

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri, kadınlarda sık görülen kanser tipi olup, kanser ölümleri arasında ikinci sıradadır (14,47,53,65,70,98).

Yaklaşık her 10 kadından biri meme kanserine yakalanmaktadır (7,53,103). Meme kanseri erkeklerde nadir olarak görülür (7,65,70,103).

Meme kanserinin nedenleri arasında çevresel faktörler, çeşitli karsinojenik maddeler ve genetik yapı sayılabilir (48,53,70,106).

Genetiksel olarak bir çok anomali yanında, telomer ve telomeraz aktivitelerinde olan anomaliler de meme kanseri ve diğer bazı kanserlerden sorumludur (34,37,47).

**Telomerler**, ökaryotik organizmalarda lineer kromozomların uçlarında bulunan özelleşmiş DNA tekrar dizilerinden oluşan heterokromatik bölgelerdir (6,10,11).

Telomerlerin fonksiyonları; kromozomları rekombinasyondan, uç füzyondan ve hasarlı DNA olarak tanınmaktan korumak, ayrıca nükleus içinde düzenli bir şekilde bulunmalarına yardımcı olmaktır (6,16,27,42,46). Telomerler, hücrelerin replikatif kapasitesini kontrol eden moleküler saat olarak da görev yaparlar (27,34).

Genç soma hücrelerinde, belirli bir boya sahip telomer, her hücre bölünmesinde giderek kısalır. Hücre bölünmesi sırasında, DNA polimeraz lineer DNA'nın uçlarını tam olarak replike edemez (telomer uç problemi). Böylece genetik materyal, kromozom uçlarından kaybolur. Telomerlerin sürekli kısalması kromozom dengesizliğine ve hücrenel yaşlanmaya neden olur (6,61,102).

**Telomeraz enzimi**, kendisine ait RNA'sının bir bölümünü (1,5 telomer DNA tekrarına komplementer dizi) kullanarak, guanince (G) zengin telomer DNA tek dalını

sentezleyen bir ribonükleoprotein (RNP) kompleksi veya bir revers transkriptazdır (5,9,16,26,27,37,46,61,73,89,102). Genç soma hücrelerinde, telomeraz enzimi inaktif olduğu halde, belli bir boya sahip telomer, Hayflick sınırına kadar hücre bölünmesini sağlar. Kanserli soma hücrelerinde ise, telomeraz enzimi aktif halde olup, telomer boyunun devamlı hücre bölünmesine yetecek kadar olmasını sağlar. Böylece hücre çoğalması duraksamadan devam eder (12).

Kanserli dokularla yapılan çalışmalarda telomeraz aktivitesinde artış tesbit edilmiştir. Örneğin, meme karsinomalarının %73, hepatoselüler karsinomalarının %85 ve nöroblastomaların %94'ünde telomeraz aktivitesinin arttığı belirlenmiştir (81).

Diğer bazı hastalıklarda olduğu gibi, kanser tedavisinde de etkili olduğu bilinen bitkisel kökenli maddelerden biri de flavonoidlerdir. Flavonoidler, molekül ağırlıkları düşük bileşiklerdir. Kersetin (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon) soğan, domates, brokoli, yeşil çay, elma, çilek gibi yenilebilir sebze ve meyvelerde yaygın olarak bulunan bir flavonoidtir (1,3,68,82,88,96).

Kersetin kardiyovasküler koruma, anti-kanser ve anti-viral aktivite, anti-ülser, anti-allerjik ve anti-inflamatuar etki ve katarakt oluşumunu önlemek gibi insan sağlığında bir çok yararlı etkiye sahiptir. Meme, kolon, over, endometriyum, mide, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre dizileri ve lösemik hastalar ile yapılan çalışmalarda, kersetinin anti-kanserojen olduğu ortaya konmuştur (68,80,82,83).

Sıçanlarda kimyasal olarak uyarılmış meme tümörlerinin insidansını azalttığı gösterilmiştir (43).

Kersetin için Faz 1 klinik denemelerine de başlanılmıştır ve anti-tümör aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (96).

Östrojen özellikle hücre çoğalması olmak üzere, çok farklı etkilere sahip steroid bir hormondur (4,8,35,48).

Östrojen, özel büyüme faktörleri ve bunlara ait reseptörler ile, hücre siklus mekanizmasını etkiler. Östrojen fonksiyonel östrojen reseptör (ER)'üne sahip meme kanserinin büyümesini uyarır ve apoptozu engeller (8,48,105).

Östrojen reseptör pozitif (ER-pozitif) meme kanseri tedavisi, hormonal yolla yapılır. Bu yolda, aromataz inhibitörleri ve antiöstrojenler olarak iki strateji kullanılır (105).

**Aromataz**, androjenin östrojene dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir (55). Bu dönüşümü engellemek için aromataz inhibitörleri kullanılır (105). Aromataz inhibitörleri, genelde tip 1 (steroidal) ve tip 2 (non-steroidal) inhibitörler olarak, iki gruba ayrılır. Bu grupların her biri, farklı yollar kullanarak aromataz enzimini inaktive eder. Böylece androjenin östrojene dönüşmesi engellenir (39,50,55).

**Antiöstrojenler** ise, östrojen reseptörüne (ER) bağlanarak, ER'nün sahip olduğu büyüme fonksiyonunu baskılayan bileşiklerdir. İki sınıfa ayrılırlar. Bunlardan tip I antiöstrojenler hem östrojenik hem antiöstrojeniktirler. Tip II'ler ise sadece östrojeniktirler. Tamoksifen, tip I antiöstrojendir. Genellikle tamoksifen ER-pozitif meme kanseri tedavisinde kullanılır. Ayrıca yaşlılarda kemik erimesi (osteopoz) tedavisinde de yararlı etkileri vardır. (8,35,71,105).

Tamoksifen, meme kanserinin hormonal tedavisinde başlıca dayanaktır. Postmenapozlu ve/veya 50 yaş üzeri kadınlarda kemoterapiden daha iyi cevap verir (4,20,99,100).

Östrojen, telomeraz enziminin aktivitesini artırırken, tamoksifen bunu baskılayabilir (67,89,99). Tamoksifen ER-pozitif ve ER-negatif hücre dizilerinde telomeraz aktivitesini baskılar Bu baskılamanın ER-pozitif MCF-7 hücrelerinde daha uzun sürdüğü bildirilmiştir (4,46,81,89,99).

Yüzyılımızda, artan kanser çeşidi ve yoğunluğuna karşılık, bunların tedavisinde oluşan güçlükler insan sağlığını ciddi bir şekilde tehdit etmektedir. Çünkü antikanser etkili ilaçlar kanser hücrelerine etki gösterirken, aynı mekanizma ile normal hücreleri de etkilemektedir. Normal hücrelerin zarar görmesi bu hücrelerin ait olduğu organın yapı ve fonksiyonunda bozulmalara neden olmaktadır. Tedavinin böyle yan etkilerini bertaraf etmek, kanserle ilgili bilinmeyenleri aydınlatmak ve yeni ilaçlar tesbit edebilmek için önemli çalışmalar yapılmaktadır.

Yaptığımız bu çalışmanın amacı, kanser tedavisinde umut verici bir flavonoid olan kersetin'in etkilerini, kanser tedavisinde kullanılan ve telomeraz enzim aktivitesi üzerine etkinliği bilinen tamoksifen ile karşılaştırmalı olarak değerlendirmek ve kanser tedavisini moleküler açıdan ele alan bilgilere katkıda bulunmaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Meme Kanseri

Meme, kadınlarda süt üretimi için düzenlenmiş ve farklılaşmış tubuloalveolar bir ter bezidir. Süt üreten lobül sistemi ile bunları meme başına aktaran duktus sisteminin birleşiminden oluşur (7,70). Meme kanseri en çok lobül ile terminal duktus birleşme yerindeki epitelyumdan köken alan bir adenokanserdir. Başlangıçta süt aktaran kanal sistemi (duktus) içinde sınırlı olan kanser hücreleri sonradan kendi bazal membranlarından ilerleyip bağ dokusu içine geçerler. Bu aşamada, tümör hücreleri kan damarları ve lenfatiklerle karşılaşarak metastaz yapma yeteneğine sahip olurlar. Metastaz oluşumu kemik, karaciğer ve akciğerde görülür (7).

Meme kanseri, kadınlarda çok sık görülen kanser tipi olup, kanser ölümleri arasında ikinci sıradadır (14,47,53,65,70,98).

Meme kanseri epidemiyolojisinde, bu kanser tipi hormon bağımlı bir hastalıktır (70,90). Östradiol gibi hormonlar, kanser gelişimi ve sürecinde rol oynarlar (90). Yaşamı boyunca östrojen replasman tedavisi görmeyen ve fonksiyonel overleri olmayan kadınlarda meme kanseri gelişmez. Erkeklerde görülen meme kanseri kadınlardakine göre yaklaşık 1:150 oranındadır (70).

Kanser oluşumunda tek bir transforme hücre, bir dizi somatik veya germline mutasyonlar ile uzun bir periyot sonucu oluşur. Genetik geçiş gösteren formlardan ailesel meme kanseri, tüm meme kanserlerinin %10'unu oluşturmaktadır (7,70).

İlk belirlenen germline mutasyon, tümör baskılayıcı gen TP53 (17p13)'tür. Bu gen, Li-Fraumeni sendromundan sorumludur (30,53,70,97). Bu gen normalde DNA hasarında, hücre siklusunda ve apoptozda rol oynar (17,32). p53'deki kalıtsal mutasyonlar, kalıtsal meme kanseri, sarkomalar ve diğer tümör tiplerine neden olur (70).

Ailesel meme kanserinde etkili tümör baskılayıcı genler, BRCA-1 (17q21) ve BRCA-2 (13q13)'dir (30,48,70,106). BRCA-1 geni bir transkripsiyon faktörü olan zinc finger proteini kodlar (30,70) ve apoptozda da yer alır (30). Ayrıca, dominant bir onkogen ürünü olan erbB2 (HER-2,neu) meme kanserlerinde aşırı eksprese edilir. Bu aşırı ekspresyon, insan meme epitelyumunun yapısını değiştirir (30,53,70). HER-2'nin aşırı ekspresyonu, meme kanserinde kullanılan tamoksifenin uyardığı apoptozu engeller (38).

Uygulanacak tedavinin türü ve tedaviden alınacak sonuçlar bakımından meme kanseri, Evre 0, Evre I, Evre II (A ve B), Evre III (A ve B), Evre IV olmak üzere 5 evreye ayrılır (70).

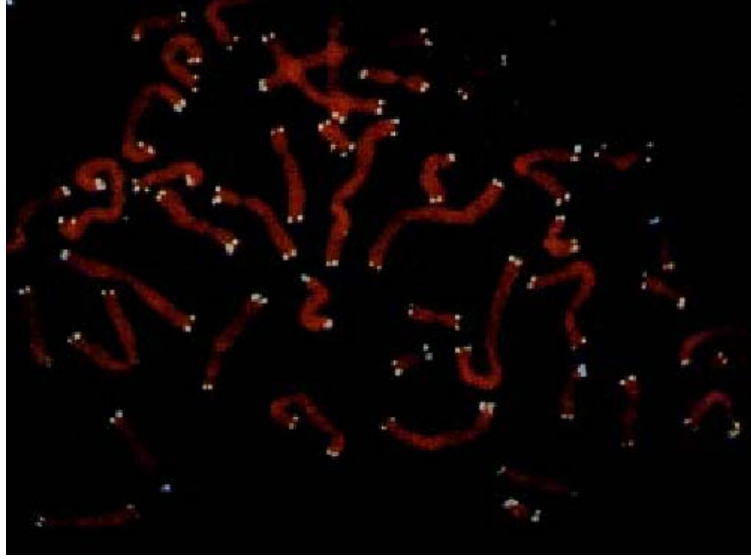
### **2.1.1. Meme kanseri risk faktörleri:**

Meme kanseri riski, genetik, çevresel ve yaşam şekilleri ile bağlantılıdır. Bunlar;

- a) Geç menapoz (40,48,53,65,70)
- b) Erken menarş (12 yaş öncesi) (40,48,53,65,70)
- c) Obezite (24,53,77)
- d) Geç hamilelik (24,48,40,65)
- e) Östrojenlere uzun süre maruz kalınması (24,40,48,90)
- f) Yüksek kemik densitesi (24,40)
- g) Aile hikayesi (40,65,77)
- h) Alkol kullanımı (53,77)
- i) Düşük fiziksel aktivite (53,77).

## **2.2. Telomer**

Telomerler, ökaryotik organizmalarda lineer kromzomların uçlarında bulunan özelleşmiş DNA tekrar dizilerinden oluşan heterokromatik bölgelerdir (6,10,11,21,23,25,27,42,93).

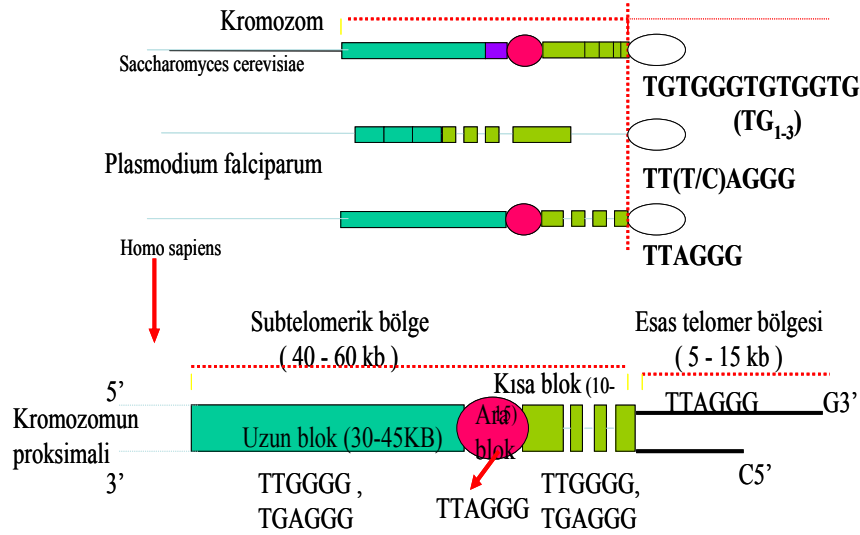


***Şekil 2.1.*** Kromozom uçlarında telomerlerin görünümü (109).

Telomerler kromozomları, rekombinasyon, uç füzyon ve hasarlı DNA olarak tanınmaktan korur, nükleus içinde belli bir düzende bulunmalarına yardımcı olurlar (6,11,16,27,37,46). İnsan hücrelerinin replikatif kapasitesini kontrol etmede moleküler bir saat olarak görev yaparlar (27,34). Ayrıca, BRCA1 ve BRCA2’de telomer yapı ve fonksiyonunda rol oynayabilir (46).

Telomer, subtelomerik ve esas telomerik bölge olarak incelenebilir (6,12).

Kromozomların devamı olan çift iplikli subtelomerik bölge canlı türlerine göre farklı uzunlukta olup, DNA tekrarları yönünden heterojen bir yapıya sahiptir (6,10). İnsan kromozom subtelomerik bölgesi, 40-60 kb kadar olup, **Şekil 2.2**'de görülen DNA tekrarlarına sahiptir (6,10,12). Subtelomerik bölgenin devamı olan esas telomerik bölge, tek iplikli olarak sonlanır. Guanince zengin olduğundan G' tek dalı (overhang) olarak isimlendirilir. İnsan soma hücrelerinde 5 kb, germ hücrelerinden spermde ise 10 kb kadardır, homojen yapıda olup, 5'-3' yönünde T2AG3 tekrarları taşır (10,12) (Şekil 2.2).



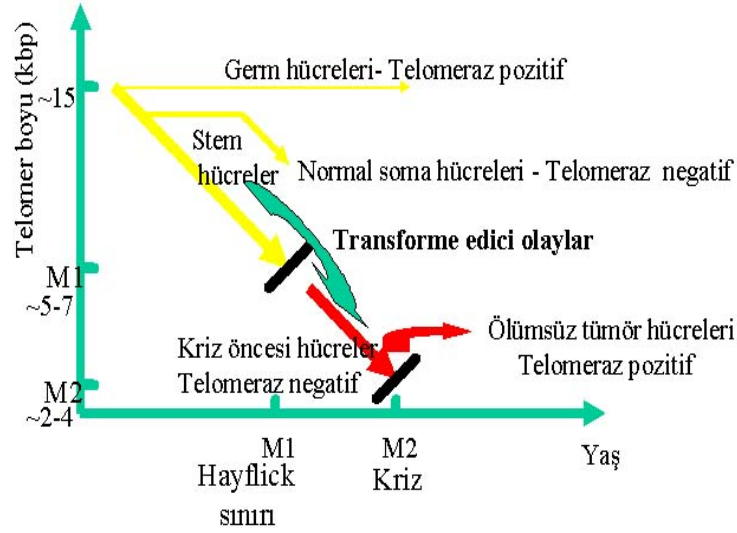
**Şekil 2.2.** Lineer kromozomların her iki ucunda telomerlerin yerleşimi (11,12).

Normal memeli genç soma hücreleri, sınırlı sayıda çoğalmaktadır. Yapılan fibroblast hücre kültürü çalışmalarında, fibroblastların başlangıçtaki sayılarının ortalama 50 katı kadar çoğalabildiği gösterilmiştir. Bu çoğalma sayısı, Hayflick Sınırı olarak ifade edilir. Çoğalması tamamlanan hücreler, G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> fazında kalırlar (5,6,9,27).

Soma hücrelerinde, telomeraz enzim negatif olduğu halde, genç soma hücrelerinde telomer boyu yeterli uzunlukta ( $\cong 15$ kb) olduğundan, hücre bölünmesi Hayflick sınırına kadar devam eder. Telomer boyunun 5-7 kb olduğu bu sınır, replikatif



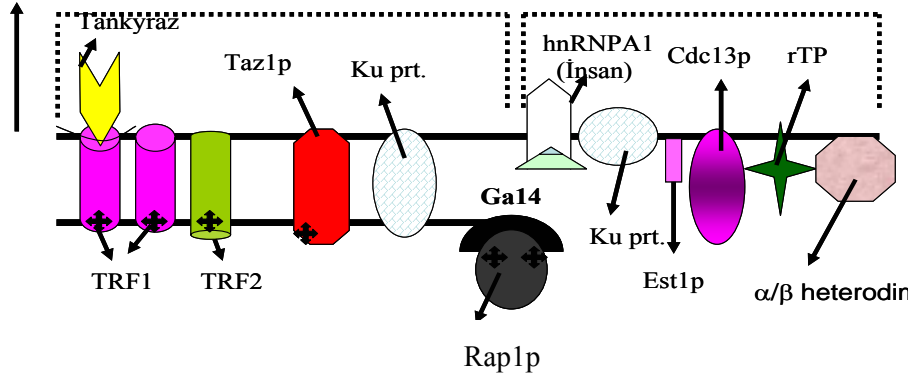
yaşlanma veya mortalite evresi 1 (M1) olarak bilinir. Telomer boyunun 5-7 kb gibi kritik bir kısalığa ulaşması, tümör süpresör proteinlerce hasar olarak algılandığından hücre siklusu G<sub>1</sub> evresinde durdurulur. Bu noktada kalan hücrelerin telomer boyu korunabilirse, hücre yaşlı olarak hayatını devam ettirir. Eğer p53 ve pRb/p16 gibi hücre siklus kontrol noktası genleri inaktive olursa, replikatif yaşlanmadan kaçabilen hücreler bir kaç bölünme daha yapabilirler. Telomer boyu aşırı kısalan (2-4 kb) bu hücreler, Mortalite evresi 2 (M2)'ye ulaşırlar. Normal hücreler bu noktada kalır. Fakat kansere meyilli olan hücreler, M2 kriz noktasını aşar ve bunlarda telomeraz yeniden aktive olarak bölünmeye devam ederler. O halde kanser hücreleri, M2 evresini aşabilen hücrelerdir (6,9,12,23,27,46,49,81,93) (Şekil 2.3).



**Şekil 2.3.** Hücre yaşlanması (M1) ve ölümsüzlüğünde (M2), telomeraz enzimi ve telomer boyu (9).

### 2.2.1. Telomer Proteinleri

Telomere bağı proteinler, çift dal bağı proteinleri ve tek dal bağı proteinler olarak incelenebilir (12,25)(Şekil 2.4).



**Şekil 2.4.** Telomere bağlanan tek ve çift dal bağı proteinler (12).

Telomere bağı proteinlerin bir kısmı, telomer tek ve çift dal ucunu sararak ve ayrıca t-loop oluşumuna yardım ederek, telomerin normal yapısını korumasını sağlarlar. Bir kısmı da, telomerez enziminin telomere bağlanıp/bağlanmamasında görev yaparak telomer boy uzunluğunu kontrol ederler (11,12,25).

#### 2.2.1.1. Çift Dal Bağı Proteinler

##### ❖ **Rap1p (Represor Activator Protein)**

Mayalarda telomerazın telomere bağlanmasını engeller, dolayısıyla telomer boyunun aşırı uzamasını kontrol eder. Ayrıca telomerlerin normal pozisyonlarını korumasını sağlar (11,12,21,45,72).

Rap1p'nin telomere bağlanması için önce Gal4 proteinine bağlanması gerekir. Böylece Rap1p/Gal4 hibridi oluşur. Bu hibrid, Gal4'ü tanıyan telomerik tekrar bölgesine bağlanır (11,21).

#### ❖ Ku Heterodimer Proteini (Double Strand Break Repairs Protein)

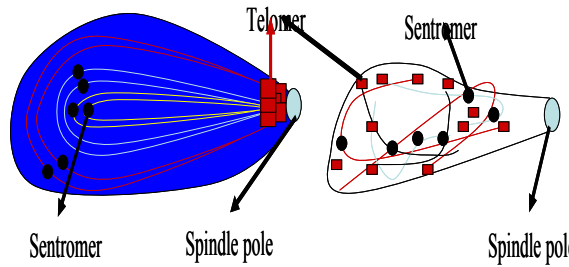
Mayalarda telomer ucunu sarar ve korur. Mayozun profazında telomerlerin nükleer zarf ile ilişki kurmasını sağlar. Tek dalı S fazında tutar (11,12,25).

Ayrıca telomerleri nükleolitik parçalanma ve rekombinasyondan korur (21).

#### ❖ Taz1 Proteini

Tüm kromozomların telomerlerinin spindle pol denilen bir kutupta toplanarak, homolog kromozom sentromerlerinin yan yana olduğu muntazam bir yapı olan at kuyruğu (horsetail) yapısının oluşturmasını sağlar (11) (Şekil 2.5).

Mayalarda, telomer boyunun aşırı uzamasını engeller (9,11,12,72). Fakat Taz1p'deki delesyon, telomer boyunun aşırı uzamasına neden olur (21,72,94).



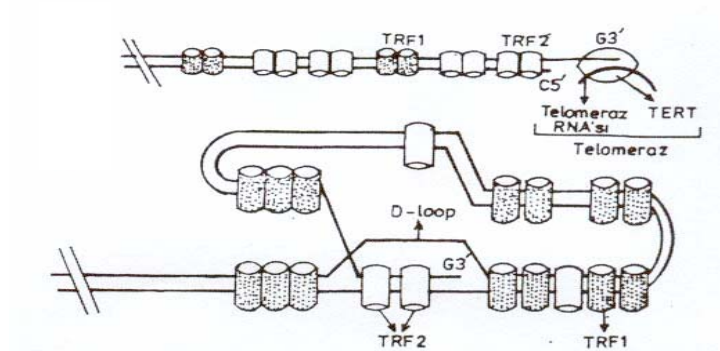
**Şekil 2.5.** *S.pombe*'de mayoz bölünme profazında at kuyruğu (horsetail) oluşumu (94).

### ❖ TRF1 (Telomere Repeat Binding Factor1)

TRF1 proteini; amino ve karboksil uç ile orta bölgeden oluşur. Orta bölge 200 amino asitlik bir dimerizasyon bölgesi içerir. Bunu takiben 100 amino asitlik NLS (Nükleer Lokalizasyon Sinyallerini alan bölge) bölgesi yer alır. NLS bölgesinin bitiminde ise, orta bölgenin son kısmı olan 50 amino asitlik MYB homoloji (myb benzeri bölge) bölgesi yer alır. Bu bölge sadece R1 domaini taşır. İnsan ve farede, R1'in 3. heliksi, telomerik DNA çift dalında T2AG3 tekrarlarını tanır. Böylece, TRF1 proteini telomere bağlanır (11).

TRF1 telomer boyunun negatif düzenleyicisidir. Bu görevini telomerin t-loop oluşturmasını sağlayarak yapar (11,12,25,72,89,102).

T-loop oluşumunda, TRF1 ve TRF2 yardımıyla, telomer çift dalı kendi üzerinde kıvrılır ve bu proteinler sayesinde iki çift dal paralel olarak karşılıklı gelir. Bunu takiben çift dallı telomer DNA'sının 100-200 bazlık kısmı birbirinden uzaklaşarak D-loop oluşur. Telomer G3' tek dalı, D-loop içine girerek, uygun bazların karşısına yerleşir. Böylece oluşan t-loop telomerazın telomere bağlanmasını engeller ve telomer boyu uzayamaz (11,12,16,37) (Şekil 2.6). T-loop aynı zamanda telomer tek dalının korunmasını sağlar (37).



**Şekil 2.6.** T-loop oluşumu (12)

### ❖ TRF2 (Telomere Repeat Binding Factor 2)

Yapı olarak TRF1'e benzer. TRF1'de olduğu gibi, özel DNA bağlanma bölgesi vardır. İnsan ve farede t-loop oluşumunda görev alarak, telomer boyunun uzamasını ve G3' tek dalının yıkılmasını engeller (11,12,16,25,37,72,102). TRF2; insan hücrelerinde hücre yaşlanması ile ilişkili olup, bu ilişkisinde p16 veya p53 ile etkileşimi de önemlidir (101).

### ❖ Tankyraz (TRF1-interacting ankyrin-related ADP ribose polymerase)

Tankyraz amino ve karboksil uç ile orta bölgeden oluşur (11). Orta bölgede bulunan 24 anykrin tekrarı tankyrazın TRF1'e bağlanmasını sağlar (11,12,26). Karboksil uçta bulunan PARP (poli-ADP ribozil polimeraz) homoloğu katalitik bölge ise, hem tankyraz hem de TRF1'e ADP-riboz gruplarının eklenmesini sağlar. Böylece insan ve farede, TRF1'in ribozillenerek inaktive olmasını sağlar. Bu durumda T-loop oluşamaz. Telomeraz telomere bağlanarak, telomer boyu uzar (11,12, 21,26,72,102).

## 2.2.1.2. Tek Dal Bağlı Proteinler

### ❖ $\alpha/\beta$ Heterodimer Proteini

Ciliatlardan *Oxytricha nova*'da, G3' tek dalının en ucuna bağlanır. Telomerazı inaktive ederek, telomer boyunun uzamasını engeller (11,12).

### ❖ rTP (Replikasyon Telomer Proteini)

Ciliatlardan *Euplates aediculatus*'da, DNA replikasyonunda görev alır (11,12).

### ❖ **Cdc13p (Cyclin dependent kinase)**

Mayalarda, telomerazın telomere bağlanmasını ve telomer boyunun uzamasını sağlar. Telomer ucunu korur (12,69).  $\alpha/\beta$  heterodimerine karşılık gelir (11).

### ❖ **Est1p (Ever shorter telomere 1 protein)**

Mayalarda, T-loop oluşmadığı zamanlar, telomer ucuna bağlanır ve ucu korur. Telomer boyunun uzamasını sağlar (11).

### ❖ **hnRNPA1 (heterogenous nükleer RibonükleoProtein-A1)**

İnsan ve farede, telomer boyunun uzamasını sağlar. Telomeri uzatan protein sentezi için önce mRNA splicing işleminde görev alır (11,12,25). hnRNPA1'in telomeraz enzimini telomere bağlaması 3 evrede gerçekleşir (11).

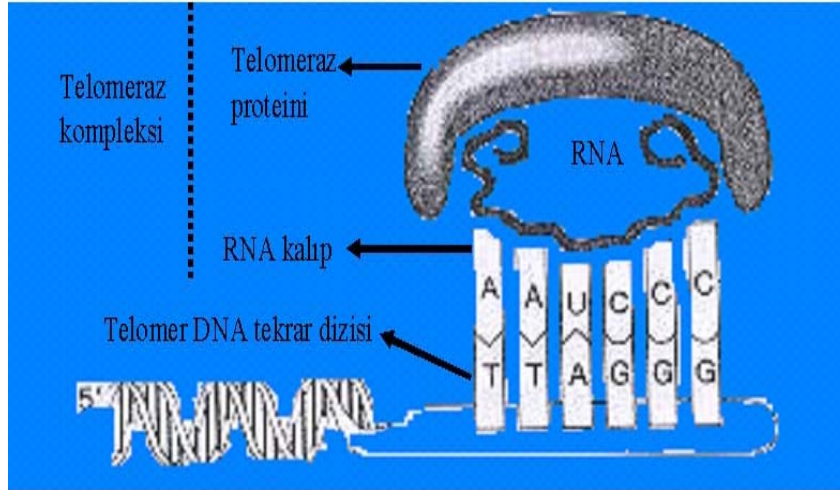
- 1. aşamada**, A1 fragmenti önce, telomer G3' tek dalına bağlanır.
- 2. aşamada**, A1'in fragmenti olan UP1, telomeraza bağlanır. Telomeraz-UP1 kompleksi meydana gelir.
- 3. aşamada**, telomeraz-UP1 kompleksi, telomer tek dalına bağlı olan A1 fragmentine bağlanır. Böylece, telomeraz enzimi G3' tek dalına bağlanmış olur(11).

### **2.3. Telomeraz Enzimi**

Telomeraz enzimi, **Şekil 2.7**'de görüldüğü gibi, kendisine ait RNA'sının bir bölümünü (1,5 telomer DNA tekrarına komplementer dizi) kullanarak, guanince (G) zengin telomer DNA tek dalını sentezleyen bir ribonükleoprotein (RNP) kompleksi veya bir revers transkriptazdır (5,9,16,26,27,37,46,73,89,102).

Telomeraz enzim kompleksi telomeraz RNA'sı ve telomeraz proteinlerinden oluşur (9,15,23,27,73).

İlk kez 1985'de *Tetrahymena thermophila*'da bulunmuştur (27).



**Şekil 2.7.** Telomeraz enzim kompleksi yapısı (12)

Normal somatik hücrede telomeraz enzimi inaktifken, kanser hücrelerinde, germ hücrelerinde (sperm), stem hücrelerinde, saç follikül hücrelerinde ve uyarılmış lenfositlerde aktif olarak görev yapar (15,16,23,27,34,46,49,60,61,73,89,101).

Telomeraz aktivitesi, hücre siklus ve çoğalması ile ilişkilidir. Normal dokulardan alınan örneklerde telomeraz aktivitesi görülmezken, bu hücreler kültüre edilip çoğaltıldıklarında telomeraz aktivitesi görülür (4).

Ayrıca fonksiyonel p53'ün olmadığı durumlarda, kritik telomer kısalmasının neden olduğu genetik dengesizlik, daha yüksek kanser insidansına neden olur (16).

### **2.3.1 İnsan Telomeraz RNA'sı (hTR: hTERC)**

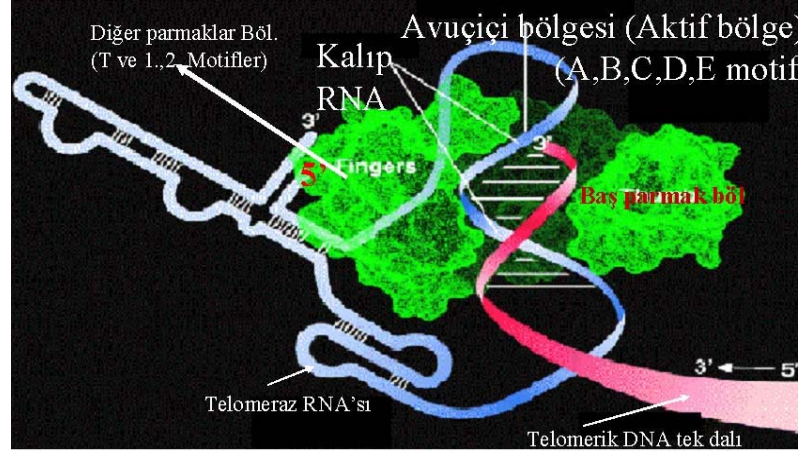
Telomerazın RNA bileşeni, telomerik tekrar sentezi için kalıp görevi görür. İnsanda hTR, RNA polimeraz II tarafından transkribe edilir. hTR molekülünde 1-209 ve 241-330 nükleotidleri arası bölgeler, telomerazın katalitik bileşeni (hTERT) ile etkileşir (27).

İnsan telomeraz RNA (TERC=hTR) geni, 3q21-28'de lokalizedir (12).

Çalışmalar, telomeraz negatif hücreler dahil, bir çok hücre tipinde geniş ölçüde, hTR'nin eksprese edildiğini göstermiştir (45,60,61,73). Bu yüzden hTR telomeraz aktivitesi için belirleyici değildir (60). Telomeraz RNA'sı, ciliatlarda 147-209 insan ve farede 450, mayada 1301 nükleotid boyundadır. Telomeraz RNA'sı, yaklaşık 1,5 telomer DNA tekrarına komplementer bir dizi içerir. Bu dizi, Tetrahymena thermophila'da 5'-CAACCCCAA-3', fare ve insanda 5'-AAUCCC-3' olarak tesbit edilmiştir (9,21).



Yapılan çalışmalar sonucu, **Şekil 2.8**'de görüldüğü üzere, telomeraz enzim kompleksini tanımlayan bir model oluşturulmuştur. Bu modele göre telomeraz enzim kompleksi, yarı açık sağ elin iç kısmı görünümündedir (12,69).



**Şekil 2.8.** Telomeraz enzim kompleksi modeli ve avuç içi bölgesinde telomer DNA'sı ile telomeraz RNA'sını bulunuşu (9,12,69).

RNA'nın diğer kısımları ise, diğer parmaklar bölgesi ve onun dışında yer alır. Tam olarak bilinmemekle birlikte, avuç içi dışında kalan bu kısımların telomeraz enzim kompleksinin bir araya gelmesinde ve telomeraz aktivitesinin gerçekleşmesinde rol oynadığı zannedilmektedir (9).

Telomeraz enzimi aktivitesine bağlı olarak, telomer boyu uzar ve hücreler sınırsız çoğalır veya telomer boyu kısalır ve çoğalma sona erer. Bu yüzden telomeraz enzim aktivitesi, telomer boyu ve hücre çoğalması birbirleri ile ilişkili kavramlardır (9).

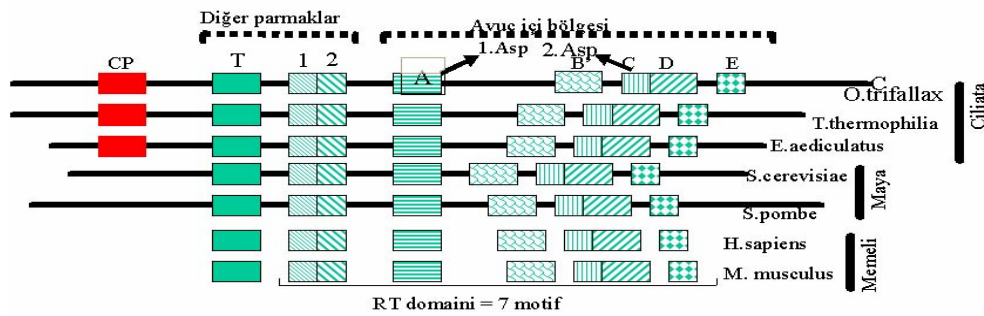
### 2.3.2. Telomeraz Proteinleri

Telomeraz proteinleri; temel proteinler (TERT) ve yardımcı proteinler olarak iki grupta incelenebilir (9,12):

#### 2.3.2.1. Temel protein TERT (Telomeraz Revers Transkriptaz)

TERT, telomeraz enzim kompleksinin katalitik alt birimidir. RNA'dan DNA sentezlenmesinde görev alır. TERT'in ağırlığı 103-127 kd arasında değişir. İncelenen canlıların hepsinde aynı motifler taşımalarına rağmen, aralarında bazı farklılıklar vardır. TERT, canlı türüne göre değişik isimler alır. İnsanda hTERT, Tetrahymena thermophila'da Tt-TERT, Mus musculus'da mTERT, Euplotes aediculatus'da Ea-p123 veya p123, Saccharomyces cerevisiae'de Sc-Est2p veya Est2p olarak isimlendirilir (9,12).

TERT proteini, Şekil 2.9'da görüldüğü gibi, 7 motifli RT domaini ve T motifinden oluşur. Bu yapı bir çok organizmada az çok birbirine benzer. İncelenen organizmalarda bu motiflere ilaveten bir de CP motifi bulunur (9,12,21).



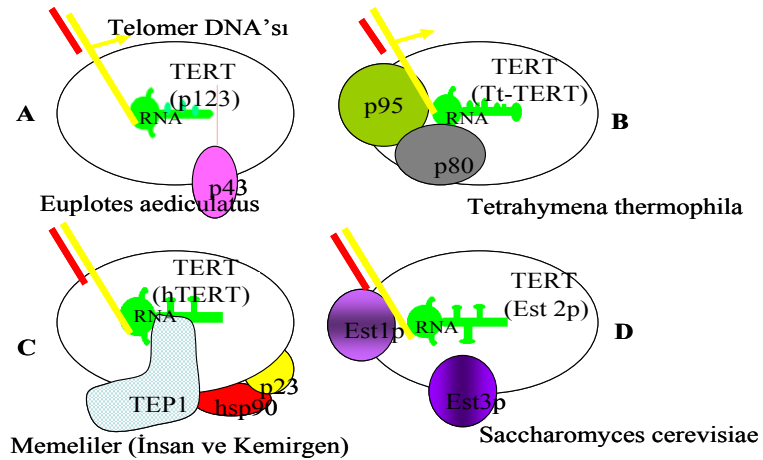
Şekil 2.9. Çeşitli TERT proteini motifleri (9,12,21,25,69)

RT domaininde yer alan motiflerden A ve C motiflerinde bulunan aspartik asitler telomerazın aktifleşmesinde rol oynarlar. Bu aspartik asitleri kodlayan genlerden birinde olan bir mutasyon, telomeraz aktivitesini önemli derecede etkiler. Telomeraz enzim kompleksi modeline göre, T, 1 ve 2. motifler diğer parmaklar bölgesinde, bunların dışındaki motifler ise avuç içi bölgesinde yer alır (9,12,21,69).

Organizmalara göre TERT proteini:

### 2.3.2.1.1. Ea-p123 veya p123

Bir ciliat türü olan *Euplates aediculatus*'da TERT proteini p123 olarak adlandırılır. Bunun ağırlığı 123 kd kadardır. Beraberinde 43 kd ağırlığındaki p43 yardımcı proteinini taşır. P43'ün fizyolojik rolü bilinmemektedir (9,21,45,69). *E. aediculatus*'a ait p123 proteinini kodlayan gen dizisi ile, *S.cerevisiae*'da Est2p (Ever shorter telomeres) proteinini kodlayan est2 geni birbiriyle homologdur (9,27,45,69,72) (Şekil 2.10).



**Şekil 2.10.** Çeşitli canlılarda telomeraz esas proteinleri (TERT) ve yardımcı proteinleri ile telomeraz RNA'sı ve telomeraz DNA'sı ilişkisi (21).

#### **2.3.2.1.2. Tt-TERT**

Bir ciliat türü olan *Tetrahymena thermophila*'da bulunan, Tt-TERT'in yapısı da maya ve insandakine benzer. Ciliatlara özel CP motifini de içerir. Telomeraz aktivitesi ile bağlantılıdır. Bu protein hakkında fazla bilgi mevcut değildir (9,45).

#### **2.3.2.1.3. Est2p (Ever Shorter Telomeres 2p)**

*Saccharomyces cerevisiae*'da tanımlanan TERT proteini 103 kd. ağırlığında olup, est2 geni tarafından kodlanır. est2 geni, kısa telomer fenotipine sahip mutantlarda belirlenen genlerden biridir (9,21,45).

#### **2.3.2.1.4. hTERT (Human Telomerase Revers Transkriptase)**

hTERT, hücre farklılaşması sırasında düzenlenmektedir. Bir çok somatik hücrede, ya eksprese edilmez ya da düşük seviyede eksprese edilir. Ancak kanser hücrelerinde upregüle haldedir (27). hTERT mRNA miktarı ile telomeraz aktivitesi arasında pozitif bir korelasyon bulunmuştur (27,60,61,73,108). Telomeraz aktivitesi ile doğrudan ilişkilidir (27).

İnsanda hTERT proteini geni 5p15.33'de lokalizedir (9,27,61). hTERT geni 16 ekzon ve 15 intron içerir. hTERT geni, insan tümörleri ve tümör hücre dizilerinde amplifiye haldedir (27). Meme kanserlerinin %25'inde hTERT gen amplifikasyonu belirlenmiştir (89).

hTERT geni, c-Myc, Bcl-2, Her-2 ve Ras gibi onkogenler tarafından düzenlenir. Ayrıca Sp1, östrojen reseptörü, E2F1, NF $\kappa$ B ve MZF-2 gibi bir çok transkripsiyonel faktör de hTERT gen ekspresyonu üzerinde etkilidir (15,27,73).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, östrojenin hTERT ekspresyonunun transkripsiyonel düzenlenişini etkilediğini göstermiştir (27). Östrojen reseptör pozitif MCF-7 hücrelerinde telomeraz aktivitesi ve hTERT ekspresyonu, 1 nM 17 $\beta$ -östradiol verilmesi ile upregüle olduğu bildirilmiştir (89). hTERT promotörleri üzerinde 2 östrojen response element (ERE) de belirlenmiştir (73,89,108).

hTERT içeren hücrelerde, içermeyenlere göre kromozom kırıklarının frekansı daha azdır (37).

### **2.3.2.2. Yardımcı Proteinler**

İncelenen türlerde, yardımcı proteinlerin, telomeraz aktivitesi için mutlaka gerekli olduğu tesbit edilememiştir. Bununla birlikte, yardımcı proteinlerin telomeraz enzim kompleksi elemanlarının bir araya gelmesinde ve telomer ile ilişki kurarak enzimin işlev görmesinde rol oynadıkları zannedilir (12).

#### **2.3.2.2.1. p43 proteini:**

Euplotes aediculatus'da tanımlanan bu protein hakkında fazla bilgi yoktur. Maya Est2p'ye homologtur (9). p43 proteininin TERT (p123) ile ilişki kurduğu tesbit edilmiştir (45,69).

#### **2.3.2.2.2. p80 ve p95 proteinleri:**

Tetrahymena thermophila'da, tanımlanan bu proteinlerden; p80, kemirgen ve insanda bulunan TEP1(Telomerase associated protein-1)'e benzer ve onun gibi sadece

telomeraz RNA'sı ile ilişki kurar. p95 ayrıca telomer DNA'sı ile ilişki kurarak ve revers transkripsiyonda telomeraz enziminin tek dala bağlanmasını sağlar (9,21,45,69).

Son yapılan bir çalışmada, p80 ve p94'den yoksun Tetrahymena suşlarında, telomeraz aktivitesi ve telomeraz RNA seviyelerinin fonksiyonlarının normal olduğu gösterilmiştir (27).

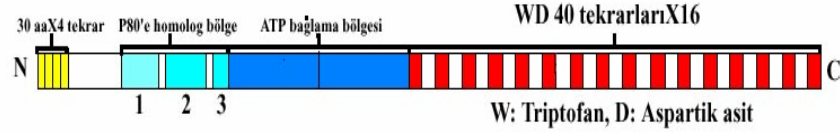
#### **2.3.2.2.3. Est1p ve Est3p (Ever shorter telomeraz 1 ve 3 protein)**

Saccharomyces cerevisiae'da tanımlanan bu proteinlerden; Est1p; telomer DNA'sı ile ilişki kurarak revers transkripsiyon olayının gerçekleşebilmesi için telomerazın olaya katılmasını sağlar. Est3p; Est2p ile etkileşir. Görevi tam olarak bilinmemektedir (45).

#### **2.3.2.2.4. TEP1, p23ve hsp90**

İnsan ve kemirgenlerde tanımlanan bu proteinlerden TEP1; insan ve farede TP1, sıçanda TLP1 olarak adlandırılır, 290 kd ağırlığında ve 2690 amino asid uzunluğundadır. Memelilerde, p80'nin homologudur. Vault olarak isimlendirilen ribonükleoprotein komplekslerinin bileşeni olarak belirlenmiştir. Telomeraz RNA'sı ile etkileşir (9,25,27,72). Bir çok hücrede TEP1 üretilir (26).

Telomeraz RNA'sı ile ilişki kuran bu yardımcı protein; *Tetrahymena thermophila*'daki p80 proteinine homolog bir bölge, ATP bağlama bölgesi ve karboksil uca yakın 16 WD40 tekrarından oluşur. Protein-protein etkileşimlerinde bulunan bir motiftir (23,27) (Şekil 2.11).



**Şekil 2.11.** WD 40 tekrarı (72).

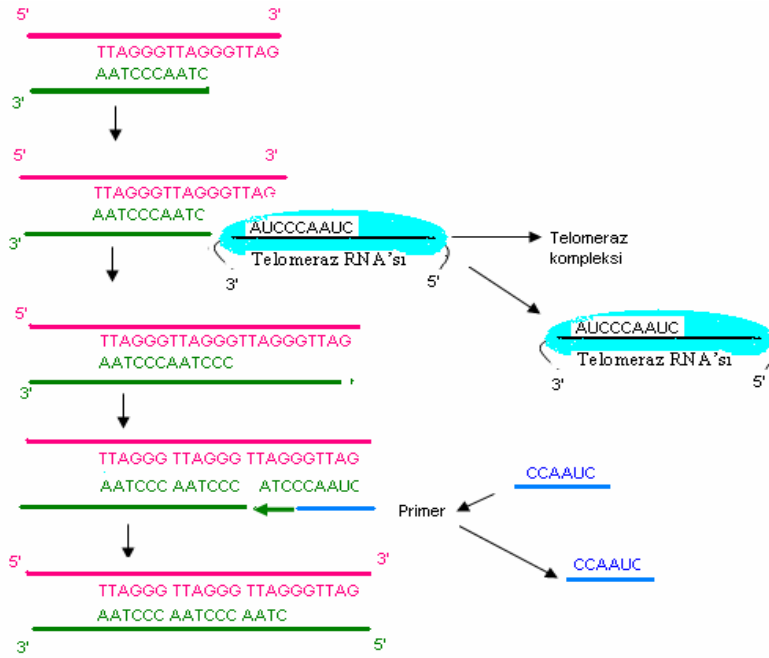
**WD40 tekrarı:** W: Tryptofan, D: Aspartik asit. WD dizileri yaklaşık 40 amino asitlik aralıklarla yerleştiklerinden WD40 tekrarı olarak bilinen WD amino asitleri 40 amino asitte bir olmak üzere 16 defa tekrar eder (45).

Memelilerde tanımlanan p23 ve hsp90 (heat shock protein 90) şaperon proteinleri, telomeraz enzimi için gerekli translasyon olayı ve telomerazın aktivitesinde yardımcı rol oynarlar (9,27,45,72). Bu proteinler TERT ile etkileşir ve hTERT'in amino ucunu bağlar (26,45).

#### **2.4. Telomerin Uzaması ve Kısılması**

Telomeraz enzimi, telomerin G3' tek dalına bağlanarak telomer revers transkripsiyonla boyu uzatır. Bu olayda ileri sürülen modele göre telomeraz kompleksinin avuç iç bölgesinde, telomeraz RNA'sının yaklaşık 1,5 telomer DNA tekrarına komplementer dizisinin ilk 3 nükleotidi, telomer tek dalının son 3 nükleotidi karşısına gelir. Bunu takiben RNA'nın diğer nükleotidleri karşısına uygun DNA nükleotidleri dizilir. Olay

tamamlanınca telomeraz RNA'sı telomeraz enzim kompleksi ile birlikte telomerden ayrılır. Bundan sonra, yeni bir normal RNA primeri (CCA AUC gibi 5-6 nükleotid boyunda), telomer G3' tek dalının karşısına 5'-3' yönünde yerleşir. Bunu takiben, DNA polimeraz enzimi yardımıyla, RNA primerinin bittiği yerden itibaren 5'-3' yönünde yeni nükleotidler telomer çift dalını tamamlayacak şekilde sıralanırlar. Sentez bitince RNA primeri telomerden ayrılır ve RNA primerinin yeri G3' tek dalı olarak kalır (9,12) (Şekil 2.12).



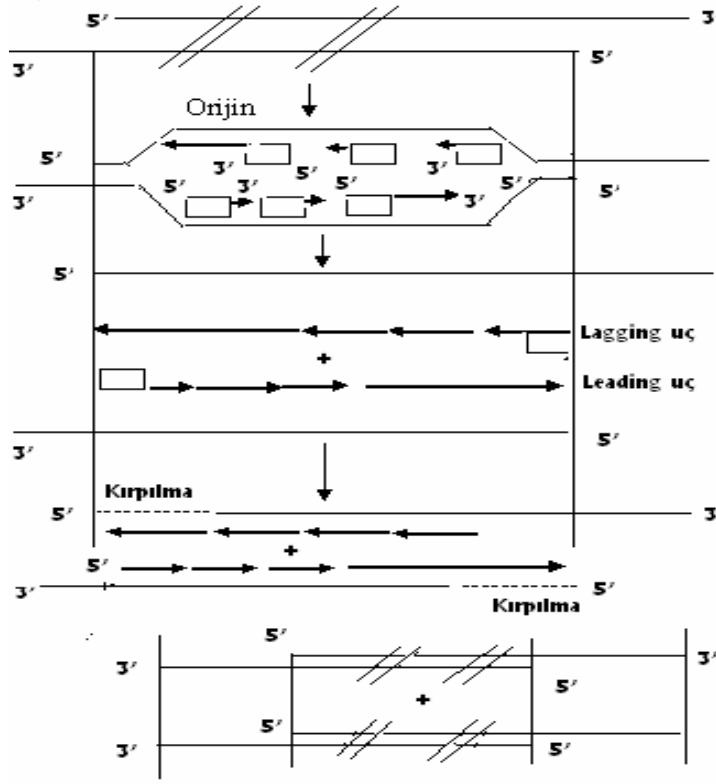
**Şekil 2.12.** Telomerin uzaması (9).

Her hücre bölünmesinde telomer boyu giderek kısalır.

Ökaryotik canlılarda DNA replikasyonu bir çok orjin noktasında aynı anda başlayarak iki yönde devam eder. Böylece kesintisiz (leading) ve Okazaki fragmentlerinden oluşan kesintili (lagging) yeni dallar sentezlenir.



Bu sentez sırasında lagging uca telomer G3' tek dalı mevcut olduğu için problem yaşanmaz. Leading uca ise, kalıp dalın 5' ucunda sona erdiğinden küt uçlar oluşur. Kesin olmamakla birlikte, CA'ce zengin kalıp DNA dallarının 5' küt uçları, ekzonükleaz enziminin kırılarak G3' tek dalının oluştuğu ileri sürülmektedir. Böylece telomer boyu giderek kısalır (12,69) (Şekil 2.13).

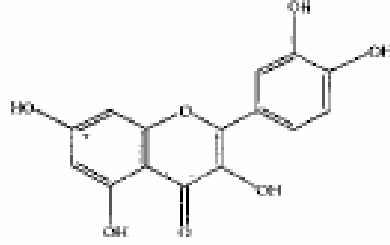


Şekil 2.13. İnsan telomerinin kısalması (9).

## 2.5. Kersetin (Quercetin)

Kersetin (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon) soğan, domates, yeşil çay, elma, çilek gibi yenilebilir sebze ve meyvelerde çok yaygın bulunan bir flavonoiddir (Şekil 2.14). Flavonoidler, bitkilerde bulunan düşük moleküler ağırlıklı bileşiklerdir. Flavonoidler

monomerik flavanoller, flavanoneler, anthocyanidinler, flavoneler ve flavonoller olmak üzere 5 sınıfa ayrılır. Ortalama olarak günlük diyetlerde 1 gram veya daha fazla flavonoid alımı olmaktadır (1,3,52,68,79,82,88,96).



**Şekil 2.14.** Kersetinin kimyasal yapısı (44).

Kersetin'in kardiyovasküler koruma, anti-kanser ve anti-viral aktivite, anti-ülser, anti-allerjik ve anti-inflamatuar etki ve katarakt oluşumunu önlemek gibi insan sağlığı üzerinde bir çok yararlı etkisi vardır (68,82).

Kersetin'in genel etkisi, antioksidant aktivitesinden kaynaklanır. Bu özelliği sayesinde, kersetin oksijen radikallerini savar, ksantin oksidaz'ı ve in vitro lipid peroksidasyonunu baskılar. Tek başına veya askorbik asit ile birleşerek, derideki nörovaskülatör yapılara zarar veren oksidatif hasarın insidansını azaltır (28,82,95).

Kersetin'in anti-inflamatuar etkisi ise, inflamasyon oluşturan enzimler (cyclooxygenase, lipoxygenase) üzerine baskılayıcı etkisinden ileri gelir (36,68,82).

Glukozun sorbitole dönüşümünü katalizleyen aldoz redüktaz enzimi, göz için önemli olup, diyabetik katarakt oluşumunda rol oynar. Kersetin insan lens aldoz redüktaz'ın etkili bir inhibitörüdür (29,82).

Kersetin ayrıca, Herpes simplex virus tip 1, polio-virus tip 1, parainfluenza virüs tip 3 ve respiratory syncytial virus (RSV) infeksiyonunu ve hücre replikasyonu azaltır (82).

Meme, kolon, over, endometriyum, mide ve küçük hücreli olmayan akciğer kanser ve lösemi hücre dizileri ile yapılan çalışmalarda, kersetin'in anti-kanserojen olduğu ve sıçanlarda kimyasal olarak uyarılmış meme tümörlerinin insidansını azalttığı gösterilmiştir. Kersetin için Faz 1 klinik denemelerine de başlanmıştır ve anti-tümör aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (43,80,82,96).

İn vitro çalışmaların büyük bir kısmı, flavonollerin tümör hücreleri üzerine antiproliferatif etkilere sahip olduğunu göstermiştir. Örneğin, kersetin, insan gastrik kanser hücreleri, kolorektal kanser hücreleri ve lösemik T hücrelerinde, hücre siklusunun G1/S geçişini önleyerek proliferasyonu baskılamaktadır (36,88).

Kersetin sayesinde lösemi, melanoma ve insan kolon kanser hücrelerinin çoğalmasının baskılanması, tip II östrojen bağlama bölgeleri ile kersetinin etkileşimine bakılarak açıklanmaktadır. Hem kersetin hem de tamoksifen'in, laryngeal kanser hücre dizileri Hep2 ve CO-K3'ün büyümelerini baskıladığı ve apoptozu uyardığı gösterilmiştir. Bu bileşenlerin sitostatik aktiviteleri, tip II östrojen bağlama bölgelerini bağlama yetenekleri ile ilişkili olabilir (36,43,57,80). MCF-7 hücrelerinde kersetinin, p21'i aktiveleştirerek apoptozu uyardığı da gösterilmiştir (107). Ayrıca kersetin, in vitro östron sülfataz'ın potansiyel bir baskılayıcısıdır (95).

Kersetinin anti-kanser aktivitesi, protein tirozin kinazları baskılayarak, tümör hücrelerinin apoptozunu uyararak, DNA sentezi ve farklı insan karsinoma hücrelerinde hücre büyümesini baskılayarak, sinyal iletim yollarını down-regüle ve modifikasyon ederek gerçekleşir (33,52,79,96,104).

Ayrıca kersetinin, in vitro deneyler ile çeşitli hücre dizilerinde, 10-100 µmol/l arası konsantrasyonlarda G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fazı, G<sub>2</sub>/M faz ve S fazında hücre siklusunu durdurduğu, hücresel çoğalmayı ve kaspaz-3 aktivitesini baskıladığı gösterilmiştir (78).

Kersetin, özellikle uterin doku ve kolon mukozasındaki hücre proliferasyonunun kontrolü ile ilişkili siklik-AMP-duyarlı kazein kinazların bir sınıfını baskılar. Ayrıca kersetinin, memeli dokularında MAP kinaz ve siklin D1, onkogenik proline-ilişkili protein kinaz FA ve protein kinaz C (PKC) gibi hücre proliferasyonu kontrolü ile ilişkili başka enzimleri de baskıladığı gösterilmiştir (36).

## **2.6. Tamoksifen**

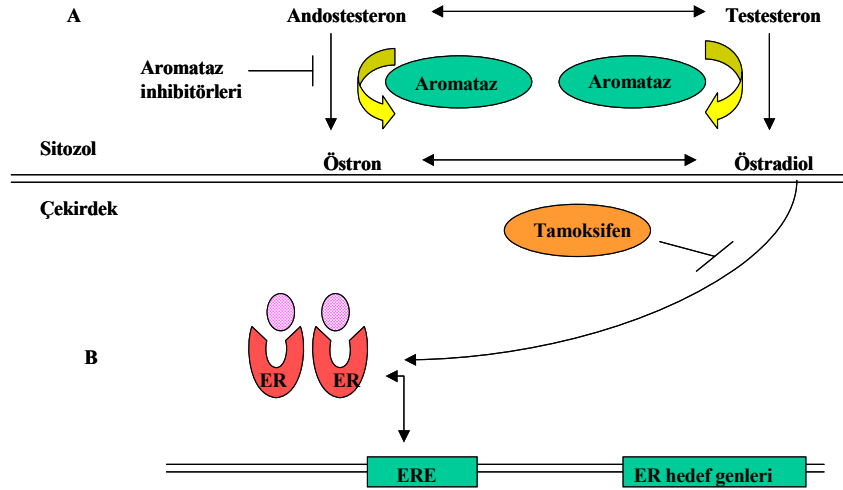
Meme kanserinde endokrin tedavinin temel prensibi, tümör hücrelerini östrojenlerin (östron E1, östradiol E2, östron sülfat E1S) büyümeyi uyarıcı etkisinden yoksun bırakmaktır (41,99). Östrojen, özel büyüme faktörleri ve bunlara ait reseptörler ile, hücre siklus mekanizmasını etkiler. Östrojen fonksiyonel östrojen reseptör (ER)'üne sahip meme kanserinin büyümesini uyarır ve apoptozu engeller (8,47,48,59,74,105).

Hormonal tedavi, östrojen reseptör pozitif meme kanseri tedavisinde önemli role sahiptir (105). Meme kanserinde, hormonal tedavi olarak aromataz inhibitörleri ve/veya antiöstrojenler kullanılır (41,105).

Aromataz (östrojen sentetaz), androjenin ve testosteronun östrojen, östron ve östradiole dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir (41,74,105). Bu dönüşümü engellemek için aromataz inhibitörleri kullanılır. Aromataz inhibitörleri, aromataz enzimini inaktive ederek, androjenin östrojene dönüşümünü engeller (39,50,55) (Şekil 2.15 A).

Nonsteroidal antiöstrojenlerden tamoksifen, östrojenle yarışarak östrojen reseptörüne bağlanır. Dolayısıyla, östrojenin, bu reseptöre bağlanmasını engeller. Oluşan tamoksifen-östrojen reseptör kompleksi, nükleusa taşınarak, östrojen duyarlı genlerin

östrojen response element bölgesine (ERE) bağlanır. Bunun sonucu olarak östrojen uyarılı genlerin transkripsiyonu azalır. Böylece östrojen sentezi yavaşlar. Hücre çoğalmasında rolü olan östrojenin azalması, hücre siklusunun G1 fazında tutularak, tümör dokusunun büyümesini engeller (4,41,50,55,91,105) (Şekil 2.15 B).



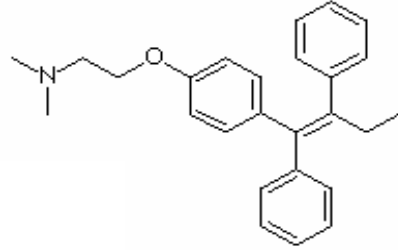
**Şekil 2.15.** Aromataz inhibitörlerinin (A) ve Tamoksifenin etki mekanizması (B) (55).

Östrojen reseptör pozitif meme kanseri tedavisinde, nonsteroidal antiöstrojenlerden tamoksifen ile tedavi ön sıradadır. Postmenapozlu ve/veya 50 yaş üzeri kadınlarda, tamoksifen kemoterapiden daha etkilidir (8,105).

Tamoksifenin, ilkin ve ilerlemiş meme kanserlerinde olumlu etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (74). Tamoksifen düşük toksisiteye sahip olup, meme kanserinin tüm safhalarında kullanılır (4,50). Meme kanseri teşhisi konan hastalarda mortaliteyi bariz bir şekilde azaltır (12). Bunlara rağmen tüm meme tümörleri östrojen reseptörü içerse de, hepsi antiöstrojen tedaviye cevap vermeyebilir (41).

Non-steroidal trifenil kökenli olan tamoksifen (Şekil 2.16), östrojen reseptörlerine bağlanarak hücre çoğalmasını baskıladığı gibi, hücre içi başka faydalı

etkilere de sahiptir. Örneğin, tamoksifen ve metabolitleri hücre gelişiminin düzenlenmesinde rol oynayan protein kinaz C (PKC) ile etkileşerek, onları baskılar. Tamoksifen mikrozomal karaciğer enzimleri tarafından aktive edilir. Tamoksifenin aktive metaboliti olan **hidroksitamoksifen**, hücre zar yapısını doğrudan etkileyerek zarda yapısal bir değişiklik sağlar. Kardiyak mikrozomlara benzer olarak, membran koruyucu antioksidan olarak etki yapar. Tamoksifen gibi hidroksitamoksifen de sülfataz aktivitesinin baskılayıcılarıdır (41,50,55,62,90).



**Şekil 2.16.** Tamoksifenin kimyasal yapısı (90).

Tamoksifen, raloksifen, toremifen ve arzoksifen gibi bileşikler, Selective Estrogen Receptor Modulator (SERM) olarak bilinir (8,50,55,71). SERM'ler vücudun farklı bölgelerinde hem östrojenik hem de antiöstrojenik etki gösteren bileşiklerdir. Bunlardan ilk defa antiöstrojenik olarak, tamoksifen meme kanseri tedavisinde kullanılmıştır (71). Tamoksifen ayrıca, BRCA1 gen mutasyonu taşıyan kişilerde, olması muhtemel kontralateral meme kanseri riskine karşı koruyucudur (14).

Bir çok önemli genin transkripsiyonel düzenlenişinde yer alan östrojen reseptörü, nüklear reseptör ailesinin bir üyesidir (53). Bu reseptör meme bezi gelişiminde görev yapar. Progesteron hormonu ile birlikte meme epitelyum gelişimi, farklılaşma ve devamlılığında rol oynar. Östrojen reseptörleri ya homodimerik ya da heterodimerik tipte olup  $\alpha$  ve  $\beta$  reseptörlerinden oluşur (30). AF-1 ve AF-2 gibi iki transkripsiyonel

aktivasyon domaini içerir. Tamoksifen, östrojen reseptörünün AF-2 aktivasyonunu baskılar, fakat AF-1'inkini baskılayamaz (2). Tamoksifen, ayrıca östrojen reseptörüne bağlanmak için, östradiol, östron ve östron sülfat gibi östrojenlerle yarışır (87,105). Bu yarışta, tamoksifen, östrojen reseptörüne, östradiole göre daha kolay ve hızlı bağlanır (41,58,105).

Tamoksifen, östrojen reseptör pozitif invaziv kanserlerin oluşumunu %69 indirir. Ancak tamoksifenin uzun süre kullanımı ilaç direncini ortaya çıkarır (58).

Tamoksifen, “National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP), Breast Intervention Study I (IBISI), Italian Breast Cancer Prevention Study” gibi büyük çaplı araştırmalarda kullanılmıştır (4,40,47,100).

Tamoksifen, meme kanser riskini azaltmak için Amerika’da Food and Drug Administration (FDA) tarafından onaylanmıştır (2,8,40,47).

Tamoksifenin ayrıca, büyüme faktörleri yoluyla çalıştığı ve östrojen duyarlılığı olmayan meme tümörlü hastalarda da yararlı olduğu bilinir (4,99).

Yapılan çalışmalarda tamoksifenin, meme kanser hücrelerinde hücre büyümesi ve proliferasyonunu durdurduğu, ayrıca apoptozu uyardığı açıklanmıştır (31,58,87). MCF-7 hücrelerinin kullanıldığı çalışmalarda da, tamoksifen ve aromataz inhibitörlerinin hücre siklusunu G<sub>0</sub> ve G<sub>1</sub> fazında durdurarak hücre proliferasyonunu baskıladığı ve apoptozu uyardığı gösterilmiştir (4,105). Mandlekar ve arkadaşları da ER-pozitif ve ER-negatif insan meme kanser hücrelerinde, tamoksifenin kaspaz yolunu aktifleştirerek apoptozu uyardığını rapor etmişlerdir (76). Yine tamoksifenin, ER-pozitif MCF-7 ve ER-negatif MDA-MB 468 hücrelerinde, apoptozu doza ve zamana bağlı olarak etkilediği bildirilmiştir (98). Özellikle, NMU (N-nitrosomethylurea) etkisi ile oluşan sıçan meme tümörlerini, tamoksifenin 1mg/kg günlük dozunun küçülttüğü tesbit edilmiştir (76,98). Tamoksifenin, kalmodulin ve PKC fonksiyonları üzerine, östrojen reseptöründen bağımsız olarak etki gösterdiği de bulunmuştur (22,62,87).

Östrojen, meme kanser hücre dizilerinde, telomeraz enziminin aktivitesini artırırken, tamoksifen bunu baskılayabilir. Tamoksifen, bu baskılama işini doğrudan değil de, hormon aracılığı ile yapar (4,27,67). Tamoksifen ER-pozitif ve ER-negatif hücre dizilerinde de telomeraz aktivitesini aynı yol ile baskılar Bu baskılama ER-pozitif MCF-7 hücrelerinde, ER-negatif MDA-MB 468 göre daha uzun sürer (4,81,89,99).

MCF-7 meme kanser hücre dizisinde, tamoksifen sayesinde telomeraz aktivitesinin down regülasyonu, kısmi olarak hTERT mRNA ekspresyonunun baskılanmasına bağlıdır. Bu baskılama, tamoksifen reseptör kompleksinin hTERT-5' regülatör bölgesindeki östrojen response elementine bağlanması sayesinde gerçekleşir (19).

## **2.7. Hücre Dizileri**

### **2.7.1. NIH3T3 Fibroblast Hücreleri**

NIH-3T3 fibroblast hücreleri, S.A. Aaronson tarafından stoklanan NIH Swiss fare embriyosundan elde edilen kontakt inhibisyona duyarlı adherent fibroblast hücrelerdir. Özellikle DNA transfeksiyonu ve transformasyon çalışmalarında kullanılmaktadır. Kültürdeki hücrelerin normal çalışması için haftada bir kez yüzeyi tamamen kaplamadan pasajlanmalıdır (96).

### **2.7.2. MCF-7 Meme adenokarsinomu**

Bu meme adenokarsinomu, C.M McGrath tarafından, 69 yaşında 0 Rh+ kan grubuna sahip Orta Asyalı bir kadından plevral efüzyon ile elde edilmiş, adherent epitelyal süt bezi adenokarsinomudur. MCF-7 hücreleri insülin growth faktör bağlama proteini (IGFBP)'nin BP-2, BP-4 ve BP-5 tiplerini üretir. MCF-7 hücreleri östrojen reseptörüne



bağımlı çalışır. Diğer deyişle, bunlar östrojen reseptör pozitifdir. MCF-7 hücrelerinin büyümesi Tümör Nekrozis Faktör-  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) tarafından baskılanır (13,92,103).

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1. Gereç**

##### **3.1.1. Hücre Dizileri**

Çalışmamızda kontrol olarak fare fibroblast hücresi NIH-3T3 ve insan meme kanser hücresi olarak MCF-7 hücre dizileri kullanıldı.

##### **3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler**

- Acrilamide (Sigma)
- Alkol
- Amonyum Persülfat (BIO-RAD)
- Bisacrilamide (Genaxis Biotechnology)
- Bovine İnsülin (Sigma)
- Distile su
- Disodyum bikarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (Merck)
- Dulbecco's Modification Eagles Medium-DMEM (Sigma)
- Dimetilsülfoksit-DMSO (Sigma)
- Etanol (Merck)
- Fetal Calf Serum (PAA)
- Formaldehit (Merck)

- Gümüş nitrat ( $\text{AgNO}_3$ )(Merck)
- Hank's Balanced Salt Solüsyonu-HBSS (Sigma)
- Kersetin (Sigma)
- Loading buffer (Sigma)
- Metil green
- Minimal Essential Medium-Eagle- MEM (Sigma)
- Natrium Hidrojen Fosfat. $2\text{H}_2\text{O}$  ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (Merck)
- Penicillin-Streptomycin solüsyonu (Sigma)
- % 0.9 Serum Fizyolojik
- Sodyum bikarbonat( $\text{NaHCO}_3$ ) (Merck)
- Sodyum hidroksit ( $\text{NaOH}$ ) (Riedel-deHaen)
- Sodyum pirüvat solüsyonu (Biological Industries)
- Steril bidistile su
- Redistile su
- TeloTAGGG<sup>PLUS</sup> PCR ELİSA Kit (Roche)
- Tamoksifen (Sigma)
- TBE
- TEMED (Sigma)

- Tripan Blue (Sigma)
- Tripsin-EDTA solüsyonu (Sigma)

### **3.1.3. Malzemeler ve Ayrıtlar**

- Buz üretme makinesi (Hoshizaki Fm-120 De K-O)
- Cam kalemi
- 2- 5 -10 ml cam pipet
- Canister
- Cryotüp
- Çok kanallı elektronik pipet (Eppendorf)
- -80 °C derin dondurucu
- Dikey elektroforez (UVP)
- 10 ml'lik enjektör
- Güç kaynağı (BOI-RAD)
- Hassas terazi (Precisa-125a)
- 25cm<sup>2</sup> hücre kültür flaskı (Orange Scientist)
- İverted mikroskop (Euromex)
- Karbondioksit inkübatörü (Heraeus)

- 24 kuyucuklu plakalar
- Lamel
- Maske
- 50-100-500-1000 ml mezür
- Mikroskop (Olympus)
- Mikrotiter plate
- Mikrotiter plate shaker (Heidolph Polymax 1040, Heidolph Titramax 100)
- Mikrotiter reader (Tka1 Teknolab A.S.S.I Srl)
- Multipette plus dağıtıcı pipet (Eppendorf)
- Neubauer lamı (Iso-Lab)
- Otoklavlanabilir 100 ve 250 ml cam şişe
- Otoklav
- Otomatik pipet
- Parafilm
- Ph metre (Nel)
- 15-50 ml santrifüj tüpü (Orange Scientist)
- Steril eldiven
- Steril kabin

- Steril pipet uçları (0,5-10, 2-20, 10-100 ve 200-1000 $\mu$ L'lik)
- Soğutmalı santrifüj (Heraeus Biofuge Stratos)
- Şırınga tipi uç (Combitips-Eppendorf)
- 37°C'lik su banyosu
- Tek kullanımlık 0,22  $\mu$  çaplı şırınga ucu filtre (Orange Scientist)
- Thermal cycler (Eppendorf)
- Vorteks mikser (Restch)
- Vial

### **3.2. Yöntem**

#### **3.2.1. Hücre Kültürü için Sterilizasyon**

Hücre kültüründe kullanılan tüm plastik malzemeler ve hazır haldeki steril medyumlar ticari firmalardan sağlandı. Cam malzemeler 160<sup>0</sup>C'de 60-90 dakika otoklavlandı. Tüm sıvı maddeler 0.22  $\mu$ m por büyüklüğündeki mikrobiyolojik filtrelerden süzülerek steril edildi. Steril kabin, 15 dakika ultraviyole ışık açılarak ve bunu takiben 15 dakika havalandırılarak steril edildi. Sterilize edilen kabine alınacak malzemeler ise %70 alkolle silinerek içeri alındı.

### **3.2.2. Hücre Dizileri ve Kültür Aşaması**

Ankara ŞAP enstitüsünden 25 cm<sup>2</sup> lik flask halinde alınan NIH-3T3 hücre dizileri rutin olarak, 100 ml besiyeri içinde, 10 ml Fetal Calf Serum, 4 ml 9.2 gr/ml Sodyum bikarbonat çözeltisi, 1 ml Penisilin/streptomisin solüsyonu destekli 10 ml 10x DMEM solüsyonu olacak şekilde %0.5 karbondioksitli ortamda yetiştirildi.

Yine Ankara ŞAP enstitüsünden 25cm<sup>2</sup> lik flask halinde alınan MCF-7 hücre dizileri rutin olarak, 100 ml besiyeri içinde, 10 ml Fetal Calf Serum, 1 ml 100 mM sodyum pirüvat, 2 ml 7.5 gr/ml Sodyum bikarbonat çözeltisi, 1mg/ml Bovine insülin destekli, 10 ml 10x MEM solüsyonu olacak şekilde %0.5 karbondioksitli ortamda yetiştirildi.

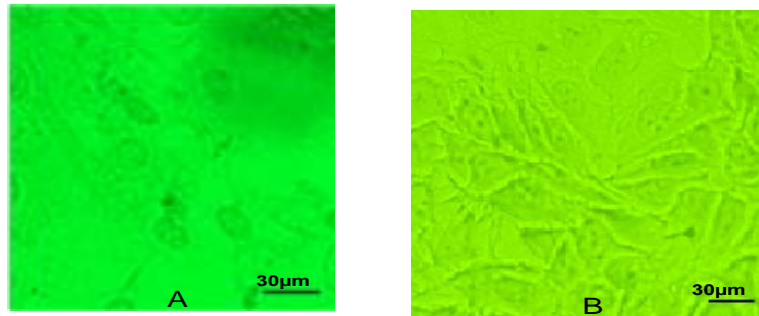
Her iki hücre dizisi ilk geldikleri gün, 37<sup>0</sup>C karbondioksitli etüvde 24 saatliğine dinlendirmeye bırakıldı. Bir sonraki gün kontaminasyon olup olmadığı kontrol edildi. 48 saat sonra flasktaki tüm besiyeri steril pipet yardımıyla çekildi. Besiyeri çekilmiş flasklara 37<sup>0</sup>C su banyosunda ısıtılan 1X'lik Tripsin-EDTA'dan 1-2 ml eklendi. Flasklara eklenen Tripsin-EDTA steril pipet yardımıyla çekildi. Tripsini çekilen flasklara yine aynı miktarda Tripsin-EDTA eklendi. Flasklar 5-7 dakika 37<sup>0</sup>C CO<sub>2</sub> etüvde bekletildi. Flask tabanına tutunmuş hücrelerin birbirlerinden ayrılmaları inverted mikroskop ile kontrol edildi. Kalkan hücreler, önceden hazırlanmış içinde 3ml. besiyeri bulunan steril santrifüj tüplerine steril pipet yardımıyla aktarıldı. 125g'de oda ısısında 10-15 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan süpernatant atıldı. Dipte kalan hücrelerle birlikte 0.5 ml. sıvı steril pipet yardımıyla alınarak, önceden içlerine 4 ml. besiyeri konmuş flasklara (hücrenin yoğunluk durumuna göre 2-4 flask) dağıtıldı.

### **3.2.3. Hücrelerin Deney için Hazırlanması**

Hücreler deney için flask içinde yeterli sayıya eriştiklerinde (**Şekil 3.1**), tripsinlenerek toplandı. Tripkan Blue boyama yöntemi yardımı ile Neubauer lamında sayılarak, 200.000 hücre olacak şekilde hazırlandı. Hücreler santrifüj edildi. NIH-3T3 ve MCF-7 hücre dizilerinde ilaçsız, çözücü, kersetin ve tamoksifenin 10, 50, 100  $\mu$ M dozlarını uygulamak üzere, ilaçsız, çözücü ve her grupta denenecek her üç doz için 3'er adet olmak üzere, 24 kuyucuklu plakalara ekildi. Hücreler yapışmaları için 24 saat bekletildi. 24 saat sonunda hücrelerin üzerindeki besiyerleri ters çevrilerek uzaklaştırıldı. Çözücü grubuna besiyerinde DMSO oranı %0.1-0.2'yi geçmeyecek şekilde taze besiyeri verilirken, ilaç verilecek grupların üzerine test maddelerinin istenen konsantrasyonlarını içeren taze besiyerleri verildi. Çözücü grubuna verilen DMSO oranı hücrelerin büyümesini etkilemeyecek değerdedir.

İlaç grupları besiyerlerinin her bir ml.'sinde DMSO oranı %0.1-0.2 geçmeyecek ve besiyerinin her bir ml.sinde ilaç konsantrasyonları 10, 50, 100  $\mu$ M olacak şekilde hazırlandı.

İlaç verildikten 48 ve 72 saat sonra hücreler tripsin ile kaldırılarak, hücre sayımları, Tripkan Blue boyama yöntemi yardımıyla, Neubauer lamında yapıldı. Alınan hücre süspansiyonlarında 48 ve 72 saat sonra telomeraz aktivitesini ölçmek için, 1 ml.'sinde 200.000 hücre olacak şekilde hücreler temiz eppendorf tüplerine aktarıldı. Ve telomeraz aktivitesi  $\text{TeloTAGG}^{\text{PLUS}}$ -PCR ELİSA kiti ile ölçüldü.



**Şekil 3.1.** Flask tabanına tutunmuş NIH-3T3 (A) ve MCF-7 (B) hücre dizilerinin görüntüsü (Filtreli)



### **3.3. TeloTAGG<sup>PLUS</sup>-PCR ELİSA Kit İçeriği**

Çalışmamızda kullandığımız kit içeriği **Çizelge 3.1**'de verilmiştir.

**Çizelge 3.1** Telomeraz PCR-ELİSA Kiti içeriği

<b>Solüsyon</b>	<b>Solüsyonun içeriği, Kullanım Amacı</b>
Lizis Reagent Solüsyon 1	11 ml, Kullanıma hazır solüsyon  Doku örnekleri ve hücre kültürlerinden hücre ekstraktlarının hazırlanması için kullanılır.
Reaksiyon karışımı Solüsyon 2	2x900 µl, Kullanıma hazır solüsyon, 2x solüsyon  Telomeraz substratı olan biotinle işaretlenmiş P1-TS primerini, optimize edilmiş bağlayıcı P2 primerini, nükleotidleri ve taq polimerazı içerir.  Telomeraz aracılı uzama ve PCR amplifikasyonu için kullanılır.
İnternal standart (IS) Solüsyon 3	350 µl, Kullanıma hazır solüsyon  213bp'lik bir internal standart (IS) DNA, 0.001 amol/µl içerir.  İnternal amplifikasyon standardı olarak kullanılır.  Amplifikasyon sürecinin inhibitörlerini ortaya çıkarır.
Kontrol kalıp (template), düşük Solüsyon 4	35 µl, 0.001 amol/µl, Kullanıma hazır solüsyon  8 telomerik tekrarlı (TS8) bir telomeraz ürünü olarak aynı dizili bir pozitif kontrol kalıp DNA içerir.
Kontrol kalıp (template),yüksek Solüsyon 5	35 µl, 0.1 amol/µl, Kullanıma hazır solüsyon  8 telomerik tekrarlı (TS8) bir telomeraz ürünü olarak aynı dizili bir pozitif kontrol kalıp DNA içerir.
Nükleazsız su Solüsyon 6	2x1.1 ml  İki kere distile edilmiş, nükleazsız su içerir.
Denaturasyon reagent Solüsyon 7	1.2 ml, Kullanıma hazır solüsyon  %.0.5'den daha az sodyum hidroksit içerir.  Amplifikasyon ürünlerini denature etmek için kullanılır.

Hibridizasyon buffer T Solüsyon 8	7 ml., Kullanıma hazır solüsyon  Telomerik tekrar dizilerine komplementer olan DIG (digoxigenin) ile işaretlenmiş bir prob içerir.  Telomeraz aracılı amplifikasyon ürünlerinin spesifik tayini için kullanılır.
Hibridizasyon buffer IS Solüsyon 9	3.5 ml, Kullanıma hazır solüsyon  İnternal standarta komplementer olan DIG (digoxigenin) ile işaretlenmiş bir prob içerir.  Telomeraz aracılı amplifikasyon ürünlerinin spesifik tayini için kullanılır.
Yıkama Buffer Solüsyon 10	50 ml  10x konsantrasyondur
Anti-DIG-HRP (Anti-digoxigenin-Horseradish Peroksidaz) Solüsyon 11	120mU  Poliklonal koyun antikoru olup, liyofilize edilerek stabil hale getirilmiştir.  Konjugat solüsyonunu hazırlamak için kullanılır.
Konjugat dilüsyon Buffer Solüsyon 12	12 ml, Kullanıma hazır solüsyon  Konjugat çalışma solüsyonunu hazırlamak için kullanılır.
TMB Substrat solüsyonu Solüsyon 13	12 ml, Kullanıma hazır solüsyon  3.3',5,5'-tetrametil benzidin içerir.
Stop reagent Solüsyon 14	12 ml, Kullanıma hazır solüsyon  %5'den daha az sülfirik asit içerir.
Mikrotiter plate	1 plate, 12x8 gözlüdür, Kullanıma hazırdır.  Önceden streptavidin ile kaplanmıştır.

### **3.3.1. Hücre Ekstraktının Hazırlanması**

1. Hücreler tripsin ile kaldırılarak, Neubauer lamı ile sayıldı.
2.  $2 \times 10^5$  hücre temiz bir ependorf tüpüne alındı.
3. 3000 g'de  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 5 dakika santrifüj edildi.
4. Süpernatant atıldı.
5. Pellet üzerine 200  $\mu\text{l}$  PBS (pH.7.4) eklendi.
6. 3000xg'de  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 5 dakika santrifüj edildi.
7. Süpernatant atıldı.
8. Buz üzerinde en az 3 kez pipetleme yapıldı.
9. 30 dakika buz üzerinde inkübe edildi.
10. 16.000xg'de  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 20 dakika santrifüj edildi.
11. Süpernatantın 175  $\mu\text{l}$ 'si yeni bir ependorf tüpüne kondu.

### **3.3.2.Negatif Kontrolün Hazırlanması**

1. Elde edilen hücre ekstraktından (telomeraz aktivitesi içeren) başka bir tüpe 5 $\mu\text{l}$  alındı.
2. Bu tüp,  $85^{\circ}\text{C}$ 'de 10 dakika etüvde inkübe edildi.
3. TRAP/ELİSA uygulaması için 2  $\mu\text{l}$  hücre ekstraktı ayrıldı.

### **3.3.3. Pozitif Kontrolün Hazırlanması**

Pozitif kontrol olarak kit içinde verilen kullanıma hazır solüsyon 5 kullanıldı (solüsyon 4'de kullanılabilir).

### **3.3.4. TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol) Prosedürü**

Tüm işlemler buz üzerinde yapıldı.

#### **3.3.4.1. Normal Örnek Tüpünün Hazırlanması**

- Uygun bir PCR tüpüne 25 µl reaksiyon karışımı (solüsyon 2) kondu.
- 5 µl internal standart (solüsyon 3) kondu.
- 17 µl nükleazsız su (solüsyon 6) kondu.
- Hazırlanan bu karışıma 3 µl örnek (hücre ekstraktı) kondu.

#### **3.3.4.2. Negatif Kontrol Tüpünün Hazırlanması**

- Uygun bir PCR tüpüne 25 µl reaksiyon karışımı (solüsyon 2) kondu.
- 5 µl internal standart (solüsyon 3) kondu.
- 18 µl nükleazsız su (solüsyon 6) kondu.
- Hazırlanan bu karışıma 2 µl ısı ile muamele edilmiş örnek (hücre ekstraktı) kondu.

#### **3.3.4.3. Pozitif Kontrol Örnek Tüpünün Hazırlanması**

- Uygun bir PCR tüpüne 25 µl reaksiyon karışımı (solüsyon 2) kondu.
- 5 µl internal standart (solüsyon 3) kondu.
- 19 µl nükleazsız su (solüsyon 6) kondu.
- Hazırlanan bu karışıma 1 µl kontrol template (solüsyon 5) kondu (solüsyon 4'te kullanılabilir).

#### **3.3.4.4. Lizis Bufferlı Tüpün Hazırlanması**

- Uygun bir PCR tüpüne 25 µl reaksiyon karışımı (solüsyon 2) kondu.
- 5 µl internal standart (solüsyon 3) kondu.
- 19 µl nükleazsız su (solüsyon 6) kondu.
- Hazırlanan bu karışıma 1 µl lizis solüsyonu (solüsyon 1) kondu.

Yukarıda hazırlanan PCR tüplerinin hepsi thermal cyclers'a yerleştirilerek **Çizelge 3.2**'de verilen protokole göre amplifikasyon ürünü (PCR ürünü) elde edildi.

**Çizelge 3.2.** Amplifikasyon ürünü elde etme programı

<b>Adım</b>	<b>Zaman</b>	<b>Sıcaklık (+)</b>	<b>Devir sayısı</b>
<b>1. Primer uzaması</b>	30 dakika	25 <sup>0</sup> C	
<b>2. Telomeraz inaktivasyonu</b>	5 dakika	94 <sup>0</sup> C	
<b>3. Amplifikasyon</b>			30
Denaturasyon	30 saniye	94 <sup>0</sup> C	
Annealing	30 saniye	50 <sup>0</sup> C	
Polimerizasyon	90 saniye	72 <sup>0</sup> C	
Son uzatma	10 dakika	72 <sup>0</sup> C	
<b>4. Bekletme</b>		4 <sup>0</sup> C	

### **3.3.5. PCR'in Kontrolü**

PCR reaksiyonunun doğruluğu, poliakrilamid jel elektroforezi yapılarak kontrol edildi.

### **3.3.5.1. Poliakrilamid Jel Hazırlanması için Gerekli Solüsyonlar**

#### **➤ 10X Tris-Borat Tamponu (TBE):**

- 50 gr Borik Asit
- 108 gr Tris bazı
- 40 ml 0.5 M EDTA, pH: 8.0 olacak şekilde kondu.
- Distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.
- Manyetik karıştırıcıda karıştırıldı.

#### **➤ %30'luk Poliakrilamid Jel:**

- 10 ml Akrilamid/ Bisakrilamid (29:1)
- 12.35 ml distile su
- 2.5 ml 10X TBE
- 175 µl %25'lik Amonyum Persülfat
- 8.5 µl TEMED olacak şekilde mezür içine kondu.

### **3.3.5.2. Poliakrilamid Jel Elektroforez Yöntemi**

%30'luk poliakrilamid jel çözeltisi hazırlandıktan sonra 1.5 mm kalınlığında olacak şekilde jel tabağına döküldü. Çözelti donmadan önce üzerine 12 dişli tarak yerleştirildi. Jel donduktan sonra 1x TBE tamponu bulunan dikey elektroforez tankına yerleştirildi. 10 µl PCR ürünü poliakrilamid jel kuyucuklarına yüklendi ve dikey

elektroforezde 120V'ta 1.5 saat yürütüldü. Bunu takiben gümüş boyama yöntemi ile bantlar görünür hale getirildi.

### **3.3.5.3. Gümüş Boyama Yönteminde Kullanılan Solüsyonlar**

- %10 Etanol
- %5 Asetik asit
- %0.1 AgNO<sub>3</sub>
- %1.5 NaOH
- 150 µl formaldehit (%30'luk stok)
- %0.75 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

### **3.3.5.4. Gümüş Boyama Prosedürü**

Dikey elektoroforezde yürütülen poliakrilamid jel aşağıda verilen solüsyon serilerinden sırası ile geçirilerek boyandı.

1. %10 Etanol+ %5 Asetik asit (v/v) 6 dakika
2. % 0.1 AgNO<sub>3</sub> 15 dakika
3. %1.5 NaOH 30 dakika
4. %1.5 NaOH+ 150 µl formaldehit bantlar oluşuncaya kadar bekletildi.
5. %0.75 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solüsyonunda yıkandı.



6. Görünür ışık altında değerlendirildi.

### **3.3.6. Hibridizasyon ve ELİSA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)**

#### **Prosedürü**

1. Pozitif kontrol, lizis bufferlı pozitif kontrol, IS'li pozitif kontrol, her bir örnek, her örneğin negatif kontrolleri ve IS'li örnek için birer tane denatürasyon tüpü hazırlandı. Bu tüplere öncelikle 10 µl denatürasyon solüsyonu (solüsyon 7) ilave edildi.
2. Hazırlanan denatürasyon tüplerine sırasıyla;
  - Normal pozitif kontrol için hazırlanan denatürasyon tüpüne pozitif kontrolün amplifikasyon ürününden 2.5 µl ilave edildi.
  - Lizis buffer için hazırlanan denatürasyon tüpüne lizis buffer amplifikasyon ürününden 2.5 µl ilave edildi.
  - IS'li pozitif kontrol için hazırlanan denatürasyon tüpüne pozitif kontrolün amplifikasyon ürününden 2.5 µl ilave edildi.
  - Örnek için hazırlanan denatürasyon tüpüne örneğin amplifikasyon ürününden 2.5 µl ilave edildi.
  - Negatif kontrol için hazırlanan denatürasyon tüpüne negatif kontrol amplifikasyon ürününden 2.5 µl ilave edildi.
  - IS'li örnek için hazırlanan denatürasyon tüpüne örneğin amplifikasyon ürününden 2.5 µl ilave edildi.
3. Tüm tüpler oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi

4. Pozitif kontrol, lizis bufferlı tüp, normal örnekler ve negatif örneklerin bulunduğu tüplere 100 µl hibridizasyon buffer T (solüsyon 8) kondu.
5. İnternal standartlı örnek ve internal standartlı pozitif kontrol tüpüne ise 100 µl hibridizasyon buffer IS (solüsyon 9) kondu.
6. Kısa süreli olarak vortekslendi.
7. Her bir tüpten MTP'nin bir gözüne karışımın 100 µl'si kondu.
8. Buharlaşmayı önlemek için kendi yapışıcı bandı ile gözler kapatıldı.
9. MTP, 37<sup>0</sup>C'de shakerda 300 rpm'de 2 saat inkübe edildi.
10. Hibridizasyon solüsyonunun tamamı dökülerek uzaklaştırıldı ve ters şekilde kurutma kağıdına kuvvetlice vurularak iyice kuruması sağlandı.
11. Her bir göze 250 µl yıkama solüsyonu (solüsyon 10) ilave edildi ve en az 30 saniye sonra dökülerek uzaklaştırıldı. Bu işlem 3 kez yapıldı.
12. Her bir göze 100 µl Anti-DIG-HRP çalışma solüsyonu (solüsyon 11) ilave edildi.
13. MTP gözleri kendi yapışıcı bandı ile örtüldü.
14. Oda sıcaklığında 300 rpm'de 30 dakika shaker'da inkübe edildi.
15. MTP gözlerindeki solüsyonun tamamı uzaklaştırıldı.
16. Her bir göze 250 µl yıkama solüsyonu (solüsyon 10) ilave edildi ve en az 30 saniye sonra dökülerek uzaklaştırıldı. Bu işlem 5 kez tekrarlandı.
17. Her bir göze 100 µl TMB substrat solüsyonu (solüsyon 13) ilave edildi.
18. MTP gözleri kendi yapışkan bandı ile örtüldü ve renk gelişimi için oda sıcaklığında 300 rpm'de 15 dakika shaker'da inkübe edildi.

19. Substrat atılmaksızın renk gelişimi durdurmak için her bir göze 100 µl stop solüsyonu (solüsyon 14) ilave edildi. (stop solüsyonu ilave edilince HRP substrat etkileşimi ile maviden sarıya doğru bir renk değişimi görüldü.)
20. Bir mikrotiter plate okuyucu kullanarak, stop solüsyonunun (solüsyon 14) ilavesinden sonra 30 dakika içinde referans dalga boyu 650 nm olmak üzere 450 nm'de absorbans değeri her örnek için okundu.

### **3.3.7. Hesaplama**

Deneylerde farklı örneklerin telomraz aktivitesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

$$RTA = \frac{(A_S - A_{S,0}) / A_{S,IS}}{(A_{TS8} - A_{TS,0}) / A_{TS8,IS}} \times 100$$

$A_S$  : Örneğin absorbansı

$A_{S,0}$  : Isı ile muamale edilmiş örneğin absorbansı

$A_{S,IS}$  : Örneğin internal standartının absorbansı

$A_{TS8}$  : Kontrol kalıp absorbansı

$A_{TS,0}$  : Lizis solüsyonunun absorbansı

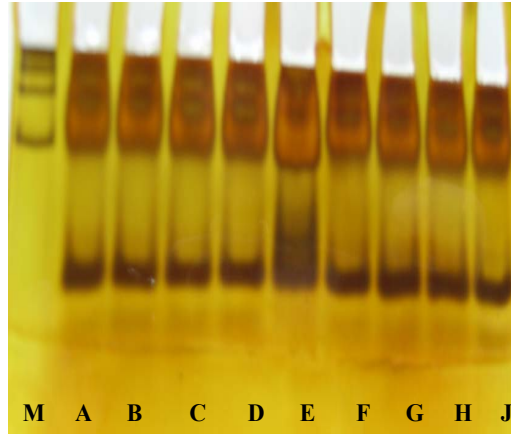
$A_{TS8,IS}$  : Kontrol kalıp internal standartın absorbansı

### **3.4. İstatistiksel Değerlendirme**

Sonuçlar istatistiksel olarak, ikili karşılaştırmalar student-t testi, ikiden fazla karşılaştırmalar ise tek yönlü varyans (One Way ANOVA) testi uygulanarak karşılaştırıldı. Çoklu karşılaştırmalar,  $p < 0.05$  olarak alınıp, Holm-Sidak metodu ile Biyoistatistik Anabilim Dalı tarafından değerlendirildi.

#### 4.BULGULAR

Çalışmamızda, MCF-7 ve NIH-3T3 hücre kültürlerinden elde edilen hücre ekstraktlarına, TeloTAGGG<sup>PLUS</sup> PCR-ELİSA kitindeki metoda uygun olarak PCR işlemi uygulandı. Sonra gümüş boyama yöntemi ile bantlar görünür hale getirildi ve fotoğrafı çekildi (Şekil 4.1).



**Şekil 4.1.** Poliakrilamid jel elektroforez görüntüsü M: Marker; A: NIH-3T3, 10  $\mu$ M kersetin; B: NIH-3T3, 10  $\mu$ M tamoksifen; C: NIH-3T3, ilaçsız kontrol; D: NIH-3T3 çözücü kontrol E: Pozitif kontrol; F: MCF-7, 10  $\mu$ M kersetin;, G: MCF-7, 10  $\mu$ M tamoksifen; H: MCF-7, ilaçsız kontrol, J: MCF-7, çözücü kontrol.

PCR reaksiyonunun gerçekleştiğinden emin olduktan sonra TeloTAGGG<sup>PLUS</sup> PCR-ELİSA kit yöntemine uygun olarak, oluşturulan her gruptan 3'er örneğin telomeraz enzim aktivitesi ölçüldü. Bu gruplar; ilaçsız (madde verilmeyen), çözücü (kersetin ve tamoksifen için çözücü olarak kullanılan DMSO), kersetin ve tamoksifen grubu olarak belirlendi.

Bunlardan kersetin ve tamoksifenin 10, 50, 100  $\mu$ M dozları her iki hücre dizisine de ayrı ayrı uygulandı.

**Çizelge 4.1.**'de NIH-3T3 hücre dizileri ile ilgili olarak, 48 ve 72 saat sonraki telomeraz aktiviteleri görülmektedir.

**Çizelge 4.1.** NIH-3T3 hücre dizilerinde saat ve ilaçlara göre grupların telomeraz aktiviteleri

NIH-3T3 hücre dizilerinde telomeraz aktivitesi				
İlaç ve doza ( $\mu$ M) göre grup			Grup içi istatistik	
	48.saat	72.saat	48. saat	72.saat
İlaçsız (İ)	6.316 $\pm$ 1.113	5.537 $\pm$ 0.677		
Çözücü (Ç)	5.765 $\pm$ 1.035	4.433 $\pm$ 1.293		
Kersetin (K)	10	0.674 $\pm$ 0.043	0.469 $\pm$ 0.003	K <sub>10</sub> -K <sub>50</sub> n.s K <sub>10</sub> -K <sub>100</sub> n.s K <sub>50</sub> -K <sub>100</sub> n.s
	50	0.544 $\pm$ 0.076	0.516 $\pm$ 0.054	
	100	0.673 $\pm$ 0.041	0.521 $\pm$ 0.018	
Tamoksifen (T)	10	0.653 $\pm$ 0.03	0.510 $\pm$ 0.017	T <sub>10</sub> -T <sub>50</sub> n.s T <sub>10</sub> -T <sub>100</sub> n.s T <sub>50</sub> -T <sub>100</sub> n.s
	50	0.633 $\pm$ 0.025	0.65 $\pm$ 0.017	
	100	0.557 $\pm$ 0.021	0.402 $\pm$ 0.046	
Gruplar arası istatistik	İ-Ç n.s İ-K <sub>10</sub> (p<0.001) İ-K <sub>50</sub> (p<0.001) İ-K <sub>100</sub> (p<0.001) İ-T <sub>10</sub> (p<0.001) İ-T <sub>50</sub> (p<0.001) İ-T <sub>100</sub> (p<0.001)		İ-Ç n.s İ-K <sub>10</sub> (p<0.001) İ-K <sub>50</sub> (p<0.001) İ-K <sub>100</sub> (p<0.001) İ-T <sub>10</sub> (p<0.001) İ-T <sub>50</sub> (p<0.001) İ-T <sub>100</sub> (p<0.001)	
	K <sub>10</sub> -T <sub>10</sub> n.s K <sub>50</sub> -T <sub>50</sub> n.s K <sub>100</sub> -T <sub>100</sub> n.s		K <sub>10</sub> -T <sub>10</sub> n.s K <sub>50</sub> -T <sub>50</sub> n.s K <sub>100</sub> -T <sub>100</sub> n.s	

n.s: not significant

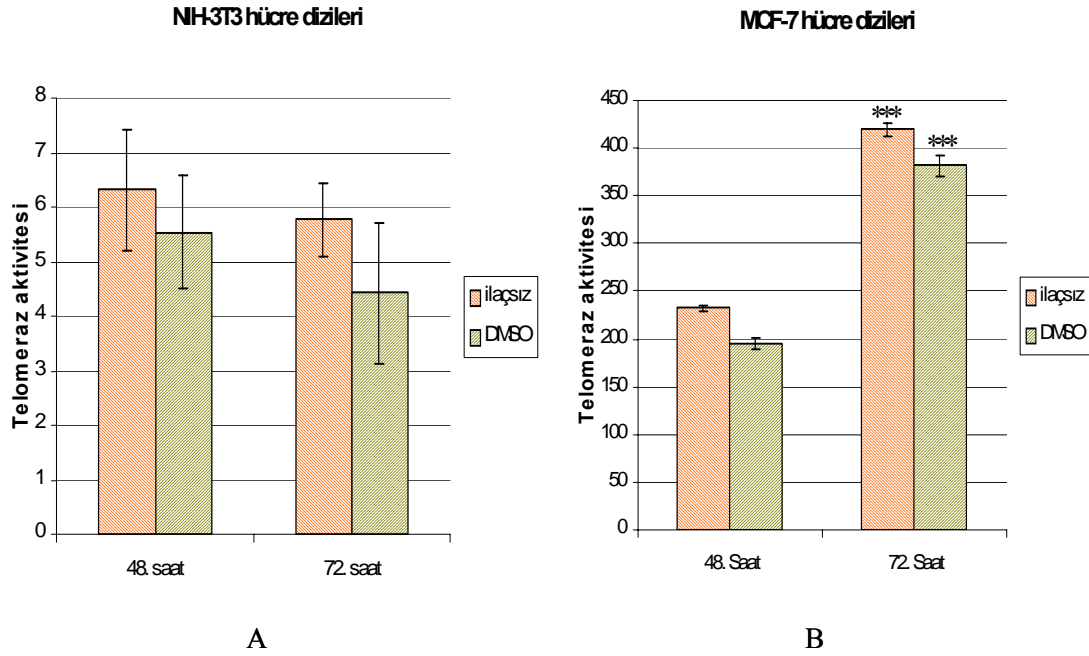
Çizelge 4.2’de MCF-7 hücre dizileri ile ilgili olarak, 48 ve 72 saat sonraki telomeraz aktiviteleri görülmektedir.

Çizelge 4.2. MCF-7 hücre dizilerinde saat ve ilaçlara göre grupların telomeraz aktiviteleri

<b>MCF-7 hücre dizilerinde telomeraz aktivitesi</b>					
<b>İlaç ve doza (µM) göre grup</b>			<b>Grup içi istatistik</b>		
	48.saat	72.saat	48. saat		72.saat
İlaçsız (İ)	232.11±2.352	419.90±6.943			
Çözücü (Ç)	194.476±5.917	381.36±11.561			
Kersetin (K)	10	20.534±0.967	1.854±0.755 ***	K <sub>10</sub> -K <sub>50</sub> n.s	K <sub>10</sub> -K <sub>50</sub> *** p<0.001
	50	16.580±1.280	6.707±0.563***	K <sub>10</sub> -K <sub>100</sub> **p<0.01	K <sub>10</sub> -K <sub>100</sub> *** p<0.001
	100	12.712±1.073 **	11.150±2.355***	K <sub>50</sub> -K <sub>100</sub> n.s	K <sub>50</sub> -K <sub>100</sub> *** p<0.001
Tamoksifen (T)	10	5.267±0.591	1.268±0.287	T <sub>10</sub> -T <sub>50</sub> n.s	T <sub>10</sub> -T <sub>50</sub> n.s
	50	4.724±0.688	0.830±0.142 **	T <sub>10</sub> -T <sub>100</sub> *p<0.05	T <sub>10</sub> -T <sub>100</sub> **p<0.01
	100	3.512±0.456*	0.251±0.090**	T <sub>50</sub> -T <sub>100</sub> n.s	T <sub>50</sub> -T <sub>100</sub> **p<0.01
<b>Gruplar arası istatistik</b>	İ-Ç n.s İ-K <sub>10</sub> p<0.001 İ-K <sub>50</sub> p<0.001 İ-K <sub>100</sub> p<0.001 İ-T <sub>10</sub> p<0.001 İ-T <sub>50</sub> p<0.001 İ-T <sub>100</sub> p<0.001  K <sub>10</sub> -T <sub>10</sub> p<0.001 K <sub>50</sub> -T <sub>50</sub> p<0.001 K <sub>100</sub> -T <sub>100</sub> p<0.05		İ-Ç n.s İ-K <sub>10</sub> p<0.001 İ-K <sub>50</sub> p<0.001 İ-K <sub>100</sub> p<0.001 İ-T <sub>10</sub> p<0.001 İ-T <sub>50</sub> p<0.001 İ-T <sub>100</sub> p<0.001  K <sub>10</sub> -T <sub>10</sub> n.s K <sub>50</sub> -T <sub>50</sub> p<0.001 K <sub>100</sub> -T <sub>100</sub> p<0.001		

n.s: not significant

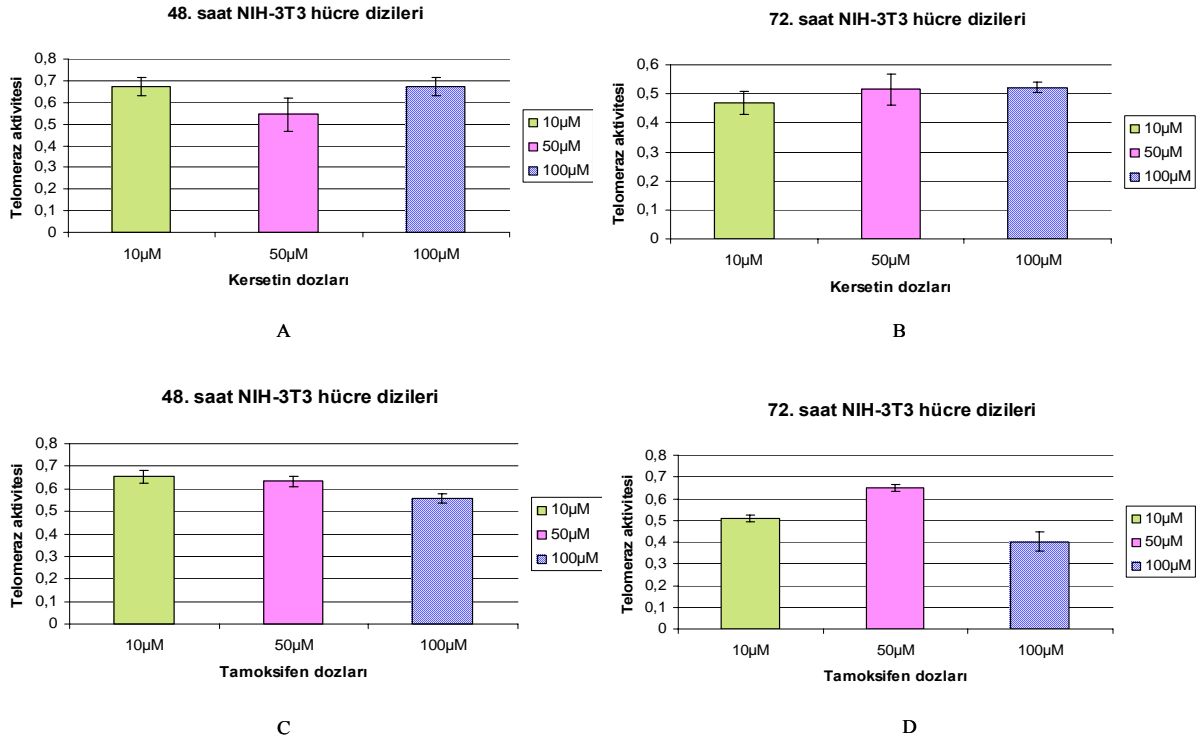
NIH-3T3 ve MCF-7 hücre dizilerinde, **Şekil 4.2 A ve B**'de görüldüğü üzere, ilaçsız çözücü gruplarının 48 ve 72 saat sonraki telomeraz aktiviteleri arasında bir fark görülmedi ( $p>0.05$ ). Buna karşılık, MCF-7 hücre dizilerinin 48 ve 72 saat grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında her iki grupta da telomeraz aktivitesinin 72. saatte önemli derecede artmış olduğu belirlendi ( $***p<0.001$ ).



**Şekil 4.2.** NIH-3T3 ve MCF-7 hücrelerinin ilaçsız ve çözücü kontrol gruplarının, 48 ve 72 saat sonra telomeraz aktiviteleri ( $***p<0.001$ , student t test)



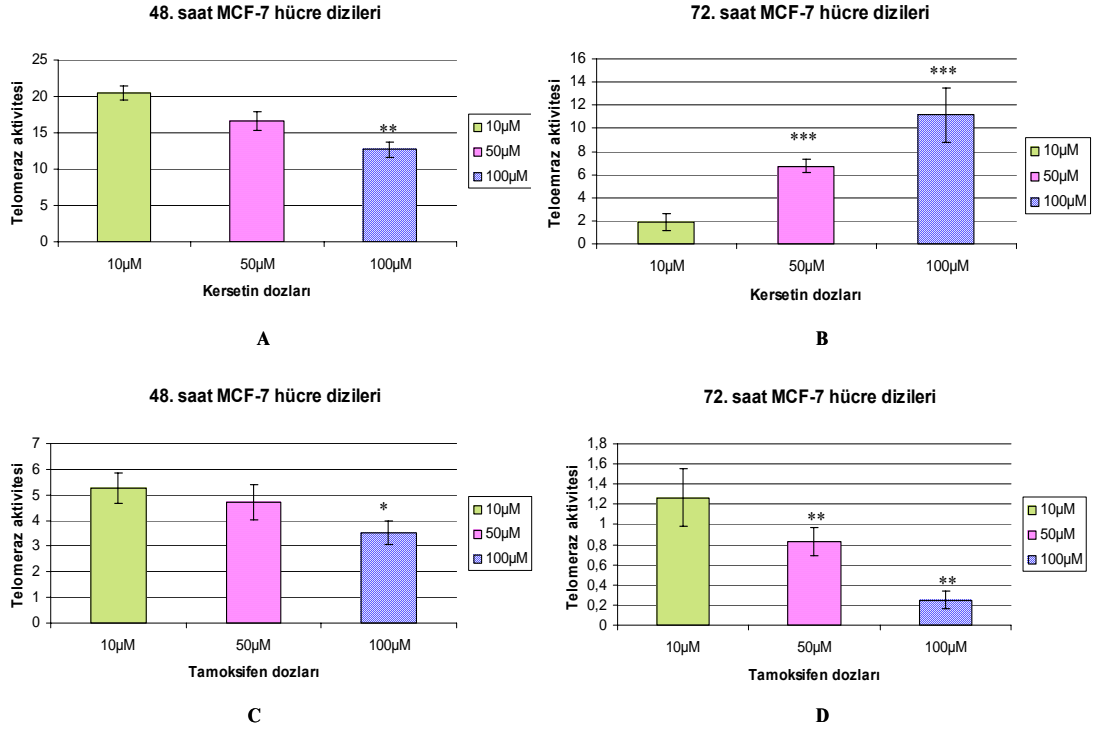
NIH-3T3 hücre dizilerine, **Şekil 4.3 A,B,C,D** ve **Çizelge 4.1**'de görüldüğü üzere, kersetin ve tamoksifenin 10, 50, 100  $\mu\text{M}$  dozları, 48 ve 72 saat sonra telomeraz aktivitesi üzerine istatistiksel olarak anlamlı etki göstermedi ( $p>0.05$ ).



**Şekil 4.3.** NIH-3T3 hücre dizilerine, 10, 50, 100  $\mu\text{M}$  kersetin ve tamoksifen uygulandıktan 48 ve 72 saat sonra, telomeraz aktivitelerine olan etkileri (ANOVA  $p>0.05$ )

MCF-7 hücre dizilerinde, 48 saat sonra 100  $\mu\text{M}$  kersetin, 10  $\mu\text{M}$  kersetine göre telomeraz aktivitesini istatistiksel olarak anlamlı düşürdü ( $p<0.01$ ) (**Şekil 4.4 A**). Buna karşılık, 72 saat sonra 10  $\mu\text{M}$  kersetin, 50 ve 100  $\mu\text{M}$  kersetine göre, telomeraz aktivitesini istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı düşürdü ( $p<0.001$ ). Ayrıca 50  $\mu\text{M}$  kersetinin de,

100 µM kersetine göre telomeraz aktivitesini istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı düşürdüğü belirlendi ( $p<0.001$ ) (Şekil 4.4 B). 48 saat sonra 100 µM tamoksifen, sadece 10 µM tamoksifene göre, telomeraz aktivitesini istatistiksel olarak anlamlı düşürdü ( $p<0.05$ ) (Şekil 4.4 C). 72 saat sonraki 50 ve 100 µM tamoksifenin, 10 µM tamoksifene göre, telomeraz aktivitesini istatistiksel olarak önemli derecede düşürdüğü belirlendi ( $p<0.01$ ). Ayrıca 100 µM tamoksifen de 50 µM tamoksifene göre, telomeraz aktivitesini, istatistiksel açıdan önemli derecede düşürdü ( $p<0.01$ ) (Şekil 4.4 D).

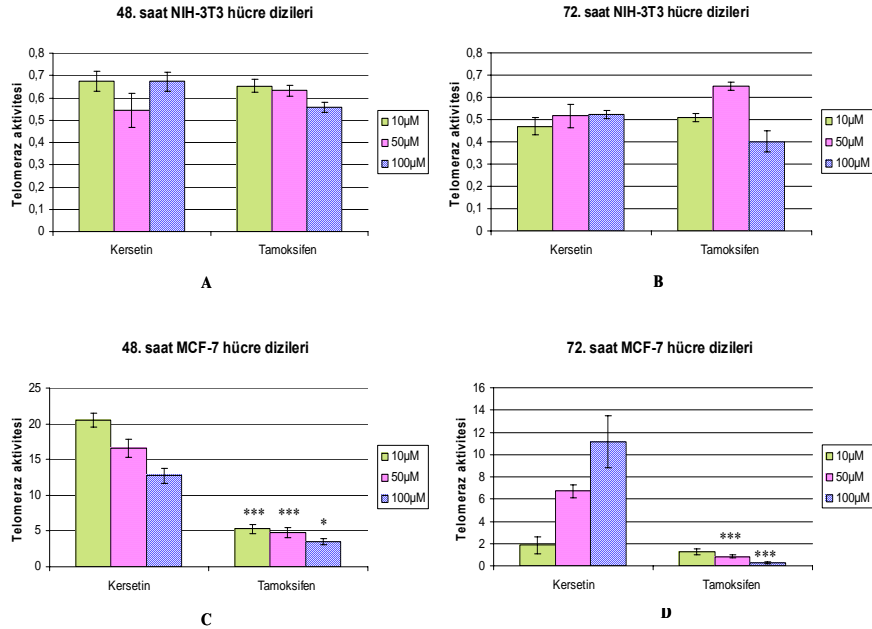


**Şekil 4.4.** MCF-7 hücre dizilerine 10, 50, 100 µM doz kersetin ve tamoksifen uygulandıktan 48 ve 72 saat sonra, telomeraz aktivitelerine olan etkileri (ANOVA \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$  )

Araştırmamızın amacı olan, iki farklı maddenin ayrı ayrı her üç dozunun, hücre dizilerinin telomeraz aktivitelerine olan etkileri Şekil 4.5’de görülmektedir.

NIH-3T3 hücre dizilerinde, 10, 50, 100  $\mu\text{M}$  kersetin ve tamoksifen dozları 48 ve 72 saat sonra kendi aralarında telomeraz aktivitesi yönünden istatistiksel bir değişiklik göstermedi ( $p>0.05$ ) (Şekil 4.5 A,B).

MCF-7 hücre dizilerinde 48 saat sonra kersetin dozlarına göre tamoksifenin 10, 50, 100  $\mu\text{M}$  dozları, telomeraz aktivitesini istatistiksel olarak önemli derecede düşürdü ( $p<0.001$ ,  $p<0.001$ ,  $p<0.05$ ) (Şekil 4.5 C). MCF-7 hücre dizilerinde 72 saat sonra 10  $\mu\text{M}$  kersetin ve tamoksifen dozları arasında istatistiksel olarak bir fark görülmezken ( $p>0.05$ ), kersetinin 50 ve 100  $\mu\text{M}$  dozlarına göre, tamoksifenin aynı dozları telomeraz aktivitesini istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı düşürdü ( $p<0.01$ ,  $p<0.001$ ) (Şekil 4.5 D).

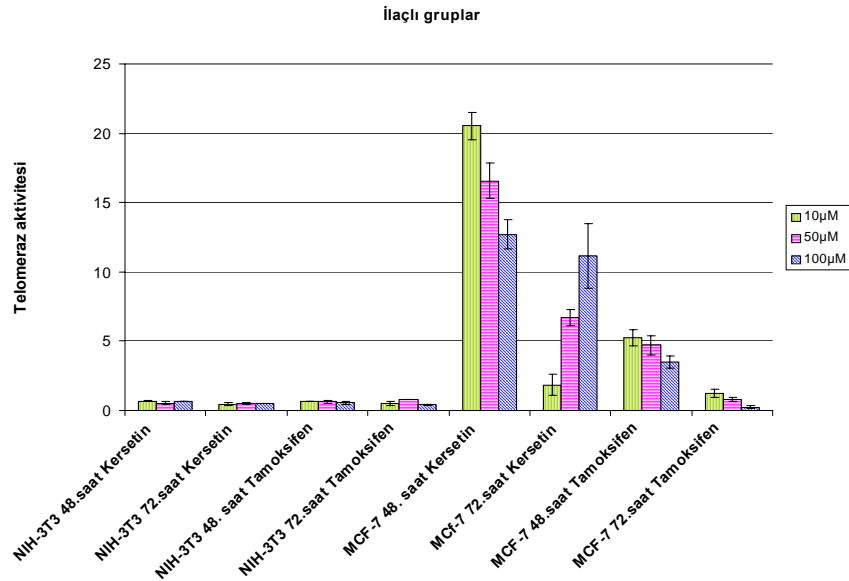


**Şekil 4.5.** NIH-3T3 ve MCF-7 hücre dizilerine 10, 50, 100  $\mu\text{M}$  doz kersetin ve tamoksifen uygulandıktan 48 ve 72 saat sonra, telomeraz aktivitesine olan etkilerinin karşılaştırılması (student t testi \* $p<0.05$ , \*\*\* $p<0.001$ ).

Şekil 4.6, Çizelge 4.3’de, 10, 50 ,100 µM dozlarında kersetin ve tamoksifen uygulanan NIH-3T3 ve MCF-7 hücre dizilerinde 48 ve 72 saat sonra telomeraz aktiviteleri topluca görülmektedir.

Çizelge 4.3 NIH-3T3 ve MCF-7 hücre dizilerinde telomeraz aktiviteleri

İlaça göre grup n=3		Hücre tipi			
		Normal hücre		Kanserli hücre	
Adı	Doz (µM)	NIH-3T3		MCF-7	
		Saat		Saat	
		48. saat	72. saat	48. saat	72. saat
İlaçsız(İ)	0	6.316±1.113	5.537±0.677	232.110±2.352	419.900±6.943
Çözücü (Ç)	0	5.765±1.035	4.433±1.293	194.476±5.917	381.36±11.561
Kersetin (K)	10	0.674±0.043	0.469±0.003	20.534±0.967	1.854±0.755
	50	0.544±0.076	0.516±0.054	16.580±1.280	6.707±0.563
	100	0.673±0.041	0.521±0.018	12.712±1.073	11.150±2.355
Tamoksifen (T)	10	0.653±0.03	0.510±0.017	5.267±0.591	1.268±0.287
	50	0.633±0.025	0.65±0.017	4.724±0.688	0.830±0.142
	100	0.557±0.021	0.402±0.046	3.512±0.456	0.251±0.090



Şekil 4.6. NIH-3T3 ve MCF-7 hücrelerinde 10, 50, 100 µM doz kersetin ve tamoksifen uygulandıktan 48 ve 72 saat sonra telomeraz aktiviteleri (ilaçsız ve çözücü grupları hariç)

## 5. TARTIŞMA

Yapılan bu çalışmada kersetinin, daha etkili olarak da tamoksifenin doz ve zamana bağlı olarak, östrojen reseptör pozitif meme kanser hücre dizileri (MCF-7)'nde telomeraz enzim aktivitesini önemli derecede düşürdüğü belirlendi.

Kersetinle ilişkili olarak, kolon karsinoma (HCT-116) ve osteokarsinoma (Saos-2) hücre dizileri ile yapılan çalışmada, 2 saat içinde 10 µM doz kersetinin, telomeraz aktivitesini düşürdüğü belirlenmiştir (84). Bu çalışma ile uyumlu olarak, bizim çalışmamızda da, 10 µM kersetinin MCF-7 hücrelerinde, 48 saat sonra telomeraz aktivitesini baskıladı.

İnsan kanser hücre dizilerinde, transkripsiyon faktör olan E2F1'in aşırı ekspresyonunun, hTERT mRNA ekspresyonu ve dolayısıyla telomeraz aktivitesinde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (27). Buna karşılık, Nair ve arkadaşlarının (2004) prostat kanser hücre dizileri ile yaptığı bir çalışmada, 25 µM doz kersetinin, E2F2 ve E2F3 transkripsiyon faktör genleri, D-tip siklin genleri (CCND1, CCND2 ve CCND3) ve hücre bölünme siklusu bağımlı kinaz genleri (CDK2, CDK4) üzerine baskılayıcı etkisi olduğu gösterilmiştir. Ayrıca S fazına özgü genlerden CDK8, hücre bölünme siklus 7 (CDC7L1), PCNA ve G2 spesifik gen CCNF üzerinde de baskılayıcı etkisinin varolduğu belirtilerek, özellikle 25 µM kersetinin M fazına özgü olan CDC2 ve CDC16 genlerini de belirgin şekilde baskıladığı belirtilmiştir. Aynı çalışmanın devamında, 25 µM kersetinin 24 saat sonunda, bazı tümör süpresör genleri %50 oranında upregüle ettiği de bildirilmiştir. Düzenlenen bu genler, insan siklik AMP response element bağlama proteini (CBP), fosfataz ve tensin homoloğu (PTEN), mutS homoloğu 2 (MSH2), siklin bağımlı kinaz inhibitörü 1A (p21, ciP1), CREB-bağlama proteini (p300), meme kanseri 1 erken başlangıç (BRCA1), nörofibromin 2 (NF2), tuberus sklerozis 1 (TSC1) ve transforming faktör β reseptör 1(TGF βR1, ALK-5) genleridir (85).

Tümör süpresör protein p53, çeşitli hücresel hasar uyarılarına cevap olarak, hücre siklusunu durdurur, apoptozu uyarır ve tümör oluşumunu baskılar. Bir transkripsiyon

faktörü olarak p53 hücre siklusu, farklılaşma, hücre yaşlanma ve apoptoz gibi olaylarda yer alan bir çok özel geni etkiler. Telomeraz aktivitesi bir çok kanser hücresinde upregüle iken, p53 inaktif haldedir. Son zamanlardaki çalışmalar p53'ün, hTERT'in transkripsiyonunu baskılayarak telomeraz aktivitesini düşürdüğünü göstermiştir (27,72,108). Ayrıca p21, E2F, p16 ve p15'in de telomeraz aktivitesini azalttığı gösterilmiştir (27). Bununla bağlantılı olarak, Nair ve arkadaşları prostat kanser hücre dizileri ile yaptıkları çalışmada, 24 saat sonunda kontrol hücrelerine göre 25  $\mu$ M kersetinin p53, adenomatosis poliposis coli (APC), transforming faktör  $\beta$  reseptör 2 (TGF  $\beta$ R2), retinoblastoma 1 (Rb), siklin bağımlı kinaz inhibitörü 1C (p57Kip2) ve tuberus sklerozis 2 (TSC-2) genlerini upregüle ettiğini göstermişlerdir. Ayrıca 25  $\mu$ M kersetinin, 24 saat sonunda CDK2 hücre siklusu genini downregüle ettiği belirtilmiştir (85).

Akciğer karsinoma (A549) ve küçük hücreli olmayan akciğer karsinoma (H1299) hücre dizileri ile yapılan başka bir çalışmada, A549 hücrelerinde, 24 saat sonunda 60  $\mu$ M kersetin, p21 ve fosforlu p53 protein seviyelerini arttırmıştır (66).

Nasofarangingial karsinoma hücre dizileri ile yapılan bir çalışmada da, 59.2  $\mu$ M kersetinin 24. saatte p53 ve fosforlu p53'ün seviyelerini etkilemediği ancak Rb proteinini artırdığı belirlenmiştir (88).

Deri tümör hücre dizisi (A431) ve meme tümör hücre dizisi (MCF-7) ile yapılan bir çalışmada, 20  $\mu$ M kersetin, 48. saatte MCF-7 hücrelerindeki büyümeyi en fazla oranda baskılamıştır (52).

Endometriyum kanser hücre dizisi (Ishikawa) ile yapılan bir çalışmada, 10, 50, 100  $\mu$ M dozlarındaki kersetin 7 gün boyunca uygulanmıştır. Kontrol hücrelerle karşılaştırıldığında, 7. gün sonunda uygulanan dozlar sırasıyla hücre büyümesini % 49,10 ve 13 oranında baskılamıştır (56).

Meme kanser hücre dizisi (MCF-7) ile yapılan başka bir çalışmada, bu hücre dizilerine 3 gün boyunca kersetinin 25, 50, 100  $\mu$ M dozları uygulanmış. 24 saat sonunda 50

$\mu\text{M}$  kersetin verilen hücrelerin, kontrol hücrelerine göre DNA sentezini  $\%34\pm3$  oranında azalttığı belirtilmiştir. Ayrıca, RNA sentezinin de kontrol hücrelerine göre,  $10 \mu\text{M}$  kersetin tarafından  $\%76\pm4$  oranında baskılandığı bildirilmiştir (96).

Kültüre edilen sıçan mezengiyal hücreler ile yapılan bir çalışmada, 4 gün boyunca verilen  $50 \mu\text{M}$  kersetinin, hücre sayısını, 2. gün  $0,99\pm0.03$ 'den  $0.21\pm0.01$ 'e, 3. gün  $1.43\pm0.03$ 'den  $0.27\pm0.09$ 'a, 4. gün ise  $2.68\pm0.08$ 'den  $0.39\pm0.02$ 'ye düşürdüğü gösterilmiştir. Ayrıca 24 saat sonunda, mitotik hücre miktarı, çözücü gruba göre,  $50 \mu\text{M}$  kersetinli grupta  $2.4\pm0.2$  (%)'den  $0.2\pm0.1$  (%)'e düştüğü de belirtilmiştir (54).

Wild tip ve varyant insan meme kanseri (MCF7wt ve MCF7SH) ve HeLa hücre dizileri ile yapılan bir çalışmada,  $100 \text{ nM}$  kersetin uygulanmış ve 6 gün sonra hücrelerin çoğalması incelenmiş. Sonuçta  $100 \text{ nM}$  gibi düşük konsantrasyondaki kersetinin, her iki hücre dizisinde, östrojen reseptör  $\alpha$  ve  $\beta$  için östrojen gibi davranarak hücre çoğalmasını sağladığı görülmüş. Buna karşın aynı zaman aralığında  $100 \mu\text{M}$  gibi yüksek konsantrasyondaki kersetinin hücrelere sitotoksik etki gösterdiği ileri sürülmüştür (75).

İnsan nasofranga kanser hücreleri (NPC-076) ile yapılan çalışmada,  $10 \mu\text{M}$  doz kersetinin, 48 saat sonra telomeraz aktivitesi üzerine etkisi olmadığı tesbit edilmiştir (63).

İnsan cholangiocarcinoma hücre dizileri (HuCC-T1) ile yapılan bir çalışmada,  $100 \mu\text{M}$  doz kersetinin 4 ve 24 saat sonunda, telomeraz enzim kompleksinde de bulunan Hsp90 ısı şoku proteinine bir etkisi olmadığı bildirilmiştir (64).

Malignant melonoma hücre dizileri MeWo ile yapılan başka bir çalışmada, 24 saat sonunda protein tirozin kinaz inhibitörü olan kersetinin  $100$  ve  $200 \mu\text{M}$  dozlarının hTERT mRNA'sını baskılamadığı bildirilmiştir (51). Nitekim Biroccio ve Leonetti'nin makalesinde, protein kinaz C inhibitörü olan kersetinin telomeraz aktivitesini belirgin bir şekilde azaltmadığı belirtilmiştir (15).

Bu çalışmaların sonuçlarından da görüldüğü gibi, kersetin kanser tedavi edici etkisini, telomeraz aktivitesini düşürmekten ziyade, tümör süpresör genleri upregüle etmek, DNA sentezini baskılamak, hücre sayısını azaltmak ve sitotoksik etki göstermek gibi farklı mekanizmalar sayesinde göstermektedir.

Tamoksifenle ilişkili olarak, kolon kanser hücre dizileri ile yapılan çalışmada, telomeraz enziminin revers transkriptaz alt birimi hTERT üzerine, tamoksifenin 10 µM dozunun 2 saat sonunda en yüksek baskılamayı sağladığı, 20 µM tamoksifen ve kersetin kombinasyonunun ise aynı benzer etkiyi göstermekle birlikte, bu etkisinin daha az olduğu bildirilmiştir. Bu sonuç, tamoksifenin tek başına telomeraz aktivitesini azaltmada daha etkili olduğunu göstermektedir (86).

Küçük hücreli olmayan akciğer kanser (SK-LU1), skuamous-hücre karsinoma (SW900), bronşogenik karsinoma (ChaGo-K-1), papilar karsinoma (H441), büyük hücre karsinoma (H661) ve adenokarsinoma (A549) hücre dizileri ile yapılan bir çalışmada, hem kersetin hem de tamoksifenin küçük hücreli olmayan akciğer kanser hücre dizilerinde ve ilkin tümörlerde çoğalmayı önleyici etkilere sahip olduğu belirtilerek, tip II östrojen bağlanma bölgeleri (EBS)'ne bağlanmak için östrojenler gibi davrandığı vurgulanmıştır (22).

İnsan meme kanseri hücre dizileri (MCF-7 ve MDA-MB-231) ile yapılan diğer bir çalışmada, 10 gün boyunca uygulanan tamoksifenin  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  ve  $10^{-9}$  M dozlarının her iki hücre dizisinde de telomeraz aktivitesini etkilemediği, ancak  $10^{-8}$  M dozun, ilaçsız MCF-7 hücrelerine göre telomeraz aktivitesinde bir azalışa neden olduğu belirlenmiştir (4).

Reseptör negatif (BM) ve reseptör pozitif (MCF-7) meme kanser hücre dizileri ile yapılan bir çalışmada, tamoksifenin aktif bir metaboliti olan 4-hidroksitamoksifen (4-OHTam)'nin 12.5 ve 25 µM dozları 96 saat boyunca uygulanmış. Sonunda her iki dozun, her iki hücre dizisinde de çoğalmayı baskılayıcı etkisi olduğu gösterilmiştir (99).



İnsan hepatoblastoma hücre dizileri (HepG2) üzerinde yapılan bir çalışmada, 20  $\mu$ M doz tamoksifenin, 48 saat sonundaki etkisinin 24 saat sonundakine göre daha fazla olduğu ve telomeraz aktivitesini daha fazla baskıladığı belirtilmiştir. Ayrıca uygulanan 20  $\mu$ M tamoksifen sayesinde, 24 saat sonunda apoptoza giren çekirdek oranı % 5 iken, 72 saat sonra bu oranın % 63'e çıktığı belirtilmiştir (18). Aynı araştırmacıların yaptığı çalışmanın devamında tamoksifenin hTR, hTERT ve TP1'in ekspresyon seviyelerini etkilemediği, ancak, sitozolik ve membran bağlı protein kinaz C aktivitesinde 24 ve 48 saat sonra bariz bir azalışa neden olduğu belirtilmiştir. Dolayısıyla, tamoksifenin PKC aktivitesini düşürerek telomeraz aktivitesini baskıladığını ve apoptozu uyararak hücre canlılığını azalttığını ileri sürmüşlerdir (19).

Bu çalışmalarla uyumlu olarak, bizim yaptığımız çalışmada da tamoksifen, MCF-7 hücre dizilerinde, 48. ve 72. saatlerde, ilaçsız gruba göre telomeraz enzim aktivitesini bariz bir şekilde azaltmıştır.

## 6. SONUÇ

Yaptığımız bu çalışmada,

1. Kersetin; soğan, domates, yeşil çay ve çilek gibi sebze ve meyvelerde bulunan bir flavonoid olup, telomeraz aktivitesini düşürdüğü,
2. Bununla birlikte tümör gelişimini, telomeraz aktivitesini azaltma yolundan ziyade, daha başka mekanizmalarla hücre çoğalmasını önleyerek, tümör gelişimini baskıladığı,
3. Tamoksifenin telomeraz aktivitesini kersetine göre daha fazla düşürdüğü,
4. Tümör gelişimini, telomeraz aktivitesini azaltarak önlemenin yanında, östrojen reseptörlerine bağlanarak da sağladığı,
5. Tamoksifenin zamana ve doza bağlı olarak giderek bu baskılamayı artırdığı,
6. Hem kersetin hem de tamoksifenin, östrojen reseptörüne bağlı çalışan kanser hücre dizilerinde (MCF-7), östrojen reseptörüne bağlı çalışmayan normal hücre dizilerine (NIH-3T3) göre, telomeraz aktivitesini baskılama yönünden daha fazla etkili olduğu,

Bununla birlikte, kanser tedavisinde kullanılan tamoksifen ve özellikle, antikanserojen etkisi olduğu ileri sürülen kersetinin etki mekanizmalarının moleküler düzeyde belirlenmesi konusunda, daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu sonucuna varılmıştır.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

1. ADEBOMOWO, C.A., CHO, E., SAMPSON, L., KATAN, M.B., SPIEGELMAN, D., WILLETT, W.C., HOLMES, M.D.: Dietary Flavonoids and Flavonol-rich Foods Intake and Risk of Breast Cancer. *International Journal of Cancer* 114, 628-633, (2005).
2. AGNUSDEI, D., IORI, N.: Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs): Effects on Multiple Organ Systems, *Current Medicinal Chemistry* 7, 577-584, (2000).
3. AHERNE, S.A., O'BRIEN, M.: Dietary Flavonols: Chemistry, Food Content, and Metabolism. *Nutrition* 18, 75-81, (2002).
4. ALDOUS, W. K., MAREAN, A. J., DEHART, M. J., MATEJ, L.A., MOORE, K.H.: Effects of Tamoxifen on Telomerase Activity in Breast Carcinoma Cell Lines. *Cancer* 85, 1523-1529, (1999).
5. ARGYLE D., ELLSMORE V., GAULT E.A., NASIR, L.: Equine Telomeres and Telomerase in Cellular Immortalisation and Ageing, *Mechanism of Ageing and Development* 124, 759-764, (2003).
6. ATLI, K., BOZCUK, A.N.: Telomer ve Hücresel Yaşlanma, *Geriatrics* 5, 111-114, (2002).
7. AYDINTUĞ, S.: Meme Kanserinde Erken Tanı, *stet* 13, 226-228, (2004).
8. BARRON-GONZALEZ, A., ARIAS-MARTINEZ, J., CASTRO-ROMERO, I.: Antiestrogens: Mechanism of Action and Clinical Applications. *Salud Publica de Mexico* 43, 577-584, (2001).
9. BAŞARAN, A.: Hücresel Yaşlanma ve Hücre Ölümsüzlüğünde Telomeraz Enzim Kompleksi, *Sendrom* 14, 90-95, (2002).

10. BAŞARAN, A.: Telomer- Telomeraz ve Hücre Yaşlanması, VI Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi 2-5 Kasım ,Özet Kitapçığı 40-45, (2000)
11. BAŞARAN, A.: Telomerlerin Yapısı ve Fonksiyonları, Sendrom 14, 112-115,(2002).
12. BAŞARAN, A.: Tıbbi Biyoloji Ders Kitabı, Güneş ve Nobel Kitabevi, Bursa 7. Baskı, (2004)
13. BELLET, D., LAZAR, V., BIECHE, I., PARADIS, V., GIOVANGRANDI, Y., OATERLINI, P., LIDEREAU, R., BEDOSA, P., BIDART, J.M., VIDAUD, M.: Malignant Transformation of Nontrophoblastic Cells is Associated with the Expression of Chorionic Gonadotropin Beta Genes Normally Transcribed in Trophoblastic Cells, Cancer Research 57, 516-523, (1997).
14. BENTREM, D.J., GAIHA, P., JORDAN, V.C.: Oestrogens, Oestrogen Receptors and Breast Cancer, EJC Supplements 1, 1-12, (2003).
15. BIROCCIO, A., LEONETTI, C.: Telomerase as a New Target for the Treatment of Hormone-Refractory Prostate Cancer, Endocrine-Related Cancer 11, 407-421, (2004).
16. BLASCO, M.A.: Telomeres in Cancer and Aging: Lessons from the Mouse, Cancer Letters 194, 183-188, (2003).
17. BOLD, R.J., TERMUHLLEN, P.M., MCCONKEY, D.J.: Apoptosis, Cancer and Cancer Therapy, Surgical Oncology 6, 133-142,( 1997).
18. BRANDT, S., HELLER, H., SCHUSTER, K-D., GROTE, J.: Tamoxifen Induces Suppression of Cell Viability and Apoptosis in the Human Hepatoblastoma Cell line HepG2 via Down-Regulation of Telomerase Activity, Liver International 24, 46-54, (2004).

19. BRANDT, S., HELLER, H., SCHUSTER, K-D., GROTE, J.: The Tamoxifen-induced Suppression of Telomerase Activity in the Human Hepatoblastoma Cell Line HepG2: A Result of Post-Translational Regulation, *Journal Cancer Research Clinical Oncology* 131, 120-128, (2005).
20. BRODIE, A., LU, Q., LIU, Y., LONG, B.: Aromatase Inhibitors and Their Anti-Tumor Effects in Model Systems, *Endocrine-Related Cancer* 6, 205-210, (1999).
21. BRYAN, T.M., CECH, T.R.: Telomerase and the Maintenance of Telomerase and the Maintenance of Chromosome Ends, *Current Opinion in Cell Biology* 11, 318,324, (1999).
22. CALTAGIRONE, S., RANELLETTI, F. O., RINELLI, A., MAGGIOANO, N., COLASANTE, A., MUSIANI, P., AIELLO, F.B., PIANTELLI, M.: Interaction with Type II Estrogen Binding Sites and Antiproliferative Activity of Tamoxifen and Quercetin in Human Non-Small-Cell Lung Cancer. *AM. Journal Respiratory Cell Molecular Biology* 17, 51-59, (1997).
23. CHEONG, C., HONG, K.U., LEE, H-W.: Mouse Models for Telomere and Telomerase Biology, *Experimental and Molecular Medicine* 35, 141-153, (2003).
24. COLDITZ, G.A.: Relationship Between Estrogen Levels, Use of Hormone Replacement Therapy, and Breast Cancer, *Journal of the National Cancer Institute* 90, 814-823, (1998).
25. COLGIN, L.M., REDDEL, R.R.: Telomere Maintenance Mechanism and Cellular Immortalization, *Current Opinion in Genetics and Development* 9, 97-103, (1999).
26. COLLINS, K.: Mammalian Telomere and Telomerase, *Current Opinion in Cell Biology* 12, 378-383, (2000).

27. CONG Y-S., WRIGHT W.E., SHAY J.W.: Human Telomerase and Its Regulation, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66, 407-425, (2002).
28. CONGUER, J.A., MAIANI, G., AZZINI, E., RAGUZZINI, A., HOLUB, B.J.: Supplementation with Quercetin Markedly Increase Plasma Quercetin Concentration without Effect on Selected Risk Factors for Heart Disease in Healthy Subjects. *Human Nutrition and Metabolism* 128, 593-597, (1998).
29. CORNISH, K.M., WILLIAMS, G., SANDERSON, J.: Quercetin Metabolism in The Lens: Role in Inhibition of Hydrogen Peroxide Induced Cataract. *Free Radical Biology Med* 1, 63-70, (2002).
30. DICKSON, R.B., LIPPMAN, M.E.: *Cancer of the Breast*, Chapter 37, 6th Edition, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, (2001).
31. DIETZE, E.C., CALDWELL, L.E., GRUPIN, S.L., MANCINI, M., SEEWALDT, V.L.: Tamoxifen but Not 4-Hydroxytamoxifen Initiates Apoptosis in p53(2) Normal Human Mammary Epithelial Cells by Inducing Mitochondrial Depolarization. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 5384-5394, (2001).
32. EKMEKÇİ, Ö.B., DONMA, O., EKMEKÇİ, H.: Programlı Hücre Ölümü: Apoptozis, *Sendrom*, 14-22 Şubat (2004).
33. ERKOÇ, Ş., ERKOÇ, F., KESKİN, N.: Theoretical Investigation of Quercetin and its Radical Isomers. *Journal of Molecular Structure (Theochem)* 631, 141-146, (2003).
34. FALCHETTI, A., BECHERINI, L., MARTINETI, V., MORELLI A., BENVENUTTI, S., PICARIELLO, L., GENNARI, L., LAMPUGNANI, R., BORDI, C., BRANDI, M.L.: Telomerase Repeat Amplification Protocol (TRAP): A New Molecular Marker for Parathyroid Carcinoma, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 265, 252-255, (1999).

35. FASCO, M. J., AMIN, A., PENTECOST, B.T., YANG, Y., GIERTHY, J.F.: Phenotypic Changes in MCF-7 Cells During Prolonged Exposure To Tamoxifen, *Molecular and Cellular Endocrinology* 206, 33 -47, (2003).
36. GEE, J.M., JHONSON, I.T.: Polyphenolic Compounds: Interactions with the Gut and Implications for Human Health. *Current Medicinal Chemistry*.8, 1245-1255, (2001).
37. GILLEY D., TANAK H., HERBERT B-S.: Telomere Dysfunciton in Aging and Cancer, *The International Journal Biochemistry and Cell Biology*, Article in Press, (2004).
38. GOMEZ-NAVARRO, J., ARAFAT, W., XIANG, J.: Gene Therapy for Carcinoma of the Breast Pro-apoptotic Gene Therapy, *Breast Cancer Research* 2, 32-44, (2000).
39. GOSS, P.: Anti-aromatase Agents in the Treatment and Prevention of Breast Cancer. *Cancer Control* 9, 2-8, (2002).
40. GOSS, P.E.: Aromatase Inhibitors for Chemoprevention, *Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism* 18, 113-130, (2004).
41. GÖKGÖZ, Ş.: Meme Kanserinde Endokrin Tedavi, *Sendrom* 17, Sayı 11, 42-50, (2005).
42. GREIDER , C.W.: Telomeres D-loop, T-loop, *Cell* 97, 419-422, (1999).
43. GUTHRIEL, N., GAPOR, A., CARROLL, KK., : Scientific Study-Tocotrienol and Breast Cancer. *Asia Pacific Journal Clinical Nutrition* 6, 41-45 , (1997).
44. HAN, D-H., TACHIBANA, H., YAMADA, K.: Inhibition of Environmental Estrogen- Induced Proliferation of Human Breast Carcinoma MCF-7 Cells by Flavonoids. *In Vitro Cell Developmental Biology-Animal* 37, 275-282, (2001).

45. HARRINGTON, L.: Biochemical Aspects of Telomerase Function, *Cancer Letters* 19, 139-154, (2003).
46. HERBERT, B-S., WRIGHT, W.E., SHAY, J.W.: Telomerase and Breast Cancer 3, 146-149, (2001).
47. HERBERT, B-S.: Advances in Breast Cancer Therapy and Chemoprevention: Current Strategies and New Approaches, *Cancer Therapy* 1, 363-371, (2003).
48. HILAKIVI-CLARKE, L.: Estrogens, BRCA1 and Breast Cancer, *Cancer Research* 60, 4993- 5001,(2000).
49. HOLT, S.E., WRIGHT, W.E., SHAY, J.W.. Multiple Pathways for the Regulation of Telomerase Activity, *European Journal of Cancer* 33, 761-766, (1997).
50. HOWELL, A., HOWELL, S.J., CLARKE, R., ANDERSON, E.: Where Do Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs) and Aromatase Inhibitors (AIs) Now Fit into Breast Cancer Treatment Algorithms?. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 79, 227-237, (2001).
51. HU, S., LIAO, S-K., PANG, J-H, S., CHEN, M-C., CHEN, C-H.,HONG, H-S.: Screening of Inhibitors of Human Telomerase Reverse Transcriptase in a Cultured Malignant Melanoma Cell Lines. *British Journal of Dermatology* 150, 367–399 (2004).
52. HUANG, Y.-T., HWANG, J.-J, LEE ,P.-P., KE, F-C., HUANG, J.H, KANDASWAMI, C., MIDDLETON, E., LEE, M.T.: Effects of Luteolin and Quercetin, Inhibitors of Tyrosine Kinase, on Cell Growth and Metastasis-associated Properties in A431 Cells Overexpressing Epidermal Growth Factor Receptor. *British Journal of Pharmacology* 128, 999-1010, (1999).



53. IMYANITOV, E.N, HANSON, K.P.: Mechanism of Breast Cancer, Drug Discovery Today: Disease Mechanism/Cancer 1, 235-245,( 2004).
54. ISHIKAWA, Y., KITAMURA, M.: Bioflavonoid Quercetin Inhibits Mitosis and Apoptosis of Glomerular Cells in Vitro and in Vivo, Biochemical and Biophysical Research Communications 279, 629-634, (2000).
55. JOHNSTON, S. R.D., DOWSETT M.: Aromatase Inhibitors for Breast Cancer: Lessons from the Laboratory. Nature Reviews/Cancer 3, 821-831, (2003).
56. KANEUCHI, M., SASAKI, M., TANAKA, Y., SAKURAGI, N., FIJIMOTO, S., DAHIYA, R.: Quercetin Regulates Growth of Ishikawa Cells Through the Suppression of EGF and Cyclin D1, International Journal of Oncology 22, 159-164, (2003).
57. KANG, T-B., LIANG M.: Studies on the Inhibitory Effects of Quercetin on the Growth of HL460 Leukemia Cells, Biochemical Pharmacology 54, 1013-1018, (1997).
58. KHALKHALI-ELLIS, Z., CHRISTIAN, A.L., KIRSCHMANN, D. A., EDWARDS, E.M., REZAI-THOMPSON, M., VASEF, M.A., GRUMAN, L.M, SEFTOR, R.E.B., NORWOOD, L.E., HENDRIX, M.J.C.: Regulating the Tumor Suppressor Gene Maspin in Breast Cancer Cells: A Potential Mechanism for the Anticancer Properties of Tamoxifen, Clinical Cancer Research 10, 449-454, (2004).
59. KIESS, W., GALLAHER, B.: Hormonal Control of Programmed Cell Death/Apoptosis, European Journal of Endocrinology 1387, 482-491, (1998).
60. KIM, Y.W, HUR ,S.Y., KIM, T.E., LEE, J.M., NAMKOONG, S.E., KIM, I-K., KIM, J.W.: Protein Kinase C Modulates Telomerase Activity in Human Cervical Cancer Cells, Experinental and Molecular Medicine 33, 156-163, (2001).

61. KIRKPATRICK, K.L., CLARK, G., GHILCHICK, M., NEWBOLD, R.F., MOKBEL, K.: hTERT mRNA Expression Correlates with Telomerase Activity in Human Breast Cancer 29, 321-326, (2003).
62. KISS, Z.: Tamoxifen Stimulates Phospholipase D Activity by an Estrogen Receptor-independent Mechanism. FEBS Letters 355, 173-177, (1994).
63. KU, W-C., CHENG A-J., WANG, T-C., V.: Inhibition of Telomerase Activity by PKC Inhibitors in Human Nasopharyngeal Cancer Cells in Culture, Biochemical and Biophysical Research Communication 241, 730-736, (1997).
64. KUDO, M., NAITO, Z., YOKOYAMA, M., ASANO, G.: Effects of Quercetin and Sunphenon on Responses of Cancer Cells to Heat Shock Damage, Experimental and Molecular Pathology 66, 66–75 (1999).
65. KUMAR, R., VADLAMUDI, R.K., ADAM, L.: Apoptosis in Mammary Gland and Cancer, Endocrine-Related Cancer 7, 257-269, (2000).
66. KUO, P-C., LIU, H-F., CHAO, J-I.: Survivin and p53 Modulate Quercetin- induced Cell Growth Inhibition and Apoptosis in Human Lung Carcinoma Cells, The Journal of Biological Chemistry 279, 55875-55885, (2004).
67. KYO, S., TAKAKURO, M., KANAYA, T., ZHUO, W., FUJIMOTO, K., NISHIO, Y., ORIMO, A., INOUE, M.: Estrogen Activates Telomerase, Cancer Research, 59, 5917-5912 (1999).
68. LAMSON, D.W., BRIGNAL, M.S.: Antioxidants and Cancer III. Alternative Medicine Review 5, 196-208, (2000).
69. LINGNER J., CECH T.R.: Telomerase and Chromosome End Maintenance, Current Opinion in Genetics and Development 8, 226-232, (1998).

70. LIPPMAN ,M.E.: Breast Cancer, Harrison's Principles of Internal Medicine 14 th Edition, 562-567, McGraw-Hill Companies (1998).
71. LIU, H., LEE, E-S., GAJDOS, C., PEARCE, S.T., CHEN, B., OSIPO, C., LOWTH, J., MCKIAN, K., DE LOS EYES, A., WING, L., JORDAN, V.C.: Apoptotik Action of 17  $\beta$ -Estradiol in Raloxifene-Resistant MCF-7 Cells In Vitro and In Vivo. Journal of National Cancer Institue 95, 1586-1597, (2003).
72. LIU, J-P.: Studies of the Molecular Mechanism in the Regulation of Telomerase Activity.FASEB Journal 13, 2091-2104, (1999).
73. LIU, L., LAI S., ANDREWS, L.G., TOLLEFSBOL, T.O.: Genetic and Epigenetic Modulation of Telomerase Activity in Development and Disease, Gene 340, 1-10,(2004).
74. LONG, B. J., TILGHAM, S. L., YUE, W., THIANTANAWAT, A., GRIGORYEV, D.M., BRODIE, A.M.H.: The Steroidal Antiestrogen ICI 182.780 is an Inhibitors of Cellular Aromatase Activity. Journal Steroid Biochemical Molecular Biology 67, 293-304, (1998).
75. MAGGIOLINI, M., BONOFILIO, D., MARSICO, S., PANNO, M.N., CENNI, B., PICARD, D., ANDO, S.: Estrogen Receptor  $\alpha$  Mediates the Proliferative but not the Cytotoxic Dose-Dependent Effects of Two Major Phytoestrogens on Human Breast Cancer Cells, Molecular Pharmacology 60, 595-602, (2001).
76. MANDLEKAR, S., HEBBAR, V., CHRISTOV, K., KONG, A-N. T.: Pharmacodynamics of Tamoxifen and Its 4-Hydroxy and N.Desmethl Metabolites: Activation of Caspases and Induction of Apoptosis in Rat Mammary Tumors and in Human Breast Cancer Cell Lines, Cancer Research 60, 6601-6606, (2000).
77. MCTIERNAN ,A.: Behavioral Risk Factors in Breast Cancer: Can Risk Be Modified? The Oncologist 8, 326-334, (2003).

78. MERTENS-TALCOTT, S.U., PERVICAL, S.S.: Ellagic Acid and Quercetin Interact Synergistically with Resveratrol in the Induction of Apoptosis and Cause Transient Cell Cycle Arrest in Human Leukemia Cells, *Cancer Letters* 218, 141-151, (2005).
79. MIDDLETON, E., JR., KANDASWAMI, C., THEOHARIDESI, T. C.: The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacol Rev* 52, 673–751, (2000).
80. MIODINI, P., FIORAVANTI, L., FRONZO, G.D.,CAPPELLETTI, V.: The Two Phyto-oestrogens Genistein and Quercetin Exert Different Effects on Oestrogen Receptor Function. *British Journal of Cancer* 80, 1150-1155, (1999).
81. MOKBEL, K.: The Role of Telomerase in Breast Cancer, *European Journal of Surgical Oncology* 26, 509-514, (2000).
82. Monograph: Quercetin. *Alternative Medicine Review*, 3, 140-143, (1998).
83. MOUAT, M.F., KOLLI K., ORLANDO, R., HARGROVEV, J.L., GRIDER, A.: The Effects of Quercetin on SW480 Human Colon Carcinoma Cells: A Proteomic Study. *Nutrition Journal* 4, 1-7, (2005).
84. NAASANI, I., OH-HASHÍ, F., OH-HARA, T., FENG, W.Y., JOHNSTON J., CHAN, K., TSURUO, T.: Blocking Telomerase by Dietary Polyphenols is a Major Mechanism for Limiting the Growth of Human Cancer Cells In Vitro and In Vivo, *Cancer Research* 63, 824-830, (2003).
85. NAIR, H.K., RAO, K.V.K., AALINKEEL, R., MAHAJAN,S., CHAWDA, R., SCHWARTZ S.A.: Inhibition of Prostate Cancer Cell Colony Formation by the Flavonoid Quercetin Correlates with Modulation of Specific Regulatory Genes, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 11, 63-69, (2004).

86. NAKAYAMA, Y., SAKAMOTO, H., SATOH, K., YAMAMOTO, T.: Tamoxifen and Gonadal Steroids Inhibit Colon Cancer Growth in Association with Inhibition of Thymidylate Synthase, Survivin and Telomerase Expression Through Estrogen Receptor Beta Mediated System, *Cancer Letters* 161, 63-71, (2000).
87. OBRERO, M., YU, D.V., SHAPIRO, D. J.: Estrogen Receptor-dependent and Estrogen Receptor-independent Pathways for Tamoxifen and 4-Hydroxytamoxifen-induced Programmed Cell Death. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 45695-45703 (2002).
88. ONG, C.S., TRAN, E., NGUYEN, T.T.T., ANG, C.K., LEE, S.K. LEE, J.J. NG, C.P., LEONG, C., HUYNH, H.: Quercetin-induced Growth Inhibition and Cell Death in Nasopharyngeal Carcinoma Cells Associated with Increase in Bad and Hypophosphorylated Retinoblastoma Expression. *Oncology Reports* 11, 727-733, (2004).
89. ORLANDO, C., GELMINI, S.: Telomerase in Endocrine and Endocrine-dependent Tumors, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 78, 201-214, (2001).
90. PASQUALINI, J.R.: The Selective Estrogen Enzyme Modulators in Breast Cancer: A Review, *Biochimica et Biophysica Acta* 1654, 123-143, (2004).
91. PETINARIA, L., KOHN L.K., CARVALHOB, J.E., GENARÍA, S. C.: Cytotoxicity of Tamoxifen In Normal And Tumoral Cell Lines And its Ability to Induce Cellular Transformation in Vitro, *Cell Biology International* 28, 531-539, (2004).
92. PRATT, SE., POLLAK, M.N.: Estrogen and Antiestrogen Modulation of MCF-7 Human Breast Cancer Cell Proliferation is Associated with Specific Alterations in

- Accumulation of Insulin-like Growth Factor-binding Proteins in Conditioned Media, *Cancer Research* 53, 5193-5198, (1993).
93. PRESCOTT, J.C., BLACKBURN, E.H.: Telomerase: Dr. Jekyll or Mr. Hyde?, *Current Opinion in Genetics and Development* 9, 373-388, (1999)
94. PRICE, M.C.: Telomeres and Telomerase Broad Effects on Cell Growth, *Current Opinion in Genetics and Development* 9, 218-224, (1999).
95. RATNA, W.N., SIMONELLI, J.A.: The Action of Dietary Phytochemicals Quercetin, Catechin, Resveratrol and Naringenin on Estrogen-mediated Gene Expression. *Life Science* 70, 1577-1589, (2002).
96. RODREGS, E.H., GRANT, M.H.: The Effects of the Flavonoids, Quercetin, Myricetin, and Epicatechin on the Growth and Enzyme Activities of MCF-7 Human Breast Cancer Cells. *Chemico-Biological Interactions* 116, 213-228, (1998).
97. ROSS, J.S., LINETTE, G.P., STEC, J., CLARK, E., AYERS, M., LESCHLY, N., SYMMANS, W.F., HORTOBAGYI, G.N., PUSZTAI, L.: Breast Cancer Biomarkers and Molecular Medicine:Part II, Experimental Review Molecular Diagnosis 4, 169-188, (2004).
98. SALAMI, S., KARAMI-TEHRANI, F.: Biochemical Studies of Apoptosis Induced by Tamoxifen in Estrogen Receptor Positive and Negative Breast Cancer Cell Line, *Clinical Biochemistry* 36, 247-253, (2003).
99. SEEGER, H., DIESING, D., GUCKEL, B., WALLWIENER, D., MUECK, A.O., HUOBER J.: Effect of Tamoxifen and 2-Methoxyestradiol Alone and in Combination on Human Breast Cancer Cell Proliferation. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 84,255–257,(2003).
- 100.SERRANO, D., BONANNI, B., CAZZANIGA, M., GALLI, A., GONZAGA,

- A.G., DECENSI, A.: Pharmacological Prevention of Breast Cancer: Quo Vadis?.  
The Breast 12, 379-386 (2003).
- 101.SHARPLESS N.E., DEPINHO R.A.: Telomeres, Stem Cells, Senescence and  
Cancer, The Journal of clinical Investigation 113, 160-168, (2004).
- 102.SHAY, J.W., ZOU, Y., HIYAMA, E., WRIGHT, W.E.: Telomerase and Cancer.  
Human Molecular Genetics 10, 677-685, (2001).
- 103.SIMSTEIN, R., BUROW, M., PARKER, A., WELDON, C., BECKMAN, B.:  
Apoptosis, Chemoresistance and Breast Cancer: Insights From the MCF-7 Cell  
Model System, Experimental Biology and Medicine 228,,995-1003, (2003).
- 104.SO, F.V., GUTHRIE, N., CHAMBERS, A., CARROLL, K.K.: Inhibition of  
Proliferation of Estrogen Receptor-positive MCF-7 Human Breast Cancer Cells by  
Flavonoids in the Presence and Absence of Excess Estrogen. Cancer Letters 112,  
127-133, (1997).
- 105.THINTANAWAT, A., LONG, B. J., BRODIE, A. M.: Signaling Pathways of  
Apoptosis by Aromatase Inhibitors and Antiestrogens, Cancer Research 63, 8037-  
8050, (2003).
- 106.VERLA-TEBIT, E., WANG-GOHRKE, S., CHANG-CLAUDE, J.: CYP17 5'UTR  
MspA1 Polymorphism and Risk of Premenopausal Breast Cancer in a German  
Population-based Case-control Study, Breast Cancer research 7, 455-464, (2005).
- 107.WANG, S., DEGROFF, V.L., CLINTON, S.K.: Tomato and Soy Polyphenols  
Reduce Insulin-like Growth Factor-I-Stimulated Rat Prostate Cancer Cell  
Proliferation and Apoptotic Resistance in Vitro via Inhibition of Intracellular  
Signalling Pathways Involving Tyrosine Kinase, Journal of Nutrition 133, 2367-  
2376, (2003).

108. WISMAN, G.B., HOLLEMA, H., HELDER, M.N., KNOL, A., VAN DER MEER, G.T., KRANS, M., DE JONG, S., DE VERIES E.G.E., VAN DER ZEE, A.G.: Telomerase in Relation to Expression of p53, c-Myc and Estrogen Receptor in Ovarian Tumours, *International Journal of Oncology* 23, 1451-1459, (2003).
109. [www.bcc1c.ca/downloads/tfl/paper10.pdf](http://www.bcc1c.ca/downloads/tfl/paper10.pdf).



## **Ayşe Ak'ın ÖZGEÇMİŞİ**

1980'de Mersin'de doğdu. İlköğrenimini Mersin Çankaya İlkokulunda, ortaöğrenimini Mersin ortaokulunda, 1998'de liseyi 19 Mayıs Süper Lisesinde tamamladı. 2002 yılında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldu. 2003 yılında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı. Halen Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.