



**ANADOLU ÜNİVERSİTESİ**



**BİLECİK ŞEYH EDEBALI  
ÜNİVERSİTESİ**

**Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**SKBR3 MEME KANSERİ HÜCRE HATTINDA  
ZEBULARİNİN APOPTOTİK YOLAKTA GÖREV ALAN  
KASPAZ-3, KASPAZ-8, VE KASPAZ-9 ÜZERİNE OLAN  
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

**Merve ÇELEN**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı**

**Yrd. Doç. Dr. Onur EROĞLU**

**BİLECİK, 2017**

**Ref. No: 10134007**



**ANADOLU ÜNİVERSİTESİ**



**BİLECİK ŞEYH EDEBALI  
ÜNİVERSİTESİ**

**Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**SKBR3 MEME KANSERİ HÜCRE HATTINDA  
ZEBULARİNİN APOPTOTİK YOLAKTA GÖREV ALAN  
KASPAZ-3, KASPAZ-8, VE KASPAZ-9 ÜZERİNE OLAN  
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

**Merve ÇELEN**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı**

**Yrd. Doç. Dr. Onur EROĞLU**

**BİLECİK, 2017**

**Ref. No: 10134007**



**ANADOLU UNIVERSITY**



**BILECIK ŞEYH EDEBALI  
UNIVERSITY**

**Graduate School of Sciences**

**Department of Molecular Biology and Genetics**

**INVESTIGATION OF ZEBULARINE EFFECT ON  
CASPASE-3, CASPASE-8 AND CASPASE-9 INVOLVED IN  
APOPTOTIC PATHWAY IN SKBR3 BREAST CANCER  
CELL LINE**

**Merve CELEN**

**Master's Thesis**

**Thesis Advisor**

**Asst. Prof. Onur EROĞLU**

**BILECIK, 2017**



**BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS  
JÜRİ ONAY FORMU**

Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 14/12/2016 tarih ve 66 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 03/01/2017 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Merve ÇELEN'in "SKBR3 MEME KANSERİ HÜCRE HATTINDA ZEBULARİNİN APOPTOTİK YOLAKTA GÖREV ALAN KASPAZ-3, KASPAZ-8 VE KASPAZ-9 ÜZERİNE OLAN ETKİSİNİN İNCELENMESİ" başlıklı tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS tezi olarak oy birliği/ oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

**JÜRİ**

ÜYE: Yrd. Doç. Dr. Onur EROĞLU (TEZ DANIŞMANI):

ÜYE: Prof. Dr. Mehtap KUTLU:

ÜYE: Doç. Dr. Beyhan DURAK ARAS:

ÜYE: Yrd. Doç. Dr. Tuba YAĞCI:

ÜYE: Yrd. Doç. Dr. Sema LEBLEBİCİ:

**ONAY**

Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun  
.../.../..... tarih ve ...../..... sayılı kararı.

**İMZA/MÜHÜR**

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımda ve lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca tecrübelerinden ve deneyimlerinden yararlandığım, her konuda desteğini benden esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Onur EROĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Lisans ve yüksek lisans hayatımdaki aldığım eğitimde katkıları olan Sayın Doç. Dr. Cihan DARCAN'a, Doç. Dr. Dilek ÖZAKÇA'ya, Yrd. Doç. Dr. İsmail POYRAZ'a, Yrd. Doç. Dr. Tuba YAĞCI ve özellikle de tez aşamasında büyük desteği olan Sayın Yrd. Doç. Dr. Rafiq GURBANOV'a,

Bu akademik süreçte benden desteklerini esirgemeyen Araş. Gör. Esin GÜVENİR ÇELİK, Hacer Kaya, M. Ali Nalbant'a

Tezim ve tüm hayatım boyunca desteklerini yanımda hissettiğim sevgili annem Nuray ÇELEN'e, babam Yaşar ÇELEN'e, kardeşim H. Betül ÇELEN'e ve çok değerli arkadaşlarım Şulenur ERGÜL ve Ufuk ÖZYÜREK'e teşekkürlerimi sunuyorum.

## ÖZET

DNA metil transferaz inhibitörü (DNMTi) olan nükleotid analogları apoptoz ile ilişkili genlerin ve metilasyon ile susturulan tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunu yeniden düzenleyebilir. Böylece, tümör hücrelerinde apoptoz oluşumu tetiklenebilir. DNA metil transferaz inhibitörü olan (sitidin analogu) zebularin bu ajanlardan birisidir. Bu çalışmada zebularinin SKBR-3 meme kanseri hücre hattında sitotoksikite ve apoptoz mekanizması üzerine olan etkilerini analiz etmeyi amaçladık ve bu çalışma literatürde bu konudaki ilk çalışma olduğundan önemlidir.

Çalışmada kullanılan SKBR-3 hücreleri %10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM besiyerinde uygun kültür ortamında büyütülmüştür. Zebularinin hücre canlılığı, hücre büyümesi, hücre transformasyonu ve hücre göçü üzerine etkilerinin araştırılması için, sırasıyla MTT deneyi, sağkalım deneyi, soft-agar koloni oluşum deneyi ve yara iyileşmesi deneyi gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda, apoptotik mekanizmadaki etkilerini anlamak için, bisülfid modifikasyonu sonrasında metilasyon spesifik HRM (MS-HRM) ile kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9'un metilasyon analizleri gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen bulgular neticesinde zebularinin hücre canlılığını, hücre büyümesini ( $p<0,0001$ ), hücre göçünü ( $p<0,001$ ) ve hücre transformasyonunu ( $p<0,001$ ) önemli derecede azalttığı gözlenmiştir. Ayrıca, zebularin 48 saatlik tedavi sonrasında hücre canlılığını %47'ye düşürmektedir. Uygulanan dozda zamanda zebularine SKBR-3 hücrelerinde kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 genlerinde metilasyon seviyelerinde önemli değişikliklere neden olmamaktadır. Bu sonuçlar neticesinde zebularinin kemoterapide kullanılabileceğine dair destekleyici sonuçlar elde edilmiştir ve literatürde zebularinin SKBR3 hücreleri üzerine etkilerinin araştırılmasına yönelik yapılan ilk çalışma olması nedeniyle özgün bir nitelik taşımaktadır. Fakat etki mekanizmasının daha iyi bir şekilde anlaşılabilmesi için gelecekteki çalışmalarda kaspaz-bağımlı apoptoz mekanizmasının aydınlatılması gerekmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Meme kanseri; hücre kültürü; zebularin; apoptoz; metilasyon

## ABSTRACT

DNA methyl transferase inhibitor (DNMTi) nucleotide analogues can reorganize the expression of the genes related to apoptosis and tumour suppressor genes which are silenced by methylation. Thus, it can trigger apoptosis formation in tumour cell. Zebularine which is DNA methyl transferase inhibitor (cytidine analogue) is one of these agents. This study aimed to analyse the effects of zebularine in SKBR3 breast cancer cell line on cytotoxic and apoptotic mechanism and it is important in the sense that it is the first study on the issue in the literature.

SKBR3 cell line used in the study is grown at DMEM medium. In order to evaluate the effects of Zebularine on cell viability, cell growth, cell transformation and cell migration, MTT assay, cell survival assay, soft agar colony formation assay, wound healing assay were done respectively. At the same time, in order to understand the effects on apoptotic mechanism, Methylation Sensitive High Resolution Melting (MS-HRM) was done for the methylation analysis of caspase-3, caspase-8 and caspase-9 genes after bisulphite modification.

As a result of the findings, it is observed that Zebularine considerably decimates the cell viability, growth ( $p < 0,0001$ ), cell migration ( $p < 0,001$ ) and cell transformation ( $p < 0,001$ ). However, Zebularine shows cell viability at 47% after treatment at 48 hours. At the same time, Zebularine don't cause significant change on methylation in caspase-3, caspase-8 and caspase-9 genes administered dose and time in SKBR3 cells. These results support that Zebularine can be a new anticancer agent in chemotherapy in breast cancer cells and this is the first work on this subject. However, for the understanding of the mechanisms of action, it is necessary to carry out studies aiming at understanding the caspase-related apoptosis mechanism in the future.

**Keyword:** Breast cancer; cell culture; zebularine; apoptosis; methylation

## İÇİNDEKİLER

### JÜRİ ONAY FORMU

### TEŞEKKÜR

|                                                                               |            |
|-------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>ÖZET .....</b>                                                             | <b>i</b>   |
| <b>ABSTRACT .....</b>                                                         | <b>ii</b>  |
| <b>İÇİNDEKİLER.....</b>                                                       | <b>iii</b> |
| <b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....</b>                                   | <b>vi</b>  |
| <b>ŞEKİLLER DİZİNİ .....</b>                                                  | <b>x</b>   |
| <b>ÇİZELGELER DİZİNİ .....</b>                                                | <b>xi</b>  |
| <b>1 GİRİŞ .....</b>                                                          | <b>1</b>   |
| <b>2 GENEL BİLGİLER.....</b>                                                  | <b>4</b>   |
| 2.1 Meme Kanseri Epidemiyolojisi.....                                         | 4          |
| 2.1.1 Coğrafi sıklığı ve dünyadaki çeşitleri.....                             | 4          |
| 2.1.2 Meme kanseri oluşumunda yaşa spesifik değişimler .....                  | 6          |
| 2.2 Meme Kanserinin Genetik Ve Moleküler Epidemiyolojisi.....                 | 6          |
| 2.2.1.1 Meme kanseri risk faktörleri .....                                    | 7          |
| 2.3 Meme Kanseri Genetik Epidemiyolojisi .....                                | 9          |
| 2.3.1 Yüksek penetrans gösteren genler .....                                  | 10         |
| 2.3.2 Orta derecede penetrans gösteren genler .....                           | 10         |
| 2.3.3 Düşük penetrans gösteren genler .....                                   | 11         |
| 2.4 Meme Kanserinin Moleküler Epidemiyolojisi.....                            | 11         |
| 2.4.1 BRCA1 ve BRCA2 ile ilişkili meme kanserinin patolojik özellikleri ..... | 11         |
| 2.4.1.1 Meme kanserinin moleküler sınıflaması .....                           | 11         |
| 2.5 Meme Kanseri Gelişim Mekanizmaları .....                                  | 13         |
| 2.5.1 Memenin anatomisi, gelişimi ve meme kök hücresi .....                   | 13         |
| 2.5.1.1 Meme gelişimi .....                                                   | 13         |
| 2.5.1.2 Meme kök hücresi .....                                                | 14         |
| 2.5.1.3 Kanser kök hücresi hipotezi .....                                     | 16         |
| 2.5.1.4 Meme kanseri kök hücresi (MKKH).....                                  | 17         |
| 2.6 Apoptotik Hücre Ölüm Mekanizmaları.....                                   | 19         |
| 2.6.1 İntrinsik (mitokondriyal) yolak .....                                   | 21         |
| 2.6.1.1 Bcl-2 Ailesi .....                                                    | 22         |

|          |                                                                          |           |
|----------|--------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.6.1.2  | İntrinsik yolda rol alan diğer moleküller .....                          | 23        |
| 2.6.2    | Ekstrinsik yolk .....                                                    | 24        |
| 2.7      | Epigenetik Düzenlenmeler ve Kanser .....                                 | 26        |
| 2.7.1    | RNA-aracılı gen ifadesinin kontrolü .....                                | 26        |
| 2.7.2    | Histon modifikasyonları .....                                            | 27        |
| 2.7.3    | DNA metilasyonu .....                                                    | 28        |
| 2.7.3.1  | DNA metil transferaz inhibitörleri (DNMTi) ve tedavi .....               | 30        |
| 2.7.3.2  | Zebularin .....                                                          | 31        |
| 2.8      | SKBR3 Hücre Hattı .....                                                  | 33        |
| <b>3</b> | <b>MATERYAL VE METODLAR .....</b>                                        | <b>34</b> |
| 3.1      | Kullanılan Malzemeler .....                                              | 34        |
| 3.1.1    | Kullanılan cihazlar .....                                                | 34        |
| 3.1.2    | Sarf malzemeler .....                                                    | 34        |
| 3.1.3    | Kullanılan kimyasallar .....                                             | 35        |
| 3.1.4    | Kullanılan tamponlar .....                                               | 36        |
| 3.1.4.1  | 1X PBS tamponu .....                                                     | 36        |
| 3.1.4.2  | Lizis tamponu .....                                                      | 36        |
| 3.1.4.3  | Hücre dondurma ortamı .....                                              | 36        |
| 3.1.4.4  | CT dönüşüm reaktifi .....                                                | 36        |
| 3.2      | Yöntemler .....                                                          | 37        |
| 3.2.1    | Hücre kültürü .....                                                      | 37        |
| 3.2.2    | Hücre canlılığının belirlenmesi .....                                    | 37        |
| 3.2.3    | Hücre sağkalım tayini .....                                              | 38        |
| 3.2.4    | Yara iyileşmesi deneyi .....                                             | 38        |
| 3.2.5    | Soft-agar koloni oluşum deneyi .....                                     | 38        |
| 3.2.6    | DNA izolasyonu .....                                                     | 39        |
| 3.2.7    | Bisülfid modifikasyonu .....                                             | 40        |
| 3.2.8    | Real time PCR .....                                                      | 40        |
| 3.2.9    | İstatistiksel analiz .....                                               | 42        |
| <b>4</b> | <b>BULGULAR .....</b>                                                    | <b>43</b> |
| 4.1      | Zebularinin SKBR-3 Hücre Hattında Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri ..... | 43        |
| 4.2      | Zebularinin Hücrelerin Metastazı Üzerine Etkilerinin İncelenmesi .....   | 44        |

|                                                                                                          |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.3 Zebularinin Zamana Bağlı Olarak SKBR-3 Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkilerinin Gösterilmesi ..... | 46        |
| <b>5 TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>                                                                         | <b>51</b> |
| <b>KAYNAKÇA .....</b>                                                                                    | <b>58</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>                                                                                     | <b>76</b> |

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

|                   |                                                 |
|-------------------|-------------------------------------------------|
| ADP:              | Adenosine diphosphate                           |
| ALDH1:            | Aldehit dehidrojenaz-1                          |
| ANT:              | Adenine nucleotide translocator                 |
| Apaf-1:           | Apoptotic protease activating factor-1          |
| ATM:              | Serine/threonine kinase                         |
| ATP:              | Adenosine triphosphate                          |
| Bax:              | Bcl-2-associated X protein                      |
| Bcl-2:            | B-cell lymphoma 2                               |
| BMI:              | Body mass index                                 |
| BRCA1:            | Breast cancer 1                                 |
| BRCA2:            | Breast cancer 2                                 |
| BRIP1:            | BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1 |
| CAD:              | Caspase- activated endonuclease                 |
| CARD:             | Caspase recruitment domain                      |
| CDH1:             | Cadherin 1                                      |
| CH <sub>3</sub> : | Methyl group                                    |
| CHEK2:            | Checkpoint kinase 2                             |
| CK:               | Cytokeratin                                     |
| CTCs:             | Circulating tumor cells                         |
| CYP19:            | Cytochrome P450 family 19                       |
| DAC:              | 5-aza-2'-deoxycytidine                          |
| DD:               | Death domain                                    |
| DED:              | The death effector domain                       |
| Diablo:           | IAP-binding mitochondrial protein               |
| DISC:             | Death-inducing signaling complex                |
| DMEM:             | Dulbecco's Modified Eagle's medium              |
| DMSO:             | Dimethyl sulfoxide                              |
| DNMT:             | DNA methyltransferase                           |
| DNMTi:            | DNA methyltransferase inhibitor                 |
| DR3 ve DR6:       | TNFr member                                     |
| EDAR:             | TNFr member                                     |

|                                   |                                             |
|-----------------------------------|---------------------------------------------|
| EDTA:                             | Etilendiamintetraacetic acid                |
| EGCG:                             | Epigallocatechin-3-gallate                  |
| EGFR:                             | Epidermal growth factor receptor            |
| Elf-5:                            | E74 like ETS transcription factor 5         |
| ER:                               | Estrogen receptor                           |
| EtOH:                             | Etanol                                      |
| FADD:                             | Fas-associated death domain                 |
| FasL:                             | Fas cell surface death receptor Ligand      |
| FBS:                              | Fetal Bovine Serum                          |
| FGF:                              | Fibroblast büyüme faktörü                   |
| FGFR:                             | Fibroblast büyüme faktör reseptörü          |
| FLIP:                             | FLICE inhibitor protein                     |
| GATA2:                            | GATA binding protein 2                      |
| GWAS:                             | Genome wide association studies             |
| HAT:                              | Histone acetyltransferase                   |
| HDAC:                             | Histone deacetylase                         |
| HDACi:                            | Histone deacetylase inhibitors              |
| HER-2:                            | Erb-b2 receptor tyrosine kinase 2 (erb-b2)  |
| Hg:                               | Hedgehog                                    |
| HRT:                              | Hormone replacement therapy                 |
| IAP:                              | Inhibitor of apoptosis                      |
| ICAD:                             | Inhibitor of caspase-activated endonuclease |
| KCl:                              | Potassium chloride                          |
| kDa:                              | Kilodalton                                  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> : | Potassium dihydrogen phosphate              |
| KKH:                              | Kanser kök hücre                            |
| lncRNAs:                          | Long non-coding RNAs                        |
| MHK:                              | Meme kök hücresi                            |
| miRNA:                            | MicroRNA                                    |
| MKKH:                             | Meme kanseri kök hücre                      |
| µl:                               | Microliter                                  |
| µM:                               | Micromolar                                  |

|                             |                                                      |
|-----------------------------|------------------------------------------------------|
| $\mu\text{m}$ :             | Micronmeter                                          |
| ml:                         | Mililite                                             |
| mRNA:                       | Messenger RNA                                        |
| MS-HRM:                     | Methylation spesific high resolution melting         |
| MTT:                        | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium |
| Bromide                     |                                                      |
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ : | Disodium hydrogen phosphate                          |
| NaCl:                       | Sodium chloride                                      |
| ncRNA:                      | Non-coding RNA                                       |
| NF-KB-IKB:                  | Nuclear factor inhibitor kinase complex              |
| NGFR:                       | Nerve growth factor receptor                         |
| nM:                         | Nanomolar                                            |
| nm:                         | Nanometer                                            |
| Numa:                       | Nuclear mitotic apparatus protein                    |
| OPN:                        | Osteopontin                                          |
| PALB2:                      | Partner and localizer of BRCA2                       |
| PBS:                        | Phosphate buffer saline                              |
| PCR:                        | Polimerase chain reaction                            |
| PgR:                        | Progesterone Receptor                                |
| PTEN:                       | Phosphatase and tensin homolog                       |
| RAR $\beta$ 2:              | Retinoic acid receptor $\beta$ 2                     |
| RISC:                       | RNA-induced silencing complex                        |
| RNAi:                       | RNA interference                                     |
| Rpm:                        | Revolutions per minute                               |
| SAM:                        | S-Adenozil metiyonin                                 |
| SDS:                        | Sodium dodecyl sulfate                               |
| siRNA:                      | Small interfering RNA                                |
| Smac/ Diablo:               | IAP-binding mitochondrial protein                    |
| STH:                        | Sirküle tümör hücreleri                              |
| STK11:                      | Serine/threonine kinase 11                           |
| Tbx3:                       | T box 3                                              |
| TNFr:                       | Tumor necrosis factor receptor                       |

|        |                                    |
|--------|------------------------------------|
| TNF:   | Tumor necrosis factor              |
| TP53:  | Tumor protein P53                  |
| TRADD: | TNFr associated death domain       |
| TRAF2: | TNFr associated factor 2           |
| TRAIL: | TNFr-apoptosis inducing ligand     |
| TSA:   | Trichostatin A                     |
| VEGF:  | Vascular endothelial growth factor |
| VDAC:  | Voltaj-bağımlı anyon kanalları     |
| WHO:   | World health organization          |
| XIAP:  | X-linked inhibitor of apoptosis    |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 2.1.</b> Meme kanseri insidansı ve mortalite oranları: bölgeye göre 100.000 kişideki oranlar.....                            | 5  |
| <b>Şekil 2.2.</b> Kaspazların yapısı.....                                                                                             | 21 |
| <b>Şekil 2.3.</b> (A) İntersik ve (B) ekstersik apoptoz sinyal yolağı .....                                                           | 25 |
| <b>Şekil 2.4.</b> DNA metilasyonunun şematik gösterimi.....                                                                           | 30 |
| <b>Şekil 2.5.</b> DNMT inhibitörleri ve mekanizmaları,.....                                                                           | 31 |
| <b>Şekil 2.6.</b> Zebularinin DNMT inhibisyon mekanizması.....                                                                        | 33 |
| <b>Şekil 3.1.</b> MS-HRM analizleri için döngü koşulları .....                                                                        | 42 |
| <b>Şekil 4.1.</b> Zebularinin farklı dozlarının (0-140 µM) SKBR-3 hücre hattında 24 saatteki hücre canlılığı üzerine etkisi. ....     | 43 |
| <b>Şekil 4.2.</b> Zebularinin SKBR-3 hücrelerinde hücre proliferasyonu üzerine etkileri, ....                                         | 44 |
| <b>Şekil 4.3.</b> Zebularinin hücre göçü ve proliferasyonu üzerine etkileri,.....                                                     | 45 |
| <b>Şekil 4.4.</b> Yara iyileşmesi deneyi yara genişliği ölçümleri,.....                                                               | 45 |
| <b>Şekil 4.5.</b> Soft-agar koloni oluşum deneyi mikroskop görüntüsü,.....                                                            | 46 |
| <b>Şekil 4.6.</b> kaspaz-3 genine ait zebularin uygulanan örnekler ve kontrol gruplarının “Melt difference plot” görüntüsü .....      | 47 |
| <b>Şekil 4.7.</b> kaspaz-3 genine ait zebularin uygulanan örnekler ve kontrol gruplarının “Melt raw/derivative curve” görüntüsü.....  | 48 |
| <b>Şekil 4.8.</b> kaspaz-8 genine ait zebularin uygulanan örnekler ve kontrol gruplarının “Melt difference plot” görüntüsü .....      | 49 |
| <b>Şekil 4.9.</b> kaspaz-8 genine ait zebularin uygulanan örnekler ve kontrol gruplarının “Melt raw/derivative curve” görüntüsü.....  | 49 |
| <b>Şekil 4.10.</b> kaspaz-9 genine ait zebularin uygulanan örnekler ve kontrol gruplarının “Melt difference plot” görüntüsü .....     | 50 |
| <b>Şekil 4.11.</b> kaspaz-9 genine ait zebularin uygulanan örnekler ve kontrol gruplarının “Melt raw/derivative curve” görüntüsü..... | 50 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Çizelge 3.1.</b> 1XPBS tampon içeriği .....                                 | 36 |
| <b>Çizelge 3.2.</b> Hücre lizis tamponu içeriği.....                           | 36 |
| <b>Çizelge 3.3.</b> CT Dönüşüm reaktifi içeriği.....                           | 37 |
| <b>Çizelge 3.4.</b> MS-HRM analizleri için PCR içeriğinin hazırlanması .....   | 41 |
| <b>Çizelge 3.5.</b> Kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9'a ait primer dizileri ..... | 41 |

## 1 GİRİŞ

Kanser 21. yüzyılda en önemli sağlık sorunlarından birisi olarak karşımıza çıkmaktadır. Görülme oranı ise birçok ülkede kalp hastalıklarını yakalamış hatta geçmiş durumdadır. Kanser, kendiliğinden, kontrolsüz bir şekilde düzensiz olarak bölünüp çoğalarak bulundukları bölge dışına yayılabilen hücrelerden oluşan bir hastalıktır. Günümüzde kanser, bugün her üç kişiden birinin ömrü boyunca yakalanabileceği yaygın bir hastalık haline gelmiştir.

Meme kanseri ise kadınlarda en sık görülen birinci ve en sık ölümlle sonuçlanan ikinci kanser türüdür (Jemal, vd., 2010). Tüm kadın kanserlerinin %18'ini oluşturur. Otuz yaşından önce meme kanseri nadir görülmekte, menapoza kadar görülme sıklığı artmakta, menapozda hafif bir azalma sonrası post menapozal dönemde sürekli artış göstermektedir. Seksen beş yaşındaki her 9 kadından 1'inde meme kanseri riski vardır. Avrupa'da her yıl 180.000 ABD'de ise yılda %1,8 dünyanın çeşitli ülkelerinde ise %1,2 oranında artış izlenmekte ve her yıl dünyada yaklaşık bir milyon kadına meme kanseri tanısı konmaktadır (Parkin, 2001). Bu kadar sık rastlanan ve kadınlar için hala büyük bir sorun olan meme kanserini anlamak ortaya çıkış nedenini ortaya koymak, nasıl başladığını bulmak önem arz etmektedir.

Diğer kanser türlerinde olduğu gibi, meme kanseri, sağlıklı meme hücrelerinde bulunan steroid hormon genlerinde, steroid hormonların reseptörlerini kodlayan genlerde, büyüme faktörü genlerinde, onkogenlerde ve tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen çeşitli mutasyonların zamanla birikmesi sonucunda oluşmaktadır (Keen ve Davidson, 2003).

Genom kararlılığının bozulması, kanser hücrelerinde ilk aşamada tanımlanabilen bir özelliktir. Genom kararlılığının bozulması sonucunda gen kaybı, gen amplifikasyonu, kromozom translokasyonları ve nokta mutasyonları gibi genetik değişiklikler meydana gelmektedir. Bu tür değişimlerin çoğu hücresel sağkalım, çoğalma, yayılma, hareketlilik, ilaç dirençliliği gibi olaylardan sorumlu genlerin aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır (Osborne, vd., 2004). Meme kanserinde genellikle gen kaybı ve gen kopya sayılarındaki değişiklikler, kanser oluşumunun ilk evrelerinde görülen değişimlerdir (O'Connell, vd., 1998). Bu tür genetik değişimlerden

etkilenen hücresel yollar arasında yüksek oranda etkileşim olduğundan meme kanseri dahil tüm kanser türlerine yönelik teşhis ve tedavi süreçleri zaman almaktadır.

Büyüme ya da ölenin yerine yenisine ihtiyaç duyulması durumunda hücreler kontrolsüz olarak çoğalabilmektedir. Kanserde de yukarıda belirtilen nedenlerle bu çoğalma kontrol dışına çıkmakta ve hücresel işlevler bozulmaktadır. Bu aşamada genetik değişikliklerin yanı sıra epigenetik mekanizmaların da önemli rol oynadığı ortaya koyulmuştur. Epigenetik değişiklikler DNA dizisinde değişim olmaksızın mitoz ve/veya mayoz bölünme ile kalıtılabilen gen ifadesindeki değişikliklerdir. Burada DNA dizisinde değişiklik meydana gelmeden gen ifadesinin değişimi söz konusudur. DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları üzerinde en çok çalışılan iki epigenetik kavramdır.

DNA metilasyonu en çok çalışılan epigenetik mekanizma olup, gen ifadesinin baskılanmasını sağlamakta, embriyonik gelişim, gen transkripsiyon, kromatin yapısı, X-kromozom inaktivasyonu, genomik baskılanmanın düzenlenmesi ve kromatin kararlılığının korunmasında fonksiyon görmektedir (Robertson, 2005). Aynı zamanda kanser oluşumunda da etkisi görülmektedir. DNA metilasyonu, DNA metil transferaz (DNMT) enzimleri tarafından düzenlenmekte ve DNA genellikle CpG bölgelerindeki sitozinin (C) 5. halkasından metillenmektedir. CpG adacıkları ise genlerin promotor bölgelerinde bulunan, yaklaşık 500 bp uzunluğunda ve %55'ten fazla CG içeren, metilasyon oranı düşük olan korunmuş dizilerdir (Egger, vd., 2004). DNA metilasyonu, transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını engelleyerek veya metile DNA'ya bağlanan protein kompleksleri sayesinde kromatin yapısını değiştirerek genlerin ifadesini baskıladığı düşünülmektedir.

Apoptoz fizyolojik şartlarda çok hücreli organizmalarda, hem gelişim sırasında hem de gelişimini tamamlamış organizmaların homeostazının sağlanmasında istenmeyen hücrelerin yok edilmesi için evrimleşmiş, karmaşık bir mekanizma olarak tanımlanmaktadır. Hasarlı hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlayan apoptoz oldukça sıkı kontrol mekanizması ile hücre sayısının kontrol altına alınması ve hasarlanmış hücrelerin çoğalmasının baskılanmasında ve sağlıklı hücrelerin yaşamına devam etmesinde önemli rol oynamaktadır. Günümüzde apoptoz kanser tedavi stratejilerinin temel araştırma konularından birisidir. Tüm kanserlerde olduğu gibi meme kanserinde

de apoptoz mekanizması hedef alınmaktadır. Amaç apoptoz mekanizması bozulmuş, sürekli proliferasyona uğrayan kanser hücrelerinin yok edilmesini hedefleyen, apoptotik proteinlerin veya sinyal yollarının tetiklenmesini sağlayan tedaviler ile hücreyi apoptoza sürüklemektir. Bu nedenle apoptoz mekanizmasının anlaşılması geliştirilecek tedavi için önemlidir.

Bu çalışmada DNMT inhibitörü olan zebularinin SKBR-3 meme kanseri hücre hattındaki hücre canlılığı, hücre transformasyonu ve hücre göçü üzerine etkilerinin yanı sıra apoptoz mekanizmasında etkili olan kaspaz-3, 8 ve 9'un metilasyon düzeylerindeki değişikliklerin araştırılması amaçlanmıştır.

## 2 GENEL BİLGİLER

### 2.1 Meme Kanseri Epidemiyolojisi

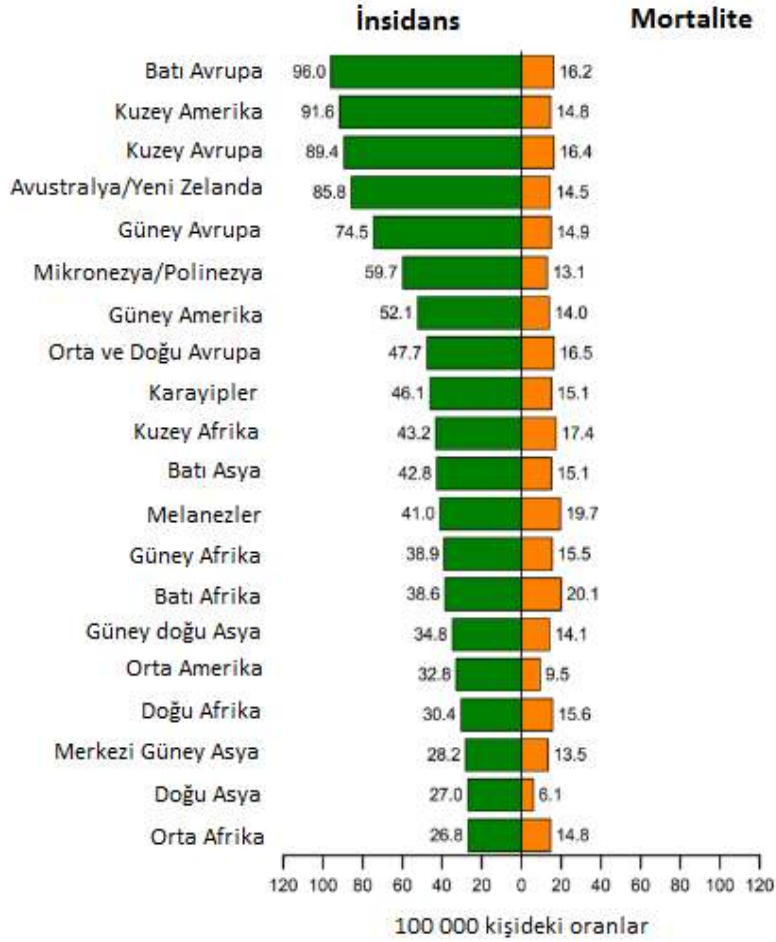
Kadınlarda meme kanseri dünya çapında en büyük sağlık problemlerinden birisidir. Hem gelişmiş ülkelerde hem de gelişmekte olan ülkelere kadınlar arasında en yaygın kanserdir. Her yıl tanımlanan bütün kanserlerin onda biri kadın meme kanseridir. Aynı zamanda dünyada kadınlar arasında kanserin sorumlu olduğu ölümlerin temel nedenidir. Bir milyondan fazla hasta tanımlanmıştır ve dünya genelinde 410.000 hastadan fazlası bundan dolayı ölmektedir (Ferlay, vd., 2004). Her iki cinste de kanser oluşumuna göre sıralandığında, akciğer kanserinden sonra ikinci en yaygın kanserdir. Küresel yoğunluğun yaklaşık %55'i son zamanlarda gelişmiş ülkelere yaşanmaktadır, fakat insidans oranları gelişmekte olan ülkelere de hızlı bir şekilde artmaktadır.

#### 2.1.1 Coğrafi sıklığı ve dünyadaki çeşitleri

Meme kanseri her yıl dünyada teşhis edilen 5 milyon kanser vakasının beşte birini oluşturmaktadır. Dünya genelinde 2012'de teşhis edilen 1,676,600 milyon vaka ile kadınlarda en sık görülen kanserdir ve 521,900 milyon ölüme neden olmuştur. 2012 verilerine göre gelişmiş ülkelere 793,700 vaka ve 197,600 ölüm oranı saptanırken, gelişmekte olan ülkelere 882,900 vaka ve 324,300 ölüm oranı saptanmıştır (Torre, vd., 2015). Dünyanın farklı bölgelerinde 2030 yılı için meme kanseri vakalarının tahmini yapıldığında insidans oranlarındaki mevcut eğilimleri sabit varsayarsak; dünyadaki daha az gelişmiş bölgelerde meydana gelen vakaların %60'dan daha fazlası (1.72 milyon) yani 2030 yılında 2,7 milyon yeni vaka meydana geleceği düşünülmektedir. Bu tahminde mevcut oranların sabit kalacağı varsayılır, birçok gelişmekte olan ülkede meme kanseri insidans oranlarındaki artış göz önüne alındığında durum böyle görünmemektedir. Bu yüzden, meme kanserinin gelecekteki dünyadaki sıklığı, özellikle daha az gelişmiş ülkelere muhtemelen büyümeye devam edecektir.

Meme kanseri insidansı ve ölümü dünyanın bölgelerinde önemli derecede değişmektedir. Tahmini yaşa bağlı insidans Çin'de her 100.000 kadın için %18,7'den, Kuzey Amerika'da her 100.000 kadın için %99,4'e değişmektedir (Şekil 2.1). Genelde insidans dünyanın gelişmiş bölgelerinde yüksek olup (her 100.000 kadın için %80 den

daha büyük) gelişmekte olan bölgelerde düşüktür (her 100.000 kişi için %30'dan daha az). Gelişmiş ülkelerde meme kanserinin daha olumlu sağ kalımından (yüksek insidans) dolayı ölüm oranlarının yüzdesi (yaklaşık 100.000'de %6-23) daha düşüktür.



**Şekil 2.1.** Meme kanseri insidansı ve mortalite oranları: bölgeye göre 100.000 kişideki oranlar (Torre, vd., 2015).

Meme kanserinin en yüksek insidans oranı Kuzey ve Batı Avrupa, Kuzey Amerika, Avustralya, Yeni Zelanda, ve Güney Amerika'nın güney ülkelerinde, özellikle de Uruguay ve Arjantin'de gözlenmektedir (Ferlay, vd., 2004) (Şekil 2.1). Genelde, gelişmiş ülkelerde yüksek meme kanseri oranları hastalık için bilinen risk faktörlerinin daha yüksek bir prevalansının sonucudur. Bunların çoğu menarşta erken yaş, nuliparite, ilk doğumda geç yaş, herhangi bir doğumda geç yaş, düşük parite (doğum sayısı), ekzojen hormonlara maruz kalma (oral kontraseptifler ve menopozal hormon terapisi), obezite ve geç menopoz (memenin menopozda menarşdan ovulasyonun kesilmesine maruz kalacağı hormonal ortamla (büyük ölçüde östrojen) ilgilidir. En az gelişmiş

lkelerde insidans oranı her 100.000 kadın içinde %40'dan daha az iken, meme kanseri az gelişmiş ülkelerin çoğunluğunda kadınlar arasında hala en yaygın kanserdir (Parkin, vd., 2005).

İnsidans oranları Porto Riko, Brezilya ve en doğudaki Avrupa popülasyonlarında olduğu gibi Hong Kong, Singapur ve Filipinler gibi çeşitli Asya popülasyonlarında da orta seviyededir (100.000 kişide %30-60) (Parkin, vd., 2005). Çeşitli in popülasyonlarında, doğu Afrika popülasyonlarında, Zimbabwe ve Uganda, Kuzey Afrika'daki Cezayir, birkaç güneydoğu Asya lkesinde (Tayland ve Vietnam) ve Hindistan'daki birkaç bölgede nispeten daha düşük oranlar görülmektedir. Asya kökenli özellikle in, Japonya ve Filipinler ABD doğumlu olanlarla kıyaslandığında ABD'de yaşayan Koreliler Kore'de yaşayan Korelilerden farklı olmamakla beraber nispeten düşük meme kanseri insidans hızını korumaktadır.

### **2.1.2 Meme kanseri oluşumunda yaşa spesifik değişimler**

Meme kanseri için yaşa özgü insidans gözlenir. Menopoz ncesi insidans oranı (50 yaşına kadar) hızlı bir artışla karakterizedir ve insidans oranının artış miktarı sonrasında daha düşüktür. Bu pattern menopozdan sonra salgılanan östrojen düzeyindeki azalmaya bağlı olabilmektedir (Henderson, vd., 1988). İlginçtir ki, düşük insidanslı gelişmekte olan ülkelerde, menopozdan sonra insidans hızında artış olmayabilir ve hatta menopozdan sonra daha düşük oranlar gözlenebilir. Bu yaşla birlikte gerçek bir risk azalmasından ziyade kadınların ardışık nesillerinde ortaya çıkma riskinin artmasının sonucudur (Moolgavkar, vd., 1979). Popülasyonların kısmen daha geç yapısı ve menopozdan sonraki düz bir yaş-insidans eğrisi Avrupa ve Amerika popülasyonlarından daha çok gelişmekte olan ülkelerde meme kanseri vakalarının teşhisinde daha düşük yaş ortalamasıyla sonuçlanmaktadır.

## **2.2 Meme Kanserinin Genetik Ve Moleküler Epidemiyolojisi**

Epidemiyoloji, toplum sağlığının ilk ve en gelişmiş dalı olmaktadır. Amacı, toplumlarda hastalığın nedenini anlayarak koruyucu müdahaleler geliştirebilmektir. Hastalığın nedenini çözümlerken maruziyet-hastalık ilişkisini sağlayan etkenleri saptamaya çalışır. Hastalığa yol açan etkenlerin bilimsel yöntemlerle saptanması koruyucu müdahalelerin geliştirilmesi için en önemli koşuldur.

Moleküler epidemiyoloji, klasik epidemiyolojinin moleküler yöntemlerin kullanılmasına olanak sağlayan bir uzantısıdır ve epidemiyolojik araştırmalarda moleküler biyoloji tekniklerini kullanmaktadır. Kanserlerde riskleri artıran ya da azaltan çevresel ve yaşam tarzı faktörlerinin belirlenmesiyle kanserden korunma yöntemlerini belirlemede oldukça başarılı bir disiplindir.

**Meme Kanseri:** Meme kanseri insidans hızlarına göre Belçika, Danimarka, Fransa ve Hollanda gibi gelişmiş ülkelerde ve Batı Avrupa ve ABD gibi gelişmiş ülkelerde kadınlarda en sık görülen kanserdir. Gelişmiş ülkelerde meme kanseri insidansının yüksek olması, yaşam standartlarının yüksek olması, erken menarş yaşı, geç gebelik ve doğum, daha az sayıda gebelik, hormon replasman tedavisi kullanımı ve ayrıca mamografi gibi tekniklerin kullanılmasıyla erken tanının mümkün olmasına olanak sağlamaktadır.

Meme kanseri hızlarının tüm dünyada özellikle gelişmekte olan ülkelerde ciddi artış göstermektedir ve özellikle son 10 yılda pek çok gelişmiş ülkede Menopozda hormon replasman tedavisi (HRT) kullanımının azalmasına bağlı olarak düşme eğilimi göstermektedir (Key, vd., 2001; Hery, vd., 2008).

Gelişmekte olan ülkeler, doğu Avrupa ülkeleri, Asya, Latin Amerika ülkelerinde gözlenen artışların batılı beslenme özelliklerine bağlı olabileceği öne sürülmektedir. Meme kanseri insidansı en çok yaşla ilişkili bulunmaktadır. Aktif üreme yaşlarında hızla yükselmekte ve 50 yaş sonrasında yavaş bir düşüş göstermektedir (Key vd., 2001). İsveç gibi gelişmiş ülkelerde ise insidansta 65 yaşlarında bir pik oluşmakta ve sonrasında düşüş gözlenmektedir.

### **2.2.1.1 Meme Kanseri Risk Faktörleri**

**Reproduktif Faktörler:** Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) östrojenin kadınlarda kanserojen olduğunu ve kanser riskinin östrojen maruziyeti ile ilişkili olduğunu bildirmiştir. Yapılan çalışmalar endojen hormon düzeyleriyle meme kanseri arasında ilişki olduğunu desteklemektedir (Dorgan, vd., 1997). Endojen seks hormonlarına yaşam boyu maruz kalındığında, kadının yaşamsal evreleri gündeme gelmektedir. Meme kanseri riskinin menarş yaşı 12'den küçük olan kadınlarda, meme epitelinin daha uzun süre östrojene maruz kalmasına bağlı olduğunu kanıtlamıştır. Menopoz yaşının

geç olması da aynı mekanizma ile açıklanmaktadır. Menopoz yaşındaki her bir yıllık gecikme, meme kanseri riskini %3 artırmaktadır (Beral, vd., 1996).

Çok sayıda doğum yapmak ve erken yaşta doğum yapmak meme kanserinin insidansında düşme yapması nedeniyle koruyucu olarak tanımlanır. Yirmi yaşın altında doğum yapan kadının meme kanseri olma riski 30 yaşından sonra doğum yapanın yaklaşık yarısı kadardır. Mekanizma tam anlaşılmamış olsa da nedeninin memenin maturasyonunu tamamlamasına ve karsinojenik transformasyona daha az duyarlı olmasına bağlanmaktadır (Kelsey, vd., 1985; Russo, vd., 2000). Benzer şekilde emzirmeme de meme kanseri için risk teşkil etmektedir (Key, vd., 2001).

**Obezite:** Özellikle post menopozal kadınlarda yağ dokusunda androjenlerin östrojene dönüştülmesiyle dolaşımda ortaya çıkan yüksek östrojen düzeylerine bağlıdır. Son dönemlerde yapılan çalışmalarda androjenlerin in situ aromatisasyonu sonucu ortaya çıkan östradiol düzeyi dolaşımdaki dolaşımda yükselen östrojenden daha yüksektir. Menopoz sonrası 10 kg'nin üzerinde artış meme kanseri riskini %18 artırmaktadır. Body mass index (BMI) 24 kg/m<sup>2</sup>'nin üstünde olan post menopozal kadınlarda insidans oranı artmaktadır (Tavasolli ve Devilee, 2003).

**Östrojen Alınması Ve Doğum Kontrol Hapı Kullanılması:** Menopoz nedeniyle 5 yıldan fazla östrojen tedavisi gören kadınlarda meme kanseri görülme riski %35 yükselmektedir. 5 yıllık kullanmama dönemi sonrası artış sıfırlanmaktadır (Clavel-Chapelon vd., 2002). Doğum kontrol haplarının meme kanseri görülme riskini yükselttiği belirtilmekle birlikte konuyla ilgili farklı görüşler vardır. Her ne kadar bu hapları kullanan kadınlarda meme kanserine yakalanma açısından %24 oranında risk artışı olduğu iddia edilse de yapılan çalışmalar 10 yıl önce doğum kontrol hapı kullanmayı bırakmış olan kadınlarda bu riskin tamamen ortadan kalktığına da işaret edilmektedir (Clavel-Chapelon vd., 2002). Yapılan çalışmalarda günümüzde ağırlıklı olarak kullanılan kombine oral kontraseptiflerin (östrojen+progesteron), tek başına östrojen kullanımına göre %26 daha yüksek risk oluşturmaktadır (Rossouw, vd., 2002).

**Sigara:** Sigaranın meme kanseriyle tam bir ilişkisi olmasa da genel anlamda sağlığı olumsuz yönde etkilemektedir. Meme kanseri çalışmalarında sigara ile meme kanseri oluşma riski arasında zayıf bir ilişki saptanmıştır. Erken yaşta başlayan ağır

içici özelliklerine uyan ve pasif içicilikle istatistiksel anlamlı ilişki kurulmuştur (Wartenberg, vd., 2000). Öte yandan sigara dumanında bulunan bazı maddelerin anti-östrojenik etkileri olduğu saptanmıştır. Nikotinin CYP19 enzimi inhibe ettiği ve erken menopoza yol açtığı kanıtlanmıştır (Baron, vd., 1990). Sigara en az 30 tanesinin kesin kanserojen olduğu bilinen yaklaşık 3000 bileşik taşımaktadır. Sigara dumanında bulunan en önemli karsinojenik maddeler, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, aril aminler, heterosiklik aromatik aminler ve N-nitrosaminlerdir (Baron, vd., 1990; Bartsch, vd., 2000).

**Alkol:** Her ne kadar bu konu tam anlamıyla netlik kazanmasa da günlük 1-5 alkollü içki kullananlarda meme kanseri riskinin arttığı gösterilmiştir. benzer bir çalışma sonucunda da alkol bağımlısı kadınlarda yapılan bir çalışmada da alkolün meme kanseri riskini %15 arttırdığı bildirilmiştir (Smith-Warner, vd., 1998).

**Genetik Geçiş:** Kanserde genetik geçiş çeşitli açılardan izlenebilir. Bugün tüm meme kanserlerinin %5-10'unun BRCA1 ve BRCA2 gibi genlerdeki mutasyonlara bağlı olduğu kanıtlanmıştır (Easton, 2002). Bu mutasyonları taşıyan ve Mendel kalıtımı gösteren hastalar kalıtsal meme kanseri olarak tanımlanmaktadır. Muayene formunda buna benzer ailesel genetik yatkınlık olması ancak belirli bir patern göstermeyen kadınların da gözlenmesi bu alanda gerçek oranın değişebileceğini düşündürmektedir (Bradbury ve Olopade, 2007). Ailesel meme kanseri açık bir genetik geçiş paterni göstermese de meme kanseri olgularının birinci ve ikinci derece akrabalarında da meme kanseri olgularının var olmasıdır. Ailesel meme kanseri olguları da tüm meme kanseri olgularının %15'ini oluşturur (Hopper ve Carlin, 1992).

### 2.3 Meme Kanseri Genetik Epidemiyolojisi

Meme kanseri için, özellikle birinci derece akrabasında meme kanseri olan kadınlarda aile öyküsünün önemli risk faktörlerinden biri olduğu kabul edilmiştir. Yapılan çalışmalarla kansere yatkınlıyı sağlayan allel ana türleri olarak 3 temel grup bulunmaktadır. Bunlar yüksek penetrans gösteren, orta penetrans ve düşük penetrans gösteren allellerdir. (Turnbull ve Rahman, 2000; Ghousaini ve Pharoah, 2009).

### 2.3.1 Yüksek penetrans gösteren genler

BRCA1 ve BRCA2 (tümör baskılayıcı genler) genlerinin kalıtsal meme kanserlerinden sorumlu olduğu bilinmektedir (Wooster, vd., 1994; Skolnick, vd., 1994). BRCA1 ve BRCA2, DNA'da oluşan hasarların homolog rekombinasyon ile onarılmasında, onarılamayan DNA'ların ise yıkılmasında ve genom stabilitesinin korunmasında görevlidirler. Diğer bir yüksek penetrans gösteren gen TP53'dür. Bu genlerden herhangi birinde oluşan mutasyon meme kanseri riskini yaklaşık 10 kat artırmaktadır (Lane, 1992).

Tipik olarak BRCA1 mutasyonu olanlarda hızla büyüyen, yüksek dereceli ve östrojen reseptörü negatif meme tümörleri gelişir. Bu tümörlerde sporadik meme kanserlerine oranla daha sık TP53 mutasyonu görülmektedir. Faulkes (2004), makalesinde BRCA1'in meme kök hücrelerinin bir düzenleyicisi olduğunu ve bunun normal meme dokusundaki temel fonksiyonu olduğunu iddia etmektedir.

**TP53** geni 17. Kromozomun p13-1 bandına yerleşmiştir ve tümör baskılayıcı bir protein olan P53'ü kodlar, bu protein hücreleri kötü huylu transformasyondan koruyan çok önemli bir proteindir (Hanahan ve Weinberg, 2000). Meme kanserlerinin %20-30'unda P53 inaktivasyonu gözlenir. P53 mutasyonlarının varlığı tümörün in situ dan invaziv karsinoma geçişi için bir belirteç olarak kullanılabilir. *In situ* duktal karsinomlarda P53 mutasyonu gözlenmediği, fakat meme karsinogenezinin erken devrelerinde P53'ün mutasyona uğradığı bildirilmiştir (Cattoretti, vd., 1988).

Yüksek penetrans gösteren diğer genler STK11, PTEN ve CDH1 ailesel lobüler meme kanserinin görüldüğü mutasyonlardır. Bu mutasyonlarda meme kanseri riskleri STK11: %45 meme kanseri riski; PTEN: %30-55 meme kanseri riski; CDH1: 2398delC için %52 meme kanseri riski taşımaktadır (Ripperger, vd., 2009).

### 2.3.2 Orta derecede penetrans gösteren genler

Yapılan gen analizleriyle orta dereceli penetrans gösteren 4 gen tespit edilmiştir. CHECK2, ATM, BRIP1 ve PALB2. Bu gen mutasyonları ailesel meme kanseri vakalarının çok küçük bir oranını oluşturur, bunun nedeni mutasyonların sıklığının oldukça düşük olmasıdır (Rahman, vd., 2007; Mavaddat, vd., 2010).

### 2.3.3 Düşük penetrans gösteren genler

Ailesel meme kanserine artmış yakınlıktan sorumlu pek çok düşük penetrans gösteren genler mevcuttur. Ailesel meme kanserinde Genom ilişkilendirme çalışmaları (GWAS) ile saptanmış olan düşük penetrans gösteren birçok gen tanımlanmıştır. Meme kanseri için en önemlileri; 10q26, 16q12, 11p15, 8q24, 2q35'tir (Balmain ve Ponder, 2003).

## 2.4 Meme Kanserinin Moleküler Epide miyolojisi

Meme kanseri, patolojik özellikleri, morfoloji, evre ve hormon reseptör özellikleriyle biyolojik ve klinik olarak çok farklı özellikler gösteren heretojen bir grup hastalıktır. Perou ve ark'ları (2000), meme tümörleri üzerinde yaptıkları analizler sonucunda 4 alt grup olarak tanımlamıştır. Sonrasında geliştirilen çalışmalarla Luminal A, Luminal B, HER-2 pozitif, Üçlü negatif (Triple negatif) ve Bazal benzeri (Basal-like) olmak üzere 5 alt grupta tanımlanmıştır. 2007 yılında altıncı grup olarak Klauidin düşük (Claudin low) grubu tanımlanmıştır. Lonning (2010), farklı gen ekspresyon yapılarının hastalığın tedavisinde belirleyici rol oynadığını bildirmiştir.

### 2.4.1 BRCA1 ve BRCA2 ile ilişkili meme kanserinin patolojik özellikleri

BRCA1 ve BRCA2 tümörler birbirlerinden ve diğer sporadik tümörlerden farklılık gösterir. BRCA1'ler sıklıkla kötü differansiye duktal karsinom, aşırı mitoz, yüksek dereceli pileomorfizm gösterirken, daha az tübül yapısına sahiptirler (Lakhani, vd., 2002). BRCA1 mutasyonu gösteren tümörlerin %90'ı östrojen reseptörü (-)'tir.

#### 2.4.1.1 Meme kanserinin moleküler sınıflaması

**Bazal-benzeri:** ER negatif, HER-2 negatif, miyoepitel belirteç ekspresyonu düşük, EGFR, P-Kaderin, c-kit, bazal sitokeratin (CK5-6, CK14, CK17) ekspresyonu yüksek, kötü prognoz, genç yaş, BRCA1 gen mutasyonu ile ilişkili tümörlerdir. İncelenen bazal benzeri tümörlerin morfolojik olarak genelde grade 3, Duktal/NOS veya metaplastik, coğrafik nekrozu sık, itici invazyon sınırı, stromal lenfositik cevabı yüksek olduğu gözlenmiştir.

Niyelsen ve ark. bazal benzeri tümör grubunda yaptığı çalışmada bazal benzeri tümörleri ER negatif, HER-2 negatif, bazal-CK pozitif, EGFR pozitif, c-kit pozitif, bulmuşlardır (Nielsen, vd., 2004). Bu panelin bazal benzeri meme kansinonların identifikasyonu için çok uygun olduğunu, EGFR ve c-kit pozitifliğinin yeni tedavi hedefi olabileceğini vurguladılar (Nielsen, vd., 2004; Pinilla, vd., 2006).

**Üçlü negatif (Triple negatif) meme kanseri:** Hızlı büyüme gösteren tümörlerdir. Tanı anında ileri evrededir. Metastaz yapma riski yüksektir. Metastaz sonrası ölüme kadar geçen süre diğer alt alt tiplere oranla daha azdır. ER negatif, PgR negatif, HER-2 negatif genellikle ER negatif= ER<sub>α</sub> negatif; ER<sub>β</sub> pozitif olabilir. Bu grup tümörlerde tedavi çok önemlidir. Üçlü negatifler kemoterapiye yanıt verir ancak, bu tümörlerin ilerleme hızları ve yeniden nüks etme oranları yüksektir. Bu sebeple özellikle bu özel grup tümörler için hedefe yönelik, düşük toksisiteli tedavilerin geliştirilmesi gerekmektedir.

**HER-2 pozitif:** HER-2 onkogen ekspresyonu yüksek olup ER negatif tümörlerdir. Normal meme benzeri gen ekspresyonu olarak Bazal epitel hücre ve adipoz doku hücre genleri yüksek derecede eksprese edilirken luminal epitel gen ekspresyonu zayıftır (Hopper ve Carlin, 1992; Cotterchio, vd.,2003; Huo, vd., 2009; Millikan, vd., 2008; Perou, 2011).

**Luminal A ve B:** ER pozitif bir alt tipidir ve ER'ne cevap veren genler ekspresse olmuştur. Ayrıca PR, GATA3, BCL2, ekspresyonu da yüksektir. HER-2 overekspresyonu zayıftır. Luminal A'da ER ile ilişkili genler daha fazla ekprese edilirken, Luminal B'de proliferatif genlerin ekspresyonu daha fazladır. Özellikle HER-2 overekspresyonu yüksektir. CK8/12 Luminal A'da yüksek orandadır, Luminal B'de değişkendir.

**Klaudin<sup>düşük</sup> Tümörler:** ER negatif, PR negatif, HER-2 negatif, meme kanseri kök hücre özellikleri vardır. Son dönemde tanımlanan bir alt tiptir. Klaudinler epitelyal hücrelerin epitelyal sıkı bağlantı alanlarında yer alırlar. Bu tümörlerde Klaudin 3, 4, 7 gen ekspresyonları oldukça düşük düzeydedir. Klaudin<sup>düşük</sup> tümörler aynı zamanda hücreler arası bağlantı proteinleri olan E-Kaderin gibi bağlantı proteinlerini kaybederler. Bu grup aynı zamanda üçlü negatif özellik gösterir (Pinilla, vd., 2006). Yüksek gradlı

duktal, medüller ve daha fazla metaplastik tümörlerdir. Meme kanseri kök hücresi özelliğindedir. Epitelyal-Mezenkimal Geçiş belirteçleri içerirler. Metastaz olurken mezenkimal belirteçleri kazanıp Bazal membranı geçer. Metastatik meme kanseri özelliği taşırlar ve tedaviye dirençlidir (Perou, 2010; Prat, vd., 2010).

## **2.5 Meme Kanseri Gelişim Mekanizmaları**

### **2.5.1 Memenin anatomisi, gelişimi ve meme kök hücresi**

#### **2.5.1.1 Meme gelişimi**

En büyük salgı bezi olan memenin gelişimi erken embriyonik dönemde başlar ve neredeyse ömür boyunca yapısal değişim geçirir (Seltzer, 1994). Memeler her iki cinstede embriyonel hayatın ikinci ayında, gövdenin yan tarafında oluşmaya başlayan bir çift bez dokusudur. Erkeklerde tüm hayat boyunca gelişmeyerek rudimente kalırken dişilerde ise gelişim ve değişim ömür boyu sürer. Gebeliğin son üç ayında plasentaya ait seks hormonları fetal dolaşıma girerek bu epitelyal dokuların kanalize olmasını sağlar. Bunlar memenin ana duktal sistemini oluşturur. Zamanla sekonder dallanmaların gelişmesiyle duktuslar ve alveoller ortaya çıkar. Pubertedeki hormonal değişikliklerle beraber memenin gelişimi tekrar hız kazanır (Arıncı, vd., 2001). Memenin duktal sisteminin dallanmasında ve seviyesinde belirgin bir artış olurken, puberteye kadar belli belirsiz ayırt edilebilen meme ucu ve aerolada daha da belirginleşir. Ancak gebelik durumunda salgılanan hormonların etkisi ile süt salgılayacak duruma gelirler. Laktasyon dönemi hariç memenin önemli bir bölümü yağ dokusu oluşturmaktadır (Kopans, 1998).

Erişkin insan memesi, her biri yağ dokusu ile çevrelenmiş çok sayıda lobülden oluşan 15-20 lobdan oluşur. Ek olarak, meme dokusunun iç lenf nodları ve aksiler bölgesel lenf nodlarına doğru lenfatik damar sistemi vardır. İnsan memesi, erken gelişmede, pubertede, menstrual sikluslar içinde, gebelik laktasyonda, menopozdaki küçülme sırasında doku homeostazının gerçekleştiği dinamik bir bezdir (Morrison, vd., 2008). Bu süreçlerden bazılarının, kök hücrelerin aktivasyonu ile olduğuna inanılır. Diğer bazı organlardan farklı olarak, insan memesi yetişkinliğe doğru sürekli bir morfolojik ve fonksiyonel değişim geçirir, pubertedeki ikinci hamle, gebelik ve laktasyon döneminde doruğa ulaşır. Pubertede östrojen hormonunun uyarımıyla meme

kanallarında uzama olur, terminal uç tomurcuklarda kök hücre aktivasyonu bulunmuştur (Howard, vd., 2000). Bu süreçlerin ardından menopoza sırasında hormonal inaktivasyonla beraber memenin bez dokusu küçülürken (Kuhns, vd., 1995), memelerde yağ dokusu oranı artar. Post menopozal dönemde yağ dokusu ve fibroblastik dokuların da azalmaya başlamasıyla pandüle memeler meydana gelir.

### **2.5.1.2 Meme kök hücresi**

Yaşam boyunca hormonlara bağlı değişikliğe uğrayan ve dinamik bir bez olan memelerde gelişim süreci meme kök hücreleri (MKH) tarafından sağlanmaktadır. Meme kök hücreleri doku yenilenmesi ve onarımından sorumludurlar (Petersen ve Polyak, 2010).

Hormonlar gibi bazı çevresel sinyallere yanıt olarak aktive olurlar ve memedeki ihtiyaca göre değişimi kök hücrelerin simetrik veya asimetrik bölünerek çoğalması ile sağlar. Östrojen MHK'ları parakrin FGF/FGFR/Tbx3 sinyal yolu ile çoğaltmaktadır. Bu sinyal yolağını inhibe eden tamoxifen mammosfer oluşumunu engellediği için anti östrojen olarak kullanılmaktadır (Fillmore, vd., 2010). Öte yandan, gebelikte beraber hormonal sinyaller meme kök hücrelerini etkileyerek asimetrik bölünmeye yol açar. MHK'lar tarafından süt üreten hücrelerin çoğalmasını sağlayacak şekilde değişim başlatılır ve memeleri laktasyona hazırlar. Bebek doğduktan sonra ilk emme işlemi sırasında meme başı ve çevresine yaptığı basının tetiklediği sinyal sistemi ile hipofizer yolla laktasyon başlatılır (Capuco ve Akers, 2009).

**Meme kök hücre düzenleyicileri:** Farelerde yapılan analizlerle, çok sayıdaki transkripsiyonel düzenleyicinin meme gelişiminin farklı yönlerini kontrol ettiği gösterilmiştir. Çeşitli sinyal yolları (Wnt, Notch ve Hedgehog sinyal yolları) çok sayıda farklı erişkin kök hücre tipleri arasında korunmuş olanlardır, fakat kontrol mekanizmalarının bozulması onkogeneze ile bağlantılıdır (Visvader, 2009). Bu yollar içinde uygun olmayan Wnt sinyallerinin, meme bezinde kendi kendini yenileme düzeninin bozulmasıyla son bulduğuyla alakalı bulgular vardır.

Wnt-1 sinyal yolağının meme epiteli üzerindeki onkojenik etkileri meme öncül hücrelerinde başlatılır ve Wnt-1/ $\beta$ -katenin ayrıca fare meme öncül hücrelerinin radyasyon direncinde aracılı olur (Reya ve Clevers, 2005; Teuliere, vd., 2005). Wnt

sinyal yolu her ne kadar MKH'nin kendi kendini yenileme normal programını hemen hemen bütünüyle düzenliyor olsa da, bu yolun meme epitelindeki fizyolojik rolü henüz belirlenmemiştir (Visvader, 2009).

Notch yolağının insanlarda MKH'ni luminal hücre soyuna doğru teşvik etmesi önemlidir (Woodward, vd., 2007). İnsan meme dokusunda, Notch-3'ün luminal hücre akıbetini belirleyen temel düzenleyici olduğu gösterilmiştir. Gebelik sırasında standart Notch sinyalizasyonu alveoller içindeki soy dengesinin kontrolünde önemli rol oynar (Visvader, vd., 2009; Bouras, vd., 2008).

Hedgehog (Hg) yolağı, belirli dokuların kök hücrelerin kendi kendilerini yenilemelerinin düzenlenmesinde yer almıştır (Bouras vd., 2008). Ancak, meme bezinde, Hg sinyallerinin karşı rolü olduğu ve MKH aktivitesinde azalmaya yol açtığı düşünülmektedir (Molofsky, vd., 2004).

Gata-3 ve Elf-5 genleri, luminal hücre farklılaşmasındaki temel düzenleyiciler olarak ortaya çıkmaktadırlar (Moraes, vd., 2007). Özellikle Gata-3'ün utero meme başı ve meme bezinin oluşumu için ve de ergenlik ve hamilelik sırasında duktal elongasyon ve fonksiyonel olgunlaşma için de gerekli olduğu saptanmıştır (Asselin-Labat, vd., 2007).

Tümör baskılayıcı BRCA1 geni, meme kök hücre düzenleyici olarak rol alır (Lindeman, vd., 2010). Meme epitelinde BRCA1'in şartlı delesyonu alveoler gelişmenin bozulmasına yol açarken (Foulkes, 2004), primer insan meme epitel hücrelerinde BRCA1'in kaybı, ALDH1 hücrelerinde artışa ve immatür luminal hücrelerin matür ERα hücrelerine farklılaşmasında başarısızlığa yol açar (Xu, vd., 1999). Çoklu BRCA1 mutasyonu taşıyanların meme dokusunda, anormal çoğalma özelliğiyle, genişlemiş luminal öncül popülasyon bulunması dikkat çekicidir (Liu, vd., 2008).

**Meme kök hücre yuvası;** Hormonal uyarılara bağlı meme bezinde oluşan gelişim ve değişimlerde rol alan MKH'lerinin işlevinde meme bezi kök hücre nişinin esas rolü açıktır (Briskin ve Duss, 2007). MKH'nin devamı ve fonksiyonu, çeşitli epitel hücreleri ve meme stroması arasındaki etkileşimlere bağlıdır. MKH'nin mikroçevresi MKH nişini oluşturur. Farklı epitel alt tipleri, tek bir kök hücrenin

transplantasyonundan sonra bile, meme stromasında MKH'nin asimetric bölünmesiyle meydana gelir (Visvader, 2009). Son veriler, meme bezi stromasının öğretici olduğunu, meme epitelyal hücresinin kaderini belirleyen soyu üretmek üzere, kök hücre testiküler hücreler ve nöral kök hücreler gibi başka organlardan yeniden programlanabileceğini göstermiştir (Booth, vd., 2008). MHK nişinin yapısı her ne kadar henüz tanımlanmadıysa da, kanser kök hücre (KKH) fonksiyonunun desteklenmesinde bütünleyici rol oynayarak makro fajlar bir bileşen olabilir (Gyorki, vd., 2009).

### **2.5.1.3 Kanser kök hücresi hipotezi**

Son yıllarda, giderek artan deneysel kanıtlar, birçok tümör tipinin heterojen hücre popülasyonlarının bir hiyerarşi içinde düzenlenmiş olduğu yönündedir, tümör oluşumunu ve gelişimini destekleme yeteneğine sahip sadece az sayıda kanser kök hücresinin tümör kitlesini oluşturan farklılaşmış hücelere dönüşme yeteneği vardır (Rappa ve Lorico, 2010).

Kök hücreler ve kanser hücrelerinin bir dizi ortak özelliği vardır. Her iki hücrenin de kendini yenileme ve aşırı çoğalma yeteneği vardır. Tümör hücrelerinde bu durum çoğalma sinyalizasyonunda öz-yeterlilik ve kontrolsüz hücre çoğalması şeklindeyken, kök hücreler için ise embriyogenez, organogenez ve erişkin dokusunun korunmasında ve onarılmasında gerçekleşen, sıkıca kontrol edilen bir durumdur. Her iki hücre tipi de, aktif anti-apoptotik yollar ve telomeraz aktivitesi olmasından dolayı uzun ömürlüdür (Hiyama ve Hiyama, 2007).

Bu özellik kök hücrelerini, hasar verici mutasyonların birikimine ve aktif DNA onarım sistemine karşı genomik instabiliteye eğilimli hale getirir. Sıklıkla kemoterapötik ajanlara ve radyasyona karşı durabilen hücrelerin bu tür yavaş döngüsü olan kök hücreler olabileceği düşünülmüştür. Kök hücreler ve kanser hücrelerin her ikisi de ayrıca hareketli hücrelerdir, kök hücreler için mikroçevreden gelen sinyallerle migrasyon oluşumu ve belirli bir hedefe yerleşme söz konusu olurken, kanser kök hücreleri için metastatik hastalık yapma yeteneklerini sağlayan bir özelliktir (Brabletz, vd., 2005).

#### **2.5.1.4 Meme kanseri kök hücresi (MKKH)**

Meme bezinin kadının yaşamı boyunca daima değişim geçirmesi, bu gelişimleri yetişkin meme kök hücreleri sayesinde yapması meme bezinin karsinogeneze özellikle eğilimli olduğunu ve erişkin meme kök hücrelerinin meme kanserinde çok önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Charafé-Jauffret, 2008).

Meme kanseri, KKH'nin tanımlandığı ve izole edildiği ilk malignitedir. KKH ile ilgili doğrudan bulgular yakın zamanda yapılan fare meme tümör oluşumu modellerinden meydana çıkmıştır (Lindeman ve Visvader, 2010).

Kök hücrelerin meme kanserinde rol oynadığına dair düşünceler ise, radyasyona bağlı gelişen meme kanseri insidansı ile ilgili epidemiyolojik verilerden gelir. Radyasyonun meme kök hücrelerini etkilemesiyle gelişen malign transformasyonu düşündüren çalışmalar vardır. Meme dokusunda uzun ömürlü hücrelerin sürekliliği, genç kızlarda iyonize radyasyona maruz kalmaları sonucunda belirsiz kalan meme kanser riskindeki artış ile uyumludur (Land ve McGregor, 1979). Tüberküloz nedeniyle çok sayıda floroskopi alan olgularda, Hodgkin hastalığı nedeniyle çocukluk çağında radyoterapi alan hastalarda meme kanseri riski daha yüksektir (Kleinerman, R. A., 2006; Alm El-Din, vd., 2009). Hiroshima ve Nagasaki atom bombalamaları sırasında radyasyona geç ergenlik döneminde maruz kalan kadınların, diğer yaş gruplarında maruz kalan kadınlarla kıyaslandığında meme kanseri gelişimi 20-30 yıl sonradır (Little, vd., 1999).

İnsana ait kanser dokusunda yapılan birçok deneysel çalışmada tüm hücrelerin eşit potansiyelde olmadığı, azınlıkta olan bir hücre grubunun farklı fenotipte olduğu ortaya konulmuştur. Bu azınlık hücre topluluğu hem meme hem de beyin solid tümörlerinde, toplam tümör kitlesinin %1-2'si oranında olarak tespit edilmiştir (All-Hajj, vd., 2003; Hemmati, vd., 2003). Meme kanserinde, kök hücreleri gibi davranan tümör hücreleri olduğunun keşfedilmesi, kanseri ortadan kaldırmanın neden bu kadar zor olduğuna dair olası bir açıklama ortaya koyar ve ayrıca yeni tedavilerin nasıl hedeflenebileceğini de göstermiş olur (Charafé-Jauffret, vd., 2008). Bu azınlıkta olan hücrelerin metastaz yapma yeteneğinde olması ve meme kanserindeki mortalitenin

çoğundan sorumlu olması nedeniyle bu hücrelerin hedef alınarak tedavilerin düzenlenmesi meme kanseri tedavisinde yeni ufuklar açmıştır (Cristofanilli, vd., 2005).

**Sirkülasyonda MKKH;** MKKH'leri bir normal MKH gibi ya bir niş içinde barınmakta ya da kan dolaşımına karışarak sirkülasyonla başka organlara gidebilmektedir. Sirküle tümör hücreleri (STH)'ni meme kanserli hastalarda kan dolaşımında tespit etmek mümkündür. Kötü prognoz işareti olan dolaşımdaki tümör hücreleri, sıklıkla hem primer hem de metastatik hastalığı olan hastalarda saptanabilir (Cristofanilli, vd., 2005). Bu hücrelerin çoğu erken evrede çoğu nonprolifere ve klasik tedavilere dirençli olup bir kısmı meme kök hücre özelliği olan CD44+ CD24-/low fenotipi gösterirler. STH tayini sistemik antikanser tedavisinin moniterize edilmesinde oldukça yararlıdır. Biyobelirteç ekspresyonunun değişimin erken tayini metastatik hastalığın çok erken yakalanmasını sağlar (Pantel ve Alix-Panabieres, 2010). Agresif STH'leri kendilerine uygun yerleşim alanı bulduklarında yeniden ekilir ve tümör progresyonunu artırır (Kim, vd., 2009).

**MKKH ve Metastaz;** Meme kanserinin metastatik yayılım potansiyeli direk, lenfatik ve hematojen yolla olmaktadır. Dolaşımdaki kanser hücreleri ise hematojen yolla metastaza neden olmaktadır. Meme kanseri en sık lenfatik yolla bölgesel lenf nodüllerine metastaz yapmakta, daha sonra hematojen olarak pek çok organa metastaz olasılığı olmakla birlikte sırasıyla kemik, akciğer, karaciğer ve beyine gitme eğilimi göstermektedir (Müller, vd., 2001).

Meme kanserinin metastazını açıklayan birçok model içinde ilgi çekici model tümörün kanser kök hücreleri ile açıklanan modeldir. Bir tümör içindeki tüm meme kanseri hücreleri aynı metastatik potansiyele sahip değildir ve sadece küçük bir alt hücre grubu vücudun belli bölgelerine yerleşir (Kang, vd., 2003).

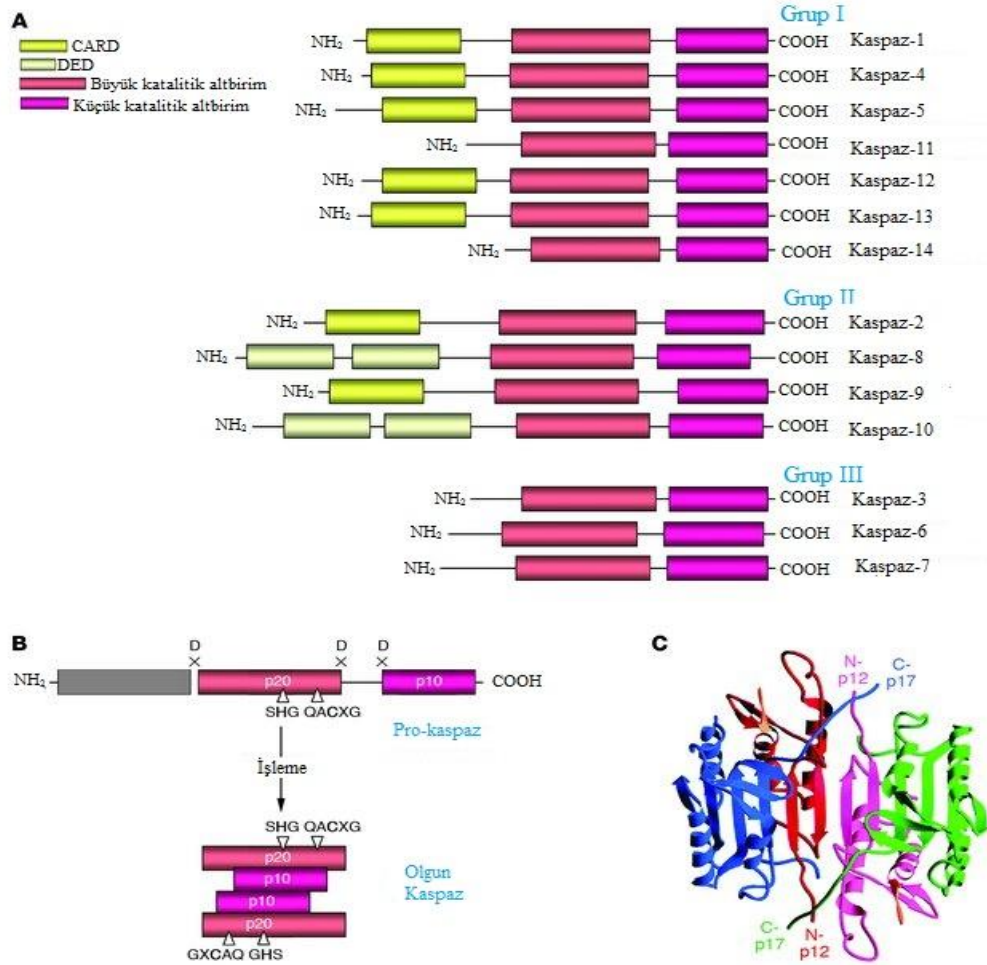
Meme kanserinde en sık kemiğe metastaz olur. Bunu akciğer, karaciğer ve beyin metastazları takip eder (Mastro, vd., 2007). CD44 için başlıca ligandlar hyaluron ve osteopontin (OPN)'dir, her ikisi de meme metastazının hedef dokularında (kemik, akciğer, karaciğer ve beyin dokusu) eksprese olurlar (Brown, vd., 1992). OPN, luminal epitelial yüzeyler lokalize olabildiği ve hücre adezyonu, sitokin/büyüme faktörü üretimi ve bağışık yanıtında bir rol oynayabildiği geniş yelpazedeki insan dokularında eksprese

edilir (Wai ve Kuo, 2004). OPN, vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) ekspresyonunu tetikler, böylece tümörün ilerlemesine, vasküler endotelial hücrelerin büyümesine ve anjiyogeneze yol açar (Chakraborty, vd., 2008). CD44 ve OPN arasındaki etkileşim ikincil tümörler oluşturmak üzere, tümörjenik hücrelerin belirli organlara doğru hareketini ve buralarda tutulmasını sağlar.

## 2.6 Apoptotik Hücre Ölüm Mekanizmaları

Morfolojik olarak apoptoz; plazma membranının tomurcuklanması, fosfolipidlerin kalıntılarının membranın dış yüzeyine yönelmesi, hücre büzülmesi, kromatin kondenzasyonu ve hücre içeriğinin çoklu membran kaplı parçacıklar halinde dağılarak komşu hücreler ve fagositler tarafından yok edilmesini kapsayan bir süreçtir (Wyllie, vd., 1980). Morfolojik değişimler hücresel bütünlük ve canlılık için gerekli olan polipeptitlerin proteolitik yıkımı ile gerçekleşmektedir. Yıkım süreci spesifik sistein proteazlar olan kaspazların aktivitesi sayesinde meydana gelmektedir (Earnshaw, vd., 2007). Apoptotik hücre ölüm mekanizmasının hücre içi mekanizmasında hücre içi bileşenlerin membran ile çevrilmiş apoptotik parçacıklar halinde çevre dokuya dağılması oldukça önemlidir. Bu nedenle nekrotik hücre ölüm mekanizması ile hücre içi bileşenlerin çevre dokuya dağılması sonucunda meydana gelen enflamasyon, apoptotik hücre ölüm mekanizması ile oluşmamaktadır. Pek çok farklı molekül tarafından hassas bir şekilde kontrol edilen apoptoz, kaspazların bir kaskad oluşturacak şekilde uyarılmasını sağlayan iki yolak tarafından tetiklenmektedir: hücre membranında bulunan ölüm reseptörlerinin uyarılması ile karakterize ekstrinik yolak ve mitokondri-apoptozom sisteminin uyarılması ile karakterize intrinsik yolak. Her iki yolağın ayrıntılarına değinmeden önce apoptoz mekanizmasında kilit rolü oynayan kaspazlara değinmek gerekmektedir. Kaspaz enzimlerinin aktivitesi apoptozun tetiklenmesinden DNA fragmentasyonuna, plazma membranının tomurcuklanmasından, fosfolipid asimetrisinin bozulmasına kadar tüm apoptoz sürecinde yer almaktadır. Proteolitik olaylarda kalpainler, katepsinler ve proteozom gibi pek çok proteazın etkisi bilinse de, asıl rol oynayanlar proteinleri aspartat kalıntılarından sonra kesen hücre içi sistein proteazlar yani kaspaz ailesi enzimlerdir. İnsanlarda bilinen 14 kaspazdan 7'sinin (kaspaz-2, 3, 6, 7, 8, 9 ve 10), apoptotik süreçte yer aldığı saptanmıştır (Şekil 2.2.). Kaspazlar, öncül formlarda inaktif zimojenler olarak sentezlenmekte ve apoptoz

sırasında aktifleşmektedirler. Kaspaz enzimleri, apoptoz sürecindeki rolleri göz önünde bulundurularak iki ana grupta incelenebilir. Başlatıcı kaspazlar, çeşitli hücre içi ya da hücre dışı sinyalleri proteolitik aktiviteye çevirerek kaspaz kaskadının başlatılmasından sorumlu olan kaspazlardır. Hücre dışı sinyaller ile aktifleşen başlatıcı kaspazlar ekstrintik yolağı, hücre içi sinyaller aracılığıyla etkinleşen kaspazlar ise intrinsik yolağı başlatarak kaspaz kaskadını tetiklerler. Sonlandırıcı kaspazlar ise hücre içerisindeki spesifik polipeptit hedeflerini proteolitik olarak keserek apoptoz mekanizmasının tamamlanmasını sağlayan enzimlerdir. Başlatıcı kaspazlar, sonlandırıcı kaspazları aktif hale getirdiklerinde apoptotik süreç ve kaspaz kaskadı başlamış olmaktadır. Sonlandırıcı kaspazların hedef proteinleri proteolitik olarak kesmesi ile apoptoz sürecine özgün hücre içi olaylar gerçekleşmektedir. Sonlandırıcı kaspazların arasında fonksiyonu en iyi tanımlanmış olan kaspaz-3 proteininin etkinleştikten sonra yüzlerce substratı seçici olarak kestığı bilinmektedir. Bu proteolitik yıkım apoptoz sürecinde gerçekleşen pek çok morfolojik değişimin temelini oluşturmaktadır. Örneğin, kaspaz-3 aktin-kesici enzim olan gelsolin'i keserek etkinleştirmektedir. Bu enzimin aktivasyonu apoptozun en karakteristik morfolojik değişimlerinden olan plazma membranında tomurcuklanmaya neden olmaktadır. Kaspaz-3 aynı zamanda lamin B, nükleer/mitotik aparat proteini (NuMA) ve sitokeratinler gibi hücre içi sito-iskelet elemanlarının kesiminden de sorumludur (Youle, 2007; Fischer, vd., 2003). Kaspaz aracılı protein yıkımı apoptotik hücrelerde gözlemlenen bazı biyokimyasal olayların da temelini oluşturmaktadır. Kaspaz-3, endonükleaz inhibitör proteininin (inhibitor of caspase-activated endonuclease, ICAD) inhibitör alt ünitesini keserek CAD (caspase-activated endonuclease) enziminin serbestleşmesine ve DNA'nın fragmentasyonuna neden olmaktadır (Enari, vd., 1998). Bunun yanı sıra, kaspaz-3 pek çok protein kinaz enzimini hedeflemekte ve bu enzimlerin inhibitör bölgelerini keserek aktivasyonlarına neden olmaktadır. Bu protein grubundan olan protein kinaz C $\delta$  enziminin aktivasyonu ile de fosfatidilserin fosfolipidinin normal koşullarda bulunduğu plazma membranının iç kısmından dış kısmına dönüşünü katalizleyen "phospholipid scramblase" enzimi aktif hale getirmektedir. Hücre membranının fosfolipid asimetrisindeki bu kayıp apoptozun karakteristik göstergelerinden biridir ve makrofajların yüzeylerinde bulunan fosfatidilserin reseptörleri tarafından apoptotik hücrelerin tanımlanması ile apoptotik hücrenin makrofajlar tarafından fagositozu gerçekleşmektedir (Frasch, vd., 2000).



**Şekil 2.2.** Kaspazların yapısı ((A) Kaspaz ailesi. Kaspazlar üç büyük gruba ayrılırlar. Grup I: İnflamatuvar kaspazlar; Grup II: Başlatıcı kaspazlar; Grup III: Efektör kaspazlar. CARD, DED ve büyük (p20) ve küçük (p10) altbirimler gösterilmiştir. (B) Pro-kaspaz aktivasyon şeması. (C) Kaspaz-3 heterotetramerinin 3D yapısı. (Lavrik, vd., 2005)).

### 2.6.1 İnterinsik (mitokondriyal) yolak

İnterinsik yolak (mitokondriyal yolak); çeşitli sinyaller tarafından mitokondri dış membranının geçirgenliğinde değişim olması sonucunda kaspaz-9'un aktifleşmesi ile sonuçlanan apoptotik aktivasyon süreci olarak tanımlanmaktadır. Bu süreçteki en kritik basamak, spesifik polipeptidlerin mitokondrideki membranlar arası alandan sitoplazmaya salınmalarıdır (Green ve Kroemer, 2004). Membranlar arası bölgeden salınan proteinler arasında en çok, elektron transport sisteminin bir bileşeni olan ve normal koşullarda mitokondri iç membranına zayıf bağlanmış konumda bulunan, sitokrom c araştırılmıştır. Apoptotik süreçte mitokondriden sitokrom c salınması hızlı, kantitatif bir süreçtir ve kaspaz-9 aktivasyonu üzerinden apoptozun tetiklenmesini

sağlamaktadır (Goldstein, vd., 2000). Sitokrom c sitoplazmaya geçtikten sonra öncelikle adaptör Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) proteinine bağlanır. Bu bağlanma sonucu protein kompleksinde ATP bağımlı bir konformasyonel değişim meydana gelir ve prokaspaz-9 yapıya katılır. Sonuçta oluşan 700 kDa büyüklüğündeki kompleks, "apoptozom" olarak adlandırılır (Zamzami ve Kroemer, 2001). Bu kompleksin etkisiyle aktifleşen kaspaz-9, kaspaz-3'ü aktifleştirerek intrinsik yolak üzerinden apoptozun tetiklenmesine neden olmaktadır (Şekil 2.3.).

Bu süreci başlatan sitokrom C'nin mitokondriden sitoplazmaya geçişinin biyokimyasal temelleri halen tartışma konusudur (Godvadze ve Orrenius, 2009). Bazı modeller sitokrom c salınmasının voltaj-bağımlı anyon kanalları (VDAC), adenin nükleozid translokatorü (ANT) ve mitokondri matriks proteini siklofilin D ile oluşan mitokondriyal membran kanallarının (permeability transition pore, PTP) aracılığı ile gerçekleştiğini savunmaktadır (Zamzami ve Kroemer, 2001).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar ise daha çok Bcl-2 ailesi proteinlerinin sitokrom c salınmasındaki fonksiyonları üzerinde odaklanmaktadır. Elde edilen veriler bu proteinlerin sitokrom c salınmasındaki en temel kontrol mekanizması olduğunu göstermektedir. Proapoptotik Bax/Bak ekspresyonunun artışı ile Bax/ Bcl-2 oranı bozulan membranda porların genişlemesi ve mitokondri membranlar arası bölgedeki moleküllerin sitoplazmaya çıkışı mümkün olmaktadır.

#### **2.6.1.1 Bcl-2 Ailesi**

Bcl-2 ailesi proteinleri mitokondriden sitokrom c salınmasını kontrol eden bir protein ailesi olarak tanımlanmaktadır. Bu ailenin ilk keşfedilen üyesi olan Bcl-2'nin hücre ölümünü engelleyici bir rolü olduğu gösterilmiştir (Zamzami ve Kroemer, 2001). Bugüne kadar yapılan çalışmalar sonucunda benzer homoloji gösteren 20 gen tanımlanmıştır. Bcl-2 ailesine ait proteinler, fonksiyonel ve yapısal kriterler göz önünde bulundurulduğunda, üç farklı grup halinde incelenebilir. Anti-apoptotik özellik gösteren grup I (Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl-1, Boo/Diva, Nrf3 ve Bcl-B), pro-apoptotik özellik gösteren grup II (Bax, Bak, Bok/Mtd) ve grup III (Bid, Bak, Bik, Bim, Blk, Bmf, Hrk, Bnip3, Nix, Noxa, PUMA ve Bcl-G). Anti-apoptotik grup I üyeleri genellikle oldukça korunmuş dört BH bölgesini (Bcl-2 homolojisi) ve mitokondri dış

membranı, endoplazmik retikulum membranı gibi çeşitli hücre içi membran yüzeylerine bağlanabilmelerine olanak sağlayan C terminal transmembran bölgesini içermektedirler.

Pro-apoptotik grup II üyeleri ise N terminal bölgesinde anti-apoptotik karakterli olan BH4 bölgesi dışında tüm diğer BH bölgelerini ve transmembran bölgesini içermektedirler ve pro-apoptotik karakterlidirler. Son olarak grup III üyeleri diğer gruplara göre oldukça heterojendir ve tek ortak homojileri 15 amino asitlik BH3 bölgesidir membrana bağlanma bölgesi içermedikleri için sitoplazmada serbest olarak yer alırlar (Cory, vd., 2003; Kaufmann, 2007). Bcl-2 proteinlerinin mitokondri membran permeabilizasyonunu nasıl sağladığı konusunda çeşitli modeller öne sürülmektedir. Kabul gören "direkt aktivasyon" modeline göre sitoplazmada bulunan grup III Bcl-2 proteinleri (Bim, Bid) mitokondri mebranında bulunan Bax/Bak ile oligomerize olarak bir kanal oluşumuna yol açmakta ve mitokondri membranlar arası bölgeden sitokrom c'nin salınmasına yol açmaktadır (Letai, 2002). Bad, Bik ve Noxa gibi grup III proteinleri ise anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerini inhibe ederek Bax ve Bak'ın anti-apoptotik proteinlerden ayrılmasını sağlamaktadır (Wang, vd., 2008).

#### **2.6.1.2 İnterinsik yolakta rol alan diğer moleküller**

Bcl-2 ailesine ait proteinler apoptozun erken sürecini regüle ederken; geç süreç apoptoz, apoptoz inhibitörleri (inhibitor of apoptosis-IAP) adı verilen bir protein ailesi tarafından regüle edilmektedir. Bu aileye ait olan XIAP, hücrel IAP 1/2, ve ML-IAP, proteinlerinin apoptoz regülasyonu ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur (Salvesen ve Duckett, 2002). Özellikle XIAP proteininin kaspaz inhibisyon mekanizması üzerine çok çalışma yapılmış ve XIAP'nin prokaspaz-9 proteinine bağlanarak aktifleşmesi için gerekli olan dimerizasyonu engellediği öne sürülmektedir (Shiozaki, vd., 2003). Kaspaz-9 dışında XIAP: kaspaz-3 ve kaspaz-7 proteinlerinin aktif merkezlerine bağlanarak bu proteinlerin proteaz aktivitesi göstermelerini engellemektedir. Apoptoz sırasında mitokondriden sitokrom c dışında pek çok protein sitoplazmaya geçmektedir. Bunlardan endonükleaz G proteininin internükleozomal DNA degradasyonuna neden olduğu bildirilmiştir. Smac/DIABLO ve HtRA2/Omi proteinleri de apoptoz sırasında mitokondriden salınmaktadır ve bu proteinlerin XL-W proteinleri ile etkileşerek kaspaz inhibisyonunu engelledikleri ortaya konulmuştur (Scott, vd., 2005; Kaufmann, 2007).

### 2.6.2 Ekstrinsik yolak

Apoptozun ekstrinsik yolağı aynı zamanda ölüm reseptörleri (death receptor, volağı olarak da bilinmektedir ve hücre dışı bir sinyalin plazma membranına bağı reseptörler aracılığıyla apoptotik aktiviteye dönüşmesi olarak tanımlanmaktadır (Raff, 1998). Tümör nekrosiz faktör (TNF) ailesi, reseptör proteinlerin hücre dışı bölgelerine bağlanarak etki göstermektedir. TNF ailesinde 19 farklı ligand bulunmaktadır ve bu ligandlar TNF reseptör (TNFr) ailesine ait 29 farklı reseptöre bağlanmaktadır (Aggarwal, 2003). TNF ailesinin her bir üyesi TNFr ailesine ait bir ya da daha fazla reseptöre ve bazı reseptörler de bir ya da daha fazla liganda bağlanabilmektedir. TNFr ailesinin apoptozu tetikleyebilen alt sınıfına ait proteinler ölüm bölgesi (Death Domain-DD) adı verilen oldukça korunmuş 80 amino asitlik bir sekansı içermektedirler ve bu bölgeyi içeren reseptörlere ölüm reseptörleri adı verilmektedir. Apoptozun ekstrinsik yolağında önemli rol üstlenen ölüm reseptörleri. TNF-nin (TNF-a, TNFSF2), FasL'ın ve TNFr-apoptoz-tetikleyici ligandın (TNFr-apoptosis-inducing ligand-TRAIL) bağlandığı reseptörlerdir. Diğer dört TNFr üyeleri ise (NGFR, EDAR, DR3 ve DR6) DD içermelerine rağmen apoptoza neden olmamaktadırlar (Wang , vd., 1996; Wu, vd., 1997) Apoptoz tetikleyebilen TNFr üyeleri ekstrinsik yolak başlatıcı kaspazlarını (kaspaz-8, -10) bağlayarak kaspaz kaskadını tetiklerler. Ligandın ölüm reseptörüne bağlanmasından sonra reseptörün yapısında meydana gelen konformasyonel değişim, ölüm-tetikleyici sinyal kompleksi (death-inducing signaling complex-DISC) adı verilen protein kompleksinin oluşmasını Sağlar. TRAIL ligandının ölüm reseptörlerine bağlanması da benzer şekilde gerçekleşmektedir. Ligand bağı Fas reseptörüne ya da TRAIL bağı ölüm reseptörüne Fas-ilişkili DD (Fas-associated death domain-FADD) adı verilen adaptör protein komplemler DD üzerinden bağlanır (Chinnaiyan, vd., 1995). Death-inducing signaling complex (DISC) kompleksinin oluşumu tamamlandıktan sonra kaspaz-8, -10 oto-proteolitik aktivite ile aktifleşir ve kompleksten ayrılarak sitoplazmaya geçer (Donepudi, vd., 2003). Aktif hale gelen kaspaz-8 ve -10 sonlandırıcı kaspazları (kaspaz-3 ve -7) keserek aktifleştirir. Tip I adı verilen bazı hücrelerde bu sonlandırıcı kaspazların aktivasyonu apoptozun tetiklenebilmesi için yeterlidir. Tip II adı verilen diğer bazı hücrelerde ise kaspaz-8 ve -10 apoptozun intrinsik yolağını da aktifleştirerek apoptozu tetiklemektedir. Kaspaz-8 ve -10 ekstrinsik ve intrinsik yolakları Bcl-2 ailesinin grup III proteinlerinden Bid proteinini keserek



## 2.7 Epigenetik Düzenlenmeler ve Kanser

İlk olarak, 1950’lerde Conrad Waddington tarafından önerilen Epigenetik terimi günümüzde “DNA dizisinde değişikliğe sebep olmadan, mitoz ve/veya mayoz bölünme ile kalıtılabilen, gen fonksiyonundaki değişiklikler” olarak tanımlanabilmektedir (Orcan, 2006). Son yıllarda yapılan çalışmalar neticesinde, epigenetik olayların, özellikle yüksek organizasyonlu canlılarda oldukça önemli etkileri olduğu anlaşılmıştır. Epigenetik, özellikle canlıların gelişim sürecinde gözlemlenen, hücre farklılaşmaları sırasında ortaya çıkan gen ifadesindeki değişikliklerde önemli rol oynamaktadır. Gen ifadesinde görülen bu değişiklikler, DNA’nın seçici olarak, farklı epigenetik mekanizmalarla farklı kromatin yapılarına paketlenmesiyle ortaya çıkmaktadır.

DNA’da genetik bilgiler, organizmanın potansiyel fenotipini belirlemektedir. Epigenetik mekanizmalar ise çevresel etkiler ve henüz tanımlanmamış bazı faktörlerin de katkısıyla epigenotip adı verilen bir düzenlenmedir (Bora ve Yurter, 2007; Güneş ve Kılıç, 2013). Epigenetik mekanizmalar arasında en çok bilinenleri RNA-aracılı gen ifadesinin kontrolü, DNA metilasyonu ve histon modifikasyonlarıdır (Bora ve Yurter, 2007; Çelik, 2007; İzmirli, 2013). Bu mekanizmalar transkripsiyon aktivasyonu sağlayan ve baskılayan proteinlerin aktivitelerini; DNA ve kromatin yapıda meydana gelen modifikasyonları düzenlemektedir (Bora ve Yurter, 2007).

### 2.7.1 RNA-aracılı gen ifadesinin kontrolü

Memeli genomunun % 3’lük kısmı, protein kodlayan mesajcı RNA’ları (mRNA) sentezlemektedir. Bu bölgelerden non-coding RNA (ncRNA) adı verilen, protein kodlamayan RNA’lar sentezlenmektedir (Akkaya ve Dinçer, 2013; Güzelgöl ve Aksoy, 2009). Bu ncRNA’ların bazılarının epigenetik süreçlerde rol aldığı bildirilmektedir (Bora ve Yurter, 2007). ncRNA’ların bazıları nukleusta transkripsiyon aşamasını engelleyerek; bazı ncRNA’lar ise sitoplazmada mRNA’ları kesip parçalayarak veya translasyonu durdurarak gen ifadesini baskılayabildiği ifade edilmektedir (Güzelgöl ve Aksoy, 2009; Bodur ve Demirpençe, 2010). Ayrıca ncRNA’lar histon modifikasyonlarının ve DNA metilasyonunun başlaması için itici güç oluşturduğu, bu sayede heterokromatin bölgenin oluşumuna katkıda bulunarak DNA’nın suskun kalmasını sağladığı düşünülmektedir (Akkaya ve Dinçer, 2013; Bora ve Yurter, 2007).

Hücrenin bazı genleri baskılamak amacıyla kullandığı RNA interferansı (RNAi) yolları, başlıca “small interfering RNA (siRNA)” ve mikroRNA (miRNA) adı verilen RNA parçacıkları ile olduğu bildirilmektedir (Bodur ve Demirpençe, 2010; Bora ve Yurter, 2007; Güzelgöl ve Aksoy, 2009; İzmirli, vd., 2012). Bu RNA’ların mRNA ile etkileşimi RNA ve RNA bağlayan proteinlerden zengin bir kompleks olan RISC kompleksi (RNA-induced silencing complex) içinde meydana geldiği ifade edilmektedir (Bodur ve Demirpençe, 2010). siRNA hedef mRNA dizisiyle birebir eşleşir ve mRNA molekülü eşleşme bölgelerinden endonükleazlar ile kesilerek parçalanır (Bodur ve Demirpençe, 2010; Güzelgöl ve Aksoy, 2009). miRNA, siRNA’dan farklı olarak, mRNA ile tam bir eşleşme göstermediğinden mRNA’yı parçalayamaz (Güzelgöl ve Aksoy, 2009). Ancak başlangıç faktörlerinin mRNA’ya bağlanmasını engelleyerek veya başlamış translasyonda mRNA’nın ribozomdan ayrılmasına neden olarak translasyonu baskılar (Bodur ve Demirpençe, 2010). Ancak bazı miRNA’lar, siRNA gibi mRNA ile tam olarak uyum gösterebilir ve mRNA’yı parçalayarak gen ifadesini engelleyebilir (Güzelgöl ve Aksoy, 2009). ncRNA’lar yaygın olarak uzunluklarına göre sınıflandırılmaktadır. Nükleotit sayısı 200’den daha uzun olan ncRNA’lar uzun kodlanmayan RNA (long non-coding RNAs-lncRNAs) olarak tanımlanmaktadır (Akkaya ve Dinçer, 2013; Güzelgöl ve Aksoy, 2009). 200 nükleotitten daha kısa olanlar ise küçük kodlanmayan RNA olarak isimlendirilir.

### 2.7.2 Histon modifikasyonları

Histon modifikasyonları kromatin yapı ve fonksiyonunu değiştirmeleri nedeniyle epigenetik düzenleyici olarak bilinmektedir (Egger, vd., 2004). Histon modifikasyonlarıyla DNA metilasyonu arasında doğrudan ilişki olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Ökaryotik hücrelerde DNA, beş farklı histon proteini ile paketlenerek nükleozom yapısını oluşturmaktadır (Cooper ve Hausman, 2004). Bir genin ifade edilmesi, histon proteinleri-DNA arasındaki paketlenmenin gevşemesi ve nükleozom yapısının yer değiştirmesi olarak bilinen yeniden düzenlenme sonucu meydana gelmektedir (Klung ve Cummings, 2000). Histon proteinlerinin amino ucunda asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, ubiquitinizasyon, ADP-ribozilasyon ve sumozilasyon gibi çeşitli post-translasyonel modifikasyonlar oluşmaktadır. Modifikasyonların histonların elektrostatik yükünü etkileyerek kromatin yapısını

değiştirdiği ve protein kompleksleri için tanıma bölgesi oluşturduğu düşünülmektedir. Böylece histon-DNA ve histon-histon ilişkisi etkilenmekte, DNA paketlenmesi, replikasyonu, tamiri ve gen ifadesinin kontrolü gibi birçok mekanizma kontrol edilebilmektedir. Modifikasyonlar tek başlarına veya farklı kombinasyonlarda bulunarak kromatine bazı anlamlar katmakta veya bu anlamları değiştirebilmektedir (Strahl ve Allis, 2000; Lizuka ve Smith, 2003).

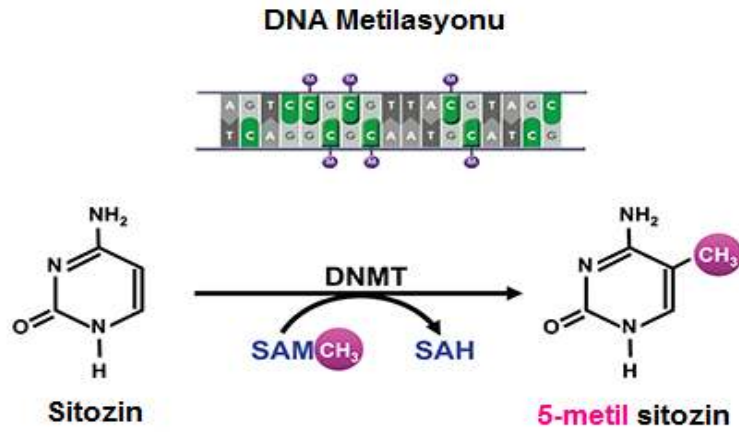
Bilimsel çalışmalara en çok konu olan histon modifikasyonu asetilasyondur (Strahl ve Allis, 2000). Histonların asetilasyonu histon asetil transferaz (HAT) ve histon deasetilaz (HDAC) enzim aileleri ile düzenlenmektedir. Negatif yüklü asetil grubunun histon proteininin amino ucuna takılmasıyla pozitif yüklü lizin aminoasiti yükünü kısmen kaybetmekte, kromatinde gevşeme meydana gelmekte, transkripsiyon faktörlerinin genlerin promotor bölgelerine erişimi kolaylaşmakta ve bu sayede transkripsiyon gerçekleşmektedir. Asetilasyon geri dönüşümlü olarak gerçekleşmektedir. Lizin amino asitinden asetil grubunun çıkartılmasıyla kromatin tekrar kondense olmakta ve transkripsiyon baskılanmaktadır. Kromatinin belli bir bölgesinde histonların asetile olması, o bölgenin transkripsiyonel olarak aktif olduğunu gösterirken, deasetile olması transkripsiyonun baskılandığını göstermektedir (Grant, 2001).

### **2.7.3 DNA metilasyonu**

DNA düzeyindeki modifikasyonların en çok çalışılan, bilinen ve işlevsel olanı DNA metilasyonudur (Fauque, 2013; İzmirli, 2013; Kürtüncü ve Eraksoy, 2008). Genel olarak DNA metilasyonu, omurgalılarda CpG (C sitozin, p fosfat, G Guanin) dinükleotitlerinin (CpG adacıkları) sıklıkla bulunduğu alanlarda sitozinin 5. karbonuna bir metil grubunun (-CH<sub>3</sub>) bağlanması ile meydana gelir (Fauque, 2013; İzmirli, 2013; Orcan, 2006). Bu reaksiyon DNA metiltransferaz (DNMT) enzimleri aracılığıyla gerçekleştirilir (Bird., 2002) ve metil vericisi olarak S-Adenozil metiyonin (SAM) görev alır (Momparker ve Bovenzi, 2000). Memeli hücrelerinde, DNA metil transferaz aktivitesi olan DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B olarak adlandırılan 3 farklı enzim bulunmaktadır (Okano, vd., 1998; Okano, vd., 1999). Hücredeki DNA metilasyonunun durumu, DNMT enzimlerinin birbirleriyle ve histon deasetilaz gibi diğer enzimlerle etkileşimleri sonucunda ortaya çıkmaktadır (Rountree, vd., 2000; Fuks, vd., 2000).

Genlerin kontrol bölgelerinin yakınında yerleşmiş 0.5 kb ile bir kaç kb büyüklüğündeki, CpG dinükleotidleri bakımından zengin olan bölgeler CpG adaları olarak isimlendirilir (Gardiner-Garden ve Frommer, 1987). Bu kontrol bölgelerinde yer alan CpG adalarında görülen DNA metilasyonu genellikle gen aktivitesini etkiler (Delgado, vd., 1998). Genomdaki CpG dinükleotidlerinin yaklaşık %80'i tekrarlayan dizilerde dağınık olarak bulunur. Ayrıca kodlayan bölgelerin içinde de dağınık bir şekilde CpG dinükleotidleri yer alır. Genomun büyük bir bölümünde CpG adaları ile ilişkili olmayan CpG dinükleotidlerinin çoğu metillenmiş durumdadır. Bu metilasyon büyük miktardaki kodlamayan DNA'nın transkripsiyonel açıdan sessiz kalmasının sağlanmasında önemlidir (Herman ve Baylin, 2003; Esteller ve Herman, 2002). Normal hücrelerde promotör bölgede metilasyon olması durumu imprint edilmiş genlerde ve X kromozomunun inaktivasyonunda görülür (Constancia, vd., 1998; Jaenisch ve Bird, 2003). Bunun aksine promotör bölgede olan CpG adalarında yer alan sitozinler normal hücrelerde metile değilken, genin içerisinde ve 3' transkripsiyonu yapılmayan bölgede yer alan CpG'ler ise metillenmiş durumdadır (Mitsiades ve Anderson, 2009; Jones ve Baylin, 2002). Normal hücrelerde promotör bölgede metilasyonun düşük olması ve gen içindeki CpG dinükleotidlerinde metilasyonun olması; promotör bölgeye transkripsiyon faktörlerinin, transkripsiyon aktivatörlerinin ve histon asetil transferaz (HAT) enzimlerinin toplanmasını kolaylaştırırken, metilsitozine bağlanan proteinler ile histon deasetilazların (HDAC) gen içindeki metile CpG bölgelerine toplanarak kromatin yapısının açılmasına olanak sağlar (Mitsiades ve Anderson, 2009). Promotörde yer alan CpG adalarında metilasyonun olmaması, uygun transkripsiyon faktörlerinin varlığında ve kromatin yapısının açık olması durumunda gen ifadesine olanak sağlar (Jones ve Baylin, 2002). Normal hücrelerde görülen CpG adalarındaki metilasyon dağılımı kanser hücrelerinde ise tam tersidir. Kanser hücrelerinde genin içinde, intronlarda ve tekrarlayan DNA dizilerinde metilasyon düşük iken, promotör bölgelerde ise aşırı metilasyon görülür (Mitsiades ve Anderson, 2009). Promotör bölgede gerçekleşen hipermetilasyon çeşitli kanserlerde TS genlerin baskılanması için yaygın olarak görülen bir mekanizmadır (Herman ve Baylin, 2000). Kanserlerde CpG adasındaki metilasyon nedeni ile baskılanmış olan genler genel olarak hücre döngüsünün kontrolü, hücre invazyonu ve adezyonu, apoptozun düzenlenmesi, DNA hasarının tamiri ve büyüme faktörlerine verilen cevapta iş gören genlerdir (Galm, vd., 2006). Promotördeki

hipermetilasyonun taranması kanserin erken tanısı için bir potansiyel sağlamakla birlikte metilasyonun geri çevirilmesi için yeni tedavilerin geliştirilmesine yönelik bir fırsat sağlamaktadır (Sidransky, 2002).



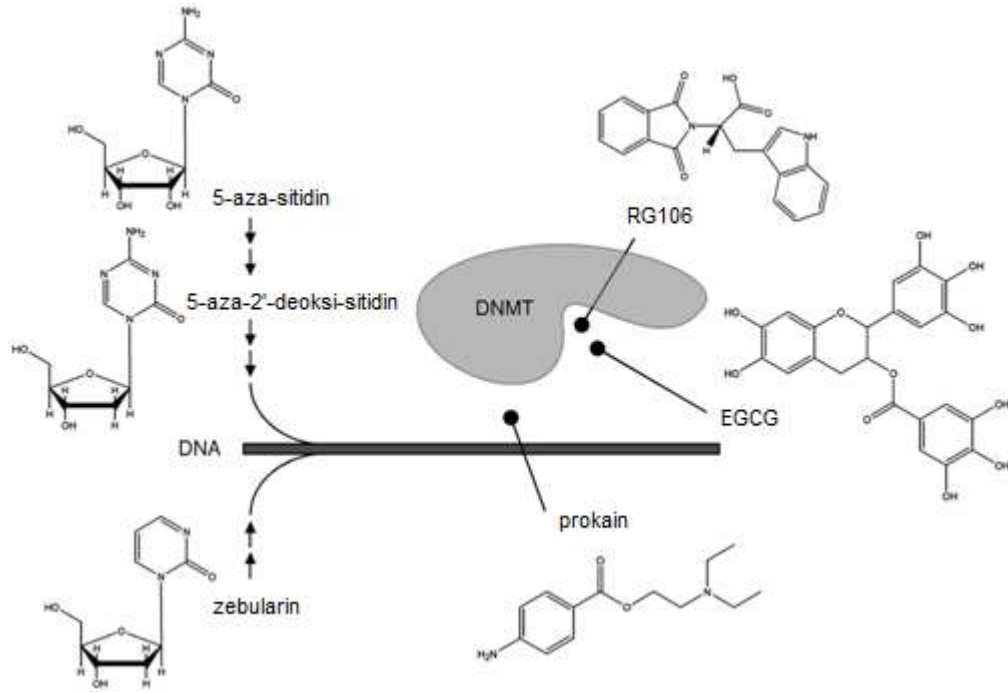
**Şekil 2.4.** DNA metilasyonunun şematik gösterimi (Zakhari, 2013).

### 2.7.3.1 DNA metil transferaz inhibitörleri (DNMTi) ve tedavi

Tümörlerdeki epigenetik değişiklikler potansiyel olarak DNA metilasyon inhibitörleri veya histon deasetilasyon inhibitörleri ile geri döndürülebilmektedir. Böylelikle inaktive edilmiş olan tümör baskılayıcı bir geninin aktivasyonu sağlanmış olacaktır. Bu nedenle tümör hücrelerinde görülen CpG adalarında meydana gelen metilasyon tedavi için hedef durumuna gelmiştir. Hematolojik tümörlerde DNA metilasyon inhibitörleri umut veren sonuçlar ortaya çıkarmış olsa da bu yararların, tam olarak epigenom üzerindeki etkilerden kaynaklanıp kaynaklanmadığı henüz tam olarak belirlenemediği için temel araştırmaların yapılması gerekmektedir (Galm, vd., 2006; Lübbert, 1999).

DNA metilasyonunu baskılayan inhibitörler (DNMTi) iki sınıfta incelenmektedir. Bunlar nükleosid analogları ve nükleosid analogu olmayan DNMT inhibitörleridir. Nükleosid analogları riboz ya da deoksiriboz birimine bağlı olan modifiye edilmiş bir sitozin halkası taşır ve replikasyon sırasında yeni sentezlenen zincirin yapısına katılmaktadır (Peedicayil, 2006). DNA'nın yapısına katılan bileşiklerle metil transferazlar arasında kovalent bağlar kurulmakta ve enzimin aktif hale geçmesini engellenerek yeni sentezlenen zincirin hipometile olması sağlanmaktadır (Egger, vd.,

2004; Miyamoto ve Ushijima, 2005). Nükleosid analogu olan DNMT inhibitörleri ribonükleosid analogları olan 5-azasitidin ve zebularin ile deoksiribonükleosid analogları olan 5-aza-2'-deoksisitidin ve 5-floro-2'-deoksisitidindir. Bu moleküller hücredeki çeşitli kinazlar tarafından fosforilasyona uğrayıp nükleosid formundan nükleotid formuna dönüştürülerek DNA veya RNA'nın yapısına katılır. Bu bileşikler, DNA yapısına katılarak metilasyonu engellemektedir (Yoo ve Jones, 2006).



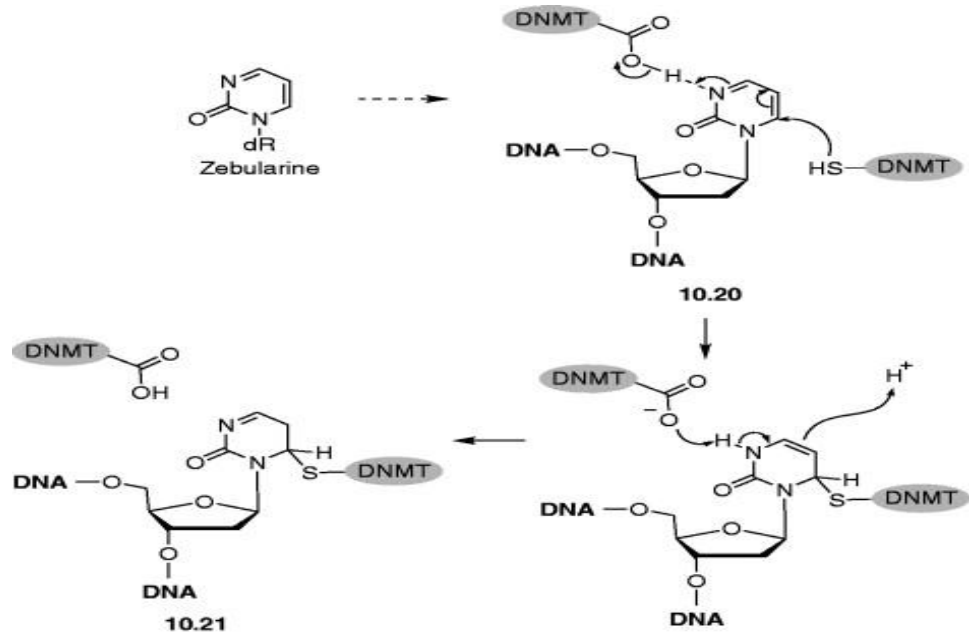
**Şekil 2.5.** DNMT inhibitörleri ve mekanizmaları (Nükleosid analogu olan 5-aza-sitidin, 5-aza-2'-deoksi-sitidin ve zebularin DNA ile birleşmeden önce geniş ölçüde hücresel yollarla metabolize edilir (küçük ok). Birleşimden sonra, onlar DNMT enzimleri için intihar substratları olarak işlev görür. Nükleosid analogu olmayan prokain, epigallocatechin-3-gallate (EGCG) ve RG108 enzimin aktif bölgesini baskılayarak veya DNMT hedef sekansını kapatarak DNMT enzimini baskılar (Lyko ve Brown, 2005)).

### 2.7.3.2 Zebularin

Kan, prostat, akciğer, kolon ve pankreas kanser hücre hatlarında gösterilen öncelikli olarak kanser hücrelerini hedef alan, zebularin ikinci jenerasyon, yüksek derecede stabil hidrofilik bir DNMT inhibitörüdür (Anderson, vd., 2010; Cheng, vd., 2004). DNA metilasyonunun etkili bir inhibitörü olmasının yanında, terapötik bir ajan olarak istenilen sayısız özelliğe de sahiptir. Zebularin DNMT proteini ve zebularin-bağlanan DNA arasında zayıf kovalent kompleksler oluşturarak DNMT proteini için bir

engel olarak hareket eder. Zebularin aynı zamanda ilk olarak sitidin deaminaz inhibitörü olarak geliştirilen bir sitidin analogudur. Farede uzun süreli uygulamadan sonra bile düşük toksisite göstermektedir (Cheng, vd., 2003; Cheng, vd., 2004). Düşük toksisiteye sahip olduğundan uzun süreli periyotlarla demetilleyici ajan olarak daha düşük dozlarda sürekli olarak verilebilir (Cheng, vd., 2004). Anormal metilasyonun tümör oluşumunun erken ve geç evrelerinde önemli bir olay olduğunu varsayarsak, bu süreç kanser risk değerlendirilmesi, tedavi ve kemoterapi için kritik bir hedefi temsil edebilir (Anderson, vd., 2010).

Zebularinin diğer bir göze çarpan özelliği normal fibroblastlar yerine tümör hücrelerini tercih etmesidir. Zebularine zaman içerisinde doğrusal olarak DNA'ya dahil edilir ve çeşitli tümör ve normal hücre hatlarında birleşme oranlarını karşılaştırdığımız zaman, normal fibroblastlardan daha yüksek oranda kanser hücre hatlarına eklendiği gösterilmiştir (Cheng, vd., 2004). Ayrıca, zebularinin normal fibroblastlara nazaran tümör hücrelerinde DNA, RNA, proteinler ve hücre büyümesi seviyelerinde daha iyi cevaplar elde edilmiştir (Cheng, vd., 2004). Zebularin tarafından indüklenen genler arasında, bu ilacın diğerleri arasında apoptozu başlatmada ve immünoterapiyle kombine edildiğinde anti-tümör potansiyele sahip olabileceğini destekleyen bir grup kanserle ilişkili genler ve apoptozla alakalı genler vardır (Cheng, vd., 2004; Pompeia, vd., 2004).



**Şekil 2.6.** Zebularinin DNMT inhibisyon mekanizması (Evendano, vd., 2015).

## 2.8 SKBR3 Hücre Hattı

SkBr3, 1970 yılında Memorial Sloan-Kettering Kanser Merkezi tarafından izole edilen bir hücre dizisidir. Kırk üç yaşında beyaz bir kadının göğsünde oluşan adenokarsinomaya bağlı olarak plevral efüzyon hücrelerinden gelişmiştir. Hücre hattında HER2 gen ürünü aşırı ifade edilmektedir. Aynı zamanda hormon reseptörleri negatif (östrojen ve progesteron reseptörü) hücrelerdir (Subik, vd., 2010). SKBR3 hücre hattı AU565 hücre hattı ile aynı hastadan elde edilmiştir. SKBR3 hücreleri HER2 aşırı ifade edilen meme kanserlerine direncin üstesinden gelmek isteyen çalışmalarda kullanılmıştır (Tseng, vd., 2006).

Bu hücreler doku kültüründe epitelyal bir morfoloji sergilerler ve immün yetmezlikli farelerde kötü diferansiye tümörler oluşturabilirler. SKBR3 hücreleri ve bunlardan türetilen ürünler HER2 için yapılan çalışmalarda pozitif kontrol olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca, hücre hattı aynı zamanda HER2 hedef alan terapötik ajanların taraması için yararlı bir prelinik modeldir (Fogh, vd., 1977).

### 3 MATERYAL VE METODLAR

#### 3.1 Kullanılan Malzemeler

##### 3.1.1 Kullanılan cihazlar

Su Banyosu (Nüve-NF 800)

CO<sub>2</sub>'li İnkübatör (New Brunswick-Galaxy 170 R)

Etüv (Jeio Tech-IB-E)

İnvert Mikroskop (Nikon eclipse TS100)

Pipet Seti (Thermo Scientific)

Laminar Flow (Steril Kabinet) (Scanlaf-Mars Safety Classe 2)

Mikrodalga Fırın (Kenwood)

Real- Time PCR Cihazı (Agilent Tech.-AriaMx)

Nanodrop (Shimadzu-Biotech)

Otoklav Cihazı (Nüve Steamart-OT 90L)

Soğutmalı Santrifüj Cihazı (Thermo Scientific- Micro CL 21R)

Hassas Terazı (Ohaus)

Jel Görüntüleme Sistemi (Gel Logic-212 Pro)

Pasteur Fırını (Jeio Tech-ON-12)

Derin Dondurucu (Bosch)

Buzdolabı (+4 °C) (Regal)

Buzdolabı (-80 °C) (Panasonic)

pH Metre (İnolab-PH 7110)

Buz Makinası (Hoshizaki)

Mikroplate Okuyucu (Thermo Scientific-Multiscan Go)

PCR Cihazı (Thermo Scientific)

Manyetik Karıştırıcı

##### 3.1.2 Sarf malzemeler

Falkon (İsolab)

25 ve 75 cm<sup>2</sup> hücre kültür kapları (Sarstedt)

Filtre (0,22 µM) (TPP)

Cryo Tüp (2 ml) (İsolab)

Enjektör (20 ml) (Ayset)  
96 kuyucuklu petri (Sarstedt)  
6 kuyucuklu petri (Sarstedt)  
Cam Şişe (İsolab)  
Mezür (S&H Labware)  
Beher (S&H Labware)  
Erlen (S&H Labware)

### **3.1.3 Kullanılan kimyasallar**

Bisülfid Modifikasyon Kiti (Zymo Research)  
Fetal Bovine Serum (Biological Industries)  
Trypsin-EDTA (Sigma)  
DMEM (Lonza)  
Penisilin/Streptomisin (Biological Industries)  
Zebularin (Cayman Chemical)  
Trypan Blue Solüsyonu (%0,4) (Amresco)  
MTT Reagent (Glentham Life Sciences)  
Kristal Viyole (Merck Millopore)  
Amonyum Asetat (Merck Millopore)  
Sodyum Klorür (CalbioChem)  
 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck Millopore)  
Potasyum Klorür (Merck Millopore)  
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Merck Millopore)  
Tris Base (Sigma)  
Methanol (Sigma)  
DMSO (Merck Millopore)  
2- Propanol (Merck Millopore)  
EDTA (Carlo Erba)  
Asetik Asit  
Agaroz (Applichem)  
Fenol-Kloroform-İzoamil Alkol (24:23:1) (Fisher Bioreagents)

### 3.1.4 Kullanılan tamponlar

#### 3.1.4.1 1X PBS tamponu

Çizelge 3.1’de verilen kimyasallar 800 ml dH<sub>2</sub>O’da çözündürüldükten sonra pH 7.4’e ayarlanıp toplam hacim 1000 ml’ye tamamlanmıştır. Otoklavlanan tampon +4 °C’de saklanmıştır.

**Çizelge 3.1. 1XPBS tampon içeriği.**

| İçerik                               | Miktar |
|--------------------------------------|--------|
| <b>NaCl</b>                          | 8 g    |
| <b>KCl</b>                           | 0,2 g  |
| <b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b> | 1,44 g |
| <b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>  | 0,24 g |

#### 3.1.4.2 Lizis tamponu

Çizelge 3.2’de verilen bileşenlerden belirtilen miktarlarda alınıp toplam hacim 100 ml olacak şekilde hazırlanmıştır.

**Çizelge 3.2. Hücre lizis tamponu içeriği.**

| İçerik                       | Miktar |
|------------------------------|--------|
| <b>10 mM Tris-HCl (pH:8)</b> | 1 ml   |
| <b>0,1 M EDTA (pH:8)</b>     | 20 ml  |
| <b>%0,5 SDS</b>              | 5 ml   |
| <b>dH<sub>2</sub>O</b>       | 74 ml  |
| <b>Toplam Hacim</b>          | 100 ml |

#### 3.1.4.3 Hücre dondurma ortamı

9 ml filtreden geçirilmiş fetal sığır serumu (FBS) ve 1 ml dimetilsülfoksit (DMSO) karıştırılarak hazırlanmıştır.

#### 3.1.4.4 CT dönüşüm reaktifi

Çizelge 3.3’te verilen bileşenlerden belirtilen miktarlarda alınıp karıştırılmıştır. Çözünmesi için 10 dk boyunca vortekslenmiştir.

**Çizelge 3.3.** CT dönüşüm reaktifi içeriği.

| İçerik                     | Miktar |
|----------------------------|--------|
| <b>M-Dissolving Buffer</b> | 50 µl  |
| <b>M-Dilution Buffer</b>   | 300 µl |
| <b>dH<sub>2</sub>O</b>     | 900 µl |

## 3.2 Yöntemler

### 3.2.1 Hücre kültürü

SKBR-3 meme kanseri hücre hattı Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'nde (DETAE) görev yapan Prof. Dr. Oğuz Öztürk'ten temin edilmiştir. SK-BR-3 hücreleri %10 fetal sıgır serumu (FBS) ve %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM besisi yerinde % 5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C'de inkübatörde üretilmiştir.

T75 petri kaplarına ekimi yapılan hücrelerin belli yoğunluğa ulaştıklarında pasajlama işlemleri gerçekleştirilmiştir. Pasajlama sırasında petri kabı içerisindeki besisi ortamı uzaklaştırılmıştır. Hücreler üzerine 2 ml fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) eklenip yıkanmıştır. PBS ortamdan uzaklaştırılıp 2 ml Tripsin-EDTA çözeltisi eklenip inkübatörde 3 dk bekletilmiştir. İnkübatörden çıkarılan hücreler üzerine tripsin inaktivasyonunun sağlanması için 2 ml besisi yeri eklenmiştir. Hücreler bir falkon içerisine toplanmıştır ve 2000 rpm'de 5 dk santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmıştır ve pelet 1 ml taze besisi yerinde süspanse hale getirilmiştir. Devamında hemositometrede hücrelerin sayımı gerçekleştirilmiştir ve sayımı yapılan hücrelerin yapılacak deneye göre yapılacak hücre kültürü deneyine özgü petri kaplarına ya da tekrardan T75 petri kaplarına ekimi yapılarak pasaj işlemi gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.2 Hücre canlılığının belirlenmesi

Hücre canlılığı MTT testi ile yapılmıştır. MTT'nin canlı hücreler içerisine girmesiyle boyanın indirgenmesi sonucu mor renkli formazan tuzları meydana gelir ve bu sayede kolorimetrik ölçümlerle bağılı hücre canlılığı belirlenmektedir. Bu amaçla 96 kuyucuklu petrilere her kuyucukta  $1 \times 10^4$  hücre olacak şekilde SKBR-3 hücrelerinin ekimi gerçekleştirilmiş ve hücrelerin yapışması beklenmiştir. Hücrelere zebulerine (0-

140  $\mu\text{M}$ ) uygulaması yapılmıştır ve hücreler 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra hücreler üzerine 10  $\mu\text{l}$  MTT eklenmiş ve hücreler 4 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında MTT eklenen besiyeri uzaklaştırılıp hücreler üzerine 100  $\mu\text{l}$  DMSO eklenmiştir ve 5 dk karanlıkta bekletilmiştir. ELİZA okuyucuda 570 ve 650 nm’lerde ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Deneyler en az üç tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır.

### 3.2.3 Hücre sağkalım tayini

Uygulanan ilacın hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla tripan mavisi ile hücreler boyanarak hücre sağkalım deneyleri gerçekleştirilmiştir. Öncelikle her kuyucukta  $1 \times 10^5$  olacak şekilde 6 kuyucuklu petrilere SKBR-3 hücrelerinin ekimi yapılmıştır ve hücrelerin yapışması beklenmiştir. MTT testi sonucunda belirlenen  $\text{IC}_{50}$  değerinde hücrelere zebularin (40  $\mu\text{M}$ ) uygulanmıştır. Hücreler 24, 48, 72 ve 96. saatlerde sayımları yapılacak şekilde inkübe edilmiştir. Belirlenen saatlerde hücreler tripsin-EDTA yardımıyla kaldırılarak tüplere toplanmıştır. 2000 rpm’de 5 dk santrifüj yapılmış ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pelet üzerine 50  $\mu\text{l}$  besiyeri ve 50  $\mu\text{l}$  tripan boyası eklenmiştir. Hücreler homojen hale getirilmiş ve hemositometrede sayımları gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.4 Yara iyileşmesi deneyi

Zebularinin hücre göçü ve hücre-hücre etkileşimlerinin üzerine etkilerinin incelenebilmesi için yara iyileşmesi (wound-healing) deneyi gerçekleştirilmiştir. SKBR-3 hücrelerinin her kuyucukta  $25 \times 10^4$  hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu petrilere ekimleri yapılmıştır ve hücrelerin yapışması beklenmiştir. Yapışan hücreler düz bir hatta olacak şekilde her kuyucuğun tam ortasından 200  $\mu\text{l}$ ’lik pipet ucu yardımıyla kazınmıştır. Hücre artıklarını temizlemek amacıyla 1xPBS ile yıkama yapılmıştır. Yıkama sonrası ilaçlı (zebularin-40  $\mu\text{M}$ ) ve ilaçsız (kontrol grubu) 2 ml taze media eklenmiştir. 24, 48, 72 ve 96. saatlerde hücrelerin hareketleri izlenmiştir ve görüntüleri kayıt edilmiştir.

### 3.2.5 Soft-agar koloni oluşum deneyi

Ankraj bağımsız büyüme hücrelerin transformasyon yeteneğinin olması sonucu düz bir yüzeye bağımlı olmadan büyümeleridir. Soft-agar koloni oluşum deneyi ile

in vitro olarak bu hücrelerin malign transformasyonları incelenebilmektedir. Bu amaç doğrultusunda öncelikle 6 kuyucuklu petriler 1:1 oranında %20 FBS içeren DMEM ve %0,6 agaroz ile kaplanmıştır ve donması beklenmiştir. Her kuyucukta  $5 \times 10^3$  hücre olacak şekilde yine 1:1 oranında karıştırılmış %10 FBS içeren DMEM (zebularin (40  $\mu$ M) eklenmiş ve eklenmemiş iki farklı DMEM) ve %0.3'luk agaroz karışımı, hazırlanan petrilerin üzerine ekilmiştir. 20 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Her iki günde bir üst besiyeri taze besiyeri ile değiştirilmiştir. Yirmi gün sonunda kuyucuklar %0,005'lik kristal viyole ile muamele edilmiştir ve 20 dk bekletilmiştir. Boyama sonrasında oluşan koloniler mikroskop yardımıyla incelenmiştir.

### 3.2.6 DNA izolasyonu

Metilasyon analizlerinin yapılabilmesi için SKBR-3 hücrelerinden DNA izolasyonu yapılmıştır. 100 mm'lik petrilere  $2 \times 10^6$  hücre olacak şekilde hücrelerin ekimleri yapılmıştır ve hücrelerin yapışmaları beklenmiştir. Devamında hücrelere ilaç uygulaması (Zebularine-40  $\mu$ M) yapılmıştır. Çalışmaya değişimin incelenebilmesi için ilaç uygulanmayan kontrol grubu da dâhil edilmiştir. Uygulama sonrasında zebularinin metilasyon üzerindeki zamana bağlı etkilerinin incelenebilmesi için 24, 48 ve 72. saatlerde DNA izolasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Belirlenen saatlerde hücreler 1x PBS ile yıkanmıştır ve kazıma işlemleri yapıp hücreler falkonlara toplanmıştır. Süpernant uzaklaştırılıp pelet üzerine lizis tamponu eklenmiştir. Pelet tampon içerisinde homojen hale getirildikten sonra buz üzerinde 1 saat bekletilmiştir. 13.200 rpm'de 10 dk (+4 °C) santrifüj işleminden sonra süpernatant yeni tüplere alınmıştır ve üzerine 8  $\mu$ l RNase ve 6  $\mu$ l Proteinaz K eklenmiştir. 37 °C' de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Hacim belirlenip 1:1 oranında fenol-kloroform-izoamilalkol eklenmiştir. 13.200 rpm'de 15 dk santrifüj işleminden sonra üst faz yeni 1,5  $\mu$ l'lik tüplere alınmıştır. Örnek üzerine 200  $\mu$ l 3 M amonyum asetat (pH:5,2) eklenmiştir ve 20 sn vortekslenmiştir. Proteinlerin çökmesi için 13.200 rpm'de 3-5 dk santrifüj işlemi yapılmıştır. Üst faz yeni tüplere alınıp üzerine 600  $\mu$ l izopropanol eklenmiştir. İyice karışması sağlandıktan sonra genomik DNA'yı dibe çöktürmek için 13.200 rpm'de 2 dk santrifüj yapılmıştır. Süpernatant uzaklaştırılıp pelet üzerine 600  $\mu$ l %70'lik EtOH eklenmiştir. Son bir santrifüj işleminden sonra süpernatant atılır ve yıkanan DNA peleti EtOH'ı tamamen

uzaklaştırmak için kurumaya bırakılır. DNA peleti 20 µl Tris-EDTA tamponu içerisinde çözdürülüp elde edilen DNA örnekleri -20 °C’de saklanmıştır.

### 3.2.7 Bisülfid modifikasyonu

İzolasyonu yapılan DNA’lara PCR işleminden önce bisülfid modifikasyonu uygulanmıştır. Burada metile olmuş sitozinler değişmeden kalırken unmetile olan sitozinler timine dönüştürülmektedir. Bu amaç doğrultusunda Zymo EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (Cat no: D5001) kullanılmıştır. Kit protokolü doğrultusunda, hazırlanan CT dönüşüm reaktifinden 130 µl CT dönüşüm reaktifi ve 20 µl DNA örneği karıştırılıp 98 °C’de 10 dk, 64 °C’de 2,5 saat ve 4 °C’de 20 saat aşamalarında PCR işlemi uygulanmıştır. Yapılan PCR işleminden sonra Zymo-Spin™ IC kolonlara 600 µl M-binding buffer eklenip üzerine PCR işlemi uygulanan DNA örneklerinin tamamı eklenmiştir ve karışması sağlanmıştır. En yüksek hızda (>10,000 g) 30 sn santrifüj yapılmıştır. Kolonun alt kısmında kalan sıvı dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Kolon üzerine 100 µl M-Wash Buffer eklenmiştir ve 30 sn spin attırılmıştır. Kolon üzerine 200 µl M-Desulphonation Buffer eklenmiştir ve 20 dk bekletilmiştir. İnkübasyondan sonra en yüksek hızda 30 sn santrifüj yapılmıştır. Kolon üzerine 200 µl M-Wash buffer eklenmiştir ve 30 sn spin attırılmıştır. Kolonun üst kısmı 1,5 µl’lik tüplerinin üzerine yerleştirilmiştir ve 10 µl M-Elution Buffer doğrudan kolon tabanına gelecek şekilde eklenmiştir. Kısa bir spin işlemi ile DNA kolonlardan aşağı çöktürülmüştür.

### 3.2.8 Real time PCR

DNA metilasyon analizlerinin yapılabilmesi için metilasyon spesifik-HRM (MS-HRM) analizleri yapılmıştır. Bisülfid modifikasyonu gerçekleştirilen DNA örnekleri (ilaç uygulanmayan kontrol grubu ve zebularin uygulanmış 24, 48 ve 72. saatlerde SKBR-3 hücrelerinden izolasyonu yapılmış DNA örnekleri) 96 kuyucuklu plate’e çizelge 3.4.’de gösterilen miktarlarda koyulmuştur. Kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 metilasyon analizleri için çizelge 3.5’te belirtilen primerler kullanılmıştır.

Örneklerin metilasyon oranlarının karşılaştırılabilmesi için tamamen unmetile ve hemi-metile kontrol grupları kullanılmıştır. Kontrol DNA’lar kullanılmadan önce

bilsülfite modifikasyonu yapılmıştır. Çizelge 3.4’te verildiği gibi reaksiyon bileşenleri 96 kuyucuklu plate içerisine eklenmiştir.

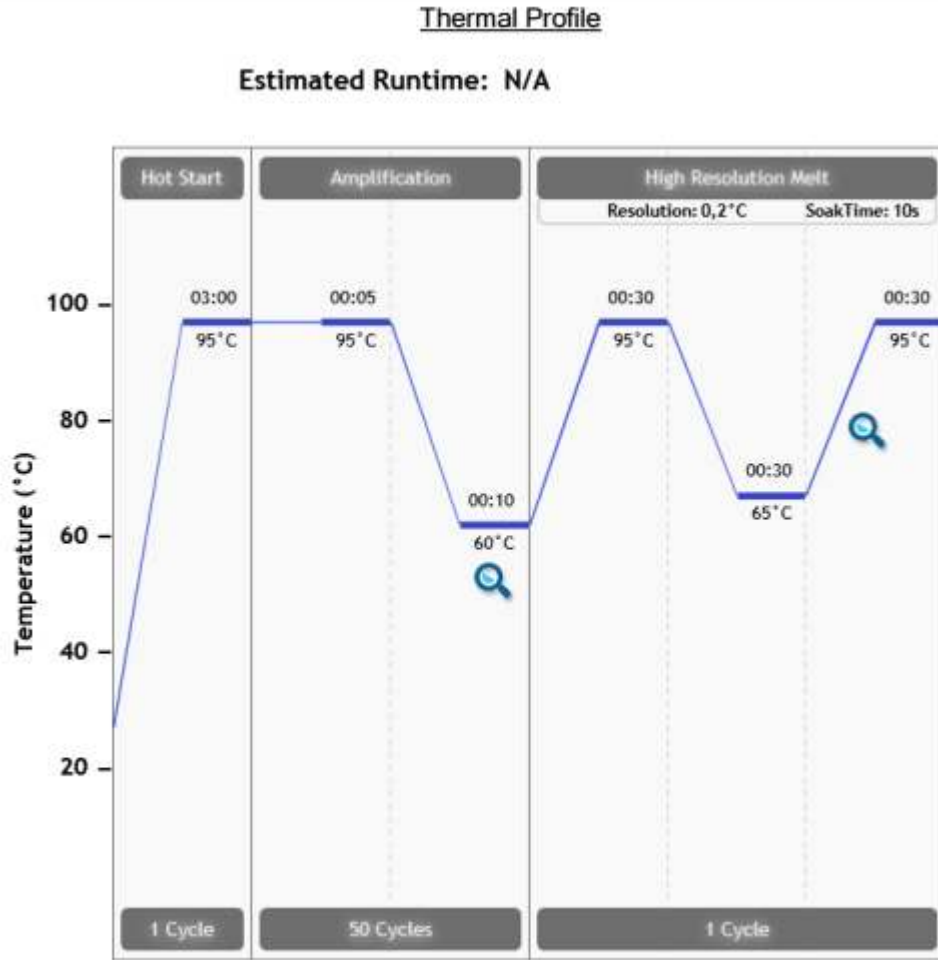
**Çizelge 3.4.** MS-HRM analizleri için PCR içeriğinin hazırlanması.

|                                                    |                                                      |
|----------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| <b>2x Brilliant HRM Ultra-Fast Loci master mix</b> | <b>10 µl</b>                                         |
| <b>DNA örneği</b>                                  | 20 ng                                                |
| <b>F primer</b>                                    | 150 nM                                               |
| <b>R primer</b>                                    | 150 nM                                               |
| <b>Nükleaz-free su</b>                             | Toplam hacim 20 µl’ye tamamlamak için yeterli miktar |
| <b>Toplam hacim</b>                                | 20 µl                                                |

**Çizelge 3.5.** Kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9’a ait primer dizileri.

| <b>Primer Adı</b> | <b>Primer Dizisi</b>                              |
|-------------------|---------------------------------------------------|
| <b>Kaspaz-3</b>   | Unmetile Forward 5’-TGAGTTTTAGGGTGGGATTAAAGT-3’   |
|                   | Unmetile Revers 5’-CACTACAACCCATCCCCTAA-3’        |
|                   | Metile Forward 5’-TTTAGGGCGGGATTAAAGC-3’          |
|                   | Metile Revers 5’-CTACGACCCGTCCCCTAA-3’            |
| <b>Kaspaz-8</b>   | Unmetile Forward 5’-TTGTTGTTTGGGTAATGTATTGA-3’    |
|                   | Unmetile Revers 5’-CAACCCTACTTAACTTAACCCTACTCA-3’ |
|                   | Metile Forward 5’-TGTTGTTTGGGTAACGTATCGA-3’       |
|                   | Metile Revers 5’-CCCTACTTAACTTAACCCTACTCGAC-3’    |
| <b>Kaspaz-9</b>   | Unmetile Forward 5’-GTGGGGAGTGAAGATTGATTT-3’      |
|                   | Unmetile Revers 5’-CCACTTCATCCATAACAAATAACC-3’    |
|                   | Metile Forward 5’-GGGAGCGAAGATTGATTC-3’           |
|                   | Metile Revers 5’-CTTCGTCCATAACGAATAACC-3’         |

Agilent Aria Mx Real Time PCR sistemi kullanılarak MS-HRM analizleri yapılmıştır. Hazırlanan örnekler cihaza yerleştirildikten sonra şekil 3.1’de belirtilen termal profile reaksiyon gerçekleştirilmiştir.



**Şekil 3.1.** MS-HRM analizleri için döngü koşulları.

### 3.2.9 İstatistiksel analiz

Yapılan bütün deneyler en az üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. yapılan deneylerin ortalamaları alınarak Graph Pad 4.04 istatistik programı ile istatistiksel analizleri gerçekleştirilmiştir. Analizlerde *bağımsız t-testi* kullanılmıştır. Olasılık değerleri;

$p > 0,05$  anlamlı düzeyde farklılık yoktur

$p < 0,05$  önemli düzeyde farklılık

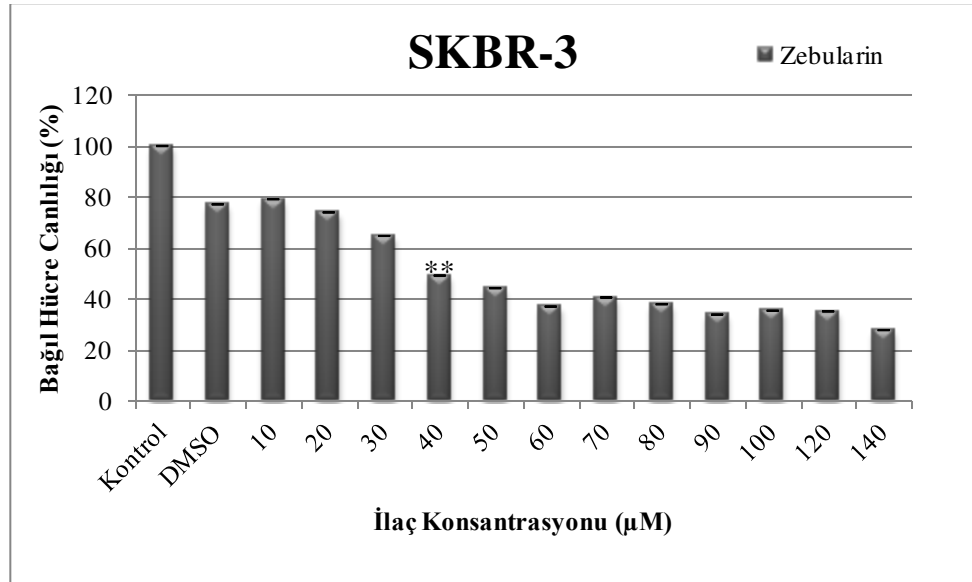
$p < 0,01$  çok önemli düzeyde farklılık

$P < 0,001$  ileri düzeyde farklılık olarak değerlendirilmiştir.

## 4 BULGULAR

### 4.1 Zebularinin SKBR-3 Hücre Hattında Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

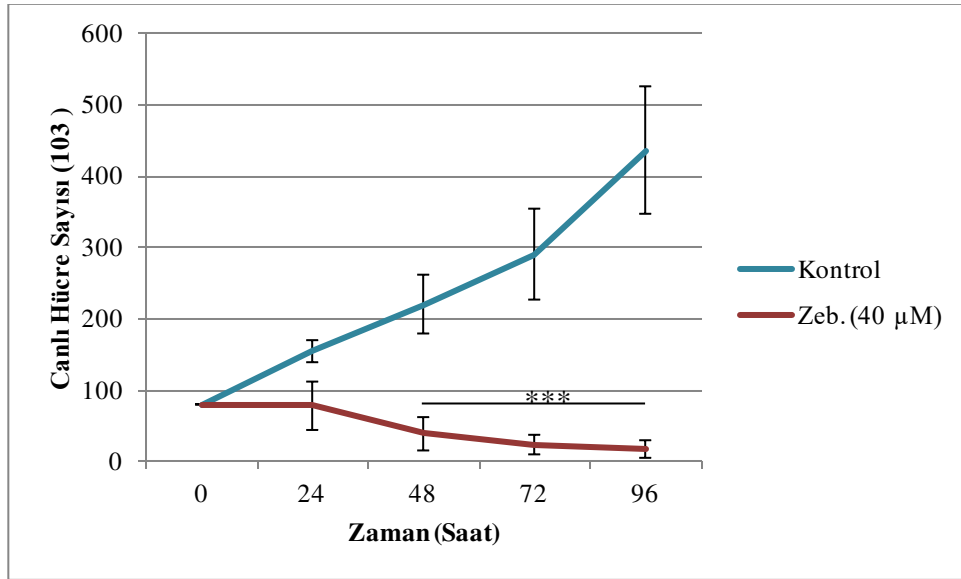
Zebularinin SKBR-3 meme kanseri hücrelerinde doza bağlı hücre canlılığı üzerine etkilerinin incelenebilmesi amacıyla MTT deneyi uygulanmıştır. Bu amaç için SKBR-3 hücrelerine artan konsantrasyonlarda (0-140  $\mu$ M) 24 saat boyunca zebularin uygulaması yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar neticesinde zebularinin artan dozlarıyla birlikte SKBR-3 hücre canlılığının azaldığı gözlenmiştir ve hücrelerinin %50'nin öldüğü değer olan  $IC_{50}$  değeri 40  $\mu$ M olarak belirlenmiştir ve diğer deneylerde hücrelere 40  $\mu$ M uygulanmıştır (Şekil 3.1).



**Şekil 4.1.** Zebularinin farklı dozlarının (0-140  $\mu$ M) SKBR-3 hücre hattında 24 saatteki hücre canlılığı üzerine etkisi (İlaç uygulaması yapılmayan kontrol grubu ile karşılaştırıldığında  $IC_{50}$  değeri 40  $\mu$ M olarak belirlenmiştir. Negatif kontrol olarak ise ilacın çözdürüldüğü DMSO kullanılmıştır).

SKBR-3 hücrelerinde zebularinin zamana bağlı etkilerinin incelenebilmesi için sağkalım deneyi yapılmıştır. MTT deneyi sonucunda belirlenen  $IC_{50}$  değerinde zebularin uygulanan hücrelerin 24, 48, 72 ve 96. saatlerde tripan mavisi ile boyamaları yapılmıştır ve hemositometre yardımıyla hücre sayımları gerçekleştirilmiştir. Yapılan sayımlar sonucunda ölü ve canlı hücre oranları hesaplanmıştır ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 24 saatte zebularinin hücre büyümesini durdurduğu gözlemlenirken,

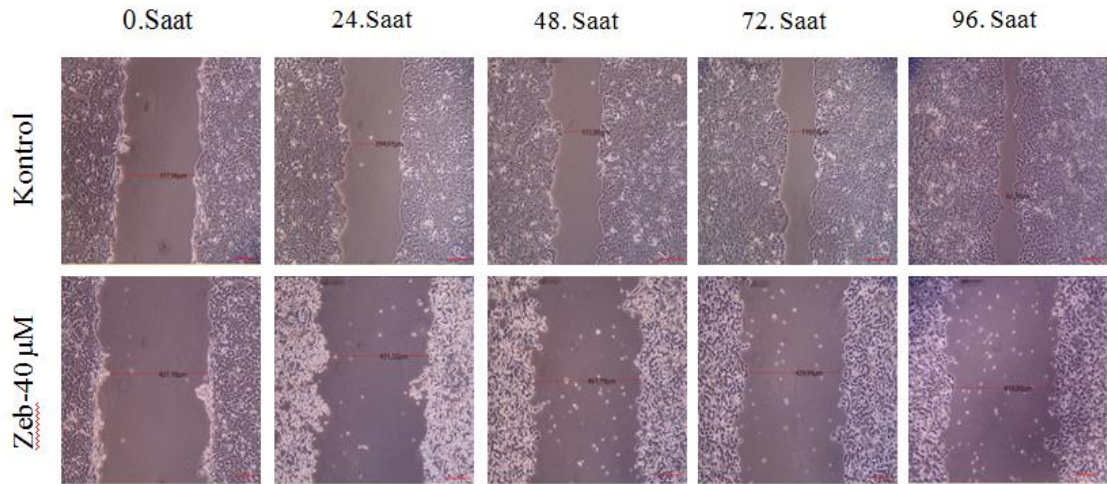
48 saat ve sonrasında hücre canlılığında anlamlı bir şekilde azalma gözlenmektedir (Şekil 3.2) ( $p<0,0001$ ).



**Şekil 4.2.** Zebularinin SKBR-3 hücrelerinde hücre proliferasyonu üzerine etkileri (SKBR-3 hücrelerine 40 µM zebularin uygulaması yapılmıştır ve zamana bağlı (24-96 Saat) etkileri incelenmiştir. 24 saatlik aralıklarla kaldırılan hücreler tripan mavisi ile boyanarak sayımları gerçekleştirilmiştir).

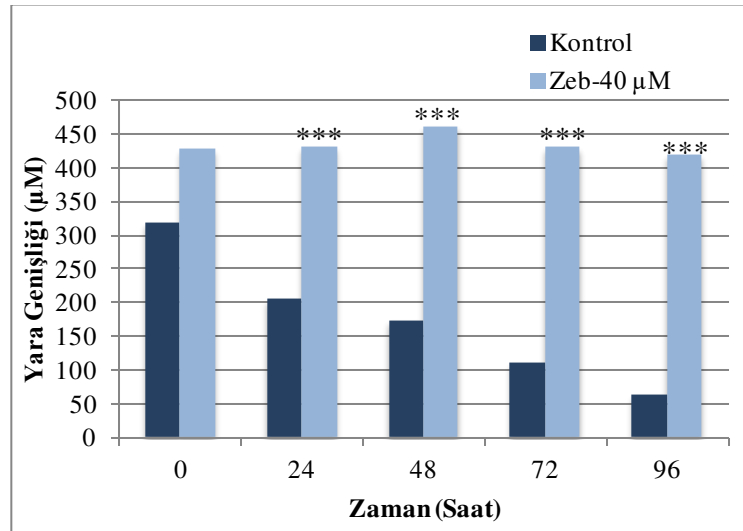
#### 4.2 Zebularinin Hücrelerin Metastazı Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

Zebularinin hücre göçü ve hücre-hücre etkileşimleri üzerine etkilerinin incelenmesi amacıyla yara iyileşmesi deneyi yapılmıştır. Yapışan SKBR-3 hücrelerine yara açılarak zebularin (40 µM) uygulaması sonrasında yara genişliğinde meydana gelen değişiklikler kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Yapılan analizler sonucunda kontrol grubunda günden güne yaranın kapandığı gözlenirken, zebularinin hücre göçünü ve proliferasyonu engellediği gözlenmiştir (Şekil 3.3).



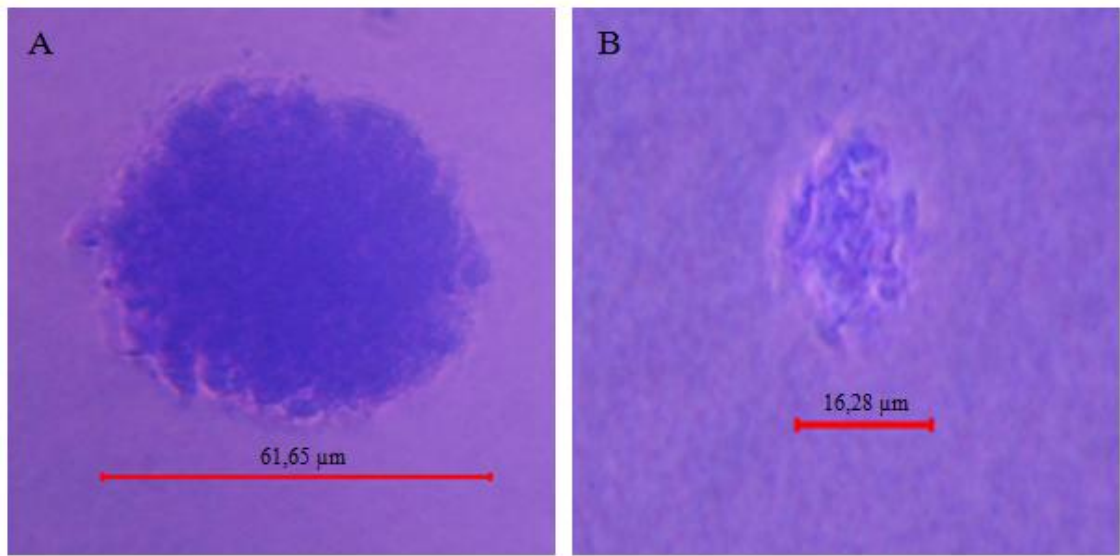
**Şekil 4.3.** Zebularinin hücre göçü ve proliferasyonu üzerine etkileri (*Yara alanı ışık mikroskobu altında incelenmiştir (10X)*).

Yara iyileşmesi deneyinde yara kapanması 24 saatlik periyotluk aralıklarla incelenmiştir. Yara genişlikleri ölçüldüğünde kontrol grubunda 0. saatte 317 µm olan yara boyutunun 96 saat sonunda 62 µm'ye düştüğü gözlenmiştir. Zebularin uygulanan SKBR-3 hücrelerinde ise 0. saatte 427 µm olarak ölçülen yara genişliği 96. saat sonunda 420 µm olarak ölçülmüştür. Bu sonuçlar neticesinde zebularinin yara iyileşmesini engellediği gözlenmektedir ( $p < 0.001$ ) (Şekil 3.4).



**Şekil 4.4.** Yara iyileşmesi deneyi yara genişliği ölçümleri (*Yapılan istatistiksel analizler sonucunda gruplar birbirisi ile karşılaştırıldığında zebularinin proliferasyonu azalttığı ve hücre göçünü engellediği gözlenmiştir ( $p < 0,001$ )*).

Hücrelerin katı bir yüzeyden bağımsız bir şekilde ve birbiri üzerinde büyümezler. Yüzeyden bağımsız bir şekilde büyümeleri için transformasyon geçirirler. Bunu göstermek amacıyla soft-agar koloni oluşum deneyi yapılmıştır. Yapılan deneyde ilaç uygulanmayan kontrol grubunda büyük bir koloni gözlenirken (61,65  $\mu\text{m}$ ), zebularin (40  $\mu\text{M}$ ) uygulanan SKBR-3 hücrelerinin ise koloni çapları küçüldüğü gözlenmektedir (16,28  $\mu\text{m}$ ). Sonuç olarak zebularinin SKBR-3 hücrelerinin yüzeyden bağımsız bir şekilde büyümelerini engellediği tespit edilmiştir. ( $p<0,001$ ) (Şekil 3.5).

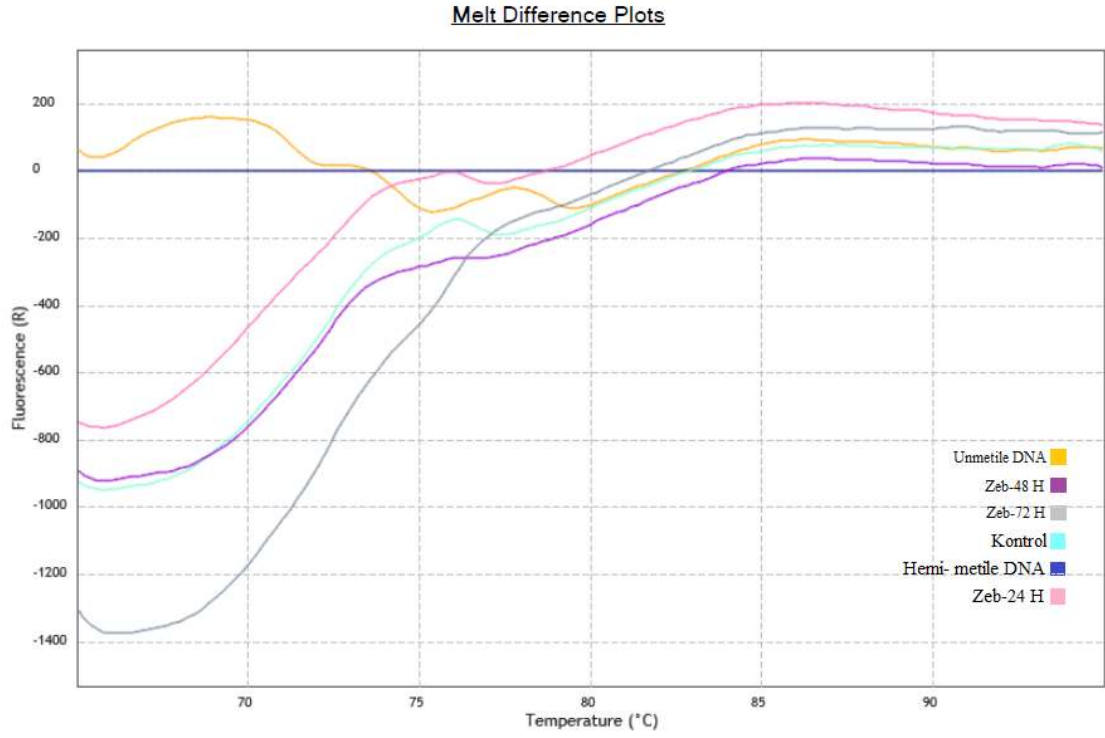


**Şekil 4.5.** Soft-agar koloni oluşum deneyi mikroskop görüntüsü (40X) ((A) İlaç uygulanmayan SKBR-3 hücreleri, (B) Zebularin uygulanan SKBR-3 hücreleri. İstatistiksel analizler sonucunda zebularin SKBR-3 hücrelerinin yüzeyden bağımsız bir şekilde büyümesini engellemektedir ( $p<0,001$ )).

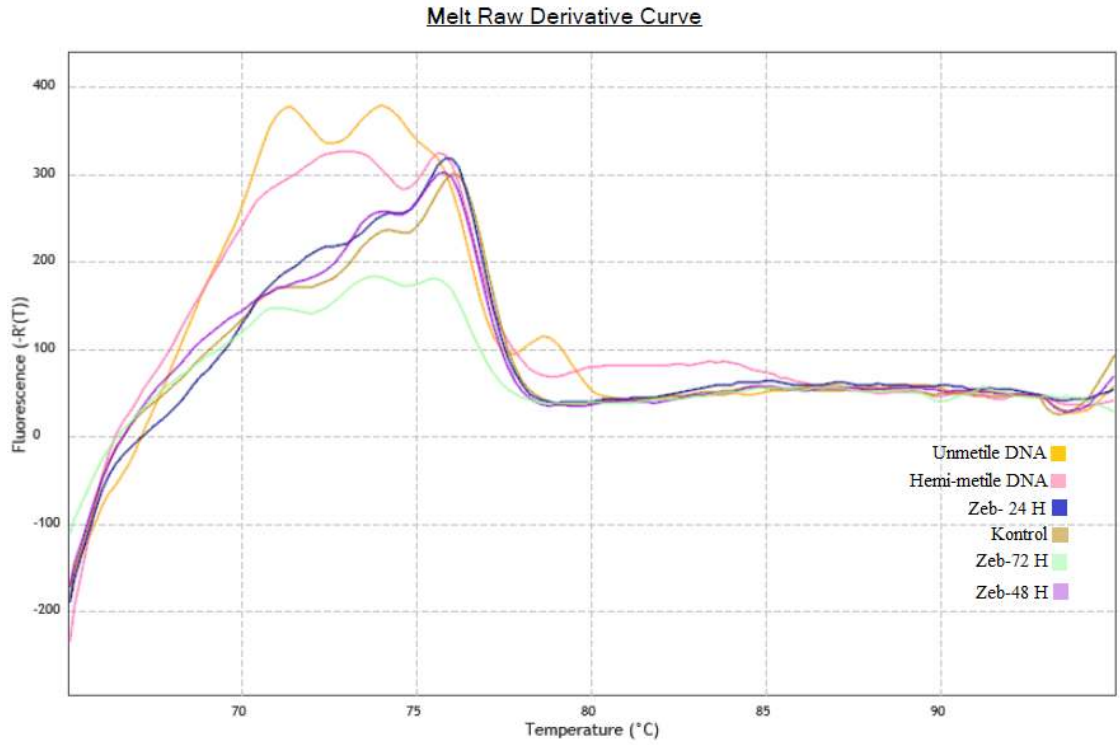
#### 4.3 Zebularinin Zamana Bağlı Olarak SKBR-3 Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkilerinin Gösterilmesi

Zebularinin apoptotik mekanizmada etkili olan kaspazlar üzerine olan etkilerinin araştırılması için metilasyon spesifik HRM analizleri gerçekleştirilmiştir. İzolasyonu yapılan DNA örneklerine PCR işlemi uygulanmadan önce bisülfid dönüşümü yapılmıştır. Sonuçların yorumlanabilmesi için kontrol olarak tamamen unmetile ve hemi-metile DNA örnekleri kullanılmıştır. Yapılan analizler sonucunda kaspaz-3 genindeki metilasyonlar incelendiğinde; ilaç uygulanmayan kontrol grubunun metilasyonunun %50'nin üzerinde olduğu gözlenmektedir. Yirmi dört saatlik ilaç

uygulaması sonrasında kontrol grubuna göre azaldığı saptanırken, %50'nin üzerindedir. Kırk sekizinci saat ve 72. saatte ise tekrardan metilasyonda bir artış meydana gelmektedir.

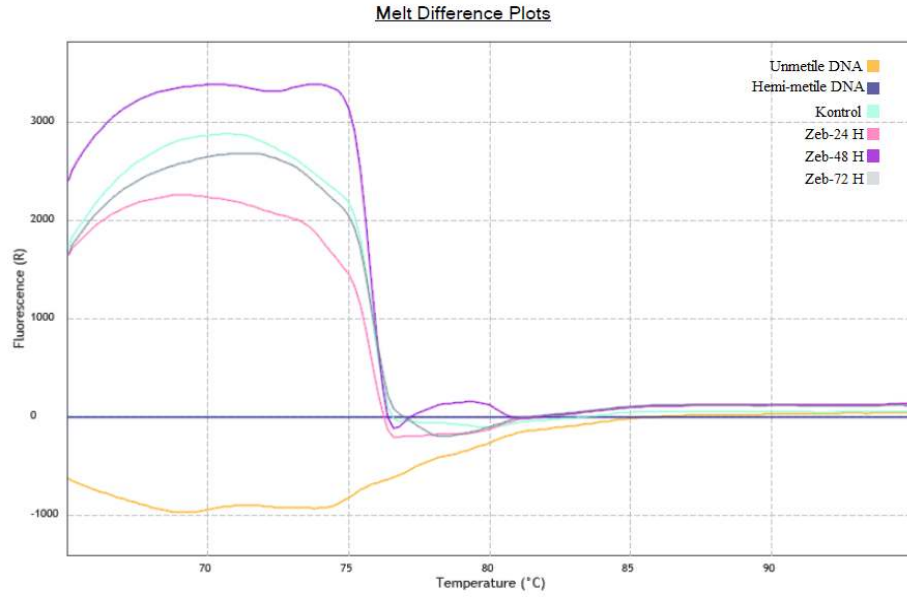


**Şekil 4.6.** Kaspaz-3 genine ait zebularin uygulanan örnekler ve kontrol gruplarının “melt difference plot” görüntüsü.

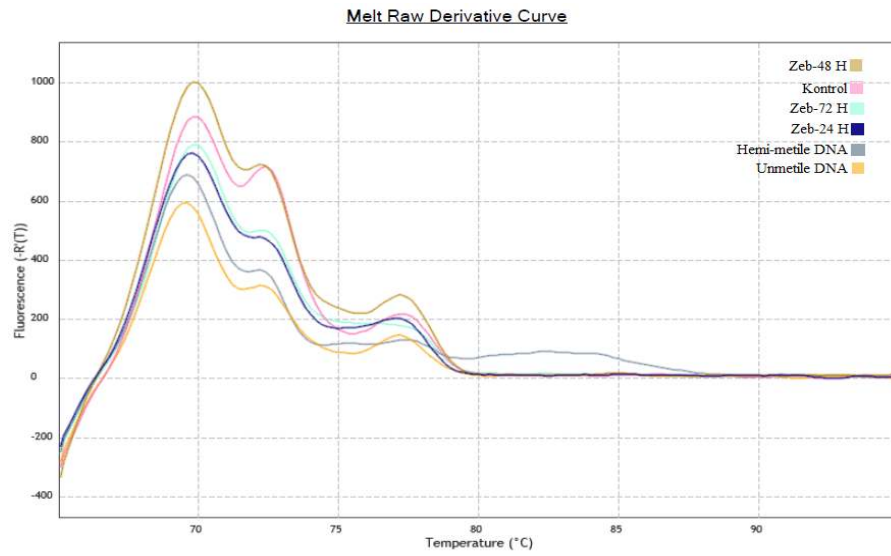


**Şekil 4.7.** Kaspaz-3 genine ait zebularin uygulanan örnekler ve kontrol gruplarının “Melt raw/derivative curve” görüntüsü.

Kaspaz-8 geninde yapılan metilasyon analizleri sonucunda elde edilen veriler incelendiğinde; zebularin uygulanan örnekler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 24 saatlik zebularin uygulaması sonrasında metilasyonun bir miktar düştüğü gözlenirken, 48 saatte bu oran artmakta kontrolden de fazla olmakta, 72 saatte tekrardan bir düşüş meydana gelmektedir. Totalde bakıldığında hiçbir örnekte metilasyon %50’nin altına düşmemektedir.

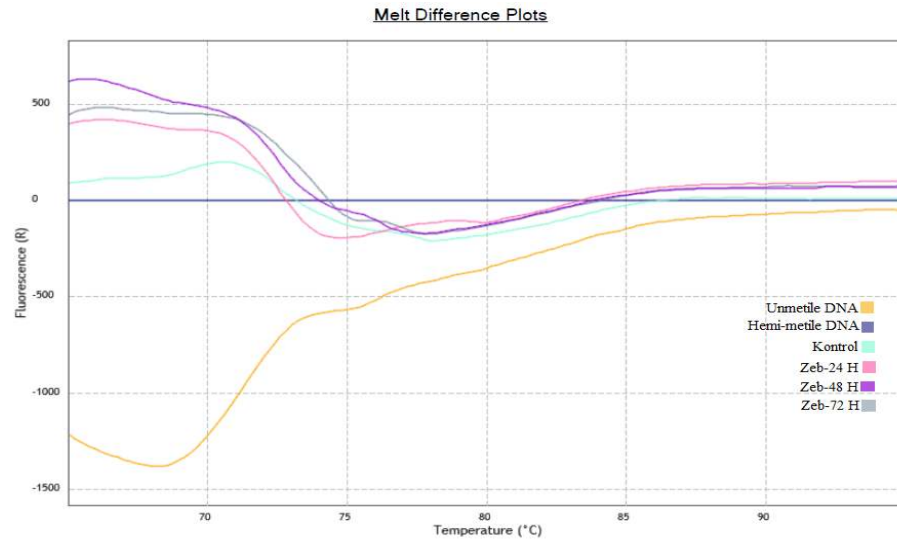


**Şekil 4.8.** Kaspaz-8 genine ait zebularin uygulanan örnekler ve kontrol gruplarının “melt difference plot” görüntüsü.

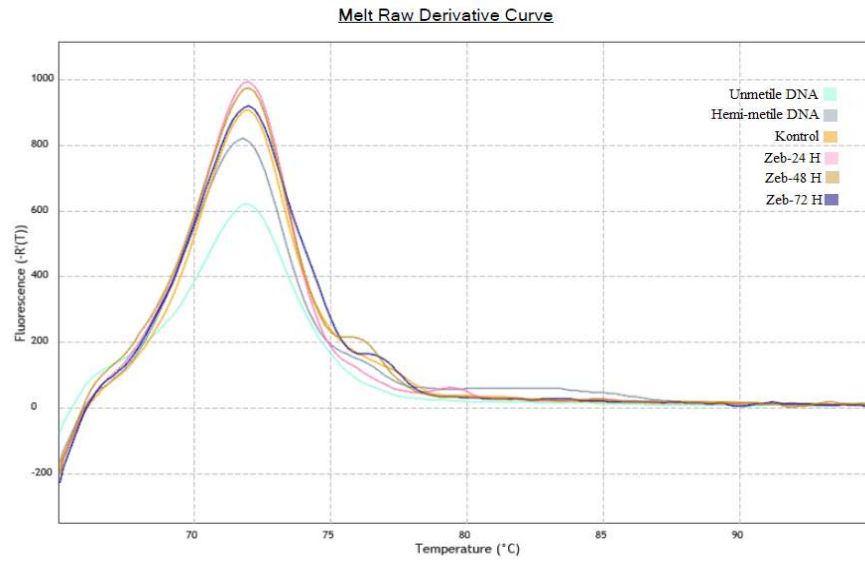


**Şekil 4.9.** Kaspaz-8 genine ait zebularin uygulanan örnekler ve kontrol gruplarının “Melt raw/derivative curve” görüntüsü.

Kaspaz-9 geninde yapılan metilasyon analizleri sonucunda elde edilen veriler incelendiğinde; zebularin uygulanan örnekler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 24 saatlik zebularin uygulaması sonrasında metilasyonda artış gözlenmektedir. Kırk sekiz saatte bu oran artmaya devam etmekte fakat 72 saatte bir düşüş meydana gelmektedir. Totalde bakıldığında hiçbir örnekte metilasyon %50’nin altına düşmemektedir.



**Şekil 4.10.** Kaspaz-9 genine ait zebuların uygulanan örnekler ve kontrol gruplarının “melt difference plot” görüntüsü.



**Şekil 4.11.** Kaspaz-9 genine ait zebuların uygulanan örnekler ve kontrol gruplarının “Melt raw/derivative curve” görüntüsü.

## 5 TARTIŞMA VE SONUÇ

Kansere bağlı ölümlerden sorumlu tümörler arasındaki en yaygın gözlenen kanser olan meme kanseri, kadınlarda görülen tüm kanserlerin yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır (Topuz, vd., 2003). Sağlık bilimlerindeki ilerlemelere, erken tanı yöntemlerinin gelişmesine, toplumun bu konuda duyarlılığının artmasına karşın, meme kanseri yaşamı tehdit etmeye devam etmektedir ve insan yaşamını sonlandırmaktadır (Weber, 1997; Vogel, 2003; Mincey, 2003; Burke, vd., 1997). Bu tehditin azaltılmasında ve kanserden gerçekleşen ölümlerin ortadan kaldırılması için terapötik tedavilerin geliştirilmesinin karsinogenez, kanserli hücre proliferasyonu ve tümör gelişimi gibi etkenler üzerinde önemli rol oynadığı belirlenmiştir.

Kanserde genetik değişikliklerden ziyade genomik DNA'ya metil grubunun eklenmesi gibi kovalent değişiklikler daha fazla meydana gelmektedir (Martens, vd., 2009). Bu değişiklikler de genlerin susturulmasına sağlamakta ve kemoterapide hücrelerin ilaca direnç kazanmasına neden olmaktadır. Son yıllarda kullanılan terapötik ajanlardan bir tanesi de DNA metilasyon mekanizmasında etkili zebularindir ve bu alanda çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Bradbury, 2004; Cheng, vd., 2004; Jonathan, vd., 2004; Yang, vd., 2013). Fakat zebularin ile alakalı meme kanserinde yeterli sayıda bir çalışma mevcut değildir. Bu nedenle literatürde bu konuda bir çalışmaya rastlanmadığı için meme kanseri hücre hattı SKBR3 üzerinde zebularinin etkinliği ile ilgili bir çalışma gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada diğer DNMTi inhibitörlerinin arasından zebularin seçmemizin nedenlerinden bir tanesi zebularinin daha düşük konsantrasyonlarda da etki gösterebilmesidir. Bu avantajından ötürü de düşük toksisiteye sahip bir ilaçtır. Yapılan çalışmalarla da bu desteklenmektedir. Zhou ve ark. (2012)'nin yaptıkları çalışmada, zebularinin insan lens epitelial hücrelerindeki doza ve zamana bağlı etkilerini incelemişlerdir. Hücrelere çeşitli konsantrasyonlarda zebularin uygulaması yapmışlar ve 12-96 saat arası hücre canlılığını belirlemişlerdir. 96 saatteki proliferasyona bakıldığında 10  $\mu$ M'da dahi %25,6 oranında bir hücre baskılanması gözlenmektedir. 50  $\mu$ M'da %52,6 oranında baskılanma ve 100  $\mu$ M'da ise %57,2 oranında bir hücre ölümü gerçekleşmektedir.

Tan ve ark. (2013)'de yaptıkları bir başka çalışmada ise insan gastrik kanser hücrelerinde zebularinin doza ve zamana bağlı olarak hücre büyümesini baskılandığını gözlemlemişlerdir. Üç farklı insan gastrik kanser hücre hattını 10, 50 ve 100  $\mu\text{M}$  zebularin ile 48 saat tedavi etmişlerdir. Tedavi sonrasında, özellikle de BGC823 hücrelerinde büyümenin önemli derecede baskılandığını bulmuşlardır. BGC823 gastrik kanser hücrelerinde 48 saat tedavi sonrasında 50  $\mu\text{M}$  zebularin uygulaması ile %50'nin altında bir hücre canlılığı gözlemlemişlerdir.

Balch ve ark. (2005); Hey, A2780 ve cisplatin-dirençli A2780/CP over kanser hücre hatlarında yaptıkları bir çalışmada da yine çeşitli dozlarda zebularin kullanmışlardır. Zebularinin artan dozlarında (20, 50, 100 ve 200  $\mu\text{M}$ ) 48 saat süreyle hücreleri tedavi etmişlerdir. Üç hücre hattında da 50  $\mu\text{M}$ 'da yaklaşık %40-50 oranında bir büyüme baskılanması gerçekleşirken, 200  $\mu\text{mol/L}$ 'da bu değer %65 üzerine çıkmaktadır. Bu yapılan üç çalışma sonucunda da yaptığımız çalışmaya benzer sonuçlar elde edilmiştir ve aynı şekilde düşük dozlarda zebularin uygulaması sonucunda etkili bir hücre ölümünün gerçekleştiğini göstermişlerdir. Bizim çalışmamızı destekleyici nitelikte çalışmalardır.

Billam ve ark. (2009)'nın MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücre hatları ile yaptıkları bir çalışmada ise, SKBR3 hücrelerinde yaptığımız çalışmadan farklı olarak daha yüksek dozda daha etkili sonuçlar elde edilmiştir. Zebularinin 25-500  $\mu\text{M}$  arasında değişen konsantrasyonlarda 24-96 saat aralığında tedavi sonrasında zamana ve doza bağlı olarak proliferasyonunun baskılanması incelenmiştir. MDA-MB-231 hücrelerinde zebularinin 100  $\mu\text{M}$  değerinde ancak 72. saatlerde yaklaşık %50 oranında bir baskılanma gözlenmektedir. MCF-7 hücrelerinde ise 100  $\mu\text{M}$  değerinde bu oran %50'nin çok daha altındadır. MDA-MB-231 hücreleri ile MCF-7 hücreleri karşılaştırıldığında, MCF-7 hücreleri belirsiz nedenlerle zebularin-aracılı toksisiteye daha az duyarlıdır.

Yapılan bu çalışmada ise, SKBR-3 meme kanseri hücrelerinde zebularinin doza bağlı hücre büyümesi üzerine etkileri incelendiğinde, SKBR-3 hücrelerini zebularinin artan dozlarıyla (0-140  $\mu\text{M}$ ) 24 saatlik süre ile muamele edilmesi sonucunda 40  $\mu\text{M}$  değerinde hücrelerin %50'sinin büyümesinin baskılandığı gösterilmiştir.

Aynı zamanda gerçekleştirilen sağkalım deneyi ile de zebularinin ( $IC_{50}$ : 40  $\mu$ M) zamana bağlı etkileri incelenmiştir. Hücreler 24, 48, 72 ve 96 saatlik sürelerle zebularin ile muamele edildiğinde, hücre canlılığı üzerine etkilerine bakılırsa 48. saatte hücre canlılığı %47.5, 72. saatte %23.75, 96. saatte ise %21.25'e düşmektedir. Yirmi dört saatte zebularinin hücre büyümesini çok fazla baskılamadığı gözlenmektedir (hücre canlılığı %96,25). Bu sonuçlar neticesinde de zebularinin düşük dozlarda da hücre büyümesinin baskılanmasında etkili olduğu söylenebilmektedir. Bu sonuçlara bakıldığında diğer DNMT inhibitörlerinin aksine, zebularinin meme kanseri hücrelerinde daha az toksisiteye sahip olduğu gözlenmiştir.

Kanser hücrelerinin çevredeki dokulara invazyonu ve damar oluşturması tümör metastazında ilk aşamadır. Metastaz ekstraselüler matrikse yapışmalarını ve hücre zarının çıkıntılı hareketi tarafından yönetilen kanser hücrelerinin kemotaktik göçünü gerektirir. İntraviral görüntülemeledeki son gelişmeler ve in vivo invazyon testinin gelişmesi birincil tümörlerde bulunan ekstraselüler matriks mimarisi ve diğer hücre tiplerini içeren mikroçevre unsurları tarafından düzenlenen kanser hücre gücünün nasıl olduğuna dair yeni görüşler sağlamaktadır. Bu sonuçlar in vitro çalışmalardan elde edilen bulgularla karşılaştırıldığında, invazyon ve metastaz sırasında hücre hareketinin ve kemotaktik göçün moleküler mekanizmasının anlaşılmasında yeni bakış açıları sağlamıştır (Yamaguchi, vd., 2005).

Zebularinin hücre göçü üzerine ve hücrelerin metastaz yapma yetenekleri üzerine etkilerine incelenecek olursa, bir çalışmada Hellebreker ve ark. (2006), İnsan umbilikal ven endotel hücreleri (HUVEC)'inde DNMTi 5-aza-2'-deoxycytidine (DAC) ve zebularin ve HDACi trichostatin A (TSA)'nın yara deneyi ile endotelial hücre göçünü değerlendirmişlerdir. 1,000 nmol/L konsantrasyonda DAC uygulandığında hücre göçünde önemli derecede bir değişiklik gözlenmemiştir. Aynı şekilde 500  $\mu$ mol/L konsantrasyonda zebularin uyguladıklarında DAC ile karşılaştırıldığında hücre göçünü baskılamada daha etkin bir sonuç vermektedir. Bu iki kimyasalın aksine, TSA etkili bir şekilde hücre göçünü inhibe etmiştir ( $p<0,05$ ).

Bir başka çalışmada ise Zhou ve ark. (2012), insan lens epitelyal hücrelerinde (LECs) transwell deneyini kullanarak hücre göçünü araştırmışlardır. Zebularine (50 ve

100  $\mu$ M) doza bağımlı olarak LECs hücre göçünü baskılamıştır. Maksimum baskılanma 100  $\mu$ M zebularin uygulamasında gözlenmektedir ( $p<0,01$ ).

Yaptığımız çalışmada da yara iyileşmesi deneyi yardımıyla zebularinin SKBR-3 meme kanseri hücre hattında hücre göçü üzerine etkilerini incelenmiştir. Zebularin (40  $\mu$ M) uygulaması sonrasında 24 saatten 96 saate kadar hücre göçü izlenmiştir ve yapılan gözlemler sonucunda zebularinin önemli derecede hücre göçünü engellediği bulunmuştur ( $p<0,001$ ). Bu sonuçlar da bize zebularinin meme kanseri hücre SKBR3'te hücre göçünü ve hücre-hücre etkileşimlerini baskılayarak hücrelerinin metastaz yapmasını engellediğini göstermektedir.

Ayrıca yapılan bir diğer çalışma olan soft-agar koloni oluşum deneyi ile de zebularinin yüzeyden bağımsız bir şekilde büyüyüp büyümediği araştırılmıştır. Hücre transformatasyonu ile hücreler malignant bir transformatasyon geçirerek tümör oluşabilmektedirler. Bu dönüşüm sayesinde de yüzeyden bağımsız bir şekilde de büyüme gerçekleştirebilirler. Araştırma sonucunda zebularin uygulanan SKBR-3 hücrelerinin hücre transformatasyonunun büyük oranda baskılandığı ve büyümelerinin engellendiği bulunmuştur ( $p<0,001$ ). Sonuç olarak malignant bir dönüşüm ile hücrelerin tümör oluşturmaları bu sayede engellenmektedir.

Zebularinin bir diğer önemli özelliği, diğer DNMT inhibitörlerinin aksine normal fibroblastlardan ziyade, kanserli hücreleri tercih etme eğilimindedir. Bundan dolayı normal fibroblastlarla karşılaştırıldığında, tümör hücre hatlarında daha fazla hücre büyümesi baskılanması ve gen ekspresyonu göstermektedir. Aynı zamanda da öncelikli olarak DNMT1'i engellemekte ve kanser hücrelerinde kanser ilişkili antijen genlerini uyarabilmektedir. Kanser ilişkili antijen genlerini uyardığı için de immünoterapi ile kombine edildiğinde, anti-tümör potansiyele sahip olabileceğini destekleyen bir grup kanserle ve apoptozla ilişkili gen bulunmuştur (Cheng, vd., 2004).

Napso ve Fares (2014), yaptıkları çalışmada SCC-9 ve SCC-25 baş-boyun kanseri hücre hatlarında zebularinin apoptotik etkinliğini araştırmışlardır. Apoptoz tespiti için tunel deneyi ve western blot çalışmalarını kullanmışlardır. İki apoptoz ilişkili gen olan PARP ve kaspaz-3'ün western blot analizleri sonucunda, PARP kesimi ve kaspaz-3'ün aktif formunun seviyelerinin uyarımı gösterilmiştir. Aktif proteinlerin

maksimum seviyelerine 72 saat tedavi sonrasında ulaşılmıştır. Hücre hatları 72 saatlik tedavi sonrasında kaspaz-3 seviyelerindeki artış açısından farklılık göstermektedir. SCC-9 hücrelerinde kontrolden 10 kat daha fazla yüksek seviyede aktif form gözlenirken, SCC-25 hücrelerinde aynı zaman aralığında sadece 4 kat daha fazla bulunmuştur. Tunel deneyi ise hem SCC-9 hem de SCC-25 hücreleri arasında apoptotik hücrelerin varlığını göstermişlerdir.

Magana ve ark. (2012), P53 mutant olan Jurkat, CEM-6 ve MOLT-4 lösemik T hücrelerinde zebularinin apoptotik etkilerini araştırmışlardır. Araştırma sonuçlarına göre her üç hücre hattında da zebularinin kaspaz-bağımlı apoptozu indüklediği gösterirken, normal T lenfositlerin bu demetilleiyici ajanlara yüksek derecede dirençli olduğunu göstermişlerdir. Aynı zamanda, zebularin reaktif oksijen türlerinin oluşumu, transmembran potansiyel kaybı ve bak aktivasyonu gibi mitokondriyal değişimlerin uyarılmasıyla bu hücre hatlarında intrinsik apoptotik yolağı da aktive etmektedir. Elde edilen sonuçlar, zebularin tarafından aktive edilen mitokondriyal apoptotik yolağın temelde DNA hasar oluşumuna bağlı olduğunu desteklemektedir.

Yapılan benzer bir çalışmada da Tan ve ark. (2013), BGC823 gastrik kanser hücreleri ile yaptıkları çalışmada zebularinin apoptotik etkilerini incelemişlerdir. BGC823 hücrelerini 48 saat süreyle zebularin (10-100  $\mu$ M) ile muamele etmişlerdir. Annexin V-FITC/PI deneyi ile elde edilen sonuçlar neticesinde zebularinin doza bağımlı bir şekilde apoptozu tetiklediğini göstermişlerdir.

Nakamura ve ark. (2013), HepG2 ve HeLa hücreleri ile yaptıkları çalışmada, Tunel deneyi ile HepG2 hücrelerinde apoptotik hücre ölümünün varlığını göstermişlerdir. Hücreleri 72 saat boyunca zebularine maruz bıraktıklarında ise apoptotik hücre sayısında artış meydana gelmiştir. Aynı zamanda zebularinin DNMTi olmasından dolayı, HepG2 hücrelerinde DNMT'lerin ekspresyonundaki etkilerini incelemişlerdir. Zebularine tedavisi ile DNMT1, DNMT3a ve DNMT3b'nin önemli derecede doza bağımlı kaybının meydana geldiğini bulmuşlardır. Fakat apoptoz ile metilasyon ilişkisini incelediklerinde kontrol grubu ile zebularin ile tedavi edilen HepG2 hücrelerini ve tedavi edilmeyen HepG2 hücrelerini karşılaştırdıklarında, CpG bölge metilasyonlarının her iki hücre grubunda da hemen hemen aynı oranda olduğunu görmüşlerdir. Bu sonuçlar zebularin tedavisi sonrasında HepG2 hücrelerinde meydana

gelen hücre büyümesinin engellenmesi ve apoptoz uyarımında DNA metilasyonunun çok az bir etkiye sahip olduğunu desteklemektedir.

Aynı çalışmada western blot analizleri ile kaspaz-3/7,-8 ve -9 protein seviyelerine baktıklarında, protein seviyelerinin önemli derecede arttığını gözlemlemişlerdir.

Epigenetik mekanizmalar kanserli dokulardaki epigenetik değişimlerle alakalı birçok çalışma yapılmıştır. Bunlar arasında en çok çalışılanlardan bir tanesi de DNA metilasyonudur ve kanserdeki rollerinin anlaşılması nedeniyle de son yıllarda metilasyon üzerine çalışmalar gerçekleştirilmektedir. Bu çalışmaları incelemek için de birçok yöntem geliştirilmiştir ve bu sayede genlerde meydana gelen metilasyon değişimleri rahatlıkla tanımlanabilmektedir.

Yüksek çözünürlüklü erime (HRM analizi), yüksek oranda spesifite ve duyarlılığa sahip olan bu alanda da kullanılan bir yöntemdir ve bize kantitatif sonuçlar vermektedir. Tekrarlanabilirliği olmasından ötürü de tercih edilen bir yöntemdir. Bu nedenlerle, hassasiyet gerektiren mutasyon taraması, genotipleme, DNA metilasyon analizi gibi çalışmalarda kullanılmaktadır. Metilasyon spesifik HRM ise metilasyon taramalarında da, dizisi bilinen DNA örnekleri ile karşılaştırılarak metilasyon seviyesinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır.

Yapılan diğer bir çalışma da MS-HRM yöntemini kullanarak meme kanserli dokularda TWIST, RAR $\beta$ 2 ve ESR1 genlerinin metilasyon durumlarını incelemiştir. Çalışma sonucunda TWIST geninde, olguların %25'inde hipermetilasyon gözlenirken, %75'inde genin unmetile olduğu bulunmuştur. RAR $\beta$ 2 geninde yapılan analizler sonucunda ise olguların %88,75'inde hipermetilasyon saptamıştır. ESR1 geni promoter metilasyonunda ise olguların %72,5 hipermetilasyon saptanmıştır (Eroğlu, 2011). Çalışma sonucunda elde edilen veriler MS-HRM analizinin spesifite ve duyarlılığının yüksek olduğunu bize göstermektedir.

Bu çalışmada da, MS-HRM deneyleri ile kaspaz-3,-8 ve -9'un CpG bölge metilasyon durumlarını incelediğimizde, Narakuma ve ark. yaptığı çalışmayı destekler nitelikte bu üç gende önemli derecede metilasyon farkına rastlanmamıştır. Elde edilen bulgularda metilasyon değişimleri minimal düzeydedir ve zebularin ile uyarılan apoptoz

mekanizmasında kaspazlar üzerinde metilasyonun etkisinin olmadığını düşündürmektedir.

Sonuç olarak, yapılan araştırmalar neticesinde, literatürde ilk kez zebularinin, SKBR-3 meme kanseri hücrelerinde kanser hücre büyümesini, hücre göçünü ve hücre transforasyonunu büyük oranda baskıladığı gösterilmiştir. Ek olarak, zebularinin kaspazların metilasyonu üzerine olan etkileri literatürde ilk kez araştırılmıştır ve zebularinin uygulanan dozda ve saatlerde kaspazların metilasyon oranlarında bir değişikliğe sebep olmadığı gösterilmiştir. Bu da bize apoptoz mekanizmasında görevli olan kaspaz uyarımının metilasyon aracılığı ile olmadığını göstermektedir. Bu sonuçlar neticesinde zebularinin kemoterapide kullanılabileceğine dair destekleyici sonuçlar elde edilmiştir ve literatürde zebularinin SKBR3 hücreleri üzerine etkilerinin araştırılmasına yönelik yapılan ilk çalışma olması nedeniyle özgün bir nitelik taşımaktadır. Fakat zebularinin etki mekanizmasının daha iyi bir şekilde anlaşılabilmesi için gelecekteki çalışmalarda kaspaz-bağımlı apoptoz mekanizmasının aydınlatılması gerekmektedir.

## KAYNAKÇA

- Andersen, J. B., et al., "An integrated genomic and epigenomic approach predicts therapeutic response to zebularine in human liver cancer.", *Science Translational Medicine*, 2(54): 54-77 (2010).
- Aggarwal, B. B., "Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword.", *Nature Reviews Immunology*, 3 (9): 745-756 (2003).
- Akkaya, Z. Y., and Pervin, D., "Tedavi yaklaşımlarında yeni bir dönem: Kodlamayan RNA'lar ve hastalıklar.", *Marmara Medical Journal*, 26 (1): 05-10 (2013).
- Al-Hajj, M., et al., "Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100 (7): 3983-3988 (2003).
- Arıncı, K., and Elhan, A., "Anatomi. 3. baskı. 1. cilt." *Güneş Kitabevi*, Ankara, (2001).
- Asselin, L., Marie, L., et al., "Gata-3 is an essential regulator of mammary-gland morphogenesis and luminal-cell differentiation.", *Nature Cell Biology*, 9 (2): 201-209 (2007).
- Avendaño, C., and Menendez, J. C., "Medicinal chemistry of anticancer drugs.", *Elsevier*, Spain, 2015.
- Balch, C., et al., "Antimitogenic and chemosensitizing effects of the methylation inhibitor zebularine in ovarian cancer.", *Molecular Cancer Therapeutics*, 4 (10): 1505-1514 (2005).
- Balmain, A., Gray, J., and Ponder, B., "The genetics and genomics of cancer.", *Nature Genetics*, 33: 238-244 (2003).
- Baron, J. A., Vecchia, C. L., and Levi, F., "The antiestrogenic effect of cigarette smoking in women.", *American Journal Of Obstetrics And Gynecology*, 162 (2): 502-514 (1990).

### KAYNAKÇA (devam ediyor)

- Bartsch, H., et al., "Genetic polymorphism of CYP genes, alone or in combination, as a risk modifier of tobacco-related cancers.", *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 9 (1): 3-28 (2000).
- Beral, V., et al., "Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast cancer: Breast cancer and abortion: collaborative reanalysis of data from 53 epidemiological studies, including 83000 women with breast cancer from 16 countries.", *Lancet*, 363 (9414): 1007-1016 (2004).
- Billam, M., Sobolewski, M. D., and Davidson, N. E., "Effects of a novel DNA methyltransferase inhibitor zebularine on human breast cancer cells.", *Breast Cancer Research and Treatment*, 120 (3): 581-592 (2010).
- Bird, A., "DNA methylation patterns and epigenetic memory.", *Genes & Development*, 16 (1): 6-21 (2002).
- Bodur, E., and Demirpençe, E., "Kodlamayan RNA'lar ve gen susturumu.", *Hacettepe Tıp Dergisi*, 41 (8): (2010).
- Booth, B. W., Boulanger, C. A., and Smith, G. H., "Stem cells and the mammary microenvironment.", *Breast Disease*, 29 (1): 57-67 (2007).
- Bora, G., and Yurter, H. E., "Epigenetik hastalıklar ve tedavi yaklaşımları.", *Hacettepe Tıp Dergisi*, 38: 48-54 (2007).
- Bouras, T., et al., "Notch signaling regulates mammary stem cell function and luminal cell-fate commitment.", *Cell stem cell*, 3 (4): 429-441 (2008).
- Brabletz, T., et al., "Migrating cancer stem cells—an integrated concept of malignant tumour progression.", *Nature Reviews Cancer*, 5 (9): 744-749 (2005).
- Bradbury, J., "Zebularine: a candidate for epigenetic cancer therapy.", *Drug Discovery Today*, 9 (21): 906-907 (2004).
- Bradbury, A. R., and Olopade, O. I., "Genetic susceptibility to breast cancer.", *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 8 (3): 255-267 (2007).

### KAYNAKÇA (devam ediyor)

- Briskin, C., and Duss, S., "Stem cells and the stem cell niche in the breast: an integrated hormonal and developmental perspective.", *Stem Cell Reviews*, 3 (2): 147-156 (2007).
- Brown, L. F., et al., "Expression and distribution of osteopontin in human tissues: widespread association with luminal epithelial surfaces.", *Molecular Biology Of The Cell*, 3 (10): 1169-1180 (1992).
- Burke, W., et al., "Recommendations for follow-up care of individuals with an inherited predisposition to cancer: II. BRCA1 and BRCA2.", *Jama*, 277 (12): 997-1003 (1997).
- Capuco, A. V., and Akers, R. M., "The origin and evolution of lactation.", *Journal Of Biology*, 8 (4): 1 (2009).
- Cattoretti, G., et al., "P53 expression in breast cancer.", *International Journal of Cancer*, 41 (2): 178-183 (1988).
- Chakraborty, G., Jain, S., and Kundu, G. C., "Osteopontin promotes vascular endothelial growth factor-dependent breast tumor growth and angiogenesis via autocrine and paracrine mechanisms.", *Cancer Research*, 68 (1): 152-161 (2008).
- Charafe-Jauffret, E., et al., "Cancer stem cells in breast: current opinion and future challenges.", *Pathobiology*, 75 (2): 75-84 (2008).
- Cheng, J. C., et al., "Inhibition of DNA methylation and reactivation of silenced genes by zebularine.", *Journal of the National Cancer Institute*, 95 (5): 399-409 (2003).
- Cheng, J. C., et al., "Continuous zebularine treatment effectively sustains demethylation in human bladder cancer cells.", *Molecular and Cellular Biology*, 24 (3): 1270-1278 (2004).
- Cheng, J. C., et al., "Preferential response of cancer cells to zebularine.", *Cancer Cell*, 6 (2): 151-158 (2004).

### KAYNAKÇA (devam ediyor)

- Chinnaiyan, A. M., et al., "FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis.", *Cell*, 81 (4): 505-512 (1995).
- Clavel-Chapelon, F., and Gerber, M., "Reproductive factors and breast cancer risk. Do they differ according to age at diagnosis?.", *Breast Cancer Research And Treatment*, 72 (2): 107-115 (2002).
- Constância, M., et al., "Imprinting mechanisms.", *Genome Research*, 8 (9): 881-900 (1998).
- Cooper, M.G., Hausman, E.R., "The cell a molecular approach.", 3rd ed. USA, 150 (4): (2004).
- Cory, S., Huang, D. C.S., and Adams, J. M., "The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis.", *Oncogene*, 22 (53): 8590-8607 (2003).
- Cotterchio, M., et al., "Hormonal factors and the risk of breast cancer according to estrogen-and progesterone-receptor subgroup.", *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 12 (10): 1053-1060 (2003).
- Cristofanilli, M., et al., "Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer.", *Journal of Clinical Oncology*, 23 (7): 1420-1430 (2005).
- Çelik, S., "Kronik Myeloid Lösemili Hastalarda DAP Kinaz Geninin Metilasyon analizleri.", Yüksek Lisans Tezi, *Ankara Üniversitesi Sağlık Biyoteknoloji Enstitüsü*, Ankara, (2007).
- Delgado, S., et al., "Initiation of DNA replication at CpG islands in mammalian chromosomes.", *The EMBO Journal*, 17 (8): 2426-2435 (1998).
- Donepudi, M., et al., "Insights into the regulatory mechanism for caspase-8 activation.", *Molecular Cell*, 11 (2): 543-549 (2003).

### KAYNAKÇA (devam ediyor)

- Dorgan, J. F., et al., "Serum sex hormone levels are related to breast cancer risk in postmenopausal women.", *Environmental Health Perspectives*, 105 (3): 583 (1997).
- Egger, G., et al., "Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy.", *Nature*, 429 (6990): 457-463 (2004).
- Earnshaw, W. C., Martins L. M., and Kaufmann S. H., "Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis.", *Annual Review of Biochemistry*, 68 (1): 383-424 (1999).
- Easton, D. F., "Familial risks of breast cancer.", *Breast Cancer Research*, 4 (5): 1 (2002).
- Enari, M., et al., "A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD.", *Nature*, 391 (6662): 43-50 (1998).
- Eroğlu, O., "Meme Kanseri Hastalarında TWIST, RAR $\beta$ 2 ve ESR1 Genlerinin Metilasyon Durumlarının Metilasyon Spesifik HRM (MS-HRM) Yöntemiyle İncelenmesi", Doktora tezi, *Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Eskişehir, (2011).
- Esteller, M., and Herman, J. G., "Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours.", *The Journal of Pathology*, 196 (1): 1-7 (2002).
- Fauque, P., "Ovulation induction and epigenetic anomalies.", *Fertility and Sterility*, 99 (3): 616-623 (2013).
- Ferlay, J., Pisani, P., and Parkin, D. M., "Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. IARC Cancer Base (2002 estimates)." (2004).
- Fillmore, C. M., et al., "Estrogen expands breast cancer stem-like cells through paracrine FGF/Tbx3 signaling.", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107 (50): 21737-21742 (2010).

### KAYNAKÇA (devam ediyor)

- Fischer, U., Jänicke, R. U., and Schulze-Osthoff, K., "Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates.", *Cell Death & Differentiation*, 10 (1): 76-100 (2003).
- Fogh, J., Fogh, J. M., and Orfeo, T., "One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice.", *Journal of the National Cancer Institute*, 59 (1): 221-226 (1977).
- Foulkes, W. D., "BRCA1 functions as a breast stem cell regulator.", *Journal of Medical Genetics*, 41 (1): 1-5 (2004).
- Frasch, S. C., et al., "Regulation of phospholipid scramblase activity during apoptosis and cell activation by protein kinase C $\delta$ .", *Journal of Biological Chemistry*, 275 (30): 23065-23073 (2000).
- Fuks, F., et al., "DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity.", *Nature Genetics*, 24 (1): 88-91 (2000).
- Galm, O., Herman, J. G., and Baylin, S. B., "The fundamental role of epigenetics in hematopoietic malignancies.", *Blood Reviews*, 20 (1): 1-13 (2006).
- Gardiner-Garden, M., and Frommer, M., "CpG islands in vertebrate genomes.", *Journal of Molecular Biology*, 196 (2): 261-282 (1987).
- Ghoussaini, M., and Pharoah, P. DP., "Polygenic susceptibility to breast cancer: current state-of-the-art.", *Future Oncology*, 5 (5): 689-701 (2009).
- Gnyszka, A., Jastrzębski, Z., and Flis S., "DNA methyltransferase inhibitors and their emerging role in epigenetic therapy of cancer.", *Anticancer Research*, 33 (8): 2989-2996 (2013).
- Gogvadze, V., Orrenius, S., and Zhivotovsky, B., "Mitochondria as targets for chemotherapy.", *Apoptosis*, 14 (4): 624-640 (2009).

### KAYNAKÇA (devam ediyor)

- Goldstein, J. C., et al., "The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant.", *Nature Cell Biology*, 2 (3): 156-162 (2000).
- Grant, P. A., "A tale of histone modifications.", *Genome Biology*, 2 (4): 1 (2001).
- Green, D. R., and Kroemer G., "The pathophysiology of mitochondrial cell death.", *Science*, 305 (5684): 626-629 (2004).
- Güneş, S., Kulaç T., "Epigenetiğin spermatogenezdeki rolü", *Turkish Journal of Urology*, 39: 181-187 (2013).
- Güzelgül, F., and Aksoy, K., "Kodlanmayan RNA'ların İşlevi ve Tıpta Kullanım Alanları.", *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 18 (3): (2009).
- Gyorki, D. E., et al., "Resident macrophages influence stem cell activity in the mammary gland.", *Breast Cancer Research*, 11 (4): 1 (2009).
- Hellebrekers, D. MEI, et al., "Angiostatic activity of DNA methyltransferase inhibitors.", *Molecular Cancer Therapeutics*, 5 (2): 467-475 (2006).
- Hemmati, H. D., et al., "Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors.", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100 (25): 15178-15183 (2003).
- Henderson, B. E., Ross R. K., and Bernstein L., "Estrogens as a cause of human cancer: the Richard and Hinda Rosenthal Foundation award lecture.", *Cancer Research*, 48 (2): 246-253 (1988).
- Herman, J. G., and Baylin S. B., "Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation.", *New England Journal of Medicine*, 349 (21): 2042-2054 (2003).
- Hery, C., et al., "Changes in breast cancer incidence and mortality in middle-aged and elderly women in 28 countries with Caucasian majority populations.", *Annals of Oncology*, 19 (5): 1009-1018 (2008).

### KAYNAKÇA (devam ediyor)

- Hiyama, E., and Hiyama, K., "Telomere and telomerase in stem cells.", *British Journal of Cancer*, 96 (7): 1020-1024 (2007).
- Hopper, J. L., and Carlin, J. B., "Familial aggregation of a disease consequent upon correlation between relatives in a risk factor measured on a continuous scale.", *American Journal of Epidemiology*, 136 (9): 1138-1147 (1992).
- Howard, B. A., and Gusterson, B. A., "Human breast development.", *Journal Of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 5 (2): 119-137 (2000).
- Hsu, H., et al., "TRADD–TRAF2 and TRADD–FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways.", *Cell*, 84 (2): 299-308 (1996).
- Huo, D., et al., "Population differences in breast cancer: survey in indigenous African women reveals over-representation of triple-negative breast cancer.", *Journal of Clinical Oncology*, 27 (27): 4515-4521 (2009).
- İzmirli, M., "Epigenetik Mekanizmalar ve Kanser Tedavisinde Epigenetik Yaklaşımlar.", *Van Tıp Dergisi*, 20(1): 48-51 (2013).
- Jaenisch, R., and Bird, A., "Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals.", *Nature Genetics*, 33: 245-254 (2003).
- Jemal, A., et al., "Cancer statistics, 2010.", *CA: A Cancer Journal For Clinicians*, 60 (5): 277-300 (2010).
- Kang, Y., et al., "A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone.", *Cancer Cell*, 3 (6): 537-549 (2003).
- Kaufmann, S. H., "The intrinsic pathway of apoptosis.", *Apoptosis, Senescence, and Cancer*, Humana Press, 3-30 (2007).
- Keen, J. C., and Davidson N. E., "The biology of breast carcinoma.", *Cancer*, 97 (3): 825-833 (2003).

### KAYNAKÇA (devam ediyor)

- Kelsey, J. L., Gammon, M. D., and John E. M., "Reproductive factors and breast cancer.", *Epidemiologic Reviews*, 15 (1): 36 (1993).
- Key, T. J., Verkasalo, P. K., and Banks, E., "Epidemiology of breast cancer.", *The Lancet Oncology*, 2 (3): 133-140 (2001).
- Kim, M. Y., et al., "Tumor self-seeding by circulating cancer cells.", *Cell*, 139 (7): 1315-1326 (2009).
- Kleinerman, R. A., "Cancer risks following diagnostic and therapeutic radiation exposure in children.", *Pediatric Radiology*, 36 (2): 121-125 (2006).
- Klung, S.W., Cummings, R.M., "Genetik kavramlar (concepts of genetics).", Öner C., *Palme Yayıncılık*, Ankara, 434-42 (2002).
- Kopans, D., "Anatomy, histology, physiology, and pathology.", Breast Imaging 2nd ed., *PA: Lippincott-Raven*, Philadelphia, 3-24 (1998).
- Kuhns, J. G., and Ackermann, D. M., "Microscopic anatomy of the breast." Cancer of the breast 4th edition, *WB Saunders*, Philadelphia, London, 16-21 (1995).
- Kürtüncü, M., and Eraksoy, M., "Multipl Skleroz: Epigenetik Bir Hastalık Olabilir mi?.", *Archives of Neuropsychiatry*, 45: 15-20 (2008).
- Lakhani, S. R., et al., "The pathology of familial breast cancer: predictive value of immunohistochemical markers estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2, and P53 in patients with mutations in BRCA1 and BRCA2.", *Journal of Clinical Oncology*, 20 (9): 2310-2318 (2002).
- Land, C. E., and McGregor, D. H., "Breast cancer incidence among atomic bomb survivors: implications for radiobiologic risk at low doses.", *Journal of the National Cancer Institute*, 62 (1): 17-21 (1979).
- Lane, D. P., "Cancer. P53, guardian of the genome.", *Nature*, 358: 15-16 (1992).

### KAYNAKÇA (devam ediyor)

- Lavrik, I. N., Golks, A., and Krammer, P. H., "Caspases: pharmacological manipulation of cell death.", *The Journal of Clinical Investigation*, 115 (10): 2665-2672 (2005).
- Letai, A., et al., "Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics.", *Cancer Cell*, 2 (3): 183-192 (2002).
- Lindeman, G. J., and Visvader, J. E., "Insights into the cell of origin in breast cancer and breast cancer stem cells.", *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology*, 6 (2): 89-97 (2010).
- Little, M. P., et al., "Relative risks of radiation-associated cancer: comparison of second cancer in therapeutically irradiated populations with the Japanese atomic bomb survivors.", *Radiation and Environmental Biophysics*, 38 (4): 267-283 (1999).
- Li, H., et al., "Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis.", *Cell*, 94 (4): 491-501 (1998).
- Liu, S., et al., "BRCA1 regulates human mammary stem/progenitor cell fate.", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105 (5): 1680-1685 (2008).
- Lizuka, M., and Smith, M. M., "Functional consequences of histone modifications.", *Current Opinion In Genetics & Development*, 13 (2): 154-160 (2003).
- Lønning, P. E., "Molecular basis for therapy resistance.", *Molecular Oncology*, 4 (3): 284-300 (2010).
- Lübbert, M., "DNA methylation inhibitors in the treatment of leukemias, myelodysplastic syndromes and hemoglobinopathies: clinical results and possible mechanisms of action.", *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 249: 135-164 (1999).

### KAYNAKÇA (devam ediyor)

- Lyko, F., and Brown, R., "DNA methyltransferase inhibitors and the development of epigenetic cancer therapies.", *Journal of the National Cancer Institute*, 97 (20): 1498-1506 (2005).
- Mavaddat, N., et al., "Genetic susceptibility to breast cancer.", *Molecular Oncology*, 4 (3): 174-191 (2010).
- Millikan, R. C., et al., "Epidemiology of basal-like breast cancer.", *Breast Cancer Research and Treatment*, 109 (1): 123-139 (2008).
- Mincey, B. A., "Genetics and the management of women at high risk for breast cancer.", *The Oncologist*, 8 (5): 466-473 (2003).
- Mitsiades, C. S., and Anderson, K. C., "Epigenetic modulation in hematologic malignancies: challenges and progress.", *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 7 (8): 1 (2009).
- Miyamoto, K., and Ushijima, T., "Diagnostic and therapeutic applications of epigenetics.", *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 35 (6): 293-301 (2005).
- Molofsky, A. V., Pardal, R., and Morrison, S. J., "Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal.", *Current Opinion in Cell Biology*, 16 (6): 700-707 (2004).
- Momparler, R. L., and Bovenzi, V., "DNA methylation and cancer.", *Journal of Cellular Physiology*, 183 (2): 145-154 (2000).
- Moolgavkar, S. H., Stevens, R. G., and Lee, J. AH., "Effect of age on incidence of breast cancer in females.", *Journal of the National Cancer Institute*, 62 (3): 493-501 (1979).
- Moraes, R. C., et al., "Constitutive activation of smoothened (SMO) in mammary glands of transgenic mice leads to increased proliferation, altered differentiation and ductal dysplasia.", *Development*, 134 (6): 1231-1242 (2007).
- Morrison, B. J., et al., "Breast cancer stem cells: implications for therapy of breast cancer.", *Breast Cancer Research*, 10 (4): 1 (2008).

### KAYNAKÇA (devam ediyor)

- Müller, A., et al., "Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis." *Nature*, 410.6824: 50-56 (2001).
- Nakamura, K., et al., "DNA methyltransferase inhibitor zebularine inhibits human hepatic carcinoma cells proliferation and induces apoptosis.", *PloS One*, 8 (1): e54036 (2013).
- Nakamura, K., et al., "DNA methyltransferase inhibitor zebularine induces human cholangiocarcinoma cell death through alteration of DNA methylation status.", *PloS One*, 10 (3): e0120545 (2015).
- Napso, T., and Fares, F., "Zebularine induces prolonged apoptosis effects via the caspase-3/PARP pathway in head and neck cancer cells.", *International Journal of Oncology*, 44 (6): 1971-1979 (2014).
- Nielsen, T. O., et al., "Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma.", *Clinical Cancer Research*, 10 (16): 5367-5374 (2004).
- O'Connell, P., et al., "Analysis of loss of heterozygosity in 399 premalignant breast lesions at 15 genetic loci.", *Journal of the National Cancer Institute*, 90 (9): 697-703 (1998).
- Okano, M., Xie, S., and Li, E., "Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases.", *Nature Genetics*, 19 (3): 219-220 (1998).
- Okano, M., et al., "DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development.", *Cell*, 99. (3): 247-257 (1999).
- Orcan, S., "Epigenetik ve Epigenomik.", *Hacettepe Üniversitesi*, 2006
- Osborne, C., Wilson, P., and Tripathy, D., "Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications.", *The Oncologist*, 9 (4): 361-377 (2004).

### KAYNAKÇA (devam ediyor)

- Pantel, K., and Alix-Panabières, C., "Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives.", *Trends in Molecular Medicine*, 16 (9): 398-406 (2010).
- Parkin, D. M., et al., "Cancer in five continents, Vols. I to VIII. IARC CancerBase No. 7.", (2005).
- Peedicayil, J., "Epigenetic therapy-a new development in pharmacology.", *Indian Journal of Medical Research*, 123 (1): 17 (2006).
- Perou, C. M., et al., "Molecular portraits of human breast tumours.", *Nature*, 406 (6797): 747-752 (2000).
- Perou, C. M., "Molecular stratification of triple-negative breast cancers.", *The Oncologist*, 16 (1): 61-70 (2011).
- Petersen, O. W., and Polyak, K., "Stem cells in the human breast.", *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2 (5): a003160 (2010).
- Pinilla, S. M. R., et al., "Caveolin-1 expression is associated with a basal-like phenotype in sporadic and hereditary breast cancer.", *Breast Cancer Research and Treatment*, 99 (1): 85-90 (2006).
- Pompeia, C., et al., "Microarray analysis of epigenetic silencing of gene expression in the KAS-6/1 multiple myeloma cell line.", *Cancer Research*, 64 (10): 3465-3473 (2004).
- Prat, A., et al., "Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer.", *Breast Cancer Research*, 12 (5): 1 (2010).
- Rahman, N., et al., "PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene.", *Nature Genetics*, 39 (2): 165-167 (2007).
- Rappa, .a, and Lorico, A., "Phenotypic characterization of mammosphere-forming cells from the human MA-11 breast carcinoma cell line.", *Experimental Cell Research*, 316 (9): 1576-1586.4 (2010).

### KAYNAKÇA (devam ediyor)

- Reya, T., and Clevers, H., "Wnt signalling in stem cells and cancer.", *Nature*, 434 (7035): 843-850 (2005).
- Ripperger, T., et al., "Breast cancer susceptibility: current knowledge and implications for genetic counselling.", *European Journal of Human Genetics*, 17 (6): 722-731 (2009).
- Rosen, E. M., et al., "BRCA1 gene in breast cancer.", *Journal of Cellular Physiology*, 196 (1): 19-41 (2003).
- Rountree, M. R., Bachman, K. E., and Baylin S. B., "DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci.", *Nature Genetics*, 25 (3): 269-277 (2000).
- Ruiz-Magaña, M. J., et al., "The DNA methyltransferase inhibitors zebularine and decitabine induce mitochondria-mediated apoptosis and DNA damage in P53 mutant leukemic T cells.", *International Journal of Cancer*, 130 (5): 1195-1207 (2012).
- Russo, J., et al., "Developmental, cellular, and molecular basis of human breast cancer.", *Journal of the National Cancer Institute Monographs*, 27: 17-37 (2000).
- Salvesen, G. S., and Duckett, C. S., "IAP proteins: blocking the road to death's door.", *Nature reviews Molecular Cell Biology*, 3 (6): 401-410 (2002).
- Scott, F. L., et al., "XIAP inhibits caspase-3 and-7 using two binding sites: evolutionarily conserved mechanism of IAPs.", *The EMBO Journal*, 24 (3): 645-655 (2005).
- Seltzer, V., "The breast: embryology, development, and anatomy.", *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 37 (4): 879-880 (1994).
- Shiozaki, E. N., et al., "Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9.", *Molecular Cell*, 11 (2): 519-527 (2003).

### KAYNAKÇA (devam ediyor)

- Sidransky, D., "Emerging molecular markers of cancer.", *Nature Reviews Cancer*, 2 (3): 210-219 (2002).
- Skolnick, M. H., "A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1.", *Science*, 266 (5172): 66-71 (1994).
- Smith-Warner, S. A., et al., "Alcohol and breast cancer in women: a pooled analysis of cohort studies.", *Jama*, 279 (7): 535-540 (1998).
- Strahl, B. D., and Allis, C. D., "The language of covalent histone modifications.", *Nature*, 403 (6765): 41-45 (2000).
- Subik, K., et al., "The expression patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by immunohistochemical analysis in breast cancer cell lines.", *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*, 4: 35 (2010).
- Tan, W., et al., "The DNA methyltransferase inhibitor zebularine induces mitochondria-mediated apoptosis in gastric cancer cells in vitro and in vivo.", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 430 (1): 250-255 (2013).
- Tavassoli, F. A., and Devilee, P., *Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs*, Iarc, (2003).
- Teulière, J., et al., "Targeted activation of  $\beta$ -catenin signaling in basal mammary epithelial cells affects mammary development and leads to hyperplasia.", *Development*, 132 (2): 267-277 (2005).
- Topuz, E., Aydın, A., and Dinçer, M., "Meme kanseri.", *Nobel Tıp Kitabevi*, (2003).
- Torre, L. A., et al., "Global cancer statistics, 2012." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 65 (2): 87-108 (2015).
- Tseng, P., et al., "Overcoming trastuzumab resistance in HER2-overexpressing breast cancer cells by using a novel celecoxib-derived phosphoinositide-dependent kinase-1 inhibitor.", *Molecular Pharmacology*, 70 (5): 1534-1541 (2006).

### KAYNAKÇA (devam ediyor)

- Turnbull, C., and Rahman N., "Genetic predisposition to breast cancer: past, present, and future.", *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 9: 321-345 (2008).
- Visvader, J. E., "Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis.", *Genes & Development*, 23 (22): 2563-2577 (2009).
- Vogel, V. G., "Assessing risk of breast cancer: Tools for evaluating a patient's 5-year and lifetime probabilities.", *Postgraduate Medicine*, 105 (6): 49-58 (1999).
- Vucic, D., Dixit, V. M., and Wertz, I. E., "Ubiquitylation in apoptosis: a post-translational modification at the edge of life and death.", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12 (7): 439-452 (2011).
- Wai, P. Y., and Kuo, P. C., "The role of osteopontin in tumor metastasis.", *Journal of Surgical Research*, 121 (2): 228-241 (2004).
- Wajant, H., Pfizenmaier, K., and Scheurich, P., "Tumor necrosis factor signaling.", *Cell Death & Differentiation*, 10 (1): 45-65 (2003).
- Wang, K., et al., "BID: a novel BH3 domain-only death agonist.", *Genes & Development*, 10 (22): 2859-2869 (1996).
- Wang, L., Du, F., and Wang, X., "TNF- $\alpha$  induces two distinct caspase-8 activation pathways.", *Cell*, 133 (4): 693-703 (2008).
- Wartenberg, D., et al., "Passive smoking exposure and female breast cancer mortality.", *Journal of the National Cancer Institute*, 92 (20): 1666-1673 (2000).
- Weber, E. S., "Questions & answers about breast cancer diagnosis.", *AJN The American Journal of Nursing*, 97 (10): 34-38 (1997).
- Wilson, N. S., Dixit, V., and Ashkenazi, A., "Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks.", *Nature Immunology*, 10 (4): 348-355 (2009).

### KAYNAKÇA (devam ediyor)

- Woodward, W. A., et al., "WNT/ $\beta$ -catenin mediates radiation resistance of mouse mammary progenitor cells.", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104 (2): 618-623 (2007).
- Wooster, R., et al, "Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13.", *Science*, 265 (5181): 2088-2090 (1994).
- Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators, "Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial.", *Jama*, 288 (3): 321-333 (2002).
- Wu, G. S., et al., "KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible P53-regulated death receptor gene.", *Nature Genetics*, 17 (2): 141 (1997).
- Wyllie, A. H., Kerr, JF R., and Currie, A. R., "Cell death: the significance of apoptosis.", *International Review of Cytology*, 68: 251-306 (1980).
- Xu, X., et al., "Conditional mutation of Brca1 in mammary epithelial cells results in blunted ductal morphogenesis and tumour formation.", *Nature Genetics*, 22 (1): 37-43 (1999).
- Yamaguchi, H., Wyckoff, J., and Condeelis, J., "Cell migration in tumors.", *Current Opinion in Cell Biology*, 17 (5): 559-564 (2005).
- Yang, PM., et al., "Zebularine inhibits tumorigenesis and stemness of colorectal cancer via P53-dependent endoplasmic reticulum stress.", *Scientific Reports*, 3: 3219 (2013).
- Yoo, C. B., and Jones, P. A., "Epigenetic therapy of cancer: past, present and future.", *Nature Reviews Drug Discovery*, 5 (1): 37-50 (2006).
- Youle, R. J., "Cellular demolition and the rules of engagement.", *Science*, 315 (5813): 776-777 (2007).

**KAYNAKÇA (devam ediyor)**

- Zakhari, S., "Alcohol metabolism and epigenetics changes.", *Alcohol Research*, 35 (1): 6-16 (2013).
- Zamzami, N., and Kroemer, G., "The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens.", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2 (1): 67-71 (2001).
- Zhou, P., Lu, Y., and Sun, XH., "Effects of a novel DNA methyltransferase inhibitor Zebularine on human lens epithelial cells.", *Molecular Vision*, 18: 22-28 (2012).

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler:

Adı Soyadı : Merve ÇELEN  
Doğum Yeri ve Tarihi : Ç ifter köyü/ 26.07.1992



### Eğitim Durumu:

Lisans Eğitimi : Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi (2014)

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

Bilimsel Faaliyetleri :

- XIV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 27-30 Ekim 2015, Fethiye-Ölüdeniz
- Bioinformatics Methods for Cancer Biology Theoretical and Practical Workshop, 9-10 Eylül 2015, İzmir
- Uygulamalı Yoğunlaştırılmış Biyoinformatik Kursu, 30 Haziran-3 Temmuz 2015, Kayseri
- 3. Uluslararası Gen-Arel Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kongresi, 24-25 Nisan 2015, İstanbul
- 1. Uluslararası Adli Biyoloji ve Genetik Kongresi, 27-28 Kasım 2014, Ankara
- The International IX. İÜGEN Molecular Biology and Genetics Students' Winter School, 24-26 Şubat 2012, İstanbul

### İş Deneyimi:

Stajlar : Bursa Şevket Yılmaz Eğitim ve Araştırma Hastanesi (2012)

Projeler :

Projeyi Destekleyen Kurum: Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Araştırma Fonu

Proje No: 2014-02-BĞL.04.02

Proje Yürütücüsü: Yrd. Doç. Dr. Onur EROĞLU

Proje Başlığı: “Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE)’in, DNA Metil Transferaz İnhibitörü (DNMTi) Zebularin İle Tetiklenen Apoptotik Mekanizmadaki Epigenetik Değişimlerin MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hatlarında Araştırılması”

Projeledeki Görev: Araştırmacı

Proje Süresi ve Yılı: 24 ay, 2014-2016

Çalıştığı Kurumlar :-

**İletişim:**

Adres : İsmetpaşa Mahallesi, Mazharbey Sokak, No:8/11  
Merkez/BİLECİK

Tel : 05452330008

E- posta Adresi : merve.chelen @gmail.com

**Akademik Çalışmaları:**

- EROĞLU O., GÜVENİR ÇELİK E., ÇELEN M., KARABIÇİCİ M., “**MCF7 Meme Kanseri Hücre Hattında Kafeik Asit Fenetil Ester Ve DNA Metil Transferaz İnhibitörü Zebularin’in Epigenetik Süreçteki Kontrolünün Apoptoz İle İlişkisi**” XIV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi 27-30 Ekim 2015, Fethiye/Muğla
- EROĞLU O., GÜVENİR ÇELİK E., ÇELEN M., KARABIÇİCİ M., “**Kafeik Asit Fenetil Ester Ve DNA Metil Transferaz İnhibitörü Zebularin’in MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattındaki Sitotoksik Etkisinin Ve Epigenetik Süreçteki Kontrolünün İncelenmesi**” XIV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi 27-30 Ekim 2015 Fethiye/Muğla
- KARABIÇİCİ M., GÜVENİR ÇELİK E., ÇELEN M., EROĞLU O., “**Meme Kanseri Hastalarında NF-kappa-B inhibitor alpha Gen Polimorfizmlerinin BfaI Enzim Kesimi ile Araştırılması**” 22.Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi 10-14 Ağustos 2015, Ankara (sözlü ve poster sunum)
- AYDEMİR M., NALBANT M. A., ÇELEN M., GÜVENİR ÇELİK E., EROĞLU O., “**Nükleer Faktör Kappa B-1 Geninde 94. Pozisyonda ATTG ve 561. Pozisyonda A/C Polimorfizminin Meme Kanseri Hastalarında Araştırılması**” 22.Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi 10-14 Ağustos 2015, Ankara
- EROĞLU O., ÇELEN M., KOYU Y., “**Investigation of the Promoter Hypermethylation of BMP6 and RINT1 Genes in Breast Carcinomas**”

Genom Varyasyonları: Uygulama ve Veri Analizleri Sempozyumu 15-16 Eylül 2014, İstanbul

- ZİLELİ R., EROĞLU O., ÖZKAMÇI H., DİKER G., NALBANT M. A., KAYA H., ÇELEN M., VATANSEVER Ş., **“Türk Bilek Güreşçilerde ACTN3 Geninin Sportif Performans Açısından Değerlendirilmesi.”** 14. Uluslar Arası Spor Bilimleri Kongresi, 1-4 Kasım 2016, Belek-Antalya
- EROĞLU O., GÜVENİR ÇELİK E., ÇELEN M., KAYA H., NALBANT M. A.,<sup>a</sup> KORKUT E., NIZAM N., **“Investigation of Cytotoxic Effect of Doxorubicin, 5-Fluorouracil, Propranolol and Triple Combined Treatment in MCF-7 Breast Cancer Cell Line.”** 4. International BAU Drug Design Congress, 13-15 October 2016, İstanbul-Turkey
- EROĞLU O., GÜVENİR ÇELİK E., KAYA H., ÇELEN M., NALBANT M.A., GÜNDEN G., USAÇ G., **“Mda-Mb-231 Meme Kanseri Hücre Hattında Kafeik Asit Fenil Ester (Cape), Zebularin(Zeb) Ve Cape-Zeb Kombininin Apoptoz Yolağında Görevli Kaspaz-9 Ve Kaspaz-7 Ekpresyonları Üzerine Etkisinin İncelenmesi”** 12. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, 5-9 Ekim 2016, Çeşme-Antalya
- EROĞLU O., GÜVENİR E., KARAÇOBAN E., ÇELEN M. **“Analysis of Epigenetic Changes in Apoptotic Mechanism Triggerred by Caffaic Acid Phenethyl Ester (CAPE) and DNA Methyl Transferase İnhibitor (DNMTi) Zebularine in MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Line”** European Human Genetics Conference, 21-24 May 2016, Barcelona-Spain
- EROĞLU O., ÇELEN M., GÜVENİR E. **“Analysis of The Effect of Zebularine on Caspase-3, Caspase-8 and Caspase-9 in SKBR3 Breast Cancer Cell Line”** European Human Genetics Conference, 21-24 May 2016, Barcelona-Spain