

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI

**B16F10 MALİGN MELANOMA HÜCRELERİNDE FLAVOPİRİDOL VE
OKSALİPLATİN'İN VE BU HÜCRELERİN AKTARILDIĞI C57BL6 FARELERİNDE
FLAVOPİRİDOL'ÜN APOPTOZ SİNYAL YOLAĞINA ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Özlem GÖKÇE

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Abdullah EKMEKÇİ

ANKARA

Haziran, 2012

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI

**B16F10 MALİGN MELANOMA HÜCRELERİNDE FLAVOPİRİDOL VE
OKSALİPLATİN'İN VE BU HÜCRELERİN AKTARILDIĞI C57BL6 FARELERİNDE
FLAVOPİRİDOL'ÜN APOPTOZ SİNYAL YOLAĞINA ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Özlem GÖKÇE

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Abdullah EKMEKÇİ

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından SBE-01/2010-77 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA

Haziran, 2012

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi :22/06/2012

İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı
Prof. Dr. Abdullah EKMEKÇİ

İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Gazi Üniversitesi
Osman GÖZÜLLÜ
Osman GÖZÜLLÜ

İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Gazi Üniversitesi
Prof. Dr. Adnan MENEVŞEKİ
A. Menevşekî

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|------|
| Kabul ve Onay | I |
| İçindekiler | II |
| Şekiller, Resimler, Grafikler | V |
| Tablolar | VIII |
| Semboller, Kısaltmalar | X |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1. Malign Melanoma | 3 |
| 2.1.1. Epidemiyoloji | 3 |
| 2.1.2. Melanomanın Etiyolojisi | 4 |
| 2.1.3. Malign Melanoma Kanserlerin Histolojik Sınıflandırılması | 6 |
| 2.1.4. B16F10 Fare Melanoma Hücre Hattı | 7 |
| 2.1.5. Malign Melanoma Kanserinde Moleküler Mekanizma | 7 |
| 2.1.5.1. Apoptoz | 9 |
| 2.1.5.2. CDK2A Gen Bölgesi | 11 |
| 2.1.5.3. P16 ^{INK4A} /CDK/Rb/E2F ve Apoptoz | 12 |
| 2.2. Flavopiridol | 15 |
| 2.3. Oksaliplatin | 18 |
| 3. GEREÇ ve YÖNTEM | 20 |
| 3.1. Kullanılan Cihazlar | 20 |
| 3.2. Kullanılan Sarf Malzemeleri | 21 |
| 3.3. Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanışı | 21 |
| 3.3.1. % 10'luk DMEM Besiyerinin Hazırlanışı | 21 |
| 3.3.2. Hücre Lizis Solüsyonunun Hazırlanışı | 21 |
| 3.3.3. Fenilmetilsülfonilflorid (PMSF) | 21 |
| 3.4. B16F10 Hücre Hattı | 22 |

| | | |
|------------|--|----|
| 3.5. | Kullanılan Kimyasal Maddeler | 22 |
| 3.6. | Kullanılan Kitler | 22 |
| 3.7. | Yöntemler | 23 |
| 3.7.1. | Hücre Kültürü | 23 |
| 3.7.2. | Subkutanöz Melanoma Model, C57BL6 ırkı farelere hücre Enjeksiyonu | 24 |
| 3.7.2.1. | Hücrelerin Hazırlanması ve Farelere Enjeksiyonu | 24 |
| 3.7.2.2. | Hücrelerin Enjeksiyon için Hazırlanması | 25 |
| 3.7.2.3. | Hücrelerin Farelere Enjeksiyonu | 25 |
| 3.7.2.4. | Deney Gruplarının Oluşturulması | 26 |
| 3.7.2.5. | Farelerin Diseksiyonu ve Patolojik İncelemeler | 29 |
| 3.7.3. | MTT Sitotoksosite Testi | 30 |
| 3.7.4. | Gen İfadesi Çalışmalarında Kullanılan Yöntemler | 31 |
| 3.7.4.1. | Hücre Kültüründen Total RNA Saflaştırılması | 31 |
| 3.7.4.2. | İn vivo Total RNA Saflaştırılması | 32 |
| 3.7.4.3. | Komplementer DNA (cDNA) Sentezi | 34 |
| 3.7.4.4. | cDNA Ters Transkriptaz PCR (RT-PCR) Programı | 35 |
| 3.7.4.5. | Gen İfadesinin Real-Time PCR ile Belirlenmesi | 35 |
| 3.7.4.5.1. | ACTB Primer ve Proben cDNA üzerindeki Yerleşimi | 36 |
| 3.7.4.5.2. | BRAF Primer ve Proben cDNA üzerindeki Yerleşimi | 36 |
| 3.7.4.5.3. | CASP3 Primer ve Proben cDNA üzerindeki Yerleşimi | 37 |
| 3.7.4.5.4. | BCL2L1 Primer ve Proben cDNA üzerindeki Yerleşimi | 38 |
| 3.7.4.5.5. | ACTB, BRAF, CASP3 ve BCL2L1 Genleri için Real Time Tepkime Karışımları | 38 |
| 3.7.4.5.6. | LightCycler (LC) 480 Deney Programı | 39 |
| 3.7.5. | Protein İfadesi Çalışmalarında Kullanılan Yöntemler | 40 |
| 3.7.5.1. | İn vitro Protein İzolasyonu | 40 |
| 3.7.5.2. | İn vivo Protein İzolasyonu | 41 |
| 3.7.5.3. | Protein Miktar Tayini | 41 |

| | |
|--|----|
| 3.7.5.4. Kaspaz 9 Aktivitesinin Kolorimetrik Olarak Belirlenmesi | 42 |
| 3.7.5.5. Kaspaz 3/7 Aktivitesinin Belirlenmesi | 43 |
| 3.7.5.6. İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi | 43 |
| 3.7.5.7. İmmünohistokimyasal Boyamanın Değerlendirilmesi | 46 |
| 3.7.6. İstatistiksel Analiz Yöntemleri | 46 |
| 4. BULGULAR | 47 |
| 4.1. MTT Hücre Canlılığı Sonuçlarının Değerlendirilmesi | 47 |
| 4.2. Transkripsiyon Düzeyinde Bulgular | 51 |
| 4.2.1. Gen İfade Düzeyinin Kantitatif Belirlenmesi | 51 |
| 4.2.2. Gen İfade Düzeyinin Karşılaştırılması | 51 |
| 4.3. Protein Düzeyinde Bulgular | 52 |
| 4.3.1. BCA Protein Tayini | 52 |
| 4.3.2. Kaspaz 9 Protein Aktivitesinin Belirlenmesi | 53 |
| 4.3.3. Kaspaz 3/7 Protein Aktivitesinin Belirlenmesi | 54 |
| 4.3.4. İmmünohistokimya Sonuçları | 56 |
| 5. TARTIŞMA | 61 |
| 6. SONUÇ | 67 |
| 7. ÖZET | 68 |
| 8. SUMMARY | 70 |
| 9. KAYNAKLAR | 72 |
| 10. EKLER | 87 |
| 10.1. Etik Onay Belgesi | 87 |
| 10.2. Teşekkürler | 88 |
| 11. ÖZGEÇMİŞ | 89 |

ŞEKİLLER

Sayfa No:

| | |
|---|----|
| Şekil 1. Melanoma gelişiminde evreleme ve genetik değişimler | 6 |
| Şekil 2. Mitokondriyel Apoptotik Yolak | 10 |
| Şekil 3. P16 ^{INK4A} proteini retinoblastoma yolağını (Rb) ve p14 ^{ARF} proteini p53 yolağını düzenler | 12 |
| Şekil 4. pRb ve P16 ^{INK4A} yolakları | 13 |
| Şekil 5. Flavopiridol | 16 |
| Şekil 6. Flavopiridolün etki mekanizması | 17 |
| Şekil 7. Oksaliptatin ve Sisplatin | 18 |
| Şekil 8. ACTB mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan UPL prob ve primerlerin nükleotid dizileri | 36 |
| Şekil 9. BRAF mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan UPL prob ve primerlerin nükleotid dizileri | 37 |
| Şekil 10. CASP3 mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan UPL prob ve primerlerin nükleotid dizileri | 37 |
| Şekil 11. Bcl2l1 mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan UPL prob ve primerlerin nükleotid dizileri | 38 |

RESİMLER

Sayfa No:

| | |
|--|----|
| Resim 1. Fare kuyruklarının işaretlenmesi | 26 |
| Resim 2. Farelerin gruplar halinde kafeslenmesi | 26 |
| Resim 3. B16F10 hücre enjeksiyonu sonrası tümör oluşumu gözlenen C57BL6 ırkı fareler | 27 |
| Resim 4. DMSO ve flavopiridol uygulamaları intraperitoneal olarak uygulandı | 28 |
| Resim 5. Diseksiyon sonrası tümör kitlesi görünümü | 29 |
| Resim 6. H&E boyaması (100X) | 56 |
| Resim 7. İmmünohistokimya Bcl-2 boyaması | 57 |
| Resim 8. İmmünohistokimya PCNA boyaması | 59 |

GRAFİKLER

Sayfa No:

| | |
|--|----|
| Grafik 1. B16F10 hücrelerine 24 ve 48 saat flavopiridol uygulaması sonrası gözlenen hücre canlılık oranları | 47 |
| Grafik 2. B16F10 hücrelerine 24 ve 48 saat oksaliptatin uygulaması sonrası gözlenen hücre canlılık oranları | 48 |
| Grafik 3. B16F10 hücrelerine 24 ve 48 saat flavopiridol ve 40 µM oksaliptatin kombine uygulaması sonrası gözlenen hücre canlılık oranları | 49 |
| Grafik 4. B16F10 hücrelerine 24 ve 48 saat flavopiridol ve | |

| | |
|---|----|
| 40 µM oksaliptatin kombine uygulaması sonrası gözlenen hücre canlılık oranları | 50 |
| Grafik 5. <i>İn vitro</i> gen ifadesi düzeyindeki değişiklikler | 51 |
| Grafik 6. <i>İn vivo</i> gen ifadesi düzeyindeki değişiklikler | 52 |
| Grafik 7. <i>İn vitro</i> ve <i>in vivo</i> çalışmalar için protein miktarı saptanması | 52 |
| Grafik 8. <i>İn vitro</i> kaspaz 9 protein aktivite değerleri | 53 |
| Grafik 9. <i>İn vivo</i> kaspaz 9 protein aktivite değerleri | 54 |
| Grafik 10. <i>İn vitro</i> kaspaz 3/7 protein aktivite değerleri | 55 |
| Grafik 11. <i>İn vivo</i> kaspaz 3/7 protein aktivite değerleri | 55 |
| Grafik 12. <i>İn vivo</i> Bcl-2 protein ifadesi | 57 |
| Grafik 13. <i>İn vivo</i> PCNA protein ifadesi | 58 |

TABLULAR**Sayfa No:**

| | |
|---|----|
| Tablo 1. Çalışma grupları ve denek sayıları | 27 |
| Tablo 2. RT-PCR tepkime karışımı | 34 |
| Tablo 3. Otomatik ısı döngüsü cihazında uygulanan program | 35 |
| Tablo 4. ACTB, BRAF, CASP3 ve BCL2L1 Real Time PCR tepkime karışımı | 39 |
| Tablo 5. ACTB, BRAF, CASP3 ve BCL2L1 genlerinin ifade düzeylerinin belirlenmesi için kullanılan Real Time PCR tepkime programı | 39 |

SEMBOLLER, KISALTMALAR

| | |
|--------------------|--|
| α | : Alfa |
| β | : Beta |
| BCA | : Biçinkonik asit |
| $^{\circ}\text{C}$ | : Santigrad derece |
| CASP3 | : Kaspaz 3 |
| CASP9 | : Kaspaz 9 |
| CCDN1 | : Siklin D1 |
| cDNA | : Komplementer DNA |
| CDK | : Siklin Bağımlı Kinaz |
| Cp | : crossing point |
| DMSO | : Dimetik Sülfoksit |
| dH ₂ O | : Distile Su |
| dk | : Dakika |
| dNTP | : Deoksinükleozidtrifosfat |
| g | : Gram |
| mRNA | : Elçi RNA |
| MAPK | : Mitojen ile aktive edilmiş protein kinaz |
| mg | : Miligram |
| ml | : Mililitre |
| μM | : Mikromolar |
| mM | : Milimolar |
| M | : Molar |
| MM | : Malign Melanoma |

PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Rb : Retinoblastoma
sn : Saniye
Taq : Thermus aquaticus
TNF- α : Tümör Nekroz Faktör alfa
UV : Ultraviyole

1. GİRİŞ

Malign melanoma dünyada görülme sıklığı açısından kadınlarda altıncı, erkeklerde beşinci sırada görülen, hem görülme sıklığı hem de ölüm oranı gün geçtikçe artan bir deri kanseridir. Diğer kanserlerde olduğu gibi malign melanoma gelişimi, metastazında ve apoptozunda birçok sinyal yolağı görev almaktadır. Malign melanomanın proliferatif ve apoptotik mekanizmasının aydınlatılması, tanı ve tedavi hedeflerinin belirlenmesi, tedavi sonrasında hastaliksız sağkalım için oldukça önemlidir.

Malign melanomada hücre döngüsünün düzenlenmesi ve hücrenin çoğalmasıyla ilişkilendirilen pek çok moleküler kusur tanımlanmıştır. Malign melanoma gelişimine özellikle CDK4-6/Siklin D inhibisyonunu gerçekleştiren CDKN2A gen bölgesi ürünü p16^{INK4A} delesyonu veya sessizleşmesinin neden olduğu bilinmektedir. p16^{INK4A}/CDK/Rb/E2F yolağı, hücre döngüsünün G1 ve S fazı boyunca ilerleyişini düzenler. p16^{INK4A} fonksiyonunun kaybı retinoblastomanın (Rb) hiperfosforilasyon ile inaktifleşmesine sebep olur ve bu durum hücre döngüsünün kontrolsüz çoğalması ile sonuçlanır ve tümör oluşumunu tetikler.

Çalışmamızda p16^{INK4A} mutant B16F10 fare malign melanoma hücre hattında ve melanoma oluşturulmuş C57BL6 ırkı farelere siklin bağımlı kinaz inhibitörü flavopiridol uygulamayı planladık. P16^{INK4A}/CDK/Rb/E2F yolağındaki siklin bağımlı kinazları inhibe ederek apoptotik değişimleri Bcl211 ve kaspaz 3'ü mRNA seviyesinde ve kaspaz 3/7, kaspaz 9'u, Bcl-2 ve hücre proliferasyonunda görev alan PCNA'yı (proliferating cell nuclear antigen) protein düzeyinde değerlendirerek flavopiridolün apoptotik ve inhibisyon mekanizmasına etkisini araştırmayı

hedefledik. B16F10 hücrelerine flavopiridol, oksaliplatin ve eş zamanlı kombinasyonları verilerek hücre canlılığı üzerine olan etkileri değerlendirilmiştir. Çalışmamız flavopiridolün melanoma oluşturulmuş farelerde apoptotik etkilerinin araştırılmasıyla ilgili sonraki çalışmalara ışık tutabilecek ilk çalışma niteliğindedir.

2. GENEL BİLGİLER

Kanser, normal hücresel davranışları kontrol eden mekanizmaların bozulması sonucu oluştuğundan sinyal yolları moleküler ve hücresel düzeyde anlaşılması gereken bir hastalıktır. Kanser hücrelerinin büyüme ve çoğalma kontrollerindeki kayıp, hücre kontrol sistemlerindeki birikmiş anormalliklerin sonucudur. Kontrolsüz şekilde çoğalan hücre kümeleri tümör olarak adlandırılır. İyi huylu (benign) tümör (örneğin bir deri siğili) köken aldığı yerde hapsedilmiş olup ne çevre dokuya ne de vücudun diğer taraflarına yayılmaz. Fakat kötü huylu (malign) tümör, hem çevre dokuya hem de dolaşım veya lenf sistemi ile vücudun diğer bölgelerine yayılır (metastaz). Genelde yalnızca kötü huylu tümörler kanser olarak tanımlanır. Kötü ve iyi huylu tümörler orijin aldıkları hücre tipine göre sınıflandırılırlar. İnsan kanserlerinin yaklaşık %90'ını oluşturan karsinomalar, epitel hücrelerin malignansileridir¹.

Malign melanoma; deri, göz, iç kulağın mukozal epiteli ve beyin zarları da dahil melanositlerin olduğu herhangi bir dokuda gelişebilir. İnsanlarda, melanositler, nöroektodermin ilk taslağından nöral öncül hücrelerden köken alırlar ve embriyonik yaşamda melanositlerin öncülleri olan melanoblastlar epidermisin bazal hücre tabakasına ve daha az sıklıkla da dermis ve subkutan yağ tabakasına göç ederler².

2.1. Malign Melanoma

2.1.1. Epidemiyoloji

Melanoma dünyada görülme sıklığı açısından, erkeklerde beşinci, kadınlarda altıncı sırada görülen bir kanserdir. Melanoma gelişimi için erkeklerde risk yaşı 39, kadınlarda ise 58'dir ve beyaz ırk erkekleri en yüksek riske sahiptir. Melanoma deri kanserleri arasında yalnızca % 5

oranında görülmesine rağmen, deri kanseri ölümlerinin çoğundan sorumludur³. Melanoma erkekler arasında herhangi bir kanserin görülme sıklığından daha hızlı artış göstermektedir ve kadınlar arasında ise görülme sıklığındaki artış bakımından ikinci sırada yer almaktadır⁴. Jamal ve arkadaşları tarafından 2012 yılında yayınlanan Amerika kanser istatistiklerine göre her iki cinsiyet için tahmini 76,250 melanoma vakası görülmüştür ve buna bağlı olarak da yaklaşık 9180'i ölümlerle sonuçlanmıştır⁵. Malign melanomanın görülme sıklığı beyaz popülasyonlarda daha fazladır⁶. Türkiye'de kanser türleri arasında, kadınlarda ve erkeklerde görülme sıklığı açısından onbirinci sırada görülen kanser türüdür⁷.

2.1.2. Melanomanın Etiyolojisi

Clark modeli normal melanositten malign melanomanın gelişimine eşlik eden histolojik değişiklikleri tanımlar⁸.

Clark modelinde, melanositlerdeki ilk fenotipik değişiklik iyi huylu benlerin gelişimidir. Atipik melanositler epidermiste bulunur. BRAF mutasyonu ve MAPK yolağının aktivasyonu bu basamakta başladığı gösterilmiştir. BRAF mutasyonları benign bende, primer ve metastatik melanomalarda aynı sıklıkla görülür. Hücrelerdeki büyümenin kontrolü bozulmuştur ve ben gelişimi henüz sınırlıdır, çok nadiren kansere dönüşür⁸.

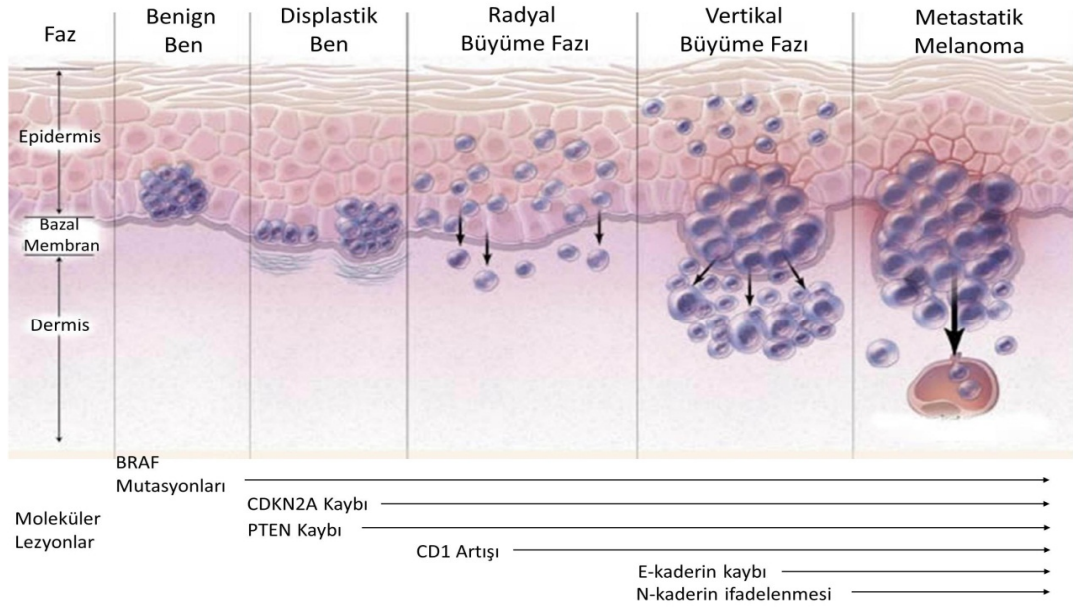
Clark modelinin önerdiği diğer basamak, önceden var olan benlerden ya da yeni lezyonlardan gelişebilen displastik bende sitolojik atipi gelişimidir. Atipik melanositler papiller dermise inmiştir, ancak retiküler dermise inmemiştir. Gelişimin bu basamağındaki moleküler değişimler, hücre ölümüne yatkınlığı, DNA tamirini ve hücre büyümesini

etkiler. Bir tümör baskılayıcı gen olan PTEN (fosfataz ve tensin homoloğu) mutasyonla inaktive olur⁹.

Clark modelinin diğerk bir basamağı olan radyal büyüme fazında atipik melanositler papiller dermisi doldurmuş retiküler dermise geçmiş ancak buraya retiküler dermise yayılmamışlardır⁸. Normal melanositlerle karşılaştırıldığı zaman, AKT'nin (yeni tanımı Protein kinaz B ya da PKB) aktif formunun artan seviyesi radyal büyüme fazında bulunabilir¹⁰.

Clark modelinde, invaziv karakterler, atipik melanositler retiküler dermise inmiş ve burayı doldurarak yayılmışlardır. Melanoma hücreleri sadece bazal membranı patlattığı zaman vertikal büyüme fazında görülürler, ayrıca genişleyen nodül olarak intradermal büyürler¹⁰. Vertikal büyüme fazında melanomanın radyal büyüme fazından vertikal büyüme fazına gelişiminde E-kaderin kaybı ve N-kaderinin ekspresyonu görülür¹¹ (Şekil 1).

Clark modelinin son basamağı olan metastatik melanomada, atipik melanositler subkutan yağ dokusuna ulaşmışlardır, stromanın etrafına doğru göç ederek, kan damarlarına geçerler ve lenfatikler uzak bir bölgede tümör oluştururlar¹².



Şekil 1. Melanoma gelişiminde evreleme ve genetik değişimler¹³

2.1.3. Malign Melanoma Kanserlerin Histolojik Sınıflandırılması

Malign melanoma Wallace Clark ve arkadaşları⁸ tarafından

- 1- Yüzeysel Yayılan Malign Melanoma,
- 2- Lentigo Malign Melanoma
- 3- Nodüler Malign Melanoma olarak sınıflandırılmıştır.

Sonrasında Dr. Richard Reed¹⁴,

- 4- Akral lentiginöz malign melanomayı tanımlamıştır.

Yüzeyel yayılan malign melanoma % 50-75, nodüler malign melanoma % 15-35, lentigo malign melanoma % 5-15 ve akral lentigo malign melanoma % 5-10 sıklıkla görülmektedir¹⁵.

2.1.4. B16F10 Fare Melanoma Hücre Hattı

B16F10 hücreleri, fare melanoma hattı olan B16F0'in metastatik bir klonudur¹⁶. Melnikova ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada bu hücre hattındaki genetik değişimler incelenmiştir. Buna göre: INK4A/ARF lokusunda ekzon 1 α , ekzon 1 β ve ekzon 2'deki delesyonlardan ötürü p16^{INK4A} ve P19^{ARF} proteinin ekspresyonunun olmadığı; PTEN ekspresyonunun kaybının bu hücre hattında bulunmadığı; p53, BRAF ve ras bakımından gen mutasyonları değerlendirildiğinde bu hücre hattının yabancıl tipte, Mdm2 protein ekspresyonunun az olduğu ve ras-MEK1-ERK1/2 MAPK sinyal yolağının düşük seviyede çalıştığı gözlenmiştir. Çalışmada p16^{INK4A}/P19^{ARF}, p53 ve ras-MAPK yolaklarındaki genetik değişimlerin fare melanoma gelişiminde beraber çalıştıkları gösterilmektedir¹⁷.

2.1.5. Malign Melanoma Kanserinde Moleküler Mekanizma

Melanoma için en güçlü risk faktörü melanomanın aile hikâyesi, çoklu benign ve atipik bendir. İmmün baskılama, güneş hassasiyeti ve ultraviyole radyasyona maruziyet de diğer risk faktörleridir. Bu risk faktörlerinin her birinden, genetik yatkınlık ya da melanomanın genetiğine katkısı olan çevresel etkenler sorumludur. Malign melanomada gen kazanımı, kaybı, amplifikasyonları, ifadede artış veya azalışa neden olan mutasyonlar ve protein fonksiyonunda değişikliğe neden olan mutasyonlar gibi hücre döngüsünün düzenlenmesi ve hücrenin çoğalmasıyla ilişkilendirilen pek çok moleküler kusur tanımlanmıştır¹³.

Melanomada ve diğer kanserlerde sıklıkla homozigot delesyonlarla etkilenen kromozom 10'daki PTEN bölgesidir^{9,18}. PTEN kaybı malign melanoma tümörögenezinde rol oynamaktadır. PTEN gen ürününün delesyonu ya da mutasyonu malign melanomada %5-20 oranında görülmektedir¹⁹.

Melanomanın fare modellerinde, CDKN2A ya da PTEN'den birinin mutasyonunun melanomaya neden olduğu gösterilmiştir. Ancak birbiri ile ya da diğer genlerdeki mutasyonlarla²⁰ kombine edildiğinde de melanoma gelişebilmektedir. CDKN2A ya da PTEN'in mutasyonu melanomanın gelişim yolunda sadece moleküler bir basamaktır. Ancak bu mutasyonların ne zaman görüldüğü tam olarak açık değildir.

Melanosit farklılaşmasının normal sürecinde, hücre döngüsünü tamamlamaya ve pigment üretimi için gerekli proteinleri kodlayan genlerin ekspresyonuna gereksinim vardır. Melanomada bu iki süreç bozulmuştur. Yetişkinlerde MITF, melanositlerin gelişimini ve farklılaşmasını²¹ ve melanosit öncül hücrelerin devamlılığını düzenler²²⁻²³. MITF, anahtar antiapoptotik faktör Bcl-2 geninin ekspresyonunu artırarak melanosit sağkalımında payı olduğu gözlenmektedir²⁴. Melanoma hücre hatlarında, ayrıca Bcl-2 proteinindeki azalma hücre ölümüne neden olur. Bu durum malign melanositlerin Bcl-2'ye bağımlı bir sağkalımının olduğunu göstermektedir²⁵⁻²⁶.

Moleküler seviyede, mitojen aktive edici protein kinaz (MAPK) sinyal yolağının anormal aktivasyonu, melanoma hücrelerinde büyümeyi uyarır²⁷. Bu yolağın aktivasyonu melanomaların yaklaşık %15'i ile ilişkili olan NRAS'ın ya da melanomaların yaklaşık %50'si ile ilişkili olan BRAF'ın somatik mutasyonu ile sonuçlanır. İkisinden birinin görüldüğü bu

mutasyonlar, ERK-MAPK yolağında serin-treonin kinazların devamlı aktivasyonuna neden olurlar²⁸⁻²⁹.

MEK yolağı NRAS ya da BRAF'tan birinin mutasyonu ile aktive edilir ve NRAS mutasyonu hem MEK hem de PTEN yolaklarını aktive edebilir. Benzer olarak, tek yolaktaki p16^{INK4A}, CDK4 ve siklin D1 fonksiyonu hücre döngüsünü etkiler; p16^{INK4A}'nın mutasyonu siklin D1 ya da CDK4'ün mutasyonu ile benzer sonuçlanır^{19,30-31}.

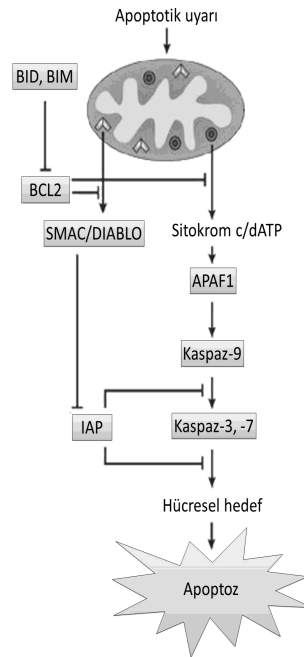
2.1.5.1. Apoptoz

Gelişmiş organizmalarda gereksinim duyulmayan ve/veya fonksiyonu bozulan hücrelerin çevreye zarar vermeden kontrollü ve programlı ölümü apoptoz olarak tanımlanır³². İlk defa 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından tanımlanan apoptoz, birçok fizyolojik ve patolojik süreçte yer almaktadır³³⁻³⁴. Apoptozun kontrolündeki bozukluklar karsinogenezde önemli rol oynamaktadır³⁵.

Apoptotik sinyal, dış yolak olarak da bilinen, plazma membran reseptörleri aracılığı ile hücrenin dışından ya da iç veya mitokondriyal yolak olarak da bilinen hücrenin içinden köken alan stres nedeniyle başlatılabilir³⁶⁻³⁷. Dış apoptotik yolak doğrudan sistein aspartik proteazlar olan kaspazların aktivasyonunu tetiklediği zaman TNF α ya da CD95L/FASL gibi proapoptotik ligandların ölüm reseptör sinyallerini tetiklemesiyle ilişkilidir³⁶.

Apoptoz pek çok gen tarafından kontrol edilmektedir. Bunlardan biri de anti-apoptotik gen olan Bcl-2 genidir³⁸. Bcl-2, hücreleri apoptozdan koruduğu belirlenen ilk gendir³⁹. İç ve dış yolaklar

birbirlerinden farklı olmasına rağmen, dış yolağın iç yolak boyunca apoptozu uyarması ya da tersi gibi birbirine karışan durumlar söz konusu olabilmektedir. Bu durumda Bcl-2 ailesi hücre kaderinin belirlenmesinde önemli kontrol noktasını oluşturur. Bcl-2 anti-apoptotik etkisini mitokondriden sitokrom-c salınmasını ve buna bağlı olarak efektör kaspazların aktivasyonunu önleyerek gösterir⁴⁰. Kaspazlar, iç ve dış apoptotik yolların temel biyokimyasal efektörleridir ve kırılma ile aktive olurlar. Monomerik apoptotik proteaz aktive edici faktör 1 (APAF1) sitokrom c ve dATP ile birlikte apoptozu oluşturur. Bu yapı, oligomerik kaspaz aktivasyon platformudur⁴¹⁻⁴². Apoptozom, sonrasında prokaspaz 3-6 ve 7'nin fonksiyonunu sağlayan pro-kaspaz-9'u aktive etmekle görevlidir. Mitokondriyal yoldaki bu durum bazen geri dönüşü olmayan nokta olarak bilinir. Apoptozun son fazı iç ve dış iki apoptotik yolağı da paylaşan kaspaz 3 gibi sonlandırıcı kaspazların aktivasyonu ile gerçekleşir³⁷ (Şekil 2).



Şekil 2. Mitokondriyal Apoptotik yolak⁴³

Antikanser ilaçlar ve UV gibi kesin apoptotik uyarılara yanıt olarak kaspaz 9'un aktivasyonu genellikle hasarlı mitokondriden sitokrom c'nin salınımı ile tetiklenir⁴⁴. Bcl-2 seviyelerindeki azalma hücreleri apoptoza götürürken, artışı ise hücreleri ölümden korumaktadır. Ayrıca melanoma hücre soyları ile normal melanositler arasında Bcl-2 seviyeleri arasında bir fark olmadığını gösteren çalışmalarda vardır²⁵⁻²⁶.

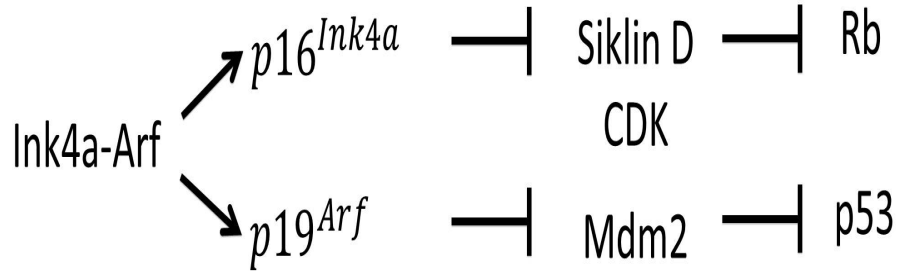
2.1.5.2. CDKN2A Gen Bölgesi

CDKN2A lokusu, 9p21 kromozom bölgesi üzerindedir ve melanoma da dahil birçok kanserde delesyona veya mutasyona uğramıştır⁴⁵⁻⁴⁷. Bu bölgede CDKN2A lokusu melanomada potansiyel tümör baskılayıcı gen olarak tanımlanmıştır⁴⁷.

CDKN2A lokusunun gen yapısı çok farklıdır. İki örtüşen ancak tamamen farklı protein olan p16^{INK4A} ve p14^{ARF} (p19^{ARF}) (insan p14'ün fare homologu olan p19'dur)'yi kodlar. Yapı olarak farklı olmalarına karşın, bu genlerin protein ürünleri hücre döngüsünün ilerleyişini de negatif şekilde düzenleyerek tümör baskılayıcı görevini üstlenirler. Majör tümör baskılayıcı 1 ve siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2a (CDKN2A) olarak da bilinen siklin bağımlı kinaz 4a (p16^{INK4A})'nın inhibitörünün moleküler ağırlığı 16 kilodaltondur⁴⁸.

P16^{INK4A} proteini retinoblastoma (Rb) yolağını ve p14^{ARF} proteini p53 yolağını düzenler ve bu yollar hücre döngüsünde fren görevi görürler. P16^{INK4A}, siklin D/CDK4-6 kompleksine bağlanarak bu kompleksi inhibe eder. Böylece Rb fosforillenmesini önleyerek, hücre döngüsünün durmasına neden olur. P16^{INK4A} fonksiyonunun kaybı hiperfosforilasyon aracılığıyla Rb inaktivasyonunun uyarılmasına neden

olur, bu da hücre döngüsünün kontrolsüz ilerleyişi ile sonuçlanır⁴⁹. Mdm2'yi inhibe eden p14^{ARF}, p53'ün ubiquitinasyonu ve sonrasında degradasyonunu sağlar. Bunun sonucunda, p14^{ARF} kaybı p53'ü inaktive eder⁵⁰ (Şekil 3).



Şekil 3. P16^{INK4A} proteini retinoblastoma (Rb) yolağını ve p14^{ARF} proteini p53 yolağını düzenler⁵¹

P16^{INK4A}'nin mutasyonu ailesel melanomada yaygın şekilde kalıtsal yatkınlığın nedeni olarak bilinir⁵², p16^{INK4A} mutasyonunun oranı yaklaşık %10 ila %40 arasındadır. Sporadik hastalıklarda nadir görülür⁵³.

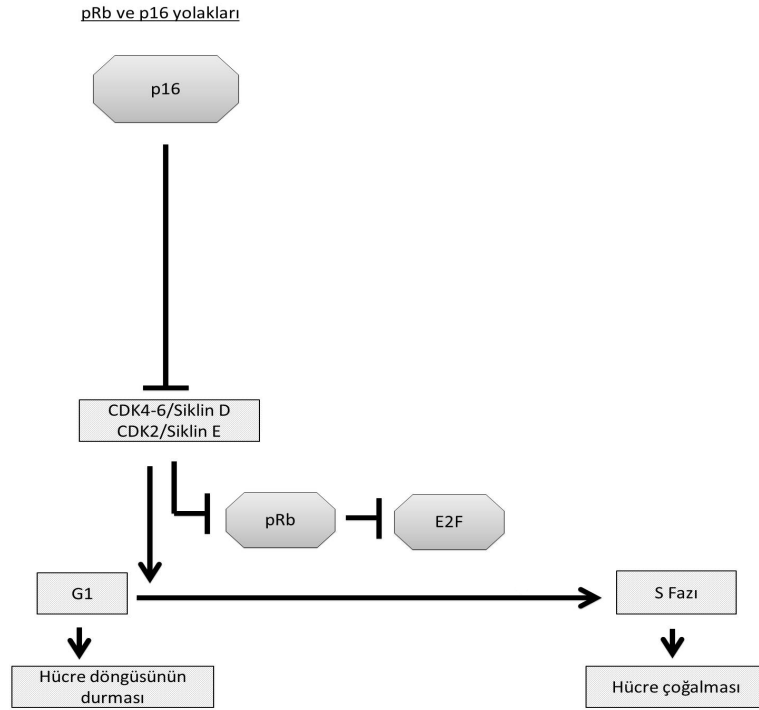
2.1.5.3. P16^{INK4A}/CDK/Rb/E2F ve Apoptoz

Hücre döngüsü kontrolünden kaçmak, kanser oluşumunda önemli bir özelliktir. Hücre döngüsünün her evresi özel CDK-siklin komplekslerinin kontrolündedir. CDK4-6/siklin D kompleksi hücre döngüsünün G1 evresi boyunca ilerleyişini düzenler. CDK2-Siklin E ise hücre döngüsünün G1/S evre geçişini düzenlemektedir⁵⁴.

G1 kontrol noktasını yöneten siklin bağımlı kinazların düzensizliği tümör oluşumu süresince görülebilir⁵⁵⁻⁵⁶. P16^{INK4A} geni

olmayan farelerle yapılan bir çalışmada, tümör oluşumunda, hücre döngüsünün erken G1 evresinin kritik rolü gösterilmiştir⁵⁶.

Retinoblastoma ailesi proteinleri hücre döngüsünün önemli anahtarlarıdır. G1 fazı süresince CDK4 ve/ya da CDK6 komplekslerince ve G1/S interfazda CDK2 tarafından Rb fosforilasyonundan sonra, Rb inaktive olur ve Rb'nin inaktivasyonu E2F proteinlerinin serbest kalmasına neden olur ve S evresiyle ilgili genlerin transkripsiyonuna izin verir. Rb bu geçişte ve DNA sentezinin gerçekleştiği S evresinin ilerleyişinde kontrol noktası olarak değerlendirilebilir^{54,57-58} (Şekil 4).



Şekil 4. pRB ve P16^{INK4A} yolağı⁵⁹

E2F ailesi üyelerinden yalnızca E2F1'in apoptoza yönlendirebildiği gösterilmiştir. E2F1 üç yolla apoptozu uyarabilmektedir⁵⁸ :

- Antiapoptotik sinyalin inhibisyonu : Hücrede iki önemli apoptotik yolak mitokondriyal ve ölüm reseptör yolağı olarak bilinir³⁶⁻³⁷. E2F1 apoptozu bu yolları kullanarak uyarabilmektedir.
- P53 homoloğu olan p73 aracılı apoptoz : E2F1 doğrudan p53'ün etkilediği hedef genlerin ve apoptozun aktivasyonunu uyaran p73'ün transkripsiyonunu aktive eder. Bu yolla p53'ten bağımsız olarak apoptoz gerçekleşmektedir⁶⁰.
- P53 bağımlı apoptoz : Bu yolda Mdm2'yi inhibe eden 14^{ARF}'nin, p53'ü ubiquitinlemesi, sonrasında da degradasyonunu sağlar. Bu yolla p53 stabilizasyonu sağlanır, 14^{ARF} kaybı p53'ü inaktive eder⁵⁰.

B16F10 fare malign melanoma hücre hattımız gibi 14^{ARF} kaybı olan diğer bazı hücrelerde yapılan çalışmalarda, 14^{ARF} kaybının E2F1 aracılı apoptozu artırdığı gösterilmiştir⁶¹⁻⁶².

Frukawa ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, E2F1'in APAF1'in aktivasyonunu artırarak, kaspaz 9'un aktivasyona neden olduğu ve kaspaz 9'un ise kaspaz 3/7'nin aktivasyonunu mitokondriyal hasar olmadan başlatabildiği gözlenmiştir⁶³.

B16 metastatik melanoma hücre hattıyla yapılan bir çalışmada da Rb fosforilasyonunun ve kaspaz 3/7 aktivitesinin artmasıyla apoptozun oluştuğu gözlenmiştir⁶⁴.

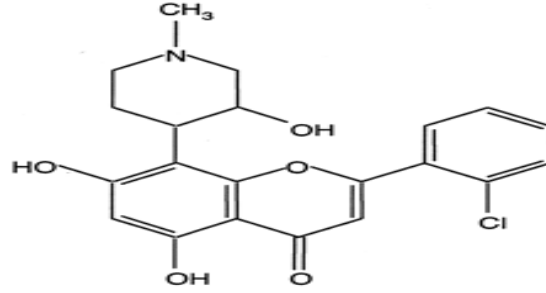
P16^{INK4A} mutant ve yabanıl tip melanoma hücre hatlarında apoptoza giderken bu hücre hatlarında normal hücre döngüsü kontrol yolağındaki Rb, E2F ve antiapoptotik Bcl-2 ifadenmesinin azaldığı gösterilmiştir⁶⁵.

PCNA (proliferating cell nuclear antigen), DNA sentezini katalizleyen, DNA tamirinde yer alan DNA polimeraz delta'nın kofaktörüdür. Sentezi, hücre siklusunun geç G1evresinde başlayarak orta-geç S evresinde en yüksek değere ulaşmaktadır⁶⁶. Mason ve arkadaşları melanoma hücre hatlarında, E2F1'in ve hücre proliferasyon belirteci olan PCNA'nın azalan ekspresyonu ve Rb defosforilasyonu nedeniyle hücre döngüsünün durduğunu göstermiştir⁶⁷.

CDKN2A, melanomada sıklıkla delesyona uğramıştır. Bu delesyon melanoma proliferasyonunda CDK2 ve CDK4 gibi siklin bağımlı kinazların rolü ile kombinasyonu sonucunda p16/CDK/Rb/E2F yolağı terapötik uygulamalar için hedef olabilir⁶⁸. Düzensiz CDK aktivitesi malign hücrelerde sıklıkla görülür ve CDK'ların inhibisyonu hücre döngüsünün durmasına ve sonrasında apoptoza sebep olmaktadır^{55-56,69}. Bu tür bulgular, flavopiridol gibi CDK inhibisyonuna yönelik yeni ajanların üretilmesine neden olmuştur.

2.2. Flavopiridol (Alvocidib)

Flavopiridol, Hindistan'a özgü bir bitkiden (Dysoxylum nectariferum) elde edilen yarı-sentetik bir flavonoiddir⁷⁰ (Şekil 5).



Şekil 5: Flavopiridol

Flavopiridol'ün, hücre döngüsünün G1/S ya da G2/M arafazında; CDK2, CDK4 ve CDK6 gibi siklin bağımlı kinazları inhibe ederek, *in vitro*, hücre döngüsünün ilerleyişini engelleyerek hücre büyümesini durdurduğu gösterilmiştir⁷¹⁻⁷². Flavopiridol, nanomolar konsantrasyonlarda bütün CDK'ları inhibe ederek, birçok sinyal yolağı aracılığıyla hem hücre döngüsünün durmasına hem de apoptoza neden olmaktadır. Ayrıca anjiyogenezin inhibisyonuna neden olduğu da gösterilmiştir^{70,72-73}.

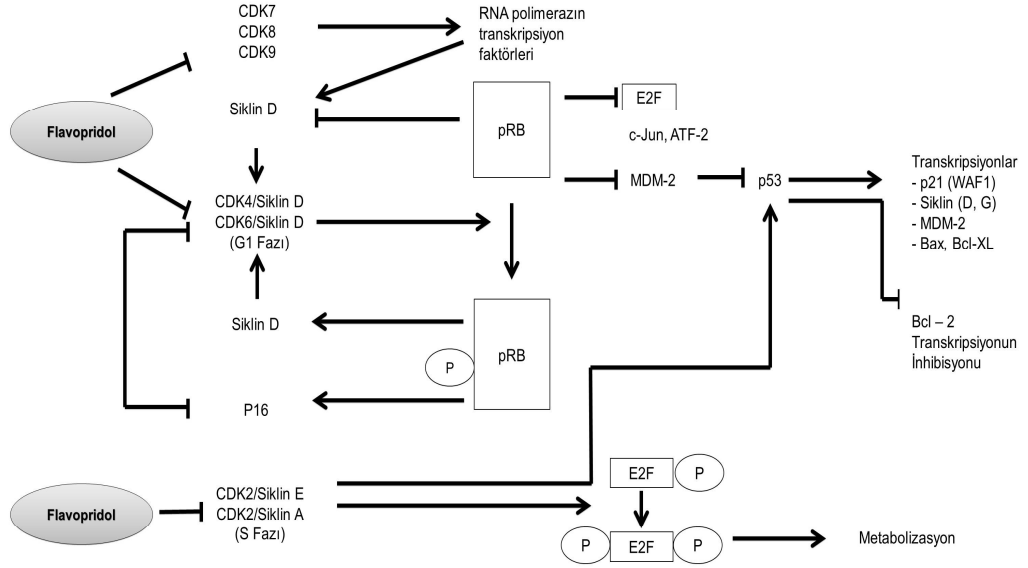
Flavopiridol hücre döngüsünün durmasını en az üç yolla tetikler⁷⁴⁻⁷⁷ (Şekil 6):

1) Flavopiridol, hücre döngüsünün ilerleyişini engelleyen bir CDK inhibitörüdür⁷⁴. CDK'ların inhibisyonu ile E2F salınır ve apoptoza gidilir⁷⁴⁻⁷⁸.

2) Flavopiridol, CDK7 ve CDK9 fonksiyonunu engelleyerek RNA polimeraz II proteininin aktivasyonunu önler⁷⁹.

3) CDK'ların doğrudan inhibisyonuna ek olarak, flavopiridol bir çok insan tümöründe fazla ifade edilen siklin D1'in düzeyinde azalmaya

neden olur. Siklin D1'in ifadesinin azalması, CDK aktivitesinin kaybını tetiklediği gösterilmiştir⁸⁰.



Şekil 6. Flavopridolün etki mekanizması⁷⁴

Flavopridolün *in vitro* ve *in vivo* birçok hücre hattında etkili olduğu gözlenmiştir^{71-73,77-78,81}. Ayrıca flavopridolün gastrik ve renal kanserlerde faz I ve faz II denemeleri bulunmaktadır⁸²⁻⁸⁵.

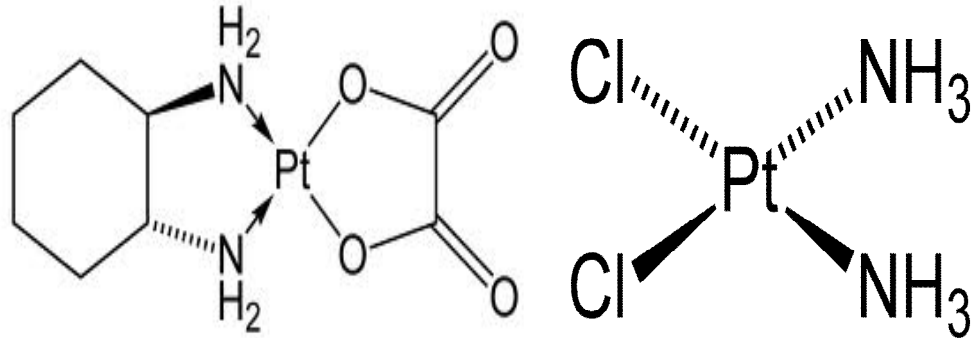
Melanoma hücre hatlarıyla yapılan çalışmalarda flavopridolün hücre döngüsünün ilerleyişini inhibe ettiği ve apoptozu tetiklediği gösterilmiştir^{65,86}.

Flavopridolün prelinik ve klinik olarak diğer ilaçlarla kombine uygulamaları bulunmaktadır^{85,87-88}. Kolon kanser hücre hattında oksaliptatin ve flavopridol birlikte verildiğinde antiproliferatif etkinliğin artırıldığı gösterilmiştir⁸⁷.

2.3. Oksaliplatin (Eloksantin)

Platin grubu ajanların sitotoksik özelliklerinden dolayı DNA hasarı oluşur⁸⁹. Sitotoksik ajanlara maruz kalındığında oluşan DNA hasarı nedeniyle, siklin bağımlı kinaz (CDK) aktivitesini inhibe eden kontrol noktası proteinlerinin aktivasyonu ile özellikle G1/S ve/veya G2/M geçişinde hücre döngüsü durdurulur⁹⁰⁻⁹¹.

Klinikte kullanılan platin kompleksi bir bileşik olan oksaliplatin, sisplatin yapısından ayrılan ligand olan klor atomlarının yerine oksalat ligandının geçmesi ile oluşan platin kompleksidir⁹² (Şekil 7).



Şekil 7. Oksaliplatin ve Sisplatin

Oksaliplatin, sisplatine karşı direnç gösteren kanser türlerinde etkilidir⁹².

Oksaliplatin tek ajan olarak, klinikte bir çok solid tümörde antitümör etki göstermiştir ve ayrıca lökoverin ve 5FU ile FOLFOX uygulamasının bir parçası olarak metastatik kolon kanserinin tedavisinde kullanılmaktadır⁹³. Faz I çalışması olarak, flavopiridolün FOLFOX'un

etkisini artırdığı belirlenmiştir⁹⁴. Melanoma hücre hatlarında oksaliplatinin antiproliferatif etkisi gösterilmiştir⁹⁵.

Bu tez çalışmamızın *in vitro* bölümünde B16F10 melanom hücre hattında flavopridol ve oksaliplatinin tek tek ve kombine şekilde uygulanmasıyla P16^{INK4A}/CDK/Rb/E2F sinyal yolağındaki apoptotik moleküllerdeki değişimleri belirlemeyi hedefledik. *In vivo* bölümünde ise melanom hücre hattında enjekte ettiğimiz melanoma tumör modelinde flavopridolün apoptotik etkilerini ortaya koymaya çalıştık.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihazlar

- Biyogüvenlik kabini (DanLaf, Danimarka)
- Karbondioksitli etüv (Sanyo, Japonya)
- Floresan ataçmanlı mikroskop (Olympus BX-50, Japonya)
- Hassas terazi (AND-ER-182A, Japonya)
- Hybaid PCR-Sprint otomatik ısı döngü cihazı (Thermo Scientific, ABD)
- Işık mikroskobu (DCM 4000, Leicia, Almanya)
- LightCycler Real-Time PCR cihazı (Roche, Almanya)
- Spektrofotometre (NanoDrop ND-1000) (Thermo Scientific, ABD)
- Mikroplaka ELIZA okuyucu (Spectramax M3, Molecular Devices, ABD)
- Soğutmalı santrifüj (Hettich Mikro 22 R, Almanya)
- pH metre (WTW 422, Almanya)
- Hassas terazi (AND-ER-182A, Japonya)
- Manyetik karıştırıcı (TMA 2071, Almanya)
- Spin vorteks (Biosan, Rusya)
- Mikropipetler, 10µL, 100µL, 100µL (Bt10, Bt100, Bt1000 Biohit, CLP, ABD)
- Derin dondurucu, -30°C (Sanyo, Japonya)
- Derin dondurucu, -86°C (Sanyo, Japonya)
- Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)
- İnvart Mikroskop (Zeiss, Almanya)

3.2. Kullanılan Sarf Malzemeleri

- Hücre üreme flaskaları, 25 cm², 75 cm² ve 175 cm² (Corning, ABD)
- Petriler, 35 mm, 60 mm ve 100 mm (Corning, ABD)
- Hücre kryo (dondurma) ampülü (Greiner, Almanya)
- Kültür tüpleri (Corning, ABD)
- Mikrosantrifüj tüpleri (CLP, Almanya)

3.3. Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanışı

3.3.1. % 10'luk DMEM Besiyerinin Hazırlanışı

- 450 ml DMEM besiyeri içerisine, 50 ml FBS ve 200 mM L-glutaminden 10ml, 100IU/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin karışımından 10 ml eklenerek % 10'luk DMEM besiyeri hazırlandı.

3.3.2. Hücre Lizis Solüsyonunun Hazırlanışı

- 10X olarak ticari şekilde satılan hücre lizis solüsyonundan 1 ml alarak, 9 ml distile su ile 1X yapıldı.

3.3.3. Fenilmetilsülfonilflorid (PMSF)

- Hassas terazide 0,3484 g PMSF tartılarak, 10 ml etanol içerisinde çözüldü.

3.4. B16F10 Hücree Hattı

Çalışmadaki ATCC'den alınan fare melanoma hücre hattı olan B16F10 hücreleri kullanıldı.

3.5. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Dimetil sülfoksit (DMSO) (Ambresco, ABD)
- DMEM besiyeri (HyClone, Thermo, ABD)
- Fetal sığır serumu (FBS) (inaktif) (HyClone, Thermo, ABD)
- Penisilin/Streptomisin (HyClone, Thermo, ABD)
- Glutamin (HyClone, Thermo, ABD)
- Tripsin-EDTA (HyClone, Thermo, ABD)
- Fenilmetilsülfonilflorid (PMSF) (Roche, Almanya)
- Primer (Aktin B, BRAF, Bcl-2, CASP3) (Alfa DNA, Almanya)
- Etanol (Sigma, ABD)
- Hücre Lizis Solüsyonu (Roche, Almanya)
- Flavopiridol (Enzo, USA)
- Fosfat saline buffer (PBS)
- Oksaliptatin (Tocris, USA)
- Universal Probe Library (UPL) Problearı (Roche, Almanya)

3.6. Kullanılan Kitler

- High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Almanya)
- High Pure RNA İzolasyon Kiti (Roche, Almanya)

- TaqMan Master Mix (Roche, Almanya)
- Transcriptor First Strand cDNA Sentez Kiti (Roche, Almanya)
- BCA protein tayin kiti (Thermo, USA)
- Kaspaz 9 Kolorimerik Assay Kit (BioVision, USA)
- Sensolyte Homogeneous AFC Kaspaz 3/7 Assay Kit (Anaspec, USA)

3.7. Yöntemler

3.7.1. Hücre Kültürü

B16F10 hücreleri, %10'luk DMEM besiyerinde %95 nem ve %5 CO₂'li ortamda 37°C'de kültüre edilerek çoğaltıldı.

Hücreler 50 nM, 100 nM, 200 nM, 400 nM, 800 nM, 1600 nM konsantrasyonlarda olacak şekilde flavopiridol ile 24 ve 48 saat inkübe edildi. Flavopiridol çözücüsü DMSO, kontrol grubu olarak kullanıldı ve kontrol grubu hücreler aynı süre için inkübe edildi. Her bir konsantrasyon için 4 ayrı kültür yapılarak deney tekrarlandı.

Hücreler 5 µM, 10 µM, 20 µM, 40 µM, 80 µM ve 160 µM konsantrasyonlarda olacak şekilde oksaliplatin ile 24 ve 48 saat inkübe edildi. Flavopiridol çözücüsü DMSO, kontrol grubu olarak kullanıldı ve kontrol grubu aynı süre için inkübe edildi. Her bir konsantrasyon için 4 ayrı kültür yapılarak deney tekrarlandı.

Belirtilen dozlardaki flavopiridol ve oksaliplatin uygulamalarından sonra deney aralıklarından uygun dozlar seçilerek hücreler 50 nM, 100 nM, 200 nM, 400 nM konsantrasyonlarda olacak

şekilde flavopiridol; 40 µM ve 80 µM olacak şekilde oksaliplatin kombinasyonu ile 24 ve 48 saat inkübe edildi. Flavopiridol kontrol çözücüsü DMSO, kontrol grubu olarak kullanıldı ve kontrol grubu hücreler aynı süre için inkübe edildi. B16F10 hücrelerine inkübasyon sonrasında flavopiridol ve oksaliplatin kombinasyonunda hücre canlılığı değerlendirildi. Deney 4 kez tekrar edildi.

3.7.2. Subkutanöz Melanoma Model, C57BL6 Irk Farelere B16F10 Hücre Enjeksiyonu

Deney gruplarında kullanılan “inbred” C57BL6 ırkı fareler Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi’nden (GÜDAM) sağlanmış, üretim, bakım ve her türlü uygulamalar da buradaki laboratuvarda yapılmıştır (Resim 1-2).

Çalışmalarda 8 haftalık 25 g erkek fareler kullanılmıştır.

3.7.2.1. Hücrelerin Hazırlanması ve Farelere Enjeksiyon

C57BL6 ırk farelere uygulama zamanı öncesi kullanılacak hücre hattı olan B16F10 hücrelerinin üretimi yapılmıştır. İlgili hücre hattı uygulamaya yetecek miktarda 175 cm²lik flasklarda çoğaltıldıktan sonra, hücrelerin sayımı ve farelere enjeksiyonu yapılmıştır.

Bütün uygulamalarda deney hayvanları kullanım ilkeleri dikkate alınmıştır.

3.7.2.2. Hücrelerin Enjeksiyon için Hazırlanması

- Hücrelerin flask yüzeyini %70-80 doluluk oranında kaplanması sağlandı.
- Tripsin ile hücreler kaldırıldı.
- Hücreler 1600 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
- Hücreler thoma lamı ile sayıldı.
- Enjekte edilecek hücreler, 5×10^6 hücre 200 ml PBS içerisinde olacak şekilde ependorf tüplerde hazırlandı.

3.7.2.3. Hücrelerin Farelere Enjeksiyonu

Farelere 50 mg/kg Alfamin (Ketamin) ve 5 mg/kg Alfazyn anestezi olarak verildi ve sırt bölgeleri traşlandı.

Hücreler, her bir farenin deri altına (enseye yakın sırt bölgesine ve kuyruğa yakın sırt bölgesine) insülin iğnesi ile bir bölge için 5×10^6 hücre/ 0,2 ml PBS olacak şekilde enjekte edildi. Uygulama bölgesinde enjeksiyon sonrası baloncuk oluşumu gözlemlendi.



Resim 1. Fare kuyruklarının işaretlenmesi



Resim 2. Farelerin gruplar halinde kafeslenmesi

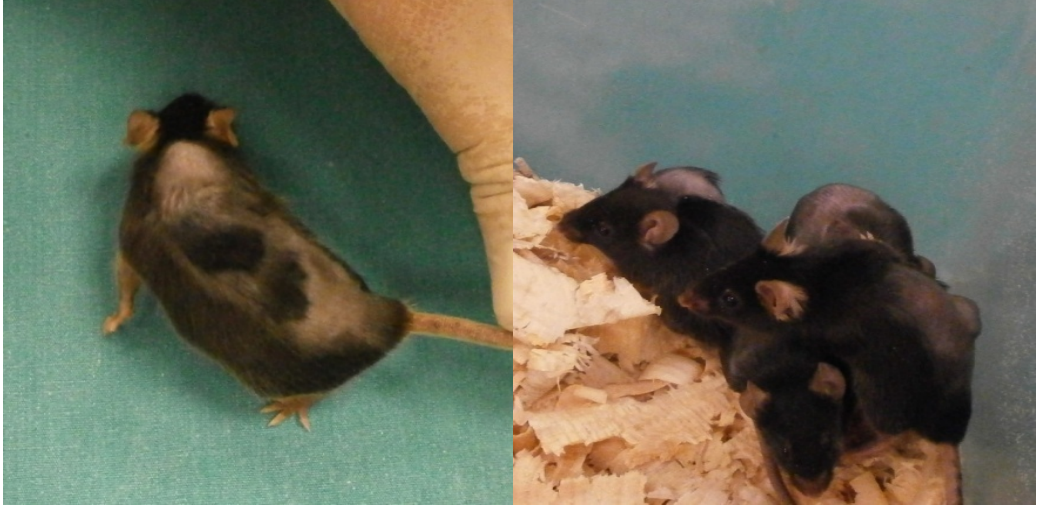
3.7.2.4. Deney Gruplarının Oluşturulması

Tablo 1’de planlanan uygulama grupları ve hayvan sayıları görölmektedir. Başlangıçta deney toplam 24 fare olarak planlanmış, ancak 20 fare ile tamamlanmıştır.

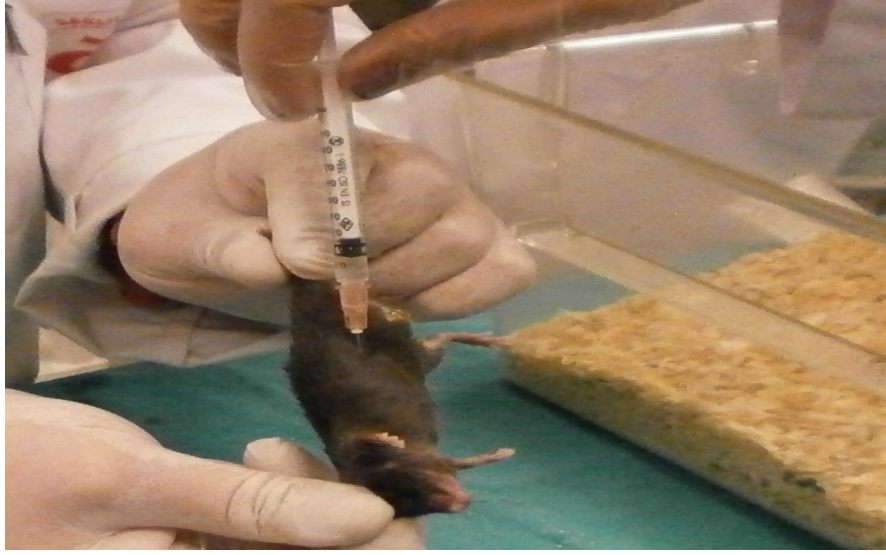
Tablo 1. Çalışma grupları ve denek sayıları

| Çalışma Grupları | Başlangıçtaki denek sayısı | Deney sonunda denek sayısı |
|------------------|----------------------------|----------------------------|
| DMSO | 6 | 6 |
| 2,5 mg/kg | 6 | 5 |
| 5 mg/kg | 6 | 5 |
| 10 mg/kg | 6 | 4 |

Tümör oluşmuş (Resim 3) tüm farelere 12. ve 15. günlerde toplam iki kez olmak DMSO ve flavopiridol kasık bölgesinden Resim 4'teki gibi intraperitoneal olarak uygulandı.



Resim 3. B16F10 hücre enjeksiyonu sonrası tümör oluşumu gözlenen C57BL6 ırk fareler



Resim 4. DMSO ve flavopiridol, intraperitonel olarak uygulandı

Uygulama Grupları:

Kontrol (DMSO): Farelere, B16F10 hücreleri enjeksiyonu sonrası 12. ve 15. günlerde DMSO uygulaması yapıldı.

2,5 mg/kg Flavopiridol: B16F10 hücreleri enjeksiyonu sonrası 12. ve 15. günlerde 2,5 mg/kg flavopiridol uygulaması yapıldı.

5 mg/kg Flavopiridol: B16F10 hücreleri enjeksiyonu sonrası 12. ve 15. günlerde 5 mg/kg flavopiridol uygulaması yapıldı.

10 mg/kg Flavopiridol: B16F10 hücreleri enjeksiyonu sonrası 12. ve 15. günlerde 10 mg/kg flavopiridol uygulaması yapıldı.

3.7.2.5. Farelerin Diseksiyonu ve Patolojik İncelemeler

Diseksiyon seti, tümör kitlelerini koymak için steril kaplar, %70'lik formaldehit, RNA ve protein için ependorflar, azot tankı ve fotoğraflamak için gerekli hazırlıklar yapıldı.

Tümör kitesi hayvanın hareketini zorlaştıracak büyüklüğe ulaştığında (15 gün sonra), DMSO ve flavopiridol uygulamalarından 1 saat sonra fareler servikal dislokasyonla sakrifiye edildi. Fareler dikkatli bir şekilde disekte edilerek oluşan tümör kitleleri alındı (Resim 5).



Resim 5. Diseksiyon sonrası tümör kitesi görünümü

Tümör kitlelerinin bir kısmı sıvı azot içerisinde muhafaza edilirken, diğer kısmı %70'lik formaldehit içine alınarak etiketlendi. Alınan tümör kitlelerinden preparat hazırlama (kasetlere yerleştirme, fiksasyon, parafin blokları oluşturma, kesit alma ve boyama) ve mikroskopik inceleme işlemleri Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

Tümör kitlelerinden alınan bir kısım doku örneği protein ve gen ifade çalışmaları için ependorflara alındı. Doku örnekleri azot içerisinde bekletildi ve sonrasında çalışma süresine kadar – 80 °C’de saklandı.

3.7.3. MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-dimetil tetrazolium bromid] Sitotoksisite Deneyi

B16F10 hücrelerinde flavopiridol, oksaliplatin ve flavopiridol+oksaliplatin kombine uygulamasının hücrelerin canlılığı üzerine olan etkilerinin belirlenmesi için MTT yöntemi kullanıldı.

Bu yöntem, MTT boyasının tetrazolyum halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır. Bu yöntemde, MTT canlı hücrelere aktif olarak diffüz olur ve reaksiyon mitokondriyal süksinat dehidrogenaz tarafından katalize edilerek mavi-mor renkli, suda çözünmeyen formazana indirgenir. Formazan oluşumu, yalnızca aktif mitokondrinin bulunduğu canlı hücrelerde görülmektedir. Bu da hücre canlılığının bir belirteci olarak kabul edilmekte ve spektrofotometrik olarak belirlenen değer, hücre sayısı ile ilişkilendirilmektedir⁹⁶⁻⁹⁷.

Flask yüzeyine yapışarak çoğalan B16F10 hücreleri flask yüzeyini %70-80 oranında kapladığı zaman besiyerleri çekilip, tripsin ile kaldırıldı. 1600 rpm’de 10 dakika santrifüj edildikten sonra pelet üzerine 1 ml % 10 FBS içeren DMEM eklendi. Hücreler Thoma lamı ile sayıldı. Hücreler % 10 FBS DMEM içerisinde homojen bir şekilde dağıtıldıktan sonra 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına her kuyucuğa yaklaşık 7.000 hücre/200 µl olacak şekilde ekildi. Hücreler 37 °C ve %5 CO₂’li etüvde bir gece inkübe edildikten sonra besiyerleri uzaklaştırıldı. Belirtilen dozlarda flavopiridol, oksaliplatin ve flavopiridol+oksaliplatin kombinasyonu verilen

hücreler 24 ve 48 saat süreyle 37 °C ve %5 CO₂'li etüvde inkübe edildi. Belirtilen sürelerin sonunda 100 µl besiyeri çekilip, 10 µl MTT eklendi. Formazan ürününün oluşturduğu renk değişimi 3 saat sonunda mikropiplaka ELIZA okuyucusu ile 570 nm dalga boyu aralığında belirlendi. Sadece DMSO uygulanan hücre içeren kontrol örneğinin ortalama absorbansı % 100 canlılığa karşılık gelen değer olarak kabul edildi ve ilaç uygulanan hücrelerden elde edilen absorbans değerleri kontrol hücrelerine göre oranlanarak hücre canlılığı yüzde olarak belirlendi.

3.7.4. Gen İfadesi Çalışmalarında Kullanılan Yöntemler

3.7.4.1. Hücre Kültüründen Total RNA Saflaştırılması

İnkübasyon süresi sonunda steril flasklarda ekili bulunan hücrelerden RNA izolasyonu, "High Pure RNA Isolation Kiti" kullanılarak, aşağıda yazılı olan protokole göre yapıldı. Kontaminasyonu engellemek amacı ile saflaştırma işlemi biyogüvenlik kabininin içinde gerçekleştirildi.

- Hücrelerin üzerine 200 µl PBS ve 400 µl Lizis tamponu eklenip 15 saniye vorteksle çalkandı.
- Filtre, toplama tüpüne yerleştirilip tüm karışım filtre üstüne aktarıldı. 9000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi.
- Toplama tüpünde toplanan sıvı atılıp filtre aynı tüpe tekrar yerleştirildi.
- Her bir örnek için 90 µl DNaz İnkübasyon tamponu steril tüpe alındı ve 10 µl DNaz I eklendi. Pipetaj ile karıştırıldıktan sonra karışım filtrenin ortasına bırakıldı. 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

- Birinci yıkama tamponu filtre üzerine 500 µl eklendi ve 9000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi. Filtre altında toplanan kısım atıldıktan sonra aynı toplama tüpü içerisine yerleştirildi.
- İkinci yıkama tamponu filtre üzerine 500 µl yerleştirildi ve 15 saniye 9000 rpm'de santrifüj edildi. Filtre altında toplanan kısım atıldıktan sonra aynı toplama tüpü içerisine yerleştirildi.
- Üçüncü yıkama tamponu filtre üzerine 200 µl eklendi ve 3 dakika 13500 rpm'de santrifüj edildi.
- Toplama tüpü atıldı. Filtre, steril 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi.
- Filtre üzerine 20 µl örnek seyrelti çözeltisi eklendi ve 9000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Elde edilen RNA'ların miktarları ve saflığı "NanoDrop ND-1000 Spektrofotometre" cihazında ölçülerek RT-PCR'da kullanılana kadar -80°C'lik derin dondurucuda saklandı.

3.7.4.2. *In vivo* Total RNA Saflaştırması

Doku örneklerinden total RNA saflaştırma işlemi peqGOLD TriFast™ dokudan RNA izolasyon kiti kullanılarak, aşağıda yazılı olan protokole göre yapıldı. Kontaminasyonu engellemek amacı ile işlemler güvenlik kabininin içinde gerçekleştirildi.

- 1.5 ml' lik ependorf tüp içinde bulunan 50-100 mg arasındaki dokuların üzerine 1000 µl TriFast eklendi ve homojenizatör ile parçalandıktan sonra oda sıcaklığında 5 dk bekletildi.
- 200 µl kloroform eklenerek, 15 sn boyunca karıştırıldı ve 10 dk oda sıcaklığında tutuldu.
- Örnekler 11.000 rpm'de 5 dk 4 °C' de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda karışım, altta kırmızı faz (fenol kloroform fazı), arafaz ve üstte renksiz sıvı faz olmak üzere üç faza ayrıldı.
- Üst faz yeni bir steril 1.5 ml'lik ependorf tüpüne aktarıldı ve üzerine 500 µl izopropanol eklenip karıştırıldı.
- Örnekler 1.5 saat -20 °C' de bekletildi. 11.500 rpm'de 10 dk 4 °C' de santrifüj edildi. Üst sıvı atıldı.
- DNA kontaminasyonunu engellemek için 60µl DNaz (µg başına 5U DNaz), 300 µl DNaz Buffer I ve 400 µl DEPC'li su eklenerek 30 dk 37°C' de bekletildi.
- Örneklerin zerine 300 µl 25 mM EDTA eklendi ve 65 °C' de 10 dk bekletildi.
- 13.000 rpm'de 10 dk 4 °C'de santrifüj edildi. keltiye dokunmadan üst sıvı atıldı.
- 1000 µl %75' lik alkol (taze hazırlanıp) eklenerek, 12 500 rpm'de 10 dk 4 °C' de santrifüj edildi. keltiye dokunmadan üst sıvı atıldı.

- Çökelti üzerine tekrar 1000 µl %75' lik alkol eklenerek, 12 000 rpm'de 10 dk 4 °C' de santrifüj edildi. Çökeltiyeye dokunmadan üst sıvı atıldı.
- Çökelti kurumaya bırakıldı. 30-50 µl DEPC'li su ile sulandırıldı. Çalışma gününe kadar -80 °C' de saklandı.

3.7.4.3. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Elde edilen RNA'lar spektrofotometrede 260 nm dalga boyunda ölçülerek mikrolitredeki mikrogram değerleri belirlendi. Primer olarak random heksamerler kullanılarak cDNA sentez kiti ile total RNA'dan cDNA sentezi yapıldı. cDNA sentezi sırasında kullanılan malzemeler ve miktarları Tablo 2'de verilmiştir. cDNA için PCR karışımı ince çepirli 0.2 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine dağıtıldıktan sonra saflaştırılan total RNA eklendi.

Tablo 2. RT-PCR tepkime karışımı

| | Son Konsantrasyon | Hacim |
|-----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Steril H ₂ O-PCR grade | - | RNA miktarına göre değişken |
| Reaksiyon Tamponu | 1x (8mM MgCl ₂) | 4µl |
| Dntp | 1Mm | 2µl |
| Random heksamer primeri | 60µM | 2MI |
| RNaz inhibitörü | 20 ünite | 0.5µL |
| Transcriptor Ters Transkriptaz | 10 ünite | 0.5µL |
| Total RNA | 1µg | 1µg olacak şekilde |

3.7.4.4. cDNA Ters Transkriptaz PCR (RT-PCR) Programı

Otomatik ısı döngüsü cihazı, Tablo 3’de belirtilen programa ayarlanarak cDNA ters transkripsiyon polimeraz zincir tepkimesi uygulandı.

Tablo 3. Otomatik ısı döngüsü cihazında uygulanan program

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

Reaksiyon sonucu cDNA örnekleri Real-Time PCR’ da kullanılıncaya kadar -20°C’lik derin dondurucuda saklandı.

3.7.4.5. Gen İfadesinin Real-Time PCR İle Belirlenmesi

Aktin B, BRAF, CASP3 ve Bcl2l1 genlerinin mRNA miktarları, Real-Time PCR yöntemi ile Light Cyler (LC) 480 cihazı kullanılarak belirlendi. Amplifikasyonlar 20 µL toplam tepkime hacmi içerisinde; cDNA, mRNA’ya özgü primerler, UPL probu, LightCyler TaqMan Master karışımı ve distile su kullanılarak gerçekleştirildi. BRAF, CASP3 ve Bcl2l1 gen ifade miktarlarını normalize etmek için Aktin B mRNA düzeyi referans olarak alındı.

3.7.4.5.1. ACTB Primer ve Probenun cDNA Üzerindeki Yerleşimi

ACTB genine ait UPL prob ve primerlerin dizileri aşağıda verilmiştir. Prob ve primerlerin cDNA'daki yerleşimi ise Şekil 8'de gösterildi.

ACTBF 5'- CTAAGGCCAACCGTGAAAAG-3'
ACTBR 5'- ACCAGAGGCATACAGGGACA-3'
64 numaralı prob dizisi:5'-CCAGGCTG-3'

5' – CTAAGGCCAACCGTGAAAAG–3'
CTAAGGCCAACCGTGAAAAGATGACCCAGATCATGTTTGAGACCTTCAACACCCCAGCCA
5' –CCAGGCTG–3'
TGTACGTAGCCATCCAGGCTGTGCTGTCCTGTATGCCTCTGGT
3' –ACAGGGACATACGGAGACCA–5'

Şekil 8. ACTB mRNA' sının belirlenmesinde kullanılan UPL prob ve primerlerin nükleotid dizileri

3.7.4.5.2. BRAF Primer ve Probenun cDNA Üzerindeki Yerleşimi

BRAF genine ait UPL prob ve primerlerin dizileri aşağıda verilmiştir. Prob ve primerlerin cDNA' daki yerleşimi ise Şekil 9'da gösterildi.

BRAFF 5'-GCTGGGACACGGACATTT-3'
BRAFR 5'-GCAAAAGTCACAAAATGCTAAGG-3'
55 numaralı prob dizisi: 5'-GGAGAGGA-3'

5' -GCTGGGACACGGACATTT-3' 5' -GGAGAGGA-3'
GCTGGGACACGGACATTTCTGGCTTACTGGAGAGGAGTTACATGTTGAAGTACTGGAGA
ATGTCCCACTTACAACACACAACCTTTGTACGGAAAACCTTTTTTTCACCTTAGCATTGTTGTGACTTTTTGC
3' -GGAATCGTAAAAACACTGAAACG-5'

Şekil 9. BRAF mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan UPL prob ve primerlerin nükleotid dizileri

3.7.4.5.3. CASP3 Primer ve Probenin cDNA Üzerindeki Yerleşimi

CASP3 genine ait UPL prob ve primerlerin dizileri aşağıda verilmiştir. Prob ve primerlerin yerleşimi ise Şekil 10'da gösterildi.

CASP3F 5'- ACTCGTGAAGACATTTTGAATTA-3'
CASP3R 5'-TCACCATGGCTTAGAATCACA-3'
68 numaralı prob dizisi: 5'-AGGAGCAG-3'

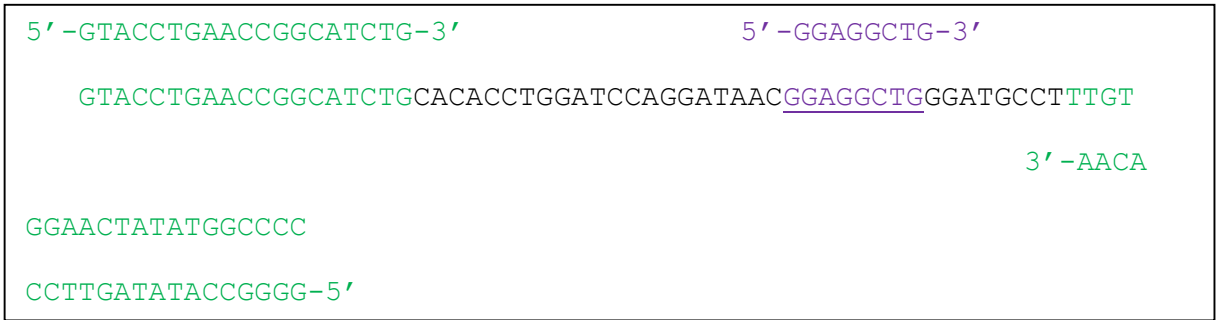
5' -ACTCGTGAAGACATTTTGAATTA-3' 5' -AGG
ACTCGTGAAGACATTTTGAATTAATGGATAGTGTTCCTAAGGAAGATCATAGCAAAAGG
AGCAG-3'
AGCAGCTTTGTGTGTGTGATTCTAAGCCATGGTGA
3' -ACACTAAGATTTCGGTACCACT-5'

Şekil 10. CASP3 mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan UPL prob ve primerlerin nükleotid dizileri

3.7.4.5.4. Bcl2l1 Primer ve Probenun cDNA Üzerindeki Yerleşimi

Bcl2l1 genine ait UPL prob ve primerlerin dizileri aşağıda verilmiştir. Prob ve primerlerin yerleşimi ise Şekil 11'de gösterildi.

BCL2L1F 5'-GTACCTGAACCGGCATCTG-3'
BCL2L1R 5'-GGGGCCATATAGTTCCACAA-3'
75 numaralı prob dizisi:5'-GGAGGCTG-3'



Şekil 11. Bcl2l1 mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan UPL prob ve primerlerin nükleotid dizileri

3.7.4.5.5. ACTB, BRAF, CASP3 ve Bcl2l1 Genleri için Real Time PCR Tepkime Karışımları

ACTB, BRAF, CASP3 ve Bcl2l1 genlerine uygun verilen primer ve proplar kullanılarak Real-Time PCR tepkimesi LC cihazında gerçekleştirildi. Tepkime karışımını hazırlamak için kullanılan bileşenlerin miktarları Tablo 4'de verilmiştir.

Tablo 4. ACTB, BRAF, CASP3 ve BCL2L1 Real-Time PCR tepkime karışımı

| | Son Konsantrasyon | Hacim |
|--------------------------|-------------------|--------|
| dH ₂ O | - | 4.1 µL |
| MgCl ₂ (25mM) | 4 mM | 1.2 µL |
| Primer F (10pmol/µL) | 2.5 pmol | 0.5 µL |
| Primer R (10pmol/µL) | 2.5 pmol | 0.5 µL |
| TaqMan prob (100pmol/µL) | 10 pmol | 0.2 µL |
| TaqMan karışımı (10x) | 1x | 2.5 µL |
| cDNA | - | 1 µL |

3.7.4.5.6. LightCycler (LC) 480 Deney Programı

Real-Time PCR karışımları hazırlandıktan sonra 96'lık çok kuyucuklu plakalara dağıtıldı ve üzerine cDNA' lar eklendi. Üzeri şeffaf kapatici ile kapatıldı ve cihaza yerleştirildikten sonra Tablo 5'de belirtilen amplifikasyon programı kullanılarak PCR tepkimesi gerçekleştirildi. ACTB, BRAF, CASP3 ve Bcl2l1 genleri için aynı program kullanıldı.

Reaksiyon sonucu, ACTB, BRAF, CASP3 ve Bcl2l1 genlerinin mRNA ifade düzeylerini gösteren Crossing point (Cp) değerleri belirlendi. BRAF, CASP3 ve Bcl2l1 ifade düzeyleri ACTB ifade düzeyine göre normalize edildi.

Tablo 5. ACTB, BRAF, CASP3 ve BCL2L1 genlerinin ifade düzeylerinin belirlenmesi için kullanılan Real Time PCR tepkime programı

| Program 1. Ayrılma (Denatürasyon) | |
|--|----------------|
| Program Verisi | Değer |
| Döngüler | 1 |
| Analiz Modu | - |
| Sıcaklık Hedefleri | Kısım 1 |
| Hedef Sıcaklık (°C) | 95 |

| | | | |
|--|----------------|----------------|---------------|
| İnkübasyon zamanı (s:dk:sn) | 10:00dk | | |
| Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn) | 4.40 | | |
| Program 2. Primer Bağlanması ve Uzama (Hibridizasyon ve Polimerizasyon) | | | |
| Program Verisi | | Değer | |
| Döngüler | 50 | | |
| Analiz Modu | Çoğalma | | |
| Sıcaklık Hedefleri | Kısım 1 | Kısım 2 | Kısım3 |
| Hedef Sıcaklık (°C) | 95 | 60 | 60 |
| İnkübasyon zamanı (s:dk:sn) | 10sn | 20sn | 1 |
| Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn) | 4.40 | 2.20 | 4.40 |
| Program 3. Soğutma | | | |
| Program Verisi | | Değer | |
| Döngüler | 1 | | |
| Analiz Modu | - | | |
| Sıcaklık Hedefleri | Kısım 1 | | |
| Hedef Sıcaklık (°C) | 40 | | |
| İnkübasyon zamanı (s:dk:sn) | 30sn | | |
| Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn) | 2.20 | | |

3.7.5. Protein İfadesi Çalışmalarında Kullanılan Yöntemler

3.7.5.1. İn vitro Protein İzolasyonu

Flavopiridolün belirli dozları ile inkübe edilen B16F10 hücrelerinde inkübasyon süresinin dolmasının ardından aşağıda yer alan basamaklar uygulandı:

- Flasklardaki besiyerleri çekildi (2×10^6 hücre/flask)
- 1 ml PBS eklendi.
- Flask yüzlerinden hücreler scrape ile kazınıp ependorflara konuldu

- Pelet üzerine 50 µl soğutulmuş hücre lizis solüsyonu eklendi, pipetaj yapıldı.
- 5 dakika 1500 rpm' de santrifüj edildi.
- Süpernatant atıldı.
- 10 dk buzda bekletildi, 8800 rpm'de 1 dk çevrildi.
- Süpernatant alınarak, peletler atıldı.
- Örnekler – 20°C'de saklandı.

3.7.5.2. *In vivo* Protein İzolasyonu

Diseksiyon sonrası alınan doku örneklerine 200 ml hücre parçalama tamponu eklendi ve homojenizatör ile parçalandı. Çalışma süresince örnekler buz içerisinde tutuldu.

3.7.5.3. Protein Miktar Tayini

İnkübasyon süresi sonunda steril flasklarda ekili bulunan hücrelerden protein tayini, "BCA (biçinkonik asit) Protein Ölçüm Kiti" kullanılarak ve aşağıda yazılı olan basamaklar takip edilerek yapıldı.

- Kit içerisinde bulunan albümin ile 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml; 0.125 mg/ml ve 0 konsantrasyonlarda standartlar hazırlandı.

- Örnekler ve standartlar 96'lık mikropolanın her bir kuyucuğuna üç tekrarlı olarak 5 µl eklendi.
- Reaktif B : reaktif A, 1:50 olacak şekilde sulandırıldı.
- Her bir kuyucuğa sulandırılan reaktiften 95 µl eklendi.
- Mikropolaka 37°C' lik inkübatörde 30 dakika bekletildikten sonra 562 nm dalga boyunda mikropolaka okuyucuda okundu.
- Örnekler çalışma gününe kadar -20 °C'de saklandı.

3.7.5.4. Kaspaz 9 Aktivitesinin Kolorimetrik Olarak Belirlenmesi

B16F10 hücrelerinin belirlenen doz ve sürede inkübasyonlarının ardından, reaksiyon sonlandırılıp protein izolasyonları yapıldı. BCA kiti ile protein miktarları belirlendikten sonra protein örnekleri "Kaspaz 9 Kolorimetrik Kaspaz Assay" kiti kullanılarak kaspaz 9 aktivitesinin belirlenmesi aşağıdaki basamaklara göre yapıldı:

- 96'lık hücre kültür kabına her bir örnekten 100 µl, hücre parçalama solüsyonundan ise 50 µl eklendi.
- Her örneğe 10 mM DTT içeren 2X Reaksiyon solüsyonundan 50 µl eklendi.
- Son konsantrasyon 200 µM olacak şekilde 4 mM EHD-pNA substratından 7 µl eklendi.

- 37 °C'de 2 saat inkübe edildi.
- Absorbans değerleri 405 nm dalga boyunda mikropate okuyucuda okundu.

3.7.5.5. Kaspaz 3/7 Aktivitesinin Belirlenmesi

B16F10 hücrelerinin belirlenen doz ve sürede inkübasyonlarının ardından, reaksiyon sonlandırılıp protein izolasyonları yapıldı. BCA kiti ile protein miktarları belirlendikten sonra protein örnekleri "Anaspec Sensolyte Homogeneous AFC Kaspaz 3/7 Assay" kiti kullanılarak kaspaz 3/7 aktivitesi aşağıdaki basamaklara göre yapıldı:

- 96'lık hücre kültür kabının her bir kuyucuğuna 150 µl örnek eklendi.
- Kaspaz 3/7 substrat (Komponent A), 1 M DTT (Komponent E) ve Assay Buffer (Komponent D) karışımından her kuyucuğa 50 µl eklendi.
- Örnekler 30 dakika çalkalayıcıda 100-200 rpm'da bekletildi.
- ELİZA cihazında Ex/Em: 380nm/500 nm'da floresan yoğunluğu ölçüldü.

3.7.5.6. İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi

Subkutanöz melanoma oluşturulmuş farelerden alınan doku örnekleri PCNA ve Bcl-2 ekspresyonunu belirlemek için streptavidin-biyotin üçlü indirekt immün peroksidaz yöntemi kullanılarak boyama yapılmıştır.

Çalışmada PCNA (Abbomax, Lot-1010-1177) ve Bcl-2 (Dako- Mouse clonal) antikörleri kullanılmıştır. Biotinlenmiş, bağlayıcı (sekonder) antikor, streptavidin-biotin kompleksi ve kromojen olarak kullanılan 3-3'diaminobenzidin tetrahidroklorid (DAB) ticari olarak kullanıma hazır kitler şeklindedir.

Doku mikroarray aleti ile hazırlanan bloklar ve diğer bloklardan elde edilen kesitler PCNA ve Bcl-2 antikörleri ile aşağıdaki prosedüre göre boyanmıştır:

- Polilizinli lam üzerine alınan 4 mikronluk kesitler 37 °C'de etüvde gece boyunca deparafinize edilmiştir.
- Kesitler ksilolde 30 dakika bekletilmiştir.
- Fiksasyon için %96'lık alkolde 15 dakika tutulmuştur.
- Kesitler çeşme suyuyla, ardından distile su ile yıkanmıştır.
- Antijen retrivel işlemi PCNA ve Bcl-2 antikörleri ile boyama için Tris-EDTA buffer (pH 9.0) içinde sırasıyla 90 °C'de 10 dakika ve 85°C'de 5 dakika mikrodalgada bekletilmiştir.
- Kesitler 20 dakika soğumaya bırakılmıştır.
- Kesitler önce su, sonra PBS ile yıkanmıştır.
- Örnekler hidrojen peroksidazda 5 dakika bekletilmiştir.
- Kesitler PBS ile yıkanmıştır.

- Primer antikor olan PCNA ve Bcl-2 lam üzerindeki doku kesitlerini kapatacak şekilde damlatılmıştır. 16 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- Kesitler PBS ile yıkanmıştır.
- Bağlayıcı (sekonder) antikor ile oda sıcaklığında 15 dakika süre ile inkübasyon yapılmıştır.
- Kesitler PBS ile yıkanmıştır.
- Streptavidin-biyotin kompleksi uygulanarak 15 dakika bekletilmiştir.
- Kesitler PBS ile yıkanmıştır.
- Renk vererek görüntülemeyi sağlamak için PCNA için AEC kromojen; Bcl-2 için DAB kromojen ile belirli bir süre ile inkübasyonu yapılmıştır.
- Kesitler çeşme suyu ile yıkanmıştır.
- 20 saniye Mayers hematoksilen ile zemin boyası yapılmış ve musluk suyunda yıkanmıştır.
- Dehidratasyon için kesitler sırasıyla %90, %95 ve %100'lük alkollerde 5'er dakika tutulmuş, ksilolde şeffaflaştırılmıştır.
- Doku kesitleri Bio Optica marka biomount ile kapatılmıştır.

3.7.5.7. İmmünohistokimyasal Boyamanın Değerlendirilmesi

İmmünohistokimyasal boyamanın değerlendirilmesinde PCNA için membranöz boyama pozitif olarak kabul edilmiş, boyanma değerlendirilirken boyanma yoğunluğu >%10 ise pozitif, <%10 ise negatif kabul edilmiştir. Bcl-2 için <10 zayıf, %11-50 arası orta ve %51-80 arası güçlü olarak değerlendirilmiştir⁹⁸.

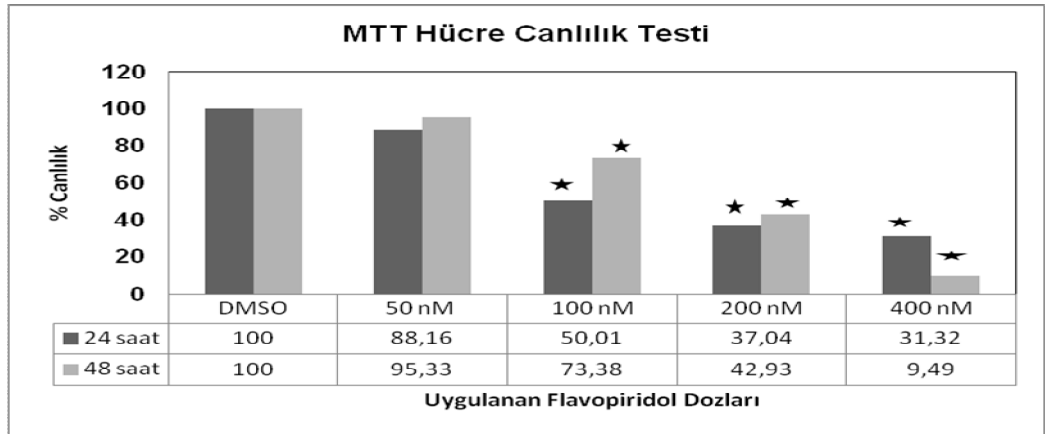
3.7.6. İstatistiksel Analiz Yöntemleri

Doza ve zamana bağlı olarak değişen, BRAF, CASP3 ve Bcl2l1 mRNA ifade düzeylerindeki farklılıklar "REST (2009 V2.0.13)" istatistik programı ile karşılaştırıldı⁹⁹. Hücre canlılığı, kaspaz 9 aktivitesi, kaspaz 3/7 aktivitesi, immünohistokimyasal oranlardaki değişimler ise "t-test" testiyle karşılaştırıldı. Veriler "SigmaStat 12.0" istatistik programı kullanılarak değerlendirildi. 0.05'den küçük olan p değerleri istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. MTT (Micro Culture Tetrazolium) Hücre Canlılığı Sonuçlarının Değerlendirilmesi

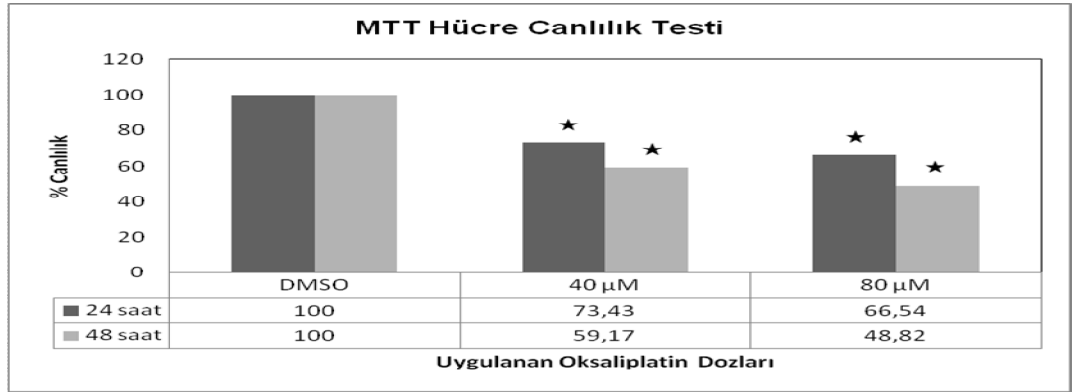
24 ve 48 saat inkübasyon sonucunda B16F10 hücrelerinde flavopiridol'ün hücre canlılığı üzerine etkisi Grafik 1'de gösterilmiştir. Flavopiridolün (F) B16F10 hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak proliferasyonu azalttığı gözlenmiştir. 24 saat flavopiridol uygulaması sonrası 24 saatte en yüksek konsantrasyondaki (400 nM) hücre canlılığı % 31.32 olarak bulunurken, 200 nM için canlılık değeri % 37.04'dir. Flavopiridolün IC₅₀ (İnhibisyon konsantrasyonu) değerinin 24 saat için 100 nM olduğu belirlendi. 48 saat flavopiridol uygulaması sonrası en yüksek konsantrasyondaki (400 nM) hücre canlılığı % 9.48 iken, 200 nM için hücre canlılığı % 42.93 olarak bulundu. 48 saat için 100 nM hücre canlılığı % 73.38 olarak belirlendi. 24 ve 48 saat uygulanan 50 nM flavopiridol uygulanan grup için fark önemsiz bulundu ($p>0,05$).



Grafik 1. B16F10 hücrelerine 24 ve 48 saat flavopiridol uygulaması sonrası gözlenen hücre canlılık oranları, $p<0,05$ ★

Grafik 2'de görüldüğü gibi 24 ve 48 saat oksaliptatin (O) ile muamele edilmiş B16F10 hücrelerinin doza ve zamana bağlı olarak hücre proliferasyonunu azalttığı belirlenmiştir. 24 saat için, 40 μ M oksaliptatin

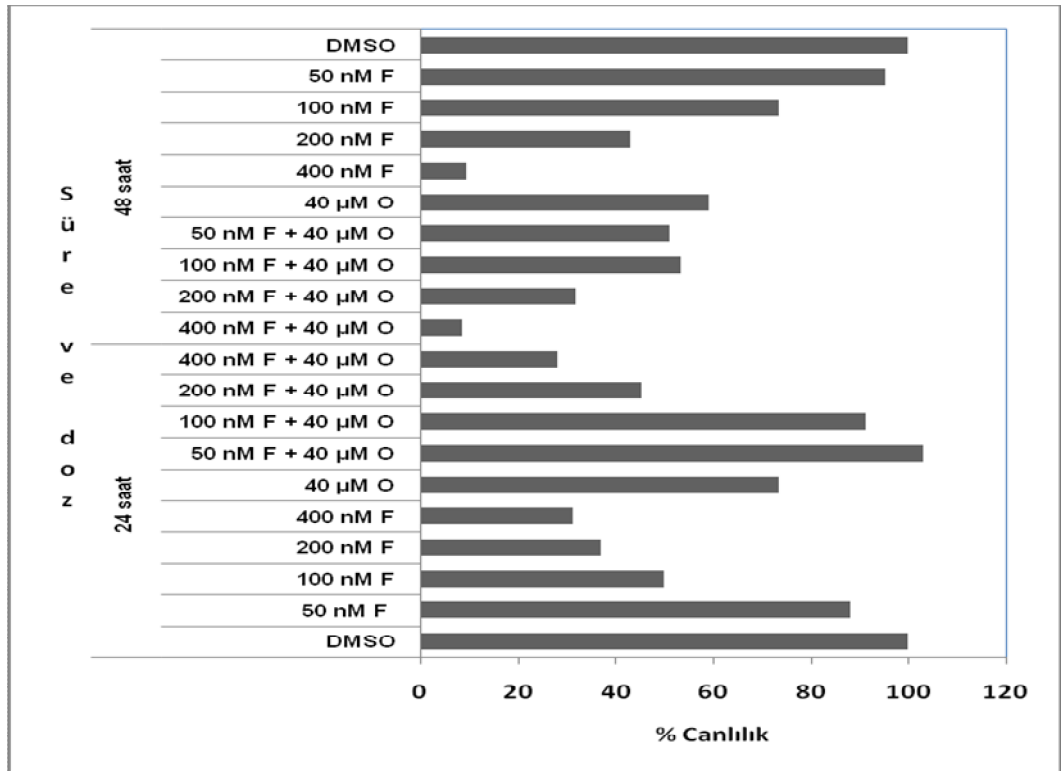
uygulamasý sonrası hücre canlilyđı % 66.54 ve 80 µM oksaliplatin uygulamasý sonrası ise % 73.43'tür bulunmuştur. 48 saat, 40 µM oksaliplatin uygulamasý sonrası hücre canlilyđı % 59.17 ve 80 µM oksaliplatin uygulamasý sonrası ise % 48.82'dir. Oksaliplatinin IC₅₀ deđeri 48. Saatte 80 µM olarak belirlendi.



Grafik 2. B16F10 hücrelerine 24 ve 48 saat oksaliplatin uygulamasý sonrası gözlenen hücre canlilyđ oranları, p<0,05 ↙

24 ve 48 saat inkübasyon sonunda flavopiridol (400 nM, 200 nM, 100 nM ve 50 nM) ve oksaliplatin (40 µM) kombinasyonlarının, hücre canlilyđı üzerine etkisi Grafik 3'de gösterilmiştir. 24 saat sonunda B16F10 hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak kombine uygulamanın tek ajan kullanımından daha etkin olmadığı gözlenmiştir. 24 saat flavopiridol ve oksaliplatin uygulamasý sonrası en yüksek konsantrasyondaki (400 nM F+40 µM O) hücre canlilyđı % 28.01 ve 200 nM favopiridol + 40 µM oksaliplatin uygulamasýndaki canlilyđ değerinin % 45.23 olduğu görüldü. 24 saat uygulanan 50 nM flavopiridol + 40 µM oksaliplatin ve 100 nM flavopiridol + 40 µM oksaliplatin konsantrasyonlarındaki sonuçlar istatistiksel olarak anlamsız bulundu (p>0,05). 48 saat sonunda flavopiridol ve oksaliplatin kombinasyonunun B16F10 hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak proliferasyonu azalttlyđı gözlenmiştir, yalnız bu azalma oksaliplatinin tek başına uygulamalarındaki değerlere çok yakın olduğundan kombine uygulama etkili bulunmamıştır. 48 saat flavopiridol ve

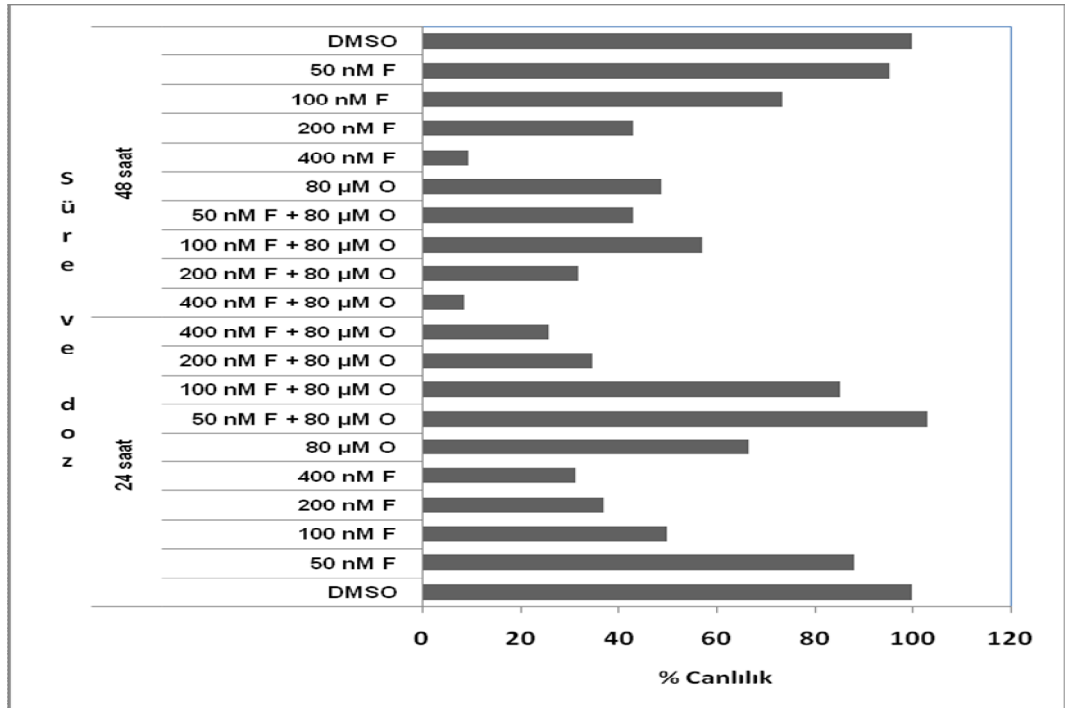
oksaliplatin uygulaması sonrası en yüksek konsantrasyondaki (400 nM flavopiridol + 40 μ M oksaliplatin) hücre canlılığı % 8.61; 200 nM flavopiridol + 40 μ M oksaliplatin uygulamasındaki canlılık değeri % 31.83; 100 nM flavopiridol + 40 μ M oksaliplatin uygulamasındaki hücre canlılığı % 57.1 ve 50 nM flavopiridol + 40 μ M oksaliplatin uygulamasındaki hücre canlılığı % 43.1 olarak saptandı.



Grafik 3. B16F10 hücrelerine 24 ve 48 saat flavopiridol ve 40 μ M oksaliplatin kombine uygulaması sonrası gözlenen hücre canlılık oranları

24 ve 48 saat inkübasyon sonunda flavopiridol (400 nM, 200 nM, 100 nM ve 50 nM) ve oksaliplatin (80 μ M) kombinasyonlarında, B16F10 hücrelerinin, flavopiridol ve oksaliplatin kombinasyonuna olan cevabının hücre canlılığı üzerine etkisi Grafik 4'te gösterilmiştir. 24 saat sonunda B16F10 hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak kombine uygulamanın tek ajan kullanımından daha etkin olmadığı gözlenmiştir. 24 saat flavopiridol ve oksaliplatin uygulaması sonrası en yüksek

konsantrasyondaki (400 nM F + 80 µM O) hücre canlılığı % 25.98 ve 200 nM flavopiridol + 80 µM oksaliplatin uygulamasındaki canlılık değeri % 34.79 bulundu. 24 uygulanan 50 nM flavopiridol + 80 µM oksaliplatin ve 100 nM flavopiridol + 80 µM oksaliplatin konsantrasyonlarındaki sonuçlar istatistiksel olarak anlamsız olarak belirlendi (p>0,05). 48 saat sonunda flavopiridol ve oksaliplatin kombinasyonunun B16F10 hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak proliferasyonu azalttığı gözlenmiştir, yalnız bu azalma oksaliplatinin tek başına uygulamalarındaki değerlere çok yakın olduğundan kombine uygulama etkili bulunmamıştır. 48 saat flavopiridol ve oksaliplatin uygulaması sonrası en yüksek konsantrasyondaki (400 nM flavopiridol + 80 µM oksaliplatin) hücre canlılığı % 8.58; 200 nM flavopiridol + 40 µM oksaliplatin uygulamasındaki canlılık değeri % 31.93 ; 100 nM flavopiridol + 80 µM oksaliplatin uygulamasındaki hücre canlılığı % 53.41 ve 50 nM flavopiridol + 80 µM oksaliplatin uygulamasındaki hücre canlılığı % 51.18 olarak saptandı.



Grafik 4. B16F10 hücrelerine 24 ve 48 saat flavopiridol ve 80 µM oksaliplatin kombine uygulaması sonrası gözlenen hücre canlılık oranları

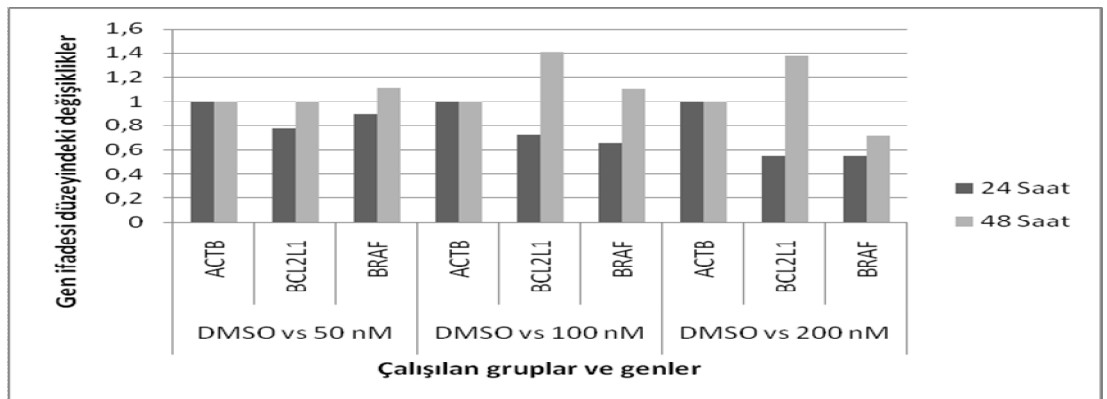
4.2. Transkripsiyon Düzeyinde Bulgular

4.2.1. Gen İfade Düzeyinin Kantitatif Belirlenmesi

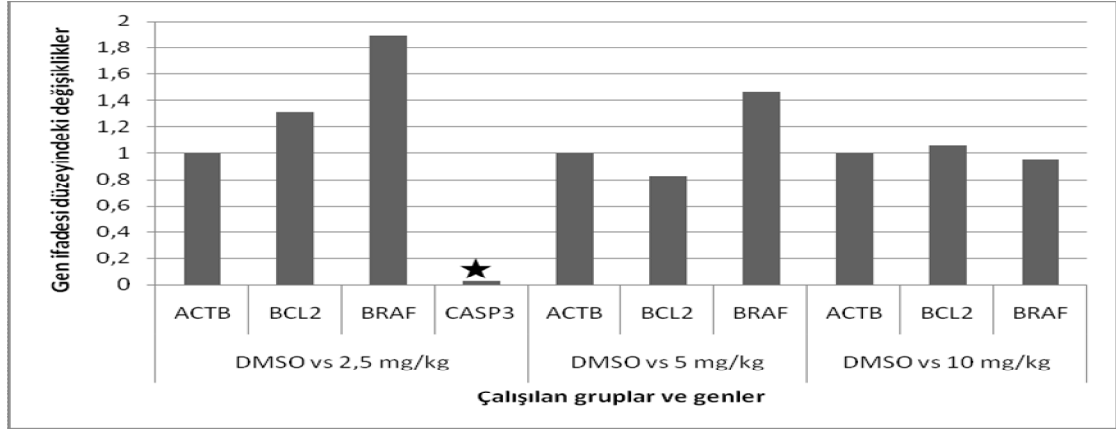
BRAF, CASP3 ve Bcl2l1 genlerinin ifade düzeyinin kantitatif değerlendirilmesi için Light Cycler 480 cihazı kullanıldı. B16F10 hücre hattından elde edilen cDNA' larda BRAF, CASP3, Bcl2l1 bu genlerin normalizasyonu için seçilen Aktin B genlerine özgül primerler ve UPL DNA problemleri kullanılarak çalışıldı.

4.2.2. Gen İfade Düzeylerinin Karşılaştırması

B16F10 hücrelerine flavopiridol uygulandığında 6, 24 ve 48. saatler sonunda BRAF, CASP3 ve Bcl2l1 mRNA ifade düzeyleri araştırıldığında, *in vivo* ve *in vitro* olarak flavopiridolün her bir doz ve süre uygulaması için BRAF mRNA ekspresyon ve Bcl2l1 mRNA ekspresyon değeri istatistik olarak anlamsız bulunmuştur. Grafik 6 ve 7'de görüldüğü gibi *in vitro* ve *in vivo* olarak flavopiridolün her bir doz ve süre uygulaması için CASP3 mRNA gen ekspresyonu sadece *in vivo* 2,5 mg/kg flavopiridol uygulamasında DMSO kontrol grubuna göre 37 kat azalış bulunmuştur, diğer dozlarda ve *in vitro* sonuçlarda ekspresyonu görülmemektedir.



Grafik 5. *In vitro* gen ifadesi düzeyindeki değişimler, $p < 0,05$ ★

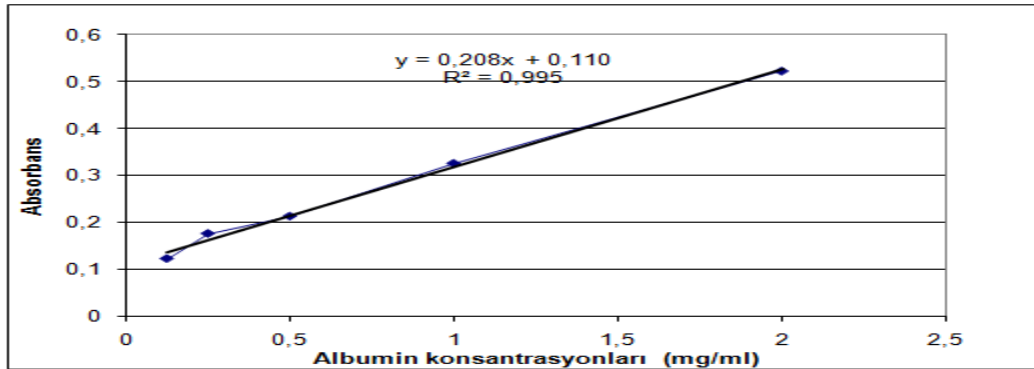


Grafik 6. *In vivo* gen ifadesi düzeyindeki değişiklikler, $p < 0,05$ ★

4.3. Protein Düzeyinde Bulgular

4.3.1. BCA Protein Tayini

Grafik 7’de görüldüğü gibi B16F10 hücrelerine ve C57BL6 ırk farelere flavopiridol uygulaması sonrası protein miktarı saptanması BCA kiti ile standart albumin konsantrasyonlarına göre belirlenmiştir. Aktif kaspaz 3/7, aktif kaspaz 9 protein aktivitelerinin ölçülmesi için gereken örnek miktarları bu grafikte belirlenen eksene göre elde edilen denklemlerle saptanmıştır ve protein miktarı eşitlenerek homojenizasyon sağlanmıştır.

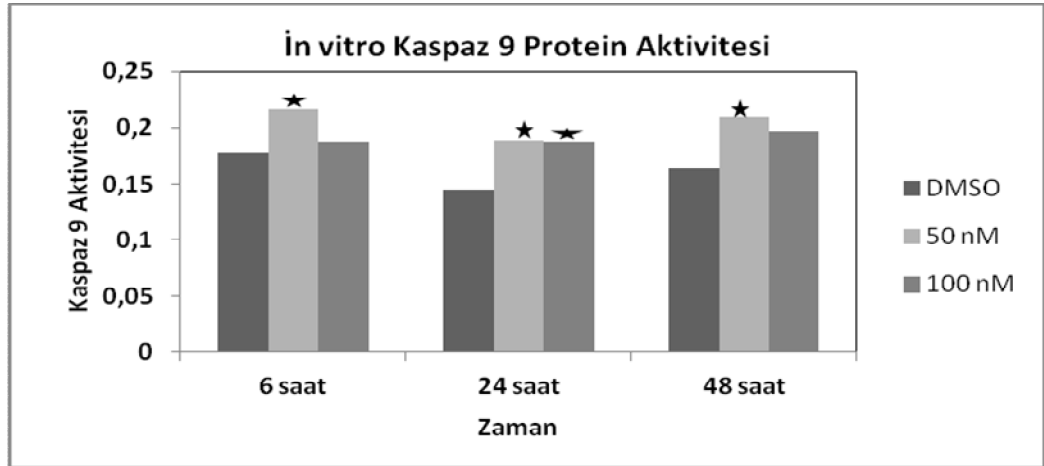


Grafik 7. *In vitro* ve *in vivo* çalışmalar için protein miktarı saptanması

4.3.2. Kaspaz 9 Protein Aktivitesinin Belirlenmesi

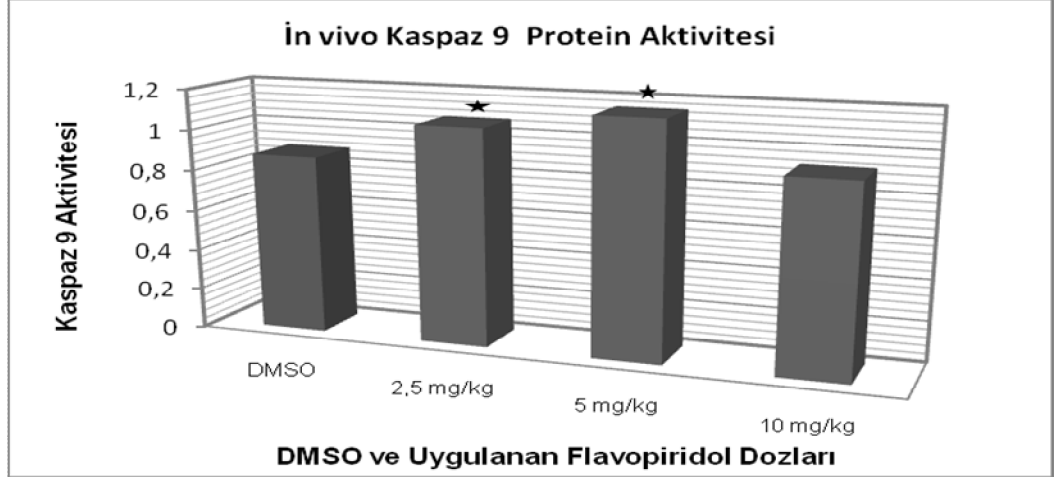
B16F10 fare melanoma hücre hatlarına 6, 24 ve 48 saat 50 nM ve 100 nM flavopiridol uygulaması sonrası ölçülen kaspaz 9 protein aktivitesi Grafik 8'de gösterilmiştir.

Bu değerlere göre 6. saat 50 nM flavopiridol uygulamasında kontrole göre anlamlı bir artış varken, 100 nM değeri istatistiksel olarak anlamsızdır. 24. saatte 50 nM ve 100 nM flavopiridol uygulaması sonrası kaspaz 9 aktivitesinde anlamlı bir artış saptanmıştır, 48. saatte ise 50 nM flavopiridolde anlamlı bir artış varken, bu saatteki 100 nM uygulama istatistiksel olarak anlamlı değildir (Grafik 8).



Grafik 8. *In vitro* kaspaz 9 protein aktivite değerleri, p<0,05

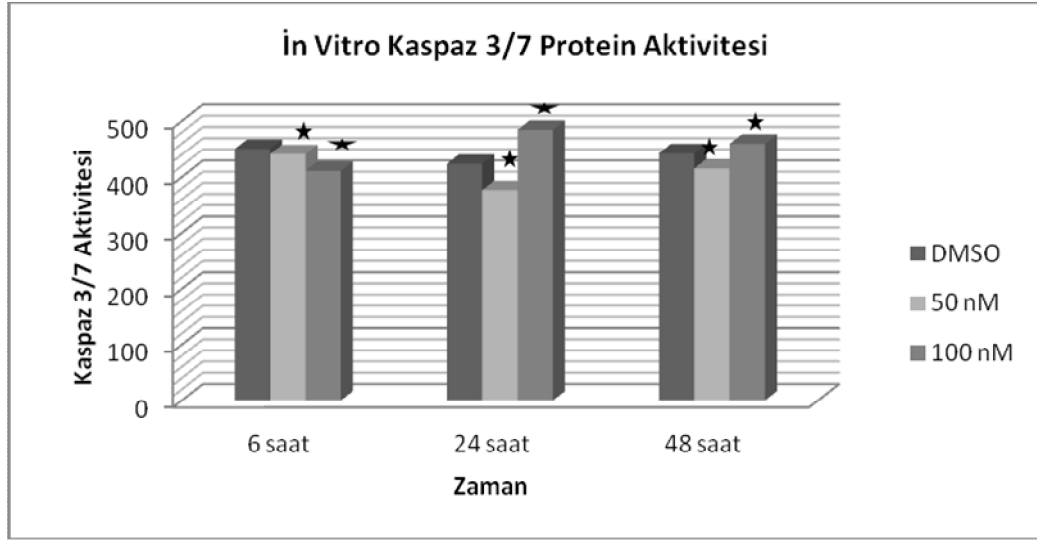
C57BL6 ırkı farelerde tümör oluşumu sonrası uygulanan flavopiridol dozlarına göre kaspaz 9 aktivite değerleri Grafik 9'da gösterilmiştir. 2,5 mg/kg ve 5 mg/kg flavopiridol uygulaması yapılan gruplarda kontrole göre anlamlı bir artış vardır, 10 mg/kg flavopiridol uygulaması ise istatistiksel olarak anlamsızdır. En fazla artış 5 mg/kg flavopiridol uygulaması yapılan grupta görülmüştür.



Grafik 9. *In vivo* kaspaz 9 protein aktivite değerleri, $p < 0,05$ ★

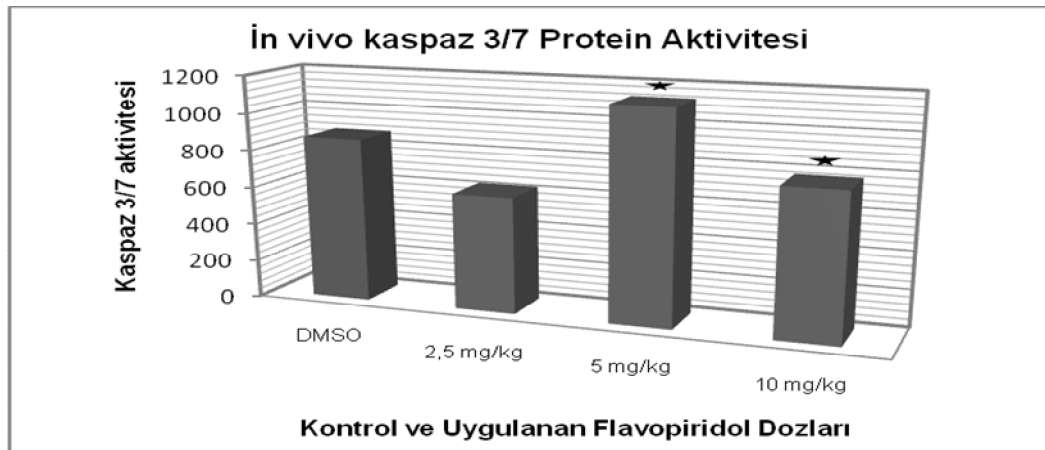
4.3.3. Kaspaz 3/7 Protein Aktivitesinin Belirlenmesi

B16F10 fare melanoma hücre hatlarına 6, 24 ve 48 saat 50 nM ve 100 nM flavopiridol uygulaması sonrası ölçülen kaspaz 3/7 protein aktivitesi değerleri Grafik 10'da gösterilmiştir. Bu değerlere göre 6. saat 50 nM ve 100 nM flavopiridol uygulaması sonrası kontrole göre anlamlı bir azalış bulunmaktadır. 24. saatte 50 nM flavopiridol uygulamasında kontrole göre anlamlı bir azalış varken; 100 nM flavopiridol uygulaması sonrası kaspaz 3/7 protein aktivitesinde anlamlı bir artış saptanmıştır, 48. saatte ise 50 nM flavopiridolde kontrole göre anlamlı bir azalış varken, 100 nM flavopiridol uygulamasında kontrole göre anlamlı bir artış vardır.



Grafik 10. *In vitro* kaspaz 3/7 protein aktivite değerleri, $p < 0,05$ ★

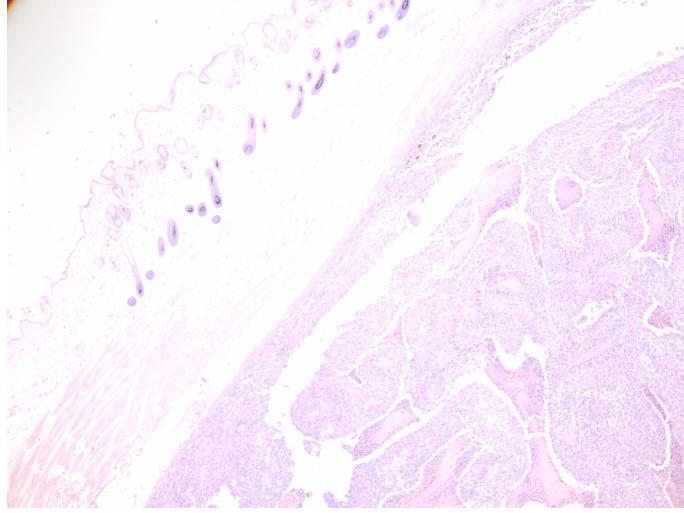
C57BL6 ırkı farelerde tümör oluşumu sonrası uygulanan flavopiridol dozlarına göre kaspaz 3/7 protein aktivite değerleri Grafik 11'de gösterilmiştir. 5 mg/kg flavopiridol uygulaması yapılan grupta kontrole göre artış bulunmaktayken, 10 mg/kg flavopiridol uygulaması yapılan gruplarda kontrole göre bir azalış bulunmaktadır. 2,5 mg/kg flavopiridol uygulaması ise istatistiksel olarak anlamsızdır ($p > 0,05$).



Grafik 11. *In vivo* kaspaz 3/7 protein aktivite değerleri, $p < 0,05$ ★

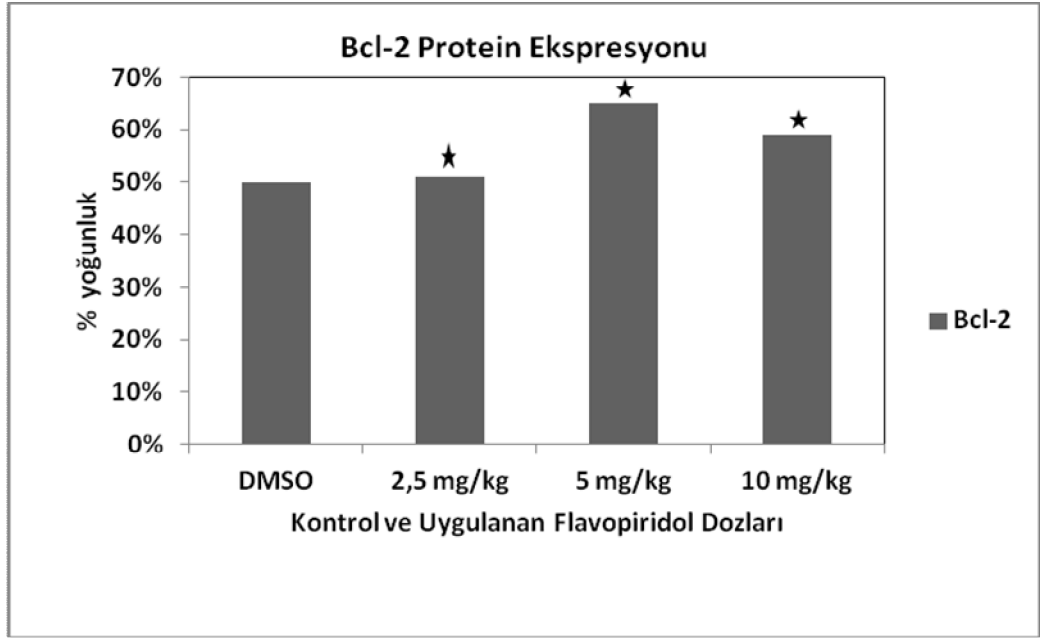
4.3.4. İmmünohistokimya Sonuçları

B16F10 fare melanoma hücrelerinin C57BL6 ırkı farelere enjeksiyonu ile oluşturulan subkutanöz malign melanoma tümörünün, fare diseksiyonundan sonra alınan doku kesiti Resim 6'da görüldüğü gibi hematoxilen&eosin ile boyanarak oluşan tümörün subkutanöz malign melanoma olduğu immünokimyasal olarak doğrulanmıştır.



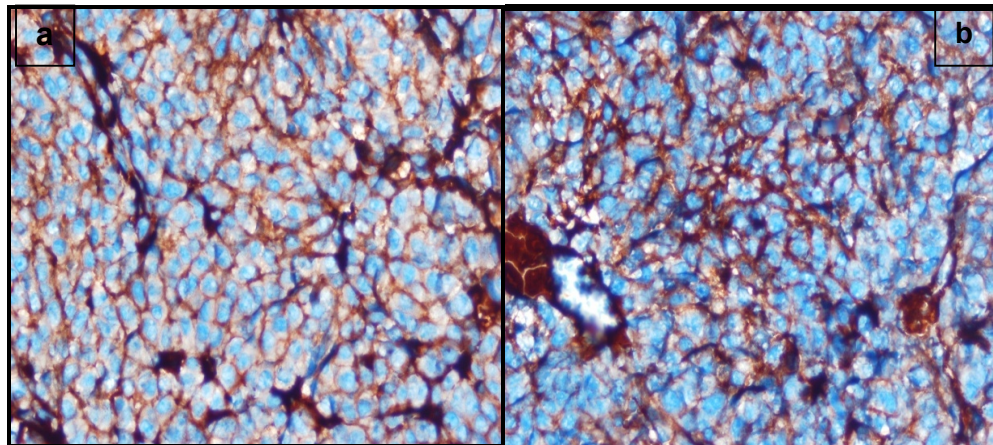
Resim 6. H&E boyaması (100X)

Grafik 12'de, DMSO ve flavopiridol uygulaması sonrası C57BL6 ırkı farelerden alınan dokularda, immünohistokimyasal olarak belirlenen Bcl-2 protein ekspresyon değerleri görülmektedir. Bu değerlere göre 2,5 mg/kg, 5 mg/kg ve 10 mg/kg flavopiridol uygulaması sonrası Bcl-2 değerlerinde kontrole göre anlamlı bir artış bulunmaktadır. En yüksek artış 5 mg/kg uygulanan gruptadır.



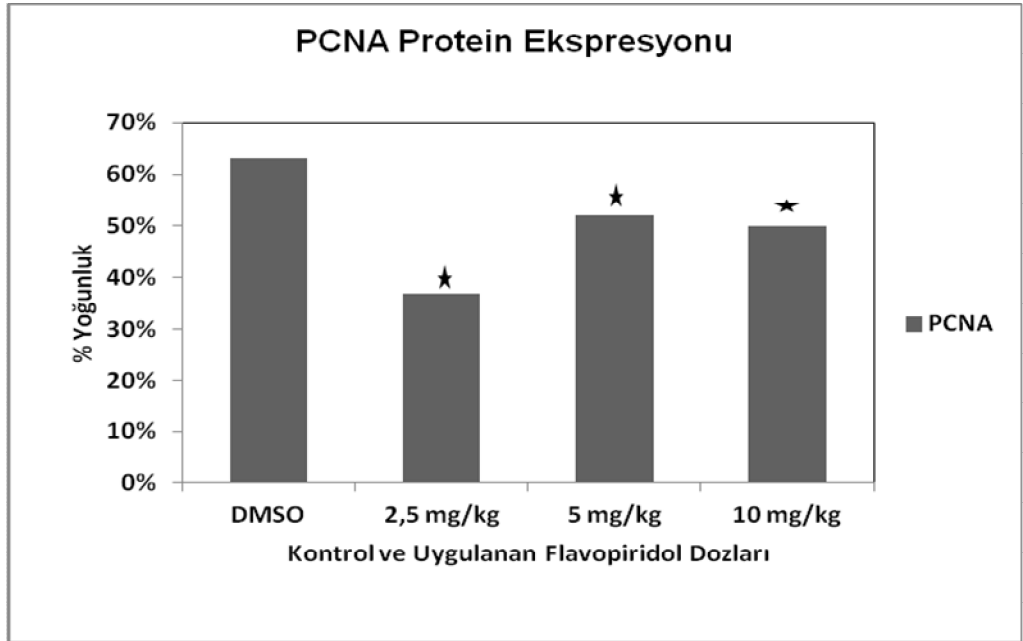
Grafik 12. *In vivo* Bcl-2 protein ifadesi, $p < 0,05$

Resim 7'de görüldüğü gibi Bcl-2 immünohistokimya boyaması sonucu dokular arasında boyanma yoğunluklarında farklılık bulunmamaktadır. Bcl-2 için <10 zayıf, %11-50 arası orta ve %51-80 arası güçlü olarak değerlendirilmiştir⁹⁸.



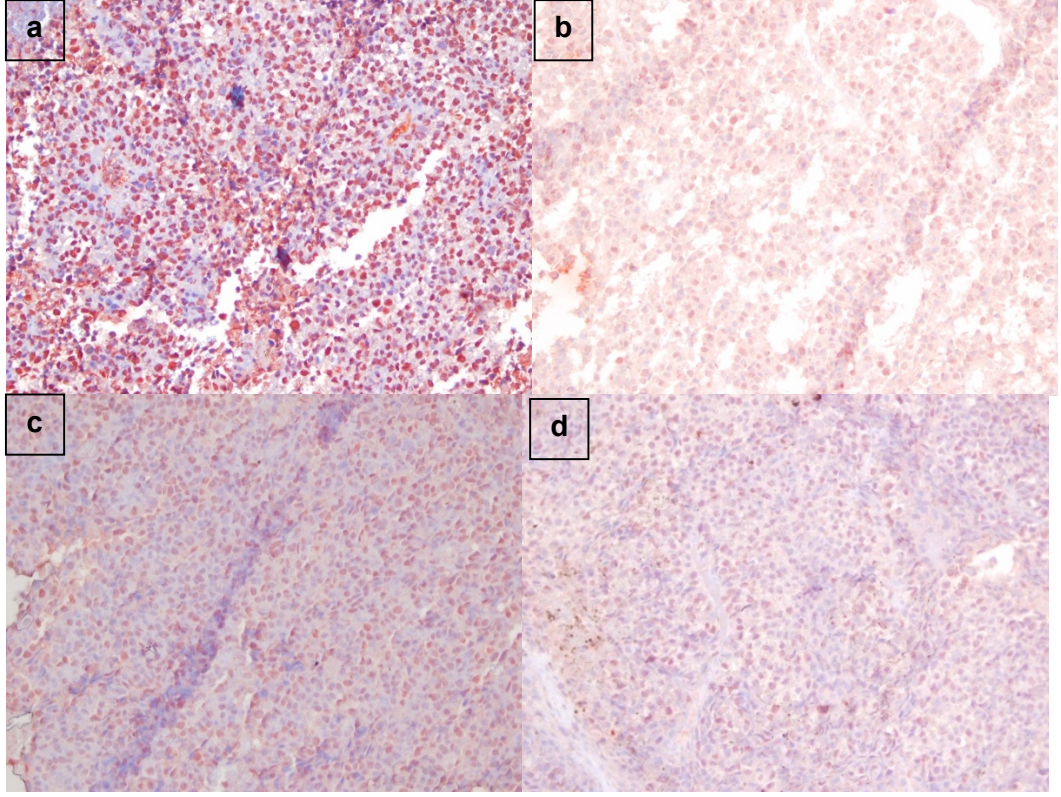
Resim 7. Bcl-2 Boyaması (200X) a) DMSO grubu b) 5 mg/kg Flavopiridol uygulanan grup

Grafik 13'te, DMSO ve flavopiridol uygulaması sonrası C57BL6 ırkı farelerden alınan dokulardan, immünohistokimyasal olarak belirlenen PCNA protein ekspresyon değerleri görülmektedir. Bu değerlere göre 2,5 mg/kg, 5 mg/kg ve 10 mg/kg flavopiridol uygulaması sonrası PCNA protein ekspresyon değerlerinde kontrole göre anlamlı bir azalış bulunmaktadır. En farklı azalma 2,5 mg/kg uygulanan gruptadır.



Grafik 13. *In vivo* PCNA protein ifadesi, $p < 0,05$

Resim 8'de görüldüğü gibi PCNA boyaması yapılan örnekler değerlendirildiğinde boyanma şiddetleri Grafik 13 ile uyumlu olarak azalan boyanma şiddeti göstermiştir.



Resim 8. PCNA Boyaması (100X) a)DMSO, b)2,5 mg/kg c)5 mg/kg, d)10 mg/kg

Çalışmamızda özet olarak 24 ve 48 saat , flavopiridol ve oksaliptatin tek halde ve oksaliptatinin flavopiridolün etkinliğini artırıp artırmadığını tespit etmek için kombine halde kullanılmıştır. Flavopiridolün ve oksaliptatinin tek ajan uygulamalarının proliferasyonu azalttığı bulunmuştur. Flavopiridolün IC₅₀ değerinin 24. saatte 100 nM olduğu ve oksaliptatinin ise 48. saatte 80 µM olduğu belirlenmiştir. Flavopiridol ve oksaliptatinin kombine uygulamalarının tek ajan kullanımlarından daha etkili olmadığı bulgulanmıştır.

Transkripsiyon düzeyinde BRAF, bcl211 ve kaspaz 3 mRNA gen ifadelerinin kantitatif değerlendirilmesi yapıldı. BRAF ve bcl211 mRNA ifade değerleri istatistiksel olarak anlamsız bulunurken kaspaz 3 mRNA ifade değerinde azalma gözlenmiştir.

Çalışmamızda protein düzeyinde, *in vitro* kaspaz 9, kaspaz 3/7 protein aktiviteleri ve *in vivo* kaspaz 9, kaspaz 3/7 protein aktiviteleri, immünohistokimyasal olarak Bcl-2 ve PCNA protein ifadeleri değerlendirildi.

In vitro flavopiridol uygulaması sonrası, kaspaz 9 aktivitesi 6., 24. ve 48. saatlerde 50 nM ve 24. saatte 100 nM'da kontrol grubuna göre artış saptanırken, kaspaz 3/7 aktivitesinde 24. ve 48. saatlerde 100 nM'da artış görüldü, diğer doz ve saatlerdeki kaspaz 3/7 aktivitelerinde kontrole göre düşüş gözlemlendi.

In vivo flavopiridol uygulaması sonrası, kaspaz 9 aktivitesi 2,5 mg/kg ve 5 mg/kg flavopiridol uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre artış saptanırken; kaspaz 3/7 aktivitesinde ise 5 mg/kg flavopiridol uygulanan grupta kontrole göre artış varken, 10 mg/kg flavopiridol uygulanan grupta kontrole göre azalmıştır. *In vivo* malign melanoma modelinde, etkin flavopiridol dozu 5 mg/kg bulunmuştur. İmmünokimya sonuçlarına göre, tüm gruplarda kontrole göre Bcl-2 protein ekspresyonlarında artış, PCNA protein ekspresyonlarında ise düşüş gözlemlenmiştir.

5. TARTIŞMA

CDKN2A, melanoma da dahil birçok kanserde delesyona veya mutasyona uğramış olan potansiyel tümör baskılayıcı bir gen lokusudur⁴⁵⁻⁴⁷. CDKN2A lokusu, tamamen farklı proteinler olan p16^{INK4A} ve p14^{ARF}(p19^{ARF})'i kodlar⁴⁸. Sunulan çalışmada, P16^{INK4A} ve p14^{ARF} proteinini ifade etmeyen B16F10 fare melanoma hücre hattının farklı kimyasallarla P16^{INK4}/CDK/pRb/E2F yolağı üzerinden apoptozisi incelenmiştir. Bu yolağın, insan melanoma patogenezinde G1 kontrol noktasında önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir⁵⁵.

Flavopiridol, nanomolar konsantrasyonlarında hücre döngüsünü durduran bir siklin bağımlı kinaz inhibitörüdür. Flavopiridolün doz ve zamana bağlı olarak antiproliferasyonu sağladığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir^{72-73,78}. Flavopiridol hücre tipine özel inhibisyon göstermektedir ve p16^{INK4A} geni olmayan tümör hücrelerinde iç kaynaklı p16^{INK4A} fonksiyonunu telafi edici görevi bulunduğu yapılan bir çalışmada gösterilmiştir¹⁰⁰.

Sunulan bu çalışmada, hücre canlılığı MTT testi kullanılarak belirlenmiştir. Çalışma, 24 ve 48 saat sürdürülmüş, flavopiridol ve oksaliptatin, tek halde ve oksaliptatinin flavopiridolün etkinliğini artırıp artırmadığını tespit etmek için kombine halde kullanılmıştır. Flavopiridol uygulanan B16F10 fare melanoma hücre hattında 24 saat için IC₅₀ değeri (inhibisyon konsantrasyonu) 100 nM olarak belirlenmiştir. Çalışmamıza paralel olarak William Robinson ve arkadaşları, A375, WM793, WM1617, C0679, CO747, K19, RPMI-C0, WM75, WM1789 melanoma hücre hatları ile yaptıkları çalışmada, flavopiridolün, bu hücre hatlarına karşı 12,5 nM ve 25 nM gibi düşük konsantrasyonlarda büyümenin durmasına; 100 nM yüksek dozlarda ise apoptoza neden olduğunu göstermişlerdir⁶⁵. Yapılan

bir diğler çalışmada da, p16^{INK4A} delesyonu olan akut lenfoblastik lösemi hücre hatlarında flavopiridolün hücre proliferasyonunu düşürmesiyle, etkili bir ajan olduğu saptanmış ve CDK aktivitesindeki azalma retinoblastomanın fosforilasyonunun azalmasına neden olmuştur; ayrıca yine bu çalışmada flavopiridolün düşük doz uygulamasında, G1/S evresinde hücre döngüsünü durdurduğu ancak apoptozun daha az görüldüğü, buna karşılık yüksek dozlarda G1/S fazının devamlılığı ve G2/M durması ve sonrasında apoptoz oluşumu gsterilmiřtir⁶⁹.

Oksaliptinin, bu tez çalışmasında hücre canlılığını azalttığı belirlenmiştir. Bu azalışın 48 saat sonunda 24 saate göre daha fazla olduğu görülmüştür. IC₅₀ değeri 48 saat için 80 M olarak belirlenmiştir. Yapılan prelinik ve klinik çalışmalarda flavopiridolün çeşitli ajanlarla birlikte verildiğinde antiproliferatif etkisinin arttığı gsterilmiştir^{85,87-88}. Schwartz ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre p53+/+ kolon kanseri hücre hattı olan HCT-116'da, flavopiridol, oksaliptin ile eş zamanlı verildiğinde flavopiridolün oksaliptinin etkisini artırdığı gözlenmiştir. P53 -/- hücrelerde bu sonuç alınamamıřtır⁸⁷. Çalışmamızda flavopiridol ve oksaliptini eş zamanlı olarak B16F10 fare melanoma hücre hattına kombine uygulandığında oksaliptin ve flavopiridolün birlikte kullanımının antiproliferasyonu arttırmadığı gösterilmiştir. Bu sonuç, Schwartz ve arkadaşlarının⁶⁷ çalışmalarını destekler niteliktedir. P14^{ARF} mutant hücre hattımızda p53'n inaktivasyonundan kaynaklanan bir sonuç olduğunu göstermektedir.

Elde edilen *in vitro* bulgularımızı değerlendirdiğimizde, kombine ilaç uygulamalarının flavopiridolün etkisini artırmaması nedeniyle, sonraki çalışmalar yalnız flavopiridol ile sürdürülmüştür. Siklin bağımlı kinaz inhibitörü flavopiridolün apoptozdaki rolünün araştırılmasına yönelik, öncelikle Bcl2l1 ve kaspaz 3 genlerinin ifadeleri, *in vivo* ve *in vitro*'da mRNA düzeyinde incelenmiştir. Bcl2L1 mRNA ekspresyon değeri, *in vivo*

ve *in vitro* çalışmaların her ikisinde de anlamsız bulunmuştur. Flavopiridolün hücre hatlarına göre apoptozu uyarma mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır, apoptozun Bcl-2 bağımlı ya da bağımsız olabileceği literatürde gösterilmiştir. Çalışmamızla paralel olarak Sedlacek ve arkadaşlarının flavopiridolün apoptozu Bcl-2 bağımsız bir mekanizma ile yönlendirdiğini göstermiştir⁷⁴. Buna karşılık König ve arkadaşları flavopiridol uygulamasıyla B hücre lösemi hücre hattında Bcl-2 mRNA ekspresyon değerinin azaldığını ve hücre döngüsünün durduğunu ve sonrasında apoptoza yönlendirdiğini göstermiştir⁷⁸. Yapılan bir başka çalışmada *in vivo* akut lösemi modelinde E2F1 geninin mRNA ekspresyonunun düşmesine paralel olarak Bcl-2 mRNA gen ekspresyonunda azalmaya neden olduğu görülmüştür¹⁰¹.

Çalışmaya, flavopiridolün apoptotik yolda görev alan kaspaz 3/7, kaspaz 9, Bcl-2 ve hücre çoğalmasında görev alan PCNA'nın protein düzeyindeki değişimleri değerlendirilerek devam edilmiştir.

Flavopiridolün hücre tipine göre apoptozu; kaspaz bağımlı ya da kaspaza bağılı olmadan tetiklediği önceki çalışmalarla gösterilmiştir¹⁰²⁻¹⁰³. Çalışmamızın *in vitro* bulgularına göre hücre canlılık sonuçlarımızı destekler şekilde 24 saat 100 nM'da kaspaza bağılı apoptozun arttığı hem kaspaz 3/7 artışı hem de kaspaz 9'un artışı ile gösterildi. Çalışmamıza paralel olarak *in vitro* bir çalışmada flavopiridolün kaspaz 9 ve kaspaz 3'ün aktivasyonunu zamana bağılı olarak, mitokondriyal yolak aracılığıyla apoptoza yönlendirildiği saptanmıştır¹⁰⁴. Puppo ve arkadaşları ise, flavopiridolün kaspaz 3 aktivasyonunu artırdığını, ancak kaspaz 9'u uyarmada etkili olmadığını göstermiştir ve apoptoza mitokondriyal yolak aracılığıyla yönlendirildiğini belirtmişlerdir¹⁰⁵.

Bulgularımızdan farklı olarak hem p16^{INK4A} hem de 14^{ARF} delesyonu olan glioma hücre hatlarıyla yapılan bir çalışmada flavopiridolün

hücreleri apoptoza, retinoblastomanın ve p53'ün tümör baskılayıcı yolak değişimlerinden bağımsız olarak yönlendirdiği ancak kaspaz 3 proteinin aktivitesinde bir değişim görülmediği için bunu kaspaza bağlı olmayan bir mekanizma ile gerçekleştirdiği gösterilmiştir¹⁰³. Bu durum hücre hattına göre, genetik özellikleri benzer olsa da flavopiridolün apoptozu, farklı yolları kullanarak yönlendirdiğini göstermektedir.

p53 inaktif bir rabdoid tümör hücre hattında yapılan çalışmada flavopiridolün G2 fazının durmasına neden olduğu ancak apoptozu kaspaz 3 aktivitesini artırarak yönlendirdiği gösterilmiştir¹⁰⁶.

In vivo çalışmamızda, 5 mg/kg flavopiridol uygulanan grupta kaspaz 9 ve kaspaz 3/7 protein aktivitelerinde kontrole göre anlamlı bir artış gözlenmiştir. Osteosarkoma ve ewing tümör modellerinde, flavopiridol uygulamasının, kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktivitelerinin artışına bağlı olarak, mitokondriyal yolak aracılığıyla apoptozu artırdığı ve tümör büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir¹⁰⁴. Bu durumda, 5 mg/kg flavopiridol uygulanan *in vivo* modelimizde, flavopiridol, kaspaz protein aktivitelerini artırarak apoptotik etki göstermiştir diyebiliriz.

Tümör dokusunda hücresel proliferasyon düzeyini belirlemek için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden biri de PCNA protein ekspresyonunun immünokimyasal değerlendirilmesidir. PCNA hücre döngüsünün S fazında sentezlenir ve DNA sentezinin göstergesi olan bir proteindir, mitoz sayısı ve mitotik indeksin belirlenmesinde önemlidir¹⁰⁷. Bu nedenle flavopiridolün *in vivo* olarak tümör dokularının proliferasyonunu protein düzeyinde gözlemlemek için PCNA protein ekspresyonunu immünokimyasal olarak inceledik ve sonuçlarımız doza bağımlı olarak PCNA protein ekspresyon seviyesinin kontrole göre anlamlı olarak düştüğünü göstermiştir. Bu flavopiridolün hücrenin S fazında hücre döngüsünü durdurması ile açıklanabilir. Melanoma hücre hatlarıyla yapılan

bir çalışmada da E2F1'in ve hücre proliferasyon belirteci olan PCNA'nın azalan ekspresyonu ve retinoblastomanının defosforilasyonu hücre döngüsünün durması ile sonuçlanmıştır⁶⁷.

Buna karşın bir diğer çalışmada ise hücre döngüsü proteinleri olan Rb, E2F1 ve PCNA'nın, flavopiridol uygulaması sonrası, protein ekspresyonlarının azaldığı gözlenmiştir ve apoptoza yönelim görülmüştür¹⁰⁸. PCNA protein ekspresyonunda düşüş; kaspaz 3/7 ve kaspaz 9 aktivitesindeki artış *in vivo* çalışmamızda flavopiridolün hücre döngüsünü durdurduğunu ve de mitokondriyal yolak aracılığıyla apoptoza yönlendirdiğini düşündürmektedir.

Literatürde, flavopiridolün apoptotik etkisinin araştırıldığı çalışmalarda Bcl-2 protein ekspresyonundaki rolü tam olarak açıklanamamıştır. Lösemi hücre hattında flavopiridol uygulaması sonrasında Bcl-2 seviyesinin düştüğü görülmüştür⁷⁸. Newcomb ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada glioma hücre hattında flavopiridol uygulaması sonrası, siklin D1 ve CDK4 protein ekspresyonlarındaki düşüşüne paralel olarak Bcl-2 proteininde ekspresyonun azalmasıyla flavopiridolün bu hücre hatlarında apoptozu uyardığı gösterilmiştir¹⁰⁹. Özefaranjiyal kanser hücre hatları olan TE8, TE9 ve KE4'te retinoblastoma ve siklin D1 protein ekspresyonlarında azalmaya paralel olarak apoptozun her hücre hattında görüldüğü, Bcl-2 ekspresyonlarına bakıldığında ise yalnızca TE8 hücre hattında Bcl-2 ekspresyonunun azaldığı ve diğer hücre hatlarında değişmediği görülmüştür¹¹⁰. *In vivo* özefaranjiyal kanser modelinde ise flavopiridol uygulaması sonrası retinoblastoma ve siklin D1 protein ekspresyonundaki düşüşe paralel olarak Bcl-2'nin proteinin ifadenmediği gözlenmiştir¹¹¹. Sedlacek ise yaptığı çalışmalarda flavopiridolün apoptotik etkisini, Bcl-2 bağımsız olarak gerçekleştirdiğini önermiştir⁷⁴. Bulgularımıza göre ise *in vivo* olarak antiapoptotik bir protein olan Bcl-2 protein ekspresyon seviyesinde flavopiridol uygulanmış fare

gruplarında anlamlı bir artış gözlenmiştir. Melanoma hücre hatlarında ise, Bcl-2 proteinindeki azalma apoptoza neden olmaktadır^{25,65}. Bu durum Sedlacek'in önerdiği gibi flavopiridolün apoptotik etkisini Bcl-2 bağımsız gerçekleştirdiğini düşündürmektedir⁷⁴.

Flavopiridolün hücre hatlarına etkisini değerlendiren bir çalışmada, P16^{INK4A} bulunan ve bulunmayan hücrelerde apoptoza giderken bu hücre hatlarında normal hücre döngüsü kontrol yolağındaki Rb ve E2F'nin ve çalışmamızda elde ettiğimiz bulgudan farklı olarak antiapoptotik Bcl-2 geninin ifadenmesinin azaldığı gösterilmiştir⁶⁵.

Yan Li ve arkadaşlarının çalışmasında ise flavopiridolün mitokondriyal sitokrom c'nin salımına neden olmuş, buradan da kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9'un aktivasyonunu sağlayarak Bcl-2'nin azalmasıyla mitokondriyal yolak aracılı apoptoza yöneldiği gösterilmiştir¹⁰⁴.

Çalışmamızla uyumlu olarak kronik lenfotik lösemi hücrelerinde flavopiridolün apoptozu kaspaz 3'ü uyararak, Bcl-2'ye ya da p53 fonksiyonuna bağlı olmadan yönlendirmiştir¹¹².

Sonuç olarak, flavopiridol uygulanan P16^{INK4A} ve p14^{ARF} mutant hücre hattı olan B16F10'da, Bcl2l1'den bağımsız, kaspaz 3/7 ve kaspaz 9 aktivasyonu ile mitokondriyal yolak aracılı apoptoz gerçekleşmektedir. *In vivo* melanoma modelinde flavopiridol, PCNA protein ekspresyonunda azalışa sebep olarak hücre döngüsünün durmasına neden olduğu gibi; Bcl-2'den bağımsız ve artan kaspaz 9 ve kaspaz 3/7 protein aktivitesiyle mitokondriyal yolak aracılı apoptoza neden olmaktadır. Elde edilen *in vivo* ve *in vitro* bulgular, P16^{INK4}/CDK/pRb/E2F yolağının malign melanoma tedavisinde önemli bir yolak olabileceğini göstermektedir.

6. SONUÇ

Çalışmamızda malign melanoma hücre hatlarında ve C57BL6 farelerinde oluşturulan subkutanöz melanoma kanserinde hücre siklin bağımlı kinaz inhibitörü flavopiridol uygulaması sonrası p16^{INK4A}/CDK/Rb/E2F yolağındaki siklin bağımlı kinazların inhibisyonuyla apoptozun uyarılması hedeflenmiştir. P16^{INK4A}/CDK/Rb/E2F yolağındaki siklin bağımlı kinazları inhibe ederek apoptotik değişimleri Bcl2l1 ve kaspaz 3'ü mRNA seviyesinde ve kaspaz 3/7, kaspaz 9, Bcl-2 ve hücre proliferasyonunda görev alan PCNA'yı protein ifadesi düzeyinde değerlendirerek flavopiridolün apoptotik etkisi belirlenmeye çalışılmıştır. Ayrıca B16F10 hücrelerine flavopiridol, oksaliptatin ve eş zamanlı kombinasyonları verilerek hücre canlılığı değerlendirilmiştir.

B16F10 fare hücre hattında flavopiridol ve oksaliptatinin tek başlarına uygulamalarının antiproliferatif etki gösterdiği, ama kombine uygulamasının etkili olmadığı belirlenmiştir. *In vitro* ve *in vivo* olarak flavopiridolün tek başına inhibitör uygulamasından sonra, antiapoptotik Bcl2l1 geninin mRNA seviyesinin istatistiksel karşılaştırmalarının anlamsız olduğu belirlendi. Flavopiridolün *in vitro* ve *in vivo* olarak kaspaz bağımlı apoptozu uyardığı ve *in vivo* hücre döngüsünü durdurduğu gözlemlendi.

Sonuç olarak, flavopiridolün, P16^{INK4A}/CDK/Rb/E2F yolağındaki siklin bağımlı kinazların inhibisyonu ile B16F10 fare melanoma hücre hattında ve fare melanoma modelinde apoptotik etkilerinin belirlenmesi, malign melanomanın tedavi yöntemlerine ışık tutacağı gibi, daha etkin tedavinin gerçekleşmesine de katkı sağlayabilecektir. Flavopiridolün diğer ajanlarla kombine uygulamaları, kanser hücreleri için sinerjistik, normal hücreler için de antagonistik bulgular elde edilinceye kadar sürdürülmelidir.

7. ÖZET

B16F10 Malign Melanoma Hücrelerinde Flavopiridol ve Oksaliptin'in ve Bu Hücrelerin Aktarıldığı C57BL6 Farelerinde Flavopiridol'ün Apoptoz Sinyal Yolaklarına Etkileri

Malignant melanoma (MM) bir deri tümörüdür ve hem görülme sıklığı hem de ölüm oranı açısından büyük bir sağlık problemi olarak değerlendirilmektedir. Siklin bağımlı kinazlar (CDK) hücre döngüsünün düzenlenmesinde çok etkili olduklarından kanser tedavisinde hedeftirler. P^{16INK4A} hücre döngüsünün giriş çıkışında ve kontrol noktasının bütünlüğünde görevlidir. Bir CDK inhibitörü olan flavopiridol ,hücre döngüsünün durmasını uyaran P^{16INK4A}'yı taklit eden bir ajandır. Flavopiridol en güçlü etkisini oksaliptin gibi DNA hasarı uyarıcılarıyla birlikte uygulandığında gösterir. Çalışmamızda P^{16INK4A} olmayan hücre hattı B16F10'da flavopiridol ve oksaliptin kombinasyonunun antiproliferatif etkilerini ve ayrıca B16F10 enjeksiyonuyla oluşturulmuş melanoma tümör modelinde tek ajan olarak flavopiridolün apoptotik etkilerini araştırdık.

Oksaliptin (40 µM and 80 µM), flavopiridol (50 nM, 100 nM, 200 nM, 400 nM) ve bunların kombinasyonlarının B16F10 hücrelerindeki antiproliferatif etkileri 24 ve 48 saatte MTT testiyle ölçüldü. Flavopiridol hücre canlılığını 24 saatte 100 nM'da bile azaltmıştır. Diğer yandan flavopiridol ve oksaliptin antagonistik etkiye sahiptir ve birlikte kullanıldıklarında hücre ölümünü azaltırlar. B16F10 hücreleri subkutanöz olarak C57BL6 farelere enjekte edilip, tümör oluşumu gözlemlendikten sonra bu fareler flavopiridol (2,5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg) ve DMSO (kontrol grubu) ile tedavi edildi. Kaspaz 3/7 ve kaspaz 9 aktiviteleri kolorimetrik yöntemle analiz edildi. Flavopiridol in vitro ve in vivo kaspaz 3/7 ve kaspaz 9 aktivitelerini doza bağımlı olarak artırdı. Bcl-2 ve PCNA ifadeleri immünohistokimyasal olarak analiz edildi. Her ne kadar Bcl-2 boyaması

flavopiridol ile tedavi edilen gruplarda artsa da, PCNA boyaması flavopiridol uygulanan farelerde azalmıştır. BRAF, kaspaz 3 ve Bcl2l1 mRNA ifade düzeyleri qPCR ile değerlendirildi.

Sonuç olarak, flavopiridol tedavisi tek ajan olarak B16F10 hücrelerinin hücre canlılığında daha iyi bir etkiye sahiptir. Ayrıca mitokondriyal apoptotik yolak aracılığıyla doza bağımlı olarak kaspaz aktivitesini artırır. PCNA ifadesindeki azalış flavopiridolün hücre döngüsünün durması ile sonuçlanabilen antiproliferatif etkisini gösterdi.

Anahtar Kelimeler: Malign melanoma, Flavopiridol, Apoptoz

8. SUMMARY

The Apoptotic Effects of Flavopiridol Combined with Oxaliplatin on B16F10 Malignant Melanoma Cells and In vivo Effects of Alone on B16F10 Inoculated C57BL6 Mice

Malign melanoma is the neoplasm of the skin and is considered a major health problem as both incidence and mortality rates. The cyclin dependent kinases (CDKs) are major players in cell cycle regulation and rational targets for cancer. P16^{INK4A} has functions on cell cycle entry/exit and checkpoint integrity. Flavopiridol is a CDK inhibitor and a potent P16^{INK4A} simulator that promotes cell cycle arrest. Flavopiridol exhibits its most potent effects when administered together with a DNA damage inducer, such as oxaliplatin. In this study, we aimed to examine the anti-proliferative effects of flavopiridol and oxaliplatin combination on p16^{INK4A} deficient melanoma cell line B16F10 and also its apoptotic effects on B16F10 injected melanoma tumor model as a single agent.

Anti-proliferative effects of oxaliplatin (40 μ M and 80 μ M) and flavopiridol (50 nM, 100 nM, 200 nM, 400 nM) and combination of flavopiridol and oxaliplatin on B16F10 cells were measured by MTT assay at 24h and 48h. Flavopiridol decreased cell viability even at 100 nM at 24 hour. On the other hand, flavopiridol and oxaliplatin have antagonistic effects and decreased cell death when used in combination. B16F10 cells were injected subcutaneously into C57BL6 mice and after tumor formation these mice were treated with flavopiridol (2,5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg) and the control group was treated with DMSO. Caspase 3/7 and caspase 9 activities were analyzed by colorimetric assays. Flavopiridol enhanced caspase 3/7 and caspase 9 activities in vitro and in vivo in a dose dependent manner. Bcl-2 and PCNA expression were analyzed by immunohistochemistry. Even though there was a significant increase in

Bcl-2 staining, PCNA staining was decreased in flavopiridol administered mice. BRAF, caspase 3 and Bcl2l1 mRNA expression levels were quantified with q-PCR.

As a conclusion, flavopiridol treatment had better effects on cell viability of B16F10 cells as a single agent. It also increased caspase activity in a dose dependent manner in vitro and in vivo via mitochondrial apoptotic pathway. Decreased PCNA expression showed antiproliferative effects of flavopiridol which might be result of cell cycle arrest.

Keywords; Malignant melanoma, Flavopiridol, Apoptosis

9. KAYNAKLAR

1. Cooper GM, Robert E. Hausman. The Cell, A Molecular Approach. 4th ed. U.S.A., Dinauer Associates Publishers; 2001.
2. Langley RGB, Barnhill RL, Mihm MC. Jr, Fitzpatrick TB, Sober AJ. Neoplasms: Cutaneous melanoma. Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine. 5th ed. New York: McGraw-Hill; 1999.
3. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. CA Cancer J Clin J 2009; 59: 225–249.
4. Homer MJ, Ries LAG, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Howlander N, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975–2006. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2009. [April 3, 2011]. Available from: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2006/
5. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. CA Cancer J Clin 2012; 62(1) : 10-29
6. Hall HI, Miller DR, Rogers JD, Bewerse B. Update on the incidence and mortality from melanoma in the United States. J Am Acad Dermatol 1999; 40(1) : 35-42
7. Prof. Dr. Tuncer M, Editör. Türkiye'de Kanser Kontrolü. Ankara, Sağlık Bakanlığı; 2007.
8. Clark WH Jr, Elder DE, Guerry D 4th, Epstein MN, Greene MH, Van Horn MA. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. Hum Pathol 1984; 15(12) : 1147-65.

9. Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH, et al. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet* 1997; 15(4) : 356-62
10. Stahl JM, Sharma A, Cheung M, Zimmerman M, Cheng JQ, Bosenberg MW, et al. Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. *Cancer Res* 2004; 64(119) : 7002-10.
11. Hsu MY, Wheelock MJ, Johnson KR, Herlyn M. Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas. *J Investig Dermatol Symp Proc* 1996; 1(2) : 188-94.
12. Haass NK, Smalley KS, Li L, Herlyn M. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Res* 2005; 18(3) : 150-9.
13. Miller AJ, Mihm MC Jr. Melanoma. *N Engl J Med* 2006; 355(1) :51-65. Review.
14. Reed. RJ. Acral lentiginous melanoma. In *New Concepts in Surgical Pathology of the Skin*. First Ed. New York; Wiley; 1976.
15. Bandarchi B, Ma L, Navab R, Seth A, Rasty G. From melanocyte to metastatic malignant melanoma. *Dermatol Res Pract* 2010; 2010
16. Fidler IJ. Selection of successive tumour lines for metastasis. *Nat New Biol.* 1973; 242(118) : 148-9
17. Melnikova VO, Bolshakov SV, Walker C, Ananthaswamy HN. Genomic alterations in spontaneous and carcinogen-induced murine melanoma cell lines. *Oncogene* 2004; 23(13) : 2347-56.

18. Guldberg P, Thor Straten P, Birck A, Ahrenkiel V, Kirkin AF, Zeuthen J. Disruption of the MMAC1/PTEN gene by deletion or mutation is a frequent event in malignant melanoma. *Cancer Res* 1997; 57(17) : 3660-3.
19. Tsao H, Goel V, Wu H, Yang G, Haluska FG. Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma. *J Invest Dermatol* 2004; 122(2) : 337-41.
20. You MJ, Castrillon DH, Bastian BC, O'Hagan RC, Bosenberg MW, Parsons R, et al. Genetic analysis of Pten and Ink4a/Arf interactions in the suppression of tumorigenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(3) : 1455-60.
21. Hodgkinson CA, Moore KJ, Nakayama A, Steingrimsson E, Copeland NG, Jenkins NA, et al. Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein. *Cell* 1993; 74(2) : 395-404.
22. Nishimura EK, Granter SR, Fisher DE. Mechanisms of hair graying: incomplete melanocyte stem cell maintenance in the niche. *Science* 2005; 307(5710) : 720-4.
23. Widlund HR, Fisher DE. Microphthalmia-associated transcription factor: a critical regulator of pigment cell development and survival. *Oncogene* 2003; 22(20) : 3035-41.
24. McGill GG, Horstmann M, Widlund HR, Du J, Motyckova G, Nishimura EK, et al. Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability. *Cell* 2002; 109(6) : 707-18.

25. Tang L, Tron VA, Reed JC, Mah KJ, Krajewska M, Li G, et al. Expression of apoptosis regulators in cutaneous malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 1998; 4(8) : 1865-71.
26. Selzer E, Schlagbauer-Wadl H, Okamoto I, Pehamberger H, Potter R, Jansen B. Expression of Bcl-2 family members in human melanocytes, in melanoma metastases and in melanoma cell lines. *Melanoma Res* 1998; 8(3) : 197- 203.
27. Lin AW, Barradas M, Stone JC, van Aelst L, Serrano M, Lowe SW. Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev.* 1998; 12(19) : 3008-19.
28. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; 417(6892) : 949-54.
29. Omholt K, Platz A, Kanter L, Ringborg U, Hansson J. NRAS and BRAF mutations arise early during melanoma pathogenesis and are preserved throughout tumor progression. *Clin Cancer Res.* 2003; 9(17) : 6483-8.
30. Tsao H, Zhang X, Fowlkes K, Haluska. FG. Relative reciprocity of NRAS and PTEN/MMAC1 alterations in cutaneous melanoma cell lines. *Cancer Res* 2000; 60(7) : 1800-4.
31. Daniotti M, Oggionni M, Ranzani T, Vallacchi V, Campi V, Di Stasi D, et al. BRAF alterations are associated with complex mutational profiles in malignant melanoma. *Oncogene* 2004; 23(35) : 5968-77.
32. Cohen JJ. Apoptosis: mechanisms of life and death in the immune system. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103(4) : 548- 54.

33. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26(4) : 239-257.
34. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 12; 407(6805) : 770-6.
35. Piras F, Perra MT, Murtas D, Minerba L, Floris C, Maxia C, et al. Combinations of apoptosis and cell cycle control biomarkers predict the outcome of human melanoma. *Oncol Rep* 2008; 20(2) : 271-7.
36. Trauth BC, Klas C, Peters AM, Matzku S, Möller P, Falk W, et al. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science*. 1989; 245(4915) : 301-5.
37. Chen M, Wang J. Initiator caspases in apoptosis signalling pathways. *Apoptosis*. 2002; 7(4) : 313-9. Review.
38. Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, Nohara T, Iwamoto M, Tanigawa N. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 2000; 6(1) : 127-34.
39. Garcia I, Martinou I, Tsujimoto Y, Martinou JC. Prevention of programmed cell death of sympathetic neurons by the Bcl-2 proto-oncogene. *Science* 1992; 258(5080) : 302- 4.
40. Goldstein JC, Waterhouse NJ, Juin P, Evan GI, Green DR. The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol* 2000; 2(3) : 156-62.
41. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997; 91(4) : 479-89.

42. Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to C. Elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 1997; 90(3) : 405-13.
43. Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5(11) : 897-907. Review.
44. Kandasamy K, Srinivasula SM, Alnemri ES, Thompson CB, Korsmeyer SJ, Bryant JL, et al. Involvement of proapoptotic molecules Bax and Bak in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced mitochondrial disruption and apoptosis: differential regulation of cytochrome c and Smac/DIABLO release. *Cancer Res* 2003; 63(7) : 1712-2.
45. Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 1994; 368(6473) : 753-6.
46. Eliason MJ, Larson AA, Florell SR, Zone JJ, Cannon-Albright LA, Samlowski WE, et al. Population-based prevalence of CDKN2A mutations in Utah melanoma families. *J Invest Dermatol* 2006; 126(3) : 660-6.
47. Knappskog S, Geisler J, Arnesen T, Lillehaug JR, Lonning PE. A novel type of deletion in the CDKN2A gene identified in a melanoma-prone family. *Genes Chromosomes Cancer* 2006; 45(12) : 1155-63.
48. Fecher LA, Cummings SD, Keefe MJ, Alani RM. Toward a molecular classification of melanoma. *J Clin Oncol* 2007; 25(12) : 1606-20. Review.
49. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 1993; 366(6456) : 704-7.

50. Kamijo T, Weber JD, Zambetti G, Zindy F, Roussel MF, Sherr CJ. Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(14) : 8292-7.
51. Quelle DE, Zindy F, Ashmun RA, Sherr CJ. Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 1995; 83(6) : 993-1000.
52. Daniotti M, Ferrari A, Frigerio S, Casieri P, Miselli F, Zucca E, et al. Cutaneous melanoma in childhood and adolescence shows frequent loss of INK4A and gain KIT. *J Invest Dermatol* 2009; 129(7) : 1759-68.
53. Flores JF, Walker GJ, Glendening JM, Haluska FG, Castesana JS, Rubio MP, et al. Loss of p16INK4a and p15INK4b genes, as well as neighbouring 9p21 markers, in sporadic melanoma. *Cancer Res* 1996; 56(21) : 5023-32.
54. Jacks T, Weinberg RA. The expanding role of cell cycle regulators. *Science* 1998; 280(5366) : 1035-6.
55. Bartkova J, Lukas J, Guldborg P, Alsner J, Kirkin AF, Zeuthen J, et al. The p16-cyclin D/Cdk4-pRb pathway as a functional unit frequently altered in melanoma pathogenesis. *Cancer Res* 1996; 56(23) : 5475-83.
56. Serrano M, Lee H, Chin L, Cordon-Cardo C, Beach D, DePinho RA. Role of the INK4A locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell* 1996; 85(1) : 27-37.
57. Sherr CJ. The ins and outs of RB: coupling gene expression to the cell cycle clock. *Trends Cell Biol* 1994; 4(1) : 15-8.

58. Ginsberg D. E2F1 pathways to apoptosis. *FEBS Lett* 2002; 529(1) : 122-5. Review.
59. Hussein MR, Haemel AK, Wood GS. Apoptosis and melanoma: molecular mechanisms. *J Pathol* 2003; 199(3) : 275-88. Review.
60. Irwin M, Marin MC, Phillips AC, Seelan RS, Smith DI, Liu W, et al. Role for the p53 homologue p73 in E2F-1-induced apoptosis. *Nature* 2000; 407(6804) : 645-8.
61. Russell JL, Powers JT, Rounbehler RJ, Rogers PM, Conti CJ, Johnson DG. ARF differentially modulates apoptosis induced by E2F1 and Myc. *Mol Cell Biol* 2002; 22(5) : 1360-8.
62. Tsai KY, MacPherson D, Rubinson DA, Crowley D, Jacks T. ARF is not required for apoptosis in Rb mutant mouse embryos. *Curr Biol* 2002; 12(2) : 159-63.
63. Furukawa Y, Nishimura N, Satoh M, Endo H, Iwase S, Yamada H, et al. Apaf-1 is a mediator of E2F-1-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2002; 277(42) : 39760-8.
64. Sato A, Ohtsuki M, Hata M, Kobayashi E, Murakami T. Antitumor activity of IFN-lambda in murine tumor models. *J Immunol* 2006; 176(12) : 7686-94.
65. Robinson WA, Miller TL, Harrold EA, Bemis LT, Brady BM, Nelson RP. The effect of flavopiridol on the growth of p16+ and p16- melanoma cell lines. *Melanoma Res* 2003; 13(3) : 231-8
66. Arima Y, Hirota T, Bronner C, Mousli M, Fujiwara T, Niwa S, et al. Down-regulation of nuclear protein ICBP90 by p53/p21Cip1/WAF1-dependent DNA-damage checkpoint signals contributes to cell cycle arrest at G1/S transition. *Genes Cells* 2004; 9(2) : 131-42

67. Mason SA, Cozzi SJ, Pierce CJ, Pavey SJ, Parsons PG, Boyle GM. The induction of senescence-like growth arrest by protein kinase C-activating diterpene esters in solid tumor cells. *Invest New Drugs* 2010; 28(5) : 575-86.
68. Du L, Lyle CS, Obey TB, Gaarde WA, Muir JA, Bennett BL, et al. Inhibition of cell proliferation and cell cycle progression by specific inhibition of basal JNK activity: evidence that mitotic Bcl-2 phosphorylation is JNK-independent. *J Biol Chem* 2004; 279(12) : 11957-66.
69. Jackman KM, Frye CB, Hunger SP. Flavopiridol displays preclinical activity in acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2008; 50(4) : 772-8.
70. Kaur G, Stetler-Stevenson M, Sebers S, Worland P, Sedlacek H, Myers C, et al. Growth inhibition with reversible cell cycle arrest of carcinoma cells by flavone L86-8275. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84(22) : 1736-40.
71. Carlson BA, Dubay MM, Sausville EA, Brizuela L, Worland PJ. Flavopiridol induces G1 arrest with inhibition of cyclin-dependent kinase (CDK) 2 and CDK4 in human breast carcinoma cells. *Cancer Res* 1996; 56(13) : 2973-8.
72. Losiewicz MD, Carlson BA, Kaur G, Sausville EA, Worland PJ. Potent inhibition of CDC2 kinase activity by the flavonoid L86-8275. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 201(2) : 589-95.
73. Carlson B, Pearkstein R, Naik R, Sedlacek H, Sausville E, Worland P. Inhibition of CDK2, CDK4 and CDK7 by flavopiridol and structural analogs. In: *Proceedings of the American Association for Cancer Research* 1996: 424.

74. Sedlacek HH. Mechanisms of action of flavopiridol. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2001;38(2) : 139-70. Review.
75. Lee YK, Isham CR, Kaufman SH, Bible KC. Flavopiridol disrupts STAT3/DNA interactions, attenuates STAT3-directed transcription, and combines with the Jak kinase inhibitor AG490 to achieve cytotoxic synergy. *Mol Cancer Ther* 2006; 5(1) : 138-48
76. Kitada S, Zapata JM, Andreeff M, Reed JC. Protein kinase inhibitors flavopiridol and 7-hydroxy-staurosporine down-regulate antiapoptosis proteins in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2000; 96(2) : 393-7.
77. Gojo I, Zhang B, Fenton RG. The cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol induces apoptosis in multiple myeloma cells through transcriptional repression and down-regulation of Mcl-1. *Clin Cancer Res* 2002; 8(11) : 3527-38.
78. König A, Schwartz GK, Mohammad RM, Al-Katib A, Gabrilove JL. The novel cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol downregulates Bcl-2 and induces growth arrest and apoptosis in chronic B-cell leukemia lines. *Blood* 1997; 90(11) : 4307-12.
79. Chao SH, Price DH. Flavopiridol inactivates P-TEFb and blocks most RNA polymerase II transcription *in vivo*. *J Biol Chem* 2001; 276(34) : 31793-9.
80. Carlson B, Lahusen T, Singh S, Loaiza-Perez A, Worland PJ, Pestell R, et al. Down-regulation of cyclin D1 by transcriptional repression in MCF-7 human breast carcinoma cells induced by flavopiridol. *Cancer Res* 1999; 59(18) : 4634-41.
81. Sato S, Kajiyama Y, Sugano M, Iwanuma Y, Sonoue H, Matsumoto T, et al. Alvocidib (Flavopiridol) suppresses tumor growth in SCID

mice with human esophageal cancer xenografts without inducing apoptosis. *Surg Oncol* 2006; 15 (2) : 107-13.

82. Senderowicz AM, Headlee D, Stinson SF, Lush RM, Kalil N, Villalba L, et al. Phase I trial of continuous infusion flavopiridol, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, in patients with refractory neoplasms. *J Clin Oncol* 1998; 16(9) : 2986-99.
83. Schwartz GK, Ilson D, Saltz L, O'Reilly E, Tong W, Maslak P, et al. Phase II study of the cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol administered to patients with advanced gastric carcinoma. *J Clin Oncol* 2001; 19(7) : 1985-92.
84. Stadler WM, Vogelzang NJ, Amato R, Sosman J, Taber D, Liebowitz D, et al. Flavopiridol, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, in metastatic renal cancer: a University of Chicago Phase II Consortium study. *J Clin Oncol* 2000; 18(2) : 371-5.
85. Bible KC, Lensing JL, Nelson SA, Lee YK, Reid JM, Ames MM, et al. Phase 1 trial of flavopiridol combined with cisplatin or carboplatin in patients with advanced malignancies with the assessment of pharmacokinetic and pharmacodynamic end points. *Clin Cancer Res* 2005; 11(16) : 5935-41.
86. Halaban R, Cheng E, Smicun Y, Germino J. Deregulated E2F transcriptional activity in autonomously growing melanoma cells. *J Exp Med* 2000; 191(6) : 1005-16.
87. M. V. Motwani, A. Racanelli and G. K. Schwartz. Flavopiridol potentiates effect of oxaliplatin *in vitro* and *in vivo* and requires intact p53. *Journal of Clinical Oncology*, 2004 ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition). Vol 22, No 14S

(July 15 Supplement), 2004:3145. Available from: URL: http://meeting.ascopubs.org/cgi/content/abstract/22/14_suppl/3145

88. Guo J, Zhou AW, Fu YC, Verma UN, Tripathy D, Frenkel EP, et al. Efficacy of sequential treatment of HCT116 colon cancer monolayers and xenografts with docetaxel, flavopiridol, and 5-fluorouracil. *Acta Pharmacol Sin* 2006; 27(10) : 1375-81.
89. Roberts JJ, Thomson AJ. The mechanism of action of antitumor platinum compounds. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1979; 22 : 71-133.
90. Hayward RL, Macpherson JS, Cummings J, Monia BP, Smyth JF, Jodrell DI. Enhanced oxaliplatin-induced apoptosis following antisense Bcl-xl down-regulation is p53 and Bax dependent: Genetic evidence for specificity of the antisense effect. *Mol Cancer Ther* 2004; 3(2) : 169-78.
91. Fujie Y, Yamamoto H, Ngan CY, Takagi A, Hayashi T, Suzuki R, et al. Oxaliplatin, a potent inhibitor of survivin, enhances paclitaxel-induced apoptosis and mitotic catastrophe in colon cancer cells. *Jpn J Clin Oncol* 2005; 35(8) : 453-63.
92. Desoize B, Modoulet C. Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002; 42(3) : 317-25. Review.
93. de Gramont A, Figer A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, Cassidy J, et al. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2000; 18(16) : 2938-47.
94. Rathkopf D, Dickson MA, Feldman DR, Carjaval RD, Shah MA, Wu N, et al. Phase I study of flavopiridol with oxaliplatin and

fluorouracil/leucovorin in advanced solid tumors. Clin Cancer Res 2009; 15(23) : 7405-11.

95. Mohammed MQ, Retsas S. Oxaliplatin is active *in vitro* against human melanoma cell lines: comparison with cisplatin and carboplatin. Anticancer Drugs 2000; 11(10) : 859-63.
96. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. J Immunol Methods 1986; 89(2) : 271-7.
97. Horáková K, Sovčíková A, Seemannová Z, Syrová D, Busányová K, Drobná Z, et al. Detection of drug-induced, superoxide-mediated cell damage and its prevention by antioxidants. Free Radic Biol Med 2001; 30(6) : 650-64.
98. Westekemper H, Karimi S, Süsskind D, Anastassiou G, Freistühler M, Steuhl KP, et al. Expression of HSP 90, PTEN and Bcl-2 in conjunctival melanoma. Br J Ophthalmol 2011; 95(6) : 853-8.
99. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucleic Acids Res 2002; 30(9) : e36.
100. Honoki K, Yoshitani K, Tsujiuchi T, Mori T, Tsutsumi M, Morishita T, et al. Growth inhibition and induction of apoptosis by flavopiridol in rat lung adenocarcinoma, osteosarcoma and malignant fibrous histiocytoma cell lines. Oncol Rep 2004; 11(5) : 1025-30.
101. Nelson DM, Joseph B, Hillion J, Segal J, Karp JE, Resar LM. Flavopiridol induces BCL-2 expression and represses oncogenic

transcription factors in leukemic blasts from adults with refractory acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 2011; 52(10) : 1999-2006.

102. Demidenko ZN, Vivo C, Halicka HD, Li CJ, Bhalla K, Broude EV, et al. Pharmacological induction of Hsp70 protects apoptosis-prone cells from doxorubicin: comparison with caspase-inhibitor- and cycle-arrest-mediated cytoprotection. *Cell Death Differ* 2006; 13(9) : 1434-41.
103. Alonso M, Tamasdan C, Miller DC, Newcomb EW. Flavopiridol induces apoptosis in glioma cell lines independent of retinoblastoma and p53 tumor suppressor pathway alterations by a caspase-independent pathway. *Mol Cancer Ther* 2003; 2(2) : 139-50.
104. Li Y, Tanaka K, Li X, Okada T, Nakamura T, Takasaki M, et al. Cyclin-dependent kinase inhibitor, flavopiridol, induces apoptosis and inhibits tumor growth in drug-resistant osteosarcoma and Ewing's family tumor cells. *Int J Cancer* 2007; 121(6) : 1212-8.
105. Puppo M, Pastorino S, Melillo G, Pezzolo A, Varesio L, Bosco MC. Induction of apoptosis by flavopiridol in human neuroblastoma cells is enhanced under hypoxia and associated with N-myc proto-oncogene down-regulation. *Clin Cancer Res* 2004; 10(24) : 8704-19.
106. Cimica V, Smith ME, Zhang Z, Mathur D, Mani S, Kalpana GV. Potent inhibition of rhabdoid tumor cells by combination of flavopiridol and 4OH-tamoxifen. *BMC Cancer* 2010; 10 : 634.
107. Rosa JC, Mendes R, Filipe MI, Morris RW. Measurement of cell proliferation in gastric carcinoma: comparative analysis of Ki-67 and proliferative cell nuclear antigen (PCNA). *Histochem J* 1992; 24(2) : 93-101.

108. Verdaguer E, Jiménez A, Canudas AM, Jordà EG, Sureda FX, Pallàs M, et al. Inhibition of cell cycle pathway by flavopiridol promotes survival of cerebellar granule cells after an excitotoxic treatment. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 308(2) : 609-16.
109. Newcomb EW, Tamasdan C, Entzminger Y, Alonso J, Friedlander D, Crisan D, et al. Flavopiridol induces mitochondrial-mediated apoptosis in murine glioma GL261 cells via release of cytochrome c and apoptosis inducing factor. *Cell Cycle* 2003; 2(3) : 243-50.
110. Sato S, Kajiyama Y, Sugano M, Iwanuma Y, Tsurumaru M. Flavopiridol as aradio-sensitizer for esophageal cancer cell lines. *Dis Esophagus* 2004; 17(4) : 338-44
111. Sato S, Kajiyama Y, Sugano M, Iwanuma Y, Sonoue H, Matsumoto T, Tsurumaru M. Alvocidib (Flavopiridol) suppresses tumor growth in SCID mice with human esophageal cancer xenografts without inducing apoptosis. *Surg Oncol* 2006; 15(2) : 107-13.
112. Byrd JC, Shinn C, Waselenko JK, Fuchs EJ, Lehman TA, Nguyen PL, et al. Flavopiridol induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells via activation of caspase-3 without evidence of bcl-2 modulation or dependence on functional p53. *Blood* 1998; 92(10) : 3804-16

10. EKLER

10.1. Etik Onay Belgesi



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı

05.04.2010

SAYI : B.30.2.GÜN.0.05.06.00/127-9370
KONU:

Sayın
Prof.Dr.Abdullah EKMEKÇİ
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Prof.Dr.Abdullah EKMEKÇİ, Doç.Dr.Özlem ERDEM, Öğr.Gör.Dr.H.İlke ÖNEN, Arş.Gör.İrem DOĞAN ve Yüksek Lisans Öğr.Özlem GÖKÇE'den oluşan, G.Ü.ET-10.067 kod numaralı ve "B16-F10 Hücrelerinde Flavopiridol ve Okzalipatin'in ve Bu Hücrelerin Aktarıldığı C57BL6 Farelerinde Flavopiridol'ün Apoptoz Sinyal Yolağına Etkileri" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-10.067 and entitled "The Apoptotic Effects of Flavopiridol Combined With Oxaliplatin on B16F10 Melanoma Cells and in Vivo Effects of Flavopiridol Alone on B16F10 Inoculated C57BL6 Mice" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

EK : 1 Liste

Prof.Dr.Gökhan ALPASLAN
Gazi Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı

10.2. Teşekkürler

Öncelikle 01/2010-77 proje kodlu tez çalışmamı destekleyen Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (BAP) teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimimin ders ve tez süreçlerinde, bilgi birikimini benimle paylaşan, önerileri ile yardımını esirgemeyen, danışman hocam, sayın Prof. Dr. Abdullah EKMEKÇİ'ye en içten ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Bu süreçte, bana emek veren hocalarım Anabilim Dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. Sevda MENEVŞE' ye, Sayın hocam Prof. Dr. Adnan MENEVŞE' ye ve Sayın hocam Doç. Dr. Ece KONAÇ'a çok teşekkür ederim. Tez çalışmam süresince yardımları ve bilgi paylaşımları için Öğr. Gör. Dr. İlke ÖNEN'e ve yüksek lisans eğitimimde desteğini ve bilgi birikimini esirgemeyen Arş. Gör. İrem DOĞAN'a teşekkürlerimi sunarım. Gözde Çobanoğlu başta olmak üzere destekleriyle her an yanımda olan Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında görev alan bütün arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Hayatımda en büyük isteğim, ideallerim doğrultusunda bilgi donanımına sahip olmak ve öğrendiklerimi paylaşmak ve paylaşarak daha çok öğrenmek oldu. Tez çalışmam sürecinde ideallerimden büyük bir parçasını hayatıma dahil etmiş bulunmak, aslında bu noktada en büyük mutluluğumdur. Bu mutluluğumda yanımda olan ailem, desteğiniz ve sevginizle her zaman olduğu gibi bu süreçte de yanımdaydınız. Sevgili annem, sevgili babam, kardeşlerim Görkem ve Mert ve değerli dostlarım Zeliha Soran ve Elif Coşkun yüreğimin en derinlerinden teşekkür ediyorum sizlere.

11. ÖZGEÇMİŞ

ADI SOYADI: OZLEM GOKCE

DOĞUM YERİ ve TARİHİ: Ankara, 1985

TABİYETİ: T.C.

TELEFON: Ev: 0312-226-56-46
Cep: 0-534-557-12-48

e-POSTA: oslemgokce@gmail.com
oslemgokce@hotmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

İlkokul: İltekin İlköğretim Okulu
1991-1999

Lise: Ankara Atatürk Lisesi
1999-2003

Lisans: Hacettepe Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Bölümü 2003-2008

KATILDIĞI KURSLAR

1. TÜBA I. Kök hücre kursu ve sempozyumu, 24-25 Haziran 2010
2. Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu VII 21-29 Aralık 2009

KONGRELER

1. Gokce O., A. Yilmaz, V. Gurbuz, E. Konac ve A. Ekmekci, "Vinorelbine's effects on the cell cycle progression in HeLa Cell Line", 9th International Meeting of the International Society for the Study of Xenobiotics (ISSX), Istanbul, Turkey, September 04-08, 2010.
2. Gurbuz V. , A. Yilmaz, O. Gokce ve E. Konac, "Apoptotic effects of cisplatin on human colon cancer cell line (HT29)", *9th International Meeting of the International Society for the Study of Xenobiotics (ISSX)*, Istanbul, Turkey, September 04-08, 2010.

YAYINLAR

1. Gürbüz V., A. Yılmaz, Gökçe Ö. ve E. Konaç, "İnsan Kolon Kanseri Hücre Hattında (HT29) Cisplatin'in Apoptotik Etkisi", *Marmara Medical Journal*, Basımda, (2011).
2. Gökçe Ö., A. Yılmaz, V. Gürbüz, E. Konaç ve A. Ekmekçi, "İnsan Servikal Kanseri HeLa Hücrelerinde Vinorelbin'in Apoptotik Etkisi", *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, **25 (1)**, 1-10 (2011)