



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK
LİSANS
TEZİ

MEME KANSERİ HÜCRE HATTINDA FARNESİL
TRANSFERAZ İNHİBİTÖRÜNÜN GEN EKSPRESYONU
ÜZERİNE PROLİFERATİF VE APOPTOTİK ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

EMİNE FİRDEVS YILDIRIM

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

EYLÜL 2018



**MEME KANSERİ HÜCRE HATTINDA FARNESİL TRANSFERAZ
İNHİBİTÖRÜNÜN GEN EKSPRESYONU ÜZERİNE PROLİFERATİF VE
APOPTOTİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Emine Firdevs YILDIRIM

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

EYLÜL 2018

Emine Firdevs YILDIRIM tarafından hazırlanan“Meme Kanseri Hücre Hattında Farnesil Transferaz İnhibitörünün Gen Ekspresyonu Üzerine Proliferatif ve Apoptotik Etkisinin Araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / ~~OY ÇOKLUĞU~~ ile Gazi Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Hacer İlke ÖNEN

Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD.

Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

.....


Başkan : Doç. Dr. Ebru ALP

Tıbbi Biyoloji AD Giresun Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

.....


Üye : Doç. Dr. Atiye Seda YAR SAĞLAM

Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD.

Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

.....


Tez Savunma Tarihi: 18/09/2018

Jüri üyeleri tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa ASLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
 - Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
 - Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,
- bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.



Emine Firdevs YILDIRIM

18.09.2018

MEME KANSERİ HÜCRE HATTINDA FARNESİL TRANSFERAZ
İNİHİTÖRÜNÜN GEN EKSPRESYONU ÜZERİNE PROLİFERATİF VE
APOPTOTİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI
(Yüksek Lisans Tezi)

Emine Firdevs YILDIRIM

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
EYLÜL 2018

ÖZET

Meme kanseri Dünya’da kadınlar arasında görülen en yaygın kanser türüdür. Etiyolojisinde hem genetik hem de çevresel faktörler rol almaktadır. Konvansiyonel tedavilerde etkinliğin artırılması ve tedavide yeni ajanlar ile yöntemlerin geliştirilmesi önemli araştırma konuları arasındadır. Bu çalışmada MCF-7 meme kanseri hücre hattında anakardik asit ve LB42708’in farklı konsantrasyonlarda ve sürelerde tek başlarına ve anakardik asit önkoşullaması ile birlikte uygulandıktan sonra hücrelere olan olası etkilerini araştırmayı amaçladık. AA ve LB42708’in MCF-7 hücrelerine etkileri hücre canlılığı, sitotoksisite ve aktif kaspaz-3 düzeylerine göre değerlendirildi. Bununla birlikte, proapoptotik (BAK ve BAX), antiapoptotik (BCL2L1 ve BCL2) ve hücre döngüsünde görevli (CCND1, cMYC ve cFOS) genlerin mRNA ifadeleri nicel gerçek zamanlı PCR (qPCR) ile belirlendi. mRNA düzeylerinin normalizasyonu için GAPDH kullanıldı. Anakardik asit önkoşullaması ve birlikte uygulanmasının LB42708 ile uyarılan hücre canlılığı ve sitotoksisite oranını azalttığı belirlendi. AA önkoşullaması ve birlikte uygulanması LB42708’in tek başına uygulanması ile karşılaştırıldığında MCF-7 hücrelerinde LB42708 ile uyarılan kaspaz bağımlı apoptozun arttığı saptandı. Bununla birlikte, AA ile önkoşullama ve birlikte uygulama sonrası antiapoptotik BCL2L1 ve BCL2 mRNA ifadesi azalırken, proapoptotik BAK ve BAX’ın mRNA seviyeleri arttı. Ancak, CCND1, cMYC ve cFOS genlerinin mRNA ifade seviyelerinin AA uygulamasından sonra anlamlı olarak etkilenmediği belirlendi. Preklinik in vitro çalışmamız, AA ile önkoşullamanın ve birlikte uygulamanın MCF-7 hücrelerinde LB42708’in sitotoksik etkilerini azalttığını ve meme kanseri hücrelerinin ölümünü arttırdığını gösterdi. Bulgularımızı doğrulamak için in vivo modellerin kullanıldığı daha ileri analizlerin yapılması gerekmektedir.

Bilim Kodu : 1055.1
Anahtar Kelimeler : LB42708, anakardik asit, meme kanseri, farnesiltransferaz
İnhibitörü
Sayfa Adedi : 77
Danışman : Doç. Dr. Hacer İlke ÖNEN

EFFECTS OF FARNESYL TRANSFERAZ INHIBITORS ON PROLIFERATIVE
AND APOPTOTIC GENE EXPRESSION ON BREAST CANCER CELL LINE

(M. Sc. Thesis)

Emine Firdevs YILDIRIM

GAZI UNIVERSITY

INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

SEPTEMBER 2018

ABSTRACT

Breast cancer is the most common type of cancer in women around the world. Both genetic and environmental factors play a role in the etiology. Increasing efficacy of conventional treatments and development of new agents and methods in treatment are important research topics. We aimed to investigate possible apoptotic effects of AA and LB42708 on MCF-7 breast cancer cells both alone and combination at different concentrations and period of time. The effects of both AA and LB42708 on MCF-7 cells were evaluated in terms of cell viability, cytotoxicity, and cleaved caspase 3 levels. Moreover, the mRNA expression levels of proapoptotic (*BAK* and *BAX*), antiapoptotic (*BCL2L1* and *BCL2*), and cell cycle regulator (*CCND1*, *cMYC* and *cFOS*) genes were detected with quantitative real time PCR (qPCR). GAPDH was used to normalize mRNA levels. We observed that pretreatment and co-incubation by AA decreased the percentage of LB42708-induced cell viability and cytotoxicity. Elevation of cleaved caspase-3 levels were also detected after pretreatment and co-incubation by AA. Compared with LB42708 alone treatment, we found that pretreatment and co-incubation by AA increased LB42708-induced caspase-related apoptosis in MCF-7 cells. Moreover, after pretreatment and co-incubation by AA, we detected the mRNA expression levels of antiapoptotic *BCL2L1* and *BCL2* was decreased, whereas proapoptotic *BAK* and *BAX* mRNA levels was elevated. Nevertheless, mRNA expression level of *CCND1*, *cMYC* and *cFOS* genes were not significantly affected by AA exposure. Our preclinical in vitro study suggest that pretreatment and co-incubation by anacardic acid may reduce cytotoxic effect of LB42708 on MCF-7 cells and increase cell death response of breast cancer cells. Further analyses using *in vivo* models are needed to confirm these findings.

Science code : 1055.1

Key words : LB42708, anacardic acid, breast cancer, farnesyltransferase
inhibitör

Page number : 77

Advisor : Assoc. Prof. Dr. Hacer İlke ÖNEN

TEŞEKKÜR

Yüksek lisansa başladığım ilk günden itibaren her adımda yol gösteren, yardımlarını gece-gündüz esirgemeyen, zengin akademik birikimiyle bu tez çalışmasının tüm aşamalarına sabır, özveri ve hoşgörüyü destek veren değerli danışman hocam, Sayın Doç. Dr. H. İlke ÖNEN'e,

Çalışma disiplini ile yüksek lisans eğitimim boyunca ilgisi ve bilgisi ile engin katkılar sağlayan, cesaret veren, tez çalışmasının her aşamasında kıymetli zamanını ayıran ve benim kadar emek vererek yanımda olan kıymetli hocam, Sayın Doç. Dr. Atiye Seda YAR SAĞLAM'a,

Yüksek lisans eğitimime katkılarından dolayı değerli hocalarım, Sayın Prof. Dr. Sevda MENVEŐE'ye, Sayın Prof. Dr. Abdullah EKMEKÇİ'ye ve Sayın Prof. Dr. Ece KONAÇ'a,

Hayatımın her döneminde maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili aileme,

En içten duygularıyla teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Meme Anatomisi.....	3
2.2. Meme Kanseri.....	5
2.2.1. Meme kanseri epidemiyolojisi ve risk faktörleri	5
2.3. Meme Kanserinin Sınıflandırılması	8
2.3.1. Östrojen reseptörü (ER).....	9
2.3.2. Progesteron reseptörü (PR).....	9
2.3.3. İnsan epidermal büyüme faktör reseptörü 2 (HER2).....	10
2.3.4. Sitokeratin 5/6 (CK5/6).....	10
2.3.5. Epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR).....	10
2.4. Meme Kanseri Tedavisi	11
2.5. Epigenetik.....	11
2.5.1. HAT ve HDAC'lar	13
2.6. Anakardik Asit (AA).....	14
2.7. Farnesil Transferaz İnhibitörleri (FTIs).....	15
2.7.1. LB42708	17

	Sayfa
2.8. Hücre Ölümü.....	18
2.8.1. Apoptoz.....	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler	21
3.1.1. Kullanılan cihazlar.....	21
3.1.2. Kullanılan kitler	21
3.1.3. Kullanılan sarf malzemeleri.....	22
3.1.4. Kullanılan kimyasal maddeler	22
3.2. Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanışı	22
3.2.1. %10 FBS içeren DMEM besiyerinin hazırlanması	22
3.2.2. % 1 FBS içeren DMEM besiyerinin hazırlanması	23
3.2.3. 5 mg/mL stok MTT hazırlanması.....	23
3.2.4. 0,01 M PBS (pH:7.4) çözeltisinin hazırlanması	23
3.2.5. 20 mM stok anakardik asit hazırlanması	23
3.2.6. 20 mM stok LB42708 hazırlanması	24
3.3. Yöntemler	24
3.3.1. Hücre kültürü	24
3.3.2. Hücre canlılığının MTT yöntemi ile belirlenmesi	25
3.3.3. Besiyerine salınan laktat dehidrojenaz (LDH) miktarının ölçülerek sitotoksik etkinin belirlenmesi	26
3.3.4. MCF-7 hücrelerinden protein eldesi.....	27
3.3.5. Protein miktarının ölçümü	27
3.3.6. Aktif kaspaz 3 miktarının belirlenmesi.....	28
3.3.7. Hücre kültüründen total RNA'nın elde edilmesi.....	29
3.3.8. Komplementer DNA (cDNA) sentezi.....	30
3.3.9. Gen ifadesinin real-time PCR ile belirlenmesi.....	31

	Sayfa
3.4. İstatistiksel Analiz Yöntemleri	37
4. BULGULAR	39
4.1. Tekli Uygulamaların Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin MTT Yöntemi ile Belirlenmesi.....	39
4.1.1. LB42708'in hücre canlılığı üzerine etkilerinin MTT yöntemi ile belirlenmesi.....	39
4.1.2. Anakardik asit'in hücre canlılığı üzerine etkilerinin MTT yöntemi ile belirlenmesi	40
4.2. MCF-7 Hücrelerine Tek Başına AA Uygulaması Ardından, LB42708'in de Ortama Eklenmesi Sonucu Hücre Canlılığının Belirlenmesi	41
4.2.1. Sabit AA konsantrasyonunun (10 µM) 2 ve 4 saat tek başına uygulanması ardından, LB42708'in de değişen konsantrasyonlarda ortama eklenmesi sonucu, MCF-7 hücrelerinde belirlenen hücre canlılık oranları.....	41
4.2.2. Sabit AA konsantrasyonunun (25 µM) 2 ve 4 saat tek başına uygulanması ardından, LB42708'in de değişen konsantrasyonlarda ortama eklenmesi sonucu, MCF-7 hücrelerinde belirlenen hücre canlılık oranları.....	42
4.2.3. Sabit AA konsantrasyonunun (50 µM) 2 ve 4 saat tek başına uygulanması ardından, LB42708'in de değişen konsantrasyonlarda ortama eklenmesi sonucu, MCF-7 hücrelerinde belirlenen hücre canlılık oranları.....	43
4.3. Besiyerine Salınan Laktat Dehidrogenaz (LDH) Miktarı ile Sitotoksosite Oranının Belirlenmesi	44
4.4. Kesilmiş Kaspaz-3 Düzeyi ile Hücrelerdeki Kaspaz Bağımlı Apoptoz Oranının Belirlenmesi	46
4.5. MCF-7 Hücrelerine Uygulanan AA ve LB42708 'in Proapoptotik, Antiapoptotik ve Hücre Döngüsünde Görevli Genlerin mRNA İfade Düzeylerine Olan Etkilerinin Belirlenmesi	47
5. TARTIŞMA.....	51
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	59
KAYNAKLAR.....	61
ÖZGEÇMİŞ.....	77

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Meme kanseri moleküler sınıflandırması	9
Çizelge 2.2. HAT inhibitörleri ve hedefleri.....	14
Çizelge 3.1. cDNA tepkime karışımı	30
Çizelge 3.2. Otomatik ısı döngüsü cihazında uygulanan program.....	31
Çizelge 3.3. <i>BCL2</i> , <i>BCL2L1</i> , <i>BAX</i> , <i>BAK</i> , <i>CCND1</i> , <i>cMYC</i> , <i>cFOS</i> ve <i>GAPDH</i> nicel gerçek zamanlı PCR tepkime karışımı.....	35
Çizelge 3.4. <i>BCL2</i> , <i>BCL2L1</i> , <i>BAX</i> , <i>BAK</i> , <i>CCND1</i> , <i>cMYC</i> , <i>cFOS</i> ve <i>GAPDH</i> genlerinin ifade düzeylerinin belirlenmesi için kullanılan nicel gerçek zamanlı PCR tepkime programı	36

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Meme anatomisi	4
Şekil 2.2. Histon asetilasyonu ve deasetilasyonu	12
Şekil 2.3. Anakardik asid'in kimyasal yapısı	15
Şekil 2.4. Ras proteininin post translasyonel modifikasyonu	17
Şekil 2.5. LB42708'in kimyasal yapısı	18
Şekil 2.6. Hücre ölümü sınıflandırması	19
Şekil 3.1. BCL2 mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi	31
Şekil 3.2. BCL2L1 mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi.....	32
Şekil 3.3. BAX mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi.....	32
Şekil 3.4. BAK mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi.....	33
Şekil 3.5. CCND1 mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi.....	33
Şekil 3.6. cMYC mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi.....	34
Şekil 3.7. cFOS mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi.....	34
Şekil 3.1. GAPDH mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi.....	35
Şekil 4.1. MCF-7 hücrelerine LB42708'in değişen konsantrasyonlarda 24 saat süresince uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları	40
Şekil 4.2. MCF-7 hücrelerine AA'in değişen süre ve konsantrasyonlarda uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları	41
Şekil 4.3. Sabit 10 µM AA konsantrasyonunun 2 ve 4 saat MCF-7 hücrelerine ön uygulamasını takiben kuyulara eklenen 5, 10, 25 ve 50 µM LB42708 ile birlikte 24 saat bekletilmesinden sonra kontrol ile karşılaştırılarak belirlenen hücre canlılık oranları.....	42

Şekil	Sayfa
Şekil 4.4. Sabit 25 µM AA konsantrasyonunun 2 ve 4 saat MCF-7 hücrelerine ön uygulamasını takiben kuyulara eklenen 5, 10, 25 ve 50 µM LB42708 ile birlikte 24 saat bekletilmesinden sonra kontrol ile karşılaştırılarak belirlenen hücre canlılık oranları.....	43
Şekil 4.5. Sabit 25 µM AA konsantrasyonunun 2 ve 4 saat MCF-7 hücrelerine ön uygulamasını takiben kuyulara eklenen 5, 10, 25 ve 50 µM LB42708 ile birlikte 24 saat bekletilmesinden sonra kontrol ile karşılaştırılarak belirlenen hücre canlılık oranları.....	44
Şekil 4.6. MCF-7 hücrelerine, sabit AA'in değişen sürelerde, LB42708'in değişen konsantrasyonlarda tek başlarına ve 2 saat 25 µM sabit AA önkoşullaması ardından ortama eklenen LB42708'in değişen konsantrasyonlarının 24 saat uygulanmasının sonunda besiyerine salınan LDH oranları	45
Şekil 4.7. MCF-7 hücrelerine, sabit AA'in değişen sürelerde, LB42708'in değişen konsantrasyonlarda tek başlarına ve 4 saat 25 µM sabit AA önkoşullaması ardından ortama eklenen LB42708'in değişen konsantrasyonlarının 24 saat uygulanmasının sonunda besiyerine salınan LDH oranları	46
Şekil 4.8. MCF-7 hücrelerine, LB42708'in değişen, AA'in sabit konsantrasyonda tek başlarına ve 2 saat 25 µM sabit AA önkoşullaması ardından ortama eklenen LB42708'in değişen konsantrasyonlarının 24 saat uygulanmasının sonunda belirlenen aktif kaspaz-3 miktar değişimleri	47
Şekil 4.9. MCF-7 hücrelerine, LB42708'in değişen (10 ve 25 µM), AA'in (25 µM) sabit konsantrasyonda tek başlarına ve 2 saat 25 µM sabit AA önkoşullaması ardından ortama eklenen LB42708'in değişen konsantrasyonlarının 24 saat uygulanmasının sonunda apoptotik (BAX ve BAK), antiapoptotik (BCL2 ve BCL2L1) ve hücre döngüsünde yer alan (CCND1, cMYC ve cFOS) genlerin mRNA ifade düzeyleri	48

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu tez çalışmasında kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklama

μm	Mikrometre
cm^2	Santimetrekare
dk	Dakika
g	Gram
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
$^{\circ}\text{C}$	Santigrad derece
rpm	Dakika başına dönme sayısı
sn	Saniye
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre

Kısaltmalar

Açıklama

AA	Anacardic Acid (Anakardik Asit)
BAK	BCL2 Antagonist Killer (BCL2 Homolog Antagonist Öldürücü)
BAX	BCL2 Associated X Protein (BCL2 İlişkili X Proteini)
BCL2	B Cell Lymphoma-2 (B Hücreli Lenfoma-2)
CICD	Caspase Independent Cell Death (Kaspaz Bağımsız Hücre Ölümü)
cDNA	Complementary DNA (Komplementer DNA)
CCND1	Cyclin D1 (Siklin D1)
CK5/6	Cytokeratin 5/6 (Sitokeratin 5/6)

Kısaltmalar	Açıklama
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl Sulfoxide (Dimetilsülfoksit)
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Deoksiribonükleik Asit)
DTTP	Deoxy Thymidine Triphosphate (Deoksitimidin Trifosfat)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid (Etilendiamintetraasetik asit)
EGFR	Epidermal growth factor receptor (Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü)
ER	Estrogen Receptor (Östrojen Reseptörü)
EtBr	Ethidium Bromide (Etidyum Bromür)
FBS	Fetal Bovine Serum (Fetal Sığır Serumu)
FDA	Food and Drugs Administration (Gıda ve İlaç Dairesi)
FTI	Farnesyltransferase İnhibitor (Farnesiltransferaz İnhibitörü)
HAT	Histone Acetyltransferase (Histon Asetiltransferaz)
HDAC	Histone Deacetylases (Histon Deasetilaz)
HER-2	Human epidermal growth factor receptor 2 (İnsan Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü 2)
HRP	Horseradish Peroxidase (Yaban Turpu Peroksidazı)
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell (İnsan Umbilikal Ven Endotel Hücresi)
IARC	International Agency for Research on Cancer (Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı)
IGFR	Insulin-like Growth Factor Receptor (İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Reseptörü)
LDH	Lactate dehydrogenase (Laktat Dehidrojenaz)
lncRNA	Long Non-Coding RNA (Uzun kodlanmayan RNA)
miRNA	Micro RNA (Mikro RNA)
MOMP	Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization (Mitokondri Dış Membran Geçirgenliği)
mRNA	Messenger RNA (mesajcı RNA)

Kisaltmalar	Açıklama
NCCD	Nomenclature Committee on Cell Death (Hücre Ölümü İsimlendirme Komitesi)
p53	Tumor Protein 53 (Tümör Protein 53)
PBS	Phosphate Buffered Saline (Fosfat Tamponlu Tuz)
piRNA	Piwi-Interacting RNA (<i>Piwi</i> -etkileşimli RNA)
PR	Progesterone Receptor (Progesteron Reseptörü)
RNA	Ribonucleic acid (Ribonükleik Asit)
ROS	Reactive Oxygen Species (Reaktif Oksijen Türleri)
RT-PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
siRNA	Small interfering RNA (Küçük İnterferans RNA)
TNF	Tumor Necrosis Factor (Tümör Nekroz Faktör)
TRAIL	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TNF İlişkili Apoptoz Uyarıcı Ligand)
WHO	World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

1. GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) tanımlamasıyla kanser; hücrelerin kontrolsüz çoğalarak kitle oluşturma, çevre dokuları tutma ve vücudun diğer bölgelerine yayılma özelliği göstermesidir. Kardiyovasküler hastalıklardan sonra en sık görülen ikinci ölüm nedeni hastalık grubudur [1].

Sağlık Bakanlığı verilerine göre Ülkemizde 450 kişi/gün ve 163.500 kişi/yıl kanser tanısı almaktadır. Kadınlarda en sık gözlenen kanserler arasında meme kanseri ilk sırada yer alırken, erkeklerde ise akciğer kanseri görülmektedir. Kadınlarda yeni tanı konulan 4 kanser türünden 1'i meme kanseridir [2].

Kanser tanısı, tedavi ve takip basamaklarının ekonomik yükü hem Ülkemiz hem de Dünya ekonomisinin sağlık harcamaları kaleminde giderek artan ciddi bir paya sahiptir. 2013 yılı verilerine göre meme kanseri tedavisinin Sosyal Güvenlik Kurumu'na (SGK) ekonomik maliyetinin 1.893.824.145 TL olduğu ve bu maliyetin her yıl ortalama %10,6 arttığı hesaplanmıştır [3]. Bu maliyet hesabı dikkate alındığında 2018 yılı için meme kanseri tedavisinin ekonomik yükünün en az 3 milyar TL olacağı tahmin edilirken, mevcut tablonun devamı durumunda 2030 yılında kanser tedavi maliyetinin SGK bütçesiyle karşılanamayacak boyuta ulaşacağı [4] öngörülmektedir.

Etkin tedavinin geliştirilmesi kanser çalışmalarının öncül hedefleri arasındadır. Bugün kullanılan konvansiyonel yöntemlerin hızlı tedavi, düşük yan etki ve yüksek etkinlik parametrelerinde geliştirilmesi, profilaktik tedavi geliştirilmesi kadar önem arz etmektedir.

Meme kanseri öncelikle invaziv ve noninvaziv (in situ) olarak sınıflandırılırken alt tiplerin belirlenmesinde TNM (tümör, lenf nodu, metastaz) evrelemesi, tümör boyutu ve büyüme hızı, tümör histolojisi, hormon reseptör durumu, onkogenler ile tümör baskılayıcı genlerin durumu prognostik faktörlerdendir.

İnvaziv meme kanseri tedavisinde evreye göre uygulanacak yöntem değişmekle birlikte konvansiyonel olarak cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, hormon tedavisi ve

hedefe yönelik tedaviler farklı kombinasyon ve sıralama ile uygulanmaktadır. Tedavinin yol haritasını kanserin moleküler düzeydeki özellikleri şekillendirmektedir.

Meme kanseri, çok sayıda alt tipi bulunan heterojen ve sistemik bir hastalıktır. Meme kanseri etiyolojisinde genetik (BRCA1, BRCA2 ve p53 gibi gen mutasyonları), hormonal (erken menarş, geç menopoza ve ileri yaşta ilk doğum) ve çevresel (obezite, beslenme, alkol ve/veya sigara kullanımı, radyasyon) faktörler rol almaktadır [5].

Konvansiyonel tedavilerin etkinliğini arttırmak amacıyla bugün üzerinde çalışılan onlarca bitkisel ve kimyasal kaynaklı ürün/molekül mevcuttur. Bu çalışmada kaju fıstığı ve ginkodan elde edilen anakardik asit ile hücre çoğalması ve sağkalım sinyallerini baskılayan LB42708 farnesil transferaz inhibitörünün MCF-7 invaziv meme kanseri hücre hattında tekli ve birlikte uygulanması sonrası proliferatif ve apoptotik etkisini araştırmayı amaçladık. Yaptığımız literatür taramasında invaziv meme kanseri hücre hatlarında anakardik asit ve farnesil transferaz inhibitörüne ilişkin çalışmalar bulunmakla beraber çalışmamız, farnesil transferaz inhibitörünün tek başına ve anakardik asit önkoşullama ile birlikte uygulanması bakımından MCF-7 hücre hattında yapılan ilk çalışmadır.

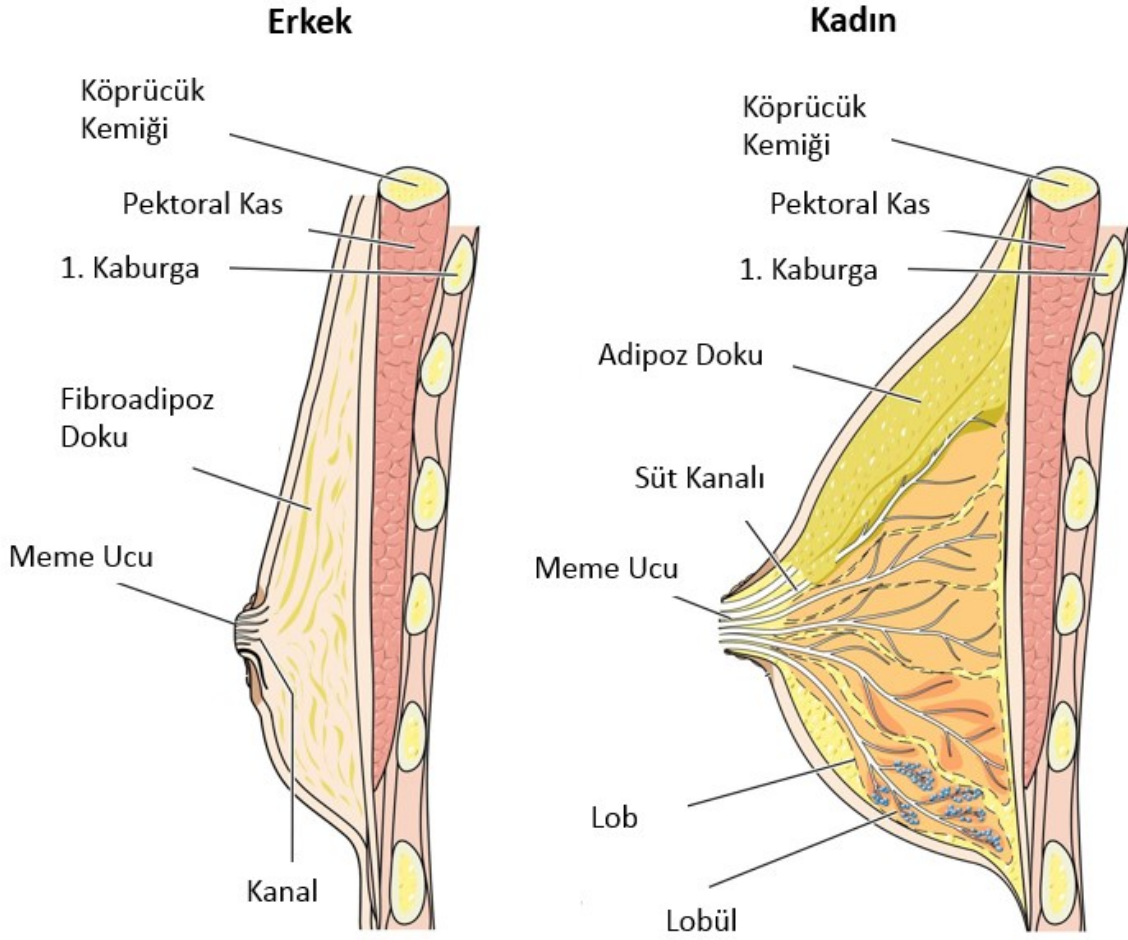
Bu tez çalışmasında LB42708'nin anakardik asit önkoşullaması ile birlikte farklı konsantrasyonlarda ve sürelerde uygulanması sonrası hücre canlılığında ve sitotoksitede tekli uygulama ile karşılaştırıldığında anlamlı azalma olduğunu belirlendi. Bununla birlikte hücrenin apoptoza yöneliminde artma tespit edildi. Ayrıca, proapoptotik *BAX* ve *BAK* genlerinin mRNA ifadelerinde kontrole kıyasla artış öte yandan, antiapoptotik *BCL2* ve *BCL2L1* genlerinin mRNA ifadelerinde azalış tespit edildi. Ancak, hücre döngüsünde görevli *CCND1*, *cMYC* ve *cFOS* genlerinin mRNA ifadelerinde anlamlı değişim saptanmadı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Anatomisi

Meme, yağ ve bağ dokusu ile süt bezlerinden oluşan, gelişimi ve fizyolojik işlevleri hormonlar ile düzenlenen, erkeklerde rudimenter iken kızlarda ergenlikle gelişen, dışı deri ile kaplı, 2-7. kaburgalar arasında pektoral kas üzerinde anterior toraksa bağlı, sternum ile ön/orta aksiller çizgi arasına yerleşik, cilde Cooper bağları ile bağlanan bir çift özelleşmiş ter bezidir [6].

Meme, erkeklerde kanallardan oluşurken kadınlarda laktasyon için süt yapımını sağlayan lobüllerin (süt bezi) bir araya gelmesiyle oluşan loblardan, loblardaki sütü meme ucuna taşıyan duktuslardan (süt kanalları) (Şekil 2.1) ve sütü meme ucunda depolayan sinüslerden oluşmaktadır [6]. Meme dokusundaki fizyolojik değişimler memenin aksillaya uzantısı olan 'Spence'nin aksiller kuyruğu'nda da görülmektedir [7]. Meme gelişiminde ve işlevlerinde östrojen, progesteron ve prolaktin hormonları önemli etkiye sahiptir. Meme ucu ve areola olarak adlandırılan çevresi fazla pigment nedeniyle daha koyu renklidir ve östrojen düzeyi arttıkça rengin koyuluğu artmaktadır [8].



Şekil 2.1. Meme anatomisi [9]

Memenin kanlanması arterler (internal mamarien arterin ön perforan dalları, lateral torasik arter, torako akromial arterin pektoral dalı, üst torasik arter, oosterior interkostal arterlerin lateral dalları, subskapuler arter, torakodorsal arter) ve venler (internal mamarian ven, aksiller ven, interkostal venler) tarafından sağlanır [10-11]. Meme dokusundaki interstisyel sıvının kan dolaşımına drenajını yüzeysel (deri) ve derin (parankimal) lenfatikler çok sayıda lenfatik damar aracılığıyla gerçekleştirir. Memede lenfatik drenajın %75'i aksiller lenf bezine kalan %25'i ise parasternal ve internal mammarian lenf bezlerine ulaşmaktadır [12]. Meme kanseri hücrelerinin uzak dokulara ulaşmasında lenfatik sistemin geniş ağı önemli bir araçtır; kanserli hücreler lenf damarlarından lenf bezlerine ulaşır ve orada büyür [13].

2.2. Meme Kanseri

Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından 2012 yılında yapılan Globocan kanser araştırması sonuçlarına göre Dünya’da kanser türleri arasında meme kanseri insidansı ikinci, mortalitesi beşinci ve prevelansı birinci sıradadır. Ülkemizde ise, kanser türleri arasında meme kanseri insidansı, mortalitesi ve prevelansı Dünya geneli sıralaması ile bire bir örtüşmektedir. Kadınlar arasında meme kanseri insidansı, mortalitesi ve prevelansı hem ülkemiz hem de Dünya lğinde birinci sırada yer almaktadır [14].

2.2.1. Meme kanseri epidemiyolojisi ve risk faktörleri

Meme kanseri etiyolojik olarak multifaktöriyeldir ve 30 yaş öncesinde nadirken 40-50 yaş aralığında daha sık görülmektedir [15]. 2015 yılı verilerine göre Amerika’da ölüm nedeni meme kanseri olan 41.524 kadının yaş dağılımları sırayla 20-39 yaş; 1049, 40-59 yaş; 10.736, 60-79 yaş; 18.762 ve 80 yaş üzerinde 10.976 kişi olduğu belirlenmiştir. Amerika’da 2018 yılında kadınlarda yeni tanı konulacak kanserlerin %30’unu ve kansere bağlı ölümlerin ise %14’n meme kanserinin oluşturması tahmin edilmektedir [16].

Meme kanserinde beslenme, obezite, ailede meme kanseri öyküsü, menarş yaşı, menopoz yaşı, ilk doğum yaşı, doğum sayısı, alkol- sigara kullanımı vb. bilinen risk faktörleri mevcuttur [17].

Ailede meme kanseri öyküsü ve genetik yatkınlık

Meme kanseri olgularından % 6-19 kadarının ailevi olduğu bilinmektedir [18]. Özellikle 1. derece akrabalarda meme kanseri öyküsünün varlığı ciddi bir risk iken, bu riski arttıran faktörler arasında meme kanseri akraba sayısının birden fazla olması, genç yaşta tanı konulması, yüksek penetranslı gen mutasyonlarının varlığı sayılmaktadır. Yapılan çalışmalara göre 1. derece 1 akrabada meme kanseri varlığı meme kanserine yakalanma riskisi 1.8 kat arttırırken, 2 akrabada görülmesi bu riski 2.9 kat arttırmaktadır. 30 yaşından önce kanser tanısı alan akrabanın varlığı meme

kanseri riskini 2.9 kat, 60 yaşından sonra tanı alan ise bu riski 1.5 kat arttırmaktadır [19].

Kişinin meme kanserine genetik yatkınlığının olması meme kanserine yakalanma riskini %40-60 düzeyine kadar çıkarmaktadır. Meme kanseri ile ilişkisi kanıtlanmış BRCA1, BRCA2, p53, PTEN, CHEK2, CDH1, TP53, STK11, NBS1, NF1, ATM, BRIP1, PALB2, RAD50, FGFR2, LSP1, MAP3K1, TGFB1 ve TOX3 gibi çok sayıda gen vardır. Meme kanserinde BRCA1 ve BRCA2 yüksek penetranslı ve tanımlanmış en eski genlerdir [20]. Bununla birlikte düşük penetrans gösteren ve birden çok genin birlikte anlamlı etki gösterdiği gen panelleri de tanımlanmıştır ve tanımlanmaya da devam etmektedir.

Reprodüktif öykü

Menarş ile başlayıp menopoz ile son bulan reprodüktif dönemde maruz kalınan östrojen ve alt tipleri östradiol, östriol, östron'un meme kanseri ile ilişkisi olduğu yapılan çalışmalarda belirlenmiştir [21]. İlk menarş ile erkeklere göre maruz kalınan östrojen düzeyi kadınlarda yüksek seyretmeye başlar ki meme gelişimi de yükselen östrojen sayesinde gerçekleşir. Bu dönemde meme dokusunda proliferasyon hızı ilk gebeliğin tamamlanmasına dek pek çok hücrel değişiklikler ile devam eder [22]. Erken menarş (<12) ve geç menopoz (>55) östrojene maruziyet süresini uzattığı için meme kanserinde önemli risk faktörleridir. Bununla birlikte doğum yapmama, ilk gebelik yaşının geç olması (>30), kısa laktasyon süresi, infertilite, uzun dönem doğum kontrol hapı kullanımı ve menopozal hormon replasman tedavisi diğer risk faktörleri olarak değerlendirilmektedir. Östrojen düzeyinin yüksek olduğu gebelik süreci ve doğum sonrası en az 6 ay emzirmenin meme kanseri için koruyucu etkisi bildirilmekte olup, laktasyon döneminde olduğu gibi östrojen maruziyetinin azalmasının koruyucu etkisi olduğu belirlenmiştir [23-24]. Öte yandan, gebeliğin özelliklerine göre (tekli/çoklu doğum, birden çok doğum, gebelikte yaşanan sağlık sorunları, bebeğin cinsiyeti-kilosu vb.) elde edilen sonuçlarla net bir fikir birliğine; hem olumlu hem olumsuz etkilerinin olması veya etkinin net olarak belirlenemediği çalışmalar nedeniyle varılamamıştır [25].

Alkol ve sigara kullanımı

IARC tarafından erişkin bir kadının günde 10g alkol tüketiminin meme kanserine yakalanma riskini %7-10 arttırdığı bildirilmektedir [26]. Yine IARC tarafından sigara dumanında bulunan 4000 farklı kimyasaldan 60 tanesinin karsinojen olduğu açıklanmıştır [27]. Nikotin, kanser biyolojisine temel olan kontrolsüz hücre bölünmesini ve anjiogenezi arttırmaya, apoptozu önlemeye neden olduğundan tüm kanser türleri için önemli bir risk faktörüdür. Diğer doku ve organlarla karşılaştırıldığında, meme dokusunun alkolün ve sigaranın içerdiği karsinojenlere daha duyarlı olduğu, her gün olmasa bile düzenli alkol kullanan kişilerde dahi tüketim miktarına bağlı olarak riskin %4-15 kat arttığı belirlenmiştir. Alkolün cinsiyet hormon düzeylerini arttırıcı etkisi vardır. Bununla birlikte alkol metabolize olma sürecinde DNA hasar onarımının engellemesine, DNA'da metilasyonunun artmasına, açığa çıkan reaktif oksijen türleri (ROS) DNA'da mutasyona ve zincir kırıklarına [22] neden olur. Bu risk faktörlerinin sigara tüketimi için de geçerli olduğu belirlenmiş olup, hem aktif hem de pasif sigara içiciliğinde meme kanserine yakalanma riskinin %9-16 arasında arttığı bildirilmiştir [28-29]. Ayrıca, tütün ürünlerinin içerdiği karsinojenlerin bazı onkogenler ile pozitif [30] bazı tümör baskılayıcı genlerle negatif [31] ilişkili olduğu bilinmektedir.

Çevresel riskler

Meme kanseri insidansının, az gelişmiş ülkelerde gelişmekte olan ve gelişmiş ülkelere göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. Yaşam tarzı, kullanılan endüstriyel ürünler, çevresel kimyasallar/kirleticiler, erken tanı politikaları, obezite vb. pek çok faktör ülkeler arasında insidans farkının [32-33] nedenleri arasında sayılmaktadır. Kansere yakalanan ikizler ve aileleriyle yapılan çalışmalarda meme kanseri olgularının %60'nın çevresel faktörlerden kaynaklandığı bildirilmiştir [34-35]. Bununla birlikte, insidans farkı olan bölgeler arası göç dikkate alınarak insidansın yüksek olduğu bölgeye göç eden bireylerin, göç edilen bölgede doğan ileri kuşaklarında meme kanseri insidansının arttığı [36-37] belirlenmiştir. Çevresel kimyasallar/kirleticiler de DNA hasarına neden olmaktadır. Bunların bazıları endokrin sistem işlevlerini bozarak hormonların salgısını arttırıcı/azaltıcı etkiye sebebiyet vermektedir. Günlük hayatta benzen, paraben, fitalat, dioksin, karbon

tetraklorid, formaldehit, metilen klorid, stiren, tetrakloroetilen, bisfenol A, poliaromatik hidrokarbonlar vb. onlarca kimyasala çeşitli nedenlerle maruz kalmaktayız. Bu kimyasalların sadece meme kanserinde değil, diğer kanser türlerinde de rol aldığına ilişkin çalışmalar [38-45] mevcuttur. Gelişen teknoloji ile radyasyona ve manyetik alana maruziyet önlenemez bir şekilde artmaktadır. Mesleki olarak kimyasallara ve radyasyona maruziyet önemli meme kanseri risk faktörleri arasında sayılmaktadır. Bununla birlikte tanı ve / veya tedavi amacıyla radyasyona sıklıkla maruz kalan kadınlarda meme kanseri riskinin arttığı gözlenmiştir [46-48]. Yapılan çalışmalar ile Japonya'da atom bombasına maruz kalan kadınlarda meme kanseri insidansının 2 kat fazla olduğu belirlenmiştir [49-50].

2.3. Meme Kanserinin Sınıflandırılması

Meme kanserinin sınıflandırılmasında kullanılan pek çok yöntem olmakla birlikte sınıflandırma temel olarak histolojik, patolojik, TNM (yayılım, tutulum, metastaz) ve gen ifadesine dayanmakta olup köken aldığı bölgeye göre lobüler, duktal, vb. kaynaklı olarak gelişirken, seyirini ve uygulanacak tedavi protokolünü invaziv olan ve invaziv olmayan alt tipleri belirlemektedir. Meme kanserinin moleküler sınıflandırması 2000 yılında 42 hastaya ait 65 meme tümöründe yapılan çalışmaya dayanmaktadır. Bu çalışmada araştırmacılar cDNA mikroarray teknolojisi ile 8102 geni analizi etmiş ve bazı genlerin ifadelerindeki varyasyona göre meme kanserini luminal hücre benzeri, bazal hücre benzeri, HER2+ ve normal epitel benzeri olmak üzere 4 gruba ayırmışlardır [51]. Luminal hücre benzeri meme kanseri üzerine yapılan araştırmalar sonucunda bu grup Luminal A ve B olmak üzere 2 gruba ayrılmıştır [52-53].

Meme kanserinin en çok kabul gören moleküler sınıflandırması luminal A, luminal B, Her-2 ve Üçlü Negatiftir (Çizelge 2.1) [54]. Üçlü negatif grubuna dahil edilen normal benzeri meme kanseri alt grubu bazı araştırmacılar tarafından sınıflandırılmayan olarak da isimlendirilmektedir [55].

Çizelge 2.1. Meme kanseri moleküler sınıflandırması (ER: östrojen reseptörü, PR: progesteron reseptörü, HER-2: insan epidermal büyüme faktör reseptörü 2, CK5/6: sitokeratin 5/6, EGFR: epidermal büyüme faktör reseptörü)

Luminal A		ER (+) ve /veya PR (+), HER-2 (-)
Luminal B		ER (+) ve/veya PR (+), HER-2 (+)
HER-2		ER (-), PR (-), HER-2 (+)
Üçlü Negatif	Bazal Benzeri	ER (-), PR (-), HER-2 (-), CK5/6 (+), EGFR (+)
	Normal Benzeri	ER (-), PR (-), HER-2 (-), CK5/6 (-), EGFR (-)

2.3.1. Östrojen reseptörü (ER)

Östrojen büyüme, gelişme ve üremede önemli rol alan bir steroid hormundur [56]. Östrojen ve östrojen reseptörleri (ER α ve ER β) invaziv meme kanserlerinin büyük bir kısmında görülen belirteçlerdendir. Nüklear reseptör ailesine üye olan ER α ve ER β , küçük lipofilik moleküller ile bağlanarak aktive olurlar ve epitelyal meme hücre döngüsünün G0 fazından S fazına geçişini düzenler [57]. Histon proteinlerinin kovalent modifikasyonları (metilasyon, asetilasyon, fosforilasyon, sumoslasyon ve ubikütinasyon) sonucu oluşan epigenetik değişimler de östrojen reseptörlerinin düzenlenmesine etki eder [58]. Öte yandan ER düzenlenmesine etki eden pek çok faktör olduğu bilinmektedir. Hatta bu durum ER pozitif olgularda endokrin terapiye gelişen direncin nedeninin; ER sinyali ile HER2, EGFR ve IGFR sinyalleri arasındaki etkileşim olduğu düşünülmektedir [59].

2.3.2. Progesteron reseptörü (PR)

Progesteron pubertede, menstural siklusta, gebelik ve süt kanallarının gelişimi ile laktasyonda rol alan bir steroid hormondur [60]. Progesteron reseptörü, ER'ü gibi meme kanseri gelişiminde etkin nüklear reseptör ailesinin üyesidir [61]. Sitozolde mevcut PR, sadece ligand-bağımlı transkripsiyon faktörleri gibi etkisini göstermez, aynı zamanda meme hücrelerinin çoğalmasında görev alan sinyal iletim yollarını da uyarır [62].

2.3.3. İnsan epidermal büyüme faktör reseptörü 2 (HER2)

İnsan epidermal büyüme faktör reseptörü 2, tirozin kinaz aktivitesine sahip epidermal büyüme faktör reseptör ailesinin dört üyesinden biri olan transmembran glikoproteindir [63]. Ailenin diğer üyelerinin aksine HER2'ye bağlanan özgül ligand yoktur ve bir başka HER2 ile ya da ailenin diğer üyeleri ile dimerize olup sinyal iletimini başlatır. HER2'nin dimerizasyonu sonrasında reseptörlerin sitoplazmik bölgesinde bulunan tirozin amino asitlerinin fosforilasyonu ile proliferasyon, sağkalım, farklılaşma, angiyojenez, invazyon ve tümöröjenez sinyal iletimi başlar. HER2'nin hücre membranında artış göstermesi HER2 geninin kopya sayısındaki artışla tetiklenmektedir [64].

2.3.4. Sitokeratin 5/6 (CK5/6)

Sitokeratinler, epitel hücrelerin iskelet bileşenlerinden olan fibröz ve keratin proteinlerdir [65]. Sitokeratin 5/6, bazal sitokeratinler arasında yer alır ve meme duktus hücrelerinin bazal tabakasındaki ara filamanlardandır [66]. Ayrıca, malign epitel tümörlerin belirteçleri arasındadır. CK 5/6 ifadesinin EGFR ifadesi ile birlikte %1'in üzerinde olduğu durumlar bazal benzeri meme kanseri şüphesi taşımaktadır [67].

2.3.5. Epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR)

Tirozin kinaz aktivitesine sahip epidermal büyüme faktör reseptör ailesinin bir diğer üyesi olan transmembran glikoproteindir [63]. EGFR'e bağlanabilen 7 çeşit ligand vardır; epidermal büyüme faktörü (EGF), dönüştürücü büyüme faktörü-alfa (TGF- α), heparin bağlayan EGF benzeri büyüme faktörü (HBEGF), betaselülin (BTC), amfiregülin (AREG), epiregülin (EREG) ve epigen (EPGN) [68]. Ligand ile bağlandıktan sonra EGFR dimerize olur ve sitoplazmik tirozin kinaz bölgesinin fosforilasyonu ile büyüme, proliferasyon, sağkalım, farklılaşma ve migrasyonun sinyal yolağı/yolakları aktive olur [69].

2.4. Meme Kanseri Tedavisi

Sistemik bir hastalık olarak değerlendirilen meme kanserinin tek başına cerrahi yöntemler ile tedavi edilemeyeceği görüşü 1958 yılında Dr. Bernard Fisher tarafından ileri sürülmüştür [70]. Bugün meme kanserinin sistemik tedavisine konvansiyonel yöntemlere alternatif ve tamamlayıcı tedavi yöntemleri de eşlik etmektedir [71].

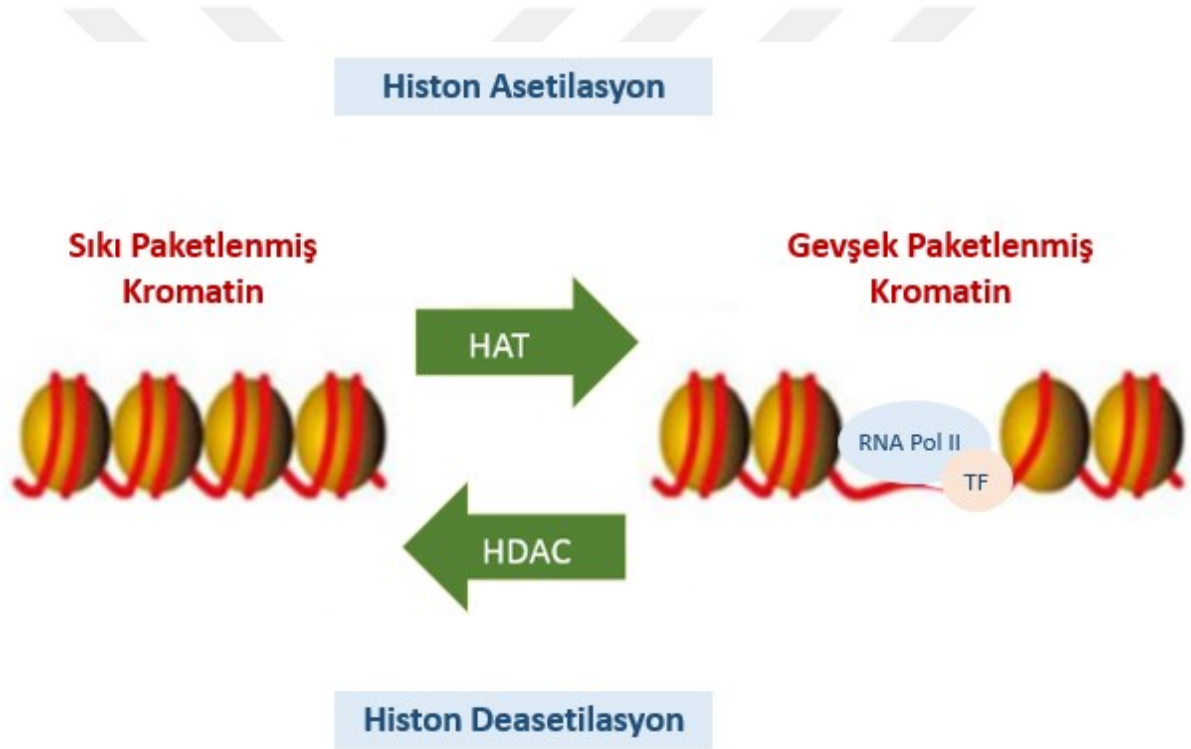
Konvansiyonel yöntemler cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, hormon tedavisi ve hedefe yönelik tedavidir. Etkinliğini arttırmak ve yan etkilerini azaltmak için tedaviler birlikte de uygulanabilmektedir. Bu tedaviler bazen farklı konvansiyonel yöntemleri bazen de tamamlayıcı/alternatif yöntemleri barındırmaktadır. Ülkemizde meme kanseri tanısı almış 129 kişi ile yapılan bir çalışmada, hastaların %48,8'nin tamamlayıcı/alternatif tedavi yöntemlerini de kullandığı belirlenmiştir [72]. Günümüzde kullanılan tedavinin konvansiyonel tedaviyi nasıl ve ne derece etkilediği kanser araştırma konularının üst sıralarında yer almakta ve tüm Dünya'da tamamlayıcı/alternatif tedaviler ile ilgili çalışmalar sadece bilim camiası tarafından takip edilmekle kalmamaktadır.

Kemopreventif ajanların birlikte kullanımı ile meme kanseri hücrelerinde ajanların tekli kullanımdaki baskılayıcı etkilerinin artırılması amaçlanmaktadır [73].

2.5. Epigenetik

DNA dizisine yansımadağı için genotipte olmayan ancak fenotipte etkili, gen işlevini ve ifadesini etkileyen, mitoz ve mayoz bölünmeyle katılımsal olduğu kabul gören ve ilk kez 1942 yılında Conrad Waddington tarafından fenotipe etki eden çevre ile gen etkileşimi olarak tanımlanmış değişikliklerdir [74]. Epigenetik değişiklikler, kalıtsal olmasına rağmen geri dönüştürülebilme potansiyeli taşıyan değişiklikler olup doğrudan DNA aracılığıyla ve dolaylı olarak da RNA aracılığıyla 2 şekilde gerçekleşmektedir. Doğrudan epigenetik değişiklikler DNA metilasyonu, kromatin ve histon modifikasyonları yoluyla olmaktadır. DNA metilasyonu kısaca bir metil grubunun kovalent bağ ile DNA'da Guanin (G) tarafından takip edilen 5 karbon pozisyonundaki Sitozin (C) bazına (CpG adalarına) bağlanmasıdır. CpG adalarının

insan genomunda %1'lik dilimi oluşturduğu ve genlerin promotor bölgelerinde yoğun olduğu bilinmektedir [75]. DNA metilasyonun embriyonik gelişim, gen regülasyonu, genomik imprinting, genom bütünlüğünün korunması, DNA onarımı, transpozonların susturulması, X-kromozom inaktivasyonu, yaşlanma ve karsinogenezde önemli rol aldığı belirlenmiştir [76]. Kromatin modifikasyonları kovalent veya non kovalent olarak gerçekleşebilir. Gen ifadelerinin aktif veya inaktif olmasına neden olmaktadır. Histon kuyruğundaki lizin / arginin / serin / treonin amino asitlerinden birine veya birden fazlasına asetil / metil / fosfat / nitrozil grubunun veya gruplarının bağlanması yanı sıra ubikütün ve ubikütün benzeri proteinlerin (SUMO) bağlanmasıyla da histon modifikasyonları gerçekleşir [77].



Şekil 2.2. Histon asetilasyonu ve deasetilasyonu

Dolaylı epigenetik değişikliklerde ise kodlanmayan miRNA, siRNA, piRNA ve lncRNA'ların hedef mRNA'ya bağlanmasıyla post transkripsiyonel düzenleme engellenir ve böylece protein sentezi gerçekleştirilemez [78].

2.5.1. HAT ve HDAC'lar

Histon modifikasyonlarından asetilasyon, histon asetiltransferazlar (HAT) ve histon deasetilazlar (HDAC) olmak üzere birbirilerinin tersi işlevi olan 2 enzim ailesi tarafından düzenlenir. Bu düzenlemeler ile kromatin yapısı ve işlevi hedef alınmaktadır. Asetil grubunun histonların amino ucunda bulunan lizin amino asitlerine HAT enzimleri ile bağlanması asetilasyon ve bağlı asetil grubunun HDAC enzimleri aracılığıyla ayrılması ise deasetilasyon olarak tanımlanmaktadır. Asetil grubunun negatif yüklü olması asetilasyonda pozitif yüklü histon ve negatif yüklü DNA arasındaki etkileşimi zayıflatır.

Böylece kromatin gevşer ve transkripsiyon faktörleri genin kontrol bölgesine (promotora) ulaşarak transkripsiyonun gerçekleşmesini sağlarken HAT enzimleri transkripsiyonel koaktivatör görevi üstlenirler. Bu mekanizmanın tersine asetil grubunun HDAC enzimleri ile lizin amino asidinden ayrılmasıyla pozitif yüklü histon ve negatif yüklü DNA arasında etkileşim artar, kromatin daha sıkı paketlenir ve transkripsiyon baskılanır (Şekil 2.2) [79].

HAT ve HDAC enzimleri histon dışında diğer proteinleri de protein kararlılığı, protein-protein etkileşimleri, protein yerleşimleri, DNA'ya bağlanabilme kapasiteleri açısından etkilemektedir [80]. HAT'lar ve HDAC'lar hücrel işlevlerin sorunsuz işlemesi için denge içinde olmalıdır. Bu dengenin bozulması başta kanser olmak üzere nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklar ile ilişkilendirilmiştir [81]. İnsanda histon asetiltransferazlar Tip A, Tip B, transkripsiyonel koaktivatörler, steroid reseptör koaktivatörler ile Gcn5-ilişkili N-asetil transferaz, MYST ve p300/CBP aileleri olmak üzere 7 gruba ayrılmıştır [82].

HAT İnhibitörleri

HAT ve HDAC işlevlerini etkileyen endojen ve ekzojen aktivatörler ve inhibitörler mevcuttur. HAT inhibitörleri genel olarak doğal ve sentetik kaynaklı olarak 2 grupta sınıflandırılmaktadır. Doğal sınıfında anakardik asit, kurkumin, garsinol 9, epigallokateşin 3 gallat, plumbagin ve gambogik asit sayılmaktadır [83-84].

HAT inhibitörlerinin genel olarak NF- κ B yolu ve p53 aracılığıyla transkripsiyonu baskıladığı bilinmektedir. Burada söz konusu inhibitörler, alkilidin malonat gibi daha özgün inhibitörlerin dahil olmasına yol açan başlangıç noktasıdır [84]. HAT inhibitörlerinin kullanımında ve rutin tedavi modellerine dahil olmasında geçirgenlik ve özgüllük parametrelerinin iyileştirilmesi gerekmektedir [85].

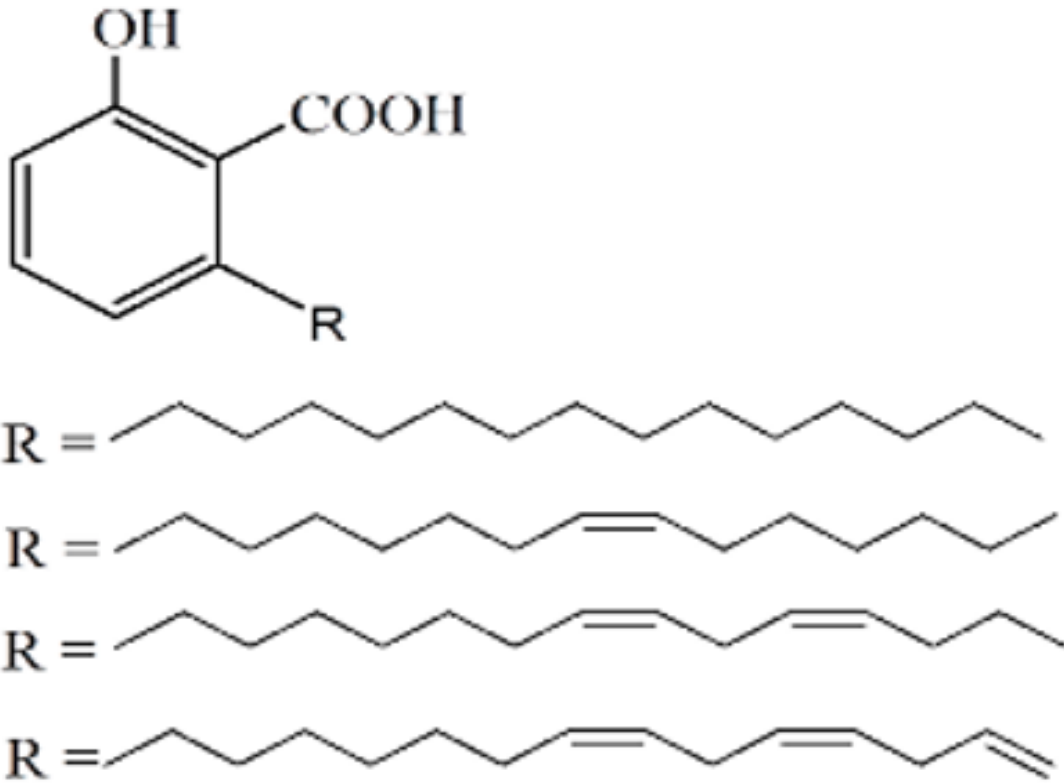
HAT inhibitörleri in vitro ve in vivo modellerde çok sayıda çalışmada farklı kanser türleri için kullanılmıştır. Çizelge 2.2'de yapılan çalışmalarla hedefleri belirlenen bazı HAT inhibitörleri verilmiştir [86-107].

Çizelge 2.2. HAT inhibitörleri ve hedefleri

HAT inhibitörleri	Hedef
Garsinol	KAT3B
Kurkumin	KAT3B
Anakardik Asit	P300, PCAF
TH1834	KAT5
Benziliden Barbitürik Asit	KAT3B
İzotiazolin	Çoklu
ICG-001	KAT3A/B-Katenin
C646	KAT3B
İskemin (bromodomain inhibitör)	KAT2A-2B ve KAT3A-3B

2.6. Anakardik Asit (AA)

Kaju fıstığı ve ginkodan elde edilen anakardik asit (6-pentadesil salisilik asit), hücre zarını geçebilen, salisilik asit analogu histon asetil transferaz inhibitörüdür (Şekil 2.3). Anakardik asidin anti-tümöral, anti-mikrobiyal, anti-inflamatuvar ve mide koruyucu etkileri olduğu bugüne kadar yapılan çalışmalarda belirlenmiştir [108-109]. Anakardik asit, kromatinin sıkı paketlenmesini uyararak ve transkripsiyonel aktiviteyi azaltarak histon asetil transferaz enzimlerini baskılar. Ayrıca, hücre çoğalmasını baskımlarken, apoptozu da uyarır [73].



Şekil 2.3. Anakardik asid'in kimyasal yapısı [110]

2.7. Farnesil Transferaz İnhibitörleri (FTIs)

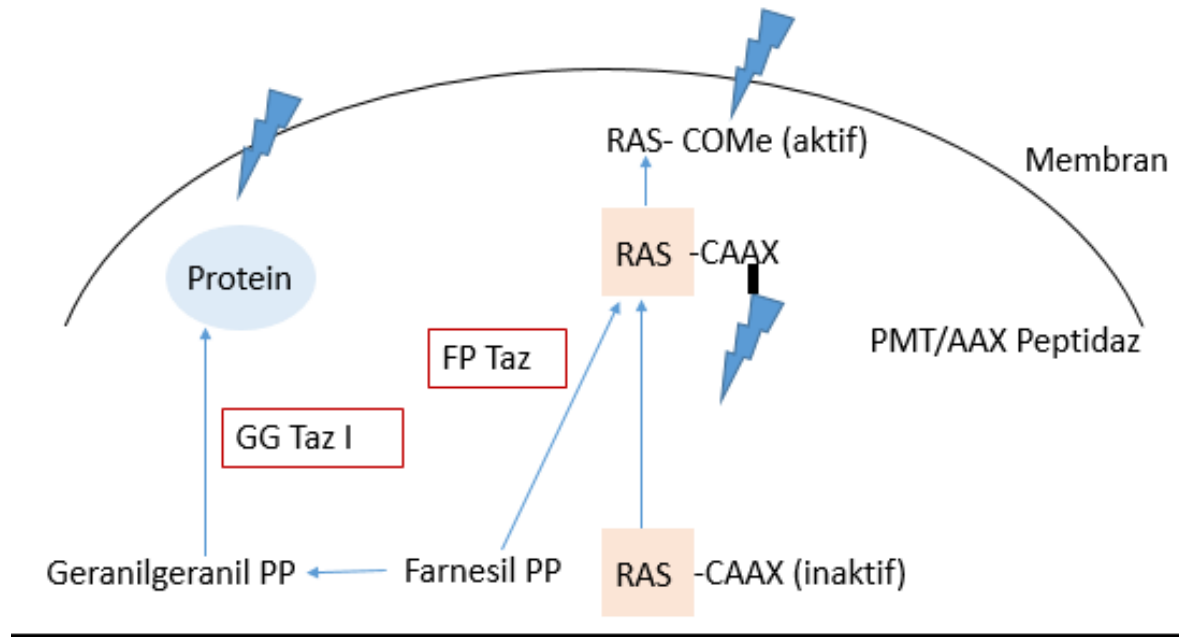
Bazı proteinlerin, hücresel faaliyetlerin kontrolü için farnesillenmesi gerekmekte olup farnesillenme erken embriyogenezde ve yetişkin homeostazında önem arz etmektedir. İzoprenil lipidin (farnesil veya geranilgeranil) bazı proteinlere (RAS vb.) eklenmesi sonucu bu proteinler post translasyonel modifikasyona uğramaktadır.

Farnesil transferaz inhibitörleri, RAS proteini post translasyonel modifikasyonunun prenilasyon aşamasını baskılamak üzere tasarlanmış hedefi Ras- aracılı uyarılan hücre çoğalması ve anti-apoptotik sinyalleri farnesil transferaz aktivitesini baskılayarak azaltmak olan bir grup kanser tedavi ajanıdır [111].

Ras proteini hücre sinyal yollarında, proliferasyonda, farklılaşmada, apoptozda ve migrasyonda önemli rol alır. Ras geninde meydana gelen mutasyon hücrelerin kontrolsüz çoğalmasına ve normal olmayan bir tablonun gelişmesine neden olur. Ras gen mutasyon prevalansı tüm kanser türlerinde %30'dur. Bu durum kansere yönelik ilaç araştırmalarında Ras genini ve ilişkili diğer proteinler ile sinyal yollarını

ilgi çekici kılmaktadır. Ras işlevlerinin baskılanması ve hücre çoğalmasının kontrol altına alınması hedef alınmaktadır [112-113].

Ras proteininin post translasyonel modifikasyonu, C-terminal uçta bulunan CAAX bölgesindeki sistein tiyol grubuna, farnesilin farnesil transferaz sayesinde bağlanması ve modifikasyonu yönlendirmesi ile gerçekleşir, FTI'ler CAAX kutusuna farnesilin bağlanmasını baskılayarak işlev gösterirler (Şekil 2.4) [114]. Ancak, in vivo uygulamada in vitro uygulamadan farklı sorunlar mevcuttur. Örneğin, FTI'ler tarafından baskılanan farnesillenme, geranil ile gerçekleşen geranilasyon adıyla farnesillenmeye alternatif prenilasyon olarak Ras proteinlerinden N-Ras ve K-Ras'da görülürken, H-Ras'da görülmemektedir. Farnesillenme de olduğu gibi geranilasyonda da geranilgeranil transferaz aktivitesini baskılayan geranilgeranil transferaz inhibitörü ajanlar vardır [115]. Bugüne kadar farklı doğal ve sentetik FTI'ler keşfedilip etkinlikleri in vitro ve in vivo olarak değerlendirilmiş, hatta R115777 (tipifarnib) gibi bazıları FDA tarafından onaylanmış ve standart tedavi yöntemleri arasına girmiştir [112].

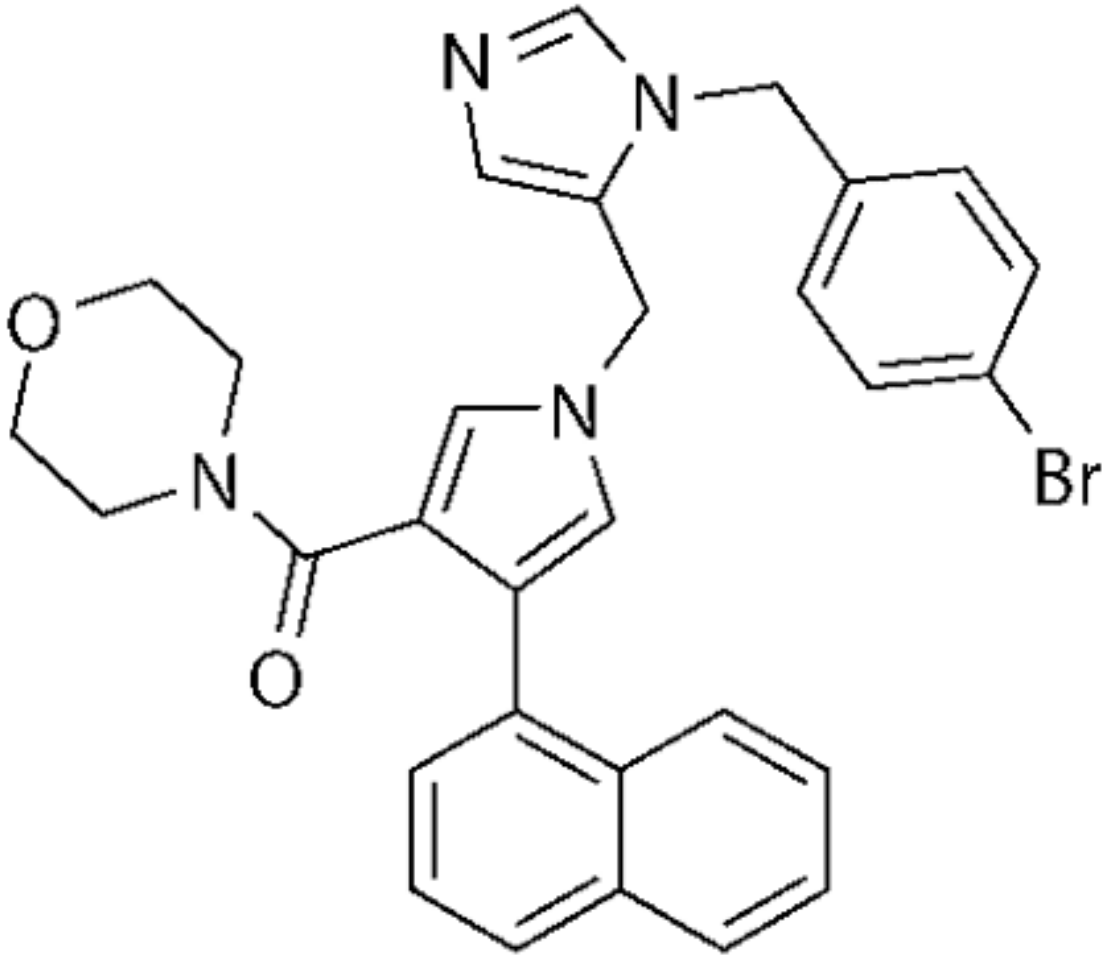


FP Taz: Farnesil Protein Transferaz
GG Taz: Geranylgeranyl Protein Transferaz
PMT: Protein Metil Transferaz
PP: Pirofosfat
CAAX:
C -> Sistein
AA-> Alifatik Amino Asit
X-> lösin ve izolösin dışında bir amino asit

Şekil 2.4. Ras proteininin post translasyonel modifikasyonu

2.7.1. LB42708

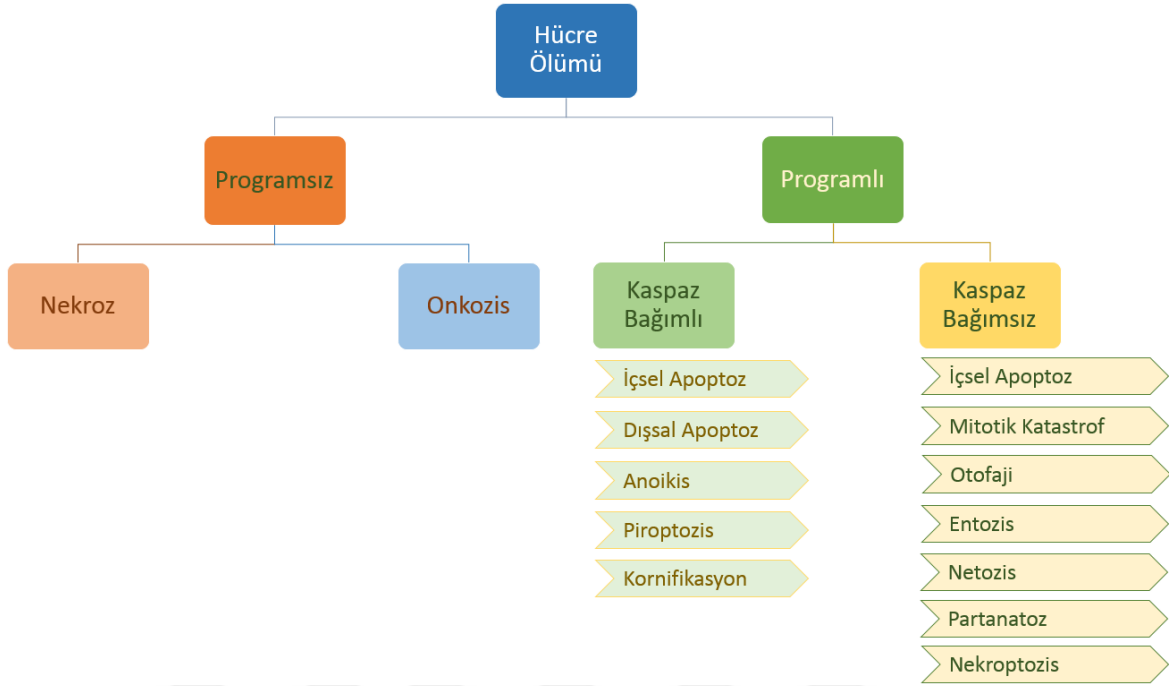
LB42708, Lee ve ark. tarafından keşfedilmiş yüksek tesirli, seçici ve non-peptidik farnesil transferaz inhibitörüdür (Şekil 2.5) [116]. Farnesil transferaz ve geranyl geranyl transferaz enzimlerini baskılayarak Ras proteinlerinin prenilasyon mekanizmalarını, prenilasyon aşamasındaki yan zincir transferini baskılayarak Ras proteininin aktivasyonunu, MAPK/ERK/p38 ve PI3K/Akt yolağı ile hücre çoğalmasını ve sağkalım sinyallerini baskılar [117-118].



Şekil 2.5. LB42708'in kimyasal yapısı [119]

2.8. Hücre Ölümü

Hücrenin ölümü, hücre içinden veya dışından gelen sinyallere verdiği cevaplardan [120] biridir ve büyüme, gelişme, bir dizi bölünme - çoğalma sürecinin son basamağıdır. Hücre çoğalması ve ölüm normal hücrelerde dengeli olarak gerçekleşirken bu dengenin bozulması başta kanser olmak üzere pek çok hastalığa neden olmaktadır. Hücre ölümü sınıflandırması histolojik, morfolojik, biyokimyasal, fonksiyonel ve moleküler özelliklere göre yapılabilmektedir. En yaygın kullanılan sınıflandırma 2012 yılında Hücre Ölümü İsimlendirme Komitesi (Nomenclature Committee on Cell Death- NCCD) tarafından yapılmıştır (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Hücre ölümü sınıflandırması [121]

2.8.1. Apoptoz

Apoptoz genlerle düzenlenen, RNA ve protein sentezi gerektiren enerji bağımlı biyokimyasal bir olay olup programlı hücre ölümünün hücre intiharı olarak da adlandırılan üyesidir. Apoptoz embriyonik dönemde; fetusun sinaptik ağ oluşumunda, parmak perdelerini kaldırılmasını, göz kapaklarının birbirinden ayrılmasında, postnatal dönemde; kemik iliğinde kan üretiminin dengede tutulmasında, menstrual siklusda endometriyum iç duvarının yıkımı ve hücrelerin ölümünde, immun sistemde lenfositlerin mikroorganizma ile savaşı sonrası ortadan kaldırılmasında patolojik durumlarda ise organizmayı korumak için virüs ile enfekte edilmiş ve DNA hasarına uğramış hücreler ile kanser hücrelerinin uzaklaştırılmasında rol alır [122].

İnsan vücudunda her saniye yüzlerce hücre çoğalıp sayıları artarken, kontrolsüz hücre bölünmesinin organizmaya doğuracağı yan etkilerin ortadan kaldırılması için apoptoz ile denge sağlanır. Bu dengenin sağlanamaması başta kanser olmak üzere çok sayıda hastalık ile ilişkilendirilmiştir. Apoptoz süreci mitokondriyal sinyal yolağı (içsel) ve ölüm reseptör aracılı sinyal yolağı (dışsal) olmak üzere 2 yolak ile

tetiklenirken; başlangıç, entegrasyon/karar ve icra/degradasyon olmak üzere 3 ana basamakta gerçekleşmektedir [123].

Kansere karşı apoptozun uyarılmasını hedef alan çalışmalar arasında ölüm reseptörlerinin ve ölüm tetikleyici sinyal iletiminin oluşumuna odaklanan çalışmalar vardır. Normal hücrelerde ihtiyaç doğrultusunda doğal olarak gerçekleşen bu süreç model alınmış ve geliştirilen rekombinant TRAIL ile apoptozun yapay olarak uyarılması amaçlanmıştır. TRAIL ile apoptoz uyarılmaktadır ancak bu durum tüm kanser türleri için geçerli değildir. Farklı tiplerde meme kanserine sahip 20 meme kanseri hücre hattının TRAIL'e karşı cevapları değerlendirilmiş ve üçlü negatif 11 meme hücre hattından 8'inin TRAIL aracılı apoptoza duyarlı olduğu belirlenmiştir. Duyarlı olan hücre hatlarının mezankimal, diğerlerinin ise epitelyal fenotipte olduğu görülmüştür. HER2 amplifikasyonu olan 5 hücre hattından 2'si duyarlılık gösterirken, ER pozitif hücrelerde duyarlılık görülmemiştir [124]. Bazı faz 1 ve faz 2 çalışmalarda kemoterapötikler ve /veya radyasyon ile TRAIL, DR4, DR5'in uyarıldığını ve kanser hücrelerinin duyarlılığını arttırdığı bildirilmiştir [125].

Apoptoz kansere karşı anahtar terapötik mekanizma olarak sayılmakta olup mitokondri dış membran geçirgenliği (MOMP), kaspaz aktivitesi olmasa da hücre ölümünü gerçekleştirmektedir. Giampazolias ve arkadaşları mitokondri dış membran geçirgenliği ile indüklenen kaspaz bağımsız hücre ölümünün (CICD), kanser hücreleri ile mücadelede etkinliğine ilişkin yaptıkları çalışmada; kaspaz bağımsız hücre ölümüne uğrayan kanser hücrelerinin apoptoza göre güçlü pro-inflamatuar etkiler gösterdiğini belirlediler. Çünkü MOMP'nin NF- κ B aktivitesini uyararak apoptoz protein inhibitörlerini baskıladığı, CICD'in dahil olmasıyla yüksek anti-tümöröjenik etki gösterdiği ve bağışıklığın kuvvetine bağlı olarak da tümör regrasyonunu uyarabildiği gösterilmiştir. NF- κ B aktivasyonu, MOMP'un hücre ölümünü tetiklemesinin yanı sıra, ek sinyaller ortaya çıkarmakta ve CICD ile kanser tedavisinde hücre ölümünü rasyonel olarak desteklenmektedir [126].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

3.1.1. Kullanılan cihazlar

- Biyogüvenlik kabini (DanLaf, Danimarka)
- Invert mikroskop (Zeiss, Almanya)
- CO2 inkübatör (Sanyo, Japonya)
- Hassas terazi (AND-ER-182A, Japonya)
- Eppendorf Mastercycler® EP Gradient S otomatik ısı döngü cihazı (Eppendorf, Almanya)
- Işık mikroskobu (DCM 4000, Leica, Almanya)
- LightCycler® 480 Gerçek Zamanlı PCR cihazı (Roche, Almanya)
- Mikroplaka okuyucu Spectramax M3 (Molecular Devices, ABD)
- pH metre (WTW 422, Almanya)
- Soğutmasız santrifüj (Hettich Mikro 22, Almanya)
- Soğutmalı santrifüj (Hettich Mikro 22 R, Almanya)
- Spektrofotometre (NanoDrop ND-1000) (Thermo Scientific, ABD)
- Spin vorteks (Biosan, Rusya)
- Derin dondurucu, -30°C ve - 86°C (Sanyo, Japonya)
- Kuru Isıtıcı Blok (Biosan, Rusya)

3.1.2. Kullanılan kitler

- Cytotoxicity Detection Kit Plus LDH (Laktat Dehidrogenaz) (Roche, Almanya)
- High Pure RNA İzolasyon Kiti (Roche, Almanya)
- LightCycler® 480 Probes Master (Roche, Almanya)
- PathScan® Cleaved Caspase-3 (Asp175) Sandwich ELISA Kit (Cell Signaling, ABD)
- BCA Protein Miktar Tayin Kiti (Thermo Scientific, ABD)
- Transcriptor First Strand cDNA Sentez Kiti (Roche, Almanya)

3.1.3. Kullanılan sarf malzemeleri

- Hücre dondurma ampülü (Greiner, Almanya)
- Hücre kültür flaskları (25 cm² ve 75 cm²) (Corning, ABD)
- Hücre kültür tüpleri (15, 50 mL) (Corning, ABD)
- Mikrosantrifüj tüpleri (0.2, 0.5, 1,5 mL) (CLP, Almanya)
- Petri kabı, 35mm, 60mm ve 100mm (Corning, ABD)
- Pipet uçları (CLP, Almanya)

3.1.4. Kullanılan kimyasal maddeler

- Anakardik asit (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Dimetil sülfoksit (DMSO) (Amresco, ABD)
- DMEM besiyeri (HyClone, Thermo, ABD)
- Disodyum Fosfat (Na₂HPO₄) (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Monosodyum Fosfat (NaH₂PO₄) (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Sodyum Klorür (NaCl) (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Fenilmetilsülfonilflorid (PMSF) (Roche, Almanya)
- Fetal sığır serumu (FBS) (inaktif) (HyClone, Thermo, ABD)
- Glutamin (HyClone, Thermo, ABD)
- Hücre Parçalama Çözeltisi (Roche, Almanya)
- LB42708 (Tocris Bioscience, ABD)
- MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2yl]-2,5-difeniltetrazolium) (Sigma, ABD)
- Penisilin/Streptomisin (HyClone, Thermo, ABD)
- Primerler (Alfa DNA, Almanya)
- Tripsin-EDTA (HyClone, Thermo, ABD)
- Universal Probe Library (UPL) Problemleri (Roche, Almanya)

3.2. Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanışı

3.2.1. %10 FBS içeren DMEM besiyerinin hazırlanması

200 mM L-glutaminden 10 ml alınıp, 50 ml fetal sığır serumu (FBS) birlikte, 450 ml DMEM (L-glutamin içermeyen) besiyerine eklendi. Daha sonra, penisilin (son

konsantrasyonu 100 IU/mL) ve streptomisin (son konsantrasyonu 100 µg/mL) ilave edilerek, deneylerde kullanılacak olan %10 FBS içeren DMEM besiyeri hazırlandı.

3.2.2. % 1 FBS içeren DMEM besiyerinin hazırlanması

200 mM L-glutaminden 10 ml alınıp, 5 ml FBS birlikte, 495 ml DMEM (L-glutamin içermeyen) besiyerine eklendi. Daha sonra, penisilin (son konsantrasyonu 100 IU/mL) ve streptomisin (son konsantrasyonu 100 µg/mL) ilave edilerek, deneylerde kullanılacak olan %1 FBS içeren DMEM besiyeri hazırlandı.

3.2.3. 5 mg/mL stok MTT hazırlanması

5 mg MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2yl]-2,5-difeniltetrazolium) tartılıp, üzerine 1 mL steril PBS eklendikten sonra 0.22 µm filtreden süzülerek sterilize edildi.

3.2.4. 0,01 M PBS (pH:7.4) çözeltisinin hazırlanması

<u>Kimyasallar</u>	<u>Miktar</u>
Na ₂ HPO ₄	1.09 g
NaH ₂ PO ₄	0.32 g
NaCl	9 g

Belirtilen kimyasallar tartıldıktan sonra, 900 mL distile suda çözüldü. NaOH veya HCl çözeltileri kullanılarak pH 7.4'e ayarlandı. Son hacim 1000 mL olacak şekilde distile su eklendikten sonra 0.22 µm filtreden süzülerek sterilize edildi.

3.2.5. 20 mM stok anakardik asit hazırlanması

25 mg anakardik asit tartılıp son hacmi 3,6 ml olacak şekilde saf dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde çözüldü. Elde edilen stok çözeltisi 1,5 ve 2 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine dağıtılarak -20 °C'de saklandı.

3.2.6. 20 mM stok LB42708 hazırlanması

10 mg LB42708 tartılıp son hacmi 900 µl olacak şekilde saf DMSO içerisinde çözüldü. Elde edilen stok çözeltisi 1,5 ve 2 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine dağıtılarak -20 °C'de saklandı.

3.3. Yöntemler

3.3.1. Hücre kültürü

MCF-7 hücre hattı

Yüksek lisans tez çalışmasında, bilimsel çalışmalar için temin edilen ve sonrasında sıvı azotta dondurulan MCF-7 hücreleri kullanılmıştır.

Dondurulan MCF-7 hücrelerinin çözündürülmesi

%5 DMSO içeren FBS içerisinde dondurulmuş olan MCF-7 hücreleri 37 °C 'ye ayarlanmış sıcak su banyosunda 1 dk'dan az bir sürede çözüldü ve önceden 37 °C' ye ısıtılmış olan 10 mL %10 FBS içeren DMEM besiyerine alındı. 800 g'de 10 dk santrifüj edildikten sonra üst kısım atıldı. Hücrelerin üzerine 10 mL yeni besiyeri eklenip karıştırıldıktan sonra, hücreler 25 cm²'lik hücre kültür kaplarına (flask) alınarak, 37 °C sıcaklıkta, %95 nem ve %5 CO₂ olan inkübatör ortamında çoğalmaları için bırakıldı.

Çoğalan MCF-7 hücrelerin pasajlanması

Çoğalan MCF-7 hücreleri, flaskları %80 oranında kapladığında, pasajlama işlemine geçildi. Flask'da bulunan besiyeri, hücrelere dokunmadan steril enjektör ile çekildi. Hücrelerin üstünü kaplayacak kadar steril PBS eklenerek, hücrelere zarar vermeden flasktan tekrar çekildi. Böylelikle, hücrelerin yıkanması sağlandı. Flask yüzeyinden hücrelerin kaldırılması için Tripsin-EDTA (%0.25 Tripsin-0.53 mM EDTA) çözeltisinden (25 cm² flasklar için 1 mL, 75 cm²'lik flasklar için 3 mL) eklendi. Flasklar CO₂'li inkübatörde 5 dk bekletildikten sonra, hücrelerin flask yüzeyinden kalkıp kalkmadığı kontrol edildi. Tripsin enzim aktivitesinin durdurulması için

kullanılan tripsin miktarının 2 katı oranında yeni besiyeri flaska eklendi. 10 ml'lik falcon tüpüne alınan hücreler 800 g'de 10 dk santrifüj edildi. Üstte bulunan sıvı besiyeri atıldı. Hücrelerin üzerine 1 mL %10 FBS içeren DMEM eklendi. Hücreler Neubauer lamında sayılarak hücre sayısı bulundu. Yeni flasklara alınan hücrelerin üstüne %10 FBS içeren DMEM eklenerek, 37 °C sıcaklıkta, %95 nem ve %5 CO₂ olan inkübatör ortamına hücreler çoğalmaları için bırakıldı.

3.3.2. Hücre canlılığının MTT yöntemi ile belirlenmesi

AA ve LB42708'in MCF-7 hücrelerinde, hücre canlılığına olan etkisinin belirlenmesi için kolorimetrik MTT yöntemi kullanıldı. Çoğalan MCF-7 hücreleri (bakınız 3.3.1.3) pasajlandı. Hücrelerin üzerine 1 mL %1 FBS içeren DMEM eklenip, hücre sayımı yapıldı. Hücreler, %1 FBS içeren DMEM içerisinde homojen bir şekilde dağıtıldıktan sonra 96 kuyulu hücre kültür kaplarına her kuyuya 10⁴ hücre/100 µL olacak şekilde ekilip 24 saat bekletildi. %1 FBS içeren DMEM ile seyreltilmiş LB42708 değişen konsantrasyonlarda (0.1-100 µM) MCF-7 hücrelerine 24 saat süresince uygulandı ve LB42708'in MCF-7 hücreleri üzerindeki IC₅₀ dozu belirlendi. %1 FBS içeren DMEM ile seyreltilmiş AA değişen konsantrasyonlarda (5, 10, 25 ve 50 µM) ve sürelerde (2, 4, 6 ve 24 saat) MCF-7 hücrelerine uygulandı. AA ve LB42708'in çözücüsü olan DMSO'nun, MCF-7 hücrelerine olan etkisinin belirlenmesi amacıyla, kontrol hücrelerine aynı miktarda DMSO, aynı sürelerde eklendi. Ayrıca, AA'in kısa süreli sabit konsantrasyonda uygulanmasını takiben ortama LB42708 eklenmesi ile birlikte MCF-7 hücrelerinin LB42708'e duyarlı hale getirip getirmediği araştırıldı. Anabilim dalımızda bir başka hücre hattında yapılan çalışmada (mezotel), yapılan literatür taramasında ve denemelerimizde alınan sonuçlar göz önüne alınarak, 4 saat süre ile 25 µM AA ön uygulaması yapıldı. 4 saat sonunda AA ortamdan uzaklaştırılmadan değişen konsantrasyonlarda (5, 10 ve 25 µM) LB42708, MCF-7 hücrelerine 24 saat daha uygulandı ve bu süre sonunda her iki ajanın da hücreler üzerindeki etkileri incelendi.

Belirtilen sürelerin sonunda, kuyularda bulunan besiyeri uzaklaştırıldı. Her bir kuyuda bulunan hücreler üzerine 100 µl %1 FBS içeren DMEM besiyeri ve ardından 10 µl stok MTT çözeltisinden eklendi. Hücreler 4 saat süresi ile 37 °C sıcaklıkta, %95 nem ve %5 CO₂ olan inkübatör ortamına bırakıldı. Bu süre sonunda oluşan

formazan kristalleri 100 µl DMSO ile çözüldü ve 570 nm dalga boyunda ELISA mikroparka okuyucuda (Spectramax M3 plate reader, Molecular Devices, ABD) absorbans değerleri belirlendi. Kontrol grupları ve uygulanan ajanların her bir konsantrasyonu için 6 kuyu değerlendirilerek ortalaması alındı. Kontrol gruplarının ortalama absorbans değerleri, hücrelerin tümünün (%100) canlı olduğu absorbans değeri olarak kabul edildi, MCF-7 hücrelerine uygulanan ajanların konsantrasyonlarından elde edilip ortalaması alınan absorbans değerleri, kontrol absorbans değerine oranlanarak yüzde canlılık olarak belirlendi.

3.3.3. Besiyerine salınan laktat dehidrojenaz (LDH) miktarının ölçülerek sitotoksik etkinin belirlenmesi

Laktat Dehidrojenaz (LDH), glikoliz sonucu oluşan piruvatın laktat'a dönüşümünü katalizleyen sitoplazmik bir enzimdir. Hücre zarı hasarlandığında veya hücre ölümü gerçekleştiğinde, LDH sitoplazmadan besiyerine salınmaktadır. Bu yöntem, besiyerine salınan LDH miktarına göre hücre canlılık oranının değerlendirilmesi esasına dayanır. Besiyerine salınan LDH miktarının belirlenmesinde, Cytotoxicity Detection (LDH) kiti kullanıldı. Kitin uygulama basamakları aşağıda sırasıyla belirtildi.

1. 96 kuyulu hücre kültür kabına, her bir kuyuda 10^4 MCF-7 hücresi olacak şekilde %1 FBS içeren DMEM besiyeri ile ekim yapıldı.
2. 24 saat sonrası hücrelerin kültür kabına yapışıp yapışmadığı mikroskop altında kontrol edildikten sonra, kullanılan ajanların MTT analiz sonucu ile belirlenen süre ve konsantrasyonları MCF-7 hücrelerine uygulandı.
3. Kit içinde 3 farklı kontrol tanımlanmıştır; Kör Kontrol: %1'lik FBS içeren DMEM besiyerini, Düşük Kontrol: %1'lik FBS içeren DMEM besiyeri ve MCF-7 hücrelerini, Yüksek Kontrol: %1'lik FBS içeren DMEM besiyeri, MCF-7 hücreleri ve Triton X-100 çözeltisini içermektedir.
4. Ajanların uygulama süresinin sonunda, kuyularda bulunan 100 µL besiyeri bir başka 96 kuyulu hücre kabına alındı.
5. Kit içeriğinde bulunan çözeltilerden taze reaksiyon karışımı hazırlanarak, her kuyuya bu karışımdan 100µL eklendi. 96 kuyulu kültür kabı 30 dk karanlık ortamda bekletildi.

6. Süre sonunda 490 nm dalga boyundaki absorbans değerleri, ELISA mikroplaka okuyucu (Spectramax M3 plate reader, Molecular Devices, ABD) ile belirlendi. Kontrol grupları ve uygulanan ajanların her konsantrasyonu için 3 kuyu değerlendirilerek ortalama absorbans değerleri belirlendi.
7. Besiyerine salınan LDH miktarının yüzdesi, aşağıda belirtilen “Eş.3.1” formül kullanılarak belirlendi.

$$\text{Sitotoksosite (\%)} = \frac{\text{Örnek abs. - düşük kontrol abs.}}{\text{Yüksek kontrol abs. - düşük kontrol abs}} \times 100 \quad (3.1.)$$

3.3.4. MCF-7 hücrelerinden protein eldesi

6 kuyulu hücre kültür kabına, her bir kuyuda 10^6 MCF-7 hücresi olacak şekilde %1 FBS içeren DMEM besiyeri ile ekim yapıldı. 24 saat sonra hücrelerin kültür kabına yapışıp yapışmadığı mikroskop altında kontrol edildikten sonra, kullanılan ajanların MTT ve LDH analiz sonucu ile belirlenen süre ve konsantrasyonları MCF-7 hücrelerine uygulandı. Kontrol grupları ve uygulanan ajanların her konsantrasyonu için 3 kuyu değerlendirildi. Ajanların uygulama süresinin sonunda, kuyularda bulunan besiyeri uzaklaştırılıp, hücreler soğuk 1X PBS ile buz üzerinde bir defa yıkandı. Ortamdan PBS uzaklaştırılıp, içerisinde 1 mM PMSF bulunan 0.5 mL soğuk hücre parçalama çözeltisi MCF-7 hücreleri üzerine eklenip, 5 dk buz üzerinde bekletildi. Hücre kazıyıcı ile 6 kuyulu hücre kültür kabında bulunan MCF-7 hücreleri/hücre lizatı sıyrılarak mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Ultrasonik homojenizatörde MCF-7 hücreleri 15 sn boyunca parçalandı. Hücreler 5500 g'de 10 dk +4 C'de santrifüj edildi. Üst kısımda yer alan sıvı faz yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.

3.3.5. Protein miktarının ölçümü

MCF-7 hücrelerinden elde edilen total protein miktarının belirlenmesinde BCA Protein miktar kiti kullanıldı. Kit içeriğinde bulunan miktarı belirli sığır serum albümininden (BSA) seyreltme yapılarak konsantrasyonları 25 µg-2000 µg arasında değişen 7 protein standartı hazırlandı. Kit içerisinde bulunan A ve B çözeltileri belirtildiği üzere 50:1 oranında karıştırılarak protein standartları üzerine eklendi.

Kuru ısıtıcı blok 37°C'ye ayarlanarak, protein standartları 30 dk boyunca 37 °C'de bekletildi. Kuru ısıtıcı bloktan alınan protein standartlarının konsantrasyonları NanoDrop ND-1000 cihazında 562 nm'de absorbans değerleri ölçülüp, standart eğri çizdirildi. Hücrelerden elde edilen protein miktarının belirlenmesi için, yukarıda sıralanan basamaklar tekrar edildi. İzole edilen protein örnekleri kuru ısıtıcı bloktan alındıktan sonra, aynı şekilde 562 nm'de absorbans değerleri ölçülüp, oluşturulan standart eğri ile karşılaştırılarak konsantrasyon değerleri belirlendi.

3.3.6. Aktif kaspaz 3 miktarının belirlenmesi

AA ve LB42708'in MCF-7 hücrelerinde, aktif kaspaz 3 miktarına olan etkisinin belirlenmesi için PathScan® Cleaved Kaspaz-3 (Asp175) Sandwich ELISA kiti kullanıldı. Kitin uygulama basamakları aşağıda sırasıyla belirtildi.

1. Konsantrasyonu belirlenen protein örneklerinden 100 µL alınarak, kitin içinde bulunan antikor ile kaplanmış 96 kuyulu kültür kabına örnek sayısı kadar eklendi. Her bir örnek çift tekrarlı çalışıldı. Kuyuların üzeri bant ile kapatılarak, 24 saat boyunca 37 °C'de bekletildi.
2. Süre bitiminde, kuyularda bulunan içerik mikropipet yardımıyla uzaklaştırıldı. Kuyulara 200 µL 1X yıkama tamponu eklenip, mikropipet yardımıyla tekrar uzaklaştırıldı. Bu işlem 4 kez gerçekleştirildi.
3. Kitin içerisinde bulunan primer antikordan 100 µL mikropipet yardımıyla çekilip her kuyuya eklendi. Kuyuların üzeri bant ile kapatılarak, 1 saat boyunca 37 °C'de bekletildi. Süre bitiminde, kuyularda bulunan içerik mikropipet yardımıyla uzaklaştırıldı. Kuyulara 200 µL 1X yıkama tamponu eklenip, mikropipet yardımıyla tekrar uzaklaştırıldı. Bu işlem 4 kez gerçekleştirildi.
4. Kitin içerisinde bulunan yaban turpu peroksidazı (HRP) bağlanmış ikinci antikordan 100 µL mikropipet yardımıyla çekilip her kuyuya eklendi. Kuyuların üzeri bant ile kapatılarak, 30 dk boyunca 37 °C'de bekletildi. Süre bitiminde, kuyularda bulunan içerik mikropipet yardımıyla uzaklaştırıldı. Kuyulara 200 µL 1X yıkama tamponu eklenip, mikropipet yardımıyla tekrar uzaklaştırıldı. Bu işlem 4 kez gerçekleştirildi.
5. Kitin içerisinde bulunan renksiz TMB substratından 100 µL mikropipet yardımıyla çekilip her kuyuya eklendi. Kuyuların üzeri bant ile kapatılarak, 10 dk boyunca 37 °C'de bekletildi.

6. TMB substratı, peroksidaz tarafından parçalandıktan sonra kuyularda mavi renk oluşumu belirlendi. Kitin içerisinde bulunan reaksiyonu durduran çözeltiden 100 µL mikropipet yardımıyla çekilip her kuyuya eklendi. Kuyularda gözlenen mavi renk bu işlemde sonra sarı renge dönüştü.
7. Örneklerde bulunan aktif kaspaz-3 miktarının belirlenmesi için, oluşan sarı rengin absorbansı Spectramax M3 mikrolaka okuyucuda 450 nm'de gerçekleştirildi. Herhangi bir ajan verilmemiş olan kontrol örneklerine ait absorbans değeri 1 olarak kabul edilip bu değerin ortalaması alındı. Çalışmamızda kullanılan ajanların çeşitli konsantrasyonlarda tek başlarına veya birlikte uygulandığı örneklerin absorbans değerinin ortalamaları hesaplanıp, kontrol absorbans ortalama değeri ile karşılaştırılarak, aktif kaspaz 3 miktarı belirlendi.

3.3.7. Hücre kültüründen total RNA'nın elde edilmesi

AA ve LB42708 uygulama sürelerinin dolmasıyla, MCF-7 hücrelerinden RNA izolasyonu, "High Pure RNA Isolation Kiti" kullanılarak, aşağıda yazılı olan protokole göre biyogüvenlik kabininin içinde yapıldı.

1. AA ve LB42708 uygulama sürelerinin dolmasının ardından hücrelerin üzerinden besiyeri uzaklaştırıldı ve hücrelerin üzerine 200 µL soğuk PBS ve ardından 400 µL Lizis tamponu eklenerek 15 sn vortekslendi.
2. Kit içeriğinde bulunan filtre ve toplama tüpü iç içe yerleştirildikten sonra PBS ve lizis tamponu karışımı filtre üstüne aktarıldı.
3. Filtre ve toplama tüpü santrifüje yerleştirilerek 9000 rpm'de 15 sn santrifüj edildi.
4. Santrifüj sonrası toplama tüpünde toplanan sıvı kısım atılarak, filtre aynı toplama tüpüne tekrar yerleştirildi.
5. Her bir örnek için 90 µL DNaz inkübasyon tamponu ve 10µL DNaz I filtrenin orta kısmına eklenerek 15 dk oda sıcaklığında bekletildi.
6. Süre bitiminde, 500 µL'lik 1. yıkama çözeltisi filtre üzerine eklendi ve filtre ve toplama tüpü 9000 rpm'de 15 sn santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpünde toplanan sıvı kısım atıldıktan sonra filtre aynı toplama tüpü içerisine yerleştirildi.
7. 500 µL'lik 2. yıkama çözeltisi filtre üzerine eklendi ve tekrar filtre ve toplama tüpü santrifüje yerleştirilerek 9000 rpm'de 15 sn santrifüj edildi. Santrifüj sonrası

toplama tüpünde toplanan sıvı kısım atıldıktan sonra filtre aynı toplama tüpü içerisine yerleştirildi.

8. 2. yıkama ozeltisinden her bir örnek için 200  L filtre üzerine eklendi, filtre ve toplama tüpü 13500 rpm'de 3 dk santrifüj edildi.
9. Santrifüj sonrası toplama tüpü atıldıktan sonra, filtre steril 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi.
10. Her bir örnek için 20  L seyreltme ozeltisi filtre üzerine eklendi, filtre ve mikrosantrifüj tüpü 9000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
11. Mikrosantrifüj tüpünde toplanan RNA'ların miktarları ve saflığı "NanoDrop ND-1000 Spektrofotometre" cihazında ölçülerek nicel gerçek zamanlı PCR' da kullanılacak güne kadar -80  C derin dondurucuda saklandı.

3.3.8. Komplementer DNA (cDNA) sentezi

Elde edilen RNA'lar spektrofotometrede 260 nm dalga boyunda ölçülerek mikrolitredeki mikrogram değerleri belirlendi. Random hegzamerler kullanılarak total RNA'dan cDNA sentezi yapıldı. cDNA sentezi sırasında kullanılan kimyasallar ve miktarları izelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. cDNA tepkime karışımı

	Son Konsantrasyon	Hacim
Steril H ₂ O-PCR grade	-	RNA miktarına göre değişken
Reaksiyon Tamponu	1x (8mM MgCl ₂)	4�L
dNTP	1mM	2�L
Random hegzamer primeri	60�M	2�L
RNaz inhibitörü	20 ünite	0.5�L
Transkriptor Ters Transkriptaz	10 �nite	0.5�L
Total RNA	1�g	1�g olacak şekilde

cDNA tepkime karışımı ince çeperli 0.2 ml'lik tüplere dağıtıldıktan sonra elde edilen total RNA eklendi.

Reverse transkriptaz PCR (RT-PCR) programı

Otomatik ısı döngüsü cihazı, Çizelge 3.2'de belirtilen programa ayarlanarak cDNA sentezi yapıldı.

Çizelge 3.2. Otomatik ısı döngüsü cihazında uygulanan program

	Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
Primer Bağlanması	25°C	10dk	1
Ters Transkripsiyon	50°C	60dk	1
İnaktivasyon	85°C	5dk	1
Soğutma	4°C	-	1

3.3.9. Gen ifadesinin real-time PCR ile belirlenmesi

BCL2, BCL2L1, BAX, BAK, CCND1, cMYC ve cFOS genlerinin mRNA miktarları, nicel gerçek zamanlı PCR yöntemi ile Light Cycler (LC) cihazı kullanılarak belirlendi. Amplifikasyonlar 20 µL toplam tepkime hacmi içerisinde; cDNA, mRNA'ya özgü primerler, UPL probu, LightCycler TaqMan Master karışımı ve distile su kullanılarak gerçekleştirildi. BCL2, BCL2L1, BAX, BAK, CCND1, cMYC ve cFOS gen ifade miktarlarını normalize etmek için GAPDH mRNA düzeyi referans olarak alındı.

BCL2 geninin ifade düzeyinin kantitatif analizi

BCL2 genine ait UPL prob ve primerlerin dizileri aşağıda verilmiştir. Prob ve primerlerin cDNA'daki yerleşimi ise Şekil 3.1'de gösterilmiştir.

BCL2 Forward primer: 5'- AGTACCTGAACCGGCACCT -3'

BCL2 Reverse primer: 5'- GCCGTACAGTTCCACAAAGG -3'

75 numaralı prob dizisi: 5'- GGAGGCTG -3'



Şekil 3.1. BCL2 mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi (Referans: ENST00000398117 giriş no'lu dizi) Translasyon başlangıç nükleotidine göre numaralandırılmıştır

BCL2L1 geninin ifade düzeyinin kantitatif analizi

BCL2L1 genine ait UPL prob ve primerlerin dizileri aşağıda verilmiştir. Prob ve primerlerin cDNA'daki yerleşimi ise Şekil 3.2'de gösterilmiştir.

BCL2L1 Forward primer: 5'- GCCACTTACCTGAATGACCAC -3'

BCL2L1 Reverse primer: 5'- TGCTGCATTGTTCCCATAGA -3'

2 numaralı prob dizisi: 5'- CAGGAGAA -3'

5'- GCCACTTACCTGAATGACCAC -3'

901 AGTCGGATCGCAGCTTGGATGGCACTTACCTGAATGACCACCTAGAGCCTTGGATCAG
5'-CAG

961 GAGAACGGCGGCTGGGATACTTTTGTGGAACCTATGGGAACAATGCAGCAGCCGAGAGC
GAGAA -3' 3'- AGATACCCTTGTTACGTCGT-5'

Şekil 3.2. BCL2L1 mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi (Referans: ENST00000307677.4 giriş no'lu dizi). Translasyon başlangıç nükleotidinde göre numaralandırılmıştır.

BAX geninin ifade düzeyinin kantitatif analizi

BAX genine ait UPL prob ve primerlerin dizileri aşağıda verilmiştir. Prob ve primerlerin cDNA'daki yerleşimi ise Şekil 3.3' te gösterilmiştir.

BAX Forward primer: 5'- ATGTTTTCTGACGGCAACTTC-3'

BAX Reverse primer: 5'- ATCAGTTCCGGCACCTTG-3'

57 numaralı prob dizisi: 5'- CTGGGGCC -3'

5'-ATGTTT

241 GCCGCCGTGGACACAGACTCCCCCGAGAGGTCTTTTTCCGAGTGGCAGCTGACATGTTT

TCTGACGGCAACTTC-3'

301 TCTGACGGCAACTTCAACTGGGGCCGGGTTGTCGCCCTTTTCTACTTTGCCAGCAAATG
5'-CTGGGGCC-3'

361 GTGCTCAAGGCCCTGTGCACCAAGGTGCCGGAAGTATCAGAACCATCATGGGCTGGACA
3'-GTTCCACGGCCTTGACTA-5'

Şekil 3.3. BAX mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi (Referans: ENST00000293288 giriş no'lu dizi) Translasyon başlangıç nükleotidinde göre numaralandırılmıştır

BAK geninin ifade düzeyinin kantitatif analizi

BAK genine ait UPL prob ve primerlerin dizileri aşağıda verilmiştir. Prob ve primerlerin cDNA'daki yerleşimi ise Şekil 3.4' te gösterilmiştir.

BAK Forward primer: 5'- AAAGTGGGCTCCCACTCA -3'

BAK Reverse primer: 5'- CAGTGGAGGACGGGATCA -3'

66 numaralı prob dizisi: 5'- CAGCAGCC -3'

61 GGGACAAGTAAAGGCTACATCCAGATGCCGGAATGCACTGACGCCCATTCCTGGAAACT
 5'-AAACT
 GGGCTCCCACTCA-3' 5'-CAGCAGCC-3'
 121 GGGCTCCCACTCAGCCCCTGGGAGCAGCAGCCGCCAGCCCCTCGGGACCTCCATCTCCAC
 181 CCTGCTGAGCCACCCGGGTTGGGCCAGGATCCCGGCAGGCTGATCCCGTCCTCCACTGAG
 3'-ACTAGGGCAGGAGGTGAC-5'

Şekil 3.4. BAK mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi (Referans: ENST00000374467 giriş no'lu dizi) Translasyon başlangıç nükleotidinde göre numaralandırılmıştır

CCND1 geninin ifade düzeyinin kantitatif analizi

CCND1 genine ait UPL prob ve primerlerin dizileri aşağıda verilmiştir. Prob ve primerlerin cDNA'daki yerleşimi ise Şekil 3.5' te gösterilmiştir.

CCND1 Forward primer: 5'- GCCGAGAAGCTGTGCATC -3'

CCND1 Reverse primer: 5'- CCACTTGAGCTTGTTACCA -3'

58 numaralı prob dizisi: 5'- CTCCATCC -3'

314 CTTGCATGTTTCGTGGCCTCTAAGATGAAGGAGACCATCCCCCTGACGGCCGAGAAGCTGT
 5'-GCCGAGAAGCTGT
 GCATC-3' 5'-CTCCATCC-3' 3'-ACC
 374 GCATCTACACCGACAACTCCATCCGGCCCGAGGAGCTGCTGCAAATGGAGCTGCTCCTGG
 434 TGAACAAGCTCAAGTGAACCTGGCCGCAATGACCCCGCACGATTTTCATTGAACACTTCC
 ACTTGTTTCGAGTTCAC-5'

Şekil 3.5. CCND1 mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi (Referans: ENST00000227507 giriş no'lu dizi) Translasyon başlangıç nükleotidinde göre numaralandırılmıştır

cMYC geninin ifade düzeyinin kantitatif analizi

cMYC genine ait UPL prob ve primerlerin dizileri aşağıda verilmiştir. Prob ve primerlerin cDNA'daki yerleşimi ise Şekil 3.6' de gösterilmiştir.

cMYC Forward primer: 5'- GCTGCTTAGACGCTGGATTT -3'

cMYC Reverse primer: 5'- TAACGTTGAGGGGCATCG -3'

75 numaralı prob dizisi: 5'- CTCCATCC -3'

5'- GCTGCTTAGACGCTGGATTT -3' 5'- CAG -3'

481 TGAAAGGCTCTCCTTGCAGCTGCTTAGACGCTGGATTTTTTCGGGTAGTGGAACCAG

5'- CAGCC -3' 5'- CGATGCCCTCAACGTTA -3'

541 CAGCCTCCCGCAGCATGCCCTCAACGTTAGCTTACCAACAGGAACTATGACCTCGAC

Şekil 3.6. cMYC mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi (Referans: ENST00000377970 giriş no'lu dizi) Translasyon başlangıç nükleotidinde göre numaralandırılmıştır

cFOS geninin ifade düzeyinin kantitatif analizi

cFOS genine ait UPL prob ve primerlerin dizileri aşağıda verilmiştir. Prob ve primerlerin cDNA'daki yerleşimi ise Şekil 3.7' de gösterilmiştir.

cFOS Forward primer: 5'- ACTACCACTCACCCGCAGAC -3'

cFOS Reverse primer: 5'- CCAGGTCCGTGCAGAAGT -3'

67 numaralı prob dizisi: 5'- CTCCAGCA -3'

5'- CTACCACTCACCCGCAGACT -3'

241 ACTACCACTCACCCGCAGACTCCTTCTCCAGCATGGGCTCGCCTGTCAACGCGCAGTGCC

5'- CTCCAGCA -3'

301 AACTTCATTCCCACGGTCACTGCCATCTCGACCAGTCCGGACCTGCAGTGGCTGGTGCAG

3'-TTGAAGTAAGGGTGCCAGTG-5'

Şekil 3.7. cFOS mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi (Referans: ENST00000554212.5 giriş no'lu dizi) Translasyon başlangıç nükleotidinde göre numaralandırılmıştır.

Light cyclers (LC) deney programı

Nicel gerçek zamanlı PCR karışımları hazırlandıktan sonra 96 kuyulu mikropalakalara dağıtılıp, daha önceden elde edilen cDNA'lar eklendi. Mikropalakaların üzeri şeffaf kapatici ile örtüldükten sonra, mikropalakalar Light Cycler 480 cihazına yerleştirildi. Çizelge 3.4'te belirtilen amplifikasyon programı kullanılarak PCR tepkimesi gerçekleştirildi. *BCL2*, *BCL2L1*, *BAX*, *BAK*, *CCND1*, *cMYC*, *cFOS* ve *GAPDH* genleri için aynı program kullanıldı. Reaksiyon sonucu, *BCL2*, *BCL2L1*, *BAX*, *BAK*, *CCND1*, *cMYC*, *cFOS* ve *GAPDH* genlerinin mRNA ifade düzeylerini gösteren Crossing point (Cp) değerleri belirlendi. *BCL2*, *BCL2L1*, *BAX*, *BAK*, *CCND1*, *cMYC* ve *cFOS* genleri ifade düzeyleri *GAPDH* ifade düzeyine göre normalize edildi.

Çizelge 3.4. *BCL2*, *BCL2L1*, *BAX*, *BAK*, *CCND1*, *cMYC*, *cFOS* ve *GAPDH* genlerinin ifade düzeylerinin belirlenmesi için kullanılan nicel gerçek zamanlı PCR tepkime programı

Program 1. Ayrılma (Denatürasyon)		
Program Verisi	Değer	
Döngüler	1	
Analiz Modu	-	
Sıcaklık Hedefleri	Kısım 1	
Hedef Sıcaklık (°C)	95	
İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)	10:00dk	
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)	20.0	
Program 2. Primer Bağlanması ve Uzama (Hibridizasyon ve Polimerizasyon)		
Program Verisi	Değer	
Döngüler	50	
Analiz Modu	Çoğalma	
Sıcaklık Hedefleri	Kısım 1	Kısım 2
Hedef Sıcaklık (°C)	95	60
İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)	10sn	20sn
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)	20.0	10.0
Program 3. Soğutma		
Program Verisi	Değer	
Döngüler	1	
Analiz Modu	-	
Sıcaklık Hedefleri	Kısım 1	
Hedef Sıcaklık (°C)	40	
İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)	30sn	
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)	20.0	

3.4. İstatistiksel Analiz Yöntemleri

Konsantrasyon ve kullanılan ajanların uygulama sürelerine bağılı olarak değişen *BCL2*, *BCL2L1*, *BAX*, *BAK*, *CCND1*, *cMYC*, *cFOS* mRNA ifade düzeylerindeki farklılıklar “REST (2009 V2.0.13)” istatistik programı ile karşılaştırıldı [127]. Hücre canlılığı, apoptoz ve sitotoksitite oranlardaki değişimler ise “tek yönlü Anova” testiyle karşılaştırıldı. Veriler “SPSS 15.0” istatistik programı kullanılarak değerlendirildi. 0.05’den küçük olan p değerleri istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi.





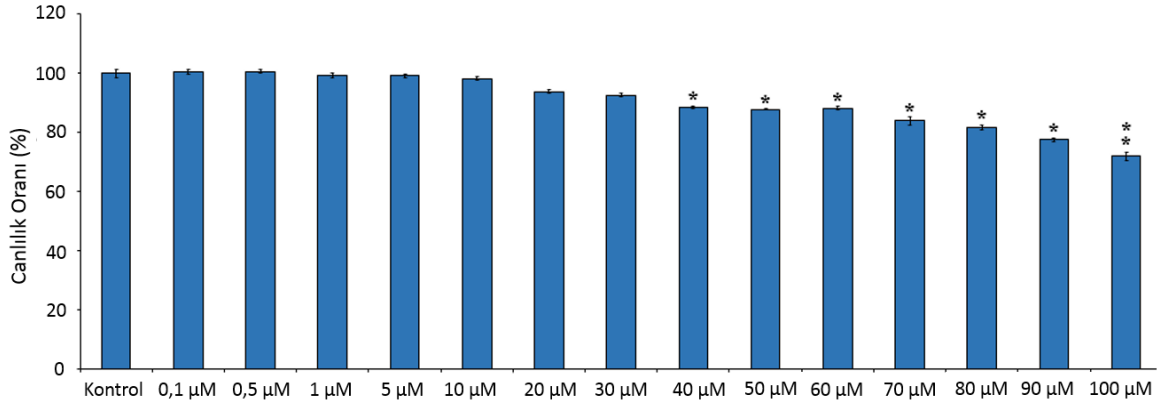
4. BULGULAR

4.1. Tekli Uygulamaların Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin MTT Yöntemi ile Belirlenmesi

LB42708'in değişen konsantrasyonlarda, AA'nın değişen süre ve konsantrasyon aralıklarında tek başlarına MCF-7 hücrelerine uygulanmalarının hücre canlılığına olan etkileri ile bu sonuçların istatistiksel anlamlılıkları değerlendirildi.

4.1.1. LB42708'in hücre canlılığı üzerine etkilerinin MTT yöntemi ile belirlenmesi

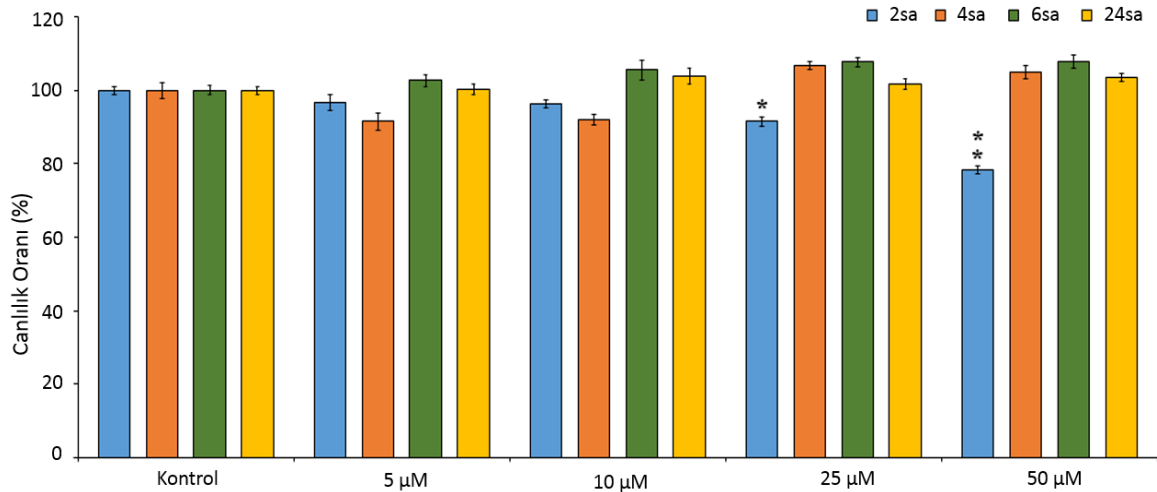
LB42708, MCF-7 hücrelerine 24 saat uygulandıktan sonra yapılan değerlendirmede, hücre canlılığının konsantrasyona bağlı olarak azaldığı belirlendi. LB42708'in 0.1 ve 0.5 μ M olduğu konsantrasyonlarda MCF-7 hücrelerindeki canlılığın %100 olduğu görüldü. Hücre canlılığının, 1 ve 5 μ M konsantrasyonlarda %99, 10 μ M konsantrasyonda %98 ve 20 ile 30 μ M konsantrasyonlarda ise %93 düzeylerinde olduğu belirlendi. Bu sonuçlar istatistiksel değerlendirme sonrası anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). Ancak, LB42708 40-80 μ M konsantrasyon aralığında MCF-7 hücrelerine uygulandığında, hücre canlılığının %88-83 düzeylerinde olduğu ve kontrol ile karşılaştırıldığında bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p<0.05$). Ayrıca, 90 ve 100 μ M LB42708 konsantrasyonlarının hücrelere uygulanması sonucu, hücre canlılık oranlarının sırasıyla % 77 ($p<0.05$) ve % 71 ($p<0.01$) olduğu ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. MCF-7 hücrelerine LB42708'in değişen konsantrasyonlarda 24 saat süresince uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları. *:p<0.05,**:p<0.01

4.1.2. Anakardik asit'in hücre canlılığı üzerine etkilerinin MTT yöntemi ile belirlenmesi

Anakardik asit (AA), MCF-7 hücrelerine 2, 4, 6 ve 24 saat uygulandıktan sonra, MTT yöntemi ile hücre canlılığının konsantrasyonlara göre değişimleri belirlendi. 2 saat süresince 5 ve 10 µM AA konsantrasyonlarının MCF-7 hücrelerine uygulanması sonucu, hücre canlılık oranlarının %96 olduğu ve bu sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı ($p > 0.05$). Öte yandan, kontrol ile karşılaştırıldığında, MCF-7 hücrelerine 2 saat boyunca AA asit uygulandığında, AA'nın 25 ve 50 µM konsantrasyonlarında hücre canlılığının sırasıyla, %91 ($p < 0.05$) ve %78 ($p < 0.01$) olduğu ve bu azalışların istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi. Ancak, AA 4, 6 ve 24 saat boyunca 5, 10, 25 ve 50 µM konsantrasyonlarda MCF-7 hücrelerine uygulandığında gözlenen değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p > 0.05$) (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. MCF-7 hücrelerine AA'in değişen süre ve konsantrasyonlarda uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları. *:p<0.05, **:p<0.01

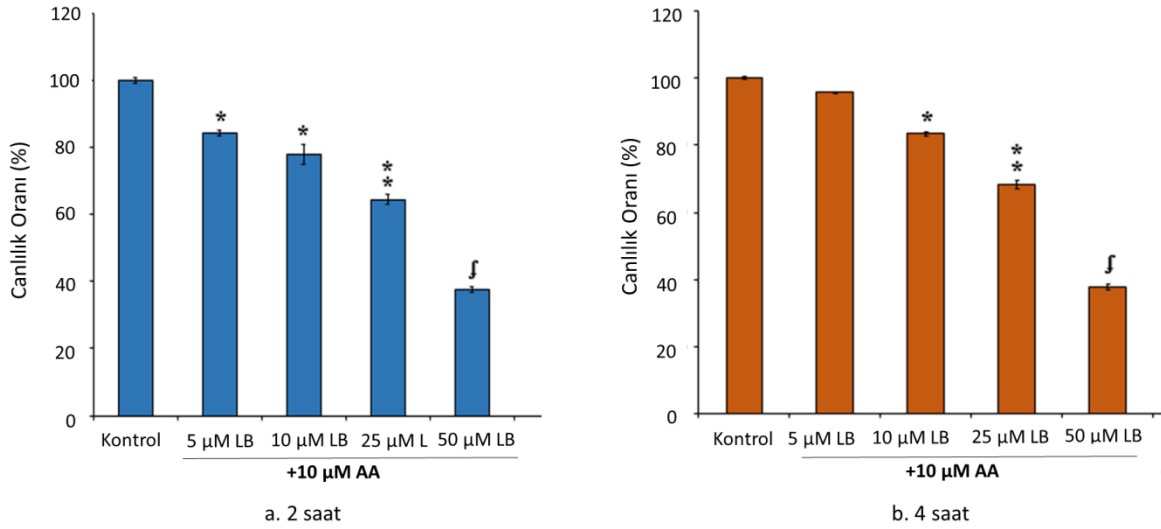
4.2. MCF-7 Hücrelerine Tek Başına AA Uygulaması Ardından, LB42708'in de Ortama Eklenmesi Sonucu Hücre Canlılığının Belirlenmesi

MCF-7 hücrelerine öncelikle 2 ve 4 saat boyunca 10, 25 ve 50 µM konsantrasyonlarda AA tek başına uygulandı. Süre bitimlerinde AA ortamdan uzaklaştırılmadan, 5, 10, 25 ve 50 µM LB42708 kuyulara eklendikten 24 saat sonundaki hücre canlılık oranları belirlendi.

4.2.1. Sabit AA konsantrasyonunun (10 µM) 2 ve 4 saat tek başına uygulanması ardından, LB42708'in de değişen konsantrasyonlarda ortama eklenmesi sonucu, MCF-7 hücrelerinde belirlenen hücre canlılık oranları

MCF-7 hücrelerine 10 µM sabit AA konsantrasyonu 2 ve 4 saat uygulanıp (ön koşullama), kuyulara 5 µM LB42708 eklendikten 24 saat sonraki hücre canlılık oranları belirlendi. Hücre canlılığının 2 saat AA ön koşullamasında %84 (p<0.05) ve 4 saat AA ön koşullamasında %95 olduğu belirlendi. Hücrelere 2 saat AA ön koşullama yapılmasının ardından eklenen 10 µM LB42708'in 24 saat sonundaki hücre canlılık oranının %74 olduğu belirlenirken, 4 saat AA ön koşullamasının ardından eklenen 10 µM LB42708'in 24 saat sonundaki hücre canlılık oranının %83 olduğu saptandı (p<0.05). 2 saat AA ön koşullaması yapılmasının ardından eklenen 25 µM LB42708'in ise 24 saat sonundaki hücre canlılık oranının %64 olduğu

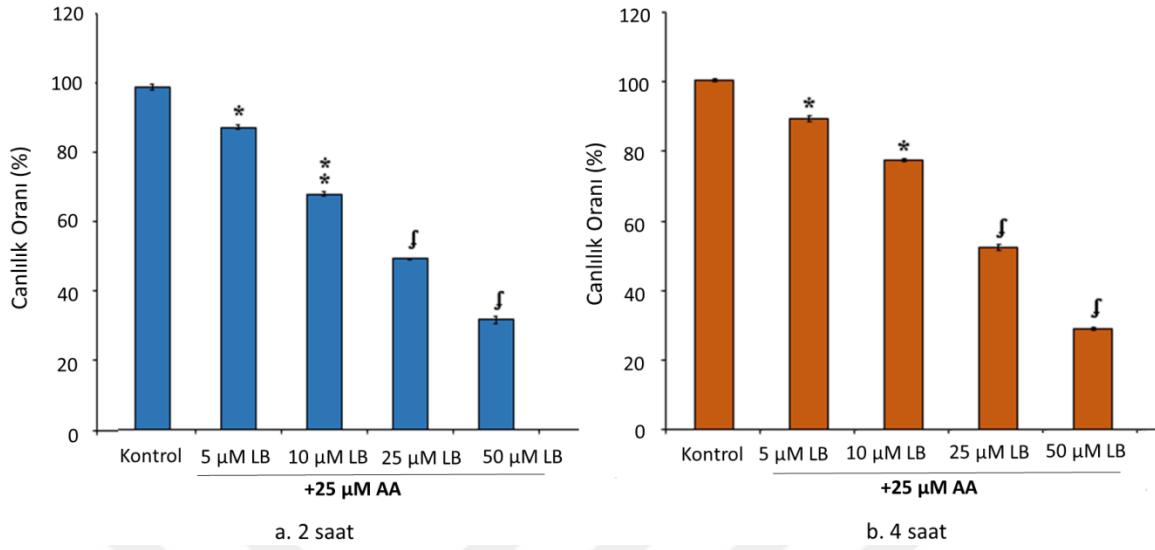
saptanırken, 4 saat AA ön koşullamasında ise bu oranın %68 olduğu belirlendi ($p<0.01$). Son olarak, her iki AA ön koşullama süresinde de, 50 μM LB42708 uygulamasının hücre canlılık oranının aynı olduğu [%37 ($p<0.001$)] saptandı (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Sabit 10 μM AA konsantrasyonunun 2 ve 4 saat MCF-7 hücrelerine ön uygulamasını takiben kuyulara eklenen 5, 10, 25 ve 50 μM LB42708 ile birlikte 24 saat bekletilmesinden sonra kontrol ile karşılaştırılarak belirlenen hücre canlılık oranları. *: $p<0.05$, **: $p<0.01$ ve ‡: $p<0.001$

4.2.2. Sabit AA konsantrasyonunun (25 μM) 2 ve 4 saat tek başına uygulanması ardından, LB42708'in de değişen konsantrasyonlarda ortama eklenmesi sonucu, MCF-7 hücrelerinde belirlenen hücre canlılık oranları

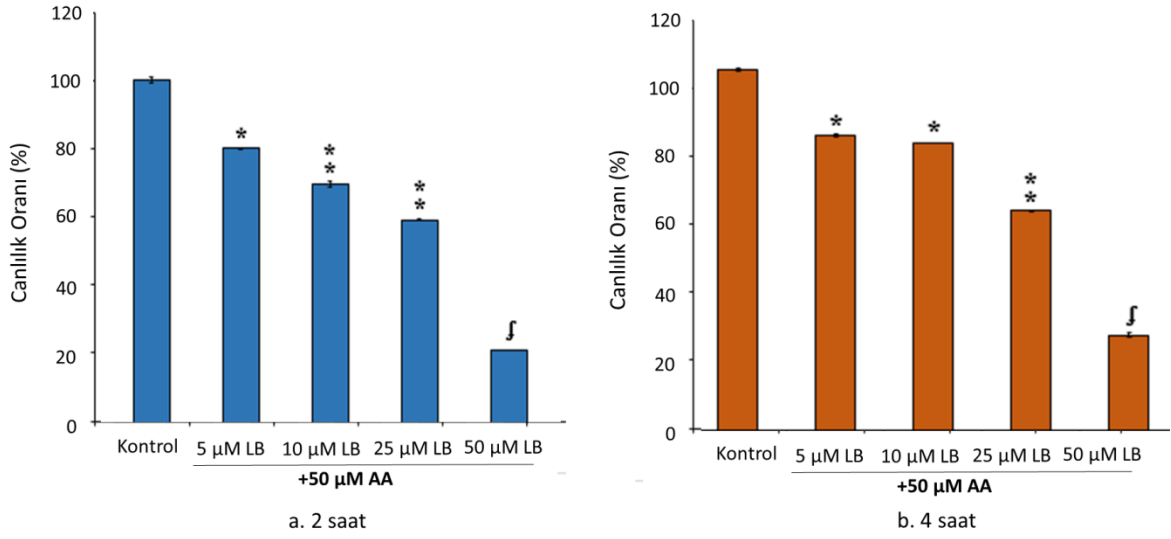
MCF-7 hücrelerine 25 μM sabit AA ile 2 ve 4 saat ön koşullama yapıp, kuyulara değişen konsantrasyonda LB42708 eklendikten 24 saat sonraki hücre canlılık oranları belirlendi. Hücrelere 2 saat AA ön koşullaması yapılmasından sonra 5 μM LB42708 eklendikten 24 saat sonra hücre canlılık oranının %88 olduğu saptanırken, 4 saat AA ön koşullamanın ardından 5 μM LB42708 eklendikten 24 saat sonra hücre canlılık oranının ise %89 olduğu tespit edildi ($p<0.05$). 2 ve 4 saat AA ön koşullamasından sonra 10 μM LB42708 eklenmesiyle hücre canlılığının sırasıyla %68 ($p<0.01$) ve %77 ($p<0.05$) olduğu belirlendi. LB42708 konsantrasyonunun 2 ve 4 saatlik AA ön koşullamaları sonrası 25 μM 'a yükseltilmesi ile hücre canlılığının sırasıyla %50 ve %52 ($p<0.001$), 50 μM LB42708 eklendiğinde ise hücre canlılığının %30 ve %28 ($p<0.001$) olduğu saptandı (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Sabit 25 µM AA konsantrasyonunun 2 ve 4 saat MCF-7 hücrelerine ön uygulamasını takiben kuyulara eklenen 5, 10, 25 ve 50 µM LB42708 ile birlikte 24 saat bekletilmesinden sonra kontrol ile karşılaştırılarak belirlenen hücre canlılık oranları. *:p<0.05, **:p<0.01 ve ‡:p<0.001

4.2.3. Sabit AA konsantrasyonunun (50 µM) 2 ve 4 saat tek başına uygulanması ardından, LB42708'in de değişen konsantrasyonlarda ortama eklenmesi sonucu, MCF-7 hücrelerinde belirlenen hücre canlılık oranları

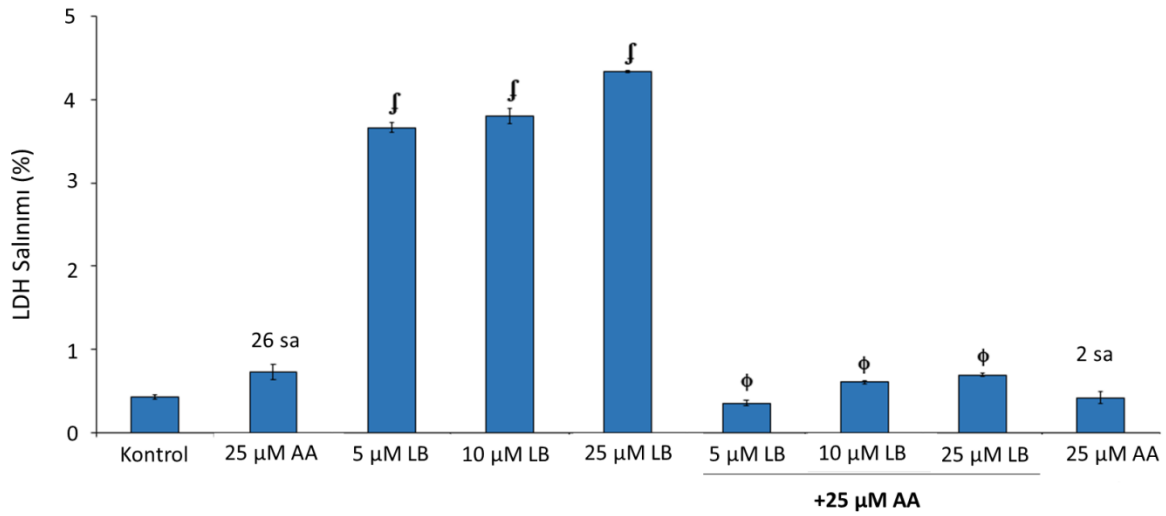
MCF-7 hücrelerine 50 µM sabit AA ön koşullaması 2 ve 4 saat uygulanıp kuyulara 5 µM LB42708 eklendikten 24 saat sonraki hücre canlılık oranları ön koşullama süresine göre sırasıyla %81 ve %82 (p<0.05) olarak belirlendi. LB42708 konsantrasyonu 10 µM olduğunda hücre canlılığı 2 saat AA ön koşullamasında %71 (p<0.01) iken, 4 saat ön koşullamada bu oranın %80 (p<0.05) olduğu tespit edildi. 25 µM LB42708 uygulandığında her iki ön koşullama için hücre canlılığı %61 (p<0.01) olarak saptandı. Son olarak, 50 µM LB42708 uygulandığında 2 saat AA ön koşullamasında hücre canlılığının %24, 4 saat ön koşullamada ise %26 (p<0.001) olduğu belirlendi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Sabit 25 µM AA konsantrasyonunun 2 ve 4 saat MCF-7 hücrelerine ön uygulamasını takiben kuyulara eklenen 5, 10, 25 ve 50 µM LB42708 ile birlikte 24 saat bekletilmesinden sonra kontrol ile karşılaştırılarak belirlenen hücre canlılık oranları. *:p < 0.05, **:p < 0.01 ve †:p < 0.001

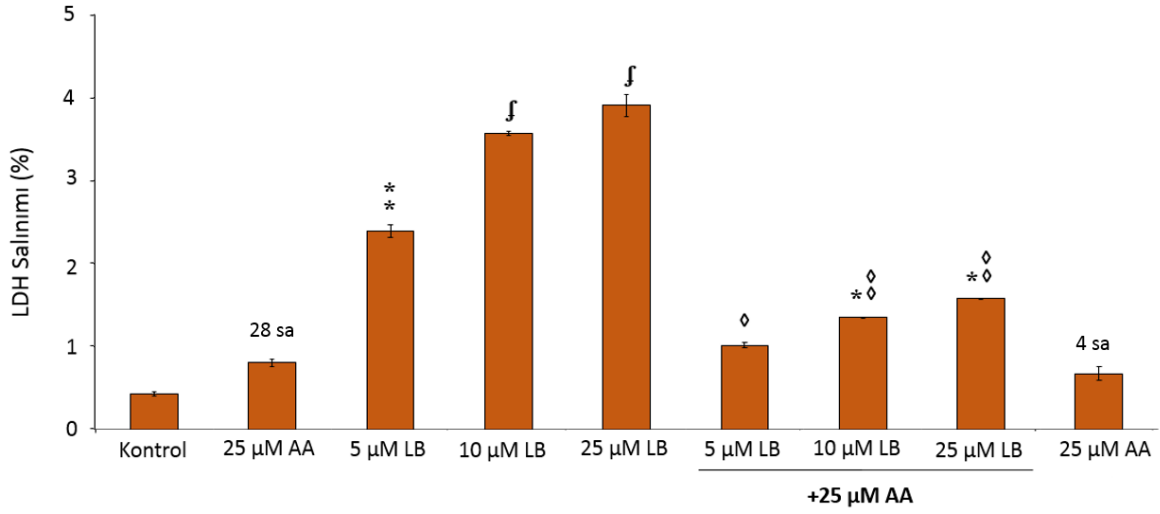
4.3. Besiyerine Salınan Laktat Dehidrogenaz (LDH) Miktarı ile Sitotoksite Oranının Belirlenmesi

MCF-7 hücrelerine 25 µM sabit AA 2 ve 26 saat süresince uygulanıp, kontrol ile karşılaştırıldığında, sitotoksik etkinin %1'in altında olduğu belirlendi. Değişen konsantrasyonlarda 5, 10 ve 25 µM LB42708 tek başına 24 saat süresince MCF-7 hücrelerine uygulanıp kontrol ile karşılaştırıldığında ise, besiyerine salınan LDH oranının sırasıyla %3.7, %3.8 ve %4.3 olduğu saptanırken bu artışların istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (p<0.001). Öte yandan, MCF-7 hücrelerine tek başına değişen konsantrasyonlarda LB42708 uygulamaları sonucu elde edilen LDH düzeyleri ile 2 saat 25 µM AA ön koşullaması ardından uygulanan 5, 10 ve 25 µM LB42708'in 24 saat sonundaki LDH düzeyleri karşılaştırıldı, bu oranların sırasıyla %0.35, %0.6 ve %0.7 olduğu saptanırken bu azalışların istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (p<0.001). (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. MCF-7 hücrelerine, sabit AA'in değişen sürelerde, LB42708'in değişen konsantrasyonlarda tek başlarına ve 2 saat 25 µM sabit AA önkoşullaması ardından ortama eklenen LB42708'in değişen konsantrasyonlarının 24 saat uygulanmasının sonunda besiyerine salınan LDH oranları. f:p<0.001 (kontrolle göre), Φ:p<0.001 (tek başına LB42708'e göre)

MCF-7 hücrelerine 25 µM sabit AA 4 ve 28 saat süresince uygulandıktan sonra kontrol ile karşılaştırıldığında, sitotoksik etkinin %1'in altında olduğu tespit edildi. Değişen konsantrasyonlarda 5, 10 ve 25 µM LB42708 tek başına 24 saat süresince MCF-7 hücrelerine uygulanıp kontrol ile karşılaştırıldığında ise, besiyerine salınan LDH oranının sırasıyla %2.4 (p<0.01), %3.6 ve %3.9 (p<0.001) olduğu ve bu artışların istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi. Ayrıca, MCF-7 hücrelerine tek başına değişen konsantrasyonlarda LB42708 uygulamaları sonucu elde edilen LDH düzeyleri ile 4 saat 25 µM AA ön koşullaması ardından uygulanan 5, 10 ve 25 µM LB42708'in 24 saat sonundaki LDH düzeyleri karşılaştırıldığında, bu oranların sırasıyla %1, %1.3 ve %1.6 (p<0.05) olduğu ve oranlardaki azalışların istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı (Şekil 4.7).

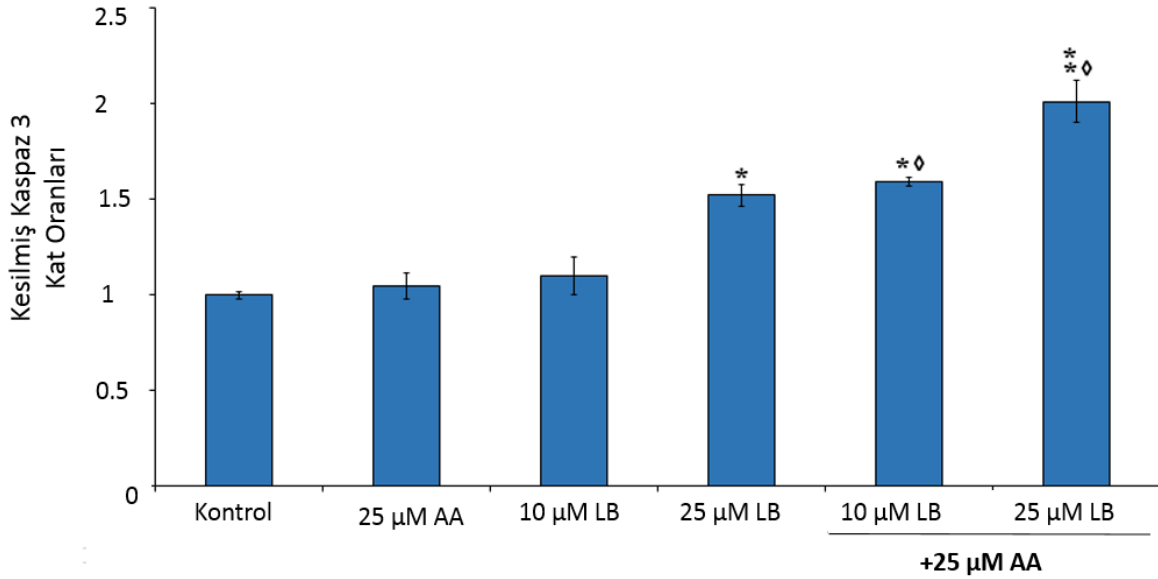


Şekil 4.7. MCF-7 hücrelerine, sabit AA'nin değişen sürelerde, LB42708'in değişen konsantrasyonlarda tek başlarına ve 4 saat 25 µM sabit AA önkoşullaması ardından ortama eklenen LB42708'in değişen konsantrasyonlarının 24 saat uygulanmasının sonunda besiyerine salınan LDH oranları. ** : $p < 0.01$ ve f: $p < 0.001$ (kontrole göre), ◇: $p < 0.05$ ve ◇◇: $p < 0.05$ (tek başına LB42708'e göre)

4.4. Kesilmiş Kaspaz-3 Düzeyi ile Hücrelerdeki Kaspaz Bağımlı Apoptoz Oranının Belirlenmesi

MCF-7 hücrelerine uygulanan AA ve LB42708'un ardından saptanan hücre canlılığındaki azalmanın nedeninin kaspaz bağımlı apoptoz olup olmadığı efektör kaspaz olan kesilmiş (aktif) kaspaz-3 miktarının kontrole göre kat artışlarının belirlenmesi ile gösterildi. Kontrol ile karşılaştırıldığında, MCF-7 hücrelerine 24 saat süresince uygulanan 25 µM AA ve 10 µM LB42708'in, aktif kaspaz-3 miktarında değişiklik yapmadığı saptandı ($p > 0.05$). 25 µM LB42708 aynı sürede MCF-7 hücrelerine uygulandığında ise, kontrol hücreleriyle yapılan karşılaştırma sonrası belirlenen aktif kaspaz 3 miktarının 1.5 kat artması istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$). Kontrol ile karşılaştırıldığında, 2 saat 25 µM AA ön koşullamasının ardından uygulanan 10 µM LB42708'in 24 saat sonundaki aktif kaspaz 3 miktarındaki 1.6 kat artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p < 0.05$). Ayrıca, 2 saat 25 µM AA ön koşullamasının ardından uygulanan 10 µM LB42708'in 24 saat sonundaki aktif kaspaz 3 miktarı ile aynı konsantrasyon ve sürede tek başına uygulanan LB42708 karşılaştırıldığında ise, 1.6 kat olan artışın anlamlı olduğu belirlendi ($p < 0.05$). Kontrol ile karşılaştırıldığında, 2 saat 25 µM AA ön koşullaması ardından uygulanan 25 µM LB42708'in 24 saat sonundaki aktif kaspaz

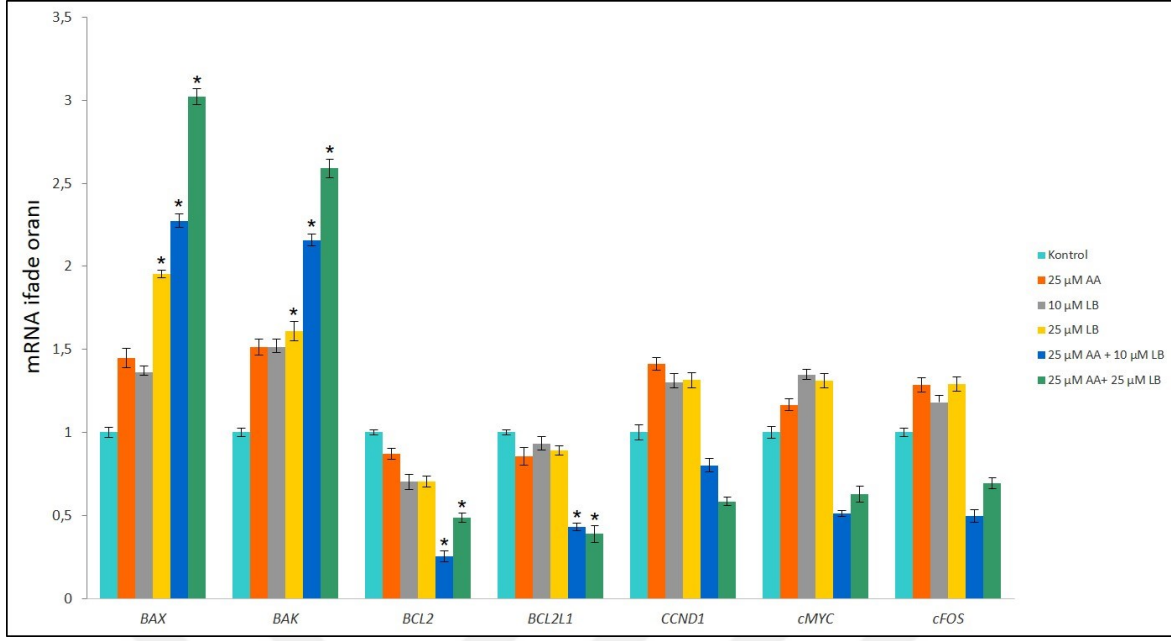
3 miktarındaki 2 kat artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p < 0.01$). Benzer şekilde, 2 saat 25 μM AA ön koşullamasının ardından uygulanan 25 μM LB42708'in 24 saat sonundaki aktif kaspaz 3 miktarı ile aynı konsantrasyon ve sürede tek başına uygulanan LB42708 karşılaştırıldığında ise, 2 kat olan artışın anlamlı olduğu belirlendi ($p < 0.05$) (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. MCF-7 hücrelerine, LB42708'in değişen, AA'in sabit konsantrasyonda tek başlarına ve 2 saat 25 μM sabit AA önkoşullaması ardından ortama eklenen LB42708'in değişen konsantrasyonlarının 24 saat uygulanmasının sonunda belirlenen aktif kaspaz-3 miktar değişimleri. *: $p < 0.05$ ve **: $p < 0.01$ (kontrole göre), Δ : $p < 0.05$ (tek başına LB42708'e göre)

4.5. MCF-7 Hücrelerine Uygulanan AA ve LB42708 'in Proapoptotik, Antiapoptotik ve Hücre Döngüsünde Görevli Genlerin mRNA İfade Düzeylerine Olan Etkilerinin Belirlenmesi

MCF-7 hücrelerine, LB42708'in değişen (10 ve 25 μM), AA'in (25 μM) sabit konsantrasyonda tek başlarına ve 2 saat 25 μM sabit AA önkoşullaması ardından ortama eklenen LB42708'in değişen konsantrasyonlarının 24 saat uygulanmasının apoptotik (BAX ve BAK), antiapoptotik (BCL2 ve BCL2L1) ve hücre döngüsünde yer alan (CCND1, cMYC ve cFOS) genlerin mRNA ifade düzeylerine olan etkilerini belirlemek için nicel gerçek zamanlı PCR yöntemi kullanıldı. Bu genlere ait mRNA ifade düzeyleri Şekil 4.9.'da gösterildi.



Şekil 4.9. MCF-7 hücrelerine, LB42708'in değişen (10 ve 25 µM), AA'in (25 µM) sabit konsantrasyonda tek başlarına ve 2 saat 25 µM sabit AA önkoşullaması ardından ortama eklenen LB42708'in değişen konsantrasyonlarının 24 saat uygulanmasının sonunda apoptotik (BAX ve BAK), antiapoptotik (BCL2 ve BCL2L1) ve hücre döngüsünde yer alan (CCND1, cMYC ve cFOS) genlerin mRNA ifade düzeyleri. *:p < 0.05 (kontrole göre)

Kontrol ile karşılaştırıldığında, MCF-7 hücrelerine 24 saat süresince uygulanan 25 µM AA ve 10 µM LB42708'in, apoptotik genler olan BAX ve BAK mRNA ifade düzeyini artırmasının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi (p>0.05). 25 µM LB42708 tek başına aynı sürede MCF-7 hücrelerine uygulanıp kontrol ile karşılaştırıldığında ise, mRNA ifadesinin BAX için 2, BAK için 1.7 kat artması istatistiksel olarak anlamlıydı (p<0.05).

Kontrol ile karşılaştırıldığında, 2 saat 25 µM AA ön koşullaması ardından, 10 ve 25 µM LB42708'in MCF-7 hücrelerine 24 saat uygulanması sonunda BAX mRNA ifade düzeylerindeki artışların sırasıyla 2.3 ve 3 kat olduğu belirlendi ve bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p<0.05). Benzer şekilde, AA önkoşullaması ardından MCF-7 hücrelerine 24 saat uygulanan 10 ve 25 µM LB42708'in BAK'ın mRNA ifade düzeyini istatistiksel olarak anlamlı şekilde sırasıyla 2.2 ve 2.6 kat artırdığı belirlendi (p<0.05).

MCF-7 hücrelerine 24 saat süresince tek başlarına uygulanan AA'in (25 µM) ve LB42708'in (10 ve 25 µM) kontrol ile karşılaştırıldığında, antiapoptotik genler olan BCL2 ve BCL2L1'in mRNA ifade düzeyinde oluşturduğu farkların istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı saptandı ($p>0.05$). Kontrol ile karşılaştırıldığında, 2 saat 25 µM AA ön koşullaması ardından, 10 ve 25 µM LB42708'in MCF-7 hücrelerine 24 saat uygulanması sonunda BCL2 mRNA ifade düzeylerindeki azalışların sırasıyla 2.7 ve 1.8 kat olduğu belirlendi ve bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). Benzer şekilde, AA önkoşullaması ardından MCF-7 hücrelerine 24 saat uygulanan 10 ve 25 µM LB42708'in BCL2L1'in mRNA ifade düzeyini istatistiksel olarak anlamlı şekilde sırasıyla 2.1 ve 2.4 kat azalttığı belirlendi ($p<0.05$).

MCF-7 hücrelerine 24 saat süresince tek başlarına uygulanan AA'in (25 µM) ve LB42708'in (10 ve 25 µM) kontrol ile karşılaştırıldığında, hücre döngüsünde yer alan (CCND1, cMYC ve cFOS) genlerin mRNA ifade düzeyindeki farklılıkların istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı saptandı ($p>0.05$). Kontrol ile karşılaştırıldığında, 2 saat 25 µM AA ön koşullaması ardından, LB42708'in değişen konsantrasyonlarının MCF-7 hücrelerine 24 saat uygulanması sonunda hücre döngüsünde yer alan (CCND1, cMYC ve cFOS) genlerin mRNA ifade düzeylerinin azaldığı belirlendi. Ancak, bu azalışın istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı saptandı ($p>0.05$).



5. TARTIŞMA

Meme kanserinin tedavisinde klasik kemoterapötiklerin tek başlarına uygulanmalarının yanı sıra, bu ilaçların birlikte kullanımı ile etkilerinin artırılması ve organizmaya olan toksisitenin azaltılması, yapılan ve yapılması hedeflenen araştırmaların ana amaçları arasındadır. Tedavi etkinliğinin artırılması için yeni ilaç hedefleri araştırılmakta ayrıca, yeni aday moleküller tanımlanmaya çalışılmaktadır. Kullanılan ajanların kanser hücreleri üzerine olan etkilerinin belirlenmesinde ve kanser tedavisinde aday bir molekül olarak tanımlanmasında hücre hatlarında *in vitro* ve deney hayvanı modellerinde *in vivo* olarak yapılan araştırmalar önem arz etmektedir. Preklinik deneysel çalışmalarda moleküllerin etkinliğinin belirlenmesi sürecinde, ajanlar tek başlarına ya da klasik kemoterapötiklerle birlikte kanser hücrelerine uygulanmakta ve ajanların sitostatik, apoptotik, antiproliferatif özellikleri değerlendirilmektedir. Yüksek lisans tez çalışmamızda, histon asetil transferaz enzimlerini baskılayan, hücre çoğalmasını durdurup apoptozu uyaran AA ile hücre proliferasyonu ve sağkalım yolaklarını baskılayan FTI LB42708'in MCF-7 meme kanseri hücrelerine olan etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir.

Ras mutasyonları meme kanseri olgularında yaygın gözlenmemektedir. Ancak, *Ras* proteininin veya bu yolda yer alan diğer proteinlerin işlevinin kanser hücrelerinde artmış olabileceği ayrıca, bu yolağın alternatif yolaklarla uyarılabilmesi sonucu, meme epitel hücrelerinde tümör gelişimini ve invaziv yetenek kazanılması sırasında onkogenik *Ras* proteininin katkısı olabileceği önerilmiştir [128]. HER2 ve diğer ilgili reseptörlerin artmış aktivasyonunun *RAS* mutasyonu olmayan meme kanserlerinde *Ras* proteininin uyarılmasına neden olabileceği belirtilmiştir [129]. Bir çalışmada özellikle agresif ve metastatik meme kanseri olgularının büyük bölümünde EGFR/HER2/K-RAS yolağının aktif olduğu belirlenmiştir [130].

FTI, *Ras* dahil pek çok proteinin farnesillenmesini engelleyerek kanserde kontrolsüz gerçekleşen hücre büyümesini ve çoğalmasını baskılamaktadır [112]. Ancak, N-*Ras* ve K-*Ras* proteinleri farnesillenmenin yanı sıra geranilgeranillenmeye de uğradıkları için bazı FTI'ler geranilgeranillenmeyi baskılayamazlar ve geranilgeranillenme, bu FTI'den bir kaçış mekanizması olarak varlık gösterebilmektedir [112,131].

FTI'lerin, farklı kanser hücrelerinin çoğalmasını baskıladığı in vitro olarak hücre hatlarında yapılan çalışmalarda, in vivo olarak da ksenograft modellerde belirlenmiştir [114,132-134]. İn vitro çalışmalarda FTI'lerin, kanser hücrelerinin çoğalmasını hücre döngüsünün G2/M evresinde, H-RAS mutasyonu bilinen kanser hücrelerini ise hücre döngüsünün G1 evresinde durdurduğu gösterilmiştir [135]. FTI'lerin çeşitli ajanlar ile birlikte uygulandığı çalışmalarda ise kanser hücrelerinde apoptozu uyardığı bilinmektedir [136-137].

Yapılan çalışmalarda yabancı tip p53 proteini olan kanser hücrelerinin FTI'lere yüksek duyarlılık gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca, bu hücrelerde FTI uygulaması yapıldıktan sonra p53 ve p21 ifadesinin artışı gösterilmiştir [135,138]. Ancak, Sun ve ark. nude fare ksenograft modelinde p53 ifadesi olmayan insan akciğer karsinoma Raf hücrelerine FTI uygulanması sonucu tümör büyümesinin baskılandığını göstermişlerdir [139].

Pankreatik duktal adenokarsinom (CAPAN-2, K-RAS mutant), melanom (C32, RAS yabancı tip) ve kolon kanseri (LoVo, K-RAS mutant) hücreleri ile oluşturulan fare ksenograft modellerinde FTI'lerinden; Tipifarnib 25–100 mg/kg değişen konsantrasyonda oral olarak günde iki kez uygulandığında, tümör büyümesinin durduğu gösterilmiştir. Bu çalışmanın bir diğer bulgusu ise, RAS mutasyonu olmayan tümör hücrelerinin Tipifarnib'e daha duyarlılığı olduğudur [134]. Bir diğer FTI olan Lonafarnib, prostat (DU-145), akciğer (NCI-H460 ve A549), pankreas (MiaPaCa) ve kolon (HCT116) kanser hücrelerinin enjeksiyonu ile oluşturulmuş fare ksenograft modellerine 40 mg/kg konsantrasyonda günde dört kez oral gavaj yoluyla uygulandığında, tümör gelişiminin baskılandığı belirlenmiştir [132].

Ayrıca meme kanseri (MDA-435) ve over kanseri (ES2, IGROV1 ile TOV-112D) hücrelerine 60mg/kg konsantrasyonda günde dört kez Lonafarnib uygulandığında kanser gelişiminin baskılandığı bununla birlikte mesane kanseri (EJ), meme kanseri (MCF-7) ve cilt kanseri (LOX) hücrelerine fare ksenograft modellerde Lonafarnib uygulandığında ise tümörün gerilediği bildirilmiştir [114].

Farklı FTI'lerin meme [140-141] ve diğer kanser hücrelerine (hepatasellüler, renal, kolon, melanom, pankreas, akciğer) [132, 134, 142-143] olan etkilerini araştıran

preklinik çalışmalar bulunmaktadır. Ancak, kullandığımız FTI olan LB42708 ile ilgili çalışmalar sınırlı olmakla birlikte, literatürde renal kanser, kolon kanseri ve kolorektal kanser ile yapılan çalışmalar bulunmaktadır.

LB42708'in *in vitro* olarak insan umbilikal ven endotel hücrelerine (HUVEC) uygulandığında IC₅₀ değerinin 75 nM olduğu belirlenmiştir [144]. Caki-2 (renal karsinom) hücrelerinde Cdk baskılayıcısı bir kemoterapötik ajan olan BAI 20 nM ve LB42708 15 µM tek başlarına ve birlikte 24 saat uygulanmış, tek başına olan uygulamaların hücre canlılığı üzerine etkisi olmadığı, ancak, ajanlar birlikte uygulandığında hücre canlılığının azaldığı belirlenmiştir [143]. Anabilim dalımızda p53 +/+ yabanıl HCT-116 ve p53 -/- null HCT-116 kolon kanseri hücreleri kullanarak yapılan yüksek lisans tez çalışmasında, LB42708'in 24 ve 48 saat kolon kanser hücrelerine uygulanması sonucunda IC₅₀ değerinin 25 µM olduğu belirlenmiştir [145]. MCF-7 hücrelerine çalışmamızda 24 saat süresince uygulanan en yüksek LB42708 konsantrasyonu olan 100 µM' da hücre canlılığının %71 olduğu saptanmıştır. Çalışmalarda belirlenen etkin LB42708 konsantrasyon ve sürelerinin farklı olmasının, kullanılan hücre hatlarının farklı doku ve kanser hücrelerine ait olması nedeniyle olabileceğini düşünmekteyiz.

Histon asetil transferaz inhibitörü (HAT) olan AA'in hücresel faaliyetler üzerine olan etkisi farklı hücre hatlarında yapılan çalışmalar ile belirlenmiştir; en önemli özellikleri transkripsiyonu baskılayarak hücre çoğalmasını engellerken, diğer taraftan hücrenin apoptoza yönelmesini uyarmaktır [108-109].

AA çeşitli kanser hücrelerine değişen süre ve konsantrasyonlarda *in vitro* uygulandıktan sonra, hücreler farklı doz ve sürelerde radyasyona tabi tutulmuş ve AA'in kanser hücrelerinin radyasyona duyarlılığını arttırdığı belirlenmiştir [93,146,147]. Ayrıca, bu çalışmaların ikisinde apoptozun uyarıldığı da belirtilmiştir [146,147].

LNCaP metastatik prostat adenokarsinom hücrelerine AA 5, 25 ve 125 µM konsantrasyonlarda 24 saat süreyle uygulanmış ve 125 µM konsantrasyonda hücre canlılığının %70 azaldığı belirlenmiştir [148]. MCF-7 (Luminal A) ve MDA-MB-231 (üçlü negatif) meme kanseri hücrelerine AA 48 saat süreyle uygulandığında IC₅₀

değerlerinin sırasıyla 13.5 μM ve 35 μM olduğu saptanmıştır [149]. Çalışmamızda, MCF-7 hücrelerine 2, 4, 6, 24 saat süresince AA tek başına uygulandığında, en yüksek uygulanan konsantrasyon olan 50 μM ' da en anlamlı azalış 2 saat sonunda gözlenmiştir. Schultz ve ark. AA'in MCF-7 hücrelerine uygulanması sonucu IC50 değerine 48 saat sonunda ulaşmışlardır. Çalışmamızda AA MCF-7 hücrelerine 24 saat süre ile uygulamış ve sonuçlarımız süre farklılığı nedeniyle karşılaştırılamamıştır. Tan ve ark.'nın 5 ve 25 μM konsantrasyonlarda AA'i LNCaP hücrelerine 4 ve 24 saat süresince uygulamaları sonucu elde ettikleri veriler ile aynı süre ve konsantrasyonlarda AA'i MCF-7 hücrelerine uyguladığımızda elde ettiğimiz sonuçlar farklılık göstermektedir. Farklı dokulara ait kanser hücrelerinin AA duyarlılığının aynı olmayışı, kanser hücrelerindeki moleküler mekanizmaların farklılığı olarak açıklanabilir.

AA'in farklı ajanlarla birlikte ya da önkoşullama ile kanser hücrelerine uygulanması sonucu, kanser hücrelerinin kullanılan ajana olan duyarlılığının arttığı ve tek başına olan uygulamalarına göre hücre canlılığının anlamlı düzeyde azaldığı gösterilmiştir [150,151]. Multipl miyelom tedavisinde kullanılan bir proteozom inhibitörü olan Bortezomib'in, AA ile birlikte uygulanmasının tekli uygulamasına karşı etkinliği araştırılmış; AA'in bortezomib ile uyarılan hücre çoğalmasının durdurulmasını ve hücre ölümünün uyarılmasını arttırdığı gösterilmiştir [150]. Anabilim Dalımızda gerçekleştirilen çalışmada ise, malign plevral mezotelyoma hücrelerine (MSTO-211H) 25 μM AA 4 saat süresince önkoşullama ile uygulandığında sisplatin ile uyarılan apoptozun arttığı, önkoşullama sonucu hücre canlılığının %60 oranında azaldığı ve bu azalmanın anlamlı olduğu belirlendi [151]. Çalışmamızda 10, 25 ve 50 μM AA, 2 ve 4 saat MCF-7 hücrelerine ön uygulamasını takiben, LB42708 ortama değişen konsantrasyonlarda (5, 10, 25 ve 50 μM) eklenmiş, 26 ve 28 saat sonrasında elde edilen hücre canlılık oranlarının, LB42708'in tek başına uygulamalarına oranla, tüm konsantrasyon ve sürelerde anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir. Literatürdeki diğer çalışmalarla benzer şekilde AA, LB42708 ile uyarılan hücre ölümünü arttırmış, MCF-7 hücrelerinin LB42708'e duyarlı hale gelmesine neden olmuştur.

Literatürde FTI ve AA ile yapılan prelinik *in vitro* çalışmalarda ajanların sitotoksik etkilerini belirleyen yöntemler az sayıda kullanılmıştır. HUVEC hücrelerine 10 μM

konsantrasyona kadar 48 saat LB42708 uygulandığında sitotoksik etki gözlenmemiştir [144]. Değişen LB42708 (5, 10, 25 μ M) konsantrasyonları p53 +/- yabanıl HCT-116 ve p53 -/- null HCT-116 kolon kanseri hücrelerine uygulandığında 24 saat sonunda gözlenen sitotoksik etkinin her iki hücre için konsantrasyon artışına bağlı olarak %4-11 aralığında olduğu saptanmıştır [145]. Çalışmamızda LB42708'in değişen konsantrasyonlarda (5, 10 ve 25 μ M) MCF-7 hücrelerine 24 saat süre ile tek başına uygulandığı zaman besiyerine salınan LDH oranının %3.7- 4.3 aralığında ve istatistiksel olarak anlamlı olduğunu belirledik. Bu sonuçlara göre, kanser hücresi olmayan HUVEC hücrelerinde daha uzun süre LB42708 uygulanmasına rağmen sitotoksikite gözlenmezken, farklı kanser hücrelerinde (kolon ve meme) aynı süre ve konsantrasyonlardaki sitotoksik etki oluşturma potansiyeli de değişkenlik göstermektedir.

HT1080 fibrosarkom ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerine 24 saat boyunca 2.5, 5, 7.5 ve 10 μ M AA uygulandığında, 10 μ M AA sonrası %10-15 seviyesinde sitotoksikite gözlemlenirken altındaki dozlarda etki saptanmamıştır [152]. Yüksek lisans tez çalışmamızda, MCF-7 hücrelerine 25 μ M sabit AA 2 ve 26 saat süresince uygulanıp, kontrol ile karşılaştırıldığında, sitotoksik etkinin %1'in altında olduğunu saptadık. Nambiar ve ark.'nın yaptığı çalışmadan daha yüksek konsantrasyonda AA'yi aynı sürede uygulamamıza karşılık, AA'nin MCF-7 hücrelerine sitotoksik etkisinin olmayışı, kullanılan farklı kanser hücrelerinin aynı moleküler özellik göstermemesinden kaynaklı olabileceğini düşünmekteyiz.

FTI olan R115777 ve tamoksifen birlikte MCF-7 hücrelerine uygulandığında sitostatik etkiler göstermiş, sitotoksik etkiye neden olmadığı belirlenmiştir [140]. Çalışmamızda, tek başına değişen konsantrasyonlarda LB42708 uyguladığımız MCF-7 hücrelerindeki besiyerine salınan LDH sonuçları ile AA ön koşullaması/birlikte uygulama sonuçlarına ait bulgular karşılaştırıldığında, AA'in tüm konsantrasyonlarda LB42708'in oluşturduğu sitotoksik etkiyi ortadan kaldırdığını belirledik.

FTI'ler tümör hücrelerinin büyümesini baskılamak ve apoptozu uyarmak için, taksan grubunda yer alan moleküller [153], sisplatin [154], tamoksifen [155], MEK kinaz inhibitörü [156], siklin bağımlı kinaz inhibitörü [157], 5-fluorourasil [158] ve Bcr-Abl

kinaz inhibitörü STI-571 [159] gibi çeşitli terapötik ajanlarla birlikte uygulanmakta ve tedavi etkinliğinin artması hedeflenmektedir.

Anti-tümöral aktivitenin yanında FTI'ler PI3K/Akt sinyal yolağı ile proapoptotik ve antiapoptotik protein ifade düzeylerinde de anlamlı değişikliklere neden olmaktadır. Over ve pankreatik kanser hücrelerinin FTI'e duyarlılığının Akt2 ifadesi ile ilişkili olduğu ve FTI'lerin bu hücrelerde Akt aktivitesini durdurduğu bildirilmiştir [160]. Ancak, meme ve over kanser hücre hatlarında Akt fosforilasyonu üzerine etkili olan lonafarnibin etkisi saptanmamıştır. Proapoptotik Bax ve Bak protein ifade düzeylerinde artış ile konformasyonel değişiklik belirlenmişken [161], bazı çalışmalarda antiapoptotik BCL2 protein ifadesinde de beklenenin aksine artış gözlenmiştir [162].

Caki renal kanser hücrelerine BAI ve LB42708 tek başlarına ve birlikte uygulandığında, tek başlarına uygulama sonuçları ile karşılaştırıldığında, birlikte uygulamada aktif Parp miktarında artış belirlenmiştir. A549 insan akciğer kanseri hücrelerinin bu ajanlar ile muamelesi sonucu apoptozun uyarıldığı saptanmıştır. Apoptozun, ER stresi ve ROS üretimi kaynaklı olmadığı, kaspaz bağımlı olduğu gösterilmiştir [143]. Yapılan literatür taraması sonucunda LB42708'in kanser hücrelerine uygulanması sonucu aktif kaspaz 3 miktarının belirlenmesine yönelik *in vitro* çalışmaya rastlanılmadığından, sonuçlarımız tartışılmamıştır. Çalışmamızda, LB42708 tek başına MCF-7 hücrelerine 24 saat uygulandığında, kontrol hücreleriyle yapılan karşılaştırma sonrası aktif kaspaz 3 miktarının konsantrasyona bağlı olarak arttığı belirlendi.

AA, A549 insan akciğer kanseri hücrelerine uygulandığında ER stresini, otofajiyi ve hücre içi kalsiyum mobilizasyonunu uyardığı bildirilmiştir. Ayrıca, ER yüzeyinde kaspaz 12'nin aktive olduğu ve ER strese bağlı apoptozun da tetiklendiği saptanmıştır [163]. İnsan U266 multipl miyelom hücrelerine AA uygulaması sonucu, proteozom inhibitörü olan bortezomib aracılı hücre büyümesinin baskılanması ve ER strese bağlı apoptozun arttığı ve hücrelerin bortezomib'e karşı daha duyarlı hale geldiği gösterilmiştir. Bu nedenle bu çalışmada, AA'in insan kanserlerinin tedavisinde birlikte kullanıldığı diğer ajana olan duyarlılığı arttırıcı potansiyel aday bir molekül olabileceği önerilmiştir [150]. MDA-MB-231 insan meme kanseri

hücrelerine AA ve lunasin'in hücre çoğalması ile ilgili yollarda bulunan proteinleri engelleyerek, apoptozu uyardığı ve iki ajanın birlikte uygulanmasında elde edilen verilerin, ajanların tek başlarına uygulanmaları verilerine göre daha anlamlı olduğu belirtilmiştir [73]. Çalışmamızda AA'in tek başına aktif kaspaz 3 miktarını artırmadığı, MCF-7 hücrelerini apoptoza yönlendirmediği belirlendi. Ancak, MCF-7 hücrelerine AA önkoşullama/birlikte değişen LB42708 konsantrasyonları ile uygulandığında, literatürdeki diğer çalışmalarla uyumlu olarak [73, 150]. LB42708'in tek başına olan uygulamaları sonucu belirlenen aktif kaspaz 3 miktarlarında anlamlı artışa neden olduğu belirlendi.

AA ve LB42708'in apoptotik yolda yer alan genlerin mRNA ifadeleri üzerine olan etkilerini araştıran sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır.

p53 +/+ yabanıl HCT-116 ve p53 -/- null HCT-116 kolon kanseri hücrelerine 25 µM LB42708 24 saat uygulandığında *cMYC* ile G1/S geçişinde görevli hücre döngü proteini *CCND1* (Siklin D1) ile antiapoptotik *BCL2L1* (BCL-XL) mRNA ifade düzeylerinin baskılandığı, bununla birlikte proapoptotik *BAX*, *BAK* ve *BIM* mRNA ifade düzeylerinin ise arttığı gösterilmiştir. Bu çalışmada ayrıca, *BCL2* mRNA ifadesi, kontrol ile karşılaştırıldığında azalmasına karşın bu azalışın anlamlı olmadığı gösterildi [145]. MCF-7 hücrelerine aynı sürede ve konsantrasyonda LB42708 uyguladığımızda, pro apoptotik genler olan *BAX* ve *BAK*'ın mRNA ifade düzeyinde anlamlı artış gözlenirken, *BCL2* mRNA düzeyinde ise anlamlı bir azalış saptanmadı. *BCL2*, *BAX* ve *BAK* genlerinin mRNA ifade düzeyi bulgularımız Elmazoglu ve ark yaptığı çalışma ile uyumludur. *cMYC*, *CCND1* ve *BCL2L1* mRNA düzeylerinde değişimler çalışmamızda anlamlı bulunmamıştır. Bu sonuçlar, her iki çalışmada aynı süre ve konsantrasyonda LB42708'in uygulandığında, LB42708'in hücre döngüsünde yer alan genlerin (*cMYC*, *CCND1*) mRNA ifadesini kolon kanser hücrelerinde azalttığını ancak, MCF-7 hücrelerinde ise etkisiz olduğunu göstermektedir. Hücre döngüsünde yer alan genlerin mRNA ifadelerinin MCF-7 kanser hücrelerinde baskılanması için daha yüksek konsantrasyonlarda LB42708'in uygulanmasının gerekliliğini düşündürmüştür.

MSTO-211H malign plevral mezotelyoma hücreleri 25 µM AA ile 4 saat muamele edilmiş, ardından hücrelere 24 saat sisplatin uygulanmıştır. Sisplatinin tek başına

uygulanması sonucu elde edilen verilere göre, AA ön koşullaması yapıldığında *cMYC*, ve *BCL2* mRNA ifadelerinin anlamlı derecede azaldığı gösterilmiştir [151]. Çalışmamızda, 2 saat 25 µM AA ön koşullamasının ardından, 25 µM LB42708'in MCF-7 hücrelerine 24 saat süre ile uygulanması sonunda *BCL2* mRNA ifade düzeyinde anlamlı bir düşüş gözlenirken, *cMYC* mRNA ifadesinin azalmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır. Her iki çalışmada da benzer şekilde AA, kullanılan ajanların etkisini arttırmış ve etkisini antiapoptotik *BCL2* mRNA ifade düzeyini azaltarak göstermiştir.

Yüksek lisans tez çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz veriler değerlendirildiğinde, LB42708'in MCF-7 meme kanseri hücrelerine tek başına olan uygulamaları sonucu belirlenen hücre canlılığı ve hücrelerdeki sitotoksosite oranlarının, AA varlığında anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar, AA'in MCF-7 hücrelerini LB42708 etkilerine karşı daha duyarlı hale getirdiğini göstermektedir. LB42708 uygulamaları sonucu MCF-7 hücrelerinde aktif kaspaz-3 varlığının saptanması, bu hücrelerde kaspaz aracılı apoptozun uyarıldığını göstergesidir. LB42708'in neden olduğu aktif kaspaz-3 düzeyleri, MCF-7 hücrelerine AA uygulamasıyla anlamlı düzeyde artmıştır. Bu veriler, AA ve LB42708'in sinerjistik etki göstererek apoptozu uyardığını göstermektedir. Apoptotik yolağın AA varlığında daha fazla uyarılmasının nedeni, antiapoptotik genlerin mRNA düzeylerindeki anlamlı azalış ve proapoptotik genlerin ise mRNA düzeylerindeki anlamlı artış olabilir. Sonuç olarak tüm verilerimiz, AA'in varlığında MCF-7 hücrelerinde LB42708 uygulanması sonucu oluşan, hücre canlılığının baskılanması, sitotoksosite ve apoptotik yolak uyarımının arttığının göstermektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmamız kapsamında MCF-7 meme kanseri hücrelerine, farklı konsantrasyon ve sürelerde AA ve farnesil transferaz inhibitörü LB42708'in tek başlarına ve AA önkoşullaması ile birlikte uygulanmasının hücre canlılığı, sitotoksite düzeyi ve apoptoz uyarımı üzerine etkilerini araştırdık.

MCF-7 hücrelerine AA önkoşullaması ardından LB42708 uygulanması ile hücre canlılığının tek başına LB42708'e oranla konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı MTT yöntemiyle belirlendi. AA ön uygulamasının LB42708'in tek başına uygulanmasının neden olduğu sitotoksiteyi anlamlı oranda azalttığı saptandı. Kullanılan ajanların MCF-7 hücreleri üzerinde oluşturduğu sitotoksite düzeyleri, hücrelerin besi yerine saldığı LDH miktarı ile belirlendi. Aktif kaspaz-3 miktarının artışı ile hücre canlılığında azalmaya neden olan apoptozun kaspaz bağımlı gerçekleştiği gözlemlendi. MCF-7 hücrelerine AA önkoşullamasının ardından LB42708 uygulanması ile proapoptotik, antiapoptotik ve hücre döngüsünde görevli genlerin mRNA ifade düzeylerine olan etkisi nicel gerçek zamanlı PCR yöntemi ile belirlendi. AA önkoşullamasının ardından LB42708 uygulanması ile proapoptotik BAX ve BAK genlerinin mRNA ifadelerinde artışın, antiapoptotik BCL2 ve BCL2L1 mRNA ifadelerinde azalışın, tek başına LB42708 uygulanmasına göre anlamlı olarak değiştiği saptandı. AA uygulaması ile hücre döngüsünde görev alan CCND1, cMYC ve cFOS genlerin mRNA ifade düzeylerinde azalış gözlemlendi, ancak bu azalışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi.

Yapılan literatür taramasında, AA ve LB42708'in etkilerinin daha önce farklı kanser türlerine ait hücre hatlarında birlikte araştırıldığı in vitro veya deneysel hayvan modelleri (in vivo) üzerine yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yüksek lisans tez çalışmamız MCF-7 meme kanseri hücrelerinde bu iki ajanın apoptotik etkilerinin birlikte değerlendirildiği ilk özgün çalışma olma özelliği taşımaktadır.

Preklinik in vitro çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgular kanser hücrelerinin tedavisinde potansiyel aday bir molekül olabilecek LB42708 etkinliğinin AA önkoşullaması ile birlikte önemli ölçüde arttığını göstermektedir. Verilerimiz, farklı kanser hücre hatlarıyla yapılan in vitro ve in vivo modellerde ileri moleküler

analizlerin yapıldığı yöntemler ile desteklenmesi durumunda, AA ve LB42708'in klinik uygulamalarda test edilebilecek potansiyel aday moleküller olabileceğini düşündürmüştür.



KAYNAKLAR

1. İnternet: World Health Organization. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.who.int%2Fcan cer%2Fen%2F&date=2018-08-18>, Son Erişim Tarihi:18.08.2018.
2. İnternet: T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. URL: http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fhsgm.saglik.gov.tr% 2Fdepo%2Fbirimler%2Fkanser-db%2Fistatistik%2F2014- RAPOR._uzuuun.pdf&date=2018-08-18, Son Erişim Tarihi:18.08.2018.
3. Yazıcı, Ö. ve Kutay Bozkurt, V. (2017). Erken Evre Meme Kanseri Hastalığının Tedavisinde Uygulanılan Meme Koruyucu Cerrahi ile Mastektomi Ameliyatlarının Maliyet Etkililik Analizi. *Sosyal Güvence Dergisi*, 6 (11), 79-106.
4. İnternet: T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. 2013-2018 Ulusal Kansere Kontrol Planı. URL: http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fwww.iccp-portal.org%2Fsystem%2Ffiles%2Fplans%2FULusal_Kanser_Kontrol_Plani_2013_2018.pdf&date=2018-08-18, Son Erişim Tarihi:18.08.2018.
5. Mansfield, C.M. (1993). A review of the etiology of breast cancer. *Journal of the National Medical Association*, 85(3),217-221.
6. Pandya, S. and Moore, R.G. (2011). Breast development and anatomy. *Clinical Obstetrics Gynecology*, 54(1),91-95.
7. Spratt, J.S. and Tabin, G.R. 1995. *Gross anatomy of the breast* (Fourth edition). Philadelphia London: W.B.Saunders, 22-42.
8. Kalaycı, G., Acarlı, K., Demirkol, K. ve Ertekin, C. (2002). *Genel cerrahi cilt 1* (Birinci Baskı). İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 537-42.
9. İnternet: URL: http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fwww.123rf.com%2Fphoto_11968948_cross-section-of-male-and-female-breast-tissue.html&date=2018-08-18, Son Erişim Tarihi:18.08.2018.
10. Cunningham, L. (1977) The anatomy of the arteries and veins of the breast. *Journal of Surgical Oncology*, 9(1),71-85.
11. Batson, O.V. (1940). The role of the vertebral veins in metastatic process of the breast cancer. *Annals of Surgery*, 112(1), 138–149.
12. Tanis, P.J., Nieweg, O.E., Valdés-Olmos, R.A., and Kroon, B.B. (2001). Anatomy and physiology of lymphatic drainage of the breast from the perspective of sentinel node biopsy. *Journal of the American College of Surgeons*, 192(3),399-409.

13. Yalav, O. (2009). *Erken Evre Meme Kanserli Hastalarda Sentinel Lenf Nodu Biyopsisinin Yeri*, Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Adana, 12-13.
14. İnternet: International Agency for Research on Cancer. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fglobocan.iarc.fr%2FDefault.aspx&date=2018-08-18>, Son Erişim Tarihi:18.08.2018.
15. Martin, A.M. and Weber B. L. (2000). Genetic and Hormonal Risk Factors in Breast Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(14), 1126-35.
16. Siegel, R. L., Miller, K. D., and Jemal, A. (2018). Cancer statistics. *Cancer Journal for Clinicians*, 68(1), 7-30.
17. Brenner, D.R., Brockton, N.T., Kotsopoulos, J., Cotterchio, M., Boucher, B.A., Courneya, K.S., Knight, J.A., Olivotto, I.A., Quan, M.L., and Friedenreich, C.M. (2016). Breast cancer survival among young women: a review of the role of modifiable lifestyle factors. *Cancer Causes Control*, 27(4),459-472.
18. Hill, A.D.K., Doyle, J.M., McDermott, E.W., and O'Higgins, N.J. (1997). Hereditary breast cancer. *British Journal of Surgery*, 84 (10), 1334-1339.
19. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. (2001). Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet*, 358(9291),1389-99.
20. Shiovitz, S. and Korde, L.A. (2015). Genetics of breast cancer: a topic in evolution. *Annals of Oncology*, 26(7), 1291–1299.
21. Brewer, H.R., Jones, M.E., Schoemaker, M.J., Ashworth, A., and Swerdlow A.J. (2017). Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure. *Breast Cancer Research and Treatment*, 165(1),193–200.
22. Russo, I.H. and Russo, J. (2011). Pregnancy-induced changes in breast cancer risk. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 16(3), 221–233.
23. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. (2012). Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. *The Lancet Oncology*, 13(11),1141-51.
24. Kobayashi, S., Sugiura, H., Ando, Y., Shiraki, N., Yanagi, T., Yamashita, H., and Toyama, T. (2012). Reproductive history and breast cancer risk. *Breast Cancer*, 19(4), 302–308.
25. Nechuta, S., Paneth, N., and Velie, E.M. (2010). Pregnancy characteristics and maternal breast cancer risk: a review of the epidemiologic literature. *Cancer Causes and Control*, 21(7),967-89.

26. IARC working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans. (2010). Alcohol Consumption and Ethyl Carbamate. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 96(3),1383.
27. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. 2004. *Tobacco Smoke and Involuntary Smoking*. France: Lyon, International Agency for Research on Cancer, 59.
28. Luo, J., Margolis, K.L., Wactawski-Wende, J., Horn, K., Messina, C., Stefanick, M.L., Tindle, H.A., Tong, E., and Rohan, T.E. (2011). Association of active and passive smoking with risk of breast cancer among postmenopausal women: a prospective cohort study. *British Medical Journal*, 1 (342), d1016.
29. Xue, F., Willett, W.C., Rosner, B.A., Hankinson, S.E., and Michels, K.B. (2011). Cigarette smoking and the incidence of breast cancer. *Archives of Internal Medicine*, 171(2),125–133.
30. Liu, Y., Nguyen, N., and Colditz, G.A. (2015). Links between alcohol consumption and breast cancer: a look at the evidence. *Womens Health*, 11(1), 65–77.
31. Ostrow, K.L., Michalidi, V., Guerrero-Preston, R., Hoque, M.O., Greenberg, A., Rom, W., and Sidransky, D. (2013). Cigarette smoke induces methylation of the tumor suppressor gene NISCH. *Epigenetics*, 8(4), 383–388.
32. Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., and Forman, D.B.F. Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*.136(5), E359-86.
33. Youlden, D.R., Cramb, S.M., Dunn, N.A., Muller, J.M., Pyke, C.M., and Baade P.D. (2012). The descriptive epidemiology of female breast cancer: An international comparison of screening, incidence, survival and mortality. *Cancer Epidemiology*, 36(3),237–248.
34. Verkasalo, P.K., Kaprio, J., Koskenvuo, M., and Pakkula, E. (1999). Genetic Predisposition, Environment and Cancer Incidence: A Nationwide Twin Study in Finland 1976-1995. *International Journal of Cancer*, 83(6), 743-749.
35. Lichtenstein, P., Holm, N.V., Verkasalo, P.K., Iliadou, A., Kaprio, J., Kosenvuo, M., Pakulo, E., Skytthe, A., and Hemminki, K. (2000). Environmental and heritable factors in the causation of cancer-analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *The New England Journal of Medicine*, 343(2),78-85.
36. Lacey, J.V., Devesa, S.S., and Brinton, L.A. (2002). Recent Trends in Breast Cancer Incidence and Mortality. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 39(2-3),82-8.
37. Key, T.J., Verkasalo, P.K., and Banks, E. (2001). Epidemiology of Breast Cancer. *Lancet Oncology*, 2(3),133-40.

38. Cantor, K.P., Stewart, P.A., Brinton, L.A., and Döşemeci, M. (1995). Occupational Exposures and Female Breast Cancer Mortality In The United States. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 37(3),336-48.
39. Hansen, J. (1999). Breast Cancer Risk Among Relatively Young Women Employed In Solvent Using Industries. *American Journal of Industrial Medicine*, 36(1),43-7.
40. Band, P.R., Le N.D., Fang, R., Desschamps, M., and Yang, P. (2000). Identification of Occupational Cancer Risks in British Columbia. A Population Based CaseControl Study of 995 Incident Breast Cancer Cases by Menopausal Status, Controlling for Confounding Factors. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 42(3), 284-310.
41. Jobling, S., Reynolds, T., White, R., Parker, M.G., and Sumpter, J.P. (1995). A Variety of Environmentally Persistent Chemicals, Including Some Phthalate Plasticizers Are Weakly Estrogenic. *Environmental Health Perspective*, 103(6), 582–587.
42. Soto, A.M., Sonnenschein, C., Chung, K.L., Fernandez, M.F., Olea, N., and Serrano, F.O. (1995). The E-Screen Assay As A Tool To Identify Estrogens: An Update On Estrogenic Environmental Pollutants. *Environmental Health Perspective*, 103(7), 113–122.
43. Tiwari, D., Kamble, J., Chilgunde, S., Patil, P., Maru, G., Kawle, D., Bhartiya, U., Joseph, L., and Vanage, G. (2012). Clastogenic and mutagenic effects of bisphenol A: An endocrine disruptor. *Mutation Research*, 743(1-2), 83-90.
44. Darbre, P.D., Aljarrah, A., Miller, W.R., Coldham, N.G., Sauer, M.J., and Pope, G.S. (2004). Concentrations of parabens in human breast tumours. *The Journal of Applied Toxicology*, 24(1),5-13.
45. Barr, L., Metaxas, G., Harbach, J.A.C., Savoy, L.A., and Darbre, D.P. (2012). Measurement of paraben concentrationsions in Human Breast Tissue at serial locations across the breast from axilla. *Journal of Applied Toxicology*, 32(3), 219-232.
46. Ronkers, C.M., Erdmann, C.A., and Land, C.E. (2005). Radiation and Breast Cancer: A Review of Current Evidence. *Breast Cancer Research*, 7(1), 21-32.
47. Boice, Jr. JD. (2001). Radiation And Breast Carcinogenesis. *Medical Pediatric Oncology*, 36(5), 508-513.
48. McElroy, J.A., Egan, K.M., Titus-Ernstoff, L., Anderson, H.A., Trentham-Dietz, A., and Hampton, J.M. (2007). Occupational exposures to electromagnetic field and breast cancer risk in a large, population-based, case-control study in the United States. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 49(3), 266-274.
49. Tokumaru, O., Haruki, K., Bascal, K., Katagiri, T., Yamamoto, T., and Sakurai, Y. (2006). Incidence of cancer among female flight attendants: a meta-analysis. *Journal of Travel Medicine*, 13(3),127-32.

50. Goodman, M.T., Mabuchi, K., Morita, M., Soda, M., Ochikubo, S., Fukuhara, T., Ikeda, T., and Terasaki, M. (1994). Cancer incidence in Hiroshima and Nagasaki, Japan, 1958–1987. *European Journal of Cancer*, 30A(6), 801-807.
51. Perou, C., Sorlie, T., Eisen, M.B., Rijn, M.V., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslén, L.A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S.X., Lonning, P.E., Borresen-Dale, A.L., Brown, P.O., and Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), 747-52.
52. Sorlie, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., Rijn, M.V., Jeffrey, S.S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J.C., Brown, P.O., Botstein, D., Eystein-Lonning, P., and Borresen-Dale, A.L. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(19), 10869-10874.
53. Sorlie, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J.S., Nobel, A., Deng, S., Johnsen, H., Pesich, R., Geisler, S., Demeter, J., Perou, C.M., Lonning, P.E., Brown, P.O., Borresen-Dale, A.L., and Botstein D. (2003). Repeated observation of breast tumor sub types in independent gene expression data sets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(14), 8418-8423.
54. Dai, X., Xiang, L., Li., and T., Bai, Z. (2016). Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. *Journal of Cancer*. 7(10), 1281-1294.
55. Sandhu, R., Parker, J.S., Jones, W.D., Livasy, C.A., and Coleman, W.B. (2010). Microarray-Based Gene Expression Profiling for Molecular Classification of Breast Cancer and Identification of New Targets for Therapy. *Laboratory Medicine*, 41 (6), 364-372.
56. Swedenborg, E., Power, K.A., Cai, W., Pongratz, I., and Rüegg J. (2009). Regulation of estrogen receptor beta activity and implications in health and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(24), 3873-3894.
57. Zhang, M.H., Man, H.T., Zhao, X.D., Dong, N., and Ma, S.L. (2014). Estrogen receptor-positive breast cancer molecular signatures and therapeutic potentials. *Biomedical reports*, 2(1), 41-52.
58. Zhou, Z., Qiao, J.X., Shetty, A., Wu, G., Huang, Y., Davidson, N.E., Wan, Y. (2014). Regulation of estrogen receptor signaling in breast carcinogenesis and breast cancer therapy. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(8), 1549.
59. Osborne, C.K., Shou, J., Massarweh, S., and Schiff, R. (2005). Crosstalk between estrogen receptor and growth factor receptor pathways as a cause for endocrine therapy resistance in breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 11(2), 865–870.
60. Lange, C.A. and Yee D. (2008). Progesterone and breast cancer. *Womens Health*, 4(2), 151–162.

61. Daniel, A.R., Hagan, C.R., and Lange, C.A. (2011). Progesterone receptor action: defining a role in breast cancer. *Expert Review of Endocrinology & Metabolism*, 6(3), 359–369.
62. Migliaccio, A., Piccolo, D., Castoria, G., Di-Domenico, M., Bilancio, A., Lombardi, M., Gong, W., Beato, M., and Auricchio, F. (1998). Activation of the Src/p21ras/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor. *European Molecular Biology Organization Journal*, 17(7), 2008-2018.
63. Iqbal, N. and Iqbal, N. (2014). Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. *Molecular Biology International*, 2014, 852748.
64. Ishikawa T., Ichikawa, Y., Shimizu, D., Sasaki, T., Tanabe, M., Chishima, T., Takabe, K., and Endo, I. (2014). The role of HER-2 in Breast Cancer. *Journal Surgical Science*, 2(1), 4–9.
65. Langbein, L. and Rogers, M.A., (1999). Winter H. The catalog of human hair keratins I. Expression of the nine type I members in the hair follicle. *Journal of Biological Chemistry*, 274(19), 874-884.
66. Bhalla, A., Manjari, M., Kahlon, S.K., Kumar, P., and Kalra, N. (2010). Cytokeratin 5/6 expression in benign and malignant breast lesions. *Indian journal of pathology and microbiology*, 53(4), 676-80.
67. Badve, S., Dabbs, D.J., Schnitt, S.J., Baehner, F.L., Decker, T., Eusebi, V., Fox, S.B., Ichihara, S., Jacquemier, J., Lakhani, S.R., Palacios, J., Rakha, E.A., Richardson, A.L., Schmitt, F.C., Tan, P.H., Tse, G.M., Weigelt, B., Ellis, I.O., and Reis-Filho J.S. (2011). Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Modern Pathology*, 24(2), 157–167.
68. Singh, B., Carpenter, G., and Coffey, R. J. (2016). EGF receptor ligands: recent advances. *F1000 Research*, 8(5), 2270
69. Seshacharyulu, P., Ponnusamy, M.P., Haridas, D., Jain, M., Ganti, A.K., and Batra, S.K. (2012). Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 16(1), 15-31.
70. Travis, K. (2005). Bernard Fisher Reflects on a Half-Century's Worth of Breast Cancer Research. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(22), 1636-1637.
71. Teshome, M. and Hunt, K.K. (2014). Neoadjuvant therapy in the treatment of breast cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 23(3), 505–523.
72. Kurt, H., Keşkek, Ş.Ö., Çil, T., ve Canataroğlu, A. (2013). Meme kanserli hastalarda tamamlayıcı/alternatif tedavi kullanımı. *Türk Onkoloji Dergisi*, 28(1), 10-15.

73. Hsieh, C.C., Hernandez-Ledesma, B., and Lumen, B.O. (2011). Cell proliferation inhibitory and apoptosis-inducing properties of anacardic acid and lunasin in human breast cancer MDA-MB-231 cells. *Food Chemistry*, 125(2), 630-636.
74. Deans, C. and Maggert, K. A. (2015). What Do You Mean, "Epigenetic"? *Genetics*, 199(4), 887-896.
75. Deaton, A. M. and Bird, A. (2011). CpG islands and the regulation of transcription. *Genes and Development*, 25(10), 1010–1022.
76. Jin, B., Li, Y., and Robertson K.D. (2011). DNA Methylation: Superior or Subordinate in the Epigenetic Hierarchy? *Genes Cancer*, 2(6), 607–617.
77. İzmirli, M. (2013). Epigenetik Mekanizmalar ve Kanser Tedavisinde Epigenetik Yaklaşımlar. *Van Tıp Dergisi*, 20(1), 48-51.
78. Chen, J. and Xue, Y. (2016). Emerging roles of non-coding RNAs in epigenetic regulation. *Science China Life Sciences*, 59(3), 227-235.
79. Bora, G. ve Erdem-Yurter, H. (2007). Epigenetik Hastalıklar Ve Tedavi Yaklaşımları. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 38(1), 48-54.
80. Koike, M., Shimokawa, H., Kanno, Z., Ohya, K., and Soma, K. (2005). Effects of mechanical strain on proliferation and differentiation of bone marrow stroma cell line ST2. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 23(3), 219-25.
81. Peserico, A. and Simone, C. (2010). Physical and Functional HAT/HDAC Interplay Regulates Protein Acetylation Balance. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011(371832), 1-10.
82. Wapenaar, H. and Dekker F.J. (2016). Histone acetyltransferases: challenges in targeting bi-substrate enzymes. *Clinical Epigenetics*, 26(8), 59.
83. Vernarecci, S., Tosi F., and Filetici P. (2010). Tuning acetylated chromatin with HAT inhibitors A novel tool for therapy. *Epigenetics*, 5(2), 105-111.
84. Furdas, S.D., Kannan, S., Sippl, W., and Jung, M. (2012). Small molecule inhibitors of histone acetyltransferases as epigenetic tools and drug candidates. *Archiv der Pharmazie*, 345(1), 7-21.
85. Cerbo, V.D. and Schneider R. (2013). Cancers with wrong HATs: the impact of acetylation. *Briefings in Functional Genomics*, 12(3), 231-43.
86. Balasubramanyam, K., Altaf, M., Varier, R.A., Swaminathan, V., Ravindran, A., Sadhale, P.P., and Kundu T.K. (2004). Polyisoprenylated benzophenone, garcinol, a natural histone acetyltransferase inhibitor, represses chromatin transcription and alters global gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, 279(32), 33716–33726.
87. Oike, T., Ogiwara, H., Torikai, K., Nakano, T., Yokota, J., and Kohno, T. (2012). Garcinol, a histone acetyltransferase inhibitor, radiosensitizes cancer

- cells by inhibiting non-homologous end joining. *International Journal of Radiation Oncology - Biology - Physics*, 84(3), 815–821.
88. Tsai, M., Chiou, Y., Chiou, L., Ho, C., and Pan, M. (2014) Garcinol suppresses inflammation associated colon carcinogenesis in mice. *Molecular Nutrition and Food Research*, 58(9), 1820–9.
 89. Ye, X., Yuan, L., Zhang, L., Zhao, J., Zhang, C.M., and Deng, H.Y. (2014). Garcinol, an acetyltransferase inhibitor, suppresses proliferation of breast cancer cell line MCF-7 promoted by 17 beta-estradiol. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(12), 5001–5007.
 90. Balasubramanyam, K., Varier, R.A., Altaf, M., Swaminathan, V., Siddappa, N.B., Ranga, U., and Kundu T.K. (2004). Curcumin, a novel p300/CREB-binding protein-specific inhibitor of acetyltransferase, represses the acetylation of histone/ nonhistone proteins and histone acetyltransferase-dependent chromatin transcription. *Journal of Biological Chemistry*, 279(49), 51163–51171.
 91. Balasubramanyam, K., Swaminathan, V., Ranganathan, A., and Kundu, T.K. (2003). Small molecule modulators of histone acetyltransferase p300. *Journal of Biological Chemistry*, 278(21), 19134–19140.
 92. Masuoka, N. and Kubo, I. (2004). Characterization of xanthine oxidase inhibition by anacardic acids. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1688(3), 245–249.
 93. Sun, Y., Jiang, X., Chen, S., and Price, B.D. (2006). Inhibition of histone acetyltransferase activity by anacardic acid sensitizes tumor cells to ionizing radiation. *FEBS Letters*, 580(18), 4353–4356.
 94. Gao, C., Bourke, E., Scobie, M., Famme, M.A., Koolmeister, T., Helleday, T., Eriksson, L.A., Lowndes, N.F., and Brown, J.A. (2014). Rational design and validation of a Tip60 histone acetyltransferase inhibitor. *Scientific Reports*, 20(4), 5372.
 95. Milite, C., Feoli, A., Sasaki, K., La-Pietra, V., Balzano, A.L., Marinelli, L., Mai, A., Novellino, E., Castellano, S., Tosco, A., Sbardella, G. (2015). A novel cell-permeable, selective, and noncompetitive inhibitor of KAT3 histone acetyltransferases from a combined molecular pruning/classical isosterism approach. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(6), 2779–2798.
 96. Wisastra, R., Ghizzoni, M., Maarsingh, H., Minnaard, A.J., Haisma, H.J., and Dekker F.J. (2011). Isothiazolones; thiol-reactive inhibitors of cysteine protease cathepsin B and histone acetyltransferase PCAF. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 9(6), 1817–1822.
 97. Dekker, F.J., Ghizzoni, M., Van der Meer, N., Wisastra, R., and Haisma, H.J. (2009). Inhibition of the PCAF histone acetyl transferase and cell proliferation by isothiazolones. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17(2), 460–461.

98. Gorsuch, S., Bavetsias, V., Rowlands, M.G., Aherne, G.W., Workman, P., Jarman, M., and McDonald, E. (2009). Synthesis of isothiazol-3-one derivatives as inhibitors of histone acetyltransferases (HATs). *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17(2), 467–474.
99. Stimson, L., Rowlands, M.G., Newbatt, Y.M., Smith, N.F., Raynaud, F.I., Rogers, P., Bavetsias, V., Gorsuch, S., Jarman, M., Bannister, A., Kouzarides, T., McDonald, E., Workman, P., and Aherne, G.W. (2005). Isothiazolones as inhibitors of PCAF and p300 histone acetyltransferase activity. *Molecular Cancer Therapeutics*, 4(10), 1521–1532.
100. Bowers, E.M., Yan, G., Mukherjee, C., Orry, A., Wang, L., Holbert, M.A., Crump, N.T., Hazzalin, C.A., Liszczak, G., Yuan, H., Larocca, C., Saldanha, S.A., Abagyan, R., Sun, Y., Meyers, D.J., Marmorstein, R., Mahadevan, L.C., Alani, R.M., Cole, P.A. (2010). Virtual ligand screening of the p300/CBP histone acetyltransferase: identification of a selective small molecule inhibitor. *Chemistry and Biology*, 17(5), 471–482.
101. Yan, G., Eller, M.S., Elm, C., Larocca, C.A., Ryu, B., Panova, I.P., Dancy, B.M., Bowers, E.M., Meyers, D., Lareau, L., Cole, P.A., Taverna, S.D., and Alani, R.M. (2013). Selective inhibition of p300 HAT blocks cell cycle progression, induces cellular senescence, and inhibits the DNA damage response in melanoma cells. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(10), 2444–2452.
102. Yang, Y., Liu, K., Liang, Y., Chen, Y., Chen, Y., and Gong, Y. (2015). Histone acetyltransferase inhibitor C646 reverses epithelial to mesenchymal transition of human peritoneal mesothelial cells via blocking TGF-beta1/Smad3 signaling pathway in vitro. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(3), 2746–2754.
103. Oike, T., Komachi, M., Ogiwara, H., Amornwichee, N., Saitoh, Y., Torikai, K., Kubo, N., Nakano, T., Kohno, T. (2014). C646, a selective small molecule inhibitor of histone acetyltransferase p300, radiosensitizes lung cancer cells by enhancing mitotic catastrophe. *Radiotherapy and Oncology*, 111(2), 222–227.
104. Gao, X.N., Lin, J., Ning, Q.Y., Gao, L., Yao, Y.S., Zhou, J.H., Li, Y.H., Wang, L.L., Yu, L. (2013). A histone acetyltransferase p300 inhibitor C646 induces cell cycle arrest and apoptosis selectively in AML1-ETO-positive AML cells. *PLoS One*, 8(2), e55481.
105. Borah, J.C., Mujtaba, S., Karakikes, I., Zeng, L., Muller, M., Patel, J., Moshkina, N., Morohashi, K., Zhang, W., Gerona-Navarro, G., Hajjar, R.J., and Zhou, M.M. (2011). A small molecule binding to the coactivator CREB-binding protein blocks apoptosis in cardiomyocytes. *Chemistry and Biology*, 18(4), 531–541.
106. Ma, H., Nguyen, C., Lee, K.S., and Kahn, M. (2005). Differential roles for the coactivators CBP and p300 on TCF/beta-catenin-mediated survivin gene expression. *Oncogene*, 24(22), 3619–3631.

107. Emami, K.H., Nguyen, C., Ma, H., Kim, D.H., Jeong, K.W., Eguchi, M., Moon, R.T., Teo, J.L., Kim, H.Y., Moon, S.H., Ha, J.R., and Kahn, M. (2004). A small molecule inhibitor of beta-catenin/CREB-binding protein transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(34), 12682–12687.
108. Kubo, I., Ochi, M., Vieira, P.C., and Komatsu, S. (1993). Antitumour agents from the cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(6), 1012-1015.
109. Sung, B., Pandey, M.K., Ahn, K.S., Yi, T.F., Chaturvedi, M.M., Liu, M.Y., and Aggarwal, B.B. (2008). Anacardic acid (6-nonadecyl salicylic acid), an inhibitor of histone acetyltransferase, suppresses expression of nuclear factor- κ B-regulated gene products involved in cell survival, proliferation, invasion, and inflammation through inhibition of the inhibitory subunit of nuclear factor- κ B α kinase, leading to potentiation of apoptosis. *Blood*, 111(10), 4880–4891.
110. Hamad, F.B. and Mubofu, E.B. (2015). Potential biological applications of bio-based anacardic acids and their derivatives. *Journal of Molecular Sciences*, 16(4), 8569-8590.
111. Dy, G.K. and Adjei A.A. (2002). Farnesyltransferase inhibitors in breast cancer therapy. *Cancer Investigation*, 20(2), 30-37.
112. Appels, N.M., Beijnen, J.H., and Schellens, J.H. (2005). Development of Farnesyl Transferase Inhibitors: A Review. *Oncologist*, 10(8), 565–578.
113. Cox, A. D., Fesik, S.W., Kimmelman, A.C., Luo, J., and Der, C.J. (2014). Drugging the undruggable RAS: Mission Possible? *Nature Reviews Drug Discovery*, 13(11), 828–851.
114. Basso, A.D., Kirschmeier, P., and Bishop, W.R. (2006). Thematic review series: Lipid Posttranslational Modifications Farnesyl transferase inhibitors. *Journal of Lipid Research*, 47(1), 15-31.
115. Baines, A.T., Xu, D., and Der, C.J. (2011). Inhibition of Ras for cancer treatment: the search continues. *Future Medicinal Chemistry*, 3(14), 1787–1808.
116. Lee, H., Lee, J., Lee, S., Shin, Y., Jung, W., Kim, J. H., Park, K., Kim K., Cho, H. S., Ro, S., Lee, S., Jeong, S., Choi, T., Chung, H. H., and Koh, J. S. (2001). A novel class of highly potent, selective, and non-peptidic inhibitors of ras farnesyltransferase (ftase). *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 11(23), 3069–3072.
117. Duursma, A. M., and Agami, R. (2003). Ras interference as cancer therapy. *Seminars In Cancer Biology*, 13(4), 267-273.

118. Kim, C.K., Choi, Y.K., Lee, H., Ha, K.S., Won, M.H., Kwon, Y.G., and Kim Y.M. (2010). The Farnesyltransferase Inhibitor LB42708 Suppresses Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Angiogenesis by Inhibiting Ras-dependent Mitogen-Activated Protein Kinase and Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signal Pathways. *Molecular Pharmacology*, 78 (1), 142-150.
119. Kim, H. S., Kim, J. W., Gang, J., Wen, J., Koh, S. S., Koh, J. S., Chung, H. H., and Song, S. Y. (2006). The farnesyltransferase inhibitor, LB42708, inhibits growth and induces apoptosis irreversibly in H-ras and K-ras-transformed rat intestinal epithelial cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 215(3), 317-329.
120. Choi, J.H., Kim, S.Y., Kim, S.K., Kemp, M.G., and Sancar A. (2015). An integrated approach for analysis of the dna damage response in mammalian cells nucleotide excision repair,dna damage checkpoint,and apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. 290(48), 28812-28821.
121. Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J.M., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., Dawson, T.M., Dawson, V.L., El-Deiry, W.S., Fulda, S., Gottlieb, E., Green, D.R., Hengartner, M.O., Kepp, O., Knight, R.A., Kumar, S., Lipton, S.A., Lu, X., Madeo, F., Malorni, W., Mehlen, P., Nuñez, G., Peter, M.E., Piacentini, M., Rubinsztein, D.C., Shi, Y., Simon, H.U., Vandenabeele, P., White, E., Yuan, J., Zhivotovsky, B., Melino, G., and Kroemer, G. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell death and Differentiation*, 19(1),107-20.
122. Su, H.C. and Lenardo, M.J. (2008). Genetic Defects of Apoptosis and Primary Immunodeficiency. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 28(2), 329-51.
123. Abraha, A.M. and Ketema, E.B. (2016). Apoptotic pathways as a therapeutic target for colorectal cancer treatment. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 8(8), 583-591.
124. Rahman, M., Davis, S.R., Pumphrey, J.G., Bao, J., Nau, M.M., Meltzer, P.S., and Lipkowitz, S. (2009). TRAIL induces apoptosis in triple-negative breast cancer cells with a mesenchymal phenotype. *Breast Cancer Research and Treatment*, 113(2), 217–230.
125. Wu, G.S. (2009). TRAIL as a target in anti-cancer therapy. *Cancer Letter*, 285(1), 1-5.
126. Giampazolias, E., Zunino, B., Dhayade, S., Bock, F., Cloix, C., Cao, K., Roca, A., Lopez, J., Ichim, G., Proïcs, E., Rubio-Patino, C., Fort, L., Yatim, N, Woodham, E., Orozco, S., Taraborrelli, S., Peltzer, N., Lecis, D., Machesky, L., Walczak, H., Albert, M.L., Milling, S., Oberst, A., Ricci, J.E., Ryan, K.M., Blyth, K., and Tait, S.W.G. (2017). Mitochondrial permeabilization engages NF-κB-dependent anti-tumour activity under caspase deficiency. *Nature Cell Biology*, 19(9), 1116-1129.

127. Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., and Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30(9), e36-e36.
128. Sainsbury, J.R., Farndon, J.R., Needham, G.K., Malcolm, A.J., and Harris, A.L. (1987). Epidermal-growth-factor receptor status as predictor of early recurrence of and death from breast cancer. *Lancet*, 1(8547), 1398-402.
129. Eckert, L.B., Repasky, G.A., Ulku, A.S., McFall, A., Zhou, H., Sartor, C.I., and Der, C.J. (2004). Involvement of Ras activation in human breast cancer cell signaling, invasion, and anoikis. *Cancer Research*, 64(13), 4585-92.
130. Wright, K.L., Adams, J.R., Liu, J.C., Loch, A.J., Wong, R.G., Jo, C.E., Beck, L.A., Santhanam, D.R., Weiss, L., Mei, X., Lane, T.F., Koralov, S.B., Done, S.J., Woodgett, J.R., Zacksenhaus, E., Hu, P., and Egan, S.E. (2015). Ras Signaling Is a Key Determinant for Metastatic Dissemination and Poor Survival of Luminal Breast Cancer Patients. *Cancer Research*, 75(22), 4960-72.
131. Wojtkowiak, J.W., Gibbs, R.A., and Mattingly, R.R. (2009). Working together: Farnesyl transferase inhibitors and statins block protein prenylation. *Molecular and Cellular Pharmacology*, 1; 1(1), 1–6.
132. Liu, M., Bryant, M. S., Chen, J., Lee, S., Yaremko, B., Lipari, P., Malkowski, M., Ferrari, E., Nielsen, L., Prioli, N., Dell, J., Sinha, D., Syed, J., Korfmacher, W.A., Nomeir, A.A., Lin, C.C., Wang, L., Taveras, A.G., Doll, R.J., Njoroge, F.G., Mallams, A.K., Remiszewski, S., Catino, J.J., Girijavallabhan, V.M., Kirschmeier, P., and Bishop, W.R. (1998). Antitumor activity of SCH 66336, an orally bioavailable tricyclic inhibitor of farnesyl protein transferase, in human tumor xenograft models and wap-ras transgenic mice. *Cancer Research*, 58(21), 4947–4956.
133. Kelland, L.R., Smith, V., Valenti, M., Patterson, L., Clarke, P.A., Detre, S., End, D., Howes, A.J., Dowsett, M., Workman, P., and Johnston S.R. (2001). Preclinical antitumor activity and pharmacodynamic studies with the farnesyl protein transferase inhibitor R115777 in human breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 7(11), 3544-50.
134. End, D.W., Smets, G., Todd, A.V., Applegate, T.L., Fuery, C.J., Angibaud, P., Venet, M., Sanz, G., Poignet, H., Skrzat, S., Devine, A., Wouters, W., and Bowden, C. (2001). Characterization of the antitumor effects of the selective farnesyl protein transferase inhibitor R115777 in vivo and in vitro. *Cancer Research*, 61(1), 131–137.
135. Ashar, H.R., James, L., Gray, K., Carr, D., McGuirk, M., Maxwell, E., Black, S., Armstrong, L., Doll, R.J., Taveras, A.G., Bishop, W.R., and Kirschmeier, P. (2001). The farnesyl transferase inhibitor SCH 66336 induces a G(2) → M or G(1) pause in sensitive human tumor cell lines. *Experimental Cell Research*, 262(1), 17–27.

136. Suzuki, N., Urano, J., and Tamanoi, F. (1998). Farnesyltransferase inhibitors induce cytochrome c release and caspase 3 activation preferentially in transformed cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(26), 15356–15361.
137. Tamanoi, F., Kato-Stankiewicz, J., Jiang, C., Machado, I., and Thapar, N. (2001). Farnesylated proteins and cell cycle progression. *Journal of Cellular Biochemistry*, 37: 64–70.
138. Sepp-Lorenzino, L., and Rosen, N. (1998). A farnesyl-protein transferase inhibitor induces p21 expression and G1 block in p53 wild type tumor cells. *Journal of Biological Chemistry*, 273(32), 20243–20251.
139. Sun, J., Qian, Y., Hamilton, A.D., and Sebt, S.M. (1995). Ras CAAX peptidomimetic FTI 276 selectively blocks tumor growth in nude mice of a human lung carcinoma with K-Ras mutation and p53 deletion. *Cancer Research*, 55 (19) 4243–4247.
140. Martin, L.A., Head, J.E., Pancholi, S., Salter, J., Quinn, E., Detre, S., Kaye, S., Howes, A., Dowsett, M., and Johnston, S.R. (2007). The farnesyltransferase inhibitor R115777 (tipifarnib) in combination with tamoxifen acts synergistically to inhibit MCF-7 breast cancer cell proliferation and cell cycle progression in vitro and in vivo. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6(9), 2458-67.
141. Lee, K.H., Koh, M., and Moon A. (2016). Farnesyl transferase inhibitor FTI-277 inhibits breast cell invasion and migration by blocking H-Ras activation. *Oncology letters*, 12(3), 2222–2226.
142. Wang, J., Lian, Y., Gu, Y., Wang, H., Gu, L., Huang, Y., Zhou, L., and Huang, Y. (2017). Synergistic effect of farnesyl transferase inhibitor lonafarnib combined with chemotherapeutic agents against the growth of hepatocellular carcinoma cells. *Oncotarget*, 26;8(62),105047-105060.
143. Jang, J.H., Cho, Y.C., Kim, K.H., Lee, K.S., Lee, J., Kim, D.E., Park, J.S., Jang, B.C., Kim, S., Kwon, T.K., and Park J.W. (2014). BAI, a novel Cdk inhibitor, enhances farnesyltransferase inhibitor LB42708-mediated apoptosis in renal carcinoma cells through the downregulation of Bcl-2 and c-FLIP (L). *International Journal of Oncology*, 45(4),1680-90.
144. Kim, C.K., Choi, Y.K., Lee, H., Ha, K.S., Won, M.H., Kwon, Y.G., and Kim, Y.M. (2010). The Farnesyltransferase Inhibitor LB42708 Suppresses Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Angiogenesis by Inhibiting Ras-dependent Mitogen-Activated Protein Kinase and Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signal Pathways. *Molecular Pharmacology*, 78 (1), 142-150.
145. Elmazoğlu, Z. (2014). *Mutant Ve Yabanıl Tıp Hct-116 Kolon Kanser Hücre Hatlarında Farnesil Transferaz İnhibitörünün Apoptotik Ve Anti-Proliferatif Etkilerinin Araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 65-72.

146. Sukumari-Ramesh, S., Singh, N., Jensen, M.A., Dhandapani, K.M., and Vender, J.R. (2011). Anacardic acid induces caspase-independent apoptosis and radiosensitizes pituitary adenoma cells. *Journal of Neurosurgery*, 14(6),1681-90.
147. Yao, K., Jiang, X., He, L., Tang, Y., Yin, G., Zeng, Q., Jiang, Z., and Tan, J. (2015) Anacardic acid sensitizes prostate cancer cells to radiation therapy by regulating H2AX expression. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(12),15926-32.
148. Tan, J., Chen, B., He, L., Tang, Y., Jiang, Z., Yin, G., Wang, J., and Jiang, X. (2012). Anacardic acid (6-pentadecylsalicylic acid) induces apoptosis of prostate cancer cells through inhibition of androgen receptor and activation of p53 signaling. *Chinese Journal of Cancer Research*, 24(4), 275-83.
149. Schultz, D.J., Wickramasinghe, N.S., Ivanova, M.M., Isaacs, S.M., Dougherty, S.M., Imbert-Fernandez, Y., Cunningham, A.R., Chen, C., and Klinge, C.M. (2010). Anacardic acid inhibits estrogen receptor alpha-DNA binding and reduces target gene transcription and breast cancer cell proliferation. *Molecular Cancer Therapeutics*, 9(3),594-605.
150. Dong, X., Liao, Y., Liu, N., Hua, X., Cai, J., Liu, J., and Huang, H. (2016). Combined therapeutic effects of bortezomib and anacardic acid on multiple myeloma cells via activation of the endoplasmic reticulum stress response. *Molecular Medicine Reports*, 14(3), 2679-84.
151. Önen, H.İ., Yılmaz, A., Alp, E., Çelik, A., Demiröz, Ş.M., Taştepe, A.İ., ve Menevşe, S. (2013). Malign Plevral Mezotelyoma Hücre Hattında Histon Asetil Transferaz İnhibitörü Olan Anakardik Asitin Sisplatin Cevabını Arttırıcı Etkisi. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 33(2),478-84.
152. Nambiar, J., Bose, C., Venugopal, M., Banerji, A., Patel, T.B., Kumar, G.B., and Nair, B.G. (2016). Anacardic acid inhibits gelatinases through the regulation of Spry2, MMP-14, EMMPRIN and RECK. *Experimental Cell Research*, 15;349(1),139-151.
153. Moasser, M. M., Sepp-Lorenzino, L., Kohl, N.E., Oliff, A., Balog, A., Su, D.S., Danishefsky, S.J., and Rosen, N. (1998). Farnesyl transferase inhibitors cause enhanced mitotic sensitivity to taxol and epothilones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(4), 1369–1374.
154. Adjei, A.A., Davis, J.N., Bruzek, L.M., Erlichman, C., and Kaufmann S.H. (2001). Synergy of the protein farnesyltransferase inhibitor SCH66336 and cisplatin in human cancer cell lines. *Clinical Cancer Research*, 7(5), 1438–1445.
155. Doisneau-Sixou, S.F., Cestac, P., Faye, J.C., Favre G., and Sutherland, R.L. (2003). Additive effects of tamoxifen and the farnesyl transferase inhibitor FTI-277 on inhibition of MCF-7 breast cancer cell-cycle progression. *International Journal of Cancer*, 106(5), 789–798.

156. Brassard, D.L., English, J.M., Malkowski, M., Kirschmeier, P., Nagabhushan, T.L., and Bishop, W.R. (2002). Inhibitors of farnesyl protein transferase and MEK1,2 induce apoptosis in fibroblasts transformed with farnesylated but not geranylgeranylated H-Ras. *Experimental Cell Research*, 273(2), 138–146.
157. Edamatsu, H., Gau, C.L., Nemoto, T., Guo, L., and Tamanoi, F. (2000). Cdk inhibitors, roscovitine and olomoucine, synergize with farnesyltransferase inhibitor (FTI) to induce efficient apoptosis of human cancer cell lines. *Oncogene*, 19(27), 3059–3068.
158. Russo, P., Malacarne, D., Falugi, C., Trombino, S., and O'Connor, P.M. (2002). RPR-115135, a farnesyltransferase inhibitor, increases 5-FU cytotoxicity in human colon cancer cell lines: role of p53. *International Journal of Cancer*, 100(3), 266–275.
159. Nakajima, A., Tauchi, T., Sumi, M., Bishop, W.R., and Ohyashiki, K. (2003). Efficacy of SCH66336, a farnesyl transferase inhibitor, in conjunction with imatinib against BCR-ABL-positive cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2(3), 219–224.
160. Jiang, K., Coppola, D., Crespo, N.C., Nicosia, S.V., Hamilton, A.D., Sefti, S.M., and Cheng, J.Q. (2000). The phosphoinositide 3-OH kinase/AKT2 pathway as a critical target for farnesyltransferase inhibitor-induced apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 20 (1), 139–148.
161. Beaupre, D. M., McCafferty-Grad, J., Bahlis, N.J., Boise, L.H., and Lichtenheld, M. G. (2003). Farnesyl transferase inhibitors enhance death receptor signals and induce apoptosis in multiple myeloma cells. *Leukemia Lymphom*, 44(12), 2123–2134.
162. Feldkamp, M.M., Lau, N., and Guha, A. (1998). Growth inhibition of astrocytoma cells by farnesyl transferase inhibitors is mediated by a combination of anti-proliferative, pro-apoptotic and antiangiogenic effects. *Oncogene*, 18(52), 7514–7526.
163. Seong, Y.A., Shin, P.G., Yoon, J.S., Yadunandam, A.K., and Kim G.D. (2014). Induction of the endoplasmic reticulum stress and autophagy in human lung carcinoma A549 cells by anacardic acid. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 68(2), 369–77.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı-Soyadı : Emine Firdevs YILDIRIM
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 04.01.1989 / Ankara
 Medeni hali : Bekar
 Telefon : 0506 698 69 39
 e-mail : eminefyildirim@gmail.com



Eğitim

Derecesi	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Doktora	Ankara Üniversitesi / Adli Bilimler Enstitüsü/Adli Biyoloji Programı	Devam ediyor
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi / Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı	Devam ediyor
Yüksek Lisans	Ankara Üniversitesi / Adli Bilimler Enstitüsü/ Adli Biyoloji Programı	2016
Lisans	Uluslararası Saraybosna Üniversitesi / Biyolojik Bilimler ve Biyomühendislik	2014
Lise	Yabancı Dil Ağırlıklı Ankara Ömer Seyfettin Lisesi	2007

İş Deneyimi, Yıl	Çalıştığı Yer	Görev
2015-Devam ediyor	TÜBİTAK	Uzman Yrd.

Yabancı Dil

İngilizce



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..

