



**KÖK HÜCRE WNT YOLAK İNHİBİTÖRÜ OLAN
NİKLOZAMİDİN, HİSTON DEASETİLİZ
İNHİBİTÖRÜ (HDAC) OLAN VALPROİK ASİT İLE
KOMBİNASYONLARININ AKCİĞER KANSER
HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK VE
APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

OĞUZHAN AKGÜN



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

**KÖK HÜCRE WNT YOLAK İNHİBİTÖRÜ OLAN NİKLOZAMİDİN, HİSTON
DEASETİLİZ İNHİBİTÖRÜ (HDAC) OLAN VALPROİK ASİT İLE
KOMBİNASYONLARININ AKCİĞER KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ
SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Oğuzhan AKGÜN

Doç. Dr. Ferda ARI

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**BURSA-2017
Her Hakkı Saklıdır**

TEZ ONAYI

Oğuzhan Akgün tarafından hazırlanan “Kök hücre Wnt yolak inhibitörü olan niklozamidin, histon deasetilaz inhibitörü (HDAC) olan valproik asit ile kombinasyonlarının akciğer kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkilerinin araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Ferda ARI

Başkan: Doç. Dr. Ferda ARI

Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi,
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza

Üye: Prof. Dr. Engin ULUKAYA

İstinye Üniversitesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

İmza

Üye: Yard. Doç Dr. Egemen DERE

Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi,
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Ali BAYRAM

Enstitü Müdürü

29.12.2017

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

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

29/12/2017

Oğuzhan AKGÜN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KÖK HÜCRE WNT YOLAK İNHİBİTÖRÜ OLAN NİKLOZAMİDİN, HİSTON DEASETİLİZ İNHİBİTÖRÜ (HDAC) OLAN VALPROİK ASİT İLE KOMBİNASYONLARININ AKCİĞER KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Oğuzhan AKGÜN

Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ferda ARI

Kanser, kontrolsüz büyüme ve anormal hücrelerin yayılması ile karakterize edilen bir hastalık grubudur. Eğer bu yayılma kontrol edilmezse ölümlerine sonuylanabilmektedir. Akciğer kanseri dünya çapında en sık rastlanan kanserdir. Epigenetik modifikasyonlar tümör gelişiminde etkili mekanizmalardan biridir. Epigenetik modifikasyonların en önemli özelliği geri dönüşümlü olmalarıdır. Bu özellik, epigenetik ilaçların geliştirilmesini ve kanser tedavisinde kullanılmasını sağlamıştır. Akciğer kanserinin gelişiminde ve ilerlemesinde de epigenetik mekanizmalar etkili olmaktadır. Akciğer kanser tedavisinde, histon deasetilaz inhibitörleri gibi epigenetik ilaçlar ile kemoterapi ilaçları kombine edilerek kullanılmaktadır.

Bu tez çalışmasında, histon deasetilaz inhibitörü valproik asit, Wnt/ β -katenin yaşam yolağı inhibitörü niklozamid ile kombine edilerek insan akciğer kanser hücre soylarında (A549, H1299) sitotoksik etkileri ve mekanizmaları araştırılmıştır. Valproik asit, niklozamid ve kombinasyon tedavisinin hücre canlılığı üzerine olan etkileri SRB canlılık testi ile belirlenmiştir. Sonuçlar ,ATP canlılık testi ile doğrulanmıştır. Kombinasyon tedavisinin sitotoksik etkilerinden sorumlu hücre ölümü modunun (apoptozis, nekrozis ve otofaji) belirlenmesi amacıyla akım sitometri kullanılmıştır. Hücrelerde apoptoz ve nekroz varlığı Hoechst 33342/Annexin-V/Propidyum iyodür üçlü floresan boyama yöntemi ile belirlenmiştir. Son olarak nekroz ve nekroptoz hücre ölümleri ile ilişkili proteinlerin ekspresyon seviyeleri immunoblotlama yöntemi ile genlerin ekspresyon seviyeleri ise real time PCR kullanılarak gösterilmiştir.

Sonuç olarak, akciğer kanser hücrelerinde valproik asit ve niklozamid kombinasyon tedavisi sonucunda hem kromatin yapısı hemde Wnt/ β -katenin yaşam yolağı hedeflenerek hücre canlılığının etkin bir şekilde azaldığı belirlenmiştir. Bu tedavi seçeneğinin, A549 akciğer kanser hücre soyunda apoptozisi indüklerken, H1299 akciğer kanser hücre soyunda ise nekroptozis indüklediği belirlenmiştir. Tüm veriler değerlendirildiğinde, valproik asit ve niklozamid kombinasyon tedavisinin farklı yolları etkileyerek etkin bir tedavi seçeneği olarak kullanılabilirliği ve *in vivo* analizlerin yapılarak sonuçların desteklenmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Akciğer Kanseri, Valproik Asit, Niklozamid, Apoptozis, Nekrozis, Nekroptozis.

2017, xi + 125 sayfa.

ABSTRACT

Master's Thesis

INVESTIGATION OF THE CYTOTOXIC AND APOPTOTIC EFFECTS ON LUNG
CANCER CELL LINES WITH THE COMBINATION OF THE HISTONE
DEACETYLASE INHIBITOR IS VALPROIC ACID AND NICLOSAMIDE WHICH
IS AN INHIBITOR OF WNT PATHWAY IN STEM CELL.

Oğuzhan AKGÜN

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

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ferda ARI

Cancer is a group of diseases characterized by uncontrolled growth and the spread of abnormal cells. If this spread is not controlled, it can result in death. Lung cancer is the most common cancer worldwide. Epigenetic modifications are one of the effective mechanisms in tumor development. The most important feature of epigenetic modifications is their reversibility. This feature has enabled epigenetic drugs to be developed and used in the treatment of cancer. Epigenetic mechanisms are also effective in the development and progression of lung cancer. In the treatment of lung cancer, epigenetic drugs such as histone deacetylase inhibitors and chemotherapy drugs are used in combination.

Therefore, in this thesis study, cytotoxic effects and mechanisms of histone deacetylase inhibitor valproic acid, stem cell Wnt pathway inhibitor cyclosamine and its combinations on human lung cancer cell lines (A549, H1299) were investigated.

The effects of the compounds and combination therapy on cell viability were determined by SRB viability test. The results were confirmed by ATP viability test. Flow cytometry was used to determine the mechanism of cell death (Apoptosis, Necrosis, Autophagy) responsible for the cytotoxic effects of combination therapy.

The presence of apoptosis and necrosis in the cells was supported by imaging on a fluorescence microscope with Hoechst 33342 / Annexin-V / Propidium Iodine triple staining method. In addition, expression levels of proteins associated with necrosis and necroptosis cell death were demonstrated by immunoblotting and expression levels of genes using real time PCR.

This treatment option induces necrosis in the A549 lung cancer cell line and necroptosis in the H1299 lung cancer cell line. When all the data are evaluated, valproic acid and nicosamid combination therapy can be used as an effective treatment option by affecting different pathways and the results should be supported by in vivo analysis.

Keywords: Lung Cancer, Valproic acid, Niclosamide, Apoptosis, Necrosis, Necroptosis,

2017, xi + 125 pages.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarında danışmanlığımı yapan, eğitimimin düzenli işleyişi için büyük bir özveri gösteren ve her konuda desteğini benden esirgemeyen değerli hocam Sayın Doç. Dr. Ferda ARI'ya,

Yüksek lisans öğrenimimin her aşamasında sonsuz anlayış ve desteğiyle hep yanımda olan, benim için çok değerli olan bilgi ve tecrübeleriyle bana her daim yol gösteren, ilgi ve yardımlarını benden hiç eksik etmeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Engin ULUKAYA'ya,

Çalışmalarım süresince bana her konuda yardımcı olan, sorularımı asla yanıtsız bırakmayan, hocalarım, Sayın Prof. Dr. Serap ÇELİKLER KASIMOĞULLARI, Sayın Yar. Doç. Dr. Egemen DERE'ye,

Tez çalışmam boyunca bilgi, deneyim ve önerilerini benimle paylaşarak bana yol göstermiş olan başta Merve ERKISA, Şeyma AYDINLIK, Pınar ALPER ile tüm çalışma arkadaşlarıma,

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

Oğuzhan AKGÜN

29/12/2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.2. Kanser.....	3
2.2.1.1. Akciğer Kanseri Epidemiyoloji.....	4
2.2.1.2. Akciğer Kanseri Moleküler Biyolojisi.....	6
2.2.1.3. Akciğer Kanserinde Etkin Olan Başlıca Genetik Faktörler.....	9
2.2.1.3.1. KRAS.....	9
2.2.1.3.2. EGFR.....	9
2.2.1.3.3. BRAF.....	10
2.2.2. Apoptozis.....	11
2.2.2.1. Apoptozis’de Kaspazların Görevi.....	12
2.2.2.2. Apoptozisin Mekanizmaları.....	13
2.2.2.2.1. Ekstrinsik (dışsal) Yolak.....	13
2.2.2.2.2. İntrinsik (İçsel) Yolak.....	14
2.2.2.2.3. Mitokondrinin Apoptozis Sürecindeki Rolü.....	16
2.3. Epigenetik.....	17
2.3.1. Epigenetik Mekanizmalar.....	18
2.3.1.1. DNA Metilasyonu.....	18
2.3.1.2. Histon Modifikasyonları.....	20
2.3.1.2.1. Histonların Yapı ve Özellikleri.....	21
2.3.1.2.2. Histon Asetilasyonu ve Metilasyonu.....	22
2.3.2. Akciğer Kanseri ve Epigenetik.....	24
2.4. Valproik Asit.....	26
2.5. Niklozamid.....	30
3.MATERYAL ve YÖNTEM.....	33
3.1.Materyal.....	33
3.1.1.Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	33
3.1.2.Kullanılan Sarf Malzemeler.....	33
3.1.3. Kullanılan Cihazlar.....	34
3.2.1. Hücre Kültürü.....	35
3.2.1.1. Çalışmada Kullanılan Hücre Soyları.....	35
3.2.1.3. Hücre Soylarının Stoktan Çıkartılması.....	35
3.2.1.4. Hücre Soylarının Pasajlanması.....	36
3.2.1.5. Hücre Soylarının Stoklanması.....	36
3.2.1.6. Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması.....	37
3.2.1.7. Hemositometre ile Hücrelerin Sayımı.....	37
3.2.2. SRB (Sulforhadamine B) Metodu.....	37
3.2.3. ATP (Adenozin Trifosfat) Canlılık Metodu.....	39
3.2.4. Floresan Boyama Yöntemi ile Ölüm Modunun Belirlenmesi.....	41
3.2.4.1. Anksin-V, Propidyum İyodür ve Hoechst Boyama Metodu.....	41
3.2.5. Akım Sitometri Analizleri.....	43
3.2.5.1. Kazpaz 3/7 Testi.....	44

3.2.5.2. Gamma H2A.X Aktivasyonu ile DNA Hasarının Belirlenmesi	46
3.2.5.3. Mitokondri Membran Potansiyeli Testi	48
3.2.6. Kaspazla Kırılmış Sitokeratin 18 (M30) Düzeylerinin Belirlenmesi.....	49
3.2.7. Asetillenmiş Histon H3 Düzeylerinin Belirlenmesi.....	50
3.2.8. Western Blot Analizi.....	51
3.2.8.1. Protein İzolasyonu.....	54
3.2.8.1.1. Çözeltiler	54
3.2.8.2. Proteinlerin Biçinkoninik asit (BCA) Yöntemi ile Konsantrasyonlarının Ölçülmesi	54
3.2.10.2.1. Çözeltiler	54
3.2.8.2.2. BSA Standartlarının Hazırlanması	54
3.2.8.2.3. BCA Ölçümünün Yapılması	55
3.2.8.3. Western Blot Yöntemi ile Proteinlerin Nitroselüloz Membrana Aktarılması....	55
3.2.8.3.1. Çözeltiler	55
3.2.8.3.2. Proteinlerin Yüklenmesi ve Jelde Yürütülmesi.....	56
3.2.8.3.3. Proteinlerin Transferi	56
3.2.8.3.4. Proteinlerinin Belirlenmesi	56
3.2.8.3.4.1. Bloklama	56
3.2.8.3.4.2. Birincil Antikor	56
3.2.8.3.4.3. İkincil Antikor	56
3.2.8.3.4.4. Görüntüleme.....	57
3.2.8.3.4.5. Birincil ve İkincil Antikorların Membrandan Uzaklaştırılması	57
3.2.9. Polimeraz Zincir Reaksiyonu İşleminin Uygulama Aşamaları ve Prensipleri.....	57
3.2.9.1. DNA'nın Denatürasyonu Aşaması.....	58
3.2.9.2. Primerlerin Bağlanması (Hibridizasyon, Annealing) Aşaması.....	58
3.2.9.3. Primerlerin Uzatılması (Polimerizasyon, Extension, Elongation) Aşaması.....	59
3.2.9.4. Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	59
3.2.9.5. Hücrelerden Total RNA İzolasyonu.....	61
3.2.9.6. İzole Edilen RNA'ların Kontrolü.....	61
3.2.9.7. cDNA Sentezinin Yapılması	61
3.2.9.8. Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizinin Yapılması	63
3.2.10. İstatistiksel Analiz.....	64
4. BULGULAR	65
4.1. SRB Canlılık Testi Bulguları	65
4.3. Anneksin-V, Propidyum İyodür ve Hoechst Boyama Yöntemi Sonuçları	73
4.4. M30 Antijen (Kaspazla Kırılmış Sitokeratin 18) Bulguları	77
4.5. Kaspaz-3/7 Aktivitesi Bulguları.....	78
4.6. Mitokondri Membran Potansiyeli Testi	81
4.7. DNA Hasarının Belirlenmesi	83
4.8. Histon Asetilasyonunun Belirlenmesi	85
4.9. Western Blot Bulguları	86
4.10. Genlerin Ekspresyon Profilleri.....	92
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	96
KAYNAKLAR	106
ÖZGEÇMİŞ	124

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

μM

Mikromolar

%

Yüzde

$^{\circ}\text{C}$

Santigra Derece

Kısaltmalar

Açıklama

7-AAD :

7-Aminoaktinomisin D

AIF :

Apoptozis indükleyici faktör (Apoptosis inducing factor)

Apaf-1 :

Apoptotik proteaz aktive eden faktör

AR:

Androjen reseptörü

ATP :

Adenozin trifosfat (Adenosine triphosphate)

BCA:

Biçinkoninik asit

BH:

Bcl-2 homoloji bölgeleri

BSA:

Sığır serum albümin

CAD :

Kaspaz aktive edici DNaz

CK18:

Sitokeratin 18

DAPK:

Ölüm ilişkili protein kinaz

DD :

Ölüm alanı (Death domain)

DHEA:

Dehidroepiandrosteron

DHT:

Dihidrottestesteron

DISC :

Ölüm indükleyici sinyal kompleksi (Death inducing signalling complex)

DMSO:

Dimetilsulfoksit

DNA :

Deoksi ribonükleik asit (Deoxyribonucleic acid)

DNMT:	DNA metil transferaz
DNA-PK :	DNA bağımlı protein kinaz (DNA-dependent Protein Kinase)
EDTA :	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
EGFR :	Epidermal büyüme faktör reseptörü(Epidermal growth factor receptor)
ER:	Endoplazmik retikulum
FADD :	Fas ilişkili ölüm alanı (Fas associated death domain)
FBS :	Fetal sığır serumu (Fetal bovine serum)
FITC :	Fluoresin izotiyosiyanat
GST:	Glutatyon S-transferaz
GTP :	Guanozin trifosfat
HAT:	Histon asetil transferaz
HMT:	Histon metil transferaz
ICAD :	Kaspazla aktive edilmiş
IGF :	İnsülin benzeri büyüme faktörü
Kbp:	Klikobaz çifti
kDa:	KiloDalton
MOMP:	Mitokondri dışı membran permeabilizasyonu
mTOR:	Rapamisin hedefi (Target of rapamycin)
MTT:	Metiltiazoldifeniltetrazolyum bromür
NAC:	N-asetil-L-sistein
PARP :	Poli(ADP-riboz)polimeraz (Poly ADP-ribose polymerase)
PBS :	Fosfat tuz tamponu (Phosphate buffered saline)
PBS:	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PCR :	Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR; polymerase chain reaction)

Pd :	Palladyum
PerCP:	Peridinin klorofil
PI :	Propidyum iyodür (Propidium iodide)
PIN:	Prostatik epitelyal neoplazi
PS :	Fosfatidil serin (phosphatidylserine)
PSA:	Prostat spesifik antijen
Pt :	Platin
PTEN:	Fosfataz ve tensin homolog proteini
Rb :	Retinoblastoma
RNA :	Ribo nükleik asit (Ribonucleic acid)
ROCK1:	Rho ilişkili sarmal oluşturan kinaz 1
ROS:	Reaktif oksijen türleri
RPMI :	Roswell Park Memorial Institute Medium
SDS :	Sodyum dodesil sülfat (Sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE:	SDS- Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi
SRB :	Sulforhodamine B
TCA :	Trikloroasetik asit
TdT :	Terminal deoksinükleotidil transferaz
TNF :	Tümör nekrozis faktör
TRAIL :	TNF-ilişkili apoptozis indükleyici ligand
VPA:	Valproik asit
VEGF:	Vasküler endotelyal büyüme faktörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Dünyada akciğer kanseri insidansının varyasyon grafiği	6
Şekil 2.2. Akciğer kanseri sınıflandırılması	8
Şekil 2.3. ErbB reseptörlerinin yapısı.	10
Şekil 2.4. Kaspazların sınıflandırılması (McIlwain ve ark. 2003).	12
Şekil 2.5. Apoptozisde ekstrinsik (dışsal) yolak	14
Şekil 2.6. Apoptozis' de intrinsik (içsel) yolak.....	15
Şekil 2.7. Epigenetik mekanizmalar. DNMT: DNA metil transferaz; HAT: histon asetil transferaz. (Chaturvedi ve ark. 2014).....	18
Şekil 2.9. Normal hücrelerin tümör süpresör genlerinde meydana gelen hipermetilasyon ve tekrar dizilerindeki hipometilasyon sonucu kanser oluşumu	20
Şekil 2.10. Histon konformasyonu ile nükleozom yapısı.	21
Şekil 2.11. Histon proteinlerinde görülen epigenetik modifikasyonlar	22
Şekil 2.12. Histonlarda görülen lizin metilasyonu	23
Şekil 2.13. Akciğer kanserinde, gen promotör bölgesindeki transkripsiyonel baskılayıcı kompleksleri (PRC1/PRC2) ve DNA metilasyon mekanizmaları ile kromatin değiştiricileri (histon deasetilaz, HDAC) arasındaki etkileşimler.....	26
Şekil 2.14. HDAC inhibitörlerinin başlıca sınıfları ve yapıları	28
Şekil 2.15. Niklozamid moleküler yapısı.....	30
Şekil 3.1. ATP' nn elde edilme reaksiyonu	40
Şekil 3.2. Apoptotik hücrelerde Annexin V bağlanması.....	42
Şekil 3.3.1. Akım sitomerisinde lazer esaslı floresans algılama	44
Şekil 3.3.2. Kaspaz 3/7 aktivitesinin ölçülmesi	45
Şekil 3.3.3. DNA hasarının (γ -H2AX) ölçülmesi	48
Şekil 3.3.4. Mitokondri membran potansiyelinin ölçülmesi	49
Şekil 3.4. Western Blot Aşamalarının Şematik Gösterimi.....	52
Şekil 3.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Siklusunun Basamakları.....	58
Şekil 4.1.1. A549 ve H1299 hücre soylarının faz görüntüleri.	65
Şekil 4.1.2. A549 hücre soyunda Valproik asit (0,07-5 mM) ve Niklozamid (0,07-5 μ M) uygulamasının zamana bağlı olarak SRB testi sonrası canlılık yüzdelerinin grafiği.	66
Şekil 4.1.3. H1299 hücre soyunda Valproik asit (0,07-5 mM) ve Niklozamid (0,07-5 μ M) uygulamasının zamana bağlı olarak SRB testi sonrası canlılık yüzdelerinin grafiği.	67
Şekil 4.1.4. A549 ve H1299 hücre soylarında Valproik asit (VPA)	69
Şekil 4.2.1. A549 ve H1299 hücre soyunda VPA ve niklozamid farklı konsantrasyonları ile kombinasyon uygulamasının SRB testi sonrası alınan canlılık yüzdelerinin grafiği.	70
Şekil 4.2.2. A549 ve H1299 hücre soyunda valproik asit (VPA) 500 μ M ve niklozamid farklı konsantrasyonları ile kombinasyon uygulamasının bileşiklerin tek başlarına etkilerinin ATP testi sonrası canlılık yüzdelerinin grafiği.	72
Şekil 4.3.1. Valproik asit (VPA), niklozamid ve kombinasyon tedavisinin A549 hücrelerinde floresan mikroskop görüntüleri.	74

Şekil 4.3.2. Valproik asit (VPA), niklozamid ve kombinasyon tedavisinin H1299 hücrelerinde floresan mikroskop görüntüleri.....	76
Şekil 4.4.1. M30 (Kaspazla Kırılmış Sitokeratin 18) Standart Eğri Grafiği.....	77
Şekil 4.4.2. M30 (kaspazla kırılmış sitokeratin 18) bulguları.....	78
Şekil 4.5.1. A549 hücrelerinde kaspaz 3/7 aktivitesi değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 48 saatlik histogramları.....	79
Şekil 4.5.2. H1299 hücrelerinde kaspaz 3/7 aktivitesi değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 48 saatlik histogramları.....	80
Şekil 4.6.1. A549 hücrelerinde Valproik asit (VPA), niklozamid ve kombinasyon tedavisinin mitokondri membran potansiyelindeki değişimi yüzde değerlerinin histogramları.....	82
Şekil 4.6.2. H1299 hücrelerinde Valproik asit (VPA), niklozamid ve kombinasyon tedavisinin mitokondri membran potansiyelindeki değişimi yüzde değerlerinin histogramları.....	83
Şekil 4.7.1. A549 hücrelerinde p- γ H2AX yüzde değerlerinin histogramı.....	84
Şekil 4.7.2. H1299 hücrelerinde p- γ H2AX yüzde değerlerinin histogramı.....	85
Şekil 4.8.1. A549 ve H1299 hücrelerinde toplam histon asetilasyon seviyeleri.....	86
Şekil 4.9.1. BSA standart eğri grafiği.....	87
Şekil 4.9.2.1. A549 hücrelerinde, Niklozamid 5 μ M,.....	88
Şekil 4.9.2.2. A549 hücrelerinde, Niklozamid 5 μ M,.....	89
Şekil 4.9.3.1. H1299 hücrelerinde, Niklozamid 5 μ M,.....	90
Şekil 4.9.3.2. H1299 hücrelerinde, Niklozamid 5 μ M,.....	91
Şekil 4.9.4.1 A549 ve H1299 hücrelerinde, Niklozamid 5 μ M,.....	91
Şekil 4.10.1. A549 hücrelerinde gen ekspresyon sonuçları.....	92
Şekil 4.10.2. H1299 hücrelerinde gen ekspresyon sonuçları.....	93
Şekil 4.11.1. A549 hücrelerinde pan-kaspaz inhibitörü Z-Vad-FMK (A) ve RIPK1 inhibitörü Nekrostatin (B) ön uygulama sonucu SRB canlılık testi sonuçları.....	94
Şekil 4.11.2. H1299 hücrelerinde pan-kaspaz inhibitörü Z-Vad-FMK (A) ve RIPK1 inhibitörü Nekrostatin (B) ön uygulama sonucu SRB canlılık testi sonuçları.....	95
Şekil 5.1. Valproik asit (VPA) ve niklozamid kombinasyon tedavisinin A549 hücre soyları üzerindeki sitotoksik etki mekanizmaları.....	102
Şekil 5.2. Valproik asit (VPA) ve niklozamid kombinasyon tedavisinin H1299 hücre soyları üzerindeki sitotoksik etki mekanizmaları.....	104

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. cDNA Sentez Karışımı Hazırlanışı.....	62
Çizelge 1.2. qPCR Master Karışımı'ın Hazırlanışı.....	63
Çizelge 2.1. Niklozamid ve valproik asit bileşiği uygulanan hücre soylarında SRB canlılık testi sonuçlarına göre 48 ve 72 saat tedavi süresindeki IC ₅₀ değerleri.....	68
Çizelge 2.2. BSA sonuçlarına göre hesaplanan örneklerin protein konsantrasyonları (mg/ml).....	87



1. GİRİŞ

Kanser, gelişmekte olan ülkelerde, her yıl 6-7 milyon yeni vakanın görülmesine yol açmakta ve dünyada kardiyovasküler hastalıklardan sonra en çok ölüme neden olan hastalık olarak bilinmektedir. Akciğer kanserinin moleküler temeli karmaşık ve heterojen bir yapıya sahiptir. Genetik, epigenetik ve protein sentezi gibi çoklu seviyelerde ki moleküler değişiklikler akciğer kanseri tanısı, tedavisi ve prognozu etkileme potansiyeline sahiptir (Larsen ve ark. 2011). Bu nedenle akciğer kanserlerinde hastalığın erken teşhisi, prognoz tahmin edilmesi ve tedavi sürecinin belirlenmesi oldukça zahmetli ve zor bir süreçtir. Genetik mutasyonlar, polimorfizmler, DNA metilasyonu ve histon modifikasyonunu içeren epigenetik varyasyonlar erken teşhis ve tanı için farmakolojik olarak önemli olaylardır.

Epigenetik mekanizmalar düşünülerek alternative bir tedavi olan histon deasetilaz (HDAC) inhibitörleri üretilmiştir. “Varinostat” ve “Romidepsin” gibi HDAC inhibitörleri antikanser etkisinden dolayı klinikte kanser tedavisinde kullanılan bileşiklerdir (Stimson ve ark. 2009). Ayrıca 2006 yılında ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), kutanöz T hücreli lenfoma (CTCL) tedavisinde histon deasetilaz inhibitörü suberoilanolid hidroksamik asit (SAHA) kullanımını onayladı. Bu başarılar HDAC inhibitörlerinin bir ilaç sınıfı olarak etkili kemoterapötik ajanlar olabileceğini göstermektedir. Temel bilim adamları, klinisyenler ve hastalar tarafından güvenli ve etkili olan yeni anti kanser ilaçlarının gelişimi paylaşılan ortak bir hedef durumundadır.

FDA (ABD Gıda ve İlaç Dairesi) onaylı anti-epileptik bir ilaç olan valproik asitin, sınıf I ve II histon deasetilazların inhibitörü olduğunun keşfedilmesi ile yapılan çalışmalar sonucu kanser tedavisinde iyi bir aday olabileceği kayda geçilmiştir. Düşük maliyeti, olumlu yan etki profili ve kan beyin bariyerini geçme kolaylığı nedeniyle ilgi çekici bir adaydır (Kramer ve ark. 2003, Gurvich ve ark. 2004).

Bağırsak parazit enfeksiyonlarının tedavisi için kullanılan niklozamid ile ilgili son yıllardaki araştırmalar, niklozamidin potansiyel bir anti kanser ajan olduğunu göstermiştir. Niklozamidin anti kanser etkisi özellikle hücrelerde Wnt/ β -katenin, mTORC1, STAT3, NF- κ B ve Notch sinyal yollarını inhibe etmesinden kaynaklandığı belirlenmiştir. Aynı zamanda niklozamidin kanser hücrelerinde mitokondriyi, hücre

döngüsünü hedefleyerek büyümeyi durdurduğu ve apoptozu uyardığı gösterilmiştir (Yonghe ve ark. 2014).

Mevcut ilaçların farmakokinetiğinin, güvenlik profillerinin bilinmesi, insan kullanım onaylarının bulunması sayesinde yeni kullanım alanları için tercih edilmektedir. Bu durum yeni bir ilaç bulmaktan çok daha hızlı ve ekonomik olmaktadır (Kraljevic ve ark. 2004).

Elde edilen bilgiler doğrultusunda bu tez çalışmasında, histon deasetilaz inhibitörü olan valproik asit ile Wnt/ β -katenin yaşam yolağı inhibitörü olan niklozamid kombine edilerek A549 ve H1299 insan akciğer kanser hücre soyları üzerindeki sitotoksik etkileri ve mekanizmaları araştırılmıştır

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.2. Kanser

Kanser büyüme özellikleri bozulmuş hücrelerin klonal yayılımıdır ve somatik genetik hastalıkların en sık, en yaygın ve aynı zamanda en komplike olanıdır (Futreal ve ark. 2001). Çok basamaklı ve uzun süreli genotipik ve fenotipik düzeyde gerçekleşen bu süreç, uzun yıllar boyunca araştırma konusu olmuştur. Özellikle sanayi ülkelerinde her 5 ölümün birinin nedeni ve yaygınlığı ile sosyal problemlerin en büyüğünü oluşturmaktadır.

Hassas bir konakçıda kanser oluşumu ve konakçının ölüme sürüklenmesi için sadece tek bir hücre yeterlidir. Tüm kanserler, DNA dizisindeki bir takım anormallikler ile oluşmaktadır. Bu nedenle kanserlerin belli bir kısmının kalıtsal olduğu yani ebeveynlerden gelen genlerle aktarıldığı görülmüştür. Fakat kanser genel olarak organizmanın yaşamı boyunca canlı hücrelerindeki DNA'nın mutajenlere maruz kalması, hücre DNA'sındaki hafif progressif değişiklikler ve replikasyonda hatalar oluşması ile şekillendiği düşünülmektedir. Son yarım yüzyılda artan kanser vakaları, kanserin modern zamana ait bir hastalık olduğu izlenimi uyandırmıştır. Fakat klinik tanı koymadaki ilerlemelerin daha önceki dönemlerde farkına varılmayan daha çok kanser vakasının teşhis edilmesine yol açması ve çeşitli etiyolojik ajanlara maruz kalmadaki artış sebebiyle kansere yakalanan insanların sayısında ki artış kanserin kısmen modern bir hastalık kategorisinden çıkarmaktadır.

Fosiller ve mumyalar üzerine yapılan araştırmalarda da kanser delilerine rastlanmıştır. Mısır mumyalarının analizinden kanserin varlığını açıkça gösteren kanıtlar mevcuttur. Granville eski Mısır'dan bir dişi mumya diseksiyonunun yumurtalıklarda yayılmış ve karın bölgesinde uzantıları bulunan, çift yönlü kötü huylu kistadenom olduğu düşünülen bir hastalığı ortaya koyduğunu bildirmektedir (Granvil 1825). İlginç bir şekilde 88 çocuk ve 5 çocuk mumyasının tetkiki kemik, nazofarenks, ve ağız tümörlerini ortaya koymuşsa da bugün sık rastlanan meme, bağırsak, mide, ve akciğer gibi tümörler belirlenememiştir. M.Ö. 2500 yıllarına ait olduğu sanılan cerrahi vaka öyküleri olan papirüsler üzerine Amerikan eski Mısır bilimcisi Edwin Smith' in araştırmaları bulunmaktadır. Bu araştırmalardan bir tanesi kanser konusunda ki en eski metinlerden olduğu kabul

edilmektedir. Bu metindeki en çarpıcı noktalardan birtanesi; memesinde şişkin urlar olan bir kadını incelersen görürsün ki kabarıklıklar memesinin her yanına sıçramıştır ve elini memesinin üzerine, bu urların üstüne koyarsan fark edersin ki bunlar pek soğuktur. Elin kadına dokunduğunda buralarda vücut ateşi yoktur, bunlar tanelenmez, akıntı yapmaz, herhangi bir sıvı salgılamaz ve elinde de kabarıklığı hissedersin. Kadınla alakalı olarak demelisin ki “Ey kabarık urlu kimse, bunun tedavisi yoktur. Bir diğer antik meme kanseri kaydı ise Heredot’un yazmalarında yer almaktadır. Heredot, M.Ö. 440 yılında kaleme aldığı Tarihler adlı eserinde, Pers Kraliçesi Atossa’nın hayatını anlatmaktadır. Atossa, memesinde kanayan bir kitle olduğunu fark eder. Doktorlara başvurmak yerine kendini inzivaya çeker ve kat kat örtülerin altına gizlenir. Kraliçenin hastalığını duyan Demodekes isimli bir Yunan savaş esiri, kraliçeden tümörü ameliyat etmesine müsaade etmesini ister. Kraliçe izin verir ve Demodekes tarihte kayda geçen ilk meme kanseri ameliyatını yapar.

Yüzyıllar boyunca bir çok farkı kanser türleri tanımlanmış ve çağın tıbbi yöntemleri ile tedavi metodları uygulanmıştır. Bunun yanında çağımızda yüksek yaşam beklentisindeki artış da kanserin dünya çapında bu kadar yaygın bir hastalık olmasına katkıda bulunmuştur.

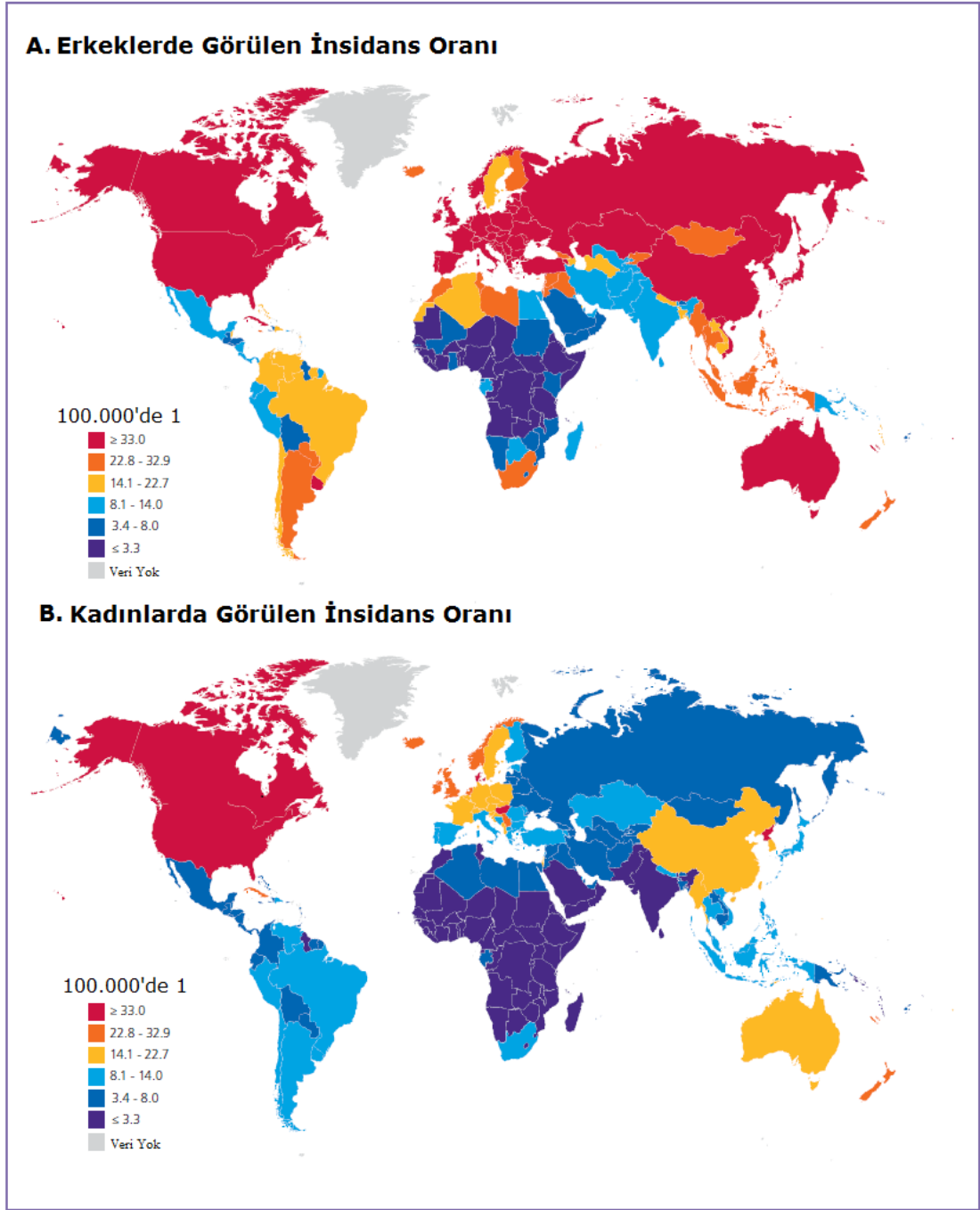
2.2.1. Akciğer Kanseri

2.2.1.1. Akciğer Kanseri Epidemiyoloji

Akciğer kanserine bağlı insidans ve mortalite çoğunlukla sigara içiciliğinin popüler olması nedeniyle 1930'lardan beri istikrarlı bir şekilde yükselmiştir. Son yüzyılda akciğer kanseri nadir bulunan bir hastalıktan küresel bir soruna dönüşmüştür (Amerika Kanser Topluluğu, 2012). Sonuçları ve iyileştirme çabaları sadece akciğer kanseri etyolojisini değil aynı zamanda bireysel akciğer tümörlerinde histolojik ve moleküler özelliklerini daha iyi anlamamıza yol açmaktadır (Adler 1992). Bilimsel literatürde ki ilk akciğer kanseri bulguları, 1400’lü yılların başlarına kadar uzanan Almanya ve Çek Cumhuriyeti sınırında çalışan madencilerin % 50'sinin dağ hastalığı adı verilen pulmoner bir hastalıktan ölümüne kadar uzanmaktadır. 1879'da Harting ve Hesse, madenciler hakkında 20 otopsi gerçekleştirmiş ve dağ hastalığı teşhisi konulan bu hastaların % 75'inde pulmoner sarkom varlığını tanımlamışlardır (Harting ve ark. 1879). Daha sonra akciğerin

skuamöz hücreli karsinomu olarak tanımlanan bu hastalıkta toz inhalasyonunun nedensel bir faktör olduğu hipotezi olarak verilmiştir (Rubin 1991). 1920 ve 1930'lu yıllarda araştırmacılar potansiyel etiyolojik ajanlar olarak radyasyon ve radon gazını önermişlerdir (Arnstein 1913). Ochsner ve DeBakey, 1930'lu yıllarda akciğer kanseri insidansı arttıkça hastalar arasındaki artan akciğer kanseri sayısını gözden geçirmiş ve sigara dumanı inhalasyonunun muhtemel bir sorumlu faktör olduğuna karar vermişlerdir (Ochsner ve ark. 1939).

Akciğer kanseri, 1950'lerin başından beri erkeklerde kanser ölümlerinin önde gelen nedeni olmuştur. 2008'de dünya çapında akciğer kanseri ölüm oranı 1.38 milyon (toplamın % 18.2'si) olarak hesaplanmıştır (Youlten ve ark. 2008). Ölüm oranları erkeklerde 1991'de düşmeye başlamış ve 2004 ile 2008 arasında ölüm oranı yılda % 2.6 azalmıştır. Erkekler için ölüm oranı en yakın zamanda 100.000'de 61.9 olarak bildirilmiştir (Devesa ve ark. 2005). Kadınlarda ise akciğer kanseri ölüm oranı en yakın zamanda 100.000'de 38.5 olarak bildirilmiştir. Ayrıca akciğer kanseri mortalitesi bölgelere göre önemli ölçüde farklılık göstermezken, ölümlerin % 43'ü daha gelişmiş ülkelerde ve % 57'si daha az gelişmiş ülkelerde gerçekleşmektedir (Ferlay ve ark. 2008). Erkeklerde en yüksek akciğer kanseri insidansı Kuzey Amerika, Avrupa, Doğu Asya ve Uruguay'da iken en düşük oranlar Sahra altı Afrika olduğu görülmüştür. Kadınlar arasında ise en yüksek akciğer kanser insidansı Kuzey Amerika, Avrupa, Avustralya, Yeni Zelanda, Kuzey Kore ve Çin'de olduğu belirlenmiştir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Dünyada akciğer kanseri insidansının varyasyon grafiği (Global Cancer Facts & Figures 3rd Edition, 2012).

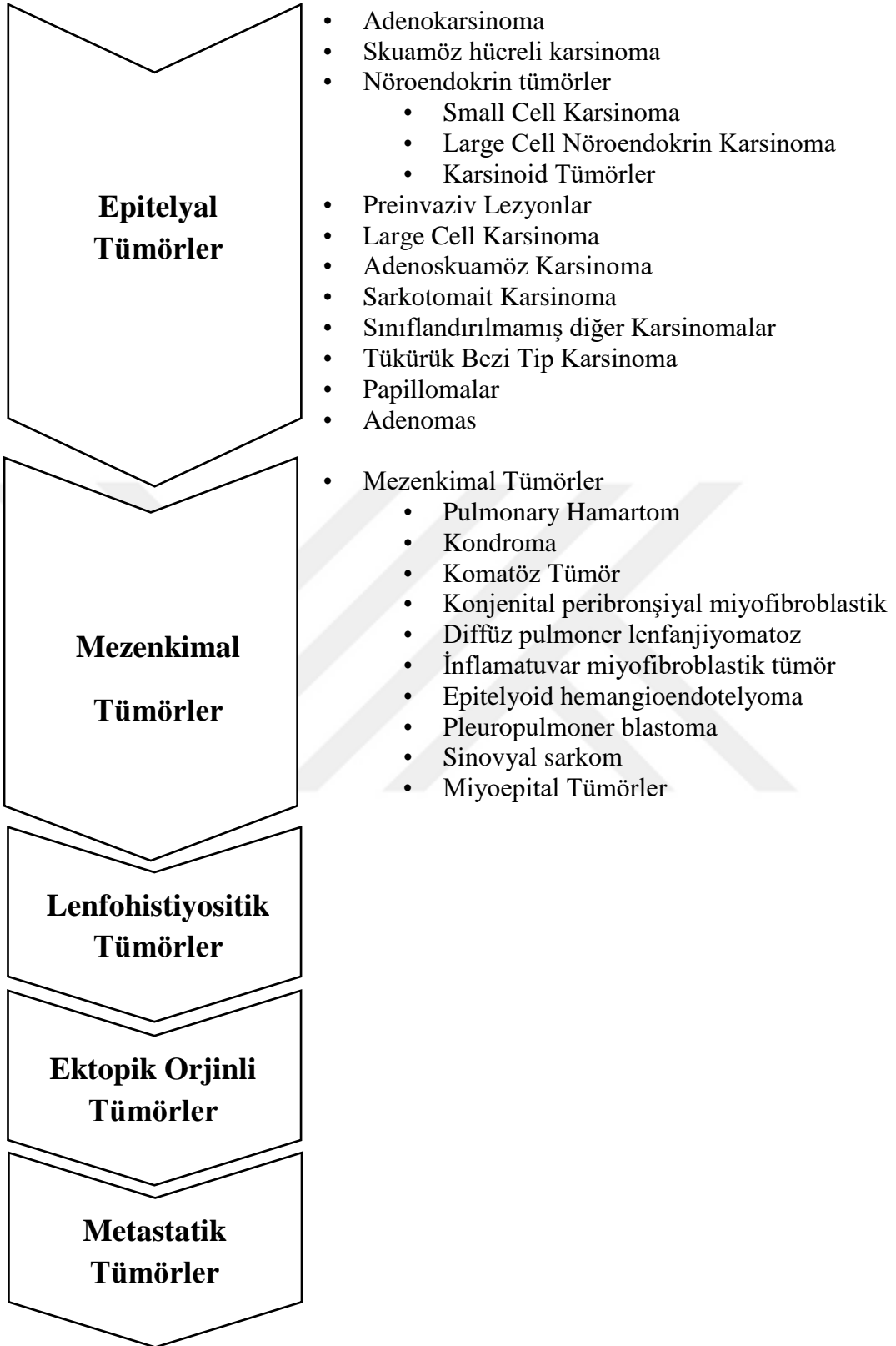
2.2.1.2. Akciğer Kanseri Moleküler Biyolojisi

Akciğer kanserinin moleküler temeli karmaşık ve heterojen bir yapıya sahiptir. Genetik, epigenetik ve protein sentezi sonrası modifikasyonlar gibi çoklu seviyelerde ki moleküler değişiklikler akciğer kanseri tanısı, tedavisi ve prognozunu etkileme potansiyeline

sahiptir (Larsen ve ark. 2011). Akciğer kanserinin gelişiminde genetik çeşitlilik oldukça yüksek olup diğer tüm tümörlere oranla daha fazladır. Bu nedenle moleküler patogenezinde rol oynayan birçok biyokimyasal yolların daha iyi anlaşılması, bu yolların aktivasyon ve inhibisyon mekanizmaları hedeflenerek tedavi stratejilerinin geliştirilmesi önem taşımaktadır (Larsen ve ark. 2011).

Diğer birçok malign türlerde olduğu gibi akciğer kanserinde de tümör büyümesi ve oluşumunun tetiklenmesi proteinlerin aktivasyonu (sentezi) ile ilgilidir. Örnek olarak KRAS (v-Kiras2 Kirsten sıçan sarkoma viral onkogen homolog), EGFR (Epidermal büyüme faktörü reseptörü), BRAF (serin/treonin-protein kinaz B-Raf), HER2 (Epidermal büyüme faktörü reseptörü 2), ALK (Anaplastik lenfoma kinaz), PTEN (Fosfataz ve tensin homologu), ALP (EML-4 anaplastik lenfoma kinaz) proteinlerinin ekspresyon seviyeleri oldukça yüksektir ve tümör gelişimi ile ilişkilidir.

Adenokarsinomalar da % 50'nin üzerinde onkojenik mutasyonlar tespit edilmiştir ve zamanla bu orana yeni mutasyonlar eklenmektedir (Sequist ve ark. 2011). Bu mutasyonlara ek olarak hastalığın doğal seyri veya tedavi süreci çeşitli mutasyonlara yol açarak hastalık daha karmaşık bir yapı halini almaktadır (Cooper ve ark. 2013). Yeni nesil dizileme teknolojileri (Yeni Nesil Sıralama Teknolojileri) sayesinde genom ve ekzonlardaki somatik değişiklikler çok geniş bir çerçevede incelenerek akciğer kanseri moleküler mekanizması daha iyi anlaşılmaya başlanmıştır. 31 küçük hücreli dışı akciğer kanseri vakasında yeni nesil dizileme teknolojisi ile 727 adet genetik mutasyon saptanmış ve bu mutasyonların birçoğu literatürde bulunmamaktadır (Liu ve ark. 2012). Son on yıldaki akciğer kanseri genetiği ve tedavisindeki araştırmalarda dikkat çekici ilerlemelere kısmen bağlı olarak 2004 dünya sağlık örgütü sınıflamasında önemli derecede değişiklikler bulunmaktadır (Travis ve ark 2004). Akciğer kanserinin sınıflandırılması Şekil 2.2.'de verilmektedir.



Şekil 2.2. Akciğer kanseri sınıflandırılması (Uluslararası Akciğer Kanseri Araştırmaları Derneği, 2015).

2.2.1.3. Akciğer Kanserinde Etkin Olan Başlıca Genetik Faktörler

2.2.1.3.1. KRAS

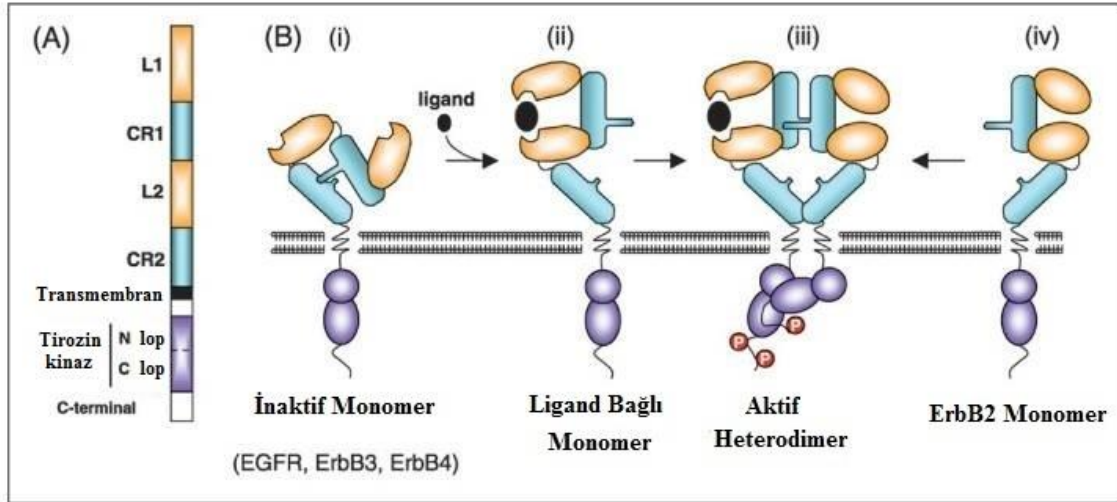
KRAS, RAS ailesinin proto-onkogenlerinin bir parçasıdır (insanlarda KRAS, NRAS ve HRAS). Hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını ve hayatta kalmayı kontrol eden sinyal transdüksiyon yollarının kontrolünde kritik role sahip olan bir G-protein kodlamaktadır (Downward 2003). Ras proteinleri normal hücrelerde guanozin difosfat (GDP) halinde ve pasiftir. Büyüme faktör reseptörlerinin aktivasyonunu takiben GDP aktive edilmiş guanozin trifosfat (GTP) formuna geçiş yapar. Aktive olan Ras-GTP, daha sonra mitojenle aktive protein kinaz (MAPK), RAS / RAF / MEK yolu ve fosfatidilinositol 3 kinaz (PI3-K) yolları da dahil olmak üzere birçok yaşam yolağını aktive eder (Karnoub ve ark. 2003). KRAS, EGFR gibi çeşitli büyüme faktörü reseptörleri tarafından indüklenen sinyal iletiminde kritik bir rol oynamaktadır. Mutasyonların aktive edilmesi, aktif RAS-GTP'nin GDP'ye inaktivasyonunu engelleyer ve proteinin GTPaz aktivitesini değiştirerek büyüme ilerleten yolların alt basamaklarına doğru artmış sinyalizasyona yol açar (Karnoub ve ark. 2003). Ayrıca akciğer kanseri tümörlerinde RAS / RAF / MEK / MAPK sinyal iletim kaskadı, 188 tümörün 132'sinde tanımlanan yollarda en az bir mutasyona sahip olduğu ve bu mutasyonların birçok akciğer kanserinde merkezi bir rol oynadığı, bunların çoğunda KRAS'daki mutasyonlardan kaynaklandığı tespit edilmiştir (Ding ve ark. 2008).

2.2.1.3.2. EGFR

EGFR 170 kDa'lık 486 amino asit içeren bir reseptör proteindir. Akciğer adenokarsinomları, göğüs duktal karsinomları ve glioblastom dahil olmak üzere birçok malign tümörlerde ErbB (Epidermal büyüme faktörü reseptörü ailesi) reseptör sinyalindeki düzensizlik programlanmış hücre ölümünden kaçınma, migrasyon yeteneklerini artırma ve metastazı kolaylaştırma yeteneği kazandırarak tümör hücrelerinin kontrolsüz proliferasyonunu hızlandırmaktadır (Markus ve ark. 2014). EGFR ligandlarının bağlanması reseptör fosforilasyonuna olanak tanıyan dimerizasyona neden olur ve bu dimerler, diğer HER2 ailesi reseptörleri ile homodimerler veya heterodimerler oluşturabilir (Ullrich 1990).

Epidermal büyüme faktörü RTK (Reseptör tirozin kinaz) ailesi, EGFR (ErbB1, HER1), ErbB2 (HER2, kemirgenlerde neu), ErbB3 (HER3) ve ErbB4 (HER4) olmak üzere dört

üyeden oluşur. Bu reseptörler, bir hücre dışı ligand bağlayan ektodamin, bir transmembran alan, membran ile bitişik kısa bir bölümü, bir tirozin kinaz alanı ve bir tirozin içeren C-terminal kuyruktan oluşan tek zincirli transmembran glikoproteinlerdir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. ErbB reseptörlerinin yapısı. (A) ErbB reseptör alanlarının lineer gösterimi. Hücre dışı N terminal alanı dört alt alan içerir. (B) monomer ve heterodimer yapısı.

Serbest ligandın reseptörün dış ortamına bağlanması, reseptörler arasındaki homo ve heterodimer oluşumunu teşvik eder. Reseptör dimerizasyonu, hücre içi tirozin kinaz alanının aktivasyonu ve C terminal kuyruğunun fosforilasyonu için önemlidir (Linggi ve ark. 2006).

EGFR mutasyonları akciğer kanserinde adenoskuamöz karsinomlarda da görülebilecek olmasına rağmen genelde tüm adenokarsinomlarda görülür (Marchetti ve ark. 2013). Ayrıca EGFR mutasyonları kadın, genç ve sigara içme öyküsü olmayan hastalarda daha sık görülmektedir (Tam ve ark. 2006). EGFR mutasyonları, histolojik olarak iyi örneklenmiş saf skuamos hücre karsinomlarda çok nadiren ortaya çıkar (Rekhtman ve ark. 2012).

2.2.1.3.3. BRAF

BRAF, KRAS'ın downstream efektör proteini olan bir serin/treonin protein kinazı kodlar. Hücrenin proliferasyonunun ve hayatta kalmanın düzenlenmesinde rol oynayan MAPK sinyal iletim yolunu aktive eder (Davies ve ark. 2002). BRAF ve KRAS genleri, EGFR aracılı sinyal yolağının bir parçasıdır ve akciğer kanseri adenokarsinomlarda BRAF

mutasyonları hemen hemen her zaman görülür (Marchetti ve ark. 2011). Nadiren de olsa, BRAF mutasyonları, melanoma için klinik kullanımda olan hedefe yönelik tedavilerin bulunması nedeniyle önemli bir terapötik hedef oluşturmaktadır. Ancak, bu yaklaşımın KHK'de (küçük hücreli dışı akciğer kanseri) klinik yanıtı hakkında sınırlı veri bulunmaktadır (Falchook ve ark. 2012).

2.2.1.3.4. Tümör Süpresör Genler

Tümör süpresör genleri, normal hücre büyümesinin önemli negatif düzenleyicileridir. Tümör süpresör geni (TSG) işlevinin kaybı, karsinogenezdeki önemli bir mekanizma olup Knudson'un iki vuruş hipotezinde olduğu gibi iki gen alleli de inaktive olmalıdır (Knudson 1993). Bir alel, bireysel gen genellikle mutasyon, epigenetik susturma veya diğer sapmalarla inaktif olurken, ikinci alel genellikle heterozigotluk kaybıyla etkisiz hale getirilmektedir. Böylece kromozomun bir bölgesi silinme, karşılıksız translokasyon veya mitoz rekombinasyon ile kaybolabilmektedir. Akciğer kanserinde, sıklıkla inaktive edilen TSG'ler arasında, TP53, retinoblastoma 1 (RB1), serinetreonin kinaz 11 (STK11), CDKN2A (Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A), RASSF1A (RAS ailesi) ve PTEN (Fosfataz ve tensin homoloğu) bulunur ve bu genlerde kromozomal bölgelere heterozigotluk kaybı yaygın olarak tanımlanmıştır (Raso ve ark. 2007). Ayrıca yapılan çalışmalarda TP53 (17p13), RB (13q12), p16 (9p21) ve PTEN (10q22) gibi bilinen TSG'lerin akciğer kanserinde sıklıkla allelik kaybı gösteren bölgeleri bulunduğu gösterilmiştir (Mogi ve ark. 2011).

2.2.2. Apoptozis

Hücrelerin yaşam döngüsü doğması, çoğalması (proliferasyon), farklılaşması (diferansiasyon) ve ölümü doğal bir denge halinde sürekli devam eder. Fakat organizma için homeostazis ölüm/yaşam dengesinin sağlıklı bir şekilde sürdürülmesine bağlıdır (Erdoğan 2003). Apoptoz, çok hücreli organizmalar tarafından istenmeyen hücrelerin çeşitli ortamlarda elden çıkarılması için kullanılan bir hücre ölüm modudur. Apoptoz geçiren hücreler, kontrollü bir şekilde, komşu hücrelere zarar vermeyi ve doku arasındaki kesintiye en aza indirgeyecek şekilde ölürlür. Ortaya çıkan hücre artıkları ise tipik olarak profesyonel fagositler tarafından ortamdan uzaklaştırılır ve yeni bir hücre ölen hücrenin yerini birkaç saat içinde alır. Apoptoz yıkma aşamasında gerçekleşen ve hücredeki bir

dizi kilit yapıların kontrollü bir şekilde parçalanıp ardından bertaraf edilmesi ile sonuçlanan olaylar dizisini içerir. Bu olaylar bir dizi gen ve kaspaz olarak bilinen bir sistein proteaz ailesinin üyeleri tarafından düzenlenmiştir (Nicholson 1999, Creagh ve ark. 2003).

2.2.2.1. Apoptozis’de Kaspazların Görevi

Kaspazlar, hücre ölümünü ve inflamasyonu düzenleyerek homeostazı korumak için önemli olan bir enzim ailesidir.

Kaspazlar, kaspaz aktif bölgesindeki katalitik sistein kalıntılarına bağlı olan ve yalnızca substrat içindeki belirli aspartik asit kalıntılarında sonra oluşan bir reaksiyonda peptit bağlarını hidrolize eden endoproteazlardır.

Buna göre, kaspazlar apoptoz (memelilerde kaspaz-3, -6, -7, -8 ve -9) ve enflamasyonda (kaspaz-1, -4, -5, -12) bilinen rolleri ile geniş bir şekilde sınıflandırılmıştır (Şekil 2.4). Apoptozda rol alan kaspazlar, etki mekanizmaları ile alt sınıflara ayrılmıştır ve başlatıcı kaspazlar (kaspaz-8 ve -9) veya yürütücü kaspazlar (kaspaz-3, -6 ve -7) 'dır.



Şekil 2.4. Kaspazların sınıflandırılması (McIlwain ve ark. 2003).

Kaspazlar, başlangıçta dimerizasyon ve çoğunlukla aktivasyon için bölünme gerektiren inaktif monomerik prokaspazlar olarak üretilirler. Dimer yapısının oluşması, prokaspazın

prodomainindeki spesifik bölgelere bağlanan çeşitli adaptör proteinler tarafından kolaylaştırılır. Farklı kaspazlar prodomainlerinde farklı protein-protein etkileşim alanlarına sahiptir ve böylece farklı adaptörlerle kompleks oluştururlar. Örneğin, kaspaz-1, 2, 4, 5 ve 9 bir kaspaz alım alanı (CARD, “Caspase Recruitment Domain”) içerirken, kaspaz-8 ve -10 bir ölüm efektör alanına (DED, “Dead Effector Domain”) sahiptir (Taylor ve ark. 2008). Apoptozis sırasında başlatıcı kaspazlar önemli yapısal proteinleri yıkmak ve diğer enzimleri aktive etmek için faaliyetlerini koordine eden yürütücü kaspazlarını aktive ederler. Bu sayede kaspazlar birbirlerini aktifleştirerek proteolitik bir şelaleyi oluştururlar. Başlatıcı kaspazlar, ölüm sinyalini iletici kaspazlara iletirler. İletici kaspazların bazıları lamin, hücre içi iskelet ve çekirdek zarı proteinlerini parçalar. Kaspaz 3, DNA onarımında görevli olan PARP’ı kırarak inaktive eder ve DNA onarımını engeller. Bazıları ise bir dizi DNaz’ı aktive ederek DNA’nın parçalanmasına yol açarlar (Ulukaya 2001).

2.2.2.2. Apoptozisin Mekanizmaları

Apoptozisin aktivasyonunda üç sinyal yolunun rol aldığı bilinmektedir;

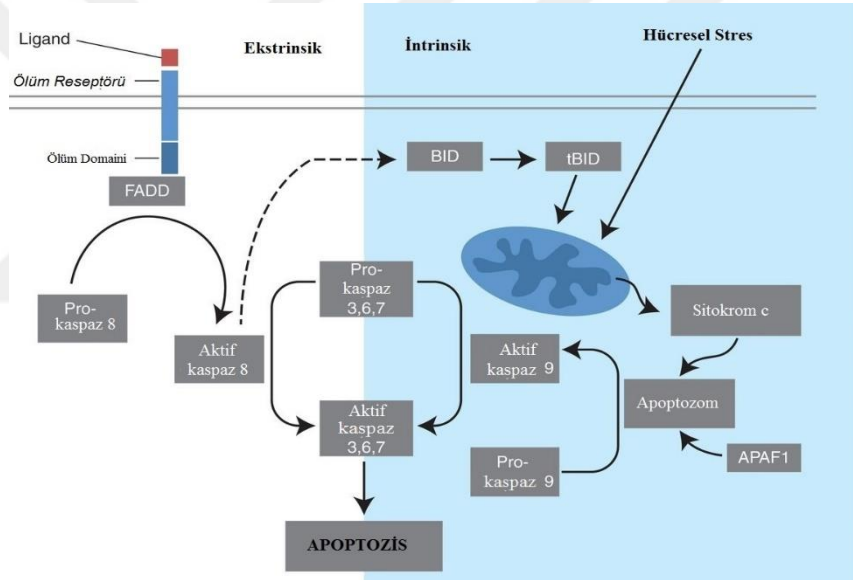
1. Hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanan ölüm aktivatörleri ile tetiklenme/ Ekstrinsik (dışsal) yolak
2. Mitokondri/Sitokrom-C aracılı apoptozis oluşturulması/İntrinsik (içsel) yolak
3. Endoplazmik retikulum aracılı apoptozis oluşturulması

2.2.2.2.1. Ekstrinsik (dışsal) Yolak

Apoptozisde ekstrinsik yolak, ölüm reseptörlerine bağlanan ligand formunda verilen hücre dışı işaretçilerle tetiklenir.

Ölüm reseptörleri; TNF reseptör-1 (TNFR1), CD95 (ayrıca Fas ve APO-1 olarak da bilinir), ölüm reseptörü 3 (DR3), TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand reseptör-sekansını ve tümör nekroz faktörü (TNF-1, TRAIL-R1; DR4 olarak da adlandırılır) ve TRAIL-R2’yi (insanlarda DR5 olarak da bilinir) içerir. Ölüm reseptörü ligandları ise, TNF, CD95-ligandı (CD95-L; Fas-L olarak da bilinir), TRAIL (Apo2-L olarak da adlandırılır) ve TNF benzeri ligand 1A (TL1A) içerir (Elmore 2007).

Ekstrinsik apoptoz yolu, bağlayıcı proteinin FADD (Fas ile ilişkili ölüm bölgesi) TRADD (Tümör nekroz faktör reseptörü tip 1 ile ilişkili ölüm bölgesi) yardımı ile kaspaz-8'in dimerizasyonuna ve aktivasyonuna yol açan bir ligandın bir ölüm reseptörüne bağlanması yoluyla aktive edilir. Aktif kaspaz-8 daha sonra, apoptozu doğrudan etkili bir hücre ölümünü indüklemek üzere, BID'nin bölünmesi yoluyla yürütücü kaspazları (-3, -6, -7) açarak ve aktifleştirerek başlatır. Ekstrinsik veya mitokondriyal apoptoz yolağında, mitokondriden sitokrom c salınmasını ve APAF1, sitokrom c, ATP ve kaspaz 9'dan oluşan apoptozomun oluşumuna yol açar. Ve bu yapı çeşitli hücresel stresler vasıtasıyla aktive edilebilir ve bu da kaspaz-9'un aktivasyonu ile sonuçlanır. Aktif kaspaz-9 daha sonra yürütücü kaspazları (kaspaz 3,6,7) keserek, kaspazları aktive eder ve apoptozu başlatır (Taylor ve ark. 2008) (Şekil 2.5).

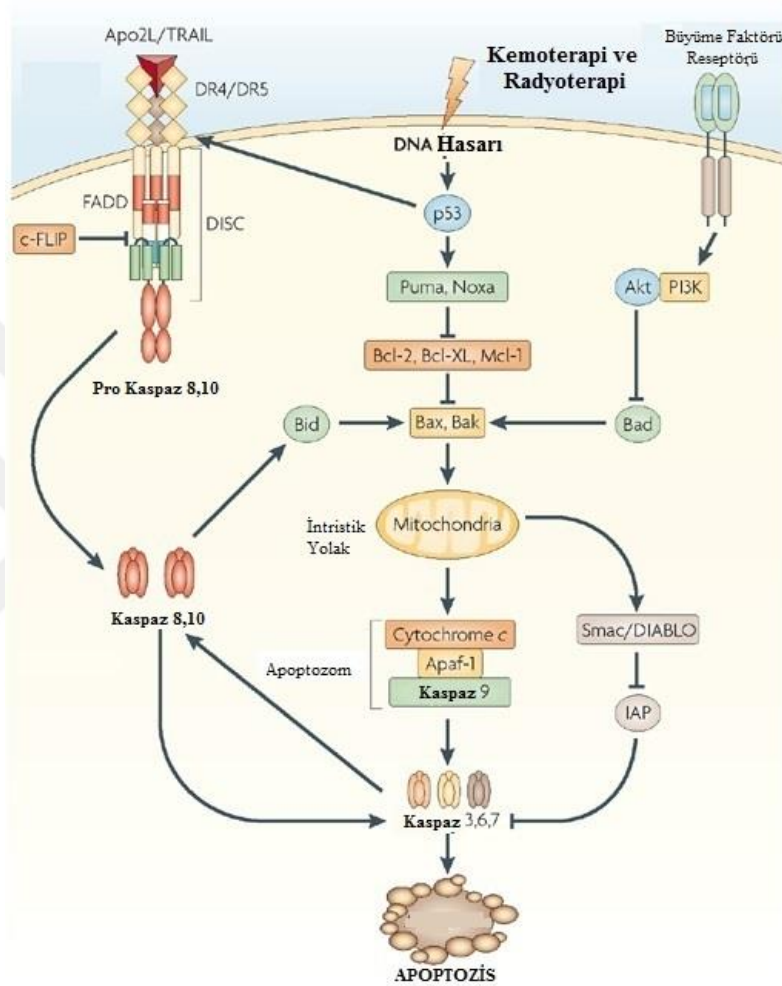


Şekil 2.5. Apoptozisde ekstrinsik (dışsal) yolak (McIlwain ve ark. 2003).

2.2.2.2.2. İntrinsik (İçsel) Yolak

Apoptozu başlatan intrinsik sinyal yolları, hücre içindeki hedeflere doğrudan etki eden ve mitokondriyal olayları başlatarak çeşitli reseptör aracılı olmayan uyarıları içerir (Şekil 2.6). İçsel yolağı başlatan uyarılar, pozitif veya negatif bir şekilde hareket edebilecek hücre içi sinyaller üretirler (Saelens ve ark. 2004). Bu sinyaller sonucunda mitokondriyal membran geçirgenliğini etkileyerek membran üzerinde ki gözeneklerin açılmasına, mitokondriyal transmembran potansiyelinin kaybına ve membranlar arası boşluktan sitosol içerisine normal olarak sekestrasyona tabi tutulan pro-apoptotik proteinlerin iki

ana grubunun salınması gerçekleşir (Loo ve ark. 2002, Garrido ve ark. 2005). Birinci grup sitokrom c, Smac / DIABLO ve serin proteaz HtrA2 / Omi'den oluşur. Bu proteinler kaspaz bağımlı mitokondriyal yolağı aktive eder. Sitokrom c, bir "apoptozom" oluşturan procaspase-9'un yanısıra Apaf-1'i de bağlar ve aktive eder (Hill ve ark. 2004).



Şekil 2.6. Apoptozis' de intrinsik (içsel) yolak (Ashkenazi 2008).

Apoptoz sırasında pro-apoptotik proteinlerin ikinci grubu, apoptoz indükleyeci faktör (AIF), endonükleaz G ve kaspazlar ile aktive olan DNase (CAD), mitokondriden salınır. AIF, nükleus içinde, 50-300 kb aralıklarla DNA parçalanmasına ve çevresel nükleer kromatin yoğunlaşmasına neden olur (Joza ve ark. 2001).

Nükleer yoğunlaşmanın bu erken şekli "evre I" yoğunlaşma olarak adlandırılır (Susin ve ark. 2000). Endonükleaz G aynı zamanda nükleusa translokasyon yaparak

oligonükleozomal DNA fragmanları üretmek üzere nükleer kromatin parçalamaktadır (Li ve ark. 2001). AIF ve endonükleaz G'nin her ikisi de kaspazdan bağımsız bir şekilde çalışırlar. CAD, daha sonra mitokondriyumdan salınır ve kaspaz-3 ile bölünmeden sonra oligonükleozomal DNA parçalanmasına ve daha belirgin ve gelişmiş bir kromatin yoğunlaşmasına yol açan çekirdeğe translokasyon yapar (Enari ve ark. 1998). Bu daha sonra ve daha belirgin olan kromatin yoğunlaşması, "evre II" yoğunlaşması olarak ifade edilir (Susin ve ark. 2000).

Bu apoptotik mitokondriyal olayların kontrolü ve düzenlenmesi, Bcl-2 familyası proteinlerinin üyeleri vasıtasıyla gerçekleşmektedir (Cory ve Adams, 2002). Proteinlerin Bcl-2 ailesi mitokondriyal membran geçirgenliğini yönetir ve pro-apoptotik veya antiapoptotik olabilir. Bugüne kadar toplam 25 gen Bcl-2 ailesinde tanımlandı. Bazı anti-apoptotik proteinler arasında Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, BAG bulunur ve bazı pro-apoptotik proteinler arasında Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik ve Blk gösterilmektedir. Bu proteinlerin özel önemi vardır, çünkü hücrenin apoptozis olaylarının başlamasını, devam etmesini veya süreci durdurduğunu belirleyebilirler. Bcl-2 protein ailesinin ana etki mekanizmasının mitokondriyal membran geçirgenliğinin değiştirilmesi yoluyla mitokondriyodaki sitokrom c salınımının düzenlenmesi olduğu düşünülmektedir. Tümör süpresör protein p53, proteinlerin Bcl-2 ailesinin regülasyonunda kritik bir role sahiptir, ancak kesin mekanizmalar henüz aydınlatılmamıştır (Schuler ve Green, 2001).

2.2.2.2.3. Mitokondrinin Apoptozis Sürecindeki Rolü

Hücre ölümünün düzenlenmesinde mitokondrinin, apoptotik yolların kesiştiği önemli bir kavşak noktası olduğu görülmüştür. Bu yüzden mitokondrinin aktivasyonu (sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınması) apoptotik süreçte geri dönüşümsüz noktayı göstermektedir (Kumar ve ark. 2005). Mitokondri, AIF, Smac/DIABLO ve sitokrom c gibi birçok pro-apoptotik proteini içermektedir. Sitokrom c, elektron transport zincirine ve oksidatif fosforilasyona katılır. Sağlıklı hücrelerde sitokrom c, mitokondride membranlar arası boşlukta yer almaktadır (Zhang 2003). Sitotoksik ilaçlar, büyüme faktörü eksikliği, reaktif oksijen türleri ve DNA hasarı gibi değişik hücrel stresler sitokrom c'nin salınmasını harekete geçirir. Sitokrom c'nin salınması, Bcl-2 ailesi üyeleri ile düzenlenir (Chang ve Yang 2000).

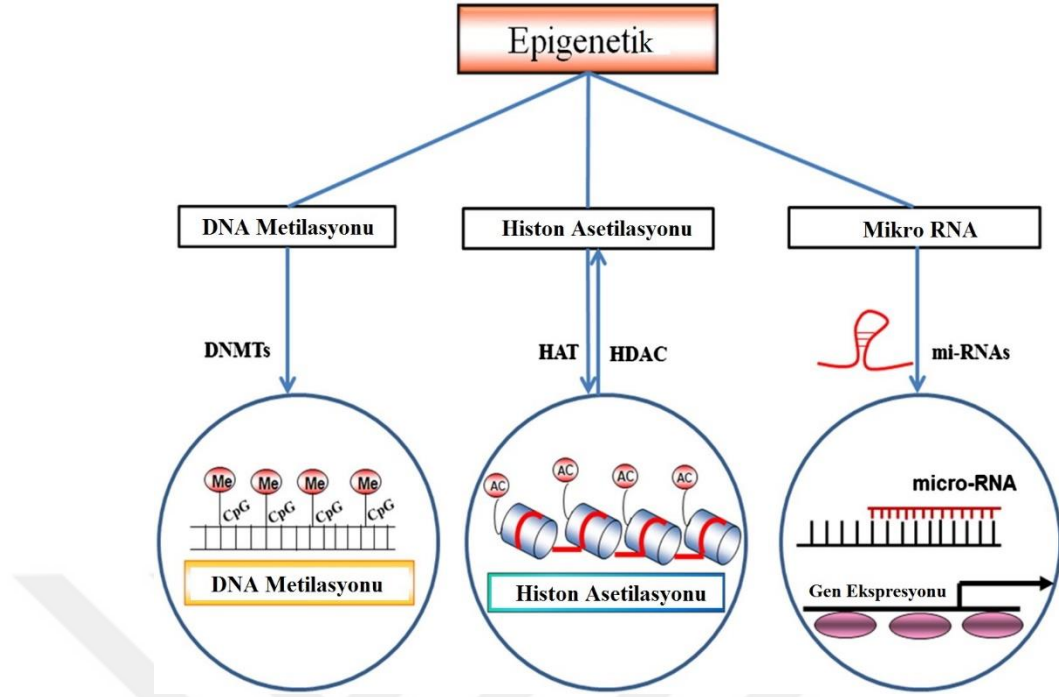
2.3. Epigenetik

Klasik genetik teorilerle birçok olayda çözümlene yapılılabılırken, genetik çözümlenmelerin de ötesine geçebilen epigenetik düzenlemeler son yıllarda birçok araştırmacının ilgisini çekmeyi başarmıştır (Can ve ark. 2016).

Epigenetik terimi DNA dizisinde değişiklik oluşturmadan gen ekspresyonunda gelişen kalıtsal değişikliklerdir (Yasmin ve ark. 2015). Genlerin ne zaman ne kadar süreyle ve nerede çalışacağını belirleyen, DNA'nın moleküler yapısında ve diziliminde bir değişime neden olmadan DNA'da kodlu olan genetik bilginin ortaya çıkmasını sağlamaktadır (Karaçay 2009). Ayrıca epigenetik genomik damgalama ve paramutasyon gibi bir dizi fenomeni kapsamaktadır. Örneğin, ilk olarak bitkilerde tanımlanan paramutasyon, bir genin bir allelinde (örneğin, tohum rengini belirten bir gen alleli) meydana gelen genetik değişikliğin normal alleli kalıtsal olarak etkilemesidir. Burada önemli olan ise, paramutant allel ve ilişkili fenotipin kuşaklararası epigenetik kalıtım olarak adlandırılan sonraki jenerasyonlara geçebilmesidir (Alyea ve ark. 2012).

1940 yılında gelişimsel biyolog olan Conrad Epigenetik terimini çalışmalarında kullanmıştır. Conrad epigenetiği, genotipin fenotipi gelişim esnasında nasıl oluşturduğunu inceleyen bilim dalı olarak bilinmektedir (Waddington 1940). 1975 yılında kimyasal DNA modifikasyonu olarak, sitozin-guanin dinükleotit adacıklarının (CpG) metilasyonunu içeren kovalent kimyasal DNA modifikasyonları olarak önerildi (Holliday ve ark. 1975). 1990'lı yıllarda ise kromatinlerin yeniden düzenlenmesi ve DNA metilasyon basamaklarını kapsayan, DNA sekansında bir değişiklik olmaksızın meydana gelen gen ekspresyonundaki kalıtsal değişiklikler olarak tanımlandı (Dolinay ve ark. 2007).

Epigenetik mekanizmalar özellikle embriyo gelişimi sırasında hücrelerin farklılaşmasında etkin bir rol oynamaktadır (Vaissiere ve ark 2008). Epigenetik mekanizmalar; DNA metilasyonu, histon modifikasyonu (asetilasyon, metilasyonu, fosforilasyon ve ubiquitinasyon gibi), kromatinin yeniden modellenmesi olarak tanımlanmaktadır (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Epigenetik mekanizmalar. DNMT: DNA metil transferaz; HAT: histon asetil transferaz. (Chaturvedi ve ark. 2014)

Bu süreçler DNA yapısına, DNA-bağlanma proteinlerinin yapısına, RNA ve protein degradasyonuna etki ederek gen fonksiyonunun kontrolünü sağlamaktadır. Epigenetik mekanizmalarda ki işleyiş bozuklukları özellikle kanser gibi çeşitli hastalıkların oluşumunda önemlidir (Liloglou ve ark. 2014).

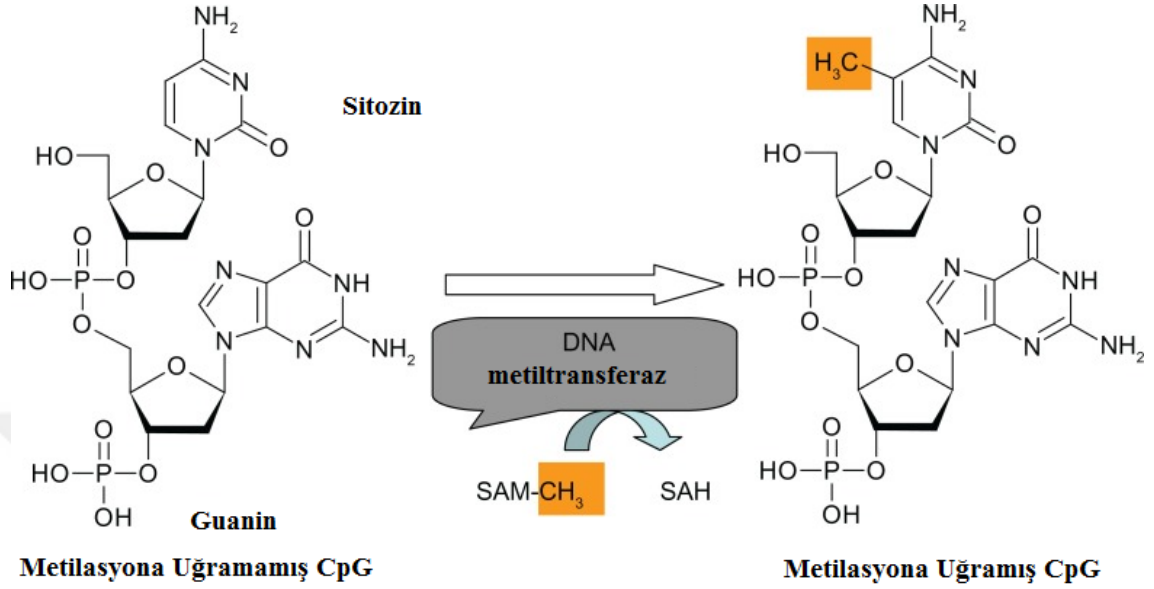
Knudson'un iki vuruş hipotezine göre; malign dönüşümün oluşabilmesi için organizmada tümör baskılayıcı genlerin iki allelinin de işlev kaybetmesi gereklidir. Bu iki vuruşun birinin genetik diğerrinin ise epigenetik ya da her ikisinin birden genetik veya epigenetik faktörler olabileceği bilinmektedir (Gronbaek ve ark. 2006).

2.3.1. Epigenetik Mekanizmalar

2.3.1.1. DNA Metilasyonu

Metilasyon, memelilerin DNA'sında gerçekleşen tek doğal kovalent olaydır (Szyf ve ark. 2000). Omurgalılarda DNA metilasyonunun en belirgin özelliği, tüm CpG'lerin metilasyona tabi tutulmadığı, metillenmiş bazların belirli dokularda farklı şekilde dağıldığı ve dokuya özgü metilasyon modelleri oluşturduğu gerçeğidir (Yisraeli ve ark. 1984). DNA metilasyon reaksiyonu, S-adenosil-metionin'den metil grubunun CG

dinükleotit diziliminde bulunan sitozin bazının 5 'konumuna DNA metil transferazlar (DNMT) katalizliği ile aktarılmasıdır (Şekil 2.8) (Ramchandani ve ark. 1999).



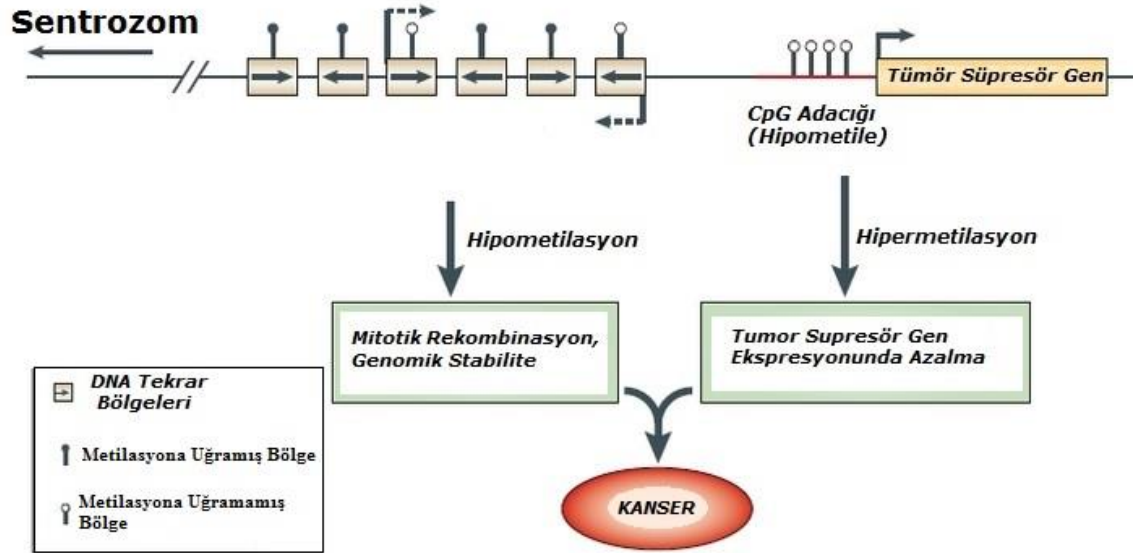
Şekil 2.8. CpG Adacıklarının DNA metil transferaz tarafından metilasyonu. (SAM-CH₃ S-adenosil-metionin) (Hafız 2010)

Bir DNA sekansında herhangi bir dinükleotidin bulunma olasılığı yaklaşık % 6 (1/16) iken insanlarda CpG dinükleotidinin sıklığı çok azdır ve bu olay CG baskılanması olarak bilinen bir durumdur.

DNMT'ler ve MTHFR (metilentetrahidrofolat redüktaz), DNA metilasyonunda iki önemli enzimi temsil etmektedir. Farelerde yapılan çalışmalarda bu enzimleri kodlayan genlerden yoksun olan farelerin DNA'larında hipometilasyon (epigenetik metilasyonda bir azalma) olduğu gösterilmiştir (Chen ve ark. 2001). İnsanlarda 5 adet DNMT enzimi tanımlanmıştır. Bunlar DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b ve DNMT3L olarak adlandırılmıştır. DNMT2' lere animoterminal regülatör bölgesi bulunmaz. Ayrıca katalitik bölgesi olmayan DNMT3L dışındaki metil transferazlarda enzimatik aktivite görülmektedir. Novo metiltransferazlar olarak adlandırılan DNMT3a ve DNMT3b yarı-metillenmiş ve hiç metillenmemiş bölgelere bağlanarak metilasyonu gerçekleştirirler. Maintenance methyltransferase olarak da bilinen DNMT1 ise sadece yarı-metillenmiş DNA bölgelerine bağlanmaktadır (Murell ve ark. 2005).

DNA’da metilasyon olayları kromatin yapının değiştirilmesi, X kromozomu inaktivasyonu, genomik imprinting, transkripsiyonel baskılanma ve DNA’ da tekrarlayan dizinlerin baskılanması gibi durumlarda önemli etkilere sahiptir (Robertson 2001). X inaktivasyonuna ve genomik imprintinge uğrayan genler dışında, normal hücrelerde CpG dinükleotidleri metile iken, gen promotörlerin bulunan CpG adacıkları demetiledir. Çünkü bu genler sadece bir allelde metiledir ve bu sayede normal hücrelerde tek allelden ekspresyonu sağlanabilir. Her dokunun metilasyon kalıbı kendine özgüdür. Hatta tek bir hücre klonunda bile farklılık gösterebilir (Sulewska ve ark. 2007). Bu olaya en güzel örnek klonlanmış hayvanlarda görülmektedir. Klon hayvanlarda epigenetik programlamanın eksikliği sonucu (özellikle imprinting) klonların erken yaşlarda öldüğü ve gelişme farklılıkları gözlenmiştir (Esteller 2006).

Metilasyon ve kanser oluşum süreçleri arasındaki ilişki 1980’li yıllardan beri bilinmektedir (Warnecke ve ark. 2000) (Şekil 1.9). Kanser hücrelerinin genomlarında görülen hipometilasyon dışında bazı özel genlerin promotor bölgelerindeki CpG adacıklarında hipermetilasyon gözlenmektedir (Park ve ark. 2007). CpG adacıklarındaki hipermetilasyon ise o genin transkripsiyonunu önlemektedir (Bird 1996).

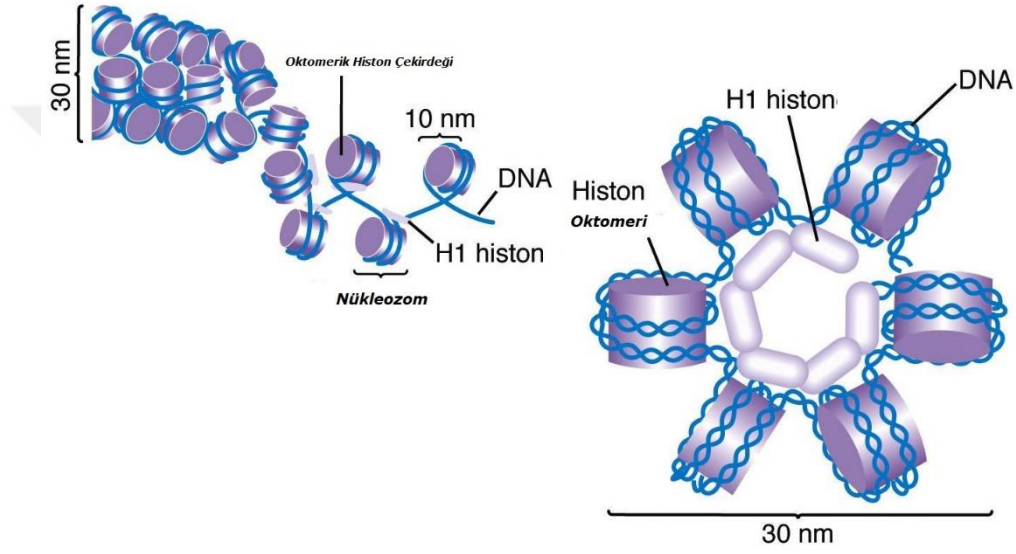


Şekil 2.9. Normal hücrelerin tümör süpresör genlerinde meydana gelen hipermetilasyon ve tekrar dizilerindeki hipometilasyon sonucu kanser oluşumu (Phillips 2008).

2.3.1.2. Histon Modifikasyonları

2.3.1.2.1. Histonların Yapı ve Özellikleri

Histonlar lizin ve arjinince zengin ökaryotik hücrelerin çekirdeğinde yer alan ve DNA'nın nükleozomlar halinde paketlenmesini sağlayan bazik proteinlerdir. Ana histon proteinleri H2A, H2B, H3 ve H4 proteinleridir ve nükleozomun çekirdek bölümünde yer almaktadırlar. Nükleozomlar, iki H3-H4 dimeri ve iki H2A-H2B dimerinin birleşmesiyle oluşan oktamerik yapıdaki proteinleri içerir ve birbirlerine H1 histonlarıyla bağlanırlar (Şekil 2.10) (Campos ve ark. 2009, Allis ve ark. 2007).



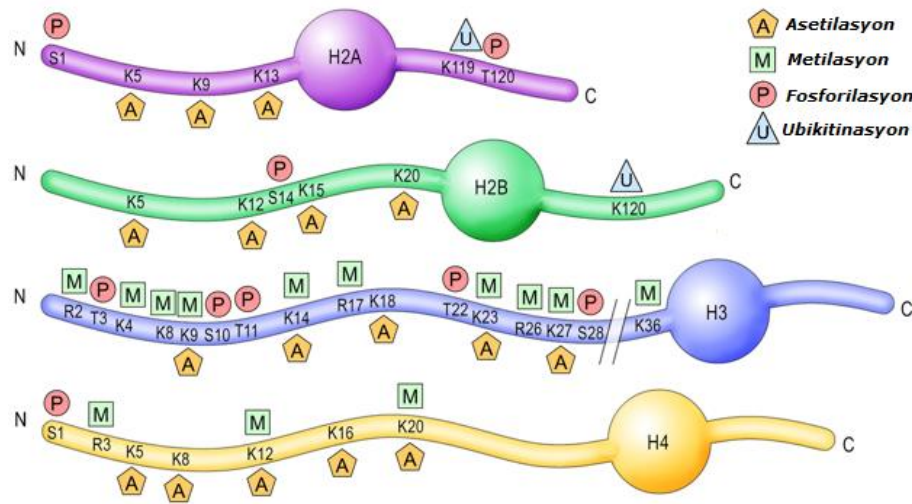
Şekil 2.10. Histon konformasyonu ile nükleozom yapısı.

Histon modifikasyonları histon proteinlerinin posttranslasyonel modifikasyonları olup; N-terminal kuyruğunda gerçekleşir. Gen fonksiyonuna, kromatin yapısına, gen ekspresyonuna etki edebilen histon modifikasyonları aynı zamanda DNA tamirinde ve replikasyonunda işlev görmektedirler (Kouzarides 2007).

DNA düzeyinde metilasyon sitozin metilasyonu ile gerçekleşirken, histonlar için bu uyarılma asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, glikolizasyon şeklinde olmaktadır.

2.3.1.2.2. Histon Asetilsyonu ve Metilasyonu

Bu modifikasyonlar arasında; histone asetil transferazlar (HAT) tarafından asetillenme ve histon metil transferazlar (HMT) tarafından metillenme yer almaktadır (Şekil 2.11). Genel ifadeyle histonlar üzerinde gerçekleşen bu modifikasyonlar, kromatinin yapısının gevşek ya da sıkı olma durumunu etkileyerek gen ifadesinde regülatör rol oynar. Yapılan çalışmalar asetil grupları histonlardaki pozitif (+) yükü nötralize ederek histonlar ve DNA arasındaki elektrostatik etkileşimleri zayıflattığı ve bunun sonucu olarak gen ifadesinde değişime neden oldukları gösterilmiştir (Ettig ve ark. 2011). Ek olarak H3 ve H4 histonlarının lizin rezidularından asetillenmesinin aktif kromatinle korelasyon gösterdiği, deasetilasyonun ise kromatinin daha sıkı bir şekilde paketlenerek genlerin inaktif duruma geçmesiyle sonuçlandığı bilinmektedir.

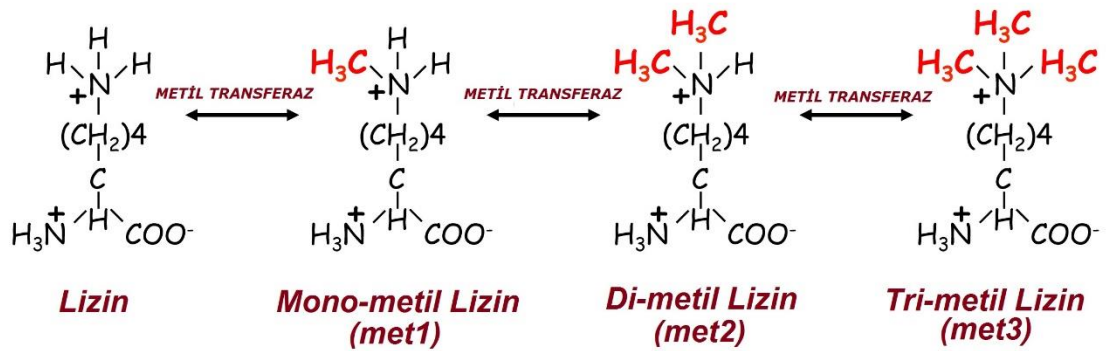


Şekil 2.11. Histon proteinlerinde görülen epigenetik modifikasyonlar (Gräff ve ark. 2008).

Histonlarda görülen asetilasyon ve deasetilasyon olayları gen ifadesi ile direk ilişkilidir. Yapılan çalışmalar histon H3 ve H4'ün asetilasyonunun açık kromatin yapısına ve transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını kolaylaştıran aktif transkripsiyona yol açmaktadır (Liu ve ark. 2011). Deasetilasyon ise transkripsiyonun inaktivasyonu ile ilişkili olup ve genel olarak metilasyon ile korelasyon göstermektedir. Genel olarak transkripsiyonun aktif olduğu bölgelerde histon asetilasyonu görülürken, inaktif ökromatin ve heterokromatin bölgelerde ise hipoasetile histonlar yer almaktadır (Peng ve ark. 2011).

HDAC'lar, deasetilaz aktivitesi için bir kofaktör olarak Zn^{+2} gerektiren 11 üyeden oluşur ve homolojisine bağlı olarak dört sınıfa ayrılırlar. Sınıf I çekirdeğin içinde yer alan HDAC'ları 1, 2, 3 ve 8'i içerir; Sınıf II hem çekirdekte hem de sitoplazmada yer alan HDAC 4, 5, 6, 7, 9 ve 10'u içerir; sınıf IV HDAC 11'i içerir. Geleneksel HDAC'ların aksine, sınıf III HDAC'lar yedi memeli sirtuinden (SIRT1-7 olmak üzere NAD^{+} bağımlı sınıf III deasetilaz enzim ailesi genleri) oluşur (Blander ve Guarente 2004). Histonların asetilasyonunun, pozitif yüklerini nötralize ettiği ve negatif yüklü DNA ile olan etkileşimlerini gevşettiği düşünülmektedir. Bu, transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını ve daha sonra gen transkripsiyonunu kolaylaştırmak için kromatin yapısını açar. Histonların HDAC'lar tarafından deasetilasyonu, DNA ile olan etkileşimini sıkılaştırır ve kapalı bir kromatin yapısına ve gen transkripsiyonunun engellenmesine neden olur (Grunstein, 1997). Histon modifikasyonunun düzenlenmesinin yanı sıra HDAC'lar, transkripsiyon faktörleri, şaperonlar ve sinyal molekülleri de dahil olmak üzere birçok histonlu proteininin post-translasyonel asetilasyon durumunu düzenleyerek protein stabilitesinde, protein-protein etkileşimlerinde ve protein-DNA etkileşimlerinde değişikliğe neden olabilmektedirler.

Histonlarda gerçekleşen bir başka epigenetik mekanizma da histon kuyruklarındaki lizinin metilasyonudur (Şekil 2.12).



Şekil 2.12. Histonlarda görülen lizin metilasyonu

Transkripsiyonel aktivasyon, histon kuyruklarındaki asetilasyon işlemine göre, metilasyon olaylarında da metilasyonun gerçekleştiği yere ya da histon kuyruğuna takılan metil sayısına göre değişmektedir. Örneğin; Histon 3 lizin 4 dimetilasyonu ve

trimetilasyonu (H3K34me2 ve H3K4me3), histon 3 lizin 9 monometilasyonu (H3K9me1) kromatin yapının açılmasını ve gen ekspresyonunun aktifleşmesini sağlarken, Histon 3 lizin 27 dimetilasyonu ve trimetilasyonu (H3K27me2 ve H3K27me3), histon 3 lizin 9 dimetilasyonu ve trimetilasyonu (H3K9me2 ve H3K9me3) ise kromatinin ve gen ekspresyonunun inaktif hale gelmesine neden olabilmektedir (Schneider ve ark. 2007).

HAT'lar ve HDAC'lar, histon metil transferaz ve de-metilazlar arasındaki dengesizliklerden kaynaklanan epigenetik değişiklikler, global transkripsiyonel profilleri etkileyerek kanser oluşumunu başlatabilirler. Aslında yapılan çalışmalarda p53 ve RUNX3 gibi tümör baskılayıcı genler, birçok kanserde anormal epigenetik değişikliklerle bastırıldığı görülmüştür. Hatta Rb ve p53 gibi klasik tümör süpresörlerinden farklı olarak, RUNX3 geninin mutasyonu çok nadirdir ve inaktivasyonuna esas olarak mutasyon yerine epigenetik değişiklikler ile olduğu belirlenmiştir (Holliday ve ark. 1993, Li ve ark. 2002).

2.3.2. Akciğer Kanseri ve Epigenetik

Akciğer kanserinin büyük çoğunluğu, skuamoz hücre karsinoması, adenokarsinom ve geniş hücreli karsinoma alt tiplerini içeren küçük hücreli (nöroendokrin) karsinom veya küçük hücreli olmayan karsinom olarak karakterize edilebilir (Dela ve ark. 2011). Tüm bu karsinogenik süreç, anahtar onkogenler, tümör süpresör genler ve DNA onarım/housekeeping genlerinin düzenlenmesi ile genetik ve epigenetik değişikliklerin birikimi tarafından yönlendirilir. DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve kodlamayan RNA ifadesi de dahil olmak üzere epigenetik değişkenlik bir kişinin fenotipik yapısına (örn., Ksenobiyotik metabolizma, DNA onarım kapasitesi, bağışıklık vb.) ve dolayısıyla malignite riskine katkıda bulunmaktadır (Langevin ve ark. 2013). Bu nedenle akciğer kanserinin patogenezini tam olarak anlamak için genetik faktörlerin yanı sıra akciğer kanseri epigenetiği hakkındaki bilgilerimizi arttırmamız büyük önem taşımaktadır. Epigenetik mekanizmaların belirlenmesi sayesinde akciğer kanserinin gelişimi, teşhisi, yeni prognostik belirteçlerin geliştirilmesi ve yeni terapötik hedeflerin belirlenmesi sağlanacaktır (Scott ve ark. 2015).

Akciğer kanser gelişiminde büyük öneme sahip olan tümör süpresör genlerin genellikle hipermetilasyon ile inaktive olduğu belirlenmiştir. Spesifik tümör süpresör genlerin artan metilasyonu, hiperplaziden adenokarsinomaya kadar neoplastik progresyon ile birlikte

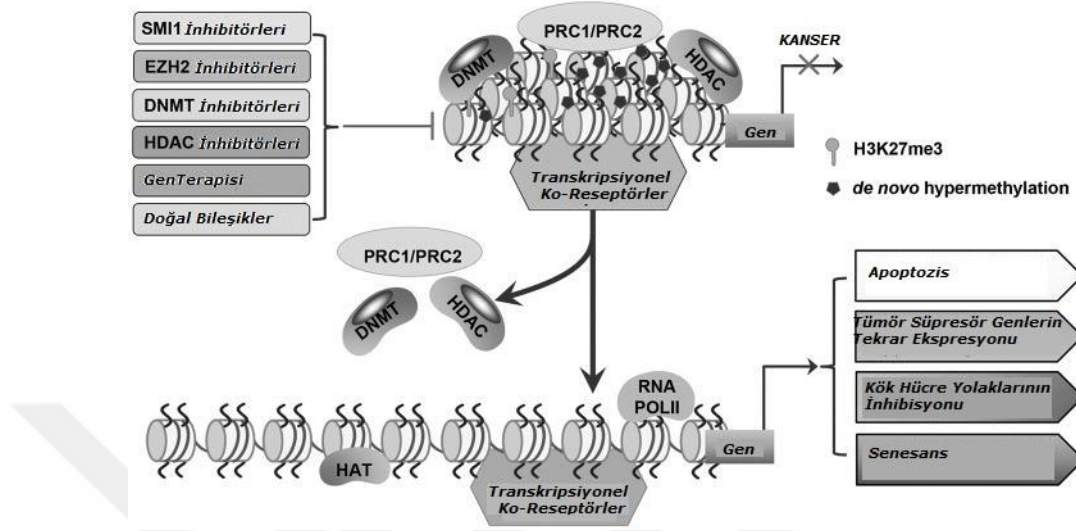
artmaktadır (Belinsky ve ark. 2011, Chung ve ark. 2011). Akciğer kanserinde hipermetilasyona uğrayan tümör süpresör genlerin çoğu sıklıkla diğer solid tümör tiplerinde de hipermetilasyona uğramaktadır. Premalign ve malign hallerde hızla devam eden metilasyonun hücre döngüsü kontrolü, proliferasyon, apoptoz, hücre yapışma (adezyon), motilite ve DNA onarımı gibi önemli fonksiyonlarla ilgili genlerde sıklıkla görülmektedir (Herceg ve Vaissiere 2011). Ayrıca metil grubunun sitozin bazına kovalent bağlanmasını katalize eden enzim grubu olan DNMT'ın, KHDAC' de yukarı doğru (upregule) düzenlenmesi sonucu yeni akciğer akciğer kanseri türleri tanımlanmıştır. Örnek olarak geniş çaplı hipermetilasyon ile karakterize tümör fenotipi olan CpG adası metilatör fenotipi (CIMP) gibi türler verilebilir (Kim ve ark. 2006, Lin ve ark. 2007).

Akciğer kanserinde tümör baskılayıcı gen inaktivasyonunun sık nedenleri arasında DNA metilasyonu (DNMT enzimi ile) ve histon deasetilasyonu (HDAC enzimi ile) gösterilmiştir. HDAC'ların akciğer kanserinde aşırı ekspresyon olduğu gözlenmiştir (Sasaki ve ark. 2004, Bartling ve ark. 2005). HDAC'lar, histon kuyruğu üzerindeki asetil gruplarının uzaklaştırılmasını katalize eder böylece transkripsiyonel olarak aktif olmayan bir heterokromatik durum meydana getirirler (Esteller 2008). HDAC'ları kodlayan genlerdeki artmış transkripsiyon açıkça karsinogenezle ilişkilendirilmiştir. H4K5/H4K8 artmış asetilasyonu ve H4K20 trimetilasyon kaybı KHDAC'de pre-invaziv bronşiyal displastik lezyonlarda gösterilmiştir (Chung ve ark. 2011).

Yapılan çalışmalarda HDAC ve DNMT inhibitörleri kullanılarak tümör baskılayıcı gen ekspresyonunu onarabilir ve dolayısıyla KHAK ve KHDAC hastaları için tedavide kullanılabileceği belirtilmiştir (Kaminsky ve ark. 2011, Kodani ve ark. 2005). Yapılan çalışmalarda HDAC inhibitörleri ile akciğer kanser hücre hatlarında Bcl-2 ve Bcl-XL mRNA ekspresyon seviyeleri down-regüle edilmiştir. HDAC inhibitörleri Kaspaz bağımlı mitokondriyal apoptotik yolu aktive ederek kanser hücrelerinin apoptoza gitmesini sağlamıştır (Doi ve ark. 2004).

Akciğer kanserinde normal akciğer dokusuna göre aşırı eksprese edildiği bildirilen polikom grup genleri bildirilmiştir (PcG). Spesifik olarak, polikom baskılayıcı kompleksleri (PRC1 ve PRC2) oluşturan PcG'ler için upregülasyonu akciğer kanseri

proliferasyonu, sağkalım ve epitelial mezenkimal geçiş ile ilişkilendirilmiştir (Şekil 2.13) (Liu ve ark. 2006, Kimura ve ark. 2011).



Şekil 2.13. Akciğer kanserinde, gen promotör bölgesindeki transkripsiyonel baskılayıcı kompleksleri (PRC1/PRC2) ve DNA metilasyon mekanizmaları ile kromatin değiştiricileri (histon deasetilaz, HDAC) arasındaki etkileşimler (Wang ve ark. 2015).

Epigenetik değişiklikler akciğer kanseri histolojik tiplerini birbirlerinden ayırmada da kullanılmıştır. Küçük hücreli karsinomalarda CDKN2A metilasyonu daha yaygın iken APC, CCND2, KCNH5 ve RUNX metilasyonu adenokarsinomlarda anlamlı olarak daha sık gözlenmiştir (Hawes ve ark. 2010). Akciğer adenokarsinomunun mikroskop altında morfolojik olarak değerlendirmesi malign plevral mezotelyomaya benzemektedir. Fakat epigenetik özellikler göz önüne alındığında DNA metilasyon profili ile adenokarsinoma mezotelyomadan ayrılabilmiştir (Christensen ve ark. 2009).

2.4. Valproik Asit

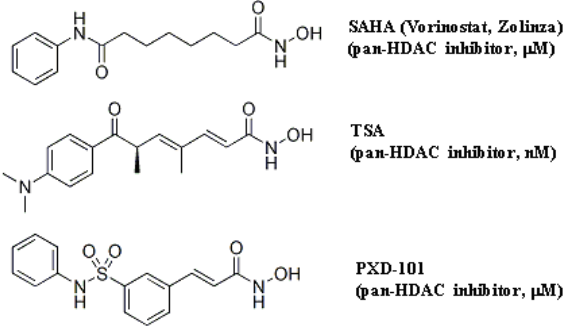
Valproik asit (VPA, 2-propilpentanoik asit), epilepsinin uzun süreli tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. VPA, hastalar tarafından iyi tolere edilmesine rağmen, erken gebelik sırasında uygulandığında nöral tüp kapatma kusurları ve diğer malformasyonlar gibi doğum kusurlarına neden olabilmektedir (Diliberti ve ark. 1984). Teratojenite ve antiepileptik aktivite, farklı etki mekanizmalarına ihtiyaç duyar gibi görünmektedir, çünkü molekülün modifikasyonları, teratojenik veya antiepileptik aktiviteye sahip seçici bileşikler üretmektedir (Nau ve ark. 1991). İyi tolere edilen bir

antikonvülsan/antiepileptik ajan olan VPA, son zamanlarda alifatik asit kategorisinde bulunan histon deasetilaz inhibitörü olarak tanımlanmıştır (Gotticher ve ark. 2001, Gotticher 2004).

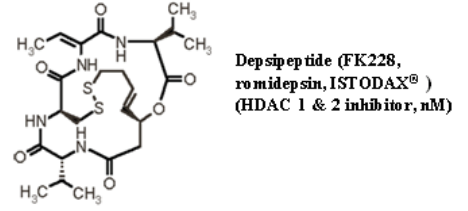
HAT'lar ve HDAC'lar tarafından histon asetilasyonu yoluyla kromatin yeniden modellenmesi, hücre büyümesinde ve farklılaşmasında hayati rol oynayan birçok genin dinamik düzenlenmesinde anahtar bir rol almaktadır (Kramer ve ark. 2003). 1990'lı yıllarda, tümör hücresi büyümesinin bastırılması ile hayatta kalma ve HDAC aktivitesinin inhibisyonu arasında net bir bağlantı kurulmuştur. HDAC inhibitörlerinin etki mekanizmaları, sırasıyla epigenetik ve post-translasyonel modifikasyon seviyelerinde regülasyon yoluyla değiştirilmiş gen ekspresyonu ve non-histon proteinlerde değişiklikler ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. HDAC'ların ekspresyon düzeyleri çeşitli tümörlerde değişiklik göstermektedir. HDAC1 prostat, gastrik, kolon ve göğüs karsinomalarında aşırı eksprese iken (Halkidou ve ark. 2004, Zhang ve ark. 2005), HDAC2 kolorektal, servikal ve gastrik kanserlerde aşırı eksprese olmaktadır (Zhu ve ark. 2004, Song v ark. 2005). Bu nedenle çok sayıda HDAC inhibitörü doğal kaynaklardan saflaştırılmış veya sentezlenmiştir. Anti-kanser ajan olarak kullanılmak üzere iki HDAC inhibitörü için (TSA- trikostatın, SAHA- Suberoilanilid hidroksamik asit) yakın zamanda yapılan FDA onayı, yeni HDAC inhibitörlerinin gelişimini teşvik etmiştir. HDAC inhibitörleri yapısal olarak en az dört sınıfa ayrılabilir: hidroksamatlar, siklik peptidler, alifatik asitler ve benzamitler (Şekil 2.14).

Butirat, fenilbutirat ve VPA gibi alifatik asitler, milimolar konsantrasyonlarda etkinlik gösteren ve diğer HDAC inhibitörlerine (TSA- trikostatın, SAHA- Suberoilanilid hidroksamik asit) oranla nispeten zayıf HDAC inhibitörleridir.

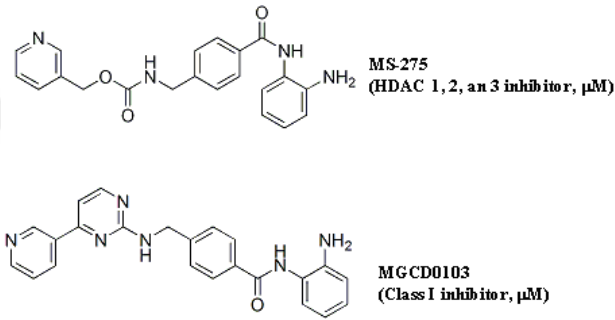
HİDROKSAMAT



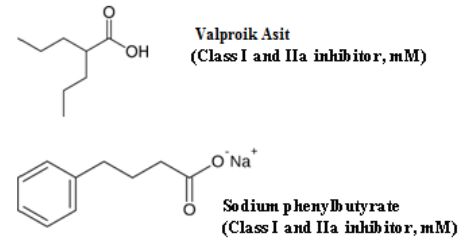
SİKLİK PEPTİTLER



BENZAMİTLER



ALİFATİK ASİTLER



Şekil 2.14. HDAC inhibitörlerinin başlıca sınıfları ve yapıları (Kim ve ark. 2011).

Antikonvülzan tedavilerde kullanılmasının yanı sıra, VPA'nın deasetilasyonu azaltma ve asetilasyonu artırma özellikleri kanser tedavisinde bir strateji olarak kullanılabilir. Kanser monoterapisinde VPA için görülen etkiler göz önüne alındığında, kanser önleyici ilaç olarak VPA'nın olası bir rolünün kanıtlandığı çalışmaların birçoğunun, diğer ilaçlarla (diğer epigenetik modifikatörler, sitotoksik kemoterapi ajanları ile kombinasyonlar ve immün modülatörler ile kombinasyonlarla kombine terapiler) birlikte görülen etkilerine dayandığı görülmektedir (Fenaux ve ark. 2009). VPA, rahim ağzı kanseri, prostat kanseri, neuroblastom, medüller tiroid kanseri, miyeloma, kolon kanseri, glioma, lösemi, göğüs kanseri, akciğer kanseri, mesane kanseri, melanom dahil birçok kanserde anti kanser etkinliği nedeniyle yaygın şekilde araştırılmıştır (Sun 2013, Duenas-Gonzalez ve ark. 2008, Chen ve ark. 2011). VPA'nın bir çok kanser tipinde yapılan in-vivo ve in-vitro çalışmalarda; HDAC inhibisyonu, histon asetilasyonu ve hiperasetilasyon birikimini indükleyerek veya HDAC aracılı transkripsiyonel baskılamayı tersine çevirerek (Havex ve ark. 2010, Gottlicher ve ark. 2001) DNA hasarı, hücre döngüsünde tutuklanma, apoptoz, farklılaşma, çoğalma ve

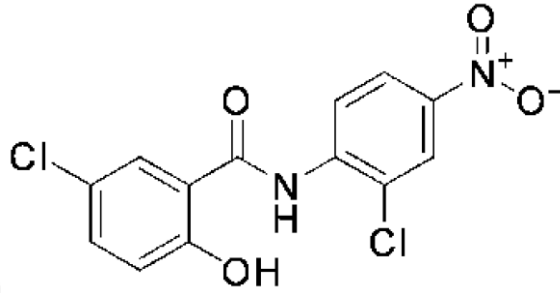
yaşlanma (sensans) gibi çoklu etkilere neden olduğu gösterilmiştir (Kostrouchova ve ark. 2007, Gan ve ark. 2012).

VPA'nın anti kanser etkisi, Wnt/ β -katenin sinyal yolağı, PI3K/AKT yolağı, p21WAF1/CDKN1A yolağı ve MAPK/ERK gibi çoklu sinyal yolaklarında rol almaktadır. VPA'nın, diğer sinyal yolaklarındaki etkisi ile birlikte, histon deasetilasyonuna ve bunun ardından muhtemelen tümör bastırılmasına aracılık etmesinin, HDAC inhibitör etkisinden kaynaklandığına inanılmaktadır (Kostrouchova ve ark. 2007, Witt ve ark. 2013, Juengel ve ark. 2013, Guadalupe ve ark. 2012). Bir diğer kritik sinyal yaşam yolağı olan Notch sinyalizasyonunun da VPA'nın etkili olduğu ve tümör baskılayıcı role sahip olduğu düşünülmektedir (Greenblatt ve ark. 2007, Machado ve ark. 2011). VPA ile tedavi edilen kanser hücrelerinde bu iki sinyal yolağının birbiriyle nasıl korele veya birbiriyle etkileşime girip girmediğini veya nasıl etkileşime girdiği açık değildir. VPA, birçok vakada histon asetilasyon /deasetilasyonunu etkileyebilmektedir. VPA aynı zamanda iki sinyal yolağını da aynı anda modüle edebilmektedir (Franko-Tobin ve ark. 2012). Yapılan çalışmalarda VPA'nın hem Notch1 sinyal yolağını uyardığı hemde serviks kanseri hücrelerinde ve nöroblastoma (NB) hücrelerinde histon H3'ün asetilasyonunu arttırdığı belirlenmiştir (Sami ve ark. 2008).

VPA'nın çeşitli hematolojik ve katı tümörlerden elde edilen hücre hatlarında ve fare modellerinde anti kanser aktivitesi görülmüştür (Hubaux ve ark. 2010). VPA küçük hücreli akciğer kanseri hücre hatlarında cisplatin ve etoposidin antikanser etkinliğini arttırmıştır. Ayrıca katı tümörlerde de birkaç faz I çalışması yapılmıştır (Münster ve ark. 2007, Chu ve ark. 2013). Küçük hücreli akciğer kanseri hastalarında yapılan bir faz-2 çalışmasında, önceden tedavi edilen hastalarda doksorubisinin tek başına yanıt oranı yokken, VPA ile kombinasyon tedavisinin % 16 gibi bir yanıt oranı gösterdiği görülmüştür (Berghmans ve ark. 2015). VPA, hastalar üzerinde daha az toksik yan etkiye sahiptir ve aynı zamanda birçok kanserde geniş fakat sınırlı anti kanser etkilere sahiptir. Böylece VPA, diğer anti kanser ajanlarla kombinasyon halinde kullanılabilen potansiyel bir anti-kanser adjuvanıdır (Sun ve Coy 2014). Tüm bunlara ek olarak 40 yılı aşkın süredir epilepsi tedavisinde kullanıldığı için farmakolojisi ve toksikolojisi iyi karakterize edilmiştir; Klasik antiepileptik ilaçlar arasında ise kurtarma kemoterapisi (Salvage chemotherapy- CT) ile en düşük etkileşime sahiptir (Vecht ve ark. 2003).

2.5. Niklozamid

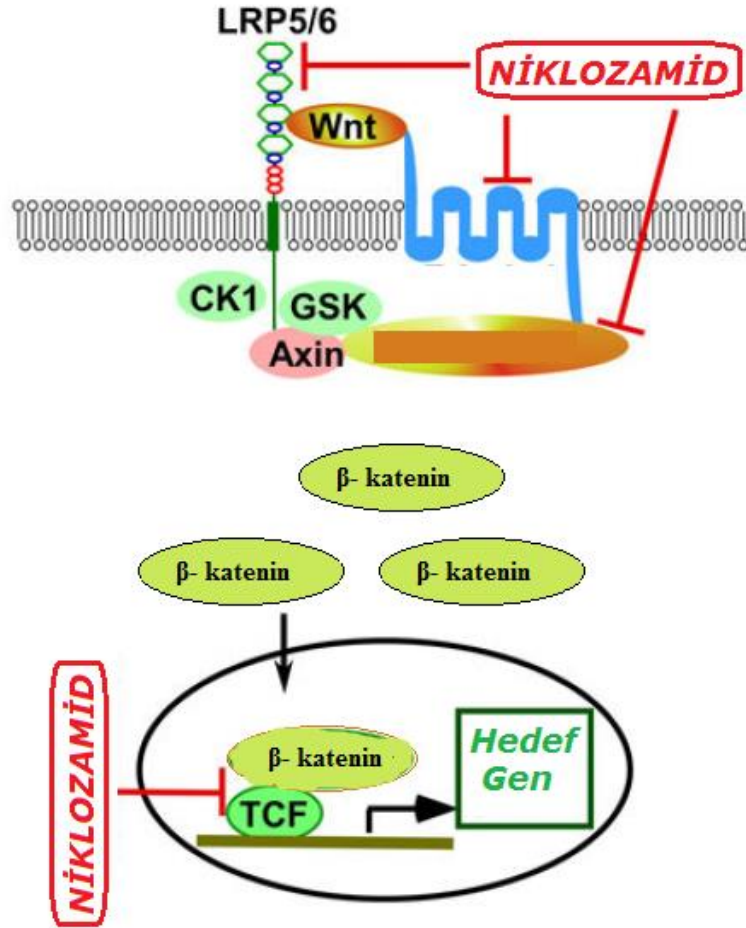
Niklozamid (C₁₃H₈Cl₂N₂O₄, MW: 327.119), anti-helmint ailesinin insan tenyalarına karşı etkili olan, yaklaşık 5 yıldır insanlarda yaygın kullanıma sahip FDA onaylı küçük moleküllü bir ilaçtır (Şekil 2.15) (Lateef ve ark. 2008). Tenyalardaki antihelmitik etkisini mitokondride oksidatif fosforilasyonu inhibe ederek etki göstermektedir (Weinbach ve ark. 1969). İnsanlarda kullanımında iyi tolere edilmektedir.



Şekil 2.15. Niklozamid moleküler yapısı (Rajamuthiah ve ark, 2015).

Eski veya başarısız ilaçlar için yeni kullanımların bulunması, mevcut ilaçların farmakokinetiği, güvenlik profilleri bilindiği ve çoğu kez insan kullanımı için onaylandığı için, yeni bir ilaç bulmaktan çok daha hızlı ve daha ekonomiktir (Kraljevic ve ark. 2004). Bu nedenle yeni tanımlanmış herhangi bir kullanım (lar) klinik çalışmalarda hızla değerlendirilmektedir (Chong ve ark. 2007). Çeşitli yüksek verimli tarama kampanyaları ile son 5 yıl içinde niklozamidi potansiyel bir kanser önleyici madde olarak tanımlanmıştır (Clevers ve ark. 2012). Anti kanser özelliğinin çoklu hücre içi sinyal yolları üzerinde (Li ve ark.2014), STAT3'ün fosforilasyonunu ve nükleer translokasyonunu baskılayarak güçlü bir STAT3 inhibitörü olduğundan kaynaklanmaktadır (Ren ve ark. 2003). Ayrıca güvenli olması, iyi tolere edilmesi ve kolaylıkla temin edilebilir olması nedeniyle birçok anti-kanser çalışmada kullanılmaya başlanmıştır (Merschjohann ve ark. 2008). Chen ve ark. 1200 adet FDA onaylı ilaç ve ilaç benzeri molekülleri içeren geniş bir kütüphanenin yüksek verimli taramasını gerçekleştirmesi sonucu niklozamidin Wnt/ β -katenin yolak inhibitörü olduğunu göstermişlerdir. Niklozamid Wnt ortak reseptör LRP6 bozunmasını teşvik ederek, Wnt sinyal düzenleyici Dvl2 ekspresyonunu bastırarak ve β -katenin/TCF kompleks oluşumunu inhibe ederek Wnt/ β -katenin sinyalini engellemektedir (Şekil 2.16). Wnt ko-

reseptör LRP6 degradasyonunu destekleyerek Wnt/ β katenin sinyalizasyonunu inhibe ettiği, ancak prostat ve meme kanseri hücrelerinde yapılan çaişmalarda Dvl2 salınımı üzerinde hiçbir etkisi olmadığı gösterilmiştir (Lu ve ark. 2011, Londoño-Joshi ve ark. 2014). Buda niklozamidin Wnt/ β -katenin sinyal yolağındaki inhibitör etki mekanizmasının altında yatan nedenin hücre türüne bağlı olabileceğini göstermektedir.



Şekil 2.16. Kanser hücrelerinde Wnt/ β -katenin sinyal yolağıının niklozamid tarafından inhibe edilmesi.

Altı farklı transkripsiyon faktöründen oluşan bir ailenin üyesi olan sinyal molekülü ve transkripsiyon aktivatörü-3 olan STAT3, sitokin ve büyüme faktörü reseptörleri downstream sinyal proteinlerinden biridir (Yu ve ark. 2009). Hücre yüzeyinde sitokin veya büyüme faktörü reseptörlerinin katılımı protein kinazların janus kinaz (JAK) ailesini aktive eder ve bu da STAT3'ü tirozin kalıntılarında fosforile ederek proteinlerin SH2 domenleri boyunca iki STAT3 monomeri dimerizasyonuna yol açmaktadır (Shuai ve ark

1994, Sasse ve ark. 1997). Aktive edilmiş STAT3 dimerleri daha sonra çekirdeğe giderek hücre proliferasyonunu, apoptozu, anjiyojenez ve diğer hücre fonksiyonlarını kontrol eden bir dizi gen panelinin transkripsiyonunu aktive etmektedir (Zhong ve ark. 1994, Darnell ve ark. 1994). Bu JAK2/STAT3 sinyal yolağı, hücre yüzey membranından çekirdeğin hedef genlerine harici sinyal gönderirken büyüme, farklılaşma, yaşlanma ve apoptoz gibi süreçleri kontrol altında tutmada önemli bir rol oynayan üç ana modülden biridir (Boudny ve ark. 2002, Steelman ve ark. 2008).

Küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücreleri ve insan baş-boyun kanseri hücrelerinde niklosamid ile yapılan çalışmalarda, STAT3'ün inhibisyonunun erlotinib ile aktive olan STAT3/Bcl-2/Bcl-XL yolunu bloke ettiği ve erlotinib direncini tersine çevirdiği bildirilmiştir (Li ve ark. 2013, You ve ark. 2013). Ayrıca niklozamid hem radyasyona duyarlı hem de radyasyona dirençli insan akciğer kanseri hücrelerinde STAT3/Bcl-2/Bcl-XL yolağının iyonlaştırıcı radyasyona bağlı aktivasyonunu engellediği ve aynı zamanda radyasyon direncini tersine çevirdiği ve radyasyona dirençli hücrelerinde iyonize radyasyona duyarlılığını geri kazandırdığı gösterilmiştir (You ve ark. 2013).

Kanser kemoterapisinde mitokondriyi hedeflemenin etkili bir strateji olduğu bilinmektedir (Galluzzi ve ark. 2006). Khanim ve ark. anti-miyeloma aktivitesi için patent dışı lisanslı oral ilaçlardan 100'ün üzerinde bir panel taramış ve niklozamidi multipl miyelom hücre hatları ile primer çoklu miyelom hücrelerinin bir hedefi olarak tanımlamışlardır. İlginç bir şekilde, niklosamid anti-multipl miyelom aktivitesini esas olarak mitokondri vasıtasıyla, mitokondriyal membran potansiyelinin hızlı bir şekilde kaybedilmesi, oksidatif fosforilasyonun ayrılması ve mitokondriyal süperoksit üretimi ile inhibe ettiği görülmüştür (Khanim ve ark. 2011).

3.MATERYAL ve YÖNTEM

3.1.Materyal

3.1.1.Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Valproik asit, Sigma, Almanya
- Niklozamid, Sigma, Almanya
- Adenosine 5'-triphosphate (ATP) bioluminescent somatic cell assay kit, Sigma, Almanya
- Muse® Caspase-3/7 Assay Kit, Merck Millipore
- Muse® Mitopotential Assay Kit, Merck Millipore
- Muse® H2A.X Activation Dual Detection Kit, Merck Millipore
- Fetal sığır serumu (FBS), PAA, USA
- Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10.000U/ml penisilin, 10mg/ml streptomisin), Gibco, USA
- L-glutamin, Gibco
- Fosfat tuz tamponu (PBS), HyClone, Thermo Scientific, USA
- Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI), Lonza
- 0,05% Tripsin-Etilen Diamin Tetraasetik Asit (Tripsin-EDTA), Gibco, USA
- Dimetil sülfoksit (DMSO), Sigma, Almanya
- Triton X-100, Sigma, Almanya, İsrail
- Tripan mavisi (% 0,5), Biological Industries
- SDS Molecular Biology grade, BioChemica Applicham, Almanya
- Annexin V-Fluos, Roche
- Cell Viability Imaging kit, Roche, Almanya

3.1.2.Kullanılan Sarf Malzemeler

- 25cm² ve 75cm²'lik flask, Thermo Scientific
- 6 kuyulu plate, Costar
- 96 kuyulu flat plate, Costar
- 5ml ve 10ml hacimlerinde enjektörler, Genject
- 10µl'lik pipet uçları, Biohit
- 100µl'lik pipet uçları, Corning
- 1000µl'lik pipet uçları, Ayset

- Steril tek kullanımlık filtreler (0,2 mikron \AA apında), Millex, Millipore
- Steril santrifüj tüpleri (15ml), SPL
- Steril santrifüj tüpleri (50ml), SPL
- Thoma lamı, Bright –Line, Haussler Scientific Horsham, PA, USA
- Kriyovial, ATS
- 2 ml'lik cam pastör pipetler, Isolab
- 1 ml ve 5 ml'lik Kombi tip, Eppendorf, Almanya
- Otoklavlanabilir cam şişe, Isolab, Almanya

3.1.3. Kullanılan Cihazlar

- Spektrofotometre (FLASHScan S12, Analytik Jena, Almanya)
- Hassas terazi, SHIMADZU AUW220D
- Luminometre (FL \times 800 Mikroplate Floresans Okuyucu)
- Muse Cell Analyzer Cihazı, Merck
- CO₂ inkübatörü, Sanyo, Japonya
- Mikroplate inkübatör ve \AA alkalayıcı, Heidolph, Almanya
- Buharlı sterilizatör (Otoklav), Nüve OT4060, Türkiye
- Steril kabin, ESCO, Singapur
- Multipipet cihazı, Multipette eppendorf, Hamburg, Almanya
- Inverted mikroskop, Olympus CKX41, Japonya
- Aspiratör, Rocker 300, Tayvan
- Kuru hava sterilizatörü, Elektro-mag M 420, Türkiye
- Santrifüj, Rotina 35R, Almanya
- 10 μ l, 100 μ l ve 1000 μ l'lik pipet seti, Orange Scientific
- 0,5-5ml pipet, Brand
- 10ml pipet, Eppendorf
- 5-5 μ l Transferpipet, Thermo Scientific
- Pipet boy, ISO fill
- 20-200 μ l Transferpipet, Brand, Almanya

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Hücre Kültürü

3.2.1.1. Çalışmada Kullanılan Hücre Soyları

Hücre kültürü, kontrollü şartlar altında hücrelerin bölünüp çoğalmasını kapsayan bir süreçtir. Çalışmamızda A549 ve H1299 insan kolon kanser hücre soyları kullanıldı. Kullanılan hücre soylarının özellikleri;

A549 Akciğer kanser hücre hattı, küçük hücreli olmayan adenokarsinom olup, p53 pozitif epitelyal karakterli hücrelerdir. 1976 yılında yapılan ilk çalışmaya göre pulmoner epitelyumun Tip II hücrelerinin tabakalı cisimlerin karakteristik özelliklerine sahiptir (Lieber ve ark. 1976).

H1299 Akciğer kanser hücre hattı ise küçük hücreli olmayan adenokarsinom olup epitelyal karakterli hücrelerdir. Fakat p53 geni bulundurmamaları nedeniyle A549 kanser hücrelerinden farklıdır.

3.2.1.2. Kullanılan İlaçların Hazırlanması

Çalışmalarda kullanılacak olan VPA, ana stok 500 mM olacak şekilde 415 mg tartılarak 5000 µl moleküler biyoloji su içerisinde, Niklozamid ise 1000 µl DMSO içerisinde 6,54 mg tartılarak hazırlandı. Hazırlanan bu stoklar -20°C'de her deney için kullanılacak miktara göre porsiyonlanarak saklandı.

3.2.1.3. Hücre Soylarının Stoktan Çıkartılması

Hücreleri çoğaltmak amacıyla, -80°C'de kriyovial içinde saklanan A549 ve H1299 hücre soyları, sıcak su banyosuna alınarak hızlı bir şekilde çözüldü. Hücre süspansiyonu; % 10 FBS, % 1 penisilin-streptomisin ve % 1 L-glutamin (Gibco) içeren 5ml RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) besiyeri içerisine alındı. Falkon tüp 800rpm'de 5dk santrifüj edildikten sonra süpernatant kısım aspire edildi ve hücre peleti üzerine 1ml besiyeri ilave edilerek hücrelerin süspansiyon hale gelmesi sağlandı. Falkon tüp üzerine

4ml besiyeri ilave edildi ve 5ml'lik hücre süspansiyonu 25 cm²'lik flasklar içerisine alınarak 37 °C'de, % 5 CO₂ içeren ortamda inkübe edildi.

3.2.1.4. Hücre Soylarının Pasajlanması

Kullanılan hücreler, 25cm²'lik flaks yüzeyini tamamen kapladıklarında yani konfluent olduklarında flaks içerisindeki besiyeri aspire edildi. Hücrelerin serumdan tamamen arındırılması için 25cm²'lik flaks içerisine 2ml 1x PBS (fosfat tuz tamponu) ilave edildi ve hücrelerin yüzeylerinin hafifçe yıkanması sağlandı. Flaks içerisindeki PBS' in aspire işleminden sonra flaks yüzeyine yapışan hücrelerin ayrılması için 0,5ml % 0,05 Tripsin-EDTA solüsyonu kullanıldı ve hücreler 37 °C'de, % 5 CO₂'li ortamda 5dk inkübe edildi. Flaks mikroskop altında bakıldığı zaman hücrelerin yüzeyden ayrıldığı gözlemlendi. Hücrelerin tamamı yüzeyden ayrıldıktan sonra tripsinin inhibe edilmesi için en az iki katı kadar besiyeri ilave edildi. Bu sayede yüzeyden ayrılan hücrelerin, hücre membranlarının tripsinden zarar görmesi engellenmiş oldu.

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

3.2.1.5. Hücre Soylarının Stoklanması

Hücreler flask yüzeyini tamamen kapladıklarında flask içerisindeki besiyeri aspire edilerek ortamdaki uzaklaştırıldı. Hücreler 1x PBS ile hafifçe yıkandıktan sonra PBS aspire edilerek uzaklaştırıldı ve hücrelerin flask yüzeyinden kalkmalarını sağlamak için % 0,05 Tripsin-EDTA solüsyonu eklendi. Hücreler 37°C 'de, % 5 CO₂'li ortamda 5dk inkübasyona bırakıldı. Mikroskopla bakıldığında flask yüzeyinden ayrıldığı kabul edilen hücrelere, tripsinin inhibe edilmesi için en az iki katı kadar besiyeri ilave edildi. Flask içerisindeki hücre süspansiyonu içerisinde besiyeri bulunan 15ml'lik falkon tüp içerisine alındı. 800rpm'de 5dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısım aspire edildi ve pelet

üzerine her bir kriyovial için 1.5ml dondurucu medium (5ml DMSO + 5ml FBS + 40ml DMEM) karanlık ortamda ilave edildi. Hücre süspansiyonu kriyovialler içerisinde bölünerek -80 °C'ye kaldırıldı.

3.2.1.6. Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması

A549 ve H1299 hücre soyu için kullanılan besiyeri ortamı için % 10 Fetal Bovine Serum, % 1 Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10.000U/ml penisilin, 10mg/ml streptomisin), % 1 L-glutamin içeren RPMI 1640 besiyeri solüsyonu kullanıldı.

3.2.1.7. Hemositometre ile Hücrelerin Sayımı

Hücreleri sayabilmek amacıyla tripsinizasyon işlemi sonucunda elde edilen hücre süspansiyonundan 20 µl 0,5 ml'lik tüpe alındı ve üzerine eşit miktarda % 0,5 tripan mavisi konarak iyice karışması sağlandı. Hematositometre distile su ile iyice temizlendi. Bu karışımdan 10µl alınarak thoma lamına koyuldu ve mikroskopta bu lam üzerinde beş alanda hücre sayımı yapıldı. Bulunan sayı sulandırma katsayısı ile çarpılarak 1ml besiyerinde bulunan hücre sayısı hesaplandı.

3.2.2. SRB (Sulforhadamine B) Metodu

SRB metodu hücre kültüründe sitotoksitenin belirlenmesinde kullanılan, hücrelerdeki total protein ölçümüne dayanan kolorimetrik bir metoddur. Bu metot, Amerika'da bu konularda referans merkez olarak kabul edilen NCI (Ulusal Kanser Enstitüsü)'ün de çalıştığı bir yöntem olduğundan, anti-kanser ilaç araştırmalarında elverişli bir yöntemdir. Ayrıca büyük ölçekli ilaç tarama uygulamaları için ilaç kaynaklı sitotoksite ve hücre çoğalmasını ölçmek için uygun bir analiz yöntemidir. SRB protein bağlayabilen anyonik bir boyadır. Triklorik asetik asit ile sabitlenen pH altında bazik aminoasitler ile elektrostatik bir kompleks oluşturur ve hızla renk değişimi gözlenir. Bu renk değişimi 560 ve 580 nm absorbanslar da kolayca ölçülür.

Pasajlama işleminden sonra 75cm²' lik flaks içerisinde konfluent olan hücreler, hücre pasaj protokolündeki gibi tripsin ile kaldırıldı. Flask içerisindeki hücre süspansiyonu, içerisinde besiyeri bulunan (falkondaki toplam hacim tripsinin 10 katı olmalı) 15ml'lik falkon tüp içerisine alındı. 800rpm'e 5dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısım

aspire edildi ve elde edilen hücre peleti 1ml hücre besiyerinde çözüldükten sonra 9ml besiyeri ilave edildi ve 10ml'lik hücre süspansiyonu elde edildi.

Hücreler, 96 kuyulu plate içerisine son hacim 200 µl medium (RPMI 1640) içinde 5000h/kuyu olacak şekilde ekildi. Kör (Negatif Kontrol) için kullanılacak kuyulara ise 200 µl medium (RPMI 1640) eklendi.

Uygun doz seçimi yapabilmek amacıyla SRB testi için, VPA ve niklozamid farklı konsantrasyonları (VPA 0,7–5 mM, Niklozamid 0,078-5 µM) hücre besiyerinde hazırlanarak 96 kuyulu hücre kültür kaplarına uygulandı. A549 ve H1299 hücreleri sayılarak 100 µl besiyeri içerisinde 5000 hücre olacak şekilde her bir kuyuya ilave edildi. Hücrelerde, ölümün negatif kontrolü (maksimum canlılık) olarak sadece besiyeri ortamı içerisinde ekilen hücreler kullanıldı. Kör için ayrılan kuyular içerisine ise 200µl besiyeri ilave edildi. Ardından hücreler, 24, 48 ve 72 saat 37 °C, % 5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakıldı.

İlk çalışmalar neticesinde ve yapılan literatür taramasına uygun olarak histondeasetilaz inhibitörü olan VPA için toksik olmayan doz 500 µM olarak belirlendi. 48 saat süre boyunca 500 µM VPA tedavisi sonrası Niklozamid farklı konsantrasyonları ile (0,039-5 µM) 24 saat boyunca kombinasyon tedavisi uygulandı.

3.2.2.1. SRB Metodu İçin Kimyasalların Hazırlanması:

-% 10 (w/v) TCA: 10 gram TCA, 100ml deiyonize su ile 100 ml ye tamamlandı.

-% 1 Asetik asit çözeltisi: 1ml asetik asit 99ml su ile hazırlanarak % 1'lik asetik asit çözeltisi elde edildi.

- % 0,4 w/v SRB: 400mg SRB boyası tartılarak % 1' lik asetik asit içinde hazırlandı.

-10mM Tris baz: 121 mg tris bazı 100ml deiyonize su ile tamamlanarak, 10 mM pH: 10.0 tris bazı elde edildi.

Tedavi süresi sonunda hücresel proteinleri fikse etmek için, her kuyuya 50 µl TCA (Trikloro asetik asit) eklendi. Ve +4 °C' de 1 saat fikse edildi. Fiksasyon süresi sonunda plate ters çevrilerek TCA döküldü. TCA'yı uzaklaştırmak için kuyular 5 kez, deiyonze su ile yıkandı. Her yıkamanın sonunda plate ters çevrilerek döküldü. Yıkama sonunda SRB solüsyonundan her kuyuya 50 µl eklendi ve 30 dakika oda sıcaklığında, karanlıkta inkübe

edildi. İnkübasyon süresi sonunda SRB plateden dökülerek uzaklaştırıldı. Bağlanmış, boyayı uzaklaştırmak için kuyular 5 kez % 1'lik asetik asitle yıkandı. Her yıkamanın sonunda plate ters çevrilerek döküldü. Yıkama sonunda plate, kuyular içerisinde hiç damla kalmayacak şekilde havada kurutulduktan sonra proteinlere bağlanan boyanın çözünmesi için, 10 mM tris bazı (150µl/kuyu) eklendi. Boya solüsyonunu homojenize hale getirmek için, plate en az 10 dk. 150 rpm'de plate çalkalayıcısında inkübe edildi. Mikroplak spektrofotometre de 564 nm dalga boyunda okuma yapıldı.

% Canlılık hesabı:

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

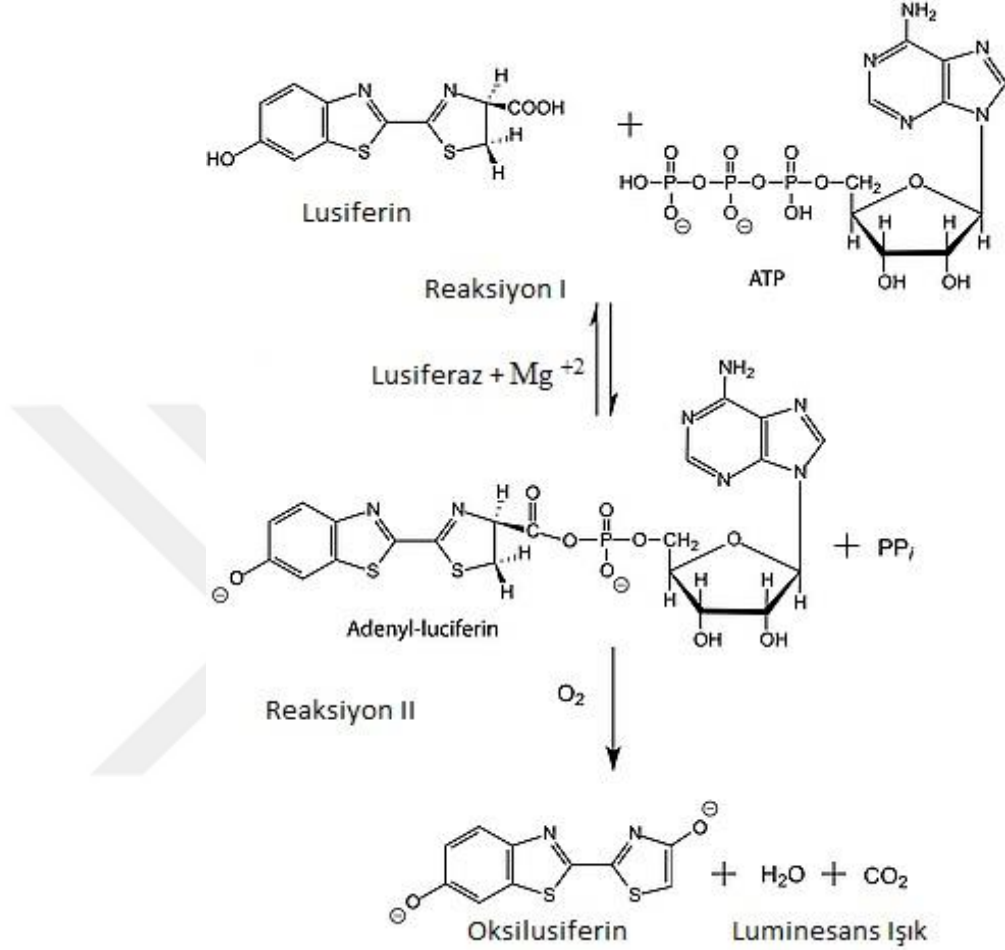
$$\% \text{ Hücre Canlılığı} = \frac{\text{Bileşik ile muamele edilen hücre absorbanısı ortalaması} - \text{Kör ortalaması}}{\text{Kontrol hücre absorbanısı ortalaması} - \text{Kör ortalaması}} \times 100$$

3.2.3. ATP (Adenozin Trifosfat) Canlılık Metodu

ATP yöntemi lüminesans bazlı metodolojiye bağlı olarak in vitro sitotoksite ölçümleri açısından SRB yöntemine göre çok daha hassas ve güvenilir olarak yapılabilmektedir. Hücre içerisindeki en önemli enerji deposu olan ATP; biyolojik sentez, sinyal iletimi, taşıma, hareket gibi önemli süreçler için kullanılmaktadır. Hücre ATP hücre canlılığını ölçmede en hassas uç noktadır. Bu yöntemin prensibi hücre kültüründe büyütülen kanser veya normal hücrelerdeki intraselüler ATP içeriğinin ölçülmesi esasına dayanmaktadır. İtraselüler ATP içeriğinin seviyesi yaşayan hücrelerin sayısının belirlenmesinde kullanılan bir göstergedir (Andreotti ve ark. 1995, Dexter ve ark. 2003, Ulukaya ve ark. 2008).

Kemoterapötik ajanlar veya mitokondriyal toksinler ile muamele sonucu hücrelerde ATP seviyesi önemli ölçüde azalmaktadır. ATP yöntemi; lüsiferinin Mg⁺² ve ATP varlığında lüsiferaz enzimi ile oksilüsiferine katalize olup lüminesans sinyal oluşturmaya dayanmaktadır (Şekil 3.1).

Lüminesans sinyal ve ATP konsantrasyonu veya hücre sayısı arasında doğrusal bir ilişki bulunmaktadır (Andreotti ve ark. 1995, Mueller ve ark. 2004, Wadhawan ve ark. 2010).



Şekil 3.1. ATP' nin elde edilme reaksiyonu

ATP yönteminde, VPA ve niklozamid ile yapılan kombinasyon çalışmasını doğrulamak için 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarında 5×10^3 hücre/kuyu ekildi. Niklozamid 200µl besiyeri içinde 5 µM dozundan azalan dozlara doğru (0,078-5 µM) 96 kuyulu hücre kültür kaplarında bulunan hücelere uygulandı ve hücreler 37⁰C'de % 5'lik CO₂'li etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı.

VPA 500 µM olarak bulunan toksik olmayan dozu 200 µl besiyeri içinde olacak şekilde 96 kuyulu hücre kültür kaplarında bulunan hücelere uygulandı ve hücreler 37⁰C'de % 5'lik CO₂'li etüvde 72 saat inkübasyona bırakıldı. Negatif kontrol (maksimum canlılık, tedavi edilmemiş hücre kontrolü) için 100µl besiyeri içerisine 100 µl 5×10^3 hücre ekildi.

Kör için ayrılan kuyular içerisine ise 200 µl besiyeri ilave edildi. Pozitif kontrol (minumum canlılık, % 100 öldüren doz) olarak 100 µl hücre süspansiyonu içerisine 100 µl hücre ölümünü % 100 indüklediği bilinen % 1'lik Triton X-100 ilave edildi. Toplamda 72 saatlik inkübasyon sonrasında intraselüler ATP içeriği ATP kiti kullanılarak belirlendi. İlk olarak 96 kuyulu hücre kültür kaplarındaki her kuyudan 150 µl atıldı. ATP kitinin içerisindeki hücre lizis tamponundan 50 µl her kuyuya ilave edildi ve böylece hücre içerisindeki ATP'nin dışarı çıkması sağlandı. 20 dakikalık bekleme süresinin ardından hücre kültür süspansiyonundan 50 µl beyaz renkli 96 kuyulu hücre kültür kaplarına aktarıldı. Ardından her kuyuya 50 µl/kuyucuk lusiferin-lusiferaz enzimi içeren solüsyon ilave edildi.

Elde edilen ATP miktarı lusiferin-lusiferaz bioluminesans reaksiyonu yardımıyla ölçme zamanı 1 saniye olacak şekilde luminometre (FLx800 Mikroplate Floresans Okuyucu) kullanılarak ölçüldü. Sonuçlar rölatif ışık ünitesi (RLU) olarak verilecektir. Böylece tedavi alan ve almayan hücrelerin RLU değerlerine göre yeni sentezlenmiş bileşiklerin sitotoksik/sitastatik etkileri hakkında bilgi edinilecektir.

% Hücre Canlılığı

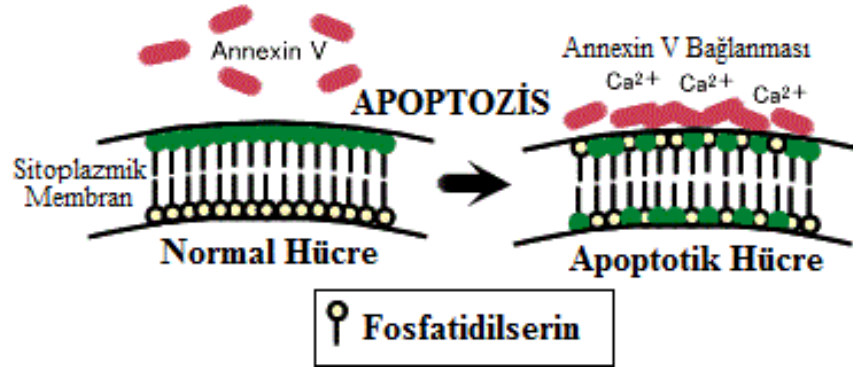
$$= \frac{\text{Bileşik ile muamele edilen hücre absorbanası ortalaması} - \text{Kör ortalaması}}{\text{Kontrol hücre absorbanası ortalaması} - \text{Kör ortalaması}} \times 100$$

3.2.4. Floresan Boyama Yöntemi ile Ölüm Modunun Belirlenmesi

3.2.4.1. Anneksin-V, Propidyum İyodür ve Hoechst Boyama Metodu

Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde membran lipidlerinden biri olan fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Eğer hücre apoptozisle ölürse normalde iç yüzde yerleşmiş olan PS molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar (Şekil 3.2). Bu yer değiştirme apoptotik hücrelerde henüz membran bütünlüğünün bozulmadığı yani ölümün erken dönemlerinde meydana gelir (Ulukaya 2003). Anneksin-V, hücrenin dış yüzeyine transloke olan PS'ye bağlanabilen bir protein olduğu için, floresan bir madde (örn. Floresein izotiyosiyanat - FITC) ile işaretlenerek apoptotik hücreler görünür hale getirilir ve floresan mikroskobu ile incelenebilir. Nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de Anneksin-V bağlanması görülebildiği için yöntem çalışılırken ikinci boya olarak Propidyum iyodür (PI) eklenmektedir. PI, sadece membran hasarlı hücrelere girebilen,

dolayısıyla tüm ölü hücreleri (primer nekrotik veya geç apoptotik/sekonder nekrotik) boyayabilen floresan nükleik asit boyasıdır. Bu boya canlı hücreler tarafından dışarı atılmaktadır. Primer nekrozis (hücre hacminin artması fakat fragmente ya da piknotik nükleusların gözlenmemesi) toksik koşullar (hipoksi, iskemi, hipertermi, vb.) altında gerçekleşen klasik ölüm şeklidir. Sekonder nekrozis ise, piknotik ya da fragmente nükleus ile karakterize olup, apoptozisin geç safhasıdır. Hücre kültürü ortamında apoptozise giden hücrelerin membranları intakt (erken apoptozda) olmasına rağmen daha ileri dönemlerde geç apoptozis/sekonder nekrozun gelişmesi ile hücrelerin membran bütünlükleri bozulmaktadır. Sekonder nekroz aşamasına kadar olan süre içinde hücreler non-vital boyalar denilen (Propidiyum İyodür - PI) boyalar ile boyanacak olurlarsa apoptozis başlamış olmasına rağmen membran intakt olmasından dolayı bu boyalarla boyanamazlar. Sekonder nekroz geliştikten sonraki aşamalarda hücreler membran bütünlüklerinin bozulması ile non-vital boyalar ile boyanmaya başlarlar. Dolayısıyla PI pozitif ve Hoechst pozitif boyanmaktadırlar. Hücreler eş zamanlı olarak Annexin-V-Fluorescein (yeşil floresan) ve non-vital boya olan propidiyum iyodür (kırmızı floresan) ile boyanır. Canlı hücreler; FITC-/PI-, erken apoptotik hücreler; FITC+/PI- ve geç apoptotik veya nekrotik hücreler; FITC+/PI+ boyanırlar ve bu şekilde birbirlerinden ayırt edilirler (Güleş ve Eren 2008, Ulukaya ve ark. 2011).



Şekil 3.2. Apoptotik hücrelerde Annexin V bağlanması

A549 ve H1299 akciğer kanser hücreleri sayılarak 96 kuyulu hücre kültür kaplarına 100 µl içerisinde 5×10^3 hücre olacak şekilde (3 tekrarlı) ekim yapıldı. Niklozamid 200 µl besiyeri içinde 5 µM dozundan azalan dozlara doğru (5- 2,5- 1,25 µM) 96 kuyulu hücre kültür kaplarında bulunan hücrelere uygulandı ve hücreler 37°C'de % 5'lik CO₂'li etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı. VPA 500 µM olarak bulunan toksik olmayan dozu 200µl

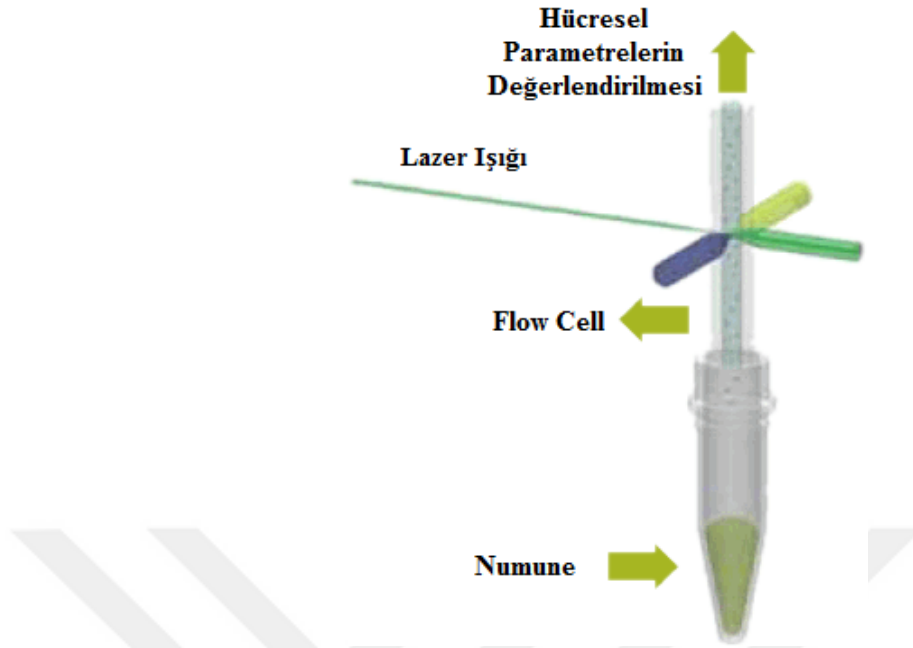
besiyeri içinde olacak şekilde 96 kuyulu hücre kültür kaplarında bulunan hücelere uygulandı ve hüceler 37°C'de % 5'lik CO₂'li etüvde 72 saat inkübasyona bırakıldı.

Kombinasyon kuyularına ise 150 µl besiyeri içerisinde VPA toksik olmayan dozu olan 500 µM olacak şekilde uygulandı ve hüceler 37°C'de % 5 'lik CO₂'li etüvde 48 saat inkübasyona bırakıldı. 48 saatlik sürenin sonunda ortamdan VPA uzaklaştırılmadan, toplamda 200 µl besiyeri içinde Niklozamid 5 µM dozundan azalan dozlara doğru (5-2,5- 1,25 µM) 96 kuyulu hücre kültür kaplarında bulunan hücelere uygulandı ve hüceler 37°C'de % 5'lik CO₂'li etüvde 24 saat daha inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sürelerinin sonunda hüceleri zedelemekten üzerlerinden tüm besiyeri (yaklaşık 180 µl) uzaklaştırılarak Anneksin-V-FLUOS Staining Kit (Roche, Mannheim, Germany) içeriğine uygun olarak çalışıldı. 500 µl Incubation Buffer içerisine 5 µl Anneksin-V-Fluorescein ve 5 µl PI boyası pipetlendi. Ayrıca hücelerin nükleus morfolojisini de incelemek amacıyla Hoechst 33342 (12,3 mg/ml) boyası son konsantrasyonu 5 µg/ml olacak şekilde bu karışıma eklendi. Her kuyuya boya karışımından 30 µL pipetlenerek yarım saat oda ısısında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda tedavilerin hücelerde sebep olduğu ölüm şekli floresan mikroskop altında değerlendirildi.

3.2.5. Akım Sitometri Analizleri

Akım sitometresindeki analizler için hücelerin sıvı içinde süspansiyon halinde bulunması gerekmektedir. Ölçüm sırasında hüceler sıvı içerisinde tek tek askıda olmalı ve hüceleri içeren süspansiyon sürekli bir akışla lazer ışını içinden geçmelidir. Akım sitometri cihazında bir saniyede binlerce hücre, lazer ışını ile karşılaştıkları flow cell adı verilen bölümden geçer ve hüceler lazer ışığı ile uyarılırlar (Şekil 3.3.1). Her bir hücre lazer ışığının bir kısmını saptırır ve aynı zamanda lazer ışığı tarafından uyarıldıklarından yani ekstra enerji yüklenmiş olduğundan, floresan ışığı yayarlar. Hüceler yüzeylerindeki veya hücre içindeki proteinlere özgün antikorlarla inkübe edilerek antijenlere bağlanmaları sağlanır. Her spesifik antikor FITC (floresin izotiyosiyanat), PE (Fikoeritrin), PerCP (Peridinin klorofil), 7-AAD (7-Aminoaktinomisin D) gibi floresan boyalarla işaretlenmiştir. Böylece belirli antijene sahip hücelerin lazer ışını ile karşılaştığında verdiği floresan sinyalleri değerlendirerek o hücrenin hangi spesifik antijeni taşıdığı belirlenebilir (Karaboz ve ark. 2008).



Şekil 3.3.1. Akım sitomerisinde lazer esaslı floresans algılama

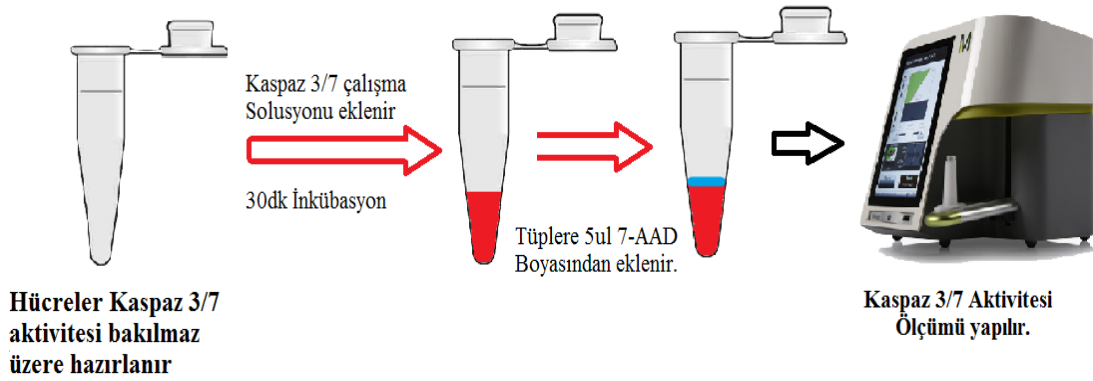
3.2.5.1. Kaspaz 3/7 Testi

Kaspazlar, programlı hücre ölümü olan apoptozis sürecinde merkezi bir öneme sahip sistein proteazlardır (Riedl ve ark. 2004). Apoptotik sinyal boyunca etkili olan efektör kaspazlardan: kaspaz 3/7 aktivasyonu membran integritesi ve hücre ölümü hakkında önemli bilgiler vermektedir.

Kaspaz 3/7 testi için A549 ve H1299 akciğer kanseri hücreleri sayılarak 6 kuyulu hücre kültür kaplarına 1ml içerisinde 100×10^3 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Niklozamid 2ml besiyeri içinde $5 \mu\text{M}$ dozundan azalan dozlara doğru (5- 2,5- 1,25 μM) 6 kuyulu hücre kültür kaplarında bulunan hücrelere uygulandı ve hücreler 37°C 'de % 5'lik CO_2 'li etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı. VPA 500 μM olarak bulunan toksik olmayan dozu 2 ml besiyeri içinde olacak şekilde 6 kuyulu hücre kültür kaplarında bulunan hücrelere uygulandı ve hücreler 37°C 'de % 5'lik CO_2 'li etüvde 72 saat inkübasyona bırakıldı.

Kombinasyon kuyularına ise 1.5 ml besiyeri içerisinde VPA toksik olmayan dozu olan 500 μM olacak şekilde uygulandı ve hücreler 37°C 'de % 5 'lik CO_2 'li etüvde 48 saat inkübasyona bırakıldı. 48 saatlik sürenin sonunda ortamdan VPA uzaklaştırılmadan, toplamda 2 ml besiyeri içinde Niklozamid $5 \mu\text{M}$ dozundan azalan dozlara doğru (5- 2,5-

1,25 μ M) 6 kuyulu hücre kültür kaplarında bulunan hücrelere uygulandı ve hücreler 37°C'de % 5'lik CO₂'li etüvde 24 saat daha inkübasyona bırakıldı. Tedavi süreleri sonunda öncelik olarak kitin bileşenlerinin oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. 6 kuyulu hücre kültür kapları içerisindeki besiyeri aspire edildi. Hücreleri serumdan uzaklaştırmak amacıyla kuyular 2 ml 1x PBS (Gibco) ilave edilerek hücre yüzeyinin yıkanması sağlandı. PBS ortamdan aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra yüzeye yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılması için 0.5 ml % 0.05 Trypsin-EDTA (Gibco) solüsyonu kullanıldı ve hücreler 37°C'de, % 5 CO₂'li ortamda 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda mikroskopla incelendiğinde yüzeyden ayrıldığı gözlenen hücreler, tripsinin inhibe olması için on katı besiyeri ile muamele edildi. Böylelikle tripsinin hücreler yüzeyden ayrıldıktan sonra hücre membranına zarar vermeye başlaması engellenmiş oldu. 6 kuyulu hücre kültür kapları içerisindeki hücre süspansiyonu, içerisinde besiyeri bulunan 15ml'lik falkon tüp içerisine alındı. 800 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısım aspire edildi ve 1 ml'sinde 2x10⁴- 5x10⁵ hücre olacak şekilde hücre peleti sulandırıldı. Tedavi gruplarını içeren etiketli ependorflara hücre süspansiyonundan 50 μ l eklendi. Daha sonra kaspaz3/7 çalışma solüsyonundan her bir tedavi grubunu içeren ependorflara 5 μ l konuldu. Kısa bir pipetaj işleminin ardından ependorflar kapakları açık bir şekilde 37°C'de, % 5 CO₂'li ortamda 30dk inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda ependorf içerisinde hücre süspansiyonlarına 150 μ l DNA'ya bağlanabilen 7-AAD eklenerek kısa bir pipetaj gerçekleştirildi. Daha sonra oda sıcaklığından karanlıkta 5 dk inkübasyona bırakıldı. Daha sonra muse cihazında kaspaz3/7 aktivitesi değerlendirildi (Şekil 3.3.2).



Şekil 3.3.2. Kaspaz 3/7 aktivitesinin ölçülmesi

3.2.5.2. Gamma H2A.X Aktivasyonu ile DNA Hasarının Belirlenmesi

DNA molekülü sürekli olarak genotoksik strese yol açan çeşitli faktörlerin etkisi altındadır. Endojen ve ekzojen kökenli pek çok fiziksel, kimyasal ve biyolojik faktör DNA zincir kırıklarının oluşumuna neden olan şeker-fosfat omurgasında kırılmalara yol açar. Özellikle DNA çift zincir kırıkları, hücrenin yaşamı boyunca sürekli olarak ortaya çıkabilen en tehlikeli lezyon türleridir ve bunların etkili bir şekilde onarılması hücrenin sağlıklı bir şekilde fonksiyonlarını devam ettirebilmesi için son derece önemlidir. Çünkü tamir edilemeyen bu hasar; genomik kararsızlık, kanser gelişimi ve neoplastik transformasyona yol açan mutasyonların oluşumuna neden olabilmektedir (Kuo ve Yang 2008, Podhorecka ve ark. 2010).

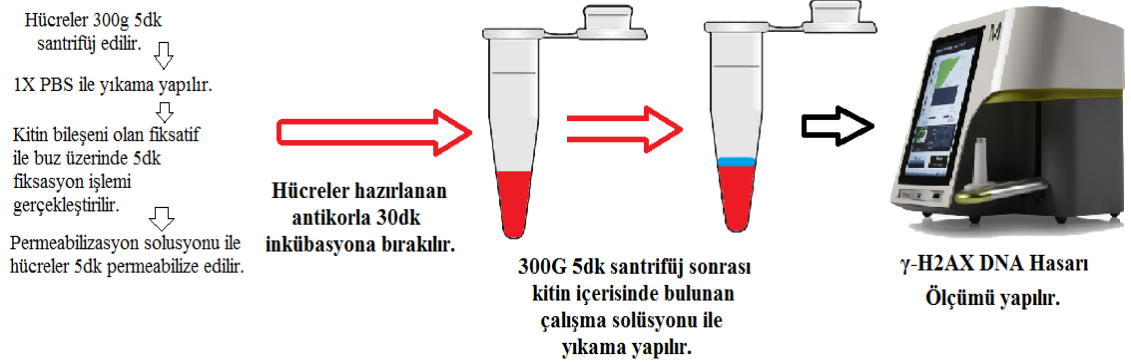
DNA tamirinin gerçekleştiği kromatinlerin yapısal ve işlevsel birimleri nükleozomlardır. Her nükleozom 147 baz çiftinden oluşan DNA zinciri ve bu zincirin etrafında sarıldığı dört çekirdek histonundan her birinin iki kopyasından oluşur. Nükleozom yapısını meydana getiren dört çekirdek histon ailesi H2A, H2B, H3 ve H4'tür. H2A histon protein ailesinin de H2A1, H2A2, H2AX ve H2AZ gibi varyantları vardır. Önemli bir H2A tipi olan H2AX proteini, hücre ve doku tipine bağlı olarak memeli H2A histon havuzunun % 2-25'lik bir bölümünü oluşturur. Ayrıca karboksil kuyruk kısmında son derece korunmuş özel bir diziyeye sahip olduğu için H2AX proteini, ökaryotlarda önemli ölçüde korunmuş olan bir H2A histon tipidir. Diğer H2A histon ailesi üyeleri gibi, H2AX de fosforilasyon, asetilasyon ve ubikuitinasyona uğrayarak pek çok hücreyel olayın düzenlenmesini sağlar. Hasarlı bölgelerde görev alan bu histon tipi, DNA hasar tamiri sürecinde anahtar bir rol oynadığı için, hücre bölünmesi ve büyümesi, immüno-reseptörlerin düzenlenmesi gibi pek çok hücreyel olay, genomik kararsızlık ve DNA hasar tamiri ile ilgili sendromlarla yakından ilişkilidir (Kinner ve ark. 2008, Rakiman ve ark. 2008). H2AX, DNA hasarına yanıt yollarında görev alan ilk proteinlerden birisidir. Fosforile olmuş H2AX, gammaH2AX (γ H2AX) adını alır ve DNA çift zincir kırıkları oluştuğunda görülebilir nükleer odaklar oluşturur. Bu nedenle γ H2AX'nin ekspresyonu DNA çift zincir kırıklarının tespitinde hassas bir indikatör olarak son yıllarda sıklıkla kullanılmaktadır. DNA tamiri gerçekleştikten sonra γ -H2AX, protein fosfataz 2A tarafından defosforile edilir ve böylece hücredeki γ -H2AX seviyesi düzenlenir. Bu nedenle γ -H2AX 'in de fosforilasyonu DNA tamir çalışmaları için de çok uygun bir parametre oluşturur. γ -H2AX

'in fosforilasyonu belirlemek amacıyla Muse- H2A.X Activation Dual Detection Kit kullanıldı.

γ -H2AX testi için A549 ve H1299 akciğer kanseri hücreleri sayılarak 6 kuyulu hücre kültür kaplarına 1 ml içerisinde 100×10^3 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Niklozamid 2 ml besiyeri içinde 5 μ M dozundan azalan dozlara doğru (5- 2,5- 1,25 μ M) 6 kuyulu hücre kültür kaplarında bulunan hücelere uygulandı ve hücreler 37°C'de % 5'lik CO₂'li etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı. VPA 500 μ M olarak bulunan toksik olmayan dozu 2ml besiyeri içinde olacak şekilde 96 kuyulu hücre kültür kaplarında bulunan hücelere uygulandı ve hücreler 37°C'de % 5'lik CO₂'li etüvde 72 saat inkübasyona bırakıldı.

Kombinasyon kuyularına ise 1.5ml besiyeri içerisinde VPA toksik olmayan dozu olan 500 μ M olacak şekilde uygulandı ve hücreler 37°C'de % 5 'lik CO₂'li etüvde 48 saat inkübasyona bırakıldı. 48 saatlik sürenin sonunda ortamdan VPA uzaklaştırılmadan, toplamda 2 ml besiyeri içinde Niklozamid 5 μ M dozundan azalan dozlara doğru (5- 2,5- 1,25 μ M) 6 kuyulu hücre kültür kaplarında bulunan hücelere uygulandı ve hücreler 37°C'de % 5'lik CO₂'li etüvde 24 saat daha inkübasyona bırakıldı.

Tedavi süreleri sonunda öncelik olarak kitin bileşenlerinin oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. 6 kuyulu hücre kültür kapları içerisindeki besiyeri aspire edildi. Hücreleri serumdan uzaklaştırmak amacıyla kuyular 2 ml 1X PBS (Gibco) ilave edilerek hücre yüzeyinin yıkanması sağlandı. PBS ortamdan aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra yüzeye yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılması için 0,5 ml % 0,05 Trypsin-EDTA (Gibco) solüsyonu kullanıldı ve hücreler 37°C'de, % 5 CO₂'li ortamda 5dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler 300g 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda örnekler 1X PBS ile yıkandı. Fiksasyon aşaması için kit içeriğindeki fiksatif kullanılarak örnekler buz üzerinde 5 dk fikse edildi. Daha sonra örnekler 300 g 5 dk santrifüj edildi ve supernatantlar atılarak hücreler permeabilizasyon için kit içerisindeki permeabilizasyon solüsyonu ile 5 dk buz üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında örnekler 300g 5 dk santrifüj edildi ve daha sonra supernatant kısmı atılarak kit içerisindeki antikorlar ile hazırlanan çalışma solüsyonu ile 30 dk karanlıkta oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda hücreler 300g 5 dk santrifüj edildi ve çalışma solüsyonu ile sulandırılarak DNA hasarının belirlenmesi üzerine Muse Cell Analyzer cihazı ile ölçüm yapıldı (Şekil 3.3.3).



Şekil 3.3.3. DNA hasarının (γ -H2AX) ölçülmesi

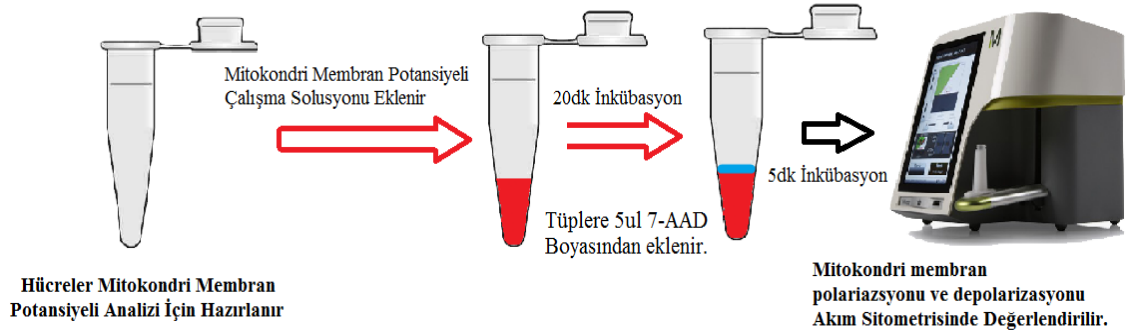
3.2.5.3. Mitokondri Membran Potansiyeli Testi

Mitokondride meydana gelecek değişiklikler hücre sağlığı ve stresi hakkında bilgi veren önemli belirteçlerdendir. Mitokondri apoptozis sürecinde önemli bir role sahip olan regülatörlerden biridir. Apoptotik yolların kesiştiği bir kavşak noktası olan mitokondri aktivasyonu (sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınması) apoptotik süreçte geri dönüşümsüz noktayı gösterir (Finkel 2001). Bu yüzden apoptotik uyarıyı takiben, hücrelerde mitokondriyal bütünlüğün kaybı gözlemlenmektedir.

Mitokondri membran potansiyeli testi için A549 ve H1299 akciğer kanseri hücreleri sayılarak 6 kuyulu hücre kültür kaplarına 1 ml içerisinde 100×10^3 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Niklozamid 2ml besiyeri içinde $5 \mu\text{M}$ dozundan azalan dozlara doğru ($5-2,5-1,25 \mu\text{M}$) 6 kuyulu hücre kültür kaplarında bulunan hücrelere uygulandı ve hücreler 37°C 'de % 5'lik CO_2 'li etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı. VPA $500 \mu\text{M}$ olarak bulunan toksik olmayan dozu 2 ml besiyeri içinde olacak şekilde 6 kuyulu hücre kültür kaplarında bulunan hücrelere uygulandı ve hücreler 37°C 'de % 5'lik CO_2 'li etüvde 72 saat inkübasyona bırakıldı.

Kombinasyon kuyularına ise 1.5ml besiyeri içerisinde VPA toksik olmayan dozu olan $500 \mu\text{M}$ olacak şekilde uygulandı ve hücreler 37°C 'de % 5 'lik CO_2 'li etüvde 48 saat inkübasyona bırakıldı. 48 saatlik sürenin sonunda ortamdan VPA uzaklaştırılmadan, toplamda 2 ml besiyeri içinde Niklozamid $2.5 \mu\text{M}$ dozundan azalan dozlara doğru ($2,5-1,25 - 0,62 \mu\text{M}$) 6 kuyulu hücre kültür kaplarında bulunan hücrelere uygulandı ve hücreler 37°C 'de % 5'lik CO_2 'li etüvde 24 saat daha inkübasyona bırakıldı. Tedavi

süreleri sonunda öncelik olarak kitin bileşenlerinin oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. 6 kuyulu hücre kültür kapları içerisindeki besiyeri aspire edildi. Hücreleri serumdan uzaklaştırmak amacıyla kuyular 2 ml 1X PBS (Gibco) ilave edilerek hücre yüzeyinin yıkanması sağlandı. PBS ortamdan aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra yüzeye yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılmaları için 0,5 ml % 0,05 Tripsin-EDTA (Gibco) solüsyonu kullanıldı ve hücreler 37°C’de, % 5 CO₂’li ortamda 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda ilaç uygulanan kuyuların süpernatantları, 15 ml’lik falkonlara toplandı 800 rpm’de 5dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası falkonların süpernatantları uzaklaştırıldı ve % 1 FBS içeren besiyeri ile hücre pelletleri sulandırıldı. Ardından 95 µl çalışma solüsyonu eklendi ve kısa bir pipetaj işleminin ardından hücreler 20 dk 37°C’de, % 5 CO₂’li inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda hücrelere 5 µL 7-AAD boyası eklenerek orta hızda yaklaşık 5 saniye vorteks yapıldı ve örnekler 5 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra Muse Cell Analyzer cihazı ile ölçüm yapıldı (Şekil 3.3.4).



Şekil 3.3.4. Mitokondri membran potansiyelinin ölçülmesi

3.2.6. Kaspazla Kırılmış Sitokeratin 18 (M30) Düzeylerinin Belirlenmesi

Epitelyal hücrelerde sitoskeletonin önemli bir proteini olan sitokeratin 18 (CK18), apoptozis sürecine özgü olarak aktifleşen bir enzim grubu olan kaspazlar tarafından kırılarak, kırılmış CK18’i (CK18-Asp396, M30) oluşturmaktadır (Leers ve ark. 1999). Bu yöntemin prensibi ise özellikle CK18’in Asp396’da kırılan fragmanını tanıyan M30 monoklonal antikorunun, hücrelerin bulunduğu ortam ile temas ettirilerek sitokeratinler üzerinden kaspaz bağımlı apoptozisin varlığının gösterilmesi esasına dayanmaktadır. ELISA metoduyla M30 Antijen fragmentini belirlemek için; A549 ve H1299 akciğer kanseri hücreleri sayılarak 6 kuyulu hücre kültür kaplarına, kuyu başına 100×10³ hücre

olacak şekilde ekim yapıldı. Tedavi süreleri sonunda hücrelerin lizis işlemi 10 µl % 10'luk NP-40 ile 15-20 dk süreyle oda sıcaklığında 600 rpm çalkalayıcı kullanılarak gerçekleştirildi. Tüm kuyulardaki lizat toplanarak 2000 rpm'de 30 saniye süreyle santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında, M30 Cytodeath ELISA kiti (Peviva, İsviçre) içeriğine uygun olarak ve 2 bağımsız deney şeklinde gerçekleştirildi. Yüzeyi CK18'i tanıyan fare monoklonal M30 antikoru kaplı kuyucuklara 25 µl süpernatantlar ile 75 µl horseradish peroksidaz konjugatı eklenerek 600 rpm çalkalayıcıda, oda sıcaklığında 4 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, kuyulara 250 µl yıkama solüsyonu ilave edilerek 5 kez yıkama yapıldı ve hemen ardından 200 µl TMB substratı eklenerek oda sıcaklığında, karanlıkta, 20 dk boyunca bekletildi. Reaksiyon, 1N H₂SO₄ içeren 50 µl stop çözeltisi kullanılarak durduruldu ve oluşan renk şiddeti, spektrofotometre ile 450 nm'de (FLASHScan S12, Jena, Almanya) ölçüldü.

3.2.7. Asetillenmiş Histon H3 Düzeylerinin Belirlenmesi

Histon deasetilaz inhibitörü olan VPA'nın akciğer kanser hücrelerinde (A549 ve H1299) asetillenmiş histon H3 düzeyleri üzerine etkisi PathScan Acetylated Histone H3 Sandwich ELISA kit (Cell Signaling Technology) kullanılarak belirlendi. Bu yöntemin prensibi histon H3 üzerindeki asetillenmiş lizinlerin endojen düzeylerini göstermesi esasına dayanır.

Asetillenmiş histon H3 düzeylerinin belirlenmesi için A549 ve H1299 akciğer kanseri hücreleri sayılarak 6 kuyulu hücre kültür kaplarına, kuyu başına 100×10^3 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Tedavi süreleri sonunda hücrelere lizis işlemi uygulanarak protein izolasyonu yapıldı.

Total protein konsantrasyonu BCA yöntemi kullanılarak belirlendi. Asetillenmiş histon H3 düzeyleri, her bir doz için 2 bağımsız deney olacak şekilde belirlendi. Her protein lizatı için, protein konsantrasyonu 1,5mg/ml olacak şekilde kit içerisinde bulunan Sample Diluent ile dilüsyon yapıldı. Lizatların protein konsantrasyonları eşitlendikten sonra, yüzeyleri histon H3 ile kaplı kuyucuklara 100 µl eklenerek 37°C'de 2 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, kuyulara 200 µl yıkama solüsyonu ilave edilerek 4 kez yıkama yapıldı ve hemen ardından 100 µl Detection antikor (1:11 oranında hazırlandı) ilave edilerek 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda yıkama işlemi

tekrar edildi ve kuyulara 100 µl horseradish peroksidaz (HRP)-bağlı ikincil antikor (1:11 oranında hazırlandı) eklenerek 37°C'de 30 dk inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda yıkama işlemi tekrarlanarak kuyulara 100µl TMB substratı ilave edildi. 37°C'de 10 dk inkübe edildikten sonra 100 µl stop çözeltisi ilave edilerek oluşan renk şiddeti, spektrofotometre ile 450 nm'de (FLASHScan S12, Jena, Almanya) ölçüldü.

3.2.8. Western Blot Analizi

Hücrelerden elde edilen bir protein karışımında hedeflenen proteinin varlığını tespit etmek ve moleküler ağırlığını belirlemek amacıyla kullanılan özel yöntemlerden biri de western blot analizleridir.

İmmüno blotlama olarak da adlandırılan bu tekniğin uygulanabilmesi için öncelikle hedef proteini tanıyarak ona bağlanabilen bir antikor mevcut olmalıdır. Western blotlama temel olarak dört aşamada gerçekleştirilir:

- i. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) yöntemiyle örnek karışımında bulunan proteinlerin jel üzerinde birbirlerinden ayrılmaları sağlanır.
- ii. Jelde büyüklüklerine göre ayrılarak bantlar oluşturan protein molekülleri, elektrotransfer tekniği ile nitroselüloz membrana aktarılırlar.
- iii. Membrana sırasıyla, hedef proteine özgü antikor, bu antikoru tanıyan ve yapısına enzim ilave edilmiş ikincil bir antikor ile muamele uygulanır.
- iv. Son olarak söz konusu enzimin substratı ile muamelesi sonucunda meydana gelen ışık aracılığı ile hedef proteinin membran üzerinde görüntülenmesi sağlanır (Şekil 3.4).

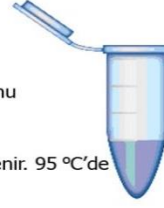
Western blot

Örnek Hazırlanışı

Lizis buffer (Örn: RIPA) kullanarak örnekler lizis edilir

Protein konsantrasyonu belirlenir

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

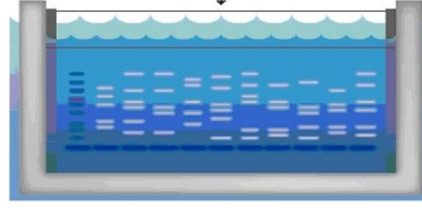


Jele Yükleme

20-30 μ g protein jele yüklenir

Jelde Yürütme

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



100V-150V, 50-90 dk

Jel yüzdesi proteinin büyüklüğüne bağlıdır.

4-40 kDa	20%
12-45 kDa	15%
10-70 kDa	12,5%
15-100 kDa	10%
25-200 kDa	8%

Proteinlerin jelden membrana aktarılması

Transfer buffer hazırlanır.



100 V-60-120 dk, 4 °C

Negatif yüklü proteinler pozitif katoda doğru hareket eder ve membrana geçer.

Bloklama

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

Primer antikor inkübasyonu



Protein bandı

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



Sekonder antikor inkübasyonu



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



Görüntüleme



Substrat

Işığa hassas ürün



Şekil 3.4. Western Blot Aşamalarının Şematik Gösterimi (Abcam 2010).

Proteinlerin saflığının kontrolü ve moleküler ağırlıklarının saptanması amacıyla kullanılan SDS-PAGE yöntemi Western blot analizinin ilk aşamasını oluşturur. Western blot yönteminde toplayıcı jel ve ayırıcı jel olmak üzere iki farklı agaroz jel kullanılır. Toplayıcı jel hafif asidik (pH: 6,8) olup düşük akrilamid konsantrasyona sahiptir ve bu sayede gözenekli jel oluşur. Ayırıcı jel baziktir (pH:8,8) ve yüksek poliakrilamid içeriği ile jel gözenekleri daha dardır. Proteinler bu sayede büyüklüklerine göre ayrılır ve büyük proteinlere kıyasla küçük proteinler daha kolay ve hızlı ilerler.

SDS-PAGE yöntemi ile ayrılmak istenilen proteinlerin sadece büyüklüklerine göre ayrımını sağlamak için önce ısı ile denatüre edilmeleri ve sonra Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) ile muamele edilmeleri gereklidir. Anyonik bir deterjan olan SDS, proteinlere bağlanıp negatif yüklü hale getirerek lineer forma dönüşmelerini sağlar. SDS sayesinde negatif yük ile yüklenen proteinler elektroforez sırasında anoda göç ederler. Elektroforez işlemi tamamlandığında farklı büyüklükteki proteinler jel boyunca ilerlerken ayrılarak farklı protein bantları halinde odaklanırlar. SDS-PAGE işleminden sonra jeldeki protein bantlarının görüntülenmesi için kemiluminesans prensibinden yararlanılır (Coşkun-Arı 2003, Mahmood ve Yang 2012).

Western Blot analizi için A549 ve H1299 akciğer kanseri hücreleri sayılarak 6 kuyulu hücre kültür kaplarına 1ml içerisinde 100×103 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Niklozamid 2ml besiyeri içinde 5µM dozundan azalan dozlara doğru (5- 2.5- 1.25µM) 6 kuyulu hücre kültür kaplarında bulunan hücrelere uygulandı ve hücreler 37⁰C'de % 5'lik CO₂'li etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı. VPA 500 µM olarak bulunan toksik olmayan dozu 2ml besiyeri içinde olacak şekilde 6 kuyulu hücre kültür kaplarında bulunan hücrelere uygulandı ve hücreler 37⁰C'de % 5'lik CO₂'li etüvde 72 saat inkübasyona bırakıldı.

Kombinasyon kuyularına ise 1.5 ml besiyeri içerisinde VPA'nın toksik olmayan dozu olan 500µM olacak şekilde uygulandı ve hücreler 37⁰C'de % 5 'lik CO₂'li etüvde 48 saat inkübasyona bırakıldı. 48 saatlik sürenin sonunda ortamdan VPA uzaklaştırılmadan, toplamda 2ml besiyeri içinde Niklozamid 5 µM dozundan azalan dozlara doğru (5- 2.5- 1.25 µM) 6 kuyulu hücre kültür kaplarında bulunan hücrelere uygulandı ve hücreler

37°C'de % 5'lik CO²'li etüvde 24 saat daha inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda bir sonraki aşama olan protein izolasyonuna geçildi.

3.2.8.1. Protein İzolasyonu

3.2.8.1.1. Çözeltiler

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

Bu aşamada, ilaç uygulanan kuyuların süpernatantları, buz üzerinde tutulan falkonlara toplandı ve negatif kontrol kuyusunun süpernatantı uzaklaştırıldı. Kuyulara 1 ml soğuk PBS ilave edilip hücreler “scraper” (Corning) ile kaldırıldı ve ilgili falkonlara aktarıldı. Süspansiyon +4°C'de 1000g'de 5 dakika santrifüj (Hettich Zentrifugen, Almanya) edildi. Santrifüj sonrası falkonların süpernatantları uzaklaştırıldı ve pelet üzerine 0,05 ml lizis tamponu pipetlendi. Falkonlar, karanlıkta 45 dakika buz üzerinde bekletildi ve bu esnada 10 dakikada bir sonikasyon işlemi gerçekleştirildi. Süre bitiminde solüsyonlar 1,5 ml'lik tüplere aktarıldı ve +4°C'de 13000g'de 15 dakika santrifüj edildi (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). Süpernatantları 0.5ml'lik tüplere toplandı ve protein miktarları ölçüldü.

3.2.8.2. Proteinlerin Biçinkonik asit (BCA) Yöntemi ile Konsantrasyonlarının Ölçülmesi

3.2.10.2.1. Çözeltiler

Bicinchoninic Acid Kit (Sigma, St. Louis, MO)

Bovine Serum Albumin (BSA, Amresco, Solon, OH, USA) Standardı

3.2.8.2.2. BSA Standartlarının Hazırlanması

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

3.2.8.2.3. BCA Ölçümünün Yapılması

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

Ölçüm için Biçinkoninik Asit Kit (Sigma, St. Louis, MO) ve 96 kuyuluk plate (Orange Scientific) kullanıldı. Her bir kuyuya 0, 20, 40, 60, 80 ve 100 μl standart ve 10 μl konsantrasyonu bilinmeyen örnekler pipetlendi. Konsantrasyonu bilinmeyen örnekler 10 kere ultrasaf dH_2O ile seyreltilerek ölçüm yapıldı, bu nedenle 10 μl örnekler 90 μl , standartlar ise 100 μl 'ye tamamlanacak şekilde ultrasaf dH_2O ile tamamlandı ve bu seyreltme katsayısı, hesaplamalarda dikkate alındı. Kuyuların üzerine 200 μl çalışma ayırıcı pipetlendi ve plate 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda oluşan renk şiddeti, spektrofotometrede 570 nm'de (FLASHScan S12, Jena, Almanya) okundu.

3.2.8.3. Western Blot Yöntemi ile Proteinlerin Nitroselüloz Membrana Aktarılması

3.2.8.3.1. Çözeltiler

MES SDS Running Buffer (Nu-PAGE, 20X, İnvitrogen, CA, USA): 30ml Running buffer, 570ml ultra saf H_2O ile tamamlandı.

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

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

Nu-PAGE Antioksidant (İnvitrogen, CA, USA)

Kaleidoscope Prestained Standarts (Biorad, CA, USA)

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

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

80,06g ve 5ml Tween20 (Dako, CA, USA) 1L ultrasaf H_2O ile çözüldü.

Chemiluminescent Detection Kit, Mouse (Amersham, Buckinghamshire, UK)

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

3.2.8.3.2. Proteinlerin Yüklmesi ve Jelde Yürütülmesi

Örnekler istenen hacimlerde toplam protein miktarı 20 µg (BCA yöntemiyle belirlenen) ve “sample buffer” ve “reducing agent” 1X olacak şekilde 0.5 ml’lik tüplere pipetlendi. Ardından tüpler su banyosunda bekletildi. Bu esnada jel, elektroforez tankına yerleştirildikten sonra SDS running buffer, doluluk sınırına kadar eklendi. Hazır jelde bulunan koruma sıvısı pipet yardımıyla al-ver yapılarak uzaklaştırıldıktan sonra 500 µl antioksidan eklendi. Marker, yüklenmeden önce 40⁰C’de 1 dakika bekletildi. Daha sonra marker (5 µl) ve örnekler kuyulara pipet yardımıyla belirlenen miktarlarda yüklendi. Yükleme işlemi sonunda 40 dakika 150V yürütme yapıldı.

3.2.8.3.3. Proteinlerin Transferi

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

3.2.8.3.4. Proteinlerinin Belirlenmesi

3.2.8.3.4.1. Bloklama

Uygun protein için, TBS-T içerisinde % 5’lik süt (Santa Cruz, CA, USA) çözeltisi hazırlandı ve 60 dakika oda sıcaklığında, çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Süre sonunda, 3 defa 5 dakika TBS-T ile yıkama yapıldı.

3.2.8.3.4.2. Birincil Antikor

Uygun birincil antikor 1:1000 olacak şekilde % 5’lik BSA veya % 5’lik süt çözeltisi içerisinde hazırlandı ve 18 saat +4⁰C’de çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, 3 defa 5 dakika TBS-T ile yıkama yapıldı.

3.2.8.3.4.3. İkincil Antikor

İkincil antikor için, uygun Anti-Rabbit veya Anti-Mouse 1:2000, Anti-biotin 1:1000 olacak şekilde % 5’lik süt çözeltisi içerisinde hazırlandı ve çalkalayıcıda 60 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, 3 defa 5 dakika TBS-T ile yıkama yapıldı.

3.2.8.3.4.4. Görüntüleme

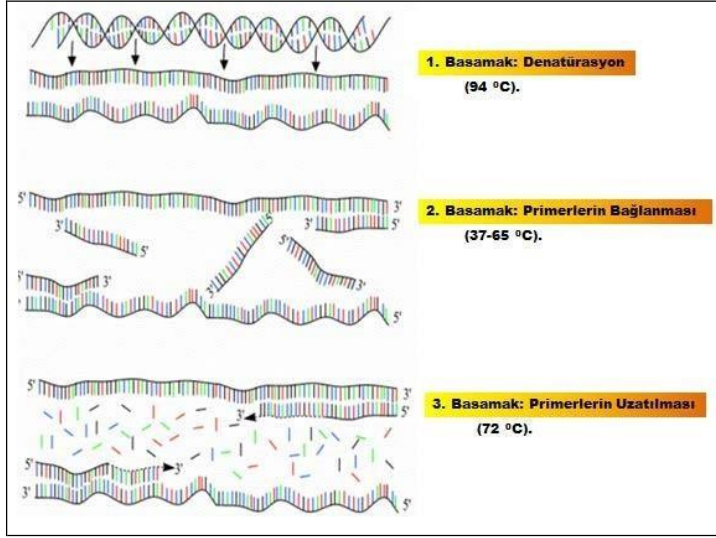
Görüntüleme için; Lumiglo reagent A (20X, Cell Signaling, MA, USA) ve Peroksidaz reagent B (20X, Cell Signaling, MA, USA) iki kat seyreltilerek kullanıldı. Membranlar hazırlanan solüsyon ile 1 dakika inkube edildikten sonra açığa çıkan kemiluminesans sinyal, Fusion FX-7 (Vilber Lourmat, Torcy, France) cihazı kullanılarak görüntülendi. Bu şekilde nitroselüloz membran üzerine transfer edilmiş olan proteinlere bağlanan antikolar görüntülendi.

3.2.8.3.4.5. Birincil ve İkincil Antikorların Membrandan Uzaklaştırılması

Birincil ve ikincil antikorları membrandan uzaklaştırmak (Stripping) için üretici firmanın (Cell Signaling, MA, USA) Western blot yeniden işaretleme (reprobing) protokolü kullanıldı. Stripping solüsyonu hazırlamak için; 100 ml ultrasaf su içerisine 0,76g Tris-base (Scharlau, Barcelona, Spain), 2g SDS (Applichem, Darmstadt, Germany) ve 700µl β-merkaptolanol (Merck, Schuchard, Germany) eklendi (1X, pH:6,8). Membran 4 kez 5 dakika TBS-T ile yıkandıktan sonra stripping solüsyonu eklenerek 150-300rpm, 37⁰C’de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda 2 kez 5 dakika TBS-T ile yıkama yapıldı ve membranda sinyal olup olmadığını kontrol etmek amacıyla görüntüleme yapıldı. Görüntüleme sonunda membranalarda sinyal yoksa 4 kez 5 dakika TBS-T ile yıkama yapılarak bloklama aşamasına geçildi.

3.2.9. Polimeraz Zincir Reaksiyonu İşleminin Uygulama Aşamaları ve Prensipleri

PCR reaksiyonu; DNA’nın iki zincirinin yüksek sıcaklıkla birbirinden ayrılmasını (denatürasyon), sonra sırasıyla sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA’ya bağlanmasını (hibridizasyon), zincirin uzamasını (polimerizasyon, çift iplikçikli DNA’ların sentezi) ve tüm bu siklusların belirli sayıda tekrarlanmasını kapsamaktadır (Şekil 3.5). PCR tekniğinin otomasyonu, her bir siklus esnasındaki ısıtma ve soğutma işlemlerini yazılım programları doğrultusunda gerçekleştiren “thermocycler” adı verilen PCR cihazları yardımıyla sağlanmaktadır. Bu cihazlarda sıcaklık +4 °C ile 100°C’ler arasında programlanabilmekte ve reaksiyon işlemlerinin sona ermesiyle +4 °C’ye ayarlanarak tüpler uzun süre bu sıcaklıkta tutulabilmektedir (Arda 1980, Erol ve ark. 1990).



Şekil 3.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Siklusunun Basamakları (Vierstrate 1999)

3.2.9.1. DNA'nın Denatürasyonu Aşaması

Bu aşamada çift zincirli hedef DNA'nın birbirinden ayrılması sağlanmaktadır. Denatürasyon aşamasında, sıcaklık yaklaşık 93-96 °C'ye kadar çıkarılır, bu sayede çift sarmallı DNA, hidrojen bağlarının kopmasıyla iki eş zincir birbirinden ayrılır. Bu sıcaklıkların uygulanmasıyla DNA'nın denatürasyonu "Thermocycler" cihazlarında gerçekleştirilmektedir. Bunun yanısıra denatürasyon sıcaklığının çok yüksek veya süresinin uzun olması enzim aktivitesinin olumsuz etkilenmesine neden olmaktadır (Erlich ve ark. 1991).

3.2.9.2. Primerlerin Bağlanması (Hibridizasyon, Annealing) Aşaması

PCR işlemlerinin bu aşamasında, primer olarak adlandırılan ve çoğaltılması istenen DNA için spesifik olan oligonükleotidler, denatürasyon aşamasında elde edilen DNA tek sarmalı üzerinde kendisine komplementer olan diziyeye bağlanmaktadır. DNA zincirlerinin eşleşmesi veya yeniden bağlanması daha düşük sıcaklıklarda gerçekleşmektedir (37-65 °C). Primerlerden birinin kendine ait olan 5' ucu, hedef DNA'lardan birinin 3' ucuyla, diğer primer de ikinci tek iplikçik DNA'nın anti paralel olan diğer ucunda bulunan 3' ucuna DNA polimerazın çalışma yönüne (5'→3') uygun olarak bağlanırlar (Erol ve ark. 1990, Aldemir ve ark. 2001).

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

Primerlerin bağlanması aşaması tamamlandıktan sonra, primerlerin hibritleştiği tek sarmalların karşılığı DNA polimeraz (genellikle Taq polimeraz) tarafından sentezlenir. Taq Polimerazın optimum çalışma sıcaklığı 72 °C'dir. Taq polimeraz enzimi 5'→3' yönünde aktivite göstererek, primerlerin 3' uçlarından başlamak üzere ortamdaki nükleotidleri kullanarak hedef DNA dizisinin birebir kopyasını yapmaktadır (Caner ve ark. 2000, Birben 2006).

3.2.9.4. Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

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

LightCycler sisteminin uygulanmasında; yalnızca çift zincirli DNA'ya bağlandıklarında floresans veren boyalar (Syber green 1) kullanılarak, çoğalmaya bağlı DNA artışı, ortaya çıkan floresansın miktarıyla ölçülmektedir. Primerin bağlanmasını takiben gerçekleştirilen uzama aşamasında, hedef DNA'nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA'ya bağlanan Syber green 1 miktarı artmakta ve buna bağlı olarak yayılan floresans miktarında artış gözlenmektedir (Heid ve ark. 1996, Grove 1999, Kubista ve ark. 2006). Bu uygulamada, floresans artışı her zaman spesifik amplifikasyonu göstermeyebilir. Çünkü çift sarmal DNA'ya entegre olan Syber green 1 ortamda hedef moleküller olmadığında primerlerin kendi aralarında gerçekleşecek olan bağlanmalar (primer dimer) sonucunda da yapıya katılarak floresans oluşumuna sebep olabilmektedir. Bu olumsuz faktörü gidermek için amplifikasyon ürünlerinin melting curve (erime eğrisi) analizi yapılmaktadır. Her çift sarmal DNA, kendine özgü melting temperature (T_m , çift sarmal DNA'nın % 50'sinin tek sarmal hale gelmesi için gerekli sıcaklık) değerine sahiptir. PCR çoğalmasının ardından sıcaklık yavaş yavaş yükseltilerek, belirli aralıklarla tüpteki floresans miktarı kaydedilir. Çift sarmal DNA zincirleri birbirinden ayrılmaya başlayınca Syber green 1 boya serbest kalmakta ve floresans miktarı azalmaktadır. Denatürasyon olduğunda floresans sinyal aniden düşmektedir. Erime eğrisinden yararlanılarak amplikonun T_m derecesi saptanabilmektedir. İncelenen örneğe ait T_m derecesi, aynı

koşullarda işleme alınan pozitif kontrolün Tm derecesiyle karşılaştırılarak, PCR sonucunun doğru veya hatalı olduğuna karar verilmektedir.

LightCycler'in diğer bir uygulama şekli, hedefe özgül prob lar kullanmaktır. Burada prob larla testin özgüllüğü arttırılmıştır. Problardan biri 3' ucundan floresans boyayla işaretli (donör boya), diğeri 5' ucundan alıcı boyayla (acceptor dye) işaretlenmiştir. Problar, hedef ampikonlar üzerinde birbirine yakın (1-5 nükleotid uzaklıkta) yere bağlanmakta ve işaretli uçlar yan yana gelmektedir. İki boyanın yan yana gelmesiyle açığa çıkan enerji, ikinci prob üzerindeki alıcı boyayı etkileyerek floresans oluşumuna yol açmaktadır. FRET (Fluoresance resonance energy transfer) olarak adlandırılan bu enerji transferi sonucunda oluşan floresans miktarı, ortamdaki hibridizasyonun derecesine, diğeri bir ifadeyle PCR siklusu süresince oluşan ampikonların miktarına bağlı olarak artmaktadır (Holland ve ark. 1991, Livak ve ark. 1995).

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

A549 ve H1299 akciğer kanseri hücreleri sayılarak 6 kuyulu hücre kültür kaplarına 1 ml içerisinde 100×10^3 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Niklozamid 2 ml besiyeri içinde 5 μ M dozu 6 kuyulu hücre kültür kaplarında bulunan hücrelere uygulandı ve hücreler 37⁰C'de % 5'lik CO₂'li etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı. VPA 500 μ M olarak bulunan toksik olmayan dozu 2ml besiyeri içinde olacak şekilde 6 kuyulu hücre kültür kaplarında bulunan hücrelere uygulandı ve hücreler 37⁰C'de % 5'lik CO₂'li etüvde 72 saat inkübasyona bırakıldı.

Kombinasyon kuyularına ise 1.5 ml besiyeri içerisinde VPA toksik olmayan dozu olan 500 μ M olacak şekilde uygulandı ve hücreler 37⁰C'de % 5 'lik CO₂'li etüvde 48 saat inkübasyona bırakıldı. 48 saatlik sürenin sonunda ortamdan VPA uzaklaştırılmadan, toplamda 2ml besiyeri içinde Niklozamid 5 μ M dozu 6 kuyulu hücre kültür kaplarında bulunan hücrelere uygulandı ve hücreler 37⁰C'de % 5'lik CO₂'li inkübatörde 24 saat daha inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda hücrelerde total RNA izolasyonu yapıldı.

3.2.9.5. Hücrelerden Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu Total RNA Purification Kit (Jena Bioscience) kullanılarak yapıldı. Bu aşamada ilaç uygulanan kuyuların süpernatantları, buz üzerinde tutulan 15 ml'lik falkonlara toplandı ve negatif kontrol kuyularının süpernatantı uzaklaştırıldı. Kuyulara 2 ml soğuk PBS ilave edilip hücreler % 0,05 Tripsin- EDTA ile kaldırıldı ve ilgili falkonlara aktarıldı. Süspansiyon +4 °C'de 1000 g'de 5 dakika santrifüj edildi.

Santrifüj sonrası falkonların süpernatantları uzaklaştırıldı ve pelet üzerine 250 µl lizis tamponu eklenerek 10 sn vortex yapıldı. Vortex yapıldıktan sonra falkonda bulunan hacmin 0,6 katı kadar (yaklaşık 180 µl) izopropanol eklendi. Kitin içerisinde yer alan filtre tüpler, koleksiyon tüpler ile birleştirdi ve filtre tüplerin içine 100 µl aktivasyon buffer pipetlendi. Daha sonra birleştirilen filtre tüpler ve koleksiyon tüpler 10000 g'de 30 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonunda koleksiyon tüplerde biriken sıvı uzaklaştırıldı. Örneklerin bulunduğu falkonlardan tüm hacim filtre tüplere aktarıldı ve 10.000 g'de 30 saniye santrifüj edilip alta geçen sıvı uzaklaştırıldı. Filtre tüplere 500 µl primer yıkama solüsyonu pipetlendi ve 10000 g'de 30 saniye santrifüj edildi, santrifüj sonunda koleksiyon tüplerde biriken sıvı uzaklaştırıldı. Daha sonra filtre tüplere 500 µl sekonder yıkama solüsyonu pipetlendi ve 10.000 g'de 30 saniye santrifüj edildi. Son olarak tüpler 10.000 g'de 2 dakika santrifüj edildi. Daha sonra filtreli tüpler kapaklı tüplere yerleştirildi ve membranın tam üstüne 50µl elüsyon buffer eklenerek 1 dakika oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 10.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında tüpte bulunan RNA çözeltilerinin konsantrasyonları ölçüldü.

3.2.9.6. İzole Edilen RNA'ların Kontrolü

İzolasyonu gerçekleştirilen RNA'ların kalitesi ve miktarları Nanodrop™ cihazı ile ölçüldü. RNA örneklerinden 1 µl alındı ve suya karşı kör alınan cihaz ile ölçümler yapıldı. RNA miktarları 50 ng/µl ile 600 ng/µl arasında bulundu.

3.2.9.7. cDNA Sentezinin Yapılması

Elde edilen total RNA örnekleri, SCRITPT cDNA Sentez Kiti (Jena Bioscience) ile cDNA'ya çevrildi. Çevrim için, kullanılacak RNA örnek sayısından 1 örnek fazla olacak

şekilde “1 çevrim” sütunundaki hacimler (RNA hariç) bu sayı ile çarpılarak bir karışım (cDNA Sentez karışımı) hazırlandı (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. cDNA Sentez Karışımı Hazırlanışı

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

Bu karışım buz üzerinde Etiketli PCR tüplerine eşit şekilde dağıtıldı ve son olarak da RNA konsantrasyonları eşit olacak şekilde pipetlendi. Reaksiyonun gerçekleşmesi için tüpler, 42 °C’de 10 dakika sıcaklık döngü cihazında inkübe edildi. Reverse transkriptaz enzimini inaktive etmek için tüp, 50 °C’de 60 dakika sıcaklık döngü cihazında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, reaksiyonu durdurmak için tüpler hızlı bir şekilde buz üzerine alındı ve eş zamanlı PCR analizi için kullanılmak üzere -20 °C’de saklandı.

3.2.9.8. Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizinin Yapılması

Literatür araştırmaları sonucunda apoptozis (FAS, TNFRSF10B, TNFRSF10A, HRK), nekroptozis (PARP1, RIPK1) ve otofaji (ATG3, ATG5, BECN) ile ilişkili sinyal yollarında etkili olan önemli genler belirlendi. Bu genlerin primerleri kullanılarak qPCR master karışımı hazırlandı (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2. qPCR Master Karışımı'nın Hazırlanışı

Bileşen	20 μ l mix için	180 μ l mix için (8 gen için +1 fazla örnek; 9 örnek)	Final konsantrasyon
qPCR Green-Master with UNG	10 μ l	90 μ l	1x
Primer (Forward)	0,6 μ l	5,4 μ l	300 nM
Primer (Reverse)	0,6 μ l	5,4 μ l	300 nM
PCR-Grade Su	7,3 μ l	65,7 μ l	-
Toplam Mix	18,5 μ l	166,5 μ l	-

Hazırlanan bu karışımdan 18,5 μ l PCR platelerinin örnek kuyucuklarına dağıtıldı.

Üzerlerine cDNA'lardan 1,5 μ l pipetlendi. Plate LightCycler 480 (Roche) cihazına yerleştirildi. Aşağıda verilen program ayarlanarak PCR tamamlandı. Sonuçlar $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanılarak LightCycler Software 4.0 ile değerlendirildi.

1 siklus	50°C'de 2 dakika
45 siklus	95°C'de 15 saniye
	52°C'de 20 saniye
	72°C'de 30 saniye
1 siklus (Melting Curve)	95°C'de 1 dakika
	55°C'de 30 saniye
	95°C'de 30 saniye
1 siklus (Cooling)	40°C'de 2 dakika

3.2.10. İstatistiksel Analiz

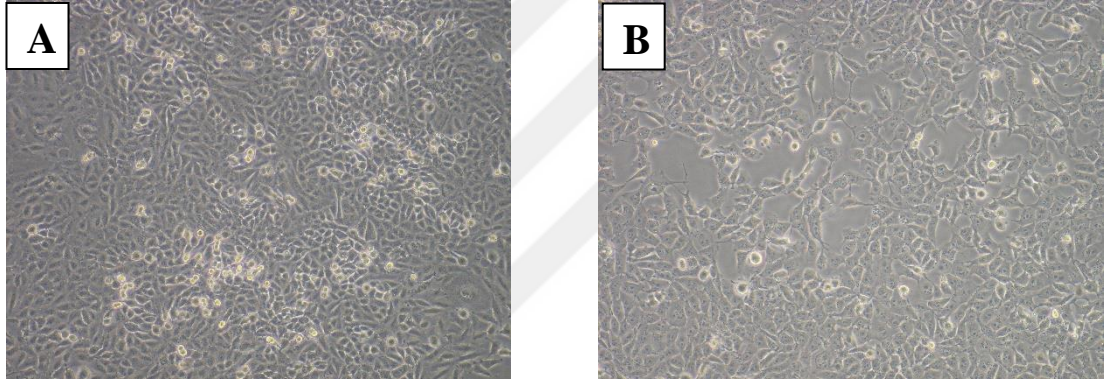
İstatistiksel analizlerin yapılabilmesi amacıyla elde edilen veriler Graph Pad programı aracılığı ile t-testi, çoklu veri analizi ANOVA ile değerlendirildi. 3 tekrarlı yapılan tüm analizlerin sonuçları ortalama ve standart sapma ile verildi. İstatistiksel olarak anlamlı veriler $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ değerine göre belirlendi.



4. BULGULAR

4.1.1 SRB Canlılık Testi Bulguları

Farklı genomik ve morfolojik özelliklere sahip olan A549 (p53 pozitif) ve H1299 (p53 negatif) akciğer kanseri hücrelerine (Şekil 4.1.1) 24, 48 ve 72 saat boyunca VPA ve niklozamid farklı konsantrasyonları (VPA 0,15-5 mM, Niklozamid 0,078-5 μ M) hücre besiyerinde hazırlanarak uygulandı. Aynı zamanda yapılacak olan kombinasyon çalışmaları için 48 saat boyunca 500 μ M konsantrasyonunda VPA tedavisi sonrası, VPA kuyudan uzaklaştırılmadan Niklozamid farklı konsantrasyonları ile (0,07-5 μ M) 24 saat boyunca kombinasyon tedavisi uygulandı ve hücre canlılığı üzerine etkisi SRB testi ile belirlendi.



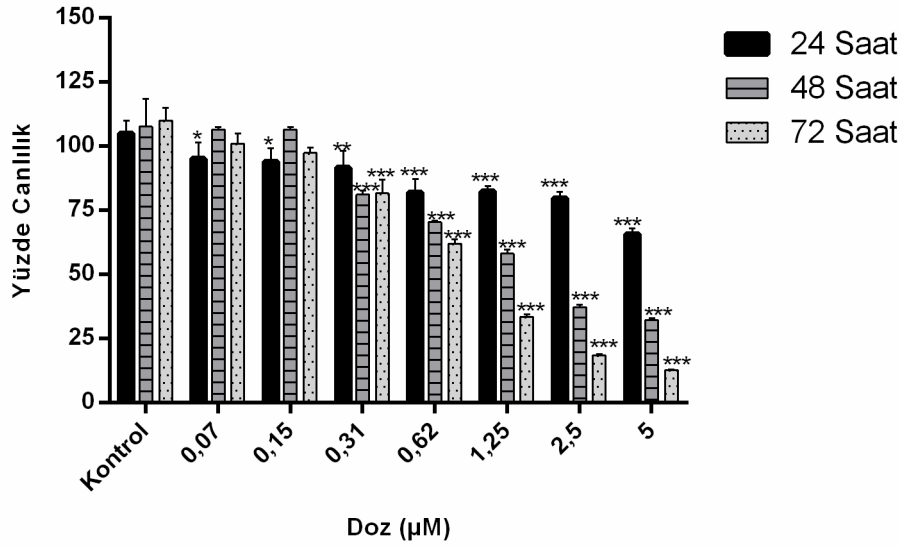
Şekil 4.1.1. A549 ve H1299 hücre soylarının faz görüntüleri. A. A549 hücre soyu, B. H1299 hücre soyu.

VPA ve niklozamid bileşiğinin uygulandığı hücre soylarında zamana ve doza bağlı olarak konsantrasyon arttıkça hücrelerin canlılık yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı azalmalar gözlemlendi ($p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$). Hücre soylarında 12, 24 ve 48 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda VPA ve niklozamid bileşiği uygulaması sonrası ortaya çıkan sonuçlar Şekil 4.1.2 ve Şekil 4.1.3' de gösterildi.

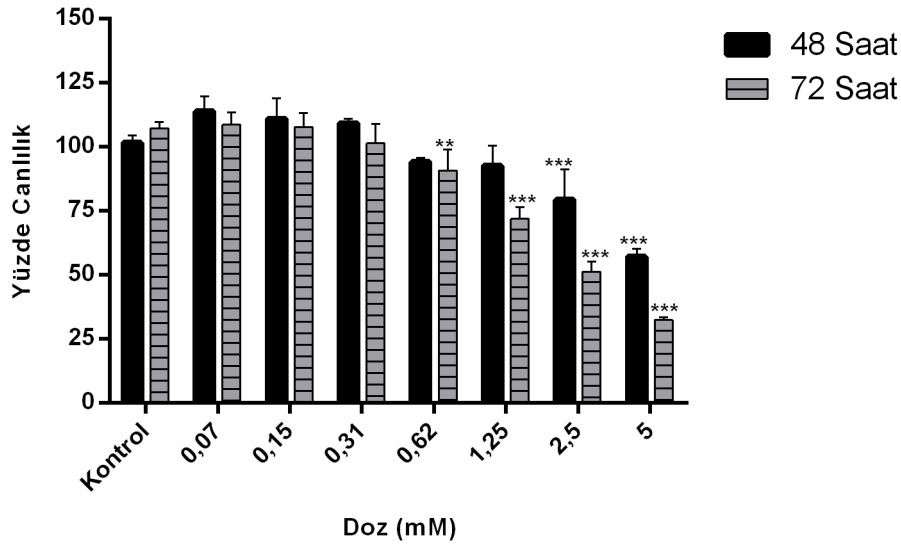
Niklozamid bileşiği 0,31-5 μ M doz aralığında uygulama sonucu; zamana ve doza bağımlı olarak A549 ve H1299 hücrelerinde kontrole kıyasla hücre canlılığında anlamlı azalmalar gözlemlendi ($p < 0,001$). VPA bileşiği ise 5, 2,5, 1,25 mM 48 saat uygulama sonucu, 5-0,62 mM doz aralığında 72 saat uygulama sonucu A549 ve H1299 hücrelerinde kontrole

kıyasla doza ve zamana bağımlı olarak hücre canlılığında anlamlı azalmalar gözlemlendi ($p<0,01$, $p<0,001$).

A549 Niklozamid SRB Testi Sonuçları

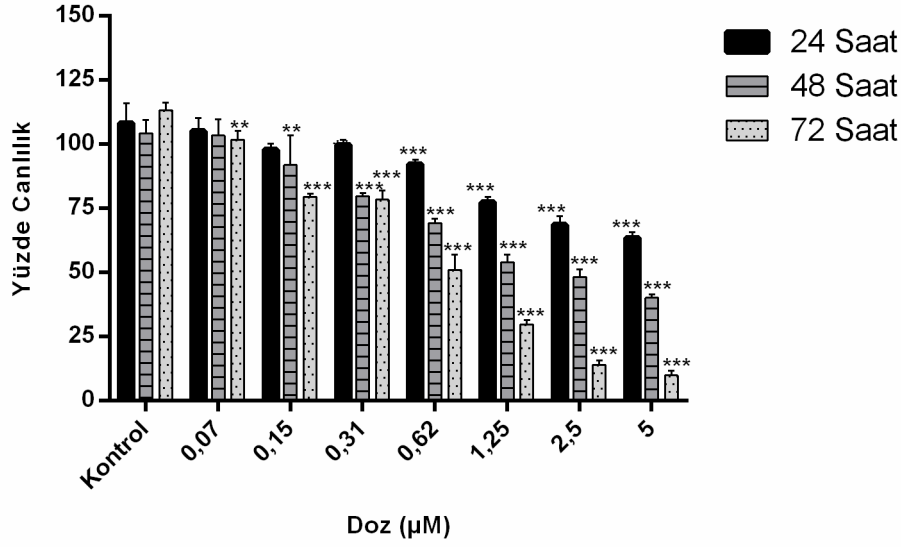


A549 Valproik Asit SRB Testi Sonuçları

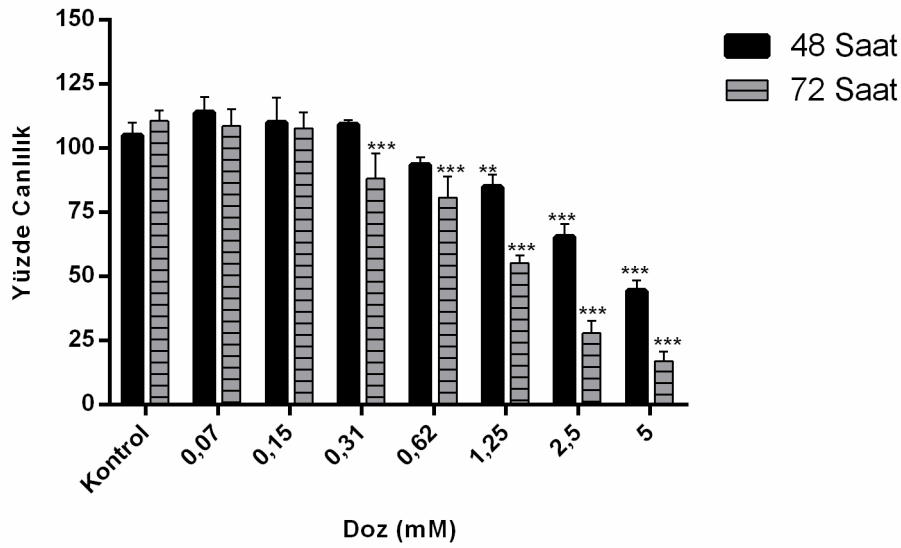


Şekil 4.1.2. A549 hücre soyunda Valproik asit (0,07-5 mM) ve Niklozamid (0,07-5 µM) uygulamasının zamana bağlı olarak SRB testi sonrası canlılık yüzdelerinin grafiği. Her bir veri noktası 3 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir. *Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre farklı dozlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (*: $p<0,05$ **: $p<0,01$ ***: $p<0,001$) ifade etmektedir.

H1299 Niklozamid SRB Testi Sonuçları



H1299 Valproik Asit SRB Testi Sonuçları



Şekil 4.1.3. H1299 hücre soyunda Valproik asit (0,07-5 mM) ve Niklozamid (0,07-5 µM) uygulamasının zamana bağlı olarak SRB testi sonrası canlılık yüzdelerinin grafiği. Her bir veri noktası 3 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir. *Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre farklı dozlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (*: p<0,05 **:p<0,01 ***:p<0,001) ifade etmektedir.

SRB verilerine göre; A549 ve H1299 hücre soylarında niklozamid ve VPA bileşiğinin sitotoksik aktivitesinin gösterilmesinde önemli olan IC₅₀ (kontrol hücrelerine kıyasla niklozamid ve VPA bileşiği ile muamele sonrası hücrelerin % 50'sini öldüren konsantrasyon) değerleri Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Niklozamid ve valproik asit bileşiği uygulanan hücre soylarında SRB canlılık testi sonuçlarına göre 48 ve 72 saat tedavi süresindeki IC₅₀ değerleri.

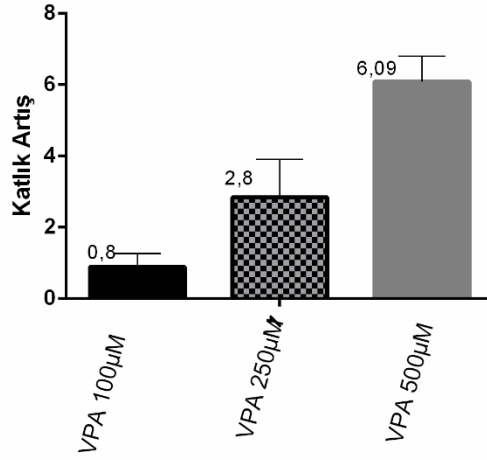
	Doz (µM)	A549	H1299
Niklozamid 48 Saat	IC₅₀	2,14	2,08
Niklozamid 72 Saat	IC₅₀	0,65	0,55

	Doz (mM)	A549	H1299
Valproik Asit 48 Saat	IC₅₀	4,8	4,34
Valproik Asit 72 Saat	IC₅₀	2,67	1,49

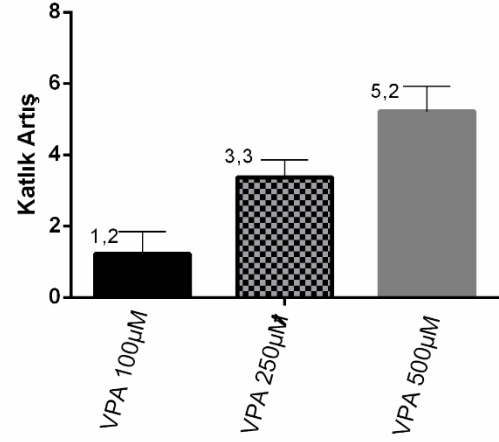
4.1.2. VPA'nın Histon Asetilasyon Seviyelerine Etkisinin Belirlenmesi

A549 ve H1299 hücre soylarında VPA'nın toksik olmayan konsantrasyonlarında (100, 250, 500 µM 72 saat uygulama) toplam histonlarda ki toplam asetilasyon seviyeleri ELISA yöntemiyle belirlendi (Şekil 4.1.4). VPA uygulaması sonrası her iki hücre soyunda, artan konsantrasyonlara paralel histonlarda asetilasyon seviyelerinde kontrole oranla artış gözlenmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak VPA'nın toksik olmayan dozlarında ki histon deasetilaz inhibitörü etkisinin en yüksek olduğu 500 µM konsantrasyonu seçilerek kombinasyon tedavisinde kullanılmıştır.

A549 Hücrelerinde Asetillenmiş Histon H3



H1299 Hücrelerinde Asetillenmiş Histon H3

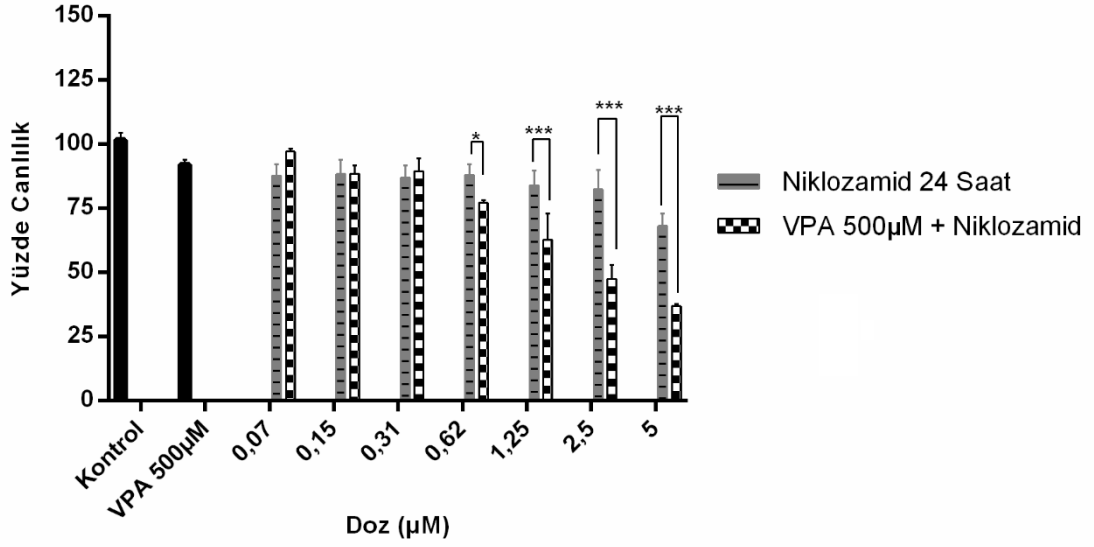


Şekil 4.1.4. A549 ve H1299 hücre soylarında Valproik asit (VPA) 100, 250, 500 µM konstantrasyonlarında 72 saat uygulama sonrası histonlardaki toplam asetilasyon seviyelerinin katlık artış grafiği. Her bir veri noktası 3 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir.

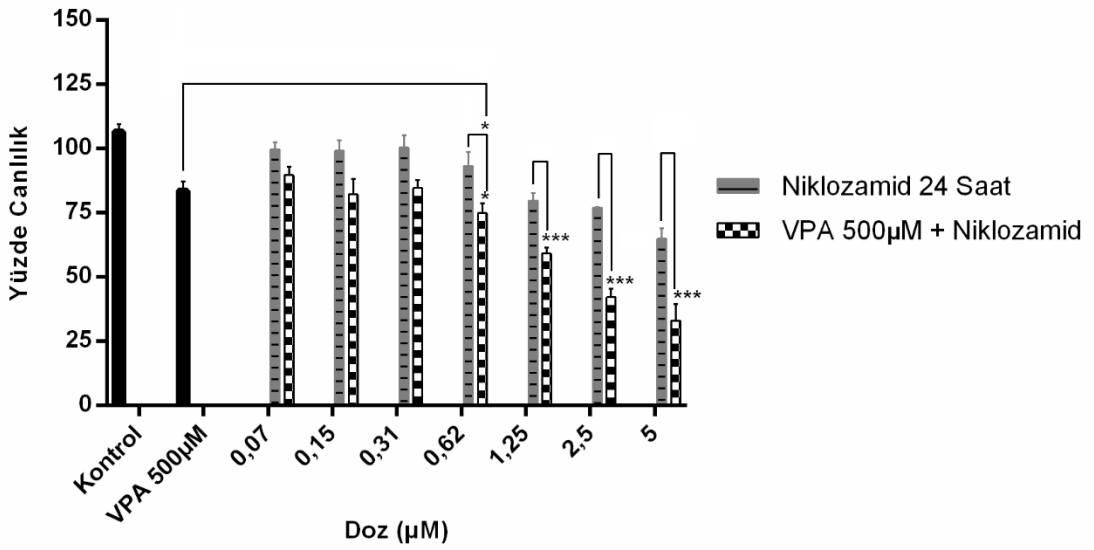
4.2.1. VPA ve Niklozamid Kombinasyon Uygulamasının SRB Canlılık Testi Bulguları

SRB canlılık testi ve toplam histon asetilasyonu sonuçlarına göre, VPA'nın 72 saatlik tedavi sonrası 500 µM dozu seçilerek niklozamidin farklı konstantrasyonları (5-0,07 µM) ile kombine edilmiştir (Şekil 4.2.1). Kombinasyon uygulamasında, VPA 500 µM konstantrasyonunda 48 saat uygulanması sonrası kuyudan çekilmeden niklozamidin farklı konstantrasyonları ile 24 saat muamele edildimiştir. Sonuç olarak hücrelere 72 saat boyunca VPA tedavisi uygulanmıştır. A549 ve H1299 hücrelerinde ki kombinasyon çalışmasının SRB canlılık testi sonuçlarına göre, niklozamidin 5-2,5 ve 1,25 µM konstantrasyonları ile yapılan kombinasyon uygulamasında bileşiklerin tek başlarına ve kontrole oranla hücre canlılığında anlamlı azalmalar gözlemlendi ($p < 0,001$) (Şekil 4.2.1).

A549 Kombinasyon SRB Testi Sonuçları



H1299 Kombinasyon SRB Testi Sonuçları



Şekil 4.2.1. A549 ve H1299 hücre soyunda VPA ve niklozamid farklı konsantrasyonları ile kombinasyon uygulamasının SRB testi sonrası alınan canlılık yüzdelerinin grafiği. Her bir veri noktası 3 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir. Kombinasyon uygulamasında, VPA 500 µM 48 saat uygulama sonrası kuyudan çekilmeden niklozamidin farklı konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilmiştir. *Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre farklı dozlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (*: $p < 0,05$ **: $p < 0,01$ ***: $p < 0,001$) ifade etmektedir.

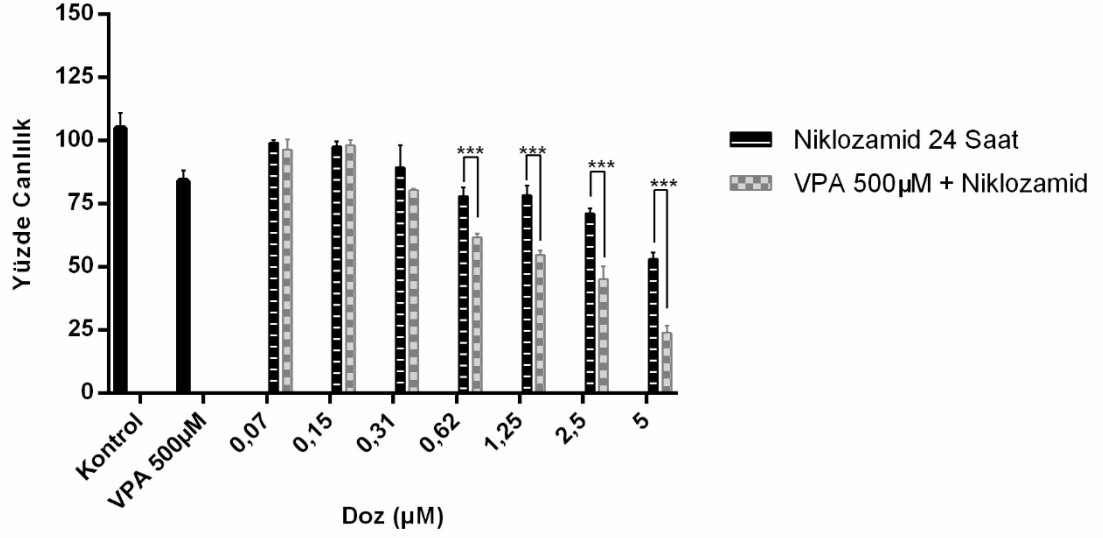
4.2.2. VPA ve Niklozamid Kombinasyon Uygulamasının ATP Canlılık Testi Bulguları

ATP canlılık testi ile hücrelerde canlılığın bir göstergesi olan intrasellüler ATP miktarı belirlendi. A549 ve H1299 akciğer kanseri hücrelerine 48 saat boyunca 500 μM konsantrasyonunda VPA tedavisi sonrası, VPA kuyudan uzaklaştırılmadan Niklozamid farklı konsantrasyonları ile (0,078–5 μM) 24 saat boyunca kombinasyon tedavisi uygulandı ve hücre canlılığı üzerine etkisi ATP testi ile belirlendi.

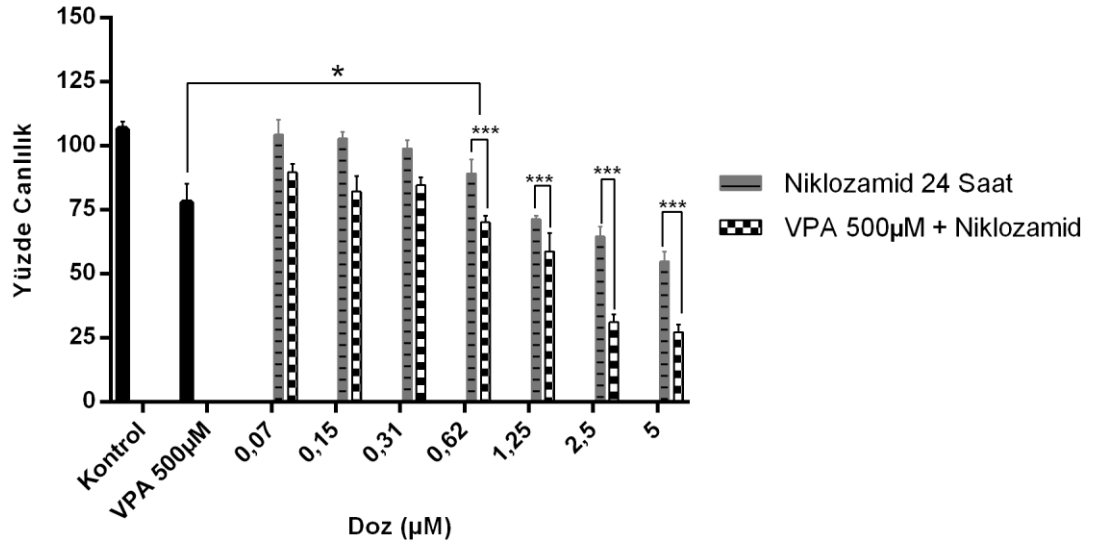
ATP canlılık testi SRB testine göre daha hassas bir metod olduğu için hem bileşiklerin tek başına hemde kombinasyonlarının hücre canlılığı değerleri ATP testinde daha düşük bulundu (Şekil 4.2.2).

A549 ve H1299 hücrelerinde ki kombinasyon çalışmasının ATP canlılık testi sonuçlarına göre, niklozamidin 5-0,62 μM konsantrasyonları ile yapılan kombinasyon uygulamasında bileşiklerin tek başlarına ve kontrole oranla hücre canlılığında anlamlı azalmalar gözlemlendi ($p<0,05$, $p<0,001$). Fakat her iki hücrede de 0,62 μM dozuyla yapılan kombinasyon uygulamasında, VPA 500 μM konsantrasyonuna kıyasla hücre canlılığında azalmanın daha az olduğu belirlendi ($p<0,05$) (Şekil 4.2.2.).

A549 Kombinasyon ATP Testi Sonuçları



H1299 Kombinasyon ATP Testi Sonuçları

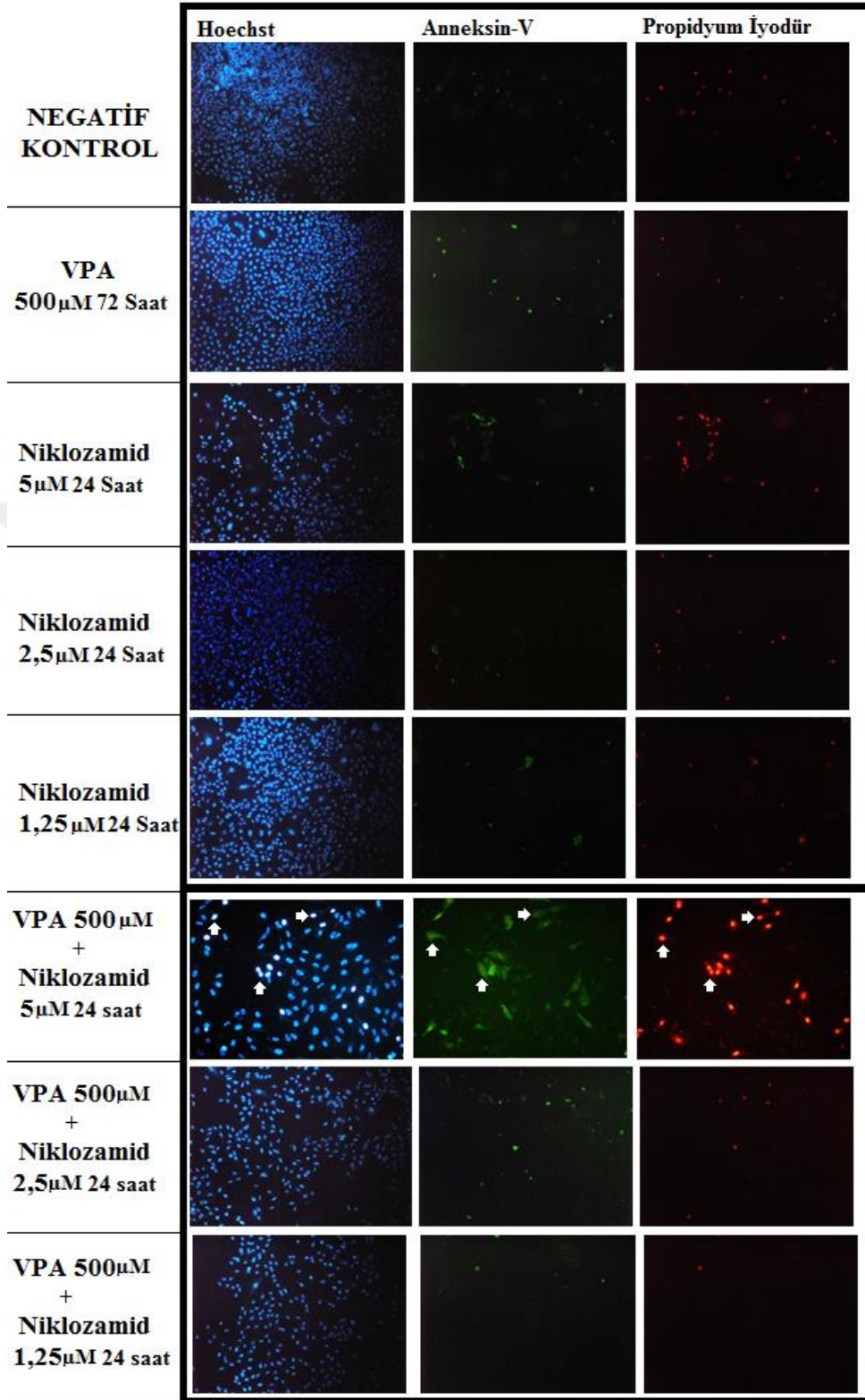


Şekil 4.2.2. A549 ve H1299 hücre soyunda valproik asit (VPA) 500 µM ve niklozamid farklı konsantrasyonları ile kombinasyon uygulamasının bileşiklerin tek başlarına etkilerinin ATP testi sonrası canlılık yüzdelerinin grafiği. Her bir veri noktası 3 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir. Kombinasyon uygulamasında, VPA 500µM 48 saat uygulama sonrası kuyudan çekilmeden niklozamidin farklı konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilmiştir. *Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre farklı dozlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (* p<0,05 **:p<0,01 ***:p<0,001) ifade etmektedir.

4.3. Anneksin-V, Propidyum İyodür ve Hoechst Boyama Yöntemi Sonuçları

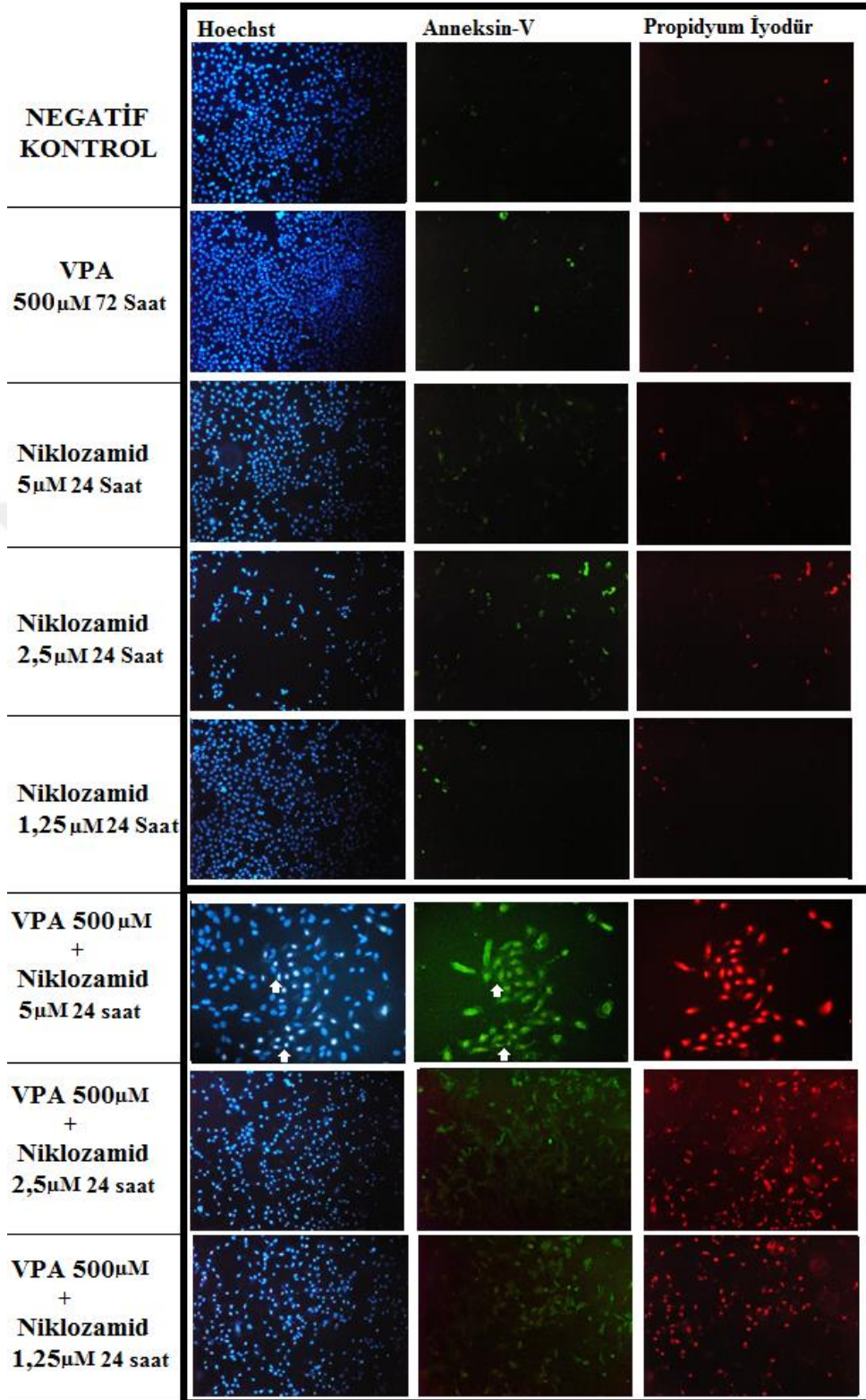
Anneksin-V, apoptozisin erken dönemlerinde hücrenin dış yüzeyine transloke olan PS'ye bağlanabilen bir proteindir ve floresan bir madde ile işaretlendiğinde apoptotik hücreler görünür hale getirilerek floresan mikroskobu ile incelenir. Ayrıca nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de Anneksin-V bağlanması görülebildiği için yöntem çalışılırken ikinci boya olarak propidyum iyodür eklenmektedir. Hücreler Anneksin-V Fluorescein (yeşil floresan) ve non-vital boya olan propidyum iyodür (kırmızı floresan) ile eş zamanlı olarak boyandığında; canlı hücreler Annexin-V negatif/ PI negatif, erken apoptotik hücreler Annexin-V pozitif/PI negatif ve geç apoptotik veya nekrotik hücreler Anneksin-V pozitif/PI pozitif sonuç verir. A549 ve H1299 hücrelerine valproik asidin toksik olmayan dozunda (500 µM) 72 saat ve niklozamid farklı konsantrasyonları (1,25-5 µM) ile 24 saat ilaç uygulamasını takiben üçlü boyama yöntemi (Hoechst 33342+Anneksin-V+PI) uygulanarak floresan mikroskop altında değerlendirme yapıldı. Aynı zamanda yapılacak olan kombinasyon çalışmaları için 48 saat boyunca 500 µM VPA tedavisi sonrası niklozamid farklı konsantrasyonları ile (1,25–5 µM) 24 saat boyunca kombinasyon tedavisi uygulandı ve ilaç uygulamasını takiben üçlü boyama yöntemi (Hoechst 33342+Anneksin-V+PI) uygulanarak floresan mikroskop altında değerlendirme yapıldı.

A549 hücre soylarında VPA 72 saat toksik olmayan dozu olan 500 µM dozunda uygulama sonucu kontrole oranla hücre yoğunluğunda bir azalma gözlenmedi. Niklozamidin farklı konsantrasyonları olan 1,25- 2,5 ve 5 µM dozlarında 24 saat uygulama sonucu kontrole oranla hücre yoğunluğunda azalma ve özellikle 5 µM dozunda apoptozise özgü olan piknozis yani nükleusun kontrole kıyasla küçüldüğü gözlemlendi (Şekil 4.3.1). Kombinasyon tedavisinde ise, kontrole ve niklozamidin tek başına etkisine oranla hücre yoğunluğunda daha fazla bir azalma gözlemlendi. Mikroskobik sonuçların canlılık testi sonuçlarımızı desteklediği görüldü. Ayrıca 5 µM niklozamid ile 500 µM VPA kombinasyon tedavisinde Anneksin-V ve PI boyaması sonuçlarının pozitif sonuç verdiği yani hücrelerin geç apoptoz ile öldüğü gözlemlendi (Şekil 4.3.1).



Şekil 4.3.1. Valproik asit (VPA), niklozamid ve kombinasyon tedavisinin A549 hücrelerinde floresan mikroskop görüntüleri. Beyaz ok: Piknotik veya kondanse nukleus. Kombinasyon uygulamasında, VPA 500 µM 48 saat uygulama sonrası kuyudan çekilmeden niklozamidin farklı konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilmiştir.

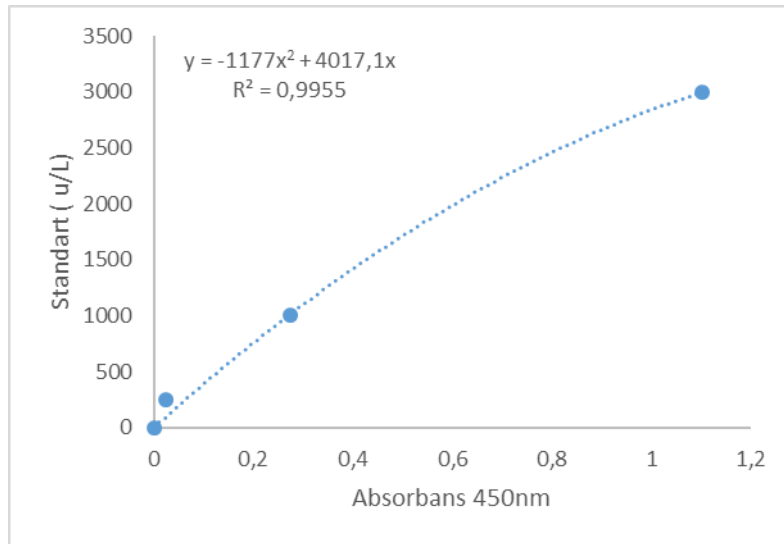
H1299 hücre soylarında, VPA'nın 72 saat toksik olmayan dozu olan 500 μ M dozunda beklenildiği gibi kontrole oranla hücre yoğunluğunda bir azalma gözlenmedi. Niklozamidin farklı konsantrasyonları olan 1,25, 2,5 ve 5 μ M dozlarında 24 saat uygulama sonucu kontrole oranla hücre yoğunluğunda azalma ve özellikle 5 μ M dozunda apoptozise özgü olan piknozis yani nükleusun kontrole kıyasla küçüldüğü gözlendi (Şekil 4.3.2). Kombinasyon tedavisi uygulamasında ise; kontrole ve niklozamidin tek başına etkisine oranla hücre yoğunluğunda azalma, Anneksin-V pozitif/PI pozitif boyanan hücre yoğunluğu gözlendi. Özellikle 500 μ M dozunda 48 saat VPA uygulaması sonrası 24 saat niklozamid (5 μ M) kombinasyon tedavisinde, Anneksin-V pozitif/PI pozitif hücre yoğunluğunun fazla olduğu yani hücrelerin geç apoptoz veya nekroz ile öldüğü gözlendi. Niklozamid 2,5 μ M ve 1,25 μ M kombinasyon tedavi sonrası ise Anneksin-V(+)/PI(+) boyaması sonuçlarının pozitif sonuç verdiği hücrelere ek olarak Anneksin-V(-)/PI(+) boyanan hücreler görüldü (Şekil 4.3.2). Bu hücrelerin nekroz ile öldüğü söylenebilir.



Şekil 4.3.2. Valproik asit (VPA), niklozamid ve kombinasyon tedavisinin H1299 hücrelerinde floresan mikroskop görüntüleri. Kombinasyon uygulamasında, VPA 500 µM 48 saat uygulama sonrası kuyudan çekilmeden niklozamidin farklı konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilmiştir. Beyaz ok: Piknotik veya kondanse nukleus; Sarı ok: Anneksin-V, pozitif PI pozitif alanları göstermektedir.

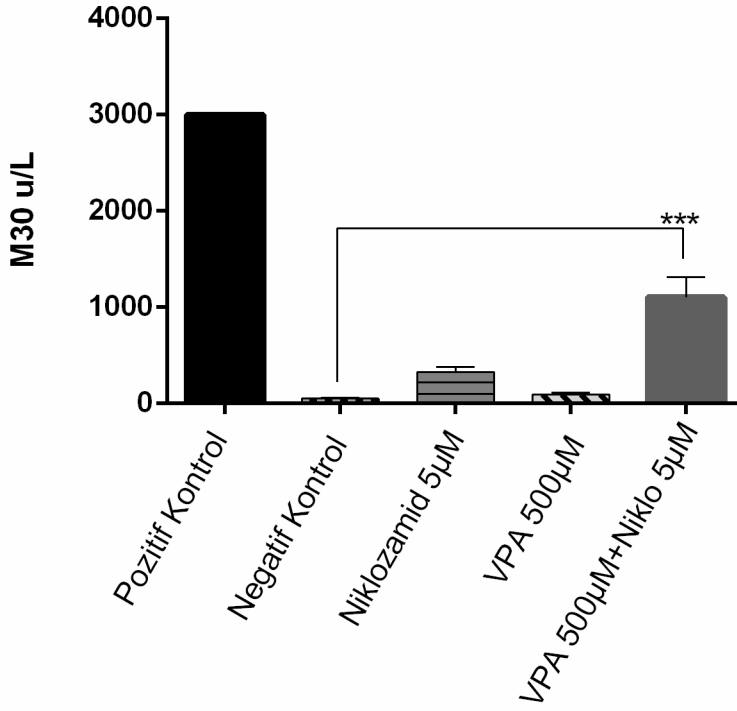
4.4. M30 Antijen (Kaspazla Kırılmış Sitokeratin 18) Bulguları

VPA 500uM dozunda 48 saat tedavi sonrası niklozamidin 5uM dozu ile 24 saat kombinasyon tedavisinin hücreler üzerinde kontrole ve bileşiklerin tek başlarına kullanımına oranla sitotoksik aktivite gösterdiği belirlendikten sonra hücre ölüm modunu araştırmak amacıyla apoptozise özgü bir belirteç olan kaspazla-kırılmış CK18 (M30) düzeylerine bakıldı. M30-Antijen ölçümlerinin değerlendirilmesi için standart eğri grafiği hazırlandı. A549 ve H1299 hücreleri ile yapılan çalışmanın standart eğri grafiği Şekil 4.4.1'te gösterilmiştir. Ölçülen absorbanslar standart eğri grafiği yardımıyla belirlenen formüller üzerinden değerlendirilerek M30 miktarları U/L cinsinden hesaplandı. A549 hücre soyunda kombinasyon tedavisinin VPA ve niklozamidin tek başlarına etkilerine oranla M30 antijen (kırılmış sitokeratin-18) miktarında artışa neden olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.4.2). Apoptosis sırasında hücre dışı bileşenlerin parçalanmasını sağlayan kaspazların, özellikle de kaspaz-3 ve kaspaz-7'nin aktivasyonu gerçekleşir. Aktif kaspaz 3/7 tarafından parçalanılan proteinlerden biri, epitelyal hücre dokusunda yüksek seviyede eksprese edilen bir protein olan sitokeratin 18'dir. A549 hücre soyunda kırılmış sitokeratin 18'e bağlanan M30 antijen seviyesinde ki istatistiksel olarak anlamlı artış, kombinasyon tedavisinde apoptozisin varlığını göstermektedir. H1299 hücre soyunda sitokeratin 18 ekspresyonu olmadığından bu çalışmada kullanılamamıştır.



Şekil 4.4.1. M30 (Kaspazla Kırılmış Sitokeratin 18) Standart Eğri Grafiği

A549 M30 Grafiği



Şekil 4.4.2. M30 (kaspazla kısılmış sitokeratin 18) bulguları.

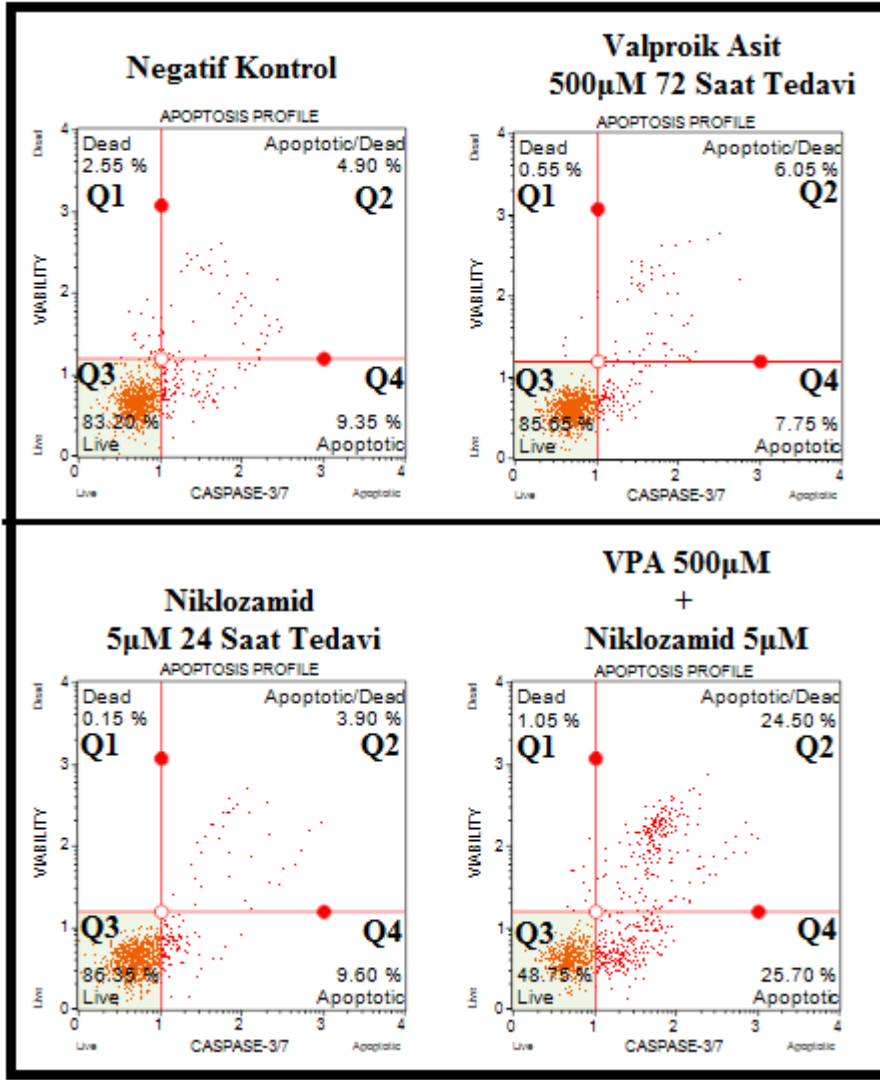
4.5. Kaspaz-3/7 Aktivitesi Bulguları

Kaspazlar, apoptozis sürecinde önemli rollere sahip olan sistein proteazlardır. Apoptotik sinyal boyunca etkili olan efektör kaspazlardan olan kaspaz 3/7 aktivasyonu membran integritesi ve hücre ölümü hakkında önemli bilgiler vermektedir.

A549 ve H1299 hücrelerine VPA 500 µM dozunda 72 saat, niklozamid 5 µM dozunda 24 saat ve kombinasyon tedavisi için 48 saat boyunca 500 µM VPA tedavisi sonrası Niklozamid 5 µM dozunda 24 saat uygulama sonrasında sonrasında Muse cell analyzer cihazı kullanılarak kaspaz-3/7 aktivitesi incelendi (Şekil 4.5.1 ve 4.5.2).

VPA (500 µM, 72 saat) uygulaması sonrasında A549 hücre soyunda canlılık oranının % 85.65 (Q3) total apoptotik oran yüzdesinin (kaspaz 3/7 aktivitesi) %13.80 (Q2+Q4) olduğu belirlendi. Benzer şekilde, tek başına niklozamid (5 µM, 24 saat) uygulaması sonrasında canlılık yüzdesi % 86.35 (Q3), total apoptotik oran yüzdesi %13.5 (Q2+Q4) olduğu gözlemlendi. Alınan sonuçlar da kontrol, VPA ve niklozamid tedavilerinin kaspaz 3/7

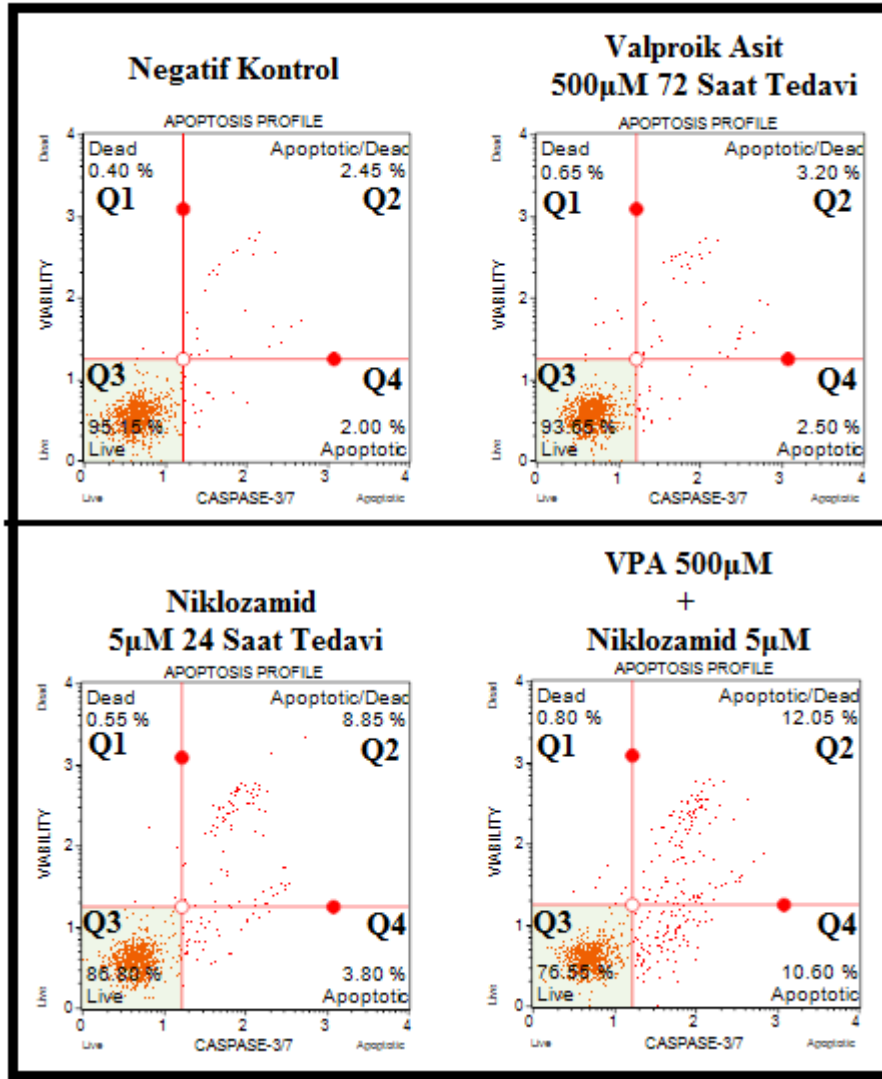
aktivitesinde herhangi bir artışa neden olmadığı belirlendi. VPA ve niklozamid kombinasyon tedavisinde ise canlılık yüzdesi % 48.75 (Q3), total apoptotik oran yüzdesi % 50.02 (Q2+Q4) ile kontrole oranla kaspaz 3/7 aktivitesinde belirgin artış bulundu (Şekil 4.5.1). Kombinasyon tedavisinde hücrelerin bir kısmının apoptoza (geç apoptozis) gittiğini yani floresan bulgularımızı destekler niteliktedir.



Şekil 4.5.1. A549 hücrelerinde kaspaz 3/7 aktivitesi değerlendirilmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 48 saatlik histogramları (Q1=Nekroz, Q2=Geç Apoptoz, Q3=% Canlılık, Q4=Erken Apoptoz).

H1299 hücrelerinde ise VPA (500 µM, 72 saat) tedavisi sonrasında canlılık yüzdesi % 93.55 (Q3), total apoptotik oran yüzdesi % 6.0 (Q2+Q4) ile canlılık yüzdesinde ve apoptotik oran yüzdesinde kontrole göre değişim olmadığı yani kaspaz 3/7 aktivitesinde

değişim görülmedi. Niklozamid (5 μ M, 24 saat) uygulaması sonrasında canlılık yüzdesi % 85.80 (Q3), total apoptotik oran yüzdesi % 12.65 (Q2+Q4) olduğu ve kaspaz 3/7 aktivitesinde kontrole oranla yüksek oranda bir artışa neden olmadığı belirlendi. VPA ve niklozamid kombinasyon tedavisinde ise canlılık yüzdesi % 76.56 (Q3), total apoptotik oran yüzdesi (kaspaz 3/7 aktivitesi) % 22.65 (Q2+Q4) olarak bulundu. Kombinasyon tedavisinde kaspaz 3/7 aktivitesinin kontrole ve niklozamidin tek başına uygulamasına oranla yaklaşık %10'luk bir artış görüldü (Şekil 4.5.2). Kombinasyon tedavisinde H1299 hücrelerin çoğunluğunun nekroptozla gittiğini desteklemektedir.



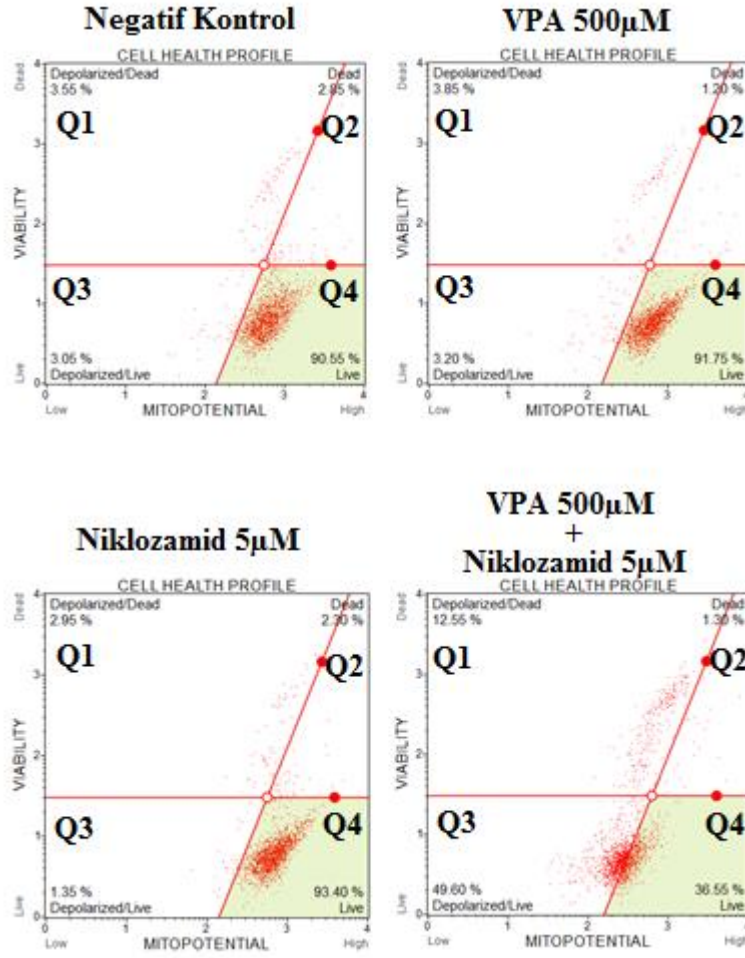
Şekil 4.5.2. H1299 hücrelerinde kaspaz 3/7 aktivitesi değerlendirilmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 48 saatlik histogramları (Q1=Nekroz, Q2=Geç Apoptoz, Q3=% Canlılık, Q4=Erken Apoptoz).

4.6. Mitokondri Membran Potansiyeli Testi

Mitokondri membran potansiyeli değişikliği erken apoptozis sürecinde görülen ve aynı zamanda hücrel stresin bir özelliği olarak düşünölmektedir. Mitokondri, hücrenin enerji dengesini korumak ve hücre ölüm süreçlerinde düzenleyici (regölatör) olarak görev yapan önemli bir hücre organelidir. Bu potansiyelin kaybı apoptozis, nekrozis ve kaspaz bağımsız hücre ölüm süreçlerinde görölebilmektedir.

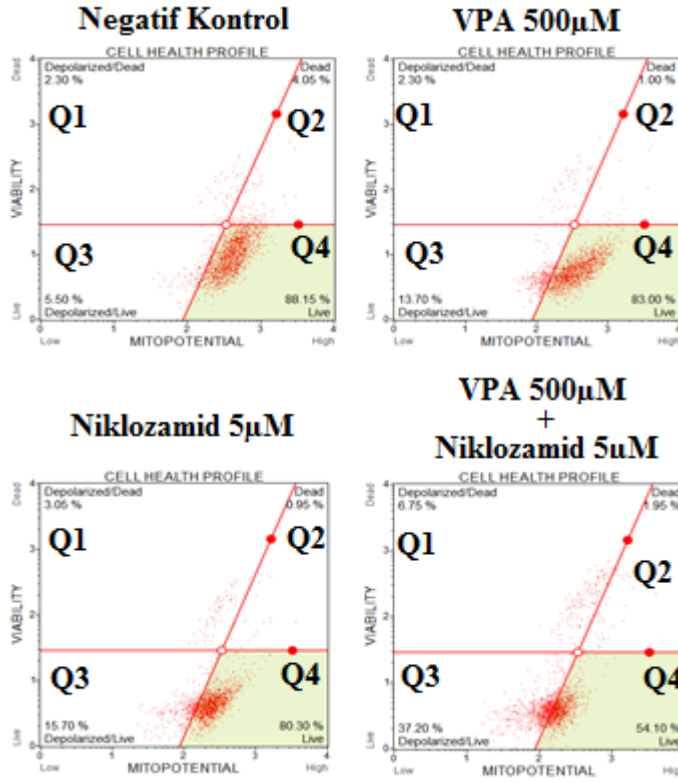
A549 ve H1299 hücrelerine VPA (500 µM, 72 saat), niklozamid (5 µM, 24 saat) ve kombinasyon tedavisi (48 saat 500 µM VPA tedavisi sonrası, 24 saat 5 µM Niklozamid) sonrasında Muse cell analyzer cihazı kullanılarak mitokondri membran potansiyeli değişiklikleri incelendi.

A549 hücre soyunda, VPA (500 µM, 72 saat) ve niklozamid (5 µM, 24 saat) uygulaması mitokondrisi depolarize olan hücrelerin yüzdesinde kontrole göre önemli değişiklikler gözlenmedi. Kontrol hücrelerinde mitokondrisi depolarize olan hücrelerin total yüzdesi % 6,6 (Q1+Q3), VPA % 7,05 (Q1+Q3) ve niklozamid uygulamasında % 4,3 (Q1+Q3) olarak belirlendi. Kombinasyon tedavisinde ise mitokondrisi depolarize olan hücrelerin total yüzdesi % 62,15 (Q1+Q3) olduğu gözlendi. Kombinasyon tedavisinde depolarize olan hücrelerin yüzdesinde kontrole ve ilaçların tek başına kullanımlarına göre anlamlı düzeyde bir artış belirlendi (Şekil 4.6.1).



Şekil 4.6.1. A549 hücrelerinde Valproik asit (VPA), niklozamid ve kombinasyon tedavisinin mitokondri membran potansiyelindeki değişimi yüzde değerlerinin histogramları (Q1=Depolarize/Ölü, Q2= Ölü, Q3=Depolarize/Canlı, Q4=Canlı).

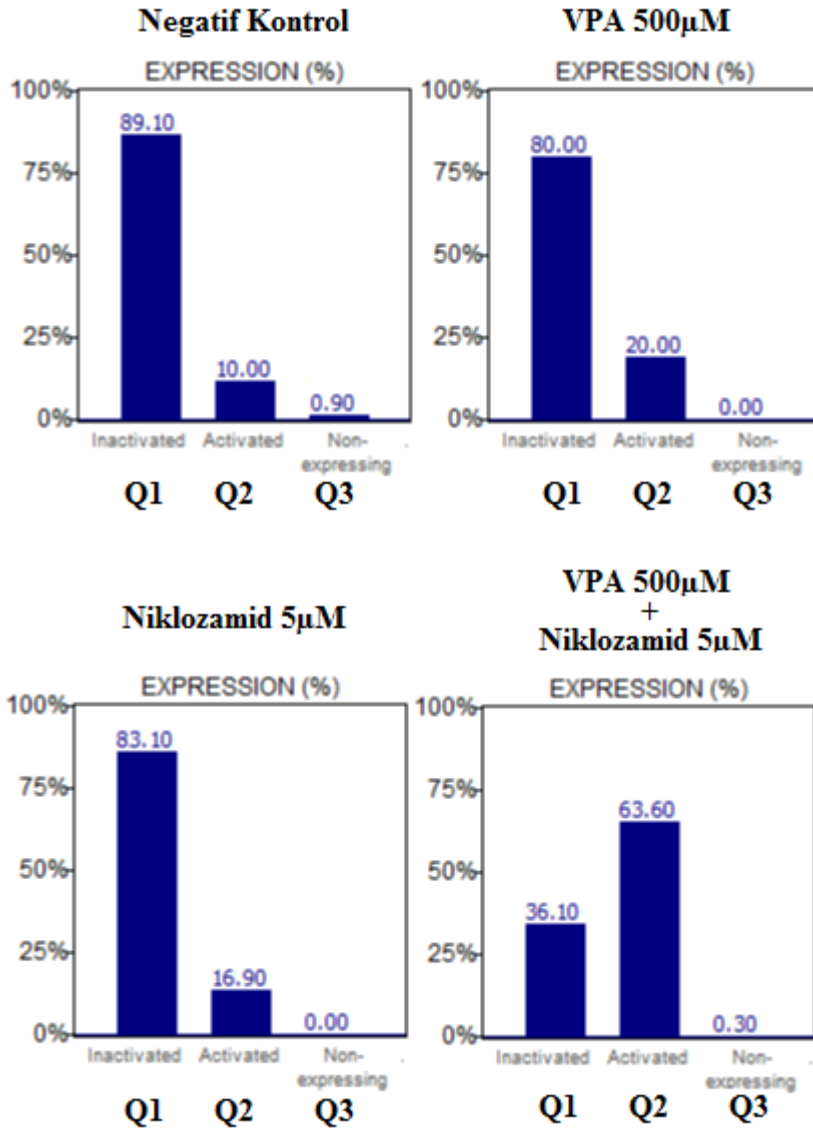
H1299 hücre soyunda ise kontrole kıyasla, VPA (500 µM, 72 saat) uygulamasında mitokondrisi depolarize olan hücrelerin total yüzdesi % 16 (Q1+Q3); niklozamid (5 µM, 24 saat) uygulamasında % 18,75 (Q1+Q3) olduğu ve kontrole (% 7,80; Q1+Q3) oranla az bir artış olduğu gözlemlendi. Kombinasyon tedavisi sonrasında ise depolarize olan hücrelerin yüzdesi % 43,95 (Q1+Q3) ile kontrole oranla bileşiklerin tek başlarına etkilerine kıyasla mitokondri membran potansiyelinde anlamlı düzeyde bir artış bulundu (Şekil 4.6.2).



Şekil 4.6.2. H1299 hücrelerinde Valproik asit (VPA), niklozamid ve kombinasyon tedavisinin mitokondri membran potansiyelindeki değişimi yüzde değerlerinin histogramları (Q1=Depolarize/Ölü, Q2= Ölü, Q3=Depolarize/Canlı, Q4=Canlı).

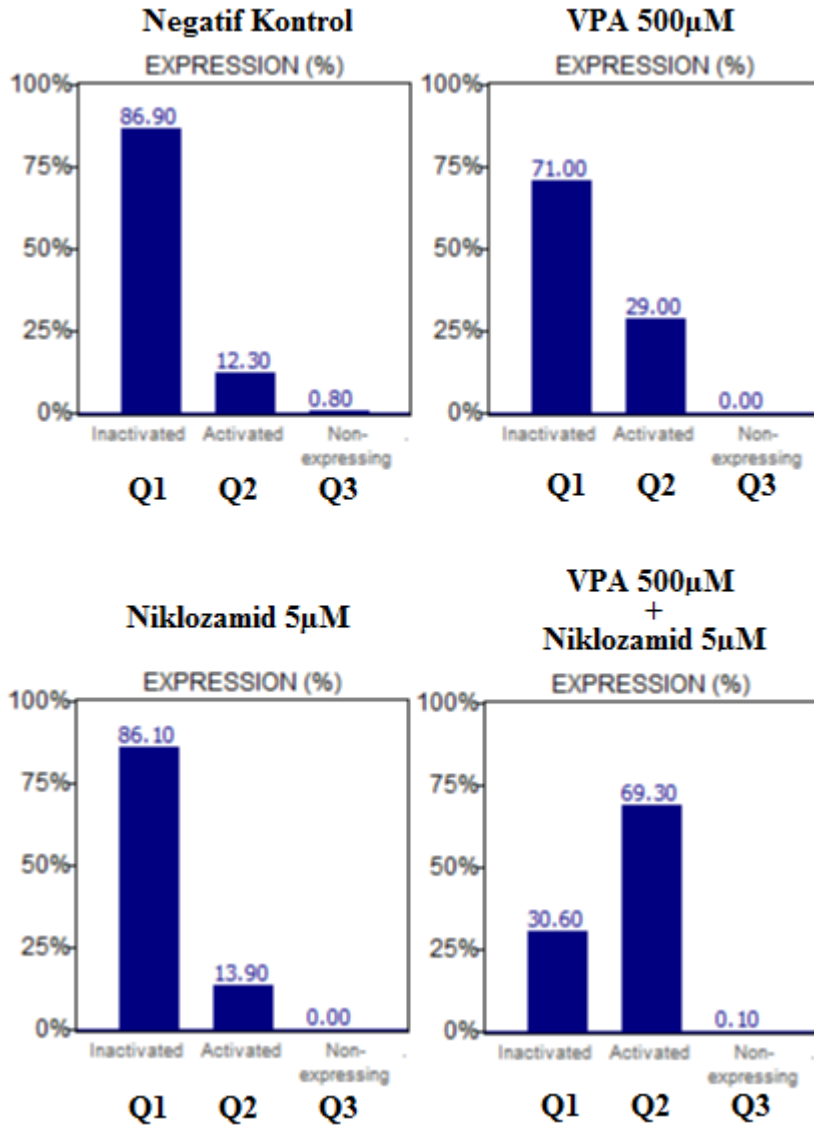
4.7. DNA Hasarının Belirlenmesi

γ H2AX'nin ekspresyonu DNA çift zincir kırıklarının tespitinde hassas bir belirteçdir. Akım sitometrisinde p- γ H2AX'nin değerlendirilmesi sonucu A549 hücre soyunda VPA 500 μ M 72 saat uygulama sonrası % 20 (Q2) DNA hasarına neden olduğu bulundu. 24 saat boyunca niklozamid 5 μ M dozunda uygulama sonrası kontrole oranla % 16,90'luk (Q2) bir DNA hasarına neden olduğu görüldü. Fakat kombinasyon tedavisi sonucu bileşiklerin tek başlarına etkilerine oranla DNA hasarında artış olduğu ve bu artışın % 63.60 (Q2) olduğu tespit edildi (Şekil 4.7.1).



Şekil 4.7.1. A549 hücrelerinde p-γH2AX yüzde değerlerinin histogramı (Q1= γH2AX, Q2= p-γH2AX, Q3= γH2AX ekspresse etmeyen)

H1299 hücre soyunda ise VPA 500 μM 72 saat uygulama sonrası % 29 (Q2) DNA hasarına neden olduğu bulundu. 24 saat boyunca niklozamid 5μM dozunda uygulama sonrası % 13,90'lık (Q2) bir DNA hasarına neden olduğu görüldü. Fakat kombinasyon tedavisi sonucu bileşiklerin tek başlarına etkilerine oranla DNA hasarında artış olduğu ve bu artışın % 69,30 (Q2) olduğu tespit edildi (Şekil 4.7.2).



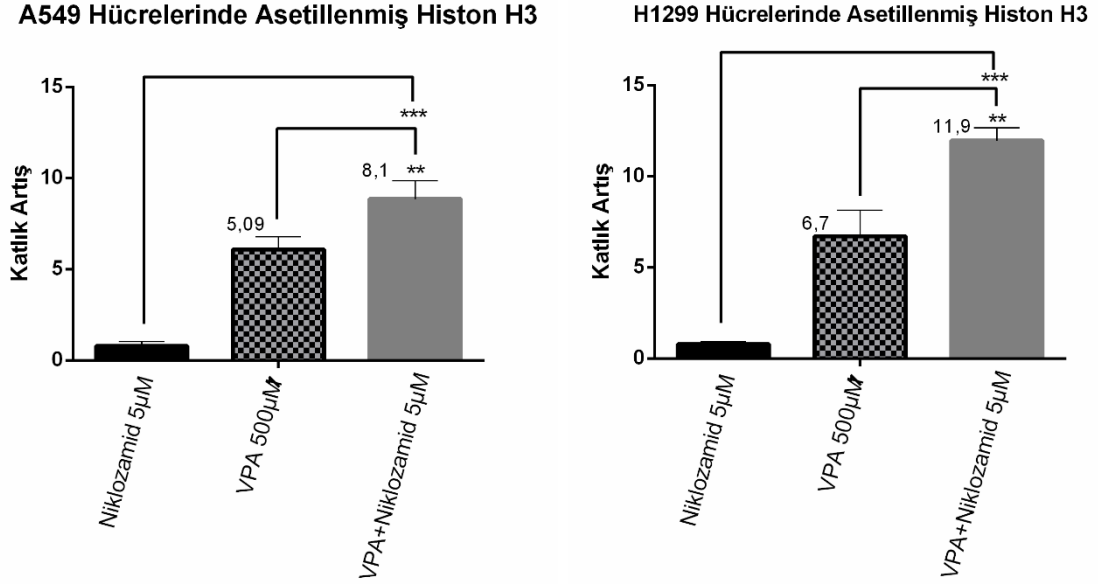
Şekil 4.7.2. H1299 hücrelerinde p-γH2AX yüzde değerlerinin histogramı (Q1= γH2AX, Q2= p-γH2AX, Q3= γH2AX ekspres etmeyen)

4.8. Kombinasyon Uygulamasının Histon Asetilasyon Seviyelerine Etkisinin Belirlenmesi

A549 ve H1299 hücre soylarında VPA, niklozamid ve kombinasyon tedavisi uygulanması sonucu toplam histonlarda ki toplam asetilasyon seviyeleri ELISA yöntemiyle belirlendi. VPA ve niklozamid kombinasyon tedavisinin histonlarda asetilasyon seviyelerinde artışa neden olduğu görüldü

A549 hücre soyunda VPA 500 μM 48 saat ön tedavi sonrası 24 saat boyunca niklozamid 5 μM dozu ile uygulanan kombinasyon tedavisi sonrası, VPA 500 μM dozuna göre 4,51

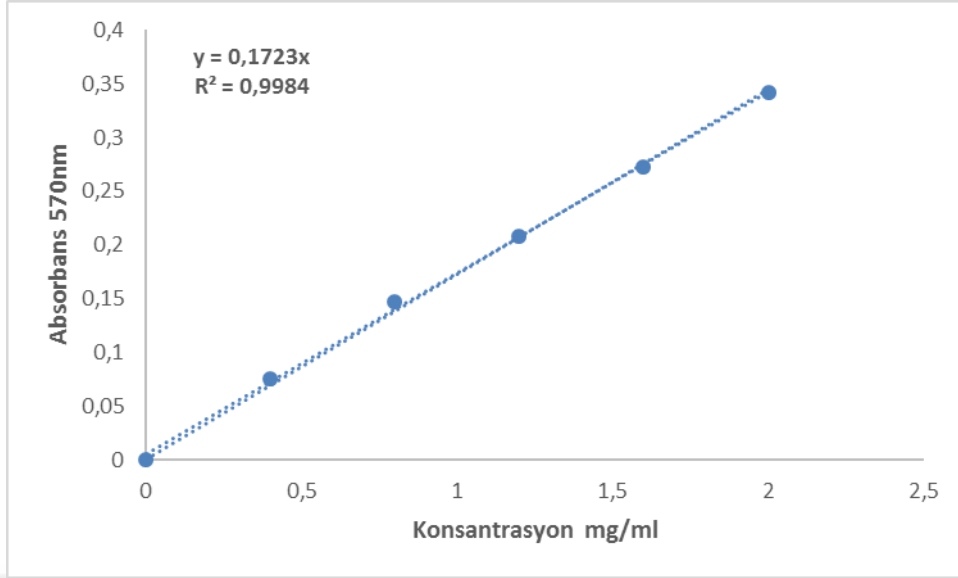
kat bir artış belirlendi (Şekil 4.8.1). H1299 hücrelerinde ise bu oranın 11,12 olduğu bulundu (Şekil 4.8.1).



Şekil 4.8.1. A549 ve H1299 hücrelerinde toplam histon asetilasyon seviyeleri. Herbir veri iki bağımsız deneyin ortalamasını ifade etmektedir.

4.9. Western Blot Bulguları

A549 ve H1299 hücrelerinde niklozamid, VPA ve kombinasyon tedavisi sonrası elde edilen lizatlardan protein konsantrasyonlarını belirlemek üzere BSA kullanılarak bir standart bir standart eğri grafiği hazırlandı (Şekil 4.9.1). Örneklerin protein konsantrasyonları bu grafikten elde edilen formül yardımıyla hesaplandı (Çizelge 2.2).

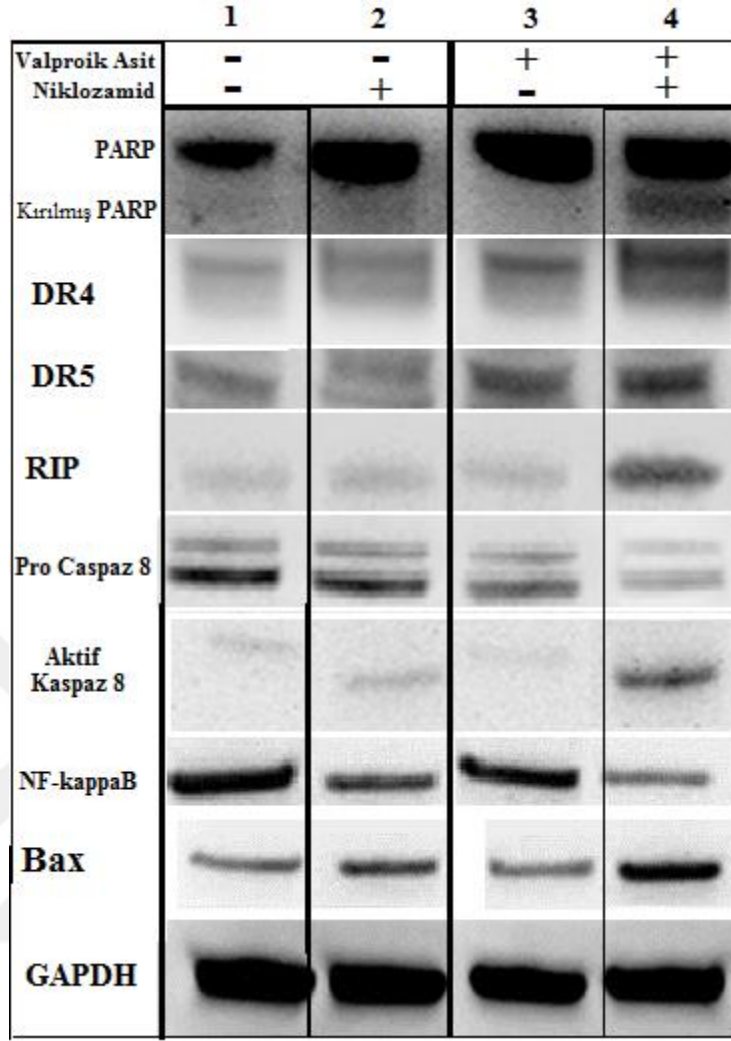


Şekil 4.9.1. BSA standart eğri grafiği

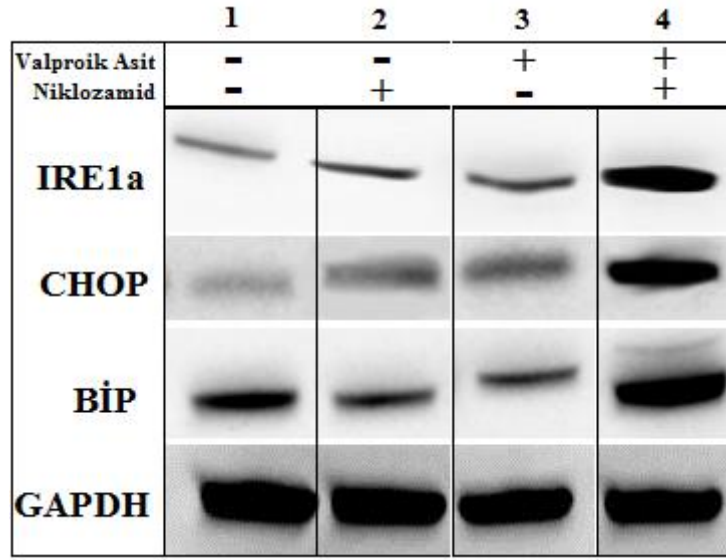
Çizelge 2.2. BSA sonuçlarına göre hesaplanan örneklerin protein konsantrasyonları (mg/ml)

	A549	H1299
Negatif Kontrol	6,030	8,013
Niklozamid 5µM	4,515	4,267
Valproik Asit + Niklozamid	3,378	3,489
Valproik Asit 500 µM	6,309	9,915

A549 hücre soyunda, Şekil 4.9.2.1 ve Şekil 4.9.2.2’de görülen western blot sonuçlarına göre, kombinasyon tedavisinde; TNFR aracılı apoptozis belirteci olarak incelenen kırılmış RİP, aktif kaspaz-8, , kırılmış PARP ve TRAIL aracılı apoptozis belirteci DR4 ve DR5 düzeyleri kontrolle ve bileşiklerin tek başlarına etkilerine göre kıyaslandığında belirgin artışlar görüldü. Ayrıca TNFR ve TRAIL aracılı apoptozisde yaşam yolağı olarak görev gören NF-κB protein düzeylerinde de azalma belirlendi. ER stres belirteci olan IRE1-α, BİP ve CHOP protein ifade düzeylerinde de artışlar belirgindir.

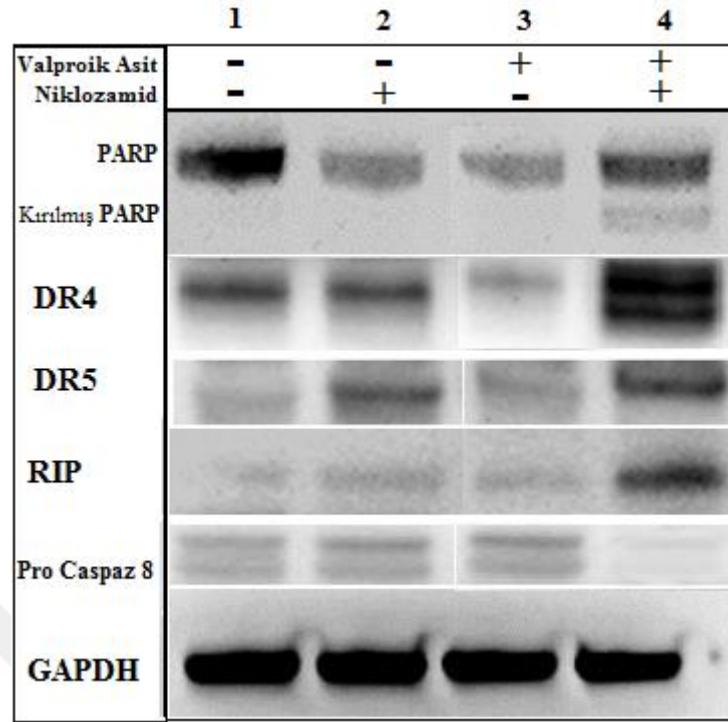


Şekil 4.9.2.1. A549 hücrelerinde, Niklozamid 5 µM, Valproik asit 500 µM ve kombinasyon tedavisi sonrası TNFR aracılı apoptozisde görevli protein düzeylerindeki değişimler. GAPDH yükleme kontrolü olarak kullanıldı. 1. Kontrol; 2. Niklozamid 5 µM 24 saat; 3. Valproik asit 500 µM 72 saat; 4. Kombinasyon (Valproik asit 500 µM + Niklozamid 5 µM).

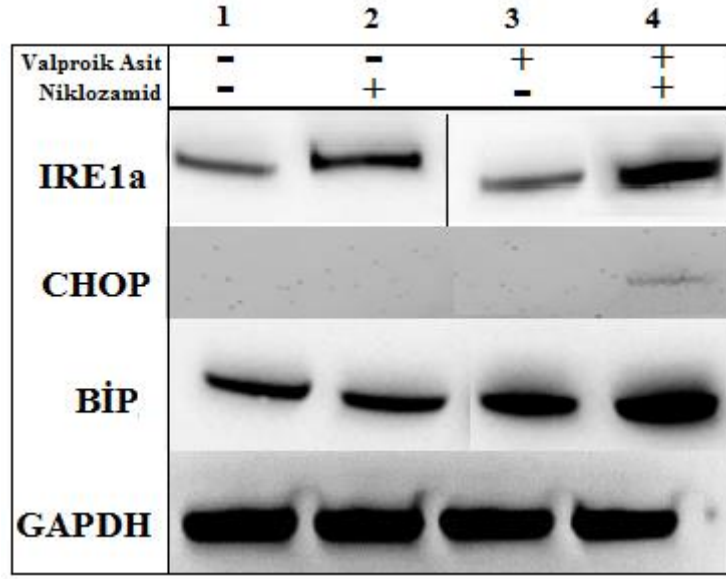


Şekil 4.9.2.2. A549 hücrelerinde, Niklozamid 5 µM, Valproik asit 500 µM ve kombinasyon tedavisi sonrası ER stres belirleyici IRE1-α, BİP ve CHOP protein düzeylerindeki değişimler. GAPDH yükleme kontrolü olarak kullanıldı. 1. Kontrol; 2. Niklozamid 5 µM 24 saat; 3. Valproik asit 500 µM 72 saat; 4. Kombinasyon (Valproik asit 500 µM + Niklozamid 5 µM).

H1299 hücre soyunda, Şekil 4.9.3.1 ve Şekil 4.9.3.2’de görülen western blot sonuçlarına göre, kombinasyon tedavisinde; TNFR aracılı nekroptosis belirteci olarak incelenen kırılmış RİP, Pro-kaspaz-8, DR4, DR5 ve kırılmış PARP düzeyleri kontrolle ve bileşiklerin tek başlarına etkilerine göre kıyaslandığında belirgin artışlar görüldü. Ayrıca ER stres belirteci olan IRE1-α, BİP ve CHOP protein ifade düzeylerinde de artışlar belirgindir.

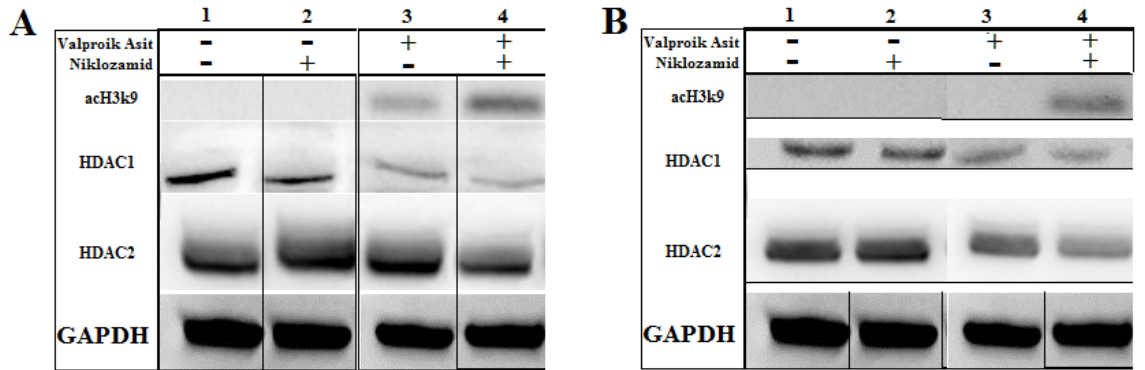


Şekil 4.9.3.1. H1299 hücrelerinde, Niklozamid 5 µM, Valproik asit 500 µM ve kombinasyon tedavisi sonrası TNFR aracılı nekroptosis ile ilişkili proteinlerin bant profilleri. GAPDH yükleme kontrolü olarak kullanıldı. 1. Kontrol; 2. Niklozamid 5 µM 24 saat; 3. Valproik asit 500 µM 72 saat; 4. Kombinasyon (Valproik asit 500 µM + Niklozamid 5 µM).



Şekil 4.9.3.2. H1299 hücrelerinde, Niklozamid 5 μ M, Valproik asit 500 μ M ve kombinasyon tedavisi sonrası ER stres belirleyici IRE1- α , Bip ve CHOP protein düzeylerindeki değişimler. GAPDH yükleme kontrolü olarak kullanıldı. 1. Kontrol; 2. Niklozamid 5 μ M 24 saat; 3. Valproik asit 500 μ M 72 saat; 4. Kombinasyon (Valproik asit 500 μ M + Niklozamid 5 μ M).

VPA ve niklozamid kombinasyon tedavisinin A549 ve H1299 hücrelerinde valproik asidin tek başına kullanımına oranla histon deasetilaz inhibitörü etkisinin güçlü bir şekilde arttırıldığı görülmüştür (Şekil 4.9.4.1).

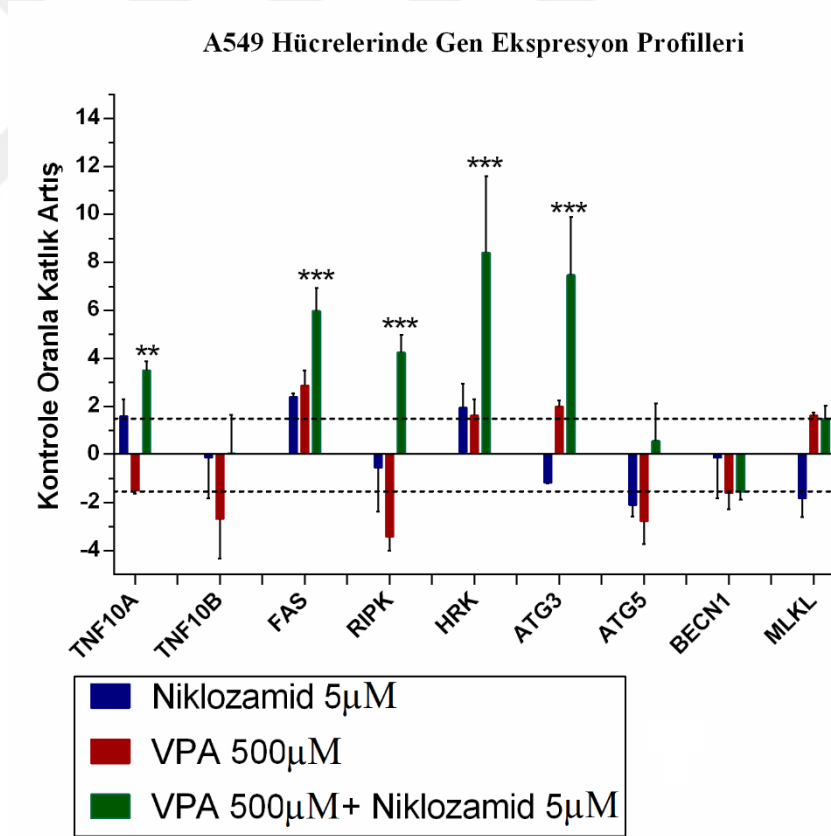


Şekil 4.9.4.1 A549 ve H1299 hücrelerinde, Niklozamid 5 μ M, Valproik asit 500 μ M ve kombinasyon tedavisi sonrası Histon H3 asetilasyonu (acH3k9) ile total HDAC1 ve HDAC2 protein düzeylerindeki değişimler. GAPDH yükleme kontrolü olarak kullanıldı. A. A549 hücre soyu. B. H1299 hücre soyu. 1. Kontrol; 2. Niklozamid 5 μ M 24 saat; 3. Valproik asit 500 μ M 72 saat; 4. Kombinasyon (Valproik asit 500 μ M + Niklozamid 5 μ M).

4.10. Genlerin Ekspresyon Profilleri

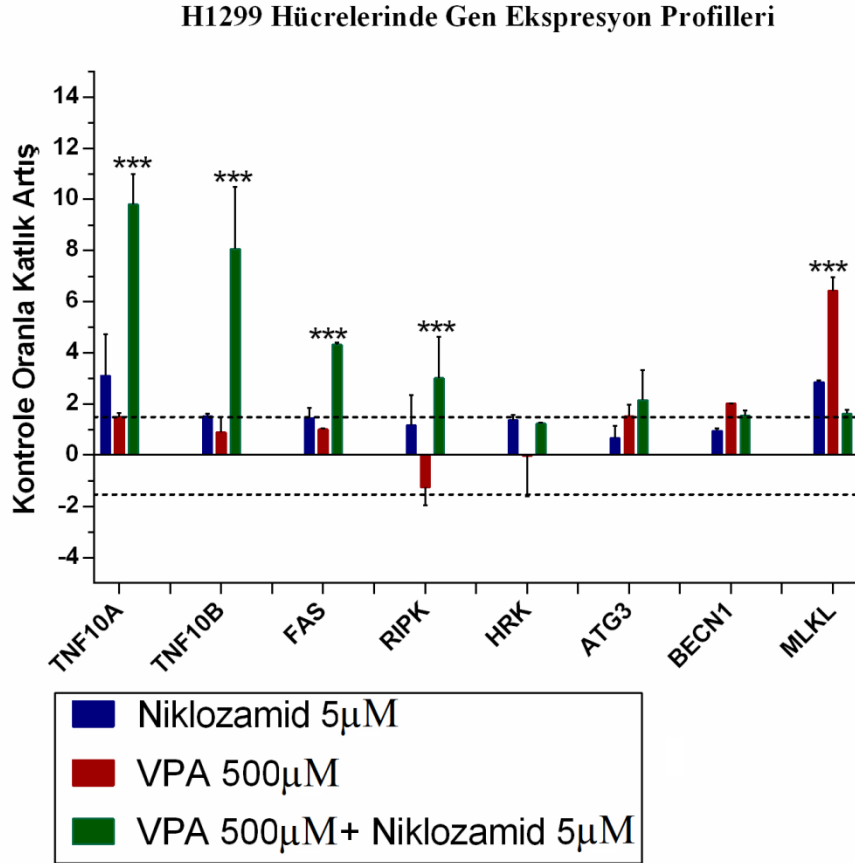
A549 ve H1299 hücrelerine VPA (500 μ M, 72 saat), niklozamid (5 μ M, 24 saat) ve kombinasyon tedavisi (48 saat 500 μ M VPA tedavisi sonrası, 24 saat 5 μ M Niklozamid) sonrasında bazı hücre ölüm genlerinin (TNFRSF10A, TNFRSF10B, FAS, RIPK, HRK, ATG3, ATG5, BECN1) ekspresyonları üzerine olan etkisi Real-Time PCR ile araştırıldı. PCR analizlerinde gen ekspresyonlarında 1,5 ve üstü değerler anlamlı kabul edilerek yorumlandı.

Alınan gen ekspresyon analizi sonuçlarına göre, A549 hücre soyunda TNF10A, FAS ve HRK gen ekspresyonlarının kombinasyon tedavisinde arttığı gözlemlendi. Ayrıca RIPK (nekrotik) ve ATG3 (otofajik) gen ekspresyon seviyelerinde de artış belirlendi (Şekil 4.10.1)



Şekil 4.10.1. A549 hücrelerinde gen ekspresyon sonuçları. Mavi sütun; Niklozamid 5 μ M dozunda 24 saat tedavi, Kırmızı sütun; VPA 500 μ M dozunda 72 saat tedavi, Yeşil sütun; Valproik asit (VPA) 500 μ M dozunda 48 saat tedavi sonrası 24 saat boyunca niklozamid 5 μ M dozu uygulaması.

Gen ekspresyon analizi sonuçlarına göre, H1299 hücre soyunda TNF10A, TNF10B ve FAS gen ekspresyonlarının kombinasyon tedavisinde arttığı gözlemlendi. Ayrıca RIPK, MLKL (nekrotik) ve ATG3 (otofajik) gen ekspresyon seviyelerinde de artış bulundu (Şekil 4.10.2).

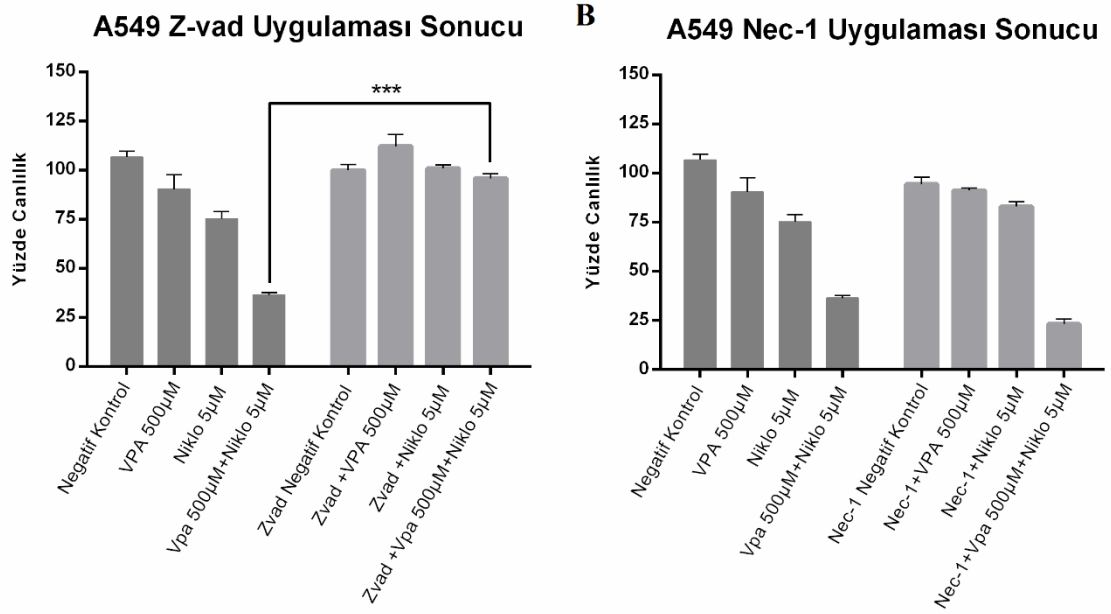


Şekil 4.10.2. H1299 hücrelerinde gen ekspresyon sonuçları. Mavi sütun; Niklozamid 5µM dozunda 24 saat tedavi, Kırmızı sütun; VPA 500µM dozunda 72 saat tedavi, Yeşil sütun; Valproik asit (VPA) 500 µM dozunda 48 saat tedavi sonrası 24 saat boyunca niklozamid 5µM dozu uygulaması.

4.11. İnhibitör Uygulaması Bulguları

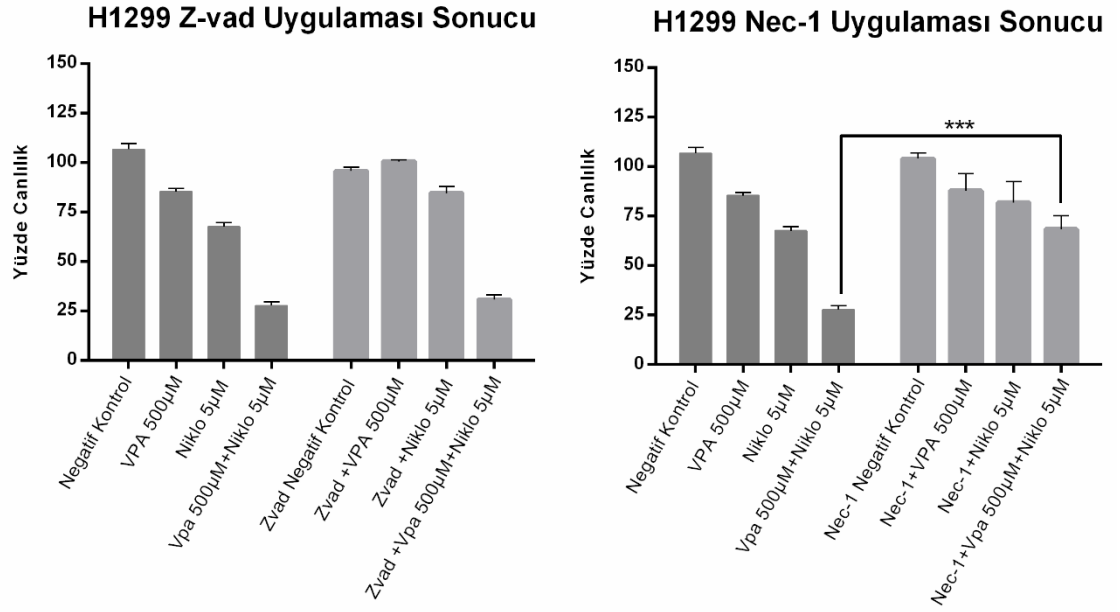
Bu verileri desteklemek üzere kaspaz aktivitesini baskılamak amacıyla, hücrelere ön uygulama ile (24 saat) 20 µM pan-kaspaz inhibitörü (z-VAD-FMK) uygulandı. Ayrıca nekroz ve nekroptoz aktivitesini bastırmak için, RIPK1 inhibitörü olan Nec-1 (Nekrostatin-1) hücrelere ön uygulama ile (30 dk) 100 µM dozunda uygulandı. İnkübasyon süreleri bitiminden sonra inhibitörler kuyulardan uzaklaştırıldı ve VPA,

niklozamid tek tek veya kombine olarak uygulandı. Bu süreçte kaspaz ve RIPK1 inhibitörünün etkisi SRB hücre canlılığı tespiti ile incelendi. Elde edilen sonuçlara göre, A549 hücre soyunda Nec-1 ön uygulama sonucunda hücre canlılığında bir değişim görülmezken, z-vad-fmk ön uygulama sonucu hücre canlılığının korunduğunun gözlenmesi, A549 hücre soyunda kombinasyon tedavisinin apoptozisi uyararak ölüme neden olduğu söylenebilir. (Şekil 4.11.1).



Şekil 4.11.1. A549 hücrelerinde pan-kaspaz inhibitörü Z-Vad-FMK (A) ve RIPK1 inhibitörü Nekrostatin (B) ön uygulama sonucu SRB canlılık testi sonuçları. Her bir veri noktası 3 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir. Kombinasyon uygulamasında, valproik asit (VPA) 500 µM 48 saat uygulama sonrası kuyudan çekilmeden niklozamid 500 µM konsantrasyonu ile 24 saat muamele edilmiştir. *Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre farklı dozlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (* p<0,05 **:p<0,01 ***:p<0,001) ifade etmektedir.

H1299 hücre soyunda ise nec-1 ön uygulama sonucu hücre canlılığında artış görülürken z-vad-fmk ön uygulama sonucu hücre canlılığında değişim görülmemesi, kombinasyon tedavisinde ölüm mekanizmasının apoptozis değil RIPK1 aracılığı ile nekroz veya necroptosis olduğu söylenebilir. (Şekil 4.11.2).



Şekil 4.11.2. H1299 hücrelerinde pan-kaspaz inhibitörü Z-Vad-FMK (A) ve RIPK1 inhibitörü Nekrostatin (B) ön uygulama sonucu SRB canlılık testi sonuçları. Her bir veri noktası 3 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir. Kombinasyon uygulamasında, valproik asit (VPA) 500 µM 48 saat uygulama sonrası kuyudan çekilmeden niklozamid 500 µM konsantrasyonu ile 24 saat muamele edilmiştir. *Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre farklı dozlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (* p<0,05 **:p<0,01 ***:p<0,001) ifade etmektedir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında, histon deasetilaz inhibitörü VPA ile hücrelerde Wnt/ β -katenin yaşam yolağı inhibitörü olan niklozamid bileşiklerinin insan akciğer kanseri hücre soylarında (A549 ve H1299) üzerinde sitotoksik etkileri ve mekanizmaları araştırılmıştır. Çalışmanın en önemli özelliğı, kullanılan bileşiklerin kombinasyon şeklinde uygulanması ve tek başlarına etkilerine oranla daha güçlü sitotoksik etkiye sahip olmalarının bulunmasıdır. Bu bileşikler (Niklozamid, VPA) FDA (Amerika Gıda ve İlaç Dairesi) onayı almış ve klinikte ilaç olarak kullanılmaktadırlar. Çalışmamızda, A549 hücrelerinde niklozamid uygulamasının (0,31-5 μ M; 24, 48 ve 72 saat) kontrole kıyasla hücre canlılığında doza ve zamana bağımlı olarak istatistiksel anlamlı azalmalara neden olduğu görüldü. Benzer şekilde, niklozamid uygulamasında, H1299 hücrelerinde kontrole kıyasla hücre canlılığında 0,62-5 μ M doz aralığında ve zamana bağımlı olarak (24, 48 ve 72 saat) istatistiksel anlamlı azalmalar gözlemlendi. Yapılan çalışmalarda niklozamidin kolon, serviks, tiroid gibi bir çok kanser türünde sitotoksik potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir (Chen ve ark. 2017, Kai ve ark. 2017). İnsan tiroid kanser hücre soylarında (TPC-1, ACT-1, BCPAP) 20, 10 ve 5 μ M dozlarında niklozamid uygulamasının sitotoksik olduğu ve bu dozlarda intristik yolağı aktif ederek apoptozisi uyardığı belirlenmiştir (Kai ve ark. 2017). Bir başka çalışmada niklozamidin kolon kanser hücrelerinde (CC531, SW620) apoptozisi uyararak hücre ölümünü tetiklediğı gösterilmiştir (Monin ve ark. 2016). Akciğer kanseri hücre hatlarında yapılan bir çalışmada ise, radyaterapiye dirençli A549 ve H1299 hücre soylarında niklozamid uygulaması sonucu direnç mekanizmalarında azalma ve bunun sonucunda apoptozisin uyarıldığı görülmüştür (You ve ark. 2014).

Asitik bir kimyasal bileşik olan VPA epilepsi, bipolar bozukluk ve migrenin neden olduğu baş ağrılarının önlenmesi için klinikte kullanılmaktadır. Ayrıca yapılan çalışmalarda VPA'nın toksik olmayan terapötik konsantrasyonlarda güçlü bir sınıf seçici HDAC inhibitörü olduğu görülmüştür (Gotticher ve ark. 2004). VPA'in lösemi, prostat, rahim ağzı, kolon, akciğer, mesane kanserleri gibi pek çok kanser tipinde anti kanser etkinliğı nedeniyle yaygın şekilde araştırılmıştır (Sun 2013, Duenas-Gonzalez ve ark. 2008, Chen ve ark. 2011). Bu çalışmada, VPA'nın anti kanser potansiyeli A549 ve H1299 akciğer kanser hücre soylarında araştırıldı. A549 hücrelerinde SRB canlılık testi

sonuçlarına göre; 48 saat VPA uygulaması sonucu 1,25-5 mM dozlarında, 72 saat uygulama sonucunda ise 0,62-5 mM dozlarında kontrole kıyasla hücre canlılığında istatistiksel açıdan anlamlı azalmalar görüldü. H1299 hücrelerinde ise, 48 saat VPA uygulaması sonucu 1,25-5 mM dozlarında, 72 saat uygulama sonucunda ise 0,31-5 mM dozlarında kontrole kıyasla hücre canlılığında istatistiksel açıdan anlamlı azalmalar belirlendi.

VPA ile yapılan çalışmalar genelde VPA'nın diğer ilaçlar ile (diğer epigenetik modifikatörler, sitotoksik kemoterapi ajanları ile kombinasyonlar ve immün modülatörler ile kombinasyonlarla kombine terapiler) birlikte görülen etkilerine dayandığı görülmektedir (Fenaux ve ark. 2009). Örneğin; yapılan bir çalışmaya göre VPA ve aspirinin (asetilsalisilik asit) hepatosellüler karsinomada kombine şekilde kullanılması sonucu istatistiksel olarak anlamlı sitotoksik etkiler görülmüştür. Hatta *in vivo* tümör modellerinde yapılan çalışmada tümör boyutunda azalmalar belirlenmiştir (Li ve ark. 2013).

Bu çalışmada da, VPA ile niklozamid bileşiği kombine edilerek kanser hücrelerinde daha etkin bir tedavi seçeneği geliştirmek amaçlanmıştır. Bu amaçla, çalışmamızda kombinasyon tedavisi için, VPA'nın toksik olmayan dozu (HDAC inhibitörü etkisini gösterdiği doz) olan 500 µM seçilmiştir. VPA'nın 500 µM dozunda 72 saat uygulama sonrası, asetillenmiş toplam histon seviyelerinde kontrole kıyasla A549 hücrelerinde 5,09 kat, H1299 hücrelerinde ise 6,7 kat artışa neden olması seçilen dozun histon deasetilaz inhibitörü etkisini doğrulamıştır. Kombinasyon tedavisinde VPA 500 µM 48 saat uygulama sonrası niklozamidin farklı dozları (0,07-5 µM) eklenerek 24 saat muamele edildi. Sonuçta kombinasyon tedavisinin A549 ve H1299 hücrelerinde, kontrole ve bileşiklerin tek başlarına oranla hücre canlılığında doza ve zamana bağlı olarak istatistiksel açıdan anlamlı azalmalara neden olduğu belirlendi. Bu sonuçlar ATP canlılık yöntemi ile de doğrulandı. SRB boyası protein bağlayabilen anyonik bir boyadır. Bu nedenle metabolik aktiviteyi ölçmeye dayanmayan bu yöntemde, bağlanan boya miktarı hücre kütlesi için bir vekil olarak kullanılabilir. ATP testinde ise hücre canlılığı intraselüler ATP düzeylerine göre belirlenmektedir. ATP testi hücrelerdeki metabolik aktiviteyi gösterdiği için elde edilen sonuçlar birbirinden farklı olabilmektedir. ATP seviyesindeki azalmaya bağlı olarak gözlenen hücre canlılığındaki düşüşün SRB testi sonuçlarında

gözlenenden daha fazla olması, hücrelerin ölüyor olmasına rağmen hücrel proteinlerin yapılarında bozulmanın başlamadığından kaynaklanmaktadır. Bu farklılık kullanılan ilacın etki mekanizmasına bağlı olarak (örneğin; enerji kaynakları, sinyal molekülleri, DNA) değişmektedir (Ulukaya ve ark. 2008).

VPA'nın niklozamid ile kombinasyonu tarafından tetiklenen hücre ölüm modunu belirlemek amacıyla apoptotik belirteçler araştırılmıştır. Öncelikle bir apoptozis belirteci olan Anneksin-V-FITC boyaması yapıldı ve floresan mikroskopu altında değerlendirildi. Anneksin-V boyama yöntemi ile erken dönem apoptotik hücreler belirlenebilmektedir. Bunun nedeni Anneksin-V bağlanması membran hasarlanmadan önce nükleer kondensasyon safhasına denk gelmektedir (Koopman ve ark. 1994, Boersma ve ark. 1996, Zhang ve ark. 1997). Ancak hücreler membran bütünlüğünü kaybetmeye başladığında (geç apoptosis/sekonder nekrozis veya primer nekrozis) Anneksin-V intraselüler fosfotidilserine bağlanarak pozitif sonuç vermektedir. Bu nedenle membranı hasarlı hücreleri belirleyebilmek için propidyum iyodür ile birlikte kullanılır (Hammill ve ark. 1999). A549 hücrelerin VPA (500 μ M dozunda 72 saat) uygulama sonrasında kontrole oranla PI pozitif hücre sayısında artış gözlenmedi. Ayrıca canlı hücre yoğunluğunda kontrole oranla değişmedi. Niklozamid (5 μ M 24 saat) uygulama sonucu hücre yoğunluğunda kontrole kıyasla azalma görülmüş ve Anneksin-V pozitif boyanan hücrelerin hem de PI'de pozitif boyandığı gözlemlendi. Kombinasyon tedavisinde ise hücre yoğunluğu kontrole ve bileşiklerin tek başlarına etkilerine göre daha fazla azaldığı belirlendi. Özellikle niklozamidin 5 μ M dozu ile yapılan kombinasyon uygulamasında Anneksin-V pozitif hücrelerin çoğunun PI pozitif olduğu gözlemlendi. Kombinasyon tedavisinin H1299 hücrelerinde kontrole kıyasla hücre yoğunluğunu belirgin bir şekilde azalttığı belirlendi. A549 hücrelerinde olduğu gibi H1299 hücrelerinde de Anneksin-V pozitif hücrelerin çoğunun PI pozitif olduğu gözlemlendi. Bu durum hücrelerde, membran hasarına bağlı olarak primer nekrozis ya da sekonder nekrozis geliştiğini göstermektedir. Bu ayrımı daha net yapabilmek açısından yöntem çalışılırken ortama Hoechst boyası eklenerek nükleus morfolojisine de değerlendirildi. Kontrole kıyasla hücrelerin nükleuslarının büyüdüğü gözlemlendi. Primer nekrozis hücre hacminin artması fakat fragmente ya da piknotik nükleusların gözlenmemesi ile karakterize iken, sekonder nekrozis piknotik ya da fragmente nükleus ile karakterize olup, apoptozisin geç safhasıdır (Ulukaya 2011). Dolayısıyla floresan mikroskop görüntülerine göre söz konusu

hücrelerin membran bütünlüğünün bozulduğu ve primer nekrozisle öldükleri sonucuna varılmıştır.

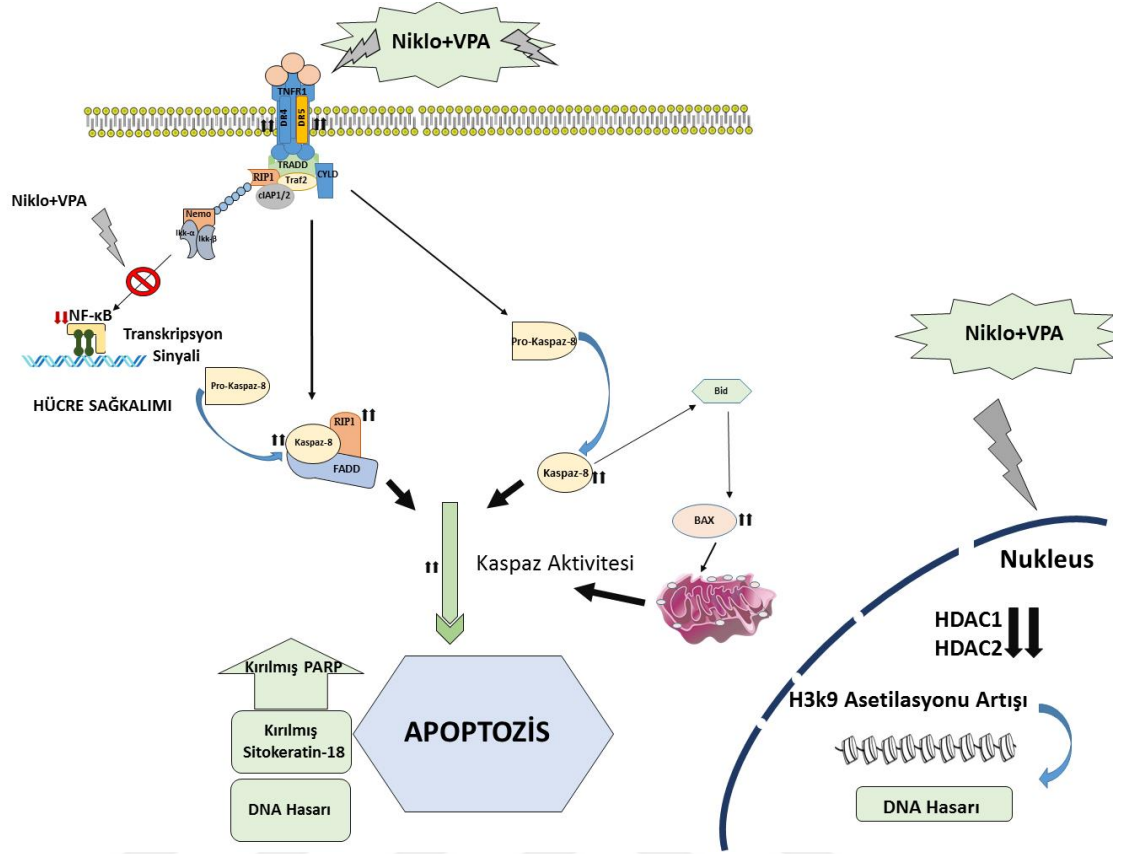
Çalışmanın bir sonraki kısmında, hücrelerin ölüm modunu belirlemek amacıyla apoptozis belirteci olan kaspazla-kırılmış sitokeratin 18 (M30) düzeylerine bakılmıştır. Bu durumda M30 testi, sadece sitokeratin 18'i eksprese eden hücrelerde çalışmaya uygundur. H1299 hücrelerinde VPA, niklozamid ve bu bileşiklerin kombinasyonlarının M30 düzeylerinde herhangi bir artışa neden olmadığı gözlemlendi. Yalnızca her iki hücre hattında da kullanılan pozitif kontrolde yaklaşık 3000 U/L düzeyinde artış görüldü. H1299 hücrelerinde herhangi bir artış olmaması bu hücrelerde sitokeratin 18 ekspresyonunun az ya da hiç olmadığı söylenebilir. Bu durumun hücrelerin genomik durumundan kaynaklanıyor olabileceği düşünülmüştür. A549 ve H1299 hücrelerinde yapılan bir çalışmada H1299 hücre soyunda sitokeratin 18 düzeyinin çok düşük olduğu gösterilmiştir (Cevatemre ve ark. 2015). A549 hücresinde ise VPA'nın niklozamid 5 µM dozuyla yapılan kombinasyon tedavisinde bileşiklerin tek başlarına etkilerine ve kontrole kıyasla M30 seviyesinde yükselme görülmüştür. Apoptosis sırasında aktif kaspaz 3/7 tarafından parçalanmış proteinlerden biri, epitelyal hücre dokusunda yüksek seviyede eksprese edilen bir protein olan sitokeratin 18'dir. A549 hücre soyunda kırılmış sitokeratin 18'e bağlanan M30 antijen seviyesinde ki istatistiksel olarak anlamlı artış, kombinasyon tedavisinde apoptozisin varlığını göstermektedir. Çalışmanın bu aşamasından sonra her iki hücre soyunda da kombinasyon tedavisinde en etkili dozlar (VPA 500 µM + Niklozamid 5 µM) kullanılarak devam edilmiştir.

Hücrelerdeki olası apoptozis mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik olarak hücrelerde kaspaz 3/7 aktivitesi araştırılmıştır. Kombinasyon tedavisinin H1299 hücrelerinde kaspaz 3/7 aktivitesinde bileşiklerin tek başlarına ve kontrole oranla %10 artış gözlemlendi. Bunun aksine A549 hücrelerinde, kombinasyon tedavisinde kaspaz 3/7 aktivitesi % 25,7 oranda artış belirlendi. A549 hücre soyunda artan kaspaz 3/7 seviyeleri kaspaz bağımlı apoptozisin varlığını göstermektedir. H1299 hücrelerinde ise kombinasyon tedavisinde SRB ve ATP canlılık testlerinde hücre canlılığının azalmasına rağmen kaspaz 3/7 seviyelerinde artışın az olması ölüm mekanizmasının kaspaz bağımsız olduğunu yani nekroz veya nekroptozis olduğunu göstermektedir.

Kombinasyon tedavisinin mitokondri membran potansiyelindeki değişime etkisi değerlendirildiğinde; H1299 hücrelerinde yüksek oranda bir değişim gözlenmezken A549 hücrelerinde ise tek başına niklozamid bileşiğine oranla mitokondri membran potansiyeli oldukça yüksek seviyede, % 49,6 oranda artış gözlemlendi. Bu sonuçlar A549 hücre soyunda ölüm yolunun mitokondriyal yolak aracılığıyla ile tetiklenebileceğini düşündürmektedir

A549 hücre soyunda kaspaz inhibitörü olan z-vad-fmk ön uygulama sonucu hücre canlılığında anlamlı bir artışın görülmesi ve nekrotik hücre ölümünde kavşak görevi gören RIPK1 inhibitörü olan nec-1 ön uygulama sonucu hücre canlılığında herhangi bir artışın gözlenmemesi ölüm yolunun kaspaz bağımlı apoptosiz ile gerçekleştiğini göstermektedir. A549 hücrelerinde uygulanan kombinasyon tedavisinde kontrole ve bileşiklerin tek başlarına etkilerine kıyasla flow sitometri analizi sonuçlarında artan kaspaz 3/7 aktivitesi, M30 eliza testinde M30 düzeylerinde artış ve westren blot analizlerinde artan kırılmış PARP düzeyide apoptozisin uyarıldığı sonucunu desteklemektedir. Fakat western blot analizlerinde pro-kaspaz 8 düzeylerinde ki azalma ve rip1 protein düzeyilerindeki artış ölümün TNFR aracılı apoptozis ile gerçekleştiğini göstermiştir. Ölüm reseptörleri, TNFR süper ailesinin üyeleri, hücre ölümü için önemli araçlardır (Aggarwal ve ark. 2003). Ölüm reseptörlerinin ligandları tarafından aktivasyonu ölüm etki alanı ve ölüm efektör alanını içeren adaptörler aracılığıyla inaktif formda bulunan (pro-kaspaz) kaspaz-8'i etkinleştirir ve pro-kaspaz-8 aktif kaspaz-8' i oluşturur. Aktif kaspaz-8, Rip1 ve FADD kompleksi kaspaz kaskadını uyararak NF-κB sağkalım yolağının yokluğunda apoptozu başlatır (Cho ve ark. 2009). RT-PCR ile alınan sonuçlarda da TNFR1 ligandı olan TNF10a düzeylerinde ki artış alınan sonuçları doğrular niteliktedir. MLKL gen düzeylerinde anlamlı bir değişimin görülmemesi de TNFR aracılı apoptozisi desteklemektedir. TNFR aracılı apoptozisde DR4 (Tnf10-α) ve DR5 (Tnf10-β) bir amino terminali lider bölünme bölgesi, bunu takiben iki sisteinden zengin tekrarlar içeren bir hücre dışı bölge, daha sonra bir merkezi transmembran alan ve bir karboksi-terminal ölüm alanını ihtiva eder. DR4 ve DR5 aktivasyonu hücre içerisine apoptotik sinyaller göndererek pro-kaspaz8'i kaspaz-8'e dönüştürür ve buda kaspazları aktive ederek apoptozisi uyarır (MacFarlane ve ark. 1997, Wu ve ark. 1997). Western blot sonuçlarında kombinasyon tedavisinde artan DR4 ve DR5 düzeyleri apoptozisin TNFR yolağı üzerinden de uyarıldığını desteklemektedir. Bu ölüm yolağı NF-κB aktivasyonuna

neden olarak transkripsiyonu uyarıp hücre sağkalımını sağlayabilir. Fakat western blot analizlerinde NF- κ B (p65) düzeylerinde ki azaltma TNFR-NF- κ B aracılı yaşam yolağının in-aktif olduğunu göstermiştir. TNFR yolağının uyardığı kaspaz-8' i, Bax' ı uyararak mitokondri membran potansiyelinde bozulmaya yol açar. Bunun sonucunda ortama salınan sitokrom-c kaspaz kaskadını uyararak apoptozisi indükler (Blaser ve ark. 2016). A549 hücre soyunda flow sitometri sonuçlarına göre mitokondri membran potansiyelindeki bozulma ve western blot sonuçlarında artan Bax protein düzeyleri, kombinasyon tedavisinin TNFR yolağı üzerinden mitokondri membran potansiyelini bozduğunu göstermektedir. Apoptizisin uyarımı ayrıca endoplazmik retikulum (ER) stresi tarafından da tetiklenebilir. Birçok çalışma, şiddetli ER stresinin sonunda apoptoz veya otofajiye yol açan hücre içi sinyalleme aktif edebildiğini göstermiştir (Gorman ve ark. 2012). A549 hücrelerinde uygulanan kombinasyon tedavisi westren blot sonuçlarında, ER-stres sensörü IRE1 α ile şaperon Bip ve transkripsiyon faktörü CHOP protein düzeylerinde belirgin bir şekilde artışın olması, kombinasyon tedavisinin ER stresi üzerinden de apoptozisi uyardığı görülmüştür. VPA ve niklozamid kombinasyon tedavisinin A549 hücre soyları üzerindeki etkisi şekil 5.1' de verilmiştir.



Şekil 5.1. Valproik asit (VPA) ve niklozamid kombinasyon tedavisinin A549 hücre soyları üzerindeki sitotoksik etki mekanizmaları.

H1299 hücre soyunda western blot analizi sonuçlarına göre rip-1 ve aktif kaspaz-8 düzeylerinde artış, prokaspaz düzeylerinde ise azalma ve RT-PCR bulgularında RIPK1, TNF10a düzeylerinde artış ölümün TNFR aracılığı ile gerçekleştiğini göstermektedir. Fakat TNFR-RİP1-Aktif Kaspaz8 kompleksi herhangi bir nedenle kaspazları uyarda başarısız olduğu koşullarda veya aktif kaspaz8'in etkinliğinin azalması durumunda hücreler alternatif bir hücre ölümü aracı olarak nekroptoz geçirirler. Nekroptoz sırasında TNF10a üretimi, reseptörü TNFR1'in uyarılmasına neden olur. TNFR ile ilişkili ölüm proteini TRADD, RIPK1'e sinyal gönderir ve bu da nekrozomu (Ripk1- Ripk3-fosfoMLKL) oluşturan RIPK3'ü aktifleştirir (Ellis ve ark. 1986). H1299 hücre soyunda nec-1 ön uygulama sonucu kombinasyon tedavisinde hücre canlılığının arttığı görülmüştür. Hücrelerin nekroptozis ölüm yolağını seçmesinin en büyük nedenlerinden birisi kaspaz uyarımının gerçekleşmemesi ve aktif-kaspaz-8'in herhangi bir şekilde etkinliğinin azalmasıdır. Bu nedenle kaspaz inhibitörü z-vad-fmk ön uygulama sonucu kombinasyon tedavisinde hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış

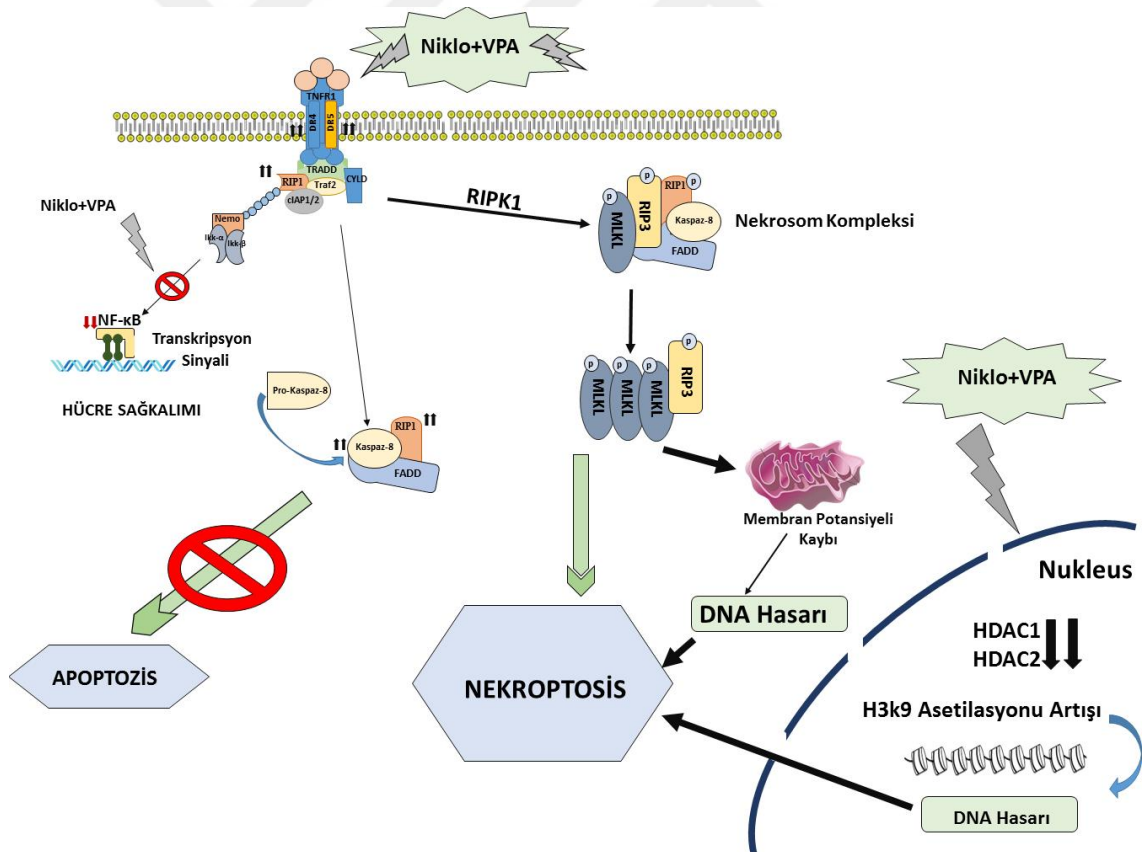
görülmemiştir. Fakat RIPK-1 inhibitörü olan nec-1' in ön uygulaması sonucu hücre canlılığında artış görülmüştür. Buda ölüm yolağının nekroptosis olabileceğini göstermektedir. Nekroptosis sırasında aktifleşen RIPK3 MLKL'yi fosforile ederek MLKL'nin oligomerleşmesini yönlendirir. Bu sayede MLKL'nin plazma zarlarına ve organellerine nüfuz etmesini ve sağlar (Kim ve ark. 2003). RT-PCR sonuçlarına göre artan MLKL gen düzeyleri, kombinasyon tedavisinin H1299 hücre soyunda nekroptosis hücre ölümünü uyardığını göstermektedir.

Ayrıca nekroptosis sürecinde oluşan nekrosom kompleksi, hücre ATP seviyelerini azaltmak için mitokondrielerde ki adenin nükleotid translokazını inhibe eder (Degterev ve ark. 2005). Mitokondriyal elektron taşıma zincirinin ayrılması ek mitokondriyal hasara ve mitokondriyal membranında permeabilite kaybına yol açar. Flow sitometride sonuçlarına göre H1299 hücrelerinde uygulanan kombinasyon tedavisinde de mitokondri membran potansiyelinde depolarizasyon görülmüştür.

ER stresinde apoptozis ve otofaji indüklenebilirken nekroptozun aktivasyonu zayıf olduğu bildirilmiştir. Fakat ER stresinin nekroptozisi uyardığı çalışmalar mevcuttur. Yapılan bir çalışmada L299sA (fare fibrokarsinoma hücre soyu) hücrelerinde ER stresinin TNFR aracılı nekroptozu uyardığı gösterilmiştir. Hatta nekroptozu neden olan ER stresinin TNFR bağımlı olduğu gösterilmiştir (Saveljeva ve ark. 2015). H1299 hücre soyunda ise ER-stres sensörü IRE1 α ile şaperon Bip ve transkripsiyon faktörü CHOP protein düzeylerinde belirgin bir şekilde artış olduğu belirlendi.

Glioblastoma üzerinde yapılan çalışmalarda, VPA RIP-1 (Reseptör Etkileşimli Serin / Threonin Kinaz 1) ekspresyonunu arttırdığı ve bunu gamma-H2Ax'ın fosforilasyonu izleyerek nekroptozisi uyardığı görülmüştür (Bollino ve ark. 2015). H1299 hücre soyunda kombinasyon tedavisinin fosforlanmış γ -H2AX düzeylerinde artışa neden olduğu görülmüştür. Ayrıca yapılan çalışmalarda VPA'nın DNA onarım yollarını susturabildiği ayrıca DNA tamir proteinlerini de inaktive edebildiği gösterilmiştir (Rajendran ve ark. 2011). VPA, kanser hücrelerinde DNA hasarına yol açan gemsitabin isimli kemoterapi ilacı ile karşılaştırılmış ve DNA tamir proteini olan gamma-H2AX seviyesini azalttığı bu sayede DNA onarımını inhibe ederek hasarı arttırdığı gözlenmiştir. Fakat bu düşüş gamma-H2AX'in fosfo-gamma-H2AX'e dönüşümünü engellememiştir. Bu nedenle artan

bir fosfo- gamma-H2AX seviyesi gözlenmiştir. Aynı çalışmada VPA 1mM dozunda gemitabin dirençli pankreas kanser hücreleri üzerinde yapılan western blot analizinde DNA tamir proteini olan fosfo-gamma-H2AX seviyelerinde artış görülmüştür (Wang ve ark. 2015). Özofageal skuamöz karsinoma hücrelerinde yapılan bir çalışmada ise VPA 500 µM dozu kullanılmış ve radyasyon tedavisine bağlı sitotoksik etkiyi arttırmıştır. Bu etkinin ise ve radyasyon tedavisi sonrası Ku70 (DNA tamir proteini ve sitoplazmada Bax'a bağlanarak bir anti-apoptotik protein olarak işlev görür) proteinini asetilleyerek γH2AX seviyelerini azaltığından kaynaklandığı gösterilmiştir (Subramanian ve ark. 2012). Bu çalışmada da A549 hücrelerinde VPA ve niklozamid tek başlarına etkilerine oranla kombinasyon tedavisinde, DNA'da yüksek seviyede hasar oluşturduğu görülmüştür. Kombinasyon tedavisi aynı şekilde H1299 hücrelerinde de yüksek seviyede DNA'da hasar oluşturduğu tespit edilmiştir. VPA ve niklozamid kombinasyon tedavisinin H1299 hücre soyları üzerindeki etkisi şekil 5.2' de verilmiştir.



Şekil 5.2. Valproik asit (VPA) ve niklozamid kombinasyon tedavisinin H1299 hücre soyları üzerindeki sitotoksik etki mekanizmaları.

HDAC1 ve HDAC2 H3 histonlarını lizin 9 bölgesinden de-asetile ederek kromatin yeniden modellenmesinde görevlidirler. HDAC1 ve HDAC2'de herhangi bir nedenle fonksiyon kaybı kromatin üzerinde bulunan H3 histonlarında asetilasyon düzeylerinin artmasına ve sonuç olarak DNA hasarına yol açmaktadır (Fernandez ve ark.2004, Martijn ve ark. 2011). A549 ve H1299 hücrelerinde kombinasyon tedavisinde artan fosforlanmış γ -H2AX düzeylerine, western blot sonuçlarında azalan HDAC1 ve HDAC2'ye paralel asetillenmiş H3k9 seviyelerinde ki artışın neden olduğu söylenebilir.

Bu tez çalışmasının sonuçlarından yola çıkarak, VPA ve niklozamid bileşiği kombinasyonunun insan akciğer hücre soylarında (A549 ve H1299) güçlü bir sitotoksik etkiye neden olduğu ve bu sitotoksik etkinin A549 hücre soyunda TNFR aracılı apoptozis ile H1299 hücre soyunda ise TNFR üzerinden nekroptozis aracılığı ile olduğu görülmüştür. Aynı kanser kökenli olmasına rağmen farklı ölüm yollarının aktif olması, H1299 hücrelerinin P53 mutant (P53 eksprese etmeyen) olduğundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Bir sonraki inceleme basamağı olarak bu kombinasyonun kliniğe uyarlanabilmesi için *in vivo* olarak araştırılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Adler, I. 1992.** Primary malignant growths of the lungs and bronchi. Ed.: Green, L. New York, pp: 24-25.
- Aggarwal B. B. 2003.** Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nature Reviews Immunology*. 3: 745-756.
- Allis, C. D., Jenuwein, T., Reinberg, D., Caparros, M. L. 2007.** *Epigenetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Alyea, R. A., Moore, N. P., LeBaron, M. J., Gollapudi, B. B., Rasoulpour, R. J. 2012.** Is the current product safety assessment paradigm protective for epigenetic mechanisms. *Journal Pharmacology Toxicology Methods*. 66: 207-214.
- American Cancer Society. 2012.** Cancer Facts and Figures 2012. Ed.: G, A. Atlanta.
- Andreotti, P.E., Cree, I.A., Kurbacher, C.M., Hartmann, D.M., Linder, D., Harel, G. 1995.** Chemosensitivity testing of human tumors using a microplate adenosine triphosphate luminescence assay: clinical correlation for cisplatin resistance of ovarian carcinoma. *Cancer Research*, 55(22): 5276-5282.
- Arnstein, A. 1913.** Uber den sogenannten "Schneeberger Lungenkrebs.". *Wien Klin Wchshscr*. 26: 748-752
- Ashkenazi, A. 2008.** Directing cancer cells to self-destruct with pro-apoptotic receptor agonists. *Nature Reviews Drug Discovery*. 7:1001-1012.
- Bartling, B., Hofmann, H. S., Boettger, T., Hansen, G., Burdach, S., Silber, R. E. 2005.** Comparative application of antibody and gene array for expression profiling in human squamous cell lung carcinoma. *Lung cancer*. 49: 145-154.
- Belinsky, S. A., Klinge, D. M., Dekker, J. D., Smith, M. W., Bocklage, T. J., Gilliland, F. D. 2005.** Gene promoter methylation in plasma and sputum increases with lung cancer risk. *Clinical cancer research journal of the American Association for Cancer Research*. 11: 6505-6511.
- Berghmans, T., Lafitte, J. J., Scherpereel, A., Ameye, L., Paesmans, M., Meert, A. P., Colinet, B., Tulippe, C., Willems, L., Leclercq, N., Sculier, J. P. 2015.** VAC chemotherapy with valproic acid for refractory/relapsing small cell lung cancer: a phase II study. *ERJ Open Research*. 1(2): 00029-2015.
- Bird, A. P. 1996.** The relationship of DNA methylation to cancer. *Journal of Cancer Survivorship*. 28: 87-101.
- Blander, G., Guarente, L. 2004.** The Sir2 family of protein deacetylases. *Annual Review of Biochemistry*. 73: 417-435.

- Boersma, W., Nooter, K., Oostrum, G., Stoter, G. 1996.** Quantification of apoptotic cells with fluorescein isothiocyanate-labeled annexin V in chinese hamster ovary cell cultures treated with cisplatin. *Cytometry*. 1;24: 123-130.
- Bollino, D., Balan, I., Aurelian, L. 2015.** Valproic acid induces neuronal cell death through a novel calpain-dependent necroptosis pathway. *Journal of Neurochemistry*. 133(2): 174-186.
- Boudny, V., Kovarik, J. 2002.** JAK/STAT signaling pathways and cancer. Janus kinases/signal transducers and activators of transcription. *Neoplasma*. 49:349–355.
- Blaser, H., Dostert, C., Mak, T., Brenner, D. 2016.** TNF and ROS Crosstalk in Inflammation. *Trends In Cell Biology*. 26: 249–261.
- Brzezianska, E., Dutkowska, A., Antczak, A. 2013.** The significance of epigenetic alterations in lung carcinogenesis. *Molecular biology reports*. 40: 309–325.
- Campos, E. I., Reinberg, D. 2009.** Histones: annotating chromatin. *Annual Review of Genetics*. 43: 559-599.
- Can, I., Aslan A. 2016.** Epigenetik Mekanizmalar ve Bazı Güncel Çalışmalar. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi*. 6(2): 445-452.
- Cevatemre, B., Ulukaya, E., Sarimahmut, M., Oral, A., Frame, F. 2015.** The M30 assay does not detect apoptosis in epithelial-derived cancer cells expressing low levels of cytokeratin 18. *Tumor Biology*. 36: 6857-6865.
- Chang, H. Y., Yang, X. 2000.** Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiology and molecular biology reviews*. 64(4): 821-846.
- Chaturvedi, P., Tyagi, S. 2014.** Epigenetic mechanisms underlying cardiac degeneration and regeneration. *International Journal of Cardiology*. 173: 1-11.
- Chen, L., Wang, L., Shen, H., Li, D. 2017.** Anthelmintic drug niclosamide sensitizes the responsiveness of cervical cancer cells to paclitaxel via oxidative stress-mediated mTOR inhibition. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 484(2): 416-421.
- Chen, M., Wang, J., Lu, J., Bond, M. C., Ren, X. R., Lysterly, H. K., Barak, L. S., Chen, W. 2009.** The antihelmintic niclosamide inhibits Wnt/Frizzled1 signaling. *Biochemistry*. 48: 10267–10274.
- Chen, Y., Tsai, Y. H., Tseng, S. H. 2011.** Combined valproic acid and celecoxib treatment induced synergistic cytotoxicity and apoptosis in neuroblastoma cells. *Anticancer Research*. 31: 2231-2239.

- Chen, Z., Andrew, C., Karaplis, S. L., Ackerman, I. P., Pogribny, S., Chen, M. F., Simon, A. P., John R. S., Bottiglieri, S. B., Bagley, P., Selhub, P., Rudnicki, M., James, J., Rozen, R. 2001.** Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition. *Human Molecular Genetic*. 10:433–43.
- Cho. Y. S., Challa, S., Moquin, D., Genga, R., Ray, D., Guildford, M., Chan, F. 2009.** Phosphorylation-driven assembly of the RIP1–RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell*. 137: 1112-1123.
- Chong, C. R., Sullivan, D. J. 2007.** New uses for old drugs. *Nature*. 448:645–646.
- Christensen, B. C., Marsit, C. J., Houseman, E. A., Godleski, J. J., Longacker, J. L., Zheng, S. 2009.** Differentiation of lung adenocarcinoma, pleural mesothelioma, and nonmalignant pulmonary tissues using DNA methylation profiles. *Cancer Research*. 69: 6315-21.
- Chu, B. F., Karpenko, M. J., Liu, Z., Aimiwu, J., Villalona-Calero, M. A., Chan, K. K., Grever, M. R., Otterson, G. A. 2013.** Phase I study of 5-aza-2'-deoxycytidine in combination with valproic acid in non-small-cell lung cancer. *Cancer Chemotherapy Pharmacology*. 71(1): 115-121.
- Chung, J. H., Lee, H. J., Kim, B. H., Cho, N. Y., Kang, G. H. 2011.** DNA methylation profile during multistage progression of pulmonary adenocarcinomas. *Virchow Arch*. 459: 201-11.
- Chung, J. H., Lee, H. J., Kim, B. H., Cho, N. Y., Kang, G. H. 2011.** DNA methylation profile during multistage progression of pulmonary adenocarcinomas. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 459: 201–211.
- Clevers, H., Nusse, R. 2012.** Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell*. 149:1192–1205.
- Cooper, W.A., Lam, D.C.L., Toole, S.A.O., Minna, J. 2013.** Molecular biology of lung cancer. *Journal of Thoracic Disease* 5: 479-490.
- Cory, S., Adams, J. M. 2002.** The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Review Cancer*. 2: 647–656.
- Coşkun-Arı, F.F. 2003.** Western Blotlama Yöntemi ile Protein Tespiti: Uygulamalı Hücre Kültürü Teknikleri Kurs Kitabı, Isparta Türkiye, 189-198.
- Cozzi, L., Fogliata, A., Bolsi, A., Nicolini, G., & Bernier, J. 2004.** Three-dimensional conformal vs. intensity-modulated radiotherapy in head-and-neck cancer patients: comparative analysis of dosimetric and technical parameters. *International Journal of Radiation Oncology*. 58(2): 617-624.

Creagh, E. M., Conroy, H., Martin, S. J. 2003. Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. *Immunology Review*. 193: 10–21.

Darnell, J. E., Kerr, I. M., Stark, G. R. 1994. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*. 264: 1415-1421.

Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C. 2002. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 417: 949-54.

Degterev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., Cuny, G. D., Mitchison, T. J., Moskowitz, M. A., Yuan, J. 2005. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nature Chemical Biology*. 1: 112-119.

Degterev, Z., Huang, M., Boyce, Y., Li, P., Jagtap, N. 2005. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nature Chemical Biology*. 112-119.

Dela, C. S., Tanoue, L. T., Matthay, R. A. 2011. Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention. *Clinics in chest medicine*. 32: 605–644.

Devesa, S. S., Bray, F., Vizcaino, A. P., Parkin, D. M. 2005. International lung cancer trends by histologic type: male:female differences diminishing and adenocarcinoma rates rising. *International Journal of Cancer*. 117(2): 294–299.

Dexter, S.J., Camara, M., Davies, M., Shakesheff, K.M. 2003. Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. *Biomaterials*. 24: 27–34.

Diliberti, J. H., Farndon, P. A., Dennis, N. R., Curry, C. 1984. The fetal valproate syndrome. *American Journal of Medical Genetics*. 19(3): 473-481.

Ding, L., Getz, G., Wheeler, D. A., Mardis, E. R., McLellan MD, Cibulskis K, Sougnez C, Greulich H, Muzny DM, Morgan MB, Fulton L, Fulton RS, Zhang Q, Wendl MC, Lawrence MS, Larson DE, Chen K, Dooling DJ, Sabo A, Hawes AC, Shen H, Jhangiani SN, Lewis LR, Hall O, Zhu Y, Mathew T, Ren Y, Yao J, Scherer SE, Clerc K, Metcalf GA, Ng B, Milosavljevic A, Gonzalez-Garay ML, Osborne JR, Meyer R, Shi X, Tang Y, Koboldt DC, Lin L, Abbott R, Miner TL, Pohl C, Fewell G, Haipok C, Schmidt H, Dunford-Shore BH, Kraja A, Crosby SD, Sawyer CS, Vickery T, Sander S, Robinson J, Winckler W, Baldwin J, Chirieac LR, Dutt A, Fennell T, Hanna M, Johnson BE, Onofrio RC, Thomas RK, Tonon G, Weir BA, Zhao X, Ziaugra L, Zody MC, Giordano T, Orringer MB, Roth JA, Spitz MR, Wistuba II, Ozenberger B, Good PJ, Chang AC, Beer DG, Watson MA, Ladanyi M, Broderick S, Yoshizawa A, Travis WD, Pao W, Province MA,

Weinstock GM, Varmus HE, Gabriel SB, Lander ES, Gibbs RA, Meyerson M, Wilson RK. 2008. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature*, 455:1069-1075.

Doi, S., Soda, H., Oka, M., Tsurutani, J., Kitazaki, T., Nakamura, Y. 2004. The histone deacetylase inhibitor FR901228 induces caspase-dependent apoptosis via the mitochondrial pathway in small cell lung cancer cells. *Molecular Cancer Therapy*. 3: 1397-1402.

Dolinoy, D. C., Weidman, J. R., Jirtle, R. L. 2007. Epigenetic gene regulation: Linking early developmental environment to adult disease. *Reproductive Toxicology*. 23: 297-307.

Downward, J. 2003. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nature Review Cancer*. 3:11-22.

Duenas-Gonzalez, A., Candelaria, M., Perez-Plascencia, C., Perez-Cardenas, E., Cruz-Hernandez, E. 2008. Valproic acid as epigenetic cancer drug preclinical, clinical and transcriptional effects on solid tumors. *Cancer Treatment Reviews*. 34: 206-222.

Dumitrescu, R. G. 2012. Epigenetic markers of early tumor development. *Methods in Molecular Biology*. 863:3–14.

Ellis, H. M., Horvitz, H. R. 1986. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. Elegans*. *Cell*. 44: 817-829.

Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Nagata, S. 1998. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*. 391: 43–50.

Erdoğan, B. B. 2003. Apoptozis mekanizmaları: tümör gelişiminde fas-faslı bağımlı apoptozis. *Akciğer Arşivi*. 4: 165-174.

Esteller, M. 2006. The necessity of a human epigenome project. *Carcinogenesis*. 27: 1121-1125.

Esteller, M. 2008. Epigenetics in cancer. *The New England journal of medicine*. 358: 1148–1159.

Ettig, R., Kepper, N., Stehr, R., Wedemann, G., Rippe, K. 2011. Dissecting DNA-Histone Interactions in the Nucleosome by Molecular Dynamics Simulations of DNA Unwrapping. *Biophys Journal*.101(8): 1999–2008.

Falchook GS, Long GV, Kurzrock R. 2012. Dabrafenib in patients with melanoma, untreated brain metastases, and other solid tumours: a phase 1 dose-escalation trial. *The Lancet*. 379: 1893-901.

Fenaux, P., Mufti, G. J., Hellstrom-Lindberg, E., Santini, V., Finelli, C., Giagounidis, A., Schoch, R., Gattermann, N., Sanz, G., List, A., Gore, S. D., Seymour, J. F., Bennett, J. M., Byrd, J., Backstrom, J., Zimmerman, L., McKenzie, D., Beach, C., Silverman, L. R. 2009. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *The Lancet Oncology*. 10: 223–232

Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F. 2008. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No.

Fernandez-Capetillo, O, Allis, C., Nussenzweig, A. 2004. Phosphorylation of histone H2B at DNA double-strand breaks. *The Journal of Experimental Medicine*. 199(12): 112-119.

Finkel E. 2001. The mitochondrion: is it central to apoptosis?. *Science*. 292: 624-626.

Franko-Tobin, L. G., Mackey, L. V., Huang, W., Song, X., Jin, B. 2012. Notch1-mediated tumor suppression in cervical cancer with the involvement of SST signaling and its application in enhanced SSTR-targeted therapeutics. *Oncologist*. 17: 220-232.

Futreal, P. A., Kasprzyk, A., Birney, E., Mullikin, J. C., 2001. Wooster, R., Stratton, M.R. Cancer and genomics. *Nature*. 15;409(6822):850-852.

Galluzzi, L., Larochette, N., Zamzami, N., Kroemer, G. 2006. Mitochondria as therapeutic targets for cancer chemotherapy. *Oncogene*. 25:4812–4830.

Gan, C. P., Hamid, S., Hor, S. Y., Zain, R. B., Ismail, S. M. 2012. Valproic acid: growth inhibition of head and neck cancer by induction of terminal differentiation and senescence. *Head Neck*. 34: 344-353.

Global Cancer Facts & Figures 3rd Edition. American Cancer Society, Atlanta, Georgia.

Gottlicher, M. 2004. Valproic acid: an old drug newly discovered as inhibitor of histone deacetylases. *Annals Hematology*. 83: 91–92.

Gottlicher, M., Minucci, S., Zhu, P., Kramer, O. H., Schimpf, A., Giavara, S. 2001. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO Journal*. 20(24): 6969–6978.

Gottlicher, M., Minucci, S., Zhu, P., Kramer, O. H., Schimpf, A. 2001. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO Journal*. 20: 6969-6978.

Gräff, J., Mansuy, I. M. 2008. Epigenetic codes in cognition and behaviour. *Behavioural Brain Research*. 1; 192.

- Granvil, A. B. 1825.** An essay on Egyptian mummies, with observations on the art of embalming among the ancient Egyptians. *Philosophical transactions of the Royal Society of London*. 115: 269-316.
- Greenblatt, D. Y., Vaccaro, A. M., Jaskula-Sztul, R., Ning, L., Haymart, M. 2007.** Valproic acid activates notch-1 signaling and regulates the neuroendocrine phenotype in carcinoid cancer cells. *Oncologist*. 12: 942-951.
- Gronbaek, K., Hother, C., Jones, P. A. 2006.** Epigenetic changes in cancer. *Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica*. 115: 1039-1059.
- Grunstein, M. 1997.** Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*. 389: 349-352.
- Guadalupe, D. G., Alma, C. B., Erick, C. H., Jose, D. C., Luis, G. Q. 2012.** Effects of valproic acid upon the PI3K/PTEN/AKT pathway in MCF-7 breast cancer cells. *International Research Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2: 153-159.
- Gurvich, N., Tsygankova, M., Meinkoth, L., Klein, S. 2004.** Histone deacetylase is a target of valproic acid-mediated cellular differentiation. *Cancer research*. 64: 1079–1086
- Güleş Ö., Eren Ü. 2008.** Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. Y.Y.Ü. *Veteriner Fakültesi Dergisi*. 2: 73-78.
- Gorman, A., Healy, J., Jager, R., Samali, A. 2012.** Stress management at the ER: regulators of ER stress-induced apoptosis. *Pharmacology & Therapeutics*. 134: 306-316.
- Hafız, A. 2010.** Promoter Methylation in Prostate Cancer and its Application for the Early Detection of Prostate Cancer Using Serum and Urine Samples. *Biomarkers in Cancer*. 2: 17–33
- Halkidou, K., Gaughan, L., Cook, S., Leung, H. Y., Neal, D. E., Robson, C. N. 2004.** Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer. *Prostate*. 59: 177-189.
- Hammill, K., Uhr, W., Scheuermann, H. 1999.** Annexin V staining due to loss of membrane asymmetry can be reversible and precede commitment to apoptotic death. *Experimental Cell Research*. 25: 16-21.
- Harting, F. H., Hesse, W. 1879.** Der Lungenkrebs, die Bergenkrankheit in den Schneeberger gruben. *Vierteljahresschr Gerichtl Medizin*. 30: 296–309.
- Hawes, S. E., Stern, J. E., Feng, Q., Wiens, L. W., Rasey, J. S., Lu, H. 2010.** DNA hypermethylation of tumors from non-small cell lung cancer (NSCLC) patients is associated with gender and histologic type. *Lung Cancer*. 69: 172-179.

Herceg, Z., Vaissiere, T. 2011. Epigenetic mechanisms and cancer: an interface between the environment and the genome. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society*. 6: 804–819.

Hill, M. M., Adrain, C., Duriez, P. J., Creagh, E. M., Martin, S. J. 2004. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *Embo Journal*. 23: 2134–2145.

Holliday, R., Grigg, G. W. 1993. DNA methylation and mutation. *Mutation Research*. 285: 61-67.

Holliday, R., Pugh, J. 1975. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science*. 187: 226-232.

Howlander, N., Noone, A. M., Krapcho, M. 2010. SEER Cancer Statistics Review, 1975–2009 (Vintage 2009 Populations). *National Cancer Institute*. Bethesda, MD.

Hubaux, R., Vandermeers, F., Crisanti, M. C., Kapoor, V., Burny, A., Mascaux, C., Albelda, S. M., Willems, L. 2010. Preclinical evidence for a beneficial impact of valproate on the response of small cell lung cancer to first-line chemotherapy. *European Journal of Cancer*. 46(9): 1724-1734.

Jones, P. A., Baylin, S. B. 2002. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Review Genetic*. 3: 415–428.

Joza, N., Susin, S. A., Daugas, E., Stanford, W. L., Cho, S. K., Li, C. Y., Sasaki, T., Elia, A. J., Cheng, H. Y., Ravagnan, L., Ferri, K. F., Zamzami, N., Wakeham, A., Hakem, R., Yoshida, H., Kong, Y. Y., Mak, T. W., Zuniga-Pflucker, J. C., Kroemer, G., Penninger, J. M. 2001. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*. 410: 549–554.

Juengel, E., Makarevic, J., Tsaour, I., Bartsch, G., Nelson, K. 2013. Resistance after chronic application of the HDAC-inhibitor valproic acid is associated with elevated Akt activation in renal cell carcinoma in vivo. *PLoS One*. 8: 53100.

Kai, Y., Wang, Y., Lia, C., Wanga, X., Wang, M. 2017. Niclosamide induces apoptosis through mitochondrial intrinsic pathway and inhibits migration and invasion in human thyroid cancer in vitro. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 92: 403-411.

Kaminsky, V. O., Surova, O. V., Vaculova, A., Zhivotovsky, B. 2011. Combined inhibition of DNA methyltransferase and histone deacetylase restores caspase-8 expression and sensitizes SCLC cells to TRAIL. *Carcinogenesis*. 32: 1450-1458.

Karaboz, İ., Kayar, E., Akar S. 2008. Flow Sitometri ve Kullanım Alanları. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, 06(2): 01-18.

Karaçay, B. 2009. Kalıtımın yeni boyutu: epigenetik. *Bilim ve Teknik Dergisi*, 505: 32-37.

Karnoub, A.E., Weinberg, R. A. 2008. Ras oncogenes: split personalities. *Nature Review*. 9(7): 517-31

Khanim, F. L., Merrick, B. A., Giles, H. V., Jankute, M., Jackson, J. B., Giles, L. J., Birtwistle, J., Bunce, C. M., Drayson, M. T. 2011. Redeployment-based drug screening identifies the anti-helminthic niclosamide as anti-myeloma therapy that also reduces free light chain production. *Blood Cancer Journal*. 1: 39.

Kim, H. J., Bae, S. C. 2011. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs. *American Journal of Translational Research*. 3(2): 166-179.

Kim, H., Kwon, Y. M., Kim, J. S., Han, J., Shim, Y. M., Park, J. 2006. Elevated mRNA levels of DNA methyltransferase-1 as an independent prognostic factor in primary nonsmall cell lung cancer. *Cancer*. 107: 1042–1049.

Kim, S. J., Li, J. 2013. Caspase blockade induces RIP3-mediated programmed necrosis in Toll-like receptor-activated microglia. *Cell Death Disease*. 4: 716.

Kimura, M., Takenobu, H., Akita, N., Nakazawa, A., Ochiai, H., Shimozato, O. 2011. Bmi1 regulates cell fate via tumor suppressor WWOX repression in small-cell lung cancer cells. *Cancer science*. 102: 983–990.

Kinner A, Wu W, Staudt C, Iliakis G. 2008. Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Research*. 36: 5678-5694

Knudson, A. G. 1993. Antioncogenes and human cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 90: 10914-10921.

Kodani, M., Igishi, T., Matsumoto, S., Chikumi, H., Shigeoka, Y., Nakanishi, H. 2005. Suppression of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway is a determinant of the sensitivity to a novel histone deacetylase inhibitor, FK228, in lung adenocarcinoma cells. *Oncology Report*. 13: 477-483.

Koopman, G., Reutelingsperger, P., Kuijten, A., Keehnen, M., Pal, T. 1994. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*. 1;84: 1415-1420.

Kostrouchova, M., Kostrouch, Z. 2007. Valproic acid, a molecular lead to multiple regulatory pathways. *Folia Biologica*. 53: 37-49.

Kouzarides, T. 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 128: 693–705.

Kraljevic, S., Stambrook, P. J., Pavelic, K. 2004. Accelerating drug discovery. *EMBO Reports*. 5: 837–842.

Kramer, O. H., Zhu, P., Ostendorff, H. P., Golebiewski, M., Tiefenbach, J., Peters, M. A. 2003. The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2. *EMBO Journal*. 22(13): 3411–3420.

Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N., Aster, J. C. 2014. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. *Elsevier Health Sciences*.

Kuo LJ, Yang LX. 2008. Gamma-H2AX-A novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo*. 22: 305-310.

Langevin, S. M., Kelsey, K. T. 2013. The fate is not always written in the genes: epigenomics in epidemiologic studies. *Environmental and molecular mutagenesis*. 54: 533–541.

Larsen, J.E., Minna, J.D. 2011. Molecular Biology of Lung Cancer: Clinical Implications. *Clinics In Chest Medicine*, 32(4): 703–740

Lateef, M., Zargar, S. A., Khan, A. R., Nazir, M., Shoukat, A. 2008. Successful treatment of niclosamide- and praziquantel-resistant beef tapeworm infection with nitazoxanide. *International Journal of Infectious Diseases*. 12: 80–82.

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

Li, L. Y., Luo, X., Wang, X. 2001. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*. 412: 95–99.

Li, Q. L., Ito, K., Sakakura, C., Fukamachi, H., Inoue, K., Chi, X. Z., Lee, K. Y., Nomura, S., Lee, C. W., Han, S. B., Kim, H. M., Kim, W. J., Yamamoto, H., Yamashita, N., Yano, T., Ikeda, T., Itohara, S., Inazawa, J., Abe, T., Hagiwara, A., Yamagishi, H., Ooe, A., Kaneda, A., Sugimura, T., Ushijima, T., Bae, S. C., Ito, Y. 2002. Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer. *Cell*. 109: 113-124.

Li, R., Hu, Z., Sun, S. Y., Chen, Z. G., Owonikoko, T. K., Sica, G. L., Ramalingam, S. S., Curran, W. J., Khuri, F. R., Deng, X. 2013. Niclosamide overcomes acquired resistance to erlotinib through suppression of STAT3 in non-small cell lung cancer. *Molecular Cancer Therapy*. 12: 2200–2212.

Li, X., Zhu, Y., He, H., Lou, L., Ye, W., Chen, Y., Wang, J. 2013. Synergistically killing activity of aspirin and histone deacetylase inhibitor valproic acid (VPA) on hepatocellular cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 436(2): 259-264.

- Li, Y., Li, P. K., Roberts, M., Arend, R., Rajeev S., Donald, J. 2014.** Multi-targeted therapy of cancer by niclosamide: a new application for an old drug. *Cancer Letters*. 349(1): 8–14.
- Lieber, M., Smith, B., Szakal, A., Nelson-Rees, W., Todaro, G. 1976.** A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *International Journal of Cancer*. 17: 62–70.
- Liloglou, T., Bediaga, N. G., Brown, B. R. B., Field, J. K., Davies, M. P. A. 2014.** Epigenetic biomarkers in lung cancer. *Cancer Letters*. 342: 200-212.
- Lin, R. K., Hsu, H. S., Chang, J. W., Chen, C. Y., Chen, J. T., Wang, Y. C. 2007.** Alteration of DNA methyltransferases contributes to 5'CpG methylation and poor prognosis in lung cancer. *Lung cancer*. 55: 205–213.
- Lin, Y., Devin, A., Rodriguez, Y., Liu, Z. G. 1999.** Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis. *Genes & Development*. 13: 2514-2526.
- Linggi, B., Carpenter, G. 2006.** ErbB receptors: New insights on mechanisms and biology. *Trends Cell Biology*. 16: 649–656
- Liu, L., Andrews, L. G., Tollefsbol, T. O. 2006.** Loss of the human polycomb group protein BMI1 promotes cancer-specific cell death. *Oncogene*. 25: 4370–4375.
- Liu, P., Morrison, C., Wang, L., Xiong, D., Vedell, P., Cui, P., Hua, X., Ding, F., Lu, Y., James, M., Ebben, J.D., Xu, H., Adjei, A.A., Head, K., Andrae, J.W., Tschannen, M.R., Jacob, H., Pan, J., Zhang, Q., Van den Bergh, F., Xiao, H., Lo, K.C., Patel, J., Richmond, T., Watt, M.A., Albert, T., Selzer, R., Anderson, M., Wang, J., Wang, Y., Starnes, S., Yang, P., You, M. 2012.** Identification of somatic mutations in non-small cell lung carcinomas using whole exome sequencing. *Carcinogenesis*, 33:1270-1276
- Liu, Y., Lu, C., Yang, Y., Fan, Y., Yang, R., Liu, C. F., Korolev, N., Nordenskiöld, L. 2011.** Influence of histone tails and H4 tail acetylations on nucleosome-nucleosome interactions. *Journal of Molecular Biology*. 14:749-764.
- Londoño-Joshi, A., Arend, A. C., Aristizabal, L., Lu, W., Samant, R. S., Metge, B. J., Hidalgo, B., Grizzle, W. E., Conner, M., Forero-Torres, A., LoBuglio, A. F., Li, Y., Buchsbaum, D. J. 2014.** Effect of niclosamide on basallike breast cancers. *Molecular Cancer Therapy*. 13(4): 800-811
- Loo, G., Gulp, M., Depuydt, B., Srinivasula, S. M., Rodriguez, I., Alnemri, E. S., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Declercq, W., Vandenabeele, P. 2002.** The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differentiation*. 9:20–26.

- Lu, W., Lin, C., Roberts, M. J., Waud, W. R., Piazza, G. A., Li, Y. 2011.** Niclosamide suppresses cancer cell growth by inducing Wnt co-receptor LRP6 degradation and inhibiting the Wnt/beta-catenin pathway. *PLoS one*. 6: 29290.
- Luijsterburg, M. S., Attikum, H. 2011.** Chromatin and the DNA damage response: The cancer connection. *Molecular Oncology*. 5(4): 349-367.
- Machado, M. C., Bellodi-Privato, M., Kubrusly, M. S., Molan, N. A., Tharcisio, T. 2011.** Valproic acid inhibits human hepatocellular cancer cells growth in vitro and in vivo. *Journal of Experimental Therapeutics & Oncology*. 9: 85-92.
- Mahmood, T., Yang, P. 2012.** Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *North American Journal of Medical Sciences*. 4(9): 429-434.
- Marchetti, A. A., Papotti, M., Crinò, L., Rossi, G., Gridelli, C., Barberis, M., Maiorano, E., Normanno, N., Taddei, G. L., Scagliotti, G., Clemente, C., Pinto, C. 2013.** Recommendations for the analysis of ALK gene rearrangements in non-small-cell lung cancer: a consensus of the Italian Association of Medical Oncology and the Italian Society of Pathology and Cytopathology. *Journal Thoracic Oncology*. 8: 352-358.
- Marchetti, A., Chen, T. H., Richards, W. G. 2011.** Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer harboring BRAF mutations. *Journal Clinical Oncology*. 29: 3574-3579.
- MacFarlane, M., Ahmad, M., Srinivasula, M., Fernand, T., Cohen, M., Alnemri, S. 1997.** Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. *The Journal of Biological Chemistry*. 10: 25417-25420.
- Markus, D., Siegelin, C. B., Alain, C. B., 2014.** Epidermal growth factor receptor mutations in lung adenocarcinoma *Laboratory Investigation*. 94: 129-137.
- McIlwain, D.R., Berger, T., Mak, T. W. 2013.** Caspase Functions in Cell Death and Disease. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. 1:5(4).
- Merschjohann, K., Steverding, D. 2008.** In vitro trypanocidal activity of the anti-helminthic drug niclosamide. *Experimental Parasitology*. 118: 637-640.
- Mogi, A., Kuwano, H. 2011.** TP53 mutations in nonsmall cell lung cancer. *Journal Biomed Biotech*. 2011:583929. *Molecular Cell Biology*. 9:517-531.
- Mologni, L., Cleris, L., Magistroni, V., Piazza, R., Boschelli, F., Formelli, F., Gambacorti-Passerini, C. 2009.** Valproic acid enhances bosutinib cytotoxicity in colon cancer cells. *International Journal of Cancer*. 124: 1990-1996.
- Monin, M., Krause, P., Stelling, R., Bocuk, D., Niebert, S., Klemm, F., Pukrop, T., Koenig, S. 2016.** The anthelmintic niclosamide inhibits colorectal cancer cell lines via

modulation of the canonical and noncanonical Wnt signaling pathway. *Journal of Surgical Research*. 203(1): 193-205.

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

Murell, A., Rakyan, V. K., Beck, S. 2005. From genome to epigenome. *Human Molecular Genetic*. 14;(1).

Münster, P., Marchion, D., Bicaku, E., Schmitt, M., Lee, J. H., DeConti, R., Simon, G., Fishman, M., Minton, S., Garrett, C., Chiappori, A., Lush, R., Sullivan, D., Daud, A. 2007. Phase I trial of histone deacetylase inhibition by valproic acid followed by the topoisomerase II inhibitor epirubicin in advanced solid tumors: a clinical and translational study. *Journal of Clinical Oncology*. 25(15):1979-1985.

Nau, H., Hauck, R. S., Ehlers, K. 1991. Valproic acid-induced neural tube defects in mouse and human: aspects of chirality, alternative drug development, pharmacokinetics and possible mechanisms. *Pharmacology Toxicology*. 69(5):310-321.

Nicholson, D. W. 1999. Caspase structure, proteolytic substrates and function during apoptotic death. *Cell Death & Differentiation*. 6: 1028–1042.

Ochsner, A., DeBakey, M. 1939. Symposium on cancer: Primary pulmonary malignancy. Treatment by total pneumonectomy, analysis of 70 collected cases and presentation of 7 personal cases. *Surgery, Gynecology & Obstetrics - Journals*. 68: 435–451

Park, S. Y., Kim, B. H., Kim, J. H., Cho, N. Y., Choi, M., Yu, E. J. 2007. Methylation profiles of CpG island loci in major types of human cancers. *Journal of Korean Medical Science*. 22: 311-317.

Peng, L., Seto, E. 2011. Deacetylation of nonhistone proteins by HDACs and the implications in cancer. *Handb Exp Pharmacol*. 206: 39-56.

Phillips, T. 2008. The Role of Methylation in Gene Expression. *Nature Education*. 1(1): 116

Podhorecka M, Skladanowski A, Bozko P. 2010. H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy. *Journal of Nucleic Acids*. 1-9.

Rajendran, P., Ho, E., Williams, D. E., Dashwood, R. H. 2011. Dietary phytochemicals, HDAC inhibition, and DNA damage/repair defects in cancer cells. *Clinical Epigenetics*. 3:4

Rakiman I, Chinnadurai M, Baraneedharan U, FDP Solomon, Venkatachalam P. 2008. γ -H2AX assay: a technique to quantify DNA double strand breaks. *Tools & Techniques - Advanced Biotech.* 39-41.

Ramchandani, S., Bhattacharya, S. K., Cervoni, N., Szyf, M. 1999. DNA methylation is a reversible biological signal. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 96: 6107–6112.

Raso, M. G., Wistuba, A. 2007. Molecular pathogenesis of early-stage non-small cell lung cancer and a proposal for tissue banking to facilitate identification of new biomarkers. *Journal Thoracic Oncology.* 2: 128-135.

Rekhtman, N., Paik, P. K., Arcila, M. E., Tafe, L. J., Oxnard, G. R., Moreira, A. L., Travis, W. D., Zakowski, M. F., Kris, M. G., Ladanyi, M. 2012. Clarifying the spectrum of driver oncogene mutations in biomarker-verified squamous carcinoma of lung: lack of EGFR/KRAS and presence of PIK3CA/AKT1 mutations. *Clinical Cancer Research.* 18: 1167-1176.

Ren, X. M., Duan, L., He, Q. A., Zhang, Z., Zhou, Y., Wu, D. H. 2010. Identification of Niclosamide as a New Small-Molecule Inhibitor of the STAT3 Signaling Pathway. *ACS Medicinal Chemistry Letters.* 1: 454–459.

Robertson, K. D. 2001. DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene.* 20: 3139-3155.

Rubin, S. A. 1991. Lung cancer: past, present, and future. *Journal of Thoracic Imaging.* 7(1): 1–8.

Saelens, X., Festjens, N., Vande, W. L., Gurr, M., Loo, G., Vandenabeele, P. 2004. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene.* 23: 2861–2874.

Sami, S., Höti, N., Xu, H. M., Shen, Z., Huang, X. 2008. Valproic acid inhibits the growth of cervical cancer both in vitro and in vivo. *The Journal of Biochemistry.* 144: 357-362.

Sasaki, H., Moriyama, S., Nakashima, Y., Kobayashi, Y., Kiriya, M., Fukai, I. 2004. Histone deacetylase 1 mRNA expression in lung cancer. *Lung cancer.* 46: 171–178.

Sasse, J., Hemmann, U., Schwartz, C., Schniertshauer, U., Heesel, B., Landgraf, C., Schneider, M. J., Heinrich, P. C., Horn, F. 1997. Mutational analysis of acute-phase response factor/Stat3 activation and dimerization. *Molecular Cell Biology.* 17: 4677–4686.

Saveljeva, S., Laughlin, L., Vandenabeele, P., Samali, A. 2015. Endoplasmic reticulum stress induces ligand-independent TNFR1-mediated necroptosis in L929 cells. *Cell Death & Disease.* 6: 1587-1589

- Schneider, R., Grosschedl, R. 2007.** Dynamics and interplay of nuclear architecture, genome organization, and gene expression. *Genes & Development*. 21: 3027–3043.
- Schuler, M., Green, D. R. 2001.** Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochemical Society Transactions*. 29: 684–688.
- Scott, M., Langevin, R. A., Kratzke, T., Karl, T. K. 2015.** Epigenetics of Lung Cancer. *Translational Research*. 165(1): 74–90.
- Sequist, L.V., Heist, R.S., Shaw, A.T., Fidas, R., Rosovsky, R., Lennes, T., Digumarthy, S., Waltman, B.A., Bast, E., Tammireddy, S., Morrissey, L., Gainor, J. 2011.** Implementing multiplexed genotyping of non-small-cell lung cancers into routine clinical practice. *Annals of Oncology*, 22: 2616-2624.
- Shuai, K., Horvath, C. M., Huang, L. H., Qureshi, S. A., Cowburn, D., Darnell, J. E. 1994.** Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell*. 76:821–828.
- Song, J., Noh, J. H., Lee, J. H., Eun, J. W., Ahn, Y. M., Kim, S. Y., Lee, S. H., Park, W. S., Yoo, N. J., Lee, J. Y., Nam, S. W. 2005.** Increased expression of histone deacetylase 2 is found in human gastric cancer. *APMIS*. 113: 264-268.
- Steelman, L. S., Abrams, S. L., Whelan, J., Bertrand, F. E., Ludwig, D. E., Basecke, J., Libra, M., Stivala, F., Milella, M., Tafuri, A., Lunghi, P., Bonati, A., Martelli, A. M., McCubrey, J. A. 2008.** Contributions of the Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/mTOR and Jak/STAT pathways to leukemia. *Leukemia*. 22 :686–707.
- Subramanian, C., Hada, M., Opiari, A. W., Castle V. P., Kwok, R. P. 2013.** CREB binding protein regulates Ku70 acetylation in response to ionization radiation in neuroblastoma. *Molecular Cancer Research*. 11(2): 173-181.
- Sulewska, A., Niklinska, W., Kozlowski, M., Minarowski, L., Naumnik, W., Niklinski, J. 2007.** DNA methylation in states of cell physiology and pathology. *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 45: 149-158.
- Sun, L. C. 2013.** Valproic acid: pharmacology, mechanisms of action and clinical implications: The novel applications of anticonvulsant drug Valproic acid in cancer therapeutics. *Nova Science Publishers*. 3: 1-52
- Sun, L., Coy, H. D. 2014.** Anti-Convulsant Drug Valproic Acid in Cancers and in Combination Anti- Cancer Therapeutics. *Modern Chemistry & Applications*. 2: 1.
- Elmore, S. 2007.** Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathology*. 35(4): 495–516.
- Susin, S. A., Dugas, E., Ravagnan, L., Samejima, K., Zamzami, N., Loeffler, M., Costantini, P., Ferri, K. F., Irinopoulou, T., Prevost, M. C., Brothers, G., Mak, T.**

W., Penninger, J., Earnshaw, W. C., Kroemer, G. 2000. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *The Journal of Experimental Medicine*. 192: 571–580.

Szyf, M., Knox, D. J., Milutinovic, S., Slack, A. D., Araujo, F. D. 2000. How does DNA methyltransferase cause oncogenic transformation?. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 910: 156-174

Tam, I. Y., Chung, L. P., Suen, W.S., Wang, E., Wong, M. C., Ho, K. K., Lam, W. K., Chiu, S. W., Girard, L., Minna, J. D., Gazdar, A. F., Wong, M. P. 2006. Distinct epidermal growth factor receptor and KRAS mutation patterns in non–small cell lung cancer patients with different tobacco exposure and clinicopathologic features. *Clinical Cancer Research*. 12: 1647-1653.

Tan, J., Cang, S., Ma, Y., Petrillo, R. L., Liu, D. 2010. Novel histone deacetylase inhibitors in clinical trials as anti-cancer agents. *Journal of Hematology & Oncology*. 3: 5.

Taylor, R. C., Cullen, S. P., Martin, S. J. 2008. Apoptosis: Controlled demolition at the cellular level. *Nature Review Molecular Cell Biology*. 9: 231–241.

Travis, W. D., Brambilla, E., Müller, H.K., Harris, C. C. 2004. Pathology and Genetics Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart.

Ullrich, A., Schlessinger, J. 1990. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*. 61:203–212.

Ulukaya, E. 2001. Akciğer Kanseri, Tanı ve Tedavide Temel İlkeler ve Uygulamalar: Hücre Siklusu ve Apoptozis. Avrupa Tıp Kitapçılık, İstanbul.

Ulukaya, E. 2003. Apoptozis ders notları. Erişim:[<http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozisdersnotu>]. (Erişim tarihi, 2017).

Ulukaya, E., Acilan, C., Yilmaz, Y. 2011. Apoptosis: Why and how does it occur in biology?. *Cell Biochem Function*. 29: 468-480.

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

Vaissiere, T., Sawan, C., Herceg, Z. 2008. Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutation Research*. 659: 40–48.

Vecht, C. J., Wagner, G. L., Wilms, E. B. 2003. Interactions between antiepileptic and chemotherapeutic drugs. *Lancet Neurology*. 2(7): 404-409.

Waddington, C. 1940. Organisers and genes. UK Cambridge University Press, Cambridge.

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

Wang, W., Qin, J., Voruganti, S., Nag, S., Zhou, J., Zhang, J. 2015. Polycomb Group (PcG) Proteins and Human Cancers: Multifaceted Functions and Therapeutic Implications. *Medical Research Review*. 35(6): 1220–1267.

Wang, Y., Kuramitsu, Y., Kitagawa, T., Tokuda, K., Baron, B., Akada, J., Nakamura, K. 2015. The Histone Deacetylase Inhibitor Valproic Acid Sensitizes Gemcitabine-Induced Cytotoxicity in Gemcitabine-Resistant Pancreatic Cancer Cells Possibly Through Inhibition of the DNA Repair Protein Gamma-H2AX. *Targeted Oncology*. 10: 575-581.

Warnecke, P. M., Bestor, T. H. 2000. Cytosine methylation and human cancer. *Current Opinion in Oncology*. 12: 68-73.

Weinbach, E. C., Garbus, J. 1969. Mechanism of action of reagents that uncouple oxidative phosphorylation. *Nature*. 221:1016–1018.

Witt, D., Burfeind, P., Hardenberg, S., Opitz, L., Salinas-Riester, G., 2013. Valproic acid inhibits the proliferation of cancer cells by re-expressing cyclin. *Carcinogenesis* 34: 1115-1124.

Yasmin, R., Siraj, S., Hassan, A., Khan, A. R., Abbasi, R., Ahmad, N. 2015. Epigenetic regulation of inflammatory cytokines and associated genes in Human malignancies. *Mediators Inflammation*. 2015: 201-209.

Yisraeli, J., Szyf, M.1984. The pattern of methylation of eukaryotic genes. *In DNA Methylation: Biochemistry and Biological Significance*. 353–378.

You, S., Li, R., Hu, Z., Chen, Z. G., Sica, G. L., Khuri, F. R., Curran, W. J., Shin, D. M., Deng, X. 2013. Inhibition of STAT3 by niclosamide synergizes with erlotinib against head and neck cancer. *PLoS one*. 8:74670.

Li, Y., Li, P. K., Roberts, M., Arend, R., Samant, R., Buchsbaum, D. 2014. Multi-targeted therapy of cancer by niclosamide: a new application for an old drug. *Cancer Letters*. 349(1): 8–14.

Wu, S., Burns, F., McDonald, E., Jiang, W., Meng, R., Krantz, D., Kao, G., Gan, D., Zhou, Y., Muschel, R., Hamilton, R., Spinner, B., Markowitz, S., Wu, G. 1997. KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nature Genetic*. 17: 141-143.

You, S., Li, R., Park, D., Xie, M., Sica, G. L., Cao, Y., Xiao, Z. Q., Deng, X. 2014. Disruption of STAT3 by niclosamide reverses radioresistance of human lung cancer. *Molecular cancer therapeutics*. 13(3): 606-616.

Youlden, D. R., Cramb, S. M., Baade, P. D. 2008. The International Epidemiology of Lung Cancer: geographical distribution and secular trends. *Journal of Thoracic Imaging*. 3(8): 819–831.

Yu, H., Pardoll, D., Jove, R. 2009. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nature Review Cancer*. 9: 798–809.

Yu, K., Wang, T., Li, Y., Wang, C., Wang, X., Zhang, M., Xie, Y., Li, S. 2017. Niclosamide induces apoptosis through mitochondrial intrinsic pathway and inhibits migration and invasion in human thyroid cancer in vitro. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 92: 403-411.

Zhang, G., Gurtu, V., Kain, R., Yan, G. 1997. Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of annexin V. *Biotechniques*. 23(3): 525-531.

Zhang, J. H., Zhang, Y., & Herman, B. (2003). Caspases, apoptosis and aging. *Ageing research reviews*. 2(4): 357-366.

Zhang, Z., Yamashita, H., Toyama, T., Sugiura, H., Ando, Y., Mita, K., Hamaguchi, M., Hara, Y., Kobayashi, S., Iwase, H. 2005. Quantitation of HDAC1 mRNA expression in invasive carcinoma of the breast. *Breast Cancer Research and Treatment*. 94: 11 -16.

Zhong, Z., Wen, Z., Darnell, J. E. 1994. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science*. 264: 95.

Zhu, P., Martin, E., Mengwasser, J., Schlag, P., Janssen, K. P., Gottlicher, M. 2004. Induction of HDAC2 expression upon loss of APC in colorectal tumorigenesis. *Cancer Cell*. 5: 455- 463.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Oğuzhan AKGÜN

Doğum Yeri ve Tarihi: Bursa, 17 Kasım 1990

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise: Bursa Cem Sultan Lisesi (2004-2007)

Lisans: Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü (2010-2015)

Yüksek Lisans: Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Ana Bilim Dalı (2015-2017)

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

TEZ ÇOĞALTMA VE ELEKTRONİK YAYIMLAMA İZİN FORMU

Yazar Adı Soyadı	Oğuzhan AKGÜN
Tez Adı	KÖK HÜCRE WNT YOLAK İNHİBİTÖRÜ OLAN NİKLOZAMİDİN, HİSTON DEASETİLİZ İNHİBİTÖRÜ (HDAC) OLAN VALPROİK ASİT İLE KOMBİNASYONLARININ AKCİĞER KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI
Enstitü	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji Anabilim Dalı
Tez Türü	Yüksek Lisans Tezi
Tez Danışman(lar)ı	Doç. Dr. Ferda ARI
Çoğaltma (Fotokopi Çekim) izni	<input type="checkbox"/> Tezimden fotokopi çekilmesine izin veriyorum <input type="checkbox"/> Tezimin sadece içindekiler, özet, kaynakça ve içeriğinin % 10 bölümünün fotokopi çekilmesine izin veriyorum <input checked="" type="checkbox"/> Tezimden fotokopi çekilmesine izin vermiyorum
Yayımlama izni	<input type="checkbox"/> Tezimin elektronik ortamda yayımlanmasına izin Veriyorum

Hazırlamış olduğum tezimin belirttiğim hususlar dikkate alınarak, fikri mülkiyet haklarım saklı kalmak üzere Uludağ Üniversitesi Kütüphane ve Dokümantasyon Daire Başkanlığı tarafından hizmete sunulmasına izin verdiğimi beyan ederim.

Tarih : 29.12.2017

İmza:

