



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GEN METİLASYONU İNHİBİTÖRÜ DESİTABİN'İN MEME KANSERİ
TEDAVİSİNDEKİ YERİNİN İN VİTRO ARAŞTIRILMASI

Ferda ARI

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA-2010



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GEN METİLASYONU İNHİBİTÖRÜ DESİTABİN'İN MEME KANSERİ
TEDAVİSİNDEKİ YERİNİN İN VİTRO ARAŞTIRILMASI

Ferda ARI

Yrd. Doç. Dr. Egemen DERE
(Danışman)

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA-2010

ÖZET

Demetile edici bir ajan olan desitabin'in epigenetik olarak susturulmuş genlerin tekrar aktifleştirilmesini sağlayarak apoptozisi artırdığı gösterilmiştir. Bu nedenle, desitabinin standart kemoterapiyle sinerjistik etkileşimi yeni bir tedavi modalitesi olabilir. Bu çalışmada, klasik FEC tedavisi (5-florourasil+Epirubisin+4-Hidroksisiklofosfamid) ile desitabin kombinasyonunun meme kanserinde yeni bir tedavi yaklaşımı olup olamayacağı araştırılmıştır.

Desitabin ve FEC ile kombinasyonu, östrojen reseptörü negatif (MDA-MB-231) ve pozitif (MCF-7) meme kanseri hücre soyları üzerinde test edildi. *uPA*, *PAI-1* (metastaz genleri), *DAPK*, *TMS1* (apoptozis-indükleyici genler), *MGMT* (DNA onarım geni) genleri ve *LINE-1* (genel metilasyon belirteci) dizisinde metilasyon seviyelerindeki değişiklikler metilasyon spesifik "real-time PCR (methyLight)" ile analiz edildi. Tüm tedavilerin sitotoksik etkileri MTT ve ATP canlılık testleri, apoptozis indükleyici etki ise M30-antijen testi ile belirlendi.

Desitabinin, MCF-7 hücrelerinde apoptozisi arttırarak büyüme baskılayıcı etki göstermesine rağmen, MDA-MB-231 hücrelerini etkilemediği gözlenmiştir. Bununla birlikte kombinasyon tedavisinden (%100 TDC FEC+10µM desitabin) sonra her iki hücre soyunda *LINE-1* metilasyon seviyesinde belirlenen anlamlı azalma sonucu genomdaki genel metilasyon seviyesinin azaldığı belirlendi (p<0.05). Her iki hücre soyunda desitabin (10µM) ve kombinasyon tedavisinden sonra *DAPK* gen promotör metilasyon seviyesinde azalma belirlendi. Ayrıca MDA-MB-231 hücrelerinde kombinasyon tedavisi sonucunda *TMS1* gen promotör metilasyonunda anlamlı azalmalar gözlemlendi (p<0.05). Bu sonuçlara rağmen bu tedavilerin sadece MCF-7 hücrelerinde apoptozisi indüklediği M30 antijen testiyle belirlendi. Ayrıca MCF-7 hücrelerinde desitabin ve kombinasyon tedavisi sonucunda *uPA* ve *PAI-1* gen promotör metilasyon seviyelerinde anlamlı azalma belirlendi. Bu da bu hücrelerde metastaz yapabilme yeteneğinin değişebileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak, standart kemoterapi ile demetile edici ajan kombinasyonlarının apoptozis ile ilişkili genlerin aktifleşmesini sağlayarak meme kanseri tedavisinin etkinliğini arttırabileceği düşünülmüştür. Fakat diğer taraftan metastaz genlerindeki aktifleşme, bu tedavilerin tümör tipine göre ve dikkatle uygulanması gerektiğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Metilasyon, Meme Kanseri, Apoptozis, Kemoterapi, *LINE-1*, *DAPK*, *TMS1*, *uPA*, *PAI-1*.

ABSTRACT

Decitabine as a demethylating agent may act synergistically with standard chemotherapy regimens to restore apoptosis by upregulation of epigenetically silenced genes. In this study, we investigated whether or not the combination of classical FEC treatment (5-FU+Epirubicine+4-Hydroxycyclophosphamide) with decitabine might be a novel therapy option in breast cancer.

The effect of decitabine and its combination with FEC has been tested on estrogen receptor negative (MDA-MB-231) and estrogen receptor positive (MCF-7) breast cancer cell lines. The changes in the methylation status of *uPA*, *PAI-1* (metastasis promoter), *DAPK*, *TMSI* (apoptosis-inducer) *MGMT* (DNA repair) genes and *LINE-1* (global methylation marker) have been analyzed by methylation specific realtime PCR (methyLight) after the application of decitabine, FEC and their combination treatment. Anti-growth effects of treatments were assayed by the MTT assay and the ATP assay; induction of apoptosis by the M30 antigen assay.

It is shown that decitabine had anti-growth effect only on MCF-7 cells by induction of apoptosis but had no effect on MDA-MB-231 cells. However, *LINE-1* methylation status significantly decreased after combination treatment (%100 TDC FEC+10 μ M decitabine) ($p<0.05$) which show that whole genom methylation decreased in both cell lines. The methylation ratio of *DAPK* promoter was significantly decreased after decitabine (10 μ M) and combination regimens in both cell line. In MDA-MB-231 cells, methylation of the *TMSI* gene promoter was significantly reduced by combination treatment ($p<0.05$). Although these results, it's found that apoptosis only induced in MCF-7 cell lines by M30 antigen test. In addition methylation of the *uPA* and *PAI-1* promoter was significantly reduced by treatment with decitabine or the combination treatment in MCF-7 ($p<0.05$). This shows that the ability of metastasis may change in these cells.

In conclusion, combination of standard chemotherapy with the combination of demethylating agents may influence therapy outcome by upregulation of apoptosis relevant genes in breast cancer therapy. But reactivation of metastasis genes shows that these therapies have to be used carefully according to tumor types.

Key words: Methylation, Breast Cancer, Apoptosis, Chemotherapy, *LINE-1*, *DAPK*, *TMSI*, *uPA*, *PAI-1*.

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa |
|--|-------|
| ÖZET..... | i |
| ABSTRACT..... | ii |
| İÇİNDEKİLER..... | iii |
| KISALTMALAR DİZİNİ..... | v |
| ÇİZELGELER DİZİNİ..... | vii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ..... | viii |
| SİMGELER DİZİNİ..... | xi |
| GİRİŞ | 1 |
| 1. KAYNAK ÖZETLERİ (veya Kuramsal Temeller) | 2 |
| 1.1. Karsinogenez | 2 |
| 1.2. Kanser Tipleri ve Görülme Sıklıkları | 3 |
| 1.3. Meme Kanseri..... | 5 |
| 1.3.1. Meme Kanserinde Risk Faktörleri..... | 6 |
| 1.3.2 Meme Kanseri Tedavisi | 6 |
| 1.3.2.1.Meme Kanserinde Kemoterapide Kullanılan İlaçlar..... | 7 |
| 1.4. Apoptozis | 10 |
| 1.4.1. Apoptozis Oluşumunun Moleküler Mekanizmaları..... | 12 |
| 1.5. Epigenetik ve Kanser..... | 16 |
| 1.5.1. Epigenetik Mekanizmalar..... | 16 |
| 1.5.2. DNA Metilasyonu..... | 17 |
| 1.5.3. DNA Metiltransferazlar (DNMT)..... | 19 |
| 1.5.4. DNMT inhibitörleri..... | 19 |
| 1.5.5. DNA Metilasyonu ve Gen İfadesi..... | 23 |
| 1.5.6. Metilasyon ve Meme Kanseri İle İlişkisi..... | 25 |
| 1.5.7. Kanserde Epigenetik Tedavi..... | 33 |
| 2. MATERYAL VE YÖNTEM..... | 35 |
| 2.1. Desitabin ve Anti kanser İlaçların Hazırlanışı..... | 35 |
| 2.2. Hücre Kültürü | 36 |
| 2.2.1. Kullanılan Besiyerleri, Sıvıların Hazırlanması..... | 37 |
| 2.2.2. Hücrelerin Sayılması ve İlaçların Uygulanması | 37 |

| | Sayfa |
|---|-------|
| 2.3. Metiltiazoltetrazolium (MTT) Canlılık Metodu | 38 |
| 2.4. ATP Canlılık Testi | 39 |
| 2.5. M30 Antijen (kaspazla kırılmış sitokeratin 18) Metodu..... | 40 |
| 2.6. DNA İzolasyonu..... | 42 |
| 2.7. Metilasyon Spesifik PCR (MSP)..... | 43 |
| 2.8. TaqMan Real-time PCR ile Gen Promotörlerinin Metilasyon Seviyelerinin Belirlenmesi..... | 46 |
| 2.9. İstatistiksel Analiz..... | 52 |
| 3. ARAŞTIRMA SONUÇLARI..... | 53 |
| 3.1. Sitotoksosite (MTT ve ATP canlılık testi) Bulguları..... | 53 |
| 3.1.1. 24 saatlik inkübasyon bulguları | 56 |
| 3.1.2. 48 saatlik inkübasyon bulguları | 62 |
| 3.2. M30- Antijen (Kaspazla Kırılmış Sitokeratin 18) Bulguları..... | 68 |
| 3.3. Metil Spesifik PCR (MSP) ile Gen Metilasyonu Bulguları..... | 70 |
| 3.4. Real-Time PCR (TaqMan) ile Gen Metilasyon Bulguları..... | 75 |
| 4. TARTIŞMA VE SONUÇ..... | 84 |
| KAYNAKLAR..... | 91 |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 110 |
| TEŞEKKÜR..... | 111 |

KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|---------------|---|
| AIF | - Apoptozis İndükleyici Faktör |
| AMP | - Adenozin Mono Fosfat |
| ANOVA | - Varyans analizi |
| Apaf-1 | - Apoptotic protease activating factor-1 |
| Asp | - Aspartat |
| ATP | - Adenozin Trifosfat |
| <i>BRCA-1</i> | - Breast Cancer-1 |
| <i>BRCA-2</i> | - Breast Cancer-2 |
| CD95 | - Fas Receptor |
| CK | - Sitokeratin |
| CpG | - Sitozin fosfo Guanin |
| CSF | - Koloni Uyarıcı Faktör |
| CT | - Threshold cycle |
| DAC | - Desitabin; 5-Aza-2'-deoksitidin |
| <i>DAPK</i> | - Death Associated Protein Kinase |
| DNMT | - DNA metiltransferaz |
| dNTP | - Deoksiribonükleotid trifosfat |
| EGCG | - Epigallocatechin-3-gallate |
| FADD | - Fas Associated Death Domain |
| FAM | - Fluorescently Labeled Probe |
| FasL | - Fas Ligand |
| FDA | - Food and Drug Administration |
| FRET | - Fluorescence Resonance Energy Transfer |
| IGF | - İnsülin Büyüme Faktörü |
| IL-2 | - İnterlökin-2 |
| <i>LINE-1</i> | - Long Interspersed Nucleotide Elements |
| MeCP2 | - Metil CpG Bağlanma Proteini 2 |
| <i>MGMT</i> | - O ⁶ Metil Guanin Metiltransferaz |
| MG98 | - DNMT1 inhibitörü antisens oligonükleotid |
| MSP | - Metilasyon Spesifik PCR |
| MTT | - Metiltiazoltetrazolium |

| | |
|-------------------------------|--|
| NGF | - Nöron Büyüme Faktör |
| <i>PAI-1</i> | - Ürokinaz Plazminojen Aktivatör İnhibitör Tip 1 |
| PBS | - Phosphate Buffered Saline |
| PMO | - Promotör Metilasyon Oranı |
| RG108 | - N-fitatil L-triptofan |
| RLU | - Relative Light Unit |
| SAM | - S-Adenozil Metionin |
| SDS | - Sodyum Dodesil Sülfat |
| SPSS | - Statistical Package for the Social Sciences |
| TAMRA | - 6-karboksitetrametil-rodamin |
| TDC | - Test Drug Concentration |
| TMB | - Tetramethylbenzidine |
| <i>TMS1</i> | - Target of Methylation-İnduced Silencing |
| TNF | - Tümör Nekroz Faktör |
| TNF- α | - Tümör Nekroz Faktör Alfa |
| TNFR-1 | - Tümör Nekroz Faktör Reseptörü-1 |
| TRADD | - TNFR-1 Associated Death Domain |
| TRAIL | - TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand |
| <i>uPA</i> | - Ürokinaz Plazminojen Aktivatör |
| 4-HC | - 4-Hidroksisiklofosfamid |
| 5-FU | - 5-Florourasil |
| H ₂ O ₂ | .. Hidrojen Peroksit |
| EDTA | .. Etilen Diamin Tetra Asetik asit |
| HCL | .. Hidro Klorik Asit |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | Sayfa |
|--|-------|
| Çizelge 1.1. Meme kanserlerinde epigenetik olarak kontrol edilen bazı genler..... | 27 |
| Çizelge 2.1. Primer sekansları (MSP sistem)..... | 50 |
| Çizelge 2.2. Primer ve prob sekansları (MethyLight sistem)..... | 51 |
| Çizelge 2.3. Primer ve prob konsantrasyonları (MethyLight sistem)..... | 52 |
| Çizelge 3.1. Hücrelerden elde edilen DNA miktarları..... | 70 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | Sayfa |
|---|-------|
| Şekil 1.1. Kanser oluşum aşamaları | 3 |
| Şekil 1.2. Türkiye’de gözlenen kanser oranlarının yıllara göre dağılımı | 4 |
| Şekil 1.3. Türkiye’de en sık görülen kanser türleri | 4 |
| Şekil 1.4. Türkiye’de kadınlarda en sık görülen kanser türleri | 5 |
| Şekil 1.5. Epirubisin’nin kimyasal yapısı | 8 |
| Şekil 1.6. 5-Florourasil’in kimyasal yapısı | 8 |
| Şekil 1.7. 4-Hidroksisiklofosfamid’in kimyasal yapısı | 9 |
| Şekil 1.8. Hücrelerde apoptozisin oluşumu | 11 |
| Şekil 1.9. Apoptozisin moleküler mekanizmaları | 14 |
| Şekil 1.10. DNA metilasyon mekanizması | 18 |
| Şekil 1.11. DNA metiltransferaz inhibitörlerinin etki mekanizmaları | 20 |
| Şekil 1.12. Desitabin’in kimyasal yapısı..... | 21 |
| Şekil 1.13. Desitabin’in DNA yapısına katılım mekanizması..... | 21 |
| Şekil 1.14. Desitabin aracılığıyla DNMT enzim inhibisyon mekanizması..... | 22 |
| Şekil 1.15. Meme kanseri gelişiminde metilasyonun rolü..... | 26 |
| Şekil 1.16. <i>DAPK</i> ölüm sinyal mekanizması..... | 30 |
| Şekil 1.17. O ⁶ Metil Guanindeki hataların <i>MGMT</i> tarafından onarılması..... | 31 |
| Şekil 1.18. Kanser hücrelerinde <i>MGMT</i> metilasyonu sonucu DNA’da oluşan değişim..... | 31 |
| Şekil 2.1. CK18’in kaspazlar ile kırılması ve M30 antikoru bu bölgeleri tanınması..... | 41 |
| Şekil 2.2. Bisülfid Modifikasyon tepkimesi..... | 43 |
| Şekil 2.3. TaqMan real-time PCR çalışma prensibi..... | 47 |
| Şekil 3.1.MTT metodu ile MDA-MB-231 hücrelerinin 570 nm’de verdikleri absorbans değerleri..... | 53 |
| Şekil 3.2.MTT testi uygulamasından önce pozitif kontrol MDA-MB-231 hücreleri..... | 54 |
| Şekil 3.3.MTT testi uygulamasından önce negatif kontrol MDA-MB-231 hücreleri..... | 54 |
| Şekil 3.4. MTT testi uygulamasından sonra oluşan pozitif kontrol MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristallerinin görünümü..... | 55 |

| | |
|---|----|
| Şekil 3.5. MTT testi uygulamasından sonra oluşan negatif kontrol MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristallerinin görünümü..... | 55 |
| Şekil 3.6. Desitabin'nin 24 saatte MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soylarının üzerine olan etkisinin MTT metoduyla gösterilmesi..... | 56 |
| Şekil 3.7. Desitabin'nin 24 saatte MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soylarının üzerine olan etkisinin ATP metoduyla gösterilmesi..... | 57 |
| Şekil 3.8. Desitabin'nin FEC ile kombinasyonlarının 24 saatte MDA-MB-231 hücre soyu üzerine etkisinin MTT metoduyla gösterilmesi..... | 58 |
| Şekil 3.9. Desitabin'nin FEC ile kombinasyonlarının 24 saatte MDA-MB-231 hücre soyu üzerine etkisinin ATP metoduyla gösterilmesi..... | 59 |
| Şekil 3.10. Desitabin'nin FEC ile kombinasyonlarının 24 saatte MCF-7 hücre soyu üzerine etkisinin MTT metoduyla gösterilmesi..... | 60 |
| Şekil 3.11. Desitabin'nin FEC ile kombinasyonlarının 24 saatte MCF-7 hücre soyu üzerine etkisinin ATP metoduyla gösterilmesi..... | 61 |
| Şekil 3.12. Desitabin'nin 48 saatte MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soylarının üzerine olan etkisinin MTT metoduyla gösterilmesi..... | 62 |
| Şekil 3.13. Desitabin'nin 48 saatte MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soylarının üzerine olan etkisinin ATP metoduyla gösterilmesi..... | 63 |
| Şekil 3.14. Desitabin'nin FEC ile kombinasyonlarının 48 saatte MDA-MB-231 hücre soyu üzerine etkisinin MTT metoduyla gösterilmesi..... | 64 |
| Şekil 3.15. Desitabin'nin FEC ile kombinasyonlarının 48 saatte MDA-MB-231 hücre soyu üzerine etkisinin ATP metoduyla gösterilmesi..... | 65 |
| Şekil 3.16. Desitabin'nin FEC ile kombinasyonlarının 48 saatte MCF-7 hücre soyu üzerine etkisinin MTT metoduyla gösterilmesi..... | 66 |
| Şekil 3.17. Desitabin'nin FEC ile kombinasyonlarının 48 saatte MCF-7 hücre soyu üzerine etkisinin ATP metoduyla gösterilmesi..... | 67 |
| Şekil 3.18. M30-Antigen Standart eğri grafiği..... | 68 |
| Şekil 3.19. 10µM Desitabin, %100 TDC FEC ve 10µM desitabin+%100 TDC FEC tedavilerinin 24 saatte MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soylarında kaspazla kırılmış sitokeratin 18 üzerine etkisinin M30 metoduyla belirlenmesi..... | 69 |
| Şekil 3.20. 10µM Desitabin, %100 TDC FEC ve 10µM desitabin+%100 TDC FEC tedavilerinin 48. saatte MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soylarında kaspazla kırılmış sitokeratin 18 üzerine etkisinin M30 metoduyla belirlenmesi..... | 70 |
| Şekil 3.21. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soylarında 48. saatte <i>TMSI</i> gen promotöründe metilasyon seviyesinin MPS yöntemiyle gösterilmesi | 71 |
| Şekil 3.22. 10µM Desitabin, %100 TDC FEC ve 10µM desitabin+%100 TDC FEC tedavilerinin 48. saatte MDA-MB-231 hücre soylarında <i>TMSI</i> gen promotöründe metilasyon seviyesinin MPS yöntemiyle gösterilmesi..... | 72 |

| | |
|--|----|
| Şekil 3.23. 10µM Desitabin, %100 TDC FEC ve 10µM desitabin+%100 TDC FEC tedavilerinin 48. saatte MCF-7 hücre soylarında <i>TMSI</i> gen promotöründe metilasyon seviyesinin MPS yöntemiyle gösterilmesi..... | 72 |
| Şekil 3.24. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soylarında 48. saatte <i>DAPK</i> gen promotöründe metilasyon seviyesinin MPS yöntemiyle gösterilmesi..... | 73 |
| Şekil 3.25. 10µM Desitabin, %100 TDC FEC ve 10µM desitabin+%100 TDC FEC tedavilerinin 48. saatte MDA-MB-231 hücre soylarında <i>DAPK</i> gen promotöründe metilasyon seviyesinin MPS yöntemiyle gösterilmesi..... | 74 |
| Şekil 3.26. 10µM Desitabin, %100 TDC FEC ve 10µM desitabin+%100 TDC FEC tedavilerinin 48. saatte MCF-7 hücre soylarında <i>DAPK</i> gen promotöründe metilasyon seviyesinin MPS yöntemiyle gösterilmesi..... | 74 |
| Şekil 3.27. MCF-7 hücrelerinde 48. saatte <i>LINE-1</i> gen promotöründe metilasyon seviyesinin TaqMan yöntemiyle gösterilmesi..... | 76 |
| Şekil 3.28. MDA-MB-231 hücrelerinde 48 saatte <i>LINE-1</i> gen promotöründe metilasyon seviyesinin TaqMan yöntemiyle gösterilmesi..... | 76 |
| Şekil 3.29. MCF-7 hücrelerinde 48. saatte <i>uPA</i> gen promotöründe metilasyon seviyesinin TaqMan yöntemiyle gösterilmesi..... | 77 |
| Şekil 3.30. MDA-MB-231 hücrelerinde 48. saatte <i>uPA</i> gen promotöründe metilasyon seviyesinin TaqMan yöntemiyle gösterilmesi..... | 78 |
| Şekil 3.31. MCF-7 hücrelerinde 48. saatte <i>PAI-1</i> gen promotöründe metilasyon seviyesinin TaqMan yöntemiyle gösterilmesi..... | 79 |
| Şekil 3.32. MDA-MB-231 hücrelerinde 48. saatte <i>PAI-1</i> gen promotöründe metilasyon seviyesinin TaqMan yöntemiyle gösterilmesi..... | 79 |
| Şekil 3.33. MCF-7 hücrelerinde 48. saatte <i>DAPK</i> gen promotöründe metilasyon seviyesinin TaqMan yöntemiyle gösterilmesi..... | 80 |
| Şekil 3.34. MDA-MB-231 hücrelerinde 48. saatte <i>DAPK</i> gen promotöründe metilasyon seviyesinin TaqMan yöntemiyle gösterilmesi..... | 81 |
| Şekil 3.35. MCF-7 hücrelerinde 48. saatte <i>TMSI</i> gen promotöründe metilasyon seviyesinin TaqMan yöntemiyle gösterilmesi..... | 81 |
| Şekil 3.36. MDA-MB-231 hücrelerinde 48. saatte <i>TMSI</i> gen promotöründe metilasyon seviyesinin TaqMan yöntemiyle gösterilmesi..... | 82 |
| Şekil 3.37. MCF-7 hücrelerinde 48. saatte <i>MGMT</i> gen promotöründe metilasyon seviyesinin TaqMan yöntemiyle gösterilmesi..... | 82 |
| Şekil 3.38. MDA-MB-231 hücre soyunda 48. saatte <i>MGMT</i> gen metilasyon seviyesinin Real-Time PCR yöntemiyle gösterilmesi | 83 |

SİMGELER DİZİNİ

| | |
|------------|------------------------------|
| % | - Yüzde Orantı |
| °C | - Santigrat derece |
| M | - Molar |
| mM | - Milimolar |
| α | - Alfa |
| μ l | - Mikrolitre |
| μ g/mL | - Mikrogram/mililitre |
| Kb | - Kilobaz |
| kDa | - Kilo Dalton |
| bç | - Bazçifti |
| mg/ml | - Miligram/mililitre |
| nmol/L | - Nanomol/Litre |
| U/ml | - Ünite/mililitre |
| U/L | - Ünite/Litre |
| nm | - Nanometre |
| Rpm | - Revolutions per minute |
| N | - Normal |
| g | - Relative centrifugal force |
| sn | - Saniye |
| OD | - Optik Densite |
| V | - Volt |
| w/v | - weight/volume |
| Δ | - Delta |

Çizelge 2.1 Primer sekansları (MSP sistem)

| Gen primer ve prob | Sekans 5'-3' | PCR ürün boyutu (bp) | Kaynaklar |
|--------------------------------|--|----------------------|-----------------------|
| <u><i>DAPK</i></u> M primer | Forward GGATAGTCGGATCGAGTTAACGTC Reverse CCCTCCCAAACGCCGA | 98 | Wethkamp ve ark. 2006 |
| U primer | Forward GGAGGATAGTTGGATTGAGTTAATGTT Reverse CAAATCCCTCCCAAACACCAA | 106 | |
| <u><i>TMS1</i></u> M primer | Forward TTGTAGCGGGGTGAGCGGC Reverse AACGTCCATAAACAACAACGCG | 272 | Conway ve ark. 2000 |
| U primer | Forward GGTTGTAGTGGGGTGAGTGGT Reverse CAAAACATCCATAAACAACAACACA | 207 | |

Çizelge 2.2 Primer ve prob sekansları (MethyLight sistem)

| Gen primer ve prob | Sekans 5'-3' | PCR ürün boyutu (bp) | Referans Sekans | Kaynaklar |
|---|--|----------------------|----------------------------|---|
| <u>LINE-1</u> Forward Reverse Probe | GGACGTATTTGGAAAATCGGG AATCTCGCGATACGCCGTT FAM-TCGAATATTGCGTTTTTCGGATCGGTTT-BHQ1 | 81 | X52230.1 1524-1605 | Weisenberger ve ark. 2005 |
| <u>uPA</u> Forward Reverse Probe | TTGTAAGATAGGGGAGGGAGT ACICCTACTCTATATCAAAACCC FAM-CGTCGGGGCGGGTT-BHQ1 | 74 | X02419.1 791-717 | Pakneshan ve ark. 2005 |
| <u>PAI-1</u> Forward Reverse Probe | GTAGTTGAATTTTTGTAGTTTAGTAGT TCTACATCCTAAAATTCTCAAAAATAC FAM-TTAGAGTAGGACGAATCGTTAATCGT -BHQ1 | 81 | X13323.1 871-952 | Gao ve ark. 2005 |
| <u>DAPK</u> Forward Reverse Probe | TCGTCGTCGTTTCGGTTAGTT TCCCTCCGAAACGCTATC FAM-CGA CCA TAA ACG CCA ACG CCG-BHQ1 | 67 | AL161787.13 47151-47218 | Friedrich ve ark. 2004, Weisenberger ve ark. 2006 |
| <u>TMS1</u> Forward Reverse Probe | CGT TGG AGA ATT TGA TCGTCG CCC GTA ACC CTC GCG CAA FAM-AGT TTA AGA AGT TTA AGT TGA AGT TGT TGT CGG TGT CG-BHQ1 | 79 | AF184072.1 1287-1366 | Friedrich ve ark. 2004 |
| <u>MGMT</u> Forward Reverse Probe | CGAATATACTAAAACAACCCGCG GTA TTT TTT CGG GAG CGA GGC FAM-AATCCTCGCGATACGCACCGTTTACG-BHQ1 | 122 | X 61657 1029-1150 | Brabender ve ark. 2003 |
| <u>Alu 1</u> Forward Reverse Probe | GGTTAGGTATAGTGGTTTATATTTGTAATTTAGTA ATTAATAAATAATCTTAAACTCCTAACCTCA VIC-CCTACCTTAACCTCCC-MGB | 98 | Consensus sequence | Weisenberger ve ark. 2005 |

I: Sitozin ya da Urasile bağlanmış Inosin

GİRİŞ

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

Meme kanseri gelişimi, gen seviyesinde değişikliklere neden olabilecek genetik ve epigenetik mekanizmaları içermektedir. Çeşitli ilaç kombinasyonlarının kullanıldığı kemoterapi yöntemlerine ek olarak hastalığı gen seviyesinde tedavi seçenekleri de kullanılmaktadır. Epigenetik mekanizmaların en önemlisi olduğu belirlenen DNA metilasyonunun kanser tedavisinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. DNA metilasyon tepkimesi bir metil grubunun kovalent şekilde DNA metiltransferaz (DNMT) enzimleri katalizinde DNA'ya eklenmesini ifade etmektedir (Bird, 2002). DNA metilasyonu sonucunda genlerin promotör bölgelerine transkripsiyon faktörlerinin bağlanması engellenir ve kromatin yapısında meydana gelen değişim ile gen ifadesi baskılanır. Organizma için önemli olan genlerin ifade edilmemesi kanser gibi önemli hastalıkların oluşumuna neden olmaktadır. DNA metilasyonu desitabin (DAC=5-Aza-2'-deoksitidin) gibi DNMT inhibitörleri tarafından engellenebilmektedir. Kanser tedavisinde bu yöntemler de kullanılmaktadır (Matei ve Nephew 2009). Bu çalışmada, standart kemoterapiye ek olarak gen seviyesinde meydana gelebilecek değişimlerin standart tedavinin etkinliği üzerindeki rolü araştırıldı. Bu amaçla çalışmada bir DNMT inhibitörü olan desitabin kullanıldı. Desitabinin standart kemoterapi ile kombinasyonunun yeni bir tedavi seçeneği olup olmayacağı araştırıldı.

1. KAYNAK ÖZETLERİ (veya Kuramsal Temeller)

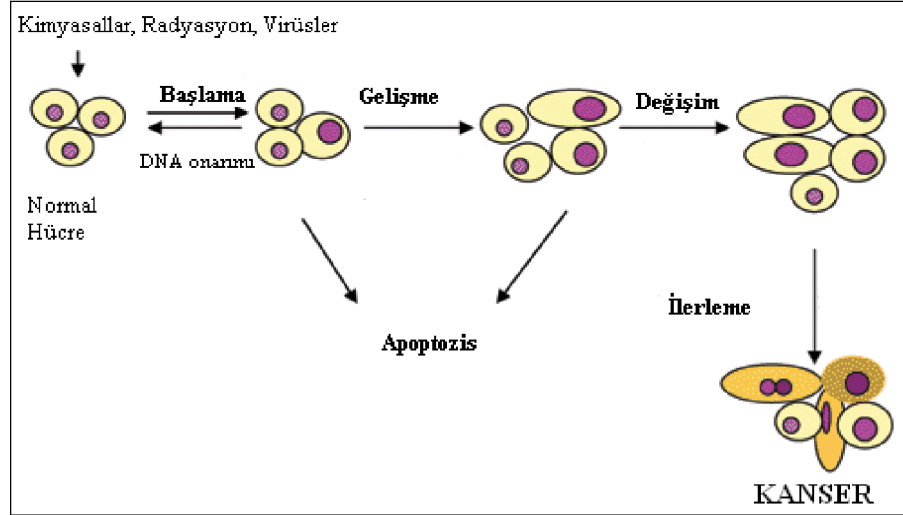
1.1. Karsinogenezis

Kanser, DNA hasarı ile hücrelerin doğal büyüme sürecinden çıkarak kontrolsüz bir şekilde anormal büyümesi ve çoğalması sonucu oluşan tüm lezyonların genel adıdır. Kanserde hücreler kontrolsüz bir şekilde üreyerek komşu dokuları işgal eder (invazyon) ve/veya kaynağını aldığı organdan daha uzak bir yere kan-lenf yoluyla yayılır (metastaz).

Kanser hakkındaki ilk belgeler Mısır papirüslerinde karşımıza çıkmaktadır. İnsan kanserleri ile ilgili en eski örnek Mısır'da milattan önce 1900-1600 yılları arasına tarihlendirilmiş bir bayana ait kafatası iskeleti kalıntısında görülmüştür. Benign (iyi huylu) ve malign (kötü huylu) tümörler arasındaki farkı açıklayan ilk kişi ise Hippocrates'tir (Beenken ve ark. 2004). Hippocrates kanser terimini Yunanca'da yengeç anlamına gelen "karkinos" kelimesi ile ifade etmiştir. Kelime İngilizceye "carcinoma" veya "carcinoma" olarak çevrilmiştir, bizim dilimize de kanser olarak geçmiştir.

Kanser gelişimi çok basamaklı bir mekanizmadır. Genel olarak 3 aşamalı olduğu kabul edilmektedir. Bunlar; başlama, gelişme ve ilerleme evreleridir. İlk evre olan başlama evresinde normal hücreler mutajenlerle geri dönüşümsüz bir reaksiyona indüklenirler. Bu evrede tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ile onkogenlerin aktivasyonu sonucu DNA mutasyonları oluşmaktadır. Geri dönüşümsüz olan tek gen mutasyonları kimyasal karsinojenler gibi çevresel genotoksik ajanlar, radyasyon ve virüsler etkisiyle oluşabilmektedir (Bishop 1991, Marshall 1991). İkinci evre olan gelişme evresinde; hormonlar, büyüme faktörleri, forbol esterleri gibi tümör geliştirici ajanların etkisiyle normal hücrenin belirgin bir şekilde tümör hücresine dönüşümü gerçekleşmektedir. Daha sonraki ilerleme ve metastaz evrelerinde tümör hücreleri malign hücrelere dönüşerek metastas yapabilme kapasitesine sahip olur (Şekil 1.1.) (Oliveira ve ark. 2007). Pek çok kanser türünün epigenetik değişimler sonucu oluştuğu

kabul edilmektedir. Epigenetik değişimler DNA diziliminde herhangi bir değişiklik olmaksızın gen ifadesinde meydana gelen değişmeleri kapsamaktadır (Dworkin ve ark. 2009).

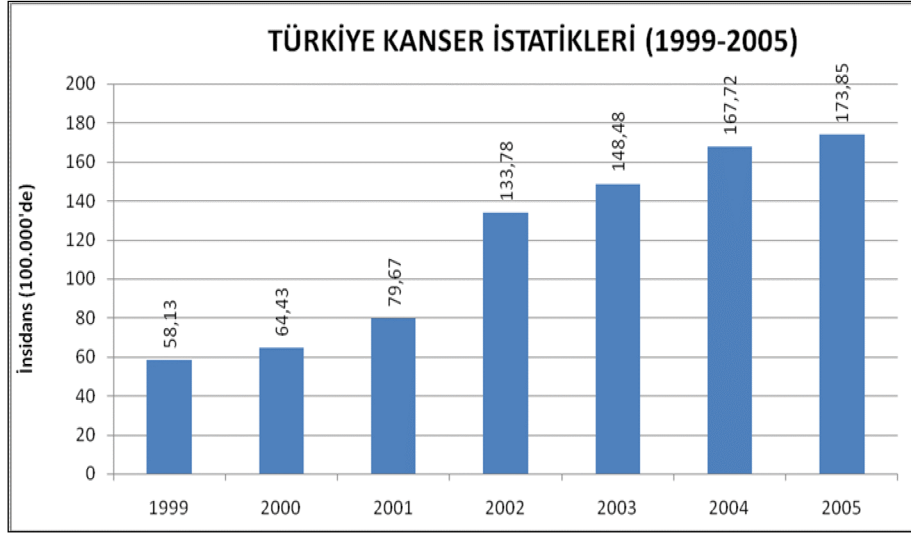


Şekil 1.1 Kanser oluşum aşamaları (Oliveira ve ark. 2007).

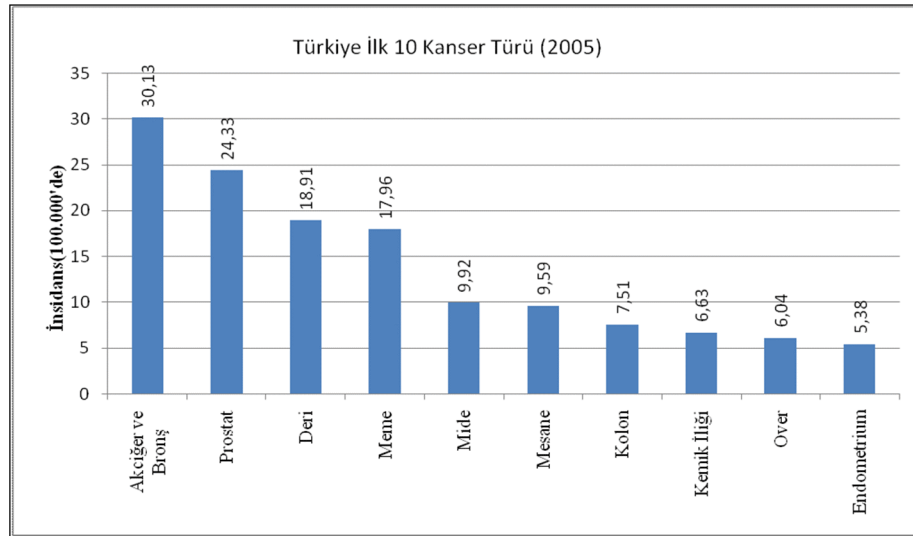
1.2. Kanser Tipleri ve Görülme Sıklıkları

Gerek benign gerekse malign tümörler köken aldıkları doku ve hücre tiplerine göre sınıflandırılırlar. Epitel hücrelerden köken alan kanserler karsinom; bağ dokusu ya da kas hücrelerinden köken alan kanserler ise sarkom olarak adlandırılırlar. Kan yapıcı hücrelerden türeyen lösemiler ve sinir sistemi hücrelerinden türeyen kanserler bu iki ana kategoriye girmeyen kanserlerdir. İnsan kanserlerinin %90'ını karsinomalar oluşturur (Alberts ve ark. 2002). Birçok kanser çeşidi olmasına rağmen sadece bir kaç çok sıklıkla görülen kanser tipleridir. Amerika Birleşik Devletlerinde her yıl yaklaşık bir milyon yeni kanser vakası belirlenmektedir ve 500 000'den fazla kişi kanser nedeniyle ölmektedir. Bunların arasında en sık görülen kanser tiplerinden biri de meme kanseridir. Amerika'da her yıl yaklaşık 40000 kadın meme kanserinden ölmektedir. 2009 istatistik verilerine göre Amerika Birleşik Devletlerinde 766130 erkek ve 713220 kadına kanser teşhisi konmuştur. Dikkati çeken nokta ise teşhis konulan kadınlarda meme kanseri %27'lik oranla birinci sırada olmaktadır (<http://www.cancer.org>, 2010). Ülkemizde sağlık bakanlığının 1999-2005 verilerine göre kanser görülme sıklığının (insidans)

giderek arttığı belirlenmiştir (Şekil 1.2.). Türkiye’de en sık görülen ilk on kanser türü arasında akciğer, prostat, deri ve meme kanserlerinin yer aldığı istatistiksel olarak belirlenmiştir (Şekil 1.3.) (<http://www.saglik.gov.tr>. 2010).



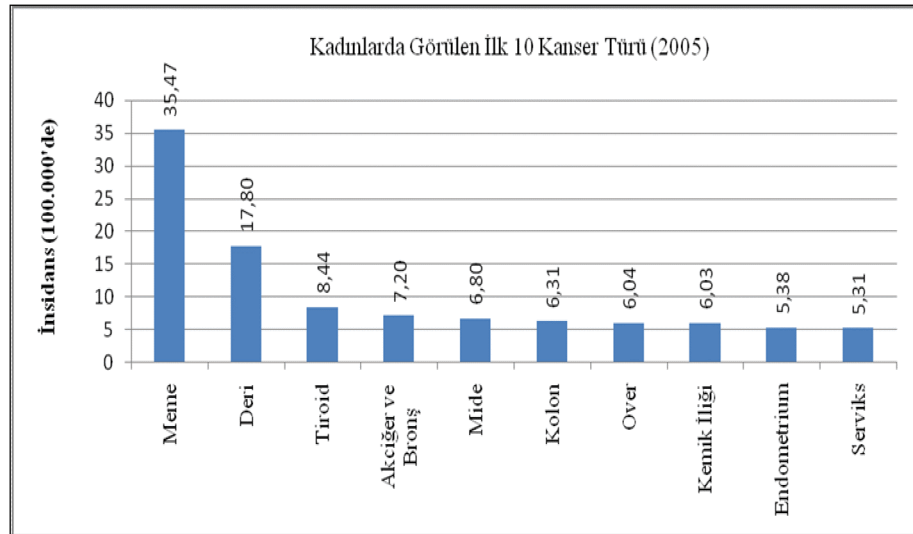
Şekil 1.2 Türkiye’de gözlenen kanser oranlarının yıllara göre dağılımı (<http://www.saglik.gov.tr>)



Şekil 1.3 Türkiye’de en sık görülen kanser türleri (<http://www.saglik.gov.tr>)

1. 3. Meme Kanseri

Meme kanseri muhtemelen, tanımlanan ve diğer selim hastalıklardan ayrımı yapılabilen ilk habis tümördür. Milattan önce 3000-2500 yılları arasında Eski Mısır'da İmhotep tarafından yazıldığı tahmin edilen tıbbi bir papirusta meme kanseri ile ilgili ilk kayıtlara rastlanmıştır. Edwin Smith'ın ortaya çıkardığı bu papirusta 9 meme kanseri hastası anlatılmaktadır (Donegan 2006). Meme kanseri tüm dünyada kadınlarda en sık rastlanan kanserdir ve ölüm sebepleri arasında önemli yer tutmaktadır (Coughlin ve Ekwueme 2009). Dünyada yaklaşık olarak her yıl bir milyondan fazla kadına meme kanser teşhisi konmakta ve 410000'den fazla kadın bu hastalıktan dolayı hayatını kaybetmektedir (Parkin ve ark. 2005). Sağlık bakanlığının 2005 yılı istatistiklerine göre ülkemizde kadınlarda en sık görülen kanser türü meme kanseridir. En sık görülen kanser türünü %35,47'lik insidans ile meme kanseri oluşturmaktadır Sırasıyla diğer kanser türleri deri, tiroid ve akciğer kanserleridir. (Şekil 1.4.).



Şekil 1.4 Türkiye'de kadınlarda en sık görülen kanser türleri (<http://www.saglik.gov.tr>)

1.3.1. Meme Kanserinde Risk Faktörleri

Meme kanseri için birçok risk faktörü belirlenmiştir. Bunlar arasında kadın olmak ve ilerleyen yaş en önemli faktörlerdir. Hastaların çoğu 55 yaşın üzerindedir. Ancak son 30 yıl içinde 40 yaş altında meme kanseri görülme oranında az fakat anlamlı bir artış olduğu belirlenmiştir. Ailede meme kanseri öyküsü olması yine yüksek risk faktörlerinden birini oluşturmaktadır. Meme kanseri olan anne, kız ve kızkardeşler arasında meme kanseri görülme olasılığı normal popülasyondan iki kat fazladır. Genetik meme kanseri olgularında özellikle p-53, BRCA-1 ve BRCA-2 gen mutasyonları etkili olmaktadır (Washbrook 2006). Meme kanseri gelişiminde hormonal faktörler de etkilidir. Menstrüasyon öyküleri oldukça etkili olmaktadır. Erken menstruasyon yaşı, meme dokusunun östrojene maruz kalma süresini uzatır. Bu nedenden dolayı erken menarşın meme kanseri riskini arttırdığına inanılmaktadır (Parsa ve Parsa 2009). Doğurmamış ya da evlenmemiş kadınlarda meme kanseri görülme olasılığı daha fazladır. İlk doğumunu 35 yaşından sonra yapmış olmak ve geç menapoz da meme kanseri görülme olasılığını arttırmaktadır (Değerli 1998, Özışık ve Baltalı 2004). Gebelik ve laktasyonun meme kanserine karşı koruyucu olduğu ileri sürülmektedir (Sayek 1996). Çevresel faktörler arasında ise radyasyona maruz kalma en önemli risk faktörüdür (Imaoka ve ark. 2009). Yine yüksek yağ tüketimi ve alkol alımının da meme kanseri riskini arttırdığına dair kanıtlar vardır. Liften zengin gıdaların bağırsaktan östrojen absorpsiyonunu engelleyerek meme kanserini önleyebileceği düşünülmektedir (Scmizu ve ark. 1990).

1.3.2. Meme Kanseri Tedavisi

Meme kanserinin tedavisinde kullanılan yöntemler temel olarak;

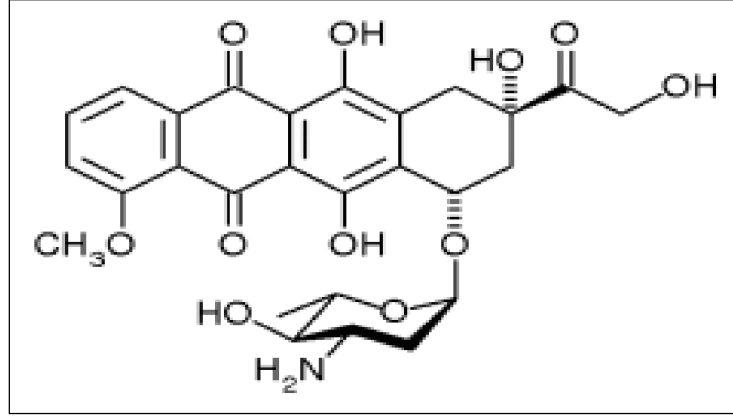
- 1) Cerrahi: Kanserli dokuyu ve çevresindeki invazyon riski taşıyan bir miktar sağlıklı dokuyu alıp çıkartma işlemidir. Bazı durumlarda kanserli dokuyu cerrahi müdahale ile çıkarmak imkânsız olabilir. Bu durumda radyoterapi veya kemoterapi uygulanır.
- 2) Radyoterapi (Işın tedavisi): Uygun dozda ışın uygulayarak kanser hücrelerinin öldürülmesi işlemidir.

- 3) Kemoterapi: Kanser hücrelerini öldürmek ya da tümör büyümesini durdurmak üzere farklı ilaç veya ilaç kombinasyonlarının kullanılmasıdır.
- 4) Hormon Tedavisi: Kanser hücrelerinin büyümek için gereksinim duyduğu hormonları engellemek amacı ile uygun hormonların hastaya verilmesi yöntemidir.
- 5) Alternatif Tıp: Bağışıklık sistemini güçlendirici, asıl tedaviye destek olan yöntemler.

1.3.2.1.Meme Kanserinde Kemoterapide Kullanılan İlaçlar

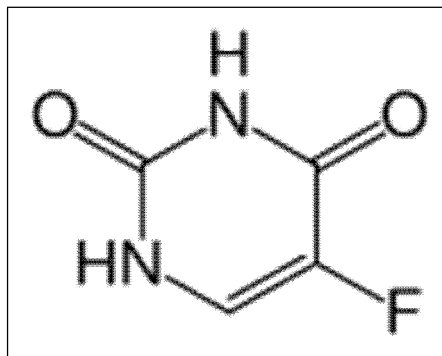
Meme kanserinde sistemik tedavinin esasını kemoterapi oluşturur. Tek başına kullanılan sitotoksik ajanların çoğu ile vakaların %20-35'inde kısmi yanıt (nadiren tam) alınır. Kemoterapide genellikle birden fazla ilacın kombinasyonu kullanılır. Çünkü çoklu ilaç kullanımının kemoterapide daha etkili olduğu belirlenmiştir (Sayek, 2004). Metotreksat (M) 5-fluorourasil (F), siklofosfamid (C), epirubisin (E), adriamisin (A) başlıca antikanser ilaçlar olup, CMF, FAC, FEC, AC gibi kombinasyonları tedavide kullanılmaktadır. İkinci kademede kemoterapi ilaçları ise vinorelbin ve taksanlardır (dozetaksel, paklitaksel). Yine mitomisin C ve prednizon son evre hastalarda kullanılan ajanlardandır. Çalışmada kullanılan antikanser ilaçların özellikleri aşağıda tanımlanmıştır.

Epirubisin: Kemoterapide kullanılan antrasiklin temelli bir ilaçtır. Farmorubisin olarak da adlandırılan epirubisinin kimyasal yapısı şekil 1.5.'de gösterilmiştir (Onrust ve ark. 1999). Epirubisinin'in etki mekanizması, epirubisinin DNA'ya bağlanabilmesinden kaynaklanmaktadır (Plosker ve Faulds 1993). Hücre kültürü çalışmaları, epirubisinin süratle hücreye geçtiğini, nukleusta lokalize olarak, DNA, RNA sentezini ve mitozu inhibe ettiğini göstermiştir. Aynı zamanda topoizomeraz II enzimini inhibe ederek hücre ölümüne de neden olmaktadır (Jarvinen ve ark. 1998). Epirubisin hücre membranlarına ve plazma proteinlerine bağlanabilir ve sitotoksik etki gösterebilir. Bununla beraber serbest radikallerin üretimine neden olarak DNA ve hücre hasarlarına neden olabilmektedir (Olinski ve ark. 1997). Epirubisin başlıca meme kanseri olmak üzere farklı kanser tiplerinde kemoterapi rejiminde kullanılmaktadır (Mavroudis ve ark. 2009).



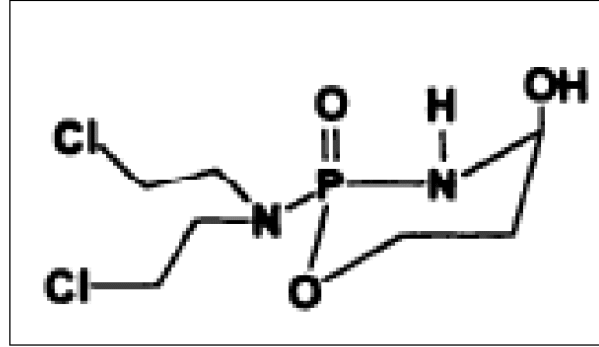
Şekil 1.5 Epirubisin'nin kimyasal yapısı (Olinski ve ark. 1997).

5-Florourasil (5-FU): Yapısında C-5 pozisyonunda hidrojen yerine bir florin atomu içeren, bir pirimidin analogudur. 5-Florourasil'in kimyasal yapısı şekil 1.6.'de gösterilmiştir. 5-FU, urasilin hücre içine transport yollarını kullanarak, rahatça hücreye girebilmektedir. Hücre içinde farklı sitotoksik metabolitlere dönüştürülür. Bu aktif metabolitler, DNA ve RNA yapısına girerek timidilat sentaz (TS) aktivitesini, RNA ve DNA sentezini inhibe ederler. Böylece hücre siklusunu durdurarak apoptosisi arttırmaktadır (Noordhuis ve ark. 2004). Kemoterapide, özellikle kolorektal ve pankreatik kanserlerin tedavisinde kullanılan 5-FU, meme kanserinin FEC tedavisinde diğer ilaçlarla kombine olarak kullanılmaktadır (Jinno ve ark. 2009).



Şekil 1.6 5-Florourasil'in kimyasal yapısı (MacNaughton ve ark. 2006).

4-Hidroksisiklofosfamid (4-HC): Nitrojen-mustard türevli alkilleyici bir ajan olan siklofosfamidin etkin maddesi 4-hidroksisiklofosfamittir. 4-HC'nin kimyasal yapısı şekil 1.7.'de gösterilmiştir. Özellikle lenfomalara ve solid tümörlere karşı kullanılan antikanser ilaçtır. Siklofosfamid tümör hücrelerinde apoptozisi artırarak hücre büyümesini yavaşlatıcı veya durdurucu etkiye sahiptir (Schwartz ve Waxman 2001).



Şekil 1.7 4-Hidroksisiklofosfamid'in kimyasal yapısı (Anderson ve ark. 1996).

1.4. Apoptozis

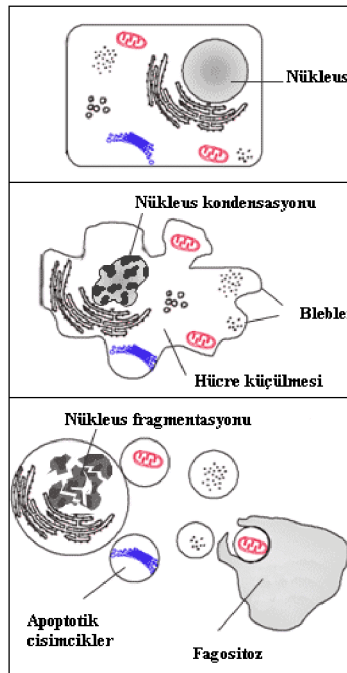
Apoptozis; gelişmiş organizmalarda hücreler arası ilişkilerin gereği olarak gereksinim duyulmayan, fonksiyonları bozulan, fazla üretilmiş, yaşlanmış, düzensiz gelişmiş veya DNA'sında hasar olan hücrelerin çevreye zarar vermeden güvenli bir şekilde yok edilmelerini sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür. Apoptozise aynı zamanda programlanmış hücre ölümü, fizyolojik hücre ölümü veya hücre intiharı da denmektedir (Thompson 1999). Hücrenin yaşam çemberi boyunca yapımı-yıkımı arasında kontrollü bir denge vardır. Bu dengenin, apoptozisin lehine veya aleyhine bozulması, birçok önemli hastalığın patogenezinde rol oynar (Cooper 2004).

Hücre ölümüyle ilgili ilk bilgiler 1920 yılında ışık mikroskobunun ve yeni boya yöntemlerinin keşfiyle başlamış, ilk olarak nekroz tanımlanmıştır. 1972 yılında, ilk defa Kerr, Wyllie ve Currie adındaki patologlar iskemiye maruz kalan dokunun etrafında nekrozdan daha farklı hücre ölümü olduğunu görmüşler ve buna, ağaç yapraklarının gövdeden ayrılması anlamına gelen apoptozis adını vermişlerdir (Kerr ve ark. 1972). 1983 yılında Duke ve ark. tarafından, endonükleazların yol açtığı DNA kırıklarının jel elektroforezinde gösterilmesi ile apoptotik hücre ölümünün ilk biyokimyasal kanıtına ulaşılmıştır (Wyllie ve Duvall, 1992). Bu tarihten sonra apoptozis ile ilgili çalışmalar hız kazanmıştır.

Apoptozis, bugüne dek bildiğimiz tek tip hücre ölümü olan nekrozdan oldukça farklıdır. Nekrozis fizyolojik bir ölüm şekli olmasına rağmen, apoptozis hem fizyolojik hem de patolojik şartlar altında meydana gelebilen ve genelde doku homeostazisini sağlayan hücre ölüm şeklidir (Thompson 1999). Nekroza giden hücre plazma membran bütünlüğünü kaybederken, apoptotik hücrelerin membranı sağlamdır. Nekrozisde hücre şişerken, apoptotik hücre tam tersine küçülür. Nekrozisde hücrelerin kromatin paterni hemen hemen normal iken apoptotik hücrenin kromatini nükleus membranının çevresinde toplanmış ve yoğunlaşmış şekildedir. Apoptozisin en önemli özgün yönü DNA'nın internükleozomal bölgelerden parçalanmasıdır. Nekrotik hücre sonradan lizise uğrar, apoptotik hücre küçük cisimciklere parçalanarak apoptotik cisimcikler oluşur.

Nekrozis sonucunda inflamasyon yanıt oluşur fakat apoptozis sonucunda inflamasyon oluşmaz (Barisic ve ark. 2003, Brouckaert ve ark. 2004, Huppertz ve ark. 1999, Willingham 1999). Bunlar gibi birçok açıdan apoptozis ve nekrozis ölüm yolları birbirinden farklılık gösterir.

Apoptozisde ana morfolojik olay, nükleusun yoğunlaşması ve daha sonra parçalara ayrılmasıdır (Galle 1997). DNA, internükleozomal bölgelerden yaklaşık 180-200 bazçifti (bç) veya bunun katları boyutunda küçük DNA parçaları oluşturacak şekilde ayrılır. Bu durum agaroz jel elektroforezinde merdiven görüntüsü imajının ‐ladder pattern‐ ortaya çıkmasına neden olur. Ama bu durum hücre tipine bağlı olarak değişebilir ya da sadece yaklaşık 50 kilo bç boyutunda bir DNA fragmentasyonu da görülebilir (Walker ve ark. 1999). Apoptozisin erken evresinde hücreler birleşme bölgelerinden ayrılır, özelleşmiş yüzey organellerini kaybeder ve belirgin şekilde büzülür, bir kaç dakikada hacimlerinin 1/3’ünü kaybederler. Daha sonra plazma membranında tomurcuklanmalar oluşur ve hücre, sitoplazma ile çevrilmiş kromatin parçalarından oluşan apoptotik cisimciklere parçalanır. Apoptotik hücreler komşu hücreler ile makrofajlar tarafından tanınır ve fagosite edilir. Genel olarak apoptozise giden hücrelerde meydana gelen değişiklikler şekil 1.8.’de gösterilmektedir (Dayan ve ark. 2000).



Şekil 1.8 Hücrelerde apoptozisin oluşumu (<http://en.wikipedia.org>)

1.4.1. Apoptozis Oluşumunun Moleküler Mekanizmaları

Apoptotik hücre ölümünün belli başlı aşamalarını özet olarak şöyle sıralayabiliriz.

- 1) Apoptozisin başlatılması (Apoptozisin indüksiyonu, hücre yüzey ölüm reseptörlerinin uyarılması)
- 2) Sitokrom c'nin saliverilmesi (Apoptozom (sitokrom c+Apaf-1 +kaspaz-9) oluşumu, mitokondriyal transmembran potansiyelin değişmesi)
- 3) Hücre içi proteazların (kaspazların) aktivasyonu
- 4) Hücrede apoptozise özgü morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerin oluşması (Fosfatidilserinin hücre membranının iç yüzünden dış yüze transloke olması, DNA'nın fragmentasyonu, apoptozise özgü morfolojik değişikliklerin meydana gelmesi).
- 5) Fagositoz

Hücrenin apoptozise gidebilmesi için ilk önce ilgili genetik mekanizmayı harekete geçirecek bir sinyalle karşılaşması gerekir. Bu sinyal hücre içinden veya dışından gelebilir (Hirose ve ark. 1997). Apoptozis önceden hazır olan hücrelerde primer başlatılabilir ya da bir uyarı sonucu sekonder olarak gelişebilir. Hücre dışı uyaranlar arasında; hücre ölüm proteinleri, tümör nekroz faktörü, koloni uyarıcı faktörler, nöron büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme faktörü, interlökin gibi maddelerin ortamda azalması, glukokortikoidler, radyasyon, ilaçlar, çeşitli antijenler ve virüsler vardır. Bunlar hücreyi apoptozise götürebilmektedir. Apoptozisi etkileyen hücre içi uyaranlar arasında sitokinler, hücre içi kalsiyum miktarında artış, tümör nekroz faktör, DNA hasarı nedeniyle bir tümör süpressör gen olan p53'ün aktive olması, viral-bakteriyel enfeksiyonlar, glukokortikoidler ve onkojenlerin yer aldığı bilinmektedir. Ayrıca hipertermi, radyasyon, sitotoksik antikanser ilaçları ve hipoksi gibi nekroz oluşturabilen etkenler hafif dozlarda apoptozis meydana getirebilmektedir. Apoptozda hücre ölümü çevreye rahatsızlık vermeksizin gelişse de bazen apoptozis dolaylı olarak çevre dokuda nekrozu başlatabilir ya da tam tersi nekroz apoptozis gelişmesine yol açabilir. Bunlara ilaveten organizmada apoptozisi uyaran ve engelleyen çok sayıda gen bulunmaktadır (Öktem ve ark. 2001).

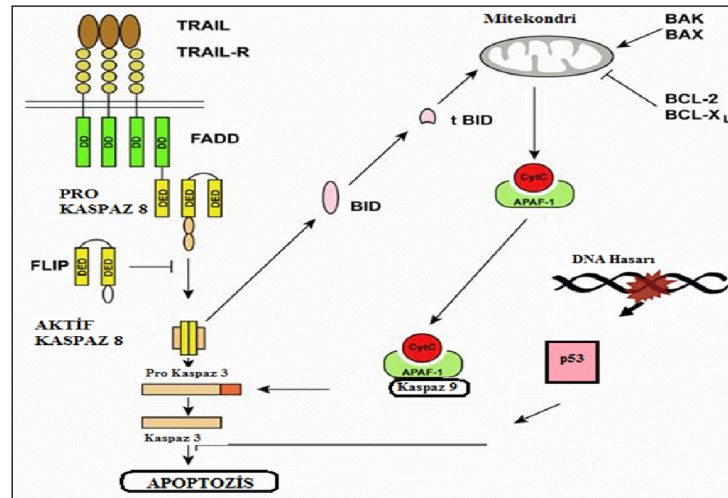
Apoptoz sürecinde belli başlı üç anahtar bileşen vardır. Bunlar; Bcl-2 ailesi proteinleri, kaspazlar ve Apaf-1 proteindir. Bu bileşenlerin biyokimyasal aktivasyonu, apoptozda gözlenen mitokondriyal hasar, çekirdek zarı kırılması, DNA fragmentasyonu, kromatin yoğunlaşması ve apoptotik cisimlerin şekillenmesi gibi morfolojik değişikliklerden sorumludur (Staley ve ark.1997). Kaspazlar, zimojen (inaktif prekürsör) olarak sitoplâzmadaki bulunan ve aktif merkezlerinde sistein içeren, sistein proteazlar olarak adlandırılan enzimlerdir. Şu ana kadar 14 tanesi tanımlanmıştır ve çoğu apoptozisde rol almaktadır. Bazıları (Kaspaz 2, 8, 9, 10) başlatıcı kaspazlar olarak bilinirken, bazıları da (3, 6, 7) efektör kaspazlar olarak bilinir. Kaspazlar birbirlerini aktifleştirerek preteolitik bir kaskada (şelale tarzı reaksiyon dizisi) neden olurlar.

Hücre ölüm reseptörleri olarak bilinen Fas (diğer isimleriyle APO-1, CD95) ve tümör nekroz faktör reseptörü-1 (TNFR-1)'in ilgili ligandları ile etkileşime girmesi (uyarılmalari) sonucu apoptozis indüklenir. Fas hücre yüzey reseptörüdür ve ilgili ligandına Fas ligand (FasL) denir. Fas ve FasL tümör nekroz faktörü ailesinin bir üyesidir. Fas lenfoid hücrelerde, hepatositlerde, bazı tümör hücrelerinde, akciğerlerde, hatta miyokarda bulunur. FasL özellikle sitotoksik T hücreleri ve NK hücreleri üzerinde bulunur. FasL'ın Fas reseptörüne bağlanması ile apoptotik işlem başlar. Fas ve TNFR-1, ligandlarıyla bağlandıklarında ölüm uyarısı almış olduklarından bir seri protein:protein interaksiyonlarından geçerler. Öncelikle kendilerine doğal olarak bağlı bulunan ve ölüm bölgeleri adı verilen TRADD ve FADD ile interaksiyona girerler. Bu ölüm bölgeleri ise kaspaz 8'i aktifleştirerek kaspazların kaskad tarzında aktivasyonlarını başlatırlar. Aktive olan kaspaz 8 daha sonra diğer uygulayıcı kaspazları aktive eder (Israels ve Israels, 1999). Kaspaz 8, kaspaz 3'ü aktive ederek DNA fregmentasyonuna neden olur ya da sitokrom c'nin mitokondriden salgılanmasını sağlar (Mccarthy ve Bennett 2002) (Şekil 1.9.).

Bcl-2 ailesi; üyelerinin bir kısmının apoptozisi indüklediği (pro-apoptotik: Bax, Bad, Bid, Bcl-X_s), bir kısmının ise inhibe ettiği (anti-apoptotik: Bcl-2, Bcl-X_l) geniş bir ailedir. Bu ailenin üyeleri kendi aralarında homo veya hetero-dimerler oluştururlar. Hücrenin yaşayabilirlik durumu bu ailenin pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyelerinin rölâtif oranına bağlıdır. Çünkü oranın artması ya da azalması apoptozisin inhibisyonu

veya aktivasyonu ile sonuçlanır. Bax sitozolde bulunur ve apoptotik uyarı alınması halinde mitokondri membranına bağlanır, burada küçük delikçikler oluşumunu indükler, böylece selektif iyon permeabilitesi kaybolur, sonuçta sitokrom c ve apoptozis-indükleyici faktörün mitokondriden sitozole çıkmasını sağlar. Sitokrom c, mitokondri iç membranında bulunan elektron transport zincirinin bir proteindir. Son yıllarda anlaşılan önemiyle apoptozis sürecinde merkezi bir konuma oturmuştur. Bu yüzden de sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salıverilmesi apoptozis yoluna girmiş bir hücrede geri dönüşümsüz bir döneme girildiğini işaret eder. Sitokrom c sitoplazmik protein olan Apaf-1'e bağlanır ve onu aktive eder, ardından ATP'nin de katılımıyla apoptozom adı verilen bir kompleks oluşur. Bu kompleks inaktif olan prokaspaz-9'un aktif kaspaz-9 haline dönüşmesini sağlar. Aktif kaspaz 9 ise efektör kaspazlardan prokaspaz 3'ü aktive eder. Aktif kaspaz 3 sayesinde deoksiribonükleaz serbestleşir ve bu da apoptozisin karakteristik bulgularından biri olan kromatin kondensasyonuna ve oligonükleozomal DNA fragmentasyonuna neden olur (Şekil 1.9.).

Apoptozis p53 proteininin indüklenmesi ile de başlatılabilmektedir. p53, hücrede bir şekilde (radyasyon, kemoterapi etkisiyle) DNA hasarı (tek ya da çift zincir kırıkları, nükleotid eksikliği) olduğunda, eğer hasar onarılabilecek düzeyde ise hücre siklusunu G1 fazında durdurur ve hücreye DNA'sını tamir edebilmesi için zaman kazandırır. Eğer DNA hasarı tamir edilemeyecek kadar büyükse bu durumda p53 apoptozisi indükler. p53'ün apoptozisi indüklemesi Bax'ın ekspresyonunu artırması böylece Bcl-2/Bax oranını değiştirmesi yoluyla gerçekleşir (Şekil 1.9.).



Şekil 1.9 Apoptozisin moleküler mekanizmaları (Pasquini ve ark. 2006).

Bu mekanizmalar kaspaz-bağımlı apoptozisi gösterir, oysa kaspaz-bağımsız apoptozisin varlığı da bilinmektedir. Kaspaz-bağımsız apoptozis yine mitokondriden salıverilen bir faktör olan apoptozis indükleyici faktör (AIF)'ün etkisiyle gerçekleştirilir (Hunot ve Flavell 2001).

Günümüzde apoptoz sürecinde rolü olan biyokimyasal ve genetik komponentlerin aydınlatılmasıyla birlikte apoptozun aktivasyonuna ya da inhibisyonuna yönelik çalışmalar; kanser, AIDS ve otoimmün bozukluklar gibi birçok hastalıkta yeni tedavi olanaklarını gündeme getirmektedir (Estaquier ve ark. 1994).

Hücrelerin normal apoptotik süreçten kaçmalarını sağlayan bir özellik kazanmaları hemen bütün kanser hücrelerinde gözlenen bir özelliktir. Tümör hücreleri ya antiapoptotik proteinlerin aşırı yapımıyla ya da proapoptotik proteinlerin yapımlarının ya da etkilerinin azalmasıyla apoptoza dirençli bir nitelik kazanırlar. p53 yoluyla başlatılan apoptoz yolundaki proteinlerin yapımları ya da işlevlerindeki bozuklukların insanlardaki kanserlerin neredeyse yarısında etkili olduğu gösterilmiştir (Fadeel ve Orrenius 2005). Apaf-1'in metastatik melanom hücrelerinde yapımının olmadığı gösterilmiştir. Bazı kanser türlerinde (hepatosellüler karsinom, melanomlar) ölüm reseptörlerinden biri olan CD95'in yapımının azaldığı bulunmuştur (Jin ve El-Deiry 2005).

1.5. Epigenetik ve Kanser

Epigenetik terimi, ilk kez 1939 yılında Conrad Waddington tarafından fenotipe yansıyan genler ve onların ürünleri arasındaki ilişkiler olarak tanımlanmıştır (Waddington 1939). Daha sonra Arthur Riggs ve arkadaşları epigenetiği DNA sekansında değişiklik olmaksızın gerçekleşen gen fonksiyonundaki mayotik ya da mitotik kalıtsal değişimler olarak tanımlamışlardır (Russo ve ark. 1996). Günümüzde ise epigenetik terimi DNA dizisinden bağımsız olarak gen ifadesinde meydana gelen kalıtsal ya da doğal olabilecek değişiklikler olarak adlandırılmaktadır (Bird 2007). Diğer bir deyişle, epigenetik değişimler kalıtsal olup, genetik olmayan fenotipik varyasyonları içermektedir. Bu değişiklikler hücreyi ya da organizmayı doğrudan etkilemektedir, ancak DNA dizisinde hiç bir değişiklik gerçekleşmemektedir. Bu özellikleriyle genetik değişimlerden ayrılmaktadır. Epigenetik değişimler genlerin sessizleşmesine neden olurlar. Bu da geni inaktive edici bir mutasyon veya delesyon gibi genetik bir mekanizmayla eşdeğer olmaktadır.

1.5.1. Epigenetik Mekanizmalar

Epigenetik mekanizmalar ikiye ayrılır. Bunlar;

1. Doğrudan gen ifadesini kontrol eden veya etkileyen mekanizmalar

Bu mekanizmalar da ikiye ayrılır:

a) DNA düzeyindeki modifikasyonlar

DNA metilasyonu: Hipermetilasyon/Hipometilasyon

b) Kromatin düzeyindeki modifikasyonlar

- 1) Kovalent histon modifikasyonları: Histonların metilasyonu, asetilasyonu, fosforilasyonu, ubikütinasyonu, sumolizasyonu ve ADP-ribozilasyonu gibi modifikasyonları içermektedir.
- 2) Nonkovalent histon modifikasyonları: Histon takasları, histon katımları ve diğer ajanlarla etkileşimleri (virüsler, farklı protein grupları) gibi modifikasyonlardır.

2. Dolaylı yoldan gen ifadesini kontrol eden veya etkileyen mekanizmalar:

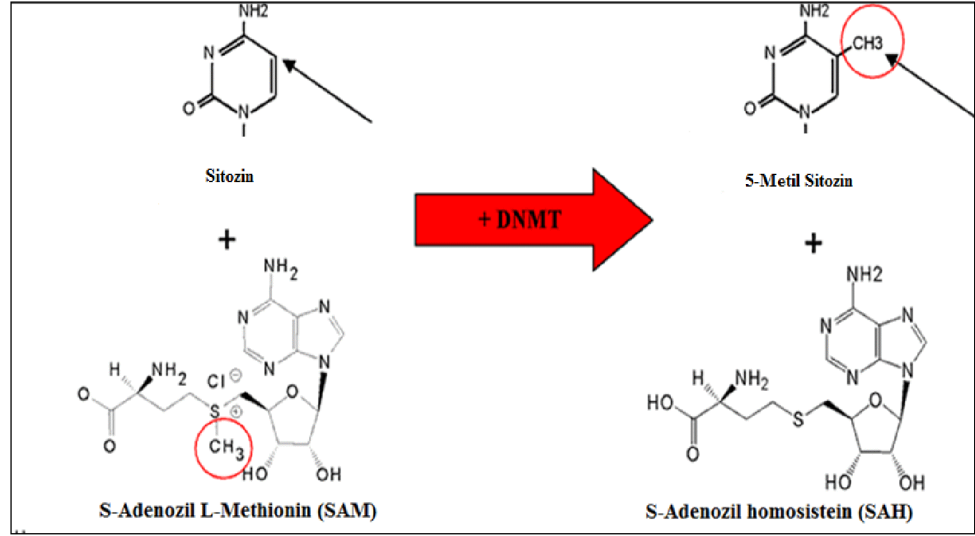
Dolaylı yoldan gen ifadesine etkiyen mekanizmalar post-transkripsiyonel (transkripsiyon sonrası, yani ana DNA molekülünden RNA molekülü elde edildikten sonra) mekanizmaları içerir (Sawan ve ark. 2008).

Mekanizmaların herhangi birindeki hata, genlerin ifadesinin aşırı artmasına veya baskılanmasına neden olarak epigenetik hastalıklara yol açmaktadır (Egger ve ark. 2004). Genetik ve epigenetik değişimlerin birikmesi sonucunda hücre ölüm ve yaşam arasındaki dengesi bozulur bu da hücrenin kanserleşmesine neden olur (Hanahan ve Weinberg 2000). DNA metilasyonu memelilerde çoğunlukla CpG dinükleotidlerinde meydana gelen değişimdir. Kromatin düzeyindeki modifikasyonlar histonların N-terminal uçlarında oluşan posttranslasyonel modifikasyonlardır. Bu modifikasyonlar arasında; histone asetil transferazlar tarafından asetillenme ve histon metil transferazlar tarafından metillenme yer almaktadır. Histonlar üzerinde gerçekleşen bu değişiklikler, DNA ile olan interaksyonları etkileyerek kromatin yapısını değiştirebilmekte ve gen ifadesinin kontrolünde rol almaktadır. DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları, tümör baskılayıcı genleri susturulmasına ve onkogenlerin aktivasyonuna yol açarak kanser gelişimine neden olabilmektedir.

Epigenetik mekanizmalar içerisinde en önemli mekanizmalarından biri DNA metilasyon mekanizmasıdır.

1.5.2. DNA Metilasyonu

DNA metilasyonu; gen ifadesini değiştirerek hücre fonksiyonlarını değiştiren ve bir metil (CH_3) grubunun kovalent şekilde DNMT katalizinde, DNA'da CpG olarak adlandırılan dinükleotidindeki sitozinin 5-karbonundan yapıya eklenmesini ifade eden epigenetik bir olaydır (Bird, 2002). DNMT'lar S-adenozil metionin'i bir metil donörü olarak kullanırlar. S-adenosil-metionin'den bir metil gurubunu sitozin rezidülerine transfer edilir ve böylelikle sitozin, 5-metilsitozin haline gelir (Şekil 1.10.). 5-metilsitozin genomdaki CpG alanlarında sıkça bulunan ve genomdaki bazların yaklaşık %4'nü oluşturan modifiye bazdır (Baylin 2005).



Şekil 1.10 DNA metilasyon mekanizması (Bird, 2002)

DNA metilasyonu, insanlarda ve pek çok memelide bilinen tek doğal DNA modifikasyonudur ve yalnızca guanozin tarafından takip edilen sitozin bazını etkiler. Böylelikle, bu organizmalarda, DNA metilasyonu genellikle CpG dinükleotid alanlarında gözlenir. İnsan DNA'sındaki tüm CpG alanlarının %70-80'i metillenmiştir. Bu alanlar genomda yüksek bir sıklıkta bulunursa CpG adacıkları olarak adlandırılır. CpG adacıkları genlerin yaklaşık % 50'sinin promotor bölgelerinde bulunan, yaklaşık 0.2-1 kb uzunluğunda ve tüm genomun yaklaşık %2'sini oluşturan bölgelerdir (Zhu ve Yao 2007).

DNA metilasyonu en çok çalışılan epigenetik mekanizma olup, gen ifadesinin baskılanmasını sağlamakta, embriyonik gelişim, transkripsiyon, kromatin yapısı, X-kromozom inaktivasyonu ve genom kararlılığının korunmasında fonksiyon görmektedir (Robertson 2005). DNA metilasyonunun, transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını engelleyerek veya metilli DNA'ya bağlanan protein kompleksleri sayesinde kromatin yapısını değiştirerek genlerin ifadesini baskıladığı düşünülmektedir. DNA metilasyon tepkimesini gerçekleştiren DNMT enzimleri tepkimenin oluşumunda kilit noktayı oluşturmaktadırlar.

1.5.3. DNA Metiltransferazlar (DNMT)

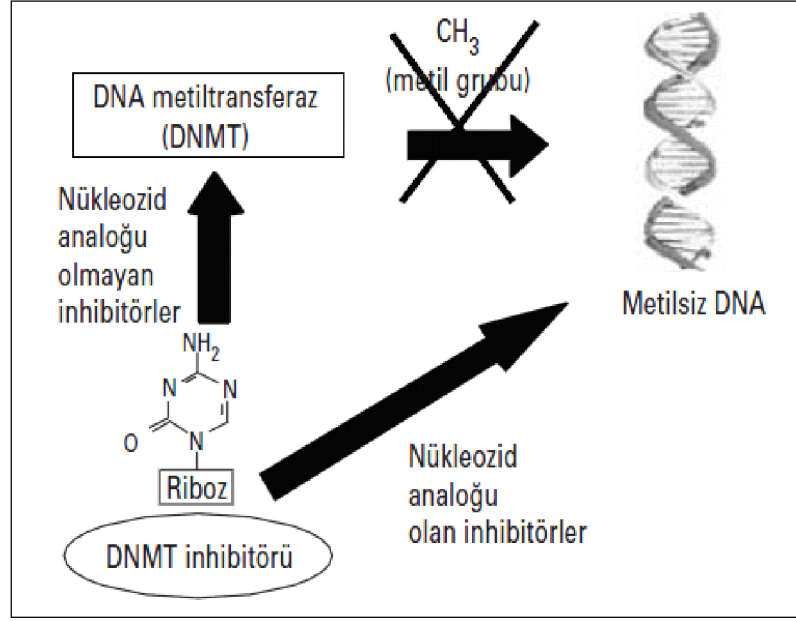
DNA metilasyonu, DNMT'lar tarafından gerçekleştirilen enzimatik bir modifikasyondur. Günümüzde bilinen 5 insan DNMT'si vardır. Bunlar, DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b ve DNMT3L olarak adlandırılmıştır. Bunlardan, amino terminal regülatör bölgesi bulunmayan DNMT2 ve katalitik bölgesi olmayan DNMT3L dışındakilerin hepsinde enzimatik aktivite görülmektedir. DNMT1, gerçek metiltransferazlar olarak da bilinir ve yarı-metillenmiş DNA bölgelerine bağlanırken (Reik ve ark. 2001), DNMT3a ve DNMT3b, de novo metiltransferazlar olarak adlandırılırlar ve yarı-metillenmiş ve hiç metillenmemiş bölgelere bağlanarak metilasyonu gerçekleştirirler (Lei ve ark. 1996). DNMT3L ise DNMT3a ve DNMT3b sekanslarıyla ilişkili olup de novo DNA metilasyonunu indüklemektedir (Chedin ve ark. 2002). DNMT2'nin diğer metiltransferazlar gibi, korunmuş olan metiltransferaz motifini taşıdığı gösterilmiştir ancak aktivitesi görülmemiştir. DNMT1 replikasyon çatalını hedef alır ve mevcut metile olan DNA kalıbınının yeni koplementerini metiller. Bu şekilde metilasyon kalıbı DNA replikasyonu boyunca korunur. Bu nedenle DNA metilasyonu kalıtlanabilir ve epigenetik bir işaret olarak nesiller boyunca mitotik ve mayotik hücre bölünmeleriyle transfer edilebilmektedir.

DNMT enzimleri DNMT inhibitörleri tarafından inhibe edilebilir ve tepkimenin gerçekleşmesi engellenebilir.

1.5.4. DNMT inhibitörleri

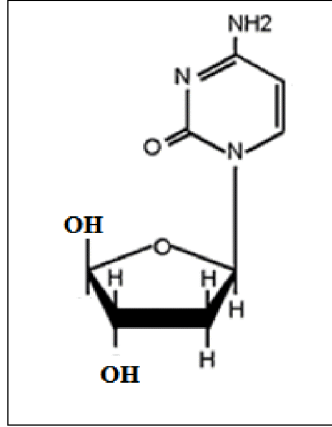
DNMT inhibitörleri etki mekanizmalarına göre, nükleozid analogu olan ve olmayan bileşikler olmak üzere iki sınıfta toplanır. Nükleozid analogları (5-azasitidin, desitabin, 5-floro-2'-deoksisitidin, 5,6-dihidro-5-azasitidin, zebularin) DNA bazlarına benzer bir yapı gösterirler ve replikasyon sırasında yeni sentezlenen zincirin yapısına katılabilirler (Peedicayil 2006). DNA'nın yapısına katılan DNMT inhibitörleri ile DNMT'lar arasında kovalent bağ kurularak, enzimin aktif hale geçmesi ve yeni sentezlenen zincirin metillenmesi engellenir (Egger ve ark. 2004, Miyamoto ve Ushijima 2005). Nükleozid analogu olmayan bileşikler (hidralazin, prokainamid, psammaplin, RG108, EGCG,

MG98) DNA metilasyonunu inhibe ederler, fakat birkaçı klinikte kullanılır. Bunlardan RG108 ve EGCG metiltransferazın aktif merkezine, prokain ve prokainamid ise hedef dizilere bağlanarak enzimin aktivitesini engellemektedir (Brueckner ve Lyko 2004) (Şekil 1.11.) .



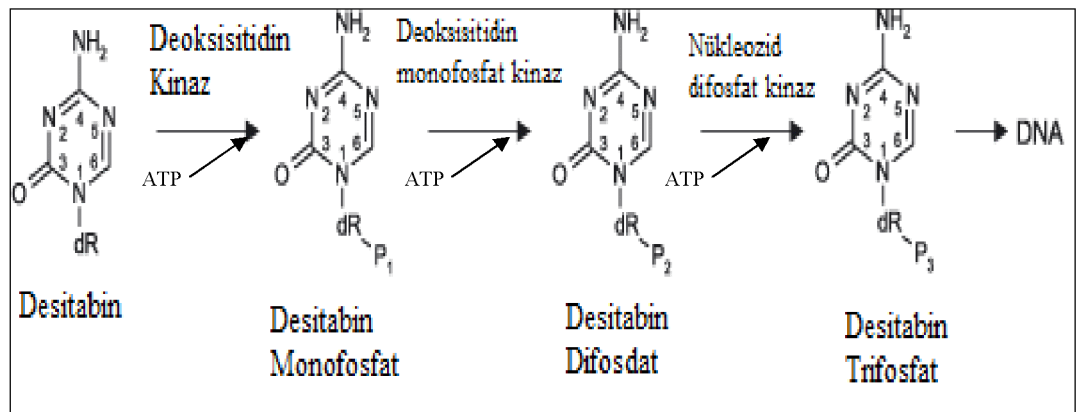
Şekil 1.11 DNA metiltransferaz inhibitörlerinin etki mekanizmaları (Bora ve Yurter 2007).

Desitabin (5-Aza-2'-deoksisitidin), DNMT enzimlerini inhibe eden bir sitozin nükleosit analogudur. Klinik çalışmalar sonucunda desitabinin myelodblastik hastalıklarda ve lösemi tedavisinde kullanımı "Food and Drug Administration" (FDA) tarafından onaylanmıştır ve günümüzde de kullanılmaktadır (Kaminkas ve ark. 2005). Birçok çalışmada desitabinin demetile edici ajan olduğu gösterilmiş (Mund ve ark. 2005, Yang ve ark. 2006) ve hastalarda epigenetik etkisinin kullanılabileceği düşünülmüştür (Gore ve ark. 2006, Matei ve Nephew 2009). Desitabinin kimyasal yapısı şekil 1.12.'de gösterilmiştir.



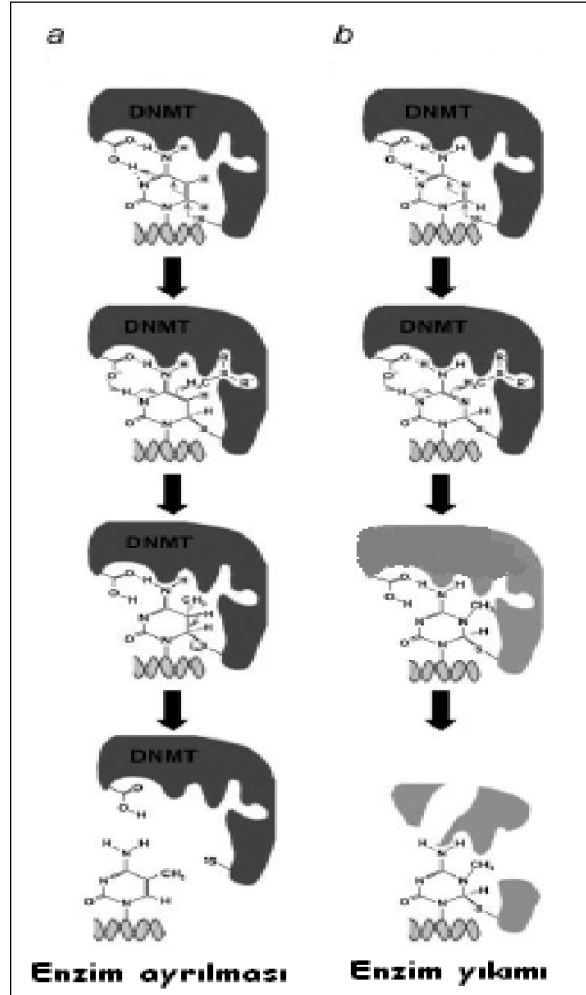
Şekil 1.12 Desitabin'in kimyasal yapısı (Gore ve ark. 2006).

Desitabinin DNMT1 enzimini inhibe mekanizması birkaç basamaktan oluşmaktadır. Desitabin hücre içerisine alındıktan sonra DNA metilasyonunda etkili olan aktif formu, desitabin trifosfata dönüşerek DNA yapısına katılır. Desitabin metabolizmasında ilk basamakta, ATP bağımlı fosforilasyon ile monofosforlanmış nükleotid olan desitabin monofosfat oluşur. Bu tepkime deoksisitidin kinaz enzimi katalizinde gerçekleşir. İkinci adımda deoksisitidin monofosfat kinaz enzimi ile desitabin difosfat dönüşür. En son basamakta nükleozid difosfat kinaz enzimi aracılığıyla desitabin trifosfata dönüşümü tamamlandıktan sonra DNA replikasyon sisteminde substrat olarak DNA yapısına katılır ve sitozin bazı yerine geçer (Ghoshal ve Bai 2007) (Şekil 1.13.).



Şekil 1.13 Desitabin'in DNA yapısına katılım mekanizması (Ghoshal ve Bai 2007).

Desitabin trifosfat DNMT'lar tarafından tanınırlar ve bu noktada nükleofilik bir atak ile metilasyon reaksiyonu başlatılır. Desitabinin 6. karbon atomu ile enzim arasında bir kovalent bağ kurulur (Santi ve ark. 1984). Oluşan bu kovalent bağ iki mekanizma ile kırılabilir. Birincisi kovalent bağ beta eliminasyonu ile kırılır ve DNMT yapıdan ayrılır (Şekil 1.14a.). İkincisi nitrojen varlığında desitabinin 5. karbon atomuna nitrojen girer ve bu DNMT enzimini bloke eder. Böylelikle DNMT enzim fonksiyonu bloke edilmiş olur. Bu tepkime, DNA hasar yollarına sinyal göndererek DNMT enziminin parçalanmasına neden olur (Şekil 1.14b.). Sonuçta replikasyon sürecinde DNA metilasyonu engellenmiş olur (Stresemann ve Lyko 2008).



Şekil 1.14 Desitabin aracılığıyla DNMT enzim inhibisyon mekanizması (Stresemann ve Lyko 2008).

Desitabinin, programlı hücre ölümünün takip ettiği tümör baskılayıcı genlerin reaktivasyonu, hücrel diferansiyasyon ya da hücrel yaşlanmanın uyarılması ile sonlanabilen gen hipometilasyonuna neden olması, son yıllarda epigenetik kanser tedavisinde tercih edilmesine yol açmıştır. Hipermetilasyon sonucunda tümör baskılayıcı genlerin ve kanserle ilişkili diğer önemli genlerin susturulması tümör gelişiminde önemli rol oynamaktadır (Esteller 2007). Hipermetile genlerin belirlenmesi ve bunların demetilasyonları ile yeniden aktif hale dönüşümleri üzerine yapılan pilot çalışmalar hastalara uygulanabilecek epigenetik tedavi bakımından önemli bir yer tutmaktadır. Yapılan çalışmalarda desitabinin myelodoblastik ve lösemi hastalarında p15 tümör baskılayıcı geninin demetilasyonunda ve tekrardan aktifleşmesinde etkili olduğu belirlenmiştir (Daskalakis ve ark. 2002). Östrojen negatif MDA-MB-231 hücrelerinin desitabin uygulamasından sonra demetile olduğu (Ferguson ve ark. 1995) ve yine bu hücrelerde RARb2 geninin desitabin uygulamasından sonra demetilasyon sonucu aktifleştiği gösterilmiştir (Yang ve ark. 2002).

1.5.4. DNA Metilasyonu ve Gen İfadesi

Genlerin promotör bölgelerindeki CpG adacıklarında görülen DNA metillenmesi, kromatin yapısının organizasyonunda ve gen ifadesinin kontrolünde önemli rol oynamaktadır. Aktif kromatin (açık yapı) yani transkripsiyon faktörlerinin ve diğer koaktivatörlerin promotöre bağlanabildiği kromatin yapısı metillenmemiş CpG dinükleotidleri içerdiğine inanılmaktadır. Buna karşın inaktif kromatin (kapalı yapı) yani transkripsiyon faktörlerinin promotöre bağlanamadığı kromatin yapısının metillenmiş CpG dinükleotidleri içerdiğine inanılmaktadır (Dworkin ve ark. 2009). Bir genin metillenme derecesi ile ifade edilme derecesi arasında ters bir ilişki vardır. Yani, düşük derecedeki metillenme yüksek oranda gen ifadesi ile ve yüksek oranda metillenme ise düşük seviye de gen ifadesi ile bağlantılıdır. Ayrıca metillenme dokuya özgüdür ve bir kere gerçekleşince o dokunun bütün hücrelerine aktarılır.

Gen ifadesinin düzenlenmesinde, özellikle genlerin promotör bölgelerindeki metillenme, transkripsiyon faktörlerinin tanıma bölgelerinde değişiklikler meydana getirerek bu faktörlerin bağlanmasını engellemekte ve bu şekilde gen ifadesinin

baskılanmasında rol oynamaktadır. Hücre farklılaşmasıyla beraber farklı dokularda farklı genlerin ifade olmasının temelinde bu düzenleme yatmaktadır

DNA metilasyonun gen ifadesini kontrol etmede 3 olası mekanizma düşünülmektedir.

1-Metillenmiş promotor bölgelerine bağlanabilen proteinlerin hedef dizilere (sekanslara) bağlanarak, esas bağlanması gereken transkripsiyon faktörlerinin buralara bağlanmasını engelleyerek (Mompalao ve Bovenzi 2000).

2-Transkripsiyon faktörlerinin metillenmiş sitozine bağlanmasını engelleyerek (Kass ve ark. 1997).

3-Kromatin yapısını değiştirerek transkripsiyon miktarında bir değişim gerçekleştirerek (Jones ve Takai 2001).

Promotor bölge hipermetilasyonu, transkripsiyon faktörlerinin (AP-2, E2F, c-myc, NF- κ B gibi) promotöre bağlanmasını önleyerek genin susturulmasına neden olabilir. Bunu doğrudan yapabileceği gibi dolaylı olarak metil sitozine bağlanan proteinleri bölgeye çekerek de gerçekleştirebilir (Ducasse ve Brown 2006, Baylin 2005). Doğrudan baskılamada metil sitozindeki metil grubu, DNA'nın büyük oluşuna doğru çıkıntı yaparak tanıma bölgesini tanınmaz hale getirirken; dolaylı yolda, promotöre bağlanacak transkripsiyon faktörlerinin tanıyacağı bölgeler, metilsitozine bağlanan proteinlerle maskelenir (Moss ve Wallrath 2007). Bu proteinlerden biri olan MeCP2, tek bir metillenmiş CpG çiftine bağlanabilen bir bağlanma domaini ve transkripsiyon baskılayan domainine sahiptir. Bu protein sayesinde transkripsiyon faktörlerinin promotöre bağlanması engellenir (Nan ve ark. 1998).

Bu etkilerin dışında biyokimyasal olarak metil grubu eklenmesinin, metil-sitozinin yüksek polaritesi nedeniyle, RNA polimerazların daha yüksek enerjiyle transkripsiyon başlangıç noktasına ulaşabilmesine yol açtığı ve bu şekilde genin ifadesini baskıladığı düşünülmektedir. Ayrıca, DNA'nın büyük oluşuna doğru uzanmış olan metil gruplarının, histonların yerleşimlerini değiştirerek daha kapalı bir kromatin yapısına neden olduğu ve gen ifadesini de bu şekilde baskıladığı öne sürülmüştür (Schmutte ve Fishel 1999).

1.5.5. Metilasyon ve Meme Kanserleri İle İlişkisi

Kanser, genetik ve epigenetik hataların birikimiyle ortaya çıkan ve normal hücrenin metastazik tümör hücresine dönüşmesiyle sonuçlanan çok basamaklı bir olaydır. DNA metilasyonundaki değişiklikler kanserle ilişkili genlerin ifadesinde değişikliklere neden olur. DNA metilasyonu ve kanser arasındaki ilişki ilk kez 1983 yılında ortaya çıkartılmış, kanser hücre genomlarının normale göre hipometile olduğu gösterilmiştir (Feinberg ve Vogelstein 1983, Gama-Sosa ve ark. 1983). Kanser hücrelerinde, genel hipometilasyon yanı sıra bazı özel genlerin promotör bölgelerinin CpG adacıklarında hipermetilasyonlar da gözlenmektedir (Hinshelwood ve Clark 2008).

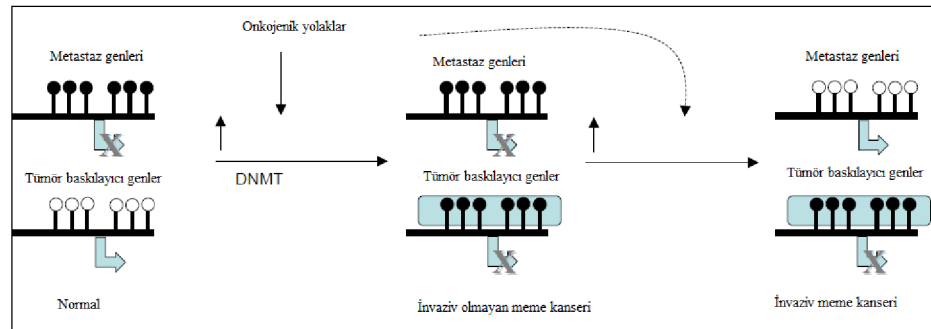
Metilasyonun kanser oluşumuna neden olma mekanizmalarından ilki, 5-metil sitozinin kendisinin, mutasyon oluşturma riskidir. Normalde DNA'da bulunan sitozin, en sık gözlenen mutasyon mekanizmalarından biri olan deaminasyon sonucu urasile dönüşür ve bir RNA bazı olması nedeniyle onarım mekanizmalarınca (urasil glikozilazlar) kolayca tanınarak onarılır. Buna karşılık metil sitozinin spontan deaminasyonu sonucu oluşan timin normalde de DNA'da bulunan bir baz olduğu için onarım mekanizmalarından kaçır (Robertson ve Jones 1997). Tüm genomdaki nokta mutasyonlarının yaklaşık üçte birinden fazlasının CpG adacıklarında gözlenmesi bu etkinin en açık belirtisidir (Bird 1996). İkinci yol ise; özellikle tümör baskılayıcı genlerin ya da imprintinge uğrayan genlerin promotör bölgelerindeki hipermetilasyonun ilgili genin normalden farklı ifade bulmasına yol açmasıdır. Bu şekilde normalden farklı düzeyde çalışan genler, kanser oluşumuna katkıda bulunur. Üçüncü yol ise, genomda gözlenen yaygın hipometilasyonun, tekrar bölgelerindeki rekombinasyon oranında artışa ve genomda kararsızlığa neden olmasıdır.

Kanser sürecinde onkogenler ve tümör baskılayıcı genler iki önemli sınıfı oluşturur. Onkogenler hücre büyümesini ve yaşama süresini arttırmada etkili iken, tümör baskılayıcı genler tam tersi etki gösterirler. Her iki grup gende gözlenen değişiklikler kansere neden olabilir. Onkogenlerde gözlenen değişiklikler onların normalden fazla ifade edilmesine neden olurken tümör baskılayıcı genlerde gözlenen değişiklikler genellikle ekspresyon azalmasına yol açar.

DNA hipometilasyonu onkogenleri aktive eder ve kromozom yapısının kararlılığını yitirmesine neden olurken, DNA hipermetilasyonu tümör baskılayıcı genlerin susturulmasına yol açar. Kanser hücrelerinde tümör baskılayıcı genlerin, hücre döngüsünü kontrol eden ve apoptozisi önleyen genlerin, DNA onarım genlerinin ve gelişim sürecinde etkili yolların normal işlemlerini sağlayan genlerin hipermetilasyon ile susturulduğu bilinmektedir (Zhu ve Yao 2007).

Meme kanserlerinde DNA metilasyonu açısından önemli olan birçok gen tanımlanmıştır. DNA metilasyonu kanser hücrelerinin büyümesi ve metastazın engellenmesini kontrol eden birçok genin kontrolünde rol almaktadır. Tümör baskılayıcı ve metastaz genlerinin susturulmasında bölgesel hipermetilasyon söz konusuysen pro-metastatik genlerin aktivasyonunda genel hipometilasyon görev almaktadır. Meme kanseri tedavisinde yeni epigenetik tedavi yaklaşımı için bölgesel hipermetilasyonun ve hipometilasyon durumlarının çok iyi analiz edilmesi gerekmektedir (Szyf ve ark. 2004).

Normal meme kanseri hücrelerinde tümör baskılayıcı genler aktif halde olup metilasyon içermezler. Metastaz genleri metile olup inaktiftirler. Onkojenik yolların aktivasyonu tümör baskılayıcıları ile spesifik represörlerin interaksiyonuna yol açar. Sonuçta DNMT etkisiyle DNA'da oluşan metilasyon sonucu tümör baskılayıcı ve metastaz genleri metillenir ve invaziv olmayan meme kanseri oluşur. Farklı bir onkojenik yolağın demetilasyon aktivitesine neden olması durumunda ise invaziv karakterli meme kanserlerinin oluşumunu sağlamaktadır. Normal meme hücrelerin farklı karakterde kanserleşmesine yol açan bu mekanizma şekil 1.15.'de gösterilmektedir (Szyf ve ark. 2004).



Şekil. 1.15 Meme kanseri gelişiminde metilasyonun rolü (Szyf ve ark. 2004).

Son on yıldır kanserlerde bölgesel DNA hipermetilasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin susturulması oldukça ilgi çekmiştir ve meme kanserinde hipermetile olan birçok gen belirlenmiştir (Huang ve ark. 1997, Huang ve ark. 1999, Chen ve ark. 2003). Kanser hücrelerinde CpG adacıklarında meydana gelen bu metilasyonların meme kanserlerinin seviyesiyle ve tipleriyle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Buna ilaveten DNA metilasyonu yoluyla susturulmuş birçok metile gen meme kanserlerinin tanısında kullanılmaktadır.

Meme kanserinde önemli olan bazı hipermetile ve hipometile durumundaki genler çizelge 1.1’de gösterilmektedir.

Çizelge 1.1 Meme kanserlerinde epigenetik olarak kontrol edilen bazı genler

| Gen | Genel Adı | Hiper/Hipo | Kaynak |
|-----------------|---|-----------------|---|
| <i>BRCA1</i> | Meme kanser geni 1 | Hipermetilasyon | Bhavani ve ark. 2009, Chan ve ark. 2002 |
| <i>CDH1</i> | E-kadherin | Hipermetilasyon | Graff ve ark. 2000 |
| <i>DAPK</i> | Ölümlle ilişkili protein kinaz | Hipermetilasyon | Lehmann ve ark. 2002 |
| <i>ESR1</i> | Östrojen reseptör 1 | Hipermetilasyon | Widschwendter ve ark. 2004 |
| <i>ESR2</i> | Östrojen reseptör 2 | Hipermetilasyon | Widschwendter ve ark. 2004 |
| <i>PGR</i> | Progesteron reseptör | Hipermetilasyon | Lapidus ve ark. 1996 |
| <i>hMLH1</i> | İnsan mutL homolog 1 | Hipermetilasyon | Murata ve ark. 2002 |
| <i>RASSF1A</i> | Ras ilişkili ailesi 1 | Hipermetilasyon | Dammann ve ark. 2003 |
| <i>TMS1</i> | Metilasyonla İndüklenmiş gen | Hipermetilasyon | Conway ve ark. 2000 |
| <i>RAR-β</i> | Retinoik asit reseptör beta | Hipermetilasyon | Widschwendter ve ark. 2000 |
| <i>p16</i> | Siklin bağımlı kinaz inhibitör 2A | Hipermetilasyon | Herman ve ark. 1995, Feng ve ark. 2009 |
| <i>MGMT</i> | O-6-metilguanin DNA metiltransferaz | Hipermetilasyon | Widschwendter ve ark. 2004 |
| <i>PTEN</i> | Fosfataz ve tensin homolog | Hipermetilasyon | Khan ve ark. 2004 |
| <i>CDKN2A</i> | Siklin bağımlı kinaz inhibitör 2A | Hipermetilasyon | Widschwendter ve ark. 2004 |
| <i>TGF-β R2</i> | Transform büyüme faktör β reseptör 2 | Hipermetilasyon | Widschwendter ve ark. 2000 |
| <i>LINE-1</i> | Tekrarlı sekanslar | Hipometilasyon | Alves ve ark. 1996 |
| <i>BCSG1</i> | Sinüklein (meme kanseri spesifik protein 1) | Hipometilasyon | Gupta ve ark. 2003 |
| <i>uPA</i> | Urokinaz Plasminojen aktivatör | Hipometilasyon | Guo ve ark. 2002 |
| <i>PAI-1</i> | Urokinaz Plasminojen aktivatör inhibitörü 1 | Hipometilasyon | Guo ve ark. 2002 |
| <i>CAVI</i> | Kalveolin 1 | Hipometilasyon | Van den Eynden ve ark. 2006 |

Bu genler arasından apoptozisle ilişkisi açısından *TMS1* ve *DAPK*, metastazla ilişkisi bakımından *uPA* ve *PAI-1*, DNA onarım mekanizması açısından ise *MGMT* genleri ve genel metilasyon göstergesi olan *LINE-1* dizisi çalışmaya alınmıştır.

Kanser gelişiminde oluşan epigenetik değişimlerde apoptozis mekanizmaları önemli rol almaktadır (Jones ve Takai, 2001). Apoptozisle ilişkili birçok genin direk ya da dolaylı olarak metilasyon tarafından kontrol edildiği belirlenmiştir (Gopisetty ve ark. 2006, Conway ve ark. 2000, Esteller 2007, Friedrich ve ark. 2004).

TMS1, apoptozisin düzenlenmesinde ve enflamasyon sinyal yollarında rol alan tümör baskılayıcı gendir. *TMS1*; 16p11.2–12.1 kromozomda lokalize olmakta ve karboksil ucunda kaspaz çalıştıran bölge içeren bir proteini ve apoptotik sinyal molekülleri ile interaksiyon bölgesi içeren proteini kodlamaktadır. Bu bölgeleri içeren proteinler apoptozisin kontrolünde ve immün sistem yollarında rol almaktadırlar. Bu proteinler kanser ve otoimmün hastalıklarla ilişkilidirler (McConnell ve Vertino, 2004, Mirza ve ark. 2007, Conway ve ark. 2000).

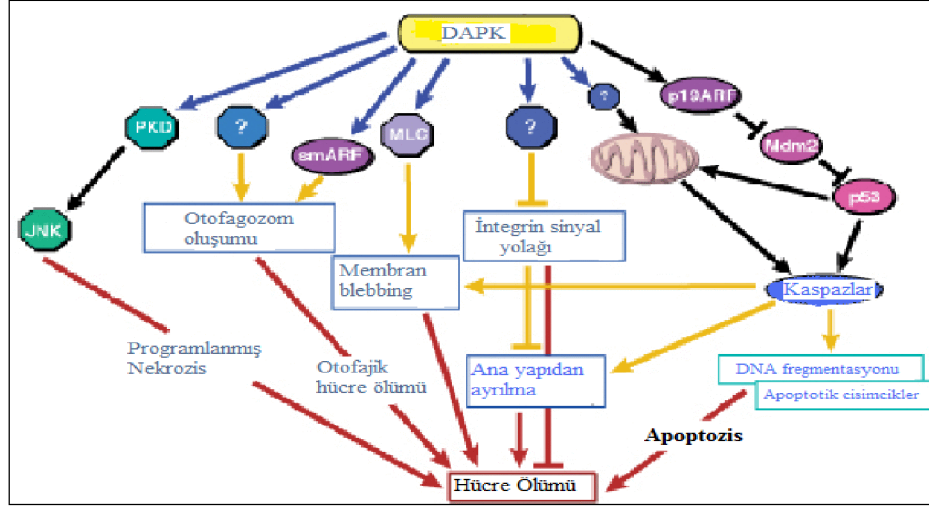
TMS1'in makrofaj ve monositlerde yüksek oranda eksprese edildiği ve doğuştan kazanılan bağışıklıkta rol aldığı belirlenmiştir (Shiohara ve ark. 2002, Stehlik ve ark. 2003). Aynı zamanda epitel hücrelerinde de eksprese olduğu ve hücrelerde oluşan strese karşı TNF- α ve TRAIL gibi ölüm ligandlarını aktive ettiği belirlenmiştir. Ayrıca *TMS1* ekspresyonunun epitel hücrelerinde kaspaz 8'e bağlı ölüm yolağını da indüklediği gösterilmiştir (Parsons ve Vertino 2006, Masumoto ve ark. 2003). Son yapılan bir araştırmada ise meme epitel hücrelerinde *TMS1* ekspresyonunun bazal membran ile integrinlerin arasındaki interaksiyonunu bozarak apoptozis ya da diğer hücre ölümlerini arttırmada rol aldığı belirlenmiştir (Parsons ve ark. 2009).

TMS1 geninin tümör oluşumunda epigenetik olarak susturulma mekanizması halen tam olarak açıklanamamıştır. Normal hücrelerde ve meme hücrelerinde *TMS1* gen promotöründe CpG adacıklarında metilasyon olmayışı ve *TMS1* ekspresyonunun belirlenmesi (Stimson ve Vertino 2002, Kapoor-Vazirani ve ark. 2008), buna rağmen *TMS1* ekspresyonunun meme ve diğer kanserlerde olmayışı tümör gelişimde etkili

olduğunu göstermektedir (McConnell ve Vertino 2004). Meme kanserlerinde *TMS1* geni metilasyon mekanizmasıyla susturulmakta ve hücrelerin apoptozis yolağı indüklenmektedir (Gopisetty ve ark. 2006). Ayrıca meme kanserlerinde *TMS1* geninin epigenetik susturulmasında CpG adacıklarının duyarlı bölgelerinin yeniden düzenlenmesi, histonların hipoasetilasyonu ve DNA hipermetilasyonu etkili olmaktadır (Stimson ve Vertino 2002, Kapoor-Vazirani ve ark. 2008). Son yapılan bir çalışmada da *TMS1*'in CpG adacıklarındaki duyarlı bölgelere bağlanan spesifik bir protein kompleksi belirlenmiş ve bunun kanser hücrelerinde *TMS1* ekspresyonunda önemli olduğu gösterilmiştir (Lucas ve ark. 2009).

Meme, akciğer, ovaryum, prostat, gastrik ve kolorektal kanserlerde *TMS1* geninin hipermetile durumda olduğu belirlenmiştir (Conway ve ark. 2000, Terasawa ve ark. 2004, Das ve ark. 2006, Yokoyama ve ark. 2003). Kanser hücrelerinin demetile edici bir ajanla muamele edilmesi sonucunda *TMS1* geninin tekrar aktifleşerek tedaviyi etkinleştirebildiği belirlenmiştir (Gordian ve ark. 2009).

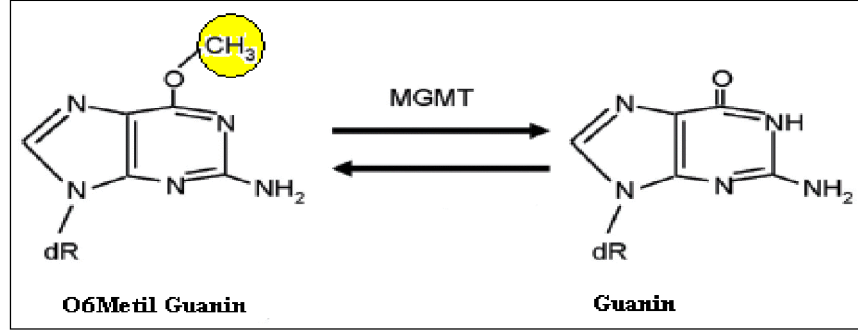
DAPK geni, 9q34.1 kromozomda lokalize olmakta ve ölümlle ilişkili protein kinaz proteinini kodlamaktadır. *DAPK*; Ca^{+2} /Kalmodulin düzenleyici veya Ser/Thr kinaz olarak da bilinir. Programlanmış hücre ölümlerini (apoptozis, otofajik hücre ölümü, programlanmış nekrozis gibi) kontrol eder. Tüm bu metabolik yollarda *DAPK* birçok substrat ve spesifik proteinlerle interaksiyona geçer. *DAPK* miyozin II regülatörleri ile interaksiyonunda fosforilasyon sonucunda apoptozis veya otofajik ölümün göstergesi olan hücrelerde membran küçülmesi gerçekleşerek ölüm yolağına gidilir. *DAPK* fosforilasyonu sonucunda JNK ve kaspas bağımsız nekrotik ölüm yolları aktive olur ve hücre ölüme gider (Bialik ve Kimchi 2006). Yine interferon gama, tümör nekrozis faktör alfa ve Fas, kaspazların aktivasyonu üzerinden apoptosisi arttırarak *DAPK* üzerinden hücreler ölüm yolağına girebilir (Cohen ve ark. 1999, Gopisetty ve ark. 2006). Tüm bu metabolik yollar şekil 1.16.'de gösterilmektedir.



Şekil 1.16 DAPK ölüm sinyal mekanizması (Bialik ve Kimchi 2006).

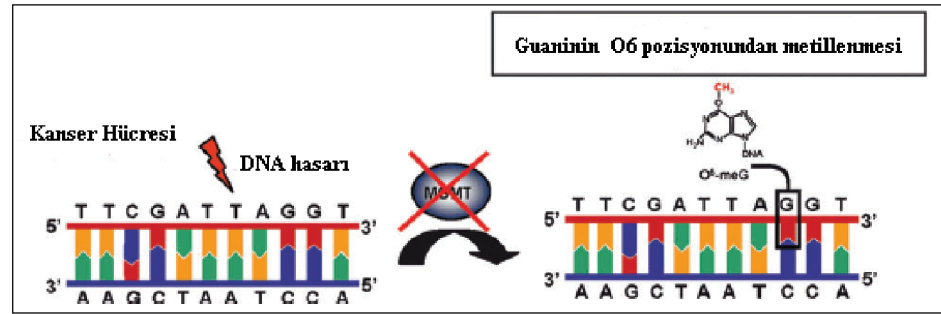
Ayrıca insanlarda metastaz baskılayıcı gen olarak da bilinmektedir. Birçok tümörün metastasında *DAPK* promotör hipermetilasyonu belirlenmiştir. Malignant melenoma, akciğer, meme, ovaryum ve kolon kanserlerinden kaynaklanan beyin metastas örnekleri ve bununla ilgili periferik kan örneklerinde *DAPK* promotör hipermetilasyonu gösterilmiştir (Gonzalez-Gomez ve ark. 2003). Meme, böbrek, mesane, özafagus, akciğer gibi birçok kanserde *DAPK* gen promotörünün metilasyonu kaydedilmiştir (Brabender ve ark. 2009, Wethkamp ve ark. 2006, Dulaimi ve ark. 2004, Lehmann 2002, Hoffmann ve ark. 2009).

MGMT geni; DNA onarım enzimi olan O⁶Metil Guanin Metiltransferaz'ı kodlayan gendir. Bu gen insan 10. kromozomunun uzun kolunun telomerik kısmında yer almaktadır (Natarajan ve ark. 1992). *MGMT* proteini (E.C. 2.1.1.63) DNA'da O⁶-alkil guanindeki alkil (metil, etil, kloroetil grupları gibi) kalıntıları kaldırır ve DNA'da oluşabilecek transversiyon (pürinden pirimidine ya da pirimidinden pürine dönüşümü) mutasyonları engeller (Kaina ve ark. 2007). Yani DNA'yı oluşabilecek spesifik hatalara karşı koruma görevi yapar (şekil 1.17.).



Şekil 1.17 O⁶Metil Guanindeki hataların *MGMT* tarafından onarılması (Kaina ve ark. 2007).

Birçok kanserde *MGMT* geninin promotör hipermetilasyonu sonucunda genin aktif olmadığı ve *MGMT* proteininin sentezlenmediği gösterilmiştir (Brell ve ark. 2005, Esteller ve ark. 2000, Wu ve ark. 2009). Bunların *MGMT* mRNA ekspresyonu ve enzimatik aktivite kaybıyla da ilişkili olduğu belirlenmiştir (Kim ve ark. 2009, Munot ve ark. 2006, Ohno ve ark. 2006, Herfarth ve ark. 1999). İnsan kanserlerinde *MGMT* promotörünün hipermetilasyonu sonucunda transkripsiyonel olarak susturulmasıyla mutasyonel bir reaksiyona neden olur. Sonuçta DNA yapısında ki O⁶-metilguanin oluşumu yapıdan çıkarılamaz ve G:C den A:T transisyonları meydana gelebilmektedir (Şekil 1.18.).



Şekil 1.18 Kanser hücrelerinde *MGMT* metilasyonu sonucu DNA'da oluşan değişim (Jacinto ve Esteller 2007).

Önceki çalışmalar meme, glioma, gastrik ve özafagus kanserleri gibi birçok kanserde *MGMT*'nin belirleyici olabileceği gösterilmiştir (Matsukura ve ark. 2001, Park ve ark. 2001, Cayre ve ark. 2002, Brell ve ark. 2005, Baumann ve ark. 2006). Meme kanseri hastalarında *MGMT* sentezinin olmadığı ve bunun *MGMT* gen metilasyonu ile

ilişkili olduğu gösterilmiştir (Munot ve ark. 2006, Preuss ve ark. 1996, Osanai ve ark. 2005). Son yapılan bir araştırmada meme kanseri türevli beyin metastasında da *MGMT* gen metilasyonu gösterilmiştir (Ingold ve ark. 2009).

uPA ve *PAI-1* genleri insan 8 ve 10. kromozomlarında lokalize olup, metastaz gelişiminde rol alırlar. Kanser hücreleri, ekstrasellüler matriksi yıkabilir invazyon ve metastaza neden olmaktadır. Metastaz tümör gelişimiyle daha başlangıç aşamasından itibaren paralel giden bir olaydır. Fibrinolitik (plazminojen) sistem kanser invazyon ve metastaz mekanizmalarında oldukça önemlidir. Kanser oluşumunda metastaz aşamasında kanser hücrelerinin karşılına çıkan ekstrasellüler matriks ile kontakt kurmaları ve etraflarındaki dokusal bariyerleri kırmaları gerekmektedir. İki proteaz ailesi, plasminojen aktivatör ve matriks metalloproteinazlar ekstrasellüler matriks yıkımında önem kazanmıştır.

Plazminojen sistemin en önemli elemanlarından biri urokinaz plazminojen aktivatör sistemdir. Bu sistem uPA, uPA reseptörü (uPAR) ve PAI-1 ve PAI-2'den oluşmaktadır (Durand ve ark. 2004). uPA, inaktif proenzim plasminojeni aktif enzim olan plazmine dönüşümünü sağlar. Plazmin, fibrini parçalar ve matriks metalloproteinazları aktive eder, sonuçta ekstrasellüler matriksinin parçalanması sağlanır. Böylece kanserli dokularda metastaz süreci aktif olarak başlatılmış olur. uPA'nın proteolitik aktivitesi dışında, tümör anjiogenesis, malignant hücre proliferasyonu, kemotaksis, adezyon, migrasyon, diferensiasyon ve metastaz alanlarının geliştirilmesi, inflamasyon ve yara iyileşmesi sırasında matriksin yeniden düzenlenmesi gibi birçok biyolojik olayda aktif olduğu belirlenmiştir (Ulisse ve ark. 2009).

PAI-1, plazmada ve pek çok dokuda ürokinaz aktivitesinin majör inhibitörüdür. PAI-1'in uPA'ya bağlanması iki basamakta gerçekleşir. uPA ve PAI-1 hızla inaktif reversible kompleks oluşturur, ardından nonkovalent bağlanmış stabil ara ürün oluşur. PAI-1 yavaşça aktif enzim salarak uPA'yı parçalar. PAI-1 uPA'in inhibitörü olmasına rağmen, sinyal iletimi, hücre adhezyonunu ve migrasyonunu yolakları ile invazyon ve metastazı indüklemektedir (Dellas ve Loskutoff 2005, Duffy 2004).

uPA ve PAI-1 ekspersyonlarının meme kanserlerinde metastaz durumlarının belirlenmesinde önemli bir marker oldukları belirlenmiştir (Annecke ve ark. 2008, De Cremoux ve ark. 2009, Pakneshan ve ark. 2004, Duffy 2004). Palmirotta ve ark (2009) yaptıkları çalışmada meme kanseri hastalarında PAI-1 plazma seviyesinin kontrol grubuna göre yüksek olduğunu belirlemiş ve PAI-1 plazma seviyesinin meme kanseri tanısında belirleyici bir faktör olabileceğini göstermişlerdir. Yine rektal kanserlerde PAI-1 seviyesinin belirleyici faktör olabileceği de gösterilmiştir (Angenete ve ark. 2009).

Kanser tedavisinde uPA aktivitesini inhibe edebilmek için birçok yaklaşım geliştirilmiştir. Bunlar arasında en bilinenleri uPA için antagonist peptidler geliştirmek, uPA reseptörünün uPA bağlanmasını engellemek veya *uPA* gen ekspresyonunu engelleyecek gen tedavi seçeneklerini geliştirmektir. Fakat *uPA* inhibitörleri açısından oldukça kısıtlı araştırma bulunmaktadır (Ulisse ve ark. 2009).

Tekrarlı elementler insan genomunun yaklaşık %45'ni oluşturur (Belancio ve ark. 2009) ve transpozonlardan köken alırlar (Weiner 2002). Rastgele olan bu tekrarlar basit ya da kompleks sekanslardan oluşabilir. Bunlar arasında en çok bilinenlerden biri *LINE-1* elementleridir. *LINE-1* elementleri somatik dokularda genellikle metile haldedirler. İnsan kanserlerinde *LINE-1* dizileri genellikle hipometile durumdadır (Kimura ve ark. 2003; Florl ve ark. 2004; Chalitchagorn ve ark. 2004). Birçok klinik çalışmada farklı kanser tiplerini belirlemede *LINE-1* gibi tekrarlı dizilerin metilasyon seviyesinin önemli olduğu belirlenmiştir (Daskalos ve ark. 2009).

1.5.6. Kanserde Epigenetik Tedavi

Genomun epigenetik durumundaki değişikliklerin ters çevrilebilir olması kanser tedavisinde yeni bir umut ışığı yakmaktadır. Epigenetik, sadece kanser tedavisinde değil, tanısında da yeni yaklaşımların gelişmesine katkıda bulunmaktadır (Miyamoto ve Ushijima, 2005). Birçok kanser tipinde, belirli genlerdeki hipermetilasyon ile tanı arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Özellikle, metastaz için E-kadherin geninin promotöründe hipermetilasyonun ön koşul olduğu düşünülmektedir. Çalışmalar

ilerledikçe, tümör baskılayıcı genlerin susturulması gibi bir takım epigenetik değişiklikler malignansi gelişiminin erken evrelerinde, hatta malignant olmayan ya da henüz kanserleşmemiş hücrelerde de saptanmaktadır. Henüz kanserleşmemiş hücrelerde saptanan epigenetik anomaliler, DNA metilasyonunun hastalığın risk değerlendirmesinde kullanılabileceğini göstermektedir.

Bir gen lokusunun epigenetik durumunun belirlenmesinde; gen ifadesinin ölçümü, histon modifikasyonlarının ve histon bileşiminin belirlenmesi ve promotor DNA metilasyonunun incelenmesi, olmak üzere üç temel yaklaşım uygulanmaktadır. Bu yöntemler arasında en güvenilir olarak görüleni CpG adacıklarındaki hipermetilasyonun ölçülmesidir. DNA metilasyon belirteçleri kanserin sınıflandırılması ve saptanmasında kullanılabilir

DNMT'lar ile histon deasetilazlar gibi enzimleri inhibe ederek, tümör baskılayıcı genlerinin epigenetik olarak susturulmasını engelleyebilecek ya da bu genlerin yeniden aktivasyonunu sağlayabilecek yeni kanser ilaçlarının geliştirilmesi üzerine yoğun çalışmalar başlamıştır. Günümüzde, epigenetik inhibisyon için geliştirilmekte olan ilaçların ana hedefleri DNA metil transferazlar ve histon deasetilazlardır.

Epigenetik gen susturulmasında rol alan karmaşık etkileşimler ağı, klinik olarak etkin bir tedavi için çeşitli ilaçların beraber kullanılmasının daha doğru olacağını göstermektedir. Gerçekten de, DNMT'lar ile histon deasetilazların inhibitörlerinin birlikte kullanımının epigenetik olarak susturulmuş genlerin yeniden aktivasyonunda başarılı sonuçlar verdiği görülmüştür. Ayrıca bunların kemoterapi, radyoterapi gibi çeşitli sitotoksik ajanlar ile kombine olarak da uygulanabilmektedir (Dworkin ve ark. 2009).

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Desitabin ve Anti kanser İlaçların Hazırlanışı

Desitabin (Sigma-A3656) Sigma firmasından alındı (St. Louis, MO). 5-FU (EBEWE Pharma, Avusturya), 4-HC (NIOMECH, Almanya) ve epirubisin (EBEWE Pharma, Avusturya) antikanser ilaçları Uludağ Üniversitesi Onkoloji Bölümünden temin edildi. Desitabin RPMI 1640 besiyeri ortamı içerisinde 1.25, 2.5, 5 ve 10 μ M dozlarında hazırlandı. Antikanser ilaçların stok konsantrasyonları PBS (fosfatlı tuzlu tampon) içerisinde, aşağıda belirtilen meme kanseri tedavisinde kullanılan konsantrasyonlarda hazırlandı. Stok konsantrasyonlar kültür besiyeri olan RPMI 1640 içerisinde seyreltildi. Hazırlanan tüm ilaçlar filtre edilerek steril hale getirildi. Her bir ilaç, önceden tanımlanan TDC olarak belirlenen dört farklı konsantrasyonda hazırlandı. TDC farmakokinetik ve klinik değerlendirme bilgileri ile belirlenmiş ve kabul edilmiş ilaç konsantrasyon birimidir (Andreotti ve ark. 1995). Meme kanseri hastalarında standart FEC tedavisi uygulandıktan sonra plazma ilaç konsantrasyonu olarak %100 TDC tanımlanmıştır (Kurbacher ve ark. 1998). Böylece %100 TDC FEC (μ g/mL'de) aşağıda belirtilen anti kanser ilaç dozlarının kombinasyonundan elde edildi.

5-FU: 22.50 μ g/mL

Epirubicine: 0.50 μ g/mL

4-HC: 3.0 μ g/mL

Hücre kültürü deneylerinde kullanılan diğer FEC ilaç kombinasyon konsantrasyonları: (%200 TDC, %50 TDC ve %25 TDC) %100 TDC FEC konsantrasyonu standart alınarak hazırlandı.

2.2. Hücre Kültürü

Hücre kültürü, hücrelerin kontrollü şartlar altında yetiştirilmesi sürecidir. Ticari olarak Amerika Hücre Kültür Koleksiyonundan satın alınan MDA-MB-231 ve MCF-7 insan meme kanser hücre soyları kriyovial denemeler için kaplar içerisinde -196°C 'de sıvı nitrojen tankında saklandı. Kullanılan hücre soylarının özellikleri aşağıda belirtilen şekildedir.

MDA-MB-231 Hücre soyu:

- ▶ İnsan meme kanseri hücre soyu
- ▶ Östrojen reseptörü (-)
- ▶ E-kaderin (-)
- ▶ Kaspaz 2: (+), Kaspaz 3: (+)
- ▶ Yüksek oranda yayılabilir

MCF-7 Hücre soyu:

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

Hücreler çoğaltmak amacıyla -196°C 'den alınarak sıcak su banyosunda hızlı bir şekilde çözüldü. Kriyovialin içindeki hücre süspansiyonu 5 ml besiyeri içeren falkon tüpe yavaşça aktarıldı. Tüp 800 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra üst sıvı kısmı atıldı. Hücre pelleti 1 ml hücre besiyeri ortamı içerisinde iyice çözüldükten sonra üzerlerine 4 ml besiyeri eklendi. 5 ml'lik hücre süspansiyonları 75 cm^2 'lik kültür kabına aktarıldı. Ertesi gün hücre besiyeri ortamı yenilenerek hücrelerin büyümeleri sağlandı. Kültür kabı her gün mikroskop altında kontrol edildi ve hücrelerin kültür kap yüzeylerini tamamen kaplamış (konfluent) olduklarında tripsinizasyon işlemi ile daha büyük hacimli kültür kaplarına aktarıldı. Tripsinizasyon işlemi için konfluent hücrelerin üzerindeki besiyeri aspire edilerek uzaklaştırıldı. Hücrelerin serumdan arındırılmak için PBS ile yıkandı. PBS aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra hücrelere 0.5 ml tripsin solüsyonu eklenerek 37°C 'de, %5 CO_2 'li ortamda inkübe edildi. Mikroskop altında

hücre kabından ayrıldığı kontrol edilen hücelere 5 ml besiyeri ortamı eklenerek hücre süspansiyonu falkon tüpe aktarıldı. Tüp 800 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra üst sıvı kısmı atıldı. Elde edilen Hücre pelleti 1 ml hücre besiyeri ortamı içerisinde iyice çözüldükten sonra üzerlerine 9 ml besiyeri eklendi. 10 ml'lik hücre süspansiyonları 125 cm²'lik kültür kabına aktarıldı. 37⁰C'de, %5 CO₂'li ortamda kültüre edildi. Bu şekilde hücrelerin istenilen sayıya ulaşınca kadar çoğaltılmaları sağlandı.

2.2. 1. Kullanılan Besiyerleri, Sıvıların Hazırlanması

MDA-MB-231 Hücre soyu için kullanılan besiyeri ortamı için %5 Newborn calf serum (Hyclone USA), %1 L-glutamin (292.3 mg/ml) (EuroClone Europe), %1 Penisilin-G (100 U/ml)-Streptomisin (100µg/ml), (Hyclone, USA) içeren RPMI 1640 (Hyclone, USA) solüsyonu kullanıldı.

MCF-7 insan meme kanseri hücre soyu için %10 Fetal bovin serum (Biochrom AG, Berlin, Almanya), %1 Penisilin-G (100 U/ml) Streptomisin (100µg/ml), (Hyclone, USA) içeren RPMI 1640 (Hyclone, USA) solüsyonu kullanıldı.

2.2. 2. Hücrelerin Sayılması ve İlaçların Uygulanması

Hücreleri sayabilmek amacıyla tripsinizasyon işlemi sonucunda elde edilen hücre süspansiyonundan 20 µl alınarak ependorf tüpe alındı. Üzerine eşit miktarda Tripkan Blue boyası konarak iyice karışması sağlandı. Bu karışımdan 12 µl alıp thoma lamına konarak thoma lamından 5 bölme sayıldı. Bulunan sayı sulandırma katsayısı ile çarpılarak 1 ml medyumda ne kadar hücre olduğu bulundu.

Kültüre edilen hücelere kimyasal ve anti kanser ilaç grupları aşağıda belirtilen şekilde belirlendi.

1. Kontrol Grubu (İlaç uygulanmamış)
2. Desitabin Grubu (DAC- gen demetile edici ajan uygulanmış)
3. FEC Grubu (5-florourasil+Epirubisin+4-Hidroksisiklofosfamid ilaç kombinasyonu uygulanmış)
4. FEC+DAC Grubu

2.3. Metiltiazoltetrazolium (MTT) Canlılık Metodu

Bu yöntemin prensibi, hücre kültüründe büyütülen hücrelerdeki dehidrogenaz enzim aktivitesinin kolorimetrik ölçülmesi esasına dayanır. Yaşayan hücrelerde normalde bu enzimin aktivitesi gözlenirken, ölen hücrelerde gözlenmemektedir. Total dehidrogenaz aktivitesi ile hücre sayısı arasında doğru ilişki olduğu Mosmann ve ark. (1983) tarafından gösterilmiştir. Böylece, ortama konulan ilaçlara yanıt olarak eğer hücreler ölürse, enzim aktivitelerinin azaldığı veya kaybolduğu gözlenir. Bunun için, hücreler bu enzimlerin değişime uğrattığı 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolimbromid (MTT) maddesine maruz bırakılırlar. MTT maddesi, yaşayan hücreler tarafından alınıp sitoplazmalarındaki bu enzimler tarafından suda çözünmeyen koyu mavi renkli formazon bileşiğine (kristallerine) dönüştürülürler. Ardından bu kristaller SDS (eritici tampon) kullanılarak suda çözünür hale getirilirler ve oluşturdukları renk şiddeti spektrofotometre ile ölçülür. Başlangıçta aynı sayıda ekilmiş ve hiç ilaç almamış kontrol hücrelerindeki renk şiddeti ile oranlanarak ilaca maruz bırakılmış hücrelerdeki ölüm oranı (yüzdesi) bulunmuş olur.

MTT testi için, MDA-MB-231 ve MCF-7 hücreleri sayılarak 200µl besiyeri içerisinde 5×10^3 hücre/kuyucuk olacak şekilde (3 tekrarlı) 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekildi. 24 saat 37°C, %5 CO₂'li ortamda inkübasyonu takiben yapışmış olan hücreler zedelemekten üzerlerinden 100µl besiyeri uzaklaştırıldı. %25, %50, %100 ve %200 TDC konsantrasyonlarında hazırlanan FEC ilaç kombinasyonu ve 1.25, 2.5, 5, 10µM konsantrasyonunda desitabin 100µl olacak şekilde üzerlerine uygulandı. İlaç uygulamasını takiben hücreler 24 ve 48 saat inkübasyona bırakıldı. Hücrelerde 1M H₂O₂, ölümün negatif kontrolü (minimum canlılık, MI) olarak kullanıldı. Pozitif kontrol (maksimum canlılık, MO) olarak sadece besiyeri ortamı içerisinde ekilen hücreler kullanıldı.

MTT kimyasalı 5 mg/ml PBS tamponu içerisinde pH 7.2 olacak şekilde stok olarak hazırlandı. Hazırlanan MTT çözeltisi filtre edilerek steril hale getirildi. 24 ve 48 saat sonra MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerine her bir kuyucuğa 25 µl MTT çözeltisi eklendikten sonra hücreler 37°C'de 4 saat süreyle karanlıkta inkübasyona bırakıldı.

Oluşan formazon bileşiklerini çözünür hale getirebilmek için bütün kuyucukların üzerine %10'luk SDS solüsyonundan 100µl olacak şekilde eklenerek 18 saat, 37°C'de %5'lik CO₂'li etüvde inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda hücrelerde oluşan renk şiddeti spektrofotometrede (FLASHScan S12, Jena, Almanya) 570nm dalga boyunda ölçüldü. Okunan absorbanlar kullanılarak hücrelerin % canlılık oranları hesaplandı.

% Canlılık hesabı:

MTT testi sonunda yaşayan hücrelerde koyu mavi farmazon kristalleri gözlemlendi, buna karşılık ölen hücrelerde bu kristaller gözlenmedi. İlaç uygulanan hücrelerin canlılıkları (Örnek C) ilaç uygulanmamış kontrol hücreleri referans alınarak hesaplandı ve bu değer %100 canlılık (Maksimum canlılık, MaxC) olarak belirlendi. Hidrojen peroksit (H₂O₂) uygulanan hücreler, minimum canlılık seviyesinin (Minimum canlılık, MinC) hesaplanmasında referans olarak alındı. Tüm bu değerler ile aşağıdaki formül kullanılarak hücrelerde inkübasyon süresi sonunda oluşan % canlılık oranları hesaplandı.

$$\text{Canlılık (\%)} = [100 \times (\text{ÖrnekC} - \text{MinC}) / (\text{MaxC} - \text{MinC})].$$

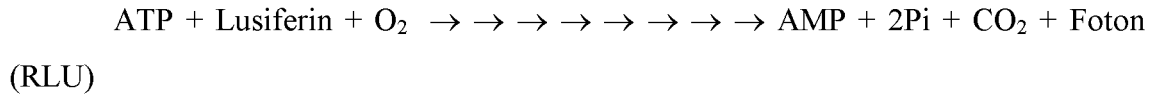
2.4. ATP Canlılık Testi

ATP testi hücre içerisindeki intraselüler ATP içeriğinin ölçülmesi esasına dayanan yüksek duyarlılığa sahip bir yöntemdir (Andreotti ve ark. 1995). İntraselüler ATP içeriğinin seviyesi yaşayan hücrelerin sayısının belirlenmesinde kullanılan bir göstergedir.

Bu yöntemde MDA-MB-231 ve MCF-7 hücreleri sayılarak 200µl besiyeri içerisinde 1×10^4 hücre/kuyucuk (3 tekrarlı) olacak şekilde 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekildi. 24 saat 37°C, %5'lik CO₂'li ortamda inkübasyonu takiben yapışmış olan hücreler zedelemekten üzerlerinden 100µl besiyeri uzaklaştırıldı. %25, %50, %100 ve %200 TDC konsantrasyonlarında hazırlanan FEC ilaç kombinasyonu ve 1.25, 2.5, 5, 10 µM konsantrasyonunda desitabin 100µl olacak şekilde üzerlerine uygulanarak hücreler 24 ve 48 saat inkübasyona bırakıldı. Hücrelerde 1M H₂O₂, ölümün pozitif

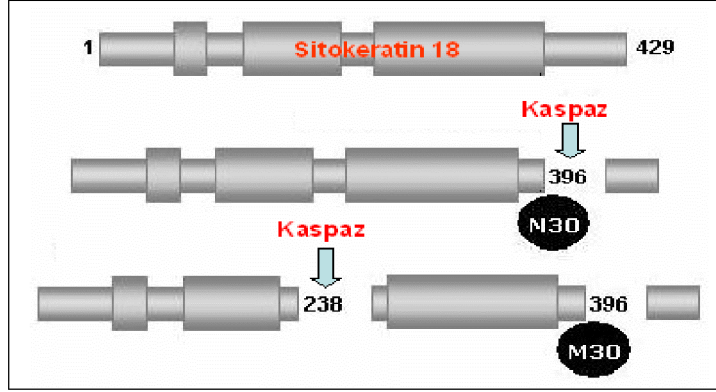
kontrolü olarak kullanıldı. Negatif kontrol olarak sadece besiyeri ortamı içerisinde ekilen hücreler kullanıldı. 24 ve 48 saatlik inkübasyonların sonunda intraselüler ATP içeriği ATP kiti (DCS Innovative Diagnostika-Systeme, Hamburg, Almanya) kullanılarak belirlendi. ATP-kitinin içinde yer alan hücre lizis tamponu kullanılarak (50µl/kuyucuk) hücre içerisindeki ATP elde edildi. 30 dakikalık bekleme süresini takiben, hücre kültür süspansiyonundan 50µl beyaz renkli 96 kuyucuklu ekim kaplarına aktarıldı ve ardından 50µl/kuyucuk lusiferin-lusiferaz enzimi içeren solüsyon ilave edildi. Sonuçta, elde edilen ATP miktarı aşağıda formüle edildiği şekilde lusiferin-lusiferaz bioluminesans reaksiyonu yardımıyla ölçme zamanı 1 saniye olacak şekilde luminometre (Bio-Tek, Winooski, USA) kullanılarak ölçüldü. Sonuçlar rölatif ışık ünitesi (RLU) olarak verildi. Böylece ilaç uygulanan ve uygulanmayan hücrelerin RLU değerlerine göre ilaçların sitotoksik etkileri hakkında bilgi edinildi.

Lusiferaz



2.5. M30 Antijen (kaspazla kırılmış sitokeratin 18) Metodu

Sitokeratinler (CK), kanser tanısında kullanılan intermediyat filament protein ailesine ait proteinlerdir. Apoptozis esnasında sitoskeletonin önemli bir proteini olan CK18 sadece apoptotik hücrelerde aktifleşen bir enzim grubu olan kaspazların etkisiyle kırılarak kırılmış CK18'i (CK18-Asp396) oluşturmaktadır (Leers ve ark. 1999). M30 monoklonal antikor, özellikle CK18'in Asp396'da kırılan fragmanını (M30 antijen) tanıyarak CK'lerin apoptotik bir belirteç olarak kullanımını sağlamaktadır (Şekil 2.1.) (Ueno ve ark. 2003). Böylece apoptozise özgü bir belirteç olan kırılmış CK18 ELISA yöntemiyle saptanmaktadır. Bu özel CK18'i tanıyan M30 antikor hücrelerin bulunduğu ortamla temas ettirilirse ve eğer ortamda apoptotik hücreler de varsa, apoptozisin varlığı gösterilmiş olur.



Şekil 2.1 CK18'in kaspazlar ile kırılması ve M30 antikorunun bu bölgeleri tanması.

Basit olarak, ELISA metoduyla M30 antijen fragmentini belirlemek için MDA-MB-231 ve MCF-7 hücreleri sayılarak 200µl besiyeri içerisinde 5×10^3 hücre/kuyucuk olacak şekilde (3 tekrarlı) 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekildi. 24 saat 37°C, %5'lik CO₂'li ortamda inkübasyonu takiben hücreler zedelemeyen üzerlerinden 100µl besiyeri alındı. Meme kanser kemoterapisinde kullanılan %100 TDC FEC ilaç kombinasyonu, 10µM desitabin ve %100 TDC FEC+10µM desitabin seçenekleri 100µl olacak şekilde hücrelerin üzerlerine uygulandı. İlaç uygulamasını takiben hücreler 24 ve 48 saat inkübasyona bırakıldı. Hücrelerde 1M H₂O₂, ölümün pozitif kontrolü olarak kullanıldı. Negatif kontrol olarak sadece besiyeri ortamı içerisinde ekilen hücreler kullanıldı.

24 ve 48 saatlik inkübasyonlardan sonra tüm kuyucuklara 10 µl %10'luk Triton-X 100 ilave edildi. 15 dakika oda sıcaklığında 600 rpm'de çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Tüm kuyucuklardaki süpernatant toplandı. 2000 rpm'de 30 sn santrifuj edilip M30 Apoptosense ELISA (M30-Apoptosense ELISA kit, Peviva, Bromma, İsveç) kit içeriğine uygun olarak çalışıldı. Süpernatantlar kitin içinden çıkan CK18'i tanıyan fare monoklonal M30 antikoruna kaplı striplere 25µl pipetlendi. Tüm örnekler 75µl horseradish peroksidaz konjugatı eklendi. 4 saat boyunca 600 rpm çalkalayıcıda oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda örnekler 250µl yıkama tamponu eklenerek 5 kez yıkama yapıldı. Daha sonra 200µl TMB substratı ilave edilerek 20 dakika karanlıkta oda sıcaklığında bekletildi. Reaksiyonu durdurmak için 1N H₂SO₄ içeren 100µl stop çözeltisi ilave edildi ve oluşan renk şiddeti spektrofotometrik olarak 450nm'de (FLASHScan S12, Jena, Almanya) okundu.

Hesaplama standart eğri grafiği kullanılarak elde edilen absorbanlar üniteye (U/L) çevrilerek M30-antijen değerleri belirlendi.

2.6. DNA İzolasyonu

MCF-7 ve MDA-MB-231 insan meme kanseri hücreleri 6 kuyucuklu hücre kaplarına 500.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi. Bir gecelik inkübasyon süresinden sonra hücrelere belirlenen ilaçlar uygulandı. 48 saat inkübasyon süresi sonunda hücreler ve süpernatantlar toplandı. 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek pellet elde edildi. DNA izolasyonu için PureLink™ Genomic DNA Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany) kullanıldı. Hücrelerden elde edilen pellete 300µl PBS eklenerek hücre süspansiyonu elde edildi. Hücre süspansiyonlarına 900µl lizis solüsyonu eklenerek hücreler lizis edildikten sonra 14.000g'de 30 sn santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırılarak pellet elde edildi. Elde edilen pellete 300µl hücre lizis solüsyonu eklenerek pipetenaj yapıldı ve 100µl protein çöktürücü solüsyon eklenerek 20 sn yüksek hızda vorteks ile karıştırıldı. 14.000g'de 1 dakika santrifüj işleminden sonra elde edilen süpernatant toplanarak üzerine 300µl izopropanol eklendi. Bu aşamada alt üst edilerek DNA iplikçik halinde gözlemlendi. Örnekler 300µl %70'lik etanol eklenerek birkaç kez karıştırıldı ve tekrar 14.000g'de 1 dakika santrifüj işleminden sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Örnekler 100µl DNA hidrasyon solüsyonu eklenerek karıştırıldı. 65°C'de 15 dakika inkübe edildikten sonra oda sıcaklığına alınan örneklerden DNA ölçümleri spektrofotometrede (CECIL, 2000) yapıldı. DNA ölçümleri için OD_{260}/OD_{280} spektrofotometrik ölçüm kullanıldı. Tüm örneklerden eşit miktarda DNA örneği alınarak metilasyon spesifik PCR ve real-time PCR metotlarında kullanıldı.

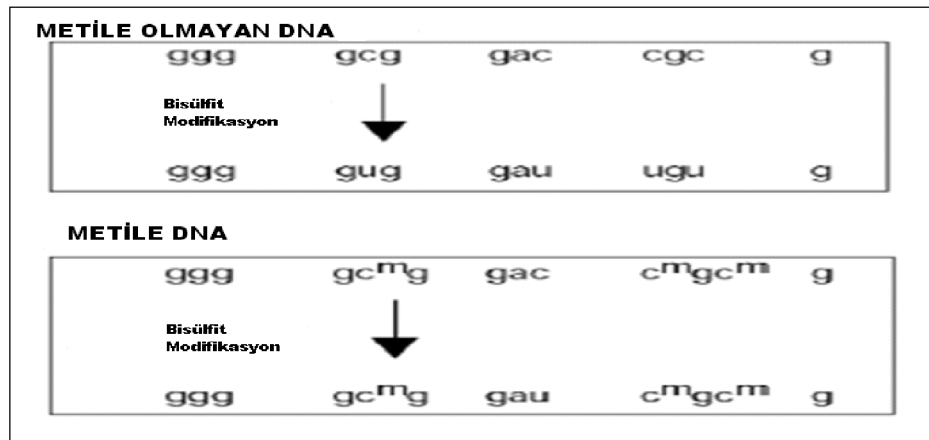
2.7. Metilasyon Spesifik PCR (MSP)

MSP ilk olarak Herman ve ark. (1996) tarafından tanımlanmış gen metilasyon seviyesinin tespit edilmesi için uygulanan bir tekniktir. Bu metoda amaç, metile ve metile olmayan hücreleri içeren karışık hücre popülasyonundan metillenmiş soyları tespit edebilmektir. Üç aşamadan oluşan bir metottur.

- 1) Bisülfıt modifikasyon
- 2) PCR ile DNA çoğaltılması
- 3) Jel elektroforezi

1) Bisülfıt Modifikasyon:

Bu teknik, genomik DNA'daki bir tek 5-metil sitozinlerin bile ortaya çıkarılması için mükemmel bir araçtır. Metod tek iplikçikli DNA'daki bütün sitozinleri sodyum bisülfıtın urasil'e deamine etmesi temeline dayanır. Bu sırada 5-metil sitozinler değişmeden kalırlar (şekil 2.2.) (Hayatsu 2008). Daha sonra bu modifiye DNA, değiştirilmiş dizi için spesifik olan bir primer seti kullanılarak PCR ile amplifiye edilir. Bu amplifikasyonda tüm urasiller (değiştirilmiş sitozinler) timin olarak amplifiye olurken, yalnızca 5-metil sitozinler sitozin bazı olarak kalırlar. Amplifiye olmuş dizilere direkt ya da her bir molekülün klonlanmasından sonra dizi analizi yapılabilir (Herman ve ark. 1996). Bisülfıt metodu, 5-metil sitozin içeren DNA ve genlerin metilasyon derecelerinin analizi için yeni tekniklerin geliştirilmesine de olanak sağlamıştır (Grigg ve Clark, 1994).



Şekil 2.2 Bisülfıt Modifikasyon tepkimesi (Hayatsu 2008).

İlk aşamada elde edilen DNA örneklerinin bisülfid modifikasyonları için CpGenome™ Universal DNA Modifikasyon Kiti (Chemicon International, Canada, USA) kullanıldı. Tüm örneklerin DNA miktarları hesaplandıktan sonra örneklerden alınan 1 µg DNA 100 µl suda seyreltildi. Üzerine 3M NaOH çözeltisinden 7 µl eklendi ve vorteks ile karıştırıldı. Örnekler 50 °C'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda örneklere kit içerisinde bulunan DNA modifikasyon solusyonu 1'den 550 µl eklendi ve 50 °C'de 10 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda örneklere 5 µl DNA modifikasyon solusyonu 3'den 5 µl ve DNA modifikasyon solusyonu 2'den 750 µl eklendi eklendi. Örnekler oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra örnekler 5000 rpm'de 10 saniye santrifüj edilerek pellet elde edildi. Örneklere 1 ml %70'lik etil alkol eklenerek tekrar santrifüj edildi. Bu işlem üç kez tekrarlandıktan sonra örnekler yüksek hızda 2 dakika santrifüj edilerek pellet elde edildi. Tüm örneklere 50 µl 20mM NaOH eklendi ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra örnekler 5000 rpm'de 10 saniye santrifüj edilerek pellet elde edildi. Örneklere 1 ml %90'lık etil alkol eklenerek tekrar santrifüj edildi. Bu işlem bir kez daha tekrarlandıktan sonra örnekler yüksek hızda 3 dakika santrifüj edilerek pellet elde edildi. Tüm örneklere 25 µl solüsyon (10mM Tris-HCL, 0.1 mM EDTA, pH:7.5) eklenerek 55 °C'de 15 dakika inkübasyona bırakıldı. Örnekler yüksek hızda 3 dakika santrifüj edilerek elde edilen modifiye DNA örnekleri MSP yönteminde kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

2) PCR ile DNA Çoğaltılması

İkinci aşamada Metilasyon Spesifik Primer Seti ile PCR yapıldı. MSP yönteminde primerlerin dikkatli seçilmesi çok önemlidir çünkü hem metillenmiş hem de metillenmemiş primer çiftleri ile yanlış pozitif sonuç elde etmek olasıdır ve bu da sonuçları değerlendirmeyi oldukça zorlaştırır.

Metilasyon spesifik PCR sisteminde *DAPK* ve *TMS1* genleri için CpG WIZ *TMS1/ASC* ve DAP-kinase Amplification Kitleri (Chemicon International, Canada, USA) kullanıldı.

MSP sisteminde kullanılan kitlerde genler için özel dizayn edilmiş primer setleri kullanıldı. Bu setler;

U primer seti: Kimyasal modifikasyon sonunda metile olmayan DNA'ya bağlanır

M primer seti: Kimyasal modifikasyon sonunda metile olan DNA ya bağlanır

W primer seti: Kimyasal modifikasyon etkinliğini gösteren kontrol olarak kullanılan primer setidir. Kullanılan primerin 5'-3' sekansları ve PCR ürün miktarları bç olarak Çizelge 2.1'de verilmiştir.

PCR sisteminde toplam miktar 25µl olacak şekilde 23µl mastermix ve 2µl (50ng/µl) modifiye DNA kullanılarak *DAPK* ve *TMS1* genlerindeki metilasyon seviyeleri kalitatif olarak belirlendi.

PCR için kullanılan Master Mix aşağıda belirtilen çözeltilerin karışımından oluşmaktadır.

2.5µl 10X Universal PCR buffer

2.5µl dNTP Karışımı

1µl U, M ya da W primeri

0.2µl (1 Unite) Taq Polimeraz

16.8µl H₂O

PCR için öncelikle 95°C'de, 5 dakika ön denatürasyon yapıldıktan sonra aşağıda belirtilen 40 döngülük program kullanıldı:

95°C'de, 45 saniye Denatürasyon

56°C'de, 45 saniye Bağlanma

72°C'de, 60 saniye Sentez.

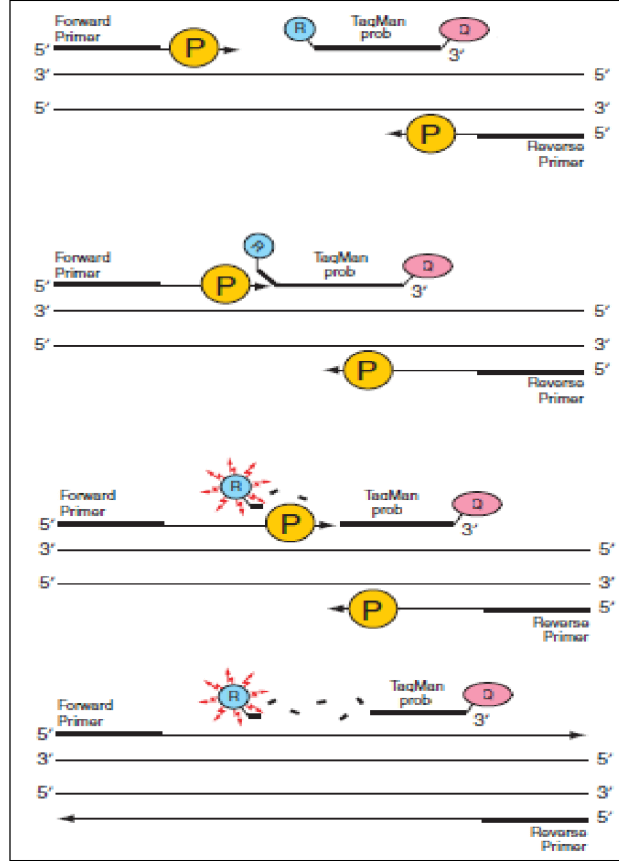
3) Jel elektroforezi

PCR tamamlandıktan sonra PCR ürünlerinin kontrolü 1X TBE tampon çözeltisi ile hazırlanan 1µg/ml olacak şekilde etidyum bromid ilave edilen %2'lik (w/v) agaroz jel ile 150 ile 170 V arasında değişen akımlar altında 30 dakika süreyle elektroforeze tabi tutularak yapıldı. Kontrol olarak da 100 bç'lik DNA kullanıldı.

2.8. TaqMan Real-time PCR ile Gen Promotörlerinin Metilasyon Seviyelerinin Belirlenmesi

TaqMan Realtime PCR sistemi dünyada sıkça kullanılan, oldukça duyarlı ve güvenilir bir metoddur (Yoshimura ve ark. 2005). Özellikle gen metilasyonlarının tespit edilmesi için uygulanan oldukça hassas bir tekniktir. TaqMan uygulamalarında bilinen termal saykıl parametreleri ve PCR reaksiyon şartları kullanılır. Bu yöntemde çoğaltılmak istenilen DNA'ya komplementer olan ve floresan işaretlenmiş tek zincirli bir prob içerir. TaqMan problemleri primerlerden daha uzun oligonükleotidlerdir (20-30 baz uzunluğunda ve Tm dereceleri 10°C daha fazladır). Bunlar genellikle 5' ucunda floresan işaret molekül ("Reporter"= "fluorophore", çoğunlukla 6-karboksifloresin= 6-FAM) ve 3' ucunda da bastırıcı ("quencher"; çoğunlukla 6-karboksitetrametil-rodamin= TAMRA) bağlı bulunmaktadır. Floresan işaretli probda olması gerekli bir özellik 5' ucunda G taşınmamasıdır. İyi dizayn edilmiş TaqMan problemleri çok az optimizasyon gerektirir. Problemler PCR esnasında bozulmazlar ve her döngüde tekrar bağlanarak ışınım yapabilirler. Uyarılan floresan molekülün enerji transferi, yakınındaki bastırıcı molekülünden daha fazla olduğunda ışınım meydana gelir (FRET). Böylece reporter ve quencher moleküllerin yakınlığı ışınımı bastırır. 3' uçtaki bastırıcı molekül boyası 5' uçtaki reporter boyasının sinyal oluşturmasını engellemektedir.

Çoğaltılma sırasında hedef nükleik asit soyu üzerinde primerler bağlanma bölgeleri arasında TaqMan probu bağlanır. Probu 5' ucunda floresan reporter (R) ve 3' ucundaki floresan quencher (Q) bağlıdır. TaqMan problemleri, PCR ürününün iç bölgesine bağlanacak şekilde dizayn edilirler. Primerlerin bağlanmasının ardından yeni zincir oluşmaya başlar. Polimeraz DNA üzerinde replikasyon yaparken TaqMan probun 5' ucuna geldiğinde 5'→3' eksonükleaz aktivitesiyle probu kırar. Serbest kalan reporter molekül ışınım yapar (quencher molekülünden uzaklaştığı için). DNA zincir sentezi uzamaya devam eder. Her bir döngüde ürün çoğaltımı arttıkça ışınım (floresanda) ona bağlı olarak artmaya devam eder. Bu ışınım, her döngüde kırılan prob sayısı ile orantılı olarak artar. PCR ürününün artışı reporter moleküllerinin artışının tespitiyle belirlenir (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3 TaqMan real-time PCR çalışma prensibi (Yoshimura ve ark. 2005).

Çalışmanın real-time PCR analiz kısmı Münih Teknik Üniversitesi, Klinik Kanser Araştırmaları Bölümünde Prof Dr. Manfred Schmitt laboratuvarında gerçekleştirildi. TaqMan Realtime PCR için, ilk aşamada Epitect Bisülfıt kiti (Qiagen) kullanılarak DNA örneklerimizde bütün metilize olmamış sitozinlerin urasile dönüşümü sağlandı. Bu aşamada 1µg DNA termal saykıl kullanılarak çoğaltıldı ve bisülfıt modifikasyonu gerçekleştirildi. PCR yaklaşık 5 saat olacak şekilde aşağıda belirtilen program uygulandı:

- 99°C'de, 5 dakika
- 60°C'de, 25 dakika
- 99°C'de, 5 dakika,
- 60°C'de, 85 dakika,
- 60°C'de 175 dakika.

Bu aşamada metillenmiş sitozinler ise değişmeden kalır. DNA'nın bu dizilişi, bisülfite muamelesinden sonra orijinal metilasyon sahalarından farklı bir yerleşim göstermiş olmaktadır. PCR sonrası kit içerisinde belirtilen prosedüre göre tüm örnekler için bisülfite modifikasyonu tamamlandı. Modifiye DNA'lar real time PCR'da kullanılmak üzere -20°C'de saklandı. Her bir deney grubunda bisülfite modifikasyonu tamamlanan örneklerden 2µl ve 10µl 2x Quantitect Prob mastermix (Qiagen) kullanıldı. *uPA*, *PAI-1*, *LINE-1*, *DAPK*, *TMS1*, *MGMT* genlerindeki metilasyon seviyelerini belirlemek için primer ve problemler hazırlandı. Kullanılan primer ve problemlerin 5'-3' sekansları ve PCR ürün miktarları bç olarak Çizelge 2.2.'de verilmiştir. Kullanılan primerlerin ve problemlerin genler için uygun konsantrasyonları yapılan real-time PCR'da bir seri denemeden sonra her gen için belirlendi (Çizelge 2.3.). Genlerin metilasyon seviyeleri TaqMan Realtime PCR sistemi ile analiz edildi. Bu sistemde ABI PRISM7700 sekans belirleyici sistemi ve bilgisayar program (Applied Biosystems, Inc., Foster City, USA) kullanıldı.

Modifiye DNA'ların değerlendirilmesi için AluI referans sistemi kullanıldı. AluI tekrarlı dizi ailesi genellikle bağımsız sekans olarak kullanılmaktadır (Weisenberger ve ark. 2005). Deneyde SssI tamamen metillenmiş insan kromozomal DNA'sı (Qiagen) referans pozitif kontrol olarak kullanıldı. *uPA* ve *PAI-1* için MethyLight sistemi referans primer sekansı temel alınarak (Weisenberger, ve ark. 2005; Gao ve ark. 2005; Pakneshan ve ark. 2004) yeniden tasarlandı. Primer ve prob sekanslarının seçiminde primer ekspres programı (Applied Biosystems) kullanıldı. Primer ve problemler Metabion (Martinsried, Germany), Applied Biosystems (Foster City, USA), ya da Microsynth (Lustenau, Austria)'dan satın alındı.

Real-time PCR veri analizi:

Real-time PCR sonunda alınan eşik-değer döngü ("threshold cycle"=CT) değerleri üründeki ilk anlamlı artışın olduğu noktayı belirtir. Sistem başladığından itibaren, üstel oranda ürün oluşması ve logaritmik lineer faza geçiş noktasıdır. Bu bize reaksiyon hakkında çok önemli bilgiler verir. Logaritmik faza yakınlık reaksiyonun gücünü gösterir. Bazı yazılım programları CT değerini, büyüme eğrisinin (Standard eğri)

matematiksel analiziyle yapmaktadır. Bu her uygulamada daha iyi sonucun çabuk bulunmasına yardımcı olur. Deneysel hataların giderilmesi için normalizasyon işleminde seçilen genlere karşı referans bir gen ya da housekeeping genler kontrol olarak kullanılmaktadır. Standart eğriler üzerinden her genin CT değeri kullanılarak hedef ve referans genlerin metilasyon oranları hesaplandı

Matematiksel olarak değerlendirilmesinde $\Delta\Delta CT$ metodu kullanıldı. Bu metoda kullanılan matematiksel veriler şöyledir:

$$R = 2^{[\text{Örnek CT} - \text{Kontrol CT}]}$$

$$R = 2^{\Delta CT}$$

$$R = 2^{[\text{Örnek } \Delta CT - \text{Kontrol } \Delta CT]}$$

$$R = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

sekansları (MSP sistem)

| Primerler (5'-3') | PCR ürün boyutu (bp) | Kaynaklar |
|--|----------------------|-----------------------|
| Forward GGATAGTCGGATCGAGTTAACGTC Reverse CCCTCCCAAACGCCGA | 98 | Wethkamp ve ark. 2006 |
| Forward GGAGGATAGTTGGATTGAGTTAATGTT Reverse CAAATCCCTCCCAAACACCAA | 106 | |
| Forward TTGTAGCGGGGTGAGCGGC Reverse AACGTCCATAAACAACAACGCG | 272 | Conway ve ark. 2000 |
| Forward GGTGTAGTGGGGTGAGTGGT Reverse CAAAACATCCATAAACAACAACA | 207 | |

sekansları (MethyLight sistem)

| 3' | PCR ürün boyutu (bp) | Referans Sekans | Kaynaklar |
|--|----------------------|----------------------------|---|
| ATTTGGAAAATCGGG GCGATACGCCGTT AATATTGCGTTTTTCGGATCGGTTT-BHQ1 | 81 | X52230.1 1524-1605 | Weisenberger ve ark. 2005 |
| GATAGGGGAGGGAGT CTCTATATCAAACCC CGGGGCGGGTT-BHQ1 | 74 | X02419.1 791-717 | Pakneshan ve ark. 2005 |
| GAATTTTTGTAGTTTAGTAGT TCCTAAAATTCTCAAAAATAC GAGTAGGACGAATCGTTAATCGT -BHQ1 | 81 | X13323.1 871-952 | Gao ve ark. 2005 |
| TCGTTTCGGTTAGTT GAAACGCTATC CCA TAA ACG CCA ACG CCG-BHQ1 | 67 | AL161787.13 47151-47218 | Friedrich ve ark. 2004, Weisenberger ve ark. 2006 |
| AGA ATT TGA TCGTCG ACC CTC GCG CAA TTA AGA AGT TTA AGT TGA AGT TGT TGT CGG TGT CG-BHQ1 | 79 | AF184072.1 1287-1366 | Friedrich ve ark. 2004 |
| TACTAAAACAACCCGCG TTT CGG GAG CGA GGC CCTCGCGATACGCACCGTTTACG-BHQ1 | 122 | X 61657 1029-1150 | Brabender ve ark. 2003 |
| GTATAGTGGTTTATATTTGTAATTTTAGTA TAAACTAATCTTAAACTCCTAACCTCA ACCTTAACCTCCC-MGB | 98 | Consensus sequence | Weisenberger ve ark. 2005 |

anmış Inosin

Çizelge 2.3 Primer ve prob konsantrasyonları (MethyLight sistem)

| Gen | Primer Konsantrasyonu (nmol/L) | Prob Konsantrasyonu (nmol/L) |
|--------------|--------------------------------|------------------------------|
| LİNE-1 | 300 | 100 |
| <i>uPA</i> | 600 | 200 |
| <i>PAI-1</i> | 600 | 200 |
| <i>DAPK</i> | 600 | 200 |
| <i>TMS1</i> | 300 | 200 |
| <i>MGMT</i> | 600 | 200 |
| Alu-1 | 300 | 100 |

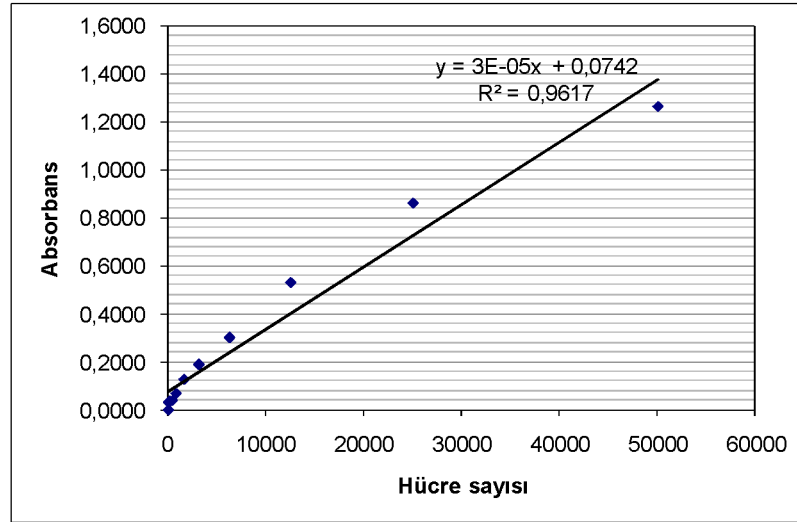
2.9. İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel analizler SPSS 13.0 bilgisayar paket programı kullanılarak yapıldı. Yüzde canlılık değerleri tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Student's *t*-testi kullanılarak hesaplandı. Mann–Whitney's U-testi çalışılan genlerdeki metilasyon seviyeleri arasındaki karşılaştırmalar için kullanıldı. 3 tekrarlı yapılan tüm analizlerin sonuçları ortalama ve standart sapma ile verildi. İstatistiksel olarak anlamlı veriler $p < 0.05$ değerine göre belirlendi.

3. ARAŞTIRMA SONUÇLARI

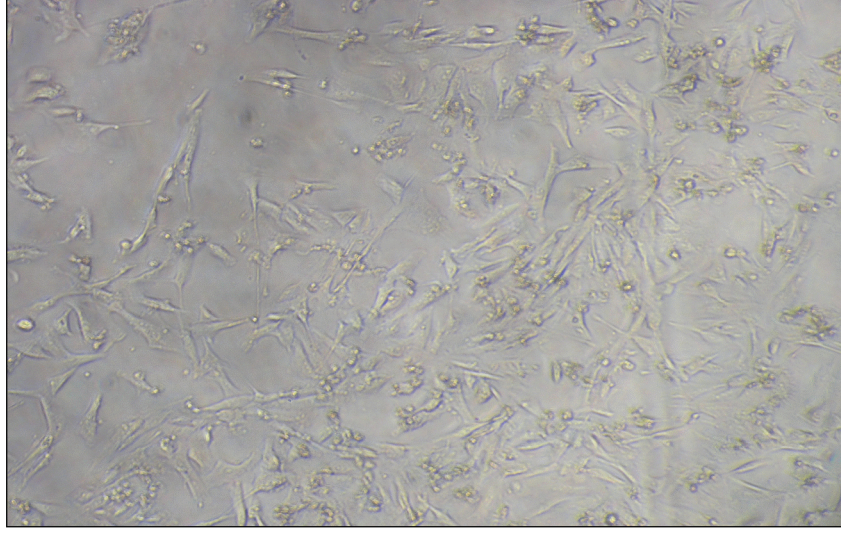
3.1. Sitotoksosite (MTT ve ATP canlılık testi) Bulguları

Sitotoksosite bulgularında, MTT test analizlerine uygun olan hücre sayısını belirlemek için MDA-MB-231 hücreleri kullanıldı ve sonuçlar MCF-7 hücreleri için referans olarak alındı. Farklı sayılarda MDA-MB-231 hücrelerinin MTT testiyle verdiği absorbanslar ölçüldü. Böylece total dehidrogenaz aktivitesi ile hücre sayısı arasında doğrusal ilişki olduğu belirlendi (Şekil 3.1.). Alınan sonuçlara uygun sayıda hücreler sitotoksiste testlerinde kullanıldı.

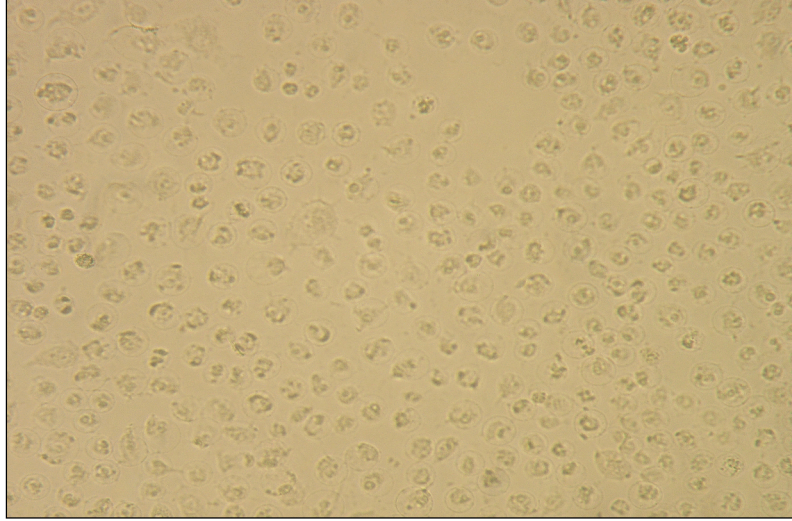


Şekil 3.1 MTT metodu ile MDA-MB-231 hücrelerinin 570 nm’de verdikleri absorbans değerleri.

Hücrelerde ilaç uygulamalarından sonra olabilecek değişimleri değerlendirebilmek ve hataları en aza indirebilmek amacıyla pozitif (maksimum canlılık) ve negatif (minimum canlılık) kontrol hücreleri kullanıldı. Bu hücrelerinin genel görünümü referans olarak alınan MDA-MB-231 hücreleri için şekil 3.2. ve şekil 3.3.’de görülmektedir.

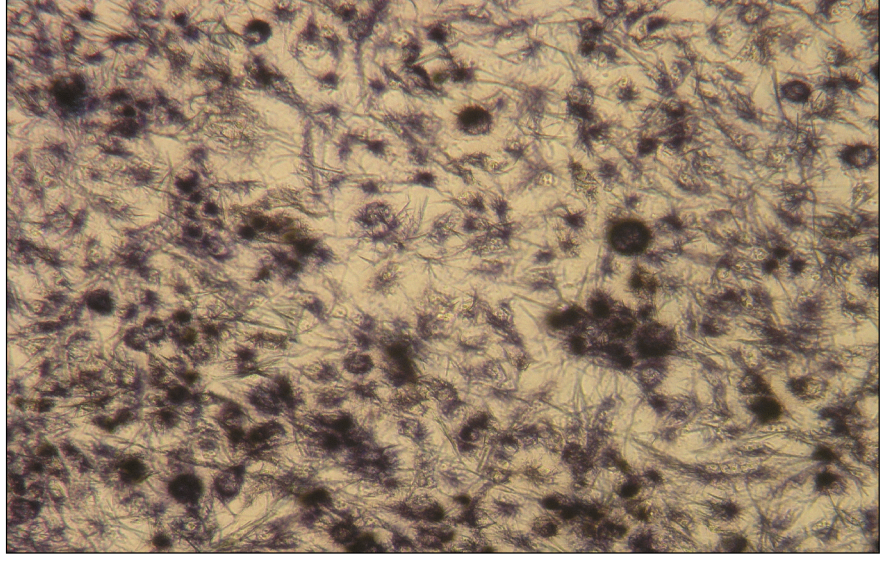


Şekil 3.2 MTT testi uygulamasından önce pozitif kontrol MDA-MB-231 hücreleri.

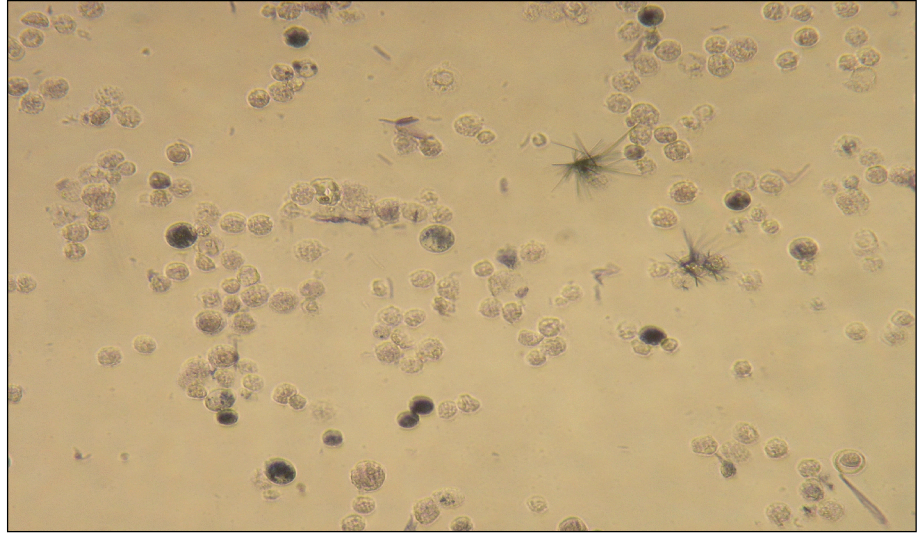


Şekil 3.3 MTT testi uygulamasından önce negatif kontrol MDA-MB-231 hücreleri.

Ayrıca MTT testi sonucunda oluşan koyu mavi renkli formazon bileşiklerinin pozitif ve negatif kontrol gruplarında genel görünüşleri şekil 3.4 ve şekil 3.5’de görülmektedir.



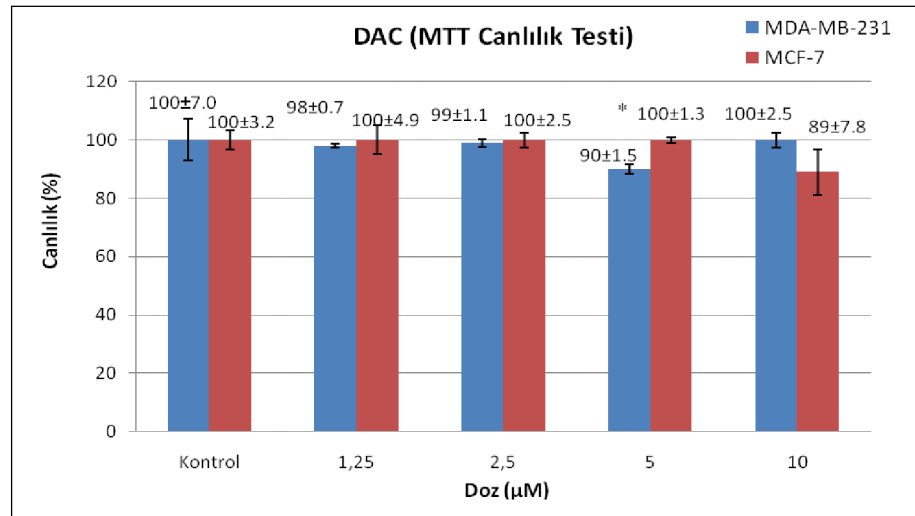
Şekil 3.4 MTT testi uygulamasından sonra oluşan pozitif kontrol MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristallerinin görünümü.



Şekil 3.5 MTT testi uygulamasından sonra oluşan negatif kontrol MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristallerinin görünümü.

3.1.1. 24 saatlik inkübasyon bulguları

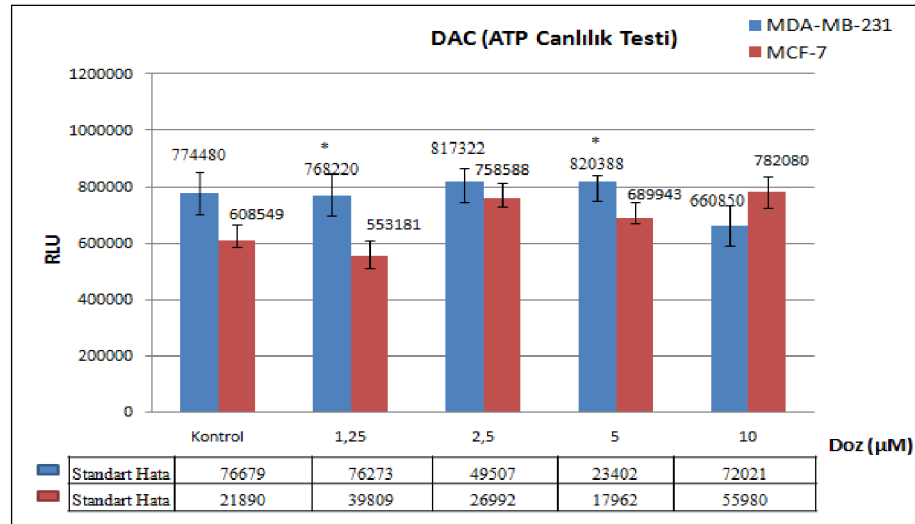
Desitabinin MCF-7 ve MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre soylarının canlılığı üzerine olan etkisini belirleyebilmek için MTT canlılık testi yapıldı. Hücrelere 24 saat süreyle desitabin uygulandığında ortaya çıkan sonuçlar şekil 3.6.'da gösterildi. Sonuçlara göre, desitabinin hem MCF-7 hem de MDA-MB-231 hücrelerinin büyümelerini engellemediği gözlemlendi. MDA-MB-231 hücrelerinde sadece 5 μM desitabinin istatistiksel olarak anlamlı olmayan %10'luk bir inhibisyona neden olduğu fakat daha yüksek 10 μM dozunda bu etkinin meydana gelmediği belirlendi. MCF-7 hücrelerinde 10 μM dozunda gözlenen %11'lik azalmanın kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p>0.05$). 1.25, 2.5, 5 ve 10 μM desitabin dozlarının MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri üzerine olan etkileri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, sadece 5 μM desitabinin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılığa neden olduğu bulundu ($p<0.05$).



Şekil 3.6 Desitabin'nin 24 saatte MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soylarının üzerine olan etkisinin MTT metoduyla gösterilmesi.

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

1.25, 2.5, 5 ve 10 μ M dozlarında uygulanan desitabinin 24. saatte MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soylarında intrasellüler ATP miktarına olan etkisi ATP canlılık testi ile belirlendi. Şekil 3.7.'de verilen sonuçlara göre; desitabin MDA-MB-231 hücrelerinde sadece 10 μ M dozunda %14.2'lik istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalmaya neden olmaktadır ($p>0.05$). MCF-7 hücrelerinde ise sadece 1.25 μ M desitabin dozunda anlamlı olmayan bir inhibisyon gözlemlendi. Kontrol ve ilaç grupları incelendiğinde MDA-MB-231 hücrelerinde belirlenen intrasellüler ATP seviyelerinin MCF-7 hücrelerinden daha yüksek miktarda olduğu gözlemlendi. İstatistiksel olarak dozların etkileri hücre soylarında karşılaştırıldığında, sadece 1.25 ve 5 μ M desitabin dozlarında anlamlı farklılıkların olduğu belirlendi ($p<0.05$).

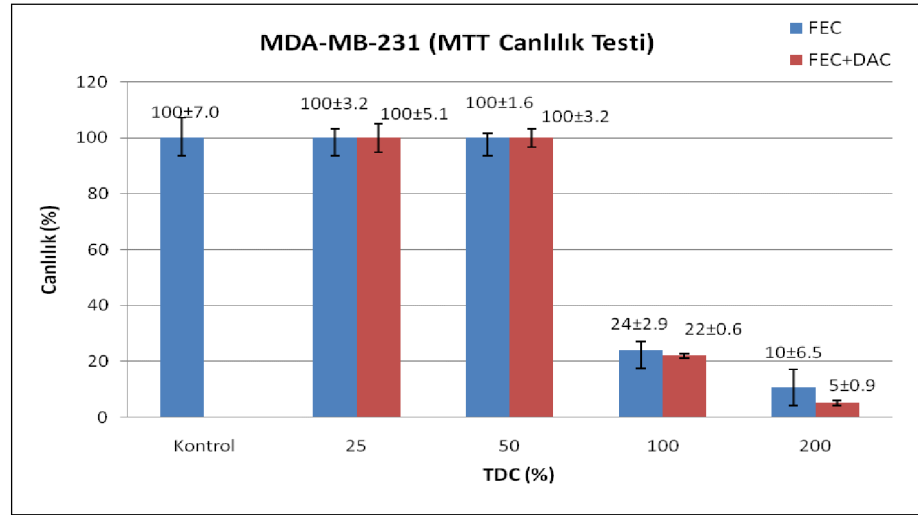


Şekil 3.7 Desitabin'nin 24 saatte MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soylarının üzerine olan etkisinin ATP metoduyla gösterilmesi.

DAC: Desitabin

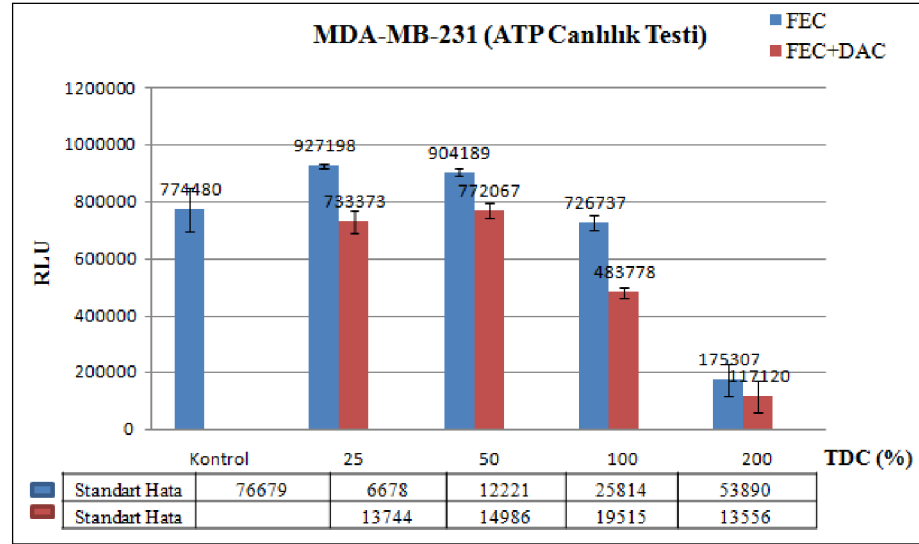
*Aynı doz içinde hücre soyları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ($p<0.05$) ifade etmektedir.

Tek başına desitabin uygulamasının her iki hücre soyunda canlılığa olan etkisi değerlendirildikten sonra, 10 μ M desitabin dozunun FEC'in %200, %100, %50 ve %25 TDC konsantrasyonları ile kombinasyonlarının etkisi MTT canlılık testi ile araştırıldı. MDA-MB-231 hücre soyunda alınan veriler şekil 3.8.'de gösterildi. %25 ve %50 TDC FEC uygulamasının MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerine herhangi bir etkisi olmadığı halde, %100 TDC ve %200 TDC'lik FEC hücre canlılığının %76 ve %90 oranlarda azaldığı bulundu. 10 μ M desitabinin FEC'in 4 farklı dozu ile kombinasyonu halinde ise, uygulanan tüm dozlarda FEC'in meydana getirdiği inhibisyonun desitabin etkisiyle anlamlı olarak değişmediği belirlendi.



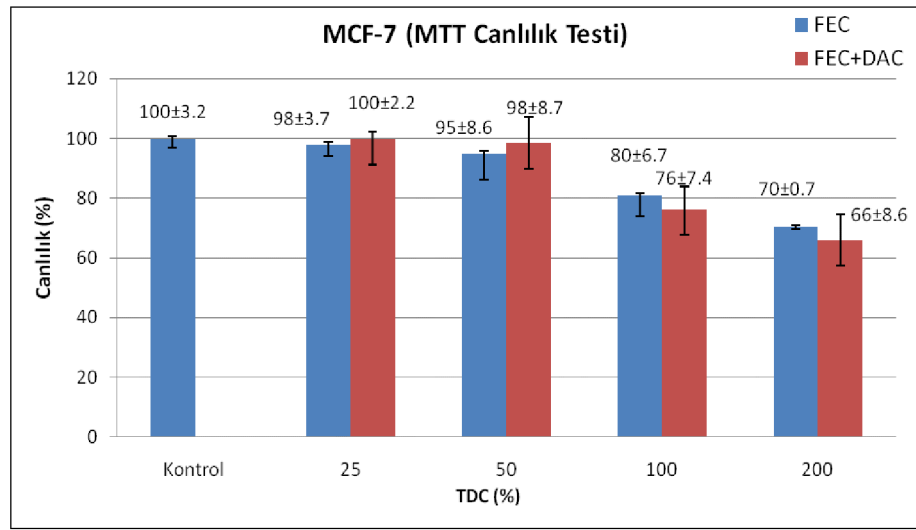
Şekil 3.8 Desitabin'nin FEC ile kombinasyonlarının 24 saatte MDA-MB-231 hücre soyu üzerine etkisinin MTT metoduyla gösterilmesi.

10 μ M desitabinin, FEC'in %200, %100, %50 ve %25 TDC konsantrasyonları ile kombinasyonlarının MDA-MB-231 hücre soyunda 24. saatte intrasellüler ATP miktarına olan etkisi şekil 3.9.'da gösterildi. FEC'in MDA-MB-231 hücrelerinde intrasellüler ATP içeriğinde %100 TDC FEC uygulamasında %6.14'lük ve %200 TDC FEC uygulamasında %77.3'lük azalmaya neden olduğu gözlemlendi. FEC'in desitabin ile beraber kullanıldığında, tüm dozlarda intrasellüler ATP seviyesinin FEC'in tek başına kullanılmasına göre daha da düşük seviyede olduğu belirlendi. %25 ve %50 TDC'lik dozlarda FEC'in meydana getirdiği proliferasyon etkisi desitabin etkisiyle azaldığı gözlemlendi. %100 ve %200 TDC FEC'in büyümeyi engelleyici etkisinin desitabinle beraber kullanıldığında daha da arttığı belirlendi.



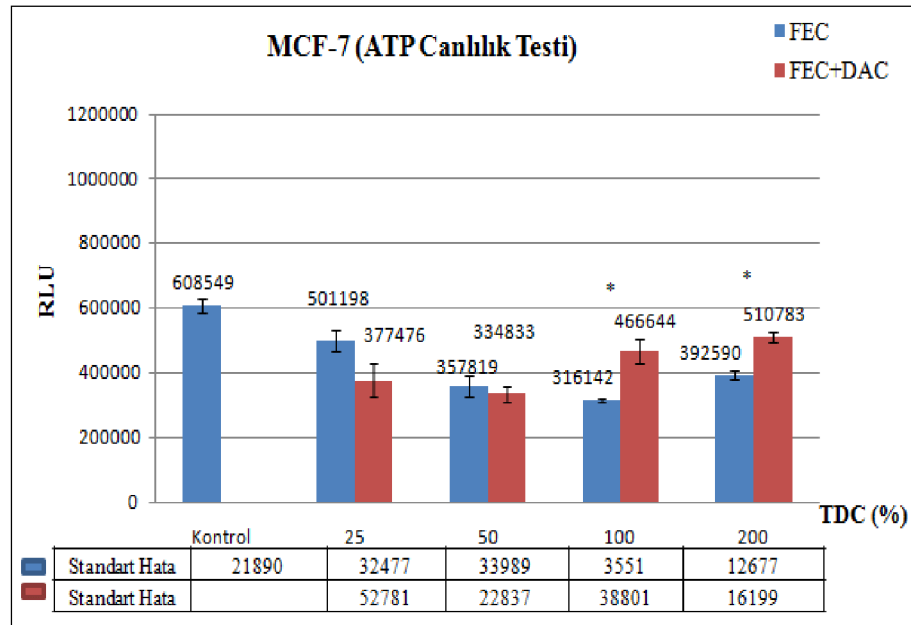
Şekil 3.9 Desitabin'nin FEC ile kombinasyonlarının 24 saatte MDA-MB-231 hücre soyu üzerine etkisinin ATP metoduyla gösterilmesi.

Şekil 3.10.'da 10µM desitabinin, FEC'in %200, %100, %50 ve %25 TDC konsantrasyonları ile kombinasyonlarının 24. saatte MCF-7 hücre soyunda % canlılık üzerine olan etkisi gösterildi. FEC'in %25 ve %50 TDC konsantrasyonlarının MCF-7 hücrelerinin canlılığını etkilemediği, %100 ve %200 TDC konsantrasyonlarında ise kontrole göre %20 ve %30'luk bir azalmaya neden olduğu belirlendi. FEC'in tüm konsantrasyonlarda 10µM desitabin ile beraber uygulandığında ise etkisinin istatistiksel olarak anlamlı değişmediği belirlendi ($p>0.05$).



Şekil 3.10 Desitabin'in FEC ile kombinasyonlarının 24 saatte MCF-7 hücre soyu üzerine etkisinin MTT metoduyla gösterilmesi.

10 μ M desitabinin %200, %100, %50 ve %25 TDC FEC ile kombinasyonlarının 24. saatte MCF-7 hücre soyunda intrasellüler ATP miktarına olan etkisi şekil 3.11.'de gösterildi. FEC uygulamasının MCF-7 hücrelerinde tüm dozlarda (%200, %100, %50 ve %25 TDC) intrasellüler ATP miktarında kontrol grubuna göre azalmaya neden olduğu belirlendi. %25 ve %50 TDC FEC'in 10 μ M desitabin ile kombinasyonlarında FEC'in tek başına olan etkisine göre, istatistiksel olarak anlamlı olmayan %24 ve %6.4'lük bir azalma gözlemlendi ($p>0.05$). %200 ve %100 TDC FEC ile 10 μ M desitabin kombinasyonlarında intrasellüler ATP içeriğinde FEC'in tek başına kullanımına göre istatistiksel olarak anlamlı olan %32 ve %23'lük bir artış gözlemlendi ($p<0.05$).

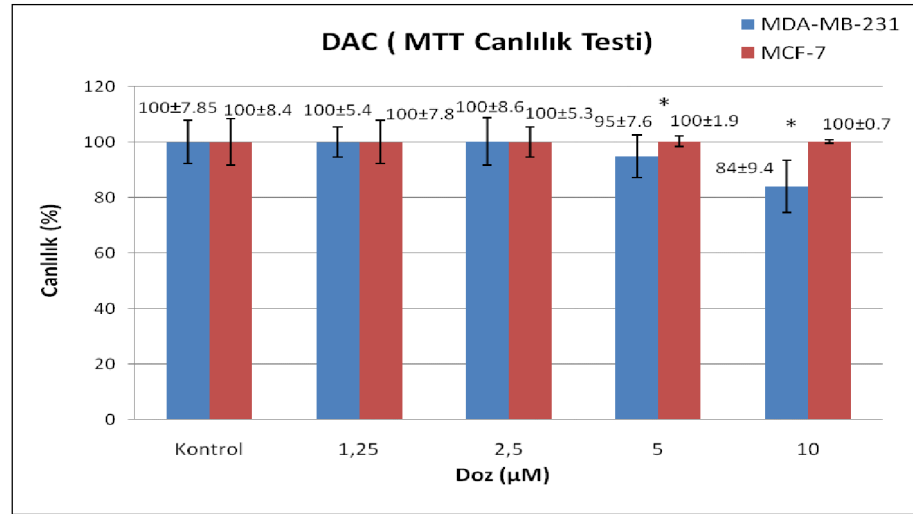


Şekil 3.11 Desitabin'nin FEC ile kombinasyonlarının 24 saatte MCF-7 hücre soyu üzerine etkisinin ATP metoduyla gösterilmesi.

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

3.1.2. 48 saatlik inkübasyon bulguları

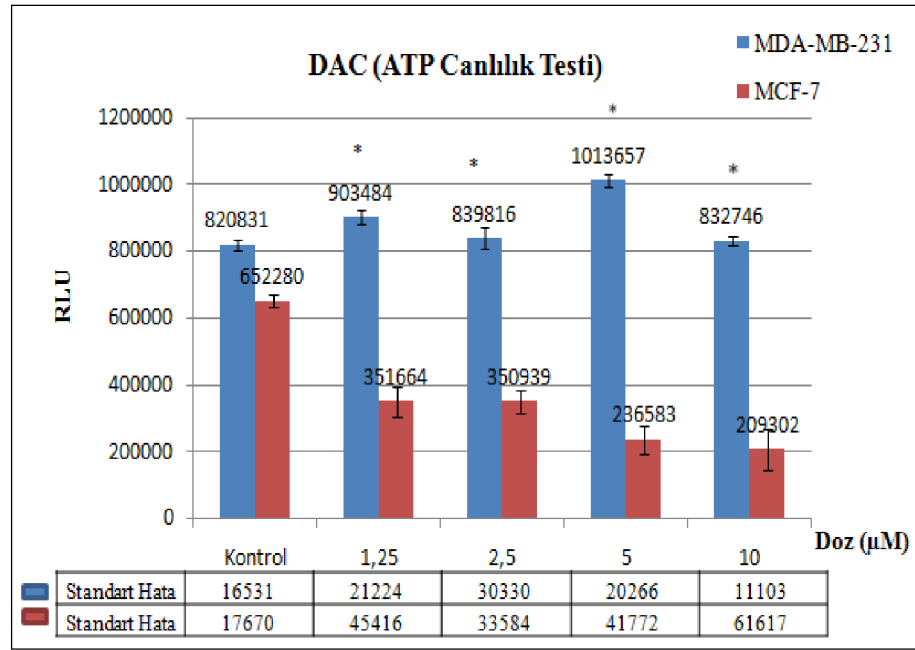
Desitabinin 1.25, 2.5, 5 ve 10 μ M dozlarında 48 saat sonra MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin canlılığına olan etkisi MTT ve ATP testleri ile değerlendirildi. Alınan MTT sonuçlarına göre, desitabinin MCF-7 hücrelerinde tüm dozlarda MDA-MB-231 hücrelerinde ise 1.25 ve 2.5 μ M dozlarında kontrol gruplarına göre hücre canlılığını etkilemediği belirlendi. MDA-MB-231 hücrelerinde 5 μ M desitabin uygulaması 48 saat sonra hücre canlılığında %5'lik bir azalmaya neden olurken ($p>0.05$), 10 μ M dozunda ise kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı %16'lık bir azalmaya neden olduğu gözlemlendi ($p<0.05$). 1.25 ve 2.5 μ M dozlarında desitabinin etkisi MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde karşılaştırıldığında, hücre canlılığı açısından anlamlı bir farklılık olmamasına rağmen ($p>0.05$), 5 ve 10 μ M dozlarında MDA-MB-231 hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma belirlendi ($p<0.05$) (şekil 3.12.).



Şekil 3.12 Desitabin'nin 48 saatte MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soylarının üzerine olan etkisinin MTT metoduyla gösterilmesi.

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

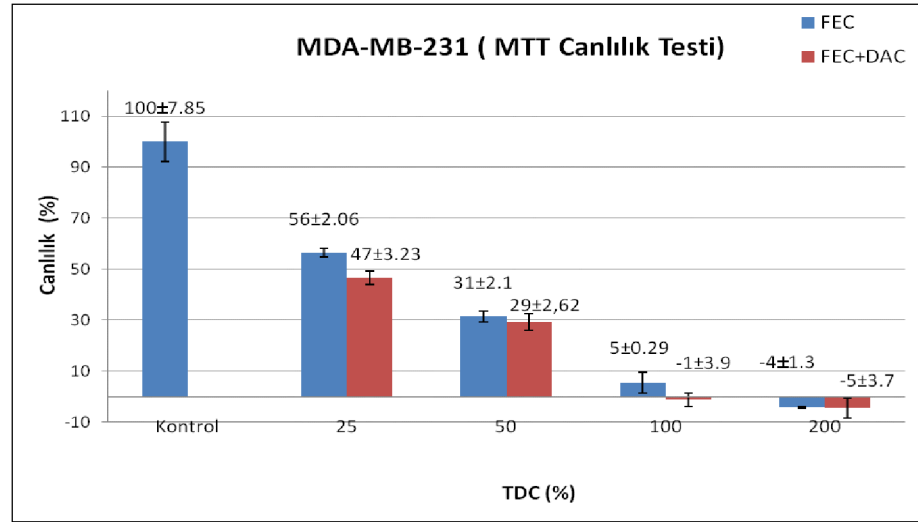
1,25, 2,5, 5 ve 10 μ M dozlarında desitabin uygulamasının 48. saatte hücre soylarında intrasellüler ATP miktarına olan etkisi değerlendirildiğinde, desitabinin tüm dozlarda MDA-MB-231 hücrelerinde kontrole göre intrasellüler ATP miktarlarında istatistiksel olarak anlamlı olmayan artışlara neden olduğu gözlenirken ($p>0.05$), MCF-7 hücrelerinde anlamlı düzeyde azalmalara neden olduğu gözlemlendi ($p<0.05$). Desitabinin tüm dozlarında MDA-MB-231 hücrelerinde belirlenen intrasellüler ATP seviyeleri MCF-7 hücreleri ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak MCF-7 hücrelerinden daha yüksek miktarda olduğu belirlendi ($p<0.05$). MDA-MB-231 hücrelerinde belirlenen bu artışların MCF-7 hücrelerinden 1,25 μ M dozunda 2.5 kat, 2,5 μ M dozunda 2.3 kat, 5 μ M dozunda 4.2 ve 10 μ M dozunda 3.9 kat fazla olduğu gözlemlendi (Şekil 3.13.).



Şekil 3.13 Desitabin' nin 48 saatte MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soylarının üzerine olan etkisinin ATP metoduyla gösterilmesi.

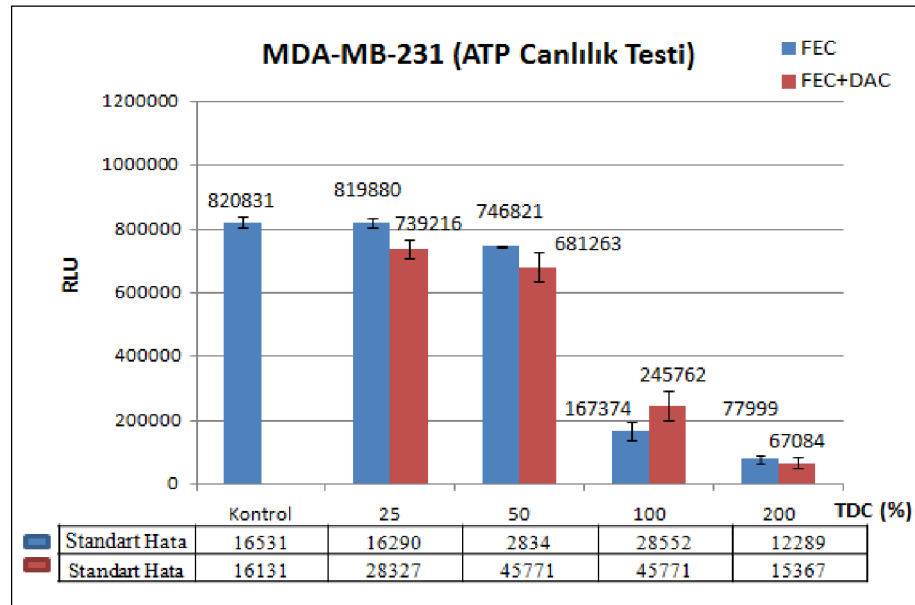
*Aynı doz içinde hücre soyları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ($p<0.05$) ifade etmektedir.

10 μ M desitabinin, FEC'in %200, %100, %50 ve %25 TDC konsantrasyonları ile kombinasyonlarının 48. saatte MDA-MB-231 hücre soyunda % canlılık üzerine etkisi şekil 3.14.'de gösterildi. FEC'in MDA-MB-231 hücrelerinde doza bağımlı olarak canlılığı azalttığı belirlendi (%25 TDC'de %44'lük, %50 TDC'de %69'luk, %100 TDC'de %95'lik ve %200 TDC'de %100'lük). 10 μ M desitabinin, FEC'le kombinasyonu halinde ise, FEC'in tek başına kullanıldığında meydana gelen etkinin desitabinle kombinasyon sonucunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değişmediği bulundu ($p>0.05$).



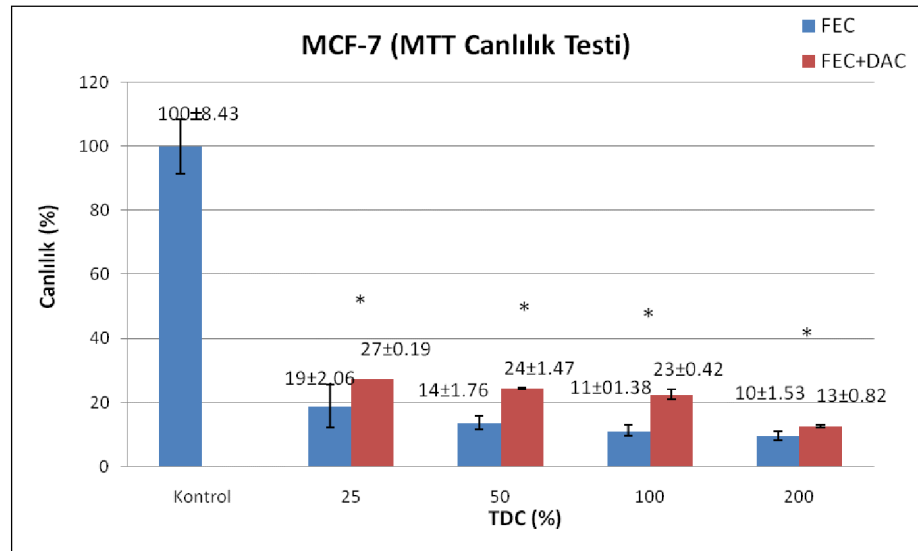
Şekil 3.14 Desitabin'nin FEC ile kombinasyonlarının 48 saatte MDA-MB-231 hücre soyu üzerine etkisinin MTT metoduyla gösterilmesi.

Şekil 3.15.'de 10 μ M desitabinin FEC'inin %200, %100, %50 ve %25 TDC konsantrasyonları ile kombinasyonlarının 48. saatte MDA-MB-231 hücre soyunda intrasellüler ATP miktarına olan etkisi gösterildi. MDA-MB-231 hücrelerinde kontrol grubuna göre hem FEC hem de FEC'in 10 μ M desitabin ile kombinasyonlarında doza bağımlı olarak intrasellüler ATP seviyesinde azalmalar belirlendi. %100 ve %200 TDC FEC uygulamasından sonra intrasellüler ATP seviyesindeki azalmanın kontrole göre %80 ve %90 oranında olduğu gözlemlendi. %25, %50 ve %200 TDC FEC etkisinin bu dozların 10 μ M desitabin ile beraber kullanıldığında intrasellüler ATP seviyesindeki azalmanın arttığı belirlendi. %100 TDC FEC+desitabin kombinasyonunda ise ATP seviyesi %100 TDC FEC'e göre daha yüksek seviyede bulundu. Fakat FEC'in tüm dozları ve bu dozların desitabinle kombinasyonları karşılaştırıldığında, tüm değişimlerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlemlendi ($p>0.05$).



Şekil 3.15 Desitabin'nin FEC ile kombinasyonlarının 48 saatte MDA-MB-231 hücre soyu üzerine etkisinin ATP metoduyla gösterilmesi.
DAC: Desitabin (10 μ M)

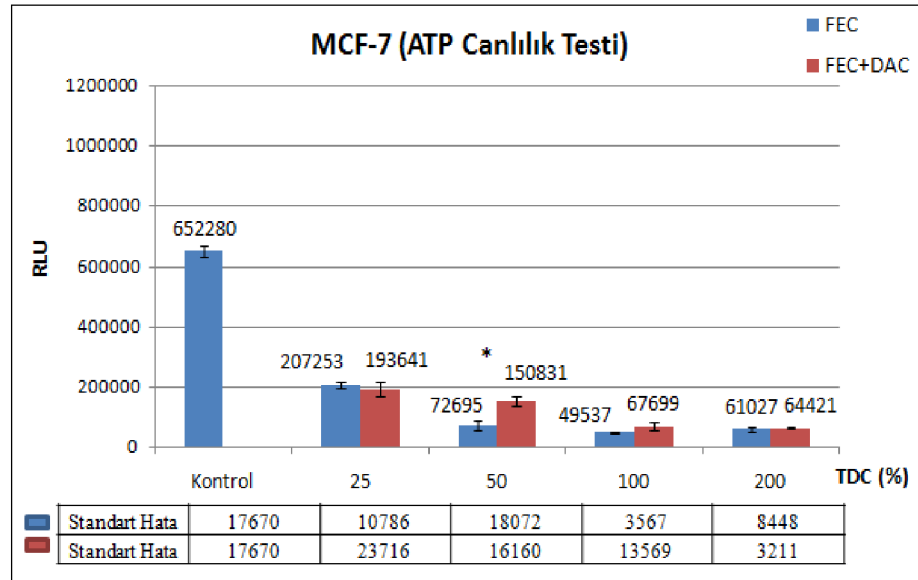
10 μ M desitabinin FEC'in %200, %100, %50 ve %25 TDC konsantrasyonları ile kombinasyonlarının 48. saatte MCF-7 hücre soyunda % canlılık üzerine etkisi şekil 3.16.'da gösterildi. 48 saat sonra FEC uygulamasının kontrol hücrelerine oranla doza bağımlı olarak MCF-7 hücre canlılığını azalttığı belirlendi. Bu azalmaların %25 TDC'de %81, %50 TDC'de %86, %100 TDC'de %89 ve %200 TDC'de %90 oranında olduğu bulundu. 10 μ M desitabinin FEC'in tüm konsantrasyonları ile kombinasyonunda ise FEC'in tek başına gösterdiği inhibisyon etkisinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı gözlemlendi ($p < 0.05$).



Şekil 3.16 Desitabin'nin FEC ile kombinasyonlarının 48 saatte MCF-7 hücre soyu üzerine etkisinin MTT metoduyla gösterilmesi.

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

FEC'in %200, %100, %50 ve %25 TDC konsantrasyonları ile 10µM desitabinin kombinasyonlarının 48. saatte MCF-7 hücre soyunda intrasellüler ATP miktarına olan etkisi araştırıldığında, kontrole göre hem FEC, hem de FEC'in 10µM desitabin ile kombinasyonları sonucunda doza bağlı olarak intrasellüler ATP seviyesinde azalma belirlendi. %50, %100 ve %200 TDC FEC'in etkisinin bu dozların 10µM desitabin ile beraber kullanıldığında intrasellüler ATP seviyesindeki azalmayı engellediği gözlemlendi. Desitabinin bu etkisinin %50 TDC'lik dozda istatistiksel olarak anlamlı bir düzeyde olduğu bulundu ($p<0.05$) (Şekil 3.17.).

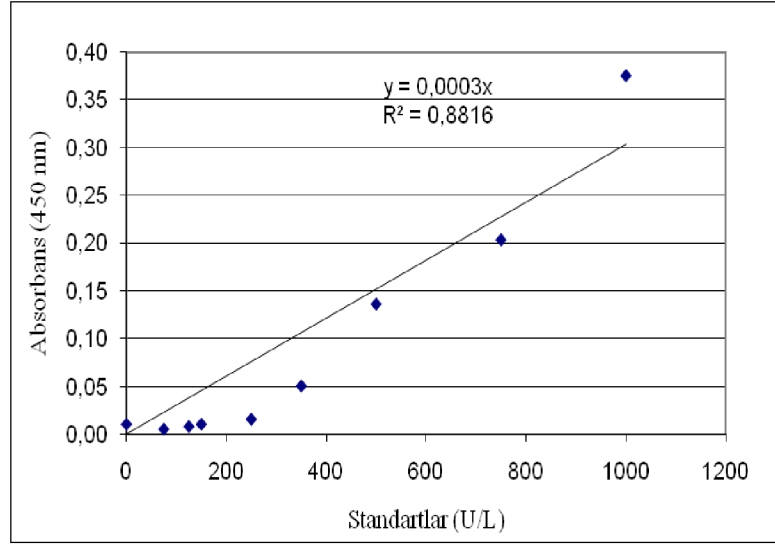


Şekil 3.17 Desitabin'nin FEC ile kombinasyonlarının 48 saatte MCF-7 hücre soyu üzerine etkisinin ATP metoduyla gösterilmesi.

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

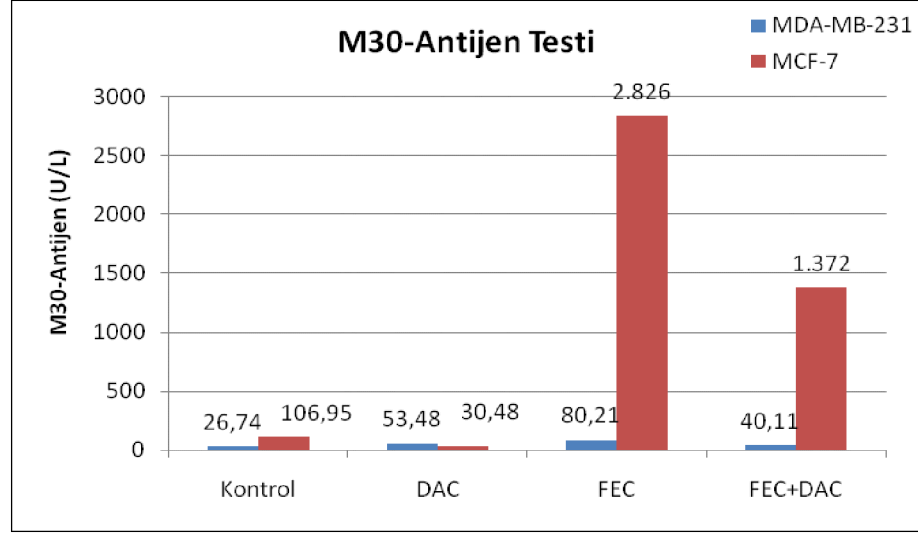
3.2. M30- Antijen (Kaspazla Kırılmış Sitokeratin 18) Bulguları

M30-Antijen ölçümlerinin değerlendirilmesi için standart eğri grafiği hazırlandı. Şekil 3.18.'de gösterilen standart eğri grafiğinden hesaplandı ve değerlendirildi.



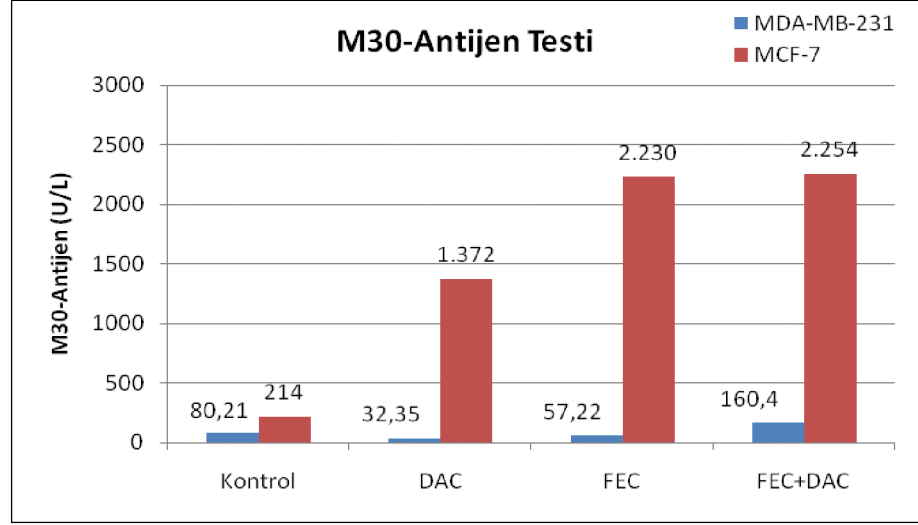
Şekil 3.18 M30-Antijen Standart eğri grafiği

Şekil 3.19.'da, 10µM desitabin, %100 TDC FEC ve 10µM desitabin+%100 TDC FEC kombinasyonunun 24. saatte MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soylarında bir apoptozis belirteci olan kaspazla-kırılmış sitokeratin 18 (M30 antijen) üzerine olan etkisi gösterilmektedir. MCF-7 hücrelerinde 10µM desitabinin kontrole göre 24. saatte M30 antijen seviyesinde bir artışa yol açmadığı belirlendi. %100 TDC FEC ve 10µM desitabin+%100 TDC FEC kombinasyonlarından 24 saat sonra M30 antijen düzeyinde artış gözlemlendi. MDA-MB-231 hücrelerinde ise, M30 antijen düzeyleri açısından tüm ilaç uygulamalarından sonra herhangi bir değişim gözlemlenmedi.



Şekil 3.19 10 μ M Desitabin, %100 TDC FEC ve 10 μ M desitabin+%100 TDC FEC uygulamalarının 24 saatte MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soylarında kaspazla kırılmış sitokeratin 18 üzerine etkisinin M30 metoduyla belirlenmesi.

10 μ M desitabin, %100 TDC FEC ve 10 μ M desitabin+%100 TDC FEC uygulamalarından 48 saat sonra MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soylarında M30 antijen düzeyleri üzerine etkisi şekil 3.20.'de gösterilmektedir. Uygulanan tüm ilaç seçeneklerinin (10 μ M desitabin, %100 TDC FEC ve 10 μ M desitabin+%100 TDC FEC) MCF-7 hücrelerinde 48 saat sonra M30 antijen seviyesinde artışa neden oldukları belirlendi. MDA-MB-231 hücrelerinde ise, 10 μ M desitabin, %100 TDC FEC ve 10 μ M desitabin+%100 TDC FEC uygulamalarından sonra M30 antijen seviyesinde bir değişim gözlenmedi.



Şekil 3.20 10 μ M Desitabin, %100 TDC FEC ve 10 μ M desitabin+%100 TDC FEC uygulamalarının 48. saatte MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soylarında kaspazla kırılmış sitokeratin 18 üzerine etkisinin M30 metoduyla belirlenmesi.

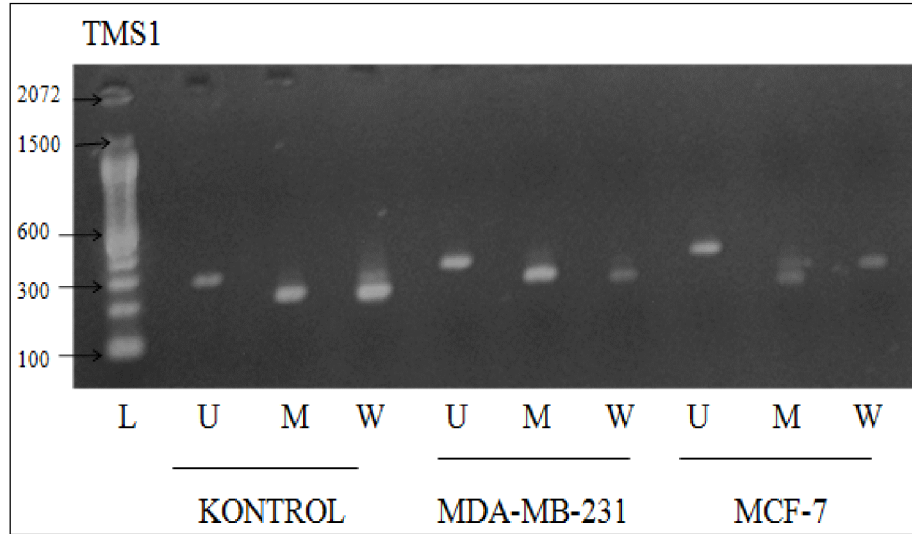
3.3. Metil Spesifik PCR (MSP) ile Gen Metilasyonu Bulguları

MCF-7 ve MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerinden izole edilen DNA örneklerinin miktarlarını ve kalitesini belirleyebilmek için OD_{260}/OD_{280} spektrofotometrik ölçüm kullanıldı. Alınan sonuçlar çizelge 3.1'de gösterilmektedir. Tüm örneklerde ölçümler iki kez tekrarlandı ve hesaplamalarda 50 kat seyreltme faktörü kullanıldı.

Çizelge 3.1 Hücrelerden elde edilen DNA miktarları

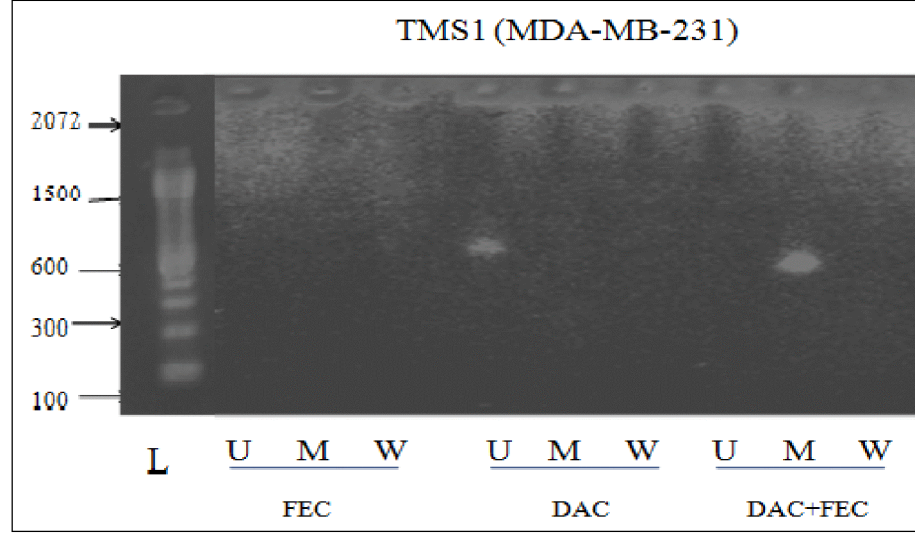
| Hücre Soy | Örnek | OD_{260}/OD_{280} | DNA miktarı (μ g/ml) |
|------------|---------|---------------------|---------------------------|
| MCF-7 | Kontrol | 1.85 | 296.67 |
| | DAC | 1.86 | 195.01 |
| | FEC | 1.9 | 83.7 |
| | FEC+DAC | 1.84 | 96.3 |
| MDA-MB-231 | Kontrol | 1.89 | 268.8 |
| | DAC | 1.83 | 250.9 |
| | FEC | 1.88 | 92.3 |
| | FEC+DAC | 1.84 | 103.6 |
| | Su | 0.89 | 0 |

Metil spesifik PCR yöntemi kullanılarak *TMS1* ve *DAPK* genlerinin metilasyon seviyeleri belirlendi. *TMS1* geni için her iki hücre soyunun kontrol (ilaç uygulanmamış) hücrelerinde hem metile (M) hem de demetile (U) bantlar gözlemlendi. MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen bantların daha belirgin olması metilasyon seviyesinin MCF-7 hücrelerinden daha yüksek olduğunu göstermektedir (Şekil 3.21.). MDA-MB-231 hücrelerinde, %100 TDC FEC uygulamasından sonra *TMS1* gen promotöründe hem metile hem de demetile bantların kaybolduğu gözlemlendi. 10 μ M desitabin uygulamasından sonra metile bantın kaybolduğu dolayısıyla desitabin gen demetilasyonuna yol açtı. Fakat 10 μ M desitabinin %100 TDC FEC ile kombinasyonu halinde ise, desitabinin demetile edici etkisinin ortadan kalktığı bulundu (Şekil 3.22.). MCF-7 hücrelerinde %100 TDC FEC uygulaması sonrasında *TMS1* gen promotöründe bulunan metilasyonun kaybolduğu gözlemlendi. 10 μ M desitabinin+%100 TDC FEC kombinasyonu sonucunda daha zayıf olsa da metile bantın varlığı gözlemlendi (Şekil 3.23.).



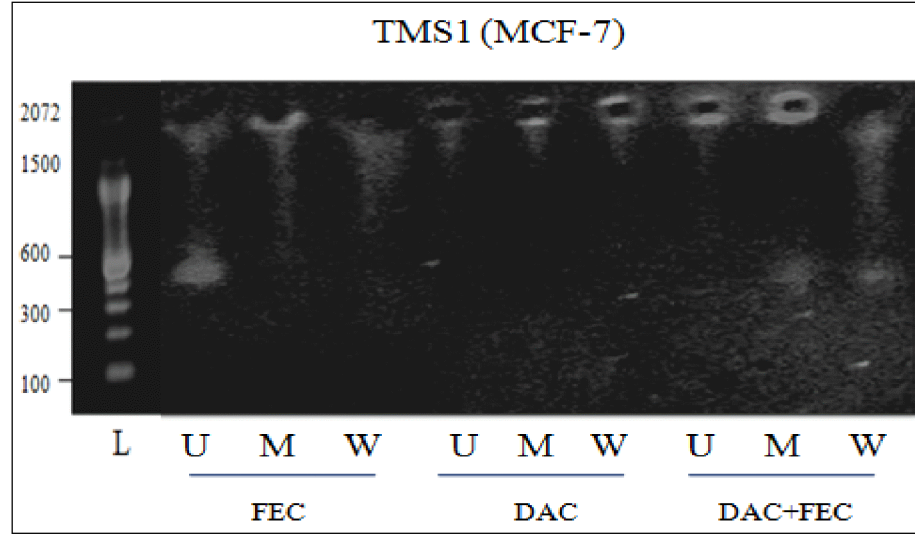
Şekil 3.21 MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soylarında 48. saatte *TMS1* gen promotöründe metilasyon seviyesinin MPS yöntemiyle gösterilmesi.

U: Metile olmayan DNA; M: Metile DNA; W: "Wild type" DNA; L: Ladder DNA



Şekil 3.22 10 μ M Desitabin, %100 TDC FEC ve 10 μ M desitabin+%100 TDC FEC uygulamalarının 48. saatte MDA-MB-231 hücre soylarında *TMS1* gen promotöründe metilasyon seviyesinin MPS yöntemiyle gösterilmesi.

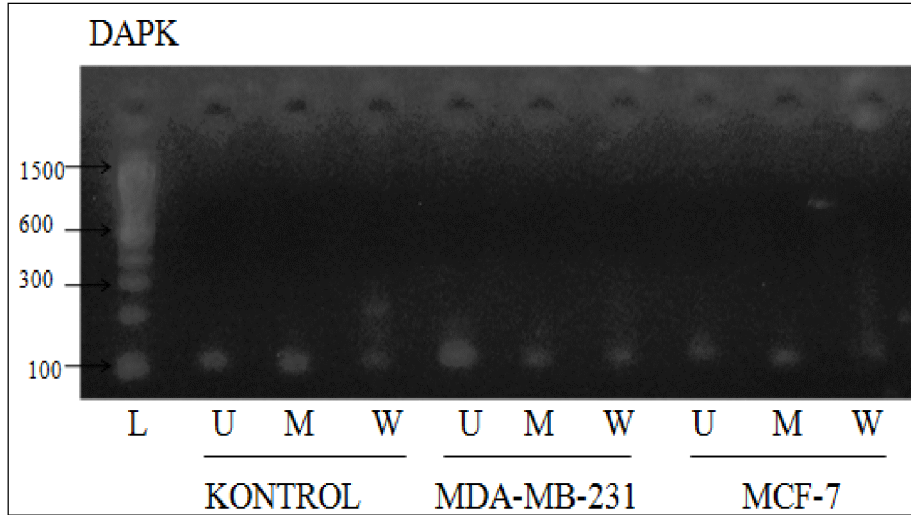
U: Metile olmayan DNA; M: Metile DNA; W: “Wild type” DNA; L: Ladder DNA



Şekil 3.23 10 μ M Desitabin, %100 TDC FEC ve 10 μ M desitabin+%100 TDC FEC uygulamalarının 48. saatte MCF-7 hücre soylarında *TMS1* gen promotöründe metilasyon seviyesinin MPS yöntemiyle gösterilmesi.

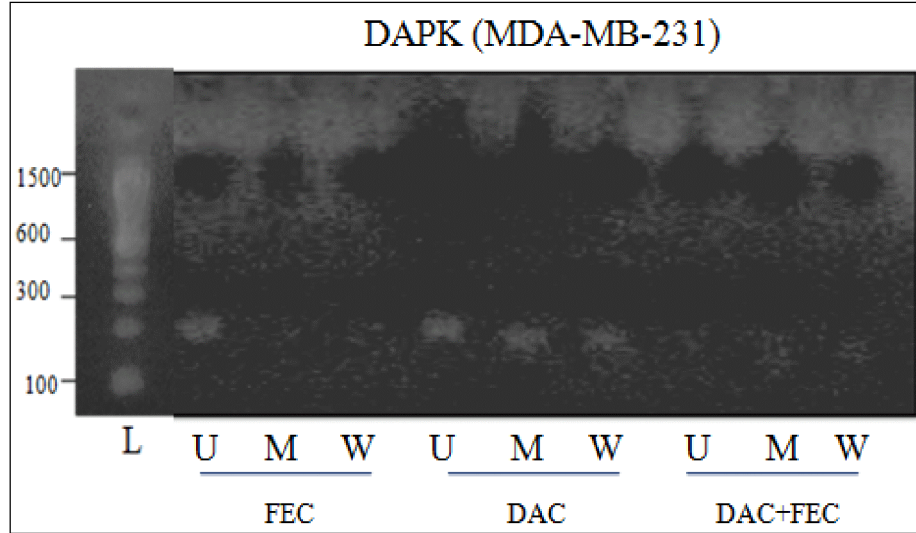
U: Metile olmayan DNA; M: Metile DNA; W: “Wild type” DNA; L: Ladder DNA

DAPK gen promotörünün metilasyon seviyesi MSP metodu ile analiz edildiğinde, MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinin ilaç uygulanmamış kontrol gruplarında hem metile (M) hem de demetile (U) bantlar gözlemlendi. Fakat MDA-MB-231 hücre soyunda demetile bandı daha belirgin olduğu gözlemlendi (Şekil 3.24.). Alınan sonuç MCF-7 hücrelerinde metilasyon seviyesinin rölatif olarak MDA-MB-231 hücrelerinden daha fazla olduğunu göstermektedir. 48 saat sonra %100 TDC FEC, 10µM desitabin ve 10µM desitabin+%100 TDC FEC uygulamalarından sonra MDA-MB-231 hücrelerinde metilasyon bandının verdiği sinyalin kontrole göre azaldığı belirlendi (şekil 3.25.). MCF-7 hücrelerinde ise %100 TDC FEC ile metilasyon durumunda değişiklik gözlenmezken, hem 10µM desitabin hem de 10µM desitabin+%100 TDC FEC'den sonra metilasyon seviyelerinde azalma gözlemlendi (Şekil 3.26.).



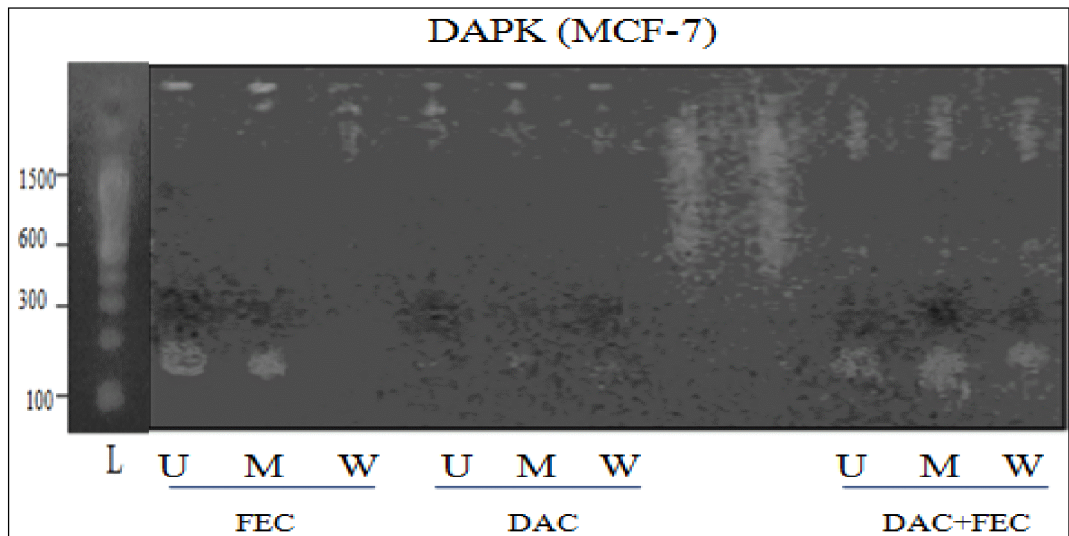
Şekil 3.24 MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soylarında 48. saatte *DAPK* gen promotöründe metilasyon seviyesinin MPS yöntemiyle gösterilmesi.

U: Metile olmayan DNA; M: Metile DNA; W: "Wild type" DNA; L: Ladder DNA



Şekil 3.25 10 μ M Desitabin, %100 TDC FEC ve 10 μ M desitabin+%100 TDC FEC uygulamalarının 48. saatte MDA-MB-231 hücre soylarında *DAPK* gen promotöründe metilasyon seviyesinin MPS yöntemiyle gösterilmesi.

U: Metile olmayan DNA; M: Metile DNA; W: “Wild type” DNA; L: Ladder DNA



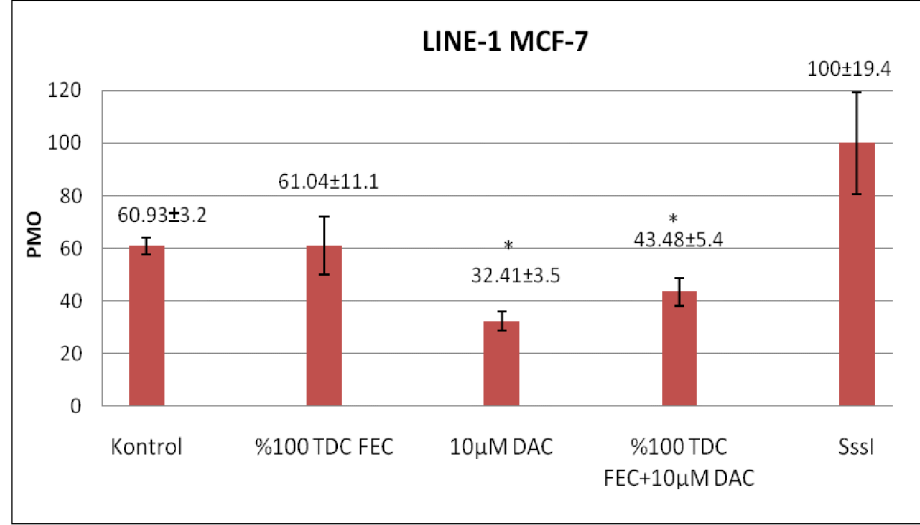
Şekil 3.26 10 μ M Desitabin, %100 TDC FEC ve 10 μ M desitabin+%100 TDC FEC uygulamalarının 48. saatte MCF-7 hücre soylarında *DAPK* gen promotöründe metilasyon seviyesinin MPS yöntemiyle gösterilmesi.

U: Metile olmayan DNA; M: Metile DNA; W: “Wild type” DNA; L: Ladder DNA

3.4. Real-Time PCR (TaqMan) ile Gen Metilasyon Bulguları

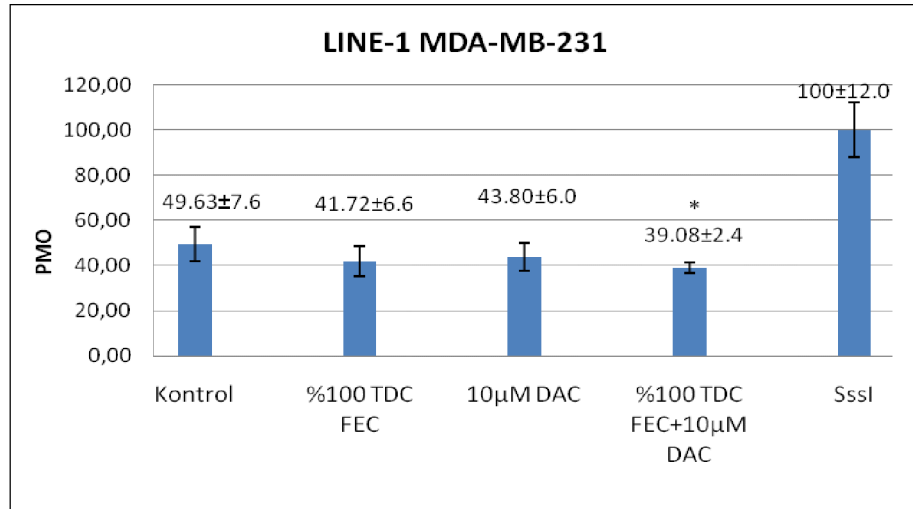
Uygulanan farklı ilaç seçeneklerinin (%100 TDC FEC, 10 μ M desitabin, %100 TDC FEC+10 μ M desitabin) kanserle ilişkili seçilen bazı genlerin metilasyon seviyelerine olan etkisi, real-time PCR (TaqMan) metoduyla araştırıldı. *uPA* ve *PAI-1* (metastas ilişkili), *DAPK* ve *TMS1* (apoptosis ilişkili), *MGMT* (DNA onarım mekanizmasıyla ilişkili) ve *LINE-1* (genle metilasyonu gösteren tekrarlı sekans) metilasyon seviyelerindeki değişiklikler belirlendi. 48 saat boyunca belirlenen ilaç seçenekleri ile inkübasyona bırakılan MCF-7 ve MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerinden elde edilen DNA örneklerinden gen analizleri yapıldı.

LINE-1 genomdaki genel metilasyon seviyesini gösterilmesinde kullanılan tekrarlı dizi elemanıdır. *LINE-1* metilasyon seviyesinin MCF-7 hücrelerinde (Şekil 3.27.) MDA-MB-231 hücrelerinden (Şekil 3.28.) daha yüksek seviyede olduğu belirlendi. MCF-7 hücrelerinde metilasyon seviyesi 60.93 \pm 3.2, MDA-MB-231 hücrelerinde ise 49.73 \pm 7.6 olduğu belirlendi. Her iki hücre soyunda %100 TDC FEC+10 μ M desitabin kombinasyonundan sonra *LINE-1* metilasyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi ($p<0.05$). 10 μ M desitabin MCF-7 hücrelerinde *LINE-1* metilasyon seviyesinde anlamlı bir azalmaya neden olurken ($p<0.05$), MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p>0.05$) (Şekil 3.27. ve 3.28.). Her iki hücre soyunda da %100 TDC FEC uygulamasından sonra *LINE-1* metilasyon seviyesinde gözlenen azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p>0.05$).



Şekil 3.27 MCF-7 hücrelerinde 48. saatte *LINE-1* gen promotöründe metilasyon seviyesinin TaqMan yöntemiyle gösterilmesi.

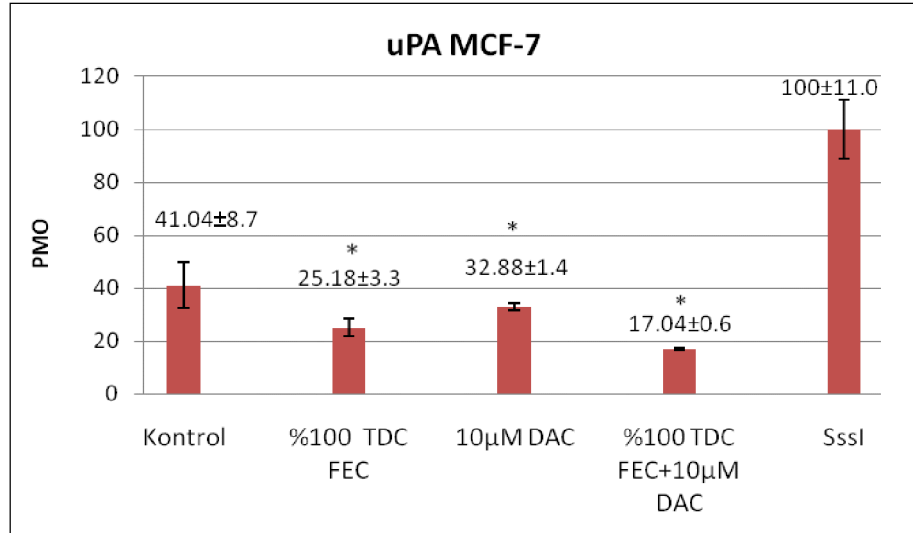
DAC: Desitabin; PMO: Promotör Metilasyon Oranı; Sssl: %100 metillenmiş kontrol
 * Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir ($p < 0.05$).



Şekil 3.28 MDA-MB-231 hücrelerinde 48 saatte *LINE-1* gen promotöründe metilasyon seviyesinin TaqMan yöntemiyle gösterilmesi.

PMO: Promotör Metilasyon Oranı; Sssl: %100 metillenmiş kontrol
 * Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir ($p < 0.05$).

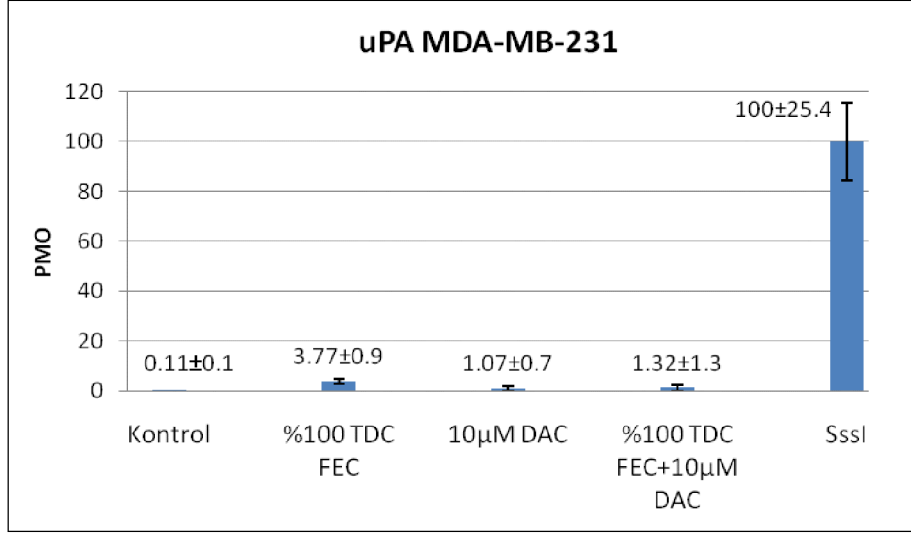
uPA gen promotör metilasyon seviyesinin MCF-7 hücrelerinde (Şekil 3.29.) yüksek seviyede belirlenmesine rağmen, MDA-MB-231 hücrelerinde metilasyon belirlenmedi (Şekil 3.30.). MCF kontrol hücrelerinde *uPA* gen promotöründe gözlenen metilasyon durumunun %100 TDC FEC, 10 μ M desitabin ve %100 TDC FEC+10 μ M desitabin uygulamalarından sonra anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi ($p<0.05$). %100 TDC FEC+10 μ M desitabin kombinasyonunun MCF-7 hücrelerinde *uPA* promotörü demetilasyonunu diğer ilaç seçeneklerine göre daha fazla azalttığı belirlendi. MDA-MB-231 kontrol grubu hücrelerinin *uPA* gen promotöründe belirlenen demetilasyon durumunun ilaç seçeneklerinden (%100 TDC FEC, 10 μ M desitabin, %100 TDC FEC+10 μ M desitabin) sonra istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik göstermediği belirlendi ($p>0.05$).



Şekil 3.29 MCF-7 hücrelerinde 48. saatte *uPA* gen promotöründe metilasyon seviyesinin TaqMan yöntemiyle gösterilmesi.

PMO: Promotör Metilasyon Oranı; Sssl: %100 metillenmiş kontrol

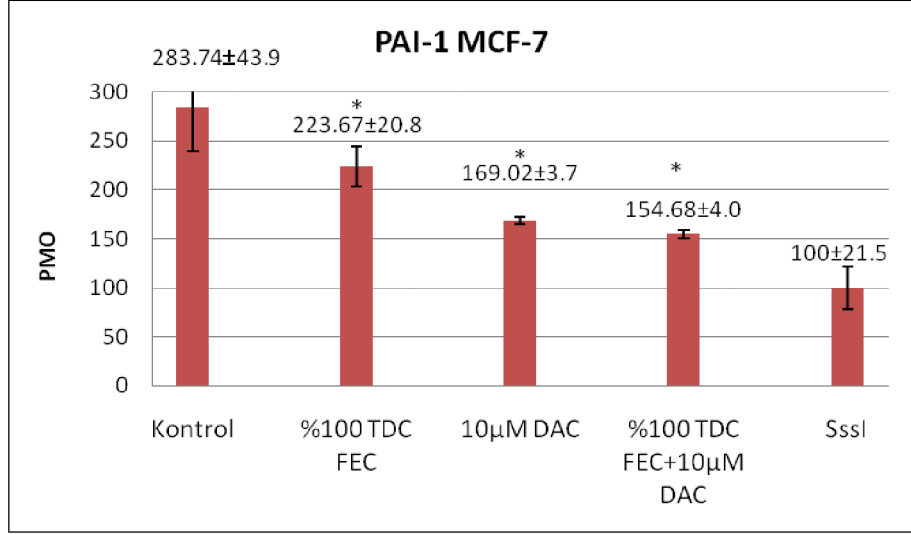
* Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir ($p<0.05$).



Şekil 3.30 MDA-MB-231 hücrelerinde 48. saatte *uPA* gen promotöründe metilasyon seviyesinin TaqMan yöntemiyle gösterilmesi.

PMO: Promotör Metilasyon Oranı; Sssl: %100 metillenmiş kontrol

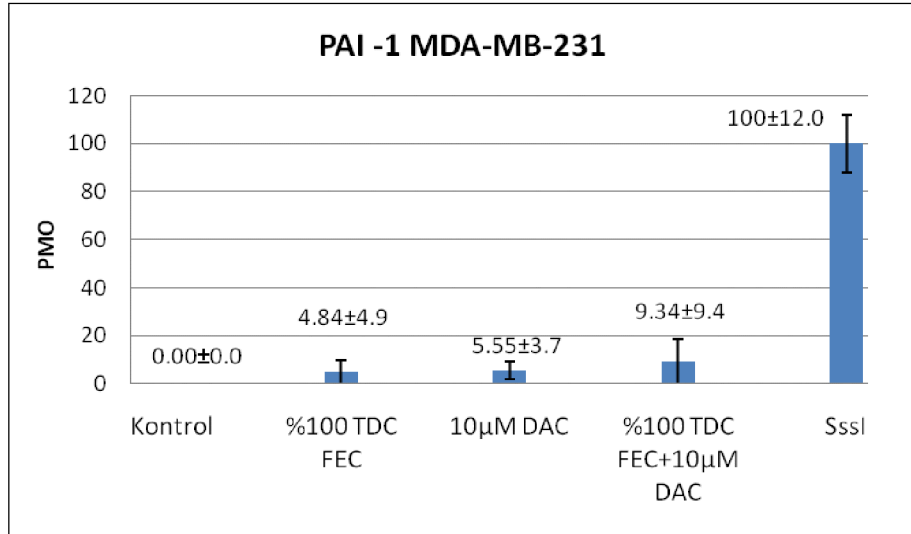
MCF-7 hücre soylarında *PAI-1* gen promotöründe metilasyon düzeyinin 283.7 ± 43.9 olarak oldukça yüksek seviyede olduğu belirlendi (Şekil 3.31.) MDA-MB-231 hücrelerinde *PAI-1* gen promotörünün demetile olduğu belirlendi (Şekil 3.32.). *PAI-1* gen promotör metilasyon seviyesinin MCF-7 hücrelerinde, %100 TDC FEC, 10µM desitabin ve %100 TDC FEC+10µM desitabin uygulamalarından sonra istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı gözlemlendi ($p < 0.05$). MDA-MB-231 kontrol grubu hücrelerinin *PAI-1* gen promotöründe belirlenen demetilasyon durumu tüm ilaç seçeneklerinden (%100 TDC FEC, 10µM desitabin, %100 TDC FEC+10µM desitabin) sonra istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik göstermedi ($p > 0.05$).



Şekil 3.31 MCF-7 hücrelerinde 48. saatte *PAI-1* gen promotöründe metilasyon seviyesinin TaqMan yöntemiyle gösterilmesi.

PMO: Promotör Metilasyon Oranı; Sssl: %100 metillenmiş kontrol

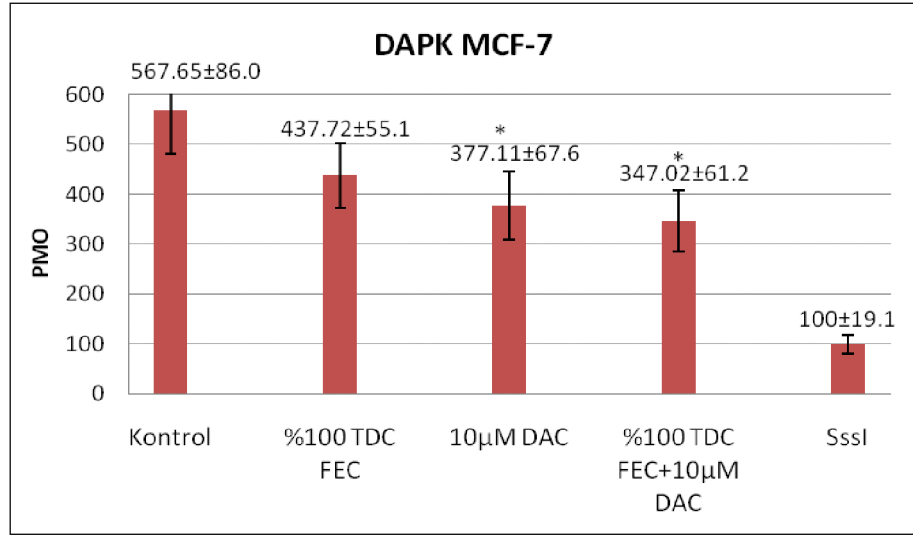
* Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir (p<0.05).



Şekil 3.32 MDA-MB-231 hücrelerinde 48. saatte *PAI-1* gen promotöründe metilasyon seviyesinin TaqMan yöntemiyle gösterilmesi.

PMO: Promotör Metilasyon Oranı; Sssl: %100 metillenmiş kontrol

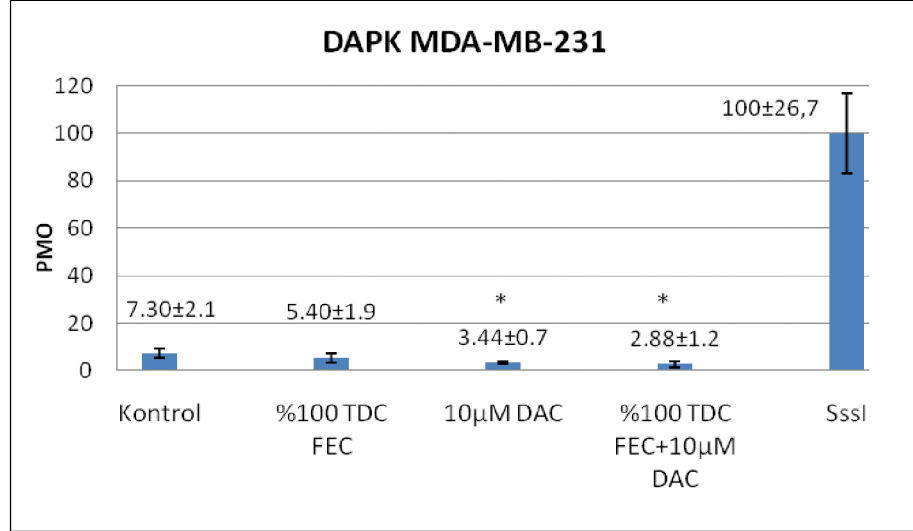
DAPK gen promotör metilasyonu MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soylarında TaqMan yöntemiyle analiz edildiğinde, MCF-7 hücrelerinde (Şekil 3.33.) yüksek metilasyon seviyesi belirlenmesine rağmen MDA-MB-231 hücrelerinde (Şekil 3.34.) metilasyon seviyelerinin düşük düzeyde olduğu belirlendi. Her iki hücre soyunda, *DAPK* gen metilasyon seviyesinin 10 μ M desitabin ve %100 TDC FEC+10 μ M desitabin uygulamalarından sonra anlamlı bir azalma görüldü ($p<0.05$).



Şekil 3.33 MCF-7 hücrelerinde 48. saatte *DAPK* gen promotöründe metilasyon seviyesinin TaqMan yöntemiyle gösterilmesi.

PMO: Promotör Metilasyon Oranı; Sssl: %100 metillenmiş kontrol

* Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir ($p<0.05$).

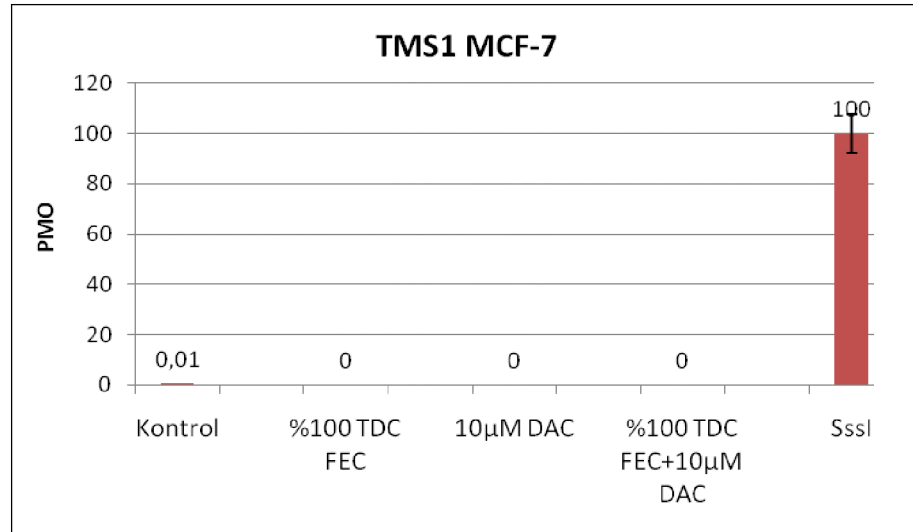


Şekil 3.34 MDA-MB-231 hücrelerinde 48. saatte *DAPK* gen promotöründe metilasyon seviyesinin TaqMan yöntemiyle gösterilmesi.

PMO: Promotör Metilasyon Oranı; Sssl: %100 metillenmiş kontrol

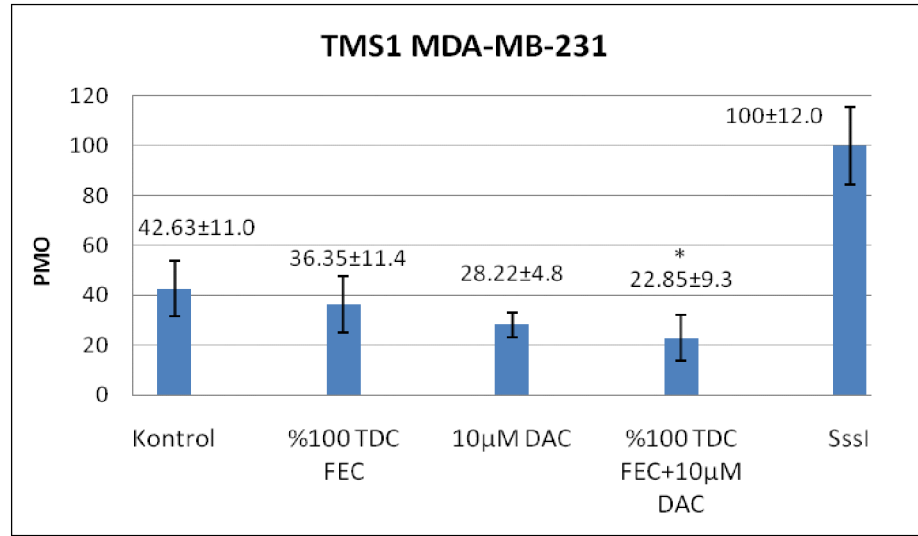
* Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir ($p<0.05$).

TMS1 gen promotörünün MCF-7 kontrol hücrelerinde demetile durumda olduğu TaqMan yöntemiyle belirlendi (Şekil 3.35.). MDA-MB-231 kontrol grubu hücrelerinde, *TMS1* gen promotörlerinin metilasyon seviyesinin 42.63 ± 11.0 seviyesinde olduğu belirlendi. MDA-MB-231 hücrelerinde %100 TDC FEC+10µM desitabin kombinasyonundan sonra metilasyon seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı saptandı (Şekil 3.36., $p<0.05$).



Şekil 3.35 MCF-7 hücrelerinde 48. saatte *TMS1* gen promotöründe metilasyon seviyesinin TaqMan yöntemiyle gösterilmesi.

PMO: Promotör Metilasyon Oranı; Sssl: %100 metillenmiş kontrol

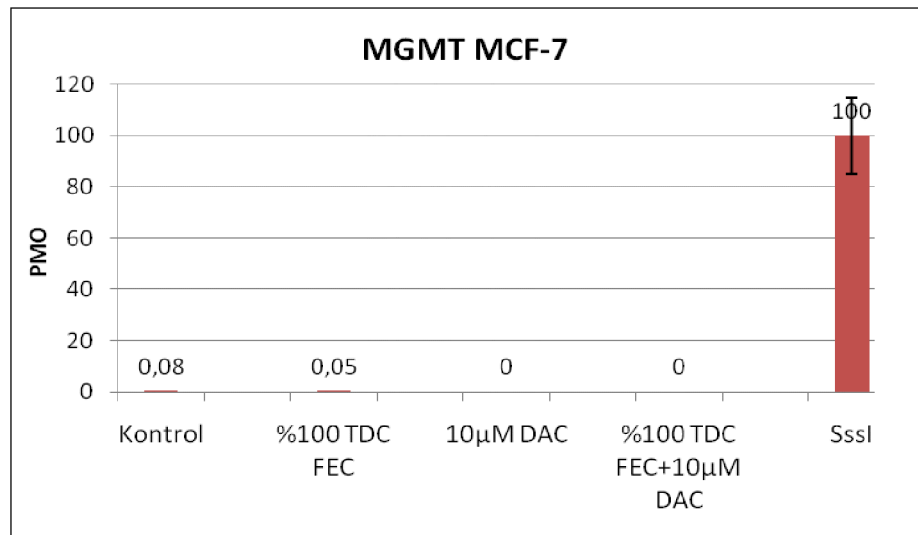


Şekil 3.36 MDA-MB-231 hücrelerinde 48. saatte *TMS1* gen promotöründe metilasyon seviyesinin TaqMan yöntemiyle gösterilmesi.

PMO: Promotör Metilasyon Oranı; Sssl: %100 metillenmiş kontrol

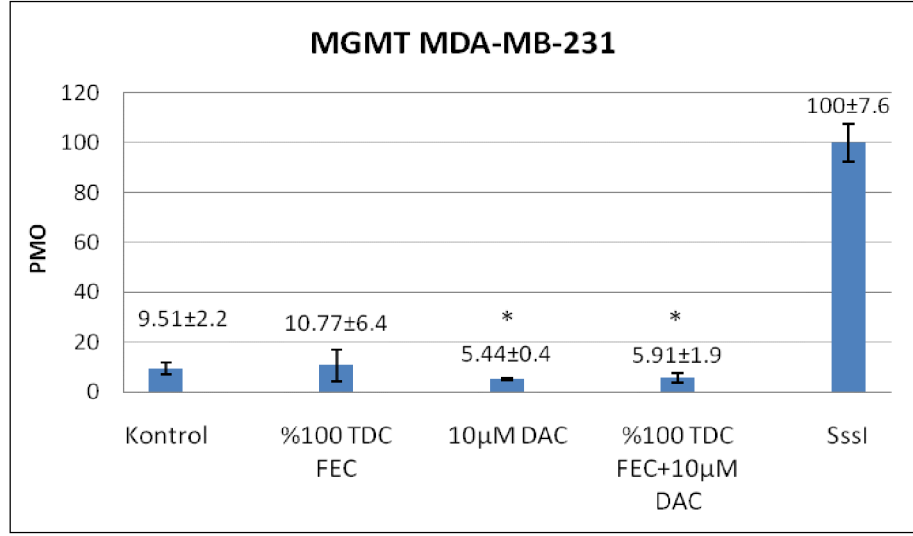
* Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir ($p < 0.05$).

MCF-7 kontrol hücrelerinde *MGMT* gen promotörünün demetile olduğu belirlendi (Şekil 3.37.). MDA-MB-231 hücrelerinde ise metilasyon seviyesinin oldukça düşük düzeyde olduğu bulundu. Bu seviyede 10µM desitabin ve %100 TDC FEC+10µM desitabin uygulamalarından sonra anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p < 0.05$) (Şekil 3.38.).



Şekil 3.37 MCF-7 hücrelerinde 48. saatte *MGMT* gen promotöründe metilasyon seviyesinin TaqMan yöntemiyle gösterilmesi.

PMO: Promotör Metilasyon Oranı; Sssl: %100 metillenmiş kontrol



Şekil 3.38 MDA-MB-231 hücre soyunda 48. saatte *MGMT* gen metilasyon seviyesinin Real-Time PCR yöntemiyle gösterilmesi.

PMO: Promotör Metilasyon Oranı, Sssl: %100 metillenmiş kontrol

* Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlıdır (P<0.05).

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Meme kanseri gelişimi gen seviyesinde değişikliklere neden olabilecek genetik ve epigenetik mekanizmalar içermektedir. Epigenetik mekanizmalar; DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve nükleozomal değişimler gibi DNA sekansında değişime neden olmaksızın gen ekspresyonunu etkileyen mekanizmaları kapsamaktadır. Günümüzde epigenetik mekanizmaların en önemlisi olduğu belirlenen DNA metilasyon mekanizmasının kanser tedavisinde etkili olduğu bilinmektedir (Szyf 2001). Meme kanseri gibi çeşitli tümörlerde DNA metilasyonunun desitabin gibi DNMT inhibitörleri tarafından engellendiği yapılan çalışmalar sonucunda gösterilmiştir (Xu ve ark. 2009, Oki ve ark. 2007, Meng ve ark. 2009, Fujikane ve ark. 2009).

Desitabinin DNMT inhibitörü olarak tümör baskılayıcı genlere olan etkisi ve kanser hastalarında kullanılması üzerine yapılan araştırmalar giderek artmaktadır (Stresemann ve Lyko 2008, Lemaire ve ark. 2008). Ayrıca desitabin gibi DNMT inhibitörlerinin tek başına ya da standart kemoterapi ile kombinasyonlarının epigenetik olarak meydana getirebilecekleri değişimler de araştırılmaktadır. Literatürde, epigenetik modifikasyonların kanser tedavisindeki rolü üzerine yapılan çalışmalarda zıt yönde etkilerin meydana gelebileceği rapor edilmiştir. Zhang ve ark. (2006), insan gastrik kanserlerinde desitabinin, antikanser ilaçlar ile beraber kullanıldığında sinerjistik olarak antiproliferatif etki gösterdiğini ayrıca apoptozis ile ilişkili genleri aktive ettiğini göstermişlerdir. Buna karşın Suzuki ve ark.'nın (2009) yaptıkları çalışmada, kanser hücrelerinde 5-Flourasil ve sisplatinin apoptozisi indükleyici etkisinin bir DNMT inhibitörü olan zebularin tarafından engellendiği belirlenmiştir. Bu zıt etkiler göz önünde bulundurularak, bu çalışmada standart kemoterapide kullanılan FEC tedavisi ile kombine olarak desitabin kullanımının, meme kanseri tedavisinde etkinliği arttırabilecek yeni bir yaklaşım olup olmadığı araştırıldı.

Bulgularda, desitabinin (5µM) MTT canlılık metoduna göre, 24. saatte ne MDA-MB-231 hücrelerinde ne de MCF-7 hücrelerinde anlamlı seviyede büyümeyi etkilemediği bulunmuştur (Şekil 3.6.). MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde 24 saat

sonra ATP seviyelerinin kontrole göre hücre canlılığını etkileyecek şekilde değişmemesi bu bulguları desteklemektedir (Şekil 3.7.). MCF-7 hücrelerinde 24 saat sonunda 5µM desitabin uygulamasında hücre canlılığında gözlenen %10'luk azalmanın, daha yüksek dozda gözlenmemesi ayrıca 48 saat sonrasında devam etmemesi bu inhibisyonun doza bağımlı olabileceğini düşündürmektedir. Desitabinin lösemi hastalarında düşük dozlarda, yüksek dozlardan daha etkili olduğu ve bu etkinin zamana bağlı olarak değişebileceği belirlenmiştir (Oki ve ark. 2007).

MTT canlılık testinde hücre canlılığı üzerine olan etki, dehidrogenaz aktivite miktarına göre belirlenirken; ATP testinde intrasellüler ATP düzeylerine göre belirlenmektedir. Her iki metodun da hücrelerdeki metabolik aktiviteyi göstermesine rağmen, elde edilen sonuçlar birbirinden farklı olabilir. Bu durum, kullanılan ilacın etki mekanizmasına göre değişmektedir. Bazı ilaçlar direkt olarak ATP üretimini etkileyebilir. 48 saat desitabin uygulaması sonunda, MDA-MB-231 hücrelerindeki intrasellüler ATP seviyesi, kontrole göre bir azalma göstermezken, MCF-7 hücrelerinde ise doza bağımlı olarak anlamlı bir azalma gözlenmektedir (Şekil 3.13.). MTT canlılık sonuçlarında ise desitabin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde hücre yaşamını etkilememektedir (Şekil 3.12.). Elde edilen sonuçlar ölen hücrelerin ATP içeriklerini kaybetmelerine rağmen, halen dehidrogenaz aktivitesine sahip olduklarını göstermektedir. Bulgularımızda gözlenen ATP seviyesindeki azalma ile gözlenen MCF-7 hücre canlılığındaki düşüşün MTT testi ile gözlenmemesi hücrelerin ölüyor olmasına rağmen halen dehidrogenaz içeriğini devam ettirdiğini düşündürmektedir. Nitekim daha önce yapılan başka bir çalışmada da MTT testinin hücrelerde yaşam aktivitesini ATP testine göre daha yüksek belirleyebildiği (inhibisyonu daha az gösterebildiği) gösterilmiştir (Ulukaya ve ark. 2008). Apoptozisle ölen hücrelerde, intrasellüler ATP miktarı tükenmiş iken dehidrogenaz aktivitesi devam ediyor olabilir. Yani hücrelerde gözlenen bu sonuç MTT testinden de kaynaklanıyor olabilir.

Elde edilen sonuçlara göre, 24 ve 48 saat %100 TDC'lik FEC uygulamasından sonra hücre canlılığı, MDA-MB-231 hücrelerinde MCF-7 hücrelerinden daha yüksek seviyede belirlenmiştir. Ayrıca 48 saatlik inkübasyonun 24 saate göre her iki hücrede de daha etkili olduğu MTT (şekil 3.14. ve şekil 3.16.) ve ATP canlılık sonuçları (şekil

3.15. ve şekil 3.17.) ile gösterilmiştir. Bu durumda, zamana bağlı olarak sitotoksik etkinin arttığını söyleyebiliriz. MDA-MB-231 hücrelerinde %100 TDC FEC ile kombine olarak desitabin kullanıldığında desitabinin FEC'in hücre canlılığını azaltıcı etkisini, daha da arttırdığı gözlenmiştir. Desitabinin gastrik kanserlerde kemoterapötik bir ilaç olarak ümit verici olduğunu (Zhang ve ark. 2006), prostat kanserlerinde ise hücrelerin apoptozise duyarlılığını arttırarak sisplatin (Fang ve ark. 2004) ve paklitaksel (Shang ve ark. 2009) yanıtını sinerjik olarak etkilediği gösterilmiştir. Ding ve ark. (2009) hepatosellüler kanser hücrelerinde yaptıkları çalışmada, desitabinin kamptotesin ile beraber kullanıldığında apoptozis ve büyüme inhibisyonunu arttırdığını göstermişlerdir. Bir diğer çalışmada desitabin ve dosetaksel kombinasyonunun MDA-MB-231 meme kanseri, Calu-6 akciğer ve DU-145 prostat kanser hücrelerinde DNA sentezini ilaçların yalnız kullanımından daha yüksek oranda inhibe ettiği gösterilmiştir (Hurtubise ve Momparler 2004).

Elde edilen sonuçlarda, FEC uygulamasının MDA-MB-231 hücrelerinde 24 ve 48 saat inkübasyondan sonra M30 antijen düzeylerinde artışa neden olmadığı, MCF-7 hücrelerinde artışa neden olduğu belirlenmiştir (şekil 3.19. ve şekil 3.20.). Bu bulgu, FEC'in MCF-7 hücrelerinde apoptozise yol açarak hücre ölümünü indüklediğini göstermektedir. FEC'in MDA-MB-231 hücrelerinde yol açtığı ölüm modunun ise nekrozis olduğu faz kontrast mikroskopisi ile yapılan incelemede gözlenmiştir. Yine bu incelemede MCF-7 hücrelerinde belirlenen apoptozis de morfolojik olarak doğrulanmıştır. Ayrıca 48 saatlik desitabin uygulamasında M30 antijen seviyesinin arttığı bulunmuştur (şekil 3.20.). Böylece, desitabinin de 48 saat sonra hücrelerde apoptozisi indükleyebildiğini söyleyebiliriz. Xu ve ark. (2007) yaptıkları çalışmada meme kanseri hücrelerinde desitabinin adriamisin antikanser ilacı ile birlikte kullanıldığında, ilaçların tek başına gösterdiği etkiye göre, apoptotik hücre ölümlerinin önemli oranda arttığını göstermişlerdir. Desitabinin antikanser aktivitesinin mekanizması tam olarak belirlenmemiş fakat apoptozisi indükleme mekanizmasının susturulmuş genleri (RUNX3) tekrar aktive etmesinden kaynaklanabileceği gösterilmiştir (Deng ve Zhang 2009).

Bu çalışmada, kanser gelişiminde etkili olan *uPA*, *PAI-1* (metastazla ilişkili), *DAPK*, *TMS1* (apoptozis indükleyen genler), *MGMT* (DNA onarım geni) genleri ve genel metilasyon belirteci olan *LINE-1* dizisi seçilerek metilasyon seviyelerindeki değişimler araştırıldı. DNA metilasyonunda meydana gelen spesifik değişikliklerin belirlenmesi, kanser hastalarında teşhis, risk tahmini, hastalığın gelişimi, erken tanı ve tedavinin etkinliği bakımından günümüzde bir belirteç olarak kabul edilmektedir (Esteller 2008; Li ve ark. 2006).

TaqMan methylight real time ve MSP bulgularımız sonucunda, MCF-7 hücrelerinde *DAPK* gen promotöründe yüksek metilasyon seviyesi (şekil 3.24. ve şekil 3.33.) MDA-MB-231 hücrelerinde ise düşük metilasyon seviyesi belirlenmiştir (şekil 3.24. ve şekil 3.34.). Buna rağmen *TMS1* gen promotörünün, MDA-MB-231 hücrelerinde hipermetile durumda olduğu gözlenmiştir (şekil 3.21. ve şekil 3.36.). Levine ve ark. (2003) *TMS1* gen promotörünün MDA-MB-231 hücrelerinde hipermetile, MCF-7 hücrelerinde ise demetile olduğunu, protein seviyeleri ile beraber belirlemişlerdir. Lehmann ve ark (2002) ise *DAPK* gen promotörünün MCF-7 hücrelerinde hipermetile olduğu ve buna bağlı olarak protein sentezinin olmadığını belirtmişlerdir. Yapılan son çalışmalar bu çalışmanın bulgularını destekler niteliktedir.

Bulgularımızda, %100 TDC FEC ve 10µM desitabin+%100 TDC FEC uygulamalarından sonra, MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinde *DAPK* gen metilasyon seviyesinde azalmanın olduğu gözlenmiştir (şekil 3.33. ve şekil 3.34.). Her iki hücre soyunda da 10µM desitabinin, %100 TDC FEC ile beraber kullanımında etkinin daha fazla olması, kombinasyonun en etkili seçenek olabileceğini düşündürmektedir. Yine MDA-MB-231 hücre soyunda hipermetile durumunda olan *TMS1* gen metilasyon seviyesinin, 10µM desitabin+%100 TDC FEC kombinasyonundan sonra ilaçların tek başına kullanımına göre daha düşük seviyede olması bu düşüncemizi desteklemektedir. MCF-7 hücrelerinde 10µM desitabinin, %100 TDC FEC ve bunların kombine kullanımından sonra belirlenen M30 antijen artışı, bu seçeneklerin apoptozis yolağını indükleyebileceğini göstermiştir (şekil 3.20.). MCF-7 hücrelerinde *DAPK* gen promotörünün bu ilaç seçeneklerinden sonra demetile olması *DAPK* geninin yeniden aktifleşmesinden kaynaklanabilir. Nitekim mesane ve nazofarenks kanserlerinde *DAPK*

geninin desitabin etkisiyle yeniden aktifleştigi gösterilmiştir (Xu ve ark. 2009, Kong ve ark. 2006). Ayrıca gastrik kanserlerde *DAPK* gen ekspresyonunun (Zhang ve ark. 2006, Qiu ve ark. 2009) prostat ve hepatik kanserlerinde ise *TMS1* gen ekspresyonlarının (Das ve ark. 2006, Zhang ve ark. 2007) desitabin etkisiyle arttığı belirlenmiştir.

Kanser hücreleri buldukları bölgelerden kan ya da lenf damarları yoluyla başka bölgelere yayılma yani metastaz özelliğine sahiptir. Kanser tedavisinin en önemli kısmını metastazı önlemek ya da durdurmak oluşturmaktadır. Metastaz tümör gelişimiyle daha başlangıç aşamasından itibaren paralel giden bir olaydır. Metastaz gelişimi ekstrasellüler matriksin parçalanması ve hücrelerin farklı bölgelere yayılmasını kapsamaktadır. Bu aşamalarda içerisinde uPA gibi birçok proteinaz ve birçok protein rol almaktadır (Ateeq ve ark. 2008). uPA ve bunun başlıca inhibitörü olan PAI-1 meme kanserlerinde metastaz durumlarının belirlenmesinde belirteç olarak kullanılmaktadırlar (De Cremoux ve ark. 2009, Thomssen ve ark. 2009). PAI-1 uPA'in inhibitörü olmasına rağmen, hücre adhezyonunu ve migrasyonunu düzenlemesi açısından metastazda da önemli rol almaktadır (Duffy 2004).

Elde edilen bulgulara göre, MCF-7 hücrelerinde 10µM desitabin, %100 TDC FEC ve 10µM desitabin+%100 TDC FEC uygulamalarından 48 saat sonra, *uPA* ve *PAI-1* gen promotör metilasyon seviyesinin azaldığı belirlenmiştir (şekil 3.29. ve şekil 3.34.). Özellikle kombinasyon seçeneğinden sonra metilasyon seviyesindeki azalmanın daha fazla ve alınan tüm sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olması, kombinasyon seçeneğinin *uPA* ve *PAI-1* ekspresyonunu da etkileyeceğini düşündürmektedir. Bu değişimin kanser hücrelerinin metastaz yapabilme yeteneğini de değiştirebileceğinden, oldukça önemli bir bulgu olduğunu düşünüyoruz. Daha önce yapılan çalışmalarda MCF-7 hücrelerinde desitabin etkisiyle *uPA* gen promotörünün demetile olduğu (Rabbani 2008) ve *uPA* ekspresyonunun arttırdığı da belirlenmiştir (Guo ve ark 2002, Ateeq ve ark. 2008). Bu durum, bu ilaçların kullanımının sakıncalı olabileceğini düşündürmektedir. Çünkü kanser hücrelerinin metastaz eğilimi artabilir.

Kanser tedavisinde ve kanser hücrelerinin kemoterapiye gösterdiği dirence karşı DNA hasarlarının onarım mekanizmaları önemli bir yer tutmaktadır (Gottesman 2002,

Kruh 2003). DNA onarım mekanizmasında sıkça rastladığımız genlerden biri *MGMT* genidir. *MGMT* geninin kodladığı protein O-6 Guanin pozisyonundan alkilenmiş guaninden alkil gruplarının uzaklaştırarak hasarın onarımında görev almaktadır. Bu şekilde DNA polimerazın hatalı çalışarak mutasyon oluşturmaya engel olur (Pegg 1990, Pegg ve ark. 1995). Kanser oluşumunda oldukça önemli bir yer tutan *MGMT* gen promotöründeki metilasyon değişiklikleri incelendiğinde, MDA-MB-231 hücre soylarında metilasyon seviyesinin oldukça düşük (9.51 ± 2.2) olduğu belirlenmiştir (şekil 3.38.). MCF-7 hücrelerinde ise herhangi bir sinyal gözlenmemiştir (şekil 3.37.). Bazı çalışmalarda MDA-MB-231 hücre soylarında *MGMT* gen promotörünün hipermetile olduğu belirlenmiştir (Hattermann ve ark. 2008; Kreklau ve ark. 2001). Gözlenen bu farklılık genin çalışılan bölgesinden kaynaklanabilir. MDA-MB-231 hücrelerinde, $10\mu\text{M}$ desitabin ve $10\mu\text{M}$ desitabin+%100 TDC FEC uygulamalarından sonra *MGMT* gen promotör seviyesinde anlamlı azalma gözlemlendi (5.44 ± 0.4 ; 5.91 ± 1.9). Bu ilaç seçenekleri *MGMT* ekspresyonunu MDA-MB-231 hücrelerinde attırmış olabilir.

LINE-1 elemanlarının metilasyonu, genomda genel metilasyon seviyesini gösteren belirteç olarak kullanılmaktadır (Weisenberger ve ark. 2005). Çalışmada genomdaki genel metilasyon seviyelerindeki değişimi belirlemek için *LINE-1* dizisi kullanıldı. Sonuçta, MCF-7 hücre soylarının genel metilasyon seviyesinin (60.93 ± 3.2) MDA-MB-231 hücrelerinden (49.63 ± 7.6) yüksek olduğu belirlenmiştir. Her iki hücre soyunda da $10\mu\text{M}$ desitabin ve $10\mu\text{M}$ desitabin+%100 TDC FEC uygulamalarından sonra genel metilasyon seviyelerinde azalma gözlemlenmiştir. Kombinasyondan sonra oluşan azalmanın istatistiksel olarak anlamlı derecede olması desitabinin FEC'in etkisini değiştirebileceğini göstermektedir (şekil 3.27. ve şekil 3.28.).

Sonuç olarak $10\mu\text{M}$ desitabin, %100 TDC FEC ve $10\mu\text{M}$ desitabin+%100 TDC FEC uygulamalarının apoptozisi indükleyerek hücrelerin büyümesini azaltabileceği belirlenmiştir. Bu ilaç seçeneklerinin, *uPA*, *PAI-1*, *TMS1* ve *DAPK* gibi metabolizmada kritik noktalarda rol alan genlerin promoter bölgelerindeki metilasyon seviyelerinde değişime neden olabileceği gösterilmiştir. Özellikle uygulanan $10\mu\text{M}$ desitabin+%100 TDC FEC kombinasyonu meme kanseri hastalarında yeni bir tedavi seçeneği olabilir. Kemoterapiye yüksek direnç gösteren meme kanseri hastalarında, standart kemoterapi

ile epigenetik ilaçların kombine kullanılması durumunda tedavi etkinliğinin artması (Arce ve ark. 2006) bu görüşümüzü desteklemektedir. Fakat diğer taraftan metastaz genlerindeki aktifleşme, bu ilaçların dikkatle uygulanmasını ya da daha ileri düzeyde araştırılmasını gerektirmektedir.

KAYNAKLAR

ALBERTS, B., A. JOHNSON, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS, P. WALTER. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. Fourth Edition, New York, 1314 p.

ALVES, G., A. TATRO, T. FANNING. 1996. Differential Methylation of Human *LINE-1* Retrotransposons in Malignant Cells. *Gene*, 176(1/2):39–44.

ANDERSON, L.W., T.L. CHEN, O.M. COLVIN, L.B. GROCHOW, J.M. COLLINS, M.J. KENNEDY, J.M. STRONG. 1996. Cyclophosphamide and 4-Hydroxycyclophosphamide/Aldophosphamide Kinetics in Patients Receiving High-Dose Cyclophosphamide Chemotherapy. *Clinical Cancer Research*, 2(9):1481-1487.

ANDREOTTI, P.E., I.A. CREE, C.M. KURBACHER, D.M. HARTMANN, D. LINDER, G. HAREL, I. GLEIBERMAN, P.A. CARUSO, S.H. RICKS, M. UNTCH, C. SARTORI, H.W. BRUCKNER. 1995. Chemosensitivity Testing of Human Tumors Using A Microplate Adenosine Triphosphate Luminescence Assay: Clinical Correlation for Cisplatin Resistance of Ovarian Cancer. *Cancer Research*, 55(22):5276 -5282.

ANGENETE, E., M. LANGENSKIÖLD, I. PALMGREN, P. FALK, T. ORESLAND, M.L. IVARSSON. 2009. *uPA* and *PAI-1* in Rectal Cancer-Relationship to Radiotherapy and Clinical Outcome. *The Journal Surgical Research*, 153(1):46-53.

ANNECKE, K., M. SCHMITT, U. EULER, M. ZERM, D. PAEPKE, S. PAEPKE, G. VON MINCKWITZ, C. THOMSEN, N. HARBECK. 2008. *UPA* and *PAI-1* in Breast Cancer: Review of Their Clinical Utility and Current Validation in the Prospective NNBC-3 Trial. *Advances in Clinical Chemistry*, 45:31-45.

ARCE, C., C. PEREZ-PLASENCIA, A. GONZALEZ-FIERRO, E. DE LA CRUZ-HERNANDEZ, A. REVILLA-VAZQUEZ, A. CHAVEZ-BLANCO, C. TREJO-BECERRIL, E. PEREZ-CARDENAS, L. TAJA-CHAYEB, E. BARGALLO, P. VILLARREAL, T. RAMIREZ, T. VELA, M. CANDELARIA, M.F. CAMARGO, E. ROBLES, A. DUENAS-GONZALEZ. 2006. A Proof-of-Principle Study of Epigenetic Therapy Added to Neoadjuvant Doxorubicin Cyclophosphamide for Locally Advanced Breast Cancer. *PLoS ONE* 1:e98.

ATEEQ, B., A. UNTERBERGER, M. SZYF, S.A. RABBANI. 2008. Pharmacological Inhibition of DNA Methylation Induces Proinvasive and Prometastatic Genes in Vitro and in Vivo. *Neoplasia*, 10(3):266-278.

BARISIC, K., J. PETRIK, L. RUMORA. 2003. Biochemistry of Apoptotic Cell Death. *Acta Pharmaceutica*, 53(3):151-164.

BAUMANN, S., G. KELLER, F. PUHRINGER, R. NAPIERALSKI, M. FEITH, R. LANGER, H. HÖFLER, H.J. STEIN, M. SARBIA. 2006. The Prognostic Impact of O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase (*MGMT*) Promoter Hypermethylation in Esophageal Adenocarcinoma. *International Journal of Cancer*;119(2):264–268.

BAYLIN, S.B. 2005. DNA Methylation and Gene Silencing in Cancer. *Nature Clinical Practice Oncology*, 2 Suppl 1:4-11 p.

BEENKEN, S.W., F.B. WANGER, K. BLAND. 2004. History of The Therapy of Breast Cancer in The Breast, KI Bland and EM Copeland III. Saunders – Elsevier, St.Louis, p.3-18.

BELANCIO, V.P., P.L. DEININGER, A.M. ROY-ENGEL. 2009. LINE Dancing in The Human Genome: Transposable Elements and Disease. *Genome Medicine*, 1(10):97.

BENSON, J.R., I. JATOI, M. KEISCH, F.J. ESTEVA, A. MAKRIS, V.C. JORDAN. 2009. Early Breast Cancer. *Lancet*, 373(9673):1463-1479.

BHAVANI, V., M. SRINIVASULU, Y.R. AHUJA, Q. HASAN. 2009. Role of BRCA1, HSD17B1 and HSD17B2 Methylation in Breast Cancer Tissue. *Cancer Biomark*, 5(4):207-213.

BIALIK, S., A. KIMCHI. 2006. The Death-Associated Protein Kinases: Structure, Function, and Beyond. *Annual Review of Biochemistry*, 75:189-210.

BIRD, A.P. 1996. The Relationship of DNA Methylation to Cancer. *Cancer Surveys*, 28:87-101.

BIRD, A. 2002. DNA Methylation Patterns and Epigenetic Memory. *Genes Development*, 16(1):6–21.

BIRD, A. 2007. Perceptions of Epigenetics. *Nature*, 447(7143):396–398.

BISHOP, J.M. 1991. Molecular Themes in Oncogenesis. *Cell*, 64(2): 235-248.

BORA, G., H.E. YURTER. 2007. Epigenetik Hastalıklar ve Tedavi Yaklaşımları. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 38:48-54.

BRABENDER, J., H. USADEL, R. METZGER, P.M. SCHNEIDER, J. PARK, D. SALONGA, D.D. TSAO-WEI, S. GROSHEN, R.V. LORD, N. TAKEBE, S. SCHNEIDER, A.H. HÖLSCHER, K.D. DANENBERG, P.V. DANENBERG. 2003. Quantitative O(6)-Methylguanine DNA Methyltransferase Methylation Analysis in Curatively Resected Non-Small Cell Lung Cancer: Associations with Clinical Outcome. *Clinical Cancer Research*, 9(1):223-227.

BRABENDER, J., D. ARBAB, X. HUAN, D. VALLBÖHMER, P. GRIMMINGER, F. LING, S. NEISS, E. BOLLSCHWEILER, P.M. SCHNEIDER, A.H. HÖLSCHER, R. METZGER. 2009. Death-Associated Protein Kinase (*DAPK*) Promoter Methylation and Response to Neoadjuvant Radiochemotherapy in Esophageal Cancer. *Annals of Surgical Oncology*, 16(5):1378-1383.

BRELL, M., A. TORTOSA, E. VERGER, J.M. GIL, N. VINOLAS, S. VILLA, J.J. ACEBES, L. CARAL, T. PUJOL, I. FERRER, T. RIBALTA, F. GRAUS. 2005.

Prognostic Significance of O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase Determined by Promoter Hypermethylation and Immunohistochemical Expression in Anaplastic Gliomas. *Clinical Cancer Research*, 11(14):5167-5174.

BROUCKAERT, G., M. KALAI, D.V. KRYSKO, X. SAELENS, D. VERCAMMEN, M. NDLOVU, G. HAEGEMAN, K. D'HERDE, P. VANDENABEELE. 2004. Phagocytosis of Necrotic Cells by Macrophages is Phosphatidylserine Dependent and Does Not Induce Inflammatory Cytokine Production. *Molecular Biology of the Cell*, 15(3):1089-1100.

BRUECKNER, B., F. LYKO. 2004. DNA Methyltransferase Inhibitors: Old and New Drugs for An Epigenetic Cancer Therapy. *Trends in Pharmacological Sciences*, 25(11):551-554.

CAYRE, A., F. PENAULT-LLORCA, M. DE LATOUR, C. ROLHION, V. FEILLEL, J.P. FERRIERE, F. KWIATKOWSKI, F. FINAT-DUCLOS, P. VERRELLE. 2002. O(6)-Methylguanine-DNA Methyl Transferase Gene Expression and Prognosis in Breast Carcinoma. *International Journal of Oncology*, 21(5):1125-1131.

CHALITCHAGORN, K., S. SHUANGSHOTI, N. HOURPAI, N. KONGRUTTANACHOK, P. TANGKIJVANICH, D. THONG-NGAM, N. VORAVUD, V. SRIURANPONG, A. MUTIRANGURA. 2004. Distinctive Pattern of *LINE-1* Methylation Level in Normal Tissues and The Association with Carcinogenesis. *Oncogene*, 23(54):8841-8846.

CHAN, K.Y., H. OZCELIK, A.N. CHEUNG, H.Y. NGAN, U.S. KHOO. 2002. Epigenetic Factors Controlling The BRCA1 and BRCA2 Genes in Sporadic Ovarian Cancer. *Cancer Research*, 62(14):4151-4156

CHEDIN, F., M.R. LIEBER, C.L. HSIEH. 2002. The DNA Methyltransferase-Like Protein DNMT3L Stimulates De Novo Methylation by Dnmt3a. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(26):16916-16921.

CHEN, C.M., H.L. CHEN, T.H. HSIAU, A.H. HSIAU, H. SHI, G.J. BROCK, S.H. WEI, C.W. CALDWELL, P.S. YAN, T.H. HUANG. 2003. Methylation Target Array for Rapid Analysis of CpG Island Hypermethylation in Multiple Tissue Genomes. *The American journal of pathology*, 163(1):37-45.

COHEN, O., B. INBAL, J.L. KISSIL, T. RAVEH, H. BERISSI, T. SPIVAK-KROIZAMAN, E. FEINSTEIN, A. KIMCHI. 1999. DAP-Kinase Participates in TNF-Alpha- and Fas-Induced Apoptosis and Its Function Requires The Death Domain. *The Journal of Cell Biology*, 146(1):141-148.

CONWAY, K.E., B.B. MCCONNELL, C.E. BOWRING, C.D. DONALD, S.T. WARREN, P.M. VERTINO. 2000. *TMS1*, A Novel Proapoptotic Caspase Recruitment Domain Protein, Is A Target of Methylation-Induced Gene Silencing in Human Breast Cancers. *Cancer Research*, 60(22):6236-6242.

COOPER, G.M. 2004. Programmed Cell Death. Cooper GM (Ed) The Cell. 3.Rd Edition. Washington, 592-596 p.

COUGHLIN, S.S., D.U. EKWUEME. 2009. Breast Cancer as A Global Health Concern. *Cancer Epidemiology*, 33(5):315-318.

DAMMANN, R., U. SCHAGDARSURENGIN, M. STRUNNIKOVA, M. RASTETTER, C. SEIDEL, L. LIU, S. TOMMASI, G.P. PFEIFER. 2003. Epigenetic Inactivation of The Ras-Association Domain Family 1 (RASSF1A) Gene and Its Function in Human Carcinogenesis. *Histology and histopathology*, 18(2):665-77.

DAS, P.M., K. RAMACHANDRAN, J. VANWERT, L. FERDINAND, G. GOPISETTY, I.M. REIS, R. SINGAL. 2006. Methylation-Mediated Silencing of *TMS1/ASC* Gene in Prostate Cancer. *Molecular Cancer*, 5:28.

DASKALAKIS, M., T.T. NGUYEN, C. NGUYEN, P. GULDBERG, G. KÖHLER, P. WIJERMANS, P.A. JONES, M. LÜBBERT. 2002. Demethylation of A Hypermethylated P15/INK4B Gene in Patients with Myelodysplastic Syndrome by 5-Aza-2'-Deoxycytidine (Decitabine) Treatment. *Blood*, 100(8):2957-2964.

DASKALOS, A., G. NIKOLAIDIS, G. XINARIANOS, P. SAVVARI, A. CASSIDY, R. ZAKOPOULOU, A. KOTSINAS, V. GORGOULIS, J.K. FIELD, T. LILOGLOU. 2009. Hypomethylation of Retrotransposable Elements Correlates with Genomic Instability in Non-Small Cell Lung Cancer. *International Journal of Cancer*, 124(1):81-87.

DAYAN, Y.B., S.V. KAVERI, M.D. KAZATCHKINE, Y. SHOENFELD. 2000. Is Cancer An Autoimmune Process Dependent on Anti-Apoptotic Autoantibodies? *Medical Hypotheses*, 55(2):103-108.

DE CREMOUX, P., L. GRANDIN, V. DIÉRAS, A. SAVIGNONI, A. DEGEORGES, R. SALMON, M.A. BOLLET, F. REYAL, B. SIGAL-ZAFRANI, A. VINCENT-SALOMON, X. SASTRE-GARAU, H. MAGDELÉNAT, L. MIGNOT, A. FOURQUET. 2009. Breast Cancer Study Group of The Institut Curie. Urokinase-Type Plasminogen Activator and Plasminogen-Activator-Inhibitor Type 1 Predict Metastases in Good Prognosis Breast Cancer Patients. *Anticancer Research*, 29(5):1475-1482.

DEGERLI Ü. 1998. Meme Kanseri. İn: Değerli ü. (eds). Genel Cerrahi. Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 288-296 p.

DELLAS, C., D.J. LOSKUTOFF. 2005. Historical Analysis of *PAI-1* From Its Discovery to Its Potential Role in Cell Motility and Disease. *Thrombosis and Haemostasis*, 93(4):631-640.

- DENG, T., Y. ZHANG. 2009. 5-Aza-2'-Deoxycytidine Reactivates Expression of RUNX3 by Deletion of DNA Methyltransferases Leading to Caspase Independent Apoptosis in Colorectal Cancer Lovo Cells. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 63(7):492-500.
- DING, L., L. QIU, J. ZHANG, B. GUO. 2009. Camptothecin-Induced Cell Proliferation Inhibition and Apoptosis Enhanced By DNA Methyltransferase Inhibitor, 5-Aza-2'-Deoxycytidine. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 32(6):1105-1108.
- DONEGAN, W.L. 2006. History of Breast Cancer in Breast Cancer DJ Winchester, DP Winchester, CA Hudis and L. Norton. Editors. DC Decker Inc. Ontario, p.1-14.
- DULAIMI, E., J. HILLINCK, I. IBANEZ DE CACERES, T. AL-SALEEM, P. CAIRNS. 2004. Tumor Suppressor Gene Promoter Hypermethylation in Serum of Breast Cancer Patients. *Clinical Cancer Research*, 10(18 Pt 1):6189-6193.
- DUCASSE, M., M.A. BROWN. 2006. Epigenetic Aberrations and Cancer. *Molecular Cancer*, 5:60.
- DUFFY, M.J. 2004. The Urokinase Plasminogen Activator System: Role in Malignancy. *Current Pharmaceutical Design*, 10(1):39-49.
- DURAND, M.K., J.S. BODKER, A. CHRISTENSEN, D.M. DUPONT, M. HANSEN, J.K. JENSEN, S. KJELGAARD, L. MATHIASSEN, K.E. PEDERSEN, S. SKELDAL, T. WIND, P.A. ANDREASEN. 2004. Plasminogen Activator Inhibitor-I and Tumour Growth, Invasion, and Metastasis. *Thrombosis and Haemostasis*, 91(3):438-449.
- DWORKIN, A.M., T.H. HUANG, A.E. TOLAND. 2009. Epigenetic Alterations in The Breast: Implications for Breast Cancer Detection, Prognosis and Treatment. *Seminars in Cancer Biology*, 19(3):165-171.
- EGGER, G., G. LIANG, A. APARICIO, A.P. JONES. 2004. Epigenetics in Human Disease and Prospects for Epigenetic Therapy. *Nature*, 429(6990):457-463.
- ESTAQUIER, J., T. IDZIOREK, F. DE BELS, F. BARRE-SINOUSI, B. HURTREL, A.M. AUBERTIN, A. VENET, M. MEHTALI, E. MUCHMORE, P. MICHEL, Y. MOUTON, M. GIRARD, J.C. AMEISEN. 1994. Programmed Cell Death and AIDS: Significance of T-Cell Apoptosis in Pathogenic and Nonpathogenic Primate Lentiviral Infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(20):9431-9435.
- ESTELLER, M., J.M. SILVA, G. DOMINGUEZ F BONILLA, X. MATIAS-GUIU, E. LERMA, E. BUSSAGLIA, J. PRAT, I.C. HARKES, E.A. REPASKY, E. GABRIELSON, M. SCHUTTE, S.B. BAYLIN, J.G. HERMAN. 2000. Promoter Hypermethylation and BRCA1 Inactivation in Sporadic Breast and Ovarian Tumors. *Journal of The National Cancer Institute*, 92(7):564-569.

EESTELLER, M. 2007. Epigenetic Gene Silencing in Cancer: The DNA Hypermethylome. *Human Molecular Genetics*, 16(1):50-59.

EESTELLER, M. 2008. Epigenetics in Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 358(11):1148-1159.

FADEEL, B., S. ORRENIUS. 2005. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-Ranging Implications in Human Disease. *Journal of Internal Medicine*, 258(6):479-517.

FANG, X., C. ZHENG, Z. LIU, P. EKMAN, D. XU. 2004. Enhanced Sensitivity of Prostate Cancer DU145 Cells to Cisplatin by 5-Aza-2'-Deoxycytidine. *Oncology Reports*, 12(3):523-526.

FEINBERG, A.P., B. VOGELSTEIN. 1983. Hypomethylation Distinguishes Genes of Some Human Cancers From Their Normal Counterparts. *Nature*, 301(5895):89-92.

FENG, J., L.H. HU, J. LU, Y.R. LI, F. XIE. 2009. Diagnostic Value of BRCA1 and P16 Gene Methylation in Sporadic Breast Cancer. *Chinese Journal of Cancer*, 28(4):436-440.

FERGUSON, A.T., R.G. LAPIDUS, S.B. BAYLIN, N.E. DAVIDSON. 1995. Demethylation of The Estrogen Receptor Gene in Estrogen Receptor-Negative Breast Cancer Cells Can Reactivate Estrogen Receptor Gene Expression. *Cancer Research*, 55(11):2279-2283.

FLORL, A.R., C. STEINHOFF, M. MÜLLER, H.H. SEIFERT, C. HADER, R. ENGERS, R. ACKERMANN, W.A. SCHULZ. 2004. Coordinate Hypermethylation at Specific Genes in Prostate Carcinoma Precedes *LINE-1* Hypomethylation. *British Journal of Cancer*, 91(5):985-994.

FRIEDRICH, M.G., D.J. WEISENBERGER, J.C. CHENG, S. CHANDRASOMA, K.D. SIEGMUND, M.L. GONZALGO, M.I. TOMA, H. HULAND, C. YOO, Y.C. TSAI, P.W. NICHOLS, B.H. BOCHNER, P.A. JONES, G. LIANG. 2004. Detection of Methylated Apoptosis-Associated Genes in Urine Sediments of Bladder Cancer Patients. *Clinical Cancer Research*, 10(22):7457-7465.

FUJIKANE, T., N. NISHIKAWA, M. TOYOTA, H. SUZUKI, M. NOJIMA, R. MARUYAMA, M. ASHIDA, M. OHE-TOYOTA, M. KAI, T. NISHIDATE, Y. SASAKI, T. OHMURA, K. HIRATA, T. TOKINO. 2009. Genomic Screening for Genes Upregulated by Demethylation Revealed Novel Targets of Epigenetic Silencing in Breast Cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, (Basimda).

GALLE, P.R. 1997. Apoptosis in Liver Disease. *Journal of Hepatology*, 27: 405-412.

GAMA-SOSA, M.A., R.M. MIDGETT, V.A. SLAGEL, S. GITHENS, K.C. KUO, C.W. GEHRKE, M. EHRLICH. 1983. Tissue Specific Differences in DNA Methylation in Various Mammals. *Biochimica et Biophysica Acta*, 740(2):212-219.

GAO, S. S. SKELDAL, A. KROGDAHL, J.A. SORENSEN, P.A. ANDREASEN. 2005. CpG Methylation of The *PAI-1* Gene 5'-Flanking Region Is Inversely Correlated with *PAI-1* mRNA Levels in Human Cell Lines. *Thrombosis and Haemostasis*, 94(3):651-660.

GHOSHAL, K., S. BAI. 2007. DNA Methyltransferases As Targets for Cancer Therapy. *Drugs of Today (Barcelona, Spain: 1998)*, 43(6):395-422.

GONZALEZ-GOMEZ, P., M.J. BELLO, M.E. ALONSO, J. LOMAS, D. ARJONA, C. AMINOSO, J.M. DE CAMPOS, A. ISLA, M. GUTIERREZ, J.A. REY. 2003. Frequent Death-Associated Protein-Kinase Promoter Hypermethylation in Brain Metastases of Solid Tumors. *Oncology Reports*. 10(4):1031-1033.

GOPISETTY, G., K. RAMACHANDRAN, R. SINGAL. 2006. DNA Methylation and Apoptosis. *Molecular Immunology*, 43(11): 1729-1740.

GORDIAN, E., K. RAMACHANDRAN, R. SINGAL. 2009. Methylation Mediated Silencing of *TMS1* in Breast Cancer and Its Potential Contribution to Docetaxel Cytotoxicity. *Anticancer Research*, 29(8): 3207-3210.

GORE, S.D., C. JONES, P. KIRKPATRICK. 2006. Decitabine. *Nature reviews Drug Discovery*, 5(11):891-892.

GOTTESMAN, M.M. 2002. Mechanisms of Cancer Drug Resistance. *Annual Review of Medicine*, 53:615-627.

GRAFF, J.R., E. GABRIELSON, H. FUJII, S.B. BAYLIN, J.G. HERMAN. 2000. Methylation Patterns of The E-Cadherin 5' CpG Island Are Unstable and Reflect The Dynamic, Heterogeneous Loss of Ecadherin Expression During Metastatic Progression. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(4):2727-2732.

GRIGG, G., S. CLARK. 1994. Sequencing 5-Methylcytosine Residues in Genomic DNA. *BioEssays*, 16(6):431-436.

GUO, Y., P. PAKNESHAN, J. GLADU, A. SLACK, M. SZYF, S.A. RABBANI. 2002. Regulation of DNA Methylation in Human Breast Cancer. Effect on The Urokinase-Type Plasminogen Activator Gene Production and Tumor Invasion. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(44):41571-41579.

GUPTA, A., A.K. GODWIN, L. VANDERVEER, A. LU, J. LIU. 2003. Hypomethylation of The Synuclein Gamma Gene CpG Island Promotes Its Aberrant Expression in Breast Carcinoma and Ovarian Carcinoma. *Cancer Research*, 63(3):664-673.

HANAHAH, D., R.A. WEINBERG. 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1):57-70.

HATTERMANN, K., H.M. MEHDORN, R. MENTLEIN, S. SCHULTKA, J. HELDFEINDT. 2008. A Methylation-Specific and SYBR-Green-Based Quantitative Polymerase Chain Reaction Technique for O6-Methylguanine DNA Methyltransferase Promoter Methylation Analysis. *Analytical Biochemistry*, 377(1):62-71.

HAYATSU, H. 2008. Discovery of Bisulfite-Mediated Cytosine Conversion To Uracil, The Key Reaction for DNA Methylation Analysis. A Personal Account. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*, 84(8):321-330.

HERFARTH, K.K., T.P. BRENT, R.P. DANAM, J.S. REMACK, I.J. KODNER, S.A. WELLS JR, P.J. GOODFELLOW. 1999. A Specific CpG Methylation Pattern of The *MGMT* Promoter Region Associated with Reduced *MGMT* Expression in Primary Colorectal Cancers. *Molecular Carcinogenesis*, 24(2):90-98.

HERMAN, J.G., A. MERLO, L. MAO, R.G. LAPIDUS, J.P. ISSA, N.E. DAVIDSON, et al. 1995. Inactivation of The *CDKN2/P16/MTS1* Gene is Frequently Associated with Aberrant DNA Methylation in All Common Human Cancers. *Cancer Research*, 55(20):4525-4530.

HERMAN, J.G., J.R. GRAFF, S. MYOHANEN, B.D. NELKIN, S.B. BAYLIN. 1996. Methylation-Specific PCR: A Novel PCR Assay for Methylation Status of CpG Islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(18):9821-9826.

HINSHELWOOD, R.A., S.J. CLARK. 2008. Breast Cancer Epigenetics: Normal Human Mammary Epithelial Cells As A Model System. *Journal of Molecular Medicine*, 86(12):1315-1328.

HIROSE, Y., N. YOSHIMI, M. SUZUI, K. KAWABATA, T. TANAKA, H. I. 1997. Expression of Bcl-2, Bax, and Bcl-XL Proteins in Azoxymethane-Induced Rat Colonic Adenocarcinomas. *Molecular Carcinogenesis*, 19(1):25-30.

HOFFMANN, A.C., J.T. KAIFI, D. VALLBÖHMER, E. YEKEBAS, P. GRIMMINGER, J.M. LEERS, J.R. IZBICKI, A.H. HÖLSCHER, P.M. SCHNEIDER, R. METZGER, J. BRABENDER. 2009. Lack of Prognostic Significance of Serum DNA Methylation of *DAPK*, *MGMT*, and *GSTPI* in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *Journal of Surgical Oncology*, 100(5):414-417.

HUANG, T.H., D.E. LAUX, B.C. HAMLIN, P. TRAN, H. TRAN, D.B. LUBAHN. 1997. Identification of DNA Methylation Markers for Human Breast Carcinomas Using The Methylation-Sensitive Restriction Fingerprinting Technique. *Cancer Research*, 57(6):1030-1034.

HUANG, T.H., M.R. PERRY, D.E. LAUX. 1999. Methylation Profiling of CpG Islands in Human Breast Cancer Cells. *Human Molecular Genetic*, 8(3):459-470.

HUNOT, S., R.A. FLAVELL. 2001. Apoptosis. Death of A Monopoly? *Science*, 292(5518):865-856.

HUPPERTZ, B., H.G. FRANK, P. KAUFMANN. 1999. The Apoptosis Cascade; Morphological and Immunohistochemical Methods for Its Visualization. *Anatomy and Embryology*, 200(1):1-18.

HURTUBISE, A., R.L. MOMPALER. 2004. Evaluation of Antineoplastic Action of 5-Aza-2'-Deoxycytidine (Dacogen) and Docetaxel (Taxotere) on Human Breast, Lung and Prostate Carcinoma Cell Lines. *Anticancer Drugs*, 15(2):161-167.

IMAOKA, T., M. NISHIMURA, D. IIZUKA, K. DAINO, T. TAKABATAKE, M. OKAMOTO, S. KAKINUMA, Y. SHIMADA. 2009. Radiation-Induced Mammary Carcinogenesis in Rodent Models: What's Different From Chemical Carcinogenesis? *Journal of Radiation Research*, 50(4):281-293.

INGOLD, B., P. SCHRAML, F.L. HEPPNER, H. MOCH. 2009. Homogeneous *MGMT* Immunoreactivity Correlates with An Unmethylated *MGMT* Promoter Status in Brain Metastases of Various Solid Tumors. *PLoS One*, 4(3):4775.

ISRAELS, L.G., E.D. ISRAELS. 1999. Apoptosis. *The Oncologist*. 4(4):332-339.

JACINTO, F.V., M. ESTELLER. 2007. *MGMT* Hypermethylation: A Prognostic Foe, A Predictive Friend. *DNA Repair*, 6(8):1155-1160.

JARVINEN, T.A., K. HOLLI, T. KUUKASJARVI, J.J. ISOLA. 1998. Predictive Value of Topoisomerase II Alpha and Other Prognostic Factors for Epirubicin Chemotherapy in Advanced Breast Cancer. *British Journal of Cancer*, 77(12):2267-2273.

JIN, Z., W.S. EL-DEIRY. 2005. Overview of Cell Death Signalling Pathways. *Cancer Biology and Therapy*, 4(2):139-163.

JINNO, H., M. SAKATA, T. HAYASHIDA, M. TAKAHASHI, M. MUKAI, T. IKEDA, Y. KITAGAWA. 2009. A Phase II Trial of Capecitabine and Docetaxel Followed by 5-Fluorouracil/Epirubicin/Cyclophosphamide (FEC) As Preoperative Treatment in Women with Stage II/III Breast Cancer. *Annals of Oncology*. (Basimda).

JONES, P.A., D. TAKAI. 2001. The Role of DNA Methylation in Mammalian Epigenetics. *Science*, 293(5532):1068-1070.

KAMINKAS, E., T.A. FARRELL, C.Y. WANG, R. SRIDHARA, R. PAZDUR. 2005. FDA Drug Approval Summary: Azacitidine (5-Azacytidine, Vidaza) for Injectable Suspension. *The Oncologist*, 10(3):176-182.

KAPOOR-VAZIRANI, P., J.D. KAGEY, D.R. POWELL, P.M. VERTINO. 2008. Role of hMOF-Dependent Histone H4 Lysine 16 Acetylation in The Maintenance of *TMSI/ASC* Gene Activity. *Cancer Research*, 68(16):6810-6821.

KAINA, B., M. CHRISTMANN, S. NAUMANN, W.P. ROOS. 2007. *MGMT*: Key Node in The Battle Against Genotoxicity, Carcinogenicity and Apoptosis Induced by Alkylating Agents. *DNA Repair*, 6(8):1079-1099.

KASS, S.U., D. PRUSS, A.P. WOLFFE. 1997. How Does DNA Methylation Repress Transcription? *Trends in Genetics*, 13(11):444-449.

KERR, J.F., A.H. WYLLIE, A.R. CURRIE. 1972. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4):239-257.

KIM, J.I., J.T. SUH, K.U. CHOI, H.J. KANG, D.H. SHIN, I.S. LEE, T.Y. MOON, W.T. KIM. 2009. Inactivation of O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase in Soft Tissue Sarcomas: Association with K-Ras Mutations. *Human Pathology*, 40(7):934-941.

KIMURA, F., H.H. SEIFERT, A.R. FLORL, S. SANTOURLIDIS, C. STEINHOFF, S. SWIATKOWSKI, C. MAHOTKA, C.D. GERHARZ, W.A. SCHULZ. 2003. Decrease of DNA Methyltransferase 1 Expression Relative to Cell Proliferation in Transitional Cell Carcinoma. *International Journal of Cancer*, 104(5):568-578.

KHAN, S., T. KUMAGAI, J. VORA, N. BOSE, I. SEHGAL, P.H. KOEFFLER, S. BOSE. 2004. PTEN Promoter is Methylated in A Proportion of Invasive Breast Cancers. *International Journal of Cancer*, 112(3):407-410.

KONG, W.J., S. ZHANG, C.K. GUO, Y.J. WANG, X. CHEN, S.L. ZHANG, D. ZHANG, Z. LIU, W. KONG. 2006. Effect of Methylation-Associated Silencing of The Death-Associated Protein Kinase Gene on Nasopharyngeal Carcinoma. *Anticancer Drugs*, 17(3):251-259.

KREKLAU, E.L., M. LIMP-FOSTER, N. LIU, Y. XU, M.R. KELLEY, L.C. ERICKSON. 2001. A Novel Fluorometric Oligonucleotide Assay to Measure O(6)-Methylguanine DNA Methyltransferase, Methylpurine DNA Glycosylase, 8-Oxoguanine DNA Glycosylase and Abasic Endonuclease Activities: DNA Repair Status in Human Breast Carcinoma Cells Overexpressing Methylpurine DNA Glycosylase. *Nucleic Acids Research*, 29(12):2558-2566.

KRUH, G.D. 2003. Introduction to Resistance to Anticancer Agents. *Oncogene*, 22(47):7262-7264.

LAPIDUS, R.G., A.T. FERGUSON, Y.L. OTTAVIANO, F.F. PARL, H.S. SMITH, S.A. WEITZMAN, S.B. BAYLIN, J.P. ISSA, N.E. DAVIDSON. 1996. Methylation of Estrogen and Progesterone Receptor Gene 50 CpG Islands Correlates with Lack of Estrogen and Progesterone Receptor Gene Expression in Breast Tumors. *Clinical Cancer Research*, 2(5):805-810.

LEHMANN, U., G. CELIKKAYA, B. HASEMEIER, F. LANGER, H. KREIPE. 2002. Promoter Hypermethylation of The Death-Associated Protein Kinase Gene in Breast

Cancer Is Associated with The Invasive Lobular Subtype. *Cancer Research*, 62(22):6634-6638.

LEI, H., S.P. OH, M. OKANO, R. JÜTTERMANN, K.A. GOSS, R. JAENISCH, E. LI. 1996. De Novo DNA Cytosine Methyltransferase Activities in Mouse Embryonic Stem Cells. *Development*, 122(10):3195–3205.

LEMAIRE, M., G.G. CHABOT, N.J. RAYNAL, L.F. MOMPARDLER, A. HURTUBISE, M.L. BERNSTEIN, M. RL OMPARDLER. 2008. Importance of Dose-Schedule of 5-Aza-2'-Deoxycytidine for Epigenetic Therapy of Cancer. *BMC Cancer*, 8:128.

LEVINE, J.J., K.M. STIMSON-CRIDER, P.M. VERTINO. 2003. Effects of Methylation on Expression of *TMS1/ASC* in Human Breast Cancer Cells. *Oncogene*, 22(22):3475-3488.

LI, S., M. RONG, B. IACOPETTA. 2006. DNA Hypermethylation in Breast Cancer and Its Association with Clinicopathological Features. *Cancer Letters*, 237(2):272-280.

LUCAS, M.E., K.S. CRIDER, D.R. POWELL, P. KAPOOR-VAZIRANI, P.M. VERTINO. 2009. Methylation-Sensitive Regulation of *TMS1/ASC* by The Ets Factor, GA-Binding Protein-Alpha. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(22):14698-14709.

MACNAUGHTON, J.B., R.G. WILKS, J.S. LEE, A. MOEWES. 2006. Experimental and Theoretical Investigation of The Electronic Structure of 5-Fluorouracil Compounds. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110(37):18180-18190.

MARSHALL, C.J. 1991. Tumor Suppressor Genes. *Cell*, 64(2):313-326.

MASUMOTO, J., T.A. DOWDS, P. SCHANER, F.F. CHEN, Y. OGURA, M. LI, L. ZHU, T. KATSUYAMA, J. SAGARA, S. TANIGUCHI, D.L. GUMUCIO, G. NUNEZ, N. INOHARA. 2003. *ASC* Is An Activating Adaptor for NF-Kappa B and Caspase-8-Dependent Apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 303(1): 69-73.

MATEI, D.E., K.P. NEPHEW. 2009. Epigenetic Therapies for Chemoresensitization of Epithelial Ovarian Cancer. *Gynecologic Oncology*, 116(2):195-201.

MATSUKURA, S., K. MIYAZAKI, H. YAKUSHIJI, A. OGAWA, K. HARIMAYA, Y. NAKABEPPU, M. SEKIGUCHI. 2001. Expression and Prognostic Significance of O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase in Hepatocellular, Gastric, and Breast Cancers. *Annals of Surgical Oncology*, 8(10):807-816.

MAVROUDIS, D., P. PAPAKOTOULAS, A. ARDAVANIS, K. SYRIGOS, S. KAKOLYRIS, N. ZIRAS, C. KOUROUSSIS, N. MALAMOS, A. POLYZOS, C. CHRISTOPHYLLAKIS, N. KENTEPOZIDIS, V. GEORGOULIAS. 2009. Randomized Phase III Trial Comparing Docetaxel Plus Epirubicin Versus Docetaxel

Plus Capecitabine As First-Line Treatment in Women with Advanced Breast Cancer. *Annals of Oncology*, 21(1):48-54.

MCCARTHY, N.J., M.R. BENNETT. 2002. Death Signalling by The CD95/TNFR Family of Death Domain-Containing Receptors. In: Jacobson MD, McCarthy N, Editors. *Apoptosis: The Molecular Biology of Programmed Cell Death*. Oxford University Press. Oxford, 200-234 p.

MCCONNELL, B.B., P.M. VERTINO. 2004. *TMS1/ASC*: The Cancer Connection. *Apoptosis*, 9(1):5-18.

MENG, C.F., X.J. ZHU, D.Q. DAI, G. PENG. 2009. Effects of 5-Aza-2'-Deoxycytidine and Trichostatin A on P16, Hmlh1 and *MGMT* Genes and DNA Methylation in Human Gastric Cancer Cells. *Chinese Journal of Gastrointestinal Surgery*, 12(5):494-497.

MIRZA, S., G SHARMA, C.P. PRASAD, R. PARSHAD, A. SRIVASTAVA, S.D. GUPTA, R. RALHAN. 2007. Promoter Hypermethylation of TMS1, BRCA1, Eralpha a and PRB in Serum and Tumor DNA of Invasive Ductal Breast Carcinoma Patients. *Life Sciences*, 81(4):280-287.

MIYAMOTO, K., T. USHIJIMA. 2005. Diagnostic and Therapeutic Applications of Epigenetics. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 35(6):293-301.

MOMPARLER, R.L., V. BOVENZI. 2000. DNA Methylation and Cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 183(2):145-154.

MOSS, T.J., L.L. WALLRATH. 2007. Connections Between Epigenetic Gene Silencing and Human Disease. *Mutation Research*, 618(1-2):163-174.

MOSMANN, T., 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2):55-63.

MUND, C., B. HACKANSON, C. STRESEMANN, M. LÜBBERT, F. LYKO. 2005. Characterization of DNA Demethylation Effects Induced by 5-Aza-2'-Deoxycytidine in Patients with Myelodysplastic Syndrome. *Cancer Research*, 65(16):7086-7090.

MUNOT, K., S.M. BELL, S. LANE, K. HORGAN, A.M. HANBY, V. SPEIRS. 2006. Pattern of Expression of Genes Linked to Epigenetic Silencing in Human Breast Cancer. *Human Pathology*, 37(8):989-999.

MURATA, H., N.H. KHATTAR, Y. KANG, L. GU, G.M. LI. 2002. Genetic and Epigenetic Modification of Mismatch Repair Genes HSMH2 and HMLH1 in Sporadic Breast Cancer with Microsatellite Instability. *Oncogene*, 21(37):5696-5703.

NAN, X., H.H. NG, C.A. JOHNSON, C.D. LAHERTY, B.M. TURNER, R.N. EISENMAN, A. BIRD. 1998. Transcriptional Repression by The Methyl-Cpg-Binding Protein MECP2 Involves A Histone Deacetylase Complex. *Nature*, 393(6683):386-389.

NATARAJAN, A.T., S. VERMEULEN, F. DARROUDI, M.B. VALENTINE, T.P. BRENT, S. MITRA, K. TANO. 1992. Chromosomal Localization of Human O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase (*MGMT*) Gene by In Situ Hybridization. *Mutagenesis*, 7(1):83-85.

NOORDHUIS, P., U. HOLWERDA, C.L. VAN DER WILT, C.J. VAN GROENINGEN, K. SMID, S. MEIJER, H.M. PINEDO, G.J. PETERS. 2004. 5-Fluorouracil Incorporation Into RNA and DNA in Relation to Thymidylate Synthase Inhibition of Human Colorectal Cancers. *Annals of Oncology*, 15(7):1025-1032.

OHNO, T., J. HIRAGA, H. OHASHI, C. I, E. LI, H. ASANO, T. ITO, H. I, Y. YAMASHITA, N. MORI, T. KINOSHITA, T. NAOE. 2006. Loss of O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase Protein Expression is A Favorable Prognostic Marker in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *International Journal of Hematology*, 83(4):341-347.

OKI, Y., E. AOKI, J.P. ISSA. 2007. Decitabine Bedside to Bench. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 61(2):140-152.

OLINSKI, R., P. JARUGA, M. FOKSINSKI, K. BIALKOWSKI, J. TUJAKOWSKI. 1997. Epirubicin-Induced Oxidative DNA Damage and Evidence for Its Repair in Lymphocytes of Cancer Patients Who Are Undergoing Chemotherapy. *Molecular Pharmacology*, 52(5):882-885.

OLIVEIRA, P.A., A. COLAÇO, R. CHAVES, H. GUEDES-PINTO, P.L.F. DE-LA-CRUZ, C. LOPES. 2007. Chemical Carcinogenesis. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 79(4):593-616 p

ONRUST, S.V., L.R. WISEMAN, K.L. GOA. 1999. Epirubicin: A Review of Its Intravesical Use in Superficial Bladder Cancer. *Drugs and Aging*, 15(4):307-333.

OSANAI, T., Y. TAKAGI, Y. TORIYA, T. NAKAGAWA, T. ARUGA, S. IIDA, H. UETAKE, K. SUGIHARA. 2005. Inverse Correlation Between The Expression of O6-Methylguanine-DNA Methyl Transferase (*MGMT*) and P53 in Breast Cancer. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 35(3):121-125.

ÖKTEM, S., M.H. ÖZHAN, D. ÖZOL. 2001. Apoptozisin Önemi. *Toraks Dergisi*, 2(1):91-95.

ÖZİŞİK Y., E. BALTALI. 2004. Meme Kanseri. In: Yasavul Ü (eds). *Hacettepe İç Hastalıkları Kitabı*. Semih Ofset. Ankara, 1426-435 p.

PAKNESHAN, P.M. SZYF, R. FARIAS-EISNER, S.A. RABBANI. 2004. Reversal of The Hypomethylation Status of Urokinase (*uPA*) Promoter Blocks Breast Cancer Growth and Metastasis. *The Journal Biological Chemistry*, 279(30):31735-31744.

- PAKNESHAN, P., M. SZYF, S.A. RABBANI. 2005. Hypomethylation of Ürokinase (*UPA*) Promoter in Breast and Prostate Cancer: Prognostic and Therapeutic Implications. *Current Cancer Drug Targets*, 5(7):471-488.
- PALMIROTTA, R., P. FERRONI, A. SAVONAROLA, F. MARTINI, F. CIATTI, A. LAUDISI, V. SINI, G. DEL MONTE, F. GUADAGNI, M. ROSELLI. 2009. Prognostic Value of Pre-Surgical Plasma *PAI-1* (Plasminogen Activator Inhibitor-1) Levels in Breast Cancer. *Thrombosis Research*, 124(4):403-408.
- PARK, T.J., S.U. HAN, Y.K. CHO, W.K. PAIK, Y.B. KIM, I.K. LIM. 2001. Methylation of O(6)-Methylguanine-DNA Methyltransferase Gene is Associated Significantly with K-Ras Mutation, Lymph Node Invasion, Tumor Staging, and Disease Free Survival in Patients with Gastric Carcinoma. *Cancer*, 92(11):2760-2768.
- PARKIN, D.M., F. BRAY, J. FERLAY, P. PISANI. 2005. Global Cancer Statistics 2002. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 55(2):74-108.
- PARSA, P., B. PARSA. 2009. Effects of Reproductive Factors on Risk of Breast Cancer: A Literature Review. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 10(4):545-550.
- PARSONS, M.J., P.M. VERTINO. 2006. Dual Role of *TMS1/ASC* in Death Receptor Signaling. *Oncogene*, 25(52):6948-6958.
- PARSONS, M.J., P. PATEL, D.J. BRAT, L. COLBERT, P.M. VERTINO. 2009. Silencing of *TMS1/ASC* Promotes Resistance to Anoikis in Breast Epithelial Cells. *Cancer Research*, 69(5):1706-1711.
- PASQUINI, L., E. PETRUCCI, R. RICCIONI, A. PETRONELLI, U. TESTA. 2006. Sensitivity and Resistance of Human Cancer Cells to TRAIL: Mechanisms and Therapeutical Perspectives. *Cancer Therapy*, 4 :47-72.
- PEEDICAYIL, J. 2006. Epigenetic Therapy-A New Development in Pharmacology. *The Indian Journal of Medical Research*, 123(1):17-24.
- PEGG, A.E. 1990. Mammalian O6-Alkylguanine-DNA Alkyltransferase: Regulation and Importance in Response to Alkylating Carcinogenic and Therapeutic Agents. *Cancer Research*, 50(19):6119-6129.
- PEGG, A.E., M.E. DOLAN, R.C. MOSCHEL. 1995. Structure, Function, and Inhibition Of O6-Alkylguanine-DNA Alkyltransferase. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 51:167-223.
- PLOSKER, G.L., D. FAULDS. 1993. Epirubicin. A Review of Its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties, and Therapeutic Use in Cancer Chemotherapy. *Drugs*, 45(5):788-856.

- PREUSS, I., S. HAAS, U. EICHHORN, I. EBERHAGEN, M. KAUFMANN, T. BECK, R.H. EIBL, P. DALL, T. BAUKNECHT, J. HENGSTLER, B.M. WITTIG, W. DIPPOLD, B. KAINA. 1996. Activity of The DNA Repair Protein O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase in Human Tumor and Corresponding Normal Tissue. *Cancer Detection and Prevention*, 20(2):130-136.
- QIU, H., M. YASHIRO, O. SHINTO, T. MATSUZAKI, K. HIRAKAWA. 2009. DNA Methyltransferase Inhibitor 5-aza-CdR Enhances The Radiosensitivity of Gastric Cancer Cells. *Cancer Science*, 100(1):181-188.
- RABBANI, S.A. 2008. Pharmacological Inhibition of DNA Methylation Induces Proinvasive and Prometastatic Genes in Vitro and in Vivo. *Neoplasia*, 10(3):266-278.
- REIK, W., W. DEAN, J. WALTER. 2001. Epigenetic Reprogramming in Mammalian Development. *Science*, 293(5532):1089-1093.
- ROBERTSON, K.D., P.A. JONES. 1997. Dynamic Interrelationships Between DNA Replication, Methylation, and Repair. *American Journal of Human Genetics*, 61(6):1220-1224.
- ROBERTSON, D.K. 2005. DNA Methylation and Human Disease. *Nature Reviews Genetics*, 6(8):597-610.
- RUSSO, V.E.A., R.A. MARTIENSSEN, A.D. RIGGS. 1996. Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation. Woodbury: Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 692 p.
- SANTI, D.V., A. NORMENT, C.E. GARRETT. 1984. Covalent Bond Formation Between A DNA-Cytosine Methyltransferase and DNA Containing 5-Azacytosine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(22):6993-6997.
- SAYEK, I. 1996. Meme Hastalıkları. İn: Sayek İ (eds). *Temel Cerrahi 1*. Güneş Kitabevi, Ankara, 864-872 p.
- SAYEK, I. 2004. *Temel Cerrahi 3*. Güneş Kitabevi, Ankara, 989 p.
- SAWAN, C., T. VAISSIÈRE, R. MURR, Z. HERCEG. 2008. Epigenetic Drivers and Genetic Passengers on The Road to Cancer. *Mutation Research*, 642(1-2):1-13.
- SCHMUTTE, C., R. FISHEL. 1999. Genomic Instability: First Step to Carcinogenesis. *Anticancer Research*, 19(6A):4665-4696.
- SCHWARTZ, P.S., D.J. WAXMAN. 2001. Cyclophosphamide Induces Caspase 9-Dependent Apoptosis in 9L Tumor Cells. *Molecular Pharmacology*, 60(6):1268-1279.

SCMIZU, Y., H. KATO, W.J. SCHULL. 1990. Studies of The Mortality of A-Bomb Survivors. 9. Mortality, 1950-1985: Part 2. Cancer Mortality Based on The Recently Revised Doses (DS86). *Radiation Research*, 121(2):120-141.

SHANG, D., Y. LIU, Q. LIU, F. ZHANG, L. FENG, W. LV, Y. TIAN. 2009. Synergy of 5-Aza-2'-Deoxycytidine (DAC) and Paclitaxel in Both Androgen-Dependent and Independent Prostate Cancer Cell Lines. *Cancer Letters*, 278(1):82-87.

SHIOHARA, M., S. TANIGUCHI, J. MASUMOTO, K. YASUI, K. KOIKE, A. KOMIYAMA, J. SAGARA. 2002. ASC, Which Is Composed of A PYD and A CARD, Is Up-Regulated by Inflammation and Apoptosis in Human Neutrophils. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 293(5):1314-1318.

SPEARS, M., J.M. BARTLETT. 2009. Human Epidermal Growth Factor Receptor Dimerization Analysis in Breast Cancer Diagnosis: Potential for Improving Testing Accuracy and Treatment Selection. *Molecular Diagnosis Therapy*, 13(6):359-365.

STALEY, K., A.J. BLASCHKE, J. CHUN. 1997. Apoptotic DNA Fragmentation Is Detected by A Semi-Quantitative Ligation-Mediated PCR of Blunt DNA Ends. *Cell Death and Differentiation*, 4(1):66-75.

STEHLIK, C., S.H. LEE, A. DORFLEUTNER, A. STASSINOPOULOS, J. SAGARA, J.C. REED. 2003. Apoptosis-Associated Speck-Like Protein Containing A Caspase Recruitment Domain Is A Regulator of Procaspase-1 Activation. *Journal of Immunology*, 171(11):6154-6163.

STIMSON, K.M., P.M. VERTINO. 2002. Methylation-Mediated Silencing of *TMS1/ASC* Is Accompanied by Histone Hypoacetylation and CpG Island-Localized Changes in Chromatin Architecture. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(7):4951-4958.

STRESEMANN, C., F. LYKO. 2008. Modes of Action of The DNA Methyltransferase Inhibitors Azacytidine and Decitabine. *International Journal of Cancer*, 123(1):8-13.

SUZUKI, M., F. SHINOHARA, M. ENDO, M. SUGAZAKI, S. ECHIGO, H. RIKIISHI. 2009. Zebularine Suppresses The Apoptotic Potential of 5-Fluorouracil Via Camp/PKA/CREB Pathway Against Human Oral Squamous Cell Carcinoma Cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 64(2):223-232.

SZYF, M. 2001. Towards A Pharmacology of DNA Methylation. *Trends in Pharmacological Sciences*, 22(7):350-354.

SZYF, M., P. PAKNESHAN, S.A. RABBANI. 2004. DNA Methylation and Breast Cancer. *Biochemical Pharmacologist*, 68(6):1187-1197.

TERASAWA, K., S. SAGAE, M. TOYOTA, K. TSUKADA, K. I, A. SATOH, H. MITA, K. IMAI, T. TOKINO, R. KUDO. 2004. Epigenetic Inactivation of *TMS1/ASC* in Ovarian Cancer. *Clinical Cancer Research*, 10(6):2000-2006.

THOMPSON, C.B. 1999. Apoptosis. In: Paul WE (eds). Fundamental immunology. Lippincott-Raven Publishers; 107-138.

THOMSEN, C., N. HARBECK, J. DITTMER, S.R. ABRAHA-SPAETH, N. PAPENDICK, A. PARADISO, B. LISBOA, F. JAENICKE, M. SCHMITT, M. VETTER. 2009. Feasibility of Measuring The Prognostic Factors *uPA* and *PAI-1* in Core Needle Biopsy Breast Cancer Specimens. Journal of The National Cancer Institute, 101(14):1028-1029.

UENO, T., M. TOI, K. BIVEN, H. BANDO, T. OGAWA, S. LINDER. 2003. Measurement of An Apoptotic Product in The Sera Of Breast Cancer Patient. European Journal of Cancer, 39(6):769-774.

ULISSE, S., E. BALDINI, S. SORRENTI, M. D'ARMIENTO. 2009. The ürokinase plasminogen activator system: a target for anti-cancer therapy. Current Cancer Drug Targets, 9(1):32-71.

ULUKAYA, E., F. OZDIKICIOGLU, A.Y. ORAL, M. DEMIRCI. 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(1):232-239.

VAN DEN EYNDEN, G.G., S.J. VAN LAERE, I. VAN DER AUWERA, S.D. MERAJVER, E.A. VAN MARCK, P. VAN DAM, P.B. VERMEULEN, L.Y. DIRIX, K.L. VAN GOLEN. 2006. Overexpression of Caveolin-1 and -2 in Cell Lines and in Human Samples of Inflammatory Breast Cancer. Breast Cancer Research and Treatment, 95(3):219–228.

WADDINGTON, C.H. 1939. Preliminary Notes on The Development of The Wings in Normal and Mutant Strains of *Drosophila*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America; 25(7):299–307.

WALKER, P.R., J. LEBLANC, B. SMITH, S. PANDEY, M. SIKORSKA. 1999. Detection of DNA Fragmentation and Endonucleases in Apoptosis. Enzymology, 17(4): 329-338.

WASHBROOK, E. 2006. Risk Factors and Epidemiology of Breast Cancer. Women's Health Medicine, 3(1):8-14.

WEINER, A.M. 2002. SINEs and LINEs: The Art of Biting The Hand That Feeds You. Current Opinion in Cell Biology, 14(3):343-350.

WEISENBERGER, D.J., M. CAMPAN, T.I. LONG, M. KIM, C. WOODS, E. FIALA, M. EHRLICH, P.W. LAIRD. 2005. Analysis of Repetitive Element DNA Methylation by Methylight. Nucleic Acids Research, 33(21):6823-6836.

WEISENBERGER, D.J., K.D. SIEGMUND, M. CAMPAN, J. YOUNG, T.I. LONG, M.A. FAASSE, G.H. KANG, M. WIDSCHWENDTER, D. WEENER, D.

BUCHANAN, H. KOH, L. SIMMS, M. BARKER, B. LEGGETT, J. LEVINE, M. KIM, A.J. FRENCH, S.N. THIBODEAU, J. JASS, R. HAILE, P.W. LAIRD. 2006. CpG Island Methylator Phenotype Underlies Sporadic Microsatellite Instability and Is Tightly Associated with Braf Mutation in Colorectal Cancer. *Nature Genetics*, 38(7):787-793.

WETHKAMP, N., U. RAMP, H. GEDDERT, W.A. SCHULZ, A.R. FLORL, C.V. SUSCHEK, M. HASSAN, H.E. GABBERT, C. MAHOTKA. 2006. Expression of Death-Associated Protein Kinase During Tumour Progression of Human Renal Cell Carcinomas: Hypermethylation-Independent Mechanisms of Inactivation. *European Journal of Cancer*, 42(2):264-274.

WIDSCHWENDTER, M., J. BERGER, M. HERMANN, H.M. MÜLLER, A. AMBERGER, M. ZESCHNIGK, A. WIDSCHWENDTER, B. ABENDSTEIN, A.G. ZEIMET, G. DAXENBICHLER, C. MARTH. 2000. Methylation and Silencing of The Retinoic Acid Receptor-Beta2 Gene in Breast Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(10):826-832

WIDSCHWENDTER, M., K.D. SIEGMUND, H.M. MULLER, H. FIEGL, C. MARTH, E. MÜLLER-HOLZNER, P.A. JONES, P.W. LAIRD. 2004. Association of Breast Cancer DNA Methylation Profiles with Hormone Receptor Status and Response to Tamoxifen. *Cancer Research*, 64(11):3807-3813.

WILLINGHAM, M.C. 1999. Cytochemical Methods for The Detection of Apoptosis. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 47(9):1101-1109.

WU, P.F., K.T. KUO, L.T. KUO, Y.T. LIN, W.C. LEE, Y.S. LU, C.H. YANG, R.M. WU, Y.K. TU, J.C. TASI, H.M. TSENG, S.H. TSENG, A.L. CHENG, C.H. LIN. 2009. O(6)-Methylguanine-DNA Methyltransferase Expression and Prognostic Value in Brain Metastases of Lung Cancers. *Lung Cancer*, (Basimda).

WYLLIE, A.H., E. DUVALL. 1992. Cell Death. In: McGee JO'D, Issacson PGR, Wright N (eds). *Oxford Textbook of Patology*, Oxford University, USA, 142-147 p.

XU, J., J.Y. ZHOU, M.A. TAINSKY, G.S. WU. 2007. Evidence That Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand Induction by 5-Aza-2'-Deoxycytidine Sensitizes Human Breast Cancer Cells to Adriamycin. *Cancer Research*, 67(3):1203-1211.

XU, N.R., C.X. LIU, S.B. ZHENG, H.L. I, Y.W. XU, K. XU. 2009. Reversion Transcriptional Expression of *DAPK* in Bladder Cancer T24 Cells 5-Aza-2'-Deoxycytidine. *Journal of Southern Medical University*, 29(9):1882-1886.

YANG, Q., L. SHAN, G. YOSHIMURA, M. NAKAMURA, Y. NAKAMURA, T. SUZUMA, T. UMEMURA, I. MORI, T. SAKURAI, K. KAKUDO. 2002. 5-Aza-2'-Deoxycytidine Induces Retinoic Acid Receptor Beta 2 Demethylation, Cell Cycle Arrest and Growth Inhibition in Breast Carcinoma Cells. *Anticancer Research*, 22(5):2753-2756.

YANG, A.S., K.D. DOSHI, S.W. CHOI, J.B. MASON, R.K. I, V. GHARYBIAN, R. LUNA, A. RASHID, L. SHEN, M.R. ESTECIO, H.M. KANTARJIAN, G. GARCIA-MANERO, J.P. ISSA. 2006. DNA Methylation Changes After 5-Aza-2'-Deoxycytidine Therapy in Patients with Leukemia. *Cancer Research*, 66(10):5495-503.

YOKOYAMA, T., J. SAGARA, X. GUAN, J. MASUMOTO, M. TAKEOKA, Y. KOMIYAMA, K. MIYATA, K. HIGUCHI, S. TANIGUCHI. 2003. Methylation of *ASC/TMSI*, A Proapoptotic Gene Responsible for Activating Procaspase-1, in Human Colorectal Cancer. *Cancer Letters*, 202(1):101-108.

YOSHIMURA, M., S. NAKAMURA, H. OGAWA. 2005. TaqMan Real-Time PCR Quantification: Conventional and Modified Methods. *Methods in Molecular Medicine*, 108:189-198.

ZHANG, X., M. YASHIRO, M. OHIRA, J. REN, K. HIRAKAWA. 2006. Synergic Antiproliferative Effect of DNA Methyltransferase Inhibitor in Combination with Anticancer Drugs in Gastric Carcinoma. *Cancer Science*, 97(9):938-944.

ZHANG, C., H. LI, G. ZHOU, Q. ZHANG, T. ZHANG, J. LI, J. ZHANG, J. HOU, C.T. LIEW, D. YIN. 2007. Transcriptional Silencing of The *TMSI/ASC* Tumour Suppressor Gene by An Epigenetic Mechanism in Hepatocellular Carcinoma Cells. *The Journal of Pathology*, 212(2):134-142.

ZHU, J., X. YAO. 2007. Use of DNA Methylation for Cancer Detection and Molecular Classification. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 40(2):135-141.

http://www.cancer.org/docroot/PRO/content/PRO_1_1_Cancer_Statistics_2009_Presentation.asp Eriřim Tarihi: 13.01.2010 Konu: Kanser İstatistięi.

<http://www.saglik.gov.tr/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433CFF71BE64510F6C8BC92747D9FFFE7A1226> Eriřim Tarihi: 13.01.2010 Konu: Kanser İstatistięi.

<http://en.wikipedia.org/wiki/Apoptosis> Eriřim Tarihi: 13.01.2010 Konu: Apoptosis.

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Erzurum'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Erzurum'da tamamladı. 2001 yılında Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünde lisans öğrenimini tamamlayıp Biyolog ünvanı aldı. 2004 yılında Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimini tamamladı. 2005 tarihinde Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında doktora eğitimine başladı. Nisan 2008-Mart 2009 tarihleri arasında doktora tez çalışmalarının bir bölümünü gerçekleştirmek üzere Almanya Münih Teknik Üniversitesi Klinik Kanser Araştırmaları Bölümünde bulundu. 2002 yılında Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünde Araştırma Görevlisi olarak başladığı göreve halen devam etmektedir.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım esnasında her türlü yardım, ilgi ve desteğini gördüğüm, öneri ve eleştirileri ile beni daima yönlendiren değerli tez danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Egemen DERE'ye ,

Çalışma konusunun belirlenmesinden, araştırmanın sonuçlanmasına kadar her aşamasında desteğini ve fikirlerini esirgemeyen Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalından Sayın Prof. Dr. Engin ULUKAYA'ya,

Doktora tez çalışmalarımda yardımlarını gördüğüm Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalından Sayın Uzm. Dr. Arzu YILMAZTEPE ORAL ve Uzm. Dr. Dilek ABİ YEĞİN'e, Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalından Sayın Prof. Dr. Barbaros ORAL ve Sayın Figen AYMAK'a, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden Sayın Meral SEVİK'e,

Tez çalışmalarım için Almanya'da bulunduğum süre içerisinde destek ve ilgilerinden dolayı Münih Teknik Üniversitesi Klinik Kanser Araştırmaları Bölümünden Sayın Prof. Dr. Manfred SCHMITT ve Sayın Dr. Rudolf NAPIERALSKI' ye,

Tez çalışmalarımın tamamlanması için gerekli olan maddi desteği sağlayan TÜBİTAK (Proje No: 106S349) ve BAYER Araştırma Birimi (Almanya/Münih) yetkililerine,

Hayatımın her döneminde maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen çok değerli aileme ve sevgili eşime,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.