



**MEME KANSERİ KÖK HÜCRELERİNDE HİSTON
MODİFİKASYONLARI ile HÜCRE ÖLÜMÜ
ARASINDAKİ İLİŞKİLERİN ARAŞTIRILMASI**

NAZLIHAN AZTOPAL



**MEME KANSERİ KÖK HÜCRELERİNDE HİSTON
MODİFİKASYONLARI ile HÜCRE ÖLÜMÜ
ARASINDAKİ İLİŞKİLERİN ARAŞTIRILMASI**

NAZLIHAN AZTOPAL



**T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MEME KANSERİ KÖK HÜCRELERİNDE HİSTON
MODİFİKASYONLARI ile HÜCRE ÖLÜMÜ
ARASINDAKİ İLİŞKİLERİN ARAŞTIRILMASI**

Nazlıhan AZTOPAL

Yrd. Doç. Dr. Egemen DERE
(Danışman)

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

BURSA – 2017
Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

Nazlıhan AZTOPAL tarafından hazırlanan "Meme kanseri kök hücrelerinde histon modifikasyonları ile hücre ölümü arasındaki ilişkilerin araştırılması" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/~~oy çokluğu~~ ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda **DOKTORA 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: Doç. Dr. Ferda Arı

Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi,

Biyoloji Anabilim Dalı

Üye: Doç. Dr. Arzu Yılmaztepe Oral

Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi,

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Üye: Yrd. Doç. Dr. Selvi Durmuş Erim

İstinye Üniversitesi, Tıp Fakültesi,

Moleküler Onkoloji

Üye: Prof. Dr. Engin Ulukaya

İstinye Üniversitesi, Tıp Fakültesi,

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

İmza

İmza

İmza

İmza

İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Ali BAYRAM

Enstitü Müdürü

24/02/2017

Ali Bayram

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

- 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.**

17/02/2017

Nazlıhan AZTOPAL

ÖZET

Doktora Tezi

MEME KANSERİ KÖK HÜCRELERİNDE HİSTON MODİFİKASYONLARI ile HÜCRE ÖLÜMÜ ARASINDAKİ İLİŞKİLERİN ARAŞTIRILMASI

Nazlıhan AZTOPAL

Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Egemen DERE

Epigenetik değişiklikler, kanser kök hücre (KKH) özelliklerinin düzenlenmesi ve ilaç direnci gelişiminde önemli role sahiptir. KKH'leri, kemoterapi ile indüklenen apoptozise dirençten sorumlu olup hücre yaşamı/kendini yenileme ve farklılaşma ile ilişkili Wnt sinyalizasyonu bu hücrelerde yeniden aktive olmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda, Niklozamid (Wnt/ β -katenin sinyal yolağı inhibitörü) ile Valproik asit (VPA, histon deasetilaz inhibitörü) kombinasyonunun meme kanseri KKH'leri üzerine olası sitotoksik/apoptotik etkileri araştırılmıştır. Parental MCF-7 hücrelerinden KKH populasyonunun başarılı bir şekilde zenginleştirildiği western blot yöntemi ile gösterildi. Niklozamid ve VPA kombinasyonunun MCF-7s hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi ATP yöntemiyle belirlendi. Daha sonra kombinasyon çalışması için seçilen dozlarda gözlenen etki akım sitometri ile doğrulandı. Histon deasetilazların inhibisyonu ile asetilenmiş histon H3 düzeyleri western blot ve ELISA yöntemiyle değerlendirildi. Kombinasyon tedavisiyle değişen Wnt/ β -katenin sinyal yolağı, KKH karakteri, epitelyal mezenkimal dönüşüm ve histon modifikasyonları ile ilişkili protein düzeyleri western blot ile gösterildi. Apoptozis, Hoechst 33342/PI ikili boyama, M30 ELISA ve akım sitometri ile değerlendirildi. Otofaji ve apoptozis ile ilişkili gen ve protein ekspresyonları Real-time PCR ve western blot ile belirlendi. Sonuç olarak; meme kanseri kök hücrelerinde Niklozamid ve VPA kombinasyonunun, tek başlarına etkilerine kıyasla, artmış Histon H3 asetilasyonu ve daha güçlü Wnt/ β -katenin yolak inhibisyonu ile hücre canlılığını belirgin bir şekilde azalttığı ve bu hücrelerde güçlü bir şekilde apoptozisin uyarıldığı bulundu. Bu kombinasyon tedavisinin, KKH'leri hedeflemedeki başarısının yeni ve umut verici bir tedavi seçeneği olarak kullanılabileceği öngörüsüyle ileri *in vivo* deneylerin yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kanser Kök Hücre, Wnt/ β -katenin Sinyal Yolağı, Histon Modifikasyonları, Apoptozis

2017, xii + 88 sayfa.

ABSTRACT

PhD Thesis

INVESTIGATING THE DYNAMICS BETWEEN HISTONE MODIFICATIONS and CELL DEATH in BREAST CANCER STEM CELLS

Nazlıhan AZTOPAL

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

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Egemen DERE

Epigenetic changes play a critical role in the regulation of cancer stem cell (CSC) properties and the development of drug resistance. CSCs are responsible for apoptosis resistance induced by chemotherapy and the Wnt signaling which is associated with cell survival/self-renewal and differentiation, is re-activated in these cells. For this reason, a possible cytotoxic/apoptotic effect of the combination of niclozamide (Wnt/ β -catenin pathway inhibitor) and Valproic acid (VPA, histone deacetylase inhibitor) on breast CSCs was investigated. Successful enrichment of the CSC population from parental MCF-7 cells has been shown by western blotting. The effects of niclozamide and VPA combination on the viability of MCF-7s cells were demonstrated by the ATP assay. The effect that is observed at selected doses for the combination was then confirmed by flow cytometry. The levels of acetylated histone H3 and the inhibition of histone deacetylases were assessed by ELISA and western blotting. Protein levels associated with the Wnt/ β -catenin signaling pathway, stemness, epithelial mesenchymal transformation and histone modifications, which were changed by combination therapy, were shown by western blotting. Apoptosis was assessed by Hoechst 33342/PI double staining, M30 ELISA and flow cytometry. Gene and protein expressions related to autophagy and apoptosis were determined by real-time PCR and western blotting. As a result, in breast CSCs, the combination of Niclozamide and VPA showed a marked decrease in cell viability by inducing apoptosis with increased histone H3 acetylation and stronger Wnt inhibition compared with the single use of each agent. It has been concluded that the future success of this combination therapy in targeting CSCs should be used as a new and promising treatment option and assumed to warrant further *in vivo* investigation.

Keywords: Cancer Stem Cell, Wnt/ β -catenin Pathway, Histone Modifications, Apoptosis

2017, xii + 88 pages.

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmamın her aşamasında, bilgi ve önerileri ile yardımlarını esirgemeyen sabırlı ve güler yüzlü danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Egemen DERE'ye,

Yüksek lisans ve doktora öğrenimimin her aşamasında bana tüm içtenliği, hoşgörüsü ve iyi niyeti ile yaklaşan, akademik eğitimime devam edebilmem için beni teşvik eden, destekleyen, bilgi ve tecrübeleriyle bana her daim yol göstererek geleceğime yön veren, yanında çalışmaktan onur duyduğum değerli hocam Sayın Prof. Dr. Engin ULUKAYA'ya,

Çalışmalarım süresince uygun koşulları sağlayarak tezimin tamamlanmasına büyük katkıları olan, her konuda yardım ve desteklerini benden hiç esirgemeyen çok kıymetli hocalarım, Sayın Doç. Dr. Ferda ARI ve Doç. Dr. Arzu YILMAZTEPE ORAL'a

Bu çalışmanın ortaya çıkmasında ve yapılan tüm deneylerde emeği bulunan, benden moral ve desteklerini hiç esirgemeyen güler yüzlü meslektaşım Merve ERKISA'ya,

En yoğun zamanlarımda yanımda olan, bilgi ve deneyimiyle her konuda desteğini gördüğüm değerli meslektaşım Buse CEVATEMRE ile yakın ilgilerinden dolayı sevgili CEVATEMRE ailesine,

Doktora çalışmam süresince bana her konuda yardımcı olarak işlerin düzenli işleyişini sağlayan Pınar ALPER ile Oğuzhan AKGÜN'e ve tüm diğer çalışma arkadaşlarıma,

Her ihtiyacıma tüm içtenliğiyle koşarak hayatımı kolaylaştıran, hoşgörülü, sabırlı ve benim için çok değerli abim Cemil ÜSKÜPLÜ'ye,

Üniversitenin ilk günlerinden bugüne kadar gelen arkadaşlığımızda her zaman sevgi ve desteklerini hissettiğim, hayatıma dokunan çok kıymetli arkadaşlarım Sezin BOZDEMİR ve Çisem ÖZKAN ile hayatıma sonradan katılan fakat tamamen şansım olarak gördüğüm Figen NAS'a, her zaman, her koşulda yanımda olarak elimi hiç bırakmayan canım kuzenim Didem GÜDÜL'e,

Hayallerimi gerçekleştirmem için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayarak her zaman benim yanımda olan en değerlim, canım babam, Murat AZTOPAL'a, hiçbir zaman pes etmeme izin vermeyerek bugünlere gelmemde en büyük emeğin sahibi, canım annem, Bediriye AZTOPAL ile hayallerimin esin kaynağı, iyi ki benim dediğim can yoldaşım, benim güzel kardeşim, Burçe AZTOPAL'a sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Nazlıhan AZTOPAL

17/02/2017

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	2
2.1. Kanser Kök Hücre Biyolojisi.....	2
2.1.1. Tarihçe.....	2
2.1.2. Kanser kök hücre hipotezi.....	2
2.1.3. Kanser kök hücre kökenine dair hipotezler.....	4
2.1.4. Kanser kök hücre özellikleri.....	5
2.1.4.1. Hücre yüzey antijenleri ve yüzey bağımsız büyüme.....	5
2.1.4.2. Pasiflik (Quiescence) ve dormansi.....	5
2.1.4.3. Apoptotik mekanizmanın düzenlenmesi ve pro-yaşam sinyal iletiminin aktivasyonu.....	5
2.1.4.4. Kanser kök hücre plastisitesi ve epitelyal mezenkimal dönüşüm.....	6
2.1.4.5. Otofaji.....	7
2.1.5. Kanser kök hücre biyolojisinde gelişimsel sinyal yolakları.....	7
2.1.5.1. Notch sinyal yolağı.....	7
2.1.5.2. Hedgehog (Hh) sinyal yolağı.....	8
2.1.5.3. Klasik Wnt/ β -katenin sinyal yolağı.....	8
2.1.5.3.1. Niklozamid.....	10
2.2. Epigenetik Mekanizmalar.....	10
2.2.1. DNA metilasyonu.....	10
2.2.2. Polikomb grup proteinler ve histon modifikasyonları.....	11
2.3. Apoptozis.....	14
2.3.1. Kaspazların aktivasyonu.....	15
2.3.2. Mitokondrinin apoptozisdeki rolü.....	15
2.3.3. Bcl-2 ailesi.....	16
2.3.4. Ekstrinsik (Dışsal) yolak.....	16
2.3.5. Mitokondriyal/ İntrinsik yolak.....	17
2.3.6. Endoplazmik retikulum aracılı apoptozis.....	19
2.3.7. Otofaji.....	19
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	21
3.1. Materyal.....	21
3.1.1. Kimyasal maddeler.....	21
3.1.2. Sarf malzemeler.....	22
3.1.3. Cihazlar.....	22
3.2. Yöntemler.....	23
3.2.1. Valproik asit ve Desitabin'in hazırlanması.....	23
3.2.2. İnhibitörlerin hazırlanması.....	23
3.2.3. Hücre kültürü.....	24

3.2.3.1. Kullanılan besiyerinin hazırlanması.....	24
3.2.3.2. Hücre soyunun stoktan çıkartılması	24
3.2.3.3. Hücre soyunun pasajlanması.....	24
3.2.3.4. Hücre soyunun stoklanması	25
3.2.3.5. Mamosfer kültürü.....	25
3.2.3.6. Kullanılan besiyerinin hazırlanması.....	25
3.2.3.7. MCF-7s hücrelerinin elde edilmesi ve çoğaltılması.....	25
3.2.3.8. MCF-7s hücrelerinin pasajlanması	25
3.2.3.9. Hemositometre ile hücrelerin sayımı	26
3.2.4. ATP (Adenozin Trifosfat) canlılık metodu	26
3.2.5. Kaspazla kırılmış sitokeratin 18 (M30) düzeylerinin belirlenmesi.....	28
3.2.6. Hoechst 33342 ve Propidyum iyodür floresan boyama yöntemi	28
3.2.7. Akım sitometri analizleri.....	29
3.2.7.1. Hücre canlılığının belirlenmesi	29
3.2.7.2. Mitokondri membran potansiyelinin belirlenmesi	30
3.2.7.3. Bcl-2 aktivasyonunun belirlenmesi	31
3.2.7.4. γ H2A.X aktivasyonu ile DNA hasarının belirlenmesi.....	32
3.2.8. Asetillenmiş histon H3 düzeylerinin belirlenmesi	32
3.2.9. Western blot analizi.....	33
3.2.9.1. Protein izolasyonu	36
3.2.9.2. Protein konsantrasyonunun ölçülmesi.....	36
3.2.9.2.1. BSA standartlarının hazırlanması	36
3.2.9.2.2. Biçinkoninik asit (BCA) ölçümünün yapılması.....	36
3.2.9.2. Elektroforez ve transfer	37
3.2.9.2.1. Çözeltiler	37
3.2.9.2.2. Proteinlerin yüklenmesi ve jelde yürütülmesi.....	37
3.2.9.2.3. Proteinlerin transferi	37
3.2.9.2.3. İlgili proteinlerin belirlenmesi.....	38
3.2.9.2.3.1. Bloklama	38
3.2.9.2.3.2. Birincil antikor	38
3.2.9.2.3.3. İkincil antikor	38
3.2.9.2.3.4. Görüntüleme.....	38
3.2.9.2.3.5. Birincil ve ikincil antikorların membrandan uzaklaştırılması.....	38
3.2.10. Gen analizi	39
3.2.10.1. Eş zamanlı (Real-Time) PCR.....	40
3.2.10.1.1. Hücrelerden total RNA izolasyonu	41
3.2.10.1.2. cDNA sentezinin yapılması	42
3.2.10.1.3. Real-time PCR	43
3.2.11. İstatistiksel analiz	44
4. BULGULAR	45
4.1. Kanser Kök Hücrelerinin (MCF-7s) Elde Edilmesi ve Karakterizasyonu.....	45
4.2. ATP Canlılık Testi Bulguları	46
4.2.1. Valproik asit'in hücre canlılığı üzerine etkisinin incelenmesi	46
4.2.2. Desitabin'in hücre canlılığı üzerine etkisinin incelenmesi	47
4.2.3. Niklozamid'in hücre canlılığı üzerine etkisinin incelenmesi.....	48
4.2.4. Niklozamid ile Valproik asit kombinasyonunun hücre canlılığı üzerine etkisinin incelenmesi.....	49
4.2.4.1. Akım sitometri bulguları	52

4.2.5. Niklozamid ile Desitabin kombinasyonunun hücre canlılığı üzerine etkisinin incelenmesi.....	53
4.3. Niklozamid ve Valproik Asit'in İnhibitör Etkilerinin Değerlendirilmesi.....	53
4.3.1. Histon deasetilazların inhibisyonu ve histon asetilasyonu	53
4.3.2. Wnt/ β -katenin sinyal yolağının inhibisyonu	54
4.4. Niklozamid ile Valproik Asit Kombinasyonunun Kök Hücre Özellikleri Üzerine Etkisinin İncelenmesi	55
4.4.1. Kök hücre karakteri ve epitelyal mezenkimal dönüşüm	56
4.5. Niklozamid ile Valproik Asit Kombinasyonunun Histon Modifikasyonları Üzerine Etkisinin İncelenmesi	57
4.6. Niklozamid ile Valproik Asit Kombinasyonunun Hücre Ölümü Üzerine Etkisinin İncelenmesi	58
4.6.1. Kaspazla kırılmış sitokeratin 18 (ccK18, M30) bulguları.....	58
4.6.2. Hoechst 33342 ve Propidyum iyodür boyama yöntemi bulguları	60
4.6.3. Akım sitometri bulguları	62
4.6.3.1. Mitokondri membran potansiyel değişiklikleri	62
4.6.3.2. Bcl-2 aktivasyonu.....	63
4.6.3.3. DNA hasarının belirlenmesi.....	63
4.6.4. Western blot ve gen analizi bulguları	64
4.6.4.1. Ekstrinsik apoptozisin uyarılması	64
4.6.4.2. Endoplazmik retikulum stresinin uyarılması	65
4.6.4.3. p53 ve p21 protein düzeylerinin incelenmesi.....	66
4.6.4.4. Otofajik akışın bozulması	67
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	68
KAYNAKLAR	76
ÖZGEÇMİŞ	87

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Simgeler	Açıklama
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
μ	Mikro

Kısaltmalar

Kısaltmalar	Açıklama
7-AAD	7-Aminoaktinomisin D
AIF	Apoptozis indükleyici faktör
AML	Akut myeloid lösemi
APC	Adenomatous Polyposis Coli
ATF6	Aktive edici transkripsiyon faktörü
Atg	Otofaji bağlantılı protein
ATP	Adenozin trifosfat (Adenosine triphosphate)
BCA	Biçinkonik asit
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-xL	B-cell lymphoma extra long
BECN1	Beklin 1
BH	Bcl-2 homoloji bölgeleri
BMP	Kemik morfojenetik proteini
BSA	Sığır serum albümin
CAD	Kaspaz aktive edici DNaz
CCND1	Siklin D1
CD	Başkalaşım kümesi
CHOP	C/EBP homolog protein
CK1	Kazein kinaz 1
CK18	Sitokeratin 18
DAC	5-Aza-2'-deoksisitidin, Desitabin
DAPK	Ölüm ilişkili protein kinaz
DD	Ölüm alanı (Death domain)
DISC	Ölüm indükleyici sinyal kompleksi
DKK1	Dickkopf-related protein 1
DMSO	Dimetilsulfoksit
DNA	Deoksi ribonükleik asit (Deoxyribonucleic acid)
DNMT	DNA metil transferaz
DR	Ölüm reseptörü
Dvl	Dishevelled
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit

EGFR	Epidermal büyüme faktör reseptörü
EKH	Embriyonik kök hücre
EMD	Epitelyal mezenkimal dönüşüm
EpCAM	Epitel hücre adezyon molekülü
ER	Endoplazmik retikulum
ERK	Ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz
EZH2	Enhancer of zeste homolog 2
FACS	Floresans aktif hücre ayırma
FADD	Fas ilişkili ölüm alanı
FBS	Fetal sığır serumu
Fz/Fzd	Frizzled
GAPDH	Gliseraldehid-3-fosfat dehidrojenaz
Gli	Glioma ilişkili onkogen
Gsk3 β	Glikojen sentaz kinaz 3 beta
H3K9ac	Histon 3 lizin 9 asetilasyonu
H3K27ac	Histon 3 lizin 27 asetilasyonu
H3K27me3	Histon 3 lizin 27 trimetilasyonu
H3K4me3	Histon 3 lizin 4 trimetilasyonu
HDAC	Histon deasetilaz
Hh	Hedgehog
ICAD	Kaspazla aktive edilmiş
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
IRE1	İnozitol gerektiren kinaz 1
JNK	c-Jun N-terminal kinaz
KKH	Kanser kök hücre
KLF	Kruppel-benzeri faktör
LC3	Mikrotübül-ilişkili protein 1 hafif zincir 3
LRP5/6	Düşük-dansiteli lipoprotein reseptör-ilişkili protein 5/6
NF- κ B	Nuclear Factor kappa B
NICD	Notch intraselüler domain;
Nik	Niklozamid
Nkd	Naked
NKH	Normal kök hücre
Oct4	Oktamer bağlayıcı transkripsiyon faktörü 4
p62	Nükleoporin 62
PARP	Poli(ADP-riboz)polimeraz (Poly ADP-ribose polymerase)
PcG	Polikomb grup protein
PERK	Protein kinaz RNA (PKR) benzeri ER kinaz
PI3K/AKT	Fosfoinositid 3 kinaz/Protein kinaz B
PRC	Polikomb baskılayıcı kompleks
Ptch1	Patched

sFRP	Salgılanan Frizzled-ilişkili protein
SIRT	Sirtuin benzeri protein
Smo	Smoothened
Sox2	Sex Determining Region Y-Box 2
TCF/LEF	T-cell factor/lymphoid enhancer factor
TLE	Transducin-like enhancer protein
TNFR	Tümör nekrozis faktör reseptör
TRADD	TNFR-1 ilişkili ölüm bölgesi proteini
TRAIL	TNF-ilişkili apoptozis indükleyici ligand
VPA	Valproik asit
WIF-1	Wnt inhibe edici faktör 1
Wls	Wntless
XIAP	X'e bağlı apoptozis inhibitör proteini



ŞEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Tümör heterojenitesine dair hipotezler	3
Şekil 2.2. KKH kökenine dair hipotezler	4
Şekil 2.3. Wnt/ β -katenin sinyal yolağı inaktif durum; Wnt sinyali yokluğunda TCF ko-baskılayıcılarla (Ko-B) birlikte Wnt hedef genlerinin ekspresyonunu baskılar (A). Aktif durum; reseptör-ligand etkileşimini takiben serbest kalan β -katenin, nükleusta birikerek ko-aktivatörlerle (Ko-A) birlikte Wnt hedef genlerinin ekspresyonunu uyarır (B).....	9
Şekil 2.4. Histon modifikasyonları ile düzenlenen kapalı (A) ve açık (B) kromatin yapısı	12
Şekil 2.5. Farklılaşma sürecinde ya tamamen bastırılmış (H3K4me3 kaybı) ya da aktive edilmiş (H3K27me3 kaybı) durumu gösteren kromatin modifikasyonları	13
Şekil 2.6. Apoptozis sürecinde; reseptör aracılı kaspaz aktivasyonu (A) ve mitokondri/sitokrom-C aracılı apoptozis (B)	18
Şekil 2.7. ER stresıyla indüklenen apoptotik mekanizmalar.....	19
Şekil 3.1. Western blot aşamalarının şematik gösterimi	35
Şekil 3.2. PCR döngüsünün basamakları	40
Şekil 4.1. MCF-7 meme kanser hücre soylarından elde edilen mamosferlerin (MCF-7s) mikroskopik görüntüsü ($\times 10$) (A). KKH'lerine özgü belirteçlerin western blot (B) ve akım sitometri sonuçları (C).....	45
Şekil 4.2. MCF-7s hücrelerinde Wnt/ β -katenin sinyal yolağı aktivasyonunun western blot ile belirlenmesi.....	46
Şekil 4.3. MCF-7 ve MCF-7s hücrelerinde VPA uygulaması sonrası hücre canlılığının doza ve zamana bağlı olarak değişimi	47
Şekil 4.4. MCF-7 ve MCF-7s hücrelerinde DAC uygulaması sonrası hücre canlılığının doza ve zamana bağlı olarak değişimi	48
Şekil 4.5. MCF-7s hücrelerinde Nik uygulaması sonrası hücre canlılığının doza ve zamana bağlı olarak değişimi.....	49
Şekil 4.6. MCF-7s hücrelerinde, Nik (1 μ M; 24 saat ön tedavi), VPA (0,63-5 mM) ve kombinasyon tedavileri sonrası hücre canlılığının doza ve zamana bağlı olarak değişimi	50
Şekil 4.7. MCF-7s hücrelerinde, Nik (1 μ M; 24 saat ön tedavi), VPA (0,63-5 mM) ve kombinasyon tedavileri sonrası hücrelerin morfolojik görüntüleri.....	51
Şekil 4.8. MCF-7s hücrelerinde, Nik (1 μ M) ile 24 saat ön tedavi uygulamasını takiben VPA'nın 0,63 (A) ve 1,25 mM (B) konsantrasyonları ile 72 saat kombinasyon tedavisi sonrası doz-etki eğrileri.....	51
Şekil 4.9. MCF-7s hücrelerinde, Nik (1 μ M) ile 24 saat ön tedavi uygulamasını takiben VPA'nın 0,63 ve 1,25 mM konsantrasyonları ile 48 ve 72 saatlik kombinasyon tedavisi sonrası canlılık yüzdelerinin akım sitometri sonuçları.....	52
Şekil 4.10. MCF-7s hücrelerinde, Nik (1 μ M; 24 saat ön tedavi), DAC (2,5-20 μ M) ve kombinasyon tedavileri sonrası hücre canlılığının doza ve zamana bağlı olarak değişimi	53
Şekil 4.11. MCF-7s hücrelerinde, Nik (1 μ M; 24 saat ön tedavi), VPA (0,63-1,25 mM) ve kombinasyon tedavileri sonrası Histon H3 asetilasyonu (A) ile total HDAC1 ve HDAC2 protein düzeylerindeki değişimler (B)	54

Şekil 4.12. MCF-7s hücrelerinde, Nik (1 µM; 24 saat ön tedavi), VPA (1,25 mM) ve kombinasyon tedavileri sonrası Wnt sinyal yolağı ile ilişkili proteinlerin ekspresyon düzeylerinde değişimlerin western blot sonuçları.....	55
Şekil 4.13. MCF-7s hücrelerinde, Nik (1 µM; 24 saat ön tedavi), VPA (1,25 mM) ve kombinasyon tedavileri sonrası KKH'lerine özgü özelliklerin gen ve protein düzeyindeki değişimlerinin western blot (A) ve Real-time PCR (B) sonuçları.....	56
Şekil 4.14. MCF-7s hücrelerinde, Nik (1 µM; 24 saat ön tedavi), VPA (1,25 mM) ve kombinasyon tedavileri sonrası EMD'ye özgü belirteçlerin protein düzeyindeki değişimlerinin western blot sonuçları	57
Şekil 4.15. MCF-7s hücrelerinde, Nik (1 µM; 24 saat ön tedavi), VPA (1,25 mM) ve kombinasyon tedavileri sonrası değişen histon modifikasyon profillerinin western blot sonuçları	58
Şekil 4.16. MCF-7s hücrelerinde, Nik (1 µM; 24 saat ön tedavi), VPA (0,63-1,25 mM) ve kombinasyon tedavileri sonrası M30 düzeylerindeki değişimler.....	59
Şekil 4.17. MCF-7s hücrelerinde, Nik'in Z-VAD ve Nekrostatin-1 ile eş zamanlı ön tedavi (24 saat) uygulamasını takiben VPA (0,63-1,25 mM) ile kombinasyonlarının hücre canlılığı üzerine etkisi (72 saat)	60
Şekil 4.18. MCF-7s hücrelerinde, Nik (1 µM; 24 saat ön tedavi), VPA (0,63-1,25 mM) ve kombinasyon tedavileri sonrası Hoechst 33342 (mavi) ve PI (kırmızı) ikili boyama görüntüleri	61
Şekil 4.19. MCF-7s hücrelerinde, Nik (1 µM; 24 saat ön tedavi), VPA (1,25 mM) ve kombinasyon tedavileri sonrası mitokondri membran potansiyel değişimi yüzde değerlerinin 48 ve 72 saatlik histogramları	62
Şekil 4.20. MCF-7s hücrelerinde, Nik (1 µM; 24 saat ön tedavi), VPA (1,25 mM) ve kombinasyon tedavileri sonrası Bcl-2 aktivitesi akım sitometri sonuçları	63
Şekil 4.21. MCF-7s hücrelerinde, Nik (1 µM; 24 saat ön tedavi), VPA (1,25 mM) ve kombinasyon tedavileri sonrası γH2AX aktivasyonunun akım sitometri sonuçları	64
Şekil 4.22. MCF-7s hücrelerinde, Nik (1 µM; 24 saat ön tedavi), VPA (1,25 mM) ve kombinasyon tedavileri sonrası apoptozis ile ilişkili gen (A) ve protein (B) düzeylerindeki değişimler	65
Şekil 4.23. MCF-7s hücrelerinde, Nik (1 µM; 24 saat ön tedavi), VPA (1,25 mM) ve kombinasyon tedavileri sonrası ER-stresi ile ilişkili protein düzeylerinin değişimi.....	66
Şekil 4.24. MCF-7s hücrelerinde, Nik (1 µM; 24 saat ön tedavi), VPA (1,25 mM) ve kombinasyon tedavileri sonrası p53 ve p21 protein düzeylerinin değişimi.....	66
Şekil 4.25. MCF-7s hücrelerinde, Nik (1 µM; 24 saat ön tedavi), VPA (1,25 mM) ve kombinasyon tedavileri sonrası otofaji ile ilişkili gen (A) ve protein (B) düzeylerindeki değişimler.....	67

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1. Çalışma kapsamında kullanılan antikorların listesi	39
Çizelge 3.2. cDNA sentez karışımının hazırlanışı	42
Çizelge 3.3. PCR karışımının hazırlanması	43
Çizelge 3.4. PCR için termal çevrim koşulu	43
Çizelge 4.1. MCF-7 ve MCF-7s hücrelerinde VPA uygulaması sonrası IC ₅₀ ve IC ₉₀ değerleri.....	47
Çizelge 4.2. MCF-7 ve MCF-7s hücrelerinde DAC uygulaması sonrası IC ₅₀ ve IC ₉₀ değerleri.....	48
Çizelge 4.3. MCF-7s hücrelerinde Nik uygulaması sonrası IC ₅₀ ve IC ₉₀ değerleri	49
Çizelge 4.4. Kombinasyon İndeks Değerleri	52



1. GİRİŞ

Kanser tedavisi, son yıllarda yeni ilaçların da kullanıma girmesine rağmen, tatmin edici başarı seviyesine ulaşmamıştır. Üstelik mortalitede kısmi azalmaya ve genel yaşam süresinde kısmi uzamaya rağmen kanser vakalarının görülme sıklığı hızla artmaktadır (Siegel ve ark. 2015). Bu nedenle, yeni anti-kanser ajan ve/veya yaklaşım arayışları daha da önem kazanmaktadır. Tedavi başarısızlığındaki en önemli neden olarak son yıllarda kanser kök hücresi (KKH, tümör başlatan hücre) teorisi ortaya atılmıştır. Çünkü KKH'lerinin tedaviye direnç göstererek hastalığın yeniden tekrarlamasında (nüks etmesinde) rol aldıkları gösterilmiştir (Ojha ve ark. 2015). Bu nedenle, kök hücreyi öldüremeyen bir kemoterapi protokolünün başarısız olacağını düşünmek gerçekçi olmalıdır. Çünkü, tümör kitlesinin çok büyük çoğunluğunu (~%99) oluşturan kanser hücreleri kemoterapi uygulamasıyla başlangıçta öldürülse bile, çok az oranda (~%0,1-2) bulunabilen KKH'lerinin varlığı, hastalığın bir süre sonra nüks etmesine neden olabilmektedir. Bu nedenle, çoğunluğu oluşturan kanser hücrelerinin yanısıra KKH'lerini de hedefleyen tedavi modaliteleri önem kazanmaktadır.

Kök hücrelerde, hayatta kalma ve proliferasyondan sorumlu Wnt/ β katenin sinyal yolağının yeniden aktive olduğu bilinmektedir. Meme kanseri hücre hatları ile yapılan çalışmalar kök hücre popülasyonlarının radyasyon tedavisine daha dirençli olduklarını ve bu dirence Wnt/ β katenin sinyal yolağının aracılık ettiğini göstermektedir (Chen ve ark. 2001). MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde Wnt/ β katenin sinyal yolağının baskılanmasıyla tümör büyümesinin durdurulduğu *in vitro* ve *in vivo* olarak gösterilmiştir (Xue ve ark. 2014). Translasyon sonrası histon modifikasyonlarında değişiklikler ile belirli histon asetilasyon ve metilasyon işaretlerinin kaybının kanser süreci ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Histon asetilasyon programının değişimi farklılaşma süreci ile ilişkilidir ve bundan dolayı farklılaşmayı arttırmak için histon deasetilazları (HDAC) hedefleyen ilaçlar kullanılmaktadır (Marks ve Xu 2009).

Elde edilen bilgiler doğrultusunda bu tez çalışmasında, KKH'lerini hedefleyen ve bu hücreleri KKH özelliği taşımayan hücrelere dönüştüren bir tedavi yaklaşımı esas alınarak, Wnt/ β katenin yolak inhibitörü Niklozamid ve HDAC inhibitörü Valproik asit kombinasyonunun meme kanseri kök hücreleri üzerine olası sitotoksik ve apoptotik etkileri araştırılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Kanser Kök Hücre Biyolojisi

2.1.1. Tarihçe

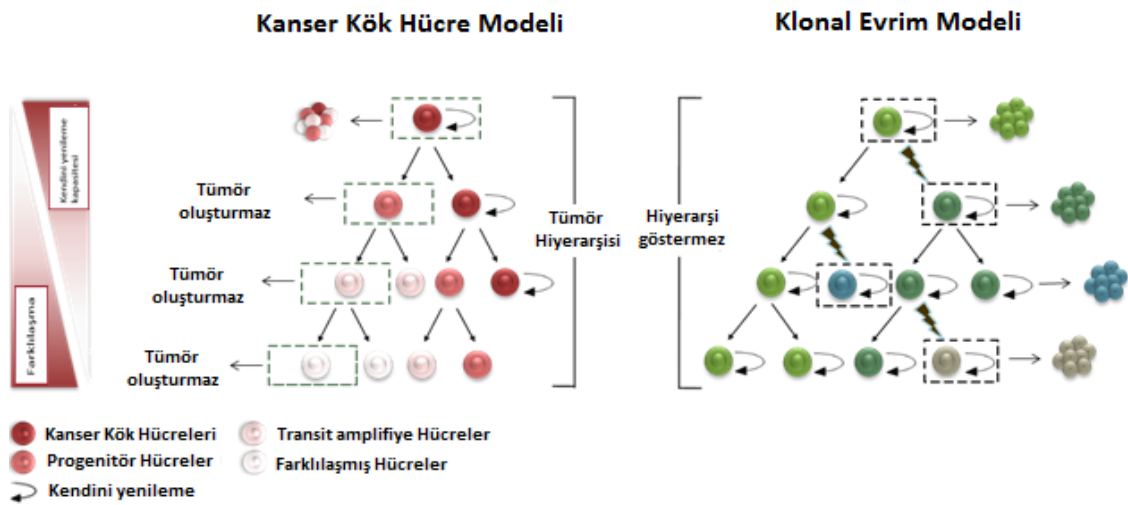
İlk olarak 1930'lu yıllarda, Lösemi oluşturulmuş fare modelinde tek bir hücrenin orjinal parental tümörü oluşturabildiği ancak her bir tek hücrenin de tümör oluşturma konusunda başarılı olamadığı dolayısıyla tümör popülasyonu içerisinde az miktarda bulunan bir altpopülasyonun varlığı tanımlanmıştır (Furth ve ark. 1937). 1970'li yıllarda, solid tümörlerden elde edilen hücrelerin, hematopoietik kanserdekilere benzer şekilde, farklı proliferasyon yeteneklerine sahip olduklarını ve bu hücrelerden bazılarının soft agarda koloni oluşturabildikleri gösterilmiştir (Hamburger ve Salmon 1977). 1994 yılında, AML hücrelerinde, yalnızca CD34⁺/CD38⁻ yüzey antijenlerine sahip belirli bir hücre grubunun koloni oluşturabildiği gösterilmiştir (Lapidot ve ark. 1994). 1997 yılında ise “KKH teorisi” ya da “Hiyerarşi modeli”ne dair en kesin ve dikkat çekici gelişme CD34⁺/CD38⁻ yüzey antijenlerine sahip bir hücre alt grubunun, *in vivo* koşullarda, tümör oluşturabildiğinin gösterilmesi olmuştur. Ayrıca bu hücrelerin normal kök hücreler ile benzer karakter (kendini yenileme, farklılaşma ve proliferasyon) sergiledikleri rapor edilmiştir (Bonnet ve Dick 1997).

Al-Hajj ve ark. (2003) ilk kez solid bir kanserde (meme kanseri) KKH varlığını (CD44⁺/CD24⁻/Lin⁻/düşük) göstermişlerdir. Bu yüzey antijenleri ile karakterize özel bir hücre alt grubunun 100 tanesinin dahi farelerde tümör oluşturabildiği gösterilmiştir (Al-Hajj ve ark. 2003). Son on yılda ise, diğer solid tümörler için de KKH'lerinin varlığı tanımlanmıştır (Islam ve ark. 2015). Tümör oluşturma kabiliyetine sahip bu hücre grubunun tümör içerisindeki sayılarının çok az olduğu ve tedavide kullanılan ilaçlar tarafından elimine edilemediklerinde hastalığın tekrarı ve tedavi direncinden sorumlu oldukları öngörülebilir.

2.1.2. Kanser kök hücre hipotezi

Tümör dokusu; morfoloji, gen ekspresyonu, proliferatif kapasite ve invaziflik açısından birbirinden farklılık gösteren hücre popülasyonlarını ihtiva eden heterojen bir yapıdır ve bu heterojenitenin nasıl ortaya çıktığını açıklayan iki teori mevcuttur (Pardal ve ark. 2003, Dick 2009). Bunlardan ilki, klonal evrim teorisi (sitokastik model); tümör içerisindeki her

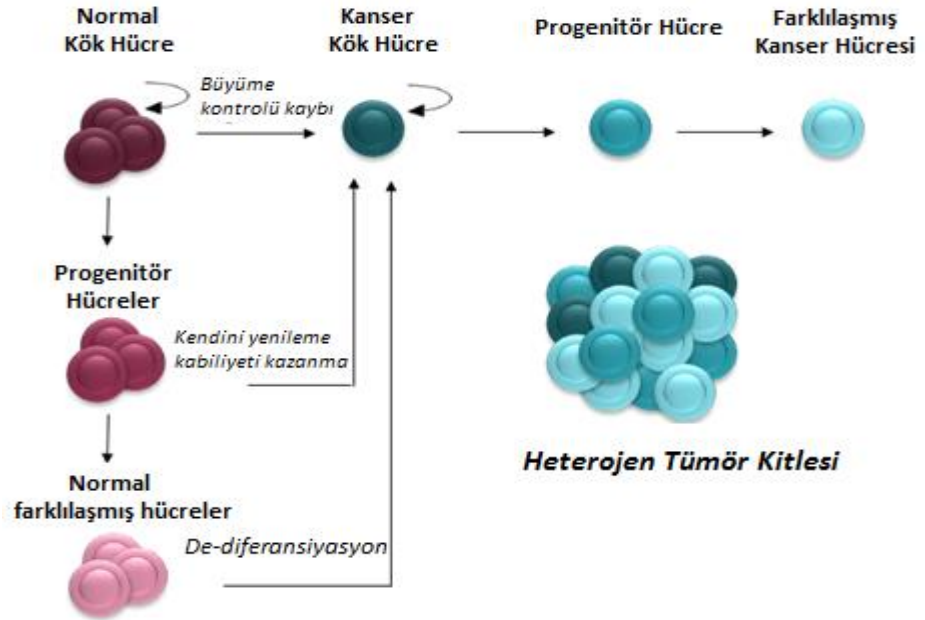
bir hücrenin genetik ve/veya epigenetik değişikliklere bağlı olarak, tümörjenik olma (tümör başlatma ve devamlılığını sağlama) ve homojen fenotipe sahip bir tümör oluşturma potansiyeli taşıdığı öne sürmektedir. Buna karşın; KKH hipotezi yani hiyerarşik model, yalnızca kendini yenileyebilen ve tümör içerisindeki tüm kanser hücre tiplerine farklılaşma kabiliyeti olan özel bir hücre alt grubunun (kök hücre benzeri karakter gösteren) tümör oluşumu ve devamlılığında sorumlu olduğunu ifade eder. Bu teoriye göre, tümör içerisindeki hücrelerin düzenlenmesinde daha katı bir hiyerarşi vardır ve kanser başlatıcı hücreler ya da KKH'leri, bu hiyerarşinin en tepesinde yer alır. Bu hücreler simetrik bölünerek ya kendilerinin kopyası olan iki yavru hücre (kendini yenileme) ya da iki adet birbirine eş tümör oluşturma kapasitesi olmayan progenitör (öncül) hücre (farklılaşma) meydana getirir. Asimetrik bölündüklerinde ise, bir tane kendisinin kopyası (KKH) ve bir tane de progenitör hücre olmak üzere birbirine eş olmayan yavru hücreler meydana gelir. Dolayısıyla bu model, yavaş bölünen, tümörün devamlılığını sağlayan ve az miktarda bulunan KKH'leri ile daha hızlı bölünen, tümör oluşturma yeteneğine sahip olmayan ve tümörün büyük kısmını oluşturan kanser hücreleri olmak üzere birbirinden tamamen farklı iki alt populasyonun varlığını öne sürer. İki teori arasındaki en büyük fark, tümör oluşturma yeteneği üzerinedir. KKH teorisine göre, tümör içerisinde yalnızca özel bir hücre alt grubu tümör oluşturabilme kapasitesine sahipken klonal evrim teorisi, tümör içerisindeki her bir kanser hücresinin, bir tümör kitlesi oluşturma kabiliyetine sahip olduğunu ifade eder (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Tümör heterojenitesine dair hipotezler (Buse Cevatemre tarafından hazırlanmıştır)

2.1.3. Kanser kök hücre kökenine dair hipotezler

KKH'lerin kökeni günümüzde net olmamakla birlikte, KKH özelliklerinin edinilmesine dair 3 temel hipotez bulunmaktadır. Bunlardan ilki normal kök hücrelerin (NKH) birtakım mutasyonlar edinerek proliferasyon kontrolünü kaybetmesi ile KKH'lere malign transformasyonudur (Smalley ve Ashworth 2003). KKH'lerinin NKH'ler ile benzer şekilde kendini yenileme ve farklılaşma yeteneği, hücre yüzey antijen ekspresyonu, kök hücre karakteriyle ilişkili gen ve protein ekspresyonları, gelişimsel sinyal yollarının aktivasyonu gibi özellikler göstermesi bu hipotezi güçlendirmektedir. İkinci hipoteze göre bir diğer potansiyel KKH kaynağı progenitör ve terminal farklılaşmış normal hücrelerin malign transformasyonudur. Progenitör hücreler kısıtlı kapasitede kendilerini yenileme özellikleri bulunmakla birlikte kök hücrelere kıyasla daha fazla sayıda bulunurlar. Terminal farklılaşmış olgun hücreler de de-diferansiye olacakları mutasyonlar edinerek kendini-yenileme potansiyeli edinebilirler (Bjerkvig ve ark. 2005). Üçüncü hipoteze göre ise, KKH'leri, farklılaşmış tümör hücrelerinin de-diferansiyasyonu ile epitelyal mezenkimal dönüşüm (EMD) yolağının aktifleşmesi neticesinde oluşmaktadır (Scheel ve Weinberg 2012) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. KKH kökenine dair hipotezler (Buse Cevatemre tarafından hazırlanmıştır)

2.1.4. Kanser kök hücre özellikleri

2.1.4.1. Hücre yüzey antijenleri ve yüzey bağımsız büyüme

Tümörün büyük bir kısmını oluşturan farklılaşmış kanser hücrelerinden farklı olarak KKH'leri, NKH'leri ile benzer şekilde, birtakım hücre yüzey belirteçlerini eksprese ederler. Bu belirteçler aynı zamanda dokuya özgüdür. Örneğin, meme KKH'leri, CD44 glikoproteinini fazla eksprese ederken CD24 proteinini düşük düzeyde eksprese eder veya etmez (CD44⁺/CD24⁻). Solid tümörlerde; CD44, CD24, CD133, EpCAM, CD90, α 2 β 1 integrin gibi KKH yüzey belirteçleri bulunmaktadır (Karakas ve ark. 2014). Bu spesifik belirteçlerin yardımı ile, KKH populasyonları, primer tümörlerden veya hücre hatlarından FACS ve/veya manyetik separasyon teknolojileri ile izole edilebilir, akım sitometri ile de karakterizasyonları yapılabilir. Bir diğer KKH karakteristiği ise, hücrelerin kendini yenileme kapasitesilerinin bir sonucu olarak yüzey bağımsız koşullar altında kürecik (sfer) şeklinde büyümeleridir (Velasco ve ark. 2012).

2.1.4.2. Pasiflik (Quiescence) ve dormansi

KKH'leri, çoğunlukla hücre siklusunun pasif fazında kalan, dormant veya düşük mitotik indekse sahip hücrelerdir. Kemoterapi ve radyoterapinin proliferen olan hücreleri hedeflediği dikkate alındığında, KKH'lerinin bu özellikleri, onları hızlı bölünen hücreleri hedefleyen tedavilere karşı daha az duyarlı yapmaktadır. Dolayısıyla, bölünen hücrelerin aksine, göreceli olarak pasif olan KKH'leri, çoğu kemoterapötik ilacın etkisinden korunmuş olurlar (Clevers 2011).

2.1.4.3. Apoptotik mekanizmanın düzenlenmesi ve pro-yaşam sinyal iletiminin aktivasyonu

Apoptozis; anti-apoptotik ve pro-apoptotik moleküllerin dengesini sıkıca kontrol eden fizyolojik bir programdır. DNA hasarı, onarılmadığı takdirde programlı hücre ölümü veya apoptozisle sonuçlanır ancak kanser hücrelerinde bu denge, DNA onarımı olmadığında dahi sıklıkla apoptozisin engellenmesi yönündedir. Kanser hücrelerinin apoptozis direnci klasik şekilde, anti-apoptotik proteinlerin (Bcl-2 aile proteinleri, apoptozis inhibitörleri, kaspaz-8 inhibitörü FLIP) aşırı ekspresyonu veya Bim gibi pro-apoptotik proteinlerin ekspresyonlarının azalması ile ilişkilendirilir (Letai 2008). Örneğin, primer kültürden

izole edilen glioblastoma KKH'leri (CD133⁺), KKH-olmayan populasyona (CD133⁻) kıyasla, Bcl-2, Bcl-xL, XIAP ve FLIP gibi anti-apoptotik proteinleri yüksek düzeyde eksprese ederler (Liu ve ark. 2006a). Dolayısıyla bu proteinler inhibe edilerek, KKH'leri kemoterapötiklere veya apoptozise duyarlı hale getirilmektedir.

KKH'leri, NKH'lere benzer şekilde, proliferasyon, yaşam, kendini-yenileme ve farklılaşma arasındaki denge için spesifik sinyal iletimlerine bağımlıdır. Terapilere yanıt olarak KKH'leri de anti-apoptotik sinyal iletimini fazla veya pro-apoptotik sinyal iletimini az miktarda aktifleştirir. KKH'leri için tanımlanmış başlıca sinyal yolları Notch, Hedgehog ve Wnt olmak üzere, EGFR, BMP, IGF, ERK, PI3K/AKT ve NF- κ B'dir (Zhao 2016). Bu yolların inhibisyonu ile KKH'lerin sayısı ve tümörjenitede azalma olmakla birlikte sinyal iletim yolları arasındaki ilişkiler birden fazlasının inhibisyonunu da gerektirmektedir.

2.1.4.4. Kanser kök hücre plastisitesi ve epitelyal mezenkimal dönüşüm

EMD, embriyonik gelişim sürecinde epitelyal hücrelerin göç edebilmelerinden sorumlu fizyolojik bir olaydır. Bu süreçte, epitelyal hücreler morfolojik değişiklikler geçirir ve fibroblast-benzeri mezenkimal fenotipe dönüşürler. Tipik olarak, polarize epitelyal hücreler, hücre-hücre bağlantılarının zayıfladığı daha hareketli ve daha invazif karakterli hücrelere dönüşürler. Moleküler düzeyde, epitelyal belirteçlerin (E-kaderin ve β -katenin gibi) ekspresyonu, yerlerini mezenkimal belirteçlere (vimentin ve fibronektin gibi) bırakır. Bu genlerin ekspresyonu ise, Twist, Zeb1, Snail ve Slug gibi çeşitli transkripsiyon faktörleri tarafından gerçekleştirilir (Scheel ve Weinberg 2012). Bu transkripsiyon faktörleri, EMD yanında, KKH uyarılmasını ve terapi direncini de kontrol edebilirler.

Terminal farklılaşmış hücrelerin, hücresel farklılaşma yolağını tamamlayarak proliferasyon yeteneklerini bu aşamada kaybetmiş oldukları düşünülmekteydi. Fakat bu hücrelerde Yamanaka faktörlerinin (yeniden programlama transkripsiyon faktörleri: Oct4, Sox2, cMyc, ve Klf4) yeniden eksprese ettirilmesine pluripotent kök hücreler (iPKH) oluşturularak de-diferansiyasyon gerçekleştirilmiştir (Takahashi ve Yamanaka 2006). Plastisite, doku kaynaklı kök hücrelerin, içerisinde yer aldığı dokunun diferansiye hücre fenotiplerini verme potansiyeline karşılık gelirken, KKH bağlamında, fenotipik olarak farklılaşmış bir hücrenin, de-diferansiye olarak kök hücre karakteristiklerini elde

etmesini ifade etmektedir (Singh ve Settleman 2010). EMD-ilişkili kök hücre veya benzeri hücrelerin oluşumu, herhangi bir maruziyet neticesinde yetişkin epitelyal kök hücre havuzunun azalmasına karşın kritik önem taşımaktadır. Ne yazık ki benzer mekanizma ile tümörjenik KKH'leri meydana gelebilir ve bu hücreler Twist, Snail veya KLF8 gibi transkripsiyon faktörlerini fazla miktarda eksprese ederler. Yani, EMD geçiren hücreler, KKH-benzeri özellikler kazanırlar veya bir diğer deyişle KKH'leri mezenkimal karaktere sahiplerdir (Mani ve ark. 2008). Dolayısıyla, hücrel plastisite, tümör içerisindeki hücrelerin durağan ve sabit olmadıklarını gösterir ki bu durumda hem KKH hem de KKH-olmayan popülasyonların birlikte hedeflenmesi, kanser tedavisinde etkili bir strateji oluşturabilir.

2.1.4.5. Otofaji

KKH'leri, hipoksi, besin azlığı veya toksik ilaçlar gibi birtakım elverişsiz/olumsuz koşullara maruz kaldıklarında, canlılıklarını ve metabolik homeostazlarını devam ettirebilmek adına çeşitli katabolik süreçleri aktive edebilirler. Homeostaz devamlılığı için temel mekanizma ise otofaji'dir. Bu süreçte, hücre için gereksiz ve işlevsel olmayan molekül/organeler; lizozomal enzimler aracılığıyla parçalanarak, hücreye enerji ve aminoasitler sağlanır. Otofaji, kanserde çift yönlü rol oynar; bir tümör baskılayıcı olarak hasarlı proteinler ve organellerin birikimini önler (tümör progresyonunu baskılayarak) veya hipoksi ve besin yokluğu gibi ağır stres koşulunda tümör lehine rol alır. Stres veya artan metabolik ihtiyaçlar, tümör hücrelerinin otofajiyi aktive etmesine neden olur. KKH'lerinde antikanser terapilerin, otofajiyi uyardığı ve sonuç olarak terapi direncini sağladığı gösterilmiştir. Dolayısıyla otofaji inhibisyonu, tümörleri kemoterapiye karşı duyarlı hale getirir (Ojha ve ark. 2015).

2.1.5. Kanser kök hücre biyolojisinde gelişimsel sinyal yolları

2.1.5.1. Notch sinyal yolağı

Notch yolağına ait Notch proteinleri hücre proliferasyonu, farklılaşması ve apoptozis gibi hücrenin kaderini belirlemede temel rolleri olan transmembran reseptörler ailesine ait proteinlerdir. Notch sinyal yolağı aktivasyonu, reseptör-ligand etkileşimleri sonucunda tümör nekrozis faktör α - dönüştürücü enzim ve γ -sekretaz kompleksi tarafından

gerçekleştirilen proteolitik bir kırılma ile gerçekleşir. Bu kırılma sonucu Notch reseptörünün intraselüler domaini (NICD) serbest kalır ve nükleusa girer.

Nükleusa giren NICD, DNA bağlanma proteini CSL'ye (CBF-1) bağlanarak büyük bir transkripsiyonel aktivatör kompleks oluşturur. Oluşan bu kompleks hücre proliferasyonu, farklılaşması ve yaşamını kapsayan çeşitli hedef genlerin ekspresyonunu sağlar (Wang ve ark. 2009).

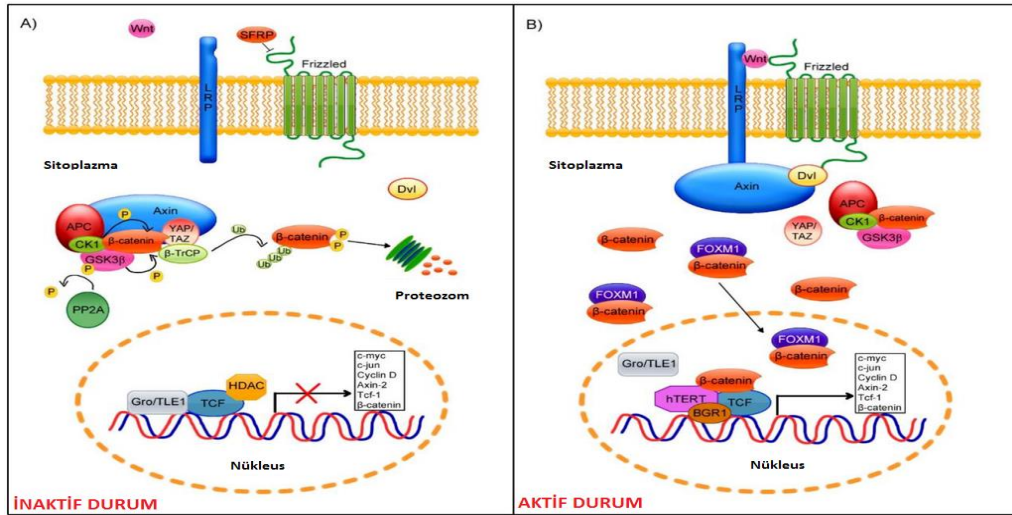
2.1.5.2. Hedgehog (Hh) sinyal yolağı

Hh sinyal yolağı KKH devamlılığı, doku polaritesi, hücre proliferasyonu ve farklılaşmasının düzenlenmesinde rol oynar (Jena ve ark. 2012). Bu yolak son derece koordineli ve planlı bir ağıdır. Normalde yolak inaktif haldeyken, transmembran bir hücre yüzey reseptörü olan Patched1 (Ptch1) bir diğer transmembran protein olan Smoothed (Smo)'yu baskılayarak inaktif halde tutar. Yolak aktivasyonunda ise; Hh proteini transmembran bir hücre yüzey reseptörü Ptch1'e bağlanarak Ptch1'i inhibe eder ve inhibe olmuş Ptch1'in Smo üzerindeki baskılayıcı etkisi ortadan kalkar. Aktive olan Smo transkripsiyon faktörü olan Gli'nin salınımını sağlar, Gli nükleusa transloke olur ve Hh hedef genlerinin transkripsiyonu başlar (Tanaka ve ark. 2009).

2.1.5.3. Klasik Wnt/ β -katenin sinyal yolağı

Wnt ligandları sisteince-zengin salgı glikoproteinleridir ve insanlarda evrimsel olarak korunmuş 19 adet Wnt ligandı mevcuttur. Wnt proteinlerinin salgılanması için translasyon sonrasında iki çeşit lipid değişikliği gereklidir: Endoplazmik retikulumda sistein rezidülerine palmitat kısmının eklenmesi ve Porcupin ile serin palmitoilasyonu. Wls transmembran proteini, Golgi'de Wnt proteinine bağlanarak ligandın hücre membranına getirilmesini sağlar (Takada ve ark. 2006). Wnt ligandlarının yokluğunda; sitoplazmik β -katenin, bir scaffold proteini olan Axin ile APC, GSK3 ve CK1 proteinlerinin oluşturduğu 'yıkım kompleksi' tarafından fosforlanır. Bu durum, sitoplazmik β -kateninin ubiquitinasyonu ve proteozomal degradasyonuna yol açar. Wnt ligandları hücreden salındıktan sonra; G-protein-bağlı reseptör ailesinin üyesi olan Fz/Fzd proteini reseptörüne ve LRP5/6 koreseptörüne bağlanarak bir Wnt-Fz-LRP5/6 kompleksi oluşturur. Bu yapıya bir scaffold proteini olan Dvl eklenerek LRP6'nın fosforilasyonunu ve aktivasyonunu sağlar. LRP6 fosforilasyonu aynı zamanda Axin

kompleksi için de bağlanma motifidir ve Axin kompleksinin yapıya eklenmesi LRP6 fosforilasyonu için gereklidir. Yani Axin hem LRP6 fosforilasyonu için gereklidir hem de p-LRP6'ya bağlanarak sinyal amplifikasyonundan sorumludur (Zeng ve ark. 2008). Dolayısıyla aynı kinaz kompleksi hem pozitif hem de negatif düzenlenmede rol alır. Bu süreçte, Axin aracılı β -katenin fosforilasyonu inhibe olarak β -katenin stabilizasyonu gerçekleşir. Ardından, sitoplazmada biriken β -katenin TCF/LEF kompleksini biçimlendirmek üzere nükleusa girer. Wnt sinyali yokluğunda, TCF ko-baskılayıcı proteinler (TLE ve HDAC) ile birlikte Wnt hedef genlerinin ekspresyonunu baskılar. β -kateninin nükleusta birikmesi TCF baskılayıcı kompleksini transkripsiyonel aktivatör kompleksine çevirir ve Wnt hedef genlerinin ekspresyonu uyarılır (MacDonald ve Tamai 2009). Başlıca Wnt hedef genleri arasında FGF20 (hücre-hücre sinyal iletimi); CCND1 ve Myc (hücre döngüsü); DKK1 (Wnt antagonisti) ve Axin 2 (Wnt sinyalinin negatif düzenleyicisi); Oct4 ve Nanog (kök hücre belirteçleri) yer almaktadır (Katoh ve Katoh 2007, Cole ve ark. 2008). Wnt sinyali ayrıca, ekstraselüler Wnt antagonistleri olan, sFRP'ler, WIF-1 (ligand-reseptör etkileşiminin inhibisyonu) ve DKK (LRP koreseptörünün inhibisyonu) ile sitozolik Wnt antagonistleri olan Axin 2 (Wnt sinyalinin negatif düzenleyicisi) ve Nkd proteinleri (Dvl antagonistleri) üzerinden düzenlenir (MacDonald ve Tamai 2009) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Wnt/ β -katenin sinyal yolağı inaktif durum; Wnt sinyali yokluğunda TCF ko-baskılayıcılarla (Ko-B) birlikte Wnt hedef genlerinin ekspresyonunu baskılar (A). Aktif durum; reseptör-ligand etkileşimini takiben serbest kalan β -katenin, nükleusta birikerek ko-aktivatörlerle (Ko-A) birlikte Wnt hedef genlerinin ekspresyonunu uyarır (B) (Bello ve ark. 2015'den Türkçeleştirilerek alınmıştır)

2.1.5.3.1. Niklozamid

Niklozamid (Nik), salisilik asit türevi bir salisilanilid olup tenya enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan FDA-onaylı bir ajandır. Niklozamid aynı zamanda Wnt/ β -katenin sinyal yolağı da dahil olmak üzere birden fazla hücre içi sinyal yolağını inhibe edici etki gösterir. Wnt/ β -katenin sinyalizasyonunu ise hücre tipine bağılı olarak LRP6 degradasyonu ya da Fzd1 endositozunu uyararak, Dvl2 protein ekspresyonunu baskılayarak, Wnt3A ile uyarılmış β -katenin birikmesi ve TCF/LEF aktivitesini önleyerek negatif yönde düzenler (Chen ve ark. 2009, Lu ve ark. 2011).

2.2. Epigenetik Mekanizmalar

Epigenetik terimi ilk kez 1942 yılında Conrad Waddington tarafından kullanılmıştır ve klasik olarak DNA veya kromatin yapısı üzerinde nükleotid sekansını değıştirmeden ortaya çıkan tüm kalıtsal değışiklikler olarak tanımlanmaktadır. Başka bir deyişle, DNA yapısını değıştirmeden gen ifadesinin değışimidir (Herceg 2007). Epigenetik mekanizmalar, embriyonik gelişim, hücrel hafıza, hücre ve doku spesifik gen ekspresyonu, farklılaşma ve yetişkin doku devamlılığı gibi önemli biyolojik süreçlerin transkripsiyonel yolaklarının ana düzenleyicileridir (Meissner 2010, Tammen ve ark. 2013). Epigenetik düzeyde gen regülasyonu, hem DNA hem de kromatin üzerinde kovalent modifikasyonlar üzerinden gerçekleşir. Bu modifikasyonlar, gen transkripsiyonunu kromatin yapısını açarak (ökromatin, aktif gen transkripsiyonu) ya da kondanse DNA yapısı sağlayarak (heterokromatin, baskılanmış gen ekspresyonu) düzenlerler (Meissner 2010). DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları iki önemli epigenetik modifikasyondur.

2.2.1. DNA metilasyonu

DNA metilasyonu, gen ifadesini değıştirerek hücre fonksiyonlarını değıştirmekte ve bir metil (CH_3) grubunun, DNA metil transferazlar (DNMT) katalizinde, kovalent olarak CG dinükleotidlerinin (CpG) 5. Karbon pozisyonundaki sitozin bazlarına eklenmesiyle oluşmaktadır (Bird, 2002). Genlerin promotör bölgelerindeki CpG adacıklarında görülen DNA metillenmesi, kromatin yapısının organizasyonunda ve gen ifadesinin kontrolünde önemli rol oynamaktadır. Metillenme, hem transkripsiyon faktörlerinin tanıma bölgelerinde değışiklikler meydana getirerek, hem de metilenmiş DNA'ya özgül olarak

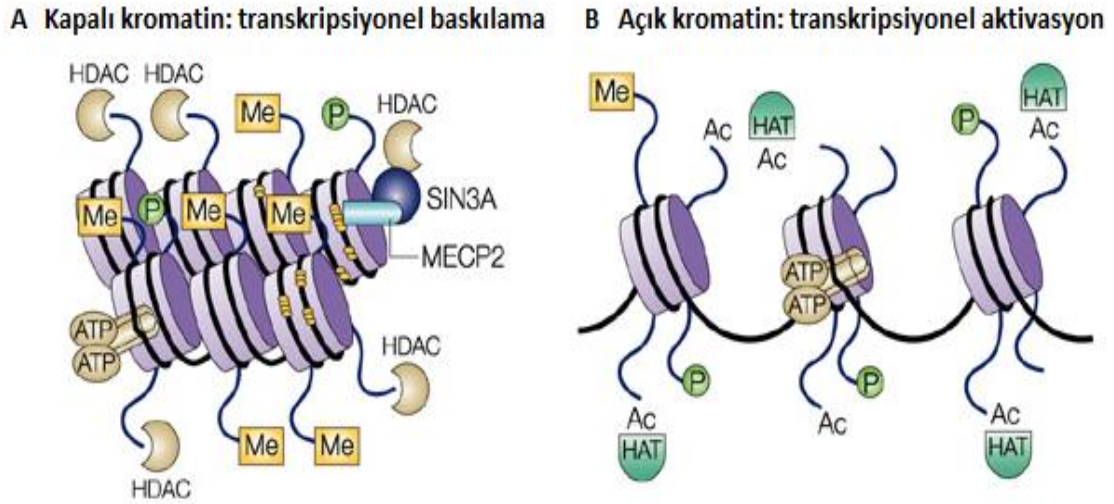
bağlanan represörlerin katılımını sağlayarak, genin ekspresyonunu engelleyebilmektedir (Baylin, 2005). DNA metilasyonu ile ilişkili olarak DNMT'ler; metilasyon modellerinin oluşturulmasından sorumlu (de novo metiltransferazlar), DNMT3a ve 3b ile bir kez oluşturulan metilasyon modelinin devam ettirilmesinden sorumlu (maintenance metiltransferazlar), DNMT1 ve 2 olmak üzere farklı tiplere ayrılmaktadır (Okano ve ark. 1999, Eden ve ark. 2003). Genomda CpG-zengin sekanslar %50 veya daha fazla G+C içeriğine sahip yaklaşık 200 bp uzunluğunda bölgeler olup CpG adaları olarak bilinmektedir. Transkripsiyonel olarak aktif genlerin (housekeeping genler ve çoğu düzenleyici genler) promotorları bu bölge ile ilişkili olup metillenmemiş durumdadır. CpG adalarındaki sitozinin metillenmesi transkripsiyonel susturma ile ilişkili olup gen ekspresyonunun düzenleyici mekanizmasıdır (Bird 2002). Transkripsiyonun baskılanması; DNA metilasyonu varlığında transkripsiyon faktörlerinin promotor bölgeye bağlanamaması üzerinden veya spesifik olarak bu metillenmiş bölgeleri tanıyarak bağlanan proteinler (MBD; metillenmiş CpG'ye bağlanan proteinler) ile gerçekleşmektedir (Klose ve Bird 2006).

Kanser epigenomu global hipometilasyon ve gen spesifik hipermetilasyon ile karakterizedir. DNA hipometilasyonu; kanser gelişiminin erken aşamalarında meydana gelerek kromozomal instabilite ve tümör ilerleyişine katkı sağlar (Esteller 2008). Ayrıca tümör oluşumunda rol alan önemli genlerin (R-Ras, Cyclin D2 gibi) spesifik aktivasyonuna yol açar (Nishigaki ve ark. 2005). Buna karşılık, tümör baskılayıcı genlerin (Retinoblastoma 1 (RB1), CDKN2A (p16), BRCA1 gibi), APC ve WNT sinyal genlerinin susturulması, promotor hipermetilasyonu ve kromatin hipoasetilasyonu ile ilişkilidir (Suzuki ve ark. 2004, Tsai ve Baylin 2011).

2.2.2. Polikomb grup proteinler ve histon modifikasyonları

Ökaryotlarda, DNA ve histonlar kromatin yapısını oluşturmak üzere nükleozomlar şeklinde organize olmuşlardır. Her bir nükleozom kor partikülü, ikişer molekül H2A, H2B, H3 ve H4 histon proteinlerini içeren bir histon oktomeri oluşturur ve DNA'ya bağlanarak 1,7 dönüş ya da yaklaşık 146 baz çifti sarar. Bu nükleozomal dizinler arasına bağlayıcı (linker) H1 histon eklenmesiyle oktamer etrafında iki tam dönüş gerçekleşerek DNA daha kompakt bir hale getirilir (Annunziato 2008).

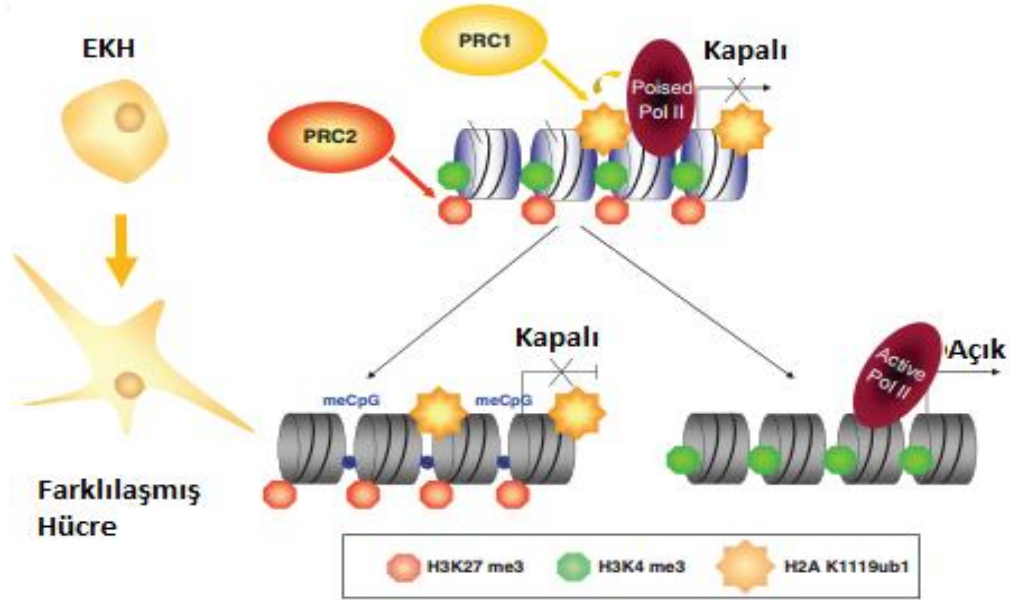
Her bir histon çekirdek, nukleozom yapısından dışarıya uzanan uzun bir N-terminal aminoasit kuyruğa sahiptir ve bu histon kuyruklar asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, ubiquitinasyon gibi kromatin yapısını kontrol eden çeşitli post translasyonel (translasyon sonrası) modifikasyonlar gösterirler (Şekil 2.4). Gen ekspresyonu üzerinde önemli etkilere sahip olan bu modifikasyonlar histon kodu olarak bilinmektedir. Bu spesifik histon modifikasyonları Lizin (K), Serin (S), Arjinin (R) rezidülerinde meydana gelir ve modifiye olan spesifik bölgeye göre aktive edici ya da baskılayıcı olabilir. Mesela, H3 histon proteininin 4. Lizin rezidüsüne 3 metil grubunun eklenmesi (H3K4me3) aktive edici bir histon işaretiyken, 27. Lizin rezidüsüne 3 metil grubunun eklenmesi (H3K27me3) baskılayıcı bir histon işaretidir (Jenuwein ve Allis 2001, Sauvageau ve Sauvageau 2010).



Şekil 2.4. Histon modifikasyonları ile düzenlenen kapalı (A) ve açık (B) kromatin yapısı (Johnstone 2002'den Türkçeleştirilerek alınmıştır)

Polikomb Grup (PcG) proteinler, epigenetik olarak kromatin modifiye eden transkripsiyonel baskılayıcılar olup hücre kaderini belirleyen anahtar düzenleyicilerdir. PcG proteinleri, Polikomb represif kompleks 1 (PRC1) ve Polikomb represif kompleks 2 (PRC2) olmak üzere en az iki sınıf çok alt üniteli kromatin bağlanma kompleksleri oluştururlar. PcG kompleksleri gen ekspresyonunu, histon kuyruklarının epigenetik modifikasyonu ve kromatinin sıkıştırılması yoluyla baskılamaktadır. Kök hücrelerin kendini yenileme özelliklerinin düzenlenmesinde rol alan Bmi1 bir PRC1 proteindir. H3 histon proteininin 27. Lizin rezidüsüne 3 metil grubunun eklenmesini katalizleyen histon

metiltransferaz, Ezh2, PRC2 proteinidir. Bu histon modifikasyonu kromatin üzerine PRC1 ve diğer ko-represörlerin katılmasına olanak sağlar ve heterokromatin oluşur. PRC2 bileşenlerinin yüksek düzeyleri embriyonik kök hücrelerde (EKH) bulunur; farklılaşma sürecinde hızla azalır. EKH’lerde PcG proteinlerinin kromatin ile etkileşimi artmış H3K27me3 düzeyleri ile ilişkilidir ve bu baskılanmış PcG hedef genleri EKH’lerinin farklılaşma sürecinde aktive olmaktadır. PcG proteinleri tarafından gerçekleştirilen H3K27me3, H3K9me3 gibi histon modifikasyonları erken embriyonik gelişimde birtakım hedef genlerin susturularak pluripotensi devamlılığının sağlanmasında rol alır. Gelişimin ileri evrelerinde ise farklılaşmayı takiben pluripotensinin sürdürülmesinde rol alan genlerin susturulmasından sorumludur. Bu, PcG bağlanma ve baskılayıcı H3K27me3 kaybı ile artmış aktif H3K4me3 modifikasyonu ile koreledir (Şekil 2.5). Ezh2 fiziksel ve fonksiyonel olarak HDAC 1 ve 2’ye bağlıdır ve genlerin PRC2-aracılı transkripsiyonel baskılanma histon deasetilasyonunu içerir. Histon asetilasyon programının değişimi farklılaşma süreci ile ilişkilidir ve bundan dolayı farklılaşmayı arttırmak için HDAC’ları hedefleyen ilaçlar kullanılmaktadır (Sauvageau ve Sauvageau 2010, Munoz ve ark. 2012).



Şekil 2.5. Farklılaşma sürecinde ya tamamen bastırılmış (H3K4me3 kaybı) ya da aktive edilmiş (H3K27me3 kaybı) durumu gösteren kromatin modifikasyonları (Schuettengruber ve Cavalli 2009’dan değiştirilerek alınmıştır)

Histon proteinlerinin asetillenmesi, kompakt DNA kalıbını gevşeterek, transkripsiyonel sürecin başlamasına olanak tanır. Bu süreç, histon asetil transferaz (HAT)'lar ya da histonların üzerindeki asetillenmeyi kaldıran, HDAC'ların engellenmesi ile yönetilir. HDAC'lar, histon proteinlerinin lizin rezidülerinden fonksiyonel asetil gruplarının ayrılmasını uyaran enzimlerdir. İnsanlarda, dizi benzerliğine göre 4 sınıfa ayrılan 18 adet HDAC enzimi bulunmaktadır. Sınıf I proteinler (HDAC1, HDAC2, HDAC3 ve HDAC8); Sınıf II proteinler (HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9 ve HDAC10); Sınıf III Sirtuin-benzeri proteinler (SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6 ve SIRT7) ve Sınıf V protein (HDAC11). Sınıf I HDAC'lar nükleusta iş görürken, Sınıf II HDAC'lar hem sitoplazmada hem de nükleusta iş görür. Ancak son çalışmalar Sınıf I HDAC'ların sitoplazmada veya özelleşmiş hücrel organellerde lokalize olabildiğini göstermektedir (Seto ve Yoshida 2014). Kısa zincirli bir yağ asidi olan Valproik asit (VPA, valproate), son 10 yıldır, epilepsi ve diğer nöropsikiyatrik hastalıkların tedavisinde kullanılan bir histon deasetilaz inhibitörüdür. Valproik asidin, birden fazla sinyal yolağının (hücre siklusunun durması, apoptozis, anjiyogenez, metastaz, farklılaşma ve hücre yaşlanması) düzenlenmesi suretiyle *in vivo* ve *in vitro* sistemlerde güçlü antitümör etki gösterdiği çalışmalarda ifade edilmiştir. Bununla birlikte, bu inhibitör grubunun tek başına ya da kemoterapi veya radyoterapi gibi çeşitli sitotoksik ajanlarla kombine olarak uygulanabildiği araştırmacıların çalışmalarında belirtilmiş, özellikle yüksek riskli meme kanserli hastaların adjuvan tedavisinde antrasiklin içeren kemoterapi rejimlerinin uygulanmasının bu hastaların tedavisinde oldukça etkili olduğu kanıtlanmıştır. İlaveten, valproik asit; karsinom hücrelerinin farklılaşmasına, hematopoietik progenitör hücrelerin ve akut miyeloid lösemi hastalarından lösemik blast hücrelerinin dönüştürülmesine neden olur (Göttlicher ve ark. 2001; Shankar ve Srivastava 2008).

2.3. Apoptozis

Apoptozis ya da programlı hücre ölümü, çok hücreli canlıların gelişimi ve devamlılığında rol alan hücrel bir olaydır. Vücutta ihtiyaç duyulmayan, fonksiyonları bozulan, fazla üretilmiş, yaşlanmış, düzensiz gelişmiş veya DNA'sında hasar olan hücreler çevreye zarar vermeden programlı yani düzenli bir yol izleyerek ölürlür. Hücrelerin içeriden ve dışarıdan gelen çeşitli uyarılara yanıt olarak aktifleştirdiği fizyolojik bir mekanizma olup hücrenin kendisi tarafından kontrol edilen aktif bir süreçtir (Meier ve ark. 2000,

Öktem ve ark. 2001, Ulukaya 2001). Çevreden gelen uyarılara yanıt olarak hücreler önce oluşan DNA hasarlarını onarmaya çalışır ve onarılamaması durumunda apoptozis sürecine girer. Böylece hasarlı hücrelerin çoğalması engellenerek tümör oluşumu gibi anormal gelişimlerin önüne geçilir (Altunkaynak ve Özbek 2008).

2.3.1. Kaspazların aktivasyonu

Kaspazlar, zimojen (inaktif prekürsör) olarak sitoplazmada bulunan ve aktif merkezlerinde sistein içeren, sistein proteazlar olarak adlandırılan enzimlerdir. Aktivasyonları ise zimojenlerin proteolitik kesimi sonucu gerçekleşir ve etkilerini, hedef proteinleri aspartik asit rezidülerinden keserek gösterirler. Bazıları başlatıcı kaspazlar (2, 8, 9, 10) olarak bilinirken, bazıları da ilerletici (efektör) kaspazlar (3, 6, 7) olarak bilinir. Kaspazlar birbirlerini aktifleştirerek preteolitik bir kaskada (şelale tarzı reaksiyon dizisi) neden olurlar (Oliver ve Valette 2005, Elmore 2007).

Başlatıcı kaspazlar, ölüm etkileyici alan (DED; death effector domain) ya da kaspaz takviye alanı (CARD; caspase recruitment domain) gibi protein-protein etkileşim motiflerini barındıran uzun bir “prodomain” içerir. Kaspazlar bu motifler sayesinde adaptör moleküllerle etkileşimlerini sağlarlar ve ardından ölüm sinyalini ilerletici kaspazlara iletirler. İlerletici kaspazlar, kısa bir “prodomain” içerirler ve apoptozisin ilerlemesini sağlamak için çeşitli hücrel substratları kırarlar (Lamkanfi 2011). Kaspaz 3, DNA onarımında görevli olan PARP’ı kırarak inaktive eder ve DNA onarımını engeller. Bazıları ise bir dizi DNaz’ı aktive ederek DNA’nın parçalanmasına yol açar Apoptozis inhibitörleri (IAP’lar) sitozolde bulunur ve kaspazların inaktif veya aktif formlarına bağlanarak fonksiyonlarını baskılar. Smac/DIABLO ise mitokondrinin iç zarında bulunur ve IAP bağlanma motifi içerir. Apoptozis sürecinde sitokrom-c ile beraber salınarak IAP’ları baskılar ve böylece kaspaz aktivasyonunu sağlar (Zimmermann ve Green 2001).

2.3.2. Mitokondrinin apoptozisdeki rolü

Hücre ölümünün düzenlenmesinde mitokondrinin, apoptotik yolların kesiştiği önemli bir kavşak noktası olduğu görülmüştür. Bu yüzden mitokondrinin aktivasyonu (sitokrom c’nin mitokondriden sitoplazmaya salınması) apoptotik süreçte geri dönüşümsüz noktayı gösterir (Kumar ve ark. 2005). Mitokondri, Apoptozis İndükleyici Faktör (AIF),

Smac/DIABLO ve sitokrom c gibi birçok pro-apoptotik proteini içerir ve bu faktörlerin mitokondriden salınmaları mitokondriyal membranda por oluşumu yoluyla gerçekleşir. Bu porlar, Bcl-2 ailesi proteinlerinin pro-apoptotik üyelerinin (Bax, Bad gibi) aktivitesi yoluyla oluşmaktadır. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyeleri olan Bcl-2 ailesi mitokondri üzerindeki etkilerini ya sitokrom c'nin sitozole salınmasını sağlayıp apoptozisi uyararak ya da sitokrom c salınımına engel olup apoptozisi baskılayarak gösterir (Palmer ve ark. 2000).

2.3.3. Bcl-2 ailesi

Bcl-2 ailesinin üyeleri, anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1) ve pro-apoptotik (Bax, Bcl-Xs, Bad, Bim, Bak, Bok, Bid) olmak üzere iki alt gruptan oluşmaktadır ve apoptozis yanıtı bu proteinlerin arasındaki dengeye bağlıdır. Pro-apoptotik proteinler fazla eksprese edildiğinde hücreler apoptoza daha duyarlı, anti-apoptotik proteinler daha fazla eksprese edildiğinde hücreler apoptoza daha dirençli olmaktadır. Pro-apoptotik Bcl-2 proteinleri hücrel hasar ya da stresin algılayıcıları olarak görev yapar ve genellikle sitozolde bulunur. Hücrel stresi takiben, anti-apoptotik proteinlerin bulunduğu mitokondri yüzeyine doğru yer değiştirmektedirler. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler arasındaki etkileşim, anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin normal fonksiyonunu bozar ve mitokondride porların oluşumuna, sitokrom c ve diğer pro-apoptotik moleküllerin zarlar arası bölgeden salınımına neden olur. Bu da apoptozom oluşumu ve kaspaz kaskadı aktivasyonuna yol açmaktadır (Fan ve ark. 2005).

2.3.4. Ekstrinsik (Dışsal) yolak

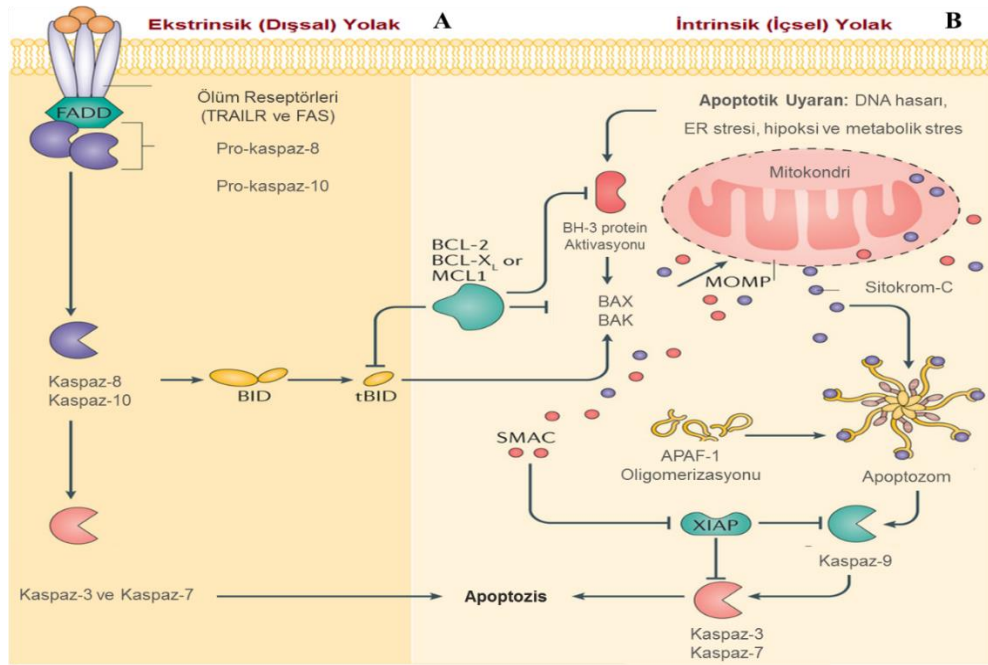
Ölüm reseptörleri (DR) olarak bilinen ve Tümör Nekroz Faktörü Reseptörü (TNFR) geni ailesinin üyesi olan; TNFR-1, Fas/CD95/APO-1 ve Tnf-İlişkili Apoptozis İndükleyici Ligand (TRAIL) reseptörleri olan DR-3 (TRAMP), DR-4 (TRAIL-R1) ve DR-5 (TRAIL-R2)'in ilgili ligandlarla etkileşime girmesi sonucunda apoptozis indüklenir. TNFR süper ailesi üyeleri, tip I transmembran proteinleri olup hepsi sistein bakımından zengin ekstrasellüler subdomainler içermektedirler. Bu özellik TNFR süper ailesi üyelerinin kendilerine özgü ligandları tarafından tek tek tanınmasını sağlamaktadır. Ölüm reseptörleri ayrıca apoptotik sinyalin transdüksiyonu için gerekli olan 80 aminoasit uzunluğunda intraselüler Ölüm Domaini (DD; Death Domain) içerir. Ölüm reseptörlerine

bağlanan ligandlar (FasL, TNF α , VE TRAIL) yapısal olarak reseptörler ile ilişkili proteinler olup TNF süperailisine aittirler. Bu ölüm ligandları tip II transmembran proteinleri gibi eksprese edilirler. Bazı durumlarda, bu proteinler proteolitik kırılabilir ve serbest kalabilirler (Guicciardi ve ark. 2009). Ölüm reseptörlerinin ligandları yani aktivatörleri reseptörlerin oligomerizasyonuna yol açarak aktifleşmelerine neden olmaktadır. Reseptörlerin aktivasyonu, Ölüm İndükleyici Sinyal Kompleksi (DISC) denilen ve proteinlerden meydana gelen bir kompleks oluşumuna sebep olur. DISC, adaptör protein Fas ilişkili ölüm alanını (FADD) ve TNFR-1 ilişkili ölüm bölgesi proteinini (TRADD) içerir. Bu ölüm bölgeleri prokaspaz-8'i aktifleştirmektedir. DISC yapısında yer alan prokaspaz 8'in aktivasyonunu takiben kaspaz 8 sırasıyla kaspaz 3, 6 ve 7'nin aktive olduğu bir kaspaz kaskatını harekete geçirir. Kaspaz 8'in aktif hale geçmesi ayrıca Bid'in aktive olmasına neden olur. Kırılmış Bid (tBid) sonrasında mitokondriye geçer ve sitokrom c, SMAC ve kalsiyum salınımını uyarır (Solakoğlu 2009, Dickens ve ark. 2012) (Şekil 2.6A).

2.3.5. Mitokondriyal/ İntrinsik yolak

İçsel/mitokondriyal yolak, pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyeleri olan Bcl-2/Bax gen ailesi ile düzenlenmekte olup uyarıldığında mitokondriden sitokrom-c salınımına ve böylece ölüm sinyaline sebep olur. İki yol da (dışsal ve içsel), düzenleyici ve yapısal molekülleri kıran ve bunun sonucunda hücrenin ölümüne sebep olan kaspaz kaskadının aktivasyonunu içeren ortak bir yolda birleşir (Ghobrial ve ark. 2005). Anti-apoptotik üyeler olan Bcl-2 ve Bcl-XL, kaspazların öncü formlarını durdurarak ya da apoptogenik faktörlerin mitokondriden salınımını engelleyerek hücrenin yaşamasını teşvik ederken; Bax, Bad, Bim, Bid gibi pro-apoptotik üyeler hücreyi apoptozise teşvik ederler. Normal durumda Bax ve Bak proteinleri Bcl-2 tarafından inaktif halde tutulur. Apoptotik sinyal oluştuğunda Bcl-2 inaktif hale geçerken aktifleşen Bax ve Bak mitokondri dış membranında porların oluşmasına ve zar potansiyelinde değişime neden olurlar. Mitokondriyal yolun kilit olayı Mitokondri Dış Membran Permeabilizasyonudur (MOMP) ve sonucunda; sitokrom c, mitokondri türevli kaspaz aktivatörü/IAP bağlayıcı protein Smac/DIABLO, HtrA2/Omi, 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 Apoptotik Proteaz Aktive

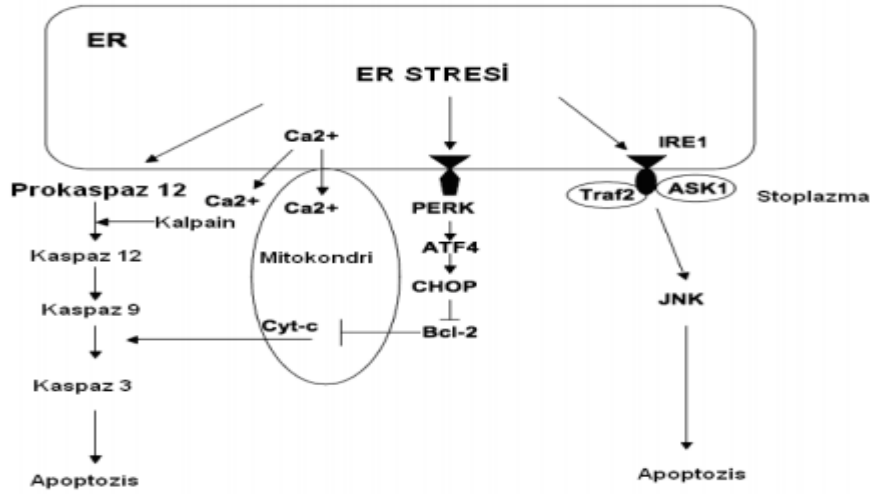
Edici Faktör-1 (Apaf-1)'e bağlanır ve onu aktive eder, dATP/ATP'nin de ortamda bulunması ile Apaf-1/sitokrom c kompleksi heptamerik bir yapıya oligomerize olur. Bu yapının oluşması, prokaspaz 9'un Apaf-1 ile etkileşimini mümkün kılar ve apoptozom kompleksi oluşur. Apoptozomun görevi, başlatıcı kaspaz olan kaspaz 9'u aktive etmektir ve aktif kaspaz 9, kaspaz-3'ü veya diğer ilerletici kaspazları aktive ederek kaspaz kaskadına aracılık eder. Aktif 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. CAD normal hücrelerde ICAD'üne bağlı ve inaktif halde bulunur ve aktif hale geçtiğinde kromatin yoğunlaşmasına ve DNA'nın nükleozomal fragmentlere kesilmesine neden olur. Ayrıca kaspaz aktivitesini inhibe eden ve aktiviteleri Smac veya Omi/HtrA2 gibi fonksiyonel analoglar ile engellenmiş birçok IAP'lar (apoptozis inhibitörleri) vardır. Ölen hücrelerde Smac ve Omi/HtrA2 (mitokondriyel proteinler, pro-apoptotik proteinler) mitokondriden salındığında IAP'lar inaktif olmakta ve böylece ilerletici kaspazların inhibisyonu engellenip hücrelerin apoptoze gitmeleri sağlanmaktadır (Riedl ve ark. 2007, Li ve Yuan 2008, Duprez ve ark. 2009) (Şekil 2.6B).



Şekil 2.6. Apoptozis sürecinde; reseptör aracılı kaspaz aktivasyonu (A) ve mitokondri/sitokrom-C aracılı apoptozis (B) (Ichim ve Tait 2016'dan Türkçeleştirilerek alınmıştır)

2.3.6. Endoplazmik retikulum aracılı apoptozis

Endoplazmik retikulum (ER) stresi; katlanmamış protein varlığı, oksidatif stres, redoks veya Ca^{2+} homeostaz bozukluğu, otofaji inhibisyonu gibi çeşitli uyarılar tarafından indüklenebilmektedir (Chaudhari ve ark. 2014, Xu ve ark. 2015). ER stresi, üstesinden gelinemediği durumlarda ise apoptozisle sonuçlanmaktadır. Kaspaz 12, ER stresiyle indüklenen apoptozisin anahtar düzenleyicisi olup ER membranında lokalize halde bulunur ve Ca^{++} seviyelerinin yükselmesi ile kalpainin endoplazmik retikulumu etkilemesi sonucu prokaspaz 12 aktifleşir. Aktifleşen kaspaz 12 sitoplazmaya yönelerek kaspaz 9 ile etkileşir ve sitozolik kaspaz kaskadını aktive eder. Bununla birlikte ER’de yanlış katlanmış protein birikimine yanıt olarak PERK, IRE1 α ve ATF6 sinyal yolları aktifleşerek apoptozisi uyarmaktadır. ER stresini algılayan bu transmembran proteinler pro apoptotik sinyalleri tetikleyerek transkripsiyon faktörlerinin (CHOP), Bcl-2 ailesinin üyelerinin, kinazların (JNK) ve kaspazların dahil olduğu hücre ölüm yollarını aktifleştirmektedir (Seydel ve Aksoy 2012) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. ER stresine indüklenen apoptotik mekanizmalar (Seydel ve Aksoy 2012)

2.3.7. Otofaji

Otofaji sürecinde rol oynayan proteinlerin çoğu “otofaji bağlantılı proteinler” ya da kısaca Atg proteinleri şeklinde tanımlanmakta olup günümüzde 30’den fazla Atg geni tanımlanmıştır (Xie ve Klionsky 2007). Bu proteinler, otofaji sırasında otofajik kese (otofagozom) çekirdeklenmesi, kese zarı uzaması-kapanması, taşınması, lizozomla

kaynaşması, iç zar ve kargonun lizozomda yıkılması ve yapıtaşlarının sitoplazmaya taşınması gibi değişik aşamalarda rol oynamaktadır. Otofagozom oluşumunun en önemli düzenleyicileri Atg1/Ulk1-2 (Mayada Atg13 ve memelilerde Ulk1-2) ve Atg13 proteinleridir. Otofajik aktivitenin kontrolünde Tor protein kompleksi önemli bir rol oynamaktadır. Tor, hücrede protein sentezi ve hücreSEL büyümeYi kontrol eden bir kinazdır. Memeli mTor protein kümesi bir hücrenin besin ve büyüme faktörü varlığını kontrol ederek otofajinin hücre için gerekli olup olmadığını kontrol eder. Memeli mTor protein kümesi mTor'a bağlanan raptor, mLST8, PRAS40 ve DEPTOR adlı ve mTOR etkinliğinin düzenlenmesinde rol oynayan proteinlerden oluşur. Hücrede açlık durumunda mTORC1 baskılanır ve Ulk1 kompleksinden ayrılır; böylece otofagozomların oluşumu tetiklenir Otofagozomların oluşumunda rol oynayan önemli bir diğer protein kompleksi III. sınıf phosphoinositol 3 fosfo (PI3P) kinaz Vps34'i içeren kümedir. Bu protein kümesinin aktivitesini düzenleyen en önemli protein memelilerde Beclin1/Atg6 proteinidir. PI3P, otofajik kese oluşumu için gerekli olan proteinlerin otofajik vezikül filizlenme bölgelerinde öbeklenmesinde rol oynar ve birçok protein için bir birleşme platformu oluşturur (Obara ve Ohsumi 2008). Otofajik keseler (otofagozom) çift zarlı membrandan oluşur. Otofajik kese uzaması ise übikitinlenme benzeri iki ayrı protein-protein kovalent eklenme tepkimesi ile gerçekleşmektedir. Bunlardan birincisinde, Atg12 proteininin Atg5 proteinine kovalent olarak bağlanması katalize edilir. Ardından Atg12'ye bağlanmış Atg5, Atg16 ile de birleşerek izolasyon membranının dış yüzeyine bağlanır. İkinci übikitin benzeri sistemde Atg8 (memelilerde MAP-LC3 ya da kısaca LC3) proteininin, bir fosfotidiletanolamin (FE) yağ molekülüne kovalent olarak bağlanmasıdır. Atg12-Atg5-Atg16 kompleksi, Atg8/LC3'ün FE'ye bağlanması için gereklidir. Atg8/LC3'ün FE'ye bağlanması, zar uzaması için gerekli bir olaydır. Ayrıca Atg4, kesecik oluşumu sonrasında görevi tamamlanan LC3 proteinlerini yağdan kopararak yeniden kullanılmalaraYı açmaktadır (Ohsumi 2001, Mehrpour ve ark. 2010). Atg9 ve döngü sistemi otofajik zardan otofagozom oluşumunda rol oynamaktadır (Mehrpour ve ark. 2010). Oluşan otofagozom daha sonraki aşamada geç endozom veya lizozomla birleşerek taşıdığı kargonun parçalanmasına yol açar. Lizozomal enzimler tarafından kargonun yıkımı sonrasında, kargo (proteinler, organeller vb.) ortaya çıkan yapıtaşları (örn. aminoasitler, yağ asitleri, vb.) tekrar kullanılmak üzere hücreye kazandırılır (Ohsumi 2001, Mehrpour ve ark. 2010).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasal maddeler

- Valproik Asit, Sigma Aldrich, USA
- Desitabin, Sigma Aldrich, USA
- Niklozamid, Sigma Aldrich, USA
- DNaz/RNaz içermeyen su, Zymo Research, USA
- Adenosine 5'-triphosphate (ATP) bioluminescent somatic cell assay kit, Sigma Aldrich, Almanya
- Muse® Count & Viability Assay Kit, Merck Millipore, USA
- Muse® Bcl-2 Activation Dual Detection Kit, Merck Millipore, USA
- Muse® Mitopotential Assay Kit, Merck Millipore, USA
- Muse® H2A.X Activation Dual Detection Kit, Merck Millipore, USA
- Fetal sığır serumu (FBS), PAA, USA
- Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10 000U/ml penisilin, 10 mg/ml streptomisin), Gibco, USA
- L-glutamin, Life Technologies, USA
- Fosfat tuz tamponu (PBS), Gibco, UK
- Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI), Gibco, UK
- Mammary Epithelial Basal Medium (MEBM), Lonza, USA
- B27 Supplement w/o vitamin A, Gibco, USA
- Epidermal büyüme faktörü (EGF), Gibco, USA
- Heparin %0,2, Stem Cell Technologies, Kanada
- Primocin, Invivo, Fransa
- Tryple Select (1X), Gibco, Danimarka
- %0,05 Tripsin-Etilen Diamin Tetraasetik Asit (Tripsin-EDTA), Gibco, UK
- Dimetil sülfoksit (DMSO), Amresco, USA
- Nonidet P-40 (NP-40), Sigma Aldrich, USA
- Tripan mavisi (%0,5), Biological Industries, İsrail
- Z-VAD-fmk, pan-kaspaz inhibitörü, Enzo Life Science, USA
- Nekrostatin-1, Santa cruz, USA

- Hoechst dye 33342 ve and Propidium Iodide (PI), Sigma Aldrich, USA
- Bicinchoninic Acid Kit, Thermo Scientific, USA
- Bovine Serum Albumin (BSA), Amresco, USA
- Triz bazı (Tris base), Scharlau, İspanya
- Sodyum klorür (NaCl), Merck, Almanya
- Tween20, Amresco, USA
- β -merkaptoetanol, Merck, Almanya

3.1.2. Sarf malzemeler

- 25 cm² ve 75 cm² lik flask, Sarstedt, Almanya
- Ultra-low attachment 25 cm² ve 75 cm² lik flask, Corning, USA
- Ultra-low attachment 6 kuyulu plate, Corning, USA
- 96 kuyulu flat plate, Costar, USA
- Ultra-low attachment 96 kuyulu flat plate, Corning, USA
- 1, 2,5, 5 ve 10 ml hacimlerinde enjektörler, Genject, Türkiye
- 10 ve 25 ml hacimlerinde serolojik pipet, Sarstedt, Almanya
- 10 μ l'lik pipet uçları, Vertex, USA
- 100 μ l'lik pipet uçları, Corning, USA
- 1000 μ l'lik pipet uçları, Vertex, USA
- Steril tek kullanımlık filtreler (0,2 mikron \mathcal{C} apında), Millex, Millipore, Almanya
- Falcon® 40 μ m Cell Strainer, Corning, USA
- Steril santrifüj tüpleri (Falkon, 15 ml), İsolab, Almanya
- Steril santrifüj tüpleri (Falkon, 50 ml), İsolab, Almanya
- Neubauer hemositometre, Marienfeld, Almanya
- Kriyovial, Corning, USA
- 2 ml'lik cam pastör pipetler, Marienfeld, Almanya
- Otoklavlanabilir cam şişe, Isolab, Almanya

3.1.3. Cihazlar

- Steril kabin, ESCO, Singapur
- CO₂ inkübatörü, Sanyo, Japonya
- Inverted mikroskop, Olympus CKX41, Japonya
- Santrifüj, Rotina 35R, Almanya

- Hassas terazi, SHIMADZU AUW220D, Japonya
- Aspiratör, Rocker 300, Tayvan
- Spektrofotometre (FLASHScan S12), Analytik Jena, Almanya
- Luminometre (FLx800 Mikroplate Floresans Okuyucu), Biotek, USA
- Muse Cell Analyzer Cihazı, Merck, USA
- Western blot görüntüleme sistemi (Fusion FX-7), Vilber Lourmat, Fransa
- Eş zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-time PCR) sistemi (StepOne Plus), Applied Biosystems, Singapur
- Mikroplate inkübatör ve çalkalayıcı, Heidolph, Almanya
- Buharlı sterilizatör (Otoklav), Nüve OT4060, Türkiye
- Multipipet cihazı, Multipette eppendorf, Hamburg, Almanya
- 10, 100 ve 1000 µl'lik pipet seti, Axygen, Polonya
- 0,5-5 ml pipet, Axygen, Polonya
- 10 ml pipet, Eppendorf, Almanya
- 5-5 µl Transferpipet, Axygen, Polonya
- 20-200 µl Transferpipet, Axygen, Polonya
- Pipet boy, Axygen, Polonya

3.2. Yöntemler

3.2.1. Valproik asit ve Desitabin'in hazırlanması

Valproik asit (MA: 166,19 g/mol) ve Desitabin (5-Aza-2'-deoksisitidin, DAC; MA:228,2 g/mol) için ana stoklar, sırasıyla, 200 mM ve 1 mM olacak şekilde DNaz/RNaz içermeyen su içerisinde hazırlandı.

3.2.2. İnhibitörlerin hazırlanması

Wnt sinyal yolağı inhibitörü olarak kullanılan Niklozamid (MA: 327,12 g/mol), ana stok 20 mM olacak şekilde DMSO içerisinde hazırlandı. Apoptosis süreci ile ilişkili olarak, pan-kaspaz inhibitörü Z-Val-Ala-dl-Asp(OMe)-fluorometilketon (Z-VAD-fmk) ve nekroptosis için seçici inhibitör olan Nekrostatin-1'in (Nec-1) ana stokları, sırasıyla, 10 mM ve 50 mM olacak şekilde DMSO içerisinde hazırlandı.

Hazırlanan stoklar her çalışma için kullanılacak miktara göre porsiyonlanarak -20°C'de saklandı ve çalışmalar için gerekli seyreltmeler ilgili besiyerleri ile yapıldı.

3.2.3. Hücre kültürü

MCF-7 insan meme kanseri hücre soyu Selçuk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda görev yapan Doç. Dr. Bahadır Öztürk'ten temin edilerek -80°C'de kriyovial olarak isimlendirilen kaplar içerisinde saklandı. MCF-7, farklılaşmış meme epiteline özgü olan özellikleri korumuş olan bir meme kanseri hücre soyudur. Epitelyal fenotipe sahip olan MCF-7 hücre soyunun ana özellikleri; östrojen reseptörü (+), sitokeratin (+), E-kaderin (+) ve vimentin (-) şeklinde tanımlanmaktadır. Ayrıca bu hücreler kaspaz 3 ifadesinden yoksundur.

3.2.3.1. Kullanılan besiyerinin hazırlanması

MCF-7 hücre soyu (parental), içerisinde %1 L-glutamin, %5 FBS ve %1 penisilin-streptomisin bulunan RPMI 1640 besiyeri ortamı kullanılarak kültüre edildi.

3.2.3.2. Hücre soyunun stoktan çıkartılması

Hücreleri çoğaltmak amacıyla, -80°C den çıkarılan kriyovialler sıcak su banyosunda hızlı bir şekilde çözüldü. Hücre süspansiyonu; içerisinde 5-7 ml RPMI 1640 besiyeri ortamı bulunan falkon tüpe alındı. 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra falkon tüpün üzerindeki süpernatant kısmı uzaklaştırıldı ve hücre peleti 1 ml besiyeri ile süspansiyon hale getirilerek içerisinde 4 ml besiyeri bulunan 25 cm²'lik flasklara alındı. Hücreler, 37°C'de, %5 CO₂ içeren ortamda inkübasyona bırakıldı.

3.2.3.3. Hücre soyunun pasajlanması

Parental MCF-7 hücreleri, flask yüzeyini %60-70 kapladığında (konfluent olduklarında) pasaj işlemi gerçekleştirildi. Öncelikle, flask içerisindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve 1X PBS (2 ml) ile hücre yüzeyinin yıkanması sağlandı. Flask yüzeyine yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılması, enzimatik olarak 0,5 ml %0,05 Tripsin-EDTA ile muamele sonrası (37°C'de, %5 CO₂'li ortamda 5 dakika) sağlandı. Hücrelerin yüzeyden ayrılmasını takiben hücre süspansiyonu, enzim inhibisyonu için, kullanılan hacmin on katı kadar besiyeri (serum içeren) ile sulandırıldı ve 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda, süpernatant kısmı uzaklaştırıldı ve hücre peleti 1 ml besiyeri ile süspansiyon hale getirilerek 75 cm²'lik flasklarda, 37°C'de, %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edildi.

3.2.3.4. Hücre soyunun stoklanması

Parental MCF-7 hücreleri konfluent olduklarında, flask içerisindeki besiyeri uzaklaştırılarak hücrelerin 1X PBS (4 ml) ile yıkanmaları sağlandı ve yukarıda belirtilen pasaj işlemi uygulandı. Santrifüj aşamasından sonra ise hücre pelleti üzerine her bir kriyovial için yaklaşık olarak $1,5-2 \times 10^6$ hücreye karşılık gelecek şekilde ışığa hassas olan dondurucu medium (%10 FBS ve % 10 DMSO içeren DMEM besiyeri) ilave edildi ve kriyovialler -80°C 'ye kaldırıldı.

3.2.3.5. Mamosfer kültürü

Mamosferler (kürecik yapıları); parental MCF-7 hücrelerinden zenginleştirilen ve KKH'lere özgü olarak serum içermeyen besiyeri ortamında, yüzey bağımsız büyüebilme kabiliyeti olan (kendini-yenileme) özel bir hücre alt grubu olarak tanımlanmaktadır.

3.2.3.6. Kullanılan besiyerinin hazırlanması

Mamosferler (MCF-7s), içerisinde 1X konsantrasyonda B27 Supplement (vitamin A içermeyen), 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ heparin, 20 ng/ml EGF ve %0,5 primocin bulunan MEBM büyüme ortamı kullanılarak kültüre edildi.

3.2.3.7. MCF-7s hücrelerinin elde edilmesi ve çoğaltılması

Öncelikle parental MCF-7 hücreleri, KKH bakımından zengin popülasyonun (MCF-7s) elde edilmesi amacıyla, hücre kültüründe çoğaltıldı ve uygun sayıya ulaşıncaya tripsin işlemi ile yüzeyden ayrılması sağlandı. Hücreler, MEBM büyüme ortamında süspansiyon hale getirildikten sonra kümeleşmelerini önlemek amacıyla 1 ml insülin enjektöründen geçirilerek süspansiyon içerisinde tek hücre olacak şekilde dağılımları sağlandı. Daha sonra, hücre sayısı 5×10^5 olacak şekilde içerisinde 10 ml MEBM bulunan 75 cm^2 'lik "ultra-low attachment" flasklara alınarak 37°C 'de, %5 CO_2 içeren ortamda 7-10 gün süreyle mamosferlerin oluşumu sağlandı.

3.2.3.8. MCF-7s hücrelerinin pasajlanması

Mamosfer oluşumu yeterli sayıya ulaştığında, flask içerisindeki besiyeri falkon tüpe toplandı. Flask yüzeyi 1X PBS ile (4 ml) yıkanarak içerik ilgili tüpe aktarıldı ve 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Santrifüj sonunda, süpernatant nazikçe

uzaklaştırılarak pelet 1 ml Tryple Select ile 8-10 dakika boyunca muamele edildi. Bu aşamada süspansiyon içerisinde tek hücre olacak şekilde ayrılıp ayrılmadıkları hemositometre ile kontrol edildi. Hücrelerin ayrıldığından emin olunduktan sonra, falkon tüpe 5-7 ml 1X PBS eklendi ve 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Santrifüj sonunda, süpernatant nazikçe uzaklaştırılarak pelet ilgili çalışma için gerekli hacimlerde MEBM ile sulandırılarak deneylerde kullanıldı.

3.2.3.9. Hemositometre ile hücrelerin sayımı

Hücre sayımı için; tripsinizasyon işlemi sonucunda elde edilen hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak üzerine eşit miktarda %0,5 tripan mavisi eklendi ve homojen şekilde karışmaları sağlandı. Bu karışımdan 10 µl alınarak thoma lamı üzerinde beş farklı alanda hücre sayımı yapıldı. Bulunan sayı, sulandırma katsayısı ile çarpılarak 1 ml besiyerinde bulunan hücre sayısı belirlendi.

3.2.4. ATP (Adenozin Trifosfat) canlılık metodu

ATP yöntemi, hücrelerdeki intraselüler ATP içeriğinin ölçülerek yaşayan hücrelerin sayısının belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır (Andreotti ve ark. 1995). Yöntemin prensibi; Mg^{+2} ve ATP varlığında lüsiferinin, lüsiferaz enzimi ile oksilüsiferine katalize olarak lüminesans sinyal oluşturması esasına dayanmaktadır. ATP seviyesi ölçümü, lüminesans temelli yöntemle bağlı olarak hem diğer canlılık yöntemlerinden çok daha hassastır hem de düşük hücre sayılarında bile (20 hücreye kadar) canlı hücre sayısı ile yöntemde okunan RLU (relative light unit) değerleri arasında mükemmel bir korelasyon bulunmaktadır (Ulukaya ve ark. 2008). Bu nedenle, MCF-7 hücrelerine kıyasla daha düşük sayıda elde ettiğimiz MCF-7s hücrelerinde olası sitotoksik etkileri değerlendirme sürecinde deney sonucunun güvenilirliği açısından ideal bir yöntemdir.

Bu amaçla, MCF-7s hücreleri 100 µl içerisinde $2,5 \times 10^3$ hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyucuklu “ultra-low attachment” hücre kültür kaplarına ekilerek 4-5 gün süreyle mamosfer oluşturmaları sağlandı. Mamosfer oluşumu sağlandıktan sonra; VPA (0,63-10 mM) ve Nik'in (0,1-10 µM) farklı konsantrasyonları 24, 48 ve 72 saat süreyle; DAC'ın (6,25-100 µM) farklı konsantrasyonları ise 24 ve 48 saat süreyle uygulandı.

Parental MCF-7 hücreleri ise 100 µl içerisinde 5×10^3 hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekildi. Hücre ekiminden bir gün sonra VPA'nın belirtilen konsantrasyonları 24, 48 ve 72 saat süreyle, DAC'ın belirtilen konsantrasyonları ise 24 ve 48 saat süreyle uygulandı.

MCF-7s hücrelerinde kombinasyon çalışmaları: Nik için belirlenen konsantrasyon, 1 µM, 50 µl içerisinde olacak şekilde hazırlanarak kuyulara eklendi ve hücreler 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı (ön-tedavi). 24 saatlik sürenin sonunda; VPA (0,63-5 mM) ve DAC (2,5-20 µM)'ın farklı konsantrasyonları 50 µl içerisinde olacak şekilde kuyulara eklenerek hücreler 48 ve 72 saat süreyle inkübasyona bırakıldı.

Negatif kontrol (maksimum canlılık, tedavi edilmemiş hücre kontrolü) için 100 µl besiyeri içerisinde ilgili hücreler için belirtilen sayılarda ekim yapıldı. Pozitif kontrol (minimum canlılık, % 100 öldüren doz) olarak 100 µl hücre süspansiyonu içerisinde 100 µl hücre ölümünü % 100 indüklediği bilinen % 1'lik Triton X-100 ilave edildi. ATP canlılık testi 96-kuyucuklu hücre kültür kaplarında her bir doz için 3 farklı kuyucuk kullanılarak ve en az 2 bağımsız deney olacak şekilde gerçekleştirildi.

Belirtilen süreler sonrasında, hücrelerin intraselüler ATP içeriğini belirlemek amacıyla kuyulara 50 µl 5X TCER (Tumor Cell Extraction Reagent, DCS Innovative Diagnostik Systeme) eklendi ve 30 dakika süreyle lizis işlemi gerçekleştirilerek hücre içerisindeki ATP'nin dışarı çıkması sağlandı. Süre sonunda, hücre kültür süspansiyonundan 50 µl alınarak beyaz renkli 96 kuyulu hücre kültür kaplarına aktarıldı ve ardından her kuyuya 50 µl lusiferin-lusiferaz enzimi içeren solüsyon ilave edildi. Tedavi uygulanmış hücrelerdeki ve kontrol hücrelerindeki ATP içeriği lusiferin-lusiferaz bioluminesans reaksiyonu yardımıyla ölçme zamanı 1 saniye olacak şekilde luminometre (Bio-Tek, USA) kullanılarak ölçüldü. Sonuçlar rölatif ışık ünitesi (Relative Light Unit, RLU) olarak elde edildi ve tedavi uygulanmış ve kontrol hücrelerinden elde edilen RLU değerlerine göre örneklerin % canlılığı hesaplandı: Canlılık (%) = $[100 \times (\text{Örnek RLU})/(\text{Kontrol RLU})]$.

3.2.5. Kaspazla kırılmış sitokeratin 18 (M30) düzeylerinin belirlenmesi

Epitelyal hücrelerde sitoskeletonin önemli bir proteini olan sitokeratin 18 (CK18), apoptozis sürecine özgü olarak aktifleşen bir enzim grubu olan kaspazlar tarafından kırılarak, kırılmış CK18'i (CK18-Asp396, M30) oluşturmaktadır (Leers ve ark. 1999). Bu yöntemin prensibi ise özellikle CK18'in Asp396'da kırılan fragmanını tanıyan M30 monoklonal antikorunun, hücrelerin bulunduğu ortam ile temas ettirilerek sitokeratinler üzerinden kaspaz bağımlı apoptozisin varlığının gösterilmesi esasına dayanmaktadır.

ELISA metoduyla M30 Antijen fragmentini belirlemek için; MCF-7s hücreleri 5×10^3 hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyucuklu "ultralow attachment" hücre kültür kaplarına ekildi ve 4-5 gün süreyle mamosfer oluşturmaları sağlandı. Mamosfer oluşumu sağlandıktan sonra, hücreler Nik (1 μ M, 24 saat ön-tedavi) ve VPA'nın kombinasyon çalışmalarından elde edilen sonuçlar dikkate alınarak seçilen 0,63 ve 1,25 mM VPA konsantrasyonları ile 48 ve 72 saat süreyle muamele edildi. Süre sonunda, hücrelerin lizis işlemi 10 μ l %10'luk NP-40 ile 15-20 dakika süreyle oda sıcaklığında 600 rpm çalkalayıcı kullanılarak gerçekleştirildi. Tüm kuyulardaki lizat toplanarak 2000 rpm'de 30 saniye süreyle santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında, M30 Cytodeath ELISA kiti (Peviva, İsviçre) içeriğine uygun olarak ve 2 bağımsız deney şeklinde gerçekleştirildi. Yüzeyi CK18'i tanıyan fare monoklonal M30 antikoruna kaplı kuyucuklara 25 μ l süpernatantlar ile 75 μ l horseradish peroksidaz konjugatı eklenerek 600 rpm çalkalayıcıda, oda sıcaklığında 4 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, kuyulara 250 μ l yıkama solüsyonu ilave edilerek 5 kez yıkama yapıldı ve hemen ardından 200 μ l TMB substratı eklenerek oda sıcaklığında, karanlıkta, 20 dakika boyunca bekletildi. Reaksiyon, 1N H₂SO₄ içeren 50 μ l stop çözeltisi kullanılarak durduruldu ve oluşan renk şiddeti, spektrofotometre ile 450 nm'de (FLASHScan S12, Jena, Almanya) ölçüldü.

3.2.6. Hoechst 33342 ve Propidyum iyodür floresan boyama yöntemi

Hoechst 33342, hücre membranından nüfuz ederek DNA'ya bağlanabilen bir boyadır ve bütün hücrelerin, canlı ve ölü (apoptotik/ nekrotik), nükleusunu boyamak için kullanılmaktadır. Hoechst 33342 boyama yönteminin prensibi, nükleus morfolojisine bakılarak hücrelerde ölüm modunun değerlendirilmesi esasına dayanır.

Propidyum iyodür (PI), canlı hücreler tarafından dışarı atılan ve sadece membranı hasarlanmış hücelere girebilen, dolayısıyla tüm ölü hücreleri, primer nekrotik veya geç apoptotik/sekonder nekrotik, boyamak için kullanılan floresan nükleik asit boyasıdır. Hücre kültürü ortamında, erken dönem apoptotik hücrelerin membranları intakt olmasına rağmen daha ileri dönemlerde geç apoptozis/sekonder nekrozun gelişmesi ile hücrelerin membran bütünlükleri bozularak PI boyası ile pozitif boyanmaktadır (Ulukaya ve ark. 2011). Apoptotik hücreler için normal hücelere kıyasla daha küçük (piknotik), ve/veya fragmente nükleus varlığı gibi özellikler aranırken, nekrotik hücreler için nükleusun normal hücrelerden biraz daha büyük olması ve daha az boya alması özelliği aranmaktadır. Dolayısıyla, Hoechst 33342 + (piknotik ve/veya fragmente nükleus yokluğunda)/ PI – gözlenen hücreler canlı; Hoechst 33342 + (piknotik ve/veya fragmente nükleus varlığında)/ PI – gözlenen hücreler erken apoptotik; Hoechst 33342 + (piknotik ve/veya fragmente nükleus varlığında)/ PI + gözlenen hücreler geç apoptotik veya sekonder nekrotik; Hoechst 33342 + (piknotik ve/veya fragmente nükleus yokluğunda)/ PI + gözlenen hücreler ise nekrotik kabul edilerek değerlendirme yapılmaktadır.

Bu amaçla, MCF-7s hücreleri 5×10^3 hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyucuklu “ultralow attachment” hücre kültür kaplarına ekildikten sonra 4-5 gün süreyle mamosfer oluşturmaları sağlandı. Hücreler, Nik (1 μ M) ile 24 saat ön-tedavi uygulamasını takiben VPA'nın 0,63 ve 1,25 mM dozlarıyla 48 ile 72 saat süreyle muamele edildi. Süre sonunda hücreler; 1X PBS içerisinde, Hoechst 33342 (200 μ g/ml) boyası için son konsantrasyon 5 μ g/ml, PI (100 μ g/ml) boyası için ise 1 μ g/ml olacak şekilde hazırlanan boyama solüsyonu ile 30 dakika boyunca inkübe edilerek floresan mikroskop altında değerlendirildi.

3.2.7. Akım sitometri analizleri

3.2.7.1. Hücre canlılığının belirlenmesi

ATP canlılık yöntemi kullanılarak elde edilen sonuçların doğrulanması amacıyla, hücre sayısı ve canlılığının kantitatif olarak belirlenmesine olanak veren floresan temelli bir yöntem kullanıldı. Bu yöntemin prensibi; canlı ve ölü hücrelerin, DNA'ya bağlanabilen boyalara karşı geçirgenliğine dayalı olarak farklı boyanmaları esasına dayanır.

Muse™ Count & Viability kiti içerisindeki mevcut DNA'ya bağlanabilen boyalardan biri hücre membranından nüfuz ederek canlı ve ölü bütün hücrelerin nükleusunu boyarken, diğeri yalnızca membran bütünlüğünü kaybetmiş, dolayısıyla ölü ya da ölmek üzere olan hücrelerin nükleusunu boyamaktadır.

Çalışma için; MCF-7s hücreleri 2×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde 6 kuyucuklu “ultralow attachment” hücre kültür kaplarına ekildi ve 4-5 gün süreyle mamosfer oluşturmaları sağlandı. Hücreler, Nik (1 μ M) ile 24 saat ön-tedavi uygulamasını takiben VPA'nın 0,63 ve 1,25 mM dozlarıyla 48 ile 72 saat süreyle muamele edildi. Süre sonunda, hücreler toplanarak santrifüj işlemi gerçekleştirildi ve ardından Tryple Select ile muamele edilerek süspansiyon içerisinde tek hücre olacak şekilde ayrılmaları sağlandı. 800 rpm'de 5 dakika santrifüj sonrası süpernatantlar uzaklaştırılarak pelet üzerine 100 μ l %1 FBS içeren besiyeri eklendi. Bu hücre süspansiyonundan, ilgili ependorflara 50 μ l alındı ve üzerlerine 150 μ l Muse™ Count & Viability solüsyonu eklendi. Oda ısısında 5 dakika inkübasyon sonrasında Muse™ Cell Analyzer cihazı ile ölçüm yapıldı.

3.2.7.2. Mitokondri membran potansiyelinin belirlenmesi

Mitokondride meydana gelen değişiklikler, hücre sağlığı ve stresi ile ilişkili oldukça duyarlı belirteçlerden biri olup mitokondri iç membranında transmembran potansiyel kaybı sıklıkla erken dönem apoptozis süreci ile ilişkilendirilmektedir (Hearps ve ark. 2002). Bu yöntemin prensibi, katyonik, lipofilik bir boyanın sağlıklı mitokondrilerde iç membranda birikerek yüksek floresan sinyal üretmesi, depolarize olmuş mitokondri varlığında ise bu sinyalin azalması esasına dayanmaktadır.

Çalışma için; MCF-7s hücreleri 1×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde 6 kuyucuklu “ultralow attachment” hücre kültür kaplarına ekildi ve 4-5 gün süreyle mamosfer oluşturmaları sağlandı. Hücreler, Nik (1 μ M) ile 24 saat ön-tedavi uygulamasını takiben VPA'nın 0,63 ve 1,25 mM dozlarına 48 ve 72 saat süreyle maruz bırakıldı. Süre sonunda, hücreler toplanarak santrifüj işlemi gerçekleştirildi ve ardından Tryple Select ile muamele edilerek süspansiyon içerisinde tek hücre olacak şekilde ayrılmaları sağlandı. 800 rpm'de 5 dakika santrifüj sonrası süpernatantlar uzaklaştırılarak pelet, 100 μ l %1 FBS içeren besiyeri ile sulandırıldı. Ardından, üzerine 95 μ l, 1X çalışma tampon çözeltisi ile sulandırılarak hazırlanan (1:1000), MitoPotential boyama solüsyonu eklendi. Kısa bir pipetaj işlemi

yapıldıktan sonra hücreler 20 dakika boyunca 37°C’de, %5 CO₂’li inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, üzerlerine 5 µL 7-AAD boyası eklenen örnekler 5 dakika oda sıcaklığında tutuldu ve Muse™ Cell Analyzer cihazı ile ölçüm yapıldı.

3.2.7.3. Bcl-2 aktivasyonunun belirlenmesi

Bcl-2 ailesinin üyeleri anti-apoptotik ve pro-apoptotik proteinler olmak üzere iki alt gruptan oluşmaktadır. Anti-apoptotik Bcl-2 proteini, mitokondriyal membran geçirgenliğini kontrol eden proteinleri düzenleyerek sitokrom c salınımının önlenmesinden sorumludur. Bcl-2’nin anti-apoptotik fonksiyonu fosforilasyon düzeyinde düzenlenmekte olup özellikle Ser70 fosforilasyonunun apoptozis ve otofaji süreçlerinde önemli role sahip olduğu bilinmektedir (Murphy ve ark. 2000, Wei ve ark. 2008). Bu yöntemin prensibi, Bcl-2’nin total (anti-Bcl-2-PECy5) ve fosforlanmış (anti-phospho-Bcl-2 (Ser70)-Alexa Fluor®555) düzeylerini belirleyen iki farklı antikor kullanımı ile total Bcl-2 ifadesine göre Bcl-2 fosforilasyonunun ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

Çalışma için; MCF-7s hücreleri 1×10⁵ hücre/kuyu olacak şekilde 6 kuyucuklu “ultralow attachment” hücre kültür kaplarına ekildi ve 4-5 gün süreyle mamosfer oluşturmaları sağlandı. Hücreler, Nik (1 µM) ile 24 saat ön-tedavi uygulamasını takiben VPA’nın 0,63 ve 1,25 mM dozlarına 48 ve 72 saat süreyle maruz bırakıldı. Süre sonunda, hücreler toplanarak santrifüj işlemi gerçekleştirildi ve ardından Tryple Select ile muamele edilerek süspansiyon içerisinde tek hücre olacak şekilde ayrılmaları sağlandı. 300 g’de 5 dakika santrifüj sonunda örnekler 1X PBS ile yıkandı. Fiksasyon işlemi için hücre peleti tampon çözeltisi ve fiksatif (1:1) ile sulandırılarak 5 dakika buz üzerinde tutuldu. Süre sonunda, 300 g’de 5 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirildi ve pelet 100 µl permeabilizasyon solüsyonu ile 5 dakika buz üzerinde inkübe edildi. Süre sonunda, 300 g’de 5 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Pelet, kit içerisindeki antikorlar ile hazırlanan çalışma solüsyonu (1:20) ile 30 dakika boyunca oda sıcaklığında, karanlıkta inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda hücreler 300 g’de 5 dakika santrifüj edildi ve tampon çözeltisi ile sulandırılarak Muse™ Cell Analyzer cihazı ile analizi yapıldı.

3.2.7.4. γ H2A.X aktivasyonu ile DNA hasarının belirlenmesi

H2A.X histon H2A ailesinin bir üyesi olup DNA hasarına yanıtta sorumlu sinyal yolağında görev almaktadır. Histon H2A.X'in Ser 139 fosforilasyonu (γ H2A.X), DNA hasarında önemli bir belirteçtir (Tanaka ve ark. 2007). DNA hasar düzeyi arttıkça, γ H2A.X düzeyleri de artarak hasarlı bölgede birikmektedir. γ H2A.X birikimi ise hücrelerdeki DNA hasar düzeyini belirlemede kullanılmaktadır. Bu yöntemin prensibi, Histon H2A.X'in total (anti-Histone H2A.X-PECy5) ve fosforlanmış (anti-phospho-Histone H2A.X (Ser139)-Alexa Fluor®555) düzeylerini belirlemeye olanak veren iki farklı antikorun kullanımıyla total H2A.X ifadesine göre γ H2A.X'in ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

Çalışma için; MCF-7s hücreleri 1×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde 6 kuyucuklu "ultralow attachment" hücre kültür kaplarına ekildi ve 4-5 gün süreyle mamosfer oluşturmaları sağlandı. Hücreler, Nik ($1 \mu\text{M}$) ile 24 saat ön-tedavi uygulamasını takiben VPA'nın 0,63 ve 1,25 mM dozlarına 48 ve 72 saat süreyle maruz bırakıldı. Süre sonunda, hücreler toplanarak santrifüj işlemi gerçekleştirildi ve ardından Tryple Select ile muamele edilerek süspansiyon içerisinde tek hücre olacak şekilde ayrılmaları sağlandı. 300 g'de 5 dakika santrifüj sonunda örnekler 1X PBS ile yıkandı. Fiksasyon işlemi, hücre peletinin tampon çözeltisi ve fiksatif (1:1) ile 5 dakika buz üzerinde tutularak gerçekleştirildi. 300 g'de 5 dakika santrifüj işlemi sonrasında, pelet 100 μl permeabilizasyon solüsyonu ile 5 dakika boyunca buz üzerinde bekletildi. Süre sonunda, 300 g'de 5 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirildi ve pelet, kit içerisindeki antikorlar ile hazırlanan çalışma solüsyonu (1:20) ile 30 dakika boyunca oda sıcaklığında, karanlıkta inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda hücreler 300 g'de 5 dakika santrifüj edildi ve tampon çözeltisi ile sulandırılarak Muse™ Cell Analyzer cihazı ile analizi yapıldı.

3.2.8. Asetillenmiş histon H3 düzeylerinin belirlenmesi

Histon deasetilaz inhibitörü olan VPA'nın MCF-7s hücrelerinde asetillenmiş histon H3 düzeyleri üzerine etkisi PathScan Acetylated Histone H3 Sandwich ELISA kit (Cell Signaling Technology) kullanılarak belirlendi. Bu yöntemin prensibi histon H3 üzerindeki asetillenmiş lizinlerin endojen düzeylerini göstermesi esasına dayanır.

Bu amaçla, MCF-7s hücreleri $7,5 \times 10^4$ hücre/kuyu olacak şekilde 6 kuyucuklu “ultralow attachment” hücre kültür kaplarına ekildi ve 4-5 gün süreyle mamosfer oluşturmaları sağlandı. Hücreler, Nik ($1 \mu\text{M}$) ile 24 saat ön-tedavi uygulamasını takiben VPA'nın 0,63 ve 1,25 mM dozlarına 48 ve 72 saat süreyle maruz bırakıldı. Süre sonunda, hücrelere lizis işlemi uygulanarak içlerindeki proteinlerin açığa çıkması sağlandı. Total protein konsantrasyonu BCA yöntemi kullanılarak belirlendi. Asetillenmiş histon H3 düzeyleri, her bir doz için 2 bağımsız deney olacak şekilde belirlendi. Her lizat için, protein konsantrasyonu 1,5 mg/ml olacak şekilde kit içerisinde bulunan Sample Diluent ile dilüsyon yapıldı. Lizatların protein konsantrasyonları eşitlendikten sonra, yüzeyleri histon H3 ile kaplı kuyucuklara 100 μl eklenerek 37°C 'de 2 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, kuyulara 200 μl yıkama solüsyonu ilave edilerek 4 kez yıkama yapıldı ve hemen ardından 100 μl Detection antikor (1:11 oranında hazırlandı) ilave edilerek 37°C 'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda yıkama işlemi tekrar edildi ve kuyulara 100 μl horseradish peroksidaz (HRP)-bağlı ikincil antikor (1:11 oranında hazırlandı) eklenerek 37°C 'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda yıkama işlemi tekrarlanarak kuyulara 100 μl TMB substratı ilave edildi. 37°C 'de 10 dakika inkübe edildikten sonra 100 μl stop çözeltisi ilave edilerek oluşan renk şiddeti, spektrofotometre ile 450 nm'de (FLASHScan S12, Jena, Almanya) ölçüldü.

3.2.9. 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 tekniği olan western blot analizi (immunoblotlama) dört ana kısımdan oluşmaktadır:

1. Örneklerin Hazırlanması: İşaretlenmek istenen proteine uygun lizis tamponu seçilerek ilgili proteinlerin hücrelerden salınımı sağlanarak protein lizatı elde edilir. Elde edilen lizatın protein konsantrasyonu belirlendikten sonra lizatlar -20°C 'de saklanır.
2. Elektroforez ve Transfer: Proteinler denatüre edilip, indirgenerek Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemiyle jel üzerinde birbirlerinden ayrılmaları sağlanır. Jelde büyüklüklerine göre ayrılarak bantlar oluşturan protein molekülleri, elektrotransfer tekniği ile bir membrana aktarılırlar.

3. İlgili proteinlerin işaretlenmesi: Membrana sırasıyla; bloklama, hedef proteine özgü antikor, bu antikoru tanıyan ve yapısına enzim ilave edilmiş ikincil bir antikor ile muamele uygulanır.

4. Görüntüleme ve Analiz: Bu aşamada, söz konusu enzimin substratı ile muamelesi sonucunda meydana gelen kimyasal ışımaya (kemiluminesan) aracılığı ile hedef proteinin membran üzerinde görüntülenmesi sağlanır (Şekil 3.1).

SDS-PAGE yöntemiyle proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayırımı toplayıcı ve ayırıcı jel olmak üzere iki farklı agaroz jel kullanımıyla sağlanmaktadır. Toplayıcı jel (pH: 6,8) düşük akrilamid konsantrasyona sahip olup gözenekli jeli oluştururken, ayırıcı jel (pH:8,8) yüksek poliakrilamid konsantrasyonu ile daha dar gözenekli jel oluşumunu sağlamaktadır. Bu sayede, küçük proteinler büyük proteinlere kıyasla daha kolay ve hızlı ilerleyebilmektedir. Proteinlerin sadece büyüklüklerine göre ayırımı sağlamak amacıyla; önce ısı ile denatüre edilmeleri ve sonra Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) negatif yüklü hale getirilerek lineer bir forma dönüşmeleri sağlanmaktadır. Negatif yük ile yüklenen proteinler elektroforez sırasında anoda göç ederken farklı protein bantları halinde odaklanmakta ve kemiluminesans prensibinden yararlanılarak görüntülenmektedir (Mahmood ve Yang 2012).

Toplam protein izolasyonu için, MCF-7s hücreleri $2,5 \times 10^5$ hücre olacak şekilde 25 cm^2 "ultralow attachment" flasklara ekilerek 4-5 gün süreyle mamosfer oluşturmaları sağlandı. Hücreler, Nik ($1 \mu\text{M}$) ile 24 saat ön-tedavi uygulamasını takiben VPA'nın $1,25 \text{ mM}$ dozu ile muamele edilerek 48 ve 72 saat süreyle 37°C , %5 CO_2 'li ortamda inkübasyona bırakıldı.

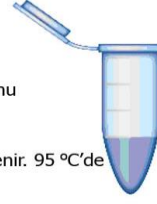
Western blot

Örnek Hazırlanışı

Lizis buffer (Örn: RIPA) kullanarak örnekler lizis edilir

Protein konsantrasyonu belirlenir

Sample buffer (SDS ve β -merkaptoetanol) eklenir. 95 °C'de 5 dakika ısıtılır.

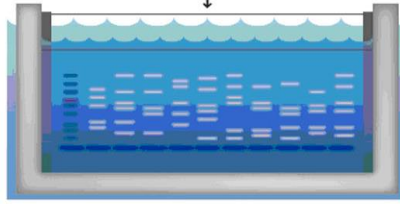


Jele Yükleme

20-30 μ g protein jele yüklenir

Jelde Yürütme

Küçük proteinler (negatif yüklü) katoda doğru daha hızlı hareket eder.



100V-150V, 50-90 dk
Jel yüzdesi proteinin büyüklüğüne bağlıdır.
4-40 kDa 20%
12-45 kDa 15%
10-70 kDa 12,5%
15-100 kDa 10%
25-200 kDa 8%

Proteinlerin jelden membrana aktarılması

Transfer buffer hazırlanır.



100 V-60-120 dk, 4 °C
Sünger
Filtre Kağıdı
Membran
Jel
Filtre Kağıdı
Sünger
Negatif yüklü proteinler pozitif katoda doğru hareket eder ve membrana geçer.

Bloklama

Membrani %5 süt veya BSA ile 1-2 saat inkübe et

Primer antikor inkübasyonu



Protein bandı

Membran primer antikorla 1-2 saat veya 4 °C'de overnight inkübe edilir.



Sekonder antikor inkübasyonu



Membran sekonder antikorla konjuge enzimle (Örn:HPR) 1-3 saat inkübe edilir.



Görüntüleme



Substrat
Işığa hassas ürün



Şekil 3.1. Western blot aşamalarının şematik gösterimi (Abcam 2010)

3.2.9.1. Protein izolasyonu

Lizis tamponu: 1 ml lizis tamponu (RIPA lysis buffer, Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA) için 10 µl 200 mM PMSF (Santa Cruz, CA, USA), 10 µl 100 mM sodyum ortovanadat (Santa Cruz, CA, USA), 15 µl proteaz inhibitör kokteyl (Santa Cruz, CA, USA) eklendi. Solüsyon karanlıkta hazırlandı.

Lizis işlemi için, kontrol ve tedavi uygulanmış grupların süpernatantları, ilgili falkonlara (buz üzerinde) toplandı ve süspansiyon +4°C, 1000 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatantlar nazıkçe uzaklaştırılarak pelet üzerine 0,05 ml lizis tamponu eklendi. Örnekler, 45 dakika boyunca karanlıkta, buz üzerinde bekletildi ve bu esnada 2 kez (15 ve 30. dakikalarda) onar saniye olmak üzere sonikasyona maruz bırakıldı. Süre sonunda, +4°C, 10 000 g'de 30 dakika santrifüj (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) edildi. Örnek süpernatantları 0,5 ml'lik tüplere toplanarak protein miktarları ölçüldü.

3.2.9.2. Protein konsantrasyonunun ölçülmesi

3.2.9.2.1. BSA standartlarının hazırlanması

İlgili örnekteki protein miktarlarını ölçebilmek amacıyla sığır serum albumin (BSA) proteini 2, 1,6, 1,2, 0,8, 0,4 mg/ml olacak şekilde RIPA lizis tamponu ile hazırlanarak bir standart eğri grafiği çizildi.

3.2.9.2.2. Biçinkoninik asit (BCA) ölçümünün yapılması

BCA protein tayin yönteminde bakır sülfat, BCA solüsyonuna eklendiğinde oluşan kompleks elma yeşili bir renk almakta ve bu solüsyon, proteinlerin peptit bağları ile etkileştiğinde Cu^{++} iyonlarını Cu^{+} iyonlarına indirgeyerek kompleksin rengini mora çevirmektedir. BCA ölçümü için; 96 kuyucuklu plate kullanılarak her bir kuyuya 10 µl hazırlanan standartlar ile konsantrasyonu bilinmeyen örnekler eklendi. Kuyuların üzerine 190 µl çalışma çözeltisi (kit içeriğinde yer alan Reagent A ve Reagent B, 1:50 olacak şekilde hazırlandı) pipetlendi ve plate 30 dakika 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda oluşan renk şiddeti, spektrofotometrede 570 nm'de okundu.

3.2.9.2. Elektroforez ve transfer

3.2.9.2.1. Çözeltiler

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

Nu-PAGE LDS Sample Buffer (4X, İnvitrogen, USA)

Nu-PAGE Sample Reducing Agent (10X, İnvitrogen, USA)

Nu-PAGE Antioksidant (İnvitrogen, USA)

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

10X TBS-T (Tris-Buffer Saline-%0,1 Tween 20; pH:7,6): Tris base; 24,23 g, NaCl; 80,06 g ve Tween20; 10 ml kullanılarak 1L ultrasaf H₂O ile çözüldü.

Biotinylated Protein Ladder Detection Pack (Cell signalling, USA)

Phototope[®]-HRP Western Blot Detection System (Cell signalling, USA)

3.2.9.2.2. Proteinlerin yüklenmesi ve jelde yürütülmesi

Örnekler istenen hacimlerde (%65 lizat çözeltisi) toplam protein miktarı 20 µg ve sample buffer (%25) ve reducing agent (%10) 1X olacak şekilde 0,5 ml'lik tüplere pipetlendi. Ardından, protein denatürasyonu için çözeltiler ısı banyosunda 95°C'de 7 dakika bekletildi. Bu esnada jel, elektroforez tankına yerleştirildikten sonra SDS running buffer, doluluk sınırına kadar eklendi ve hazır jelde bulunan koruma sıvısı pipet yardımıyla al-ver yapılarak uzaklaştırıldı. Ortama 500 µl antioksidan eklendi. Marker, yüklenmeden önce 95°C'de 2 dakika bekletildi. Daha sonra marker (5 µl) ve örnekler kuyulara pipet yardımıyla belirlenen miktarlarda yüklenerek 45 dakika 150V elektroforez işlemi gerçekleştirildi.

3.2.9.2.3. Proteinlerin transferi

Transfer işlemi için I-Blot jel transfer cihazına (İnvitrogen, USA) sırasıyla anot bakır (+), jel, ultra saf H₂O ile ıslatılmış filtre kağıdı, katot bakır (-) ve sünger yerleştirilerek 8 dakika boyunca transfer işlemi gerçekleştirildi.

3.2.9.2.3. İlgili proteinlerin belirlenmesi

3.2.9.2.3.1. Bloklama

Membranlar, 1X TBS-T içerisinde hazırlanan %5'lik süt (Santa Cruz, CA, USA) çözeltisi ile 60 dakika boyunca çalkalayıcı üzerinde, oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre sonunda, membranlar 1X TBS-T ile 3 defa 5 dakika süreyle yıkanarak bir sonraki aşamaya geçildi.

3.2.9.2.3.2. Birincil antikor

İlgili birincil antikorlar (Cell Signalling, USA; Çizelge 3.1), %5'lik BSA veya %5'lik süt çözeltisi içerisinde 1:1000 olacak şekilde hazırlandı ve membranlar ile 18 saat boyunca +4⁰C'de çalkalayıcı üzerinde inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, 1X TBS-T ile 3 defa 5 dakika yıkama işlemi gerçekleştirildi.

3.2.9.2.3.3. İkincil antikor

İlgili birincil antikora uygun Anti-Rabbit veya Anti-Mouse ikincil antikorunu %5'lik süt çözeltisi içerisinde 1:2000 olacak şekilde, Anti-biotin ise 1:1000 olacak şekilde hazırlandı ve membranlar üzerinde 60 dakika inkübe edildi. Süre sonunda, 3 defa 5 dakika 1X TBS-T ile yıkama yapıldı.

3.2.9.2.3.4. Görüntüleme

Görüntüleme solüsyonu için, Lumiglo reagent A (20X, Cell Signaling, MA, USA) ve Peroksidaz reagent B (20X, Cell Signaling, MA, USA) ultrasaf H₂O ile 1X olacak şekilde hazırlandı. Membranlar hazırlanan solüsyon ile 1 dakika inkübe edildikten sonra açığa çıkan kemiluminesans sinyali, Fusion FX-7 cihazı kullanılarak görüntülendi.

3.2.9.2.3.5. Birincil ve ikincil antikorların membrandan uzaklaştırılması

Birincil ve ikincil antikorları membrandan uzaklaştırmak (Stripping) için; 100 ml ultrasaf su içerisine 0,76 g Tris-base, 2 g SDS ve 700 µl β-merkaptotanol eklenerek stripping solüsyonu hazırlandı (1X, pH: 6,8). Membranlar, 50⁰C'de, çalkalayıcıda (900 rpm) 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda 4 defa 5 dakika 1X TBS-T ile yıkama yapılarak bloklama aşamasına geçildi.

Çizelge 3.1. Çalışma kapsamında kullanılan antikörlerin listesi

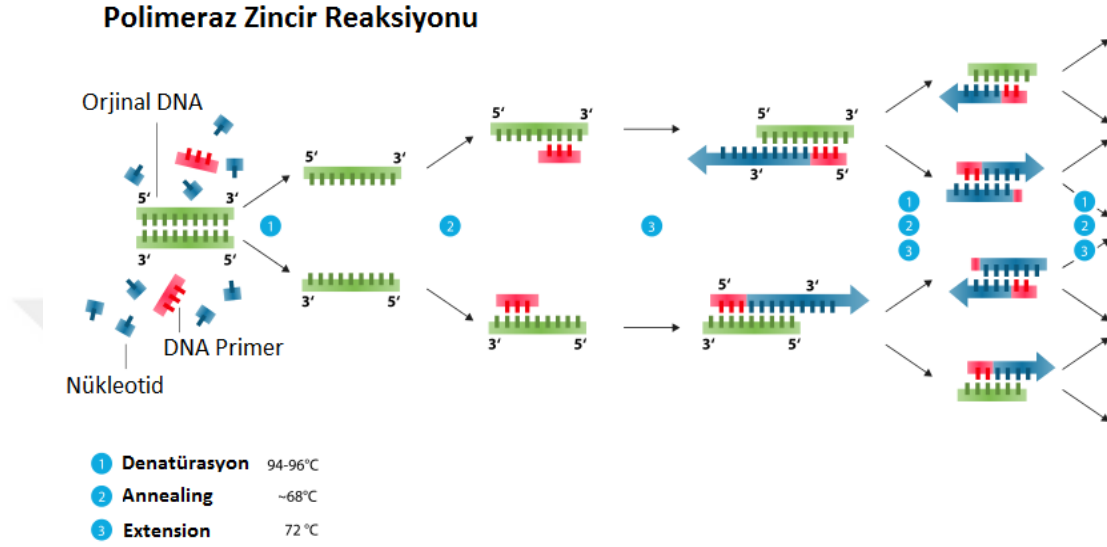
Çalışma Kapsamında Kullanılan Antikörler			
Anti-LRP6	Anti-HDAC1	Anti-Fas	Anti-IRE1 α
Anti-p-LRP6	Anti-HDAC2	Anti-DR4	Anti-CHOP
Anti-Dvl3	Anti-Ezh2	Anti-DR5	Anti-BIP
Anti-Naked2 Anti-Bmi1 Anti-Sox2	Anti-Tri-Methyl- Histone H3 (Lys27)	Anti-Kaspaz 8 Anti-PARP Anti-Bax	Anti-p53 Anti-p21
Anti-Non-phospho (Active) β -katenin (Ser33/37/Thr41)	Anti-Tri-Methyl- Histone H3 (Lys4)	Anti-acetyl Histone H3 (Lys27)	Anti-p62/SQSTM Anti-LC3B
Anti- β katenin Anti-E kaderin	Anti-acetyl Histone H3 (Lys9)	Anti-ZEB1	Anti-Sitokeratin 18
Anti-Fibronektin	Anti-N kaderin	Anti- β Aktin	Anti-GAPDH

3.2.10. Gen analizi

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), genomik DNA' daki özgül bölgelerin uygun in vitro koşullar altında çoğaltılması (amplifikasyonunu) esasına dayanmaktadır. PCR'ın prensibi; belirli sayıda tekrarlanan 3 temel basamağı kapsamaktadır:

1. Amplifiye edilecek DNA'nın iki zincirinin yüksek sıcaklıkla birbirinden ayrılması (Denatürasyon, 94⁰C).
2. Primerlerin DNA' daki hedef bölgelere bağlanmasına (hibridizasyon) olanak verecek sıcaklıkta zincirin uzaması (Annealing). Primerlerin ayrılmış DNA zincirleri üzerinde komplementer oldukları bölgeler ile eşleşerek, kalıp DNA zinciri ile primer arasında hidrojen bağlarının oluştuğu sıcaklık derecesi T_m (erime noktası) olarak adlandırılmaktadır ve bu sıcaklık derecesi primer dizisinin baz içeriğine göre değişmektedir. Primerdeki G ve C sayısı artıkça T_m derecesi artmaktadır. Optimal bağlanma sıcaklığı T_m = 4(G+C)+2(A+T) şeklinde hesaplanmaktadır ve genellikle T_m değerinin 5⁰C aşağısı (güven payı) alınarak belirlenmektedir.
3. Taq DNA polimeraz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklıkta (72⁰C), primerlerin 3' uçlarından başlamak üzere ortamdaki nükleotidleri kullanarak 5' → 3' yönünde primerlerin uzaması, tamamlayıcı zincir sentezi (Extension) (Yılmaz ve Devran 2003) (Şekil 3.2).

PCR'in üç basamaktan oluşan ve yaklaşık olarak 10-15 dakika kadar devam eden birinci amplifikasyon aşaması, sıcaklığın tekrar 95°C'ye yükseltilmesi ve aynı aşamaların 25-30 kez tekrarlanmasıyla sonlandırılmaktadır. Böylece tek bir hedef DNA segmenti, 2^n formülüne göre yaklaşık 33,6 milyon çoğaltılmış olmaktadır.



Şekil 3.2. PCR döngüsünün basamakları (Anonim 2014)

3.2.10.1. Eş zamanlı (Real-Time) PCR

Real-time PCR, nükleik asit çoğalmasıyla eş zamanlı olarak artış gösteren floresan boya ve problemlerin verdiği sinyalin izlenmesine dayalı olarak kısa sürede kantitatif sonuç verebilen bir PCR yöntemidir. Spesifik olmayan çift zincirli DNA'nın çoğaltımında yalnızca çift zincirli DNA'ya bağlandıklarında floresans veren boyalar (Syber green 1) kullanılarak çoğalmaya bağlı DNA miktarındaki artış, eş zamanlı olarak ortaya çıkan floresanın miktarıyla ölçülmektedir. Primerin bağlanmasını takiben gerçekleştirilen uzama aşamasında, hedef DNA'nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA'nın küçük oluşuna bağlanan Syber green 1 miktarı ile buna bağlı yayılan floresans miktarında artış gözlenmektedir (Kubista ve ark. 2006). Bununla birlikte, floresans artışı her zaman spesifik amplifikasyonla ilişkili olmayabilmektedir. Çünkü ortamda hedef DNA dizisi olmadığında, çift sarmal DNA'ya bağlanan Syber green 1 primerlerin birbiri ile bağlanmaları (primer dimer) sonucunda da yapıya katılarak floresans oluşumuna sebep olabilmektedir. Bu olumsuz faktörü gidermek ve DNA'nın istenilen hedef bölge olup olmadığını anlayabilmek için DNA'ların erime eğrisi analizleri (melting curve)

yapılmaktadır. Erime eğrisi analizinde, sıcaklık yavaş yavaş yükseltilir ve çift zincirli DNA birbirinden ayrılmaya başladığında (melting temperature= Tm) Syber green 1 boya serbest kalmakta ve okunan floresan miktarı da düşmektedir. Denatürasyon gerçekleştiğinde ise floresans sinyal aniden düşmektedir. Erime eğrisinden yararlanılarak aradığımız DNA parçasının Tm derecesi saptanabilmektedir. Çünkü her ürünün kendine özgü uzunluğu ve gen dizisi mevcuttur ve Tm sıcaklığı her ürün için özeldir. İncelenen örneğe ait Tm derecesi, aynı koşullarda işleme alınan pozitif kontrolün Tm derecesiyle karşılaştırılarak, PCR sonucunun doğru veya hatalı olduğuna karar verilmektedir (Günel 2007).

3.2.10.1.1. Hücrelerden total RNA izolasyonu

Total RNA izolasyonu, Total RNA Purification Kit (Jena Bioscience, Almanya) kullanılarak yapıldı. Bu aşama için öncelikle, MCF-7s hücreleri $2,5 \times 10^5$ hücre olacak şekilde 25 cm² “ultralow attachment” flasklara ekildi ve 4-5 gün süreyle mamosfer oluşturmaları sağlandı. Hücreler, Nik (1 µM) ile 24 saat ön-tedavi uygulamasını takiben VPA'nın 1,25 mM dozu ile muamele edilerek 12 ve 24 saat süreyle 37°C, %5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakıldı.

Bu aşamada, kontrol ve tedavi uygulanmış grupların süpernatantları, buz üzerinde tutulan 15 ml'lik falkonlara toplandı ve süspansiyon +4°C, 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatantlar nazikçe uzaklaştırıldı ve pelet üzerine 0,05 ml lizis tamponu eklenerek pipet ile birkaç kez al-ver yapıldı. Ardından, lizis tamponunun 0,6 katı olacak şekilde 2-propanol (300 µl) eklendi ve karışmaları için 5 saniye kadar vortex yapıldı. Kitin içeriğinde yer alan filtreli tüpler, toplama tüplerine yerleştirildi ve filtre tüpe 100 µl aktivasyon tamponu eklenerek 10 000 g'de 30 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpündeki sıvı dökülerek filtre tüple tekrar birleştirildi ve ilgili örnekler için tüm hacim filtreli tüplere aktarıldı. 10 000 g'de 30 saniye santrifüj işlemi ardından filtre tüplere 500 µl primer yıkama tamponu eklendi ve 10 000 g'de 30 saniye santrifüj gerçekleştirildi. Santrifüj sonrası, filtre tüplere 500 µl primer yıkama tamponu eklendi ve 10 000 g'de 30 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonrası, etanol kalıntılarından kurtulmak için tüpler 10 000 g'de 2 dakika santrifüj edildi ve filtre tüpler, temiz 1.5 ml'lik ependorflara yerleştirildi. Üzerlerine 40 ul elusyon tamponu eklendi ve oda ısısında bir dakika bekletildikten sonra 10 000 g'de 1 dakika santifüj işlemi yapıldı. Santrifüj

sonrasında tüpte bulunan RNA'ların kalitesi ve miktarları NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA) cihazı ile ölçüldü. RNA miktarları 30 ng/µl ile 80 ng/µl arasında bulundu. Örnekler kullanılıncaya kadar -80°C'de saklandı.

3.2.10.1.2. cDNA sentezinin yapılması

Elde edilen total RNA örnekleri, SCRIPPT cDNA Sentez Kiti (Jena Bioscience, Almanya) kullanılarak cDNA'ya çevrildi. Bu amaçla, kullanılacak örnek sayısından bir örnek fazla olacak şekilde "1 çevrim" sütunundaki hacimler (RNA hariç) ilgili sayı ile çarpılarak bir karışım (cDNA Sentez Karışımı) hazırlandı (Çizelge 3.2). Etiketli PCR tüplerine bu karışım eşit şekilde dağıtıldı ve örnekler RNA konsantrasyonları eşit olacak şekilde (200 ng) pipetlendi ve tüpler StepOne Plus cihazına yerleştirildi. Termal çevrim koşulu 42°C'de 10 dakika; 50°C'de 60 dakika olacak şekilde ayarlandı. Süre sonunda, örnekler Real-time PCR analizi için kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

Çizelge 3.2. cDNA sentez karışımının hazırlanışı

Bileşen	Stok Konsantrasyonu	Final Konsantrasyon	1 çevrim (20 µL)
RNase-free su	-	-	20 µl'ye tamamla
RNA	-	Total RNA: 10 pg- 5 µg Ya da mRNA: 10 pg-500 ng	x µl
Primer	100 µM	Oligo-dT: 500 pmol (300 ng) Hexamer: 50 pmol (300 ng)	0,1-0,2 µl 0,5 µl 0,5 µl
SCRIPT RT Tampon	5x	1x	4 µl
dNTP Karışımı	10 mM (her biri)	500 µM (her biri)	1 µl
DTT Stok Çözeltisi	100 mM	5 mM	1 µl
RNase inhibitör	40 ünite/µl	40 ünite	1 µl
SCRIPT Reverse Transkriptaz	200 ünite/µl	100 ünite	0,5 µl

3.2.10.1.3. Real-time PCR

Elde edilen cDNA örneklerinden, KKH karakteri (OCT4) ve hücre ölümü (ATG5, BECN1, DR4, DR5 ve FAS) ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri, Real Time PCR kullanılarak araştırıldı. PCR karışımı; her gen için total reaksiyon hacmi 20 µl olacak şekilde, ilgili genlerin primerleri ile Power SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, UK) kullanılarak hazırlandı (Çizelge 3.3). Hazırlanan bu karışımdan 18,5 µl alınarak PCR platelerinin örnek kuyucuklarına dağıtıldı ve üzerlerine ilişkili cDNA'lardan 1,5 µl pipetlendi. Plate, StepOne Plus cihazına yerleştirildi ve termal çevrim koşulu üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda ayarlanarak PCR tamamlandı (Çizelge 3.4). Elde edilen sonuçlar $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanılarak StepOne Plus v2.3 (Applied Biosystems) yazılımı ile değerlendirildi.

Çizelge 3.3. PCR karışımının hazırlanması

Bileşen	20 µl karışım için	180 µl karışım için (1 gen için 8 kuyu +1 fazla kuyu; 9 kuyu)	Final konsantrasyon
Power SYBR Green Master Mix	10 µl	90 µl	1x
Primer (Forward)	0,4 µl	3,6 µl	200 nM
Primer (Reverse)	0,4 µl	3,6 µl	200 nM
PCR-Grade Su	7,7 µl	69,3 µl	-
Toplam Karışım	18,5 µl	166,5 µl	-

Çizelge 3.4. PCR için termal çevrim koşulu

Aşama	AmpliTag Gold Enzim Aktivasyonu	PCR	
	Tutma	Döngü (40 Döngü)	
		Denatürasyon	Bağlanma/Uzama
Zaman	10 dakika	15 saniye	60 saniye
Sıcaklık (°C)	95	95	60

3.2.11. İstatistiksel analiz

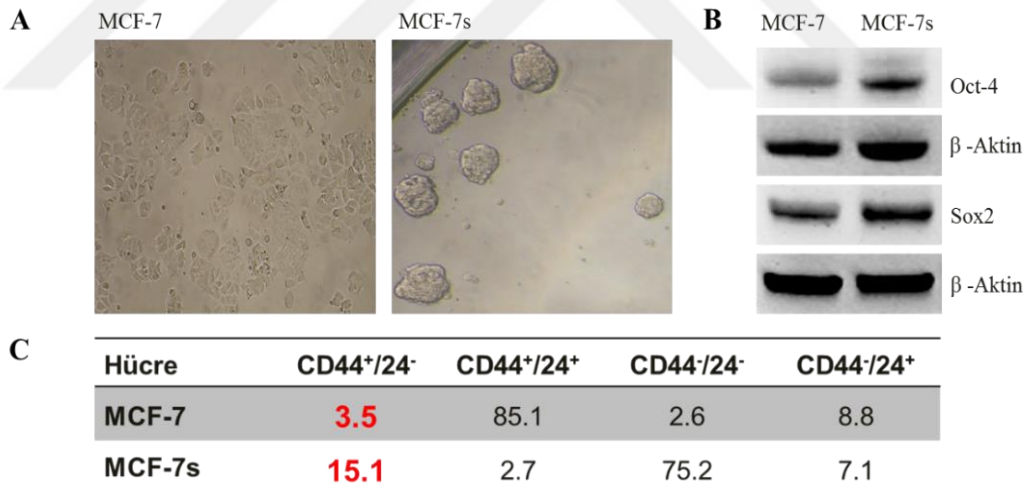
Tüm istatistiksel analizler GraphPad Prism 6.0 (Demo Versiyonu) programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılık tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ile Tukey çoklu karşılaştırma (post-hoc) testi kullanılarak hesaplandı. İstatistiksel olarak anlamlı veriler $p < 0,05$ değerine göre belirlendi. 3 tekrarlı yapılan tüm analizlerin sonuçları ortalama ve standart sapma ile verildi. Kombinasyon indeksi (CI; combination index) değerleri, CalcuSyn Version 2.1 (Biosoft, UK) yazılımı kullanılarak Chou-Talalay metoduna göre hesaplandı.



4. BULGULAR

4.1. Kanser Kök Hücrelerinin (MCF-7s) Elde Edilmesi ve Karakterizasyonu

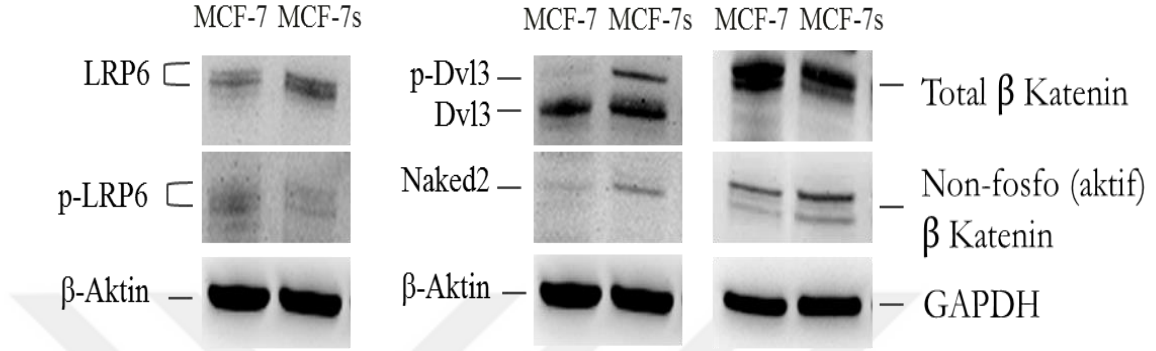
Öncelikle, parental MCF-7 hücrelerinden KKH'lerine özgü olarak serum içermeyen koşullar altında yüzey bağımsız büyüeyebilen ve mamosfer oluşturabilen hücre popülasyonunun (MCF-7s) zenginleştirilmesi sağlandı. Bu koşullar altında kültüre edilen parental MCF-7 hücrelerinin 5-7 gün sonra etkin bir şekilde düzgün küresel morfolojiye sahip yüzen koloniler (mamosfer) oluşturduğu gözlemlendi (Şekil 4.1A). Ardından hem parental MCF-7 hem de MCF-7s hücrelerinde, mamosfer oluşumu ve kök hücre-benzeri fenotipin sürdürülmesiyle ilişkili olarak Oct-4 ve Sox2 protein düzeylerindeki değişimler değerlendirildi. Parental MCF-7 hücreleri ile kıyaslandığında MCF-7s hücrelerinde hem Oct-4 hem de Sox2 protein düzeylerinde artış olduğu bulundu (Şekil 4.1B). Başka bir çalışmamızda, MCF-7s hücrelerinde, meme kanseri kök hücrelerine özgü yüzey belirteçleri olan CD44⁺/24⁻ hücre yüzdesinin MCF-7 hücrelerine oranla yaklaşık beş kat arttığı gösterilmiştir (Şekil 4.1C, Karakas ve ark. 2015).



Şekil 4.1. MCF-7 meme kanser hücre soylarından elde edilen mamosferlerin (MCF-7s) mikroskopik görüntüsü ($\times 10$) (A). KKH'lerine özgü belirteçlerin western blot (B) ve akım sitometri sonuçları (C). Yükleme kontrolü olarak β -aktin kullanıldı

Kök hücrelerde, hücre akıbetinin belirlenmesi, hücre proliferasyonu ve kök hücre devamlılığı gibi pek çok biyolojik süreci kontrol eden Wnt/ β -katenin sinyal yolağının KKH'lerinde yeniden aktifleştiği bilinmektedir. Bu nedenle hem parental MCF-7 hem de MCF-7s hücrelerinde Wnt/ β -katenin sinyal yolağı ile ilişkili protein düzeyleri

değerlendirildi. Her iki hücre grubu için yolağın aktivasyonu ile ilişkili olarak; MCF-7 hücrelerinde yalnızca fosforlanmış LRP6 (p-LRP6) protein düzeyinde artış gözlenirken, MCF-7s hücrelerinde fosforlanmış Dvl3 (p-Dvl3), Naked2 ve aktif β -katenin düzeylerinde belirgin artışlar olduğu belirlendi (Şekil 4.2).

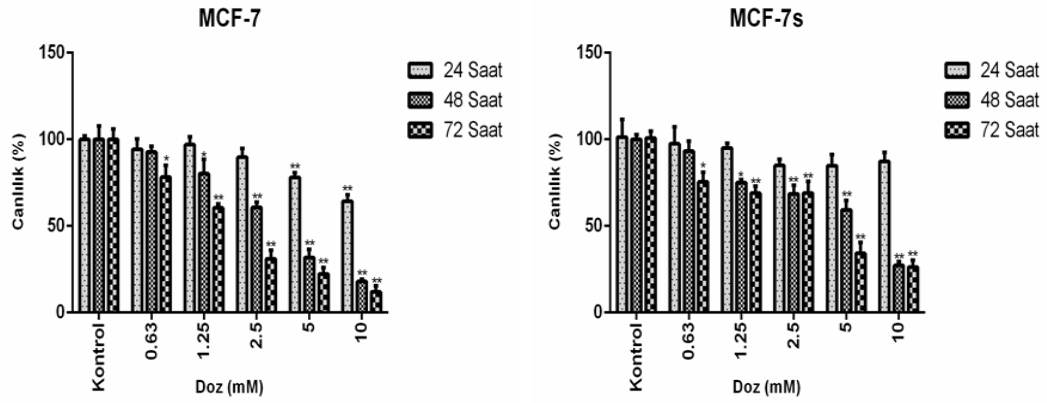


Şekil 4.2. MCF-7s hücrelerinde Wnt/ β -katenin sinyal yolağı aktivasyonunun western blot ile belirlenmesi. Yükleme kontrolü olarak β -aktin ve GAPDH kullanıldı

4.2. ATP Canlılık Testi Bulguları

4.2.1. Valproik asit'in hücre canlılığı üzerine etkisinin incelenmesi

Histon deasetilaz inhibitörü olan VPA'nın farklı konsantrasyonlarının (0,63-10 mM) MCF-7 ve MCF-7s hücrelerinin canlılığı üzerine olan etkisini belirleyebilmek için ATP testi kullanıldı. 24, 48 ve 72 saat süre ile VPA uygulamasını takiben her iki hücre grubunda da hücre canlılığının doza ve zamana bağlı olarak anlamlı şekilde azaldığı gösterildi ($p<0,01$; $p<0,001$) (Şekil 4.3). Kontrol hücrelerine kıyasla VPA ile muamele sonrası hücrelerin %50 (IC_{50}) ve %90'ını (IC_{90}) öldüren konsantrasyonlar hesaplandığında, beklenildiği şekilde, MCF-7s hücrelerinin MCF-7 hücrelerine kıyasla tedaviye daha dirençli olduğu belirlendi (Çizelge 4.1).



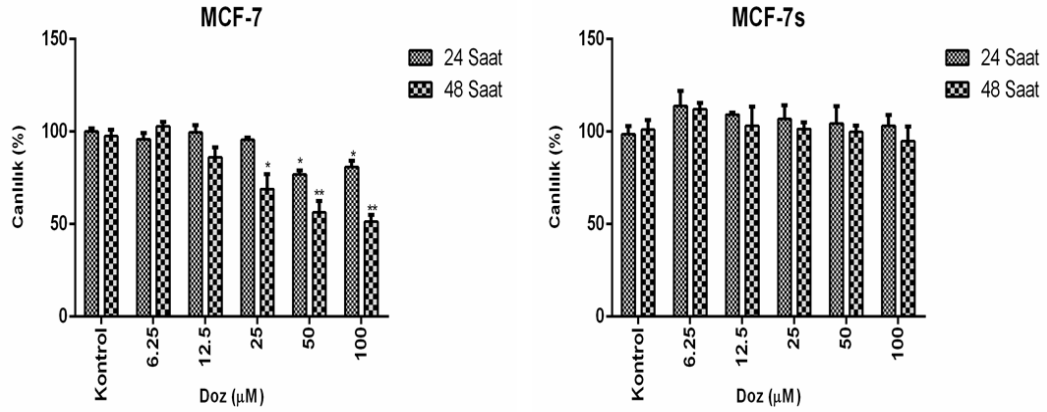
Şekil 4.3. MCF-7 ve MCF-7s hücrelerinde VPA uygulaması sonrası hücre canlılığının doza ve zamana bağlı olarak değişimi. Her bir veri noktası 2 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir. * Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre farklı dozlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (*: $p < 0,01$ **: $p < 0,001$) ifade etmektedir

Çizelge 4.1. MCF-7 ve MCF-7s hücrelerinde VPA uygulaması sonrası IC_{50} ve IC_{90} değerleri

Doz (mM)		IC_{50}			IC_{90}		
Süre		24 Saat	48 Saat	72 Saat	24 Saat	48 Saat	72 Saat
Hücre	MCF-7	>10	3,43±0,22	1,70±0,11	>10	>10	10,89±1,64
	MCF-7s	>10	6,38±0,58	3,88±0,28	>10	>10	>10

4.2.2. Desitabin'in hücre canlılığı üzerine etkisinin incelenmesi

DNA metiltransferaz inhibitörü olan Desitabin (DAC)'in farklı konsantrasyonlarının (6,25-100 μ M) MCF-7 ve MCF-7s hücrelerinin canlılığı üzerine olan etkisini belirleyebilmek için ATP testi kullanıldı. 24 ve 48 saat süre ile DAC uygulamasını takiben MCF-7 hücre canlılığında doza ve zamana bağlı olarak bir miktar azalma görülürken ($p < 0,01$; $p < 0,001$), MCF-7s hücrelerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmedi (Şekil 4.4). DAC uygulanan hücrelerin IC_{50} ve IC_{90} değerleri Çizelge 4.2'de verilmiştir.



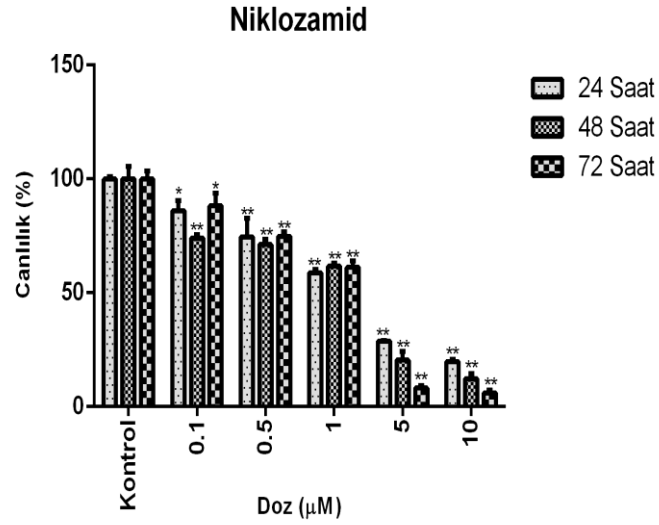
Şekil 4.4. MCF-7 ve MCF-7s hücrelerinde DAC uygulaması sonrası hücre canlılığının doza ve zamana bağlı olarak değişimi. Her bir veri noktası 2 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir. * Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre farklı dozlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (*: $p < 0,01$ **: $p < 0,001$) ifade etmektedir

Çizelge 4.2. MCF-7 ve MCF-7s hücrelerinde DAC uygulaması sonrası IC_{50} ve IC_{90} değerleri

Doz (µM)		IC_{50}		IC_{90}	
Süre		24 Saat	48 Saat	24 Saat	48 Saat
Hücre	MCF-7	>100	90,61±13,25	>100	>100
	MCF-7s	>100	>100	>100	>100

4.2.3. Niklozamid'in hücre canlılığı üzerine etkisinin incelenmesi

Wnt sinyal yolağı inhibitörü olan Niklozamid (Nik)'in farklı konsantrasyonlarının (0,1-10 µM) MCF-7s hücrelerinin canlılığı üzerine olan etkisini belirleyebilmek için ATP testi kullanıldı. 24, 48 ve 72 saat süre ile Nik uygulamasını takiben MCF-7s hücrelerinde canlılığının doza ve zamana bağlı olarak anlamlı şekilde azaldığı belirlendi ($p < 0,01$; $p < 0,001$) (Şekil 4.5). Nik uygulanan hücrelerin IC_{50} ve IC_{90} değerleri Çizelge 4.3'te verilmiştir. Nik ile kombinasyon çalışmaları için, literatür verileri ve elde edilen sonuçlar dikkate alınarak, yaklaşık olarak hücre canlılığının %50 olduğu konsantrasyona yakın bir doz olan 1 µM dozu ile 24 saat ön tedavi uygulanmasına karar verildi.



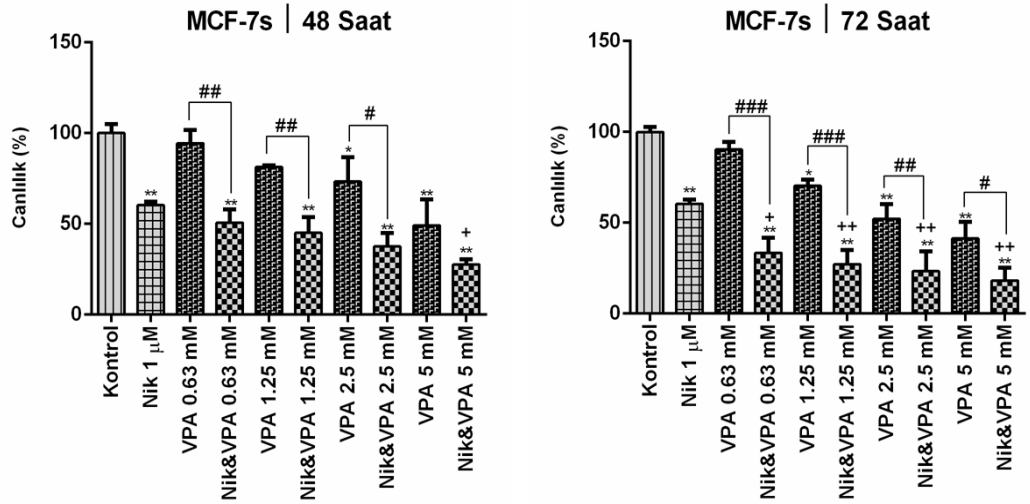
Şekil 4.5. MCF-7s hücrelerinde Nik uygulaması sonrası hücre canlılığının doza ve zamana bağlı olarak değişimi. Her bir veri noktası 2 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir. *Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre farklı dozlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (*: $p<0,01$ **: $p<0,001$) ifade etmektedir

Çizelge 4.3. MCF-7s hücrelerinde Nik uygulaması sonrası IC_{50} ve IC_{90} değerleri

Doz (µM)		IC_{50}			IC_{90}		
		24 Saat	48 Saat	72 Saat	24 Saat	48 Saat	72 Saat
Hücre	MCF-7s	2,17±0,14	2,14±0,10	1,84±0,17	>10	11,39±1,24	4,86±0,08

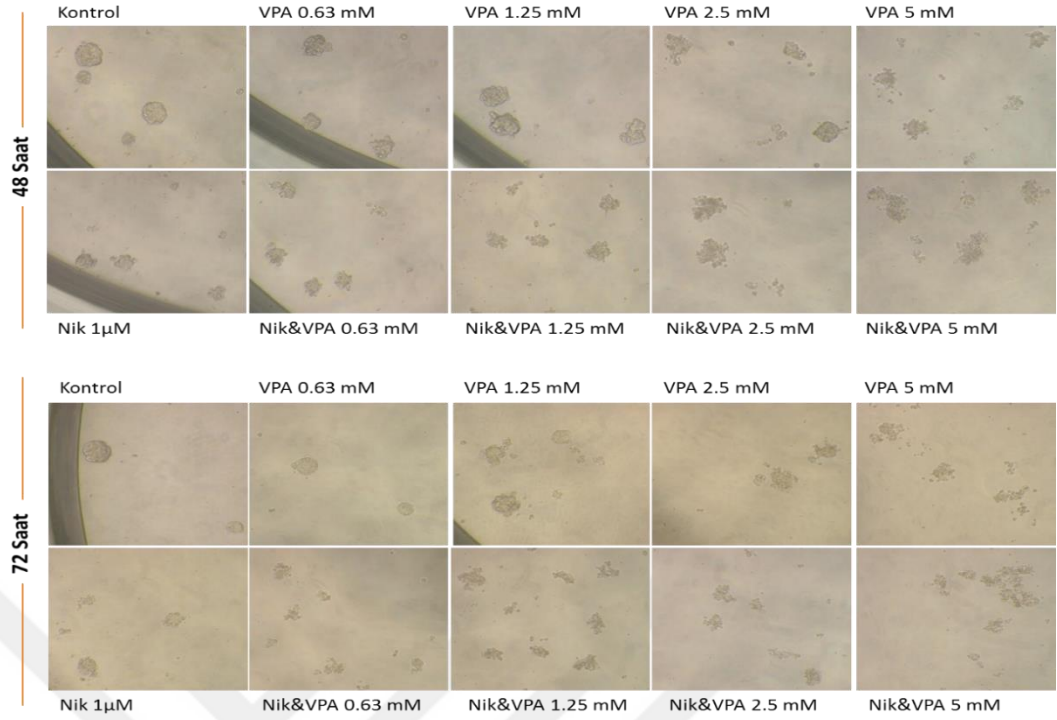
4.2.4. Niklozamid ile Valproik asit kombinasyonunun hücre canlılığı üzerine etkisinin incelenmesi

MCF-7s hücrelerinde, Nik ile 24 saat ön tedavi uygulaması sonrası VPA'nın farklı konsantrasyonlarının (0,63-5 mM) hücre canlılığı üzerine olan etkisi ATP testi ile belirlendi. 48 ve 72 saat süren kombinasyon uygulaması sonrası, hücre canlılığının, Nik ve VPA'nın tek başına etkilerine kıyasla, anlamlı şekilde azaldığı gösterildi ($p<0,05$; $p<0,01$; $p<0,001$) (Şekil 4.6).

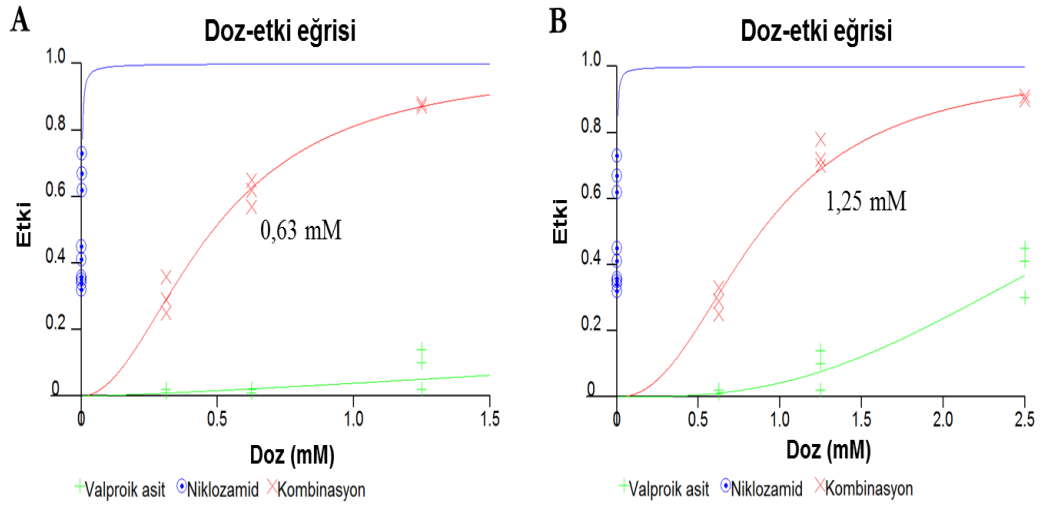


Şekil 4.6. MCF-7s hücrelerinde, Nik (1 µM; 24 saat ön tedavi), VPA (0,63-5 mM) ve kombinasyon tedavileri sonrası hücre canlılığının doza ve zamana bağlı olarak değişimi. Her bir veri noktası 3 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir. *Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre (*: $p<0,01$ **: $p<0,001$); + Nik'e göre (+: $p<0,01$ ++: $p<0,001$); # VPA'ya göre (#: $p<0,05$ ##: $p<0,01$ ####: $p<0,001$) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir

Kombinasyon çalışmalarında, VPA için, literatür verileri (klinik öncesi faz çalışmalarında etkinliği gösterilmiş olan) ve elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde toksik olmayan dozları (0,63 ve 1,2 mM) ile çalışılmasına karar verildi. Kombinasyon uygulaması için (72 saat), doz-etki eğrileri CalcuSyn yazılımı kullanılarak gösterildi ve kombinasyon indeks (CI) değerleri hesaplandı (Şekil 4.8). CI değerleri ilaç kombinasyonlarının etkinliğini göstermek için kullanılmaktadır. 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 (Chou 2006). MCF-7s hücrelerinde, Nik ile VPA kombinasyonunun her iki doz (0,63 ve 1,25 mM) için de sinerjistik etki ($0,3<CI<0,7$) gösterdiği belirlendi (Çizelge 4.4).



Şekil 4.7. MCF-7s hücrelerinde, Nik (1 μ M; 24 saat ön tedavi), VPA (0,63-5 mM) ve kombinasyon tedavileri sonrası hücrelerin morfolojik görüntüleri ($\times 10$)



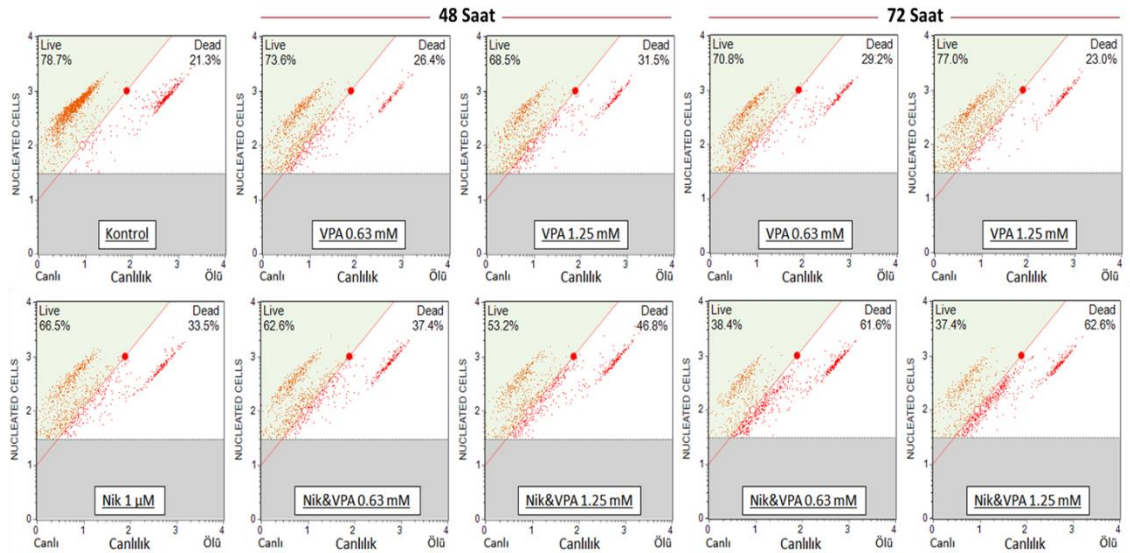
Şekil 4.8. MCF-7s hücrelerinde, Nik (1 μ M) ile 24 saat ön tedavi uygulamasını takiben VPA'nın 0,63 (A) ve 1,25 mM (B) konsantrasyonları ile 72 saat kombinasyon tedavisi sonrası doz-etki eğrileri

Çizelge 4.4. Kombinasyon İndeks Değerleri

Kombinasyon	CI değeri	Tanımlanan etki
0,5 µM Nik + 0,32 mM VPA	1,114 ± 0,276	Hafif antagonistik (1,10-1,20)
0,5 µM Nik + 0,63 mM VPA	1,387 ± 0,232	Orta derece antagonistik (1,2-1,4)
1 µM Nik + 0,63 mM VPA	0,608 ± 0,102	Sinerjistik (0,3-0,7)
1 µM Nik + 1,25 mM VPA	0,622 ± 0,090	Sinerjistik (0,3-0,7)
2 µM Nik + 1,25 mM VPA	0,289 ± 0,015	Güçlü Sinerjistik (0,1-0,3)
2 µM Nik + 2,5 mM VPA	0,558 ± 0,021	Sinerjistik (0,3-0,7)

4.2.4.1. Akım sitometri bulguları

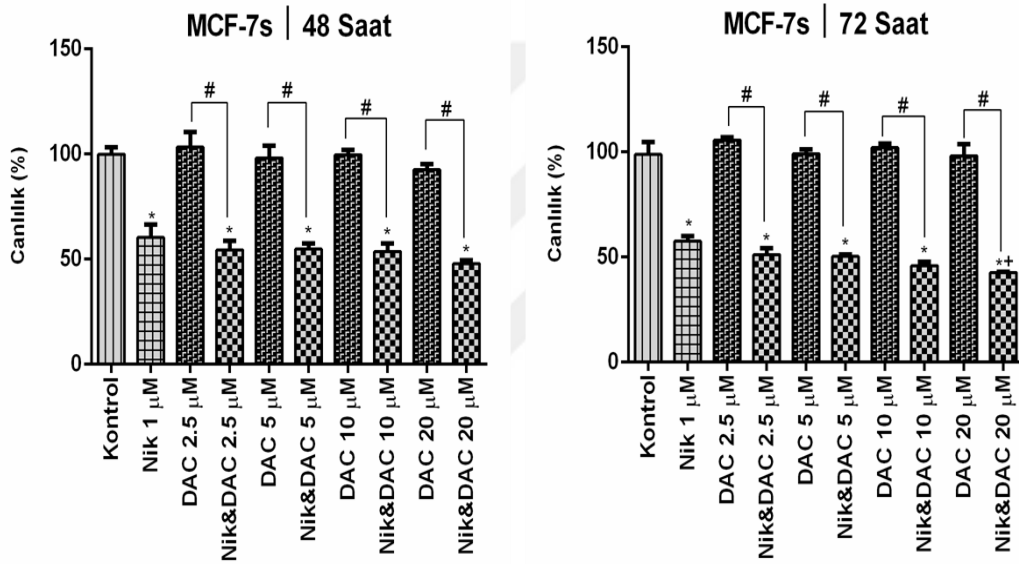
MCF-7s hücrelerinde, Nik ile 24 saat ön tedavi uygulaması sonrası VPA'nın 0,63 ve 1,25 mM konsantrasyonları ile kombinasyon tedavisinin hücre canlılığı üzerine etkileri akım sitometri yöntemiyle doğrulandı. 48 ve 72 saat süren kombinasyon tedavisi sonucu, ATP testiyle elde edilen verilerle uyumlu olarak hücre canlılığının, Nik ve VPA'nın tek başına etkilerine kıyasla, belirgin şekilde azaldığı gösterildi (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. MCF-7s hücrelerinde, Nik (1 µM) ile 24 saat ön tedavi uygulamasını takiben VPA'nın 0,63 ve 1,25 mM konsantrasyonları ile 48 ve 72 saatlik kombinasyon tedavisi sonrası canlılık yüzdelerinin akım sitometri sonuçları

4.2.5. Niklozamid ile Desitabin kombinasyonunun hücre canlılığı üzerine etkisinin incelenmesi

MCF-7s hücrelerinde, Nik ile 24 saat ön tedavi uygulaması sonrası DAC'ın farklı konsantrasyonları (2,5-20 μ M) ile 48 ve 72 saat süreyle kombinasyon tedavisi sonucu, hücre canlılığının, Nik'in tek başına etkisine kıyasla, anlamlı şekilde değişmediği gözlemlendi (Şekil 4.10). MCF-7s hücrelerinde, DAC'ın tek başına ve/veya kombinasyon çalışmalarında hücre canlılığı üzerine anlamlı etkileri bulunmadığından sonraki aşamalara VPA ile devam edilmesine karar verildi.



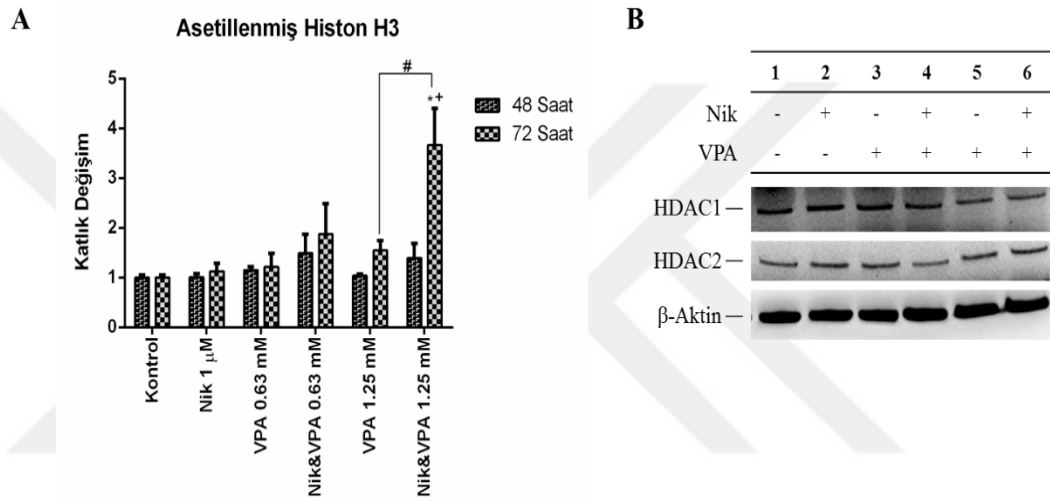
Şekil 4.10. MCF-7s hücrelerinde, Nik (1 μ M; 24 saat ön tedavi), DAC (2,5-20 μ M) ve kombinasyon tedavileri sonrası hücre canlılığının doza ve zamana bağlı olarak değişimi. Her bir veri noktası 2 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir. * Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre (*: $p < 0,001$); + Nik'e göre (+: $p < 0,05$); # VPA'ya göre (#: $p < 0,001$) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir

4.3. Niklozamid ve Valropik Asit'in İnhibitör Etkilerinin Değerlendirilmesi

4.3.1. Histon deasetilazların inhibisyonu ve histon asetilasyonu

MCF-7s hücrelerinde, Nik ile 24 saat ön tedavi uygulaması sonrası VPA'nın 0,63 ve 1,25 mM konsantrasyonları ile 48 ve 72 saatlik kombinasyon tedavisinin asetilenmiş Histon H3 düzeyleri üzerine etkisi ELISA yöntemiyle değerlendirildi. VPA'nın belirlenen dozlarda tek başına kullanımının, kontrole kıyasla asetilasyon düzeylerinde anlamlı bir değişikliğe yol açmadığı gözlemlendi. Buna karşılık, 72 saatlik kombinasyon tedavisi sonucu

histon H3 asetilasyon düzeylerinin 1,25 mM dozunda anlamlı şekilde artış gösterdiği belirlendi ($p<0,05$; $p<0,01$) (Şekil 4.11A). 0,63 mM kombinasyon dozunda da bir miktar artış gözlenmesine rağmen, istatistiksel olarak anlamlılık bulunmadı. Bu nedenle, 1,2 mM kombinasyon dozunun HDAC1 ve HDAC2 protein düzeyleri üzerine etkisi western blot yöntemi ile araştırıldı. 48 saatlik kombinasyon tedavisi sonucunda, kontrole ve VPA'ya kıyasla, hem HDAC1 hem de HDAC2 proteinlerinin total düzeylerinde azalma olduğu bulundu (Şekil 4.11B). Kombinasyon tedavisi sonucu, VPA için belirlenen dozların tek başlarına kullanımına kıyasla, inhibitör etkisinin güçlü bir şekilde arttırıldığı gösterildi.

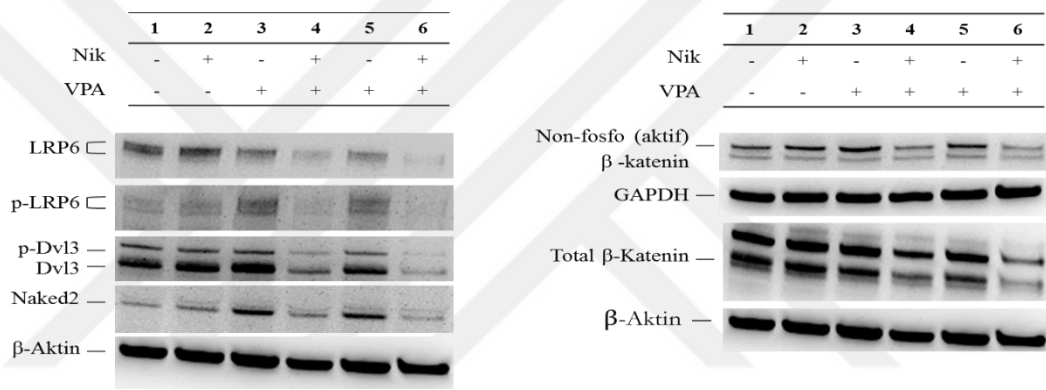


Şekil 4.11. MCF-7s hücrelerinde, Nik (1 µM; 24 saat ön tedavi), VPA (0,63-1,25 mM) ve kombinasyon tedavileri sonrası Histon H3 asetilasyonu (A) ile total HDAC1 ve HDAC2 protein düzeylerindeki değişimler (B). Her bir veri noktası 2 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir. *Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre (*: $p<0,01$); + Nik'e göre (+: $p<0,01$); # VPA'ya göre (#: $p<0,05$) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir. β-aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. 1. MCF-7s Kontrol; 2. Niklozamid; 3. VPA 1,25 mM 48 saat; 4. Kombinasyon 48 saat; 5. VPA 1,25 mM 72saat; 6. Kombinasyon 72 saat ifade etmektedir

4.3.2. Wnt/β-katenin sinyal yolağının inhibisyonu

MCF-7s hücrelerinde, Nik ile 24 saat ön tedavi uygulaması sonrası VPA (1,25 mM) ile 48 ve 72 saatlik kombinasyon tedavisinin Wnt sinyalizasyonu ile ilişkili protein düzeyleri üzerine etkisi western blot yöntemiyle değerlendirildi. Nik (1 µM) ile 24 saat ön tedavi uygulaması sonucu, kontrole kıyasla, LRP6 ve p-LRP6 protein düzeylerinde değişiklik gözlenmedi ancak p-Dvl3 protein düzeylerinde azalma ile uyumlu şekilde Naked2 protein düzeylerinde artış gözlandı. Naked2; Dvl3 proteinine bağlanarak Wnt/β-katenin

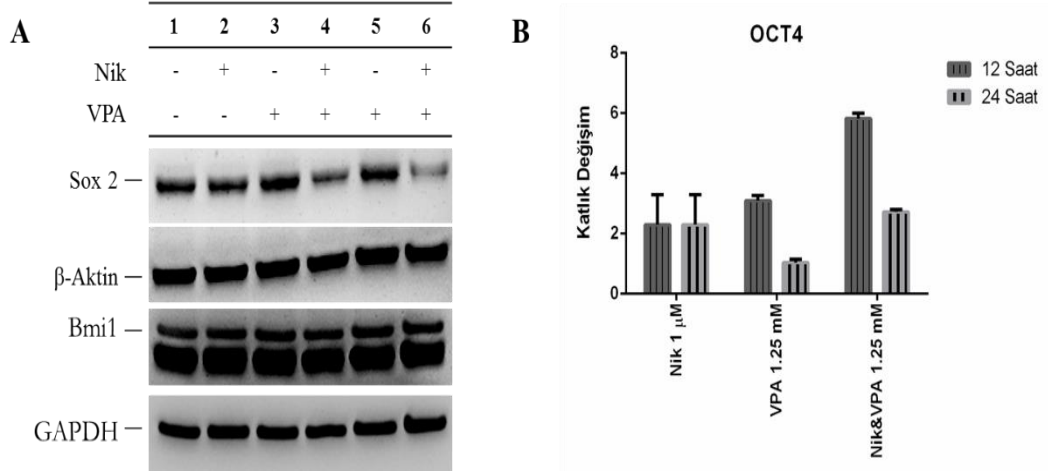
yolağını inhibe eder ve negatif geri bildirim (feedback) mekanizma üzerinden Dvl aktivitesinin düzenlenmesinde rol alır. VPA ile 48 saat muamele sonrasında aktif Wnt sinyal yolağı ile ilişkili olarak, p-LRP6, p-Dvl3 ve Naked2 protein düzeylerinde geçici bir artış gözlenirken, 72 saat sonunda Naked2 protein düzeylerindeki artışa karşılık p-Dvl3 protein düzeyleri ile total β -katenin düzeylerinde azalma belirlendi. Nik ve VPA'nın tek başlarına kullanımlarında aktif β -katenin düzeylerinde kontrole kıyasla artış gözlemlendi. Kombinasyon tedavisi sonucu, Nik ve VPA'nın tek başlarına etkilerine kıyasla, LRP6, p-LRP6, Dvl3, p-Dvl3, Naked2, aktif β -katenin ve total β -katenin düzeylerinde belirgin azalmalar ile Wnt sinyal yolağının çok daha güçlü bir şekilde inhibe edildiği gösterildi (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. MCF-7s hücrelerinde, Nik (1 μ M; 24 saat ön tedavi), VPA (1,25 mM) ve kombinasyon tedavileri sonrası Wnt sinyal yolağı ile ilişkili proteinlerin ekspresyon düzeylerinde değişimlerin western blot sonuçları. β -aktin ve GAPDH yükleme kontrolü olarak kullanıldı. 1. MCF-7s Kontrol; 2. Niklozamid; 3. VPA 1,25 mM 48 saat; 4. Kombinasyon 48 saat; 5. VPA 1,25 mM 72saat; 6. Kombinasyon 72 saat ifade etmektedir

4.4. Niklozamid ile Valproik Asit Kombinasyonunun Kök Hücre Özellikleri Üzerine Etkisinin İncelenmesi

MCF-7s hücrelerinde, Nik ile 24 saat ön tedavi uygulaması sonrası VPA (1,25 mM) ile 48 ve 72 saatlik kombinasyon tedavisinin kök hücre özellikleri üzerine etkisi gen ve protein düzeyinde değerlendirildi. Kombinasyon uygulaması sonucu, 48 ve 72 saat sonunda, kök hücre karakterinin sürdürülmesinde sorumlu Sox2 protein düzeylerinin belirgin şekilde azaldığı görülürken, Bmi1 protein düzeylerinde anlamlı bir değişiklik belirlenmedi (Şekil 4.13A). Nik ve VPA kombinasyonu ile 12 saat muamele sonrasında OCT4 gen ekspresyon düzeylerinde geçici bir artış gözlenirken, 24 saat sonunda ekspresyonunun belirgin bir şekilde azaldığı belirlendi (Şekil 4.13B).

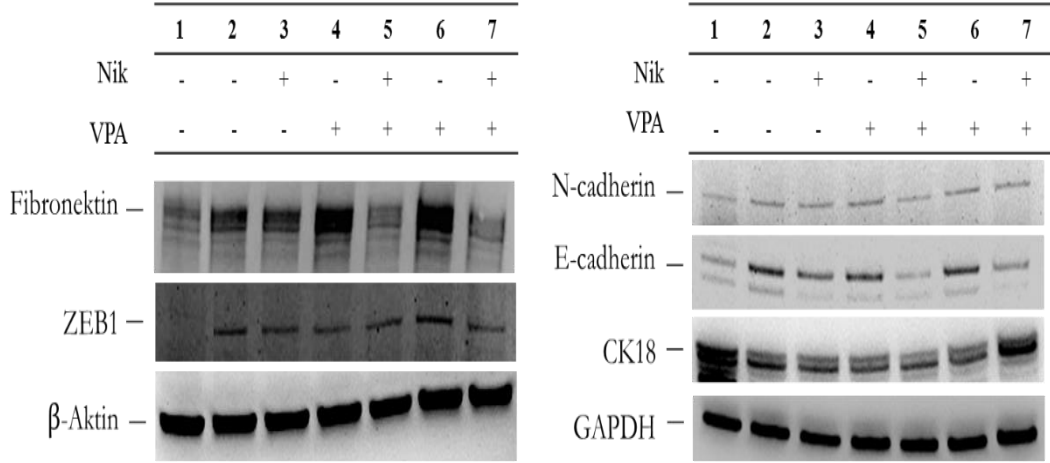


Şekil 4.13. MCF-7s hücrelerinde, Nik (1 μ M; 24 saat ön tedavi), VPA (1,25 mM) ve kombinasyon tedavileri sonrası KKH'lerine özgü özelliklerin gen ve protein düzeyindeki değişimlerinin western blot (A) ve Real-time PCR (B) sonuçları. β -aktin ve GAPDH yükleme kontrolü olarak kullanıldı. 1. MCF-7s Kontrol; 2. Niklozamid; 3. VPA 1,25 mM 48 saat; 4. Kombinasyon 48 saat; 5. VPA 1,25 mM 72saat; 6. Kombinasyon 72 saat ifade etmektedir

4.4.1. Kök hücre karakteri ve epitelyal mezenkimal dönüşüm

KKH'lerine özgü karakterin kazanılmasında EMD sürecinin de rol oynadığı bilinmektedir. Bu nedenle, MCF-7s hücrelerinde, Nik ile 24 saat ön tedavi uygulaması sonrası VPA (1,25 mM) ile 48 ve 72 saatlik kombinasyon tedavisinin EMD süreci ile ilişkili protein düzeyleri üzerine etkisi araştırıldı. Parental MCF-7 hücreleri ile kıyaslandığında, MCF-7s hücrelerinde mezenkimal belirteçler olan fibronektin ve N-kaderin protein düzeylerinde artış belirlendi. Bununla birlikte, epitelyal bir belirteç olan sitokeratin 18 (CK18) protein düzeylerinde azalma gözlenirken, beklenilen aksine E-kaderin protein düzeylerinde artış görüldü.

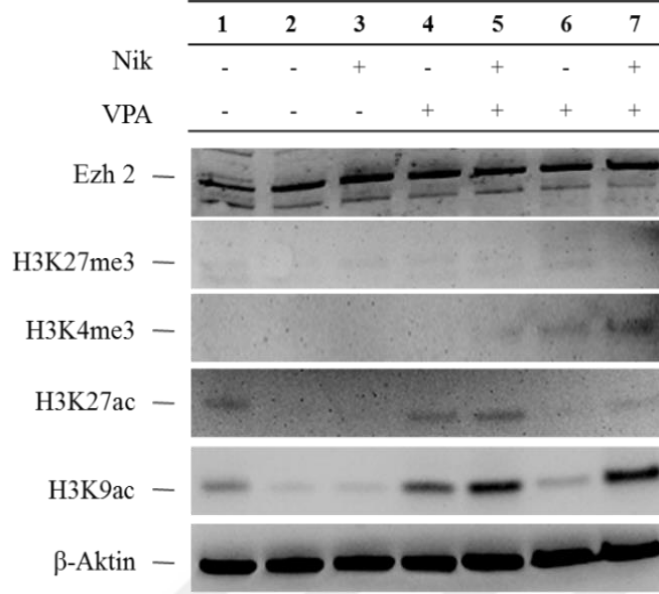
Kombinasyon uygulaması sonucunda; EMD sürecinin baskılanması ile ilişkili olarak, fibronektin, N-kaderin, ve ZEB1 protein düzeylerinde azalma gözlenirken, EMD aktivasyonu ile ilişkilendirilen E-kaderin protein düzeylerinde de azalma olduğu görüldü. Kombinasyon uygulaması sonucu 72 saat sonunda ise epitelyal bir belirteç olan CK18 protein düzeylerinin MCF-7 hücrelerine benzer şekilde arttığı belirlendi (Şekil 4.14). Dolayısıyla, E-kaderin protein düzeylerinde gözlenen değişimlerinin EMD sürecinden ziyade hücre-hücre bağlantıları ile ilişkili olduğu düşünüldü.



Şekil 4.14. MCF-7s hücrelerinde, Nik (1 μ M; 24 saat ön tedavi), VPA (1,25 mM) ve kombinasyon tedavileri sonrası EMD'ye özgü belirteçlerin protein düzeyindeki değişimlerinin western blot sonuçları. β -aktin ve GAPDH yükleme kontrolü olarak kullanıldı. 1. MCF-7 Kontrol; 2. MCF-7s Kontrol; 3. Niklozamid; 4. VPA 1,25 mM 48 saat; 5. Kombinasyon 48 saat; 6. VPA 1,25 mM 72saat; 7. Kombinasyon 72 saat ifade etmektedir

4.5. Niklozamid ile Valproik Asit Kombinasyonunun Histon Modifikasyonları Üzerine Etkisinin İncelenmesi

MCF-7s hücrelerinde, Nik ile 24 saat ön tedavi uygulaması sonrası VPA (1,25 mM) ile 48 ve 72 saatlik kombinasyon tedavisi ile değişen histon modifikasyon profilleri western blot yöntemi ile araştırıldı. Kombinasyon tedavisi sonucu, polikomb grup protein (PcG) olan Ezh2'nin protein düzeylerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmezken, aktivitesiyle uyumlu olarak baskılayıcı histon işareti olan H3K27me3'u da belirlenemedi. Buna karşılık, aktif histon işareti olan H3K4me3 protein düzeylerinde zaman bağlı olarak belirgin artış olduğu gözlemlendi. MCF-7 hücrelerine kıyasla, MCF-7s hücrelerinde aktif transkripsiyonla ilişkili histon modifikasyonları olan H3K9ac ve H3K27ac'u çok düşük düzeylerde gözlenirken, kombinasyon tedavisi sonrası protein düzeylerinin zamana bağlı olarak belirgin şekilde arttığı gösterildi (Şekil 4.15).

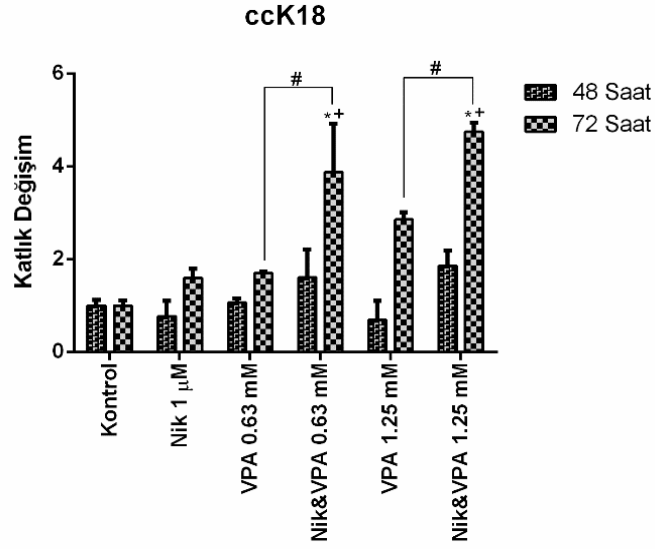


Şekil 4.15. MCF-7s hücrelerinde, Nik (1 μ M; 24 saat ön tedavi), VPA (1,25 mM) ve kombinasyon tedavileri sonrası değişen histon modifikasyon profillerinin western blot sonuçları. β -aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. 1. MCF-7 Kontrol; 2. MCF-7s Kontrol; 3. Niklozamid; 4. VPA 1,25 mM 48 saat; 5. Kombinasyon 48 saat; 6. VPA 1,25 mM 72saat; 7. Kombinasyon 72 saat ifade etmektedir

4.6. Niklozamid ile Valproik Asit Kombinasyonunun Hücre Ölümü Üzerine Etkisinin İncelenmesi

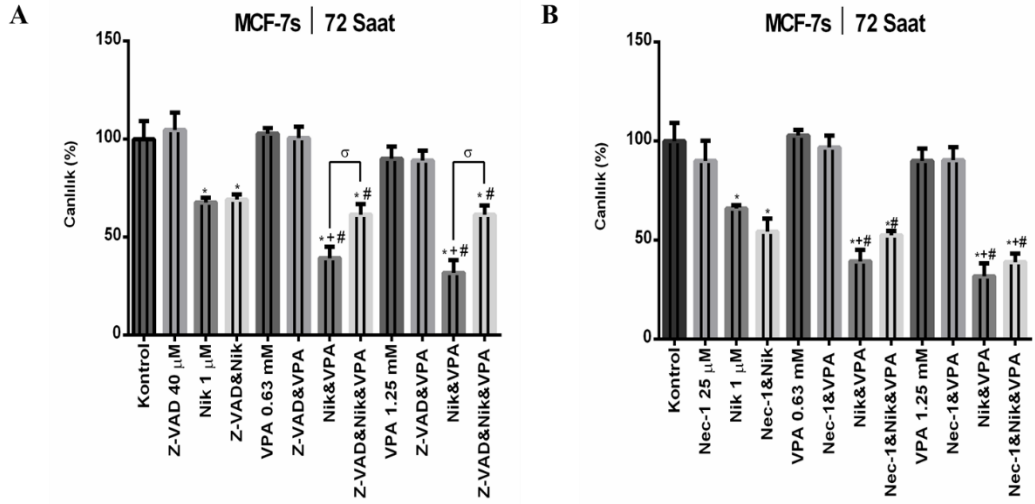
4.6.1. Kaspazla kırılmış sitokeratin 18 (ccK18, M30) bulguları

Nik ile VPA kombinasyonunun hücreler üzerine sitotoksik aktivite sergilediği belirlendikten sonra hücre ölüm modunu belirlemek amacıyla apoptozise özgü bir belirteç olan kaspazla-kırılmış CK18 (ccK18, M30) düzeylerine bakıldı. MCF-7s hücrelerinde, Nik ile 24 saat ön tedavi uygulamasını takiben VPA (0,63 ve 1,25 mM) ile kombinasyon tedavisi sonucu (48 ve 72 saat), her iki doz için de 72 saat sonunda M30 düzeylerinin anlamlı düzeyde artış gösterdiği belirlendi (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. MCF-7s hücrelerinde, Nik (1 µM; 24 saat ön tedavi), VPA (0,63-1,25 mM) ve kombinasyon tedavileri sonrası M30 düzeylerindeki değişimler. Her bir veri noktası 2 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir. *Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre (*: $p<0,01$); + Nik'e göre (+: $p<0,05$); # VPA'ya göre (#: $p<0,05$) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir

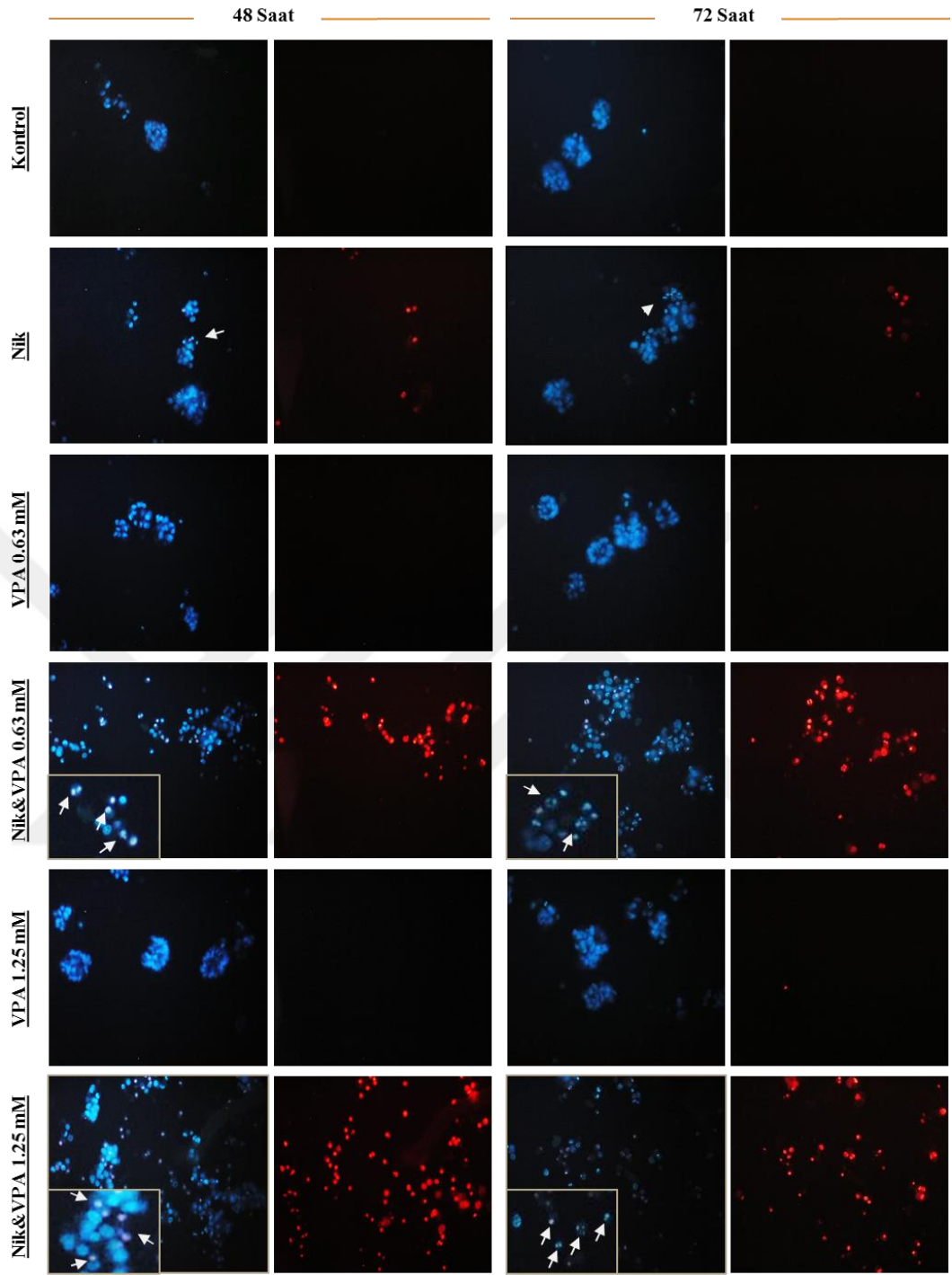
Bu veriyi desteklemek üzere kaspaz aktivitesini baskılamak amacıyla, MCF-7s hücreleri, Nik ile eş zamanlı olarak pan-kaspaz inhibitörüyle (40 µM Z-VAD-FMK) 24 saat ön tedavi uygulamasını takiben 72 saat boyunca VPA (0,63-1,25 mM) ile muamele edildi. İlâveten, kaspaz bağımsız hücre ölümü olarak tanımlanan nekroptozisin, bu süreçte rol alıp almadığını belirlemek için hücreler Nik ön tedavisiyle eş zamanlı olarak Nekrostatin-1 (Nec-1, 25 µM) ile muamele edildi ve ardından VPA (0,63-1,25 mM) uygulandı. Süre sonunda inhibitörlerin etkisi ATP canlılık testi ile gösterildi. Nec-1 varlığında kombinasyonun etkisi devam ederken, kaspaz inhibitörü varlığında hücre canlılığının anlamlı şekilde korunduğu belirlendi (Şekil 4.17). Bu veriler, kombinasyon uygulaması sonucu kaspaz bağımlı apoptozis sürecine işaret etmektedir.



Şekil 4.17. MCF-7s hücrelerinde, Nik'in Z-VAD ve Nekrostatin-1 ile eş zamanlı ön tedavi (24 saat) uygulamasını takiben VPA (0,63-1,25 mM) ile kombinasyonlarının hücre canlılığı üzerine etkisi (72 saat). Her bir veri noktası 3 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir. *Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre (*: $p<0,001$); + Nik'e göre (+: $p<0,001$); # VPA'ya göre (#: $p<0,001$); Nik&VPA'ya göre (σ : $p<0,01$) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir

4.6.2. Hoechst 33342 ve Propidyum iyodür boyama yöntemi bulguları

MCF-7s hücrelerinde, Nik ile 24 saat ön tedavi uygulamasını takiben VPA (0,63 ve 1,25 mM) ile kombinasyonunun (48 ve 72 saat) nükleus morfolojisi ve membran bütünlüğü üzerine olan etkisi, sırasıyla, Hoechst 33342 ve Propidyum İyodür (PI) ikili boyama yöntemi kullanılarak floresan mikroskop altında değerlendirildi. MCF-7s hücrelerinde kombinasyon uygulaması sonucu, apoptozise özgü olarak, nükleusun kontrole kıyasla küçüldüğü (piknozis) ve/veya nükleer fragmentasyon varlığı belirlendi. Aynı zamanda, hücrelerin membran bütünlüğünü kaybederek PI pozitif boyandığı gözlemlendi. Bu durum, hücrelerin ölüm şeklinin geç dönem apoptozis (sekonder nekrozis) olduğunu göstermektedir. İlave olarak, sitotoksikite bulgularına paralel olarak, Nik ve VPA'nın tek başına kullanımlarına kıyasla mamosfer yapılarının doza ve zamana bağlı olarak tamamen dağıldığı ve hücre yoğunluğunun da azaldığı belirlendi (Şekil 4.18).

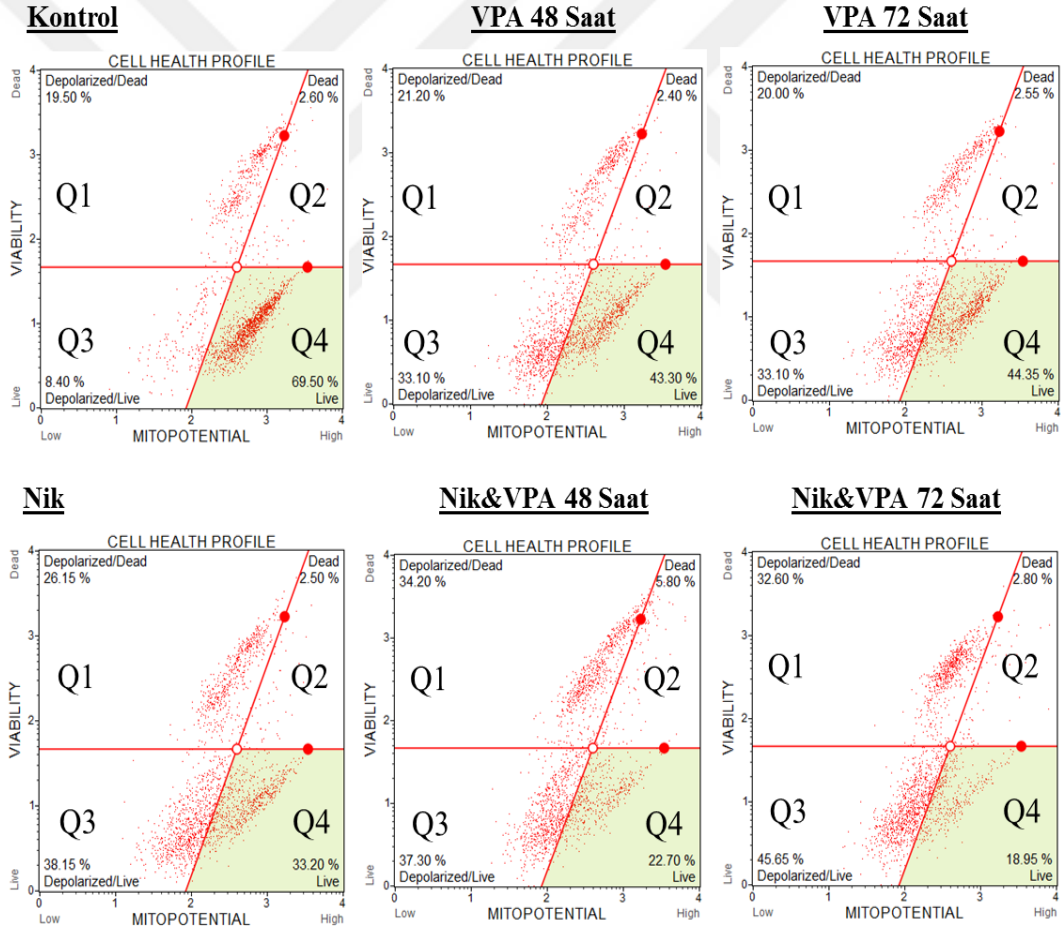


Şekil 4.18. MCF-7s hücrelerinde, Nik (1 μ M; 24 saat ön tedavi), VPA (0,63-1,25 mM) ve kombinasyon tedavileri sonrası Hoechst 33342 (mavi) ve PI (kırmızı) ikili boyama görüntüleri. → Hücre ölüm şekli olarak apoptozisi temsil eden piknotik ve/veya fragmente nükleus varlığını göstermektedir

4.6.3. Akım sitometri bulguları

4.6.3.1. Mitokondri membran potansiyel değişiklikleri

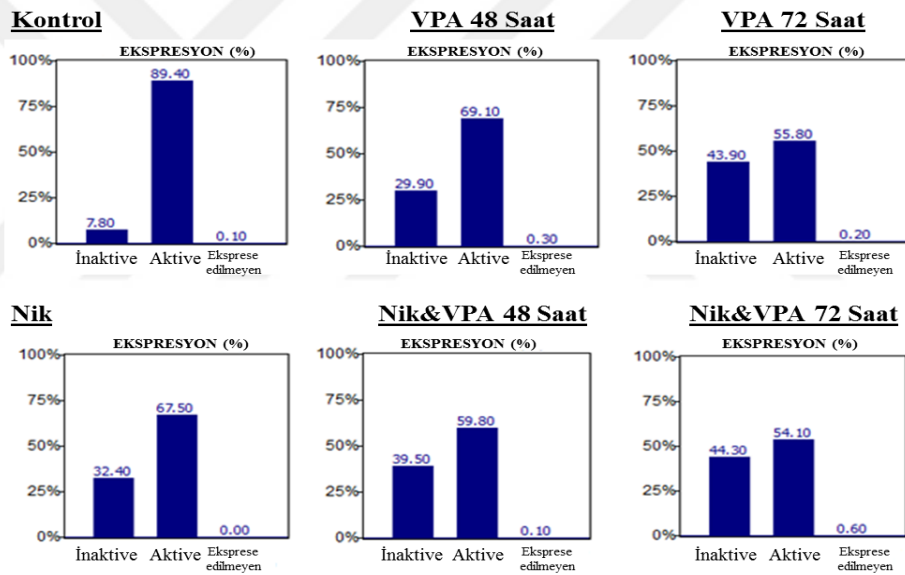
MCF-7s hücrelerinde, Nik ile 24 saat ön tedavi uygulaması sonrası VPA (1,25 mM) ile 48 ve 72 saatlik kombinasyon tedavisinin, apoptozis sürecinde önemli değişikliklerden biri olan mitokondri membran potansiyeli üzerine etkisi değerlendirildi. Nik'in tek başına kullanımında, mitokondrisi depolarize olan hücrelerin total yüzdesi %66,3 (Q1+Q3) olarak belirlendi. Tek başına VPA için ise 48 ve 72 saat sonrasında mitokondrisi depolarize olan hücrelerin total yüzdesi ise sırasıyla, %54,3 ve %53,1 (Q1+Q3) bulundu. Kombinasyon uygulaması sonucu ise bu oranın tek başlarına etkilerine kıyasla arttığı, % 71,5 (48 saat) ve %78,25 (72 saat), gösterildi (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. MCF-7s hücrelerinde, Nik (1 μ M; 24 saat ön tedavi), VPA (1,25 mM) ve kombinasyon tedavileri sonrası mitokondri membran potansiyel değişimi yüzde değerlerinin 48 ve 72 saatlik histogramları (Q1=Depolarize/Ölü, Q2= Ölü, Q3=Depolarize/Canlı, Q4= Canlı)

4.6.3.2. Bcl-2 aktivasyonu

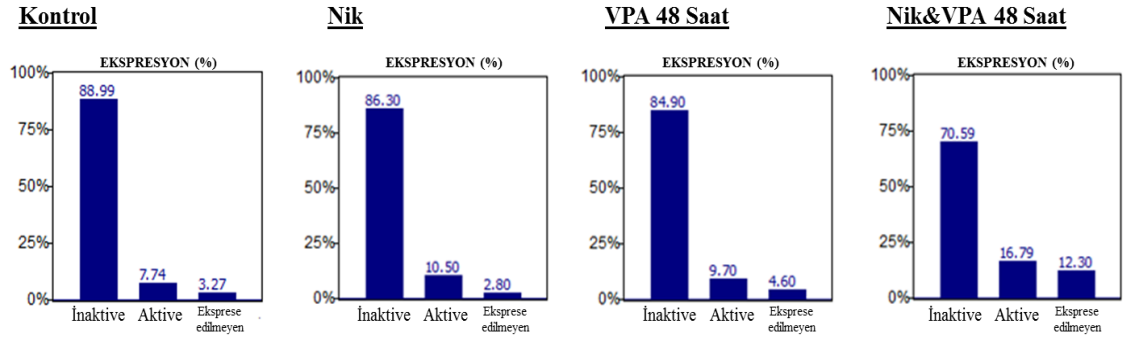
MCF-7s hücrelerinde, Nik ile 24 saat ön tedavi uygulamasını takiben VPA (1,25 mM) ile 48 ve 72 saatlik kombinasyon tedavisi sonrası anti-apoptotik bir protein olan Bcl-2'nin aktivasyonundaki değişim araştırıldı. Bcl-2 aktivitesinin azalması, mitokondri-aracılı apoptozisin uyarılması ile ilişkili olup kombinasyon tedavisi sonucu Bcl-2 aktivasyonunun, 48 saat sonunda, Nik ve VPA'nın tek başına kullanımına kıyasla yaklaşık % 10 azaldığı ancak 72 saat sonunda tek başına VPA kullanımına kıyasla anlamlı bir değişiklik olmadığı belirlendi (Şekil 4.20). Mitokondri membran potansiyeli sonuçlarında; kombinasyon tedavisi sonucu depolarize/ölü hücrelerin yüzdesinin, Nik ve VPA'nın tek başlarına kullanımına kıyasla, yaklaşık %10 arttığı dikkate alınarak apoptozis sürecinde mitokondrinin baskın şekilde rol almadığı sonucuna varıldı.



Şekil 4.20. MCF-7s hücrelerinde, Nik (1 µM; 24 saat ön tedavi), VPA (1,25 mM) ve kombinasyon tedavileri sonrası Bcl-2 aktivitesi akım sitometri sonuçları

4.6.3.3. DNA hasarının belirlenmesi

MCF-7s hücrelerinde, Nik ile 24 saat ön tedavi uygulamasını takiben VPA (1,25 mM) ile 48 saatlik kombinasyon tedavisi sonrası, DNA çift zincir kırıklarının tespitinde hassas bir belirteç olan γ H2AX'in aktivasyonu araştırıldı. DNA'da hasar düzeyi arttıkça γ H2AX düzeyleri de artış göstermektedir. Kombinasyon uygulaması sonucu, Nik ve VPA'nın tek başına kullanımına kıyasla γ H2AX düzeyinde az miktarda bir artış (yaklaşık olarak % 6) olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.21).

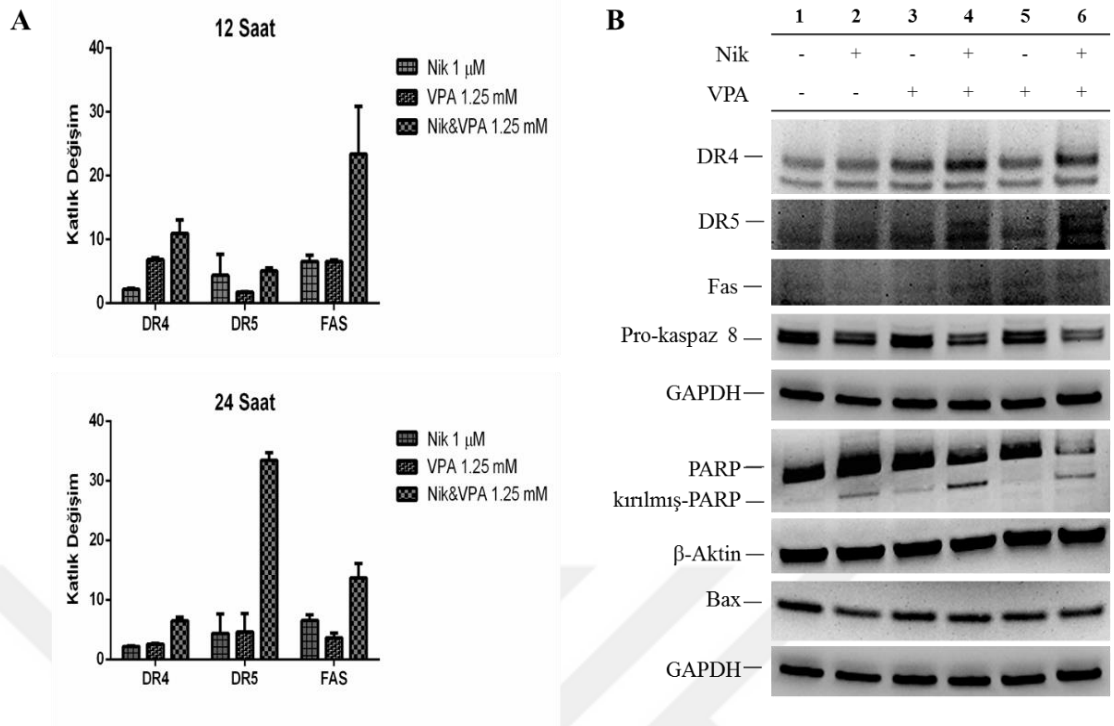


Şekil 4.21. MCF-7s hücrelerinde, Nik (1 μ M; 24 saat ön tedavi), VPA (1,25 mM) ve kombinasyon tedavileri sonrası γ H2AX aktivasyonunun akım sitometri sonuçları

4.6.4. Western blot ve gen analizi bulguları

4.6.4.1. Ekstrinsik apoptozisin uyarılması

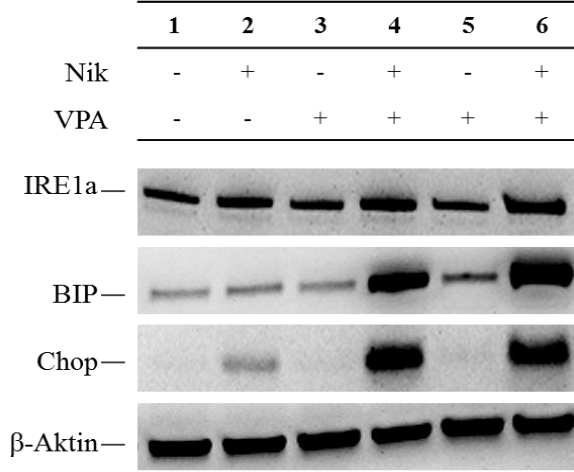
MCF-7s hücrelerinde, Nik ile 24 saat ön tedavi uygulaması sonrası VPA (1,25 mM) ile kombinasyon tedavisinin ölüm reseptörlerinin aktivasyonu üzerine etkileri gen ve protein düzeyinde araştırıldı. Kombinasyon uygulamasının, 12 ve 24 saat sonunda DR4, DR5 ve FAS gen ekspresyonlarını belirgin şekilde arttırdığı belirlendi (Şekil 4.22A). Gen düzeyinde gözlenen artışla uyumlu olarak, 48 ve 72 saatlik western blot sonuçlarında DR4, DR5 ve Fas protein düzeylerinde artış olduğu gösterildi. Ayrıca, ölüm reseptörlerinin aktivasyonu ile ilişkili olarak pro-kaspaz 8 düzeylerinde de azalma (aktivasyon) olduğu belirlendi (Şekil 4.22B). Bununla birlikte, kaspazların aktivasyonu ile ilişkili olarak PARP düzeylerinde azalma ile kırılmış-PARP düzeylerinde belirgin bir artış bulundu. Mitokondri membran potansiyeli ve Bcl-2 aktivasyonu sonuçları ile uyumlu olarak Bax protein düzeylerinde anlamlı bir değişiklik olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.22B). Elde edilen veriler doğrultusunda, kombinasyon tedavisi ile hücrelerde ekstrinsik apoptozis sürecinin uyarıldığı sonucuna varıldı.



Şekil 4.22. MCF-7s hücrelerinde, Nik (1 µM; 24 saat ön tedavi), VPA (1,25 mM) ve kombinasyon tedavileri sonrası apoptozis ile ilişkili gen (A) ve protein (B) düzeylerindeki değişimler. β-aktin ve GAPDH yükleme kontrolü olarak kullanıldı. 1. MCF-7s Kontrol; 2. Niklozamid; 3. VPA 1,25 mM 48 saat; 4. Kombinasyon 48 saat; 5. VPA 1,25 mM 72saat; 6. Kombinasyon 72 saat ifade etmektedir

4.6.4.2. Endoplazmik retikulum stresinin uyarılması

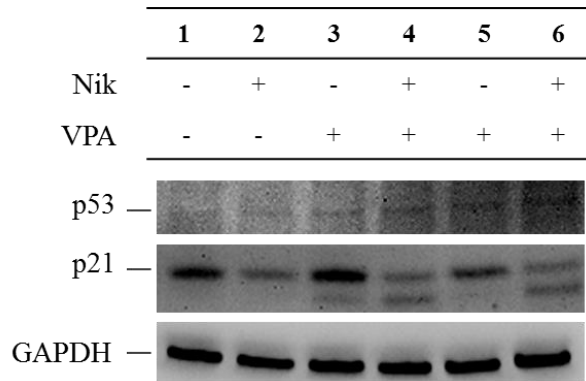
MCF-7s hücrelerinde, Nik ile 24 saat ön tedavi uygulaması sonrası VPA (1,25 mM) ile 48 ve 72 saatlik kombinasyon tedavisinin ER-stresi ile ilişkili protein düzeyleri üzerine etkileri değerlendirildi. Kombinasyon tedavisi sonucu, ER-stres sensörü IRE1α ile şaperon Bip ve transkripsiyon faktörü CHOP protein düzeylerinde belirgin bir şekilde artış olduğu belirlendi (Şekil 4.23). ER stresinin üstesinden gelinemediği zaman hücrelerde apoptozisin uyarıldığı bilinmektedir. Elde edilen veriler doğrultusunda, hücrelerde ER-aracılı apoptozisin indüklendiği gösterildi.



Şekil 4.23. MCF-7s hücrelerinde, Nik (1 μ M; 24 saat ön tedavi), VPA (1,25 mM) ve kombinasyon tedavileri sonrası ER-stresi ile ilişkili protein düzeylerinin değişimi. β -aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. 1. MCF-7s Kontrol; 2. Niklozamid; 3. VPA 1,25 mM 48 saat; 4. Kombinasyon 48 saat; 5. VPA 1,25 mM 72saat; 6. Kombinasyon 72 saat ifade etmektedir

4.6.4.3. p53 ve p21 protein düzeylerinin incelenmesi

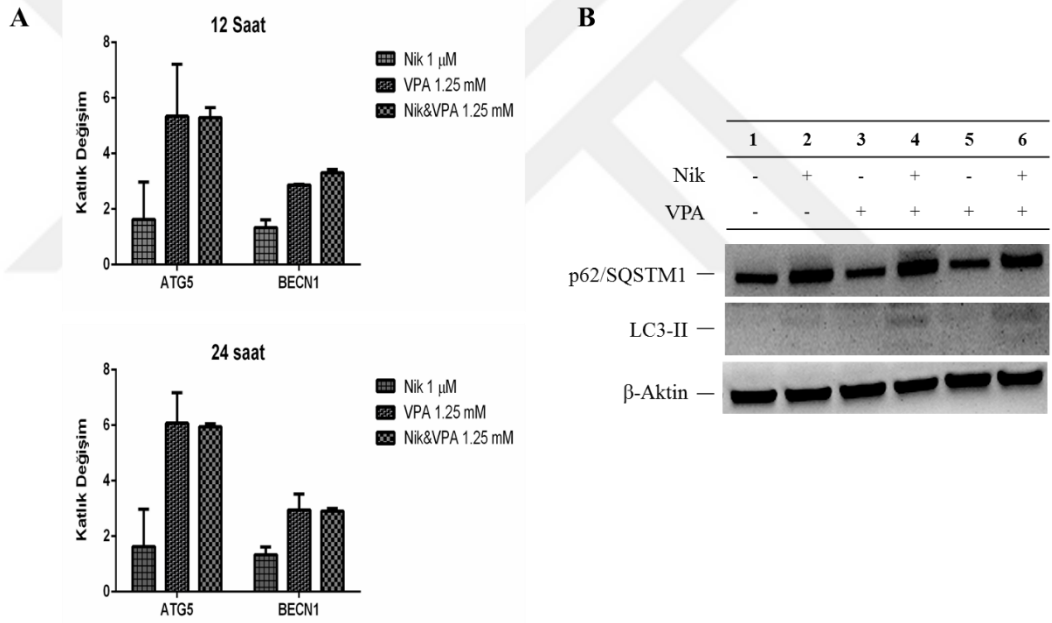
MCF-7s hücrelerinde, Nik ile 24 saat ön tedavi uygulaması sonrası VPA (1,25 mM) ile 48 ve 72 saatlik kombinasyon tedavisinin hücresel strese yanıt olarak aktifleşerek hücre döngüsünü durdurma veya apoptozis sürecinde rol alan p53 ve p21 protein düzeyleri üzerine etkisi western blot yöntemiyle araştırıldı. Kombinasyon tedavisi sonucu, 72 saat sonunda apoptozis süreciyle ilişkili olarak p53 düzeylerinde artış olurken, p21 protein düzeylerinin azaldığı gösterildi (Şekil 4.24).



Şekil 4.24. MCF-7s hücrelerinde, Nik (1 μ M; 24 saat ön tedavi), VPA (1,25 mM) ve kombinasyon tedavileri sonrası p53 ve p21 protein düzeylerinin değişimi. β -aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. 1. MCF-7s Kontrol; 2. Niklozamid; 3. VPA 1,25 mM 48 saat; 4. Kombinasyon 48 saat; 5. VPA 1,25 mM 72saat; 6. Kombinasyon 72 saat ifade etmektedir

4.6.4.4. Otofajik akışın bozulması

MCF-7s hücrelerinde, Nik ile 24 saat ön tedavi uygulaması sonrası VPA (1,25 mM) ile kombinasyon tedavisinin otofaji süreci ile ilişkili gen ve proteinler üzerine etkileri değerlendirildi. Kombinasyon uygulamasının, 12 saat sonunda, izolasyon membranı ve otofagozom oluşumunda rol alan ATG5 ve BECN1 gen ekspresyonlarını belirgin şekilde arttırdığı ve 24 saatte de bu artışın korunduğu belirlendi (Şekil 4.25A). Bununla birlikte, önemli otofajik belirteçler olan p62/SQSTM1 ve LC3II protein düzeylerinde artış olduğu belirlenmiştir. Ancak, otofaji sürecinde p62/SQSTM1 proteininin kendisi de, otofagozoma taşıdığı proteinlerle birlikte lizozomda yıkılmaktadır. Bu nedenle, p62/SQSTM1 ve LC3II proteinlerinin birikimi kombinasyon uygulaması sonucu otofajik akışın bozulduğunu göstermektedir (Şekil 4.25B).



Şekil 4.25. MCF-7s hücrelerinde, Nik (1 µM; 24 saat ön tedavi), VPA (1,25 mM) ve kombinasyon tedavileri sonrası otofaji ile ilişkili gen (A) ve protein (B) düzeylerindeki değişimler. β-aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. 1. MCF-7s Kontrol; 2. Niklozamid; 3. VPA 1,25 mM 48 saat; 4. Kombinasyon 48 saat; 5. VPA 1,25 mM 72saat; 6. Kombinasyon 72 saat ifade etmektedir

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Meme kanseri, tüm dünyada kadınlar arasında en sık görülen kanser tipidir ve kanser ile ilişkili ölümler arasında ikinci sırada yer almaktadır (DeSantis ve ark. 2013, Siegel ve ark. 2015). Günümüzde, kanser tanısı koyulan her dört kadından biri meme kanseridir (Stewart ve ark. 2015, Gültekin ve ark. 2016). Bununla birlikte, kadınların yaşamları süresince meme kanserine yakalanma ihtimalleri yaklaşık olarak % 12,5'dur (her 8 kadından biri) (American Cancer Society 2015). On yıl öncesine kadar bu oranların neredeyse %50 daha az olduğu dikkate alınarak, bu şekilde seyrettiği takdirde 2030 yılında bu rakamların ikiye katlanacağı öngörülmektedir. Her ne kadar geleneksel kemoterapi yöntemlerinin çoğu başta başarı ile sonuçlansa da, tedaviye dirençli özel bir hücre alt grubunun tamamen elimine edilememesinden dolayı tedavi başarısız olmakta ve hastalık tekrar etmektedir (Chabner ve Roberts 2005, Li ve ark. 2008). Son yıllarda giderek artan kanıtlar, meme tümörlerinin farklı morfolojik ve karakteristik özelliklere sahip heterojen hücre gruplarından meydana geldiğini ve bu hücre grupları arasında kök hücrelerle benzer şekilde kendini yenileme ve farklılaşma kabiliyetine sahip özel bir hücre alt grubunun, KKH'lerinin, varlığını göstermektedir (Al-Hajj ve Clarke 2004, Meacham ve Morrison 2013, Cabrera ve ark. 2015). Tümörün çok küçük bir kısmını (%0,1-2) oluşturan bu hücre grubunun; tümör oluşumu ve gelişimi, artmış invazif özellik, radyasyon ve kemorezistans ile ilişkili oldukları düşünülmektedir (Li ve ark. 2010). Dolayısıyla, tümörü tam anlamıyla elimine edebilmek için KKH'lerini de hedefleyen tedavi yaklaşımları geliştirmek son derece sıcak bir araştırma konusu haline gelmiştir.

KKH'lerinde, tümörün büyük çoğunluğunu oluşturan ve kök hücre özelliği taşımayan kanser hücrelerinden farklı olarak; hayatta kalma, kendini yenileme ve proliferasyon sürecinde kritik rol oynayan bazı moleküler yolaklar yeniden/aşırı aktifleşmiş haldedir (Song ve Miele 2007). Bu yollardan biri olan Wnt/ β -katenin sinyal yolağı hücre akıbetinin belirlenmesi, hücre proliferasyonu ve kök hücre devamlılığı gibi pek çok biyolojik süreci kontrol eder ve tümörlerin büyük kısmında deregüle haldedir (Hooper ve Scott 2005, Ponti ve ark. 2006, Valkenburg ve ark. 2011). Meme kanserinde, Wnt/ β -katenin sinyal yolağının pozitif düzenleyicilerinin aşırı ekspresyonu ya da amplifikasyonu ve negatif düzenleyicilerinin de inaktive olduğu bildirilen çalışmalar mevcuttur (Cowin ve ark. 2005, Reya ve Clevers 2005, Lindvall ve ark. 2007).

Meme tümörüne, birçok genetik ve epigenetik değişiklikleri kapsayan çok aşamalı bir süreç olup epigenetik değişiklikler gen promotor metilasyonları (hipermetilasyon, hipometilasyon), histonların modifikasyonları (metilasyon, asetilasyon, fosforilasyon vb.) ve kromatin yeniden modellenmesi gibi mekanizmaları kapsamaktadır (Byler ve ark. 2014). Translasyon sonrası histon modifikasyonlarında değişiklikler ile belirli histon asetilasyon ve metilasyon işaretlerinin kaybının kanser süreci ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Seligson ve ark. 2005, Elsheikh ve ark. 2009). Bununla birlikte, epigenetik değişikliklerin KKH'lerinin yeniden programlanması, hücre yaşam yollarının aktivasyonu, kendini yenileme ve farklılaşma kabiliyeti kazanmaları gibi süreçlerde kritik öneme sahip olduğunu gösteren kanıtlar giderek artmaktadır (Munoz ve ark. 2012). Birçok kanser türünde HDAC'ların aşırı ekspresyonunun global bir histon asetilasyon kaybına yol açtığı ve kötü prognozla ilişkili olduğu belirlenmiştir (Osada ve ark. 2004, Weichert ve ark. 2008, Park ve ark. 2011). Histon asetilasyon programının değişiminin ise farklılaşma ve apoptozis süreci ile yakından ilişkili olduğu HDAC'ları hedefleyen ajanlar ile yapılan klinik çalışmalarda gösterilmiştir (Lane ve Chabner 2009, Marks ve Xu 2009).

Meme kanseri kök hücrelerinin en önemli özelliklerinden biri apoptotik mekanizmaların disregülasyonudur. İyi işleyen bir ölüm programından kaçmak, KKH'lerinin tedavi direncine katkı sağlamaktadır (Signore ve ark. 2013). Dolayısıyla KKH'lerinde apoptotik sistemin manipülasyonu, kanser terapisinde etkin bir yöntem olabilir. Literatürde, Wnt/ β -katenin sinyal yolağı inhibisyonunun ya da HDAC'ların inhibisyonu ile histon asetilasyonunda artışın apoptozis sürecinin uyarılması ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Wei ve ark. 2010, Xue ve ark. 2014, Di Pompo ve ark. 2015, Cha ve ark. 2016).

Bu bilgiler doğrultusunda, hem KKH'lerini hedefleyen hem de bu hücreleri KKH özelliği taşımayan hücrelere dönüştüren bir tedavi yaklaşımının en ideal strateji olacağı düşünülerek bu tez çalışması kapsamında, meme KKH'lerinde, Wnt/ β -katenin sinyal yolağı ile HDAC'ların birlikte inhibisyonunun hücre ölümü üzerine etkileri incelendi. Bu amaçla, öncelikle, parental MCF-7 hücrelerinden KKH bakımından zengin popülasyonunun (MCF-7s) zenginleştirilmesi sağlandı. Bunun için, meme KKH'lerinin en önemli özelliklerinden biri olan yüzey-bağımsız koşullarda hayatta kalarak mamosfer oluşturma özelliklerinden yararlandı (Velasco ve ark. 2012). Daha sonra bu hücrelerde,

KKH karakterinin sürdürülmesinden sorumlu transkripsiyon faktörlerinin, Oct-4 ve Sox2, ekspresyon düzeylerinin arttığı gösterildi (Niwa 2007, Ben-Porath ve ark. 2008). Son yıllarda, meme kanseri kök hücrelerinde artmış Oct-4 ve Sox2 düzeylerinin mamosfer oluşumu ile ilişkili olduğu da gösterilmiştir (Simoes ve ark. 2011, Leis ve ark. 2012).

Parental MCF-7 ve MCF-7s hücrelerinin VPA yanıtı değerlendirildiğinde, beklenildiği üzere MCF-7s hücrelerinin tedaviye daha dirençli olduğu gözlemlendi. VPA'nın, *in vitro* koşullarda, farklılaşmış meme kanseri hücreleri (MCF-7) ile meme KKH'leri (mamosfer) üzerine farklı etkiler sergilediği rapor edilmiştir. Bu çalışmada elde edilen sonuca göre; VPA, MCF-7 hücrelerini radyasyona duyarlı hale getirirken, meme kanseri kök hücreleri radyasyona direnç sergilemiştir (Debeb ve ark. 2010).

Wnt/ β -katenin sinyal yolağı inhibitörü olarak FDA onaylı bir tenya öldürücü ajan olan Niklozamid kullanıldı (Merschjohann ve Steverding 2008). Çalışmanın en önemli sonuçlarından biri; Wnt/ β -katenin sinyal yolağının aktif olduğu belirlenen bu hücrelerde, Nik ile 24 saat ön tedavi sonrası HDAC inhibitörü VPA ile kombinasyon uygulamasının Wnt/ β -katenin sinyal yolağında çok daha güçlü bir inhibisyon ile sonuçlanmış olmasıdır. Niklozamid, Wnt/ β -katenin sinyal yolağını LRP6 ekspresyonunu ve fosforilasyonunu önleyerek inhibe etmektedir (Lu ve ark. 2011, Arend ve ark. 2014). Çalışmada, Nik (1 μ M) ile 24 saat ön tedavi uygulaması sonucu, kontrole kıyasla, LRP6 ve p-LRP6 protein düzeylerinde değişiklik gözlenmemiştir. Ancak p-Dvl3 protein düzeylerinde azalma ile uyumlu şekilde Naked2 protein düzeylerinde artış bulunmuştur. Nik'in Dvl ekspresyonlarında azalmaya yol açtığı ve Naked2'nin Dvl proteinin negatif düzenleyicisi olduğu dikkate alınarak yolağın kısmen inhibe olduğu sonucuna varılmıştır (Hu ve ark. 2010, Osada ve ark. 2011). VPA ile muamele sonrası ise 48 saat sonunda, p-LRP6, p-Dvl3 ile Naked2 düzeylerindeki artış yolağın aktivasyonuna işaret etse de, 72 saat sonunda bu protein düzeylerinde azalma olduğu belirlendi. Bu durumda, Wnt/ β -katenin sinyal yolağında geçici bir aktivasyon olduğu sonucuna varıldı. Yapılan çalışmalarda, VPA'nın, Wnt/ β -katenin sinyal yolağını aktifleştirdiği ve mamosfer oluşturma kapasitesini arttırdığı rapor edilmiştir (Phiel ve ark. 2001, Debeb ve ark. 2012). Bu veriler doğrultusunda; Wnt sinyal yolağı inhibe edildiğinde, hücrelerin VPA'ya daha duyarlı hale geleceği ön görüldü. Nitekim, kombinasyon çalışmaları sonucunda sinerjistik etki

göstererek çok daha güçlü bir sitotoksik aktivite sergiledikleri belirlendi. Yakın zamanda gerçekleştirilen bir çalışmada, Wnt, HDAC ve Er α (östrojen reseptör alfa)'nın birlikte inhibisyonunun meme KKH popülasyonunu etkin bir şekilde baskıladığını göstermiştir (Sulaiman ve ark. 2016). Bu kombinasyona tamoksifen eklendiğinde, daha düşük dozlarda, KKH popülasyonunun başarılı bir şekilde baskılandığını rapor etmişler ancak mekanizma açıklamamışlardır.

Çalışmanın bir sonraki kısmında; kombinasyon tedavisi için seçilen dozlarda, tek başına VPA'ya kıyasla, histon H3 asetilasyon düzeylerinin belirgin şekilde arttığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, kök hücre karakteri ile ilişkili olarak Sox2 protein düzeylerinin belirgin şekilde azaldığı gösterilmiştir. Hücrel asetilasyon artışının Sox2 düzeylerini, proteozomal degradasyonunu uyararak, azalttığı gösterilmiştir (Baltus ve ark. 2009). Polikomb grubu proteinlerden biri olan Bmi1, kök hücrelerin kendini-yenileme özelliğinin düzenlenmesinde rol alır ve ekspresyonunun pozitif geri bildirim (feedback) mekanizma tarafından Wnt sinyal yolağı ile düzenlediği gösterilmiştir (Liu ve ark. 2006b, Cho ve ark. 2013). Ancak, bu çalışmada, Bmi1 protein düzeylerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Aynı zamanda Wnt hedef genlerinden biri olan Oct-4'un gen ekspresyonunun ise zamana bağlı olarak önce arttığı sonra azaldığı gösterilmiştir. Bu etki, Wnt/ β -katenin sinyal yolağının inhibisyonu ile ilişkilendirilmiştir.

EMD ile kök hücre özelliklerinin kazanılması arasında doğrudan bir bağ olduğu ve meme epitelyal hücrelerinde EMD uyarılması sonucu kök hücre belirteçlerinin ekspresyonu ile mamosfer oluşturma kabiliyetinin arttığı daha önce yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (Mani ve ark. 2008). Ek olarak, Wnt/ β -katenin sinyal yolağı aktivasyonunun da EMD sürecinin uyarılmasında rol aldığı bilinmektedir (Polyak ve Weinberg 2009). Çalışmamızda, literatürle uyumlu olarak, MCF-7 hücrelerine kıyasla MCF-7s hücrelerinde mezankimal karakter ile ilişkili olarak fibronektin, N-kaderin ve ZEB1 protein düzeylerinin artış gösterdiği bulunmuştur. Kombinasyon tedavisi sonucu ise bu belirteçlerin düzeylerinde azalma ile birlikte epitelyal bir belirteç olan CK18 protein düzeylerinde artış gözlenmiştir. Bu veriler değerlendirildiğinde, kombinasyon tedavisi ile MCF-7s hücrelerinde kök hücre karakteri ile birlikte EMD'nin de baskılandığı ve hücrelerin MCF-7 benzeri karakter sergiledikleri sonucuna varılmıştır. Wnt/ β -katenin sinyal yolağı ya da EMD süreci epigenetik olarak polikomb grubu protein Ezh2 tarafından

düzenlenmektedir. Ezh2'nin yüksek derecede ekspresyonu Wnt/ β -katenin sinyal yolağı aktivasyonu ile ilişkilidir (Li ve ark. 2009). Ezh2, fiziksel ve fonksiyonel olarak HDAC1 ve 2'ye bağılı olup H3K27me3'ünü uyararak transkripsiyonun baskılanması ile gen susmasından sorumludur (Song ve ark. 2005). Tez çalışmasında, kombinasyon uygulaması sonucu HDAC1 ve HDAC2 protein düzeylerinde azalma olmasına rağmen Ezh2 düzeylerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Ayrıca, Ezh2 aktivitesiyle ilişkilili olarak H3K27me3'da belirlenememiştir. Bununla birlikte aktif transkripsiyonla ilişkilili olarak H3K4me3, H3K9 ve H3K27 asetilasyon düzeylerinin belirgin şekilde arttığı gözlenmiştir. Histon deasetilaz olan SIRT1 ile yapılan bir çalışmada, SIRT1 inhibisyonunun, Wnt antagonisti olan SFRP1'in yeniden aktifleşerek Wnt/ β -katenin sinyal yolağı inhibe ettiği ve aktif SFRP1 promotor bölgesinde artmış H3K9 asetilasyonunun varlığı gösterilmiştir (Pruitt ve ark. 2006). Bir başka Wnt antagonisti olan Naked2'nin aktivitesi de epigenetik olarak düzenlenmekte olup promotor bölgesinde hipermetilasyona bağılı inaktivasyonu Wnt/ β -katenin sinyal yolağının aktivasyonu ile ilişkilidir (Dong ve ark. 2015). Ancak, literatürde henüz, Naked2'in epigenetik düzenlenmesinde histon modifikasyonlarının rolüne dair herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. HDAC'ların inhibisyonuna bağılı asetilasyon artışı ve çalışma sonucunda gözlenen ilgili histon modifikasyonları, Naked2 aktivasyonunun uyarılmasıyla ilişkilili olabilir ancak ileri analizlerinin yapılması gerekmektedir. Yakın zamanda yapılan bir başka çalışmada, HDAC inhibisyonuyla artan global histon H3 asetilasyonu ile birlikte, ZEB1 hedef gen bölgesinde, aktif histon işareti olan H3K4me3'u ve H3K9 asetilasyonunun arttığı ve ilaç direncinin azaldığı gösterilmiştir (Meidhof ve ark. 2015). Bir başka çalışmada, ZEB1 ile uyarılan EMD sürecinde H3K27 asetilasyonunun azaldığı rapor edilmiştir (Roche ve ark. 2013).

Chikamatsu ve ark. (2013) baş ve boyun kanserinde HDAC inhibisyonunun, kemoterapötik ajanlarla sinerjistik etki sergilediğı, kök hücre karakterini ve EMD'yi baskıladığı, hücre döngüsünü durduğu ve hücrelerde apoptozisi indüklediğini göstermişlerdir (Chikamatsu ve ark. 2013). Tez çalışmasında, Nik ile 24 saat ön-tedavi uygulaması sonrası, VPA ile kombinasyon sonuçları MCF-7s hücrelerinde apoptozisin indüklediğini göstermiştir. CK18'in apoptozise özgü olarak kaspaz bağımlı kırılması M30 yöntemiyle araştırıldı. Kombinasyon tedavisi sonucu, MCF-7s hücrelerinde kaspazla kırılmış CK 18 düzeylerinin tek başına Nik ya da VPA kullanımına göre anlamlı

şekilde arttığı gösterildi ($p<0,05$; $p<0,01$). Apoptozis sürecinin kaspaz bağımlı yolak üzerinden gerçekleştiği, ortamda pan kaspaz inhibitörü varlığında hücre canlılığının anlamlı şekilde korunmasıyla doğrulandı ($p<0,01$). Boo ve ark. (2011) histon asetilasyonunun kaspaz aktivasyonunu ve apoptozisi uyardığını göstermişlerdir (Boo ve ark. 2011). Bir sonraki aşamada, apoptozise özgü olarak kontrole göre küçülmüş (piknotik) ve/veya fragmente nükleusların varlığı ile birlikte membran bütünlüğünün de bozulduğu, dolayısıyla hücrelerde sekonder nekrozis (geç dönem apoptozis) uyarıldığı tespit edildi (Ulukaya 2011). Kombinasyon tedavisinin, mitokondri üzerine etkisi ile apoptozisin mitokondri aracılı uyarılıp uyarılmadığını belirlemek amacıyla; mitokondri membran potansiyeli, Bcl-2 defosforilasyonu (inaktivasyonu) ve Bax'ın protein düzeylerindeki değişiklikler değerlendirildi. Mitokondri membran potansiyelinin, Nik ve VPA'nın tek başlarına etkisine kıyasla, yaklaşık %10 azaldığı belirlendi. Mitokondri membran potansiyelinin azalması sıklıkla apoptozis ve kaspaz aktivasyonu ile ilişkilendirilmektedir (Goldstein ve ark. 2000). Buna karşılık, Bcl-2 inaktivasyonunun 48 saat sonunda yaklaşık %10 artış gösterdiği ancak bu farkın 72 saat sonunda kapandığı ve Bax protein düzeylerinin de anlamlı şekilde değişmediği görüldü. Bu veriler, kombinasyon tedavisi ile uyarılan apoptozis sürecinde mitokondrinin baskın şekilde rol almadığını düşündürmüştür. Yapılan çalışmalarda VPA'nın hem ekstrinsik yolak hem de mitokondriyal yolak aracılığıyla apoptozisi tetiklediği gösterilmektedir (Lagneaux ve ark. 2007, Jasek ve ark. 2012). Tez çalışmasında kombinasyon uygulaması sonucunda, hücre yüzey ölüm reseptörleri, DR4, DR5 ve Fas, ekspresyonlarının gen ve protein düzeyinde artış gösterdiği ve bununla uyumu olarak pro-kaspaz 8 düzeylerinin azaldığı belirlenmiştir. Hücre yüzey ölüm reseptörlerinin aktivasyonu ile aktiveşen kaspaz-8 üzerinden ilerleyen ekstrinsik apoptotik yolda, aktif kaspaz 8 direkt olarak kaspaz-3 aktivasyonunu uyarabilir ya da Bcl-2 pro-apoptotik protein ailesi üyelerinden olan Bid'i kırabilir. (Thornberry ve Lazebnik 1998). Ayrıca, apoptozis belirteci olarak kaspazlar tarafından indüklenen spesifik PARP kırılması gözlenmiştir (Nicholson ve ark. 1995). Yakın zamanda, aktif histon işaretleri olan H3K4me3 ile H3K9 asetilasyonunun FasL'in transkripsiyonel aktivasyonunu uyardığı gösterilmiştir (Ghare ve ark. 2014). Bu sonuçlar, MCF-7s hücrelerinde, kombinasyon tedavisi sonucu ölüm reseptörleri üzerinden giden, kaspaz bağımlı bir apoptozis varlığına işaret etmektedir.

Tez çalışmasında, kombinasyon uygulamasıyla hücrelerde ER-stresinin de indüklendiği gösterilmiştir. ER-stres sensörü olarak görev yapan IRE1 α , şaperon protein BIP ve hücrelerde ER-aracılı apoptozis uyarılmasıyla ilişkili transkripsiyon faktörü CHOP'un protein düzeylerinde belirgin artışlar belirlenmiştir. Uzun süren ER-stresi durumunda hücrelerde apoptozisin uyarıldığı bilinmektedir. ER-stresiyle indüklenen apoptotik mekanizmalar JNK aktivasyonu, Bcl-2 ailesi ve kaspaz aktivasyonlarını kapsamaktadır (Gorman ve ark. 2012). Hücrel stres yanıtıyla yakından ilişkili olarak; p53 protein düzeyleri zamana bağlı artış gösterirken, p21 düzeylerinde azalma gözlenmiştir. HDAC inhibitörlerinin, p53-aracılı p21 aktivasyonu ile hücre döngüsünde tutulma sürecini uyardığı bilinmektedir. Ancak, tez çalışmasında gözlenen düşük p21 düzeyleri, bu proteinin anti-apoptotik rolünün ortadan kalkarak hücrelerde kaspaz aktivasyonu ve apoptozisin uyarıldığına işaret etmektedir (Hollmann ve ark. 2016). Ayrıca, ER-stresi sürecinde, DNA hasarının p53-bağımlı p21 aktivasyonu ile değil p53-bağımlı apoptozis aktivasyonu ile ilişkili olduğu ve bu süreçte p21 ekspresyonunun azaldığı rapor edilmiştir (Mlynarczyk ve Fähræus 2014). Tez çalışmasında, kombinasyon uygulaması sonucu DNA hasarında bir miktar artış olduğu gösterilmiştir. Ek olarak, H3K4me3'unun p53-bağımlı transkripsiyonu arttırdığı yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (Lauberth ve ark. 2013).

Bir diğer hücrel stres yanıtı olan otofaji, KKH'lerinin hayatta kalması, devamlılığı ve ilaç direncine katkı sağlaması açısından oldukça önemli bir mekanizmadır (Gong ve ark. 2013, Cojoc ve ark. 2015). Kombinasyon ile tedavi sonucunda, gen düzeyinde ATG5 ve BECN1 ekspresyonlarında artış olduğu ve bu artışın zamana bağlı olarak azalmadığı gözlenmiştir. Bununla birlikte, önemli otofajik belirteçler olan LC3II ve p62/SQSTM1 düzeylerinde zamana bağlı artış olduğu gözlenmiştir. Ancak, otofaji süresince, p62/SQSTM1 tamamlanmış otofagozomlarla birlikte lizozomlarda degrade olmaktadır (Bjørkøy ve ark. 2009). Bu nedenle, birikmiş p62 varlığı otofaji aktivasyonundan ziyade otofajik akışın bozulması şeklinde yorumlanmaktadır. Benzer etki, tek başına Nik kullanımında da gözlenmiş olup Gao ve ark. (2014), niklozamid varlığında LC3II ve p62 birikiminin otofajinin geç dönemde inhibe olduğunu gösterdiğini rapor etmişlerdir (Gao ve ark. 2014).

Bu *in vitro* çalışmanın sonuçları değerlendirildiğinde; meme kanseri kök hücrelerinde, Niklozamid ile Valproik asit kombinasyonunun artmış Histon H3 asetilasyonu ve daha güçlü Wnt yolak inhibisyonu ile hücre canlılığını belirgin bir şekilde azalttığı ve bu hücrelerde apoptozisin etkin bir şekilde uyarıldığı bulundu. Hem KKH'lerini hedefleyen hem de bu hücreleri KKH özelliği taşımayan hücrelere dönüştüren bu yaklaşımın gelecek çalışmalar adına umut verici olduğu düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

- Al-Hajj, M., ve Clarke, M. F. 2004.** Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene*, 23(43): 7274-7282.
- Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., Clarke, M. F. 2003.** Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Science*, 100(7): 3983–3988.
- Altunkaynak, B.Z., Özbek, E. 2008.** Programlanmış Hücre Ölümü: Apoptoz Nedir?. *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 6(2): 93 -104.
- American Cancer Society. 2015.** What are the key statistics about breast cancer? Available at: <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-key-statistics>. Erişim tarihi: 4 Şubat 2015.
- 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 Research*, 55(22): 5276-5282.
- Annunziato, A. 2008.** DNA packaging: nucleosomes and chromatin. *Nature Education*, 1(1): 26.
- Anonim 2014.** https://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction (Erişim tarihi: 01.02.2017).
- Anonim, 2010.** Protocol Books. <http://docs.abcam.com/pdf/misc/abcam-protocols-book-2010.pdf> (Erişim tarihi: 04.07.13).
- Arend, R. C., Londono-Joshi, A. I., Samant, R. S., Li, Y., Conner, M., Hidalgo, B., Alvarez, R. D., Charles, N. L., Straughn, M., Buchsbaum, D. J. 2014.** Inhibition of Wnt/ β -catenin pathway by niclosamide: A therapeutic target for ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 134(1): 112-120.
- Baltus, G. A., Kowalski, M. P., Zhai, H., Tutter, A. V., Quinn, D., Wall, D., ve Kadam, S. 2009.** Acetylation of sox2 induces its nuclear export in embryonic stem cells. *Stem Cells*, 27(9): 2175-2184.
- Baylin, S. B. 2005.** DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nature Clinical Practice Oncology*, 1: 4–11.
- Bello, J. O. M., Nieva, L. O., Paredes, A. C., Gonzalez, A. M. F., Zavaleta, L. R., Lizano, M. 2015.** Regulation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway by human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins. *Viruses*, 7(8): 4734-4755.
- Ben-Porath, I., Thomson, M. W., Carey, V. J., Ge, R., Bell, G. W., Regev, A., ve Weinberg, R. A. 2008.** An embryonic stem cell–like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nature Genetics*, 40(5): 499-507.
- Bird, A. 2002.** DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes and Development*, 1: 6–21.
- Bjerkvig, R., Tysnes, B. B., Aboody, K. S., Najbauer, J., Terzis, A. J. A. 2005.** The origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights. *Nature Reviews Cancer*, 5(11): 899-904.

- Bjørkøy, G., Lamark, T., Pankiv, S., Øvervatn, A., Brech, A., & Johansen, T. 2009.** Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods in Enzymology*, 452: 181-197.
- Bonnet, D., Dick, J. E. 1997.** Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine*, 3(7): 730–737.
- Byler, S., Goldgar, S., Heerboth, S., Leary, M., Housman, G., Moulton, K., Sarkar, S. 2014.** Genetic and epigenetic aspects of breast cancer progression and therapy. *Anticancer Research*, 34(3): 1071–1077.
- Cabrera, M. C., Hollingsworth, R. E., ve Hurt, E. M. 2015.** Cancer stem cell plasticity and tumor hierarchy. *World Journal of Stem Cells*, 7(1): 27-36.
- Cha, H. Y., Lee, B. S., Chang, J. W., Park, J. K., Han, J. H., Kim, Y. S., Shin, Y. S., Byeon, H. K., Kim, C. H. 2016.** Downregulation of Nrf2 by the combination of TRAIL and Valproic acid induces apoptotic cell death of TRAIL-resistant papillary thyroid cancer cells via suppression of Bcl-xL. *Cancer Letters*, 372(1): 65-74.
- Chabner, B. A., ve Roberts, T. G. 2005.** Chemotherapy and the war on cancer. *Nature Reviews Cancer*, 5(1): 65-72.
- Chaudhari, N., Talwar, P., Parimisetty, A., Lefebvre d'Hellencourt, C., Ramanan, P. 2014.** A molecular web: endoplasmic reticulum stress, inflammation, and oxidative stress. *Front Cell Neurosci.*, 8:213.
- Chen, M., Wang, J., Lu, J., Bond, M. C., Ren, X. R., Lyerly, H. K., Barak, L. S., Chen, W. 2009.** The anti-helminthic niclosamide inhibits Wnt/Frizzled1 signaling. *Biochemistry*, 48(43): 10267-10274.
- Chen, S., Guttridge, D. C., You, Z., Zhang, Z., Fribley, A., Mayo, M. W., Kitajewski, J., Wang, C. Y. 2001.** Wnt-1 signaling inhibits apoptosis by activating beta-catenin/T cell factor-mediated transcription. *J. Cell Biol.*, 152: 87-96.
- Cheung-Ong, K., Giaever, G., Nislow, C. 2013.** DNA-damaging agents in cancer chemotherapy: serendipity and chemical biology. *Chemical Biology*, 20(5): 648-659.
- Chikamatsu, K., Ishii, H., Murata, T., Sakakura, K., Shino, M., Toyoda, M., Takahashi, K., Masuyama, K. 2013.** Alteration of cancer stem cell-like phenotype by histone deacetylase inhibitors in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Science*, 104(11): 1468-1475.
- Cho, J. H., Dimri, M., Dimri, G. P. 2013.** A positive feedback loop regulates the expression of polycomb group protein BMI1 via WNT signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 288(5): 3406-3418.
- Chou, T.C. 2006.** Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacological Reviews*, 58(3): 621-681.
- Clevers, H. (2011).** The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nature Medicine*, 313-319. doi:10.1038/nm.2304.
- Cojoc, M., Mabert, K., Muders, M. H., Dubrovskaja, A. 2015.** A role for cancer stem cells in therapy resistance: cellular and molecular mechanisms. *Seminars in Cancer Biology*, 31: 6-27.

- Cole, M. F., Johnstone, S. E., Newman, J. J., Kagey, M. H., Young, R. A. 2008.** Tcf3 is an integral component of the core regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Genes and Development*, 22(6): 746-755.
- Cowin, P., Rowlands, T. M., Hatsell, S. J. 2005.** Cadherins and catenins in breast cancer. *Current Opinion in Cell Biology*, 17(5): 499-508.
- Debeb, B. G., Lacerda, L., Xu, W., Larson, R., Solley, T., Atkinson, R., Sulman, E. P., Ueno, N. T., Krishnamurthy, S., Reuben, J. M., Buchholz, T. A., Woodward, W. A. 2012.** Histone Deacetylase Inhibitors Stimulate Dedifferentiation of Human Breast Cancer Cells Through WNT/ β -Catenin Signaling. *Stem Cells*, 30(11): 2366-2377.
- Debeb, B. G., Xu, W., Mok, H., Li, L., Robertson, F., Ueno, N. T., Reuben, J., Lucci, A., Cristofanilli, M., Woodward, W. A. 2010.** Differential radiosensitizing effect of valproic acid in differentiation versus self-renewal promoting culture conditions. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 76(3): 889-895.
- DeSantis, C., Ma, J., Bryan, L., ve Jemal, A. 2014.** Breast cancer statistics, 2013. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 64(1): 52-62.
- Di Pompo, G., Salerno, M., Rotili, D., Valente, S., Zwergel, C., Avnet, S., Lattanzi, G., Baldini, N., Mai, A. 2015.** Novel histone deacetylase inhibitors induce growth arrest, apoptosis, and differentiation in sarcoma cancer stem cells. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(9): 4073-4079.
- Dick, J. E. 2009.** Looking ahead in cancer stem cell research. *Natura Biotechnology*, 27(1): 44-46.
- 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.
- Dong, Y., Cao, B., Zhang, M., Han, W., Herman, J. G., Fuks, F., ve Guo, M. 2015.** Epigenetic silencing of NKD2, a major component of Wnt signaling, promotes breast cancer growth. *Oncotarget*, 6(26): 22126.
- Duprez, L., Wirawan, E., Berghe, T.V., Vandenabeele, P. 2009.** Major cell death pathways at a glance. *Microbes and Infection*, 11: 1050-1062.
- Eden, A., Gaudet, F., Waghmare, A., Jaenisch, R. 2003.** Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science*, 300: 455.
- Elmore, S. 2007.** Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.*, 35(4): 495-516.
- Elsheikh, S. E., Green, A. R., Rakha, E. A., Powe, D. G., Ahmed, R. A., Collins, H. M., Soria, D., Garibaldi, J. M., Paish, C. E., Ammar, A. A., Grainge, M. J., Ball, G. R., Abdelghany, M. K., Martinez-Pomares, L., Heery, D. M., Ellis, I. O. 2009.** Global histone modifications in breast cancer correlate with tumor phenotypes, prognostic factors, and patient outcome. *Cancer Research*, 69(9): 3802-3809.
- Esteller, M. 2008.** Epigenetics in cancer. *N. Engl. J. Med.*, 358: 1148-1159.

Fan, T.J., Han, L.H., Cong, R.S., Liang, J. 2005. Caspase Family Proteases and Apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37(11): 719–727.

Furth J, Kahn MC, Breedis C. 1937. The transmission of leukemia of mice with a single cell. *American Journal of Cancer*, 31(2): 276-282.

Gao, Y., Liang, A., Kang, J. H., Liu, P., Yin, X., Li, M. 2014. Niclosamide blocks autophagy via lysosomal dysfunction. *The FASEB Journal*, 28: 663-718.

Ghare, S. S., Joshi-Barve, S., Moghe, A., Patil, M., Barker, D. F., Gobejishvili, L., Brock, G. N., Cave, M., McClain, J. C., Barve, S. S. 2014. Coordinated histone H3 methylation and acetylation regulate physiologic and pathologic fas ligand gene expression in human CD4+ T cells. *The Journal of Immunology*, 193(1): 412-421.

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

Goldstein, J. C., Waterhouse, N. J., Juin, P., Evan, G. I., & Green, D. R. 2000. The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nature Cell Biology*, 2(3): 156-162.

Gong, C., Bauvy, C., Tonelli, G., Yue, W., Delomenie, C., Nicolas, V., Zhu, Y., Domergue, V., Marin-Esteban, V., Tharinger, H., Delbos, L., Gary-Gouy, H., Morel, A. P., Ghavami, S., Song, E., Codogno, P., Mehrpour, M. 2013. Beclin 1 and autophagy are required for the tumorigenicity of breast cancer stem-like/progenitor cells. *Oncogene*, 32: 2261–2272.

Gorman, A. M., Healy, S. J., Jäger, R., ve Samali, A. 2012. Stress management at the ER: regulators of ER stress-induced apoptosis. *Pharmacology & Therapeutics*, 134(3): 306-316.

Göttlicher, M., Minucci, S., Zhu, P., Krämer, O. H., Schimp, A., Giavara, S., Sleeman, J. P., Lo Coco, F., Nervi, C., Pelicci, P. G., Heinzl, T. 2001. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J*, 20: 6969-6978.

Guicciardi, M.E., Gores, G.J. 2009. Life and death by death receptors. *FASEB J*, 23: 1625-1637.

Günel, T. 2007. Gen Anlatımının Kantitatif Analizi. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 27(5): 763-767.

Hamburger, A. W., Salmon, S. E. 1977. Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science*, 197(4302): 461-463.

Hearps, A.C., Burrows, J., Connor, C.E., Woods, G.M., Lowenthal, R.M., Ragg, S.J. 2002. Mitochondrial cytochrome c release precedes transmembrane depolarisation and caspase-3 activation during ceramide-induced apoptosis of Jurkat T cells. *Apoptosis*, 7(5): 387-394.

Herceg, Z. 2007. Epigenetics and cancer: towards an evaluation of the impact of environmental and dietary factors. *Mutagenesis*, 22(2): 91-103.

Hollmann, G., Linden, R., Giangrande, A., Allodi, S. 2016. Increased p53 and decreased p21 accompany apoptosis induced by ultraviolet radiation in the nervous system of a crustacean. *Aquatic Toxicology*, 173: 1-8.

Hooper, J. E., Scott, M. P. 2005. Communicating with Hedgehogs. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(4): 306-317.

Hu, T., Li, C., Cao, Z., Van Raay, T. J., Smith, J. G., Willert, K., Solnica-Krezel, L., Coffey, R. J. 2010. Myristoylated Naked2 antagonizes Wnt- β -catenin activity by degrading Dishevelled-1 at the plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 285(18): 13561-13568.

Ichim, G., Tait, S. W. 2016. A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. *Nature Reviews Cancer*, 16: 539–548.

Islam F, Qiao B, Smith RA, Gopalan V, Lam, AKY. 2015. Cancer stem cell: Fundamental experimental pathological concepts and updates. *Experimental and Molecular Pathology*, 98(2): 184-191.

Jasek, E., Lis, G. J., Jasinska, M., Jurkowska, H., ve Litwin, J. A. 2012. Effect of histone deacetylase inhibitors trichostatin A and valproic acid on etoposide-induced apoptosis in leukemia cells. *Anticancer Research*, 32(7): 2791-2799.

Jena, R. K., Kansurkar, S. S., ve Rekha, S. T. 2012. Cancer stem cell—essence of tumorigenesis. *Journal of Carcinogenesis Mutagenesis*, 1.

Jenuwein, T., Allis, C. D. 2001. Translating the histone code. *Science*, 293(5532): 1074-1080.

Jin Boo, J., Se Chul, H., Jin Suk, K., ve Hyung Jin, J. 2011. Induction of apoptosis and acetylation of histone H3 and H4 by arctigenin in the human melanoma cell line SK-MEL-28. *Food and Nutrition Sciences*, 2(2): 4535-4539.

Johnstone, R. W. 2002. Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, 1(4): 287-299.

Karakas, D., Cevatemre, B., Aztopal, N., Ari, F., Yilmaz, V.T., Ulukaya, E. 2015. Addition of niclosamide to palladium (II) saccharinate complex of terpyridine results in enhanced cytotoxic activity inducing apoptosis on cancer stem cells of breast cancer. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23(17): 5580-5586.

Karakas, D., Cevatemre, B., Ulukaya, E. 2014. Cancer stem cells: emerging actors in both basic and clinical cancer research. *Turkish Journal of Biology*, 38(6): 829-838.

Katoh, M., Katoh, M. 2007. WNT signaling pathway and stem cell signaling network. *Clinical Cancer Research*, 13(14): 4042-4045.

Klose, R.J., Bird, A.P. 2006. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem. Sci.*, 31(2): 89-97.

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.

Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N. 2005. Cellular adaptations, cell injury, and cell death: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, Editörler: Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N. Elsevier, Philadelphia, 3-46.

- Lagneaux, L., Gillet, N., Stamatopoulos, B., Delforge, A., Dejeneffe, M., Massy, M., Meulemana, N., Kentosc, A., Martiata, P., Willemsb, L., Bron, D. 2007.** Valproic acid induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells through activation of the death receptor pathway and potentiates TRAIL response. *Experimental Hematology*, 35(10): 1527-1537.
- Lamkanfi, M. 2011.** Emerging inflammasome effector mechanisms. *Nature Reviews Immunology*, 11: 213-220.
- Lane, A. A., ve Chabner, B. A. 2009.** Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. *Journal of Clinical Oncology*, 27(32): 5459-5468.
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoand, T. 1994.** A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, 367(6464): 645–648.
- Lauberth, S. M., Nakayama, T., Wu, X., Ferris, A. L., Tang, Z., Hughes, S. H., & Roeder, R. G. 2013.** H3K4me3 interactions with TAF3 regulate preinitiation complex assembly and selective gene activation. *Cell*, 152(5): 1021-1036.
- 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. *The Journal of Pathology*, 187: 567-72.
- Leis, O., Eguiara, A., Lopez-Arribillaga, E., Alberdi, M. J., Hernandez-Garcia, S., Elorriaga, K., Pandiella, A., Rezola, R., Martin, A. G. 2012.** Sox2 expression in breast tumours and activation in breast cancer stem cells. *Oncogene*, 31(11): 1354-1365.
- Letai, A. G. 2008.** Diagnosing and exploiting cancer's addiction to blocks in apoptosis. *Nature Reviews Cancer*, 8(2): 121–132.
- Li, J., Yuan, J. 2008.** Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*, 27: 6194-6206.
- Li, W., Liu, F., Lei, T., Xu, X., Liu, B., Cui, L., Wei, J., Guo, X., Lang, R., Fan, Y., Gu, F., Tang, P., Zhang, X., Fu, L. 2010.** The clinicopathological significance of CD44+/CD24-/low and CD24+ tumor cells in invasive micropapillary carcinoma of the breast. *Pathology-Research and Practice*, 206(12): 828-834.
- Li, X., Gonzalez, M. E., Toy, K., Filzen, T., Merajver, S. D., ve Kleer, C. G. 2009.** Targeted overexpression of EZH2 in the mammary gland disrupts ductal morphogenesis and causes epithelial hyperplasia. *The American Journal of Pathology*, 175(3): 1246-1254.
- Li, X., Lewis, M. T., Huang, J., Gutierrez, C., Osborne, C. K., Wu, M. F., Hilsenbeck, S. G., Pavlick, A., Zhang, X., Chamness, G.C, Wong, H . Rosen, J, Chang, J. C. 2008.** Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *Journal of the National Cancer Institute*, 100(9): 672-679.
- Lindvall, C., Bu, W., Williams, B. O., Li, Y. 2007.** Wnt signaling, stem cells, and the cellular origin of breast cancer. *Stem Cell Reviews*, 3(2): 157-168.
- Liu, G., Yuan, X., Zeng, Z., Tunici, P., Ng, H., Abdukadir, I. R., Lu, L., Irvin, D., Black, K. L., Yu, J. S. 2006a.** Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Molecular Cancer*, 5(1): 1.

- Liu, S., Dontu, G., Mantle, I. D., Patel, S., Ahn, N. S., Jackson, K. W., Suri, P., Wicha, M. S. 2006b.** Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate selfrenewal of normal and malignant human mammary stem cells, *Cancer Research*, 66(12): 6063–6071.
- Lu, W., Lin, C., Roberts, M. J., Waud, W. R., Piazza, G. A., ve Li, Y. 2011.** Niclosamide suppresses cancer cell growth by inducing Wnt co-receptor LRP6 degradation and inhibiting the Wnt/ β -catenin pathway. *PloS One*, 6(12), e29290.
- MacDonald, B. T., Tamai, K. H. X. 2009.** Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Developmental Cell*, 17(1): 9-26.
- Mahmood, T., Yang, P. 2012.** Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9): 429–434.
- Mani, S. A., Guo, W., Liao, M. J. Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C. C., Shipitsin, M., Campbell, L. L., Polyak, K., Brisken, C., Yang, J., Weinberg, R. A. 2008.** The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 133(4): 704-715.
- Marks, P. A., ve Xu, W. S. 2009.** Histone deacetylase inhibitors: Potential in cancer therapy. *Journal of Cellular Biochemistry*, 107(4): 600-608.
- Meacham, C. E., ve Morrison, S. J. 2013.** Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature*, 501(7467): 328-337.
- Mehrpour, M., Esclatine, A., Beau, I., Codogno, P. 2010.** Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells. *Cell Research*, 20(7): 748-762.
- Meidhof, S., Brabletz, S., Lehmann, W., Preca, B. T., Mock, K., Ruh, M., Schüler, J., Berthold, M., Weber, A., Burk, U., Lübbert, M., Pühr, M., Culig, Z., Wellner, U., Keck, T., Bronsert, P., Küsters, S., Hopt, U. T., Stemmler, M. P., Brabletz, T. 2015.** ZEB1-associated drug resistance in cancer cells is reversed by the class I HDAC inhibitor mocetinostat. *EMBO Molecular Medicine*, 9(2): 133 - 279.
- Meier, P., Finch, A., Evan, G. 2000.** Apoptosis in development. *Nature*, 407(6805): 796-801.
- Meissner, A. 2010.** Epigenetic modifications in pluripotent and differentiated cells. *In Vivo*, 28: 1079–1088.
- Merschjohann, K., Steverding, D. 2008.** In vitro trypanocidal activity of the antihelminthic drug niclosamide. *Experimental Parasitology*, 118(4): 637-640.
- Mlynarczyk, C. ve Fåhraeus, R. 2014.** Endoplasmic reticulum stress sensitizes cells to DNA damage-induced apoptosis through p53-dependent suppression of p21CDKN1A. *Nature Communications*, 5.
- Munoz, P., Iliou, M. S., ve Esteller, M. 2012.** Epigenetic alterations involved in cancer stem cell reprogramming. *Molecular Oncology*, 6(6): 620-636.
- Murphy, K.M., Ranganathan, V., Farnsworth, M.L., Kavallaris, M., & Lock, R.B. 2000.** Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells. *Cell Death and Differentiation*, 7(1): 102.

- Nicholson, D. W., Ali, A., Thornberry, N. A., & Vaillancourt, J. P. 1995.** Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*, 376(6535): 37.
- Nishigaki, M., Aoyagi, K., Danjoh, I., Fukaya, M., Yanagihara, K., Sakamoto, H., Yoshida, T., Sasaki, H. 2005.** Discovery of aberrant expression of R-RAS by cancer-linked DNA hypomethylation in gastric cancer using microarrays. *Cancer Res.*, 65: 2115-2124.
- Niwa, H. 2007.** How is pluripotency determined and maintained?. *Development*, 134(4): 635-646.
- Obara, K., Ohsumi, Y. 2008.** Dynamics and function of PtdIns (3) P in autophagy. *Autophagy*, 4(7): 952-954.
- Ohsumi, Y. 2001.** Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(3): 211-216.
- Ojha, R., Bhattacharyya, S., Singh, S. K. 2015.** Autophagy in Cancer Stem Cells: A Potential Link Between Chemoresistance, Recurrence, and Metastasis. *BioResearch Open Access*, 4(1): 97-108.
- Okano, M., Bell, D.W., Hber, D.A., Li, E. 1999.** DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 99(3): 247-257.
- Oliver, L., Vallette, F.M. 2005.** The role of caspases in cell death and differentiation. *Drug Resistance Updates*, 8: 163-170.
- Osada, H., Tatematsu, Y., Saito, H., Yatabe, Y., Mitsudomi, T., ve Takahashi, T. 2004.** Reduced expression of class II histone deacetylase genes is associated with poor prognosis in lung cancer patients. *International Journal of Cancer*, 112(1): 26-32.
- Osada, T., Chen, M., Yang, X. Y., Spasojevic, I., Vandeusen, J. B., Hsu, D., Clary, B. M., Clay, T. M., Chen, W., Morse, M. A., Lyerly, H. K. 2011.** Antihelminth compound niclosamide downregulates Wnt signaling and elicits antitumor responses in tumors with activating APC mutations. *Cancer Research*, 71(12): 4172-4182.
- Öktem, S., Özhan, M.H., Özol, D. 2001.** Apoptozisin Önemi. *Toraks Dergisi*, 2(1): 91-95.
- Palmer, A.M., Greengrass, P.M., Cavalla, D. 2000.** The role of mitochondria in apoptosis. *Drug News & Perspectives*, 13(6): 378-384.
- Pardal, R., Clarke, M. F., Morrison, S. J. 2003.** Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nature Reviews Cancer*, 3(12):895-902.
- Park, S. Y., Jun, J., Jeong, K. J., Heo, H. J., Sohn, J. S., Lee, H. Y., Park, C. G., Kang, J. 2011.** Histone deacetylases 1, 6 and 8 are critical for invasion in breast cancer. *Oncology Reports*, 25(6): 1677-1681.
- Phiel, C. J., Zhang, F., Huang, E. Y., Guenther, M. G., Lazar, M. A., ve Klein, P. S. 2001.** Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *Journal of Biological Chemistry*, 276(39): 36734-36741.

- Polyak, K., Weinberg, R.A. 2009.** Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nature Reviews Cancer*, 9(4): 265-273.
- Ponti, D., Zaffaroni, N., Capelli, C., Daidone, M. G. 2006.** Breast cancer stem cells: an overview. *European Journal of Cancer*, 42(9): 1219-1224.
- Pruitt, K., Zinn, R. L., Ohm, J. E., McGarvey, K. M., Kang, S. H. L., Watkins, D. N., Herman, J. G., Baylin, S. B. 2006.** Inhibition of SIRT1 reactivates silenced cancer genes without loss of promoter DNA hypermethylation. *PLoS Genetic*, 2(3): e40.
- Reya, T., ve Clevers, H. 2005.** Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*, 434(7035): 843-850.
- Riedl, S.J., Salvesen, G.S. 2007.** The apoptosome: Signalling platform of cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8: 405-413.
- Roche, J., Nasarre, P., Gemmill, R., Baldys, A., Pontis, J., Korch, C., Guilhot, J., Drabkin, H. 2013.** Global decrease of histone H3K27 acetylation in ZEB1-induced epithelial to mesenchymal transition in lung cancer cells. *Cancers*, 5(2): 334-356.
- Sauvageau, M., Sauvageau, G. 2010.** Polycomb group proteins: multi-faceted regulators of somatic stem cells and cancer. *Cell Stem Cell*, 7(3): 299-313.
- Scheel, C., Weinberg, R. A. 2012.** Cancer stem cells and epithelial–mesenchymal transition: concepts and molecular links. *In Seminars in Cancer Biology*, 22(5): 396-403.
- Schuettengruber, B., Cavalli, G. 2009.** Recruitment of polycomb group complexes and their role in the dynamic regulation of cell fate choice. *Development*, 136(21): 3531-3542.
- Seligson, D. B., Horvath, S., Shi, T., Yu, H., Tze, S., Grunstein, M., & Kurdistani, S. K. 2005.** Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence. *Nature*, 435(7046): 1262-1266.
- Seto, E., Yoshida, M. 2014.** Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(4): a018713.
- Seydel, G. Ş., Aksoy, K. 2012.** Endoplazmik Retikulum Stresi ve Apoptozis Mekanizması. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 21(4): 221-235.
- Shankar, S., Srivastava, R. K. 2008.** Histone deacetylase inhibitors: mechanisms and clinical significance in cancer: HDAC inhibitor-induced apoptosis. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 615: 261-298.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., ve Jemal, A. 2015.** Cancer statistics, 2015. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 65(1): 5-29.
- Signore, M., Ricci-Vitiani, L., ve De Maria, R. 2013.** Targeting apoptosis pathways in cancer stem cells. *Cancer Letters*, 332(2): 374-382.
- Simões, B. M., Piva, M., Iriando, O., Comaills, V., López-Ruiz, J. A., Zabalza, I., Mieza, J. A., Acinas, O., dM Vivanco, M. 2011.** Effects of estrogen on the proportion of stem cells in the breast. *Breast Cancer Research and Treatment*, 129(1): 23-35.
- Singh, A., Settleman, J. 2010.** EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene*, 29(34): 4741-4751.

- Smalley, M., Ashworth, A. 2003.** Stem cells and breast cancer: a field in transit. *Nature Reviews Cancer*, 3(11): 832–844.
- Solakoğlu, Z. 2009.** Apoptoz varlığı ya da yokluğu bir hastalık nedeni. *Klinik Gelişim*, 22(3): 20-25.
- Song, J., Noh, J.H., Lee, J.H., Eun, J.W., Ahn, Y.M., Kim, S.Y., Lee, S.H., Park, W.S., Yoo, N.J., Lee, J.Y., Nam, S.W. 2005.** Increased expression of histone deacetylase 2 is found in human gastric cancer. *APMIS*, 113(4): 264-268.
- Song, L. L., Miele, L. 2007.** Cancer stem cells--an old idea that's new again: implications for the diagnosis and treatment of breast cancer. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 7(4): 431-438.
- Stewart, B. W. K. P., Wild, C. P. 2015.** World cancer report 2014. World.
- Sulaiman, A., Sulaiman, B., Khouri, L., McGarry, S., Nessim, C., Arnaout, A., Li, X., Addison, C., Dimitroulakos, J., Wang, L. 2016.** Both bulk and cancer stem cell subpopulations in triple-negative breast cancer are susceptible to Wnt, HDAC, and ER α coinhibition. *FEBS Letters*, 590(24): 4606-4616.
- Suzuki, H., Watkins, D.N., Jair, K.W., Schuebel, K.E., Markowitz, S.D., Chen, W.D., Pretlow, T.P., Yang, B., Akiyama, Y., Van Engeland, M., Toyota, M., Tokino, T., Hinoda, Y., Imai, K., Herman, J. G., Baylin, S. B. 2004.** Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nat. Genet.*, 36: 417-422.
- Takada, R., Satomi, Y., Kurata, T., Ueno, N., Norioka, S., Kondoh, H., Takao, T., Takata, S. 2006.** Monounsaturated fatty acid modification of Wnt protein: its role in Wnt secretion. *Developmental Cell*, 11(6): 791-801.
- Takahashi, K., Yamanaka, S. 2006.** Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4): 663-676.
- Tammen, S., Friso, S., Choi, S.W. 2013.** Epigenetics: the link between nature and nurture. *Molecular Aspects of Medicine*, 34: 753–64.
- Tanaka, H., Nakamura, M., Kameda, C., Kubo, M., Sato, N., Kuroki, S., Tanaka M., Katano, M. 2009.** The Hedgehog signaling pathway plays an essential role in maintaining the CD44⁺ CD24^{-/low} subpopulation and the side population of breast cancer cells. *Anticancer*, 29(6): 2147-2157.
- Tanaka, T., Huang, X., Halicka, H.D., Zhao, H., Traganos, F., Albino, A.P., Dai, W., Darzynkiewicz, Z. 2007.** Cytometry of ATM activation and histone H2AX phosphorylation to estimate extent of DNA damage induced by exogenous agents. *Cytometry Part A*, 71(9): 648-661.
- Tsai, H.C., Baylin, S.B. 2011.** Cancer epigenetics: linking basic biology to clinical medicine. *Cell Res.*, 21: 502-517.
- Ulukaya, E. 2001.** Akciğer Kanseri, Tanı ve Tedavide Temel İlkeler ve Uygulamalar: Hücre Siklusu ve Apoptozis. Ed: Engin, K., Özyardımcı, N., Avrupa Tıp Kitapçılık, İstanbul, Bölüm III.
- Ulukaya, E., Acilan, C., Yilmaz, Y. 2011.** Apoptosis: Why and how does it occur in biology? *Cell Biochemistry and Function*, 29: 468-480.

- Ulukaya, E., Acilan, C., Yilmaz, Y. 2011.** Apoptosis: Why and how does it occur in biology? *Cell Biochemistry and Function*, 29(6): 468-480.
- 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.
- Valkenburg, K. C., Graveel, C. R., Zylstra-Diegel, C. R., Zhong, Z., Williams, B. O. 2011.** Wnt/ β -catenin Signaling in Normal and Cancer Stem Cells. *Cancers*, 3(2): 2050-2079.
- Velasco-Velázquez, M. A., Homsí, N., De La Fuente, M., Pestell, R. G. 2012.** Breast cancer stem cells. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 44(4): 573-7.
- Wang, Z., Li, Y., Banerjee, S., Sarkar, F. H. 2009.** Emerging role of Notch in stem cells and cancer, *Cancer Letters*, 279(1): 8-12.
- Wei, W., Chua, M. S., Grepper, S., So, S. 2010.** Small molecule antagonists of Tcf4/ β -catenin complex inhibit the growth of HCC cells in vitro and in vivo. *Int. J. Cancer*, 126(10): 2426-2436.
- Wei, Y., Sinha, S.C., Levine, B. 2008.** Dual role of JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 in autophagy and apoptosis regulation. *Autophagy*, 4(7): 949-951.
- Weichert, W., Röske, A., Gekeler, V., Beckers, T., Ebert, M. P., Pross, M., Dietel, M., Denkert, C., Röcken, C. 2008.** Association of patterns of class I histone deacetylase expression with patient prognosis in gastric cancer: a retrospective analysis. *The Lancet Oncology*, 9(2): 139-148.
- Xie, Z., Klionsky, D. J. 2007.** Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nature Cell Biology*, 9(10): 1102-1109.
- Xu L, Liu JH, Zhang J, Zhang N, Wang ZH. 2015.** Blockade of autophagy aggravates endoplasmic reticulum stress and improves Paclitaxel cytotoxicity in human cervical cancer cells. *Cancer Res. Treat.*, 47(2): 313-321.
- Xue M, Wang Q, Zhao J, Dong L, Ge Y, Hou L, Liu Y, Zheng Z. 2014.** Docosahexaenoic acid inhibited the Wnt/ β -Catenin pathway and suppressed breast cancer cells in vitro and in vivo. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 25(2): 104–110.
- Yılmaz, S., Devran, Z. 2003.** Polimeraz zincir reaksiyonu (pzt) ve bitki biyoteknolojisinde yaygın uygulamaları. *Derim*, 20(1): 31-42.
- Zeng, X., Huang, H., Tamai, K., Zhang, X., Harada, Y., Yokota, C., Almeida, K., Wang, J., Doble, B., Woodgett, J., Wynshaw-Boris, A., Hsieh, J. C., He, X. 2008.** Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions. *Development*, 135(2): 367-375.
- Zhao, J. 2016.** Cancer stem cells and chemoresistance: The smartest survives the raid. *Pharmacol and Therapeutics*, 160: 145-158.
- Zimmermann, K.C., Green, D.R. 2001.** How cells die: Apoptosis pathways. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 108(4): 99-103.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Nazlıhan AZTOPAL

Doğum Yeri ve Tarihi: Samsun, 15 Ocak 1988

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise: Çarşamba Anadolu Lisesi (2002-2006)

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

Yüksek Lisans: Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Ana Bilim Dalı (2011-2013)

Doktora: Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Ana Bilim Dalı (2013- Halen)

İletişim (e-posta): nazlihanaztopal@gmail.com

Yayınları:

Ari, F., Aztopal, N., Iysel, C., Yilmaz, V. T., Guney, E., Buyukgungor, O., Ulukaya, E. 2013. Synthesis, structural characterization and cell death-inducing effect of novel palladium (II) and platinum (II) saccharinate complexes with 2-(hydroxymethyl) pyridine and 2-(2-hydroxyethyl) pyridine on cancer cells in vitro. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21(21): 6427-6434.

Ari, F., Aztopal, N., Oran, S., Bozdemir, S., Celikler, S., Ozturk, S., Ulukaya, E. 2014. *Parmelia sulcata* Taylor and *Usnea filipendula* Stirt. Induce Apoptosis-Like Cell Death and DNA Damage in Cancer Cells. *Cell Proliferation*, 47(5): 457-464.

Ari, F., Cevatemre, B., İkitimur, I. E., Aztopal, N., Yilmaz, V. T., Ulukaya, E. 2014. Apoptosis-Inducing Effect of A Palladium (II) Saccharinate Complex of Terpyridine on Human Breast Cancer Cells *in vitro* and *in vivo*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 22(17): 4948-1954.

Çelikler Kasımoğulları S., Oran, S., Ari, F., Ulukaya, E., Aztopal, N., Sarımahmut, M., Ozturk, S. 2014. Genotoxic, cytotoxic, and apoptotic effects of crude extract of *Usnea filipendula* Stirt. in vitro. *Turkish Journal of Biology*, 38: 940-947.

Karakas, D., Cevatemre, B., Aztopal, N., Ari, F., Yilmaz, V. T., & Ulukaya, E. 2015. Addition of niclosamide to palladium (II) saccharinate complex of terpyridine results in enhanced cytotoxic activity inducing apoptosis on cancer stem cells of breast cancer. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23(17): 5580-5586.

Aztopal, N., Erkisa, M., Celikler, S., Ulukaya, E., Ari, F. 2016. Anti-growth and apoptosis inducing effects of *Hypericum olympicum* L. and *Hypericum adenotrichum* Spach. on lung cancer cells in vitro: Involvement of DNA damage. *Journal of Food Biochemistry*, 40(4): 559-566.

Yilmaz, V. T., Icel, C., Suyunova, F., Aygun, M., Aztopal, N., Ulukaya, E. 2016. Ni(II)/Cu(II)/Zn(II) 5,5-diethylbarbiturate complexes with 1,10-phenantroline and 2,2'-dipyridylamine: Synthesis, structures, DNA/BSA binding, nuclease activity, molecular docking, cellular uptake, cytotoxicity and the mode of cell death. *Dalton Transactions*, 45: 10466-10479.

Aztopal, N., Cevatemre, B., Sarimahmut, M., Ari, F., Dere, E., Ozel, M. Z., Firat, M., Ulukaya, E. 2016. *Pelargonium quercetorum* Agnew induces apoptosis without PARP or cytokeratin 18 cleavage in non-small cell lung cancer cell lines. *Oncology Letters*, 12: 1429-1437.

Turaclar, N., Polat, P., Dere, E., Bingol, G., Ari, F., Aztopal, N. 2016. The Effect of Aspartame on the Activity of Glutathione S-Transferase in Tissues of Brain, Liver, Kidney and Lung of Rats. *International Invention Journal of Medicine and Medical Sciences*, 3: 130-135.

Aztopal, N., Karakas, D., Cevatemre, B., Ari, F., Icel, C., Daidone, M. G., Ulukaya, E. 2017. A trans-platinum (II) complex induces apoptosis in cancer stem cells of breast cancer. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25(1): 269-276.

Ari, F., Aztopal, N., Erkisa, M., Celikler, S., Sahin, S., Ulukaya, E. 2017. Nonapoptotic cell death induced by Hypericum species on cancer cells. *The European Research Journal*.