



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**C6 GLİOMA HÜCRELERİNDE HİSTON DEASETİLAZ
İNİHİTÖRLERİNİN VE SİNİR BÜYÜME FAKTÖRÜ'NÜN
ROLÜ**

**Sevinç NARİN
Biyoloji Anabilim Dalı
Zooloji Programı**

**Danışman
Prof.Dr. Şehnaz BOLKENT
Haziran, 2011**

İSTANBUL



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**C6 GLİOMA HÜCRELERİNDE HİSTON DEASETİLAZ
İNİHİTÖRLERİNİN VE SİNİR BÜYÜME FAKTÖRÜ'NÜN
ROLÜ**

**Sevinç NARİN
Biyoloji Anabilim Dalı
Zooloji Programı**

**Danışman
Prof.Dr. Şehnaz BOLKENT
Haziran, 2011**

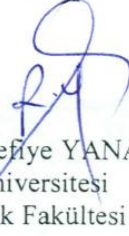
İSTANBUL

Bu çalışma 01/07/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Zooloji programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi



Prof. Dr. Şehnaz BOLKENT
(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



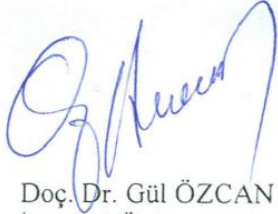
Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



Prof. Dr. Seyhan ALTUN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Doç. Dr. N. Ömür KARABULUT BULAN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Doç. Dr. Gül ÖZCAN ARICAN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 4108 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim sırasında ve tez çalışmalarım boyunca deneyimi, bilgi birikimi ve imkanlarını paylaşıp, bana her türlü konuda destek olan ve bu çalışmanın ortaya çıkarılmasında büyük emeği geçen değerli hocam Prof. Dr. Şehnaz BOLKENT'e yardımları, güler yüzü ve içtenliği için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Deney çalışmalarımda kullandığım C6 Glioma hücre soyunu hediye ederek nezaket gösteren sayın Doç. Dr. Meral KOYUTÜRK'e teşekkür ederim. Sabırlı davranışlarıyla yardımlarını benden esirgemeyen, çalışmalarımın her aşamasıyla yakından ilgilenen ve yol gösteren Araş. Gör. Dr. Selda GEZGİNCİ OKTAYOĞLU, Araş. Gör. Serap SANCAR BAŞ ve Araş. Gör. Ayşe KARATUĞ'a sonsuz teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca manevi desteklerini benden esirgemeyen sevgili dönem arkadaşlarım Biyolog Özgecan KAYALAR, Biyolog Zeliha GÜLER, Biyolog Semra Zuhâl FİCEN, Biyolog Hale ÖVET ve Biyolog Öznur YILMAZ'a teşekkür ederim. Tezimin basılması sürecinde tüm yoğunluklarına rağmen zaman ayırıp bana yardımcı olan değerli arkadaşlarım Melisa ŞİRAZİ, Deniz OKMAN ve Sinan YİĞİT'e en içten duygularıyla teşekkür ederim. Başta amcam Veysel Narin olmak üzere hayatımın her döneminde sonsuz sevgi ve anlayışla yanımda olduklarını hissettiren anneme, babama ve tüm aileme, mesleğimi seçmemde ve sevmemde etkili olan, üzerimde emeği bulunan bütün bilim insanlarına sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Haziran, 2011

Sevinç NARİN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ	v
TABLO LİSTESİ	vii
SEMBOL LİSTESİ	viii
ÖZET	x
SUMMARY	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR	7
2.1. HÜCRE DÖNGÜSÜ	9
2.1.1. Siklinler ve Siklin Bağımlı Kinazlar	9
2.1.2. Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörleri	10
2.2. APOPTOTİK HÜCRE ÖLÜMÜ	11
2.2.1. Kaspazlar ve Aktivasyon Yolakları.....	15
2.2.2. Kaspaz 3	16
2.3. TRANSLASYON SONRASI HİSTON MODİFİKASYONLARI VE GEN EKSPRESYONUNUN DÜZENLENMESİ	16
2.3.1. Histon Deasetilaz Enzimleri (HDAC)	18
2.3.2. Histon Deasetilaz İnhibitörleri (HDACI).....	19
2.4. TRİKOSTATİN A	21
2.5. VALPROİK ASİT	22
2.6. SİNİR BÜYÜME FAKTÖRÜ	23
2.7. C6 GLİOMA HÜCRE SOYU.....	26
3. MALZEME VE YÖNTEM	27
3.1. KULLANILAN KİMYASALLAR	27
3.2. HÜCRE KÜLTÜRÜ	28
3.3. KULLANILACAK KİMYASALLARIN ÇÖZÜLMESİ VE SULANDIRILMASI	28
3.3.1. TSA'nın Çözülmesi ve Sulandırılması	28
3.3.2. VPA'nın Çözülmesi ve Sulandırılması.....	28

3.3.3. NGF'nin Çözülmesi ve Sulandırılması.....	29
3.4. BİYOKİMYASAL YÖNTEMLER	29
3.4.1. TSA, VPA ve NGF'nin Etkin Doz ve Sürelerinin Belirlenmesi.....	29
3.4.1.1. TSA İçin Doz ve Süre Belirleme Deneyleri	29
3.4.1.2. VPA İçin Doz ve Süre Belirleme Deneyleri.....	30
3.4.1.3. NGF İçin Doz ve Süre Belirleme Deneyleri.....	32
3.4.2. VPA, TSA Ve NGF'nin Etkin Dozlarının İkili (VPA+TSA) ve Üçlü (VPA+TSA+NGF) Kombinasyonlar Halinde Verilmesi	33
3.4.3. MTT Testi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi.....	33
3.4.3.1. MTT Çözeltisinin Hazırlanması	34
3.4.3.2. Hücrelerin MTT ile Muamele Edilmesi.....	34
3.4.4. Bromodeoksiüridin (BrdU) ile Hücre Döngüsü Analizi.....	35
3.4.4.1. Çalışma Çözeltilerinin Hazırlanması	35
3.4.4.2. Yöntem.....	36
3.4.5. Apoptotik Hücre Ölümünün Belirlenmesi	36
3.4.5.1. Testin Prensibi	36
3.4.5.2. Çalışma Çözeltilerinin Hazırlanması.....	37
3.4.5.3. Kullanılacak Örneğin Hazırlanması.....	37
3.4.5.4. Yöntem.....	37
3.4.6. NGF Miktarının Belirlenmesi.....	38
3.4.6.1. Testin Prensibi	38
3.4.6.2. Çalışma Çözeltilerinin Hazırlanması.....	38
3.4.6.3. Kuyucukların Antikorla Kaplanması	39
3.4.6.4. Yöntem.....	40
3.4.6.5. NGF Standart Grafiğinin Çizilmesi	40
3.5. MİKROSKOBİK YÖNTEMLER.....	40
3.5.1. TrkA İmmunfloresan İşaretleme.....	41
3.5.2. Kaspaz-3/p75 İkili İmmunfloresan İşaretleme.....	42
3.5.3. %TrkA ⁺ ve Kaspaz3 ⁺ /p75 ⁺ C6 Glioma Hücrelerinin Hesaplanması.....	43
3.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	43

4. BULGULAR	44
4.1. BİYOKİMYASAL BULGULAR	44
4.1.1. Trikostatın A'ya Ait Hücre Canlılık Testi Bulguları.....	44
4.1.2. Valproik Asit'e Ait Hücre Canlılık Testi Bulguları.....	46
4.1.3. Sinir Büyüme Faktörü'ne Ait Hücre Canlılık Testi Bulguları	48
4.1.4. TSA, VPA ve NGF'nin İkili (VPA+TSA) ve Üçlü (VPA+TSA+NGF) Kombinasyonlar Halinde Uygulandığı C6 Glioma Hücre Soyuna Ait Hücre Canlılık Testi Bulguları	50
4.1.5. Bromodeoksiüridin (BrdU) ile Hücre Döngüsü Analizine Ait Bulgular.....	51
4.1.6. Apoptotik Hücre Ölümü Analizine Ait Bulgular	52
4.1.7. NGF Miktar Analizine Ait Bulgular	53
4.2. MİKROSKOBİK BULGULAR	55
4.2.1. TrkA İmmüno Floresan İşaretleme Tekniğine Ait Bulgular	55
4.2.2. Kaspaz-3/p75 ^{NTR} İkili İmmüno Floresan İşaretleme Tekniğine Ait Bulgular.....	57
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	59
KAYNAKLAR	69
ÖZGEÇMİŞ	88

ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 2.1** Hücre döngüsü evrelerinin şematik görünümü
(www.sydney.edu.au/wmi/cellcycle/cellcycle.htm)7
- Şekil 2.2** Hücre ölüm reseptörleri aracılığıyla etkisini meydana getiren hücre dışı sinyallerle tetiklenen hücre dışı ve mitokondri aracılığıyla gerçekleşen hücre içi apoptotik yolak gösterilmektedir
(www.imgenex.com/.../LivinorSurvivin_forweb.htm)13
- Şekil 2.3** HDAC inhibitörleri etki mekanizmalarının şematik gösterimi. HAT enzimleri asetil gruplarını lizin bakiyelerine aktararak açık ve transkripsiyonel olarak aktif bir kromatin yapısı meydana getirir. HDAC enzimleri ise lizin bakiyelerinden asetil gruplarını uzaklaştırarak, transkripsiyonel olarak aktif olmayan bir kromatin yapısı meydana getirir (Gillet ve diğ., 2007)21
- Şekil 2.4** Nörotrofinler ve reseptörlerini gösteren şema (Pezet ve diğ., 2006).....25
- Şekil 4.1** TSA'nın konsantrasyon ve zamana bağlı olarak C6 glioma hücrelerinin sağkalımı üzerindeki etkisi. Deney gruplarındaki veriler ortalama±standart hata (SEM) olarak ifade edilmiştir. p değerleri kontrole göre hesaplanmıştır (**p<0.01).....46
- Şekil 4.2** VPA'nın konsantrasyon ve zamana bağlı olarak C6 glioma hücrelerinin sağkalımı üzerindeki etkisi. Deney gruplarındaki veriler ortalama±standart hata (SEM) olarak ifade edilmiştir. p değerleri kontrole göre hesaplanmıştır (*p<0.05).....48
- Şekil 4.3** NGF'nin konsantrasyon ve zamana bağlı olarak C6 glioma hücrelerinin sağkalımı üzerindeki etkisi. Deney gruplarındaki veriler ortalama ± standart hata (SEM) olarak ifade edilmiştir. p değerleri kontrole göre hesaplanmıştır (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).....50
- Şekil 4.4** VPA, TSA, NGF, VPA+TSA, VPA+TSA+NGF' nin konsantrasyon ve zamana bağlı olarak C6 glioma hücrelerinin sağkalımı üzerindeki etkisi. Farklı deney gruplarından elde edilen veriler ortalama ± standart hata (SEM) olarak ifade edilmiştir. p değerleri kontrole göre hesaplanmıştır (*p<0.05).....51
- Şekil 4.5** VPA, TSA, NGF, VPA+TSA, VPA+TSA+NGF' nin konsantrasyon ve zamana bağlı olarak C6 glioma hücrelerinin hücre çoğalması üzerindeki etkisi. Farklı deney gruplarından elde edilen veriler ortalama ± standart hata (SEM) olarak ifade edilmiştir. p değerleri kontrole göre hesaplanmıştır (*p<0.05).....52
- Şekil 4.6** VPA, TSA, NGF, VPA+TSA, VPA+TSA+NGF' nin konsantrasyon ve zamana bağlı olarak C6 glioma hücrelerinde meydana getirdiği apoptozdaki katlı artış

	miktari. Farklı deney gruplarından elde edilen veriler ortalama \pm standart hata (SEM) olarak ifade edilmiştir. p değerleri kontrole göre hesaplanmıştır (* $p < 0.05$).....	53
Şekil 4.7	Ngf standart grafiği.....	54
Şekil 4.8	VPA, TSA, NGF, VPA+TSA, VPA+TSA+NGF' nin farklı dozlarına maruz kalmış C6 glioma hücrelerine ait NGF miktarı. Farklı deney gruplarından elde edilen veriler ortalama \pm standart hata (SEM) olarak ifade edilmiştir. Gruplar arasında anlamlı bir istatistiksel saptanmamıştır ($p > 0.05$).....	54
Şekil 4.9	VPA, TSA, NGF, VPA+TSA, VPA+TSA+NGF' ye 48 saat maruz kalmış C6 glioma hücrelerinin % TrkA ⁺ oranları. Farklı deney gruplarından elde edilen veriler ortalama \pm standart hata (SEM) olarak ifade edilmiştir (* $p < 0.05$).....	55
Şekil 4.10	VPA, TSA, NGF, VPA+TSA, VPA+TSA+NGF'ye 48 saat maruz kalmış deney gruplarına ait TrkA ⁺ C6 Glioma hücreleri (yeşil, \rightarrow) görülmektedir. X200.....	56
Şekil 4.11	VPA, TSA, NGF, VPA+TSA, VPA+TSA+NGF'ye 48 saat maruz kalmış C6 glioma hücrelerinin % Kaspaz-3 ⁺ /P75 ^{NTR+} oranları. Farklı deney gruplarından elde edilen veriler ortalama \pm standart hata (SEM) olarak ifade edildi (* $p < 0.05$).....	57
Şekil 4.12	VPA, TSA, NGF, VPA+TSA, VPA+TSA+NGF'ye 48 saat maruz kalmış deney gruplarına ait P75 ^{NTR+} (yeşil), Kaspaz-3 ⁺ (kırmızı) ve Kaspaz-3 ⁺ /P75 ^{NTR+} (sarı \rightarrow) C6 glioma hücreleri görülmektedir. X 200	58

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1	Histon deasetilaz enzimleri	19
Tablo 3.1	Trikostatin A'ya ait deney grupları	30
Tablo 3.2	Valproik Asit'e ait deney grupları	31
Tablo 3.3	Sinir Büyüme Faktörü'ne ait deney grupları	32
Tablo 3.4	NGF seviyesi belirleme deneyine ait deney grupları	39
Tablo 3.5	TrkA ⁺ C6 glioma hücre sayısının hesaplanması	43

SEMBOL LİSTESİ

ABST	(2,2'-azino-di-[3-etilbenzotiazolin sülfonat (6)])
AD	Alzheimer hastalığı
BDNF	Beyin kökenli nörotrofik faktör
BrdU	5-Bromo-2'-deoksi-üridin
BSA	Sığır serum albumin
CDK	Siklin bağımlı kinaz
CKI	Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri
CNTF	Siliarik nörotrofik faktör
CYC	Siklin
DMEM/F12	Dulbecco'nun modifiye edilmiş Eagle medyumuna :F12 besleyici
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
ELISA	Enzim bağımlı immünemici tekniği
FADD	Fas ile ilişkili ölüm bölgesi
FBS	Fötal sığır serumu
FGF- 1	Fibroblast büyüme faktörü-1
FGF- 2	Fibroblast büyüme faktörü-2
FITC	Florescein
FTS	Fizyolojik tuzlu su
GDNF	Gliyal kökenli nörotrofik faktör
GFAP	Gliyal fibriler asidik protein
H₂O₂	Hidrojen peroksit
HAT	Histon asetil transferaz
HD	Huntington hastalığı
HDAC	Histon deasetilaz
HDACI	Histon deasetilaz inhibitörü
HRP	Yaban turbu peroksidazı
ICE	İnterlökin-1 β değiştirici enzim
JNK	N-terminal kinaz
MSC	Mezenkimal kök hücre
MTT	Metil-Tiazol-tetrazolyumbromid
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotid
NGF	Sinir büyüme faktörü
NT	Nörotrofin
p75^{NTR}	Düşük affiniteli NGF reseptörü
PARP	Poli-(ADP-riboz) polimeraz
PBS	Fosfatla tamponlu tuz çözeltisi
PCNA	Çoğalan hücre nükleus antijeni
PD	Parkinson hastalığı
PDGF	Platelet kökenli büyüme faktörü
PI-3-Kinaz	Fosfotidil-3-kinaz

POD	Peroksidaz
Rpm	Dakikadaki dönüş sayısı
SIRT	Sirtuin
TGF- α	Transforme edici faktör- α
TGF- β	Transforme edici faktör- β
TNF	Tümör nekroz faktör
TrkA	Tirozin kinaz A
TSA	Trikostatin A
VPA	Valproik asit

ÖZET

C6 GLİOMA HÜCRELERİNDE HİSTON DEASETİLİZ İNHİBİTÖRLERİNİN VE SİNİR BÜYÜME FAKTÖRÜ'NÜN ROLÜ

Histonlardan ve diğer proteinlerden asetil bakiyelerinin çıkarılması, kanser ve nörodejeneratif hastalıklarda terapötik hedef olarak gittikçe yaygın olarak kullanılmaktadır. Histon deasetilaz inhibitörleri bazı genlerin aktivasyonuna sebep olan kromatinde hiperasetilasyonu ve kanser hücrelerinde terminal hücre farklılaşması ve/veya apoptozu uyarmaktadır. Valproik asit (VPA) güçlü antiepileptik, antineoplastik ve nöroprotektif özellikleri bilinen bir ajan olup, merkezi sinir sisteminde nörotropinler dahil çeşitli hedef yapıların ekspresyonunu değiştirebilmektedir. Trikostatın A (TSA) ise ökaryotik hücrelerde büyüme evresinin başlangıcında hücre siklusunu inhibe etmekte ve histonlardan asetil gruplarının uzaklaşmasını engelleyerek yine gen ekspresyonunu değiştirebilmektedir. Bu histon deasetilaz inhibitörleri antitümör aktiviteye ve antiinflamatuvar özelliklere de sahiptir. Sıçan C6 glioma hücrelerinin hem *in vitro* ve *in vivo* olarak sinir büyüme faktörü (NGF) reseptörlerini eksprese ettiği ve hem de NGF muamelesi ile bu hücrelerin farklılaşmasına sebep olduğu ve bu hücrelerin çoğalmasını inhibe ettiği bilinmektedir.

Bu çalışma, iki farklı histon deasetilaz inhibitör sınıfına ait olan VPA ve TSA'nın ikili kombinasyonunun C6 glioma hücrelerinde *in vitro* olarak özellikle apoptoz ve hücre proliferasyon mekanizmaları üzerindeki etkisinin NGF uygulanması ile etkilenip etkilenmeyeceğini ortaya koymak amacıyla tasarlanmıştır. Böylelikle C6 glioma hücrelerinde tam olarak açıklanamayan hücre ölüm mekanizmasının moleküler düzeyde incelenmesi amaçlanmıştır.

Bütün bu veriler dikkate alınarak, C6 glioma hücrelerini tedavi etmek amacı ile iki histon deasetilaz inhibitörü farklı dozlarda ve sürelerde tek tek ve kombine olarak uygulandı ve apoptotik hücre indeksi ile hücre çoğalma indeksi hesaplandı. Ayrıca bu histon deasetilaz inhibitörlerinin C6 glioma hücrelerinde *in vitro* olarak özellikle apoptoz ve hücre proliferasyon mekanizmaları üzerindeki etkisinin NGF'nin uygulanması ile etkilenip etkilenmediği de tespit edildi. Çalışmada kaspaz-3 aktivitesi, P75^{NTR}, TrkA immunohistokimyasal olarak, NGF miktarı, hücre proliferasyonu ve apoptoz ise kolorimetrik (ELISA) olarak incelendi.

Sonuç olarak VPA, TSA ve NGF tek tek, ikili VPA+TSA ve üçlü VPA+TSA+NGF kombinasyonlar halinde uygulandığında C6 glioma hücrelerinin çoğalmasının engellendiği ve bu hücrelerin apoptoza gittiği gözlemlendi. Tüm bu veriler göz önünde bulundurulduğunda, HDAC inhibitörleri ile NGF kombinasyonunun, C6 glioma hücre soyu üzerinde meydana getirdiği apoptotik hücre ölümü ile, nörodejeneratif hastalıkların ve gliyal kökenli beyin kanserinin tedavisinde kullanılacak terapötik ajanlar olabileceği öne sürülebilir.

SUMMARY

THE ROLE OF NERVE GROWTH FACTOR AND HISTON DEACETYLASE INHIBITORS IN C6 GLIOMA CELLS

Removal of acetyl moieties from histones and other proteins is used widely as a therapeutic aim in cancer and neurodegenerative diseases. Histone deacetylase inhibitors stimulate the hyperacetylation in chromatin, which causes activation of some genes and it also stimulates the terminal cell differentiation and/or apoptosis. Valproic acid (VPA) is an agent whose powerful antiepileptic, antineoplastic and neuroprotective features are known and it can change the expression of several targets including neurotrophines in central nervous system. Trichostatin A (TSA) inhibites cellular cycle in the beginning of growth period in eucaryotic cells and it can change gene expression by inhibiting removal of acetyl groups from histones. These histone deacetylase inhibitors have antitumour activity and antiinflammatory properties. It is known that rat C6 glioma cells express nerve growth factor (NGF) receptors both in vitro and in vivo, and they also cause differentiation of these cells, leading to inhibition of their proliferation.

This study is designed to determine the effects of two histone deacetylase inhibitors in combined manner on especially apoptosis and cellular proliferation mechanism in C6 glioma cells and relationship to the administration of NGF. Therefore, it was aimed to investigate the inexplicable cell death mechanism of C6 glioma cells at molecular level.

By considering all these findings, VPA and TSA administered different doses and periods (individually and in combined manner) and apoptotic cellular index and cellular proliferation index calculated. In addition, the effect of these histone deacetylase inhibitors *in vitro* on especially apoptosis and cellular proliferation mechanisms in C6 glioma cells, the relationship to the administration of NGF are determined. In this study, caspase-3 activity, P75^{NTR} and TrkA determined with immunocytochemical manner whereas the NGF levels, cell proliferation and cell death determined with colorimetric (ELISA) manner.

As a result, we report that VPA, TSA and NGF individually and combined manner inhibit the cell proliferation of C6 glioma cells and trigger apoptosis. By considering these findings, we suggest that VPA, TSA and NGF combination may be new therapeutic agents in the therapy of neurodegenerative diseases and glial derivative brain cancer.

1. GİRİŞ

Sinir sistemi, beyin ve omurilikten oluşan merkezi sinir sistemi ile sinir lifleri ve gangliyonlardan oluşan periferik sinir sisteminden oluşur. Merkezi sinir sistemini oluşturan sinir dokusu iki tip hücreden meydana gelmiştir. Bu hücreler, uzun sinir lifleri içeren nöronlar ve nöronları koruyan, destekleyen ve merkezi sinir sisteminin savunmasında görev alan gliyal hücrelerdir (Rubinstein, 1985). Gliyal hücreler nöronlara besin sağlama, homeostazın korunması ve miyelin kılıf oluşumundaki fonksiyonları nedeniyle, nöronal hücre metabolizmasının düzenlenmesinde ve beyindeki nöronal iletimde önemli rol oynadığı düşünülen hücrelerdir (Morita ve diğ., 2009). Gliyal hücreler normal koşullar altında, nöronlara nörotrofik faktörleri sağlayarak bu hücrelerin sağkalımını arttırabilir ve böylelikle nöronların canlılığını destekleyebilir (Frukawa ve diğ., 1987; Assouline ve diğ., 1988; Houlgatte ve diğ., 1989; Yokoyama ve diğ., 1991; Condorelli ve diğ., 1994; Cortazzo ve diğ., 1996). Bunun yanı sıra toksik koşullar altında, gliyal hücreler nöroprotektif ajanların ekspresyonunu arttırabilirler (Bakhit ve diğ., 1991; Yokoyama ve diğ., 1991; Oderfeld-Nowak ve diğ., 1992; Pechan ve diğ., 1992; Rudge ve diğ., 1994; Rossner ve diğ., 1997).

Nörodejeneratif hastalıklar sinir sisteminde meydana gelen ve aşamalı hücre kaybı olarak karakterize edilen patolojik koşullar olarak tanımlanır. Merkezi sinir sisteminde meydana gelen bu hücre kaybı, kavrama ve hareket etme yeteneği üzerinde önemli sonuçlara sebep olabilmektedir (Graff ve diğ., 2011). Uzun yıllar süren araştırmalar ve çeşitli klinik denemelere rağmen, nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için kesin sonuçlar veren bir yöntem bulunamamıştır (Cummings, 2004). Alzheimer ve Huntington gibi nörodejeneratif hastalıklar epigenetik temelleri olan hastalıklardır (Urduinguo ve diğ., 2009). Hatalı histon asetilasyonu ve DNA metilasyonu gibi epigenetik modifikasyonların nörodejeneratif hastalıkların oluşumuna katkı sağladığı düşünülmektedir. Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklar nöronal ve gliyal hücrelerde meydana gelen ölümle bağlantılıdır (Marangolo ve diğ., 2001). Uzun

yıllar sinir hücrelerinde ve gliyal hücrelerde meydana gelen bu kaybın nekroz adı verilen bir ölüm yoluyla gerçekleştiğine inanıldı. Bununla beraber güncel kanıtlar, bu hücrelerin en azından bir kısmının daha sıkı bir kontrol altında gerçekleşen ve apoptoz adı verilen bir süreçle öldüğünü öne sürmektedir (Lassman ve diğ., 1995; Smale ve diğ., 1995; Barinaga, 1998).

Apoptotik hücre ölümü, istenmeyen, zararlı ya da enfekte olmuş hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlayan bir çeşit hücre intihar mekanizmasıdır (Kerr ve diğ., 1972). Apoptoza özgü başlıca morfolojik kriterler; hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması, membran tomurcuklanması, DNA fragmentasyonu ve son olarak DNA fragmentlerinin apoptotik kesecikler içinde paketlenmesidir (Wiyllie ve diğ., 1980). Nörodejeneratif hastalıklarla ilgili yapılan araştırmaların önemli bir kısmı nöronal hücre ölümü üzerinde yoğunlaşmış, çok azı gliyal hücre ölümüne önem vermiştir. Buna karşın son zamanlarda yapılan araştırmalar gliyal hücrelerin de apoptotik hücre ölümünden etkilendiğini öne sürmüştür (Liu ve diğ., 1997; Siman ve diğ., 1999).

Merkezi sinir sistemi tümörlerinin yaklaşık %40'ı astrosit, oligodendrosit ve endodermal hücreler gibi gliyal hücrelerden kökenlenir. Astrositomalar tüm gliyal hücre tümörlerinin yaklaşık %60-70'ini oluşturur (Criscuolo, 1993). Çeşitli büyüme faktörlerinin hücrel çoğalma ve farklılaşma üzerindeki etkilerini, hücre içi mekanizmaları aktif hale getirerek gösterdikleri ve bu yolla tümör büyümesini düzenledikleri *in vitro* ve *in vivo* olarak gösterilmiştir. Günümüzde gliyal tümörlerle ilişkili olduğu bilinen büyüme faktörlerinin en önemlilerinin tümör büyüme faktörü- α (TGF- α), tümör büyüme faktörü- β (TGF- β), fibroblast büyüme faktörü-1 (FGF-1), fibroblast büyüme faktörü-2 (FGF-2), platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF), gliyal kökenli büyüme faktörü (GDNF), vaskuloendotelial büyüme faktörü (VEGF) olduğu düşünülmektedir (Maxwell ve diğ., 1990; Schlegel ve diğ., 1990; Takahashi ve diğ., 1990; Plate ve diğ., 1992; Stockhammer ve diğ., 1995; Wiesenhofer ve diğ., 2000). Başka çalışmalar ise, sinir büyüme faktörü (NGF), beyin-kökenli nörotrofik faktör (BDNF), ve nörotrofin-3 (NT-3) gibi nörotrofinlerin ve reseptörlerinin gliomalar tarafından ekprese edildiğini ve bu faktörlerin neoplazinin tetiklenmesinde ve ilerlemesinde etkili olabileceğini öne sürmektedir (Aguado ve diğ., 1998; Wang ve diğ., 1998). Nörotrofinler, sinir sisteminin gelişiminde ve idamesinde, hayati rol oynayan

özgün bir protein ailesini oluşturur. İyi tanımlanmış bir nörotrofin olan sinir büyüme faktörü'nün (NGF), nöron ve nöronal tümörlerde hücre sağkalımını destekleme, apoptozu önleme, çoğalmayı düzenleme ve farklılaşmayı tetikleme gibi birçok biyolojik etkiye sahip olduğu bilinmektedir (Levi-Montalcini ve diğ., 1968; Li ve diğ., 1995).

NGF, iki farklı reseptör olan p75^{NTR} ve TrkA aracılığı ile etkisini gösterebilir. p75^{NTR}, tümör nekrozis faktör (TNF) sitokin ailesinin seçici-olmayan bir nörotrofin reseptörü iken, TrkA NGF'nin trofik etkisine aracılık eden tirozin kinaz reseptörü olarak bilinmektedir (Barbacid, 1994). Sitokin ve tirozin kinaz reseptörleri arasındaki seçici etkileşimler, farklı ligand reseptör sistemlerinden gelen sinyalleri birleştirerek, birbirine zıt hücrel cevaplar oluşturan yeni bir mekanizma sağlamaktadır (Yoon ve diğ., 1998; Niederhauser ve diğ., 2000). Özellikle, NGF reseptörlerinin her ikisini de eksprese eden hücrelerde TrkA aktivitesi p75^{NTR} tarafından modüle edilmektedir (Kahle ve diğ., 1994; Ross ve diğ., 1998).

Çoğalma, farklılaşma ve hücre ölümünün düzenlenmesinin bozulması, gliyal tümörlerin gelişmesinde önemli bir rol oynar ve çeşitli merkezi sinir sistemi-kökenli tümör hücre soylarında, NGF ve reseptörlerinin düzenleyici içsel bir mekanizmaya sahip olduğuna dair kanıtlar vardır. NGF mRNA'sı sıçan glioma soyunda belirlenmiştir (Yamakuni ve diğ., 1987) ve insan glioblastoma hücre soyları tarafından salınan NGF seviyeleri otokrin bir düzenlenmenin olduğunu öne sürmektedir (Emmet ve diğ., 1997). Eksojen NGF'nin tümör hücre büyümesi üzerine etkisi hücre tipine özgüdür. NGF, sıçan feokromositoma hücreleri (van Grunsven ve diğ., 1996) ve insan nörojenik tümör hücre soylarının (Yaeger ve diğ., 1991) büyümesi üzerinde negatif etki gösterirken, birçok insan glioblastoma hücre soyunun büyümesinin NGF'den etkilenme oranı değişiklik gösterir (Oelmann ve diğ., 1995).

Sıçan C6 glioma hücreleri merkezi sinir sisteminden kökenlenmiş hücreler olup astrosit, oligodendrosit ve bunların öncüleri olan hücrelerin özelliğini taşımaktadır (Holland, 2001). C6 glioma hücrelerinin büyümesinin çeşitli nörotrofik faktörler tarafından düzenlendiği ve bu hücrelerin NGF reseptörlerini hem *in vivo* hem de *in vitro* eksprese ettiği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. (Kumar ve diğ., 1990; Zanellato ve diğ., 1994; Tornatore ve diğ., 1997). NGF muamelesi C6 glioma hücrelerinin farklılaşmasına neden

olup, çoğalmalarını güçlü bir şekilde engellemektedir (Watanabe ve diğ., 1999) ve NGF (TrkA) reseptörü eksprese eden insan medulla blastoma hücre soyunda apoptozu tetikleyebilmektedir (Muragaki ve diğ., 1997; Chou ve diğ., 2000). *İn vitro* çalışmalardan elde edilen tüm bu sonuçlar, NGF aracılı farklılaşmanın ve apoptozun gliyal tümörlerin büyümesinin kontrol edilmesinde, yeni bir teröpatik bakış açısı olarak sunulabileceğini öne sürmektedir (Kimura ve diğ., 2002).

NGF, farklılaşmanın yanı sıra sağ kalımı da teşvik eder. NGF'nin başlangıçta, gelişim esnasında duyu ve sempatik nöronların sağkalımını teşvik edebilme yeteneğinde bir molekül olarak tanımlanması onun duyarlı hücreleri daha dirençli bir hale getirdiğini göstermektedir. Sinir hücreleri üzerindeki bu koruyucu etkisi, NGF'nin Alzheimer, Parkinson, inme ve periferik sinir sistemi hastalıkları gibi merkezi sinir sistemine ait çeşitli nörodejenaratif hastalıkların tedavisinde kullanılabileceği fikrini doğurmuştur (Connor ve diğ., 1998). NGF'nin kanser gelişimi ve ilerlemesi üzerindeki rolü iki yönlüdür. NGF, farklılaşmayı tetikleyerek tümör büyümesinin kontrol edilmesi üzerinde pozitif bir etki sağlarken, ikinci önemli özelliği olan sağkalımın teşvik edilmesi özelliğinden dolayı daha dirençli tümör hücreleri oluşmasına yol açabilmektedir. Bu durum özellikle gliomalarda tümör tedavisinde büyük bir engel olarak karşımıza çıkmaktadır (Knüpfen ve diğ., 2001).

Translasyon sonrası meydana gelen modifikasyonların en iyi bilinenlerinden bir tanesi şüphesiz histon asetilasyonudur. Histon proteinine asetil gruplarının eklenmesi veya bu grupların uzaklaştırılması Histon Asetil Transferazlar (HAT) ve Histon Deasetilazlar (HDAC) olarak adlandırılan iki enzim ailesi tarafından katalizlenir. HAT'ler histonların amino ucundaki kuyruğa asetil grubu eklerken, HDAC'ler histonlardaki asetil gruplarını uzaklaştırır. Asetil grubunun pozitif yüklü bazik histon kuyruğundaki lizin amino asitine eklenmesi ile pozitif yük nötralize olur ve histonların negatif yüklü fosfat DNA iskeleti ile elektriksel etkileşimi zayıflar, böylece transkripsiyon faktörlerinin hedef gen bölgesine ulaşılabilirliği artar (Margueron ve diğ., 2005; Yoon ve diğ., 2005). Tam tersine, histon deasetilaz enzimleri (HDACs) ile katalizlenen özdeş histonların amino-terminal uçlarının tekrar pozitif yük kazanmaları, histonlar ile DNA'nın etkileşimini artırmakta ve promotör üzerindeki bağlantı bölgeleri bloke edilerek gen transkripsiyonu engellenmektedir (Margueron ve diğ., 2005). Histon molekülünde translasyon sonrası

meydana gelen tüm bu değişiklikler kromatinin sıkı veya gevşek bir şekilde paketlenmesini ve bu yolla gen ifadesinin düzenlenmesini etkilemektedir.

Gen ifadesinin düzenlenmesine etki eden ve histonlarda meydana gelen bu epigenetik değişikliklerin, çeşitli hastalıkların oluşumunda aktif rol aldığı gösterilmiştir. Özellikle kanserde, tümör baskılayıcı genlerin promotör bölgelerindeki asetilasyonların artmasının bu genlerin susturulmasına neden olduğu görülmüştür (Bolden ve diğ., 2006; Minucci ve Pelucci, 2006). Histonların, hastalıkların ortaya çıkmasında oynadığı rol anlaşıldıkça HDAC'lerin engellenmesiyle hastalıkların önleneceği düşüncesi, HDAC'lerin bu fonksiyonlarını engelleyecek ilaçların tasarımına ve doğal kimyasalların araştırılmasına yol açmıştır (Yoo ve diğ., 2006). Histon deasetilaz inhibitörleri, histon ve histon olmayan proteinlerin işlevlerini ve dolayısıyla gen transkripsiyonunu düzenleyerek, histon asetilasyonunu arttıran ve bu yolla kromatinin daha açık bir yapı kazanmasına neden olan çeşitli ajanlardır. HDAC inhibitörleri genel olarak antikanserojen ajan olarak düşünülmektedir. Bu moleküllerin, histon ve histon olmayan proteinler üzerinden etki göstererek, hücre büyümesini durdurduğu, apoptozu ve farklılaşmayı arttırdığı ve yeni damar oluşumunu durdurduğu *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar ile gösterilmiştir (Magner ve diğ., 2000; Qian ve diğ., 2006).

Günümüzde HDAC inhibitörlerinin en çok dikkat çekenlerinin başında şüphesiz Trikostatin A (TSA) gelmektedir. TSA antifungal antibiyotik olarak iş gören organik bir bileşik olup, memelilerde sınıf I ve sınıf II HDAC enzim ailesini özgün bir şekilde inhibe eden yeni antikanser bir ajandır (Marks ve diğ., 2000). Histon deasetilazların TSA tarafından inhibe edilmesi farklılaşma, apoptozun tetiklenmesi ya da transkripsiyonun değişmesi gibi geniş spekturumlu epigenetik etkiler meydana getirir. TSA'nın en önemli etkilerinden bir tanesi uzun süreli büyüme inhibisyonu ve memelilerde hücre döngüsünü G₁ fazında durdurmasıdır. Bu özelliğinden dolayı TSA kanser tedavisinde kullanılabilecek muhtemel adaylardan biri olarak kabul edilmektedir. TSA'nın C6 glioma hücrelerinde apoptozu tetiklediği gösterilmiştir (Hsu ve diğ., 2011).

Güçlü HDAC inhibitörlerinden bir diğeri olan Valproik asit (VPA), iyi tolere edilen antiepileptik bir ilaçtır ve toksisite profili iyi tanımlanmıştır. VPA hem sınıf I hem de sınıf II HDAC'leri (HDAC6 ve HDAC10 hariç) inhibe ederek, H3 ve H4 histonlarının

hiperasetilasyonuna yol açar. VPA'nın nöroblastoma (Yuan ve diğ., 2001; Cinatl ve diğ., 2002), glioma (Bacon ve diğ., 2002; Kamitani ve diğ., 2002), lösemi (Fischkoff ve Walter, 1984; Kawagoe ve diğ., 2002), meme kanseri (Olsen ve diğ., 2004) ve prostat kanseri (Thelen ve diğ., 2004) gibi çeşitli kanser türlerinde büyümeyi inhibe ettiği ve bu hücre soylarının farklılaşmalarını teşvik ettiği (Blaheta ve Cinatl, 2002), *in vitro* ve *in vivo* olarak gösterilmiştir. VPA'nın tümör hücreleri üzerindeki farklılaştırıcı etkisi sıklıkla kaspaz aktivasyonuna bağımlı ya da bağımsız olarak gerçekleşen apoptoz ile beraber tanımlanmaktadır (Tang ve diğ., 2004).

Gerek TSA'nın gerekse de VPA'nın C6 glioma hücre soyu üzerinde apoptotik etkisi olduğu bilinmesine karşın, bu iki HDAC inhibitörü daha önce kombine olarak uygulanmamıştır. Bu çalışma, C6 glioma hücrelerinde *in vitro* olarak özellikle apoptoz ve hücre proliferasyon mekanizmaları üzerinde, iki farklı HDAC inhibitör sınıfına ait olan VPA ile TSA'nın tek başına, ikili ve NGF'nin uygulanması ile de üçlü kombinasyonunun etkilerini araştırmak amacıyla tasarlanmıştır. Böylelikle C6 glioma hücrelerinde tam olarak açıklanamayan hücre ölüm mekanizmasının moleküler düzeyde incelenmesi hedeflenmiştir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. HÜCRE DÖNGÜSÜ

Tek ve çok hücreli organizmalar büyüme, gelişme ve çoğalmalarını sağlamak amacıyla bölünürler. Çoğu ökaryotik hücrenin genetik materyallerini iki katına çıkarıp mitoz esnasında bunu iki yavru hücreye eşit şekilde paylaşmasıyla gerçekleşen ve birbirini takip eden ardışık olaylardan oluşan süreç “hücre döngüsü” olarak adlandırılır. Ökaryotlarda hücre döngüsü G_1 , S ve G_2 fazlarını kapsayan interfaz evresi ve mitoz evresinden oluşmaktadır (Lodish ve diğ., 2000) (Şekil: 2.1).



Şekil 2.1: Hücre döngüsü evrelerinin şematik görünümü
(www.sydney.edu.au/wmi/cellcycle/cellcycle.htm).

Hücre için büyük önem taşıyan hücre döngüsünün aşamaları arasındaki geçişler, korunmuş bir mekanizma tarafından kontrol edilmektedir (Papeleu ve diğ., 2005). Radyasyon ve çeşitli kimyasalların DNA’da herhangi bir hasar oluşturması ile hücre döngüsü durdurma noktaları aktive olmaktadır. DNA’nın kendini tamir etmesi için zaman yaratmak amacıyla, hücre döngüsünün ilerlemesi değişik fazlarda geciktirilmekte ya da durdurulmaktadır. Bu mekanizma sadece hücre döngüsünün farklı olaylarını kontrol etmekle kalmaz, hücre çoğalmasını kontrol eden hücre dışı sinyallerle hücre döngüsü arasındaki ilişkiyi de sağlar. Genellikle, programlı hücre ölümü olan apoptoz

mekanizmaları da, tamir edilemeyecek olan anormal hücrelerin ortadan kaldırılması için bu mekanizmalara paralel olarak aktive edilmektedir (Marc ve diğ., 2004; Sturgeon ve diğ., 2006).

G₁ fazı: Normal hücre döngüsünün ilk fazı olan G₁ fazında hücre DNA replikasyonu için hazırlanır. Bu evrede metabolik olarak aktif olan hücre sürekli olarak büyür ve DNA sentezi için gerekli olan proteinleri ve RNA'yı sentezler. Tipik ökaryotik bir hücrede yaklaşık on iki saat süren bu faz en uzun faz olup, karar verme noktası olarak bilinen (R noktası) önemli bir kontrol noktası bulundurur. G₁/S kontrol noktası, hücrede DNA hasarı olup olmadığını kontrol eder. Eğer G₁ fazında hasar gerçekleşmişse, bu kontrol noktası proliferasyonu geciktirir veya hücreyi apoptoza sürükler. G₁ tutuklanması, hasarlı DNA'nın replikasyonunun yapılacağı S fazına girmeden önce hatanın onarılmasına izin verir. Bu noktadaki durdurmanın genellikle p53 geni üzerinden gerçekleştiği gösterilmiştir (Levine, 1997).

S fazı: Yaklaşık 6-8 saat süren bu faz DNA sentezinin gerçekleştiği evredir. S fazında bulunan kontrol noktası, hasarlı DNA replike olmadan önce onarılması için DNA'nın bütünlüğünü sürekli izler ve replikasyon sırasında yanlış baz eşleşmesi ya da DNA bölümlerinin eksik replikasyonu gibi oluşabilecek hataları bulma ve onarma şeklinde kontrol görevi üstlenir (Painter 1986; Paulovich ve Hartwell 1995).

G₂ fazı: Hücrenin mitoz için hazırlandığı bu faz yaklaşık 3-6 saat sürer. Mitozda kullanılacak enerji için ATP depolanması ve mitoz mekiği için tubulin yapımı, bu fazda gerçekleşen olayların başlıcalarıdır. G₂/M kontrol noktası, DNA hasarı gibi bir durumla karşılaşması halinde replikasyonu engellemekte ya da geciktirmektedir. Hücre döngüsünün ilerleyişinin engellenmesi p53-bağımlı ya da p53 bağımsız yollarla olabilmektedir (Vermeulen ve diğ., 2003).

M fazı: Hücrelerin replike olmuş kromozomları kardeş hücrelere eşit bir şekilde paylaştırdığı mitoz fazı yaklaşık olarak 30 dakika sürer. "İğ ipliklerini durdurma noktası" olarak da bilinen bu fazdaki durdurma noktası metafaz ve anafaz arasında tüm kardeş kromatidlerin iğ ipliklerine doğru bir biçimde paylaştırılıp paylaştırılmadığını kontrol etmektedir (Johnson ve Walker, 1999; Shackelford ve diğ., 1999). Bahsi geçen

durdurma noktası tarafından kontrol edilen bir diğ er yapı ise iğ ipliğ i mikrotübül yapısıdır. Mitoz evresini takiben gerç ekleş en sitokinez evresini tamamlayan hücre interfaz aş amasına girerek, yaş am dōngüs ünü devam ettirmektedir (Morgan, 2007). Hücre dōngüs ünün süresi her ne kadar hücre tipine göre farklılık gösterse de, birçok memeli hücresinde dōngü, 10-30 saatlik bir zaman dilimini kapsamaktadır. Hızlı çoğ alan embriyonik hücrelerin dışında, yetişkin hayvanlarda bazı hücreler (nōronlar veya çizgili kas hücreleri) bölünmeyi günler, haftalar hatta bazı durumlarda tüm yaşamları boyunca tamamıyla durdururken, bazıları da (fibroblast, karaciğ er, böbrek ve akciğ er hücreleri) nadiren sadece hücrede yaralanma ya da ölüm meydana geldiğ inde yerine yenisini koymak amacıyla bölünmektedir. Hücre dōngüs ünü G_1 fazında terk eden birinci gruptaki hücreler G_0 (dinlenme) evresindedir. G_0 hücreleri metabolik olarak aktif olmalarına rağ men, hücre dışından uygun bir sinyal almadıkları sürece bölünme yeteneklerini kaybetmiş lerdir (Lodish ve diğ ., 2000; Kumar ve diğ ., 2005).

2.1.1. Siklinler ve Siklin Bağımlı Kinazlar

Hücrelerin, hücre dōngüsüne girişi ve ilerleyişi, siklinler (CYC), siklin bağımlı kinazlar (CDK) ve siklin bağımlı kinaz inhibitörleri'nin (CKI) seviyeleri ve aktiviteleri tarafından kontrol edilmektedir (Vermeulen ve diğ ., 2003). Siklinlerin hücre dōngüs ünün özg ün fazlarında seviyeleri en üst noktaya çıkar, daha sonra hızla düş er ve hücre, dōngünün bir sonraki fazına geçer. CYC'ler fonksiyonlarını, hücre dōngüsünde G_1 -S- G_2 ve mitoz geçişi kontrol eden, CDK'lerle kompleks oluşturarak gerç ekleş tirir. CDK'ler hücre dōngüsü sırasında düzenli fakat inaktif formda üretilmiş olan siklin-bağımlı kinazların aktif formlarına dönüşmesi, siklinlere bağlanarak fosforlanmasıyla gerç ekleşmektedir. CYC ve CDK'lerin oluşturduğ u farklı kombinasyonlar hücre dōngüsü geçiş noktalarında rol almaktadır (Vermeulen ve diğ ., 2003).

Günümüzde memeli hücrelerinde, hücre dōngüs ünün düzenlenmesinde görev aldığ ı bilinen 16 tane siklin ve 11 tane siklin-bağımlı kinaz bulunmaktadır (Pines, 1995). Hücre büyüme sinyali aldığ ında, D tipi siklinler sentezlenir ve büyüme faktörleri olmadığ ında sentezi hemen durur. D tipi siklinlerin yarılanma ömrü yaklaşık 30 dakikalık kısa bir süreyi kapsamaktadır. Siklin D1, siklin D2 ve siklin D3 olmak üzere üç tipi bulunan siklin D proteinleri CDK4 ve CDK6'ya bağlanır. G_1 fazının erken

fazında siklin D'lerin, geç fazında ise siklin E'lerin sentezi uyarılmaktadır. Sentezi uyarılan siklin E'ler CDK 2'ye bağlanmaktadır. SiklinD/CDK4, siklinD/CDK6 ve siklinE/CDK2'nin bir araya gelmesiyle oluşan bileşik retinoblastom proteinini fosforile etmekte ve bu noktadan sonra hücre DNA sentezinin başladığı S fazına girmektedir. Hücre döngüsünün S fazından G₂ aşamasına geçişi siklin A seviyesindeki artış ile gerçekleşmektedir. siklin A, CDK1 ve CDK2 ile bağlanır. Oluşan siklinA/CDK2'nin fosforilasyonu ile G₂ aşamasına geçiş sağlanır. G₂ fazından M fazına geçiş G₂ fazında sentezlenen siklin B'nin CDK1 ile bağlanması ve siklinB/CDK1'in oluşturduğu kompleksin fosforlanıp aktifleşmesiyle gerçekleşmektedir. Daha sonra çeşitli proteinler mitoz sırasında devreye girer ve DNA replikasyonu, mitotik iğ oluşumu gözlenir ve ilgili siklinler *ubikuitin-proteozom* yoluyla ortamdan uzaklaştırılmaktadır (Sridhar ve diğ., 2006).

2.1.2. Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörleri

Hücre siklusunda CDK'lerin aktivitesini düzenlemeden sorumlu olan moleküller siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri (CKI) olarak adlandırılır. CKI seviyesinde meydana gelen değişiklikler normal hücre döngüsünü değiştireceğinden hücre yaşlanmasına ya da bazı tümörlerin oluşumuna neden olabilir (Vermeulen ve diğ., 2003). Güncel çalışmalar CKI'lerin birçok hücrenin farklılaşması, çoğalması ve apoptoza gitmesinin kontrolünde rol alabileceğini göstermiştir.

Siklin-CDK komplekslerinin aktivitesi CIP/KIP ve INK4 olarak adlandırılan iki inhibitör ailesi tarafından kontrol edilmektedir (Sherr ve Roberts, 1995). CIP/KIP ailesi, p21(WAF1, CIP1), p27(CIP2) ve p57'den (KIP2) oluşurken, INK4 ailesi p15 (INK4b), p16 (INK4a), p18(INK4c), ve p19'dan (INK4d), oluşur. INK4 ailesi G₁ fazında görev alan CDK'leri (CDK4 ve CDK6) inaktive eder. Bu inhibitörler siklin bağımlı kinazlarla birleşerek bu enzimlerin siklin D ile kompleks oluşturmasını engeller (Carnero ve Hannon, 1998). İkinci aileyi oluşturan inhibitörler ise CDK-siklin komplekslerini inaktive eder (Polyak ve diğ., 1994; Harper ve diğ., 1995; Lee ve diğ., 1995). p21'in transkripsiyonel aktivitesi p53-bağımlı (hücre döngüsü ve durdurulması) veya p53-bağımsız (hücre farklılaşması) mekanizmalar ile düzenlenir (Baccini ve diğ., 2001). Nükleer bir fosfoprotein olan p53, hücre döngüsünün düzenlenmesinde hayati bir önem

taşır. Çok sayıda genin ekspresyonunu negatif ya da pozitif yönde düzenleyebilen stres tetikli bir transkripsiyon faktörü olan p53, insanlarda görülen tümörlerin yaklaşık % 50'sinde mutasyona uğramıştır. p53 DNA hasarı, onkogen aktivasyonu ve hipoksiya gibi hücrede stres oluşturan çeşitli koşullara karşı oluşturulan cevapta aktive edilir. p53 transkripsiyonel programın aktive edilmesiyle hasarlı DNA ya da mitoz sonrası anormal kromozom paylaşımına sahip hücrelerin yaşaması engellenmiş olur. p53 zarar görmüş/stresli hücrelerde bu koruyucu etkisini hücre döngüsünü durdurmak ya da programlı hücre ölümünü tetiklemek yoluyla gerçekleştirir (Kumar ve diğ., 2005; McPherson ve diğ., 2007). p53-bağımlı gerçekleşen apoptoz mekanizmaları henüz tam olarak açıklık kazanmamasına rağmen, bu protein üzerinden işleyen hücre döngüsü inhibisyonunun CDK inhibitörü p21 tarafından düzenlendiği bilinmektedir (Gartel ve Tyner, 2002). Herhangi bir DNA hasarına karşı oluşan cevapta hücrenin, döngüyü durdurma ya da apoptoza gitme yollarından hangisini seçeceğine nasıl karar verdiğine dair kesin bir bilgi olmamasına karşın, birçok çalışmada yüksek miktarlardaki p21'in transkripsiyonunun, p53-bağımlı apoptozu inhibe ettiği gösterilmiştir (Gartel ve Tyner, 2002).

Hücrede DNA hasarı meydana geldiği zaman p53 miktarı hücre içinde artmaya başlar ve p21 gen promotörünün p53-bağlayıcı bölgesine bağlanarak p21 geninin transkripsiyonel olarak aktif olmasını sağlar. C-ucu ve N-ucu olmak üzere iki temel işlevsel parçası olan p21 proteini, C-ucu parçası ile DNA replikasyonu ve onarımında görev alan PCNA (çoğalan hücre nükleus antijeni) proteini ile ilişkiye girerken, N-ucu parçası ile CDK-siklin kompleksi ile bağlantı kurmaktadır. p21 hücre döngüsünü ya PCNA ile ya da çeşitli siklin kompleksleriyle bağlantı kurarak durdurmaktadır (Fang ve diğ., 1999, Johnson ve Walker, 1999). p21 normal bölünmekte olan hücrelerde düşük seviyede eksprese edilmekte ve transkripsiyonu p53 bağımlı veya birçok sinyal yolu ve transkripsiyon faktörleri aracılığı ile p53-bağımsız yolla gerçekleşebilmektedir (Hirsch ve Bonham, 2004).

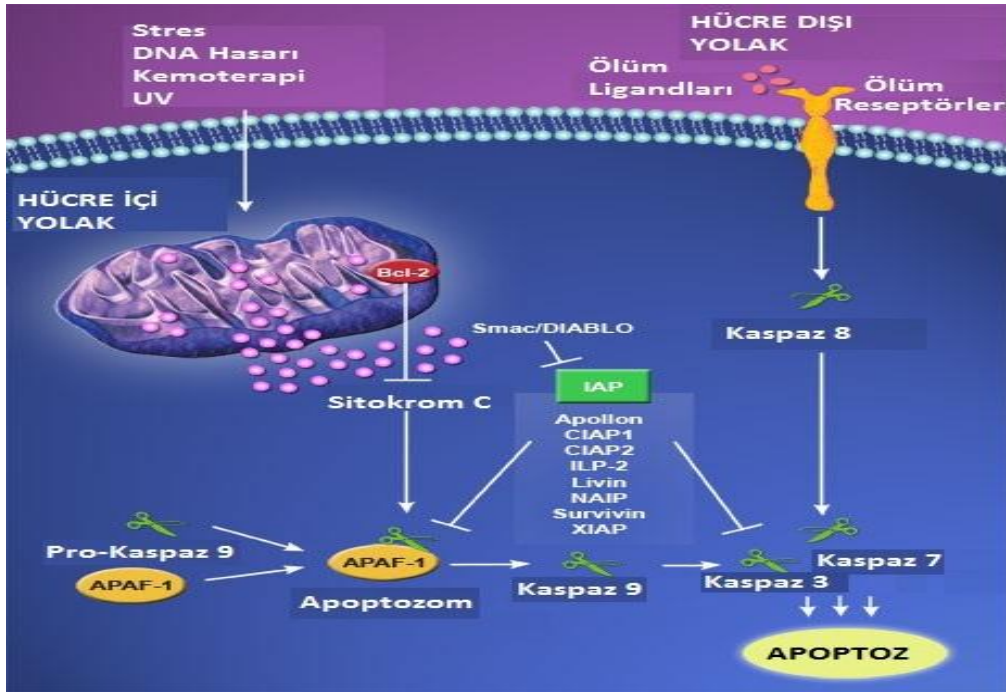
2.2. APOPTOTİK HÜCRE ÖLÜMÜ

Tek ve çok hücreli canlılarda yaşam, doğum, büyüme, üreme, yaşlanma ve ölüm olmak üzere dört temel aşamadan oluşmaktadır. Organizmaların temel canlılık birimi olan

hücrelerin gereksinimleri karşılanmadığı zaman, yaşamsal faaliyetleri geri dönüşümsüz olarak durur ve hücre ölümü gerçekleşir. Yaşamın düzenli bir şekilde devam etmesi için canlıyı oluşturan hücrelerin sayısal dengesi önemli olduğundan, hücre çoğalması ve ölümü arasındaki sabit dengenin korunması hayati bir önem taşımaktadır. Kerr ve arkadaşları (1972) nekroz ve apoptoz olmak üzere iki ölüm tipi tanımlamıştır.

Apoptoz, çok hücreli organizmalarda işlevini yerine getiremeyen, organizma için yabancı ya da metabolizması bozulmuş hücrelerin, yine hücrenin kendisi tarafından programlanmış bir mekanizma vasıtasıyla, ortadan kaldırılmasıdır (Sastry ve Rao, 2000). Birbirini takip eden olaylar serisinden oluşan apoptoz, oldukça karmaşık bir süreç olup, nükleus ve sitoplazmada meydana gelen biyokimyasal ve morfolojik değişikliklerle karakterize edilmektedir. Viral enfeksiyonlar, iyonize radyasyon ve kemoterapiyi içeren travmatik ajanlar vasıtasıyla gerçekleşen hücrel lezyonlar, hipoksi, genetik faktörler ya da büyüme faktörü eksikliği apoptozun tetiklenmesine neden olan başlıca etmenlerdir. Memelilerde apoptotik hücre yolağı, hücre dışı yolak (TNF reseptör ailesinin alt grubu olan ölüm reseptörleri) ve hücre içi yolak (Bcl-2 ailesi üyeleri tarafından kontrol edilen) olmak üzere iki farklı mekanizma ile düzenlenir (Marsden ve Strasser, 2003). Başlatma modlarındaki farklılığa rağmen, her iki yolak da kaspaz ailesi üyesi olan proteolitik enzimlerin aktivasyonuna yol açtığından, birbiri ile keşismektedir. Hücre dışı yolakta (reseptör aracılı yolak) ölüm, ölüm reseptörleri olan TNF reseptör süper ailesinin belli üyelerinin (Fas, TNFR1, ölüm reseptörü DR1, DR3 ve DR5) teşviki ile başlar (Sprick ve Walczak, 2002). Fas, trimerik Fas ligandına bağlanarak sitosolik bir protein olan FADD'ı (Fas ilişkili ölüm kısmı) aktive eder. Bu aktivasyon, Fas reseptörünün hücre içinde kalan ölüm kısmı ile FADD'ın C ucu ölüm kısmı arasındaki homotipik etkileşim aracılığıyla olur (Boldin ve diğ., 1995; Chinnaiyan ve diğ., 1995). Aktive olan FADD, reseptör aracılığıyla tetiklenen yolakta, apoptotik sinyal akışını başlatan kaspaz 8'i uyarır (Krammer, 2000). Kaspaz 8 ve FADD ölüm reseptörü ile tetiklenen yolakta rol oynayan temel moleküllerdir (Yeh ve diğ., 1998; Zhang ve Bieker, 1998). Hücre içi yolak oksijen yetersizliği, büyüme faktörü eksikliği ve sitotoksik ajanlar gibi hücrel strese sebep olan çeşitli faktörler tarafından tetiklenebilir. Bu yolağın merkezinde, hücre içi kaspaz-9'u aktive eden bileşik olan apoptozom oluşumu yatar. Sonlandırıcı bir sinyal ya da hücre içi bir değişiklik mitokondriden sitozole sitokrom c gibi mitokondriyal bir enzimin salınmasına neden

olur. Sitokrom c, dATP varlığında Apaf-1'i uyararak prokaspaz'ın aktivasyonunu sağlar. Mitokondriyal yolda kaspaz akışını başlatan enzim olarak bilinen kaspaz 9'un aktifleşmesi ise, icracı kaspazları uyarır ve böylece apoptotik ölüm sonuçlandırılmış olur. Ölüm reseptörü ile tetiklenen yolak doğrudan kaspaz aktivasyonuna neden olmasına karşın, hücre içi ya da stres-tetikli apoptoz yolağında kaspaz aktivasyonu pro ya da antiapoptotik proteinlerinin (BCL-2 ailesini kapsayan) oluşturduğu ağ kompleksine tabidir (Martin ve Elkon, 2004) (Şekil: 2.2).



Şekil 2.2: Hücre ölüm reseptörleri aracılığıyla etkisini meydana getiren hücre dışı sinyallerle tetiklenen hücre dışı ve mitokondri aracılığıyla gerçekleşen hücre içi apoptotik yolak gösterilmektedir (www.imgenex.com/.../LivinorSurvivin_forweb.htm).

Memelilerde hücrenin çeşitli yerlerine yerleşmiş, farklı işlevlere sahip, BCL-2 ailesine ait en az 20 üye bilinmektedir. Ailenin kurucu üyesi olan BCL-2, ilk olarak B-hücre lenfomalarında keşfedilmiştir (McDonnell ve diğ., 1989). Bu aileye ait tüm üyeler çeşitli pro ya da antiapoptotik proteinlerle etkileşime girmelerine izin veren bir ya da daha fazla Bcl-2 homoloji (BH) kısımlarına sahip olup, yapı ve işlevleri bakımından birbirleriyle etkileşim halinde olan 3 gruba ayrılır. Birinci grup Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 ve A1'i içerir ve bu proteinler hücreleri, büyüme faktör eksikliği, radyasyon (UV ve gamma) ve kemoterapi gibi ölüm tetikleyicilere karşı korur. Bu gruba ait proteinler

mitokondri dış zarının geçirgenliğini azaltarak, sitokrom c gibi mitokondriyal proteinlerin sitozole geçmesine mani olarak, hücrenin apoptoza gitmesini engellemektedir. Bax, Bak ve Bok proteinlerini içeren ikinci BCL-2 grubu, yapısal olarak BCL-2'ye benzerlik gösterir (BCL-2 gibi 3 BH kısmı içerir) ve apoptozu teşvik etmektedir. İkinci gruba ait proteinler, apoptozu teşvik etme işlevlerini, mitokondri ya da diğer membranların geçirgenliğini değiştirip, proapoptotik araçların salınmasını sağlayarak başarır. Son grup olan BH3 proteinleri proapoptotik proteinler olup Bid, Bad, Bik, Bim, Bmf, Hrk, Noxa ve Puma üyelerine sahiptir ve BCL-2 ailesinin koruyucu etkilerine zıt etkiler meydana getirir. Bazı BH3 proteinleri apoptozda hücreler için nöbetçi görevi üstlenirken diğerleri doğrudan apoptozu aktive etmede görev almaktadır (Danial ve diğ., 2003). BH 3 üyeleri çeşitli organellerde nöbetçi gibi hareket edip, ölüm ya da sağkalım sinyallerine uyum sağlar ve Bax/Bak tetikli apoptozu kolaylaştırmaktadır. Pro ve anti apoptotik proteinler arasındaki denge ya da etkileşimler hücrenin yaşayıp yaşamayacağını belirlemeye yardım etmektedir (Gross, 1999).

Senkronize şekilde apoptoza gitmesi için tetiklenmiş hücrelerin sitozolik ekstratlarında yapılan çok sayıdaki çalışma, apoptozun neden olduğu biyokimyasal ve morfolojik değişikliklerin hücrenin plazma zarı, sitoplazması ve nukleusu gibi tüm unsurlarını etkilediğini ortaya koymuştur (Lazebnik ve diğ., 1993). Nukleusta gözlenen başlıca değişiklikler apoptotik hücre ölümünün en belirgin özellikleri olan kromatin yoğunlaşması, DNA'nın endonukleazlar aracılığıyla yaklaşık 180-200 baz çiftlik parçalara ayrılması ve yoğunlaşmış kromatinin nukleus zarına doğru göç etmesidir. Apoptotik hücrelerde sitoplazma büzüşmüş ve eozinifilik bir görünüm almıştır. Bu hücrelerin sitoplazmik organellerinde aşırı bir hasar gözlenmemesine karşın, normal fizyolojik koşullardaki morfolojilerinde de olmadığı saptanmıştır. İç zarda pH kaybı, matriksin osmotik olarak şişmesi, dış zarın bozulması ve zarlar arasındaki bölgeden proapoptotik proteinlerin salınması, apoptotik hücrelerin mitokondrilerine ait başlıca değişikliklerdir (Saraste ve Pulkki, 1999).

Apoptotik hücrelerde gözlenen en belirgin biyokimyasal değişiklik, hızla RNA ve protein sentezinin azaltılmasıdır (Cohen, 1993). Normal fizyolojik şartlar altında hücre zarının iç ve dış zarındaki fosfolipitler asimetric dağılmışlardır. Ancak normal şartlarda hücre zarının iç kısmında lokalize olmuş fosfatidilserinin hücre dış zar yüzeyindeki

proteinlere bağlanması ile bu asimetri bozulur ve apoptotik hücre, komşu hücrelerin makrofajları tarafından tanınır hale gelir. Fosfotidil reseptörleri taşıyan komşu makrofajlar apoptotik hücreleri içine alırlar ve bu yolla dokuyu apoptotik cisimlerden temizlemiş olurlar. Sürecin başından sonuna kadar, hücre zarı parçalanmayıp, hücre içi bileşenler dışarı sızmadığı için inflamasyon oluşmaz (Fiers ve diğ., 1999).

2.2.1. Kaspazlar ve Aktivasyon Yolakları

Gelişim ve doku homeostazı için hayati önem taşıyan apoptoz süreci evrimsel olarak iyi korunmuş bir programla kontrol edilir (Nunez ve diğ., 1998). Farklı organizmaların apoptotik hücrelerinde benzer morfolojik özelliklerin gözlenmesi, hücre işletiminin ortak bir mekanizma tarafından tetikleniyor olabileceğini öne sürer. Nematod bir kurt olan *Caenorhabditis elegans*'da yapılan genetik analizler sonucunda hücre ölüm süreci için gerekli olan ve *Ced-3* ve *Ced-4* olarak adlandırılan iki gen tanımlanmıştır (Yuan ve Horvitz, 1992; Yuan ve diğ., 1993). Memelilerde de homoloğu bulunan ve bir proteazı kodlayan *Ced-3* geninin klonlanması ile sistein proteazların hücre ölüm mekanizmasının önemli bileşenleri olduğu gösterilmiştir (Yuan ve diğ., 1993). İnterlökin 1- β dönüştürücü enzim (ICE) memelilerde tanımlanan ilk *Ced 3* homoloğudur.

Günümüzde memelilerde birçok *Ced 3* homoloğu tanımlanmış ve bunlardan en az 14 tanesinin kaspaz ailesine ait olduğu ortaya konmuştur. Memelilerde tespit edilen başlıca kaspazlar; kaspaz-I (ICE), kaspaz-2 (ICH-1), kaspaz 3 (CPP 32), kaspaz 4 (TX, ICH-2, ICERel-II), kaspaz 5 (ICERel-III), kaspaz 6 (Mch2), kaspaz 7 (mch3, ICE-LAP3, CMH-1), kaspaz 8 (MACH, FLICE, Mhc5), kaspaz 9 (ICE-LAP6, Mhc6), kaspaz 10 (Mhc-4, FLICE2), kaspaz 11 (IHC-3), kaspaz 12, kaspaz 13 (ERICE) ve kaspaz 14'tür. Kaspazlar yapı ve işlevlerine göre üç alt gruba ayrılır. Birinci gruba ait olanlar (kaspaz -1, -4, -5, -11, 14) inflamasyon yanıtında, ikinci (kaspaz -2, -3, -7) ve üçüncü (kaspaz -6, -8, -9 ve -10) gruba ait kaspazlar genel olarak apoptotik hücre ölümünden sorumludur (Shi, 2002).

Kaspazlar hücrelerde dört ayrı kısımdan oluşan inaktif öncülerinden sentezlenir. Aktif olmayan öncül kaspazların başlıca kısımları şunlardır: çeşitli boyutlardaki bir amino ucu (N ucu polipeptid ya da pro kısım olarak adlandırılır), bir büyük alt birim, bir küçük

alt birim, büyük ve küçük alt birimler arasındaki Asp ile sağlanan bağlayıcı bölge (Nicholson ve Thornberry, 1997). Kaspazlar, kendini oluşturan pro ve bağlayıcı bölgelerin proteolitik kesimle uzaklaştırılması sonucu, aktif formlarına dönüşürler. Memeli hücre ölüm proteazları olan kaspazlar, proteolitik kaspaz yolağında aktif olan bölgeleri baz alınarak, başlatıcı (kaspaz-2, -8, -9, 10) ve icracı kaspazlar (kaspaz-3,-6,-7) olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Başlatıcı kaspazlar öncül kaspaz molekülünün özgün aktivatörleri ile bağlanmasını sağlayan uzun ön zincirlere (>90 amino asit) sahipken, icracı kaspazlar sadece 20-30 bakiyelik bir zincire sahiptir. Kaspaz 3 ve kaspaz 7 gibi icracı kaspazların aktivasyonu, kaspaz 9 gibi başlatıcı bir kaspaz aracılığıyla mümkün olurken, başlatıcı kaspazların aktivasyonu apoptotik koşullar altında otoaktivasyonla gerçekleşir (Shi, 2005).

2.2.2. Kaspaz 3

Kaspaz-3 ve kaspaz-8 apoptotik sinyal akışında anahtar rol oynayan temel moleküllerdir (Varfolomeev ve diğ., 1998). 32 kDa ağırlığındaki bir proenzimin parçalanmasıyla ortaya çıkan aktif kaspaz-3, apoptotik ölümün gerçekleşmesini sağlayan esas kaspazdır. Aktif hale geçmiş olan kaspaz-3, diğer kaspazları keserek onları uyarmasının yanı sıra DNA tamir mekanizmasında yer alan enzim ve moleküllerin parçalanmasında da rol alır. Kaspaz -3'ün hücrel substratları arasında gelsolin (F aktini depolimerize ederek, hücre membranının altında bulunan hücre membranının dayanıklılığı koruyan bir molekül) ve PARP (serbest DNA uçlarını tanıyarak, DNA'nın onarılmasında görev alan bir molekül) sayılabilir (Kothakota ve diğ., 1997; Earnshaw ve diğ., 1999). Hücrel substratların aktif kaspaz-3 tarafından parçalanması sonucu, hücre membranında çıkıntılar oluşması ve DNA'nın parçalara ayrılması gibi apoptoza özgü özellikler gözlenir. Başlatıcı ve icracı kaspazlar, hücrelerde apoptozun belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan hedeflerdir. Özgün antikolar veya floresan ile konjuge edilmiş antikolarla kaspazların aktif formları belirlenebilmektedir.

2.3. TRANSLASYON SONRASI HİSTON MODİFİKASYONLARI VE GEN EKSPRESYONUNUN DÜZENLENMESİ

Kromatinin organizasyonu gen ekspresyonunun düzenlenmesi için hayati önem taşır. Özellikle de ökaryotik kromatini meydana getiren tekrarlayan temel birimler olan

nukleozomların yerleşimi ve özellikleri hücre içi ya da hücre dışı sinyallere karşı oluşan cevapta promotör özgün transkripsiyonu etkiler (Grunstein, 1997). Tipik bir nükleozom, özdeş H2A, H2B, H3 ve H4 histonlarından birer kopya içeren sekiz histonluk bir oktomer ve bu oktomerin etrafına sarılmış yaklaşık 146 DNA baz çiftinden oluşur (Conley ve diğ., 2006). DNA'nın paketlenmesi ve kromatinin yapısında meydana gelen değişimler gen ekspresyonu için kilit noktalar olup, hücre fonksiyonunun düzgün işleyişini, farklılaşmasını ve çoğalmasını etkiler (Drummond ve diğ., 2004). Fizyolojik koşullar altında nukleozomun bileşenleri olan histonların N-ucu kuyrukları, lizin bakiyeleri bakımından zengin olup, pozitif yüklüdür (Timmermann ve diğ., 2001). Pozitif yüklü bu proteinler, nukleozomun diğer bileşeni olan negatif yüklü DNA omurgasına sıkı bir şekilde bağlanmışlardır. Bu bağlanma kromatinin yüksek düzeyde katlanmasına yol açarak, kromatine sıkı bir yapı kazandırır. Kromatinin “kapalı” yapısı transkripsiyon faktörlerinin, transkripsiyon düzenleyici komplekslerin ve RNA polimerazların DNA'ya geçişlerini engeller ve transkripsiyonel olarak aktif olmayan bir kromatin oluşmasına neden olur (Hansen ve diğ., 1998; Nightingale ve diğ., 1998; Tse ve diğ., 1998; Walia ve diğ., 1998).

Asetilasyon özdeş histonların N-ucu kuyruk bölgeleri arasındaki lizin bakiyeleri arasında oluşur. Histon asetiltransferazlar (HATs), asetil gruplarını (CH₃CO), asetil koenzim A'dan, özdeş histonlar arasında yer alan lizin bakiyelerinin ε-amino grupları üzerine transfer eder (Gennaro ve diğ., 2004). Histonlardaki lizin bakiyelerinin pozitif yüklerinin asetil grupları tarafından nötralize edilmesi ile histonların DNA ile olan ilişkisi kopmakta ve kromatin daha açık bir yapıya kavuşmaktadır. Böylece aktif gen transkripsiyonu için, gerekli olan transkripsiyon faktörlerinin nukleozomal DNA'ya geçmesinin yolu açılmış olur (Grunstein, 1997). Bu etki histon deasetilaz (HDAC) enzimlerinin özdeş histonların amino uçlarının pozitif yük kazanmalarını sağlayıp, DNA'nın histonlarla olan etkileşimi arttırması ile engellenir. Histon asetilasyon seviyesi histon asetil transferaz ve deasetilazların oluşturduğu iki enzim ailesinin geri dönüşümlü ve birbirine zıt hareket eden aktivitesiyle düzenlenmektedir (Yoshida ve diğ., 2001). Bu iki enzim sınıfının aktiviteleri arasındaki denge, normal hücre çoğalması için oldukça önemlidir ve bu dengenin bozulması karsinogeneze yol açabilmektedir (Timmermann ve diğ., 2001).

Epigenetik değişiklikler fenotipte meydana gelen, geri dönüşümlü, genlerin nükleotid dizilimindeki değişikliklerden kaynaklanmayan ve hücre bölünmesi ile sonraki kuşağa aktarılabilen farklılaşmalardır (Santini ve diğ., 2007). Bu değişiklikler, transkripsiyon düzenlenmesinde rolü olan DNA ve/veya bu sürece katılan ilgili proteinlerin modifikasyonlarını içerdiğinden yeni bir genetik bilgi içermez. Histon asetilasyonu ve DNA metilasyonu memelilerde en iyi tanımlanmış iki epigenetik değişikliktir (Strahl ve Allis, 2000; Klose ve Bird, 2006). Hücrenin fizyolojik durumu, çevresel sinyaller gibi hücrenin içinde bulunduğu çevre, histon kodlarının geçici olarak değişmesine neden olur. Hücre farklılaşması, çoğalması ve sağkalımına katılan genlerin transkripsiyonunun kontrolünü yapan epigenetik mekanizmalar malignazi gelişiminin en açık hedeflerinden birisidir (Ellis ve diğ., 2009). Epigenetik modifikasyonların değişmesi, kanser (Esteller, 2007) dahil birçok hastalıkta gözlenir ve epigenetik düzenlenmenin bozulmasının ilk dönüştürücü olay olabileceğine dair kanıtlar vardır (Feinberg, 2005). Bu kanıtlar, epigenetik değişikliklerin hücrenel homeostazının kaybındaki erken olaylar olduğunu ve bazı durumlarda genetik mutasyonlara ve genomik kararsızlığa öncülük edebileceğini ileri sürer.

2.3.1. Histon Deasetilaz Enzimleri (HDAC)

Histon deasetilaz enzimleri, genellikle transkripsiyonel baskılamada görev alarak, kromatinin yeniden şekillendirilmesinde önemli rol oynar. Memelilerde, bir maya olan *Saccharomyces cerevisiae*'nin HDAC enzimleri olan Rpd3, Hda1 ve Sir2 ile homoloji gösteren ve üç sınıfa ayrılan 18 üyelik bir histon deasetilaz ailesi tanımlanmıştır (De Ruijter ve diğ., 2002; Blander ve Guarente, 2004; Marks ve diğ., 2004). Bu ailenin 11 üyesini bulduran Tip I ve Tip II HDAC'ler "klasik HDAC'ler" olarak adlandırılırken; kalan 7 üyeyi içeren Tip III HDAC'ler "sirtuinler" olarak bilinmektedir.

Maya transkripsiyon düzenleyici geni Rpd3 ile homoloji gösteren, Tip 1 deasetilazlar 350-500 aminoasit uzunluğunda olup, HDAC-1, -2, -3, -8, ve -11 üyelerini içerir (Santini ve diğ., 2007). Birçok hücre tipinde eksprese edilebilen bu enzimler nukleusta bulunup hücre döngüsünün ilerlemesini düzenler. Maya Hda1 geni ile homoloji gösteren Tip II deasetilazlar 1000 aminoasit uzunluğunda olup HDAC-4, -5, -6, -7, -9, -10 üyelerini içerir (Leipe ve Landsman, 1997; De Rujiter ve diğ., 2002; Grozinger ve Schreiber, 2002). Tip II deasetilazlar uzun N-ucu kısmı ya da ikinci katalitik bölgeye

sahip olmaları bakımından, diğer sınıflardan farklılık gösterir. Bu enzim sınıfına ait üyeler hücre dışı sinyallere cevaben sitoplazma ve nukleus arasında mekik dokumaktadır. Tip II deasetilazların daha çok hücre olgunlaşması ve farklılaşması ile ilgili olduğu görünmesine karşın, Tip II deasetilazlardan biri olan HDAC6'nın son zamanlarda sitoplazmik bir protein olan beta-tubulinin deasetilasyonunu katalizlediği gösterilmiştir (Hubbert ve diğ., 2002; Zhang ve diğ., 2003). Histon olmayan sitoplazmik proteinlerin deasetilasyonunun katalizi Tip II HDAC sınıfına özgü ayrı bir özellik olarak görünmektedir.

Maya Sir2 proteinleri'nin homologlarını taşıyan Tip III HDAC'lerin yapısal olarak insan Tip I ve Tip II HDAC'lerle ilişkisi yoktur. Tip III HDAC'ler klinikte kullanılan HDACI'larla inhibe edilemez. Sirtuinler, deasetilaz aktivitesi için Tip I ve Tip II HDAC'ler tarafından kullanılan Zn bağımlı mekanizmanın aksine; nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) kullanmaktadır. Tip I ve Tip II HDAC enzimleri kısa zincirli yağ asitleri ve hidrokisamid asitler ile inhibe edilebilirken; Tip III HDAC enzimleri bu tür ajanlar ile inhibe edilemez (Richon ve O'Brien, 2002; Vigushin ve Coombes, 2002).

Tablo 2.1: Histon deasetilaz enzimleri

Tip	Enzim	Homoloji	Katalitik Parça	Deasetilaz Aktivasyon Mekanizması	Yerleşimi
I	HDAC 1, 2, 8	RPD 3	1	Zn Bağımlı	Nükleus
	HDAC 3		1	Zn Bağımlı	Nükleo-sitoplazmik
	HDAC 11		1	Zn Bağımlı	Nükleo-sitoplazmik
II	HDAC 4, 5, 7, 9, 10	HDA1	1	Zn Bağımlı	Nükleo-sitoplazmik
	HDAC 6		2	Zn Bağımlı	Sitoplazma
III	SIRT 1-7	SIR2	1	NAD Bağımlı	Sitoplazma

2.3.2. Histon Deasetilaz İnhibitörleri (HDACI)

Histon deasetilaz inhibitörleri, histon ve histon olmayan proteinlerin işlevlerini ve dolayısıyla gen transkripsiyonunu düzenleyerek, histon asetilasyonunu arttıran ve bu yolla kromatinin daha açık bir yapıya kazanmasına neden olan çeşitli ajanlardır.

Günümüzde yapısal farklılıkları dolayısıyla engelleyici potansiyelleri birbirinden farklı olan 6 sınıf HDACI tanımlanmıştır (Curtin ve Glaser, 2003; Miller ve diğ., 2003; Yoshida ve diğ., 2003; Marks ve diğ., 2004). Bunlar;

Kısa Zincirli Yağ Asitleri: Sodyum bütirat, Sodyum fenilbütirat, VPA, Pivaloiloksimetil bütirat, AN-9.

Hidroksamik Asitler: TSA, Suberoilanilid hidroksamik asit (SAHA), Piroksiamid, Propenamidler, Aroil pirrolil hidroksiamidler, Oksamflatin, ABHA, Skriptaid (SB-556629).

Epoksiketon İçeren SiklikTetrapeptidler: Trapoksinler, 2-Amino-8-okso-9, 10-epoksidekanoik asit AOE.

Epoksiketon İçermeyen Siklik Tetrapeptidler: FK 228, Apicidin, Depsipeptid.

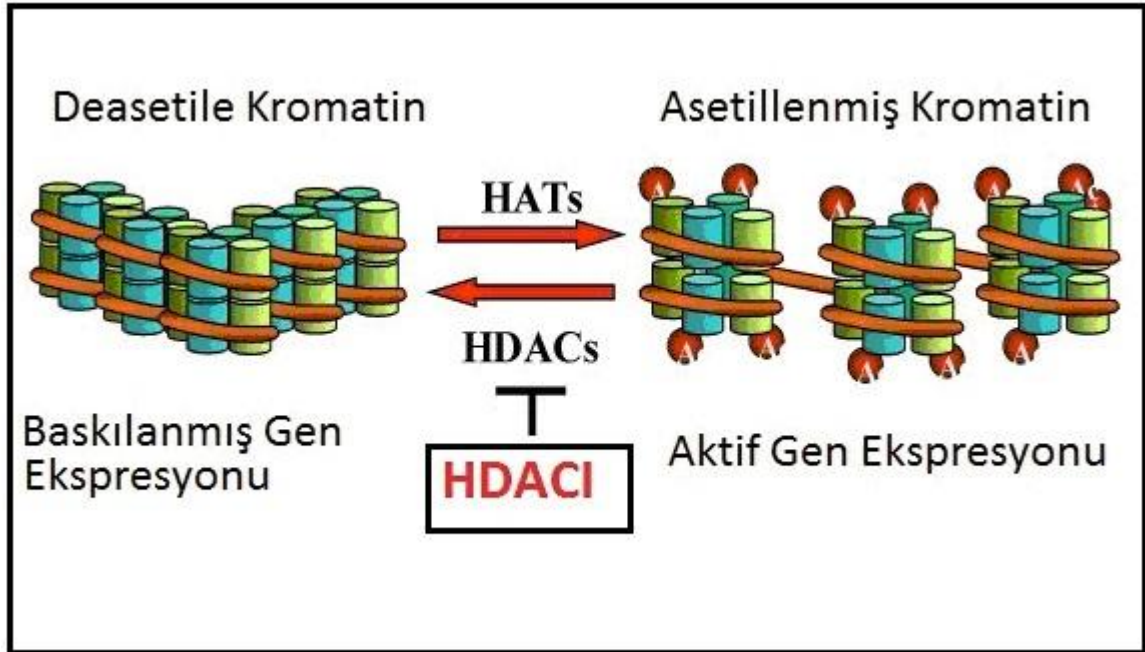
Benzamidler: MS-275, CI-994, MGCD103.

Hibrid Moleküller: CHAP31, CHAP50.

HDACI'lar, birçok transforme ya da kanser hücre tipinde nukleozomal histonların hiperasetilasyonunu tetikleyerek, baskılanmış genlerin yeniden aktif hale gelmesini sağlar (Marks ve diğ., 2001; Johnstone ve Licht, 2003) (Şekil: 2.3). Birçok kanser tipinde baskılanmış olan bu genler fizyolojik şartlarda apoptozu ve farklılaşmayı tetikleyerek, hücre döngüsünün G1 ve G2 fazında durmasına neden olup, hücre çoğalmasını inhibe ederler. Antitümör aktiviteye sahip HDACI'ların en çok dikkat çeken özelliklerinden birisi, HDAC inhibisyonu ile oluşan asetilasyonun sadece belli genlerin transkripsiyonunu aktive etmesi ve bu yolla tümör büyümesini inhibe etmesidir. Hücre siklusu kinaz inhibitörü olan p21^{WAF1} geni, ekspresyonu en çok uyarılmış genlerden birisidir (Blagosklonny ve diğ., 2002). HDACI'larla muamele sonucu p21'in promotör bölgesinde bulunan H3 ve H4 histonların asetilasyonu, p21 geninin ekspresyonun artması ile sonuçlanır (Gui ve diğ., 2004). HDACI'lar, fizyolojik koşullarda DNA hasarı ya da DNA tamir hataları gibi apoptotik sinyallere karşı duyarlı olmasına karşın, kanserde bu özelliğini yitiren hücrelerde engellenmiş ya da baskılanmış apoptotik yolların tekrar aktive edilmesini sağlayabilir.

HDACI'ların antitümöral özellikleri arasında, tümöre kan sağlama, metastatik potansiyel ve konak immun cevabı gibi daha sistemik etkiler de bulunur (Walkinshaw ve Yan, 2008). HDACI'lar VEGF (vaskuloendotelial büyüme faktörü) gibi pro-

anjiojenik faktörlerin ekspresyonunu baskılayarak ve endotelial hücrelerin anjiogenik teşvike duyarlılığını azaltarak anjiyogenezi engellemektedir (Deroanne ve diğ., 2002; Bolden ve diğ., 2006). HDACI'lar, tümör büyümesi için önemli olan yeni kan damarlarının oluşumunun engellenmesine ek olarak matriks metalloproteinaz enzimlerinin ekspresyonunu da inhibe eder. Matriks metalloproteinazlar tümörlerin etrafını saran bazal membranı yıkar, bu da metastazın başlamasında oldukça önemli bir adımdır (Bolden ve diğ., 2006). Bununla beraber HDACI'ların konak immun cevabını teşvik etmesiyle, tümör hücreleri immun sistem tarafından yıkılmaya daha duyarlı hale gelebilir (Johnstone, 2002). Tüm bu veriler göz önüne alındığında, HDACI'ların kanserin başlangıcı ve gelişimindeki çeşitli hücresel ve fizyolojik süreçlerde etkin bir role sahip olduğu görülür.



Şekil 2.3: HDAC inhibitörleri etki mekanizmalarının şematik gösterimi. HAT enzimleri asetil gruplarını lizin bakiyelerine aktararak açık ve transkripsiyonel olarak aktif bir kromatin yapısı meydana getirir. HDAC enzimleri ise lizin bakiyelerinden asetil gruplarını uzaklaştırarak, transkripsiyonel olarak aktif olmayan bir kromatin yapısı meydana getirir (Gillet ve diğ., 2007).

2.4. TRİKOSTATİN A

TSA *Streptomyces hygroscopicus*'den elde edilmiş doğal bir ürün olup, başlangıçta yalnızca antifungal etki gösteren bir antibiyotik olarak kullanılmasına karşın sonradan güçlü, özgün ve geri dönüşümlü bir histon deasetilaz inhibitörü olarak tanımlanmış ve kullanılmaya başlanmıştır (Tsuji ve diğ., 1976). Histon deasetilaz inhibitörlerinin hidroksamik asitler sınıfına dahil olan TSA memelilerde sınıf I ve sınıf II HDAC'leri

seçici bir şekilde inhibe ederken, aynı etkiyi sınıf III deasetilazlar üzerinde göstermez. Histon deasetilazların TSA tarafından inhibe edilmesi farklılaşma ve apoptozun tetiklenmesi ya da transkripsiyonun değişmesi gibi geniş spektrumlu epigenetik etkiler meydana getirmektedir (Yoshida ve diğ., 1995). TSA meme, prostat, kolon, mide ve hepatoma kanser hücre soyunda proliferasyonu engeller ve apoptozu tetikler (Mcbain ve diğ., 1997; Saito ve diğ., 1999; Eickhoff ve diğ., 2000; Suzuki ve diğ., 2000). TSA'nın en önemli etkilerinden bir tanesi uzun süreli büyüme inhibisyonu ve memelilerde hücre döngüsünü G1 fazında durdurmasıdır (Yoshida ve diğ., 1995). Bu özelliğinden dolayı TSA kanser tedavisinde kullanılabilecek muhtemel adaylardan biri olarak kabul edilir. TSA'nın etkisi ile ilgili öne sürülen muhtemel mekanizmalardan bir tanesi TSA'nın apoptozla ilişkili genlerin ekspresyonunu teşvik edip, bu yolla kanserin ilerlemesini yavaşlattığıdır. Diğer etki mekanizması ise hücre farklılaşmasının tetiklenmesi ve bu yolla tümörlerde bulunan bazı farklılaşmamış hücrelerin olgunlaşmasını sağlamaktır.

Histon deasetilaz inhibitörleri histon olmayan icracı moleküller üzerinde de birçok etkiye sahip olduğundan günümüzde HDACI'larının antikanser mekanizması tam olarak anlaşılammıştır. HDACI'lar epigenetik değişikliklere neden olmaları sebebiyle, kanserin yanı sıra çeşitli hastalıkların tedavisi için popüler ilaç hedefleri haline gelmiştir. Nörodejeneratif hastalıklarda deasetilasyon düzeyinin arttığının gösterilmesi üzerine, bu hastalık grubunun tedavisinde de HDAC inhibisyonunun etkili olabileceği düşünülmüştür (Sama ve diğ., 2009). TSA'nın C6 glioma hücrelerinde apoptozu tetiklediği gösterilmiştir (Hsu ve diğ., 2011).

2.5. VALPROİK ASİT

Kısa zincirli bir yağ asidi olan Valproik asit (VPA, 2-propilpentanoik asit), ilk olarak *Valeriana officinalis*'den elde edilen valereik asitin analogu olarak sentez edilmiştir. Klinikte uzun yıllar tüm epilepsi nöbet tiplerine karşı geniş spektrumlu bir ilaç olarak kullanılmasının yanı sıra, son zamanlarda HDAC'leri inhibe edebildiğinin anlaşılmasıyla farklı alanlarda da kullanılmaya başlanmıştır (Göttlicher ve diğ., 2001; Phiel ve diğ., 2001).

VPA; hem tip I hem de tip II (HDAC-6 ve HDAC- 10 hariç) HDAC'leri inhibe etmekte ve histonların (H3 ve H4) hiperasetilasyonuna neden olmaktadır (Gottlicher ve diğ., 2001). VPA ile muamele edilen hücrelerde, CDKI p21^{CIP1}, glikojen sentaz kinaz-3 β ve peroksizom-proliferator-aktifveli reseptörlerini kapsayan çok sayıdaki genin ekspresyonunun değiştiği bildirilmiştir (Phiel ve diğ., 2001; Werling ve diğ., 2001). VPA'nın nöroblastoma (Yuan ve diğ., 2001; Cinatl ve diğ., 2002), glioma (Bacon ve diğ., 2002; Kamitani ve diğ., 2002), lösemi (Fischkoff ve Walter, 1984; Kawagoe ve diğ., 2002), meme kanseri (Olsen ve diğ., 2004) ve prostat kanseri (Thelen ve diğ., 2004) gibi çeşitli kanser türlerinde büyümeyi inhibe ettiği ve bu hücre soylarının farklılaşmalarını teşvik ettiği (Blaheta ve Cinatl, 2002) *in vitro* ve *in vivo* olarak gösterilmiştir. VPA'nın tümör hücreleri üzerindeki farklılaştırıcı etkisi sıklıkla kaspaz aktivasyonuna bağımlı ya da bağımsız olarak gerçekleşen apoptoz ile beraber tanımlanmaktadır (Tang ve diğ., 2004). VPA ile ilgili yapılan çeşitli hücre siklusu analizleri, ilacın etkisini p21 ekspresyonunu artırıp, hücreleri G1 fazında tutarak, hücre siklusunu inhibe ettiğini göstermiştir.

2.6. SİNİR BÜYÜME FAKTÖRÜ

Büyüme faktörleri memeli sinir sisteminin gelişiminde ve devamlılığının sağlanmasında hayati bir rol oynamaktadır (Barbacid, 1995). Bu faktörlerden platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF) ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) çok yönlü aktiviteye sahiptir ve sinir sisteminden başka sistemlerde sıklıkla çalışılmıştır (Westermarck ve Heldin, 1993). Buna karşın diğer faktörler sinir sistemi üzerinde daha geniş etkiye sahip olup, "nörotrofinler" olarak adlandırılırlar. Memelilerde ilk keşfedilen ve en iyi tanımlanan nörotrofin sinir büyüme faktörü (NGF) olmasına karşın, nörotrofin (NT) 3, 4, ve 5, gliyal kökenli nörotrofik faktör (GDNF) ve siliarik nörotrofik faktör (CNTF) de sıklıkla çalışılmaktadır.

NGF, yaklaşık 27 kDa ağırlığındaki 7S kompleksi oluşturmak için birbirleriyle etkileşim halinde olan α , β , ve γ alt birimlerinden oluşur (Connor ve diğ., 1998). 7S bileşiği yalnızca NGF'nin trofik aktivitesinden sorumlu 118 aminoasitlik iki özdeş β zincirden meydana gelir (Ullrich ve diğ., 1983; Maness ve diğ., 1994). Olgun β -NGF

prepro- β 'dan sentezlenir (27kDa) ve merkezi sinir sisteminde homodimer olarak varlığını sergiler (Ullrich ve diğ., 1983; Scott ve diğ., 1993; Maness ve diğ., 1994).

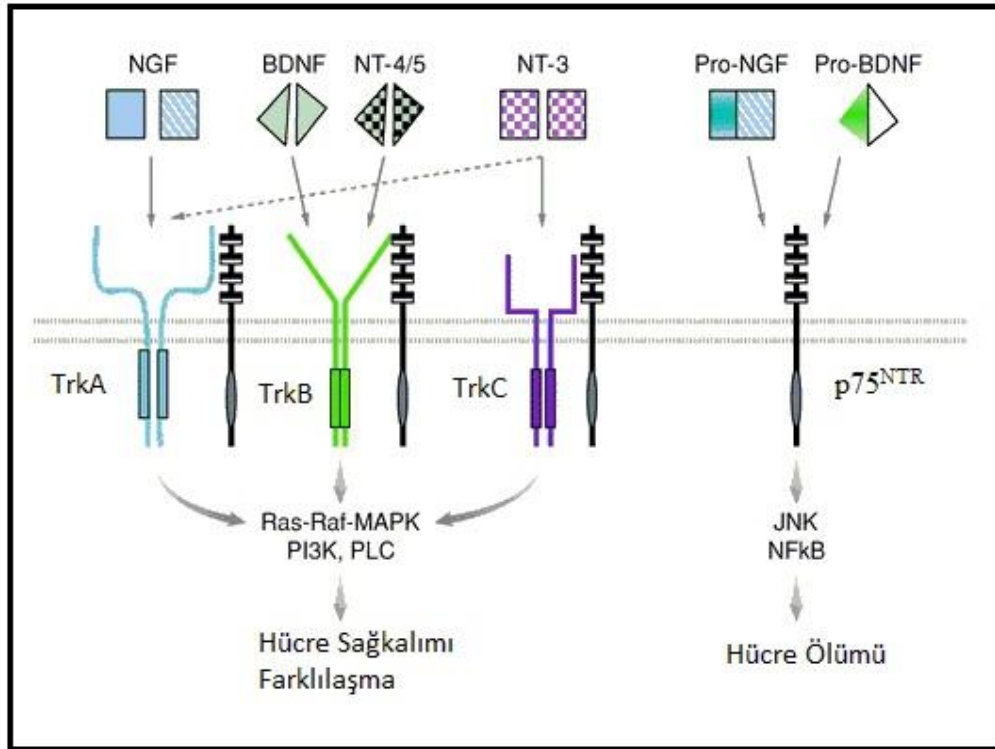
Sinir büyüme faktörü (NGF), normal koşullar altında periferik sinir sisteminde sempatik nöronların sonlandığı hedef dokulardan üretilip, salınmaktadır (Korsching, 1993). Bu dokulardan salınan NGF, sinir uçları tarafından reseptör aracılı endositozla yakalanmakta ve aksonlardan nöronal hücre gövdesine aktararak, nöronal sağkalım ve farklılaşmayı teşvik etmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, NGF'yi de kapsayan nörotrofinlerin, başka kaynaklar tarafından da üretilebileceğini ortaya koymuştur. Periferik sinir incinmesini takiben, makrofajlar inflamatuvar cevabın bir parçası olarak sinire sızmakta ve sitokinleri salmaktadır. Makrofajlardan sitokin salınması incinmiş sinirdeki fibroblastlarda ve Schwann hücrelerinde NGF sentezini tetikler (Korsching, 1993). Mast hücrelerinde de sentezi yapılan NGF, mast hücresinin aktivite kazanmasını takiben salınmaktadır (Levi-Moltacini ve diğ., 1996). Bunun yanı sıra bazı patolojik durumlarda, reaktif olmaya başlayan astroglial hücreler, astrositoma ve glioblastoma hücreleri gibi bazı glial tümör hücreleri de NGF'yi de içeren birçok nörotrofik faktörü sentezleyip çevre dokuya salar. NGF sentezini düzenleyen mekanizma tam olarak bilinmemesine karşın hedef dokulardaki NGF mRNA'sı ve protein seviyesi ile sempatik uyarımın birbiri ile uyumlu olduğu gözlenmiştir (Heuman ve diğ., 1984).

NGF, hücre yüzeyinde bulunan iki farklı reseptör $p75^{NTR}$ ve TrkA aracılığı ile, etkisini gösterebilmektedir. $p75^{NTR}$, tümör nekroz faktör (TNF) sitokin ailesinin seçici olmayan bir nörotrofin reseptörü iken, TrkA NGF'nin trofik etkisine aracılık eden tirozin kinaz reseptörü olarak bilinmektedir (Barbacid, 1994). 75 kilodalton ağırlığında, membran geçişli bir glikoprotein olan $p75^{NTR}$ tüm nörotrofinleri düşük affinite ile bağlama özelliğine sahiptir (Rodriguez ve diğ., 1990; Chao, 1994). Hücre dışında kalan kısmı sistince zengindir. Hücre içinde kalan kısım ise ölüm ile ilgili bölge olarak bilinmektedir. Başlangıçta yalnızca Trk reseptörlerinin bir koreseptörü olarak tanımlanan $p75^{NTR}$ 'nin, Trk ile beraber eksprese edildiğinde, Trk üzerinde yüksek duyarlılık taşıyan bir bölge oluşturduğu ve bu yolla Trk'nin ligandlarına olan hassasiyetini arttırdığı kabul edilmiştir (Hempstead ve diğ., 1991; Mahadeo ve diğ., 1994). Bununla beraber son zamanlarda yapılan çalışmalar Trk ailesinin üyeleri

olmadan da $p75^{NTR}$ 'nin farklı işlevlere aracılık ederek kendine ait değişik sinyal yollarını aktive ettiğini ortaya koymuştur (Wang ve diğ., 2001).

$p75^{NTR}$ reseptörü seramid üretimine öncülük edip, NF κ B ve c-Jun N-terminal kinaz'ı (JNK) aktive etmektedir (Bothwell, 1996; Cassaccia-Bonnet ve diğ., 1996). $p75^{NTR}$ aracılığıyla meydana gelen hücre ölümünde önemli rol oynadığı öne sürülen, JNK sinyal yolağı diğer bir nörotrofin olan Trk aracılığıyla uyarılan Ras-fosfotidil-3-kinaz sinyal yolağı ile engellenir. Buna karşın, $p75^{NTR}$ aracılığıyla uyarılan NF κ B yolağı Trk ile uyarılan sinyal yolağından etkilenmez (Yoon ve diğ., 1998).

Trk A, TrkB ve Trk C olmak üzere 3 farklı tipi tanımlanan Trk reseptörleri zar geçişli tirozin kinazlardır. Nörotrofinlere bağlandığında aktivite kazanan Trk reseptörleri NT ailesi üyelerine bağlanma yönünden ileri derecede özgünlük gösterir (Barbacid, 1994). NGF TrkA'ya, NT-3 TrkC'ye, NT-4, 5 ve beyinden kökenlenen nörotrofik faktör (BDNF) Trk B'ye bağlanır (Şekil: 2.4).



Şekil 2.4: Nörotrofinler ve reseptörlerini gösteren şema (Pezet ve diğ., 2006).

Nörotrofinlerin kendine özgü reseptörlere bağlanması sonucu gerçekleşen olayların ilk aşaması reseptörlerin dimer halini alması ve hücre içi tirozin kinaz enziminin

uyarılmasıdır. Uyarılan tirozin kinaz enzimi, reseptörlerin sitoplazmik kısmında yer alan tirozin bakiyelerini fosforlayarak, aktivite kazanmalarına neden olmaktadır. Diğer tirozin bakiyelerinin fosforlanması fosfotirozin bağlayan (PTB) ya da src-homoloji-2 (SH-2) motifleri içeren adaptör proteinler için bağlanma bölgeleri oluşturarak, sinyal oluşumunu teşvik eder (Pawson ve Nash, 2003). Bu adaptör proteinler Trk reseptörleri ile birleşerek, fosfolipaz C(PLC)- γ 1, Ras/ERK (hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz) protein kinaz yolağı ve fosfotidil-3-kinaz (PI-3 kinaz)/Akt kinaz yolağını içeren hücre içi sinyal kaskadını başlatır. Tüm bu olaylar sonunda transkripsiyon faktörlerinin aracılığıyla çok çeşitli hücresel cevapların oluşması sağlanır (Bredesen ve Rabizadeh, 1997; Oktayoğlu ve Bolkent, 2011).

2.7. C6 GLİOMA HÜCRE SOYU

Sıçan C6 glioma hücreleri merkezi sinir sisteminden kökenlenmiş hücreler olup astrosit, oligodendrosit ve bunların öncüleri olan hücrelerin özelliğini taşımaktadır (Holland, 2001). Bu hücreler yüksek mitotik aktivite, nükleer pleomorfizm, tümör nekroz odakları, tümör içi kanama gibi çeşitli malign glioblastoma karakteristiklerine sahip hücreler olarak primer beyin tümörü araştırmalarında kullanılmaktadır. Wistar- Furth sıçanlara N-N' nitrozometilüre uygulanmasıyla oluşturulan C6 glioma tümör hattı ilaç etkileşimi çalışmaları için tüm dünyada yaygın olarak tercih edilmektedir (Grobben ve diğ., 2002).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN KİMYASALLAR

1. Nevre Growth Factor (NGF 2.5 S) İnvitrogen Cat.No:13257-019
2. Valproik Asit, Gerot PharmazeutikaGmbH
3. DMEM, İnvitrogen 31885
4. F-12, İnvitrogen 21765
5. Etanol, Sigma 32221
6. DMSO, sc-202581 Santa Cruz Biotechnology, İnc
7. Tripsin EDTA, İnvitrogen 15090
8. L-Glutamin, İnvitrogen 25030
9. Penisilin+Streptomisin, İnvitrogen 15140
10. Fetal Sığır Serumu, İnvitrogen 10270
11. Trichostatin A, Sigma T1952
12. Tripan mavisi, Sigma T8154
13. Hücre Çoğalması Elisa Kiti, BrdU Roche 11647229001
14. Hücre Ölümü Belirleme Elisa Kiti, Roche 11544675001
15. NGF (M-20): sc-549 Santa Cruz Biotechnology, İnc
16. Trk A (763): sc-118 Santa Cruz Biotechnology, İnc
17. NGFRp75 (NGFR5):sc-58567 Santa Cruz Biotechnology, İnc
18. Kapatma Çözeltisi, İnvitrogen Prolong P36934
19. FITC, sc-2012 Santa Cruz Biotechnology, İnc
20. CY3, Temecula California 92590
21. Metanol, Merck K39066609 839
22. Tiazol Blue Tetrazolyum Bromid, Applichem A2231 0001

3.2. HÜCRE KÜLTÜRÜ

Çalışmalarımızda kullanılan sıçan kökenli C6 glioma hücre soyu, haftada iki kez rutin pasajları yapılmak suretiyle, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Zooloji Anabilim Dalı Hücre Kültürü Laboratuvarı'nda çoğaltıldı. C6 glioma hücreleri, ısı ile inaktive edilmiş % 5 fetal sığır serumu (FBS) ve antibiyotikler (100 unite/ml penisilin G, 100 µg/ml streptomisin) içeren DMEM-F12 medyumunda (Dulbecco'nun Modifiye Edilmiş Eagle Medyumu, besleyici karışım F-12 Ham Medyumu), 37 °C'de, % 5 CO₂ ve % 95 hava içeren nemli inkübatörde, 1 atmosfer basınç altında büyütüldü. 25 ve 75 cm²'lik steril kültür kaplarında üretilen hücreler, kültür kabı yüzeyinin % 60-80'ini kapladıklarında, deney için kullanıldı.

3.3. KULLANILAN KİMYASALLARIN ÇÖZÜLMESİ VE SULANDIRILMASI

3.3.1. TSA'nın Çözülmesi ve Sulandırılması

TSA'nın [(763): sc-118 Santa Cruz] 5, 10, 25, 50, 100, 200 ng/ml yoğunluğundaki 6 farklı konsantrasyonu seri dilüsyon ile DMEM-F12 medyumu içerisinde her kullanımda taze olarak hazırlandı ve 0.22 µm por çaplı membran filtreden geçirilerek steril edildi.

3.3.2. VPA'nın Çözülmesi ve Sulandırılması

Kapsül halinde Gerot Pharmazeutika firmasından temin edilen Valproik asit %70 etanol içinde çözüldü. Sterilizasyon amacı ile çözelti 0.22 µm por çaplı membran filtreden geçirildi ve küçük hacimlere bölünerek, -20 °C'ye kaldırıldı. VPA'nın 0.1, 0.5, 1, 3, 5, 10 mM yoğunluğundaki 6 farklı konsantrasyonu seri dilüsyon ile DMEM-F12 medyumu içerisinde her kullanımda taze olarak hazırlandı.

3.3.3. NGF'nin Çözülmesi ve Sulandırılması

13257-019 katalog numarası ile Invitrogen firmasından temin edilen NGF 2.5S, 1X PBS (pH 7.4) içinde çözüldü, 1000 ng/ml olacak şekilde sulandırıldı ve küçük hacimlere bölünerek, -20°C'ye kaldırıldı. NGF'nin 10, 50, 100 ve 200 ng/ml yoğunluğundaki 4 farklı konsantrasyonu seri dilüsyon ile DMEM-F12 medyumu içerisinde her seferinde taze olarak hazırlandı.

3.4. BİYOKİMYASAL YÖNTEMLER

3.4.1. TSA, VPA ve NGF'nin Etkin Doz ve Sürelerinin Belirlenmesi

3.4.1.1. TSA için Doz ve Süre Belirleme Deneyleri

Deneylerde kullanılacak hücreler, kültür kaplarını % 60-80 oranında kapladıklarında, tripsin kullanılarak yapışıkları kültür kabı yüzeyinden kaldırıldı. Mikroskop altında kalktıkları gözlenen hücrelere tripsinin etkisini engellemek amacıyla, tripsinle eşit miktarda medyum konuldu ve hücre süspansiyonu santrifüj tüpünde toplanarak 1500 rpm'de, 3 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı, tüpün dibinde kalan hücrelerin üzerine medyum eklendi ve tek hücre süspansiyonu oluşturmak amacıyla pipetaj yapıldı. Hemositometre kullanılarak toplam hücre sayısı hesaplandı. 96 kuyucuklu kültür kaplarının her birine hücre sayısı hesaplanmış, % 100 canlı tek hücre süspansiyonundan alınmış 5000 C6 hücresi ekildi. Ekilen hücreler kültür kabının yüzeyine yapışması ve çoğalması için 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. 24 saatlik inkübasyon sonunda hücreler, TSA için seçilmiş dozlar olan 5 ng/ml, 10 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml'lik TSA ile muamele edildi. Deneylerde kontrol grubu da dahil, her doz için 4 kuyucuk kullanıldı ve her konsantrasyon için 24 ve 48 saatlik deney grupları oluşturuldu.

Tablo 3.1: Trikostatin A'ya ait deney grupları

DOZ	SÜRE	
KONTROL	24 Saat	48 Saat
TSA 5 ng/ml	4 kuyu/3 tekrar	4 kuyu/3 tekrar
TSA 10 ng/ml	4 kuyu/3 tekrar	4 kuyu/3 tekrar
TSA 25 ng/ml	4 kuyu/3 tekrar	4 kuyu/3 tekrar
TSA 50 ng/ml	4 kuyu/3 tekrar	4 kuyu/3 tekrar
TSA 100 ng/ml	4 kuyu/3 tekrar	4 kuyu/3 tekrar
TSA 200 ng/ml	4 kuyu/3 tekrar	4 kuyu/3 tekrar

3.4.1.2. VPA için Doz ve Süre Belirleme Deneyleri

Deneylerde kullanılacak hücreler kültür kaplarının yüzeyini % 60-80 oranında kapladıklarında % 0.25'lik tripsin kullanılarak, yapışıkları kültür kabı yüzeyinden kaldırıldı. Mikroskop altında kaktıkları gözlenen hücelere tripsinin etkisini engellemek amacıyla, tripsinle eşit miktarda medyum konuldu ve hücre süspansiyonu santrifüj tüpünde toplanarak 1500 rpm'de, 3 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı, tüpün dibinde kalan hücrelerin üzerine medyum eklendi ve tek hücre süspansiyonu oluşturmak amacıyla pipetaj yapıldı. Hemositometre kullanılarak toplam hücre sayısı hesaplandı. 96 kuyucuklu kültür kaplarının her birine, hücre sayısı hesaplanmış % 100 canlı tek hücre süspansiyonundan alınmış 5000 C6 hücresi ekildi. Ekilen hücreler kültür kabının yüzeyine yapışması ve çoğalması için 37 °C'de, 24 saat

inkübe edildi. 24 saatlik inkübasyon sonunda, hücreler VPA için seçilmiş dozlar olan 0.1 mM, 0.5 mM, 1 mM, 3 mM, 5 mM, 10 mM VPA ile muamele edildi. Deneylede kontrol grubu da dahil her doz için 4 kuyucuk kullanıldı ve her konsantrasyon için 24 ve 48 saatlik deney grupları oluşturuldu. Her doz ve süre için deneyler 3 kez tekrar edildi.

Tablo 3.2: Valproik Asit'e ait deney grupları

DOZ	SÜRE	
	24 Saat	48 Saat
KONTROL	24 Saat	48 Saat
VPA 0.1 mM	4 kuyucuk/3 tekrar	4 kuyucuk/3 tekrar
VPA 0.5 mM	4 kuyucuk/3 tekrar	4 kuyucuk/3 tekrar
VPA 1 mM	4 kuyucuk/3 tekrar	4 kuyucuk/3 tekrar
VPA 3 mM	4 kuyucuk/3 tekrar	4 kuyucuk/3 tekrar
VPA 5 mM	4 kuyucuk/3 tekrar	4 kuyucuk/3 tekrar
VPA 10 mM	4 kuyucuk/3 tekrar	4 kuyucuk/3 tekrar

3.4.1.3. NGF için Doz ve Süre Belirleme Deneyleri

Deneyleerde kullanılacak hücreler kültür kaplarını % 60-80 oranında kapladıklarında, % 0.25'lik tripsin kullanılarak, yapıştıkları kültür kabı yüzeyinden kaldırıldı. Mikroskop altında kalktıkları gözlenen hücrelere tripsinin etkisini engellemek amacıyla, tripsinle eşit miktarda medyum konuldu ve hücre süspansiyonu santrifüj tüpünde toplanarak 1500 rpm'de, 3 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı, tüpün dibinde kalan hücrelerin üzerine medyum eklendi ve tek hücre süspansiyonu oluşturmak amacıyla pipetaj yapıldı. Hemositometre kullanılarak, toplam hücre sayısı hesaplandı. 96 kuyucuklu kültür kaplarının her birine, hücre sayısı hesaplanmış % 100 canlı tek hücre süspansiyonundan alınmış, 5000 C6 hücresi ekildi. Ekilen hücreler kültür kabının yüzeyine yapışması ve çoğalması için 37 °C'de, 24 saat inkübe edildi. 24 saatlik inkübasyon sonunda hücreler NGF için seçilmiş dozlar olan 10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 200ng/ml ile muamele edildi. Deneyleerde kontrol grubu da dahil her doz için 4 kuyucuk kullanıldı ve her konsantrasyon için 24 ve 48 saatlik deney grupları oluşturuldu. Her doz ve süre için deneyler 3 kez tekrar edildi.

Tablo 3.3: Sinir Büyüme Faktörü'ne ait deney grupları

DOZ	SÜRE	
	24 Saat	48 Saat
KONTROL		
10 ng/ml	4 kuyu/3 tekrar	4 kuyu/3 tekrar
50 ng/ml	4 kuyu/3 tekrar	4 kuyu/3 tekrar
100 ng/ml	4 kuyu/3 tekrar	4 kuyu/3 tekrar
200 ng/ml	4 kuyu/3 tekrar	4 kuyu/3 tekrar

3.4.2. VPA, TSA ve NGF'nin Etkin Dozlarının İkili (VPA+TSA) ve Üçlü (VPA+TSA+NGF) Kombinasyonlar Halinde Uygulanması

Deneyleerde kullanılacak hücreler kültür kaplarını % 60-80 oranında kapladıklarında tripsin kullanılarak, yapışıkları kültür kabı yüzeyinden kaldırıldı. Mikroskop altında kalktıkları gözlenen hücrelere tripsinin etkisini engellemek amacıyla, tripsinle eşit miktarda medyum konuldu ve hücre süspansiyonu santrifüj tüpünde toplanarak 1500 rpm'de, 3 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı, tüpün dibinde kalan hücrelerin üzerine medyum eklendi ve tek hücre süspansiyonu oluşturmak amacıyla pipetaj yapıldı. Hemositometre kullanılarak toplam hücre sayısı hesaplandı. 96 kuyucuklu kültür kaplarının her birine hücre sayısı hesaplanmış % 100 canlı tek hücre süspansiyonundan alınmış, 5000 C6 hücresi ekildi. Ekilen hücreler kültür kabının yüzeyine yapışması ve çoğalması için 37 °C'de, 24 saat inkübe edildi. 24 saatlik inkübasyon sonunda VPA, TSA ve NGF tek başına uygulandığında, hücreler 100 µl içinde 10 mM VPA, 100 ng/ml TSA ve 100 ng/ml NGF içeren medyumla 48 saat inkübe edildi. VPA ve TSA ikili ilaç uygulamalarında, hücreler yine 100 µl içinde 10 mM VPA ve 100 ng/ml TSA'ya, VPA, TSA ve NGF'nin üçlü kombinasyonlar halinde uygulandığı deney gruplarında ise 150 µl içinde aynı konsantrasyonları (VPA 10 mM, TSA 100 ng/ml, NGF 100 ng/ml) içeren ajanlara 48 saat maruz bırakıldı. Deneyleerde kontrol grubu da dahil her doz için 4 kuyucuk kullanıldı ve deney 3 kez tekrar edildi.

3.4.3. MTT Testi İle Hücre Canlılığının Belirlenmesi

MTT ([3-(4, 5-dimetil tiyazol-2-il)-2, 5 difenil tetrazolyum bromid]) testi doğrudan olmayan yolla hücre büyümesi ve/veya hücre ölümünü değerlendirmeyi amaçlayan ve hücre kültürü esasına dayanan bir ilaç duyarlılığı testidir (Mcgahon ve diğ., 1995; Scinto ve Daffner, 2000). Sıkça kullanılan bu test, diğere test yöntemlerinden hızlı, hassas, tekrarlanabilir ve uygulama kolaylığı gibi avantajlı özelliklere sahip olması bakımından ayrılır. Bu yöntemin temelinde, canlı hücrelerde MTT boyasının tetrazolyum halkasının mitokondri tarafından parçalanması yatar. Bu reaksiyon mitokondriyal enzim süksinat dehidrogenaz tarafından katalizlenir. MTT hücrelere aktif olarak absorbe olur ve mitokondride gerçekleşen reaksiyonla mavi-mor renkli, suda çözünmeyen formazana indirgenir. Hücrelerin MTT indirgeme özellikleri hücre canlılığının ölçütü olarak algılanır ve MTT analizi sonunda elde edilen, boya yoğunluğu ile canlı hücre sayısı doğru orantılıdır. Canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış

hücreler mor renkte boyanırken, ölmüş ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmamaktadır. MTT ile inkübe edilen canlı hücrelerin oluşturduğu formazan kristalleri çözünür hale getirildikten sonra reaksiyon ürünü kolorimetrik olarak okunur.

3.4.3.1. MTT Çözeltisinin Hazırlanması

0.025 gram MTT maddesi (Appllichem A2231 0001) tartıldı, 5 ml 1X PBS içinde vorteks aracılığıyla, çözünmemiş boya partiküllerinin kalmamasına özen gösterilerek, çözündürüldü ve 0.22 µl'lik filtreden geçirilerek steril edildi. MTT çözeltisi +4 °C'de, karanlık ortamda, 1 ay süreyle saklanabilmekte ve ihtiyaç duyulduğunda ana kaynaktan alınarak, deney protokolüne uygun bir şekilde, medyuma eklenerek kullanılabilir.

3.4.3.2. Hücrelerin MTT ile Muamele Edilmesi

0.025 gram MTT maddesi (Appllichem A2231 0001) tartıldı, 5 ml 1X PBS ile vorteks aracılığıyla içinde, boya partiküllerinin kalmamasına özen gösterilerek, karanlık ortamda çözündürüldü ve 0.22 µl'lik filtreden geçirilerek steril edildi. Deneylerde toksik ya da koruyucu ajan ile muamele edilmemiş hücreler kontrol grubu olarak kullanıldı. Doksan altı kuyucuklu kültür plaklarına ekilip, ilaçların (TSA, VPA, NGF) belirlenen doz ve süreleri ile muamele edilen hücrelere, hedeflenen inkübasyon süresinin sonunda, 30 µl/kuyucuk hacimde MTT çözeltisi eklendi. MTT çözeltisi eklendikten sonra, kültür plakları aliminyum folyo ile sarılarak % 5 CO₂'li nemli hava hava içeren 37 °C 'lik etüvde 4 saat süreyle tutuldu. Hedeflenen bekleme süresinin sonunda, faz kontrast mikroskobu kullanılarak canlı hücrelerde mor renkte formazan kristallerinin oluştuğu, buna karşın ölü hücrelerin boyanmadığı saptandı. Formazan kristallerini çözünür hale getirmek için, boya içeren çözelti kuyucuklardan uzaklaştırıldı ve her kuyucuğa 100 µl DMSO eklendi. DMSO eklenmesini takiben, çözündüğü gözlenen formazan kristallerini içeren kültür plağı, orbital çalkalayıcı üzerine konularak 70 rpm'de, 5 dakika çalkalandı (Carmichael ve diğ., 1987). Çalkalama işlemi son bulduktan sonra, kültür plağı ELISA plak okuyucusuna konularak değerleri 570-630 nm dalga boyunda okutuldu. Kontrol ve deney gruplarında canlılık oranı absorbans değerleri karşılaştırılarak incelendi.

3.4.4. Bromodeoksiüridin (BrdU) ile Hücre Çoğalmasının Belirlenmesi

Bir tümörü oluşturan populasyonda yer alan hücrelerin, hücre döngüsünün farklı fazlarında yer aldığı kabul edilir. Bu tip bir hücre populasyonunda, G1, S, G2 ve M fazına ait hücreler bulunur. Günümüzde hücre döngüsü analizi yapmak amacıyla kullanılan yöntemlerin en çok tercih edilenlerinden bir tanesi BrdU yöntemidir (Leif ve diğ., 2004). C6 glioma hücrelerinde hücre döngüsü analizini yapmak amacıyla, BrdU kiti (Roche, 11647229001) kullanıldı. BrdU bir timidin analogudur ve bölünen hücrelerin S fazında olanlarının DNA'sındaki timidin yerine bağlanır. Kültür medyumunu alındıktan sonra hücreler fikse edilerek, DNA denature edilir. DNA'nın denaturasyonu, bağlanmış olan BrdU'nun antikor ile gösterilebilmesini kolaylaştırmak açısından önemlidir. Anti-BrdU yeni sentezlenen hücresel DNA'ya katılmış olan BrdU'ya bağlanır ve immün kompleksler devamında uygulanan substrat reaksiyonu ile tespit edilir. Reaksiyon ürünleri belli dalga boylarında ölçülerek değerlendirilir. Gelişen renk ve absorbans değerleri, doğrudan DNA sentezi ve kültürdeki bölünen hücre miktarı ile doğru orantılıdır.

3.4.4.1. Çalışma Çözeltilerinin Hazırlanması

- **BrdU İşaretleme Çözeltisi:** BrdU işaretleme çözeltisi 1:100 oranında steril kültür medyumunu ile sulandırıldı. Elde edilen çözeltinin konsantrasyonu 100 μM 'dir. Sulandırılmış çözeltiden her bir kuyucuğa 10 μl eklendi.
- **Anti-BrdU –POD Stok Çözeltisi:** Anti—BrdU –POD 1.1 ml ultra saf su ile çözülüp 10 dakika çalkalandı. Elde edilen çözelti 10 μl 'lik hacimler şeklinde etiketlenerek -20 °C'de saklandı.
- **Anti-BrdU –POD Çalışma Çözeltisi (10 Testlik):** 10 μl Anti-BrdU –POD stok çözeltisinin üzerine 990 μl antikor seyreltme çözeltisi eklenerek her bir kuyucuğa 100 μl ilave edildi.
- **Yıkama Çözeltisi:** Yıkama tamponu 1:10 oranında ultra saf su ile sulandırılarak kullanıldı.
- **Konjugat Çözeltisi:** Anti-DNA-POD 1:10 oranında inkübasyon tamponu ile sulandırıldı. Konjugat çözeltisi kullanılmadan önce her defasında taze olarak hazırlandı.
- **Durdurma Çözeltisi (1M H₂SO₄):** % 96 'lık H₂SO₄ 'ten 0.571 ml alınarak ultra saf su ile 10 ml'ye tamamlandı.

3.4.4.2. Yöntem

Hücreler, 96 kuyucuklu kültür kablarında kuyu başına 100 µl'de 2×10^4 hücre bulunacak şekilde ekilerek, ilaçların belirlenen doz ve süreleriyle inkübe edildi. Kuyulara 10 µl BrdU işaretleme çözeltisi eklenerek ve 2-24 saat inkübe edildi. Birçok uygulama için 2 saat inkübasyon yeterlidir. İşaretleme medyumunu toplandı. Her kuyucuğa 200 µl FixDenat eklenip 30 dakika oda ısısında inkübe edildi. FixDenat çözeltisi toplandı. Tüm kuyucuklara 100 µl anti-BrdU POD çalışma solusyonu eklenip hücreler 1.5 saat oda ısısında inkübe edildi. Antikor konjugatı toplanmakta ve 3 kez 200-300 µl yıkama tamponuyla yıkandı. Yıkama tamponu toplandı. Her bir kuyucuğa 100 µl substrat çözeltisi eklenip fotometrik saptama için yeterli renk oluşuncaya kadar (5-30 dakika) oda ısısında inkübe edildi. Kuyulara 25 µl 1M H₂SO₄ eklenerek 1 dakika çalkalayıcıda 300 rpm'de karıştırıldı. 450 nm'de (690 nm referans dalga boyu) 5 dakika içinde okundu.

3.4.5. Apoptotik Hücre Ölümünün Belirlenmesi

VPA, TSA, NGF, VPA+TSA ve VPA+TSA+NGF'nin farklı dozlarına maruz bırakılmış hücrelerde, hücre ölümünün tetiklenmesinden sonra ortaya çıkan sitoplazmik histon ile ilişkili DNA fragmentlerinin (mono ve oligonukleozomlar) *in vitro* olarak fotometrik enzim immün yöntemi ile kalitatif ve kantitatif saptanması amacıyla, hücre ölümünü belirleme kiti (Roche -11544675001) kullanıldı.

3.4.5.1. Testin Prensipleri

Mikroplaka modülünün tabanı ve duvarları anti-histon antikoruna ile kaplandı. Engelleyici tampon ile özgün olmayan bağlanma bölgeleri doyuruldu. Örnekte bulunan nukleozomlar, histon bölgeleriyle anti-histon antikoruna bağlandı. Nukleozomların DNA kısımlarıyla reaksiyona girecek olan anti-DNA-peroksidaz (POD) eklendi. Yıkama işlemiyle bağlı olmayan peroksidaz konjugatı uzaklaştırıldı. İmmün kompleks tarafından tutulan peroksidazın miktarı, ABTS (2,2'-azino-di-[3-etilbenzotiazolin sülfonat (6)]) substratı ile belirlendi.

3.4.5.2. Çalışma Çözeltilerinin Hazırlanması

- **Anti-Histon Çözeltisi:** Anti-histon, 1 ml ultra saf suda 10 dakika karıştırılarak çözüldü. Elde edilen çözelti 2-8 °C 'de 2 ay dayanmaktadır.
- **Anti-DNA-POD Çözeltisi:** Anti-DNA-POD 1 ml ultra saf suda 10 dakika karıştırılarak çözüldü. Elde edilen çözelti 2-8 °C'de 2 ay dayanmaktadır.
- **Kaplama Çözeltisi:** Kaplama tampon çözeltisi 1:10 oranında sulandırıldı. Kullanmadan hemen önce 1 ml anti-histon antikoru 1:10 oranında kaplama tamponu ile sulandırıldı.
- **Yıkama Çözeltisi:** Yıkama tamponu, 15-25 °C'ye getirilerek 1:10 oranında ultra saf su ile sulandırıldı. Elde edilen çözelti 2-8 °C'de 2 ay dayanmaktadır.
- **Örnek Çözeltisi:** 25 µl örnek 225 µl inkübasyon tamponu ile sulandırıldı. Sulandırma işlemi örnek kullanılmadan hemen önce yapıldı.
- **Substrat Çözeltisi :** Örnek sayısına bağlı olarak 1, 2 veya 3 tablet 5, 10 ve 15 ml substrat tamponu ile çözüldü. Çözelti kullanılmadan önce 15-25 °C'ye getirildi. Çözelti 2-8 C'de 1 ay dayanmaktadır.

Not: ABST ışıkla reaksiyona girdiğinden ışıktan korunmalıdır.

3.4.5.3. Örneğin Hazırlanması

1×10^5 hücre/ml 2 mikrosantrifüj tüpüne 500 µl hacimde yani 5×10^4 hücre/tüp olacak şekilde bölündü. 1477 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Süpernatant atılıp hücre peleti 1 ml kültür medyumunu ile tekrar suspense edildi. 4044 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Hücre peleti 500 µl inkübasyon tamponu ile tekrar suspense edilip karıştırıldı. Örnek 30 dakika 15-25 °C'de lizis edildi. Lizat 14770 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. 400 µl süpernatant sitoplazmik kısım alındı. Süpernatant 1:10 oranında inkübasyon tamponu ile sulandırıldı.

3.4.5.4. Yöntem

100 µl kaplama çözeltisi her bir kuyucuğa konularak modulün üzeri yapışkan folyo ile kaplandı. 15-25 °C'de 1 saat veya alternatif olarak 2-8 °C 'de 1 gece inkübe edildi. Kaplama çözeltisi atıldı. 200 µl inkübasyon tamponu her kuyucuğa eklenerek modul yapışkan folyo ile kaplandı. 30 dakika 15-25 °C'de inkübe edildi. Çözelti toplandı.

Kuyucuklar 3 kez 250 -300 µl yıkama çözeltisi ile yıkanarak son eklenen çözelti toplandı. 100 µl örnek çözelti her kuyucuğa eklendi. Modül yapıştırıcı folyo ile kaplanarak 90 dakika 15-25 °C’de inkübe edildi. Çözelti toplandı. Kuyucuklar 3 kez 250-300 µl yıkama çözeltisi ile yıkanarak son çözelti toplandı. Tüm kuyucuklara 100 µl substrat çözeltisi eklendi. Mikroplaka çalkalayıcının üzerinde 250 rpm hızda fotometrik analiz için yeterli miktarda renk oluşuncaya kadar (yaklaşık 10-20 dakika) inkübe edildi. Kuyuların içeriği modüle dikkatlice vurulmak suretiyle homojenize edildi ve 450 nm dalga boyunda substrat çözeltisi köre karşı okundu.

3.4.6. NGF Miktarının Belirlenmesi

VPA, TSA, NGF, VPA+TSA, VPA+TSA+NGF’ye maruz bırakılmış C6 glioma hücre soyuna ait farklı deney gruplarındaki NGF miktarını saptamak amacıyla, NGF Sandwich Elisa kiti (Chemicon, Cat. No. CYT304) kullanıldı.

3.4.6.1. Testin Prensibi

NGF Sandwich Elisa yöntemi, fare NGF’sine karşı oluşturulan keçi poliklonal antikorlarıyla kaplanmış olan kuyucuklara konulan örnekte bulunan NGF’nin yakalanması prensibine dayanır. NGF özgün fare monoklonal antikorları, tutunmuş NGF’ya bağlanmaktadır. Fare özgün eşek poliklonal antikorları peroksidazla işaretlenmiştir ve fare monoklonal antikoruna bağlanır. Substratın ve reaksiyon durdurma çözeltisinin eklenmesiyle, NGF miktarı saptanmaktadır. Standart eğri, Optik Densite (OD) ile NGF konsantrasyonu arasındaki ilişkiyi göstermektedir.

3.4.6.2. Çalışma Çözeltilerinin Hazırlanması

- **Yıkama Çözeltisi:** 1:10 oranında ultra saf su ile sulandırılmaktadır.
- **Standart Çözeltiler:** NGF standartı 500 µl sulandırıcı ile sulandırıldı. Elde edilen çözeltinin konsantrasyonu 20000 pg/ml’dir. Bu stok çözelti standart eğrinin hazırlanması için gerekli olan standartların sulandırılması için kullanıldı. Standartlar sulandırıcı kullanılarak seri sulandırma yöntemi ile hazırlandı. NGF protein standartları olarak 15.6, 31.25, 125 ve 1000 pg/ml’lik konsantrasyonlar seçildi.
- **Fare Anti-Fare NGF Monoklonal Antikor Çözeltisi:** Fare anti-fare NGF monoklonal antikoru 120 µl steril ultra saf su ile çözüldü. Çalışmadan hemen

önce bu stoktan alınan antikor 1:100 oranında sulandırıcı kullanılarak sulandırıldı.

- **Eşek Anti-Fare IgG Poliklonal Antikor Çözeltisi (HRP Bağlı):** Eşek anti-fare IgG poliklonal antikor HRP bağlı 100 µl % 50 gliserol ile sulandırılarak 2 µl'lik hacimler halinde parçalara ayrılarak -20 °C'de saklandı. Çalışmadan hemen önce 1:1000 oranında sulandırıcı ile sulandırılarak kullanıldı.

3.4.6.3. Kuyucukların Antikorla Kaplanması

100 µl kaplama çözeltisi her bir kuyucuğa konularak modülün üzeri yapışkan folyo ile kaplandı. Kuyucuklar 15-25 °C'de 1 saat veya alternatif olarak 2-8 °C'de inkübe edildi. Kaplama çözeltisi toplandı. 200 µl inkübasyon tamponu her bir kuyucuğa eklenerek modül yapışkan folyo ile kaplanmakta ve 30 dakika 15-25 °C'de bekletildi. Çözelti toplandı. Kuyucuklar 3 kez 250-300 µl yıkama çözeltisi ile yıkanarak en son çözelti toplandı.

- Örnek, standart ve kör kuyucukları aşağıdaki gibi hazırlandı ve çift çalışıldı.

Tablo 3.4: NGF Seviyesi Belirleme Deneyine Ait Deney Grupları

Kör (FTS)	Kör (FTS)	1. Kontrol	2.Kontrol
1.Standart 15.6 (pg/ml)	1.Standart 15.6 (pg/ml)	VPA 10 mM	VPA 10 mM
2. Standart 31.25 (pg/ml)	2. Standart 31.25(pg/ml)	TSA 100 ng/ml	TSA 100 ng/ml
3.Standart 125 (pg/ml)	3.Standart 125 (pg/ml)	NGF 100 ng/ml	NGF 100 ng/ml
4.Standart 250 (pg/ml)	4.Standart 250 (pg/ml)	VPA+TSA 10 mM, 100 ng/ml	VPA+TSA 10 mM, 100 ng/ml
4.Standart 1000 (pg/ml)	4.Standart 1000 (pg/ml)	VPA+TSA+NGF 10mM,100ng/ml,100ng/ml	VPA+TSA+NGF 10mM,100ng/ml,100ng/ml

3.4.6.4. Yöntem

Hücre homojenatları, 12357 rpm'de 30 dakika +4 °C'de santrifüj edildi. Kör (FTS), standartlar ve örnekler çift kuyucuklu çalışılmalıdı. Daha önceden çeşitli işlemlerden geçirilerek antikorla kaplanmış kuyucukların her birine, 100 µl FTS, standartlar ve örneklerden konuldu. Modülün üzeri yapışkan folyo ile kaplanarak, oda ısısında çalkalayıcı üzerinde, 150 rpm hızda 3 saat inkübe edildi. Her bir kuyucuğa 250 µl yıkama tamponu konularak geri çekildi ve 96 kuyucuklu kültür plağı temiz bir filtre kağıdına hızla ters vurularak kalan sıvının uzaklaştırılması sağlandı. Bu işlem 4 kez tekrar edildi. Anti-fare NGF monoklonal antikor 1:100 sulandırıcı ile sulandırılarak kuyucuklara 100 µl hacimde konularak çalkalayıcı üzerinde 150 rpm hızda oda ısısında inkübe edildi. Bağlanmayan anti-fare NGF monoklonal antikorlarını uzaklaştırmak amacıyla, yıkama işlemi gerçekleştirildi. Peroksidaz bağlı eşek anti-fare IgG poliklonal antikor 1:1000 oranında sulandırıcı ile sulandırılarak kuyucuklara 100 µl hacimde konuldu. 2 saat beklendi. Bağlanmayan peroksidaz bağlı eşek anti-fare IgG poliklonal antikorlarını uzaklaştırmak amacıyla yıkama işlemi gerçekleştirildi. Yıkama işlemi takiben, kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirilmiş TMB/E substratı her bir kuyucuğa 100 µl hacimde konuldu. 10 dakika oda ısısında beklenildiğinde 1. standarta ait kuyucuktaki çözeltinin mavi renk aldığı gözlemlendi. Kuyucuklara 100 µl reaksiyonu durdurma çözeltisi konuldu. Çözelti renginin maviden sarıya döndüğü gözlemlendi. Sarı renkli çözelti zaman kaybetmeden 450 nm dalga boyunda okundu.

3.4.6.5. NGF Standart Grafiğinin Çizilmesi

Tüm grupların NGF seviyeleri standart fare NGF'si kullanılarak hazırlanan standart eğri üzerinden hesaplandı.

3.5. MİKROSKOBİK YÖNTEMLER

Mikroskopik uygulamalar için VPA, TSA, NGF, VPA+TSA, VPA+TSA+NGF'nin farklı konsantrasyonlarına maruz kalmış hücreler kullanılarak elde edilmiş preparatlar kullanıldı. TrkA ve kaspaz-3/p75 eksprese eden C6 glioma hücrelerinin görüntülenebilmesi amacıyla, tekli ve ikili immunfloresan işaretleme tekniği kullanıldı.

C6 glioma hücreleri kültür kabı yüzeyinin %80'ini kaplayıncaya kadar büyütüldü, % 0.25'lik tripsin kullanılarak toplandı ve hemositometre aracılığıyla hücre sayısı hesaplandı. 24'lük plakaların içine yerleştirilmiş 12 mm'lik yuvarlak lamellerin üzerine her kuyucuğa 5000 hücre gelecek şekilde ekim yapıldı. Hücrelerin lamellere yapışması için 30 dakika beklendikten sonra, 250 µl % 5 serum içeren DMEM/F12 kültür medyumunu eklendi ve hücreler 24 saat inkübe edildi. 24 saat sonunda hücreler VPA, TSA, NGF, VPA+TSA, VPA+TSA+NGF'nin daha önceden belirlenmiş dozları ile 48 saat muamele edildi.

3.5.1. TrkA İmmüno Floresan İşaretleme

TrkA eksprese eden C6 glioma hücrelerini görüntüleyebilmek amacıyla daha önceden bahsedilen protokol göz önünde bulundurularak 48 saat inkübe edilmiş hücreler 48. saatin sonunda PBS ile 37 °C'de 15 dakika inkübe edildi. PBS ile inkübasyonu takiben hücreler saf metanol ile 30 dakika -20 °C'de fikse edildi. Fiksatif uzaklaştırıldıktan sonra hücreler PBS ile 3 kez yıkandı. Endojen peroksidaz aktivitesinin engellenmesi amacıyla, karanlık ortamda ve oda ısısında 20 dakika süreyle % 0.5 H₂O₂ çözeltisi uygulandı. Kuyucuklar PBS ile yıkandıktan sonra, hücrelerde özgün olmayan işaretlenmelerin önüne geçmek amacıyla, engelleyici çözelti (% 2 BSA içeren Triton - X-100 (% 0.1) hücrelere 45 dakika boyunca uygulandı. TrkA birincil antikoru (Tavşan poliklonal, Santa Cruz; sc-118) 1:500 oranında engelleme çözeltisi ile sulandırılarak hazırlandı ve hücreler 25 °C' de bir gece boyunca inkübe edildi. Kuyucuklar yıkama tamponu ile 3 kez yıkandıktan sonra, antikor sulandırıcı çözeltiyle (% 1.5 Fötal sığır serumu ve % 0.01 Triton X-100 PBS'de hazırlanan) 1:200 oranında sulandırılarak hazırlanan Floresein (FITC) bağlı ve tavşandan elde edilen birincil antikora özgü IgG (Keçi anti-tavşan IgG-FITC, Santa cruz ; scG1708) oda ısısında ve karanlıkta 45 dakika süreyle uygulandı. Kuyucuklar yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra, lameller kültür kabından alındı, ters çevrilerek üzerinde kapatma çözeltisi (Prolong p36934, invitrogen) bulunan bir lama yapıştırıldı ve kuruması için karanlık ortamda ve oda ısısında bir gece beklendi. Nikon Edipse Ti-U aracılığıyla preparatların fotoğrafları çekildikten sonra uzun süreli saklama amacıyla 4 °C 'ye kaldırıldı.

3.5.2. Kaspaz-3/p75^{NTR} İkili İmmüno Floresan İşaretleme

Kaspaz-3/p75^{NTR} eksprese eden C6 glioma hücrelerinin görüntülenebilmesi amacıyla, sıçandan elde edilmiş C6 glioma hücrelerinin farklı deney gruplarında kaspaz 3/p75 ikili immüno floresan işaretleme tekniği kullanıldı. VPA, TSA, NGF, VPA+TSA ve VPA+TSA+NGF'nin farklı dozlarına 48 saat boyunca maruz bırakılmış hücreler 48. saatin sonunda PBS ile 37 °C'de 15 dakika inkübe edildi. PBS ile inkübasyonu takiben, hücreler saf metanol ile 30 dakika -20 °C'de fikse edildi. Fiksatif uzaklaştırıldıktan sonra, hücreler PBS ile yıkandı. Endojen peroksidaz aktivitesinin engellenmesi amacıyla, karanlık ortamda ve oda ısısında 20 dakika süreyle % 0.5 H₂O₂ çözeltisi uygulandı. Kuyucuklar PBS ile yıkandıktan sonra, hücrelerde özgün olmayan işaretlenmelerin önüne geçmek amacıyla, engelleyici çözelti (%2 BSA içeren Triton - X-100 (% 0.1 PBS'de hazırlanır) hücrelere 45 dakika boyunca uygulandı. p75^{NTR} birincil antikoru (Tavşan poliklonal, Chemicon; AB1554) 1:500 oranında engelleme çözeltisi ile sulandırılarak hazırlandı ve hücreler 25°C'de bir gece boyunca inkübe edildi. Kuyucuklar yıkama tamponu ile 3 kez yıkandıktan sonra, hücreler 1:500 oranında engelleme çözeltisi ile sulandırılarak hazırlanan 2. birincil antikor Kaspaz-3 ile 25 °C'de bir gece boyunca inkübe edildi. 1 gecelik inkübasyon sonunda, yıkama tamponu ile hücreler yıkandı, antikor sulandırıcı çözeltiyle (% 1.5 Fötal sığır serumu ve % 0.01 Triton X-100) 1:200 oranında sulandırılarak hazırlanan FITC-bağlı, tavşandan elde edilen birincil p75^{NTR} antikoruna özgü IgG (Keçi anti-tavşan IgG-FITC, Santa cruz; scG1708) oda ısısında ve karanlıkta 45 dakika süreyle uygulandı. Kuyucuklar yıkama tamponu ile yıkandı ve antikor sulandırıcı çözeltiyle (% 1.5 Fötal sığır serumu ve % 0.01 Triton X-100) 1:200 oranında sulandırılarak hazırlanan CY3 bağlı, tavşandan elde edilen birincil kaspaz-3 antikoruna özgü IgG (Keçi anti-tavşan IgG-FITC, Santa cruz ; scG1708) oda ısısında ve karanlıkta 45 dakika süreyle uygulandı. Kuyucuklar yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra, lameller kültür kabından alındı, ters çevrilerek üzerinde kapatma çözeltisi (Prolong p36934, invitrogen) bulunan bir lama yapıştırıldı ve kuruması için karanlık ortamda ve oda ısısında bir gece beklendi. Nikon Edipse Ti-U aracılığıyla preparatların fotoğrafları çekildikten sonra uzun süreli saklama amacıyla 4°C'ye kaldırıldı.

3.5.3. % TrkA⁺ ve Kaspaz-3⁺/p75⁺ C6 Glioma Hücrelerinin Hesaplanması

TrkA⁺ ve Kaspaz-3⁺/p75⁺ C6 glioma hücrelerinin tüm sayım alanındaki oranının belirlenebilmesi amacıyla, her preparattta rastgele seçilen 20 alanda sayım yapılarak en az 800 adet TrkA⁺ ve Kaspaz-3⁺/p75⁺ C6 hücresi değerlendirildi. Nikon Edipse Ti-U mikroskobu kullanılarak, elde edilen görüntü NIS ELEMENTS görüntüleme sistemi aracılığıyla bilgisayara aktarıldı.

Floresan mikroskopi incelemesinde FITC florokromu için yeşil FITC filtresi, CY3 incelemesinde kırmızı CY3 filtresi ve FITC/CY3 incelemesinde sarı filtre kullanıldı. Elde edilen sonuçlar aşağıdaki formül aracılığı ile değerlendirildi (Gezginci-Oktayoğlu, 2009).

Tablo 3.5: TrkA⁺ C6 glioma hücre sayısının hesaplanması

$$\% \text{TrkA}^+ \text{ C6 Glioma Hücreleri} = \frac{\text{TrkA}^+ \text{ C6 Glioma Hücre Sayısı} \times 100}{\text{Ekilen Toplam Hücre Sayısı (10000)}}$$

3.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

VPA, TSA ve NGF ile muamelenin C6 glioma hücreleri üzerine etkilerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde, Graphpad Prism 5.0 adlı yazılım programı kullanılmış ve tüm deneyler için bağımsız Student-t-Testi uygulaması yapılmıştır. Sonuçlar ortalama \pm standart hata (SEM) olarak yazılmıştır. Hesaplamalar sonucunda p değeri 0.05'ten küçük olan farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Belirlenen deney gruplarına ait çeşitli yöntemlerden elde edilen bulgular, biyokimyasal ve mikroskopik bulgular olmak üzere iki ana başlık altında toplanmıştır.

4.1.BİYOKİMYASAL BULGULAR

4.1.1. TSA'ya Ait Hücre Canlılık Testi Bulguları

Histon deasetilaz inhibitörü TSA'nın, sıçandan elde edilen C6 glioma hücre soyu canlılığı üzerindeki etkisini incelemek amacıyla, C6 glioma hücreleri TSA'nın farklı konsantrasyonları olan 5, 10, 25, 50, 100, 200 ng/ml ile 24 ve 48 saat boyunca kültüre edilmiştir. TSA'nın C6 glioma hücre soyunun canlılığı üzerindeki etkisi doza ve süreye bağlı olarak farklılık göstermesine karşın, maksimum öldürücü etki 48 saatte 100 ng/ml'lik dozda gözlenmiş ve hücre canlılığında meydana gelen bu azalma istatistiksel olarak anlamlı düzeyde gerçekleşmiştir.

Kontrol grubunda C6 glioma hücrelerinin 24 ve 48 saat sonunda sağlıklı bir şekilde çoğaldığı gözlenmiştir.

5 ng/ml konsantrasyonda uygulanan TSA, hücre sayısında kontrole göre 24 (Kontrol: 100, 5 ng/ml TSA: 117.15 ± 8.6) ve 48 saatte (Kontrol: 100, 5 ng/ml TSA: 145.74 ± 29.33) artma meydana getirmiş ve meydana gelen bu artma istatistiksel olarak anlamlı düzeyde gerçekleşmiştir ($p < 0.01$) (Şekil 4.1).

TSA, 10 ng/ml konsantrasyonda uygulandığında hücre sayısının kontrole göre 24 saatte (Kontrol: 100, 10 ng/ml TSA: 104.12 ± 5.13) arttığı, 48 saatte (Kontrol: 100, 10 ng/ml TSA: 86.43 ± 13.15) azaldığı görülmüştür. 24 ve 48 saatte gözlenen artmanın ve azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır (Şekil 4.1).

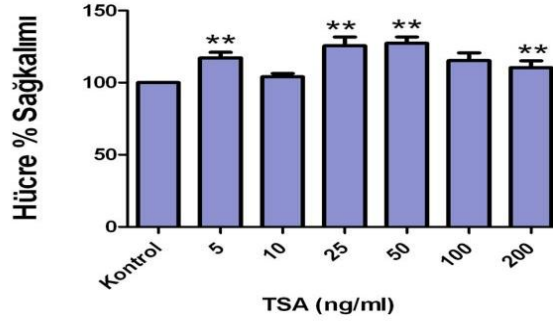
TSA, 25 ng/ml konsantrasyonda uygulandığında hücre sayısının kontrole göre 24 saatte (Kontrol: 100, 25 ng/ml TSA: 125.61 ± 13.65) ve 48 saatte (Kontrol: 100, 25 ng/ml TSA: 118.58 ± 13.89) arttığı görülmüştür. 24 saatte gözlenen artmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p < 0.01$) (Şekil 4.1).

TSA, 50 ng/ml konsantrasyonda uygulandığında hücre sayısının kontrole göre 24 saatte (Kontrol: 100, 50 ng/ml TSA: 127.28 ± 9.83) arttığı, 48 saatte (Kontrol: 100, 50 ng/ml TSA: 98.81 ± 8.22) azaldığı görülmüştür. 24 saatte gözlenen artmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p < 0.01$) (Şekil 4.1).

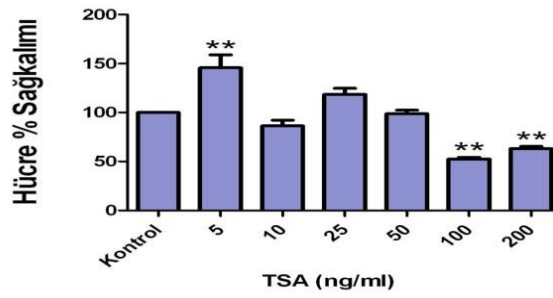
TSA, 100 ng/ml konsantrasyonda uygulandığında hücre sayısının kontrole göre 24 saatte (Kontrol: 100, 100 ng/ml TSA: 115.26 ± 11.99) arttığı, 48 saatte (Kontrol: 100, 100 ng/ml TSA: 52.58 ± 3.56) azaldığı görülmüştür. 48 saatte gözlenen azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p < 0.01$) (Şekil 4.1).

TSA, 200 ng/ml konsantrasyonda uygulandığında hücre sayısının kontrole göre 24 saatte (Kontrol: 100, 200 ng/ml TSA: 110.37 ± 10.78) arttığı, 48 saatte (Kontrol: 100, 200 ng/ml TSA: 63.26 ± 5.32) azaldığı görülmüştür. Her iki zaman aralığında gözlenen artma ve azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p < 0.01$) (Şekil 4.1).

A)
C6 Glioma Hücrelerinde TSA Doza Bağlı Hücre % Sağkalımı-24 Saat



B)
C6 Glioma Hücrelerinde TSA Doza Bağlı Hücre % Sağkalımı-48 Saat



Şekil 4.1: TSA'nın konsantrasyon ve zamana bağlı olarak C6 glioma hücrelerinin sağkalımı üzerindeki etkisi. Deney gruplarındaki veriler ortalama \pm standart hata (SEM) olarak ifade edilmiştir. p değerleri kontrole göre hesaplanmıştır (**p<0.01).

4.1.2.VPA'ya Ait Hücre Canlılık Testi Bulguları

VPA'nın sıçandan elde edilen C6 glioma hücre soyu canlılığı üzerindeki etkisini incelemek amacıyla, C6 glioma hücreleri VPA'nın farklı konsantrasyonları (0.1, 0.5, 1, 3, 5, 10 mM) ile 24 ve 48 saat boyunca kültüre edilmiştir. VPA'nın C6 glioma hücre soyunun canlılığı üzerindeki etkisi doza ve süreye bağlı olarak farklılık göstermesine karşın, en fazla öldürücü etki 48 saatte 10 mM'lık dozda gözlenmiş ve hücre canlılığında meydana gelen bu azalma istatistiksel olarak anlamlı düzeyde gerçekleşmiştir.

Kontrol grubunda C6 glioma hücrelerinin 24 ve 48 saat sonunda sağlıklı bir şekilde çoğaldığı gözlenmiştir.

VPA, 0.1 mM konsantrasyonda uygulandığında hücre sayısında kontrole göre 24 (Kontrol: 100, 0.1 mM VPA: 78.70 ± 13.29) ve 48 saatlik (Kontrol: 100, 0.1 mM VPA: 93.58 ± 5.1) zaman aralıklarında azalma meydana getirdiği görülmüştür. 24 saatte gerçekleşen azalma istatistiksel olarak anlamlı düzeyde gerçekleşmiştir ($p < 0.05$) (Şekil 4.2).

VPA, 0.5 mM konsantrasyonda uygulandığında hücre sayısında kontrole göre 24 saatte (Kontrol: 100, 0.5 mM VPA: 106.18 ± 11.18) ise artma 48 saatte (Kontrol: 100, 0.5 mM VPA: 65.27 ± 6.84) azalma, görülmüştür. 48 saatte meydana gelen artmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$) (Şekil 4.2).

VPA, 1 mM konsantrasyonda uygulandığında hücre sayısında kontrole göre 24 (Kontrol: 100, 1 mM VPA: 69.92 ± 5.44) ve 48 saatlik zaman (Kontrol: 100, 1 mM VPA: 62.31 ± 4.52) aralıklarında azalma görülmüştür. 24 ve 48 saate meydana gelen azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$) (Şekil 4.2).

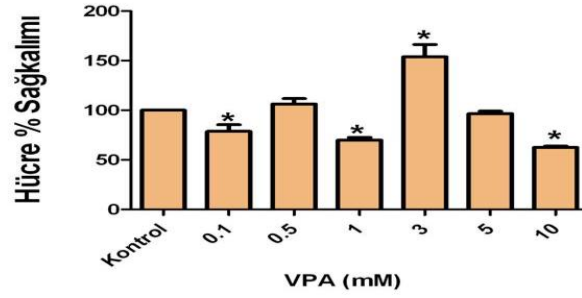
VPA, 3 mM konsantrasyonda uygulandığında hücre sayısında kontrole göre 24 saatte (Kontrol: 100, 3 mM VPA: 153.95 ± 24.51) artma, 48 saatte (Kontrol: 100, 3 mM VPA: 60.45 ± 7.18) ise azalma görülmüştür. 24 saatte gerçekleşen artma ve 48 saatte gerçekleşen azalma istatistiksel olarak anlamlı düzeyde gerçekleşmiştir ($p < 0.05$) (Şekil 4.2).

VPA, 5 mM konsantrasyonda uygulandığında hücre sayısında kontrole göre 24 (Kontrol: 100, 5 mM VPA: 96.54 ± 4.95) ve 48 saatlik (Kontrol: 100, 5 mM VPA: 52.86 ± 8.28) zaman aralıklarının her ikisinde azalma görülmüştür. 48 saatte gerçekleşen azalma istatistiksel olarak anlamlı düzeyde gerçekleşmiştir ($p < 0.05$) (Şekil 4.2).

VPA, 10 mM konsantrasyonda uygulandığında hücre sayısında kontrole göre 24 (Kontrol: 100, 10 mM VPA: 62.58 ± 2.5) ve 48 saatte (Kontrol: 100, 10 mM VPA: 41.47 ± 0.49) azalma görülmüştür. Her iki zaman aralığında da meydana gelen azalmalar istatistiksel olarak anlamlı düzeyde gerçekleşmiştir ($p < 0.05$) (Şekil 4.2).

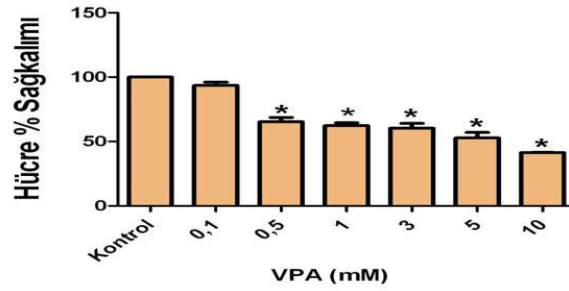
A)

C6 Glioma Hücrelerinde VPA Doza Bağlı Hücre % Sağkalımı-24 Saat



B)

C6 Glioma Hücrelerinde VPA Doza Bağlı Hücre % Sağkalımı-48 Saat



Şekil 4.2: VPA'nın konsantrasyon ve zamana bağlı olarak C6 glioma hücrelerinin sağkalımı üzerindeki etkisi. Deney gruplarındaki veriler ortalama \pm standart hata (SEM) olarak ifade edilmiştir. p değerleri kontrole göre hesaplanmıştır (* $p < 0.05$).

4.1.3. NGF'ye Ait Hücre Canlılık Testi Bulguları

NGF'nin sıçandan elde edilen C6 glioma hücre soyu canlılığı üzerindeki etkisini incelemek amacıyla, C6 glioma hücreleri NGF'nin farklı konsantrasyonları olan 10, 50, 100, 200 ng/ml ile 24 ve 48 saat boyunca kültüre edilmiştir. NGF'nin C6 glioma soyunun canlılığı üzerindeki etkisi doza ve süreye bağlı olarak farklılık göstermesine karşın, en fazla öldürücü etki 48 saatte 100 ng/ml'lik dozda gözlenmiş ve hücre canlılığında meydana gelen bu azalma istatistiksel olarak anlamlı düzeyde gerçekleşmiştir.

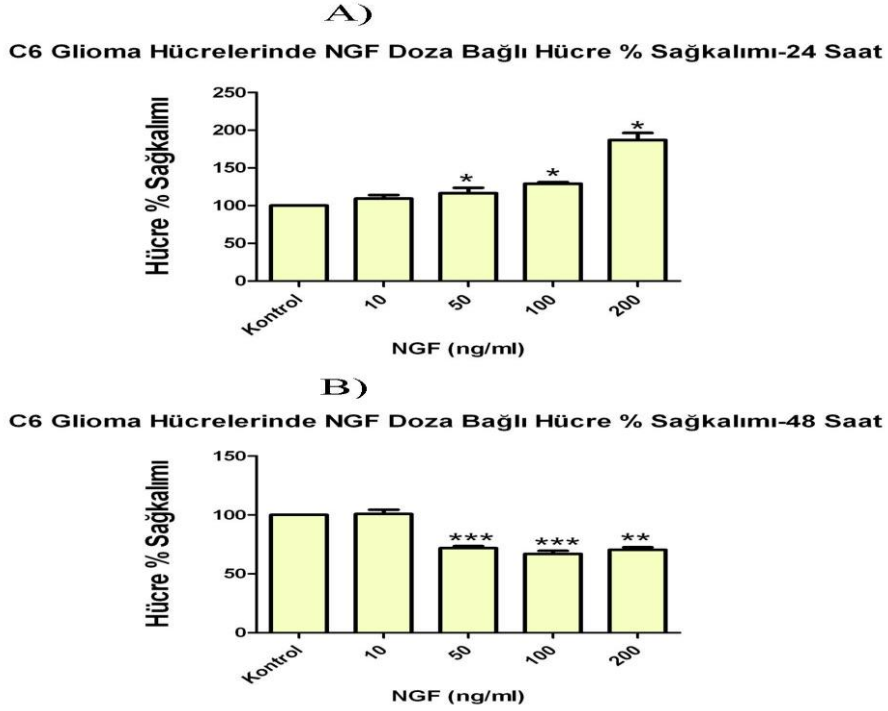
Kontrol grubunda C6 glioma hücrelerinin 24 ve 48 saat sonunda sağlıklı bir şekilde çoğaldığı gözlenmiştir.

NGF, 10 ng/ml konsantrasyonda uygulandığında, hücre sayısında kontrole göre 24 (Kontrol: 100, 10 ng/ml NGF: 109.22 ± 9.81) ve 48 saatte (Kontrol: 100, 10 ng/ml NGF: 100.84 ± 10.07) artma görüldü. Her iki zaman aralığında da hücre sayısında meydana değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı bir düzeyde gerçekleşmemiştir ($p > 0.05$) (Şekil 4.3).

NGF, 50 ng/ml konsantrasyonda uygulandığında, hücre sayısında kontrole göre 24 saatte (Kontrol: 100, 50 ng/ml NGF: 116.61 ± 13.91) artma, 48 saatte (Kontrol: 100, 50 ng/ml NGF: 71.77 ± 4.58) azalma görülmüştür. 24 ve 48 saatte, hücre sayısında gözlenen değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı bir düzeyde gerçekleşmemiştir ($p < 0.05$, $p < 0.001$) (Şekil 4.3).

NGF, 100 ng/ml konsantrasyonda uygulandığında, hücre sayısının kontrole göre 24 saatte (Kontrol: 100, 100 ng/ml NGF: 128.97 ± 4.16) arttığı, 48 saatte (Kontrol: 100, 100 ng/ml NGF: 66.98 ± 6.19) azaldığı görülmüştür. 24 ve 48 saatte gözlenen değişimin istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$) (Şekil 4.3).

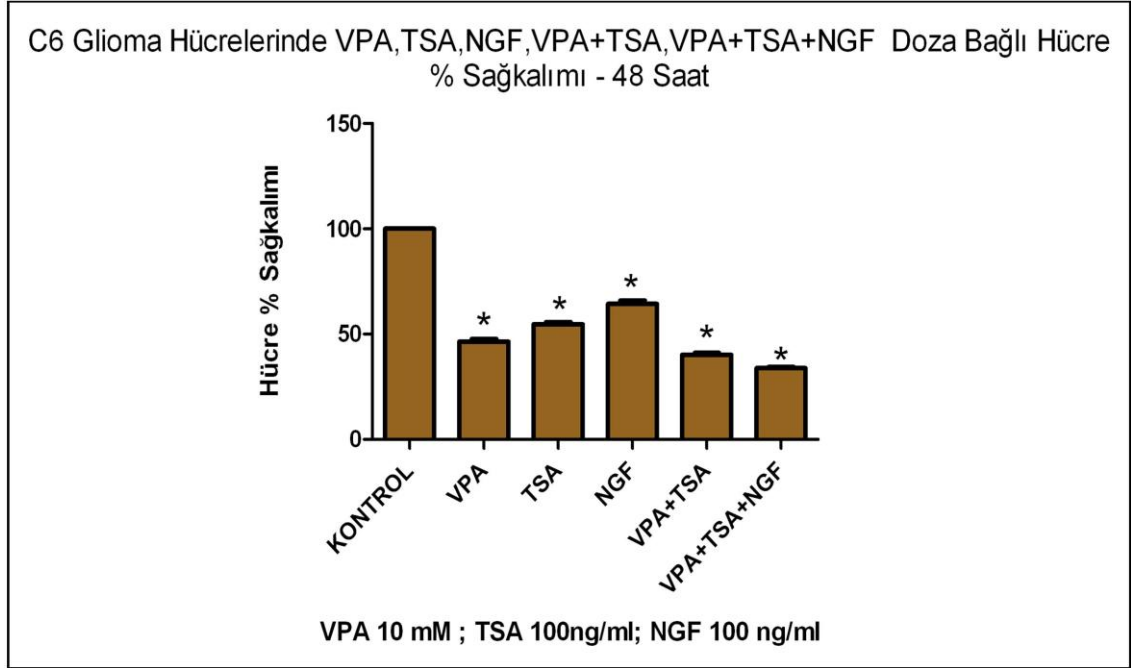
NGF, 200 ng/ml konsantrasyonda uygulandığında, hücre sayısının kontrole göre 24 saatte (Kontrol: 100, 200 ng/ml NGF: 186.98 ± 18.57) arttığı, 48 saatte (Kontrol: 100, 200 ng/ml NGF: 70.41 ± 4.33) azaldığı görülmüştür. Her iki zaman aralığında da gözlenen değişimin istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$, $p < 0.01$) (Şekil 4.3).



Şekil 4.3: NGF'nin konsantrasyon ve zamana bağlı olarak C6 glioma hücrelerinin sağkalımı üzerindeki etkisi. Deney gruplarındaki veriler ortalama \pm standart hata (SEM) olarak ifade edilmiştir. p değerleri kontrole göre hesaplanmıştır (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

4.1.4. TSA, VPA ve NGF'nin İkili (VPA+TSA) ve Üçlü (VPA+TSA+NGF) Kombinasyonlar Halinde Uygulandığı C6 Glioma Hücre Soyuna Ait Hücre Canlılık Testi Bulguları

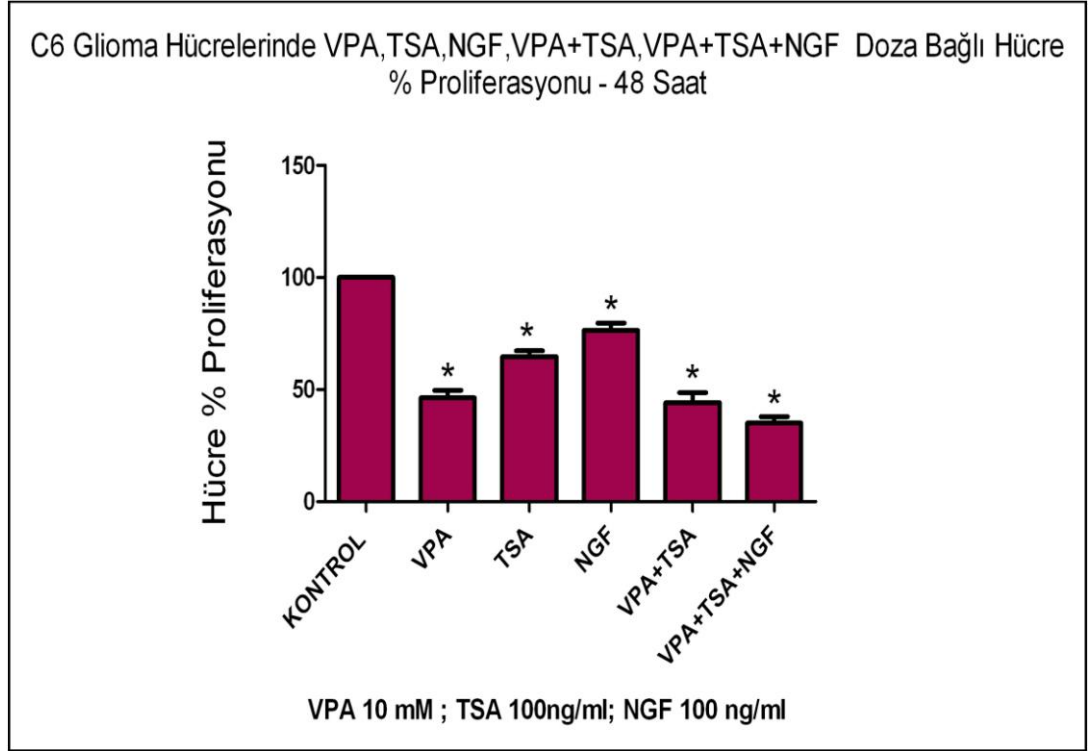
Sıçandan elde C6 glioma hücreleri üzerindeki, sitotoksik etkiyi incelemek amacıyla, VPA, TSA ve NGF tek başına, ikili (VPA+TSA) ve üçlü (VPA+TSA+NGF) kombinasyonları ile en etkin oldukları dozlarda, (10mM, 100 ng/ml, 100 ng/ml) 48 saat boyunca kültüre edilmiştir. Kontrol ile karşılaştırıldığında tüm deney gruplarında hücre canlılığında azalma (VPA: 46.41 ± 2.51 , TSA: 54.69 ± 1.86 , NGF: 64.31 ± 3.18 , VPA+TSA: 40.13 ± 1.96 , VPA+TSA+NGF: 33.79 ± 1.39) meydana gelmesine karşın en fazla öldürücü etki VPA+TSA+NGF'nin üçlü kombinasyon halinde uygulandığı deney grubunda gözlenmiş ve hücre canlılığında meydana gelen bu azalma istatistiksel olarak anlamlı düzeyde gerçekleşmiştir ($p < 0.05$) (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: VPA, TSA, NGF, VPA+TSA, VPA+TSA+NGF' nin konsantrasyon ve zamana bağlı olarak C6 glioma hücrelerinin sağkalımı üzerindeki etkisi. Farklı deney gruplarından elde edilen veriler ortalama \pm standart hata (SEM) olarak ifade edilmiştir. p değerleri kontrole göre hesaplanmıştır (* $p < 0.05$).

4.1.5. Bromodeoksiüridin (BrdU) ile Hücre Çoğalması Analizine Ait Bulgular

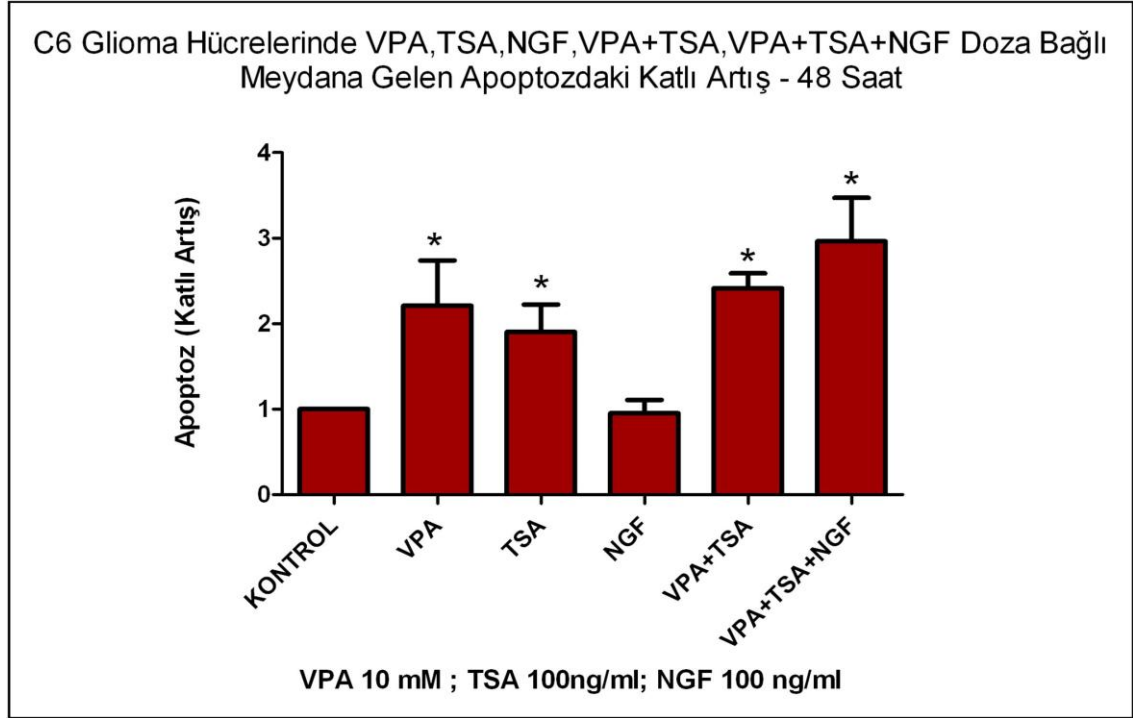
VPA, TSA ve NGF'nin tekli, ikili (VPA+TSA) ve üçlü (VPA+TSA+NGF) kombinasyonu ile en etkin oldukları dozda (10mM, 100 ng/ml, 100 ng/ml) 48 saat boyunca kültürü yapılan C6 glioma hücrelerinde bulunan bölünen hücre miktarını belirlemek amacıyla yapılan BrdU Elisa testi sonunda, kontrol grubu ile kıyaslandığında tüm deney gruplarında hücre çoğalmasında azalma (VPA: 46.37 ± 6.71 , TSA: 64.64 ± 5.41 , NGF: 76.49 ± 6.34 , VPA+TSA: 44.18 ± 9.04 , VPA+TSA+NGF: 35.09 ± 5.57) görülmüştür. Hücre çoğalmasında meydana gelen maksimum azalma VPA+TSA+NGF'nin üçlü kombinasyon halinde verildiği deney grubunda gözlenmiş ve hücre çoğalmasında meydana gelen bu azalma istatistiksel olarak anlamlı düzeyde gerçekleşmiştir ($p < 0.05$) (Şekil 4.5).



Şekil 4.5: VPA, TSA, NGF, VPA+TSA, VPA+TSA+NGF' nin konsantrasyon ve zamana bağlı olarak C6 glioma hücrelerinin hücre çoğalması üzerindeki etkisi. Farklı deney gruplarından elde edilen veriler ortalama \pm standart hata (SEM) olarak ifade edilmiştir. p değerleri kontrole göre hesaplanmıştır (* $p < 0.05$).

4.1.6. Apoptotik Hücre Ölümü Analizine Ait Bulgular

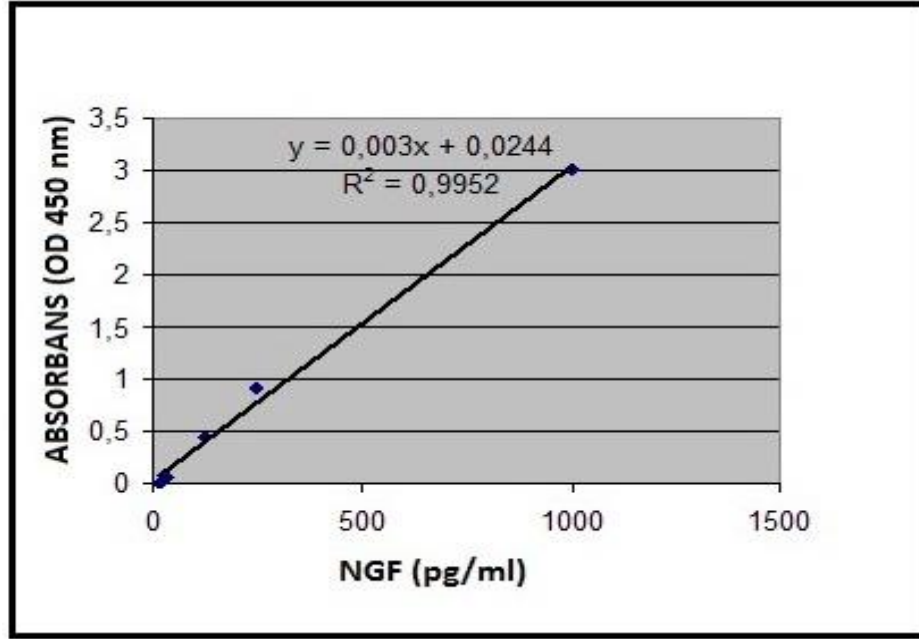
VPA, TSA, NGF, VPA+TSA, VPA+TSA+NGF'nin farklı dozlarına 48 saat maruz bırakılan C6 glioma hücrelerinde meydana gelen apoptozdaki katlı artışı belirlemek amacıyla gerçekleştirilen deneyler sonucunda tüm deney gruplarında artış gözlenmiştir (VPA: 2.20 ± 1.06 , TSA: 1.90 ± 0.64 , NGF: 0.95 ± 0.31 , VPA+TSA: 2.41 ± 0.34 , VPA+TSA+NGF: 2.96 ± 1.01). C6 glioma hücrelerinde meydana gelen apoptozdaki katlı artış, en fazla VPA+TSA+NGF'nin üçlü kombinasyon halinde verildiği deney grubunda gözlenmiş ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı düzeyde gerçekleşmiştir ($p < 0.05$) (Şekil 4.6).



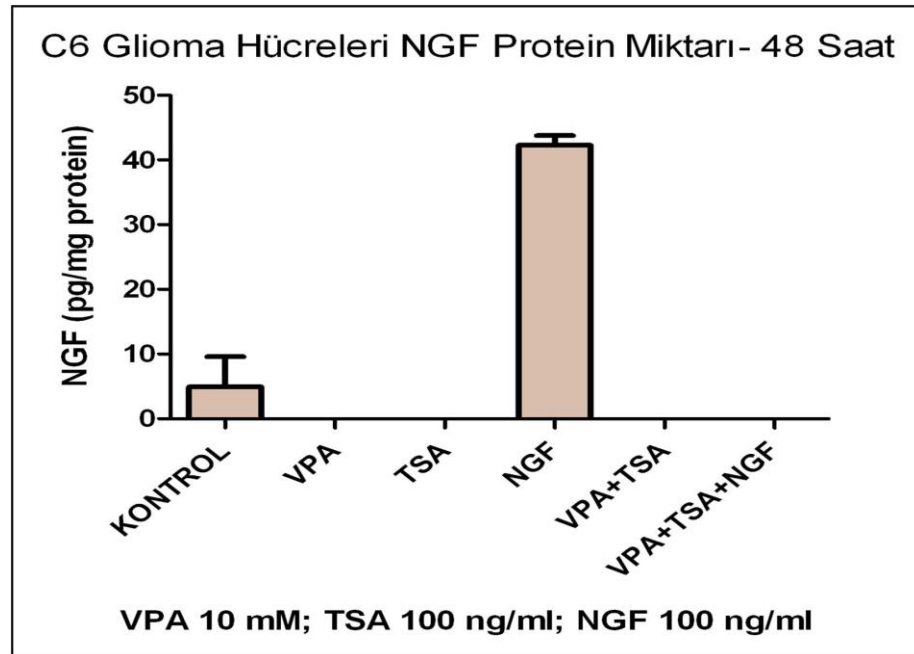
Şekil 4.6: VPA, TSA, NGF, VPA+TSA, VPA+TSA+NGF' nin konsantrasyon ve zamana bağlı olarak C6 glioma hücrelerinde meydana getirdiği apoptozdaki katlı artış miktarı. Farklı deney gruplarından elde edilen veriler ortalama \pm standart hata (SEM) olarak ifade edilmiştir. p değerleri kontrole göre hesaplanmıştır (* $p < 0.05$).

4.1.7. NGF Miktarı Analizine Ait Bulgular

VPA, TSA, NGF, VPA+TSA, VPA+TSA+NGF'ye maruz bırakılmış C6 glioma hücre soyuna ait farklı deney gruplarındaki NGF miktarını saptamak amacıyla tasarlanan deneyden elde edilen veriler sonucunda, kontrol ve NGF grubunda, NGF miktarının arttığı ve en fazla artışın NGF grubunda meydana geldiği gözlenmiştir (Kontrol: 4.93 ± 6.60 , NGF: 42.28 ± 2.10). Kontrol ve NGF deney grubunda NGF miktarında meydana gelen artış istatistiksel olarak anlamlı düzeyde gerçekleşmemiştir ($p > 0.05$) (Şekil 4.8).



Şekil 4.7: NGF standart grafiği



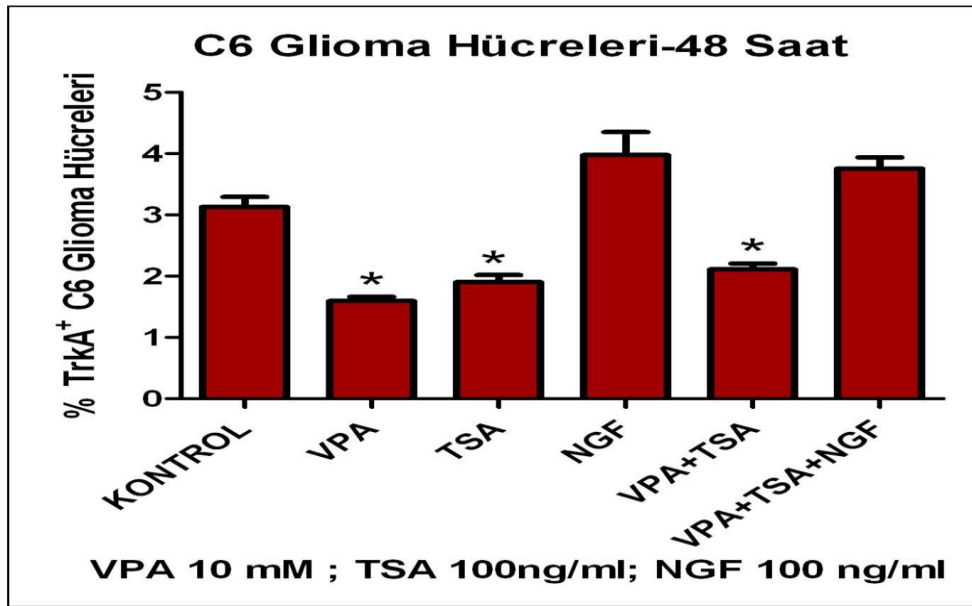
Şekil 4.8: VPA, TSA, NGF, VPA+TSA, VPA+TSA+NGF' nin farklı dozlarına maruz kalmış C6 glioma hücrelerine ait NGF miktarı. Farklı deney gruplarından elde edilen veriler ortalama \pm standart hata (SEM) olarak ifade edilmiştir. Gruplar arasında anlamlı bir istatistiksel saptanmamıştır ($p > 0.05$).

4.2. MİKROSKOBİK BULGULAR

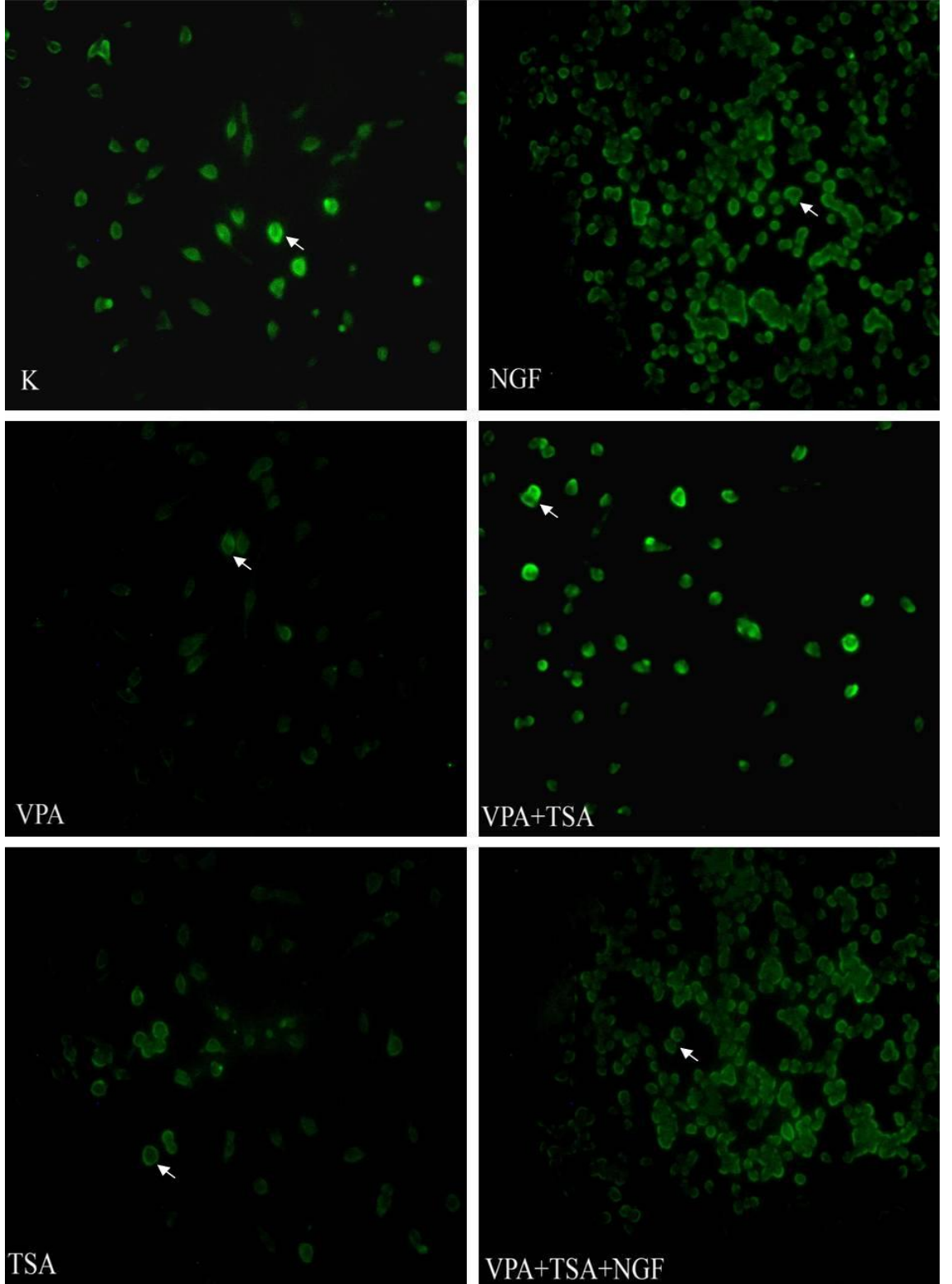
% TrkA⁺ ve % Kaspaz 3⁺/ p75⁺ C6 glioma hücrelerinin sayısını belirlemek amacıyla kullanılan mikroskopik yöntemlerin sonunda elde edilen veriler mikroskopik bulgular başlığı altında değerlendirilmiştir.

4.2.1. TrkA İmmüno Floresan İşaretleme Tekniğine Ait Bulgular

VPA, TSA, NGF, VPA+TSA, VPA+TSA+NGF'nin farklı dozlarına 48 saat maruz bırakılan TrkA⁺ C6 glioma hücrelerini belirlemek amacıyla uygulanan immüno floresan işaretleme tekniği sonucunda, tüm deney gruplarında TrkA⁺ hücreler (Kontrol : 3.13 ± 0.323625 VPA: 1.59 ± 0.144, TSA: 1.90 ± 0.23, NGF: 3.98 ± 0.75, VPA+TSA: 2.11 ± 0.18, VPA+TSA+NGF: 3.75 ± 0.36) gözlenmiştir. % TrkA⁺ C6 glioma hücreleri en fazla NGF'nin tek başına uygulandığı deney grubunda gözlenmiş, ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı düzeyde gerçekleşmemiştir (Şekil 4.9).



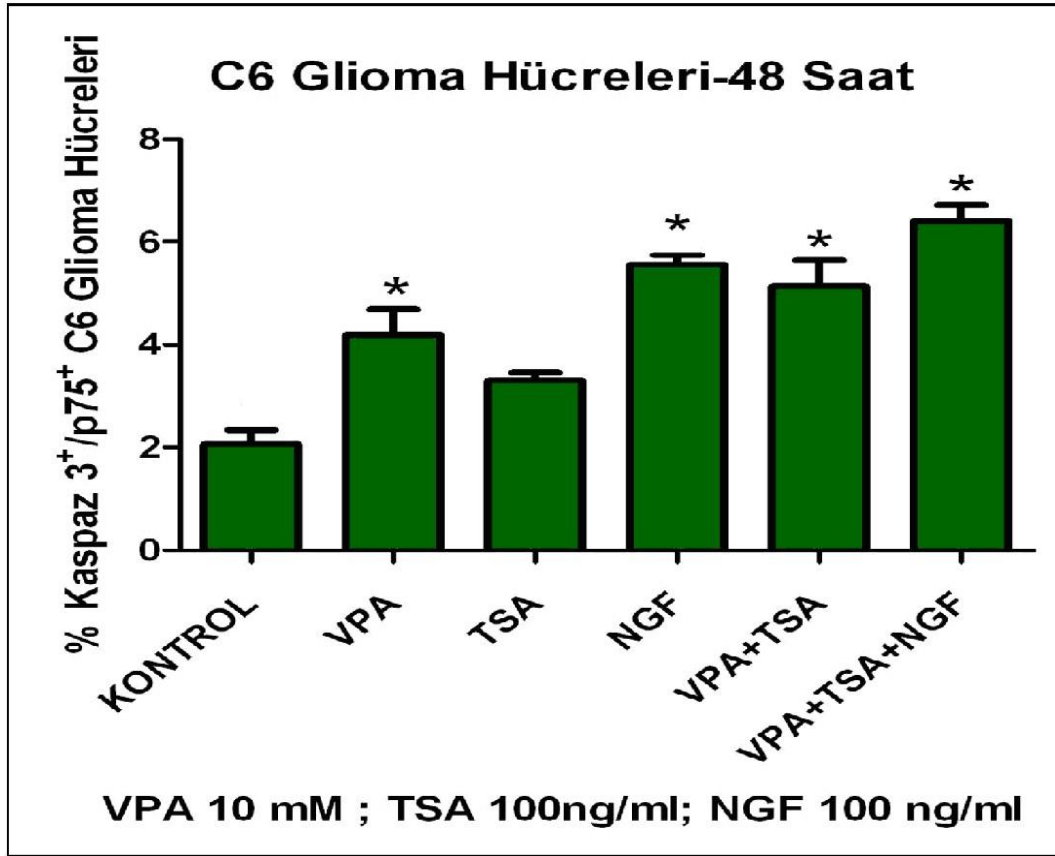
Şekil 4.9: VPA, TSA, NGF, VPA+TSA, VPA+TSA+NGF' ye 48 saat maruz kalmış C6 glioma hücrelerinin % TrkA⁺ oranları. Farklı deney gruplarından elde edilen veriler ortalama ± standart hata (SEM) olarak ifade edilmiştir (*p<0.05).



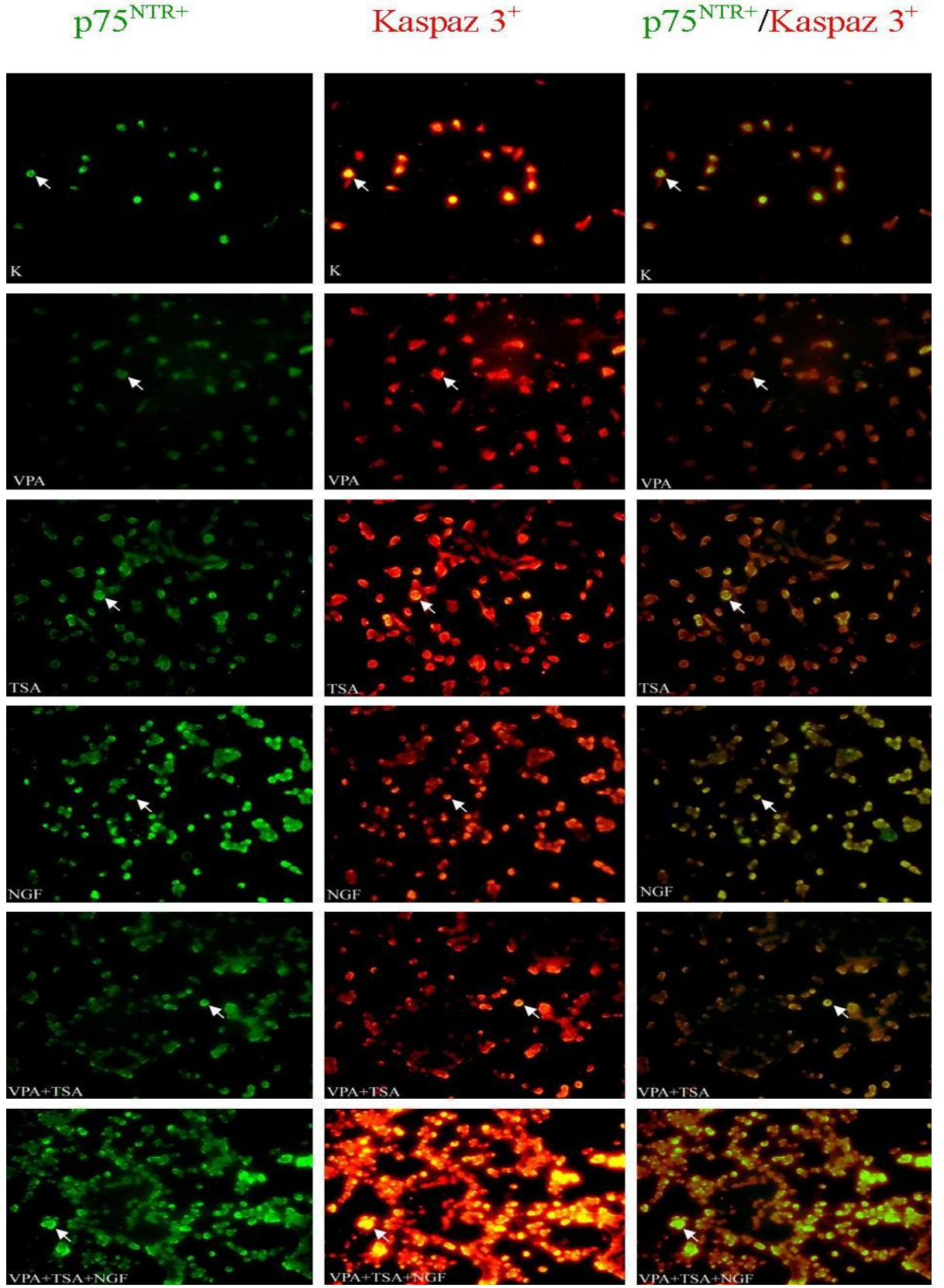
Şekil 4.10: VPA, TSA, NGF, VPA+TSA, VPA+TSA+NGF'ye 48 saat maruz kalmış deney gruplarına ait TrkA⁺ C6 Glioma hücreleri (yeşil,→) görülmektedir. X 200

4.2.2. Kaspaz-3/p75^{NTR} İkili İmmüno Floresan İşaretleme Tekniğine Ait Bulgular

VPA, TSA, NGF, VPA+TSA, VPA+TSA+NGF'nin farklı dozlarına 48 saat maruz bırakılan Kaspaz-3⁺/P75^{NTR+} C6 glioma hücrelerini belirlemek amacıyla uygulanan ikili immüno floresan işaretleme tekniği sonucunda, tüm deney gruplarında Kaspaz-3⁺/P75^{NTR+} hücreler (Kontrol : 2,07± 0.53 VPA: 4.2 ± 0.96, TSA: 3.31 ± 0.24, NGF: 5.56 ± 0.36, VPA+TSA: 5.13 ± 1.02, VPA+TSA+NGF: 6.41 ± 0.60) gözlenmiştir. % Kaspaz-3⁺/P75^{NTR+} C6 glioma hücreleri en fazla VPA+TSA+NGF'nin üçlü kombinasyon halinde uygulandığı deney grubunda gözlenmiş ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı düzeyde gerçekleşmiştir (p<0.05) (Şekil 4.11).



Şekil 4.11: VPA, TSA, NGF, VPA+TSA, VPA+TSA+NGF'ye 48 saat maruz kalmış C6 glioma hücrelerinin % Kaspaz-3⁺/P75^{NTR+} oranları. Farklı deney gruplarından elde edilen veriler ortalama ± standart hata (SEM) olarak ifade edildi (*p<0.05).



Şekil 4.12: VPA, TSA, NGF, VPA+TSA, VPA+TSA+NGF'ye 48 saat maruz kalmış deney gruplarına ait P75^{NTR+} (yeşil), Kaspaz-3⁺ (kırmızı) ve Kaspaz-3⁺/P75^{NTR+} (sarı→) C6 glioma hücreleri görülmektedir. X 200

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Dünyada ve Türkiye’de nörodejeneratif hastalıklar ve beyin tümörüne sahip insan sayısı her geçen gün artmasına karşın, merkezi sinir sistemine ait bu hastalıklara karşı henüz kesin bir tedavi yöntemi geliştirilememiştir (Sleiman, 2009). Bu durum bilim adamlarını farklı arayışlara yöneltmiştir. Klinikte kullanılan mevcut teröpatik ajanlar seçici özellikte olmadıkları için, hastalıklı hücreler üzerinde meydana getirdikleri sitotoksik etkiyi normal hücreler üzerinde de meydana getirerek, istenmeyen sonuçlar doğmasına neden olmaktadır. Günümüzde, merkezi sinir sistemi hastalıklarının tedavisi için yapılan araştırmalarda, geleneksel tedavi yaklaşımlarının dışına çıkılarak, daha özgün bir yöntem olan “hedefleme” tedavisi üzerinde yoğunlaşmaya başlanılmıştır. Çeşitli sinyal iletimi yolları, büyüme faktörleri ve bunların reseptörleri, hücre döngüsü düzenleyicileri ve apoptoz sürecinde görev alan çeşitli düzenleyici moleküller seçili hedefleri bulunan, yeni tedavi yaklaşımlarının temel odak noktalarını oluşturmaktadır (Kansu, 2005).

Son zamanlarda, gerek malign hücrelerde kromatin yapısının hücre çoğalması ve sağkalımı ile bağlantılı sinyal yollarında görev aldığına dair verilerin artması gerekse nörodejeneratif hastalıklarda kromatinin yapısında değişikliklerin meydana geldiğinin ortaya çıkması, kromatini bahsi geçen hastalıkların tedavisi için kullanılacak bir hedef haline getirmiştir (Marks ve diğ., 2001). Beyin tümörü ve nörodejeneratif hastalıklarda meydana geldiği gözlenen epigenetik olayların başını DNA metilasyonu ve histon asetilasyonu çekmektedir. 1960’lı yılların başından günümüze kadar yapılan çalışmalar asetillenmiş histonların kromatini transkripsiyonel olarak aktif, deasetillenmiş histonların ise kromatini transkripsiyonel olarak inaktif hale getirdiğini ortaya koymuştur. Histonlara asetil gruplarının eklenmesi ya da asetil gruplarının uzaklaştırılması HAT ve HDAC’ler olarak adlandırılan iki enzim ailesi tarafından gerçekleştirilmektedir. Histonlarda meydana gelen ve gen düzenlenmesine etki eden epigenetik değişiklikler, merkezi sinir sistemine ait çeşitli nörodejeneratif hastalıkların (AD, PD ve felç) ve primer beyin tümörünün ortaya çıkmasında aktif rol oynar. Histonların, hastalıkların ortaya çıkmasında oynadığı rol anlaşıldıkça, HDAC’lerin engellenmesiyle hastalıkların önleneceği düşüncesi, HDAC’lerin bu fonksiyonlarını engelleyecek ilaçların tasarımına ve doğal kimyasalların araştırılmasına yol açmıştır

(Yoo ve diğ., 2006). Histon deasetilaz inhibitörleri, histon ve histon olmayan proteinlerin işlevlerini ve dolayısıyla gen transkripsiyonunu düzenleyerek histon asetilasyonunu arttıran ve bu yolla kromatinin daha açık bir yapıya kazanmasına neden olan çeşitli ajanlardır. Bu moleküllerin, histon ve histon olmayan proteinler üzerinde etki göstererek, hücre büyümesini durdurduğu, apoptozu ve farklılaşmayı arttırdığı ve yeni damar oluşumunu durdurduğu *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda gösterilmiştir (Magner ve diğ., 2000; Qian ve diğ., 2006). Bu çalışmada iki farklı histon deasetilaz inhibitörü olan TSA ve VPA ile çalışılmıştır.

VPA, uzun yıllar bipolar hastalıklar ve epilepsi tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir ilaç iken, sonradan HDAC inhibitörü olduğunun keşfedilmesiyle dikkatleri üzerine çekmiş ve farklı amaçlar için kullanılmaya başlanmıştır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, VPA'nın birçok kanser hücre soyunda çoğalmayı inhibe ettiği, farklılaşmayı düzenlediği; bunun yanı sıra tümör yayılımı ve anjiyojenez üzerine etkileri olduğu bildirilmiştir (Xia ve diğ., 2006).

VPA'nın, insan endometriyal stromal kanser hücrelerine 3 mM'lık doz ve 16 saatlik sürede uygulandığında, hücre döngüsünün durmasını ve p21 ekspresyonunu tetiklediği (Wu ve Guo, 2007), C6 glioma hücrelerinde 2 mM'lık dozda ve 24 saatlik sürede uygulandığında gliyal fibriler asidik protein (GFAP) geninin ekspresyonunu teşvik ettiği (Morita ve diğ., 2009), BDNF (Fukumoto ve diğ., 2001) ve GDNF (Fukumoto ve diğ., 2001) gibi nörotrofinlerin ekspresyonunu değiştirdiği, kronik olarak uygulandığında kültürü yapılan nöronları oksidatif strese karşı koruduğu (Wang ve diğ., 2003), çeşitli insan lösemi hücre soylarında apoptozu tetiklediği (Kawagoe ve diğ., 2002), benzer dozlarda uygulandığında sıçan serebral kortikal nöronlarını kendiliğinden meydana gelen ölüme karşı koruduğu ve bu nöronların yaşam süresini uzattığı (Jeong ve diğ., 2003), teröpatik dozlarının C6 glioma hücrelerinde ve sıçan beyinde aktivatör protein-1'in (AP-1) DNA'ya bağlanma aktivitesini arttırdığı (Chen ve diğ., 1997), nöral progenitör hücrelerin farklılaşmasını tetiklediği (Hsieh ve diğ., 2004), nöroblastoma hücre soylarında nöronal belirteçlerin ekspresyonunu arttırdığı ve inflamasyonun artmasını teşvik ettiği (Yuan ve diğ., 2001; Stockhausen ve diğ., 2005), dopaminerjik nöronları nörotoksisiteden koruduğu (Peng ve diğ., 2005) ve bazı durumlarda nöronal hücre ölümünü teşvik ettiği (Jin ve diğ., 2005) ve prostat kanser hücre soyu olan LNCaP hücrelerinin *in vitro* modelinde apoptozu tetiklediği (Thelen ve diğ., 2004), buna karşın SHSY-5Y nöroblastoma hücrelerinde

apoptozu baskıladığı ve koruyucu bir etki sergilediği (Pan ve diğ., 2005), endotelial hücrelerde hücre dışı sinyallerle düzenlenen kinaz 1/2 (ERK 1/2) aktivasyonunu tetiklediği ve apoptozu engellediği (Michaelis ve diğ., 2006), oksidatif stresle bağlantılı olarak glioma hücrelerinde (U87 MG, SF295 ve T98G) otofajiyi tetiklediği (Fu ve diğ., 2010), C6 glioma hücrelerini endoplazmik retikulumda meydana gelen strese bağlı olarak tetiklenen hücre ölümüne karşı koruduğu (Bown ve diğ., 2000) değişik çalışmalarda bildirilmiştir. Çalışmamızda VPA'nın 10 mM'lık dozunun 48 saatte C6 glioma hücrelerinin çoğalmasını azaltıp, hücreleri apoptoza götürdüğü gözlenmiştir.

TSA başlangıçta anti-fungal antibiyotik olarak, daha sonra ise özgün bir HDAC inhibitörü olarak tanımlanmıştır (Tsuji ve diğ., 1976). HDAC'leri inhibe etme özelliği olduğu keşfedildikten sonra, TSA'nın *in vitro* olarak çeşitli kanser hücre soylarında hücre çoğalmasını engellediği ve apoptozu tetiklediği bildirilmiştir. TSA, eritrolösemi hücrelerinde güçlü bir şekilde hücre farklılaşmasını tetiklemekte (Yoshida ve diğ., 1987), kolon kanseri hücre soyunda iyonize radyasyonun sitotoksik etkisini güçlendirmekte (Biade ve diğ., 2001), insan glioblastoma hücre soyu U251 MG'den VEGF salınımını engellemekte (Sawa ve diğ., 2002), insan glioma hücrelerinde 40 ng/ml dozda ve 48 saatlik sürede uygulandığında (T98G, A172, U-87 MG, U118 MG, U373MG) p21WAF/Cip1 ve gelsolin tetiklendiği zaman glioma hücre çoğalmasını %50'den fazla baskılayabilmekte (Kamitani ve diğ., 2002), hepatoma hücrelerinde çoğalmayı engellemekte ve apoptotik programları tetiklemekte (Herold ve diğ., 2002), insan kafa (HN-3) ve boyun (HN-9) kanseri hücre soylarında iyonize radyasyonun sitotoksik etkisini güçlendirmekte (Kim ve diğ., 2004), insan endometriyal stromal hücrelerinde hücre çoğalmasını baskılamakta (Krikun ve diğ., 2004), p21^{WAF1/CIP1} aracılığıyla idrar kesesi kanseri hücrelerinin büyümesini engellemekte ve hücre döngüsünü G1 fazında durdurmakta (Zhang ve diğ., 2006), insan SGC-7901 gastrik kanseri hücre soyunda kaspaz-bağımsız yolla apoptozu tetiklemektedir (Wu ve diğ., 2007). Hsu ve arkadaşları (2011) C6 glioma hücre soyu üzerinde yaptıkları bir çalışmada, TSA'nın apoptotik hücre ölümünü tetiklediğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda TSA'nın 100 ng/ml'lik dozunun 48 saatte C6 glioma hücrelerinin çoğalmasını azaltıp, hücreleri apoptoza götürdüğü gözlenmiştir.

NGF, büyüme faktörlerinin nörotrofin sınıfına ait en iyi tanımlanmış üyelerinden bir tanesidir (Levi-Montalcini ve diğ., 1996). Normal koşullar altında NGF yetişkin beyninde ağırlıklı olarak nöronal hücrelerde üretilir ve bu hücrelerden salınır (Ayer ve diğ., 1988). Bazı patolojik durumlarda reaktif olan astroglial hücreler, astrositoma ve glioblastoma gibi gliyal tümör hücreleri de NGF üretir ve çevre dokuya salar (Bakhit ve diğ., 1991; Arendt ve diğ., 1995). C6 glioma hücreleri hem astrosit hem de oligodendrositlerin özelliklerini gösteren karma bir hücre soyu olup, glial hücre fonksiyonunu çalışmak için oldukça iyi bir modeldir (Kumar ve diğ., 1984; Vielkind ve diğ., 1990; Vernadakis ve diğ., 1991).

NGF ve NGF reseptörlerinin ekspresyonu, bu hücre soyunda, *in vivo* ve *in vitro* olarak iyi belirlenmiştir (Kumar ve diğ., 1990; Zanellato ve diğ., 1994; Tornatore ve diğ., 1997). NGF'nin, *in vivo*'da C6 glioma hücre soyunun büyümesini inhibe ettiği (Kimura ve diğ., 2002), 9L glioma, PC12 feokromositoma ve C6 glioma hücre soylarında serum yoksunluğunda hücre sağkalımını azalttığı (Knüpfner ve Arendt, 2001), insan nörojenik tümör hücre soylarının büyümesini engellediği (Yaeger ve diğ., 1991), insan karaciğer kanser hücre soyunda klonal büyümeyi teşvik ettiği (Oelmann ve diğ., 1999), C6 glioma hücrelerini etanol tetikli hücre ölümünden koruduğu (Kim ve diğ., 1999) çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir.

NGF, hücre yüzeyinde bulunan iki farklı reseptör p75^{NTR} ve TrkA aracılığı ile etkisini gösterebilir. NGF ve reseptörlerinin (p75-TrkA) hücre çoğalması ve ölümündeki muhtemel rolleri insan glioblastoma hücre soylarında gösterilmiştir. NGF'nin insan glioblastoma hücre soylarında serum yokluğunda, bu hücre soyunda çoğaltıcı bir etkisi olduğu ve bu etkinin TrkA aracılığıyla meydana geldiği (Singer ve diğ., 1999) bildirilmesine karşın, başka bir araştırma grubu NGF muamelesinin C6 glioma hücrelerinin sayısını serumsuz medyumda güçlü bir şekilde azalttığını ortaya koymuşlardır (Watanebe ve diğ., 1999). Diğer bir NGF reseptörü olan p75'in ise, glioblastoma hücre soylarında baskın bir şekilde eksprese edildiğinde, serumsuz medyumda kontrolle kıyaslandığında, hücre çoğalmasının daha az olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda NGF'nin 100 ng/ml'lik dozunun 48 saatte C6 glioma hücrelerinin çoğalmasını azaltıp, hücreleri apoptoza götürdüğü gözlenmiştir.

VPA ve TSA tek başlarına uygulandıklarında, C6 glioma hücre soyu da dahil olmak üzere çeşitli kanser hücre soylarında (nöroblastoma, meme, glioma, prostat) antiproliferatif ve apoptotik etkisi olduğu ortaya konulmuş ancak bu iki HDAC inhibitörü daha önce hiçbir çalışmada ikili (VPA+TSA) ve üçlü (VPA+TSA+NGF) kombinasyonlar halinde uygulanmamıştır. Bu çalışma, VPA ve TSA olarak adlandırılan iki histon deasetilaz inhibitörünün C6 glioma hücre soyunun çoğalması, hücre sağkalımı ve apoptotik hücre ölümü üzerindeki etkisini belirlemek ve bu etkinin iyi karakterize edilmiş bir büyüme faktörü olan NGF tarafından etkilenip etkilenmeyeceğini ortaya koymak için tasarlanmıştır.

Bu amaçla, önce sıçan beyninden elde edilen kanser hücre soyu C6 glioma hücreleri VPA, TSA ve NGF'ye tek başına farklı doz ve sürelerde maruz bırakılmıştır. VPA, TSA ve NGF'ye ait farklı deney gruplarından elde edilen hücre sağkalım verileri göz önünde bulundurulduğunda, en az sağkalımın meydana geldiği doz ve sürelerin VPA için 10 mM-48 saat, TSA için 100 ng/ml-48 saat ve NGF için 100 ng/ml -48 saat olduğu tespit edilmiştir. VPA, TSA ve NGF etkin dozları belirlendikten sonra, tek tek (VPA, TSA, NGF), ikili (VPA+TSA) ve üçlü (VPA+TSA+NGF) kombinasyonlar halinde en etkin oldukları süre olan 48 saatte C6 glioma hücrelerine uygulanmış, değerlendirme aşamasından sonra hücre sağkalımında en fazla azalmanın meydana geldiği deney grupları şöyle sıralanmıştır: VPA+TSA+NGF, VPA+TSA, VPA, TSA, NGF.

Etkin oldukları dozlar belirlendikten sonra VPA, TSA ve NGF'nin tekli, ikili (VPA+TSA) ve üçlü (VPA+TSA+NGF) kombinasyonlarının 48 saatte C6 glioma hücre çoğalması üzerinde meydana getireceği etki saptanmak istenmiştir. Bahsi geçen farklı deney gruplarına ait hücre çoğalma oranları değerlendirildiğinde, tüm deney gruplarında azalma meydana geldiği gözlenmiş ve çoğalma oranlarının en az olduğu gruplar şöyle sıralanmıştır: VPA+TSA+NGF, VPA+TSA, VPA, TSA, NGF. Wu ve arkadaşları (2007), insan endometriyal stromal hücre soyu üzerinde yaptıkları çalışmada, VPA ve TSA'nın birbirinden bağımsız olarak p21 ekspresyonunu arttırdığını ve hücre döngüsünün durmasını tetiklediğini ortaya koymuş bu veri de VPA ve TSA'nın hücre döngüsü üzerinde benzer sonuçlar meydana getirdiğini düşündürmüştür. VPA+TSA deney grubuna ait hücre çoğalma oranının, VPA ve TSA'nın tek tek uygulandığı deney grubuna ait hücre çoğalma oranlarından, daha az olması bu iki ilacın C6 glioma hücre

soyunda da benzer etkiler meydana getirmiş olabileceğini düşündürmüştü, ancak bu çalışmamızda hücre döngüsü analizi ve gen ekspresyon çalışması yapılmadığından kesin bir yargıya varılamamıştır. Buna karşın C6 glioma hücrelerine ait farklı deney gruplarının hücre sağkalım ve hücre çoğalma oranlarına ait veriler birbiri ile kıyaslanmış ve hem hücre sağkalımında hem de hücre çoğalma oranlarında meydana gelen azalma arasında bir paralellik olduğu düşünülmüştür.

VPA, TSA ve NGF'nin tekli, ikili (VPA+TSA) ve üçlü (VPA+TSA+NGF) kombinasyonu ile 48 saat muamele edildikten sonra, hücre sağkalımı ve çoğalması üzerinde azalma gözlenen gruplarda meydana gelen hücre ölümünün apoptozla bağlantılı olup olmadığı belirlenmek istenmiştir. Bu amaçla tasarlanan deneylerin sonuçları değerlendirildiğinde, tüm deney gruplarında apoptozda katlı artış meydana geldiği gözlenmiştir. TSA'nın tek başına uygulandığı deney grubunda meydana gelen apoptozdaki artış, Hsu ve arkadaşlarının (2011) C6 glioma hücre soyu üzerinde apoptozla ilgili yaptıkları çalışma sonucu ile paralellik göstermiştir. VPA+TSA ikili kombinasyonunun C6 glioma hücrelerinde meydana getirdiği apoptozdaki katlı artışın VPA ya da TSA'nın tek başına uygulandığı deney grubundan daha fazla olması, bu iki HDAC inhibitörünün birbirinin etkisini azaltmadığını, aksine C6 glioma hücrelerinin apoptotik ölümü üzerinde sinerjik etki gösterdiğini düşündürmüştür.

VPA, TSA ve NGF'nin tekli, ikili (VPA+TSA) ve üçlü (VPA+TSA+NGF) kombinasyonu ile 48 saat muamele edilmiş C6 glioma hücre soyuna ait farklı deney gruplarındaki NGF protein miktarını belirlemek amacıyla kurgulanan, deney sonuçlarından elde edilen verilere göre, VPA, TSA ve VPA+TSA+NGF'ye ait deney gruplarında NGF proteinine rastlanmamış, buna karşın kontrol ve NGF deney grubunda NGF miktarı belirlenebilmiştir. Literatürde TSA'nın NGF proteinin üretimi üzerinde herhangi bir etkiye sahip olup olmadığına dair bir bilgi bulunmamaktadır. Buna karşın, C6 glioma hücre soyunda, VPA'nın BDNF (0.5, 1, 3 ve 5 mM-48 saat) ve GDNF mRNA (1, 3 ve 5mM-48 saat) ekspresyonunu arttırdığına ve artışların anlamlı bulunduğu veriler bulunmaktadır (Castro ve diğ., 2005). Bu verilerden yola çıkıldığında, VPA'nın C6 glioma hücre soyunda nörotrofin ailesinin başka bir üyesi olan NGF üretimini de tetikleyebileceği öngörüsünde bulunulabilir. Ancak VPA, TSA, VPA+TSA, VPA+TSA+NGF'ye ait deney gruplarının sonuçları değerlendirildiğinde,

VPA ve TSA'nın hem tek tek hem de ikili kombinasyon halinde uygulandığında, NGF üretimini engellediği tespit edilmiştir.

NGF'nin tek başına uygulandığı deney grubundaki NGF miktarının kontrol grubundaki NGF protein miktarından daha fazla olduğunu gözlenmiştir. Çalışmamızdan elde edilen bu veri, NGF muamelesine maruz kalan C6 glioma hücrelerinde NGF salınımının teşvik edildiğini öne süren çalışma (Kumar ve diğ., 1990; Zanellato, 1994) sonucu ile paralellik göstermekte, ancak uygulanan doz ve sürelerin farklılık göstermesi bakımından bu çalışmadan ayrılmaktadır. VPA, TSA ve NGF'nin tekli, ikili (VPA+TSA) ve üçlü (VPA+TSA+NGF) kombinasyonu ile 48 saat muamele edilmiş, yüksek affiniteli NGF reseptörü olan TrkA'nın varlığını göstermek üzere tasarlanan çalışmanın tüm deney gruplarında TrkA varlığı saptanmıştır. Kontrol, NGF ve VPA+TSA+NGF'ye ait deney gruplarındaki TrkA miktarının VPA ve TSA'ya ait deney gruplarında bulunan TrkA miktarından daha fazla olduğu gözlenmiştir. Çalışmamızdan elde edilen bu veri NGF protein miktarı verileri ile beraber değerlendirildiğinde, NGF muamelesinin hem NGF hem de NGF yüksek affiniteli reseptörü TrkA'nın üretimini teşvik ettiği açık bir şekilde gözlenir.

Apoptotik yolda iş gören moleküllerden bir ya da birkaçının aktivitesinin gösterilmesi ile bu ölüm tipini meydana getiren hücresel mekanizma açığa çıkarılabilir. Çalışmamızda bahsi geçen mekanizmayı açığa çıkarmak için, apoptotik süreçte rol alan en önemli moleküllerden biri olan kaspaz 3 seçilmiştir. TNF reseptör ailesinin bir üyesi olarak tanımlanan p75^{NTR}'nin nöronal hücre soylarında Trk reseptörleri ekprese edilmediğinde, NGF tarafından tetiklenen hücre ölümüne aracılık ettiği gösterilmiştir (Rabizadeh ve diğ., 1993). Bir diğer çalışmada (Weis ve diğ., 2002) ise NGF'nin C6 glioma hücre soyunun büyümesi üzerinde meydana getirdiği negatif etkinin gerçekleşmesi için p75^{NTR}'in bazal seviyede bulunması gerektiği bildirilmiştir. Tüm bu veriler göz önünde bulundurulduğunda, C6 glioma hücre soyunda meydana gelen apoptotik hücre ölümünün p75^{NTR} ile olan bağlantısı ortaya konmak istenmiş, bu nedenle kaspaz 3 ve p75^{NTR}'nin varlığı aynı hücrede gösterilmek istenmiştir. Bu amaçla tasarlanan deney gruplarından elde edilen veriler değerlendirildiğinde, kaspaz 3/p75^{NTR}'yi beraber bulunduran hücreleri en fazla barındıran deney grupları şöyle sıralanmıştır: VPA+TSA+NGF, NGF, VPA+TSA, VPA, TSA ve Kontrol.

Çalışmamız boyunca yapılan tüm deneylerin sonuçları değerlendirildiğinde, C6 glioma hücre soyu üzerinde antiproliferatif ve apoptotik etkinin en fazla meydana geldiği deney grubunun VPA, TSA ve NGF'nin üçlü kombinasyon (VPA+TSA+NGF) halinde uygulandığı grup olduğu gözlenmiştir. Bu gözlem, akla antiproliferatif ve apoptotik etkinin VPA, TSA ve NGF arasındaki hangi etkileşimden kaynaklandığı sorusunu getirmiştir. HDACI'larının çok yönlü hücresel etkilerinin arkasında yatan mekanizmalar henüz tam olarak açıklık kazanamamıştır. Buna karşın mezenkimal kök hücrelerde (MSC) yapılan çalışmalar, HDAC inhibitörleri ile muamele edilen hücrelerin DNA hasarına karşı daha duyarlı bir hale geldiğini ortaya koymuştur (Giovanni ve diğ., 2010). Bu olgu DNA tamirine katılan genlerin düzenlenmesinin doğrudan bir sonucu olabilir.

Transkripsiyonel modelin yanı sıra histon olmayan proteinlerin asetilasyonun da HDAC inhibitörlerinin aktivitesi için önemli olduğu görülmektedir. Bu yolak HDAC inhibitörleri ile muamele edilmiş MSC'de DNA hasar tamirinin bozulmasına katılmış olabilir (Giovanni ve diğ., 2010) VPA+TSA+NGF deney gruplarının Kaspaz 3/p75^{NTR} sonuçları değerlendirildiğinde benzer bir mekanizmanın burada da iş gördüğü düşünülebilir. Şöyle ki, NGF, C6 glioma hücre soyu üzerindeki apoptotik etkisini, düşük affiniteli reseptörü p75^{NTR} aracılığıyla meydana getirir. NGF'nin p75^{NTR}'ye bağlanması ile aktifleşen apoptotik yolakta kaspaz 3 aktifleşerek, DNA'yı 180-200 baz çiftlik fragmentlere ayırır. Kaspaz 3'ün substratları arasında histonların etrafını saran DNA da bulunmaktadır. Kaspaz 3 tarafından kesilmiş DNA'nın tamiri HDAC inhibitörlerinin aracılık ettiği bir mekanizma tarafından engellenir. Bu nedenle, VPA+TSA+NGF deney grubunda, NGF ile tetiklenen apoptotik sürecin HDAC inhibitörleri olan VPA ve TSA tarafından da desteklendiği öne sürülebilir. Bu öngörü en fazla apoptotik etkinin neden VPA+TSA+NGF deney gruplarında meydana geldiğini açıklar niteliktedir.

Sonuçlar:

1. VPA, TSA ve NGF'nin tekli, ikili (VPA+TSA) ve üçlü (VPA+TSA+NGF) kombinasyonu C6 glioma hücrelerine 48 saat uygulandığında hücre sağkalım oranının azaldığı gözlenmiştir.
2. VPA, TSA ve NGF'nin tekli, ikili (VPA+TSA) ve üçlü (VPA+TSA+NGF) kombinasyonu C6 glioma hücrelerine 48 saat uygulandığında, hücre proliferasyon oranının azaldığı gözlenmiştir.
3. VPA, TSA ve NGF'nin tekli, ikili (VPA+TSA) ve üçlü (VPA+TSA+NGF) kombinasyonu C6 glioma hücrelerine 48 saat uygulandığında, apoptoz oranında artış meydana geldiği gözlenmiştir. Çalışmamızda VPA+TSA+NGF üçlü kombinasyonunun hücre ölümü üzerinde, diğer deney gruplarından neden daha fazla etkili olduğuna dair öngörüle bulunulmasına karşın, kesin bir yargıya varılamamıştır. İleride bu alanda yapılacak benzer çalışmalarda, apoptoz sürecinde rol alan sinyal yollarının daha detaylı çalışılması ile, bu konu tam olarak açıklığa kavuşturulabilir.
4. VPA, TSA ve NGF'nin tekli, ikili (VPA+TSA) ve üçlü (VPA+TSA+NGF) kombinasyonu 48 saat uygulandığı, C6 glioma hücrelerine ait deney gruplarının hepsinde TrkA reseptörünün varlığı saptanmış, NGF aracılığı ile meydana gelen apoptotik hücre ölümüne p75^{NTR} 'nin aracılık ettiği gözlenmiştir. Çalışmamızda NGF reseptörlerinin varlığı farklı deney gruplarında gösterilmiş, ancak reseptörlerin aynı deney grubunda hangi oranda eksprese edildiğini ortaya koymayı amaçlayan ortak bir ekspresyon çalışması yapılmamış, bu nedenle NGF muamelesi ile tetiklenen apoptotik süreçte TrkA/ p75^{NTR} etkileşiminin rolüne dair bir öngörüle bulunulmamıştır. İleride bu konuda yapılacak benzer çalışmalarda, NGF reseptörlerinin ekspresyon oranının ve sinyal yollarının HDAC inhibitörlerinin muamelesi ile etkilenip etkilenmediğini ortaya koyan daha detaylı çalışmaları ile bu soruya cevap bulmak mümkün olacaktır.

5. Tüm bu veriler göz önünde bulundurulduğunda, HDAC inhibitörleri ile NGF kombinasyonunun, C6 glioma hücre soyu üzerinde meydana getirdiği apoptotik hücre ölümünün, birçok nörodejeneratif hastalığın ve glial kökenli beyin kanserinin tedavisinde kullanılacak terapötik ajanlar olabileceği öne sürülebilir.

KAYNAKLAR

AGUADO, F., BALLABRIGA, J., POZAS, E., FERRER, I., 1998, TrkA immunoreactivity in reactive astrocytes in human neurodegenerative diseases and colchicine-treated rats, *Acta Neuropathologica*, 96: 495–501.

ARCHER, S.Y., HODIN, R.A., 1999, Histone acetylation and cancer, *Current Opinion Genetics Development*, 9 (2):171-4

ARENT, T., BRUCKNER, M.K., KRELL, T., PAGLIUSI, S., KRUSKA, L., HEUMANN, R., 1995, Degeneration of rat cholinergic basal forebrain neurons and reactive changes in nerve growth factor expression after chronic neurotoxic injury-II. reactive expression of the nerve growth factor gene in astrocytes, *Neuroscience*, 65: 647-659

ASSOULINE, JG., BOSCH, P., LIM, R., KIM, IS., JENSEN, R., PANTAZIS, NJ., 1987, Rat astrocytes and Schwann cells in culture synthesize nerve growth factor-like neurite-promoting factors, *Brain Research.*, 428-102-118

AYER, L.C., OLSON, L., EBENDAL, T., SEIGER, A., PERSSON, H., 1988, Expression of the beta nerve growth factor gene in hippocampal neurons, *Science*, 240: 1339-41.

BACCINI, V., ROY, L., VITRAT, N., CHAGRAOUI, H., SABRI, S., LE, COUEDIC, P., DEBILI, N., WENDLING, F., VAINCHENKER, W., 2001, Role of p21 (Cip1/Waf1) in cell-cycle exit of endomitotic megakaryocytes, *Blood*, 98(12):3274-82.

BACON, C.L., GALLAGHER, H.C., HAUGHEY, J.C., REGAN, C.M., 2002, Antiproliferative action of valproate is associated with aberrant expression and nuclear translocation of cyclin D3 during the C6 glioma G1 phase, *Journal of Neurochemistry*, 83: 12-9.

BAKHIT, C. M. ARMANINI, G.L. , BENNETT, W.L. WONG, S.E. HANSEN, R., 1991, It is of interest to identify the receptors in CGC by Taylor, Increase in gliaderived nerve growth factor following which NGF and BDNF produce their biological effects of hippocampal neurons, *Brain Research*, 560 76–83.

BARBACID, M., 1994, The trk family of neurotrophin receptors, *Journal of Neurobiology*, 25: 1386-1403

BARBACID, M., 1995, Neurotrophic factors and their receptors, *Current opinion in cell biology*, 7:148-155

- BARINAGA, M., 1998, Is apoptosis key in Alzheimer disease? *Science*, 281, 1303-1304
- BIADE, S., STOBBE, C.C., BOYD, J.T., CHAPMAN, J.D., 2001, Chemical agents that promote chromatin compaction radiosensitize tumour cells, *International Journal of Radiation Biology*, 77:1033-1042.
- BLAGOSKLONNY, M.V., ROBEY, R., SACKETT, D.L., DU, L., TRAGANOS, F., DARZYNKIEWICZ, Z., FOJO, T., SUSAN, E.B., 2002, Histone Deacetylase Inhibitors All Induce p21 but Differentially Cause Tubulin Acetylation, Mitotic Arrest, and Cytotoxicity, *Molecular Cancer Therapeutics*, 1: 937-941
- BLAHETA, A., CINATL, J.R., 2002, Anti-tumor mechanisms of valproate: a novel role for an old drug, *Medicinal Research Reviews*, 22:492-511.
- BLANDER, G., GUARENTE, L., 2004, The sir2 family of protein deacetylases, *Annual Review of Biochemistry*, 73: 417-35
- BOLDEN, J.E., PEART, M.J., JOHNSTONE, R.W., 2006, Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors, *Nature Reviews Drug Discovery*, 5:769-784.
- BOLDIN, M.P., VARFOLOMEV, E., PANCER, Z., METT, I.L., CAMONIS, J.H., WALLACH, D., 1995, A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death, *Journal of Biological Chemistry*, 270: 7795-7798.
- BOTHWELL, M., 1995, Functional interactions of neurotrophins and neurophin receptors, *Annual Review Neuroscience*, 18, 223-253.
- BOWN, C.D., WANG, J.F., YOUNG, L., 2000, Increased expression of endoplasmic reticulum stress proteins following chronic valproate treatment of rat C6 glioma cells, *Neuropharmacology*, 39: 2162- 2169.
- BREDESEN, D.E., RABIZADEH, S., 1997, p75NTR and apoptosis: Trk-dependent and Trk-independent effects, *Trends Neuroscience*, 20, 287-290.
- CARMICHAEL J., DEGRAFF W. C., GAZDAR A. F., 1987, Viability measurements in mammalian cell systems, *Cancer Research*, 46, 936.
- CARNERO, A., HANNON, G.J., 1998, The INK4 family of CDK inhibitors, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 227, 43.
- CASSACCIA BONNEFIL, P., CARTER, B.D., DOBROWSKY, R.T., CHAO, M.V., 1996, Death oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75, *Nature*, 383,716-719.
- CASTRO, L.M., GALLANT, M., NILES L.P., 2005, Novel targets for valproic acid: up-regulation of melatonin receptors and neurotrophic factors in C6 glioma cells, *International Society for Neurochemistry, Journal of Neurochemistry*, 95, 1227–1236.

- CHAO, M.V., 1994, The p75 neurotrophin receptor, *Journal of Neurobiology*, 25, 1373-1385.
- CHEN, G., YUAN, P., HAWVER, D.B., POTTER, W. Z., MANJI, H. K., 1997, Increase in AP-1 transcription factor DNA binding activity by valproic acid, *Neuropsychopharmacology*, 16, 238-245.
- CHEN, G., ZENG, W. Z., YUAN, P. X., HUANG, L. D., JIANG, Y. M., ZHAO, Z. H., MANJI, H. K., 1999A, The mood-stabilizing agents lithium and valproate robustly increase the levels of the neuroprotective protein bcl-2 in the CNS, *Journal of Neurochemistry*, 72, 879-882.
- CHEN, G., YUAN, P. X., JIANG, Y.M., HUANG, L. D., MANJI H. K., 1999B, Valproate robustly enhances AP-1 mediated gene expression, *Molecular Brain Research*, 64, 52-58.
- CHINNAIYAN, A.M., KO'ROURKE, M., TEWARI, V.M., DIXIT, 1995, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis, *Cell*, 81:505-512.
- CHOU, T.T., TROJANOWSKI, J.Q., LEE, V.M., 2000, A novel apoptotic pathway induced by nerve growth factor-mediated TrkA activation in medulloblastoma, *Journal of Biological Chemistry*, 275:565-570.
- CINATL, J.R., KOTCHETKOV, R., BIAHETTA, R., 2002, Induction of differentiation and suppression of malignant phenotype of human neuroblastoma BE(2)-C cells by valporic acid: enhancement by combination with interferon- α , *International Journal of Oncology*, 20 :97-106
- COHEN, J.J., 1993, Apoptosis, *Immunology Today*, 14(3), 126-130.
- CONDORELLI, D.F., ALBANI, P. DELL., MUDO, G., TIMMUSK, T., BELLUARDO, N., 1994, Expression of neurotrophins and their receptors in primary astroglial cultures: induction by cyclic AMP-elevating agents, *Journal of Neurochemistry*, 63, 509-516.
- CONLEY, B.A, WRIGHT, J.J., KUMMAR, S., 2006, Targeting epigenetic abnormalities with histone deacetylase inhibitors, *Cancer*, 107:832-840.
- CONNOR, B., DRAGUNOW, M., 1998, The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain, *Brain Research Reviews*, 1-39.
- CORTAZZO, M.H., KASSIS, E.S., SPROUL, K.A., SCHOR, N.F., 1996, Nerve growth factor (NGF)-mediated protection of neural crest cells from antimitotic agent-induced apoptosis: the role of the low affinity NGF receptor, *Journal of Neuroscience*, 16, 3895-3899.

CRISCUOLO, G.R., 1993, The genesis of peritumoral vasogenic brain edema and tumor cysts: a hypothetical role for tumor-derived vascular permeability factor, *Yale Journal of Biology Medicine*, 66: 277-314.

CUMMINGS, J.L., 2004, Alzheimer's disease, *The New England Journal of Medicine*, 351:56-57.

CURTIN, M., GLASER, K., 2003, Histone deacetylase inhibitors: The abbott experience, *Current Medicinal Chemistry*, 10: 2373-2392

DANIAL, N.N., GRANN, C.F., SCORRANO, L., 2003, BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis, *Nature*, 424(6951): 952-956.

DE RUTIJER, A.J., VAN GENNIP, A.H., CARON, H.N., KEMP, S., VAN KUILENBURG, A.B., 2002, Histone deacetylases: Characterization of the classical HDAC family, *Biochemical Journal*, 370: 737-749.

DEROANNE, C.F., BONJEAN, K., SERVOTTE, S., 2002, Histone deacetylases inhibitors as anti-angiogenic agents altering vascular endothelial growth factor signaling, *Oncogene*, 21:427-436.

DOKMANOVIC, M., MARKS, P.A., 2005, Prospects: Histone Deacetylase Inhibitors, *Journal of Cellular Biochemistry*, 96: 293-304.

DRUMMOND, D.C., NOBLE, C.O., KIRPITON, D.B., GUO, Z., SCOTT, G.K., BENZ, C.C., 2004, Clinical Development of Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Agents, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45: 495-528.

EARNSHAW, W.C., MARTINS, L.M., KAUFMANN, S.H., 1999, Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis, *Annal Review of Biochemistry*, 68, 383-424.

EICKHOFF, B., RULLER, S., LAUE, T., KOHLER, G., STAHL, C., SCHLAAK, M., VAN DER BOSCH, J., 2000, Trichostatin A modulates expression of p21 waf1/cip1, Bclx1, ID1, ID2, ID3, CRAB2, GATA-2, hsp86 and TFIID/TAFII31 mRNA in human lung adenocarcinoma cells, *Biological Chemistry*, 381:107-112.

ELLIS, L., ATADJA, P.W., JHONSTONE, R.W., 2009, Epigenetics in cancer: Targeting chromatin modifications, *Molecular Cancer Therapeutics*, 8: 1409-1420.

EMMETT, C.J., MCNEELEY, P.A., JOHNSON, R.M., 1997, Evaluation of human astrocytoma and glioblastoma cell lines for nevre growth factor release, *Neurochemistry International*, 30(4-5): 465-474.

ESTELLER, M., 2007, Cancer epigenomics: DNA methylomes and histonemo factor-like neurite-promoting factors, *Brain Research*, 428-102-118.

FEINBERG., A.P., 2005, Cancer epigenetics is no Mickey Mouse, *Cancer Cells*, 8:267-268.

FIERS, W., BEYAERT, R., DECLERCQ, W., VANDENABEELE, P., 1999, More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage, *Oncogene*, 18:7719-7730.

FISCHKOFF, S.A., WALTER, E., J.R., 1984, Induction of neutrophilic differentiation of human promyelocytic leukemic cells by branched-chain carboxylic acid anticonvulsant drugs, *Journal of Biological Response Modifiers*, 3:132-137.

FU, J., SHAO, C.J., CHEN, F.R., NG H.K., CHEN, ZHONG., 2010, Autophagy induced by valproic acid is associated with oxidative stress in glioma cell lines, *Neuro Oncology*, 12(4):328-340.

FUKUMOTO, T., MORINOBU S., OKAMOTO, Y., KAGAYA, A., YAMAWAKI, S., 2001, Chronic lithium treatment increases the expression of brain derived neurotrophic factor in the rat brain, *Psychopharmacology*, 158, 100–106.

FURUKAWA, S., FURUKAWA, Y., SATOYOSHI, E., HAYASHI, K., 1987, Synthesis / secretion of nerve growth factor is associated with cell growth in mouse astroglial cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 142, 395–402.

GENNARO, E.D.I, BRUZZESE, F., CARAGLIA, M., ABRUZZESE, A., BUDILLON, A., 2004, Acetylation of proteins as novel target for antitumor therapy: Review article, *Amino Acids*, 26: 435–441.

GEZGINCI- OKTAYOGLU, 2009, Streptozotosin verilen sıçanların pankreas beta hücrelerinde sinir büyüme faktörünün apoptoz mekanizmasına etkileri, *Doktora Tezi*, 51.

GEZGINCI- OKTAYOGLU, S., BOLKENT, S., 2011, 4-Methylcatechol prevents NGF/p75(NTR)-mediated apoptosis via NGF/TrkA system in pancreatic β cells, *Neuropeptides*, 45(2):143-150.

GILLET, N., FLORINS, A., BOXUS, M., BURTEAU, C., NIGRO, A., VANDERMEERS, F., 2007, Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human, *Retrovirology*, 4, 18.

GIOVANNI DI, B., ALESSIO, N., DELL' AVERSANA, C., CASALE, F., TETI, D., CIPOLARO, M., ALTUCCI, L., GALDERISI, U., 2010, Impact of Histone Deacetylase Inhibitors SAHA and MS-275 on DNA Repair Pathways in Human Mesenchymal Stem Cells, *Journal of Cellular Physiology*, 225: 537-544.

GOTTLICHER, M., MINUCCI, S., ZHU, P., 2001, Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells, *EMBO Journal*, 20:6969–6978.

GRAFF, J., TAMARA, B., MANSUY, I., 2011, Epigenetics of Brain Disorders, *Handbook of Epigenetics: The New Molecular and Medical Genetics*.

GROBEN B, DE DEYN, PP, SLEGGERS H, 2002, Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion, *Cell and Tissue Research*, 310:257-270

GROZINGER, C.M., SCHREIBER, S.L., 2002, Deacetylase enzymes: biological functions and the use of small-molecule inhibitors, *Chemistry and Biology*, 9: 3-16.

GROSS, A., MCDONNELL, J.M., KORSMEYER, S.J., 1999, BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis, *Genes & Development*, 13: 1899.

GRUNSTEIN, M., 1997, Histone acetylation in chromatin structure and transcription, *Nature*, 389:505-509.

GUI, C.Y., NGO, L., XU, W.S., RICHON, V.M., MARKS, P.A., 2004, Histone deacetylase (HDAC) inhibitor activation of p21WAF1 involves changes in promoter-associated proteins, including HDAC1, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101:1241–1246.

HANSEN, J. C., TSE, C., WOLFFE, A.P., 1998, Structure and function of the core histone N-termini: more than meets the eye, *Biochemistry*, 37: 17637–17641.

HARPER, J.W., ELLEDGE, S.J., KEYOMARS, I. K., DYNLACHT, B., TSAI, L.H., ZHANG, P., DOBROWOLSKI, S., BAI, C., CONNELL, C.L., SWINDELL, E., 1995, Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21, *Molecular Biology of the Cell*, 6, 387.

HEMPSTEAD, B., MARTIN-ZANCA, L., KAPLAN, D., KAPLAN, D.R., CHAO, M.V., 1991, High affinity NGF binding requires co-expression of the trk proto-oncogene and the low affinity NGF receptors, *Nature*, 350, 678-683.

HEROLD, C., GANSLMAYER, M., OCKER, M., HERMANN, M., GEERTS, A., HAHN, E.G., SCHUPPAN, D., 2002, The histone-deacetylase inhibitor Trichostatin A blocks proliferation and triggers apoptotic programs in hepatoma cells, *Journal of Hepatology*, 233-240.

HOLLAND E.C., 2001, Progenitor cells and glioma formation, *Current opinion in Neurology*, 14:683-688.

HSIEH, J., NAKASHIMA, K., KUWABARA, T., MEJIA, E., GAGE, F.H., 2004, Histone deacetylase inhibition-mediated neuronal differentiation of multipotent adult neural progenitor cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101: 16659-16664.

HSU, Y., SHEU, J., HSIAO, G., LIN, C., CHANG, T., CHIU, P., WANG, C., HSU, M., 2011, p53 in trichostatin A induced C6 glioma cell death, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, Volume 1810, Issue 5, 504-513.

HUBBERT, C., GUARDÌOLA, A., SHAO, R., KAWAGUCHI, Y., ITO, A., NIXON, A., YOSHIDA, M., WANG, X., YAO, F., 2002, *Nature*, 417: 455-458.

HOULGATTE, R., MALLAT, M., BRACHET, P., PROCHIANTZ, A., 1989, Secretion of nerve growth factor in cultures of glial cells and neurons derived from different regions of the mouse brain, *Journal of Neuroscience Research*, 24, 143–152.

JEONG, M.R., HASHIMOTO, R., SENATOROV, V.V., FUJIMAKI K., REN, M., LEE, M. S., CHUANG, D.M., 2003, Valproic acid, a mood stabilizer and anticonvulsant, protects rat cerebral cortical neurons from spontaneous cell death: a role of histone deacetylase inhibition, *FEBS Letters*, 542, 74–78.

JIN, N., KOVACS, A.D., SUI, Z., DEWHURST, S., MAGGIRWAR, S.B., 2005, Opposite effects of lithium and valproic acid on trophic factor deprivation- induced glycogen synthase kinase 3 activation, c-Jun expression and neuronal cell death, *Neuropharmacology*, 48: 576-583.

JOHNSTONE, R.W., 2002, Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer, *Natura Reviews Drug Discovery*, 1: 287–299.

JOHNSON, D.G., WALKER, C.L., 1999, Cyclins and cell cycle checkpoints, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 39:295-312.

JOHNSTONE, R.W., LICHT J.D., 2003, Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy: is transcription the primary target? *Cancer Cell*, 4: 13–18.

KAHLE, P., BARKER, P.A., SHOOTER, E.M., HERTEL, C., 1994, p75 nerve growth factor receptors modulates gp140trkA kinase activity, but not ligand internalization, in PC12 cells, *Journal of Neuroscience Research*, 38: 599-606.

KAMITANI, H., TANUIRA, S., WATANABE, K., 2002, Histone acetylation may suppress human glioma cell proliferation when p21 WAF/Cip1 and gelsolin are induced, *Neuro-oncology*, 4: 95-101.

KANSU, E., 2005, Hedeflenmis tedavilerde hedef moleküller, *Aknem Der*, 19 (Ek 2) 112-16.

KAWAGOE, R., KAWAGOE, H., SANO, K., 2002, Valproic acid induces apoptosis in human leukemia cells by stimulating both caspase-dependent and independent apoptotic signaling pathways, *Leukemia Research*, 26: 495-502.

KERR, J.F.R., WYLIIE, A.H., CURRIE, A.R., 1972, apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetic, *British Journal of Cancer*, 26: 239-257.

KIM, J.H., SHIN, B.S, CHIE,E.K., WU, H.G., KIM, S.J., KIM, H., HA, S.W., PARK, C., KANG,W.S., 2004, Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor , potentiated cytotoxic effect of ionizing radiation in human head and neck cancer cell lines, *Journal of the Korean Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 22(2): 138-144.

- KIM, Y.B., YOSHIDA, M., HORINOUCI. S., 1999, Selective induction of cyclin-dependent kinase inhibitors and their roles in cell cycle arrest caused by trichostatin A, an inhibitor of histone deacetylase, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 886: 200-203.
- KIMURA, S., YOSHINO, A., KATAYAMA, Y., WATANEBE, T., FUKUSHIMA, T., 2002, Growth control of C6 glioma *in vivo* by nerve growth factor, *Journal of Neuro-Oncology*, 59:199-205.
- KRIKUN, G., MOR, G., ALVERO,A., GULLER,S., SCHATZ, F., SAPI, E., RAHMAN, M., CAZE, R., QUMSIYEH , M., LOCKWOOD, C.J., 2004, *Endocrinology*, 145(5): 2291–2296.
- KLOSE, R.J., BIRD, A.P., 2006, Genomic DNA methylation: the mark and its mediators, *Trends in Biochemical Sciences*, 31: 89-97.
- KNUPFER, H., ARENDT, T., 2001, NGF increases cell survival rates under serum deprived conditions, *Anticancer Research*, 21: 2797-2802.
- KORSCHING, S., 1993, The neurotrophic factor concept: a reexamination, *Journal of Neuroscience*, 13-2739-2748.
- KOTHAKOTA, S., AZUMA, T., REINHARD, C., KLIPPEL, A., TANG,J., CHU., K., MCGARRY, T.J., KIRSCHNER, M.W., KOTHS, K., KWIATKOWSKI, D.J., WILLIAMS, L.T., 1997, Caspase-3- generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis, *Science*, 278 (5336): 294-298.
- KRAMMER, P.H., 2000, CD95's deadly mission in the immun system, *Nature*, 407(6805), 789-795.
- KUMAR, S., HUBER, J., PENA, L.A., PEREZ-POLO, J.R., WEERBACH-PEREZ, K., DE VELLIS, J., 1990, Characterization of functional nerve growth factor-receptors in a CNS glial cell line : monoclonal antibody 217e recognizes the nerve growth factor-receptor on C6 glioma cells, *Journal of Neuroscience Research*, 27: 408-417.
- KUMAR, S., WEINGARTEN, D.P., CALLAHAN, J.W., SACHAR, K., DE VELLIS, J., 1984, Regulation of mRNAs for three enzymes in the glial cell model C6 cell line, *Journal of Neurochemistry*, 43, 1455–1463.
- KUMAR, V., ABBAS, A.K., ROBBINS, S.L., FAUSTO, N., COTRAN, R.S., 2005, Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, USA, Elsevier Saunders.
- LASSMAN, H., BANCHER, C., BREITSCHOPF, H., BOBINSKI, M., JELLINGER, K., WISNIEWSKI, H.M., 1995, Cell death in Alzheimer's evaluated by DNA fragmentation *in situ*, *Acta Neuropathologica*, 89, 35-41.

- LAZEBNIK, Y.A., COLE, S., COOKE, C.A., NELSON, W.G., EARNSHAW, W.C., 1993, Nuclear events of apoptosis in vitro in cell-free mitotic extracts: a model system for analysis of the active phase of apoptosis, *Journal of Cell Biology*, 123:7–22
- LEE, M.H., REYNISDOTTIR, I., MASSAGUE, J., 1995, Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes and Developments*, 9: 639.
- LEIF, R.C., STEIN, J.H., ZUCKER, R.M., 2004, A Short History of the Initial Application of Anti-5-BrdU to the Detection and Measurement of S Phase, *Cytometry Part*, 58A: 45–52.
- LEIPE, D.D., LANDSMAN, D., 1997, Histone deacetylases, acetoin utilization proteins and acetylpolyamine amidohydrolases are members of an ancient protein superfamily, *Nucleic Acids Research*, 25: 3693-3697.
- LEVI-MONTALCINI R., ANGELETTI, P., 1968, Nerve growth factor, *Physiological Research*, 48: 534-569.
- LEVI-MONTALCINI, R., SKAPER, S.D., DAL TOSO, R., PETRELLI, L., LEON, A., 1996, Nerve growth factor: from neurotrophin to neurokinin, *Trends Neurosciences*, 19: 514-520.
- LI, G.C., ZHANG, X., PAN, T.J., CHEN, Z., YE, Z.Q., 2006, Histone deacetylase inhibitor trichostatin A inhibits the growth of bladder cancer cells through induction of p21WAF /CIP1 and G1 cell cycle arrest, *International Journal of Urology*, 13: 581-586.
- LI, Y., HOLTMAN, D.M., KROMER, L.F., KAPLAN, D.R., CHUA-COUZENS, J., CLARY, D.O., KNUSEL, B., MOBLEY, W.C., 1995, Regulation of TrkA and ChAT expression in developing rat basal forebrain: evidence that both exogenous and endogenous NGF regulate differentiation of cholinergic neurons, *Journal of Neuroscience*, 15: 2888-2905.
- LIU, X.Z., XU, X.M., HU, R., DU, C., ZHANG, S.X., MCDONALD, J.W., DONG, H.X., WU, Y.J., FAN, G.S., JACQUIN, M.F., HSU, C.Y., CHOI, D.W., 1997, Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury, *Journal of Neuroscience*, 17, 5395-5406.
- LU, B., YOKOYAMA, M., DREYFUS, C.F., BLACK, I.B., 1991, NGF gene expression in actively growing brain glia, *Journal of Neuroscience*, 11, 318–326.
- LODISH, H., BERK, A., ZIPURSKY, S.L., MATSUDAIRA, P., BALTIMORE, D., DARNELL, J., 2000, *Molecular Cell Biology, USA, Freeman*.
- MAGNER, W.J., KAZIM, A.L., STEWART, C., 2000, Activation of MHC class I, II, and CD40 gene expression by histone deacetylase inhibitors, *Journal of Immunology*, 165:7017-7024.

MANES, L.M., KASTIN, A.J., WEBBER, J.T., BANKS, W.A., BECKMAN, B.S., ZADINA, J.D., 1994, The neurotrophins and their receptors: structure, function, and neuropathology, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 18: 143-159.

MARANGOLO, M., GEE, M., TIPTON, K., WILLIAMS, D., ZISTERER, D., 2001, Oxidative stress induces apoptosis in C6 glioma cells: involvement of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor kappa b, *Neurotoxicity Research*, Vol.3, pp.397-409.

MARC, J., BELLÉ, R., MORALES, J., CORMIER, P., MULNER-LORILLON, O., 2004, Formulated glyphosate activates the DNA-response checkpoint of the cell cycle leading to the prevention of G2/M transition, *Toxicological Sciences*, 82(2): 436-442.

MARGUERON, R., TROJER, P., REINBERG, D., 2005, The key to development: interpreting the histone code, *Current Opinion in Genetics & Development*, 15: 163-176.

MARKS, P.A., RICHON, V.M., RIFKIND, R.A., 2000, Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells, *The Journal of the National Cancer Institute*, 92: 1210-1216.

MARKS P, RICHON, V.M., MILLER, T., 2004, Histone deacetylase inhibitors, *Advances in Cancer Research*, 91: 137-168.

MARKS, P., RIFKIND, R.A., RICHON, V.M., BRESLOW, R., MILLER, T, KELLY, W.K., 2001, Histone deacetylases and cancer: causes and therapies, *Nature Reviews Cancer*, 1: 194–202.

MARSDEN, V.S., STRASSER, A., 2003, Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more, *Annual Review of Immunology*, 21: 71-105.

MARTIN, D.A., M.D., ELKON, K.B., 2004, Mechanisms of apoptosis, *Rheumatic Disease Clinics of North America*, 30: 441-454

MAXWELL, M., NE HABER, S.P., WOLFE, H.L., GALANOPOULOS, T., HEDLEY-WHYTE, E.T., BLACK, P.M., ANTONIADES, H.N., 1990, Coexpression of platelet-derived growth factor (PDGF) and PDGF-receptor genes by primary human astrocytomas may contribute to their development and maintenance, *Journal of Clinical Investigation*, 86: 131–140.

MCBAIN, J.A., EASTMAN, A., NOBEL, C.S, MUELLER, G.C., 1997, Apoptotic death in adenocarcinoma cell lines induced by butyrate and other histone-deacetylase inhibitors, *Biochemical Pharmacology*, 53: 1357-1368.

MCDONNELL, T.J., DEANE, N., PLATT, F.M., 1989, Bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation, *Cell*, 57(1): 79-88.

MCGAHON, A.J, MARTIN S.J., BISSONNETTE, R.P., MAHBAUBI, A., SHI, Y., MOGIL R.J., NISHIOKA, W.K., GREN, D.R., 1995, The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis *in vitro*, In “*Methods in Cell Biology, Vol 46, Cell Death*”, LM Schwartz and BA Osborne (eds.), 150-181.

MICHAELIS, M., MICHAELIS, U.R., FLEMING, I., SUHANG, T., CINATL, J., BLAHATE, R.A., HOFFMANN, K., KOTCHETKOV, R., BUSSE, NAU, H., CINATL, J.J.R., 2004, Valproic acid inhibits angiogenesis *in vitro* and *in vivo*, *Molecular Pharmacology*, 65: 520-527.

MILLER, T.A., WITTER, D.J., BELVEDERE, S., 2003, Histone deacetylase inhibitors, *Journal Medicinal Chemistry*, 46: 5097-5116

MINUCCI, S., PELICCI, P.G., 2006, Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer, *Nature Reviews Cancer*, 6: 38-51.

MONTI, B., POLAZZI, E., CONTESTABILE, A., 2009, Biochemical, Molecular and Epigenetic Mechanism of Valproic Acid Neuroprotection, *Current Molecular Pharmacology*, 2: 95-109

MORGAN, D.O., 2007, The cell cycle: principles of control, UK, *New Science Pres.*

MORITA, K., GOTOHDA, T., ARIMUCHI, H., LEE, M., HER, S., 2009, Histone Deacetylase Inhibitors Promote Neurosteroid-Mediated Cell Differentiation and Enhance Serotonin-Stimulated Brain-Derived Neurotrophic Factor Gene Expression in Rat C6 Glioma Cells, *Journal of Neuroscience Research*, 87: 2608-2614.

MURAGAKI, Y., CHOU, T.T., KAPLAN, D.R., TROJANOWSKI, J.Q., LEE, V.M., 1997, Nerve growth factors induces apoptosis in human medulloblastoma cell lines that express TrkA receptors, *Journal of Neuroscience*, 17: 530-542.

NICHOLSON, D.W., THORNBERRY, N.A., 1997, Caspases: killer proteases, *Trends in Biochemical Sciences*, 22 (8): 299-306.

NIEDERHAUSER, O., MANGOLD, M., SCHUBENEL, R., KUSZNIR, E.A., SCHMIDT, D., HERTEL, C., 2000, NGF ligand alters NGF signaling via p75^{NTR} and TrkA, *Journal of Neuroscience Research*, 61: 263-272.

NIGHTINGALE, K.P., WELLINGER, R.E., SOGO, J.M., BECKER, P.B., 1998, Histone acetylation facilitates RNA polymerase II transcription of the *Drosophila* hsp26 gene in chromatin, *EMBO Journal*, 17: 2865–2876.

NUNEZ, G., BENEDIC, M.A., HU, Y., INOHARA, N., 1998, Caspases: the proteases of the apoptic pathway, *Oncogene*, 17: 3237-3245

ODERFELD-NOWAK, B., BACIA, A., GRADKOWSKA, M., FUSCO, M., VANTINI, G., LEON, A., ALOE, L., 1992, In vivo activated brain astrocytes may produce and secrete nerve growth factor-like molecules, *Neurochemistry International*, 21, 455–461.

OELMANN, E., SRETER, L., SCHULLER, I., SERVE, H., KOENIGSMANN, M., WIEDENMANN, B., OBERBERG, D., REUFI, B., THIEL, E., BERDEL, W.E., 1995, Nerve growth factor stimulates clonal growth of human lung cancer cell lines and human glioblastoma cell line expressing high-affinity nerve growth factor binding sites involving tyrosine kinase signaling, *Cancer Research*, 55(10): 2212–2219.

OLSEN, CM., MEUSSEN-ELHOLM, E.T., ROSTE, L.S., TAUBOLL, E., 2004, Antiepileptic drugs inhibit cell growth in the human breast cancer cell line MCF7, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 213: 173-179.

PAINTER, R.B., 1986, Inhibition of mammalian cell DNA synthesis by ionizing radiation, *International Journal of Radiation Biology & Related Studies in Physics, Chemistry & Medicine*, 49: 771.

PAN, T., LI, X., XIE, W., 2005, Valproic acid-mediated Hsp70 induction and anti-apoptotic neuroprotection in SH-SY5Y cells, *FEBS Letters*, 579: 6716-9720.

PANTAZIS, N.J., ZAHEER, A., DAI, D., ZAHEER, S., GREEN, S.H., LIM, R., 2000, Transfection of c6 glioma cells with glia maturation factor upregulates brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor: trophic effects and protection against ethanol toxicity in cerebellar granule cells, *Brain Research*, 865: 59-76.

PAULOVICH, A.G., HARTWELL, L.H., 1995, A checkpoint regulates the rate of progression through S phase in *S.cerevisiae* in response to DNA damage, *Cell*, 82: 841.

PAPELEU, P., VANHAECKE, T., ELAUT, G., VINKEN, M., HENKENS, T., SNYKERS, S., ROGIERS, V., 2005, Differential effects of histone deacetylase inhibitors in tumor and normal cells-what is the toxicological relevance? *Critical Reviews in Toxicology*, 35(4): 363-378.

PATTERSON, P.H., 1992, The emerging neuropoietic cytokine family: first CDF/LIF, CTNF and IL-6; next ONC, MGF, GCSF? *Current Opinion in Neurobiology*, 2: 94-97.

PAWSON, T., NASH, P., 2003, Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains, *Science*, 18; 300(5618): 445-452

PECHAN, P.A., CHOWDHURY, K. , SEIFERT, W., 1992, Free radicals induce gene expression of NGF and bFGF in rat astrocyte culture, *NeuroReport* 3: 469–472.

PENG, G.S., LI, G., TZENG, N.S., CHEN, P.S., CHUANG, D.M., HSU, Y.D., YANG, S., HONG, J.S., 2005, Valproate pretreatment protects dopaminergic neurons from LPS-induced neurotoxicity in rat primary midbrain cultures: role of microglia, *Brain Research Molecular Brain Research*, 134: 162-169.

PEZET, S., MCMAHON, S.B., 2006, Neurotrophins: Mediators and Modulators of Pain, *Annual Review of Neuroscience*, 29: 507–38.

PHIEL, C.J., ZHANG, F., HUANG, E.Y., 2001, Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen, *Journal of Biological Chemistry*, 276: 36734–36741.

PINES, J., 1995, Cyclins and cyclin-dependent kinases: theme and variations, *Advances in Cancer Research*, 66: 181-212.

PLATE, K., BREIER, G., WEICH, H., RISAU, W., 1992, Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas *in vivo*, *Nature*, 359: 845–848.

POLYAK, K., LEE, M.H., ERDJUMENT, B.H., KOFF, A., ROBERTS, J.M., TEMPST, P., MASSAGUE, J., 1994, Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals, *Cell*, 78, 59.

QIAN, D.Z., KATO, Y., SHABBEER, S., 2006, Targeting tumor angiogenesis with histone deacetylase inhibitors: the hydroxamic acid derivative LBH589, *Clinical Cancer Research*, 12: 634-642.

RAZIBADEH, S., OH, J., ZHONG, L.T., YANG, J., BITLER, C.M., BUTCHER, L.L., BREDESEN, D.E., 1993, Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor, *Science*, 261: 345-348.

RICHON, V.M., O'BRIEN, J.P., 2002, Histone Deacetylase Inhibitors: A new class of potential therapeutic agents for cancer treatment, *Clinical Cancer Research*, 8(3): 718-728.

RODRIGUEZ TEBAR, A., DECHANT, G., BARDE, Y.A., 1990, Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor, *Neuron*, 4: 487-492.

ROSS, G.M., SHAMOVSKY, J.L., LAWRENCE G., SOLE, M., DOSTALER, S.M., WEAVER, D.F., RIOPELLE, R.J., 1998, Reciprocal modulation of TrkA and p75^{NTR} affinity states is mediated by direct receptor interactions, *European Journal of Neuroscience*, 10: 890-898.

ROSSNER, S., SCHLIEBS, R., HARTIG, W., PEREZ-POLO, J.R., BIGL, V., 1997, Selective induction of c-Jun and NGF in reactive astrocytes after cholinergic degenerations in rat basal forebrain, *NeuroReport*, 8: 2199–2202.

RUBINSTEIN, L.J., 1985, Tumors of Central Neuroepithelial Origin, *Journal of Neurosurgery*, Vol. 62, No.6.

RUDGE, J.S., MORRISSEY, D., LINDSAY, R.M., PASNIKOWSKI, E.M., 1994, Regulation of ciliary neurotrophic factor in cultured rat hippocampal astrocytes, *European Journal of Neuroscience* 6: 218–229.

SAITO, A., YAMASHITA, I., MARIKO, Y., NOSAKA, Y., TSUCHIYA, K., ANDO, T., 1999, A synthetic inhibitor of histone deacetylase, MS-27-275, with marked *in vivo* antitumor activity against human tumors, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 9: 4592-4597.

SANTINI, V., GOZZINI, A., FERRARI, G., 2007, Histone deacetylase inhibitors: molecular and biological activity as a premise to clinical application, *Current Drug Metabolism*, 8: 383-394.

SARASTE, A., PULKKI, K., 2000, Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis, *Cardiovascular Research*, 45: 528-537.

SASTRY, P.S., RAO, K.S., 2000, Apoptosis and Nervous System, *Journal of Neurochemistry*, Vol. 74, No. 1.

SAWA, H., MURAKAMI, H., OHSHIMA, Y., MURAKAMI, M., YAMAZAKI, I., TAMURA, Y., MIMA, T., SATONE, A., WATARU, I., HASHIMOTO, I., KAMADA, H., 2002, Histone deacetylase inhibitors such as sodium butyrate and trichostatin A inhibit vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion from human glioblastoma cells, *Brain Tumor Pathology*, 19: 77-81.

SCHLEGEL, U., MOOTS, P.L., ROSENBLUM, M.K., THALER, H.T., FURNEAUX, H.M., 1990, Expression of transforming growth factor alpha in human gliomas, *Oncogene*, 5: 1839-1842.

SCINTO, L.F., DAFFNER, K.R., 2000, Early diagnosis of Alzheimer's disease. *Humana press*: pp 31.

SCOTT, J., SELBY, M., URDEA, QUIROGA, M., BELL, G.I., RUTTER, W.J., 1993, Isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding the precursor of mouse nerve growth factor, *Nature*, 302, 538-540.

SHACKELFORD, R.E., KAUFMANN, W.K., PAULES, R.S., 1999, Cell cycle control, checkpoint mechanisms, and genotoxic stress, *Environmental Health Perspectives*, 107:5-24.

SHERR, C.J., ROBERTS, J.M., 1995, Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases, *Genes and Development*, 9: 1149.

SHI, Y., 2002, Mechanism of caspase inhibition and activation during apoptosis, *Molecular Cell*, 9: 459-470.

SHI, Y., 2005, Activation of Initiator Caspases: History, Hypotheses, and Perspectives, *Journal of Cancer Molecules*, 1(1): 9-18.

SIMAN, R., BOZYCZKO-COYNE, D., MEYER, S.L., BHAT, R.V., 1999, Immunolocalization of caspase proteolysis in situ: evidence for widespread caspase-mediated apoptosis of neurons and glia in the postnatal rat brain, *Neuroscience*, 92, 1425-1442.

SINGER, H., HANSEN, B., MARTINIE, D., KARP, C.L., 2000, Mitogenesis in glioblastoma multiforme cell lines: a role for NGF and its TrkA receptors, *Journal of Neuro-Oncolog*, 45:1-8.

SLEIMAN, S.F., BASSO, M., MAHISHI, L., KOZIKOWSKI, A.P., DONOHOE, M.E., LANGLE, B., RATAN, R.R., 2009, Putting the 'HAT' back on survival signalling: the promises and challenges of HDAC inhibition in the treatment of neurological conditions, *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 18(5): 573-584.

SMALE, G., NICHOLS, N.R., BRADY, D.R., FINCH, C.E., HORTON, W.E., 1995, Evidence for apoptotic cell death in Alzheimer disease, *Experimental Neurology*, 133, 225-230

SPRICK, M.R., WALZCAK, H., 2002, *Landes Bioscience*, 53-73.

SRIDHAR, J., AKULA, N., PATTABIRAMAN, N., 2006, Selectivity and Potency of Cyclin-dependent Kinase Inhibitors, *AAPS Journal*, 8(1): E204-E221.

STELLER, H., 1995, Mechanism and genes of cellular suicide, *Science*, 267, 1445-1449.

STOCKHAUSEN, M.T., SJOLUND, J., MANETOPOULOS, C., AXELSON, H., 2005, Effects of the histone deacetylase inhibitor valproic acid on Notch signalling in human neuroblastoma cells, *British Journal of Cancer*, 92: 751-759.

STOCKHAMMER, G., MANLEY, G.T., JOHNSON, R., ROSENBLUM, M.K., SAMID, D., LIEBERMAN, F., 1995, Inhibition of proliferation and induction of differentiation in medulloblastoma and astrocytoma-derived cell lines with phenylacetate, *Journal of Neurosurgery*, 83: 672-681.

STRAHL, B.D., ALLIS, C.D., 2000, The language of covalent histone modifications, *Nature*, 403: 41-45.

STURGEON, C.M., KNIGHT, Z.A., SHOKAT, K.M., ROBERGE, M., 2006, Effect of combined DNA repair inhibition and G2 checkpoint inhibition on cell cycle progression after DNA damage, *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(4): 885-892.

SUZUKI, T., YOKOZAKI, H., KUNIYASU, H., HAYASHI, K., NAKA, K., ONO, S., 2000, Effect of trichostatin A on cell growth and expression of cell cycle and apoptosis-related molecules in human gastric and oral carcinoma cell lines, *International Journal of Cancer*, 88: 992-997.

TAKAHASHI, J.A., MORI, H., FUKUMOTO, M., IGARASHI, K., JAYE, M., ODA, Y., KIKUCHI, H., HATANAKA, M., 1990, Gene expression of fibroblast growth factors in human gliomas and meningiomas: demonstration of cellular source of basic fibroblast growth factor mRNA and peptide in tumor tissues, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87: 5710-5714.

TANG, R., FAUSSAT, A. M., MAJDAK, P., PERROT, J.Y., CHAOUI, D., LEGRAND, O., MARIE, J.P., 2004, Valproic acid inhibits proliferation and induces

apoptosis in acute myeloid leukemia cells expressing P-gp and MRP1, *Leukemia*, 18, 1246-1251.

THELEN, P., SCHWEYER, S., HEMMERLEIN, B., 2004, Expressional changes after histone deacetylase inhibition by valproic acid in LNCaP human prostate cancer cells, *International Journal of Oncology*, 24: 25-31.

TIMMERMAN, S., LEHRMANN, H., POLESSKAYA, A., HAREL-BELLAN, A., 2001, Histone acetylation and disease, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58: 728-736.

TORNATORE, C., RABIN, S., BARKER-CAIRNS, B., KEIR, S., MOCEHETTI, I., 1997, Engraftment of C6-2B cells in to the striatum of ACI nude rats as a tool for comparison of the *in vivo* and *in vivo* phenotype of a glioma cell line, *Cell Transplant*, 6: 317-326.

TSE, C., SERA, T., WOLFFE, A.P., HANSEN, J.C., 1998, Disruption of higher-order folding by core histone acetylation dramatically enhances transcription of nucleosomal arrays by RNA polymerase III, *Molecular and Cellular Biology*, 18: 4629–4638.

TSUJI, N., KOBAYASHI, M., NAGASHIMA, K., WAKISAKA, Y., KOIZUMI, K., 1976, A new antifungal antibiotic, trichostatin, *Journal of Antibiotic (Tokyo)*, 29 (1):1-6

ULLRICH, A., GRAY, C., BERMANN, T.J., 1983, Human β -nerve growth factor gene sequence highly homologous to that of mouse, *Nature*, 303, 821-822.

URDINGIO, R.G., SANCHEZ-MUT, J.V., ETSSELLER, M., 2009, Epigenetic mechanisms in neurological diseases: genes, syndromes and therapies, *Lancet Neurology*, 8:1056-72.

VAN GRUNSVEN, L.A., THOMAS, A., URDIALES, J.L., MACHENAUD, S., CHOLER, P., DURAND, I., RUDKIN, B.B., 1996, Nerve growth factor-induced accumulation of PC12 cells expressing cyclin D1: evidence for a G1 phase block, *Oncogene*, 12(4): 855–862.

VARFOLOMEEV, E.E., SCHUCHMANN, M., LURIA, V., CHIANNILKULCHAI, N., BECKMANN, J.S., METT, I.L, REBRIKOV, D., BRODIANSKI, V.M., KEMPER, O.C. KOLLET, O., LAPIDOT, T., SOFFER, D., SOBE, T., AVRAHAM, K.B., GONCHAROV, T., HOLTSMANN, H., LONAI, P., WALLACH, D., 1998, Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/apo1, and DR3 and is lethal prenatally, *Immunity*, 9(2): 267-276.

VERDI, J.M., BIRREN, S.J., IBANEZ, C.F., PERSSON, H., KAPLAN, D.R., BENEDETTI, M., CHAO, M.V., ANDERSON, D.J., 1994, p75 LNGFR regulates Trk signal transduction and NGF-induced neuronal differentiation in MAH cells, *Neuron*, 12: 733-745.

VERMEULEN, K., BOCKSTAELE, V.D.R., BERNEMAN, Z.N., 2003, The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer, *Cell Proliferation*, 36:131-149.

VERNADAKIS, A., KENTROTI, S., BRODIE, C., MANGOURA, D., SAKELLARIDIS, N., 1991, C6 glioma cells of early passage have progenitor properties in culture, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 296: 181–195.

VIELKIND, U., WALENCEWICZ, A., LEVINE, J.M., BOHN, M.C., 1990, Type II glucocorticoid receptors are expressed in oligodendrocytes and astrocytes, *Journal of Neuroscience Research*, 27: 360–373.

VIGUSHIN, D.M., COOMBES, R.C., 2002, Histone deacetylase inhibitors in cancer treatment, *Anticancer Drugs*, 2002, 13(1): 1-13.

WALIA, H., CHEN, H.Y., SUN, J.M., HOLTH, L.T., DAVIE J.R., 1998, Histone acetylation is required to maintain the unfolded nucleosome structure associated with transcribing DNA, *The Journal of Biological Chemistry*, 273: 14516–14522.

WALKINSHA, D.R., YAN, X.J., 2008, Histone deacetylase inhibitors as novel anticancer therapeutics, *Current Oncology*, Volume 15, number 5.

WANG, F.J., AZAM, E.J., YOUNG, L.T., 2003, Valproate inhibits oxidative damage to lipid and protein in primary cultured rat cerebrocortical cells, *Neuroscience*, 116: 485–489.

WANG, Y., HAGEL, C., HAMEL, W., MULLER, S., KLUWE, L., WESTPHAL, M., 1998, Trk A, B and C are commonly expressed in human astrocytes and astrocytic gliomas but not by human oligodendrocytes and oligodendroglioma, *Acta Neuropathologica*, 96(4): 357-364.

WATANABE, T., KATAYAMA, Y., KIMURA, S., YOSHINO, A., 1999, Control of proliferation and survival of C6 glioma cells with modification of the nerve growth factor autocrine system, *Journal of Neuro-Oncology*, 41: 121-128.

WEIS, C., WIESENHOFER, B., HUMPEL, C., 2002, Nerve growth factor plays a divergent role in mediating growth of rat C6 glioma cells via binding to the p75 neurotrophin receptor, *Journal of Neuro-Oncology*, 56: 59-67.

WERLING, U., SIEHLER, S., LITFIN, M., NAU, H., GOTTLICHER, M., 2001, Induction of differentiation in F9 cells and activation of peroxisome proliferator-activated receptor δ by valproic acid and its teratogenic derivatives, *Molecular Pharmacology*, 9: 1269-76

WESTERMAK, B., HELDIN, C.H., 1993, Platelet-derived growth factor. Structure, function and implications in normal and malignant cell growth, *Acta Oncologica*, 32: 101-105.

WIESENHOFER, B., WEIS, C., HUMPEL, C., 2000, Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) is a proliferation factor for rat C6 glioma cells: evidence from antisense experiments, *Antisense and Nucleic Acid Drug Development*, 10: 311–321.

WU, Y., GUO, S.W., 2007, Histon deacetylase inhibitors trichostatin A and valproic acid induce cell cycle arrest and p21 expression in immortalized human endometrial stromal cells, *European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology*, 137, 198-203.

WYLIE, A.H., KERR, J.F.R., CURRIE, A.R., 1980, Cell death: the significance of apoptosis, *International Review of Cytology*, 68: 251-306.

XIA, Q., SUNG, J., CHOWDHURY, W., CHEN, C.L., HÖTİ, N., SHABBEER, S., CARDUCCI, M., RODRIGUEZ, R., 2006, Chronic administration of valproic acid inhibits prostate cancer cell growth in vitro and in vivo, *Cancer Research*, 66(14): 7237-7244.

WANG, X., BAUER, J. H., YONG, L., SHAO, Z., ZETOUNE, F.S., CATTANEO, E., VINCENZ, C. 2001, Characterization of a p75NTR Apoptotic Signaling Pathway Using a Novel Cellular Model, *Journal of Biological Chemistry*, Vol, 276, No. 36.

YAEGER, M.J., KOESTNER, A., MARUSHIGE, K., MARUSHIGE, Y., 1991, The reverse transforming effects of nerve growth factor on five human neurogenic tumor cell lines: *in vitro* results, *Acta Neuropathologica*, 83(1): 72–80.

YAMAKUNI, T., OZAWA, F., HISHUNUMA, F., KUWANO, R., TAKAHASHI, Y., AMANO, T., 1987: Expression of beta-nerve growth factor mRNA in rat glioma cells astrocytes from rat brain, *FEBS Letters*, 223(1): 117-121.

YAN, N., SHI, Y., 2005, Mechanism of Apoptosis Through Structural Biology, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21: 35-56.

YEH, W.C., POMPA, J.L., MCCURRACH, M.E., SHU, S.B., ELIA, A.J., SHAHINIAN, A., N.G., M, WAKEHAM, A., KHOO, W., MITCHELL, K., EL-DEIRY, W.S., LOWE, S.W., GOEDDEL, D.V., MAK, T.W., 1998, *Science*, 279, 1954-1958.

YOKOYAMA, M., LU, B., DREYFUS, C.F., BLACK, I.B., 1991, NGF gene expression in actively growing brain glia, *Journal of Neuroscience*, 11: 318–326.

YOO, C.B., JONES, P.A., 2006, Epigenetic therapy of cancer: past, present and future, *Natura Reviews Drug Discovery*, 5:37-50.

YOON, J., MIN, B.G., KIM, Y.H., 2005, Differentiation, engraftment and functional effects of pre-treated mesenchymal stem cells in a rat myocardial infarct model, *Acta Cardiologica*, 60: 277-284.

YOON, S.O., CASACCI-BONNEFIT, P., CARTER, B., CHAO, M.V., 1998, Competitive signaling between TrkA and p 75 nerve growth factor receptors determines cell survival, *Journal of Neuroscience*, 18: 3273-3281.

YOSHIDA, M., HORINOUCI, S., BEPPU, T., 1995, Trichostatin A and trapoxin: Novel chemical probes for the role of histone deacetylation chromatin structure and function, *Bioessays*, 17: 423-430.

YOSHIDA, M., FURUMAI, F., NISHIYAMA, M., KOMATSU, Y., NISHINO, N., HORINOUCI, S., 2001, Histone deacetylase as a new target for cancer chemotherapy, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 1: 20-26.

YOSHIDA, M., MATSUYAMA, A., KOMATSU, Y., NISHINO, N., 2003, From discovery to the coming generation of histone deacetylase inhibitors, *Current Medicinal Chemistry*, 10: 2351-2358.

YOSHIDA, M., NOMURA, S., BEPPU, T., 1987, Effects of trichostatins on differentiation of murine erythroleukemia cells, *Cancer Research*, 47: 3688-3691.

YUAN, P.X., HUANG, L.D., JIANG, Y.M., 2001, The mood stabilizer valproic acid activates mitogen-activated protein kinases and promotes neurite growth, *Journal of Biological Chemistry*, 276: 31674-83.

YUAN, J., HORVITZ, H.R., 1992, The *C. elegans* cell death gene *ced-4* encodes a novel protein and is expressed during the period of extensive programmed cell death, *Development*, 116: 309-320.

YUAN, K., SHAHAM, S., LEDOUX, S., ELLIS, H.M., HORVITZ, H.R., 1993, *Cell*, 75: 641-652.

ZANELLATO, A., FACCI, L., PETRELLI, L., DAL TOSO, R., SKAPER, S.D., 1994, Characterization and growth-dependent regulation of the nerve growth factor receptor gp140trk in rat C6 glioma cells, *Molecular Brain Research*, 23: 299-309

ZHANG, J., CADO, D., CHEN, A., KABRA, N.H., WINOTO, A., 1998, Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1, *Nature*, 392: 293-300.

ZHANG, Y., LI, N., CARON, C., MATTHIAS, G., HESS, D., KHOCHBIN, S., MATTHIAS, P., 2003, HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules *in vivo*, *EMBC Journal*, 22: 1168-1179.

ZHANG, W., BIEKER J.J., 1998, Acetylation and modulation of erythroid Kruppel-like factor (EKLF) activity by interaction with histone acetyltransferases, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95: 9855-9862.

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Tunceli’de doğdu. İlk ve orta öğrenimini 1998 yılında Karacapaşa İlk Öğretim Okulunda, lise öğrenimini 2002 yılında Arnavutköy Korkmaz Yiğit Lisesi’nde (Yabancı Dil Ağırlıklı Lise) tamamladı. 2003 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nü kazandı. 2007 yılında lisans öğrenimini tamamladı. 2008 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Zooloji Programında yüksek lisans öğrenimine başladı.