hücre 96 kuyucuklu petrilere ekilmiştir. Belirli dozlar arasında (0-160 μ M) ZEB uygulamasından 24 saat sonra hücre canlılığı MTT testi ile belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre 80 μ M ZEB, 70 μ M CAPE'in etkin doz olduğu gösterilmiştir.



Şekil 4.2. CAPE ve ZEB'in kombine dozlarının MDA-MB-231 hücre hatlarında 24 saatte ki hücre canlılığına etkisinin incelenmesi. *MDA-MB-231 hücre hatlarından 1×10^4 hücre 96 kuyucuklu petrilere ekilmiştir. CAPE ve ZEB' in çeyrek dozlarından oluşan (CAPE:17,5 µM ve ZEB:20 µM) kombine uygulamasından 24 saat sonra hücre canlılığı MTT testi ile belirlenmiştir.*

MDA-MB-231 hücrelerinde 70 µM CAPE ve 80 µM ZEB'in zamana bağlı olarak hücre sağ kalım üzerine etkisini belirleyebilmek için hücre sağ kalım testi yapılmıştır. 24, 48, 72, 96 saat inkübasyonları yapıldı ve 24 saat olacak şekilde her gün aynı saatte iki tekrarlı olarak hemositometre ile MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin sayımları yapıldı. Bu analizler sonucunda bir grafik oluşturuldu (şekil 4. 3).

İlaç uygulanmayan kontrol grubunda hücre sayısının saat aralıklarına göre arttığı, CAPE, ZEB, CAPE+ZEB konsantrasyonlarının uygulanmasıyla hücre canlılığının azaldığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda bu çalışmanın amacı olan CAPE+ZEB'in beraber kullanımıyla, ilaçların ayrı ayrı verildiğinde yarattığı toksik etkinin azaltıldığı görülmüştür. CAPE ve ZEB ayrı uygulanan hücrelerde 24 saatte toksik etkiden dolayı ani hücre ölümlerine sebep olduğu bu etkinin ilaçların çeyrek dozlarından oluşan kombine uygulamasıyla saatlere göre orantılı bir şekilde hücre canlılığının azalmasını sağladığı böylece ilaçların hücrede yarattığı toksisitenin azaltılması yönünde beklenen sonuçların elde edildiği gözlenmiştir (şekil 4. 3).



Şekil 4. 3. CAPE, ZEB ve kombine ilaç uygulanmasının MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin çoğalması üzerine etkisinin gösterilmesi. MDA-MB-31 meme kanseri hücreleri 6 kuyucuklu petrilere 80×10^3 hücre olacak şekilde ekildi. İlaç uygulanmayan Kontrol, $70 \mu\text{M}$ CAPE, $80 \mu\text{M}$ ZEB ve $20 \mu\text{M}$ ZEB+ $17,5 \mu\text{M}$ CAPE ilaç kombinasyonu 24 saat, 48 saat, 72 saat ve 96 saat zamana bağlı olarak denendi. Hücrelere %0.4 (w/v) Tripin Blue ($50 \mu\text{l}$) ve $1 \times \text{PBS}$ ($50 \mu\text{l}$) 1:1 oranında eklendi. Neubauer hemositometre ile hücreler sayıldı. Y eksenini boyanmayan canlı hücre sayılarını göstermektedir.

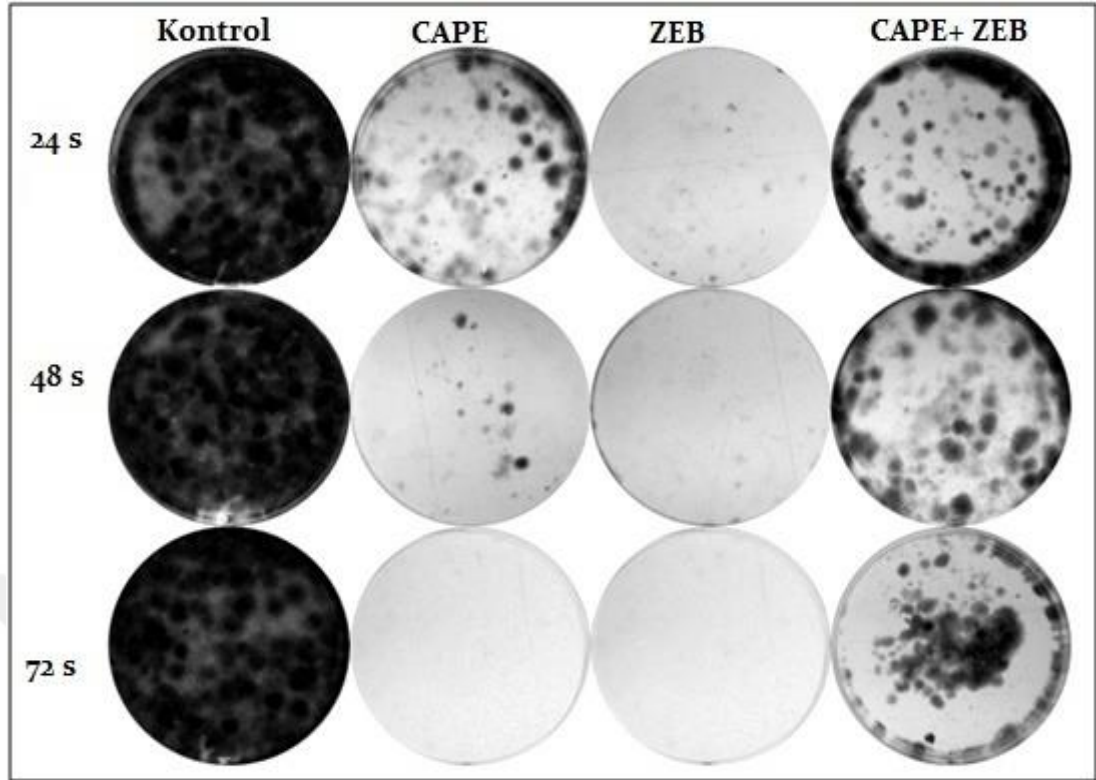
4.2. CAPE, ZEB, CAPE+ZEB Kombinasyonunun MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattında Hücre Metastaz Üzerine Etkisi

CAPE ve ZEB'in hücredeki metastatik etkisini ve hücrelerin tek başına bırakıldığında nasıl davrandığını belirlemek için koloni oluşum testi yapılmıştır.

$70 \mu\text{M}$ CAPE uygulanan hücreler, ilaç uygulanmamış kontrol gruplarıyla karşılaştırıldıklarında zamana bağlı olarak hücre proliferasyonunda azalma görülmüştür.

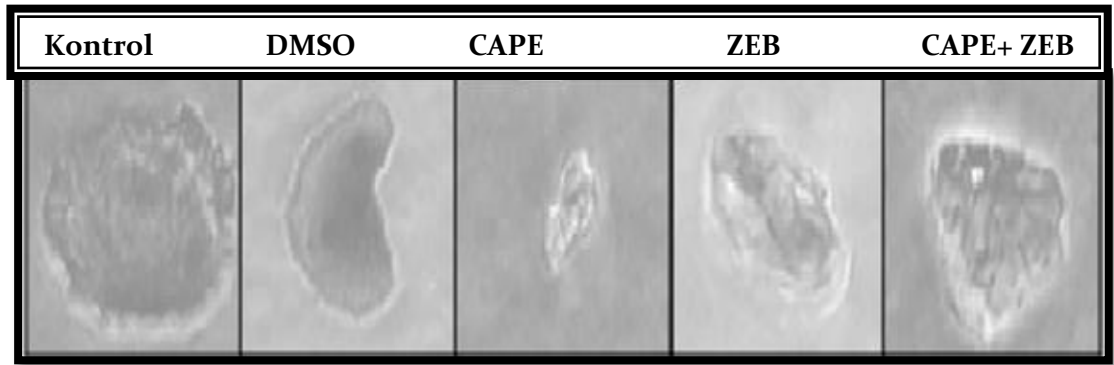
$80 \mu\text{M}$ ZEB uygulanan hücreler, ilaç uygulanmamış kontrol gruplarıyla karşılaştırıldıklarında zamana bağlı olarak hücre proliferasyonunda azalma gözlenmiştir.

CAPE ve ZEB uygulanan hücreler karşılaştırıldığında ZEB uygulanan hücrelerdeki hücre proliferasyonundaki azalmanın daha fazla olduğu görülmüştür. İlaçların yarattığı toksisitenin giderilmesi için uygulanan kombine terapinin tek başlarına ilaç uygulanmasına oranla hücre proliferasyonundaki toksisiteyi azalttığı gözlenmiştir (şekil 4. 4).



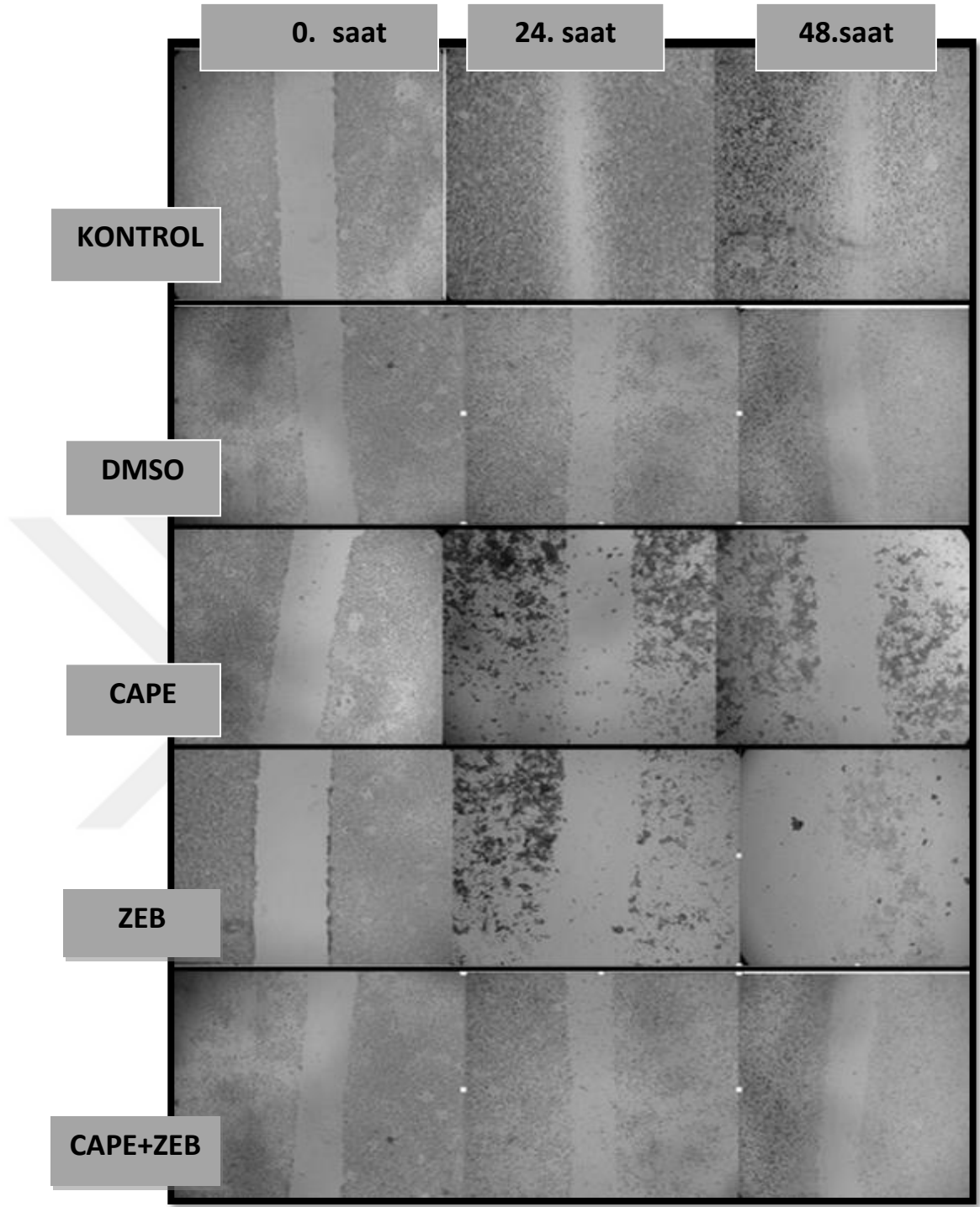
Şekil 4. 4. CAPE, ZEB ve CAPE+ ZEB Kombinesinin MDA-MB-231 Hücre Hattı Hücrelerinin Metastazı Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi. MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri 4×10^3 hücre/ kuyucuk olacak şekilde 6 kuyucuklu petrilere ekimi yapıldı. Hücreler 70 μ M CAPE , 80 μ M ZEB, 17,5 μ M CAPE+20U μ M ZEB kombinasyonu ile 24, 48, 72 saat muamele edildikten sonra ilaçsız medya ile değiştirilerek hücrelerin büyümesi incelendi. 14 gün sonunda hücreler metanol asetik asit (3:1) ile 5 dakika muamele edilerek fıkse edildi. Hücreler %0,5' lik Kristal viyole ile 20 dk muamele edildikten sonra yıkandı ve görüntüler trans UV ile çekildi.

Hücrelerin yüzeye yapışmasının engellendiği ortamda hücrelerin büyüebilme yeteneğinin ölçülmesi amacı ile Soft- Agar koloni oluşum testi yapılmıştır. 70 μ M DMSO uygulanan hücrelerde, hiçbir ilaç uygulanmamış kontrol grubuna benzer bir şekilde DMSO'nun hücre büyümesini ve koloni oluşumunu engellemediği görülmüştür. 70 μ M CAPE ile 80 μ M ZEB uygulanan hücrelerde yüzeye bağımsız olarak koloni oluşumunu ve büyümesini engellediği belirgin bir şekilde gözlenmiştir. CAPE ve ZEB in beraber kombinasyonu uygulandığında ilaçların ayrı ayrı uygulanmasına oranla, toksisiteyi azaltarak yüzeye bağımsız olarak koloni oluşumunu ve büyümesini daha az engellediği tespit edilmiştir.



Şekil 4. 5. Hücrelerin Yüzeye Yapışmasının Engellendiği Ortamda Hücrelerin Büyüyebilme Yeteneğinin Ölçülmesi. MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri $1,5 \times 10^4$ hücre/kuyucuk olacak şekilde %0,5 agoroz ile kaplanan 6 kuyucuklu petrilere ekildi. 70 μ M CAPE, 70 μ M DMSO, 80 μ M ZEB, 17,5 μ M CAPE+20 μ M ZEB kombinasyonu ile 15 gün muamele edildi. Oluşan kolonileri gözlemleyebilmek için % 0,005' lik Kristal viyole ile 20 dk bekletildi. Soft agarda hücrelerin oluşturduğu koloniler ışık mikroskopunda incelenerek fotoğrafları çekildi.

CAPE, ZEB ve CAPE ve ZEB kombinasyonunun MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde lateral hücre hareketi üzerindeki etkileri yara iyileşme analizi ile tespit edilmeye çalışılmıştır (şekil 4. 6). MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattının kontrol grubunda açılan yara genişliğinin zamana bağlı olarak yavaş yavaş kapandığı gösterilmiştir. DMSO uygulanmış hücrelerde açılan yara genişliğinin kontrole benzer bir şekilde zamana bağlı olarak yavaş yavaş kapandığı saptanmıştır. 70 μ M CAPE ve 80 μ M ZEB uygulanan hücrelerde yara genişliği kapanmasının engellendiği ve 24 saatten sonra hücrelerin toksik etkisinden kaynaklı hücre proliferasyonunun arttığı ve hücrelerin yapıştığı yerden kalktığı düşünülmektedir. CAPE+ ZEB kombine terapisi ile ilaçların ayrı ayrı kullanıldığında oluşturdukları sitotoksitenin azaltıldığı gözlenmektedir. 48. saatte ilaçlı hücelere oranla CAPE+ ZEB Kombinesinin uygulanmasıyla toksisite azaltılarak hücrelerin proliferasyonun daha az olduğu ve hücrelerin yüzeye yapışık kaldığı ve oluşturulan yaranın kapandığı tespit edilmiştir (şekil 4. 6).



Şekil 4. 6. CAPE, ZEB, Ve CAPE+ZEB Kombinasyonunun MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücrelerinde Lateral Hücre Hareketi Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi. *Yara kapanmasına ait Işık mikroskobu görüntüleri.*

4.3. CAPE, ZEB, CAPE+ZEB Kombinasyonunun MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattında Hücre Anti-Metastaz Üzerine Etkisi

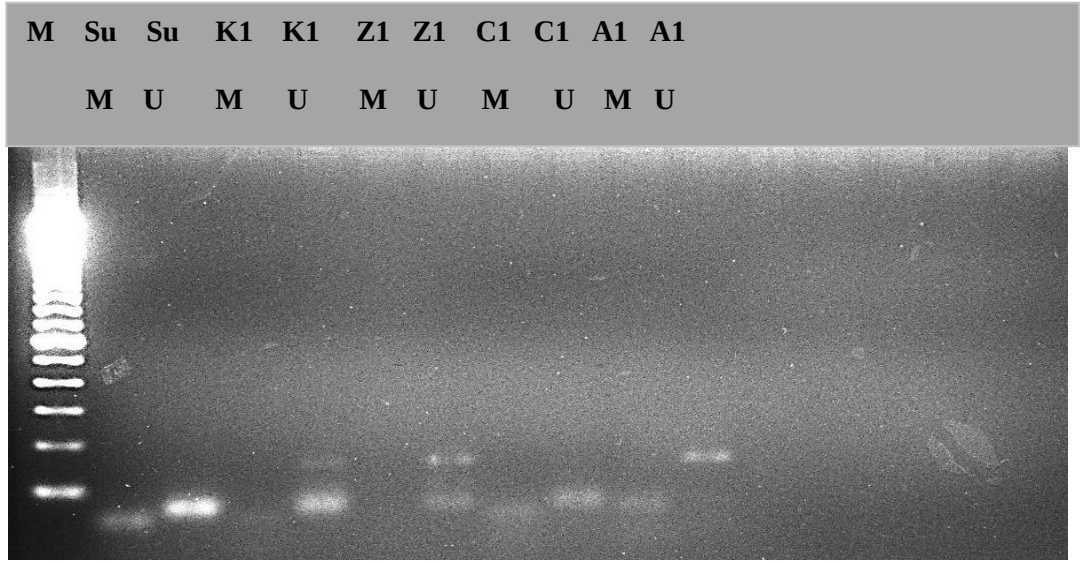
DNA, ilaç verilmiş hücrelerden izole edildi, daha sonra bisülfıt modifikasyonları yapıldı. TP53, kaspaz-9, kaspaz-8 ve kaspaz-3 genlerinde metilasyonu durumu Metilasyona Spesifik PCR (MSP) ile analiz edilmiştir.

Kaspaz-9 Geni Jel Görüntüsü

CAPE, ZEB ve CAPE+ ZEB kombinesi uygulanan MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde kaspaz-9 genin metile/unmetile durumlarının incelenmesi hedeflenmiştir. MDA-MB-231 kanser hücrelerinin kaspaz-9 geni için yapılan uygulamada kontrolün metile bandı, unmetile bantla birbirlerine yakın değerler göstermektedir. Unmetile durumu belirten asıl bant üstteki ince banttır. ZEB'in 80µM'lık dozu tek başına uygulanmış ve belirgin bir şekilde unmetile olarak tespit edilmiştir. ZEB için istenilen sonuca paralel olarak metile bant görülmemektedir. ZEB' in 80µM'lık dozu MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde genin metile durumunu unmetile olarak değiştirmektedir. Sonuç itibariyle kaspaz-9 geninin aktivasyonunu sağladığı ifade edilmektedir.

CAPE'in 70µM 'lık dozu ayrı uygulanmıştır. Uygulamalardan aldığım sonuçlar neticesinde 70 µM CAPE uygulamasının metile bir profil oluşumunda etkili olduğu saptanmıştır. Buna karşılık kombine terapiye bakıldığında (20µM Zebularin+ 17,5µM CAPE) CAPE'in etkisinin tersinde ve ZEB daha etkin bir unmetile durum görülmektedir. Buda daha aktif bir apoptotik indüklemeye alakalı olduğu düşünülmektedir (şekil 4. 7).

Bu çalışmada gösterilmesi amaçlanan hedef, kombine terapinin meme kanserli insanlarda apoptotik yolun indüklenmesinde ilaçların ayrı ayrı kullanılmasına oranla ilaçların çeyrek dozlarından oluşan kombinelerin kullanılmasının daha etkili olabileceğidir.

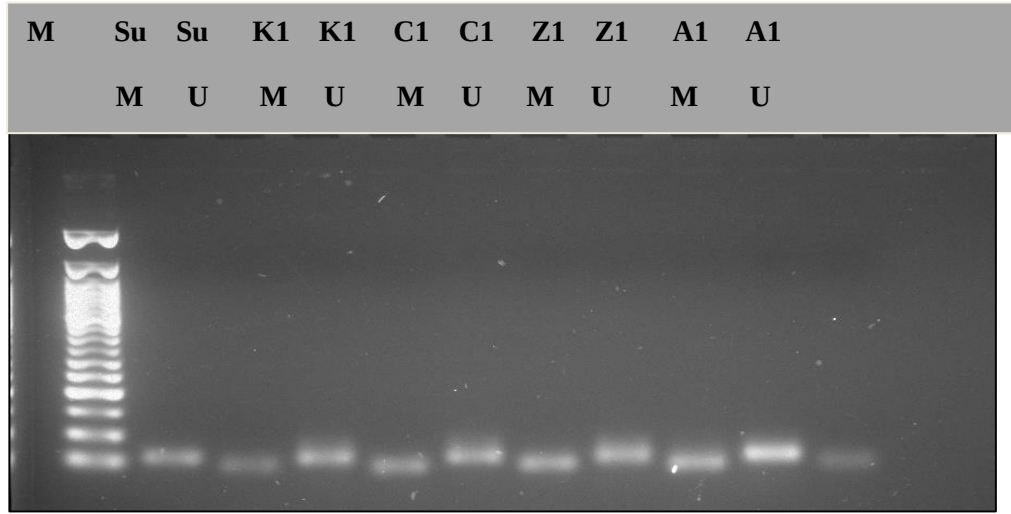


Şekil 4.7. MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hatlarında Kaspaz-9 Geninin Metile Ve Unmetile Örneklerinin Jel Görüntüleri. Örnekler sırasıyla *M:Marker(100bp)*; *Su kontrolü*; *K1: İlaç uygulanmamış Kontrol*; *Z1: 80µM ZEB*; *C1: 70µM CAPE*; *A1: 20µM ZEB+ 17,5µM CAPE*.

Kaspaz-8 Geni Jel Görüntüsü

CAPE, ZEB ve CAPE+ ZEB kombinesi uygulanan MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde kaspaz-8 genin metile/unmetile durumlarının incelenmesi hedeflenmiştir.

70µM CAPE ve 80µM ZEB ayrı ayrı uygulanmış ve %50 oranında metile- unmetile bir profil gösterilmiştir. İlaçların ayrı uygulanmasına paralel olarak kombine tedavide de metile bir profil saptanmıştır. MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde kaspaz-8 yani ekstrinsik yol üzerinden uyarma sağlayamadığı tespit edilmiştir. Apoptotik uyarım intrinsik yol (şekil 2. 8) üzerinden veya farklı bir yol üzerinden sağlanmaktadır.



Şekil 4.8. MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hatlarında Kaspaz-8 Geninin Metile Ve Unmetile Örneklerinin Jel Görüntüleri. Örnekler sırasıyla M:Marker(100bp); Su kontrolü; K1: İlaç uygulanmamış Kontrol; C1: 70 μ M CAPE; Z1: 80 μ M ZEB; A1: 20 μ M ZEB+17,5 μ M CAPE.

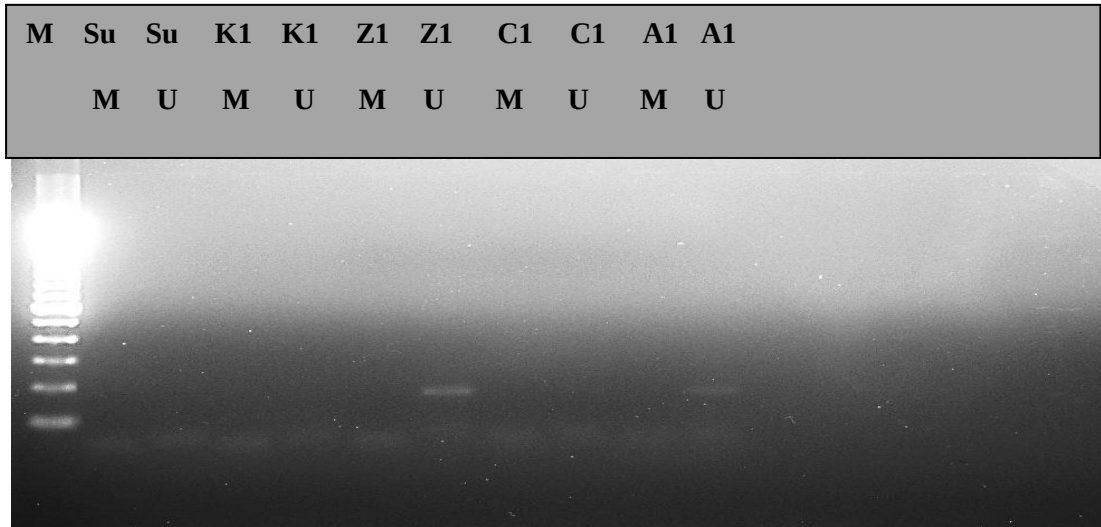
Kaspaz-3 geninin jel görüntüleri

CAPE, ZEB ve CAPE+ ZEB kombinesi uygulanan MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde kaspaz-3 genin metile/unmetile durumlarının incelenmesi hedeflenmiştir.

80 μ M ZEB MDA-MB-231 hücrelerine tek başına uygulandığında unmetile bir profil göstermektedir. 70 μ M CAPE'in MDA-MB-231 hücrelerine tek başına uygulanması ise daha çok metile bir profil sergilemekle birlikte belirgin olmasa dahi unmetile bant gösterilmektedir.

Kaspaz-8 ve kaspaz-9'un birleştiği noktalardan biri olan kaspaz-3 bir seri kaskadı başlatarak apoptozu indükler bu anlamda önemli olup apoptozun başlaması hakkında daha net bir fikir vermektedir. Kaspaz-9 ve kaspaz-8 hücre içi sinyallerle durdurulabilirken kaspaz-3 apoptotik sinyal kaskadını indüklediğinde apoptoz hızlı bir şekilde devam etmektedir.

Jel görüntülerini ele aldığımızda kombine ilaç uygulaması (20 μ M ZEB+17,5 μ M CAPE) başarılı olarak gösterilmektedir. %50 oranında metile–unmetile bir profil ifade edilmektedir (şekil 4. 9).



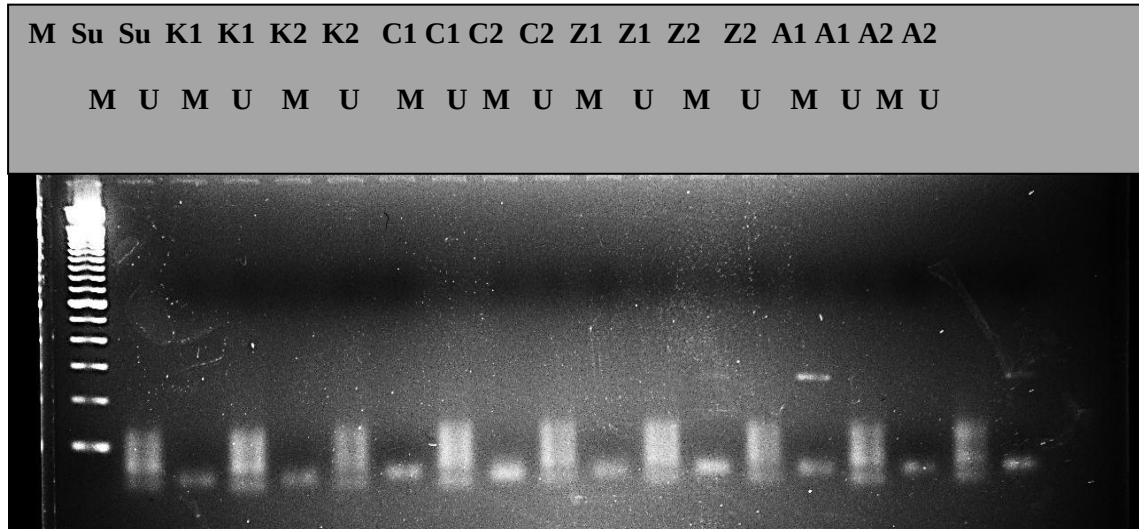
Şekil 4.9. MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hatlarında Kaspaz-3 Geninin Metile Ve Unmetile Örneklerinin Jel Görüntüleri. Örnekler sırasıyla M: Marker(100bp); Su kontrolü; K1: İlaç uygulanmamış Kontrol; Z1: 80µM ZEB; C1: 70µM CAPE; A1: 20µM Zebularin+17,5µM CAPE.

TP53 geninin jel görüntüsü

CAPE, ZEB ve CAPE+ ZEB kombinesi uygulanan MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde TP53 genin metile/unmetile durumlarının incelenmesi hedeflenmiştir.

MDA-MB-231 meme kanser hücrelerine 70 µM CAPE iki kontrollü olarak tek başına uygulanmıştır. Her bir kontrol için metile ve unmetile primerlerle reaksiyon kurulmuştur. ZEB 80µM ve kombine dozları (20µM ZEB+17,5µM CAPE) da aynı şekilde iki kontrollü olarak jele yüklenmiştir.

Uygulanan dozlar da bant görüntülerinin arasında anlamlı bir farklılık görülmemektedir. Uygulanan örnekler %50 oranında metile-unmetile durum ile ilişkilidir (şekil 4. 10). Fakat ilaçların ayrı uygulanmasının sitotoksik etkiler gösterebildiği ifade edildiğinde, aynı zamanda yaptığım diğer deneylere paralel olarak elde ettiğim sonuçlara göre tedavi amaçlı kombine ilaç terapisinin ilaçların ayrı kullanılmasına oranla daha yararlı olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 4.10. MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hatlarında TP53 Geninin Metile Ve Unmetile Örneklerinin Jel Görüntüleri. Örnekler sırasıyla M:Marker(100bp); K1 ve K2: İlaç uygulanmamış Kontrol; C1 ve C2: 70µM CAPE; A1 ve A2: 20µM ZEB+17,5µM CAPE; Z1 ve Z2: 80µM ZEB

Kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak MSP, sonucunda elde edilen veriler;

Metilasyon değişiklikleri;

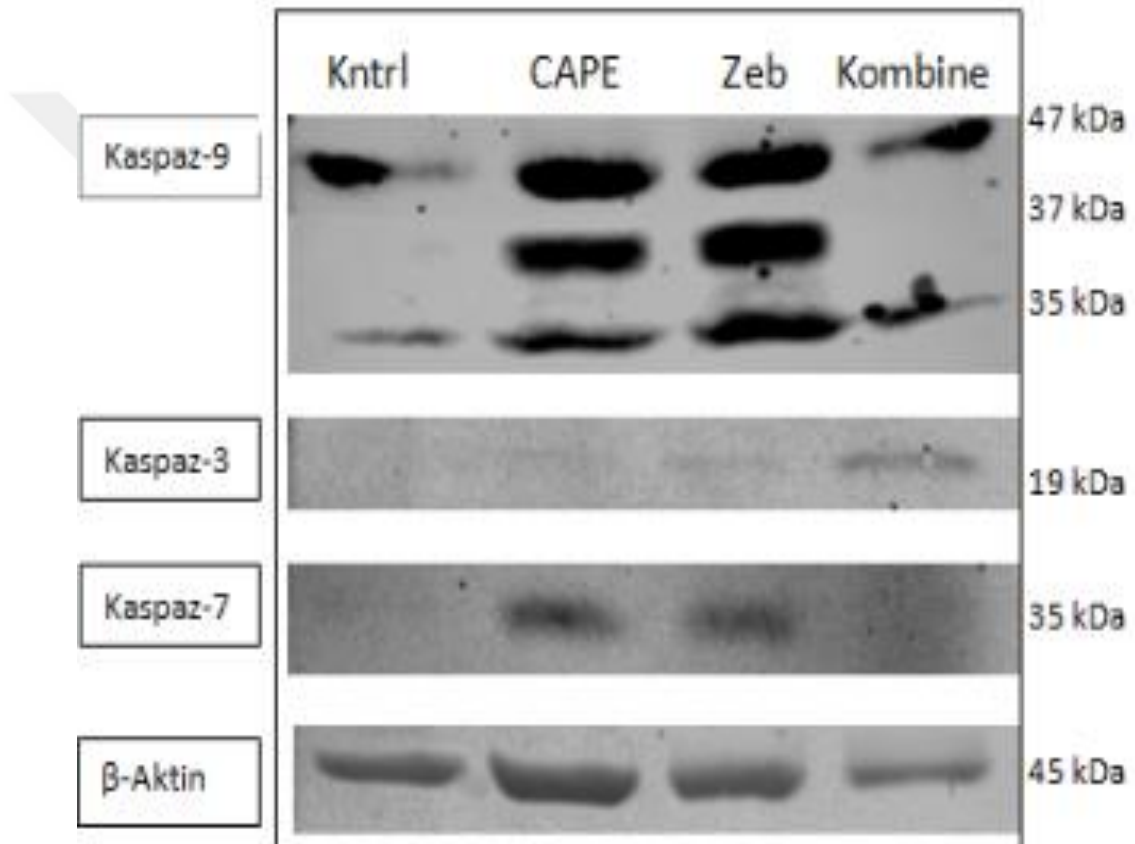
- TP53% 50 metillenmemiş (p <0.05),
- Kaspaz-9% 70 metillenmemiş (p <0.001),
- Kaspaz-8% 60 metillenmemiş (p <0.01),
- Kaspaz-3% 60 metillenmemiş (p <0.01) gözlenmiştir.

MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerine CAPE, ZEB ve CAPE+ ZEB kombine ilaçlarının neden olduğu apoptik ölümün görsel olarak belirlenmesinin ardından, bu ilaçların tetiklediği apoptik hücre ölümü yolağı ile ilişkili proteinler üzerindeki etkisini incelemek için apoptotik yolakta görev alan proteinler immunblotlama yöntemi ile belirlenmiştir.

Uygulanan ilaçların kaspaz-3 geninde ilaç uygulanmayan kontrol grubunda bantlaşma görülmezken ilaçların ayrı kullanılmasıyla CAPE ve ZEB de bant çizgisi belirgin olmamakla birlikte belirginlik seviyesi ilaçların kombine terapisi ile bantlaşmanın belirginliği fark edilebilir seviye de ilaçlara oranla daha fazla olduğu görülmektedir (şekil 4. 11).

İlaçların kaspaz-7 geninde ilaç uygulanmayan kontrol grubunda bantlaşma görülmezken ilaçların ayrı kullanılmasıyla CAPE ve ZEB de bant çizgisi belirgin olduğu görülürken ilaçların kombine uygulandığında aktifliği azalmış olduğu belirgin bir seviyede gösterilmiştir (şekil 4. 11).

Uygulanan ilaçlarda kaspaz-9 geninde ilaç uygulanmayan kontrol grubunda ilaçlıların ayrı kullanılması sonucunda CAPE ve ZEB ilaçlarının belirginliği daha fazla olduğu ve ilaçların kombine terapisinde kontrol grubuna yakın bir değerde olduğu tespit edilmiştir (şekil 4. 11).



Şekil 4.11. MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattında CAPE, ZEB ve CAPE+ZEB Kombine Terapisinin Kaspaz-9 Ve Kaspaz-3/7 Ekspresyonuna Etkisi İmmünoyblotlama Tekniği. *LICOR CLx görüntüleme cihazı kullanarak elde edilen membran görüntüsü.*

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda DNMT inhibitörü olan ZEB ile yeni nesil bir ilaç olan propolis özütü CAPE'in MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında öncelikle ilaçların ayrı ayrı kullanımını sonucu hangi değerdeki dozların uygulama için uygun olduğu belirlenmesi hedeflenmiştir. Hücrelerin IC değerleri baz alınarak CAPE için 70 μ M, ZEB için 80 μ M doz değerlerinin uygun olduğu MTT testi ile belirlenmiştir. Aynı zamanda ilaçların çeyrek dozları alınarak kombine ilaç uygulaması da MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattına uygulanmıştır.

Çalışmamızda MTT testi ile belirlenen ilaç dozlarının MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattına uygulanmasıyla hücrelerde oluşabilecek sitotoksitenin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla hücre büyümesi ve hücre proliferasyonu üzerindeki etkiler sağ kalım ve koloni oluşum, yara iyileşme analizleriyle gösterilmeye çalışılmıştır. Bununla beraber hücre kültüründe büyütülen hücrelerden DNA izolasyonu yapıldıktan sonra bisülfid modifikasyon işlemi uygulanmıştır. Modifiye edilen örneklerin metilasyon spesifik PCR yöntemiyle, TP53, kaspaz-3, 7, 8, 9 genleri için metilasyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca kaspaz-3, 7, 9 genlerinin apoptozu indüklemeye süreçleri immunblotlama yöntemiyle gerçekleştirilmiştir.

CAPE ve ZEB ilaçlarının farklı meme kanseri hücre hatlarında ayrı ayrı uygulanmalarının mevcut olmasına rağmen bu iki ilacın kombine kullanımına rastlanmamaktadır. Bu nedenle bu çalışmamızın özgün değeri korunmaktadır. Çalışmamızın sonuçları literatür ile karşılaştırılarak tartışılmıştır.

5.1. Elde Edilen Verilerin Literatür Bilgileri ile Karşılaştırılması

5.1.1. CAPE'in MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattına etkilerinin literatürdeki diğer çalışmalar ile karşılaştırılması

Yapılan bir çalışmada CAPE'in anti-inflamatuar, anti-mantar, anti-viral, anti-bakteriyel olmak üzere bir dizi önemli biyolojik etkilere sahip olduğu belirtilmiştir (Son, ve Lewis, 2002; Yang, vd., 2005). Yapılan başka bir çalışmada meme kanser hücreleri dahil bir çok kanser tipinde sitotoksik etkisi belirlenirken normal hücrelerde bu etki gözlenmediği belirtilmiştir (Xiang, vd.,2006; Omene ve Wu., 2012).

Bizim çalışmamızda CAPE'in sitotoksik etkisi MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattına uygulanan MTT testi ile gösterilmiştir. CAPE'in 70 μ M doz değerinin % 50 canlılığa sahip olduğu gösterilmiştir. CAPE'in belirlenen doz değerinin hücre sağ kalım üzerine etkisinin belirlenmesi için sağ kalım testi yapılmıştır ve 24 saatte ilacın toksik etkisi gösterilmeye çalışılmıştır. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde 70 μ M CAPE'in MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde büyümeyi inhibe ettiği söylenebilir.

Omene ve arkadaşları (2012), CAPE'in MCF7, SKBR3 meme kanseri hücre hatları üzerinde etkinliğinin hücre canlılığı üzerine etkisini araştırmış 72. saatte MCF7 IC50 değerinin 20 μ M ve SKBR3 IC50 değerinin 35 μ M olduğunu belirlemişlerdir. Bizim çalışmamızda Omene ve arkadaşlarının belirlediği doz değerlerinden daha yüksek doz seçilmiştir. Bu bulgularla çalışılan hücrelerin meme kanseri hücre hattı hücreleri olmalarına rağmen, farklı özelliklere sahip olduklarını düşündürmektedir. Farklı meme kanseri hücre hatlarında CAPE için düşük doz seçimi hücre canlılığı ve hücre proliferasyonuna yönelik toksik etkisinin gösterilmesi adına bizim çalışmamızla korelasyon oluşturmaktadır. Bununla birlikte Omene ve arkadaşları CAPE'in SKBR3 meme kanseri hücre hattında HER2 geni ekspresyonunu inhibe ettiğini ilk kez göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda kullanılan MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı HER2 negatif olduğu için CAPE'in HER2 ekspresyonunu artırıcı ya da azaltıcı yönde etkisinin olmadığını düşündürebilir.

Lee ve arkadaşları (2003), CAPE ile C6 gliom hücrelerinde yaptıkları çalışmada, IC50 değerini 50 μ M bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı hücrelerinde IC50 değeri 70 μ M olarak belirlenmiştir. Lee ve arkadaşlarının belirlediği doz değerinin bizim çalışmamıza yakın olması, hücre canlılığı ve hücre proliferasyonu üzerindeki etkilerinin benzer olabileceğini düşündürmektedir.

Biray ve arkadaşları (2006), CCRF-CEM Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL) hücre hatlarında CAPE uygulamasının hücre canlılığı üzerine 10 μ M dozunun kullanılması dışında diğer uygulanan dozların logaritmik olarak anlamlı bir sitotoksosite gösterdiğini bulmuşlardır. CAPE'in CCRF-CEM hücre hattı üzerinde sitotoksitesinin gösterilmesi amacıyla, tripan mavisi boyası sağ kalım testi ve XTT yöntemi uygulamışlardır.

CAPE'in 1 μM ile 10 μM aralığındaki konsantrasyonlarda tripan mavisi boyası testi ile sitotoksitesi değerlendirilmesinde, propolisin IC50 dozunu temel sitotoksite olarak kullanmışlardır.

CAPE'in CCRF-CEM hücre hattında kullanılan doz ve zamana bağlı olarak sitotoksik etki gösterdiği buna dayanarak IC50 dozunun 1 μM olarak belirlenmesini uygun bulmuşlardır. Biray ve arkadaşlarının elde ettiği sonuçlar bizim çalışmamızın amacını desteklediği, MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında da CAPE'in toksik etkisi olduğu fakat CCRF-CEM hücre hattının sitotoksiteye duyarlılığının çok fazla olduğunu düşündürmektedir. CAPE'in tümöral veya viral olarak aktarıma uğramış hücreler üzerinde sitotoksik etkisinin bulunduğu gösterilmeye çalışılmıştır. Bununla birlikte normal hücreler üzerinde bir etkisi olmadığı ifade edilmiştir (Grunberger, vd., 1988; Chen, vd., 1996; Su, vd., 1994).

Ayrıca, Biray ve arkadaşları (2006), hücre canlılığı ve hücre proliferasyonu dışında CAPE'in IC50 değeri ile apoptoz değerlendirmesi yapmışlardır. Değerlendirme de 2 yöntem kullanılmıştır. Birinci yöntem olarak kullanılan Elisa, apoptotik hücrelerde 48 saatte % 35'lik bir artış olduğunu göstermiştir. İkinci yöntem olan Akridin- Oranj Etidyum Bromid boyama ile %53'lük artış olduğu bulunmuştur. Bu bulgularla Akridin-Oranj Etidyum Bromid boyamanın daha kullanışlı olabileceğini göstermektedir. Bizim çalışmamızda apoptotik genlerin (kaspaz-7, 3, 9) ekspresyon seviyelerinin gösterilmesi için immunblotlama yöntemi kullanılmış olup, CAPE terapisi uygulanan hücrelerde kaspazların ekspresyon seviyeleri artmıştır. Bu sonuçlara dayanarak CCRF-CEM hücre hattında apoptotik etkilerin gözlemlendiği belirtilmesi bizim çalışmamıza koreledir.

Brudzynski ve Carlone (2004), MCF-7 ve MDA-MB-435 meme kanseri hücre dizisinde CAPE'in IC50 değerini 5,95 μM olarak belirlemişlerdir. Rossi ve arkadaşları (2002), J774 Makrofaj hücre dizisinde 1,5 μM olarak bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda ise MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerine MTT testi sonucu belirlenen CAPE doz değeri ise 70 μM 'dır. Brudzynski ve Carlone, Rossi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda bizim çalışmamızda uygulanan doz değerinden oldukça düşüktür. Böylelikle MCF7 ve MDA-MB-435 meme kanseri hücre hatlarında, J774 Makrofaj hücre dizisinde CAPE'in toksik etkisinin daha fazla olduğu söylenebilir.

Koru ve arkadaşları (2009), Multiple Myeloma kanser hücre hattı olan ARH-77 hücrelerine 100 µg mL⁻¹ dozunda CAPE uygulaması yapmışlardır. 72. saatte CAPE'in büyüme %90.4 oranında inhibe ettiği aynı zamanda %80.4 oranında sitotoksikite gösterdiğini göstermişlerdir.

Bununla birlikte apoptoz üzerine etkisi incelenmiş olup, CAPE dozu 22.5 µg mL⁻¹ olarak düşürüldüğünde 72. saatte hücreler %93.2 oranında apoptozu tetiklediğini göstermişlerdir. Böylece daha öncede bahsedilen CAPE'in yüksek dozlarının zamana bağlı olarak büyüme inhibe edici özelliği olması ve sitotoksik etki yaratması tekrar desteklenmiştir. Ayrıca düşük doz kullanımının apoptozu tetikliyor olması apoptotik mekanizmalar üzerinde detaylı araştırmalar yapılmasını düşündürmektedir. Bu çalışmada da CAPE terapisi uygulanan MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında apoptotik yolakla ilişkili olduğu bilinen kaspazların ekspresyonunun artışı ile apoptozun indüklediği yöntemiyle gösterilmeye çalışılmıştır. Ayrıca CAPE'in LD50 dozunda uygulanması ARH-77 hücrelerinden IL-6 salgılanmasını engellediği saptanmıştır. Bu bulgu ise CAPE'in tedavi edici özelliği olduğunu düşündürmektedir.

Kern ve McLennan (1998), apoptoz indükleyen TP53 geninin tümör süpresör olarak görev yaptığını ve bu gende oluşan mutasyon ya da mutasyon kaybı %80 oranında akciğer kanseri olgularında görülmekte olduğunu göstermişlerdir. Tümör dokusundaki proliferasyon artışı ile apoptozun indüklenme sürecinin artmasına neden olmaktadır (Soini, vd., 1998). Bizim çalışmamızda MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında CAPE ve ZEB uygulamasıyla TP53 geninin MSP yöntemiyle metilasyon durumları incelenmiş olup TP53 geninin metile durumdan unmetile duruma geçtiği, bu bulgularla en çok çalışılan epigenetik değişiklik olan DNA metilasyonu üzerine etkilerinin olduğu gösterilmiştir. TP53 geninin metillenmesi o genin ekspresyonunu inhibe eder. Böylece hücre siklusunun G1 fazının durdurulması engellenerek apoptotik indüklenmenin inhibe edilmesiyle kanser gelişimini tetikleyici etkisinin olduğunu düşündürmektedir. İlaç terapileriyle TP53 geninin ekspresyonu arttırılmaktadır. Bizim çalışmamız da ayrıca TP53 geni dışında daha önce bahsedilen apoptotik yolakta sıklıkla karşılaştığımız kaspazlarında (kaspaz-3, 7, 8, 9) metilasyon durumları incelenmiştir. Böylelikle uygulanan ilaç terapisi ile ilgili genlerde kaspaz-8 dışında diğerlerinin metile durumdan unmetile duruma geçtiği gözlemlenmektedir.

Metile olup eksprese olamayan genlerin uygulanan ilaçlarla ekspresyon seviyelerinin arttırıldığı tespit edilmiştir. Kern ve McLennan ve bizim çalışmamız korelasyon göstermektedir.

Wu ve arkadaşları (2011), CAPE aracılı apoptoz, kaspaz-3 ün aktivasyonu aracılığıyla BCL-2'nin gen anlatımındaki azalma ve insan lösemi HL-60 hücrelerinde anti-apoptotik bir protein olan Bax'ın gen ekspresyonundaki artışın belirgin hale gelmesi için beraber hareket ettiğini ifade etmişlerdir. Bizim çalışmamızda MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerine CAPE kullanımı ile kaspaz-3 ekspresyonun arttığı bunun sonucu olarak pro-apoptotik genlerin seviyesini arttırarak apoptozu indüklediğini düşündürmektedir.

Kim (2013), CAPE'in P38 ve JNK sinyalizasyonunun regülasyonu vasıtasıyla TRAIL reseptörlerin (DR4, DR5) ifadesinin artması yoluyla SK-HEP1 hücrelerinde TRAIL ile indüklenen apoptozu arttırdığını göstermiştir. Böylelikle ekstrinsik yolak üzerinden apoptozun tetiklendiğini göstermiş olduğu düşünülebilir. Bizim çalışmamızda CAPE'in tek başına kullanımı ve ZEB ile beraber kullanımı ile intrinsik ve ekstrinsik apoptotik yolakta görev yapan farklı kaspazların (kaspaz-3, 7, 8, 9) ekspresyonlarının tetiklendiği gösterilmiştir. Yapılan çalışma ve bizim çalışmamızın korele yanının TRAIL reseptörlerinin artışı ile ekstrinsik yolak üzerinden kaspaz-8, 9, 3'ün ekspresyon seviyelerinin arttırılması olduğu düşünülebilmektedir.

Öztürk ve arkadaşları (2013), melanoma, prostat ve akciğer kanseri üzerinde CAPE etkisini inceledikleri çalışmalarında kaspaz-3 indüklenmesi sonucunda hücrelerin apoptozu gittiğini göstermişlerdir. MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı incelenen bizim çalışmamızda Öztürk ve arkadaşlarına korele olarak CAPE'in kaspaz-3 ekspresyonunu arttırdığı gözlenmiştir.

Watabe ve arkadaşları (2004), miyeloid lösemi U937 hücreleri üzerinde CAPE' in 12 saatlik bir uygulama sonrası Bax ve TP53 transkripsiyonunu arttırdığı dolayısıyla kanserli hücrelerde apoptozu indüklediğini göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattına CAPE'in 24 saatlik uygulama sonrası TP53 geninin MSP yöntemiyle metilasyon durumları incelenmiştir.

MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında metilasyonla ekspresyonu engellenen TP53 geninin CAPE uygulamasıyla tekrar eksprese olarak apoptozu tetiklediği gösterilmektedir. Watabe ve arkadaşlarının elde ettiği sonuç bizim çalışmamızla korelasyon oluşturmaktadır.

CAPE'in apoptozla ilişkisi açıklanması ve bu amaçla kaspaz genlerinin indüklenme süreçlerinin farklı kanser hücre hatlarında da benzer şekilde etkiler göstermesi literatür araştırmalarıyla desteklenmiştir.

5.1.2. Zebularin'in MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattına etkilerinin literatürdeki diğer çalışmalar ile karşılaştırılması

Billiam ve arkadaşları (2010), MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücre hatlarında DNMT inhibitörü olan ZEB'in hücre proliferasyonuna etkisini MTT testi ile belirlemişlerdir. MTT testinde MDA-MB-231 hücre hattı için 150, 99 ve 88 μM ve MCF-7 için 426, 180, 149 μM uygulamışlardır. İki hücre hattı için sitotoksosite kıyaslaması yapıldığında, MDA- MB-231 meme kanseri hücre hattının ER negatif olmasından kaynaklı toksisiteye daha duyarlı olduğu düşünülmektedir. Bizim çalışmamızda da MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattına 0-160 μM dozları uygulanarak ilacın 70 μM dozunun sitotoksitenin oluşmaması adına en uygun değer olduğu belirlenmiştir. Bu bulgularla Billiam ve arkadaşlarının yaptığı çalışma bizim çalışmamızla korelasyon oluşturmaktadır.

Scott ve arkadaşları (2007), myeloid lösemi hücre hattı olan AML-193 hücrelerinin tedavisi için 250 veya 500 μM zebularin uygulanmasıyla yaklaşık olarak % 85 oranında hücre proliferasyonunda inhibisyona neden olduğunu göstermişlerdir. Billiam ve arkadaşları, Scott ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalar ZEB'in yüksek konsantrasyonlarının hücre proliferasyonunu inhibe ederken sitotoksositeye sebep olduğunu göstermektedir. Yapılan çalışmalar bizim çalışmamızla korelasyon oluşturmaktadır.

Nakamura (2013), ZEB'in apoptozun instrinsik ve ekstrinsik yollarını tetiklediğini aynı zamanda çift zincirli RNA bağımlı protein kinaz (PKR) inhibisyonu ile apoptozu tetiklediğini ifade etmiştir.

Bizim çalışmamızda MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattına ZEB uygulamasıyla kaspazların aktivasyonun arttığı belirlenmiştir. Böylelikle apoptoz indüklenmektedir. Özellikle Kaspaz-7 proteininin ekspresyon seviyesinin yüksek olması apoptozun ekstrinsik ve intrinsik yollarının her ikisi tarafından da etkinleştirilebilir olduğu düşüncesini oluşturmaktadır.

You ve Park (2014), ZEB uygulanmış akciğer kanseri hücre hattı A549 ve HPF hücrelerinde tümör süpresör geni olan TP53 aktivitesinin arttığı gözlenmiştir. You ve Park'ın elde ettiği sonuç bizim çalışmamızla korele olmakla birlikte ZEB'in farklı kanser hücre hatlarında apoptozun indüklenme sürecinin artmasıyla kanseri önleyici etki yaptığını düşündürebilir.

Yeni tedavi yaklaşımlarında, ilaçları tek başına uzun süre kullanımlarının toksisite üzerine olumsuz etkisinden kaynaklı, farklı ilaçlarla kombin oluşturulması tedavilerin sağlıklı seyri için önem arz etmektedir.

5.1.3. ZEB ve CAPE kombine ilaç terapisinin MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattına etkilerinin literatürdeki diğer çalışmalar ile karşılaştırılması

Literatürde DNMT inhibitörü olan ZEB ile apoptotik yolak üzerinde etkinliği bilinen CAPE'in beraber kullanımına rastlanamamaktadır. Bu nedenle MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattına uygulanan CAPE+ZEB kombine terapi, CAPE ve ZEB için yapılan farklı araştırmalardan yararlanılarak tartışılmıştır.

Omene ve arkadaşları (2012), CAPE'in kanser hücrelerinde kemoterapötik ilaçlara karşı dirence neden olan MDR-1 geninin, ekspresyonunu inhibe ettiğini göstermişlerdir. In vitro ve in vivo ortamda CAPE ve taksol ilacının uygun dozlarda beraber muamele edildiğinde hücre büyümesi ve hücre döngüsü engellenmesi için daha güçlü sonuçlar vermiştir. Bu çalışma ile CAPE'in kemoterapötik ilaçlar ile kombinasyon halinde kullanılmasına izin verebildiğini göstermiştir. Bu bulgularla birlikte bizim çalışmamızda amaçlanmış olan apoptotik yolda etkinliği bilinen CAPE ve DNMT inhibitörü olan ZEB'in kombine oluşturulmasının etkin sonuçlar verebileceğini düşündürmektedir. Bizim çalışmamızda CAPE+ZEB kombinasyonunun MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında uygulanmasının ilaçların ayrı ayrı kullanımından doğan toksisite gibi olumsuz koşulları en aza indirgeyip, toksisitenin azaltılması gibi olumlu sonuçlar ifade ettiği gösterilmiştir.

Böylelikle CAPE+ZEB kombine ilaç terapisinin kullanılmasının yeni tedaviler için umut verici olduğu düşünülmektedir.

Tolba ve arkadaşları (2013), CAPE'in prostat kanserinde Paklitaksel ve Dosetaksel kombinasyonlarının bu ilaçların IC50 volümlerinin önemli miktarda azalmasında etkili olduğu ve kaspaz-3'ün etkinliğinde tek başına yapılan ilaç uygulamalarına göre CAPE ile yapılan kombine uygulamaların 1,3 kat daha etkili olduğunu göstermişlerdir. Literatür araştırmalarıyla desteklenen çalışmamız MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı hücrelerine ZEB ve CAPE'in tek başlarına uygulamalarına oranla ZEB+CAPE kombine ilaç terapisinin yapılan deneyler sonucunda hücre çoğalması, hücre proliferasyonu, apoptotik mekanizmadaki etkileşimlerinin daha etkili olduğunu düşündürmektedir.

Billiam ve arkadaşları (2010), DNMT inhibitörü olan ZEB'in diğer DNMTi'lerin aksine birçok hücre hattında daha az toksik olduğunu bulmuşlardır. Bu nedenle ZEB'in etkin dozlarda tek başına ya da diğer 5-aza-dC gibi DNMT inhibitörleri ile kombine olarak uzun süreli uygulanmasına olanak sağladığı düşünülmektedir. Kanser hücreleri, epigenetik olarak susturulmuş genlerin yüksek oranda tekrar aktive olmasını sağlamaktadır. Bizim çalışmamızda MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattına ZEB ilacının tek başına uygulaması ve ZEB'in CAPE ile kombine uygulaması gerçekleştirilmiştir. ZEB'in ayrı kullanımı hücreler üzerine sitotoksik etki yaparken CAPE ile beraber kullanımının sitotoksik etkiyi azalttığı yapılan deneylerle gösterilmeye çalışılmıştır. Ayrıca ZEB'in apoptotik süreçlerde de etkinliği bilinmektedir. Bu sebeple çalışmamızda MSP yöntemi ile TP53 ve farklı kaspaz genlerinin (kaspaz-3, 7, 9, 8) metilasyon durumları genlerin ekspresyon seviyelerine bakılarak değerlendirilmiştir. Genlerin metile (susturulmuş) durumdan unmetile (eksprese) olarak apoptozu indükledikleri gösterilmeye çalışılmıştır. Ekstrinsik ve intrinsik yollar üzerinden apoptozu indükledikleri düşünülmektedir. ZEB'in hem tek başına kullanımı hemde CAPE ile kombine kullanımı apoptotik yollar üzerinde etkinliği bilinen kaspazların ekspresyonlarını artırarak apoptozu indüklediği ayrıca immunblotlama yöntemiyle de gösterilmiştir. Böylece ekstrinsik ve intrinsik gibi farklı yollar üzerinden hareket ettiklerini düşündürmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmanın amaçları doğrultusunda öncelikle CAPE, ZEB ve CAPE+ZEB kombine uygulamasının hücre canlılığı, hücre proliferasyonu, üzerine etkileri ayrı ayrı çalışılması gerçekleştirilmiştir. Kombine uygulamanın MTT testi, sağ kalım testi ve koloni oluşum testleriyle toksisiteyi azalttığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte çalışmanın ikinci aşaması olan, apoptotik yolak üzerindeki etkilerinin protein düzeyinde belirlenmesi, bu etkiler sonucunda apoptotik yolakla ilişkili proteinler olan kaspazların gen ifadesindeki değişimlerin araştırılması ve elde edilen verilere göre apoptoz ve epigenetik arasındaki ilişkinin ortaya konması amaçlanmıştır. Bunun sonucunda MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında ilaçların (CAPE, ZEB, CAPE+ZEB) uygulanmasıyla kaspaz genlerinin apoptotik yolak üzerindeki indükleyici etkisi MSP yöntemi ve immunblotlama analizi ile gösterilmiş olup kombin uygulamanın daha sağlıklı bir tedavi sağladığı yönünde varsayımları doğrular nitelikte olduğu gösterilmiştir.

MSP yöntemiyle, genlerdeki metile durumlar incelenmiş olup, MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattına uygulanan ilaçların kaspaz-8 üzerinden metile olma durumu ile ilgili bir etkiye sahip olmadığı gözlemlenmiştir. Elde edilen veriler neticesinde apoptotik uyarılmanın, iç sinyal yolu olan intrinsik yol üzerinden veya etkilenen farklı bir sinyal yolu üzerinden gerçekleşmekte olduğu varsayımları oluşturulmuştur. Diğer kaspazlar ve TP53 genlerinde metile durumlar gözlenmiştir. MDA-MB-231 hücre hattında epigenetik faktörlerin etkinliği gösterilmiştir. CAPE+ZEB kombine ilaç terapisi ile normal hücrelerde aktivasyonları olup, kanser hücrelerinde ekspresyonu engellenmiş olan genlerin tekrar eksprese olması sağlanarak tedavi edici özelliğinin ilaçların ayrı kullanımına oranla daha spesifik olduğunu düşündürmektedir. Böylelikle CAPE+ZEB kombine ilaç uygulamasının başarılı olduğu kombine terapide, düşük dozların kullanılmış olmasına göre etkinliğin yüksek değerlerde bulunması tedaviler için oldukça umut verici olduğunu düşündürmektedir.

MDA-MB-231 hücre hattında CAPE, ZEB, CAPE+ZEB kombinesi belirtilen kaspazlar üzerinde farklı ekspresyon seviyelerini oluşturmuştur. Prokaspaz-9 ve kesici kaspaz-9 ekspresyon seviyelerini arttırmıştır. Kaspaz-3 de ise ZEB ve CAPE de ekspresyon seviyesinde artış gözlenmiştir.

Bununla birlikte, kombine terapi CAPE ve ZEB ile karşılaştırıldığında ekspresyon seviyesinde daha fazla artışa neden olduğu ifade edilmiştir. Kaspaz-7 ekspresyon seviyesi incelendiğinde ise CAPE ve ZEB uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde ekspresyon seviyeleri artmıştır.

Bu sonuçlarla birlikte kombine ilaç terapisinin uygulanması, ilaçların tek başlarına kullanmasına oranla toksisiteyi azalttığı, apoptotik yolların benzer şekilde indüklendiğini göstermektedir. Tedavi yaklaşımları için kombine ilaç terapisinin uygun olabileceği gösterilmektedir. Zamanla ilaçların moleküler mekanizmalarının tam olarak bilinmesi, kombine tedavilerin araştırılması ve uygulanma çalışmalarının artmasıyla yeni ve uzun süreli tedaviler için avantaj sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Aapro, M., Editorial, “Optimizing breast cancer patient care today and tomorrow: implications for clinicians”, ***Breast Cancer Res Treat***, 20: 1-3 (2008).
- Allred, DC, Cllark, GM, Tandon, AK, Molina, R, Tormey, DC, et al. “Her-2/neinnode negative breast cancer: Prognostic significance of overexpression influenced by the presence of in situ carcinoma”, ***J Clin Oncol***, 10: 599-605 (1992).
- Alptekin Ülgey, N, “Meme Kanseri Cerrahisinde Meme Koruyucu Girişimler Ve Sonuçları”, Uzmanlık Tezi, ***T.C. Genelkurmay Başkanlığı Gülhane Askeri Tıp Akademisi Askeri Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı Başkanlığı***, Ankara (1999).
- Altunkaynak, BZ, Özbek, E; Programlanmış Hücre Ölümü: Apoptoz Nedir?”, ***Tıp Araştırmaları Dergisi***, 6 (2): 93 -104 (2008)
- Amatya, VJ, Naumann, U, Weller, M, Ohgaki, H, “TP53 promoter methylation in human gliomas”, ***Acta neuropathologica***, 110(2): 178-184 (2005).
- Andersen, JB, Factor, VM, Marquardt, JU, Raggi, C, Lee, YH, et al, “An integrated genomic and epigenomic approach predicts therapeutic response to zebularine in human liver cancer”, ***Sci Transl Med***, 2: 54–77 (2010).
- Atılğan, H, “Meme Kanserlerinde Modifiye Radikal (Subkutan) Mastektomi Ve Eş Zamanlı Meme Rekonstrüksiyonu”, Uzmanlık Tezi, ***T.C. Genelkurmay Başkanlığı Gülhane Askeri Tıp Akademisi Askeri Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı Başkanlığı***, Ankara (1999).
- Bankova, VS, de Castro, SL, Marcuci, MC, “Propolis: recent advances in chemistry and plant origin”, ***Apidologie***, 31: 3-15 (2000).
- Baylin, SB, Ohm, JE, “Epigenetic gene silencing in cancer-a mechanism for early oncogenic pathway addiction?”, ***Nat Rev Cancer***, 6: 107–116 (2006).

KAYNAKLAR (DEVAM EDİYOR)

- Beisler, JA, “Isolation, characterization, and properties of a labile hydrolysis product of the antitumor nucleoside, 5-azacytidine”, *J Med Chem*, 21: 204–208 (1978).
- Bhimani, RS, Troll, W, Grunberger, D, Frenkel, K, “ Inhibition of oxidative stress in HeLa cells by chemopreventive agents”, *Cancer Res*, 53: 4528-33 (1993).
- Billam, M, Sobolewski, MD, Davidson, NE, “Effects of a novel DNA methyltransferase inhibitor zebularine on human breast cancer cells”, *Breast cancer research and treatment*, 120(3): 581-592 (2010).
- Biray, Çığır, Gündüz, Cumhur, Yılmaz, Berna, Şahin, Fahri, Topçuoğlu Nejat, “Propolis Ve Etken Maddeleri Olan Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE) Ve Sinamik Asitin, İnsan T Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi Hücre Dizisi (CcrfCem)’De Sitotoksik Ve Apoptotik Etkinliğinin Değerlendirilmesi”, *Ege Tıp Dergisi*, 45(2): 83 – 92 (2006).
- Bora, G, Yurter, HE, “Epigenetik hastalıklar ve tedavi yaklaşımları”, *Hacettepe Tıp Dergisi*, 38: 48-54 (2007).
- Brudzynski, K, Carlone, R, “Stage-dependent modulation of limb regeneration by caffeic acid phenethyl ester (CAPE)- immunocytochemical evidence of a CAPE evoked delay in mesenchyme formation and limb regeneration”, *J Exp Zool A Comp Exp Biol*, 301: 389 – 400 (2004).
- Brueckner, B, Lyko, F, “DNA methyltransferase inhibitors: old and new drugs for an epigenetic cancer therapy”, *Trends Pharmacol Sci*, 25: 551-4 (2004).
- Buzdar, AU, Ibrahim, NK, Francis, D, Booser, DJ, Thomas, ES, Theriault, RL, Puszta, L, Green, MC, Arun, BK, Giordano, SH, Cristofanilli, M, Frye, DK, Smith, TL, Hunt, KK, Singletary, SE, Sahin, AA, Ewer, MS, Buchholz, TA, Berry, D, Hortobagyi, GN, “Significantly higher pathologic complete remission rate after neoadjuvant therapy with trastuzumab, paclitaxel, and epirubicin chemotherapy: results of a randomized trial in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer”, *J Clin Oncol*, 23: 3676-3685 (2005).

KAYNAKLAR (DEVAM EDİYOR)

- Calvisi, DF, Ladu, S, Gorden, A, Farina, M, Lee, JS, et al, “Mechanistic and prognostic significance of aberrant methylation in the molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma”, *J Clin Invest*, 117: 2713–2722 (2007).
- Cheng, JC, Yoo, CB, Weisenberger, DJ, Chuang, J, Wozniak, C, et al, “Preferential response of cancer cells to zebularine”, *Cancer Cell*, 6: 151–158 (2004).
- Chen, JH, Shao, Y, Huang, MT, et al. “Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on human leukemia HL-60 cells”, *Cancer Lett*; 108: 211-4 (1996).
- Chen, YJ, Shiao, MS, Hsu, ML, et al, “Induction of apoptosis by caffeic acid phenethyl ester through activation of caspase-3, downregulation of bcl-2 and upregulation of Bax in human leukemic HL-60 cells”, *J. Agri. Food Chem*, 49: 5615-5619 (2001).
- Cohen, JJ. “Apoptosis, To be or not to be”, *Postgraduate Syllabus*, 1: 1-19 (1998)
- Collard, Rachael L., et al. "Methylation of the ASC gene promoter is associated with aggressive prostate cancer", *The Prostate*, 66. 7: 687-695 (2006).
- Coşkun, G, Özgür, H, “Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması”, *ARŞİV*, 20: 145 (2011).
- Cunha, FM, Duma, D, Assreuy, J, Buzzi, FC, Niero, R, Campos, MM, Calixto, JB “Caffeic acid derivatives: *in vitro and in vivo* anti-inflammatory properties”, *Free Radic Res*, 11: 1241-53 (2004).
- Egger, G, Liang, G, Aparicio, A, Jones, AP, “Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy”, *Nature*, 429: 457-63 (2004).
- Engin, K, Çetintaş, SK, ”Meme Kanseri”, *Nobel Tıp Kitabevleri*, 172 (2005).
- Feinberg, AP, “The epigenetics of cancer etiology”, *Semin Cancer Biol*, 14: 427–432 (2004).

KAYNAKLAR (DEVAM EDİYOR)

- Fesen, Mr., Pommier, Y., Leteurtre, E., Hiroguchi, S., Yung, J., Kohn, Kw, “InhibitionOf Hiv-1 İntegrase By Flavones, Caffaic Acid Phenethyl Ester (Cape) And Related Compounds”, **Biochem Pharmaco**, 48; 595–608 (1994).
- Fisher, ER, “Ultrastructure of the human breast and its disorders”, **Am J Clin Pathol**, 66: 291-374 (1976).
- Fisher, ER, Redmond C, Fisher B et al, “Pathologic findings from the NSABP. Prognostic Discriminant for 8 –year survival for node – negative invasive breast cancer patients”, **Cancer**, 65: 2121-2128 (1990).
- Gavrieli, Y, Sherman, Y, Sasson, SAB, “Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation.”, **The Journal of Cell Biology**, 119:493-501 (1992).
- Gelmann, EP; Vol I. Ed: Bland KI, Copeland EM ”Oncogenes in human breast Cancer. In: The Breast: Comprehensive management of benign and malignantDiseases”, **WB saunders Company**, USA, 499-517 (1998).
- Ghavami, S, Hashemi, M, Ande, SR, Yeganeh, B, Xiao, W, Eshraghi, M, Bus, CJ, Kadkhoda, K, Wiechec, E, Halayko, AJ, Los, M, “Apoptosis and cancer:mutations within caspase genes”, **J Med Genet**, 46: 497–510 (2009).
- Gnyszka, A, Jastrzebski, Z, Flis, S, “DNA Methyltransferase Inhibitors and Their Emerging Role in Epigenetic Therapy of Cancer”, **Anticancer Research**, 33: 2989-2996 (2013).
- Göcen, E, “Meme Koruyucu Cerrahi Uygulanmış Meme Kanserli Hastalarda Konvansiyonel Radyoterapi İle Konformal Radyoterapi Tekniğinin Doz Dağılımı Açısından Değerlendirilmesi”, Uzmanlık Tezi, **Sağlık Bakanlığı Kartal Dr. Lütfi Kırdar Eğitim ve Araştırma Hastanesi Radyoloji Kliniği**, İstanbul (2008).

KAYNAKLAR (DEVAM EDİYOR)

- Gökpınar, C, “Memede Kitle Şüphesiyle Hastaneye Başvuran Kadınların Meme Kanseri Ve Kendi Kendine Meme Muayenesi İle İlgili Bilgi Düzeyleri Ve Kitlenin Fark Edilmesinde Kendi Kendine Meme Muayenesinin Etkisi”, Yüksek Lisans Tezi, **Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Cerrahi Hastalıkları Hemşireliği Anabilim Dalı**, Afyon (2003).
- Grunberger, D, Banerjee, R, Etal. “Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis”, **Experientia**, 44: 230-28 (1988).
- Hsieh, CJ, Kuo, PL, Hsu, YC, Huang, YF, Tsai, EM, Hsu, YL, “Arctigenin, a dietary phytoestrogen, induces apoptosis of estrogen receptor-negative breast cancer cells through the ROS/p38 MAPK pathway and epigenetic regulation”, **Free radical biology & medicine**, 67:159-170 (2014).
- Jiang, Y, Bressler, J, Beaudet, LA, “Epigenetics and human disease”, **Annu Rev Genet**; 5: 479-510 (2004).
- Jones, AP, Baylin, BS, “The fundamental role of epigenetic events in cancer.”, **Nature Rev Genet**; 3: 415-8 (2002).
- Jones, PA, Baylin, SB, “The epigenomics of cancer. Cell”, **PubMed**, 128: 683 (2007).
- Kaminkas, E, Farrell, TA, Wang, CY, Sridhara, R, Pazdur, R, “FDA drug approval summary: azacitidine (5-azacytidine, Vidaza) for injectable suspension”, **The Oncologist**, 10: 176-82 (2005).
- Kaplan, B, “1992-1995 Yılları Arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Gevher Nesibe Hastanesine Lokal İleri Meme Kanseri Tanısıyla Başvuran Hastaların Tedavi ve Takip Sonuçları”, Uzmanlık Tezi, **Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı**, Kayseri (1996).
- Kim, A, “CAPE promotes TRAIL-induced apoptosis through the upregulation of TRAIL receptors via activation of p38 and suppression of JNK in SK-Hep1 hepatocellular carcinoma cells”, **Int J Oncol** (2013).

KAYNAKLAR (DEVAM EDİYOR)

- Klijn, JGM, Berns PMJJ, Schmits PLM, Foekens JA, "The Clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer" a review on 5232 patients. *Endocr Rev*, 13: 3- 17 (1992).
- Koru, Ö, Avcu, F, Tanyüksel, M, Ural, A, Araz, U, Remzi,E, Şener, K, "Cytotoxic effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on the human multiple myeloma cell line", *Türk J Med Sci; TÜBİTAK*, 6: 863-870 (2009).
- Kurebayashi, JJ, "Biological and clinical significance of her2 overexpression in breast cancer.", *Breast Cancer*, 1: 45-51 (2001).
- Laird, WP, "The power and the promise of DNA methylation markers", *Nature Rev Genet*; 3: 253-66 (2003).
- Lee, JY, Kuo, CH, Chu, CY, etal. "Involvement of tumor suppressor protein p53 and p38 MAPK in caffeic acid phenethyl esterinduced apoptosis of C6 glioma cells", *Biochemical Pharmacology*, 66: 2281-2289 (2003).
- Lee, SK, Song, L, Mata-Greenwood, E, etal, "Modulation of in vitro biomarkers of the carcinogenic process by chemopreventive agents", *Anticancer Re*, 19: 35-44 (1999).
- Leist, M, Gantner, F, Bohlinger, I, Germann, PG, Tiegs, G, et al. "Murine hepatocyte apoptosis induced in vitro and in vivo by TNF-alpha requires transcriptional arrest", *J Immunol*, 153: 1778–1788 (1994).
- Liao, DJ, Dickson, RB, "C-Myc in breast cancer", *Endocr Relat Cancer*, 7(3):143-164 (2000).
- Mahmoud, NN, Carothers AM, Grunberger D, etal, "Plant phenolics decrease intestinal tumors in an animal model of familial adenomatous polyposis", *Carcinogenesis*, 21: 921-927 (2000).
- Marquez, VE, Liu, PS, Kelley, JA, Driscoll, JS, McCormack, JJ, "Synthesis of 1, 3 diazepin-2-one nucleosides as transition-state inhibitors of cytidine deaminase", *J Med Chem*, 23:713 (1980).

KAYNAKLAR (DEVAM EDİYOR)

- Merey, S, “Kadınlarda Meme Kanseri Tarama Davranışları” Yüksek Lisans Tezi, *İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Halk Sağlığı Hemşireliği Anabilim Dalı*, İstanbul (2002).
- Miyamoto, K, Ushijima T, “Diagnostic and therapeutic applications of epigenetics”, *Jpn J Clin Oncol*, 35: 293-301 (2005).
- Nakamura, K, Aizawa, K, Nakabayashi, K, Kato, N, Yamauchi, J, et al. “DNA Methyltransferase Inhibitor Zebularine Inhibits Human Hepatic Carcinoma Cells Proliferation and Induces Apoptosis”, *PLoS ONE*, 8(1): 4036 (2013)
- Narula, J, Kharbanda, S, Khaw, BA, “Apoptosis and the Heart”, *Chest*, 112:1358-62 (1997).
- Newman, D.J, Cragg, G.M., “Advanced preclinical and clinical trials of natural products and related compounds from marine sources”, *Current Medicinal Chemistry*, 11: 1693-713 (2004).
- Omene, CO, Wu, J, Frenkel, K, “Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) derived from propolis, a honeybee product, inhibits growth of breast cancer stem cells”, *Invest New Drugs*, 30: 1279-1288 (2012).
- Orcan, S, “Epigenetik ve Epigenomik”, http://yunus.hacettepe.edu.tr/~mergen/derleme/d_epigenetik (2006).
- Ozturk, G, Gınıs, Z, Akyol, S, Erden, G, Gurel, A, Akyol, O, “The anticancer mechanism of caffeic acid phenethyl ester (CAPE)”, *review of melanomas, lung and prostate cancers*, 16: 2064-2068 (2012).
- Pathefsky, AS, Schwartz, GF, Finkelstein, SD et al, “ Heterogeneity of intraductal carcinoma of the breast ”, *Cancer* 6, 39: 731-741 (1989).
- Peedicayil, J, “Epigenetic therapy-a new development in pharmacology”, *Indian J Med*, 123: 17-24 (2006).
- Perren, TJ “CerbB2 oncogene as a prognostic marker in breast cancer”, *Br J Cancer*, 63: 328-332 (1991).

KAYNAKLAR (DEVAM EDİYOR)

- Philippe, MA, Ruddell, RG, Ramm, GA, “Role Of Iron In Hepatic Fibrosis: One Piece In The Puzzle”, *World J Gastroenterol*, 13: 4746-4754 (2007).
- Robertson, DK, “DNA methylation and human disease”, *Nature Rev Genet*, 6: 597-610 (2005).
- Rossi, A, Ligresti, A, Longo, R, etal, “The inhibitory effect of propolis and caffeic acid phenethyl ester on cyclooxygenase activity in J774 macrophages”, *Phytomedicine*, 9: 530-5 (2002).
- Russo, A, Longo, R, Vanella, A, “Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin”, *Fitoterapia*, 73; 21-29 (2002).
- Scott SA, Lakshimikuttysamma A, Sheridan DP, Sanche SE, Geyer CR, DeCoteau JF, “Zebularine inhibits human acute myeloid leukemia cell growth in vitro in association with p15INK4B demethylation and reexpression”, *Exp Hematol*, 35; 263–273 (2007).
- Singal, R. and Ginder, G, “DNA methylation” *Blood*, 93; 4059- 4070 (1999)
- Soini, Y, Paakkö P, Lehto, VP, “ Histopathological evaluation of apoptosis in cancer ”, *Am J of Pathology*, 153: 1043-9 (1998).
- Son, S, Lewis, BA, “Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: structure-activity relationship”, *J Agric Food Chem*, 50: 468-472 (2002).
- Su, Z, Lin, J, Grunberger, D, Fischer, PB, “Growth suppression and toxicity induced by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in type 5 adenovirus- transformed rat embryo cells correlate directly with transformation progression”, *Cancer Res*, 54: 1865-70 (1994).
- Tavassoli, FA: second ed., Stamford, Connecticut, “Pathology of the Breast”, *Appleton&Lange*, (1999).

KAYNAKLAR (DEVAM EDİYOR)

- Totan, Y, Aydın, E, Cekic, O, Dagloglu, C.M, Borazan, M, Daglioglu, K, Gultek, A, “Effect of caffeic acid phenethyl ester on corneal neovascularization in rats”, *Curr. Eye Res*, 23: 291-297 (2001).
- Ünver, S, “Meme Kanserinde Doku Ferritin Düzeyinin Standart Prognostik Parametrelerle Korelasyonu ve Prognostik Önemi”, Uzmanlık Tezi, *T.C. Genelkurmay Başkanlığı Gülhane Askeri Tıp Akademisi Haydarpaşa Eğitim Hastanesi İç Hastalıkları Servis Şefliği*, İstanbul (1998).
- Watabe, Masahiko, etal. "Caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis by inhibition of NFκB and activation of Fas in human breast cancer MCF7 cells", *Journal of Biological Chemistry*, 7: 6017-6026 (2004).
- Wilting, RH, Dannenberg, JH, “Epigenetic mechanisms in tumorigenesis, tumor cell heterogeneity and drug resistance”, *Drug resistance updates :reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 15(1-2): 21-38 (2012).
- Winchester, DJ, Chang, HR, Graves, TA et al, “A comparative analysis of lobular and ductal carcinoma of the breast: presentation, treatment, and outcomes”, *J Am Coll Surg*, 186: 416-422 (1998).
- Wood, LD, Parsons DW, Jones S, et al, “The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers”, *Science*, 318:1108–1113 (2007).
- Wu J, Omene, C, Karkoszka, J, Bosland, M, Eckard, J, Klein, CB, Frenkel, K, “Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), derived from a honeybee propolis, exhibits a diversity of anti-tumor effects in pre-models of human breast cancer”, *Cancer letters*, 1: 43-53 (2011).
- Xiang, D, Wang D, He, Y, Xie, J, Zhong, Z, etal, “Caffeic acid phenethyl ester induces growth arrest and apoptosis of colon cancer cells via the betacatenin/T-cell factor signaling”, *Anticancer Drugs*, 17: 753-762 (2006).

KAYNAKLAR (DEVAM EDİYOR)

- Yamamoto, T, Ikawa S, Akiyama T, Semba K, Nomura N, Miyajima N, Saito T, Toyoshima K, “Similarity of protein encoded by the human cerbB2 gene to epidermal growth factor receptor”, *Nature*, 319: 230-234 (1986).
- Yang, C, Wu J, Zhang R, Zhang P, Eckard J, etal, “Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) prevents transformation of human cells by arsenite (As) and suppresses growth of As-transformed cells”, *Toxicology*, 213: 81-96 (2005).
- You, BR, Park, WH, “Zebularine inhibits the growth of A549 lung cancer cells via cell cycle arrest and apoptosis”, *Molecular carcinogenesis*, 53(11): 847-857 (2014).
- Zhou, L, Cheng, X, Connolly, BA, Dickman, MJ, Hurd, PJ, Hornby, DP, “Zebularine: anovel DNA methylation inhibitor that forms a covalent complex with DNA methyltransferases.’’, *J Mol Biol*, 321: 591-9 (2002).

Ek-1: Hücre kültür donanımları.

Ürün Adı	Ürün Markası
96 Kuyucuklu Petri	Sarstedt
25 Cm2 Hücre Büyütme Kabı	Sarstedt
75 Cm2 Hücre Büyütme Kabı	Sarstedt
Enjektör Filtreleri (0.22 Um)	Chromfilter
Enjektör	Ayset
Tripsin-EDTA	Multicell
Fetal Bovine Serum	BI
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Lon7a, Sigma
6 Kuyucuklu Petri	Greiner
96 Kuyucuklu Petri	Greiner
Seralojik Pipetler (5ml)	Greiner
Seralojik Pipetler (10ml)	Greiner
15 Lik Falkon	Greiner
50'lik Falkon	Greiner
Hemositometre	Neubauer
Penicillin- Streptomycin	Life Tech

Ek-2: Kullanılan cihazlar.

Adı	Firma Adı
Buzdolabı (No Frost)	Regal
Derin Dondurucu	Bosch
Dondurucu (-80)	Panasonic
Elektroforez Aletleri	Cleaver
Güç Kaynağı	Consert
Hassas Tartı	Ohaus
Inverted Mikroskop	Nikon
İnkübatör	Lab. Companion
Co2'li İnkübatör	New Brunswick
Buz Makinası	Hosizaki
Laminar Flow	Scanlaf
Mikropipet (0,2 µl -2 µl)	Thermo
Mikropipet (2 µl -20 µl)	Thermo
Mikropipet (20 µl -200 µl)	Thermo
Mikropipet (100 µl -1000 µl)	Thermo
Otoklav	Nüve
Ph Metre	WTW-Inolab
Santrifüj	Nüve
Elisa	Thermo Fisher Scientific
Su Banyosu	Thermo
Transfer Sistemi	Bs11
Vorteks	Life Technology
Dikey Transfer Sistemi	Lab.Companion
Distile Su Cihazı	Cleaver
Pastör Fırını	Nüve
Rotator	Lab. Companion
Jel Elektroforez	Biosan, Multi Bio Rs 24
Termal Çalkalamalı İnkübatör	Cleaver Scientific
Mikrodalga	Kenwood
PCR Cihazı	Thermal Cycler
Jel Dökümasyon Cihazı	Gel Logic

Ek-3: Kullanılan çözelti ve tamponlar.

Adı	Firma Adı
Tris-Glycine Sds Running Buffer	Cell Signaling Technology
Blue Loading Buffer Pack	Cell Signaling Technology
Nonfat Dry Milk	Cell Signaling Technology
Apoptosis Antibody Sampler Kit	Cell Signaling Technology
B-Actin Mouse Mab	Cell Signaling Technology
DNA Metilasyon Kiti (Gold)	Zymo- Research
Sığır Serum Albümin (Bsa)	Thermo Fisher Scientific
Cpgenome Universal Methylated DNA	Biovision
Cpgenome Universal Unmethylated DNA	Biovision

Etanol	RNase Free Water
Etilendiamintetraasetik asit (EDTA)	Etil Alkol
Bradford Reagent	Kristal Viyole
İzopropanol	Ethidium Bromide
Metanol	Agarose Basic
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	PCR Reacteon Buffer
RIPA Buffer	MgCl ₂
TEMED	Platinum Taq DNA Polimeraz
Tris-Baz	Amonyum Asetat
Amonyum Persülfat	Tris- EDTA
FenolKloroform	Tris- HCL
Lizis Buffer	NaOH
ProteinazK	DMSO
Asetik Asit	MTT Reagent
NaCl	

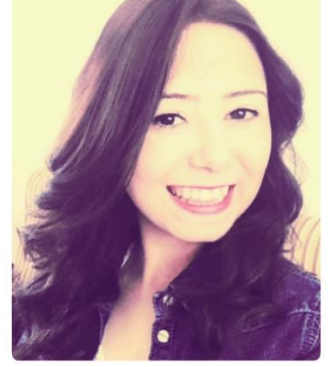
Ek-4: Elektoroforez yürütme jel içeriği.

	Ayırma Jeli (Alt Jel)	Yükleme Jeli (Üst Jel)
Distile su	3,4 ml	3,025 ml
Tris-Hcl	2,5 ml(1,5 M pH: 8. 8)	1,25 ml (0,5 M pH: 6. 8)
%10 SDS	0,1 ml	0,05 ml
Akrilamid/ Bis-Akrilamid	4ml	0,67 ml
Amonyum Persülfat (APS)	75 ml	80 ml
TEMED	8 ml	20 ml

Ek- 5: Kullanılan primerler.

KASPAZ-8	
Metile Forward	5'-TGTTGTTTGGGTAACGTATCGA-3'
Metile Reverse	5'-CCCTACTTAACTTAACCCTACTCGAC-3'
Unmetile forward	5'-TTGTTGTTTGGGTAATGTATTGA-3'
Unmetile reverse	5'-CAACCCTACTTAACTTAACCCTACTCA-3'
KASPAZ-9	
Unmetile Sense forward	5'-GTG GGG AGT GAA GAT TGAT TT-3'
Unmetile Antisens reverse	5'-CCA CTT CAT CCA TAA CAA ATA ACC-3'
Metile Sense:	5'-GGG AGC GAA GAT TGA TTC-3'
Metile Antisens	5'-CTT CGT CCA TAA CGA ATA ACC-3'
KASPAZ-3	
Unmetile Sense	5'-TGA GTT TTA GGG TGG GAT TAA AGT-3'
Unmetile Antisens	5'-CAC TAC AA CCC ATC CCC TAA-3'
Metile Sens	5'-TTT AGG GCG GGA TTA AAG C-3'
Metile Antisens	5'-CTA CGA CCC GTC CCC TAA-3'
TP53	
Unmetile Forward	5'-TTGGTAGGTGGATTATTTGTTT-3'
Unmetile Reverse	5'-CCAATCCAAAAAACATATCAC-3'
Metile Forward:	5'-TTCGGTAGGCGGATTATTTG-3'
Metile Reverse	5'-AAATATCCCCGAAACCCAAC-3'

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Elif KARAÇOBAN

Doğum Yeri ve Tarihi : Bilecik/ 1990

Eğitim Durumu

Lisans Öğrenimi : Hitit Üniversitesi (Çorum)

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

Bilimsel Faaliyetleri :

EROĞLU O., GÜVENİR ÇELİK E., KARAÇOBAN E., ÇELEN M., Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE)'in, DNA Metil Transferaz İnhibitörü (DNMTi) Zebularin Kombinasyonu İle Tetiklenen Apoptotik Mekanizmadaki Epigenetik Değişimlerin MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hatlarında Araştırılması, Avrupa İnsan Genetiği (ESHG) Konferansı, 21,-24 Mayıs 2016, Barselona/ İspanya, Bildiri ve Poster Kitabı.

Projeler

“Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE)'in, DNA Metil Transferaz İnhibitörü (DNMTi) Zebularin Kombinasyonu İle Tetiklenen Apoptotik Mekanizmadaki Epigenetik Değişimlerin MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hatlarında Araştırılması”, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2014-2016, Proje No: 2014-02-BİL.04.02, Araştırmacı

İş deneyimi

Stajlar : Yüksek İhtisas Eğitim Ve Araştırma Hastanesi, 2011

“Mikrobiyoloji, Patoloji ve Biyokimya Laboratuvarları” BURSA.

Çalıştığı Kurumlar

: Final Dergisi Dershaneleri, Biyoloji Öğretmeni, 2014
(BİLECİK)

Sınav Dergisi Dershanesi, Biyoloji Öğretmeni, 2015
(BİLECİK)

Gelişim Kursu, Biyoloji Öğretmeni, 2016
(BİLECİK)

İletişim

E-Posta Adresi

: elfkrcbn11@gmail.com

