

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

**KARACİĞER VE MEME KANSERİ HÜCRELERİ İLE  
EMBRİYONİK BÖBREK HÜCRELERİNDE DOKSORUBİSİNİN  
APOPTOTİK GENLERİN VE MDR-1 GENİNİN EKSPRESYON  
DÜZEYLERİNE ETKİSİ**

**Bio. Selin ÖNCÜL**

**Biyokimya Programı**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA**

**2013**

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

**KARACİĞER VE MEME KANSERİ HÜCRELERİ İLE  
EMBRİYONİK BÖBREK HÜCRELERİNDE DOKSORUBİSİNİN  
APOPTOTİK GENLERİN VE MDR-1 GENİNİN EKSPRESYON  
DÜZEYLERİNE ETKİSİ**

**Bio. Selin ÖNCÜL**

**Biyokimya Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI  
Doç. Dr. Ayşe ERCAN**

**ANKARA**

**2013**

Anabilim Dalı :Biyokimya  
 Program :Yüksek Lisans  
 Tez Başlığı :Karaciğer ve Meme Kanseri Hücreleri ile Embriyonik Böbrek Hücrelerinde Doksorubisinin Apoptotik Genlerin ve MDR-1 Geninin Ekspresyon Düzeylerine Etkisi  
 Öğrenci Adı-Soyadı :Selin ÖNCÜL  
 Savunma Sınavı Tarihi :27.12.2013

Bu çalışma jürimiz tarafından yüksek lisans/doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

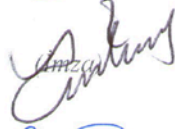
Jüri Başkanı: Prof. Dr. Yeşim ÖZKAN  
 Gazi Üniversitesi



Tez danışmanı: Doç. Dr. Ayşe ERCAN  
 Hacettepe Üniversitesi



Üye: Doç. Dr. İncilay LAY  
 Hacettepe Üniversitesi



Üye: Doç. Dr. Samiye YABANOĞLU ÇİFTÇİ  
 Hacettepe Üniversitesi



Üye: Yrd. Doç. Dr. Tuba TÜYLÜ  
 KÜÇÜKKILINÇ  
 Hacettepe Üniversitesi



ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Ersin FADILLIOĞLU  
 Müdür

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmasının her aşamasında yanımda olan, bilgisini ve deneyimlerini benimle cömertçe paylaşan, desteğini her zaman hissettiğim, bana her konuda yardımcı olan, beraber çalışmaktan gurur ve onur duyduğum değerli tez danışmanım Doç. Dr. Ayşe ERCAN'a,

Tez yazım sürecinin başlangıcından sonuna kadar bana karşı ilgisini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen saygıdeğer Hocam Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Gülberk UÇAR'a,

Bu zorlu süreçte yardımlarını ve desteğini esirgemeyen değerli Hocam Doç. Dr. Samiye YABANOĞLU ÇİFTÇİ'ye

Çalışmalarım sırasında sorularımı yanıtsız bırakmayan, her zaman çözüm önerisi getiren değerli Hocam Yrd. Doç. Dr. Tuba TÜYLÜ KÜÇÜKKILINÇ'a

Tezimin son aşamalarında laboratuvarlarını bana cömertçe açan Eczacılık Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı üyeleri Arş. Gör. Didem KART ve Arş. Gör. Ceren ÖZKUL ERDOĞDU'ya,

Zorlu tez yazım süreci boyunca beni hep destekleyen Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri ve Çalışanlarına,

Çalışmam süresince beni hiç yalnız bırakmayan, en zor zamanlarımda bile sevgi ve desteklerini benden hiç esirgemeyen çalışma arkadaşlarım ve dostlarım Arş. Gör. Kevser BİBEROĞLU, Arş Gör. Açelya YALOVAÇ ERİKÇİ, Arş Gör. İpek BAYSAL, Arş. Gör. Beyza AYAZGÖK ve Arş Gör. Melike YÜKSEL TEK'e,

11 sene boyunca hep yanımda olan, bütün mutluluklarımı ve üzüntülerimi paylaştığım, hep yanımda olan canım dostum İlkcan AKKAYA'ya,

Hayatım boyunca beni maddi ve manevi her konuda koşul gözetmeksizin destekleyen, sevgilerini, ilgilerini hep hissettiğim, onların evladı olmaktan gurur duyduğum canım Babama ve Anneme,

**Teşekkürlerimi bir borç bilirim.**

## ÖZET

**Öncül, S. Karaciğer ve Meme Kanseri Hücreleri ile Embriyonik Böbrek Hücrelerinde Doksorubisinin Apoptotik Genlerin ve MDR-1 Geninin Ekspresyon Düzeylerine Etkisi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2013.** Bu tez çalışmasında MCF-7 (meme), HEPG2 (karaciğer) kanserli hücre hatları ve embriyonik böbrek hücresi hattı HEK293, apoptozun işleyişinde belirli genlerin rolü ve apoptoz durumunda bu genlerin ekspresyon düzeylerinin incelenmesi amacıyla bir anti-kanser ilacı olan Doksorubisin (DOX)'in artan dozları ile muamele edilmiştir. Bu hücrelerde apoptoz yolağının en önemli geni olan TP53'ün 72. kodonunda tek nükleotit polimorfizmi (SNP) bulunup bulunmadığına bakılmış ve hepsinde Arg/Pro heterozigot formu tespit edilmiştir. Daha sonra TP53, MDM2, BCL-2, BAX ve MDR-1 genlerinin ekspresyon düzeylerine bakılmıştır. Buna göre MCF-7 ve HEPG2 hücrelerinde TP53'ün ekspresyon düzeyi düşük ilaç dozlarında artarken; yüksek dozlarda azalma göstermiştir. HEK293 hücrelerinde ise dozdan bağımsız bir azalma gözlenmiştir. MCF-7 hücrelerinde MDM2'nin ekspresyon düzeyi 400 ve 800 nM DOX uygulamasının ardından belirgin biçimde azalırken; HEPG2 ve HEK293'de ise düşük ilaç dozlarında artmış, daha yüksek dozlarda azalmıştır. BCL-2'nin ekspresyon düzeyi MCF-7 ve HEK293'de uygulanan ilaç dozundan bağımsız olarak azalma gösterirken; HEPG2 hücrelerinde 50 nM ilaç uygulamasıyla artmış, daha yüksek dozlarda ise azalmıştır. BAX'ın ekspresyon düzeyi MCF-7 hücrelerinde düşük dozlarda artarken; daha yüksek dozlarda azalmıştır. HEPG2 hücrelerinde 50 nM ilaç dozunun uygulanmasıyla artmış, daha yüksek dozlarda ise kontrole göre aynı kalmıştır. Artan ilaç dozuyla birlikte MDR-1'in ekspresyonu kontrole kıyasla MCF-7 hücrelerinde azalmış, HEPG2 hücrelerinde göreceli aynı kalmış, HEK293 hücrelerinde ise artış göstermiştir. Böylece bu üç hücre hattının farklı apoptoz ve çoklu ilaç direnci profillerine sahip olduğu gösterilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Apoptoz, p53, Çoklu İlaç Direnci, Gen Ekspresyonu  
Destekleyen Kurum: H.Ü.B.A.B (Proje numarası: 08 01 301 002).

## ABSTRACT

**Oncul, S. Effect of Doxorubicin on Expression Levels of Apoptotic Genes and MDR-1 Gene in Liver and Breast Cancer Cells and Embryonic Kidney Cells. Hacettepe University Institute of Health Sciences, Master Thesis in Biochemistry, Ankara, 2013.** In this study, in order to investigate roles of certain genes and expression levels of these genes in apoptosis, MCF-7 (breast), HEPG2 (liver) cancer cells and HEK293 embryonic kidney cells were treated with increasing doses of Doxorubicin (DOX). It was examined whether these cells have single nucleotide polymorphism on codon 72 of the most important gene of apoptotic pathway, p53 and Arg/Pro heterozygote form is detected in all the cells. Later, expression levels of TP53, MDM2, BCL-2, BAX and MDR-1 measured. According to the results, expression level of TP53 was increased in low doses and decreased in higher doses of the drug in MCF-7 and HEPG2 cells. In HEK293 cells, it was decreased in dose-independent manner. The expression level of MDM2 was significantly decreased in MCF-7 cells when they were treated with 400 and 800 nM DOX; while it was increased in lower doses and decreased in higher doses in HEPG2 and HEK293 cells. The expression level of BCL-2 was decreased in MCF-7 and HEK293 cells independently from the applied doses. In HEPG2 it was increased with the exposure of 50 nM dose of drug and decreased with the higher doses. The expression level of BAX was increased in lower doses and decreased in higher doses in MCF-7 cells. In HEPG2 cells, it was increased with 50 nM dose of drug and remained unchanged in higher doses when compared to the control. The expression of MDR-1 is decreased in MCF-7 cells when compared to the control, remained relatively unchanged in HEPG2 cells and increased in HEK293 cells with increasing doses of the drug. Thus it was demonstrated that these three cells lines have different apoptosis and multiple drug resistance profiles.

**Key Words:** Apoptosis, p53, Multiple Drug Resistance, Gene Expression

Supported by: H.U.B.A.B (Project Number: 08 01 301 002).

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLOLAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Hücrede Ölüm Mekanizmaları	3
2.1.1. Otofaji	3
2.1.2. Senesens	4
2.1.3. Nekroz	5
2.1.4. Apoptoz	6
2.2. p53	12
2.2.1. p53-Mdm2 İlişkisi	15
2.3. BCL-2 geni ve Bcl-2 Protein Ailesi	17
2.3.1. BAX Geni ve Proteini	19
2.4. MDR-1 Geni ve P-glikoprotein	22
2.5. Doksorubisin	25
3. GEREÇLER ve YÖNTEMLER	29
3.1. Gereçler	29
3.1.1. Hücreler	29
3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Kitler	29
3.1.3. Cihazlar	29
3.2. Yöntemler	30
3.2.1. Hücre Kültürü	30
3.2.2. Thoma Lamı ile Hücre Sayımı	31
3.2.3. MTT Sitotoksisite Deneyi	32

3.2.4. MCF-7, HEPG2 ve HEK293 Hücrelerinden DNA Saflaştırılması	33
3.2.5. MCF-7, HEPG2 ve HEK293 Hücrelerinden Saflaştırılan DNA'ların Miktarı ve Saflık Tayini	34
3.2.6. DNA için Agaroz Jelin Hazırlanması ve DNA'ların Jel Görüntüsünün Elde Edilmesi	34
3.2.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	35
3.2.8. MCF-7, HEPG2 ve HEK293 Hücrelerinde TP53 Geninin Genomik Dizisinin 72. Kodonunda Polimorfizm Çalışması	36
3.2.9. MCF-7, HEPG2 ve HEK293 Hücrelerinin 6 cm'lik Petrilere Ekilmesi	38
3.2.10. MCF-7, HEPG2 ve HEK293 Hücrelerinin RNA'larının Saflaştırılması	38
3.2.11. MCF-7, HEPG2 ve HEK293 Hücrelerinden Saflaştırılan RNA'ların Miktarının Tayini	39
3.2.12. RNA için Agaroz Jelin Hazırlanması ve RNA'ların Jel Görüntüsünün Elde Edilmesi	40
3.2.13. MCF-7, HEPG2 ve HEK293 Hücrelerinden Saflaştırılan RNA'lardan cDNA Oluşturulması	40
3.2.14. cDNA için Agaroz Jelin Hazırlanması ve cDNA'ların Jel Görüntüsünün Elde Edilmesi	42
3.2.15. Kantitatif Eş Zamanlı PCR Yöntemi ile Gen Ekspresyon Düzeylerinin Tayini	43
3.2.16. Gen Ekspresyon Düzeylerinin Tayini Amacıyla Seçilen Genlerin ve Tasarlanan Primerlerin Dizileri	52
4. BULGULAR	53
4.1. MCF-7, HEPG2 VE HEK293 Hücrelerinin Işık Mikroskobu Altındaki Görüntüsü	53
4.2. MTT Sitotoksosite Deneyi Sonuçları	53
4.3. MCF-7, HEPG2 ve HEK293 Hücrelerinden Saflaştırılan DNA Örnekleri ile İlgili Sonuçlar	55
4.4. MCF-7, HEPG2 ve HEK293 Hücrelerinden Saflaştırılan DNA Örneklerinin PCR Yöntemi ile Elde Edilen PCR Ürünleri	56



4.5. MCF-7, HEPG2 ve HEK293 Hücrelerinde TP53 Geninin Genomik Dizisinin 72. Kodonunda Polimorfizm Çalışması	57
4.6. MCF-7, HEPG2 ve HEK293 Hücrelerinden Saflaştırılan RNA Örnekleri ile İlgili Sonuçlar	59
4.7. MCF-7, HEPG2 ve HEK293 Hücrelerinden Saflaştırılan Total RNA Örneklerinin Agaroz Jel Görüntüleri	61
4.8. MCF-7, HEPG2 ve HEK293 Hücrelerinden Saflaştırılan Total RNA Örneklerinden Oluşturulan cDNA'ların Agaroz Jel Görüntüleri	62
4.9. MCF-7, HEPG2 ve HEK293 Hücrelerinde TP53, MDM2, BCL-2, BAX ve MDR-1 Genlerinin Ekspresyon Düzeyi Sonuçları	63
5. TARTIŞMA	73
KAYNAKLAR	81

## SİMGELER ve KISALTMALAR

ABC:	ATP-bağlayıcı kaset
AIF:	Apoptoz indükleyici faktör
AP1:	Aktivatör protein 1
Apaf-1:	Apoptoz proteaz aktivatör proteini 1
ART:	Hedeflemenin apoptotik düzenlenmesi
Bad:	Bcl-2 hücre ölümü antagonisti
Bak:	Bcl-2 antagonist katili
Bax:	Bcl-2 ile ilişkili X proteini
Bcl:	İnsan B hücresi foliküler lenfoması
BH:	Bcl-2 homolojisi
Bid:	BH3 ile etkileşen bölge ölüm agonisti
Bik:	Bcl-2 ile etkileşen katil
Bim:	Bcl-2 ile etkileşen hücre ölümünün düzenleyicisi
Bmf:	Bcl-2 modifiye edici faktör
Bp:	Baz çifti
BSA:	Sığır serum albümini
CTD:	C-Terminal bölge
DBD:	DNA-bağlayıcı bölge
DIABLO:	Düşük pI'ya sahip IAP bağlanma proteini
DISC:	Ölümü indükleyen sinyal kompleksi
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF:	Dimetilformamid
DMSO:	Dimetilsülfoksit
DNR:	Daunorubisin
DOX:	Dokсорubisin
ECG:	Elektrokardiyografi
ER:	Endoplazmik retikulum
EtBr:	Etidyum bromür
FADD:	Fas ile ilişkili ölüm bölgesi
Hdm2:	Human double-minute 2
HdmX:	Human double-minute X

HI FBS:	Isı ile inaktive edilmiş fetal sığır serumu
HIV:	İnsan bağışıklık yetmezlik virüsü
HPLC:	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
Hrk:	Harakiri
Hsc70:	Isı şok kognatı 70
IAP:	Apoptoz protein inhibitörü
JNK:	c-Jun N-Terminal kinaz
Kb:	Kilobaz
L-Glu:	L-Glutamin
MAPK:	Mutajen ile aktive edilen protein kinaz
Mcl-1:	Miyeloid hücre lösemisi-1
Mdm2:	Murine double-minute 2
Mdm4:	Murine double-minute 4
MdmX:	Murine double-minute X
MDR-1:	Çoklu ilaç direnci 1
MOMP:	Mitokondriyel dış zar geçirgenliği
mTOR:	Rapamisin'in memelilerdeki hedefi
MTT:	3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-difeniltetrazolyum bromür
NBD:	Nükleotit bağlayıcı bölge
NGF:	Sinir büyüme faktörü
NO:	Nitrik oksit
OD:	Oligomerizasyon bölgesi
OIS:	Onkojen ile indüklenen senesens
Omi/HtrA2:	Yüksek sıcaklık ihtiyaç proteini A
OMM:	Dış mitokondriyal zar
P/S:	Penisilin/Streptomisin
P-gp:	P-glikoprotein
PARP:	Poli-ADP-riboz polimeraz
PBS:	Fosfat tamponlu salin
PCR:	Polimeraz zincir reaksiyonu
PI3K:	Fosfoinozidid-3 kinaz
PLA:	Polilaktik asit

PRP:	Prolince zengin bölge
PS:	Fosfatidilserin
PTP:	Geçirgenlik geçiş poru
PUMA:	p53 ile regüle edilen apoptoz düzenleyicisi
Rb:	Retinoblastoma
RING:	Really interesting new gene
RIPK:	Reseptör ile etkileşen serin-treonin kinaz
ROS:	Reaktif oksijen türleri
SA- $\beta$ -gal:	Senesens ile ilişkili $\beta$ -galaktozidaz
SDS:	Sodyum dodesil sülfat
Smac:	İkinci mitokondri-türevli kaspaz aktivatörü
SNP:	Tek nükleotit polimorfizmi
SV40:	Simian virüs 40
TAD:	Transaktivasyon bölgesi
TAE:	Tris-Asetik Asit EDTA
tBid	Budanmış Bid
TE:	Tris-EDTA
TMD:	Transmembran bölgesi
TNF:	Tümör nekroz faktörü
TNFR1:	Tip 1 tümör nekroz faktörü reseptörü
TRADD:	TNF ile ilişkili ölüm bölgesi
TRAF2:	TNF reseptörü ile ilişkili faktör 2
UV:	Ultraviyole

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Şekil 2.1. Otofajinin aşamaları.	3
Şekil 2.2. Senesensde telomerlerin kırılması.	5
Şekil 2.3. Apoptoz ve nekroz	7
Şekil 2.4. Apoptoz sırasında hücrede gözlenen morfolojik değişiklikler.	8
Şekil 2.5. Kaspaz şelalesi.	9
Şekil 2.6. İntrinsik ve ekstrinsik apoptotik yollar.	11
Şekil 2.7. İntrinsik mitokondriyal, intrinsik ER ve ekstrinsik apoptotik yollar.	12
Şekil 2.8. TP53'ün DNA-bağlayıcı bölgesinin DNA'ya bağlanması	13
Şekil 2.9. TP53 geninin gen bölgeleri	14
Şekil 2.10. p53 ve Mdm2 proteini arasındaki ilişki.	15
Şekil 2.11. Mdm2'nin tanımlanmış bölgeleri	16
Şekil 2.12. BCL-2 ailesi	18
Şekil 2.13. Bax'ın yapısı.	21
Şekil 2.14. P-gp ile başlatılan akış mekanizması modelleri.	24
Şekil 2.15. Doksorubisinin kimyasal yapısı	25
Şekil 2.16. Doksorubisinin tek zincirli DNA'ya interkalasyonu.	27
Şekil 3.1. MTT sitotoksosite deneyinin esası	32
Şekil 3.2. <i>FnuDII</i> restriksiyon enziminin kesim bölgesi.	37
Şekil 4.1. MCF-7, HEPG2 ve HEK293 hücrelerinin ışık mikroskobu altındaki görüntüsü	53
Şekil 4.2. MCF-7, HEPG2 ve HEK293 hücreleri üzerinde yapılan MTT sitotoksosite deneyinin yüzde canlılık sonuçları.	54
Şekil 4.3. Standart PCR ürünlerinin % 1,2'lik agaroz jelde 30 dakika süre ile 100V'da yürütüldükten sonraki görüntüleri.	57
Şekil 4.4. SNP bulunan TP53 geninde 309 baz çiftlik gen bölgesi.	58
Şekil 4.5. MCF-7, HEPG2 ve HEK293 hücrelerinin PCR ürünleri ile gerçekleştirilen polimorfizm çalışması.	59
Şekil 4.6. Hücrelerden saflaştırılan total RNA örneklerinin jel görüntüleri.	62

Şekil 4.7. MCF-7, HEPG2 ve HEK293 hücrelerinden saflaştırılan total RNA örneklerinden oluşturulan cDNA'ların agaroz jel görüntüleri.	63
Şekil 4.8. (A) MCF-7, (B) HEPG2 ve (C) HEK293 hücrelerinde TP53 ekspresyon düzeyleri grafiği	64
Şekil 4.9. (A) MCF-7, (B) HEPG2 ve (C) HEK293 hücrelerinde MDM2 geninin ekspresyon düzeyleri grafiği	65
Şekil 4.10. (A) MCF-7, (B) HEPG2 ve (C) HEK293 hücrelerinde BCL-2 geninin ekspresyon düzeyleri grafiği	67
Şekil 4.11. (A) MCF-7 ve (B) HEPG2 hücrelerinde BAX geninin ekspresyon düzeyleri grafiği	68
Şekil 4.12. (A) MCF-7, (B) HEPG2 ve (C) HEK293 hücrelerinde MDR-1 geninin ekspresyon düzeyleri grafiği	69
Şekil 4.13. MCF-7 hücrelerinde gen ekspresyon düzeyleri	71
Şekil 4.14. HEPG2 hücrelerinde gen ekspresyon düzeyleri	71
Şekil 4.15. HEK293 hücrelerinde gen ekspresyon düzeyleri	72
Şekil 5.1. Bu tez çalışmasında ekspresyon düzeyleri incelenen apoptotik genler arasındaki ilişki.	75

## TABLOLAR DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Tablo 3.1. PCR yönteminde kullanılan PCR reaksiyon ortamı.	35
Tablo 3.2. Gradient PCR yöntemi için seçilen sıcaklık döngüleri.	36
Tablo 3.3. Standart PCR yöntemi için sıcaklık döngüleri.	36
Tablo 3.4. Polimorfizm çalışması için hazırlanan reaksiyon ortamı.	37
Tablo 3.5. Total RNA örneklerinden cDNA oluşturulması için hazırlanan ortam	41
Tablo 3.6. Polimorfizm ve gen ekspresyonu çalışmaları için tasarlanan primerler ve ilgilenilen gen ürünleri.	44
Tablo 3.7. Kantitatif RT-PCR işlemi için hazırlanan reaksiyon ortamı.	51
Tablo 3.8. TP53, BCL-2, MDR-1 ve GAPDH genleri için yapılan kantitatif RT-PCR işleminde döngü sayısı, süre ve sıcaklık değerleri.	51
Tablo 3.9. MDM2 ve BAX genleri için yapılan kantitatif RT-PCR işleminde döngü sayısı, süre ve sıcaklık değerleri.	52
Tablo 4.1. MCF-7, HEPG2 ve HEK293 hücrelerinden saflaştırılan DNA örneklerinin 260 ve 280 nm’de verdiği absorbans değerleri, saflığı ve miktarı.	56
Tablo 4.2. MCF-7, HEPG2 ve HEK293 hücrelerinden saflaştırılan total RNA örneklerinin 260 nm’de ve 280 nm’de verdiği absorbans değerleri, saflığı ve miktarı.	60
Tablo 4.3. MCF-7, HEPG2 ve HEK293 hücrelerinde TP53 geninin ekspresyon düzeylerinin ortalaması ve standart sapması.	64
Tablo 4.4. MCF-7, HEPG2 ve HEK293 hücrelerinde MDM2 geninin ekspresyon düzeylerinin ortalaması ve standart sapması.	66
Tablo 4.5. MCF-7, HEPG2 ve HEK293 hücrelerinde BCL-2 geninin ekspresyon düzeylerinin ortalaması ve standart sapması.	67
Tablo 4.6. MCF-7 ve HEPG2 hücrelerinde BAX geninin ekspresyon düzeylerinin ortalaması ve standart sapması.	68
Tablo 4.7. MCF-7, HEPG2 ve HEK293 hücrelerinde MDR-1 geninin ekspresyon düzeylerinin ortalaması ve standart sapması.	70

## 1. GİRİŞ

Canlılarda hücre ölümünün farklı tipleri genellikle izledikleri yola ve morfolojik özelliklerine göre tanımlanmaktadır. Apoptoz, hücrenin yuvarlaklaşması, hücresel hacmin azalması (piknoz) ve psödopodların geri çekilmesi ile birlikte nükleus ve kromatinin kondenzasyonu ve nükleer fragmantasyon ile karakterize edilen programlanmış hücre ölümüdür. Apoptozun Kerr ve arkadaşları tarafından 1970'lerde tanımlanmasından beri apoptoz, biyolojik araştırmalarda en çok incelenen süreçlerden biri olmuştur (1). p53, DNA hasarı, hipoksi ya da onkojen aktivasyonu gibi bazı hücresel stres faktörleri ile aktive olabilen ve DNA hasarı tamir edilene kadar hücre döngüsünün durdurulmasında rol oynayan tümör baskılayıcı bir proteindir (2). DNA hasarı tamir edilemeyecek kadar şiddetli olduğunda ise p53 yolağının aktivasyonu, tamir edilemeyen DNA'ya sahip hücrelerin bölünmesini önlemek amacıyla apoptoz ile sonuçlanmaktadır (3). p53 proteini insanlarda görülen kanser türlerinin yaklaşık %50'sinde mutasyona ya da delesyona uğramıştır (4). Bu nedenle p53 proteinini kodlayan TP53 geni ve p53 yolağında bulunan diğer bazı genler olan MDM2, BCL-2 ve BAX'ın ekspresyon düzeylerinin kanser gelişiminde önemli rolü bulunmaktadır.

Birçok kanser türünün tedavisinde kullanılan Doksorubisin (DOX), antrasiklin-tipi bir ilaçtır (5) ve kanser hücreleri üzerinde çoğalmayı önleyici aktivitesini iki farklı mekanizma olan interkalasyon ve enzim inhibisyonu ile göstermektedir. Her iki mekanizma da hücre ölümüne yol açan DNA hasarı ile sonuçlanmaktadır (6,7). Çoklu ilaç direnci, yapısal benzerliği bulunmayan ve moleküler hedefler üzerinde farklı etkileri olan farklı ilaçlara yönelik eş zamanlı bir direnç olarak tanımlanmaktadır (8). Kanser tedavisinin başlangıcında DOX gibi anti-kanser ilaçlarına karşı duyarlı olan kanser hücreleri, zamanla çoklu ilaç direnci geliştirebilmektedir. Çoklu ilaç direnci 1 (MDR-1) geni, anti-kanser ilaçlarının hücreden dışarı atılmasını sağlayan ve ATP-bağımlı bir pompa görevi gören (9), 170 kDa ağırlığında bir zar proteini olan P-glikoprotein (P-gp)'i kodlamaktadır (10,11). Bu nedenle MDR-1 geninin ekspresyonunun artması, kanser tedavisinin başarısız olmasına neden olan en önemli etkenlerden biri olarak gösterilmektedir. Bu bilgiler göz önünde bulundurulduğunda, çoklu ilaç direnci ve MDR-1 geni üzerinde yapılan çalışmalar, insanlarda kanser tedavisinin ilerlemesi açısından son derece önemlidir.



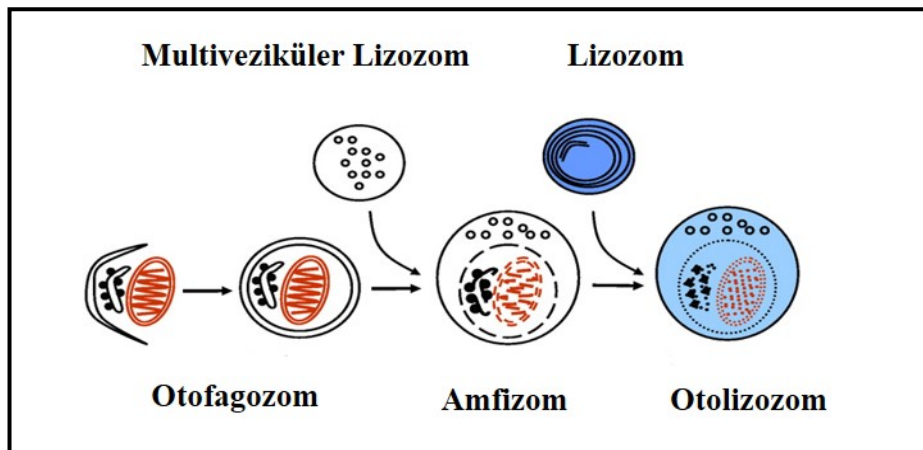
Bu çalışmada, bir anti-kanser ilacı olan ve günümüzde birçok kanser türünün tedavisinde klinik olarak kullanılan DOX'un insan meme kanseri hücre hattı MCF-7, insan karaciğer kanseri hücre hattı HEPG2 ve insan embriyonik böbrek hücresi hattı HEK293 üzerindeki etkisi incelenmiştir. MCF-7 hücre hattı, 1970'li yılların başlarında, metastatik meme kanseri olan bir kadının akciğer zarı akıntısından elde edilmiştir (12) ve *in vitro* meme kanseri çalışmalarında sıkça kullanılmaktadır. Bunun sebebi bu hücre hattının hücre sitoplazmasında östrojen reseptörlerinin bulunması ve bu şekilde östrojeni işleyebilmesidir. MCF-7 hücrelerinin çoğalması tümör nekroz faktörü (TNF)-alfa ve anti-östrojenler ile inhibe edilebilmektedir (13). HEPG2 hücreleri, karaciğer metabolizması, gelişim, onkojenesis ve hepatotoksisite gibi alanlarda geniş alanda kullanılan bir karaciğer kanseri hücre hattıdır. HEPG2 hücre hattı 1970'li yılların sonlarında, farklılaşmış epitelyal hepatoblastoma hastası 15 yaşında bir erkekten elde edilmiştir (14). HEK293 hücre hattı 1970'li yılların başlarında kürtaj işlemi ile anne karnından alınmış bir fetusun sağlıklı böbrek hücrelerinin adenovirüs tip 5 ile transformasyonu sonucu elde edilmiştir (15). MCF-7 ve HEPG2 hücre hatlarının seçilmesindeki neden meme ve karaciğer kanserlerinin dünya genelinde en çok görülen kanser tiplerinden olması ve DOX'a karşı duyarlı olmaları iken; HEK293 hücre hattının seçilmesi ile ise, sağlıklı bir hücre hattının DOX'a maruz bırakılması sonucunda gözlenen etkilerin bir kontrol olarak alınması amaçlanmıştır. Üç hücre hattı da aynı koşullarda çoğaltılmış ve aynı DOX koşullarına maruz bırakılmıştır. p53 yolağında bulunan TP53, MDM2, BCL-2, BAX ve MDR-1 genlerinin ekspresyon düzeyleri gözlenmiş ve DOX ile indüklenen apoptoz ile ekspresyon düzeylerinin değişip değişmediğine bakılmıştır. Aynı zamanda bu genlerin gen ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişki incelenerek apoptoz yolağının işleyişi üzerine ışık tutulması amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Hücrede Ölüm Mekanizmaları

#### 2.1.1. Otofaji

Otofaji, Latince ‘kendini yiyen’ anlamına gelmektedir ve ökaryotlarda evrimsel süreçte yüksek derecede korunmuş olan sitoplazmik içeriğinin lizozomal yıkımı ile karakterize edilen hayatta kalım cevabıdır (Şekil 2.1) (16,17). Besin yetersizliği, hipoksi, endoplazmik retikulum (ER) stresi, oksidatif stres gibi çeşitli stres uyaranlarına karşı gelişen hücresel bir cevaptır (17). İçinde bulunulan duruma bağlı olarak hücre ölümüne ya da hücrenin hayatta kalmasına yol açabilmektedir. Açlık durumunda reaktif oksijen türleri (Reactive Oxygen Species, ROS)’nin birikimi ve ATP yokluğu, genellikle oksidatif stres ile indüklenen hücre ölümüne yol açmaktadır (18,19). Otofaji aynı zamanda nörodejenerasyon, yaşlanma, doku gelişimi, doku farklılaşması ve homeostazın sağlanmasında da rol oynamaktadır (20). Otofajinin görevini yerine getirememesi iskemi, kardiyovasküler hastalıklar, nörodejenerasyon ve kanser gibi çeşitli hastalıklara neden olabilmektedir (16,21). Otofaji, rapamisin’in memelilerdeki hedefi (mammalian target of rapamycin, mTOR), fosfoinozid-3 kinaz (PI3K), GTPaz’lar, kalsiyum ve protein sentezine katılan bazı elemanlar gibi besin sinyal iletiminde önemli rol oynayan proteinler tarafından düzenlenmektedir (22).



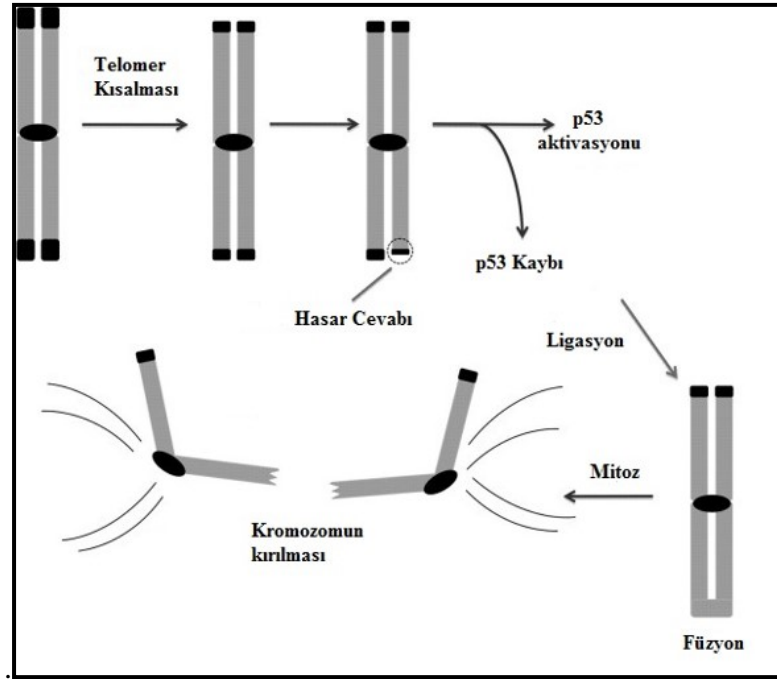
Şekil 2.1. Otofajinin aşamaları (16).

### 2.1.2. Senesens

1961 yılında insan hücrelerinin *in vitro* sonsuz bir şekilde bölünmediği anlaşıldıktan sonra hücrel senesens fikri ortaya atılmıştır (23). Senesens, hücrenin çoğalma yeteneğini geri dönüşümü olmayan biçimde kaybettiği durum olarak tanımlanmaktadır. Senesens; telomer kısalması, DNA hasarı, onkojenik ya da mitojenik uyarılar ve kanserdeki sinyal transdüksiyonu yoluyla tümör baskılayıcı mutasyon mekanizmaları ile tetiklenmektedir (24). Senesens geçiren hücreler, moleküler değişikliklerin yanı sıra karakteristik morfolojik değişiklikler de göstermektedir. Yapısal düzeyde senesens geçiren hücrelerde ER’da yanlış katlanan proteinler gözlenirken (25); mikroskobik düzeyde vakuol içeren granüler sitoplazmaya sahip genişlemiş, yassı ve düzensiz hücreler gözlenmektedir (26).

Hücrelerin senesense girmesi hücre döngüsünün G<sub>1</sub>/S safhasında gözlenmektedir (27). Normal hücrelerin aksine senesens geçiren hücreler göreceli daha stabildir, çoğalma yeteneğini kaybetmiştir ancak; metabolik aktivitesini korumaktadır (28). Senesens geçiren hücreler mitojenik uyarıların varlığında bölünme yeteneğini kaybetse de metabolik olarak aktiftir ve senesens ile ilişkili  $\beta$ -galaktozidaz (Senescence-Associated  $\beta$ -galactosidase, SA- $\beta$ -gal)’ı, birkaç büyüme faktörünü, sitokinleri, proteazları, DNA hasarı cevap proteinlerini (DNA-SCARS/TIF) ya da heterokromatinleri eksprese edebilmektedir (29). pH 6.0’da SA- $\beta$ -gal’in senesense uğramış hücreler tarafından *in vivo* ya da *in vitro* olarak ekspresyonu, senesens aktivitesinin standart bir biyobelirteci olarak kullanılmaktadır (30).

Senesens, replikatif senesens ve onkojen ile indüklenmiş senesens olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Replikatif senesens hücre çoğalması sonucunda kısalmış telomerlerin birikimiyle indüklenmektedir (31). Kısalan telomerler çift zincir DNA kırıklarına yol açmakta; bu da p53 ve retinoblastoma (Rb) tümör baskılayıcı yollarının aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır (Şekil 2.2) (32,33).



**Şekil 2.2.** Senesensde telomerlerin kırılması (33).

Onkojen ile indüklenen senesens (oncogene-induced senescence, OIS) ise Ras gibi onkojenler (34), DNA hasarı ya da diğer hücrel stresler ile aktive edilmektedir (35). OIS ayrıca kritik bir tümör baskılayıcı genin ya da bu genin fonksiyonunun kaybı ile de indüklenebilmektedir (30). Bu senesense uğrayan hücreler yeni genetik mutasyonlarla değişime uğradığında ise senesensden kurtulabilmekte ve çoğalma durumlarına geri dönebilmektedir (36).

### 2.1.3. Nekroz

Nekroz, hücre ölümünün oksijensiz kalma ve ani besin azalışı gibi şiddetli ve akut ya da sıcaklık, deterjanlar, kuvvetli bazlar ve radyasyona maruz kalma gibi ağır fizyokimyasal hasar durumlarında gözlenen pasif bir şekli olarak tanımlanmaktadır (37).

Nekroz, hücre içi homeostazın bozulmasıyla hücrenin şişmesi, mitokondrinin genellikle şişerek ve patlayarak fonksiyonunu kaybetmesi, hücrel zarın yırtılması, sitoplazmik içeriğin hücreler arası boşluğa dökülmesi ve hücrenin lize uğraması ile karakterize edilmektedir (38,39). Nekrozu *in vivo* şartlarda inflamatuvar cevap takip

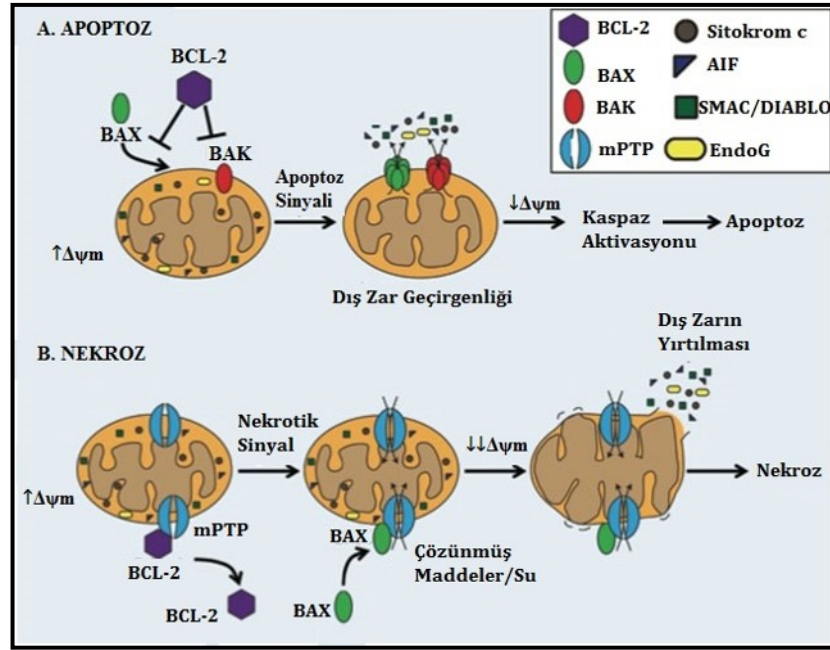
etmektedir (40). Nekroz geçiren hücrelerin organellerinde karakteristik morfolojik değişiklikler gözlenirken; nukleuslarının yapısı göreceli aynı kalmaktadır (41).

Nekroz uzun yıllar boyunca kabul görülenin aksine kontrol edilebilmektedir (42). Programlanmış nekroz ya da nekroptoz, reseptör ile etkileşen serin-treonin kinaz (receptor-interacting serine-threonine kinase, RIPK)'lar,  $Ca^{2+}$  ve mitokondrinin katıldığı birkaç sinyal iletim şalesi arasındaki ilişkinin bir sonucu olarak gözlenmektedir. RIPK3, RIPK1 ile etkileşime girerek karbohidrat ve glutamin metabolizmasındaki bazı enzimlere bağlanmaktadır (37,43).  $Ca^{2+}$ , nekroza yol açan bazı süreçleri indükleyen polilaktik asit (PLA), kalpainler ve nitrik oksit (NO)'in aktivasyonunu düzenlemektedir. Yüksek düzeylerde ROS üretimi ve mitokondrinin fonksiyonunu kaybetmesine bağlı olarak mitokondriyal geçirgenlik geçiş poru (permeability transition pore, PTP) ve ATP yokluğu nekroptozu neden olabilmektedir (40).

DNA hasarı bulunan ancak apoptotik yolları eksik olan hücreler, DNA tamiri ile ilişkili bir protein olan poli-ADP-riboz polimeraz (PARP)-bağımlı olan düzenlenmiş bir nekroz ile ölebilmektedir (41).

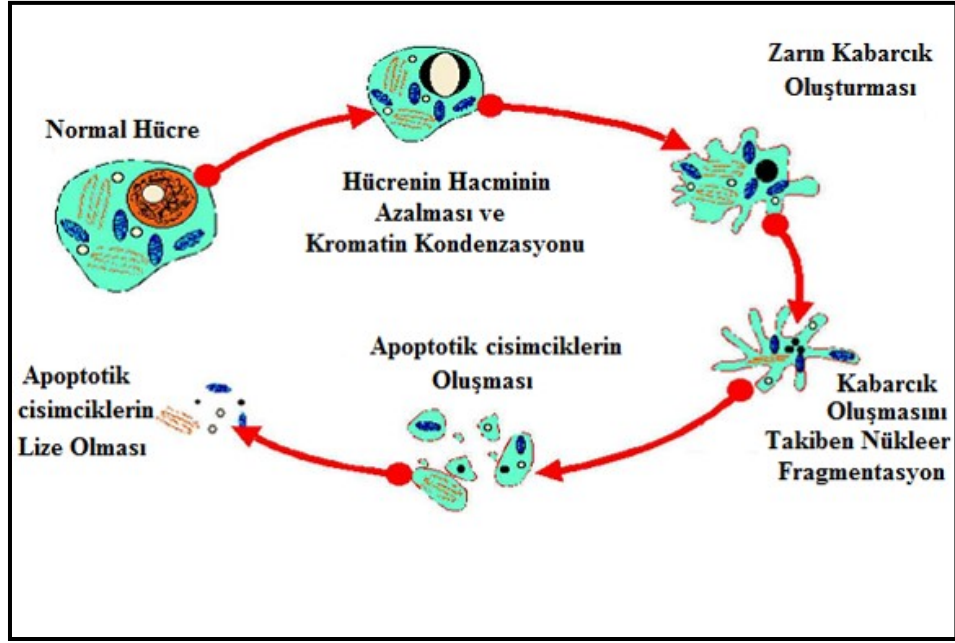
#### **2.1.4. Apoptoz**

Apoptoz sözcüğü Yunanca'da 'sonbaharda ağaçların yapraklarının dökülmesi' anlamına gelmektedir. Bu terim, nekrozdan farklı olarak hücrenin aktif olarak belirli uyarıları alması üzerine, ölüme giden bir yol izlediği durumu belirtmek için kullanılmaktadır. Apoptozun Kerr ve arkadaşları tarafından 1970'lerde tanımlanmasından beri apoptoz, biyolojik araştırmalarda en çok incelenen süreçlerden biri olmuştur (Şekil 2.3) (1).



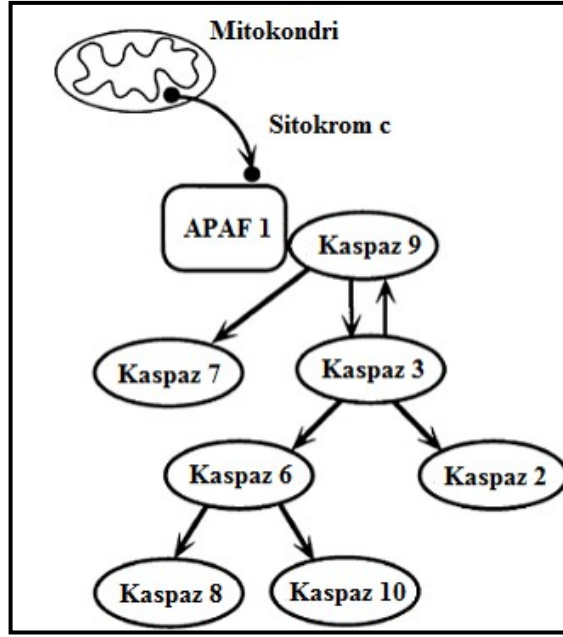
Şekil 2.3. Apoptoz ve nekroz (31).

Hem nukleusta hem de sitoplazmada, apoptotik hücre ölümünde gözlenen morfolojik değişiklikler, hücre tipleri ve türler arasında önemli derecede benzerlik göstermektedir (32,33). Hücre ölümünün başlangıcından, son hücresel fragmentasyona kadar genellikle birkaç saat gerekmektedir. Ancak bu zaman; hücre tipine, uyarana ve apoptotik yolağa bağlı olarak değişebilmektedir (34). Apoptoz; hücrenin yuvarlaklaşması, hücresel hacmin azalması (piknoz), psödopodların geri çekilmesi, nukleus ve kromatinin kondenzasyonu ile birlikte nukleer fragmentasyon ile karakterize edilmektedir (35). Kromatin kondenzasyonu, nukleer zarın periferinde başlamakta ve hilal ya da halka benzeri bir yapı oluşturmaktadır. Kromatin daha sonra, karyogenez olarak tanımlanan işlemle, hücre içinde kırılana kadar kondenzasyona uğramaktadır (36). Bütün bu süreç boyunca plazma zarı bozulmadan kalmaktadır. Apoptozun daha sonraki aşamalarında zarın kabarcık oluşturmasını, sitoplazmik organellerin yapısal modifikasyonunu ve zar bütünlüğünün bozulmasını içeren bazı morfolojik değişiklikler görülmektedir (Şekil 2.4) (44,45). Genellikle fagositik hücreler, apoptotik cisimcikler oluşmadan önce apoptotik hücreleri yutmaktadır. Bu nedenle apoptoz 1972'de, hücre biyolojisinin çok geç bir tarihinde keşfedilmiştir ve apoptotik cisimcikler sadece özel koşullar altında *in vitro* görülebilmektedir (46).



Şekil 2.4. Apoptoz sırasında hücrede gözlenen morfolojik değişiklikler (45).

Apoptozda genel olarak kaspazların aktivasyonu, DNA/protein yıkımı ve zar değişiklikleri/fagositik hücreler tarafından tanınma olmak üzere üç temel biyokimyasal değişiklik gözlenmektedir (47). Apoptozun erken safhalarında, fosfatidilserin (phosphatidylserine, PS) zarın iç tabakasından dış tabakasına çıkmakta, böylece ölü hücrelerin makrofajlar tarafından erken tanınmasını sağlamakta ve bu erken tanınma da pro-inflamatuvar hücresel bileşikler salınmadan fagositoz ile sonuçlanmaktadır (48). Bu süreci DNA'nın 50-300 kilobaz (kb)'lık parçalara karakteristik yıkımı izlemektedir (49). Daha sonra, DNA'nın endonükleazlar tarafından 180-200 baz çifti (bp) uzunluğunda olabilen çok sayıda oligonükleozomlara internükleozomal kırılması gözlenmektedir (50). Apoptozun bir başka özgün özelliği de, sistein proteaz ailesine ait kaspaz olarak isimlendirilen bir grup enzimin aktivasyonudur (Şekil 2.5) (47,51). Aktifleşen kaspazlar, canlılarda birçok hücresel proteini kesebilmekte, nükleer yapı iskeletini ve sitoskeleti parçalayabilmektedir. Kaspazlar, ayrıca nükleer DNA'yı daha ileri derecede yıkıma uğratan DNaz'ı aktive etmektedir (52).



Şekil 2.5. Kaspaz şelalesi (51).

#### 2.1.4.1. Apoptoz Yolakları

Kaspazlar, hem başlatıcı hem de infaz edici olmaları açısından apoptoz mekanizmasının merkezinde yer almaktadır. Kaspazların aktive edildiği üç yolak vardır. Bu yollardan genel olarak başlatıcı yollar olarak tanımlanan ikisi, apoptozun intrinsik (ya da mitokondriyal) ve ekstrinsik (ölüm reseptörü) yollarıdır. İki yolak da hücreyi sonunda ortak yolağa, apoptozun infaz aşamasına yönlendirmektedir (Şekil 2.6) (46,53). Daha az bilinen üçüncü başlatıcı yolak ise intrinsik ER yolağıdır (53).

##### 2.1.4.1.1. İntrensik Yolak

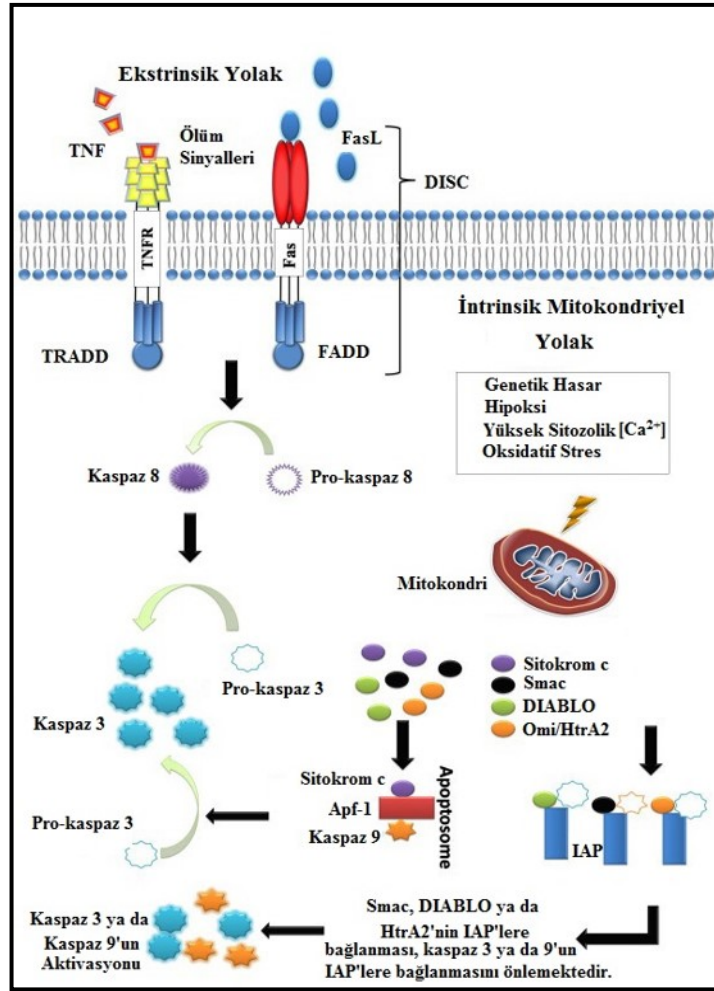
İsminden de anlaşılacağı üzere intrinsik yolak, hücre içinde başlatılmaktadır. Tamir edilemez genetik hasar, hipoksi, aşırı yüksek derişimlerdeki sitozolik  $Ca^{2+}$ , şiddetli oksidatif stres gibi iç uyaranlar, intrinsik mitokondriyal yolağın başlamasının tetikleyicilerinden bazılarıdır. Bu yolak, uyaranlardan bağımsız olarak, artmış mitokondriyal geçirgenliğin ve sitokrom c gibi pro-apoptotik moleküllerin sitoplazmaya salınımının bir sonucudur (26). Bu yolak asıl olarak, ismini BCL-2 geninden alan, Bcl-2 ailesine ait bir grup protein tarafından düzenlenmektedir (54).



Apoptoz indükleyici faktör (AIF), ikinci mitokondri-türevli kaspaz aktivatörü (second mitochondria-derived activator of caspase, Smac), düşük pI ile IAP bağlama proteini (binding protein with Low pI, DIABLO) ve Omi/Yüksek Sıcaklık İhtiyaç Proteini A (Omi/high temperature requirement protein A, HtrA2)'yı da içeren diğer apoptotik faktörler, mitokondrinin zarlar arası bölgesinden sitoplazmaya salınmaktadır. Sitokrom c'nin sitoplazmik salınımı, sitokrom c, apoptoz proteaz aktivatör proteini 1 (Apaf-1) ve kaspaz 9'dan oluşan, apoptozom denilen bir kompleksin oluşumu yoluyla kaspaz 3'ü aktive etmektedir (55). Smac/DIABLO ya da Omi/HtrA2 ise apoptoz proteinlerinin inhibitörleri (inhibitors of apoptosis proteins, IAP'ler)'ne bağlanarak kaspaz aktivasyonunu arttırmakta ve bu da sonrasında IAP'lerin kaspaz 3 ya da 9 ile etkileşiminin kaybına yol açmaktadır (55,56).

#### **2.1.4.1.2. Ekstrinsik Yolak**

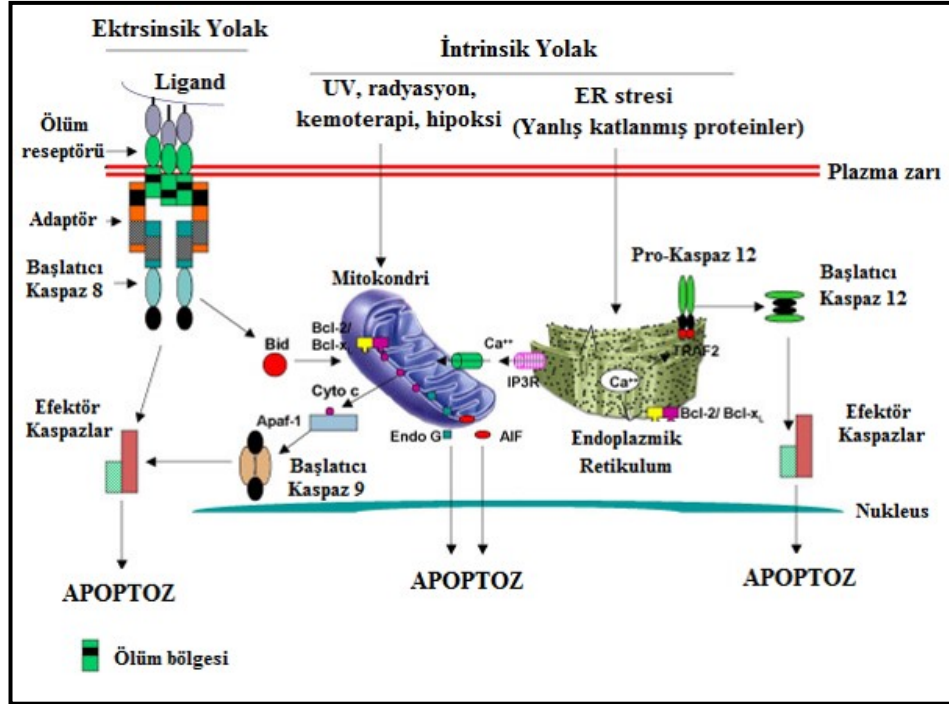
Bu yolak, ölüm ligandlarının ölüm reseptörüne bağlanmasıyla başlamaktadır. Birkaç ölüm reseptörü tanımlanmış olsa da en çok bilinen ölüm reseptörleri Tip 1 TNF reseptörü (TNFR1) ve ilişkili bir protein olan Fas (CD95)'dir ve bunların ligandları sırasıyla TNF ve Fas ligandı olarak isimlendirilmektedir (48). Bu ölüm reseptörlerinin TNF reseptörü ile ilişkili ölüm bölgesi (TNF receptor-associated death domain, TRADD) ve Fas ile ilişkili ölüm bölgesi (Fas-associated death bölge, FADD)'nin yanı sıra kaspaz 8 gibi adaptör proteinleri çalıştıran hücre içi ölüm bölgeleri de vardır (56). Ölüm ligandının ölüm reseptörüne bağlanması, bir adaptör protein için bağlanma bölgesinin oluşması ile sonuçlanmakta ve bu ligand-reseptör-adaptör protein kompleksi, ölüme-indükleyen sinyal kompleksi (death-inducing signaling complex, DISC) olarak bilinmektedir (53). DISC, daha sonra pro-kaspaz 8'in birikmesi ve aktivasyonunu başlatmaktadır. Aktif kaspaz 8, diğer infaz edici kaspazları keserek apoptozu tetiklemektedir (Şekil 2.6) (26).



Şekil 2.6. İntrinsik ve ekstrinsik apoptotik yollar (46).

### 2.1.4.1.3. İntrinsik Endoplazmik Retikulum Yolağı

İntrinsik ER yolağı, üçüncü ve en az bilinen yolağıdır. Bu yolağın kaspaz 12-bağımlı olduğuna ve mitokondri-bağımlı olmadığına inanılmaktadır (57). ER; hipoksi, serbest radikaller, glukoz açlığı gibi hücrel stresler tarafından hasara uğratıldığında, hücre içinde katlanmış proteinlerin açılması ve azalmış protein sentezi görülmektedir. TNF reseptörü ile ilişkili faktör 2 (TNF receptor associated factor 2, TRAF2) olarak bilinen düzenleyici bir protein, pro-kaspaz 12'den ayrılmakta ve bu da daha sonra pro-kaspaz 12'nin aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır (53). Şekil 2.7'de her üç apoptoz yolağını da gösteren bir şema sunulmuştur (58).



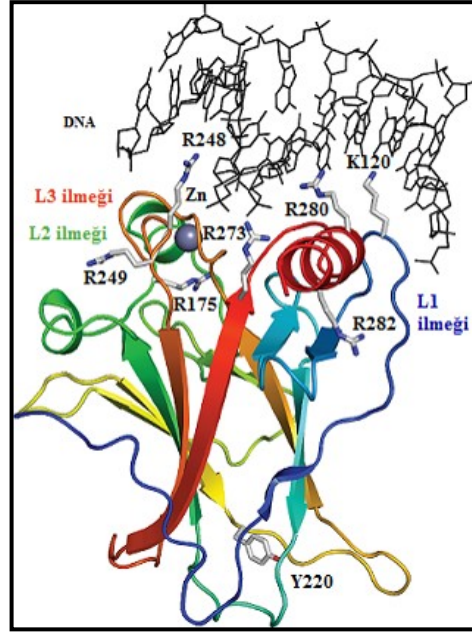
Şekil 2.7. İntrinsik mitokondriyal, intrinsik ER ve ekstrinsik apoptotik yollar (58).

## 2.2. p53

p53 proteini, ilk olarak simian virüs 40 (SV40) büyük T-antijeni ile oluşturduğu kompleks içinde tanımlanmıştır (59,60). Daha sonra birçok tümörün bu proteini normal dokularda gözlenmeyen şekilde aşırı miktarda ürettiği gösterilmiş; bu nedenle p53'ün hücrel bir onkojen olarak rol oynayabileceği öne sürülmüştür (61,62). 1989 yılında bir tümör baskılayıcı olarak tanımlanan p53 proteini (63), 17. kromozomun kısa kolunda, 17p 13.1. pozisyonunda bulunan 20 kb'lık insan TP53 geni tarafından kodlanmaktadır (64-66). TP53'ün genomik organizasyonu farklı türler arasında önemli derecede benzerlik göstermektedir. TP53'ün yapısındaki 11 ekzon, 10 intron ile bölünmektedir. İlk ekzon kodlanmamakta; 2-11. ekzonlar ise 393 amino asitlik p53 proteinini kodlamaktadır. 5. ve 8. ekzonlar evrim sürecinde yüksek derecede korunmuş bölgelerdir (67).

p53 proteininin ismi, sodyum dodesil sülfat (SDS) poliakrilamid jel elektroforezi ile belirlenen molekül ağırlığı ( $M_A$  53,000)'ndan gelmektedir. p53 beş bölgeden oluşmaktadır: p53 ile düzenlenen genlerin transkripsiyonel aktivasyonunu indükleyen transaktivasyon bölgesini oluşturan N-terminal bölgesi, p53'ün diğer

proteinlerle etkileşimini arttıran prolince zengin bölge, p53 ile aktive edilen konsensus dizisini tanıyan DNA-bağlayıcı bölge (DNA-binding domain, DBD) (Şekil 2.8) (68,69), tetramerizasyon bölgesi ve hedef p53'ün proteozomlar ile yıkımında ubiquitin molekülleri ile kimyasal olarak modifiye edilen C-terminal bölgesi (70).



**Şekil 2.8.** TP53'ün DNA-bağlayıcı bölgesinin DNA'ya bağlanması (68).

Yabani-tip p53 proteinin ömrü çok kısa olsa da (5-40 dakika) (69); p53'ün stabilitesi DNA ya da RNA tümör virüsleri ya da kimyasal kanserojenler ile farklılaşmış çeşitli hücre tiplerinde belirgin bir şekilde uzamaktadır (70).

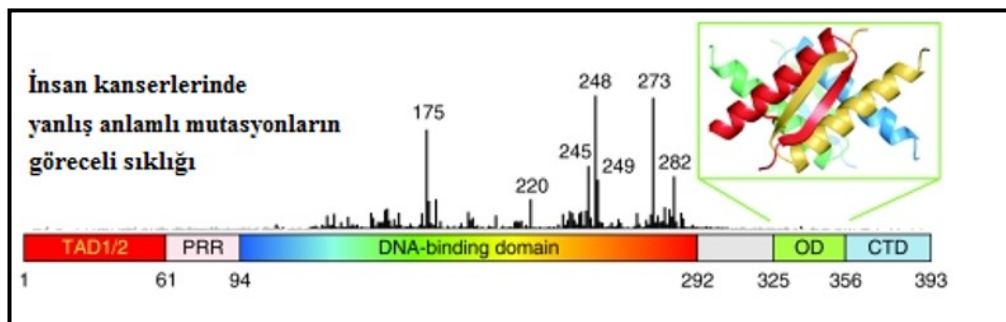
Yabani-tip p53, DNA hasarı, hipoksi ya da onkojen aktivasyonu gibi bazı hücrel stres faktörleri ile aktive olabilmektedir (2). Aktivasyonu sonucunda yabani-tip p53, normalde hücre döngüsünün ilerlemesini inhibe etmek, senesensi hızlandırmak ya da apoptozu indüklemek için diziye özgü transkripsiyon faktörü olarak rol oynamaktadır (2,71,72).

p53'ün bir tümör baskılayıcı olarak stres durumunda ya DNA hasarı tamir edilene kadar hücre döngüsünün durdurulmasında ya da hasar tamir edilemediğinde apoptozun başlamasında rolü bulunmaktadır. p53, hücre döngüsünün durdurulması için hücre döngüsünün G<sub>1</sub>/S ve G<sub>2</sub>/M fazlarını bir kontrol mekanizması olarak

kullanmakta ve böylece DNA hasarı tamir edilirken hücre döngüsünün devam etmesini önlemektedir. Ancak bu hasar tamir edilemeyecek kadar şiddetli olduğunda p53 yolağının aktivasyonu, tamir edilemeyen DNA'ya sahip hücrelerin bölünmesini önlemek amacıyla apoptoz ile sonuçlanmaktadır (3).

Normal koşullarda p53, başlıca murine double minute (Mdm) 2 E3-ubikitin ligaz ve bununla ilişkili Mdm4 proteini ile düzenlenen p53'ün yıkımı şeklinde ya da direkt olarak transkripsiyonu ile düşük düzeylerde tutulmaktadır (73,74). Hücresel stres durumunda ise fosforilasyon ve asetilasyon gibi post-translasyonel modifikasyonlar ile indüklenen bir tetramerik transkripsiyon faktörü olarak rol oynamaktadır. Hücre döngüsünün durdurulmasında, apoptozda, DNA hasarının tamirinde, senesensde ya da farklılaşmada rol oynayan çeşitli genlerin ekspresyonunu düzenlemektedir (75). DNA hasarı sonucunda N-terminal bölgenin Ser15 ve Ser20'den fosforillenmesinin p53 ve Mdm2 arasındaki etkileşimi inhibe ederek p53'ü stabilize ettiği düşünülmektedir (76-79).

Delesyon ya da kesim ile inaktive edilen birçok tümör baskılayıcı genin aksine TP53'de görülen kanser ile ilişkili mutasyonlarının büyük çoğunluğu, farklı bir amino asidin translasyonu ile sonuçlanan tek bir bp değişiminin görüldüğü yanlış anlamlı mutasyonlardır. Bu yanlış anlamlı mutasyonların büyük çoğunluğu p53'ün yüksek derecede korunmuş olan ve yaklaşık altı 'sıcak bölge' içeren DNA-bağlayıcı bölgesinde gözlenmektedir (Şekil 2.9) (68,80-82).



Şekil 2.9. TP53 geninin gen bölgeleri (68).

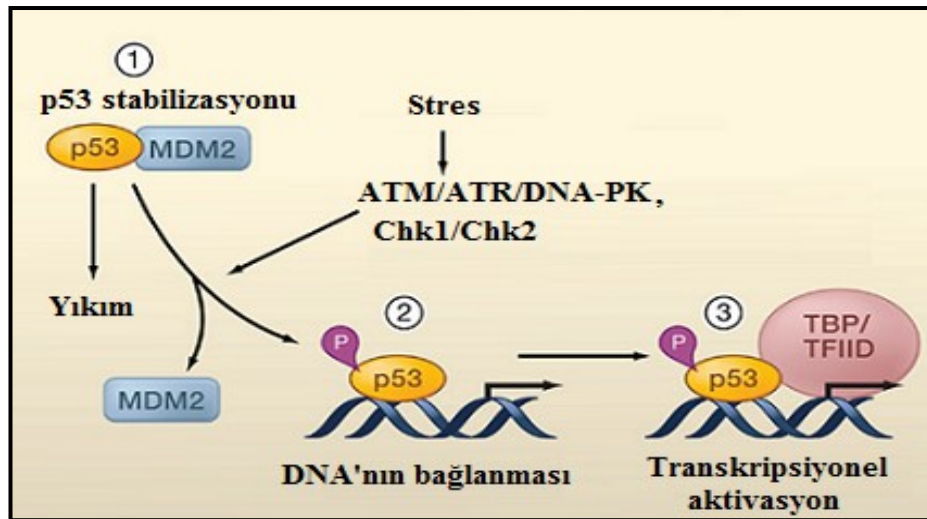
TAD1/2: Transaktivasyon bölgesi, PRP: Prolince zengin bölge, DNA-binding domain: DNA bağlayıcı bölge, OD: Oligomerizasyon bölgesi, CTD: C-Terminal bölge. Burada ayrıca insan kanserlerinde yanlış anlamlı mutasyonların göreceli

sıklığı görülebilmektedir. Buna göre insan kanserlerinde yanlış anlamlı mutasyonların çoğunun DNA-bağlayıcı bölgede olduğu görülmektedir.

Birçok p53 mutanı sadece tümör baskılayıcı özelliğini kaybetmemekte; ayrıca yabancı-tip p53'den bağımsız olarak ölümsüzlük, farklılaşma ve ilaç direnci gibi bazı özellikler kazanmaktadır (83).

### 2.2.1. p53-Mdm2 İlişkisi

p53 proteini insanlarda görülen kanser türlerinin yaklaşık % 50'sinde mutasyona ya da delesyona uğramıştır (4). Geriye kalan kısmında ise p53 yabancı-tip özelliğini korumaktadır ancak; p53'ün başlıca hücrel inhibitörü olan Mdm2 tarafından inhibe edilmektedir (84). Mdm2, ilk olarak farklılaşmış fare fibroblastlarında *double-minute* korozomlarında ekspresyonu artmış bir genin ürünü olan protein olarak tanımlanmıştır (85). İnsanlarda Hdm2 (human double-minute 2) olarak da bilinen bu proteinin, p53 ile etkileşerek p53'ün fonksiyonunu olumsuz bir şekilde düzenlediği gösterilmiştir (86,87). Mdm2 ve p53 birbirlerini olumsuz geri-besleme döngüsü ile düzenlenmektedir (88). p53'ün aktivasyonu ile MDM2 geni transkripsiyona uğramakta; Mdm2 proteini de p53'ün aktivitesini inhibe etmektedir (Şekil 2.10) (84,89).



Şekil 2.10. p53 ve Mdm2 proteini arasındaki ilişki (89).

İnsan Mdm2 proteini 491 amino asitten meydana gelmektedir ve Mdm2'nin 4 bölgesi tanımlanmıştır (Şekil 2.11) (90-92). N-terminal bölge, p53 için temel bağlanma bölgesidir. Mdm2'nin orta kısmında asidik bir bölge ve bir çinko parmak bulunurken; C-terminal bölgede de Mdm2'nin ubiquitin ligaz aktivitesinden sorumlu olan ve aynı zamanda Mdm2'ye yapısal olarak çok benzeyen bir protein olan MdmX (Mdm4) için bağlanma bölgesi olarak görev gören bir RING (Really Interesting New Gene) parmağı bulunmaktadır (93). Hem RING hem de çinko parmak bölgeleri Mdm2'nin ubiquitinlenmesi ve substratlarının proteozomal yıkımı için gereklidir (94).



Şekil 2.11. Mdm2'nin tanımlanmış bölgeleri (90).

Mdm2, normal koşullarda başlıca nükleusta bulunmaktadır ancak; hem nükleer lokalizasyon hem de nükleer göç dizileri içerdiğinden nükleus ve sitoplazma arasında yer değiştirebilmektedir (95). Mdm2 bu özelliğiyle, p53'ü nükleustan çıkartarak p53'ün genleri transaktive etmesini önlemekte ve DNA ile ilişkisinin kesilmesini sağlamaktadır (96).

Normal koşullarda p53 düzeyi, başlıca yüksek düzeylerdeki Mdm2 ile çoklu ubiquitinlenme yoluyla p53'ün hızlı yıkımı sayesinde düşük seviyelerde tutulmaktadır. Böylece hücre döngüsünün durması ya da hücre ölümünün gerçekleşmesi önlenmektedir. Hücresel stres koşullarında ise Mdm2, post-translasyonel olarak modifiye edilmekte, p53'ün strese ya da hasara cevap verebilmesi için geçici olarak p53 inhibisyonunu durdurmaktadır (97). Bu süreç iki mekanizma ile gerçekleşmektedir. Bu mekanizmalardan birinde Mdm2, p53'ün N-terminal ucuna direkt olarak bağlanarak p53'ün transkripsiyonel aktivasyon fonksiyonunu inhibe etmektedir (86,87). İkinci mekanizmada ise, Mdm2 E3 ubiquitin ligaz aktivitesi göstererek p53'ün 26S proteozom yoluyla yıkımına yol açmaktadır (98-100).

İnsanlarda HdmX (human double-minute X) olarak bilinen MdmX (murine double-minute X), Mdm2'nin bir homologudur ve Mdm2 ile yapısal benzerlik göstermektedir. MdmX ilk olarak fare cDNA kütüphanesinde p53'e bağlanan bir protein olarak tanımlanmıştır (101). p53 üzerindeki etkilerinin yanı sıra, Mdm2



proteininin stabilize edilmesinde de görev görmektedir (102,103). Mdm2 proteinine benzer şekilde, MdmX de p53'ün önemli bir olumsuz düzenleyicisidir ve MdmX aşırı eksprese edildiğinde bir onkojen olarak rol oynamaktadır (104).

MdmX, RING bölgesine sahip olmasına karşın Mdm2'den farklı olarak, E3 ubiquitin ligaz aktivitesi göstermemektedir. Bu nedenle MdmX, tek başına p53'ün yıkımına sebep olamamakta; sadece p53'ün transaktivasyon bölgesine bağlanarak p53 aktivitesini inhibe edebilmektedir (96). MdmX ve Mdm2'nin RING bölgeleri arasındaki etkileşim, hem Mdm2'yi stabilize etmekte; hem de Mdm2'nin p53'ü ubiquitinleme yeteneğini arttırarak, p53'ün yıkımına katkıda bulunmaktadır. MdmX ve Mdm2 arasındaki bir diğer fark da, Mdm2'nin hem nukleusa yerleşme hem de nükleer göç dizilerinin MdmX'de bulunmamasıdır. Böylece Mdm2 yokluğunda, MdmX başlıca sitoplazmada bulunmaktadır (105). Mdm2 ile MdmX nukleusa taşınmakta ve burada Mdm2-MdmX kompleksleri p53 ile etkileşime girerek p53'ü baskılamaktadır (96).

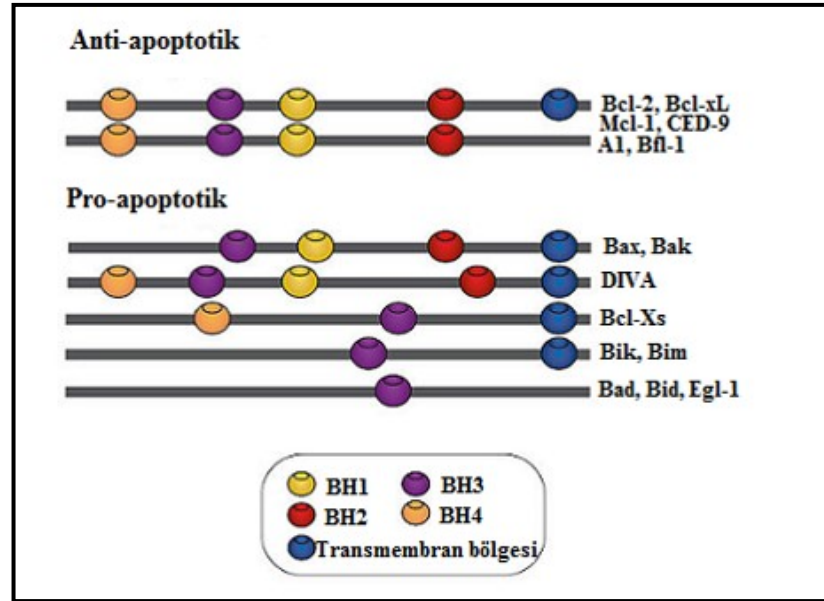
Genetik analizler, hem Mdm2'nin hem de MdmX'in başlıca hücresel hedefinin p53 olduğunu göstermiştir (91) ancak; her iki proteinin de gelişim, morfojeniz ve tümör oluşumu sırasında diğer birçok proteinle etkileştiği bilinmektedir (106-117). Bu etkileşimlerin incelenmesinin, Mdm2 ve MdmX'in p53 üzerindeki etkilerinin daha iyi anlaşılmasına yardımcı olabileceği düşünülmektedir (92).

### **2.3. BCL-2 geni ve Bcl-2 Protein Ailesi**

Bcl-2, Bcl-2 protein ailesinin tanımlanan ilk üyesi olan ve ilk olarak insan B hücresi foliküler lenfoması (human B cell follicular lymphoma, BCL)'nda gösterilen, korozomal translokasyonu t(14;18)(q32;q21) olan, BCL-2 geninin düzenlenmesini bozan ve aşırı ekspresyonunu indükleyen bir proteindir (118).

Bcl-2 üzerinde yapılan çalışmalar, neredeyse bütün Bcl-2 ailesi üyelerinin, evrimsel düzeyde korunmuş bir  $\alpha$ -heliks Bcl-2 homolojisi (BH) bölgesine sahip olduğu, fonksiyonel ve/veya yapısal benzerlik gösterdiğini ortaya koymuştur. Bcl-2 ailesi, bu fonksiyonel ve yapısal benzerlikler göz önünde bulundurularak anti-apoptotik ve pro-apoptotik proteinler olmak üzere iki fonksiyonel gruba ayrılmıştır (Şekil 2.12) (118,119).





Şekil 2.12.BCL-2 ailesi (119).

Anti-apoptotik proteinler grubu altında Bcl-2, Bcl-xL (Bcl211 uzun izoform), Bcl-w (Bcl212), Mcl-1 (miyeloid hücre lösemisi-1, Bcl213) ve Bfl-1/A1 (Bcl215) proteinleri yer almaktadır. Bu proteinlerin dört BH bölgesi ve bir karboksil terminal transmembran bölgesi (A1 dışında) bulunmaktadır. Bu proteinler genel olarak dış mitokondriyal zar (outer mitochondrial membrane, OMM)'da yer almaktadır. Bütün bu anti-apoptotik proteinler BH1-3 bölgelerini çevreleyen beş ya da altı heliksten meydana gelen tersiyer bir yapıya sahiptir. Bu yapı, Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik üyeleriyle etkileşiminden sorumlu olan hidrofobik bir oluk oluşturmaktadır. Birçok hücre tipinde anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin aşırı ekspresyonu, pro-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin direkt olarak tutulmasıyla pro-apoptotik sinyal iletimini baskılamaktadır (120,121). Bu durum apoptoza karşı direnci geliştirmekte, immün hastalıklara ve tümör oluşumuna yol açabilmektedir (122).

Pro-apoptotik Bcl-2 proteinleri ise yapı ve fonksiyonlarına göre iki alt gruba ayrılmaktadır. Bunlardan ilki, Bcl-2 ile ilişkili X proteini (Bcl-2 associated X protein, Bax) ve Bcl-2 antagonist katili (Bcl-2 antagonist killer, Bak)'ni içermektedir. Bu proteinlerin üç BH bölgesi vardır ve OMM proteolipid porları içine oligomerize olmuştur (123,124). Apoptotik sinyal iletimi ile bu proteinlerin konformasyonu değişmekte ve mitokondriyal zarlar arası boşluğuna salınımı sonucu mitokondriyal dış zar geçirgenliği (mitochondrial outer membrane permeabilization, MOMP)'ne

yol açmaktadır (120). MOMP, sitokrom c, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2 gibi öldürücü efektörlerin mitokondriden sitozole salınması yoluyla apoptotik sürecin düzenlenmesinde rol oynamaktadır (125).

Pro-apoptotik proteinlerin ikinci sınıfı, sadece tek bir BH bölgesi içerdiğinden tek-BH3 proteinleri olarak da adlandırılmakta ve Bcl-2 hücre ölümü antagonisti (Bcl-2 antagonist of cell death, Bad), BH3 ile etkileşen bölge ölüm agonisti (BH3 interacting-domain death agonist, Bid), Bcl-2 ile etkileşen katil (Bcl-2 interacting killer, Bik), Bcl-2 ile etkileşen hücre ölümünün düzenleyicisi (Bcl-2 interacting mediator of cell death, Bim), Bcl-2 modifiye edici faktör (Bcl-2 modifying factor, Bmf), Harakiri (Hrk), Noxa ve p53 ile regüle edilen apoptoz düzenleyicisi (p53 upregulated mediator of apoptosis, Puma)'ni içermektedir. Bu tek bir BH3 bölgesine sahip proteinler direkt olarak anti-apoptotik ve pro-apoptotik proteinlere bağlanabilmekte ve bu proteinleri düzenleyebilmektedir (118). Antagonistik Bcl-2 proteinlerinin oranı (örneğin Bad/Bcl-2) hücrelerin mitokondriyal apoptotik yolağa girip girmeyeceğinin göstergesidir (126).

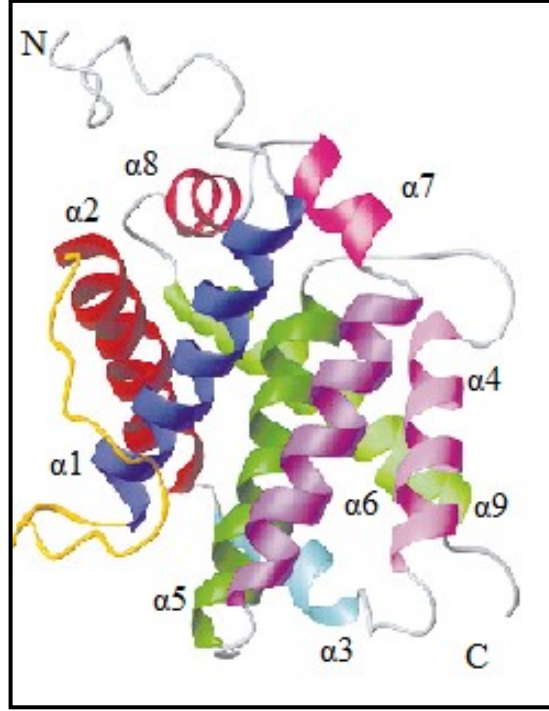
Bcl-2 protein ailesi, apoptoza ek olarak diğer bazı hücrel süreçlerde de rol oynamaktadır. Örneğin; nükleer zar ile ilişkili Bcl-2 fraksiyonu, nükleusta transkripsiyon faktörlerinin lokalize olmasını önleyerek bu transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini inhibe etmektedir (127-129). Ayrıca Bcl-2, hücre döngüsünde G<sub>1</sub> fazının durma süresinin uzamasına neden olmakta (130), hücre döngüsünün G<sub>0</sub> fazında kalmasına yol açmakta ve hücre döngüsünün büyüme faktörleri ile aktive edilmesinden sonra anti-apoptotik rolünden bağımsız olarak hücrelerin hücre döngüsüne girmesinin gecikmesine yol açmaktadır (131). Bcl-2 ailesi, bu fonksiyonlarına ek olarak nükleer DNA tamirinde de rol oynamaktadır. Bcl-2 ayrıca özellikle ER düzeyinde hücre içi Ca<sup>2+</sup> akışının düzenlenmesinde de rol oynamaktadır. Bcl-2'nin Ca<sup>2+</sup> akışının düzenlenmesindeki bu rolü apoptozun başlamasının yanı sıra normal koşullarda da hücre fizyolojisi açısından son derece önemlidir (132).

### **2.3.1. BAX Geni ve Proteini**

Memelilerde stres ile indüklenen apoptoz, Bcl-2 ailesi proteinleri tarafından kontrol edilmektedir (26,108,126,133,134). Bu proteinlerden Bax, apoptozun

başlamasında merkezi bir rol oynamaktadır (135). Sağlıklı hücrelerde Bax, çoğunlukla sitozolde inaktif monomerler halinde; düşük derişimlerde ise ER'da ve OMM'de gevşek bir şekilde tutunmuş halde bulunmaktadır (136-140). Tek BH3 bölgesi içeren proteinlerin aktivasyonu ile Bax konformasyonel değişikliğe uğramakta, mitokondriye göç etmekte, mitokondride multimerize olarak MOMP'a neden olmaktadır. Böylece sitokrom c gibi mitokondriyal apoptotik proteinler ve ROS mitokondriden salınmakta ve kaspaz aktivasyonuna neden olmaktadır (141).

Bax, yapısal olarak Bcl-2 ailesi üyeleri ile benzerlik göstermektedir (142). Bax proteini kısa ilmekler ile birbirine bağlanmış olan 9  $\alpha$ -heliksten oluşmaktadır.  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  ve  $\alpha 9$ 'un, Bax'ın OMM ile etkileşimine katkıda bulunduğu düşünülmektedir.  $\alpha 5$  ve  $\alpha 6$ , lipid çift tabakasında por oluşturduğu bilinen bakteriyel toksinlere çok benzer biçimde, saç tokası şeklindeki amfipatik helikslerdir (143,144). Bax'ın  $\alpha 5$  ve ya  $\alpha 6$  heliksindeki mutasyonlar, Bax'ın zar geçirgenliğini artırma ve dolayısıyla apoptozu tetikleme özelliğini ortadan kaldırmaktadır (145).  $\alpha 5$  ve  $\alpha 6$  heliksleri, bir tarafında  $\alpha 1$  ve  $\alpha 2$  heliksleri, diğer tarafında  $\alpha 3$  ve  $\alpha 4$  heliksleri, yukarısında ise  $\alpha 7$  ve  $\alpha 8$  ile çevrelenmiştir (Şekil 2.13) (146,147). Bax'ın ilk  $\alpha$ -heliksi ( $\alpha 1$ ), sağlıklı hücrelerde Bax'ın konformasyonunu stabilize etmekte ve homo-oligomerizasyonu inhibe etmektedir. Budanmış Bid (truncated Bid, tBid), Puma gibi tek BH3 bölgesi içeren aktivatörler Bax'ın  $\alpha 1$  heliksine direkt olarak bağlanarak N- ve C-terminal bölgelerini açığa çıkartmakta; bu da homo-oligomerizasyona neden olmaktadır (148,149). Bir  $\alpha 1$  kalıntısı olan D33, Bax'ın tBid ve Puma ile etkileşiminden sorumlu iken (149,150); K21 kalıntısı ise Bax'ın BH3 bölgesinin Bim ile etkileşiminde rol oynamaktadır (151). Dolayısıyla, bu kalıntılarda görülen mutasyonlar Bax'ın tek BH3 aktivatörleri ile etkileşimini engellemekte, Bax aktivasyonunun zayıflamasına ve sonuç olarak apoptoza yol açmaktadır (148-152).



**Şekil 2.13.** Bax'ın yapısı (146).

Bax'ın N-terminal bölgesi, proteinin çözünebilir inaktif formunda tutulmasında görev almaktadır ve Bax'ın mitokondriyal göçü için bu bölgenin hareket etmesi gerekmektedir. Bu sebeple bu bölgeye Hedeflemenin Apoptotik Düzenlenmesi (Apoptotic Regulation of Targeting, ART) de denilmektedir (153). Bax'ın N-terminal bölgesindeki konformasyonel değişiklik, tek başına Bax'ın aktivasyonu ve mitokondriye göçü için yeterli değildir (154). Bax'ın C-terminal bölgesi olan hidrofobik  $\alpha$ -heliks ( $\alpha 9$ ), BH bölgelerinden oluşan hidrofobik bir helikstir ve transmembran çapası gibi görev görmektedir (155). Bu heliksin baskılanması, proteinin zara tutunmasını önlemektedir (156,157) ve bu heliksin hareket etmesi BH bölgelerini,  $\alpha 5$  ve  $\alpha 6$  hidrofobik saç tokası yapısını açığa çıkartarak dimerizasyon ve oligomerizasyona neden olmaktadır (147,158).

Bax'ın aktivasyon mekanizması tam olarak anlaşılammış olsa da iki model üzerinde durulmaktadır (159). Direkt olmayan modelde Bax, Bcl-2 hayatta kalım proteinleri tarafından tutulmaktadır (126,160). Bax'ın BH3 bölgesi, Bax'ın diğer Bcl-2 ailesi proteinleri ile etkileşimini ve homo-oligomerizasyonu düzenlemektedir. Bax'ın bazı BH3 kalıntıları, hayatta kalım proteinleriyle olan etkileşimini düzenlemektedir (152,161,162). Apoptoz sırasında tek BH3 bölgesi içeren proteinler

Bcl-2 hayatta kalım proteinlerine bağlanarak Bax'ın inhibisyonunu kolaylaştırmaktadır (163). Direkt modelde ise tBid, Bim ve muhtemelen Puma gibi tek BH3 bölgesi içeren aktivatörler direkt olarak Bax'a bağlanmakta ve Bax'ın konformasyonunu değiştirmektedir. Diğer tek BH3 bölgesi içeren aktivatörler de Bcl-2 hayatta kalım proteinlerine bağlanarak geriye kalan tek BH3 bölgesi içeren aktivatörlerin salınmasına neden olmaktadır (148,150,164). Son yapılan çalışmalar, her iki modelin de Bax'ın aktivasyonunda rol oynayabileceğini göstermiştir (159).

#### **2.4. MDR-1 Geni ve P-glikoprotein**

Çoklu ilaç direnci, yapısal benzerliği bulunmayan ve moleküler hedefler üzerinde farklı etkileri olan farklı ilaçlara yönelik eş zamanlı bir direnç olarak tanımlanmaktadır. Çoklu ilaç direnci, hücre içindeki belirli derişimlerde bulunan ilaçların dışarı akışının görüldüğü bazı biyokimyasal direnç mekanizmaları ile gözlenebilmektedir (8). Anti-kanser ilaçların hücrenin dışına aktığı bu mekanizmalar, ATP-bağlayıcı Kaset (ATP-binding Cassette, ABC) taşıyıcı protein süperailisine ait ABCB1 ya da çoklu ilaç direnci 1 (multidrug resistance 1, Mdr-1) olarak da isimlendirilen geçirgenlik glikoproteini (permeability glycoprotein, P-gp) gibi proteinler ile düzenlenmektedir (165).

P-gp ilk kez 1976 yılında tanımlanmış olup (166), 7q21.12 korozomunda bulunan ABCB1 (MDR-1) geni tarafından kodlanan glikozillenmiş, 170 kDa ağırlığında bir zar proteinidir (10,11). İnsanlarda 1280 amino asitten oluşan bu protein (167), ilacın hücreden çıkartılmasını sağlayan ATP-bağımlı bir pompa görevi görmektedir. P-gp'nin üyesi olduğu ABC-taşıyıcı ailesi aynı zamanda şekerler, amino asitler, peptidler, organik iyonlar, birkaç hidrofobik ve metabolik bileşiğin taşınmasında da görev almaktadır (9).

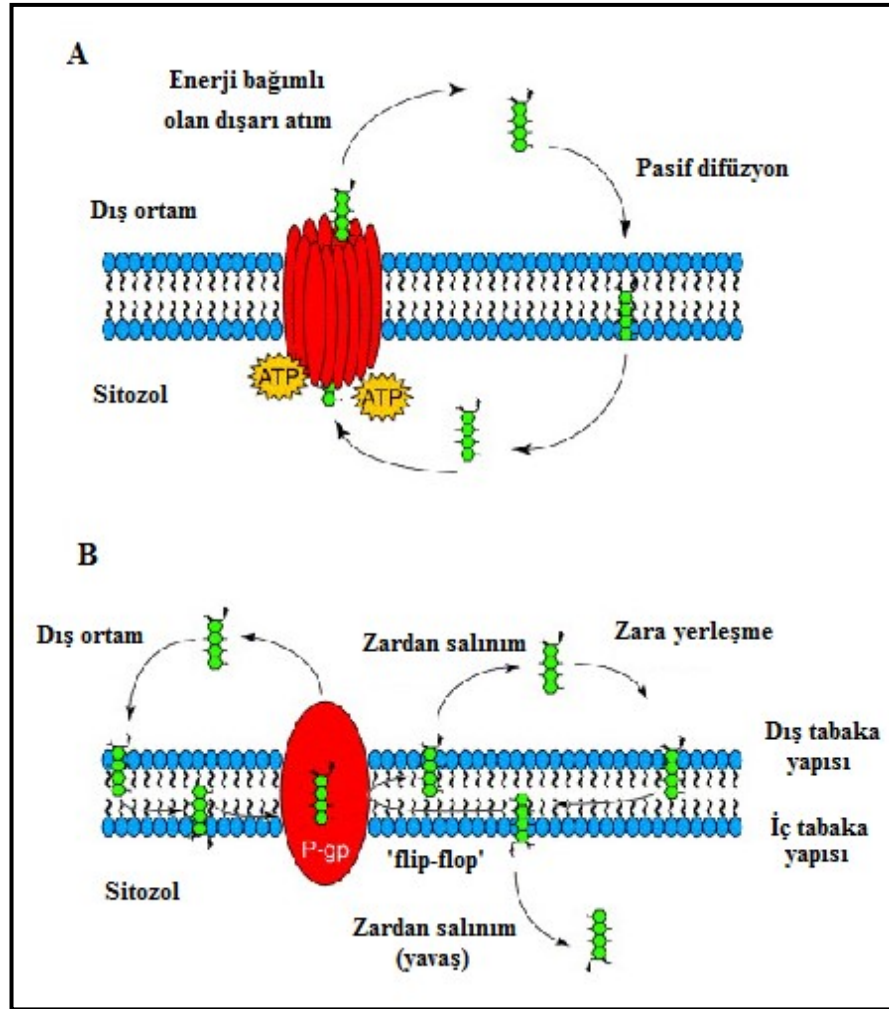
P-gp, 150 kDa'luk bir ara protein olarak sentezlenmekte, kalneksin ve Isı şok kognatı (Heat shock cognate, Hsc) 70 yardımıyla katlanmaktadır (168). Yanlış katlanan P-gp proteinleri proteozomlarda hemen yıkıma uğramakta; doğru katlananlar ise golgi aygıtına taşınarak glikozillenmekte ve 170 kDa'luk olgun proteine dönüşmektedir (169).

İki ayrı kısma ayrılmış olan bu proteinin N-terminal kısmında, altı hidrofobik TMD ve ATP-bağlanma bölgesine sahip olan büyük bir sitoplazmik bölge

(nucleotide-binding domain, NBD); diğ er kısmında ise yine altı TMD ve bir NBD bulunmaktadır (170,171). Bu iki kısım birbirine esnek bir bağlayıcı bölge ile bağlanmıştır. Sitoplazma dışındaki ilk bölge üzerinde üç tane glikozilasyon bölgesi bulunmaktadır (172). Bu iki kısım arasında % 65 oranında dizi benzerliği bulunmaktadır (167). P-gp tarafından hidrolize edilen ATP, substratların hücre zarından geçmesi için gerekli olan enerjiyi sağlamaktadır (173).

P-gp, canlı hücrelerde plasenta, adrenal bez, böbrek, karaciğ er gastrointestinal sistem ve kan-beyin bariyerinde ekspresyona uğ ramaktadır (174-177). Bu protein kan-beyin-bariyerini ve plasenta bariyerini korumakta, hormonların geç ünü sağlamakta, besinlerle birlikte alınan ksenobiyotiklerin hücre dışına atılmasını sağlamaktadır (178). P-gp ayrıca, hidrofobik ve ya amfipatik ilaçları, yapısal olarak stabil olmayan anti-kanser ajanları ve İnsan Bağış ıklık Yetmezlik Virüsü (HIV)-proteaz inhibitörleri gibi kimyasal ve yapısal olarak birbirine benzemeyen çeş itli substratların da taş ınmasını sağlamaktadır (179).

P-gp ile baş latılan akış mekanizmasını açıklamak için birkaç model ö ne sürülmüştür. Bu mekanizmalardan ‘hidrofobik elektrik süpürgesi’ en iyi bilinen modellerden biridir (180). Bu modelde P-gp’in iki alt ünitesi konformasyonel değ iş ikliğ e uğ rayarak tek bir taş ıma kanalı oluşturmakta ve ilaç nötral ya da yüklenmiş durumda dışarı atılmaktadır. Bu konformasyonel değ iş iklik ATP hidrolizi ile baş arılmaktadır. P-gp proteini, bu özelliğ i ile hücre zarında bulunan fosfolipid moleküllerinin taş ınmasına yardım eden flippaz enzimine benzerlik göstermektedir (181). Diğ er bir model de substratın lipid çift tabakasından ayrılarak P-gp’in substrat bağ lanma bölgesinin bulunduğu ‘iç tabaka’ denilen bölgeye gelmesidir. ATP, NBD’e bağ landığında P-gp proteini konformasyonel değ iş ikliğ e uğ ramakta; substrat-bağ layıcı bölge açığ a çıkmakta ve böylece ilacın dışarı atılmasına olanak sağlamaktadır (182). Ş ekil 2.14’te P-gp ile baş latılan iki akış mekanizması modeli sunulmuştur (183).



**Şekil 2.14.** P-gp ile başlatılan akış mekanizması modelleri. (A) 'Hidrofobik elektrik süpürgesi' modeli (B) P-gp'in substrat bağlanma bölgesinin bulunduğu 'iç tabaka' denilen bölgeye geldiği model (183).

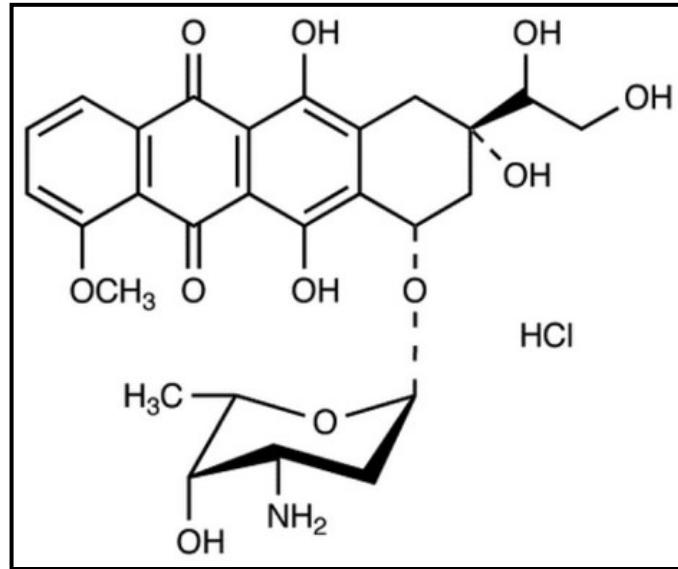
İlacın dışarı atıldığı bu mekanizmalar, P-gp proteininin aşırı ekspresyonunun kemoterapiye karşı direnci ile ilişkilidir. P-gp proteininin ekspresyon düzeyinin birkaç kanser çeşidinde ilaçlara direnç göstermeye yetecek düzeyde yüksek olduğu gösterilmiştir (184).

Yapılan çalışmalar MDR-1'in bir *housekeeping* gen olmadığını ancak; MDR-1'e sahip olmayan hayvanların özellikle beyin dokusunun sitotoksik ajanlara karşı duyarlı olduğunu göstermiştir (185,186).

## 2.5. Dokсорubisin

Dokсорubisin (DOX) (adriamisin, 14-hidroksidaunorubisin), çeşitli kanserleri tedavi etmek amacıyla kemoterapide kullanılan antrasiklin-tipi (antineoplastik) bir ilaçtır. Dokсорubisin; lösemi, Hodgkin lenfoması, mesane, meme, mide, akciğer, yumurtalık ve tiroid kanserlerinde, yumuşak doku sarkomasında, çoklu miyeloma gibi birçok kanser tipinin bazı kanser hücrelerinde etki göstermektedir. DOX ilk olarak 1969 yılında *Streptomyces peucetius* alttürü *caesius* ATCC29050'den türetilen mutant bir soy olan ATCC27952'den izole edilmiştir (5). DOX, DOX'un doğrudan öncüsü olan daunorubisin (DNR)'in C-14 hidroksilasyonu ile oluşmaktadır ve kanser hücreleri üzerinde çoğalmayı önleyici aktivitesini iki farklı mekanizma olan interkalasyon ve enzim inhibisyonu ile göstermektedir. Her iki mekanizma da hücre ölümüne yol açan DNA hasarı ile sonuçlanmaktadır (6,7).

Bu ilaç aglikonik ve şeker kısımlarına sahip, seçici olmayan bir sınıf I antrasiklidir. Aglikon kinin-hidroksikinin komşu grupları, metoksi substitüe kısa yan zincir ve bunu takip eden karbonil grubunun oluşturduğu bir tetrasiklik halka içermektedir. Şeker bileşeni (daunosamin olarak da bilinir) bir glikozidik bağ ile bu halkalardan birine bağlanmıştır (Şekil 2.15) (187,188).



Şekil 2.15. Dokсорubisinin kimyasal yapısı (187).

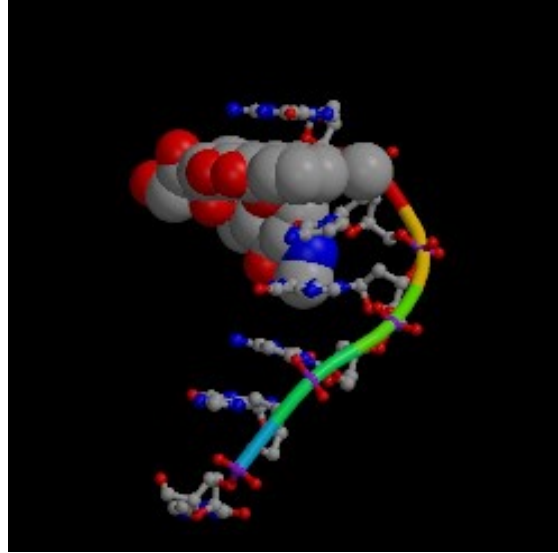


Yukarıda anlatıldığı gibi, DOX, DNA ile ilişkili enzimlere bağlanarak görev görmekte ve DNA'nın çift heliks yapısındaki baz çiftlerinin arasına girebilmektedir (188). Topoizomeraz I ve II enzimleri gibi çoklu moleküler hedeflere bağlanarak DNA hasarı ile sonuçlanan anti-proliferasyon ile bağlantılı olarak meydana gelen çeşitli sitotoksik etkilere yol açmaktadır (189). Apoptotik yolak, DNA'daki kırıkların tamirinin başarısız olması durumunda ve hücre çoğalması  $G_1$  ve  $G_2$  fazlarında inhibe edildiğinde tetiklenmektedir. DOX'un ayrıca hem DNA ve hem de RNA polimerazın inhibisyonu ile DNA'nın arasına girdiği ve sonuçta DNA replikasyonunu ve RNA transkripsiyonunu durdurduğu bilinmektedir (188).

Birçok ilaç gibi DOX da hücreye pasif difüzyon ile girmekte ve hücre içi kompartmanlarda derişimi 10-50 kat artarak birikmektedir. Nükleer kompartmanlardaki DOX, hücre sitoplazmasında birikenden 50 kat daha fazladır. Daha da spesifik olarak, nükleustaki DOX miktarı 340 mM saturasyon düzeyine ulaşabilmektedir bu da bir molekül DOX'un her beş baz çiftinde bir DNA zincirlerinin arasına girmesi şeklinde tanımlanabilmektedir (190,191). Kalan serbest hücre içi DOX (hücre içindeki total ilacın % 2'si) diğer organellere gelişigüzel bir şekilde dağılmaktadır (golgi aparatı, lizozom ve mitokondri) (192,193). DOX muhtemelen karaciğerin metabolizmadaki rolünden dolayı en çok karaciğerde birikmektedir. Ayrıca, DOX'un kemik iliği ve beyaz kan hücrelerindeki derişimi plazmadakinden 200-500 kat daha yüksektir. DOX'un dokulara bu hızla dağılması, kandaki düzeyinin hızla düşmesine yol açmaktadır. DOX'un dokulara hızla girme yeteneği vardır ancak; bu yetenek lipofilik yapısı ve DNA zincirlerinin arasına girme/bağlanma özelliği nedeniyle sadece nükleusa sahip hücrelerde görülmektedir. İlginç bir şekilde, DOX'un hızlı nüfuz etme özelliğine karşın; DOX kan-beyin-bariyerini geçememektedir (194).

DOX'un DNA'ya interkalasyonu ise, DOX'un sitoplazmanın proteozomuna yüksek bağlanma affinitesini kullanarak difüzyon yoluyla hücreye girmesiyle gerçekleşmektedir. DOX, proteozomun 20S altünitesine bağlandığında ve nükleer por kompleksleri yoluyla nükleusa taşındığında DOX-proteozom kompleksi oluşmaktadır. DOX'un, bağlandığı proteozoma göre nükleer DNA'ya daha yüksek affiniteye sahip olmasından dolayı; DOX proteozomdan ayrılmakta ve DNA'ya bağlanmaktadır (Şekil 2.16) (188,195).

DOX'un diğer etkileri, daha ileri DNA hasarına neden olan serbest radikal üretimi, makromolekül üretiminin inhibisyonu, DNA'nın çözülmesi/ayrılması ve alkilenmede artış gözlenmesini içermektedir (196,197). DOX sadece nükleer DNA'nın değil; aynı zamanda mitokondriyal DNA'nın da yapısına katılabilmektedir (198). Ayrıca DOX, plazma proteinlerine bağlanarak direkt olarak hücre zarını etkilemekte ve DOX'un enzimatik elektronlarının azalmasına sebep olmaktadır. Bu da hidrosik serbest radikallerin yüksek derecede reaktif olan türlerinin oluşumuna yol açmaktadır. Serbest radikaller, ilacın kullanımıyla ortaya çıkan toksisitenin tehlikeli yan etkilerinden sorumlu olsa da; DOX'u güçlü bir anti-kanser ilacı yapan aynı mekanizmalar, kanserin çeşitli formlarına karşı etkili olmasını sağlamaktadır (196,198).



**Şekil 2.16.** Doksorubisinin tek zincirli DNA'ya interkalasyonu (195).

DOX'un başarılı bir şekilde kullanımı, hematopoietik baskılama, mide bulantısı, kusma, ekstrevasyon, saç dökülmesi ve en çok korkulan yan etki olan kardiyomiyopati gibi toksisiteler ile gölgelenmektedir. Kardiyomiyopatinin görülmesi, kemoterapinin kesilmesinden 10-15 yıl sonrasına kadar ertelenebilmektedir. Kardiyomiyopati, semptomatik olmayan elektrokardiyografi (ECG) değişikliklerinden; perikardit ve dekompanse kardiyomiyopatiye kadar çok çeşitli semptomlar ile karakterize edilmektedir. Kardiyomiyopatinin görülme ihtimali

büyük ölçüde doza bağımlı olsa da (199); kardiyomiyopati, bireyin artan duyarlılığına bağlı olarak düşük dozlarda da ortaya çıkabilmektedir (200).

DOX'un kalp üzerindeki zararlı etkilerinin genelde kemoterapinin kesilmesinden yıllar sonrasına kadar belirlenememesinden dolayı en büyük etki, kanser sonrası hayatta kalan pediatri hastalarında görülmektedir (201,202). Pediatrik kanser hastalarının yaklaşık % 60'ına antrasiklin uygulandığında (203); bu hastaların % 10'u kemoterapi sonrasında 15 yıl içinde semptomatik kardiyomiyopati geliştirmektedir (204).

### 3. GEREÇLER ve YÖNTEMLER

#### 3.1. Gereçler

##### 3.1.1. Hücreler

HEPG2 hücreleri DSMZ (Almanya) firmasından, MCF-7 ve HEK293 hücreleri ise ATCC (Amerika Birleşik Devletleri) firmasından sertifikalı olarak temin edilmiştir.

##### 3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Kitler

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Tripsin-EDTA, ısı ile inaktive edilmiş Fetal Sığır Serumu (HI FBS), L-Glutamin (L-Glu) ve Penisilin/Streptomisin (P/S) GIBCO (İngiltere) isimli firmadan temin edilmiştir. Ultra Pure™ agaroz, Track It  $\psi$  X 174 RF DNA/Hae Fragment, Track It Cyan/Orange Buffer, Etidyum Bromür (EtBr) Solüsyonu, Proteinaz K, Purelink DNase, DNaz I, RNase away, total RNA saflaştırılmasında kullanılan Purelink™ RNA Mini Kit, total RNA örneklerinin cDNA'ye çevrilmesinde kullanılan Superscript® III Cells Direct cDNA Synthesis System, Superscript® One-Step RT-PCR with Platinum® Taq ve SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain Invitrogen'den (İngiltere, Amerika Birleşik Devletleri) alınmıştır. PCR kiti Gene Direx (Almanya) isimli firmadan temin edilmiştir. Polimorfizm çalışmasında Fermantas (İspanya) markalı *FnuDII* restriksiyon enzimi kullanılmıştır. MTT sitotoksiste deneyinde kullanılan Doksorubisin hidroklorür Sigma'dan (Almanya) temin edilmiştir. Real Time PCR işleminde kullanılan 96 kuyucuklu plakalar ve Power SYBR Green Master Mix Applied Biosystems (Amerika Birleşik Devletleri)'den alınmıştır. Serolojik pipetler ve hücre kültürü malzemeleri ile DNaz-RNaz-pirojen içermeyen pipet uçları Orange Scientific (Belçika)'ten temin edilmiştir.

##### 3.1.3. Cihazlar

MCF-7, HEPG2 ve HEK293 hücreleri Sanyo MCO-18 model karbondioksit inkübatöründe (Japonya) inkübe edilmiştir. Hücrelerin gözlenmesi ve sayımı için

NIKON Eclipse TS100 (Amerika Birleşik Devletleri) ışık mikroskopundan yararlanılmıştır. Bütün hücre kültürü işlemleri Clean Air Techniek (Hollanda) isimli firmadan temin edilen laminar akış kabini içerisinde gerçekleştirilmiştir. Santrifüj işlemlerinde Hettich Rotina 35R (Almanya) isimli cihaz kullanılmıştır.

Deneylerde kullanılan gereçlerin sterilizasyonunun sağlanması ve RNA saflaştırılması işlemleri BIOSAN (Ukrayna) firmasından temin edilen DNA-RNA UV-cleaner isimli kabin içerisinde gerçekleştirilmiştir. DNA ve RNA örneklerinin jel elektroforezinde yürütülmesinde Invitrogen (İngiltere, Amerika Birleşik Devletleri) marka yatay jel elektroforez tankı ve ZOOM Dual Power Supply (Amerika Birleşik Devletleri) isimli güç kaynağı cihazından yararlanılmıştır. DNA ve RNA örneklerinin Trans UV altında görüntülenebilmesi için Gel Logic 200 Imaging System isimli cihaz ve KODAK MI SE adlı bilgisayar programı kullanılmıştır. DNA ve RNA örneklerinin miktar tayini UV-1800 SHIMADZU (Japonya) spektrofotometre cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

PCR işlemleri için Long Gene (Kore) firmasından MyGene™ Series Peltier Thermal Cycle isimli cihazın MG966 sayılı modeli temin edilmiştir. Kantitatif RT-PCR işlemleri için Applied Biosystems'dan (Amerika Birleşik Devletleri) ViiA™ 7 Real-Time PCR System isimli cihazdan yararlanılmıştır.

Deneylerde kullanılan tamponların pH ayarlamaları Orion 520A pH metre ile gerçekleştirilmiştir. Tartım işlemlerinde Mettler Toledo AGI35 isimli hassas terazi ve Sartorius tartı cihazı kullanılmıştır.

## **3.2. Yöntemler**

### **3.2.1. Hücre Kültürü**

MCF-7, HEPG2 ve HEK293 hücreleri % 10 FBS, % 1 (w/v) P/S ve 1 X L-Glu içeren DMEM ortamında, 37°C'de ve % 5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. Hücrelerin canlılık ve çoğalma durumları her gün ışık mikroskobu altında izlenmiş ve 3-4 günde bir buldukları besiyeri taze DMEM ortamı ile değiştirilmiş ve ya hücreler pasajlanmıştır.

### 3.2.1.1. Hücrelerin Pasajlanması

Hücre hatlarının % 80-90 oranında doluluğa ulaştığı gözlemlendikten sonra, besiyeri aspire edilmiş ve hücreler 1 X Fosfat tamponlu salin (PBS, 10 mM pH 7,4) ile yıkanmıştır. Hücrelere % 0,25'lik Tripsin-EDTA çözeltisi eklenmiş ve 37°C'de 2-3 dakika süre ile inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda kültür kaplarına soğuk DMEM eklenmiş ve toplanan hücreler oda sıcaklığında 10 dakika süre ile 250 x g'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant aspire edilmiş, hücrelere ılık DMEM eklenmiş ve belirlenen seyreltme oranına göre yeni kültür kaplarına aktarılmıştır. Hücreler 37°C'de ve % 5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde saklanmıştır.

### 3.2.1.2. Hücrelerin Dondurulması ve Çözdürülmesi

Pasajlama sırasında santrifüj işleminden sonra pellet olarak çöktürülen hücrelerin bir kısmı saklanmak ve daha sonra kullanılmak üzere dondurulmuştur. Bunun için steril bir karyotüp içine süspansiyon edilmiş hücrelere % 10 Dimetilsülfoksit (DMSO) eklenmiştir. Hücreler önce -20°C'de 2 saat süre dondurulmuş daha sonra -86°C'lik derin dondurucuya aktararak saklanmıştır.

-86°C'de saklanan hücrelerin çözdürülmesi için hücreler 37°C'lik su banyosunda hafifçe çalkalanarak çözdürülmüştür. Hücrelerin tamamı bir falkon tübe aktarılıp üzerine ılık DMEM eklenmiş ve oda sıcaklığında 10 dakika süre ile 250 x g'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant aspire edilip hücrelerin üzerine ılık besiyeri eklenmiş ve çözülen hücreler kültür kabına aktararak 37°C'de % 5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde saklanmıştır.

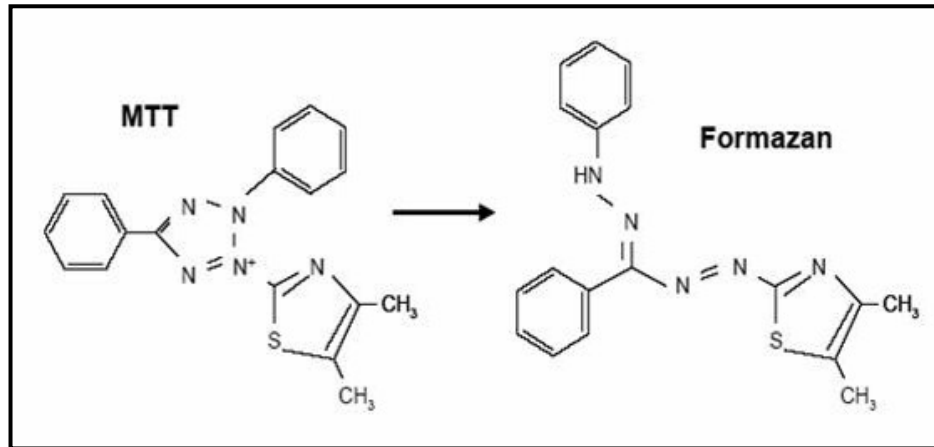
### 3.2.2. Thoma Lamı ile Hücre Sayımı

Sayımı yapılacak hücrelerin besiyeri aspire edilmiş ve 1 X PBS ile yıkanmıştır. % 0,25'lik Tripsin-EDTA çözeltisi eklenmiş ve kültür kapları 37°C'de % 5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatör ortamında 2-3 dakika süre ile inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda kültür kaplarına soğuk DMEM eklenmiş ve pipet yardımı ile altüst edilerek homojen hale gelmesi sağlanmıştır. Hücreler steril falkon tüplere aktarılmış ve oda sıcaklığında 10 dakika süre ile 250 x g'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında, süpernatant kısım aspire edildikten sonra hücrelerin üzerine ılık DMEM eklenmiş ve

pipet yardımı ile altüst edilerek homojen hale gelmesi sağlanmıştır. Bu süspansiyon, steril bir ependorf içinde ılık DMEM ile 1/10 oranında seyreltilmiş ve bu süspansiyondan belirlenen hacimde alınıp Thoma lamı ve lamel arasına konularak ışık mikroskobu altında hücre sayımı yapılmıştır.

### 3.2.3. MTT Sitotoksosite Deneyi

3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-difeniltetrazolyum bromür (MTT) sitotoksosite deneyi, MTT solüsyonunun hücresel enzim aktivitesi ile mor renkli formazana indirgenmesi esasına dayanan (Şekil 3.1), hücre büyümesinin ve ya hücre ölümünün indirekt olarak değerlendirilmesini amaçlayan bir deneydir.



Şekil 3.1. MTT sitotoksosite deneyinin esası (205).

MCF-7, HEPG2 ve HEK293 hücrelerinin her biri 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına kuyucuk başına 10.000 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Kontrol amaçlı ölçülecek kuyucuklara hiç hücre ekilmemiştir. Hücreler ekimden sonra 37°C % 5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübasyona bırakılmıştır.

Hücrelerin tutunmaya başlamasından yaklaşık 2 gün sonra eski DMEM ortamı aspire edilip hücreler 1 X PBS ile yıkanmıştır. Deneyin kontrolü olan kuyucuklara hiç DOX eklenmezken, diğer kuyucuklara ise artan dozlarda (50 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM, 750 nM, 1000 nM, 2000 nM, 3000 nM ve 4000 nM) DOX uygulaması yapılmıştır. Bunun için her kuyucuğa toplam hacim 100 µL olacak şekilde FBS içermeyen besiyeri ve ilgili dozlarda DOX uygulaması yapılmış; hiç

DOX uygulanmayan kuyucuklara sadece 100 µL FBS içermeyen ılık DMEM eklenmiştir. DOX uygulamasından sonra hücreler 37°C'de % 5 CO<sub>2</sub> ortamında 48 saat süre ile inkübe edilmiştir. 48 saat sonunda bütün kuyucuklara MTT solüsyonu (5 mg/mL) eklenmiş ve hücreler 4 saat boyunca 37°C'de % 5 CO<sub>2</sub> ortamında inkübasyona bırakılmıştır. 4 saat inkübasyonun sonrasında bütün kuyucuklara % 23 SDS ve % 45 dimetilformamid (DMF) içeren lizis solüsyonundan eklenmiştir. Bu işlem sonrasında ELISA plaka okuyucuda, 590 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüş ve kaydedilmiştir. Hücre ekilmeyen, sadece MTT solüsyonu ve DMF-SDS lizis solüsyonu eklenen kuyucuklardan elde edilen absorbans değerleri ise kör olarak kabul edilmiştir.

#### **3.2.4. MCF-7, HEPG2 ve HEK293 Hücrelerinden DNA Saflaştırılması**

Her gün durumları izlenen kültür kapları içindeki hücre hatları % 80-90 oranında doluluğa ulaştığında, kültür kaplarının içindeki besiyeri aspire edilmiş ve hücreler 1 X PBS ile yıkanmıştır. Hücrelerin bulunduğu kültür kaplarına % 0,25'lik Tripsin-EDTA çözeltisi eklenmiş ve hücreler 37°C'de 2-3 dakika süre ile inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda kültür kaplarına soğuk DMEM eklendikten sonra hücreler oda sıcaklığında 10 dakika süre ile 250 x g'de santrifüj edilmiş ve süpernatant aspire edilmiştir. Besiyerini uzaklaştırmak amacıyla pellet 1 X PBS ile yıkanıp oda sıcaklığında 4 dakika süre ile 250 x g'de tekrar santrifüj edilmiştir. Pellet Tris-EDTA Tamponu (TE Tamponu, 10 mM, pH 8,0) ile çözülüp tekrar oda sıcaklığında 4 dakika süre ile 250 x g'de santrifüj edilmiştir. Proteinaz K, 1mg/mL olacak şekilde lizis tamponu içinde çözündürülmüş ve elde edilen pellet bu solüsyonda çözülmüştür. Süspansiyon steril ependorfa aktarılarak yaklaşık 16 saat süre ile sıcak su banyosunda 37°C'de inkübe edilmiştir.

İnkübasyon süresinin sonunda son derişim 2,5 M olacak şekilde amonyum asetat eklenmiş ve 30 saniye süresince hızlı bir şekilde çalkalanmıştır. Hücreler oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildikten sonra 2700 x g'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra süpernatant başka bir steril ependorfa aktarılmış, üzerine hacminin 2,5 katı kadar % 96'lık soğuk etanol eklenmiştir. Örnek, 20 dakika süre ile 4°C sıcaklıkta 20,800 x g'de santrifüj edildikten sonra süpernatant aspire edilmiş ve pelletin üzerine % 70'lik etanol eklenerek örnekten amonyum asetat tuzunun



uzaklaştırılması sağlanmıştır. Örnek tekrar 20 dakika süresince oda sıcaklığında  $20,800 \times g$ 'de santrifüj edildikten sonra süpernatant aspire edilmiş ve etanolün uçması için ependorfun kapağı açık olacak şekilde oda sıcaklığında 5-6 dakika süre ile inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda TE tamponu eklenerek pipet yardımı ile homojen hale gelmesi sağlanmıştır.

### **3.2.5. MCF-7, HEPG2 ve HEK293 Hücrelerinden Saflaştırılan DNA'ların Miktarı ve Saflık Tayini**

MCF-7, HEPG2 ve HEK293 hücrelerinden saflaştırılan DNA'ların miktarının tayini spektrofotometre cihazında 260 ve 280 nm'de verdikleri absorbans değerleri ölçülerek tespit edilmiştir. Nükleik asitler 260 nm'de; proteinler ise 280 nm'de maksimum absorbans vermektedir ve bu iki değerde ölçülen absorbans değerlerinin oranı ( $A_{260}/A_{280}$ ), örneğin saflık derecesini göstermekte ve bu oranın DNA için 1,6-1,8 değerleri arasında olması beklenmektedir. DNA miktarı tayininde, 260 nm'de 1 absorbans değeri veren saf DNA miktarının 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  olduğu kabul edilmektedir. Hücrelerden saflaştırılan DNA'lar steril bir ependorf içinde TE tamponu ile 1/100 oranında seyreltildikten sonra kuartz küvetine aktarılarak 260 ve 280 nm'deki absorbanslar ölçülmüş ve  $A_{260}/A_{280}$  oranı ve DNA miktarları hesaplanmıştır.

### **3.2.6. DNA için Agaroz Jelin Hazırlanması ve DNA'ların Jel Görüntüsünün Elde Edilmesi**

Değişen yüzdelerde agaroz jellerini hazırlamak için gerekli miktarda agaroz tartılıp 1 X Tris-Asetik Asit EDTA (TAE) tamponu içerisinde ısıtılarak çözülmüştür. Solüsyonun sıcaklığı yaklaşık  $50^\circ\text{C}$ 'ye düştüğünde son derişim 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  olacak şekilde EtBr eklenmiş ve jel elektroforez kasetine dökülmüştür. Jel donduktan sonra içinde 1 X TAE tamponu bulunan elektroforez tankına yerleştirilmiş ve örnekler jele yüklenip 30 dakika süre ile 100 V'da yürütülmüştür. Belirteç olarak her agaroz jeline 1000 bp'lik Track It  $\psi$  X 174 RF DNA/Hae Fragment yüklenirken, nükleik asit boyası olarak Track It Cyan/Orange iki renkli boya kullanılmıştır. Jelin KODAK jel görüntüleme cihazı ile UV ışığı altında fotoğrafı çekilmiş ve fotoğraf kaydedilmiştir.

### 3.2.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

MCF-7, HEPG2 ve HEK293 hücrelerinden saflaştırılan DNA'lar polimorfizm çalışmasında kullanılmak üzere polimeraz zincir reaksiyonuna (PCR) tabi tutulmuştur. Bunun için ilgilenilen gen bölgesi için özgün primerler tasarlanmış ve bu primerlerin DNA'ya optimum bağlandığı sıcaklığı belirlemek amacıyla önce gradient PCR yönteminden yararlanılmıştır. Gradient PCR yönteminde 44°C, 46°C, 48°C, 50°C ve 55°C sıcaklıklar seçilmiştir. Hem gradient hem de standart PCR yönteminde aynı şekilde PCR reaksiyon ortamı hazırlanmış ve hazırlanan PCR reaksiyon ortamı Tablo 3.1'de sunulmuştur.

**Tablo 3.1.** PCR yönteminde kullanılan PCR reaksiyon ortamı.

Malzemeler	Stok Derişim	Son Derişim
PCR tamponu	10 X	1 X
dNTP	10 mM	0,2 mM
İleri Primer	10 mM	0,2 mM
Geri Primer	10 mM	0,2 mM
Taq polimeraz	5 U/ $\mu$ L	5 U
DNA örneği	-	-
dH <sub>2</sub> O	-	-

Gradient PCR yöntemi için seçilen sıcaklık döngüleri Tablo 3.2'de sunulmuştur.

**Tablo 3.2.** Gradient PCR yöntemi için seçilen sıcaklık döngüleri.

Protokol	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Zaman
1	1	94°C	5 dakika
2	34	94°C	45 saniye
		44-55°C	1 dakika
		72°C	1 dakika
3	1	72°C	10 dakika
4	-	4°C	∞

Gradient PCR yöntemi ile primerlerin DNA'ya bağlandığı optimum sıcaklık 44°C olarak belirlenmiş, buna göre standart PCR yöntemi uygulanmış ve standart PCR yöntemi için sıcaklık döngüleri Tablo 3.3'de sunulmuştur.

**Tablo 3.3.** Standart PCR yöntemi için sıcaklık döngüleri.

Protokol	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Zaman
1	1	94°C	5 dakika
2	34	94°C	45 saniye
		44°C	1 dakika
		72°C	1 dakika
3	1	72°C	10 dakika
4	-	4°C	∞

### 3.2.8. MCF-7, HEPG2 ve HEK293 Hücrelerinde TP53 Geninin Genomik Dizisinin 72. Kodonunda Polimorfizm Çalışması

MCF-7, HEPG2 ve HEK293 hücrelerinden saflaştırılan DNA örnekleri kullanılarak yapılan PCR çalışmasından elde edilen PCR ürünleri, TP53 geninin genomik dizisinin 72. kodonunda Arg/Pro genotipi bulunup bulunmadığının tespit edilmesi amacıyla polimorfizm çalışmasında kullanılmıştır. Bunun için *Bst*uI

enziminin izoşizomeri olan *Bsh1236I* (*FnuDII*) (10 U/ $\mu$ L) restriksiyon enzimi kullanılmıştır. *FnuDII* enzimi, bir DNA dizisinde yer alan CGCG sekansını tanıyıp küt uçlu olarak G ve C nükleotidlerinin ortasından kesmektedir (Şekil 3.2).



**Şekil 3.2.** *FnuDII* restriksiyon enziminin kesim bölgesi.

Polimorfizm çalışması için hazırlanan reaksiyon ortamı Tablo 3.4’de sunulmuştur.

**Tablo 3.4.** Polimorfizm çalışması için hazırlanan reaksiyon ortamı.

Malzemeler	Miktar ( $\mu$ L)
dH <sub>2</sub> O	11
PCR ürünü	6
BSA içeren R <sup>+</sup> tamponu	2
Enzim ( <i>FnuDII</i> )	1

*FnuDII* restriksiyon enzimi için BSA (Sığır Serum Albümini) içeren 10 X R<sup>+</sup> tamponu (10 mM Tris-HCl, pH 8.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub> 100 mM KCl, 0,1 mg/mL BSA) son derişim 1 X olacak şekilde reaksiyon ortamına eklenmiştir.

Hazırlanan reaksiyon ortamları sıcak su banyosunda 37°C’de yaklaşık 16 saat süre ile inkübe edildikten sonra % 1,8’lik agaroz jelde 30 dakika süre ile 100 V’da yürütülmüş ve Trans UV ışığı altında jelin fotoğrafı çekilerek kaydedilmiştir.

### **3.2.9. MCF-7, HEPG2 ve HEK293 Hücrelerinin 6 cm'lik Petrilere Ekilmesi**

Hücre hatları % 80-90 oranında doluluğa ulaştığında, **3.2.1.1.** no'lu başlıkta anlatıldığı üzere hücreler toplanmıştır. Hücre süspansiyonu steril bir ependorf içinde besiyeri ile seyreltilmiş ve ışık mikroskobu altında thoma lamı ile hücre sayımı yapılmıştır. 6 cm çapındaki her bir petri kabında 200.000 hücre olacak şekilde hücreler ekilmiştir. Hücrelerin üzerine 4-5 ml besiyeri eklendikten sonra 37°C'de % 5 CO<sub>2</sub> içeren ortamında inkübasyona bırakılmıştır.

Petri kaplarına ekilen hücreler % 80-90 oranında doluluğa ulaştığında, bu kaplardaki besiyeri aspire edilmiş, FBS içermeyen besiyeri eklendikten sonra artan dozlarda DOX (50 nM, 200 nM, 400 nM, 800 nM) uygulanmıştır. Deney kontrolü amacıyla kullanılacak bir petriye hiç DOX eklenmemiştir. Hücreler 48 saat süre ile 37°C'de % 5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübe edilmiştir.

### **3.2.10. MCF-7, HEPG2 ve HEK293 Hücrelerinin RNA'larının Saflaştırılması**

MCF-7, HEPG2 ve HEK293 hücrelerinin RNA'larının saflaştırılması için petri kaplarına ekilen ve artan derişimlerde DOX uygulaması yapılan hücrelerin ortamı aspire edilmiştir. Her bir kaba 1:100 oranında β-merkaptolan ve lizis tamponu içeren karışımdan eklenmiş ve pipet yardımı ile alt üst edilerek homojen hale gelmesi sağlanmıştır. Homojenat, petri kabında hiç hücre kalmadığından emin olunarak steril bir ependorfa aktarılmıştır. Her bir kaba konulan β-merkaptolan ve lizis tamponu içeren karışımın hacmine göre 1:1 oranında % 70'lik etanol eklenmiş ve vorteks yardımı ile homojen hale getirilmiştir. Bu örnekler, toplama tüpünün içine oturtulmuş olan kolona aktarıldıktan sonra oda sıcaklığında 15 saniye süre ile 12,000 x g'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında toplama tüpünün içinde biriken kısım döküldükten sonra kolon tekrar toplama tüpüne oturtulmuş, örneğin geri kalan kısmı da aynı şekilde içine toplama tüpüne oturtulmuş olan kolona aktarılmıştır. Kolon oda sıcaklığında 15 saniye süre ile 12,000 x g'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında toplama tüpünün içinde biriken kısım döküldükten sonra kolon tekrar toplama tüpüne oturtulmuştur. Daha sonra tüplerdeki örneklerin üzerine yıkama tamponu I eklenerek

oda sıcaklığında 15 saniye süre ile 12,000 x g'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında toplama tüpünün içinde biriken kısım döküldükten sonra kolon tekrar toplama tüpüne oturtulmuştur. Örneklerin üzerine % 96'lük saf etanol içeren yıkama tamponu II eklenmiş ve kolon oda sıcaklığında 15 saniye süre ile 12,000 x g'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında toplama tüpünün içinde biriken kısım döküldükten sonra kolon tekrar toplama tüpüne oturtulmuş ve RNA'nın bağlı olduğu membranı kurutmak amacıyla, örnekler oda sıcaklığında 10 dakika süre ile 12,000 x g'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında kolon toplama tüpünden çıkartılarak kazanım (recovery) tüpüne takılmıştır. Kazanım tüpünün tam ortasına RNaz içermeyen su eklenmiş, oda sıcaklığında bir dakika süre ile inkübe edilmiş ve bu sürenin sonunda oda sıcaklığında 2 dakika süre ile 12,000 x g'de santrifüj edilmiştir. Kazanım tüpünün tam ortasına RNaz içermeyen su eklendikten sonra aynı işlemler tekrar edilmiş ve RNA elde edilmiştir. Saflaştırılan RNA örnekleri, miktar tayini yapıncaya kadar -86°C'de muhafaza edilmiştir. RNA saflaştırma işlemleri bütün hücreler için 3 kez tekrar edilmiştir.

### **3.2.11. MCF-7, HEPG2 ve HEK293 Hücrelerinden Saflaştırılan RNA'ların Miktarının Tayini**

MCF-7, HEPG2 ve HEK293 hücrelerinden saflaştırılan RNA'ların miktarının tayini spektrofotometre cihazında 260 ve 280 nm'de verdikleri absorbans değerleri ölçülerek tespit edilmiştir. Nükleik asitler 260 nm'de; proteinler ise 280 nm'de maksimum absorbans vermektedir. Bu iki değerde ölçülen absorbans değerlerinin oranı ( $A_{260}/A_{280}$ ), örneğin saflık derecesini göstermekte ve bu oranın RNA için 1,8-2,0 değerleri arasında olması beklenmektedir. RNA miktarı tayininde, 260 nm'de 1 absorbans değeri veren saf RNA miktarının 40 µg/mL olduğu kabul edilmektedir. Hücrelerden saflaştırılan RNA'lar steril bir ependorf içinde distile su ile 1/500 oranında seyreltildikten sonra kuartz küvetine aktarılarak 260 ve 280 nm'deki absorbanslar ölçülmüş ve  $A_{260}/A_{280}$  oranı ve RNA miktarları hesaplanmıştır.

### **3.2.12. RNA için AgaroZ Jelin Hazırlanması ve RNA'ların Jel Görüntüsünün Elde Edilmesi**

RNA için % 2'lik agaroz jeli hazırlamak amacıyla, gerekli miktarda agaroz tartılmış 1 X TAE tamponuna 500 µL seyreltilmemiş çamaşır suyu eklenip ısıtılarak çözülmüştür. Solüsyon 50-60°C'ye düştüğünde son derişim 0,5 µg/mL olacak şekilde EtBr eklenmiş ve jelin oda sıcaklığında donması beklenmiştir. Jel donduktan sonra içinde 1 X TAE tamponu bulunan elektroforez tankına yerleştirilmiş ve 6 X Track It Cyan/Orange iki renkli nükleik asit boyası bulunan ve örneklerden oluşan karışım yüklenmiştir. Örnekler 30 dakika süre ile 100 V'da yürütüldükten sonra görüntüleme cihazı ile UV ışığı altında jelin fotoğrafı çekilmiş ve kaydedilmiştir.

### **3.2.13. MCF-7, HEPG2 ve HEK293 Hücrelerinden Saflaştırılan RNA'lardan cDNA Oluşturulması**

-86°C'de saklanmış olan MCF-7, HEPG2 ve HEK293 hücrelerine ait total RNA örneklerinden cDNA oluşturulması için öncelikle her bir RNA örneği miktarı 500 ng olacak şekilde nükleaz içermeyen su ile dengeleyerek 11 µL'lik RNA stokları hazırlanmıştır. Daha sonra 20 µL'lik cDNA reaksiyon ortamınının oluşturulması için gereken diğer malzemeler Tablo 3.5'e göre eklenmiştir.

**Tablo 3.5.** Total RNA örneklerinden cDNA oluşturulması için hazırlanan ortam

Hücre	Örnek	Stok RNA (ng/ $\mu$ L)	RNA ( $\mu$ L)	ddH <sub>2</sub> O ( $\mu$ L)	Oligo dT ( $\mu$ L)	dNTP ( $\mu$ L)	5X Tampon ( $\mu$ L)	DTT ( $\mu$ L)	Rnaz inhibitörü ( $\mu$ L)	RT ( $\mu$ L)
HEPG2	1A	880	0,57	10,43	1	1	4	1	1	1
	2A	100	5	6	1	1	4	1	1	1
	3A	660	0,76	10,24	1	1	4	1	1	1
	4A	640	0,78	10,22	1	1	4	1	1	1
	5A	440	1,14	9,86	1	1	4	1	1	1
	1B	100	5	6	1	1	4	1	1	1
	2B	80	6,25	4,75	1	1	4	1	1	1
	3B	260	1,92	9,08	1	1	4	1	1	1
	4B	740	0,68	10,32	1	1	4	1	1	1
	5B	500	1	10	1	1	4	1	1	1
MCF7	6A	360	1,39	9,61	1	1	4	1	1	1
	7A	380	1,32	9,68	1	1	4	1	1	1
	8A	320	1,56	9,44	1	1	4	1	1	1
	9A	220	2,27	8,73	1	1	4	1	1	1
	10A	80	6,25	4,75	1	1	4	1	1	1
	6B	320	1,56	9,44	1	1	4	1	1	1
	7B	360	1,39	9,61	1	1	4	1	1	1
	8B	260	1,92	9,08	1	1	4	1	1	1
	9B	240	2,08	8,92	1	1	4	1	1	1
	10B	140	3,57	7,43	1	1	4	1	1	1



**Tablo 3.5.** (Devam) Total RNA örneklerinden cDNA oluşturulması için hazırlanan ortam

Hücre	Örnek	Stok RNA	RNA	ddH <sub>2</sub> O	Oligo dT	dNTP	5X Tampon	DTT	Rnaz inhibitörü	RT
HEK293	11A	280	1,79	9,21	1	1	4	1	1	1
	12A	232	2,16	8,84	1	1	4	1	1	1
	13A	80	6,25	4,75	1	1	4	1	1	1
	14A	56	8,93	2,07	1	1	4	1	1	1
	15A	80	6,25	4,75	1	1	4	1	1	1
	11B	112	4,46	6,54	1	1	4	1	1	1
	12B	80	6,25	4,75	1	1	4	1	1	1
	13B	136	3,68	7,32	1	1	4	1	1	1
	14B	120	4,17	6,83	1	1	4	1	1	1
	15B	88	5,68	5,32	1	1	4	1	1	1
	11C	104	2,4	8,6	1	1	4	1	1	1
	12C	48	5,2	5,8	1	1	4	1	1	1
	13C	64	3,9	7,1	1	1	4	1	1	1
	14C	24	10,4	0,6	1	1	4	1	1	1
	15C	32	7,8	3,2	1	1	4	1	1	1

- 1A, 1B, 6A, 6B, 11A, 11B ve 11C: DOX uygulanmayan hücrelerden saflaştırılan RNA örneklerini;
- 2A, 2B, 7A, 7B, 12B, 12B ve 12C: 50 nM DOX uygulanan hücrelerden saflaştırılan RNA örneklerini;
- 3A, 3B, 8A, 8B, 13A, 13B ve 13C: 200 nM DOX uygulanan hücrelerden saflaştırılan RNA örneklerini;
- 4A, 4B, 9A, 9B, 14A, 14B ve 14C: 400 nM DOX uygulanan hücrelerden saflaştırılan RNA örneklerini;
- 5A, 5B, 10A, 10B, 15A, 15B ve 15C ise 800 nM DOX uygulanan hücrelerden saflaştırılan RNA örneklerini temsil etmektedir.

### 3.2.14. cDNA için Agaroz Jelin Hazırlanması ve cDNA'ların Jel

#### Görüntüsünün Elde Edilmesi

mRNA'lardan cDNA'lerin oluşturulup oluşturulmadığını görebilmek amacıyla % 2'lik agaroz jeli hazırlanmış ve DNA jelinden farklı olarak EtBr eklenmemiştir. Bunun yerine jel donduktan sonra ilk kuyucuğa 1000 bp'lik Track It  $\psi$  X 174 RF DNA/Hae Fragment belirteci yüklenirken diğer kuyucuklara cDNA

örnekleri ve Cyan/Orange iki renkli boyadan oluşan karışım yüklenmiştir. Jel 30 dakika süre ile 100 V'da yürütülmüştür. Bu sürenin sonunda jel, 1 X TAE tamponu ve 1 X SYBR Gold nükleik asit jel boyası içeren bir kaba alınmış ve yaklaşık iki saat süre ile ışık almayan bir ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda trans UV altında jelin fotoğrafı çekilmiş ve kaydedilmiştir.

### **3.2.15. Kantitatif Eş Zamanlı PCR Yöntemi ile Gen Ekspresyon Düzeylerinin Tayini**

Hiç DOX uygulanmamış ya da artan dozlarda DOX uygulanmış olan MCF-7, HEPG2 ve HEK293 hücrelerinden elde edilen cDNA'lerin uygun şekilde oluşturuldukları agaroz jel görüntüleri ile doğrulanmıştır. Bundan sonraki aşamada cDNA örnekleri ile kantitatif eş zamanlı PCR (RT-PCR) yöntemi uygulanarak TP53, MDM2, BCL-2, BAX ve MDR-1 genlerinin ekspresyon düzeyleri belirlenmek üzere çalışılmıştır. Kontrol geni olarak GAPDH seçilmiş ve GAPDH'nin gen ekspresyon düzeyi ile bu genlerin ekspresyon düzeyleri karşılaştırılmıştır.

Polimorfizm çalışmasında kullanılacak olan primer çifti bölgesi Başlık 3.2.8'de anlatılan gen bölgesini içerecek şekilde seçilmiş ve çoğaltma buna göre yapılmıştır.

Tablo 3.6'da primerlerin oluşturduğu ürünlerin boyutu, % GC oranları ve  $T_m$  sıcaklıkları da gösterilmiştir.

Tablo 3.6'nın aşağısında polimorfizm çalışması için tasarlanan primerler, TP53 geninin yaklaşık 1000 bazlık bölgesi içinde mavi renk ile gösterilmiştir. Ayrıca RT-PCR çalışması için seçilen genlerin cDNA dizileri verilmiş ve yine bu cDNA dizilerinden tasarlanan primerler de mavi renk ile belirtilmiştir. Belirtilen bütün gen ve cDNA dizileri National Center for Biotechnology Information (NCBI) veri tabanından alınmıştır.

**Tablo 3.6.** Polimorfizm ve gen ekspresyonu çalışmaları için tasarlanan primerler ve ilgilenilen gen ürünleri.

Primer	Primer Dizisi (5'-3')	Tm (°C)	% GC	Çoğaltılan Gen Ürününün
PolF (TP53)	CTCAGGGCAACTGACCGT	43	50	309
PolR (TP53)	CTCAGGGCAACTGACCGT	47	61	
Gen1F (TP53)	CACCATGAGCGCTGCTCAGATAGC	65,86	58,33	300
Gen1R (TP53)	ACAGGCACAAACACGCACCTCAAA	65,97	50,00	
Gen2F (MDM2)	AGGTCACTCCGATGAAAGGT	58,35	50,00	174
Gen2R (MDM2)	GTTGTCTAGTACCATTAACC	50,61	40,00	
Gen4F (BCL-2)	GTGTGTGGAGAGCGTCAACCGG	65,78	63,64	162
Gen4R (BCL-2)	TCAAACAGAGGCCCGCATGCTGG	65,90	59,09	
Gen5F (BAX)	TTTCATCCAGGATCGAGCAG	57,39	50,00	262
Gen5R (BAX)	AAAGTAGAAAAGGGCGACAA	55,19	40,00	
Gen6F (MDR-1)	TTCAACTATCCCACCCGACCGGAC	66,03	58,33	257
Gen6R (MDR-1)	ATGCTGCAGTCAAACAGGATGGGC	66,01	54,17	
Gen7F (GAPDH)	GTCGTATTGGGCGCCTGGTCAC	65,93	63,64	239
Gen7R (GAPDH)	GCCAGCATCGCCCCACTTGATT	66,00	59,09	

**P53 Geninin Genomik Dizisinin 1000 Bazlık Bölgesi (Toplam 32772 baz çifti)**

ACCACCCCACCCCAACCCCAGCCCCCTAGCAGAGACCTGTGGGAAGCGAAAATTCC  
 ATGGGACTGACTTTCTGCTCTTGTCTTTCAGACTTCCTGAAAACAACGTTCTGGTAA  
 GGACAAGGGTTGGGCTGGGGACCTGGAGGGCTGGGGACCTGGAGGGCTGGGGGGCTG  
 GGGGGCTGAGGACCTGGTCCTCTGACTGCTCTT**TTCACCCATCTACAGTCC**CCCTTG  
 CCGTCCCAAGCAATGGATGATTTGATGCTGTCCCCGGACGATATTGAACAATGGTTC  
 ACTGAAGACCCAGGTCCAGATGAAGCTCCAGAAATGCCAGAGGCTGCTCCCCCGTG  
 GCCCCTGCACCAGCAGCTCCTACACCGGCGGCCCTGCACCAGCCCCCTCCTGGCCC  
 CTGTCATCTTCTGTCCCTTCCAGAAAACCTACCAGGGCAGCTACGGTTTCCGTCTG  
 GGCTTCTTGCAATTCTGGGACAGCCAAGTCTGTGACTTGC**ACGGTCAGTTGCCCTGAG**  
 GGGCTGGCTTCCATGAGACTTCAATGCCTGGCCGTATCCCCCTGCATTTCTTTTGT  
 TGAACTTTGGGATTCTCTTACCCTTTGGCTTCTGTCAGTGTTTTTTTATAGTT  
 TACCACTTAATGTGTGATCTCTGACTCCTGTCCCAAAGTTGAATATCCCCCCTTG  
 AATTTGGGCTTTTATCCATCCATCACACCTCAGCATCTCTCCTGGGGATGCAGAA  
 CTTTTCTTTTTCTTCATCCACGTGTATTCTTGGCTTTTGAAAATAAGCTCCTGACC  
 AGGCTTGGTGGCTCACACCTGCAATCCAGCACTCTCAAAGACTCAGGCTGGAGTGC  
 AGTGGCTCAATCTCAGCTCACTGCAAGCTCTGCCTCCAGGTTTCATGCCATTCTCCT  
 GCCTCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGACTACAGGCGCCCGCCACCACGCCTGGCTAATT  
 TTTTGTATTTTATAGTAGAGACAGGGTTTCAC

**TP53 Geninin cDNA Dizisinin 1500 Bazlık Bölgesi (Toplam 2591 baz çifti)**

GATGGGATTGGGGTTTTCCCTCCCATGTGCTCAAGACTGGCGCTAAAAGTT  
 TTGAGCTTCTCAAAGTCTAGAGCCACCGTCCAGGGAGCAGGTAGCTGCTGGGCTCC  
 GGGACACTTTGCGTTCGGGCTGGGAGCGTGCTTCCACGACGGTGACACGCTTCCC  
 TGGATTGGCAGCCAGACTGCCTTCCGGGTCCTGCCATGGAGGAGCCGCAGTCAGAT  
 CCTAGCGTCGAGCCCCCTCTGAGTCAGAAACATTTTCAGACCTATGGAACTACTT  
 CCTGAAAACAACGTTCTGTCCCCCTTGCCGTCCCAAGCAATGGATGATTTGATGCTG  
 TCCCCGGACGATATTGAACAATGGTTCCTGAAGACCCAGGTCCAGATGAAGCTCCC  
 AGAATGCCAGAGGCTGCTCCCCCGTGGCCCCCTGCACCAGCAGCTCCTACACCGGCG  
 GCCCTGCACCAGCCCCCTCCTGGCCCCCTGTCATCTTCTGTCCCTTCCAGAAAACC  
 TACCAGGGCAGCTACGGTTTCCGTCTGGGCTTCTTGCATTCTGGGACAGCCAAGTCT

GTGACTTGCACGTA CTCCCCTGCCCTCAACAAGATGTTTTGCCAACTGGCCAAGACC  
 TGCCCTGTGCAGCTGTGGGTTGATTCCACACCCCCGCCCGCACCCGCGTCCGCGCC  
 ATGGCCATCTACAAGCAGTCACAGCACATGACGGAGGTTGTGAGGCGCTGCCCCCAC  
 CATGAGCGCTGCTCAGATAGCGATGGTCTGGCCCCCTCCTCAGCATCTTATCCGAGTG  
 GAAGGAAATTTGCGTGTGGAGTATTTGGATGACAGAAACACTTTTCGACATAGTGTG  
 GTGGTGCCCTATGAGCCGCCTGAGGTTGGCTCTGACTGTACCACCATCCACTACAAC  
 TACATGTGTAACAGTTCCTGCATGGGCGGCATGAACCGGAGGCCATCCTCACCATC  
 ATCACACTGGAAGACTCCAGTGTAATCTACTGGGACGGAACAGCTTTGAGGTGCGT  
 GTTTGTGCCTGTCTCTGGGAGAGACCGGCGCACAGAGGAAGAGAATCTCCGCAAGAAA  
 GGGGAGCCTCACCACGAGCTGCCCCAGGGAGCACTAAGCGAGCACTGCCCAACAAC  
 ACCAGCTCCTCTCCCCAGCCAAAGAAGAAACCACTGGATGGAGAATATTTCAACCCTT  
 CAGATCCGTGGGCGTGAGCGCTTCGAGATGTTCCGAGAGCTGAATGAGGCCTTGAA  
 CTCAAGGATGCCAGGCTGGGAAGGAGCCAGGGGGGAGCAGGGCTCACTCCAGCCAC  
 CTGAAGTCCAAAAGGGTCAGTCTACCTCCCGCCATAAAAAACTCATGTTCAAGACA  
 GAAGGGCCTGACTCAGACTGACATTCTCCACTTCTTGTTCCTCCACTGACAGCCTCCC  
 ACCCCATCTCTCCCTCCCCTGCCATTTTGGGTTTTGGGTCTTTGAACCCTTGCTTG  
 CAATAGGTGTGCGTCAGAAGCAC

**MDM2 Geninin cDNA Dizisinin 1500 Bazlık Bölgesi (Toplam 7495 baz çifti)**

CCTGTCAAATATCTGCAAGAACTATGGAATAAACTACTGATGCAGTGAAGA  
 CAGTTGAAAAGATCAAACAAATGCCAAGCTATATTTATAATGAACAAATTCAAGAAA  
 AAGGACTACGGAAAGTTCAGGACATCAAAGAAGTCAGGCAAAACTCATCTTGACCCC  
 TGTTCAGGCAAAGGAACGCAGCTGGAAGAAAAGATGATATAACAGTTAACAGGATG  
 CAGACATGGCAGAGGTTTCCTAAAAATCTCATTATCTATAACCATTTCTATATTTAC  
 ATTTGAAAATCTCCTTTGGAGACTTAGAACCTCTAAATTATTGACTTATTTTTTTATA  
 TA  
 AGGTCACTCCGATGAAAGGTGATTACAAAATCATCTACATTGCTGTCTACAAAACAG  
 ATAATATGGATGTTTGATCGCATCTCATTGTTAACTCTTTACTGATATGTTTGTA  
 TACAGAAGTGAATGTGGACATAAAATAGTTACGCTATTTGGTTAATGGTACTAGAC  
 AACATGTAATTAATGACATTCAAAAATTTATGGCTAGTGATATATATAAAGTAAAT  
 TTTCTTTGCAGTAAAATATGCCCTTTATTATAGAAGGGAGGATATAAGGAACCAACA  
 GTTTGTATGAAAATAGCTCAAATAATATCTTTTATTTTGATTTTAATATTTCTTATT

TTGGTTTATTAGTGTCTTAGAACAAAATGGCCTTATATAATGAAGCCTAGTTATGCT  
 GGACTGTTTTGATCTCTTTTAATTGTTCTGACAGATAGTTGGGGATGAGAGCCGAAT  
 AAGGTTTGCCTGAAATAACTGACACTATATAATTTCTGCTTTGGCAAATACTAAGTT  
 CTAACCTTGTCAATTCCTGGTAGAACAAAGCTTTATTTTTTCGAGCCTAGCAATGATCTAG  
 AAGCAGATGTTATCTCAGTGCCTTTTGCAATTTGTTGTGTGGGTTTTTTTTTTTTTTA  
 AAGCCACACAATAATTTTGGAAAACAATGTATGGGTAGAACATGTGTCTGTTAATTG  
 CACACAAAACCACTTTTAATGGGTACAGAGTTAAATTTGAAGGAATAAGTTCTAGCT  
 GAAGTATTATGAACTCCAATAATGCTTTGAGGACCTCCAAGGTAAAAGTACTAAT  
 CCCTTTGGCCATTTATTGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGTAGGGTGACTATAGTTAAT  
 GTATTGAATGTTCTTGCTACAAATAAATGATATTTGAGCTGATGGGTGTGCTAATTA  
 CACTGATTTGATCAATACCCATTGTATGTGAAACAGTACATACACCATATTTACAAT  
 TATGTATTTAACATTTAAAATTTCTAATATAAGTATCTCTCAAACCTGTGGATTAAC  
 TCTTGATTTATATTTAAATATGAATCTTAAGCAAAACAGTGAAAATAACCATCTTGA  
 TTTAGTGTTTTTCTCCCATATGTGAATTGTATATACTTAGGTGAAGACAATAAAATC  
 AACTGAACTGTAAGCTTAGA

**BCL-2 Geninin cDNA Dizisinin 1500 Bazlık Bölgesi (Toplam 6492 baz cifti)**

TTTCTGTGAAGCAGAAGTCTGGGAATCGATCTGGAAATCCTCCTAATTTTTTA  
 CTCCCTCTCCCCGCGACTCCTGATTCATTGGGAAGTTTCAAATCAGCTATAACTGGA  
 GAGTGCTGAAGATTGATGGGATCGTTGCCTTATGCATTTGTTTTGGTTTTTACAAAA  
 GGAACTTGACAGAGGATCATGCTGTACTTAAAAAATACAACATCACAGAGGAAGTA  
 GACTGATATTAACAATACTTACTAATAATAACGTGCCTCATGAAATAAAGATCCGAA  
 AGGAATTGGAATAAAAAATTTCTGCATCTCATGCCAAGGGGGAAACACCAGAATCAA  
 GTGTTCCGCGTGATTGAAGACACCCCTCGTCCAAGAATGCAAAGCACATCCAATAA  
 AATAGCTGGATTATAACTCCTCTTCTTTCTCTGGGGGCCGTGGGGTGGGAGCTGGGG  
 CGAGAGGTGCCGTTGGCCCCGTTGCTTTTCTCTGGGAAGGATGGCGCACGCTGGG  
 AGAACAGGGTACGATAACCGGGAGATAGTGATGAAGTACATCCATTATAAGCTGTGCG  
 CAGAGGGGCTACGAGTGGGATGCGGGAGATGTGGGCGCCGCGCCCCGGGGGCCGCC  
 CCCGCACCGGGCATCTTCTCCTCCAGCCGGGCACACGCCCCATCCAGCCGCATCC  
 CGGGACCCGGTCGCCAGGACCTCGCCGCTGCAGACCCCGGCTGCCCCGGCGCCGCC  
 GCGGGGCCTGCGCTCAGCCCGGTGCCACCTGTGGTCCACCTGACCCTCCGCCAGGCC  
 GGCGACGACTTCTCCCGCCGCTACCGCCGCGACTTCGCCGAGATGTCCAGCCAGCTG

CACCTGACGCCCTTACCCGCGCGGGGACGCTTTGCCACGGTGGTGGAGGAGCTCTTC  
 AGGGACGGGGTGAACCTGGGGGAGGATTGTGGCCTTCTTTGAGTTCGGTGGGGTCATG  
 TGTGTGGAGAGCGTCAACCGGGAGATGTGCCCTTGGTGGACAACATCGCCCTGTGG  
 ATGACTGAGTACCTGAACCCGGCACCTGCACACCTGGATCCAGGATAACGGAGGCTGG  
 GATGCCTTTGTGGAACCTGTACGGCCCCAGCATGCGGCCTCTGTTTGAATTTCTCCTGG  
 CTGTCTCTGAAGACTCTGCTCAGTTTGGCCCTGGTGGGAGCTTGCATCACCCCTGGGT  
 GCCTATCTGGGCCACAAGTGAAGTCAACATGCCTGCCCAAACAATATGCAAAGG  
 TTCACTAAAGCAGTAGAAATAATATGCATTGTCTCAGTGATGTACCATGAAACAAAGCT  
 GCAGGCTGTTTAAGAAAAAATAACACACATATAAACATCACACACACAGACAGACAC  
 ACACACACACAACAATTAACAGTCTTCAGGCAAACGTCGAATCAGCTATTTACTGC  
 CAAAGGGAAATATCATTTATTTTTTACATTATTAAGAAAAAAGATTTATTTATTTA  
 AGACAGTCCCATCAAACTCCTG

**BAX Geninin cDNA Dizisi (Toplam 888 baz cifti)**

TCACGTGACCCGGGCGCGCTGCGGCCGCCCGCGCGGACCCGGCGAGAGGCGG  
 CGGCGGGAGCGGCGGTGATGGACGGGTCCGGGGAGCAGCCCAGAGGCGGGGGGCCCA  
 CCAGCTCTGAGCAGATCATGAAGACAGGGGCCCTTTTGCTTCAGGGTTTCATCCAGG  
 ATCGAGCAGGGCAATGGGGGGGAGGCACCCGAGCTGGCCCTGGACCCGGTGCCTC  
 AGGATGCGTCCACCAAGAAGCTGAGCGAGTGTCTCAAGCGCATCGGGGACGAACTGG  
 ACAGTAACATGGAGCTGCAGAGGATGATTGCCGCCGTGGACACAGACTCCCCCGAG  
 AGGTCTTTTTCCGAGTGGCAGCTGACATGTTTTCTGACGGCAACTTCAACTGGGGCC  
 GGGTTGTCGCCCTTTTCTACTTTGCCAGCAAACCTGGTGTCTCAAGGCCCTGTGCACCA  
 AGGTGCCGGAACCTGATCAGAACCATCATGGGCTGGACATTGGACTTCCTCCGGGAGC  
 GGCTGTTGGGCTGGATCCAAGACCAGGGTGGTTGGGACGGCCTCCTCTCCTACTTTG  
 GGACGCCACGTGGCAGACCGTGACCATCTTTGTGGCGGGAGTGCTCACCGCCTCAC  
 TCACCATCTGGAAGAAGATGGGCTGAGGCCCCAGCTGCCTTGGACTGTGTTTTTCC  
 TCTTACTTTTGTAAATTATTGGGGGGTGTGGGGAAGAGTGGTCTTGAGGGGGTAATAA  
 ACCTCCTTCGGGACACAA  
 AAA

**MDR-1 Geninin cDNA Dizisinin 1500 bazlık bölgesi (Toplam 4718 baz çifti)**

GTTCTGGGAAGATCGCTACTGAAGCAATAGAAAACCTCCGAACCGTTGTTTC  
 TTTGACTCAGGAGCAGAAGTTTGAACATATGTATGCTCAGAGTTTGCAGGTACCATA  
 CAGAAACTCTTTGAGGAAAGCACACATCTTTGGAATTACATTTTCCTTCACCCAGGC  
 AATGATGTATTTTTCTATGCTGGATGTTTCCGGTTTGGAGCCTACTTGGTGGCACA  
 TAAACTCATGAGCTTTGAGGATGTTCTGTTAGTATTTTCAGCTGTTGTCTTTGGTGC  
 CATGGCCGTGGGGCAAGTCAGTTCATTTGCTCCTGACTATGCCAAAGCCAAAATATC  
 AGCAGCCCACATCATCATGATCATTGAAAAACCCCTTTGATTGACAGCTACAGCAC  
 GGAAGGCCTAATGCCGAACACATTGGAAGGAAATGTCACATTTGGTGAAGTTGTA**TT**  
**CAACTATCCCACCCGACCGGAC**ATCCAGTGCTTCAGGGACTGAGCCTGGAGGTGAA  
 GAAGGGCCAGACGCTGGCTCTGGTGGCAGCAGTGGCTGTGGGAAGAGCACAGTGGT  
 CCAGCTCCTGGAGCGGTTCTACGACCCCTTGGCAGGGAAAGTGCTGCTTGATGGCAA  
 AGAAATAAAGCGACTGAATGTTTCAGTGGCTCCGAGCACACCTGGGCATCGTGTCCCA  
 GGA**GCCCATCCTGTTTACTGCAGCAT**TGCTGAGAACATTGCCTATGGAGACAACAG  
 CCGGGTGGTGTACAGGAAGAGATTGTGAGGGCAGCAAAGGAGGCCAACATACATGC  
 CTTTCATCGAGTCACTGCCTAATAAATATAGCACTAAAGTAGGAGACAAAGGAACTCA  
 GCTCTCTGGTGGCCAGAAACAACGCATTGCCATAGCTCGTGCCCTTGTTAGACAGCC  
 TCATATTTTGCTTTTGGATGAAGCCACGTCAGCTCTGGATACAGAAAGTGAAAAGGT  
 TGTCCAAGAAGCCCTGGACAAAGCCAGAGAAGGCCGCACCTGCATTGTGATTGCTCA  
 CCGCCTGTCCACCATCCAGAAATGCAGACTTAATAGTGGTGTTCAGAATGGCAGAGT  
 CAAGGAGCATGGCACGCATCAGCAGCTGCTGGCACAGAAAGGCATCTATTTTTCAAT  
 GGTCAAGTGTCCAGGCTGGAACAAAGCGCCAGTGAACCTCTGACTGTATGAGATGTTAA  
 A**TA**CTTTTTTAATATTTGTTTAGATATGACATTTATTCAAAGTTAAAAGCAAACACTT  
 ACAGAATTATGAAGAGGTATCTGTTTAACATTTCTCAGTCAAGTTCAGAGTCTTCA  
 GAGACTTCGTAATTAAAGGAACAGAGTGAGAGACATCATCAAGTGGAGAGAAATCAT  
 AGTTTAAACTGCATTATAAATTTTATAACAGAATTAAAGTAGATTTTAAAAGATAAA  
 ATGTGTAATTTTGTATATTTTCCCATTTGGACTGTA**ACTGACTGCCTTGCTAAAA**  
 GATTATAGAAGTAGCAAAAAGTA



**GAPDH cDNA Dizisi (Toplam 1401 baz çifti)**

GGCTGGGACTGGCTGAGCCTGGCGGGAGGCGGGGTCCGAGTCACCGCCTGCC  
 GCCGCGCCCCCGTTTTCTATAAATTGAGCCCGCAGCCTCCCGCTTCGCTCTCTGCTC  
 CTCCTGTTTCGACAGTCAGCCGCATCTTCTTTTGGCTCGCCAGCCGAGCCACATCGCT  
 CAGACACCATGGGGAAGGTGAAGGTTCGGAGTCAACGGATTTG**GTCGTATTGGGCGCC**  
**TGGTCAC**CAGGGCTGCTTTTAACTCTGGTAAAGTGGATATTGTTGCCATCAATGACC  
 CCTTCATTGACCTCAACTACATGGTTTACATGTTCCAATATGATTCCACCCATGGCA  
 AATTCCATGGCACCGTCAAGGCTGAGAACGGGAAGCTTGTCAATGAAATCCCA  
 TCACCATCTTCCAGGAGCGAGATCCCTCCAA**AATCAAGTGGGGCGATGCTGGC**GCTG  
 AGTACGTCGTGGAGTCCACTGGCGTCTTACCACCATGGAGAAGGCTGGGGCTCATT  
 TGCAGGGGGGAGCCAAAAGGGTCATCATCTCTGCCCCCTCTGCTGATGCCCCCATGT  
 TCGTCATGGGTGTGAACCATGAGAAGTATGACAACAGCCTCAAGATCATCAGCAATG  
 CCTCCTGCACCACCAACTGCTTAGCACCCCTGGCCAAGGTCATCCATGACAACCTTGTG  
 GTATCGTGGAAGGACTCATGACCACAGTCCATGCCATCACTGCCACCCAGAAGACTG  
 TGGATGGCCCCCTCCGGGAAACTGTGGCGTGATGGCCGCGGGGCTCTCCAGAACATCA  
 TCCCTGCCTCTACTGGCGCTGCCAAGGCTGTGGGCAAGGTCATCCCTGAGCTGAACG  
 GGAAGCTCACTGGCATGGCCTTCCGTGTCCCCACTGCCAACGTGTCAGTGGTGGACC  
 TGACCTGCCGTCTAGAAAAACCTGCCAAATATGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAGC  
 AGGCGTCGGAGGGCCCCCTCAAGGGCATCCTGGGCTACACTGAGCACCAGGTGGTCT  
 CCTCTGACTTCAACAGCGACACCCACTCCTCCACCTTTGACGCTGGGGCTGGCATTG  
 CCCTCAACGACCACTTTGTCAAGCTCATTTCTGGTATGACAACGAATTTGGCTACA  
 GCAACAGGGTGGTGGACCTCATGGCCACATGGCCTCCAAGGAGTAAGACCCCTGGA  
 CCACCAGCCCCAGCAAGAGCACAAGAGGAAGAGAGAGACCCTCACTGCTGGGGAGTC  
 CCTGCCCACTCAGTCCCCACCACTGAATCTCCCTCCTCACAGTTGCCATGTA  
 GACCCCTTGAAGAGGGGAGGGCCTAGGGAGCCGCACCTTGTCAATGTACCATCAATA  
 AAGTACCCTGTGCTCAACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Kantitatif RT-PCR işlemi için hazırlanan reaksiyon ortamı Tablo 3.7’de sunulmuştur.

**Tablo 3.7.** Kantitatif RT-PCR işlemi için hazırlanan reaksiyon ortamı.

Malzemeler	Stok Derişim	Son Derişim	1 Reaksiyon (µL)	50 Reaksiyon (µL)
Master Mix	2X	1X	12,5	625
İleri Primer	10 µM	1 µM	2,5	125
Geri Primer	10 µM	1 µM	2,5	125
ddH <sub>2</sub> O	-	-	5	250
cDNA	-	-	2,5	-
Final	-	-	25	1125

Her bir gen için ayrı reaksiyon ortamı hazırlanmış ve hazırlanan reaksiyon ortamından 3 adet 96 kuyucuklu plakaya, her bir kuyucuğa 22,5 µL olacak şekilde dağıtılmıştır. Daha sonra her bir kuyucuğa daha önceden hazırlanmış plaka tasarımına uygun şekilde ilgili cDNA örneğinden 2,5 µL eklenerek toplamda 25 µL reaksiyon ortamı oluşturulmuştur. RT-PCR işleminde kullanılan floresans boya SYBR Green ve referans boya olarak kullanılan ROX Master Mix içinde bulunmaktadır. SYBR Green floresans boyasının kullanılması ile oluşan PCR ürününün miktarı saptanmış; referans boya olan ROX boyası ile de pipetleme hatalarının önüne geçilmesi ve veri analizinin normalizasyonu sağlanmıştır. Her bir hücre hattı için, her doz ve BAX dışında her gen n=3 şeklinde çalışılmıştır ve sonuçlar kaydedilmiştir.

Kantitatif RT-PCR işlemi için seçilen sıcaklık döngüleri Tablo 3.8 ve Tablo 3.9'da sunulmuştur.

**Tablo 3.8.** TP53, BCL-2, MDR-1 ve GAPDH genleri için yapılan kantitatif RT-PCR işleminde döngü sayısı, süre ve sıcaklık değerleri.

Döngü Sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre
1	95	10 dakika
40	95	15 saniye
	65	1 dakika

**Tablo 3.9.** MDM2 ve BAX genleri için yapılan kantitatif RT-PCR işleminde döngü sayısı, süre ve sıcaklık değerleri.

Döngü Sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre
1	95	10 dakika
40	95	15 saniye
	55	1 dakika

### 3.2.16. Gen Ekspresyon Düzeylerinin Tayini Amacıyla Seçilen Genlerin ve Tasarlanan Primerlerin Dizileri

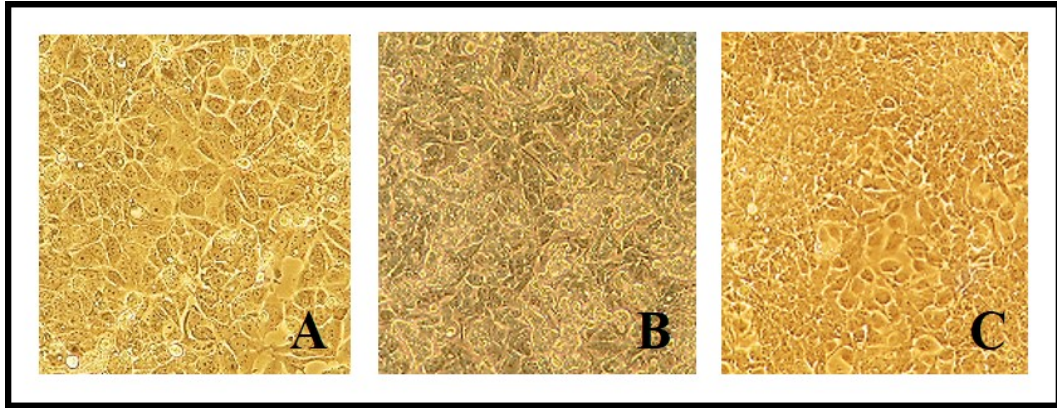
MCF-7, HEPG2 ve HEK293 hücre hatlarında ya hiç DOX uygulaması yapılmamış ya da artan dozlarda DOX uygulanmıştır ve apoptoz yolağındaki önemli genler olan TP53, MDM2, BCL-2, BAX ve MDR-1'in ekspresyon düzeylerine bakılmıştır. Kontrol gen olarak GAPDH seçilmiş ve GAPDH'in gen ekspresyon düzeyi ile bu genlerin gen ekspresyon düzeyleri karşılaştırılmıştır.

Gen ekspresyon düzeylerinin gözlemlenmesi amacıyla her bir gen için özgün primerler tasarlanmıştır ve bu primer çiftleri Tablo 3.6'da gösterilmiştir. Primerlerin hazırlanması sırasında internette yer alan National Center for Biotechnology Information'ın (NCBI) 'nucleotide blast' veri bankası kullanılmıştır. RT-PCR işlemlerinde kullanılacak primerler belirlenirken bir primerin başka herhangi bir genin ekspresyonunu gerçekleştirmediği, genomik DNA dizisine bağlanmadığı, her bir primer çiftinin erime sıcaklıklarının (T<sub>m</sub>) birbirine yakın olduğu, mümkün olan durumlarda GC oranlarının benzer olduğu çiftler tercih edilmiştir. Bu primerler tasarlanırken aynı zamanda kendi aralarında hibridizasyona uğrayarak ikincil katlanmalar oluşturmamalarına dikkat edilmiştir. Bunun için primer uzunluğu 20-24 baz çifti olacak şekilde tasarlanmış ve kantitatif RT-PCR yönteminde kullanılan bu primerlerin yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile saflaştırılmış ve liyofilize halde olmasına dikkat edilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. MCF-7, HEPG2 VE HEK293 Hücrelerinin Işık Mikroskobu Altındaki Görüntüsü

MCF-7, HEPG-2 ve HEK293 hücreleri, gereçler ve yöntemler başlığı altında anlatılan şekilde pasajlanmış ve kültür kaplarına ekilmiştir. Bu işlemler sonrasında hücrelerin canlılık durumları, kültür kabının tabanına tutunup tutunmadıkları ve doluluk oranları her gün ışık mikroskobu altında incelenmiştir. MCF-7 ve HEPG2 hücrelerinin ekim sonrasında yaklaşık 3 gün içinde; HEK293 hücrelerinin ise yaklaşık 2 gün içinde kültür kabının tabanına tutunduğu gözlemlenmiştir. MCF-7 ve HEPG2 hücrelerinin % 90 doluluk oranına ulaşması yaklaşık 6 gün içinde gerçekleşirken (Şekil 4.1. A, B) HEK293 hücreleri için bu süre 4 gün olarak kaydedilmiştir (Şekil 4.1. C)

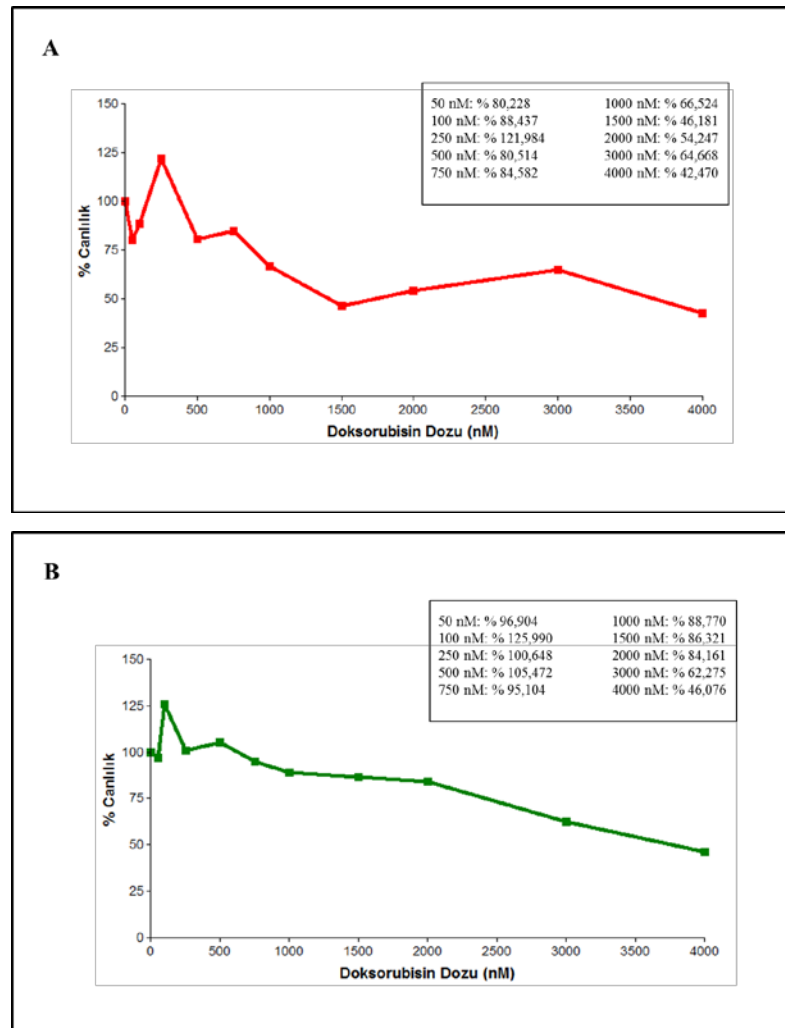


**Şekil 4.1.** MCF-7, HEPG2 ve HEK293 hücrelerinin ışık mikroskobu altındaki görüntüsü. (A) MCF-7, (B) HEPG2, (C) HEK293.

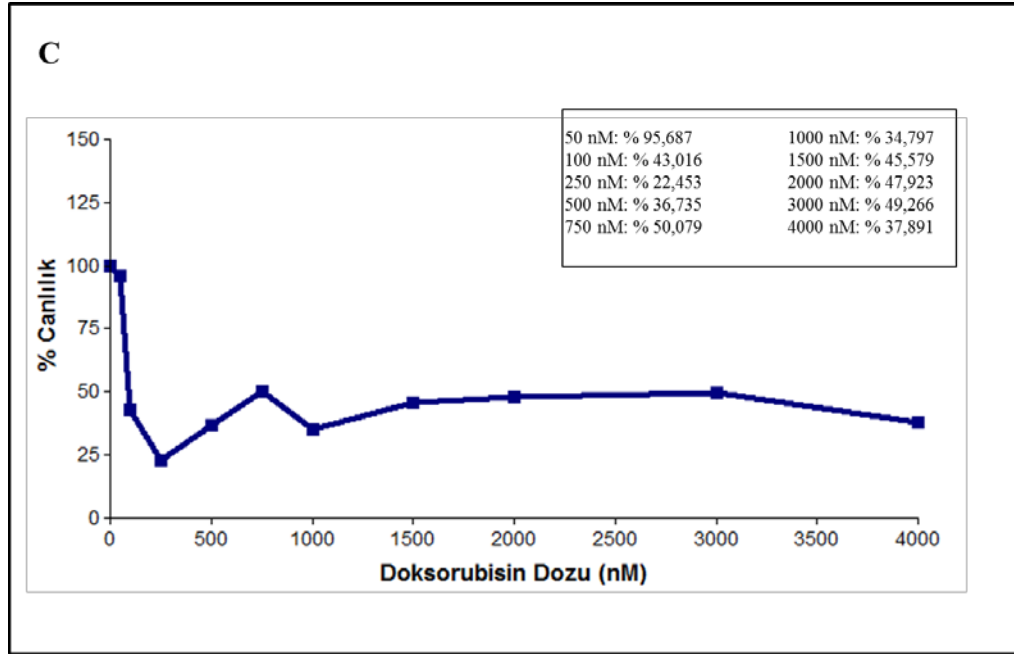
### 4.2. MTT Sitotoksosite Deneyi Sonuçları

Gereçler ve yöntemler başlığı altında anlatıldığı gibi hücreler bir sıra kuyucukta hücre olmayacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. Hücrelerin tutunmaya başlamasından yaklaşık iki gün sonra bir sıra kuyucuğa hiç DOX uygulanmazken; diğer kuyucuklara artan dozlarda (50 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM, 750 nM, 1000 nM, 2000 nM, 3000 nM ve 4000 nM) DOX uygulaması

yapılmıştır ve MTT sitotoksosite deneyi gerçekleştirilmiştir. Bu deney, her bir hücre hattı için 6 kez tekrarlanmıştır. 590 nm’de okunan absorbands değerlerinden, kör olarak kabul edilen kuyucuklarda 590 nm’de okunan absorbands değerleri çıkartılmıştır. Hiç DOX uygulaması yapılmamış olan kuyucuklarda 590 nm’de okunan absorbands değerleri % 100 canlılık olarak kabul edilmiş ve buna göre DOX uygulaması yapılan kuyucuklardan 590 nm’de okunan absorbands değerleri oranlanarak % canlılık düzeyleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar artan DOX dozlarına karşı % canlılık cinsinden grafikler halinde sunulmuştur (Şekil4.2).



**Şekil 4.2.** MCF-7, HEPG2 ve HEK293 hücreleri üzerinde yapılan MTT sitotoksosite deneyinin yüzde canlılık sonuçları. MCF-7 hücrelerinde (A), HEK293 hücrelerinde (B) ve HEPG2 hücrelerinde (C) artan DOX dozuna karşılık elde edilen yüzde canlılık değerleri.



**Şekil 4.2.** (Devam) MCF-7, HEPG2 ve HEK293 hücreleri üzerinde yapılan MTT sitotoksosite deneyinin yüzde canlılık sonuçları. MCF-7 hücrelerinde (A), HEK293 hücrelerinde (B) ve HEPG2 hücrelerinde (C) artan DOX dozuna karşılık elde edilen yüzde canlılık değerleri.

### 4.3. MCF-7, HEPG2 ve HEK293 Hücrelerinden Saflaştırılan DNA Örnekleri ile İlgili Sonuçlar

DNA saflaştırma işlemleri sonrasında elde edilen DNA örnekleri miktar tayini yapılmaya dek 4°C’de muhafaza edilmiştir. DNA miktar tayini için, gereçler ve yöntemler kısmında anlatıldığı gibi örnekler belirlenen oranlarda seyreltilmiş ve kuantaz küvetine aktarılarak spektrofotometre cihazında 260 ve 280 nm’de verdikleri absorbans değeri ölçülmüştür. Nükleik asitler 260 nm’de; proteinler ise 280 nm’de maksimum absorbans verdiğiinden bu iki değerde ölçülen absorbans değerlerinin oranı ( $A_{260}/A_{280}$ ), örneğin saflık derecesini göstermektedir. Buna göre her bir hücre hattından saflaştırılan DNA örneklerinin saflık derecesi hesaplanmış ve  $A_{260}$  değeri, seyreltme faktörüyle ve 260 nm’de 1 absorbans değeri veren saf DNA miktarının 50 µg/mL olduğu kabul edilerek 50 ile çarpılmış ve toplam DNA miktarı hesaplanmıştır (Tablo 4.1).

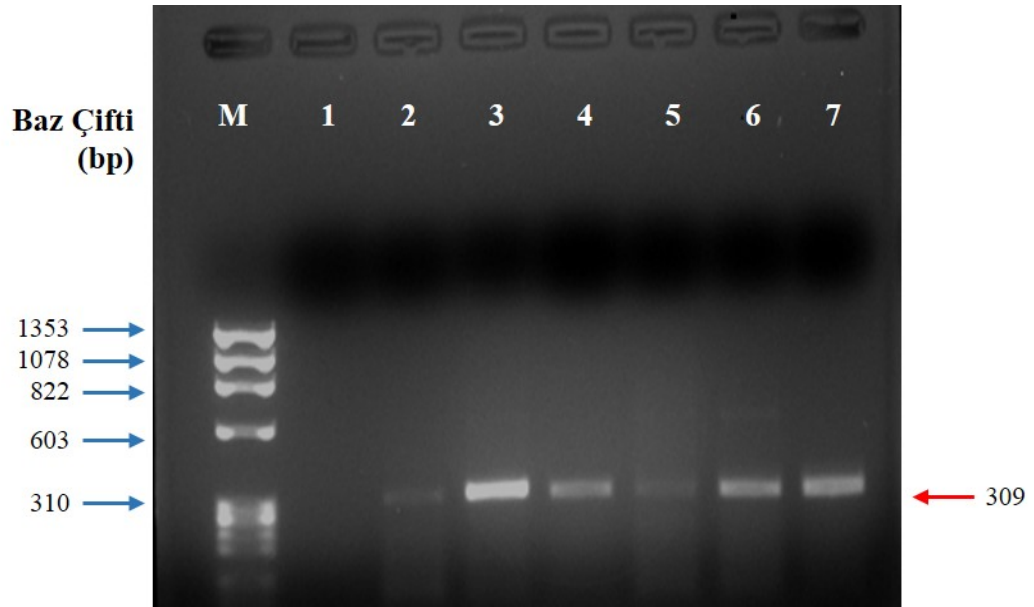
**Tablo 4.1.** MCF-7, HEPG2 ve HEK293 hücrelerinden saflaştırılan DNA örneklerinin 260 ve 280 nm’de verdiği absorbans değerleri, saflığı ve miktarı.

DNA Örneği	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> / A <sub>280</sub>	DNA miktarı (ng/μL)
<b>MCF-7</b>	0,057	0,029	1,96	285
<b>HEPG2</b>	0,060	0,030	2,00	300
<b>HEK293</b>	0,024	0,010	2,40	120

#### 4.4. MCF-7, HEPG2 ve HEK293 Hücrelerinden Saflaştırılan DNA Örneklerinin PCR Yöntemi ile Elde Edilen PCR Ürünleri

MCF-7, HEPG2 ve HEK293 hücrelerinden saflaştırılan DNA’ların ilgili bölgelerinin kopyalarının elde edilmesi ve çoğaltılması amacıyla PCR yönteminden yararlanılmıştır. Bunun için ilgilenilen 309 bp’lik TP53 gen bölgesi için özgün primerler tasarlanmış ve bu primerlerin DNA’ya optimum bağlandığı sıcaklığı belirlemek amacıyla gradient PCR yönteminden yararlanılmıştır. Gradient PCR yönteminde, primerlerin DNA’ya bağlandığı optimum sıcaklığı saptamak için 44°C, 46°C, 48°C, 50°C ve 55°C seçilmiştir. Gradient PCR yöntemi sonucunda primerlerin DNA’ya bağlandığı optimum sıcaklık 44°C olarak saptanmış ve standart PCR yöntemi buna göre uygulanmıştır. PCR çalışma solüsyonu gereçler ve yöntemler kısmında açıklandığı gibi hazırlanmış; sıcaklık döngüleri ve süreleri de yine gereçler ve yöntemler kısmında anlatılan şekilde uygulanmıştır. Kontaminasyon olasılığını ortadan kaldırmak amacıyla bir DNA içermeyen çalışma solüsyonu örneği hazırlanırken; diğer 3 çalışma solüsyonu her bir hücre hattından saflaştırılan DNA örneklerini içerecek şekilde hazırlanmıştır. PCR işlemi ile elde edilen PCR ürünleri % 1,2’lik agaroz jelde 30 dakika süre ile 100 V’da yürütülmüş ve jelin fotoğrafı çekilerek kaydedilmiştir. Jeldeki ilk kuyucuğa Track It ψ X 174 RF DNA/Hae Fragment belirteci, ikinci kuyucuğa ise Track It Cyan/Orange boyası ile DNA içermeyen PCR ürünü yüklenmiştir. Diğer kuyucuklara ise yine Track It Cyan/Orange boyası ile sırasıyla MCF-7, HEPG2 ve HEK293 hücrelerinden

saflaştırılan DNA'lardan elde edilen PCR ürünleri yüklenmiştir. DNA içermeyen PCR ürününün yüklendiği kuyucukta bant gözlenmemesi kontaminasyon olmadığına işaret etmektedir. Hücrelerden saflaştırılan DNA'lardan elde edilen PCR ürünlerinin yüklendiği kuyucuklarda ise 309 bp'lik bantlar gözlenmesi, TP53 geninin ilgilenilen 309 bp'lik bölgesinin PCR yöntemi ile başarılı bir şekilde çoğaltıldığını göstermektedir (Şekil 4.3).



**Şekil 4.3.** Standart PCR ürünlerinin % 1,2'lik agaroz jelde 30 dakika süre ile 100V'da yürütüldükten sonraki görüntüleri. M: DNA belirtecini, 1 numaralı kuyucuk herhangi bir PCR ürünü yüklenmemiş olan kontrol grubunu, 2 ve 5 numaralı kuyucuklar MCF-7 PCR ürünlerini, 3 ve 6 numaralı kuyucuklar HEPG2 PCR ürünlerini, 4 ve 7 numaralı kuyucuklar ise HEK293 PCR ürünlerini temsil etmektedir.

#### 4.5. MCF-7, HEPG2 ve HEK293 Hücrelerinde TP53 Geninin Genomik Dizisinin 72. Kodonunda Polimorfizm Çalışması

MCF-7, HEPG2 ve HEK293 hücrelerinden saflaştırılan DNA örnekleri ile yapılan PCR çalışması sonucu elde edilen PCR ürünleri ile TP53 geninin genomik dizisinin 72. kodonunda Arg/Pro genotipi bulunup bulunmadığının tespit edilmesi



amacıyla polimorfizm çalışması yapılmıştır. Bunun için, DNA dizisini GC bölgesinden tanıyan ve kesen *Bsh1236I* (*FnuDII*) restriksiyon enzimi kullanılmıştır.

Gereçler ve yöntemler kısmında anlatıldığı gibi numaralandırılmış steril ependorflarda dH<sub>2</sub>O, hücre hatlarından saflaştırılan DNA örnekleri ile yapılan PCR çalışması sonucu elde edilen PCR ürünleri, *FnuDII* restriksiyon enzimi ve BSA içeren R<sup>+</sup> tamponu içeren çalışma solüsyonları hazırlanmıştır. Daha sonra ependorf tüplerinin ağzı parafilm ile sarılarak ~16 saat süre ile 37°C'lik su banyosunda inkübe edilmiştir.

İnkübasyon süresinin sonunda % 1,8'lik agaroz jel dökülmüş ve jel donduktan sonra ilk kuyucuğa Track It ψ X 174 RF DNA/Hae Fragment belirteci, diğer kuyucuklara ise Track It Cyan/Orange boyası ile sırasıyla MCF-7, HEPG2 ve HEK293 hücrelerinin polimorfizm çalışması sonucunda elde edilen ürünleri yüklenmiştir. Ürünler 30 dakika süre ile 100 V'da yürütüldükten sonra jelin fotoğrafı çekilmiş ve kaydedilmiştir.

*FnuDII* restriksiyon enzimi, yabancı-tip TP53 geninde bulunan CCC bölgesinin Arg/Pro genotipi ile CGC olarak değişmesi ile bu bölgeyi tanıyıp kesebilmektedir. Bu süreç sonunda 309 baz çiftlik gen bölgesi restriksiyon enzimi ile kesilmekte ve 134 ve 175 baz çiftlik gen bölgeleri meydana gelmektedir.

İleri Primer

→

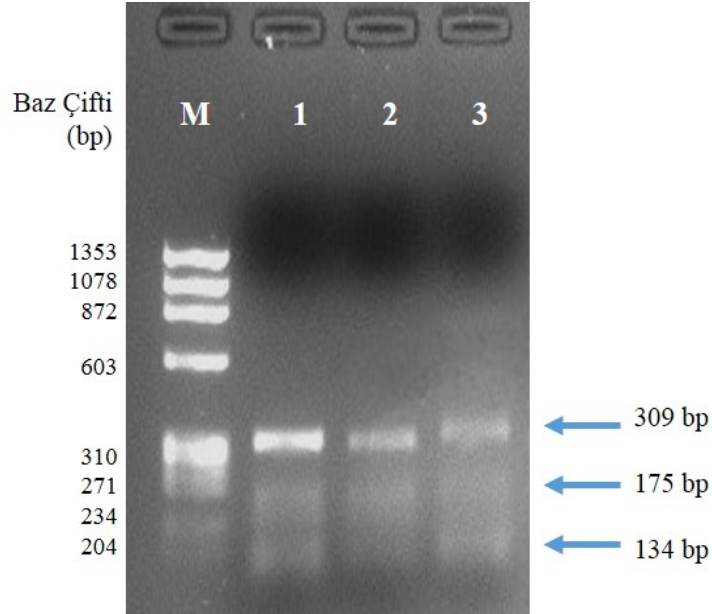
**TTCACCCATCTACAGTCC**CCCTTGCCGTCCCAAGCAATGGATGATTTG  
 ATGCTGTCCCCGGACGATATTGAACAATGGTTCACTGAAGACCCAGGT  
 CCAGATGAAGCTCCCAGAATGCCAGAGGCTGCTCCC**CCC**GTGGCCCCT  
 GCACCAGCAGCTCCTACACCGGCGGCCCTGCACCAGCCCCCTCCTGG  
 CCCCTGTCATCTTCTGTCCCTTCCCAGAAAACCTACCAGGGCAGCTAC  
 GGTTCCGTCTGGGCTTCTTGCAATTCTGGGACAGCCAAGTCTGTGACT  
 TGC**ACGGTCAGTTGCCCTGAG**

←  
 Geri Primer

**Şekil 4.4.** SNP bulunan TP53 geninde 309 baz çiftlik gen bölgesi.

Jel görüntüsünde, üç hücre ile yapılan polimorfizm çalışmasında da 309 baz çiftlik gen bölgesinin yanı sıra, 134 ve 175 baz çiftlik gen bölgeleri için de bantlar

gözlenmesi, her üç hücrede de TP53 geninde Arg/Pro heterozigot formu bulunduğuna işaret etmektedir (Şekil 4.5).



**Şekil 4.5.** MCF-7, HEPG2 ve HEK293 hücrelerinin PCR ürünleri ile gerçekleştirilen polimorfizm çalışması. M: DNA belirtecini, 1 numaralı kuyucuk MCF-7 PCR ürünü ile yapılan polimorfizm çalışmasını, 2 numaralı kuyucuk HEPG2 PCR ürünü ile yapılan polimorfizm çalışmasını, 3 numaralı kuyucuk ise HEK293 PCR ürünü ile yapılan polimorfizm çalışmasını temsil etmektedir.

#### 4.6. MCF-7, HEPG2 ve HEK293 Hücrelerinden Saflaştırılan RNA Örnekleri ile İlgili Sonuçlar

RNA saflaştırma işlemleri sonrasında elde edilen RNA örnekleri miktar tayini yapılmaya dek  $-86^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir. Bu RNA örneklerinin 260 ve 280 nm'de verdikleri absorbans değerlerine bakılarak bu örneklerin saflık derecesi ve örnekteki total RNA miktarı ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ ) ölçülmüştür. Tablo 4.2'de 1A, 1B, 6A, 6B, 11A, 11B ve 11C: DOX uygulanmayan hücrelerden saflaştırılan RNA örneklerini; 2A, 2B, 7A, 7B, 12B, 12B ve 12C: 50 nM DOX uygulanan hücrelerden saflaştırılan RNA örneklerini; 3A, 3B, 8A, 8B, 13A, 13B ve 13C: 200 nM DOX uygulanan

hücrelerden saflaştırılan RNA örneklerini; 4A, 4B, 9A, 9B, 14A, 14B ve 14C: 400 nM DOX uygulanan hücrelerden saflaştırılan RNA örneklerini; 5A, 5B, 10A, 10B, 15A, 15B ve 15C ise 800 nM DOX uygulanan hücrelerden saflaştırılan RNA örneklerini temsil etmektedir.

**Tablo 4.2.** MCF-7, HEPG2 ve HEK293 hücrelerinden saflaştırılan total RNA örneklerinin 260 nm’de ve 280 nm’de verdiği absorbans değerleri, saflığı ve miktarı.

Hücre	Örnek	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	RNA miktarı (ng/μL)
HEPG2	1A	0,044	0,027	1,63	880
	2A	0,005	0,003	1,67	100
	3A	0,033	0,018	1,83	660
	4A	0,032	0,017	1,88	640
	5A	0,022	0,011	2,00	440
	1B	0,005	0,003	1,67	100
	2B	0,004	0,003	1,33	80
	3B	0,013	0,009	1,44	260
	4B	0,037	0,019	1,95	740
	5B	0,025	0,013	1,92	500
MCF7	6A	0,018	0,009	2,00	360
	7A	0,019	0,011	1,73	380
	8A	0,016	0,009	1,78	320
	9A	0,011	0,007	1,57	220
	10A	0,004	0,002	2,00	80
	6B	0,016	0,009	1,78	320
	7B	0,018	0,01	1,80	360
	8B	0,013	0,007	1,86	260
	9B	0,012	0,006	2,00	240
	10B	0,007	0,004	1,75	140

**Tablo 4.2. (Devam)** MCF-7, HEPG2 ve HEK293 hücrelerinden saflaştırılan total RNA örneklerinin 260 nm’de ve 280 nm’de verdiği absorbans değerleri, saflığı ve miktarı.

Hücre	Örnek	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	RNA miktarı (ng/μL)
HEK293	11A	0,035	0,018	1,94	700
	12A	0,029	0,015	1,93	580
	13A	0,01	0,007	1,43	200
	14A	0,007	0,004	1,75	140
	15A	0,01	0,005	2,00	200
	11B	0,014	0,007	2,00	280
	12B	0,01	0,005	2,00	200
	13B	0,017	0,009	1,89	340
	14B	0,015	0,007	2,14	300
	15B	0,011	0,006	1,83	220
	11C	0,013	0,007	1,86	260
	12C	0,006	0,004	1,50	120
	13C	0,008	0,004	2,00	160
	14C	0,003	0,002	1,50	60
	15C	0,004	0,003	1,33	80

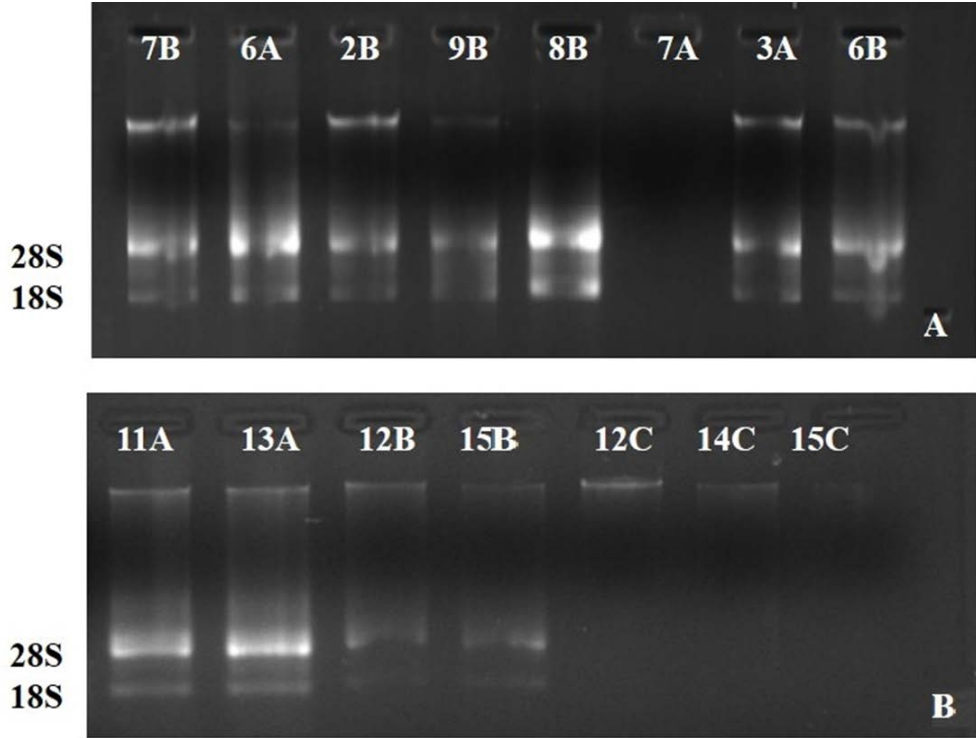
#### 4.7. MCF-7, HEPG2 ve HEK293 Hücrelerinden Saflaştırılan Total RNA Örneklerinin Agaroz Jel Görüntüleri

MCF-7, HEPG2 ve HEK293 hücrelerinden saflaştırılan total RNA örneklerinden seçilen 16 örnek, çamaşır suyu içeren % 2’lik agaroz jelde kuyucuklara Track It Cyan/Orange boyası ile birlikte yüklenmiştir. Örnekler 30 dakika süre ile 100 V’da yürütülmüş ve fotoğrafı çekilerek kaydedilmiştir. Fotoğrafta 28S rRNA ve 18S rRNA bantlarının gözlenmesi total RNA’nın hücrelerden başarılı bir şekilde saflaştırıldığına işaret etmektedir (Şekil 4.6).

Şekil 4.6. A’da kuyucuklara yüklenmiş olan örneklerden sırasıyla 7B: 50 nM DOX uygulanmış MCF-7, 6A: DOX uygulaması yapılmamış MCF-7, 2B: 50 nM DOX uygulanmış HEPG2, 9B: 400 nM DOX uygulanmış MCF-7, 8B: 200 nM DOX uygulanmış olan MCF-7, 7A: 50 nM DOX uygulanmış MCF-7, 3A: 200 nM DOX uygulanmış HEPG2 ve 6B: hiç DOX uygulaması yapılmamış MCF-7 hücrelerinden saflaştırılan RNA örneklerini temsil etmektedir.

Şekil 4.6. B’de kuyucuklara yüklenmiş olan örneklerden sırasıyla 11A: hiç DOX uygulaması yapılmamış, 13A: 200 nM DOX uygulanmış, 12B: 50 nM DOX uygulanmış, 15B: 800 nM DOX uygulanmış, 12C: 50 nM DOX uygulanmış, 14C:

400 nM DOX uygulanmış ve 15C: 800 nM DOX uygulanmış HEK293 hücrelerinden saflaştırılan RNA örneklerini temsil etmektedir.



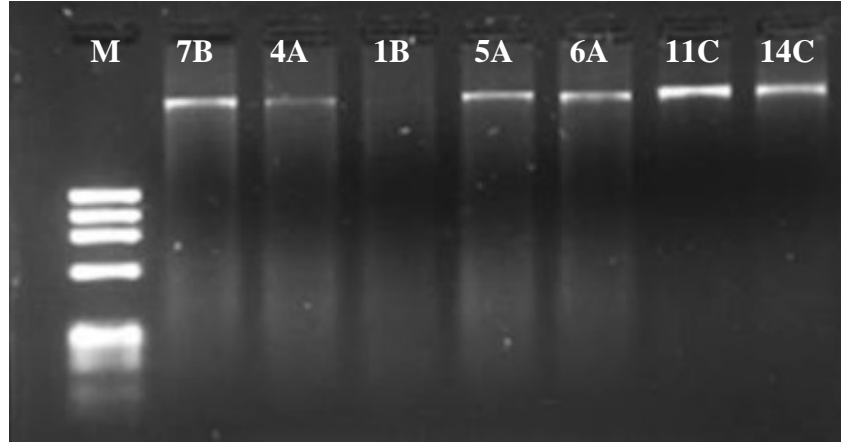
Şekil 4.6. Hücrelerden saflaştırılan total RNA örneklerinin jel görüntüleri.

#### 4.8. MCF-7, HEPG2 ve HEK293 Hücrelerinden Saflaştırılan Total RNA Örneklerinden Oluşturulan cDNA’ların Agaroz Jel Görüntüleri

% 2’lik agaroz jele yüklenen cDNA örneklerinin 100 V’da 30 dakika süre ile yürütülmesinden sonra jel 1 X SYBR Gold ile boyanmış ve inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinden sonunda jelin fotoğrafı çekilmiş ve cDNA örneklerinin bir örnek dışında başarılı bir şekilde oluşturulduğu gösterilmiştir.

Şekil 4.7’de M: DNA belirtecini, 7B: 50 nM DOX uygulanmış MCF-7, 4A: 400 nM DOX uygulanmış HEPG2, 1B: hiç DOX uygulanmamış HEPG2, 5A: 800 nM DOX uygulanmış HEPG2, 6A: 200 nM DOX uygulanmış MCF-7, 11C: hiç

DOX uygulaması yapılmamış HEK293 ve 14C ise 400 nM DOX uygulanmış HEK293 hücrelerinden saflaştırılan RNA'lerden oluşturulan cDNA örneklerini temsil etmektedir.



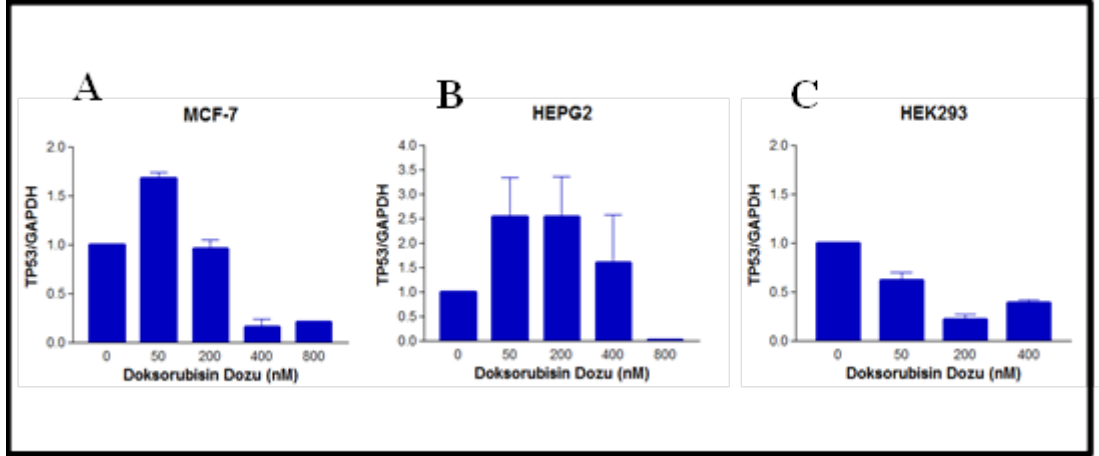
**Şekil 4.7.** MCF-7, HEPG2 ve HEK293 hücrelerinden saflaştırılan total RNA örneklerinden oluşturulan cDNA'ların agaroz jel görüntüleri.

#### **4.9. MCF-7, HEPG2 ve HEK293 Hücrelerinde TP53, MDM2, BCL-2, BAX ve MDR-1 Genlerinin Ekspresyon Düzeyi Sonuçları**

Hiç DOX uygulaması yapılmamış ya da artan dozlarda DOX uygulanmış olan MCF-7, HEPG2 ve HEK293 hücrelerinde TP53, MDM2, BCL-2, BAX ve MDR-1 genlerinin ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi amacıyla RT-PCR işleminden yararlanılmış ve kontrol gen olarak GAPDH seçilmiştir.

BAX dışında her bir gen, her bir hücre hattı için n=3 olacak şekilde çalışılmıştır. Sonuçların ortalama ve standart sapmaları alınmış ve GraphPad grafik programı yardımıyla gen ekspresyon grafikleri çizilmiştir.

Şekil 4.8'de her bir hücre hattı için TP53 geninin ekspresyon düzeylerinde, DOX'un artan dozlarına bağlı gözlenen değişiklikler grafik halinde sunulmuştur. Tablo 4.3'te ise her bir hücre hattı için ayrı ayrı TP53 gen ekspresyon düzeylerinin ortalaması ve standart sapması verilmiştir.



**Şekil 4.8.** (A) MCF-7, (B) HEPG2 ve (C) HEK293 hücrelerinde TP53 ekspresyon düzeyleri grafiği (n=3).

**Tablo 4.3.** MCF-7, HEPG2 ve HEK293 hücrelerinde TP53 geninin ekspresyon düzeylerinin ortalaması ve standart sapması.

DOX (nM)	Hücre Hattı	Ortalama	Standart Sapma
0	MCF-7	1,000	0,000
	HEPG2	1,000	0,000
	HEK293	1,000	0,000
50	MCF-7	1,677	0,087
	HEPG2	2,539	1,359
	HEK293	0,618	0,135
200	MCF-7	0,959	0,119
	HEPG2	2,536	1,431
	HEK293	0,215	0,082
400	MCF-7	0,157	0,109
	HEPG2	1,590	1,692
	HEK293	0,387	0,055
800	MCF-7	0,208	0,004
	HEPG2	0,009	0,009
	HEK293	–	–

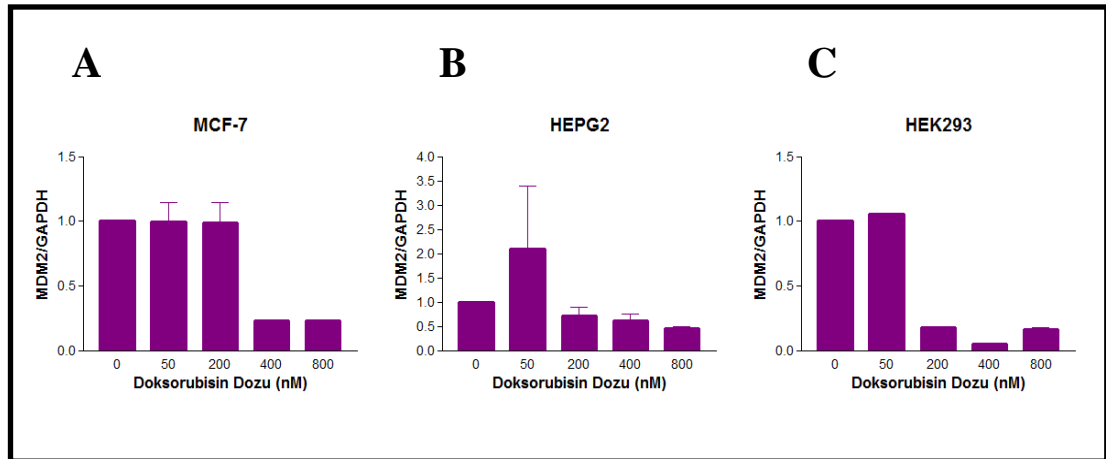
MCF-7 hücrelerinde 50 nM DOX uygulamasının ardından TP53 geninin ekspresyon düzeyinde 1,7 kat artış gözlenirken 200, 400 ve 800 nM DOX uygulaması sonrasında çarpıcı bir şekilde azalmıştır. En belirgin azalma 400 nM DOX uygulamasından sonra gözlenmiştir.

HEPG2 hücrelerinde 50 nM ve 200 nM DOX uygulaması sonrasında TP53 geninin ekspresyon düzeyi kontrol ile karşılaştırıldığında 2,5 kat artarken; bu artış 400 nM DOX uygulamasının ardından 1,5 kat olacak şekilde gözlenmiştir. 800 nM DOX uygulanmış HEPG2 hücrelerinde ise bu genin ekspresyon düzeyi çarpıcı şekilde azalmıştır.

HEK293 hücrelerinde DOX uygulaması sonrasında TP53 geninin ekspresyon düzeyinde doza bağlı olmayan bir azalma gözlenmiş; 800 nM DOX uygulamasının ardından ise ekspresyon düzeyi ölçülemeyecek kadar düşük çıkmıştır.

Şekil 4.9'da MCF-7, HEPG2 ve HEK293 hücrelerinde artan dozlarda DOX uygulamasına bağlı olarak MDM2'nin ekspresyon düzeyleri grafik halinde verilmiştir.

Tablo 4.4'te ise her bir hücre hattı için ayrı ayrı MDM2 geninin ekspresyon düzeyinin doza bağlı olarak değişiminin ortalaması ve standart sapması verilmiştir.



Şekil 4.9. (A) MCF-7, (B) HEPG2 ve (C) HEK293 hücrelerinde MDM2 geninin ekspresyon düzeyleri grafiği (n=3).



**Tablo 4.4.** MCF-7, HEPG2 ve HEK293 hücrelerinde MDM2 geninin ekspresyon düzeylerinin ortalaması ve standart sapması.

DOX (nM)	Hücre Hattı	Ortalama	Standart Sapma
0	MCF-7	1,000	0,000
	HEPG2	1,000	0,000
	HEK293	1,000	0,000
50	MCF-7	0,995	0,263
	HEPG2	2,093	2,257
	HEK293	1,054	0,010
200	MCF7	0,991	0,263
	HEPG2	0,718	0,315
	HEK293	0,179	0,012
400	MCF-7	0,227	0,002
	HEPG2	0,617	0,234
	HEK293	0,047	0,014
800	MCF-7	0,229	0,002
	HEPG2	0,454	0,063
	HEK293	0,162	0,017

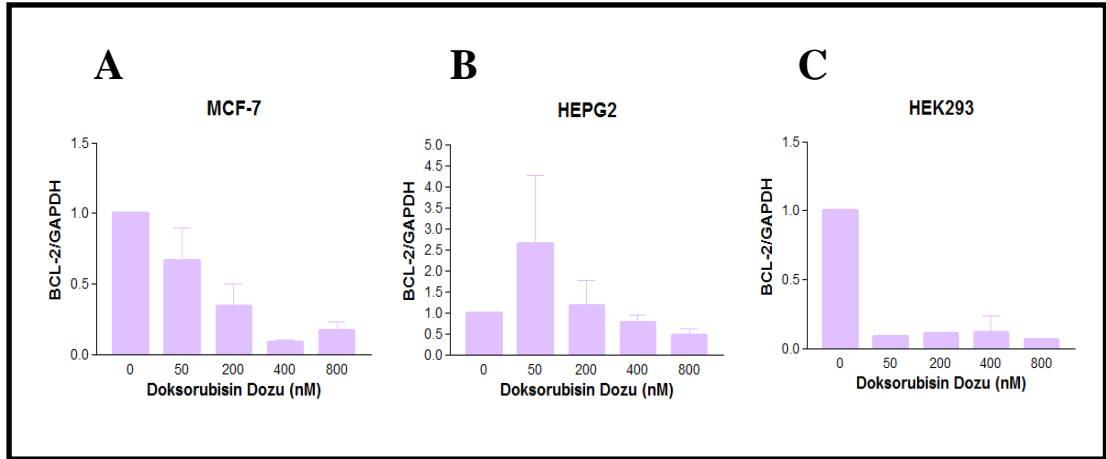
MCF-7 hücrelerinde MDM2 geninin ekspresyon düzeyi, 50 ve 200 nM DOX uygulamasının ardından kontrole göre göreceli aynı kalmıştır. 400 ve 800 nM DOX uygulamasından sonra ise bu genin ekspresyon düzeyinde belirgin bir azalma gözlemlenmiştir.

Artan dozlarda DOX uygulaması yapılmış HEPG2 hücrelerinde MDM2 geninin ekspresyon düzeyi kontrole göre karşılaştırıldığında 50 nM DOX uygulamasının ardından ekspresyon düzeyinin 2,093 kat arttığı; diğer dozlarda ise kademeli olarak azaldığı görülmüştür.

HEK293 hücrelerinde MDM2'nin ekspresyon düzeyi 50 nM DOX uygulamasının ardından kontrole göre göreceli aynı kalmış; 200 nM, 400 nM ve 800 nM DOX uygulamasının ardından dozdan bağımsız olarak çarpıcı bir şekilde azalmıştır. Bu azalma en belirgin şekilde 400 nM DOX uygulamasının ardından gözlemlenmiştir.

Şekil 4.10'da MCF-7, HEPG2 ve HEK293 hücrelerinde artan dozlarda DOX uygulamasına bağlı olarak BCL-2 geninin ekspresyon düzeyleri grafik halinde verilmiştir.

Tablo 4.5'de ise her bir hücre hattı için ayrı ayrı BCL-2'nin ekspresyon düzeyinin doza bağlı olarak değişiminin ortalaması ve standart sapması verilmiştir.



**Şekil 4.10.** (A) MCF-7, (B) HEPG2 ve (C) HEK293 hücrelerinde BCL-2 geninin ekspresyon düzeyleri grafiği (n=3).

**Tablo 4.5.** MCF-7, HEPG2 ve HEK293 hücrelerinde BCL-2 geninin ekspresyon düzeylerinin ortalaması ve standart sapması.

DOX (nM)	Hücre Hattı	Ortalama	Standart Sapma
0	MCF-7	1,000	0,000
	HEPG2	1,000	0,000
	HEK293	1,000	0,000
50	MCF-7	0,665	0,405
	HEPG2	2,644	2,278
	HEK293	0,86	–
200	MCF-7	0,345	0,268
	HEPG2	1,666	1,060
	HEK293	0,111	–
400	MCF-7	0,088	0,028
	HEPG2	0,771	0,311
	HEK293	0,118	0,164
800	MCF-7	0,169	0,104
	HEPG2	0,472	0,231
	HEK293	0,062	–

MCF-7 hücrelerinde BCL-2 geninin ekspresyon düzeyi, artan DOX dozuyla birlikte ters orantılı olarak azalmıştır. Bu azalma en belirgin şekilde 400 nM DOX uygulaması yapılmış olan hücrelerde gözlemlenmiştir.

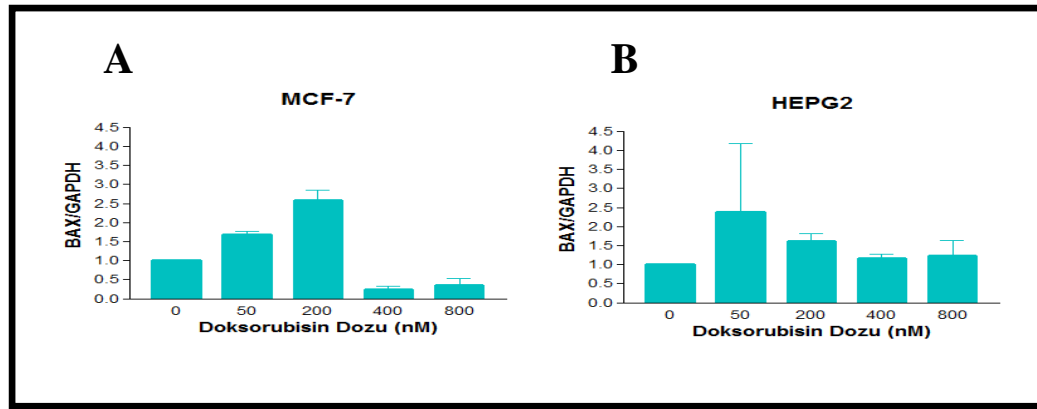
HEPG2 hücrelerinde artan DOX dozu ile birlikte BCL-2 geninin ekspresyon düzeyinde gözlenen değişiklikler kontrol ile karşılaştırıldığında 50 nM DOX uygulamasından sonra bu genin ekspresyon düzeyinin 2,644 kat artarken; 200 nM DOX uygulamasından sonra 1,666 kat arttığı görülmüştür. 400 ve 800 nM ilaç

uygulanmasından sonra ise genin ekspresyon düzeyinde kontrole göre bir azalma tespit edilmiştir.

HEK293 hücrelerinde BCL-2 ekspresyon düzeyleri n=3 olacak şekilde ölçülmediğinden bütün veriler için standart sapma hesaplanamamıştır. Elde edilen sonuçlara göre BCL-2 geninin ekspresyon düzeyi bu hücrelerde DOX dozunun artmasından bağımsız bir şekilde azalma göstermiştir.

Şekil 4.11’de MCF-7 ve HEPG2 hücrelerinde artan dozlarda DOX uygulamasına bağlı olarak BAX’ın ekspresyon düzeyleri grafik halinde sunulmuştur.

Tablo 4.6’da ise bu iki hücre hattı için ayrı ayrı BAX geninin ekspresyon düzeyinin doza bağlı olarak değişiminin ortalaması ve standart sapması verilmiştir.



Şekil 4.11. (A) MCF-7 ve (B) HEPG2 hücrelerinde BAX geninin ekspresyon düzeyleri grafiği (n=3).

Tablo 4.6. MCF-7 ve HEPG2 hücrelerinde BAX geninin ekspresyon düzeylerinin ortalaması ve standart sapması.

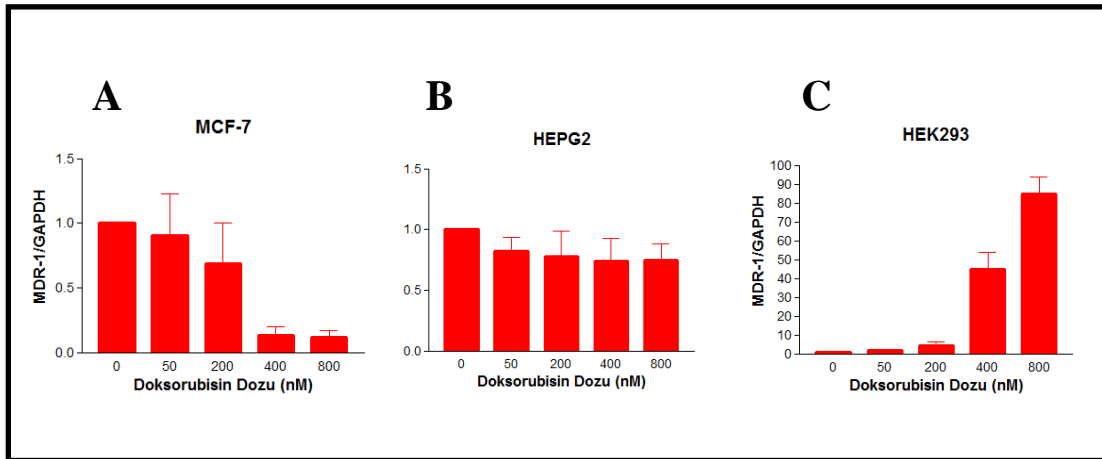
DOX (nM)	Hücre Hattı	Ortalama	Standart Sapma
0	MCF-7	1,000	0,000
	HEPG2	1,000	0,000
50	MCF-7	1,672	0,124
	HEPG2	2,380	2,556
200	MCF-7	2,573	0,400
	HEPG2	1,611	0,358
400	MCF-7	0,244	0,135
	HEPG2	1,156	0,233
800	MCF-7	0,345	0,262
	HEPG2	1,229	0,695

MCF-7 hücrelerinde artan dozlarda DOX uygulanmasıyla birlikte BAX geninin ekspresyon düzeyi 50 nM DOX uygulamasının ardından kontrole göre 1,672 kat; 200 nM DOX uygulamasının ardından ise 2,573 kat artmıştır. 400 ve 800 nM DOX uygulamasından sonra ise BCL-2'nin ekspresyon düzeyi dramatik bir şekilde azalma göstermiştir.

HEPG2 hücrelerinde BAX geninin ekspresyon düzeyi incelendiğinde 50 nM DOX uygulanmasından sonra kontrole göre 2,380 kat bir artış gözlenirken; 200 nM DOX uygulamasının ardından ise 1,611 kat bir artış tespit edilmiştir. 400 ve 800 nM DOX uygulanan hücrelerdeki BAX ekspresyon düzeylerinin ise kontrole göre göreceli aynı kaldığı gözlemlenmiştir. HEK293 hücrelerinde artan DOX dozlarına bağlı olarak BAX geninin ekspresyon düzeylerindeki kontrole göre değişikliklere bakılmamıştır.

Şekil 4.12'de MCF-7, HEPG2 ve HEK293 hücrelerinde artan dozlarda DOX uygulamasına bağlı olarak çoklu ilaç direnci geni MDR-1'in ekspresyon düzeyleri grafik halinde sunulmuştur.

Tablo 4.7'de ise her bir hücre hattı için ayrı ayrı MDR-1 geninin ekspresyon düzeyinin doza bağlı olarak değişiminin ortalaması ve standart sapması verilmiştir.



**Şekil 4.12.** (A) MCF-7, (B) HEPG2 ve (C) HEK293 hücrelerinde MDR-1 geninin ekspresyon düzeyleri grafiği (n=3).

**Tablo 4.7.** MCF-7, HEPG2 ve HEK293 hücrelerinde MDR-1 geninin ekspresyon düzeylerinin ortalaması ve standart sapması.

DOX (nM)	Hücre Hattı	Ortalama	Standart Sapma
0	MCF-7	1,000	0,000
	HEPG2	1,000	0,000
	HEK293	1,000	0,000
50	MCF-7	0,905	0,560
	HEPG2	0,824	0,192
	HEK293	2,057	0,617
200	MCF-7	0,685	0,445
	HEPG2	0,778	0,369
	HEK293	4,181	3,602
400	MCF-7	0,131	0,122
	HEPG2	0,743	0,320
	HEK293	45,072	12,377
800	MCF-7	0,119	0,089
	HEPG2	0,747	0,231
	HEK293	84,790	12,850

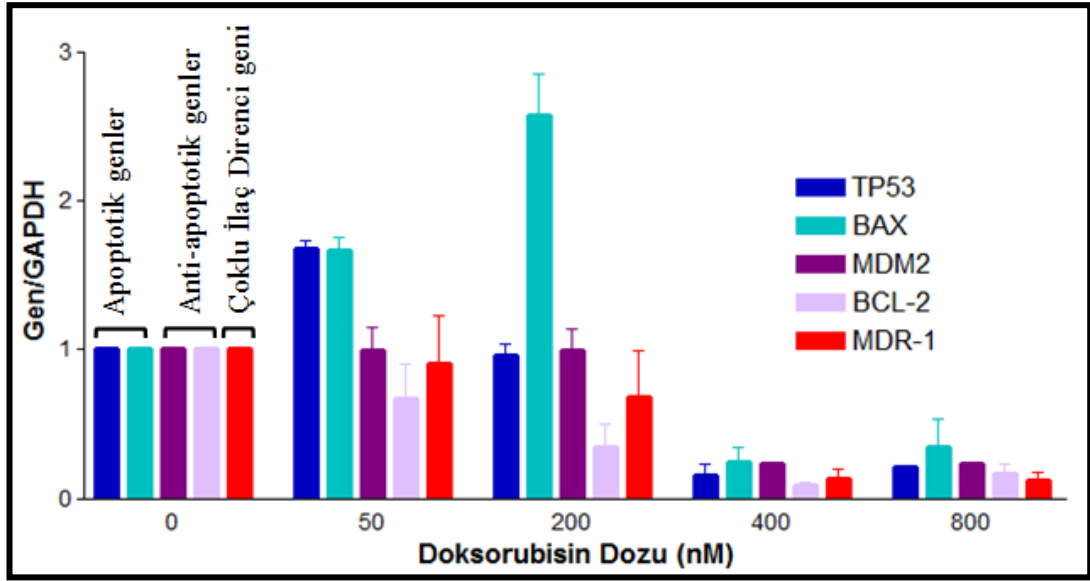
MCF-7 hücrelerinde artan DOX dozuna bağlı olarak MDR-1 geninin ekspresyon düzeyindeki değişiklikler kontrol ile karşılaştırıldığında, bu genin ekspresyon düzeyi, 50 nM DOX dozunun uygulanmasının ardından göreceli aynı kalmıştır. 200 nM DOX dozunun uygulanmasından sonra azalmış; 400 ve 800 nM DOX dozlarının uygulanmasının ardından ise bu azalma daha belirgin biçimde gözlemlenmiştir.

HEPG2 hücrelerinde MDR-1 geninin ekspresyon düzeyinde gözlenen ilaç dozuna bağlı değişikliklerin kontrole göre kıyaslanması sonucunda, DOX dozundan bağımsız bir şekilde belirgin bir değişiklik gözlenmemiş; göreceli olarak aynı kalmıştır.

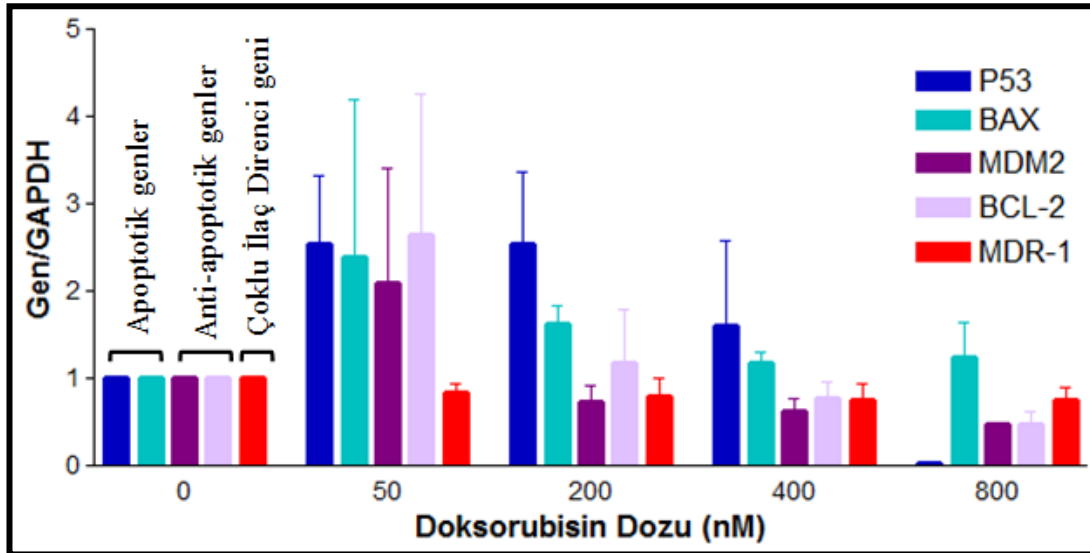
HEK293 hücrelerinde MDR-1 geninin ekspresyon düzeyi incelendiğinde uygulanan DOX dozundaki artış ile ekspresyon düzeyinin çarpıcı şekilde arttığı ve

bu artışın 800 nM DOX dozunun uygulanmasının ardından kontrole kıyasla yaklaşık 85 kata ulaştığı gözlemlenmiştir.

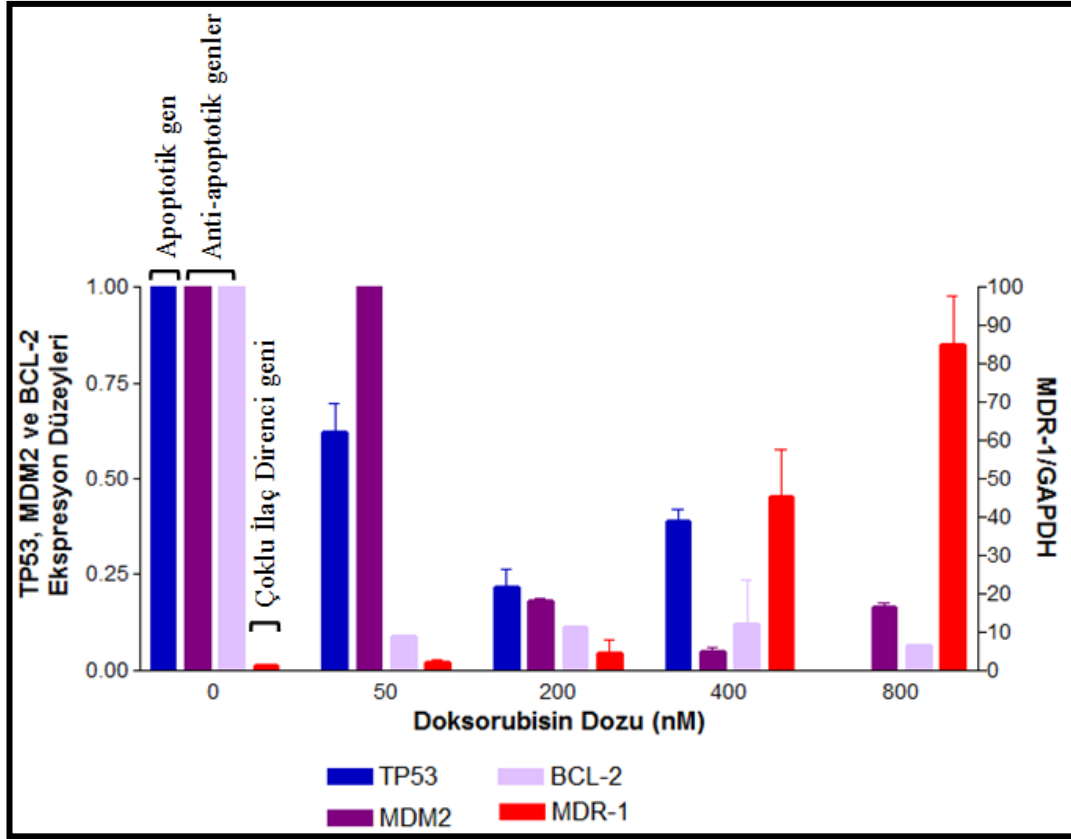
Şekil 4.13, Şekil 4.14 ve Şekil 4.15’de sırasıyla MCF-7, HEPG2 ve HEK293 hücre hatlarında, gen ekspresyon düzeyleri incelenen bütün genlerin bir arada gösterildiği grafikler sunulmuştur.



Şekil 4.13. MCF-7 hücrelerinde gen ekspresyon düzeyleri (n=3).



Şekil 4.14. HEPG2 hücrelerinde gen ekspresyon düzeyleri (n=3).



Şekil 4.15. HEK293 hücrelerinde gen ekspresyon düzeyleri (n=3).

## 5. TARTIŞMA

Apoptoz terimi, hücrenin aktif olarak belirli uyarılarına alması üzerine, ölüme giden bir yol izlediği durumu belirtmek için kullanılmaktadır (1). Apoptozda genel olarak kaspazların aktivasyonu, DNA yıkımı/protein yıkımı ve zar değişiklikleri/fagositik hücreler tarafından tanınma olmak üzere üç temel biyokimyasal değişiklik gözlenmektedir (47).

Bu tez çalışmasında apoptozun işleyişi, apoptoz yolağındaki belirli genlerin rolü ve apoptoz durumunda bu belirli genlerin ekspresyon düzeylerinin incelenmesi amacıyla MCF-7, HEPG2 ve HEK293 hücreleri tercih edilmiştir. Bu hücrelere ya hiç ilaç uygulaması yapılmamış; ya da çeşitli kanser türlerini tedavi etmek amacıyla kullanılan antrasiklin tipi bir anti-kanser ilacı olan DOX'un artan dozları uygulanmıştır.

Tezin ilk basamağında, yöntemler kısmında anlatılan şekilde hücreler 96 kuyucuklu plakalara ekilmiş ve her bir hücre hattına artan dozlarda DOX uygulaması yapılmıştır. Hücrelerin tutunmaya başlamasından yaklaşık iki gün sonra MTT solüsyonunun hücresel enzim aktivitesiyle mor renkli formazana indirgenmesi esasına dayanan; hücre büyümesinin ya da hücre ölümünün indirekt olarak değerlendirilmesi amaçlayan bir deney olan MTT sitotoksosite deneyi yapılmıştır. Her bir hücre hattı için n=6 tekrar yapılan bu deneyin sonuçları göz önünde bulundurulduğunda, her üç hücre hattının da canlılık düzeylerinde doza bağımlı bir azalma saptanmıştır. MCF-7 ve HEPG2 kanserli hücre hatları karşılaştırıldığında MCF-7 hücrelerinde, HEPG2 hücrelerine kıyasla göreceli olarak daha belirgin bir azalma gözlemlenmiştir. Bu sonuç, MCF-7 hücrelerinin HEPG2 hücrelerine göre DOX'un artan dozlarına daha duyarlı olduğuna işaret etmektedir. Kanada'da dokuz hücre hattı üzerinde yapılan bir çalışmada, HEPG2 (karaciğer), HCT-15 (kolon), NCI-H460 (akciğer) ve A-498 (böbrek) hücrelerinin, DOX ve antasiklin ailesine mensup diğer bir anti-kanser ilacı olan DNR'ye H9c2 (kalp), PC-3 (prostat), OVCAR-4 (yumurtalık), PANC-1 (pankreas) ve MCF-7 (meme) hücrelerine oranla daha dirençli olduğu gösterilmiştir (206). Bu sonuçlar, bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar ile tutarlılık göstermektedir. HEK293 hücrelerinin kanserli hücre hatları ile karşılaştırılması sonucunda, canlılık düzeyindeki azalmanın HEK293 hücrelerinde çok daha çarpıcı olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuç, sağlıklı

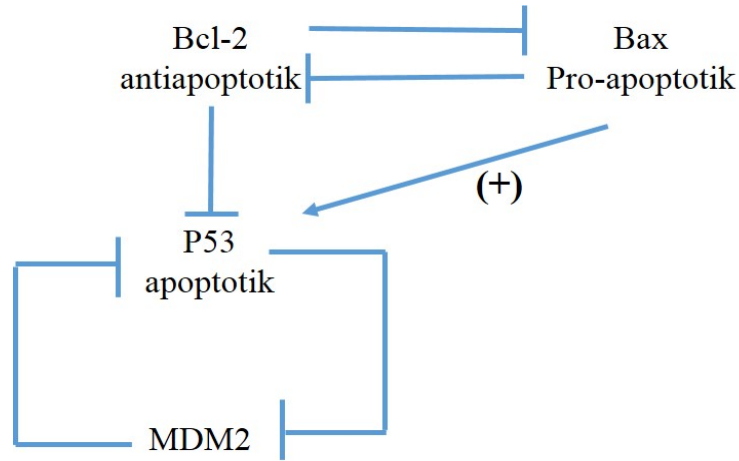


bir hücre hattı olan HEK293'ün DOX'un artan dozlarına karşı diğer iki kanserli hücre hattına kıyasla daha duyarlı olması gerektiği fikrini doğrulamaktadır.

Tez çalışmasının ikinci basamağında, MCF-7, HEPG2 ve HEK293 hücrelerinden saflaştırılan DNA örneklerinden elde edilen PCR ürünleri ile TP53 geninin genomik dizisinin 72. kodonunda SNP bulunup bulunmadığının tespit edilmesi amaçlanmıştır. p53, TP53 geni tarafından eksprese edilen, DNA hasarı, hipoksi ve ya onkojen aktivasyonu gibi bazı hücresel stres faktörleriyle aktive olabilen ve oluşan DNA hasarı tamir edilene kadar hücre döngüsünün durdurulmasında rol oynayan tümör baskılayıcı bir proteindir (2). DNA hasarı tamir edilemeyecek kadar şiddetli olduğunda ise p53 yolağı aktive olmakta ve tamir edilemeyen DNA'ya sahip hücrelerin bölünmesini önlemek amacıyla apoptozu indüklemektedir (3). p53 proteini insanlarda görülen kanser türlerinin yaklaşık %50'sinde mutasyona ya da delesyona uğramıştır (4). Delesyon ya da kesim ile inaktive edilen birçok tümör baskılayıcı genin aksine TP53'de gözlenen kanser ile ilişkili mutasyonların büyük çoğunluğu, farklı bir amino asidin translasyonu ile sonuçlanan tek bir bp'nin değişiminin neden olduğu SNP'dir. Bu SNP'lerin büyük çoğunluğu p53'ün yüksek derecede korunmuş olan ve yaklaşık altı 'sıcak bölge' içeren DNA-bağlayıcı bölgesinde gözlenmektedir (68,80-82). Polimorfizm çalışması sonucu elde edilen verilerde her üç hücre hattının da TP53 geninin genomik dizisinin 72. kodonunda heterozigot (Arg/Pro) genotipe sahip olduğu gösterilmiştir. 2013 yılında yapılan bir meta-analiz çalışmasına göre, TP53 72. Kodon Arg/Pro polimorfizmi karaciğer kanserinin gelişmesinde önemli bir rol oynamaktadır ve karaciğer kanserinde, cinsiyet ve ailede karaciğer kanseri geçişinin olup olmaması TP53'ün 72. Kodonunda gözlenen Arg/Pro genotipinin etkisini değiştirmemektedir (207).

Tezin üçüncü ve son basamağında, hücre hatlarından saflaştırılan RNA örneklerinden cDNA oluşturulmuş ve bu cDNA'lar RT-PCR yöntemi ile gen ekspresyon düzeylerinin incelenmesi amacıyla kullanılmıştır. Bu çalışmada, apoptoz yolağının en önemli genlerinden biri olan ve yukarıda anlatılan TP53 geninin yanı sıra; p53'ün başlıca hücresel inhibitörü olan MDM2, BCL-2 ailesinin tanımlanan ilk üyesi olan ve anti-apoptotik özellik gösteren BCL-2, yine BCL-2 ailesine mensup pro-apoptotik bir gen olan BAX ve çoklu ilaç direnci geni olan MDR-1 genlerinin

ekspresyon düzeyleri *housekeeping* bir gen olan ve hücrelerde ekspresyon düzeyi her koşulda aynı kalan GAPDH ile karşılaştırılmıştır. Bu genler arasındaki ilişki Şekil 5.1.'de sunulmuştur. Gen ekspresyon düzeylerinin incelenmesi sonucu elde edilen verilerde gözlenen doza bağlı değişiklikler Student's t test ile analiz edilmiş ve istatistiksel açıdan anlamlı olup olmadıklarına bakılmıştır. Bu testin değerlendirilmesinde GraphPad isimli yazılım programından yararlanılmıştır.



**Şekil 5.1.** Bu tez çalışmasında ekspresyon düzeyleri incelenen apoptotik genler arasındaki ilişki.

Her bir hücre hattı için TP53 geninin ekspresyon düzeylerine Şekil 4.9'da verilmiştir. Buna göre, 50 nM DOX uygulanan MCF-7 hücrelerinde TP53 geninin ekspresyon düzeyi 1,7 kat artış gösterirken; 200, 400 ve 800 nM DOX uygulamasının ardından belirgin şekilde azalmıştır. HEPG2 hücrelerinde 50 ve 200 nM DOX uygulamasının ardından TP53 geninin ekspresyon düzeyi kontrol ile karşılaştırıldığında 2,5 kat artarken; 400 nM ilaç uygulamasından sonra ise 1,5 kat artmıştır. 800 nM ilaç uygulaması sonrasında ise TP53'ün ekspresyon düzeyinin çarpıcı şekilde düştüğü görülmüştür. Elde edilen bu veriler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu iki kanser hücresi hattında ilaç uygulanmasının ardından hücrede p53 düzeyinin arttığı ve daha sonra ilaç dozunun artmasıyla birlikte bu artışın baskılandığı düşünülmektedir. TP53'ün kanser hücrelerinde gösterdiği bu artış DOX'un etkisi üzerine yapılan bir çalışmada elde edilen sonuçlar ile paralellik göstermektedir (190). Buna göre; MCF-7 ve HEPG2 hücrelerinde uygulanan ilaç

dozunun düşük olmasına karşın TP53 geninin ekspresyon düzeyi hücrede tetiklenmiş ancak; yüksek dozlarda bu artış baskılanmıştır.

Artan dozlarda DOX uygulanan sağlıklı HEK293 hücrelerinde ise TP53 geninin ekspresyon düzeyi dozdan bağımsız olarak azalmış ve 800 nM DOX dozunun uygulanmasının ardından ise ekspresyon düzeyi normal değerlerin çok altına düşmüş ve ölçülememiştir. TP53 geninin ekspresyon düzeyi için elde edilen bu veriler istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ( $P < 0,05$ ). Bu düşüşün sebebinin kanser hücrelerinde ilaca cevap olarak tetiklenen ilk mekanizmanın p53 üzerinden apoptoz olması; sağlıklı hücrelerde ise bunun tersi olarak p53 aracılı apoptozun baskılanması olduğu düşünülmektedir.

TP53 geninin hücrel inhibitörü olan MDM2 anti-apoptotik bir gen dir (Şekil 5.1) (84). MDM2, TP53'ün aktivasyonu sonucunda transkripsiyona uğramaktadır. Mdm2 proteinleri ise p53'ün aktivitesini inhibe etmektedir (84,89). Artan dozlarda DOX uygulanan MCF-7 hücrelerinde MDM2 geninin ekspresyon düzeyine bakıldığında, 50 ve 200 nM ilaç uygulamasının ardından kontrole göre göreceli olarak değişmediği saptanmıştır. 400 ve 800 nM ilaç dozunun uygulanmasından sonra ise bu genin ekspresyon düzeyinde % 77 oranında bir düşüş gözlenmiştir. HEPG2 hücrelerinde ilaç dozuna bağlı olarak MDM2 geninin ekspresyon düzeyinin kontrole göre kıyaslanması sonucunda, 50 nM ilaç dozunun uygulanmasının sonrasında ekspresyon düzeyinin iki kat arttığı, daha yüksek dozlarda ise kademeli olarak azaldığı gözlemlenmiştir. En yüksek doz olan 800 nM'da ise % 55 oranında bir azalma tespit edilmiştir. HEK293 hücrelerinde 50 nM DOX uygulaması MDM2 geninin ekspresyon düzeyini değiştirmemiş; artan dozlarda ise dozdan bağımsız olarak belirgin biçimde düşüş göstermiştir. Apoptotik yolda, MDM2 geninin TP53'ün antagonisti olmasından dolayı, bu iki genin ekspresyon düzeylerinin karşıt çıkması beklenmiştir. Oysa yüksek dozlarda (400 ve 800 nM) ilaç uygulamasının ardından her iki genin de ekspresyon düzeyinde kontrole kıyasla bir azalma tespit edilmiştir. Bunun sebebinin, yüksek doz ilaç uygulamasında her iki proteinin işleyişini de etkileyen bir başka mekanizmanın devreye girdiği ve her iki proteini de inaktive etmesi olduğu düşünülmektedir. TP53 ve MDM2 genlerinin ekspresyon düzeylerinin birbirine benzer olması, azalan TP53 gen ekspresyonunun MDM2 geninin ekspresyonunun artması ve dolayısıyla TP53'ün ubiquitinlenerek inhibe

edilmesi için yeterli olmaması şeklinde yorumlanabilmektedir. MDM2 geninin ekspresyon düzeylerinde gözlenen bu doza bağlı değişikliklerin istatistiksel açıdan anlamlı olup olmadıklarına bakılmış ve MCF-7 ve HEPG2 hücreleri için bu değişiklikler anlamlı bulunurken ( $P<0,05$ ); HEK293 hücreleri için anlamlı bulunmamıştır ( $P=0,0919$ ). Her bir hücre hattında DOX dozuna bağlı olarak MDM2 geninin ekspresyon düzeyinde gözlenen değişiklikler Şekil 4.10'da sunulmuştur.

Bcl-2 protein ailesinin tanımlanan ilk üyesi olan Bcl-2'yi kodlayan BCL-2 geni (118), anti-apoptotik bir gen dir ve MCF-7 hücrelerinde bu genin ekspresyon düzeyinde, uygulanan DOX dozuna bağlı olarak gözlenen değişiklikler incelendiğinde, artan doz ile ters orantılı olarak bir azalma görülmüştür. En belirgin azalma 400 nM ilaç uygulamasının ardından % 91,2 oranında olacak şekilde ölçülmüştür. HEPG2 hücrelerinde 50 nM ve 200 nM DOX dozu uygulamasının ardından BCL-2 geninin ekspresyon düzeyinde kontrole kıyasla bir artış gözlenirken; 400 ve 800 nM dozlarda kontrole göre bir düşüş gözlenmiştir. HEK293 hücrelerinde BCL-2 geninin ekspresyon düzeyi  $n=3$  tekrar şeklinde ölçülemediğinden dolayı, bütün veriler için standart sapma hesaplanamamıştır. Elde edilen sonuçlara göre, BCL-2 geninin ekspresyon düzeyi, dozdan bağımsız olarak kontrole kıyasla azalma göstermiştir. Her bir hücre hattında DOX dozuna bağlı olarak BCL-2 geninin ekspresyon düzeyinde gözlenen değişiklikler Şekil 4.11'de sunulmuştur. BCL-2 geninin ekspresyon düzeylerinde gözlenen bu değişikliklerin HEPG2 hücreleri için istatistik açıdan anlamlı olduğu tespit edilirken ( $P<0,05$ ); MCF-7 ve HEK293 hücreleri için bu değişiklikler anlamlı bulunmamıştır.

Pro-apoptotik bir gen olan BAX, apoptozun indüklenmesinde merkezi bir oynamaktadır (135). MCF-7 ve HEPG2 hücreleri için artan DOX dozu ile birlikte BAX geninin ekspresyon düzeyinde gözlenen değişiklikler Şekil 4.12'de gösterilmiştir. MCF-7 hücrelerinde bu genin ekspresyon düzeyinde uygulanan DOX dozuna bağlı değişiklikler gözlenmiş ve 50 nM ve 200 ilaç dozunun uygulanması sonrasında kontrole kıyasla bir artış saptanmıştır. 400 ve 800 nM ilaç dozunun uygulanmasından sonra ise BAX geninin ekspresyon düzeyinde sırasıyla %76 ve % 65 oranında bir azalma tespit edilmiştir. 2008 yılında Türkiye'de yapılan bir çalışmaya göre (208), 500 nM DOX uygulamasının ardından 24 saat ve 72 saat sonunda MCF-7 hücrelerinde BCL-2 geninin ekspresyon düzeyinin sırasıyla 0,21 ve

0,66 kat azaldığı gözlenmiştir. Bu veriler, bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar ile tutarlılık göstermektedir. HEPG2 hücrelerinde 50 ve 200 nM ilaç uygulamasından sonra BAX geninin ekspresyon düzeyi sırasıyla 2,4 ve 1,6 kat artarken; 400 ve 800 nM ilaç uygulanan hücrelerde bu genin ekspresyon düzeyi kontrole göre göreceli değişmemiştir. BAX genin ekspresyon düzeyinde gözlenen değişiklikler HEPG2 hücrelerinde istatistiksel açıdan anlamlı bulunurken ( $P<0,05$ ); MCF-7 hücrelerinde anlamlı bulunmamıştır ( $P=0,0552$ ). HEK293 hücrelerinde ise BAX geninin ekspresyon düzeyinde uygulanan ilaç dozuna bağlı değişiklikler incelenmemiştir.

Birbirinin antagonisti olan BCL-2 ve BAX genlerinin ekspresyon düzeyleri oranının incelendiği, 2012 yılında Portekiz’de yapılan bir çalışmaya göre (209), HEPG2 hücreleri,  $IC_{50}$  değerlerine göre DOX ile muamele edildiğinde HEPG2 hücrelerinde BAX/BCL-2 oranının 1’den büyük olduğu tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasında da benzer şekilde 400 ve 800 nM DOX dozunun uygulanmasının ardından BAX/BCL-2 oranının 1’den büyük olduğu (400 nM için 1,5 ve 800 nM için 2,6) gözlemlenmiştir. Bu veriler, HEPG2 hücrelerinin 400 nM DOX dozunun uygulanmasından itibaren apoptoza giden bir yol izlediğine işaret etmektedir.

Çoklu ilaç direnci, yapısal benzerliği bulunmayan ve moleküler hedefler üzerinde farklı etkileri olan farklı ilaçlara yönelik eş zamanlı bir direnç olarak tanımlanmaktadır. Hücre içinde belirli derişimlerde bulunan ilaçların dışarı akışının görüldüğü bazı biyokimyasal direnç mekanizmaları ile bu çoklu ilaç direnci gözlenebilmektedir (8). Anti-kanser ilaçlarının hücrenin dışına atıldığı bu mekanizmalar, MDR-1 geninin ürünü olan P-gp gibi proteinler ile düzenlenmektedir (165). P-gp proteininin ekspresyon düzeyinin, birçok kanser çeşidinde ilaçlara direnç göstermeye yetecek düzeyde yüksek olduğu gösterilmiştir. MDR-1 geninin ekspresyon düzeyleri üç hücre hattı için incelendiğinde, MCF-7 hücrelerinde 50 nM DOX uygulamasının ardından kontrole göre göreceli değişmemiştir. 200 nM doz uygulamasından sonra ise azalma tespit edilmiş ve bu azalma 400 ve 800 nM dozlarda çarpıcı bir şekilde gözlemlenmiştir. MDR-1 geninin ekspresyon düzeyinin artan ilaç dozu ile birlikte kademeli olarak azalması, bu hücre hattı için 800 nM’a kadar olan ilaç dozunun çoklu ilaç direnci gelişimi için yeterli olmadığına işaret etmektedir. HEPG2 hücrelerinde MDR-1 geninin ekspresyon düzeyinde artan ilaç dozuna bağlı olarak kontrole kıyasla belirgin bir değişiklik görülmemiştir ve bu

sonuç, literatürde bulunan HEPG2 hücrelerinin DOX'a karşı çoklu ilaç direnci gösterdiği bilgisiyle paralellik göstermektedir. HEK293 hücrelerinde ise MDR-1 geninin ekspresyon düzeyi artan DOX dozuyla birlikte belirgin bir biçimde artış göstermiş ve bu artış 800 nM ilaç dozunun uygulanmasının ardından 84 kat olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, çoklu ilaç direncinin MCF-7 hücrelerinde azaldığına, HEPG2 hücrelerinde değişmediğine ve HEK293 hücrelerinde ise arttığına işaret etmektedir. MCF-7, HEPG2 ve HEK293 hücrelerinde DOX dozuna bağlı olarak MDR-1 geninin ekspresyon düzeyinde gözlenen değişiklikler Şekil 4.13'de sunulmuştur. MDR-1 geninin ekspresyon düzeylerinde gözlenen bu değişiklikler MCF-7 ve HEPG2 hücreleri için istatistiksel açıdan anlamlı bulunurken ( $P < 0,05$ ); HEK293 hücreleri için anlamlı bulunmamıştır ( $P = 0,1731$ ).

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında her üç hücre hattında da artan dozlarda DOX uygulanması sonucunda yüzde canlılık düzeylerinde düşüş gözlenmiştir ve bir kez daha DOX'un etkili bir anti-kanser ilacı olduğu kanıtlanmıştır. Her üç hücre hattında da TP53 geninin 72. kodonunda Arg/Pro heterozigot formu bulunduğu saptanmış ancak; TP53 geninin artan ilaç dozuna karşı farklı düzeylerde ekspresyona uğradığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla bu hücrelerde apoptoz mekanizmalarının ilk bakışta benzer olduğu düşünülse de gen ekspresyon düzeylerine bakıldığında bu varsayımın doğru olmadığı sonucuna varılmıştır. Benzer şekilde MCF-7 hücrelerinde çoklu ilaç direncinin azalması, HEPG2 hücrelerinde kontrole kıyasla göreceli aynı kalması, sağlıklı HEK293 hücrelerinde ise artış göstermesi, bu üç hücre hattının apoptoz gelişimi ve çoklu ilaç direnci açısından farklı profillere sahip olduğuna işaret etmektedir. Böylelikle, kanser hücrelerinde ve sağlıklı hücrelerde apoptozun sadece polimorfizm profiline bakılarak belirlenemeyeceği gösterilmiştir. Arg/Pro heterozigot formunun sağlıklı HEK293 hücrelerinde de gösterilmesi ile bu formun sadece kanser hücrelerinde değil; aynı zamanda sağlıklı hücrelerde de görülebildiği sonucuna varılmıştır.

## 5. ÖNERİLER

Bu tez sonunda elde edilen, apoptoz yolağının işleyişi, apoptoz yolağındaki belirli genlerin ekspresyon düzeylerinin artış ya da azalış gösterdiği durumlar, çoklu

ilaç direncinin hücre hattına bağlı olarak gösterdiği özellikler ile ilgili sonuçlar daha sonra yapılacak olan deneylere ışık tutması açısından önemlidir.

Apoptoz yolağında çalışılan genlerin ekspresyon düzeyleri hakkında daha kesin sonuçlar elde edebilmek amacıyla her bir gen için RT-PCR işleminin en az duplike olarak yeniden çalışılması daha yararlı olacaktır.

HEK293 hücrelerinde ekspresyon düzeyine bakılmayan BAX geninin de ekspresyon düzeyinin incelenmesi ve bu düzeylerin apoptoz yolağındaki diğer genlerin ekspresyon düzeyleri ile karşılaştırılması son derece önem arz etmektedir.

Apoptoz yolağında bulunan c-Jun N-Terminal kinaz (JNK), PUMA, BAK gibi genlerin de gen ekspresyonu düzeyinde incelenmesi, her üç hücre hattı için de apoptoz yolağının işleyişi hakkında daha geniş bilgi elde etmemizi sağlayacaktır. Buna ek olarak bütün bu genlerin aynı zamanda protein düzeyinde de çalışılması, bu genler hakkında daha ayrıntılı bilgi elde edebilmemiz açısından gereklidir.

Çalışılan her bir hücre hattı için, bir firmadan satın alınan bir apoptoz ya da kaspaz kiti ile çalışılması, apoptoz varlığının gösterilmesi açısından ek bir bilgi sağlayacaktır.

Aynı zamanda bundan sonraki çalışmalarda çoklu ilaç direncini daha belirgin ve doğru tespit edebilmek için ilaca dirençli hücre hatları satın alınacak ve karşılaştırmalı olarak bu hücre gruplarıyla deneyler tekrarlanacaktır.

## KAYNAKLAR

1. Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26 (4), 239-257.
2. Vousden, K.H., Lu, X. (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nature Reviews. Cancer*, 2 (8), 594-604.
3. Benchimol, S., Pim, D., Crawford, L. (1982). Radioimmunoassay of the cellular protein p53 in mouse and human cell lines. *The EMBO Journal*, 1 (9), 1055-1062.
4. Feki, A., Irminger-Finger, I. (2004). Mutational spectrum of p53 mutations in primary breast and ovarian tumors. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 52 (2), 103-116.
5. Arcamone, F., Cassinelli, G., Fantini, G., Grein, A., Orezzi, P., Pol, C. ve diğeri. (1969). Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. *Biotechnology and Bioengineering*, 11 (6), 1101-1110.
6. Momparler, R.L., Karon, M., Siegel, S.E., Avila, F. (1976). Effect of adriamycin on DNA, RNA, and protein synthesis in cell-free systems and intact cells. *Cancer Research*, 36 (8), 2891-2895.
7. Fornari, F.A., Randolph, J.K., Yalowich, J.C., Ritke, M.K., Gewirtz, D.A. (1994). Interference by doxorubicin with DNA unwinding in MCF-7 breast tumor cells. *Molecular Pharmacology*, 45 (4), 649-656.
8. Larsen, A.K., Escargueil, A.E., Skladanowski, A. (2000). Resistance mechanisms associated with altered intracellular distribution of anticancer agents. *Pharmacology & Therapeutics*, 85 (3), 217-229.
9. Dean, M., Rzhetsky, A., Allikmets, R. (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Research*, 11 (7), 1156-1166.
10. Luqmani, Y.A. (2005). Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy. *Medical Principles and Practice*, 14 Suppl 1, 35-48.
11. van der Deen, M., de Vries, E.G., Timens, W., Scheper, R.J., Timmer-Bosscha, H., Postma, D.S. (2005). ATP-binding cassette (ABC) transporters in normal and pathological lung. *Respiratory Research*, 6, 59.



12. Soule, H.D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., Brennan, M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 51 (5), 1409-1416.
13. MCF7. (t.y.). Erişim: 23 Aralık 2013, <http://www.mcf7.com/>
14. Aden, D.P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I., Knowles, B.B. (1979). Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature*, 282 (5739), 615-616.
15. Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of General Virology*, 36 (1), 59-74.
16. Eskelinen, E.L., Saftig, P. (2009). Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1793 (4), 664-673.
17. Levine, B., Kroemer, G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 132 (1), 27-42.
18. Boya, P., Gonzalez-Polo, R.A., Casares, N., Perfettini, J.L., Dessen, P., Larochette, N. ve diğerleri. (2005). Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 25 (3), 1025-1040.
19. Essick, E.E., Sam, F. (2010). Oxidative stress and autophagy in cardiac disease, neurological disorders, aging and cancer. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3 (3), 168-177.
20. Codogno, P., Mehrpour, M., Proikas-Cezanne, T. (2012). Canonical and non-canonical autophagy: variations on a common theme of self-eating? *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 13 (1), 7-12.
21. Mehrpour, M., Esclatine, A., Beau, I., Codogno, P. (2010). Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells. *Cell Research*, 20 (7), 748-762.
22. Yang, Y.P., Liang, Z.Q., Gu, Z.L., Qin, Z.H. (2005). Molecular mechanism and regulation of autophagy. *Acta Pharmacologica Sinica*, 26 (12), 1421-1434.
23. Hayflick, L., Moorhead, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 25, 585-621.
24. Collado, M., Serrano, M. (2006). The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. *Nature Reviews. Cancer*, 6 (6), 472-476.

25. Nuss, J.E., Choksi, K.B., DeFord, J.H., Papaconstantinou, J. (2008). Decreased enzyme activities of chaperones PDI and BiP in aged mouse livers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 365 (2), 355-361.
26. Danial, N.N., Korsmeyer, S.J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell*, 116 (2), 205-219.
27. Afshari, C.A., Vojta, P.J., Annab, L.A., Futreal, P.A., Willard, T.B., Barrett, J.C. (1993). Investigation of the role of G1/S cell cycle mediators in cellular senescence. *Experimental Cell Research*, 209 (2), 231-237.
28. Herbig, U., Jobling, W.A., Chen, B.P., Chen, D.J., Sedivy, J.M. (2004). Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Molecular Cell*, 14 (4), 501-513.
29. Rodier, F., Campisi, J. (2011). Four faces of cellular senescence. *The Journal of Cell Biology*, 192 (4), 547-556.
30. Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C. ve diğeri. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92 (20), 9363-9367.
31. Allsopp, R.C., Vaziri, H., Patterson, C., Goldstein, S., Younglai, E.V., Fletcher, A.B. ve diğeri. (1992). Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89 (21), 10114-10118.
32. von Zglinicki, T., Saretzki, G., Ladhoff, J., d'Adda di Fagagna, F., Jackson, S.P. (2005). Human cell senescence as a DNA damage response. *Mechanisms of Ageing and Development*, 126 (1), 111-117.
33. Artandi, S.E., DePinho, R.A. (2010). Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis*, 31 (1), 9-18.
34. Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., Lowe, S.W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, 88 (5), 593-602.
35. Matarazzo, M.R., Lembo, F., Angrisano, T., Ballestar, E., Ferraro, M., Pero, R. ve diğeri. (2004). In vivo analysis of DNA methylation patterns recognized by

- specific proteins: coupling CHIP and bisulfite analysis. *Biotechniques*, 37 (4), 666-668, 670, 672-663.
36. Pare, R., Yang, T., Shin, J.S., Lee, C.S. (2013). The significance of the senescence pathway in breast cancer progression. *Journal of Clinical Pathology*, 66 (6), 491-495.
  37. Tekpli, X., Holme, J.A., Sergent, O., Lagadic-Gossmann, D. (2013). Role for membrane remodeling in cell death: implication for health and disease. *Toxicology*, 304, 141-157.
  38. Leist, M., Jaattela, M. (2001). Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2 (8), 589-598.
  39. Schweichel, J.U., Merker, H.J. (1973). The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology*, 7 (3), 253-266.
  40. Jain, M.V., Paczulla, A.M., Klonisch, T., Dingba, F.N., Rao, S.B., Roberg, K. ve diğeri. (2013). Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 17 (1), 12-29.
  41. Edinger, A.L., Thompson, C.B. (2004). Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current Opinion in Cell Biology*, 16 (6), 663-669.
  42. Van Herreweghe, F., Festjens, N., Declercq, W., Vandenabeele, P. (2010). Tumor necrosis factor-mediated cell death: to break or to burst, that's the question. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67 (10), 1567-1579.
  43. Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, A., Valitutti, S. ve diğeri. (2000). Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nature Immunology*, 1 (6), 489-495.
  44. Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H. ve diğeri. (2009) Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation*, 16 (1), 3-11.

45. Microbiologybytes. (t.y.). Erişim: 21 Eylül 2013, <http://www.microbiologybytes.com/virology/kalmakoff/baculo/pics/Apoptosis.gif.pagespeed.ce.xjjHGwnrJy.gif>
46. Wong, R.S. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30, 87.
47. Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N., Aster, J.C. (2009). Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, Professional Edition: Expert Consult-Online: Elsevier Health Sciences.
48. Hengartner, M.O. (2001). Apoptosis: corralling the corpses. *Cell*, 104 (3), 325-328.
49. Vaux, D.L., Silke, J. (2003). Mammalian mitochondrial IAP binding proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 304 (3), 499-504.
50. McCarthy, N.J., Evan, G.I. (1997). 15 Methods for Detecting and Quantifying Apoptosis. A. F. Flora de Pablo & D. S. Claudio (Ed.). Current Topics in Developmental Biology (c. Volume 36, s. 259-278): Academic Press
51. Slee, E.A., Harte, M.T., Kluck, R.M., Wolf, B.B., Casiano, C.A., Newmeyer, D.D. ve diğerleri. (1999). Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *The Journal of Cell Biology*, 144 (2), 281-292.
52. Lavrik, I.N., Golks, A., Krammer, P.H. (2005). Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *The Journal of Clinical Investigation*, 115 (10), 2665-2672.
53. O'Brien, M.A., Kirby, R. (2008). Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 18 (6), 572-585.
54. Tsujimoto, Y., Finger, L.R., Yunis, J., Nowell, P.C., Croce, C.M. (1984). Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science*, 226 (4678), 1097-1099.
55. Kroemer, G., Galluzzi, L., Brenner, C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological Reviews*, 87 (1), 99-163.

56. LaCasse, E.C., Mahoney, D.J., Cheung, H.H., Plenchette, S., Baird, S., Korneluk, R.G. (2008). IAP-targeted therapies for cancer. *Oncogene*, 27 (48), 6252-6275.
57. Szegezdi, E., Fitzgerald, U., Samali, A. (2003). Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1010, 186-194.
58. Immunityageing. (t.y.). Erişim: 18 Eylül 2013, <http://www.immunityageing.com/content/figures/1742-4933-3-5-1-1.jpg>
59. Lane, D.P., Crawford, L.V. (1979). T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*, 278 (5701), 261-263.
60. Linzer, D.I., Levine, A.J. (1979). Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell*, 17 (1), 43-52.
61. DeLeo, A.B., Jay, G., Appella, E., Dubois, G.C., Law, L.W., Old, L.J. (1979). Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76 (5), 2420-2424.
62. Rotter, V. (1983). p53, a transformation-related cellular-encoded protein, can be used as a biochemical marker for the detection of primary mouse tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80 (9), 2613-2617.
63. Smith, N.D., Rubenstein, J.N., Eggener, S.E., Kozlowski, J.M. (2003). The p53 tumor suppressor gene and nuclear protein: basic science review and relevance in the management of bladder cancer. *The Journal of Urology*, 169 (4), 1219-1228.
64. Isobe, M., Emanuel, B.S., Givol, D., Oren, M., Croce, C.M. (1986). Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature*, 320 (6057), 84-85.
65. McBride, O.W., Merry, D., Givol, D. (1986). The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm (17p13). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83 (1), 130-134.

66. Miller, C., Mohandas, T., Wolf, D., Prokocimer, M., Rotter, V., Koeffler, H.P. (1986). Human p53 gene localized to short arm of chromosome 17. *Nature*, 319 (6056), 783-784.
67. Soussi, T., May, P. (1996). Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution: a second look. *Journal of Molecular Biology*, 260 (5), 623-637.
68. Joerger, A.C., Fersht, A.R. (2010). The tumor suppressor p53: from structures to drug discovery. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2 (6), a000919.
69. Rogel, A., Popliker, M., Webb, C.G., Oren, M. (1985). p53 cellular tumor antigen: analysis of mRNA levels in normal adult tissues, embryos, and tumors. *Molecular Biology of the Cell*, 5 (10), 2851-2855.
70. Scheffner, M., Werness, B.A., Huibregtse, J.M., Levine, A.J., Howley, P.M. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*, 63 (6), 1129-1136.
71. Prives, C., Hall, P.A. (1999). The p53 pathway. *The Journal of Pathology*, 187 (1), 112-126.
72. Vousden, K.H., Prives, C. (2009). Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell*, 137 (3), 413-431.
73. Barboza, J.A., Iwakuma, T., Terzian, T., El-Naggar, A.K., Lozano, G. (2008). Mdm2 and Mdm4 loss regulates distinct p53 activities. *Molecular Cancer Research*, 6 (6), 947-954.
74. Chi, S.W., Lee, S.H., Kim, D.H., Ahn, M.J., Kim, J.S., Woo, J.Y. ve diğeri. (2005). Structural details on mdm2-p53 interaction. *The Journal of Biological Chemistry*, 280 (46), 38795-38802.
75. Ashcroft, M., Taya, Y., Vousden, K.H. (2000). Stress signals utilize multiple pathways to stabilize p53. *Molecular and Cellular Biology*, 20 (9), 3224-3233.
76. Shieh, S.Y., Ikeda, M., Taya, Y., Prives, C. (1997). DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell*, 91 (3), 325-334.
77. Shieh, S.Y., Ahn, J., Tamai, K., Taya, Y., Prives, C. (2000). The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes & Development*, 14 (3), 289-300.

78. Appella, E., Anderson, C.W. (2001). Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *European Journal of Biochemistry*, 268 (10), 2764-2772.
79. Ashcroft, M., Kubbutat, M.H., Vousden, K.H. (1999). Regulation of p53 function and stability by phosphorylation. *Molecular and Cellular Biology*, 19 (3), 1751-1758.
80. Harris, C.C., Hollstein, M. (1993). Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *The New England Journal of Medicine*, 329 (18), 1318-1327.
81. Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P.D., Pavletich, N.P. (1994). Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science*, 265 (5170), 346-355.
82. Petitjean, A., Achatz, M.I., Borresen-Dale, A.L., Hainaut, P., Olivier, M. (2007). TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene*, 26 (15), 2157-2165.
83. Xu, Y. (2006). DNA damage: a trigger of innate immunity but a requirement for adaptive immune homeostasis. *Nature Reviews. Immunology*, 6 (4), 261-270.
84. Shangary, S., Wang, S. (2008). Targeting the MDM2-p53 interaction for cancer therapy. *Clinical Cancer Research*, 14 (17), 5318-5324.
85. Fakharzadeh, S.S., Trusko, S.P., George, D.L. (1991). Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumor cell line. *The EMBO Journal*, 10 (6), 1565-1569.
86. Momand, J., Zambetti, G.P., Olson, D.C., George, D., Levine, A.J. (1992). The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell*, 69 (7), 1237-1245.
87. Oliner, J.D., Pietenpol, J.A., Thiagalingam, S., Gyuris, J., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. (1993). Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature*, 362 (6423), 857-860.
88. Wu, X., Bayle, J.H., Olson, D., Levine, A.J. (1993). The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes & Development*, 7 (7A), 1126-1132.
89. Kruse, J.P., Gu, W. (2009). Modes of p53 regulation. *Cell*, 137 (4), 609-622.
90. Lane, D.P., Brown, C.J., Verma, C., Cheok, C.F. (2011). New insights into p53 based therapy. *Discovery Medicine*, 12 (63), 107-117.

91. Marine, J.C., Dyer, M.A., Jochemsen, A.G. (2007). MDMX: from bench to bedside. *Journal of Cell Science*, 120 (Pt 3), 371-378.
92. Wade, M., Wang, Y.V., Wahl, G.M. (2010). The p53 orchestra: Mdm2 and Mdmx set the tone. *Trends in Cell Biology*, 20 (5), 299-309.
93. Manfredi, J.J. (2010). The Mdm2-p53 relationship evolves: Mdm2 swings both ways as an oncogene and a tumor suppressor. *Genes & Development*, 24 (15), 1580-1589.
94. Honda, R., Yasuda, H. (2000). Activity of MDM2, a ubiquitin ligase, toward p53 or itself is dependent on the RING finger domain of the ligase. *Oncogene*, 19 (11), 1473-1476.
95. Roth, J., Dobbstein, M., Freedman, D.A., Shenk, T., Levine, A.J. (1998). Nucleo-cytoplasmic shuttling of the hdm2 oncoprotein regulates the levels of the p53 protein via a pathway used by the human immunodeficiency virus rev protein. *The EMBO Journal*, 17 (2), 554-564.
96. Shadfan, M., Lopez-Pajares, V., Yuan, Z.M. (2012). MDM2 and MDMX: Alone and together in regulation of p53. *Translational Cancer Research*, 1 (2), 88-89.
97. Coutts, A.S., Adams, C.J., La Thangue, N.B. (2009). p53 ubiquitination by Mdm2: a never ending tail? *DNA Repair (Amst)*, 8 (4), 483-490.
98. Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., Oren, M. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*, 387 (6630), 296-299.
99. Honda, R., Tanaka, H., Yasuda, H. (1997). Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Letters*, 420 (1), 25-27.
100. Kubbutat, M.H., Jones, S.N., Vousden, K.H. (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature*, 387 (6630), 299-303.
101. Shvarts, A., Steegenga, W.T., Riteco, N., van Laar, T., Dekker, P., Bazuine, M. ve diğeri. (1996). MDMX: a novel p53-binding protein with some functional properties of MDM2. *The EMBO Journal*, 15 (19), 5349-5357.
102. Stad, R., Ramos, Y.F., Little, N., Grivell, S., Attema, J., van Der Eb, A.J. ve diğeri. (2000). Hdmx stabilizes Mdm2 and p53. *The Journal of Biological Chemistry*, 275 (36), 28039-28044.



103. Sharp, D.A., Kratowicz, S.A., Sank, M.J., George, D.L. (1999). Stabilization of the MDM2 oncoprotein by interaction with the structurally related MDMX protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 274 (53), 38189-38196.
104. Danovi, D., Meulmeester, E., Pasini, D., Migliorini, D., Capra, M., Frenk, R. ve diğeri. (2004). Amplification of Mdmx (or Mdm4) directly contributes to tumor formation by inhibiting p53 tumor suppressor activity. *Molecular Biology of the Cell*, 24 (13), 5835-5843.
105. Migliorini, D., Danovi, D., Colombo, E., Carbone, R., Pelicci, P.G., Marine, J.C. (2002). Hdmx recruitment into the nucleus by Hdm2 is essential for its ability to regulate p53 stability and transactivation. *The Journal of Biological Chemistry*, 277 (9), 7318-7323.
106. Weber, J.D., Taylor, L.J., Roussel, M.F., Sherr, C.J., Bar-Sagi, D. (1999). Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nature Cell Biology*, 1 (1), 20-26.
107. Zhang, Y., Lu, H. (2009). Signaling to p53: ribosomal proteins find their way. *Cancer Cell*, 16 (5), 369-377.
108. Wang, X. (2001). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes & Development*, 15 (22), 2922-2933.
109. Sabbatini, P., McCormick, F. (2002). MDMX inhibits the p300/CBP-mediated acetylation of p53. *DNA and Cell Biology*, 21 (7), 519-525.
110. Kadakia, M., Brown, T.L., McGorry, M.M., Berberich, S.J. (2002). MdmX inhibits Smad transactivation. *Oncogene*, 21 (57), 8776-8785.
111. Jackson, M.W., Lindstrom, M.S., Berberich, S.J. (2001). MdmX binding to ARF affects Mdm2 protein stability and p53 transactivation. *The Journal of Biological Chemistry*, 276 (27), 25336-25341.
112. Grossman, S.R., Perez, M., Kung, A.L., Joseph, M., Mansur, C., Xiao, Z.X. ve diğeri. (1998). p300/MDM2 complexes participate in MDM2-mediated p53 degradation. *Molecular Cell*, 2 (4), 405-415.
113. Gilkes, D.M., Chen, L., Chen, J. (2006). MDMX regulation of p53 response to ribosomal stress. *The EMBO Journal*, 25 (23), 5614-5625.
114. Ghosh, M., Weghorst, K., Berberich, S.J. (2005). MdmX inhibits ARF mediated Mdm2 sumoylation. *Cell Cycle*, 4 (4), 604-608.

- 115.Ferreon, J.C., Lee, C.W., Arai, M., Martinez-Yamout, M.A., Dyson, H.J., Wright, P.E. (2009). Cooperative regulation of p53 by modulation of ternary complex formation with CBP/p300 and HDM2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106 (16), 6591-6596.
- 116.Marine, J.C., Lozano, G. (2010). Mdm2-mediated ubiquitylation: p53 and beyond. *Cell Death and Differentiation*, 17 (1), 93-102.
- 117.Prives, C., White, E. (2008). Does control of mutant p53 by Mdm2 complicate cancer therapy? *Genes & Development*, 22 (10), 1259-1264.
- 118.Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E., Croce, C.M. (1985). Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science*, 228 (4706), 1440-1443.
- 119.Wikimedia. (2006). Erişim: 04 Ağustos 2013, [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/8a/Bcl-2\\_Family.jpg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/8a/Bcl-2_Family.jpg)
- 120.Renault, T.T., Chipuk, J.E. (2013). Getting away with murder: how does the BCL-2 family of proteins kill with immunity? *Annals of the New York Academy of Sciences*.
- 121.Cheng, E.H., Wei, M.C., Weiler, S., Flavell, R.A., Mak, T.W., Lindsten, T. ve diğerleri. (2001). BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Molecular Cell*, 8 (3), 705-711.
- 122.Certo, M., Del Gaizo Moore, V., Nishino, M., Wei, G., Korsmeyer, S., Armstrong, S.A. ve diğerleri. (2006). Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell*, 9 (5), 351-365.
- 123.Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R., Wang, X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 86 (1), 147-157.
- 124.Kluck, R.M., Bossy-Wetzel, E., Green, D.R., Newmeyer, D.D. (1997). The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*, 275 (5303), 1132-1136.
- 125.Renault, T.T., Tejjido, O., Antonsson, B., Dejean, L.M., Manon, S. (2013). Regulation of Bax mitochondrial localization by Bcl-2 and Bcl-x(L): keep your

- friends close but your enemies closer. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 45 (1), 64-67.
126. Adams, J.M., Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, 26 (9), 1324-1337.
127. Beham, A., Marin, M.C., Fernandez, A., Herrmann, J., Brisbay, S., Tari, A.M. ve diğ erleri. (1997). Bcl-2 inhibits p53 nuclear import following DNA damage. *Oncogene*, 15 (23), 2767-2772.
128. Linette, G.P., Li, Y., Roth, K., Korsmeyer, S.J. (1996). Cross talk between cell death and cell cycle progression: BCL-2 regulates NFAT-mediated activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93 (18), 9545-9552.
129. Massaad, C.A., Portier, B.P., Tagliatela, G. (2004). Inhibition of transcription factor activity by nuclear compartment-associated Bcl-2. *The Journal of Biological Chemistry*, 279 (52), 54470-54478.
130. Borner, C. (1996). Diminished cell proliferation associated with the death-protective activity of Bcl-2. *The Journal of Biological Chemistry*, 271 (22), 12695-12698.
131. Vairo, G., Soos, T.J., Upton, T.M., Zalvide, J., DeCaprio, J.A., Ewen, M.E. ve diğ erleri. (2000). Bcl-2 retards cell cycle entry through p27(Kip1), pRB relative p130, and altered E2F regulation. *Molecular and Cellular Biology*, 20 (13), 4745-4753.
132. Laulier, C., Lopez, B.S. (2012). The secret life of Bcl-2: apoptosis-independent inhibition of DNA repair by Bcl-2 family members. *Mutation Research*, 751 (2), 247-257.
133. Youle, R.J., Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9 (1), 47-59.
134. Green, D.R., Kroemer, G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*, 305 (5684), 626-629.
135. Wang, C., Youle, R.J. (2009). The role of mitochondria in apoptosis\*. *Annual Review of Genetics*, 43, 95-118.
136. Griffiths, G.J., Dubrez, L., Morgan, C.P., Jones, N.A., Whitehouse, J., Corfe, B.M. ve diğ erleri. (1999). Cell damage-induced conformational changes of the

- pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. *The Journal of Cell Biology*, 144 (5), 903-914.
- 137.Hsu, Y.T., Wolter, K.G., Youle, R.J. (1997). Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94 (8), 3668-3672.
- 138.Wolter, K.G., Hsu, Y.T., Smith, C.L., Nechushtan, A., Xi, X.G., Youle, R.J. (1997). Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *The Journal of Cell Biology*, 139 (5), 1281-1292.
- 139.Scorrano, L., Oakes, S.A., Opferman, J.T., Cheng, E.H., Sorcinelli, M.D., Pozzan, T. ve diğerleri. (2003). BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>: a control point for apoptosis. *Science*, 300 (5616), 135-139.
- 140.Zong, W.X., Li, C., Hatzivassiliou, G., Lindsten, T., Yu, Q.C., Yuan, J. ve diğerleri. (2003). Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *The Journal of Cell Biology*, 162 (1), 59-69.
- 141.Gross, A., Jockel, J., Wei, M.C., Korsmeyer, S.J. (1998). Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *The EMBO Journal*, 17 (14), 3878-3885.
- 142.Petros, A.M., Olejniczak, E.T., Fesik, S.W. (2004). Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1644 (2-3), 83-94.
- 143.Schlesinger, P.H., Gross, A., Yin, X.M., Yamamoto, K., Saito, M., Waksman, G. ve diğerleri. (1997). Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94 (21), 11357-11362.
- 144.Schendel, S.L., Montal, M., Reed, J.C. (1998). Bcl-2 family proteins as ion-channels. *Cell Death and Differentiation*, 5 (5), 372-380.
- 145.Annis, M.G., Soucie, E.L., Dlugosz, P.J., Cruz-Aguado, J.A., Penn, L.Z., Leber, B. ve diğerleri. (2005). Bax forms multispinning monomers that oligomerize to permeabilize membranes during apoptosis. *The EMBO Journal*, 24 (12), 2096-2103.

146. Suzuki, M., Youle, R.J., Tjandra, N. (2000). Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell*, 103 (4), 645-654.
147. Lalier, L., Cartron, P.F., Juin, P., Nedelkina, S., Manon, S., Bechinger, B. ve diğerleri. (2007). Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. *Apoptosis*, 12 (5), 887-896.
148. Kim, H., Tu, H.C., Ren, D., Takeuchi, O., Jeffers, J.R., Zambetti, G.P. ve diğerleri. (2009). Stepwise activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA initiates mitochondrial apoptosis. *Molecular Cell*, 36 (3), 487-499.
149. Cartron, P.F., Gallenne, T., Bougras, G., Gautier, F., Manero, F., Vusio, P. ve diğerleri. (2004). The first alpha helix of Bax plays a necessary role in its ligand-induced activation by the BH3-only proteins Bid and PUMA. *Molecular Cell*, 16 (5), 807-818.
150. Gallenne, T., Gautier, F., Oliver, L., Hervouet, E., Noel, B., Hickman, J.A. ve diğerleri. (2009). Bax activation by the BH3-only protein Puma promotes cell dependence on antiapoptotic Bcl-2 family members. *The Journal of Cell Biology*, 185 (2), 279-290.
151. Gavathiotis, E., Suzuki, M., Davis, M.L., Pitter, K., Bird, G.H., Katz, S.G. ve diğerleri. (2008). BAX activation is initiated at a novel interaction site. *Nature*, 455 (7216), 1076-1081.
152. Kim, H., Rafiuddin-Shah, M., Tu, H.C., Jeffers, J.R., Zambetti, G.P., Hsieh, J.J. ve diğerleri. (2006). Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nature Cell Biology*, 8 (12), 1348-1358.
153. Goping, I.S., Gross, A., Lavoie, J.N., Nguyen, M., Jemmerson, R., Roth, K. ve diğerleri. (1998). Regulated targeting of BAX to mitochondria. *The Journal of Cell Biology*, 143 (1), 207-215.
154. Renault, T.T., Manon, S. (2011). Bax: Addressed to kill. *Biochimie*, 93 (9), 1379-1391.
155. Garcia-Saez, A.J., Mingarro, I., Perez-Paya, E., Salgado, J. (2004). Membrane-insertion fragments of Bcl-xL, Bax, and Bid. *Biochemistry*, 43 (34), 10930-10943.
156. Nguyen, M., Branton, P.E., Walton, P.A., Oltvai, Z.N., Korsmeyer, S.J., Shore, G.C. (1994). Role of membrane anchor domain of Bcl-2 in suppression of

- apoptosis caused by E1B-defective adenovirus. *The Journal of Biological Chemistry*, 269 (24), 16521-16524.
157. Janiak, F., Leber, B., Andrews, D.W. (1994). Assembly of Bcl-2 into microsomal and outer mitochondrial membranes. *The Journal of Biological Chemistry*, 269 (13), 9842-9849.
158. Er, E., Oliver, L., Cartron, P.F., Juin, P., Manon, S., Vallette, F.M. (2006). Mitochondria as the target of the pro-apoptotic protein Bax. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1757 (9-10), 1301-1311.
159. Llambi, F., Moldoveanu, T., Tait, S.W., Bouchier-Hayes, L., Temirov, J., McCormick, L.L. ve diğeri. (2011). A unified model of mammalian BCL-2 protein family interactions at the mitochondria. *Molecular Cell*, 44 (4), 517-531.
160. Giam, M., Huang, D.C., Bouillet, P. (2008) BH3-only proteins and their roles in programmed cell death. *Oncogene*, 27 Suppl 1, S128-136.
161. George, N.M., Evans, J.J., Luo, X. (2007). A three-helix homo-oligomerization domain containing BH3 and BH1 is responsible for the apoptotic activity of Bax. *Genes & Development*, 21 (15), 1937-1948.
162. Fletcher, J.I., Meusburger, S., Hawkins, C.J., Riglar, D.T., Lee, E.F., Fairlie, W.D. ve diğeri. (2008). Apoptosis is triggered when prosurvival Bcl-2 proteins cannot restrain Bax. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105 (47), 18081-18087.
163. Willis, S.N., Fletcher, J.I., Kaufmann, T., van Delft, M.F., Chen, L., Czabotar, P.E. ve diğeri. (2007). Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science*, 315 (5813), 856-859.
164. Marani, M., Tenev, T., Hancock, D., Downward, J., Lemoine, N.R. (2002). Identification of novel isoforms of the BH3 domain protein Bim which directly activate Bax to trigger apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 22 (11), 3577-3589.
165. de Moraes, A.C., Maranhão, C.K., Rauber, G.S., Santos-Silva, M.C. (2013). Importance of detecting multidrug resistance proteins in acute leukemia prognosis and therapy. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 27 (1), 62-71.

166. Juliano, R.L., Ling, V. (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 455 (1), 152-162.
167. Chen, C.J., Chin, J.E., Ueda, K., Clark, D.P., Pastan, I., Gottesman, M.M. ve diğeri. (1986). Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell*, 47 (3), 381-389.
168. Gething, M.J., Sambrook, J. (1992). Protein folding in the cell. *Nature*, 355 (6355), 33-45.
169. Molinari, A., Cianfriglia, M., Meschini, S., Calcabrini, A., Arancia, G. (1994). P-glycoprotein expression in the Golgi apparatus of multidrug-resistant cells. *International Journal of Cancer*, 59 (6), 789-795.
170. Borst, P., Elferink, R.O. (2002). Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annual Review of Biochemistry*, 71, 537-592.
171. Shilling, R.A., Venter, H., Velamakanni, S., Bapna, A., Woebking, B., Shahi, S. ve diğeri. (2006). New light on multidrug binding by an ATP-binding-cassette transporter. *Trends in Pharmacological Sciences*, 27 (4), 195-203.
172. Fu, D., Arias, I.M. (2012). Intracellular trafficking of P-glycoprotein. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44 (3), 461-464.
173. Shipley, J.L., Butera, J.N. (2009). Acute myelogenous leukemia. *Experimental Hematology*, 37 (6), 649-658.
174. Fojo, A.T., Ueda, K., Slamon, D.J., Poplack, D.G., Gottesman, M.M., Pastan, I. (1987). Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84 (1), 265-269.
175. Cordon-Cardo, C., O'Brien, J.P., Casals, D., Rittman-Grauer, L., Biedler, J.L., Melamed, M.R. ve diğeri. (1989) Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86 (2), 695-698.
176. Volm, M., Pommerenke, E.W., Efferth, T., Lohrke, H., Mattern, J. (1991). Circumvention of multi-drug resistance in human kidney and kidney carcinoma in vitro. *Cancer*, 67 (10), 2484-2489.

- 177.Efferth, T., Dunn, T.A., Berlion, M., Langenbahn, H., Pommerenke, E.W., Volm, M. (1993). Reversal of inherent multidrug-resistance in primary human renal cell carcinoma cell cultures by S 9788. *Anticancer Research*, 13 (4), 905-908.
- 178.Eichhorn, T., Efferth, T. (2012). P-glycoprotein and its inhibition in tumors by phytochemicals derived from Chinese herbs. *Journal of Ethnopharmacology*, 141 (2), 557-570.
- 179.Lee, C.G., Gottesman, M.M., Cardarelli, C.O., Ramachandra, M., Jeang, K.T., Ambudkar, S.V. ve diğerleri. (1998). HIV-1 protease inhibitors are substrates for the MDR1 multidrug transporter. *Biochemistry*, 37 (11), 3594-3601.
- 180.Litman, T., Druley, T.E., Stein, W.D., Bates, S.E. (2001). From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58 (7), 931-959.
- 181.Higgins, C.F. (1994). Flip-flop: the transmembrane translocation of lipids. *Cell*, 79 (3), 393-395.
- 182.Dawson, R.J., Locher, K.P. (2006). Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. *Nature*, 443 (7108), 180-185.
- 183.Johnstone, R.W., Ruefli, A.A., Smyth, M.J. (2000). Multiple physiological functions for multidrug transporter P-glycoprotein? *Trends in Biochemical Sciences*, 25 (1), 1-6.
- 184.Gottesman, M.M. (2002). Mechanisms of cancer drug resistance. *Annual Review of Medicine*, 53, 615-627.
- 185.Schinkel, A.H., Smit, J.J., van Tellingen, O., Beijnen, J.H., Wagenaar, E., van Deemter, L. ve diğerleri. (1994). Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell*, 77 (4), 491-502.
- 186.Schinkel, A.H., Wagenaar, E., Mol, C.A., van Deemter, L. (1996). P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *The Journal of Clinical Investigation*, 97 (11), 2517-2524.
- 187.United States Biological. (t.y.). Erişim: 02 Temmuz 2013, <http://www.usbio.net/images/doxorubicin.jpg>



- 188.Hilmer, S.N., Cogger, V.C., Muller, M., Le Couteur, D.G. (2004). The hepatic pharmacokinetics of doxorubicin and liposomal doxorubicin. *Drug Metabolism and Disposition*, 32 (8), 794-799.
- 189.Buchholz, T.A., Stivers, D.N., Stec, J., Ayers, M., Clark, E., Bolt, A. ve diğeri. (2002). Global gene expression changes during neoadjuvant chemotherapy for human breast cancer. *The Cancer Journal*, 8 (6), 461-468.
- 190.Wang, Y., Wang, Y.P., Tay, Y.C., Harris, D.C. (2000). Progressive adriamycin nephropathy in mice: sequence of histologic and immunohistochemical events. *Kidney International*, 58 (4), 1797-1804.
- 191.Rook, M., Lely, A.T., Kramer, A.B., van Goor, H., Navis, G. (2005). Individual differences in renal ACE activity in healthy rats predict susceptibility to adriamycin-induced renal damage. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 20 (1), 59-64.
- 192.Bertani, T., Cutillo, F., Zoja, C., Brogini, M., Remuzzi, G. (1986). Tubulointerstitial lesions mediate renal damage in adriamycin glomerulopathy. *Kidney International*, 30 (4), 488-496.
- 193.Lal, S., Mahajan, A., Chen, W.N., Chowbay, B. (2010). Pharmacogenetics of target genes across doxorubicin disposition pathway: a review. *Current Drug Metabolism*, 11 (1), 115-128.
- 194.Zheng, Z., Pavlidis, P., Chua, S., D'Agati, V.D., Gharavi, A.G. (2006). An ancestral haplotype defines susceptibility to doxorubicin nephropathy in the laboratory mouse. *Journal of the American Society of Nephrology*, 17 (7), 1796-1800.
- 195.Grand Valley State University. (t.y.). Erişim: 13 Ekim 2013, **<http://www2.gvsu.edu/chm463/chemo/1QDAx500.jpg>**
- 196.Gewirtz, D.A. (1999). A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochemical Pharmacology*, 57 (7), 727-741.
- 197.Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., Gianni, L. (2004). Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews*, 56 (2), 185-229.

- 198.Ashley, N., Poulton, J. (2009). Mitochondrial DNA is a direct target of anti-cancer anthracycline drugs. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 378 (3), 450-455.
- 199.Allen, A. (1992). The cardiotoxicity of chemotherapeutic drugs. *Semin Oncol*, 19 (5), 529-542.
- 200.Jain, D. (2000). Cardiotoxicity of doxorubicin and other anthracycline derivatives. *Journal of Nuclear Cardiology*, 7 (1), 53-62.
- 201.Saltiel, E., McGuire, W. (1983). Doxorubicin (adriamycin) cardiomyopathy. *The Western Journal of Medicine*, 139 (3), 332-341.
- 202.Singal, P.K., Iliskovic, N. (1998). Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *The New England Journal of Medicine*, 339 (13), 900-905.
- 203.Kremer, L.C., van Dalen, E.C., Offringa, M., Voute, P.A. (2002). Frequency and risk factors of anthracycline-induced clinical heart failure in children: a systematic review. *Annals of Oncology*, 13 (4), 503-512.
- 204.Hershman, D.L., McBride, R.B., Eisenberger, A., Tsai, W.Y., Grann, V.R., Jacobson, J.S. (2008). Doxorubicin, cardiac risk factors, and cardiac toxicity in elderly patients with diffuse B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, 26 (19), 3159-3165.
- 205.Fame Pharmaceuticals. (t.y.). Erişim: 27 Ocak 2013, <http://famepharma.com/images/scientific-biocrush-clip-image002.jpg>
- 206.Bains, O.S., Szeitz, A., Lubieniecka, J.M., Cragg, G.E., Grigliatti, T.A., Riggs, K.W. ve diğerleri. (2013). A correlation between cytotoxicity and reductase-mediated metabolism in cell lines treated with doxorubicin and daunorubicin. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 347 (2), 375-387.
- 207.Lv, L., Wang, P., Zhou, X., Sun, B. (2013). Association between the p53 codon 72 Arg/Pro polymorphism and hepatocellular carcinoma risk. *Tumour Biology*, 34 (3), 1451-1459.
- 208.Eskiocak, U., Iseri, O.D., Kars, M.D., Bicer, A., Gunduz, U. (2008). Effect of doxorubicin on telomerase activity and apoptotic gene expression in doxorubicin-resistant and -sensitive MCF-7 cells: an experimental study. *Chemotherapy*, 54 (3), 209-216.

209. Brito, A.F., Abrantes, A.M., Pinto-Costa, C., Gomes, A.R., Mamede, A.C., Casalta-Lopes, J. ve diğeri. (2012). Hepatocellular carcinoma and chemotherapy: the role of p53. *Chemotherapy*, 58 (5), 381-386.