

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEME KANSERİ HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE TRABECTEDİN (ET-743)
MOLEKÜLÜNÜN ETKİLEŞTİĞİ MOLEKÜLER SİSTEMLERİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Harika ATMACA

Anabilim Dalı: Biyoloji

Bilim Dalı: Moleküler Biyoloji

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Selim UZUNOĞLU

MANİSA-2013

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEME KANSERİ HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE TRABECTEDİN (ET-743)
MOLEKÜLÜNÜN ETKİLEŞTİĞİ MOLEKÜLER SİSTEMLERİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Harika ATMACA

Anabilim Dalı: Biyoloji

Bilim Dalı: Moleküler Biyoloji

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Selim UZUNOĞLU

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: Mayıs, 2013

MANİSA-2013

ÖNSÖZ

Lisans, yüksek lisans ve doktora eğitimim süresince eşsiz bilgi birikimi, tecrübe ve hoşgörüsü ile bana yol gösteren, danışman hocam Sayın Doç. Dr. Selim UZUNOĞLU'na,

Tez çalışmam süresince yardım ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, dâhiyane fikirleriyle hep yanımda olan Emir BOZKURT'a,

Çalışma konusunun belirlenmesinden, araştırmanın sonuçlanmasına kadar her aşamasında bilgi, tecrübelerinden yararlandığım, çalışmalarım süresince manevi destek ve ilgisini esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Burçak KARACA'ya,

Geniş vizyonuyl bu tez çalışması da dâhil olmak üzere pek çok çalışmaya ortam ve olanak sağlayan Sayın Prof. Dr. Rüçhan USLU'ya,

Tez çalışmam için gerekli olan maddi desteği sağlayan Ege Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü'ne,

Hayatımın her döneminde bana inanan, maddi ve manevi destek olan sevgili aileme, Sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Haziran, 2013

Harika ATMACA

"Shoot for the moon. Even if you miss, you will land among the stars."

Les Brown

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	IV
ÇİZELGE LİSTESİ.....	VIII
ŞEKİL LİSTESİ.....	IX
SEMBOL LİSTESİ.....	XI
KISALTMALAR.....	XII
ÖZET.....	XV
ABSTRACT.....	XVIII
1.GİRİŞ.....	1
1.1. Trabectedin (ET-743).....	1
1.1.1. Keşfi ve Tarihçesi.....	1
1.1.2. Kimyasal Yapısı.....	2
1.1.3. Etki Mekanizmaları.....	3
1.1.3.1. DNA ile Etkileşimi.....	3
1.1.3.2. DNA Tamir Mekanizmaları ile Etkileşimi.....	4
1.1.3.3. Transkripsiyon Düzenlenmesi ile Etkileşimi.....	5
1.1.3.4. Tümör Mikroçevresi ile Etkileşimi.....	5
1.1.4. Trabectedin'e Direnç.....	5
1.1.5.Trabectedin ile Yapılmış Kombinasyon Çalışmaları.....	6
1.2. Hücrenin Sağlıklı İşleyişi için Gerekli Moleküler Etkileşim Ağları/Sistemler.....	7
1.2.1. Hücrenin Yaşamasını/Çoğalmasını Sağlayan Moleküler Etkileşimler.....	8
1.2.2. Hücresel Hasarı Algılayan, Tamir Eden ve Düzenleyen Sistemler.....	10
1.2.3. Hücre Ölüm Mekanizmaları.....	12
1.2.4. Hücresel Sağlığın Korunmasında İmmün Sistemin Rolü.....	14
1.2.5. Hücre-Doku-Organ Sistemlerinin Bütünlüğünü Sağlayan Mekanizmalar.....	15
1.2.6. Hücredeki Enerji Metabolizmasının İşleyişi.....	18
1.2.7. Hücresel Bilgi Akışının Düzenleyicilerinden Biri Olan Epigenetik Mekanizmalar.....	19
1.3. Kanser.....	22
1.4. Meme Kanseri.....	23
1.4.1. Meme Kanserinin Moleküler Biyolojisi.....	24
1.4.2. Meme Kanserinin Alt Tipleri.....	26

1.4.3. Meme Kanseri Çalışmalarında Kullanılan Model Sistemler.....	27
1.4.4. Meme Kanserinin Farklı Moleküler Tiplerini Modelleyen Hücre Hatları.....	28
1.4.4.1. MDA-MB-453 İnsan Meme Kanseri Hücre Hattının Özellikleri.....	29
1.4.4.2. MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücre Hattının Özellikleri.....	30
1.4.4.3. MCF-10A İnsan Normal Meme Epitel Hücre Hattının Özellikleri.....	31
1.5. Hücredeki Moleküler Sistemler Hangi Parametreler Üzerinden Çalışılır?.....	31
1.5.1. Sitotoksisite Ölçüm Yöntemleri.....	31
1.5.2. Apoptozis Ölçüm Yöntemleri.....	33
1.5.3. Oksidatif Stres Ölçüm Yöntemleri.....	33
1.5.4. Anjiyogenez Ölçüm Yöntemleri.....	34
1.5.5. Epigenetik Ölçüm Yöntemleri.....	35
1.6. Literatür Işığında Trabectedinin Meme Kanseri Hücre Kültürlerindeki Etkilerini Anlamak için Cevaplanması Gereken Sorular.....	35
1.7. Amaç.....	37
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	38
2.1. Çalışmada Kullanılan Hücre Hatlarının Temini, Çoğaltımı ve İdamesi.....	38
2.2. Hücrelerinin Sayımı.....	38
2.3. Trabectedin'in Stok Solüsyonlarının Hazırlanması.....	40
2.4. Meme Kanseri Hücre Kültürlerinde Kullanılan Hücre Canlılık Testleri.....	40
2.4.1. XTT Testi.....	40
2.4.2. Gerçek Zamanlı Hücre Canlılık Ölçüm Sistemi (xCELLigence).....	40
2.5. Apoptozisin Varlığını Göstermede Tercih Edilen Yöntemler.....	41
2.5.1. DNA Fragmentasyon Testi.....	41
2.5.2. Mitokondriyal Membran Potansiyelinin Ölçümü.....	42
2.5.3. Kaspaz-8, Kaspaz-9 ve Kaspaz-3 İnhibitör Uygulamaları.....	42
2.6. Protein Antikor Array Yöntemi.....	43
2.7. Hücre içi Reaktif Oksijen Türevlerinin (ROS) Ölçümü.....	44
2.8. Glutasyon S Transferaz (GST) Aktivitesinin Ölçümü	45

2.9. DNA Metiltransferaz (DNMT) Aktivitesinin Ölçümü	45
2.10. Histon Deasetilaz (HDAC) Aktivitesinin Ölçümü	46
2.11. Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimer Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR).....	46
2.11.1. RNA İzolasyonu.....	46
2.11.2. qRT-PCR Uygulamaları ve Analiz.....	47
2.12. Protein Array ve qRT-PCR Sonuçlarının Western Blot Yöntemi ile Doğrulanması	47
2.13. İstatistiksel Analiz.....	48
3. BULGULAR.....	49
3.1. İnsan Meme Kanseri Hücre Kültürlerinde Trabectedin'in Sitotoksik Etkileri.....	49
3.2. Trabectedin'in Hücre Kültürlerinde Erken Dönem Etkisinin Belirlenmesi.....	51
3.3. Trabectedin Aracılı Apoptozisi Gösteren Bulgular.....	52
3.4. Mitokondriyal Membran Potansiyeli Ölçümü ile Trabectedin Aracılı Apoptozisin Doğrulanması.....	54
3.5. Trabectedin Aracılı Apoptoziste Rol Alan Proteinlerin Antikor Array Bulguları.....	55
3.6. Trabectedin'in Etkilediği Apoptotik Proteinlerin Western Blot Yöntemiyle Doğrulanması.....	57
3.7. Trabectedin'in Etkilediği Apoptotik Proteinlerin mRNA Düzeyindeki Değişiklikler.....	58
3.8. Farklı Apoptotik Yolaklar Üzerinden Gerçekleşen Trabectedin Aracılı Apoptozis.....	58
3.9. Anjiyogenezle İlişkili Proteinlerin Sentez Düzeylerinde Trabectedin Aracılı Değişiklikler.....	60
3.10. Trabectedin'in Hücre içi Reaktif Oksijen Türevleri (ROS) Üzerine Etkisi.....	62
3.11. Trabectedin'in Glutasyon S Transferaz (GST) Aktivitesi Üzerine Etkileri.....	62
3.12. DNA Metiltransferaz (DNMT) ve Histon Deasetilaz (HDAC) Aktivitelerindeki Trabectedin Aracılı Değişiklikler.....	63
4. TARTIŞMA.....	65
5. SONUÇ.....	71
KAYNAKLAR.....	74
ÖZGEÇMİŞ.....	89

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 1.1: Çalışmada kullanılan meme hücre hatlarının özellikleri.....	29
Çizelge 2.1: Human Apoptosis Protein Array kitinin ihtiva ettiği apoptotik proteinler	43
Çizelge 2.2: Human Angiogenesis Antibody Array kitinin ihtiva ettiği anjiogenik proteinler.....	44
Çizelge 3.1: Trabectedine maruz bırakılan MCF-7 hücre kültürlerinde istatistiksel olarak anlamlı değişim gösteren proteinler ve değişim oranları	55
Çizelge 3.2: Trabectedin'e maruz bırakılan MDA-MB-453 hücre kültürlerinde istatistiksel olarak anlamlı değişim gösteren proteinler ve değişim oranları	56
Çizelge 3.3: Trabectedin'e maruz bırakılan MCF-7 hücre kültürlerinde anlamlı değişim gösteren anjiyogenezele ilişkili proteinler ve değişim oranları	61
Çizelge 3.4: Trabectedin'e maruz bırakılan MDA-MB-453 hücre kültürlerinde anlamlı değişim gösteren anjiyogenezele ilişkili proteinler ve değişim oranları	61

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1: <i>Ecteinascidia turbinata</i>	1
Şekil 1.2: Trabectedin molekülünün kimyasal yapısı	3
Şekil 1.3: Trabectedin'in DNA'ya bağlanmasını gösteren şematik çizim	4
Şekil 1.4: Trabectedin'in tki mekanizmalarının özeti	7
Şekil 1.5: Kanser hücresinin karakteristik özellikleri	23
Şekil 1.6: Meme bezi.....	24
Şekil 1.7: Yeni anti kanser ajanların araştırıldığı translasyonel araştırmalarda izlenen strateji.....	28
Şekil 1.8: MDA-MB-453 hücrelerinin faz kontrast mikroskopundaki görüntüsü (10x)	29
Şekil 1.9: MCF-7 hücrelerinin faz kontrast mikroskopundaki görüntüsü (10x).....	30
Şekil 1.10: MCF-10A hücrelerinin faz kontrast mikroskopundaki görüntüsü (10x)	31
Şekil 1.11: Pubmed, Sciencedirect ve EBSCO veritabanlarında Trabectedin ile ilgili yapılmış yayınların sayısal dağılımı	36
Şekil 2.1: (a) Hücre kültür flasklarının laminar hava akımlı çalışma kabinlerine taşınması, (b) Tripan boyasıyla boyanan hücrelerin hücre sayım lamlarına yüklenmesi, (c) Otomatik hücre sayım cihazı, (d) Hücrelerin 96 kuyucuklu plakalara ekimi.	39
Şekil 2.2: Otomatik sayım cihazında Tripan mavisi ile muamele edilen hücrelerin cihaza entegre kameradaki görünümü (10X)	39
Şekil 2.3: DNA Fragmentasyon kitinin çalışma prensibi.....	42
Şekil 2.4: H2-DCF-DA boyasının hücre içindeki ROS non-floresans ve floresans formları	45
Şekil 3.1: Trabectedin'in çeşitli dozlarının 24., 48. ve 72. saatlerdeki etkileri (MCF-10A).....	50
Şekil 3.2: Trabectedin'in çeşitli dozlarının 24., 48. ve 72. saatlerdeki etkileri (MCF-7).....	50
Şekil 3.3: Trabectedin'in çeşitli dozlarının 24., 48. ve 72. saatlerdeki etkileri (MDA-MB-453)	50
Şekil 3.4: Sürekli izlenen MCF-7 meme kanseri hücre kültürlerinde Trabectedin'in etkisi	51
Şekil 3.5: Sürekli izlenen MDA-MB-453 meme kanseri hücre kültürlerinde Trabectedin'in etkisi	51
Şekil 3.6: Trabectedin'in değişen dozlarıyla muamele edilen MCF-10A hücre kültürlerinde zamana bağlı DNA fragmentasyon yüzdeleri	53

Şekil 3.7: Trabectedin'in değişen dozlarıyla muamele edilen MCF-7 hücre kültürlerinde zamana bağlı DNA fragmentasyon yüzdeleri	53
Şekil 3.8: Trabectedin'in değişen dozlarıyla muamele edilen MDA-MB-453 hücre kültürlerinde zamana bağlı DNA fragmentasyon yüzdeleri	53
Şekil 3.9: TMRE boyası ile boyanan MCF-7 ($IC_{25}=1.98$, $IC_{50}=4.8$ nM) ve MDA-MB-453 ($IC_{25}=1.18$, $IC_{50}=2.5$ nM) hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri (40X)	54
Şekil 3.10: Trabectedinle muamele edilen MCF-7 ($IC_{25}=1.98$, $IC_{50}=4.8$ nM) ve MDA-MB-453 ($IC_{25}=1.18$, $IC_{50}=2.5$ nM) hücrelerinde apoptozisle ilişkili proteinlerde meydana gelen değişimler	57
Şekil 3.11: : Trabectedin'in IC_{50} dozuna maruz bırakılan MCF-7 ($IC_{50}=4.8$ nM) ve MDA-MB-453 ($IC_{50}=2.5$ nM) hücrelerinde apoptozisle ilişkili moleküllerin mRNA'larında meydana gelen değişimler (48. saat)	58
Şekil 3.12: Spesifik Kaspaz inhibitörleriyle ön muamele edilen MCF-7 ve MDA-MB-453 hücrelerinde Trabectedin uygulaması sonrası DNA fragmentasyon miktarlarında meydana gelen değişimler (48. saat)	60
Şekil 3.13: H2-DCF-DA ile boyanan MCF-7 ve MDA-MB-453 hücrelerinde ROS'un floresan mikroskop görüntüleri (48. saat, 40X)	62
Şekil 3.14: Trabectedin muamelesi sonucu MCF-7 ve MDA-MB-453 hücrelerinde Glutatyon S Transferaz (GST) aktivitesinde meydana gelen değişimler (48. saat)	63
Şekil 3.15: Trabectedin muamelesi sonucu MCF-7 hücrelerinde DNA Metiltransferaz (DNMT) ve Histon Deasetilaz (HDAC) aktivitelerinde meydana gelen değişimler (48. Saat).....	63
Şekil 3.16: Trabectedin muamelesi sonucu MDA-MB-453 hücrelerinde DNA Metiltransferaz (DNMT) ve Histon Deasetilaz (HDAC) aktivitelerinde meydana gelen değişimler (48. saat)	64

SEMBOL LİSTESİ

%	Yüzde oran
°C	Santigrat derece
M	Molar
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
μM	Mikromolar
ml	Mililitre
μl	Mikrolitre
μg	Mikrogram
kDa	Kilodalton
α	Alfa
β	Beta
Δ	Delta
nm	Nanometre
mg/ml	Miligram/mililitre
g	Rölatif santrifüj kuvveti; yerçekimi birimi
OD	Optik dansite
Dk	Dakika

KISALTMALAR LİSTESİ

4E-BP1: EIF4E-Bağlanma proteini 1
8-OHdG: 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin
ABTS: 2,2'-azino-bis-[3-etilbenzthiazolin-6-sülfonik asit]
AKT: Rac protein kinase alpha
AMPK: AMP ile aktive protein kinaz
APAF: Apoptozis aktive edici faktör
AR: Androjen reseptörü
ATM: Ataxia telangiectasia mutated
BAD: Bcl-2 bağlanma bileşeni 6
BAX: Bcl-2 ilişkili X protein
BCL-2: B-cell lymphoma protein
BCL-XL: Apoptozis düzenleyici Bcl-X
BRCA1: Meme ve yumurtalık kanseri duyarlılık proteini 1
BRCA2: Meme ve yumurtalık kanseri duyarlılık proteini 2
CASP8: Kaspaz-8
CAT: Katalaz
CCL2: Kemokin ligand 2
CD31: Platelet endotel hücre adhezyon molekülü 1
CD62L: L-selektin
CD62P: P-selektin
CD62E: E-selektin
CD144: Kaderin 5
CDH1: Kaderin 1
cIAP-1: Apoptozis inhibitör proein 3
cIAP-2: Apoptozis inhibitör proein 1
CHEK2: Glutamat dehidrogenaz 2
CI: Hücre indeksi
CK8: Keratin 8
CK18: Keratin 18
CXCL8: İnterlökin 8
DMEM/F12: Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium
DMSO: Dimetil sülfoksit
DNMT1: DNA metiltransferaz 1
DNMT3a: DNA metiltransferaz 3a
DNMT3b: DNA metiltransferaz 3b
ET-743: Trabectedin
E2F: Transkripsiyon faktörü E2F
ECM: Ekstrasellüler matriks
EGF: Epidermal çoğalma faktörü
ERBB2: Protoonkogen c-ErbB2
ERK1/2: MAPK p42/p44
FADD: Fas ilişkili ölüm domaini
FAS: TNF süper ailesinin 6. üyesi
FGF: Fibroblast çoğalma faktörü
FKHR-L1: Bcl-2 benzeri protein 11
GATA3: GATA benzeri protein 3
GPx: Glutasyon peroksidaz 1
GR: Glutasyon redüktaz
GRB7: Büyüme faktörü reseptör bağlanma proteini 7
GST: Glutasyon-S-transferaz
GTP: Guanazin tri fosfat

H2-DCF-DA: 29,79-diklorofloresan diasetat
HDAC: Histon deasetilaz
HGF: Hepatosit çoğalma faktörü
HIF-1A: Hipoksia indüklenen faktör 1 alfa
HO-1/HMOX1/HSP32: Hem oksijenaz 1
HO-2/HMOX2: Hem oksijenaz 2
HPA: Sağlık Koruma Ajansı
HSP27: Isı şok proteini 27
HSP60: Isı şok proteini 60
HSP70: Isı şok proteini 70
HR: Homolog rekombinasyon
ICAM-1: İntraselüler adhezyon molekülü 1
ICAM-2: İntraselüler adhezyon molekülü 2
ICAM-3: İntraselüler adhezyon molekülü 3
ICLC: Interlab Cell Line Collection
IL-1: İnterlökin 1 alpha
IL-1β: İnterlökin-1 beta
IL -6: İnterlökin 6
K-RAS: Transforming Protein N-Ras (H-RAS, NRAS)
LDH: Laktat dehidrogenaz
LKB1/STK11: Serin treonin protein kinaz 11
MAF: C-Maf protoonkogen
MAPK: Mitojenle aktiveşen protein kinaz
MASP-1/2: Serin proteaz 5
MDR1: Çoklu ilaç direnci proteini 1
MLH1: DNA yanlış eşleşme tamir proteini MLH1
MMP-1: Matriks Metalloproteinaz 1
MMP-9: Matriks Metalloproteinaz 9
MMR: Yanlış eşleşme tamiri
MSH2: DNA yanlış eşleşme tamir proteini MSH2
mTOR: Target of rapamycin
MYB: Protoonkogen c-Myb
MYC: Protoonkogen c-Myc
NER: Nukleotid eksizyon tamiri
NF-Y: Nuklear transkripsiyon faktörü Y
NHEJ: Serbest uçların homolog olmayan şekilde bağlanması
NK: Doğal öldürücü hücre
N-RAS: Transforming Protein N-Ras (K-RAS, NRAS)
ÖR: Östrojen reseptörü
p16: Protein 16
p21: Protein 21
p27/KIP1: Protein 27
p53: Tümör protein 53
PDGF : Trombosit kaynaklı çoğalma faktörü
PDK1: Pruvat dehidrogenaz kinaz izoenzim 2
PECAM: Platelet endotel hücre adhezyon molekülü
PI3K: Fosfoinositid-3-kinaz
PI: Fosfatidil inositol
PIGF: Fosfatidilinositol glikan f sınıfı
PIP: Fosfatidil inositol-4-fosfat
PON2: Paraoksonaz 2
PR: Progesteron reseptörü
PRMT: Peptidilarginin metiltransferaz
RTCA: Gerçek zamanlı hücre analizatörü
PTEN: Phosphatase and tensin homolog

PTX3: Matriks bağlayıcı protein pentraksin 3
PVDF: Polyvinylidenedifluoride
qRT-PCR: Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimer Zincir Reaksiyonu
RAF: GTP-bağlı Ras serin threonin protein kinaz
RB: Retinoblastoma
Rheb: GTP bağlanma proteini Rheb
ROS: Reaktif oksijen türevleri
RTK: Reseptör tirozin kinaz
S6K1: Serine/Threonine-Protein Kinase 14A
SD: Standart sapma
Shc: SH2 domain protein C3
SOD: Süperoksit dismutaz
Sos: Guanin nükleotid değişim faktörü
SP1: Transkripsiyon faktörü Sp1
SRF: Serum cevap faktörü
TBP: TATA box bağlanma proteini
TBST: Tris buffered saline
TC-NER: Transkripsiyon bağımlı nükleotid kesip çıkarma tamiri
TGF- α : Transforme edici çoğalma faktörü alfa
TGF- β 1: Transforme edici çoğalma faktörü beta 1
TIMP-1: Metalloproteinaz doku inhibitörü 1
TIMP-2: Metalloproteinaz doku inhibitörü 2
TMRE: Tetrametilrodamin etil ester
TNF: Tümör nekrozis faktör
TNF-R1: TNF reseptör tip 1
TOP2A: Topoizomeraz 2 alfa
TP53: Tümör protein 53
TRADD: TNFRSF1A-ilişkili ölüm domaini
TRAILR1/DR4: TRAIL reseptör 1
TRAIL R2/DR5: TRAIL reseptör 2
Try: Tirozin
Thr: Triptofan
TSC1/2: Tuberous sclerosis complex
uPA: Urokinaz plazminojen aktivatör yüzey reseptörü
VCAM-1: Vasküler hücre adhezyon molekülü
VEGF: Vasküler endotelial çoğalma faktörü
VEFG-B: Vasküler endotelial çoğalma faktörü-B
VEGF-C: Vasküler endotelial çoğalma faktörü-C
VEGF-D: Vasküler endotelial çoğalma faktörü-D
WNT7B: Wingless type MMTV integration site family member 7B
XIAP: Apoptozis inhibitör protein 3
XPA: Xeroderma Pigmentosum, tamamlama grup A
XPB: Xeroderma Pigmentosum, tamamlama grup D
XPG: Xeroderma Pigmentosum, tamamlama grup G

MEME KANSERİ HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE TRABECTEDİN (ET-743) MOLEKÜLÜNÜN ETKİLEŞTİĞİ MOLEKÜLER SİSTEMLERİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Trabectedin (ET-743), *Ecteinascidia turbinata*'dan (deniz fiskeyi) 1969 yılında izole edilen antikanser bir moleküldür. Günümüzde ise sentetik olarak üretilen bu molekül, 2007 yılında yumurtalık kanseri ve yumuşak doku sarkomlarında tek başına veya mevcut kemoterapötiklerle kombine olarak kullanılmaya başlanmıştır. Ancak, Trabectedin'in çeşitli kanser hücre hatlarında hangi yollar üzerinden etki gösterdiği büyük ölçüde aydınlatılmayı beklemektedir.

Bu çalışmanın amacı, insan normal meme (MCF-10A) ve meme kanseri hücre kültürlerinde (MDA-MB-453 ve MCF-7) Trabectedin'in (1) hücre çoğalmasını engelleyici etkisini, etkileşime girdiği olası (2) apoptotik ve (3) anti-anjiyogenik molekülleri, (4) hücre içi redüksiyon/oksidasyon dengesini düzenleyici molekülleri, (5) epigenetik düzenlemede rol oynayan kritik molekülleri güncel moleküler yöntemlerle belirlemektir.

Trabectedin'in hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin araştırılmasında XTT canlılık testi ve xCELLigence sistemi kullanıldı. Trabectedin'in antiproliferatif etkisinin apoptozis üzerinden gerçekleşip gerçekleşmediği DNA fragmentleri ve mitokondriyal membran potansiyeli ölçülerek belirlendi. Apoptozisin hangi moleküller üzerinden gerçekleştiğine dair hipotez üretebilmek için ön çalışma olarak apoptozisle ilişkili 35 molekül içeren "apoptozis antikor array" (çoklu western blot) yöntemi kullanıldı. Apoptozisin ölüm reseptörleri aracılığıyla mı (ekstrinsik yolak) yoksa mitokondri aracılığıyla mı (intrinsik yolak) gerçekleştiğinin belirlenmesi amacıyla sırasıyla Kaspaz-8 ve Kaspaz-9 inhibitörleri kullanılarak DNA fragmentasyon miktarındaki değişimler gözlemlendi. İlgili apoptotik yoldaki moleküller Western Blot ve qRT-PCR yöntemleriyle doğrulandı. Trabectedin'in meme kanseri hücrelerinde etkilediği anjiyogenik moleküller, 55 molekül içeren antikor array kullanılarak belirlendi. Trabectedin'in hücre içi oksidasyon/ redüksiyon dengesini etkileyip etkilemediği ise reaktif oksijen türevlerinin ve Glutasyon S Transferaz (GST) enzim aktivitesinin ölçümü ile belirlendi. Trabectedin molekülünün meme kanseri hücrelerindeki epigenetik süreçleri etkileyip etkilemediği ise Histon Deasetilaz (HDAC) ve DNA Metiltransferaz (DNMT) enzim aktivitelerinin ölçümü ile araştırıldı.

Trabectedin'in insan meme kanseri hücre kültürleri (MCF-7 ve MDA-MB-453) üzerinde artan doza (10^{-6} - 10^{-12} M) ve zamana (24., 48. ve 72. saat) bağlı olarak sitotoksik etki gösterdiği belirlendi. Trabectedin'in 48. saatteki IC_{50} değerleri MCF-7 ve MDA-MB-453 hücre kültürlerinde sırasıyla 4.8 ± 0.8 ve 2.5 ± 0.4 nM olarak hesaplandı. Trabectedin'in insan MCF-10A normal meme epitel hücreleri üzerindeki doza ve zamana bağlı sitotoksik etkisinin meme kanseri hücre kültürlerine oranla daha az olduğu belirlendi ($IC_{50} = 9.55 \times 10^{-9}$ nM).

Trabectedin ile muamele edilen meme kanseri hücre kültürlerinin DNA fragmentasyon miktarında doza ve zamana bağlı; MCF-10A hücrelerinde ise sadece yüksek dozlarda ($\geq 10^{-7}$ M) artış belirlendi. Trabectedin'in MCF-7 ve MDA-MB-453 hücrelerinin mitokondriyal membran potansiyelinde doza bağlı olarak anlamlı azalışa yol açtığı belirlendi.

Trabectedine 48 saat maruz bırakılan MCF-7 hücre kültürlerinde proapoptotik moleküllerden TRAIL R1/DR4 (2.6 kat), TRAIL R1/DR5 (3.1 kat),

Fas/TNFRSF6 (1.7 kat), TNF RI/TNFRSF1A (11.2 kat) ve FADD (4.0 kat)'da kontrol hücrelerine göre artış belirlendi ($p \leq 0.05$). Apoptozis inhibitör proteinleri (AIP) ailesinden olan CIAP-1, XIAP, Livin ve Survivin'de sırasıyla 5.5, 2.5, 2.6, 3.0 kat azalış tespit edildi ($p \leq 0.05$). MDA-MB-453 hücre kültürlerinde ise 48 saat Trabectedin muamelesi sonucu proapoptotik moleküllerden Bad, Bax, aktif-kaspaz-3, Sitokrom-c, SMAC/DIABLO, Htra2/Omi'de sırasıyla 3.6, 4.2, 4.4, 4.8, 4.5 ve 5.2 kat artış belirlendi ($p \leq 0.05$). Antiapoptotik moleküllerden Bcl-2, Bcl-XL, Pro-kaspaz-3'de 4.8, 5.2 ve 6.0 kat azalış tespit edildi ($p \leq 0.05$). AIP ailesinden olan CIAP-1 ve Survivin'de ise sırasıyla 5.0 ve 2.7 kat azalış tespit edildi ($p \leq 0.05$).

Trabectedin muamelesi sonucu MCF-7 hücre kültürlerinde, proapoptotik moleküllerden TRAIL R1/DR4, TRAIL R2/DR5, TNF RI/TNFRSF1A, FADD ve Fosfo-p53 mRNA düzeylerinde sırasıyla 2.9, 2.1, 8.4, 2.1 ve 3.5 kat artış, antiapoptotik moleküllerden CIAP-1 ve XIAP mRNA düzeylerinde ise sırasıyla 4.2 ve 3.8 kat azalış belirlendi ($p \leq 0.05$). MDA-MB-453 hücrelerinde proapoptotik moleküllerden Bax, Bad, Sitokrom c ve SMAC/Diablo mRNA düzeylerinde sırasıyla 2.6, 2.5, 3.4, 10.5 kat artış, antiapoptotik moleküllerden Bcl-2 mRNA'sında ise 1.8 kat azalış, belirlendi ($p \leq 0.05$).

Kaspaz-8 ve Kaspaz-9 spesifik inhibitörleri kullanılarak, Trabectedin'in apoptozisi MCF-7 hücrelerinde ölüm reseptörleri aracılı yolk üzerinden, MDA-MB-453 hücrelerinde ise mitokondri aracılı yolk üzerinden indüklediği belirlendi. Trabectedin öncesi Kaspaz-3 inhibitörüyle ön muamele edilen MDA-MB-453 hücre kültürlerinde, DNA fragmentasyonunda yalnızca Trabectedin'le muamele edilen hücrelere göre anlamlı değişim gözlenmedi ($p > 0.05$).

Trabectedin muamelesi sonucu MCF-7 hücre kültürlerinde anti-anjiyojenik moleküllerden Serpin E1/PAI-1 ve TIMP-1 proteinlerinde sırasıyla 3.5 ve 4.2 kat artış tespit edildi ($p \leq 0.05$). Tissue Factor/Factor III, DPPIV/CD26, uPA, VEGF pro-anjiyojenik moleküllerinde ise sırasıyla 8.4, 6.2, 6.2, 6.8 kat azalış tespit edildi ($p \leq 0.05$). MDA-MB-453 hücrelerinde ise Trabectedin muamelesi sonucu anti-anjiyojenik moleküllerden ENDOGLIN, PF4, TIMP-1 ve TIMP-2'de sırasıyla 26.0, 3.5, 3.0, 2.2 kat artış tespit edilirken ($p \leq 0.05$), pro-anjiyojenik moleküllerden IGFBP-2, MMP-8, MMP-9 ve VEGF'de sırasıyla 4.2, 6.2, 2.1, 8.4 kat azalış tespit edildi ($p \leq 0.05$).

Trabectedin dozlarına (10^{-12} - 10^{-6} M) bağılı olarak, meme kanseri hücre kültürlerinde reaktif oksijen türevlerinin oluşumunda anlamlı artış tespit edildi. Kırk sekiz saat süresince Trabectedin uygulanan MCF-7 ve MDA-MB-453 hücrelerinde GST aktivitesinde artış belirlendi ($p \leq 0.05$). Epigenetik belirteçlerden DNMT ve HDAC aktivitelerinde ise her iki meme kanseri hücre hatlarında anlamlı azalış tespit edildi ($p \leq 0.05$).

Bu tez, Trabectedin'in meme kanseri hücre kültürlerinde sitotoksik, apoptotik ve anti-anjiyojenik etkileri olduğunu gösteren ilk *in vitro* çalışmadır. Bu veriler, Trabectedin'in *in vivo* ve faz çalışmaları tamamlandığı taktirde meme kanseri tedavisinde kullanılabilecek etkili bir kemoterapötik molekül olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Trabectedin (ET-743), MCF-7/MDA-MB-453, apoptozis, anjiyogenezis, epigenetik.

INVESTIGATION OF MOLECULAR SYSTEMS THAT TRABECTEDIN (ET-743) AFFECTS IN BREAST CANCER CELL CULTURES

ABSTRACT

Trabectedin (ET-743) is an anti-cancer molecule that was originally isolated from *Ecteinascidia turbinata* (sea squirt) at 1969. It has been approved for the treatment of patients with advanced soft tissue sarcoma and ovarian cancer either alone or in combination with present chemotherapeutics and now being prepared synthetically. However, it is still waiting to discover which signaling pathways are involved in the effect of Trabectedin in cancer cells.

The aim of this study is to investigate (1) the anti-proliferative effect of Trabectedin, possible (2) apoptotic and (3) anti-angiogenic molecules that interact with Trabectedin, (4) molecules that regulate the cellular reduction/oxidation balance, (5) molecules that play critical roles in epigenetic regulation on breast cancer cell lines (MDA-MB-453 ve MCF-7) and normal breast epithelial cells (MCF-10A) by using current molecular methods.

Anti-proliferative effect of Trabectedin was determined by XTT cell viability assay kit and real time cell analyze system (xCELLigence). To show whether the anti-proliferative effect of Trabectedin is through apoptosis, DNA fragmentation and mitochondrial membrane potential were measured. A preliminary study was done to produce hypotheses by an ELISA based apoptosis array (multiple western blotting) including 35 molecules associated with apoptosis. Caspase-8 and Caspase-9 inhibitors were used to see the changes in DNA fragmentation to determine that apoptosis occurs via death receptors (extrinsic pathway) or mitochondrial pathway (intrinsic pathway). Experiments were confirmed by western blotting and qRT-PCR methods. An ELISA based apoptosis array including 55 molecules associated with angiogenesis was performed to investigate the anti-angiogenic effect of Trabectedin. Reactive oxygen species and Glutathione S Transferase (GST) activities were measured to investigate whether Trabectedin affects reduction/oxidation balance of the breast cancer cells. The effect of Trabectedin on epigenetic system of cells was shown by measuring Histone Deacetylase (HDAC) and DNA Methyltransferase (DNMT) activities.

Trabectedin was cytotoxic to breast cancer cell cultures (MCF-7 and MDA-MB-453) in a dose (10^{-6} - 10^{-12} M) and time (24., 48. and 72. h) dependent manner. IC_{50} values of Trabectedin in MCF-7 and MDA-MB-453 cell cultures were 4.8 ± 0.8 and 2.5 ± 0.4 nM respectively, at 48 h. It was determined that dose and time dependent cytotoxic effect of Trabectedin was less in human MCF-10A normal breast epithelial cells ($IC_{50} = 9.55 \times 10^{-9}$ nM).

There was a dose and time dependent increase in DNA fragmentation in Trabectedin treated breast cancer cells, however in MCF-10A cells, DNA fragmentation was observed only at higher doses of Trabectedin ($\geq 10^{-7}$ M). Trabectedin caused a dose-dependent decrease in mitochondrial membrane potential in MCF-7 and MDA-MB-453 cells. Levels of proapoptotic molecules such as; TRAIL R1/DR4 (2.6 fold), TRAIL R1/DR5 (3.1 fold), Fas/TNFRSF6 (1.7 fold), TNF R1/TNFRSF1A (11.2 fold) and FADD (4.0 fold) were increased in MCF-7 cells treated with Trabectedin for 48 h as compared to control cells ($p \leq 0.05$). Levels of inhibitors of apoptosis family proteins (AIP) such as; CIAP-1, XIAP, Livin and

Survivin were decreased by 5.5, 2.5, 2.6, 3.0 fold, respectively ($p \leq 0.05$). Levels of pro-apoptotic molecules such as Bad, Bax, Active caspase-3, Cytochrome-c, SMAC/DIABLO, Htra2/Omi were increased by 3.6, 4.2, 4.4, 4.8, 4.5 and 5.2 fold respectively, in 48 h Trabectedin treated MDA-MB-453 cells ($p \leq 0.05$). Levels of anti-apoptotic molecules such as Bcl-2, Bcl-XL, pro-caspase-3 were decreased by 4.8, 5.2 and 6.0 fold ($p \leq 0.05$). Levels of AIP family proteins CIAP-1 and Survivin were decreased by 5.0 and 2.7 fold, respectively ($p \leq 0.05$).

mRNA levels of pro-apoptotic molecules such as TRAIL R1/DR4, TRAIL R2/DR5, TNF RI/TNFRSF1A, FADD and Fosfo-p53 were increased by 2.9, 2.1, 8.4, 2.1 and 3.5 fold, respectively, however anti-apoptotic molecules such as CIAP-1 and XIAP were decreased by 4.2 and 3.8 fold in Trabectedin treated MCF-7 cells ($p \leq 0.05$). mRNA levels of pro-apoptotic molecules such as Bax, Bad, Cytochrome c and SMAC/Diablo were increased by 2.6, 2.5, 3.4, 10.5 fold respectively, however, mRNA level of anti-apoptotic Bcl-2 molecule was decreased by 1.8 fold in MDA-MB-453 cells ($p \leq 0.05$).

It was found that Trabectedin induced apoptosis through death receptor pathway (extrinsic pathway) in MCF-7 cells but mitochondrial pathway (intrinsic pathway) in MDA-MB-453 cells by using Caspase-8 and Caspase-9 specific inhibitors. There was no significant change in DNA fragmentation levels of MDA-MB-453 cells pretreated with Caspase-3 inhibitor, as compared to Trabectedin alone treated cells ($p > 0.05$).

The levels of anti-angiogenic proteins such as Serpin E1/PAI-1 and TIMP-1 were increased by 3.5 and 4.2 fold in Trabectedin treated MCF-7 cells ($p \leq 0.05$). However, anti-angiogenic proteins such as Tissue Factor/Factor III, DPPIV/CD26, uPA, VEGF were decreased by 8.4, 6.2, 6.2, 6.8 fold, respectively ($p \leq 0.05$).

In MDA-MB-453 cells, anti-angiogenic proteins such as ENDOGLIN, PF4, TIMP-1 and TIMP-2 were increased by 26.0, 3.5, 3.0, 2.2 fold respectively, however pro-angiogenic proteins such as IGFBP-2, MMP-8, MMP-9 and VEGF were decreased by 4.2, 6.2, 2.1, 8.4 fold respectively by Trabectedin treatment ($p \leq 0.05$).

While Trabectedin increased the generation of reactive oxygen species and GST activity in a dose dependent manner (10^{-12} - 10^{-6} M), it decreased DNMT and HDAC activities in 48 h Trabectedin treated (10^{-12} - 10^{-6} M) MCF-7 and MDA-MB-453 cells ($p \leq 0.05$).

This thesis is the first *in vitro* study indicating that Trabectedin has cytotoxic, apoptotic and anti-angiogenic effects in breast cancer cell cultures. These data reveal that after completing *in vivo* and phase studies Trabectedin may be an effective chemotherapeutic molecule for breast cancer treatment.

Key Words: Trabectedin (ET-743), breast cancer cell lines, apoptosis, angiogenesis, epigenetics

1. GİRİŞ

1.1. Trabectedin (ET-743)

Trabectedin (ET-743), *Ecteinascidia turbinata*'dan (deniz fıskiyesi) izole edilmiş antikanser bir moleküldür. Günümüzde ise sentetik olarak üretilen bu molekül, 2007 yılında yumurtalık kanseri ve yumuşak doku sarkomlarında tek başına veya mevcut kemoterapötiklerle kombine olarak kullanılmaya başlanmıştır.

1.1.1. Keşfi ve Tarihçesi

Ulusal Kanser Enstitüsü 1950'li yıllarda yeni anti kanser özellikte maddeler ortaya çıkarabilmek üzere bitkileri ve deniz canlılarını tarama çalışmaları başlatmıştır. 1969 yılında, Karayip Denizlerinde yaşayan bir tunikat olan *Ecteinascidia turbinata*'nın (Deniz Fıskiyesi) etanolik ekstraktının anti kanser aktivitesi tespit edilmiştir (Şekil 1.1) (Maurizio ve Galmarini, 2010).



Şekil 1.1: *Ecteinascidia turbinata*

Ekstraktın içerdiği aktif moleküllerin belirlenmesi ve ayrıştırılması yeni tekniklerin gelişmesine kadar mümkün olmamıştır. Illionis Üniversitesinden KL Rinehart, Batı Hint Adaları'ndaki resiflerde dalışlar yaparak deniz fıskiyelerini toplamış ve *Ecteinascidia turbinata* ekstraktının içerdiği etken maddeleri belirlemeye yönelik çalışmalar yapmıştır. Bu etken maddelerin en önemlisi olan Trabectedin

(Ecteinascidin 743)'in kimyasal yapısı, 1984 yılında Rinehart tarafından ortaya konmuştur (Şekil 1.2) (Rinehart, 2000).

Saflaştırma sırasında elde edilen iki etken maddeden biri olan Trabectedin, dimetil analogu olan ET-729'dan daha potent ve daha stabil olması nedeniyle tercih sebebi olmuş ve klinik çalışmalarına başlanmıştır (Simmons ve diğ., 2005). İspanyol PharmaMar şirketi Illionis Üniversitesi'nden Trabectedin'in lisansını 1994 yılında almış, Trabectedin üretimi için deniz fiskeyileri kültüre edilmeye başlanmıştır. Bir ton tunikattan ancak 1 gram Trabectedin elde edilebilmiştir. Bir klinik çalışma için ise en az 5 gram etken maddeye ihtiyaç duyulduğundan Trabectedin eldesi için yeni yöntemler araştırılmaya başlanmıştır (Cuevas ve Francesch, 2009).

Harward Üniversitesinden kimyager E.J. Corey ve grubu, Rinehart'ın isteği üzerine Trabectedin'i sentetik olarak üretmek üzere bir yöntem geliştirmiş ve bunu 1996 yılında yayınlamışlardır. Daha sonraki yıllarda ise daha kolay bir yöntem geliştiren grup, *Pseudomonas fluorescens* bakterisinin fermantasyonu ile elde edilen Safrasin B antibiyotiklerinden yola çıkılarak Trabectedin'i yarı-sentetik olarak üretmeyi başarmışlardır. Johnson&Johnson firması ile anlaşılan PharmaMar, günümüzde Trabectedin'in satışını Avrupa'ya "Yondelis" adıyla yapmaktadır (Cuevas ve Francesch, 2009).

Benzersiz yapısı nedeniyle Avrupa ve Amerika'da klinik çalışmaları hızlı bir şekilde tamamlanan Trabectedin, bu çalışmalar sonunda 2007 yılında yumurtalık kanseri ve yumuşak doku sarkomlarında tek başına veya mevcut kemoterapötiklerle kombine olarak hastalara uygulanmaya başlanmıştır (Maurizio ve Galmarini, 2010).

Avrupa birliği tarafından onaylanan denizel kaynaklı ilk anti kanser ilaç olma özelliğinde olan Trabectedin, 2007 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi tarafından da onay almıştır. Trabectedin'in prostat ve meme kanserlerinde faz II çalışmaları halen devam etmektedir (Maurizio ve Galmarini, 2010).

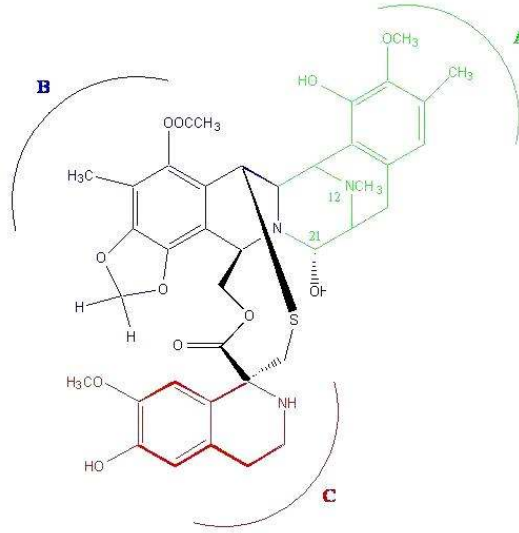
1.1.2. Kimyasal Yapısı

Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği'nin (IUPAC) isimlendirme sistemine göre formülü; {(1'R,6R,6aR,7R,13S,14S,16R)-5-(acetyloxy)-3', 4', 6, 6a, 7, 13,14,16-octahydro-6',8,14-trihydroxy7',9-dimethoxy-4,10,23-trimethyl-spiro [6,16 (epithiopropoxymethano) -7,13-imino-12H-1,3-dioxolo [7,8] isoquino[3,2-b][3]benzazocine-20,1'(2'H)-isoquinolin]-19-one} olan Trabectedin'in moleküler formülü ise C₃₉H₄₃N₃O₁₁S'dir (ADIS R&D profile, 2003).

Trabectedin molekülünün yapısına bakıldığında üç tane tetrahidroizokinolin halkasına sahip olduğu görülmektedir (Şekil 1.2). A ve B alt ünitesi, tek köprülü

pentasiklik iskeletle birleşmiştir. C alt ünitesi ise A ve B alt ünitelerine benzilik sülfid bağının oluşturduğu lakton köprüsü ile bağlanır (Gago ve Hurley, 2002).

Bu halkalarda ikisi (A ve B halkaları) DNA'nın küçük oluğu ile etkileşime girdiği, diğer halkanın (C halkası) ise transkripsiyon faktörleri gibi moleküllerle etkileştiği düşünülmektedir (Gago ve Hurley, 2002).



Şekil 1.2: Trabectedin molekülünün kimyasal yapısı.

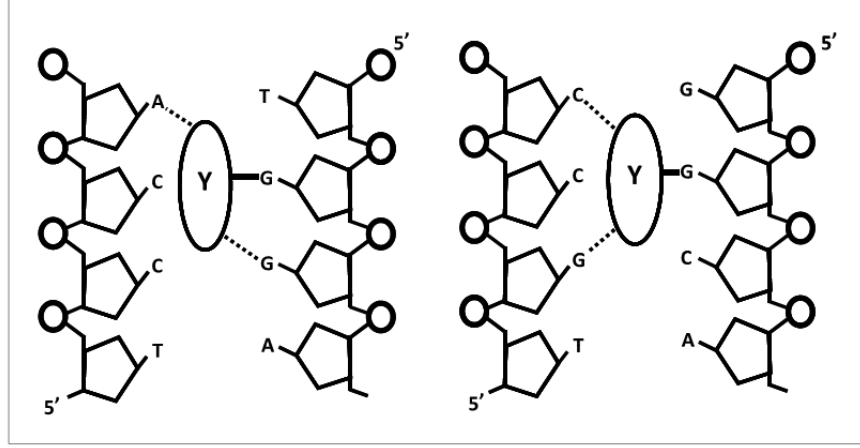
1.1.3. Etki Mekanizmaları

Trabectedin'in etki mekanizmalarının özeti Şekil 1.4'te özetlenmiştir (Maurizio ve Galmarini, 2010).

1.1.3.1. DNA ile Etkileşimi

DNA'nın büyük oluğundaki N7 veya O6 pozisyonundaki guaninlere bağlanan diğer alkilleyici ajanların aksine, Trabectedin heliks yapının küçük oluğundaki guaninlerin N2 amino gruplarına bağlanır. Bu bağlanmada A halkasındaki karbinolamin kısmının büyük payı olduğu düşünülmektedir, zira karbinolamin reaktif grubu içermeyen ET-745 gibi yapısal analoglarının Trabectedin'den 100 kat daha az aktif olduğu bilinmektedir (Gago ve Hurley, 2002).

A ve B halkaları ile komşu dizideki nukleotidler Van der Waals kuvvetleri ve hidrojen bağları ile bağlanarak, iki iplik arasında çapraz bağlanmaya neden olur (Şekil 1.3).



Şekil 1.3: Trabectedin (Y)'in DNA'ya bağlanmasını gösteren şematik çizim (Kovalent bağlar düz çizgilerle, hidrojen bağları ise kesikli çizgilerle gösterilmiştir)(Maurizio ve Galmarini, 2010).

Trabectedin'in küçük oluğa bağlanması DNA'nın doğal konformasyonunda bozulmalara neden olur. Bu da transkripsiyon faktörlerinin ve nükleotid kesip çıkarma tamir sisteminin görev yapmasını engelleyerek hücreyi apoptozise götürür (Hurley ve Zewail-Foote, 2001).

1.1.3.2. DNA Tamir Mekanizmaları ile Etkileşimi

Transkripsiyon bağımlı nükleotid kesip çıkarma tamir (TC-NER) sistemi, DNA hasarının tanınması ve çeşitli tamir proteinlerinin hasarlı bölgeye çağrılmasında rol alır. *In vitro* çalışmalar, diğer DNA hasarı oluşturan ajanların aksine (Ör: Cisplatin), TC-NER yoksunu hücrelerin Trabectedin'e 2-10 kat daha az duyarlı olduğunu ortaya koymuştur (Erba ve diğ., 2000; Takabayashi ve diğ., 2001; Damia ve diğ., 2001; Damia ve diğ., 2007). Trabectedin normal NER fonksiyonu olan hücrelerde RNA polimeraz II'nin hızlı bir şekilde yıkılmasına neden olurken, XPD, XPA, XPG ve XPF-yoksunu hücrelerde bu etkisinin olmadığı tespit edilmiştir (Aune ve diğ., 2002).

Homolog rekombinasyon (HR) ve serbest uçların homolog olmayan şekilde bağlanması (NHEJ) tamir sistemleri DNA çift zincir kırıklarının tamirinden sorumludur. HR yoksunu hücrelerin Trabectedin'e 100 kat daha duyarlı olduğu bilinmektedir. Ancak NHEJ yoksunu hücrelerde aynı durum gözlenmemiştir. HR

yoksunu hücrelerdeki duyarlılık klinik çalışmalarla da doğrulanmış; BRCA1 ve BRCA2 eksprese eden sarkomalarda, bu tamir proteinlerini eksprese etmeyen tümörlere göre Trabectedin'e cevabın daha az olduğu gösterilmiştir (Guirouilh-Barbat ve diğ., 2008).

1.1.3.3. Transkripsiyonun Düzenlenmesi ile Etkileşimi

Trabectedin'in DNA'ya bağlanması sonucu meydana gelen yapısal bozuklukların transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanma dinamiklerini etkilediği bilinmektedir. Trabectedin'in MAF, MYB, ve MYC gibi transkripsiyon faktörlerini engellemediği, ancak TBP, E2F, SRF ve NF-Y gibi transkripsiyon faktörlerinin Trabectedinin artan dozlarıyla inhibe olduğu gösterilmiştir (Bonfanti ve diğ., 1999). Trabectedin'in nanomolar konsantrasyonlarda, HSP-70 ve MDR1 genlerinin transkripsiyonlarını bloke ettiği tespit edilmiştir (Minuzzo ve diğ., 2000; Jin ve diğ., 2000). DNA'nın küçük oluşuna bağlandığı bilirse de, Sp1 gibi DNA'nın büyük oluşuna bağlanan transkripsiyon faktörlerini inhibe ettiğini gösteren çalışmalar da mevcuttur (Maurizio ve Galmarini, 2010).

1.1.3.4. Tümör Mikroçevresi ile Etkileşimi

Trabectedin'in tümör büyümesi ve metastazı ile ilişkili bazı kemokin ve sitokinleri transkripsiyonel düzeyde baskıladığı gösterilmiştir. Yumurtalık kanseri tümör örneklerinde Trabectedin'in monositlerden, makrofajlardan ve tümör-ilişkili makrofajlardan CCL2 ve interleükin 6 (IL-6) salınımını baskıladığı gösterilmiştir (Allavena ve diğ., 2005). CCL2 tümör bölgesine monosit çağırılmasında rol alırken, IL-6 pek çok tümör için büyüme faktörü olarak rol alır. Trabectedin sitotoksik olmayan çok düşük dozlarında bile miksoid liposarkom hücre kültürlerinde CCL2, CXCL8, IL - 6, vasküler endotelial çoğalma faktörü (VEGF) ve matriks bağlayıcı protein pentraksin 3 (PTX3) gibi moleküllerin üretimini engellediği gösterilmiştir. Aynı bulgular miksoid liposarkom ksenograft fare modellerinde de doğrulanmıştır (Germano ve diğ., 2010).

1.1.4. Trabectedin'e Direnç

Trabectedin'e direnç gösteren az sayıda hücre hattı belirlenmiştir. XPG geninin kodlandığı 13q33 kromozomundaki heterozigote kaybı bulunan ER5 kolon karsinom hücre hattında direnç tespit edilmiştir. Trabectedin'e dirençle ilgili diğer bir mekanizma insan kondrosarkom CS-1 hücrelerinde yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bu hücre tipinde kollajen I ve IV'ün modifiye formlarının üretildiği,

bunun da sitoskelet yapısında değişimlere neden olduğu bilinmektedir (Shao ve diğ., 2003).

Diğer bir çalışmada, Trabectedin'in artan dozlarına (800 nM/L'ye kadar) maruz bırakılan, p-glikoprotein ekspresyonu artmış Igrov-1/25ET insan yumurtalık kanseri hücre hatlarında Trabectedin'e yüksek oranda direnç geliştiği gözlenmiştir (Erba ve diğ., 2000).

1.1.5. Trabectedin ile Yapılmış Kombinasyon alışmaları

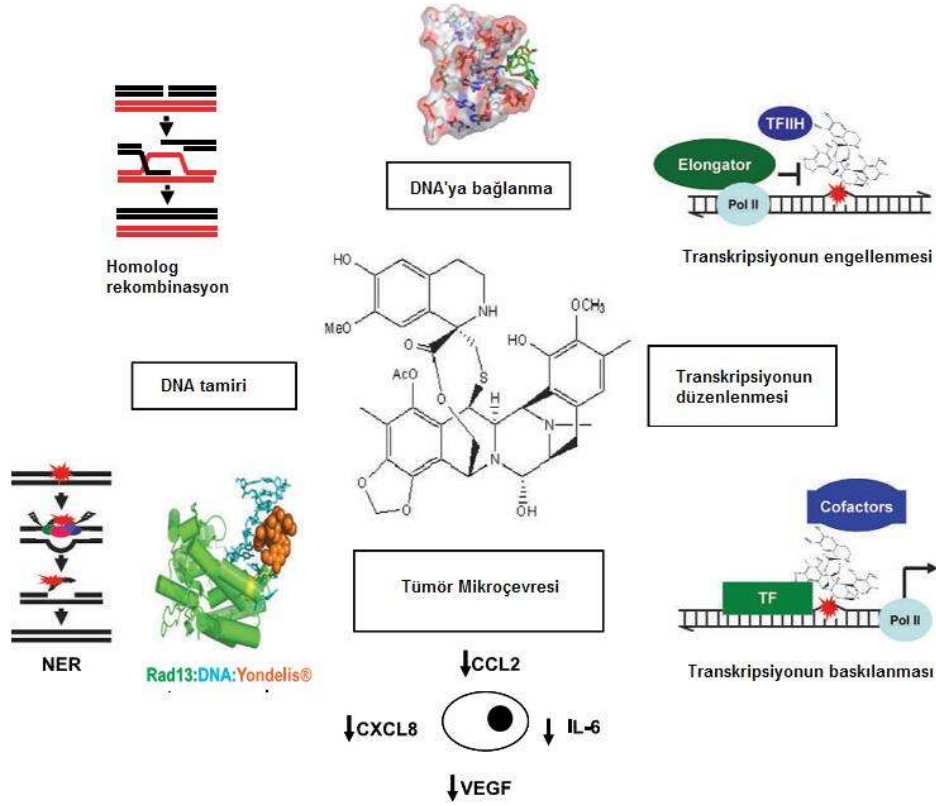
Literatürde, farklı kanser hücre tiplerinde ve *in vivo* modellerde, Trabectedin ve Doksorubisin kombinasyonun sinerjistik ve additif etkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur.

İnsan sarkom hücre hatlarında (TE671, HT-1080, HS-18), Trabectedin ve Doksorubisin'in eş zamanlı uygulanmasının hücrelerin yaklaşık %90'ının ölümüne neden olduğu belirlenmiştir. Bu kombine uygulama, ilaçların tek başlarına uygulanmalarından daha düşük dozlarda uygulanabilmesine olanak sağlamıştır (Doksorubisinin 6.7 kat, Trabectedin'in 1.5 kat daha düşük dozlarda kullanılarak kombine edilebilmiştir) (Takahashi ve diğ., 2001; Meco ve diğ., 2003).

İnsan sarkom U-2OS ve Saos-2 ve meme kanseri MCF-7 ve MX-1 hücre hatlarında bu kombinasyonun yüksek sinerjistik sitotoksik olduğu belirlenmiştir (Takahashi ve diğ., 2001). Aynı kombinasyonla yapılan *in vivo* alışmalarda da sinerjistik etkiler gözlenmiştir. Fare fibrosarkom UV2237 ve insan rabdomiyosarkom TE671 ksenograflarıyla yapılan çalışmalarda kombinasyonun uygulama programına bağlı olmaksızın sinerjistik olduğu belirlenmiştir (Meco ve diğ., 2003).

Trabectedin-Doksorubisin kombinasyonu platin duyarlı yumurtalık kanseri nüksetmiş hastalarda Avrupa komisyonu tarafından onay almış, günümüzde bu hastaların tedavisinde öncelikle tercih edilen bir kombinasyondur.

Platin bileşenleri ile Trabectedin arasındaki sinerjistik etkileşimler insan sarkom (TE671, U-2OS, Saos-2), yumurtalık (Igrov-1 ve A2780), kolon (HCT116) ve meme (MCF-7) kanseri hücre kültürlerinde gösterilmiştir. Benzer bulgular yumurtalık ve sarkom ksenograflarında da gözlenmiştir (Scotlandi ve diğ., 2002; Erba ve diğ., 2001b; Erba ve diğ., 2003; Takahashi ve diğ., 2001). Sarkom (HT-1080) ve meme kanseri (MCF-7 ve MX-1) hücre kültürlerinde Trabectedin'in Paklitaksel ile sinerjistik etkili olduğu belirlenmiştir. Farklı tümör modellerinde Trabectedin'in Oksaliptatin veya Paklitaksel'le kombinasyonunun sinerjistik anti-tümör etkili olduğu gösterilmiştir (Maurizio ve Galmarini, 2010).



Şekil 1.4: Trabectedin'in etki mekanizmalarının özeti (Maurizio ve Galmarini, 2010).

1.2. Hücrenin Sağlıklı İşleyişi için Gerekli Moleküler Etkileşim Ağları/Sistemler

Canlılık genetik enformasyon varlığında enerji kullanılarak biyolojik moleküllerin dinamik ve hiyerarşik örgütlenmesini, örgütlenmeye katılan moleküller arasında haberleşmeyi ve kontrolü gerektirir. Canlılığın sürdürülmesi ise sistemde uyum sağlayıcı bir esnekliği ve dinamik değişimi gerekli kılar. Canlıyı oluşturan moleküllerin hiyerarşik örgütlenmesinde fonksiyonel ve kendi içinde bağımsız düzey hücredir. Organizmalar tek veya çok hücrelidir. Çok hücreli organizmalarda koloni halinde veya değişen derecelerde farklılaşarak inşa edilen doku, organ, sistem gibi örgütlenme düzeyleri görülür. Canlılığı oluşturan bu parametrelerden herhangi birindeki bozukluk veya bu parametrelerin doğru yerde doğru zamanda doğru miktarda olmaması da değişen derecelerde hücrenin veya canlının sağlığını etkiler. Organizmanın sağlıklı işleyişi bu perspektifte en temel fonksiyonel birim olan hücrenin sağlıklı işleyişine bağlıdır.

1.2.1. Hücrenin Yaşamalarını/Çoğalmalarını Sağlayan Moleküler Etkileşimler

Hücre, iç ve dış çevrenin yapıtaşları üzerindeki etkilerine cevap üreterek değişen koşullara uyum sağlar. Hücrenin yaşamını sürdürebilmesi, çoğalması ve hücre döngüsünün sağlıklı bir şekilde işleyebilmesi pek çok genin ve ürününün etkileştiği sinyal yolları ile mümkündür. Hormonlara, çoğalma faktörlerine, sinyal moleküllerine veya ekstraselüler matriksteki değişikliklere karşı cevap sinyal yolları aracılığı ile hücre içine iletilir. Sinyal yollarının temel bileşenleri; sinyal, reseptör, iletim ve efektör moleküllerdir. Sinyal molekülünün/ligandın mesajının nihai hedefe ulaştırabilmesi için (a) reseptöre bağlanması, (b) sinyal kaskadındaki diğer molekülleri aktive/inaktif etmesi ve sonunda (c) bir ya da daha fazla efektör molekülün aktivasyonuna yol açar (Schlessinger 2004). Hedefe ulaşan sinyal hücre içi metabolitleri aktif/inaktif hale geçirebilir veya gen ekspresyonu değiştirebilir, sonuçta hücrenin fenotipinde değişikliğe yol açar.

Ağ tabanlı işleyen ve kendi içinde çapraz iletişim kuran sinyal yollarının işlevleri tüm yönleriyle bilinmiyor olsa da bunları fonksiyonel açıdan hücrenin canlılığını sürdüren/hücreyi ölüme götüren, hücreyi bölünmeye sevk eden/hücrenin çoğalmalarını durduran sinyal yolları ve bu ikili çalışan sinyal yollarını kontrol edip düzenleyen karar verici yollar şeklinde gruplanabilir.

Hücrenin yaşamalarını/çoğalmalarını sağlayan sinyal yollarının önde gelenleri arasında Trombosit kaynaklı çoğalma faktörü (PDGF), Epidermal çoğalma faktörü (EGF) ve Transforman edici çoğalma faktörü alfa ($TGF-\alpha$) gibi çoğalma faktörleri ailesine ait üyeler yer alır. Bu faktörlerin ortak yönü; reseptörlerinin protein tirozin kinaz (RTK) alt birimine sahip olmasıdır (Jorissen ve diğ., 2003; Schlessinger, 2003; Schlessinger, 2004; Citri ve diğ., 2006). Ligandın reseptörüne bağlanması, reseptörün tirozin kinaz alt birimini aktive eder. RTK'ların aktive ettiği en temel yollar Ras/ERK ve PI3K sinyal yollarıdır (Fambrough ve diğ., 1999).

Ras/ERK sinyal yolağı ERK1 ve ERK2 gibi MAP kinazların aktivasyonuna yol açar (Rodriguez-Viciano ve diğ., 2005; Schreck ve Rapp, 2006). P21-Ras farnilizasyon sonucu plazma membranına bağlanır ve GTP bağlanınca aktive olur. Sos, GTP/GDP değişiminden sorumlu faktör olup Grb2 adaptör proteini ile substratına ulaştırılır. Diğer bir adaptör protein olan Shc de bu aktivasyonu sağlayabilir. Sh2 RTK'lar veya Src ailesine ait tirozin kinazlar tarafından fosforillenir ve fosforillenen Shc'ye Grb2 bağlanır ve Sos'u membrana gönderir (Schlessinger, 2004).

GTP-bağılı Ras serin threonin protein kinaz olan Raf'ı plazma membranına gönderir. Burada fosforillenen Raf aktive olur (Schreck ve Rapp, 2006; Tootle ve Rebay, 2005). Raf diğer bir protein kinaz olan MEK'i fosforilleyerek aktive eder. Aktive olan MEK, mitojenle aktifleşen protein kinaz'ı (MAPK), ERK1 ve ERK2'yi Try ve Thr birimlerinden fosforiller. RAF- MEK-ERK fosforilasyon kaskadı memelilerdeki fosforilasyon kaskadlarından biri olup, ERK fosforilasyonu membranla ilişkili ve sitoplazmik pek çok proteinin fosforillenmesine sebep olur. Ayrıca nukleusa giderek TCF/Ets ailesine ait transkripsiyon faktörlerini fosforiller ve fos, jun, myc gibi genlerin aktive olmasını sağlar (Hill ve Treisman, 1999). Ras/MAPK sinyalizasyonunun aktive ettiği önemli diğer bir protein hücre döngüsünü düzenleyen Siklin D1'dir. Ras, Raf veya Erk, Siklin D1'in transkripsiyonunu aktive edebilir. Ras/Erk sinyalizasyonunun hücre çoğalması ve apoptozis ile ilişkili pek çok molekülün doğrudan fosforilasyonuna neden olduğu bilinmektedir (Citri ve Yarden, 2006; Anjum ve diğ., 2005; Shahbazian ve diğ., 2006).

RTK'ların aktive ettiği sinyal yollarından bir diğeri PI3K yolağıdır. PI3K'in p110 katalitik alt ünitesinin p85 düzenleyici alt ünitesi ile birleşmesi PI3K'nin aktivasyonunu sağlar (Shaw ve Cantley, 2006). Aktive olan PI3K, fosfotidil inositol'ü (PI), fosfotidil inositol-4-fosfat (PIP) ve fosfotidil inositol-4,5-difosfat'ı fosforiller. Bu fosforillenmeler sonucu iki önemli serin treonin protein kinaz olan protein kinaz B (AKT) ve PDK1 aktive olur. AKT, PI3K yolağındaki pek çok efektör molekülün düzenleyicisidir. mTOR, TOR (Target of rapamycin) kompleksi olup, 4EBP1'in aktivitesini inhibe eder. PDK1 ile birlikte S6K1'i fosforilleyerek aktive eder. 4EBP1 ve S6K1'in aktivitelerindeki değişiklikler protein sentezini önemli ölçüde etkiler (Ruggero ve Sonenberg, 2005; Wullschleger ve diğ., 2006). mTOR'un GTP-bağılı formunun aktivasyonu için Rheb (Ras homolog enriched in brain) ile bağlanması gerekir. TSC1/2 (Tuberous sclerosis complex) proteinleri Rheb'in GTPaz aktivitesini teşvik eder ve dolayısıyla indirekt olarak mTOR aktivitesini engeller (Shaw ve Cantley, 2006; Wullschleger ve diğ., 2006). TSC1/2 aktivitesi PI3K sinyalizasyonu ile inhibe edilir, besin eksikliğinde, hipoksi ve enerji miktarı azaldığında aktive olur. Enerji miktarı azaldığında hücrede AMP birikimi olur ve LKB1 fosforilasyonu sonucu AMPK (AMP ile aktive protein kinaz) aktive olur. TSC2'nin AMPK ile fosforilasyonu ve ardından GSK3 ile fosforilasyonu TSC1/2'nin aktivasyonuna neden olur (Inoki ve diğ., 2006). Enerji azalışı mTOR'u inaktive eder ve protein sentezini azaltır. Akt sadece TSC1/2'yi fosforilleyerek değil, aynı zamanda ATP/AMP oranını yüksek seviyede tutarak da bu enerji azalışına karşı koyar (Hahn-Windgassen ve diğ., 2005). Bu nedenledir ki PI3K sinyalizasyonunun temel görevlerinden biri besin,

oksijen ve enerji yokluğunda protein sentezini baskılayan S6K ve 4E-BP proteinlerinin PDK1, PKB, TSC1/2, Rheb ve mTOR ile aktivasyonlarını sağlamaktır.

AKT, aynı zamanda hücre sağ kalımını ve nihayetinde çoğalmasını da uyarır. FKHR-L1 gibi replikasyon çatalı transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonu, proapoptotik ve büyüme inhibitörü genler için transkripsiyonal aktivasyonlarını önler. Önemli bir apoptozis aktivatörü olan BAD' ta AKT tarafından fosforile edilerek inhibe edilir. Bu durumlarda AKT tarafından fosforile edilen proteinler 14-3-3 proteinlerince tanınırlar. Protein kompleksi sitozolde tutularak, FKHR-L1'in nukleusa girişi ve BAD'ın mitokondriyal proteinler ile etkileşimi engellenir. Aynı mekanizma ile, AKT nin fosforilasyonu, hücre döngüsü inhibitörü p27/KIP1 in aktivitesini sınırlar. Buna ek olarak, Siklin D1 ve myc' i fosforile ve inhibe ederek hücre proliferasyonunu düzenler (Schulz, 2005).

Sonuç olarak, AKT hücrenin sağ kalımını uyarıcı bir molekül olmasının yanında apoptotik molekülleri baskılayıcı rolü de olan önemli bir oyuncudur.

1.2.2. DNA Hasarını Algılayan, Tamir Eden ve Düzenleyen Sistemler

Genetik materyalin nesilden nesile korunarak aktarılması mutasyon oranlarının düşük düzeylerde sürdürülmesine bağlıdır. Hücrelerin sağlıklı bir şekilde yaşamını sürdürmesi, binlerce genin doğru yerde, doğru zamanda, doğru miktarda okunmasını veya aktivasyonunu gerektirir. Genler, kodlayan ve düzenleyici bölgelerdeki mutasyonlarla veya mRNA'nın ekspresyonunu/olgunlaşmasını yöneten araya giren dizilerdeki bir mutasyonla zarar görebilir.

DNA kimyasal stabilitesi sınırlı, kompleks ve kırılgan organik bir moleküldür. Eksojen ve endojen kaynaklı mutajenler genetik materyalde hasara neden olur. En basit mutasyonlar bir bazın diğerine dönüşümü şeklindedir. İki türü vardır;

Transisyon, pürinin pürine veya pirimidinin pirimidine dönüşümü, transversiyon ise pirimidinin pürine veya pürinin pirimidine dönüşümü şeklindedir. Diğer basit mutasyonlara örnek ise bir veya birkaç nükleotidin insersiyon veya delesyonudur. Tek baz değişimine neden olan mutasyonlara nokta mutasyonları denir. Mutasyonun diğer çeşitleri DNA'da daha büyük hasarlara neden olur. Örneğin; büyük bir parçanın eklenmesi veya çıkması, kromozom yapılarında yeniden düzenlenmeler gibi. Bu gibi değişiklikler bir transpozonun, genin kodlayan bölgesine ya da düzenleyici bölgesine girmesi veya hücredeki rekombinasyon işlemlerinin hatalı işleyişi ile meydana gelebilir.

Metil veya etil grupları bazların veya fosfatların reaktif gruplarına transfer edilir (Örneğin; nitrozamin, nitrozoguanidinler). En sık alkilasyona uğrayan bölge

guaninin 6. karbonundaki oksijen atomudur. Timinle hatalı eşleşir. G:C baz çiftini A:T'ye dönüştürür ve kanserlerde en sık görülen mutasyonlardır.

Bazlarda hasara neden olan bir diğer etken UV ışıktır. 260 nm dalga boyundaki radyasyon bazlar tarafından kuvvetle emilir. Aynı polinükleotid zincirinde yan yana duran primidinlerin fotokimyasal birleşmesine neden olur. İki timin varsa oluşan birleşme timin dimeridir, beşinci ve altıncı karbonlardan birleşerek siklobütan halkası oluştururlar. Bu birleşmiş bazlar DNA polimerazın replikasyon sırasında durmasına neden olur.

Gama radyasyonu ve x ışınları da DNA'da çift iplik kırıkları oluşturmaları nedeniyle zararlıdır. Ayrıca radyasyonla tetiklenen serbest radikaller DNA'da baz modifikasyonlarına yol açar. Trabectedin, Bleomisin gibi kanser ilaçları DNA'da kırıklara sebep olur, bunlara klastrojenik ajanlar denir.

Mutasyonlar normal bazların yerine geçebilen (baz analogları) veya bazlar arasına giren (interkalasyon ajanları) ajanlardan dolayı da meydana gelebilir. 5-bromourasil timin analogu olup, mutasyona yol açar. İnterkalasyon yapan ajanlar polisiklik halkalar içeren moleküller olup, DNA'daki pürin ve primidin bazlarına bağlanırlar. Bu ajanlar DNA üzerindeki genlerin transkripsiyonunu engeller.

Bazların kaybıyla kendiliğinden zarara uğrayabileceği gibi, doğal ya da sentetik kimyasallarla veya radyasyonla bağları kırılabilir, kimyasal bağları kopabilir veya bazlar değişebilir. Dolayısıyla replikasyondaki hatalar ve çevresel hasar kaçınılmazdır. DNA replikasyonu sırasında kendiliğinden oluşan hatalı eşleşmeler, DNA polimerazın sahip olduğu proofreading alt birimi ile tamir edilir. DNA replikasyonun doğru şekilde gerçekleşmesinin son kontrolü hatalı eşleşme tamir sistemi ile sağlanır. Bu mekanizma, tashih mekanizmasından kaçan hataları uzaklaştırır. Bu sistem sentezin doğruluğunu 2-3 misli artırır.

Replikasyonu ve transkripsiyonu bozan değişiklikler hücre fonksiyonlarında değişikliklere sebep olabilir. Hücrenin bu değişikliklere karşı cevabı iki basamakta gerçekleşir. Birincisi, hücre tüm genomu taramak ve DNA hasarını saptamak ve ikincisi saptadığı lezyonları tamir etmek zorundadır.

DNA Hasarının Doğrudan Tamiri; Fotoreaktivasyon primidin dimerlerinin oluşumunu geriye çevirir. Primidin dimerleri UV'ye maruz kalmakla oluşur. Fotoreaktivasyonda DNA fotolizaz enzimi ışıktan enerji alıp komşu timinler arasındaki kovalent bağları kırmada kullanır. Diğer örnek ise; metilguanin'deki metil grubunun uzaklaştırılmasıdır. Böyle durumlarda metiltransferaz enzimi guaninden metil grubunu uzaklaştırır.

Hasara uğramış bazların tamirinde iki ana sistem kullanılır.

Birincisi; bazların kesilip uzaklaştırılarak tamiri, ikincisi; nükleotidlerin kesip uzaklaştırılarak tamiridir.

Bazların kesip uzaklaştırma tamir sisteminde, glikozilaz enzimi zarara uğramış bazın glikosidik bağını kopararak uzaklaştırır. Açığa çıkan bazsız şeker endonükleotidik mekanizma ile uzaklaştırılır.

Nükleotidi kesip uzaklaştırma tamir sistemi, lezyonun her iki tarafında zarara uğramış DNA bölgesini kesip uzaklaştırır. Bu sistem double helix şeklindeki bozulmaları tanır, dolayısıyla belli bir bölgeyi uzaklaştırır. Burada oluşan tek iplikli boşluk polimerazla doldurulur.

Nükleotid kesim tamiri için dört farklı protein kullanılır (UvrA, UvrB, UvrC, UvrD). UvrA ve UvrB'den oluşan kompleks DNA'yı tarar, UvrA helix yapısındaki bozulmaları bulur. Hasar bulununca UvrA kompleksten ayrılır, UvrB DNA sarmalını açar ve lezyonun etrafında tek iplikli bir baloncuk oluşur. Daha sonra UvrD, UvrC'yi bağlar. UvrC lezyonun iki ucunda kesim yapar. DNA polimeraz I oluşan boşluğu doldurur ve DNA ligaz yapıştırır.

Çift iplik kırıkları hücre için en ölümcül DNA hasar tipidir. DNA'nın her iki ipliğinin kırılmasıyla oluşan hasar **çift iplik kırıklarını tamir yolağı** ile tamir edilir. Bu yolak doğru dizi bilgisini kardeş kromatidden alır. Eğer kardeş kromatide kırık oluşursa, o zaman kalıp olarak iş görecektir doğru dizi bilgisi kullanılamayacaktır. Bu koşullarda alternatif sistem olan **homolog olmayan uçları birleştirme (NHEJ) tamir sistemi** devreye girer. NHEJ'i gerçekleştiren mekanizma, kırık uçları işleminden geçirip sonra onları birleştirir. Dizi bilgisi kırık uçlardan kayıp olduğu için NHEJ sistemi mutajenik bir sistemdir. NHEJ sistemiyle DNA uçlarının birleştirilmesi kırık uçları tamir etmeden bırakmanın sonuçlarından daha az tehlikelidir. Dolayısıyla, NHEJ tamir sistemiyle büyük bir zarardan korunmak için daha küçük bir zarar kabul edilmiş olur.

Özetle; hücrelerin DNA'ları doğru bir şekilde replike olur, genetik bilgileri kimyasal ve fiziksel zararlardan korunursa yaşamlarını sağlıklı bir şekilde sürdürebilir.

1.2.3. Hücre Ölüm Mekanizmaları

Çok hücreli organizmaların gelişimi süresince, fizyolojik ve patolojik koşullarda dokulardaki hücre popülasyonlarının düzenlenmesinde, ihtiyaç duyulmayan ya da hasar görmüş hücrelerin yok edilmesinde hücre ölüm mekanizmaları devreye girer.

Apoptosis, morfolojik süreçlerin önderliğinde hücrelerin kendilerini kontrollü olarak yok etmelerini tarif eden bir terim olarak 1972 yılında Kerr ve arkadaşları

tarafından tanımlanmıştır. Apoptozisin belli başlı aşamaları: apoptozisin indüksiyonu, hücre yüzey ölüm reseptörlerinin uyarılması, sitokrom c'nin salınımı, apoptozom oluşumu (sitokrom c + Apaf-1 + kaspaz-9), mMitokondriyal transmembran potansiyelin değişmesi, kaspazların aktivasyonu, fosfatidilserinin hücre membranının iç yüzünden dış yüze transloke olması, DNaz'ın aktivasyonu sonucu DNA'nın fragmentasyonu (internukleozomal DNA fragmentasyonu), yapısal proteinlerin yıkılmasına bağlı olarak apoptozise özgü morfolojik değişikliklerin meydana gelmesi şeklindedir.

Apoptozisin hücre içinde uyarılmasında rol alan dört farklı sinyal yolağı mevcuttur. Bunlardan iki tanesi kaspaz bağımlı yolaklar iken, üçüncüsü kaspazdan bağımsız yolak, dördüncü ise endoplazmik retikulumda oluşan fonksiyonel bozuklukların oluşturduğu strese bağlı olarak uyarılan apoptozistir (Vermeulen et al, 2005).

Kaspazlar sistein proteazlardır ve aspartik asitten sonraki peptid bağıntı kırarlar. Hücrede inaktif olarak bulunurlar ve seri olarak birbirlerini aktifleştirirler. Kaspazların 7 tanesi apoptoziste rol almaktadır. Bunlar; kaspaz 2, 8, 9, 10, 3, 6 ve 7'dir. Apoptoziste hücreyi parçalayan yani apoptotik morfolojinin oluşumunu sağlayan kaspazlar 3, 6 ve 7'dir. Diğer kaspazlar ise başlatıcı rol oynayıp, apoptotik sinyali almada ve etkili kaspazları aktive etmede rol oynarlar.

Hücre dışı uyarılarla tetiklenen apoptozis (ölüm reseptörleri aracılı yolak), hücre dışı sinyalle apoptozisi başlatan plazma membran reseptörleri (FAS, TNF-R1, TRAIL-R1 gibi) reseptör süper ailesine aittir. Ölüm ligandının transmembran ölüm reseptörüyle birleşmesi sonucu oluşan sinyal sitoplazmaya iletilir ve kaspaz-8 aktive olur.

Hücre içi uyarılarla tetiklenen apoptozis (mitokindri aracılı yolak) ise, mitokondriden sitoplazmaya salınan kaspazları aktive edici proteinlerle başlatılır. mitokondriden sitokrom c'nin salınımı, apoptotik proteaz aktive edici faktör 1 (Apaf-1)' in aktivasyonuna yol açar. Sitokrom C ve ATP'nin varlığında Apaf-1'in CARD domaini prokaspaz 9'un CARD domaini ile temasa geçer ve mitokondriyal ölüm resptörünü uyarıcı sinyal kompleksi (DISC=Apoptozom) oluşur. Apoptozomla ilişkili kaspaz 9 aktif hale geçerek kaspaz 3,6 ve 7'yi aktifleştirir.

Nekrozis, apoptozisten farklı olarak enfeksiyon, inflamasyon ve iskemi (belli bir bölgede kan akımının kesilmesi) gibi patofizyolojik durumlarda gözlenir (Coşkun ve diğ., 2011). Hücre membranının bozulması, organel degradasyonu ve hücrede şişme gibi kendine özgü belirgin morfolojik özelliklere sahip bir ölüm tipidir.

Otofajik hücre ölümü ise, organellerin lizozomlarda yıkılmasındaki artışa bağlı olarak hücrenin ölüme sürüklenmesidir. Apoptozise benzer şekilde, fizyolojik

şartlar altında gerçekleşen bir hücre içi olaydır ancak hücrede kromatin kondensasyonu gözlenmez.

Hücre içi yapıların lizozomlara hangi yolla taşındığına bağlı olarak; mikrootofaji, şaperonlar aracılı otofaji ve makrootofaji olarak sınıflanıdırılır. Mikrootofaji, lizozom membranının ie çökmesi ile sitoplazmanın lizozom tarafından doğrudan yıkılmasıdır. şaperonlar aracılı otofaji ise Lys-Phe-Glu-Arg-Gln motifli proteinlerin lizozom zarına seii biçimde taşınması ile gerçekleşir (Arslan ve diğ., 2011). Makrootofaji, sitoplazmanın parçalarının ve organellerin çift zarlı vakuollerde paketlenmesi ve yıkım için lizozomlara veya endozomlara taşınmasını sağlayan otofagozom oluşumu ile karakterizedir.

1.2.4. Hücresel Sağlığın Korunmasında İmmün Sistemin Rolü

İmmun sistem, immün hücreleri, lenf dolaşım sistemi, lenfoid organları (timus, dalak, lenf bezleri) içine alan kompleks bir sistemdir. İmmün sistem hücreleri T ve B lenfositleri olmak üzere iki ana tiptir. Lenfositler birincil lenfoid organlarda (T lenfositlerinin yerleşim yeri olan timus, B lenfositlerinin yerleşim yeri olan kemik iliği), yerleşim gösterir ve işlevsel özellik kazanırlar.

İmmunite, patojenlerin neden olduğu zararlı etkilere kaşı korunma durumudur. Konak savunması değişik şekillerde olabilir; (1) mekanik-kimyasal savunma, (2) doğal bağışıklık ve (3) kazanılmış bağışıklık. Mekanik ve kimyasal savunma sürekli çalışırken, doğal immun yanıt hızla aktive olur fakat farklı patojenleri ayırt edebilme özelliği sınırlıdır. Buna karşın kazanılmış immun yanıtın oluşumu günler alır ve yüksek derecede zgldr.

Patojenlere karşı konak savunmasının ilk kademesi mekanik ve kimyasal savunmadır. Mekanik savunmaya örnek olarak deri ve epitel; kimyasal savunmaya örnek olarak ise düşük pH'lı mide salgıları ve ter sıvısındaki lizozim verilebilir.

Doğal bağışıklık sistemi, mekanik ve kimyasal savunmanın düşmesi ve bir patojenin girişinin saptanması ile aktive olur. Doğal immun sistem hücreleri makrofajlar, nötrofiller ve dendritik hücreler olup fagositoz yapabilme yeteneğine sahiptirler.

Doğal immun sistemin diğer bir önemli öğesi olan kompleman, bir grup serum proteininden oluşan, mikrobiyal ve fungal yüzeylere bağlanabilen proteinlerdir. Bu bağlanma proteolitik bir kaskad yaratarak, patojenin koruyucu zarını geçirgen bir duruma getirebilen zar saldırı kompleksini içeren por oluşturucu proteinlerin oluşumuyla sonuçlanır. Kompleman sisemini aktive eden en az üç farklı yolak mevcuttur. Klasik yolak, kazanılmış immun yanıt sonucu gelişen antikora ve bu antikolların mikroorganizma yüzeyine özgül olarak bağlanmasına ihtiyaç duyar.

Birçok mikrop yüzeyi alternatif yolak vasıtasıyla komplemanı doğrudan aktive eder. Sonuçta mannozca zengin hücre duvarı içeren patojenler mannoz bağlayan lektin yolağı vasıtasıyla komplemanı aktive eder. Bağlanan lektin, iki adet mannoz bağlayan lektinle ilişkili proteaz, MASP-1 ve MASP-2'nin aktivasyonunu başlatarak, kompleman zincirindeki diğer bileşenleri aktive eder.

Doğal immun yanıt, bakteriyel saldırılara ek olarak, virüsle enfekte hücrenin varlığı tespit edildiğinde doğal öldürücü (NK) hücreler aktive olur. Virüsle enfekte birçok hücre, NK hücreleri aktive eden Tip 1 interferonlar üretir. Aktive olmuş NK hücreleri de viral partikülü üreten kaynağı yok eder.

Her bir B lenfosit, tek bir diziye sahip bir Ig taşıy ve bu yüzden tek bir antijene karşı özgüllüğü vardır. Antijenin tanınmasıyla sadece bu antijene özgü reseptör taşıyan B lenfosit aktive olacak ve çoğalacaktır. Antikorların antijen özgüllüğü, değişken veya komplementer tanımlama bölgesi denilen ve yüksek düzeyde değişkenlik gösteren değişken domainlerle sağlanır. Bu aşırı değişken bölgeler değişken domainlerin ucunda yer alır ve bir antikora özgül olan antijenle özgül temaslar oluşturur. Bir virüse veya mikrobik yüzeye bağlanmış antikorlar, Ig'lerin Fc kısmına özgü reseptör taşıyan hücrelerce doğrudan tanınır. Ig'lerin her bir sınıf ve alt sınıfına özgül olan bu Fc reseptörleri (FcR) yapısal ve işlevsel heterojenite gösterir. FcR bağımlı olaylar vasıtasıyla makrofaj ve dendritik hücreler gibi fagositik hücreler antikorlarla kaplı partiküllere bağlanır, opsonizasyon denilen yol ile onları sindirir ve yok eder. Fc bağımlı aynı zamanda viral veya diğer antijenleri taşıyan hedef hücrelere bağlı antikorlar vasıtasıyla immun sistem hücrelerinin doğrudan bağlanmasını sağlar. Bu bağlanma, immun sistem hücrelerini, toksik küçük molekülleri (oksijen radikalleri gibi) veya perforinler ve granzimler içeren sitotoksik granül içerikleri salgılamaları yönünde uyarır ve sonrasında hedefi öldürür. "**Antikor bağımlı hücre aracılı sitotoksik**" etki olarak adlandırılan bu olay, immun sistem hücrelerinin nasıl kazanılmış immun yanıt oluşturduğunu ifade eder.

Sonuç olarak immun sistem, doğuştan veya sonradan edinilebilen mekanizmalarla, patojenlerden ve kanser hücresine farklılaşma potansiyeli bulunan neoplastik hücrelerden koruyarak, hücrenin sağlıklı bir şekilde yaşamını sürdürülmesine doğrudan katkı sağlamaktadır.

1.2.5. Hücre-Doku-Organ Sistemlerinin Bütünlüğünü Sağlayan Mekanizmalar

Hücre-doku-organ sistemlerinin dinamik olarak örgütlenmesi canlılığın sağlıklı bir şekilde sürdürülebilmesi için gerekli şartlardan biridir. Anjiyogenez, önceden var olan damarlardan yeni kan damarlarının oluşturulması olayı, vaskülogenez ise dolaşımda bulunan endotel hücre öncüllerinin (endotel progenitör

hücreler) daha önceden var olan herhangi bir damardan köken almadan olgun endotel hücrelere dönüşerek yeni damarlar oluşturmaları olarak bilinir (Carmeliet ve Jain., 2003; Folkman ve Shing, 1992). Embriyogenez ve fetal gelişim sırasında sürekli görülen bu iki olay, kan damarı oluşumunu açıklayan iki temel mekanizmadır (Ferrara, 2004).

Yetişkinlerde fizyolojik anjiyogenez ovulasyon, yara iyileşmesi, plasenta formasyonu, kemik tamiri gibi olaylarla sınırlıdır (Auerbach ve Auerbach, 1994; Reynolds ve Redmer, 1998). Tümör gelişimi, ilerlemesi, yayılması ve metastaz, yaşlanmaya bağlı dejenerasyon, sedef hastalığı, romatoid artrit, hemanjiyom, kronik akciğer hastalıkları gibi hastalıkların gelişimi sırasında meydana gelen anjiyogenez ise patolojik anjiyogenez olarak adlandırılır (Yamamoto ve diğ., 1997; Carmeliet ve Jain., 2000).

Anjiyogenez doku kütleindeki ve bunun sonucu olarak besin ve oksijen ihtiyacındaki artışa cevap olarak oluşan karmaşık bir mekanizmadır (Tong ve diğ., 2004). Anjiyogenezin başlaması proanjiyogenik ve anti-anjiyogenik uyaranlar arasındaki denge ile düzenlenir (Tong ve diğ., 2004; Hanahan ve Folkman, 1996; Fidler ve diğ., 2001).

Anjiyogenezin başlaması; vasküler endotel çoğalma faktörü ailesi (VEGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D), fibroblast çoğalma faktörü (FGF), trombosit kökenli çoğalma faktörü (PDGF), hepatosit çoğalma faktörü (HGF) gibi proanjiyogenik çoğalma faktörlerinin endotel hücrelerini aktive etmesi ile tetiklenir (Yamamoto ve diğ., 1997; Hanahan ve Folkman, 1996). Bu anjiyogenik faktörler tümör hücrelerinde ve komşu stromal hücrelerde üretilirler, bunlar çevredeki endotel hücrelerinde bulunan reseptörlerine bağlanırlar ve anjiyogenik sinyallerin aktarımını sağlarlar (Shimizu ve Oku, 2004). Endotel hücrelerin ana kapiller veya venülün bazal laminası boyunca ilerleyebilmesi, var olan kan damarını çevreleyen bazal laminada bir açıklık oluşturulmasını gerektirir; bazal membran ve ekstrasellüler matriksin yıkımı için proteazlar üretilir. Endotel hücreleri CD31, CD144, $\alpha\beta 3$ integrinler gibi hücre membran adhezyon molekülleri sayesinde bozulmuş ekstrasellüler matrikse (ECM) göç ederler. Bu göçün ardından endotel hücreleri yeni kan damarı yapımı için gerekli hücre sayısını sağlamak amacıyla çoğalırlar. Yeterli miktarda çoğalmanın ardından üç boyutlu tüpsü yapı oluşumu gerçekleşmektedir (Auerbach ve diğ., 2003; Ferrara, 2004; Kahn ve diğ., 2000). Proliferasyon durur, hücreler morfolojilerini değiştirerek bir lümen oluşturacak şekilde birbirlerine sıkıca tutunurlar. Çoğunlukla perisitlerin ve vasküler düz kas hücrelerin endotelyuma katılması ve yeni bazal membranın sentezlenmesi ile anjiyogenez tamamlanır (Ferrara, 2004). Endotel hücrelerinin yeni damar oluşumu sırasında göç edebilmesi hücre adezyon molekülleriindeki

değişiklikler sayesinde olur. Bu değişiklikler hem hücre-hücre hem de hücre-ECM arasındaki sinyalizasyonu etkiler (Güç, 2004).

Hücre-doku-organ bütünlüğünün kurulmasıyla ilişkili ikinci örgütlenme basamağındaki moleküller genel olarak adezyon molekülleri adı altında incelenir. Adezyon molekülleri fonksiyonlarına ve yapılarına göre dört sınıfta incelenmektedirler: integrinler, selektinler, immünglobulin süper-ailesine dahil adezyon molekülleri ve kaderinler.

İntegrinlerin, yapıları ve fonksiyonları Ca^{2+} , Mg^{2+} bağımlıdır. Arginin-glisin-asparagin (RGD) aminoasit dizilerine sahip moleküllere bağlanma özelliği gösterir. Bu diziler hücre-ECM glikoproteinlerinde, bazı hücrelerin yüzeyinde ve bazı kompleman proteinlerinde bulunur. Sitoplazmik kısımları ile vinkulin, talin, aktin, α -aktinin, tropomiyozin gibi hücre içi iskelet yapısı elemanlarıyla etkileşirler. Aktif hale geçen bir hücre sitoplazmasından sinyal iletilindiğinde, integrinlerin hücre-dışında kalan kısmı şekil değişimi göstererek kendi ligandına olan afinitesini artırır. Bu işleme içeriden-dışa (inside-out) sinyal iletimi denir. Bu işlem adezyon molekülleri arasında bir tek integrinlerde görülür. İntegrinlerin ligandına bağlanması ile bu kez dışarıdan-içeriye (outside-in) sinyal mekanizması çalışır; bu da hücre içerisinde apoptozisten proliferasyona kadar birçok olayda rol alır. Embriyolojik gelişim, hemostazis, tromboz, yara iyileşmesi, immün savunma mekanizmaları gibi birçok fizyolojik olayda hücre-hücre ve hücre-matriks adezyonuna katılırlar (Güç, 2004).

Selektinler; bulundukları dokuya ve hücre yüzey molekülleri ile ilişkilerine göre L-Selektin (CD62L), P-Selektin (CD62P), E-Selektin (CD62E) olmak üzere üçe ayrılır. L-selektinler, hemen tüm nötrofiller ve monositlerde, T ve B lenfositlerin büyük bölümünde ve NK hücrelerinin bir alt grubunda eksprese olurlar. E-selektinler, endotel hücresi üzerinde bulunurlar ve ekspresyonları IL-1, TNF- α gibi inflamatuvar uyarılara cevaben artar. P-selektinler, trombositler ve endotel hücreleri üzerinde bulunurlar. Bu gruptaki selektinler trombin, histamin, protein kinaz C, kompleman fragmanları gibi çeşitli mediatörlerle uyarılabilir (Güç, 2004).

Kaderinler; üzerinde bulundukları dokulara göre isimlendirilirler ve bugün bilinen beş kaderin grubu vardır. Kaderinler embriyoda morfogenezden, erişkin organizmada seçici hücre tanınmasından ve yaşam boyu normal doku mimarisinden sorumlu hücre yüzey glikoproteinleridir. Embriyoda özgün adezyon moleküllerinin ekspresyonu hücre göçü ve doku diferansiyasyonu için gereklidir. E-kaderin ekspresyonu azalan epitel hücrelerinde diferansiyasyonunun azaldığı ve göç kabiliyetlerinin arttığı belirlenmiştir (Güç, 2004).

İmmünglobulin (Ig) süper-ailesi; Ig benzeri bölgeler içeren hücre yüzey moleküllerinin olduğu bir gruptur. Kaderin ve selektinlerden farklı olarak Ig süper

ailesi üyeleri, Ca^{2+} 'dan bağımsız hücre yapışma molekülleri olup, hücre-hücre adezyonundan sorumludurlar. Bu aile üyeleri; ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, VCAM-1 ve PECAM'dır. ICAM-1 yapısal olarak endotel hücrelerinde eksprese olur. ICAM-2'nin endotel hücrelerindeki ekspresyonu ICAM-1'e göre daha fazladır. Tümör nekrozis faktör (TNF), interlökin-1 beta (IL-1 β) ve interferon- γ (IFN- γ) salınımının ardından ICAM-1 ve VCAM-1 miktarında artış olur (Güç, 2004).

Anjiyogenez sürecinin düzenlenmesini sağlayan moleküller, hücre proliferasyonunu da tetiklerler. Bu nedenle karsinogenez sürecinde önemli rol oynarlar. Örneğin; anjiyogenez sürecinde önemli moleküllerden biri olan EGF, sonucunda hücre proliferasyonunu arttıracak çok sayıda genin upregüle olmasını sağlar. Kansereleşmiş hücrelerin diğer dokulara yayılması da anjiyogenez ile sağlanır. Diğer yandan hücrelerde adezyon moleküllerinin sentezi azaldığında komşu hücreler ile etkileşimleri azalır. Hücre-hücre etkileşimlerinin azalması da, hücrelerin normal dokudan farklılaşmalarını ve dolayısıyla kansereleşme potansiyellerini artırır.

1.2.6. Hücredeki Enerji Metabolizmasının İşleyişi

Hücrede metabolik olaylar dinamik bir denge halinde düzenlenmektedir; anabolik ve katabolik olaylar arasında gayet ince olarak ayarlanmış bir denge bulunmaktadır. Bu denge sayesinde hücrenin kimyasal kompozisyonu değişmeden kalır. Metabolitlerin nasıl ve nerede yapılacağı veya nerede kullanılacağı çoğalma faktörleri ve sitokinlerin dahil olduğu ekstrasülüler sinyalizasyon mekanizmaları ile kontrol edilir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, hücresel metabolizmanın apoptozisin düzenlenmesinde de rol aldığını göstermiştir. Metabolizma ve apoptozis arasındaki bağlantı enerji metabolizması ile kurulur ve bu bağlantıdaki temel organel mitokondridir. Mitokondri, sitoplazmadaki metabolitleri kullanarak trikarboksilik asit döngüsünü (TCA), beta oksidasyonu ve oksidatif fosforilasyonunun gerçekleşmesini sağlayarak yaşam için gerekli olan ATP sentezini sağlar. Farklı hücre tiplerinin farklı metabolik ihtiyaçları vardır. Hızlı çoğalan hücreler çok miktarda enerjiye, yavaş çoğalan hücreler ise minimum enerjiye ihtiyaç duyarlar. Hücrelerde mitokondride piruvatın oksidasyonu ile glikoliz gerçekleştiği bilinmektedir. Kansere hücrelerinin sitosolünde ise laktik asit fermentasyonu ile yüksek oranda glikoliz ile enerji üretilir. Kansere hücrelerinin hücrenin oksijenden bağımsız olarak oldukça yüksek glikoliz oranıyla karakterize bir metabolik motif göstermesi Warburg etkisi olarak bilinir.

Mitokondri hücresel enerji metabolizmasındaki kilit görevinin yanı sıra, intrinsik apoptoziste de rol alan bir organeldir. Pro ve anti apoptotik Bcl-2 ailesine ait

proteinler mitokondri dışı zarının geçirgenliğini değiştirerek pro apoptotik bir molekül olan sitokrom c'nin salınmasına, sitokrom c ise kaspaz aktivasyonuna neden olarak hücreyi apoptozise götürür. Apoptozis, nekrozun aksine enerji bağımlı bir işlemdir. Yeterli miktarda ATP yoksa apoptoz gerçekleşmez.

1.2.7. Hücresel Bilgi Akışının Düzenleyicilerinden Biri Olan Epigenetik Mekanizmalar

Genomdaki bilgilerin ne zaman, nerede ve ne sıklıkla okunacağını belirlenmesinde 90'lı yılların sonuna kadar kabul edilen mekanizmalar, genlerin düzenleyici bölgesinde bulunan promotor, operator, enhancer, silencer gibi dizi motiflerine transkripsiyon faktörlerinin, aktivatör ve represör proteinlerin bağlanmasını ve etkileşiminin cis ve trans olarak düzenlenmesini içeriyordu. 2000'li yıllardan itibaren ise, genlerin sessizleştirilmesinde RNA interferans, mikro RNA'lar gibi post transkripsiyonel kontrollerin de önemli rol oynadığı gösterildi. Daha da önemlisi, genlerin ekspresyonunda transkripsiyon öncesi moleküler olayların da transkripsiyon faktörleri kadar önemli olduğu anlaşıldı. Kavram karmaşıklığını azaltmak için bu olaylar "epigenetik" kavramı altında toplanmaya çalışıldı ve zaman içerisinde epigenetiğin tam olarak neyi ifade edip etmediği konusu da giderek netleşmeye başladı. Genel görüş, hücre içerisinde 90'lı yılların sonuna kadar bilinen gen ekspresyonu mekanizmaları dışında kalan bütün mekanizmalar epigenetik kavramı altında toplanmaya çalışılsa da, epigenetik esas olarak transkripsiyonel kontrol öncesi genomun ve ilgili genin transkripsiyona hazır hale getirilmesiyle ilgili bütün moleküler olayları ve mekanizmaları kapsar. Bu moleküler olaylar ve mekanizmalar üç başlık altında toplanabilir. Birincisi; kromatinin yeniden modellenmesi (transkripsiyona izin veren/vermeyen paketlenme) ile ilgili moleküler olaylar; ikincisi; histon paketçiklerine sarılmış DNA'nın transkripsiyona açık veya kapalı hale gelmesine yönelik histon kodları veya modifikasyonları (asetilasyon /deasetilasyon, metilasyon/demetilasyon, fosforilasyon/defosforilasyon gibi); üçüncüsü ise; genlerin düzenleyici bölgesine yakın yerde bulunan CG adacıklarının metilasyon durumlarıdır (5metil sitozin aracılığıyla hipo/hipermetilasyon düzeyleri). Son yıllarda bazı araştırmacılar kodlama yapmayan RNA'ların da gen ekspresyonu üzerine etkilerini epigenetik kavramı altında sınıflandırmışlardır (Murrell ve diğ., 2005).

DNA metilasyonu/demetilasyonu, DNA da belirli tekrarlayan dizilerdeki CpG adacıklarındaki sitozinin 5 nolu karbonuna DNA metiltransferaz enzimleri aracılığıyla metil gruplarının eklenmesi/çıkarılması olaylarını içerir. Her bir CpG adacığındaki

metilasyon ve demetilasyon deseni karakteristiktir, dolayısıyla hücrede bazı genler hipermetile veya hipometile durumdadır.

Bir genin metillenme derecesi ile ifade edilme derecesi arasında ters bir ilişki vardır. Yani, düşük derecedeki metillenme yüksek oranda gen ifadesi ile yüksek oranda metillenme ise düşük seviyede gen ifadesi ile bağlantılıdır. Hipermetilasyon, transkripsiyon inaktivasyonu ile, hipometilasyon ise transkripsiyon aktivasyonu ile sonuçlanabilir. Çünkü hipermetilasyon o gene özgü transkripsiyon faktörlerinin ilgili DNA bölgelerine tutunmasını engeller.

Başta tümör supresör genler olmak üzere DNA tamir genleri, hücre siklus regülatörleri, apoptozis ve transkripsiyonla ilişkili genler gibi genomda hayati fonksiyonu olan pek çok gen metilasyon/demetilasyon işlemleri ile aktive/inaktive edilir.

DNA metilasyonundan sorumlu enzimlerin genel adı DNA metil transferazlardır (DNMT). DNMT enzimleri oluşturdukları DNA metilasyon desenleri hem gen ekspresyonunu düzenler hem de genom stabilitesini korurlar.

DNMT'ler geniş bir enzim ailesidir. Bunlardan DNMT1, DNMT3a ve DNMT3b şimdiye kadar en çok çalışılmış DNA metiltransferazlardır. DNMT1, somatik hücrelerde en çok bulunan DNMT'dir. (Ballestar ve Esteller, 2005). Replikasyon alanında lokalizedir, yarı metillenmiş DNA'yı metillenmemiş DNA'ya nazaran 10-40 kat daha fazla metiller. Ayrıca DNMT1'nin metilasyonun sürdürülmesinden sorumlu enzim olduğu bilinmektedir (Bird, 2002; Ballestar ve Esteller, 2005).

DNMT3a ve DNMT3b *de novo* metilleyici enzimlerdir. Hem metillenmiş hem de metillenmemiş DNA'yı kalıp olarak kullanırlar. DNMT3b'nin karboksi terminal katalitik bölgesindeki mutasyonların immün yetersizlik, sentromerik instabilite, fasial anomaliler ile ilişkisi gösterilmiştir (Laird ve Jaenisch, 1996).

DNMT'ler histondeasetilazlarla birlikte çalışarak transkripsiyonu engelleyici fonksiyon gösterirler. Başta tümör baskılayıcı genler olmak üzere DNA tamir genleri, hücre siklus regülatörleri, apoptozis ve transkripsiyonla ilişkili genler gibi genomda hayati fonksiyonu olan pek çok gen hipermetile hale getirilerek inaktive edilir.

Histon modifikasyonları; Ökaryotik organizmalarda genetik materyal hücre içinde çekirdek gibi kısıtlı bir alana sığdırılmak zorundadır. Bu nedenle DNA çeşitli yoğunlaşmalara ve katlanmalara maruz kalır. Bu yoğunlaşmaların ilk basamağını DNA'nın histon proteinleri etrafında sarılması oluşturur. H1, H2A, H2B, H3, H4 olmak üzere beş çeşit histon proteini mevcuttur. Bu proteinlerden H2A, H2B, H3, H4'ten ikişer tanesi bir araya gelerek oktomerik histon kompleksini oluştururlar. H1 proteini de bu yapıya katılır ve nükleozom yapısı oluşur. 146 baz çiftlik DNA bu yapı

üzerinde iki kez dolandır. Daha sonra nükleozomlara paketlenmiş durumdaki DNA daha da katlanarak yoğunlaşmış kromotin yapılarını oluşturur (Grant, 2001).

Transkripsiyonunun gerçekleşebilmesi için normalde transkripsiyona izin vermeyen bu kromotin yapılarının yeniden düzenlenmesi gerekmektedir. Bu yeniden düzenlenme olayında kromotinin yapıtaşları olan nükleozomları oluşturan histonların kimyasal modifikasyonları belirleyici rol oynar.

Bu modifikasyonlar nükleozomların yapısındaki histon proteinlerin asetilasyonu/ deasetilasyonu, fosforilasyonu/ defosforilasyonu, metilasyonu/ demetilasyonu, ubiquitinasyonu/ deubiquitinasyonu gibi işlemleri içerir (Ballestar ve Esteller, 2005).

Histon asetilasyonu; histon proteinlerinin asetilasyonunun iki fonksiyonu vardır. Birincisi; pozitif yüklü lizin aminoasitlerini nötralize etmesi, ikincisi ise histon uçları ile yapısal proteinler arasındaki bağları destabilize etmesidir. Kromozomların “aktif gen” bölgelerindeki H3 ve H4 proteinlerine ait lizin aminoasitleri hiper asetillenmiş formdadırlar (Ballestar ve Esteller, 2005).

Histon proteinlerine asetil gruplarını ekleyen enzim Histon Asetiltransferaz (HAT) olarak adlandırılır. Bu işleme zıt olarak, histon proteinlerinden negatif yüklü asetil gruplarının çıkarılması, histonların daha fazla pozitif yüklenmesine sebep olur. DNA histonlara daha sıkı bağlanır ve transkripsiyon faktörleri DNA ya bağlanamadığı için transkripsiyon engellenmiş olur. Histonlar histon deasetilaz enzimi (HDAC) deasetillenir (Ballestar ve Esteller, 2005).

Histon metilasyonu, arginin ve lizin aminoasitlerine metil grubunun eklenmesiyle gerçekleştirilir. Bu modifikasyon nükleozomun özelliğini değiştirir ve diğer proteinlerle etkileşimini etkiler. Arginine, peptidilarginin metiltransferazlar (PRMT) tarafından, Lizine ise lizin metiltransferazlar tarafından bir ya da iki metil grubu eklenebilir (Ballestar ve Esteller, 2005).

Histon fosforilasyonu; Negatif yüklü fosfor gruplarının histon proteinlerine eklenmesi histonların pozitif yükünü nötralize ederek DNA ya olan afinitelerini azaltır. H1, H2A, H2B, H3 ve H4 histonlarındaki serin ve treonin aminoasitlerinde meydana gelir. H3 histonlarındaki serin aminoasitlerinin memeli hücrelerindeki gen aktivasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. H2A histonlarındaki yine serin aminoasitlerinin fosforilasyonunun mitotik kromozom yoğunlaşmasıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Ballestar ve Esteller, 2005). Histonlar mitoz sırasında fosforillenirler. Histonlar sinyal iletişimde de fosforilasyon gösterirler.

Histon ubiquitinasyonu; Histon proteinlerin C (Karboksil) terminaline yakın lizin aminoasitlerine ubiquitin proteinlerinin aktarılması ile karakterize modifikasyon şeklidir. En sık H2A ve H2B histonları ubiquitinlenir. Transkripsiyonel aktif gen

bölgelerinde ubiquitinlenen histon proteinlerin yaygın olarak bulunmalarından dolayı gen regülasyonunda görev aldıkları düşünülmektedir (Ballestar ve Esteller, 2005).

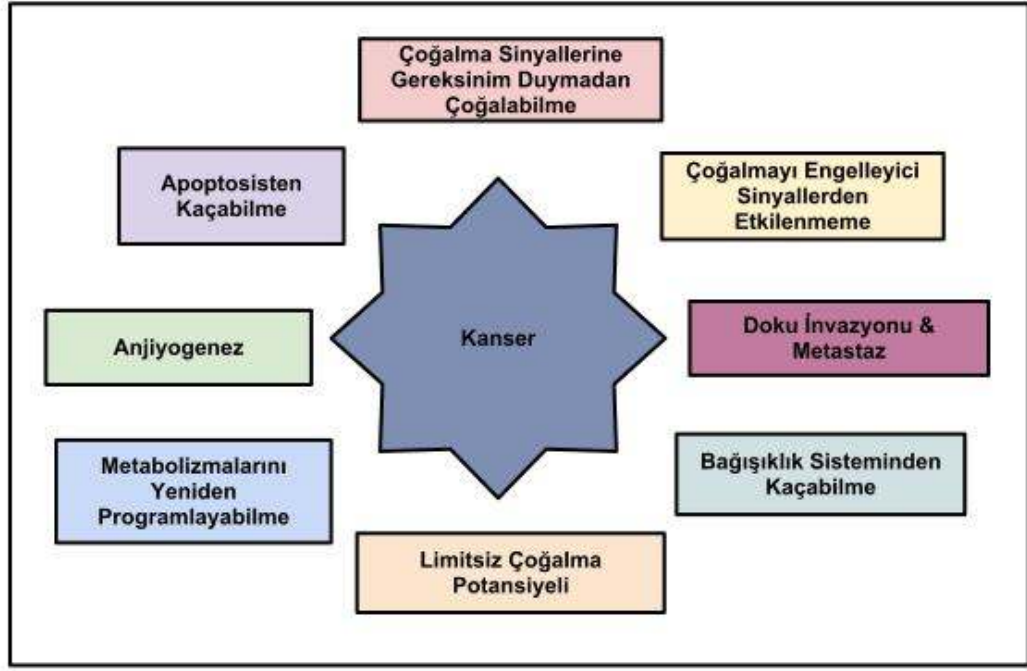
1.3. Kanser

Hücrelerin kontrolsüz çoğalması, apoptotik ve antiapoptotik mekanizmalarının düzensiz işleyişi ve bulundukları dokudan diğer dokulara yayılmasıyla karakteristik bir hastalık olan kanserin 100'ün üzerinde çeşidi vardır. Genel olarak köken aldıkları dokuya göre sınıflandırmaları yapılır. Epitelyal hücrelerinden köken alanlar “karsinom”, mezoderm hücrelerinden (kemik, kas gibi) köken alanlar “sarkom”, meme hücreleri gibi salgı bezi hücrelerinden köken alanlar ise “adenokarsinom” olarak adlandırılırlar.

Kökenleri, moleküler ve hücresel mekanizmaları birbirlerinden farklı olsa da, Hanahan ve Weinberg 2000 yılında yaptıkları derlemede, kanser hücrelerinin karakteristik özelliklerini altı temel kategoride özetlemişlerdir. Bu özellikler; (1) çoğalma sinyallerine gereksinim duymadan çoğalabilmeleri, (2) çoğalmayı engelleyici sinyallerden etkilenmemeleri, (3) apoptotik hücre ölümünden kaçabilmeleri, (4) limitsiz çoğalma potansiyelleri, (5) yeni damar oluşturabilmeleri (anjyogenezis) ve (6) metastaz yapabilmeleridir (Hanahan ve Weinberg, 2000).

Hanahan ve Weinberg'in 2011 yılında yaptıkları güncellemede, yapılan araştırmalar ışığında kanser hücrelerinin iki yeni karakteristik özelliğinin daha bu listeye eklenmesi gerektiğini vurgulamışlardır. Bu özelliklerden ilki, kanser hücrelerinin sürekli çoğalma potansiyelini sürdürebilmek için hücresel metabolizmalarını yeniden programlayabilmeleridir. Diğer özellikleri ise bağışıklık sisteminden, özellikle T ve B lenfositlerinden, makrofajlardan ve natural killer hücrelerden kaçabilmeleridir (Hanahan ve Weinberg, 2011) (Şekil 1.5).

Yukarıda özetlendiği gibi kanser hücrelerinde meydana gelen bozuklukların aydınlatılması ve bunların araştırılması, yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi ve kanser tedavisi süreçlerine katkı sağlayacaktır.

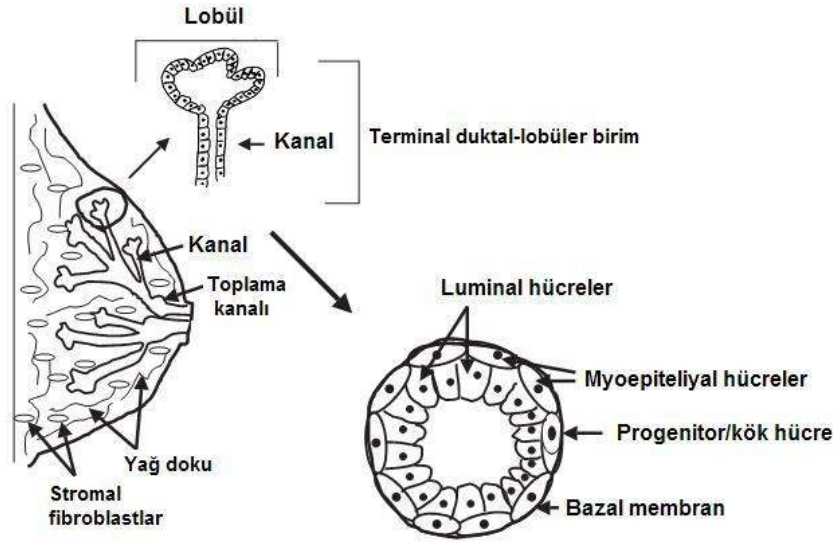


Şekil 1.5: Kanser hücresinin karakteristik özellikleri.

1.4. Meme Kanseri

Meme dokusu; epiteliyal parankim, kas, bağ ve yağ doku, kan damarları, lenf ve sinir sisteminden oluşmaktadır. Epiteliyal parankim, alveolun kanalcıklarının birleşerek oluşturduğu lobüllerden ve her biri ayrı bir kanal ile meme başına açılan 20 veya daha fazla lobdan oluşur (Şekil 1.6) (Batson, 1942).

Meme kanseri, lobülleri ya da süt kanallarını oluşturan hücrelerin kontrolsüz çoğalmaları ve vücuttaki diğer dokulara yayılarak çoğalmaya devam etmeleriyle gelişir. Süt kanallarından kaynaklanan kansere duktal karsinom, lobüllerden kaynaklanan kansere de lobüler karsinom adı verilmektedir.



Şekil 1.6: Meme bezi (Dimri ve diğ., 2005).

Meme kanseri, dünya çapında kadınlarda en sık görülen (%23) kanser tipidir ve kansere bağlı ölümlere bakıldığında akciğer kanserinin ardından ikinci sırada yer alır. 2008 yılında, dünyada yaklaşık 1.38 milyon kadına meme kanseri tanısı konulduğu ve bu hastaların üçte birinin (460.000 kişi) öldüğü bilinmektedir (Giuliano, 2009).

Türkiye'deki en güncel meme kanseri istatistiği 2005 yılında sağlık bakanlığı tarafından yapılmıştır ve bu istatistiklere göre meme kanseri %35.47'lik oranla ülkemiz kadınları arasında en yaygın görülen kanser tipidir. Meme kanserinin görülme sıklığı, son yıllarda giderek artmıştır. Bu artışın ekzojen hormonlar, mensturasyon durumu (erken menarş, geç menopoz), kilo, beslenme biçimi ve alkol tüketimi ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Beral ve diğ., 2003; Reeves ve diğ., 2007; Monninkhof ve diğ., 2007). Meme kanserinde yaş ve cinsiyet en önemli risk faktörleridir. Otuz yaşın altındaki kadınlarda meme kanseri görülme oranı, menopoz ve sonraki dönemler ile karşılaştırıldığında daha düşüktür (Rogers ve diğ., 2002). Erkeklerde ise meme kanseri tüm vakaların %1'ini oluşturmaktadır (Giordano ve diğ., 2004). BRCA-1 ve BRCA-2 gibi tümör baskılayıcı gen mutasyonları, ailede meme ve yumurtalık kanseri bulunması gibi genetik faktörler de hastalığın ortaya çıkma riskini arttırmaktadır (Armstrong ve diğ., 2000).

1.4.1. Meme Kanserinin Moleküler Biyolojisi

Meme kanseri hem genetik hem epigenetik mekanizmalardaki bozukluklardan kaynaklanır. Bu bozuklukta hem ekzojen hem endojen kaynaklı iç ve dış çevresel faktörler rol oynadığı gibi, atalarından kalıtılan bozuk genler de rol alır.

Meme kanserinin hem kalıtsal (ailel) hem de sporadik tipleri mevcuttur. Birincil veya ikincil derece akrabalarında birden fazla kişide meme kanseri görülen ve diğer kanserlerin metastaz yapması sonucu (sekonder) oluşmamış olan meme kanserleri kalıtsal (ailel) meme kanserleri olarak tanımlanır (Beckmann ve diğ.,1997).

Meme kanserlerinin %5-10'unda meme kanserine yatkınlık genlerinde mutasyonlar görülmektedir. Bu genlerden BRCA1, BRCA2, PTEN, TP53, LKB1/STK11 ve CDH1 yüksek risk genleri, CHEK2, TGF- β 1, CASP8 ve ATM ise düşük risk genleri olarak kabul edilmektedir. BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki mutasyonlar kalıtsal meme kanserlerinin üçte birinden sorumludur (Beckmann ve diğ.,1997).

Kalıtsal meme kanserlerinin %40'ında BRCA 1 geninde ve %30'unda BRCA2 geninde mutasyonlar saptamıştır. Bu mutasyonlar bazı popülasyonlarda daha sık görülmektedir. Örneğin; Aşkenaz Yahudi kadınlarının %2'si BRCA1 185 del AG (185. bazda AG delesyonu), BRCA1 5382 ins C (5382. pozisyona ekstra baz eklenmesi) veya BRCA1 6174 del T (6174. pozisyonda T bazının delesyonu) mutasyonlarını taşır. BRCA2 999 del 5 (999. pozisyonda 5 bazın delesyonu) mutasyonu ise bu kadınlarda görülen kalıtsal meme kanserlerinin yaklaşık %50'sinden sorumludur (McPherson, 2000).

İki üç kuşak boyunca birinci dereceden akrabalarında meme kanseri öyküsüne rastlanmaksızın meme kanseri gözlenen hastalar **sporadik meme kanseri** hastalarıdır. Ailede meme kanseri ile birlikte farklı bir tip kanser öyküsü olan, otozomal dominant geçiş gösteren meme kanseri hastaları bu gruba dahil edilmektedir (Beckmann ve diğ.,1997).

Sporadik meme kanserleri, kalıtsal mutasyonlar yerine ilk defa bireyin genomunda ortaya çıkan ve tamir sistemleri tarafından düzeltilemeyen mutasyonların birikimi sonucu oluşur. Onkogenlerin aktivasyonu ile birlikte tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ve bunların yanında bu genlerin bir kaçında birden meydana gelen mutasyonların rol oynadığı bilinmektedir (Beckmann ve diğ.,1997).

Günümüzde, meme kanserinin oluşumu ve gelişimi hakkında iç ve dış faktörlerin nasıl rol oynadığına dair hipotezler ortaya konulmuştur. Örneğin; Melchor ve Benitez (2008), meme tümörlerinin bireyde ilk ortaya çıkışını "kanseri kök hücresi" hipotezi ve tümör gelişimini ve çoğalmasını ise "klonal seçilim modeli" hipoteziyle açıklamaya çalışmışlardır. Bu hipoteze göre; normal meme dokusu diğer organların aksine yetişkin yaşamı süresince çok çeşitli yapısal değişikliklere uğrar. Ergenlikle birlikte hormonal salınımlarla meme kanallarında dallanmalar başlar, hamilelik ve emzirme sırasında meme hücrelerinde çoğalma hızı artarken doku farklılaşması son

halini alır. Süt salgılanması bitiminde meme dokusu apoptozis ile hamilelik öncesi halini alır. Meme dokusunun bu şekilde çoğalabilmesi ve farklılaşabilmesi için bünyesinde “kök hücreler” veya “progenitor (öncü)” hücreler bulunması gerekir. Bu hücrelerde meydana gelen mutasyonlar sonucu tümör oluşumuna neden olan değişiklikler meydana gelecektir ve meme hücrelerindeki heterojenite ortaya çıkacaktır (Melchor ve Benítez, 2008).

1.4.2. Meme Kanserinin Alt Tipleri

Meme kanseri klinik, morfolojik ve moleküler açılardan oldukça farklılık gösteren heterojen bir hastalıktır. Bu heterojeniteyi tümör çapı, lenf nodu sayısı, histolojik derece, yaş gibi klinik parametreler veya östrojen reseptörü (ÖR), progesteron reseptörü (PR), epidermal çoğalma faktörü reseptörü 2 (EGFR2) gibi biyobelirteçleri tek başlarına kullanılarak açıklamak mümkün değildir. Son dönemde yapılan araştırmalarla, meme kanseri gelişiminde farklı moleküllerin ve sinyal yollarının rol aldığı belirlenmiştir. Bunun yanında, hücresel mikroçevrenin ve genetik yapının da hastalığın patofizyolojisini, gelişimini ve tedaviye cevabı etkilediği belirlenmiştir (Hu ve Polyak, 2008).

Meme tümörleri histolojik incelemeler sonucu 18 alt tipe ayrılabilir. Bu sınıflandırma hastalığın prognozu hakkında ipuçları verse de aynı histolojik alt tipteki hastaların tedaviye cevapları konusunda hala büyük farklar bulunmaktadır (Stingl ve caldas, 2007).

Mikroarray ile yapılan gen ekspresyon profillemesi analizlerinde araştırmacılar binlerce genin eş zamanlı ekspresyon profillerini ortaya koymuşlardır. Buna göre meme tümörlerinin sınıflandırılması tekrar yapılmıştır (Perou ve diğ., 2000). Gen ekspresyon motiflerine bakılarak yapılan sınıflandırmaya göre meme tümörleri Luminal A, Luminal B, ERBB2 (HER2), bazal ve normal-benzeri olmak üzere beş alt tipe ayrılmıştır. Bu moleküler alt tipler, normal yetişkin memede luminal epitel ile miyoepitel hücreleri olmak üzere iki temel epitelyum hücre tipi bulunduğuna işaret eder (Perou ve diğ., 2000).

Luminal tümörler, östrojen reseptör (ÖR) pozitif olup, PR, GATA3, BCL-2 ve siklokeratinlerden CK8 ve CK18'i eksprese ederler. HER2, bazal ve normal-benzeri alt tipleri ise ÖR negatiftir. ÖR pozitif ve HER2 pozitif tümörler Luminal B alt tipinde gruplandırılırlar.

HER2 pozitif tümörler, meme kanserlerinin %15-20'sini oluşturur. Yüksek miktarda HER2 ve çoğalma faktörü-bağlı protein 7 (GRB7) gibi hücre çoğalmasına neden olan genleri eksprese ederler. Hızlı çoğalma potansiyeline sahip bu

tümörlerin %40'ından fazlasında p53 mutasyonu görülür (Sorlie ve diğ., 2001; Sotiriou ve diğ., 2003).

Normal-benzeri meme tümörleri %5-10 oranında görülmektedir. Bu tümörlerde normal meme yağ dokusunda ekspresyonu olan genler eksprese edilir. ÖR, PR ve HER2 negatif tümörlerdir ancak CK5 ve EGFR ekspresyonu görülmez (Sorlie ve diğ., 2001; Sotiriou ve diğ., 2003).

Bazal-benzeri tümörler, meme kanserlerinin %10-20'sini oluşturur. Bu tümörlere bazal-benzeri denmesinin nedeni; çoğunlukla bazal epiteliyal hücreler ve normal meme miyoepitel hücrelerinde eksprese edilen CK5, CK17, P-kaderin, Kalveolin 1 ve 2, netsin, CD44 ve EGFR gibi genlerin ekspresyonun görülmesidir. Östrojen ve progesteron reseptör (PR) ve HER2 negatif (üçlü negatif) tümörlerdir (Sorlie ve diğ., 2001; Sotiriou ve diğ., 2003).

Moleküler alt tipteninin yapılmasından sonraki yıllarda yapılan çalışmalar, bu alt tiplere sahip hastaların tedaviye birbirinden farklı cevaplar verdiğini ve ortalama yaşam sürelerinin de birbirinden farklı olduğunu ortaya koymuştur (Sorlie ve diğ., 2001; Sotiriou ve diğ., 2003). ÖR pozitif Luminal A tip tümürlü hastaların prognozu iyi ve ortalama yaşam süresi uzunken, ÖR negatif, HER2 pozitif ve bazal-benzeri tümörlere sahip hastaların prognozu kötü ve ortalama yaşam süreleri oldukça kısadır. Bunun yanında, tümörün ÖR durumunun klinik özellikler ve tümör derecesinden bile daha önemli bir prognostik faktör olduğu belirlenmiştir (Sotiriou ve diğ., 2003).

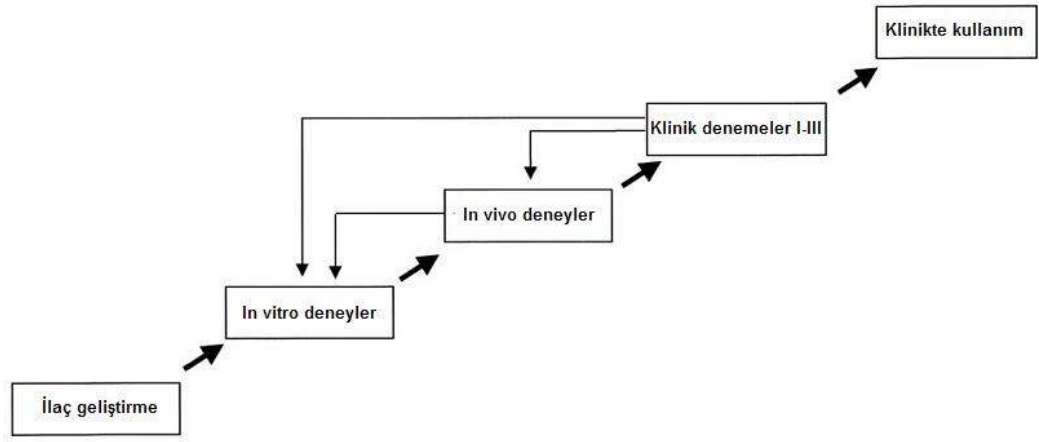
Tüm bu bulgular, meme kanserinin her hastada ve hatta hastalığın her evresinde farklılık gösterdiğini, bu nedenle her hastanın hastalığının kendine özgü olduğunu ortaya koymuştur.

1.4.3. Meme Kanseri Çalışmalarında Kullanılan Model Sistemler

İlaç tarama çalışmaları programları sonucu bulunan yeni anti kanser ilaçlar genelde hedefe yönelik üretilmektedirler. Yüksek derecede tümör spesifik özelliklere sahip olmaları nedeniyle tek başlarına veya mevcut kemoterapötiklerle kombine olarak kullanımları kanser hastaları için yeni tedavi seçenekleri anlamına gelmektedir. Hızlı bir şekilde ortaya çıkan bu ajanların temel, pre-klinik ve klinik araştırmalarla etkinliklerinin ortaya konmasındaki zorluklar klinikte kullanılmaya başlama süreçlerini zorlaştırmaktadır (Gupta ve Kuperwasser, 2004; Zips ve diğ., 2005).

İnsanlar üzerinde deney yapmanın mümkün veya etik olmadığı durumlarda, hastalıkların sebeplerini ve tedavi seçeneklerini belirlemek için model sistemler kullanılır. Günümüzde, etik, tıbbi, ekonomik kısıtlamalar ve klinik çalışmalara uygun

hastaların sayısının azlığı gibi nedenlerle pek çok araştırma deneysel sistemler kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Meme kanseri oldukça kompleks kanser türlerinden olup, bu hastalığın meme kanserini hücre düzeyinde modelleyen hücre hatları üzerinden çalışılması, tercih edilen yaklaşımlar arasındadır. Uzun yıllar boyunca araştırmacılar anti kanser ajanlara cevabı ölçümleyebildikleri çok çeşitli *in vitro* ve *in vivo* model sistemler geliştirmişlerdir. Araştırılacak anti kanser ajanın ilk denemeleri önce kanser hücre kültürlerinde, daha sonra ksenograft modellerde ve son olarak faz I, faz II, faz III klinik çalışmalarla doğrulandıktan sonra kliniğe uyarlanması mümkün olmaktadır (Şekil 1.7). (Zips ve diğ., 2005).



Şekil 1.7: Yeni anti kanser ajanların araştırıldığı translasyonel araştırmalarda izlenen strateji (Zips ve diğ., 2005).

Meme kanserini hücresel seviyede modellemede kullanılan birçok insan meme kanseri hücre hattı tanımlanmıştır. Bu hücre hatlarından çalışmamızda kullanılanlar aşağıda detaylı olarak açıklanmaktadır.

1.4.4. Meme Kanserinin Farklı Moleküler Tiplerini Modelleyen Hücre Hatları

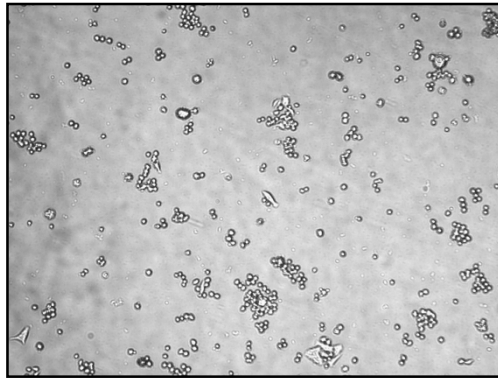
Çalışmamızda kullanılan sağlıklı hücreleri modelleyen MCF-10A ve meme kanserinin farklı moleküler alt tiplerini modelleyen MCF-7 ve MDA-MB-453 hücre hatlarının temel özellikleri aşağıda detaylı olarak verilmiştir. Ayrıca hücrelerin temel özellikleri Çizelge 1.1’de özetlenmiştir.

Çizelge 1.1: Çalışmada kullanılan meme hücre hatlarının özellikleri.

Hücre Hattı	Tipi	ÖR	P53	Kaspaz 3	Bcl-2
MCF-10A	Normal meme epitel hücresi	-	Sağlam	+	Normal
MCF-7	İnvaziv duktal karsinom	+	Sağlam	-	Fazla
MDA-MB-453	Adenokarsinom	-	Mutant	+	Az

1.4.4.1. MDA-MB-453 İnsan Meme Kanseri Hücre Hattının Özellikleri

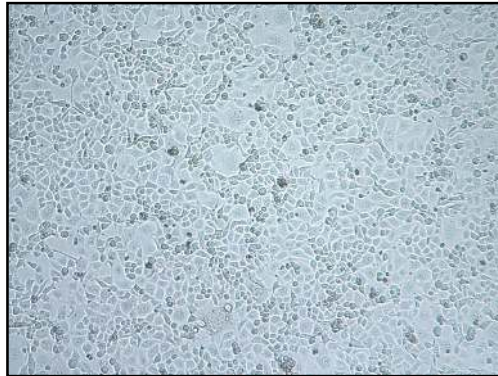
Metastatik meme kanseri olan 48 yaşında meme kanseri beyaz ırktan bir kadının plevral efuzyonundan elde edilmiş, 46 kromozoma sahip bir hücre hattıdır (Şekil 1.8). Tek tek hücreler veya küçük hücre grupları şeklinde çoğalan, ikilenme süreleri 2-3 gün olan kültürlerdir. Timusu olmayan farede tümör oluşturmaz. En önemli çoğalma regülatörlerinden olan androjen reseptörleri (AR), meme kanseri hastalarının %80'inde yüksek oranda sentezlenmektedir. MDA-MB-453 insan meme kanseri hücreleri, yüksek seviyede AR sentezledikleri için AR ile ilişkili çalışmalarda sıklıkla kullanılan bir hücre hattıdır. Androjen reseptör pozitif olmasının yanında, östrojen reseptörü, progesteron reseptörü yoktur. HER2 reseptörü ekspresyonu ise mevcuttur (Vranic ve diğ., 2011). EGFR, TOP2A, HER2 genlerinin amplifikasyonu veya aşırı ekspresyonu görülür. Hücre döngüsünde rol alan proteinlerden p16, pRb ve cyclin D1'in aşırı ekspresyonu tespit edilmiştir. K-RAS (Gly13Asp GGC>GAC) ve p53 genlerinde mutasyon tespit edilmiştir. BCL-2 gen ekspresyonu düşüktür (Vranic ve diğ., 2011).



Şekil 1.8: MDA-MB-453 hücrelerinin faz kontrast mikroskopundaki görüntüsü (10x).

1.4.4.2. MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücre Hattının Özellikleri

MCF-7 hücreleri, 64 yaşında evre IV invaziv duktal karsinomalı beyaz ırktan bir kadının plevral efüzyonundan izole edilmiştir (Soule ve diğ.,1973). Morfolojisi epitelyal olup (Şekil 1.9), insülin benzeri çoğalma faktörü bağlanma proteinleri sentezler. Ayrıca WNT7B onkogeninin ekspresyonu mevcuttur. HER-2 geninin ekspresyonu normaldir. MCF-7 hücrelerinin sitogenetik analizlerinde; kromozom sayılarındaki anormal artış ve azalış (anöploid 66-87), hatalı eşleşmiş bazların onarım sisteminde (mismatch repair) bozukluklar (Watanabe ve diğ., 2001) görülmektedir (Nieves-Neira ve Pommier, 1999). DNA'da hatalı eşleşen bazlar, DNA tamir proteinleri (mismatch repair, MMR) tarafından onarılırlar ve ayrıca genomun bütünlüğünün korunmasında görev alırlar. Hatalı eşleşmiş bazların onarımında görev alan MLH1 ve MSH2 tamir proteinleri MCF-7 hücrelerinde mutasyona uğradığı için, hücreler antikanser ajanlara karşı direnç geliştirir. Sonuç olarak, DNA tamir genlerindeki mutasyonlar ve/veya tamir proteinlerinin az veya aşırı ifadesi, direnç gelişiminde önemli bir faktördür (Schwarz ve diğ., 2002). Meme kanseri ve diğer birçok insan kanserinin oluşumunda, hücre döngüsü kontrol noktalarından siklin D1'de oluşan mutasyonlar MCF-7 hücrelerinde de mevcuttur (Nagasawa ve diğ., 1998). MCF-7 hücre hattında kaspaz -6, -7 ve -9 ekspresyonunun yanısıra BCL-2 ekspresyonu da oldukça iyidir. Diğer yandan p53 ve p21 genlerinin ekspresyonu ve düzenlenmesi normaldir (Nieves-Neira and Pommier, 1999). MCF-7 hücrelerinin çoğalma mekanizmalarında; aşırı artmış östrojen ekspresyonu ve östrojene bağlı proliferasyon, EGF'den bağımsız çoğalma, artmış Her-2/Neu/c-ErbB-2 ekspresyonu (Rait ve diğ., 2001) artmış N-ras (Sutherhland ve diğ., 1999) ve Rb proteininin hızlı fosforilasyonu rol oynamaktadır (Botos ve diğ., 2002).



Şekil 1.9: MCF-7 hücrelerinin faz kontrast mikroskopundaki görüntüsü (10x).

1.4.4.3. MCF-10A İnsan Normal Meme Epitel Hücre Hattının Özellikleri

MCF-10A hücre hattı, hücre kültürü için modifiye edilmiş normal meme epitelyum hücreleridir. 36 yaşında beyaz ırktan bir kadının meme dokusundan izole edilmiştir. Mikroskopta luminal duktal hücre özellikleri gösterirler (Şekil 1.10). Hücre kültürlerinde adherent (flaska tutunarak çoğalan) hücreler olarak çoğalırlar. Diploit karyotipe sahip hücrelerdir. P53 ekspresyonu normal olup, agarda koloni oluşturmazlar. İmmun sistemi olmayan farelerde çoğalıp tümör oluşturmazlar (Imbalzano ve diğ., 2009).



Şekil 1.10: MCF-10A hücrelerinin faz kontrast mikroskobundaki görüntüsü (10x).

1.5. Hücredeki Moleküler Sistemler Hangi Parametreler Üzerinden Çalışılır?

1.5.1. Sitotoksosite Ölçüm Yöntemleri

Sitotoksosite, bir kimyasal bileşiğin veya ajanın tanımlanmış deney koşulları altında hücreleri öldürme yüzdesini ifade eder. Sitotoksik etki genelde hücreye ait “canlılık” ve “zindelik” parametreleri üzerinden dolaylı olarak hesaplanır. Bu parametreler membran bütünlüğüne dayanan yöntemler (canlılık) ve metabolik aktiviteye dayanan yöntemlerle (zindelik) ölçülmektedir.

Membran bütünlüğüne dayalı yöntemlerden biri, hücrelerin tripan mavisini gibi boya ile boyanarak, mikroskopta hemositometre ile sayımına dayanan, boya atılım yöntemidir. Tripan mavisini membran bütünlükleri koruyan canlı hücrelere giremez, dolayısıyla canlı hücreler mikroskopta boyanmamış, parlak hücreler olarak görünürler. Ancak ölü hücrelerin membran bütünlükleri kaybolduğundan bu hücreler mikroskopta boyalı olarak görünürler (Berridge ve diğ., 1993).

Membran bütünlüğüne dayanan diğer bir test Laktat Dehidrogenaz (LDH) salınım yöntemidir. LDH canlı hücrelerin sitoplazmasında bulunan bir enzimdir ve

hücre membran bütünlüğü bozulması sonucunda ortama salınırlar. İlaçla muamele edilen hücrelerin süpernatantı toplanarak salgıladıkları LDH enzim miktarı ölçülür. Membran bütünlüğü bozulmuş hücrelerin miktarıyla orantılı olarak ortamdaki LDH enzim seviyesinin miktarı da fazla olur (Timm ve diğ., 1982).

Metabolik aktiviteye dayanan testler (XTT, MTT, WST) ise daha çok hücrenin zindelik düzeyini ölçmede kullanılır. Kültür ortamına XTT gibi tetrazolyum tuzları eklenir. Tetrazolyum tuzları canlı hücrelerdeki (metabolizmaları aktif hücreler) mitokondriyal enzimler tarafından renkli formazan boyasına çevrilirler (Cory et al, 1991). Oluşan renk değişimi spektrofotometrede uygun dalga boyunda ölçülür.

Sıklıkla kullanılan bu yöntemlerin yanında metabolik aktivite ölçümünde kullanılan diğer bir yöntem, resazurin yöntemidir. Resazurin, okside formu koyu mavi renkli olan hafif floresans özellikteki bir boyadır. Metabolik olarak aktif hücrelerin mitokondriyal enzimleri tarafından indirgenerek pembe renkli, güçlü floresans etkili resorufine dönüşmektedir. Resazurinin resorufine dönüşümüne derecesi mitokondrilerin canlılık ve sağlamlığını da belirlemede kullanılır (O'Brien ve diğ., 2000).

Günümüzde gelişen teknoloji ile birlikte hücre canlılığının ölçümünde yeni yöntemler ortaya çıkmıştır. Bu yöntemlerden biri; gerçek zamanlı hücre canlılığının izlenmesine olanak sağlayan xCELLigence sistemidir.

xCELLigence sistemi, gerçek zamanlı hücre analiz cihazı (RTCA cihazı), plaka bölgesi, RTCA yazılımını içeren bilgisayar ve 96 kuyucuklu E-plakalar olmak üzere dört ana parçaya sahiptir. E-plakalar, hücre kültüründe yaygın olarak kullanılan standart 96 kuyucuklu plakalara benzerdir. Kuyucukların tabanları altın kaplı mikroeletrotlar ile kaplanmıştır. Elektrik iletimi ile kuyucuklardaki hücrelerin gerçek zamanlı izlenebilmesi ve analizi sağlanır. Uygulanan düşük voltaj (20 mV) mikroeletrotlar arasında küçük bir elektrik alan üretir. Bu alandaki akım, zemine tutunan hücreler nedeniyle engellenir ve ölçülen empedansta değişikliklere yol açar. Empedans basitçe, alternatif akımla çalışan devrelerde bulunan direnç olarak tanımlanabilir. Kuyucuklarda ölçülen empedans elektrot geometrisine, kuyucuktaki iyon konsantrasyonuna ve hücrelerin tutma miktarına bağlı olarak değişir. Hücre yokluğunda empedans, hem elektrot/çözelti etkileşimine hem de çözeltinin iyon içeriğine bağlıdır. Hücrelerin varlığında ise elektrot yüzeyine tutunan hücreler yalıtkan bir davranış gösterecek ve böylece elektrot/çözelti etkileşimi empedansta artışa neden olacaktır. Bu değişim miktarı kuyucuktaki hücre sayısı, hücrelerin morfolojileri ve tutunma özellikleriyle ilişkilidir. Elektrotlar üzerindeki hücre sayısının artışı empedans değerinin artışına neden olur. Hücre indeksi (CI), elektriksel empedans değişiminin ölçülmesi ile elde edilen değerdir. CI değeri, $CI = (Z_i - Z_0) / 15$

formülü ile hesaplanır. Formüldeki Z_i , deney sırasında her hangi bir noktada ölçülen empedans, Z_0 ise başlangıçtaki empedans değerini temsil eder.

1.5.2. Apoptozis Ölçüm Yöntemleri

Hücreye apoptozis için sinyal alındıktan sonra hücrede birçok morfolojik (hücre küçülmesi, kromatin yoğunlaşması, apoptotik cisimcikler) ve biyokimyasal değişim (DNA parçalanması, fosfatidilserin moleküllerinin hücre membranının dış yüzeyine çıkması) gözlenir. Apoptotik hücrelerin tespiti için kullanılan yöntemler de bu nedenle çok çeşitlidir (Güleç ve Eren, 2008).

Morfolojik değişikliklerin en doğru olarak gözlemlendiği yöntem elektron mikroskopi yöntemidir. Sitoplazmik küçülme, kromatin kondansasyonu ve fragmentasyonu izlenebilirken, mitokondrinin durumu, hücre zarı ya da nükleus membranının bütünlüğünün bozulup bozulmadığı gibi detaylar da incelenebilir. Floresan mikroskopi de sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Floresan boyalar DNA'ya bağlanarak hücrenin nükleusunu görünür hale getirirler. Kromatin kondansasyonu veya nükleus fragmentasyonu olan hücreler apoptotik hücreler olarak değerlendirilir (Güleç ve Eren, 2008).

ELISA yöntemi ile de hücre kültürlerinde DNA fragmentasyonunu tespit etmek mümkündür. ELISA yönteminde, antijen-antikor kompleksine bir enzimle işaretli antiglobulinin ilave edilmesi ve sonra substratın eklenmesi ile eğer antijen veya antikor var ise renk oluşumunun gözlenmesi esasına dayanmaktadır (Güleç ve Eren, 2008).

Apoptotik hücrelerde, normalde hücre membranının iç yüzünde yerleşmiş olan fosfatidilserin (PS) molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar. Anneksin V, hücrenin dış yüzeyine transloke olan fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olduğu için, floresan bir madde ile işaretlenerek apoptotik hücre görünür hale getirilebilir (Güleç ve Eren, 2008).

Western blotlama, bir protein karışımı içindeki belirli bir proteini ve büyüklüğünü saptamak için kullanılan nicel bir yöntemdir. Bu metot istenilen bir proteine karşı yönlendirilen yüksek kalitede bir antikor kullanılarak ilgili protein bir karışımın içinden saptanabilir. Bu metot yardımıyla apoptozise özgü bazı proteinlerin (kaspaz 3,6,7 gibi) eksprese olup olmadıklarının saptanması mümkündür (Güleç ve Eren, 2008)..

Günümüzde çoklu western olarak bilinen "protein antikor" yöntemi de sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Bu yöntemle belli bir fenomenle ilişkili pek çok proteinin ekspresyon miktarlarının aynı anda belirlenmesi mümkün olmaktadır. Bu nedenle

western blot yönteminin yanında tercih edilebilecek daha ekonomik ve pratik bir yöntemdir.

1.5.3. Oksidatif Stres Ölçüm Yöntemleri

Oksidatif stres, serbest radikal üretiminin artışı ve antioksidan savunmanın azalması sonucu olabilir. Bu nedenle, oksidatif stres biyobelirteci olarak antioksidan tüketiminin araştırılması antioksidan miktarlarındaki azalış veya onların metabolitlerindeki artışın değerlendirilmesi ile olabilir. Oksidatif stres, genelde lipid peroksidasyon son ürünü olan MDA; oksidatif DNA hasar göstergesi olan 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG); protein oksidasyonu; SOD, GPx, CAT, glutatyon-S-transferaz (GST), glutatyon redüktaz (GR) gibi antioksidan enzimler; alfa-tokoferol, askorbik asit, glutatyon, ubikinon, sistein gibi antioksidanların ölçümü ile belirlenebilir. Tüm bu enzimlerin ya da son ürünlerin ölçülmesi için ELISA yöntemi ile çalışan kitler mevcuttur. Bu kitlerin yanında, reaktif oksijen türevlerinin hücre içinde çeşitli boyalarla gösterilmesi de mümkündür. 2',7'-diklorofloresan diasetat (H₂-DCF-DA) gibi floresans olmayan ancak reaktif oksijen türevleriyle okside olup floresans hal geçen boyalarla muamele edilen hücreler mikroskop altında görüntülenebileceği gibi, oluşan floresans miktarı florimetre ile kantitatif hale getirilebilir (Eken, 2012).

1.5.4. Anjiyogenez Ölçüm Yöntemleri

In vitro anjiyogenez modelleri, bir ajanla muamele edilen endotel hücrelerinin proliferasyonu, migrasyonu ve tüp oluşturma miktarlarının ölçülmesine dayanır. Bunlardan ilki, endotel hücrelerin canlılığının ölçülmesidir. Araştırılacak ajanla muamele edilen endotel hücrelerinin canlılığı MTT, XTT gibi çeşitli yöntemlerle ölçülür. Bu yöntemde hücre çoğalmasındaki azalmanın nedeninin ajanın sitostatik etkisinin mi sitotoksik etkisinin mi olduğunu belirlemek mümkün değildir. Bu nedenle, eğer bu yöntem kullanılıyorsa diğer anjiyogenez yöntemlerinden biriyle beraber kullanılarak ajanın anti-anjiyojenik etkili olduğunun doğrulanması gerekir.

Endotel hücreler, VEGF gibi çeşitli anjiyojenik faktörler sayesinde hareket ederler. Hücre göçünün tespitinde kullanılan yöntemlerden en eskisi ve en sık kullanılanı "chamber=odacık" yöntemidir. Bu yöntemde üst odacığa yerleştirilen hücrelerin alt odacığa hareket miktarları ölçülür (Staton ve diğ., 2004).

Tüp oluşturma yöntemi, endotel hücrelerin matrijel matriksler üzerinde tüpsü yapılar oluşturup oluşturmadığının gözlenmesine dayanır. Diğer pratik bir yöntem olan "scratch" yönteminde ise, hücre kültürü plakalarına ekilen endotel hücrelerinin ortasının pipet ucu yardımıyla çizgi çekilir. Ardından, belirlenen inkübasyon

sürelerince oluşturulan çizginin endotel hücreleri tarafından kapatılma hızı ölçülür (Staton ve diğ., 2004).

Bu yöntemlere ek olarak günümüzde, array yöntemiyle kanser hücreleri tarafından ekprese edilen anjiyogenezle ilişkili proteinlerin belirlenmesi, araştırılacak ajanla muamele edildikten sonra bu proteinlerin ekspresyon durumlarının araştırılması da yaygın olarak kullanılmaktadır.

1.5.5. Epigenetik Ölçüm Yöntemleri

Hücredeki epigenetik sistemlerin ölçümü için çok çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bunların başında bu mekanizmalarda rol alan DNA metiltransferazların veya histon deasetilaz gibi enzimlerin aktivitelerindeki değişimlerin ELISA tabanlı kitlerle ölçümü gelir. Enzim aktivitelerinin yanı sıra, bu genlerin ekspresyon düzeyleri PCR yöntemiyle, protein ekspresyonları ise western blotlama tekniği ile ölçülebilmektedir.

1.6. Trabectedin'in Meme Kanseri Hücre Kültürlerindeki Etkilerini Anlamak için Cevaplanması Gereken Sorular

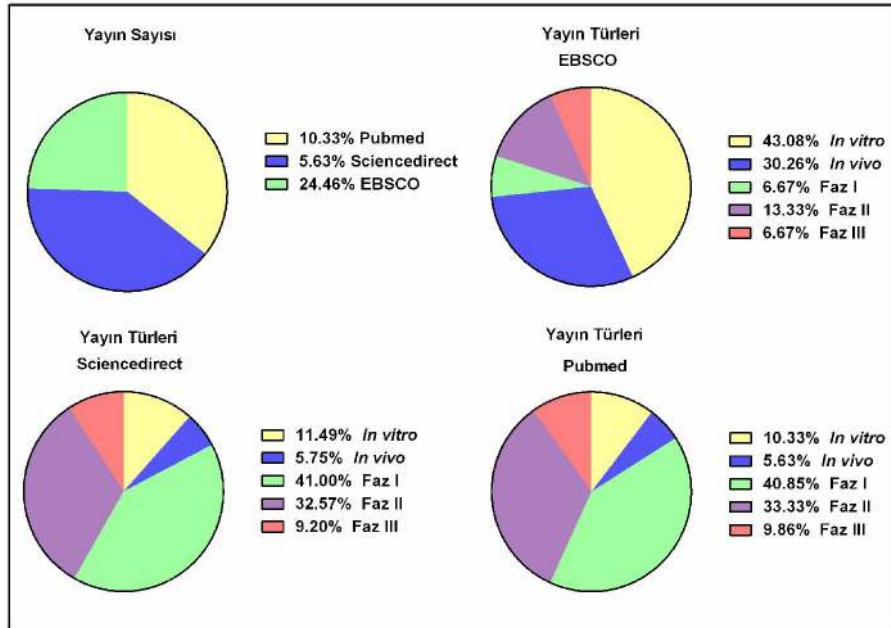
Pubmed, Sciencedirect ve EBSCO veritabanlarında Trabectedin ile ilgili yapılmış *in vitro*, *in vivo*, faz I, II ve III çalışmaların yüzde oranları Şekil 1.11'de gösterilmiştir. Mevcut çalışmalar, Trabectedin'in DNA'nın küçük oluşuna bağlandığını, DNA hasarı meydana getirerek DNA tamiri ve transkripsiyon işlemlerinin normal fonksiyonunu engellediğini göstermiştir. Bu etkilerinin sonucu olarak hücre çoğalmasını engellediği ve hücreyi ölüme götürdüğü bilinmektedir (Maurizio ve Galmarini, 2010). Ancak hala Trabectedin'in kanser hücre hatlarındaki etki mekanizmaları tam ve detaylı olarak aydınlatılamamıştır. Örneğin; Trabectedin'in miksoid liposarkomlarda FUS-CHOP füzyon geniyle etkileşime girdiği için yüksek aktivite gösterdiği düşünülmektedir. Ancak Trabectedin, bu genin ekprese edilmediği diğer kanser hücrelerinde de yüksek aktivite göstermektedir. Yine, meme ve yumurtalık kanser hücre kültürleri de Trabectedin'e oldukça duyarlı olmalarına karşın Trabectedin'in bu hücrelerdeki etki mekanizmaları henüz aydınlatılamamıştır.

Trabectedin'in meme kanseri hücrelerindeki etkilerinin anlaşılması için öncelikli olarak cevaplanması gereken soru; Trabectedin'in sarkoma ve yumurtalık kanseri hücrelerinde olduğu gibi meme kanserinin farklı alt tiplerini temsil eden hücre hatlarında da sitotoksik etkili olup olmadığıdır. Kemoterapötik ajanların normal hücreler üzerindeki etkilerinin belirlenmesi yan etki profillerinin öngörülmesi noktasında kritik bir konu olduğundan, Trabectedin'in normal meme hücreleri üzerinde sitotoksik etkili olup olmadığının da ortaya konması gereklidir.

“Apoptozisden kaçma” kanser hücrelerinin karakteristik özelliklerinden biri olduğu için Trabectedin’in meme kanseri hücrelerinde apoptotik yolları aktive edip etmediğinin gösterilmesi oldukça önemlidir. Bu bağlamda, Trabectedin’in meme kanserinin farklı alt tiplerini temsil eden hücre hatlarında hangi apoptotik yolak/yolları aktive ettiği ve apoptozisle ilişkili moleküllerden hangileriyle etkileştiğinin belirlenmesi gereklidir. Trabectedin’in özgün kimyasal yapısı incelendiğinde, hücre içinde reaktif oksijen türevlerinin oluşumuna neden olabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle, Trabectedin’in sitotoksik ve apoptotik etkilerini ortaya koyarken, hücre içi redüksiyon/oksidasyon dengesini etkileyip etkilemediğinin belirteç moleküller üzerinden araştırılması gereklidir.

Literatürde Trabectedin’in liposarkom hücrelerinde CCL2, CXCL8, IL-6, VEGF gibi çeşitli anjiyojenik sitokinleri inhibe ettiği gösterilmiştir (Germano ve diğ., 2010). Trabectedin’in meme kanseri hücrelerinde de benzer şekilde anti-anjiyojenik etkilerinin olup olmadığı araştırılması gereken diğer bir konudur.

Epigenetik mekanizmalarda meydana gelen değişikliklerin hücrelerin kanserleşme sürecinde önemli rolleri olduğu bilinmektedir. Epigenetik mekanizmalarda meydana gelen değişiklikler geri dönüşümlü olduklarından, kanser tedavisinde kullanılabilecek hedef bir sistemdir. Trabectedin’in meme kanseri hücrelerinde epigenetik mekanizmaları etkileyip etkilemediğinin araştırılması bu nedenle önemli bir husustur.



Şekil 1.11: Pubmed, Sciencedirect ve EBSCO veritabanlarında Trabectedin ile ilgili yapılmış yayınların sayısal dağılımı.

1.7. AMAÇ

Bu çalışmanın temel amacı, Karayip Denizinde yaşayan Tunikatlardan olan *Ecteinascidia turbinata*'dan izole edilmiş, günümüzde ise yarı-sentetik olarak üretilen Trabectedin molekülünün insan normal meme (MCF-10A) ve meme kanseri hücre kültürlerinde (MDA-MB-453 ve MCF-7) hücre içi moleküler sistemler üzerindeki etkilerinin araştırılmasıdır. Bu amacın gerçekleştirilmesinde, Trabectedin'in (1) hücre çoğalmasını engelleyici etkisi, etkileşime girdiği olası (2) apoptotik ve (3) anti-anjiyogenik moleküller, (4) hücre içi redüksiyon/oksidasyon dengesini düzenleyici moleküller, (5) epigenetik düzenlemede rol oynayan kritik molekülleri araştırmak için çeşitli güncel moleküler yöntemler kullanılacaktır. Elde edilen deneysel veriler ışığında, Trabectedin molekülünün meme kanseri hücre kültürlerindeki etki yollarının bir resminin ortaya konması hedeflenmiştir.

Doktora tezi süresince aşağıdaki hipotezlerin ve soruların cevaplarının araştırılması hedeflenmiştir;

1. Çeşitli hücre hatlarında sitotoksik ve apoptotik etkileri gösterilen Trabectedin'in normal meme (MCF-10A) ve meme kanseri hücre hatlarında (MDA-MB-453 ve MCF-7) da sitotoksik etkili olup olmadığının belirlenmesi,
2. Trabectedin'in, meme kanseri hücre hatlarında apoptotik etkisinin olup olmadığının gösterilmesi,
3. Meme hücre hatlarında Trabectedin aracılı apoptozisin varlığı gösterildiği takdirde, apoptozis array yöntemiyle Trabectedin'in apoptotik etki mekanizmasıyla ilgili yeni hipotezlerin üretilip üretilmeyeceğinin belirlenmesi,
4. Trabectedin'in hücre içi oksidasyon/redüksiyon dengesini etkileyip etkilenmediğinin araştırılması,
5. Trabectedin'in anjiyogenezele ilişkili moleküller üzerinde etkisi olup olmadığının güncel moleküler yöntemlerle belirlenmesi ve yeni hipotezlerin araştırılması,
6. Trabectedin'in meme hücrelerinin epigenetik hafızasını etkileyip etkilemediğinin epigenetik belirteçler kullanılarak araştırılması.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Çalışmada Kullanılan Hücre Hatlarının Temini, Çoğaltımı ve İdamesi

İnsan meme epitel hücre hattı (MCF10-A) ve meme kanseri hücre hatları (MCF-7 ve MDA-MB-453), Tülay Aktaş Onkoloji Hastanesi Tıbbi Onkoloji Araştırma Laboratuvarı'nın sırasıyla Interlab Cell Line Collection (ICLC, İtalya) ve Health Protection Agency (HPA, İngiltere)'den satın aldığı hücre hatları stoğundan temin edildi.

Hücre kültür işlemleri steril laminar hava akımlı çalışma kabinlerinde gerçekleştirildi. -80 °C'de saklanan hücreler, 37 °C su banyosunda çözöldü ve 75 cm²'lik filtreli hücre kültür flasklarına aktarıldı.

MCF-7 ve MDA-MB-453 hücreleri, DMEM/F12 (Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium) besiyerine % 10 ısı ile inaktive edilmiş fetal sığır serumu, 10.000 unite/ml penisilin ve 10 mg/ml streptomisin eklenerek çoğaltıldı. MCF-10A hücreleri ise aynı besiyerine 100 mg/ml EGF, 1 mg/ml hidrokortizon 10 mg/ml insölin, % 10 ısı ile inaktive edilmiş fetal sığır serumu, 10.000 unite/ml penisilin ve 10 mg/ml streptomisin eklenerek, 37 °C sıcaklıkta, % 5 CO₂ ve nem içeren inkübatörde çoğaltıldı.

Hücre hatları canlılık, çoğalma ve enfeksiyon açısından inverted mikroskopta günlük olarak izlendi. Flasklarda %80'in üzerinde hücre yoğunluğu gözleendiğinde hücreler pasajlanarak çoğaltıldı.

2.2. Hücrelerin Sayımı

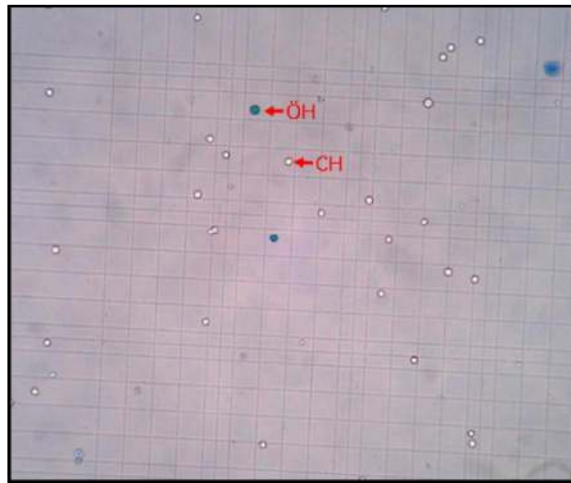
Hücrelerin sayımı için öncelikle flask zemininden ayrılmaları sağlandı. Bu işlem için, MCF10-A, MCF-7 ve MDA-MB-453 hücrelerini içeren flasklardaki besiyerleri dököldü. Üzerine 4 ml Trypsin EDTA eklenen hücreler ~10 dakika 37 °C inkübatörde bekletildi. Mikroskopta kontrol edilen hücreler, zeminden ayrılınca üzerlerine 1:1 oranında besiyeri ile nötraleze edilip, 15 ml'lik steril santrifüj tüplerine aktarıldı. Santrifüjlenen hücrelerin süpernatantları atılarak dibe çöken hücre pelleti 10 ml besiyeri içinde tekrar homojenize edildi. Bu süspansiyondan tripan mavisi ile hücre süspansiyonu 1:1 oranında karıştırıldı. Bu karışım otomatik sayım cihazının

(Cellometer, Nexcelom, ABD) lamına aktarıldı ve hücre sayımı otomatik olarak yapıldı (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: (a) Hücre kültür flasklarının laminar hava akımlı çalışma kabinlerine taşınması, (b) Tripan boyasıyla boyanan hücrelerin hücre sayım lamalarına yüklenmesi, (c) Otomatik hücre sayım cihazı, (d) Hücrelerin 96 kuyucuklu plakalara ekimi.

Membran bütünlüklerini koruyan canlı hücreler tripan mavisi ile muamele edildiğinde boyanmaz ve mikroskopta incelendiğinde parlak görülürler. Ölü hücreler ise membran bütünlüklerini kaybettiklerinden tripan mavisi ile boyanırlar ve mikroskopta mavi boyalı şekilde görülür (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: Otomatik sayım cihazında Tripan mavisi ile muamele edilen hücrelerin cihaza entegre kameradaki görünümü (10X) (ÖH: Ölü hücre, CH: Canlı hücre).

2.3. Trabectedin'in Stok Solüsyonlarının Hazırlanması

Trabectedin, üretici firma (Pharma Mar, İspanya) yetkililerinden Dr. Carlos Galmarini'den temin edildi. Deneylerde kullanılmak üzere 1.4 mg Trabectedin tartılarak 1 ml dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözüldü. 1.8 mM'lık stok solüsyonlar halinde hazırlanan Trabectedin, 0.22 µm'lik filtreden geçirilerek sterilize edildi ve 100 µl'lik parçalar halinde - 20°C 'de saklandı. Her deney için taze stok kullanıldı.

2.4. Meme Kanseri Hücre Kültürlerinde Kullanılan Hücre Canlılık Testleri

2.4.1. XTT Testi

Trabectedin'in farklı konsantrasyonlarıyla (10^{-11} - 10^{-6} M) 24, 48 ve 72 saat inkübasyonları sonucu hücrelerdeki sitotoksik etkileri belirlemek üzere XTT testi (Roche, Almanya) kullanıldı. XTT solüsyonu sodyum 3'- [1-(fenil-aminokarbonil)- 3, 4-tetrazolyum]- bis (4-methoksi-6-nitro) benzen sülfonik asit hidrat ile N-metil dibenzopirazin metil sülfat'ın 50:1 oranında karıştırılması ile hazırlandı. Her bir kuyucuğa toplam hacmin (200 µl) yarısı kadar (100 µl) XTT solüsyonu eklendikten sonra 96 kuyucuklu hücre kültür plakaları 37 °C'de ve %5 CO₂ ihtiva eden inkübatörde 4 saat inkübe edildi. Dört saat sonunda her kuyucuğun absorbans değeri 450-490 nm referans dalga boyu aralığında mikro plaka okuyucuda (DTX 880 Multimode Reader, Beckman Coulter, ABD) ölçüldü.

% Sitotoksosite = $1 - \left[\frac{\text{[İlaçlı Kuyucukların Absorbans Ortalaması]} }{\text{Pozitif Kontrol Kuyucuklarının Absorbans Ortalaması}} \right] \times 100$ formülü ile hesaplandı.

Absorbans değerlerinden yukarıdaki formül kullanılarak hesaplanan sitotoksosite yüzdeleri CalcuSyn 2.0 (Biosoft, İngiltere) programına girildi. Her ilacın doz etki tablosu ve eğrisi çizilerek hücrelerin % 50'sini (IC₅₀) ve % 75'ini (IC₇₅) öldüren konsantrasyonlar hesaplandı.

2.4.2. Gerçek Zamanlı Hücre Canlılık Ölçüm Sistemi (xCELLigence)

Trabectedin'in sitotoksik etkisini doğrulamak ve Trabectedin'in etki göstermeye başladığı zaman diliminin belirlemek üzere xCELLigence sistemi kullanıldı. XTT testi belirli zaman dilimlerinde (24, 48, 72. saatler gibi) sitotoksik etkinin belirlenmesini sağlarken, xCELLigence sistemi hücre canlılığının gerçek zamanlı olarak ölçümünü sağlar.

E-plaka kuyucuklarına 50 µl besiyeri eklendi. Kullanılacak hücreler 75 µl içerisinde 104 hücre olacak şekilde ekildi ve E-plaka oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Ardından E-plaka inkübatörde bulunan RTCA cihazının plaka bölgesine yerleştirildi. Hücrelerin logaritmik proliferasyon durumları istenilen zaman

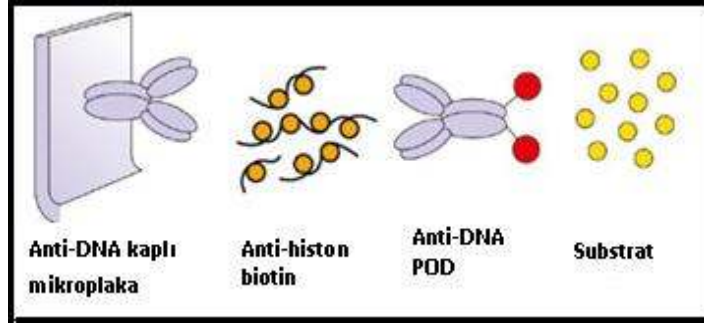
aralıklarında RTCA analiz cihazı ile gözlemlendi. 24 saat inkübasyon sonunda kuyucuklara araştırılacak ajanın farklı konsantrasyonlarını içeren 25 µl besiyeri eklendi. Kontrol kuyucuklarına ise sadece besiyeri ve besiyeri+DMSO eklendi. Ajan eklendikten sonra 72 saat deney devam eder ve bu sırada CI değerlerinin ölçümü gerçekleştirildi. Hücrelerin ajana karşı geliştirdikleri kısa süreli cevabı ölçmek için, hücreler ajanın eklenmesinden sonraki bir saat boyunca her 2 dakikada bir, uzun süreli hücresel cevapları gözlemleyebilmek için ise deney süresince her 30 dakikada bir gözlemlendi.

2.5. Apoptozisin Varlığını Göstermede Tercih Edilen Yöntemler

Trabectedin'in doza ve zaman bağlı apoptotik etkilerinin belirlenmesi için DNA fragmentasyonunu ölçen ELISA tabanlı bir kit ve mitokondriyal membran potansiyelinin ölçümünü sağlayan Tetrametilrodamin etil ester (TMRE) boyası tercih edildi. Apoptozisin ölüm reseptörleri aracılığıyla mı (ekstrinsik yolak) yoksa mitokondri aracılı mı (intrinsik yolak) gerçekleştiğinin belirlenmesi amacıyla sırasıyla Kaspaz-8, Kaspaz-9 ve Kaspaz-3 spesifik inhibitörleri kullanılarak DNA fragmentasyon miktarındaki değişimler gözlemlendi.

2.5.1. DNA Fragmentasyon Testi

Trabectedin'in artan konsantrasyonları ile muamele edilen ve ilaç eklenmeyen hücreler kitin içerdiği lizis solüsyonu ile oda sıcaklığında 30 dakika muamele edildi. Elde edilen hücre lizatları, kitin içerdiği streptavidin kaplı mikropalaklara eklendi. Histon proteinleri ve nükleozomlara bağlanmayı sağlayacak (Anti-histon biotin ve Anti-DNA-Peroksidaz) antikorları içeren reaktiften 80 µl eklenen mikropalaka, oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sırasında anti-histon antikoru bir taraftan nükleozomlardaki histonlara tutunurken bir taraftan da oluşan immunokompleks streptavidin kaplı plakalara tutunmaktadır. Anti-DNA-Peroksidaz antikoru ise nükleozomlar arasındaki DNA'lara bağlanmaktadır. Bağlanmayan bileşenlerin yıkama basamaklarıyla uzaklaştırılmasının ardından, nükleozom miktarlarının kantitatif olarak belirlenmesi immunokomplekslere tutunmuş olan peroksidaz'ların ölçülmesiyle gerçekleştirildi. Peroksidaz, ABTS (2,2'-azino-bis-[3-etilbenzthiazolin-6-sülfonik asit]) substratı ile 405 nm ve 490 nm referans dalga boyunda mikro plaka okuyucuda (DTX 880 Multimode Reader, Beckman Coulter, ABD) ölçüldü (Şekil 2.3). Kitin ihtiva ettiği %100 apoptotik hücrelerin absorbans değeri baz alınarak, hücre lizatlarında meydana gelen histon ve nükleozom miktarındaki artış, apoptozis miktarındaki artışla doğru orantılı olarak değerlendirildi.



Şekil 2.3: DNA Fragmentasyon kitinin çalışma prensibi.

2.5.2. Mitokondriyal Membran Potansiyelinin Ölçümü

Hücrenin apoptoza gittiğinin bir diğer göstergesi de mitokondriyal membran potansiyelinde meydana gelen değişikliklerdir. Mitokondriyal membran potansiyelindeki değişiklikler, Tetrametilrodamin etil ester (TMRE) boyası kullanılarak belirlendi. TMRE, pozitif yüklü floresans bir boya olup hücredeki negatif yüklü (aktif) mitokondrileri boyar. Depolarize veya inaktif mitokondrilerde membran potansiyeli azalacağından gözlenen floresans miktarı da azalır.

5 mg TMRE, 1 ml DMSO içinde çözülerek boyanın stok solüsyonu (10 mM) hazırlandı. Hücreler, her kuyucukta 5×10^5 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara ekildi. Trabectedin'in IC_{50} ve IC_{75} konsantrasyonları ile 48 saat muamele edilen hücrelere, 1:10 oranında TMRE boyası eklendi ve hücreler 37 °C'de 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücrelerdeki floresans miktarı 550 nm dalga boyunda mikro plaka okuyucuda (DTX 880 Multimode Reader, Beckman Coulter, ABD) ölçüldü ve hücreler floresans mikroskopta (Leica Microsystems, Mannheim, Almanya) görüntülendi.

2.5.3. Kaspaz-8, Kaspaz-9 ve Kaspaz-3 İnhibitör Uygulamaları

Meme kanseri hücrelerinde hangi apoptotik yolağın baskın olduğunu belirlemek amacıyla hücreler Kaspaz-8 (z-IETD-fmk), Kaspaz-9 (z-LEHD-fmk) ve Kaspaz-3 (Z-DEVD-fmk) spesifik inhibitörleri ile 1 saat muamele edildikten sonra 48 saat boyunca Trabectedinle muamele edildi ve DNA fragmentasyon miktarları ELISA yöntemiyle ölçüldü.

2.6. Protein Antikor Array Yöntemi

Trabectedin'in meme kanseri hücre kültürleri üzerindeki apoptotik ve anjiyogenetik etkisini hangi olası moleküller üzerinden gerçekleştirdiğini belirlemek amacıyla Apoptozis [Human Apoptosis Protein Array (R&D Systems, İngiltere)] ve Anjiyogenezis [Human Angiogenesis Protein Array (R&D Systems, İngiltere)] protein antikor array kitleri kullanıldı.

Trabectedin'in IC₅₀ dozlarıyla 48 saat muamele edilen hücrelerden kitin içerdiği lizis solüsyonu kullanılarak hücre lizatları elde edildi. Her bir sitokine spesifik olarak nitroselulöz membrana tutundurulmuş olan spesifik antikorları içeren membranlar blok solüsyonuyla bloke edilerek, örnekler eklendi ve +4 °C'de bir gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Bağlanamayan proteinler, yıkama basamakları ile uzaklaştırıldı. Apoptozis ve anjiyogenezisle ilişkili proteinlerin belirlenmesi, biotinlenmiş antikor ve streptavidin-HRP inkübasyonu ile tamamlandı. Her bir spotun sahip olduğu protein miktarıyla doğru orantılı olarak artan ya da azalan sinyal, Kodak® Gel Logic 1500 görüntüleme sistemi kullanılarak ölçüldü. Her molekül için ikişer spot ölçülerek elde edilen verilerin sayısal analizi Koadarray 2.6 (İngiltere) yazılımı ile yapıldı. Protein ekspresyon miktarlarının belirlenmesinde alt limit olarak 1.5 kat baz alındı. Çizelge 2.1'de "Human Apoptosis Antibody Array" kitinin ihtiva ettiği proteinler ve Çizelge 2.2'de ise "Human Angiogenesis Antibody Array" kitinin ihtiva ettiği proteinler listelenmiştir.

Çizelge 2.1: Human Apoptosis Protein Array kitinin ihtiva ettiği apoptotik proteinler.

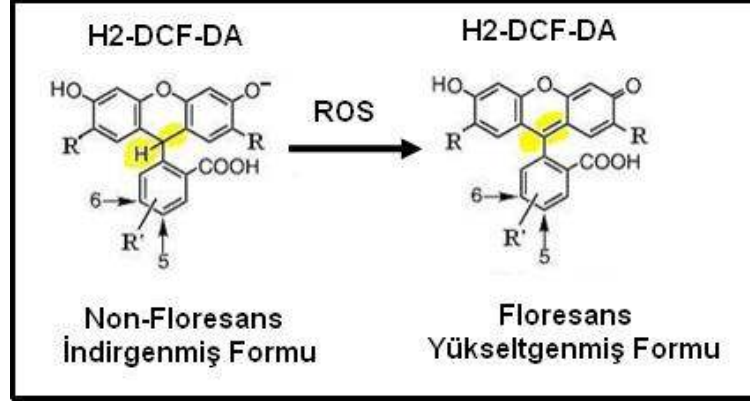
Bad	TRAIL R1/DR4	PON2
Bax	TRAIL R2/DR5	p21/CIP1/CDNK1A
Bcl-2	FADD	p27/Kip1
Bcl-xL	Fas/TNFSF6	Phospho-p53 (S15)
Pro-Caspase-3	HIF-1 alpha	Phospho-p53 (S46)
Cleaved Caspase-3	HO-1/HMOX1/HSP32	Phospho-p53 (S392)
Catalase	HO-2/HMOX2	Phospho-Rad17 (S635)
cIAP-1	HSP27	SMAC/Diablo
cIAP-2	HSP60	Survivin
Claspin	HSP70	TNF RI/TNFRSF1A
Clusterin	HTRA2/Omi	XIAP
Cytochrome c	Livin	

Çizelge 2.2: Human Angiogenesis Antibody Array kitinin ihtiva ettiği anjiogenik proteinler.

Activin A	FGF-7/KGF	PD-ECGF
ADAMTS-1	GDNF	PDGF-AA
Angiogenin	GM-CSF	PDGF-AB/PDGF-BB
Angiopoietin-1	HB-EGF	Persephin
Angiopoietin-2	HGF	CXCL4/PF4
Angiostatin/Plasminogen	IGFBP-1	PIGF
Amphiregulin	IGFBP-2	Prolactin
Artemin	IGFBP-3	Serpin B5/Maspin
Tissue Factor/Factor III	IL-1 beta	Serpin E1/PAI-1
CXCL16	CXCL8/IL-8	Serpin F1/PEDF
DPPIV/CD26	LAP (TGF-beta 1)	TIMP-1
EGF	Leptin	TIMP-4
EG-VEGF	CCL2/MCP-1	Thrombospondin-1
Endoglin/CD105	CCL3/MIP-1 alpha	Thrombospondin-2
Endostatin/Collagen XVIII	MMP-8	uPA
Endothelin-1	MMP-9	Vasohibin
FGF acidic	NRG1-beta 1	VEGF
FGF basic	Pentraxin 3	VEGF-C
FGF-4		

2.7. Hücre içi Reaktif Oksijen Türevlerinin (ROS) Ölçümü

Trabectedin muamelesi sonrası ROS'un meme kanseri hücrelerindeki birikimini ölçmek üzere, 29,79-diklorofloresan diasetat (H2-DCF-DA) boyama metodu kullanıldı (Şekil 2.4). Hücreler 6'lı plakalara ekilip Trabectedin'in IC₅₀ dozları ile 48 saat muamele edildikten sonra, kuyucuktaki besiyeri ve H2-DCF-DA karışımının son konsantrasyonu 2 mM olacak şekilde H2-DCF-DA eklendi ve kuyucuklar 37 °C'de 20 dakika inkübasyona bırakıldı. Daha sonra hücreler PBS ile 2 kez yıkandı ve hücre içi ROS birikimi floresans mikroskopta (Leica) (490/520 nm) görüntülendi.



Şekil 2.4: H2-DCF-DA boyasının hücre içindeki ROS non-floresans ve floresans formları.

2.8. Glutasyon S Transferaz (GST) Aktivitesinin Ölçümü

Meme kanseri hücre kültürleri kuyucuk başına 2×10^6 hücre olacak şekilde ekildi ve tutunmaları için 37°C de 24 h inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası hücrelere Trabectedin'in artan konsantrasyonları 48 saat süresince uygulandı. İnkübasyon sonunda hücreler hücre kazıyıcı ile kaldırıldı ve $400 \times g$ 'de 4°C 'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen hücre pelletleri 1 ml 100 mM potasyum fosfat ve 2 mM EDTA (pH 7.0) solüsyonu içerisinde homojenize edildi ve pelletler $15000 \times g$ de 4°C 'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar test için ayrıldı ve buz içerisinde saklandı. Sitosolik ve mikrozomal (total) GST aktivitesinin ölçümü için Glutathione S-transferase Assay Kit (Cayman Chemicals, Michigan, ABD) kullanıldı. Bu kit, 1-kloro-2,4-dinitrobenzen'in redükte olmuş glutasyon ile konjugasyonunu ölçümleyen bir kittir. Konjugasyon sonucu artan absorbans artan GST aktivitesi ile orantılı olarak kabul edilir.

2.9. DNA Metiltransferaz (DNMT) Aktivitesinin Ölçümü

Meme kanseri hücrelerinin Trabectedin ile muamelesi sonucu, hücredeki epigenetik sistemin etkilenip etkilenmediğini ölçmek amacıyla DNA metiltransferaz aktivitesi ELISA tabanlı bir kit [(EpiQuik DNA Methyltransferase Activity/Inhibition Assay kit (Epigentek, ABD)] kullanılarak ölçüldü. EpiQuik Nuclear Extraction Kit (Epigentek, ABD) kullanılarak elde edilen nuklear ekstraktlardan $20 \mu\text{g}$ alınarak kitin içerdiği 96 kuyucuklu plakalara eklendi. Metilasyon substratı da eklenerek 37°C 'de 1 saat inkübe edilen plakaya, kitin içerdiği antikor eklenerek 60 dakika daha inkübe edildi. Daha sonra, ikinci antikor eklenerek 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildi ve

absorbans 450 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçüldü. DNMT aktivitesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı:

$$\text{DNMT Aktivitesi} = \frac{\text{Inhibitör OD} - \text{Blank OD}}{\text{Protein miktarı (}\mu\text{g)} \times \text{İnkübasyon süresi (saat)}} \times 1000$$

2.10. Histon Deasetilaz (HDAC) Aktivitesinin Ölçümü

Trabectedin muamelesi sonucu hücrelerdeki HDAC aktivitesinde meydana gelen değişim ELISA tabanlı bir kit [(EpiQuik HDAC Activity/Inhibition Assay kit (Epigentek, ABD)] kullanılarak ölçüldü. EpiQuik Nuclear Extraction Kit (Epigentek, ABD) kullanılarak elde edilen nuklear ekstrakttan 20 µg alınarak kitin ihtiva ettiği kuyucuklu plakalara eklendi. Spesifik substratta eklenerek 1 saat 37 °C'de inkübe edilen plakaya kitin ihtiva ettiği antikor eklenerek 60 dakika daha inkübe edildi. Daha sonra ikinci antikor eklenerek 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildi ve absorbans 450 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçüldü. HDAC aktivitesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı:

$$\text{HDAC Aktivitesi} = \frac{\text{OD (Kontrol-Blank)} - \text{OD (Örnek-Blank)}}{\text{Reaksiyon süresi (İnkübasyon süresi-saat)}} \times \text{örnek dilüsyonu}$$

2.11. Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

qRT-PCR metodu, RNA izolasyonu, qRT-PCR uygulaması ve analiz basamaklarını içerir.

2.11.1. RNA İzolasyonu

Protein array analizleri sonunda istatistiksel olarak anlamlı değişim gösteren proteinlerin mRNA düzeyleri RT-PCR yöntemi ile araştırıldı. 25 cm² flaslara ekilen hücreler Trabectedin'in IC₅₀ dozlarıyla 48 saat süresince muamele edildi. RNA izolasyonu için flaslardaki besiyeri döküldü ve hücrelere 1ml Tridity G (Applchem, Almanya) eklendi. 10 dakika inkübasyonun ardından mikrosantrifüj tüplerine alınan örnekler 500 µl kloroform eklendi ve 15-20 sn. çalkalayıcıda çalkalandı. Daha sonra, 200 µl isopropanol eklenerek 15 dk oda sıcaklığında bekletildi ve sıvıdaki faz oluşumu gözlemlendi. 4°C'de 12.000xg'de santrifüjlenen örnekler 500 µl etanol eklenerek tekrar santrifüj edildi. Elde edilen RNA pelletinin üzerindeki etanol pipetörle çekildikten sonra RNA pelleti 50 µl RNA içermeyen su içinde çözüldü.

RNA miktarları spektrofotometrede ölçüldü (Nanaodrop, Thermo Scientific, ABD). A260:A280 oranı 2.0'dan büyük olan örnekler array çalışması için kullanıldı.

2.11.2. qRT-PCR Uygulamaları ve Analiz

Her örnekten 4 µg RNA alınarak “QuantiTect Reverse Transcription Kit” ile cDNA sentezi yapıldı. Her primer için 2,5 µl RT2 SYBR Green qPCR Master Mix, 10,5 µl DNaz-RNAz içermeyen su, 1,0 µl gene-spesifik 10 µM PCR primerleri [QuantiTect Primer Assay (Qiagen, CA, ABD)] ve 1,0 µl cDNA örneği karıştırılarak PCR karışımı hazırlandı. 96 kuyuklu plakaların her kuyucuğuna bu karışımdan 25 µl eklendi ve 96 kuyucuklu plaka Light Cycler 480 (Roche Applied Science, Almanya) cihazına yüklendi. PCR işlemi 95 °C'de 10 dk, 95 °C'de 15 sn, 60 °C'de 1 dk, 40 döngü olacak şekilde gerçekleştirildi.

Her bir arrayin normalizasyonu için her molekülün yanında deney içi kontrol olarak Beta Actin kullanıldı. Gen ekspresyonunun relatif quantifikasyonun hesaplanması için karşılaştırmalı ΔCT method kullanıldı. Trabectedin'le muamele edilmiş ve edilmemiş (kontrol) hücrelerdeki gen ekspresyonlarının karşılaştırılması için aşağıdaki formül kullanıldı:

$\Delta\Delta CT = \Delta CT$ (ilaçla muamele edilmiş) – ΔCT (kontrol). (ΔCT ; Hedef gen ve house-keeping genler arasındaki CT değerleri farkının logaritmasıdır).

2.12. Protein Array ve qRT-PCR Sonuçlarının Western Blot Yöntemi ile Doğrulanması

Western blot analizi için hücrelerden protein izolasyonu “M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent” (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) kullanılarak yapıldı. 14.000xg 'de 15 dk. santrifüj edilen hücre lizatlarındaki protein konsantrasyonları Bradford metodu kullanılarak ölçüldü. Hazırlanan proteinler Laemmli tamponu ile 1:1 oranında karıştırılarak 96°C'ye ayarlanmış su banyosunda 5 dk inkübe edildi. Proteinler %7.5 ve %15'lik SDS poliakrilamid jellere yüklendi ve elektroforez işlemi Tris-Glisin SDS tamponu (BioRad, CA, ABD) içinde 90V sabit voltajda gerçekleştirildi. Bu işlem için BioRad MiniProtean elektroforez tankı ve BioRad PowerPac 200 güç kaynağı kullanıldı. Moleküler ağırlıklarına göre jelde ayrılması sağlanan proteinler polyvinylidenedifluoride (PVDF, BioRad) membranlara transfer edilmek üzere sırasıyla; filtre kağıdı, jel, membran ve filtre kağıdından oluşan aktarma sandviçine alındı. BioRad blotting tankında BioRad PowerPac 200 güç kaynağı kullanılarak 350 mA sabit akımda 1 saat tampon solüsyon içinde transfer yapıldı. Transfer sonrası membranlar, %5 yağsız süt tozu ve %0.1 Tween

20 içeren TBS ile hazırlanan karışım kullanılarak oda sıcaklığında 1 saat bloklandı. Ardından membranlar, dilüsyonları imalatçı firmanın talimatlarına göre hazırlanan primer antikor ile +4°C'de gece boyunca inkübe edildi. TBST kullanılarak yapılan birçok yıkama basamağı sonrasında membranlar, yine imalatçı firmanın talimatlarına göre hazırlanmış olan sekonder antikorlar ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Protein bantları, Kodak Gel Logic 1500 görüntüleme sistemi ile görüntülendi.

2.13. İstatistiksel Analiz

Deneylerde Trabectedin'in ardışık konsantrasyonları üçer kuyucukta test edildi ve her bir deney üç kez tekrarlandı. Her kuyucuğa ait absorbans/floresans değerleri, mikroparka okuyucu tarafından ortalama ve $\pm$ SD değerleri olarak hesaplandı. Trabectedin'in çeşitli konsantrasyonlarına ait doz cevap eğrileri, Graphpad Prism 5.0 istatistik yazılımında oluşturuldu. Sitotoksik ve apoptotik etki yüzdesi açısından Trabectedin'in artan konsantrasyonları ile pozitif kontroller arasında anlamlı bir farklılığın olup olmadığı tek yönlü ANOVA ve ardından Dunnett's t-test kullanılarak araştırıldı.

3. BULGULAR

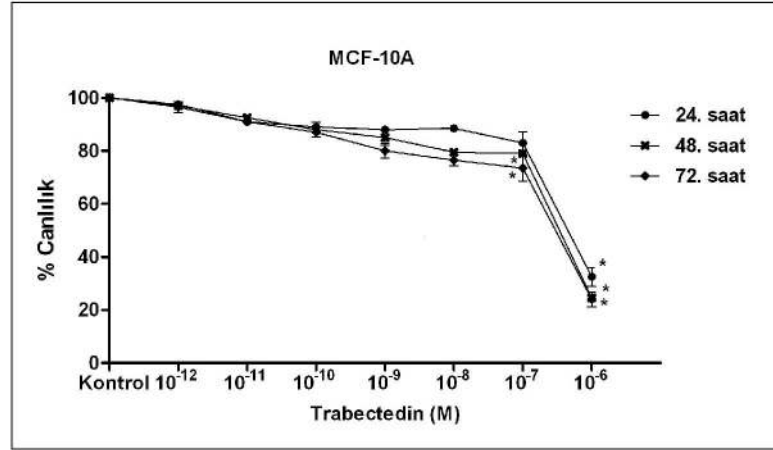
3.1. İnsan Meme Kanseri Hücre Kültürlerinde Trabectedin'in Sitotoksik Etkileri

Trabectedin'in insan normal (MCF-10A) ve kanserli meme (MCF-7 ve MDA-MB-453) hücre kültürlerinde hücre canlılığı üzerine etkileri, hem artan doza (10^{-12} - 10^{-6} M) hem de zamana (24., 48. ve 72. saat) bağlı olarak çalışıldı ve bulgular Şekil 3.1, 3.2 ve 3.3'te gösterildi.

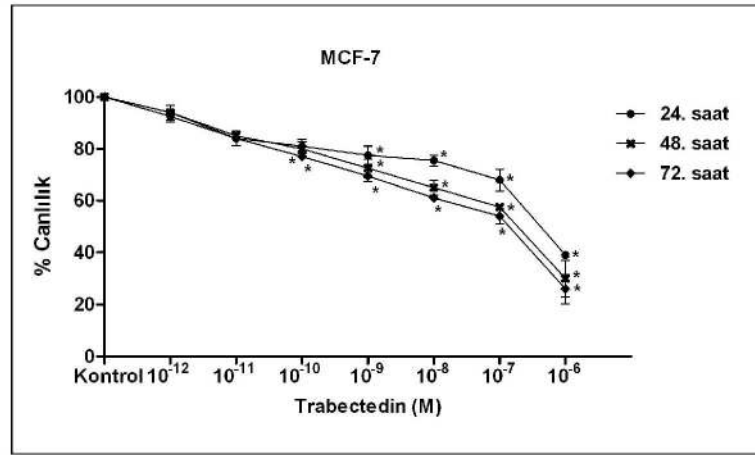
Trabectedinle 24 saat muamele sonunda, insan normal meme (MCF-10A) hücrelerinde 10^{-12} - 10^{-7} M arasındaki konsantrasyonlarda anlamlı sitotoksik etki saptanmazken ($p \geq 0.05$), 10^{-6} M konsantrasyonda anlamlı sitotoksik etki saptandı ($*p \leq 0.05$). 48. saatte Trabectedin 10^{-7} ve 10^{-6} konsantrasyonda sırasıyla % 22 ve %76 sitotoksik etki gösterirken ($*p \leq 0.05$), 10^{-12} - 10^{-8} M konsantrasyon aralığında anlamlı sitotoksik etki göstermedi ($p \geq 0.05$). 72. saatte ise Trabectedin MCF-10A hücrelerine 10^{-8} , 10^{-7} ve 10^{-6} M konsantrasyonlarda anlamlı sitotoksik etki gösterdi ($*p \leq 0.05$). Bu veriler kullanılarak Trabectedin'in MCF-10A normal meme hücre kültürlerinde 24, 48 ve 72. saatlerdeki IC_{50} değerleri sırasıyla 5.3×10^{-9} , 9.55×10^{-9} , 3.25×10^{-11} M olarak tespit edildi (Şekil 3.1).

MCF-7 meme kanseri hücrelerinde ise Trabectedin 24. saatte 10^{-10} M ve üzerindeki konsantrasyonlarda anlamlı sitotoksik etki gösterdi ($*p \leq 0.05$). 48. saatte 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , ve 10^{-7} M konsantrasyonlardaki sitotoksik etkisi sırasıyla %22, %27, %45 ve %63 olarak hesaplandı. 72. saatte anlamlı sitotoksik etkiye 10^{-10} M ve üzerindeki konsantrasyonlarda ulaşıldı ($*p \leq 0.05$). Bu veriler kullanılarak Trabectedin'in MCF-7 meme kanseri hücre kültürlerinde 24, 48 ve 72. saatlerdeki IC_{50} değerleri sırasıyla 6.2×10^{-9} , 4.85×10^{-9} , 3.6×10^{-10} M olarak tespit edildi (Şekil 3.2).

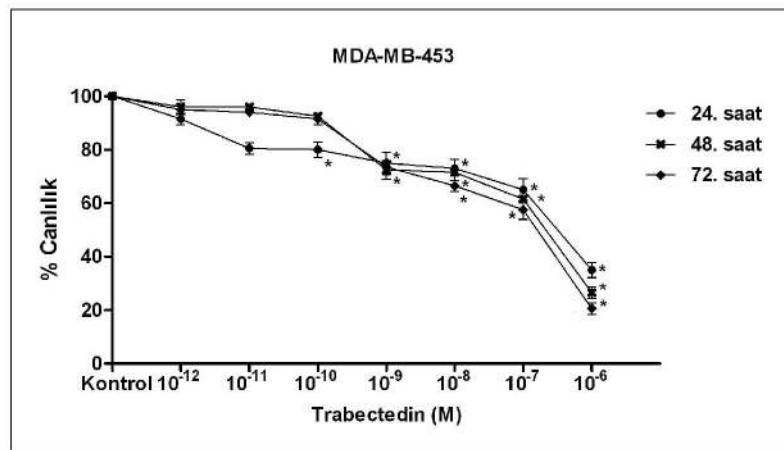
Trabectedin, MDA-MB-453 meme kanseri hücrelerinde 24. saatte 10^{-9} M ve üzerindeki konsantrasyonlarda anlamlı sitotoksik etki gösterdi ($*p \leq 0.05$). 48. saatte 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} M ve 10^{-6} M konsantrasyonlardaki sitotoksik etkisi sırasıyla %27, %32, %40 ve %73 olarak hesaplandı ($*p \leq 0.05$). 72. saatte anlamlı sitotoksik etkiye 10^{-11} M ve üzerindeki konsantrasyonlarda ulaşıldı ($*p \leq 0.05$). Bu veriler kullanılarak Trabectedin'in MDA-MB-453 meme kanseri hücre kültürlerinde 24, 48 ve 72. saatlerdeki IC_{50} değerleri sırasıyla 5.4×10^{-9} , 2.5×10^{-9} , 1.7×10^{-10} M olarak tespit edildi (Şekil 3.3).



Şekil 3.1: Trabectedin'in çeşitli dozlarının 24., 48. ve 72. saatlerdeki etkileri (MCF-10A).



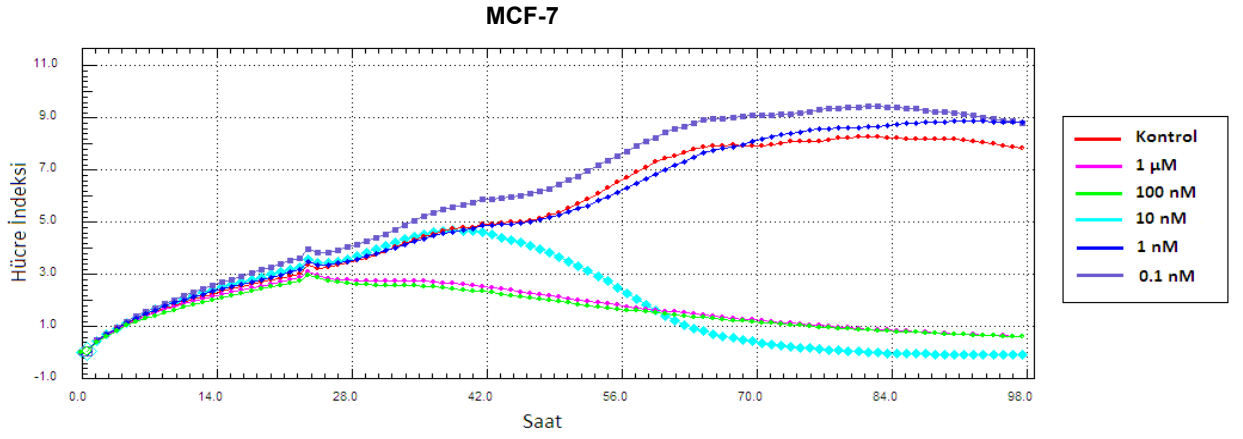
Şekil 3.2: Trabectedin'in çeşitli dozlarının 24., 48. ve 72. saatlerdeki etkileri (MCF-7).



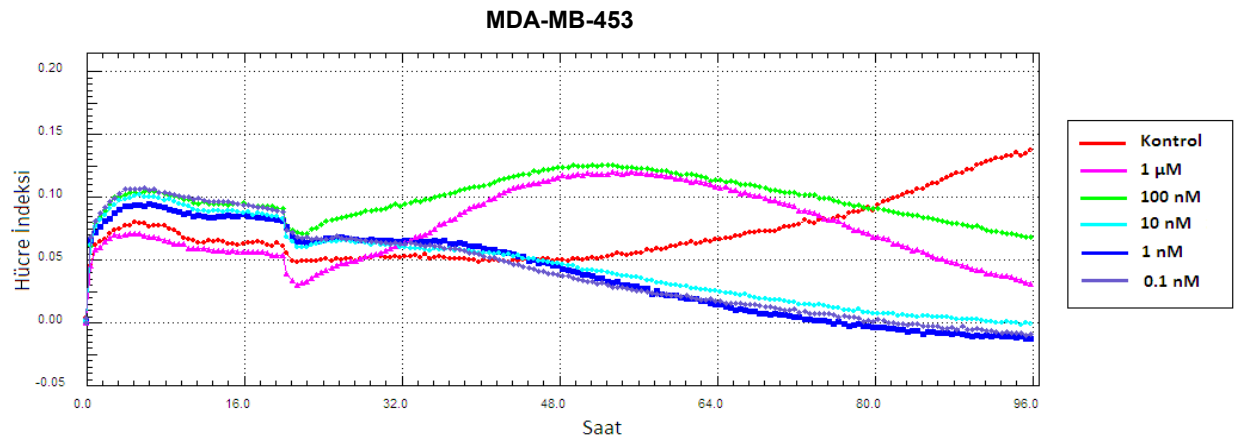
Şekil 3.3: Trabectedin'in çeşitli dozlarının 24., 48. ve 72. saatlerdeki etkileri (MDA-MB-453).

3.2. Trabectedin'in Hücre Kültürlerinde Erken Dönem Etkisinin Belirlenmesi

Trabectedin'in hücre kültürlerinde erken dönem etkisinin belirlenmesi için sitotoksik etkinin gerçek zamanlı ölçümüne olanak sağlayan xCELLigence sistemi kullanıldı. xCELLigence sisteminden elde edilen grafikler incelendiğinde, MCF-7 ve MDA-MB-453 hücre hatlarında Trabectedin'in etkisini göstermeye başladı zaman diliminin 48. saat olduğu tespit edildi (Şekil 3.4 ve Şekil 3.5). xCELLigence sistemine entegre yazılımı kullanılarak, elde edilen grafiklerden Trabectedin'in IC₂₅ ve IC₅₀ değerleri hesaplandı. Buna göre, Trabectedin'in 48. saatteki IC₂₅ ve IC₅₀ değerleri MCF-7 hücre hattında sırasıyla 1.98± 0.4 ve 4.8 ±0.8 nM, MDA-MB-453 hücre hattında ise sırasıyla 1.18± 0.2 ve 2.5±0.4 nM olarak tespit edildi.



Şekil 3.4: Sürekli izlenen MCF-7 meme kanseri hücre kültürlerinde Trabectedin'in etkisi.



Şekil 3.5: Sürekli izlenen MDA-MB-453 meme kanseri hücre kültürlerinde Trabectedin'in etkisi.

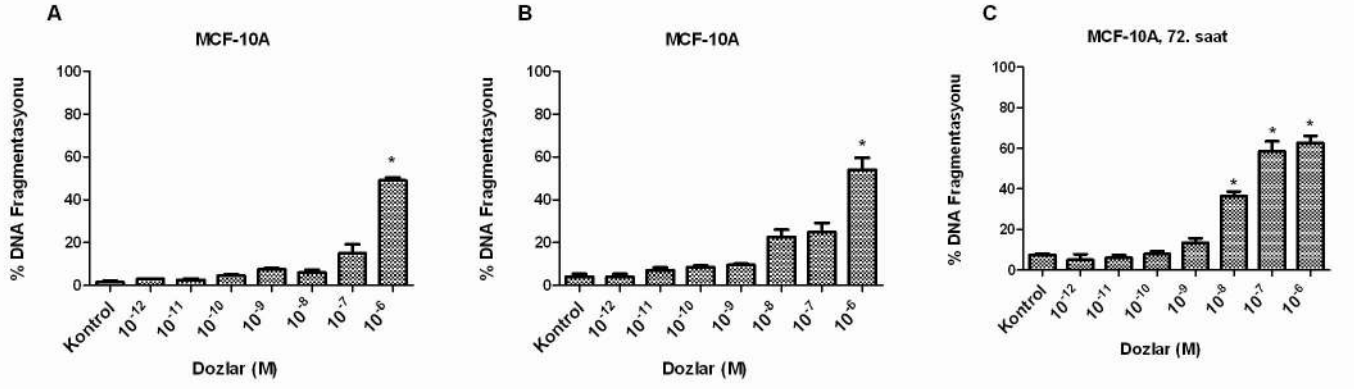
3.3. Trabectedin Aracılı Apoptozisi Gösteren Bulgular

Trabectedin'in MCF-10A, MCF-7 ve MDA-MB-453 hücrelerinde canlılığına olan etkilerinin apoptoza mı nekroza mı bağlı olarak gerçekleşip gerçekleşmediğini belirlemek üzere iki farklı yöntemden elde edilen sonuçlar [Şekil 3.6 (A-C), 3.7(A-C), 3.8(A-C)]'de verildi.

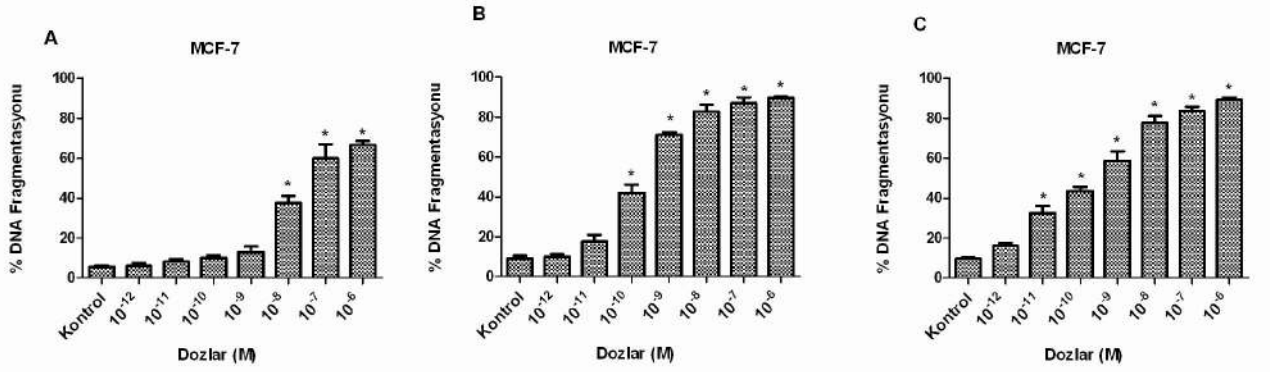
İnsan normal meme epitelyum hücreleri MCF-10A'da Trabectedin (10^{-12} - 10^{-7} M arasındaki konsantrasyonlarda) 24. ve 48. saatlerde DNA fragmentasyonunda anlamlı bir değişiklik gözlenmedi ($p \geq 0.05$). 72. saatte ise, 10^{-8} , 10^{-7} ve 10^{-6} M konsantrasyonda sırasıyla %38, %58, %62 oranında DNA fragmentasyonu saptandı ($*p \leq 0.05$). MCF-10A'da Trabectedin'in yüksek dozlarında belirlenen sitotoksik etkinin apoptozis aracılı olduğuna işaret eden bulgular Şekil 3.6(A-C)'de gösterildi.

Meme kanseri MCF-7 hücrelerinde ise, sitotoksik etkiyle paralel olarak DNA fragmentasyonunda (10^{-12} - 10^{-6} M arasındaki konsantrasyonlarda) artış tespit edildi. MCF-7 hücrelerinde DNA fragmentasyonunda 24. saatte 10^{-12} - 10^{-9} M konsantrasyonlarda anlamlı bir artış gözlenmezken ($p \geq 0.05$), 10^{-8} , 10^{-7} ve 10^{-6} M konsantrasyonlarda sırasıyla %37, %60 ve %66 oranında anlamlı artış tespit edildi ($*p \leq 0.05$). 48. saatte 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} ve 10^{-6} M konsantrasyonlarda DNA fragmentasyonunda sırasıyla %42, %71, %82.5, %87 ve %90 artış belirlendi ($*p \leq 0.05$). 72. saatte ise, 10^{-11} , 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} ve 10^{-6} M konsantrasyonlarda DNA fragmentasyonunda sırasıyla %32, %43.5, %58, %77, %83 ve %89 artış tespit edildi ($*p \leq 0.05$).

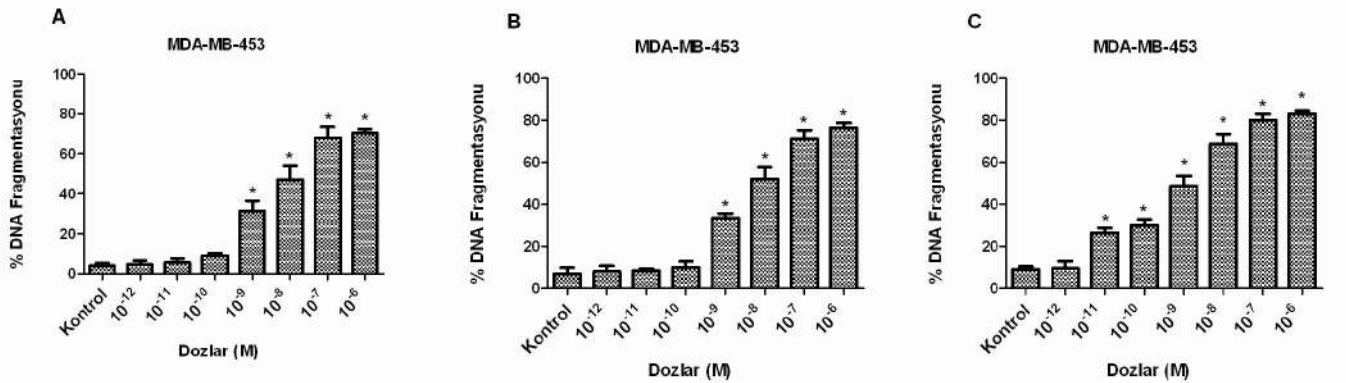
Trabectedin'in artan dozlarıyla 24 saat muamele edilen MDA-MB-453 kültürlerinde (10^{-12} - 10^{-10} M konsantrasyonlarda) DNA fragmentasyonunda anlamlı bir artış saptanmazken ($p \geq 0.05$), 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} ve 10^{-6} M konsantrasyonlarda sırasıyla %31, %47, %68.5 ve %70 artış belirlendi ($*p \leq 0.05$). 48. saatte 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} ve 10^{-6} M konsantrasyonlarda DNA fragmentasyonunda sırasıyla %33.5, %52, %71 ve %76.5 artış belirlendi ($*p \leq 0.05$). 72. saatte aynı dozlarla muamele edilen MDA-MB-453 hücre kültürlerinden elde edilen DNA fragmentasyon yüzdeleri sırasıyla %48.5, %68.5, %80 ve %83 idi ($*p \leq 0.05$).



Şekil 3.6: Trabectedin'in değişen dozlarıyla muamele edilen MCF-10A hücre kültürlerinde zamana bağlı DNA fragmentasyon yüzdeleri



Şekil 3.7: Trabectedin'in değişen dozlarıyla muamele edilen MCF-7 hücre kültürlerinde zamana bağlı DNA fragmentasyon yüzdeleri

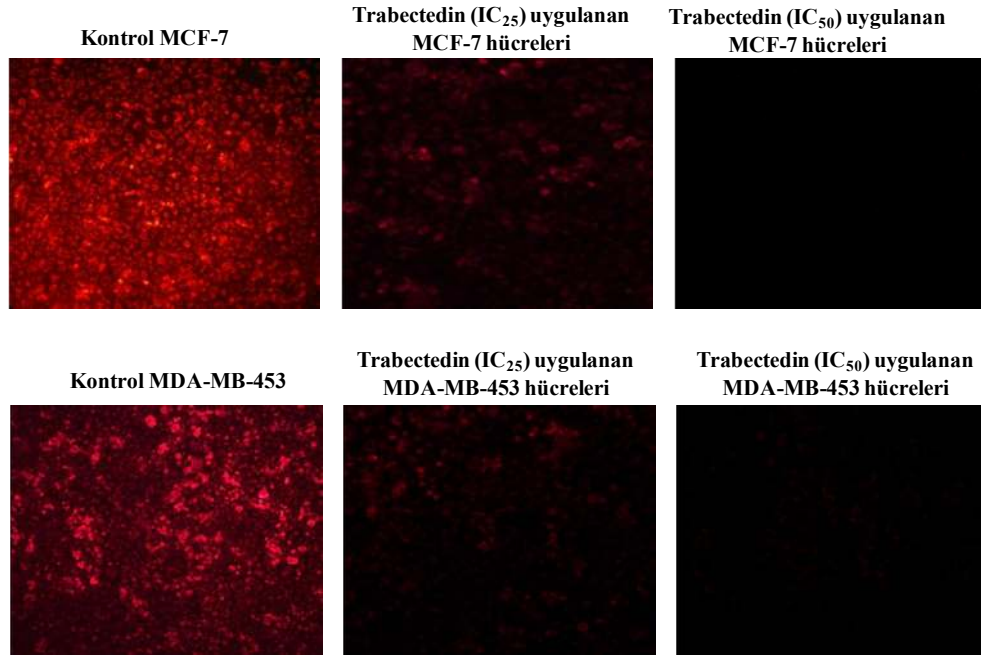


Şekil 3.8: Trabectedin'in değişen dozlarıyla muamele edilen MDA-MB-453 hücre kültürlerinde zamana bağlı DNA fragmentasyon yüzdeleri

3.4. Mitokondriyal Membran Potansiyeli Ölçümü ile Trabectedin Aracılı Apoptozisin Doğrulanması

Trabectedin' in IC_{25} ve IC_{50} dozlarıyla muamele edilen MCF-7 ve MDA-MB-453 insan meme kanseri hücre kültürlerinde apoptozisin bir belirtici olarak kullanılan mitokondriyal membran potansiyeli değişimleri ölçüldü. TMRE boyası kullanılarak 48. saatte alınan sonuçlar Şekil 3.9' da gösterildi.

Kontrol hücrelerindeki mitokondriler floresans kırmızı TMRE boyası ile boyanırken, Trabectedinin IC_{25} dozuyla 48 saat muamele edilen MCF-7 ve MDA-MB-453 hücrelerinde Trabectedin uygulanan hücrelerdeki floresans miktarında azalma gözlemlendi. Trabectedin'in IC_{50} dozuyla muamele edilen hücrelerde TMRE ile boyanan hücre miktarı ise IC_{25} uygulanan hücrelere göre daha azdı (Şekil 3.9).



Şekil 3.9: TMRE boyası ile boyanan MCF-7 (IC_{25} =1.98, IC_{50} =4.8 nM) ve MDA-MB-453 (IC_{25} =1.18, IC_{50} =2.5 nM) hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri (40X).

3.5. Trabectedin Aracılı Apoptoziste Rol Alan Proteinlerin Antikor Array Bulguları

Trabectedin'in IC₅₀ dozlarıyla muamele edilen MCF-7 (IC₅₀=4.8 nM) ve MDA-MB-453 (IC₅₀=2.5 nM) 48 saatlik hücre kültürlerinde protein antikor array (çoklu western) yöntemiyle ölçülen apoptozisle ilişkili 35 proteinin miktarları Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2'de gösterildi.

Trabectedine maruz bırakılan MCF-7 hücre kültürlerinde proapoptotik moleküllerden TRAIL R1/DR4, TRAIL R1/DR5, Fas/TNFRSF6, TNF RI/TNFRSF1A ve FADD'da sırasıyla 2.6, 3.1, 1.7, 11.2 ve 4.0 kat artış belirlendi (p≤0.05). Apoptozis inhibitör proteinleri (AIP) ailesinden olan CIAP-1, XIAP, Livin ve Survivin'de sırasıyla 5.5, 2.5, 2.6, 3.0 kat azalış tespit edildi (p≤0.05)

Çizelge 3.1: Trabectedine maruz bırakılan MCF-7 hücre kültürlerinde istatistiksel olarak anlamlı değişim gösteren proteinler ve değişim oranları.

Protein Adı	Değişim Oranı
TRAIL R1/DR4	+ 2.6 ± 0.8
TRAIL R2/DR5	+ 3.1 ± 1.2
FAS/TNFRSF6	+ 1.7 ± 2.4
TNF RI/TNFRSF1A	+ 11.2 ± 0.4
FADD	+ 4.0 ± 0.2
Fosfo-p53 (S46)	+ 5.5 ± 2.4
Fosfo-p53 (S392)	+ 4.5 ± 0.8
CIAP-1	- 5.5 ± 0.6
XIAP	- 2.5 ± 1.4
HSP27	+ 2.5 ± 1.2
HSP60	+ 3.0 ± 1.2
Livin	- 2.6 ± 0.4
Survivin	- 3.0 ± 0.8

Trabectedine maruz bırakılan MDA-MB-453 hücre kültürlerinde proapoptotik moleküllerden Bad, Bax, aktif-kaspaz-3, Sitokrom-c, SMAC/DIABLO, Htra2/Omi'de sırasıyla 3.6, 4.2, 4.4, 4.8, 4.5 ve 5.2 kat artış belirlendi ($p \leq 0.05$). Antiapoptotik moleküllerden Bcl-2, Bcl-XL, Pro-kaspaz-3'de 4.8, 5.2 ve 6.0 kat azalış tespit edildi ($p \leq 0.05$). AIP ailesinden olan CIAP-1 ve SURVIVIN'de sırasıyla 5.0 ve 2.7 kat azalış tespit edildi ($p \leq 0.05$).

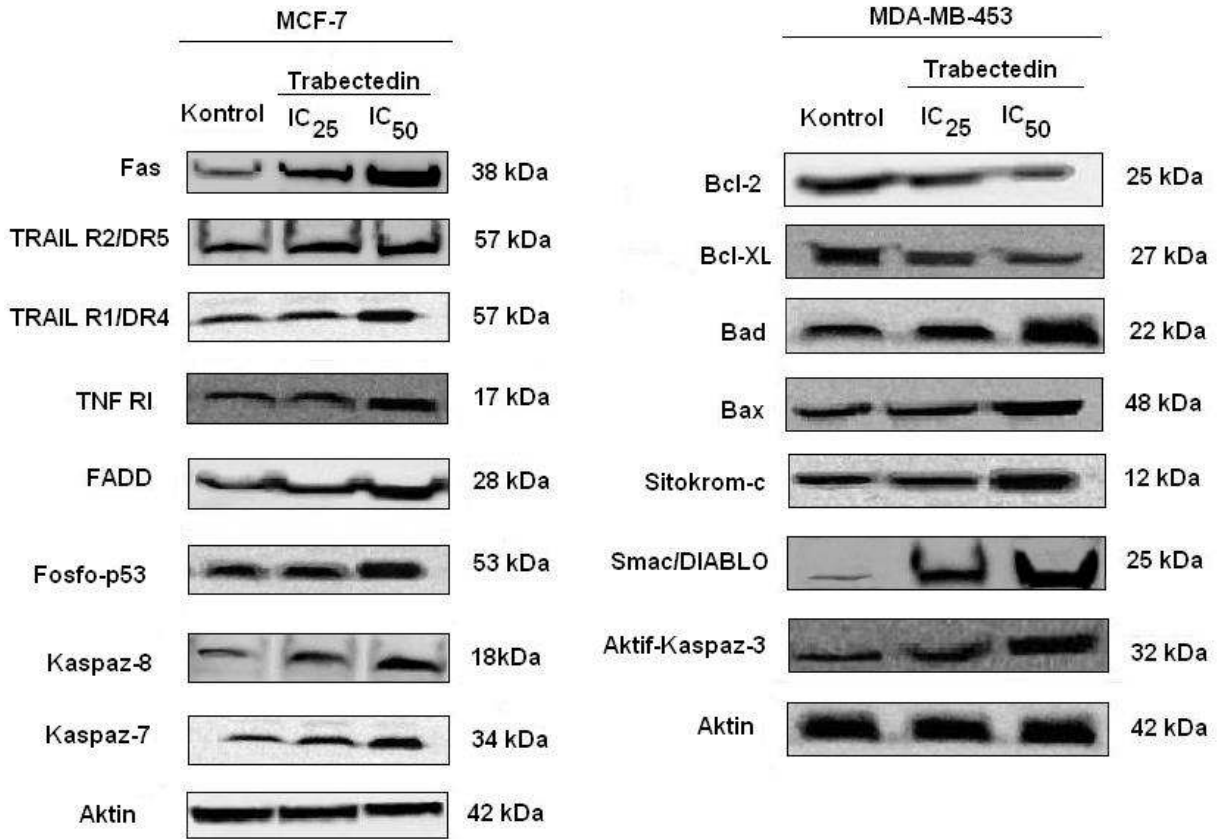
Çizelge 3.2.: Trabectedin'e maruz bırakılan MDA-MB-453 hücre kültürlerinde istatistiksel olarak anlamlı değişim gösteren proteinler ve değişim oranları.

Protein	Değişim Oranı
Bad	+ 3.6 $\pm$ 2.2
Bax	+ 4.2 $\pm$ 1.2
Bcl-2	- 4.8 $\pm$ 1.4
Bcl-XL	- 5.2 $\pm$ 0.8
Pro-Kaspaz-3	- 6.0 $\pm$ 0.6
Aktif Kaspaz-3	+ 4.4 $\pm$ 0.4
HIF-1A	- 4.8 $\pm$ 1.2
Katalaz	+ 8.8 $\pm$ 2.4
Sitokrom-c	+ 4.8 $\pm$ 2.1
SMAC/DIABLO	+ 4.5 $\pm$ 0.4
Htra2/Omi	+ 5.2 $\pm$ 0.4
HO-2/HMOX2	- 6.8 $\pm$ 0.6
HSP27	+ 3.6 $\pm$ 1.2
HSP70	+ 5.2 $\pm$ 1.4
CIAP-1	- 5.0 $\pm$ 1.6
Survivin	- 2.7 $\pm$ 2.1

3.6. Trabectedin'in Etkilediği Apoptotik Proteinlerin Western Blot Yöntemiyle Doğrulanması

Trabectedine maruz bırakılan MCF-7 ve MDA-MB-453 hücrelerinde apoptotik proteinlerde meydana gelen anlamlı değişimler, western blot yöntemiyle doğrulandı.

Apoptotik protein array analizlerinde, MCF-7 hücrelerinde anlamlı değişim gösteren moleküllerden Fas, TRAIL R2/DR5, TRAIL R1/DR4, TNFR1, FADD, Fosfo-p53, kaspaz-8 ve kaspaz-7, MDA-MB-453 hücrelerinde ise Bcl-2, Bcl-XL, Bax, Bad, Sitokrom c, SMAC/DIABLO ve aktif kaspaz-3 proteinlerine western blot yöntemi uygulandı. Western blot uygulanan proteinlerde meydana gelen değişimler Şekil 3.10'da gösterildi.

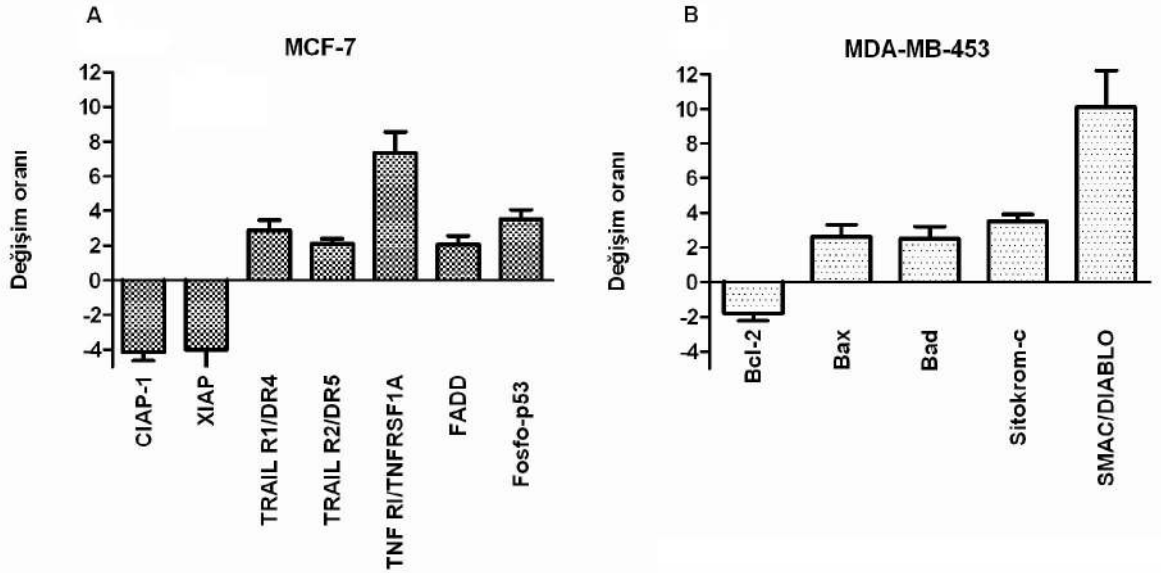


Şekil 3.10: Trabectedinle muamele edilen MCF-7 (IC₂₅=1.98, IC₅₀=4.8 nM) ve MDA-MB-453 (IC₂₅=1.18, IC₅₀=2.5 nM) hücrelerinde apoptozisle ilişkili proteinlerde meydana gelen değişimler.

3.7. Trabectedin'in Etkilediği Apoptotik Proteinlerin mRNA Düzeyindeki Değişiklikler

Trabectedin'in apoptotik proteinlerin sentezinde sebep olduğu değişikliklerin mRNA düzeyinde de gerçekleşip gerçekleşmediği qRT-PCR (primer assay) kullanılarak araştırıldı ve sonuçlar Şekil 3.11'de gösterildi.

Trabectedin muamelesi sonucu MCF-7 hücre kültürlerinde, antiapoptotik moleküllerden CIAP-1 ve XIAP mRNA'larında 4.2 ve 3.8 kat azalış, proapoptotik moleküllerden TRAIL R1/DR4, TRAIL R2/DR5, TNF RI/TNFRSF1A, FADD ve Fosfo-p53 mRNA'larında ise sırasıyla 2.9, 2.1, 8.4, 2.1 ve 3.5 kat artış belirlendi ($p \leq 0.05$). MDA-MB-453 hücrelerinde antiapoptotik moleküllerden Bcl-2 mRNA'sında 1.8 kat azalış, proapoptotik moleküllerden ise Bax, Bad, Sitokrom c ve SMAC/Diablo mRNA'larında ise sırasıyla 2.6, 2.5, 3.4, 10.5 kat artış belirlendi ($p \leq 0.05$) (Şekil 3.11 A,B).



Şekil 3.11: Trabectedin'in IC₅₀ dozuna maruz bırakılan MCF-7 (IC₅₀=4.8 nM) ve MDA-MB-453 (IC₅₀=2.5 nM) hücrelerinde apoptozis ile ilişkili moleküllerin mRNA'larında meydana gelen değişimler (48. saat).

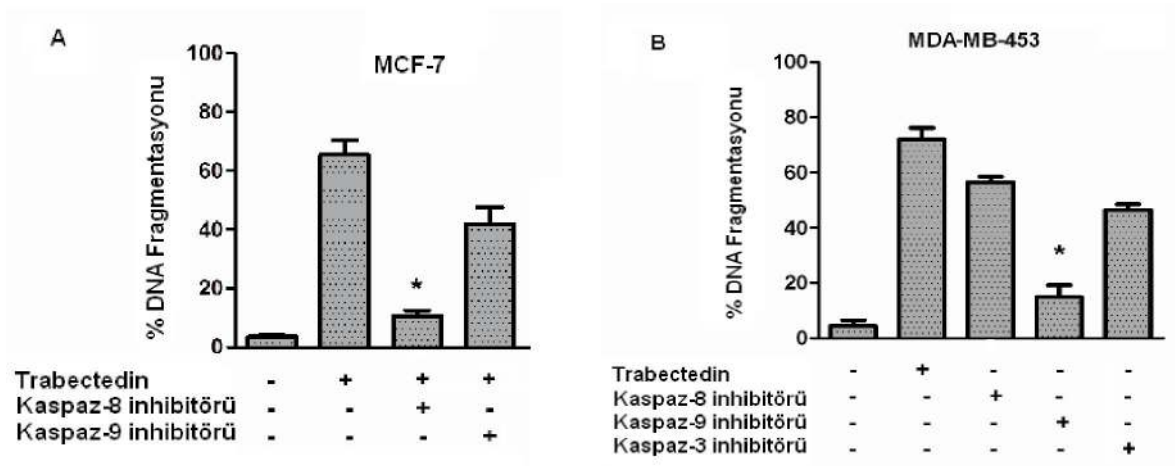
3.8. Farklı Apoptotik Yolaklar Üzerinden Gerçekleşen Trabectedin Aracılı Apoptozis

Apoptotik protein array verilerinden yola çıkarak, Trabectedin'in apoptozisi MCF-7 hücrelerinde ölüm reseptörleri aracılı yolak (dış yolak) üzerinden, MDA-MB-453 hücrelerinde ise mitokondri aracılı yolak (iç yolak) üzerinden indüklediği hipotezi kurulmuştur.

Bu hipotezin doğrulanması için apoptozisin iç ve dış yollarının araştırıldığı çalışmalarda yaygın olarak kullanılan spesifik Kaspaz-8 (z-IETD-fmk) ve Kaspaz-9 (z-LEHD-fmk) inhibitörleri kullanılmıştır. MCF-7 hücreleri Kaspaz-8, Kaspaz-9 ve Kaspaz-3 spesifik inhibitörleri ile 1 saat muamele edildikten sonra 48 saat boyunca Trabectedinle muamele edildi ve DNA fragmentasyon miktarları ölçüldü. Sonuçlar incelendiğinde, Kaspaz-8 inhibitörüyle ön muamele edilen hücrelerde, yalnızca Trabectedinle muamele edilen hücrelere göre DNA fragmentasyonunda azalış belirlenirken ($*p \leq 0.05$), Kaspaz-9 inhibitörüyle ön muamele edilen hücrelerde, yalnızca Trabectedinle muamele edilen hücrelere göre DNA fragmentasyonunda önemli bir değişim tespit edilmedi ($p > 0.05$) (Şekil 3.12A). Bu sonuçlar, Trabectedin'in MCF-7 hücrelerinde ölüm reseptörü aracılı yolk üzerinden apoptozisi indüklediğini doğrulamıştır.

MDA-MB-453 hücrelerinde hangi apoptotik yolağın baskın olduğunu belirlemek amacıyla MDA-MB-453 hücreleri yine Kaspaz-8 (z-IETD-fmk), Kaspaz-9 (z-LEHD-fmk) ve Kaspaz-3 (Z-DEVD-fmk) spesifik inhibitörleri ile 1 saat muamele edildikten sonra 48 saat boyunca Trabectedinle muamele edildi ve DNA fragmentasyon miktarları ölçüldü. Kaspaz-9 inhibitörüyle ön muamele edilen hücrelerde, yalnızca Trabectedinle muamele edilen hücrelere göre DNA fragmentasyonunda azalış belirlenirken ($*p \leq 0.05$), Kaspaz-8 inhibitörüyle ön muamele edilen hücrelerde, yalnızca Trabectedinle muamele edilen hücrelere göre DNA fragmentasyonunda önemli bir değişim tespit edilmedi ($p > 0.05$) (Şekil 27B). Elde edilen bu sonuçlar, Trabectedin'in MDA-MB-453 hücrelerinde mitokondri aracılı yolk üzerinden apoptozisi indüklediğini göstermiştir.

Kaspaz-3 inhibitörüyle ön muamele edilen MDA-MB-453 hücre kültürlerinde, yalnızca Trabectedinle muamele edilen hücrelere göre DNA fragmentasyonunda anlamlı değişim gözlenmedi ($p > 0.05$) (Şekil 3.12B).



Şekil 3.12: Spesifik Kaspaz inhibitörleriyle ön muamele edilen MCF-7 (A) ve MDA-MB-453 (B) hücrelerinde Trabectedin uygulaması sonrası DNA fragmentasyon miktarlarında meydana gelen değişimler (48. saat).

3.9. Anjiyogenezle İlişkili Proteinlerin Sentez Düzeylerinde Trabectedin Aracılı Değişiklikler

Trabectedin'in IC_{50} dozlarıyla 48 saat muamele edilen MCF-7 ($IC_{50}=4.8$ nM) ve MDA-MB-453 ($IC_{50}=2.5$ nM) hücre kültürlerinde protein antikor array yöntemiyle ölçülen anjiyogenezle ilişkili 55 proteinden istatistiksel olarak anlamlı değişim gösteren proteinlerin miktarları Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.4'te gösterilmektedir.

Trabectedin muamelesi sonucu MCF-7 hücre kültürlerinde anti-anjiyojenik moleküllerden Serpin E1/PAI-1 ve TIMP-1 proteinlerinde sırasıyla 3.5 ve 4.2 kat artış tespit edildi ($p \leq 0.05$). Tissue Factor/Factor III, DPPIV/CD26, uPA, VEGF gibi pro-anjiyojenik moleküllerde ise sırasıyla 8.4, 6.2, 6.2, 6.8 kat azalış tespit edildi ($p \leq 0.05$). MDA-MB-453 hücrelerinde ise Trabectedin muamelesi sonucu anti-anjiyojenik moleküllerden ENDOGLIN, PF4, TIMP-1 ve TIMP-2'de sırasıyla 26.0, 3.5, 3.0, 2.2 kat artış tespit edilirken ($p \leq 0.05$), pro-anjiyojenik moleküllerden IGFBP-2, MMP-8, MMP-9 ve VEGF'de sırasıyla 4.2, 6.2, 2.1, 8.4 kat azalış tespit edildi ($p \leq 0.05$).

Çizelge 3.3: Trabectedin'e maruz bırakılan MCF-7 hücre kültürlerinde anlamlı değişim gösteren anjiyogenezle ilişkili proteinler ve değişim oranları.

Protein Adı	Değişim Oranı
Tissue Factor/Factor III	- 8.4 ± 1.2
DPPIV/CD26	- 6.2 ± 1.4
GM-CSF	-2.1 ± 0.4
Serpin E1/PAI-1	+ 3.5 ± 0.8
TIMP-1	+ 4.2 ± 1.2
IGFBP-1	- 4.8 ± 2.4
IGFBP-2	- 3.2 ± 1.0
CXCL8/IL-8	- 4.6 ± 1.6
uPA	- 6.2 ± 2.2
HB-EGF	- 2.2 ± 1.6
VEGF	- 6.8 ± 0.8

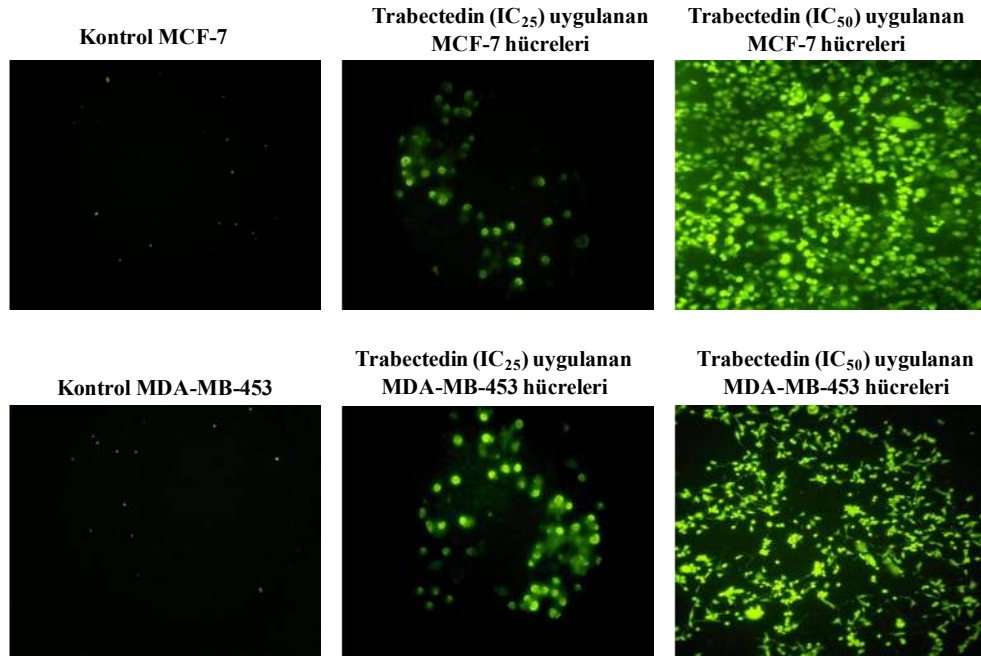
Çizelge 3.4: Trabectedin'e maruz bırakılan MDA-MB-453 hücre kültürlerinde anlamlı değişim gösteren anjiyogenezle ilişkili proteinler ve değişim oranları.

Protein Adı	Değişim Oranı
ANGIOGENIN	- 2.0 ± 1.4
ANGIOPOIETIN-1	+2.1 ± 0.2
CXCL16	-3.5 ± 1.4
ENDOGLIN	+26 ± 2.1
GM-CSF	-2.5 ± 1.2
IGFBP-2	-4.7 ± 0.8
MCP-1	-3.5 ± 1.6
MMP-8	-6.2 ± 2.4
MMP-9	-2.1 ± 2.6
PF4	+3.5 ± 1.8
SERPIN B5	+2.8 ± 1.2
TIMP-1	+3.0 ± 1.6
TIMP-4	+2.2 ± 1.8
THROMBOSPONDIN-1	-6.0 ± 0.2
VASOHIBIN	+2.5 ± 1.2
VEGF	-8.4 ± 0.8

3.10. Trabectedin'in Hücre içi Reaktif Oksijen Türevleri (ROS) Üzerine Etkisi

Trabectedinle muamele edilen meme kanseri hücre kültürlerinde ROS'un hücre içindeki birikimini ölçmek üzere, 29,79-diklorofloresan diasetat (H2-DCF-DA) boyama metodu kullanıldı ve hücreler floresan mikroskopta (490/520 nm) görüntülendi (Şekil 3.13).

Kontrol grubu olarak kullanılan hücre kültürlerinde H2-DCF-DA boyaması sonucu, floresan ışımaya gözlenmezken, Trabectedin'in IC₂₅ konsantrasyonlarıyla muamele edilen hücrelerde floresan ışımaya gözlemlendi. IC₅₀ konsantrasyonda ise artan ROS ile doğru orantılı olarak neredeyse tüm hücrelerin floresan ışımaya yaptığı gözlemlendi (Şekil 3.13).

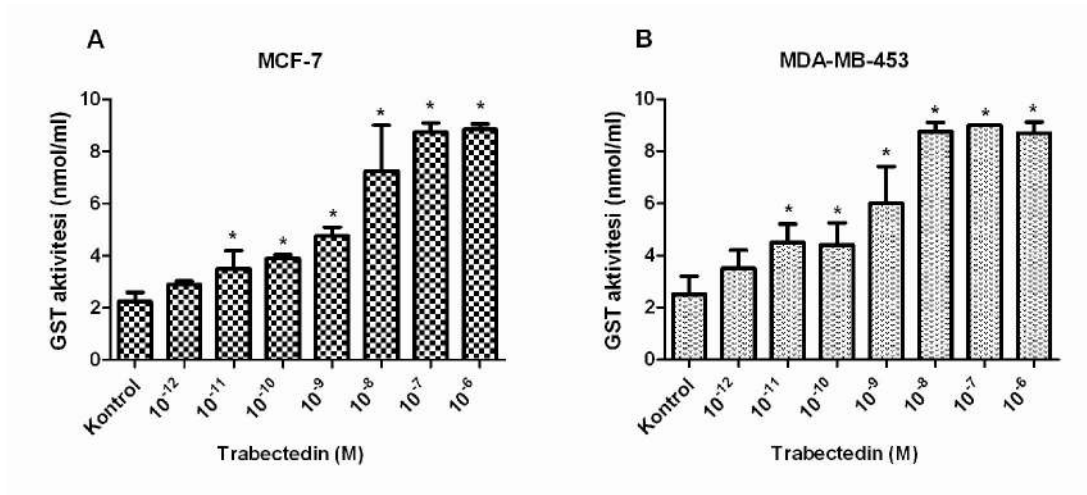


Şekil 3.13: H2-DCF-DA ile boyanan MCF-7 ve MDA-MB-453 hücrelerinde ROS'un floresan mikroskop görüntüleri (48. saat, 40X).

3.11. Trabectedin'in Glutatyon S Transferaz (GST) Aktivitesi Üzerine Etkileri

Trabectedin'in MCF-7 ve MDA-MB-453 hücrelerinde GST aktivitesi üzerindeki etkilerine ait bulgular Şekil 3.14 (A,B)'da gösterildi.

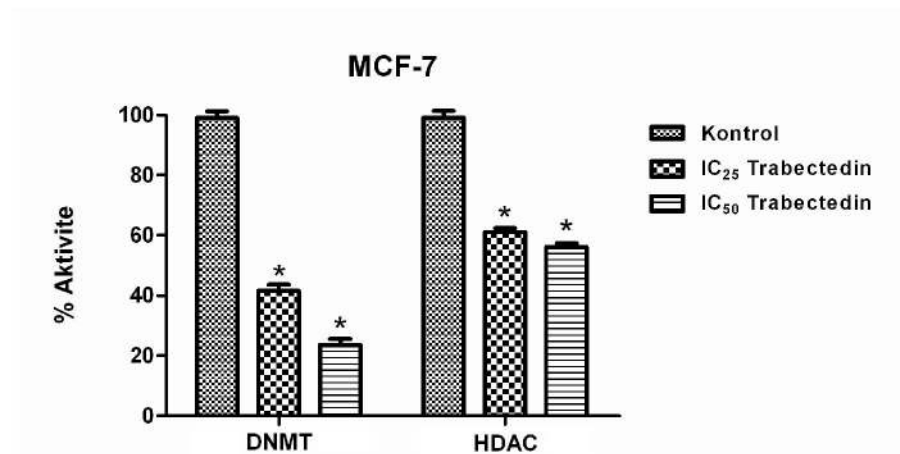
Artan dozlarda (10^{-12} - 10^{-6} M) 48 saat süresince Trabectedin uygulanan MCF-7 ve MDA-MB-453 hücrelerinde GST aktivitesinde anlamlı artış belirlendi (*p≤0.05).



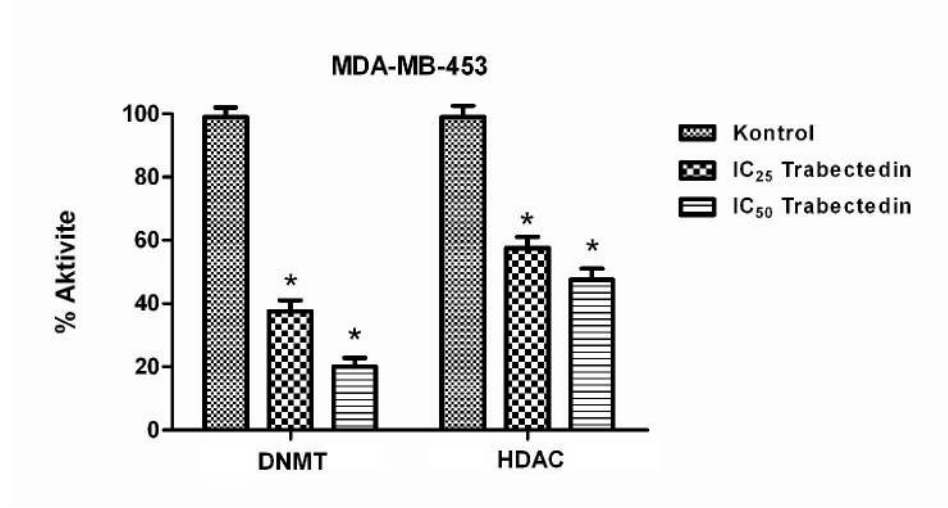
Şekil 3.14: Trabectedin muamelesi sonucu MCF-7 ve MDA-MB-453 hücrelerinde Glutasyon S Transferaz (GST) aktivitesinde meydana gelen değişimler (48. saat).

3.12. DNA Metiltransferaz (DNMT) ve Histon Deasetilaz (HDAC) Aktivitelerindeki Trabectedin Aracılı Değişiklikler

Trabectedin muamelesi sonucu epigenetik mekanizmalardaki değişikliği izlemede kullanılan DNMT ve HDAC aktivitelerine ait bulgular, Şekil 3.15 ve Şekil 3.16'da gösterildi. MCF-7 ve MDA-MB-453 hücrelerinde Trabectedin'in artan dozlarına bağlı olarak her iki enzim aktivitesinde anlamlı düzeyde azalış tespit edildi (* $p \leq 0.05$).



Şekil 3.15: Trabectedin muamelesi sonucu MCF-7 hücrelerinde DNA Metiltransferaz (DNMT) ve Histon Deasetilaz (HDAC) aktivitelerinde meydana gelen değişimler (48. saat).



Şekil 3.16: Trabectedin muamelesi sonucu MDA-MB-453 hücrelerinde DNA Metiltransferaz (DNMT) ve Histon Deasetilaz (HDAC) aktivitelerinde meydana gelen değişimler (48. saat).

4. TARTIŞMA

Kanserin tedavisinde kullanılan ilaçların geliştirilmesindeki zorlu süreç ve tedavide kullanılan ajanlara karşı, kanser hücrelerinin çoklu ilaç direnci geliştirmesinden dolayı, kullanıma yeni giren ilaçların kullanılabileceği kanser çeşitlerinin sayısının artırılması, kritik derecede önemli stratejik yaklaşım olarak kabul edilmektedir. Ayrıca kanserin kimyasal moleküllerle etkin tedavisini başarma, büyük ölçüde, ilaç ve hücre etkileşimlerinin moleküler biyolojisini çözümlmeye bağlıdır.

Her hastada ve hatta hastalığın her evresinde farklı genotipik ve fenotipik özellikler gösteren bir hastalık özelliğinde olan meme kanseri tedavisinde yeni tedavi protokollerinin araştırılması, kemoterapilerin etkinliğini artırıcı mekanizmaların bulunması gerekmektedir. Bu bağlamda meme kanserinde etkili olan yeni ilaçların ortaya koyulması ve bu ilaçların moleküler mekanizmalarının meme kanserinin hücresel düzeydeki modeli olan model hücre hatlarında aydınlatılması meme kanserinin tedavisine önemli katkılar sunacaktır (Ubezio et al, 2008).

Bu stratejinin ilk basamağını, meme kanseri hücre kültürlerinde ve/veya model organizmalarda yeni kullanıma giren, etkinliği bilinmeyen ilaçlarla ilgili detaylı yansıtıcı araştırmaların yapılması ve moleküler etkileşim sistemlerine ait veri toplanılması oluşturmaktadır.

Özgün bir yapı ve konformasyona sahip Trabectedin'in, çeşitli tümör hücre kültürlerinde sitotoksik etkinliği çalışılmış ve yumuşak doku sarkomlarında etkili bir kemoterapotik ajan olduğu gösterilmiştir. Bununla beraber, Trabectedin molekülünün değişik dokulara ait kanser türlerinde hangi moleküler mekanizmalar ve moleküller üzerinden etkili olduğu ise güncel araştırma konusudur. Meme kanseri hücre kültürlerindeki etkileri ve buna yol açan moleküler mekanizmaları ise henüz aydınlatılmamış olup, bu çalışmada ilk moleküler veriler elde edilmiştir.

Literatürdeki araştırmaların çoğu, Trabectedin'in DNA üzerindeki etkilerine yöneliktir. Bu tez çalışmasında ise, Trabectedin molekülünün normal meme (MCF-10A) ve meme kanseri hücre kültürlerindeki (MDA-MB-453 ve MCF-7) hücre çoğalmasını engelleyici etkilerinin yanında, etkileşime girdiği olası apoptotik ve anti-

anjyogenik moleküller, hücre içi redüksiyon/oksidasyon dengesini düzenleyici moleküller ve epigenetik düzenlemede rol oynayan kritik moleküller araştırıldı.

Heterojen bir hastalığı farklı özellikleriyle temsil eden hücre hatlarıyla çalışmak, *in vitro* deney bulgularının kliniğe yansıtılmasının geçerliliği noktasında önemli bir yaklaşımdır. Son yıllarda, potansiyel antikanser ilaçların meme kanseri hücreleri üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda, Luminal A tipte meme kanserini temsil eden MCF-7 ve HER2 pozitif meme kanserini temsil eden MDA-MB-453 hücre hatları sıklıkla tercih edilmektedir (Choi ve Kim, 2008; Fukumura ve diğ., 2009; Choi ve diğ., 2010; Zhao ve diğ., 2010; Choi ve diğ., 2011; Kim ve diğ., 2012; Liu ve diğ., 2012). Bu çalışmada da meme kanserinin farklı alt tiplerini temsil eden MCF-7 ve MDA-MB-453 hücre hatları kullanıldı. Yeni antikanser ajanların kanser hücreleri üzerindeki etkilerinin araştırılmasının yanı sıra, normal hücreler üzerindeki etkilerinin de araştırılması oldukça önemlidir. Bu nedenle, normal meme hücrelerini temsil eden MCF-10A hücre hattı deneylerde dış kontrol olarak kullanıldı.

Çalışmamızda Trabectedin'in 48. saatte, MCF-7 hücre hattındaki IC₅₀ değeri 4.8 nM olarak hesaplandı. Takahashi ve arkadaşlarının MCF-7 hücre hattı ile yaptığı çalışmada ise, Trabectedin'in 96. saatteki IC₅₀ değeri 1.5 nM olarak tespit edilmiştir (Takahashi ve diğ., 2002). IC₅₀ değerleri arasındaki bu farklılık, Takahashi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada MCF-7 hücrelerinin Trabectedin'le 96 saat muamele edilmesinden kaynaklanabileceği gibi, test edilen hücre sayısı ve çoğaltım koşullarının farklı oluşundan da kaynaklanabilir. Zira bizim çalışmamızda gerçek zamanlı hücre canlılık grafikleri incelendiğinde, Trabectedin'in meme kanseri hücrelerindeki sitotoksik etkisinin en belirgin olduğu saatin 48. saat olduğu tespit edildi ve ilacın en etkili olduğu 48. saatteki IC₅₀ değeri hesaplandı.

XTT gibi sitotoksisite ölçüm yöntemleri, araştırılan ajanla muamele edilen hücrelerdeki sitotoksik etkiyi kesikli olarak tek veya iki üç zaman dilimi (24, 48, 72 saat gibi) sonunda ölçmemize izin verir. Ancak xCELLigence gibi sistemler, ajanla muamele edilen hücre kültürlerini kesintisiz olarak izleme imkanı sağlar. Hücre kültürlerinin xCELLigence sistemi ile gerçek zamanlı olarak gözlenebilmesi, ajanın etkisini göstermeye başladığı saatin belirlenmesine, dolayısıyla etkinin en belirgin olduğu saatin belirlenmesi gibi avantajlar sağlar. Ayrıca, XTT yönteminden elde edilen verilerin standart sapmaları oldukça yüksek iken, xCELLigence sisteminden elde edilen verilerin standart sapmaları oldukça düşüktür. Bu da, xCELLigence sisteminden elde edilen verilerin kesinliğini, tutarlılığını ve tekrarlanabilirliğini arttırmaktadır.

Literatürde Trabectedin'in sitotoksik etkilerinin araştırıldığı pek çok çalışma mevcuttur ancak, MDA-MB-453 meme kanseri hücre hattıyla yapılmış bir çalışma

bulunmamaktadır. Benzer şekilde, Trabectedin'in MCF-10A hücre hatları üzerindeki etkilerinin de araştırıldığı çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışma, Trabectedin'in sitotoksik etkilerinin MDA-MB-453 ve MCF-10A hücre hatlarında araştırıldığı ilk çalışmadır.

Trabectedin'in meme hücrelerindeki IC_{50} değerleri incelendiğinde, Trabectedin'in meme kanseri hücre kültürlerindeki etkinliğinin, diğer hücre hatlarındaki gibi nanomolar seviyelerde olduğu görülmektedir. Takahashi ve arkadaşlarının MCF-7 ile yaptıkları çalışmada, Trabectedinin IC_{50} değerini 1.5 nM olarak tespit etmişlerdir (Takahashi ve diğ., 2002). Scotlandi ve arkadaşlarının, TC-71 ve TC/DOXO8 Ewing's sarkoma hücre hatlarıyla yaptığı çalışmada ise, Trabectedin'in 72. saatteki IC_{50} değerleri sırasıyla 0.23 ve 0.70 nM, U-2 OS ve Saos-2 osteosarkoma hücre hatlarında 96. saatteki değerleri ise sırasıyla 0.42 ve 0.15 nM olarak tespit etmişlerdir (Scotlandi ve diğ., 2002). Li ve arkadaşlarının çalışmasında, Trabectedin'in çeşitli tiplerdeki insan sarkom hücre hatlarındaki sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Trabectedin'in fibrosarkom hücre hattı HT-1080'deki IC_{50} değeri 0.0002 nM, mezenşimal kondrosarkom hücre hattı HS-16'daki IC_{50} değeri 0.02 nM, liposarkom hücre hattı HS-18'deki IC_{50} değeri 0.06 nM, mezodermal sarkoma hücre hatları M8805, M9110 ve HS-90 hücre hatlarındaki IC_{50} değerleri ise sırasıyla 0.0006, 0.0004 ve 0.001 nM olarak tespit edilmiştir (Lİ ve diğ., 2001). Takahashi ve arkadaşları ise Trabectedin'in fibrosarkom hücre hattı HT-1080 ve liposarkom hücre hattı HS-18'deki IC_{50} değerlerini sırasıyla 0.01 ve 0.27 nM olarak belirlemiştir (Takahashi ve diğ., 2001). Trabectedin'in sarkom hücre hatlarında meme kanseri hücre hatlarına oranla daha düşük dozlarda etkili olması, Trabectedin'in hücre içine alım miktarlarındaki farklılıktan kaynaklanabileceği gibi, hücre hatlarındaki MDR ekspresyon miktarlarındaki farklılıklardan da kaynaklanabilir.

Trabectedin'in normal meme hücrelerine olan sitotoksik etkisinin meme kanseri hücrelerine olan sitotoksik etkisine oranla daha az olduğu belirlendi. Bu durum Trabectedin'in tümör spesifik özelliğinin olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, Trabectedin'in DNA tamir sistemlerinde defektler olan hücrelerde daha etkili olduğu bilindiğinden, normal hücrelerde nispeten daha az etkili olması beklenen bir durumdur (D'Incalci ve diğ., 2002). Sitotoksikite verilerinden elde edilen bu ümit verici sonuçlar, Trabectedin'in meme kanseri de dahil olmak üzere çeşitli kanser tiplerinde faz II ve III klinik çalışmalarının başlatılmasına neden olmuştur.

Literatürde Trabectedin'in apoptozisi indükleyip indüklemediğinin araştırıldığı çalışmalar kısıtlıdır. Meme kanseri hücre hatlarında ise Gajate ve arkadaşlarının yaptığı çalışma dışında, Trabectedin'in apoptotik etkisinin araştırıldığı detaylı bir

Çalışma bulunmamaktadır. Gajate ve arkadaşları, Trabectedin'in HL-60, K562 ve RAPO lösemi hücre hatlarında apoptozisi indüklediğini göstermiştir. Trabectedin'in mitokondriden sitokrom-c salınımını tetiklediği, Fas/CD95'i etkilemediği, Bcl-2'nin apoptotik etkiyi engellediğini göstermişlerdir (Gajate ve diğ., 2002).

Çalışmamızda meme kanserinin farklı moleküler alt tiplerini modelleyen hücre kültürlerindeki DNA fragmentasyon analizleri sonucunda, Trabectedin'in her iki meme kanseri hücre hattında da apoptozisi doza ve zamana bağılı olarak indüklediği, mitokondriyal membran potansiyelinde azalmaya neden olduğu gösterildi. Normal meme hücre hattı MCF-10A'da ise sitotoksik etkiye paralel olarak apoptotik etkisinin de daha az olduğu belirlendi. Trabectedin'in, kaspaz-3 geni eksprese olmayan MCF-7 hücre hattında apoptotik etkili olduğu belirlendi. Ancak, literatürde Gajate ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, Trabectedin'in MCF-7 hücre hattında apoptotik etkisinin olmadığı belirtilmiş ve bunun nedeninin MCF-7 hücre hattında kaspaz-3 ekspresyonunun olmamasına bağlamışlardır. MCF-7 hücre hattında Trabectedin'in gösterdiği apoptotik etkinin kaspaz-3 bağımsız olup olmadığını test etmek için bu alışmamızda Kaspaz-3 geni eksprese olan MDA-MB-453 hücre hattında kaspaz-3 spesifik inhibitörü kullanılmıştır. Kaspaz-3 inhibitörü uygulanan MDA-MB-453 hücrelerinde, Trabectedin'in apoptotik etkisinin Kaspaz-3'ten bağımsız olduğu gözlemlendi. Bu alışmada Trabectedin'in apoptotik etkisinin kaspaz-3 bağımlı olabileceğini vurgulayan Gajate ve arkadaşlarının yorumu doğrulanmamıştır.

MCF-7 hücrelerinde Trabectedin'in apoptozisle ilişkili 35 proteinden TRAIL R1/DR4, TRAIL R1/DR5, Fas/TNFRSF6, TNF RI/TNFRSF1A ve FADD gibi ölüm reseptörleri ve adaptör molekülleri indüklediği, MDA-MB-453 hücre hattında ise proapoptotik moleküllerden Bad, Bax, aktif-kaspaz-3, Sitokrom-c, SMAC/DIABLO, Htra2/Omi, antiapoptotik moleküllerden Bcl-2, Bcl-XL, Pro-kaspaz-3 gibi proteinlerin ekspresyonlarında değışimlere neden olduğu belirlendi. Bu verilerden yola çıkılarak, Trabectedin'in MCF-7 hücrelerinde apoptozisi dış yoldan indüklediği, MDA-MB-453 hücrelerinde ise iç yoldan indüklediği hipotezi ortaya atılmış, bu veri spesifik apoptozis inhibitörleri kullanılarak doğrulanmıştır.

Literatürde, MCF-7 hücre hattında TRAIL R1/DR4, TRAIL R1/DR5, Fas/TNFRSF6, TNF RI/TNFRSF1A reseptörlerinin ekspresyonun fazla, MDA-MB-453 hücre hattında ise oldukça düşük olduğu gösterilmiştir (Keane ve diğ., 1999; Chen ve diğ., 2012). Bu bulgu, bu çalışmada elde edilen apoptotik protein antikor array verileriyle de doğrulanmıştır. Trabectedin'in meme kanseri hücre hatlarında farklı apoptotik yolları indüklemesinin sebebi bu hücrelerin farklı reseptör profillerine sahip olmaları olabilir. Trabectedin'in farklı moleküler alt tipleri

modelleyen meme kanseri hücre hatlarında farklı apoptotik yolları indüklemesi, Trabectedin'in meme kanseri hücreleri için potent bir apoptotik ajan olduğunun göstergesidir.

Trabectedin'in meme kanseri hücre kültürlerinde hücre içi reaktif oksijen türevlerinin (ROS) oluşumunu doza bağlı olarak arttırdığı tespit edildi. Düşük miktarlarda ROS hücre içi sinyal molekülleri olarak görev yapsalar da hücre içinde birikimleri apoptozisi indükler (Simon ve diğ., 2000). Elde edilen veriler Trabectedin'in potent apoptotik etkisinin hücre içinde artan ROS'a bağlı olduğunu düşündürmektedir.

Hücre içi ROS'un azaltılmasında önemli rol alan bir enzim ailesi de Glutasyon transferazlardır. Yaygın olarak kullanılan ismiyle glutasyon s-transferazlar (GST), indirgenmiş glutasyon varlığında (GSH), endojen ve ekzojen kaynaklı elektrofilik ve hidrofobik bileşiklere hidrojen transfer ederek, onların suda çözünebilen ve böylelikle daha kolay atılabilen, daha az toksik metabolitlere dönüşümünü katalizleyen Faz-II detoksifikasyon enzim ailesinin üyeleridir (Cho ve diğ., 2001). Çalışmamızda Trabectedin ile muamele edilen meme kanseri hücrelerinde GST aktivitesinde gözlenen anlamlı düzeyde artış, hücre içinde ROS miktarının arttığını doğrulamaktadır.

Çalışmamızda meme kanseri hücre hatlarında anjiyogeneze ilişkili proteinlerin sentez düzeylerinde meydana gelen Trabectedin aracılı değişiklikler araştırıldı. MCF-7 hücre kültürlerinde Tissue Factor/Factor III, DPPIV/CD26, uPA, CXCL8/IL-8, VEGF proteinlerinde, MDA-MB-453 hücre kültürlerinde ise ENDOGLIN, MMP-8, THROMBOSPONDIN-1, VEGF proteinlerinde anlamlı değişimler belirlendi. GM-CSF, TIMP-1, IGFBP-2 ve VEGF proteinlerinin her iki hücre hattında da değişim gösterdiği tespit edildi.

Literatürde Trabectedin'in anti-anjiyojenik etkilerinin meme kanseri hücre kültürlerinde araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak, Germano ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, Trabectedin'in miksoid liposarkom hücre hatlarında anjiyogeneze rol alan CCL2, CXCL8, IL-6, VEGF ve PTX3 proteinlerinin sentezini baskıladığı gösterilmiştir (Germano ve diğ., 2010).

Trabectedin'in baskıladığı moleküllerden olan CXCL8/IL-8, endotel hücre çoğalmasını, kemotaksiyi, proteaz aktivasyonunu arttıran ve anjiyogenezi düzenleyici bir kemokindir (Balkwill, 2004; . Raman ve diğ., 2007). Bunun yanında CXCL8'in mitojenik bir molekül olduğu, tümör büyümesi ve metastazda kritik öneme sahip olduğu bilinmektedir (Raman ve diğ., 2007).

Trabectedin'in meme kanseri hücrelerinde matriks metalloproteinazlar'lardan (MMP) MMP-8'in sentezini azalttığı belirlendi. MMP'ler 28 üyeye sahip çinko bağımlı

proteaz ailesindendir ve ekstraselüler matriks degradasyonu, çoğalma faktörleri ve sitokinlerin baskılanmasında rol alır. MMP-8'in sentezinin reaktif oksijen türevleri aracılığıyla düzenlendiği gösterilmiştir (Lenglet ve diğ., 2013). MMP'lerin aktivitesinin spesifik doku inhibitörleri ailesi (TIMP) üyeleri tarafından baskılandığı bilinmektedir. Çalışmamızda da bu aile üyelerinden TIMP-1'in Trabectedin muamelesi sonucu arttığı gösterilmiştir. Trabectedin'in meme kanseri hücre kültürlerinde ROS'u ve TIMP-1'i arttırdığı göz önüne alındığında, MMP-8 sentezinin bu yollarla baskılanabileceği düşünülmektedir.

Vasküler endotel hücreler için spesifik bir mitojen ve vasküler geçirgenliği artırıcı potansiyele sahip olan VEGF, anjiyogenez sürecinde endotel hücre çoğalmasını ve göçünü düzenleyen en önemli moleküllerden biridir (Keshavarz ve diğ., 2010). Trabectedin'in her iki meme kanseri hücresinde de önemli miktarda VEGF'i baskılaması, Trabectedin'in meme kanseri hücreleri için potansiyel bir anti-anjiyojenik ajan olabileceğini düşündürmektedir.

Epigenetik modifikasyonların geri dönüşümlü olmaları nedeniyle kanser tedavisinde kullanılabilecek potansiyel hedefler olarak kabul edilmektedir (Yang ve diğ., 2001; Gao ve diğ., 2002). Bu çalışmada Trabectedin'in meme kanseri hücrelerinde DNMT ve HDAC aktivite düzeylerinde azalmaya yol açması, Trabectedin'in epigenetik düzenlemede değişikliğe yol açma ihtimalinin olduğunu ortaya koymaktadır. Trabectedin'in bu iki temel epigenetik sistemde değişikliğe yol açması, bu bulgunun daha detaylı çalışmalarla aydınlatılması gerekliliğini vurgulamaktadır.

Bu tez çalışmasından elde edilen veriler, yumuşak doku sarkomlarında ve yumurtalık kanserinde oldukça etkin bir şekilde kullanılan Trabectedin'in meme kanseri hücre kültürlerinde de etkili bir sitotoksik, apoptotik ve anti-anjiyojenik etkileri olan bir ajan olduğunu göstermektedir. Ayrıca, Trabectedin'in epigenetik sistem ve hücrenin antioksidan sistemleri üzerinde de etkili olabileceğine dair ön veriler elde edilmiştir. Bu çalışma ile Trabectedin'in in vivo ve faz çalışmaları tamamlandıktan sonra meme kanseri tedavisinde de kullanılabilecek etkin bir kemoterapötik olabileceğine dair temel moleküler veriler elde edilmiştir.

5.SONUÇ

Trabectedin molekülünün insan normal meme (MCF-10A) ve meme kanseri hücre kültürlerinde (MDA-MB-453 ve MCF-7) hücre içi moleküler sistemler üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bu tez çalışmasında aşağıdaki sonuçlar elde edildi.

- Trabectedin insan meme kanseri hücre kültürleri (MCF-7 ve MDA-MB-453) üzerinde hem artan doza (10^{-12} - 10^{-6} M) hem de zamana (24., 48. ve 72. saat) bağlı olarak sitotoksik etki gösterdi.
- MCF-7 ve MDA-MB-453 meme kanseri hücre kültürlerinde Trabectedin'in 48. saatteki IC_{50} değerleri sırasıyla 4.8 ± 0.8 ve 2.5 ± 0.4 nM olarak hesaplandı.
- Trabectedin'in insan MCF-10A normal meme epitelyum hücreleri üzerindeki doza ve zamana bağlı sitotoksik etkisinin meme kanseri hücre kültürlerine oranla daha az olduğu belirlendi ($IC_{50} = 9.55 \times 10^{-10}$ M).
- Trabectedin ile muamele edilmiş meme kanseri hücre kültürlerinin DNA fragmentasyon miktarında artan doza ve zamana bağlı olarak artış tespit edildi.
- İnsan MCF-10A normal meme epitelyum hücreleri ise Trabectedin'in sadece yüksek dozlarında ($\geq 10^{-7}$ M) DNA fragmentasyonu gözlemlendi.
- Trabectedin MCF-7 ve MDA-MB-453 hücrelerinde artan doza bağlı olarak mitokondriyal membran potansiyelinde azalışa neden oldu.
- Trabectedine 48 saat maruz bırakılan MCF-7 hücre kültürlerinde proapoptotik moleküllerden TRAIL R1/DR4 (2.6 kat), TRAIL R1/DR5 (3.1 kat), Fas/TNFRSF6 (1.7 kat), TNF RI/TNFRSF1A (11.2 kat) ve FADD (4.0 kat)'da kontrol hücrelerine göre artış belirlendi ($p \leq 0.05$). Apoptozis inhibitör proteinleri (AIP) ailesinden olan CIAP-1, XIAP, Livin ve Survivin'de sırasıyla 5.5, 2.5, 2.6, 3.0 kat azalış tespit edildi ($p \leq 0.05$).
- MDA-MB-453 hücre kültürlerinde ise 48 saat Trabectedin muamelesi sonucu proapoptotik moleküllerden Bad, Bax, aktif-kaspaz-3, Sitokrom-c, SMAC/DIABLO, Htra2/Omi'de sırasıyla 3.6, 4.2, 4.4, 4.8, 4.5 ve 5.2 kat artış belirlendi ($p \leq 0.05$). Antiapoptotik moleküllerden Bcl-2, Bcl-XL, Pro-kaspaz-3'de 4.8, 5.2 ve 6.0 kat azalış tespit edildi ($p \leq 0.05$). AIP ailesinden olan CIAP-1 ve SURVIVIN'de sırasıyla 5.0 ve 2.7 kat azalış tespit edildi ($p \leq 0.05$).

- Trabectedin muamelesi sonucu MCF-7 hücre kültürlerinde, proapoptotik moleküllerden TRAIL R1/DR4, TRAIL R2/DR5, TNF RI/TNFRSF1A, FADD ve Fosfo-p53 mRNA düzeylerinde sırasıyla 2.9, 2.1, 8.4, 2.1 ve 3.5 kat artış, antiapoptotik moleküllerden CIAP-1 ve XIAP mRNA düzeylerinde ise sırasıyla 4.2 ve 3.8 kat azalış belirlendi ($p \leq 0.05$).
- MDA-MB-453 hücrelerinde proapoptotik moleküllerden Bax, Bad, Sitokrom c ve SMAC/Diablo mRNA düzeylerinde sırasıyla 2.6, 2.5, 3.4, 10.5 kat artış, antiapoptotik moleküllerden Bcl-2 mRNA'sında ise 1.8 kat azalış, belirlendi ($p \leq 0.05$).
- Kaspaz-8 ve Kaspaz-9 spesifik inhibitörleri kullanılarak, Trabectedin'in apoptozisi MCF-7 hücrelerinde ölüm reseptörleri aracılı yoldan, MDA-MB-453 hücrelerinde ise mitokondri aracılı yoldan indüklediği belirlendi.
- Trabectedin öncesi Kaspaz-3 inhibitörüyle ön muamele edilen MDA-MB-453 hücre kültürlerinde, yalnızca Trabectedinle muamele edilen hücrelere göre DNA fragmentasyonunda anlamlı değişim gözlenmedi ($p > 0.05$).
- Trabectedin muamelesi sonucu MCF-7 hücre kültürlerinde anti-anjiyojenik moleküllerden Serpin E1/PAI-1 ve TIMP-1 proteinlerinde sırasıyla 3.5 ve 4.2 kat artış tespit edildi ($p \leq 0.05$). Tissue Factor/Factor III, DPPIV/CD26, uPA, VEGF gibi pro-anjiyojenik moleküllerde ise sırasıyla 8.4, 6.2, 6.2, 6.8 kat azalış tespit edildi ($p \leq 0.05$).
- MDA-MB-453 hücrelerinde ise Trabectedin muamelesi sonucu anti-anjiyojenik moleküllerden ENDOGLIN, PF4, TIMP-1 ve TIMP-2'de sırasıyla 26.0, 3.5, 3.0, 2.2 kat artış tespit edilirken ($p \leq 0.05$), pro-anjiyojenik moleküllerden IGFBP-2, MMP-8, MMP-9 ve VEGF'de sırasıyla 4.2, 6.2, 2.1, 8.4 kat azalış tespit edildi ($p \leq 0.05$).
- Trabectedin dozlarına (10^{-12} - 10^{-6} M) bağlı olarak, meme kanseri hücre kültürlerinde reaktif oksijen türevlerinin oluşumunda anlamlı artış olduğu tespit edildi.
- Kırk sekiz saat süresince Trabectedin uygulanan (10^{-12} - 10^{-6} M) MCF-7 ve MDA-MB-453 hücrelerinde GST aktivitesinde artış belirlendi ($p \leq 0.05$).
- Kırk sekiz saat süresince Trabectedin uygulanan (10^{-12} - 10^{-6} M) MCF-7 ve MDA-MB-453 hücrelerinde DNMT ve HDAC aktivitelerinde azalış tespit edildi ($p \leq 0.05$).

Bu tez çalışmasından elde edilen veriler, yumuşak doku sarkomlarında ve yumurtalık kanserinde oldukça etkin bir şekilde kullanılan

Trabectedin'in meme kanseri hücre kültürlerinde de etkili bir sitotoksik, apoptotik ve anti-anjiyojenik etkileri olan bir ajan olduğunu göstermektedir. Trabectedin'in *in vivo* ve faz çalışmaları tamamlandıktan sonra meme kanseri tedavisinde de kullanılabilecek etkin bir kemoterapötik olabileceğine dair temel moleküler veriler elde edilmiştir.

KAYNAKLAR

Armstrong, K., Eisen, A., Weber, B., 2000. Assessing the risk of breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, Vol. **342**, pp. 564-571.

Allavena, P., Signorelli, M., Chieppa, M., Erba, E., Bianchi, G., Marchesi, F., Olimpio, C., O., Bonardi, C., Garbi, A., Lissoni, A., de Braud, F., Jimeno, J., D'Incalci, M., 2005. Anti-inflammatory properties of the novel antitumor agent yondelis (Trabectedin): inhibition of macrophage differentiation and cytokine production. *Cancer Research*, Vol. **65**, pp. 2964-2971.

Anjum, R., Roux, P., P., Ballif, B., A., Gygi, S., P., Blenis, J., 2005. The tumor suppressor DAP kinase is a target of RSK-mediated survival signaling. *Current Biology*, Vol. **15**, pp. 1762-1767.

Arslan, D., Ö., Korkmaz, G., Gözüaık, D., 2011. Otofaji: Bir hücrel stres yanıtı ve ölüm mekanizması. *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, Vol **2**, pp. 184-194.

Auerbach, W., and Auerbach, R., 1994. Angiogenesis inhibition: A review. *Pharmacology & Therapeutics*, Vol. **63**, pp. 265-311.

Auerbach, R., Lewis, R., Shinnars, B., Kubai, L., Akhtar, N., 2003. Angiogenesis Assays: A Critical Overview, *Clinical Chemistry*, Vol. **49**, pp. 32-40.

Aune, G., J., Furuta, T., Pommier, Y., 2002. Ecteinascidin 743: a novel anticancer drug with a unique mechanism of action. *Anticancer Drugs*, Vol. **13**, pp. 545-555.

Batson, O., V., 1942. The role of the vertebral veins in metastatic process of the breast cancer. *Annals of Internal Medicine*. Vol. **36**, pp. 38-45.

Balkwill, F., 2004. Cancer and the chemokine network. *Nature Reviews Cancer*, Vol. **4**, pp. 540-550.

Ballestar, E., Esteller, M., 2005. The epigenetic breakdown of cancer cells: from DNA methylation to histone modifications. *Progress in Molecular Subcellular Biology*. Vol. **38**, pp. 169-181.

Beckmann, M.,W., Niederacher, D., Schnurch, H.,G., Gusterson, B.,A., Bender, H.,G., 1997. Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumor heterogeneity. *Journal of Molecular Medicine*, Vol. **75**, pp. 429-439.

Beral, V., 2003. Million Women Study Collaborators. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet*, Vol. **362**, pp. 419-427.

Berridge, M.V. and Tan, A.S., 1993. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Vol. **303**, pp. 474-482.

Bird, A., 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes&Development*, Vol. **16**, pp. 6-21.

Blumberg, J., 2004. Use of biomarkers of oxidative stres in research studies. *Journal of Nutrition*, Vol. **134**, pp. 3188-3189.

Bonfanti, M., La Valle, E., Fernandez Sousa Faro, J.,M., Faircloth, G., Caretti, G., D'Incalci, M., 1999. Effect of ecteinascidin-743 on the interaction between DNA binding proteins and DNA. *Anticancer Drug Design*, Vol.**14**, pp. 179-186.

Botos, J., Barhoumi, R., Burghardt, R., Kochevar, D.T., 2002. Rb localization and phosphorylation kinetics correlate with the cellular phenotype of cultured breast adenocarcinoma cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, Vol. **38**, pp. 235-241.

Bronchud, M.,H., Foote, M., Giaccone, G., Olopade, O.I., Workman, P. (Eds.), 2008, *Principles of molecular oncology*. Third edition, Humana press, Totowa, New Jersey, pp. 153-189.

Carmeliet, P., and Jain, R.,K., 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, Vol. **407**, pp. 249.

Carmeliet, P., 2003. Angiogenesis in health and disease, *Nature Medicine*, Vol. **9**, pp. 653-660.

Chen, J.J., Shen, H.C., Rivera, Rosado, L.A., Zhang, Y., Di, X., Zhang, B., 2012. Mislocalization of death receptors correlates with cellular resistance to their cognate ligands in human breast cancer cells. *Oncotarget*, Vol. **3**, pp. 833-842.

Cho, S.,G., Lee, Y.,H., Park, H.,S., Ryoo, K., Kang, K.,W., Park, J., Eom, S.,J., Kim, M.,J., Chang, T.,S., Choi., S.,Y., Shim, J., Kim., Y., Dong, M.,S., Lee, M.J., Kim, S.,G., Ichijo, H., Choi, E.,J., 2001. Glutathione S-transferase mu modulates the stresss-activated signals by suppressing apoptosis signal-regulating kinase 1. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. **276**, pp. 12749-12755.

Choi, E.,J and Kim, T., 2008. Equol induced apoptosis via cell cycle arrest in human breast cancer MDA-MB-453 but not MCF-7 cells. *Molecular Medicine Reports*, Vol. **2**, pp. 239-244.

Choi, E.,J., Lee, J.,I., Kim, G.,H., 2010. Anti-carcinogenic effect of a new analogue 4'-chloroflavanone from flavanone in human breast cancer cells. *International Journal of Molecular Medicine*, Vol. **25**, pp. 293-298.

Choi, E.,J., Lee, J.,I., Kim, G.,H., 2011. Evaluation of the anticancer activities of thioflavanone and thioflavone in human breast cancer cell lines. *International Journal of Molecular Medicine*, Vol. **29**, pp. 252-256.

Citri, A., and Yarden, Y., 2006. EGF-ERBB signalling: Towards the systems level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Vol. **7**, pp. 505–516.

Cory, A.H., Owen, T.C., Barltrop, J.A., Cory, J.G., 1991. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Communications*, Vol. **3**, pp. 207-212.

Coşkun, G., Özgür, H., 2011. Molecular Mechanism of apoptosis and necrosis. *Archives Medical Review Journal*, Vol. **20**, pp. 145-158.

Cuevas, C. and Francesch, A., 2009. Development of Yondelis (trabectedin, ET-743). A semisynthetic process solves the supply problem. *Natural Product Reports*, Vol. **26**, pp. 322-337.

Damia, G., Silvestri, S., Carrassa, L., Filiberti, L., Faircloth, G.,T., Liberi, G., Foiani, M., D'Incalci, M. 2001. Unique pattern of ET-743 activity in different cellular systems with defined deficiencies in DNA-repair pathways. *International Journal of Cancer*, Vol. **92**, pp. 583-588.

Damia, G. and D'Incalci, M., 2007. Targeting DNA repair as a promising approach in cancer therapy. *European Journal of Cancer*, Vol. **43**, pp. 1791-1801.

Dimri, G., Band, H., Band, V., 2005. Mammary epithelial cell transformation: insights from cell culture and mouse models. *Breast Cancer Research*, Vol. **7**, pp. 171-179.

D'Incalci, M., Erba, E., Damia, G., Galliera, E., Carrassa, L., Marchini, S., Mantovani, R., Tognon, G., Fruscio, R., Jimeno, J., Faircloth, G.,T., 2002. Unique features of the mode of action of ET-743. *Oncologist*, Vol. **7**, pp. 210 - 216.

Eken, A., 2012. Küçük Deney Hayvanlarından Rat, In: Yücel, O., Genç, O., (ed), *Rat Kan ve Doku Örneklerinde Oksidatif Stres Parametreleri*, Derman Tıbbi Yayıncılık, Ankara, pp. 69-73.

Erba, E., Bergamaschi, D., Bassano, L., Ronzoni, S., Di Liberti, G., Muradore, I., Vignati, S., Faircloth, G., Jimeno, J., D'Incalci, M., 2000. Isolation and characterization of an IGROV-1 human ovarian cancer cell line

made resistant to Ecteinascidin-743 (ET-743). *British Journal of Cancer*, Vol. **82**, pp. 1732-1739.

Erba, E., Bergamaschi, D., Bassano, L., Damia, G., Ronzoni, S., Faircloth, G., T., D'Incalci, M. 2001a. Ecteinascidin-743 (ET-743), a natural marine compound, with a unique mechanism of action. *European Journal of Cancer*, Vol. **37**, pp. 97-105.

Erba, E., Muratore, I., Tiozzo, G., Ubezio, P., Colombo, T., Nicoletti, I., 2001b. ET-743 and cisplatin (DDP) show in vitro and in vivo synergy against human sarcoma and ovarian carcinoma cell lines. *Clinical Cancer Research*, Vol. **7**, pp. A406.

Erba, E., Colombo, T., Ubezio, P., Ferrarese, L., Matera, G., Falcioni, C., 2003. Combination of Yondelis (ET- 743) and oxaliplatin in experimental ovarian cancer. *Clinical Cancer Research*, Vol. **9**, pp. C247.

Fambrough, D., McClure, K., Kazlauskas, A., Lander, E., S., 1999. Diverse signaling pathways activated by growth factor receptors induce broadly overlapping, rather than independent, sets of genes. *Cell*, Vol. **97**, pp. 727-741.

Fidler, I., J., Kerbel, R., S., and Ellis, L., M. 2001. CANCER; Principles&Practice of Oncology, Chapter 9, pp. 137-140.

Ferrara N., 2004. Vascular Endothelial Growth Factor as a Target for Anticancer Therapy, *The Oncologist*, Vol. **9**, pp. 2-10.

Folkman, J. ve Shing Y., 1992. Angiogenesis, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. **267**, pp. 10931-10934.

Fukumura, M., Ando, H., Hirai, Y., Toriizuka, K., Ida, Y., Kuchino, Y., 2009. Achyranthoside H methyl ester, a novel oleanolic acid saponin derivative from *Achyranthes fauriei* roots, induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 and MDA-MB-453 cells via a caspase activation pathway. *Journal of Natural Medicines*, Vol. **63**, pp.181-188.

Gago, F., Hurley, L.,H., 2002. Devising a structural basisfor the potent cytotoxic effects of ecteinascidin 743. In: Demeunynck, M., Bailly, C., Wilson, W.,D., (ed), *Small molecule DNA and RNA binders: From synthesis to nuclear acid complexes*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, pp. 643-675.

Gajate, C., An, F., and Mollinedo, F., 2002. Differential cytostatic and apoptotic effects of ecteinascidin-743 in cancer cells. Transcription-dependent cell cycle arrest and transcription-independent JNK and mitochondrial mediated apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. **277**, pp. 41580-41589.

Gao, L., Cueto, M.,A., Asselbergs, F., Atadja, P., 2002. Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. **277**, pp. 25748-25755.

Germano, G., Frapolli, R., Simone, M., Tavecchio, M., Erba, E., Pesce, S., Pasqualini, F., Grosso, F., Sanfilippo, R., Casali, P.,G., Gronchi, A., Virdis, E., Tarantino, E., Pilotti, S., Greco, A., Nebuloni, M., Galmarini, C.,M., Tercero, J.,C., Mantovani, A., D'Incalci, M., Allavena, P., 2010. Antitumor and anti-infla mmatory effects of trabect edin on human myxoid liposarcoma cells. *Cancer Research*, Vol. **70**, pp. 2235-2244.

Giordano, S.,H., Cohen, D.,S., Buzdar, A.,U., Perkins, G., Hortobagyi, G.,N., 2004. Breast carcinoma in men: a population-based study. *Cancer*, Vol. **1**, no. 101, pp. 51-57.

Giuliano, A.,E., 2009. Breast disorders. Current Medical Diagnosis & Treatment. 48th ed. *McGraw-Hill Companies, Inc.* USA, pp. 630-654.

Guirouilh- Barbat, J., Redon, C., Pommier, Y., 2008. Transcription-coupled DNA double-strand breaks are mediated via the nucleotide excision repair and the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Molecular Biology of the Cell*, Vol. **19**, pp. 3969-3981.

Gupta, P.,B., Kuperwasser, C., 2004. Disease models of breast cancer. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*. Vol. **1**, no. 1, pp. 9–16.

Grant, P., A., 2001. A Tale of histone modifications. *Genome Biology*, Vol. **2**, no. 4, pp. 0003.1–0003.6.

Güç, D., 2004. Adezyon molekülleri. *ANKEM Dergisi*; Vol. **2**, pp. 158-163.

Güleş, Ö. and Eren Ü., 2008. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. Vol. **2**, pp. 73-78.

Kansas, G.,S., 1996. Selectins and their ligands: Current concepts and controversies. *Blood*, Vol. **88**, pp. 3259-3287.

Hahn-Windgassen, A., Nogueira, V., Chen, C.,C., Skeen, J.,E., Sonenberg, N., Hay, N., 2005. Akt activates the mammalian target of rapamycin by regulating cellular ATP level and AMPK activity. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. **280**, pp. 32081-32089.

Hanahan, D., and Folkman, J., 1996, Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, Vol. **86**, 353-364.

Hanahan, D., Weinberg, R.,A., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, Vol. **100**, no. 1, pp. 57-70.

Hanahan, D., Weinberg, R.,A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. Vol. **4**, no. 144, pp. 646-74.

Hendriks, H.,R., Fiebig, H.,H., Giavazzi, R., Langdon, S.,P., Jimeno, J.,M., Faircloth, G.,T., 1999. European Osteosarcoma Intergroup (EOI) (1999) High antitumour activity of ET743 against human tumour xenografts from melanoma, non-small-cell lung and ovarian cancer. *Annals of Oncology*, Vol. **10**, pp. 1233-1240.

Hu, M. and Polyak, K., 2009. Microenviromental regulation of cancer development. *Current Opinion in Genetics & Development*. Vol. **18**, pp. 27-34.

Hurley, L.,H., Zewail-Foote, M., 2001. The antitumor agent ecteinascidin 743: characterization of its covalent DNA adducts and chemical stability. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Vol. **500**, pp. 289-299.

Hill, C.,S., Treisman, R., 1999. Growth factors and gene expression: Fresh insights from arrays. *Science STKE*. Vol. **3**, PE1.

Imbalzano, K.,M., Tatarkova, I., Imbalzano, A.,N., Nickerson, J.,A., 2009. Increasingly transformed MCF-10A cells have a progressively tumor-like phenotype in three-dimensional basement membrane culture. *Cancer Cell International*. Vol.**9**, pp.7.

Inoki, K., Ouyang, H., Zhu, T., Lindvall, C., Wang, Y., Zhang, X., Yang, Q., Bennett, C., Harada, Y., Stankunas, K., Wang, C.,Y., He, X., MacDougald, O.,A., You, M., Williams B.,O., Guan, K.,L., 2006. TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell*, Vol. **126**, pp. 955–968.

Jimeno, J.,M., Faircloth, G., Cameron, L., Meely, K., Vega, E., Gomez, A., Fernandez Sousa-Faro, J.,M., Rinehart, K., 1996. Progress in the acquisition of new marine-derived anticancer compounds: development of ecteinascidin-743. *Drugs Future*, Vol. **21**, pp. 1155-1165.

Jin, S., Gorfajn, B., Faircloth, G., Scotto, K.,W., 2000. Ecteinascidin 743, a transcription targeted chemotherapeutic that inhibits MDR1 activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. **97**, pp. 6775-6779.

Jorissen, R.,N., Walker, F., Pouliot, N., Garrett, T.,P., Ward, C.,W., Burgess, A.,W., 2003. Epidermal growth factor receptor: Mechanisms of activation and signalling. *Experimental Cell Research*, Vol. **284**, pp. 31-53.

Kahn, J., Merhaban, F., Ingle, G., Xin, X., Bryant, J.,E., Vehar, G., Schoenfeld, J., Grimaldi, C.,J., Peale, F., Draksharapu, A., Lewin, D.,A., Gerritsen, M.,E., 2000, Gene expression profiling in an in vitro model of angiogenesis, *American Journal of Pathology*, Vol. **156**, pp. 1887-900.

Keane, M.,M., Ettenberg, S.,A., Nau, M.,M., Russell, E.,K., Lipkowitz, S., 1999. Chemotherapy augments TRAIL-induced apoptosis in breast cell lines. *Cancer Research*. Vol. **59**, pp. 734-741.

Keshavarz, M., Mostafaie, A., Mansouri, K., Bidmeshkipour, A., Motlagh, H.,R., Parvaneh, S., 2010. *In vitro* and ex vivo antiangiogenic activity of *Salvia officinalis*,” *Phytotherapy Research*, Vol. **24**, pp. 1526-1531.

Kim, H.,J., Kim, H.,P., Yoon, Y.,K., Kim, M.,S., Lee, G.,S., Han, S.,W., Im, S.,A., Kim, T.,Y., Oh, D.,Y., Bang, Y.,J., 2012. Antitumor activity of HM781-36B, a pan-HER tyrosine kinase inhibitor, in HER2-amplified breast cancer cells. *Anticancer Drugs*, Vol. **23**, no. 3, pp. 288-297.

Laird, P., R, Jaenisch., 1996. The role of DNA methylation in cancer genetics and epigenetics, *Annual Review of Genetics*, Vol. **30**, pp. 441–464.

Lenglet, S., Mach, F., Montecucco, F., 2013. Role of matrix metalloproteinase-8 in atherosclerosis. 2009. *Circulation Research*, Vol. **105**, pp. 921-929.

Li, W.,W., Takahashi, N., Jhanwar, S., Cordon-Cardo, C., Elisseyeff, Y., Jimeno, J., Faircloth, G., Bertino, J.,R., 2001. Sensitivity of soft tissue sarcoma cell lines to chemotherapeutic agents: identification of ecteinascidin-743 as a potent cytotoxic agent. *Clinical Cancer Research*, Vol. **7**, pp. 2908-2911.

Liu, Z.,L., Tian, W., Wang, Y., Kuang, S., Luo, X.,M., Yu, Q., 2012. A novel sulfonamide agent, MPSP-001, exhibits potent activity against human cancer cells in vitro through disruption of microtubule. *Acta Pharmacologica Sinica*. Vol. **33**, pp. 261-270.

Maurizio, D., and Galmarini, C.,M., 2010. A review of trabectedin (ET-743): a unique mechanism of action. *Molecular Cancer Therapeutics*, Vol. **9**, pp. OF1–7.

McPherson, K., Steel, C.,M., Dixon, J.,M., 2000. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *British Medical Journal*, Vol. **321**, pp. 625-628.

Meco, D., Colombo, T., Ubezio, P., Zucchetti, M., Zaffaroni, M., Riccardi, A., Faircloth, G., Jose, J., D'Incalci, M., Riccardi, R., 2003. Effective combination of ET-743 and doxorubicin in sarcoma: preclinical studies. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, Vol. **52**, no. 2, pp.131-138.

Melchor, L., Benítez, J., 2008. An integrative hypothesis about the origin and development of sporadic and familial breast cancer subtypes. *Carcinogenesis*, Vol. **29**, no. 8, pp. 1475-1482.

Minuzzo, M., Marchini, S., Broggin, M., Faircloth, G., D'Incalci, M., Mantovani, R., 2000. Interference of transcriptional activation by the antineoplastic drug ecteinascidin-743. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. **97**, pp. 6780-6784.

Monninkhof, E.,M., Elias, S.,G., Vlems, F.,A., van der Tweel, I., Schuit, A.,J., Voskuil, D.,W., van Leeuwen, F.,E., TFPAC., 2007. Physical activity and breast cancer: a systematic review. *Epidemiology*, Vol. **18**, no. 1, pp. 137-157.

Murrell, A., Vardhman, K., Rakan, B., S., 2005. From genome to epigenome. *Human Molecular Genetics*, Vol. **14**, pp. R3-R10.

Nagasawa, H., Keng, P., Maki, C., Yu, Y.,J., Little, J.,B., 1998. Absence of a radiation-induced first-cycle G(1)-S arrest in p53(+) human tumor cells synchronized by mitotic selection. *Cancer Research*, Vol. **58**, pp. 2036–2041.

Nieves-Neira, W., Pommier, Y., 1999. Apoptotic response to camptothecin and 7-hydroxystaurosporine (UCN-01) in the 8 human breast cancer cell lines of the NCI anticancer drug screen: multifactorial relationships with topoisomerase I, protein kinase C, Bcl-2, p53, MDM-2 and caspase pathways. *International Journal of Cancer*, Vol. **82**, pp. 396-404.

O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., Pognan, F., 2000. Investigation of alamar blue (Resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*., Vol. **267**, pp. 5421-5426.

Perou, C.,M., Sørli, T., Eisen, M.,B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.,S., Rees, C.,A., Pollack, J.,R., Ross, D.,T., Johnsen, H., Akslen, L.,A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S.,X., Lønning, P.,E., Børresen-Dale, A.,L., Brown, P.,O., Botstein, D., 2000. Molecular portraits of human breast tumors. *Nature*, Vol. **406**, pp. 747-752.

Raman, D., Baugher, P.,J., Thu, Y.,M., Richmond, A., 2007. Role of chemokines in tumor growth. *Cancer Letters*, 2007, Vol. **256**, pp.137–165.

Reeves, G.,K., Pirie, K., Beral, V., Green, J., Spencer, E., Bull, D. 2007. Million Women Study Collaboration. Cancer incidence and mortality in relation to body mass index in the Million Women Study: cohort study. *British Medical Journal*, Vol. **335**, no. 7630, pp. 1134.

Reynolds, L.,P., and Redmer, D.,A., 1998, Expression of the angiogenic factors,basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor, in the ovary. *Journal of Animal Science*, Vol. **76**, pp. 1671-1681.

Rait, A.,S., Pirollo, K.,F., Rait, V., Krygier, J.,E., Xiang, L.,M., Chang, E.,H., 2001. Inhibitory effects of the combination of HER-2 antisense oligonucleotide and chemotherapeutic agents used for the treatment of human breast cancer. *Cancer Gene Therapy*, Vol. **8**, pp. 728-739.

Rinehart, K.,L., 2000. Antitumor compounds from tunicates. *Medicinal Research Reviews*. Vol. **20**, no. 1, pp. 1-27.

Rodriguez-Viciana, P., Tetsu, O., Oda, K., Okada, J., Rauen, K., McCormick, F., 2005. Cancer targets in the Ras pathway. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* ,Vol. **70**, pp. 461-467.

Rogers, C., Thompson, K., Robinson, S., 2002. Intoducing A Breast Health Strategy into Schools. *Health Education*, Vol. **12**, pp. 106-112.

Ruggero, D. and Sonenberg, N., 2005. The Akt of translational control. *Oncogene*, Vol. **24**, pp. 7426–7434.

Schlessinger, J., 2003. Signal transduction. Autoinhibition control. *Science*, Vol. **300**, pp. 750–752.

Schlessinger, J., 2004. Common and distinct elements in cellular signaling via EGF and FGF receptors. *Science*, Vol. **306**, pp. 1506-1507.

Schreck, R., Rapp, U.,R., 2006. Raf kinases: Oncogenesis and drug discovery. *International Journal of Cancer*, Vol. **119**, pp. 2261-2271.

Shaw, R.,J. and Cantley, L.,C., 2006. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature*, Vol. **441**, pp. 424-430.

Schulz, WA. 2005. Tumor suppressor genes. In: *Molecular Biology of Human Cancer*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 91-111.

Schwarz, V., A., Hornung, R., Fedier, A., Fehr, M., K., Walt, H., Haller, U., Fink, D., 2002. Photodynamic therapy of DNA mismatch repair-deficient and proficient tumour cells. *British Journal of Cancer*, Vol. **86**, pp. 1130-1135.

Scotlandi, K., Perdichizzi, S., Manara, M.,C., Serra, M., Benini, S., Cerisano, V., Strammiello, R., Mercuri, M., Reverter-Branchat, G., Faircloth, G., D'Incalci, M., Picci, P., 2002. Effectiveness of Ecteinascidin-743 against drug-sensitive and -resistant bone tumor cells. *Clinical Cancer Research*, Vol. **8**, pp. 3893-3903.

Shahbazian, D., Roux, P.,P., Mieulet, V., Cohen, M.,S., Raught, B., Taunton, J., Hershey, J.,W., Blenis, J., Pende, M., Sonenberg, N., 2006. The mTOR/PI3K and MAPK pathways converge on eIF4B to control its phosphorylation and activity. *Embo Journal*, Vol. **25**, pp. 2781–2791.

Shao, L., Kasanov, J., Hornicek, F.,J., Morii, T., Fondren, G., Weissbach, L., 2003. Ecteinascidin - 743 drug resistance in sarcoma cells:transcriptional and cellular alterations. *Biochemical Pharmacology*, Vol. **66**, pp 2381 –2395.

Shimizu, K. and Oku, N., 2004. Cancer Anti-angiogenic Therapy, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, Vol. **27**, no. 5, pp. 599-605.

Simmons, T.,L., Andrianasolo, E., McPhail, K., Flatt, P., Gerwick, W.,H., 2005. Marine natural products as anticancer drugs. *Molecular Cancer Therapeutics*. Vol. **4**, no. 2, pp. 333-342.

Simon, H., U., Haj-Yehia, A., Levi-Schaffer, F., 2000. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis*, Vol. **5**, pp. 415-418.

Soule, H., D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., Brennan, M., 1973. Human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of National Cancer Institute*, Vol. 51, pp. 1409–1416.

Soule, H., D., Maloney, T., M., Wolman, S., R., Peterson, W., D., Brenz, R., McGrath, C., M., Russo, J., Pauley, R., J., Jones, R., F., Brooks, S., C., 1990. Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Research*. Vol. **50**, pp. 6075-6086.

Sørlie, T., Perou, C., M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M., B., van de Rijn, M., Jeffrey, S., S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J., C., Brown, P., O., Botstein, D., Eystein, L., P., Børresen-Dale, A., L., 2001. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. **98**, no. 19, pp. 10869-108674.

Sotiriou, C., Neo, S., Y., McShane, L., M., Korn, E., L., Long, P., M., Jazaeri, A., Martiat, P., Fox, S., B., Haris, A., L., Liu, E., T., 2003. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. **100**, no. 18, pp. 10393-10398.

Staton, C., A., Stribbling, S., M., Tazzyman, S., Hughes, R., Brown, N., J., Lewis, C., E., 2004. Current methods for assaying angiogenesis in vitro and in vivo. *International Journal of Experimental Pathology*, Vol. **85**, no. 5, pp. 233-248.

Stingl, J. and Caldas, C., 2007. Molecular heterogeneity of breast carcinomas and cancer stem cell hypothesis. *Nature Reviews Cancer*, Vol. **7**, pp. 791-799.

Sutherland, R., L., Watts, C., K., W., Lee, C., S., L., Musgrove, E., A., 1999. Breast cancer. In: Masters J.R.W., Palsson B. Human cell culture. Vol. II. Cancer cell lines. Part 2. *Kluwer Academic Publishers*, Boston: pp. 79–106.

Takahashi, N., Li, W., W., Banerjee, D., Scotto, K., W., Bertino, J., R., 2001. Sequence-dependent enhancement of cytotoxicity produced by ecteinascidin 743 (ET-743) with doxorubicin or paclitaxel in soft tissue sarcoma cells. *Clinical Cancer Research*, Vol. **7**, no. 10, pp. 3251-3257.

Takahashi, N., Li, W., Banerjee, D., Guan, Y., Wada-Takahashi, Y., Brennan, M., F., Chou, T., C., Scotto, K., W., Bertino, J., R., 2002. Sequence-dependent synergistic cytotoxicity of ecteinascidin-743 and paclitaxel in human breast cancer cell lines in vitro and in vivo. *Cancer Research*, Vol. **62**, no. 23, pp. 6909-6915.

Takebayashi, Y., Pourquier, P., Zimonjic, D., B., Nakayama, K., Emmert, S., Ueda, T., Urasaki, Y., Kanzaki, A., Akiyama, S., I., Popescu, N., Kraemer, K., H., Pommier, Y., 2001. Antiproliferative activity of ecteinascidin 743 is dependent upon transcriptioncoupled nucleotide-excision repair. *Nature Medicine*, Vol. **7**, pp. 961–966.

Timm, M., Hornig, J., von, Baehr, R., 1982. Dye exclusion test and LDH release assay. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, Vol. **28**, pp. 64-69.

Tollefsbol, T., 2009. DNA Hypomethylation in Cancer. In: Cancer epigenetics, Taylor & Francis Group, FL, USA, pp. 7-79.

Tong, Y., Zhang, X., Zhao, W., Zhang, Y., Jingyu, L., Shi, Y., Tan, W., Li, M., Zhang, Y., Tong, L., Lu, H., Lin, L. And Ding, J., 2004. Anti-angiogenic effects of Shiraiachrome A, a compound isolated from a Chinese folk medicine used to treatrheumatoid arthritis, *European Journal of Pharmacology*, Vol. **494**, pp. 101-109.

Tootle, T., L., Rebay, I., 2005. Post-translational modifications influence transcription factor activity: A view from the ETS superfamily. *Bioessays*, Vol. **27**, pp. 285–298.

Trabectedin: ET 743, Ecteinascidin 743, Yondelis. In: Drugs in R&D, Adis, USA, pp. 75-81.

Ubezio, P. and Cameron D., 2008. Cell killing and resistance in pre-operative breast cancer chemotherapy. *BMC Cancer*. Vol. **8**, pp. 201.

Vranic, S., Gatalica, Z., Wang, Z., Y., 2011. Update on the molecular profile of the MDA-MB-453 cell line as a model for apocrine breast carcinoma studies. *Oncology Letters*. Vol. **2**, pp. 1131-1137.

Watanabe, N., Okochi, E., Mochizuki, M., Sugimura, T., Ushijima, T., 2001. The presence of single nucleotide instability in human breast cancer cell lines. *Cancer Research*, Vol. **61**, pp. 7739-7742.

Wulschleger, S., Loewith, R., Hall, M., N., 2006. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, Vol. **124**, pp. 471-484.

Yamamota, S., Konishi, I., Tsuruta, Y., Nanbu, K., Mandai, M., Kuroda, H., Matsushita, K., Hamid, A.A., Yura, Y. and Mori, T., 1997. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) during folliculogenesis and corpus luteum formation in the human ovary. *Gynecological Endocrinology*, Vol. **11**, pp. 371-381.

Yang, X., Yan, L., Davidson, N., E, 2001. DNA methylation in breast cancer. *Endocrine Related Cancer*, Vol. **8**, no. 2, pp.115–127.

Zhao, X., C., Tian, L., Cao, J., G., Liu, F., 2010. Induction of apoptosis by 5,7-dihydroxy-8-nitrochrysin in breast cancer cells: the role of reactive oxygen species and Akt. *International Journal of Oncology*. Vol. **37**, no. 5, pp. 1345-1352.

Zips, D., Thames, H., D., Baumann, M., 2005. New anticancer agents: in vitro and in vivo evaluation. *In Vivo*. Vol. **19**, no. 1, pp. 1-7.

ÖZGEÇMİŞ

Harika ATMACA

Doğum tarihi	: 27.06.1983
Doğum yeri	: İzmir
Lise	: (1994-2001), Çankaya Milli Piyango Anadolu Lisesi
Lisans	: (2002-2006), Celal Bayar Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans	: (2006-2008), Celal Bayar Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı
Doktora	: (2008-2013), Celal Bayar Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı
Çalıştığı kurum	: (2009 - devam ediyor), Celal Bayar Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı

YAYIN LİSTESİ (SEÇİLMİŞ YAYINLAR)

1. **Atmaca H**, Bozkurt E, Uzunoglu S, Uslu R, Karaca B. A diverse induction of apoptosis by trabectedin in MCF-7 (HER2-/ER+) and MDA-MB-453 (HER2+/ER-) breast cancer cells. *Toxicol Lett.* **2013 Jun 20. doi:pii: S0378-4274(13)01076-X. 10.1016/j.toxlet.2013.06.213. [Epub ahead of print].**
2. Karaca B, **Atmaca H**, Bozkurt E, Kisim A, Uzunoglu S, Karabulut B, Sezgin C, Sanli UA, Uslu R. Combination of AT-101/cisplatin overcomes chemoresistance by inducing apoptosis and modulating epigenetics in human ovarian cancer cells. *Mol Biol Rep.* **2013 Jun;40(6):3925-33.**
3. Bozkurt E, **Atmaca H**, Kisim A, Uzunoglu S, Uslu R, Karaca B. Effects of Thymus serpyllum extract on cell proliferation, apoptosis and epigenetic events in human breast cancer cells. *Nutr Cancer.* **2012;64(8):1245-50.**
4. Cirak Y, Varol U, **Atmaca H**, Kisim A, Sezgin C, Karabulut B, Uzunoglu S, Uslu R, Karaca B. Zoledronic acid in combination with serine/threonine phosphatase inhibitors induces enhanced cytotoxicity and apoptosis in hormone-refractory prostate cancer cell lines by decreasing the activities of PP1 and PP2A. *BJU Int.* **2012 Dec;110(11 Pt C):E1147-54. Epub 2012 Aug 9.**

5. Kisim A, Atmaca H, Cakar B, Karabulut B, Sezgin C, Uzunoglu S, Uslu R, Karaca B. Pretreatment with AT-101 enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis of breast cancer cells by inducing death receptors 4 and 5 protein levels. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2012 Jul;138(7):1155-63. doi: 10.1007/s00432-012-1187-1. Epub 2012 Mar 13.
6. Selim UZUNOGLU, Burcak KARACA, Harika ATMACA, Aslı KISIM, Bülent KARABULUT, Rüçhan USLU. Targeting Bcl-2 Protein to Enhance Chemosensitivity of Hormone Refractory Prostate Cancer Cell Line, DU-145 by a Synergistic Combination of Docetaxel and Gossypol. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 31(4):859-66, 2011.
7. Kucukzeybek Y, Gorumlu G, Cengiz E, Karabulut B, Sezgin C, Atmaca H, Sanlı UA, Uzunoglu S, Uslu R. Apoptosis-mediated cytotoxic effects of ibandronic acid on hormone- and drug refractory prostate cancer cells and human breast cancer cells. *The Journal of International Medical Research*, 38:1663 -1672, 2010.
8. Uzunoglu S, Karaca B, Atmaca H, Kisim A, Sezgin C, Karabulut B, Uslu R. Comparison of XTT and Alamar blue assays in the assessment of the viability of various human cancer cell lines by AT-101 (-/- gossypol). *Toxicology Mechanisms and Methods*, 20(8): 482–486, 2010.
9. Karabulut B, Karaca B, Varol U, Muslu U, Cakar B, Atmaca H, Kisim A, Uzunoglu S, Uslu R. Enhancing cytotoxic and apoptotic effect in OVCAR-3 and MDAH-2774 cells with all-trans retinoic acid and zoledronic acid: a paradigm of synergistic molecular targeting treatment for ovarian cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 29:102, 2010.
10. Karabulut B, Karaca B, Atmaca H, Kisim A, Uzunoglu S, Sezgin C, Uslu R. Regulation of Apoptosis- Related Molecules by Synergistic Combination of All-Trans Retinoic Acid (ATRA) and Zoledronic Acid in Hormone-Refractory Prostate Cancer Cell Lines. *Molecular Biology Reports*, 38(1): 249–59, 2011.
11. Akagunduz O, Karaca B, Atmaca H, Uzunoglu S, Karabulut B, Sanli U.A, Haydaroglu A, Ruchan Uslu. Radiosensitization of Hormone-Refractory Prostate Cancer Cells by Gossypol Treatment. *Journal of BUON*, 15(4), 763-767, 2010.
12. Cengiz E, Karaca B, Kucukzeybek Y, Gorumlu G, Gul M.K, Erten C, Atmaca H, Uzunoglu S, Karabulut B, Sanli, Ruchan Uslu. Overcoming drug resistance in hormone-and drug refractory prostate cancer cell line, PC-3 by docetaxel and gossypol combination. *Molecular Biology Reports*, 37(3): 1269–1277, 2009.
13. Sanli UA, Gorumlu G, Erten C, Gul MK, Cengiz E, Kucukzeybek Y, Karaca B, Atmaca H, Uzunoglu S, Karabulut B, Uslu R. Targeting apoptosis in the hormone- and drug-resistant prostate cancer cell line, DU-145, by

gossypol/zoledronic acid combination. *Cell Biology International*, 33(11): 1165–1172, 2009.

14. **Atmaca H**, Gorumlu G, Karaca B, Degirmenci M, Tunali D, Cirak Y, Purcu DU, Uzunoglu S, Karabulut B, Sanli U.A, Uslu R. Combined gossypol and zoledronic acid treatment results in synergistic induction of cell death and regulates angiogenic molecules in ovarian cancer cells. *European Cytokine Network*, 20(3): 121–130, 2009.
15. Karaca B, **Atmaca H**, Uzunoglu S, Karabulut B, Sanli U.A, Uslu R. Enhancement of taxane-induced cytotoxicity and apoptosis by gossypol in human breast cancer cell line, MCF–7. *Journal of BUON*, Jul-Sep, 14(3): 479–485, 2009.
16. Erten C, Karaca B, Kucukzeybek Y, Gorumlu G, Cengiz E, Gul M.K, **Atmaca H**, Uzunoglu S, Karabulut B, Sanli U.A and Uslu R. Regulation of growth factors in hormone and drug-resistant prostate cancer cells by synergistic combination of docetaxel and octreotide. *British Journal of Urology International*, Jul; 104(1): 107–114, 2009

ULUSAL KİTAP BÖLÜMLERİ

1. **Atmaca H**, Karaca B. Bölüm 4. Meme Kanseriinde Genetik ve Molekuler Prediktörler. **Meme Kanseriine Moleküler Yaklaşım**, Ege Üniversitesi Yayınları, Sayfa: 305-311, 2011.