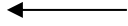
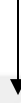


Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**VALPROİK ASİT İLE İNDÜKLENEN PANC-1
HÜCRELERİNDE WNT SİNYAL YOLAĞININ
İNCELENMESİ**

FATMA YELİZ EKİCİ

**DANIŞMAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ FEYZA NUR TUNCER KILINÇ**

**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI**

İSTANBUL-2019

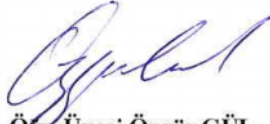
TEZ ONAYI

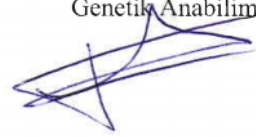
İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı, Genetik Programında Yüksek Lisans öğrencisi Fatma Yeliz EKİCİ tarafından Dr. Öğr. Üyesi Feyza Nur TUNCER KILINÇ'ın danışmanlığında hazırlanan “**Valproik Asit ile İndüklenen PANC-1 Hücrelerinde Wnt Sinyal Yolağının İncelenmesi**” başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 01.07.2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.


Doç. Dr. Ayşe Evrim BAYRAK
 İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
 Genetik Anabilim Dalı


Doç. Dr. Umut Can KÜÇÜKSEZER
 İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
 İmmünoloji Anabilim Dalı


Doç. Dr. Zeynep DOĞUSAN
 İst. Yeni Yüzyıl Üniversitesi Tıp Fak.
 Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı


Dr. Öğr. Üyesi Özgür GÜL
 İstanbul Bilgi Üniversitesi
 Genetik ve Biyomühendislik


Dr. Öğr. Üyesi Feyza Nur TUNCER KILINÇ
 İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
 Genetik Anabilim Dalı

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Fatma Yeliz EKİCİ



İTHAF

Bana olan inançları hiç tükenmeyen sevgili çekirdek aileme ithafen.



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim sırasında ve tez çalışmalarım boyunca bana değerli fikirleri ile yol gösteren ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Feyza Nur Tuncer Kılınç'a,

Tez çalışmalarına katkıda bulunan ve yapıcı fikirleri ile beni yönlendiren değerli hocalarım Sayın Doç. Dr. Umut Can Küçüksezer, Sayın Doç. Dr. Sema Bilgiç Gazioglu ve Sayın Doç. Dr. Zeynep Doğusan'a,

Tezimi bitirme aşamasında iken başımın sıkıştığı en kritik anda yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Sayın Doç. Dr. Evrim Bayrak'a

Deneyisel süreçte bana sabırla flow sitometri öğretene, her daim güler yüzü ve pozitif kişiliği ile yanımda olan Abdullah Yılmaz'a,

İhtiyacım olan her an derdimi dinleyen, varlıklarından mutluluk duyduğum sevgili arkadaşlarım Meryem Sema Ayaz, Ayşe Engin, Tuğçe Sudutan ve Gizem Kına'ya,

Aramıza en son katılmasına rağmen sanki ilk günden beri yanımızdaymış gibi sıcak davranan, özellikle tez yazım sürecine geçtiğimde beni yazmaya teşvik eden laboratuvar arkadaşım Hazal Banu Çelebioğlu'na

Yüksek lisans eğitimim boyunca laboratuvar ortamındaki pozitif havayı sağlayan ismini sayamadığım tüm arkadaşlarıma,

Tanıştığımız günden beri tükenmeyen sevgisi ve sabrıyla yanımda olan, hayatımın olmazsa olmazı, yol arkadaşım Baran Karakoç'a

Doğduğum günden beri yeri geldiğinde arkadaşlık yeri geldiğinde annelik yapan sevgili teyzem Tevhide Keskin'e

Bana her konuda her an yanımda olarak sonsuz desteğini esirgemeyen, huzur dolu bir çalışma ortamı sağlayan ve akademik hayatımın ilk gününden beri beni önemli adımlar atmam konusunda cesaretlendiren en değerli varlığım ailem, sevgili annem Ayşe Ekici ve babam Mustafa Ekici'ye,

en içten dileklerle teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDP-2019-32763

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	X
ÖZET	Xİİ
ABSTRACT.....	Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Pankreas	2
2.2. Pankreas kanseri.....	2
2.3. Apoptoz.....	4
2.4. Hücre döngüsü ve Kanser ilişkisi	8
2.5. Histon Deasetilazlar (HDACs)	10
2.6. WNT Sinyal Yolağı	11
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	15
3.1. Gereç	15
3.1.1. Kullanılan hücre hattı.....	15
3.1.2. Kullanılan kimyasallar	15
3.1.3. Kullanılan kitler	16
3.1.4. Kullanılan cihazlar	16
3.1.5. Kullanılan elektronik veritabanları ve bilgisayar programları.....	17
3.2. Yöntem.....	18
3.2.1. Hücre Kültürü Aşamaları	18
3.2.1.1. Donmuş PANC-1 Hücre Hattının Çözündürülmesi ve Çoğaltılması.....	18
3.2.1.2. Uygulanacak Etkin VPA Dozunun Belirlenmesi İçin Proliferasyon Ölçümü	19

3.2.1.3. Proliferasyon Ölçümlerinin Analizleri	23
3.2.1.4. Apoptoz Ölçümlerinin Gerçekleştirilmesi	23
3.2.2. Wnt Sinyal Yolağı Genlerinin Anlatım Düzeylerinin İncelenmesi	25
3.2.2.1. RNA İzolasyonu.....	25
3.2.2.2. RNA Konsantrasyonlarının Ölçülmesi	26
3.2.2.3. Primer Tasarımı.....	26
3.2.2.4. cDNA Sentezi, Kontrolü ve Primerlerin Optimizasyonu İçin Polimeraz Zincir Reaksiyonu	27
3.2.2.5. SYBR Green I ile Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu	28
3.2.2.6. Hidroliz Prob Kullanımı ile Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu	28
3.2.3. İstatistiksel analiz.....	29
4. BULGULAR.....	31
4.1. Akan Hücre Ölçer Cihazı ile Ölçümleri.....	31
4.1.1. Proliferasyon Ölçümü ve Analizleri	31
4.1.2. Apoptoz Ölçümü ve Analizleri	38
4.2. kRT-PZR'de Gen Anlatım Düzeylerinin Hesaplanması.....	40
5. TARTIŞMA	44
KAYNAKLAR	48
HAM VERİLER	57
FORMLAR	58
ETİK KURUL KARARI	59
PATENT HAKKI İZNİ	60
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	61
ÖZGEÇMİŞ	63

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: HDAC Enzimleri	10
Tablo 3-1: Kullanılan kimyasallar	15
Tablo 3-2: Kullanılan kitler	16
Tablo 3-3: Kullanılan Cihazlar	16
Tablo 3-4: Kullanılan elektronik veritabanları	17
Tablo 3-5: Kullanılan bilgisayar programları	18
Tablo 3-6: PANC-1 hücre kültüründe kullanılan besi yeri	18
Tablo 3-7: 1. Proliferasyon Deneyi Düzenegi (24 kuyucuklu plate)	21
Tablo 3-8: Solüsyon Hazırlığı	24
Tablo 3-9: Primer Dizileri	27
Tablo 3-10: SensiFAST cDNA Synthesis Kit protokolü	27
Tablo 3-11: SensiFAST SYBR No-ROX Kit Protokolü	28
Tablo 3-12: TaqMan Gene Expression Assays Protokolü	29
Tablo 3-13: $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu	29
Tablo 4-1: Proliferasyon Ölçümlerinin Sonucu Bölünme Oranları	32
Tablo 4-3: Gen Anlatımlarının $2^{-\Delta\Delta CT}$ Yöntemi ile Analizi	42
Tablo 4-4: Tukey Testi ile kRT-PZR Sonuçlarının Anlamlılık Değerlerinin Hesaplanması	43

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1 - GLOBOCAN 2018 Pankreas kanseri Verileri	3
Şekil 2-2 - Apoptoz yolakları	7
Şekil 2-3 - Hücre Döngüsü	8
Şekil 2-4 - Wnt/ β -katenin sinyal yolağı	12
Şekil 2-5 - Wnt/PCP Sinyal Yolağı ve Wnt/ Ca^{++} Sinyal Yolağı	14
Şekil 4-1 - 2. Proliferasyon Deneylerinin Histogram Görüntüsü	31
Şekil 4-2 - 3. Proliferasyon Deneyi Sonuçları	33
Şekil 4-3 - 4. Proliferasyon Deneyi Sonuçları	34
Şekil 4-4 - 5. Proliferasyon Deneyi Sonuçları	35
Şekil 4-5 – 2,5 mM’lık VPA Uygulamasının 24, 48, 72 ve 96. Saatlerdeki Ölçümleri	36
Şekil 4-6 - Tüm VPA Dozlarının 48. Saat ölçümleri	37
Şekil 4-7 - 4. Proliferasyon Deneyi ile Eş Zamanlı Gerçekleştirilen Apoptoz Ölçümü	39
Şekil 4-8 - SYBR Green I Erime Eğrisi Analizi	40
Şekil 4-9 - SYBR Green I Agaroz Jel Görüntüsü	40
Şekil 4-10 - Wnt sinyal yolağı genlerindeki anlatım düzeyi farklılıkları	41

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ATCC	<i>The American Type Culture Collection</i> (Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu)
ATF2	<i>Activating Transcription Factor 2</i> (Aktif Transkripsiyon Faktörü 2)
BrdU	<i>Bromodeoksiüridin</i> (Bromodeoksiüridin)
CAMKII	<i>Ca⁺⁺-Calmodulin Dependent Kinase II I</i> (Ca ⁺⁺ -Kalmodulin Bağımlı Kinaz)
CDK	<i>Siklin Bağımlı Kinazlar</i> (Cyclin Dependent Kinase)
CFSE	<i>Karboksifluoresein Süksinimidil Ester</i> (Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester)
ct	<i>Threshold Cycle</i> (Eşik Değeri)
DAAM1	<i>Dvl Associated Activator Of Morphogenesis 1</i> (Dvl İle İlişkili Morfogenez 1 Aktivatörü)
DAG	<i>1,2-Diacylglycerol</i> (Diasilgliserol)
DISC	<i>Death Inducing Signaling Complex</i> (Ölüme Neden Olan Sinyal Kompleksi)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	<i>Dimethyl Sulfoxide</i> (Dimetik Sülfoksit)
Dvl	<i>Disheveled</i>
FADD	<i>Fas-Associated Death Domain Protein</i> (FAS-İlişkili Ölüm Alanı Protein)
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i> (Floresein İzotiyosiyanat)
Fzds	<i>Frizzled Receptors</i> (Frizzled Reseptörleri)
GLOBOCAN	<i>Global Cancer Observatory</i>
HAT	<i>Histon Asetil-Transferazlar</i> (Histone Acetyltransferase)
HDACi	<i>Histon Deasetilaz İnhibitörleri</i> (Histone Deacetylase İnhibitors)
IC ₅₀	<i>Half Maximal Inhibitory Concentration</i>
IP3	<i>Inositol 1,4,5-Triphosphate</i> (Inositol 1,4,5-Trisfosfat)
kRT-PZR	<i>Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction</i> (Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
LEF	<i>Lymphoid Enhancer Factor</i> (Lenfoid Arttırıcı Faktör)
MMTV	<i>Mouse Mammary Tumour Virus</i> (Fare Meme Tümörü Virüsü)
MOMP	<i>Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization</i> (Mitokondriyal Dış Membran Geçirgenliği)
MTT	<i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide</i>
NCBI	<i>National Center For Biotechnology Information</i>
NFAT	<i>Nuclear Factor Of Activated T-Cells</i> (Aktif T- Hücrelerinin Nükleer Faktörü)
NLK	<i>Nemo Like Kinase</i> (Nemo Benzeri Kinaz)
ns	<i>Not Significant</i>
OD	<i>Optical Density</i>
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCP	<i>Planar Cell Polarity Pathway</i> (Wnt/Planar Hücre Polaritesi Yolağı)
PDAK	<i>Pankreas Duktal Adenokarsinoma</i> (Pancreatic Ductal Adenocarcinoma)
Pen/Strep	<i>Penicillin Streptomycin</i>
PI	<i>Propidium Iodide</i> (Propidium İyodür)

PIP2	<i>Phosphatidyl Inositol 4,5 Biphosphate</i> (Fosfatidil Inositol 4,5 Bifosfat)
Rb	<i>Retinoblastoma</i>
SEER 9	<i>United States Surveillance, Epidemiology, And End Results Program</i>
SMAC	<i>Second Mitochondria-Derived Activator Of Caspases</i> (İkincil Mitokondri Türevli Aktivatör Kaspaz)
TAE	<i>Tris-Acetate-Edta</i>
TCF	<i>T-Cell Factor</i> (T Hücre Faktörü)
TLE	<i>Transducing-Like Enhancer Protein</i> (Transdüktif Benzeri Geliştirici Protein)
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> (Tümör Nekroz Faktörü)
TSA	<i>Trikostatin A</i>
VPA	<i>Valproic Acid</i> (Valproik Asit)
Wg	<i>Wingless</i>
XIAP	<i>X-Linked Inhibitor Of Apoptosis Protein</i> (X'e Bağlı Apoptoz Protein İnhibitörü)

Semboller

°C	Santigrad derece
bç	Baz Çifti
Ca	Kalsiyum
dk	Dakika
g/rcf	Relative Centrifugal Force
L	Litre
Mg	Magnezyum
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimol
nm	Nanometre
rpm	Revolutions Per Minute
sn	Saniye
µL	Mikrolitre

ÖZET

Ekici FY. Valproik asit ile indüklenen PANC-1 hücrelerinde Wnt sinyal yolağının incelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans. İstanbul. 2019.

Pankreas duktal adenokarsinoma (PDAK), tüm dünyada 5 yıllık sağ kalım oranı %8'in altında gözlemlenen en agresif kanser türlerinden biri olarak tanımlanmaktadır. Hastalığın çoğu bireyde sergilediği agresif tümör davranışı ile konvansiyonel tedaviye direnç göstermesi ve erken tanıya uyumlu belirteçlerden yoksun olması, güncel etkin tedavi yaklaşımlarını uygun hastalarda cerrahi müdahale ile kısıtlamaktadır. Bu nedenle, hastalığın tedavisinde yeni stratejilerin geliştirilmesine yönelik çalışmalar, tüm dünyada önem kazanmıştır. Bu doğrultuda yapılan çalışmalar, duktal pankreas kanser modellemeleri aşamasında PANC-1 hücrelerini kullanmıştır ve bu hücrelerde VPA'nın apoptozu indüklediğini göstermiştir.

Çalışmamızda, PANC-1 hücrelerine uygulanan VPA'nın, hücre proliferasyonunu %50 baskıladığı konsantrasyonu gösteren IC₅₀ değerinin CFSE boyama yöntemi ile hesaplanmıştır. Bunu takiben Annexin V/PI boyası ile yapılan apoptoz ölçümü ile bulunan IC₅₀ değeri desteklenmiştir. Daha sonra, IC₅₀ değeri olarak tespit edilen VPA dozuna maruz kalmış PANC-1 hücrelerindeki Wnt/Beta katenin sinyal yolağı ana komponentlerinden olan *LEF1*, *AXIN1*, *CCND1* ve *CTNNB1* genlerinin anlatım düzeyleri kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (kRT-PZR) metodu kullanılarak ve 2^{-ΔΔCT} analiz yöntemi incelenmiştir.

48. saatte elde edilen proliferasyon analizleri sonucunda IC₅₀ değeri, 2,5 mM olarak hesaplanmıştır. Apoptoz ölçümleri sonucunda, 2,5 mM'lık VPA dozuna maruz kalan hücrelerde erken apoptozun belirginleştiği tespit edilerek, bulunan IC₅₀ değerinin etkinliği onaylanmıştır. VPA uygulanması sonucu *AXIN1* ve *CTNNB1* genlerinin anlatım düzeylerinde anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. *CCND1* ve *LEF1* genlerinde ise anlatım düzeylerinin anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlenmiştir.

Bu bulgular ile ilk kez IC₅₀ değerinin, CFSE ve annexin V/PI metotlarının birleştirilmesiyle hesaplanabileceği gösterilmiştir. Ayrıca VPA'nın kanser hücrelerindeki bölünmeyi durdurarak apoptozu indüklediği teyit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler : PANC-1, apoptoz, Wnt sinyal yolağı, CFSE, kRT-PZR

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDP-2019-32763

ABSTRACT

Ekici FY. Investigation of Wnt signaling pathway in valproic acid-induced PANC-1 cells. İstanbul University, Institute of Health Science, Aziz Sancar Institute of Experimental Medicine, Department of Genetics, Msc Thesis. İstanbul. 2019.

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is defined as one of the most aggressive cancers worldwide with a 5-year survival rate of less than 8%. The facts that the disease is resistant to conventional treatment with aggressive tumor behavior in most individuals and the lack of markers compatible with early diagnosis, limit current effective treatment approaches to surgical intervention in suitable patients. Therefore, development of new strategies for the treatment of the disease has gained importance all over the world. Accordingly, studies have used PANC-1 cells in the ductal pancreatic cancer modeling stage and have shown that VPA induces apoptosis in these cells.

In our study, IC_{50} value that shows the concentration of VPA that inhibits cell proliferation by 50%, is calculated using CFSE staining method. This IC_{50} value is supported by the apoptosis measurement made by Annexin V/PI staining. Afterwards, PANC-1 cells were exposed to the determined IC_{50} dose of VPA, and the expression levels of *LEF1*, *AXIN1*, *CCND1* and *CTNNB1* genes, as the main components of Wnt/Beta-catenin signal pathway, were determined by qRT-PCR method, utilizing $2^{-\Delta\Delta CT}$ analysis.

IC_{50} value is calculated as 2,5 mM after proliferation analyses made in 48th hour. Determination of early apoptosis in cells exposed to 2,5 mM VPA in the apoptosis analyses confirmed the calculated IC_{50} value. No significant difference has been observed in the expression levels of *AXIN1* and *CTNNB1* genes after the application of VPA. A significant increase was observed in the expression levels of *CCND1* ve *LEF1* genes.

These findings have shown for the first time that IC_{50} value can be calculated by combining the CFSE and annexin V/PI methods. In addition, VPA has been confirmed to inhibit division of cancer cells and induce apoptosis.

Key Words: PANC-1, apoptosis, Wnt signaling pathway, CFSE, qRT-PCR

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. TDP-2019-32763

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Pankreatik kanserlerin yaklaşık %95'ini ekzokrin tümörler oluşturmaktadır [1]. Pankreas duktal adenokarsinoma (PDAK), ekzokrin bölgede ortaya çıkan agresif bir kanser türüdür [1]. Bu kanser türüne yakalanan hastalar için tüm dünyada 5 yıllık sağ kalım oranı %8'in altındadır [2]. Pankreas kanseri tanısı olan hastalar için en etkili tedavi yöntemi cerrahi rejeksiyondur [3]. Ancak erken tanıya uygun belirteçlerin olmaması nedeniyle hastalar çoğu zaman lokal olarak ilerlemiş olan metastatik tümörlere sahiplerdir [3]. Bu durum tanı almış hastaların yalnızca %20'sine cerrahi rejeksiyon uygulanabilmesine neden olmaktadır [3]. Bu nedenle, hastalığın tedavisinde yeni stratejilerin geliştirilmesine yönelik çalışmalar, tüm dünyada önem kazanmıştır.

Çeşitli *in vitro* çalışmalar, bir histon deasetilaz inhibitörü (HDACi) olan valproik asitin (VPA) çeşitli tümör tiplerinde; tümör büyümesini, anjiyogenezini ve metastazını baskıladığı, kanser hücrelerini apoptoza yönlendirdiği bildirilmiştir [4-6]. Buna paralel olarak, VPA'nın Wnt, PI3K/AKT ve Notch sinyal yolağı gibi farklı yollar üzerinden kanser karşıtı etki gösterdiği de bilinmektedir; ancak buna rağmen henüz moleküler mekanizmaları aydınlatılamamıştır [7-10]. VPA'nın anti-kanser etkisi; rahim ağzı, kolon, meme, tiroid kanseri, lösemi gibi pek çok farklı kanser tipinde araştırılmıştır [11-15]. Diğer ilaçlara göre daha az toksik yan etkiye sahip olması nedeniyle birçok kanser önleyici sitotoksik terapötik ajan ile kombinasyon halinde ideal bir adjuvan ajan olarak kullanılmaktadır [11, 12, 16, 17]. Ancak VPA'nın tek başına gösterdiği etki halen birçok kanser tipinde anlaşılmış değildir.

Bu nedenle tezimizin amacı, en agresif kanser türlerinden biri olan pankreas kanserine alternatif ya da tamamlayıcı tedavi geliştirilmesine yönelik VPA uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisinin, Wnt sinyal yolağı komponentleri üzerinde oluşturduğu moleküler yanıtın ve apoptozun aydınlatılmasıdır. Bu kapsamda, pankreas kanser modeli olarak insan duktal kökenli pankreatik karsinom hücre hattına (PANC-1) VPA uygulamasıyla indüklenen apoptozun ölçümü, azalan proliferasyon oranlarıyla birlikte değerlendirilmiş ve bunun Wnt sinyal yolağı ana komponentleri anlatım düzeyleri üzerine etkisinin tespiti gerçekleştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Pankreas

Pankreas, karın boşluğunda bulunan ve salgı bezi görevi gören, hem ekzokrin hem de endokrin bileşenlere sahip bir organdır [18]. Gelişim sırasında, endokrin hücreler kanal sisteminden göç eder ve ekzokrin glandüler dokuya dağılmış Langerhans adacıkları olarak bilinen izole edilmiş hücre kümelerini oluşturmak için kılcal damarların etrafında toplanırlar [19]. Adacık hücrelerinin en bilinenleri alfa, beta ve delta hücreleridir ve bu hücreler sırasıyla glukagon, insülin ve somatostatin hormonlarını salgılamaktadır [19]. İnsülin ve glukagon hormonları karbonhidrat metabolizmasında önemli rol oynamaktadır. Bunun yanı sıra, endokrin pankreasın salgılayıcı ana ürünlerinin enerji metabolizmasında, büyüme ve gelişme üzerinde de çok çeşitli etkileri vardır [19].

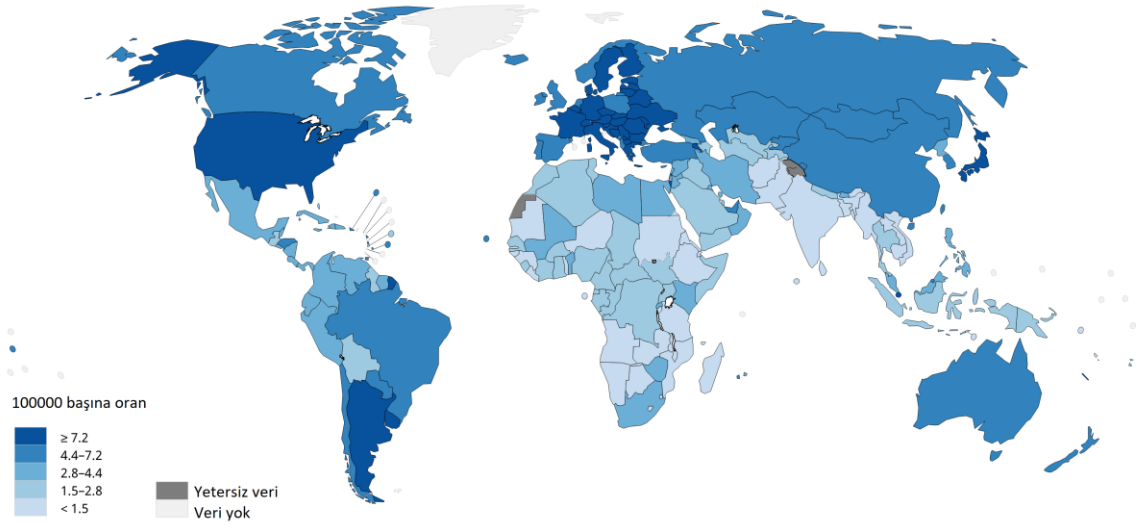
Pankreasın büyük bir kısmını ekzokrin hücreler oluşturur. Bu hücrelerin yaklaşık %90'ını duktal lümen çevresinde gruplar halinde kümelenmiş asinar hücrelerdir [20]. Asinar hücrelerden sindirim sisteminde görevli amilolitik, lipolitik ve proteolitik enzimler salgılanır [20]. Proteolitik enzimler olan tripsin ve kimotripsin, inaktif öncüller (zimojenler) olarak salgılanır. Bu enzimler daha sonra duodenumda aktif hale getirilir. Ayrıca ekzokrin bölümden sindirim sistemine bikarbonat iyonlarından zengin bir sıvı salgılanır [20]. Bu sıvı mide asidinin nötralize edilmesine yardımcı olur ve pankreas enzimlerinin aktivitesi için uygun pH'ı oluşturur [20].

2.2. Pankreas kanseri

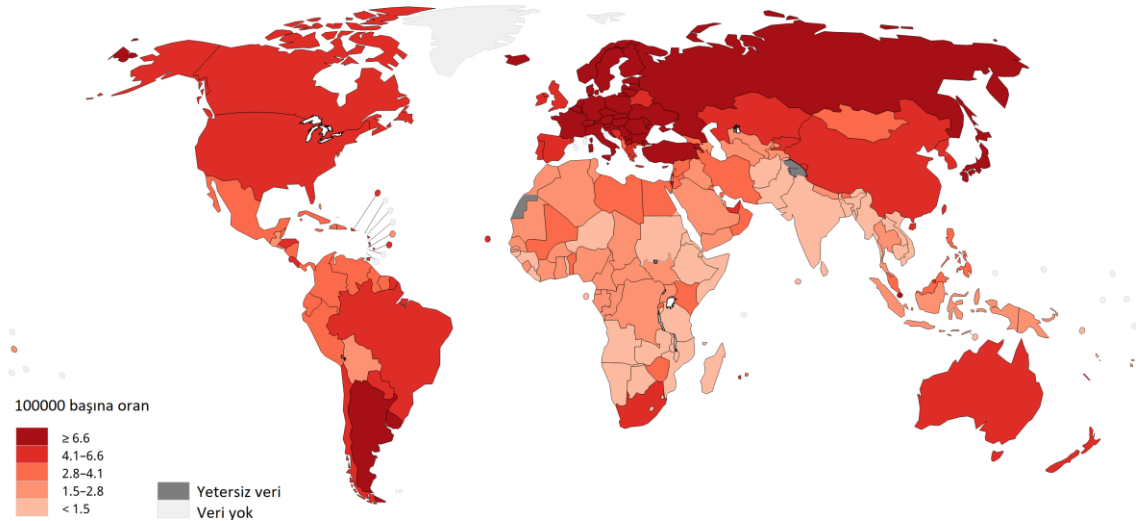
Pankreas kanseri, dünyadaki en yaygın 14. kanser türü olup 7. en yüksek kanser ölüm nedeni olarak gösterilmektedir [21]. İnsidans oranları ülkeler arasında önemli ölçüde değişmektedir. Yaşa göre standardize edilmiş veriler, en yüksek kanser oranının Avrupa ve Kuzey Amerika'da, en düşük kanser oranının ise Afrika ve Güney Orta Asya'da görüldüğünü göstermektedir [22]. Gelişmiş ülkelerde gelişmekte olan ülkelere göre hem erkeklerde hem de kadınlarda daha yüksek pankreas kanseri insidansı olduğu görülmektedir [23].

En büyük endişe batı dünyasında pankreas kanseri insidansının artmasıdır. Saad ve arkadaşlarının SEER 9 veritabanını (*United States Surveillance, Epidemiology, and End Results Program*) kullanarak yaptıkları 1973-2014 yıllarını kapsayan bir çalışmada, cinsiyet, ırk ve kanser evreleri yaşa göre standardize edilmiş ve pankreas kanseri insidansının her yıl %1,03 oranında arttığı tespit edilmiştir [24]. Bu verilere göre, 2030 yılına kadar Amerika Birleşik Devletleri'nde pankreas kanseri ile ilişkili ölümlerin sıklığının dördüncü sıradan ikinci sıraya çıkacağı tahmin edilmektedir [2, 25].

Dünya çapında, tüm yaş grupları ve her iki cinsiyet için pankreas kanseri insidansı (2018)



Dünya çapında, tüm yaş grupları ve her iki cinsiyet için pankreas kanseri nedenli ölüm oranları (2018)



Şekil 2-1 - GLOBOCAN 2018 Pankreas kanseri Verileri

Şekilde GLOBOCAN 2018 verilerine göre kadın ve erkekler için tüm dünyadaki pankreas kanseri yeni vaka (üstte) ve ölüm oranları (altta) gösterilmektedir.

Bununla birlikte, pankreas kanseri insidansında ülkeler arasında gözlemlenen büyük farklılıklar, çevresel faktörlerin de hastalık gelişiminde önemli bir rol oynadığını göstermektedir.

Pankreatik kanserlerin yaklaşık %95'ini ekzokrin tümörler oluşturmaktadır [1]. Ekzokrin kanserlerin de yaklaşık %90'ını epitel hücre kökenli PDAK oluşturmaktadır [1]. Duktal adenokarsinomalar, sindirim enzimlerini ve bikarbonatı duodenuma taşıyan pankreatik kanalda (dukt) meydana gelmektedir [1].

2.3. Apoptoz

Apoptoz, çok hücreli organizmalarda meydana gelen kontrollü hücre ölüm şekillerinden biridir [26]. Apoptozun morfolojik özellikleri, sürecin doğal olarak programlanmış bir olgu olduğunu göstermekle birlikte, hem fizyolojik hem de patolojik olarak çeşitli çevresel uyarıcılar tarafından başlatılabileceği veya inhibe edilebileceğini de betimlemektedir [27].

Apoptoz, her ne kadar çok uzun yıllar önce tarif edilmiş olsa da terim olarak ilk kez 1972'de Kerr, Wyllie ve Currie tarafından kullanılmıştır [27, 28]. Apoptoz genleri, bir nematod (yuvarlak solucan) olan *Caenorhabditis elegans*'ın gelişimi incelenerek tanımlanmıştır [29]. Daha sonra bu genlerin memeli homologları tespit edilmiş ve apoptozun insanlar dahil çeşitli yaşam formlarında benzer yollarla meydana geldiği gösterilmiştir [30].

Apoptoz, normal gelişim ve yaşlanma sırasında dokulardaki hücre popülasyonlarını korumak için homeostatik bir mekanizma olarak ortaya çıkabileceği gibi, savunma mekanizması olarak ya da hastalık veya toksik ajanlar tarafından hücrelerin zarar gördüğü durumlarda da ortaya çıkabilmektedir [28].

Apoptotik hücre ölümünün alternatifi, hücrenin pasif bir kurban olduğu, enerjiden bağımsız ve toksik bir süreç olarak kabul edilen nekrozdur [28]. Apoptoz ve nekrozun mekanizmaları ve morfolojileri farklı olsa da bu iki işlem arasında örtüşme vardır. Kanıtlar, nekroz ve apoptozun “apoptoz-nekroz sürekliliği” olarak tanımlanan ortak bir biyokimyasal ağın morfolojik ifadelerini temsil ettiğini göstermektedir [31]. Örneğin kaspazların ve hücre içi ATP'nin mevcudiyetinde bir düşüş, devam eden bir apoptotik sürecin nekrotik bir işleme dönüşmesine neden olabilmektedir [32]. Bir

hücrenin nekroz veya apoptozla ölüp ölmemesi, kısmen hücre ölüm sinyalinin doğasına, doku tipine, dokunun gelişim aşamasına ve fizyolojik ortama bağlıdır [31, 32].

Geleneksel histolojiyi kullanarak apoptozu nekrozdan ayırt etmek her zaman kolay değildir; uyarının yoğunluğu ve süresi, ATP tükenmesinin derecesi ve kaspazların mevcudiyeti gibi faktörlere bağlı olarak eş zamanlı ortaya çıkabilmektedir [31]. Nekroz, genellikle geniş hücre alanlarını etkileyen kontrolsüz ve pasif bir işlemdir, oysa ki apoptoz kontrol edilir ve enerjiye bağlıdır; bireysel veya hücre kümelerini etkileyebilir [28]. Hücrenin enerji kaynağına müdahale ve hücre zarlarında doğrudan hasar oluşturma, nekrotik hücre hasarının iki ana mekanizmasıdır [28].

Nekrozla birlikte meydana gelen başlıca morfolojik değişikliklerin bazıları: hücre şişmesi; sitoplazmik vakuollerin oluşumu; şişmiş endoplazmik retikulum; sitoplazmik kabarcıkların oluşumu; yoğunlaşmış, şişmiş veya yırtılmış mitokondri; ribozomların ayrıştırılması ve ayrılması; parçalanmış organel membranları; şişmiş ve yırtılmış lizozomlar ve sonunda hücre zarının bozulmasıdır [27]. Hücre zarı bütünlüğünün kaybı, sitoplazmik içeriğin çevre dokuya salınması ile sonuçlanır ve nihayetinde enflamatuar hücrelerin alınmasıyla kemotatik sinyaller gönderir [33]. Apoptotik hücreler, hücresel bileşenlerini çevresindeki interstisyel dokuya salmadıkları ve makrofajlar veya bitişik normal hücreler tarafından hızlı bir şekilde fagosite edildikleri için, esasen enflamatuar reaksiyonu gerçekleştirmemektedir [33].

Apoptozun gerçekleşmesi, bir grup proteaz olan kaspazlara dayanmaktadır [34]. Kaspazlar, proenzim olarak sentezlenir ve aktive edildikten sonra diğer kaspazların aktifleşmesini sağlayan bir proteaz kaskadı oluşturmaktadır [34]. Bugüne kadar on büyük kaspaz tanımlanmış olup bu kaspazlar, başlatıcılar olan kaspaz-2, -8, -9 ve -10; efektörler veya uygulayıcılar olarak tanımlanan kaspaz -3, -6 ve -7; enflamatuar olan kaspaz -1, -4 ve -5'tir [35, 36].

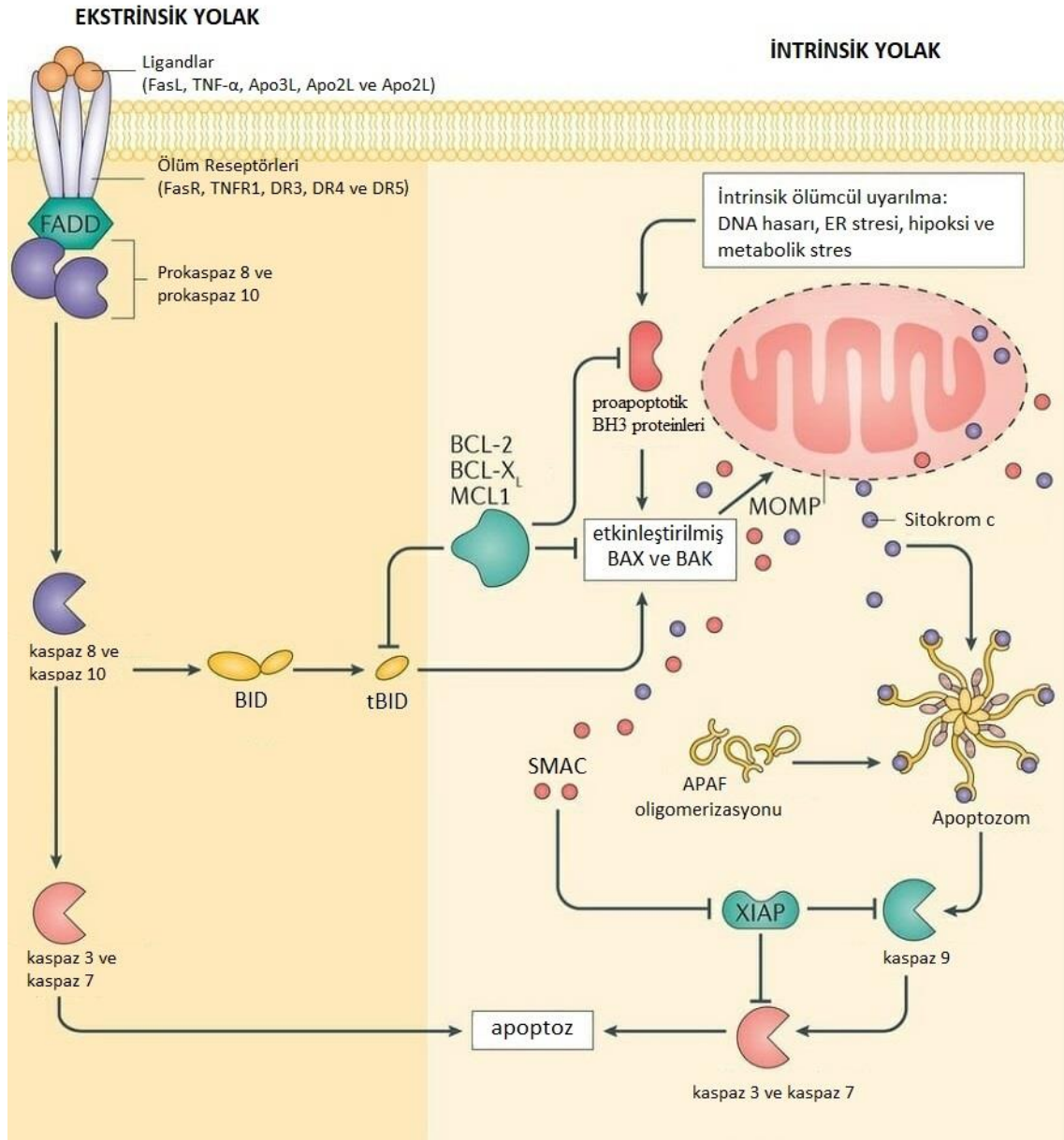
Memeli sistemlerinde apoptozu başlatmak için intrinsik ve ekstrinsik iki alternatif yol vardır ve her ikisi de nihayetinde efektör kaspazlar olan -3, -6 ve -7'yi aktive etmektedir (Şekil 2-2) [37]. Mitokondriyal yol olarak da adlandırılan intrinsik yolak, Bcl-2 aile üyeleri tarafından düzenlenmektedir [37]. Yolak gelişimsel olarak kontrol edilmekte ya da genotoksik ajanlar tarafından tetiklenmektedir [37]. Bcl-2 ailesi üç alt aileden oluşur: sadece tek BH3 alanı içeren proapoptotik BH3-üyeleri (Bim, Bid, Puma, Noxa, Hrk, Bmf ve Bad), proapoptotik efektör molekülleri (Bax ve Bak) ve

antiapoptotik Bcl-2 ailesi proteinleri (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl1, A1 ve Bcl-B) [38]. Sağlıklı hücrelerde, Bax/Bak kompleksi antiapoptotik Bcl-2 aile üyeleri tarafından baskılanmaktadır [38]. Bir apoptotik uyarıcıya, örneğin gelişimsel bir işaret; büyüme ya da sağ kalım faktörünün eksikliği veya genotoksik ajana cevaben proapoptotik BH3 üyeleri, transkripsiyonel ya da posttranskripsiyonel olarak aktive edilmektedir [38]. Aktif proapoptotik BH3 üyeleri, antiapoptotik Bcl-2 ailesi üyelerini antagonize etmektedir [38]. Ayrıca Bax/Bak kompleksinin oligomerizasyonunu sağlamakta ve bu kompleks daha sonra mitokondriyal dış membran geçirgenliğini [MOMP (*mitochondrial outer membrane permeabilization*)] arttırarak sitokrom c'nin mitokondriden salınımını uyarmaktadır [38]. Sitokrom c, Apaf-1 ile birlikte apoptozom denilen heptametik bir kompleks oluşturmaktadır [39]. Kompleks daha sonra monomerik kaspaz-9'a bağlanarak bu yapının dimer oluşturmalarını sağlamakta ve bu yapı da kaspaz-3'ü parçalayarak aktive etmektedir [38].

İkinci apoptotik süreç ekstrinsik yolaktır ve bu yolağın çalışmasına tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör geni süper ailesinin üyeleri olan ölüm reseptörleri aracılık etmektedir [40]. TNF reseptörü ailesi üyeleri benzer sistein bakımından zengin ekstraselüler alanları paylaşmaktadır ve “ölüm alanı” adı verilen yaklaşık 80 amino asitten oluşan bu alanlar, ölüm sinyalini hücre yüzeyinden hücre içi sinyal yollarına aktarmada kritik bir rol oynamaktadır [41].

Bugüne kadar en iyi karakterize edilmiş ligandlar ve karşılık gelen ölüm reseptörleri FasL/FasR, TNF- α /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 ve Apo2L/DR5'tir (Şekil 2-2) [41-43]. Bir uyarıcı ile spesifik ligandların hücre dışı ölüm reseptörlerine bağlanması ile reseptörlerin aktive edilmesi, FADD'nin [FAS-ilişkili ölüm alanı proteini (*FAS-associated death domain protein*)] uyarılarak, prokaspaz-8 ve prokaspaz-10'u ölüm alanına çekmesini sağlar [43]. Kaspazların alana katılması ile DISC [ölümüne neden olan sinyal kompleksi (*death inducing signaling complex*)] oluşturulur [43]. Bu aşamada DISC'in iki farklı yoldan apoptozu indükleyebileceği önerilmektedir [44]. Kaspaz-8'in DISC'de yeterince aktive olduğu tip I grubunda (örneğin timositler) kaspaz-8, prokaspaz-3'ü doğrudan aktive etmektedir [44]. Tip II grubunda (örneğin hepatositler ve fibroblastlar) ise kaspaz-8, proapoptotik BH3'ün bir üyesi olan Bid'i parçalamaktadır [44]. Parçalanmış olan Bid (tBid), mitokondriden sitokrom c ve SMAC [ikincil mitokondri türevli aktivatör kaspaz (*second mitochondria-derived activator of*

caspases)] salınımı indükleyerek intrinsik yolu aktive etmektedir [44]. SMAC'nin mitokondriden salınması, XIAP'yi [X'e bağlı apoptoz protein inhibitörü (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*)] bloke ederek apoptozu kolaylaştırmaktadır [42].

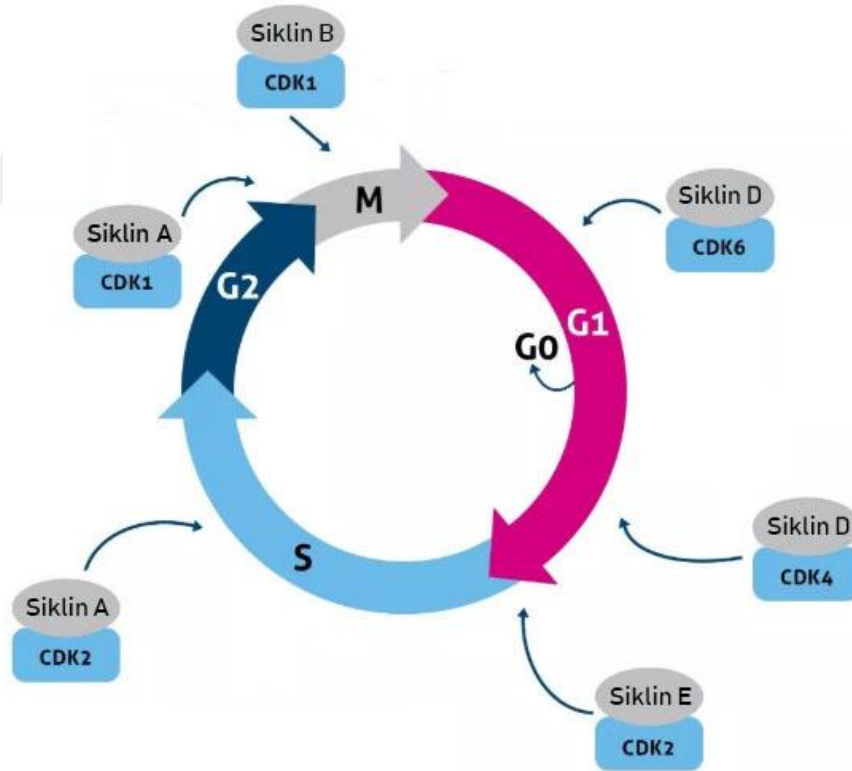


Şekil 2-2 - Apoptoz yolaqları

İntinrik yolak (mitokondriyal yolak), hücreöl stresi algılayan ve sağkalım yanlısı Bcl-2 ailesi üyelerini inaktive eden proapoptotik BH3 proteinleri tarafından aktive edilir. Yolağın aktivasyonu, dış mitokondriyal zarın geçirgenliğine ve siktokrom C, Apaf-1 ve kaspaz-9 salınımına yol açar. Ekstrinrik yolak, TNF ailesi ligandların FADD içeren adaptör proteinleri uyarması ile aktive edilir. Aktivasyon sonucunda kaspaz 8 ve 10 uyarılır. Bu durum ya proapoptotik BH3'ün bir üyesi olan Bid'in parçalanarak intrinrik yolağın uyarılmasına ya da kaspaz 3 ve 7'nin uyarılarak hücrenin doğrudan apoptozla gitmesine neden olmaktadır [42].

2.4. Hücre döngüsü ve Kanser ilişkisi

Ökaryotik hücre döngüsü dört ayrı aşamadan oluşur: G_1 fazı , S fazı (sentez), G_2 fazı ve M fazı (mitoz ve sitokinez) (Şekil 2-3). G_1 fazında hücreler büyür ve kontrol mekanizması hücrenin DNA sentezine hazır olup olmadığını kontrol eder; S fazında DNA replikasyonu gerçekleşir; G_2 fazında hücrenin mitoz evresi için hazır olup olmadığı kontrol edilir ve bu aşamada da hücre büyümeye devam eder; M fazında ise hücre iki yavru hücre olarak bölünmek üzere kontrol noktasından geçerek bölünür [45]. Bölünmeden sonra hücreler G_1 'e geri döner ve hücre döngüsü tamamlanır [45]. Bu aşamada hücreler her zaman döngü içinde kalmayabilirler [45]. Bunun yerine hücre döngüsünden çıkıp, transkripsiyon ve translasyon da dahil olmak üzere hücresel temel metabolizmanın baskılandığı aşama olan G_0 fazına girebilirler [45]. Hücre döngüsünden diğer sapma durumları, programlanmış hücre ölümü (apoptoz) ve farklılaşmayı içerir [45].



Şekil 2-3 - Hücre Döngüsü

M (mitotik) faz, hem mitozu hem de sitokinezi kapsayan hücre döngüsünün en kısa bölümüdür. Hücre döngüsünün büyük bir bölümünü kapsayan interfazda ise G_1 fazı, S fazı (sentez), G_2 fazı yer almaktadır [49]. Şekil 2-3, 48 numaralı referanstan uyarlanmıştır.

Ökaryotik hücre döngüsünün ilerlemesi ve sınırlanması birçok düzenleyici mekanizma tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilir [46]. Bir hücrenin hücre döngüsü boyunca geçişini kontrol eden ana proteinler arasında retinoblastoma (Rb) gen ürünü, siklinler, siklin bağımlı kinazlar (CDK), sikline bağımlı kinaz inhibitörleri (CKIs) ve p53 proteini bulunur [45]. Siklin bağımlı kinazlar, hücre döngüsünün her aşaması boyunca ilerlemeyi sağlayan motorlara benzemektedir [47]. Bu proteinler, aktive olmak için siklinlerle kompleksler oluşturarak hücre döngüsü için majör kontrol anahtarları olarak işlev görürler [47]. Böylece hücrenin G₁'den S fazına veya G₂'den M fazına hareket etmesini sağlarlar [47].

Hücre döngüsü modeline göre, G₁ evresinin başlarında CDK4 ve CDK6, D tipi siklinler tarafından aktive edilir ve Rb ailesinin (Rb, p107 ve p130) fosforilasyonunu başlatır [49]. Bu, E2F transkripsiyon faktörlerinin salınımına yol açar ve hücre döngüsü ilerlemesi için gereken E2F'ye cevap veren genlerin aktivasyonu ve transkripsiyonuyla sonuçlanır [50, 51]. Erken E2F'ye cevap veren genler, E ve A tipi siklinleri içerir [49, 51]. Geç G₁ fazında, CDK2 siklin E'ye bağlanarak aktive edilir ve E2F aracılı transkripsiyonun daha fazla aktivasyonuna yol açan Rb'nin fosforilasyonunu tamamlar [49]. Bu, G₁/S fazı sınırındaki kısıtlama noktasından geçiş ve S fazı başlatmasına neden olur [49]. Daha sonra CDK2, siklin A ile kompleksleşerek S fazı ilerlemesinde önemli bir rol oynar [49]. A tipi siklinler, S fazının başlangıcında sentezlenir [52]. G₂/M geçişi sırasında, fazın başlatılması için CDK1/siklin A aktivitesi gereklidir [52]. Son olarak, CDK1/siklin B kompleksleri aktif olarak mitozaya katılır [52] (Şekil 2-3).

Kanser, genomik instabilite ve hücre döngüsü kontrol noktalarının düzensizleşmesi ile karakterize edilir [53]. İnsan neoplazmaları, onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerdeki genetik ve epigenetik değişikliklerin ilerleyici birikimini takiben gelişir [53]. Hücrenin büyümesine ve bölünmesine yardımcı olan onkogenlerin mutasyonu ya da duplikasyonu, kontrolsüz bölünmelerin oluşmasına neden olmaktadır [54]. Bu durumda onkogenler sıkışmış bir gaz pedalına benzetilmektedir [54]. Tümör baskılayıcı genler ise tıpkı bir fren gibi davranarak hücre bölünmesini yavaşlatmaktadır [54]. Bu sayede DNA replikasyonunda meydana gelen hatalar onarılabilmekte veya hücreler apoptoza yönlendirilmektedir [54]. Tümör baskılayıcı genlerin düzgün çalışmadığı durumlarda hücreler kontrolden çıkarak kansere neden olabilmektedir [54].

2.5. Histon Deasetilazlar (HDACs)

DNA'nın paketlenmesi, negatif yüklü DNA ile pozitif yüklü histonlar arasındaki etkileşimlere dayanmaktadır [55]. Histon kuyukları, lizin ve arjinin amino asitlerinde bulunan amin grupları nedeniyle pozitif olarak yüklenir. Bu sayede histon kuyukları, DNA omurgasında bulunan negatif yüklü fosfat gruplarına bağlanabilmektedir [56]. Histonların asetilasyonu ve deasetilasyonu, ökaryotik hücrelerin transkripsiyon düzenlemesinde önemli bir rol oynamaktadır [55]. Histon ve histon olmayan proteinlerin asetilasyon durumu, histon deasetilazlar (HDAC) ve histon asetil-transferazlar (HAT) ile belirlenir [55]. HAT enzimleri, histon kuyuklarındaki lizin kalıntılarına asetil grupları ekleyerek pozitif yükü nötralize eder, böylece kromatin yapısı gevşer [55]. Bu durum, transkripsiyonel aktiviteye izin verir [55]. HDAC enzimleri ise asetil gruplarını çıkararak transkripsiyonun engellenmesini ve kromatin yapısının yoğunlaşarak eski haline dönmesini sağlar [55]. Ayrıca HDAC enzimleri; hücre çoğalmasını ve hücre ölümünü düzenleyen hormon reseptörleri, şaperon proteinleri ve hücre iskeleti proteinleri gibi pek çok histon olmayan proteinin regülasyonunda rol oynamaktadır [57].

Bugüne kadar insanlara ait on sekiz adet HDAC enzimi tanımlanmış ve maya HDAC enzimleri ile homolojilerine dayanarak dört gruba ayrılmıştır [58]. Bu gruplar Tablo 2-1'de gösterilmektedir.

Tablo 2-1: HDAC Enzimleri

Sınıf	Hücre içi lokalizasyon	(Kaynak)
Sınıf I	HDAC1	[58]
	HDAC2	
	HDAC3	
	HDAC8	
Sınıf IIa	HDAC4	[59]
	HDAC5	
	HDAC7	
	HDAC9	
Sınıf IIb	HDAC6	[59]
	HDAC10	
Sınıf IV	HDAC11	[59]

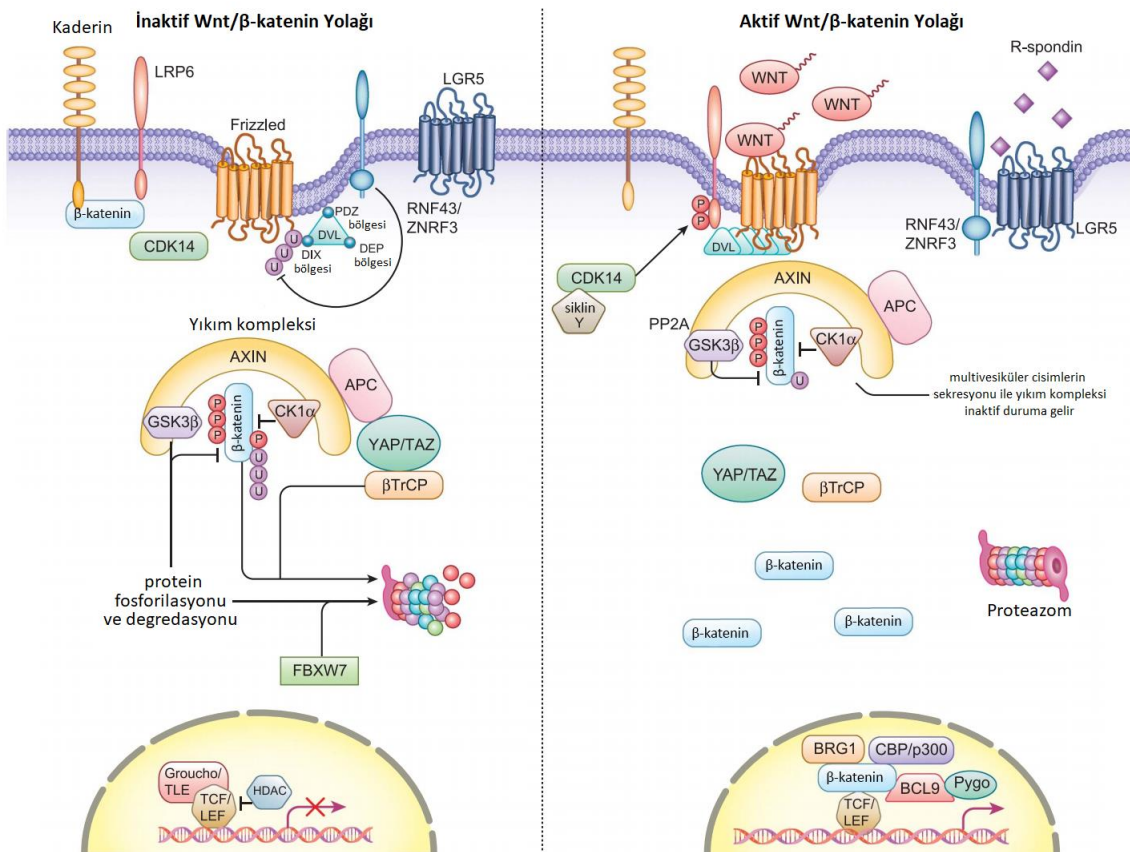
Histon deasetilaz inhibitörleri (HDACi ya da HDAC inhibitörleri), histon deasetilazları inhibe eden kimyasal bileşiklerdir [60]. HDAC inhibitörleri, tümör hücresi apoptozunu, büyümeyi durdurmayı, yaşlanmayı, farklılaşmayı ve immünojenisiteyi indükleyebilmekte ve anjiyogenezi inhibe edebilmektedir [60].

2.6. WNT Sinyal Yolağı

Wnt sinyal yolağı ile ilgili verilere ilk kez Nusse ve arkadaşlarının farelerde gerçekleştirdiği viral karsinogenez deneylerinde ulaşılmıştır [61]. Bu deneyde fare meme tümörü virüsü [*mouse mammary tumour virus* (MMTV)] kaynaklı meme tümörlerinde, *Int-1* geninin promotörüyle ortak bir viral entegrasyon bölgesi tanımlanmıştır [61]. Bu bölge transgenik farelerde indüklendiğinde *Int-1* protein seviyesinin arttığı ve buna bağlı olarak da farelerde meme tümörünün geliştiği gözlemlenmiştir [62, 63]. Daha sonra tümör indükleyen *Int-1*'in dizi analizi gerçekleştirildiğinde bu genin, *Drosophila* segment polarite geni Wingless (Wg) ile ortolog olduğu saptanmış ve bu iki gen isminden memeli *Int-1* geni ve paralogları için Wnt ismi türetilmiştir [64]. Wnt sinyal yolağı, embriyonik gelişim sırasında hücrenin akıbetinin belirlenmesini (apoptoz ve proliferasyon gibi), hücre göçünü, hücre polaritesini, sinirsel şekillenmeyi ve organogenezin kritik yönlerini düzenleyen evrimsel olarak korunmuş bir yoldur [65].

Üç farklı Wnt sinyal yolağı vardır: kanonik Wnt/ β -katenin yolağı, Wnt/ Ca^{++} yolağı ve Wnt/Planar Hücre Polaritesi (PCP) yolağı [66, 67]. Kanonik Wnt sinyali, kök hücre yenilenmesi ve farklılaşması gibi hücre kaderinin belirlenmesine katkı sağlamaktadır. Kanonik olmayan PCP ve Wnt/ Ca^{++} yolları ise genellikle hücre hareket, morfolojik değişiklikler ve doku organizasyonu ile ilgilidir [66, 67]. Üç yolağın da hücre yüzeyine yerleşmiş bir transmembran glikoprotein ailesi olan Frizzled reseptörler (Fzds) tarafından aktive edilir. Yolları özel Wnt ligantları Frizzled reseptörlerinin sisteinden zengin bölgelerine bağlanır. Bu etkileşim daha sonra Dishevelled (Dvl) proteinlerini fosforiller ve böylece sitozolik iletişim sağlanır [68].

Kanonik Wnt sinyalinde Wnt ligandlarının yokluğu, Axin'in iskele görevi gördüğü, APC, GSK3 kinazlar ve kazein kinaz (CK1a) içeren yıkım kompleksi tarafından β -kateninin fosforilasyonuna yol açar [69]. Bu durumda β -katenin, GSK3 β ile fosforile edilir, β -TrCP ile ubiquitinlenir ve böylece proteasomal bozulma hedeflenir [69]. Nükleer β -katenin yokluğunda, TCF/LEF ve TLE/Groucho [transdüktif benzeri geliştirici protein (*transducing-like enhancer protein*)] içeren baskıcı bir kompleks, hedef genleri susturmak için HDACleri uyarır [70] (Şekil 2-4). Kanonik yolak, salgılanan Wnt ligandlarının (Wnt3a ve Wnt1 gibi) Fzd reseptörlerine ve LRP yardımcı reseptörlerine bağlanması ile aktive edilir [70]. Daha sonra CK1 α ve GSK3 β ile fosforile edilen LRP reseptörleri, Dvl proteinlerini plazma membranına alarak aktive edilmelerini sağlarlar [70]. Dvl polimerleri, β -katenin yıkım kompleksini multivesiküler cisimlerin sekresyonu yolu ile inaktif hale getirir [71]. Bunun sonucunda serbest kalan β -katenin nükleus içinde birikmeye başlar.



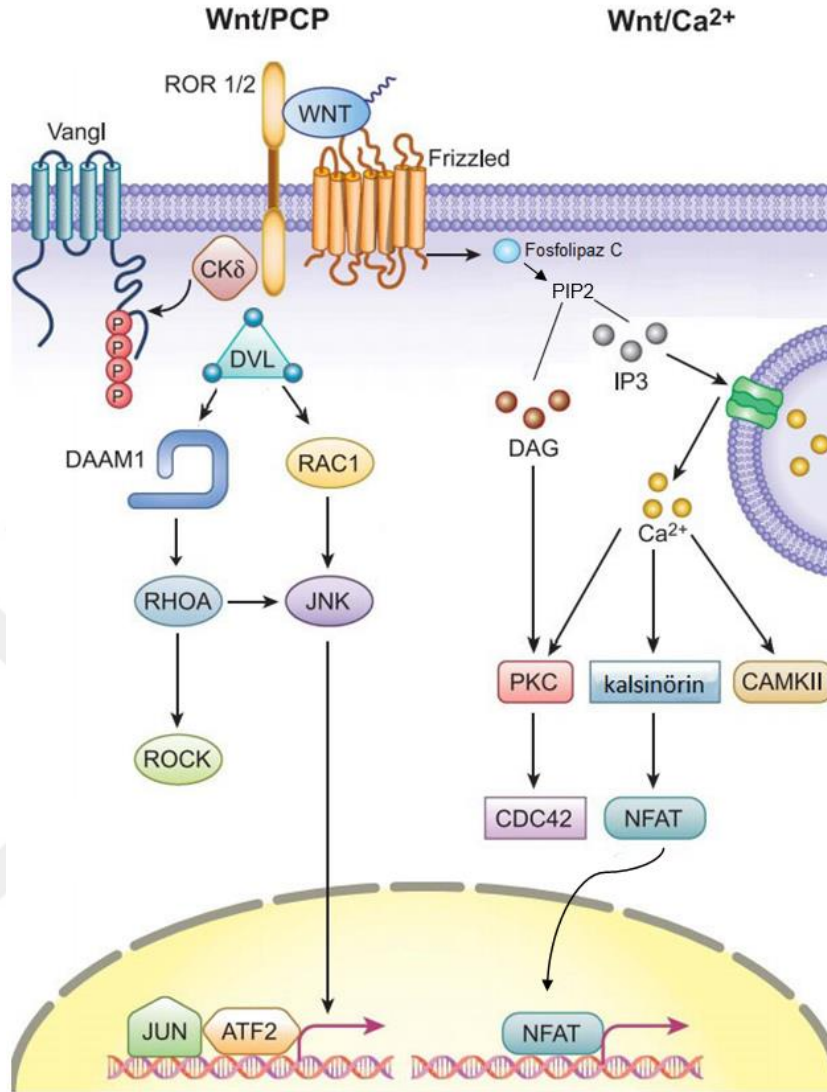
Şekil 2-4 - Wnt/β-katenin sinyal yolağı

Zhan ve arkadaşlarının [74] yayınlamış olduğu çalışmadan uyarlanan şekle göre: Wnt/β-katenin sinyal yolağı, Wnt ligandlarının yokluğunda yıkım kompleksi tarafından β-kateninin yıkılması nedeniyle inaktif halde bulunur (sol taraf). Wnt ligandlarının hücre yüzey reseptörlerine bağlanması ile yolak aktif hale gelir (sağ taraf).

Burada LEF [lenfoid arttırıcı faktör (*lymphoid enhancer factor*)] ve TCF [T hücre faktörü (*T-cell factor*)] proteinleri ile aktif bir kompleks oluşturarak TLE/Groucho'nun yerine geçer ve CBP/p300, BRG1, BCL9 ve Pygo gibi histon modifiye edici ko-aktivatörlerin çalışmasını tetikler [71] (Şekil 2-4).

Kanonik olmayan Wnt sinyalleri, β -kateninden bağımsız sinyal iletim mekanizmalarıyla tanımlanır. Wnt / PCP sinyali sırasında, Wnt ligandları, Dvl'yi aktive etmek için ROR-Frizzled reseptör kompleksine bağlanır [72]. Dvl, sitoplazmik protein DAAM1'in [(Dvl ile ilişkili morfogenez 1 aktivatörü (*Dvl associated activator of morphogenesis 1*))] de-inhibisyonu ile küçük GTPase Rho'ya (*the small GTPase Rho*) bağlanır [73]. Küçük GTPase Rac1 ve Rho birlikte ROCK [Rho kinaz (*Rho kinase*)] ve JNK'yi tetikler [74]. Bu durum ATF2 [aktif transkripsiyon faktörü 2 (*activating transcription factor 2*)] gibi faktörlerle hücre iskeleti ve transkripsiyonel cevapların yeniden düzenlenmesine yol açar [74]. Vangl da Dvl gibi Wnt/PCP sinyal yolağının önemli bir üyesidir. Vangl, Wnt5a'ya bağımlı bir şekilde fosforilasyon ile aktive edilir [74] (Şekil 2-5).

Wnt/ Ca^{++} sinyali, G-proteini ile tetiklenen fosfolipaz C aktivitesi ile başlatılmaktadır [75]. Fosfolipaz C aktivasyonu, PIP2'yi [fosfatidil inositol 4,5 bifosfat (*phosphatidyl inositol 4,5 biphosphate*)], DAG [diasilgliserol (*1,2-diacylglycerol*)] ve IP3'e [inositol 1; 4,5-trifosfat (*inositol 1,4,5-triphosphate*)] parçalar [75]. Sonuç olarak PKC (protein kinaz C) DAG yoluyla aktive olurken, IP3 ise endoplazmik retikulum'dan kalsiyum salımını başlatarak PKC'lerin fosforilasyonunu ve aktivasyonunu artırır [75]. Ek olarak, Ca^{++} -kalmodulin bağımlı kalsinörin (CN) ve CAMKII'nin [Ca^{++} -kalmodulin bağımlı kinaz (*Ca^{++}-calmodulin dependent kinase II*)] aktivasyonu, NFAT [aktif T-hücrelerinin nükleer faktörü (*nuclear factor of activated T-cells*)] ve NLK [nemo benzeri kinaz (*nemo like kinase*)] translokasyonuna neden olur [68]. NFAT, uygun hedef genler için bir transkripsiyon aktivatörü görevi görürken; NLK, TCF/LEF transkripsiyon koaktivatörlerini parçaladığından kanonik WNT yolak inhibitörü görevi görür [75] (Şekil 2-5).



Şekil 2-5 - Wnt/PCP Sinyal Yolağı ve Wnt/Ca⁺⁺ Sinyal Yolağı

Zhan ve arkadaşlarının [74] yayınlamış olduğu çalışmadan uyarlanan şekle göre: Wnt/PCP Sinyal Yolağı solda, Wnt/Ca⁺⁺ Sinyal Yolağı ise sağda gösterilmektedir

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan hücre hattı

Tez çalışması, ATCC'den [Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu (*The American Type Culture Collection*)] temin edilmiş, epitelial kökenli bir kanser hücresi olan PANC-1 (ATCC® CRL-1469™) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

PANC-1 hücreleri ilk kez, 56 yaşındaki Kafkasyalı bir erkekten alınan pankreatikoduodenektomi örneğinden elde edilmiştir [76]. Primer kültürü gerçekleştirilen tümör dokusunun; pankreasın endokrin ve ekzokrin salgı üreten bölümünden uzak olan baş kısmında, duodenuma bitişik, sınırları belirli bir nodül halinde yer almakta olduğu bildirilmiştir [76]. Tümörün mikroskopik incelemesi, farklılaşmamış bir karsinom olduğunu gösterse de bazı alanların belirgin şekilde anormal malign tip hücrelerle kaplı olduğu gözlemlenmiştir [76]. Tümörün anaplastik bölgelerinde, belirgin bir şekilde atipik çekirdekler, çok sayıda çok çekirdekli dev hücre ve sayısız mitotik şekil görülmüştür [76]. Ayrıca enzim ve kromozom çalışmaları, PANC-1 hücre hattının insan kökenli olduğunu göstermiştir [76].

3.1.2. Kullanılan kimyasallar

Tablo 3-1: Kullanılan kimyasallar

Kimyasal Adı	Markası	Katalog Numarası
Etanol	EMSURE	K45722983429
İzopropanol	Merck	1096341000
DMEM	Biosera	LM-D1110
DMSO	Biofrox	1084ML100
2-merkaptoetanol	Gibco	21985-023
FBS	Gibco	10270
Pen/Strep	Lonza	DE 17-602E
Trypsin	Biosera	LM-T1720
VPA	Sigma-Aldrich	P4543

PBS	Gibco	70011
Molecular Biology Water	Lonza	BE51200
RLT buffer	Qiagen	74104
6X Loading Dye	Bioline	BIO-33030
100 bp DNA Ladder	Bioline	BIO-33030
TAE Buffer (50X)	Genemark	GB01-1
Seakem LE Agarose	Lonza	50002

3.1.3. Kullanılan kitler

Tablo 3-2: Kullanılan kitler

Kit Adı	Markası	Katalog Numarası
CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit	Thermo Fisher Scientific	C34554
Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V FITC and PI	Thermo Fisher Scientific	V13242
Quick-DNA/RNA Microprep Plus Kit	ZYMO Research	D7005
SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit	Bioline	BIO-65053
SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit	Bioline	BIO-98050
TaqMan® Gene Expression Assays	Thermo Fisher	4453320
TaqMan™ Universal Master Mix II, with UNG	Thermo Fisher	4440038
Vi-Cell Single Pak Hücre Sayım Kiti	Beckman Coulter Inc.	383721

3.1.4. Kullanılan cihazlar

Tablo 3-3: Kullanılan Cihazlar

Cihaz	Markası
Işık Mikroskobu	Olympus CKX41
İnkübatör	Hibrigene Techne
Vi-Cell Hücre Sayım Cihazı	Beckman Coulter
Laminer Akış Kabini	Thermo Scientific, Hera

Su Banyosu	Memmert WNB45
Masaüstü Santrifüj	Thermo Scientific
Otomotik Pipetler	Thermo Scientific
Pipetör/Pipetleyici	Axygen Motopet
+4°C Buzdolabı	Sanyo Labcool
-20°C Buzdolabı	Panasonic
-80°C Buzdolabı	Heraeus Sepatech
Buz Makinası	Cornelius
Hassas Terazı	KERN, EMB 200-2
Distile Su Cihazı	Millipore
Mikrosantrifüj	Beckman Coulter Microfuge 16
Nanodrop	Thermo Scientific (ND-1000)
Vorteks	Kermanlar
Elektroforez Tankı	İnvitrogen
Jel Görüntüleme Sistemi	UVP Imaging System
Lightcycler 480	Roche, Light Cycler 480 II
StepOnePlus Real Time PCR	Applied Biosystems
Plate Santrifüj	Beckman Coulter Allegra X-22
Thermal Cycler	T100 Thermal Cycler Bio-Rad
BD FACS Calibur	Becton Dickinson

3.1.5. Kullanılan elektronik veritabanları ve bilgisayar programları

Tablo 3-4: Kullanılan elektronik veritabanları

Adı	Web Adresi	Kullanım Amacı
NCBI / BLAST	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	Biyolojik diziler arasındaki benzerlik bölgelerini bulur. Farklı veritabanlarını tarayarak nükleotit veya protein sekanslarını karşılaştırır ve

Primer-BLAST	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/	istatistiksel önemi hesaplar. Primer3 and BLAST araçlarını kullanarak istenilen PCR koşulları için en uygun primerlerin dizayn edilmesini sağlar.
Ensembl	http://www.ensembl.org/index.html	Çok sayıda canlının genom referans dizilerini ve diziler hakkında bilgileri içerir.

Tablo 3-5: Kullanılan bilgisayar programları

Adı	Kullanım Amacı
NovoExpress	Akan hücre ölçer cihazı ile yapılan ölçüm görüntülenmesini ve analizini sağlar.
GraphPad Prism 7	Deneyisel verilerin istatistiksel analizlerin yapılmasını ve bu veriler ile grafikler oluşturulmasını sağlar.

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Kültürü Aşamaları

3.2.1.1. Donmuş PANC-1 Hücre Hattının Çözündürülmesi ve Çoğaltılması

PANC-1 hücre kültüründe kullanılan besi yerinin hazırlanışı Tablo 3-6'da gösterildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3-6: PANC-1 hücre kültüründe kullanılan besi yeri

PANC-1 hücre kültüründe kullanılan besi yerinin hazırlanışı	
DMEM (4 mM L-glutamin, 4500 mg/L glukoz, 1 mM sodyum piruvat ve 1500 mg/L sodyum bikarbonat)	45 mL
Heat-inactivated FBS/FCS	5 mL
PenStrip (100 units/mL penisilin ve 100 µg/mL streptomisin)	250 µL

PANC-1 hücrelerinin çözündürülmesi

1. Cryotüpler sıvı azottan alınır ve 37°C su banyosunda elle tutarak çözündürülür.
2. 9 mL kültür medyumunu, 15 mL'lik falkona eklenir. Çözünen hücre falkona aktarılır ve nazik bir şekilde pipetajlanır.
3. 1500 rpm'de, oda sıcaklığında 5 dk santrifüj edilir. Süpernatant dökülür.
4. Hücreler 5 mL medyum ile 25T flasklara ekilir.

Hücrelerin canlılığı ve flasklara yayılma süreci mikroskop yardımı ile izlenir. 2'şer gün aralıklarla medyum değişikliği gerçekleştirilir. Pasajlama işlemi, genellikle ekimden 5 gün sonra gerçekleştirilir.

PANC-1 hücrelerinin pasajlanması

1. Pasajlanacak flasklarda üst faz dökülür.
2. 25T flasklar için 4 mL, 75T flasklar için ise 8 mL 1X PBS (Ca ve Mg yoksunu) kullanılarak flasklar yıkanır ve tekrar dökülür.
3. 25T flasklara 4 mL, 75T flasklara ise 9 mL tripsin (%0,05) eklenerek 5 dakika 37°C inkübatörde bekletilir.
4. 6 mL PANC-1 medyumunu tripsinli flaska eklenerek pipetaj yapılır. Daha sonra 50 mL'lik falkona hücreleri içeren tüm solüsyon alınır. 1500 rpm'de 5 dakika oda sıcaklığında santrifüjlenir.
5. Üst faz atılır. 1:2 ya da 1:4 şeklinde pasajlama yapılacak şekilde PANC-1 medyumunu eklenir, hücreler pipetajlanır. Ekilen hücreler 37°C sıcaklıkta, %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edilir.

3.2.1.2. Uygulanacak Etkin VPA Dozunun Belirlenmesi İçin Proliferasyon Ölçümü

Hücre proliferasyonunda %50 azalmaya neden olan inhibe edici konsantrasyona IC₅₀ adı verilmektedir [77]. Bu kantitatif ölçüm, belirli bir biyolojik süreci yarı yarıya inhibe etmek için bir kimyasaldan ne ölçüde kullanılması gerektiğini gösterir [77].

PANC-1 hücrelerine uygulanacak etkin IC₅₀ dozununun belirlenebilmesi için hassas bir proliferasyon ölçümü sağlayan, “CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit”inden (Thermo Fisher Scientific)” yararlanılmıştır. CFSE ile proliferasyon ölçümleri, Akan hücre ölçer (BD FACS Calibur) cihazında gerçekleştirilmiştir.

Hücrelerdeki proliferasyon miktarının belirlenmesinde kullanılacak olan proliferasyon kitinin temeli, pasif olarak hücrelere yayılım gösteren karboksifluoresein süksinimidil ester (CFSE) molekülüne dayanmaktadır [78]. CFSE, hücre zarından geçebilen bir moleküldür [78]. Molekül, süksinimidil grubu sayesinde hücre içi lizin kalıntılarına ve diğer amin kaynaklarına kovalent olarak bağlanır [78]. Bu sayede molekülün bitişik hücrelere aktarılması engellenmiş olur [78]. Molekülde yer alan asetat grupları, hücre içi esterazlar tarafından uzaklaştırılır ve böylelikle molekül ışıma yapabilir duruma gelir [78]. Her bölünme sonrasında hücrelerdeki floresan boya miktarı yarıya inmektedir [79]. Bu sayede boya-protein birleşimi ile işaretlenen hücreler, gelişim ve mayoz bölünme boyunca *in vivo* olarak izlenebilmektedir [79].

Proliferasyon ölçümü için hücrelere CFSE uygulanması:

Hücreler ekimden önce CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit protokolü izlenerek boyanmıştır.

1. Hücreler bölüm 3.2.1.1’de belirtilen şekilde flasktan kaldırılır.
2. Toz halinde bulunan CFSE, 18 µL DMSO (dimetil sülfoksit) ile karıştırılır.
3. 1×10^7 hücre, 1 mL medyum ile pipetajlanır. İçerisine 1 µL CFSE eklenir.
4. 20 dakika boyunca, 37°C sıcaklıkta, ışık almayacak şekilde inkübe edilir.
5. İnkübasyon sonunda iki kez medyum ile yıkanarak, 2000 rpm’de, 3 dakika santrifüjlenir.

PANC-1 hücrelerinin CFSE ile boyanmasının ardından, uygulanacak etkin dozun belirlenebilmesi amacıyla 24 kuyucuklu plate kullanılarak beş adet proliferasyon deneyi gerçekleştirilmiştir. Her bir deneyde ölçüm yapılacak her saat için 1 kuyucuk “boyasız kontrol” (CFSE eklenmemiş PANC-1 hücreleri) kullanılmıştır. Bu kontrol, akan hücre ölçer cihazında PANC-1 hücrelerinin oluşturduğu doğal floresan ışıma nedeniyle oluşan arka plan hatalarının elimine edilmesi amacı ile kullanılmıştır. Buna ek olarak, CFSE ile boyanmış ancak VPA eklenmemiş “boyalı kontrol” grubu da VPA dozlarının proliferasyon miktarında oluşturduğu değişiklikleri karşılaştırmak için kullanılmıştır. Tablo 3-7’de gerçekleştirilen proliferasyon deneyleri için örnek şablon gösterilmektedir. Bu şablon dikkate alınarak gerçekleştirilen 5 farklı deneyde öncelikli amaç hücre sayısının optimize edilmesi sonrasında ise farklı VPA dozlarının denenmesi

olduğundan deneyler arası farklılıklar mevcuttur. Öte yandan kontrol grupları her deneyde aynıdır.

Tablo 3-7: 1. Proliferasyon Deneyi Düzenegi (24 kuyucuklu plate)

1 x 10⁵ hücre	Boyasız kontrol	Boyalı kontrol	0,25 mM/mL	0,5 mM/mL	1 mM/mL	2 mM/mL
5 x 10⁵ hücre	Boyasız kontrol	Boyalı kontrol	0,25 mM/mL	0,5 mM/mL	1 mM/mL	2 mM/mL

Tabloda kontrol, VPA dozu uygulanmamış ancak CFSE ile boyanmış hücreleri belirtmektedir. Boyasız kontrol ise VPA ya da CFSE boyası içermeyen PANC-1 hücrelerini betimlemektedir.

1. Proliferasyon Deneyi

Bu deney, proliferasyon deneylerinin ilk uygulaması olması nedeniyle literatürde yer alan VPA doz aralıkları esas alınmıştır [80-83]. 24 kuyucuklu plate'e en uygun hücre miktarının belirlenmesi için hücre miktarları farklı iki deney düzenegi kurulmuştur. Bunun için 1 x 10⁵ ve 5 x 10⁵ sayıda hücre (pasaj no: 13) kullanılmıştır. Bu hücrelere literatürde belirtilen toksik sınırlar içinde kalan 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM ve 2 mM'lık VPA dozları uygulanarak 48. saatin sonunda akan hücre ölçer cihazında (BD FACS Calibur) proliferasyon miktarları ölçülmüştür [81] (Tablo 3-7).

2. Proliferasyon Deneyi

İlk deneyin değerlendirilmesinin ardından uygulanan VPA dozlarının ve ölçüm saatlerinin arttırılmasına karar verilmiştir. 1 x 10⁵ ve 5 x 10⁵ sayıda ve 6. pasajda olan PANC-1 hücrelerine bu sefer 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2,5 mM, 5 mM ve 10 mM konsantrasyonlarında VPA uygulanmıştır. Daha sonra hücreler hem 24. hem de 48. saatlerin sonunda toplanmış ve akan hücre ölçer cihazında CFSE ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

3. Proliferasyon Deneyi

Bu deney düzeneği ilk iki deneyden elde edilen sonuçlar çerçevesinde 1×10^5 hücre sayısı ile devam edilmesi uygun bulunarak yapılmıştır. Proliferatif kapasitenin yüksek olması gözetilerek 6. pasajdaki hücreler bu deney düzeneğinde ekilmiştir ve 2. deneyde yer alan tüm dozlar deneye dahil edilmiştir. Önceki deneylerden farklı olarak akan hücre ölçer cihazındaki ölçümleri 24. ve 48. saatlere ek olarak, 72. saatte toplanan hücrelerde de gerçekleştirilmiştir. Grupların istatistiksel açıdan değerlendirilebilmesi için tüm koşulları duplike olarak çalışılmıştır.

4. Proliferasyon Deneyi

Bu deney, 1, 2 ve 3. proliferasyon deneylerindeki optimizasyonlar neticesinde kurgulanmıştır. Bu nedenle bu deney kapsamında 1×10^5 hücre (pasaj no: 5), 0,5 mM, 1 mM, 2,5 mM, 5 mM ve 10 mM konsantrasyonlarında VPA uygulanmasının ardından 24., 48. ve 72. saatlerde toplanarak CFSE ölçümüne tabi tutulmuşlardır. Her koşul duplike olarak çalışılmıştır. Bu deney düzeneğinde diğer proliferasyon deneylerine ek olarak eş zamanlı apoptoz etkisini ölçebilmek adına, aynı doz ve saatlerin kullanıldığı apoptoz ölçümleri de gerçekleştirilmiş (Bknz Bölüm 3.2.1.3).

5. Proliferasyon Deneyi

Bu deney düzeneğinde bir öncekilere kıyasla VPA dozajlarının uygulanması hücre ekimini takip eden 24. saatte gerçekleştirilmiştir. Buradaki hipotezimiz, hücrelerin ekim sonrası plate yüzeyine yapışması ve proliferatif kapasitelerini yakalamaları için yeterli zamanı tanıyıp, bu zamanın deney sonuçları üzerindeki etkisini ölçmektir. Önceki dört deneyde ise, hücre ekimleriyle eş zamanlı VPA dozları uygulanmıştır. Bu bağlamda, 5. proliferasyon deneyi kapsamında her doz (0,5 mM, 1 mM, 2,5 mM, 5 mM ve 10 mM) ve saat (24, 48, 72 ve 96) için VPA içermeyen besi yerine, 10. pasajdaki hücreler 1×10^5 miktarda olacak şekilde ekilmiş ve öncelikle 24 saat inkübe edilmiştir. 24. saat sonunda hücreleri kaldırmadan yalnızca besi yerleri toplanmış ve bahsi geçen VPA dozlarını içeren besi yerleri ile değiştirilmiştir. 4. deneydeki tüm koşullar bu deneyde de kullanılmış olup, daha iyi bir değerlendirme için ek olarak VPA eklenmesini takiben 96. saatte de ölçüm gerçekleştirilmiştir. Yine bir önceki deneyde olduğu gibi eş zamanlı apoptoz ölçümü de yine bu deney koşullarında gerçekleştirilmiştir (Bknz Bölüm 3.2.1.3).

3.2.1.3. Proliferasyon Ölçümlerinin Analizleri

Proliferasyon çıktılarının değerlendirilmesi için literatürde yer alan $2^n = F_{\text{kontrol}} / F_{\text{VPA}}$ formülünden yararlanılmıştır [84, 85]. Hesaplamaya göre F değeri, CFSE'nin floresan yoğunluğu; n ise hücre bölünme sayısındaki farkı temsil etmektedir. Bu formülün çıkış noktası temel olarak 1 adet hücrenin n sayıda geçirdiği bölünme miktarının 2^n olarak hesaplanmasına dayanır. Bu hesaplama sonucunda ham CFSE verilerinden elde ettiğimiz ışıma değerlerinin proliferasyon katsayısına dönüştürülmesi sağlanmaktadır. Bu formül kullanılarak 3, 4 ve 5. deneylerin sonuçları ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Böylece 5. deneyde yer alan VPA uygulamasındaki saat değişiminin deney düzeneğine olan etkisi karşılaştırılabilmiştir.

3.2.1.4. Apoptoz Ölçümlerinin Gerçekleştirilmesi

Proliferasyondaki değişimin artmış apoptoz ya da nekroz oranı ile ilişkili olup olmadığını görmek amacıyla apoptoz ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Bu işlem için erken ve geç apoptozun belirlenmesini ve apoptozun nekrozdan ayırt edilebilmesini sağlayan “Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V FITC and PI, for flow cytometry (Thermo Fisher Scientific)” kitinden yararlanılmıştır. Yine ölçümler akan hücre ölçer (BD FACS Calibur) cihazında gerçekleştirilmiştir.

Ölçüm için kullanılan apoptoz kitinde, hücrelerdeki endojen Ca^{2+} -bağlı fosfolipid bağlayıcı Annexin V proteininden faydalanılmaktadır [86]. Annexin V, hücre zarının iç yüzeyinde yer alan fosfatidilserin (FS) için yüksek afiniteye sahip olup, apoptozun erken evresinde hücre yüzeyine geçmiş olan FS 'ye bağlanmaktadır [86]. Annexin V, FS'ye olan yüksek afinitesini korurken bir florokrom olan floresin izotiyosiyanat [*fluorescein isothiocyanate* (FITC)] ile konjuge edilebilmekte ve böylece apoptoz uygulanan hücrelerin akan hücre ölçer analizi için hassas bir prob olarak görev yapmaktadır [87]. Apoptozun geç evrelerinin tespitinde propidyum iyodür [*propidium iodide* (PI)] kullanılmaktadır [87]. Geç evrede zar yapısı bozulan hücrenin sitoplazması PI ile boyanmaktadır [87].

Bu bağlamda, 3 farklı apoptoz deneyi gerçekleştirilmiştir. Bunlardan ilki, deney koşullarını optimize etmek için yapılmıştır. 24 kuyucuklu plate kullanılarak her kuyuya pasaj numarası 13 olan 1×10^5 adet hücre ekilmiştir. Bu hücrelere öncelikle 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2,5 mM, 5 mM ve 10 mM konsantrasyonlarında VPA uygulanmış ve bunu takip eden, 24., 48. ve 72. saatlerde hücreler toplanarak apoptoz ölçümleri

gerçekleştirilmiştir. Uygulanan VPA dozları haricinde her saat için, akan hücre ölçer cihazında PANC-1 hücrelerinin oluşturduğu doğal floresan ışığa nedeniyle oluşan arka plan hatalarının elimine edilmesi amacı ile CFSE ile boyanmamış bir kontrol (“boyasız kontrol”) ve buna ek olarak CFSE ile boyanmış ancak VPA eklenmemiş “boyalı kontrol” grubu da VPA dozlarının apoptoz miktarında oluşturduğu değişiklikleri karşılaştırmak için kullanılmıştır.

Bir sonraki apoptoz ölçümü 4. proliferasyon deneyi ile eş zamanlı olarak yapılmış, bu deneyde belirtilen koşullar bire bir uygulanmıştır.

Daha sonra, koşulları değiştirilerek yapılan 5. proliferasyon deneyi ile birlikte üçüncü bir apoptoz deneyi daha gerçekleştirilmiş olup, yalnızca bu deney duplike olarak çalışılmıştır. 5. proliferasyon deneyindeki tüm koşullar bire bir uygulanmıştır.

Apoptoz ölçümü için uygulanan protokol:

“Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V FITC and PI, for flow cytometry” kit protokolü Tablo 3-8’de belirtilen şekilde uygulanmıştır.

Tablo 3-8: Solüsyon Hazırlığı

1X annexin-binding buffer		PI çalışma solüsyonu	
1 mL	5X annexin-binding buffer	5 µL	PI stok solüsyonu
4 mL	deiyonize su	45 µL	1X annexin-binding buffer
=	1X annexin-binding buffer	=	PI çalışma solüsyonu

1. Hücreler kuyulardan 200’er µL tripsin uygulanarak 4 dakika, 37°C inkübatörde bekletilir.
2. Tripsin uygulamış hücreler üzerine 250 µL kültür besi yeri eklenerek tripsin aktivitesi durdurulur. Daha sonra akan hücre ölçer için kullanılan tüplere alınır.
3. 1500 rpm’de, oda sıcaklığında 5 dk santrifüj edilir. Süpernatant mikropipet yardımı ile dikkatlice alınır.
4. Pelete 150 µL soğuk PBS uygulanarak 1500 rpm’de, oda sıcaklığında 5 dk santrifüj edilir. Süpernatant mikropipet yardımı ile dikkatlice alınır.

5. Pelete 100 µL 1X annexin-binding buffer (Tablo 3-8) konularak nazıkçe pipetlenir.
6. 100 µL 1X annexin-binding buffer ile pipetlenmiş sıvı içerisine 5 µL FITC annexin V ve 1 µL PI çalışma solüsyonu (Tablo 3-8) eklenerek oda sıcaklığında, karanlık ortamda 15 dakika inkübe edilir.
7. Inkübasyon sonrasında her tüp üzerine 400 µL daha 1X annexin-binding buffer eklenerek buz içerisinde ölçüm için akan hücre ölçer cihazına götürülür. Bekletmeden ölçüm gerçekleştirilir.

3.2.2. Wnt Sinyal Yolağı Genlerinin Anlatım Düzeylerinin İncelenmesi

PANC-1 hücreleri için VPA'nın IC₅₀ değeri, yukarıda özetlenen proliferasyon ve apoptoz analizleri sonucunda tespit edilerek hücrelere tatbiki gerçekleştirilmiştir. Bu deneyde de, proliferasyon deneylerinde olduğu gibi tüm kuyulara 1 x 10⁵ hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. Bu uygulama sonrası VPA'nın Wnt sinyal yolağı ana komponentleri üzerindeki moleküler etkisinin tespiti için aşağıdaki basamaklar takip edilmiştir.

3.2.2.1. RNA İzolasyonu

Belirlenen doz ve süre boyunca inkübasyonu gerçekleştirilen hücreler, tüm kuyulara 1'er mL tripsin eklenerek kaldırılmış ve pasaj aşamalarındaki gibi santrifüjlenmiştir. Daha sonra hücreler 250 µL PBS ile yıkanarak medyumdan arındırılmıştır. Çalışma üçerli gruplar halinde gerçekleştirilmiş ve her bir kuyudaki hücre 89 µL RLT+ buffer içerisine alınarak izolasyon yapılana kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.

RNA izolasyonu, ZYMO Quick-DNA/RNA Microprep Plus Kit protokolü takip edilerek gerçekleştirilmiştir:

1. RLT+ bufferi içinde liziz edilmiş hücreler, Zymo-Spin™ IC-XM kolona aktararak 30 saniye boyunca, 14000 x g'de santrifüjlenir.
2. Kolon atılarak altta kalan sıvı üzerine, daha önceki adımda koyulan RLT+ buffer miktarı kadar %70'lik etanol eklenir.
3. İyice karıştırılan sıvı, ZymoSpin™ IC kolona aktararak 30 saniye boyunca 14000 x g'de santrifüjlenir ve kolon altında toplanan sıvı atılır.

4. ZymoSpin™ IC kolon 400 µl DNA/RNA Prep Buffer eklenerek 30 saniye boyunca 14000 x g'de santrifüjlenir ve kolon altında toplanan sıvı atılır.
5. ZymoSpin™ IC kolona 700 µl DNA/RNA Wash Buffer eklenerek 30 saniye boyunca 14000 x g'de santrifüjlenir ve kolon altında toplanan sıvı atılır.
6. ZymoSpin™ IC kolona 400 µl DNA/RNA Wash Buffer eklenerek 2 dakika boyunca 14000 x g'de santrifüjlenir ve kolon 1,5 ml'lik toplama tüpüne alınır.
7. Kolon membranının merkezine 15 µl Rnaz'dan yoksun su eklenir. Bu işlem yapılırken kolonun membranına dokunmamaya özen gösterilir. 5 dakika boyunca 14000 x g'de santrifüjlenir ve RNA elde edilir.

3.2.2.2. RNA Konsantrasyonlarının Ölçülmesi

İzole edilen RNA'ların kalitesini kontrol etmek amacıyla, NanoDrop ND-1000 spektrofotometresinde optik dansite (OD) ölçümü gerçekleştirilmiştir. 260/280 nm oranında örnek absorbansının ~2,0-2,2 arasında, 260/230 nm oranında ise örnek absorbansının 1,8-2,2 arasında olmasına dikkat edilmiştir [88].

Ayrıca tüm RNA'ların saflığı %2'lik agaroz jel elektroforezinde de kontrol edilmiştir.

3.2.2.3. Primer Tasarımı

Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunda (kRT-PZR) kullanılması amacıyla gene özgü primerler internet-tabanlı primer-BLAST'ta (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) tasarlanmıştır. Bu aşamada NCBI ve Ensembl'dan istenen genin transkriptleri incelenmiş ve transkript kimliği (*transcript ID*) uygun transkript, NCBI/primer-BLAST sayfasında yer alan bölgeye yazılmıştır. Daha sonra primerler için uygun parametreler seçilmiştir. Seçilen parametreler şu şekilde özetlenmektedir:

- PCR ürün boyu: 70-155 baz çifti (bç) arasında olmasına dikkat edilmiştir.
- Primer T_m değeri: minimum 57°C, optimum 60°C ve maksimum değeri 63°C'dir.
- Primer çiftinin ekzon-ekzon bağlantısının bulunduğu bölgelere denk getirilmesi seçeneği seçilmiştir.
- Maksimum ampikon uzunluğu 200 baz çiftidir (bç).
- Primer seçilirken primer uzunluklarının 20 bç civarı olmasına dikkat edilmiştir.

Bahsedilen parametrelere özgü düzenlenen primerler SYBR Green I kullanılarak kRT-PZR’da kullanılmıştır. Bu primerlere özgü diziler Tablo 3-9

Tablo 3-9: Primer Dizileri

Gen İsmi	Boyut (bp)	Tm	Primer Dizileri	Transkript Kimliği
AXIN1	147	59.92	F TACCGGGTGCCGAAGGA	NM_003502.3
		59.82	R CTCACCTTCCTCCTCCATGC	
LEF1	98	59.60	F GGGTGGTGTGGACAGATCA	NM_016269.4
		59.58	R ACAGTGAGGATGGGTAGGGT	
CCND1	107	60.54	F TGGCGTTTCCCAGAGTCATC	NM_053056.2
		60.11	R AAAGGAAGGGGCAGGGGATA	
CTNNB1	106	59.94	F CGGCGCCATTTTAAGCCTC	NM_001904.3
		60.54	R TGAAGCTGCTCCTCAGACCT	
ACTB	105	57.32	F GTCATTCCAAATATGAGATGCGT	NM_001101
		59.81	R TGTGGACTTGGGAGAGGACT	
PPIA	109	55.00	F GCCGAGGAAAACCGTGTACT	NM_021130
		47.62	R TGTCTGCAAACAGCTCAAAGG	

3.2.2.4. cDNA Sentezi, Kontrolü ve Primerlerin Optimizasyonu İçin Polimeraz Zincir Reaksiyonu

cDNA sentezi, SensiFAST cDNA Synthesis Kit protokolüne göre gerçekleştirilmiştir (Tablo 3-10).

Tablo 3-10: SensiFAST cDNA Synthesis Kit protokolü

First strand cDNA sentezi		Sıcaklık	Süre
RNA	1 µg	95°C	10 dk
5x TransAmp Buffer	4 µl	42°C	15 dk
Reverse Transcriptase	1 µl	85°C	5 dk
DEPC, H ₂ O	RNA miktarına göre son hacme tamamlanır	4°C	∞
Toplam hacim	20 µl		

Sentezlenen cDNA'lar 1:10 sulandırılarak öncelikle kalite kontrolü açısından SensiFAST SYBR No-ROX Kit koşullarına uygun olarak (Tablo 3-11), *housekeeping* geni *ACTB* ile polimeraz zincir reaksiyonuna (PZR) tabi tutulmuştur. PZR'yi takiben %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülen örneklerde beklenen boyutta bant görülmesi durumunda tüm genlerin kRT-PZR işlemine geçilmiştir.

3.2.2.5. SYBR Green I ile Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Tüm genlerin anlatım düzeylerinin incelenmesi amacıyla, PANC-1 hücrelerinden elde edilen cDNA'lar 1:10 oranında kullanılarak, Tablo 3-11'de yer alan protokolle kRT-PZR gerçekleştirilmiştir. SYBR Green I yöntemi sonrasında floresan ışımanın istenen hedef bölgenin amplifikasyonu ile gerçekleşip gerçekleşmediğinin belirlenmesi için erime eğrisi (*melting curve*) analizi yapılmıştır.

Tablo 3-11: SensiFAST SYBR No-ROX Kit Protokolü

SensiFAST SYBR No-ROX Kit Bioline	mm (µl)	Döngü	Sıcaklık	Süre	İşlem
	1x	1 x	95 °C	2 dk	Polimeraz aktivasyonu
SYBR qPCR Mix	5,00	40 x	95 °C	10 sn	Denatürasyon
DEPC, H ₂ O	1,00		65 °C	15 sn	Primer bağlanması ve Uzama
F primer	1,0				
R primer	1,0				
Karışım	8,00				
cDNA	2,00				
Toplam hacim	10 µl				

3.2.2.6. Hidroliz Prob Kullanımı ile Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Kontrol ve VPA uygulanmış hücrelerden elde edilen cDNA'larda, Tablo 3-12'de yer alan protokol takip edilerek, *LEF1*, *AXIN1*, *CCND1* ve *CTNNB1* genlerinin anlatım düzeylerinin hesaplanması için kRT-PZR gerçekleştirilmiştir. Her bir gen için kRT-PZR'de üçer kopya halinde çalışılmıştır. Bunun için "StepOnePlus Real Time PCR" cihazı kullanılmıştır.

Tablo 3-12: TaqMan Gene Expression Assays Protokolü

TaqMan® Gene Expression Assays	mm (µl)	Döngü	Sıcaklık	Süre	İşlem
	1x	1x	50 °C	2 dk	UNG inkübasyonu
Master Mix (2X)	5,00	1x	95 °C	10 dk	Enzim aktivitesi
TaqMan® Gene Expression Assay (20X)	0,50	40x	95 °C	15 sn	Denatürasyon
DEPC, H2O	2,50		65 °C	1 dk	Primer bağlanması ve Uzama
mix	8,00				
cDNA	2,00				
Toplam hacim	10 µl				

3.2.3. İstatistiksel analiz

Gen anlatım düzeylerinin analizi $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu kullanılarak hesaplanmıştır (Tablo 3-13). kRT-PZR'den elde edilen ham verilerin ortalaması alınarak hesaplamaya dahil edilmişlerdir.

Tablo 3-13: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu

ΔCt (kontrol) = Ct hedef gen - Ct referans gen

ΔCt (örnek) = Ct hedef gen - Ct referans gen

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (örnek) - ΔCt (kontrol).

$R = 2^{-[\Delta Ct \text{ örnek} - \Delta Ct \text{ kontrol}]}$

$R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$

Elde edilen verilerin istatistiksel anlamlılıklarının değerlendirilmesi için GraphPad Prism 7 programı kullanılmıştır. Bu program ile two-way ANOVA analizi kullanılarak Tukey testi gerçekleştirilmiş ve gen anlatım düzeyleri karşılaştırılmıştır. Tukey testi, birbirinden önemli ölçüde farklı olan araçları bulmak için ham verilerde ya da varyans analizi (ANOVA) ile birlikte kullanılabilen bir testtir. Adını John Tukey'den alan test, eşit örnek sayısına sahip gruplar arasında çoklu karşılaştırma yaparak farklılık yaratan grup ya da grupları belirlemek amacıyla kullanılmaktadır [89]. Bu test sonucunda elde edilen gen anlatım düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı olup

olmadıkları, P değeri hesaplanarak yorumlanmıştır. Ayrıca bu testten, proliferasyon verileri arasındaki anlamlılık düzeylerinin tespiti için de faydalanılmıştır. Proliferasyon deneyleri tek başlarına istatistiksel analizlere tabi tutulmuştur.



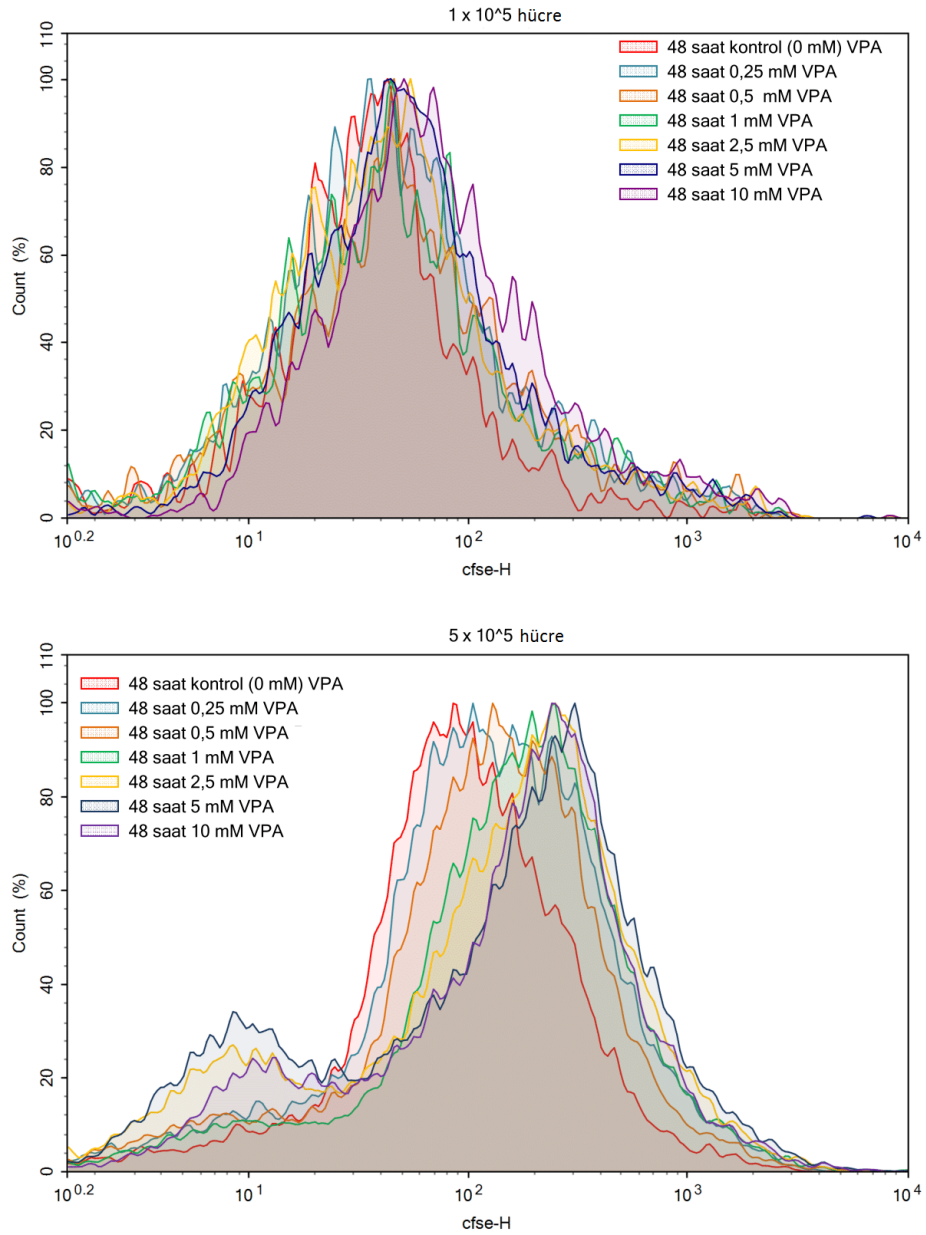
4. BULGULAR

4.1. Akan Hücre Ölçer Cihazı ile Ölçümleri

4.1.1. Proliferasyon Ölçümü ve Analizleri

Optimizasyon deneylerinin analizleri

1. ve 2. Proliferasyon deneylerinde 24 kuyucuklu plate'lere ekilecek optimum hücre sayısının belirlenmesi amaçlanmıştır.



Şekil 4-1 - 2. Proliferasyon Deneylerinin Histogram Görüntüsü

2. proliferasyon deneyinde 1 x 10⁵ ve 5 x 10⁵ hücre kullanılarak gerçekleştirilen; 0,25, 0,5 mM, 1 mM, 2,5 mM, 5 mM ve 10 mM konsantrasyonlarında VPA uygulamasının Novoexpress ile oluşturulmuş histogram görüntüleri karşılaştırılmıştır.

CFSE ışımasının, 1×10^5 hücrede daha optimal miktarda görülmesi sebebiyle, bu hücre sayısı ile deneylere devam edilmesine karar verilmiştir.

3, 4 ve 5. proliferasyon deneylerinin analizi

Bu deneyler, $2^n = F_{\text{kontrol}} / F_{\text{VPA}}$ formülü kullanılarak boyalı kontrole göre normalize edilmiş olup sonuçlar Tablo 4-1’de verilmektedir. 3. deney analizleri diğer iki deney analizleriyle kıyaslandığında 5 ve 10 mM’lık dozajlarda proliferasyonun beklenenin aksi yönünde hareket ettiği gözlemlenmiştir (Tablo 4-1) (Şekil 4-2). Bunun deneysel bir hatadan kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu düşünce bağımsız 4 ve 5. deneyler tarafından konfirme edilmiştir (Tablo 4-1) (Şekil 4-3) (Şekil 4-4).

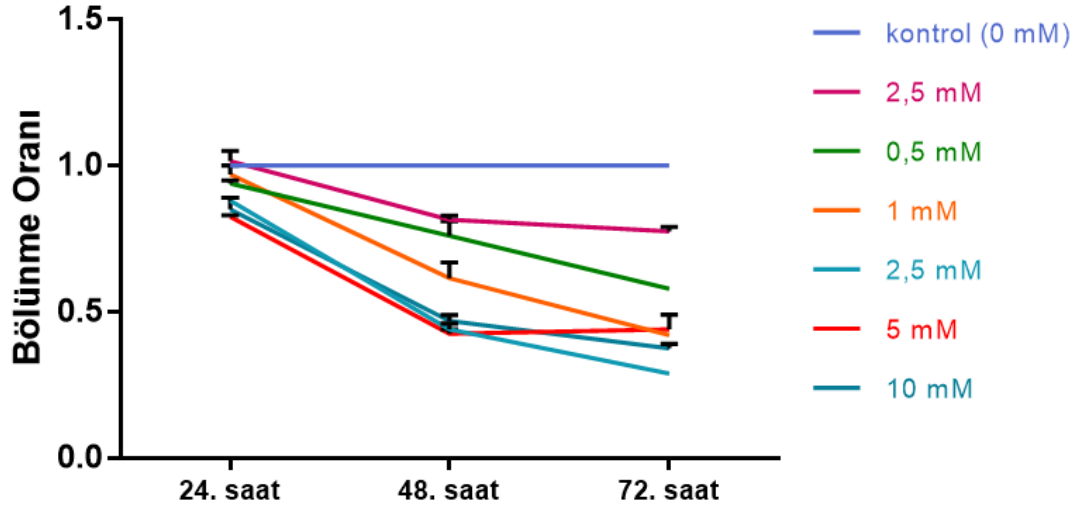
Tablo 4-1: Proliferasyon Ölçümlerinin Sonucu Bölünme Oranları

Deney	Süre	0 mM	0,25 mM	0,5 mM	1 mM	2,5 mM	5 mM	10 mM
3. deney	24 saat	1,00	1,01	0,94	0,97	0,88	0,83	0,85
	48 saat	1,00	0,81	0,76	0,61	0,44	0,43	0,47
	72 saat	1,00	0,77	0,58	0,42	0,29	0,44	0,37
4. deney	24 saat	1,00		0,86	0,84	0,83	0,82	0,74
	48 saat	1,00		0,70	0,61	0,57	0,52	0,44
	72 saat	1,00		0,61	0,53	0,49	0,42	0,33
5. deney	24 saat	1,00		0,89	0,88	0,79	0,70	0,64
	48 saat	1,00		0,70	0,58	0,57	0,53	0,49
	72 saat	1,00		0,72	0,55	0,43	0,34	0,30
	96 saat	1,00		0,58	0,41	0,26	0,21	0,16

Tüm analizler biyolojik replikelerin ortalamaları alınarak gösterilmiştir.

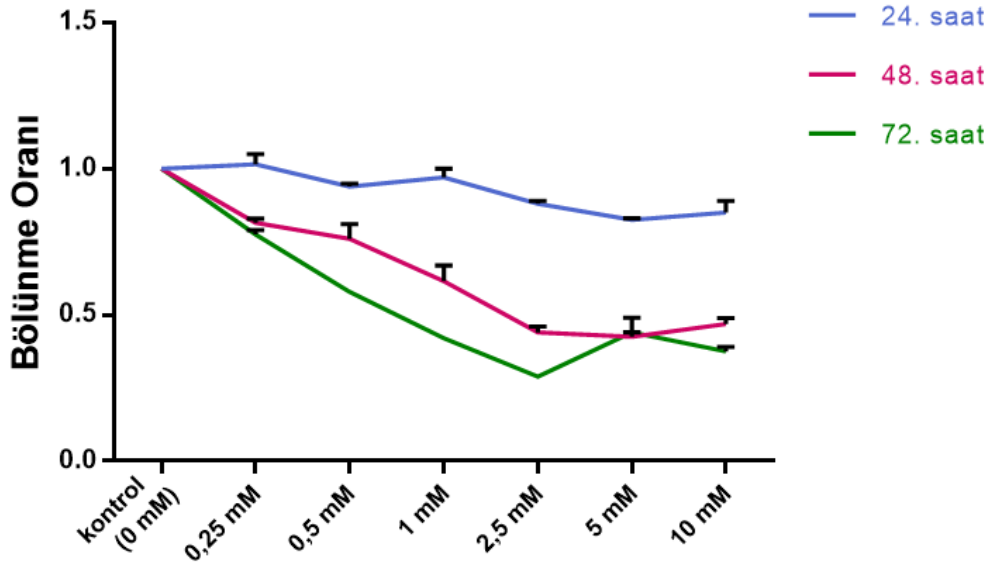
a

3. Proliferasyon Deneyi Saatlere Göre Değerlendirme



b

3. Proliferasyon Deneyi Dozlara Göre Değerlendirme

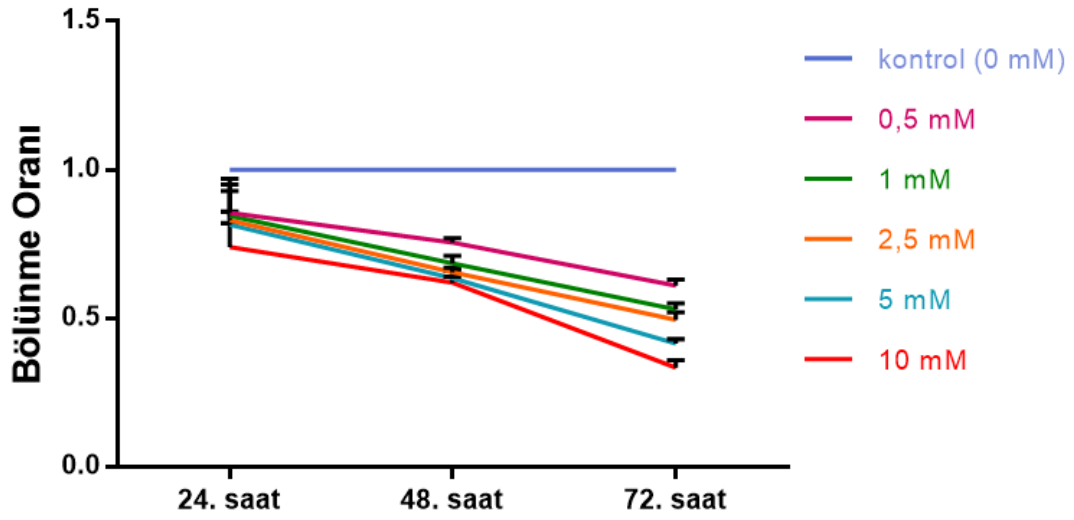


Şekil 4-2 - 3. Proliferasyon Deneyi Sonuçları

3. proliferasyon deneyinin değerlendirilmesi saatlere (a) ve dozlara (b) göre lineer regresyon grafiklerinde gösterilmiştir. Tüm koşullar kontrol grubu referans alınarak karşılaştırılmıştır.

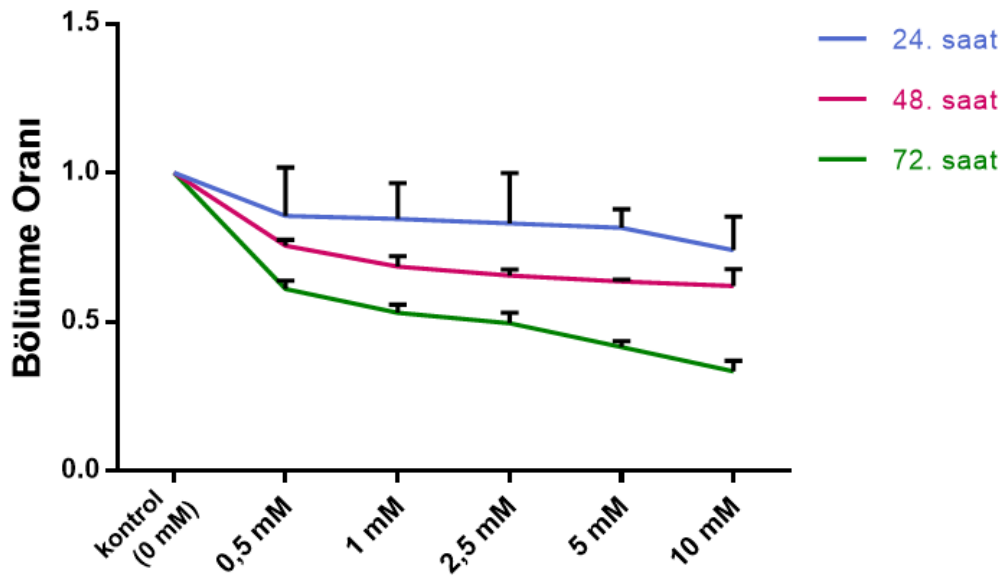
a

4. Proliferasyon Deneyi Saatlere Göre Değerlendirme



b

4. Proliferasyon Deneyi Dozlara Göre Değerlendirme

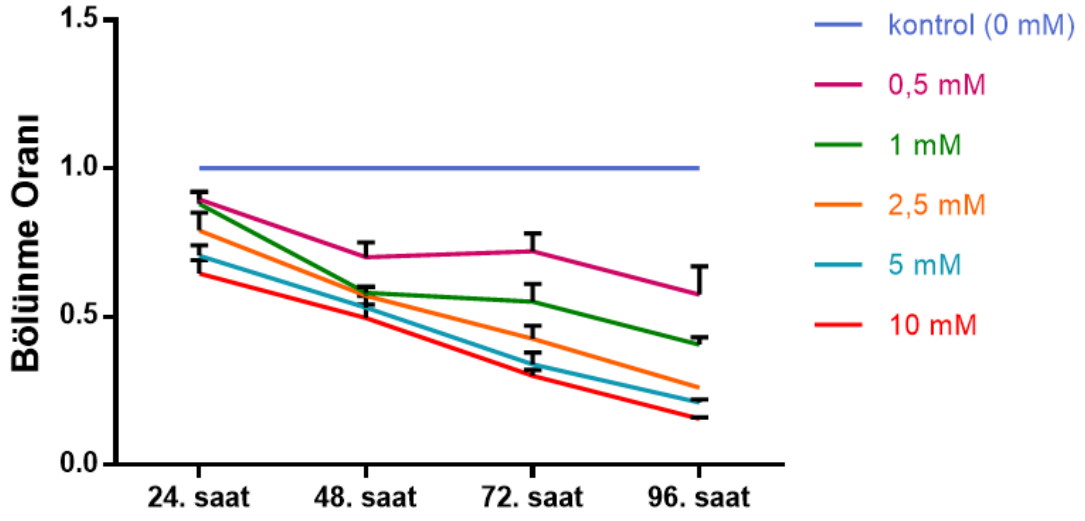


Şekil 4-3 - 4. Proliferasyon Deneyi Sonuçları

4. proliferasyon deneyinin değerlendirilmesi saatlere (a) ve dozlara (b) göre lineer regresyon grafiklerinde gösterilmiştir. Tüm koşullar kontrol grubu referans alınarak karşılaştırılmıştır.

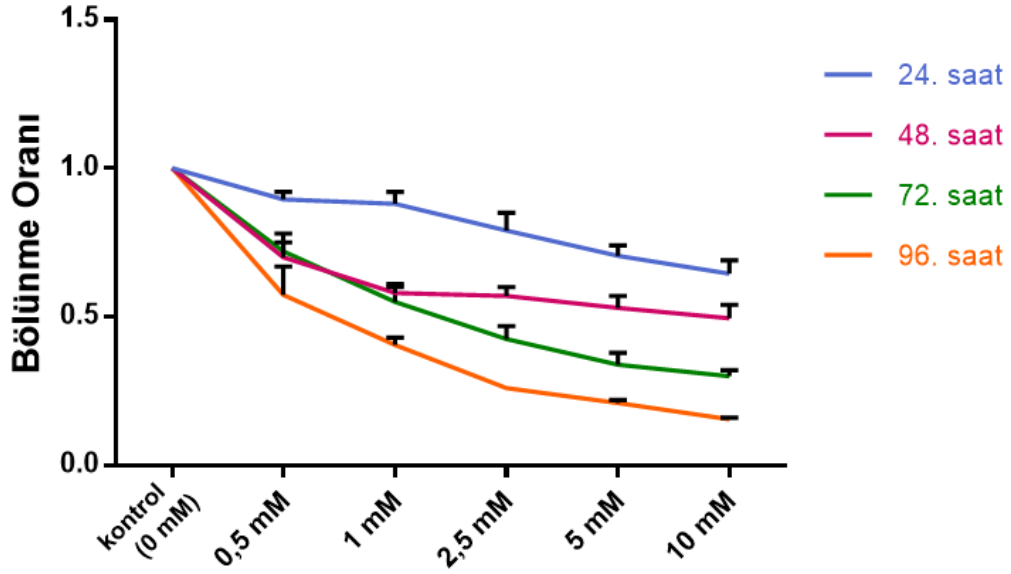
a

5. Proliferasyon Deneyi Saatlere Göre Değerlendirme



b

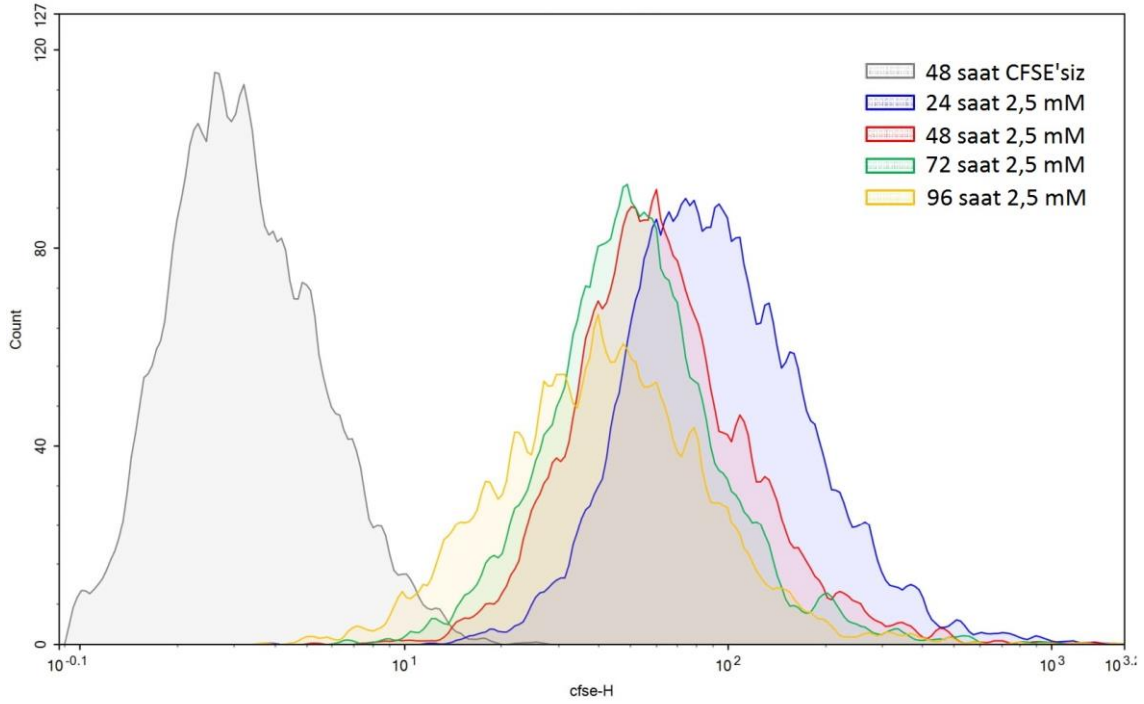
5. Proliferasyon Deneyi Dozlara Göre Değerlendirme



Şekil 4-4 - 5. Proliferasyon Deneyi Sonuçları

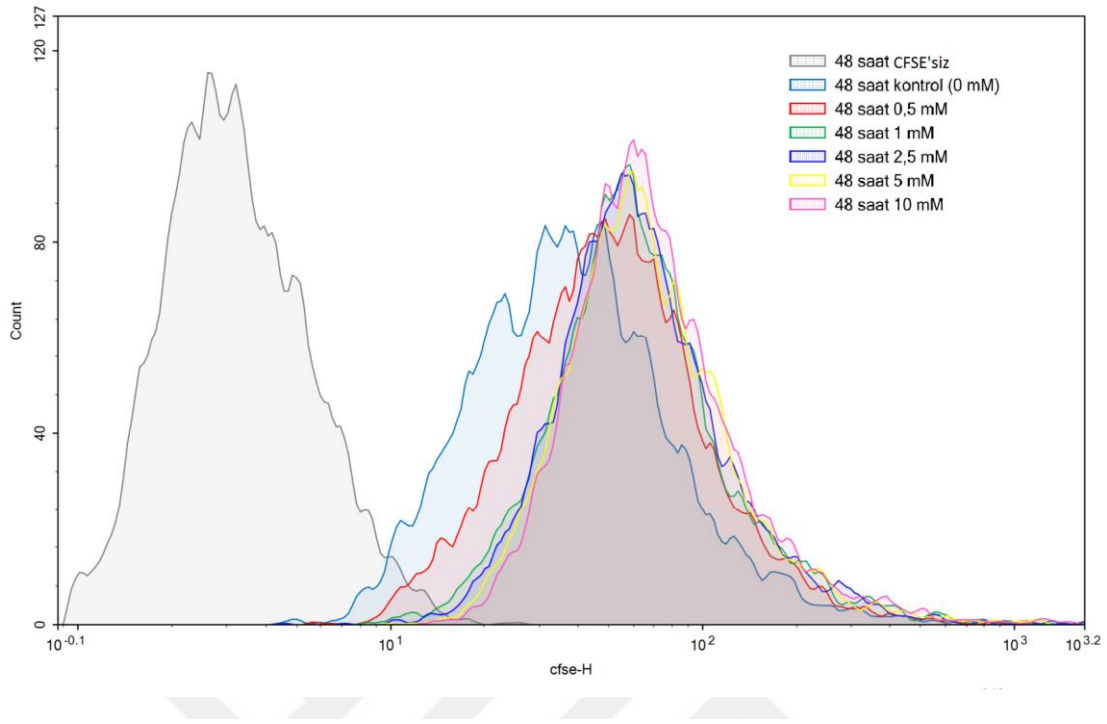
5. proliferasyon deneyinin değerlendirilmesi saatlere (a) ve dozlara (b) göre lineer regresyon grafiklerinde gösterilmiştir. Tüm koşullar kontrol grubu referans alınarak karşılaştırılmıştır.

Bu bulgular doğrultusunda 3, 4 ve 5. Proliferasyon analizlerinden elde edilen sonuçlar ile PANC-1 hücrelerinde VPA'nın IC_{50} değeri, 48. saatte 2,5 mM olarak tespit edilmiştir. Bununla birlikte, artan saat ile 48. saatte artan VPA dozlarının proliferasyon üzerindeki etkisinin histogram görüntüleri gösterilmektedir (Şekil 4-5 ve Şekil 4-6). Bu görüntüler yalnızca 5. deneye ait olup 3 ve 4. Proliferasyon deneylerinde de benzer sonuçlar tespit edildiğinden, tüm deneyleri temsilen paylaşılmaktadır.



Şekil 4-5 – 2,5 mM'lık VPA Uygulamasının 24, 48, 72 ve 96. Saatlerdeki Ölçümleri

Novoexpress programı kullanılarak elde edilmiş histogramda 24, 48, 72 ve 96. saatlerdeki CFSE floresan ışıma değerleri görülmektedir. Bu değerler CFSE boyası ile boyanmamış ve VPA ile indüklenmemiş hücreler referans alınarak karşılaştırılmıştır. Bölünme sayısı zamanla artan hücrelerin histogramda sola doğru ilerlediği görülmektedir. Akan hücre ölçer cihazındaki ölçümlerde her bir örnek tüpünden 1×10^4 hücre sayılmıştır.



Şekil 4-6 - Tüm VPA Dozlarının 48. Saat ölçümleri

Novoexpress programı kullanılarak elde edilmiş histogramda CFSE boyası ile boyanmamış ve VPA ile indüklenmemiş hücreler referans alınarak 48. saatte akan hücre ölçer cihazı ölçümleri gösterilmektedir. Histograma bakıldığında 1 mM'dan itibaren floresan değerlerinin birbirine yakın bir görüntü sergilediği görülmektedir. Akan hücre ölçer cihazındaki ölçümlerde her bir örnek tüpünden 1×10^4 hücre sayılmıştır.

Proliferasyon Deneylerinin İstatistiksel Olarak Anlamlandırılması

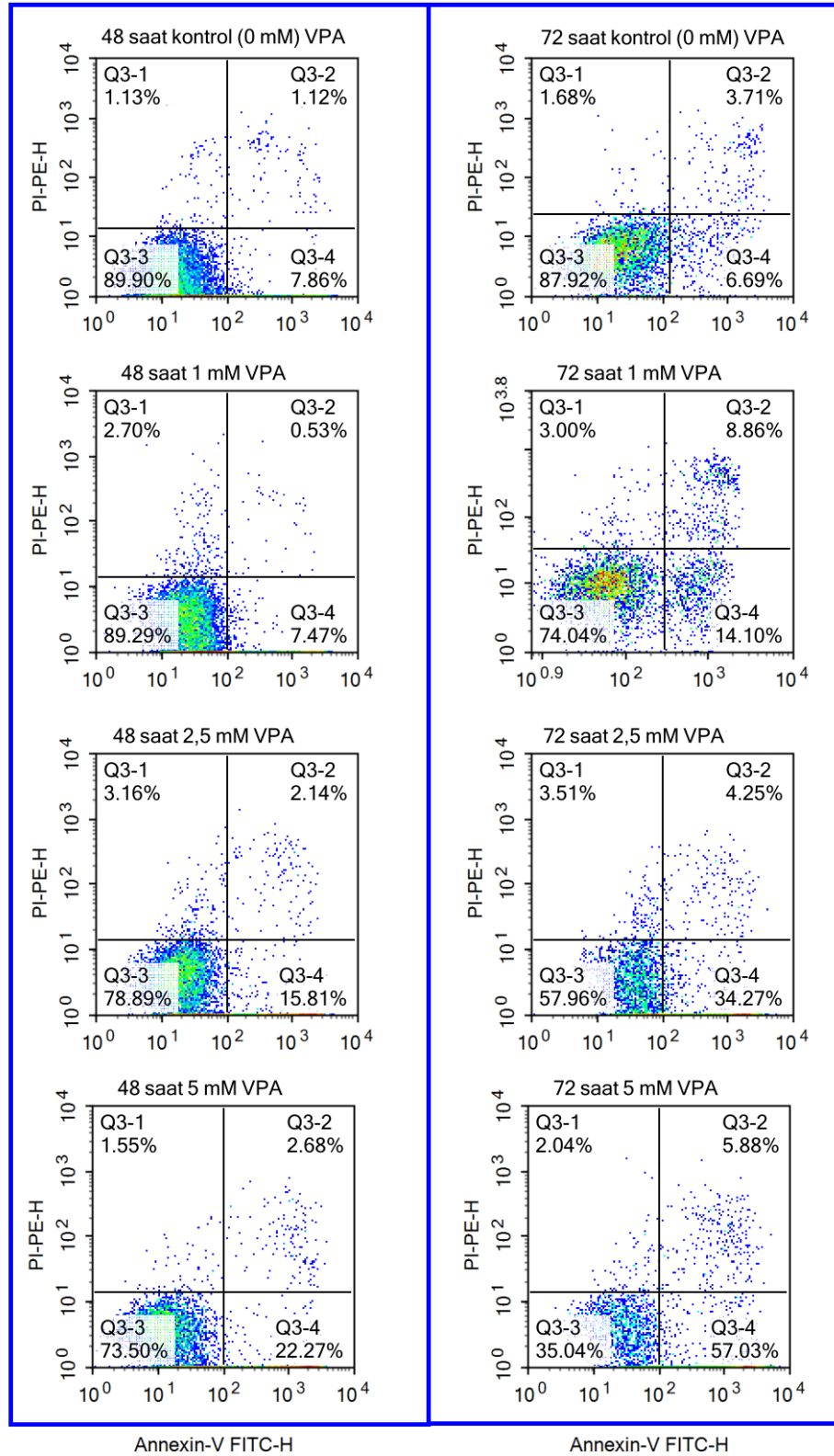
Öncelikle her doz, hücre toplama saatleri sabit olacak şekilde kendi içinde karşılaştırılmıştır. Buna göre, 24. saatte dozlar arasındaki bölünme oranlarında anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir (Tablo 4-1). Ancak 48. saatte, 2,5 mM'lık VPA dozundaki bölünme oranının yaklaşık %50 oranında düştüğü görülmektedir. Aynı saatteki 5 mM'lık VPA dozunun bölünme oranının da 2,5 mM'a yakın olduğu görülmektedir. 72. saatte, 2,5 mM'lık dozda 48. saatte olduğu gibi yaklaşık %50 oranında baskılanma gözlemlenmiştir. 96. saate gelindiğinde ise bölünme oranı oldukça düşmüş olduğundan IC₅₀ değerinin dozlar arasında tartışılmasının uygun olmadığı görülmüştür (Tablo 4-1). Daha sonra aynı karşılaştırma bu kez dozlar sabitlenerek saatler arasında yapılmıştır. Tukey testine göre 48. saatte uygulanan 2,5 ile 5 mM VPA dozları arasında anlamlı bir fark tespit edilememiştir (Tablo 4-1). Bu nedenle daha sonraki saatlerde oluşacak toksisite de hesaba katılarak daha düşük doz olan 2,5 mM VPA için 48. ve 72.

saatlerdeki bölünme oranları istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Tukey testine göre saatler arasındaki farkın anlamlı olmadığı görüldüğünden 48. saat, 2,5 mM'lık VPA uygulaması için uygun görülmüştür.

4.1.2. Apoptoz Ölçümü ve Analizleri

Proliferasyon deneyinde, ikilemde kalınan IC₅₀ değeri için doz ve saat seçimine istatistiksel olarak açıklık getirilmiştir. Bu yüzden IC₅₀ değerinin seçimi için istatistiksel veriler, apoptoz deneyi ile karşılaştırılmıştır.

Analizler sonucunda, 48. saatte yapılan ölçümlerde, 2,5 mM'lık VPA dozu uygulanan hücrelerde belirgin şekilde erken apoptozun başladığı ve nekrozun çok az olduğu gözlenmiştir (Şekil 4-7). 72. saat sonuçlarında ise geç apoptozun daha çok öne çıktığı görülmüştür (Şekil 4-7). Hücrelerin VPA'ya maruz kalma süresinin artması nedeniyle bu etkinin olduğu gözlemlenmiştir. Amacımız, proliferasyonu yarı yarıya baskılayarak erken apoptozun başladığı ilk dozu bulmak olduğundan, 48. saatte 2,5 mM'lık VPA dozundaki sonuçların, proliferasyon ölçümlerinde hesaplanan IC₅₀ değeri ile uyumlu olduğu görünmektedir.

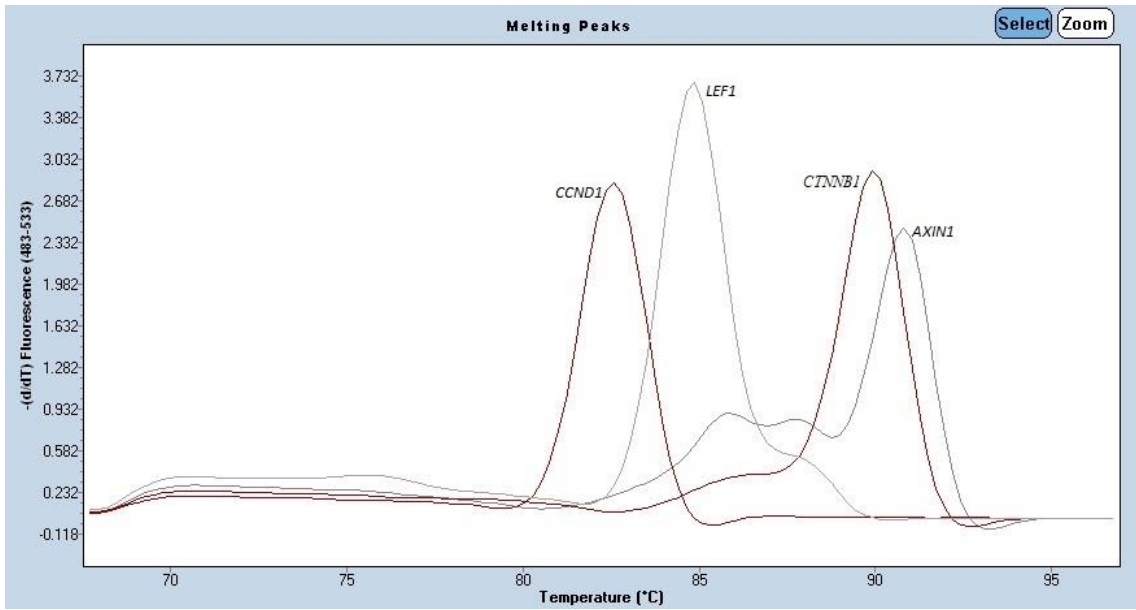


Şekil 4-7 - 4. Proliferasyon Deneyi ile Eş Zamanlı Gerçekleştirilen Apoptoz Ölçümü

Şekilde 1 mM, 2,5 mM ve 5 mM'lık VPA uygulanan hücreler ile kontrol (0 mM) grubunun 48. ve 72. saatteki ölçümleri karşılaştırılmaktadır. Sol alt alan (Q3-3) canlı hücreleri, sağ alt (Q3-4) erken apoptozu, sağ üst (Q3-2) geç apoptozu, sol üst (Q3-1) nekrotik/ölü hücreleri göstermektedir.

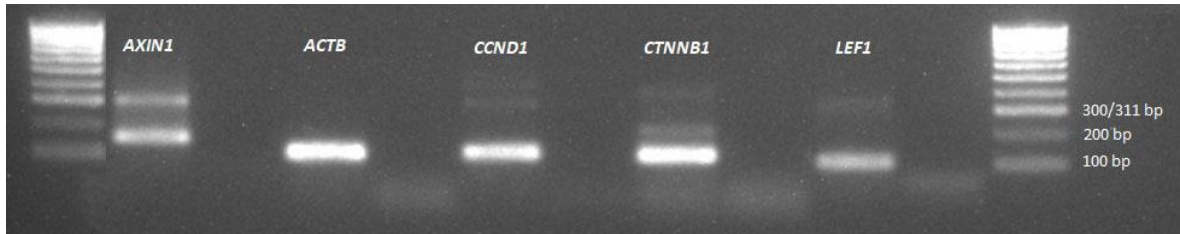
4.2. kRT-PZR'de Gen Anlatım Düzeylerinin Hesaplanması

İlk etapta *LEF1*, *AXIN1*, *CCND1* ve *CTNNB1* genlerinin anlatım düzeylerinin ölçümü için SYBR Green I metodunun kullanılması planlanmıştır. Ancak yapılan optimizasyon çalışmalarının kontrolünde, erime eğrisi analizi nonspesifik çoğalmalar göstermiştir (Şekil 4-8). Daha sonra tüm PZR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş ve erime eğrisinde görülen nonspesifik çoğalmalar doğrulanmıştır (Şekil 4-9).



Şekil 4-8 - SYBR Green I Erime Eğrisi Analizi

LEF1, *AXIN1*, *CCND1* ve *CTNNB1* genlerinin erime eğrisi analizlerinde nonspesifik çoğalmalar ve primer dimerleri görülmektedir. Bu kontrol işlemi kRT-PZR'nin hemen ardından gerçekleştirilmektedir.

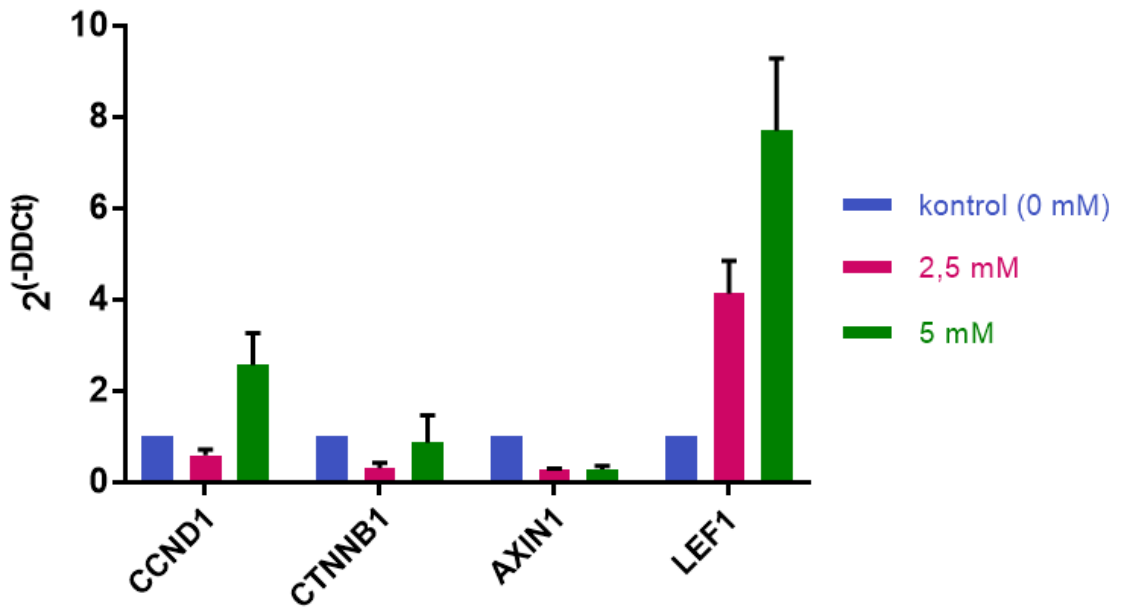


Şekil 4-9 - SYBR Green I Agaroz Jel Görüntüsü

Elektroforez sonucu *ACTB* (*housekeeping*) hariç tüm genlerde nonspesifik çoğalmalar görüntülenmiştir. Ayrıca *CTNNB1* ve *LEF1* genlerinde primer dimer oluşumu görülmektedir.

Taqman Prob Kullanılarak Gen Anlatım Düzeyinin Hesaplanması

SYBR Green I metodu kullanılarak yapılan kRT-PZR çalışmasından verimli bir sonuç alınamaması nedeniyle genlerin anlatım düzeylerinin incelenmesi amacıyla, hidroliz prob kullanımına karar verilmiştir. *ACTB*, *LEF1*, *AXIN1*, *CCND1* ve *CTNNB1* genlerinin anlatım düzeyleri Taqman hidroliz prob kullanılarak ölçülmüştür. kRT-PZR çıktıları öncelikle $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanılarak hesaplanmıştır (Tablo 4-3). Bu hesaplamalar sonucunda elde edilen sonuçlara ait grafikler Şekil 4-10'da gösterilmektedir.



Şekil 4-10 - Wnt sinyal yolağı genlerindeki anlatım düzeyi farklılıkları

2,5 ve 5 mM'lık VPA dozlarının 0 mM'lık kontrole göre normalize edilmiş anlatım düzeyleri gösterilmektedir.

Tablo 4-2: Gen Anlatımlarının $2^{-\Delta\Delta CT}$ Yöntemi ile Analizi

Gen	Deney grupları	$2^{-\Delta\Delta CT}$ ortalaması	Standart hata
<i>CCND1</i>	Kontrol (0 mM)	1	0
	2,5 mM	0,599008	0,061591
	5 mM	2,568627	0,349356
<i>CTNNB1</i>	Kontrol (0 mM)	1	0
	2,5 mM	0,31038	0,061485
	5 mM	0,869115	0,299896
<i>AXIN1</i>	Kontrol (0 mM)	1	0
	2,5 mM	0,27329	0,015493
	5 mM	0,288198	0,038113
<i>LEF1</i>	Kontrol (0 mM)	1	0
	2,5 mM	4,139539	0,355197
	5 mM	7,702911	0,792704

Kontrol (0 mM), 2,5 mM ve 5 mM konsantrasyonlarında VPA uygulanan deney gruplarının $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi ile anlatım düzeyleri değerlendirilmiştir. Her bir konsantrasyon için üçer biyolojik replike analize dahil edilmiştir.

Daha sonra elde edilen verilerin istatistiksel anlamlılıklarının değerlendirilmesi için GraphPad Prism 7 programı ile two-way ANOVA analizi kullanılarak Tukey testi gerçekleştirilmiştir (Tablo 4-4).

Tablo 4-3: Tukey Testi ile kRT-PZR Sonuçlarının Anlamlılık Değerlerinin Hesaplanması

		ortalama farkı	%95 güven aralığı	sonuç	P değeri
	kontrol – 2,5 mM	0,401	-1,121 → 1,923	ns	0,7662
<i>CCND1</i>	kontrol - 5 mM	-1,569	-3,091 → -0,0475	*	0,0432
	2,5 mM - 5 mM	-1,97	-3,492 → -0,4485	*	0,0123
	kontrol – 2,5 mM	0,69	-0,8315 → 2,212	ns	0,47
<i>CTNNB1</i>	kontrol - 5 mM	0,131	-1,391 → 1,653	ns	0,9714
	2,5 mM - 5 mM	-0,559	-2,081 → 0,9625	ns	0,6026
	kontrol – 2,5 mM	0,727	-0,7945 → 2,249	ns	0,435
<i>AXIN1</i>	kontrol vs. 5 mM	0,712	-0,8095 → 2,234	ns	0,4491
	2,5 mM vs. 5 mM	-0,015	-1,537 → 1,507	ns	0,9996
	kontrol vs. 2,5 mM	-3,14	-4,661 → -1,618	***	0,0004
<i>LEF1</i>	kontrol vs. 5 mM	-6,703	-8,225 → -5,181	****	<0,0001
	2,5 mM vs. 5 mM	-3,564	-5,085 → -2,042	***	0,0001

P değerlerinin skorlama tablosu:

ns (anlamsız)

ns - 0,0332 (*); 0,0332- 0,0021 (**); 0,0021-0,0002 (***); <0,0001 (****)

5. TARTIŞMA

Güncel verilere göre en agresif kanser türlerinden biri olan PDAK olgularında beş yıllık sağkalım oranı %8'dir [2]. Bu yüksek ölüm oranının sebebi, hastalığın erken teşhisini sağlayacak belirteçlerden yoksun olması, tümörün agresif davranış sergilemesi ve en önemlisi konvansiyonel tedavi yöntemlerinden kemoterapi ve radyoterapiye direnç göstermesidir [7]. Hastalığın tedavisinde en etkili tedavi metodu pankreatektomi olsa da hastalığın ileri seviyede olması ya da metastaz riski içermesi nedeniyle hastaların yalnızca %15-20'sine uygulanabilmektedir [90]. Cerrahi rejeksiyon sonrası nüks ihtimali yüksek olduğundan, bu işlemin kemoterapi ve radyoterapi ile desteklenmesi gerekmektedir [91].

Cerrahi rejeksiyon sonrası uygulanan kemoterapi ve radyoterapinin ana amacı, kanser hücrelerinin proliferasyonunu durdurarak, hücrelerin apoptoza gitmelerini sağlayacak DNA hasar sinyali ya da hücrel stresini oluşturmaktır [91]. Antiepileptik bir ilaç olarak kullanılan VPA'nın çeşitli tümör tiplerinde apoptozu tetiklediği ve tümör büyümesi, anjiyogenezi ve metastazı baskıladığı bildirilmiştir [4-6]. Gerek cerrahi müdahale sonrası tamamlayıcı kemoterapi tedavisi esnasında, gerekse cerrahi müdahalenin gerçekleştirilemediği durumlarda kemoterapi ve radyoterapi tedavilerine ek olarak VPA'nın farklı kanser tiplerinde kullanıldığı gösterilmiştir [92, 93].

Bir çalışmada, HDAC inhibitörlerinden olan VPA ve trikostatın A (TSA)'nın pankreas kanseri üzerindeki moleküler etkisi, PDAK hücrelerinden PANC-1 ve PaCa44 üzerinde test edilmiştir. Bu test sonucunda intrinsik (mitokondriyal) apoptoz yolağında rol alan ana genlerdeki anlatım değişikliklerinin tespiti ile apoptozun gerçekleştiği gösterilmiştir [7]. Buna paralel olarak, VPA'nın PI3K/AKT, MAPK/ERK, EGFR, TGF- β ve Notch sinyal yolağı gibi farklı yollar üzerinden kanser karşıtı etki gösterdiği de bilinmektedir [7-10].

Çeşitli uyaranlarla muameleden sonra kültürdeki hücrelerin tepkisini ve sağ kalımını izlemek için yaygın olarak hücre proliferasyonunu, hücre canlılığını ve sitotoksiteyi ölçen testler kullanılmaktadır. Bu testler, hücrelerle muamele edilecek inhibitör maddenin (ilaç gibi) IC₅₀ değerinin belirlenmesi için büyük bir öneme sahiptir. IC₅₀ değeri, bir maddenin canlıdaki belirli bir biyolojik veya biyokimyasal

fonksiyonunu *in vitro* olarak %50 oranında inhibe etme potansiyeline sahip dozu belirleyen kantitatif bir ölçümdür [94].

IC₅₀ değerinin belirlenmesinde en iyi bilinen ve en yaygın kullanımda olan metotlardan biri MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) testidir. MTT testi, canlı hücrelerde mitokondriyal dehidrojenazın, soluk sarı MTT'nin tetrazolyum halkalarını kırması ve hücre zarlarından geçemeyen mor formazan kristalleri oluşturmaya dayanmaktadır [95]. Kristaller deterjanlarla çözülebilir niteliktedir. Canlı hücre sayısı, fotometrik olarak nicelendirilebilen formazanın seviyesi ile doğru orantılıdır. Testin etkinliği dehidrojenaz enzimlerinin miktarına bağlı olduğundan, hücrelerin fizyolojik durumu test sonuçlarını etkileyebilmektedir.

Özellikle kanser araştırmalarında yaygın olarak kullanılan bir diğer test ise timidin analogu olan bromodeoksiüridin (BrdU) testidir. Bu testte, BrdU DNA replikasyonu sırasında timidinin yerini alır. DNA yapısına dahil edilen BrdU daha sonra spesifik floresan işaretli anti-BrdU antikorları ile boyanarak proliferasyon takibi için replike olan hücrelerin DNA'larındaki boyanın azalma miktarının ölçümünde kullanılmaktadır [96]. Sadece sentez fazında ölçüm gerçekleştiğinden kısa süreli deneylerde etkin sonuç alınamamaktadır.

Her iki metot da yaygın olarak kullanılsa da testlerin etkinliğini sınırlayan bir çok faktör bulunmaktadır. Bu yüzden uygun test yönteminin seçimi, beklenen sonucun yanı sıra, kullanılan hücrelerin sayısına ve tipine de bağlıdır. Hücre proliferasyonu için deneyler zaman içinde hücre sayısını, hücresel bölünme sayısını, metabolik aktiviteyi veya DNA sentezini izleyebilir.

Tez çalışmasında hücrelere uygulanan annexin V / PI ve CFSE boyalarının ölçümleri birlikte değerlendirilmiştir. Böylece hem proliferasyon miktarı analiz edilmiş, hem de proliferasyonu azalan hücrelerin sağkalım davranışları hakkında yorum yapılabilmektedir. Böylece literatürde ilk kez PANC-1 hücre hattında CFSE kullanılarak VPA IC₅₀ değerinin hesaplanması sağlanmıştır. Deney başlangıcında referans alınan literatür örneğinde [83], MTT testi gerçekleştirilerek etkin dozun 1,5 mM olduğu bulunmuştur. VPA'nın yüksek dozlarda çeşitli yan etkiler oluşturmaya sebebiyle genellikle 10 mM'dan daha yüksek dozların denendiği çalışmalar az miktarda bulunmaktadır [7, 97]. Gilardini ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, PANC-1 hücrelerine uygulanan IC₅₀ dozunun belirlenmesi için MTT ve BrdU testlerinden

yararlanılmıştır [7]. Buna göre VPA'nın IC₅₀ değeri, 10 ± 1.1 mM olarak bulunmuştur. Bulunan bu IC₅₀ değeri, daha önceki literatür bulguları ile karşılaştırıldığında oldukça yüksektir ve tez kapsamında uygulanan dozların üst limiti olan (10 mM) değerdir. Bu tez kapsamında yapılan annexin V / PI ve CFSE deneyleri sonucunda ise literatürden farklı olarak VPA IC₅₀ değeri 2,5 mM olarak bulunmuştur. CFSE boyasının hücre bazında spesifik sonuç vermesinin, bu farkın ortaya çıkmasının nedeni olduğu düşünülmektedir. Yine de gelecekte yapılacak çalışmalarda 10mM'lardan daha yüksek dozların da hücrelere uygulanarak sonuçların değerlendirilmesi planlanmaktadır. Ayrıca çalışmamızda 2,5 mM olarak belirlenen IC₅₀ değeri, yine deney başlangıcında yararlanılan literatür örneğindeki (1mM VPA, antiepileptik üst limit; 2,7 mM VPA, düşük toksisite ve uyku hali gibi zararsız yan etkiler) doz aralığına da uymaktadır [81].

Oldukça spesifik CFSE boyamasının akan hücre ölçerde ölçümü ile tespit edilen bu değer, yaygın kullanıma geçtiği takdirde benzer çalışmalara anlamlı şekilde değer katacağı düşünülmektedir. Özellikle insanlarda gerçekleştirilecek ilaç denemelerine geçmeden önce *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda ilaçların IC₅₀ değerlerinin spesifik ölçümünün kanser tedavisine önemli bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Bu bağlamda gerçekleştirdiğimiz hesaplamaların literatüre iletilmesi ile farklı hücre hatlarında farklı ilaçların IC₅₀ değerlerinin tespit edilmesine ışık tutacağını ümit etmekteyiz. Bu şekilde kanser çalışmalarına yeni bir bakış açısı kazandıracağımızı düşünmekteyiz.

Wnt sinyal yolağı, hücre gelişimini düzenleyen kilit basamaklardan biridir ve ayrıca kanserle yakından ilişkilidir. Wnt sinyallemesinin karsinogenezdeki rolü en belirgin şekilde kolorektal kanser için tarif edilmiştir ancak daha birçok kanser varlığında anormal Wnt sinyali gözlenmektedir [98].

Tezin ikinci aşamasını, optimize edilen yeni bir yöntemsel yaklaşımın, Wnt sinyal yolağındaki etkisinin irdelenmesi oluşturmaktadır. Bu kapsamda tespit edilen IC₅₀ (2,5 mM) dozu, PANC-1 hücrelerine kontrol (0 mM) ve 5 mM VPA dozu ile birlikte uygulanmıştır. Çıkan sonuçların karşılaştırılması gerçekleştirildiğinde, *AXIN1* ve *CTNNB1* genlerinin anlatım düzeylerinde anlamlı bir fark gözlenmemiş olduğundan kanonik Wnt/Beta-katenin yolağının aktivitesine dair kesin bir bilgiye ulaşılamamıştır. Burada kısıtlı sayıda genin incelenmiş olmasının etkisi büyüktür. *CCND1* geninin yalnızca kanonik yolak üyesi genlerden biri olmayıp aynı zamanda kanser belirteci

olması nedeniyle, gen anlatımında oluşan anlamlı değişim hakkında spesifik bir sonuca ulaşılamamaktadır. Bunun yanı sıra *LEF1* geninin ifadesindeki anlamlı artışın sebebinin kanonik yoldan bağımsız olduğu düşünölmektedir [75]. Ancak bu konuya yeterli açıklamanın getirilebilmesi için gelecek çalışmalarda yoldaki bulunan genlerin daha kapsamlı araştırılması ve protein çalışmaları ile fonksiyonel olarak desteklenmesi hedeflenmektedir. Ortaya çıkacak verilerin olası bir kanonik olmayan yoldaki aktivitesine işareti durumunda bu yolların da irdelenmesi hedeflenmektedir.

Tüm bu bulgular ışığında, bu tez çalışması kapsamında IC_{50} dozunun belirlenmesi için ilk kez akan hücre ölçer cihazı kullanımı aracılığıyla, yüksek spesifiteye sahip CFSE ile proliferasyon ve Annexin V / PI ile apoptoz ölçüm yöntemlerini birleştirmiştir. Elde edilen IC_{50} dozunun moleküler düzeydeki etkisinin tespitinde, kanser araştırmalarında yoğun olarak çalışılmış Wnt sinyal yolağı komponentlerinin incelenmesi ise tezin ikinci basamağını oluşturmuştur. İkinci basamağın tamamlanması için öngörölen gelecek çalışmaların gerçekleştirilmesiyle ilk kez PANC-1 hücre hattı özelinde spesifik yöntemler ile tespit edilen anti-proliferatif VPA dozunun etkisi tanımlanmış olacaktır.

KAYNAKLAR

1. *Types of pancreatic cancer* (internette) 2016. Pankreatik kanser İngiltere, 2018. <http://web.archive.org/web/20170217082948/https://www.pancreaticcancer.org.uk/information-and-support/facts-about-pancreatic-cancer/types-of-pancreatic-cancer/>
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* 2018, 68: 7–30.
3. Chatterjee D, Katz MH, Rashid A ve ark. Histologic grading of the extent of residual carcinoma following neoadjuvant chemoradiation in pancreatic ductal adenocarcinoma: a predictor for patient outcome. *Cancer* 2012, 118(12):3182–3190. doi:10.1002/cncr.26651
4. Blaheta RA, Cinatl J. Jr. Anti-tumor Mechanisms of Valproate: A Novel Role For An Old Drug. *Medicinal Research Reviews* 2002, 22(5), 492-511.
5. Blaheta RA, Michaelis M, Driever PH, Cinatl, J. Jr. Evolving Anticancer Drug Valproic Acid: Insights Into The Mechanism and Clinical Studies. *Medicinal Research Reviews* 2005, 25(4), 383-97.
6. Michaelis M, Michaelis UR, Fleming I. Valproic Acid Inhibits Angiogenesis in Vitro And in Vivo. *Molecular pharmacology* 2004, 65(3), 520-527.
7. Gilardini Montani MS, Granato M, Santoni C, Del Porto ve ark. Histone Deacetylase Inhibitors VPA and TSA Induce Apoptosis And Autophagy in Pancreatic Cancer Cells" *Cellular Oncology (Dordrecht)* 2017, 40(2), 167-180.
8. Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA, Klein PS. Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J Biol Chem.* 2001, 276(39):36734-41.
9. Kostrouchová M, Kostrouch Z, Kostrouchová M. Valproic acid, a molecular lead to multiple regulatory pathways. *Folia Biol (Praha).* 2007, 53(2):37-49.
10. Wong HH, ve Lemoine NR. Pancreatic cancer: molecular pathogenesis and new therapeutic targets" *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* 2009, 6(7), 412–422. <http://doi.org/10.1038/nrgastro.2009.89>
11. Sun LC. *Valproic acid: pharmacology, mechanisms of action and clinical implications: The novel applications of anticonvulsant drug Valproic acid in cancer therapeutics.* New York, USA: Nova Science Publishers Inc; 2013.

12. Duenas-Gonzalez A, Candelaria M, Perez-Plascencia C, Perez-Cardenas E, de la Cruz-Hernandez E ve ark. Valproic acid as epigenetic cancer drug: preclinical, clinical and transcriptional effects on solid tumors. *Cancer Treat Rev* 2008, 34:206-222.
13. Witt D, Burfeind P, von Hardenberg S, Opitz L, Salinas-Riester G ve ark. Valproic acid inhibits the proliferation of cancer cells by re-expressing cyclin D2. *Carcinogenesis* 2013, 34:1115-1124.
14. Juengel E, Makarevic J, Tsaor I, Bartsch G, Nelson K ve ark. Resistance after chronic application of the HDAC-inhibitor valproic acid is associated with elevated Akt activation in renal cell carcinoma in vivo. *PLoS One* 2013, 8 e53100.
15. Chen Y, Tsai YH, Tseng SH. Combined valproic acid and celecoxib treatment induced synergistic cytotoxicity and apoptosis in neuroblastoma cells. *Anticancer Res* 2011, 31:2231-2239.
16. Cha HY, Lee BS, Kang S, Shin YS, Chang JW ve ark. Valproic acid sensitizes TRAIL-resistant anaplastic thyroid carcinoma cells to apoptotic cell death. *Ann Surg Oncol 20 Suppl* 2013, 3:S716-724.
17. Li Y, Liu T, Ivan C, Huang J, Shen DY ve ark. Enhanced Cytotoxic Effects of Combined Valproic Acid and the Aurora Kinase Inhibitor VE465 on Gynecologic Cancer Cells. *Front Oncol* 2013, 3:58.
18. Young B, Heath JW, Stevens A, Lowe JS, Wheeler PR, Burkitt HG. *Wheater's functional histology: A text and colour atlas*. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2000. pp. 287.
19. Young B, Heath JW, Stevens A, Lowe JS, Wheeler PR, Burkitt HG. *Wheater's functional histology: A text and colour atlas*. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2000. pp. 332.
20. Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL ve ark. (içinde) *Acute and Chronic Pancreatitis*. Harrison's Principles of Internal Medicine; 2008. pp.2005-2006 .
21. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* [serial online] 2018, 68(6):394-424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
22. Ilic M, Ilic I. Epidemiology of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2016, 22(44):9694–9705. doi:10.3748/wjg.v22.i44.9694

23. Wong MCS, Jiang JY, Liang M, Fang Y, Yeung MS, Sung JJY. Global temporal patterns of pancreatic cancer and association with socioeconomic development. *Sci Rep* 2017, 7:3165. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02997-2>
24. Saad AM, Turk T, Al-Husseini MJ, Abdel-Rahman O. Trends in pancreatic adenocarcinoma incidence and mortality in the United States in the last four decades; a SEER-based study. *BMC Cancer* 2018, 18:688. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4610-4>
25. Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, Matrisian LM. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res* 2014, 74(11):2913-21. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0155>
26. Green D. *Means to an End: Apoptosis and other Cell Death Mechanisms*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2011.
27. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972, 26(4):239–257. doi:10.1038/bjc.1972.33
28. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007, 35(4):495-516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
29. Ellis HM, Horvitz HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 1986, 44(6):817-29. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90004-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90004-8)
30. Gumieny TL, Lambie E, Hartweg E, Horvitz HR, Hengartner MO. Genetic control of programmed cell death in the *Caenorhabditis elegans* hermaphrodite germline. *Development* 1999, 126(5):1011-22.
31. Zeiss CJ. The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Vet Pathol* 2003 40(5):481-95. <https://doi.org/10.1354/vp.40-5-481>
32. Fiers W, Beyaert R, Declercq W, Vandenabeele P. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene* 1999, 18:7719–30. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203249>
33. Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 2000, 407:784–8. <https://doi.org/10.1038/35037722>
34. Degterev A, Boyce M, Yuan J: A decade of caspases. *Oncogene* 2003, 22:8543-8567. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207107>

35. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997, 326:1–16. DOI:10.1042/bj3260001
36. Rai NK, Tripathi K, Sharma D, Shukla VK. Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *Int J Low Extrem Wounds* 2005, 4:138–44. <https://doi.org/10.1177/1534734605280018>
37. Riedl SJ, Salvesen GS. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007, 8:405–13. <https://doi.org/10.1038/nrm2153>
38. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014, 15:49–63. <https://doi.org/10.1038/nrm3722>
39. Yuan S, Akey CW. Apoptosome structure, assembly, and procaspase activation. *Structure* 2013, 21:501–15. <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.02.024>
40. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001, 104:487–501. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00237-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00237-9)
41. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998, 281:1305–8. DOI: 10.1126/science.281.5381.1305
42. Ichim G, Tait SW. A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. *Nat Rev Cancer* 2016, 16(8):539–48. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.58>
43. Ashkenazi A, Yuan J, Wells JA. Regulated cell death part A: apoptotic mechanisms. Preface. *Methods Enzymol* 2014, 544. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417158-9.10000-7>
44. Özören N, El-Deiry WS. Defining characteristics of Types I and II apoptotic cells in response to TRAIL. *Neoplasia* 2002, 4(6):551–557. <https://doi.org/10.1038/sj.neo.7900270>
45. Gali-Muhtasib H, Bakkar N. Modulating cell cycle: current applications and prospects for future drug development. *Curr Cancer Drug Targets* 2002, 2(4):309–36. DOI: [10.2174/1568009023333809](https://doi.org/10.2174/1568009023333809)
46. Golias CH, Charalabopoulos A, Charalabopoulos K. Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. *Int J Clin Pract* 2004, 58(12):1134–41. <https://doi.org/10.1111/j.1742-1241.2004.00284.x>

47. Murakami H, Nurse P. DNA replication and damage checkpoints and meiotic cell cycle controls in the fission and budding yeasts. *Biochem J* 2000, 349:1–12. doi:[10.1042/0264-6021:3490001](https://doi.org/10.1042/0264-6021:3490001)
48. Hücre dönsüsü diyagramı <http://articles-publisher.com/cell-cycle-diagram>
49. Sherr CJ, Roberts JM. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 2004, 18:2699–2711. DOI:10.1101/gad.1256504
50. Dyson N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* 1998, 12: 2245–2262.
51. Lundberg AS, Weinberg RA. (1998). Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol Cell Biol* 18: 753–761.
52. Satyanarayana A, Kaldis P. Mammalian cell-cycle regulation: several Cdk, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene* 2009, 28(33):2925-39. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.170>
53. Corn BG, El-Deiry WS. Derangement of growth and differentiation control in oncogenesis. *Bioessays* 2002, 24(1):83–90. <https://doi.org/10.1002/bies.10036>
54. Amerikan Kanser Derneği. *Oncogenes and tumor suppressor genes* (internet) 2014. <https://www.cancer.org/cancer/cancer-causes/genetics/genes-and-cancer/oncogenes-tumor-suppressor-genes.html>
55. Lehrmann H, Pritchard LL, Harel-Bellan A. Histone acetyltransferases and deacetylases in the control of cell proliferation and differentiation. *Adv Cancer Res* 2002, 86:41-65. [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(02\)86002-X](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(02)86002-X)
56. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular biology of the cell*. New York: Garland Science; 2002.
57. Glozak MA, Sengupta N, Zhang X, Seto E. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene* 2005, 363:15-23. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.09.010>
58. de Ruijter AJ, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S and van Kuilenburg AB. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* 2003, 370:737-749. DOI: 10.1042/BJ20021321
59. Gray SG, Ekstrom TJ. The human histone deacetylase family. *Exp Cell Res* 2001, 262:75-83. <https://doi.org/10.1006/excr.2000.5080>
60. West AC, Johnstone RW. New and emerging HDAC inhibitors for cancer treatment. *J Clin Invest* 2014, 124(1):30-9. doi: 10.1172/JCI69738

61. Nusse R, Varmus HE. Many tumors induced by the mouse mammary-tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 1982, 31: 99–109.
62. Vanooyen A, Nusse R. Structure and nucleotide-sequence of the putative mammary oncogene Int-1—proviral insertions leave the protein-encoding domain intact. *Cell* 1984, 39: 233–240.
63. Nusse R, Vanooyen A, Cox D, Fung YKT, Varmus H. Mode of proviral activation of a putative mammary oncogene (Int-1) on mouse chromosome-15. *Nature* 1984, 307: 131–136.
64. Nusse R, Brown A, Papkoff J, Scambler P, Shackleford G, McMahon A, Moon R, Varmus H. A new nomenclature for Int-1 and related genes—the Wnt gene family. *Cell* 1991 64: 231–231.
65. Komiya Y, Habas R. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* 2008, 4(2):68–75. <https://doi.org/10.4161/org.4.2.5851>
66. Lustig B, Behrens J. The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003, 129(4): 199–221.
67. van Es JH, Barker N, Clevers H. You Wnt some, you lose some: oncogenes in the Wnt signaling pathway. *Curr Opin Genet Dev* 2003, 13(1): 28–33
68. Kohn AD, Moon RT. Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways. *Cell Calcium* 2005, 38, 439–446.
69. Latres E, Chiaur DS, Pagano M. The human F box protein beta-Trcp associates with the Cul1/Skp1 complex and regulates the stability of beta-catenin. *Oncogene* 1999; 18: 849–854.
70. Metcalfe C, Mendoza-Topaz C, Mieszczanek J, Bienz M. Stability elements in the LRP6 cytoplasmic tail confer efficient signalling upon DIX-dependent polymerization. *J Cell Sci* 2010; 123: 1588–1599.
71. Lien WH, Fuchs E. Wnt some lose some: transcriptional governance of stem cells by Wnt/ β -catenin signaling. *Genes Dev* 2014, 28: 1517–1532.
72. Tree DRP, Shulman JM, Scott MP, Gubb D, Axelrod JD. Prickle mediates feedback amplification to generate asymmetric planar cell polarity signaling. *Cell* 2002, 109: 371–381.

73. Habas R, Kato Y, He X. Wnt / frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel formin homology protein Daam1. *Cell* 2001, 107: 843–854.
74. Zhan T, Rindtorff N, Boutros M. Wnt signaling in cancer. *Oncogene* 2017, 36(11):1461–1473.
75. Pez F, Lopez A, Kim M, Wands JR, Caron de Fromentel C, Merle P. Wnt signaling and hepatocarcinogenesis: molecular targets for the development of innovative anticancer drugs. *J Hepatol* 2013, 59(5): p.1107-17.
76. Lieber M, Mazzetta J, Nelson-Rees W, Kaplan M, Todaro G. Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *International Journal of Cancer* 1975, 15(5):741–747. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910150505>
77. Beck B, Chen YF, Dere W, Devanarayan V, ve ark. *Assay Operations for SAR Support* (internet) 2012. *Assay Guidance Manual* 2017, 20 Kasım. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK91994/>
78. Parish CR. Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunol Cell Biol* 1999, 77(6):499-508. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1711.1999.00877.x>
79. Filby A, Begum J, Jalal M, Day W. Appraising the suitability of succinimidyl and lipophilic fluorescent dyes to track proliferation in non-quiescent cells by dye dilution. *Methods* 2015, 82:29-37. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.02.016>
80. Fritsche P, Seidler B, Schüler S, Schnieke A, Göttlicher M, Schmid RM, Saur D, Schneider G. HDAC2 mediates therapeutic resistance of pancreatic cancer cells via the BH3-only protein NOXA. *Gut*. 2009, ;58(10):1399-409. doi: 10.1136/gut.2009.180711.
81. Li XN, Shu Q, Su JM, Perlaky L, Blaney SM, Lau CC. Valproic acid induces growth arrest, apoptosis, and senescence in medulloblastomas by increasing histone hyperacetylation and regulating expression of p21Cip1, CDK4, and CMYC. *Mol Cancer Ther*. 2005, 4(12):1912-22.
82. Strey CW, Schamell L, Oppermann E, Haferkamp ve ark. Valproate inhibits colon cancer growth through cell cycle modification in vivo and in vitro. *Exp Ther Med*. 2011, 2(2): 301–307.

83. Miyashita T, Miki K, Kamigaki T, Makino I, Tajima H ve ark. Low-dose valproic acid with low-dose gemcitabine augments MHC class I-related chain A/B expression without inducing the release of soluble MHC class I-related chain A/B. *Oncol Lett.* 2017, 14(5): 5918–5926.
84. Raz S, Sheban D, Gonen N, Stark M, Berman B1, Assaraf YG. Severe hypoxia induces complete antifolate resistance in carcinoma cells due to cell cycle arrest. *Cell Death Dis* 2014, 5:e1067. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.39>
85. Ahlen MT, Husebekk A, Killie MK, Skogen B, Stuge TB. T-cell responses associated with neonatal alloimmune thrombocytopenia: isolation of HPA-1a-specific, HLA-DRB3*0101-restricted CD4+ T cells. *Blood.* 2009, 16;113(16):3838-44.
86. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995, 184(1):39-51. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(95\)00072-I](https://doi.org/10.1016/0022-1759(95)00072-I)
87. van Engeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 1998, 31(1):1-9.
88. NanoDrop Technologies. *ND-1000 Spectrophotometer V3.5 User's Manual.* 2007.
89. Linton LR, Harder LD. *Biology 315 – Quantitative Biology Lecture Notes.* (internetten) University of Calgary, Calgary, AB. 2007.
90. Kleger A, Perkhofer L, Seufferlein T. Smarter drugs emerging in pancreatic cancer therapy. *Ann Oncol.* 2014, 25(7):1260-70.
91. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin.* 2010, 60(5):277-300.
92. Lichun S, David H. Anti-Convulsant Drug Valproic Acid in Cancers and in Combination Anti-Cancer Therapeutics. *Modern Chemistry & Applications* 2014, 02(01).
93. Münster P, Marchion D, Bicaku E ve ark. Phase I Trial of Histone Deacetylase Inhibition by Valproic Acid Followed by the Topoisomerase II Inhibitor Epirubicin in Advanced Solid Tumors: A Clinical and Translational Study. *Journal of Clinical Oncology* 2007, 25(15), 1979–1985.

94. FDA. Clinical Pharmacology Review (internette). Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi 2006, 7 Ocak. Erişim 19.03.2019, <https://www.fda.gov/media/102760/download>
95. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity tests. *J. Immunol. Methods* 1983, 65, 55–63.
96. Lehner B, Sandner B, Marschallinger J, Lehner C, Furtner T ve ark. The dark side of BrdU in neural stem cell biology: detrimental effects on cell cycle, differentiation and survival. *Cell Tissue Res.* 2011, 345(3):313-28.
97. Venkataramani V, Rossner C, Iffland L, Schweyer S, Tamboli IY, Walter J, Wirths O, Bayer TA. Histone deacetylase inhibitor valproic acid inhibits cancer cell proliferation via down-regulation of the alzheimer amyloid precursor protein. *J Biol Chem.* 2010, 285(14):10678-89. doi: 10.1074/jbc.M109.057836.
98. Zhan T, Rindtorff N, Boutros M. Wnt signaling in cancer. *Oncogene* 2017, 36;1461–1473.

HAM VERİLER



FORMLAR

ETİK KURUL KARARI

PATENT HAKKI İZİNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

VALPROİK ASİT İLE İNDÜKLENEN PANC-1 HÜCRELERİNDE WNT SİNYAL YOLAĞININ İNCELENMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 7	% 3	% 2	% 6
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Gaziantep Aniversitesi Öğrenci Ödevi	% 2
2	Submitted to Marmara University Öğrenci Ödevi	% 1
3	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	% 1
4	publications.aston.ac.uk İnternet Kaynağı	<% 1
5	Submitted to Ege Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
6	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	<% 1
7	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<% 1
8	Submitted to Konya Necmettin Erbakan University Öğrenci Ödevi	<% 1



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Fatma Yeliz	Soyadı	Ekici
Doğ.Yeri	Antalya/Elmalı	Doğ.Tar.	05.07.1993
Email	yyelizekici@gmail.com	Uyruğu	TC

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	İstanbul Üniversitesi	2016
Lise	Isparta Anadolu Lisesi	2012

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	orta	İyi		72

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı	75		

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri):