

T.C.
KIRŞEHİR AHİ EVRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Lactobacillus plantarum SUŞUNUN SEKONDER
METABOLİTLERİ VE BİYOAKTİVİTELERİNİN
MOLEKÜLER DÜZEYDE ARAŞTIRILMASI

MELİH ŞENTÜRK

YÜKSEK LİSANS TEZİ
GENETİK VE BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

KIRŞEHİR 2018

T.C.
KIRŞEHİR AHI EVRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Lactobacillus plantarum SUŞUNUN SEKONDER
METABOLİTLERİ VE BİYOAKTİVİTELERİNİN
MOLEKÜLER DÜZEYDE ARAŞTIRILMASI

MELİH ŞENTÜRK

YÜKSEK LİSANS TEZİ
GENETİK VE BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç.Dr. Fahriye ERCAN
Doç.Dr. Serap YALÇIN AZARKAN

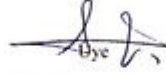
KIRŞEHİR 2018

Fen Bilimleri Enstitüsü Mdrlg'ne

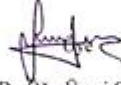
**Bu alışma jürimiz tarafından Genetik ve Biyomühendislik Anabilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.**



Prof. Dr. Aydın ř. TUNÇBİLEK



Doç. Dr. Fahriye ERCAN



Dr. Or. Üyesi Gamze TURNA

Onay yukarıdaki imzaların, adı geçen üretim üyelerine ait olduğunu onaylım.

03/08/2018

Prof. Dr. Yılmaz ALTUN

Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek yazıldığını, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atf yapıldığını bildiririm.

Bu çalışma Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Biriminin ZRT.A4.18.007 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

MELİH ŞENTÜRK



ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Lactobacillus plantarum* SUŞUNUN SEKONDER METABOLİTLERİ VE BİYOAKTİVİTELERİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE ARAŞTIRILMASI**

Melih ŞENTÜRK

Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Genetik ve Biyomühendislik Anabilim Dalı

Danışman: Doç.Dr. Fahriye ERCAN, Doç.Dr. Serap YALÇIN AZARKAN

Bu çalışmada, probiyotik özellikteki *Lactobacillus plantarum* sekonder metabolitinin insan meme kanseri MCF-7 hücre hattı ve insandaki genlerin bir kısmının korunduğu, model organizma olarak bilinen meyve sineği, *Drosophila melanogaster* üzerindeki sitotoksik etkileri araştırılmıştır. MCF-7 hücre hattında sekonder metabolitin IC₅₀ değeri 0,0013 gr/ml belirlenmiştir. *Drosophila melanogaster*'de dozlar çalışma sırasında saptanmış olup probit analizi sonucu LC₅₀ ve LC₉₉ değerleri sırasıyla 0,24 mg/ml ve 0,56 mg/ml olarak saptanmıştır. Uygulama sonrası MCF-7 hücre hattında; RRAS-2, TP53, BCL-2, APAF-1, CASP-3, FADD, CASP-7, BOK genleri ve *Drosophila melanogaster*'de RAS64B P53, BUFFY, DARK, DECAF, FADD, DRICE, DEBCL genlerinin ekspresyon seviyeleri RT-PCR ile belirlenmiştir. Metabolit uygulaması sonucu insan meme kanseri hücre hattında ve meyve sineğinde antiapoptotik olarak karşımıza çıkan BCL-2 ve BUFFY genlerinin

ekspresyonlarında azalma görülmüştür. Aynı zamanda *Drosophila melanogaster*'de DECAF, FADD, RAS64B apoptotik genlerinde ekspresyon artışı saptanmıştır.

Bununla birlikte *Lactobacillus plantarum* sekonder metabolitinin analizi GC-MS yöntemi ile belirlenmiştir. Belirlenen maddelerin ilgili genlere bağlanması moleküler docking yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Sekonder metabolit içeriğinde tespit edilen ve L13 olarak kodlanan maddenin çalışılan genlerde yüksek bağlanma afinitesine sahip olduğu gözlenmiştir.

Temmuz 2018, xvi + 61 sayfa

Anahtar kelimeler: *Lactobacillus plantarum*, *Drosophila melanogaster*, MCF-7, moleküler docking, apoptoz, gen ekspresyonu

ABSTRACT

MASTER THESIS

INVESTIGATION OF SECONDARY METABOLITES AND BIOACTIVITIES OF *Lactobacillus plantarum* STRAIN AT MOLECULAR LEVEL

Melih ŞENTÜRK

Kırşehir Ahi Evran University

Institute of Science

Genetics and Bioengineering Department

Supervisor: Doç.Dr. Fahriye ERCAN, Doç.Dr. Serap YALÇIN

AZARKAN

In this study, the cytotoxic effects of the probiotic *Lactobacillus plantarum* secondary metabolite on the human breast cancer cell line were identified as MCF-7 cell line and the *Drosophila melanogaster* fruit fly, investigated. The IC₅₀ value of the secondary metabolite in the MCF-7 cell line was 0.0013 gr/ml. *Drosophila melanogaster* doses were determined during the study and the probit analysis resultant LC₅₀ and LC₉₉ values were 0.24 mg/ml and 0.56 mg/ml, respectively. After application, MCF-7 cell line; RRAS-2, TP53, BCL-2, APAF-1, CASP-3, FADD, CASP-7, BOK genes and expression levels of RAS64B P53, BUFFY, DARK, DECAF, FADD, DRICE and DEBCL genes in *Drosophila melanogaster* were determined by RT-PCR expression of the BCL-2 and BUFFY anti-apoptotic pathway

genes, in the human and the fruit fly, has been reduced. At the same time, expression increase of DECAF, FADD, RAS64B apoptotic genes was detected in *Drosophila melanogaster*.

However, analysis of *Lactobacillus plantarum* secondary metabolite was performed by GC-MS method. Molecular docking was used to link the matter to the related genes. The substance detected in the secondary metabolite content and encoded as L13 has been observed to have high binding affinity in the studied genes.

July 2018, xvi + 61 pages

Key words: *Lactobacillus plantarum*, *Drosophila melanogaster*, MCF-7, molecular docking, apoptosis, gene expression



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca hep yanımda olan, bana destek veren, güvendiğim, danıştığım, hayatım boyunca emeklerini asla unutamayacağım insanlar oldu. Bu bağlamda;

Eğitimim boyunca benden bilgi ve desteğini hiç esirgemeyen, tez çalışmamızın planlanması, yürütülmesi ve her aşamasında bilgi, birikim ve deneyimlerini paylaşan ve her türlü yardımı ve desteği esirgemeyen sayın danışman hocam Doç.Dr. Fahriye ERCAN ve ikinci danışmanım sayın Doç.Dr. Serap YALÇIN AZARKAN'a,

Bana Moleküler Biyoloji ve Genetik alanını sevdiren ve bu yola girmemi sağlayan, Erzurum Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümü öğretim üyelerine,

Bilgi ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen Ahi Evran Üniversitesi Merkezi Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı öğretim üyelerine,

Bakterilerin temini ve metabolitlerin hazırlanması aşamasında desteklerini esirgemeyen Araş. Gör. Dr. Esin KIRAY'a

Moleküler docking çalışmalarında desteklerini benden esirgemeyen Batman Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu Dr.Öğr. Üyesi Selami ERCAN'a,

Eğitimimin her aşamasında maddi ve manevi destek olan, benim başarılarımla gurur duyan başta canım annem ve canım babam olmak üzere tüm aileme,

Her zaman aklımda ve kalbimde olan bana emeği geçen çok değerli hocalarım ve dostlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Temmuz, 2018

MELİH ŞENTÜRK

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
TABLolar DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Probiyotikler ve <i>Lactobacillus plantarum</i>	1
1.2. Kanser	1
1.2.1. Meme Kanseri.....	2
1.2.1.1. Meme Kanserinde Tedavi Yöntemleri.....	2
1.2.1.1.1. Cerrahi Tedavi	2
1.2.1.1.2. Kemoterapi	3
1.2.1.1.3. Radyoterapi.....	3
1.2.1.1.4. Hormon Tedavisi	3
1.2.1.1.5 İmmünoterapi.....	4
1.3. Çoklu İlaç Direnci ve Mekanizması	4
1.4. Apoptoz.....	5
1.4.1. Mitokondri/Sitokrom-c Aracılı Apoptoz Oluşturulması	6
1.4.2. Dış Sinyallerle Apoptozun Tetiklenmesi.....	6
1.4.3. Endoplazmik Retikulum Aracılı Apoptoz Oluşturulması.....	7
1.5. <i>Drosophila melanogaster</i>	8
1.6. Moleküler Modelleme ve Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı.....	9
1.6.1. Protein Veritabanı	9
1.6.2. Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı	9
1.6.3. Moleküler Docking (kenetlenme) Yöntemi	10
2.KAYNAK ARAŞTIRMASI	11
3. MATERİYAL METOT	16

3.1. Materyal.....	16
3.1.1. <i>Lactobacillus plantarum</i>	16
3.1.2. <i>Drosophila melanogaster</i>	16
3.1.3. Meme Kanseri Hücre Hattı.....	16
3.1.4. Kullanılan Kimyasallar.....	16
3.1.5. Cihazlar ve Laboratuvar Araçları.....	17
3.2. Metot.....	17
3.2.1. Bakterilerin Aktifleştirilmesi ve Süpernantların Liyo filizasyonu.....	17
3.2.2. Sineklerin Yetiştirilmesi ve Doz Uygulamaları.....	17
3.2.3. Hücre Kültürü Uygulamaları.....	18
3.2.4. Sekonder Metabolitin invitro Ortamda Toksikite Analizleri.....	20
3.2.5. Total RNA İzolasyonu.....	20
3.2.6. cDNA Sentezi.....	22
3.2.7. Meme Kanseri İle İlgili Apoptotik Genlerin Belirlenmesi.....	23
3.2.8. Genlerin Ekspresyon Analizleri.....	25
3.2.9. Sekonder Metabolitin GC-MS Analizi.....	25
3.2.10. Sekonder Metabolitin FTIR Spektroskopisi.....	26
3.2.11. Moleküler Docking Çalışmaları.....	27
3.2.11.1. Ligand Hazırlığı.....	27
3.2.11.2. Protein Hazırlığı.....	27
3.2.11.3. Docking Hesaplamaları.....	27
3.2.11.4. Protein-Ligand Etkileşimlerinin Belirlenmesi.....	27
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	29
4.1. Sitotoksikite Sonuçları.....	29
4.1.1. <i>Lactobacillus plantarum</i> 'un Hücresiz Taze Filtratının MCF-7 Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkileri.....	29
4.1.2. <i>Lactobacillus plantarum</i> 'un Hücresiz Taze Filtratının <i>Drosophila melanogaster</i> Üzerine Etkileri.....	30
4.2. FTIR Sonuçları.....	30
4.2.1. MCF-7 Hücre Hattı Kontrol ve Metabolit Uygulaması FTIR Sonucu.....	30
4.3. Sekonder Metabolitin GC-MS Sonucu.....	32
4.4. Moleküler Docking (kenetlenme) Sonuçları.....	33
4.4.1. Hesaplamalar-Skorlar.....	33

4.4.2. Protein – Ligand Etkileşimleri.....	34
4.5. Genlerin Ekspresyon Sonuçları	42
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	45
6. KAYNAKÇA.....	47
7. EKLER	54
8. ÖZGEÇMİŞ	61



TABLULAR DİZİNİ

Tablo 2.1. <i>D.melanogaster</i> 'de çalışılan insan kanser tipleri listesi	13
Tablo 2.2. <i>D. melanogaster</i> 'de onaylanmış veya geliştirilen antikanser ilaçların listesi....	15
Tablo 3.1. <i>Drosophila melanogaster</i> ve <i>Homo sapiens</i> çalışılan genler.....	23
Tablo 4.1. <i>Drosophila melanogaster</i> 'de probit analizi ile dozların belirlenmesi	30



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. İmmünoterapi Tedavi Yöntemi	4
Şekil 1.2. İntrensek ve Ekstrensek Yolak	7
Şekil 1.3. Protein veri tabanı web sayfası.....	9
Şekil 1.4. 2001-2011 döneminde en yaygın protein-ligand yerleştirme programları için alıntı sayısı (2011'de yayımlanan programlar dahil değil)	10
Şekil 2.1. Yıllar boyunca <i>D. melanogaster</i> 'de kanser araştırmaları üzerine yayın sayısı... 13	
Şekil 3.1. Hemositometre sayım karesi	19
Şekil 3.2. <i>Homo sapiens</i> genlerinin <i>Drosophila melanogaster</i> karşılığının belirlenmesi adımları.....	24
Şekil 3.3. Real-Time PCR reaksiyon basamakları	25
Şekil 3.4. GC-MS cihazı.....	26
Şekil 3.5. Vina programında grid parametrelerinin belirlenmesi ve docking işleminin başlatılması	28
Şekil 4.1. XTT hücre proliferasyon kiti kullanılarak <i>Lactobacillus plantarum</i> ekstrakte metabolit ürünlerinin MCF-7 hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkisinin grafik olarak gösterimi	29
Şekil 4.2. MCF-7 hücre kontrol hattı FTIR sonuç grafiği.....	30
Şekil 4.3. MCF-7 hücre hattı 24 saat metabolit uygulaması FTIR sonuç grafiği.....	31
Şekil 4.4. MCF-7 hücre hattı 48 saat metabolit uygulaması FTIR sonuç grafiği.....	31
Şekil 4.5. Metabolit GC-MS Analiz Grafiği	32
Şekil 4.6. RRAS2-L03 Docking Sonucu Etkileşimleri	34
Şekil 4.7. APAF1-L13 Docking Sonucu Etkileşimleri	35

Şekil 4.8. CASP3-L13 Docking Sonucu Etkileşimleri.....	36
Şekil 4.9. CASP7-L13 Docking Sonucu Etkileşimleri.....	37
Şekil 4.10. FADD-L13 Docking Sonucu Etkileşimleri.....	38
Şekil 4.11. TP53-L13 Docking Sonucu Etkileşimleri.....	39
Şekil 4.12. 1GJH-L13 Docking Sonucu Etkileşimleri	40
Şekil 4.13. 1G5M-L13 Docking Sonucu Etkileşimleri	41
Şekil 4.14. <i>Drosophila melanogaster</i> kontrole göre LC ₉₉ doz uygulaması sonucu genlerdeki ekspresyon değişimleri	42
Şekil 4.15. <i>Drosophila melanogaster</i> kontrole göre LC ₅₀ doz uygulaması sonucu genlerdeki ekspresyon değişimleri	43
Şekil 4.16. MCF-7 kontrole göre IC ₅₀ doz uygulaması sonucu genlerdeki ekspresyon değişimleri	44

SİMGELER VE KISALTMALAR

- ADT** : AutoDock
- AGS** : İnsan Mide Kanser Hücre Hattı
- ALA** : Alanin
- ARG** : Arjinin
- ATP** : Adenozin Trifosfat
- Ca⁺²** : Kalsiyum
- cDNA** : Komplementer DNA
- CO₂** : Karbondioksit
- CYS** : Sistein
- DISC** : Death-İnducing Signaling Complex
- DNA** : Deoksiribo Nükleik Asit
- DNase**: Deoksiribonukleaz
- dNTP** :Deoksiniükleotid Trifosfat
- EDTA** :Etilendiamin Tetraasetik Asit
- ELISA**: Enzim Bağlı İmmünosorbent Deneyi
- ER** : Endoplazmik Retikulum
- FADD** : Fas-Associated Death Domain
- FAO** : Gıda ve Tarım Organizasyonu
- FDA** : Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
- FTIR** : Fourier-Transform İnfrared Spectroscopy
- GI** : Gastrointestinal
- GLN** : Glutamin
- GLY** : Glisin
- HIS** : Histidin
- H₂O₂** : Hidrojen Peroksit
- HeLa** : İnsan Servikal Kanser Hücre Hattı
- HT-29** : İnsan Kolorektal Kanser Hücre Hattı
- HUVEC**: İnsan Göbek Bağı Damar Endotel Hücresi

IAF : Apoptozis İnducing Faktör
IAP : Apoptozis İnhibitör Proteinini
IC₅₀ : Inhibition Concentration % 50
ILE : İzolösin
LC₅₀ : Lethal Concentration % 50
LC₉₉ : Lethal Concentration % 99
LEU : Lösin
LYS : Lizin
MCF-7: İnsan Meme Kanser Hücre Hattı
MDR : Multi-Drug Rezistans
MRP : Multi-Drug Rezistans İlişkili Protein
MRS : De Man Rogosa Sharpe
NMR : Nükleer Manyetik Rezonans
PBS : Phosphate-Buffered Saline
PDB : Protein Veri Bankası
PHE : Fenilalanin
PRO : Prolin
RNA : Ribonükleikasit
RNase: Ribonukleaz
RPMI-1640: Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR: Real-Time Polymerase Chain Reaction
SER : Serin
SLRLT: Eşeye Bağlı Resefif Letal Mutasyon Testi
TNF : Tümör Nekroz Faktör
TNFR1: Tümör Nekroz Faktör Reseptörü
TRP : Triptofan
TYR : Tirozin
TRADD: Receptor-Associated Death Domain
VAL : Valin
WHO : Dünya Sağlık Organizasyonu

1. GİRİŞ

1.1. Probiyotikler ve *Lactobacillus plantarum*

Probiyotik kelimesi Yunanca kökenli bir kelime olup; ‘yaşam için’ anlamına gelmektedir. Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) probiyotikleri uygun miktarda alındıkları takdirde konakçı sağlığı üzerinde olumlu etkileri olan canlı mikroorganizmalar olarak ifade etmiştir [1].

Probiyotikler, insanların bağırsak mikrobiyal homeostazını düzenleyen, laktobasiller, bifidobakteriler, enterokoklar ve streptokoklardan oluşan, yararlı, canlı mikrobiyal gıda içerikleri şeklinde tanımlanmaktadır [2].

Probiyotiklerin en önemli etkileri; GI (gastrointestinal) sistemde, enteropatojen mikroorganizmaların, konakçının GI sistemine kolonizasyonunu engellemek amacıyla barsak epitel yüzeyinde bulunan tutunma bölgeleri için rekabet yaratmak, ürettikleri laktik asit, asetik asit gibi organik asitler aracılığıyla barsak pH'sını azaltarak zararlı bakterilerin yaşam faaliyetini sonlandırmak ve hidrojen peroksit (H₂O₂), karbondioksit (CO₂), diasetil, asetaldehit, reuterin ve bakteriyosin benzeri maddeler gibi pek çok antimikrobiyal maddeler sayesinde, patojen bakterilerin çoğalmalarını kontrol altında tutmak ve mikroflora dengesini sağlamak olarak belirtilmektedir [3].

Lactobacillus plantarum, çubuk şekilli, gram-pozitif bir laktik asit bakterisi olarak bilinmektedir. Genellikle insan ve diğer memeli GI yollarda, tükürükte ve çeşitli gıda ürünlerinde bulunur. 15-45°C arasındaki sıcaklıklarda ve 3.2 pH seviyesi kadar düşük şartlarda dahi varlığını sürdürebilen bir bakteridir [4].

1.2. Kanser

Kanser vücudun tamamını ya da bir kısmını etkileyen hastalıklar için kullanılan genel bir terim olarak kabul edilmektedir. Neoplazi ve malign tümör kanserin yerine kullanılan yaygın terimlerdir. Kanselerin belirgin özelliği hücrelerin standart büyüme sınırları dışına çıkarak büyümesi, etrafındaki bulunan hücrelere istila etmesi ve organlara yayılma etkisi metastaz göstermesidir. Kansere dünyada ölüm nedenleri arasında 2. sıradadır ve 2015 yılında 8.8 milyon ölüm gerçekleşmiştir. Erkeklerde görülen en yaygın kanser tipleri akciğer, prostat,

kolorektal, mide ve karaciğer kanseri iken kadınlarda meme, kolorektal, akciğer, serviks ve mide kanseridir [5].

1.2.1. Meme Kanseri

Meme kanseri kadınların arasında en yaygın görülen kanser çeşididir. Çoğu meme kanseri lobül denilen süt üretimine yönelik bezlerin üstünde yer alan meme dokusunda ya da lobülleri meme ucuna bağlayan kanallarda başlamaktadır. Meme kanseri genellikle kadınlarda görülür ancak nadiren de olsa erkeklerde de görülebilmektedir [6].

Dünya genelinde hastalığın görülme sıklığı her yıl bir önceki yıla oranla artış göstermektedir. Yapılan araştırmalar sonucunda meme kanseri görülme oranının kentli kadınlarda kırsal kesimde yaşayan kadınlardan daha fazla olduğunu göstermiştir [7].

1.2.1.1. Meme Kanserinde Tedavi Yöntemleri

Kanser tedavisinde belirlenen yöntem genellikle tümörün evresine bağlıdır. Uygulanan tedavi yönteminin başarısı; hastanın yaşına, cinsiyetine, genel durumuna ve yaşam kalitesine göre değişkenlik göstermektedir. Temel olarak kullanılan tedavi yöntemleri cerrahi tedavi, kemoterapi, radyoterapi, hormonal tedavi, immünoterapi şeklinde sıralanabilmektedir. Her tedavi yönteminin kendi içinde farklı uygulamaları, riskleri ve yan etkileri bulunmaktadır [8].

1.2.1.1.1. Cerrahi Tedavi

Cerrahi tedavi genellikle ilk yöntem olarak akla gelmektedir. Cerrahi yöntemin belirlenmesi kanserin evresine ve kişiliğine göre değişmektedir. Genel olarak kullanılan iki yöntem vardır;

Lumpektomi, meme koruyucu cerrahi yöntem olarak da bilinen lumpektomi sadece tümörün ve tümörü çevreleyen az miktarda dokunun çıkarılmasıdır.

Mastektomi yönteminde ise meme dokusunun tamamının ameliyat ile alınması söz konusudur [6,9].

1.2.1.1.2. Kemoterapi

Kemoterapi tedavisi tümör bölgesi ve çevresindeki hücreler ve vücudun başka bir bölümüne yayılmış olabilecek tüm kanser hücreleri de dahil olmak üzere vücuttaki kanser hücrelerini zayıflatmak ve yok etmek amacıyla kullanılan bir tedavi yöntemidir. Kemoterapi sistemik bir tedavidir ve bu da kan dolaşımına girerek tüm vücudu etkilediği anlamına gelmektedir. Bu durumdan dolayı sağlıklı hücrelerde kemoterapiden etkilenmektedir ve bu durum kemoterapinin en büyük dezavantajlarından biridir.

Erken evre invaziv meme kanseri ameliyatından sonra geride kalabilecek kanserli hücrelerden kurtulmak ve geri gelen kanser riskini azaltmak, ileri evre meme kanseri durumlarında ise kanser hücrelerini tahrip etmek veya zarar vermek için kemoterapi kullanılmaktadır.

Gemzar (kimyasal adı: gemsitabin) Taxol (kimyasal adı: paklitaksel) Adriamisin (kimyasal adı: doksorubisin) meme kanserinde kullanılan kemoterapi ilaçlarından bazılarıdır [6,9].

1.2.1.1.3. Radyoterapi

Aynı zamanda radyasyon tedavisi olarak da adlandırılan radyoterapi ameliyattan sonra etrafta kalabilen memedeki kanser hücrelerini yok etmek için oldukça hedefli ve oldukça etkili bir yoldur. Birçok insanın korkmasına rağmen, radyasyon tedavisinin tolere edilmesi nispeten kolaydır ve yan etkileri tedavi edilen alanla sınırlı kalmaktadır [6,9].

1.2.1.1.4. Hormon Tedavisi

Hormon reseptörü pozitif meme kanserlerinde hormon tedavisi iki farklı yol ile gerçekleştirilmektedir. Vücuttaki östrojen hormonu miktarını düşürerek ve meme kanseri hücrelerinde östrojen eylemini bloke ederek etkisini göstermektedir.

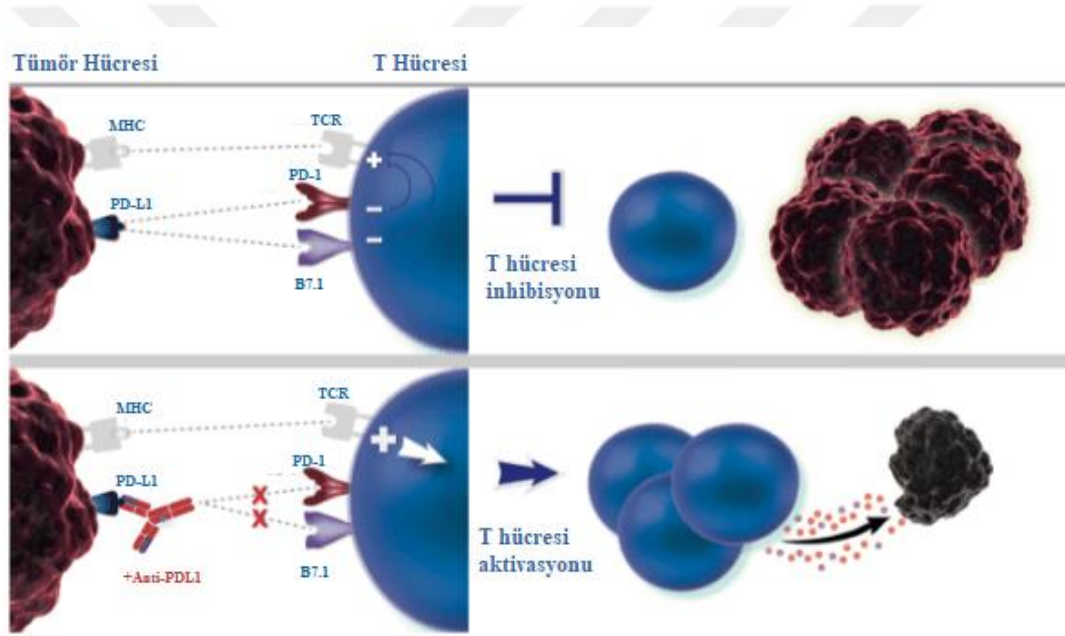
Hormonal tedavi ilaçları hormon reseptörü negatif meme kanserlerinde etki göstermemektedir.

Aromataz inhibitörleri, selektif östrojen reseptör modülatörleri ve östrojen reseptörü down regülasyonları dahil olmak üzere birçok hormonal tedavi ilacı bulunmaktadır [6,9].

1.2.1.1.5 İmmünoterapi

İmmünoterapi ilaçları vücudun bağışıklık sistemini kanser hücreleri ile savaşırken desteklenmesi ve güçlendirilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Kanser için kullanılan aşuların yanı sıra bağışıklık kontrol noktası inhibitörleri de kullanılmaktadır.

Bağışıklık sisteminizin “kendî” hücrelerini tanmasına yardımcı olan proteinlerin bir kısmına bağışıklık kontrol noktaları denir. Kanser hücreleri, bağışıklık sistemi tarafından tanımlanıp saldırıya uğramamak için bazen bu bağışıklık kontrol noktası proteinlerini bir kalkan olarak kullanmaktadırlar. İmmün kontrol noktası inhibitörleri esas olarak, kanser hücreleri veya bunlara yanıt veren T hücreleri üzerindeki kontrol noktası inhibitör proteinlerini bloke ederek kalkanları bağışıklık sisteminden uzaklaştırmaktadır [6,9].



Şekil 1.1. İmmünoterapi Tedavi Yöntemi [10]

1.3. Çoklu İlaç Direnci ve Mekanizması

Belirli bir ajana karşı dirençli olarak seçilen birçok tümör hücresinin çeşitli ilaçlar, vinka alkaloidler, taksol, kolşisin gibi yapısal ve fonksiyonel bileşiklere karşı çapraz direnç göstermesi durumu çoklu ilaç direnci olarak açıklanmaktadır [11].

Kanser hücrelerinde görülen çoklu ilaç direnci ile ilgili olarak apoptotik mekanizmalardaki düzensizlikler, hücre döngüsü kontrol noktalarındaki değişiklikler, hasar görmüş hücresel

hedeflerin onarımı ve hücre içi ilaç birikiminin azaltılması gibi çeşitli mekanizmalar aydınlatılmış bulunmaktadır. Hücre zarında transmembran proteini olan ve enerji bağımlı bir pompa şeklinde çalışması nedeniyle hücre içi ilaç yoğunluğunda azalmaya neden olan P-glikoprotein ifadesinin artışı bu mekanizmalar arasında en yaygın olarak bilinmektedir [12].

İlaç direncini açıklayan birçok hücrenel mekanizma ortaya koyulmuştur. Bu mekanizmalar, insan multi-drug rezistans (MRP) ilişkili protein tarafından ilaçların artan atılımı, DNA topoizomera II gibi ilaç hedeflerindeki değişimleri ve bileşiklerin artan detoksifikasyonunu içermektedir. MDR'nin klasik formu ise, bir transmembran ilaç atılım pompası olarak fonksiyon gören P-glikoprotein'i kodlayan MDR1 geninin aşırı ekspresyonu sonucu ortaya çıkmaktadır [11].

P-glikoprotein'in çalışma mekanizması için yaygın olarak kabul edilen "hidrofobik vakum pompası"dır. Bu mekanizmaya göre substrat doğrudan proteinin ilaç-bağlama bölgesine bağlanmakta ve ATP'nin hidrolizinden elde edilen enerji ile hücre dışı ortama pompalanmaktadır [13].

1.4. Apoptoz

Apoptoz, fonksiyonunu kaybetmiş, fazla üretilmiş, düzensiz gelişmiş veya genetik olarak hasarlı durumda olan hücrelerin, organizma için güvenli bir yol ile yok edilmesini sağlayan ve genetik temelli olarak da kontrol edilen programlı hücre ölümüdür.

Apoptoz normal meme hücresinin gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. Apoptoz oranları tümör derecesi ile ilişkilidir ve daha agresif tümörler daha yüksek apoptoz ve proliferasyon oranlarına sahiptir. Apoptotik mekanizmanın bozulması kontrol noktası yollarının çoğunu geçersiz kılar ve neoplastik hücrelerin genişlemesine yol açmaktadır. Apoptozu kontrol eden genler ve proteinler, kanser hücrelerinin ölümünü artırmak için manipülasyon hedefleri haline gelebilmektedirler [14].

1.4.1. Mitokondri/Sitokrom-c Aracılı Apoptoz Oluşturulması

İntrensek yolak hücrel stress (özellikle de mitokondriyal stres) ile tetiklenmektedir. Mitokondriyal tetiklemede tamir edilemez genetik hasar, aşırı yüksek derişimlerdeki sitozolik Ca^{2+} , hipoksi, şiddetli oksidatif stres gibi iç uyaranlar rol almaktadır [15]. Stress sinyali alınması üzerine, sitoplazmada bulunan proapoptotik proteinler BAX ve BID mitokondri dış zarına bağlanarak mitokondri içeriğinin dışarıya çıkmasını sağlayacak sinyaller salar. Bununla birlikte, mitokondri içinde bulunan BAK ve sitokrom-c mitokondri içi bileşimin mitokondriden salınımı için gereklidir. Sitokrom-c'nin salınmasından sonra hücre içi apoptozom yapısı oluşmaktadır. Bu kompleks mitokondriden salınan sitokrom c ile birlikte APAF-1, ATP ve inaktif başlatıcı kaspaz olan pro-kaspaz-9'u içermektedir. Apoptozomun oluşması ile kaspaz-9 aktive edilmektedir. Aktive kaspaz-9 sitokrom-c, ATP ve APAF-1 ile birlikte hasarı başlatacak olan etkin kaspaz olan kaspaz-3'ü aktive edilerek diğer kaspaz kaskadının tetiklenmesi sağlanarak hücre apoptoza götürülür. Membran içi boşluktan sitokrom c salınımı dışında, DNA fragmantasyonunu kolaylaştıran apoptosis inducing factor (IAF) ve apoptosis inhibitör proteinini (IAP) inhibe eden Smac/Diablo proteinlerini ve Omi/HtrA2 proteinleri salınmaktadır [16,17].

Kaspazların yanı sıra BCL-2 gen ailesi üyeleri apoptozis mekanizmasında önemli bir yere sahiptir. Kendi içinde antagonist ilişkiye sahip proteinleri kodlarlar. Bu proteinlerden Mcl-1, Bcl-2, Bcl-xl apoptozu engellemekle görevli iken, Bid, Bad, Bax, Bcl-xs apoptozu uyarmakta görevli üyelerdir. Mitokondriyal yolda mitokondri zarlarından sitokrom-c salınımı ve kaspaz ativasyonu BCL-2 ailesindeki apoptozu uyaran proteinler tarafından sağlanmaktadır. Büyüme faktörü eksikliği, DNA hasarı, kemoterapi ve radyasyon gibi apoptozu uyaran ajanlar hücreyi mitokondriyal yolla apoptoza götürmektedir. Bu ajanlar sitozolde bulunan BCL-2 gen ailesi üyelerinin görevlerini yapmalarını sağladığından dolayı mitokondriyal yol iç sinyal apoptozu olarak anılmaktadır [18].

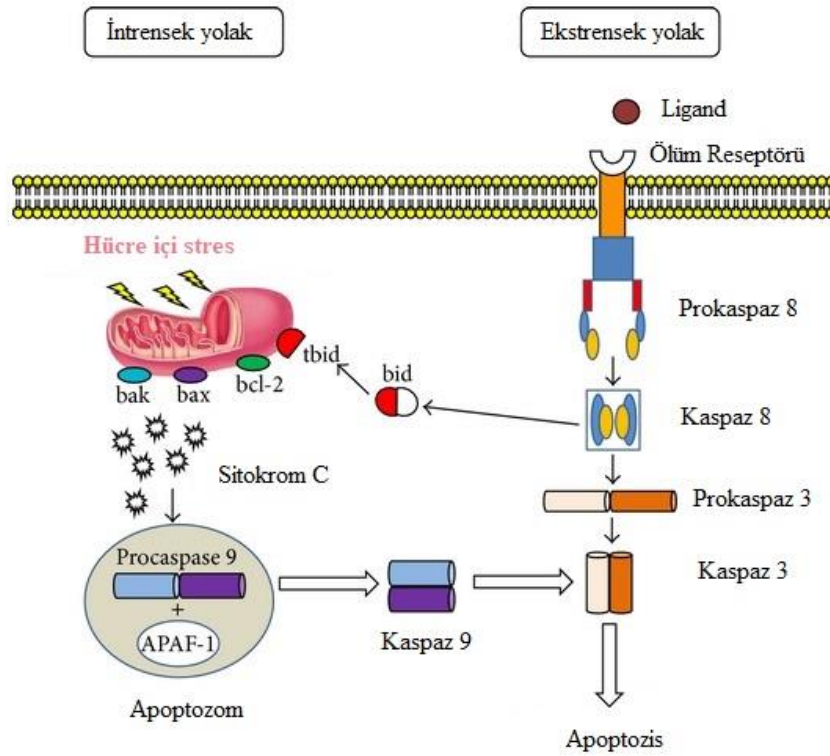
1.4.2. Dış Sinyallerle Apoptozun Tetiklenmesi

Ekstrensek yolak ölüm reseptörüne ölüm ligandlarının bağlanmasıyla birlikte aktif hale gelmektedir. En çok bilinen ölüm reseptörleri TNFR1 (Tümör nekroz faktör reseptörü) ve CD95 (Fas) 'dir. Bunların ligandları ise sırasıyla TNF ve Fas ligandı olarak adlandırılmaktadır. Bu reseptörlerinin TNF reseptörü ile ilişkili ölüm bölgesi TRADD (TNF receptor-associated death domain) ve Fas ile ilişkili ölüm bölgesi FADD (Fas-associated

death domain)'dır. Bunların yanı sıra kaspaz-8 gibi adaptör proteinleri aktiveştiren hücre içi ölüm bölgeleri de vardır. Bu reseptör-ligand bağlanması sonucu bir adaptör protein için bağlanma bölgesi oluşturmaktadır. Bu reseptör-ligand-adaptör protein kompleksi, ölümü tetikleyen sinyal kompleksi DISC (death-inducing signaling complex) olarak bilinmektedir. DISC kompleksi pro-kaspaz-8'in birikmesi ve aktivasyonunda rol almaktadır. Aktif kaspaz-8, kaspaz-3 ü aktiveştirir ve hücrede morfolojik değişikliklerle birlikte apoptoz süreci başlatmaktadır [19,20].

1.4.3. Endoplazmik Retikulum Aracılı Apoptoz Oluşturulması

Kaspaz-12 bağımlı bu yolak ölüm reseptörü ve mitokondriyal apoptoz mekanizmasında farklı bir yolak olarak tanımlanmıştır. Endoplazmik retikulum membran proteinlerinin katlanması, hücre içi kalsiyum sentezi ve dengesi gibi kritik birçok süreçte etkin rol oynamaktadır. Kaspaz-12 ER'de lokalize olup ER'de apoptoza aracılık etmektedir. İnaktif konumda bulunan proKaspaz-12 Ca^{+2} seviyesinin yükselmesi, kalpain ER ile etkileşimi sonucu aktive olmaktadır. Aktifleşmiş kaspaz-12 sitoplazmaya yönelerek kaspaz-9 ile etkileşimi sonucu kaspaz şalesini aktive etmektedir [20].



Şekil 1.2. İntrensek ve Ekstrenek Yolak [21]

1.5. *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster genetik ve gelişim biyolojisinde çok fazla çalışılan bir model organizmadır. Çürümüş meyvelerin üzerinde beslenen ve üreyen küçük bir böcek türüdür. Yaklaşık olarak 100 yıldan fazla bir süredir model organizma olarak kullanılmaktadır.

Genetik çalışmalar ve ilerleyen yıllarda genotoksisite testleri içinde model organizma olarak kullanılan *D. melanogaster*'ın en büyük avantajları arasında; ökaryotik bir organizma olması, üreme ortamları ve içeriklerinin kolay olması ve böylelikle fazla sayıda bireyin ucuz ve kolay bir şekilde yetiştirilebilmesi, yaşam döngülerinin kısa olması, çok sayıda döl vermesi ve özellikle biyoaktivasyon için gerekli enzim mekanizmalarının memelerinki ile benzerlik göstermesi şeklinde sıralanabilmektedir [22].

İnsan ve meyve sineğinde gen sayılarının farklılık göstermesine rağmen ortak gen benzerliklerinin olduğu bilinmektedir. Bu benzerlik sayesinde insandaki genlerin çalışma prensipleri ve fonksiyonları konusunda bilgi edinilerek yeni ilaç keşfedilmesinde *D.melanogaster*'in yardımcı bir model organizma olarak kullanılabilceği düşünülmektedir. *D. melanogaster*'in bu çalışmalarda kullanılması 1927'de Müller'in eşeye bağlı resesif letal mutasyon testini (SLRLT) bilim dünyasına kazandırmasıyla birlikte başlamıştır [23].

Drosophila'nın tüm genomu dizilenmiş ve yaklaşık 13.600 gen tespit edilmiştir [24]. Model organizma *Drosophila*'nın en önemli avantajlarından biride etik kurul izinlerine ihtiyaç duyulmamasıdır [25].

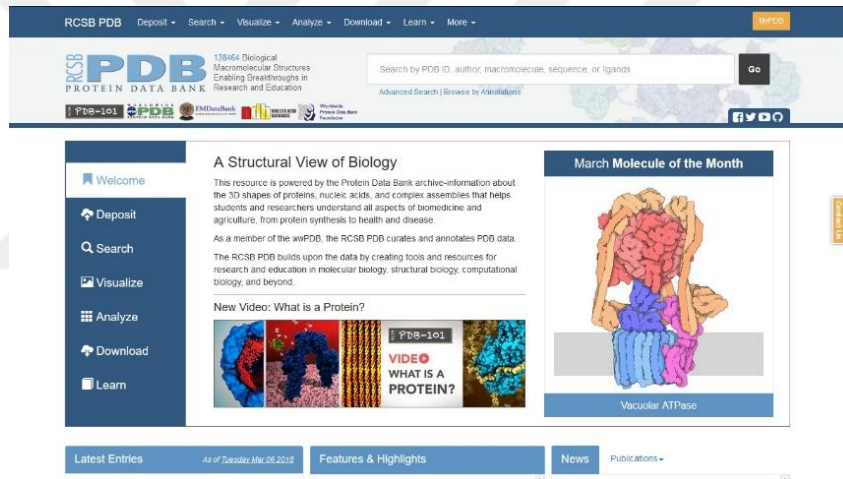
Ayrıca *Drosophila*'nın proteinlerinin yaklaşık yarısı memeli proteinleri ile benzer dizilim göstermektedir. Hastalık genleri bakımından ise % 75-77 civarında insan ile benzer olduğu bilinmektedir [26]. Bu hastalıklar arasında gelişimsel ve nörolojik hastalıklar, Alzheimer, Parkinson, kanser hastalıkları, kardiyovasküler hastalıklar, bağırsak enfeksiyonları ve immün sistem fonksiyonlarının genetik temelleri yer almaktadır [27].

1.6. Moleküler Modelleme ve Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı

1.6.1. Protein Veritabanı

1971 yılında kurulan, protein veri bankası (PDB) proteinler ve nükleik asitler gibi biyolojik moleküllerin 3 boyutlu yapılarını içeren gelişmiş bir kaynaktır. Protein veri bankasında yer alan bilgilerin kaynağı X-ışını kristalografisi veya nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi yöntemleriyle sağlanmaktadır.

Protein veri tabanında yer alan yapılar .pdb dosya formatı biçiminde arşivlenmektedir. Pdb formatı ilaç tasarımı ve moleküler docking programlarının hemen hepsi tarafından tanınmaktadır. Pdb formatında moleküllerin atomik koordinatları, birincil ve ikincil yapı bilgileri, kristalografik yapı faktörleri ve NMR bilgilerini içermektedir. PDB kodu ise ilki rakam olmak üzere 4 karakterli isimlerle simgelenmektedir [28].



Şekil 1.3. Protein veri tabanı web sayfası

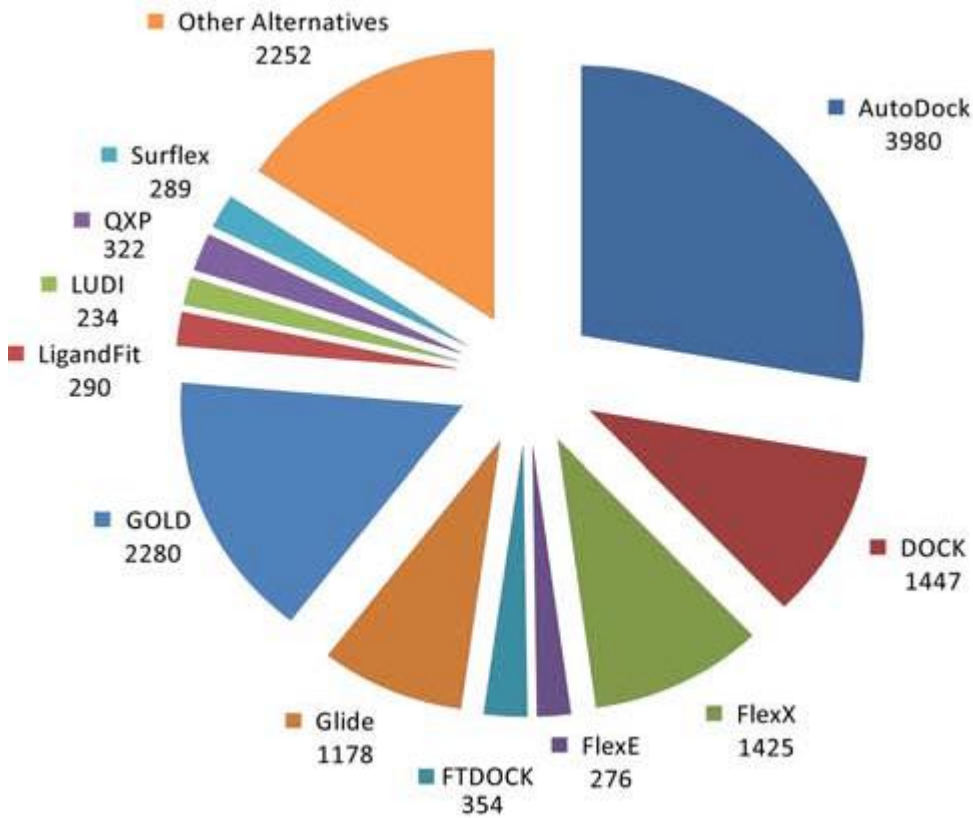
1.6.2. Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı

İlaç tasarımı biyolojik yapılar ve hedef moleküllerin temel alınmasıyla yeni ilaç geliştirilmesi için izlenen adımların tamamıdır. İlaç tasarımında değişik ilaç moleküllerinin tasarımı yer alır ve bu moleküllerin biyolojik yapılara bağlanarak onlarla farmakolojik etkilerinin oluşmasını sağlamaktadır. İlaç tasarımının modern uygulaması ise günümüzde yüksek kapasiteli bilgisayarlar yardımıyla gerçekleştirilmektedir. Temel amaç belirlenen küçük molekülün hedefe bağlanıp bağlanmadığı ve farmakolojik etki yaratıp yaratmadığını araştırmaktır. Bu amaçla birçok farklı program kullanılmaktadır [29].

1.6.3. Moleküler Docking (kenetlenme) Yöntemi

Docking işlemi hedef ligand yapısının tahmin edilen proteinin aktif bölgesine bağlanma konformasyonunu ve bağlanma sırasındaki etkileşimlerin tahminini içermektedir. Docking işlemi için 3 boyutlu yapısı bilinen ligand ve reseptöre ihtiyaç duyulmaktadır. Program ise 3 boyutlu yapılardan yola çıkarak ligandı çalışılan proteinin hedeflenen bölgesine yerleştirir ve bu esnada gerçekleşen enerji ve gerekli bilgileri sağlamaktadır.

Kenetleme çalışmasının doğru yapısal modelleme ve aktivitenin doğru tahmin edilmesi olmak üzere 2 hedefi vardır. Günümüzde bu işlemleri gerçekleştiren birçok farklı program bulunmaktadır. Bu farklılıklar kenetleme pozu belirlenmesi için kullandıkları algoritma ve skorlama fonksiyonlarının farklılığından ileri gelmektedir. Şekil 1.4'de kullanılan programlar ve atıf sayıları gösterilmektedir [30].



Şekil 1.4. 2001-2011 döneminde en yaygın protein-ligand yerleştirme programları için alıntı sayısı (2011'de yayınlanan programlar hariç) [31]

2.KAYNAK ARAŞTIRMASI

Günümüzde probiyotiklerin insan sağlığı üzerine etkileri konusundaki çalışmalar hızla artmaktadır. Kanser hastalığının tedavisinde kullanılan standart yöntemlerin yanısıra alternatif ve destekleyici olarak probiyotiklerin kullanımına ilgi artmıştır.

Süt ürünlerinden izole edilen *Lactobacillus* ve *Lactococcus* suşlarının probiyotik özelliklerinin belirlendiği çalışmada sekrete edilen metabolitlerin HT-29 (insan kolorektal kanser hücre hattı), AGS (insan mide kanser hücre hattı), MCF-7 (insan meme kanser hücre hattı ve HeLa (insan servikal kanser hücre hattı) kanser hücre hattı ve normal hücre hattı HUVEC (insan göbek bağı damar endotel hücresi) üzerindeki sitotoksik etkileri araştırılmıştır. *Lactococcus lactis subsp. lactis 44Lac.* bakterileri tarafından sentezlenen metabolitlerin kanser tedavisinde halihazırda kullanılan Taxol ilacı benzer sitotoksik etki gösterdiğini ve normal hücre hattı üzerinde sitotoksik etki yaratmadığını fakat potansiyel olarak anti-kanser ilacı olarak kullanılması için in vitro/in vivo çalışmaların daha ayrıntılı bir şekilde araştırılması gerektiğini vurgulamışlardır [32].

Vajinal mikrofloradan izolasyonu yapılmış probiyotiklerin kullanıldığı çalışmalarda ise sağlıklı İran kadınlarının vajinal mikroflorasından izole edilen *L. acidophilus 36YL* suşunun probiyotik karakterizasyonu ve AGS, HeLa, MCF-7, HT-29 ve normal hücre HUVEC hücre hattında sitotoksik etkileri çalışılmıştır. Çalışmada *L. acidophilus 36YL* suşu tarafından sentezlenen metabolitlerin çalışılan 4 farklı kanser hücre hattı üzerinde antikanser aktivitesinin olduğunu, en iyi sitotoksik etkinin HT-29 ve HeLa hücre hatları üzerinde olduğunu ve bunun yanı sıra normal hücre hattında önemsiz derecede bir yan etki görüldüğünü belirtmişlerdir [33].

Geçmişte kanser araştırmaları memeli tabanlı sistemlerde, doku kültüründen hayvan çalışmalarına kadar çeşitli alanlarda yürütülmüştür. Ancak son yıllarda, sinekler zamanla bir model organizma olarak kullanılmıştır. Kanser biyolojisi çalışmasına sineklerin en büyük katkılarından biri 20 yıldan uzun bir süre önce tanımlanan Ras sinyal transdüksiyon kaskadının aydınlatılmasıydı [34,35,36]. Bu yolağın memelilerde korunduğu bulunmuştur. Temel olarak, hücre içindeki sinyal olaylarının yanlış düzenlenmesi sonucu hücrenin anormal büyümesi ve çoğalmasına yol açmaktadır. Kanser türüne ve yapısına bağlı olarak, anormal çoğalmanın altta yatan mekanizmaları çeşitlilik göstermektedir. İnsanlardaki

kanserlerin çoğunluğu epitel hücrelerinden türemektedir [37]. Buna göre, epitelyal hücre kaynaklı kanserlerin araştırılması için bir keşif platformuna dönüştürülebilen ve geliştirilmiş bir dizi sinek modeli bulunmaktadır. Bu modeller sadece proliferatif fenotipleri değil, aynı zamanda metastatik ve invaziv olanları da içermektedir.

Apoptosis mekanizmasında kaspazlar kilit rol oynamaktadır. Memeliler'de ve *Drosophila*'da benzer yolların korunduğu birçok çalışmada belirtilmiştir. *Drosophila*'da DCP-1, DCP-2, DRICE ve DRONC kaspazlarının yanı sıra DEWAY kaspazı tanımlanmıştır. Dorstyn ve arkadaşları *D.melanogaster*'de DEWAY kaspazının ön karakterizasyonunu yapmışlardır. Bu çalışmada tanımlanan kaspaz türünün memelilerdeki kaspaz-3 benzeri efektör kaspazlara çok benzediğini ve benzer bir substrat özgüllüğünü paylaştığını belirtmişlerdir. Kaspaz-8 ve kaspaz-10 ile % 48-52 benzerlik gösterirken kaspaz-3 ve kaspaz-7 ile ise % 56 benzerlik gösterdiğini belirtmişlerdir [38].

Çalışmalar insandaki hastalık genlerinin % 75'inin *Drosophila*'da korunduğunu göstermektedir [39]. İnsan kanser genlerinin % 68'inin *Drosophila*'da homoloğu bulunmaktadır [40].

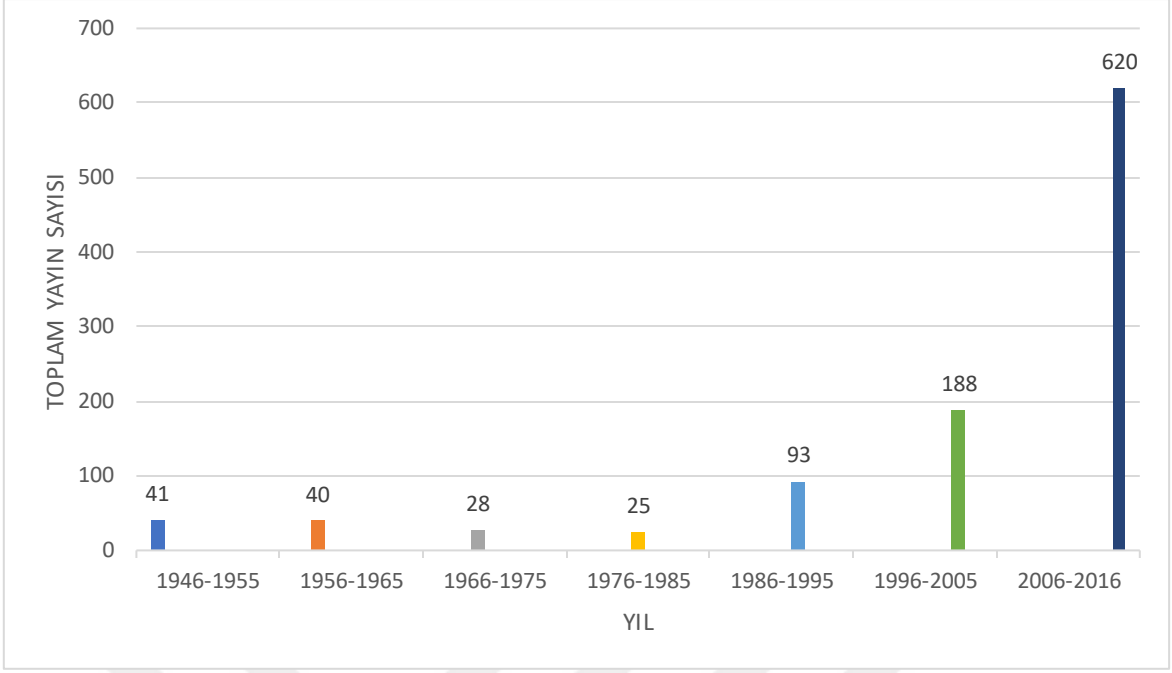
Kanser ilaçlarının geliştirilmesinde başarısızlık oranları, yüksek maliyet ve zaman gerektiren deneyler alternatif yolların ihtiyacını doğurmuştur. Sinyal yollarının korunmuş olması, zaman açısından çalışma kolaylığı ve yetiştirilme maliyetinin az olması *D.melanogaster*'in kanser ilaçlarının yüksek verimli taraması için güçlü bir araç olmasını sağlamıştır. *D.melanogaster*'in çeşitli insan kanserlerine bağlı genlerin homoloğunu içermesi bu model organizmanın kanser ilacı keşiflerinde kullanılması için bir avantaj sağlamıştır. Model organizma çeşitli onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin keşfine katkı sağlamıştır.

Meyve sineği *Drosophila melanogaster*, kanser terapötiklerinin test edilmesi ve geliştirilmesi için in vivo bir araç olarak kullanılmıştır. *D.melanogaster*'in kanser araştırmalarında kullanılması konusundaki itici güç, sinyal yollarının korunmasından, kısa yaşam döngüsünden, genetik yatkınlıktan ve bakım kolaylığından kaynaklanmaktadır. *D.melanogaster*'de birkaç hücre sinyali yolu, kanser ilaçlarının geliştirilmesi için kullanılmıştır. Model organizma, yüksek verimli tarama için güçlü bir araç olarak ortaya çıkmaktadır ve ilaç geliştirmede maliyetle birlikte zamanı da önemli ölçüde azaltmaktadır [41].

Örneğin hücre proliferasyonu ve apoptozun düzenlenmesi olarak bilinen HIPPO sinyal yolu ilk olarak *D.melanogaster*'de tanımlanmıştır [42]. Benzer şekilde, JAK-STAT sinyal yolunun insan lösemisindeki rolünün keşfedilmesinden önce *D.melanogaster*'de hemositlerinde aşırı büyümeye sebep olduğu gözlenmiştir [43].

Tablo 2.1. *D.melanogaster*'de çalışılan insan kanser tipleri listesi [41]

Kanser Tipi	Yolak Tipi	Referans
Beyin Kanseri	PDGF, EGFR, PI3K, Notch	[44,45,46,47]
Tiroid kanseri	RET, Ras, EGFR, ERK	[48,49,50,51]
Skleroz	TSC-1, TSC-2	[52,53]
Kolorektal kanseri	Wnt, EGFR, Ras	[54,55,56]
Prostat Kanseri	MRGBP, CNPY2, MEP1A	[57]
Yumurtalık Kanseri	YAP/Hippo	[58]
Cilt Kanseri	Hh/Ptc	[59]



Şekil 2.1. Yıllar boyunca *D. melanogaster*'de kanser araştırmaları üzerine yayım sayısı [41]

1946-2016 yılları arasında *D.melanogaster* meyve sineği üzerindeki kanser araştırmaları çalışmalarının sayısı Tablo 2.3'de verilmiştir. Son yıllardaki artan çalışmalar kanser araştırmaları içinde model organizma olarak kullanılmasını kanıtlar niteliktedir.

Tablo 2.2. *D. melanogaster*'de onaylanmış veya geliştirilen antikanser ilaçların listesi [41]

İlaç	Kanser Tipi	Mevcut Durum	Referans
Methotrexate	Akut lenfoblastik lösemi	FDA onaylı	[60,61]
Gemcitabine	Meme, akciğer, yumurtalık, pankreatik	FDA onaylı	[60]
Topotecan	Serviks, akciğer, yumurtalık	FDA onaylı	[60]
ZD6474/vandetanib	Tiroid Kanseri	FDA onaylı	[62]
Gefitinib, erlotinib	Akciğer kanseri	FDA onaylı	[63,64]
Curcumin	Multipl miyelom	Klinik denemede	[65]
Crizotinib	Nöroblastom	FDA onaylı	[66]
F14512	Akut miyeloid lösemi	Klinik denemede	[67]

3. MATERYAL METOT

3.1. Materyal

3.1.1. *Lactobacillus plantarum*

Bu çalışmada kullanılan *Lactobacillus plantarum* bakterisi Ahi Evran Üniversitesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir.

3.1.2. *Drosophila melanogaster*

Bu çalışmada kullanılan *Drosophila melanogaster* meyve sineği Erzurum Teknik Üniversitesi Temel Genetik Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir.

3.1.3. Meme Kanseri Hücre Hattı

Bu çalışmada kullanılan insan meme kanseri hücre hattı MCF-7 Ahi Evran Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Kanser ve Kök Hücre Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir.

3.1.4. Kullanılan Kimyasallar

- MRS agar
- Agar
- Yeast extract
- Şeker
- Mısır unu
- RPMI-1640 Medium
- Fetal Bovin Serum
- Phosphate Buffered Saline
- Tripsin-EDTA
- XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide)
- Tripan blue boyası
- Zymo RNA izolasyon kiti
- GeneAll RNA izolasyon kiti
- GeneAll cDNA sentez kiti

3.1.5. Cihazlar ve Laboratuvar Araçları

- Liyofilizasyon cihazı
- Santrifüj
- Hassas terazi
- Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı
- CO₂ İnkübatörü
- Laminar akışlı kabin
- Spektrofotometre
- PCR

3.2. Metot

3.2.1. Bakterilerin Aktifleştirilmesi ve Süpernantların Liyofilizasyonu

Çalışmada kullanılan *Lactobacillus plantarum* bakterisinin aktifleştirilmesi ve geliştirilmesinde MRS (De Man Rogosa Sharpe, Merck) besiyeri kullanılmıştır. Bakterinin MRS katı besiyerine ekimi gerçekleştirilmiş anaerob kavanozda içerisinde 37 °C’de 24-48 saat inkübasyonu sağlanmıştır. Liyofilizasyon işlemi Ahi Evran Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Laboratuvarı’nda gerçekleştirilmiştir.

Sekonder metabolitlerin hazırlanmasında durgun fazda olan bakteriler (37 °C’de 18 saat inkübasyonun işleminin ardından) 5.000 x g’de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Bakteri süpernantları pellet kısmından ayrılarak pH’sı 7.2’ye ayarlanmış ve 0.22 µm’lik (Milipore, USA) filtrelerden geçirilerek sterilize edilmiştir. Steril edilen süpernantların liyofilizasyon işlemi -58 °C’de liyofilizasyon cihazında (Labfreez FD-10-R) gerçekleştirilmiştir [32].

3.2.2. Sineklerin Yetiştirilmesi ve Doz Uygulamaları

Model organizma olarak kullanılacak olan *D. melanogaster* meyve sinekleri için kültür ortamı hazırlanmıştır ve 3 ayrı doz (0,14 mg/ml 0,27 mg/ml 0,54 mg/ml) sekonder metabolit uygulaması gerçekleştirilmiştir. İşlemler aşağıdaki protokole göre yapılmıştır [68].

- 1.600 ml distile su (dH₂O) kaynatılır.
- 2.Kaynayan suya 3,5 g agar ve 2 g yeast extract eklenir.
- 3.Topaklanma olmayacak şekilde aralıklarla karıştırılır.
- 4.Homojen halde görülen bu karışıma 50 g mısır unu ve 50 g şeker eklenir.
- 5.Homojen dağılmasına dikkat edilerek 15 dakika boyunca kaynatılır.
- 6.Kaynatma işlemi bittikten sonra besiyeri ortalama 5 dakika kadar soğutmaya alınır.
- 7.Donmamasına dikkat edilerek son olarak içerisine 3,5 ml propanoik asit eklenir ve karıştırılır. Ardından belirlenen doz ilave edilir
- 8.Hazırlanan besiyeri sıcakken besiyeri kaplarına koyulur. Besiyeri kaplarının kapağı steril pamuklarla kapatılır.
- 9.Besiyeri şişesinin kenarlarındaki buharlar gittikten sonra, aynı genotipteki 5 dişi ve 5 erkek sinek kültür şişesine uygun bayılma yöntemi kullanılarak eklenir.

3.2.3. Hücre Kültürü Uygulamaları

Çalışmada insan meme kanseri hücre hattı MCF-7 kullanılmıştır.

Stoktan çıkarılan MCF-7 hücreleri, % 10'luk Fetal Bovine Serum ve % 1 Penisilin-Streptomisin içeren RPMI-1640 besiyeri içerisinde 75 cm²'lik flasklarda % 5 CO₂ içeren ve 37 °C'deki inkübatörde kültüre edilmiştir.

Hücreler sıkışık (konfluent) duruma geldiğinde hem besiyeri yetersizliğinden dolayı hem de kontakt inhibisyonu mekanizmasından dolayı çoğalmaları durmaktadır. Bu duruma bağlı olarak flask yüzeyinin % 70-80'i hücreler tarafından kaplandıkça hücrelerin pasajlanması gerekmektedir. İlk olarak mevcut besiyeri alınmış daha sonra 3-4 ml PBS (Phosphate-Buffered Saline) eklenerek, yüzey yıkanmış ve PBS yavaşça çekilmiştir. Yeni bir pipet ile hücre miktarına bağlı olarak ortama 1-2 ml Tripsin-EDTA eklenerek, 2-3 dakika inkübatörde bekletilerek flask yüzeyine fikse olan hücrelerin serbest hale gelmesi sağlanmıştır. Tripsin-EDTA etkisini ortadan kaldırmak için hemen istenilen yoğunlukta hücre bırakmak üzere yeni besiyeri eklenmiştir.

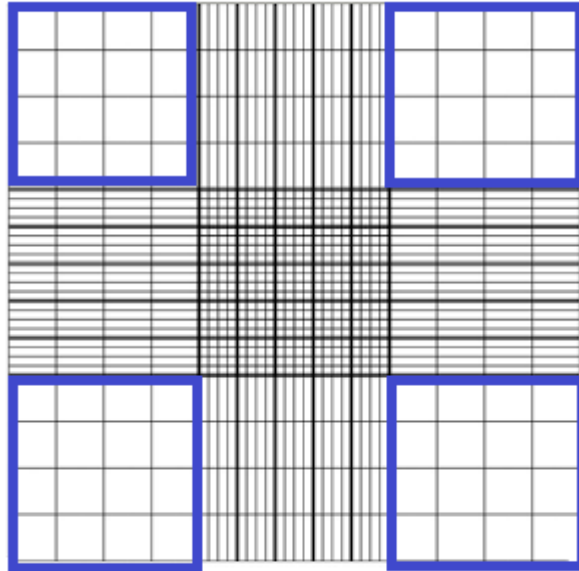
RNA izolasyonu öncesi belirli bir sayıda hücre ile deneye başlamak gerekmektedir.

Hücre sayımında öncesinde ölü hücrelerin belirlenmesi için TripanBlue boyası kullanılmaktadır. TripanBlue boyası ölü hücrelerin zarlarından geçip hücreleri boyarken canlı hücrelerin zarlarından geçemez.

Hücreler pasajlandıktan sonra bir falkon tüp içerisinde çözülmüştür ve içerisinde karıştırılarak hücrelerin tek tek olmaları sağlanmıştır. Hemositometre ve lamel % 70 alkol ile temizlenmiştir. Lamel hemositometrenin üzerine koyularak, ependorf içerisinde 100 µl hücre ile 100 µl TripanBlue boyası karıştırılmıştır. Bu solüsyondan 10 µl hemositometreye yüklenmiştir. Hemositometre üzerinde mavi renkli 4 köşedeki hücreler sayılarak, sayıların ortalaması alınmıştır(Şekil 3.1.).Mavi ile işaretli her bölümün hacmi 0,1 mm³ tür.1 ml = 1 cm³ = 1000 mm³ dolayısıyla 1ml içerisinde kaç hücre bulunduğunu hesaplamak için ortalama değer 10.000 ile çarpılır. Hücre miktarı ve TripanBlue boyası 1:1 oranında karıştırıldığı için bulunan sayı 2 ile çarpılmıştır [69].

1 ml'deki hücre sayısı = Ortalama hücre sayısı x 10.000 x 2

$$\% \text{ Hücre Canlılığı} = \frac{\text{Canlı Hücre Sayısı}}{\text{Canlı Hücre} + \text{Ölü Hücre Sayısı}}$$



Şekil 3.1. Hemositometre sayım karesi

3.2.4. Sekonder Metabolitin in vitro Ortamda Toksikite Analizleri

MCF-7 hücre hattına, sekonder metabolitin hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerini ve hücrelere uygulanacak metabolit çözeltilerin dozunu belirlemek için sitotoksikite analizi yapılmıştır. Ölmek üzere olan hücreler hücre canlılığını devam ettirmek için gerekli enerjiyi sağlayamaz. Hücre üreme analizi, formazan bileşeni kullanılarak yaşayan hücrelerdeki mitokondri enzim aktivitesine göre belirlenmektedir. Yaşayan hücreler, tetrazolyum bileşenini turuncu formazan tuzuna dönüştürür. Oluşan renk değişimi belirli dalga boyunda ELISA okuyucu kullanılarak ölçülür. Yaşayan hücre miktarı ne kadar fazla olursa renk değişimi, dolayısıyla ELISA okuyucuda okunan değer o kadar fazla olmaktadır.

Bu çalışmada sitotoksikite analizleri için XTT(2,3-Bis(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolyum) yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde 96 kuyucuklu plaklara her kuyucukta 5000 adet hücre olacak şekilde hücreler ekilmiştir. Metabolitin hücreler ile 72 saat inkübasyonu sonrasında XTT solüsyonu eklenmiş ve 2-3 saat bekletildikten sonra, ELISA okuyucusu kullanılarak optik yoğunluklar belirlenmiştir. Bu yoğunluklar sonucunda IC₅₀ değeri hesaplanmıştır.

3.2.5. Total RNA İzolasyonu

Çalışılan genlerin ifade düzeylerinin belirlenebilmesi için metabolit uygulamasını takiben hücrelerden RNA izolasyonu işlemi gerçekleştirilmelidir. MCF-7 hücre hattında IC₅₀ değeri belirlendikten sonra RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Böcekten RNA izolasyonunda LC₅₀ ve LC₉₉ dozları uygulamaları sonucunda ölü böceklerden RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. RNA izolasyonu *Drosophila melanogaster* için Zymo marka QuickRNA kit kullanılarak aşağıdaki protokole göre yapılmıştır.

Santrifüjler 10.000-16.000 x g 30 saniye süre ile gerçekleştirilmiştir.

1.Örneği lizis etmek için 300 µl RNA lizis buffer eklenmiş ardından kalıntıları uzaklaştırmak için santrifüj yapılmıştır.

2.Şeffaf süpernatant bir toplama tüpünde Spin-Away Filtre içine aktarılarak santrifüjlenmiştir.

3.1 hacim etanol (% 95-100) eklenerek karıştırılmıştır.

4.Karışım bir toplama tüpü içinde zymo-Spin IIIcG kolonuna aktarılarak santrifüjlenmiştir.

Tavsiye edilen DNase Arıtma yüzdesi sütunu ise;

(1) Kolona 400 Yıkama Tamponu eklenerek santrifüjlenmiştir.

(2) 5 µl DNase I ve 75 HI DNA sindirim tamponu RNase free tüpte karıştırılarak, karışım doğrudan kolona aktarılmıştır.

(3) 15 dakika oda sıcaklığında (20-30 °C) inkübe edilmiştir.

5.Kolona 400 µl RNA hazırlık tamponu eklenerek santrifüjlenmiştir. Collection tüp yenisi ile değiştirilmiştir.

6.Kolona 700 µl RNA yıkama tamponu eklenerek santrifüjlenmiştir.. Collection tüp yenisi ile değiştirilmiştir.

7.Kolona 400 µl RNA yıkama tamponu eklenerek 2 dakika santrifüjlenmiştir. Karışım RNase tüp içine aktarılmıştır.

8.RNA'yı ayırmak için, 100 µl DNase/RNase free water doğrudan kolona eklenmiş ve santrifüjlenmiştir.

RNA izolasyonu MCF-7 hücre hattı için GeneAll, Cat no:305-101 Hybrid-R marka kit kullanılarak aşağıdaki protokole göre yapılmıştır.

1.1x10⁷ olacak şekilde alınan hücrenin üzerine 1 ml RiboEx eklenmiştir.

2.Oda ısısında 5 dakika inkübe edilmiştir. Bu işlemle hücre içeriğinin ortaya çıkması sağlanmıştır.

3.Üzerine 200 µl kloroform eklenmiştir. Hücrenin açığa çıkan farklı bileşenleri kloroform sayesinde görünür bir faz ayrımı sağlamaktadır.

4.4 °C de 12,000 g'de 15 dakika santrifüj yapılmıştır.

5.En üst fazda RNA içeren sıvı başka bir eppendorfa alınmıştır. Alınan sıvının hacmi kadar RB1 Buffer eklenmiştir. Pipetaj yapılan karışım spin kolona aktarılmıştır. 10,000 g de 30 saniye santrifüj yapılmıştır. Collection tüp yenisi ile değiştirilmiştir.

6.Üzerine 500 µl SW1 Buffer eklenerek, 10,000 g de 30 saniye santrifüj yapılmıştır. Collection tüp yenisi ile değiştirilmiştir.

7.Üzerine 500 µl RNW Buffer eklenerek, 10,000 g de 30 saniye santrifüj yapılmıştır. Collection tüp yenisi ile değiştirilmiştir.

8.Herhangi bir Wash Buffer kalma ihtimaline karşı 10,000 g de 1 dakika santrifüj yapılmıştır.

9.RNase-DNase free 1,5 ml lik etiketlenmiş tüplere kolonlar aktarılarak, üzerine 50-100 µl RNase free su eklenmiş ve 1 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 10,000 g de 1 dakika santrifüj yapılmıştır.

10.Örnekler -20 °C'ye alınmıştır.

3.2.6. cDNA Sentezi

Gen ifadesinin gerçek zamanlı polimeraz reaksiyonu ile belirlenebilmesi için öncelikle genin transkriptinin, mRNA'sının, DNA'ya (komplementer DNA, cDNA) çevrilmesi gerekmektedir. cDNA sentezi GeneAll Cat. No. 605-005 HyperScript™ marka kit kullanılarak aşağıdaki protokole göre yapılmıştır.

1.RNA konsantrasyonları nanodrop ile ölçülmüştür.

2.10 pg – 500 ng Total RNA için gerekli hacimler hesaplanmıştır.

3.cDNA ilk zincir sentezi için, 1 µl dNTP 1 ul Oligo DT primer karışımı hazırlanmıştır.

4.Belirlenen RNA hacimlerinin üzerine eklendikten sonra 14 µl hacim nükleaz free water ile tamamlanmıştır.

5.BioRad T100 marka PCR cihazı kullanılarak 65 °C'de 5 dakika ünkübasyon sağlanmıştır ve ardından 1 dakika buzda bekletilmiştir.

6.İkinci zincir sentezi için; 2 µl 10x RTase buffer, 2 µl 0.1 M DTT, 1 µl HyperScript™ Reverse Transcriptase, 1 µl ZymAII™ RNase Inhibitor karışımı hazırlanarak ependorfa eklenmiştir.

7.55 °C'de 60 dakika ve 85 °C'de 5 dakika inkübasyonu sağlanmıştır.

3.2.7. Meme Kanseri İle İlgili Apoptotik Genlerin Belirlenmesi

Ortolog gen farklı organizmalarda bulunan, atasal kökeni aynı, dolayısıyla yapısal ve işlevsel benzerliği olan fakat tür oluş sürecinde ayrılmış olan genlerdir.

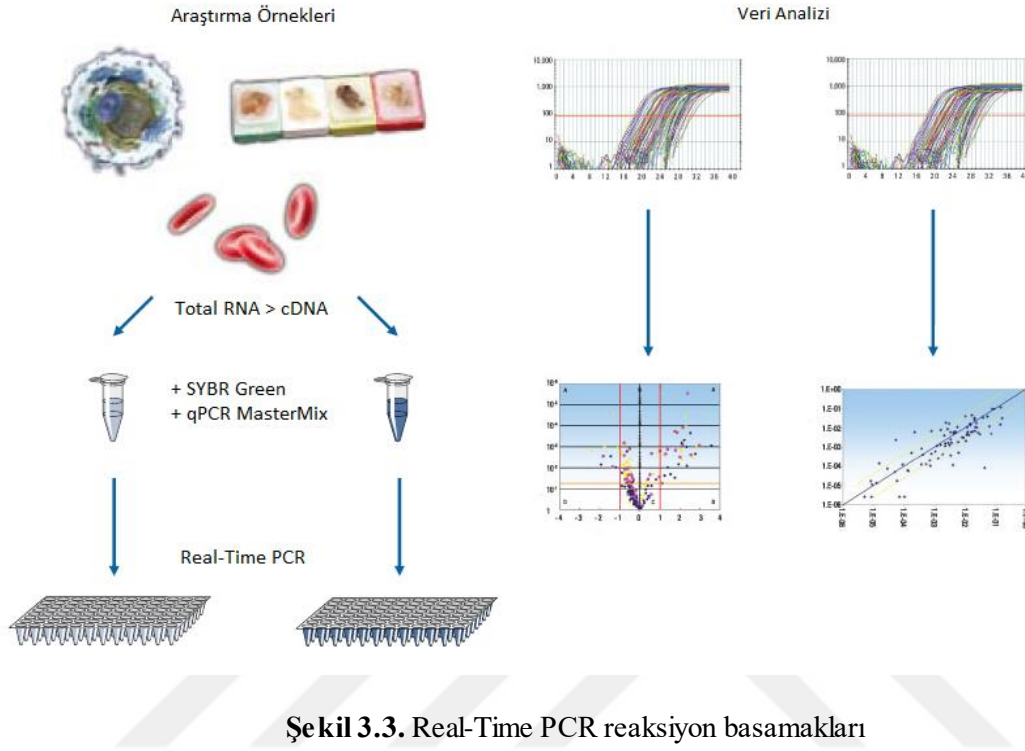
Qiagen ticari firması data bankasından (<https://www.qiagen.com>) apoptozis genleri listesinden meme kanseri ile ilgili genler belirlemiştir. Belirlenen genlerin *D. melanogaster* da karşıtını bulmak için Flybase.org sitesine erişim sağlandıktan sonra QuickSearch bölümünden arama kategorisi olarak Orthologs kısmı seçilmiştir. Giriş türü olarak *Homo sapiens* çıkış türü olarak *D. melanogaster* belirlenmiştir. İlgili genlerin araması yapıldıktan sonra kaynaklardan en fazla taranan gen eşleşme kısmından benzerlik yüzdelerine göre genler belirlenmiştir.1 gen için örnek çalışması Şekil 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.1. *Drosophila melanogaster* ve *Homo sapiens* çalışılan genler

<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Homo sapiens</i>
RAS64B	RRAS-2
P53	TP53
BUFFY	BCL-2
DARK	APAF-1
DECAY	CASP-3
FADD	FADD
DRICE	CASP-7
DEBCL	BOK

3.2.8. Genlerin Ekspresyon Analizleri

Sentezlenen cDNA'ların Real-Time PCR reaksiyonları hizmet alımı yoluyla gerçekleştirilmiştir.

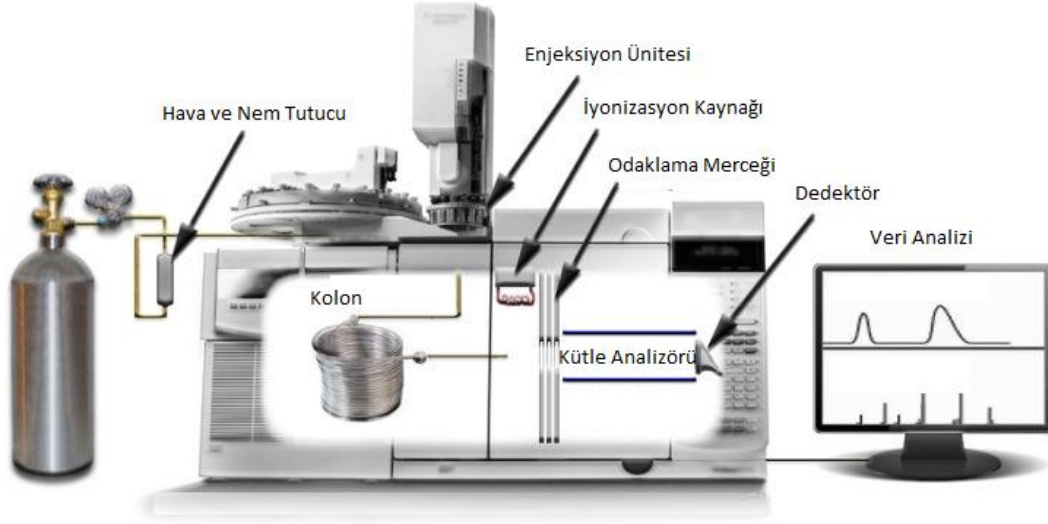


Şekil 3.3. Real-Time PCR reaksiyon basamakları

3.2.9. Sekonder Metabolitin GC-MS Analizi

GC-MS, GC (Gaz Kromatografisi) ve MS (Kütle Spektrometresi) ünitelerinin birlikte çalıştığı miktar tayini ve yapı analizinde kullanılan bir cihazdır. Gaz kromatografisi karışımdaki bileşenleri ayırma işlemini gerçekleştirirken kütle spektrometresi ise ayrılan her bir bileşenin yapısal analizini gerçekleştirmektedir.

Sekonder metabolitin GC-MS analizi Aksaray Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden hizmet alımı yoluyla gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.4. GC-MS cihazı [70]

3.2.10. Sekonder Metabolitin FTIR Spektroskopisi

Fourier Transform Infrared (Kızılötesi) Spektroskopisi (FTIR) kimyasal bağlardaki titreşimlerin tespit edilerek maddenin moleküler düzeyde biyokimyasal bileşimlerini belirlemek için kullanılan bir analitik yöntemdir.

3.2.11. Moleküler Docking Çalışmaları

3.2.11.1. Ligand Hazırlığı

Lactobacillus plantarum sekonder metabolitinin GC-MS analizi sonucunda belirlenen 18 etken maddenin 3 boyutlu yapıları PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) data bankasından ulaşılmıştır.

3.2.11.2. Protein Hazırlığı

Protein veri bankasından çalışılan RRAS-2 (2ery), TP53 (1tup), BCL-2 (1g5m-1gjh), APAF-1 (1cy5), CASP-3 (3edq), FADD (3ezq), CASP-7 (4fdl) genlerine erişim sağlanmıştır. BioDiscovery Studio 2017 (deneme sürümü) programı kullanılarak optimizasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir.

BOK ve *D. melanogaster* genleri yüksek kapasiteli bilgisayar erişimi sağlanamadığından docking işlemleri gerçekleştirilememiştir.

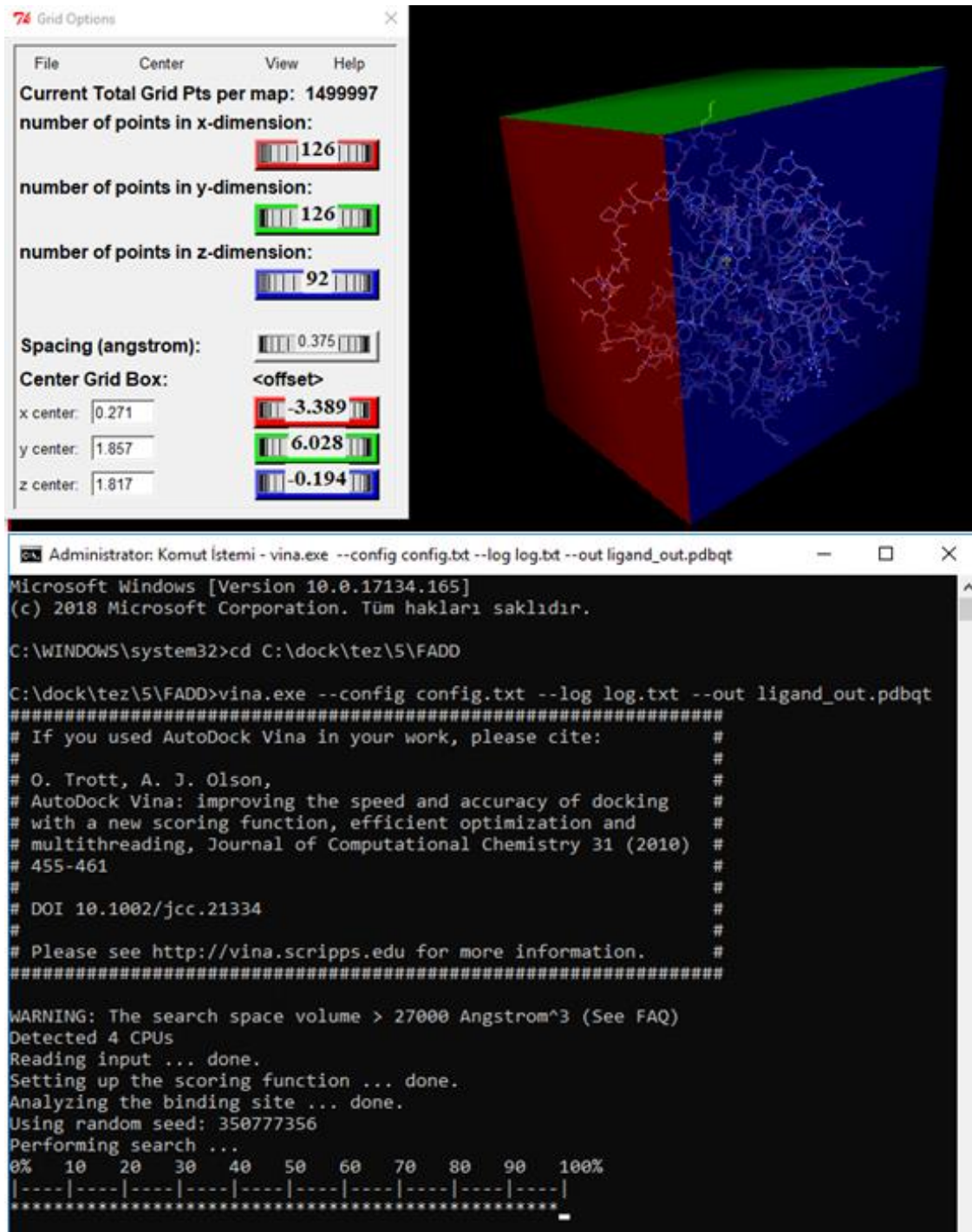
3.2.11.3. Docking Hesaplamaları

Çalışılan protein AutoDock (ADT) programı ile açılmış polar hidrojenler eklenmiş ardından Kollman yükleri eklenerek tüm yapıya dağıtılmıştır. Ligand için ADT ile torsiyon kökleri ve torsiyon sayıları belirlenmiştir. Sonrasında ligand ve protein yapılarına AutoDock Vina docking girdi dosyalarının gerektirdiği gibi AD4 atom tipleri tanımlanmıştır.

Protein ve ligandı kapsayan grid parametreleri belirlenmiştir. Windows komut istemi açılarak girdilerin bulunduğu dosya yolu açılıp Vina komut parametreleri girilerek hesaplama işlemi başlatılmıştır (Şekil 3.5)[71].

3.2.11.4. Protein-Ligand Etkileşimlerinin Belirlenmesi

Autodock Vina programının çıktısı olan protein-ligand dosyası (.pdbqt) BioDiscovery Studio 2017 (deneme sürümü) programı ile ligand ve protein ayrı ayrı seçilmiş ardından aminoasit düzeyinde 2 ve 3 boyutlu protein-ligand etkileşimleri gözlemlenmiştir.

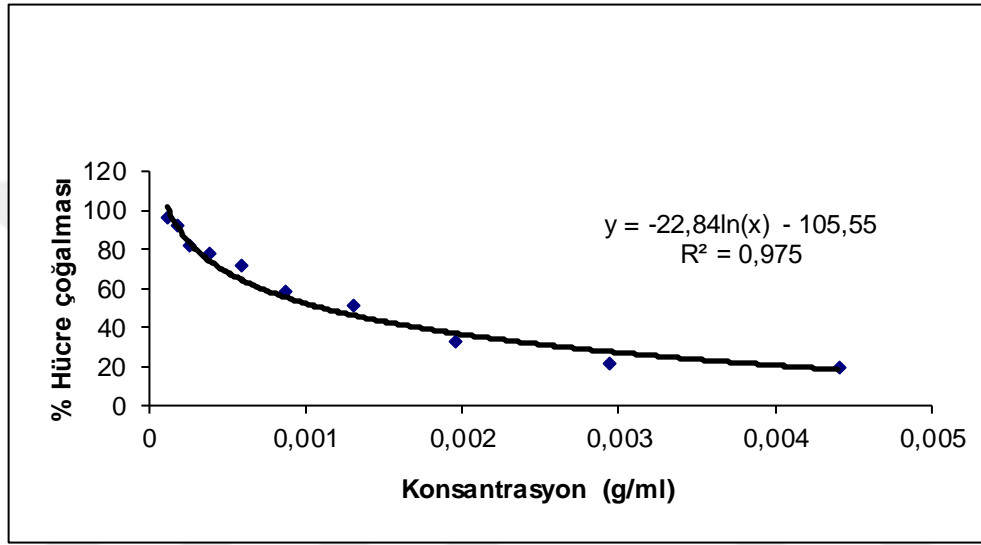


Şekil 3.5. Vina programında grid parametrelerinin belirlenmesi ve docking işleminin başlatılması

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Sitotoksisite Sonuçları

4.1.1. *Lactobacillus plantarum* 'un Hücresiz Taze Filtratının MCF-7 Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkileri



Şekil 4.1. XTT hücre proliferasyon kiti kullanılarak *Lactobacillus plantarum* ekstrakte metabolit ürünlerinin MCF-7 hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkisinin grafik olarak gösterimi

XTT hücre proliferasyon kiti ile sekonder metabolitin meme kanseri hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Hesaplanan değerler sonucunda IC_{50} : 0.0013 gr/ml olarak bulunmuştur.

4.1.2. *Lactobacillus plantarum* 'un Hücesiz Taze Filtratının *Drosophila melanogaster* Üzerine Etkileri

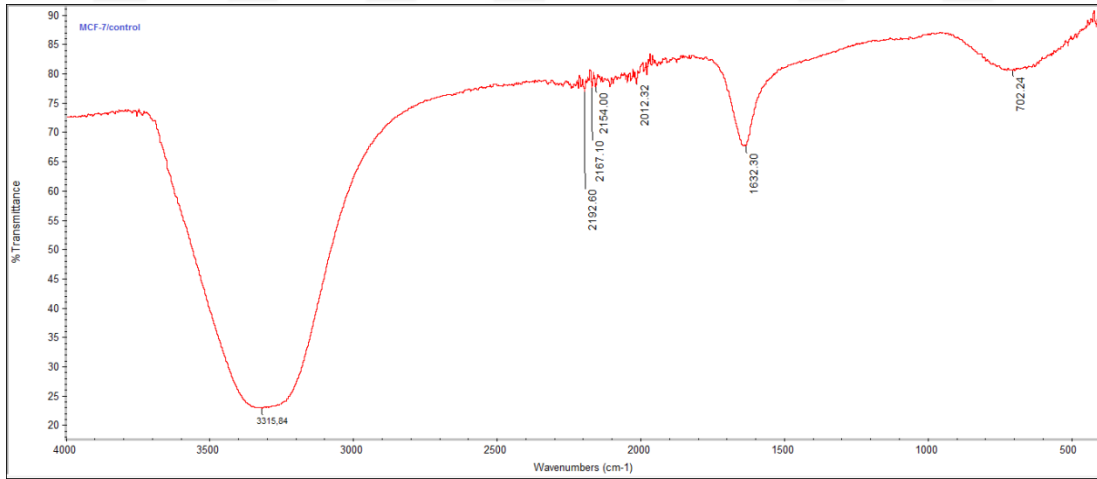
Drosophila erginleri 24 saat boyunca belirlenen dozlarda sekonder metabolit karışımına maruz bırakılmıştır. Uygulamalar sonucu ölüm oranları belirlenmiş ve LC₅₀ ve LC₉₉ dozlarını saptamak için probit analizi yapılmıştır [72]. Belirlenen dozlar Tablo 4.2'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. *Drosophila melanogaster*'de probit analizi ile dozların belirlenmesi

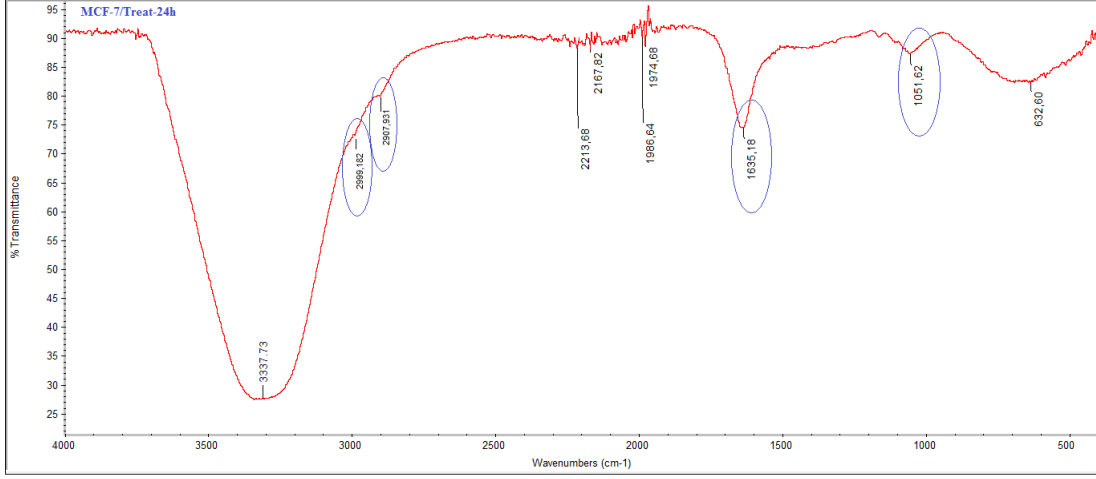
Süre (24 saat)	N	LC ₅₀	LC ₉₉	DF	C2
	10	0,24 mg/ml	0,56 mg/ml	2	0,694

4.2. FTIR Sonuçları

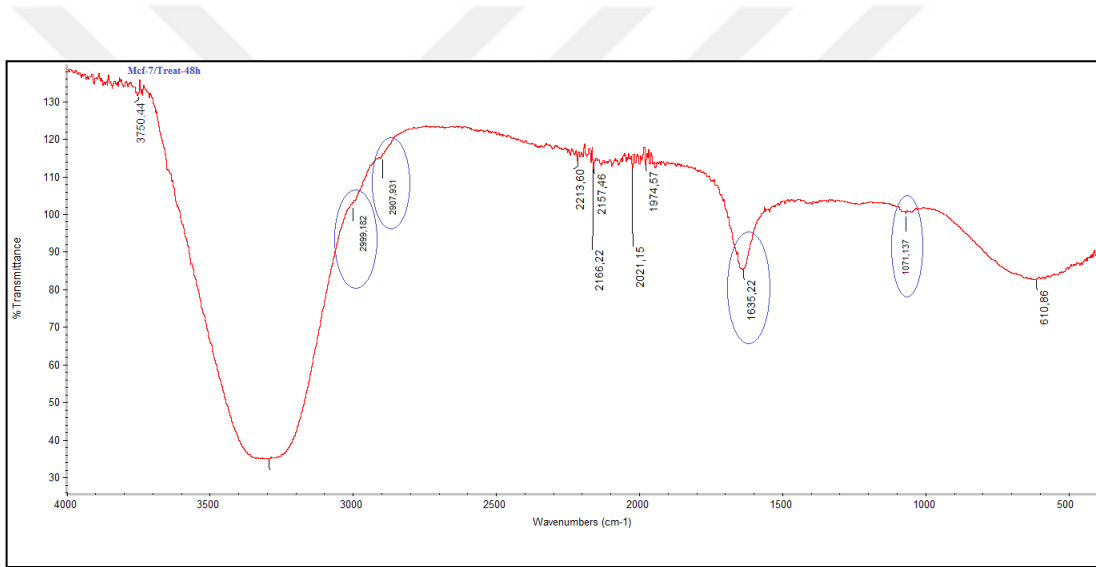
4.2.1. MCF-7 Hücre Hattı Kontrol ve Metabolit Uygulaması FTIR Sonucu



Şekil 4.2. MCF-7 hücre kontrol hattı FTIR sonuç grafiği



Şekil 4.3. MCF-7 hücre hattı 24 saat metabolit uygulaması FTIR sonuç grafiği

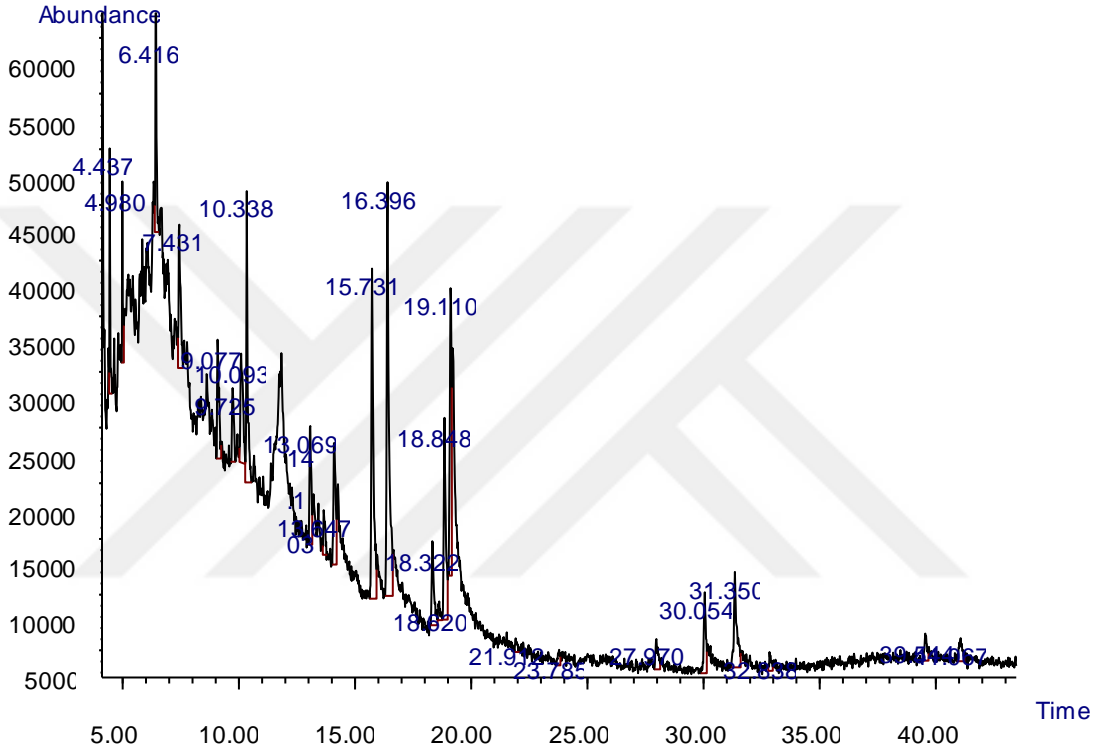


Şekil 4.4. MCF-7 hücre hattı 48 saat metabolit uygulaması FTIR sonuç grafiği

MCF-7 hücre kontrol hattı ve 24 saat, 48 saat sekonder metabolit uygulaması sonucunda medyum kısmı alınarak FTIR analizi yapılmıştır. Şekil 4.1, 4.2 ve 4.3 incelendiğinde uygulama süresiyle birlikte hücrelerin parçalandığı ve nükleik asitlerin ortama yayıldığı görülmektedir. (1200-200 cm^{-1}). Bu sonuçlar metabolitin hücre hattına sitotoksik etkisini desteklemektedir.

4.3. Sekonder Metabolitin GC-MS Sonucu

GC-MS analiz grafiğindeki (Şekil 4.5) piklerden yola çıkılarak PubChem databankasından birçok madde taranmıştır. Eş ve benzer birçok madde bulunmuştur. Bulunan maddeler kategorize edilerek EK-1’de verilmiştir.



Şekil 4.5. Metabolit GC-MS Analiz Grafiği

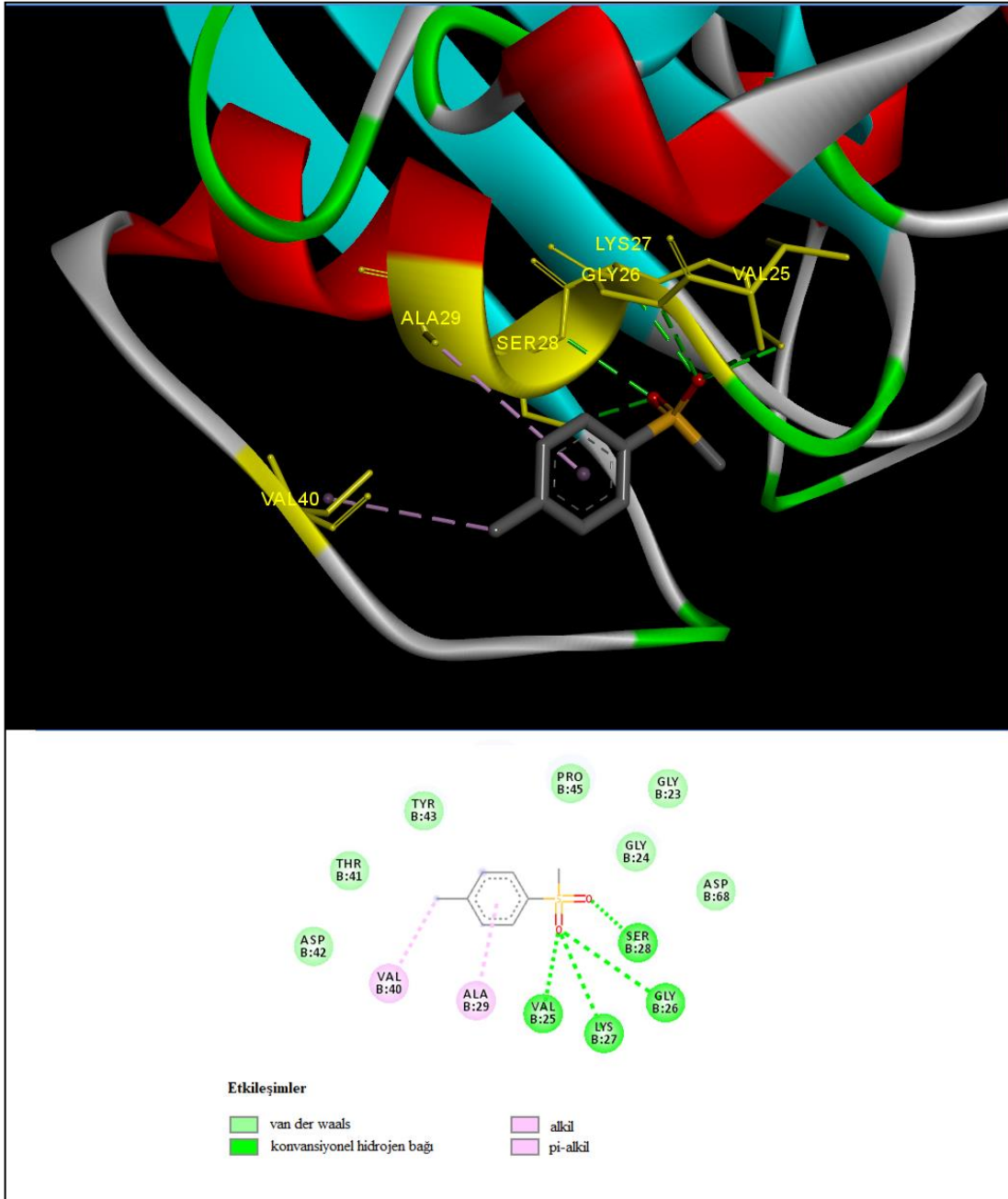
4.4. Moleküler Docking (kenetlenme) Sonuçları

4.4.1. Hesaplamalar-Skorlar

Çalışılan proteinlerin moleküler docking sonuçları EK-2’de verilmiştir.

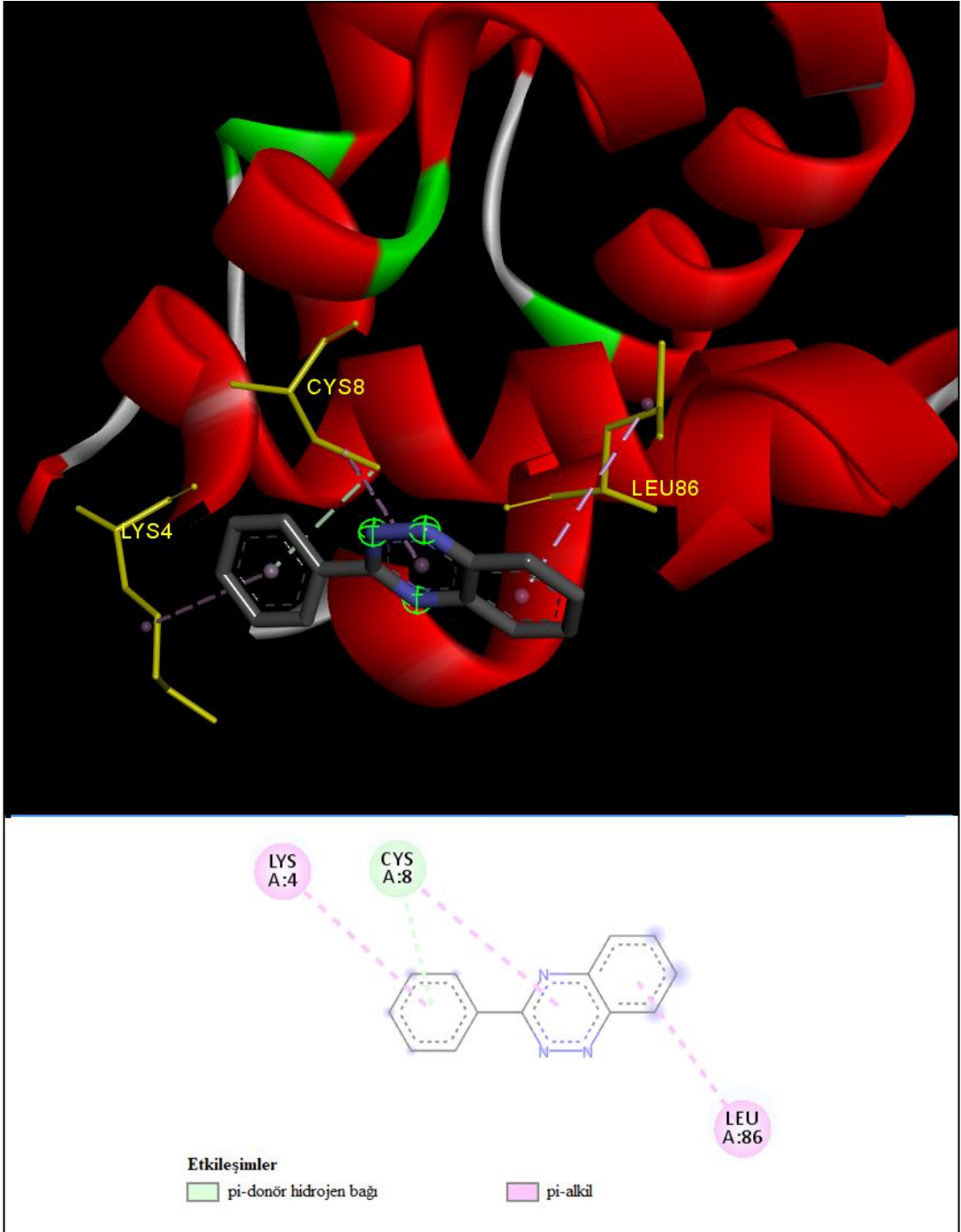


4.4.2. Protein – Ligand Etkileşimleri



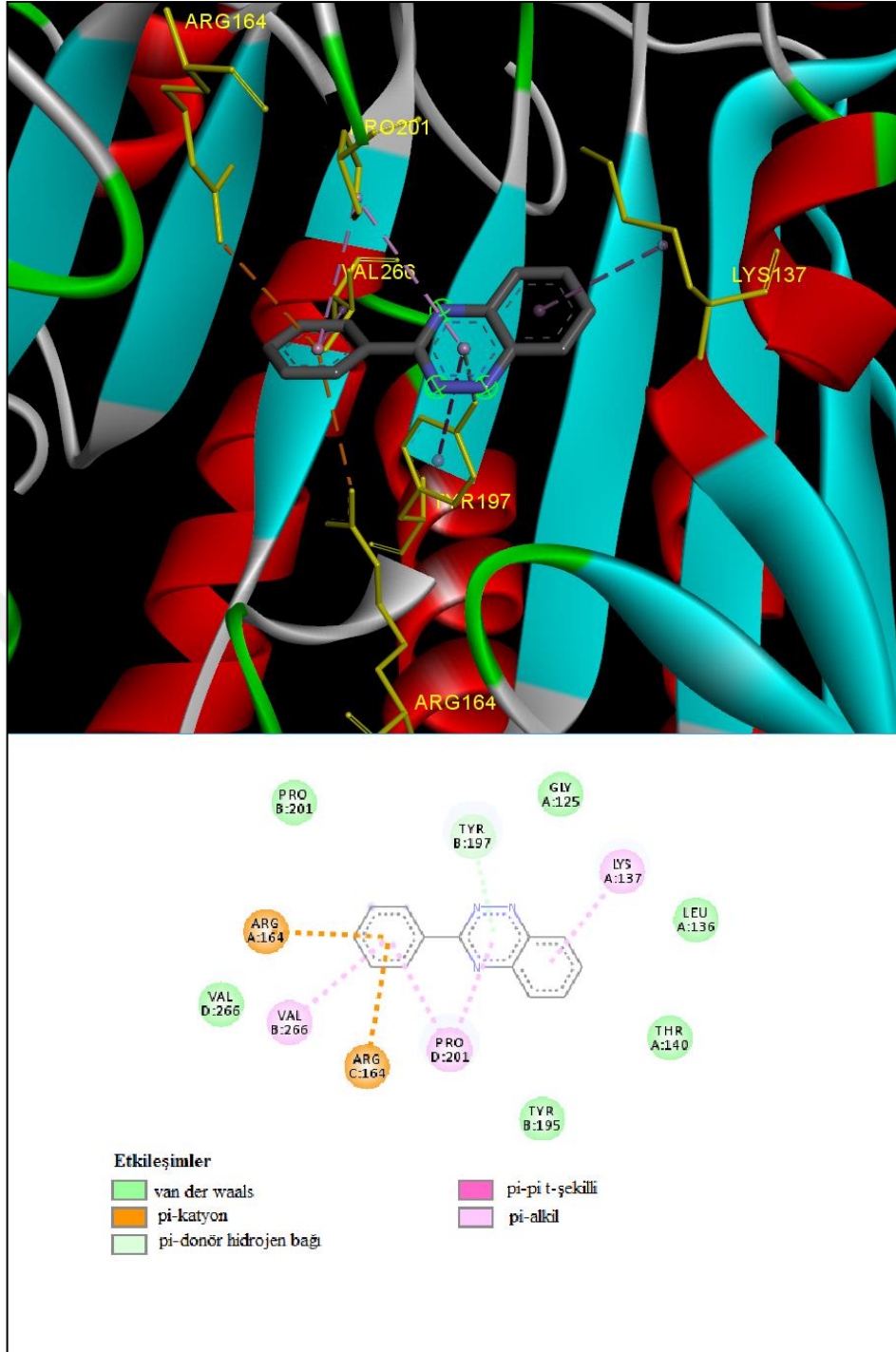
Şekil 4.6. RRAS2-L03 Docking Sonucu Etkileşimleri

L03 kodlu ligand ile kristal yapıdaki protein arasında B:25 VAL, B:26 GLY, B:27 LYS, B:28 SER hidrojen bağı etkileşimi, B:29 ALA, B:40 VAL alkil bağı etkileşimi görülmüştür.



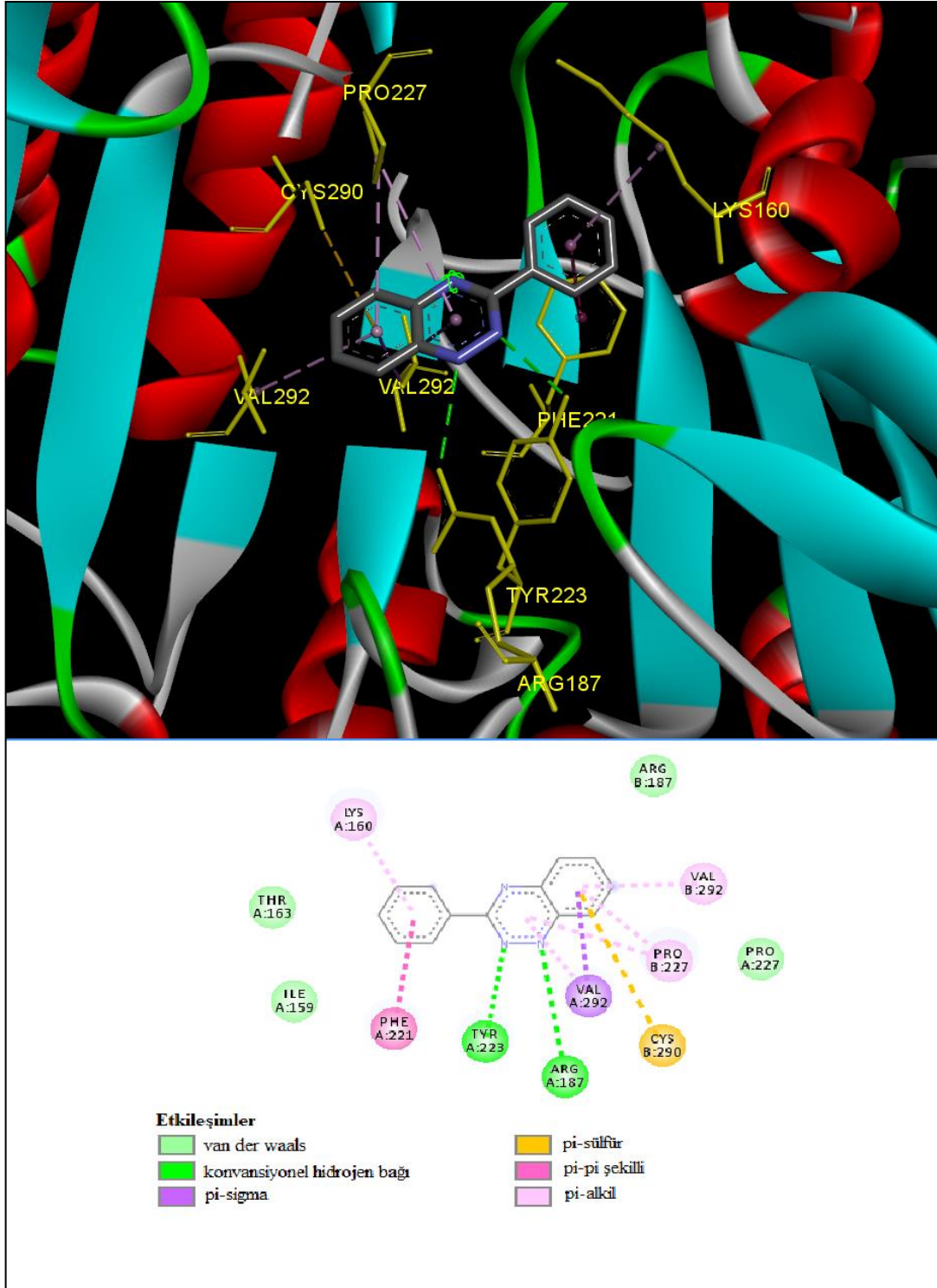
Şekil 4.7. APAF1-L13 Docking Sonucu Etkileşimleri

L13 kodlu ligand ile kristal yapıdaki protein arasında A:4 LYS alkil bağı, A:8 CYS hidrojen bağı ve alkil bağı, A:86 LEU alkil bağı etkileşimi görülmüştür.



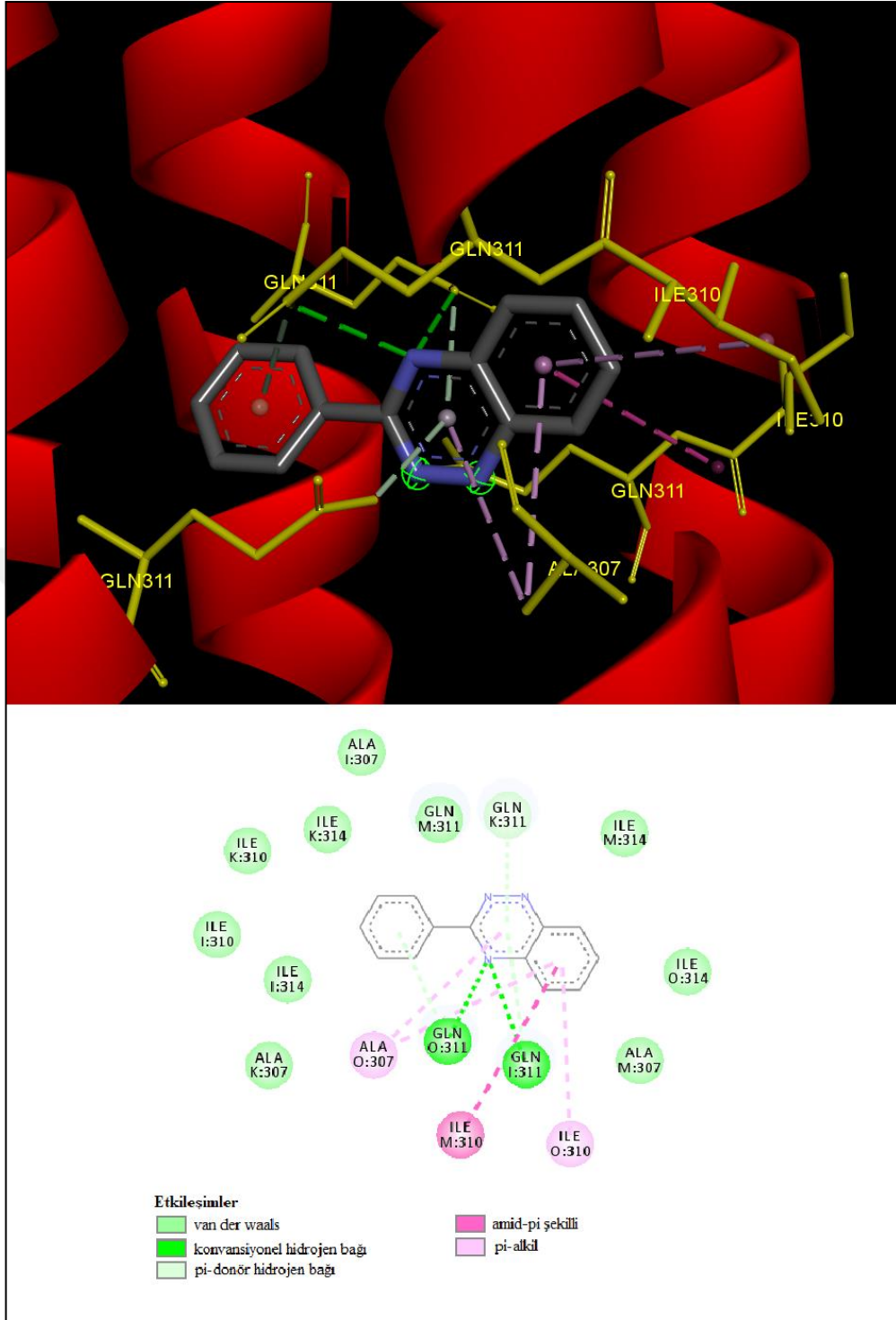
Şekil 4.8. CASP3-L13 Docking Sonucu Etkileşimleri

L13 kodlu ligand ile kristal yapıdaki protein arasında A:164 ARG, C:164 ARG pi-kasyon bağı, A:137 LYS, B:266 VAL, D:201 PRO alkil bağı, B:197 TYR hidrojen bağı etkileşimi görülmüştür.



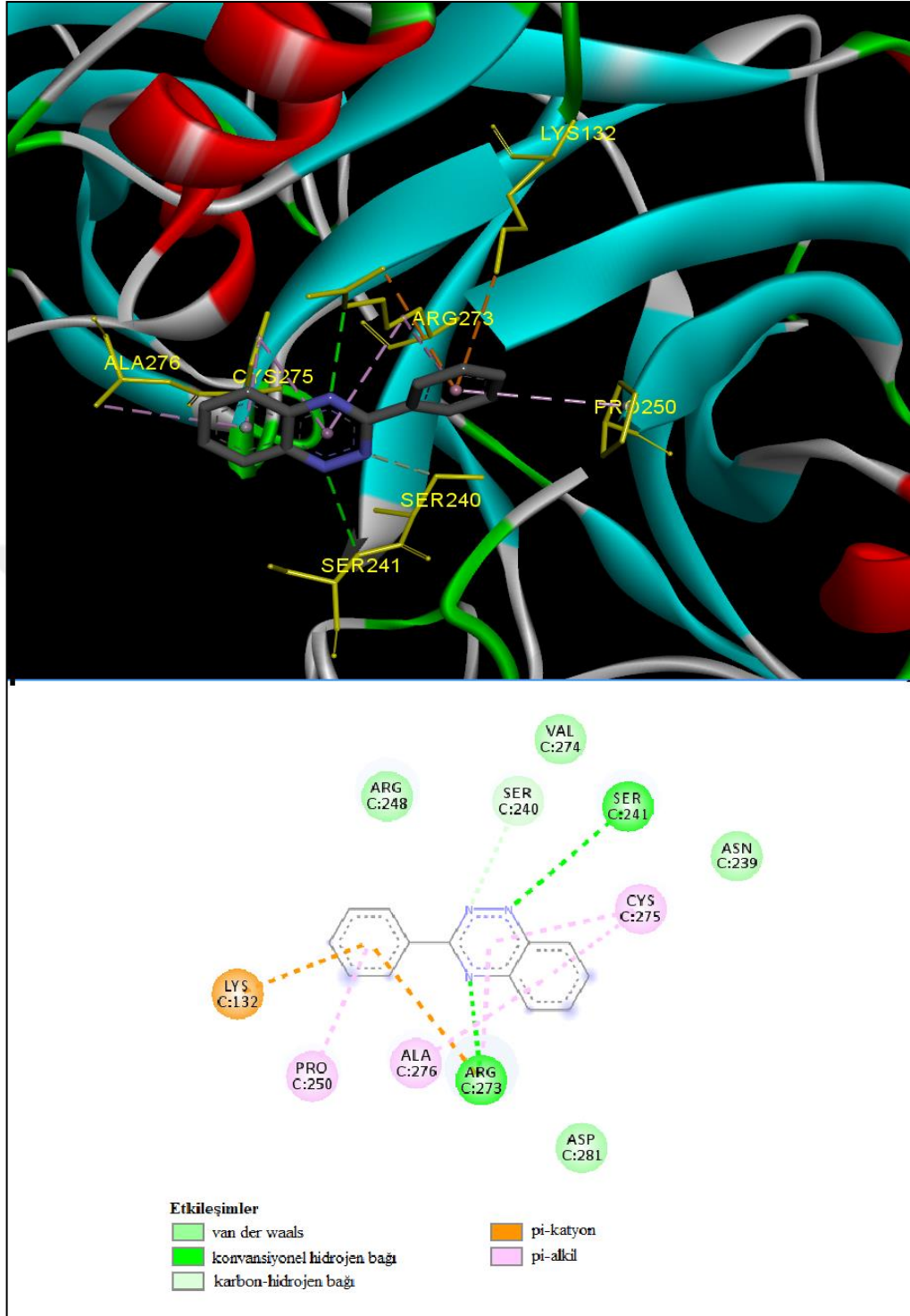
Şekil 4.9. CASP7-L13 Docking Sonucu Etkileşimleri

L13 kodlu ligand ile kristal yapıdaki protein arasında A:160 LYS, B:227 PRO, B:292 VAL pi-alkil, A:221 PHE pi-pi bağı, A:187 ARG, A:223 TYR hidrojen bağı, A:292 VAL pi-sigma ve alkil, B:290 CYS pi-sülfür bağı etkileşimi görülmüştür.



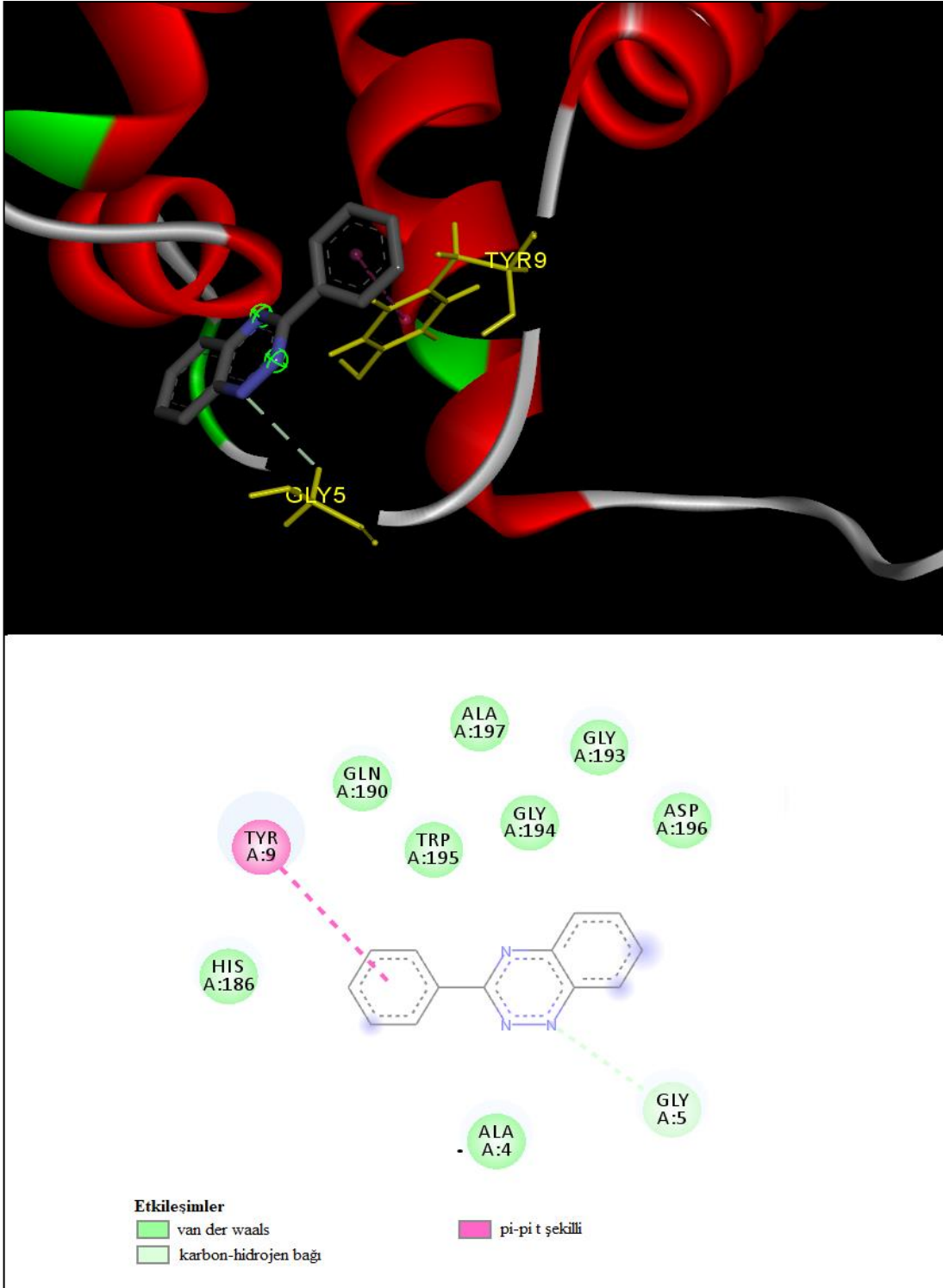
Şekil 4.10. FADD-L13 Docking Sonucu Etkileşimleri

L13 kodlu ligand ile kristal yapıdaki protein arasında M:310 ILE amid-pi bağı, O:311 GLN, I:311 GLN hidrojen bağı, O:307 ALA, O:310 ILE pi-alkil bağı, K:311 GLN hidrojen bağı etkileşimi görülmüştür. En bağlanma enerjisi bu konformasyonda elde edilmiştir.



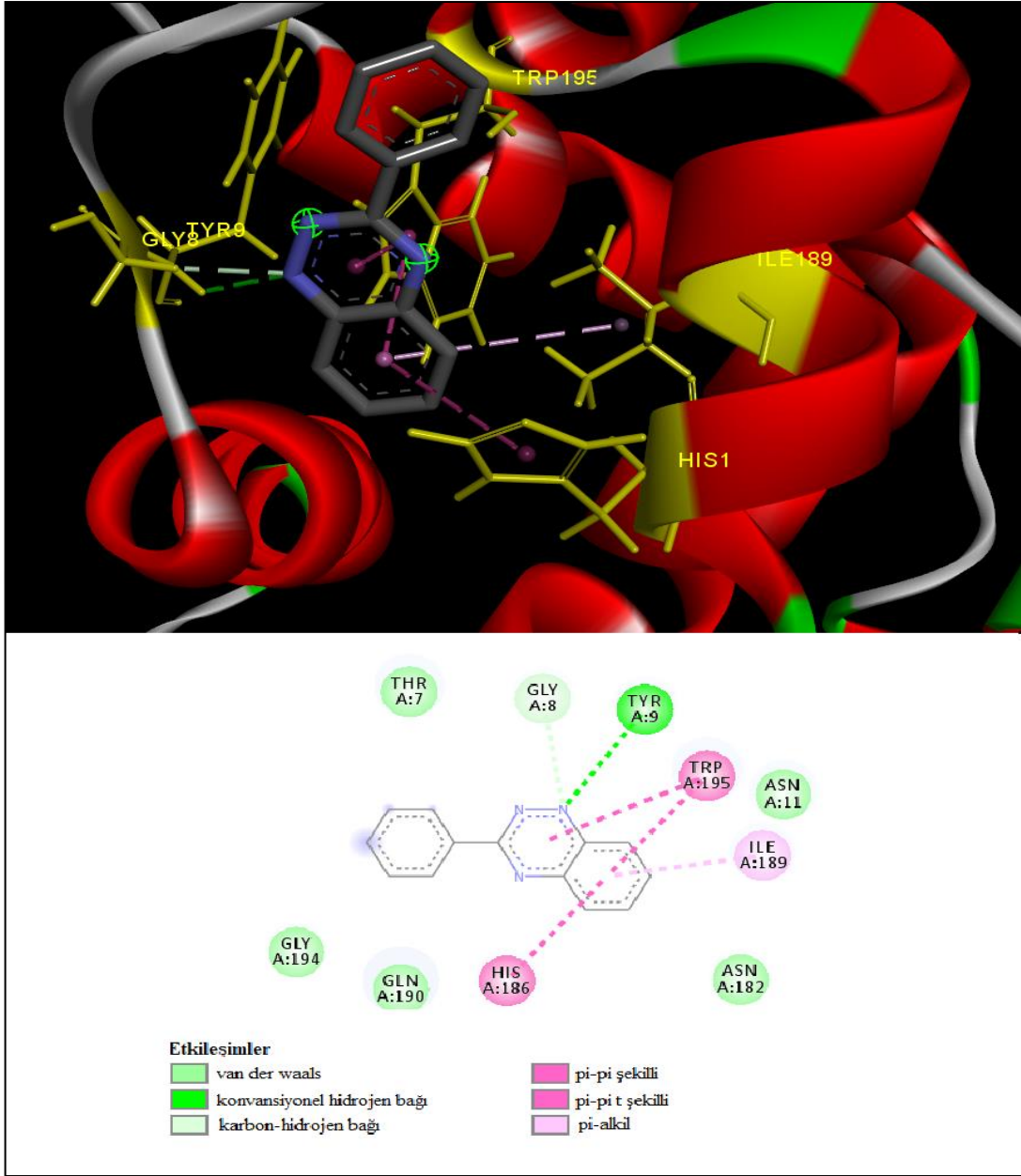
Şekil 4.11. TP53-L13 Docking Sonucu Etkileşimleri

L13 kodlu ligand ile kristal yapıdaki protein arasında C:250 PRO, C:275 CYS, C:276 ALA, pi-alkil bağı, C:241 SER, C:273 ARG hidrojen bağı, C:132 LYS, C:273 ARG pi-kasyon bağı, C:240 SER karbon-hidrojen bağı etkileşimi görülmüştür.



Şekil 4.12. 1GJH-L13 Docking Sonucu Etkileşimleri

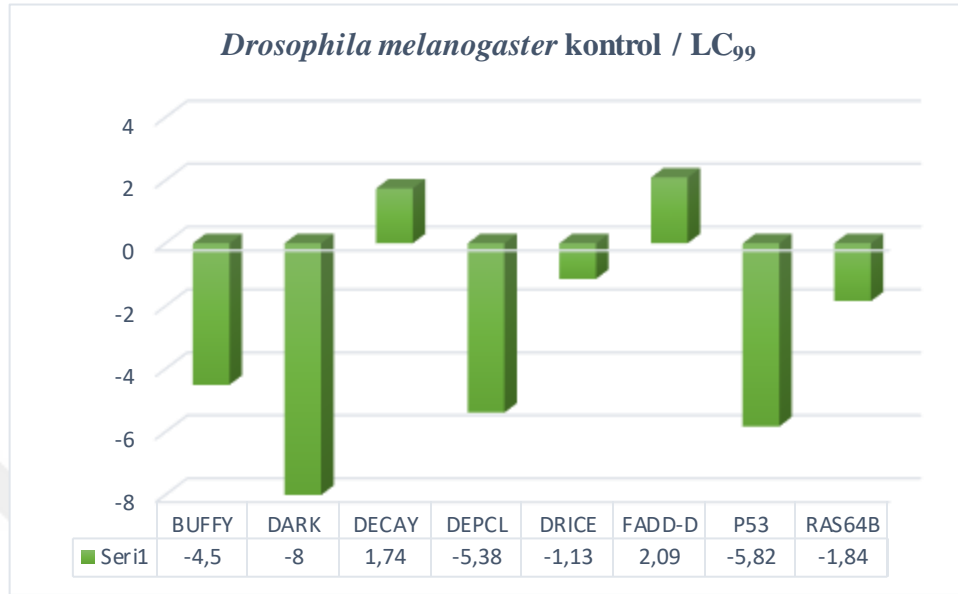
L13 kodlu ligand ile kristal yapıdaki protein arasında A:5 GLY karbon-hidrojen bağı, A:9 TYR pi-pi bağı etkileşimleri görülmüştür.



Şekil 4.13. 1G5M-L13 Docking Sonucu Etkileşimleri

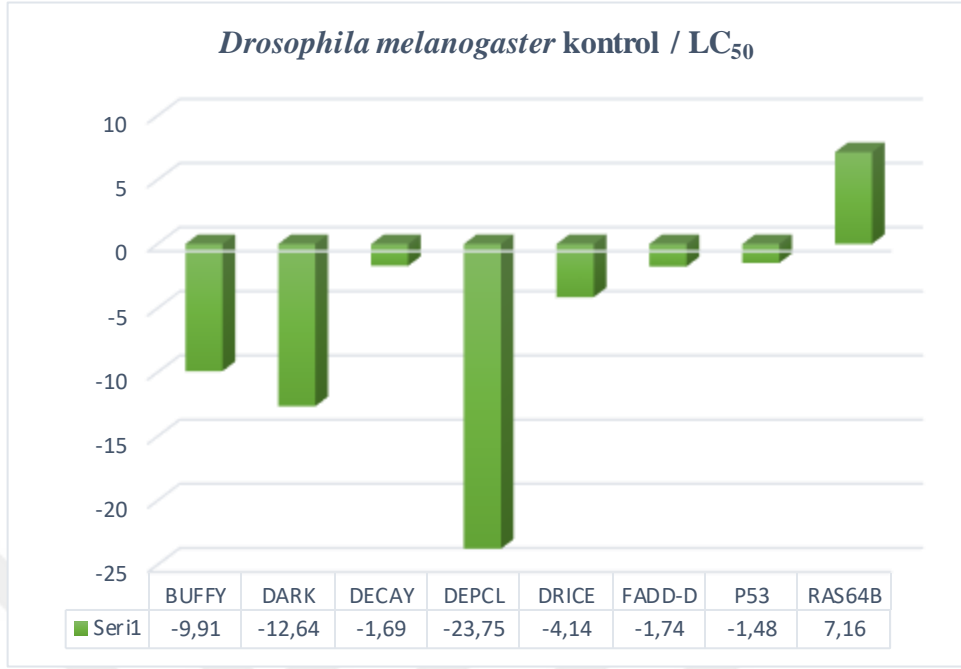
L13 kodlu ligand ile kristal yapıdaki protein arasında A:186 HIS, A:195 TRP pi-pi bağı, A:189 ILE pi-alkil bağı, A:9 TYR hidrojen bağı, A:8 GLY karbon-hidrojen bağı etkileşimleri görülmüştür.

4.5. Genlerin Ekspresyon Sonuçları



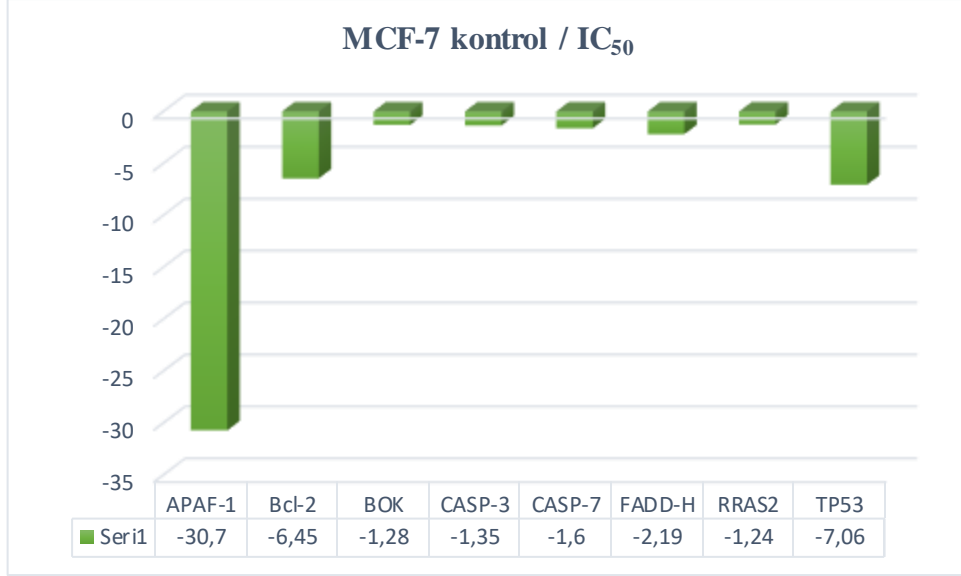
Şekil 4.14. *Drosophila melanogaster* kontrole göre LC₉₉ doz uygulaması sonucu genlerdeki ekspresyon değişimleri

LC₉₉ doz uygulaması sonucunda apoptotik ve antiapoptotik genlerde ekspresyon profilleri Şekil 4.13'de görülmektedir. Antiapoptotik bir gen olan BUFFY'de gen ekspresyonunda azalma görülmüş olması uygulanan sekonder metabolitin hücre içerisinde antiapoptotik gen ekspresyonunu düşürerek hücrenin ölüme gidişini kolaylaştırdığı sonucuna varılmaktadır. Bununla birlikte diğer apoptotik genlerin önemli bir kısmında da yine ekspresyonda azalmalar tespit edilmiştir. DECAY ve FADD apoptotik genlerinde daha fazla ekspresyon görülmüş olması yine hücrenin apoptoza gidişini kolaylaştıracak bir sonuç olarak karşımıza çıkmaktadır.



Şekil 4.15. *Drosophila melanogaster* kontrole göre LC₅₀ doz uygulaması sonucu genlerdeki ekspresyon değişimleri

LC₅₀ uygulaması sonucunda elde edilen gen ekspresyon sonuçlarına göre antiapoptotik bir gen olan BUFFY de LC₉₉ uygulamasına benzer şekilde ekspresyon da önemli ölçüde bir düşüş gözlenmiştir. Apoptotik RAS64B'deki ekspresyon artışı ve antiapoptotik BUFFY'deki ekspresyon azalışı uygulanan maddenin hücreyi apoptoza götürmedeki etkinliğini ortaya koymaktadır. Bununla birlikte yine apoptotik genler olan DARK ve DEPCL'deki önemli ölçüdeki ekspresyon azalışı da gözlenmiştir.



Şekil 4.16. MCF-7 kontrole göre IC₅₀ doz uygulaması sonucu genlerdeki ekspresyon değişimleri

MCF-7 hücre hattında IC₅₀ doz uygulaması sonucunda apoptotik ve antiapoptotik genlerde oluşan ekspresyon değişim profilleri Şekil 4.15’de görülmektedir. Antiapoptotik bir gen olan BCL-2’de gen ekspresyonunda azalma görülmüş olması uygulanan sekonder metabolitin hücre içerisinde antiapoptotik gen ekspresyonunu düşürerek hücrenin ölüme gidişini kolaylaştırdığı sonucuna varılmaktadır. Bununla birlikte diğer apoptotik genlerde yine ekspresyonda azalmalar tespit edilmiştir. APAF-1 ve TP53 apoptotik genlerinde daha fazla azalma görülmüş olması dikkat çekmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Drosophila erginleri üzerine denenen *Lactobacillus plantarum* sekonder metabolitinin apoptotik ve antiapoptotik genlerinin ekspresyon düzeylerine etkisinin araştırıldığı çalışmamızda antiapoptotik gen olan BUFFY'nin her iki doz uygulamasında da ekspresyon düzeyinde düşüş saptanması uygulanan maddenin hücrenin apoptoza gidişine katkı sağladığı şeklinde yorumlanabilir. Bununla birlikte BUFFY ekspresyonunda azalış gözlenmiş olsa da DARK ve DEBCL gibi önemli apoptotik genlerin ekspresyonundaki azalış hücrenin apoptoza gidişine engel teşkil edebilmektedir. Fakat yine apoptotik genler olan DECAY ve FADD da ekspresyonun artması önemli bir sonuç olarak karşımıza çıkmaktadır.

MCF-7 hücre hattı üzerine denenen *Lactobacillus plantarum* sekonder metabolitinin antiapoptotik bir gen olan BCL-2'nin ekspresyon düzeyinde düşüş saptanması uygulanan maddenin hücrenin apoptoza gidişine katkı sağladığı şeklinde yorumlanabilir. Bununla birlikte BCL-2 ekspresyonunda azalış gözlenmiş olsa da TP53 ve APAF-1 gibi önemli apoptotik genlerin ekspresyonundaki azalış hücrenin apoptoza gidişine engel teşkil edebilmektedir. Bu sonuçlar apoptotik sürecin farklı reseptörler üzerinden ve farklı gen aileleri üzerinden yürüdüğünü düşündürmektedir.

D.melanogaster'de LC₅₀ ve LC₉₉ uygulaması 24 saat, MCF-7 hücre hattında ise IC₅₀ uygulaması 4 saat yapılmıştır. Aplikasyon süresi ve dozlarda açılım artırılarak uygulanan maddenin etkinliği üzerinde daha net kanya varılabilir. Aynı zamanda çalışmamızda hücreyi apoptoza götüren genlerin belirli kısmı incelenmiş olup bu apoptotik gen yollarının daha detaylı analizi, uygulanan maddenin etkinliğinin sonuçlarını daha net ortaya konmasını sağlayacaktır. Çalışmamız ilgili maddenin bu genlerin ekspresyonları üzerine etkisinin ilk kez çalışılmış olması bakımından özgün olup ileri çalışmalara temel oluşturacak niteliktedir.

Sekonder metabolitin analizi sonucu belirlenen 16 maddenin her biri ile çalışılan genlerde moleküler docking hesaplamaları yapılmıştır. Moleküler docking sonuçlarında sadece RRAS-2 geninde L03 kodlu ligand bağlantısı, diğer tüm genlerde L13 kodlu ligand bağlantısı gerçekleşmiştir. Aynı zamanda en yüksek bağlanma enerjisi FADD proteini ile L13 kodlu ligand arasında -8.6 kkal/mol olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar ile birlikte

sekonder metabolit içeriğindeki etken maddenin L13 kodlu ligand yapısı olduğu düşünülmektedir.



6. KAYNAKÇA

- [1] Culligan, E. P., Hill, C. & Sleator, R. D., 2009, Probiotics and gastrointestinal disease: Successes, problems and future prospects. *Gut Pathog.*, 1(1), 1–12.
- [2] Oh, S., Kim, S. H. & Worobo, R. W., 2000, Characterization and purification of a bacteriocin produced by a potential probiotic culture, *Lactobacillus acidophilus* 30SC. *J. Dairy Sci.*, 83(12), 2747–52.
- [3] Kiray, E., 2015, Probiyotikler, prebiyotikler ve sinbiyotiklerin kolorektal kanser ilişkisi, *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, 28-46.
- [4] Kleerebezem, M. vd., 2003, Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100(4), 1990–5.
- [5] WHO | World Health Organization, Available at: <http://www.who.int/>, (Erişim: 5. Haziran 2018)
- [6] American Cancer Society. Breast Cancer Facts, Figures 2017-2018., *Breast Cancer Facts & Figures* 1–44 (2017).
- [7] Trichopoulos, D., Lagiou, P. & Adami, H.-O., 2005, Towards an integrated model for breast cancer etiology: the crucial role of the number of mammary tissue-specific stem cells. *Breast Cancer Res.*, 7(1), 13–7.
- [8] Tan, M. L., Choong, P. F. M. & Dass, C. R., 2009, Cancer, chitosan nanoparticles and catalytic nucleic acids. *J. Pharm. Pharmacol.*, 61(1), 3–12.
- [9] Treatment & Side Effects, Available at: <http://www.breastcancer.org/treatment>, (Erişim: 5. Haziran 2018)
- [10] Immunotherapy: Mapping Genes to Better Precision Oncology Care, Available at: <http://edoriumjournals.com/blog/immunotherapy-mapping-genes-better-precision-oncology-care/>, (Erişim: 17. Haziran 2018)
- [11] Baguley, B. C., 2010, Multiple drug resistance mechanisms in cancer. *Mol. Biotechnol.*, 46(3), 308–316.

- [12] Gottesman, M. M., 2002, M c d r.
- [13] Sharom, F. J., 2011, The P-glycoprotein multidrug transporter. *Essays Biochem.*, 50, 161–178.
- [14] Parton, M., Dowsett, M., Smith, I. & Smith, I., 2001, Studies of apoptosis in breast cancer., 322(june), 1528–1532.
- [15] Danial, N. N. & Korsmeyer, S. J., 2004, Cell Death: Critical Control Points. *Cell.*, 116(2), 205–219.
- [16] Kiess, W. & Gallaher, B., 1998, Hormonal control of programmed cell death/apoptosis [Review]. *Eur. J. Endocrinol.*, 138, 482–491.
- [17] Mcilwain, D. R., Berger, T. & Mak, T. W., 2015, Caspase Functions in Cell Death and Disease. 1–29.
- [18] Burlacu, A., 2003, Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *J Cell Mol Med.*, 7(3), 249–257.
- [19] O'Brien, M. A. & Kirby, R., 2008, Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease. *J. Vet. Emerg. Crit. Care.*, 18(6) 572–585.
- [20] Fan, T. J., Han, L. H., Cong, R. S. & Liang, J., 2005, Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai).*, 37(11), 719–727.
- [21] Loreto, C. vd., 2014, The role of intrinsic pathway in apoptosis activation and progression in Peyronie's disease. *Biomed Res. Int.*, 2014, 1–10.
- [22] Graf, U. vd., 1984, Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.*, 6(2), 153–188.
- [23] Muller, H. J., 1927, Artificial transmutation of the gene. *Science (80-)*, 66(1699), 84–87.
- [24] Rand, M. D., 2010, Drosophotoxicology: The growing potential for *Drosophila* in neurotoxicology. *Neurotoxicol. Teratol.*, 32(1), 74–83.
- [25] Alaraby, M. vd., 2015, Antioxidant and antigenotoxic properties of CeO₂ NPs and

- cerium sulphate: Studies with *Drosophila melanogaster* as a promising *in vivo* model. *Nanotoxicology.*, 9(6), 749–759.
- [26] Bernards, A. & Hariharan, I. K., 2001, Of flies and men--studying human disease in *Drosophila*. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 11(3), 274–8.
- [27] Wolf, M. J. *vd.*, 2006, From The Cover: *Drosophila* as a model for the identification of genes causing adult human heart disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 103(5), 1394–1399.
- [28] RCSB PDB: About RCSB PDB: Enabling Breakthroughs in Scientific and Biomedical Research and Education, Available at: <http://www.rcsb.org/pages/about-us/index>, (Erişim: 5. Haziran 2018)
- [29] Alten, O., 2011, Hrv-1 glikoprotein 41 molekülünün aktif bölgesinin substrat-bağlayıcı alanının moleküler kenetlenme yöntemiyle araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Hacettepe Üniversitesi.
- [30] Ülgen, O., 2012, Trombin inhibitörlerinin moleküler modelleme çalışmalarını, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Hacettepe Üniversitesi.
- [31] Sousa, S. F. *vd.*, 2013, Protein-ligand docking in the new millennium--a retrospective of 10 years in the field. *Curr. Med. Chem.*, 20(18), 2296–314.
- [32] Haghshenas, B. *vd.*, 2014, Different effects of two newly-isolated probiotic *Lactobacillus plantarum* 15HN and *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* 44Lac strains from traditional dairy products on cancer cell lines. *Anaerobe.*, 30, 51–59.
- [33] Nami, Y. *vd.*, 2014, Probiotic potential and biotherapeutic effects of newly isolated vaginal *Lactobacillus acidophilus* 36YL strain on cancer cells. *Anaerobe.*, 28, 29–36.
- [34] Simon, M. A., Bowtell, D. D. L., Dodson, G. S., Laverty, T. R. & Rubin, G. M., 1991, Ras1 and a putative guanine nucleotide exchange factor perform crucial steps in signaling by the sevenless protein tyrosine kinase. *Cell.*, 67(4), 701–716.
- [35] Olivier, J. P. *vd.*, 1993, A *Drosophila* SH2-SH3 adaptor protein implicated in coupling the sevenless tyrosine kinase to an activator of Ras guanine nucleotide exchange, Sos. *Cell.*, 73(1), 179–191.

- [36] Nagaraj, R. & Banerjee, U., 2004, The little R cell that could. *Int. J. Dev. Biol.*, 48(8-9), 755–760.
- [37] Christofori, G. & Semb, H., 1999, The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem. Sci.*, 24(2), 73–76.
- [38] Dorstyn, L., Read, S. H., Quinn, L. M., Richardson, H. & Kumar, S., 1999, DECAY, a novel *Drosophila* caspase related to mammalian caspase-3 and caspase-7. *J. Biol. Chem.*, 274(43), 30778–30783.
- [39] Banfi, S. *vd.*, 1996, Identification and mapping of human cDNAs homologous to *Drosophila* mutant genes through EST database searching. *Nat. Genet.*, 13(2), 167–174.
- [40] Rubin, G. M. *vd.*, 2000, Comparative genomics of the eukaryotes. *Science.*, 287(5461), 2204–15.
- [41] Yadav, A. K., Srikrishna, S. & Gupta, S. C., 2016, Cancer Drug Development Using *Drosophila* as an in vivo Tool: From Bedside to Bench and Back. *Trends Pharmacol. Sci.*, 37(9), 789–806.
- [42] Perrimon, N., Pitsouli, C. & Shilo, B.-Z., 2012, Signaling mechanisms controlling cell fate and embryonic patterning. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 4(8), a005975.
- [43] Harrison, D. A., Binari, R., Nahreini, T. S., Gilman, M. & Perrimon, N., 1995, Activation of a *Drosophila* Janus kinase (JAK) causes hematopoietic neoplasia and developmental defects. *EMBO J.*, 14(12), 2857–65.
- [44] Read, R. D., Cavenee, W. K., Furnari, F. B. & Thomas, J. B., 2009, A *Drosophila* Model for EGFR-Ras and PI3K-Dependent Human Glioma. *PLoS Genet.*, 5(2), e1000374.
- [45] Mukherjee, S. *vd.*, 2016, *Drosophila* Brat and Human Ortholog TRIM3 Maintain Stem Cell Equilibrium and Suppress Brain Tumorigenesis by Attenuating Notch Nuclear Transport. *Cancer Res.*, 76(8), 2443–52.
- [46] Gont, A. *vd.*, 2014, Inhibition of glioblastoma malignancy by Lgl1. *Oncotarget.*, 5(22), 11541–51.

- [47] Kim, S. N. *vd.*, 2014, ECM stiffness regulates glial migration in *Drosophila* and mammalian glioma models. *Development.*, 141(16), 3233–3242.
- [48] Read, R. D. *vd.*, 2005, A *Drosophila* model of multiple endocrine neoplasia type 2. *Genetics.*, 171(3), 1057–81.
- [49] Vidal, M., Wells, S., Ryan, A. & Cagan, R., 2005, ZD6474 Suppresses Oncogenic RET Isoforms in a *Drosophila* Model for Type 2 Multiple Endocrine Neoplasia Syndromes and Papillary Thyroid Carcinoma. *Cancer Res.*, 65(9), 3538–3541.
- [50] Das, T. K. & Cagan, R. L., 2013, A *Drosophila* approach to thyroid cancer therapeutics. *Drug Discov. Today Technol.*, 10(1), e65–e71.
- [51] Deshpande, H., Roman, S., Thumar, J. & Sosa, J. A., 2011, Vandetanib (ZD6474) in the Treatment of Medullary Thyroid Cancer. *Clin. Med. Insights. Oncol.*, 5, 213–21.
- [52] Tapon, N., Ito, N., Dickson, B. J., Treisman, J. E. & Hariharan, I. K., 2001, The *Drosophila* tuberous sclerosis complex gene homologs restrict cell growth and cell proliferation. *Cell.*, 105(3), 345–55.
- [53] Sun, P., Quan, Z., Zhang, B., Wu, T. & Xi, R., 2010, TSC1/2 tumour suppressor complex maintains *Drosophila* germline stem cells by preventing differentiation. *Development.*, 137(15), 2461–2469.
- [54] Markstein, M., 2013, Modeling colorectal cancer as a 3-dimensional disease in a dish: The case for drug screening using organoids, zebrafish, and fruit flies. *Drug Discov. Today Technol.*, 10(1), e73-e80.
- [55] Martorell, Ò. *vd.*, 2014, Conserved Mechanisms of Tumorigenesis in the *Drosophila* Adult Midgut. *PLoS One.*, 9(2), e88413.
- [56] Bhandari, P. & Shashidhara, L. S., 2001, Studies on human colon cancer gene APC by targeted expression in *Drosophila*. *Oncogene.*, 20(47), 6871–6880.
- [57] Ito, S. *vd.*, 2014, A genetic screen in *Drosophila* for regulators of human prostate cancer progression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 451(4), 548–555.
- [58] Fu, D. *vd.*, 2014, YAP regulates cell proliferation, migration, and steroidogenesis in adult granulosa cell tumors. *Endocr. Relat. Cancer.*, 21(2), 297–310.

- [59] Canamasas, I., Debes, A., Natali, P. G. & Kurzik-Dumke, U., 2003, Understanding Human Cancer Using *Drosophila*. *J. Biol. Chem.*, 278(33), 30952–30960.
- [60] Markstein, M. vd., 2014, Systematic screen of chemotherapeutics in *Drosophila* stem cell tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 111(12), 4530–5.
- [61] Thomas, S. vd., 2015, Effect of methotrexate on JAK/STAT pathway activation in myeloproliferative neoplasms. *Lancet.*, 385, S98.
- [62] Wells, S. A. vd., 2010, Vandetanib for the Treatment of Patients With Locally Advanced or Metastatic Hereditary Medullary Thyroid Cancer. *J. Clin. Oncol.*, 28(5), 767–772.
- [63] Aritakula, A. & Ramasamy, A., 2008, *Drosophila* -based in vivo assay for the validation of inhibitors of the epidermal growth factor receptor / Ras pathway. *J. Biosc.*, 33(december), 731–742.
- [64] Maione, P. vd., 2010, Review: Treating advanced non-small cell lung cancer in the elderly. *Ther. Adv. Med. Oncol.*, 2(4), 251–260.
- [65] Gupta, S. C., Patchva, S. & Aggarwal, B. B., 2013, Therapeutic roles of curcumin: lessons learned from clinical trials. *AAPS J.*, 15(1), 195–218.
- [66] Schönherr, C. vd., 2011, Activating ALK mutations found in neuroblastoma are inhibited by Crizotinib and NVP-TAE684. *Biochem. J.*, 440(3), 405–414.
- [67] Tierny, D. vd., 2015, Phase I Clinical Pharmacology Study of F14512, a New Polyamine-Vectorized Anticancer Drug, in Naturally Occurring Canine Lymphoma. *Clin. Cancer Res.*, 21(23), 5314–5323.
- [68] Erzurum Teknik Üniversitesi Temel Genetik Laboratuvarı Föyü, Temel_Genetik_Laboratuvar_Notul7752, Available at: https://www.erzurum.edu.tr/Content/Yuklemeler/Personel/Aysenur_OZDEMIR/Temel_Genetik_Laboratuvar_Notul7752.docx, (Erişim: 4. Mart 2018)
- [69] Crowley, L. C., Marfell, B. J., Christensen, M. E. & Waterhouse, N. J., 2016, Measuring cell death by trypan blue uptake and light microscopy. *Cold Spring Harb. Protoc.*, 2016(7), 643–646.

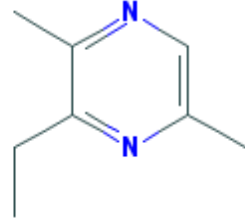
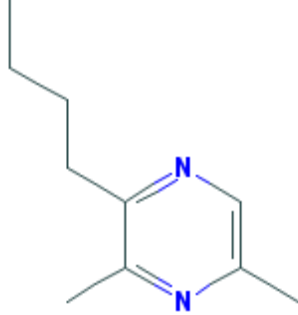
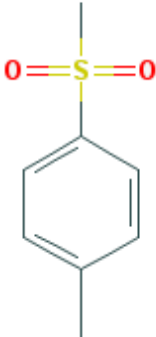
- [70] GC-MS, Available at: http://www.avomeen.com/wp-content/uploads/2013/10/www.avomeen.com_GC_MS.jpg, (Erişim: 9. Temmuz 2018)
- [71] Trott, O. & Olson, A. J., 2009, AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.*, *31*(2), 455-461.
- [72] Abbott, W. S., 1925, A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide. *J. Econ. Entomol.*, *18*(2), 265–267.



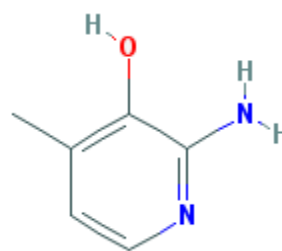
7. EKLER

EK-1

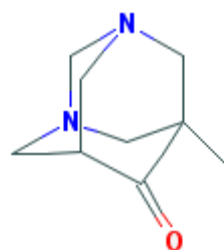
GC-MS Analizi Sonucu Belirlenen Maddeler

Ligand Numarası	Kimyasal İsmi	Pubchem Kodu	Kimyasal Yapısı
1	2-Ethyl-3,6-dimethylpyrazine	25916	
2	2-Butyl-3,5-dimethylpyrazine	528127	
3	P-Tolyl methyl sulfone	18521	

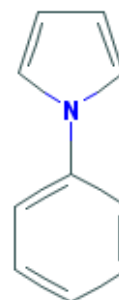
4 2-Amino-4-methylpyridin-3-ol 580054



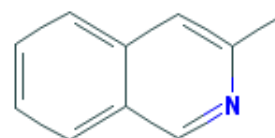
5 5-Methyl-1,3-diazaadamantan-6-one 580197



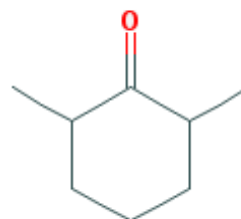
6 1-Phenylpyrrole 12480



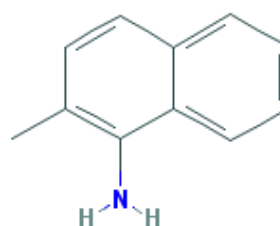
7 3-Methylisoquinoline 14306



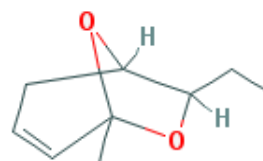
8 2,6-Dimethylcyclohexanone 17780



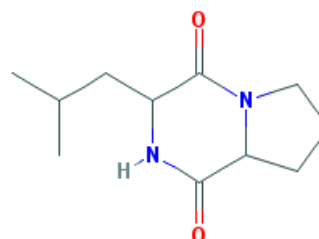
9 1-Amino-2-methylnaphthalene 16733



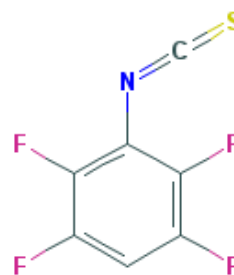
10 7-Ethyl-5-methyl-6,8-dioxabicyclo[3.2.1]oct-3-ene 536095



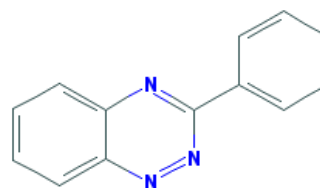
11 L,L-Cyclo(leucylprolyl) 102892



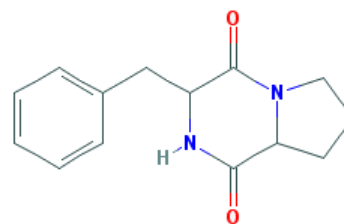
12 2,3,5,6-Tetrafluorophenyl isothiocyanate 140779



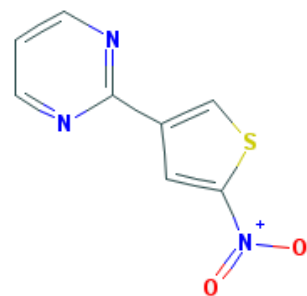
13 3-Phenyl-1,2,4-benzotriazine 239695



14 Phenylalanyl-prolyl diketopiperazine 99895



15 2-(5-Nitrothiophen-3-yl)pyrimidine 901433



16 2-(2-Nitrothiophen-3-yl)pyrimidine 12399594



EK-2

Çalışılan proteinlerin moleküler docking sonuçları

RRAS-2			
Ligand numarası	Bağlanma Enerjisi (kcal/mol)	Ligand numarası	Bağlanma Enerjisi (kcal/mol)
L01	-5.4	L10	-5.2
L02	-5.4	L11	-5.8
L03	-6.2	L12	-5.5
L04	-5.3	L13	-6.0
L05	-5.3	L14	-6.1
L06	-5.1	L15	-5.4
L07	-5.9	L16	-5.1
L08	-5.0		
L09	-6.1		

TP53			
Ligand numarası	Bağlanma Enerjisi (kcal/mol)	Ligand numarası	Bağlanma Enerjisi (kcal/mol)
L01	-4.8	L10	-5.2
L02	-5.0	L11	-5.8
L03	-5.5	L12	-5.5
L04	-5.4	L13	-7.1
L05	-5.3	L14	-6.8
L06	-5.3	L15	-5.5
L07	-5.8	L16	-5.3
L08	-5.0		
L09	-7.0		

BCL-2 (1g5m)			
Ligand numarası	Bağlanma Enerjisi (kcal/mol)	Ligand numarası	Bağlanma Enerjisi (kcal/mol)
L01	-4.7	L10	-4.8
L02	-5.4	L11	-6.2
L03	-5.5	L12	-5.4
L04	-4.5	L13	-6.9
L05	-5.2	L14	-6.8
L06	-5.0	L15	-6.1
L07	-5.5	L16	-5.8
L08	-4.8		
L09	-5.6		

BCL-2 (1gjh)			
Ligand numarası	Bağlanma Enerjisi (kkal/mol)	Ligand numarası	Bağlanma Enerjisi (kkal/mol)
L01	-4.7	L10	-5.1
L02	-5.3	L11	-5.4
L03	-5.1	L12	-5.2
L04	-4.5	L13	-6.5
L05	-5.0	L14	-6.4
L06	-5.1	L15	-5.8
L07	-5.5	L16	-4.8
L08	-4.9		
L09	-6.1		

APAF-1			
Ligand numarası	Bağlanma Enerjisi (kkal/mol)	Ligand numarası	Bağlanma Enerjisi (kkal/mol)
L01	-3.7	L10	-3.8
L02	-3.9	L11	-4.4
L03	-5.1	L12	-4.1
L04	-4.4	L13	-5.6
L05	-3.9	L14	-5.5
L06	-4.0	L15	-4.9
L07	-4.4	L16	-4.2
L08	-4.0		
L09	-4.7		

CASP-3			
Ligand numarası	Bağlanma Enerjisi (kkal/mol)	Ligand numarası	Bağlanma Enerjisi (kkal/mol)
L01	-4.8	L10	-5.3
L02	-5.4	L11	-5.8
L03	-5.7	L12	-5.4
L04	-4.5	L13	-7.7
L05	-4.8	L14	-6.7
L06	-5.3	L15	-5.9
L07	-5.8	L16	-5.3
L08	-4.9		
L09	-6.1		

FADD			
Ligand numarası	Bağlanma Enerjisi (kkal/mol)	Ligand numarası	Bağlanma Enerjisi (kkal/mol)
L01	-4.7	L10	-5.1
L02	-6.1	L11	-6.1
L03	-6.5	L12	-5.1
L04	-6.3	L13	-8.6
L05	-6.1	L14	-6.9
L06	-7.1	L15	-
L07	-5.8	L16	-
L08	-6.0		
L09	-6.0		

CASP-7			
Ligand numarası	Bağlanma Enerjisi (kkal/mol)	Ligand numarası	Bağlanma Enerjisi (kkal/mol)
L01	-5.1	L10	-5.2
L02	-5.3	L11	-5.9
L03	-5.6	L12	-5.2
L04	-4.8	L13	-7.9
L05	-5.0	L14	-6.9
L06	-5.5	L15	-5.8
L07	-6.1	L16	-5.7
L08	-5.0		
L09	-6.5		

8. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Melih ŞENTÜRK
Doğum Yeri	Kaman/KIRŞEHİR
Doğum Tarihi	19.12.1993
Uyruğu	T.C.
Telefon	0 544 264 40 65
E-Posta Adresi	senturkmlh@gmail.com
Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Erzurum Teknik Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Moleküler Biyoloji ve Genetik
Mezuniyet Yılı	2016
Eğitim Bilgileri	
Yüksek Lisans	
Üniversite	Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi
Fakülte	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Genetik ve Biyomühendislik
Mezuniyet Yılı	2016 – Devam ediyor