

**FENRETİNİD VE İNDOL-3-KARBİNOL
KOMBİNASYONUNUN MEME KANSERİ HÜCRE
SOYLARI ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK/APOPTOTİK
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Buse CEVATEMRE



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FENRETİNİD VE İNDOL-3-KARBİNOL KOMBİNASYONUNUN MEME
KANSERİ HÜCRE SOYLARI ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK/APOPTOTİK
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Buse CEVATEMRE

Yrd. Doç. Dr. Egemen DERE

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA-2012
Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

Buse CEVATEMRE tarafından hazırlanan “Fenretinid ve İndol-3-karbinol kombinasyonunun meme kanseri hücre soyları üzerindeki sitotoksik/apoptotik etkilerinin araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Egemen DERE

Başkan : Yrd. Doç. Dr. Egemen DERE
Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Anabilim Dalı

Üye: Prof. Dr. Engin ULUKAYA
Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Üye: Doç. Dr. Serap ÇELİKLER
Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Kadri ARSLAN
Enstitü Müdürü

.././....

U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

-tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,

-görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,

-başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,

-atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,

-kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,

-ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

.././....

Araş. Gör. Buse CEVATEMRE

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FENRETİNİD VE İNDOL-3-KARBİNOL KOMBİNASYONUNUN MEME KANSERİ HÜCRE SOYLARI ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK/APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Buse CEVATEMRE

Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Egemen DERE

Günümüzde meme kanseri hastalarının durumları, kliniğe yeni kemoterapi rejimleri girmesine rağmen halen tatmin edici değildir. Bu nedenle, meme kanseri hastalarında kullanılabilir yeni yaklaşımlar gerekmektedir. Bu çalışmada, sentetik bir retinoid olan fenretinid (4-HPR) ile brokoli ve lahanaya gibi bitkilerde doğal bir bileşik olarak bulunan indol-3-karbinol'ün (I3C), MCF-7 (östrojen reseptör pozitif) ve MDA-MB-231 (östrojen reseptör negatif) hücre soyları üzerindeki sitotoksik aktiviteleri araştırılmıştır. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde, 4-HPR ve I3C kombinasyon tedavisinin apoptozisi indükleyerek, bileşiklerin yalnız başlarına kullanımına kıyasla daha güçlü bir sitotoksik aktiviteye neden olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak, kombinasyon tedavisinin, insan meme kanseri tedavisinde kullanılabilirliği öngörüsüyle *in vivo* deneylerin yapılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: 4-HPR, I3C, meme kanseri, kemoterapi, sitotoksikite.

2012, viii + 86 sayfa.

ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION OF CYTOTOXIC/APOPTOTIC EFFECTS OF FENRETINIDE AND INDOLE-3-CARBINOL COMBINATION ON BREAST CANCER CELL LINES

Buse CEVATEMRE

Uludag University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Egemen DERE

The outcome of patients with breast cancer is still not satisfactory to date although new chemotherapy regimens have been introduced into the clinics. Therefore, novel approaches are required for better management of breast cancer patients. In this study, cytotoxic activity of a new combination of fenretinide, a synthetic retinoid with indole-3 carbinol, a natural product present in vegetables such as broccoli and cabbage, is tested against MCF-7 (estrogen receptor positive) and MDA-MB-231 (estrogen receptor negative) cell lines. It has been found that the combination resulted in more powerful cytotoxic activity by inducing apoptosis, compared to their single use of each agent. In conclusion, this novel combination warrants *in vivo* experiments to elucidate its possible use in the treatment of breast cancer.

Keywords: 4-HPR, I3C, breast cancer, chemotherapy, cytotoxicity.
2012, viii + 86 pages.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarında danışmanlığımı yapan, eğitimimin düzenli işleyişi için büyük bir özveri gösteren ve her konuda desteğini benden esirgemeyen değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Egemen DERE'ye,

Alanımda yetişmeme yönelik emekleri bulunan bölüm başkanım Prof. Dr. Şükran DERE'ye ve bölüm hocalarıma,

Araştırmam sonuçlanıncaya kadar her aşamada bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, hem mesleki hem manevi açıdanı birer bilim insanı olarak yetişmemiz için büyük emek harcayan, çalışma alanımla ilgili deneyimkazanmamı sağlayan, yanında çalışmaktan onur duyduğum hocam Sayın Prof. Dr. Engin ULUKAYA'ya,

Çalışmalarımdatecrübeleriyle beni yönlendiren ve güler yüzlerini hiç esirgemeyen hocalarım Sayın Doç. Dr. Ferda ARI ve Sayın Doç. Dr. Arzu YILMAZTEPE ORAL'a,

Tez çalışmam boyunca bana her konuda yardımcı olan, benden moral ve desteklerini esirgemeyen ve birlikte çalışmaktan çok büyük keyif aldığım meslektaşlarım Mehmet SARIMAHMUT, Nazlıhan AZTOPAL ve Didem KARAKAŞ'a,

Bu tez çalışmasının bir kısım deneylerinde benden bilgilerini ve hoşgörülerini esirgemeyen TUBİTAK-MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü'nden Ömer KAÇAR, Zelal ADIGÜZEL ve Dr. Ceyda AÇILAN'a,

Eğitimimin her aşamasında maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen ve hayatım boyunca hiçbir fedakârlıktan kaçınmayarak her zaman yanımda olan, bugünlere gelmemde en büyük emeğin sahibi ve başarılarımın esin kaynağı aile fertlerime sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Bu tez çalışması Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı (UAP(F)-2011/44) numaralı proje tarafından desteklenmiştir.

Arş. Gör. Buse CEVATEMRE

../../..

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
GİRİŞ	1
1. KAYNAK ÖZETLERİ	3
1.1.Meme Kanseri.....	3
1.1.1.Meme Kanseri ve Moleküler Biyolojisi.....	4
1.1.2.Meme Kanseri ve Apoptozis.....	5
1.2.Apoptozis.....	5
1.2.1.Apoptotik Proteazlar.....	6
1.2.1.1.Kaspazlar.....	6
1.2.1.2.Granzim B ve Katepsin D.....	11
1.2.2.Apoptozisin Mekanizmaları.....	13
1.2.2.1.Mitokondri Dış Membran Permeabilizasyonu (MOMP).....	17
1.2.2.1.1.MOMP Düzenlenmesinde Bcl-2 Aile Proteinlerinin Rolü.....	17
1.2.2.1.1.1.Bcl-2 Aile Üyeleri.....	17
1.2.2.1.1.2.BH3 Proteinlerinin Aktivasyonu.....	18
1.2.2.1.1.3.Bax ve Bak Aktivasyonu.....	18
1.2.3.Apoptozisin Genetik Kontrolü.....	20
1.2.4.Apoptotik Hücrede Görülen Morfolojik Değişiklikler.....	24
1.2.5.Apoptozisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler.....	26
1.3.4-HPR ve I3C.....	28
2.MATERYAL VE YÖNTEM	31
2.1.Materyal.....	31
2.1.1.Kimyasal Maddeler.....	31
2.1.2.Sarf Malzemeler.....	31
2.1.3.Cihazlar.....	32
2.2.Yöntem.....	32
2.2.1.4-HPR ve I3C'nin Hazırlanması.....	32
2.2.2.Hücre Kültürü.....	32
2.2.2.1.Hücre Soylarının Stoktan Çıkartılması.....	33
2.2.2.2.Hücre Soylarının Pasajlanması.....	34
2.2.2.3.Hücre Soylarının Stoklanması.....	34
2.2.2.4.Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması.....	35
2.2.2.5.Hemositometre ile Hücrelerin Sayımı.....	35
2.2.3.MTT (Metiltiazotetrazolium) Canlılık Metodu.....	35
2.2.4.ATP (Adenozin trifosfat) Canlılık Metodu.....	37
2.2.4.1.Çözeltiler.....	38
2.2.4.2.ATP Ölçümünün Yapılması.....	38
2.2.5.Hoechst 33342, Propidiyum İyodür (PI) ile İkili Boyama yöntemi.....	39
2.2.6.M30 Antijen (Kaspazla Kırılmış Sitokeratin 18) Metodu.....	41
2.2.7.Apoptotik Gen Ekspresyonlarının İncelenmesi.....	42
2.2.7.1.Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	42

2.2.7.1.1.PZRİşleminin Uygulama Aşamaları ve Prensipleri.....	42
2.2.7.1.1.1.DNA'nın Denatürasyonu Aşaması.....	43
2.2.7.1.1.2.Primerlerin Bağlanması(Hibridizasyon, Annealing) Aşaması.....	44
2.2.7.1.1.3.Primerlerin Uzatılması(Polimerizasyon, Extention, Elongation) Aşaması.....	45
2.2.7.2.Eş Zamanlı PZR.....	45
2.2.7.3.Hücrelerden Total RNA İzolasyonu.....	47
2.2.7.4.İzole Edilen RNA'ların Kontrolü.....	48
2.2.7.5.cDNA Sentezinin Yapılması.....	49
2.2.7.6. Eş Zamanlı PZR Analizinin Yapılması.....	49
2.2.8.RNA İnterferans Prensipleri ile Ekspresyonları Artmış Apoptotik Genlerin Susturulmasının Canlılık Üzerine Etkisi.....	50
2.2.8.1.Hücrelerin siBIK ve siFASLG ile Lipofectamin-2000 Kullanılarak Transfeksiyonu.....	52
2.2.8.1.1.Çözeltiler.....	53
2.2.8.1.2.Transfeksiyon İşleminin Yapılması.....	53
2.2.8.1.3.Transfekte Hücrelerin Bileşikler ile Muamele Edilmesi.....	54
2.2.8.1.4.Tedavi Uygulanmış Transfekte Hücrelerin WST-1 Testi ile Canlılığının Belirlenmesi.....	54
2.2.9.Western Blot Analizi.....	55
2.2.9.1.Protein İzolasyonu.....	56
2.2.9.1.1.Çözeltiler.....	56
2.2.9.2.Proteinlerin BCA Yöntemi ile Konsantrasyonlarının Ölçülmesi.....	57
2.2.9.2.1.Çözeltiler.....	57
2.2.9.2.2.BSA Standartlarının Hazırlanması.....	57
2.2.9.2.3.BCA Ölçümünün Yapılması.....	57
2.2.9.3.Western Blot Yöntemi ile Proteinlerin Nitroselüloz Membrana Aktarılması.....	58
2.2.9.3.1.Çözeltiler.....	58
2.2.9.3.2.Proteinlerin Yüklenmesi ve Jelde Yürütülmesi.....	58
2.2.9.3.3.Proteinlerin Transferi.....	58
2.2.9.3.4.Bloklama.....	59
2.2.9.3.5.Birincil Antikor.....	59
2.2.9.3.6.İkincil Antikor.....	59
2.2.9.3.7.PARP/Aktin Proteinlerinin Belirlenmesi.....	60
2.2.9.3.7.1.Karanlık Oda İşlemleri.....	60
2.2.10.İstatistiksel Analiz.....	60
3.BULGULAR.....	61
3.1.MTT ve ATP Canlılık Testi Bulguları.....	61
3.2.Hoechst 33342, Propidyum İyodür (PI) ile İkili Boyama Yöntemi Bulguları	62
3.3.M30-Antijen (Kaspazla Kırılmış Sitokeratin 18) Bulguları.....	63
3.4.Apoptotik Genlerin Ekspresyon Profilleri.....	65
3.5.Apoptotik Genlerin Susturulmasının Canlılık Üzerine Etkisi.....	65
3.6.Western Blot Bulguları.....	67
4.TARTIŞMA VE SONUÇ.....	68
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	71
ÖZGEÇMİŞ.....	85

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AIF	:Apoptozis indükleyici faktör (Apoptosis inducing factor)
ATP	:Adenozin trifosfat (Adenosine triphosphate)
BRCA1	:Breast cancer gene 1
BRCA2	:Breast cancer gene 2
CARD	:Kaspaz takviye alanı (Caspase recruitment domain)
DED	:Ölüm etkileyici alan (Death effector domain)
DD	:Ölüm alanı (Death domain)
DISC	:Ölüm indükleyici sinyal kompleksi (Death inducing signalling complex)
DIM	:3,3-diindolmetan (Di-indole methane)
DMEM	:Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	:Dimetil sülfoksit (Dimethyl sulfoxide)
DNA	:Deoksi ribonükleik asit (Deoxyribonucleic acid)
DTT	:Dithiothreitol
ER	:Östrojen reseptörü (Estrogen receptor)
FADD	:Fas ilişkili ölüm alanı (Fas associated death domain)
FBS	:Fetal sığır serumu (Fetal bovine serum)
GTP	:Guanozin trifosfat (Guanosine triphosphate)
ICAD DNase)	:Kaspazla aktive edilmiş DNaz inhibitörü (inhibitor of caspase-activated DNase)
IMM	:Mitokondriyal iç membran (inner mitochondrial membrane)
MOMP	:Mitokondri dış membran permeabilizasyonu (mitochondrial outer membrane permeabilization)
MTT	:3-(4,5-dimetiltiyazol -2)-2,5-difenil tetrazolyum bromid
OMM	:Mitokondriyal dış membran (outer mitochondrial membrane)
PAGE	:Poliakrilamid jel elektroforezi (Polyacrylamide gel electrophoresis)
PARP	:Poli(ADP-riboz)polimeraz (Poly ADP-ribose polymerase)
PZR	:Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR; polymerase chain reaction)
PBS	:Fosfat tuz tamponu (Phosphate buffered saline)
PI	:Propidyum iyodür (Propidium iodide)
PS	:Fosfatidil serin (phosphatidylserine)
PTP	:Permeabilizasyon geçiş poru (permeability transition pore)
Rb	:Retinoblastoma RNA :Ribo nükleik asit (Ribonucleic acid)
RPMI	:Roswell Park Memorial Institute Medium
SDS	:Sodyum dodesil sülfat (Sodium dodecyl sulfate)
TAMRA	:6-carboxy-tetramethyl-rhodamine
TRAIL	:TNF-ilişkili apoptozis indükleyici ligand (TNF-related apoptosis inducing ligand)
UV	:Ultraviyole (Ultraviolet)
VDAC	:Voltaj bağımlı anyon kanalları (Voltage-dependent anion channels)

ŞEKİLLER DİZİNİ

- 1.1.Memeli kaspazlarının yapıları ve alt birim organizasyonları
- 1.2.Prokaspaz aktivasyonu için önerilen iki model
- 1.3.Kaspaz aktivasyon yolları
- 1.4.Apoptotik uyarı sonucu apoptozom şekillenmesi
- 1.5.Apoptozis sürecinde CAD aktivasyonu
- 1.6.Granzim B ve perforin aracılığıyla kaspaz aktivasyonu
- 1.7.Katepsin D'nin apoptozis sürecindeki rolü
- 1.8.Reseptör aracılı kaspaz aktivasyonu
- 1.9.Kaspaz aktivasyonunun mitokondriyal yolu B.Apoptozom oluşumu ve aktivasyonu
- 1.10.Apoptozis'in Bcl-2 ailesi tarafından düzenlenmesi
- 1.11.p53 proteinin hücre siklusu ve apoptozis sürecindeki rolü
- 1.12.Ras ailesi G-proteinlerin işlevsel döngüleri
- 1.13.Hücre siklusunun Rb, Cdk4,6 ve siklin D kompleksleri tarafından kontrolü
- 1.14.Apoptozis ve nekrozisin şematik karşılaştırılması
- 1.15.Apoptozisin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerin şematik özeti
- 1.16.I3C'nin metabolik transformasyonu
- 2.1.MTT'nin reaksiyon şeması
- 2.2.Lusiferin/lusiferaz biyoluminesans tepkimesi
- 2.3.Sitokeratin 18'in kaspazlar aracılığıyla kesimi ve bu bölgenin M30 antikoruna ile tanınmasının şematik gösterimi
- 2.4.PZR siklusunun basamakları
- 2.5.RNA interferansın mekanizması
- 2.6.Katyonik lipozomların negatif yüklü siRNA molekülleri ile etkileşimi ve ardından hücre içerisine alınımı
- 3.1.4-HPR, I3C, ve bu bileşiklerin kombinasyonları ile tedavi edilen MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin % canlılıklarının gösterimi
- 3.2.10µM 4-HPR, 100µM I3C ve 10µM 4-HPR+100µM I3C uygulanan MCF-7 (sol sütun) ve MDA-MB-231 (sağ sütun) hücrelerinin 48 saatlik tedavi sonrasındaki floresan mikroskop görüntüleri
- 3.3.M30-Antijen standart eğri grafiği
- 3.4.10µM 4-HPR, 100µM I3C, kombinasyon (10µM 4-HPR+100µM I3C), ve 3,21µM Paklitaksel tedavilerinin 48 saatte MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soylarında kaspazla-kırılmış sitokeratin 18 (M30-Antijen) üzerine etkisi
- 3.5.MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soylarında 16 saatlik kombinasyon (10µM 4-HPR + 100µM I3C) tedavisinin, bazı apoptotik genlerin ekspresyonları üzerine olan etkisi
- 3.6.siBIK ve siFASLG ile transfekte edilen MCF-7 hücre soyunun, 10µM 4-HPR, 100µM I3C, ve kombinasyon (10µM 4-HPR+100µM I3C) tedavileri sonrası % canlılığının gösterimi
- 3.7.siBIK ve siFASLG ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücre soyunun, 10µM 4-HPR, 100µM I3C, ve kombinasyon (10µM 4-HPR+100µM I3C) tedavileri sonrası % canlılığının gösterimi
- 3.8.Anti aktin ve anti PARP antikorları ile yapılan western blot sonucu bant profilleri

GİRİŞ

Meme kanseri morbiditesi, mortalitesi ve tedavi maliyeti açısından önemli bir toplum sağlığı sorunudur (Hortobagyi ve ark., 2005; Benson ve ark., 2009). Ayrıca son yıllarda kanserin tanı ve tedavisinde birçok ilacın kullanıma girmesine rağmen tedavinin etkinliği tatmin edici şekilde artmamıştır. Meme kanseri de halen riskli bir hastalık olma özelliğini korumaktadır. Bu yüzden daha etkili tedavi şekillerinin geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Meme kanser tedavilerinin uzun, pahalı ve bazen organ kaybına neden olması ve hastalığın çabuk yayılabilmesi kadınlar arasında en önemli sorunlardan birini oluşturmaktadır. Evreleme açısından heterojen bir grup olan meme kanserinin hangi evrede olduğu tespit edildikten sonra uygun tedavi seçeneğine başlanmalıdır. Günümüzde ilk olarak başvuru olan tedavi seçeneği, birçok antikanser ilaç kombinasyonlarından oluşan kemoterapi yöntemidir (Spears ve ark., 2009).

Sıklıkla retinol olarak bilinen vitamin A'nın, epitelial dokuların normal şekilde farklılaşması ve devamlılığının sağlanması için gerekli olduğu bilinmektedir. Retinol ve retinoid denilen türevlerinin, belli bazı tümörler üzerinde antiproliferatif ve/veya farklılaştırma etkilerinden dolayı kemopreventif ajanlar olarak önemi giderek artmaktadır (Ulukaya ve ark., 1999). Fenretinid, bu amaçla kullanılan sentetik retinoidlerden yalnızca bir tanesidir. Fenretinid (4-HPR), 1-10 µM dozları arasında, meme, akciğer, prostat, ovaryan, pankreas ve hepatosellüler karsinom gibi kanser hücre soylarının büyümesini *in vitro* baskıladığı rapor edilmiştir (Roberson ve ark., 1997; Tolis ve ark., 1999; Simeone ve ark., 2002; Golubkov ve ark., 2005; Bu ve ark., 2007; Messner ve ark., 2011).

Indol-3-karbinol (I3C), besinsel bir kemopreventif bileşik olup lahana, brokoli gibi *Brassicacinsi* sebzelerde bulunan glukobrassikin maddesinin doğal olarak gerçekleşen otoliz ürünüdür. Bu doğal bileşik, pek çok insan kanser hücrelerinde anti-proliferatif aktivite göstermektedir (Nguyen ve ark., 2010). I3C'ün 50-100 µM aralığındaki konsantrasyonlarda; meme, kolon, prostat, akciğer ve endometrium gibi çeşitli kanser hücre soylarının proliferasyonlarını baskıladığı gösterilmiştir (Leong ve ark., 2001; Hong ve ark., 2002; Hudson ve ark., 2002; Jeon ve ark., 2003; Rahman ve ark., 2003; Choi ve ark., 2010).

4-HPR; anti-enflamatuvar bir ajan olan indometazin, platin-temelli ilaçlar ve bitki-türevli bir kimyasal olan genistein gibi bazı kimyasallar ile kombine edilmiştir (Karmakar ve ark., 2009; Whitworth ve ark., 2011; Hojka-Osinska ve ark., 2012). Fakat, literatürde 4-HPR ve I3C'nin kombine etkisinin gösterildiği bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma, 4-HPR ve I3C kombinasyonunun, östrojen reseptör pozitif (MCF-7) ve östrojen reseptör negatif (MDA-MB-231) meme kanseri hücre soyları üzerindeki sitotoksik etkisinin belirlenmesi ve bu etkinin moleküler mekanizmalarının araştırılması amacıyla yapılmıştır.

1.KAYNAK ÖZETLERİ

1.1.Meme Kanseri

Meme kanseri dünyada kadınlar arasında en sık görülen ve ölüme neden olan kanser tipidir. WHO ve IARC'ın (International Agency for Research on Cancer) ortak raporuna göre her yıl dünyada 1.000.000 kadında meme kanseri gelişmekte ve 370.000 kadın ise bu hastalıktan ölmektedir. Sadece Avrupa'da her yıl 340.000 yeni meme kanseri olgusu gözlenmektedir. ABD'de ise yılda 184.000 yeni meme kanseri gözlenmekte olup, akciğer kanserinden sonra tüm kanser ölümleri arasında %18 ile ikinci ölüm nedeni olarak bildirilmektedir. Dünyada meme kanseri görülme sıklığı yıllık ortalama %0,5 oranında artmaktadır. Ancak görülme sıklığındaki bu artışa karşın, gelişmiş batı ülkelerinde mortalite oranında az da olsa gerileme gözlenmektedir. Diğer taraftan meme kanseri sadece kadınlara özel bir hastalık değildir. Tüm meme kanserlerinin yaklaşık %1'i erkeklerde görülmektedir. Meme kanseri erkeklerde görülen tüm kanser çeşitlerinin %0.2'sinden ve ölümlerin ise %0.14'ünden sorumludur.

İnsanlarda meme kanserinin nedeni kesin olarak bilinmemektedir. Meme kanseri genetik ve çevresel faktörler arasında güçlü etkileşimin olduğu karmaşık ve multifaktöriyel bir hastalıktır. Son araştırmalar kadında meme kanserini tetikleyen faktörlerin ne olduğunu bulmaya yönelmiştir. Genetik, hormonal, sosyobiyojik ve psikolojik etkenlerin oluşumda rol aldığı kabul edilmekle beraber, meme kanserli kadınların %70-80'i bu risk faktörlerine sahip değildir. Çok değişik ajanların kromozomal mutasyonlara neden olarak kanserin ortaya çıkışı ve gelişimi ile yakından ilişkili olduğu düşünülmektedir. Yeni çalışmalar en önemli belirleyici faktörün genetik imza olduğu yönünde veriler içermektedir.

Meme kanseri için birçok risk faktörü belirlenmiştir. Bunların arasında cinsiyet ve yaş önemli bir faktör olup hastaların çoğu 55 yaşın üzerindedir. Ailede meme kanseri öyküsü olması yine yüksek risk faktörlerinden birini oluşturmaktadır. Genetik meme kanseri olgularında özellikle p53, BRCA1 ve BRCA2 gen mutasyonları etkili olmaktadır (Washbrook, 2006). Meme kanseri gelişiminde hormonal faktörler de etkilidir. Erken menstruasyon yaşı, meme dokusunun östrojene maruz kalma süresini uzatır bu nedenle erken menarşın meme kanseri riskini arttırdığına inanılmaktadır.

Doğurmamış kadınlarda meme kanseri görülme olasılığı daha fazladır. İlk doğumu 35 yaşından sonra yapmış olmak ve geç menapoz da meme kanseri görülme olasılığını arttırmaktadır. Gebelik ve laktasyonun meme kanserine karşı koruyucu olduğu ileri sürülmektedir. Çevresel faktörler arasında ise radyasyona maruz kalma en önemli risk faktörüdür. Yüksek yağ tüketimi ve alkol alımının da meme kanseri riskini arttırdığına dair kanıtlar vardır. Lifçe zengin gıdaların bağırsaktan östrojen absorpsiyonunu engelleyerek meme kanserini önleyebileceği düşünülmektedir (Kelsey ve ark., 1993; Wohlfahrt ve ark., 2004).

1.1.1.Meme Kanseri ve Moleküler Biyolojisi

Meme kanserinin gelişiminin altında yatan mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır. Çevresel karsinojenlere maruz kalma sonrasında kazanılan mutasyonların yanında, germline mutasyonlarla kalıtılan genetik değişiklikler sonucu tümör süpresör genlerin aktivasyonu ve proto onkogenlerin aktivasyonu ile apoptozis mekanizmasının bozulması ve/veya kontrolsüz hücre proliferasyonunun sonucunda meme kanseri gelişiminin başladığı öne sürülmektedir. Çeşitli büyüme faktörleri ve ilişkili reseptörlerde oluşabilecek çeşitli bozuklukların da kontrolsüz hücre çoğalmasına neden olarak insan meme kanserinde oldukça önemli rol oynadığı bilinmektedir.

Östrojen reseptörlerinin (ER) östrojen uyarısıyla büyüme sinyalinde olduğu kadar meme kanseri gelişiminde de oldukça önemli olduğu bilinmektedir. Östrojenin fonksiyonunu iki spesifik hücre içi reseptörü vasıtasıyla gerçekleştirdiği bilinmektedir. ER α ve ER β olarak adlandırılan bu reseptörler, hormon bağımlı transkripsiyon düzenleyiciler olarak işlev görürler. ER yolu, insan meme kanseri patofizyolojisinde kritik bir rol oynar. Meme kanseri hastalarında ER α 'nın fazla ekspresyonu, iyi anlaşılmalı olan bir prognostik ve prediktif bir faktördür. ER β 'nin prognostik anlamı tam olarak tanımlanamamıştır (Dotzlaw ve ark., 1999, Fugua ve ark., 1999; Speirs ve ark., 2000; Su ve ark., 2000)

Genetik değişiklikler germline mutasyonlarla kalıtılır veya sonradan somatik mutasyonlarla kazanılır. Sonradan kazanılan mutasyonla çevresel karsinojenlere maruz kalmayla oluşabilir. Bunlar, fiziksel (iyonize radyasyon), kimyasal (polisiklik hidrokarbonlar) ve biyolojik karsinojenlerdir (virüsler). Mevcut araştırmalar karsinogenez sürecini hangi genetik değişikliklerin hızlandırdığını bulmaya yönelmiştir. İnvaziv duktal karsinoma dönüşümü üzerinde durulan modele göre; hiperplaziden in

situ karsinomaya geçiş ve sonuçta da invaziv karsinoma gelişimi söz konusudur. Meme kanserinin genetik temeli üzerindeki çalışmalar tümörjenez sürecinde birden fazla role sahip özellikli genlere yönelmiştir. Bu genler arasında onkogenler (ras, c-myc genleri), tümör supresör genleri (p53, BRCA1, BRCA2, nm23), büyüme faktörü reseptör genleri (HER2), hücre döngüsünün düzenlenmesinde rol alan genler (telomeraz) ve apoptozisde rol alan genler (bcl gen ailesi) sayılabilir. Tümör süpresör genlerin ortaya çıkan meme kanserlerinin ailesel grupta olanlarının yaklaşık %50'sinde önem taşıdıkları bildirilmiştir. BRCA1 ve BRCA2 proteinleri genomik stabilitenin sağlanması, DNA hasarında hücresel cevap olarak transkripsiyonel düzenlemeye ve hücresel proliferasyon süreçlerine katkıda bulunurlar (Oesterreich ve ark.,1999; Cui ve ark., 2000).

1.1.2.Meme Kanseri ve Apoptozis

Normal meme gelişimi, hücre proliferasyonu ve apoptozis arasındaki dengeyle kontrol edilmektedir. Meme, doğumdan sonra ergenlik ve hamilelik olmak üzere iki ayrı fizyolojik süreçle gelişimini tamamlayan birkaç organdan biridir. Bu safhalar süresince memenin proliferasyon ve farklılaşmasında belirgin değişiklikler meydana gelmektedir. Tümör gelişimi yalnızca kontrolsüz hücre çoğalması ile değil bununla birlikte azalmış apoptozis sonucu olması bunun güçlü bir kanıtıdır. Proliferasyon ve apoptozis arasındaki denge, kemoterapi, radyoterapi ve hormonal tedavilerin cevabında tümör gelişimi veya gerilemesini belirlemede çok önemlidir. Tüm bu olaylarda apoptozisin indüklenmesi oldukça önemli bir yer tutmaktadır (Hickman 1992; Reed ve ark., 1999; Tamm ve ark., 2001).

1.2.Apoptozis

Çok hücreli biyolojik sistemlerin gelişim ve devamlılıkları, organizmayı meydana getiren hücrelerin karşılıklı etkileşimlerine bağlıdır. Gelişim boyunca çoğu hücre fazla miktarda meydana gelir ve neticede programlı bir ölüm gerçekleşir. Böylece pek çok organ ve dokunun şekillenmesi sağlanır (Meier ve ark., 2000). Programlı hücre ölümünün hayvan gelişiminde yer aldığına dair en belirgin örneklerinden bir tanesi, parmak arası mezenkimal dokuda meydana gelen kitlesel ölüm sonucunda parmakların serbest ve bağımsız bir halde şekillenmesidir (Zuzarte-Luis ve ark., 2002). Beyin gelişiminde, ilk zamanlarda oluşan nöronların, beyin şekillenmesi tamamlandığında nicel olarak yarısının bu süreçte ölmesi ve üreme organlarının gelişimi diğer

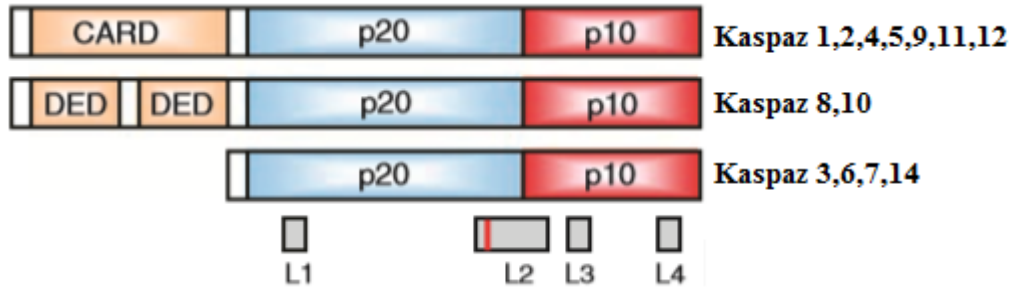
örneklerdendir (Hutchins ve ark., 1998; Meier ve ark., 2000). Ayrıca, erişkin bir organizmanın hücrelerinde, homeostazı sürdürmek ve sabit sayılarını korumak açısından düzenli bir şekilde fizyolojik ölüm gerçekleşir. Gelişmekte olan lenfositlerin çoğu, çeşitli süreçlerle ölürlere ve bu şekilde etkin ve işlevsel havuz sıkıca kontrol edilmekte, aynı zamanda lenfosit sayısı sabit tutulmaktadır (Rathmell ve ark., 2002). Birlikte ele alındığında; gelişim, farklılaşma, proliferasyon/homeostaz, immün sistemin düzenlenmesi ve işlevi, hasarlı ve zararlı hücrelerin ortadan kaldırılması gibi süreçlerde yer alan apoptozisin biyolojik önemi büyüktür. Apoptotik programda meydana gelen fonksiyon ya da düzenlenme bozuklukları çeşitli patolojik durumlarla ilişkilidir. Apoptozis sürecinde oluşacak bir hata; kanser, otoimmün hastalıklar ve viral enfeksiyonların yayılması ile sonuçlanabilir. Buna karşın apoptozisin çok fazla gerçekleştiği durumlar ise nörodejeneratif bozukluklar, AIDS ve iskemik hastalıklar ile sonuçlanabilmektedir (Faddeel ve ark., 1999).

1.2.1.Apoptotik Proteazlar

1.2.1.1.Kaspazlar

Kaspazlar, sistein proteaz ailesine-katalitik nükleofil olarak sistein rezidülerini kullanan peptidazlar-ait olup hedef proteinleri aspartik asit rezidüleri ardındankırma özgülüğünü paylaşan proteinlerdir. Kaspazların belirli bir grubu apoptozis dışında, prositokin aktivatörleri olarak inflamasyonda görev alırlar. Kaspazların bazıları (2,8,9,10) başlatıcı kaspazlarolarak bilinirken, bazıları da (3,6,7) ilerletici kaspazlar olarak bilinmektedir. Hatalı düzenlenen kaspaz aktivitesi, hücre için ölümcül olabilir, bu sebeple kaspazlar hücre içerisinde prekürsör yani zimojen olarak sentez edilirler. Dolayısıyla aktivasyon süreci gerektirirler.

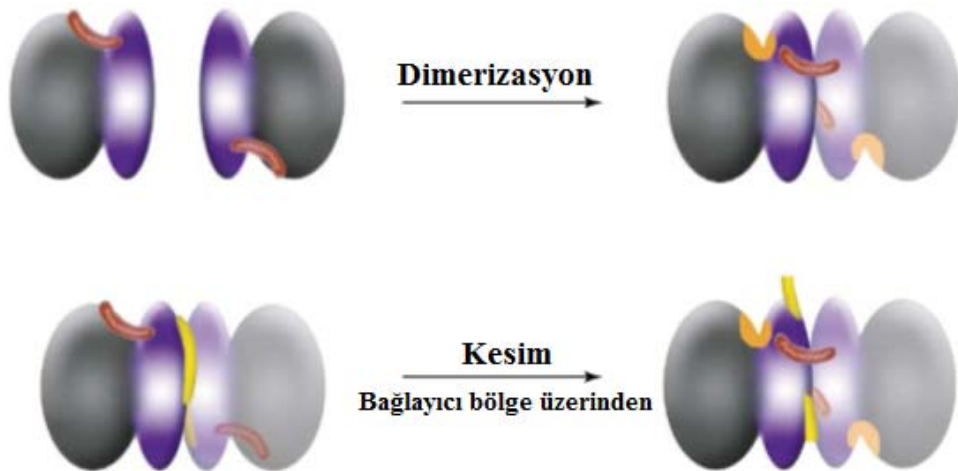
Kaspazlar, bir “prodomain”, bir p20 büyük alt birim ve bir p10 küçük alt birim içeren inaktif zimojenler şeklinde sentez edilirler. Zimojenlerin proteolitik kesim ile aktivasyonları sonucu, büyük ve küçük alt birimler ayrılır ve “prodomain”leri uzaklaştırılır. p20 alt biriminde yer alan katalitik rezidüleri, Cys285 ve His237’den oluşan aktif bir alandan oluşur (Fuentes-Prior ve ark., 2004). Kaspazlar, substratlarında birbirini takip eden en az dört amino asit (P4–P3–P2–P1) yapısını tanırlarve C-terminal rezidüsünden (P1) sonra kırarlar. Bu ise genellikle Asp (aspartik asit) rezidüsüdür.



Şekil 1.1.Memeli kaspazlarının yapıları ve alt birim organizasyonları (Li ve ark., 2008)

Başlatıcı kaspazlar, protein-protein etkileşim motiflerini barındıran uzun bir “prodomain” içerir. Bu motifler, ya ölüm etkileyici alan (DED;death effector domain) ya da kaspaz takviye alanıdır (CARD;caspase recruitment domain). Kaspazlar bu motifler sayesinde adaptör moleküllerle etkileşimlerini sağlarlar (Şekil 1.1). İlerletici kaspazlar, kısa bir “prodomain” içerirler ve apoptozisin ilerlemesini sağlamak için çok çeşitli hücresel substratları kırarlar.

Başlatıcı kaspazlar, aktif formlarının en az bir aktif bölge içeren katalitik üniteleriyle dimer oluştururlar. Katalitik üniteler, bir büyük ve bir küçük olmak üzere iki alt birim içermektedir. Bu alt birimler prekürsör moleküllerin bağlayıcı bölgeden internal kesimi sonucu ayrılmalarıyla meydana gelirler. Fakat son çalışmalar, başlatıcı kaspazların aktivasyonu için kesim sürecinin gerekli olmadığını göstermektedir. Başlatıcı kaspazların zimojenleri hücre içerisinde inaktif monomer durumundadırlar. Monomerik zimojenler, aktif şekilleri için dimerizasyon sürecine ihtiyaçları vardır ve bu aktivasyon kesim işleminden bağımsızdır (Şekil 1.2).

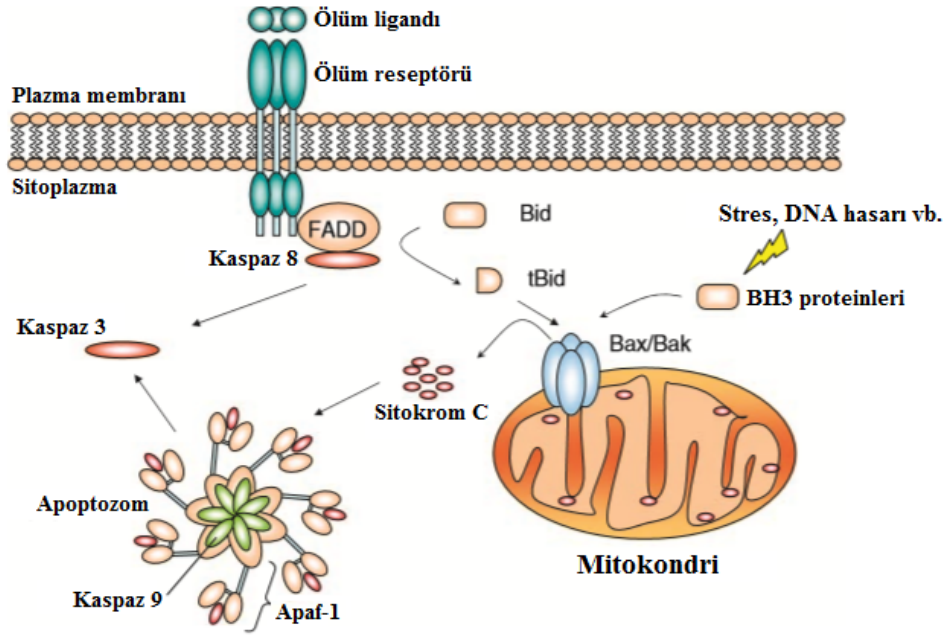


Şekil 1.2.Prokaspaz aktivasyonu için önerilen iki model (Boatright ve ark., 2003)

Dimerizasyon, kaspaz zimojenlerin sahip oldukları N-terminal alanlar sayesinde bir araya geldikleri multiprotein aktive edici kompleksler ile gerçekleşir. Aktive edici kompleksler, içsel ve dışsal yol olmak üzere ölüm uyarısına göre işlev görürler. Başlatıcı kaspazların zimojen formları latent monomerler şeklindedir. Bu monomerler dimerizasyon ile aktifleşirler. Bu süreçte, şekil 1.2’de kırmızı çentik şeklinde gösterilen aktivasyon ilmiği komşu dimerin akseptör cebine transloke olur. Sonuç olarak turuncu renk ile gösterilen aktif bölgenin yapılanması sağlanır. İlerletici kaspazların zimojen formları dimer halde bulunur ve latent durumları, şekil 1.2’de sarı renkte gösterilen alanlar arası bağlayıcıyla (yapısal engelleme) sürdürülür. Bu bağlayıcının kesimi, aktif bölgenin yapılanmasını sağlayan aktivasyon ilmiğinin translokasyonuna izin verir. Her iki proenzim grubunda aktivasyon süreci, aktivasyon ilmiğinin translokasyonunu içerir.

Dışsal yol ölüm reseptörlerinin ligasyonu ile aktifleşir. Ölüm reseptörleri, tip I transmembran proteinlerin bir ailesi olup ekstraselüler alanlarında sistince zengin tekrarların ve sitoplazmik kuyruklarında ölüm alanı (DD; death domain) olarak bilinen protein-protein etkileşim alanlarının varlığıyla karakterizedirler. Ölüm reseptörleri, ekstraselüler tehlike sinyallerini algılamak için hücre yüzey sensörleri olarak işlev görürler. Bu işlev ise, ligand bağlanması (ligasyon) ile gerçekleşir. Ölüm reseptör ailesi, tümör nekroz faktör reseptör 1 (TNFR1/DR1/CD120a/p55/p60), Fas (DR2/APO-1/CD95), DR3 (APO-3/LARD/TRAMP/WSL1), TNF-ilişkili apoptozis indükleyici ligand reseptör 1 (TRAILR1/ DR4/APO-2), TRAILR2 (DR5/KILLER/TRICK2), DR6, ve sinir büyüme faktör reseptörüdür (Lavrik ve ark., 2005) (Şekil 1.3).

Ölüm reseptörleri, spesifik ligandlarıyla etkileşimler sonucunda, adaptör moleküller içeren DISC yapılarını oluşturmak üzere multimerizasyona uğrarlar. Fas ve TRAIL reseptörleri durumunda; FADD, C-terminal ölüm alanı (DD; death domain) aracılığıyla DISC yapısına katılır ve N-terminal bölgesiyle de kaspaz 8’in ölüm etkileyici alanı (DED; death effector domain) ile etkileşir. Kaspaz 8’in DISC yapısına katılması ve oligomerizasyonu, otokatalitik aktivasyonuna neden olur ve bu aktivite hücre ölümü için kritik bir önem taşır (Juo ve ark., 1998; Varfolomeev ve ark., 1998).

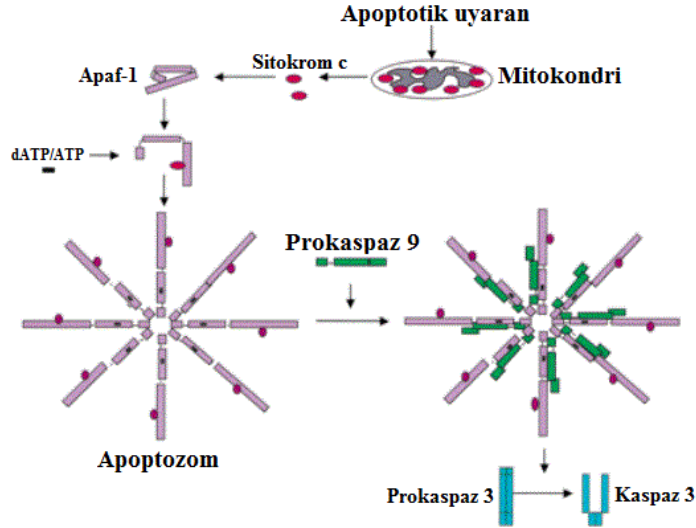


Şekil 1.3.Kaspaz aktivasyon yolları (Li ve ark., 2008)

İçsel yol (mitokondriyal yol), DNA hasarı ve sitotoksik ilaçlar gibi faktörlerle uyarılabilir. Çeşitli hasar ya da stres sinyalleri, bir veya birden fazla BH3 protein aile üyesini aktifleştirebilir. BH3 protein aktivasyonu belli bir eşiğin üzerine çıktığında, anti apoptotik Bcl-2 ailesinin baskılayıcı etkisi ortadan kalkar ve mitokondri dış membranında Bak-Bax oligomerlerinin oluşumunu teşvik eder, sitozole sitokrom c geçişi gerçekleşir (Chipuk ve ark., 2008).

Sitozolik sitokrom c ise apoptozom yapısının şekillenmesini uyarır. Apoptozom, Apaf-1, sitokrom c, ve kofaktör dATP/ATP içeren multiprotein komplekstir (Liu ve ark., 1996; Li ve ark., 1997; Zou ve ark., 1997). Apaf-1, apoptozom yapısının merkezi bileşenidir ve N-terminal CARD, nükleotid bağlama alanı ve C-terminal WD40 alanı içerir. CARD, kaspaz 9'un "prodomain"i (CARD) ile etkileşiminden sorumlu alandır (Qin ve ark., 1999). CARD ve Apaf-1'in nükleotid bağlama alanı, sitokrom c ve dATP varlığında oligomerizasyondan sorumluyken, WD40 alanı sitokrom c ile etkileşim halindedir. Apoptotik uyarın yokluğunda, Apaf-1 monomer formda bulunur. Sitokrom c ve dATP varlığında ise; Apaf-1, apoptozom denilen disk şeklinde bir sinyal platformu oluşturur. Bu platformda, yedi adet Apaf-1 molekülü bulunur ve her bir Apaf-1 molekülü bir adet sitokrom c ve bir adet kaspaz 9 ile bağlı bulunur (Acehan ve

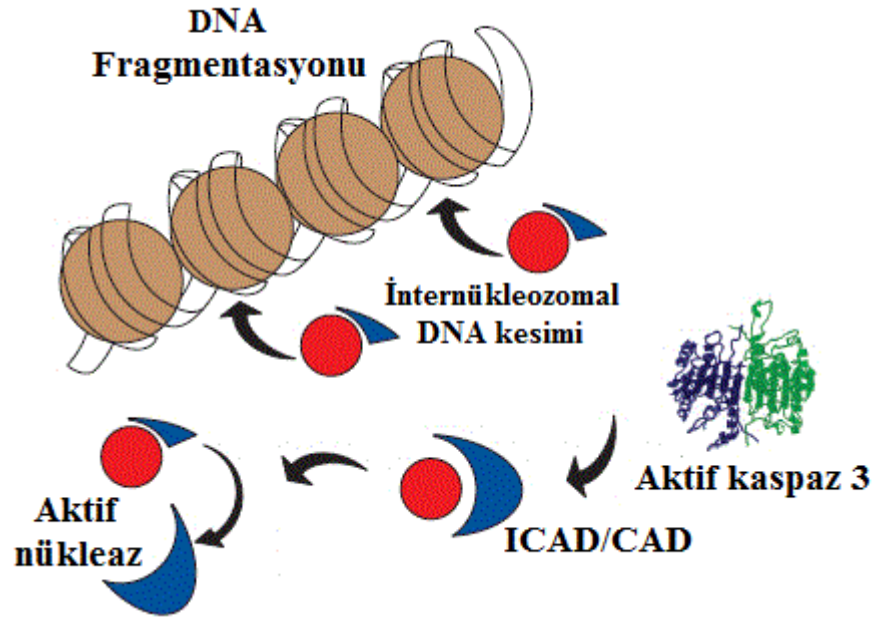
ark.,2002; Yu ve ark., 2005). Apoptozom aracılığıyla gerçekleşen yapısal değişiklik sonucu aktifleşen kaspaz 9, apoptozisin ilerlemesi için kaspaz 3 ve kaspaz 7 gibi ilerletici kaspazlarla etkileşime girer (Slee ve ark., 1999) (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. Apoptotik uyarı sonucu apoptozom şekillenmesi (Wang, 2001)

Kaspaz 3, kaspazla aktive edilmiş DNaz inhibitörü (ICAD; inhibitor of caspase-activated DNase) poli(ADP-riboz)polimeraz (PARP, DNA tamir enzimi), Rho ilişkili sarmal oluşturan kinaz I (ROCKI; Rho-associated coiledcoil forming kinase I, aktin, fodrin ve lamin gibi hücresel substratları kırarak apoptotik morfolojinin oluşumunu sağlar. ROCKI'yi kırarak (sonucunda kinaz serbest kalır ve miyozinin hafif zindiri kalıcı olarak fosforlanır) membran bleblenmesine, hücresel yapının dağılmasına da sebep olabilir. Bunların yanında, ICAD'ı kırar ve serbest kalan CAD nükleusa geçerek DNA'yı internükleozomal olarak keser (Şekil 1.5)

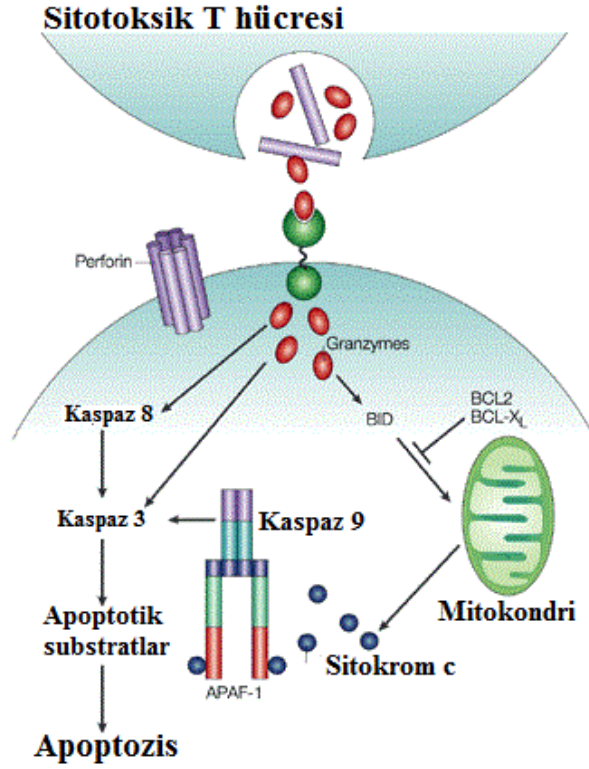
Kaspaz 9'un içsel yolun ortak başlatıcısı olmasına rağmen, son yıllarda nörotrofik yoksunluk ve DNA hasarına yanıt olarak kaspaz 2'nin aktivasyonu dikkat çekmektedir. Kaspaz 2, CARD yapısı ile yüksek moleküler ağırlıklı bir kompleksin etkileşimi ile aktive edilmektedir. Diğer başlatıcılara benzer şekilde, kaspaz 2'nin zimojen formu monomer şeklinde olup aktivasyonları için kesim işlemi gerekli değildir.



Şekil 1.5. Apoptosis sürecinde CAD aktivasyonu (Anonim, 2008)

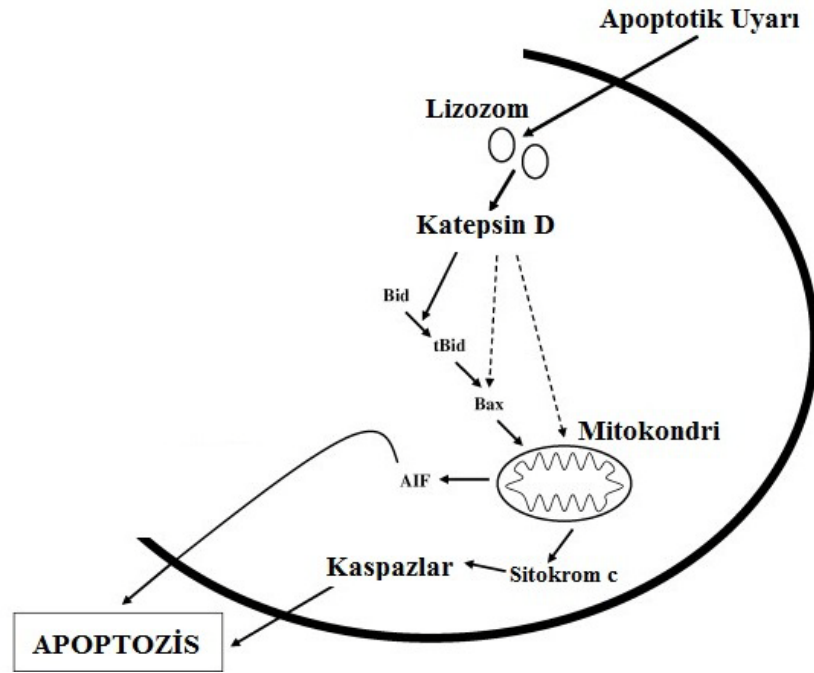
1.2.1.2. Granzim B ve Katepsin D

Apoptosis sürecinde kaspazların dışında etkili olan, granzim B ve katepsin D gibi diğer başka proteazlar bulunmaktadır. Bu salgısal apoptotik yol, patojenle enfekte hücreler ve tümör hücrelerinin ortadan kaldırılmasında etkilidir. Sitotoksik T lenfositleri sitoplazmalarında granzim B ve perforin adı verilen, apoptozisin oluşmasını sağlayan proteinler içeren sitoplazmik granüllere sahiptirler ve apoptozisi bu molekülleri salgılayarak indüklerler. Granzim B ve perforin, kaspaz ailesini aktive edebilen serin esterazlardır. Perforin bu süreç için önemlidir çünkü aktivitesi sayesinde membranda por oluşumunu sağlamaktadır. Bu porlar, hücre içine kalsiyum girişinde hızlı bir artışa sebep olur ve granzim B'nin hücreye girişini sağlamak ve apoptozisi başlatmaktadır. Granzim B ise kaspaz 3 ve kaspaz 9'u aktive etmektedir (Şekil 1.6).



Şekil 1.6.Granzim B ve perforin aracılığıyla kaspaz aktivasyonu (Stassi ve ark., 2002)

Kaspazlar ve granzimler dışında, interferon- γ (IFN- γ)-, TNF-, Fas-, oksidatif stres aracılı hücre ölümünde yer alan diğer proteazlar, aspartik proteaz katepsin D ve serin proteaz AP24'tür (apoptozis proteaz 24). Katepsin D (lizozomal aspartik proteaz), lizozom içerisinde endositozla sindirilecek proteinlerin proteolizinde, salgılanan proteinlerin proteolitik aktivasyonunda ve metastatik hücrelerin migrasyonu ile ilişkili ekstraselüler aktiviteyle yakından alakalı olduğu bilinmektedir. Apoptotik uyarı sonucunda 34 kDa ağırlığındaki Katepsin D'nin sitozole lizozomal salınımı; mitokondriyal sitokrom c'nin sitozole geçmesiyle sonucunda prokaspazların aktivasyonuna, pH 6.2'de Bid'in kırılmasına, ve Bid'in kırılmasından bağımsız olarak Bax aktivasyonuna sebep olur (Beaujouin ve ark., 2008) (Şekil 1.7).



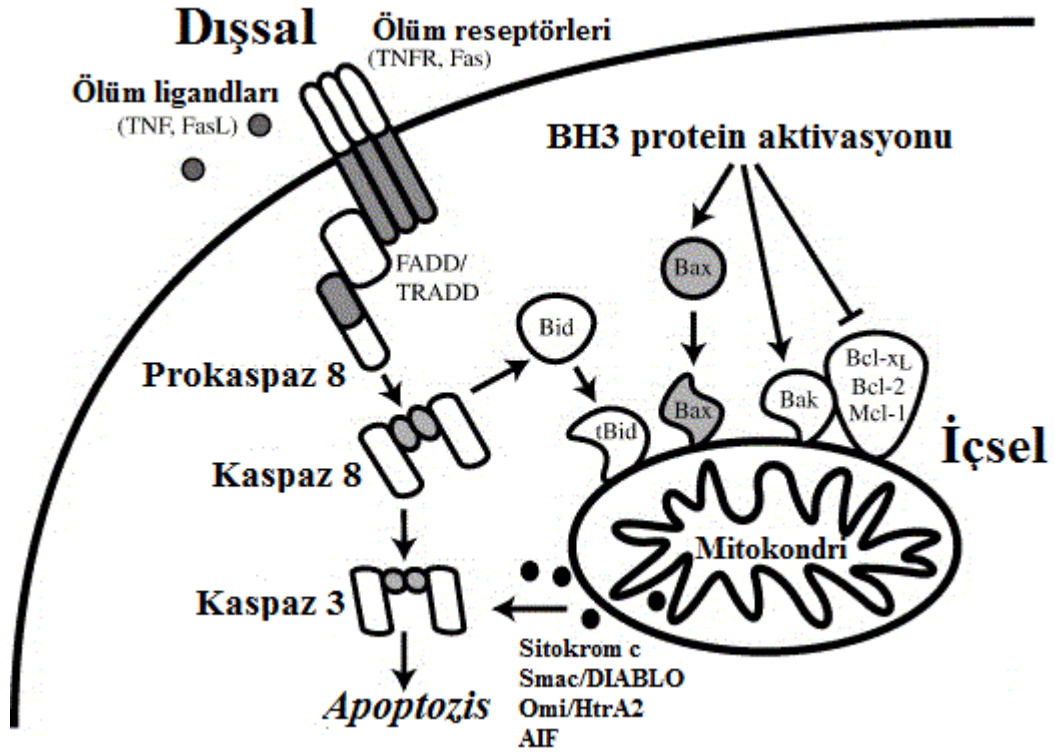
Şekil 1.7. Katepsin D'nin apoptozis sürecindeki rolü (Benes ve ark., 2008)

1.2.2. Apoptozisin Mekanizmaları

Bir uyarıyı takiben, apoptozisin ilk basamağını/karar fazını hücre ölümünün genetik kontrol noktaları oluşturur. Bunu ise, apoptozisin morfolojik değişikliklerinden sorumlu olan ikinci basamak/ilerleme fazı takip eder. Apoptozisin çok çeşitli fizyolojik ve patolojik uyarınları olup başlıca dört büyük gruba ayrılır. İyonize radyasyon ve alkilleyici antikanser ilaçları içeren ilk grup uyarınları DNA hasarına sebep olurlar. İkinci grup ise apoptozisi ya glukokortikoid ve tümör nekroz faktör (TNF) aracılı reseptör aktivasyonu ile ya da büyüme faktörleri (sinir büyüme faktörü ve interlökin-3) aracılı mekanizmalarla uyarır. Fosfatazlar ve kinaz inhibitörlerini içeren üçüncü grup apoptotik yolları biyokimyasal ajanlarla uyarır. Ultraviyole (UV) ışın ve okside edici ajanları (süperoksit anyonu, hidrojen peroksit) içeren dördüncü grup doğrudan hücre membran hasarına sebep olurlar. Süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijen türlerinin fazla miktarda üretimi, lipid membranları, proteinleri, nükleik asitleri ve ekstraselüler matriks glukozaminoglikanlarına zarar veren serbest radikallerinin oluşumuna sebep olur. Bu uyarınların yüksek dozları nekrozise yol açar. Hücre membranının asit sfingomiyelinazı aktive ederek hasarlanması apoptozisi uyarır ve sonuç olarak membran lipidlerinden ikincil mesajcı seramid oluşumu gözlenir.

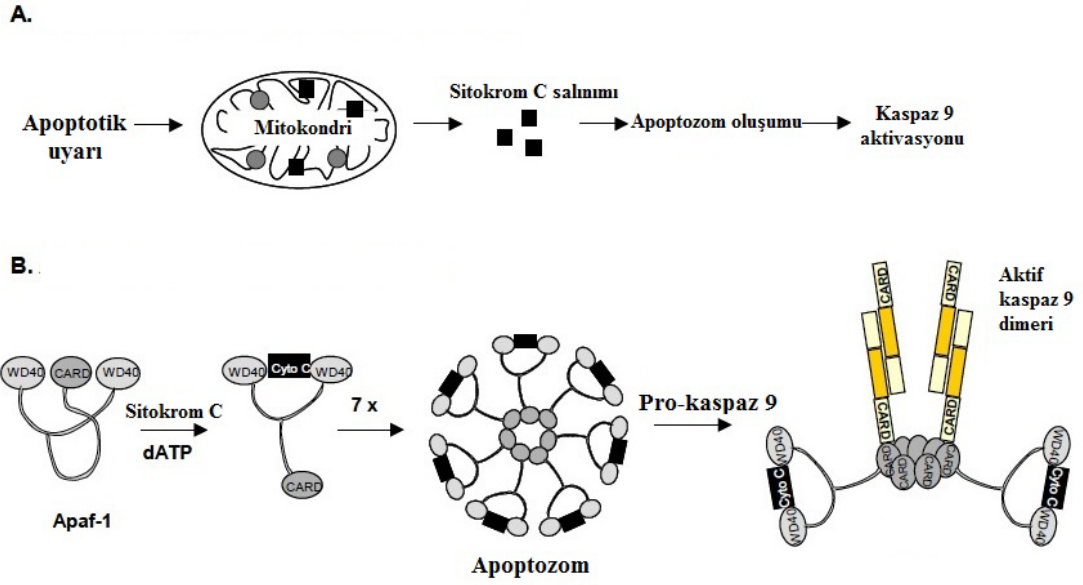
Apoptozisi başlatan sinyaller, hücre yüzey ölüm reseptörlerinin bağlanması ya da genom hasarından kaynaklanabilir (Kam ve ark., 2000).

Apoptozis başlıca iki yol aracılığıyla gerçekleşir. İlki dışsal (ekstrinsik)/sitoplazmik yol olup, hücre yüzey ölüm reseptörlerinin ligandlarıyla bağlanması sonucu aktifleşir. Ölüm reseptörleri TNFR (tümör nekroz faktör reseptörü) süperailesine aittir. Bu aile üyeleri, tip I transmembran proteinleri olup sistince zengin ekstraselüler domainleri ile ligand bağlama özellikleriyle karakterizedir. Ölüm reseptörleri, apoptotik sinyalin transdüksiyonu için gerekli olan 80 amino asit uzunluğunda intraselüler ölüm domaini (DD) içerir. Sıklıkla çalışılan ölüm reseptörleri Fas (CD95/Apo-1),TNFR1, TRAIL-R1 (DR4) ve TRAIL-R2 (DR5/Killer/TRICK2)'dir. Ölüm reseptörlerine bağlanan ligandlar (FasL, TNF α , VE TRAIL) yapısal olarak reseptörler ile ilişkili proteinler olup TNF süperailesine aittirler. Bu ölüm ligandları tip II transmembran proteinleri gibi eksprese edilirler. Bazı durumlarda, bu proteinler proteolitik kırılabilir ve serbest kalabilirler (Ghobrial ve ark., 2005; Guicciardi ve ark., 2009).TRAIL-R1 veya TRAILR2'yeTRAIL ya da agonistik monoklonal antikorların bağlanması, hücre membranında bulunan reseptörün oligomerizasyonu ve apoptozisin başlaması ile sonuçlanır. FasL ve TRAIL tarafından başlatılan hücre içi sinyal kaskadı benzer yolları içerir. Reseptörlerin aktivasyonu, DISC (ölüm indükleyici sinyal kompleksi) denilen ve proteinlerden meydana gelen bir kompleks oluşumuna sebep olur. DISC, reseptörün ölüm alanı ve prokaspaz 8'e kendi ölüm alanı ile bağlanabilen adaptör protein FADD'yi (Fas ilişkili ölüm alanı) içerir. DISC yapısında yer alan prokaspaz 8, otosüreçlerle aktifleşir yani lokal konsantrasyonları otokatalitik aktivasyonlarına ve aktif kaspaz-8 salınımına yol açmaktadır. İnsanlarda kaspaz 10 da, DISC yapısına katılabilir ve apoptozisi teşvik edebilir (Bodmer ve ark., 2000;Kischkel ve ark., 2001; Dickens ve ark., 2012).Sonrasında aktif kaspaz 8 doğrudan kaspaz 3'ü veya diğer ilerletici kaspazları kırar. Kaspaz 8 ayrıca BH3 proteinlerinden Bid'i de kırabilir. Kırılmış Bid (tBid) sonrasında mitokondriye geçer ve kaspaz 9 ve kaspaz 3 aktivasyonuna neden olacak sitokrom c salınımını uyarır (Şekil 1.8).



Şekil 1.8. Reseptör aracılı kaspaz aktivasyonu (Taylor ve ark., 2006)

İkincisi içsel (intrinsik)/mitokondriyal yol olup, uyarıldığında mitokondriden sitokrom-c salınımına ve böylece ölüm sinyaline sebep olur. İki yol da, düzenleyici ve yapısal molekülleri kıran ve bunun sonucunda hücrenin ölümüne sebep olan kaspaz denilen proteaz kaskadının aktivasyonunu içeren ortak bir yolda birleşir (Ghobrial ve ark., 2005). Mitokondriyal yolun kilit olayı mitokondri dışı membran permeabilizasyonudur (MOMP). Permeabilizasyon sonucunda; sitokrom c, mitokondri türevli kaspaz aktivatörü/IAP bağlayıcı protein Smac/DIABLO, HtrA2/Omi, apoptozis indükleyici faktör (AIF) ve endonükleaz D (EndoG) gibi mitokondri membran proteinleri sitozole salınır. Mitokondri iç membran yüzeyinden sitokrom c'nin sitozole salınması ile sitokrom c, sitoplazmik protein olan Apaf-1 (apoptotik proteaz aktive edici faktör-1)'e bağlanır ve onu aktive eder, dATP/ATP'nin de ortamda bulunması ile Apaf-1/sitokrom c kompleksi heptamerik bir yapıya oligomerize olur. Bu yapının oluşması, prokaspaz 9'un Apaf-1 ile etkileşimini mümkün kılar ve apoptozom kompleksi oluşur (Şekil 1.9).



Şekil 1.9.Kaspaz aktivasyonunun mitokondriyal yolu B.Apoptozom oluşumu ve aktivasyonu(Gewies, 2004)

Apoptozomun görevi, başlatıcı kaspaz olan kaspaz 9'u aktive etmektir. Aktif kaspaz 9, kaspaz-3'ü veya diğer ilerletici kaspazları aktive ederek kaspaz kaskadına aracılık eder. Ayrıca kaspaz aktivitesini inhibe eden ve aktiviteleri Smac veya Omi/HtrA2 gibi fonksiyonel analoglar ile engellenmiş birçok IAPs (apoptozis inhibitörleri) vardır. Ölen hücrelerde Smac ve Omi/HtrA2 (mitokondriyel proteinler, pro-apoptotik proteinler) mitokondriden salındığında IAPs inaktifte olmakta ve böylece ilerletici kaspazların inhibisyonu engellenerek hücrelerin apoptoze gitmeleri sağlanır (Ulukaya, 2003; Riedl ve ark., 2007; Li ve ark., 2008; Duprez ve ark., 2009).

Bu içsel ve dışsal yol mekanizmaları kaspaz-bağımlı apoptozisi göstermektedir. Ayrıca kaspazlardan bağımsız olarak apoptoze neden olduğu düşünülen kaspaz aktivasyonunun gerçekleşmediği mekanizmada bulunmaktadır. Bu mekanizmada AIF (apoptoz indükleyici faktör) mitokondriden salınıp nükleusa geçmekte ve nükleazları aktifleştirerek DNA hasarına yol açmaktadır. AIF, steroidler, granzyme B ve endonukleaz G kaspazlardan bağımsız olarak apoptoze neden olmaktadır (Ulukaya, 2003).

1.2.2.1.Mitokondri Dış Membran Permeabilizasyonu (MOMP)

Mitokondri, enerji üretiminde rol alan hücresel organellerden biri olup hücresel yaşam için önemi büyüktür. Bunun yanında, hücre ölümünde de önemli roller üstlenmektedir. Apoptozis sürecinde gerçekleşen mitokondri dış membran permeabilizasyonu (MOMP), “geri dönülmez” bir noktayı ifade eder ve takiben, normal (homeostaz) koşullarda mitokondriyal iç (IMM) ve dış (OMM) membranları arasında yer alan birçok proteinin sitozole bırakılması gerçekleşir. MOMP, sıklıkla mitokondri membran potansiyelinin ($\Delta\Psi_m$) bozulmasıyla ilişkilidir. $\Delta\Psi_m$ kaybı uyarana göre, MOMP sırasında ya da sonrasında gerçekleşir. Apoptotik koşullar altında en önemli MOMP mekanizması Bcl-2 aile üyelerini içerir. Apoptozis sırasında aktif Bax ve/veya Bak mitokondri dış membranında (OMM) porlar oluşturur ve membranlar arası proteinlerin sitozole salınımına sebep olurlar. MOMP indüksiyonuna mitokondri iç membranı (IMM) da katkı sağlayabilir. İç membran, permeabilizasyon geçiş poru (PTP) aracılığıyla MOMP'ye sebep olur. PTP, dış membranda yer alan voltaj bağımlı anyon kanal (VDAC) proteinleri, iç membranda yer alan adenin nükleotit translokator (ANT) ve matrikste bulunan siklofilin D (cypD) gibi çeşitli proteinlerin yer aldığı bir komplekstir. Bu porun açılması, iyonların mitokondri matriksine geçişini sağlamakta ve $\Delta\Psi_m$ kaybı ile birlikte matriksin şişmesine yol açmaktadır (Green ve ark., 2004; Chipuk ve ark., 2006).

1.2.2.1.1.MOMP Düzenlenmesinde Bcl-2 Aile Proteinlerinin Rolü

1.2.2.1.1.1.Bcl-2 Aile Üyeleri

Bcl-2 ailesi, işlevlerine ve içerdikleri Bcl-2 homoloji alanlarının (BH) sayısına göre üç gruba ayrılır. Anti apoptotik üyeler (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1, A1 ve Bcl-B) mitokondri dış membranıyla ilişkilidirler ve hücreleri çeşitli apoptotik uyarılara karşı korurlar. Yapılarında dört çeşit BH alanı (BH1-BH4) bulunur. Pro apoptotik üyeler iki gruba ayrılır. Bunlar Bax-benzeri çoklu alan (BH1-BH3) apoptotik proteinleri (Bax, Bak, Bok) ve BH3 proteinleridir (Bik, Bid, Bad, Puma, Noxa, Bim, Hrk, Bmf). Bcl-2 aile proteinleri, homo- ve heterodimerler oluştururlar ve pro ve anti-apoptotik üyeler arasındaki etkileşimler birbirlerinin aktivitelerini dengeler ve bu pro-apoptotik ve anti-apoptotik Bcl-2 aile üyelerinin dengesi, hücrelerin yaşamı ve ölümünü belirlemede oldukça önemlidir (Adams ve ark., 2001; Bouillet ve ark., 2002; van Delft ve ark., 2006).

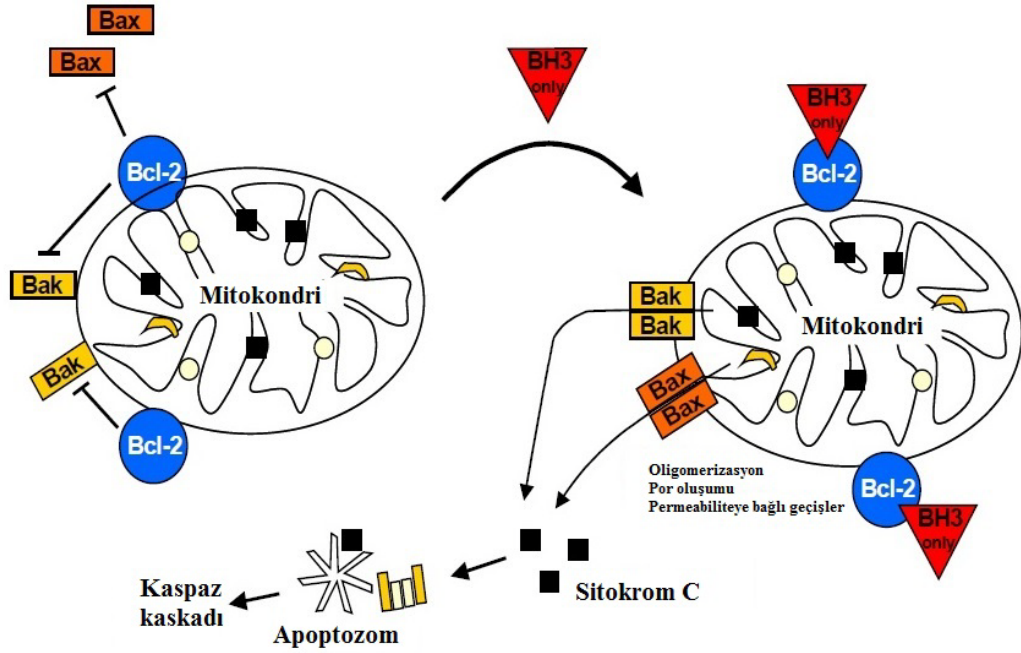
1.2.2.1.1.2.BH3 Proteinlerinin Aktivasyonu

BH3 proteinlerinin aktivitesi, transkripsiyonel ya da post-translasyonel seviyede çeşitli mekanizmalarla düzenlenir. En azından dört BH3 proteini, apoptotik uyarılara yanıt olarak transkripsiyonel olarak uyarılır. Bu proteinler; Hrk, Puma, Noxa ve Bim'i içerir. Bad, Bim ve Bik fosforilasyon ile düzenlenir. Bad ve Bim'in pro apoptotik potansiyeli fosforilasyonlar azalır. Bunun tersine, Bik'in fosforilasyonu pro apoptotik aktivitesini arttırmaktadır. Bid proteolitik kırılarak aktifleştirilir ve kırılmış Bid'in (tBid) mitokondriye geçişi, kırılma sonrası modifikasyona uygun hale gelmiş bölgenin N-miristilasyonu ile gerçekleşir. Aktifleşmiş BH3 proteinleri anti apoptotik Bcl-2 üyelerin pro apoptotik üyelerini baskılamasını ortadan kaldırır

(Zha ve ark., 1996; Inohara ve ark., 1997; Li ve ark., 1998; Luo ve ark., 1998; Imaizumi ve ark., 1999; Zha ve ark., 2000; Oda ve ark., 2000; Dijkers ve ark., 2000; Han ve ark., 2001; Nakano ve ark., 2001; Yu ve ark., 2001; Harris ve ark., 2001; Putcha ve ark., 2001; Shinjyo ve ark., 2001; Whitfield ve ark., 2001; Verma ve ark., 2001; Leung ve ark., 2008; Rambal ve ark., 2009).

1.2.2.1.1.3.Bax ve Bak Aktivasyonu

Apoptotik uyarı akabinde temel olarak Bax ve Bak eksprese edilir ve MOMP uyarılır. Dolayısıyla Bax ve Bak normal hücrelerde inaktif durumdadır. Bax proteinleri, sitozolde monomerler şeklinde bulunurlar ve aktif olmadıkları sürece mitokondri dışı membran ile ilişkileri minimal düzeydedir. Bax, aktivasyon sürecinde mitokondriyal dışı membranına transloke olur. Sonucunda, sitokrom c gibi pro apoptotik faktörler mitokondri iç membranından sitozole salınır ve apoptozom oluşumunu takiben kaspaz kaskadının aktivasyonu gerçekleşir (Şekil 1.10). Bak, aktif olmadığı durumlarda bile mitokondriyal dışı membranda konumlanabilir. Belli bazı BH3 proteinlerin aktivasyonu, Bax ve Bak'ın oligomerize olmaları ve sonrasında mitokondri dışı membranına stabil şekilde konumlanmaları için gereklidir (Hsu ve ark., 1997; Wolter ve ark., 1997; Wei ve ark., 2000; Letai ve ark., 2002; Kuwana ve ark., 2003; Billen ve ark., 2008).



Şekil 1.10. Apoptozis'in Bcl-2 ailesi tarafından düzenlenmesi (Anonim, 2006)

BH3 proteinlerinin Bax ve Bak'ı aktifleştirdiklerine dair iki model bulunmaktadır. Doğrudan aktivasyon modeline göre, BH3 proteinleri (Bim, tBid ve PUMA) aktivatör rolü üstlenerek doğrudan Bax ve Bak'a bağlanıp aktivasyonlarını sağlarlar. Bu modele göre, BH3 proteinlerinin geri kalanı hassaslaştırıcı olarak işlev görürler ve Bim, tBid ve PUMA'yı serbestleştirmek üzere anti apoptotik Bcl-2 aile üyelerine bağlanırlar (Letai ve ark., 2002; Marani ve ark., 2002; Cartron ve ark., 2004; Kim ve ark., 2006; Oh ve ark., 2006; Walensky ve ark., 2006). Dolaylı aktivasyon modeline göre, tüm BH3 proteinleri Bax ve Bak yerine anti apoptotik Bcl-2 aile üyelerine bağlanırlar ve sonuç olarak yine Bax ve Bak aktivasyonu sağlanır. Bu modelde, tüm anti-apoptotik Bcl-2 aile proteinlerine bağlanabildiklerinden ötürü, Bim, tBid ve PUMA apoptozisin uyarılmasında potansiyelleri yüksek olan proteinlerdir. Bax ve Bak aktivasyonunda yer alan adımlardan ilki, bu proteinlerin N-terminal uçlarını açığa çıkaran konformasyonel değişikliktir. Sonrasında ise, porların şekillenmesi ve MOMP süreçlerinde aktif şekilde rol alacak Bax ve Bak homo-oligomerlerin oluşumudur (Chen ve ark., 2005; Kuwana ve ark., 2005; Willis ve ark., 2005; Certo ve ark., 2006; Willis ve ark., 2007).

1.2.3.Apoptozisin Genetik Kontrolü

Apoptozisin kontrolünde çok sayıda gen, protein rol oynar ve apoptotik yollarda üstlendikleri aktivitelere ve spesifik hastalıklarla olan ilişkileri baz alınarak sınıflandırılabilirler. Çeşitli uyarılar bir takım ölüm yollarının düzenleyicilerini aktifleştirerek bir kaskad başlatırlar. Apoptozis, “geri dönülmez” noktaya hedef proteinleri enzimatik olarak kıran kaspazların aktifleşmesiyle gelir. Bcl-2 ailesi, kaspaz aktivasyonunu ya negatif ya da pozitif (örneğin Bax) yönde düzenler. Diğer bazı apoptozis düzenleyicileri biraz daha ileri aşamalarda rol alır ve bir takım kaskadları aktifleştirirler. Bu düzenleyiciler, apoptozisi aktive eden ve tümörjenez ya da kanser terapilerinde önem teşkil eden c-myc gibi onkogenler veya p53 gibi tümör baskılayıcı genlerdir.

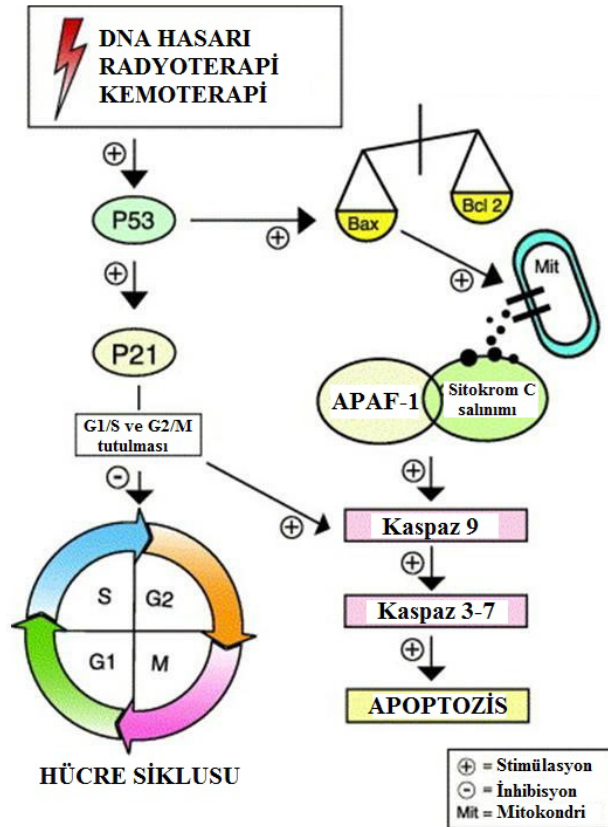
c-Myc

Bir transkripsiyon faktörü olan c-Myc, pek çok insan tümöründe anormal şekilde düzenlenmekte ve apoptozisin kontrolünde önem taşımaktadır. İnsan c-Myc proteini 439 amino asitten meydana gelir. Nükleusta yer alır ve kısa bir ömrü vardır. c-Myc; metabolizma, protein biyosentezi, hücre siklus düzenlenmesi, apoptozis (Bcl-2’yi aşağı yönde düzenleyerek), hücre adezyonu ve sitoskelet yapılımasını sağlayan belirli gen sınıflarıyla düzenli olarak etkileşim halindedir. Proto-onkogen olan c-myc’nin hatalı düzenlenmesi, hücre proliferasyonunu (siklinleri yukarı ve p21’i aşağı yönde düzenleyerek) ve neoplastik transformasyonu teşvik eder. Bu hatalı düzenlenme ayrıca besin ve büyüme faktörü eksikliğinde apoptotik genleri aktifleştirir. Myc, Wnt, Shh, ve EGF gibi çeşitli mitojenik sinyallerle aktifleştirilir. Bu hedef genlerin ekspresyonlarını düzenleyerek, Myc aktivasyonu birtakım biyolojik etkilerle sonuçlanır.

p53

Nükleer fosfoprotein insan p53 geni, 17. kromozomun kısa kolunda (17p 13,1) yer alır ve iki ana sürece önemli katkısı bulunmaktadır. Bunlar hücre siklusunun ilerleyişi ve apoptozisidir. P53, viral veya hücrel onkogenlerin sebep olduğu transformasyonu baskıladığından, bir tümör baskılayıcı gen olarak sınıflandırılmaktadır. Birçok insan kanserlerinin mutant p53 baskılayıcı genine sahip olduğu bulunmuştur. p53 mutasyon veya delesyonları insan kanserlerinde sıklıkla rastlanır ve yaklaşık %50’sinden

fazlasıyla ilişkilidir. Bunlar mesane, meme, kolon, akciğer, karaciğer, prostat ve cilt kanserleridir. Herhangi bir uyararla meydana gelen DNA hasarında, p53 aktifleşerek bir dizi mekanizmayı başlatır. Bu mekanizmalar ile hasarlı hücre G1 fazında durur ve S fazına giremez Bu nedenle DNA hasarı olan hücrede ya onarım sağlanır ya da hücre apoptozise yönlendirilir. DNA hasarı sonrasında p53 proteininin transkripsiyonu ve dolayısıyla translasyonu artar. Oluşan p53 proteini, bir CDKI (siklin bağımlı kinaz inhibitörü) olan p21 proteininin sentezini uyararak hücre döngüsünü p21 proteini aracılığıyla G1 evresinde durdurur (Şekil 1.11). p21 proteini bu fonksiyonunu siklin-siklin bağımlı kinaz komplekslerine bağlanarak gerçekleştirir. p21 proteini CDK-C (siklin-siklin bağımlı kinaz) kompleksine bağlandığında CDK-C kompleksi, Rb (Retinoblastoma) proteinini fosforile edemez. Bunun sonucunda Rb-E2F kompleksinden E2F transkripsiyon faktörü ayrılamaz ve DNA sentezi için gerekli olan enzimlerin ve bazı proteinlerin ekspresyonu gerçekleşmez. Böylece hücre döngüsü S fazına geçmeden durdurulur (El-Deiry ve ark., 1993; Cachot ve ark., 1998).

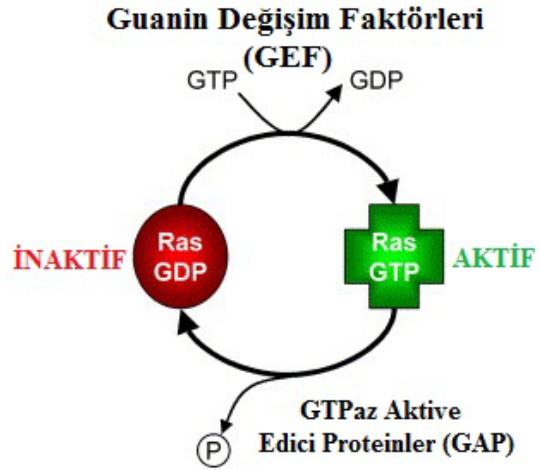


Şekil 1.11.p53 proteininin hücre siklusu ve apoptozis sürecindeki rolü (Gillham ve ark., 2007)

Eğer DNA hasarı, hücrenin tamir mekanizmasının onarabileceği kapasitenin üzerinde gerçekleşmesi sonucu onkogenik sürecin engellenmesi için apoptozis gerçekleşir. Hem hücre yüzeyinde yer alan TNFR aile üyesi olan Fas(CD95) reseptörlerinin uyarılmasıyla hem de mitokondriden sitokrom c salınımıyla gerçekleşen apoptotik süreçlerin her ikisinde de p53 proteinin önemli rol üstlenmektedir (Zornig ve ark., 2001; Dumont ve ark., 2003).

Ras

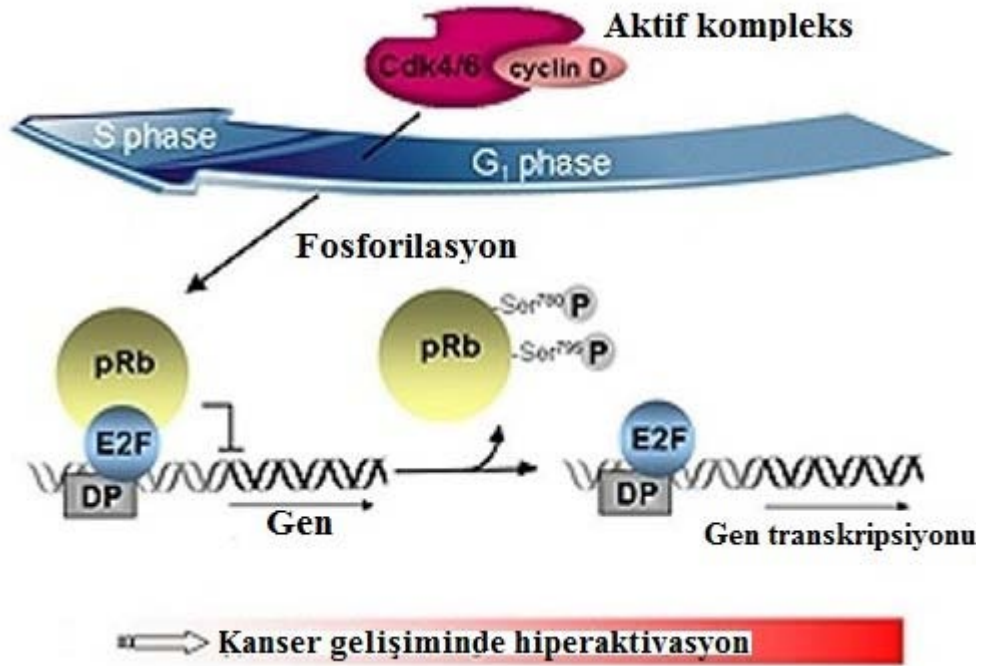
Memelilerde ras onkogen gen ailesi p21s olarak adlandırılan molekül ağırlığı 21 kDa olan proteinleri kodlayan üç üyeden (H-, K- ve N-ras) oluşmaktadır. p21s, membranla ilişkili proteinler olup GTP (guanin trifosfat) bağlamakta ve hidrolize etmektedirler yani GTP bağlayıcı proteinlerdir. Ras ailesi proteinleri GTP bağlı veya GDP bağlı formları ile, iki konformasyon arasında geçişlerle hücre içerisindeki çeşitli proteinleri etkiler ve onların da konformasyonlarının değişmesine ve fosforillenmelerine yol açarak hücre içi sinyal iletimini tetiklerler. Ras'ın bağlanan GTP'yi hidrolizinden sonra, proteine bağlı kalan GDP'nin uzaklaştırılması için Guanin Değişim Faktörlerine (GEF; Guanine Exchange Factor) ihtiyaç vardır. GEF proteinleri Ras-GDP ile etkileşir ve GDP'nin proteinden uzaklaşarak, Ras'ın hücre içi derişimi daha fazla olan GTP'yi bağlayabilmesine olanak tanır. Bağlanan GTP Ras'ın içsel GTPaz aktivitesi ile ve bunun yanı sıra, Ras'a bağlanan GTPaz Aktive edici Proteinler'in (GAP) etkisi ile hidrolize uğrar (Şekil 1.12). Ras'ın GTP bağlı konformasyonu, bu proteinin bağlandığı sinyal iletiminin daha alt basamağında bulunan moleküllerin (efektörlerin) de konformasyonel değişiklik geçirmelerine ve fosforillenerek sinyal iletimine katılmalarına yol açar. GTPaz bozuk olması molekülün GTP formunun devamlı olarak aktif kalmasına yol açtığından nükleus proteinleri ve DNA transkripsiyonu devamlı olarak aktive edilir (Quincoces ve ark., 1997; Lowitz ve ark., 2000; Martinez ve ark., 2003; Telkoparan ve ark.,2011).



Şekil 1.12.Ras ailesi G-proteinlerin işlevsel döngüleri (Telkoparan ve ark., 2011)

Rb

Rb, insanın 13. kromozomu üzerinde bulunan tümör baskılayıcı genidir. Rb proteini, Rb gen ürünü olup hücre siklusunu düzenlemede önemli role sahip nükleer bir fosfoproteindir. Rb proteini, S fazında hücresel replikasyonda yer alan nükleer transkripsiyon faktörü olan E2F proteini ile etkileşime girmektedir. Bu etkileşim E2F'nin transkripsiyon faktörü olarak işlev görmesini önlemektedir. Rb proteininin fosforile formu inaktif, defosforile formu ise aktiftir. Fosforlanmamış Rb, E2F tarafından kontrol edilen genlerin transkripsiyonunu baskılamak üzere, E2F'ye bağlanır. Rb'nin G1'in sonunda Cdk4, 6 ve siklin D kompleksleri tarafından fosforillenmesi E2F'den ayrılmasına neden olur. Hücre döngüsünün ilerlemesi için gerekli proteinleri kodlayan hedef genlerin ekspresyonunu uyarır (Şekil 1.13). Rb mutantlar (yapısal fosforile olmuş ve E2F bağlanmamış), S fazı restriksiyon bölgesinde kontrolsüz hücre bölünmesine neden olmaktadır dolayısıyla hücreler tümörojenik olabilmektedir. (Kopnin, 2000; Hanahan ve ark., 2000).

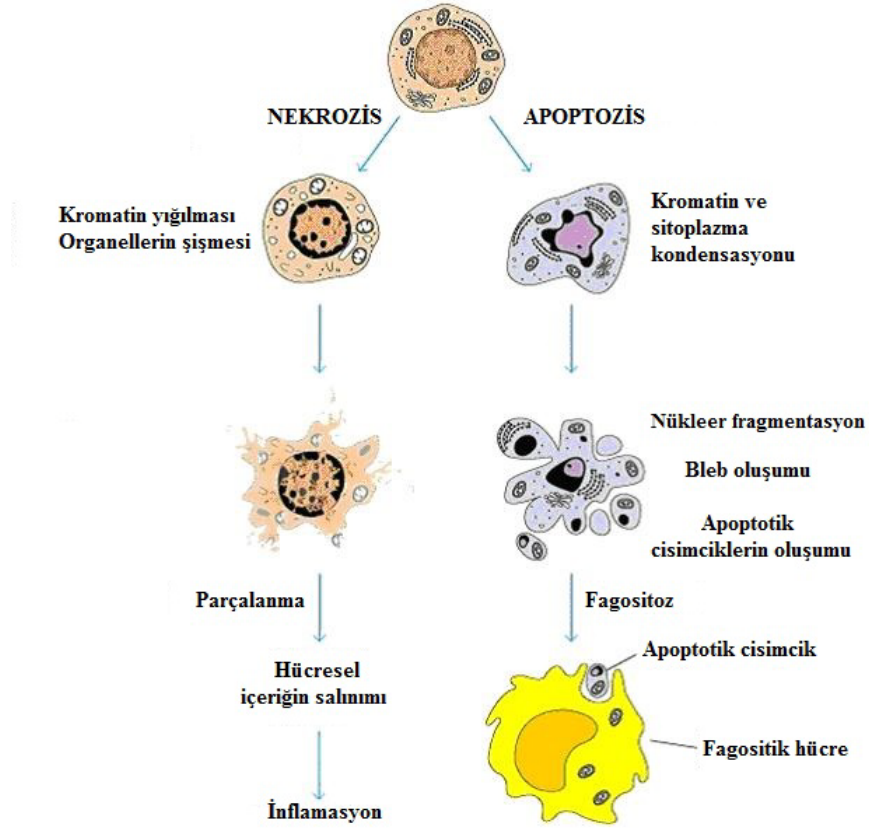


Şekil 1.13. Hücre siklusunun Rb, Cdk4,6 ve siklin D kompleksleri tarafından kontrolü (Anonim, 2009)

1.2.4. Apoptotik Hücrede Görülen Morfolojik Değişiklikler

Apoptotik hücreler tipik morfolojik değişikliklerle tanımlanabilir: hücre büzülür, deformasyona uğrar ve komşu hücrelerle olan temasını kaybeder. Kromatini kondanse olur ve nükleer membranın altında konumlanır, plazma membranı blebilenir ve hücre son olarak, sitozol, kondanse kromatin ve organelleri içeren membranla çevrili yapılara yani “apoptotik cisimcikler”e parçalanır. Apoptotik cisimcikler, çoğunlukla makrofajlar bazen de komşu hücreler tarafından fagosite edilir ve dokudan herhangi bir inflamatuvar yanıt oluşmadan uzaklaştırılırlar. Bu morfolojik değişiklikler, apoptotik bir hücrede meydana gelen karakteristik moleküler ve biyokimyasal olayların neticesidir. Sitoplazma ve organellerin şekil ve bütünlüğünü belirleyen belli bazı protein substratların ve DNA'nın oligonükleozomal parçalanmasını sağlayan proteolitik enzimlerin aktivasyonu, bu olaylardan öne çıkanlardır (Saraste ve ark., 2000; Ulukaya, 2003; Elmore, 2007; Hotchkiss, 2009). Nekrotik hücre ölümü, apoptozisin tersine, membran bütünlüğünün kaybı, şişme, ve hücrelerin parçalanması ile sonuçlanan bir süreçtir (Şekil 1.14). Nekrozis, enerji üretim yetmezliği, iyon kanallarındaki bozukluklar veya pH dengesindeki aşırı değişimler gibi birtakım fizyolojik koşulların aşırı bozulması sonucunda hücresel içerik kontrolsüz bir şekilde hücre çevresine dağılır

ve bunun sonucu olarak komşu hücrelerin zarar görmesinden dolayı dokuda güçlü bir inflamatuvar yanıt oluşur (Leist ve ark., 2001). Apoptozisde erken hücre-hücre temas kaybı, nekrozisde ise geç hücre-hücre temas kaybı gözlenmektedir. Apoptozis için ATP gerekliyken (aktif süreç) nekrozisde ATP gerekmez çünkü pasif bir süreçtir (Ulukaya, 2003).



Şekil 1.14. Apoptozis ve nekrozisin şematik karşılaştırılması (Anonim, 2007)

Apoptotik cisimcikler in vivo hızlı bir şekilde fagositoz ile ya özelleşmiş fagositik hücreler ya da apoptotik cisimciklerin çevresindeki komşu hücreler tarafından ortadan kaldırılırlar. Apoptotik hücrelerin fagosite edilmelerinde fosfatidilserin (PS) reseptörü rol almaktadır (Messmer ve ark., 2000). PS, plazma membranının iç yüzeyinde ATP bağımlı flippaz aktivitesiyle devamlılığını sağlar. Bu flippaz kaspazlar tarafından inaktifleştirilir ve PS plazma membranının dış yüzeyine transloke olur (Daleke ve ark., 2000). Memeli apoptotik cisimciklerinin fagositoz süreçlerinde bir dizi hücre yüzey molekülleri (trombospondin 1 ve reseptörü CD36) ve hücre içi moleküller (180 kDa

protein DOCK180) tanımlanmıştır (Savill ve ark., 2000; Hengartner ve ark., 2001; Henson ve ark., 2001; Somersan ve ark., 2001).

1.2.5. Apoptozisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler

1972 yılında, apoptozis terimi ilk kez kullanıldığında hücrenin morfolojik görünümüne göre karar veriliyordu. İlk kez morfolojik kriterlere görebirlenen apoptozis, 80'li yılların sonuna doğru DNA kırıklarının oluştuğunun ortaya çıkarılmasıyla birlikte bu kırıkların saptanmasına yönelik yöntemlerle belirlenmeye başlandı. 90'ların ortalarında ise apoptotik hücrelerde kaspazların aktifleştığının bulunmasıyla apoptozis, kaspaz aktivasyonlarının belirlenmesine yönelik metodlarlatayin edilebilmiştir. 90'ların sonuna doğru ise fosfatidilserin translokasyonunu belirleyen yöntemler apoptozis tayininde kullanılmaya başlandı. Apoptozisin belirlenmesine yönelik geliştirilen tüm bu metodları, 2000'li yılların başlarında geliştirilen, sadece apoptotik epitelyal hücrelerde kaspaz aktivitesiyle kırılan bir protein olan keratin 18'in kırıldıktan sonraki özgün formunu saptayan antikorların kullanımı ile daha spesifik olarak saptanması takip etti (Şekil 1.15). Apoptozisin belirlenmesinde kullanılan yöntemler şöyledir;

1. Morfolojik görüntüleme yöntemleri
2. İmmunohistokimyasal yöntemler
3. Biyokimyasal yöntemler
4. İmmünolojik yöntemler
5. Moleküler biyoloji yöntemleri (Ulukaya, 2003; Akşit ve ark., 2008; Güleş ve ark., 2008).

	<i>Işık mikroskobu kullanımı</i>	<i>Floresan mikroskobu /Lazerli konfokal mikroskop</i>	<i>Elektron mikroskobu:</i>	<i>Faz kontrast mikroskobu:</i>
Morfolojik görüntüleme yöntemleri	<p>a. Hematoksilen boyama Hematoksilen boyası kromatini boyadığından apoptotik hücreler nükleus morfolojisine göre değerlendirilir.</p> <p>b. Giemsa boyama Hematoksilenle boyamada olduğu gibi nükleus morfolojisi esas alınarak apoptotik hücreler tanınır. Sitoplazma sınırları hematoksilen boyamaya göre daha iyi seçilir.</p>	<p>a. Hoechst boyası Membranı intakt olan (canlı) veya membran bütünlüğü bozulmuş (ölü) tüm hücreleri boyar.</p> <p>b. Propidium iyodür Sadece membran bütünlüğü bozulmuş (ölü) hücreleri boyar. -Ölü hücrelerin apoptozisle veya nekrozisle ölüp ölmediklerinin ayrımı hematoksilen boyamada olduğu gibi nükleus morfolojisine bakılarak yapılır.</p>	Morfolojik değişikliklerin en doğru şekilde gözlenebildiği yöntemdir. Üstelik subseleler detaylar da incelenebilir (örn. mitokondrinin durumu, hücre zarı ya da nükleus membranının bütünlüğünün bozulup bozulmadığı gibi).	Hücrelerin kültür ortamında, "flask" veya "plate"lerde büyütüldüğü çalışmalarda, hücreyi veya hücre topluluğunu incelemek amacıyla kullanılır.
İmmünohistokimyasal yöntemler	<p>Anneksin V Yöntemi: Hücre apoptozise giderse normalde hücre zarının iç yüzeyinde yerleşmiş olan fosfatidilserin (PS) molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar. Dış yüze transloke olan PS'ler, floresan bir madde (örn. FITC) ile işaretlenmiş Anneksin V kullanılarak görünür hale getirilir.</p>	<p>TUNEL Yöntemi: DNA kırıklarının <i>in situ</i> olarak tanınmasını sağlar. Parafin bloklar, donmuş kesitler, kültürü yapılmış solüsyon halindeki veya "plate"lere ekilmiş, ya da lameller üzerinde büyütülmüş hücrelerde apoptozisin varlığı bu metotla saptanabilir.</p>	<p>M30 Yöntemi: M30 yönteminde apoptotik hücreler sitokeratin 18'in kaspazların etkisiyle kırılması sonucu ortaya çıkan yeni antijenik bölgenin immunohistokimyasal yöntemle boyanması prensibine göre belirlenir.</p>	<p>Kaspaz-3 Yöntemi: Kaspaz-3 yöntemi ile sadece apoptotik hücrelerde oluşan aktif kaspaz-3 belirlenebilir.</p>
Biyokimyasal yöntemler	<p>Agaroz Jel Elektroforezi: -DNA fragmentasyonu Apoptoziste DNA, 180 baz çifti ve bunun katlarına karşılık gelen noktalarından kırıldığı için merdiven görüntüsü "ladder pattern" oluşur. Bu bulgu apoptozisin karakteristik özelliğidir ve nekroziste görülmez.</p>	<p>"Western" Blotting: -Substrat kırılmaları -Aktif kaspazın belirlenmesi -Sitokrom c salınması</p>	<p>"Flow" Sitometri: "Flow" sitometri yardımıyla floresan bir madde ile işaretlenmiş antikor kullanılarak apoptoziste eksprese olduğu bilinen herhangi bir hücre yüzey proteininin saptanması mümkündür.</p>	
İmmunolojik yöntemler	<p>ELISA: -DNA fragmentasyonu -M30 düzeyi</p>	<p>Fluorimetrik Yöntem: -Kaspaz aktivasyonu (Hücre kültürü)</p>		
Moleküler biyoloji yöntemleri	<p>"DNA Microarrays": - Gen ekspresyon dereceleri (mRNA) - Hücre ölüm reseptörleri - Kaspazlar</p>			

Şekil 1.15. Apoptozisin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerin şematik özeti

1.3.4-HPR ve I3C

Fenretinide(4-HPR) bir A vitamini (retinoid) türevidir. Vücutta doğal olarak oluşan retinoidlerden etki mekanizması açısından farklılıklar göstermesi yanında daha az toksik özelliğe sahip olmasıyla ilgi çekmiştir. 4-HPR'nin 1990'lı yılların başından beri antitümöral etkili bir ajan olduğu hem in vitro hem de in vivo birçok çalışmayla vurgulanmıştır (Ulukaya ve ark., 1999; Kocdor ve ark., 2009). Antitümöral etkisinden ayrı olarak, 4-HPR'nin kanser hücrelerinde sitotoksik etki gösterirken normal hücrelere böyle bir etkisinin olmadığı rapor edilmiştir (Ulukaya ve ark., 2001). Daha sonraki yıllarda, epidermoid karsinoma (A431), metastatik nöroblastoma ve lösemi hücrelerinde, 4-HPR'nin proliferasyonu baskıladığı ve apoptozisi uyardığı gösterilmiştir(Ulukaya ve ark., 2003; Raguenez ve ark. 2009;Wang ve ark., 2009).4-HPR'nin over kanserine karşı koruyucu etkisi olduğu düşünülmektedir. Yapılan bir randomize, prospektif, placebo kontrollü çalışmada 6 ayboyunca unilateral meme kanserli hastalara oral fenretinide veya placebo uygulanmıştır.Çalışma grubunda over kanseri gelismemiş, kontrol grubunda ise 6 vakada over kanserioluşmuştur (De Palo ve ark., 1995).

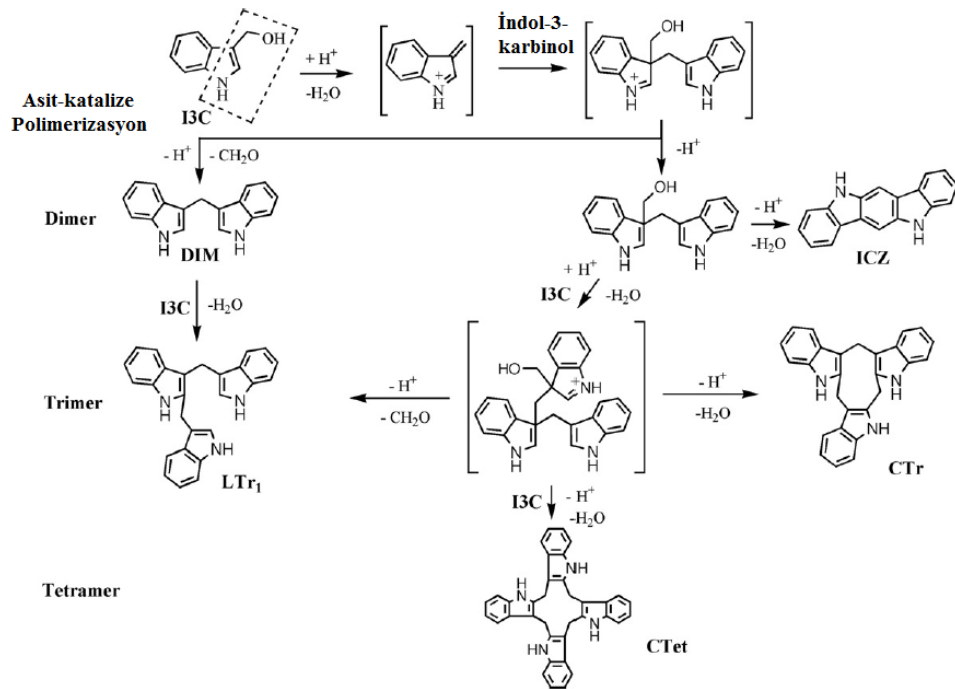
4-HPR'nin meme gibi yağ dokusunda lokalize olduğunun gösterilmesinden sonra, özellikle meme kanserinin önlenmesinde ümit verici bir özelliğe sahip olduğunu gösteren birçok çalışma rapor edilmiştir (Costa ve ark., 1993; Costa ve ark., 1995; Mokbel, 2003). Hatta, sekonder meme kanserini önleyici etkisi geniş bir randomize faz III çalışması ile test edilmiş ve etkili olduğu bulunmuştur (Veronesi ve ark., 2006; Decensi ve ark., 2007). 4-HPR'nin etkisi ayrıca gama radyasyonla, çeşitli kemoterapötik ajanlarla (örn. Sisplatin, Tamoksifen) veya seramid inhibitörleriyle kombine edilerek de araştırılmıştır (Zou ve ark., 1998; Scribner ve ark., 2002; Johansson ve ark., 2008).

İndol-3-karbinol (I3C), Brassica cinsinin, beyaz lahana, kara lahana, karnabahar, turp, brokoli, kıvırcık lahana, hardal, brüksel lahanası gibi yaygın olan bitkilerde bulunan indolmetil glukosinolat glukobrassikinin enzimatik hidroliz ürünü ve kansere karşı korunmada ümit verici bir ajandır. I3C'nin sıklıkla vurgulanan ve devamlı olan koruyucu etkisi, tümörjenez karşı olduğu östrojen duyarlı hücrelerde rapor edilmiştir. In vivo yapılan bir çalışmada ise, I3C'nin dimethylbenzanthraceneindüklenerek

oluşturulmuş memeli tümörlerini %75 oranında azalttığı gösterilmiştir. Bir başka çalışmada ise; indolün, karsinojen muamelesinin öncesi ya da sonrası uygulandığında, tümör yoğunluğunu %95 azalttığı gösterilmiştir (Chang ve ark.1999).

İnsan meme kanseri hücrelerine doğrudan uygulanan I3C; östrojen reseptör pozitif ya da negatif hücrelerin büyümesini, G1 fazında durdurarak inhibe etmektedir. MCF-7 hücre kültüründe, I3C'nin önemli bir kısmı, doğal dimerizasyon formu olan 3,3-diindolmetan'a (DIM) dönüşür. I3C'nin anti-proliferatif etkisinin DIM biyoaktivitesinden farklı ve tamamlayıcı nitelikte olduğu gösterilmiştir (Jump ve ark.2008).

I3C, özgün yapısından ötürü, asit-katalize dehidrasyon ve kondensasyona duyarlıdır. Aralarında DIM, indolo-karbazol (ICZ), linear trimer (LTr₁), siklik trimer (CTr), ve siklik tetramer (CTet)'in bulunduğu in vivo oligomerik kompleks ürünleri oluşturur (Şekil 1.16). Bunların arasında DIM, kanser hücrelerinde sinyal iletimi ile apoptozis ve hücre-siklusunun engellenmesini indükler.



Şekil 1.16.I3C'nin metabolik transformasyonu (Weng ve ark., 2008)

(I3C: Indol-3-karbinol, DIM: 3,3-di indol metan, LTr₁:linear trimer, ICZ: indolo-karbazol, CTr: siklik trimer, CTet: siklik tetramer)

I3C ve onun metaboliti olan DIM, kanser hücre-siklus regülasyonu, Akt-NFjB sinyal iletimi, kaspaz aktivasyonu, siklin-bağımlı kinaz aktiviteleri, östrojen metabolizması, östrojen reseptör sinyal iletimi, endoplazmik retikulum stresi, ve BRCA gen ekspresyonu gibi süreçleri çok yönlü hedefler (Weng ve ark. 2008).

2.MATERYAL ve YÖNTEM

2.1.Materyal

2.1.1.Kimyasal maddeler

- Fenretinide (4-HPR), Sigma
- Indol-3-karbinol (I3C), Sigma
- MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid), Sigma
- Fetalsıgırserumu (FBS), Biochrom AG
- Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10.000U/ml penisilin,10mg/ml streptomisin), Gibco
- Fosfat tuz tamponu (PBS), Gibco
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Gibco
- Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI), Hyclone
- 0,05% Tripsin-Etilen Diamin Tetraasetik Asit (Tripsin-EDTA), Gibco
- Dimetil sülfoksit (DMSO), Sigma
- Triton X-100, Sigma
- Adenosine 5'-triphosphate (ATP) Chemosensitivity Assay, Dcs Innovative Diagnostic Systeme, Hamburg, Almanya
- Tripanmavisi(%0,5), Biological Industries

2.1.2.Sarf malzemeler

- 25cm² ve 75cm² lik flask, Orange Scientific
- 6 kuyulu plate, Orange Scientific
- 96 kuyulu flat plate, Orange Scientific
- 5ml ve 10ml hacimlerinde enjektörler, Set inject
- 10µl'lik pipet uçları, Biohit
- 100µl'lik pipet uçları, Expell
- 1000µl'lik pipet uçları, Ayset
- Steril tek kullanımlık filtreler (0,2 mikron çapında), Orange Scientific
- Steril santrifüj tüpleri (15ml), Orange Scientific
- Steril santrifüj tüpleri (50ml), Nest
- Thoma lamı, Bright –Line, Hausser Scientific Horsham, PA, USA
- Kriyovial, Corning Incorporated Corning

2.1.3.Cihazlar

- Spektrofotometre (FLASHScan S12, Analytik Jena, Almanya)
- Hassas terazi, SHIMADZU AUW220D
- Luminometre (FL_x800 Mikroplate Floresans Okuyucu)
- CO₂inkübatörü, Sanyo, Japonya
- Mikroplate inkübatör ve çalkalayıcı, Heidolph, Almanya
- Buharlı sterilizatör (Otoklav), Nüve OT4060, Türkiye
- Steril kabin, ESCO, Singapur
- Multipipet cihazı, Multipette eppendorf, Hamburg, Almanya
- Inverted mikroskop, Olympus CKX41, Japonya
- Aspiratör, Rocker 300, Tayvan
- Kuru hava sterilizatörü, Elektro-mag M 420, Türkiye
- Santrifüj, Rotina 35R, Almanya
- 10µl, 100µl ve 1000µl'lik pipet seti, Orange Scientific
- 0,5-5ml pipet, Brand
- 10ml pipet, Eppendorf
- 5-50µl Transferpipet, Thermo Scientific
- Pipet boy, ISO fill
- 20-200µl Transferpipet, Brand, Almanya

2.2.Yöntem

2.2.1.4-HPR ve I3C'nin Hazırlanması

4-HPR (Retinoic acid p-hydroxyanilide) bileşiğinin stok çözeltisi 10mM; I3C'nin (Indole-3-carbinol) ise 100mM olacak şekilde DMSO ile çözümleri sağlandı. Bu çözülmüş bileşikler daha sonra 0,5ml'lik tüplere; I3C 100'er µl, 4-HPR ise 12'şer µl olacak şekilde azot gazının altında alikotlandı ve -20°C'de saklandı. Çalışmalar için gerekli seyreltmeler ise besiyeri ile yapıldı.

2.2.2.Hücre Kültürü

Hücre kültürü, hücrelerin kontrollü şartlar altında yetiştirilmesi sürecidir. Ticari olarak Amerika Hücre Kültür Koleksiyonundan satın alınan MDA-MB-231 ve MCF-7 insan

meme kanseri hücre soyları kriyovial denen kaplar içerisinde -80°C dolaplarda saklandı. Kullanılan hücre soylarının özellikleri aşağıda belirtilen şekildedir.

MDA-MB-231 Hücre Soyu: ► İnsan meme kanseri hücre soyu

- Östrojen reseptörü (-)
- Epidermal growth factor (EGF) (+)
- Transforming growth factor alpha (TGF alpha) (+)
- E-kaderin (-)
- Kaspaz 2: (+), Kaspaz 3: (+)
- Yüksek oranda yayılabilir.

MCF-7 Hücre Soyu:

- İnsan meme kanseri hücre soyu
- Östrojen reseptörü (+)
- E-kaderin (+)
- Kaspaz 2: (+/-), Kaspaz 3: (-)
- Daha az oranda yayılabilir.

2.2.2.1.Hücre Soylarının Stoktan Çıkartılması

Hücreleri çoğaltmak amacıyla kriyovialler -80°C den alınarak sıcak su banyosunda hızlı bir şekilde çözüldü.Hücre süspansiyonu; %5 FBS, %1 penisilin-streptomisin ve %1 L-glutamin(Gibco)içeren 5ml RPMI(Roswell Park Memorial Institute medium) besiyeri içerisine alındı. Falcon tüp 800rpm'de 5dk santrifüj edildikten sonra süpernatant kısım aspire edildi ve hücre peleti üzerine 1ml besiyeri ilave edilerek hücrelerin süspansiyon hale gelmesi sağlandı. Falcon tüp üzerine 4ml besiyeri ilave edildi ve 5ml'lik hücre süspansiyonu 25cm²'lik flasklar (Thermo Scientific) içerisine alınarak 37°C'de, %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edildi.

2.2.2.2.Hücre Soylarının Pasajlanması

Deneyleerde kullanılan hücre soyları, flask yüzeyini tamamen kapladıklarında (konfluent olduklarında) flask içerisindeki besiyeri aspire edildi. Hücrelerin serumdan arındırılması için 25cm²'lik flask içerisine 2ml 1X PBS (Gibco) ilave edildi ve hücrelerin yüzeylerinin hafifçe yıkanması sağlandı. PBS ortamdan aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra flask yüzeyine yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılması için 0.5ml %0,05 Tripsin-EDTA (Gibco) solüsyonu kullanıldı ve hücreler 37°C'de, %5 CO₂'li ortamda 5dk inkübe edildi. Mikroskopla bakıldığında flask yüzeyinden ayrıldığı kabul edilen hücrelere, tripsinin inhibe edilmesi için en az iki katı kadar besiyeri ilave edildi. Böylece tripsinin hücreleri yüzeyden ayırdıktan sonra hücre membranlarına zarar vermeye başlaması engellenmiş oldu.

Flask içerisindeki hücre süspansiyonu, içerisinde besiyeri bulunan (falkondaki toplam hacim tripsinin 10 katı olmalı) 15ml'lik falkon tüp içerisine alındı. 800rpm'e 5dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısım aspire edildi ve elde edilen hücre peleti 1ml hücre besiyerinde çözüldükten sonra 9ml besiyeri ilave edildi ve 10ml'lik hücre süspansiyonu 75cm² lik flasklara alınarak 37°C'de, %5 CO₂ içeren ortamda inkübasyona bırakıldı. Bu şekilde hücreler istenilen sayıya gelene kadar çoğalmaları sağlandı.

2.2.2.3.Hücre Soylarının Stoklanması

Hücreler flask yüzeyini tamamen kapladıklarında flask içerisindeki besiyeri aspire edilerek ortamdan uzaklaştırıldı. Hücreler 1X PBS ile hafifçe yıkandıktan sonra PBS aspire edilerek uzaklaştırıldı ve hücrelerin flask yüzeyinden kalkmalarını sağlamak için %0,05 Tripsin-EDTA (Gibco) solüsyonu eklendi. Hücreler 37°C'de, %5 CO₂'li ortamda 5dk inkübasyona bırakıldı. Mikroskopla bakıldığında flask yüzeyinden ayrıldığı kabul edilen hücrelere, tripsinin inhibe edilmesi için en az iki katı kadar besiyeri ilave edildi. Flask içerisindeki hücre süspansiyonu içerisinde besiyeri bulunan 15ml'lik falkon tüp (Orange Scientific) içerisine alındı. 800rpm'de 5dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısım aspire edildi ve pelet üzerine her bir kriyovial için 1.5ml dondurucu medium (5ml DMSO + 5ml FBS + 40ml DMEM) karanlık ortamda ilave edildi. Hücre süspansiyonu kriyovialler içerisine dağıtılarak -80°C'ye kaldırıldı.

2.2.2.4.Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması

MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre soyları için kullanılan besiyeri ortamı için %5 Fetal Bovine Serum (Hyclone USA), %1 Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10.000U/ml penisilin, 10mg/ml streptomisin, Gibco), %1 L-glutamin (Gibco) içeren RPMI 1640 (Hyclone USA) solüsyonu kullanıldı.

2.2.2.5.Hemositometre ile Hücrelerin Sayımı

Hücreleri sayabilmek amacıyla tripsinizasyon işlemi sonucunda elde edilen hücre süspansiyonundan 20µl 0,5 ml'lik tüpe alındı ve üzerine eşit miktarda %0,5 tripan mavisi (Biological Industries) konarak iyice karışması sağlandı. Hematositometre distile su ile iyice temizlendi. Bu karışımdan 12µl alınarak thoma lamına koyuldu ve mikroskopta bu lam üzerinde beş alanda hücre sayımı yapıldı. Bulunan sayı sulandırma katsayısı ile çarpılarak 1ml besiyerinde ne kadar hücre olduğu hesaplandı.

2.2.3.MTT (Metiltiazotetrazolium) Canlılık Metodu

MTT yöntemi, ilk kez Mosmann ve ark. tarafından 1983 yılında belirlenmiştir ve hücre kültüründe büyütülen hücrelerdeki mitokondriyel dehidrogenaz enzim aktivitesinin kolorimetrik ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Mossmann ve ark., 1983). Bu enzim aktivitesi yaşayan hücrelerde gözlenirken, ölen hücrelerde ise gözlenmemektedir. Ortama konulan bileşiğe yanıt olarak eğer hücreler ölürse enzim aktivitesinin azaldığı veya kaybolduğu görülmektedir. Bu nedenle hücreler mitokondriyel dehidrogenaz enziminin değişime uğrattığı MTT maddesine (tetrazolyum (3-(4,5-dimetiltiazol -2)-2,5-difenil tetrazolyum bromid) maruz bırakılırlar. MTT, sarı renkli suda çözünebilir tetrazolium tuzu olup canlı hücreler tarafından alınır ve mitokondriyel süksinat dehidrogenaz enzimleri tarafından suda çözünmeyen koyu mavi-mor renkli formazan kristallerine dönüştürülür (Şekil 2.1). Dolayısıyla indirgenme ve formazan kristallerinin oluşum bölgelerinin mitokondri olduğu kabul edilmektedir.



Şekil 2.1.MTT'nin reaksiyon şeması

Sitotoksik bileşiklerin hücrelere zarar vermesi MTT tetrazoliumun formazana indirgenmesini azaltmaktadır. Sonuç olarak; canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mavi-mor renkte boyanmakta, ölü veya mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler ise boyanmamaktadır. Daha sonra oluşan bu formazan kristalleri SDS (%10 sodyum dodesil sülfat+steril distile su + 0,01N HCl) kullanılarak suda çözünür hale getirilir ve oluşturdukları renk şiddeti 570nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçülür. Sonuç olarak; başlangıçta aynı sayıda ekilmiş hiç ilaç uygulanmamış kontrol hücrelerindeki (MO) renk şiddeti ile ilaca maruz bırakılmış hücrelerdeki renk şiddeti oranlanarak ilaca maruz bırakılmış hücrelerdeki canlılık oranı (yüzdesi) hesaplanmış olur.

MTT testi için, 4-HPR bileşiğinin 10µM, 5µM, 2.5µM, 1.25µM, 0.62µM, 0.31µM konsantrasyonları, I3C bileşiğinin 100µM, 50µM, 25µM, 12.5µM, 6.25µM, 3.12µM ve bu bileşiklerin kombinasyonları 3 tekrarlı ve 100µl olacak şekilde 96 kuyulu hücre kültür kaplarına uygulandı. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri sayılarak 100µl besiyeri içerisinde 5×10^3 hücre olacak şekilde her bir kuyuya ilave edildi. Hücrelerde, ölümün negatif kontrolü (maksimum canlılık, MO) olarak sadece besiyeri ortamı içerisinde ekilen hücreler kullanıldı. Kör için ayrılan kuyular içerisine ise 200µl besiyeri ilave edildi.Ardından hücreler, 48 saat 37⁰C, %5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakıldı.

MTT kimyasalı, 5mg/ml PBS tamponu içerisinde pH=7.2 olacak şekilde stok olarak hazırlandı. Hazırlanan MTT çözeltisi filtre edilerek steril hale getirildi. 48 saat sonunda MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerine her bir kuyucuğa 20µl MTT boyası eklendikten sonra hücreler 37⁰C'de 4 saat süreyle inkübasyona bırakıldı.

Oluşan formazan kristallerini çözünür hale getirmek için bütün kuyucukların üzerine %10'luk SDS solüsyonundan 100µl eklenerek 18 saat 37⁰C'de %5'lik CO₂'li etüvde inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda hücrelerde oluşan renk şiddeti spektrofotometrede (FLASHScan S12, Jena, Almanya) 570nm dalga boyunda ölçüldü ve okunan absorbanslar kullanılarak hücrelerin canlılık oranları belirlendi. Bu yöntem MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde 3 defa tekrar edildi.

% Canlılık hesabı:

İlaç uygulanmamış kontrol hücre (MO) canlılığı %100 olarak kabul edilerek, ilaç uygulanan hücrelerin canlılık oranları aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı. Deney içerisinde her bir konsantrasyon birbirinden bağımsız üç farklı kuyuda tekrarlandı.

% Canlılık = $[100 \times (\text{Bileşik ile muamele edilen hücre absorbansı ortalaması} - \text{kör ortalama}) / (\text{Kontrol hücre absorbansı ortalaması} - \text{kör ortalama})]$ olarak hesaplandı.

2.2.4. ATP (adenozin trifosfat) Canlılık Metodu

MTT yöntemi, sıklıkla kullanılan ucuz bir yöntem olmasına rağmen ATP yöntemi, lüminesans bazlı metodolojiye bağlı olarak teknolojik açıdan daha gelişmiştir ve *in vitro* sitotoksite ölçümlerini MTT yöntemine göre çok daha hassas ve güvenilir yapabilmektedir.

ATP hücre içerisindeki en önemli enerji deposudur ve biyolojik sentez, sinyal iletimi, taşıma, hareket gibi süreçler için kullanılmaktadır. Hücresel ATP hücre canlılığını ölçmede en hassas parametrelerden biridir. Bu yöntemin prensibi hücre kültüründe büyütülen kanser veya normal hücrelerdeki intraselüler ATP içeriğinin ölçülmesi esasına dayanmaktadır. İntraselüler ATP içeriğinin seviyesi yaşayan hücrelerin sayısının belirlenmesinde kullanılan bir göstergedir (Maehara ve ark., 1987; Andreotti ve ark., 1995; Dexter ve ark., 2003; Ulukaya ve ark., 2008).

Hücrelerde örneğin; kemoterapötik ajanlar veya mitokondriyal toksinler ile öldürücü hasarlar oluştuğunda ATP seviyesi önemli ölçüde azalmaktadır. Bu amaçla, bileşiklerle

muamele edilmiş hücrelerdeki intraselüler ATP içeriği belirlenerek total hücre sayısı belirlenmeye çalışıldı.

ATP yöntemi; lüsiferinin Mg^{+2} ve ATP varlığında lüsiferaz enzimi ile oksilüsiferine katalize olup lüminesans sinyal oluşturmasına dayanmaktadır (Şekil 2.2). Lüminesans sinyal (ATP konsantrasyonu) ile hücre sayısı arasında doğrusal bir ilişki bulunmaktadır (Andreotti ve ark., 1995; Mueller ve ark., 2004; Wadhawan ve ark., 2010).

2.2.4.1.Çözeltiler

ATP kiti (DCS Innovative Diagnostika-Systeme, Hamburg, Germany)

Triton X-100 (Sigma)

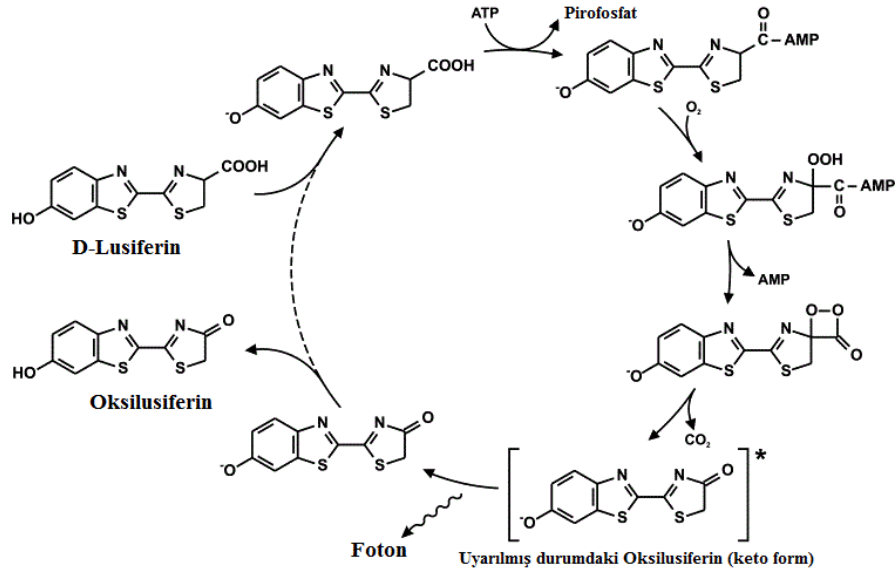
2.2.4.2.ATP Ölçümünün Yapılması

ATP testi için, 4-HPR bileşiğinin 10 μ M, 5 μ M, 2.5 μ M, 1.25 μ M, 0.62 μ M, 0.31 μ M konsantrasyonları, I3C bileşiğinin 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 12.5 μ M, 6.25 μ M, 3.12 μ M ve bu bileşiklerin kombinasyonları 3 tekrarlı ve 100 μ l olacak şekilde 96 kuyulu hücre kültür kaplarına uygulandı. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri sayılarak 100 μ l besiyeri içerisinde 5×10^3 hücre olacak şekilde her bir kuyuya ilave edildi. Ardından hücreler, 48 saat 37⁰C, %5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Bu yöntem MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde 3 defa tekrar edildi.

Negatif kontrol (maksimum canlılık, MO, muamele uygulanmamış hücre kontrolü) için 200 μ l besiyeri içerisine 5×10^3 hücre ekildi. *Pozitif kontrol* (minimum canlılık, MI, %100 öldüren doz) olarak, 100 μ l hücre süspansiyonu içerisine hücre ölümünü %100 indüklediği bilinen %1'lik Triton X-100 çözeltisinden 100 μ l ilave edildi. Hücreler 37⁰C'de %5'lik CO₂'li etüvde 48 saat inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonrasında ATP kitinin içinde yer alan hücre lizis tamponu kullanılarak (50 μ l/kuyucuk) hücre içerisindeki ATP'nin hücre dışına çıkması sağlandı. 20 dakikalık bekleme süresini takiben, 50 μ l hücre süspansiyonu beyaz renkli 96 kuyucuklu ekim kaplarına aktarıldı ve ardından 50 μ l/kuyucuk lusiferin-lüsiferaz enzimi içeren solüsyon

ilave edildi. Reaksiyon sonunda oluşan ATP miktarı (lusiferin-lusiferaz bioluminesans reaksiyonu yardımıyla), ölçme zamanı 1 saniye olacak şekilde luminometre (Bio-Tek, Winooski, USA) kullanılarak ölçüldü. Böylece bileşiklerle muamele edilen ve edilmeyen hücrelerin RLU değerlerine göre, bileşiklerin sitotoksik/sitostatik etkileri hakkında bilgi edinildi. % Canlılık aşağıdaki formüle göre hesaplandı.



Şekil 2.2.Lusiferin/lusiferaz biyoluminesans tepkimesi (Roda ve ark., 2009)

% Canlılık=[100×(Bileşik ile muamele edilen hücre absorbanası ortalaması-MI)/(Kontrol hücre absorbanası ortalaması-MI)] olarak hesaplandı.

2.2.5.Hoechst 33342, Propidiyum İyodür (PI) ile İkili Boyama Yöntemi

Floresan boyalar DNA'ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatini dolayısıyla nükleusu görünür hale gelebilmektedir. Hoechst 33342, DNA'ya bağlanabilen dolayısıyla hücre membranından nüfuz edebilen bir boyadır. Canlı ve ölü (apoptotik / nekrotik) hücrelerin çekirdeklerini boyamak için kullanılmaktadır.

Propidium iyodür (PI), sadece membran hasarlı hücrelere girebilen, dolayısıyla tüm ölü hücreleri (primer nekrotik ve geç apoptotik/sekonder nekrotik) boyayabilen floresan nükleik asit boyasıdır. Bu boya canlı hücreler tarafından dışarı atılmaktadır. Primer nekrozis (hücre hacminin artması fakat fragmente ya da piknotik nükleusların gözlenmemesi) toksik koşullar (hipoksi, iskemi, hipertermi, vb.) altında gerçekleşen

klasik ölüm şeklidir. Sekonder nekrozis ise, piknotik ya da fragmente nukleus ile karakterize olup, apoptozisin geç safhasıdır.

Hücre kültürü ortamında apoptozise giden hücrelerin membranları intakt (erken apoptozda) olmasına rağmen daha ileri dönemlerde geç apoptoz/sekonder nekrozun gelişmesi ile hücrelerin membran bütünlükleri bozulmaktadır. Sekonder nekroz aşamasına kadar olan süre içinde hücreler non-vital boyalar denilen (PI) boyalar ile boyanacak olurlarsa apoptozis başlamış olmasına rağmen membran intakt olmasından dolayı bu boylarla boyanamazlar.Yani PI negatifve Hoechst boyası pozitif boyanmaktadırlar.Sekonder nekroz gelişikten sonraki aşamalarda hücreler membran bütünlüklerinin bozulması ile non-vital boyalar ile boyanmaya başlarlar. Dolayısıyla PI pozitif ve Hoechst pozitif boyanmaktadırlar (Ulukaya ve ark., 2011).

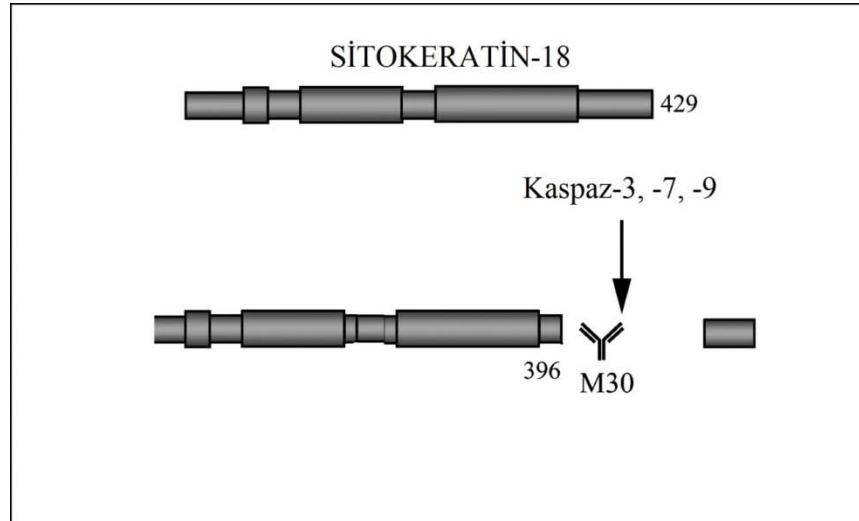
İkili boyama yöntemi kullanılarak bileşiklere maruz kalmış hücrelerin ölüm şekilleri, nükleus morfolojisine bakılarak yapılabilir. Apoptotik hücrelerde; çekirdeğin normal hücrelere göre daha küçük olma özelliği aranırken, nekrotik hücrelerde ise çekirdeğin normal hücrelerden biraz daha büyük olması ve daha az boya alması özelliği aranmaktadır.Bu amaçla, bileşiklerin hücre soyları üzerindeki etkilerinin morfolojik olarak floresan mikroskopta görüntülenebilmesi için ikili boyama yöntemi kullanıldı.

İkili boyama yöntemi için, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri sayılarak 6 kuyulu hücre kültür kaplarına 2ml içerisinde 5×10^5 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat 37°C , %5 CO_2 'li ortamda inkübasyonu takiben hücreleri zedelemekten 1ml besiyeri uzaklaştırıldı ve 4-HPR bileşiğinin $10\mu\text{M}$, I3C bileşiğinin $100\mu\text{M}$ ve bu bileşiklerin kombinasyonları ($10\mu\text{M}$ 4-HPR+ $100\mu\text{M}$ I3C) 1ml içerisinde olacak şekilde kuyulara ilave edildi. Negatif kontrol kuyularından 1ml besiyeri uzaklaştırıldı ve yerine 1ml taze besiyeri ilave edildi. Ardından hücreler, 48 saat 37°C , %5 CO_2 'li ortamda inkübasyona bırakıldı.48 saatilaç uygulamasını takiben, hücrelerin süpernatantları 15ml'lik falkonlara toplandı ve bir kez 1ml PBS ile yıkama yapıp tekrar aynı falkonlara toplandı. Hücreleri toplamak amacıyla kuyulara 200 μl tripsin pipetlendi ve 4 dakika 37°C 'de bekletildi. Süre sonunda hücreler, ilgili falkonlara toplandı ve bu süspansiyon 800rpm'de 4 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant

uzaklaştırıldı ve pelet üzerine, PBS içerisinde konsantrasyonları 1µg/ml PI, 1mg/ml RNaz, ve 10µg/ml olan ikili boyama çözeltisinden 100µl pipetlendi ve karanlıkta 20 dakika 37°C’de inkübe edildi. Süre sonunda bu süspansiyondan 20µl temiz bir lam üzerine alındı ve lamel ile kapatılarak, bileşiklerin hücrelerde sebep olduğu ölüm şeklifloresan mikroskop altında değerlendirildi.

2.2.6.M30 Antijen (Kaspazla Kırılmış Sitokeratin 18) Metodu

Sitokeratinler (CK), kanser tanısında kullanılan intermediat filament protein ailesine ait proteinlerdir. Apoptozis esnasında sitoiskeletin önemli bir protein olan CK18 sadece apoptotic hücrelerde aktifleşen bir enzim grubu olan kaspazların etkisiyle kırılarak, kırılmış CK18’i (CK18-Asp396) oluşturmaktadır (Leers ve ark. 1999).M30 monoklonal antikor, özellikle CK18’in Asp396’da kırılan fragmanını (M30 antijen) tanıyarak CK’lerin apoptotik bir belirteç olarak kullanımını sağlamaktadır (Şekil 2.3.)(Ueno ve ark. 2003). Böylece apoptozise özgü bir belirteç olan kırılmış CK18, ELISA yöntemiyle saptanmaktadır. Bu özel CK18’i tanıyan M30 antikor, hücrelerin bulunduğu ortamla temas ettirilirse ve eğer ortamda apoptotik hücreler de var ise, apoptozisin varlığı gösterilmiş olur.



Şekil 2.3.Sitokeratin 18’in kaspazlar aracılığıyla kesimi ve bu bölgenin M30 antikoruna tanımlanmasının şematik gösterimi (Micha ve ark., 2008)

Basit olarak, ELISA metoduyla M30 antijen fragmentini belirlemek için, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri sayılarak 96 kuyulu hücre kültür kaplarına 200µl içerisinde 5×10^3 hücre olacak şekilde (3 tekrarlı) ekim yapıldı. 24 saat 37°C, %5 CO₂’li ortamda

inkübasyonu takiben hücreleri zedelemeyen üzerlerinden 100µl besiyeri uzaklaştırıldı. Sonrasında 4-HPR bileşiğinin 10µM, I3C bileşiğinin 100µM ve bu bileşiklerin kombinasyonları (10µM 4-HPR+100µM I3C) 100µl içerisinde olacak şekilde hücrelerin üzerlerine uygulandı. Negatif kontrol kuyularından 100µl besiyeri uzaklaştırıldı ve yerine 100µl taze besiyeri ilave edildi. Hücrelerde apoptozisin pozitif kontrolü olarak, günümüzde meme kanser kemoterapisinde kullanılan Paklitaksel, 3,21µM dozunda kullanıldı. İlaç uygulamalarını takiden hücreler 48 saat 37°C, %5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakıldı.

48 saatlik inkübasyon sonunda tüm kuyulara 10µl%10'luk Triton-X100 ilave edildi. 15 dakika oda sıcaklığında 600rpm çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Tüm kuyulardaki supernatant toplandı ve 2000rpm'de 30 saniye santrifüj edilip M30 Apoptosense ELISA (M30-Apoptosense ELISA kit, Peviva, Bromma, Sweden) kit içeriğine uygun olarak çalışıldı. Supernatantlar, kitin içerisinde yer alan CK18'i tanıyan fare monoklonal M30 antikoru kaplı striplere 25µl pipetlendi. Tüm örnekler üzerine 75µl horseradish peroksidaz konjugatı eklendi. 4 saat boyunca 600rpm çalkalayıcıda oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda örnekler 250µl yıkama solüsyonu ilave edilerek 5 kez yıkama yapıldı ve hemen ardından 200µl TMB substratı ilave edilerek 20 dakika karanlıkta oda sıcaklığında bekletildi. Reaksiyonu durdurmak için 1N H₂SO₄ içeren 100µl stop çözeltisi ilave edildi ve oluşan renk şiddeti, spektrofotometrik olarak 450nm'de (FLASHScan S12, Jena, Almanya) okundu.

2.2.7. Apoptotik Gen Ekspresyonlarının İncelenmesi

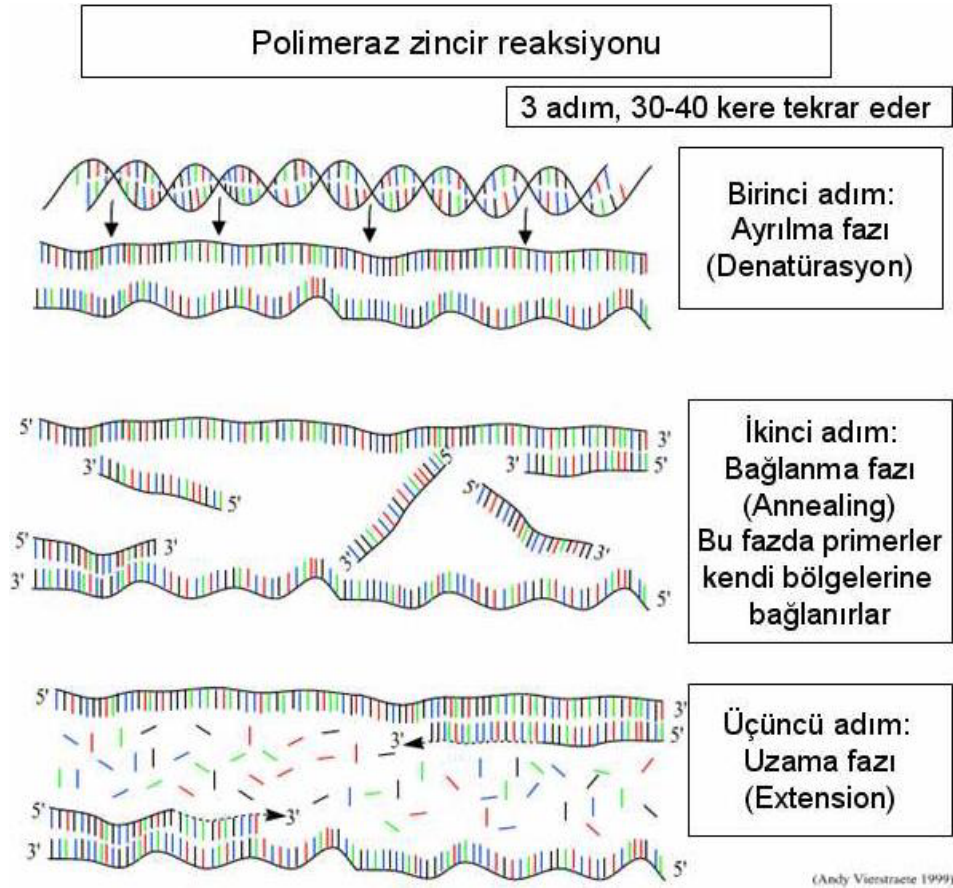
2.2.7.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Henry A. Erlich, Kary Mullis ve Randall K. Saiki tarafından geliştirilen yöntem, nükleik asitlerin, uygun in vitro koşullar altında çoğaltılmasına dayanmaktadır.

2.2.7.1.1. PZR İşleminin Uygulama Aşamaları ve Prensipleri

PZR reaksiyonu; DNA'nın iki zincirinin yüksek sıcaklıkla birbirinden ayrılmasını (denatürasyon), sonra sırasıyla sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanmasını (hibridizasyon), zincirin uzamasını (polimerizasyon, çift iplikçikli DNA'ların sentezi), ve tüm bu siklusların belirli sayıda tekrarlanmasını kapsamaktadır.

(Şekil 2.4). PCR tekniğinin otomasyonu, her bir siklus esnasındaki ısıtma ve soğutma işlemlerini yazılım programlarıdoğrultusunda gerçekleştiren “thermocycler” adı verilen PCR cihazlarıyardımıyla sağlanmaktadır. Günümüzde değişik firmalar tarafından sıcaklık, inkübasyon süresi ve siklus sayısının programlanabildiği “thermocycler” cihazlarıticari olarak sunulmaktadır. “Thermocycler” cihazlarına değişik hacim ve sayıdaki tüpler yerleştirilebilmektedir. Bu cihazlarda sıcaklık +4°C ile 100°C’ler arasında programlanabilmekte ve reaksiyon işlemlerinin sona ermesiyle +4°C’ye ayarlanarak tüpler uzun süre bu sıcaklıkta tutulabilmektedir (Arda, 1980; Erol ve ark.,1990).



Şekil 2.4.PCR Siklusunun basamakları(Andy, 1999)

2.2.7.1.1.1.DNA'nın Denatürasyonu Aşaması

Bu aşamada çift zincirli hedef DNA'nın birbirinden ayrılması sağlanmaktadır. Çift sarmallı DNA, hidrojen bağlarının kopmasıyla tek sarmal haline getirilmektedir. Denatürasyon aşamasında, yüksek sıcaklık dereceleri G+C yönünden zengin olan hedef zincirler için daha uygun olsa da, sık kullanılan denatürasyon sıcaklıkları 95°C' de 30

saniye veya 97°C'de 15 saniyedir. "Thermocycler" cihazlarında, bu sıcaklıkların uygulanmasıyla DNA'nın denatürasyon gerçekleştirilmektedir. Bunun yanısıra denatürasyon sıcaklığının çok yüksek veya süresinin uzun olması enzim aktivitesinin olumsuz etkilenmesine neden olmaktadır (Erich ve ark., 1991).

2.2.7.1.1.2. Primerlerin Bağlanması (Hibridizasyon, Annealing) Aşaması

PZR işlemlerinin bu aşamasında, primer olarak adlandırılan ve çoğaltılması istenen DNA için spesifik olan oligonükleotidler, denatürasyon aşamasında elde edilen DNA tek sarmal üzerinde kendisine komplementer olan diziyeye bağlanmaktadır. Ortamda bulunan iki tür primerin her birinin komplementeri olduğu tek iplikçikli hedef DNA üzerindeki spesifik bölgelere bağlanması için, programlanan thermocycler sıcaklığı 37-65°C'ye indirilmektedir. Primerlerden birinin kendine ait olan 5' ucu, hedef DNA'lardan birinin 3' ucuyla, diğer primer de ikinciyi tek iplikçik DNA'nın anti paralel olan diğer ucunda bulunan 3' ucuna DNA polimerazın çalışma yönüne (5' → 3') uygun olarak bağlanırlar. Bu işlemlerin tamamlanması yaklaşık 0.5-1 dakika sürmektedir. Primerlerin bağlanması aşamasında gerekli olan sıcaklık ve sürenin uzunluğu; primerlerin nükleotid yapısına, uzunluğuna ve PCR solüsyonundaki konsantrasyonlarına bağlıdır. Bağlanma sıcaklığı, genellikle primerlerin erime sıcaklıklarının 5°C altında olup 55-65°C'lerde en iyi sonucu vermektedir. Optimal bağlanma sıcaklığı; G-C, A-T bazlarının miktarı ve baz sayısı ile hesaplanır. G ve C bazları arasında üç hidrojen bağı bulunurken, A ve T bazları arasında iki hidrojen bağı bulunmaktadır. Her bir G-C bazları arasındaki bağlanma sıcaklığı 4°C, A-T bazları arasındaki bağlanma sıcaklıkları da 2°C olarak hesaplanır. Örneğin; 20 bazdan oluşmuş bir primer yapısında, 11 G-C, 9 A-T bulunduğu kabul edilirse optimal bağlanma sıcaklığı şu şekilde hesaplanmaktadır.

$$11 \times 4 + 9 \times 2 = 62^\circ\text{C}$$

Hesaplanan 62°C'den 5°C güven payı çıkarılarak optimal bağlanma sıcaklığı elde edilir (Erol ve ark., 1990; Aldemir ve ark., 2001).

2.2.7.1.1.3. Primerlerin Uzatılması (Polimerizasyon, Extention, Elongation) Aşaması

Primerlerin uzatılması aşaması genellikle 72°C 'de gerçekleştirilir. Primerlerin bağlanması aşaması tamamlandıktan sonra, primerlerin hibritleştiği tek sarmalların karşılığı DNA polimeraz tarafından sentezlenir. PZR işlemlerinde, genellikle her bir siklus için iki dakikalık bir uzatılma süresi yeterli olmakla birlikte, bu süre amplifiye edilecek DNA bölgesinin uzun olmasında arttırılabilmektedir. Daha uzun DNA fragmanlarının çoğaltılabilmesi için ortalama her kb için bir dakika eklenmesi önerilmektedir. Bu aşamada Taq polimeraz enzimi $5' \rightarrow 3'$ yönünde aktivite göstererek, primerlerin $3'$ uçlarından başlamak üzere ortamdaki nükleotidleri kullanarak hedef DNA dizisinin kopyasını yapmaktadır. Reaksiyon sıcaklığı tekrar arttırılarak son uzama sıcaklığı 95°C 'ye yükseltilmektedir. Böylece PZR'nin üç aşamadan oluşan ve yaklaşık olarak 10-15 dakika kadar devam eden birinci amplifikasyon aşaması, tekrar sıcaklığın 95°C 'ye yükseltilmesi ve aynı aşamaların 25-30 kez tekrarlanmasıyla sonlandırılır. Böylece tek bir hedef DNA segmenti, 2^n formülüne göre yaklaşık 33,6 milyon çoğaltılmış olur. Bir PZR işleminde, 20 PZR siklusundan sonra aranan DNA'nın eksponensiyel olarak 2^{20} kat artmış olması beklenir. Ancak bu sayıya her bir siklustaki ürünün %100 olması koşuluyla ulaşılabilir. Her bir siklusta değişik faktörler etkili olarak %100 ürün oluşumunu engellemekte ve bu durum daha sonraki PCR sikluslarında daha belirgin ortaya çıkmaktadır. Bu şekilde 25-30 siklus sonunda DNA miktarındaki artış ve azalan enzim miktarı arasındaki dengesizlik reaksiyonu sınırlamaktadır. Bu süreç içerisinde enzimin aktivasyonu da azalmaktadır (Caner ve ark., 2001; Birben, 2006).

2.2.7.2. Eş Zamanlı PZR

Nükleik asit çoğalmasıyla eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalin ölçülmesiyle, kısa sürede kantitatif sonuç verebilen bir PZR yöntemidir. Ticari olarak geliştirilmiş üç tipi bulunmaktadır. Bunlar; LightCycler (Roche), TaqMan (PE Biosystem) ve iCycler (BIO-RAD)'dır.

LightCycler sisteminin uygulanmasında; yalnızca çift zincirli DNA'ya bağlandıklarında floresans veren boyalar (Syber green 1) kullanılarak, çoğalmaya bağlı DNA artışı, ortaya çıkan floresansın miktarıyla ölçülmektedir. Primerin bağlanması takiben gerçekleştirilen uzama aşamasında, hedef DNA'nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA'ya

bağlanan Syber green 1 miktarı artmakta ve buna bağlı olarak yayılan floresans miktarında artış gözlenmektedir (Heid ve ark. 1996; Grove 1999; Kubista ve ark. 2006).

Bu uygulamada, floresans artış her zaman spesifik amplifikasyonu göstermeyebilir. Çünkü çift sarmal DNA'ya entegre olan Syber green 1 ortamda hedef moleküller olmadığında primerlerin kendi aralarında gerçekleşecek olan bağlanmalar (primer dimer) sonucunda da yapıya katılarak floresans oluşumuna sebep olabilmektedir. Bu olumsuz faktörü gidermek için amplifikasyon ürünlerinin melting curve (erime eğrisi) analizi yapılmaktadır. Her çift sarmal DNA, kendine özgü melting temperature (T_m , çift sarmal DNA'nın %50'sinin tek sarmal hale gelmesi için gerekli sıcaklık) değerine sahiptir. PZR çoğalmasının ardından sıcaklık yavaş yavaş yükselttilerek, belirli aralıklarla tüpteki floresans miktarı kaydedilir. Çift sarmal DNA zincirleri birbirinden ayrılmaya başlayınca Syber green 1 boya serbest kalmakta ve floresans miktarı azalmaktadır. Denatürasyon olduğunda floresans sinyali aniden düşmektedir. Erime eğrisinden yararlanılarak ampliconun T_m derecesi saptanabilmektedir. İncelenen örneğe ait T_m derecesi, aynı koşullarda işleme alınan pozitif kontrolün T_m derecesiyle karşılaştırılarak, PZR sonucunun doğru veya hatalı olduğuna karar verilmektedir.

LightCycler'in diğer bir uygulama şekli, hedefe özgül problemler kullanmaktır. Burada problemlerle testin özgüllüğü artırılmıştır. Problemlerden biri 3' ucundan floresans boyayla işaretli (donör boya), diğeri 5' ucundan alıcı boyayla (acceptor dye) işaretlenmiştir. Problemler, hedef ampliconlar üzerinde birbirine yakın (1-5 nükleotid uzaklıkta) yere bağlanmakta ve işaretli uçlar yan yana gelmektedir. İki boyanın yan yana gelmesiyle açığa çıkan enerji, ikinci problem üzerindeki alıcı boyayı etkileyerek floresans oluşumuna yol açmaktadır. FRET (Fluorescence resonance energy transfer) olarak adlandırılan bu enerji transferi sonucunda oluşan floresans miktarı, ortamdaki hibridizasyonun derecesine, diğer bir ifadeyle PZR siklusuna süresince oluşan ampliconların miktarına bağlı olarak artmaktadır. TaqMan sisteminde, 5' ve 3' uçlarından florokrom (floresans veren) maddelerle işaretli problem kullanılmaktadır. Problemün 5' ucunda raporör florokrom (6-carboxyfluorescein= 6-FAM), 3' ucunda ise baskılayıcı (quencher) florokrom (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine=TAMRA) bulunmaktadır. Problem, tek sarmal hale getirilen hedef molekül üzerinde, primerlerin bağlanma bölgesinin arasında kalan

yere bağlanır. Proba hedef molekül arasındaki hibridizasyon devam ettiği sürece raportör florokrom maddenin sinyal oluşturması, 3' uçtaki baskılayıcı florokrom tarafından engellenmektedir. Primerlerin hedef nükleik asite bağlanmasını takiben başlatılan primer uzaması probun bağlandığı noktaya kadar geldiğinde, sentezin devam edebilmesi için *Taq* DNA polimeraz enzimi 5'→3' nükleaz aktivitesini kullanarak probu 5' uçtan yıkmaya başlar. Böylece raportör florokrom serbest hale geçer ve sinyal oluşturur. Her siklusta üretilen ampikon miktarına paralel olarak sinyal şiddeti de artmaktadır (Holland ve ark., 1991; Livak ve ark., 1995).

Eş zamanlı PZR, kısa sürede kantitatif sonuç verebilmektedir. Tüpler açılmadan tanıya gidildiği için kontaminasyon riski düşüktür. Elektroforeze gerek kalmadan çoğalma esnasında sonuç alınabilmektedir. Ayrıca floresan veren probalar kullanılarak hedef nükleik asitteki mutasyonlar saptanabilmektedir (Morris ve ark., 1996).

Apoptotik gen ekspresyonlarının (BCL2L10, BIK, BAX, BCL-2, FASLG, HRK, TNFRSF10B, TNFRSF10A) incelenmesi için, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri sayılarak 6 kuyulu plakelere 2 ml içerisinde 1×10^6 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat 37°C , %5 CO_2 'li ortamda inkübasyonu takiben hücreleri zedelemekten uzaklaştırıldı ve 10 μM 4-HPR ile 100 μM I3C bileşiği kombine edilerek 1 ml içerisinde olacak şekilde kuyulara ilave edildi. Negatif kontrol kuyularından 1 ml besiyeri uzaklaştırıldı ve yerine 1 ml taze besiyeri ilave edildi. Ardından hücreler, 16 saat 37°C , %5 CO_2 'li ortamda inkübasyona bırakıldı. 16 saat ilaç uygulamasını takiben, total RNA izolasyonu yapıldı.

2.2.7.3. Hücrelerden Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu High Pure RNA Isolation Kit (Roche) kullanılarak yapıldı. Bu aşamada ilaç uygulanan kuyuların süpernatantları, buz üzerinde tutulan 15 ml'lik falkonlara toplandı ve negatif kontrol kuyularının süpernatantı uzaklaştırıldı. Kuyulara 2 ml soğuk PBS ilave edilip hücreler scraper (Corning) ile kaldırıldı ve ilgili falkonlara aktarıldı. Süspansiyon $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 800 rpm'de 5 dakika santrifüj (Hettich Zentrifugen, Almanya) edildi. Santrifüj sonrası falkonların süpernatantları uzaklaştırıldı ve pelet üzerine 200 μl PBS eklenerek al-ver yapıldı. Kitin içerisinde yer alan filtre tüpler,

koleksiyon tüpler ile birleştirdi ve lysis-binding tamponundan falkonlara 400µl eklenerek tüm hacim, birleştirilmiş tüplere (üst kısımda yeralan filtre tüp içerisine) aktarıldı ve 8000g'de 15 saniye santrifüj edildi(Eppendorf AG, Hamburg, Germany). Santrifüj sonrası filtre tüp ile koleksiyon tüpü ayrıldı, koleksiyon tüpündeki sıvı uzaklaştırıldı ve filtre tüp ile koleksiyon tüpü tekrar birleştirildi.Ortamdaki total DNA'yı uzaklaştırmak amacıyla kitin içerisinde yeralan DNaz inkübasyon tamponundan100µl pipetlenerek oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda, DNaz inkübasyon tamponunu uzaklaştırmak amacıyla yıkama işlemleri gerçekteştirildi.Bu amaçla kitin içerisinde yeralan 1 numaralı yıkama solüsyonundan 500µl eklenerek 8000g'de 15 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonrası filtre tüp ile koleksiyon tüpü ayrıldı, koleksiyon tüpündeki sıvı uzaklaştırıldı ve filtre tüp ile koleksiyon tüpü tekrar birleştirildi.İkinci bir yıkama için kitin içerisinde yer alan 2 numaralı yıkama solüsyonundan 500µl eklenerek 8000g'de 15 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonrası filtre tüp ile koleksiyon tüpü ayrıldı, koleksiyon tüpündeki sıvı uzaklaştırıldı ve filtre tüp ile koleksiyon tüpü tekrar birleştirildi.Son olarak 2 numaralı yıkama solüsyonundan 200µl eklenerek 13.000g'de 2 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında, koleksiyon tüpü uzaklaştırıldı ve filtre tüpler, steril 1,5ml'lik tüpler ile birleştirilerek, filtrede tutulan total RNA'nın tüp içerisinde eldesi için 70µl elusyon tamponu, filtre tüpe pipetlendi ve 8000g'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında tüpte bulunan RNA çözeltilerinin konsantrasyonları ölçüldü.

2.2.7.4.İzole Edilen RNA'ların Kontrolü

İzolasyonu gerçekteştirilen RNA'ların kalitesi ve miktarları Nanodrop™ (ThermoScientific) cihazı ile ölçüldü. RNA örneklerinden 2µl alındı ve suya karşı kör alınan cihaz ile ölçümler yapıldı. RNA miktarları 50ng/µl ile 600ng/µl arasında bulundu.

2.2.7.5.cDNA Sentezinin Yapılması

Elde edilen total RNA örnekleri, Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis kiti (Roche) ile cDNA'ya çevrildi.cDNA Sentez kiti içeriği:

Reverse Transkriptaz Enzimi

Reaksiyon tamponu

RNaz inhibitör koruyucusu

Deoksinukleotit karışımı

Rastlantısal hegzamer

DTT

Su (PZR derecesi)

1µg RNA hacmi ile 2µl rastlantısal hegzamer, son hacim 11,4µl olacak şekilde buz üzerinde ve steril PZR tüpleri içerisinde hazırlandı. RNA sekonder yapılarının denatüre edilmesi için tüp, 65°C'de 10 dakika sıcaklık döngü cihazı ile denatüre edildi. Bir başka tüp içerisine; 4µlreaksiyon tamponu, 0,5µlRNaz inhibitör koruyucusu, 2µldeoksinukleotit karışımı, 1µl DTT, 1,1µlreverse transkriptaz enzimi (toplam hacim 8,6µl) pipetlendi ve dikkatlice karıştırıldı. Hazırlanan bu karışım, bir önceki aşamada sekonder yapıları denatüre edilen RNA'yı içeren tüpe aktarılır ve son hacim böylece 20µl olur. Reaksiyonun gerçekleşmesi için tüp, 45°C'de 30 dakika sıcaklık döngü cihazında inkübe edildi. Reverse transkriptaz enzimini inaktive etmek için tüp, 85°C'de 5 dakika sıcaklık döngü cihazında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, reaksiyonu durdurmak için tüpler hızlı bir şekilde buz üzerine alındı ve eş zamanlı PZR analizi için kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

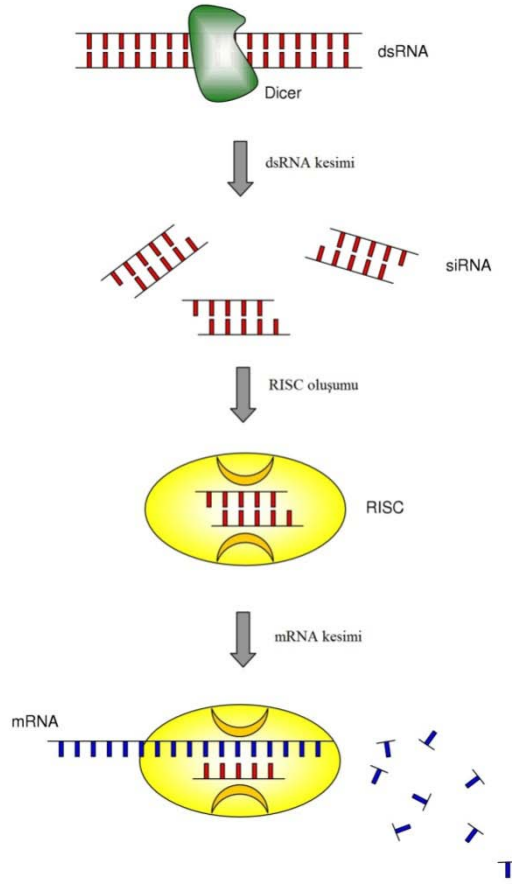
2.2.7.6.Eş Zamanlı PZR Analizinin Yapılması

RealTime ready Human Apoptosis Custom Panel (Roche) ve LightCycler480 Probes Master (Roche) kitleri kullanılarak alınan eş zamanlı PZR sonuçlarının analizi LightCycler 480 yazılımı kullanılarak yapıldı.

2.2.8.RNA İnterferans Prensipli ile Ekspresyonları Artmış Apoptotik Genlerin SusturulmasınınCanlılık Üzerine Etkisi

İnsan genomunun ve birçok model organizmanın dizi analizlerinin belirlenmesi, fonksiyon henüz bilinmeyen çok sayıda geni açığa çıkardığı için, gen susturma için etkili metodlar, fonksiyonel genomik (gen fonksiyonu) alanında dikkat çekici bir artış göstermiştir. Yıllardır çok sayıda gen susturma mekanizması ortaya çıkmıştır ve bunlar temel olarak genlerin kendisi veya onların kodladığı mRNA'ları hedef almaktadır. Doğrudan geni hedef alan bazı istisna teknikler geliştirilmiş olmakla beraber, mRNA hedefli tekniklerde artış olduğu, bu tekniklerle doğrudan bağlantılı olan çoğu tedavi amaçlı çabalardan anlaşılmaktadır. mRNA hedefli bu tekniklerde "antisense stratejileri" çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu antisense stratejileri, tamamen hedef alınan proteini kodlayan mRNA'ya revers komplementer olan bir DNA veya RNA nükleik asit zincirini hücrelere aktarmaya dayanır. Antisense oligonükleotid çalışmaları, son yıllarda gen susturma mekanizması için yüksek derecede etkili bir metod olan RNA interferansın (RNAi) keşfedilmesine yol açmıştır. RNA interferans, uygun çift zincirli RNA'nın hücreye girdiği zaman, endojenik komplementer mRNA dizisinin parçalanmasına yol açan, transkripsiyon sonrası gen susturma mekanizmasıdır (Gündoğdu ve ark., 2009).

RNA interferans, Dicer adı verilen bir RNaz III enzimi tarafından çift zincirli RNA'nın küçük engelleyici RNA'lara (siRNA) kesilmesi ile başlamaktadır. Bu siRNA'lar daha sonra, bir multiprotein-RNA nükleaz kompleksi olan, RNA-indükleyici baskılama kompleksine (RISC) bağlanır. RISC, siRNA'ları komplementer mRNA'yı bulmak için kullanır ve hedef mRNA'yı endonükleolitik olarak keser (Şekil 2.4). Neticede spesifik mRNA'nın azalması, uygun protein(ler)in azalmasına yol açar. RNA interferans doğal bir mekanizma olmakla birlikte *in vitro* olarak sentezlenen siRNA'lar kullanılarak endojenik genlerin ekspresyonu baskılanabilmektedir. Bu yüzden RNA interferans moleküler biyolojide gen fonksiyonu analizinde ve aynı zamanda gen terapisinde geniş bir uygulama alanına sahiptir (Gündoğdu ve ark., 2009).



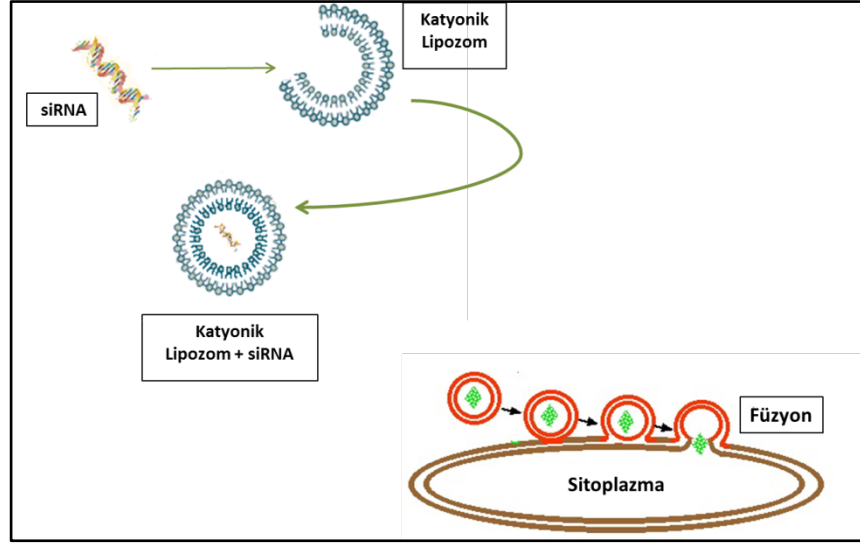
Şekil 2.5.RNA interferansın mekanizması (Mocellin ve ark., 2004)

4-HPR (10 μ M), I3C (100 μ M), ve kombinasyonlarının (10 μ M 4-HPR+100 μ M I3C), insan meme kanser hücre soyları MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde yarattığı ölümün moleküler mekanizması hakkında fikir sahibi olmak için apoptotik genlerin bazılarında (FASLG ve BIK) gözlenen artışın baskılanması ve bu işlemin ardından uygulanan muamele sonrasında hücrelerin canlılığına bakıldı.

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri sayılarak 96 kuyulu platelere 200 μ l içerisinde, 7-8 saat sonrasında dolulukları %50-60 olacak şekilde (3 tekrarlı) ekim yapıldı. 6 saat 37⁰C, %5 CO₂'li ortamda inkübasyonu takiben transfeksiyon işlemine geçildi.

2.2.8.1.Hücrelerin siBIK ve siFASLG ile Lipofectamin-2000 Kullanılarak Transfeksiyonu

Transfeksiyon genel olarak; biyokimyasal ve fiziksel işlemler ile hücrelere yabancı nükleik asitlerin aktarılmasıdır. Ökaryotik hücrelerde gen regülasyonu ve ekspresyonunu çalışmak amacıyla çok çeşitli DNA/RNA aktarım (transfeksiyon) yöntemleri geliştirilmiştir. Bunlardan bazıları kalsiyum fosfat veya diğer divalent katyonlar, polikasyonlar, retroviruslar, mikro-enjeksiyon, ve elektroporasyon gibi yöntemlerin kullanımlarıdır. Bu yöntemlerde karşılaşılan en büyük sorunlardan bazıları hücre toksisitesi, zayıf üreme ve hücrelere yeterli miktar DNA/RNA aktaramamaktır. Transfeksiyon repertuarına önemli bir ilave katyonik lipozom formülasyonlarının kullanımı olmuştur (lipofeksiyon). Kültüre hücrelerde katyonik lipidli ortamlarda DNA/RNA transferi için uygulanan metod; monokasyonik bir lipid ajanın, polikasyonik bir tanesi ile (lipofektamin–DNA'nın ve siRNA'nın hücre içine girmesini sağlayan özel olarak tasarlanmış katyonik lipitlerden biri olan transfeksiyon ajanı) yer değiştirmesi ile geliştirilmiştir (Ciccarone ve ark., 1993; Hawley-Nelson ve ark., 1993). Katyonik lipid ajanlar, sulu çözeltilerde küçük unilamellar lipozomlar oluştururlar. Lipozomların pozitif yükü, nükleik asit ve hücre membranının etkileşimini sağlar. Böylece lipozom/ nükleik asit/hücre membran kompleksi (transfeksiyon kompleksi) oluşur. Bu kompleksler serumlu yada serumuz hücre kültür ortamlarına doğrudan ilave edilebilmektedir. Lipit keseciklerinin hücrelerin zarına teması ile de kesecikler ve dolayısıyla DNA/RNA molekülleri hücre içine aktarılmaktadır (Şekil 2.5).



Şekil 2.6.Kationik lipozoların negatif yüklü siRNA molekülleri ile etkileşimi ve ardından hücre içerisine alınımı

Lipozomlar ile hem *in vitro* hem de *in vivo* ortamlara başarılı bir şekilde DNA/RNA, ribonükleoprotein partikülleri ve protein transferi yapılabilmekte ve 150µg/ml'ye kadar hücreler için toksik olmadığı bildirilmektedir.

2.2.8.1.1.Çözeltiler

siFASL (Qiagen, #SI00013398, Gen aksesyon numarası: NM_000639)

siBIK (Qiagen, #SI00023317, Gen aksesyon numarası: NM_001197)

Hedefi olmayan siRNA (Dharmacon, #D001810-10-05)

Lipofectamine 2000 (Life Technologies)

Opti-MEM(Life Technologies)

WST-1 (Roche, Mannheim, Germany)

2.2.8.1.2.Transfeksiyon İşleminin Yapılması

6 saat inkübasyon sonunda transfeksiyon çözeltilisini hazırlamak üzere, iki hücre soyu ve 4 adet ilaç uygulaması (0µM, 10µM 4-HPR, 100µM I3C, ve 10µM 4-HPR ile 100µM I3C kombinasyonu) için optimize bir hesap yapıldı. Buna göre, 4 adet falkon içerisine 340µl Opti-MEM pipetlendi. Bu falkonların ikili gruplarının bir tanesine 10µl lipofectamin 2000 diğerine ise 10µl ya siBIK (0,5µg) ya da siFASLG (0,5µg) pipetlendi. Hedefi olmayan siRNA ve negatif kontrol için ise yine 4 adet falkon içerisine

240µl Opti-MEM pipetlendi. Bu falkonların ikili gruplarının bir tanesine 7,2µl lipofectamin 2000 diğerine ise 7,2µl ya siBIK (0,5µg) ya da siFASLG (0,5µg) pipetlendi. Lipofectamin 2000 çözeltilerinin Opti-MEM içerisine pipetlenmesinden 5 dakika sonra, transfeksiyon kompleksinin oluşumu için ikili grupların her biri, bir diğeriyle birleştirildi ve falkonlar 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Bu süre boyunca 96 kuyulu platelerdeki hücreleri zedelemeyen üzerlerindeki besiyeri uzaklaştırıldı. Süre bitiminde, hazırlanan bu transfeksiyon çözeltisinden kuyulara 50µl pipetlendi ve hücrelerin transfekte olması için 18 saat inkübasyona bırakıldı.

2.2.8.1.3. Transfekte Hücrelerin Bileşikler ile Muamele Edilmesi

18 saat inkübasyon sonrasında, 96 kuyulu platelerdeki transfekte hücrelerin üzerindeki transfeksiyon çözeltisi uzaklaştırıldı. 4-HPR bileşiğinin 10µM, I3C bileşiğinin 100µM ve bu bileşiklerin kombinasyonları (10µM 4-HPR+100µM I3C) 50µl içerisinde olacak şekilde hücrelerin üzerlerine uygulandı. Negatif kontrol kuyularına ise 50µl taze besiyeri ilave edildi. İlaç uygulamalarını takiben hücreler 48 saat 37°C, %5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakıldı.

2.2.8.1.4. Bileşikler ile Muamele Edilmiş Transfekte Hücrelerin WST-1 Testi ile Canlılığının Belirlenmesi

48 saat inkübasyon sonrasında, 96 kuyulu platelerdeki hücrelerin üzerindeki bileşikler uzaklaştırıldı ve çalışma prensibi MTT ile benzer olan WST-1 çözeltisinden 50µl, 1:10 oranında olacak şekilde, her kuyuya eklendi ve 2 saat 37°C, %5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Oluşan renk şiddeti, spektrofotometre ile 450nm'de okundu ve % canlılık hesabı yapıldı.

% Canlılık hesabı:

İlaç uygulanmamış kontrol hücre (MO) canlılığı %100 olarak kabul edilerek, ilaç uygulanan hücrelerin canlılık oranları aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

$$\% \text{Canlılık} = \frac{100 \times (\text{Bileşik ile muamele edilen hücre absorbansı ortalaması} - \text{kör ortalaması})}{(\text{Kontrol hücre absorbansı ortalaması} - \text{kör ortalaması})}$$
 olarak hesaplandı.

2.2.9. Western Blot Analizi

Western Blot analizi hücrelerden elde edilen bir protein karışımında, aranan (hedef)proteinin varlığını göstermek ve molekül ağırlığını belirlemek amacıyla kullanılan özel bir protein-protein hibridizasyon tekniğidir. İmmüno-blotlama olarak da adlandırılan tekniğin uygulanabilmesi için öncelikle hedef proteini tanıyarak ona bağlanabilen bir antikor mevcut olmalıdır. Western blotlama temel olarak üç aşamada gerçekleştirilir:

- i. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) yöntemiyle örnek karışımında bulunan proteinlerin jel üzerinde birbirlerinden ayrılması sağlanır.
- ii. Jelde büyüklüklerine göre ayrılarak bantlar oluşturan protein molekülleri, elektrotransfer tekniği ile nitroselüloz membrana aktarılırlar.
- iii. Membranın sırasıyla, hedef proteine özgü antikor, bu antikoru tanıyan ve yapısına enzim ilave edilmiş ikincil bir antikor ve son olarak söz konusu enzimin substratı ile muamelesi sonucunda meydana gelen ışık aracılığı ile hedef proteinin membran üzerinde görüntülenmesi sağlanır.

Proteinlerin saflığının kontrolü ve moleküler ağırlıklarının saptanması amacıyla kullanılan SDS-PAGE yöntemi Western Blot analizinin ilk aşamasını oluşturur. Elektrik akımı etkisiyle proteinlerin büyüklüklerine göre ayrılmasını sağlayan ortam akrilamid ve N-N'-metilen bis-akrilamid monomerlerinin polimerleşmesiyle oluşan jel matriksidir. Poliakrilamid jel matriksi farklı büyüklükte kanallar (porlar) içerdiğinden denatüre protein karışımı jele yüklenip elektrofrez uygulandığında, proteinlerin bu kanallardan geçiş hızı tamamen büyüklüklerine bağlıdır. Küçük proteinler jelde hızlı, büyük proteinler ise yavaş ilerler. SDS-PAGE yöntemi ile ayrılmak istenilen proteinlerin sadece büyüklüklerine göre ayırımını sağlamak için önce ısı ile denatüre edilmeleri ve sonra Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) ile muamele edilmeleri gereklidir. Anyonik bir deterjan olan SDS, proteinlere bağlanıp negatif yüklü hale getirerek lineer forma dönüşmelerini sağlar. SDS sayesinde negatif yük ile yüklenen proteinler elektrofrez sırasında anoda göçerler. Elektrofrez işlemi tamamlandığında farklı büyüklükteki proteinler jel boyunca ilerlerken ayrılarak farklı protein bantları halinde odaklanırlar. SDS-PAGE işleminden sonra jeldeki protein bantlarının

görüntülenmesi için kemiluminesans prensibinden yararlanır. Akrilamid ve bisakrilamid oranı jelin ayrıştırma kapasitesini belirler. Boyutları ayarlanabilen gözenekli yapıları nedeniyle proteinleri molekül ağırlıkları veya kütleleri ile orantılı olarak moleküllerin göçünü yavaşlatan bir ‘moleküler elek’ olarak davranır. Bu nedenle ayırım hem moleküler eleme hem de elektroforetik mobilite temeline dayanmaktadır. Düşük derişimde hazırlanan jellerin gözenekleri daha büyük olup, büyük molekül ağırlıklı biyomoleküllerin ayırımında kullanılırlar (Coşkun-Arı, 2003).

MDA-MB-231 ve MCF-7 insan meme kanseri hücre soyları yeterli miktarda üretildikten sonra ilaç uygulaması için 75cm²’lik flasklara ekim yapıldı. Hücreler %70-80 doluluk oranına ulaştıklarında 1. flask negatif kontrol, 2. flask 4-HPR (10µM), 3. flask I3C (100µM), 4. flask 4-HPR (10µM) + I3C (100µM), 5. flask paklitaksel (3,21µM) olmak üzere ilaç uygulandı. 37°C’de %5 CO₂’li ortamda 30 saatlik inkübasyon süresinin sonunda protein izolasyonu aşamasına geçildi.

2.2.9.1. Protein İzolasyonu

2.2.9.1.1. Çözeltiler

Lizis tamponu: 3ml lizis tamponu (RIPA lysis buffer, Santa Cruz, ABD) için 30µl 200mM PMSF (Santa Cruz, ABD), 30µl 100mM sodyum ortovanadat (Santa Cruz, ABD), 45µl proteaz inhibitör kokteyl (Santa Cruz, ABD) eklendi. Solüsyon karanlıkta hazırlandı.

Bu aşamada, ilaç uygulanan flaskların süpernatantları, buz üzerinde tutulan 15ml’lik falkonlara toplandı ve negatif kontrol flaskının süpernatantı uzaklaştırıldı. Flasklara 10ml soğuk PBS ilave edilip hücreler ‘scraper’ (Corning) ile kaldırıldı ve ilgili falkonlara aktarıldı. Süspansiyon +4°C’de 1000g’de 5 dakika santrifüj (Hettich Zentrifugen, Almanya) edildi. Santrifüj sonrası falkonların süpernatantları uzaklaştırıldı ve pelet üzerine 0,5ml lizis tamponu pipetlendi. Falkonlar, karanlıkta 30 dakika buz üzerinde bekletildi ve bu esnada 10 dakikada bir pipetaj yapılarak karıştırıldı. Süre bitiminde solüsyonlar 1,5ml’lik tüplere aktarıldı ve +4°C’de 10,000g’de 10 dakika santrifüj edildi (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). Süpernatantları 0,5ml’lik tüplere toplandı ve protein miktarları ölçüldü.

2.2.9.2. Proteinlerin BCA Yöntemi ile Konsantrasyonlarının Ölçülmesi

2.2.9.2.1. Çözeltiler

Bicinchoninic Acid Kit (Sigma-Aldrich)

Bovine Serum Albumin (BSA, Amresco) Standardı

2.2.9.2.2. BSA Standartlarının Hazırlanması

BCA ile protein miktarlarını ölçebilmek için sığır serum albumin (BSA) proteininin değişik konsantrasyonları ultrasaf dH₂O ile hazırlanarak bir standart eğri grafiği çizildi. ml'inde 1, 0,8, 0,6, 0,4, 0,2mg BSA bulunan standartlar hazırlandı.

2.2.9.2.3. BCA Ölçümünün Yapılması

Biçinkoninik asit (BCA) protein tayin yönteminde bakır sülfat, BCA solüsyonuna eklendiğinde oluşan kompleks elma yeşili bir renk alır. Bu solüsyon, protein solüsyonuna ilave edildiğinde, proteinin peptit bağları ile etkileşir ve Cu⁺⁺ iyonları Cu⁺ iyonlarına dönüşür. Neticesinde kompleksin rengini mora çevirir. Bu yöntem hızlı, hassas ve kesindir ancak deterjan ve organik solventlerle etkileşimlerine dikkat etmek gerekmektedir.

Ölçüm için Biçinkoninik Asit Kit (Sigma-Aldrich) ve 96 kuyuluk plate (Orange Scientific) kullanıldı. Her bir kuyuya 0, 20, 40, 60, 80 ve 100µl standart ve 10µl konsantrasyon bilinmeyen örnekler pipetlendi. Konsantrasyonu bilinmeyen örnekler 10 kere ultrasaf dH₂O ile seyreltilerek ölçüm yapıldı, bu nedenle 10µl örnekler 90µl, standartlar ise 100µl'ye tamamlanacak şekilde ultrasaf dH₂O ile tamamlandı ve bu seyreltme katsayısı, hesaplamalarda dikkate alındı. Kuyuların üzerine 200µl çalışma ayırıcı pipetlendi ve plate 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda oluşan renk şiddeti, spektrofotometrede 570nm'de (FLASHScan S12, Jena, Almanya) okundu.

2.2.9.3. Western Blot Yöntemi ile Proteinlerin Nitroselüloz Membrana Aktarılması

2.2.9.3.1. Çözeltiler

MES SDS Running Buffer (Nu-PAGE, 20X, İnvitrogen): 30ml Running buffer, 570 ml ultra saf H₂O ile tamamlandı.

Nu-PAGELDS Sample Buffer (4X, İnvitrogen)

Nu-PAGESample Reducing Agent (10X, İnvitrogen)

Nu-PAGEAntioksidant (İnvitrogen)

Kaleidoscope Prestained Standarts (Biorad)

%4-12 gradient, NuPAGE Bis-Tris Mini Gels, 1mm, 12 kuyucuk (İnvitrogen)

10X pH:7,6 TBS-T (Tris-Buffer Saline-Tween20):Tris base 24,23g NaCl (Merck)

80,06g(Scharlau) ve 5ml Tween20 (Dako) 1L ultrasaf H₂O ile çözüldü.

Western Breeze Chemiluminescent Immunodetection System, Rabbit (Invitrogen)

Chemiluminescent Detection Kit, Mouse (Amersham)

2.2.9.3.2. Proteinlerin Yüklenmesi ve Jelde Yürütülmesi

Örnekler istenen hacimlerde toplam protein miktarı 50µg (BCA yöntemiyle belirlenen) ve sample buffer ve reducing agent 1X olacak şekilde 0,5ml'lik tüplere pipetlendi. Ardından tüpler su banyosunda bekletildi. Bu esnada jel, elektroforez tankına yerleştirildikten sonra SDS running buffer, doluluk sınırına kadar eklendi. Hazır jelde bulunan koruma sıvısı pipet yardımıyla al-ver yapılarak uzaklaştırıldıktan sonra 500µl antioksidan eklendi. Marker, yüklenmeden önce 40⁰C' de 1 dakika bekletildi. Daha sonra marker (5µl) ve örnekler kuyulara pipet yardımıyla belirlenen miktarlarda yüklendi. Yükleme işlemi sonunda 60 dakika 150V yürütme yapıldı.

2.2.9.3.3. Proteinlerin Transferi

Transfer işlemi için I-Blot jel transfer cihazına (İnvitrogen) sırasıyla anot bakır (+), jel, filtre kağıdı (ultra saf H₂O ile ıslatılır), katot bakır (-) ve sünger yerleştirildi. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda 8 dakika transfer işlemi gerçekleştirildi.

2.2.9.3.4.Bloklama

β -Aktin için, TBS-T içerisinde %5'lik süt (Santa Cruz) çözeltisi hazırlandı ve 30 dakika oda sıcaklığında, çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Süre sonunda, 3defa 1,5 dakika ve ardından 1 defa 10 dakika TBS-T ile yıkama yapıldı. Bu yıkama işlemi üç defa yapıldı.

PARP için, kitin içerisinde yer alan 4ml Blocker Part A ve 2ml Blocker Part B 14ml ultrasaf H₂O ile tamamlanarak bloklama çözeltisi hazırlandı. 30 dakika oda sıcaklığında, çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi.Süre sonunda, 2defa 5 dakika 20ml ultrasaf H₂O ile yıkama yapıldı.

2.2.9.3.5.Birincil Antikor

Anti-Aktin antikorunu (Santa Cruz), 1:1000 olacak şekilde 1%'lik süt çözeltisi içerisinde hazırlandı ve 18 saat +4⁰C'de çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, 3 defa 1,5 dakika ve ardından 1 defa 10 dakika TBS-T ile yıkama yapıldı. Bu yıkama işlemi üç defa yapıldı.

Anti-PARP antikorunu (Cell Signalling),1:1000 olacak şekilde bloklamaçözeltisi içerisindehazırlandı ve 18 saat +4⁰C'de çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı.Süre sonunda 4 defa 5 dakika, kitin içerisinde yer alan 20 ml yıkama çözeltisi (1X) ile yıkama yapıldı.

2.2.9.3.6.İkincil Antikor

β -Aktin için, Anti-Mouse (Amersham Biosciences)1:5000 olacak şekilde 1%'lik süt çözeltisi içerisinde hazırlandı veçalkalayıcıda 60 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, 3 defa 1,5 dakika ve ardından 1 defa 10 dakika TBS-T ile yıkama yapıldı. Bu yıkama işlemi üç defa yapıldı.

PARP için, Anti-Rabbit(Invitrogen)1:5000 olacak şekilde bloklamaçözeltisi içerisindehazırlandı veçalkalayıcıda 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonund 4 defa 5 dakika,kitin içerisinde yer alan 20ml yıkama çözeltisi (1X) ile yıkama yapıldı.

2.2.9.3.7.PARP/Aktin Proteinlerinin Belirlenmesi

Bu yöntem ile SDS-PAGE ile protein bantları halinde ayrılmış olan lizatlar elektrik akımı ile bir membrana aktarıldı. Membrana aktarılmış proteinlerden araştırılmak istenene karşı antikorlar ve anti-antikorlar ile bir deteksiyon yapıldı. Bu deteksiyon ile ilgilenilen protein tespit edildi.

2.2.9.3.7.1.Karanlık Oda İşlemleri

Nitroselüloz üzerine transfer edilmiş olan proteinler karanlık odada, kemiluminesans kit (β -Actin için Amersham, PARP için Invitrogen) kullanılarak oluşan ışımaya X-ray filmlere aktarıldı. Kemiluminesans kit protokolünde belirtildiği gibi, bu kitin iki bileşeninden 1:1 (β -Actin), 1:20 (PARP) oranında alınarak her bir membran için 2,5ml kullanıldı ve membran bu solüsyon ile iyice ıslatıldı. Ardından 5 dakika bekletildi. Membranın altına üstüne asetat film konuldu. Asetatların üzerinde sıvı kalmamasına dikkat edilerek bir X-ray film kasetine yerleştirildi. X-ray film ile 1, 5, 10,ve 30 dakika sürelerle membran ile film bekletildi. Bu süreler sonunda filmler, karanlık odada film banyo makinesinde basılarak bant görüntüleri elde edildi.

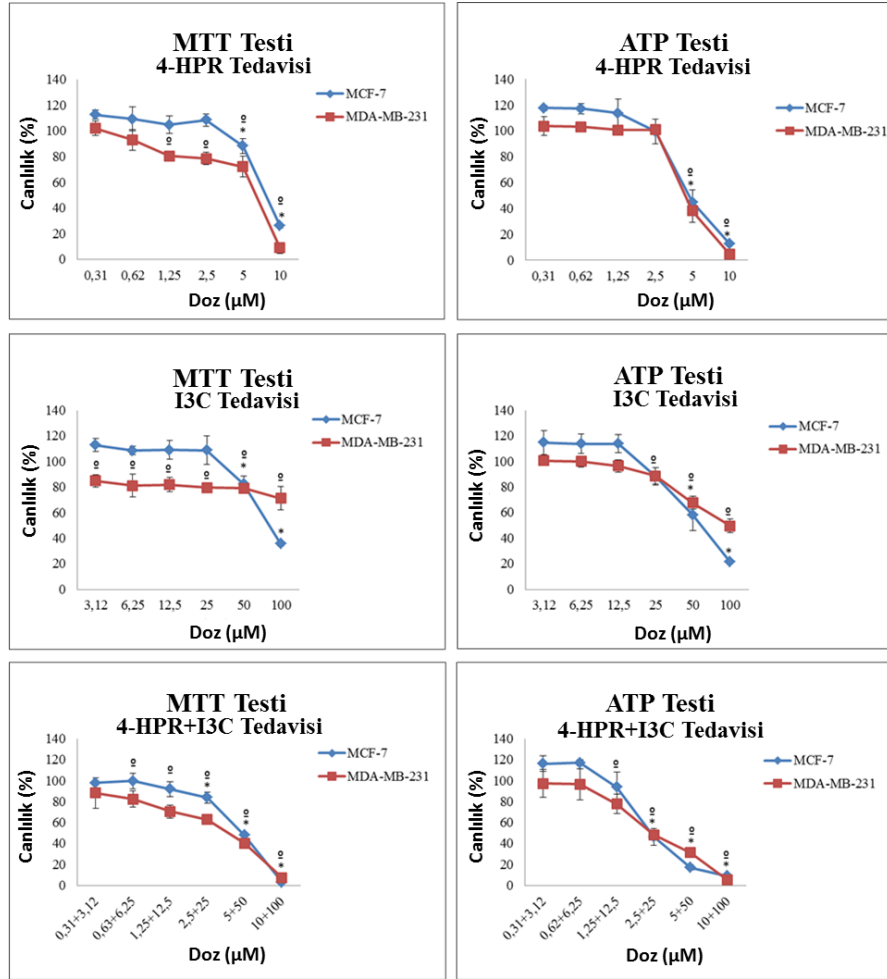
2.2.10.İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel analizler SPSS 20.0 bilgisayar paket programı kullanılarak yapıldı. Yüzde canlılık değerleri tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak hesaplandı. 3 tekrarlı yapılan tüm analizlerin sonuçları ortalama ve standart sapma ile verildi. İstatistiksel olarak anlamlı veriler $p < 0.05$ değerine göre belirlendi. IC_{50} ve CI(combination index) değerleri, CalcuSyn Version 2.1 (Biosoft, Cambridge, U.K.) yazılımı kullanılarak hesaplandı.

3.BULGULAR

3.1.MTT ve ATP Canlılık Testi Bulguları

4-HPR, I3C ve bu bileşiklerin kombinasyonlarının 1:2 dilüe altı farklı konsantrasyonunun (4-HPR için 0,31-10 μ M ve I3C için 3,12-100 μ M) MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soylarının canlılığı üzerine olan etkisini belirleyebilmek için MTT ve ATP canlılık testleri yapıldı. Hücre soylarına 48 saat süre ile söz konusu bileşikler uygulandığında ortaya çıkan sonuçlar Şekil 3.1’de gösterildi. Bileşiklerin uygulandığı hücre soylarında konsantrasyon arttıkça hücrelerin canlılık yüzdesinde, uygulanan konsantrasyonlarda, istatistiksel olarak anlamlı azalmalar gözlemlendi ($p < 0.05$).



Şekil 3.1.4-HPR, I3C, ve bu bileşiklerin kombinasyonları ile muamele edilen MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin canlılık yüzdesinin grafiği. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyunun ortalamasını temsil etmektedir.

* Aynı doz içinde hücre soyları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ($p < 0.05$) ifade etmektedir.

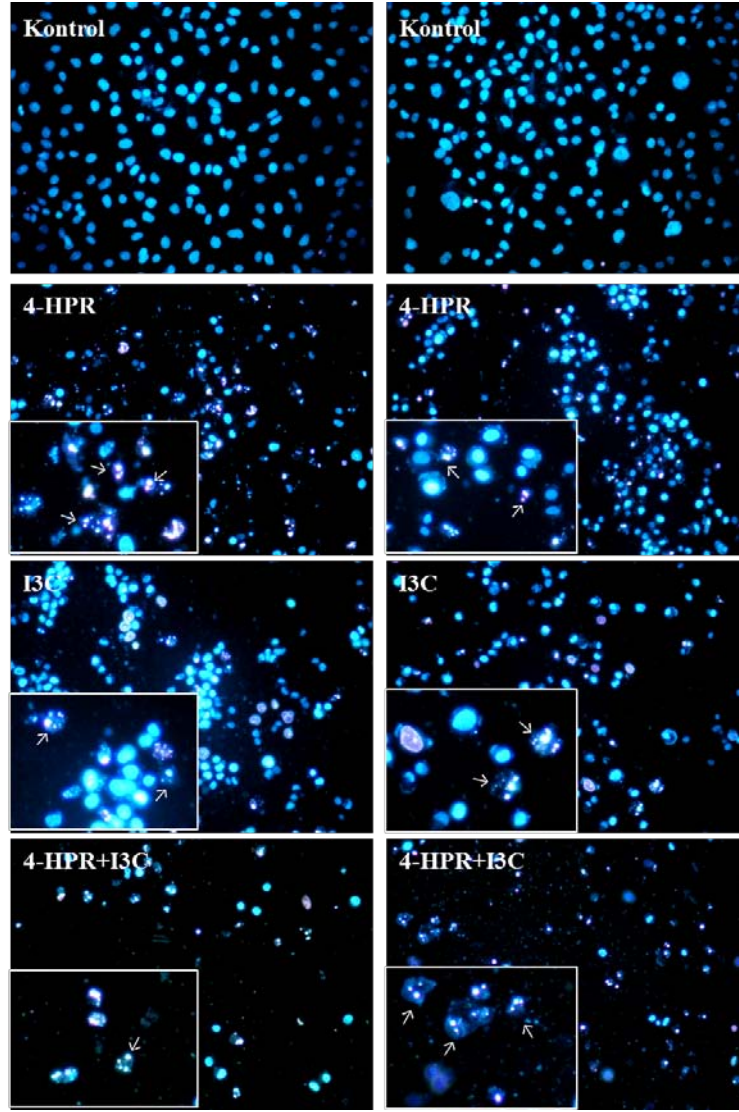
° Aynı doz içinde hücre soyları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ($p < 0.05$) ifade etmektedir.

MTT ve ATP testleri arasında dozlaraverilen yanıt açısından büyük bir farklılık gözlenmemiştir. Bileşiklerin sitotoksik aktivitesinin gösterilmesinde önemli olan IC_{50} (kontrol hücrelerine kıyasla bileşik ile muamele sonrası hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyon) değerleri her iki hücre hattı için de ATP testi sonuçlarına göre CalcuSyn yazılımı ile hesaplandı. Her iki hücre soyunda uygulanan 4-HPR ve I3C kombinasyonunun IC_{50} değerlerindeki CI (combination index) değerleri yine CalcuSyn yazılımı kullanılarak belirlendi. CI değeri 1'den az hesaplanırsa ($CI < 1$) sinerjistik, 1'den fazla hesaplanırsa ($CI > 1$) antagonistik, ve 1'e eşit hesaplanırsa ($CI = 1$) additif etkiyi göstermektedir. IC_{50} değerlerindeki CI değerlerinden yola çıkarak, kombinasyon muamelesinin yalnızca MDA-MB-231 hücreleri için sinerjistik etki gösterdiği bulunmuştur (MCF-7 için CI değeri 1,01 iken MDA-MB-231 için 0,83 bulundu). MCF-7 hücrelerinde IC_{50} dozu; 4-HPR için $7,45 \mu M$, I3C için $63,2 \mu M$ ve kombinasyon için $3,45 + 34,5 \mu M$ olarak bulundu. MDA-MB-231 hücrelerinde IC_{50} dozu; 4-HPR için $5,28 \mu M$, I3C için $100,1 \mu M$ ve kombinasyon için $2,85 + 28,5 \mu M$ olarak bulundu.

3.2. Hoechst 33342, Propidium İyodür (PI) ile İkili Boyama Yöntemi Bulguları

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerine 4-HPR'nin $10 \mu M$, I3C'nin $100 \mu M$ ve bunların kombine konsantrasyonları uygulandı. 48 saat ila 72 saat uygulamasını takiben ikili boyama yöntemi uygulanarak floresan mikroskopta değerlendirme yapıldı.

4-HPR ve I3C muameleleri sonucunda, Hoechst 33342 boyası ile her iki hücre soyunda gözlenen nükleer fragmentasyon varlığı ve/veya piknozis, aynı bölgeler için propidyum iyodür ile boyama sonucunda pozitif görüldüğünden, hücrelerin ölüm şeklinin geç apoptoz = sekonder nekrozis olduğu bulundu (Şekil 3.2). Kombinasyon ile muamele edilen hücrelerin ölüm şeklinin ise, bileşiklerin yalnız başına uygulanmasıyla gözlenen ölüm şekline benzer olduğu görüldü. Ayrıca, sitotoksikite bulgularına paralel olarak kombinasyon muamelesinin, 4-HPR ve I3C'nin tek başlarına kullanımına kıyasla, hücre yoğunluğunun daha fazla azalmasına sebep olduğu bulundu.

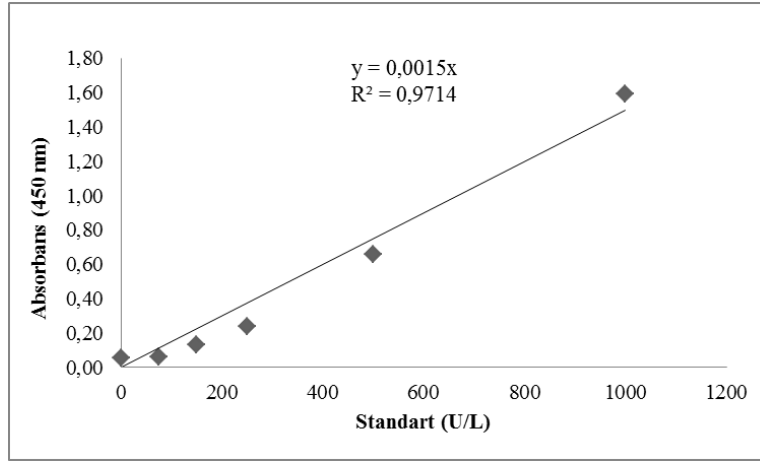


Şekil 3.2. $10\mu\text{M}$ 4-HPR, $100\mu\text{M}$ I3C ve $10\mu\text{M}$ 4-HPR + $100\mu\text{M}$ I3C uygulanan MCF-7 (sol sütun) ve MDA-MB-231 (sağ sütun) hücrelerinin 48 saatlik muamele sonrasındaki floresan mikroskop görüntüleri

→ Hücre ölüm şekli olarak apoptozisi temsil eden piknotik ve fragmente nükleus varlığını göstermektedir.

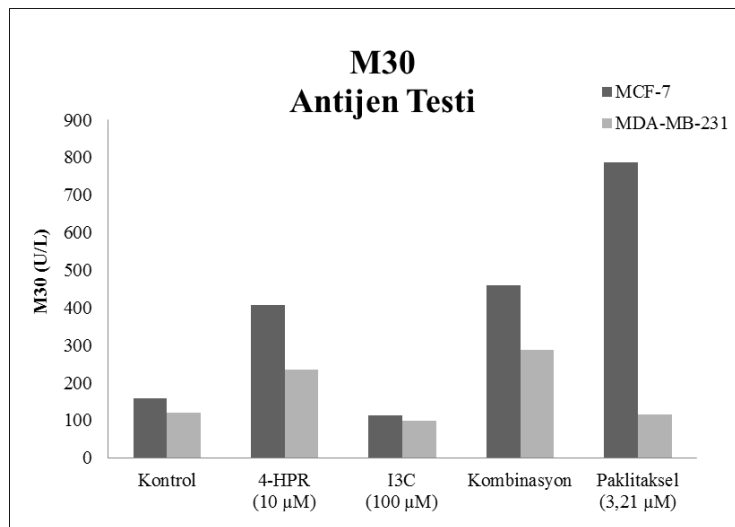
3.3.M30-Antijen (Kaspazla Kırılmış Sitokeratin 18) Bulguları

M30-Antijen ölçümlerinin değerlendirilmesi için standart eğri grafiği hazırlandı (Şekil 3.3) ve ölçülen absorbanlar formül üzerinden değerlendirilerek M30 miktarları U/L cinsinden hesaplandı (Şekil 3.4).



Şekil 3.3.M30-Antijen standart eğri grafiği

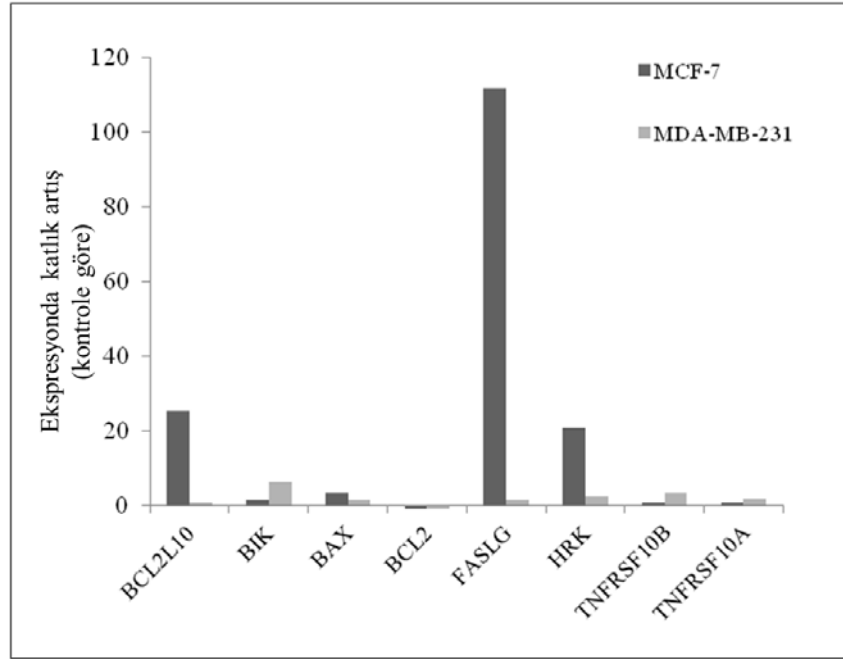
Şekil 3.4’de, 10µM 4-HPR, 100µM I3C, kombinasyon (10µM 4-HPR + 100µM I3C), ve 3,21µM Paklitaksel muamelelerinin 48saatte MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soylarında, bir apoptozis belirteci olan kaspazla-kırılmış sitokeratin 18 (M30-Antijen) üzerine olan etkisi gösterilmektedir. MCF-7 hücrelerinde 10µM 4-HPR’nin kontrole göre 48. saat M30 antijen seviyesinde 4-katlık bir artışa, kombinasyon muamelesinin 4-4,5-katlık, Paklitaksel’in ise 7-7,5-katlık bir artışa neden olduğu buna karşın 100µM I3C muamelesinde herhangi bir değişimin olmadığı belirlendi. MDA-MB-231 hücrelerinde ise, M30 antijen düzeyleri açısından tüm muamelelerden sonra herhangi bir değişim gözlenmedi.



Şekil 3.4.10µM 4-HPR, 100µM I3C, kombinasyon (10µM 4-HPR + 100µM I3C), ve 3,21µM Paklitaksel muamelelerinin 48 saatte MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soylarında kaspazla-kırılmış sitokeratin 18 (M30-Antijen) üzerine etkisi

3.4. Apoptotik Genlerin Ekspresyon Profilleri

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soylarında gözlenen apoptozisi gen düzeyinde doğrulamak amacıyla, 16 saatlik kombinasyon ($10\mu\text{M}$ 4-HPR + $100\mu\text{M}$ I3C) muamelesinin, bazı apoptotik genlerin (BCL2L10, BIK, BAX, BCL-2, FASLG, HRK, TNFRSF10B, TNFRSF10A) ekspresyonları üzerine olan etkisine bakıldı. Şekil 3.5'te gösterildiği üzere, FASLG (FAS isimli bir hücre yüzey ölüm reseptörünün ligandı) ekspresyonunun MCF-7 hücrelerinde yaklaşık 100-kat arttığı bulundu. HRK (pro-apoptotik bir gen) ve bunlara karşın BCL2L10 (anti-apoptotik) ekspresyonlarının da yine bu hücre soyunda arttığı görüldü. MDA-MB-231 hücrelerinde ise, BIK ekspresyonunun 8-katlık, TNFRSF10A (DR4 veya TRAIL-R1) ve TNFRSF10B (DR5 veya TRAIL-R2) ekspresyonlarının da sırasıyla 2 ve 3-katlık artışları bulundu.

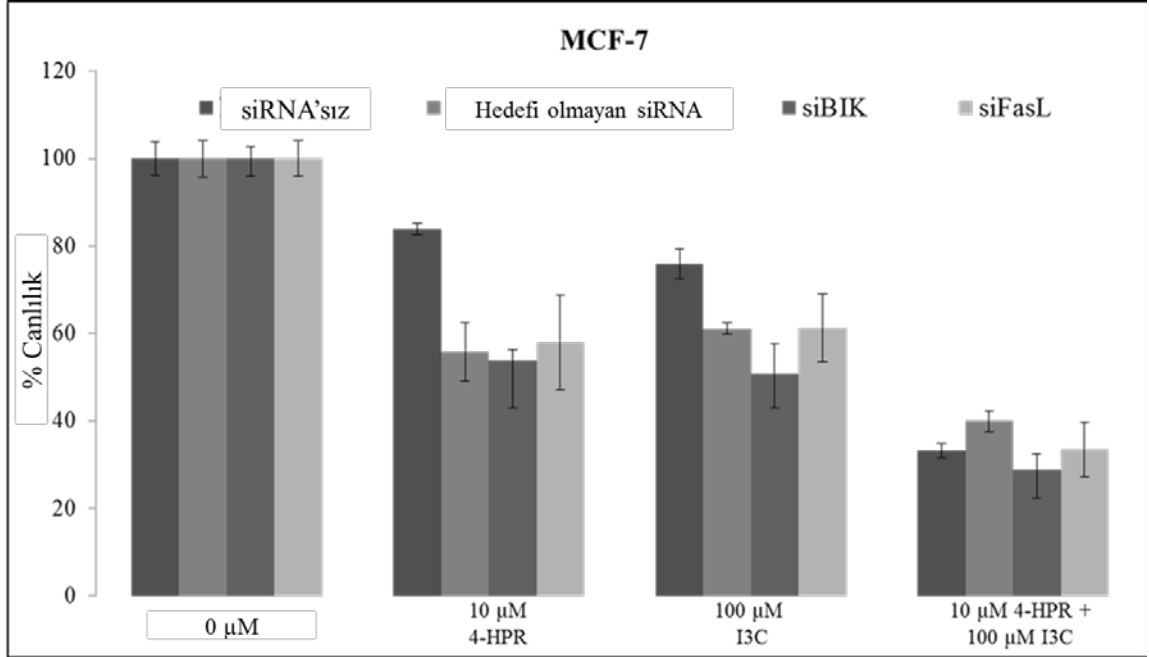


Şekil 3.5. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soylarında 16 saatlik kombinasyon ($10\mu\text{M}$ 4-HPR + $100\mu\text{M}$ I3C) muamelesinin, bazı apoptotik genlerin ekspresyonları üzerine olan etkisinin gösterimi

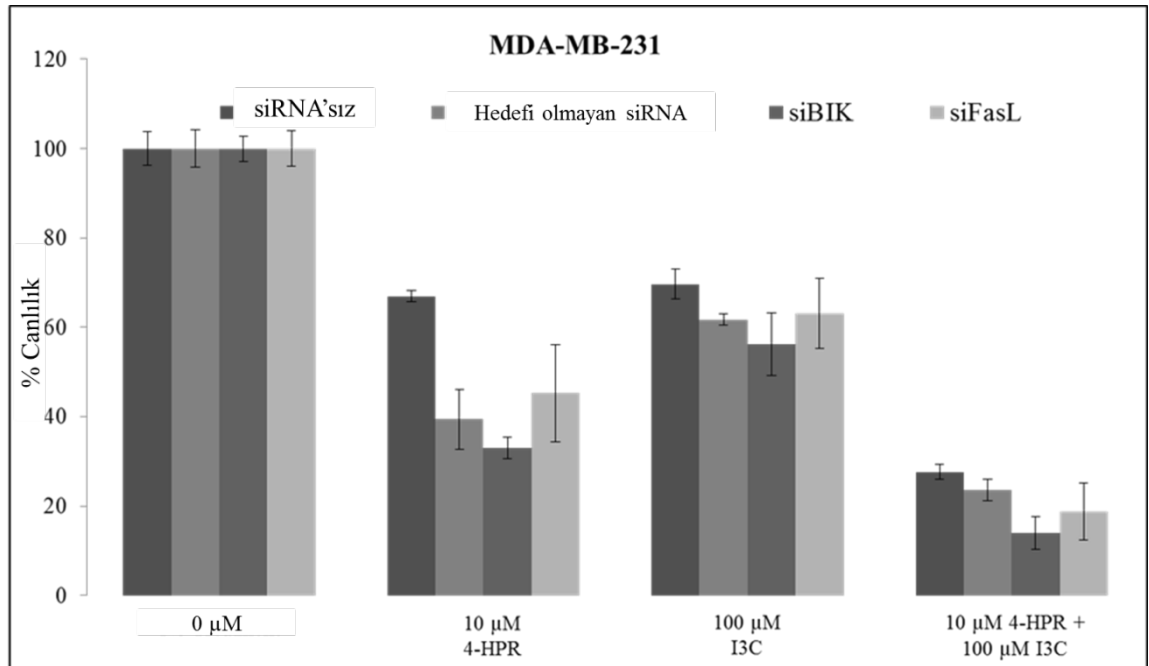
3.5. Apoptotik Genlerin Susturulmasının Canlılık Üzerine Etkisi

MCF-7 hücrelerinde FASLG'nin, MDA-MB-231 hücrelerinde ise BIK'in kontrol grubuna kıyasla artmış ekspresyonlarının, bu genlere özgül siRNA'ların kullanılarak baskılanmasının Şekil 3.6 ve Şekil 3.7'de gösterildiği üzere, hücre canlılıklarını etkilemediği belirlendi. İki hücre soyunda da, ilaç uygulanan gruplara bakıldığında, siRNA'lar (siBIK ve siFASLG) ile transfekte edilen hücrelerde canlılığın, transfekte

edilmeyen hücrelerin canlılığına benzer olduğu bulundu. Ayrıca 48 saatlik muamele sonunda ilaç uygulamalarının, MTT ve ATP testi bulguları ile uyumlu olduğu gözlemlendi. Yani, her iki hücre soyunda da kombinasyon muamelesinin, bileşiklerin tek başına uygulanmasına kıyasla daha etkili olduğu bulundu.



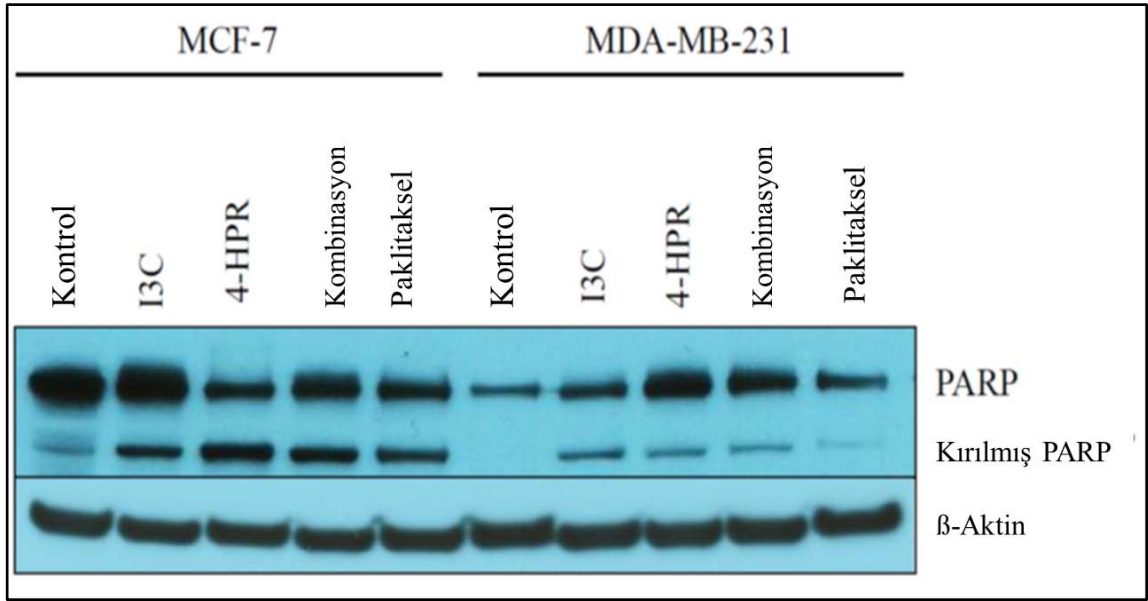
Şekil 3.6. siBIK ve siFASLG ile transfekte edilen MCF-7 hücre soyunun, 10μM 4-HPR, 100μM I3C, ve kombinasyon (10μM 4-HPR + 100μM I3C) muameleleri sonrası % canlılığının gösterimi



Şekil 3.7. siBIK ve siFASLG ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücre soyununun, 10µM 4-HPR, 100µM I3C, ve kombinasyon (10µM 4-HPR + 100µM I3C) muameleleri sonrası % canlılığının gösterimi

3.6. Western Blot Bulguları

Western blot analizi, 50µg protein lizatı ve kontrol olarak da anti aktin antikorları kullanılarak gerçekleştirildi. Paklitaksel, PARP-kırılması için pozitif kontrol olarak kullanıldı. Yapılan deney sonucunda; 4-HPR, I3C, ve kombinasyon muameleleriyle her iki hücre soyunda PARP'ın kırıldığı bulundu (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Anti aktin ve anti PARP antikorları ile yapılan western blot sonucu bant profilleri

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, yalnız başlarına kullanımlarına kıyasla daha güçlü bir etki yaratmak amacıyla 4-HPR ve I3C kombinasyonunun sitotoksik aktivitesi çalışılmıştır. Çalışmalar neticesinde, kombinasyon muamelesinin artmış bir sitotoksik aktivite ile sonuçlandığı gösterilmiştir ve literatürde bu bileşenlerin kombine halde kullanılması ile ilişkili bir çalışma bulunmamaktadır. Bu açıdan bakılacak olursa, bu çalışma, söz konusu bileşenlerle yapılan kombinasyon muamelesinin daha iyi bir sitotoksik aktiviteye yol açtığını gösteren ilk çalışmadır. Çalışmanın bir diğer yararlı sonucu ise, bileşiklerin daha düşük konsantrasyonlardaki kombinasyonunun dahi hücre ölümünü indükleyebilmesidir. Bu konu, kemoterapötiklerin sebep olduğu yan etkilerden ötürü kanser tedavisinde önemli bir konudur. Örneğin 4-HPR, kemopreventif/kemoterapötik bir ajan olmasına karşın, hastalara uygulandığı takdirde toksik olabilmektedir. Meme kanserli hastalar üzerinde beş yıl süre ile yapılan; plasebo kontrollü randomize çift-körlü adjuvant klinik çalışmada, 426 hasta tamoksifen ve tamoksifen ile fenretinid kombinasyonu ile muamele edilmiştir (Rao ve ark., 2011). Sonuçta 4-HPR'nin meme kanseri hastalarında 3/4 derecelik toksisiteye neden olduğu rapor edilmiştir. Bu problemin çözümü için, 4-HPR'nin dozunda bir seyreltme yapılması düşünülmüştür. Bu çalışmada, 4-HPR'nin azalan fakat I3C ile kombine dozlarında etkinlik anlamlı bulunmuştur. Bu kapsamda en önemli sonuçlardan bir tanesi, düşük dozların kombine halde etkisidir. Örneğin, 5µM 4-HPR, 50µM I3C ile kombine edildiğinde, sitotoksik aktivite 2-3 kat artmaktadır. Bu sonuç, özellikle klinik göz önüne alındığında önem teşkil edebilir.

I3C'nin çeşitli kanser hücre soylarının büyümelerini baskıladığını ve meme kanserinde de bu durum rapor edilmiştir (Rahman ve ark., 2003). Araştırmacılar daha sonra I3C'nin tümörijenik olmayan hücrelere zarar vermediğini fakat tümörijenik hücrelerde apoptozisi indüklediğini göstermişlerdir. Yine meme kanseri hücre soylarında benzer sonuçlar bildirilmiştir (Howells ve ark., 2002). Bu çalışmada; 4-HPR, I3C, ve kombinasyon muamelelerinin apoptozisle sonuçlandığı gösterilmiştir. Apoptozisin varlığı, bu ölüm şeklinin en iyi bilinen özelliklerinden biri olan nükleer fragmentasyonu gösteren boyama çalışması (ikili boyama yöntemi) ile belirlenmiştir. Apoptozisi indükleyen bileşiklerin, bu süreçte hangi mekanizmaları etkinleştirdiklerinin bilinmesi, elde edilen bilgilerin kliniğe aktarılması/uyarlanması açısından oldukça önemlidir.

(Ulukaya ve ark., 2011). Bu düşünceden yola çıkılarak, kombinasyon tedavisinin indüklediği olası apoptotik mekanizma araştırıldı. Hücre yüzey ölüm reseptör ligandı (FASLG), ekspresyonunun MCF-7 hücre soyunda yaklaşık 100-kat arttığı bulundu. Buna ek olarak, HRK ekspresyonunun da 20-kat arttığı gözlemlendi. İlginç bir şekilde, MDA-MB-231 hücre soyunda, bu iki genin ekspresyonunda herhangi bir değişiklik (artma/azalma) gözlenmedi. Bunun yerine, bu hücre soyunda, BIK (pro-apoptotik bir gen) ekspresyonunun 7-katlık artışı gözlemlendi. Ancak, FASLG ve BIK yukarı-regülasyonunun siRNA'lar ile engellenmesi; 4-HPR, I3C, ve kombinasyonlarının ölüm-indükleyici etkisini restore edememiştir. Dolayısıyla, söz konusu bu iki genin, bu bileşiklerin sitotoksik etkisinde yer almıyor olabileceği düşünülmüştür. Buna ilişkin olarak, diğer bazı genlerin (örneğin DR4, DR5, veya HRK), hücre ölüm mekanizmasında rol alabileceği düşünülmüştür. Öyle ki yapılan bir çalışmada, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soylarında uygulanan Bufalin muamelesi sonrasında, DR4 ve DR5'in yukarı regüle edildiği gösterilmiştir (Yan ve ark., 2012). Benzer şekilde, MDA-MB-231 hücrelerinde, Mitomisin C tedavisinin DR4 ekspresyonunu arttırdığı rapor edilmiştir (Kim ve ark., 2003). Ayrıca Metamfetamin'in (METH), DP5/HRK genlerinin de içinde bulunduğu bir takım genlerin farklı regülasyonları nedeniyle, oligodendrositler üzerine sitotoksik etkisinin olduğu bildirilmiştir (Genc ve ark., 2003). Benzer şekilde bu çalışmada da söz konusu bu genlerin (DR4, DR5, HRK) 2-20 katlık artışlarla yukarı regüle edildikleri bulundu. Bundan dolayı mekanizmanın; MCF-7 hücrelerinde HRK, MDA-MB-231 hücrelerinde ise TNFRSF10A (DR4 veya TRAIL-R1) ve TNFRSF10B (DR5 veya TRAIL-R2) yukarı regülasyonlarını içeriyor olabileceği düşünüldü. Hücre-ölümünü restore edici bir etkinin olmamasının bir diğer nedeni ise, çoklu gen susturulmasının gerekliliğinin olabileceği düşünülmüştür (Sung ve ark., 2007).

I3C'nin apoptozisi her iki hücre soyunda da belirgin şekilde indüklemesine rağmen, IC₅₀ değerlerinin yüksek olduğu düşünülmüştür. Bu çalışmada, IC₅₀ değerleri MCF-7 hücre soyu için 65 µM, MDA-MB-231 hücre soyu için ise 100,1 µM bulunmuştur. Yapılan bir çalışmada IC₅₀ değerleri 30-100 µM arasında değişkenlik göstermiştir (Howells ve ark., 2002). Bir diğer çalışmada ise IC₅₀ değerinin MDA-MB-231 hücreleri için 52 µM olduğu gösterilmiştir (Nguyen ve ark., 2010). Göreceli olarak yüksek bulunan bu IC₅₀ değerleri, I3C'nin klinikte kemoterapötik ilaç olarak kullanılmasındaki en büyük

engeli teşkil ediyor olabilir. Bununla birlikte I3C'nin hem N-alkoxy hem de 1-benzyl türevlerinin, I3C'ye kıyasla daha güçlü bir sitotoksik aktiviteye yol açtığı gösterilmiştir (Jump ve ark., 2008; Nguyen ve ark., 2010). Özellikle bu iki türev bileşiklerden sonuncusunun, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soylarında dikkat çekici bir sitotoksik aktiviteye sebep olduğu rapor edilmiştir.

Bu *in vitro* çalışma sonucunda; 4-HPR ve I3C kombinasyonunun insan meme kanseri hücre soyları (MCF-7 ve MDA-MB-231) üzerindeki sinerjistik etkileri ve bu uygulamaların apoptozisi indükleyerek hücrelerin büyümesini baskılayabildiği belirlenmiştir. Anti-tümoral etkinin ilk defa bu çalışma sayesinde gösterilmesi ile literatür bilgisine katkıda bulunulmuştur. Bu sonuçlara göre kombinasyon etkisinin, bir sonraki inceleme basamağı olan *in vivo* olarak araştırılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D.G., Heuser, J.E., Wang, X., Akey, C.W. 2002. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell*. 9: 423–432.

Adams, J.M., Cory, S. 2001. Life-or-death decisions by the bcl-2 protein family. *Trends Biochem.Sci*. 26:61-66.

Akşit, H., Bildik, A., 2008. Apoptozis. *Yü Vet Fak Derg*. 19(1), 55-63.

Aldemir, O. S., Uçan, U. S., 2001. Polimeraz Zincir Reaksiyonu, Temel Prensipler. *Hayvancılık Araştırma Dergisi*, 11 (1): 53-59.

Andreotti, P.E., Cree, I.A., Kurbacher, C.M., Hartmann, D.M., Linder, D., Harel, G. 1995. Chemosensitivity testing of human tumors using a microplate adenosine triphosphate luminescence assay: clinical correlation for cisplatin resistance of ovarian carcinoma. *Cancer Res*. 55(22):5276-5282.

AndyVierstrate. 1999. Principle of the PCR. <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>-(Erişim tarihi:11 Eylül 2012)

Anonim, 2006. Cytochrome-C.

http://www.humphath.com/spip.php?article9145&id_document=24433#documents_portfolio-(Erişim tarihi:11 Ocak 2013)

Anonim, 2007. Difference between the Forms of Cell Necrosis and Apoptosis.

<http://www.google.com.tr/imgres?hl=tr&tbo=d&biw=1441&bih=687&tbn=isch&tbnid=WbJKrR5YCdQFkM:&imgrefurl=http://www.aibnsus.org/AcdamicEmblem.html&docid=-Hdlt-BjUk0u7M&imgurl=http://www.aibnsus.org/images/Cell.jpg&w=620&h=597&ei=g5rtUPT2F8Sm4gS7jYH4Cg&zoom=1&iact=rc&dur=198&sig=117589085420719919574&page=1&tbnh=139&tbnw=144&start=0&ndsp=24&ved=1t:429,r:10,s:0,i:114&tx=126&ty=60>-(Erişim tarihi:11 Ocak 2013))

Anonim, 2008. <http://www.abdserotec.com/catalog/apoptosis-and-autophagy-antibodies-and-kits/nuclear-molecules-antibodies.html>-(Erişim tarihi:11 Ocak 2013)

Anonim, 2009. Cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6: targets for cancer treatment and visualization. <http://old.ecco-org.eu/Conferences-and-Events/Past-events/2009/ECCO-15-ESMO-34/CongressNewspaper/Wednesday/Graf/page.aspx/1842>-(Erişim tarihi:11 Ocak 2013)

Arda, M., 1980. Hastalıkların Teşhisinde Biyoteknolojik Yöntemlerin Kullanılması. *Kükem Derneği Bilimsel Yayınları*No: 1, Ankara.

Beaujouin, M., Liaudet-Coopman, E. 2008. Cathepsin D overexpressed by cancer cells can enhance apoptosis-dependent chemo-sensitivity independently of its catalytic activity. *Adv Exp Med Biol*. 617: 453–461.

- Benes, P., Vetvicka, V., Fusek, M. 2008.** Cathepsin D—Many functions of one aspartic protease. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 68 (1). 12-28.
- Benson, J.R., I. Jatoi, M. Keisch, F.J. Esteva, A. Makris, V.C., Jordan. 2009.** Early breast Cancer. *Lancet*. 373(9673):1463-1479.
- Billen, L.P., Kokoski, C.L., Lovell, J.F., Leber, B., Andrews, D.W. 2008.** Bcl-XL inhibits membrane permeabilization by competing with bax. *PLoS Biol*. 6:e147.
- Birben, E., 2006.** Polimeraz zincir reaksiyonu. *Astım Allerji İmmünoloji*, 4(2):92-94.
- Bodmer, J.L., Holler, N., Reynard, S., Vinciguerra, P., Schneider, P., Juo P. 2000.** TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. *Nat. Cell Biol*. 2:241-243.
- Boatright KM, Salvesen GS. 2003.** Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol*. 15(6):725-31.
- Bouillet, P., Strasser, A. 2002.** BH3-only proteins - evolutionarily conserved proapoptotic bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J.Cell.Sci*. 115:1567-1574.
- Bu, P., Wan, Y.J. 2007.** Fenretinide-induced apoptosis of Huh-7 hepatocellular carcinoma is retinoic acid receptor beta dependent. *BMC Cancer*. 7:236.
- Cachot, J., Galgani, F. ve Vincet, F. 1998.** cDNA cloning and expression analysis of flounder p53 tumour suppressor gene. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*. 121, 235-242.
- Caner, V., Çarlı, K.T., 2001.** Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Bazı Tavuk İnfeksiyonlarındaki Yeri. *U. Ü. J. Fac. Vet. Med*. 20: 137-145.
- Cartron, P.F., Gallenne, T., Bougras, G., Gautier, F., Manero, F., Vusio, P. 2004.** The first alpha helix of bax plays a necessary role in its ligand-induced activation by the BH3-only proteins bid and PUMA. *Mol.Cell*. 16:807-818.
- Certo, M., Del Gaizo Moore, V., Nishino, M., Wei, G., Korsmeyer, S., Armstrong, S.A. 2006.** Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer.Cell*. 9:351-365.
- Chang, Y.C., Riby, J., Chang, G.H., Peng, B.C., Firestone, G., Bjeldanes, L.F. 1999.** Cytostatic and antiestrogenic effects of 2-(indol-3-ylmethyl)-3,3'-diindolylmethane, a major in vivo product of dietary indole-3-carbinol. *Biochem Pharmacol*. 58(5):825-34.
- Chen, L., Willis, S.N., Wei, A., Smith, B.J., Fletcher, J.I., Hinds, M.G. 2005.** Differential targeting of prosurvival bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol.Cell*. 17:393-403.

- Chipuk, J.E., Bouchier-Hayes, L., Green, D.R. 2006.** Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: The innocent bystander scenario. *Cell Death Differ.* 13:1396-1402.
- Chipuk, J.E., Green, D.R. 2008.** How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol.* 18: 157–164.
- Choi, H.S., Cho, M.C., Lee, H.G., Yoon, D.Y. 2010.** Indole-3 carbinol induces apoptosis through p53 and activation of caspase 8 pathway in lung cancer A549 cells. *Food Chem Toxicol.* 48(3):883-90.
- Ciccarone V, Hawley-Nelson P, Jessee J. 1993.** Cationic liposome-mediated transfection: Effect of serum on expression and efficiency. *Focus.*15:80–3.
- Costa, A., De Palo, G., Decensi, A., Formelli, F., Chiesa, F., Nava, M., Camerini, T., Marubini, E., Veronesi, U. 1995.** Retinoids and Cancer Chemoprevention. Clinical trials with the synthetic analogue fenretinide. *Ann N Y Acad Sci.* 768: 148-162.
- Costa, A., Sacchini, V., Decensi, A. 1993.** Retinoids and tamoxifen in breast cancer chemoprevention. *Int J Clin&Lab Res.* 23 (2): 53-55.
- Coşkun-Arı, F.F., 2003.** Western Blotlama Yöntemi ile Protein Tespiti. Uygulamalı Hücre Kültürü Teknikleri Kurs Kitabı. Isparta Türkiye. s. 189-198.
- Cui, J., Hopper, J.L. 2000.** Why are the majority of hereditary cases of early-onset breast cancer sporadic? A simulation study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 9(8):805-12.
- Daleke, D.L., Lyles, J.V. 2000.** Identification and purification of aminophospholipid flippases. *Biochim Biophys Acta.* 1486:108–127.
- De Palo, G., Veronesi, U., Camerini, T. 1995.** Can fenretinide protect women against ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst.* 87:146-147.
- Decensi, A., Zanardi, S., Argusti, A., Bonanni, B., Costa, A., Veronesi, U. 2007.** Fenretinide and risk reduction of second breast cancer. *Nat Clin Pract Oncol.* 4(2):64-5.
- Dexter, S.J., Camara, M., Davies, M., Shakesheff, K.M. (2003).** Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. *Biomaterials.* 24, 27–34.
- Dickens, L.S., Boyd, R.S., Jukes-Jones, R., Hughes, M.A., Robinson, G.L., Fairall, L., Schwabe, J.W., Cain, K., Macfarlane, M. 2012.** A death effector domain chain DISC model reveals a crucial role for caspase-8 chain assembly in mediating apoptotic cell death. *Mol Cell.* 47(2):291-305.
- Dijkers, P.F., Medema, R.H., Lammers, J.W., Koenderman, L., Coffey, P.J. 2000.** Expression of the pro-apoptotic bcl-2 family member bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr.Biol.* 10:1201-1204.

Dotzlaw, H., Leygue, E., Watson, P.H., Murphy, L.C. 1999. Estrogen receptor-beta messenger RNA expression in human breast tumor biopsies: relationship to steroid receptor status and regulation by progestins. *Cancer Res.* 59,529-532

Dumont, P., Leu, J.I., Della Pietra, A.C., III, George D.L., Murphy M. 2003. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet.* 33:357-65.

Duprez, L., Wirawan, E., Berghe, T.V., Vandenabeele, P. 2009. Major cell death pathways at a glance. *Microbes and Infection.* 11, 1050-1062.

El-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, P.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercewr, W.E., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell.*75:817.

Elmore, S. 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 35, 495-616.

Erlich, H.A., Gelfand, D., Sninsky, J., 1991. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science.* 252: 1643-1651.

Erol, İ., Yurtyeri, A., Hildebrant, G., Kieer, J., 1990. Polimeraz Zincir Reaksiyonu. Seminer Notu, yayımlanmamış, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Ankara.

Fadeel, B., Gleiss, B., Hogstrand, K., Chandra, J., Wiedmer, T., Sims, P.J., Henter, J.I., Orrenius, S., Samali, A. 1999. Phosphatidylserine exposure during apoptosis is a cell-type-specific event and does not correlate with plasma membrane phospholipid scramblase expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 266(2): 504-11.

Fuentes-Prior, P., Salvesen, G.S. 2004. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J.* 384: 201-232.

Fugua, S. A., Schiff, R., Parra, I., Friedrichs, W.E., Su, J.L., Mckee, D.D., Slentz-Kesler, K., Moore, L.B., Willson, T.B., Moore, J.T. 1999. Expression of wild type estrogen receptor beta and variant isoforms in human breast cancer. *Cancer Res.* 59,5425-5428

Genc K, Genc S, Kizildag S, Sonmez U, Yilmaz O, Tugyan K, Ergur B, Sonmez A, Buldan Z. 2003. Methamphetamine induces oligodendroglial cell death in vitro. *Brain Res.*982(1):125-30.

Gewies, Andreas. 2004. Investigation of the ubiquitin-specific protease UBP41 and of the lysosomal cysteine proteases cathepsin-L and cathepsin-B as potential mediators of proapoptotic signalling. *Doktora tezi.* LMU Munich.

Ghobrial, I.M.,Witzig, T.E., Adjei, A.A. 2005.Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. *Cancer J Clin.* 55:178 -194.

- Gillham, C.M., Reynolds, J., Hollywood D. 2007.** Predicting the response of localised oesophageal cancer to neo-adjuvant chemoradiation. *World Journal of Surgical Oncology*. 5:97 doi:10.1186/1477-7819-5-97
- Golubkov, V., Garcia, A., Markland, F.S. 2005.** Action of fenretinide (4-HPR) on ovarian cancer and endothelial cells. *Anticancer Res*. 25(1A):249-53.
- Green, D.R., Kroemer, G. 2004.** The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*. 305:626-629.
- Grove, D. S., 1999.** Quantitative real-time polymerase chain reaction for the core facility using Taqman and the Perkin-Elmer/Applied Biosystems Division 7700 Sequence Detector. *Journal of Biomolecular Techniques*. 10: 11-16.
- Guicciardi, M.E., Gores, G.J. 2009.** Life and death by death receptors. *FASEB J*. 23:1625-1637.
- Güleş, Ö., Eren, Ü. 2008.** Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi*. 2, 73-78.
- Gündoğdu, R., Celik, V. 2009.** RNA İNTERFERANS (RNAi). *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*. 25(1-2) 34 – 47.
- Han, J., Flemington, C., Houghton, A.B., Gu, Z., Zambetti, G.P., Lutz, R.J. 2001.** Expression of bbc3, a proapoptotic BH3-only gene, is regulated by diverse cell death and survival signals. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 98:11318-11323.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A. 2000.** The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 100, 57-70.
- Harris, C.A., Johnson, E.M.Jr. 2001.** BH3-only bcl-2 family members are coordinately regulated by the JNK pathway and require bax to induce apoptosis in neurons. *J.Biol.Chem*. 276:37754-37760.
- Hawley-Nelson P, Ciccarone V, Gebeyehu G, Jessee J, Felgner. 1993.** P. *Focus*. 15:73.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P. M., 1996.** Real-time quantitative PCR. *Gen. Res*. 6: 986-994.
- Hengartner, M.O. 2001.** Apoptosis: corralling the corpses. *Cell*. 104:325–328.
- Henson, P.M., Bratton, D.L., Fadok, V.A. 2001.** Apoptotic cell removal. *Curr Biol*. 11:R795–R805.
- Hickman, J.A. 1992.** Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer Metastasis Rev*. 11:121-39.

Hojka-Osinska, A., Ziolo, E., Rapak, A. 2012. Combined treatment with fenretinide and indomethacin induces AIF-mediated, non-classical cell death in human acute T-cell leukemia Jurkat cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 419(3):590-5.

Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R., Gelfand, D. H., 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 88: 7276-7280.

Hong, C., Firestone, G.L., Bjeldanes, L.F. 2002. Bcl-2 family mediated apoptotic effects of 3,30-diindolylmethane (DIM) in human breast cancer cells. *Biochem Pharmacol.* 63, 1085–1097.

Hortobagyi, G.N., de la Garza Salazar, J., Pritchard, K., Amadori, D., Haidinger, R., Hudis, C.A., Khaled, H., Liu, M.C., Martin, M., Namer, M., O'Shaughnessy, J.A., Shen, Z.Z., Albain, K. 2005. The global breast cancer burden: variations in epidemiology and survival. *Clin Breast Cancer.* 6: 391–401.

Hotchkiss, R.S., Strasser, A., McDunn, J.E., Swanson, P.E. 2009. Cell Death. *N Engl J Med.* 361, 1570-1583.

Howells, L.M., Gallacher-Horley, B., Houghton, C.E., Manson, M.M., Hudson, E.A. 2002. Indole-3-carbinol inhibits protein kinase B/Akt and induces apoptosis in the human breast tumor cell line MDAMB468 but not in the nontumorigenic HBL100 line. *Mol Cancer Ther.* 1(13):1161-72.

Hsu, Y.T., Wolter, K.G., Youle, R.J. 1997. Cytosol-to-membrane redistribution of bax and bcl-X(L) during apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:3668-3672.

Hudson, E.A., Howells, L.M., Gallacher-Horley, B., Fox, L.H., Gescher, A., Manson, M.M. 2002. Growth-inhibitory effects of the chemopreventive agent indole-3-carbinol are increased in combination with the polyamine putrescine in the SW480 colon tumour cell line. *BMC Cancer.* 3:2.

Hutchins, J.B., Barger, S.W. 1998. Why neurons die: cell death in the nervous system. *Anat Rec.* 253(3): 79-90.

Imaizumi, K., Morihara, T., Mori, Y., Katayama, T., Tsuda, M., Furuyama, T. 1999. The cell death-promoting gene DP5, which interacts with the BCL2 family, is induced during neuronal apoptosis following exposure to amyloid beta protein. *J. Biol. Chem.* 274:7975-7981.

Inohara, N., Ding, L., Chen, S., Nunez, G. 1997. Harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins bcl-2 and bcl-X(L). *EMBO J.* 16:1686-1694.

Jeon, K.I., Rih, J.K., Kim, H.J., Lee, Y.J., Cho, C.H., Goldberg, I.D., Rosen, E.M., Bae, I. 2003. Pretreatment of indole-3-carbinol augments TRAIL-induced apoptosis in a prostate cancer cell line, LNCaP. *FEBS Lett.* 544(1-3):246-51.

Johansson, H., Gandini, S., Guerrieri-Gonzaga, A., Iodice, S., Ruscica, M., Bonanni, B., Gulisano, M., Magni, P., Formelli, F., Decensi, A. 2008. Effect of fenretinide and low-dose tamoxifen on insulin sensitivity in premenopausal women at high risk for breast cancer. *Cancer Res.* 68(22):9512-8.

Jump, S.M., Kung, J., Staub, R., Kinseth, M.A., Cram, E.J., Yudina, L.N., Preobrazhenskaya, M.N., Bjeldanes, L.F., Firestone, G.L. 2008. N-Alkoxy derivatization of indole-3-carbinol increases the efficacy of the G1 cell cycle arrest and of I3C-specific regulation of cell cycle gene transcription and activity in human breast cancer cells. *Biochem Pharmacol.* 75(3):713-24.

Jump, S.M., Kung, J., Staub, R., Kinseth, M.A., Cram, E.J., Yudina, L.N., Preobrazhenskaya, M.N., Bjeldanes, L.F., Firestone, G.L. 2008. N-Alkoxyderivatization of indole-3-carbinol increases the efficacy of the G1 cell cycle arrest and of I3C-specific regulation of cell cycle gene transcription and activity in human breast cancer cells. *Biochem Pharmacol.* 75(3):713-24.

Juo, P., Kuo, C.J., Yuan, J., Blenis, J. 1998. Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Curr Biol.* 8: 1001–1008.

Kam, P.C.A., Ferch, N. I. 2000. Apoptosis: mechanisms and clinical implications. *Anaesthesia.* 55, pages 1081-1093.

Karmakar, S., Choudhury, S.R., Banik, N.L., Ray, S.K. 2009. Combination of N-(4-hydroxyphenyl) retinamide and genistein increased apoptosis in neuroblastoma SK-N-BE2 and SH-SY5Y xenografts. *Neuroscience.* 163(1):286-95.

Kelsey, J.L., Gammon, M.D., John, E.M. 1993. Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev.* 15.

Kim R, Tanabe K, Emi M, Uchida Y, Toge T. 2003. Death receptor-dependent and-independent pathways in anticancer drug-induced apoptosis of breast cancer cells. *Oncol Rep.* 10(6):1925-30.

Kim, H., Rafiuddin-Shah, M., Tu, H.C., Jeffers, J.R., Zambetti, G.P., Hsieh, J.J. 2006. Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nat. Cell Biol.* 8:1348-1358.

Kischkel, F.C., Lawrence, D.A., Tinel, A., LeBlanc, H., Virmani, A., Schow, P. 2001. Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J. Biol. Chem.* 276:46639-46646.

Kocdor, H., Kocdor, M.A., Canda, T., Gurel, D., Cehreli, R., Yilmaz, O., Alakavuklar, M., Guner, G. 2009. Chemopreventive efficacies of rosiglitazone, fenretinide and their combination against rat mammary carcinogenesis. *Clin Transl Oncol.* 11(4):243-9.

Kopnin, B.P. 2000. Targets of Oncogenes and Tumor Suppressors: Key for Understanding Basic Mechanisms of Carcinogenesis. *Biochemistry (Moscow)*. 65, 2-27.

Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjogreen, J., Strombom, L., Stahlberg, A., Zoric, N., 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*. 27: 95-125.

Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Chipuk, J.E., Bonzon, C., Sullivan, B.A., Green, D.R. 2005. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol.Cell*. 17:525-535.

Kuwana, T., Newmeyer, D.D. 2003. Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Curr.Opin.Cell Biol*. 15:691-699.

Lavrik, I., Golks, A., Krammer, P.H. 2005. Death receptor signaling. *J Cell Sci*. 118: 265–267.

Leers, M.P., Kölgen, W., Björklund, V., Bergman, T., Tribbick, G., Persson, B., Björklund, P., Ramaekers, F.C., Björklund, B., Nap, M., Jörnvall, H., Schutte, B. 1999. Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. *J Pathol*. 187: 567-72.

Leist, M., Jaattela, M. 2001. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2(8): 589-98.

Leong, H., Firestone G.L., Bjeldanes L.F. 2001. Cytostatic effects of 3,30-diindolylmethane in human endometrial cancer cells result from an estrogen receptor-mediated increase in transforming growth factor- α expression. *Carcinogenesis*. 22(11):1809–1817.

Letai, A., Bassik, M.C., Walensky, L.D., Sorcinelli, M.D., Weiler, S., Korsmeyer, S.J. 2002. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell*. 2:183-192.

Leung, K.T., Li, K.K., Sun, S.S., Chan, P.K., Ooi, V.E., Chiu, L.C. 2008. Activation of the JNK pathway promotes phosphorylation and degradation of BimEL--a novel mechanism of chemoresistance in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Carcinogenesis*. 29:544-551.

Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., Yuan, J. 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the fas pathway of apoptosis. *Cell*. 94:491-501.

Li, J., Yuan, J. 2008. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*. 27:6194-6206.

Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. 91: 479–489.

- Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R., Wang, X. 1996.** Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*. 86: 147–157.
- Livak, K.J., Flood, S.J.A., Marmaro, J., Giusti, W., Deetz, K., 1995.** Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *Gen. Res.*, 4: 357-362.
- Lowitz, B.B. ve Casciato, D.A. 2000.** Medical oncology & principles of cancer biology, Cancer Biology and Oncogenes. *Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA.*
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X. 1998.** Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*. 94:481-490.
- Maehara, Y., Anai, H., Tamada, R., Sugimachi, K. 1987.** The ATP assay is more sensitive than the succinate-dehydrogenase inhibition test for predicting cell Viability. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 23, 273–276.
- Marani, M., Tenev, T., Hancock, D., Downward, J., Lemoine, N.R. 2002.** Identification of novel isoforms of the BH3 domain protein bim which directly activate bax to trigger apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 22:3577-3589.
- Martinez, J.D., Parker, M.T., Fultz, K.E., Ignatenko, N.A. ve Gerner, E.W. 2003.** Cancer-Related Genes. *Molecular Biology of Cancer*. (Ed: Abraham, D.J.), John Wiley&Sons, Inc, 21-26.
- Meier, P., Finch, A., Evan, G. 2000.** Apoptosis in development. *Nature*. 407(6805): 796-801.
- Messmer, U.K., Pfeilschifter, J. 2000.** New insights into the mechanism for clearance of apoptotic cells. *Bioessays*. 22:878–881.
- Messner, M.C., Cabot, M.C. 2011.** Cytotoxic responses to N-(4 hydroxyphenyl)retinamide in human pancreatic cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 68(2):477-87.
- Micha, D., Cummings, J., Shoemaker, A., Elmore, S., Foster, K., Greaves, M., Ward, T., Rosenberg, S., Dive, C. & Simpson, K. 2008.** Circulating biomarkers of cell death after treatment with the BH-3 mimetic ABT-737 in a preclinical model of small-cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. Vol. 14, no. 22, pp. 7304–7310
- Mocellin, S., Provenzano., M. 2004.** RNA interference: learning gene knock-down from cell physiology. *Journal of Translational Medicine*. 2:39.
- Mokbel, K. 2003.** Risk-reducing strategies for breast cancer - A review of recent literature. *Int J Fertility and Womens Medicine*. 48 (6): 274-277.

Morris, T., Robertson, B., Gallagher, M., 1996. Rapid reverse transcription-PCR detection of hepatitis C virus RNA in serum by using the TaqMan fluorogenic detection system. *J. Clin. Microbiol.*, 34: 2933-2936.

Mossman, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 65(1-2), 55-63.

Mueller, H., Kassack, M.U., Wiese, M. 2004. Comparison of the usefulness of the MTT, ATP and calcein assays to predict the potency of cytotoxic agents in various human cancer cell lines. *J. Biomol.Screen.* 9, 506–515.

Nakano, K., Vousden, K.H. 2001. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol.Cell.* 7:683-694.

Nguyen, H.H., Lavrenov, S.N., Sundar, S.N., Nguyen, D.H., Tseng, M., Marconett, C.N., Kung, J., Staub, R.E., Preobrazhenskaya, M.N., Bjeldanes, L.F., Firestone, G.L. 2010. 1-Benzyl-indole-3 carbinol is a novel indole-3-carbinol derivative with significantly enhanced potency of anti-proliferative and anti-estrogenic properties in human breast cancer cells: *Chem Biol Interact.* 186(3):255-66.

Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T. 2000. Noxa, a BH3-only member of the bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science.* 288:1053-1058.

Oesterreich, S., Fuqua, S. A. W. 1999. Tumor suppressor genes in breast cancer. *Endocrine-Related Cancer.* 6:405-419

Oh, K.J., Barbuto, S., Pitter, K., Morash, J., Walensky, L.D., Korsmeyer, S.J. 2006. A membrane-targeted BID BCL-2 homology 3 peptide is sufficient for high potency activation of BAX in vitro. *J.Biol.Chem.* 281:36999-37008.

Putchu, G.V., Moulder, K.L., Golden, J.P., Bouillet, P., Adams, J.A., Strasser, A. 2001. Induction of BIM, a proapoptotic BH3-only BCL-2 family member, is critical for neuronal apoptosis. *Neuron.* 29:615-628.

Qin, H., Srinivasula, S.M., Wu, G., Fernandes-Alnemri, T., Alnemri, E.S., Shi, Y. 1999. Structural basis of procaspase-9 recruitment by the apoptotic protease-activating factor 1. *Nature* 399: 549–557.

Quincoces, A.F., Polanco, I., Thomson, T. ve Leon, J. 1997. Positive autoregulation of *ras* genes expression in fibroblasts. *FEBS Letters.* 416, 317-323.

Raguenez, G., Mühlethaler-Mottet, A., Meier, R., Duros, C., Bénard, J., Gross, N. 2009. Fenretinide-induced caspase-8 activation and apoptosis in an established model of metastatic neuroblastoma. *BMC Cancer.* 9:97.

Rahman, K.M., Aranha, O., Sarkar, F.H. 2003. Indole-3-carbinol (I3C) induces apoptosis in tumorigenic but not in nontumorigenic breast epithelial cells. *Nutr Cancer*. 45(1):101-12.

Rambal, A.A., Panaguiton, Z.L., Kramer, L., Grant, S., Harada, H. 2009. MEK inhibitors potentiate dexamethasone lethality in acute lymphoblastic leukemia cells through the pro-apoptotic molecule BIM. *Leukemia*.

Rao, R.D., Cobleigh, M.A., Gray, R., Graham, M.L., Norton, L., Martino, S., Budd, G.T., Ingle, J.N., Wood, W.C. 2011. Phase III double-blind, placebo controlled, prospective randomized trial of adjuvant tamoxifen vs. tamoxifen and fenretinide in postmenopausal women with positive receptors (EB193): an intergroup trial coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group. *Med Oncol*. 1:S39-47.

Rathmell, J.C., Thompson, C.B. 2002. Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. *Cell*. 109(Suppl): S97-107.

Reed, J.C. 1999. Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol*. 17:2941-53.

Riedl, S.J., Salvesen, G.S. 2007. The apoptosome: Signalling platform of cell death. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol*. 8:405-413.

Roberson, K.M., Penland, S.N., Padilla, G.M., Selvan, R.S., Kim, C.S., Fine, R.L., Robertson, C.N. 1997. Fenretinide: induction of apoptosis and endogenous transforming growth factor beta in PC-3prostate cancer cells. *Cell Growth Differ*. 8(1):101-11.

Roda, A.,Michelini, E., Mirasoli, M. 2009.Bioluminescence in analytical chemistry and in vivo imaging. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 28(3), 307–322.

Saraste, A., Pulkki, K. 2000. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res*. 45(3): 528-37.

Savill, J., Fadok, V. 2000. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*. 407:784–788.

Scribner, D.R., Benbrook, D.M. 2002. Retinoids enhance cisplatin-based chemoradiation in cervical cancer cells in vitro. *Gynecological Oncology*. 85 (1): 223-225.

Shinjyo, T., Kuribara, R., Inukai, T., Hosoi, H., Kinoshita, T., Miyajima, A. 2001. Downregulation of bim, a proapoptotic relative of bcl-2, is a pivotal step in cytokine-initiated survival signaling in murine hematopoietic progenitors. *Mol.Cell.Biol*. 21:854-864.

Simeone, A.M., Ekmekcioglu, S., Broemeling, L.D., Grimm, E.A., Tari, A.M. 2002. A novel mechanism by which N-(4-hydroxyphenyl)retinamide inhibits breast cancer cell growth: the production of nitric oxide. *Mol Cancer Ther*. 1(12):1009-17.

- Slee, E.A., Harte, M.T., Kluck, R.M., Wolf, B.B., Casiano, C.A., Newmeyer, D.D. 1999.** Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol.* 144: 281–292
- Somersan, S., Bhardwaj, N. 2001.** Tethering and tickling: a new role for the phosphatidylserine receptor. *J Cell Biol.* 155:501–504.
- Spears, M., J.M. Bartlett. 2009.** Human epidermal growth factor receptor dimerization analysis in breast Cancer diagnosis: Potential for improving testing accuracy and treatment selection. *Molecular Diagnosis Therapy.* 13(6):359-365.
- Speirs ,V., Kerin, M.J. 2000.** Prognostic significance of oestrogen receptor beta in breast cancer. *Br J Surg.* 87:405-409
- Stassi, G., De Maria, R. 2002.**Autoimmune thyroid disease: new models of cell death in autoimmunity. *Nature Reviews Immunology.* 2, 195-204.
- Su, J.L., Mckee, D.D., Ellis, B., Kadwell, S.H., Wisely, G.B., Moore, L.B., Triantafillou, J.A., Kost, T.A. Fugua, S., Moore, J.T. 2000.** Production and characterization of an estrogen receptor beta subtype specific mouse monoclonal antibody. *Hybridoma.* 19, 481-487
- Sung, Y.H., et al. 2007.**Influence of co-down-regulation of caspase-3 and caspase-7 by siRNAs on sodium butyrate-induced apoptotic cell death of Chinese hamster ovary cells producing thrombopoietin. *Metab Eng.*9(5-6): p. 452-64.
- Tamm, I., Schriever, F., Dorken, B. 2001.** Apoptosis: implications of basic research for clinical oncology. *Lancet Oncol.* 2:33-43.
- Taylor, J. M.,Barry,M.2006.**Near death experiences: Poxvirus regulation of apoptotic death. *Virology.* 344(1): 139–150.
- Telkoparan, P., Tazebay, U. H. 2011.** Ras Protein Ailesi: Hücresel İşlevi, Moleküler Kontrolü, Onkogenezdeki Rolü. *Turk J Biochem.* 36 (4) ; 367–373.
- Tolis, C., Peters, G.J., Ferreira, C.G., Pinedo, H.M., Giaccone, G. 1999.** Cell cycle disturbances and apoptosis induced by topotecan and gemcitabine on human lungcancer cell lines. *Eur J Cancer.* 35(5):796-807.
- Ueno, T.,Toi, M., Bivén, K., Bando, H., Ogawa, T., Linder, S. 2003.**Measurement of an apoptotic product in the sera of breast cancer patients. *Eur J Cancer.* 39: 769-74.
- Ulukaya E, Acilan C, Yilmaz Y. 2011.**Apoptosis: Why and how does it occur in biology? *Cell Biochem Func.* 29: 468-480.
- Ulukaya, E. 2003.** Apoptozis ders notları.
http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozis_ders_notu.pdf-(Erişim tarihi:12 Mayıs 2011)

Ulukaya, E., Kurt, A., Wood, E.J. 2001. 4-(N-Hydroxyphenyl)retinamide can Selectively Induces Apoptosis in Human Epidermoid Carcinoma Cells but not in Normal Dermal Fibroblasts. *Cancer Investigation*. 19(2): 1-12.

Ulukaya, E., Ozdikicioglu, F., Yilmaztepe-Oral, A., Demirci, M. 2008.The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested. *Toxicology in Vitro*. 22, 232–239.

Ulukaya, E., Pirianov, G., Kurt, M.A., Wood, E.J., Mehmet, H. 2003. Fenretinide induces cytochrome c release, caspase 9 activation and apoptosis in the absence of mitochondrial membrane depolarisation. *Cell Death and Differentiation*. (10): 856-859.

Ulukaya, E., Wood, E.J. 1999. Fenretinide and Its Relation to Cancer. *Cancer Treatment Reviews*. 25:229-235.

van Delft, M.F., Huang, D.C. 2006. How the bcl-2 family of proteins interact to regulate apoptosis. *Cell Res*. 16:203-213.

Varfolomeev, E.E., Schuchmann, M., Luria, V., Chiannikulchai, N., Beckmann, J.S., Mett, I.L. 1998. Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity*. 9: 267–276.

Verma, S., Zhao, L.J., Chinnadurai, G. 2001. Phosphorylation of the pro-apoptotic protein BIK: Mapping of phosphorylation sites and effect on apoptosis. *J.Biol.Chem*. 276:4671-4676

Veronesi, U.,Mariani, L., Decensi, A., Formelli, F., Camerini, T., Miceli, R., Di Mauro, M.G., Costa, A., Marubini, E., Sporn, M.B., De Palo, G. 2006. Fifteen-year results of a randomized phase III trial of fenretinide to prevent second breast cancer. *Ann Oncol*.17(7):1065-71.

Wadhawan, T., McEvoy, J., Prß, B.M., Khan, E. 2010. Assessing tetrazolium and ATP assays for rapid in situ viability quantification of bacterial cells entrapped in hydrogel beads. *Enzyme and Microbial Technology*. 47, 166–173.

Walensky, L.D., Pitter, K., Morash, J., Oh, K.J., Barbuto, S., Fisher, J. 2006. A stapled BID BH3 helix directly binds and activates BAX. *Mol.Cell*. 24:199-210.

Wang, K.,Fang, H., Xiao, D., Zhu, X., He, M., Pan, X., Shi, J., Zhang, H., Jia, X., Du, Y., Zhang, J. 2009. Converting redox signaling to apoptotic activities by stress-responsive regulators HSF1 and NRF2 in fenretinide treated cancer cells. *PLoS One*. 4(10):e7538.

Wang, X. 2001. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes & Development*.15:2922–2933

Washbrook, E. 2006. Risk factors and epidemiology of breast cancer. *Woman's Health Medicine*. 3(1):8-14.

Wei, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J. 2001. Proapoptotic BAX and BAK: A requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*. 292:727-730.

Weng, J.R., Tsai, C.H., Kulp, S.K., Chen, C.S. 2008. Indole-3-carbinol as a chemopreventive and anti-cancer agent. *Cancer Lett.* 18;262(2):153-63.

Whitfield, J., Neame, S.J., Paquet, L., Bernard, O., Ham, J. 2001. Dominant-negative c-jun promotes neuronal survival by reducing BIM expression and inhibiting mitochondrial cytochrome c release. *Neuron*. 29:629-643.

Whitworth, J.M., Londoño-Joshi, A.I., Sellers, J.C., Oliver, P.J., Muccio, D.D., Atigadda, V.R., Straughn, J.M. Jr, Buchsbaum, D.J. 2011. The impact of novel retinoids in combination with platinum chemotherapy on ovarian cancer stem cells. *Gynecol Oncol*. 125(1):226-30.

Willis, S.N., Chen, L., Dewson, G., Wei, A., Naik, E., Fletcher, J.I. 2005. Proapoptotic bak is sequestered by mcl-1 and bcl-xL, but not bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev*. 19:1294-1305.

Willis, S.N., Fletcher, J.I., Kaufmann, T., van Delft, M.F., Chen, L., Czabotar, P.E. 2007. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple bcl-2 homologs, not bax or bak. *Science*. 315:856-859.

Wohlfahrt, J., Melby, M. 2004. Age at any birth is associated with breast cancer risk. *Epidemiology*. 12: 68-73.

Wolter, K.G., Hsu, Y.T., Smith, C.L., Nechushtan, A., Xi, X.G., Youle, R.J. 1997. Movement of bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J. Cell Biol*. 139:1281-1292.

Yan S, Qu X, Xu C, Zhu Z, Zhang L, Xu L, Song N, Teng Y, Liu Y. 2012. Down-regulation of Cbl-b by bufalin results in up regulation of DR4/DR5 and sensitization of TRAIL-induced apoptosis in breast cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol*. 138(8):1279-89

Yu, J., Zhang, L., Hwang, P.M., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. 2001. PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol. Cell*. 7:673-682.

Yu, X., Acehan, D., Menetret, J.F., Booth, C.R., Ludtke, S.J., Riedl, S.J. 2005. A structure of the human apoptosome at 12.8 Å resolution provides insights into this cell death platform. *Structure*. 13: 1725–1735.

Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., Korsmeyer, S.J. 1996. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell*. 87:619-628.

Zha, J., Weiler, S., Oh, K.J., Wei, M.C., Korsmeyer, S.J. 2000. Posttranslational N-myristoylation of BID as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis. *Science*. 290:1761-1765.

Zornig, M., Hueber, A-O., Baum, W., Evan, G. 2001. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1551: F1-F37.

Zou, C., Wang, L., Liebert, M., Grossman, H.B., Lotan, R., Wei, Q. 1998. Combined effect of chemopreventive agent N-(4-hydroxyphenyl) retinamide (4-HPR) and gamma-radiation on bladder cancer cell lines. *In J Oncol*. 13(5):1037-41.

Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A., Wang, X. 1997. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4 participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*. 90: 405–413.

Zuzarte-Luis, V., Hurle, J.M. 2002. Programmed cell death in the developing limb. *Int J Dev Biol*.46(7): 871-6.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı:Buse CEVATEMRE

Doğum Yeri ve Tarihi:Tekirdağ, 24 Temmuz 1989

Yabancı Dili:İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise:Bursa Erkek Lisesi (2003-2006)

Lisans:Celal Bayar Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü (2006-2010)

Yüksek Lisans:Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Ana Bilim Dalı (2010-2012)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü (2011-)

İletişim (e-posta):bcevatemre@uludag.edu.tr

Yayınları:

Cevatemre, B., Ari, F., Sarimahmut, M., Oral, A.Y., Dere, E., Kacar, O., Adiguzel, Z., Acilan, C., Ulukaya E. 2012.Combination of fenretinide and indole-3-carbinol results in synergistic cytotoxic activity inducing apoptosis against human breast cancer cells *in vitro*. *Anti Cancer Drugs*. (YAYINDA)

Ulukaya, E., Frame, F., Cevatemre, B., Pellacani, D., Walker, H., Mann, V., Simms, M., Stower, M., Yilmaz, V., Maitland, N. 2012.Differential Cytotoxic Activity of a Novel Palladium-Based Compound on Prostate Cell Lines, Primary Prostate Epithelial Cells and Prostate Stem Cells. *Plos One*.(YAYINDA)