

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**VULPİNİK ASİT LİKEN SEKONDER METABOLİTİNİN MEME KANSER
HÜCRE HATLARI ÜZERİNE SİTOTOKSİK ETKİSİNİN VE APOPTOZLA
İLGİLİ GENLERE AİT mRNA İFADE SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ**

NİL KILIÇ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA

2016

Her hakkı saklıdır

Hayattaki en büyük eksiğim olarak kalacak olan,
özlemlerimin en büyüğü, hasretim, yaşadıklarımız ve yüreğimdeki
yeri ile hiç solmayacak olan gönül sızım, canım babacığım Ömer KURNAZ'a

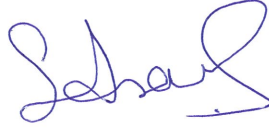


TEZ ONAYI

Nil KILIÇ tarafından hazırlanan “**Vulpinik Asit Liken Sekonder Metabolitinin Meme Kanseri Hücre Hatları Üzerine Sitotoksik Etkisinin ve Apoptozla İlgili Genlere Ait mRNA İfade Seviyelerinin Belirlenmesi** ” adlı tez çalışması 10/06/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

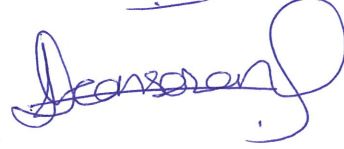
Danışman: Prof. Dr. Emine Sümer ARAS

Ankara Üniversitesi Biyoloji ABD



Eş Danışman: Doç. Dr. Demet CANSARAN DUMAN

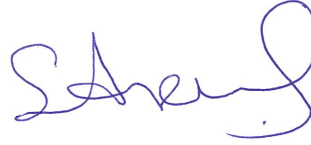
Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü



Jüri Üyeleri :

Başkan: Prof. Dr. Emine Sümer ARAS

Ankara Üniversitesi Biyoloji ABD



Üye: Prof. Dr. Gönül DÖNMEZ

Ankara Üniversitesi Biyoloji ABD



Üye: Prof. Dr. Hakkı TAŞTAN

Gazi Üniversitesi Biyoloji ABD



Üye: Doç. Dr. Demet CANSARAN DUMAN

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü



Üye: Doç. Dr. Sevgi ERTUGRUL KARATAY

Ankara Üniversitesi Biyoloji ABD



Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. İbrahim DEMİR

Enstitü Müdürü

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

10/06/2016



Nil KILIÇ

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

VULPİNİK ASİT LİKEN SEKONDER METABOLİTİNİN MEME KANSER HÜCRE
HATLARI ÜZERİNE SİTOTOKSİK ETKİSİNİN VE APOPTOZLA İLGİLİ GENLERE AİT
mRNA İFADE SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ

Nil KILIÇ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Bölümü

Danışman: Prof. Dr. Emine Sümer ARAS
Eş-Danışman: Doç. Dr. Demet CANSARAN DUMAN

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser tipidir. Meme kanseri tedavisindeki ilaçlara karşı direnç gelişmesi nedeniyle tedavide başarı oranı düşmektedir. Bu nedenle alternatif terapötik özellikli ajanların keşfi kanser hastaları için umut kaynağı olmaktadır. Vulpinik asit (VA) MDA-MB-231, MCF-7, BT-474, SK-BR-3 ve normal meme hücre hattı (MCF-12A) üzerinde 48 saat süre ile antiproliferatif etkisinin değerlendirilmesi sonrasında apoptotik etkinin tespiti amaçlı flow sitometri, kaspaz-3 aktivitesi belirlenmiştir. Ayrıca apoptoz belirteci olarak TP53, Bax, Bcl-2, BIRC5 ve ekspresyonu değişmeyen gen olarak GAPDH, Kaspaz 3, 7, 8, 9 genlerin ifade analizi mRNA düzeyinde belirlenmiştir. Elde edilen veriler; VA 100, 50, 35, 25, 15, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56 ve 0.78'den oluşan konsantrasyonların MTT testi sonuçları ile hesaplanan EC50 değerlerine göre MDA-MB-231 için 11 μ M, SK-BR-3 için 10 μ M, 18 μ M olarak MCF-7 ve BT-474 için 5 μ M olarak hesaplanmıştır. Gerçekleştirilen flow sitometri sonucunda en yüksek hücre ölümü MCF-7 hücresinde %53 olarak görülürken, en düşük hücre ölümü %29 olarak BT-474'de görülmüştür. Kaspaz-3 aktivite sonuçlarına göre tüm hücreler için kaspaz aktivitesi %10-13 arasındaki oranlarda artmıştır. Real Time PCR sonuçlarına göre proapoptotik genlerin ifadesi artarken antiapoptotik gen ifadesi azalmıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde doğada bol ve kolay bulunan liken türlerinden hızlı, maliyeti düşük ve uygulaması etkin sekonder metabolitlerin eldesi ile meme kanseri tedavisinde alternatif bir terapötik ajan olarak kullanılmalarını sağlayacak çalışmalara önemli bir basamak oluşturmıştır.

Haziran 2016, 105 sayfa

Anahtar Kelimeler: Meme kanseri, vulpinik asit, Annexin V, Kaspaz-3, qRT-PCR

ABSTRACT

Master Thesis

DETERMINATION OF CYTOTOXIC EFFECT OF VULPINIC ACID IN BREAST
CANCER CELL LINES AND mRNA EXPRESSION LEVELS OF APOPTOTIC
RELATED GENES

Nil KILIÇ

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

Supervisor: Prof. Dr. Emine Sümer ARAS
Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Demet CANSARAN DUMAN

Breast cancer is the most common cancer type in women. The success rate for treatment is reduced due to the development of drug resistance in breast cancer treatment. Therefore, discovery of alternative therapeutic capable agent may be a source of hope for patients with cancer. In this context, it is designed for the determination of apoptotic effects using flow cytometry and caspase-3 activity after the evaluation antiproliferative effect of Vulpinic acid (VA) 48 hours on cancer cell line such as MDA-MB-231, MCF-7, BT-474, SK-BR-3 and normal breast cell line such as MCF-12A. Also analysis of mRNA levels were determined for TP53, Bax, Bcl-2, BIRC5 as apoptosis markers and caspase-3, 7, 8, 9 gene expression. The resulting data; MTT assay results were obtained according to concentration including VA 100, 50, 35, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56 and 0.78. The value of EC₅₀ which were calculated according to MTT results were indicated that 11 µM for MDA-MB-231, 10 µM for SK-BR-3, 18 µM for MCF-7 and 5 µM for BT-474. According to the flow cytometry results, the highest cell death was determined to be 53% in MCF-7 cells and the lowest cell death was shown to be 29% in BT-474. The caspase-3 activities were increased by 10-13% for all the cancer cells. According to Real Time PCR results, proapoptotic genes expression value were increased, but antiapoptotic gene expression value were decreased in our study. Our results were demonstrated, used of secondary lichen metabolites which low cost and effective application in the treatment of breast cancer as an alternative therapeutic agents to provide an important step.

June 2016, 105 pages

Key Words: Breast cancer, vulpinic acid, Annexin V, caspase-3, qRT-PCR

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Bana olan desteği, inancı ve cesaretlendirmesi ile birçok şeyi öğrenmemde yardımcı olan, hep arkamda duran, her konuda desteğini hiç bir zaman esirgemeyen, istediğim herşeyi içtenlikle kabul eden, bu yoldaki en büyük yardımcım ve destekcim canım hocam Doç. Dr. Demet CANSARAN DUMAN'a,

Yüksek lisanssa başlamamda en büyük etken olan, hocalığı, candanlığı ve içtenliğiyle kendine hayran bırakan her zaman arkamızda olan dünya tatlısı canım hocam Prof. Dr. Sümer ARAS'a,

Laboratuvara geldiğim günden itibaren en büyük yardımcım, can arkadaşım, dünya tatlısı Sinem AYDINOĞLU'na,

Deneylerimde yardımlarını eksik etmeyen Yrd.Doç. Dr. Bala Gür DEDEOĞLU ve ekibine, Dr. İlker BÜYÜK Hocam'a, arkadaşlarım Arş.Gör. Berk DİNÇSOY ve Arş.Gör.Yasemin KARTAL'a,

Tez deneylerimi yürüttüğüm Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı ailesine,

Hayat ve bu yoldaki en büyük destekçim, sabrı ve içtenliği ile her konuda her kararımدا sonuna kadar arkamda duran dünyanın en güzel yüreğine sahip bitanecik aşkım, en büyük şansım, hayat arkadaşım, Dali'm, canımın diğer yarısı Dalokay KILIÇ'a,

İlk arkadaşım, çocukluğum, tek kardeşim, canımdan çok sevdiğim Zekai KURNAZ'a,

Benim dünyadaki meleğim, en yakın dostum, her anımda dimdik arkamda duranım, en büyük destekçim, canımın canı, güzel kalpli hep iyi niyetli güzeller güzeli anneciğim Asiye KURNAZ'a,

Sonsuz kez teşekkürlerimi sunuyorum...

Nil KILIÇ

Ankara, Haziran 2016

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1 Kanser	3
2.2 Meme Kanseri	5
2.2.1 Meme kanseri oluşumuna etki eden faktörler.....	6
2.3 Kanser Moleküler Yolaklarında Apoptozis.....	7
2.3.1 Apoptotik hücre ölümü aşamaları.....	8
2.3.2 Apoptozis mekanizmaları.....	10
2.3.3 Apoptozisin genetik kontrolü	14
2.3.4 Apoptozisin saptanmasında kullanılan yöntemler	16
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	17
3.1 Materyal.....	17
3.1.1 Genel reaktifler	17
3.1.2 Kullanılan sarf malzemeler	17
3.1.3 Kullanılan kitler	18
3.1.4 Liken sekonder metaboliti.....	18
3.1.5 Kanser ve normal hücre hatları.....	18
3.1.6 Kullanılan cihazlar	19
3.2 Yöntem	21
3.2.1 Hücre kültürü besiyerinin hazırlanması.....	21
3.2.2 Hücre açma ve hücrelerin idamesi	22
3.2.3 Hücrelerin pasajlanması.....	23

3.2.4 Hücrelerin dondurulması ve saklanması	23
3.2.5 Kullanılan hücre sayısının optimizasyonu ve plate yerleşimi	24
3.2.6 Hücre sayımı	24
3.2.7 Kullanılan çözeltilerin hazırlanması	25
3.2.8 Liken sekonder metaboliti Vulpinik asitin çözülmesi ve uygun konsantrasyonların hazırlanması.....	26
3.2.9 Liken sekonder metaboliti vulpinik asitin meme kanseri hücreleri üzerine etkisinin mtt testi ile değerlendirilmesi	26
3.2.10 Annexin V uygulaması ile apoptoz değerlendirilmesi	29
3.2.11 Kaspaz-3 aktivitesinin belirlenmesi.....	30
3.2.12 RNA izolasyonu öncesi hücre kültürünün uygun hale getirilmesi	33
3.2.13 RNA izolasyonu, miktar ve kalite tayini	34
3.2.14 cDNA (komplementer DNA) sentezi	35
3.2.15 Primer dizaynı	37
3.2.16. Real-time PCR uygulaması	38
3.2.17 Normalizasyon ve istatistiksel hesaplamalar	40
3.2.18 Veri analizi.....	40
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	41
4.1 Farklı Dozlarda Vulpinik Asit Konsantrasyonları Uygulanan Meme Hücre Hatlarında MTT Testi Sonuçları.....	41
4.2 MTT Testi Sonucunda EC50 Değerinin Belirlenmesi	49
4.3 Annexin V Uygulaması ile Flow Sitometri ile Apoptoz Sürecine Olan Etkinin Belirlenmesi	49
4.4 Kaspaz-3 Aktivitesinin Belirlenmesi	57
4.5 Total RNA İzolasyonu Sonuçları	61
4.6 cDNA Sentezi Sonuçları.....	63
4.7 qRT PCR Sonuçları	64
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	77
KAYNAKLAR	89
EK 1 Hücre Mikroskop Görüntüleri.....	99
ÖZGEÇMİŞ.....	104

SİMGELER DİZİNİ

µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
°C	Santigrat Derece

Kısaltmalar

nm	Nanometre
ATCC	Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection)
dk	Dakika
DMEM	Dulbecco'nun Modifiye Eagle Ortamı (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
FCS	Fetal Sığır Serumı (Fetal Calf Serum)
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry (Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği)
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide
PBS	Fosfat Tampon Çözeltisi (Phosphate Buffered Saline)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
VA	Vulpinik Asit
QRT-PCR	Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Liken türleri.....	1
Şekil 1.2 Vulpinik asit formülasyonu.....	2
Şekil 2.1 Kanser gelişim süreci	4
Şekil 2.2 Türkiye’de görülen kanser hastalığı sıklığı	5
Şekil 2.3 Apoptotik süreç	8
Şekil 2.4 Apoptozisin başlamasında rol oynayan hücre içi ve dışı yollar	9
Şekil 2.5 Apoptoz I ve Apoptoz II için farklı moleküler yollar	11
Şekil 2.6 Ölüm reseptörleri ve mitokondrial yollarla kaspaz-3 aktivasyonunun başlamasıyla nükleusda oluşan DNA fragmentasyonu	12
Şekil 3.1 İş akış şeması	21
Şekil 3.2 Thoma Lamı ve Thoma laminin sayım yapılan kareleri	25
Şekil 3.3 Vulpinik asit.....	26
Şekil 3.4 Flow sitometri cihazı.....	30
Şekil 3.5 EC50 konsantrasyonuna göre vulpinik asit uygulaması	34
Şekil 4.1 MDA-MB-231 hücresinin 48 saat belirlenen dozlarla vulpinik asit muamelesi sonucunda elde edilen doz eğrisi	41
Şekil 4.2 MDA-MB-231 hücresinin 48 saat belirlenen dozlarla vulpinik asit muamelesi sonucunda elde edilen grafik	42
Şekil 4.3 MCF-7 hücresinin 48 saat belirlenen dozlarla vulpinik asit muamelesi sonucunda elde edilen doz eğrisi	43
Şekil 4.4 MCF-7 hücresinin 48 saat belirlenen dozlarla vulpinik asit muamelesi sonucunda elde edilen grafik.....	43
Şekil 4.5 BT-474 hücresinin 48 saat belirlenen dozlarla vulpinik asit muamelesi sonucunda elde edilen doz eğrisi	44
Şekil 4.6 BT-474 hücresinin 48 saat belirlenen dozlarla vulpinik asit muamelesi sonucunda elde edilen grafik.....	45
Şekil 4.7 SK-BR-3 hücresinin 48 saat belirlenen dozlarla vulpinik asit muamelesi sonucunda elde edilen doz eğrisi	46

Şekil 4.8 SK-BR-3 hücresinin 48 saat belirlenen dozlarla vulpinik asit muamelesi sonucunda elde edilen grafik.....	46
Şekil 4.9 MCF-12A (Normal meme hücresi) hücresinin 48 saat belirlenen dozlarla vulpinik asit muamelesi sonucunda elde edilen doz eğrisi	47
Şekil 4.10 MCF-12A hücresinin 48 saat belirlenen dozlarla vulpinik asit muamelesi sonucunda elde edilen grafik	48
Şekil 4.11 MDA-MB-231 hücresi kontrol örneğine göre flow sitometri grafikleri.....	50
Şekil 4.12 MDA-MB-231 hücrelerine vulpinik asit uygulanması sonrası flow sitometri grafikleri.....	50
Şekil 4.13 MDA-MB-231 hücrelerinin erken apoptoz ve hücre ölüm oranı.....	51
Şeki 4.14 MCF-7 hücresi kontrol örneğine göre flow sitometri grafikleri	51
Şekil 4.15 MCF-7 hücrelerine vulpinik asit uygulaması sonrası flow sitometri grafikleri.....	52
Şekil 4.16 MCF-7 hücrelerinin erken apoptoz ve hücre ölüm oranı	52
Şekil 4.17 BT-474 hücresi kontrol örneğine göre flow sitometri grafikleri.....	53
Şekil 4.18 BT-474 hücrelerine vulpinik asit uygulaması sonrası flow sitometri grafikleri.....	53
Şekil 4.19 BT-474 hücrelerinin erken apoptoz ve hücre ölüm oranı	54
Şekil 4.20 SK-BR-3 hücresi kontrol örneğine göre flow sitometri grafikleri	54
Şekil 4.21 SK-BR-3 hücrelerine vulpinik asit uygulaması sonrası flow sitometri grafikleri.....	55
Şekil 4.22 SK-BR-3 hücrelerinin erken apoptoz ve hücre ölüm oranı.....	55
Şekil 4.23 MCF-12A hücresi kontrol örneğine göre flow sitometri grafikleri	56
Şekil 4.24 MCF-12A hücrelerine vulpinik asit uygulaması sonrası flow sitometri grafikleri.....	56
Şekil 4.25 MCF-12A hücresinin erken apoptoz ve hücre ölüm oranı.....	57
Şekil 4.26 Vulpinik asitin MDA-MB-231 hücresi için belirlenmiş EC50 degerinin Kaspaz-3 aktivitesi üzerine etkisi.....	57
Şekil 4.27 Vulpinik asitin MCF-7 hücresi için belirlenmiş EC50 degerinin Kaspaz-3 aktivitesi üzerine etkisi.....	58

Şekil 4.28 Vulpinik asitin BT-474 hücresi için belirlenmiş EC50 degerinin Kaspaz-3 aktivitesi üzerine etkisi.....	58
Şekil 4.29 Vulpinik asitin SK-BR-3 hücresi için belirlenmiş EC50 degerinin Kaspaz-3 aktivitesi üzerine etkisi.....	59
Şekil 4.30 Vulpinik asitin MCF-12A hücresi için belirlenmiş EC50 degerinin Kaspaz-3 aktivitesi üzerine etkisi.....	59
Şekil 4.31 Vulpinik asitin çalışılan tüm hücre hatları için belirlenmiş EC50 degerinin Kaspaz-3 aktivitesi üzerine etkisi	60
Şekil 4.32 Kaspaz-3 kiti ile yapılan deney sonrası plate görünümü	60
Şekil 4.33 MDA-MB-231, MCF-7 ve BT-474 hücre hatlarına ait izole edilen RNA örneklerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü	62
Şekil 4.34 SK-BR-3 ve MCF-12A hücrelerinden izole edilen RNA örneklerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	63
Şekil 4.35 BAX geni erime eğrisi	66
Şekil 4.36 TP53 geni erime eğrisi	66
Şekil 4.37 Çalışılan tüm hücre hatlarında Bcl-2 geninin erime eğrisi analizi.....	67
Şekil 4.38 Çalışılan tüm hücre hatlarında GAPDH geninin erime eğrisi analizi.....	67
Şekil 4.39 Çalışılan tüm hücre hatlarında Kaspaz-8 geninin erime eğrisi analizi.....	68
Şekil 4.40 Çalışılan tüm hücre hatlarında TP53 geninin Real Time PCR ile elde edilmiş ifade seviyeleri	69
Şekil 4.41 Çalışılan tüm hücre hatlarında Bax geninin Real Time PCR ile elde edilmiş ifade seviyeleri	69
Şekil 4.42 Çalışılan tüm hücre hatlarında Bcl-2 geninin Real Time PCR ile elde edilmiş ifade seviyeleri	70
Şekil 4.43 Çalışılan tüm hücre hatlarında BIRC5 geninin Real Time PCR ile elde edilmiş ifade seviyeleri	70
Şekil 4.44 Çalışılan tüm hücre hatlarında Kaspaz-3 geninin Real Time PCR ile elde edilmiş ifade seviyeleri.....	71
Şekil 4.45 Çalışılan tüm hücre hatlarında Kaspaz -7 geninin Real Time PCR ile elde edilmiş ifade seviyeleri.....	71
Şekil 4.46 Çalışılan tüm hücre hatlarında Kaspaz- 8 geninin Real Time PCR ile elde edilmiş ifade seviyeleri.....	72

Şekil 4.47 Çalışılan tüm hücre hatlarında Kaspaz -9 geninin Real Time PCR ile elde edilmiş ifade seviyeleri.....	72
Şekil 4.48 MDA-MB-231 hücrelerinde apoptoz ile ilgili bazı genlerin mRNA ifade seviyeleri	73
Şekil 4.49 MCF-7 hücrelerinde apoptoz ile ilgili bazı genlerin mRNA ifade seviyeleri	74
Şekil 4.50 BT-474 hücrelerinde apoptoz ile ilgili bazı genlerin mRNA ifade seviyeleri	74
Şekil 4.51 SK-BR-3 hücrelerinde apoptoz ile ilgili bazı genlerin mRNA ifade seviyeleri	75
Şekil 4.52 MCF-12A hücrelerinde apoptoz ile ilgili bazı genlerin mRNA ifade seviyeleri	76
Şekil.1 11 µM (EC50) 48 saat vulpinik asit uygulaması sonrası MDA-MB-231 hücre hattı.....	99
Şekil.2 MDA-MB-231 hücre hattı	99
Şekil.3 18 µM (EC50) 48 saat vulpinik asit uygulaması sonrası MCF-7 hücre hattı	100
Şekil.4 MCF-7 hücre hattı.....	100
Şekil.5 5 µM (EC50) 48 saat vulpinik asit uygulaması sonrası BT-474 hücre hattı .	101
Şekil.6 BT-474 hücre hattı	101
Şekil.7 SK-BR-3 hücre hattı 10 µM 48 saat vulpinik asit uygulaması sonrası SK-BR-3 hücre hattı.....	102
Şekil.8 SK-BR-3 hücre hattı	102
Şekil.9 MCF-12A hücre hattı 10 µM (EC50) 48 saat vulpinik asit uygulaması sonrası MCF-12A hücre hattı.....	103
Şekil.10 MCF-12A hücre hattı.....	103

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Kullanılan meme kanseri hücre hatlarının patolojik bilgileri.....	18
Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan meme hücre hatları ve ATTC numaraları.....	19
Çizelge 3.3 Kullanılan cihazlar listesi	19
Çizelge 3.4 Meme kanseri hücre hatları, uygulanan vulpinik asit konsantrasyonları	27
Çizelge 3.5 Kaspaz-3 kit içeriği	31
Çizelge 3.6 Kaspaz-3 enzim aktivitesinin ölçülmesinde uygulanan bileşenlerin konsantrasyonu.....	32
Çizelge 3.7 Kaspaz-3 enzim aktivitesinin belirlenmesindeki kalibrasyonun hazırlanması	33
Çizelge 3.8 cDNA sentezi için total RNA ve primer konsantrasyonu	36
Çizelge 3.9 Ters transkripsiyon reaksiyonu bileşenlerinin konsantrasyonları	36
Çizelge 3.10 Ters transkripsiyon reaksiyon koşulları.....	37
Çizelge 3.11 Çalışmada kullanılan apoptozla ilişkili gen bölgeleri için tasarlanan primer dizileri	37
Çizelge 3.12 Real Time PCR reaksiyon bileşenleri konsantrasyonu	39
Çizelge 3.13 Real Time PCR reaksiyon koşulları	39
Çizelge 4.1 MDA-MB-231 hücrelerine uygulanan vulpinik asit konsantrasyonlarına ait hücre canlılık testi sonuçları.....	42
Çizelge 4.2 MCF-7 hücrelerine uygulanan vulpinik asit konsantrasyonlarına ait hücre canlılık testi sonuçları.....	44
Çizelge 4.3 BT-474 hücrelerine uygulanan vulpinik asit konsantrasyonlarına ait hücre canlılık testi sonuçları.....	45
Çizelge 4.4 SK-BR-3 hücrelerine uygulanan vulpinik asit konsantrasyonlarına ait hücre canlılık testi sonuçları.....	47
Çizelge 4.5 MCF-12A hücrelerine uygulanan vulpinik asit konsantrasyonlarına ait hücre canlılık testi sonuçları.....	48
Çizelge 4.6 Çalışılan tüm meme hücre hatlarına karşı uygulanan vulpinik asit konsantrasyonu sonrası belirlenen EC50 değeri	49

Çizelge 4.7 Total RNA izolasyonu sonucu miktar ve saflık tayini	61
Çizelge 4.8 Apoptozla ilişkili bazı genlere ait C _T değerleri	64
Çizelge 4.9 Apoptozla ilişkili bazı kaspaz genlerine ait C _T değerleri.....	65



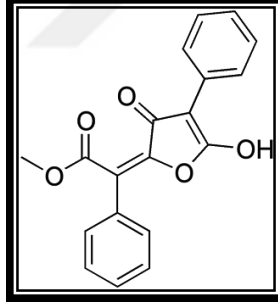
1. GİRİŞ

Toplumdaki bireylerin sosyal, ruhsal ve fiziksel durumlarını önemli ölçüde etkileyerek sosyo-ekonomik, psikolojik, ve aile hayatı gibi tüm yaşam kalitesini etkileyen hastalıkların başında gelen kanser hastalığı vücuttaki hücrelerin kontrolsüz bölünmesi ile meydana gelen bir hastalıktır (Arslan ve Bölükbaşı 2003). Son yıllarda oldukça çok sık rastlanması ve daha etkin tedavi yönteminin hala bulunamaması sebebiyle önemi gittikçe artmakta olan sağlık sorunudur (Alıcı vd. 2006, Gürel 2007). Kanser tedavisinde sıklıkla kullanılan yöntemlerin başında cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi gelmektedir. Hayati öneme sahip bu sağlık problemine etkin çözüm yöntemlerinin bulunması amaçlı birçok laboratuvarın öncelikli araştırma hedefini oluşturmuştur. Günümüzde hızla tercih edilen tedavi yöntemleri ise hormon tedavisi, biyolojik tedavi yöntemleri ve hedefe yönelik gen tedavileridir. Tedavi amaçlı kullanılan yöntemlerin ciddi ölçüde kanser hastalarında yan etkiler göstermesi ve bu tedavi yöntemlerinin hastanın iyileşme sürecinde uzun zaman alması nedeniyle araştırmacıların alternatif tedavi modelleri arayışı her geçen gün artmaktadır. Bu nedenle son yıllarda özellikle sentetik ve biyolojik kaynaklı olan bitkisel ve fungus kaynaklı aday moleküllerin hücre ölüm etkinliğinin belirlenip tedavi amaçlı çeşitli kanser tiplerine karşı etkisinin tespiti araştırılmaya başlanmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalar ile fungusların bir alt grubu olan likenlerin ve sadece likenlere (Şekil 1.1) özgü olan sekonder metabolitlerinin kanser tedavisinde etkili olabileceği konusunda umut vadeden sonuçlar elde edilmiştir (Singh vd. 2013, Shrestha ve Clair 2013, Chen vd. 2014).



Şekil 1.1 Liken türleri (Anonim 2013a, Anonim 2014)
a) *Ramalina pollinaria* b) *Letharia vulpina*

Hücre ölümü üzerine etkisi son yıllarda oldukça dikkat çeken likenler; mantarların alglerle birlikte oluşturdukları morfolojik ve fizyolojik simbiyotik birliktelik olarak tanımlanırlar (Anonim 2013, Anonim 2014). Günümüze kadar farklı liken türlerinden yaklaşık 1000 adet sekonder metabolit tanımlanmıştır. Bu metabolitler yağ asitleri ve laktonlar, zeorin grubu bileşikler, pulvinik asit türevleri, kumaron türevleri, depsidler, depsidonlar ve antrokinon türevleri olarak sınıflandırılabilirler. Likenlerden elde edilen bir sekonder metabolit olan **vulpinik asit** ilk olarak 1831 yılında Bebert tarafından izole edilmiştir (Huneck ve Yoshimura 1996). 1925 yılında ise pulvinik asit türevinden vulpinik asit Mazza tarafından izole edilmiştir (Mazza 1925). Parlak sarı görünümlü olan vulpinik asit çok yüksek konsantrasyonlarda *Letharia vulpine* yiyen ren geyikleri üzerine toksik etkisi olduğu uzun yıllar önce yapılan yayınlarda belirtilmiştir (Huneck ve Yoshimura 1996). IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) ismi 3-hidroksil-5-okso-4-fenil-3-2-(2H)-füriden fenilasetat olup $C_{19}H_{14}O_5$ kimyasal yapısında $322.32 \text{ g.mol}^{-1}$ moleküler ağırlığa sahiptir (Şekil 1.2) (Huneck ve Yoshimura 1996).



Şekil 1.2 Vulpinik asit formülasyonu (Huneck ve Yoshimura 1996)

Tez kapsamındada farklı histolojik kökenli dört farklı meme kanser hücresi ve bir adet normal meme hücresine liken sekonder metaboliti olan vulpinik asitin hücre ölümü üzerine etkisi, moleküler yollardan biri olan apoptotik yolak üzerinde gerçekleşen etkisi biyokimyasal açıdan ve apoptozla ilişkili genlerin moleküler boyut da ifade seviyelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Tez çalışması sonucu elde edilen veriler ışığında vulpinik asit sekonder metabolitin hücre ölümü üzerine etkisinin tespiti sonucunda meme kanser hücre alt tiplerinde umut verici aday ilaç molekülü olabileceği tespit edilmesi amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Kanser

Kanser genel olarak hücrelerin düzensiz ve kontrol dışı çoğalması olarak tanımlanmaktadır (Kutluk ve Kars 1994). Hipokrat (M.Ö. 460-377) ilk olarak kanser kavramını canlılarda tedavisi olmayan yapıları belirtmek için kullandığı bildirilmektedir ve vücutta gelişen, normal hücrelerden farklı olan şişkinliklere ‘Karsinoma’ adını vermiştir. M.S. II. yy’da ise Galen oluşan kitleleri yengece benzetmesi ile ‘kanser’ olarak adlandırmıştır.

Hücreler canlıların temel yapıtaşdır ve tüm organlar hücrelerden oluşur. Hücreler vücutta uyaranlar enzimler ve hormonlar ile kordine olarak belli bir düzen çerçevesinde bölünür, büyür, yaşlanır ve parçalanırlar. Kanserli hücrelerde ise bu düzen farklı etkenlerle bozulup hücrelerin farklılaşmaları sonucu düzensiz bir şekilde bölünüp çoğalmaları söz konusu olmaktadır (Topal vd. 2009, Öncel 2012). Kontrolsüzce bölünüp çoğalan hücreler zamanla birikerek bulundukları yerde kitleler oluşturur, normal seyirdeki dokulara zarar verir ve sıkıştırıp içine sızabilirler. Kontrolsüz büyüyen hücreler kan, lenf veya vücut boşluklarındaki sıvılar aracılığı ile ilk bulundukları yerden hareket ederek farklı dokulara lokalize olurlar ve burada bölünmeye devam ederler. Kanser hücrelerinin bu davranışı metastaz olarak adlandırılır (Kutluk ve Kars 1994). Metastaz ile farklı organlara taşınan kanserli hücreler özelleşmez, birbirlerine bağlanmaz, apoptoza uğramaz ve birbirlerinden gelen sinyallere cevap oluşturmazlar (Aslan 2010). Sık rastlanan mutasyonlarda sinyal iletim yollarını ve sinyal proteinlerini hedef alan onkojenik mutasyonlar oluşmaktadır (Hanahan ve Weinberg 2000). Bu şekilde sinyal iletiminde yaşanan problemler hücrelerin yaşamsal işlevlerinin düzenlenmesini ortadan kaldırmaktadır.

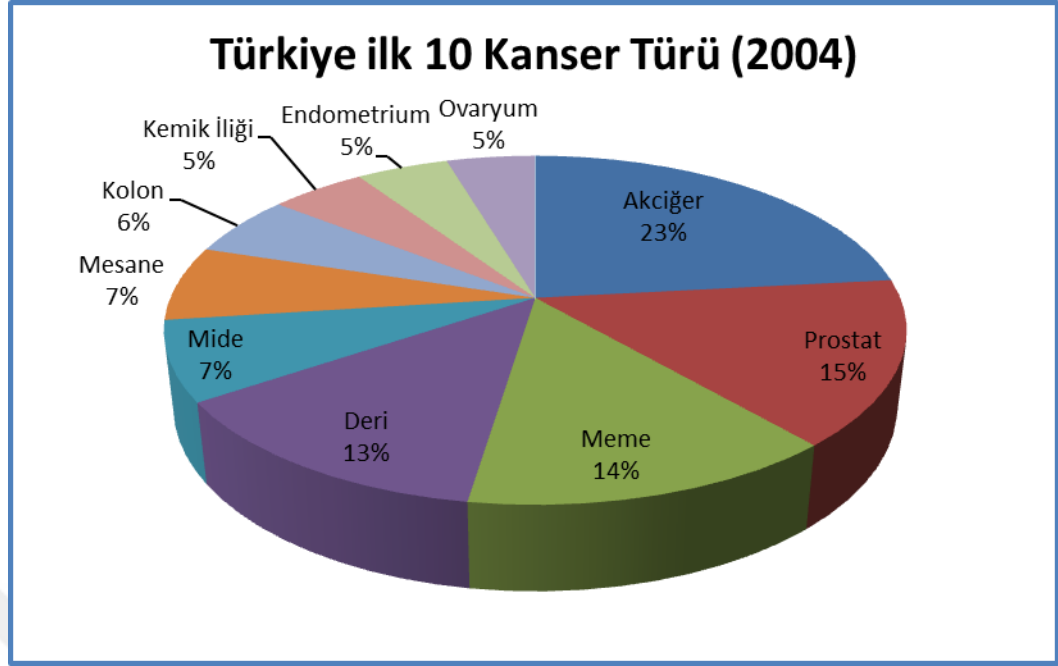
Bir kanser tipine veya farklı kanser tiplerine sahip bireylerde, kanser yolakları aynı düzenleyici sistemlerin farklı bileşenlerindeki değişimlerle ortaya çıkabilirler. Kanserin gelişim süreci içerisinde invazyon ve metastazın aktivasyonu, replikatif ölümsüzlüğün

gerçekleşmesi, besleyici çoğalma sinyallerinin ortaya çıkması ve angiogenezis gibi değişimler meydana gelmektedir (Şekil 2.1) (Hanahan ve Weinberg 2011).



Şekil 2.1 Kanser gelişim süreci (Hanahan ve Weinberg 2011)

Dünyada hastalık sonucu ölümlerin başında kalp ve damar hastalıkları gelmektedir. Hemen ardından ise kanser hastalığı gelmektedir. Yüksek ölüm oranı ve özellikle son yıllarda çok sık rastlanması nedeni ile önemli bir halk sağlığı sorunu olmuştur (Kutluk ve Kars 1994). Dünya Kanser Örgütü (International Union Against Cancer-UICC) verilerine göre 2007’de yaklaşık olarak 7.9 milyon kişi farklı kanser türlerinden yaşamını kaybetmiştir. Uluslararası Kanser Ajansı 2012 yılı kanser hastalığı görülme sıklığı tahminlerine göre Dünya’da toplam 14.1 milyon yeni kanser vakası gelişmiştir ve 8.2 milyon kansere bağlı ölüm gerçekleşmiştir (Anonim 2015). Dünya’da en çok tanı konulan kanser tipleri akciğer (%13), meme (%11,9) ve kolon (%9,7) kanserleri iken kanserden ölümlerin ise en çok akciğer (%19,4), karaciğer (%9,1) ve mide (%8,8) kanserlerinden gerçekleştiği belirtilmiştir (Bora-Başaran vd. 2014). Türkiye Halk Sağlığı Kurumu verilerine göre Türkiye’de 2002-2009 yılları arasında kadınlarda en sık görülen kanser türü meme kanseridir ve bunu tiroid ve kolorektal kanserleri takip etmektedir (Bora-Başaran vd. 2014) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Türkiye’ de görülen ilk on kanser türü yüzdeleri (Anonim 2013b)

Kanser hastalığı görülen kişi sayısının son yıllarda artması ile 2025 yılında kanserden ölümlerinin sayısı dünya genelinde 25 milyonu aşacağı öngörülmektedir (Çevik vd. 2012).

2.2 Meme Kanseri

Tüm dünyada ciddi sağlık problemi yaratan ve memenin duktus veya lobüllerini saran epitel kökenli hücrelerin malign proliferasyonu olarak bilinen meme kanseri kadınlar arasında yaygın olarak görünen ve kanserden ölümlerde akciğer kanserinden sonra ikinci sırayı alan kanser türüdür (Somunoğlu 2009, Saip vd. 2011). Hayatları boyunca ortalama her 10 kadından birinin meme kanserine yakalanma olasılığı ve bu hastalığa yakalananlar arasından ise üçte biri bu hastalıktan yaşamını yitirdiği bildirilmektedir (Gölbaşı vd. 2010). Kadınlarda görünme sıklığı %22 iken gelişmiş ülkelerde bu oran %26’ya kadar ulaşmaktadır. Hastalığın gelişme süresine göre meme tümörleri çeşitli evrelere ayrılmıştır (Anonim 2016a).

Evre 0; Bu evre ‘in-situ’ olarak da bilinir ve geliştiği dokuda kalarak etrafındaki dokulara sıçramamış kanser türünü ifade eder. In-situ kanserler tümör oluşturmaya başladığı yere göre ikiye ayrılırlar. Süt bezlerinde (lobes) oluşan tümöre lobular karsinoma in situ (LCIS) adı verilirken, süt kanallarında (ducts) oluşan tümöre ise duktal karsinoma in-situ (DCIS) adı verilir. LCIS kanser sadece göğüsde kanser oluşum riskinin arttığını gösteren bir belirteçtir ve kanser gibi davranmaz ve kanser gibi tedavi edilmez. DCIS’da ise kanser süt kanallarında kalmıştır ve vücudun farklı alanlarına yayılım göstermemiştir (Anonim 2016a).

Evre 1; Metastaz yapabilen meme kanserinin ilk aşamasıdır. Evre 1’de kitle en fazla 2 cm’dir ve bu oluşum memeden farklı yerlere (yağ dokusu ve lenf bezleri gibi) yayılmadığı aşamadır (Anonim 2016a).

Evre 2; İki alt gruba sahiptir. Bunlar Evre IIA ve Evre IIB’dir. Evre IIA’da tümör 2 cm büyüklüğünde ve koltuk altı lenf bezlerine yayılmıştır. Evre IIB ise 2 ile 5 cm arasındadır ve lenf bezlerine yayılmıştır (Anonim 2016a).

Evre 3; İlerlemiş meme kanseri evresidir. Bu evrede tümör meme çevresindeki lenf nodlarına ve çevre dokulara yayılma eğilimindedir.

Evre 4; Metastatik meme kanseri evresidir. Kanser memeden uzak dokulara (beyin, kemik, akciğer, karaciğer gibi) yayılmıştır.

2.2.1 Meme kanseri oluşumuna etki eden faktörler

Meme kanseri gelişmesindeki en önemli faktörler; genetik yatkınlık yani ailede meme kanseri hikayesine sahip olmak, daha önce meme kanserine yakalanmış olmak, radyasyon, alkol kullanımı, pestisitlere maruz kalmak yer almaktadır. Ayrıca obezite, ilerlemiş yaş, erken menstrüasyon, geç menepoz ve çocuk doğurmamış olmakta meme kanseri oluşumunu destekleyen önemli sebepler arasında yer almaktadır (Somunoğlu 2007, Kosova ve Arı 2008).

2.3 Kanser Moleküler Yolaklarında Apoptozis

Yüksek organizmalarda hücrelerin kendi otonom sistemleri tarafından gereksinim duyulmayan ve aktivitelerini kaybetmiş hücrelerin çevreye zarar vermeden yok edilmesi **apoptozis** olarak adlandırılır (Cohen 1998). Canlı sistem sürekli bir denge durumundadır. Bazı hücreler sentezlenirken bazı hücreler ise apoptoz yolu ile ortadan kaldırılır ve bu sayede denge sürdürülür. Dolayısıyla apoptoz enerjiye ihtiyaç duyan ve canlıda var olan homeostazı koruyan bir faaliyettir (Coşkun ve Özgür 2011). Apoptoz homeostazı korumanın yanında çeşitli nedenlerle zarar görmüş hücrelere karşı savunma mekanizması rolünü üstlenir (Eröz vd. 2012).

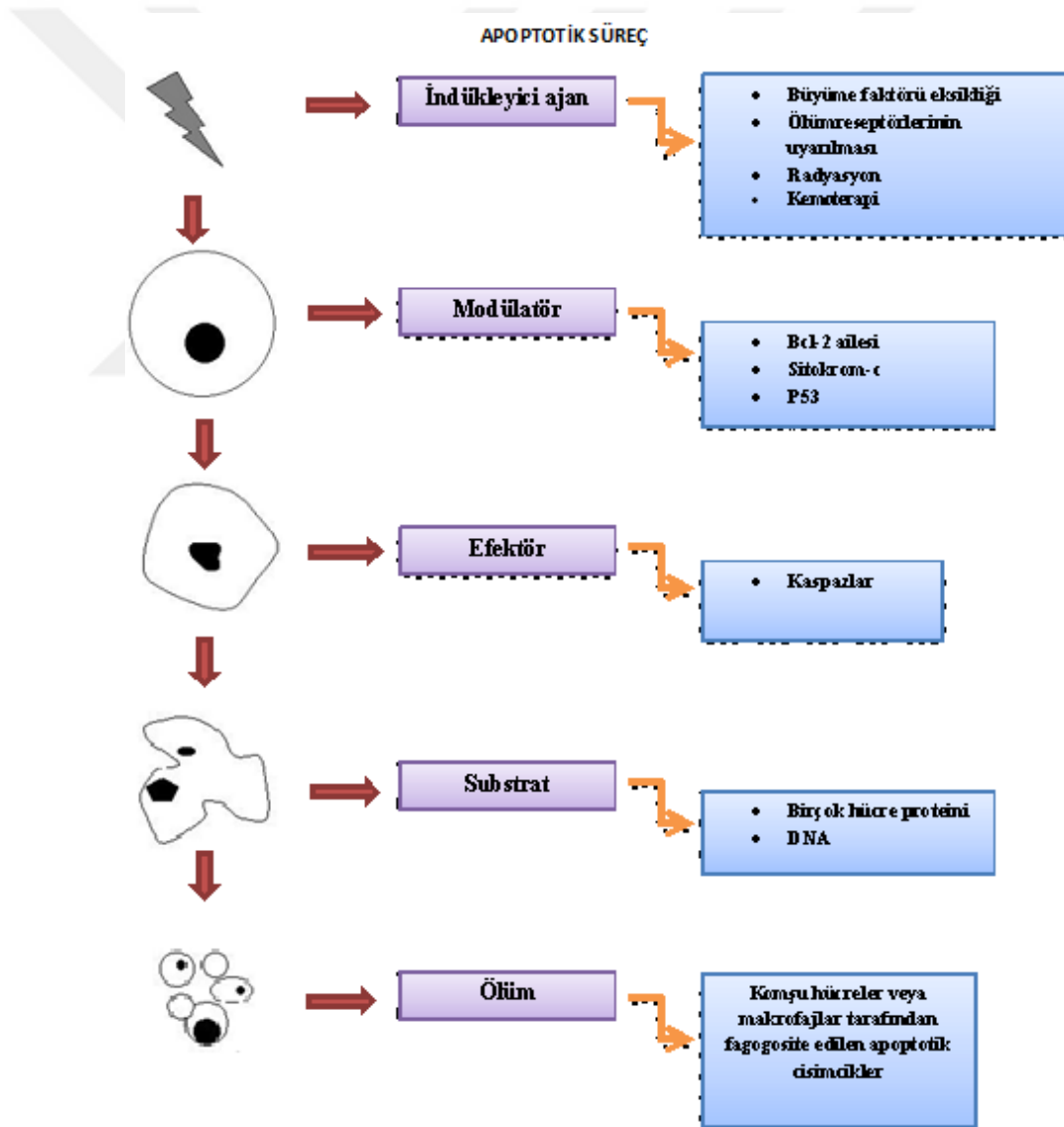
Apoptoz terimi 1972 tarihinde ilk olarak İskoçyalı bilim adamları Kerr, Wyllie ve Currie tarafından kullanılmıştır. Özgün bir hücre ölüm tipi olan apoptoz, canlı dokulardaki hücre azalmalarından sorumludur ifadesine yer verilmiştir (Kerr vd. 1972). Önemli fizyolojik süreçler olan normal doku yıkımlarında, gelişim biyolojisinde, immün sistem hücrelerinin sitotoksik fonksiyonlarında rolü arttıkça önemide hızla yükselmiştir (Kinloch vd. 1999).

Apoptozis organ büyüklüklerinin korunmasında, homeostazı sağlamada ve tamir süreçlerinde önemli rolü vardır (Sjöström ve Bergh 2001). Canlı sistemdeki milyonlarca hücre her saniyede vücuttan uzaklaştırılmaktadır ve bunların yerine yenileri üretilmektedir. Apoptoz ile yıkım olurken mitoz ile yapım gerçekleşmektedir ve bu şekilde kontrollü bir denge sağlanmıştır. Bu dengenin bozulması apoptozisin faydasına ya da faydasına olmayarak bir çok hastalığın patogenezisine neden olur (Erdoğan ve Uzaslan 2003). Apoptozun gereksiz yere oluşması veya hızlanması canlı sistem için tehlike oluşturur ve bunun akabinde AIDS’de görülen lenfosit yetersizliğine, insulin bağımlı tip diyabete, hepatit C enfeksiyonuna, nörodejeneratif hastalıklara, miyokard enfarktüsüne ve otoimmün hastalıklara neden olabilir (Sjöström ve Bergh 2001).

2.3.1 Apoptotik hücre ölümü aşamaları

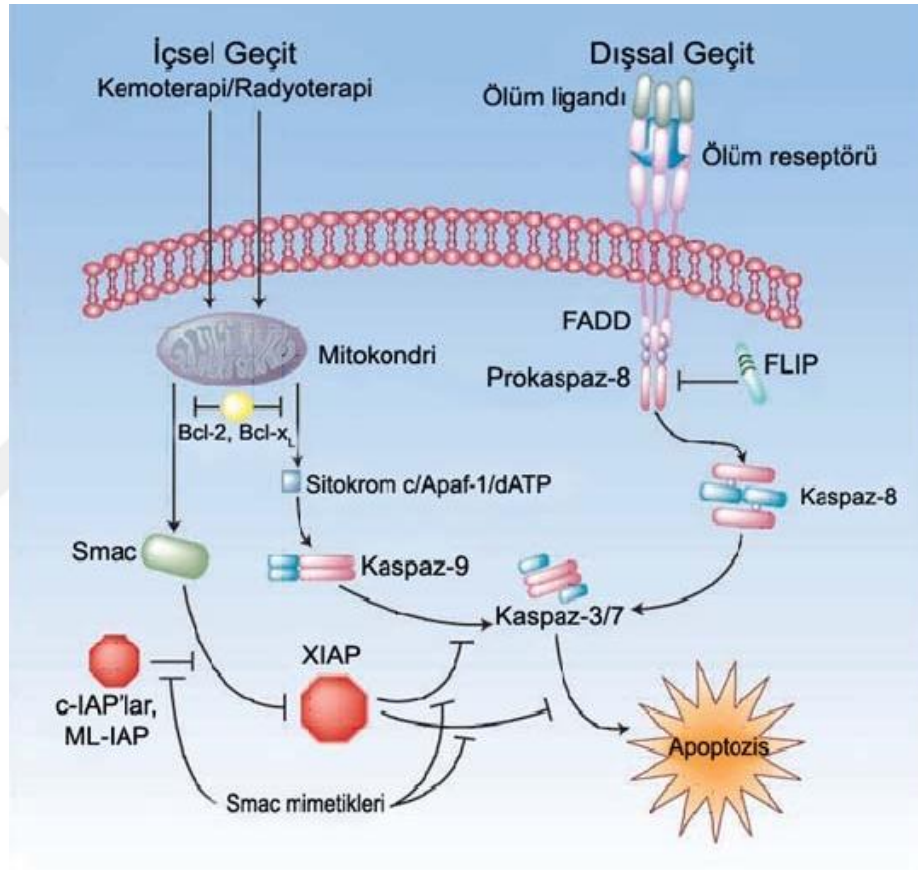
Birbirini takip eden olaylar dizisi olan apoptoz, hücre içinden veya dışından gelen sinyallerle başlatılır (Şekil 2.3). Bu olaylar dizisi;

- ❖ Apoptozun başlaması,
- ❖ Hücre için proteaz (kaspaz) aktivasyonu,
- ❖ Hücrede çeşitli morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerin oluşması,
- ❖ Fagositoz



Şekil 2.3 Apoptotik süreç (Anonim 2012)

Hücrelerin apoptoza uğrayabilmesi için öncelikle ilgili mekanizmayı aktive edecek bir sinyal ile karşı karşıya kalması gerekir (Şekil 2.4) (Vucic ve Fairbrother 2007). Bu sinyal hücre dışından veya hücre içinden gelebilir (Thompson 1999, Mountz ve Zhou 2001). Hücre dışı uyaranları olan koloni uyarıcı faktörler (CSF), insülin benzeri büyüme faktörleri (IGF), tümör nekroz faktörü (TNF), nöron büyüme faktörü (NGF) ve IL-2 gibi maddelerin ortamda azalması radyasyon, ilaçlar, çeşitli antijenler gibi pozitif uyaranlar olabilir.



Şekil 2.4 Apoptozisin başlamasında rol oynayan hücre içi ve dışı yollar (Vucic ve Fairbrother 2007)

Hücreler yaşamsal faaliyetleri için diğer hücrelerden ve hücre dışı matrikden gelen büyüme faktörlerine ve yaşam sinyallerine gereksinim duyarlar. Bu sinyaller belli bir düzen içerisinde gerçekleşmez ise hücre apoptoza gider (Hirose vd. 1997). Hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanarak sinyal iletimini başlatan büyüme faktörleri hücre çoğalmasını pozitif yada negatif yönde etkiler. Bir hücrenin hangi faktörlere cevap

vereceği hücrenin yüzeyindeki reseptörler belirler. Bu nedenle hücre yüzeyindeki reseptör düzenindeki farklılıklar, pozitif veya negatif uyaranlar hücre siklusu regülasyonunun kaybına yol açar (Güneş 1999).

2.3.2 Apoptozis mekanizmaları

Apoptozisin başlatılmasında üç prototip sinyal yolu rol almaktadır.

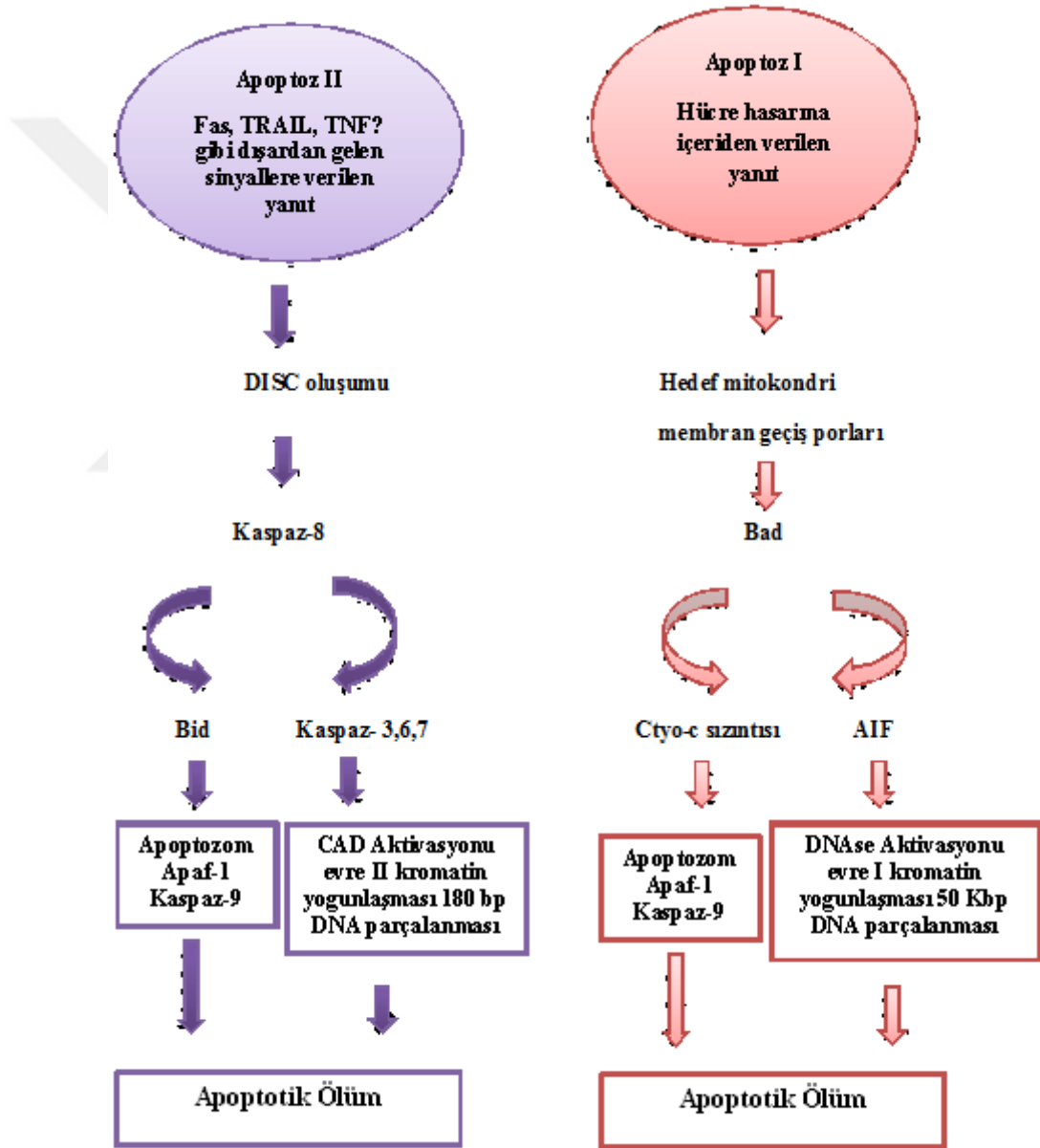
a. Mitokondri /sitokrom-c aracılı apoptozis oluşturulması

Mitokondri standart durumlarda ATP üretmek için sitokrom-c bulundurur. Sitokrom-c mitokondrial stres durumunda serbest hale geçer ve apoptotik hücre ölümünde kaspaz-3 aktivasyonu için önemli rol oynar (Crowe vd. 1997, Lou vd. 1998, Li vd. 2000, Lu vd. 2000, Takagi vd. 2003). Mitokondri tarafından bu yolda apoptotik proteaz aktive edici faktör (Apaf-1) ve kaspaz-9 bulunmaktadır (Liu vd. 1997, Hu vd. 1999, Krajewski vd. 1999). Sitokrom-c ve Apaf-1 kofaktör nükleotid trifosfat (d-ATP ve ATP) ile aktive edilmesinin ardından birleşerek prokaspaz-9'u aktive eder. Aktive olmuş olan kaspaz-9 da kaspaz-3'ü aktive ederek, diğer kaspaz kaskadının tetiklenmesine neden olur (Krajewski vd. 1999, Keane vd. 2001).

Sorunsuz bir hücre mitokondrisinin dış membranında Bcl-2 proteini bulunur (Newton ve Strasser 1998, Choi vd. 2001). Apaf-1 proteininin bir molekülünü bağlayan Bcl-2 sebep olduğu iç hasarla mitokondride çatlaklar oluşturur ve Apaf-1 ve sitokrom-c salınımına yol açar. Bu proteinler kaspaz-9 moleküllerine bağlanır (Hu vd. 1999, Krajewski vd. 1999, Takahashi vd. 1999). Kaspaz-3 terminal uç olması ile bu proteolitik aktivite sayesinde kromozomal DNA'nın degradasyonu, sitoplazmada yapısal proteinlerin sindirimi ve hücrenin fagositozu gerçekleştirilir (Newton ve Strasser 1998, Nakatsuka vd. 1999, Takagi vd. 2003).

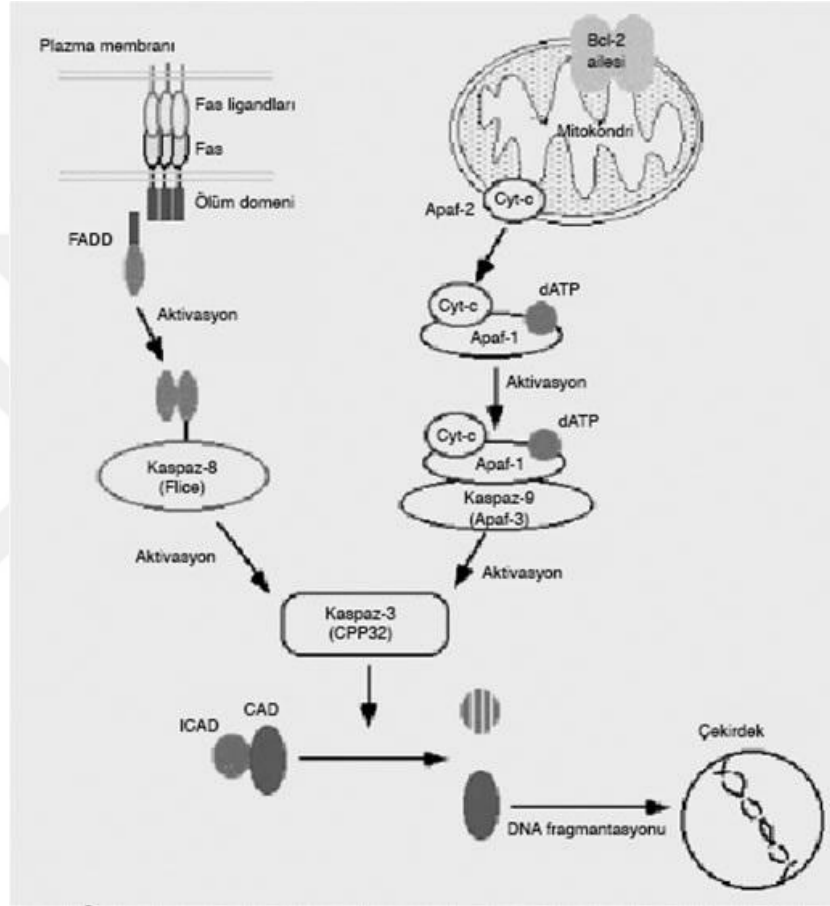
b. Dış sinyallerle apoptozisin tetiklenmesi

Ölüm aktivatörleri olan ve birbirini tamamlayan Tümör nekroze faktörü (TNF) ve Fas-ligand (Fas-L)'ın hücre yüzeyinde bulunan TNF ve Fas reseptörleri ile birleşmesiyle sitoplazmaya kaspaz-8'in aktivasyonunu sağlayan sinyaller gelir. Kaspaz-9 gibi kaspaz 8'de diğer kaspazları uyarır ve hücrenin fagositozuna yol açar. Tümör nekroz faktör reseptör (TNFR) gen ailesinin bir üyesi olan SCI reseptörü p75 ve Fas ile ilişkilidir. Bunların apoptozisi harekete geçiren kaspaz kaskadını aktive ettiği bilinmektedir (Şekil 2.5) (Banasiak ve Haddad 1998).



Şekil 2.5 Apoptoz I ve apoptoz II için farklı moleküler yollar

Oligodentrositlerde olduğu gibi diğer sistemlerde de apoptotik hücre ölümünde p75 ve Fas'ın sorumlu olduğu gösterilmiştir (Banasiak ve Haddad 1998). FADD (Fas bağımlı ölüm domein proteini) aracılığı ile Fas reseptör-ligand birleşimi gerçekleşir ve kaspaz-8 aktive edilerek apoptotik döngü başlar (Şekil 2.6) (Kromer vd. 1995, Banasiak ve Haddad 1998)



Şekil 2.6 Ölüm reseptörleri ve mitokondrial yollarla kaspaz-3 aktivasyonunun başlamasıyla nükleusda oluşan DNA fragmentasyonu (Anonim 2016b)

c. Endoplazmik retikulum aracılı apoptozis oluşturulması

Mitokondrial/sitokrom-c ve ölüm reseptör aracılı apoptozisten farklı bir yol olan ve amiloid β nörotoksisitesine katkı sağlayan kaspaz-12'ye bağımlı endoplazmik retikulum (ER) aracılı apoptotik yol belirtilmiştir. Endoplazmik retikulum'un hücre içerisinde membran proteinlerinin katlanması Ca^{+2} sentezi ve dengesi gibi süreç de ciddi öneme

sahiptir (Nakamura vd. 2000). ER membranlarında yerleşik olan ve ER yoluyla apoptozis için esas teşkil eden kaspaz-12'dir. Son yapılan çalışmalarda Ca^{+2} düzeylerinin yükselmesi ve kalpainin ER'i etkilemesi ile prokaspaz-12 aktif hale gelir. Sitoplazmaya yönelen aktifleşmiş kaspaz-12, kaspaz-9 ile etkileşerek sitozolik kaspaz kaskadını aktive eder (Rao vd. 2001).

Apoptotik yolak iki farklı yoldan işlev gösterir. Bunlardan ilki **ekstrinsik** yani ölüm reseptörleri yolağı diğeri ise **intrinsik** yani mitokondrial yolağıdır. Apoptozun başlamasını sağlayan ekstrinsik sinyal yolakları transmembran reseptör aracılı etkileşimler içerir. Bunlar tümör nekrozis faktör (TNF) reseptör gen üst familyası üyelerini içeren ölüm reseptörlerini kapsamaktadır (Locksley vd. 2001). Ölüm domainler ve ekstraselüler domainler olarak adlandırılan yaklaşık olarak 80 aminoasitten meydana gelen sitoplazmik domaine sahip TNF reseptör ailesi üyeleri ölüm sinyallerinin hücre yüzeyinden intraselüler sinyal yolağına iletilmesinde önemli rol oynarlar (Ashkenazi ve Dixit 1998). Ölüm reseptörlerinden en iyi bilinenleri FasL/FasR, TNF- α /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 ve Apo2L/DR5'dir (Chicheportiche vd. 1997, Rubio-Moscardo vd. 2005). Apoptozun başlamasını sağlayan intrinsik sinyal yolağında ise reseptör aracılı olmayan uyarılarla hedef hücre içinden gelen intraselüler sinyaller görev alır ve bu sinyaller iç mitokondriyal membranda değişikliğe neden olmaktadır. Bu değişiklik ile birlikte mitokondriyal porlar açılır ve proapoptotik proteinler ortaya çıkar (Elmore 2007). Mitokondrial apoptozis de Bcl-2 protein ailesi kontrol ve düzenlenmesinde görev yapar ve P-53 bu protein ailesinin düzenlenmesinde önemli role sahiptir (Schuler ve Green 2001, Cory ve Adams 2002). 25 geni tanımlanan Bcl-2 protein ailesi mitokondrial membran geçirgenliğini kontrol eder ve bu proteinler apoptozun oluşmasında kritik öneme sahiptir (Elmore 2007). Apoptotik sinyallerin ilk hedefi prokaspazların aktivasyonu ve mitokondrial fonksiyonların saf dışı bırakılmasını sağlamaktır. Kaspazlar ise apoptozun yürütülmesinde merkezi rol oynayan sistein proteazların bir alt sınıfıdır (Thornberry ve Lazebnik 1998) ve bunlar çoğunlukla prokaspazlar olarak sentezlenirler. Kaspazlar apikal kaspazlar (Kaspaz 2, 8, 9 ve 12) ve efektör kaspazlar (Kaspaz 3, 6, 7) olarak ikiye ayrılırlar. Apikal prokaspazlar dimerizasyon ile aktifleşirken, efektör prokaspazlar daha önce aktive edilmiş apikal kaspazlar tarafından proteolitik yıkım ile aktive edilirler

(Stennicke vd. 1998, 1999, Boatright vd. 2003). Bu aktivasyonun ardından hücrede efektör kaspazlar proteolitik yıkımı gerçekleştirir (Fischer 2003).

Şekil 2.6'da görüldüğü gibi ekstrinsik yolda ölüm reseptörlerinin aktivasyonu ile prokaspaz 8 aktifleşerek kaspaz 8 haline gelir. Aktif kaspaz 8 kaspaz 3'ü aktif hale getirerek hücreyi ölüme götürür. İntrinsik yolda ise intraselüler ve ekstraselüler ölüm sinyalleri mitokondriye taşınmaktadır. Bax, Bak, Sitokrom c, Smac/DIABLO ve diğer apoptojenlerin mitokondriden çıkmasını stimüle ederler. Bcl-2 ve Bcl-XL bu yolun aktifleşmesini engellemektedir. Sitokrom c, dATP, Apaf-1 ve prokaspaz 9 apoptozom içerisinde birleşirler ve prokaspaz 9 aktifleşir. Aktifleşen kaspaz 9 prokaspaz 3'ü aktifleştirir ve ölüm gerçekleşir. Apoptozom oluşumunu ve kaspaz 3 aktivasyonunu XIAP inhibe etmektedir.

2.3.3 Apoptozisin genetik kontrolü

Normal hücrelerin büyüme ve gelişmelerini sağlayan genler protoonkogenlerdir ve bu genler aktive olup mutasyona uğradıklarında onkogene dönüşürler. Onkogenler ise hücrelerin düzensiz biçimde aşırı olarak büyüme ve bölünmesini gerçekleştirirler. Protoonkogenleri baskılayarak hücre bölünme ve büyümesini dengede tutan genlere ise tümör baskılayıcı genler adı verilmektedir (Millerk vd. 1990, Nowell 1990, Akins 1996). Yapılan son çalışmalarda, tümör baskılayıcı genlerin ve onkogenlerin apoptozu kontrol ettiği gösterilmiştir (Caotes vd. 1996). Yüksek organizmalarda apoptozisi düzenleyen genler P-53, C-myc ve Bcl-2 ailesi olarak bilinir ve üretiminden sorumlu oldukları proteinlerde aynı isimle ifade edilirler (Wyllie 1995, Nakano 1997, Newton ve Strasser 1998, Choi vd. 2001).

Programlı hücre ölümü sinyal iletimini kontrol eden, aktive eden veya baskılayan birçok modülatör bulunmaktadır. Regülatörlerin bazıları apoptozun erken evrelerinde görülüp hücreyi ölüme hazırlarlar. Bu yapılar patojenler tarafından ifade edilen proteinler (Örn; Bcl-2 ve ilgili proteinler) ve kinazlardır (stres ile aktive olmuş protein kinazlardır) (Kinloch vd. 1999).

P-53: P53 geni tümör baskılayıcı bir gen olup apoptozu düzenler. Önemli görevleri ise serbest radikal oluşumu, hipoksi ve p53 aracılı DNA onarımı ve apoptozisdir (Banasiak ve Haddad 1998). DNA hasar gördüğü zaman hücre döngüsünün S fazına geçişini engeller ve DNA tamirini bekler. Eğer DNA tamir olmayacak şekilde ise hücreler apoptozisle yok edilir (Nakano 1997, Miyashita vd. 1994, Spencer vd. 1996).

C-myc: C-myc proteini bir transkripsiyon düzenleyici faktördür ve ortamdaki maddelere göre hücrenin apoptozuna ya da çoğalmasına neden olur (Evan vd. 1992). Bir protoonkogen olan C-myc hücrenin büyümesini programlamaktadırlar. Hücrede büyüme faktörlerinin yanında C-myc'de yoksa büyüme durdurulur tam tersi olarak her ikisinde bulunuyor ise hücre çoğalır. Fakat C-myc olduğunda büyüme faktörlerinin eksikliğinde ise apoptozis görülür (Evan vd. 1992, Schwartzman ve Cidloski 1993, Wagner vd. 1993).

Bcl-2: Büyüklüğü 26 kDa olan ve çekirdek, mitokondrial ve endoplazmik retikulum dış yüzeyindeki membranlarda yerleşmiş protein olan Bcl-2 ilk olarak *C. elegans*'da yapılan genetik çalışmada Ced-9 adında bir molekülün programlanmış hücre ölümünü engellediği gösterilmiştir. Memelilerdeki Ced-9'un karşılığı Bcl-2 olarak adlandırılmıştır (Thompson 1995, Cooper 1994). Bcl-2 ailesinin bazı üyeleri proapoptotik olup apoptozu uyarırken (Bax, Bad, Bid, Bcl-X_S) diğer kısmı ise antiapoptotik olup (Bcl-2, Bcl-X_L) apoptozu inhibe etmektedir. Bu ailede proapoptotik olanlar mitokondri'den sitokrom-c salınımı indüklerken antiapoptotikler sitokrom-c salınımını baskırlar. Proapoptotik üyeler ile antiapoptotik üyelerin birbirine bağlanması ile inhibitör etki yok olur ve sitokrom-c salınımı gerçekleşir. Bu nedenle proapoptotik ve antiapoptotik arasında gerçekleşen denge yaşam ile ölüm arasındaki seçeneği belirler. Bcl-2 ailesinin anti-apoptotikleri Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1'dir. Proapoptotikleri ise; Bax, BclX_S, Bad, Bim, Bak, Bok, Bid'dir (Petros vd. 2004). Antiapoptotik üyelerin fazla ifadesi apoptozu baskırlarken; proapoptotik üyelerin fazla ifadesi hücrelerin ölümüne neden olmaktadır.

2.3.4 Apoptozisin saptanmasında kullanılan yöntemler

Morfolojik görüntüleme yöntemleri

a) Işık mikroskobu kullanımı

Hematoksilen boyama

Giemsa boyama

b) Floresan mikroskobu

c) Elektron mikroskobu

d) Faz kontrast mikroskobu

İmmünohistokimyasal yöntemler

a) Anneksin V Yöntemi

b) TUNEL Yöntemi

c) M30 Yöntemi

d) Kaspaz-3 yöntemi

Biyokimyasal Yöntemler

a) Agaroz Jel Elektroforezi

b) Western Blot

c) Flow Sitometri

İmmünojenik Yöntemler

a) ELISA DNA fragmentasyonu M30 düzeyi

b) Flourimetrik Yöntem Kaspaz aktivasyonu

Moleküler Biyoloji Yöntemleri

DNA mikrodizin

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Genel reaktifler

Hücre hatlarının çoğaltılması için Modified Eagle's Medium (MEM) (PAA [The Cell Culture Company], E08209-2261) besiyeri kullanılmıştır. Besiyerine fetal calf serum (FCS) (Stem Cell, 04F11678) ve Penisilin/Streptomisin (Biowest, S12204L0018) eklenmiştir. Hücrelerin yıkanması için PBS (PAA [The Cell Culture Company], H00210-0647) ve hücrelerin plakalardan kaldırılması için Tripsin-EDTA (Stem Cell, 05A13807) kullanılmıştır. Çözücü olarak DMSO (Sigma, 049K2387) kullanılmıştır. RNA izolasyonu için ise TRizol (Genexol, XN19001), kloroform (MERCK, K02545831341), izopropanol (EMSURE, K44834034334), etanol (MERCK, K38999227830) kullanılmıştır. Hücre canlılığını belirlemek için ise MTT (3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue) (Sigma, MF6004) kullanılmıştır.

3.1.2 Kullanılan sarf malzemeler

Hücre kültürü flasksı 25 cm² (SARSTEDT, 5025112), Cryo.S kriyovial, Dnase-Rnase free, 2 ml (ROTH, 60024042), steril polipropilen konik santrifüj tüp, 1.5 ml'lik steril santrifüj tüpü (CELLSTAR® TUBES, Kat.no:188 271), pipet uçları; Dnase-Rnase free, steril, filtreli 10 µl, 100 µl, 1000 µl (BioPointe Scientific® Kat.no:321-4050A), steril serolojik pipetler 1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml (JET BİOFİL, Lot No: 090415-071), 96 kuyucuklu düz tabanlı steril plaka (SARSTEDT, Lot:5025111), 6 kuyucuklu düz tabanlı steril plaka (SARSTEDT, Lot:5024611), 384 kuyucuklu plaka (ROCHE, Lot:13019801).

3.1.3 Kullanılan kitler

- ❖ cDNA Sentez kiti, ROCHE, Lot#10760921
- ❖ Kazpaz 3 kolorimetrik testi kiti, Sigma-Aldrich, Lot#074M4123V
- ❖ Annexin V-FITC apoptoz belirleme kiti, Invitrogen, Lot#1597071

3.1.4 Liken sekonder metaboliti

Çalışma boyunca ana materyal olarak kullanılan ve liken sekonder metabolit olan vulpinik asit (Santa Cruz Biotechnology, Lot#L2612) üretici firmadan ticari olarak temin edilerek kullanılmıştır.

3.1.5 Kanser ve normal hücre hatları

Deneyler, ATCC'den temin edilen farklı reseptör alt tiplerine ait MDA-MB-231 (İnsan meme kanser epitel hücre hattı), MCF-7 (İnsan meme kanser epitel hücre hattı), BT-474 (İnsan meme kanser epitel hücre hattı), SK-BR-3 (İnsan meme kanser epitel hücre hattı) ve MCF-12A (İnsan meme dokusu normal epitel hücre hattı) hattı kullanılmıştır (Çizelge 3.1-3.2).

Çizelge 3.1 Kullanılan meme kanseri hücre hatlarının patolojik bilgileri

	ER (Östrojen Hormon Reseptörü)	PR (Progesteron Hormon Reseptörü)	HER2 (İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü)
MDA-MB-231	-	-	-
MCF-7	+	+	-
BT-474	+	+	+
SK-BR-3	-	-	+

Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan meme hücre hatları ve ATTC numaraları

Kanserli Hücreler	Normal Hücre
MDA-MB-231 Kat No. HTB-26 TM	MCF-12A Kat No. CRL-10782 TM
MCF-7 Kat No. HTB-22 TM	
BT-474 Kat No. HTB-20 TM	
SK-BR-3 Kat No. HTB-30 TM	

3.1.6 Kullanılan cihazlar

Bu tez kapsamında çizelge 3.3’de belirtilen cihazlar kullanılmıştır.

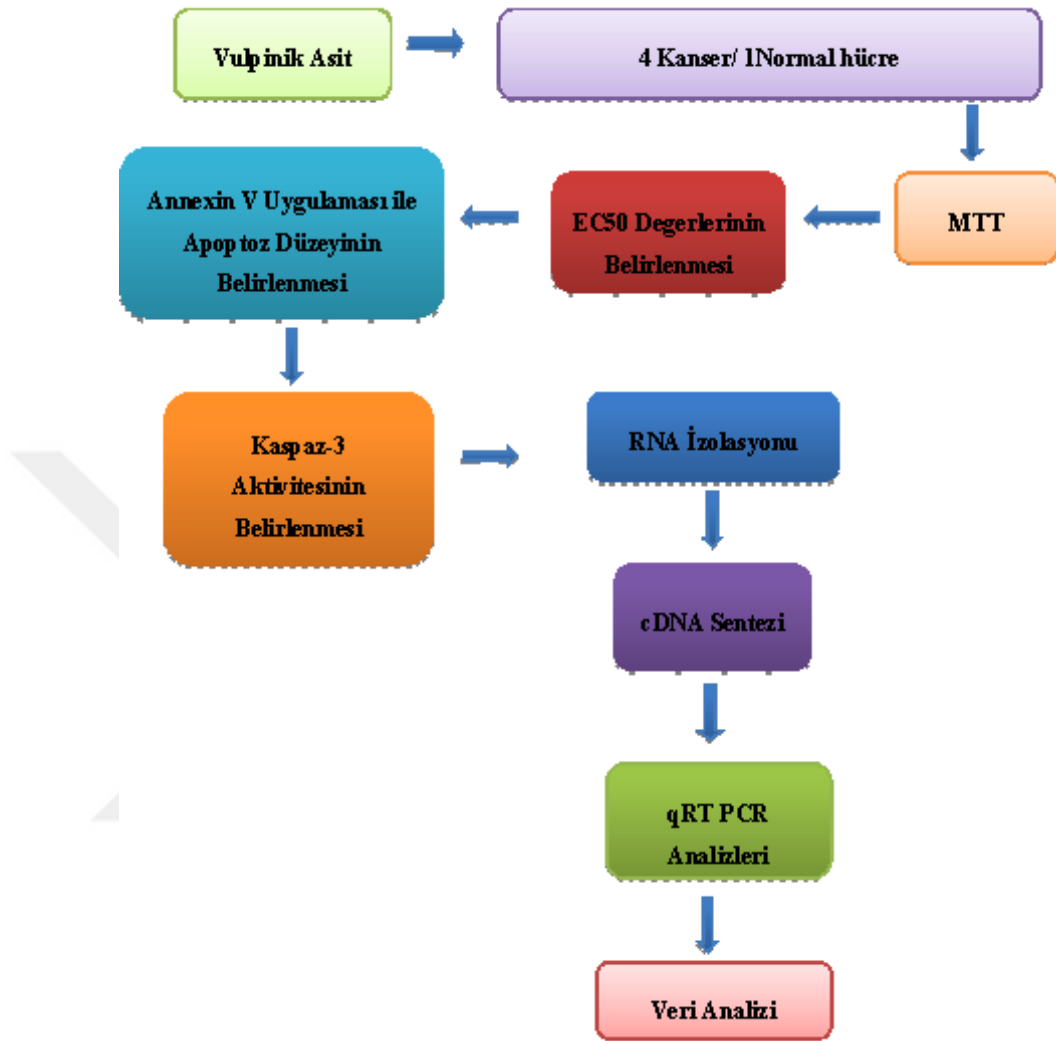
Çizelge 3.3 Kullanılan cihazlar listesi

Cihaz Adı	Markası
CO ₂ inkübatör	Sanyo CO ₂ Incubator
Elektroforez tankı	Thermo Scientific
Eliza okuyucu	VICTOR3 V
Flow sitometri cihazı	BDFACSAria II
Görüntüleme sistemi	Syngene Gene Genius Bio Imaging
Güç kaynağı	Thermo Scientific
Kırık buz makinası	Scotsman
Laminar flow kabin	Holten LaminAir Model 1,8
Mikroskop	Leica DCF290

Çizelge 3.3 Kullanılan cihazlar listesi (devam)

Cihaz Adı	Markası
Nanodrop	NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer
Otomatik pipetler 10µl, 100µl, 1000µl	Gilson
Real Time PCR	Roche Light Cyclers 480
Saf su cihazı	Millipore Synergy, 185
Santrifüj	Hettich Zentrifugen Rotina 35R
Shaker	Finepcr Orbital Shaker SH30
Sıvı azot tankı	STATEBOURNE cryogenics
Spin santrifüj	BioSan
Su banyosu	Lab-Line Aquabath
Terazi	Shimadzu AX200

3.2 Yöntem



Şekil 3.1 İş akış şeması

3.2.1 Hücre kültürü besiyerinin hazırlanması

Hücre kültürü çalışmalarının hepsi hücre kültürü odası ve steril güvenlik kabini içerisinde gerçekleştirilmiştir. MDA-MB-231, MCF-7, BT-474 ve SK-BR-3 hücreleri için hazırlanan besi yeri içeriği;

- %10 Fetal Bovine Serum
- %1 2 mM L-glutamin,

- %1 Penisilin + streptomisin
- DMEM (PAA Laboratories, Ausria)

100 ml MCF-12A hücre besiyeri için ise;

- %10 Fetal Bovine Serum
- %1 2 mM L-glutamin
- %1 Penisilin+ streptomisin
- 300 µl insülin (10µg/ml), 3.75 µl EGF (20ng/ml)
- 250 µl Hidrokortizon (0.5mg/ml)
- DMEM HAM'S-F12 besiyerinde çoğaltılmıştır.

3.2.2 Hücre açma ve hücrelerin idamesi

- Sıvı azot tankında dondurulmuş halde muhafaza edilen hücreler tanktan çıkarılarak önceden 37°C getirilmiş su banyosunda yaklaşık 2-3dk bekletilerek çözündürülmüştür.
- Kontaminasyonu önlemek amacıyla su banyosuyla etkileşen tüpler %70'lik alkolle silinerek laminar güvenlik kabini içerisine alındı.
- Laminar kabin içerisinde ayrı ayrı açılan MDA-MB-231, MCF-7, BT-474 ve SK-BR-3 hücreleri için 15'lik falkon tüp içerisine 5 ml %10 FBS içeren DMEM besiyeri konuldu.
- Sıvı azot tankından çıkarılan ve çözündürülen hücreler 15'lik falkon içerisine aktarıldı. MCF-12A hücresi ise DMEM HAM'S F-12 içeren 15'lik falkona aktarıldı.
- Falkon 1500 rpm'de +4°C'de 5 dakika santrifüj edilip hücrelerin pellet şeklinde dibe çökmesi sağlandı.
- Santrifüj sonrasında süpernatant kısmı atıldı ve pellet şeklindeki hücreler 5 ml taze besiyeri ile süspanse edildi.
- Süspanse edilen hücreler kontaminasyonu önlemek amacıyla filtre kapaklı 25 cm²'lik hücre kültürü flaskı içerisine alındı.
- Flask 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

- Hücrelerin daha sağlıklı büyümesi açısından besiyerleri yaklaşık iki günde bir değiştirildi ve çoğalma hızları, morfolojik yapıları ve canlılıkları invert mikroskop ile takip edildi.

3.2.3 Hücrelerin pasajlanması

Yaklaşık 3-4 günlük inkübasyon sonrasında mikroskop ile bakıldığında %80-90 oranında doygunluğa ulaşan flask inkübatörden alındı.

- Laminar kabin içerisine alınan flaskdaki besiyeri serolojik pipet ile çekilip atıldı.
- Flaskın yüzeyinde yapışık olan hücelere zarar vermeden flask yüzeyine yapışmamış halde bulunan ölü hüceler 25 cm² flask için yaklaşık 2 ml fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile yıkandı ve hemen PBS çekilip atıldı.
- Ardından 1 ml Tripsin-EDTA solüsyonu eklenerek flask yaklaşık 2-3 dakika inkübatöre kaldırıldı.
- 2-3 dakika sonunda flask yüzeyindeki hücelerin kalkıp kalkmadığı öncelikle gözle bulanıklık durumuna göre ve akabinde mikroskop ile hücelerin hareket edip etmediğine bakıldı.
- Flask yüzeyinden kalkmış olan hücelere tripsinin inhibisyonu için tripsin hacminin üç katı besi yeri eklendi ve 15'lik falkona alındı.
- 15'lik falkon içerisindeki süspansiyon 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve tripsin-EDTA solüsyonu uzaklaştırıldı.
- Tüp içerisinde kalan hücre pelleti taze besiyeri ile süspanse edilerek iki adet 25 cm² 'lik flaska bölünerek pasajlandı.
- Yeniden pasajlanan hüceler % 90 nem 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde inkübe edildi.

3.2.4 Hücrelerin dondurulması ve saklanması

- Flaskın % 80-90 dolmasının ardından besiyeri çekilip atıldı ve 25 cm² flask için yaklaşık 2 ml PBS ile yıkandı.

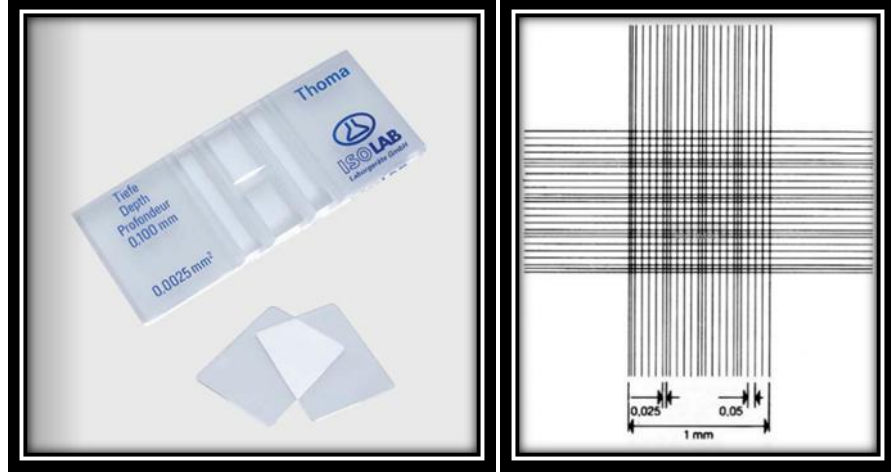
- Ardından hücreler 25 cm² flask için 1 ml Tripsin-EDTA ile kaldırılarak 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve tripsin besiyerinden uzaklaştırıldı.
- Oluşan hücre pelleti önceden hazırlanmış 900 µl fetal bovine serum içerisine 100 µl Dimetil sülfoksit (DMSO) eklenmesiyle elde edilen dondurma besiyerinde (%90 Fetal Bovine Serum + %10 DMSO) süspanse edilerek dondurma tüpleri içerisine alındı.
- İçerisinde hücre olan dondurma tüpleri kademeli olarak 1 saat -20°C'de bekletildi ve 1 saat sonunda -80°C'de 24 saat bekletilmesinin ardından uzun süre muhafaza etmek için sıvı azot tankına kaldırıldı.

3.2.5 Kullanılan hücre sayısının optimizasyonu ve plate yerleşimi

Deneylerde kullanılacak uygun hücre sayısının belirlenmesi amacıyla 96 kuyucuklu mikrolakalarda dört farklı kanser hücresi ve bir adet normal meme hücresi için üç tekrarlı olarak kuyucuklara ekim yapıldı. Her biri 5000, 7000, 10000 hücre içeren 100 µl DMEM besiyeri her bir kuyucuğa ekilip mikrolak 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakıldı ve hücrelerin çoğalması mikroskopik olarak gözlemlendi. Bu optimizasyon sonunda tüm hücrelerin 24 saat çoğalmalarına bağlı olarak bir kuyucuk için 10000 (1x10⁴) olarak saptandı ve diğer analizler bu şartlarda gerçekleştirildi.

3.2.6 Hücre sayımı

Flasktan kaldırılarak 15'lik falkon tüpe alınan hücreler santrifüj edildi ve süpernatant çekilip atıldı. Pellet halindeki hücreler taze besiyeri ile süspanse edildi. Süspanse olmuş hücreden 100 µl çekilerek thoma lamı oluklarına dikkatlice yayılmıştır. Thoma lamının alt ve üst kısmında bulunan 16 karedeki hücreler mikroskop altında 10X objektif büyütmesinde bu işlem dört defa tekrarlanarak sayılmıştır ve aritmetik ortalaması alınmıştır (Şekil 3.2). Hücreler thoma lamında sayıldıktan sonra aşağıdaki formüle göre toplam hücre sayısı belirlenmiştir.



Şekil 3.2 Thoma Lamı ve Thoma lamının sayım yapılan kareleri

3.2.7 Kullanılan çözeltilerin hazırlanması

Kanser ve normal hücrelerin ticari vulpinik asite olan hassasiyetleri MTT (Hücre proliferasyon reaktifi) (Sigma, MF6004) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

Çözücü (DMSO) hazırlanışı

1M olarak satın alınan DMSO (Sigma, 049K2387) vulpinik asit sekonder metabolitinin son konsantrasyonu DMSO'nun toksik etkisini en aza indirmek için daha önce literatürde belirlenen 14 mM olacak şekilde DMEM ile seyreltilmiştir.

MTT çözeltisinin hazırlanışı

50 mg olarak tartılan MTT reaktifi 10 ml PBS içerisinde çözündürülmüştür. Çözelti 0.20 µm'lik filtreden geçirilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir. MTT reaktifinin ışığa olan duyarlılığı nedeni ile çözelti hazırlığı karanlık ortamda yapılmaya dikkat edilmiştir. Filtrelenmesinin ardından hazır hale getirilen stok solüsyon bu haliyle +4°C'de en fazla bir ay karanlık ortamda saklanabilmektedir.

3.2.8 Liken sekonder metaboliti vulpinik asitin çözülmesi ve uygun konsantrasyonların hazırlanması

322,22 g/mol moleküler ağırlığa (mA) sahip olan vulpinik asit'den (Şekil 3.3) çalışılacak ana stok olan 200 μ M vulpinik asit konsantrasyonu 14 mM DMSO ile hazırlanmıştır. Çalışılacak diğer konsantrasyonlar (100, 50, 35, 25, 15, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56 ve 0.78 μ M) 200 μ M vulpinik asit konsantrasyonunun ileri dilusyonları ile hazırlanmıştır.



Şekil 3.3 Vulpinik asit

3.2.9 Liken sekonder metaboliti vulpinik asitin meme kanseri hücreleri üzerine etkisinin mtt testi ile değerlendirilmesi

Farklı dozdaki vulpinik asit konsantrasyonları (100, 50, 35, 25, 15, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56 0.78 μ M) dört adet meme kanseri hücrelerine (MDA-MB-231, MCF-7, BT-474 ve SKBR-3) ve bir adet normal meme hücresi (MCF-12A) grubu için de uygulanmıştır (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4 Meme kanseri hücre hatları, uygulanan vulpinik asit konsantrasyonları

Hücre Kültürü	Vulpinik asit konsantrasyonları	Zaman
MDA-MB-231	0.78, 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 15, 25, 35, 50, 100 µM	48 saat
MCF-7		
BT-474		
SK-BR-3		
MCF-12A (normal meme hücresi)		

MTT testi indirekt olarak hücre büyümesi ve/veya hücre ölümünü değerlendirmeyi amaçlayan, hücre kültürü esasına dayanan bir yöntemdir. MTT (3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue) canlı hücrelerin kültür ortamlarında mitokondrial aktivitesi devam ederken kolorimetrik olarak ölçülmesini sağlar. Tetrazolium tuzu olan ve suda çözünebilen MTT içerisinde fenol kırmızısı içermeyen besiyeri ve ya tuz solüsyonlarında hazırlandığında sarımsı bir solüsyon oluşturur. Canlı hücrelerin mitokondrileri aracılığı ile dehidrogenaz enzimlerce parçalanarak tetrazolium halkası sonucunda MTT mor renkli çözülemez formazona dönüşür. Bu oluşan formazon çözücü ile çözünebilir hale getirilir ve oluşan renk reaksiyonu spektrofotometrik olarak okunup değerlendirilerek bu şekilde hücrelerin çoğalması ve canlılığı takip edilir (Mosmann 1983, Freimoser vd. 1999).

- MTT testinde kullanılacak olan vulpinik asit sekonder metaboliti dilüsyonları, pozitif ve negatif kontrol, MTT boyası aynı gün taze hazırlanarak kullanıldı.
- 96 kuyucuklu düz tabanlı steril plaka içerisine 100 µl besiyeri içinde 1×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde ekim yapıldı.
- 24 saat hücrelerin plakaya yapışması için inkübasyona bırakıldı.

- İnkübasyon sonrası kuyucuklardaki besiyeri steril filtreli pipet ile çekilip atıldı ve hücrelerin üzerine hazırlanan 100, 50, 35, 25, 15, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56 ve 0.78 μ M konsantrasyonlarındaki 100 μ l vulpinik asit konsantrasyonları üç tekrarlı olacak şekilde eklendi.
- Aynı şekilde negatif kontrol olarak 100, 50, 35, 25, 15, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56 ve 0.78 konsantrasyonlardaki 100 μ l vulpinik asit içermeyen 14 mM DMSO konsantrasyonları da üç tekrarlı olarak eklendi ve 48 saat 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde inkübasyona bırakıldı.
- Pozitif kontrol olarak Amonyum Molibdat eklendi.
- 48 saatin sonunda vulpinik asit sekonder metabolit konsantrasyonları çekildi ve hücrelerin üzerine taze hazırlanmış MTT solüsyonundan 50 μ l eklendi.
- MTT solüsyonu ile 4 saat 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde inkübasyona bırakıldı.
- 4 saat sonunda MTT solüsyonu çekilip atıldı ve her kuyucuğa 100 μ l isopropanol eklendi.
- Plate hafifçe çalkalanmasının ardından spektrofotometrik olarak 570 nm (referans 650 nm)'de absorbens değerleri okutuldu.

Sitotoksiteyi değerlendirmeden önce, hücresiz kuyulardaki OD değerleri (sadece besiyeri + MTT), özütlerin bulunduğu kuyucukların OD değerlerinden çıkarılmıştır. Numunelerin toksisitesinin hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılmıştır. Canlılık hesabının yapılması için; OD değeri (ilaç) / OD değeri (Hücre Kontrol) x100 formülü kullanılmıştır. Sonuçlar 3 tekrarlı yapıp student-t testi ile anlamlılık seviyeleri belirlenmiştir.

Absorbans değerlerine ait verilerin elde edilmesi ile EC50 değeri ve canlılık oranları hesaplandı. EC50 değerinin hesaplanmasında absorbens değerleri (OD değerleri) logaritma tabanına çevrildi, daha sonra Graphpad Prism 6 programı kullanılarak hesaplamalar yapıldı.

Graphpad Prism 6 ile eğrinin EC50 değerinin hesaplanması için;

$$Y=100/[1+10^{((\text{LogEC50}-X)*\text{HillSlope})}] \text{ eşitliği kullanılmıştır.}$$

3.2.10 Annexin V uygulaması ile apoptoz değerlendirilmesi

Sitoplazma yüzünde fosfatidilserin (PS) bulunan normal hücrelerde hücre apoptozise uğrarsa iç tarafa yerleşmiş olan PS molekülleri zarın dış tarafına transloke olurlar. PS'lerin dış yüze transloke olması ise floresan bir madde (örneğin; FITC) ile işaretlenmiş Annexin V ile görünür hale getirilirler.

Annexin V uygulaması ile apoptoz değerlendirilmesi aşamasında Annexin V-FITC apoptoz belirleme kiti kullanıldı. Kit Bileşenleri: Annexin V-EGFP, 1X Bağlama Tamponu, Propidium Iodid'dir.

- Hücreler 6 kuyucuklu plakalara her kuyucuğa 2×10^5 hücre olacak şekilde ekim yapıldı ve 24 saat hücre kültürü şartlarında inkübasyona bırakıldı.
 - Hücre besiyeri çekilip atıldı ve PBS ile yıkandı.
 - Hücre için hesaplanan EC50 değerleri ile hazırlanan vulpinik asit konsantrasyonları hücelere uygulandı ve 48 saat hücre kültürü koşullarında inkübasyona bırakıldı.
 - 48 saat sonunda besi yeri ve hücre çekilerek 15'lik falkona konuldu.
 - 2 ml SF ile yıkandı ve tekrar 15'lik falkona konuldu.
 - Üzerine 200 µl Tripsin-EDTA eklendi ve en fazla 5 dk olmak şartıyla beklendi.
 - Hücrelerin kalktığı mikroskopta gözlemlendikten sonra üzerine 5 ml besiyeri eklenerek 15'lik falkona alındı.
 - Falkon $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 1800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
 - Üstte kalan süpernatant boşaltıldı ve üzerine yaklaşık 13-14 ml soğuk PBS eklendi.
 - Falkon alt üst edildikten sonra tekrar $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 1800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
 - Tekrar üst sıvı boşaltıldı ve 1 ml soğuk PBS ile süspanse edildi.
 - Sıvı filtre ile süzöldükten sonra 1 µl YO-PRO, 1 µl PI ilave edildi.
 - 30 dk buz üzerinde inkübasyona bırakıldı.
 - Sonrasında flow sitometri ile analiz edildi (Şekil 3.4).
- * Çalışma boyunca falkonlar buz üzerinde tutulmasına dikkat edildi.



Şekil 3.4 Flow sitometri cihazı

Annexin V-EGFP bağlı hücreler plazma membranlarında yeşil boya göstermiştir. Membran bütünlüğünü kaybetmiş hücreler nükleus boyunca kırmızı boyanma (PI) ve hücre yüzeyinde (plazma membranı) yeşil boyanın (EGFP) bir halesini göstermiştir. Bu deney basamağı vulpinik asit sekonder metabolitleri için 3 tekrarlı olarak yapıldı.

3.2.11 Kaspaz-3 aktivitesinin belirlenmesi

CPP-32 hücre içi sistein proteazı olan Kaspaz 3, memeli hücrelerin apoptozisini başlatan ICE-ailesi proteazların/kaspazların aktivasyonunu başlatır. Proenzim olarak sentezlenen kaspaz 3 apoptozis aşamasında kaspaz kaskadının uyarılması ile aktif hale geçer. Kaspaz 3 enzimi, DEVD (Asp-Glu-Val-Asp) aminoasit motifi içeren PARP (poli ADP-riboz polimeraz) ve 70 kD büyüklüğündeki U1-ribonükleoprotein gibi molekülleri parçalar.

Hücre lizatındaki proteaz aktivasyonu kaspaz 3'ün pNA ile konjuge olması ile spesifik peptit olan DEVD ile tespit edilir. Kromofor madde olan pNA kaspaz 3 tarafından parçalanarak serbest kalır. pNA'nın ortaya çıkarttığı renk şiddeti spektrofotometrede 405 nm de okunur. Meydana gelen renk şiddeti hücre lizatındaki kaspaz 3 enzim aktivitesiyle doğru orantılı olarak kantitatif bir sonuç verir. Kaspaz 3 analizi “Sigma-Aldrich, Caspase-3 colorimetric assay” kiti Sigma-Aldrich, (Lot# 074M4123V) ile gerçekleştirildi (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5 Kaspaz-3 kit içeriği

5X Liziz Tamponu	5 ml
10X Reaksiyon Tamponu	20 ml
Kaspaz-3	5µg
Ac-DEVD-pNA Substrat	15 mg
Ac-DEVD-CHO İnhibitör	0.5 mg
p-Nitroanilin Standart	1 mg
Su	125 ml

Apoptotik hücrelerin hücre lizatının hazırlanması

- Hücreler 6 kuyucuklu plakalara her kuyucuğa 5×10^5 hücre/2 ml olacak şekilde uygulama grubu ve kontrol grubu için ikiye tekrarlı olarak ekildi.
- Hücreler 37°C’de %5 CO₂’li inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakıldı.
- EC50 değerleri belirlenmiş miktarlardaki vulpinik asit konsantrasyonları uygulandı ve 48 saat hücre kültürü şartlarında inkübasyona bırakıldı.
- 48 saat sonunda besiyeri çekilip atıldı ve hücreler 1 ml PBS ile yıkandı.
- Hücreler 50 µl soğutulmuş hücre liziz tamponu ile plakalardan kazındı. Bu işlemin buz üzerinde yapılmasına dikkat edildi.
- 1.5’lik ependorf tüpüne alınarak 15-20 dakika buz üzerinde inkübe edildi.
- 15 dakika 17000 g’de +4°C’de santrifüj yapıldı ve süpernatant yeni bir ependorf tüpüne aktarıldı (Lizatlar reaksiyon bittikten sonra aliquotlanarak -80°C’de saklandı).
- Kit içeriği çizelge 3.6’de gösterildiği gibi 96’lık plate’lere dağıtıldı.

Çizelge 3.6 Kaspaz-3 enzim aktivitesinin ölçülmesinde uygulanan bileşenlerin konsantrasyonu

	Hücre Lizatı	Kaspaz-3 5 µg/ml	Reaksiyon Tamponu	Kaspaz-3 İnhibitör Ac-DEVD-CHO 2 mM	Kaspaz-3 Substrat Ac-DEVD-CHO 20 mM
Blank	-----	-----	90 µl	-----	10 µl
Apoptoz için indüklenmemiş hücre lizatı	5 µl	-----	85 µl	-----	10 µl
Apoptoz için indüklenmemiş hücre lizatı + İnhibitör	5 µl	-----	75 µl	10 µl	10 µl
Apoptoz için indüklenmiş hücre lizatı	5 µl	-----	85 µl	-----	10 µl
Apoptoz için indüklenmiş hücre lizatı + İnhibitör	5 µl	-----	75 µl	10 µl	10 µl
Kaspaz-3 Pozitif Kontrol	-----	5 µl	85 µl	-----	10 µl
Kaspaz-3 Pozitif Kontrol	-----	5 µl	75 µl	10 µl	10 µl

- Plate yerleşiminin ardından 1,5-2 saat 37°C’de inkübasyona bırakıldı (Sarımsı bir renk gözlenmesi beklendi olmadığı takdirde gece boyu inkübasyona bırakıldı).
- Daha sonra plate 405 nm dalga boyunda eliza okuyucu cihazında analize alındı.
- Bu deney basamağı vulpinik asit sekonder metabolitleri için 3 tekrarlı yapıldı. Deney tekrarları sonucunda student-t testi yapılmıştır.

Standardın hazırlanması

- Toz halinde bulunan p-Nitroanilin standart 720 µl DMSO ile çözüldü.

- Hazırlanan stok standart solüsyonun 1/100 oranında reaksiyon tamponu ile dilüe edildi.
- Bu dilüsyon 405 nm’de ölçüldü.
- Gerçek konsantrasyon ölçüm sonucunda $\sigma^{Mm}=10.5$ formülü ile hesaplandı.

p-Nitroanilin kalibrasyon eğrisi çizimi

- p-Nitroanilin stok solüsyonu 1X reaksiyon tamponu kullanılarak 200 μ M ile 10 μ M aralığında konsantrasyonlar hazırlandı (Çizelge 3.7).
- Bu dilüsyonlar 100 μ l olarak kuyulara dağıtıldı.
- 405 nM’ de absorbansı okundu.

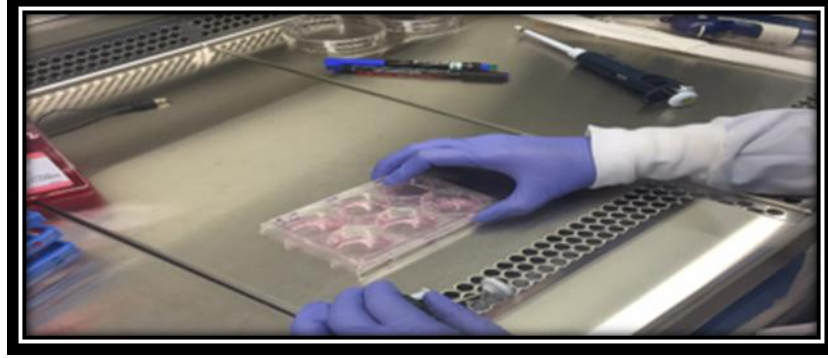
Çizelge 3.7 Kaspaz-3 enzim aktivitesinin belirlenmesindeki kalibrasyonun hazırlanması

μ M p-Nitroanilin	μ mol p-Nitroanilin 100 μ l
10	0.001
20	0.002
50	0.005
100	0.01
200	0.02

3.2.12 RNA izolasyonu öncesi hücre kültürünün uygun hale getirilmesi

MDA-MB-231, MCF-7, BT-474, SK-BR-3 ve MCF-12A hücreleri T-25’lik flasklar içerisinde çoğaltılmasının ardından hücreler 6 kuyucuklu steril plakalara her kuyucukta 5×10^5 hücre olacak şekilde optimize edilen miktarda hücreler dağıtılmıştır. Bu hücreler 24 saat 37°C’de %5 CO₂’li inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Ardından her bir hücre için GraphPad programı ile belirlenmiş EC50 (Half Maximal Effective Concentration) değerine karşılık gelen vulpinik asit konsantrasyonu uygulaması yapılmıştır. Her bir kanser ve hücre hattı için iki adet biyolojik tekrar kullanılmıştır. Ayrıca vulpinik asit

liken sekonder metabolitinin çözücüsü olan DMSO ve MEM ile de tüm hücreler aynı şekilde muamele edilmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5 EC50 konsantrasyonuna göre vulpinik asit uygulaması

3.2.13 RNA izolasyonu, miktar ve kalite tayini

RNA kolayca değrede olabilen bir molekül olduğu için izolasyon sürekli buz üzerinde gerçekleştirilir. Çalışmaya başlamadan önce santrifüjde +4°C'ye getirildi.

- RNA izolasyonu için hazır olan 6 kuyucuklu plaka da bulunan hücrelerin besiyeri çekilip atıldı ve hücreler 1 ml soğuk PBS ile iki kere yıkandı.
- Her kuyucuk için 1 ml TRizol (Genezol) eklendi ve scraper ile kazındı.
- Kazımanın ardından kalkan hücreler steril 1.5'lik ependorf tüplerine alındı.
- Hücrelerin gruplaşma ve yapışma ihtimaline karşı vortekslendi ve ince uçlu enjektörden geçirildi. Enjektör ucundan geçerken hücreler patlar.
- 1000 µl TRizol ve örnek karışımı için 1/5 oranında (200 µl) fenolü uzaklaştırmak amaçlı kloroform eklendi. Böylece kloroform fenol'ü bağlar ve dibe çöker böylece berrak faz üste çıkar.
- Kloroform eklendikten sonra tüpler sertçe çalkalandı ve 1-2 dakika beklendi.
- Tüpler kapak yönüne dikkat edilerek 14.000 rpm +4°C'de 25 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonunda üç faz oluştu.
 1. Berrak faz > RNA

2. Bulutsu (beyaz) faz > DNA

3. Pembe (organik) faz > Fenol ve Kloroform

- Berrak faz pipet yardımıyla dikkatlice alındı. Berrak fazın alt kısmında bulunan beyaz faza çok yaklaşılmadı aksi takdirde DNA kontaminasyonuna sebebiyet verilebilir.
- Başlangıç TRizol miktarının (1 ml) yarısı kadar 500 µl izopropanol suyu uzaklaştırmak amaçlı eklendi ve pipetaj yapıldı.
- Oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi.
- 14.000 rpm +4°C’de 25 dakika santrifüj edildi ve pellet oluştu.
- Tüp pellete dikkat edilerek boşaltıldı ve kuruması beklendi.
- Başlangıç TRizol miktarı kadar (1 ml) etanol (%70) ile 10.000 rpm +4°C’ de 5 dakika santrifüj edildi (Etanol TRizol kaynaklı tuzları uzaklaştırır).
- Tüp pellete dikkat edilerek boşaltıldı.
- Tekrar başlangıç TRizol miktarı kadar (1 ml) etanol (%70) ile 10.000 rpm +4°C’ de 5 dakika santrifüj edildi.
- Tüp pellete dikkat edilerek boşaltıldı ve ağzı açık bırakılarak etanol’ün uçması beklendi.
- Pellet 35-40 µl suda çözdürüldü ve iyice pipetaj yapıldı ve buz üzerine alındı.
- Nanodrop ND 1000 (Thermo Scientific) kullanılarak saflık ve konsantrasyonlarına bakıldı.

3.2.14 cDNA (komplementer DNA) sentezi

cDNA sentezi, Rosche First Strand cDNA Synthesis Kit (Rosche) kullanılarak gerçekleştirildi. Çizelge 3.8’de cDNA sentezinin ilk aşamasında hazırlanan total RNA ve primer karışımı içerisinde bulunan bileşenler ve son konsantrasyonları verilmiştir.

- Çizelge 3.8’de yer alan bileşenler buz üzerinde tutulan nükleaz free tüpe sırasıyla eklendi.

Çizelge 3.8 cDNA sentezi için total RNA ve primer konsantrasyonu

Komponent	Son Konsantrasyon
Total RNA	0.1 ng – 5 µg total RNA
Anchored-oligo(dT)18 Primer, 100 pmol/µl	1 µL
Saf su	Toplam hacim 13 µl'ye ayarlanır

- Total RNA–primer karışımı ısı döngü cihazında, 65°C’de 5 dakika bekletilerek RNA’nın ikincil yapısının denatürasyonu sağlandı.
- Isı döngü cihazından çıkan örnekler kırık buza saplanıp 5 dakika bekletildi.
- Ters transkripsiyon reaksiyonunun (RT-PCR) gerçekleştirilmesi için çizelge 3.9’da yer alan bileşenler sırasıyla eklendi.

Çizelge 3.9 Ters transkripsiyon reaksiyonu bileşenlerinin konsantrasyonları

Komponent	Miktar
5x Reaksiyon tamponu	4 µL
RiboLock RNase İnhibitör (20 U/µL)	0,5 µL
10 mM dNTP karışımı	2 µL
RevertAid H Minus M- MuL V Ters Transkriptaz (200 U/ µL)	0,5 µL
Toplam hacim	20 µL

- Pipetle hafifçe karıştırılıp, santrifüj edildi.
- Ters transkripsiyon reaksiyonu çizelge 3.10’da belirtilen programda, ısı döngü cihazında gerçekleştirildi.

Çizelge 3.10 Ters transkripsiyon reaksiyon koşulları

Primer	Hedef mRNA	RT Reaksiyonu İnkübasyon Süresi
Oligo(dT) ₁₈ primer	4 kb'a kadar	55 °C'de 30 dk
		85 °C'de 5 dk

- Elde edilen cDNA'lar Real time PCR reaksiyonu gerçekleştirilene kadar -20 °C'de muhafaza edildi.
- Sonrasında RNA örneklerinden sentezlenmiş cDNA'ların saflık ve miktar ölçümleri gerçekleştirildi.

3.2.15 Primer dizaynı

Çalışmada housekeeping gen olarak kullanılan GAPDH ve hedef gen bölgelerine ait olan TP53, Bcl-2, Bax, BIRC5, kaspaz 3, kaspaz 7, kaspaz 8 ve kaspaz 9 primerlerinin sentezi, gen bankasında (NCBI) yer alan dizilerden hedef hücre hattı orjinal kaynağına en yakın homolojiyi gösterenler kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.11). Sentezlenen primerler için erime eğrisi (melting curve) analizi yapıldı ve primer dimer oluşumu ve özgül olmayan amplifikasyon ürünleri gibi hataların olup olmadığı gözlemlenmiştir.

Çizelge 3.11 Çalışmada kullanılan apoptozla ilişkili gen bölgeleri için tasarlanan primer dizileri

Primer	Sekans (5'→3')	Primer uzunluğu (bç)	Bağlanma Sıcaklığı (T _m)
TP53-F	5'-TAC CAC CAT CCA CTA CAA CT-3'	20mer	60.0 °C
TP53-R	5'-CAG AGG CAC AAA CAC GCA C-3'	19 mer	60.0 °C
Bcl-2-F	5'-ATG TGT GTG GAG AGC GTC AACC-3'	22mer	65.0 °C
Bcl-2-R	5'-TGA GCA GAG TCT TCA GAG ACA GCC-3'	24mer	65.0 °C
Bax-F	5'-TTT CTG ACG GCA ACT TCA ACT GGGT-3'	24mer	65.0 °C
Bax-R	5'-TGT CCA GCC CAT GAT GGT TCT GAT-3'	24mer	65.0 °C

Çizelge 3.11 Çalışmada kullanılan apoptozla ilişkili gen bölgeleri için tasarlanan primer dizileri

Primer	Sekans (5'→3')	Primer uzunluğu (bp)	Bağlanma Sıcaklığı (T _m)
GAPDH-F GAPDH-R	5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT C-3' 5'-GAA AGA TGG TGA TGG GAT TT-3'	19mer 20mer	60.0 °C 60.0 °C
BIRC5-F BIRC5-R	5'-AGC CCT TTC TCA AGG ACC AC-3' 5'-TGG CTC GTT CTC AGT GGG GCA GT-3'	20mer 23mer	60.5 °C 68.2 °C
Kaspaz 3-F Kaspaz 3-R	5'-TGT TTG TGT GCT TCT GAG CC-3' 5'-CAC GCC ATG TCA TCA TCA AC-3'	20mer 20mer	58.4 °C 58.4 °C
Kaspaz 7-F Kaspaz 7-R	5'-CCA ATA AAG GAT TTG ACA GCC-3' 5'-GCA TCT GTG TCA TTG ATG GG-3'	21mer 20mer	57.4 °C 58.4 °C
Kaspaz 8-F Kaspaz 8-R	5'-GAT CAA GCC CCA CGA TGA C-3' 5'-CCT GTC CAT CAG TGC CAT AG-3'	19mer 20mer	59.5 °C 60.5 °C
Kaspaz 9-F Kaspaz 9-R	5'-CAT TTC ATG GTG GAG GTG AAG-3' 5'-GGG AAC TGC AGG TGG CTG-3'	21mer 18mer	59.4 °C 60.7 °C

(F: Forward/İleri, R: Reverse/Geri)

3.2.16 Real-time PCR uygulaması

Real-Time PCR uygulaması Roche Light Cycler 480 Real Time cihazı aracılığıyla SYBR Green I Master boyası kullanılarak gerçekleştirildi. Çalışılması hedeflenen genlere ait diziler NCBI veri tabanında araştırılıp çıkarılmış ve bölgeye özgü primerler tasarlanarak sentezletirilmiştir. Ayrıca ekspresyon çalışmaları için gerekli şartlardan birisi olan normalizasyon işleminde bir housekeeping (referans) gen olan GAPDH geni kullanılmıştır. Real-Time PCR yöntemi ile kantitasyon (gen ekspresyonu miktarı belirleme) çalışması SYBR Green I boyası kullanılarak gerçekleştirilmiş ve kantitasyonu takiben PCR'ın etkinliğini saptamak ve herhangi bir dimer oluşumu olup olmadığını gözlemlemek amacıyla erime eğrisi (melting curve) analizi yapılmıştır. Kontrol grubu ile TP53, Bcl-2, Bax, BIRC5, kaspaz 3, kaspaz 7, kaspaz 8 ve kaspaz 9 gen bölgesi için tasarlanan bütün primerlerin gerçek zamanlı PCR reaksiyonları denenerek optimizasyonu sağlanmıştır. En iyi sonucu veren TP53, Bcl-2, Bax, BIRC5, kaspaz 3, kaspaz 7, kaspaz 8 ve kaspaz 9 primeleri ile çoğaltma işlemi gerçekleştirilmiştir. Kontrol örnekleri ile gerçekleştirilen primer optimizasyonu çalışmaları sonrasında bütün örneklerin gerçek zamanlı PCR reaksiyonu yapılmıştır.

Vulpinik asit uygulamaları sonrasında seçilen örneklerin gerçek zamanlı PCR reaksiyonları üç tekrarlı (teknik tekrar) olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Gerçek zamanlı PCR reaksiyonu çizelge 3.12’de verilen komponentler ile hazırlanmış olup saf su ile toplam hacim 20 µl’ye ayarlanarak Roche Light Cyler 480 Real-Time cihazında çizelge 3.13’de verilen programda çoğaltılmıştır.

Çizelge 3.12 Real Time PCR reaksiyon bileşenleri konsantrasyonu

Komponent	Son Konsantrasyon
cDNA	1,5 µl
İleri (Forward) Primer	0,7 µl
Geri (Reverse) Primer	0,7 µl
SYBR® Green Master Mix	10 µl
Toplam hacim 20 µl’dir.	

Çizelge 3.13 Real Time PCR reaksiyon koşulları

Primer	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Ön denatürasyon	95 °C	10 s	1
Denatürasyon	95 °C	10 s	40
Bağlanma	60 °C	10 s	
	72 °C	8 s	
Erime	95 °C	30 s	1
Eğrisi Analizi	60 °C	30 s	
	99 °C sürekli okuma		

GAPDH, TP53, Bcl-2, Bax, BIRC5, kaspaz 3, kaspaz 7, kaspaz 8 ve kaspaz 9 genlerinin vulpinik asit uygulaması sonrasında alınmış örneklerin Real-Time PCR reaksiyonu

Roche Light Cycler 480 Real Time cihazında, Relative Standard Curve'de gerçekleştirilmiş ve gerçek zamanlı olarak izlenerek pik profilleri kaydedilmiştir. Cycle Treshold (Ct) değeri polimeraz zincir reaksiyonuna ait pik profilinde logaritmik artışa geçilen ilk noktayı belirtmektedir. Real time PCR reaksiyonları sonrasında elde edilen pik profillerinden her bir örneğe ait Ct değerleri belirlenmiştir.

3.2.17 Normalizasyon ve istatistiksel hesaplamalar

Vulpinik asit uygulanan örneklerden de üçer tekrarlı olacak şekilde Real Time PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Vulpinik asit uygulanmış hücrelere ait transkript profilleri kontrol profilleri ve housekeeping gen olarak seçilen GAPDH ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi Livak ve Schmittgen'in $2^{-\Delta\Delta CT}$ metoduna göre yapılmıştır (Vousden 2000).

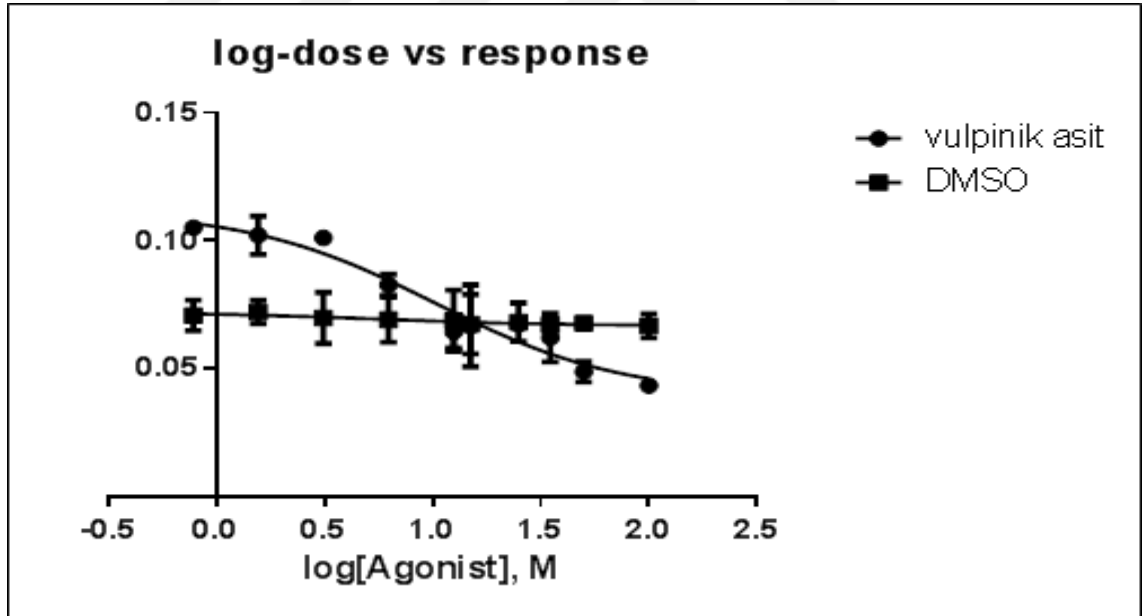
3.2.18 Veri analizi

qRT-PCR analizi sonrası ham Cp (crossing point) değerleri olarak elde edilmiş ve $\Delta\Delta Ct$ metodu kullanılarak analiz edilmiştir. Her bir gen ifade seviyesi referans genlerin (GAPDH) ifadeleri ile normalize edilerek hesaplanmış daha sonra hücre hatlarındaki her bir gen değişimi birbirleri ile kıyaslanmıştır. Bu verilerin ortalama, standart sapma, standart hata ve istatistiksel olarak anlamlılık dereceleri istatistik programı (SPSS 15) ile hesaplanmıştır. RNA kalitesi ve $\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{örnek 2}) - \Delta CT (\text{örnek 1})$ formülü ile her bir RNA için $\Delta\Delta CT$ değerleri hesaplanır. Son olarak her bir gen için $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ ile kat değişimleri hesaplanmıştır.

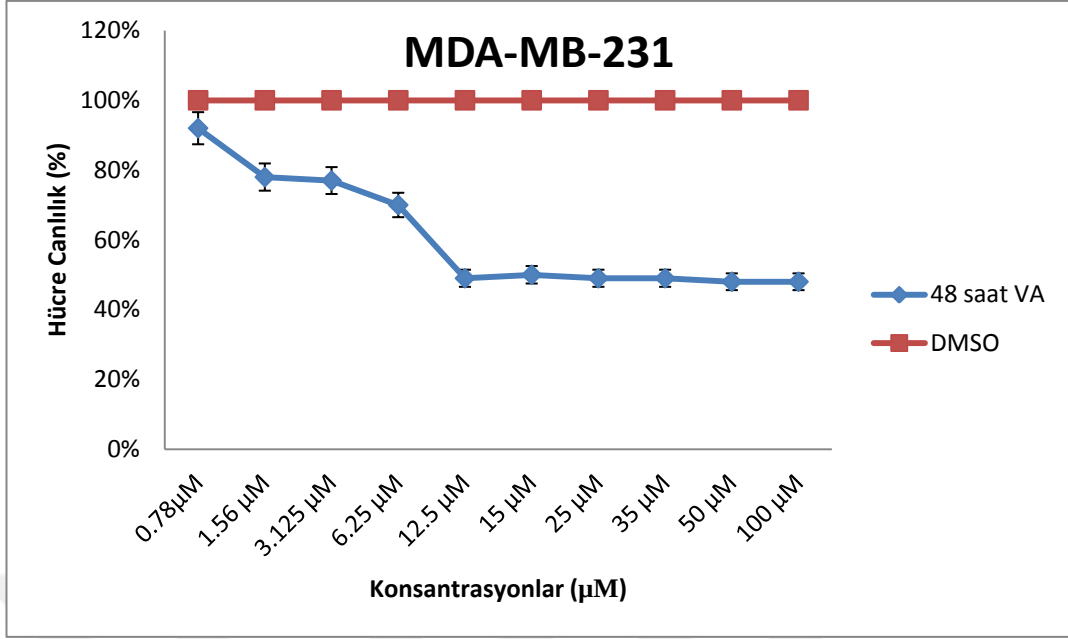
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Farklı Dozlarda Vulpinik Asit Konsantrasyonları Uygulanan Meme Hücre Hatlarında MTT Testi Sonuçları

Vulpinik asitin 100, 50, 35, 25, 15, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56 ve 0.78 μM 'dan oluşan konsantrasyonların MDA-MB-231, MCF-7, BT-474, SK-BR-3 meme kanseri hücre hattına ve MCF-12A (meme normal) hattına uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılığı tespiti için yapılan MTT sonuçlarının Graph-Pad ve Excel grafik gösterimi şekil 4.1-4.10 arasında verilmiştir. Belirlenen dozlardaki vulpinik asitin üç tekrarlı olarak uygulaması sonucunda kanser hücrelerinde yüksek oranda hücre ölümü görülürken vulpinik asit ile aynı konsantrasyonlarda hazırlanan ve vulpinik asit çözücüsü olarak kullanılan DMSO ile muamele edilen hücrelerde herhangi bir hücre ölümü görülmemiştir.



Şekil 4.1 MDA-MB-231 hücresinin 48 saat belirlenen dozlarla vulpinik asit muamelesi sonucunda elde edilen doz eğrisi

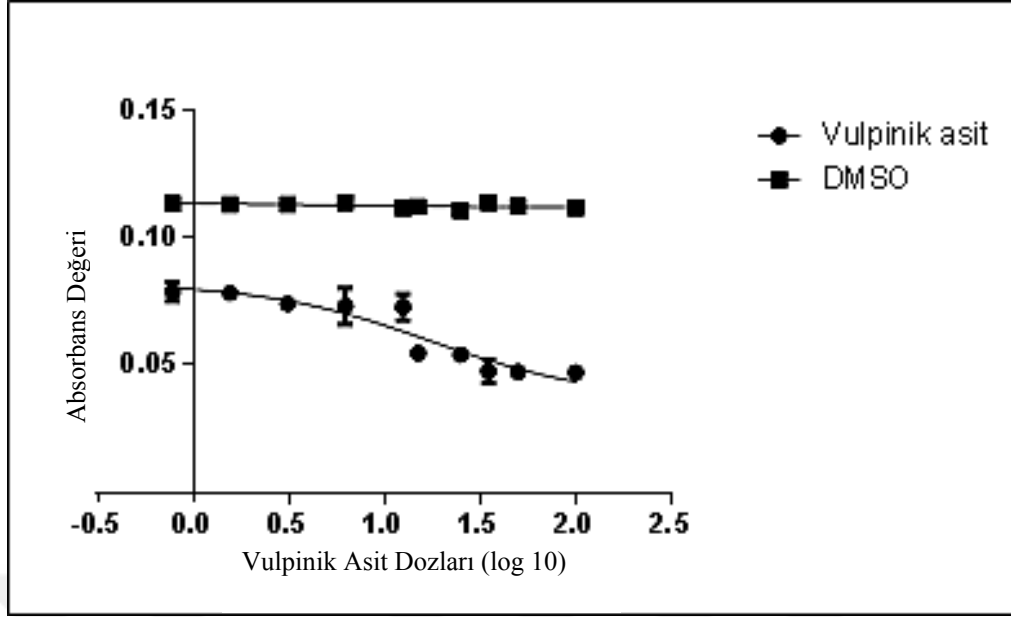


Şekil 4.2 MDA-MB-231 hücrelerinin 48 saat belirlenen dozlarla vulpinik asit muamelesi sonucunda elde edilen grafik

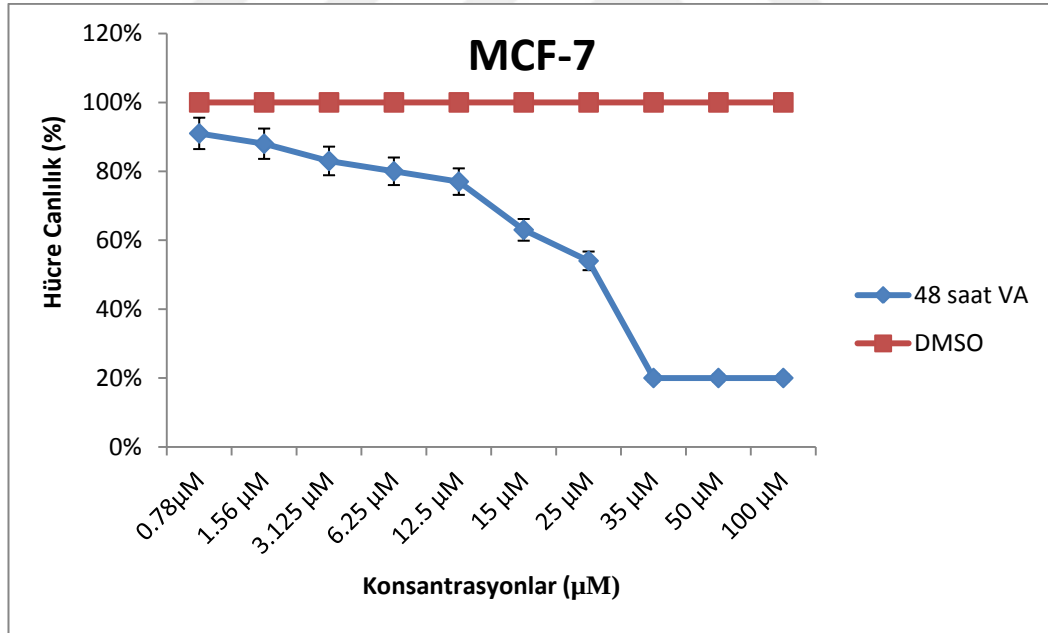
Çizelge 4.1 MDA-MB-231 hücrelerine uygulanan vulpinik asit konsantrasyonlarına ait hücre canlılık testi sonuçları

Dozlar	% Canlılık
0.78μM	%92
1.56 μM	%78
3.125 μM	%77
6.25 μM	%70
12.5 μM	%49
15 μM	%50
25 μM	%49
35 μM	%49
50 μM	%48
100 μM	%48

Şekil 4.1-4.2’de gösterildiği gibi MDA-MB-231 hücrelerine belirlenen dozlarda 48 saat vulpinik asit muamelesi sonucunda hücre canlılık oranının azaldığı görülmüştür ve hücre hattına ait doz cevap eğrisinde 11 μM konsantrasyonda %55 oranında hücre canlılığında azalma görülmüştür ($p < 0.001$).



Şekil 4.3 MCF-7 hücresinin 48 saat belirlenen dozlarla vulpinik asit muamelesi sonucunda elde edilen doz eğrisi

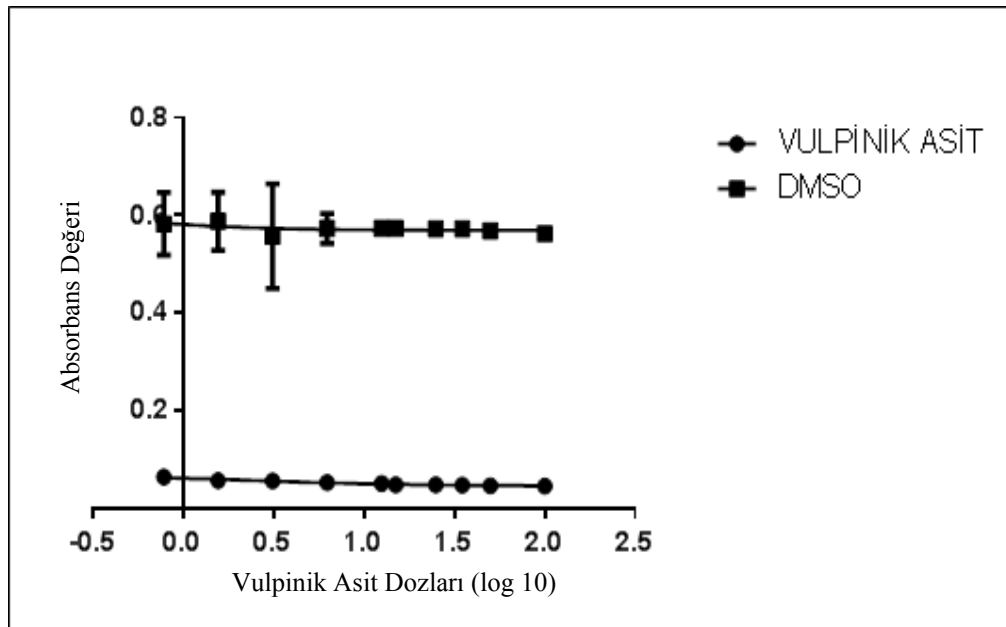


Şekil 4.4 MCF-7 hücresinin 48 saat belirlenen dozlarla vulpinik asit muamelesi sonucunda elde edilen grafik

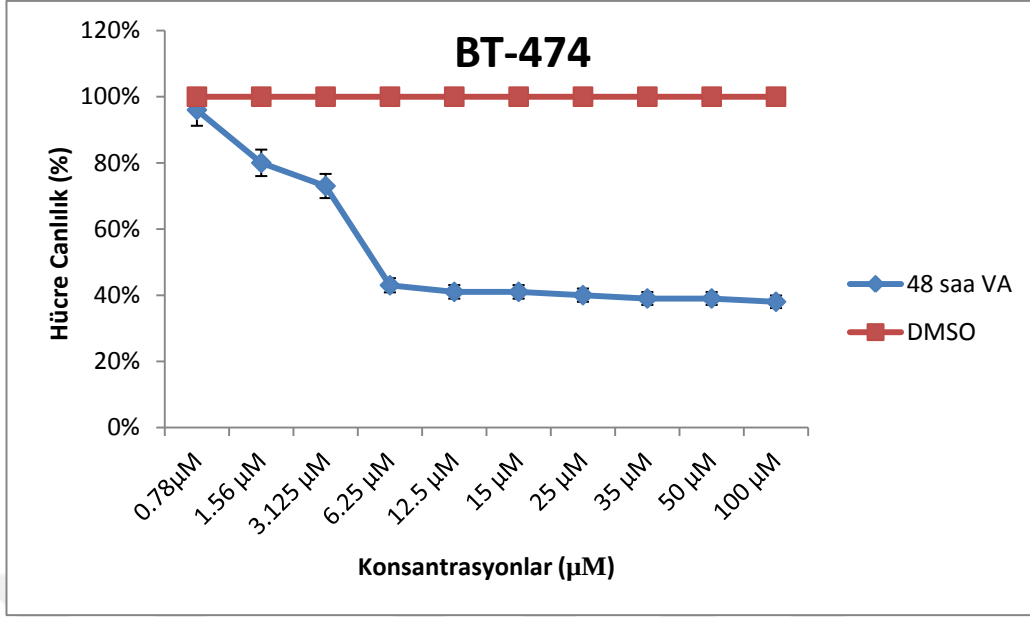
Çizelge 4.2 MCF-7 hücrelerine uygulanan vulpinik asit konsantrasyonlarına ait hücre canlılık testi sonuçları

Dozlar	%Canlılık
0.78µM	%91
1.56 µM	%88
3.125 µM	%83
6.25 µM	%80
12.5 µM	%77
15 µM	%63
25 µM	%54
35 µM	%20
50 µM	%20
100 µM	%20

Şekil 4.3-4.4’de gösterildiği gibi MCF-7 hücrelerine belirlenen dozlarda 48 saat vulpinik asit muamelesi sonucunda hücre canlılık oranının azaldığı görülmüştür ve hücre hattına ait doz cevap eğrisinde 18 µM konsantrasyonda %52,5 oranında hücre canlılığında azalma görülmüştür ($p<0.007$).



Şekil 4.5 BT-474 hücrelerinin 48 saat belirlenen dozlarla vulpinik asit muamelesi sonucunda elde edilen doz eğrisi

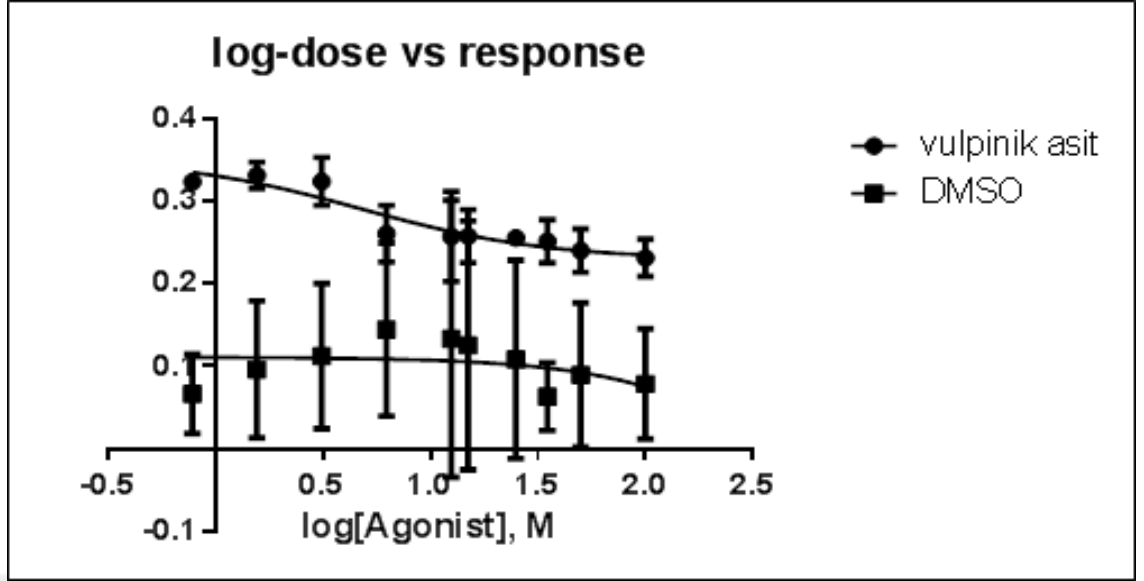


Şekil 4.6 BT-474 hücresinin 48 saat belirlenen dozlarla vulpinik asit muamelesi sonucunda elde edilen grafik

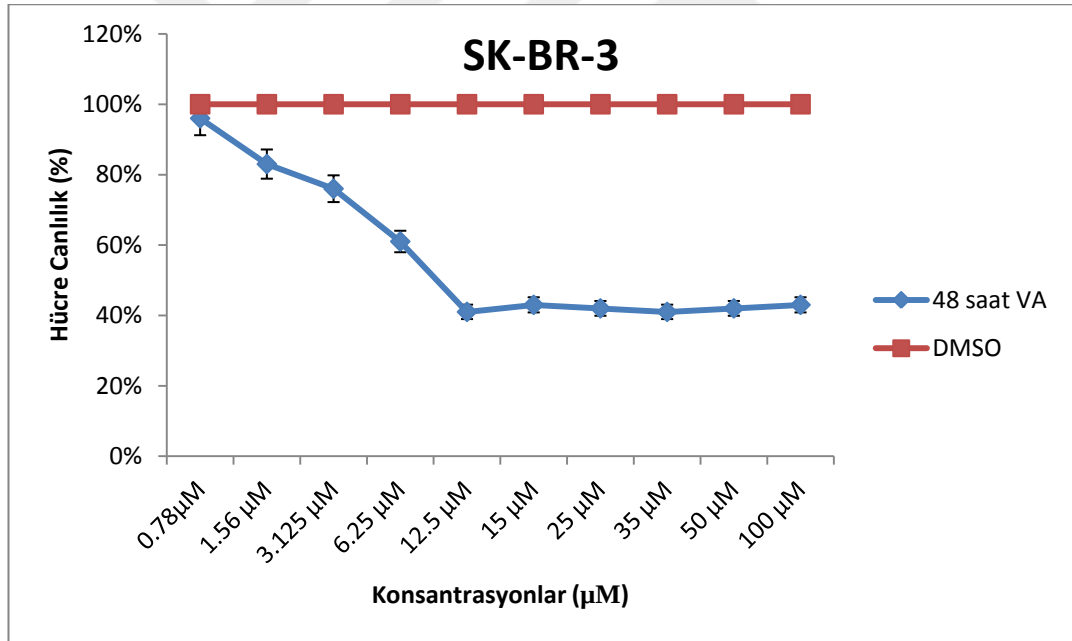
Çizelge 4.3 BT-474 hücrelerine uygulanan vulpinik asit konsantrasyonlarına ait hücre canlılık testi sonuçları

Dozlar	%Canlılık
0.78μM	%96
1.56 μM	%80
3.125 μM	%73
6.25 μM	%43
12.5 μM	%41
15 μM	%41
25 μM	%40
35 μM	%39
50 μM	%39
100 μM	%39

Şekil 4.5-4.6’da gösterildiği gibi BT-474 hücrelerine belirlenen dozlarda 48 saat vulpinik asit muamelesi sonucunda hücre canlılık oranının azaldığı görülmüştür ve hücre hattına ait doz cevap eğrisinde 5 μM konsantrasyonda %53,75 oranında hücre canlılığında azalma görülmüştür ($p < 0.006$).



Şekil 4.7 SK-BR-3 hücresinin 48 saat belirlenen dozlarla vulpinik asit muamelesi sonucunda elde edilen doz eğrisi

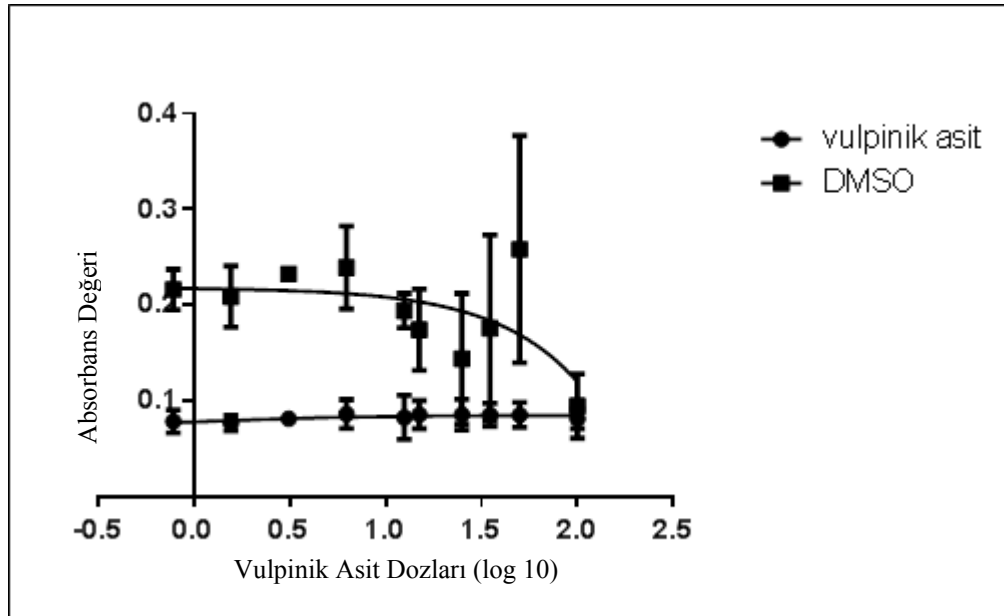


Şekil 4.8 SK-BR-3 hücresinin 48 saat belirlenen dozlarla vulpinik asit muamelesi sonucunda elde edilen grafik

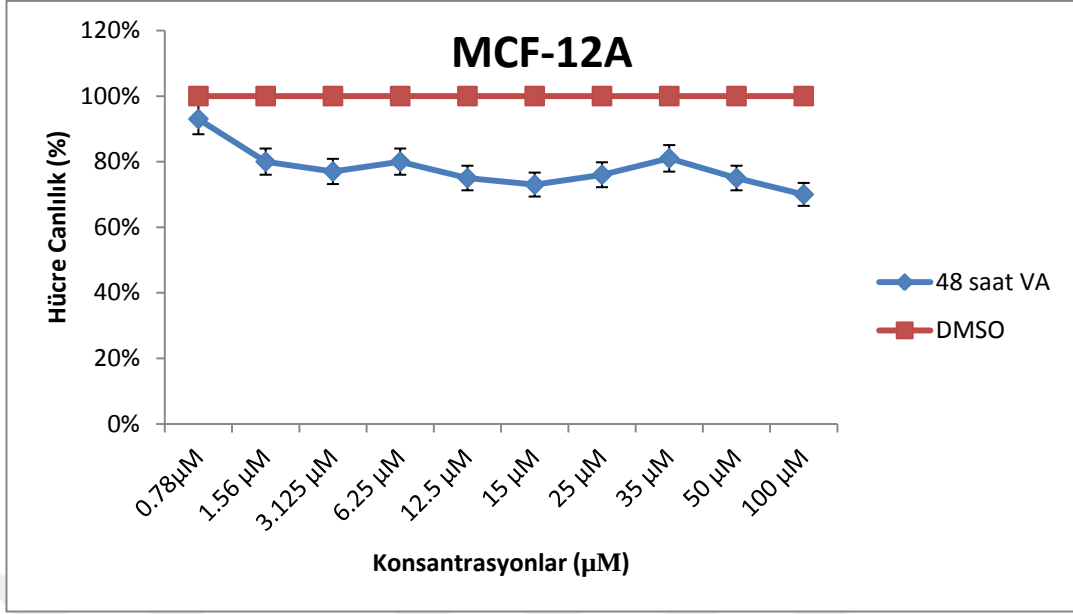
Çizelge 4.4 SK-BR-3 hücrelerine uygulanan vulpinik asit konsantrasyonlarına ait hücre canlılık testi sonuçları

Dozlar	%Canlılık
0.78 μ M	%96
1.56 μ M	%83
3.125 μ M	%76
6.25 μ M	%61
12.5 μ M	%41
15 μ M	%43
25 μ M	%42
35 μ M	%41
50 μ M	%42
100 μ M	%43

Şekil 4.7-4.8’de gösterildiği gibi SK-BR-3 hücrelerine belirlenen dozlarda 48 saat vulpinik asit muamelesi sonucunda hücre canlılık oranının azaldığı görülmüştür ve hücre hattına ait doz cevap eğrisinde 10 μ M konsantrasyonda %51,25 oranında hücre canlılığında azalma görülmüştür ($p<0.003$).



Şekil 4.9 MCF-12A (Normal meme hücresi) hücrelerinin 48 saat belirlenen dozlarla vulpinik asit muamelesi sonucunda elde edilen doz eğrisi



Şekil 4.10 MCF-12A hücresinin 48 saat belirlenen dozlarla vulpinik asit muamelesi sonucunda elde edilen grafik

Çizelge 4.5 MCF-12A hücrelerine uygulanan vulpinik asit konsantrasyonlarına ait hücre canlılık testi sonuçları

Dozlar	%Canlılık
0.78μM	%92,8
1.56 μM	%80
3.125 μM	%77
6.25 μM	%80
12.5 μM	%75
15 μM	%73
25 μM	%76
35 μM	%81
50 μM	%75
100 μM	%70

Belirlenen vulpinik asit konsantrasyonları MCF-12A hücrelerine uygulanması sonucunda hücre canlılığında çok düşük oranlarda değişme olduğu görülmüştür ($p < 0.003$). Deneyin kontrolünü sağlamak için normal hücre hattında diğer kanserli hücrelerin EC50 değerlerine yakın oranda yani 10 μM konsantrasyonda vulpinik asit uygulaması yapılmıştır.

4.2 MTT Testi Sonucunda EC50 Değerinin Belirlenmesi

Tez çalışmalarının ön denemelerinde liken sekonder metaboliti olan vulpinik asitin MTT testi sonucunda da hücre canlılığındaki azalma için tüm hücrelerde en etkili zamanın 48 saat olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle tez kapsamında 48 saatin etkinliği tercih edilmiştir. EC50 değerlerinin hesaplanabilmesi için MTT testi sonucunda spektrofotometrede okuma sonucu alınan absorbans değerleri (OD değerleri) logaritma (log10) tabanına çevrilmiş, daha sonra GraphPad Prism 6 programı kullanılarak hesaplamalar yapılmıştır. Sonuçlar çizelge 4.6’da gösterilmiştir.

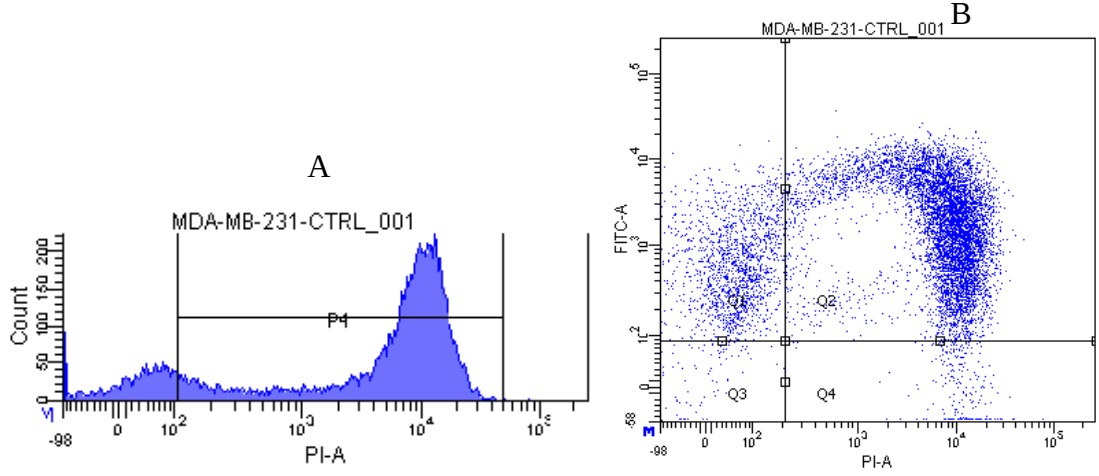
Çizelge 4.6 Çalışılan tüm meme hücre hatlarına karşı uygulanan vulpinik asit konsantrasyonu sonrası belirlenen EC50 değeri

HÜCRE HATTI	EC50
MDA-MB-231	11 μ M
MCF-7	18 μ M
BT-474	5 μ M
SK-BR-3	10 μ M
MCF-12A	*

* Vulpinik asit uygulanan kanserli hücrelerde tespit edilen EC50 değerinin yaklaşık ortalama değerine yakın olacak şekilde tarafımızca EC50 değeri 10 μ M olarak belirlenmiştir. Böylece MTT testi sonucunda Vulpinik asit’in her ne kadar normal hücre üzerine etkisini çok düşük oranlarda belirlensedeki kontrol amaçlı bundan sonraki deneylerde 10 μ M vulpinik asit konsantrasyonu uygulanmıştır.

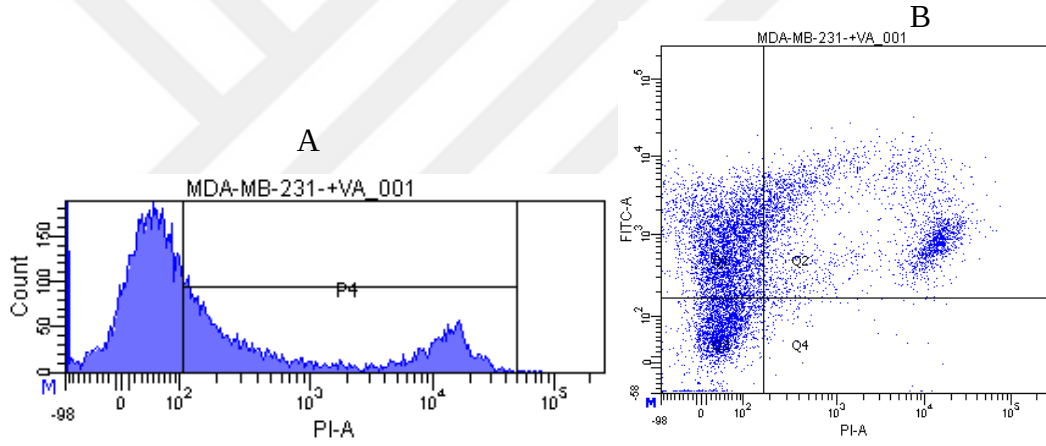
4.3 Annexin V Uygulaması ile Flow Sitometride Apoptoz Sürecine Olan Etkinin Belirlenmesi

MDA-MB-231 hücrelerine 48 saat süre ile iki tekrarlı olacak şekilde 11 μ M vulpinik asit uygulaması sonucunda flow sitometri cihazında apoptotik etkinin belirlenmesi amaçlı alınan sonuçlara göre hücrelerin %42’si erken apoptoza girerken %37’si ölmüştür. Bu sonuçlara göre MDA-MB-231 hücrelerinin yaklaşık %79’u apoptoz süreci ile hücre ölüme gitmiştir (Şekil 4.11-4.13).



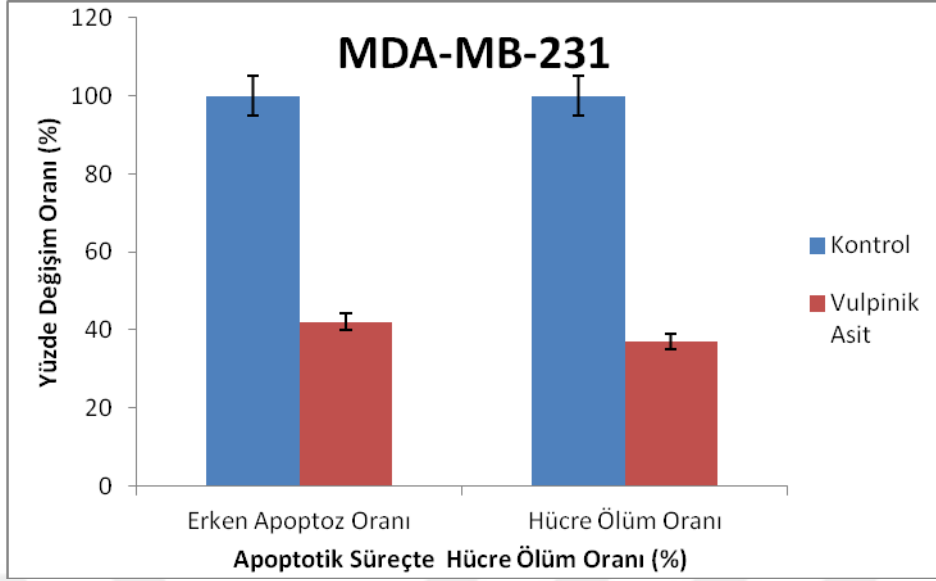
Şekil 4.11 MDA-MB-231 hücresi kontrol örneğine göre flow sitometri grafikleri

A: Pozitif Kontrol, B: Apoptoza giren hücre ayırımı ve kantitatif yüzde analizi



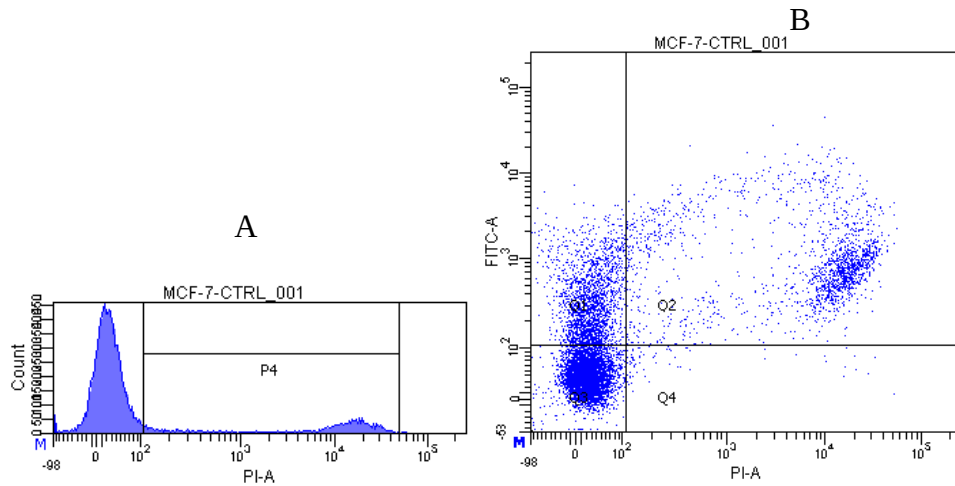
Şekil 4.12 MDA-MB-231 hücresine vulpinik asit uygulanması sonrası flow sitometri grafikleri

A: Pozitif Kontrol, B: Apoptoza giren hücre ayırımı ve kantitatif yüzde analizi



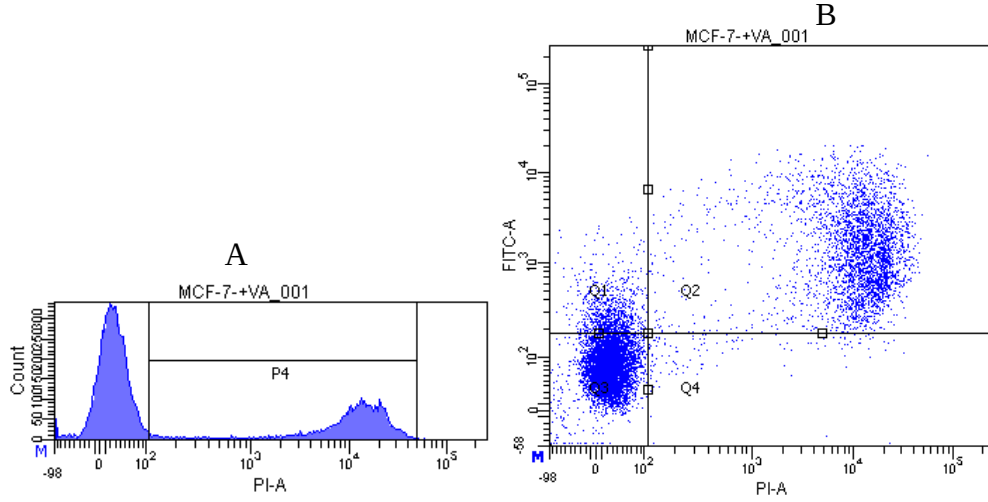
Şekil 4.13 MDA-MB-231 hücrelerinin erken apoptoz ve hücre ölüm oranı

MCF-7 hücrelerine 48 saat süre ile iki tekrarlı olarak 18 μ M vulpinik asit uygulaması sonucunda flow sitometri cihazında apoptotik etkinin belirlenmesi amaçlı alınan okuma sonuçlarına göre hücrelerin %40'ı erken apoptoza girerken %53'ü ölmüştür. Bu sonuçlara göre MCF-7 hücrelerinin yaklaşık %93'ü apoptoz süreci ile ölüm yoluna gitmiştir (Şekil 4.14-4.16).



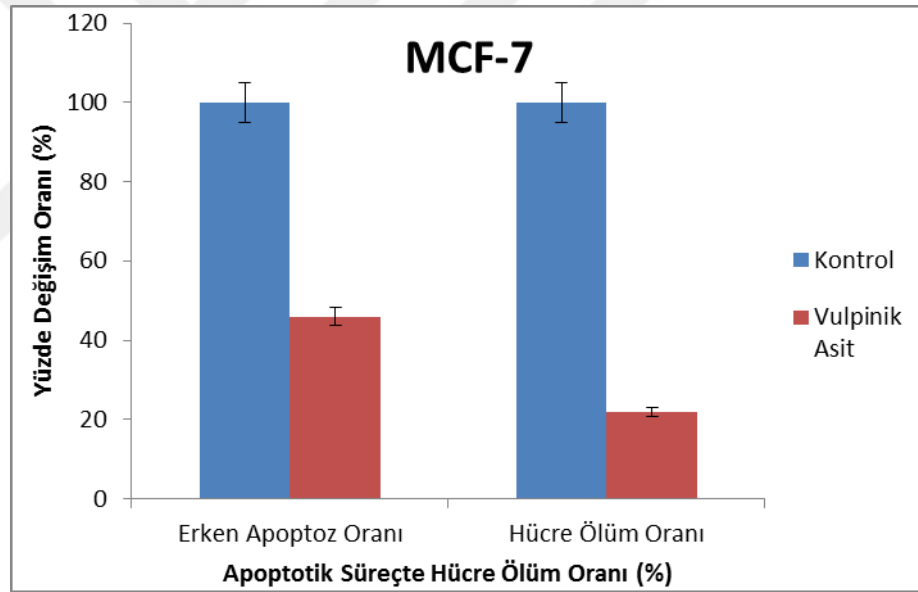
Şeki 4.14 MCF-7 hücresi kontrol örneğine göre flow sitometri grafikleri

A: Pozitif Kontrol, B: Apoptoza giren hücre ayırımı ve kantitatif yüzde analizi



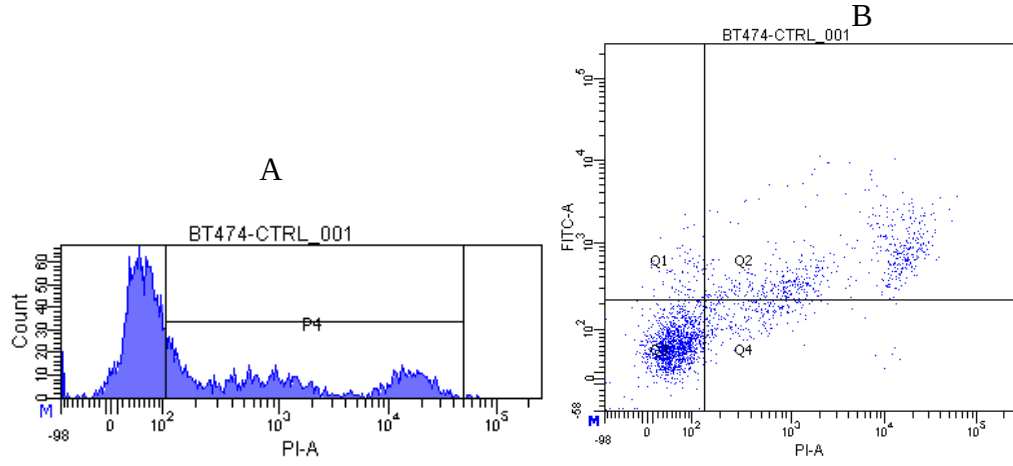
Şekil 4.15 MCF-7 hüresine vulpinik asit uygulaması sonrası flow sitometri grafikleri

(A: Pozitif Kontrol, B: Apoptoza giren hücre ayrımı ve kantitatif yüzde analizi)



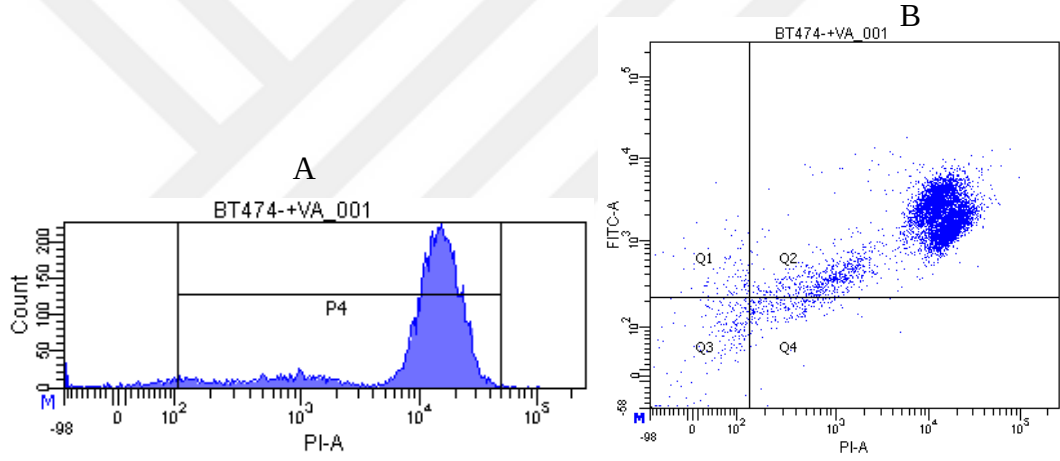
Şekil 4.16 MCF-7 hücrelerinin erken apoptoz ve hücre ölüm oranı

BT-474 hüresine 48 saat süre ile iki tekrarlı olarak 5 μ M vulpinik asit uygulaması sonucunda flow sitometri cihazında apoptotik etkinin belirlenmesi amaçlı alınan okuma sonuçlarına göre hücrelerin %41'i erken apoptoza girerken %29'u ölmüştür. Bu sonuçlara göre BT-474 hüresinin yaklaşık %70'i apoptoz süreci ile ölüm yoluna gitmiştir (Şekil 4.17-4.19).



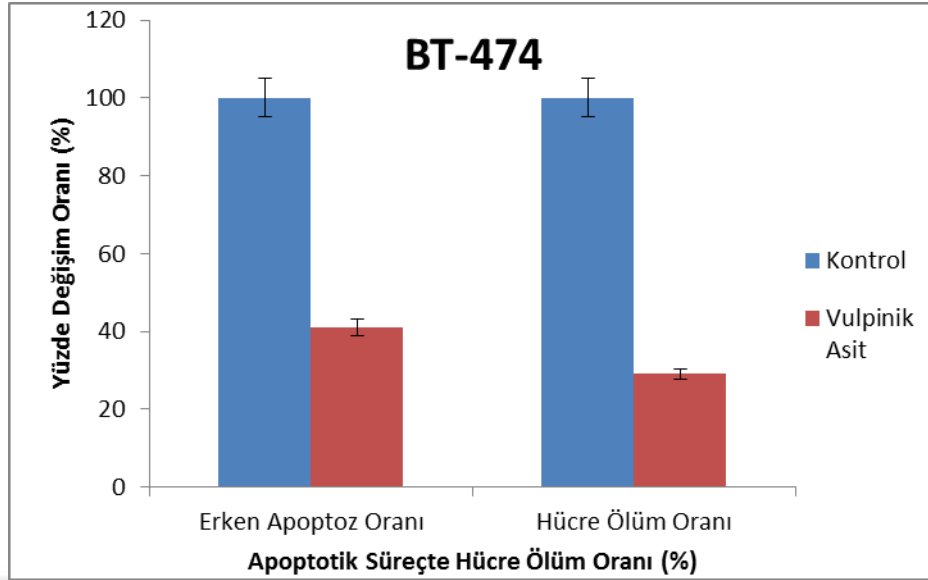
Şekil 4.17 BT-474 hücresi kontrol örneğine göre flow sitometri grafikleri

A: Pozitif Kontrol, B: Apoptoza giren hücre ayırımı ve kantitatif yüzde analizi



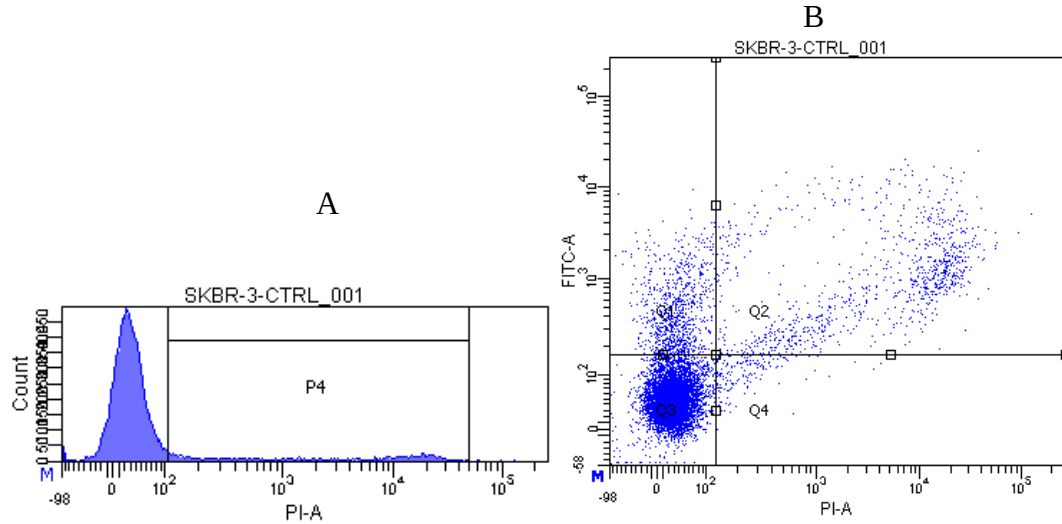
Şekil 4.18 BT-474 hücresine vulpinik asit uygulaması sonrası flow sitometri grafikleri

A: Pozitif Kontrol, B: Apoptoza giren hücre ayırımı ve kantitatif yüzde analizi



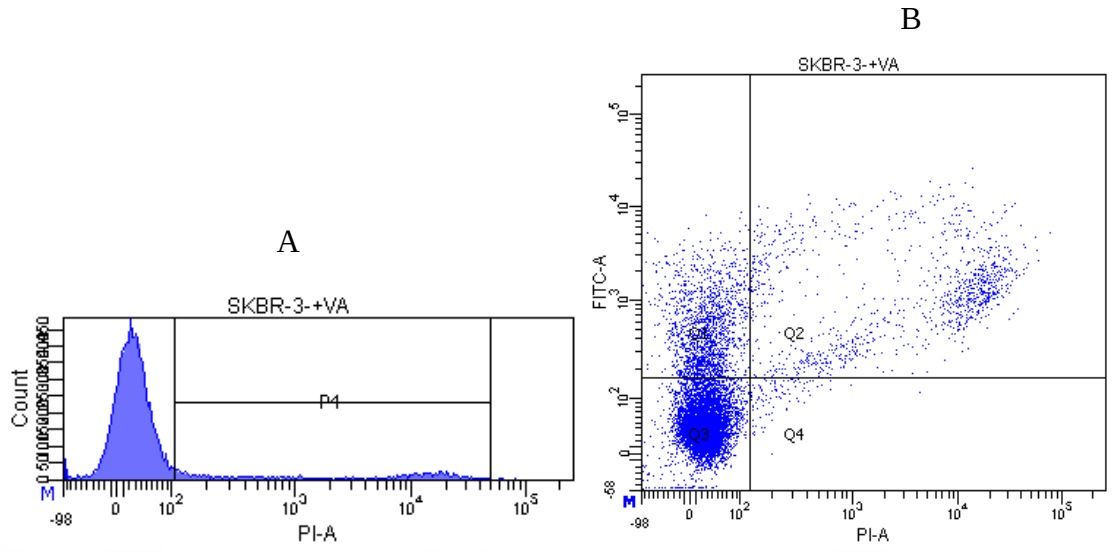
Şekil 4.19 BT-474 hücrelerinin erken apoptoz ve hücre ölüm oranı

SK-BR-3 hücrelerine 48 saat süre ile iki tekrarlı olacak şekilde 10 μ M vulpinik asit uygulaması sonucunda flow sitometri cihazında apoptotik etkinin belirlenmesi amaçlı alınan sonuçlara göre %35'i erken apoptoza girerken %31'i ölmüştür. Bu sonuçlara göre SK-BR-3 hücrelerinin yaklaşık %66'sı apoptoz süreci ile ölüm yoluna gitmiştir (Şekil 4.20-4.22).



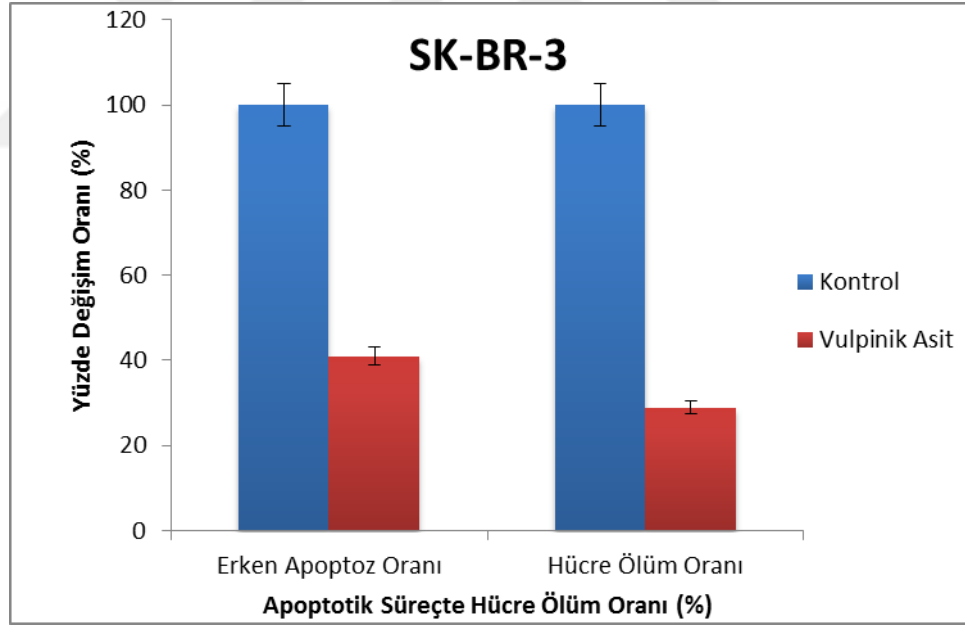
Şekil 4.20 SK-BR-3 hücresi kontrol örneğine göre flow sitometri grafikleri

A: Pozitif Kontrol, B: Apoptoza giren hücre ayrımı ve kantitatif yüzde analizi



Şekil 4.21 SK-BR-3 hüresine vulpinik asit uygulaması sonrası flow sitometri grafikleri

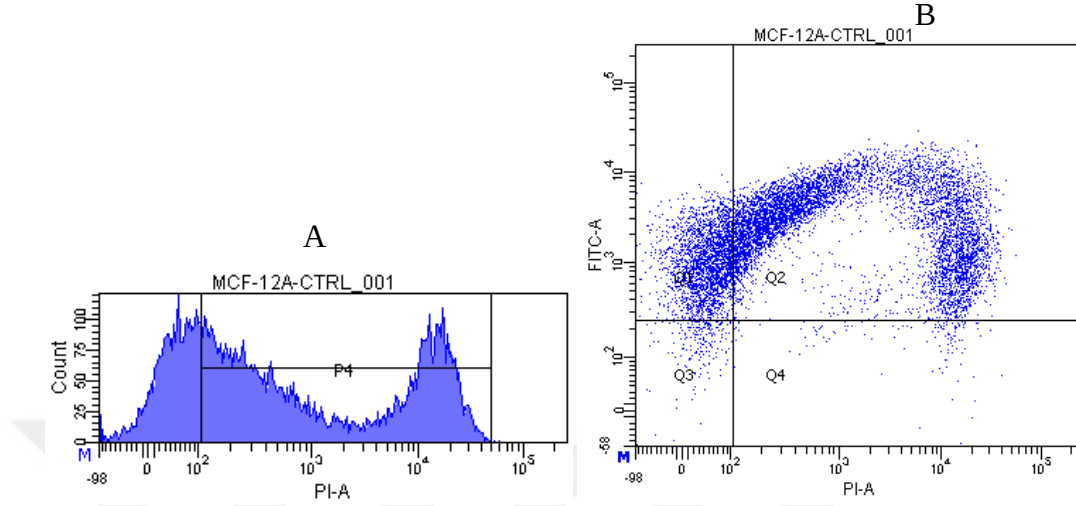
A: Pozitif Kontrol, B: Apoptoza giren hücre ayrımı ve kantitatif yüzde analizi



Şekil 4.22 SK-BR-3 hücrelerinin erken apoptoz ve hücre ölüm oranı

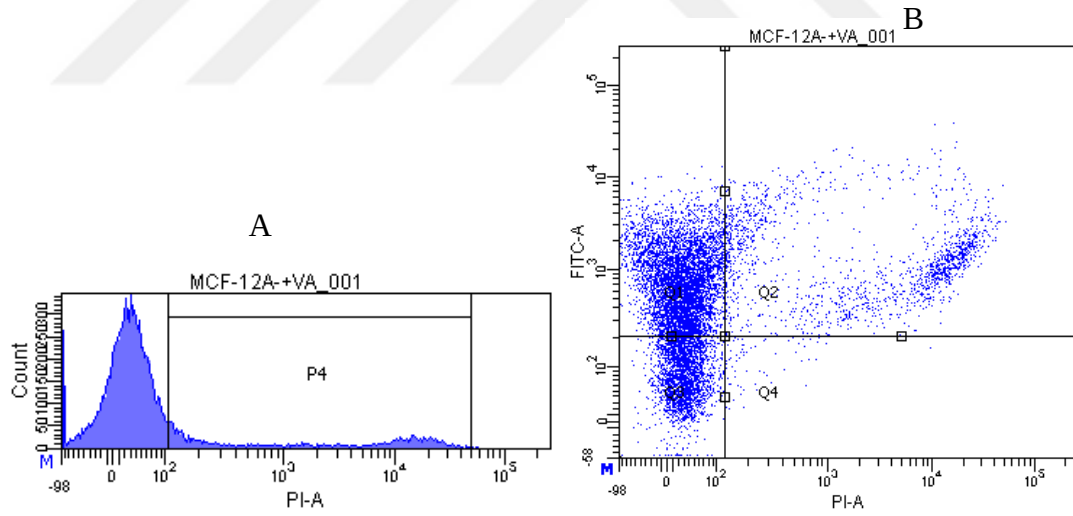
MCF-12A hüresine 48 saat süre ile iki tekrarlı olacak şekilde 10 μ M vulpinik asit uygulaması sonucunda flow sitometri cihazında apoptotik etkinin belirlenmesi amaçlı alınan sonuçlara göre %20'si erken apoptoza girerken %15 ölmüştür. Bu sonuçlara göre

MCF-12A hücresinin yaklaşık %35'i apoptoz süreci ile ölüm yoluna gitmiştir. Kanserli hücelere göre çok daha düşük yüzdelerde görülmüştür (Şekil 4.23-4.25).



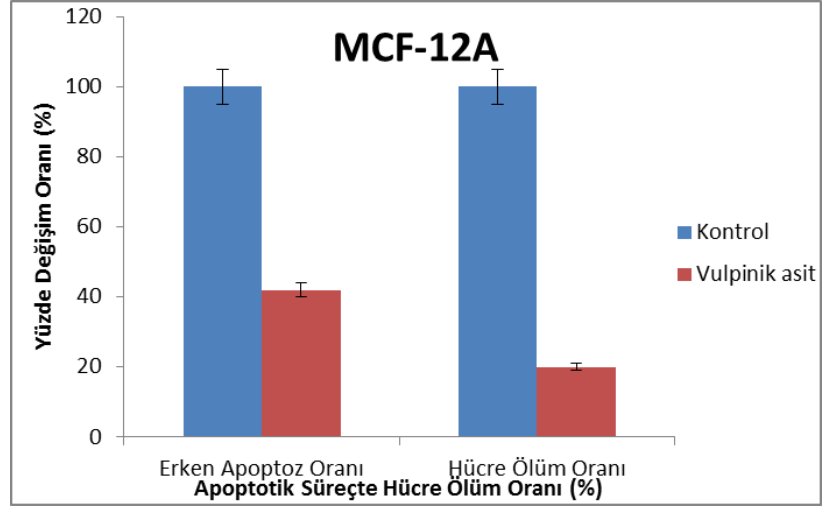
Şekil 4.23 MCF-12A hücresi kontrol örneğine göre flow sitometri grafikleri

A: Pozitif Kontrol, B: Apoptoza giren hücre ayrımı ve kantitatif yüzde analizi



Şekil 4.24 MCF-12A hücresine vulpinik asit uygulaması sonrası flow sitometri grafikleri

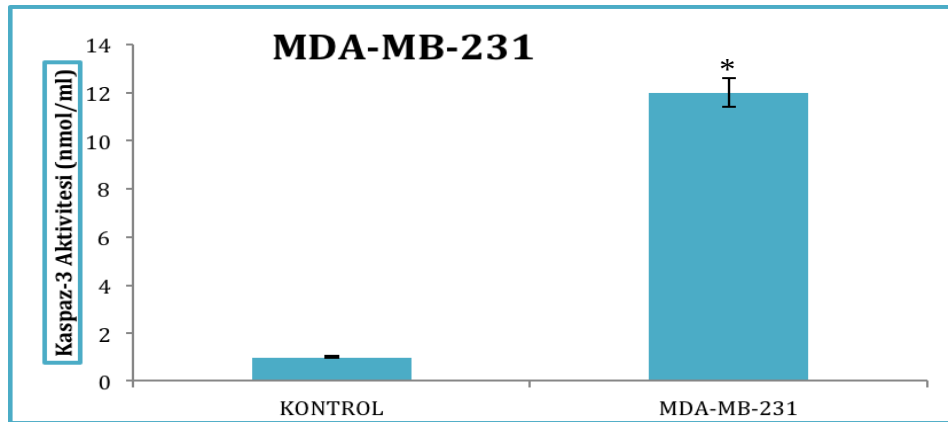
A: Pozitif Kontrol, B: Apoptoza giren hücre ayrımı ve kantitatif yüzde analizi



Şekil 4.25 MCF-12A hücresinin erken apoptoz ve hücre ölüm oranı

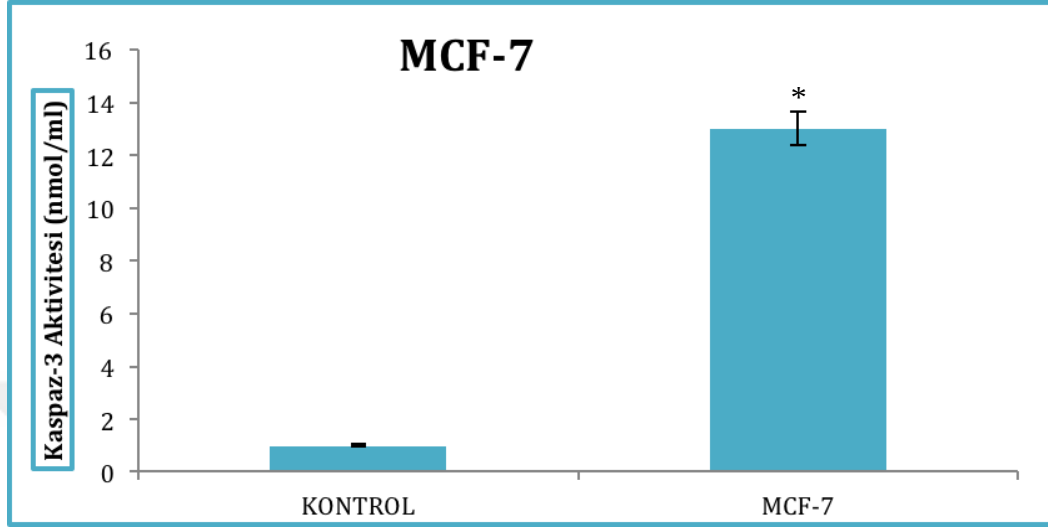
4.4 Kaspaz-3 Aktivitesinin Belirlenmesi

Hücre canlılık testi sonucunda belirlenen EC50 değerleri uygulanmış MDA-MB-231, MCF-7, BT474, SK-BR-3 ve MCF-12A hücrelerinde kontrole (vulpinik asit uygulanmamış) göre kaspaz-3 enzim aktivitesi üç tekrarlı yapılarak şekil 4.26 ve şekil 4.31 arasında gösterilmiştir. Vulpinik asitin MDA-MB-231 hücresi için belirlenen EC50 değerinin hücreye uygulanması sonucunda sadece hücre besiyeri olan DMEM ile muamele edilmiş kontrol hücresine göre kaspaz-3 aktivitesi %12 artmıştır ($p < 0.0001$) (Şekil 4.26).



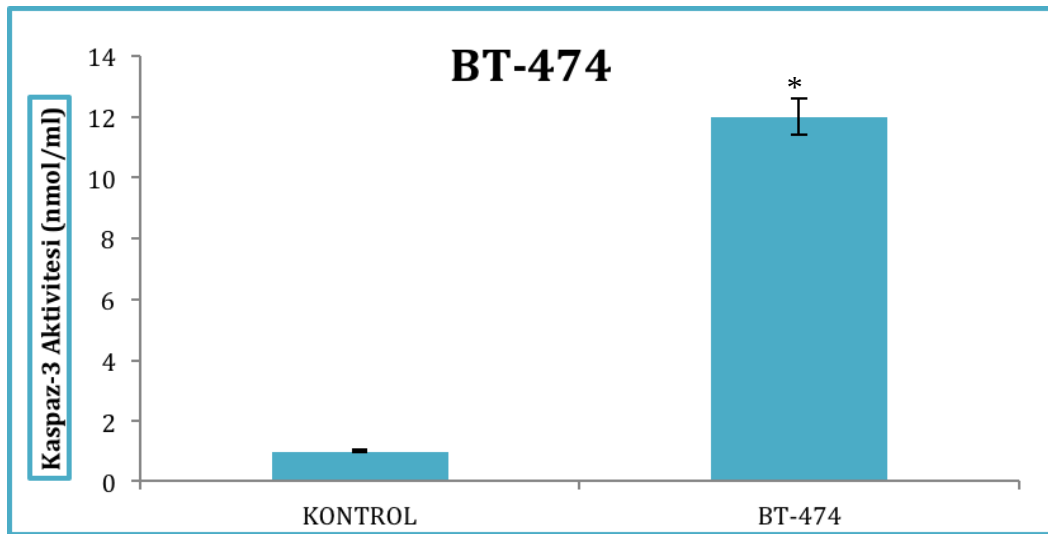
Şekil 4.26 Vulpinik asitin MDA-MB-231 hücresi için belirlenmiş EC50 degerinin kaspaz-3 aktivitesi üzerine etkisi

Vulpinik asitin MCF-7 hücresi için belirlenen EC50 değerin hücreye uygulanması sonucunda sadece hücre besiyeri olan DMEM ile muamele edilmiş kontrol hücresine göre kaspaz-3 aktivitesi %13 artmıştır ($p<0.0007$) (Şekil 4.27).



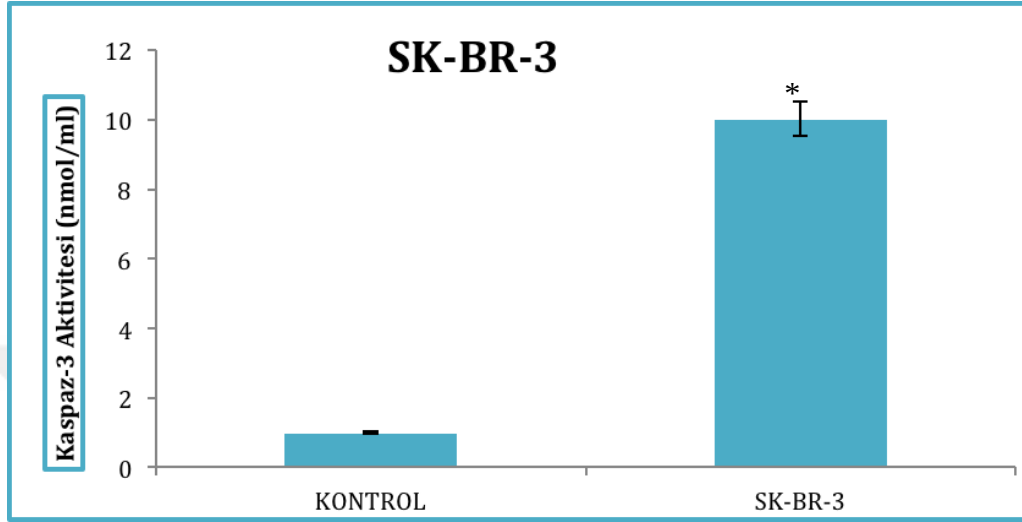
Şekil 4.27 Vulpinik asitin MCF-7 hücresi için belirlenmiş EC50 degerinin Kaspaz-3 aktivitesi üzerine etkisi

Vulpinik asitin BT-474 hücresi için belirlenen EC50 değerin hücreye uygulanması sonucunda sadece hücre besiyeri olan DMEM ile muamele edilmiş kontrol hücresine göre kaspaz-3 aktivitesi %12 artmıştır ($p<0.0006$) (Şekil 4.28).



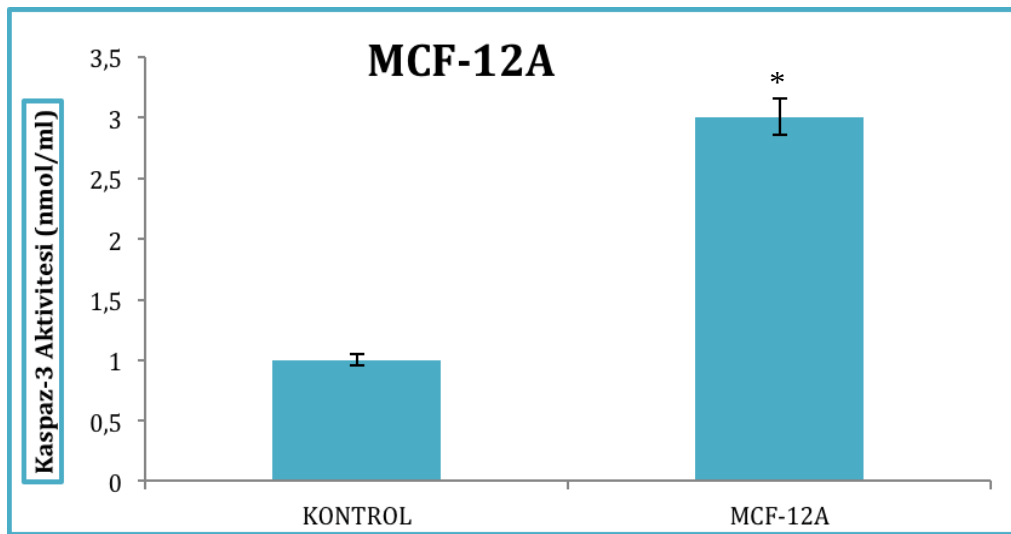
Şekil 4.28 Vulpinik asitin BT-474 hücresi için belirlenmiş EC50 degerinin Kaspaz-3 aktivitesi üzerine etkisi

Vulpinik asitin SK-BR-3 hücresi için belirlenen EC50 değerinin hücreye uygulanması sonucunda sadece hücre besiyeri olan DMEM ile muamele edilmiş kontrol hücresine göre kaspaz-3 aktivitesi %10 artmıştır ($p<0.0003$) (Şekil 4.29).



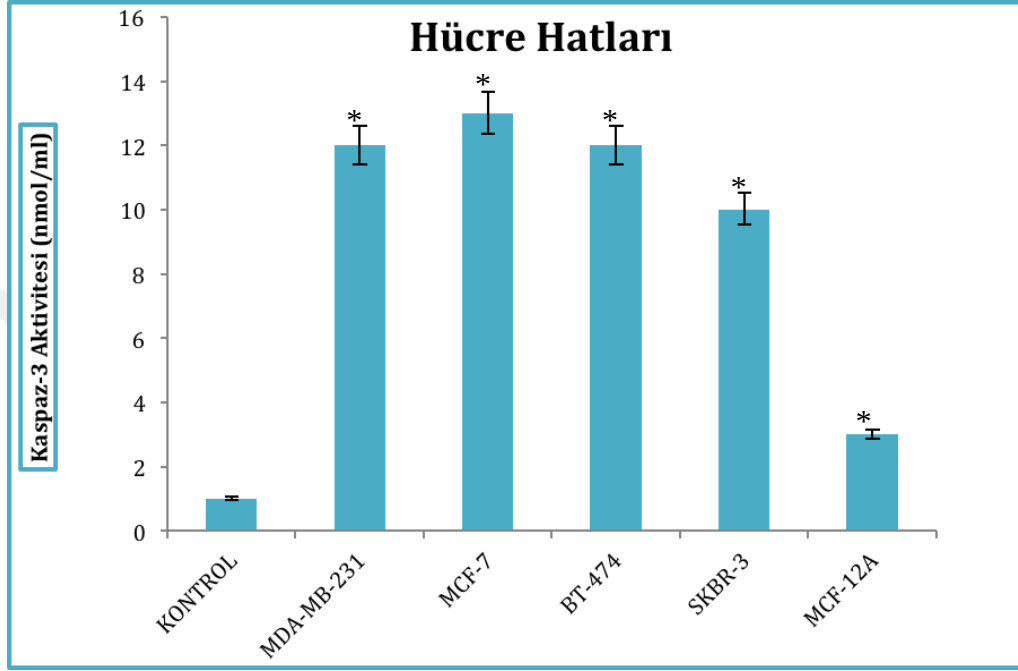
Şekil 4.29 Vulpinik asitin SK-BR-3 hücresi için belirlenmiş EC50 degerinin Kaspaz-3 aktivitesi üzerine etkisi

Vulpinik asitin MCF-12A hücresi için belirlenen EC50 değerinin hücreye uygulanması sonucunda kontrol hücresine göre kaspaz-3 aktivitesi % 3 artmıştır ($p<0.03$) (Şekil 4.30).

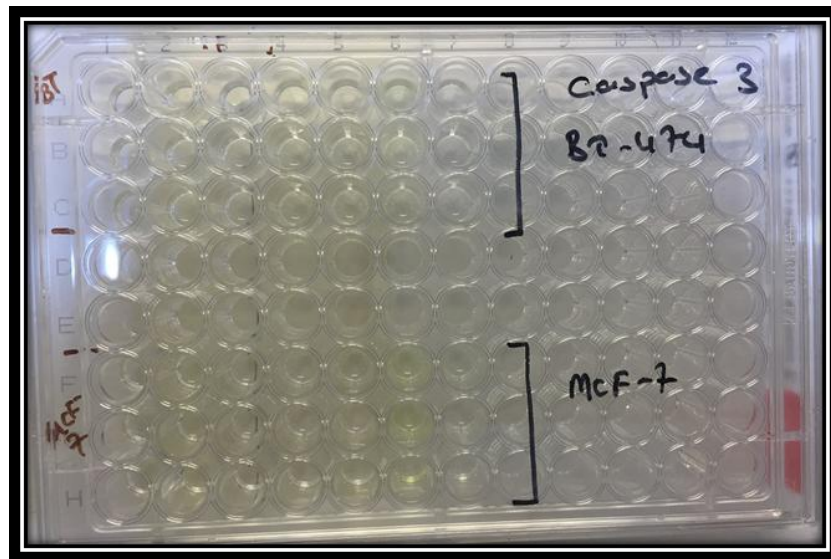


Şekil 4.30 Vulpinik asitin MCF-12A hücresi için belirlenmiş EC50 degerinin Kaspaz-3 aktivitesi üzerine etkisi

Çalışılan tüm hücrelerin kontrol grubuna göre kaspaz-3 aktivitesi değerlendirilmiştir. Kanser hücrelerindeki kaspaz-3 aktivitesindeki artışın %10-13 olduğu görülürken normal meme hücresi olan MCF-12A'da bu oranın %3'lerde kaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.31).



Şekil 4.31 Vulpinik asitin çalışılan tüm hücre hatları için belirlenmiş EC50 degerinin kaspaz-3 aktivitesi üzerine etkisi



Şekil 4.32 Kaspaz-3 kiti ile yapılan deney sonrası plate görünümü

4.5 Total RNA İzolasyonu Sonuçları

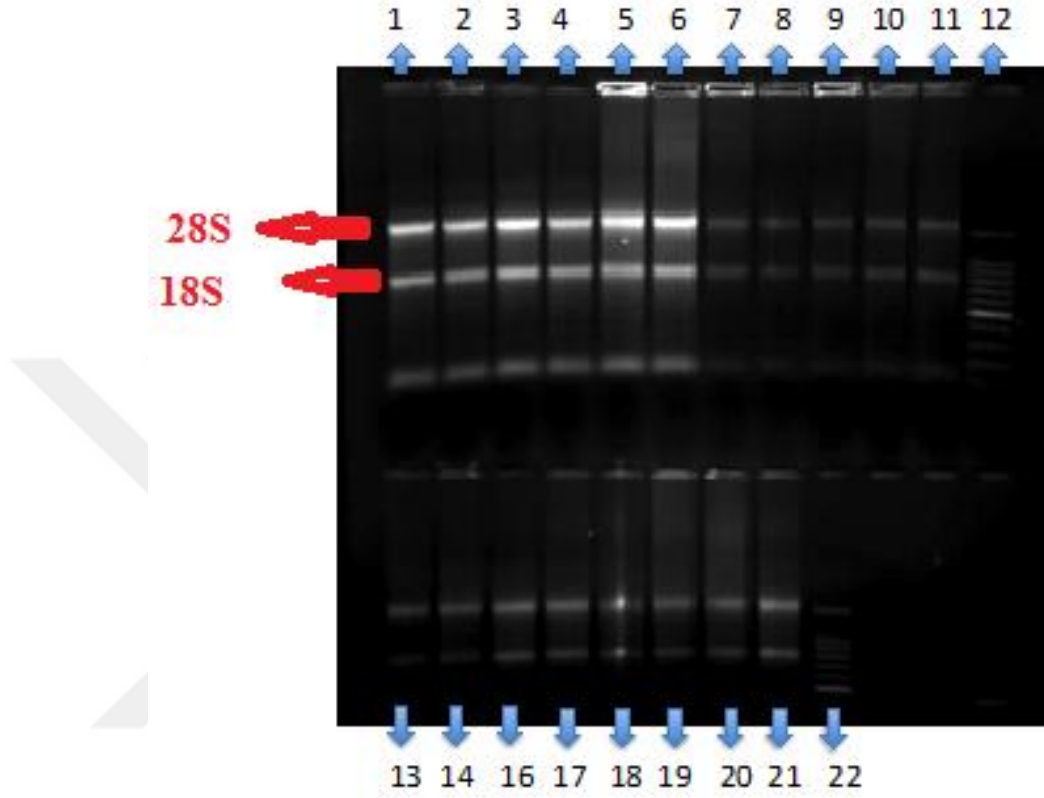
Çalışılan hücrelerden izole edilen RNA örneklerinin miktar ve saflık derecesinin belirlenmesi için spektrofotometrik ölçüm sonuçları çizelge 4.7’de verilmiştir. Spektrofotometre ölçümlerinin ardından OD260/OD280 saflık oranları 1,84 ile 2,08 arasında olduğu tespit edilmiştir. Hücre total RNA örneği miktar aralığı ise 41,06 ng/μl ile 466,60 ng/μl arasında bulunmuştur (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7 Total RNA izolasyonu sonucu miktar ve saflık tayini

Örnek Adı	ng/μl	260/280	260/230
MDA-MB-231 VA I	339,54	1,94	1,94
MDA-MB-231 VA II	352,62	1,97	1,70
MDA-MB-231 DMSO I	362,35	1,94	1,33
MDA-MB-231 DMSO II	326,23	1,96	1,61
MDA-MB-231 MEM I	405,28	1,93	1,75
MDA-MB-231 MEM II	418,71	1,89	1,90
MCF-7 VA I	183,15	1,85	1,02
MCF-7 VA II	113,55	1,96	0,90
MCF-7 DMSO I	176,73	1,86	0,73
MCF-7 DMSO II	174,39	1,84	2,04
MCF-7 MEM I	134,54	1,86	1,54
MCF-7 MEM II	151,24	1,91	1,06
BT-474 VA I	277,07	2,01	1,29
BT-474 VA II	291,00	1,95	1,83
BT-474 DMSO I	309,47	1,95	1,56
BT-474 DMSO II	362,80	1,97	1,78
BT-474 MEM I	346,29	1,88	1,59
BT-474 MEM II	375,01	1,84	1,87
SK-BR-3 VA I	53,34	2,07	1,86
SK-BR-3 VA II	47,90	2,03	2,09
SK-BR-3 DMSO I	61,06	2,06	1,07
SK-BR-3 DMSO II	55,44	2,08	1,58
SK-BR-3 MEM I	41,06	2,07	1,66
SK-BR-3 MEM II	46,09	2,01	1,83
MCF-12A VA I	344,89	1,89	1,73
MCF-12A VA II	348,89	1,89	2,04
MCF-12A DMSO I	410,09	1,86	2,22
MCF-12A DMSO II	466,60	1,88	2,09
MCF-12A MEM I	361,07	1,90	1,96
MCF-12A MEM II	389,43	1,89	1,99

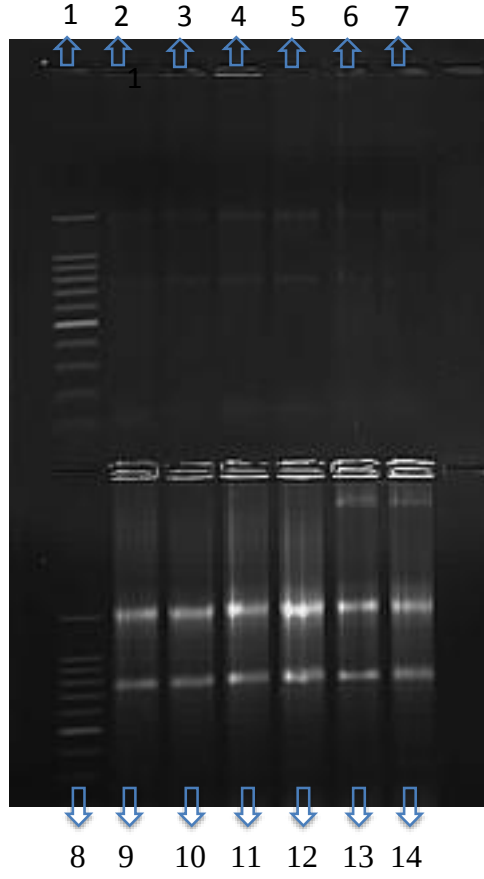
VA: Vulpinik asit

İzole edilen total hücre RNA'ları %2'lik agaroz jelde 100V'da 30dakika yürütülerek 28S ve 18S rRNA bantları şekil 4.33-4.34'de verilmiştir. Her hücre örneği iki tekrarlı olarak jel kuyularına art arda olmak üzere yüklenmiştir.



Şekil 4.33 MDA-MB-231, MCF-7 ve BT-474 hücre hatlarına ait izole edilen RNA örneklerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü

1:MDA-MB-231 VA I, 2:MDA-MB-231 VA II, 3:MDA-MB-231 DMSO I, 4:MDA-MB-231 DMSO II, 5:MDA-MB-231 DMEM I, 6:MDA-MB-231 DMEM II, 7:MCF-7 VA I, 8:MCF-7 VA II, 9:MCF-7 DMSO I, 10:MCF-7 DMSO II, 11:MCF-7 DMEM I, 12: MARKER, 13:MCF-7 DMEM II, 14:BT-474 VA I, 16:BT-474 VA II, 17:BT-474 DMSO I, 18:BT-474 DMSO II, 19:BT-474 DMEM I, 20:BT-474 DMEM II, 21:BT-474 VA, 22:MARKER



Şekil 4.34 SK-BR-3 ve MCF-12A hücrelerinden izole edilen RNA örneklerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü

1:MARKER, 2:SK-BR-3 VA I, 3:SK-BR-3 VA II, 4:SK-BR-3 DMSO I, 5:SK-BR-3 DMSO II, 6:SK-BR-3 DMEM I, 7:SK-BR-3 DMEM II, 8:MARKER, 9:MCF-12A VA I, 10:MCF-12A VA II, 11:MCF-12A DMSO I, 12:MCF-12A DMSO II, 13:MCF-12A DMEM I, 14:MCF-12A DMEM II

4.6 cDNA Sentezi Sonuçları

RNA örneklerinin saflıkları ve miktarları spektrofotometrede ve jelde kontrol edildikten sonra 200 ng/ml'e ayarlanarak cDNA sentez kiti (ROCHE, Lot#10760921) kullanılarak cDNA sentezi yapılmıştır.

4.7 qRT PCR Sonuçları

200 ng RNA örneklerinden elde edilen cDNA'lar ile Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'nde Roche Light Cycler 480 cihazı ile polimeraz zincir reaksiyonları her örnek için iki tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonları ile apoptozla ilişkili bazı genlere ait ifade seviyesinin tespiti sonucu elde edilen eşik değerleri (C_T) çizelge 4.8-4.9'da verilmiştir.

Çizelge 4.8 Apoptozla ilişkili bazı genlere ait C_T değerleri

Hücre Hatları	TP53 (Hedef Gen)	BAX (Hedef Gen)	BCL-2 (Hedef Gen)	BIRC-5 (Hedef Gen)	GAPDH (Housekeeping)
MDA-MB-231 VA I	28.00	27.48	31.76	29.56	31.00
MDA-MB-231 VA II	28.54	26.49	30.84	29.27	28.34
MDA-MB-231 DMSO I	28.54	25.72	31.83	30.76	25.98
MDA-MB-231 DMSO II	29.42	26.05	31.78	30.04	23.17
MDA-MB-231 MEM I	30.60	27.32	34.27	32.19	23.48
MDA-MB-231 MEM II	30.75	28.67	32.49	30.84	25.79
MCF-7 VA I	32.41	31.23	31.70	31.97	26.03
MCF-7 VA II	31.50	29.29	31.91	31.97	27.74
MCF-7 DMSO I	32.29	32.47	32.45	31.86	28.21
MCF-7 DMSO II	33.35	30.08	31.25	31.57	25.96
MCF-7 MEM I	31.75	29.32	32.45	30.93	25.56
MCF-7 MEM II	31.81	28.95	35.00	31.67	26.26
BT-474 VA I	27.45	28.27	31.44	30.57	23.52
BT-474 VA II	29.30	29.54	33.18	30.69	25.44
BT-474 DMSO I	27.26	29.93	32.28	29.04	23.99
BT-474 DMSO II	28.04	32.95	33.07	29.18	30.88
BT-474 MEM I	30.63	32.74	31.20	32.41	27.30
BT-474 MEM II	29.22	34.46	31.00	32.72	25.91
SK-BR-3 VA I	30.52	33.07	35.00	34.48	29.83
SK-BR-3 VA II	31.50	32.70	31.91	34.30	26.03
SK-BR-3 DMSO I	27.80	33.50	29.07	33.11	28.07
SK-BR-3 DMSO II	28.55	33.86	28.70	33.56	26.82
SK-BR-3 MEM I	27.99	34.00	32.08	33.44	27.68
SK-BR-3 MEM II	27.74	34.53	32.57	33.00	27.66
MCF-12A VA I	27.11	33.00	33.15	31.81	26.48
MCF-12A VA II	27.22	33.00	33.00	32.71	26.53
MCF-12A DMSO I	26.24	31.40	30.87	31.08	25.56
MCF-12A DMSO II	26.41	31.43	31.06	31.76	25.32
MCF-12A MEM I	26.23	31.93	31.88	32.27	24.71
MCF-12A MEM II	26.70	32.09	32.20	31.95	24.82
NK	35.00	35.00	24.15	34.56	25.43
NK	35.00	35.00	25.01	35.00	29.16

VA: Vulpinik asit, NK: Negatif Kontrol

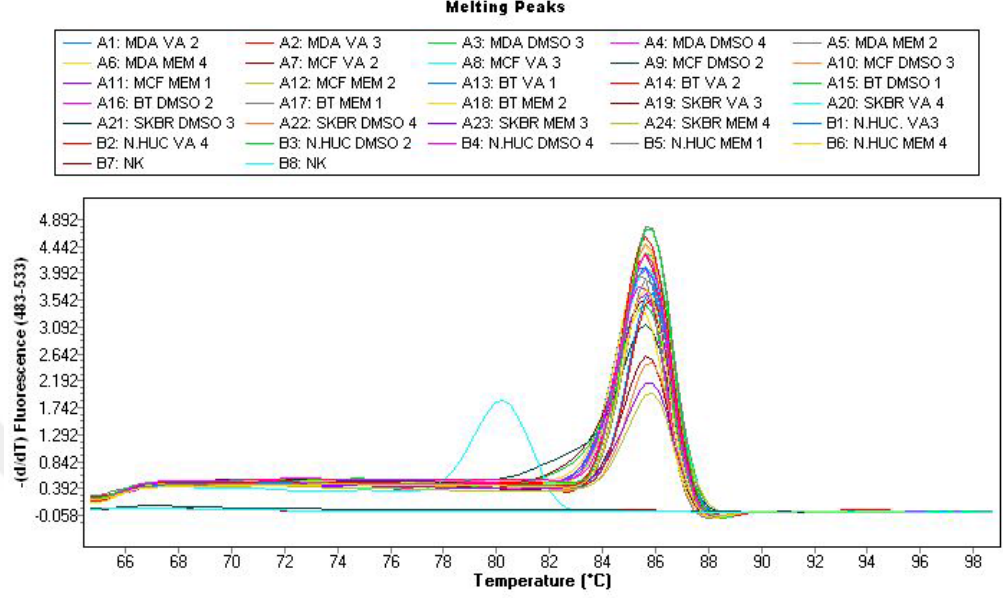
Çizelge 4.9 Apoptozla ilişkili bazı kaspaz genlerine ait C_T değerleri

Hücre Hatları	Kaspaz-3	Kaspaz-7	Kaspaz-8	Kaspaz-9
MDA-MB-231 VA I	32.15	35.00	32.72	32.00
MDA-MB-231 VA II	33.07	35.00	31.64	32.04
MDA-MB-231 DMSO I	33.79	32.81	27.72	28.86
MDA-MB-231 DMSO II	33.05	32.21	28.99	29.92
MDA-MB-231 MEM I	34.52	31.87	25.28	30.92
MDA-MB-231 MEM II	34.03	31.94	24.52	31.22
MCF-7 VA I	28.07	32.58	24.53	32.80
MCF-7 VA II	28.61	32.31	26.16	32.59
MCF-7 DMSO I	27.16	32.71	25.20	32.99
MCF-7 DMSO II	28.00	35.00	25.92	33.19
MCF-7 MEM I	29.00	32.41	26.04	33.23
MCF-7 MEM II	28.88	32.22	26.26	32.83
BT-474 VA I	29.50	31.58	28.67	30.84
BT-474 VA II	29.22	32.03	29.85	31.97
BT-474 DMSO I	29.74	31.29	27.62	30.59
BT-474 DMSO II	30.63	30.04	28.03	30.80
BT-474 MEM I	29.11	32.90	24.58	31.92
BT-474 MEM II	29.93	27.91	24.03	31.61
SK-BR-3 VA I	31.23	35.00	26.52	33.80
SK-BR-3 VA II	31.88	32.11	25.07	34.02
SK-BR-3 DMSO I	30.15	28.83	26.01	32.91
SK-BR-3 DMSO II	30.63	32.34	25.58	33.15
SK-BR-3 MEM I	33.45	31.92	25.60	32.89
SK-BR-3 MEM II	33.01	32.40	26.00	33.24
MCF-12A VA I	29.11	27.95	24.28	33.12
MCF-12A VA II	29.30	31.81	25.33	32.24
MCF-12A DMSO I	28.90	31.92	23.66	31.21
MCF-12A DMSO II	28.50	29.54	23.91	31.86
MCF-12A MEM I	27.93	30.98	24.64	32.00
MCF-12A MEM II	30.57	26.59	24.28	31.94
NK	33.11	31.19	34.00	33.10
NK	32.78	30.84	34.41	32.70

VA: Vulpinik asit, NK: Negatif Kontrol

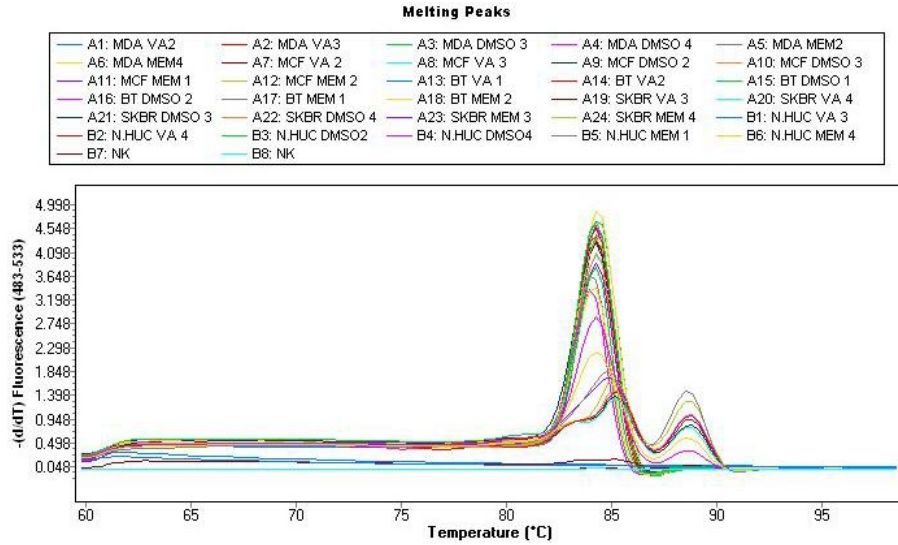
Güvenilirliği test etmek için TP53, Bcl-2, Bax, BIRC5 ve GAPDH genlerine ait primerlerin erime eğrisi (melting curve) analizi yapılmıştır. İstenmeyen amplifikasyon ürünleri ve primer dimer oluşumunun önüne geçmek için doğru primer tasarlamaya ve uygun sıcaklıkta reaksiyon kurulmasına dikkat edilmiştir. Çalıştığımız tüm genlere ait erime eğrisi analiz sonuçları şekil 4.35-4.39 arasında verilmiştir.

Bax genine ait MDA-MB-231, MCF-7, BT-474, SK-BR-3 ve MCF-12A hücre hatlarına ait erime eğrisi grafiği şekil 4.35’de verilmiştir.



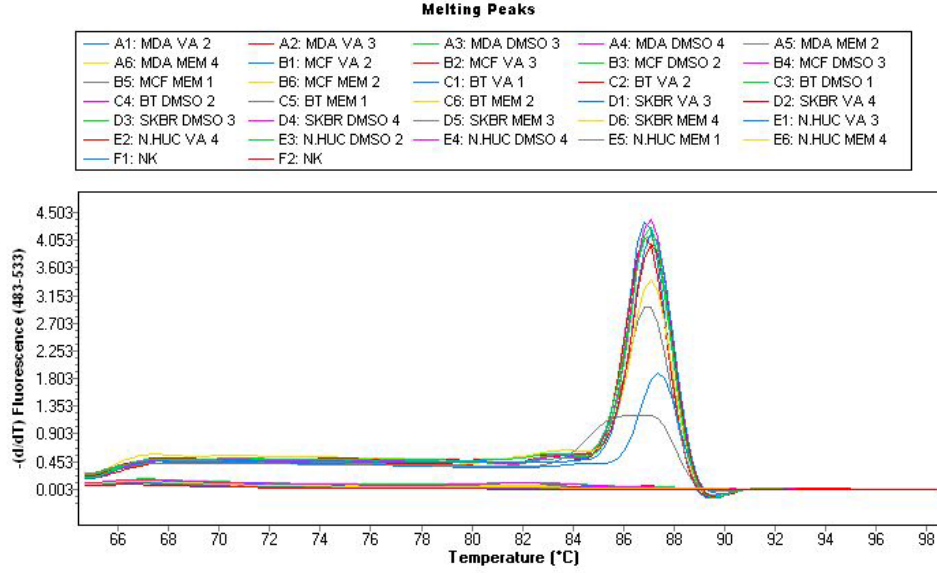
Şekil 4.35 Bax geni erime eğrisi

TP53 genine ait MDA-MB-231, MCF-7, BT-474, SK-BR-3 ve MCF-12A hücre hatlarına ait erime eğrisi grafiği aşağıda verilmiştir (Şekil 4.36).



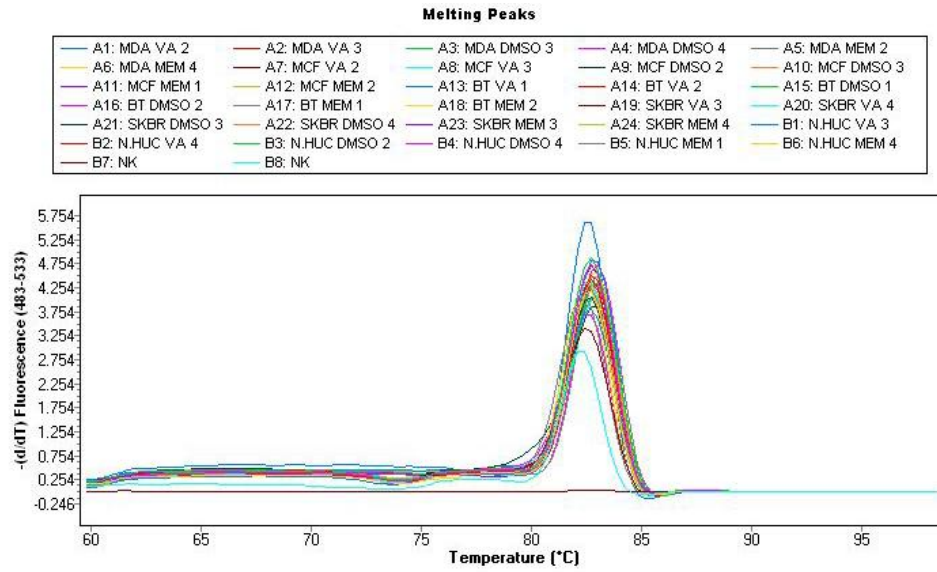
Şekil 4.36 TP53 geni erime eğrisi

Bcl-2 genine ait MDA-MB-231, MCF-7, BT-474, SK-BR-3 ve MCF-12A hücre hatlarına ait erime eğrisi grafiği aşağıda verilmiştir (Şekil 4.37).



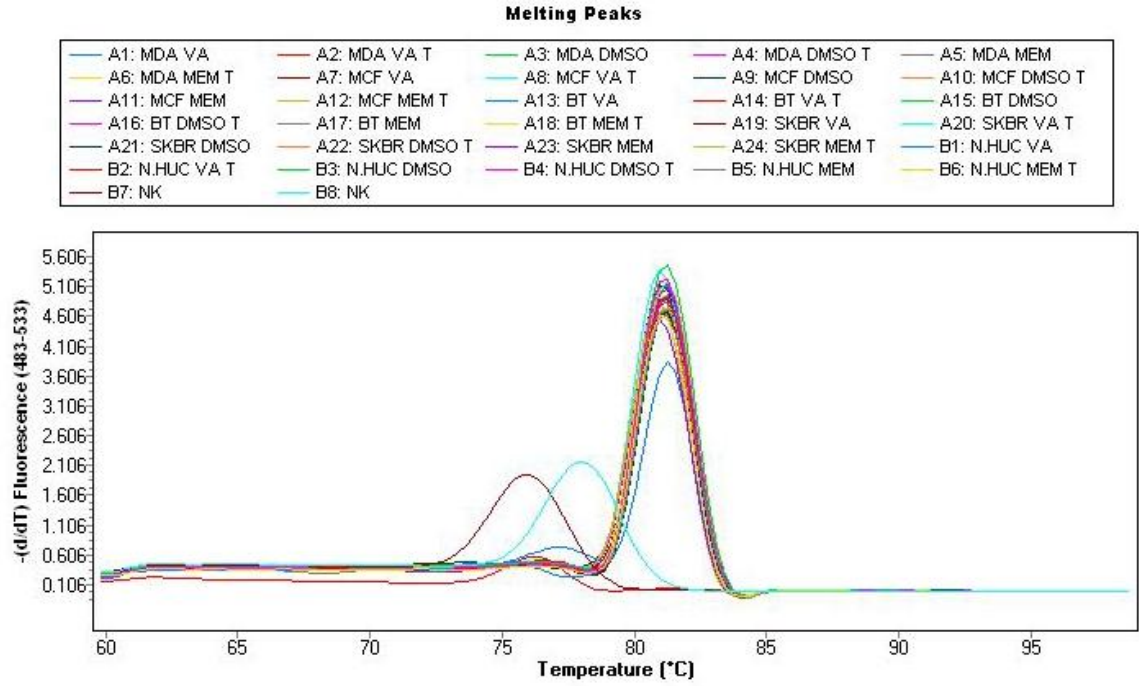
Şekil 4.37 Bcl-2 geni erime eğrisi

GAPDH genine ait MDA-MB-231, MCF-7, BT-474, SK-BR-3 ve MCF-12A hücre hatlarına ait erime eğrisi grafiği aşağıda verilmiştir (Şekil 4.38).



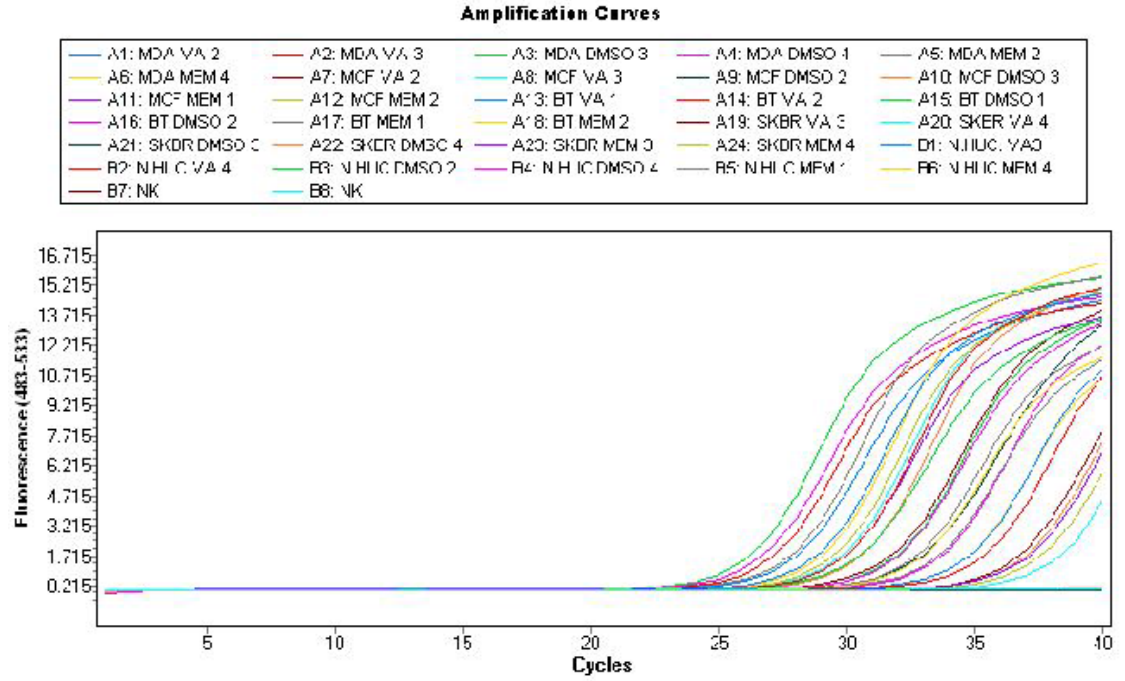
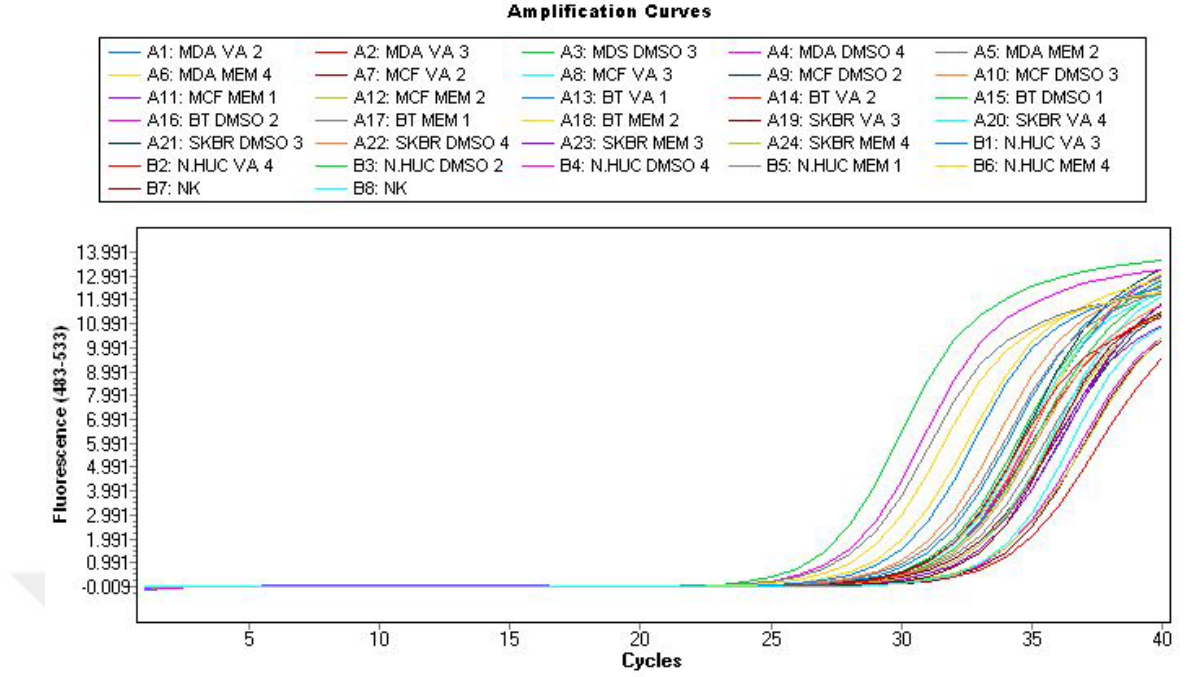
Şekil 4.38 GAPDH (Housekeeping) geni erime eğrisi

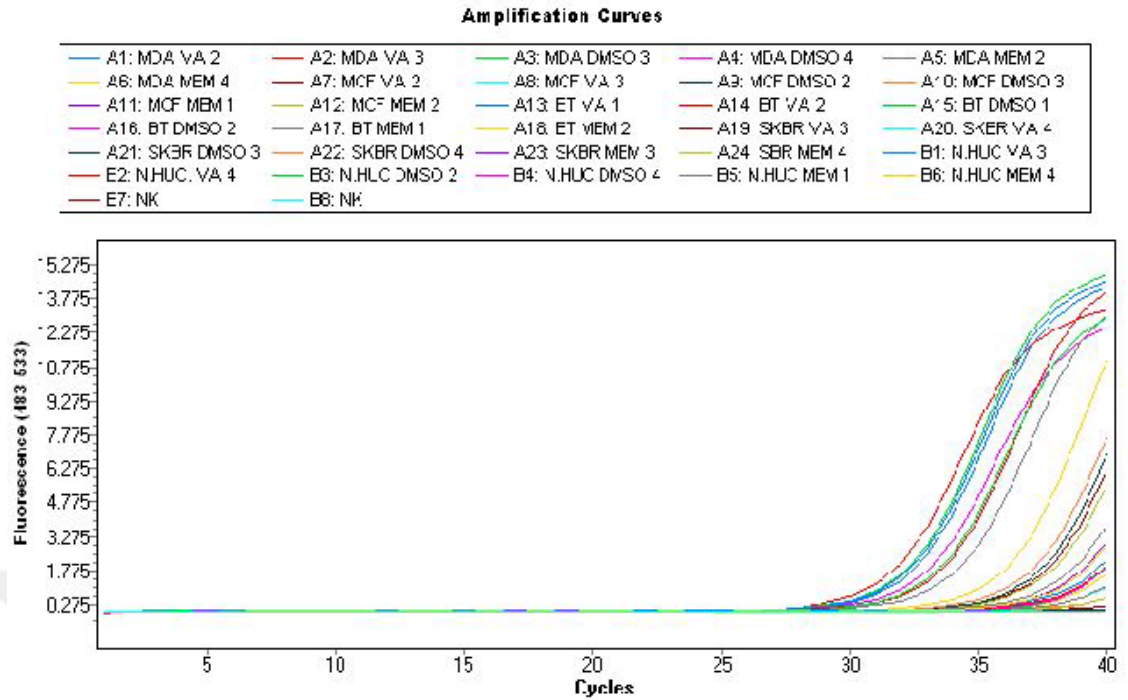
Kaspaz-8 genine ait MDA-MB-231, MCF-7, BT-474, SK-BR-3 ve MCF-12A hücre hatlarına ait erime eğrisi grafiği aşağıda verilmiştir (Şekil 4.39).



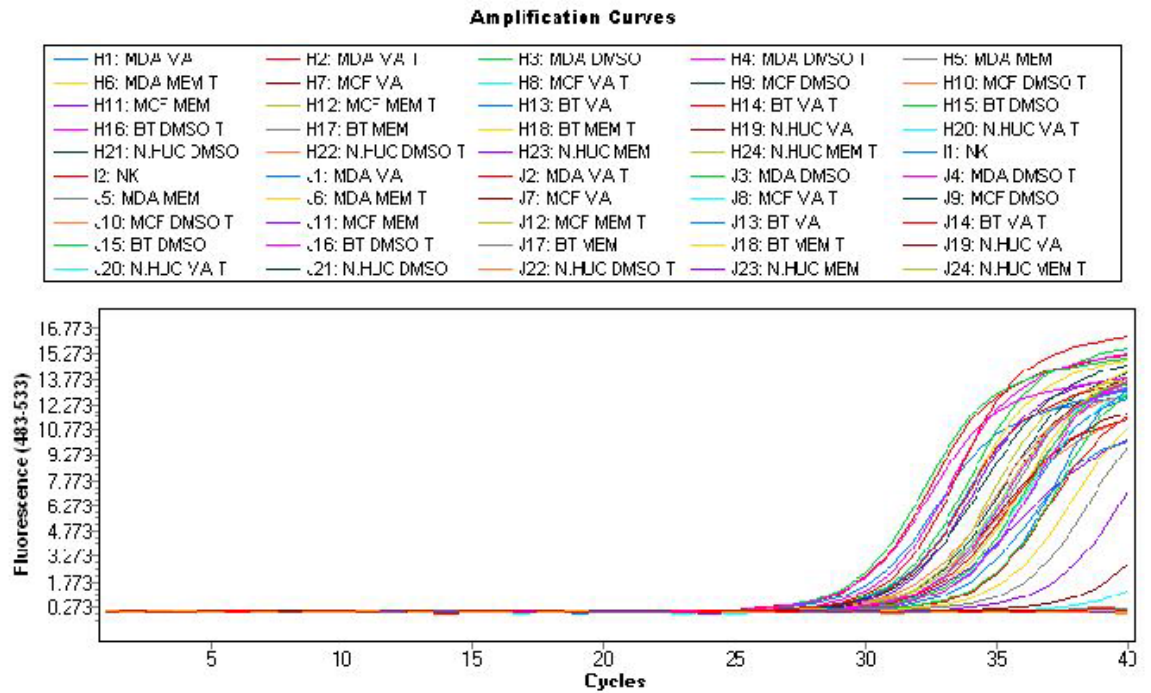
Şekil 4.39 Kaspaz-8 geni erime eğrisi

Gerçek zamanlı PCR'in her döngüsünde ürün artışına bağlı meydana gelen floresans ışımanın şiddetine bağlı olarak örneklerin C_T değerleri (Cycle threshold-PCR ürünlerinin miktarındaki ilk önemli artış olan değer) belirlenmiştir. Kullanılan tüm genler için örneklerin gerçek zamanlı PCR sonucu oluşan pik profilleri şekil 4.40 ve şekil 4.47 arasında verilmiştir.

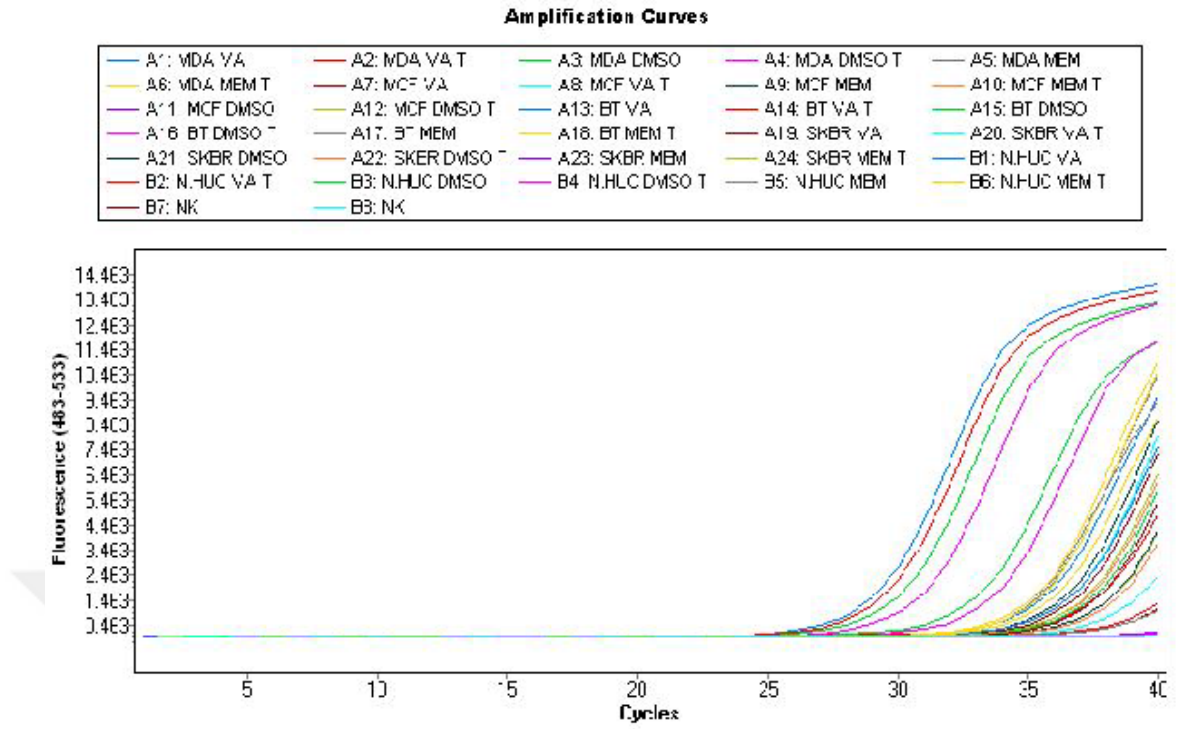




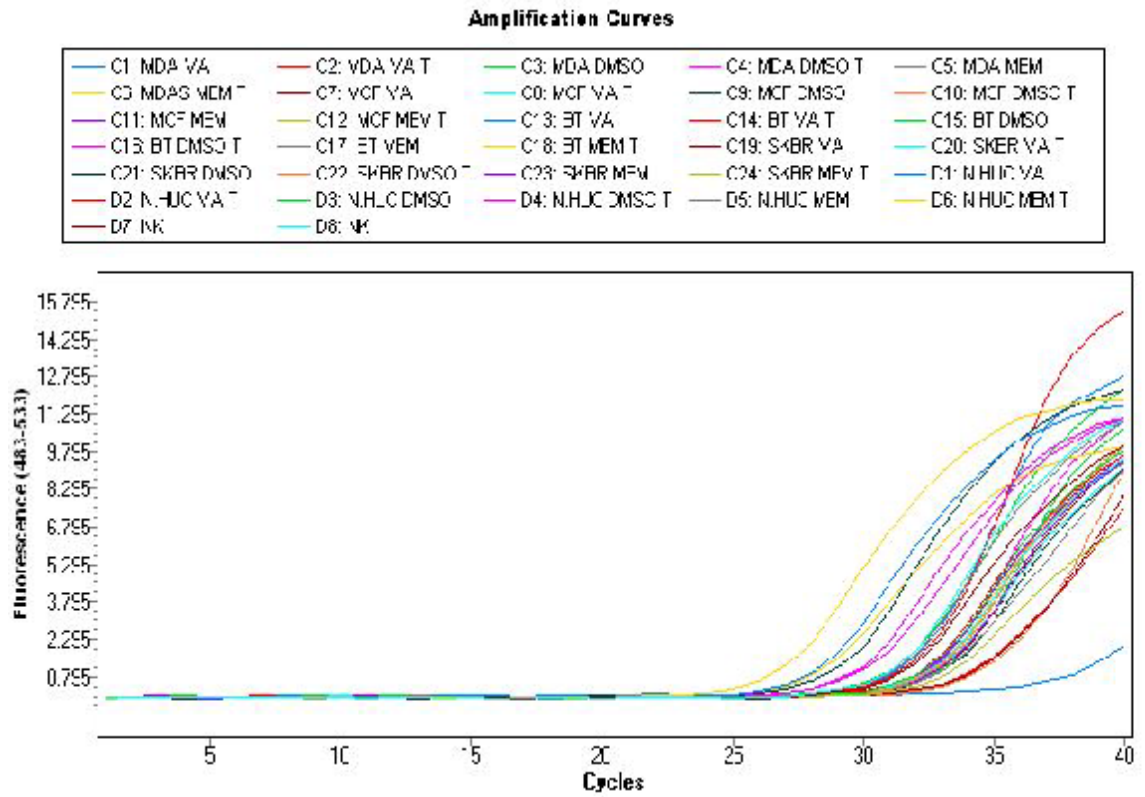
Şekil 4.42 Bcl-2 geni Gerçek Zamanlı PCR ifade artış profilleri



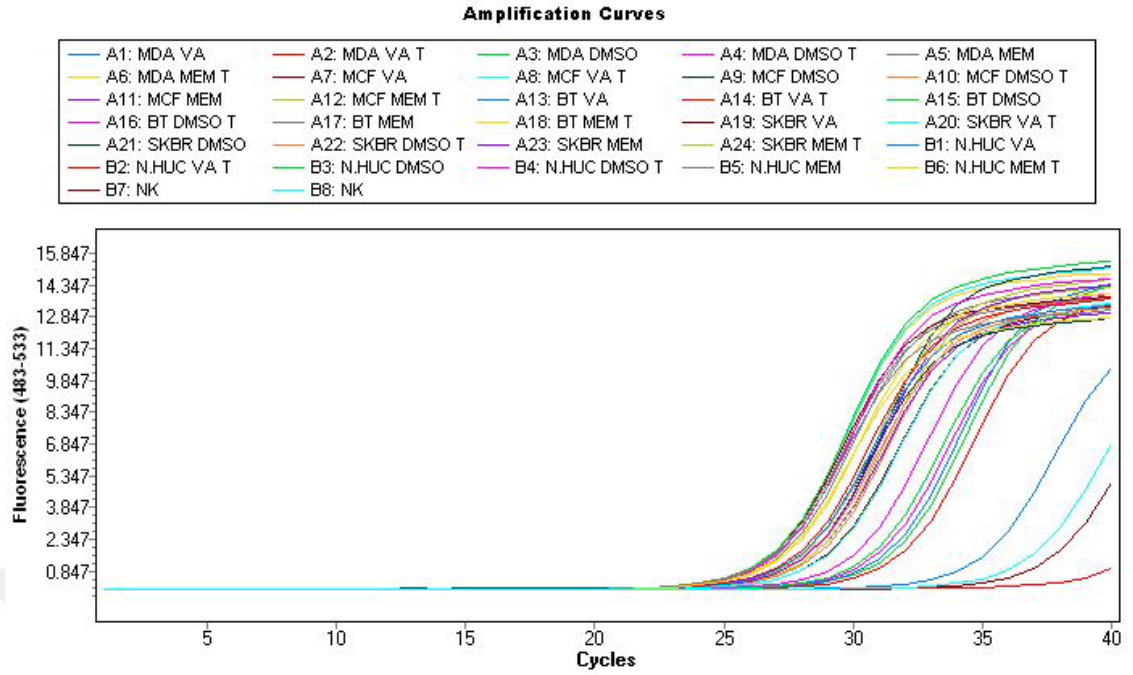
Şekil 4.43 BIRC5 geni Gerçek Zamanlı PCR ifade artış profilleri



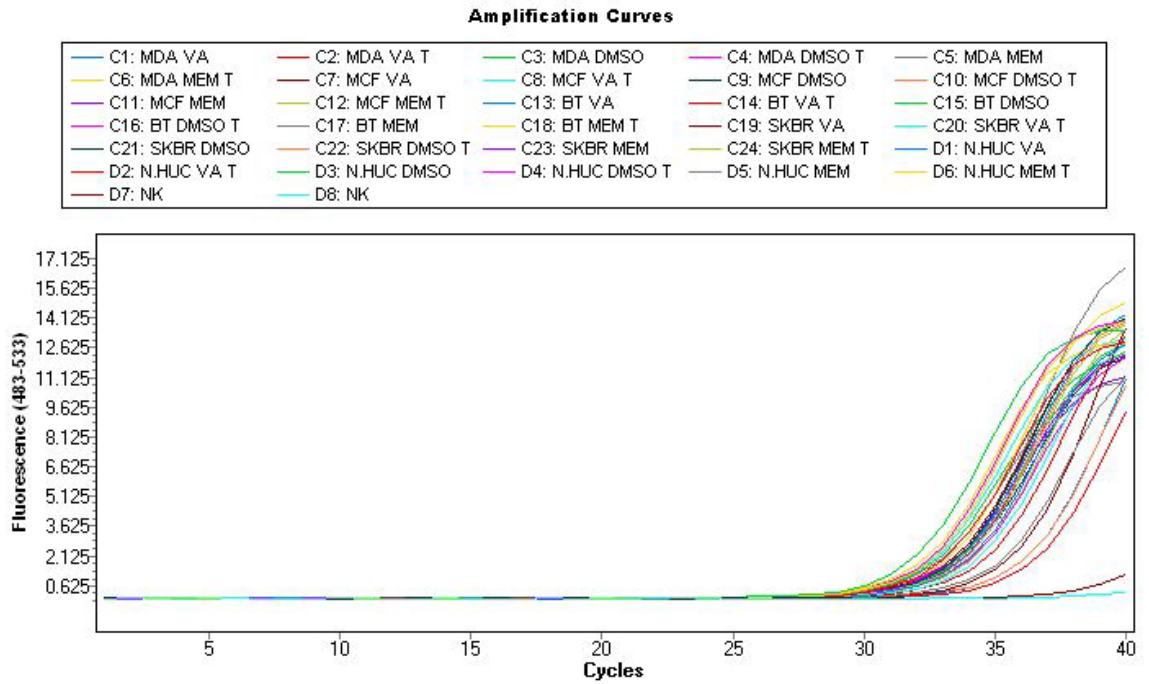
Şekil 4.44 Kaspaz-3 geni Gerçek Zamanlı PCR ifade artış profilleri



Şekil 4.45 Kaspaz-7 geni Gerçek Zamanlı PCR ifade artış profilleri



Şekil 4.46 Kaspaz-8 geni Gerçek Zamanlı PCR ifade artış profilleri

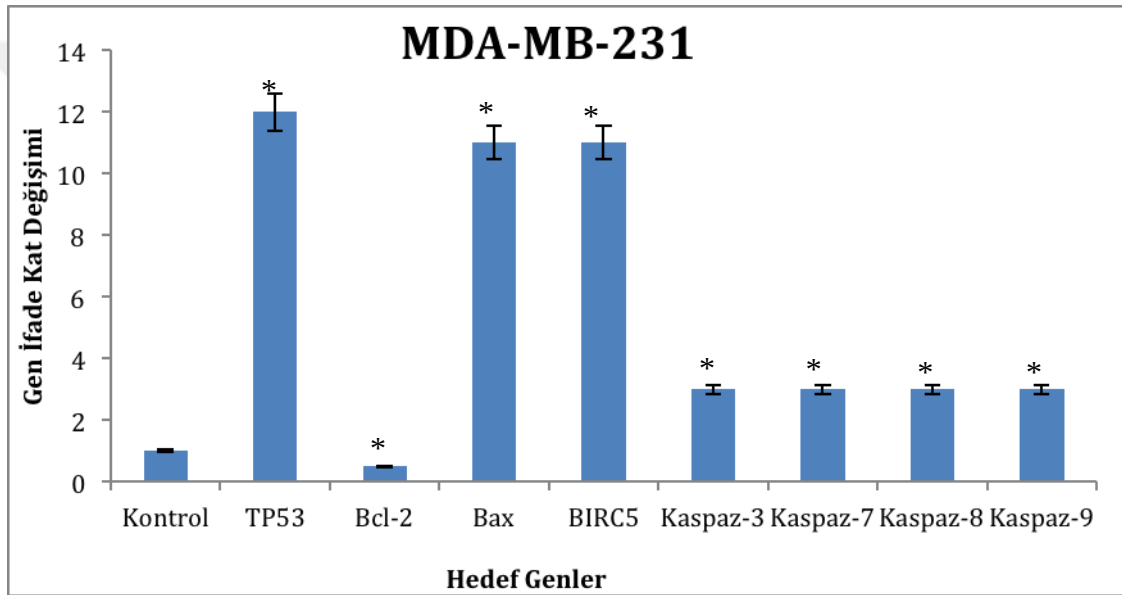


Şekil 4.47 Kaspaz-9 geni Gerçek Zamanlı PCR ifade artış profilleri

Vulpinik asitin meme kanser hücreleri olan MDA-MB-231, MCF-7, BT-474, SK-BR-3 ve normal meme hücresi olan MCF-12A hücre hatları üzerindeki TP53, Bcl-2, Bax,

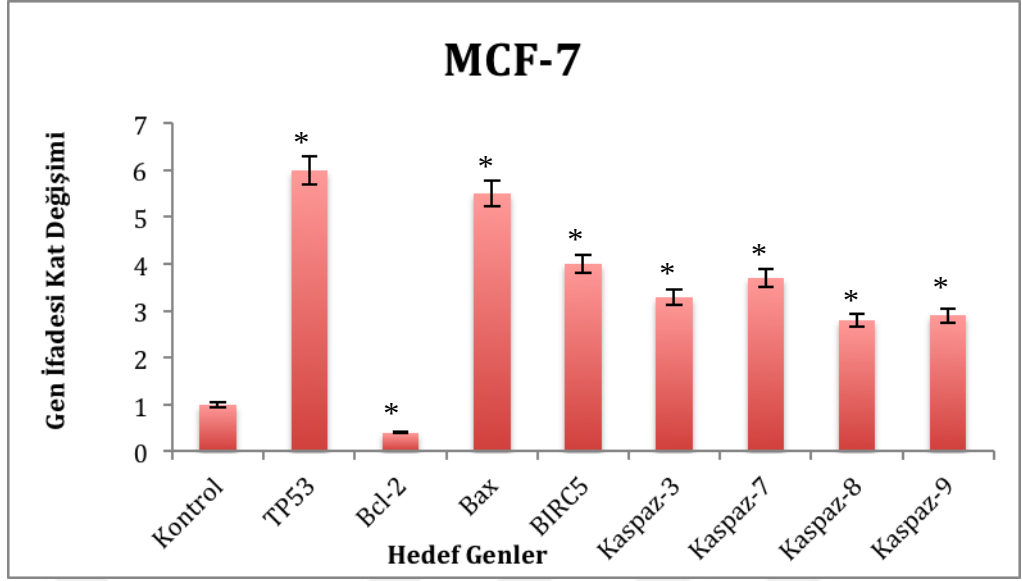
BIRC5, kaspaz-3, kaspaz-7, kaspaz-8 ve kaspaz-9 genlerine ait mRNA ekspresyon seviyeleri gerçek zamanlı PCR ile yapılan ifade değişim profilleri şekil 4.48 ve şekil 4.52 arasında gösterilmiştir.

Şekil 4.48’de MDA-MB-231 hücre hattı için belirlenen EC50 değerindeki vulpinik asit uygulamasından sonra proapoptotik genler TP53, Bax ve BIRC5’de kontrole göre sırasıyla 12, 11, 11 kat artış görülürken antiapoptotik gen Bcl-2’de ise kontrole göre 0,5 kat azalma görülmüştür ($p<0.01$). Ayrıca kaspaz ailesi üyelerinden kaspaz-3, kaspaz-7, kaspaz-8 ve kaspaz-9’da kontrole göre 3 kat artma görülmüştür ($p<0.01$) (Şekil 4.48).



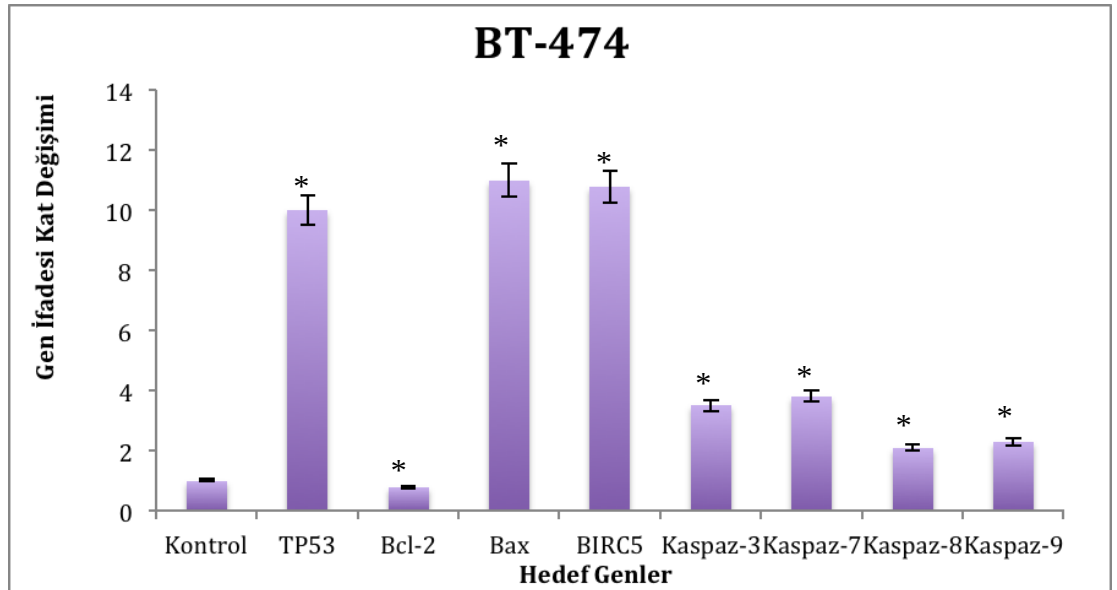
Şekil 4.48 MDA-MB-231 hücrelerinde apoptoz ile ilgili bazı genlerin mRNA ifade seviyeleri

MCF-7 hücre hattı için belirlenen EC50 değerindeki vulpinik asit uygulamasından sonra proapoptotik genler TP53, Bax ve BIRC5’de kontrole göre sırasıyla 6, 5.5, 4 kat artış görülürken antiapoptotik gen Bcl-2’de ise kontrole göre 0,6 kat azalma görülmüştür ($p<0.01$). Ayrıca kaspaz ailesi üyelerinden kaspaz-3, kaspaz-7, kaspaz-8 ve kaspaz-9’da kontrole göre sırasıyla 3.3, 3.7, 2.8, 2.9 kat artma görülmüştür ($p<0.01$) (Şekil 4.49).



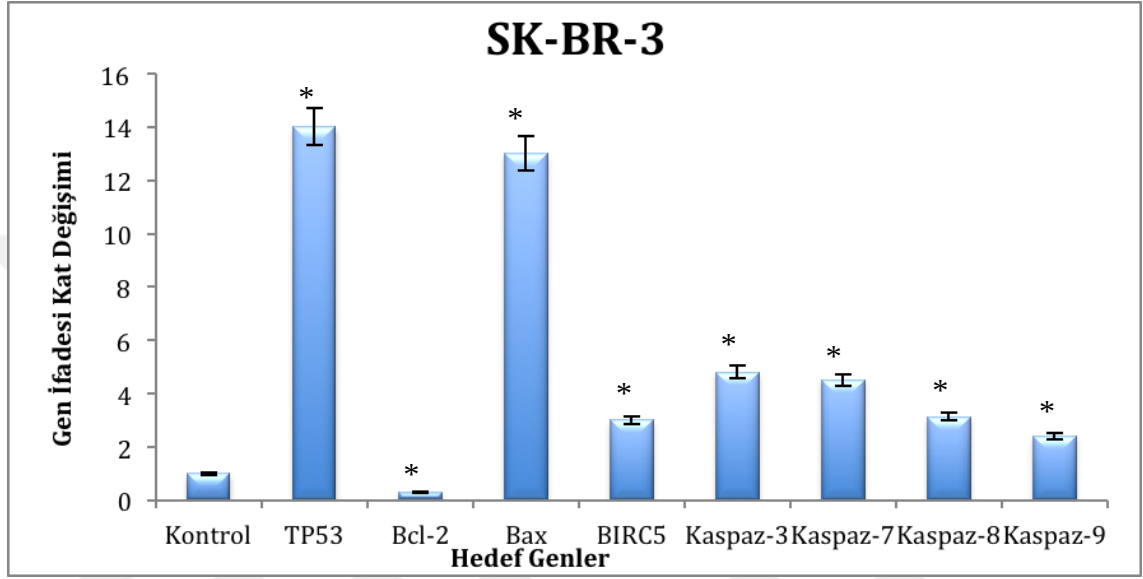
Şekil 4.49 MCF-7 hücrelerinde apoptoz ile ilgili bazı genlerin mRNA ifade seviyeleri

Şekil 4.50 incelendiğinde BT-474 hücre hattına belirlenen EC50 değerindeki vulpinik asit uygulamasından sonra proapoptotik genler TP53, Bax ve BIRC5’de kontrole göre sırasıyla 10, 11, 10.8 kat artış görülürken antiapoptotik gen Bcl-2’de ise kontrole göre 0.2 kat azalma görülmüştür ($p<0.01$). Ayrıca kaspaz ailesi üyelerinden kaspaz-3, kaspaz-7, kaspaz-8 ve kaspaz-9’da kontrole göre sırasıyla 3.5, 3.8, 2.1, 2.3 kat artma görülmüştür ($p<0.01$) (Şekil 4.50).



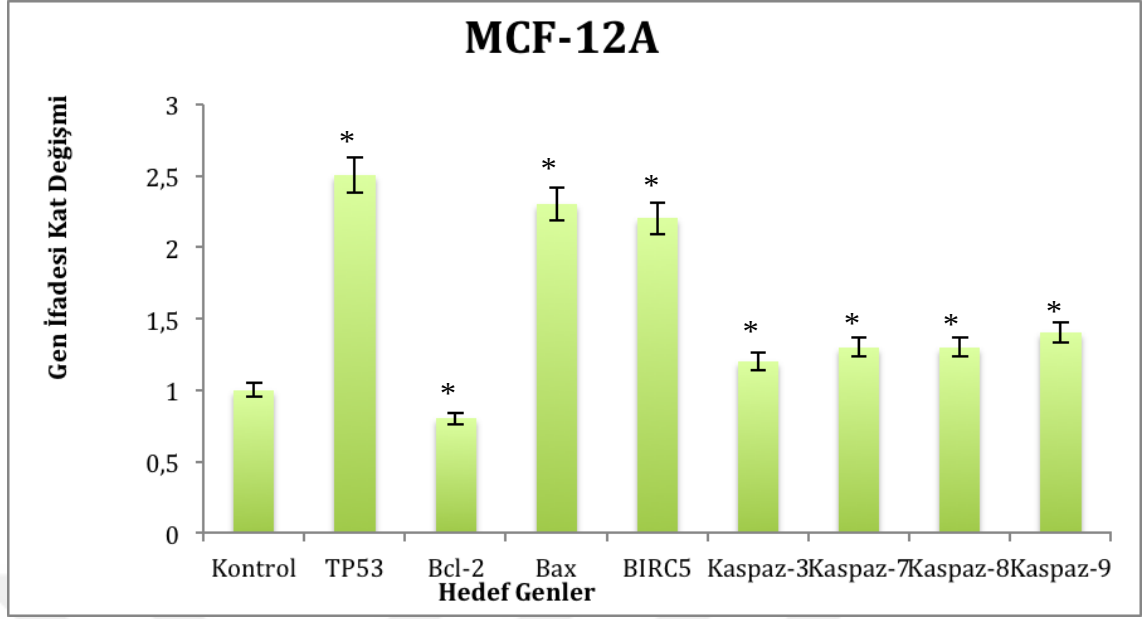
Şekil 4.50 BT-474 hücrelerinde apoptoz ile ilişkili bazı genlerin mRNA ifade seviyeleri

SK-BR-3 hücre hattına belirlenen EC50 değerindeki vulpinik asit uygulamasından sonra proapoptotik genler TP53, Bax ve BIRC5’de kontrole göre sırasıyla 14, 13, 3 kat artış görülürken antiapoptotik gen Bcl-2’de ise kontrole göre 0.7 kat azalma görülmüştür ($p<0.01$). Ayrıca kaspaz ailesi üyelerinden kaspaz-3, kaspaz-7, kaspaz-8 ve kaspaz-9’da kontrole göre sırasıyla 4.8, 4.5, 3.1, 2.4 kat artma görülmüştür ($p<0.01$) (Şekil 4.51).



Şekil 4.51 SK-BR-3 hücrelerinde apoptoz ile ilişkili bazı genlerin mRNA ifade seviyeleri

Şekil 4.52’de MCF-12A hücre hattı için belirlenen EC50 değerindeki vulpinik asit uygulamasından sonra proapoptotik genler TP53, Bax ve BIRC5’de kontrole göre sırasıyla 2.5, 2.3, 2.2 kat artış görülürken antiapoptotik gen Bcl-2’de ise kontrole göre 0.2 kat azalma görülmüştür ($p<0.01$). Ayrıca kaspaz ailesi üyelerinden kaspaz-3, kaspaz-7, kaspaz-8 ve kaspaz-9’da kontrole göre sırasıyla 1.2, 1.3, 1.3 ve 1.4 kat artış görülmüştür ($p<0.01$) (Şekil 4.52).



Şekil 4.52 MCF-12A hücrelerinde apoptoz ile ilişkili bazı genlerin mRNA ifade seviyeleri

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Varol vd. (2016) yaptıkları bir çalışmada vulpinik asit ve gyrophorik asit liken sekonder metabolitlerinin UVB radyasyonunun zararlı etkisine karşı kozmetik amaçlı kullanım potansiyelinin değerlendirilmesi amacı ile insan kerotosistit (HaCat) hücrelerine karşı etkisini değerlendirmişlerdir (Varol vd. 2016). *Letharia vulpinia* ve *Xanthoparmelia pokornyi* liken türlerinin aseton ekstratından vulpinik asit ve gyrophorik asit izole etmişlerdir. HaCat hücrelerine 2,5 J/cm² UVB radyasyonu uygulaması yapılmıştır. Ayrıca kontrol normal hücreye de UVB radyasyonu uygulanmıştır. Vulpinik asit ve gyrophorik asitin 25 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM, 400 µM ve 800 µM konsantrasyonları UV radyasyonu uygulanan ve uygulanmayan hücreler üzerine etkisini belirlemek amaçlı MTT testi yapılmıştır (Varol vd. 2016). Sonrasında UVB radyasyonunun etkisini belirlemek için laktat dehidrogenaz enzim testi, apoptoz belirleme testi, siklosiklon değişim testi yapılmıştır. Elde edilen sonuçların istatistik değerlendirmeleri sonucunda her iki liken türünün de 2,5 J/cm² UVB uygulanan HaCat hücreleri üzerine sitotoksik ve apoptotik etki gösterdiği tespit edilmiştir (Varol vd. 2016). Ayrıca gyrophorik asit 400 µM'dan daha yüksek dozları hariç her iki liken sekonder metabolitide HaCat hücreleri üzerine toksik apoptotik veya siklosiklon değiştirici etkisi göstermediği tespit edilmiştir. Her iki liken sekonder metaboliti karşılaştırıldığında vulpinik asitin UVB ile zarar görmüş HaCat hücreleri üzerine daha koruyucu etki gösterdiği yapılan çalışma ile belirlenmiştir. Gerçekleştirilen tez kapsamında vulpinik asitin farklı dozlarda farklı meme kanseri hücre hatları üzerine etkisi tarafımızca MTT testi, Annexin V ile apoptotik sürecin değerlendirmesi, kaspaz-3 aktivitesi yöntemleri ile belirlenmiştir. Vulpinik asitin MDA-MB-231 için EC50 değeri 11 µM, MCF-7 için EC50 değeri 18 µM, BT-474 için EC50 değeri 5 µM, SK-BR-3 için EC50 değeri 10 µM değerleri tarafımızca bulunmuştur. Varol vd. (2016) yaptığı çalışmada vulpinik asitin HaCat hücresi üzerine yaklaşık 400 µM ile 800 µM arasında UVB'ye karşı koruyucu etki gözlemlemiştir. Tez kapsamında elde edilen sonuçlara göre vulpinik asitin normal meme MCF-12A üzerine sitotoksik ve apoptotik etkisinin meme kanseri hücre hatlarına göre çok daha az oranda olduğu belirlenmiştir (Varol vd. 2016). Çalışma sonuçlarımız normal meme hücre hattı üzerine vulpinik asitin etkisinde Varol

vd. (2016) çalışması ile benzer sonuçlar görülmüştür. Böylece vulpinik asitin çalışılan normal hücreler üzerine toksik etkisinin çok düşük seviyelerde olduğu belirlenmiştir.

Koparal (2015) yaptığı çalışmada HepG2 hepatokarsinoma hücresi NS20Y nöroblastoma kanser hücreleri ve HUVEC endotelial hücresi üzerine vulpinik asit ve usnik asitin hücre canlılığı ve anti-anjiyogenik etkisini araştırmıştır (Koparal 2015). Yapılan çalışma sonucunda vulpinik asitin 48 saat uygulanması sonrasında HepG2 hücresi üzerine EC50 değeri 168 ± 3.33 bulunmuştur. Aynı şekilde NS20Y hücresi üzerine EC50 değeri 68.83 ± 1.58 bulunmuştur (Koparal 2015). Tez kapsamında yaptığımız çalışmada vulpinik asitin MDA-MB-231 için EC50 değeri 11 μ M, MCF-7 için EC50 değeri 18 μ M, BT-474 için EC50 değeri 5 μ M ve SK-BR-3 için EC50 değeri 10 μ M değerleri NS20Y ve HepG2'ye göre meme kanser hücrelerinde EC50 değeri düşük çıktığı tarafımızca bulunmuştur. Aynı şekilde HUVEC hücresi üzerine vulpinik asitin EC50 değeri 231.94 ± 25.4 bulunmuştur (Koparal 2015). Yaptığımız çalışmada kullanılan MCF-12A normal meme hücresinde ise vulpinik asit uygulanan kanserli hücrelerde tespit edilen EC50 değerinin yaklaşık ortalama değerine yakın olacak şekilde tarafımızca 10 μ M olarak belirlenmiştir ve uygulanmıştır. Gerçekleştirdiğimiz tez kapsamında vulpinik asitin çok daha düşük konsantrasyonlarda (0.78, 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 15, 25, 35, 50, 100 μ M) meme kanseri üzerindeki etkisi tarafımızca değerlendirilmesi ile meme kanseri hücresine etkisi ilaç aday molekülü olarak kullanılabilirliğinin ancak bu düşük dozlarda sağlanabileceği göz önünde bulundurularak ilaç endüstrisinde etkinliği tarafımızca belirlenmeye çalışılmıştır.

Coşkun vd. (2015) gerçekleştirdikleri çalışmada meme kanseri üzerine farklı *Cladonia* liken türlerinin metanol ekstraktlarının hücre canlılığı ve apoptotik etki düzeyinin belirlenmesi değerlendirilmiştir (Coşkun vd. 2015). Çalışmada MCF-7 meme kanser hücre hattına *C. rangiformis* ve *C. convolute* liken türlerinin metanol ekstraktı 24 saat süre ile uygulanmıştır. Hücre ölüm oranını belirlemek için MTT testi uygulanmıştır. Sonrasında apoptotik sürecin hücreler üzerindeki etkisinin belirlenmesi için TUNEL tekniği uygulanmıştır (Coşkun vd. 2015). MTT testi sonuçlarına göre; her iki likene ait total metanol ekstresinden 0.01, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 ve 2 mg/ml olacak şekilde MCF-7 hücresine uygulama sonrasında *C. rangiformis* için ED50 değeri 0.905 ve *C. convolute*

için ise ED50 değeri 0.977 mg/ml olarak belirlenmiştir. Ayrıca her iki liken türüne ait ekstraktın 0.6 ve 0.8 mg/ml konsantrasyonlarında MCF-7 hücrelerine karşı inhibe edici etkisi tespit edilmiştir. Kontrol hücreler ile *C. rangiformis* metanol ekstraktı ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinde PCNA immunopozitif hücrelerin oranında azalma gözlemlenmiştir. Aynı sonuçlar *C. convolute* liken türünün metanol ekstraktında da gözlemlenmiştir (Coşkun vd. 2015). Bunlara ilaveten her iki ekstrakta apoptoz-pozitif hücrelerin oranında önemli derecede artış gösterilmiştir. Özellikle *C. rangiformis* 0.2 mg/ml konsantrasyonda kontrol ile karşılaştırıldığında MCF-7 hücrelerinde apoptozu arttırdığı ve hücre sayısını önemli derecede azalttığı bulunmuştur ($p<0.05$). *C. convolute*'nın 0.8 mg/ml konsantrasyonunda neredeyse tüm hücreler üzerine apoptotik etkisi gözlemlenmiştir (Coşkun vd. 2015). Tez kapsamında MCF-7 hücrelerine 0.78 ile 100 μ M aralığındaki konsantrasyonlarda vulpinik asit uygulanması ile elde edilen MTT testi sonucu diğer meme hücrelerine göre en yüksek EC50 konsantrasyonu olan 18 μ M bulunmuştur. Bununla beraber EC50 değerinin belirlenmesiyle MCF-7 hücrelerinde kaspaz-3 aktivitesine bakılmıştır ve kaspaz-3 aktivitesi kontrol hücrelerine göre %13 artış göstermiştir. Ayrıca çalışmamızda liken türünün total ekstresinden ziyade saf izole edilmiş vulpinik asit liken sekonder metaboliti meme kanseri hücrelerine uygulanmıştır ve sonuçta Coşkun vd. (2015) yaptıkları çalışma ile bizim çalışmamız sonucunda elde edilen verilere göre gerek *Cladonia* türünün tüm ekstresi gerekse saf vulpinik MCF-7 hücrelerine karşı yüksek oranda hücre ölümüne sebebiyet verdiği ve bunu da apoptotik süreç ile yürüttüğü her iki çalışmada da gösterilmiştir.

Kasımoğulları vd. (2014) gerçekleştirdikleri çalışmada *Usnea filiipendula* liken ekstraktının sitotoksik, genotoksik ve apoptotik etkisinin tespiti amaçlı meme kanseri hücre hatlarından MCF-7 ve MDA-MB-231 üzerine 72 saat boyunca denenmiştir. Hücre canlılığı etkisi için MTT testi ve ATP canlılık testi ile belirlenmiştir. Apoptozis ve nekroz morfolojik olarak floresan boyanma ile biyokimyasal olarak kaspaz enzim aktivitesi, sitokeratin 18, kaspaz-3 aktivitesi ve poli(ADP-riboz) polimeraz (PARP) bölünme testi ile belirlenmiştir. Ayrıca *U. filiipendula*'nın genotoksik aktivitesi mikronükleus, kromozomal hata ve comet assay yöntemleri ile belirlenmiştir (Kasımoğulları vd. 2014). MTT testi sonuçlarına göre MDA-MB-231 hücreleri için EC50 değeri 44.7 mg/ml ve MCF-7 hücreleri için EC50 değeri 23.0 mg/ml bulunmuştur. Tez

kapsamında MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerine uygulanan vulpinik asit konsantrasyonları ile EC50 değerleri sırasıyla MDA-MB-231 için 11 μ M ve MCF-7 için 18 μ M olarak bulunmuştur. Her iki çalışmadan elde edilen sonuçlara göre aynı hücre hatları üzerine yakın oranda EC50 değerleri belirlenmiştir. *Usnea filipendula*'nın ekstraktının farklı konsantrasyonları (12.5-100 μ g/ml) ile 72 saat uygulanması sonrasında MDA-MB-231 hücreleri üzerinde M30 düzeyinde herhangi bir değişim görülmemiştir. Tam tersi olarak M30 düzeyi 50 ve 100 μ g/ml *Usnea filipendula* ekstraktında MCF-7 hücrelerinde önemli artış görülmüştür (Kasımoğulları vd. 2014). Tez kapsamında gerçekleştirilen Annexin V uygulaması ile MDA-MB-231 hücrelerine 48 saat vulpinik asit muamelesi sonrasında flow sitometri cihazından alınan sonuçlara göre %42 erken apoptoz görünürken % 37 oranında hücrelerin öldüğü görülmüştür. Aynı şekilde MCF-7 hücrelerine 48 saat vulpinik asitin EC50 değeri karşılığı konsantrasyon uygulanmasından sonra flow sitometri cihazından alınan sonuca göre MCF-7 hücrelerinin %40'ının erken apoptoza girdiği görülürken %37 oranında hücre ölümü gerçekleştiği görülmüştür. Kasımoğulları vd. (2014) yaptığı çalışmada MDA-MB-231 hücrelerinde, kaspaz-3 aktivasyonu 100 μ g/ml *Usnea filipendula* ekstraktının uygulanması sonucunda yaklaşık 1.5 kat artmıştır. Bunun nedeni olarak MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatlarında kaspaz ailesine bağlı yollar vasıtasıyla apoptotik hücre ölümü uyarılmış olduğu tespit edilmiştir. Tez kapsamında ise kaspaz-3 enzim aktivitesi belirlenmesinde MDA-MB-231 hücresi için kontrole göre kaspaz aktivitesi %12 artmıştır ayrıca MCF-7 hücresinde de kaspaz aktivitesi %13 oranında artmıştır. Dolayısıyla çalışma sonuçlarımız literatürle uyum göstermiştir. Genotoksik etkiyi belirlemek amaçlı Kasımoğulları vd. (2014) yaptığı çalışmada mikronükleus testi (MN) sonuçlarına göre; *Usnea filipendula* ekstraktının tüm uygulanan dozlarda (125, 250, 500 μ g/ml) MN frekansında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edememişlerdir. Nükleus ayırım indeksi (NDI) açısından değerlendirildiğinde ise *Usnea filipendula* ekstraktının 250 μ g/ml dozunda önemli farklılaşma tespit etmişlerdir. (Kasımoğulları vd. 2014). Bizim çalışmamızda moleküler boyutta mRNA düzeyinde apoptozla ilişkili TP53, Bcl-2, Bax, BIRC5, kaspaz-3, kaspaz-7, kaspaz-8, kaspaz-9 genlerini ait primerleri ile gen ifadesi seviyelerindeki değişim incelenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre; EC50 değeri karşılığı konsantrasyonda MDA-MB-231 hücrelerine vulpinik asit uygulanması sonrasında TP53, Bax ve BIRC5 gibi apoptotik genlerde kontrole göre

sırasıyla 12, 11, 11 kat artış görülürken, Bcl-2 antiapoptotik gende kontrole göre 0.5 kat azalma görülmüştür. Ayrıca kaspaz ailesi üyelerinden kaspaz-3, kaspaz-7, kaspaz-8 ve kaspaz-9'da sırasıyla kontrole göre 3 kat artış görülmüştür. MCF-7'de ise aynı genlere bakıldığında TP53, Bax, BIRC5 gibi proapoptotik genlerde kontrole göre sırasıyla 12, 11, 11 kat artma görülürken Bcl-2 gibi antiapoptotik gende ise kontrole göre yaklaşık 0.5 kat azalma görülmüştür. Kaspaz ailesi üyelerinden kaspaz-3, kaspaz-7, kaspaz-8 ve kaspaz-9 bakıldığında ise kontrole göre sırasıyla 3.3, 3.7, 2.8, 2.9 kat artış görülmüştür.

Karaosmanoğlu ve Sivas (2015) gerçekleştirdikleri çalışmada vulpinik asiti hepatosellüler karsinoma hücre hattı HepG2 ve fare embriyonik fibroblast hücre hattı olan F2408 üzerinde sitotoksik etkisini MTT testi ile ve apoptotik etkisine ise AO/EB boyası ile floresan mikroskop ile bakmışlardır. Vulpinik asitin EC50 değerleri F2408 normal hücre için 450-500 μ M bulunurken, kanser hücresi olan HepG2 hücresi üzerine 48 saat de 300-400 μ M aralığında tespit edilmiştir (Karaosmanoğlu ve Sivas 2015). Tez kapsamında bizim yaptığımız deneylerde en yüksek konsantrasyon olan 100 μ M konsantrasyonda normal meme hücresi MCF-12A hücresine vulpinik asitin %30 oranında kanserli hücreye göre daha az oranda etki ettiği bulunmuştur. Meme kanser hücresi olan MDA-MB-231, MCF-7, BT-474, SK-BR-3 hücresi için ise EC50 değerleri sırasıyla 11 μ M, 18 μ M, 5 μ M, 10 μ M olarak bulunmuş olması bizim çalışmamızda kullanılan meme kanser hücrelerine vulpinik asitin çok düşük konsantrasyonlarda etki ettiği görülmüştür. Ayrıca 100 μ M vulpinik asit uygulanan hücrelerde 48 saat sonra apoptotik hücre oranında önemli artış görülmüştür. Tez kapsamında yaptığımız Annexin V boyası ile flow sitometri analizi sonrası değerlendirme EC50 değerlerine karşı gelen konsantrasyonlarda vulpinik asit uygulanan meme kanseri hücrelerinde MDA-MB-231 için %42 erken apoptoz görülürken MCF-7 için %40, BT-474 için %41 ve SK-BR-3 için %35 erken apoptoz görülmüştür. Her iki çalışma sonucunda vulpinik asit liken sekonder metabolitinin normal ve çalışan kanser hücreleri üzerine büyüme ve apoptoz aktivasyonuna karşı engelleyici etki gösterdiği belirlenmiştir

Bazı önemli bileşiklerin hangi moleküler yolları kullanarak etki mekanizması gösterdiğine dair son yıllarda yapılan çalışmalar oldukça önem arz etmektedir. Literatürde yer alan birkaç önemli makale sonuçları şu şekilde değerlendirilmiştir.

Aravina vd. (2015) gerçekleştirdikleri bir çalışmada normal dokularda önemli derecede toksisiteye sebebiyet vermeyen kanser hücrelerinde apoptozu seçici olarak azaltabilme özelliğine sahip olması nedeniyle kanser terapisinde etkili bir hedef olan tümör nekrosis faktör-apoptozla ilişkili-azaltıcı ligand (TRAIL) üzerine odaklanmışlardır. Daha önce gerçekleştirdikleri çalışmalar sonucunda galaktoksiloglukan (PST001) yüksek derecede antitümör ve immünomodülatör özelliğinin olduğunu belirlemişlerdir. Ancak antikanser etkisini gösteren gerçek mekanizma hakkında bir veri bulunmadığını tespit etmişlerdir. Bunun üzerine taraflarınca literatürde ilk defa gerçekleştirilmiş olan apoptoz ile ilişkili TRAIL ile KB ve boğaz kanseri hücrelerine PST001'in etkisini araştırmışlardır. Çalışmada apoptozun morfolojisi, Annexin V bağlanması, kaspaz 3, 8, 9 ve 2 aktivitesi, western blot, hücre canlılık değerlendirmesi, mikrodizin gen ekspresyon analizi ve qRT-PCR ile doğrulama yöntemleri ile PST001'in kanser hücreleri üzerine etkinliği tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda PST001'in potansiyel antikanserojen ajan olarak değerlendirilebileceğini önermişlerdir (Aravina vd. 2015).

Zhang vd. (2014) ABD'de bitkisel tedavi amaçlı kullanılan daha önce antikanserojenik etkisi belirlenmiş protopanaxadiol (PPD)'ün kolon kanseri üzerine *in vivo* etkisinin değerlendirmesi üzerine çalışmışlardır. Apoptoz uygulaması, xenograft tümör model yöntemi kullanılması sonucunda hücre döngüsü uygulaması, mRNA array uygulaması sonucunda 76 genin ekspresyon düzeyi PPD uygulaması sonucu 2 kat artış göstererek değişmiştir. Kolon kanseri üzerine TRAIL yolağı, DR4/DR4 ve P53 arasında etkileşimde PPD aktivasyonunun önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Zhang vd. 2014).

Demirel vd. (2009) meme kanseri hücresi MCF-7 üzerine bitki alkoloidlerinden paklitaksel ve vinkristin'in uygulanması sonucunda gelişmiş çoklu ilaç direnci mekanizmalarının mikrodizin analizi ile tespit edilmesi amaçlanmıştır. Araştırma sonucunda MDR1 genin ifadesinde artışın dirençlilik mekanizmaları arasında önemli ve anlamlı olduğunu tespit etmişlerdir. Özellikle apoptozla ilgili bazı genlerin ifadelerinde azalma olduğu gösterilmiştir. Çalışma sonucunda çoklu ilaç dirençliliğine sebep olan genlerin etkisinin tanımlanmasında kemoterapi için uygulanan ilaçların kişiye özel

olarak uygulanabilmesinin mümkün olması ile kanser tedavisinin klinik başarısının artırılmasına katkı sağlanmıştır (Demirel-Kars vd. 2009).

Kiper vd. (2013) gerçekleştirdikleri çalışmada nitrojen içeren bisfosfonat bir bileşik olan zoledronik asit üzerine odaklanılmıştır. Önklilik verilerin detaylı incelenmesi sonucu solid ve hematoksikolojik tümörün birçok tipi için zoledronik asit güçlü antikanserojenik aktivite göstermiştir (Jagdev vd. 2001, Tassone vd. 2003). Bunun üzerine K562 kronik myeloid leukemia (CML) hücreleri üzerine sitotik ve apoptotik etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca apoptozu azaltan zoledronik asit üzerine STAT genlerinin rolü'nde tespit edilmeye çalışılmıştır. Çalışma kapsamında sitotoksikite ölçümü XTT testi ile, apoptozisin değerlendirilmesi ise AnnexinV-EGFP Apoptoz belirleme kiti ile yapılmıştır. Akabinde STAT genlerinin ekspresyon düzeyinin belirlenmesi için qRT-PCR analizi ve de protein boyutunda kontrol olarak da western blot tekniği yapılmıştır. Çalışma sonucunda zoledronik asitin poliferasyonu azalttığı, doza ve zamana bağlı olarak K562 hücrelerinde apoptozisi azalttığı belirlenmiştir. STAT3-5A ve -5B genlerinin protein ve mRNA düzeyleri zoledronik asit ile muamele görmüş K562 hücrelerinde önemli derecede azalma gözlemlenmiştir. Çalışma sonuçları klinik çalışmaların da uygulanmasından sonra CML hastalarında tedavi edici STAT inhibisyonunu sağlayan zoledronik asit'in etkili olabileceği belirtilmiştir (Kiper vd. 2013).

Başsoy ve Baran (2012) prostat kanser hücreleri üzerine apoptozu azaltan etkisi olan docetaxel içerisindeki sifingolipidlerin biyoaktivitesini belirlemeye yönelik bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada DU-145 ve PC-3 hücreleri kullanılmıştır. Çalışmada seramid sentez gen ailesi, spingozin kinaz-1 ve glukosileramid sintaz'ın ekspresyon düzeylerinin etkisi detaylı araştırılmıştır. Gerçekleştirilen çalışmada dikkate değer sonuçlar açığa çıkarmıştır ki prostat kanser hücrelerinde apoptozu azaltıcı etkisi olan docetaxel'de seramide metabolize edici genlerin gelişimin vurgulayan mekanizmalar tanımlanmıştır. Başsoy ve Baran (2012) tüm bu gerçekleştirilen çalışmalarda kullanılan yöntemlere benzer olarak çalışmamızda da vulpinik asitin hangi moleküler yolak üzerinden yol aldığı çalışılmıştır böylece literatüde ilk kez vulpinik asit sekonder

metabolitinin apoptotik yolak ile meme kanseri hücreleri üzerinde hücre canlılığını azalttığı belirlenmiştir (Başsoy ve Baran 2012).

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda sitotoksik kemoteröpotik ajanlar olarak likenlerin kullanımı, immun-düzenleyici özelliğe sahip likenlerin araştırılması ve son alt başlık olarak antikanser tedavisinde yeni stratejilerin geliştirilmesi çalışmalarında likenlerin kullanılması detaylıca anlatılmıştır. Liken sekonder metabolitlerinin kullanımı ile yapılan antikanserojenik çalışmaların sayısı her geçen gün artmasına karşın, bu konudaki çalışmalar kanser spesifik sinyal hedef yolaklarının henüz moleküler boyutta araştırılmamış olması yapılan bu tez çalışmasının özgünlüğünü artırmaktadır.

Esmaili ve Farimani tarafından (2014) yapılan çalışmada kullanılan daucosterol İran'da endemik medikal bitki olan *Salvia sahendica* bitkisinden izole edilmiştir. Daucosterol İran'da birçok hastalığın tedavisinde antibakteriyal, antifungal ve antikanserojenik amaçlı tedavide kullanılmaktadır (Lotfipour vd. 2007). İnsan meme adenokarsinoma hücresi olan MCF-7 hücresine karşı apoptozu azaltıcı etkisi olan daucosterol moleküler mekanizması aydınlatmak amaçlı çalışmalarını yönlendirmişlerdir. Daucosterol'un özellikle P13K/akt yolağının inaktivasyonunu sağladığı görülmüştür. Çalışma sonucunda araştırmacılar daucosterol'un in vitro şartlarda insan meme kanser hücrelerinin apoptozu azalttığı ve önemli derecede hücre büyümesini durdurduğunu belirlemişlerdir (Esmaili ve Farimani 2014). Tez kapsamında bizim yaptığımız çalışmalarda ise vulpinik asitin meme kanseri hücre hatları üzerinde hücre büyümesini durdurduğu görülmüştür.

Chen vd. (2014) yayınladıkları çalışmada in vitro ve in vivo olarak insan meme kanseri üzerine ROS bağlı mitokondriyal yolağı ile usnik asitin apoptozu artırıcı etkisi çalışılmıştır (Chen vd. 2014). Çalışmada MCF-7, MDA-MB-231, SK-BR-3 ve normal hücre olarak da MCF-10A hücreleri kültüre edilmiştir. Sonrasında farklı dozlarda ve farklı zaman aralığında usnik asit hücrelere uygulanıp MTT testi ile hücre canlılık testi uygulanmıştır. Sonrasında apoptoz uygulaması, kaspaz-3 aktivitesi, intraselüler ROS belirleme uygulaması, mitokondriyal membran potansiyelinin değerlendirilmesi ve western blot ile protein bazında incelenmesi yapılmıştır. In vivo olarak da tümör

xenograft çalışması uygulanmıştır. Çalışma sonucunda önemli bir toksisite oluşturmaksızın usnik asit MCF-7 tümörlü farelerde doza bağlı durumlarda tümör gelişimini inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu sonuçlara ilaveten MCF-7 hücrelerinde ROS-bağlı mitokondriyal yolak vasıtasıyla usnik asitin apoptozu uyarıcı etkisi olduğu bildirilmiştir (Chen vd. 2014). Gerçekleştirdiğimiz tez kapsamında vulpinik asit sekonder metabolitinin gerçek moleküler mekanizmasının aydınlatılmaması konusundaki boşluğun doldurulması amaçlı hücre canlılığı etki sürecinde etkin olan tüm genlerin karakterizasyonu yapılarak meme kanserinde olası tedavi ve önlemede yeni kanser ilaç adayı olarak kullanılabilirliğinin sağlanması açısından aydınlatılmaya çalışılmış ilk çalışmadır.

Feng vd. (2013) yaptığı çalışmada *Artemisia capillaris* bitkisinde izole ettikleri suda çözülebilir formdaki polisakkaritleri (WACP) fizyokimyasal analizlerini yaptıktan sonra CNE-2 hücre hattına uygulamışlardır. Hücre canlılık analizini MTT yöntemi ile gerçekleştirmişlerdir (Feng vd. 2013). Sonrasında apoptozun belirlenmesinde flow sitometri, mitokondriyal membran potansiyel analizi, sitokrom-c salınımı ve kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivite analizi yapmışlardır. Çalışma sonucunda 200 µg/ml WACP'ı 48 saat süre ile CNE-2 hücrelerine uygulaması sonrasında % 65.4 oranında maksimum inhibitör etkisi göstermiştir (Feng vd. 2013). Tez kapsamında yaptığımız çalışmada ise meme kanser hücre hattına 48 saat boyunca uygulanan vulpinik asit 0.78, 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 15, 25, 35, 50, 100 µM konsantrasyonları sonucunda EC50 değeri MDA-MB-231 hücrelerinde 11 µM, MCF-7 hücrelerinde 18 µM, BT-474 hücrelerinde 5 µM, SK-BR-3 hücrelerinde 10 µM olarak bulunmuştur. Feng vd. (2013) apoptoz belirleyici olarak gerçekleştirdikleri flow sitometri analizi sonucunda; normal hücre ile mukayese ettiklerinde WACP ile muamele edilmiş CNE-2 hücrelerinde önemli oranda apoptotik hücre ölümü görülmüştür. WACP'nin tüm uygulanan konsantrasyonlarında (50, 100 ve 200 µg/ml) ve uygulama sürelerinde (24, 48 ve 72 saat) canlı hücrelerin yüzdesi azalmıştır. Tez kapsamında yaptığımız flow sitometri sonuçlarımıza göre MDA-MB-231 hücresi yaklaşık %79 canlı hücrelerde azalma olurken, MCF-7'de %93, BT-474' de %70, SK-BR-3'de %60 oranlarında canlı hücre azalması görülmüştür. Çalışma sonuçlarımız literatürle uyumlu sonuçlar vermiştir.

Lin vd. (2003) yılında gerçekleştirdikleri çalışmada *Cladonia furcata* liken türüne ait polisakkarit (CFP-2) izole etmişlerdir (Lin vd. 2003). Elde edilen CFP-2'nin biyolojik doğrulamaları sonrasında telomeraz inhibisyonu ve apoptotik etkisi değerlendirilmiştir. Hücre canlılığı tespiti için HL-60 ve K562 kanser hücre hatları üzerinde MTT testi yapılmıştır. CFP-2'nin 50, 100, 200, 400 ve 800 mg/L konsantrasyonları 4.5 ve 6 gün boyunca her iki hücreye de uygulanmıştır. Sonrasında apoptotik etkinin belirlenmesi amaçlı DNA fragment analizi ve western blot yapılmıştır. DNA fragment analizi sonuçlarına göre CFP-2 uygulanan kanser hücrelerinin jelde yürütülen DNA örneklerinde bant yoğunluğunda kayıplar tespit edilmiştir. Western blot sonuçlarına göre de kontrol ile karşılaştırıldığında 300 mg/L CFP-2 uygulaması öncesi ve sonrasında Bcl-2 düzeyi aynı seviyede kalırken Bax ifadesinde artış gözlemlenmiştir (Lin vd. 2003). Tez kapsamında yaptığımız qRT-PCR sonuçlarına göre ise MDA-MB-231 hücresinde TP53 ve Bax geninde ifade artışı görülürken, Bcl-2 geninde ise kontrole göre 0.5 kat ifade azalması görülmüştür. MCF-7, BT-474 ve SK-BR-3 hücrelerinde ise TP53 ve Bax genlerindedeki ifade artışı görülmüştür.

Backorova vd. (2012) gerçekleştirdikleri çalışmada kullanılan parietin, atronorin, usnik asit ve girofik asitin apoptozu indükleyici etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır (Backorova vd. 2012). Flow sitometri analizi ve kaspaz-3 aktivasyonunun belirlenmesi bizim çalışmamıza ortak kullanılan teknikler arasında yer almaktadır. Flow sitometri sonuçlarına göre usnik asit (50 ve 100 µM) konsantrasyonlarda A2780 hücresinde etkin oranda hücre ölüm miktarını göstermiştir. Benzer şekilde yine usnik asit (50 ve 100 µM) sekonder metaboliti HT-29 hücresi üzerine en potansiyel kaspaz-3 aktivasyonu göstermiştir (Backorova vd. 2012). Tez kapsamında yaptığımız kaspaz-3 enzim aktivasyonuna göre kullanılan meme kanseri hücre hatları üzerinde %10-13 oranında artış görülmüştür. Çalışma sonuçlarımızda benzer veriler elde edilmiştir.

Singh vd. (2013) yaptıkları çalışmada insan akciğer karsinoma hücresi A549 üzerine usnik asitin (UA) inhibe edici etkisi ve apoptozis durumu değerlendirilmiştir (Singh vd. 2013). A549 hücresine MTT testi ile 25, 50 ve 100 µM uygulaması yapılmıştır. Apoptoz belirleme amaçlı FITC Annexin V apoptoz belirleme kiti kullanılmıştır. Çalışma sonucunda, UA uygulamasının 48 saat sonrasında A549 hücresi üzerine %68-89

oranında hücre canlılığını etkileyecek düzeyde olduğu belirlenmiştir (Singh vd 2013). Bizim yaptığımız çalışmada da 48 saat vulpinik asit uygulaması sonrasında % 60-90 oranında hücre canlılığını azaltıcı etki göstermiştir. Ayrıca UA uygulanan tüm konsantrasyonları (25,50 ve 100 μ M) 48 saat sonrasında kontrole göre apoptotik hücrelerde sırasıyla %6, %10 ve %11 oranında ölüm görülmüştür. Tez kapsamında gerçekleştirdiğimiz flow sonuçlarımızda ise MDA-MB-231 hücresinde % 37, MCF-7 hücresinde %53, BT-474 hücresinde %29 ve SK-BR-3 hücresinde % 31 ölüm görülmüştür.

Narender vd. (2013) yaptıkları çalışmada *Rheum emodi* bitkisinden izole edilen emodin maddesinin kaspaza bağlı apoptozisinin belirlenmesi üzerine odaklanmışlardır (Narender vd. 2013). İzolasyonu yapılan Emodin'nin MDA-MB-231, HepG2 ve NIH13T3 hücre hatlarına karşı hücre canlılık testi MTT yöntemi ile yapılmıştır. EC50 değeri MDA-MB-231 için 291 μ M bulunmuştur. Bizim çalışmamızdaki 48 saat vulpinik asit uygulanmasıyla yapılan MTT sonucunda MDA-MB-231 hücresi için EC50 değeri 11 μ M bulunmuştur. Apoptozu belirlemek amaçlı Annexin V boyası ile boyanan normal ve kanserli hücre hatları flow sitometri ile karşılaştırılmıştır. Flow sitometri sonuçlarına göre; MDA-MB-231 hücresine karşı uygulanan Emodin maddesi erken ve geç apoptozis evreleri doza bağlı tüm durumlarda (5, 10 ve 20 μ M) artış göstermiştir (Narender vd. 2013). Bizim çalışmamızda MDA-MB-231'e 48 saat EC50 değeri 11 μ M olan konsantrasyon uygulandığında hücrelerin % 42'si erken apoptoza girmiş olduğu literatürle uyumlu olarak gösterilmiştir.

Da-lian vd. (2011) gerçekleştirdiği çalışmada potansiyel bir malarya önleyici ilaç olan mefloquine uygulaması sonrasında apoptozla ilişki pro veya anti-apoptotik genlerin ifade düzeylerindeki değişimi incelemişlerdir (Da-lian vd. 2011). Gerçekleştirilen gerçek zamanlı PCR analizinde 84 apoptozla ilişkili genin ifade değişimi detaylıca değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda 23 genin ifadesinde artış ve/veya azalma değişikliği tespit edilmiştir. Birçok anti-apoptotik gen örneğin; Bcl2a1 Birc1b, Birc3, Birc4, Brip1, Cflar, Il10, Lhx4, mcl1, Nfkb1, Prlr, Prok2 ve TNF ifadesinde artış gözlemlenmiştir. Bizim yaptığımız çalışmadaki gerçek zamanlı PCR sonuçlarına göre bütün meme kanseri hücrelerinde Bcl-2 gen ifadesinde azalma gözlemlenmiştir.

Çalışmada kullanılan Bid3, Birc4, Brip1, Casp1, Casp7, Casp9, Cradd, Faim, Prlr, Sphk2, Tnfsf10, Tnfsf12 ve Tradd genlerinin ifadesinde de azalma belirlenmiştir. Bizim yaptığımız deneyler kapsamında kaspaz genlerinin ekspresyonu bütün hücrelerde yaklaşık 2 ile 4 kat artış görülmüştür. Bir diğer önemli apoptotik yolak içerisinde yer alan p53 geni ise 2.69 oranında ifade artışı göstermiştir (Da-lian vd. 2011). Bizim çalışmamızda ilaç aday molekül olarak gösterdiğimiz vulpinik asitin MDA-MB-231 hücresinde TP53 gen ekspresyonu kontrole göre 12 kat artarken, MCF-7 hücresinde 6 kat, BT-474 hücresinde 10 kat ve SK-BR-3 hücresinde 14 kat artış görülmüştür.

Atronorin ve usnik asit sekonder metabolitinin meme kanseri hücresinden MCF-7, SK-BR-3 ve T-47D hücresine karşı yalnızca antikansejonik aktivitesi çalışılmıştır (Mayer vd. 2005, Backorova vd. 2012). Ancak angiogenesis'in engellenmesi, nekroz, apoptoz ve hücre döngüsünün durdurulmasında liken sekonder metabolitleri tarafından hücre ölümünün moleküler mekanizmasının aydınlatılmasına dair çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (Brisdelli 2013). Gerçekleştirilen tez çalışmamızda bir liken sekonder metaboliti olan vulpinik asitin hücre canlılık belirleme yöntemlerinden biri olan MTT testi ile sitotoksik etkisine, gerçek zamanlı PCR ile bazı apoptozla ilişkili genlerin ifade değişimine, annexin V boyası ile hücre apoptosiz düzeyi ve kaspaz-3 enzim aktivitesi tespit edilmiştir. Özellikle Stanojkovic (2015) usnik asit sekonder metabolitinin sitotoksitesisi, *in vitro* ve *in vivo* antitümör aktivitesi, moleküler mekanizmalarının daha çok deney basamağı ve klinik denemelerin yapılmasına ihtiyaç olduğu belirtilmiştir (Stanojkovic 2015). Tedavide en etkin bileşiğin fazla miktarlarda üretimi ile devam edilecek liken türlerinden izole edilen sekonder metabolitlere dayalı tedavinin kullanılabilirliğinin mümkün olabilmesi için genişletilmiş klinik denemeleri ve spesifik moleküler mekanizmaların etki yollarının tanımlanması üzerine odaklanılarak meme kanseri tedavisinde umut verici çözümler elde edilebileceği mümkün görülmektedir.

KAYNAKLAR

- Akins, P.T., Liu, P.K. and Hsu, C.Y. 1996. Immediate early gene expression in response to cerebral ischemia: friend or foe. *Stroke*, 27, 1682-1687.
- Alıcı, S., İzmirli, M. ve Doğan, E. 2006. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı'na başvuran kanser hastalarının epidemiyolojik değerlendirilmesi. *Türk Onkoloji Dergisi*, 21(4); 87-97.
- Anonim. 2012. Web Sitesi: <http://www.istanbul.edu.tr/fen/notlar/1260110414.pdf> Erişim tarihi: 17.05.2016.
- Anonim. 2013a. Web Sitesi: <http://dogalhayat.org/property/liken/> Erişim tarihi: 01.05.2016.
- Anonim. 2013b. Web Sitesi: <http://www.tuba.gov.tr/> Erişim tarihi: 10.05.2016.
- Anonim. 2014. Web Sitesi: <https://tr.wikipedia.org/wiki/Likenler>. Erişim tarihi: 01.05.2016.
- Anonim. 2015. Web Sitesi: <http://globocan.iarc.fr>. Erişim tarihi: 05.05.2016.
- Anonim. 2016a. <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/breast/Patient/page2> Erişim tarihi: 12.05.2016.
- Anonim. 2016b. Web Sitesi: <http://old.tkd.org.tr/pages>. Erişim tarihi: 17.05.2016.
- Aravina, S.R., Joseph, M.M., George, S.K., Dileep, K.V., Varghese, S., Rose-James, A., Balaram, P., Sadasivan, C. and Sreelekha, T.T. 2015. Trail-based tumor sensitizing galactoxyloglucan, a novel entity fortargeting apoptotic machinery, *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 59, 153-166.
- Arslan, S. ve Bölükbaş, N. 2003. Kanserli hastalarda yaşam kalitesinin değerlendirilmesi. *Atatürk Üniversitesi Hemşirelik Yüksekokulu Dergisi*, 6(3); 38-47.
- Ashkenazi, A. and Dixit, V.M. 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281,1305-8.
- Aslan, G. 2010. Tümör immünolojisi. *Turkish Journal of Immunology*, 15(1); 7-13.

- Backorova, M., Jendzelovsky, R., Kello, M., Backor, M., Mikes, J. and Fedorocko, P. 2012. Lichen secondary metabolites are responsible for induction of apoptosis in HT-29 and A2780 human cancer cell lines. *Toxicology in Vitro*, 26, 462-468.
- Banasiak, K.J. and Haddad, G.G. 1998. Hypoxia-induced apoptosis: effect of hypoxic severity and role of p53 in neuronal cell death. *Brain Research*, 797, 295-304.
- Başsoy, E.Y. and Baran, Y. 2012. Bioactive sphingolipids in docetaxel-induced apoptosis in human prostate cancer cells, *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 66, 103-110.
- Boatright, K.M., Renatus, M., Scott, F.L., Sperandio, S., Shin, H., Pedersen, I.M., Ricci, J.E., Edris, W.A., Sutherlin, D.P., Green, D.R. and Salvesen, G.S. 2003. A unified model for apical caspase activation. *Molecular Cell Biology*, 11(2); 529–541.
- Bora-Başaran, B., Güler, C. ve Yentür, G.K. 2014. Dünya kanser örgütü verileri. Sağlık Araştırmaları Genel Müdürlüğü, Sağlık Bakanlığı, Ankara.
- Brisdelli, F., Perilli, M. and Sellitri, D. 2013. Cytotoxic activity and antioxidant capacity of purified lichen metabolites: an in vitro study, *Phytother Research*, 27, 431-437.
- Caotes, P.J., Hales, S.A. and Hall, P.A. 1996. The association between cell proliferation and apoptosis; studies using cell cycle-associated proteins Ki67 and DNA polymerase alpha. *The Journal of Patology*, 178, 71- 77.
- Chen, S., Dobrovolsky, V.N., Liu, F., Wu, Y., Zhang, Z., Mei, N. and Guo, L. 2014. The role of autophagy in usnic acid-induced toxicity in hepatic cells. *Toxicological Sciences*, 142(1); 33-44.
- Chen, Z., Zhang, L., Xia, L., Jin, Y., Wub, Q., Guo, H., Shang, X., Dou, J., Wua, K., Nie, Y. and Fan, D. 2014. Genomic analysis of drug resistant gastric cancer cell lines by combining mRNA and microRNA expression profiling. *Cancer Letters*, 350, 43-51.
- Chicheportiche, Y., Bourdon, P.R., Xu, H., Hsu, Y.M., Scott, H., Hession, C., Garcia, I. and Browning, J.L. 1997. TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(51); 32401–10.
- Choi, W.S., Lee, E.H. and Chung, C.W. 2001. Cleavage of bax is mediated by caspase dependent or independent calpain activation in dopaminergic neuronal cells: protective role of Bcl 2. *Journal of Neurochemistry*, 77, 1531-1541.

- Cohen, J.J. 1998. Apoptosis. To Be Or Not To Be. Postgraduate Syllabus (AA-AA-I) 1, 1–19.
- Cooper, G.M. 1994. Programmed cell death. The cell. In: Cooper GM, 14, 592-596.
- Cory, S. and Adams, J.M. 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. Nature Reviews Cancer, 2(9); 647–56.
- Coşkun, G. ve Özgür, H. 2011. Apoptoz ve nekrozun moleküler mekanizması. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, 20, 145-158.
- Coşkun, M.Z., Ersöz, M., Açıkgöz, B., Karaltı, I., Çobanoğlu, G. and Sesal, C. 2015. Anti-Proliferative and apoptotic effects of methanolic extracts from different *Cladonia* species on human breast cancer cells. Folia Biologica (Praha), 61, 97-103.
- Crowe, M.J., Bresnahan, J.C., Shuman, S.L., Masters, J.N. and Beattie, M.S. 1997. Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. Nature Medicine, 3, 73-76.
- Çevik, Ö., Aydın, U. ve Gürsoy, R.N. 2012. Kanseri Tedavisinde Lenfatik Hedeflendirme. Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, 32(1); 67-90.
- Da-lian, D., Shinichi, S., Hai-yan, J., Wei-dong, Q.I., Dong-zhen, Y.U., Tanokura, M. and Salvi, R. 2011. Detection of apoptosis by RT-PCR array in mefloquine – induced cochlear damage. Journal of Otology, 6, 1.
- Demirel-Kars, M., Darcansoy-İşeri, Ö., Arpacı, F. ve Gündüz, U. 2009. Meme kanseri MCF-7 hücre hattında paklitaksel ve vinkristin’e karşı gelişmiş çoklu ilaç direnci mekanizmalarının mikrodizin analizi ile belirlenmesi, Türk Onkoloji Dergisi, 24(4); 153-158.
- Elmore, S. 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. Toxicological Pathology, 35(4):495–516.
- Erdoğan, B. ve Uzaslan, E.K. 2003. Apoptozis Mekanizmaları: Tümör Gelişiminde Faz-Fasl Bağımlı Apoptozis, Akciğer Arşiv, 4, 165-174.
- Eröz, R., Karataş, A., Alkoç, O.A., Baltacı, D., Oktay, M. ve Çolakoğlu, S. 2012. Apoptozis hakkında bilinenler. Düzce Tıp Dergisi, 14, 87-101.
- Esmaeili, M.A. and Farimani, M.M. 2014. Inactivation of PI3K/Akt pathway and upregulation of PTEN gene are involved in daucosterol, isolated from *Salvia sahendica*, induced apoptosis in human breast adenocarcinoma cell, South African Journal of Botany, 93, 37-47.

- Evan, G.L., Wyllie, A.H., Gilbert, G.S., Littlewood, T.D., Lond, H. and Breaks, M. 1992. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell*, 69, 119-128.
- Feng, A., Wang, X., You, C., Cheng, X., Han, Z., Zong, L., Zhou, C. and Zhang, M. 2013. Antiproliferative potential of *Artemisia capillaris* polysaccharide against human nasopharyngeal carcinoma cells. *Carbohydrate Polymers*, 92, 1040-1045.
- Fischer, U., Janicke, R.U. and Schulze-Osthoff, K. 2003. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differentiation*, 10(1); 76–100.
- Freimoser, F.M., Jakob, C.A., Aebi, M. and Tuor, U. 1999. The MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide] assay is a fast and reliable method for colorimetric determination of fungal cell densities. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(8); 3727-3729.
- Gölbaşı, Z., Çetin, R., Kalkan, S. ve Durmuş, T. 2010. Üniversite öğrencisi kızların meme kanseri ve kendi kendine meme muayenesi ile ilgili bilgi ve davranışları. *The Journal of Breast Health*, 6, 69-73.
- Güneş, H. 1999. Sitokinlerin hücre döngüsü üzerinde etkileri. *Turkish Journal of Biolojy*, 23, 283-292.
- Gürel, D.K. 2007. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Erişkin Onkoloji, Hematoloji Kliniklerinde Kemoterapi Uygulanan Hastaların Yaşam Kalitesi Ve Bunu Etkileyen Faktörlerin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1); 57-70.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. 2011. Hallmarks of cancer, The Next Generation. *Cell*, 144(5); 646-674.
- Hirose, Y., Yoshimi, N., Suzui, M., Kawabata, K., Tanaka, T. and Mori, H. 1997. Expression of bcl-2, bax, and bcl-XL proteins in azoxymethane-induced rat colonic adenocarcinomas. *Molecular Carcinogenesis*, 19(1); 25-30.
- Hu, Y.M., Benedict, M.A. and Ding, L.Y. 1999. Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf I- mediated caspase-9 activation and apoptosis. *The EMBO Journal*, 18, 3586-95.
- Huneck, S. and Yoshimura, I. 1996. Identification of lichen substances. *Springer*, 228–229.

- Jagdev, S.P., Coleman, R.E., Shipman, C.M., Rostami, H.A. and Croucher, P.I. 2001. The bisphosphonate, zoledronic acid, induces apoptosis of breast cancer cells: evidence for synergy with paclitaxel, *British Journal of Cancer*, 84, 1126-1134.
- Karaosmanoğlu, O. and Sivas, H. 2015. The in vitro investigation of cytotoxic and apoptotic effects vulpinic acid on normal and cancer cell. *Journal of Biotechnology*, 208-s95.
- Kasımoğulları-Çelikler, S., Oran, S., Arı, F., Ulukaya, E., Aztopal, N., Sarımahmut, M. and Öztürk, Ş. 2014. Genotoxic, cytotoxic, and apoptotic effects of crude extract of *Usnea filipendula* Stirt. In vitro. *Turkish Journal of Biology*, 38, 940-94.
- Keane, R.W., Kraydieh, S., Lotocki, G., Bethea, J.R., Krajewski, S., Reed, J.C. and Dietrich, W.D. 2001. Apoptotic and anti-apoptotic mechanisms following spinal cord injury. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 60, 422-429.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H. and Currie, A.R. 1972. Apoptosis. A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26, 239-245.
- Kinloch, R.A., Treherne, J.M., Furness, L.M. and Hajimohamadreza, I. 1999. The Pharmacology of Apoptosis. *Trends in Pharmacological Sciences*, 20, 35-42.
- Kiper, H.D., Tezcanlı-Kaymaz, B., Adan-Gökbulut, A., Selvi, N., Avcı, C.B., Kosova, B., İskender, G., Kartal-Yandım, M., Gündüz, C., Şahin, F., Baran, Y. and Saydam, G. 2013. Stat pathway in the regulation of zoledronic acid-induced apoptosis in chronic myeloid leukemia cells. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 67, 527-532.
- Koparal, A.T. 2015. Anti-angiogenic and antiproliferative properties of the lichen substances (-)- usnic acid and vulpinic acid. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 70(5-6); 159-164.
- Kosova, F. ve Arı, Z. 2008. Adipositokinler ve meme kanseri. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 22(6); 377-384.
- Krajewski, S., Krajewska, M., Ellerby, L.M., Welsh, K., Xie, Z., Deveraux, Q.L., Salvesen, G.S., Bredesen, D.E., Rosenthal, R.E., Fiskum, G. and Reed, J.C. 1999. Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. *Proceeding of the National Academy of Science*, 96, 5752-57.
- Kromer, G., Petit, P., Zamzami, N., Vayssiere, J.L. and Mignotte, B. 1995. The biochemistry of programmed cell death. *Federation of American Societies for Experimental Biology*, 9, 1277-87.

- Kutluk, T. ve Kars, A. 1994. Kanser Konusunda Genel Bilgiler. Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu Yayınları, Ankara, 26.
- Li, M., Ona, V.O., Chen, M., Kaul, M., Tenneti, L., Zhang, X., Stieg, P.E., Lipton, S.A. and Friedlander, R.M. 2000. Functional role and therapeutic implications of neuronal caspase-1 and -3 in a mouse model of traumatic spinal cord injury. *Neuroscience*, 99, 333-342.
- Lin, X., Cai, Y.J., Li, Z.X., Chen, Q., Liu, Z.L. and Wang, R. 2003. Structure determination, apoptosis induction, and telomerase inhibition of CFP-2, a novel lichenin from *Cladonia furcata*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1622, 99-108.
- Liu, X.Z., Xu, X.M., Hu, R., Du, C., Zhang, S.X., McDonald, J.W., Dong, H.X., Wu, Y.J., Fan, G.S., Jacquin, M.F., Hsu, C.Y. and Choi, D.W. 1997. Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *The Journal of Neuroscience*, 17, 5395-5406.
- Locksley, R.M., Killeen, N. and Lenardo, M.J. 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, 104(4); 487–501.
- Lotfipour, F., Samiee, M. and Nazemiyeh, H. 2007. Evaluation of the antibacterial activity of *Salvia sahendica* and *Phlomis caucasica*, *Pharmaceutical sciences, Journal of Faculty of Pharmacy*, 1, 29-34.
- Lou, J., Lenke, L.G., Ludwig, F.J. and O'Brien, M.F. 1998. Apoptosis as a mechanism of neuronal cell death following acute experimental spinal cord injury. *Spinal Cord*, 36, 683-690.
- Lu, J., Ashwell, K., Ken, W.S. and Waite, P. 2000. Advances in spinal cord injury: role of apoptosis. *Spine*, 25, 1859-1866.
- Mayer, M., O'Neill, M.A. and Murray, K.E. 2005. Usnic acid: a non-genotoxic compound with anti-cancer properties, *Anticancer Drugs*, 16, 805-809.
- Mazza, F. 1925. Constitution and physical properties of vulpinic acid. *Zentralblatt MATH*, 31, 182–90.
- Millerk, D.M., Blume, S. and Borst, M. 1990. Oncogenes: Malignant transformation and modern medicine. *The American Journal of the Medical Sciences*, 300, 59-65.
- Miyashita, T., Krajewski, S. and Krajewsko, M. 1994. Tumor supressor p53 is a regulator of bcl-2 bax gene expression in vivo. *Oncogene*. 9, 1799-1805.

- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunology Methods*, 16(65); 55-63.
- Mountz, J.D. and Zhou, T. 2001. Apoptosis and Autoimmunity. In: Koopman WJ ed. A, *Textbook of Rheumatology: Arthritis and Allied Conditions*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Nakamura, K., Bossy-Wetzel, E. and Burns, K. 2000. Changes in endoplasmic reticulum luminal environment affect cell sensitivity to apoptosis. *The Journal of Cell Biology*, 150(4); 731-740.
- Nakano, R. 1997. Apoptosis: gene directed cell death. *Hormone Research*, 48, 2-4.
- Nakatsuka, H., Ohta, S., Tanaka, J., Toku, K., Kumon, Y., Maeda, N., Sakanaka, M. and Sakaki, S. 1999. Release of cytochrome c from mitochondria to cytosol in gerbil hippocampal CA1 neurons after transient forebrain ischemia. *Brain Research*, 849, 216-219.
- Narender, T., Sukanya, P., Sharma, K. and Bathula, S.R. 2013. Preparation of novel antiproliferative emodin derivatives and studies on their cell cycle arrest, caspase dependent apoptosis and DNA binding interaction. *Phytomedicine*, 20, 890-896.
- Newton, K. and Strasser, A. 1998. The Bcl-2 family and cell death regulation. *Current Opinion in Genetics and Development*, 8, 68-75.
- Nowell, P.C. 1990. Cytogenetics of tumor progression. *Cancer*, 65, 2172-75.
- Öncel, M. 2012. Isı şok proteinleri ve kanser. *European Journal of Basic Medical Sciences*, 2(1); 16-23.
- Petros, A.M., Olejniczak, E.T. and Fesik, S.W. 2004. Structural biology of the bcl-2 family of proteins. *Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1644(2-3); 83-94.
- Rao, V.R., Hermel, E. and Castro-Obregon, S. 2001. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: mechanism of caspase activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(36); 869-874.
- Rubio-Moscardo, F., Blesa, D., Mestre, C., Siebert, R., Balasas, T., Benito, A., Rosenwald, A., Climent, J., Martinez, J.I., Schilhabel, M., Karran, E.L., Gesk, S., Esteller, M., Leeuw, R., Staudt, L.M., Fernandez-Luna, J.L., Pinkel, D., Dyer, M.J. and Martinez-Climent, J.A. 2005. Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in Bcell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes. *Blood*, 106(9); 3214-22.

- Saip, P., Keskin, S., Özkan, M., Kaplan, M.A., Aydoğan, F., Demirağ, G.G., Uzunoğlu, S., Engin, H., Başaran, G., Güler, N., Uygun, K., Demirkan, B., Özdemir, F., Çubukçu, E., Salepçi, T. ve Çiçin, İ. 2011. Türkiye’de meme kanserli hastaların tanı ve tedavi yöntemlerine ulaşım hızı; çok merkezli gözlemsel çalışma. *The Journal of Breast Health*, 7(3); 109-117.
- Schuler, M. and Green, D.R. 2001. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochemical Society Transactions*, 29(6); 684–8.
- Schwartzman, R.A. and Cidloski, J.A. 1993. Apoptosis; the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Reviews*, 14, 133-144.
- Shrestha, G. and Clair, L. 2013. Lichens: a promising source of antibiotic and anticancer drugs. *Phytochemistry Reviews*, 12, 229-244.
- Singh, N., Nambiar, D., Kale, R.K. and Singh, R.P. 2013. Usnic acid inhibits growth and induces cell cycle arrest and apoptosis in human lung carcinoma A549 cells. *Nutrition and Cancer*, 65(1); 36-43.
- Sjöström, J. and Bergh, J. 2001. How Apoptosis Regulated, and What Goes Wrong in Cancer. *British Medical Journal*, 322, 1538–1539
- Somunoğlu, S. 2007. Meme kanserinde risk faktörleri. *Fırat Sağlık Hizmetleri Dergisi*, 2(3); 1-12.
- Somunoğlu, S. 2009. Meme kanseri: Belirtileri ve erken tanıda kullanılan tarama yöntemleri. *Fırat Sağlık Hizmetleri Dergisi*, 4, 103-122.
- Spencer, S., Cataldo, N.A. and Jaffe, R.B. 1996. Apoptosis in the human female reproductive tract. *Obstetrical and Gynecological Survey*, 5, 314-323.
- Stanojković T. 2015. Investigations of Lichen Secondary Metabolites with Potential Anticancer Activity, *Lichen Secondary Metabolites*, 127-146.
- Stennicke, H.R., Deveraux, Q.L., Humke, E.W., Reed, J.C., Dixit, V.M. and Salvesen, G.S. 1999. Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(13); 8359–8362.
- Stennicke, H.R., Jurgensmeier, J.M., Shin, H., Deveraux, Q., Wolf, B.B., Yang, X., Zhou, Q., Ellerby, H.M., Ellerby, L.M., Bredesen, D., Green, D.R., Reed, J.C., Froelich, C.J. and Salvesen, G.S. 1998. Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(42), 27084 – 27090.

- Takagi, T., Takayasu, M., Mizuno, M., Yoshimoto, M. and Yoshida, J. 2003. Caspase activation in neuronal and glial apoptosis following spinal cord injury in mice. *Neurologia medico-chirurgica*, 43, 20-29.
- Takahashi, K., Schwarz, E., Ljubetic, C., Murray, M., Tessler, A. and Saavedra, R.A. 1999. DNA plasmid that codes for human Bcl-2 gene preserves axotomized Clarke's nucleus neurons and reduces atrophy after spinal cord hemisection in adult rats. *Journal of Comparative Neurology*, 404, 159-71.
- Tassone, P., Tagliaferri, P., Viscomi, C., Palmieri, C., Caraglia, M. and D'Alessandro, A. 2003. Zoledronic acid induces antiproliferative and apoptotic effects in human pancreatic cancer cells in vitro. *British Journal of Cancer*, 88, 1971-1978.
- Thompson, C.B. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 267, 1456-1462.
- Thompson, C.B. 1999. Apoptosis. In: Paul WE, Ed. *Fundamental Immunology*. Lippincott-Raven Publishers
- Thornberry, N.A. and Lazebnik, Y. 1998. Caspases: enemies within. *Science*, 281(5381); 1312-1316.
- Topal, T., Öter, Ş. ve Korkmaz, A. 2009. Melatonin ve kanserle ilişkisi. *Genel Tıp Dergisi*, 19(3); 137-143.
- Varol, M., Türk, A., Candan, M., Tay, T. and Koparal, T. 2016. Photoprotective activity of vulpinic and Gyrophic acid toward ultraviolet B-induced damage in human keratinocytes. *Phytoteraphy Research*, 30, 9-15.
- Vousden, K.H. 2000. *Cell*, 103(5); 691-694.
- Vucic, D. and Fairbrother, W. 2007. The inhibitor of apoptosis proteins as therapeutic target in cancer. *Clinical Cancer Research*, 13, 20.
- Wagner, A.J., Small, M.B. and Itoy, N. 1993. Myc-mediated apoptosis is blocked by ectopic expression of bcl-2. *Journal of Molecular Cell Biology*, 13, 2432-2440.
- Wyllie, A.H. 1995. The genetic regulation of apoptosis. *Current Opinion in Genetics and Development*, 5, 97-104.

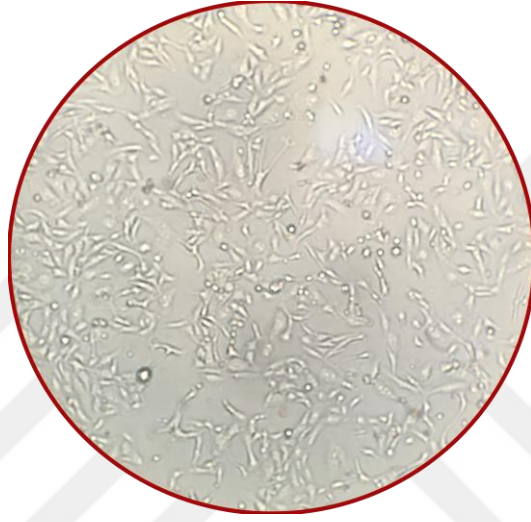
Zhang, Z., Li, Z., Wu, X., Zhang, C.F., Calway, T., He, T.C., Du, W., Chen, J., Wang, C.Z. and Yuan, C.S. 2014. Trail pathway is associated with inhibition of colon cancer by protopanaxadiol, *Journal of Pharmacological Sciences*, 1, 9.



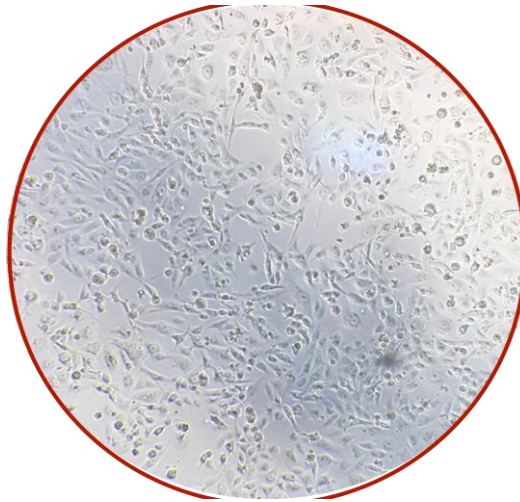
EK 1

Hücre Mikroskop Görüntüleri

Meme kanseri hücre hatları üzerine vulpinik asit'in her hücre için EC50 konsantrasyonlarının ve sadece hücre besi yeri ile 48 saat muamelesi sonucu alınan görüntüleri



Şekil 1 11 µM (EC50) 48 saat vulpinik asit uygulaması sonrası MDA-MB-231 hücre hattı



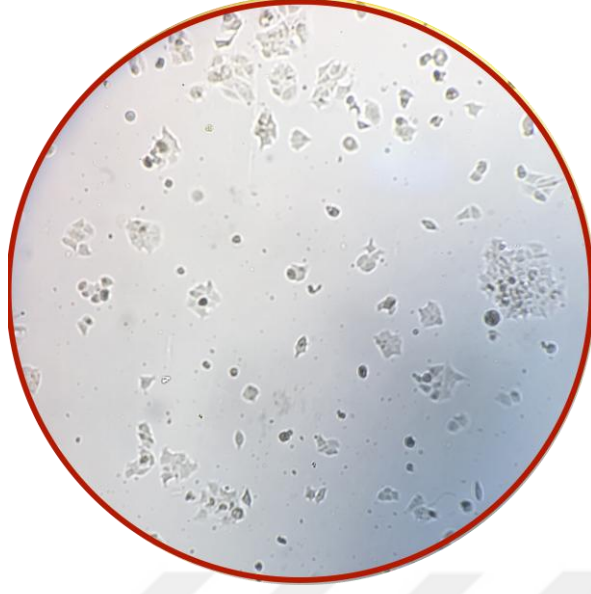
Şekil 2 MDA-MB-231 hücre hattı



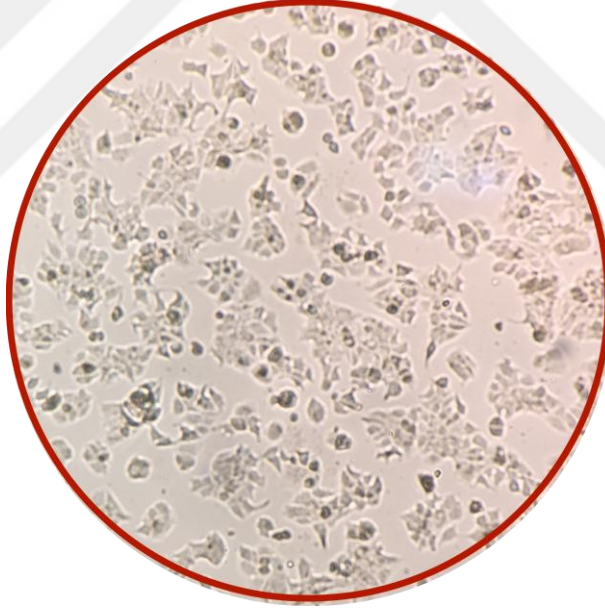
Şekil 3 18 μ M (EC50) 48 saat valpinik asit uygulaması sonrası MCF-7 hücre hattı



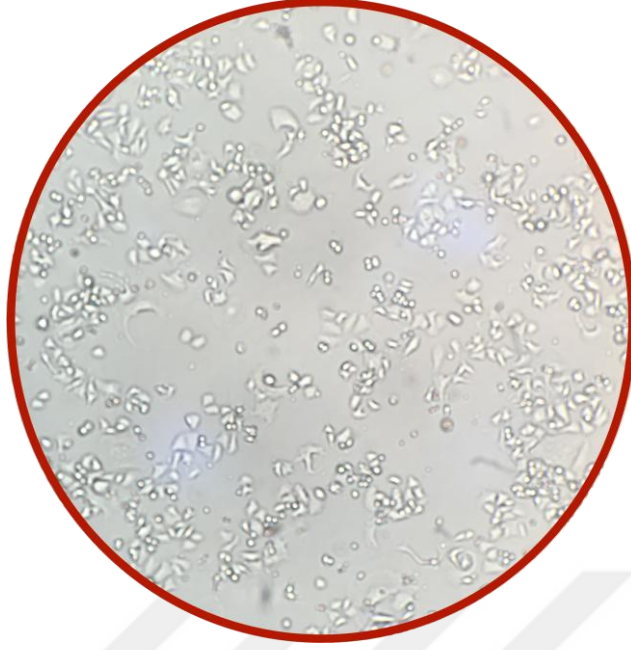
Şekil 4 MCF-7 hücre hattı



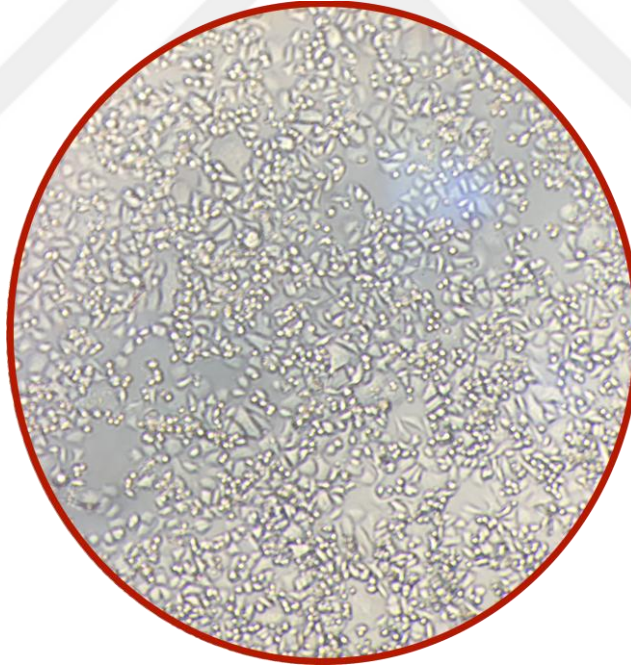
Şekil 5 5 μ M (EC50) 48 saat vulpinik asit uygulaması sonrası BT-474 hücre hattı



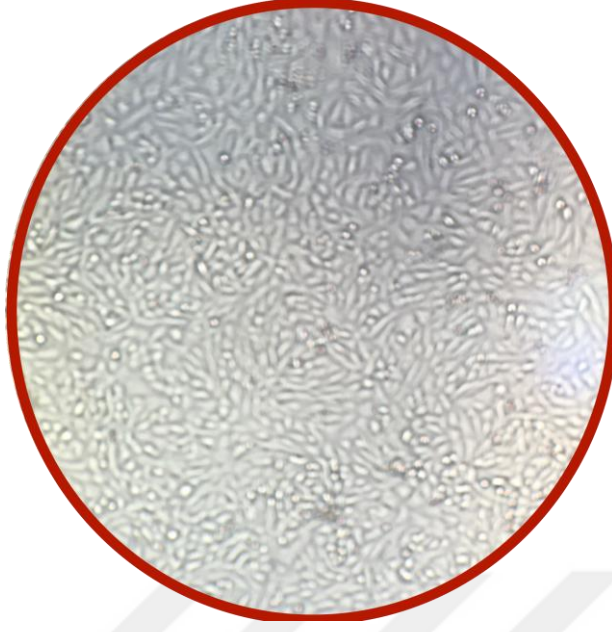
Şekil 6 BT-474 hücre hattı



Şekil 7 SK-BR-3 hücre hattı 10 µM 48 saat vulpinik asit uygulaması sonrası SK-BR-3 hücre hattı



Şekil 8 SK-BR-3 hücre hattı



Şekil 9 MCF-12A hücre hattı 10 μ M (EC50) 48 saat vulpinik asit uygulaması sonrası MCF-12A hücre hattı



Şekil 10 MCF-12A hücre hattı

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Nil KILIÇ
Doğum Yeri : Ankara
Doğum Tarihi : 04.10.1990
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Şentepe Lisesi (2008)
Lisans : Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji bölümü (2014)
Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi , Fen Bilimleri Enstitüsü, Anabilim Dalı
(Eylül 2014 - Haziran 2016)

Uluslararası Dergi:

1. Merve Şekerli, **Nil Kılıç**, Demet Cansaran-Duman. Liken metabolitlerinin antikanser aktivite etkisinin moleküler düzeyde mekanizmaları. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi. 2017; 74(1): accepted.

Uluslararası Kongreler

1. Sinem Özenoğlu-Aydınoğlu, **Nil Kılıç**, İlker Büyük, Sümer Aras, Demet Cansaran-Duman. Protein profiles alternation of safflower under drought stresses. IBCESS 16 congress, August 31-September 03, 2016, Giresun, Turkey. **Poster sunum.**
2. Senem Noyan, **Nil Kılıç**, Yasemin Öztemur, Bala Gür Dedeoğlu, Demet Cansaran-Duman. Determination of miRNAs of usnic acid lichen seconder metabolite using high-throughput technology. 41. FEBS 2016 Congress, 3-8 Eylül 2016, Kuşadası, İzmir, Turkey.

3. **Nil Kılıç**, Sümer Aras, Demet Cansaran-Duman. Determination of effect cytotoxic, apoptotic, caspase-3 activity and mRNA expression levels of apoptotic related genes of vulpinic acid on breast cancer cell lines. 41. FEBS 2016 Congress, 3-8 Eylül 2016, Kuşadası, İzmir, Turkey.

Projeler

1. Cansaran-Duman D., **Kılıç N.** 2016. Usnik asit liken sekonder metabolitinin meme kanser ve normal hücre hattı üzerine antikanserojenik etkisinin apoptozla ilgili genlere ait mRNA boyutunda ifade seviyelerinin belirlenmesi. Ankara Univ. BAP. Proje no: 16H0715803. **Araştırmacı.** Devam Ediyor.
2. Cansaran-Duman D., Dedeoğlu-Gür B, Aras S., Büyük İ, **Kılıç N.** 2016. Meme kanserinde usnik asit sekonder metabolitine karşı cevap veren mikroRNA'ların mikrodizin yöntemi ile belirlenmesi. Ankara Univ. BAP. Proje no: 15B0415001. **Araştırmacı.** 2016. Devam Ediyor.