

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

**ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ ÜZERİNE PACHYMİC ASİT  
ETKİSİNİN MEME KANSERLERİNDE İNCELENMESİ**

Nilüfer SERTDEMİR

Kocaeli Üniversitesi  
Sağlık bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin  
Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Programı için Öngördüğü  
DOKTORA TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır

KOCAELİ  
2018



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

**ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ ÜZERİNE PACHYMİC ASİT  
ETKİSİNİN MEME KANSERLERİNDE İNCELENMESİ**

Nilüfer SERTDEMİR

Kocaeli Üniversitesi  
Sağlık bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin  
Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Programı için Öngördüğü  
DOKTORA TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Doç.Dr. Naci Çine

Bu tez Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından  
2016/010 Proje numarası ile Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından  
desteklenmiştir.

KOCAELİ  
2018

## SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

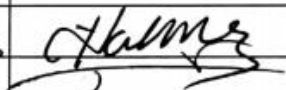
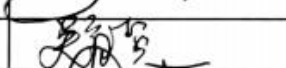




**Tez Adı:** Endoplazmik Retikulum Stresi Üzerine Pachymic Asit Etkisinin Meme Kanserlerinde İncelenmesi

**Tez yazarı:** Nilüfer Sertdemir

**Tez savunma tarihi:**

**Tez danışmanı:** Doç. Dr. Naci Çine

Bu çalışma, sınav kurulumuz tarafından Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

SINAV KURULU ÜYELERİ		İMZA
ÜNVANI	ADI SOYADI	
BAŞKAN	Doç. Dr. Özden Hotunmaz Ne	
ÜYE (DANIŞMAN)	Doç. Dr. Naci Çine	
ÜYE	Dr. Öğ. Üye. Peter Ng	
ÜYE	Dr. Öğ. Üye. Deniz S. Akkoyunlu	
ÜYE	Dr. Öğ. Üye. Seda E. Kestkin	
ÜYE	Prof. Dr. Hakan Souli	

### Onay

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.

.../.../2018

Prof. Dr. Sema Aşkın Keçeli  
KOÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdür

## ÖZET

### Endoplazmik Retikulum Stresi Üzerine Pachymic Asit Etkisinin Meme Kansерlerinde İncelenmesi

**Amaç:** Meme kanseri dünyada kadınlar arasında çok yaygın görülen bir kanser türüdür. Kansер hücrelerinde meydana gelen bozuklukların aydınlatılması ve bunların araştırılması, yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi kanser tedavisi süreçlerine katkı sağlayacaktır. Bu çalışmanın amacı, pachymic asit (PA) molekülünün, insan meme kanser hücresi MDA-MB-231 üzerindeki gen ekspresyon farklılıklarının tanımlanması, sitotoksik ve apoptotik etkilerinin belirlenmesidir.

**Yöntem:** Çalışmamızda, meme kanseri hücre hattı (MDA-MB-231) kültüre edilerek, PA ile farklı konsantrasyon ve sürelerde muamele edilmiştir. Bu işlem sonrasında hücre canlılığında azalma tespit edilmiştir. PA'nın hücre canlılığına olan etkisi gerçek zamanlı hücre elektronik algılama sistemiyle belirlenmiştir. PA'nın apoptotik etkileri akış sitometrisi yöntemi ile analiz edilmiştir. ER stress yolağında yer alan CASP12, PARP, PERK, CHOP, ATF4, GADD34, IRE1, TRAF2, BCLXL, CASP3, CASP8, ATF6, AP1, eIF2a, S1P ve ASK1 genlerinin ekspresyon farklılıkları gerçek zamanlı PCR ile belirlenmiştir.

**Bulgular:** 24 saatlik PA tedavisi sonrasında 50, 100 ve 150µM'lık artan doza bağlı olarak CASP12, ASK1, IRE1, GADD34, CHOP, PERK ve ATF4 genlerinde anlamlı düzeyde artış gözlenmiştir. AP1, TRAF2, S1P ve ATF6 genlerinde 24 saatlik 150uM PA tedavisi sonrasında ekspresyonun anlamlı düzeyde arttığı gözlenirken 24 saatlik 50 ve 100uM'lık PA uygulaması sonrasında bu 4 genin ekspresyonlarında dozlar arası farklılık saptanmamıştır. BCLXL ve CASP8 gen ekspresyonlarında zamana ve doza bağlı bir değişim saptanmamıştır.

**Sonuç:** Çalışmamızın sonucunda Pachymic asidin meme kanseri hücreleri üzerinde sitotoksik ve apoptotik etkileri olduğu belirlenmiştir. Bu etkiler ilk 24 saatte ve 150µM'lık doz tedavisinde önem arz etmektedir. Sonuçlarımız meme kanserinde PA'nın terapötik potansiyelinin olabileceğini gösterir niteliktedir.

**Anahtar Kelimeler:** Pachymic asit, ER stresi, apoptoz, meme kanseri, Real Time PCR

## ABSTRACT

### Investigation of Pachymic Acid Effect on Endoplasmic Reticulum Stress in Breast Cancer

**Objective:** Breast cancer is a very common type of cancer among women worldwide. The identification and investigation of disorders in cancer cells will contribute to the development of new treatment strategies and cancer treatment processes. The aim of this study is to investigate gene expression profiling, cytotoxic and apoptotic effects on human breast cancer cell MDA-MB-231 caused by pachymic acid (PA).

**Method:** In our study, the effect of PA on ER stress pathways was investigated. The breast cancer cell line (MDA-MB-231) was cultured and treated at different concentrations and for periods with PA. A decrease in cell viability was detected after this procedure. The effect of pachymic acid on cell viability was determined by xCELLigence RTCA system. Apoptotic effects of pachymic acid were analyzed by flow cytometry. Expression differences of CASP12, PARP, PERK, CHOP, ATF4, GADD34, IRE1, TRAF2, BCLXL, CASP3, CASP8, ATF6, AP1, eIF2a, S1P and ASK1 genes were determined by real-time PCR.

**Results:** Significant increases were observed in CASP12, ASK1, IRE1, GADD34, CHOP, PERK and ATF4 genes due to increasing doses of 50, 100 and 150  $\mu\text{M}$  after 24 h of PA treatment. Expression of AP1, TRAF2, S1P and ATF6 genes was significantly increased after 24 h of 150  $\mu\text{M}$  PA treatment, but there was no difference between these 4 gene expressions after 24 h of 50 and 100  $\mu\text{M}$  PA treatment. There was no time- and dose-dependent change in BCLXL and CASP8 gene expressions.

**Conclusions:** As a result of our study, it was determined that Pachymic acid has cytotoxic and apoptotic effects on breast cancer cells. These effects are important in the first 24 hours and 150  $\mu\text{M}$  dose treatment. Our results show that PA may be the therapeutic potential of breast cancer.

**Keywords:** Pachymic acid, ER stress, Apoptosis, Breast Cancer, Real-Time PCR

## TEŞEKKÜR

On bir yıllık yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca bilgi birikiminden faydalandığım, akademik olarak kendime örnek aldığım, birlikte çalışmaktan onur ve mutluluk duyduğum, yapmak istediğim çalışmalarını ve fikirlerimi her zaman destekleyerek beni motive eden, hoşgörülü ve sabırlı tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Naci Çine'ye teşekkür ve saygılarımı sunuyorum.

Tıbbi Genetik alanında çalışma şansını bana tanımış olan anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Hakan Savlı'ya,

Tez çalışmam boyunca, deneyler sırasında büyük bir sabır ve hoşgörü ile bana destek olan değerli arkadaşlarımdan başta Eda Güzdolu olmak üzere Seda Eren Keskin, Merve Gökbayrak, Duygu Aydın'a ve akış sitometri çalışması ve analizlerinde bana imkan ve yardım sağlayan KÖGEM çalışma arkadaşım Gülay Erman'a ve Sayın Hocam Doç.Dr. Yusufhan Yazır'a,

Yaşadığım tüm zorlukları, fedakarlıkları ve sabırla benim için kolaylaştıran, her zaman beni destekleyen değerli eşim Yaman Sertdemir'e,

Destekleri ve sevgileriyle hep yanımda olan değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRGESİ

Tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan yazı, bilgi, çizim, çizelge ve diğer malzemeler kaynakları gösterilerek verilmiştir. Tezimin herhangi bir yayından kısmen ya da tamamen aşırma olmadığını ve bir İntihal Programı kullanılarak test edildiğini beyan ederim.

**23/05/2018**

Nilüfer Sertdemir



## İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY	iii
ÖZET	iv
İNGİLİZCE ÖZET	v
TEŞEKKÜRLER	vi
TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ÇİZİMLER DİZİNİ	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Meme Kanseri	1
1.2. Endoplazmik Retikulum Stresi	3
1.2.1. UPR	4
1.2.2. Endoplazmik Retikulum Stresi Moleküler Mekanizması	4
1.2.3. Endoplazmik Retikulum Stresi Apoptoz İlişkisi	6
1.2.4. Endoplazmik Retikulum ve Kanser	7
1.3. Pahymic Asit	7
1.4. Meme Kanseri Hücre Hattı- MDA-MB231	9
2. AMAÇ	10
3. YÖNTEM	11
3.1. MDA-MB231 Hücre Hattı	11
3.2. Kullanılan Cihazlar	11
3.3. Kullanılan Kitler	11
3.4. Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeler	12
3.5. Hücre Kültürü	12
3.5.1. Hücrelerin Çözülmesi	12
3.5.2. Hücrelerin Çoğaltılması	13
3.6. Hücre Proliferasyonu Optimizasyon Çalışması	13
3.7. Pahymic Asit Ana Stok Çözeltilisinin Hazırlanması	14
3.8. Sitotoksisite Testi	14

## İÇİNDEKİLER-DEVAMI

3.9. Tripan Mavisi Boyama ile Otomatik Hücre Sayımı	15
3.10. Annexin-V FITC-PI ile Apoptoz Tayini	16
3.11. RNA İzolasyonu	17
3.12. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	18
3.13. Gen İfadelerinin Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Tepkimesi (Real Time PCR) ile Belirlenmesi	19
3.14. Kullanılan Primerler	20
3.15. İstatistiksel Analiz	22
4. BULGULAR	23
4.1. MDA-MB-231 İnsan Meme Kanseri Hücre Kültüründe Pachymic Asidin Sitotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi	23
4.2. İnsan Meme Kanseri MDA-MB231 Hücre Kültüründe Pachymic Asidin Apoptotik Etkileri	24
4.3. İnsan Meme Kanseri MDA-MB231 Hücre Kültüründe Pachymic Asidin Endoplazmik Retikulum Stresi ile İlişkili Genlerin İfadesi Üzerine Etkileri	30
4.3.1. PARP Gen İfade Değerlendirilmesi	31
4.3.2. PERK Gen İfade Değerlendirilmesi	32
4.3.3. CHOP Gen İfade Değerlendirilmesi	32
4.3.4. BCLXL Gen İfade Değerlendirilmesi	33
4.3.5. CASP3 Gen İfade Değerlendirilmesi	34
4.3.6. CASP8 Gen İfade Değerlendirilmesi	34
4.3.7. ATF4 Gen İfade Değerlendirilmesi	35
4.3.8. GADD34 Gen İfade Değerlendirilmesi	35
4.3.9. IRE1 Gen İfade Değerlendirilmesi	36
4.3.10. TRAF2 Gen İfade Değerlendirilmesi	37
4.3.11. ATF6 Gen İfade Değerlendirilmesi	37
4.3.12. CASP12 Gen İfade Değerlendirilmesi	38
4.3.13. AP1 Gen İfade Değerlendirilmesi	39
4.3.14. EIF2A Gen İfade Değerlendirilmesi	39
4.3.15. S1P Gen İfade Değerlendirilmesi	40

## İÇİNDEKİLER (DEVAMI)

4.3.16. ASK1 Gen İfade Değerlendirilmesi	41
5. TARTIŞMA	42
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	50
KAYNAKLAR DİZİNİ	51
ÖZGEÇMİŞ	54



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%: Yüzde

µl: Mikro litre

µM: Mikro molar

α: alfa

AP1: Activator Protein 1

ASK1: Mito en-activated protein kinase kinase kinase 5

ATCC American Type Culture Collection

ATF4: Activating Transcription Factor 4

ATF6 Activating Transcription Factor 6

ATM: ATM serine/threonine kinase

ATP: Adenozin trifosfat

B2M: Beta 2 mikroglobulin

BARD1: BRCA1 associated RING domain 1

Bcl2: Beta – cell lymphoma 2

BCLXL: BCL2 like 1

BRCA1: Breast cancer 1

BRCA2: Breast cancer 2

BRIP1: BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1

C/EBP: CCAAT enhancer binding protein

CASP12: Kaspaz 12

CASP3: Kaspaz 3

CASP8: Kaspaz8

CDH1: Cadherin 1

cDNA: Komplementer deoksiribonükleik asit

CHEK2: Check point kinase 2

CHOP: C/EBP homologous protein- DNA damage inducible transcript 3

CO<sub>2</sub>: Karbondioksit

DMSO: Dimetil Sülfoksit

DNA: Deoksiribonükleik asit

DR5: TNF receptor süper family member 10b

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (DEVAMI)

EDTA: Etilendiamin Tetraasetik Asit  
EGF: Epidermal Growth Factor  
eIF2 $\alpha$ : Eukaryotic Initiation Factor 2 $\alpha$   
ER: Endoplazmik retikulum  
ERAD: Endoplasmic reticulum associated protein degradation  
ERBB2: erb-b2 receptor tyrosine kinase 2  
ESR1: Estrogen receptor 1  
FBS: Fetal bovine serum  
FGFR2: Fibroblast growth factor receptor 2  
FITC: Fluorescein isothiocyanate  
GADD34: Growth arrest and DNA damage-inducible protein  
GLS1: Glutaminase transcript variant 1  
GLS2: Glutaminase transcript variant 2  
GRB7: Growth factor receptor bound protein 7  
GRP170: Glucose regulated protein 170  
GRP78: Glucose regulated protein 78  
GRP94: Glucose regulated protein 94  
IC50: Maksimum inhibisyon sağlayan dozun yarısı  
IRE1: Inositol requiring kinase 1  
JNK: c-Jun N-terminal kinase  
LSP1: Lymphocyte specific protein 1  
M: Molar  
MAP3K1: Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1  
MDA-MB-231: İnsan meme kanseri hücre hattı  
Mg: Miligram  
Ml: Mililitre  
MRE11: Meiotic recombination 11  
mRNA: Mesajcı ribonükleik asit  
NBN: Nibrin

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (DEVAMI)

- PA: Pachymic asit  
PALB2: Partner and localizer of BRCA2  
PARP1: Poly (ADP-ribose) polymerase 1  
PBS: Phosphate-Buffered Saline  
PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu  
PERK: Protein kinase RNA-like endoplasmic retikulum kinase  
PP1: Pyrophosphatase (inorganic) 1  
PR: Progesteron reseptörü  
PTEN: Phosphatase and tensin homolog  
RAD50: Double strand break repair protein RAD50  
RAD51: RAD51 recombinase  
RAD51B: RAD51 paralog B  
RAD51C: RAD51 paralog C  
RAD51D: RAD51 paralog D  
RNA: Ribonükleik asit  
RT-PCR: Revers Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu  
RTCA: Real time cell analysis- Eş zamanlı hücre analizi  
S1P: Sphingosine-1-phosphate  
S2P: Sphingosine-2-phosphate  
STK11: Serine/threonine kinase 11  
TGF $\alpha$ : Transforming growth factor alpha  
TOX3: TOX high mobility group box family member 3  
TP53: Tumor protein p53  
TRAF2: TNF receptor associated factor 2  
Trb3: Tribbles pseudokinase 3  
UPR: Unfolded protein response –Katlanmamış protein yanıtı  
XBP1: X-box binding protein 1  
XRCC2: X-ray repair cross complementing 2  
XRCC3: X-ray repair cross complementing 3

## ÇİZİMLER DİZİNİ

Çizim 1.1. Endoplazmik retikulum stresi moleküler mekanizma	6
Çizim 1.2. Pachymic asitin moleküler yapısı	9
Çizim 3.1. MDA-MB231 insan meme kanseri hücreleri	13
Çizim 3.2. Meme kanseri hücreleri proliferasyon çalışması	14
Çizim 3.3. Otomatik hücre sayım cihazı ve yükleme lamı	16
Çizim 4.1. PA uygulaması sonrası zamana göre hücre indeks değerlerinin değişimi	24
Çizim 4.2. Doza ve zamana bağlı Pachymic Asit uygulaması sonrası Annexin V /PI akım sitometri analiz görüntüleri.	25
Çizim 4.3. Doza ve zamana bağlı Pachymic Asit uygulaması sonrası Annexin V /PI akım sitometri analiz görüntüleri.	27
Çizim 4.4. Doza ve zamana bağlı Pachymic Asit uygulaması sonrası Annexin V /PI akım sitometri analiz görüntüleri.	29

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. cDNA sentezi 1. Aşamada kullanılan reaksiyon bileşenleri	18
Çizelge 3.2. Denatürasyon	18
Çizelge 3.3. cDNA sentezi 2. Aşamada kullanılan reaksiyon bileşenleri	18
Çizelge 3.4. cDNA PCR döngüsü aşamaları	19
Çizelge 3.5. Eş zamanlı PCR karışımı	19
Çizelge 3.6. Eş zamanlı PCR programı	20
Çizelge 3.7. Kullanılan eş zamanlı PCR primer dizileri	20
Çizelge 4.1. MDA-MB231 hücrelerinin 24. saat doza bağlı olarak Pachymic Asit uygulanması sonrası apoptotik, nekrotik ve canlı hücre yüzde değişimi.	26
Çizelge 4.2. MDA-MB231 hücrelerinin 48. saat doza bağlı olarak Pachymic Asit uygulanması sonrası apoptotik, nekrotik ve canlı hücre yüzde değişimi.	28
Çizelge 4.3. MDA-MB231 hücrelerinin 72. saat doza bağlı olarak Pachymic Asit uygulanması sonrası apoptotik, nekrotik ve canlı hücre yüzde değişimi.	29
Çizelge 4.4. REST analizi sonrasında yüksek ekspresyon seviyeleri gösteren Genler	30
Çizelge 4.5. REST analizi sonrasında control grubu ile yaklaşık aynı ekspresyon seviyeleri gösteren genler	31
Çizelge 4.6. MDA-MB231 hücrelerinin doz ve zamana bağlı olarak Pachymic Asit uygulanması sonrası PARP geninin ifade düzey değişikliği.	31
Çizelge 4.7. MDA-MB231 hücrelerinin doz ve zamana bağlı olarak Pachymic Asit uygulanması sonrası PERK geninin ifade düzey değişikliği.	32
Çizelge 4.8. MDA-MB231 hücrelerinin doz ve zamana bağlı olarak Pachymic Asit uygulanması sonrası CHOP geninin ifade düzey değişikliği.	33
Çizelge 4.9. MDA-MB231 hücrelerinin doz ve zamana bağlı olarak Pachymic Asit uygulanması sonrası BCLXL geninin ifade düzey değişikliği.	33
Çizelge 4.10. MDA-MB231 hücrelerinin doz ve zamana bağlı olarak Pachymic Asit uygulanması sonrası CASP3 geninin ifade düzey değişikliği.	34



## ÇİZELGELER DİZİNİ (DEVAMI)

Çizelge 4.11. MDA-MB231 hücrelerinin doz ve zamana bağlı olarak Pachymic Asit uygulanması sonrası CASP8 geninin ifade düzey değişikliği.	34
Çizelge 4.12. MDA-MB231 hücrelerinin doz ve zamana bağlı olarak Pachymic Asit uygulanması sonrası ATF4 geninin ifade düzey değişikliği.	35
Çizelge 4.13. MDA-MB231 hücrelerinin doz ve zamana bağlı olarak Pachymic Asit uygulanması sonrası GADD34 geninin ifade düzey değişikliği.	36
Çizelge 4.14. MDA-MB231 hücrelerinin doz ve zamana bağlı olarak Pachymic Asit uygulanması sonrası IRE1 geninin ifade düzey değişikliği.	36
Çizelge 4.15. MDA-MB231 hücrelerinin doz ve zamana bağlı olarak Pachymic Asit uygulanması sonrası TRAF2 geninin ifade düzey değişikliği.	37
Çizelge 4.16. MDA-MB231 hücrelerinin doz ve zamana bağlı olarak Pachymic Asit uygulanması sonrası ATF6 geninin ifade düzey değişikliği.	38
Çizelge 4.17. MDA-MB231 hücrelerinin doz ve zamana bağlı olarak Pachymic Asit uygulanması sonrası CASP12 geninin ifade düzey değişikliği.	38
Çizelge 4.18. MDA-MB231 hücrelerinin doz ve zamana bağlı olarak Pachymic Asit uygulanması sonrası AP1 geninin ifade düzey değişikliği.	39
Çizelge 4.19. MDA-MB231 hücrelerinin doz ve zamana bağlı olarak Pachymic Asit uygulanması sonrası EIF2A geninin ifade düzey değişikliği.	40
Çizelge 4.20. MDA-MB231 hücrelerinin doz ve zamana bağlı olarak Pachymic Asit uygulanması sonrası S1P geninin ifade düzey değişikliği.	40
Çizelge 4.21. MDA-MB231 hücrelerinin doz ve zamana bağlı olarak Pachymic Asit uygulanması sonrası ASK1 geninin ifade düzey değişikliği.	41



# 1. GİRİŞ

## 1.1. Meme Kanseri

Günümüzde kanser insan sağlığını tehdit eden en yaygın hastalık haline gelmiştir (Zhang ve diğ. 2014). 2008 yılında yaklaşık 12,7 milyon kanser teşhis edilmiş ve 2010 yılında yaklaşık 7,98 milyon kişi hayatını kaybetmiştir. Her yıl tüm ölümlerin yaklaşık %13'ü kadarı kanser sebebiyle olmaktadır. En sık olarak, akciğer kanseri (1,4 milyon ölüm), mide kanseri (740,000 ölüm), karaciğer kanseri (700,000 ölüm), kolorektal kanser (610,000 ölüm) ve meme kanseri (460,000 ölüm) sayılmaktadır (Xia ve diğ. 2104).

Meme kanseri kadınlar arasında en yaygın gözlemlenen kanser türüdür ve tüm kanser türleri arasında 25.2'lik bir yüzdeye sahiptir (Gómez-Flores-Ramos ve diğ. 2017). Her 4 kadın kanserinden biri meme kanseri olmaktadır (Gültekin 2014). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) meme kanserini kadınlar arasında en sık rastlanılan kanser türü olduğunu ve tüm dünyada milyonlarca kadını etkilediğini belirtmiştir. Bin dokuz yüz doksan yılından beri meme kanserinde ölüm oranları gitgide düşmektedir. Bunun sebebi olarak ileri görüntüleme yöntemlerindeki gelişme, erken tespit artışı, hastalık ile ilgili farkındalık ve tedavi yöntemindeki gelişimler gösterilmektedir. Yapılan istatistiksel çalışmalarla İngiltere'de meme kanseri tanısı almış her 5 kadından birinin, Amerika'da 6 kadından birinin, Hindistan'da 2 kadından birinin, Mısır'da 3 kadından birinin öldüğü gösterilmiştir (Dubey ve diğ. 2015).

Meme kanseri ile ilişkili pek çok risk faktörü tanımlanmıştır. Bu risk faktörleri cinsiyet, yaş, ırk, menarş yaşı, doğum sayısı, ilk hamilelik yaşı, menapoz yaşı, emzirme süresi, infertilite, düşük sayısı, aile kanser öyküsü, meme kanseri ile ilgili gen mutasyonları, çevresel faktörler ve diğer faktörler olarak sınıflandırılabilir ( Koçak ve diğ. 2011). Meme kanseri insidansının artan yaşla yakından ilişkili olması sebebiyle yaş bu kanserin en önemli risk faktörlerinden biri olmaktadır (Sun ve diğ. 2017). Bir kadının hayatı boyunca meme kanseri bakımından riski non invazif meme kanseri açısından altıda bir, invazif meme kanseri açısından sekizde bir olarak belirtilmektedir. Bu riskin yaş arttıkça arttığı belirlenmiştir (Koçak ve diğ. 2011). Meme kanserinde ailesel öykü diğer kanser türlerinde olduğu gibi önem arz etmektedir. Bir kadının meme kanseri geliştirme riski birinci derece yakınları arasında etkilenmiş bireyin varlığında 3 kata kadar, birden fazla birinci derece

yakınlarında etkilenen bireylerin varlığında ise 10 kata kadar artmıştır. Meme kanseri olan yakının 40 yaşında yada daha erken yaşta tanı almış olması bu riski daha da arttırmaktadır (Thompson 2005).

Meme kanseri hem genetik hem de epigenetik faktörlerin etkisiyle oluşan kompleks bir hastalıktır. Yaş sınıflandırması yapmadan meme kanseri hastalarından elde edilen epidemiyolojik verilere göre meme kanseri vakalarının yaklaşık %10-30'u ailesel faktörler ile ilgilidir (Gómez-Flores-Ramos ve diğ. 2017). Son yıllarda yapılan yoğun araştırmalar hücre proliferasyonu ve hücre ölümünü kontrol eden genlerin mutasyonlarının kanserden sorumlu olduğunu göstermiştir. Birçok kanserde, mutasyonların tek bir somatik hücrede olduğu ve daha sonra bölünerek kanser gelişimine yol açtığı bilinmektedir. Daha nadir tipi ise ailesel kanser sendromunda izlenmektedir, kanserin başlamasına neden olan mutasyonlar germ hücrelerine aktarılmakta ve böylece vücudun tüm hücrelerinde yer almaktadır (Thompson 2005). Ailesel meme kanseri vakalarında gözlenen kalıtsal bileşen yüksek derecede penetrans gösteren, otozomal dominant kalıtıma sahip, patojenik mutasyonlardır. Meme kanseri, genetik olarak sadece mutasyon varlığı ile değil genomda meydana gelen büyük delesyon/insersiyon oluşumu, ekspresyon farklılıkları, mi-RNAs etkileri, kopya sayısı değişiklikleri gibi pek çok farklı genetik etkileşim ile de ilişkilidir. Yapılan çalışmalarda meme kanserinde yüksek penetrans gösteren genler; BRCA1 (17q21.31), BRCA2 (13q13.1), TP53 (17p13.1), PTEN (10q23.31), STK11 (19p13.2), CDH1 (16q22.1), CHEK2 (22q12.1), PALB2 (16p12.2), ATM (11q22.3), BRIP1 (17q23.2), BARD1 (2q35), MNR genleri, orta dereceli penetrans gösteren genler; MRE11 (11q21), RAD50 (5q31.1), NBN (8q21.3), RAD51 (15q15.1), RAD51B (14q24.1), RAD51C (17q22), RAD51D (17q12), XRCC2 (7q36.1), XRCC3 (14q32.3), düşük penetrans gösteren genler ve bölgeler ise; FGFR2 (10q26.13), CASP8 (2q33), MAP3K1 (5q11.2), LSP1 (11p15.5), TOX3 (16q12.1), ESR1 (6q25), RAD51B (14q24), 2q35, 8q24, 5p12, 1p11 olarak belirtilmiştir (Gómez-Flores-Ramos ve diğ. 2017). Meme kanserinde de diğer kanser türlerinde olduğu gibi moleküler anormalliklerin erken tespit edilmesi prognozun belirlenmesi ve tedavi seçimi için büyük önem taşımaktadır (Öztürk 2006).

Meme kanseri karmaşık ve heterojen bir hastalıktır. Tanımlanmasında ve sınıflandırılmasında çok sayıda klinik ve patolojik özellikler göz önünde bulundurulur. Genel olarak sınıflandırmada göz önünde bulundurulanan klinik özellikler; yaş, tümör boyu aksiller nod tutulumu, anjiyo-lenfatik invazyon, histolojik derece, hormonal reseptör

durumu ve ERBB2 (daha çok HER-2/neu olarak bilinir) amplifikasyonu olarak sayılmaktadır. Klinik özelliklere dayalı sınıflandırma günümüzde hala geçerliliğini korumasının yanı sıra gen ekspresyonuna dayalı yeni bir sınıflandırma yayınlanmıştır. Bu sınıflandırma meme kanserini 4 alt sınıfa ayırmaktadır: Lüminal, ERBB2 pozitif, normal benzeri meme ve bazal benzeri. Lüminal grup, meme lüminal hücreleri tarafından östrojen reseptörü (ER) ve östrojen reseptörü (ER) düzenleyici genleri de içeren çok sayıda genin yüksek ekspresyonu ile karakterize olan bir alt gruptur. Bu grupta yer alan tümörlerin hiçbirinde ERBB2 geninin yüksek ekspresyonu gözlenmez. ERBB2 pozitif grupta, bir onkogen olan ERBB2 geninin yüksek ekspresyonun yanı sıra ERBB2 ve GRB7 genlerinin de bulunduğu 17q22.24 bölgesindeki pek çok genin ekspresyonu ile karakterizedir. Bu tümör tipinde östrojen reseptörlerinin düşük ekspresyon seviyeleri gözlemlenir. Normal benzeri meme grubu, bazal epitel ve adipoz hücrelerinin kendine özgü genlerinin ifade edildiği gruptur. Bu grupta tümör hücrelerinin azlığı gözlenmektedir. Bazal benzeri grup, östrojen reseptörü, progesteron reseptörü (PR) ve ERBB2 negatif olan tümörlerdir (Bosch ve diğ. 2010, Eliyatkin ve diğ. 2015). Yapılan çalışmalarda, genç kadınlarda ki meme tümörleri yaşlı kadınlardakine göre daha agresif karakter gösterdiği belirtilmiştir ve genç kadınlardaki çoğu habis meme tümörleri üçlü-negatif veya HER-2-pozitif olarak sınıflandırılmıştır (Gómez-Flores-Ramos ve diğ. 2017).

## **1.2. Endoplazmik Retikulum Stresi**

Endoplazmik retikulum özelleşmiş salgı ve membran proteinlerinin sentezinin ve katlanmasının olduğu, yapıları ve aktiviteleri için gerekli olan post-translasyonel modifikasyonların gerçekleştiği membranöz ağ yapısında bir organeldir. ER'nin pH'sı nötrüye yakın olup sitozole benzerdir ve hücre içi kalsiyum depolanmasından sorumludur. ER protein sentezi için kalite kontrol merkezi olarak tanımlanmaktadır. ER'ye gelen yeni proteinler post-translasyonel modifikasyona uğramadan katlanamazlar. Proteinlerin her katlanma aşamasını sorunsuz bir şekilde tamamlaması için protein katlanmasında rol oynayan moleküller görev almaktadır. Proteinlerin katlanması karmaşık bir seri döngüden oluşmaktadır ve hata olasılığı oldukça yüksektir. Eğer katlanma engellenirse veya hatalı bir katlanma oluşursa ER stresi oluşur. Genel olarak ER stresine viral enfeksiyonlar, büyük ve ağır proteinlerin ER'ye girmesi, küçük ve basit proteinlerin moleküler şaperona bağlı

olarak ya da yüksek molekül ağırlıklı agregatlar halinde bulunması, mutant ve katlanmasında bozukluk olan proteinlerin sentezi sebep olabilmektedir. ER'nin stresi girmesi protein katlama kapasitesini azaltmakta ve katlanmamış proteinlerin birikimine yol açabilmektedir. (Gundeflli ve diğ. 2008, Hussain 2007, Rasheva 2009, Seydel 2012, Szegezdi ve diğ. 2006)

### **1.2.1. UPR**

ER stresi oluştuğunda stresi azaltmaya yönelik hücre içi sinyal iletim yolları aktifleşir. Stresin etkilerini azaltmaya yönelik aktifleşen bu yollar Unfolded Protein Response-katlanmamış protein yanıtı (UPR) olarak adlandırılır. UPR, ER'de bulunan katlanmamış veya hatalı katlanmış proteinlerin degradasyonunu (ERAD) ve tekrar sitoplazmaya dönüşünü sağlamak, ER'de proteinlerin katlanma kapasitesini arttırmak ve normal ER işlevini yeniden kurmak için cevap oluşturur. UPR hücre koruyucu bir yanıt olmasına rağmen uzamış ER stresi mitokondri bağımlı veya mitokondri bağımlı olmayan yolları aktive ederek programlı hücre ölümüne sebep olur. ER, mitokondriden bağımsız olarak ER stresini düzenleyerek apoptoza hatta nekroza sebep olabilecek bir organel olarak kabul edilmektedir. Bir kaç programlı hücre ölüm yolağı ER stresi sırasında aktive edilir (Gundeflli ve diğ. 2008, Hussain 2007, Rasheva 2009, Seydel 2012, Szegezdi ve diğ. 2006, Boelens 2007).

### **1.2.2. Endoplazmik Retikulum Stresi Moleküler Mekanizması**

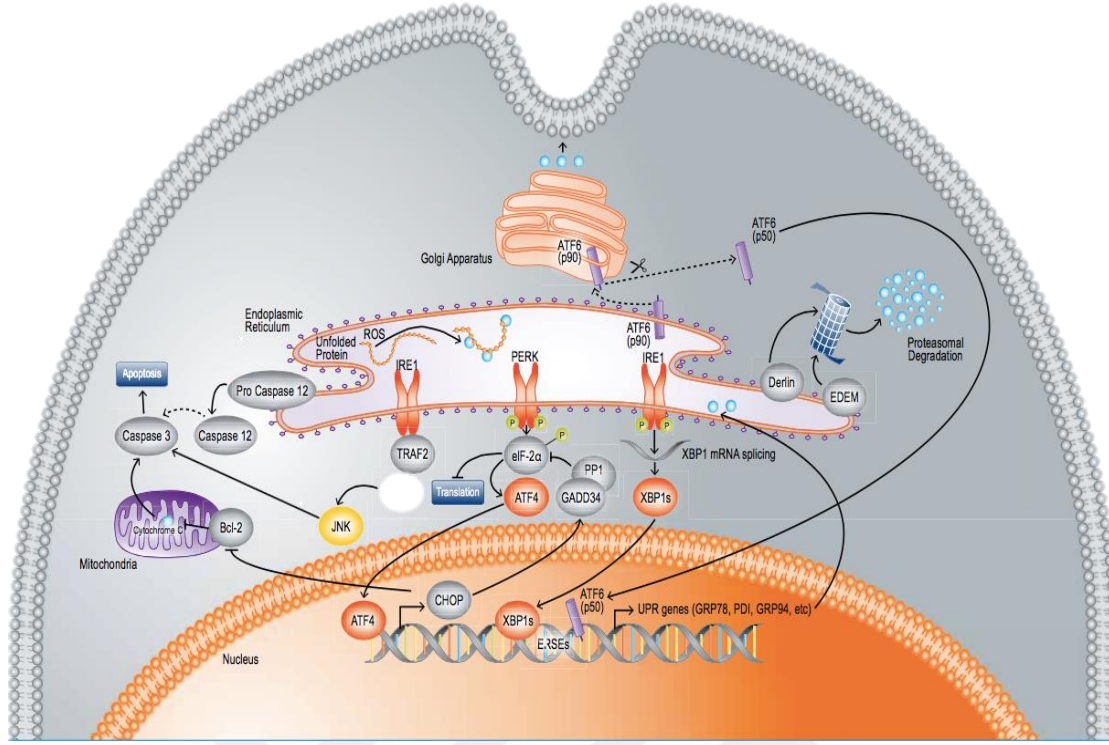
UPR'nin aktivasyonu PERK, ATF6 ve IRE1 olarak adlandırılan üç farklı ER transmembran protein yolları ile olmaktadır. ER'de bulunan GRP78/BiP bir şaperon proteini ve UPR düzenleyicisidir. IRE, PERK ve ATF6 yollarının aktivasyonunda ve ER stres cevabının oluşturulmasında görev almaktadır. (Gundeflli ve diğ. 2008, Hussain 2007, Rasheva 2009, Seydel 2012, Szegezdi ve diğ. 2006). Normal hücrel koşullar altında, PERK, IRE1 ve ATF6, GRP78/BiP ile kararlı birleşikler oluştururlar ve inaktif durumda kalırlar. GRP78/BiP, ER lüminal bölgeye bağlanmayı sağlar ve PERK ile IRE1'in aktivitesini önler. GRP78/BiP'nin ATF6'ya bağlanması, Golgi-lokalizasyon sinyallerini bloke eder ve ATF6'nın ER membranından ayrılmasına engel olur. Hücrel stres

oluştduğunda GRP78/BiP, PERK, IRE1 ve ATF6'dan ayrılır ve böylece bu proteinin inhibitör etkisi ortadan kalkmış olur.

GRP78/BiP serbest bırakılması ile PERK oligomerize olur ve bu durum PERK'in otofosforilasyonu ile sonuçlanır. Aktive edilmiş PERK ökaryotik translasyon başlatma faktörü  $2\alpha$ 'yı (eIF2 $\alpha$ ) fosforile eder ve translasyon başlangıç kompleksinin oluşumu inhibe edilir. Genel protein sentezi durur (Wang ve diğ. 2014). eIF2 $\alpha$ 'nın PERK tarafından fosforilasyonu, ATF4 mRNA'nın translasyonunu teşvik eder, bu da CHOP'un (GADD153 olarak da bilinen C/EBP homolog protein-10) transkripsiyonel indüksiyonu ile sonuçlanır. CHOP promotöründe bir ER stres cevap elementi içeren ve ATF4 ile ATF6 tarafından uyarılan bir bZIP (bazik lözün fermuarı) transkripsiyon faktörüdür. C/EBP ve fos-jun ailelerinin üyeleri ile heterodimer oluşturabilir. Ayrıca CHOP, p38 mitojenle etkileşen protein kinaz (p38MAPK) tarafından da aktive edilir. CHOP, C/EBP aile üyeleri ile birlikte mitokondriyal hücre ölüm yollarında da yer alır (Boelens ve diğ. 2007). ATF4, oksidatif stres, amino asit sentezi, protein katlanması ve farklılaşması gibi hücre sağ kalım genlerini düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür.

IRE1, ER lüminal dimerizasyon, sitozolik kinaz ve endoribonükleaz bölgeleri içeren tip-1 ER transmembran proteindir. GRP78/BiP'nin IRE1'den ayrılması ile IRE1'in dimerizasyonu ve otofosforilasyonu gerçekleşir ve endoribonükleaz bölgesi aktif olur. IRE1'in hedefi X-box bağlayıcı protein 1'i (XBP-1) kodlayan mRNA'dır. XBP-1 mRNA'sının 26 nükleotidlik bölgesini keserek çerçeve kayması yaratır ve XBP-1s formunu oluşturur (Wang ve diğ. 2014). XBP-1s, protein katlanması, kalite kontrolü, protein salgılanması ve ERAD ile bağlantılı UPR hedef genlerinin transkripsiyonunu artırır (Kadowaki 2013).

GRP78/BiP'nin ATF6'dan ayrılması, ATF6'nın Golgi kompleksine göç etmesine izin veren Golgi-lokalizasyon sinyalleri (GLS1 ve GLS2) oluşumu ile sonuçlanır. S1P enzimi ATF6'yı lüminal bölgeden, S2P enzimi ise transmembran bölgesinden keser. ATF6'nın bZIP bölgesi serbest kalır ve bu durum ATF6'nın nükleusa göç etmesine neden olur. ATF6 nükleusta aktif bir transkripsiyon faktörü gibi görev alarak ER şaperonlarını içeren pek çok UPR hedef genini (BiP, protein disülfid izomeraz-PD1, GRP94) ve XBP1 genini indükler (Wang ve diğ. 2014, Kadowaki 2013).



**Çizim 1.1.** Endoplazmik retikulum stresi moleküler mekanizma (Abcam, Erişim:17.05.2018)

### 1.2.3. Endoplazmik Retikulum Stresi Apoptoz İlişkisi

ER orta dereceli bir strese maruz kaldığında UPR sağ kalım mekanizması başarılı bir şekilde sürdürülebilir ve hücre içi denge sağlanabilir. Bununla birlikte uzamış ER stresi durumunda UPR'nin devam eden aktivasyonu hücreyi apoptoza sürükler. CHOP, ER stresi kaynaklı apoptoza aracılık eden ve UPR'nin her üç yolağında da kullanılan majör pro-apoptotik bir transkripsiyon faktörüdür. CHOP çeşitli genlerin ekspresyonunu düzenleyerek hücre ölümüne neden olur. Özellikle, CHOP anti-apoptotik Bcl-2 proteininin ekspresyonunu baskılamakta, bu da reaktif oksijen türlerinin üretimini arttırmakta ve hücrenin zarar görmesine neden olmaktadır. CHOP pek çok pro-apoptotik faktör olan GADD34, DR5, Trb3 gibi genlerin ekspresyonlarını artırır. PP1, GADD34'ün düzenleyici alt birimidir ve eIF2α'nın defosforile olmasına sebep olur. Bu durum protein sentezinin tekrar başlamasına ve hücrede katlanmamış protein yükünün artışına neden olur (Wang ve diğ. 2014, Kadowaki 2013).

Uzun süreli ER stresi sırasında IRE1, TRAF2 ile etkileşir. IRE1-TRAF kompleksi JNK yolunun aktivasyonuna yol açan MAP kinaz kinaz kinazı olarak da bilinen apoptotik sinyal



düzenleyici ASK1'i aktive eder. JNK yolağı genleri apoptozun ana araçlarıdır (Kadowaki 2013). IRE1'in TRAF2'ye bağlanması sadece ER stresine cevap veren bir diğer pro-apoptotik protein olan kaspaz-12'nin aktivasyonuna da yol açar (Wang ve diğ. 2014).

#### **1.2.4. Endoplazmik Retikulum ve Kanser**

Tümör hücrelerinde, başlangıçta düşük vaskülarizasyon, asidik pH, oksijen, glikoz ve diğer hücre için gerekli besin maddelerinin eksikliği olumsuz bir ortamın oluşmasına sebep olur. Bunların hepsi ER stresi oluşum sebebi olabilecek nitelikte faktörlerdir. Özellikle düşük glikoz mevcudiyeti ER içerisindeki yanlış katlanmış proteinlerin birikmesine yol açan protein glikosilasyonuna neden olur ve ATP üretimi etkilenir (Wang ve diğ. 2014). GRP78/BiP pek çok tümör hücresinde yüksek ekspresyon seviyelerinde bulunarak kanser hücrelerinin proliferasyonuna ve hayatta kalmasına katkı sağlar (Lee 2007). GRP78/BiP gen ekspresyonunun baskılanması tümör hücresi büyümesini, ilerlemesini ve metaztasını inhibe ettiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Kadowaki 2013, Lee 2007).

Meme kanseri hastalarının tedavilerinde özellikle ön planda tutulan iki belirteç vardır; hormon reseptör durumu ve Her2/neu durumu. Bu iki biyobelirteç tedavi yanıtı alınmadığı durumlarda tedavi direncinin kırılmasında önem arz etmektedir. Yapılan çalışmalarda GRP78'nin yüksek ekspresyonu varlığında kanser hücrelerinin topoizomera inhibitörlerine direnç kazandığı belirtilmiştir (Lee 2007). Faz II ve III durumunda olan 167 meme kanseri vakası ile tedavi öncesi yapılan bir çalışmada biyopsi örneklerindeki hücrelerin %67'sinde GRP78'in yüksek gen ifade düzeyi olduğu ve bu hastalarda rekürrens riskinin daha yüksek olduğu bulunmuştur. Alınacak olan kemoterapi öncesi GRP78'in durumunun belirlenmesi ilaç etkileşiminde fark yaratabileceği bu çalışmada ortaya atılmıştır (Lee ve diğ. 2006).

Meme tümörlerinde, gastrik tümörlerde, hepatosellüler karsinomlarda, yemek borusu adenokarsinomlarında XBP1, ATF6, CHOP, GRP78/BiP, GRP94 ve GRP170 artmış ekspresyonları bildirilmiştir (Boelens ve diğ. 2007).

### **1.3. Pachymic Asit**

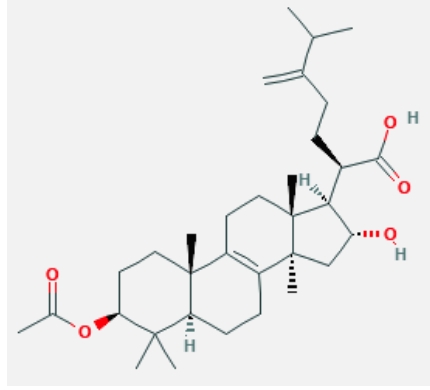
Bazı alternatif tedavilerin uygulanışı ve kullanımının geleneksel değeri ve geçmişi vardır. Geleneksel Çin tıbbi milattan önce 770 yılından beri tedavi amaçlı kullanılmaktadır.

Örnek olarak, bitkilerden elde edilen triterpenoidler genellikle pek çok Asya ülkesinde tıbbi amaçlarla kullanılmakta ve bu bileşikler üzerine yapılan bilimsel çalışmalar hızla artmaktadır.

Bitkilerden elde edilen triterpenoidler genellikle birçok Asya Ülkesinde tıbbi amaçlarla kullanılmaktadır. *Poria cocos* (*Wolfiporia cocos*) Fu-Ling olarak bilinmektedir ve Asya ülkelerinde yatıştırıcı ve diüretik etkisi sebebiyle kullanılmaktadır. *P. cocos*'un (*Wolfiporia cocos*) alkolik özütleri çeşitli lanostane tip triterpenoid içermektedir (Gapter ve diğ. 2005). Pachymic asit, *Poria cocos* (*Wolfiporia Cocos*) alkolik özütünün ana bileşenidir (Ling ve diğ. 2010).

Pachymic asit, çeşitli Pinus türlerinin kökünde parazit olarak yaşıyan bir mantar türü olan *Wolfiporia cocos* 'dan (diğer adı *Poria cocos*) elde edilebilen doğal bir triterpenoid kimyasaldır (Çizim 1.2.). *Wolfiporia Cocos*, Doğu Asya, Avustralya, Amerika ve Afrika'da yaygın olarak bulunmaktadır. Bu mantarların kurutulmuş sklerotiaları (hif düğümleri-çok hücreli dayanıklı yapılar) Çin, Kore ve Japonya'da geleneksel tıp adı altında ilaç olarak kullanılırken Amerikalılar tarafından bir tür gıda olarak tüketilmektedir (Shu ve diğ. 2013). Son çalışmalar, Fu-Ling'in kanser hücrelerine olan etkisine odaklanmıştır ve *Wolfiporia Cocos* 'un doğrudan etkisini belirlemek için klinik çalışmalar halen devam etmektedir.

Son çalışmalar, triterpenoid asit tipi birleşiklerin in vivo ve in vitro olarak tümör büyümesini doğrudan inhibe ettiğini göstermiştir. Triterpenoidler lupane, oleanane, ursane, cork ve lanostane tip olarak sınıflandırılmaktadır. İn vivo ve in vitro çalışmalar göstermiştir ki lupane tip triterpenoidlerin güçlü anti-mutasyon, anti-tümör ve anti-inflamatuvar etkileri vardır. Bunun yanında kimyasal reaktiflerden kaynaklanan DNA hasarını azaltmaktadır. Yapılan çalışmalarda lupane tip triterpenoidlerin prostat kanseri, deri kanseri ve meme kanserindeki anti-tümör etkilerinin yanı sıra sinir tümör hücreleri, insan melanoma hücreleri, sarkoma sarkoid tümör hücreleri ve çocuk beyin tümör hücrelerinde proliferasyonu baskıladığı gösterilmiştir (Zhang ve diğ. 2014).



**Çizim 1.2.** Pachymic asitin moleküler yapısı (PubChem, Erişim: 17.05.2018)

#### 1.4. Meme Kanseri Hücre Hattı – MDA-MB231

MDA-MB-231 oldukça agresif, yüksek oranda invazif ve kötü diferansiye olan üçlü negatif insan epitelyal meme adenokarsinom hücre hattıdır. Pleural efüzyondan elde edilmiştir. Bu hücre hattındaki hücreler östrojen ve progesteron reseptörleri içermezler. EGF (epidermal growth factor), TGF $\alpha$  (transforming growth factor alpha), kaspaz-2 ve kaspaz-3 ekspresyonları pozitiftir. E-kaderin ekspresyonu negatiftir. Mutant p53 proteini üretirler (Chavez ve diğ. 2010, Holliday 2011).

## 2. AMAÇ

Bu çalışmanın amacı, literatürde çeşitli kanser hücrelerinde in vitro ve in vivo çalışmalarda anti-proliferatif, anti-tümör, anti-oksidan, anti-inflamatuvar ve anti-emetik etkinliği gösterdiği söylenen, fakat henüz moleküler etki mekanizmaları net olmayan lanostane tip triterpenoidlerden pachymic asit birleşiminin, insan meme kanser hücre hattı MDA-MB-23 üzerindeki gen ekspresyon farklılıklarının tanımlanması ve apoptotik etkilerinin belirlenmesidir.

Farklı kanser hücrelerinde lanostane tip triterpenoid tedavisi sonucunda hücre sinyal yollarındaki etkileri gösterilmiştir. Yapılan bu çalışmanın hedefleri arasında elde edilmesi planlanan, meme kanseri hastalığının altında yatan moleküler mekanizmalara yönelik yeni veriler ile pachymic asidin ER stres sinyal yollarına etki edip etmediğinin belirlenmesi bulunmaktadır.

Çalışmada, meme kanseri hücre hattı (MDA-MB-231) kültüre edilmiştir. Hücreler, Pachymic asit ile farklı konsantrasyon ve sürelerde muamele edilmiştir. PA'nın meme kanseri hücrelerine olan proliferatif etkileri, gerçek zamanlı hücre elektronik algılama sistemiyle belirlenmiştir ve hücrelerdeki gen ekspresyon farklılıkları tespit edilmiştir. Literatürde PA'nın meme kanseri hücre kültürlerindeki (MDA-MB-231) apoptotik etkileri ve buna yol açan moleküler yollar henüz netlik kazanmamış olup bu çalışmada ilk moleküler veriler elde edilmiştir.

### **3. YÖNTEM**

#### **3.1. MDA-MB-231 Hücre Hattı**

İnsan meme kanseri hücre hattı (MDA-MB-231) Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu'ndan (American Type Culture Collection; ATCC) temin edilmiştir.

#### **3.2. Kullanılan Cihazlar**

- TC20 Otomatik hücre sayım cihazı (Bio-Rad)
- BD FACSCalibur Flow Sitometri Cihazı
- Biyogüvenlik kabini (LabCulture, Singapure)
- Derin dondurucu -80°C (Sanyo, Japonya)
- LightCycler 480 Real Time PCR cihazı (Roche, Almanya)
- Karbondioksitsiz etüv (Binder, Almanya)
- Mikro Santrifüj (Sigma, ABD)
- Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)
- Invert mikroskop (Olympus, Japonya)
- Spektrofotometre, NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, ABD)
- Mikropipetler, 10µl, 100µl, 1000µl (Eppendorf, Almanya)
- Vorteks (BioCote, İngiltere)
- Hybex Mikro tüp İnkübatör (SciGene, ABD)

#### **3.3. Kullanılan Kitler**

- Annexin V-FITC Kit (Beckman Coulter, France)
- Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Germany)
- LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green (Roche, Germany)
- RNeasy RNA izolasyon kiti (Qiagen, Hilden, Almanya)

### 3.4. Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeler

- Fetal Bovin Serum (Capricorn Scientific, Güney Amerika)
- 0,05% Trypsin EDTA 1X (Gibco, Thermo Scientific, ABD)
- Leibovitz's L-15 Modification, 1X (Multicell, Wisent Bioproducts, Kanada)
- PBS Dulbecco, Tuzlu Fosfat Tamponu (Merck, Almanya)
- Penisilin/Streptomisin (HyClone, Avusturya)
- Pachymic Acid (TRC, Canada)
- DMSO (ChemCroz, ABD)
- Hücre Kültür Flaskları 25 cm<sup>2</sup> ve 75 cm<sup>2</sup> (Nest, Çin)
- Mikrosantrifüj Tüpler (Axygen, ABD)
- Pipet Uçları (Nest, Çin)
- Filtre 0,2µm (Sartorius, Almanya)
- Primerler (IDT, ABD)
- Falkon tüp 10ml ve 50ml (Nest, Çin)

### 3.5. Hücre Kültürü

Hücre kültürleri canlılık, çoğalma hızı, kontaminasyon yönünden inverted mikroskopta günlük olarak takip edilmiştir.

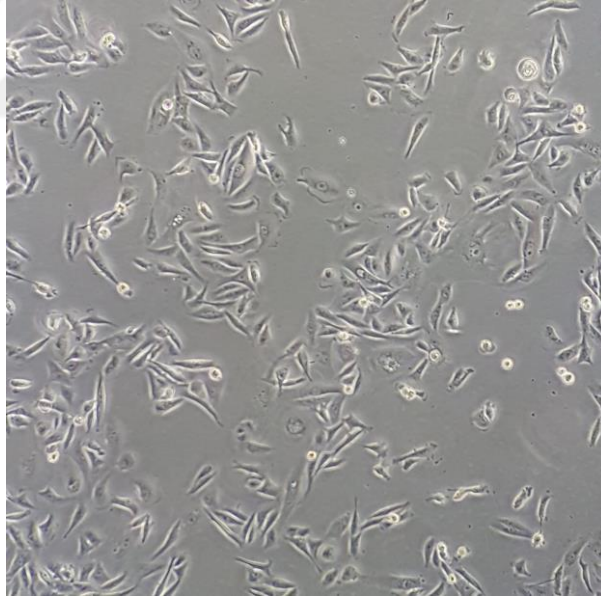
#### 3.5.1. Hücrelerin Çözülmesi

MDA-MB-231 hücre hattı Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu'ndan (ATCC) temin edilmiştir. Hücre hattı 37°C su banyosunda yavaşça çalkalanarak eritilmiştir. Kontaminasyona sebep olmamak adına kapak kısmı suyun dışında tutulmuştur. Eritme işlemi yaklaşık 2 dakika içinde yapılmıştır. Su banyosundan çıkartılan tüp alkollenerek steril kabin içerisine alınmıştır. Hücre süspansiyonu 9 ml kültür medyumuna (L-15 + %10 FBS) içeren falkon tüpe aktarılmıştır. Sekiz dakika 130g'de santrifüj edilmiştir. Otomatik hücre sayım cihazı ile canlı hücre sayısı belirlenmiştir. Ölçüm sonrası toplam hücre sayısı  $1,46 \times 10^6$  hücre/ml, canlı hücre sayısı  $7,37 \times 10^5$  hücre/ml, canlılık yüzdesi %50 olarak belirlenmiştir. Hesaplamalar yapılarak 25 cm<sup>2</sup>'lik kültür kaplarına uygun hücre ekimi

yapılmıştır.

### 3.5.2. Hücrelerin Çoğaltılması

MDA-MB-231 hücreleri CO<sub>2</sub>'siz ve 37°C'lik atmosferde, %10 FBS içeren Leibovitz's L-15 Medium besi yerinde kültüre edilmiştir. Hücrelerin pasajlanması 4-5 günde bir olmuştur. Hücreler tripsin-EDTA ile kaldırılmıştır. Tuzlu fosfat tamponu (PBS) ile yıkandıktan sonra 130g'de 8 dakika santrifüj edilmiştir. Yüzeyi yaklaşık %80 kaplanan kültür kaplarına kendi içinde pasajlama yapılmıştır. Tripsinle muamele edilen hücrelerin, santrifüjden sonra besi yeri uzaklaştırılmıştır. Hücre stoklanması için DMSO içeren soğuk büyüme medyumu hazırlanmıştır. Soğuk büyüme medyumu (L-15 +%10 FBS) içine DMSO'nun son konsantrasyonu %5 olacak şekilde eklenmiştir. Hücre süspansiyonu DMSO içeren soğuk büyüme medyumu içinde 1,5 ml'lik kriyotüplerde -80°C' de saklanmıştır.

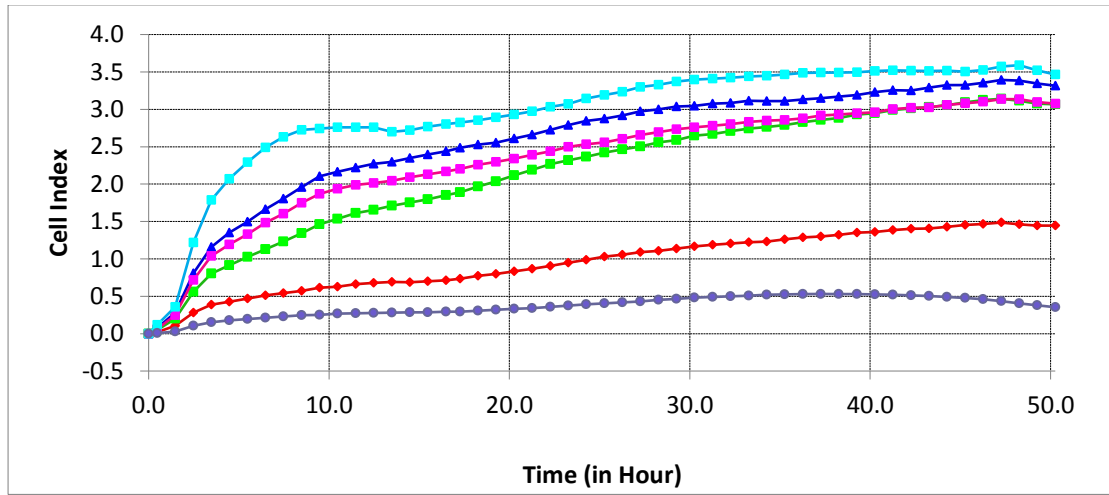


**Çizim 3.1.** MDA-MB231 insan meme kanseri hücreleri

### 3.6. Hücre Proliferasyonu Optimizasyon Çalışması

MDA-MB-231 hücrelerinin proliferere olduğu ideal hücre sayısının belirlenmesi amacıyla gerçek zamanlı elektronik hücre algılama sistemiyle (XCELLigence RTCA) proliferasyon

eğrisi belirleme deneyi yapılmıştır. E-platelerin (mikroelektrot içeren özel hücre kültürü kapları) her bir kuyusuna öncelikle 100 mikrolitre MDA-MB-231 Leibovitz's L-15 Medium besi yeri eklenmiştir ve 30 dakika kuyulara yerleşmesi için beklenmiştir. Otomatik hücre sayım cihazı ile hücre sayımı yapılmıştır ve farklı sayılarda ( 10000, 15000, 20000, 25000, 30000, 35000) hücre karışımı hazırlanmıştır. Hücreler, içinde uygun besi yeri bulunan kuyulara 100'er mikrolitre olacak şekilde dağıtılmıştır. Belirlenen e-plate planlaması RTCA yazılımı barındıran bilgisayara girilmiştir. Hücrelerdeki değişiklikler deney boyunca her 60 dakikada bir inkübatör içindeki xCELLigence cihazı ile kaydedilmiştir. Çalışma sonrasında ideal hücre sayısı 20000 olarak belirlenmiştir.



**Çizim 3.2.** Meme kanseri hücreleri proliferasyon çalışması

### 3.7. Pachymic Asit Ana Stok Çözeltinin Hazırlanması

Toz halinde 10mgr satın alınan Pachymic asit ana stok içerisinde 20mM olacak şekilde DMSO içerisinde çözülmüştür. Deneyde kullanılan ara stoklar taze olarak hazırlanmış ve kullanılmıştır. Ana stok Pachymic asit -80°C'de muhafaza edilmiştir.

### 3.8. Sitotoksisite Testi

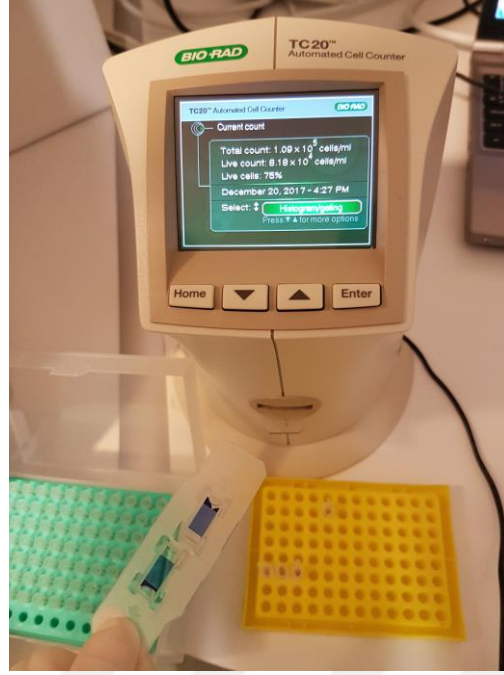
Pachymic asidin MDA-MB231 hücreleri üstüdeki sitotoksik miktarını belirlemek için XCELLigence RTCA sistemi kullanılmıştır. PA doz grupları 30, 50, 100, 150, 200 ve 250 µM olarak belirlenmiştir. Ara stok PA solüsyonları çalışma için 20mM ana stoktan



hazırlanmıştır. E-platelerin (mikroelektrot içeren özel hücre kültürü kapları) her bir kuyusuna öncelikle 100 mikrolitre MDA-MB-231 Leibovitz's L-15 Medium besi yeri eklenmiştir ve 30 dakika kuyulara optimizasyonu için beklenmiştir. Hücre sayımı sonrası 20000 meme kanseri hücreleri her bir kuyuya eklenmiştir. Belirlenen e-plate planlaması RTCA yazılımı barındıran bilgisayara girilmiştir. Hücrelerin kuyulara yapışması için 24 saat 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Hücrelerin kuyu tabanına yapışması sonrasında PA doz grupları eklenmiş ve 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Hücrelerdeki değişiklikler deney boyunca her 30 dakikada bir inkübatör içindeki xCELLigence cihazı ile kayıt edilmiştir. Deney sonunda Pachymic asidin hücreler üzerindeki IC<sub>50</sub> (hücrelerin %50'sinin çoğalmasını baskılayan doz) değeri 150 µM olarak belirlenmiştir. Bu değer cihaz tarafından kontrol grupları hariç uygulanan tüm doz gruplarının belirli bir saatte logaritmalarının alınması ve bu değerle birlikte hücre indeks değerlerine karşı bir grafik çizilmesi ile hesaplanmıştır.

### **3.9. Tripan Mavisi Boyama ile Otomatik Hücre Sayımı**

Hücre sayımı için hücre pelleti 2-3 ml besi yeri içinde homojenize edilmiştir. Hücre süspansiyonu ve tripan mavisi boyası 1:1 oranında karıştırılmıştır. Boyalı karışımın yarısı TC20 Otomatik hücre sayım cihazının (Çizim 3.3) lamına yüklenmiştir. Hücre sayımı otomatik olarak gerçekleştirilmiştir.



**Çizim 3.3.** Otomatik hücre sayım cihazı ve yükleme lamı

### 3.10. Annexin –V FITC –PI ile Apoptoz Tayini

Meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231 üzerinde uygulanan Pachymic asit tedavisi ile hücrelerde tetiklenen doz ve zaman bağımlı apoptozun ve nekrozun kantitatif tayini amacıyla akış sitometri ile Annexin-V Apoptoz/Nekroz Analizi yapılmıştır. Hücrelere tripsinizasyon işlemi yapılmıştır ve hücreler soğuk PBS ile yıkanmıştır. 500g'de 5 dakika santrifüj edilen hücreler otomatik hücre sayıcı kullanılarak sayılmıştır. Hazırlanan  $2 \times 10^5$  hücre/mL süspansiyonu ile aşağıdaki basamaklar izlenerek apoptoz deneyi kurulmuştur.

- 10X Bağlayıcı Buffer 1X'e dilüe edilmiştir.
- Dilüe edilen buffer buzda bekletilmiştir.
- 250µgr PI 1ml 1x bağlayıcı buffer içinde çözülmüştür.
- Hazırlanan solüsyon buzda bekletilmiştir.
- Kullanımdan sonra kalan solüsyonlar +4°C' de muhafaza edilmiştir.
- Hücreler 1x bağlayıcı buffer içinde son hacim 100µl olacak şekilde ayarlanmıştır.
- 100µl'lik hücre süspansiyonunun içine 1µl annexin V-FITC solüsyonu ve 5µl çözülmüş PI eklenmiştir.
- Hücreler buz içinde karanlıkta 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır.

- Hücre-boya süspansiyonunun üstüne 400µl soğuk 1x bağlayıcı buffer eklenmiştir ve yavaşça karıştırılmıştır.
- Hücre-boya süspansiyonu 30 dakika içerisinde akış sitometrisi ile değerlendirilmiştir.

### 3.11. RNA İzolasyonu

25 cm<sup>2</sup>'lik flaklara ekilen hücreler Pacyhmic asidin farklı dozlarıyla 24, 48, 72 saat boyunca muamele edilmiştir. RNA izolasyonu için flaklardaki besi yeri dökülmüştür. Hücreler PBS ile yıkandı ve tripsin-EDTA ile muamele edilmiştir. RNA için ayrılan hücreler PBS ile yıkanmıştır. Kaldırılan hücreler otomatik hücre sayım cihazı ile ölçülmüştür. Hücreler santrifüj edilmiştir ve hücre pelleti üstüne 350µl B-mercaptoethanol içeren buffer RLT eklenmiştir. RNA eldesi için aşağıdaki basamaklar izlenmiştir:

- Hücre süspansiyonunun üstüne 350µl (1:1) %70 taze hazırlanmış ethanol eklenmiştir.
- Pipetaj yapılmıştır.
- 700µl örnek RNeasy Mini Spin kolonuna eklenmiştir.
- 8000g'de 15 saniye santrifüj edilmiştir. Altta toplanan sıvı atılmıştır.
- Spin kolona 700µl Buffer RW1 eklenmiştir.
- 8000g'de 15 saniye santrifüj edilmiştir. Altta toplanan sıvı atılmıştır.
- Spin kolona 500µl Buffer RPE eklenmiştir.
- 8000g'de 15 saniye santrifüj edilmiştir. Altta toplanan sıvı atılmıştır.
- Spin kolona tekrar 500µl Buffer RPE eklenmiştir.
- 8000g'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Altta toplanan sıvı atılmıştır.
- Spin kolon yeni 2ml'lik toplama tüpüne alınmıştır.
- Santrifüjün maksimum hızında (14800 rpm) 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- Spin kolon 1,5 ml'lik tüpe alınmıştır.
- Spin kolonun filtresinin üstüne 50µl RNase free su konulmuştur.
- 8000g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. RNA'lar NanoDrop Spektrofotometre ile ölçülmüştür ve mikrolitredeki mikrogramları belirlenmiştir.

### 3.12. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

RNA izolasyonu sonrasında spektrofotometre ile miktarları ölçülen her RNA örneği eşit miktarda olacak şekilde ayarlanmıştır. RNA örnekleri 0,2ml'lik PCR tüplerine konulmuştur. cDNA sentezi random hexamer primer kullanılarak yapılmıştır. Reaksiyon tablolarında belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.1. - 3.4.). Elde edilen cDNA örnekleri -20°C'de muhafaza edilmiştir.

**Çizelge 3.1.** cDNA sentezi 1. Aşamada kullanılan reaksiyon bileşenleri

Karışım Bileşeni	Hacim	Son Konsantrasyon
Steril H <sub>2</sub> O-PCR Grade	-	RNA miktarına göre değişken; toplam hacim 13µl olacak şekilde
Total RNA	-	300ngr
Random Hexamer Primer	2µl	60µM
Toplam	13µl	

**Çizelge 3.2.** Denatürasyon protokolü

	Sıcaklık	Zaman	Döngü
Denatürasyon	65°C	10 dakika	1
Soğutma	Buz	-	-

**Çizelge 3.3.** cDNA sentezi 2. Aşamada kullanılan reaksiyon bileşenleri

Karışım Bileşeni	Hacim	Son konsantrasyon
Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer, 5x Conc.	4 µl	1x (8 mM MgCl <sub>2</sub> )
Protector RNase Inhibitor, 40U/µl	0,5 µl	20 U
Deoxynucleotide Mix, 10mM	2 µl	1 mM herbiri
Transcriptor Reverse Transcriptase, 20 U/µl	0,5 µl	10 U
<b>Toplam Hacim</b>	20 µl	-

**Çizelge 3.4.** cDNA PCR döngüsü aşamaları

	<b>Sıcaklık</b>	<b>Zaman</b>	<b>Döngü</b>
Primer bağlanması	25 °C	10 dakika	1
Ters Transkripsiyon	55 °C	30 dakika	1
İnaktivasyon	85 °C	5 dakika	1
Soğutma	4 °C	-	-

### **3.13. Gen İfadelerinin Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Tepkimesi (Real Time PCR) ile Belirlenmesi**

PARP1, PERK, CHOP, TRAF2, EIF2A, S1P, ASK1, BCLXL, CASP3, CASP8, ATF6, CASP12, AP1, ATF4, GADD34 ve IRE1 genlerinin mRNA miktar tayinleri LightCycler 480 (Roche, Almanya) Real Time PCR cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Uygulanan PCR karışımı (Çizelge 3.5. ) ve cihaz protokolü tabloda belirtildi (Çizelge 3.6 ).

**Çizelge 3.5.** Eş zamanlı PCR karışımı

<b>Karışım Bileşeni</b>	<b>Hacim</b>
Steril H <sub>2</sub> O-PCR Grade	5 µl
MgCl <sub>2</sub> -25mM	1 µl
PCR Primer Karışımı	2 µl
DNA Master SYBR Green	1 µl
cDNA	1 µl
Toplam Hacim	10 µl

**Çizelge 3.6.** Eş zamanlı PCR programı

<b>Analiz Modu</b>	<b>Döngü Sayısı</b>	<b>Segment</b>	<b>Sıcaklık °C</b>	<b>Tutma Süresi</b>	<b>Belirleme Modu</b>
<b>Ön İnkübasyon</b>					
<b>Yok</b>	1	-	95	10dk	Yok
<b>Amplifikasyon</b>					
<b>Kantitasyon</b>	45	Denatürasyon	95	10sn	Yok
		Bağlanma	Primere bağlı değişken	0-10sn	Yok
		Uzama	72	=(amplikon (bp)/25) sn	Tek
<b>Erime</b>					
<b>Erime</b>	1	Denatürasyon	95	0 sn	Yok
		Bağlanma	65	15 sn	Yok
		Erime	95	0 sn	Devamlı
<b>Soğutma</b>					
<b>Yok</b>	1		40	30 sn	Yok

#### 2.14. Kullanılan Primerler

Seçilen genler için primer dizayn edilmiş ve IDT (Integrated DNA Technology, ABD) firmasından temin edilmiştir. Primerlere ait nükleotid dizileri çizelge 3.7’de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.7.** Kullanılan eş zamanlı PCR primer dizileri

<b>Gen İsmi</b>	<b>Primer Dizisi</b>	<b>Yönü</b>
PERK	5’-CGTGTGTCTGCACATCTTCC-3’	F
	5’-TCCCTGTGCATCAGTCCTTT-3’	R
EIF2A	5’- TGTGCCATCAAATGCAGAAT- 3’	F
	5’- TTCACTTGGAAGCTTGGT-3’	R

ATF4	5'- TCCTGTCCTCCACTCCAGAT-3'	F
	5'- TCATGGCAACGTAAGCAGTG- 3'	R
GADD34	5'- GCCGAGGATGAAAGAGAAGC- 3'	F
	5'- TGA CTCAGCTTCTCCCAAGG- 3'	R
CHOP	5'- AGAGCCCTCACTCTCCAGAT- 3'	F
	5'- TGGTTCTCCCTTGGTCTTCC-3'	R
ATF6	5'- AGGAGAATGAACCCTAGTGTGAG	F
	5'- TGTCCCTGTGCCTCTTTAGCA	R
S1P	5'- ACATTGTCACCTATGGTGCTG- 3'	F
	5'- CCACTGGAGAAGCAACTG- 3'	R
IRE1 (ERN1)	5'- ACAGAGACCTAAAGCCACACA-3'	F
	5'- GCCAAAGTCGGAGATCATGG- 3'	R
TRAF2	5'-CTCATGCTGACCGAATGTCC-3'	F
	5'-GCAGCTCAGGCTTCTCT-3'	R
ASK1	5'- AATCTCCCTGGTGACAGAGC- 3'	F
	5'- GCTCCATGGTCTCTGCTT-3'	R
CASP12	5'- TGGAGAAAGAGAGGCGAACA- 3'	F
	5'- AGGTCAAGTTCAGAACCATTTCG- 3'	R

PARP1	5'- CCACTTCTCCTGCTTCTGGA-3'	F
	5'- ACTTTCTGCTGGTCATCCCA-3'	R
AP1	5'- CGACCTTCTATGACGATGCC- 3'	F
	5'- GTAGCCATAAGGTCCGCTCT- 3'	R
CASP8	5' - AGAGCCTGAGAGAGCGATG - 3'	F
	5' - CACCATCAATCAGAAGGGAAG - 3'	R
CASP3	5' - GAATATCCCTGGACAACA - 3'	F
	5' - ACGCCATGTCATCATCAA - 3'	R
BCLXL	5' - GTAAACTGGGGTTCGCATTGT - 3'	F
	5' - TGGATCCAAGGCTCTAGGTG - 3'	R
B2M	5' - TGACTTTGTCACAGCCCAAGATA - 3'	F
	3' - AATCCAAATGCGGCATCTTC - 3'	R

### 3.15. İstatistiksel Analiz

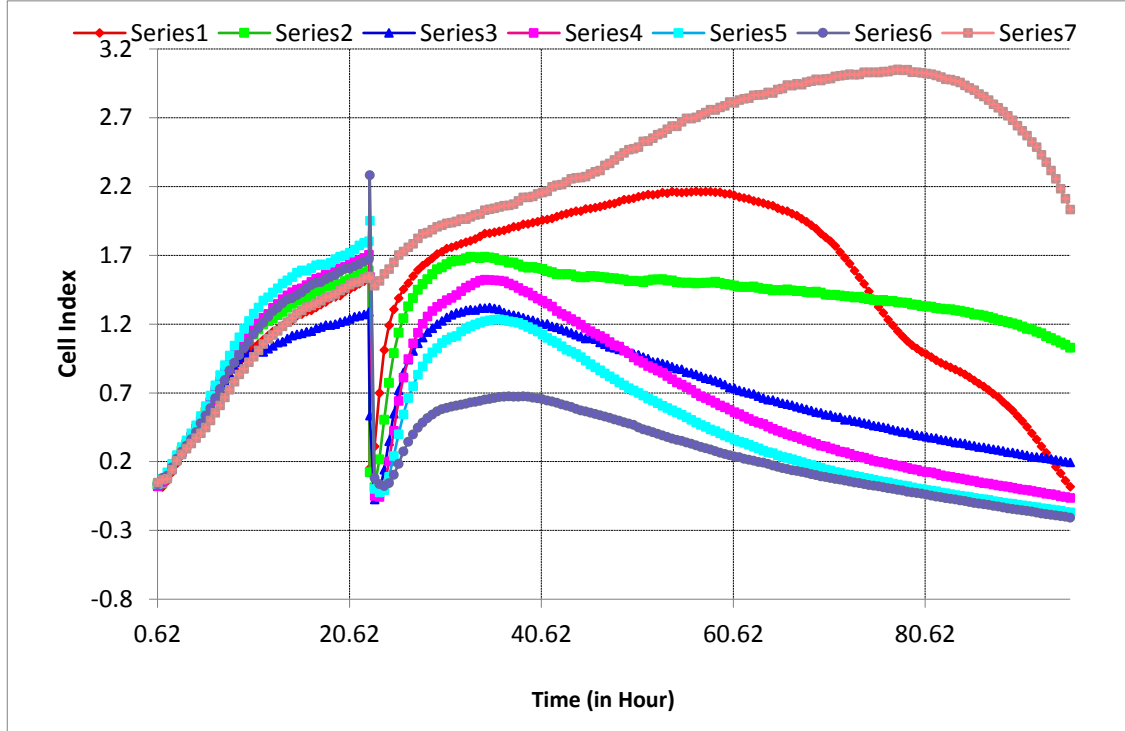
PARP1, PERK, CHOP, TRAF2, EIF2A, S1P, ASK1, BCLXL, CASP3, CASP8, ATF6, CASP12, AP1, ATF4, GADD34 ve IRE1 genlerinin mRNA ifadesindeki farklılıklar REST (Relative Expression Software Tool, 2009) istatistik programı kullanılarak analiz edilmiştir. Akış sitometri sonuçları Cell Quest Pro Version 5.2.1 kullanılarak analiz edilmiştir. Gen ifadesindeki farklılıklar, apoptoz ve hücre canlılığındaki değişimler tek yönlü ANOVA ve HSD post hoc testleriyle karşılaştırılmıştır. SPSS V.21 istatistik programı kullanılmıştır. 'p' değeri 0,05'in altında olan veriler anlamlı kabul edilmiştir.



## 4. BULGULAR

### 4.1. MDA-MB-231 İnsan Meme Kanseri Hücre Kültüründe Pachymic Asidin Sitotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi

Hücre kültürlerinde hücrelerin zamana bağlı çoğalması ve uygulanan farklı dozlardaki PA'nın meme kanseri hücreleri üzerindeki etkileri xCELLigence RTCA sistemi ile incelenmiştir. Bu çalışmada, PA'nın sitotoksik etkilerinin incelenmesi amacıyla 30, 50, 100, 150, 200 ve 250  $\mu\text{M}$  olmak üzere altı farklı doz, meme kanseri hücrelerine uygulanmış ve etkileri 72 saat boyunca takip edilmiştir. Hücre içeren ve madde eklenmeyen kuyular kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. PA'nın 200 ve 250 $\mu\text{M}$ 'lık derişimleri MDA-MB231 hücreleri üzerinde toksik etki göstermiş ve hücre canlılığı ile proliferasyonunda, madde eklenmesinden kısa bir süre sonra önemli derecede azalmaya yol açmıştır. 30 $\mu\text{M}$ 'lık doz uygulamasında, hücreler kontrol grubuna yakın proliferasyon göstermiştir. 50, 100 ve 150 $\mu\text{M}$ 'lık doz uygulamalarında hücre indeks eğrisinde azalma olmuştur. Bu azalma, 200 ve 250 $\mu\text{M}$ 'lık doz uygulamasında olduğu gibi hücrelerde ciddi toksik etki yaratmamıştır. Bu durum PA'nın meme kanseri hücreleri üzerinde etkili bir madde olabileceğini destekler niteliktedir. Çalışma sonunda hesaplamalar yapıldığında  $\text{IC}_{50}$  değeri de 150 $\mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir. Bu sebepten çalışmaya PA'nın 50, 100 ve 150 $\mu\text{M}$ 'lık derişimleri ile devam edilmiştir.



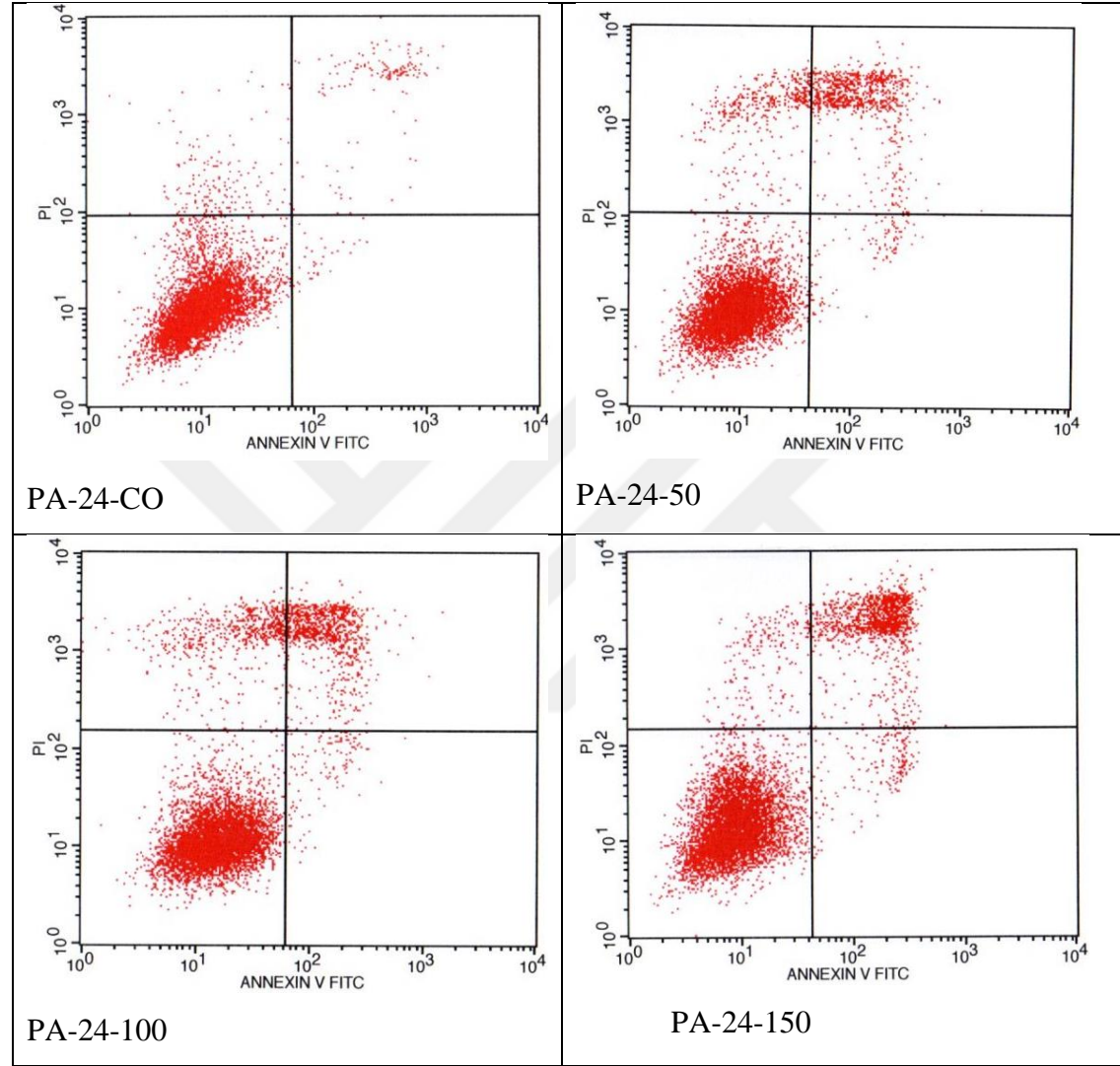
**Çizim 4.1.** PA uygulaması sonrası zamana göre hücre indeks değerlerinin değişimi. Series1: 30  $\mu$ M PA, Series2: 50  $\mu$ M PA, Series3: 100  $\mu$ M PA, Series4: 150  $\mu$ M PA, Series5: 200  $\mu$ M PA, Series6: 250  $\mu$ M PA, Series7: 0  $\mu$ M PA.

#### 4.2. İnsan Meme Kanseri MDA-MB231 Hücre Kültüründe Pachymic Asidin Apoptotik Etkileri

PA'nın meme kanseri hücreleri üzerindeki apoptotik etkileri Annexin V-FITC Kit (Beckman Coulter, France) kullanılarak akım sitometrisinde analiz edilmiştir. Sonuçlar canlı hücreler, erken apoptotik hücreler, geç apoptotik hücreler ve nekrotik hücreler olarak değerlendirilmiştir.

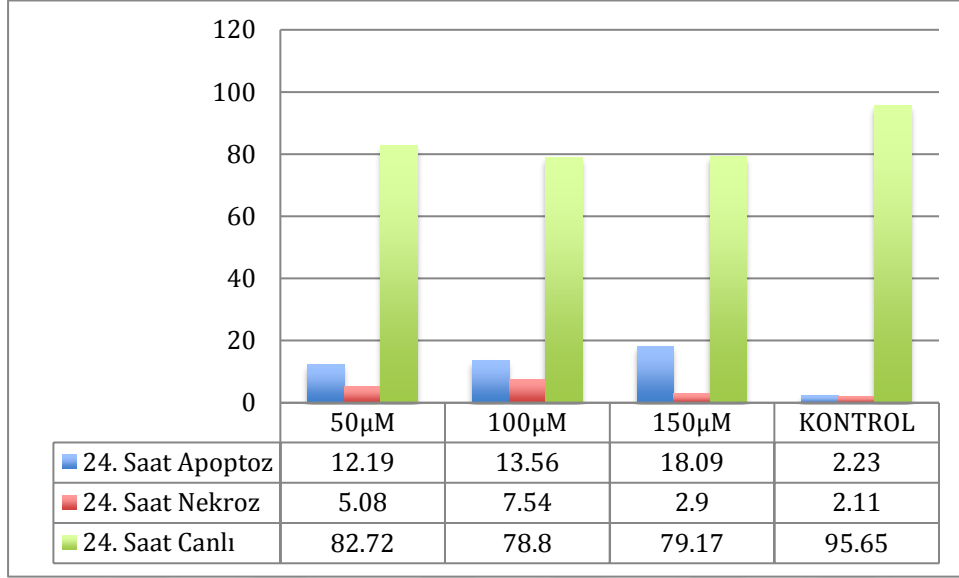
MDA-MB231, 24 saat kontrol hücrelerinde canlılık %95.96, erken apoptoz %0.42, geç apoptoz %1.81 ve nekrotik hücre %2.11 olarak bulunmuştur. Hücelere 50  $\mu$ M PA uygulandığında canlı hücre %82.72, erken apoptoz %1.53, geç apoptoz %10.65 ve nekrotik hücre % 5.08 olarak bulunmuştur. Hücelere 100  $\mu$ M PA uygulandığında canlı hücre %78.8, erken apoptoz %1.57, geç apoptoz %11.93 ve nekrotik hücre % 7.54 olarak bulunmuştur. Hücelere 150  $\mu$ M PA uygulandığında canlı hücre %79,17, erken apoptoz %2.77, geç apoptoz %15.32 ve nekrotik hücre % 2.9 olarak bulunmuştur. Kontrol grubu hücrelerindeki apoptotik oran ile 50, 100 ve 150 $\mu$ M PA uygulanan hücrelerdeki apoptotik

oran karşılaştırıldığında anlamlı bir düzeyde artış olduğu belirlenmiştir ( $p < 0.0005$ ). Uygulanan  $150\mu\text{M}$  PA konsantrasyonu nekrotik hücre yüzdesinde farklılığa sebep olmamıştır ( $p > 0.05$ ).

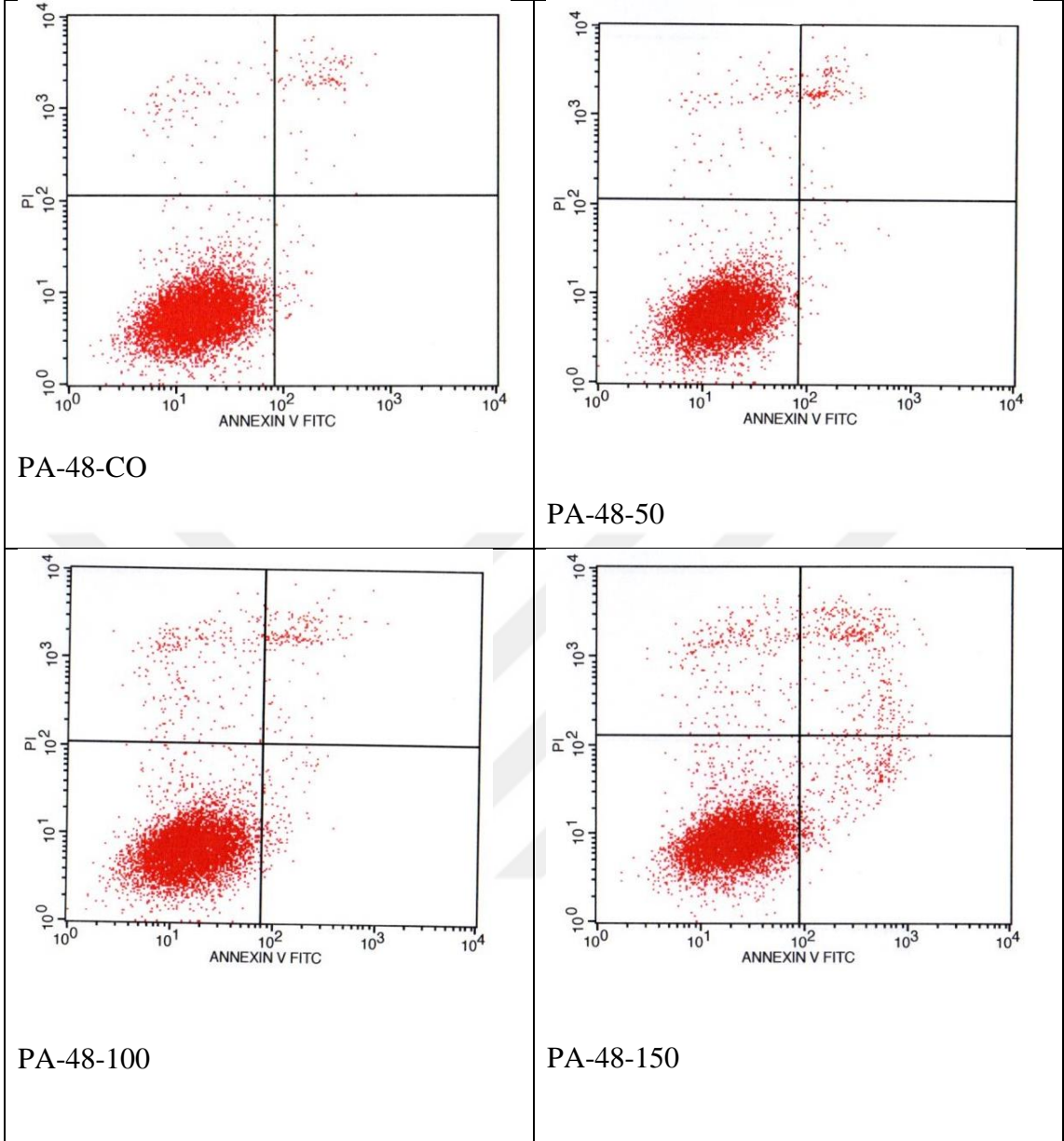


**Çizim 4.2.** Doza ve zamana bağlı Pachymic Asit uygulaması sonrası Annexin V /PI akım sitometri analiz görüntüleri.

**Çizelge 4.1.** MDA-MB231 hücrelerinin 24. saat doza bağlı olarak Pachymic Asit uygulanması sonrası apoptotik, nekrotik ve canlı hücre yüzde değişimi.

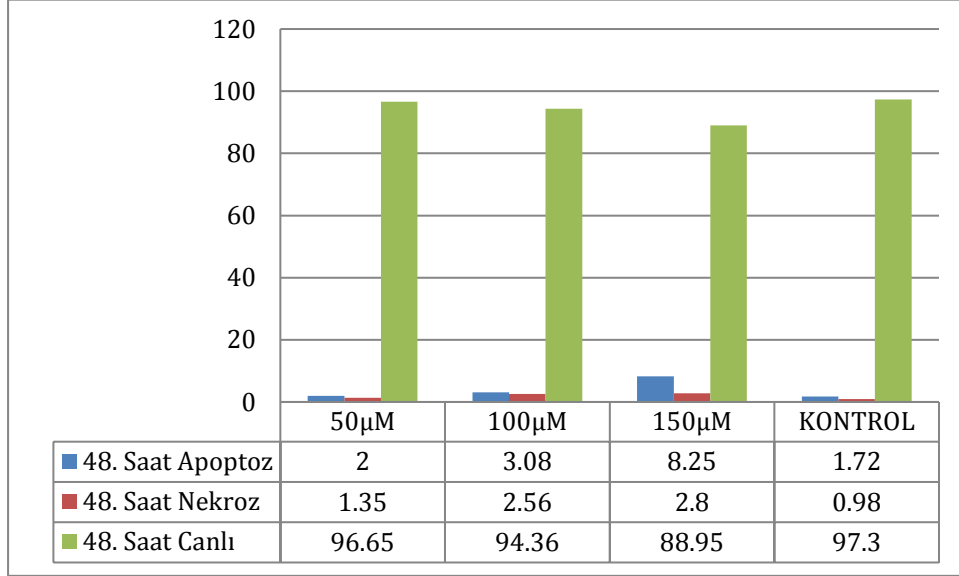


MDA-MB231, 48 saat kontrol hücrelerinde canlılık %97.3, erken apoptoz %0.54, geç apoptoz %1.18 ve nekrotik hücre %0.98 olarak bulunmuştur. Hücrelere 50 µM PA uygulandığında canlı hücre %96.7, erken apoptoz %0.44, geç apoptoz %1.55 ve nekrotik hücre %1.35 olarak bulunmuştur. Hücrelere 100 µM PA uygulandığında canlı hücre %94.4, erken apoptoz %1.23, geç apoptoz %1.85 ve nekrotik hücre % 2.56 olarak bulunmuştur. Hücrelere 150 µM PA uygulandığında canlı hücre %88.9, erken apoptoz %3.88, geç apoptoz %4.36 ve nekrotik hücre % 2.8 olarak bulunmuştur. Kontrol grubu hücrelerindeki apoptotik oran ile 50µM PA uygulanan hücrelerdeki apoptotik oran karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ( $p>0.05$ ). Kontrol grubu ile 100 ve 150µM PA uygulanan hücrelerde apoptoz hücre yüzdesi anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ( $p< 0.0005$ ). Uygulanan 50µM PA dozu sonrası canlı hücre yüzdesi ile kontrol grubu arasında fark yokken ( $p>0.05$ ) 100 ve 150 µM'lık PA uygulaması canlı hücre sayısında düşüşe sebep olmuştur ( $p< 0.0005$ ).

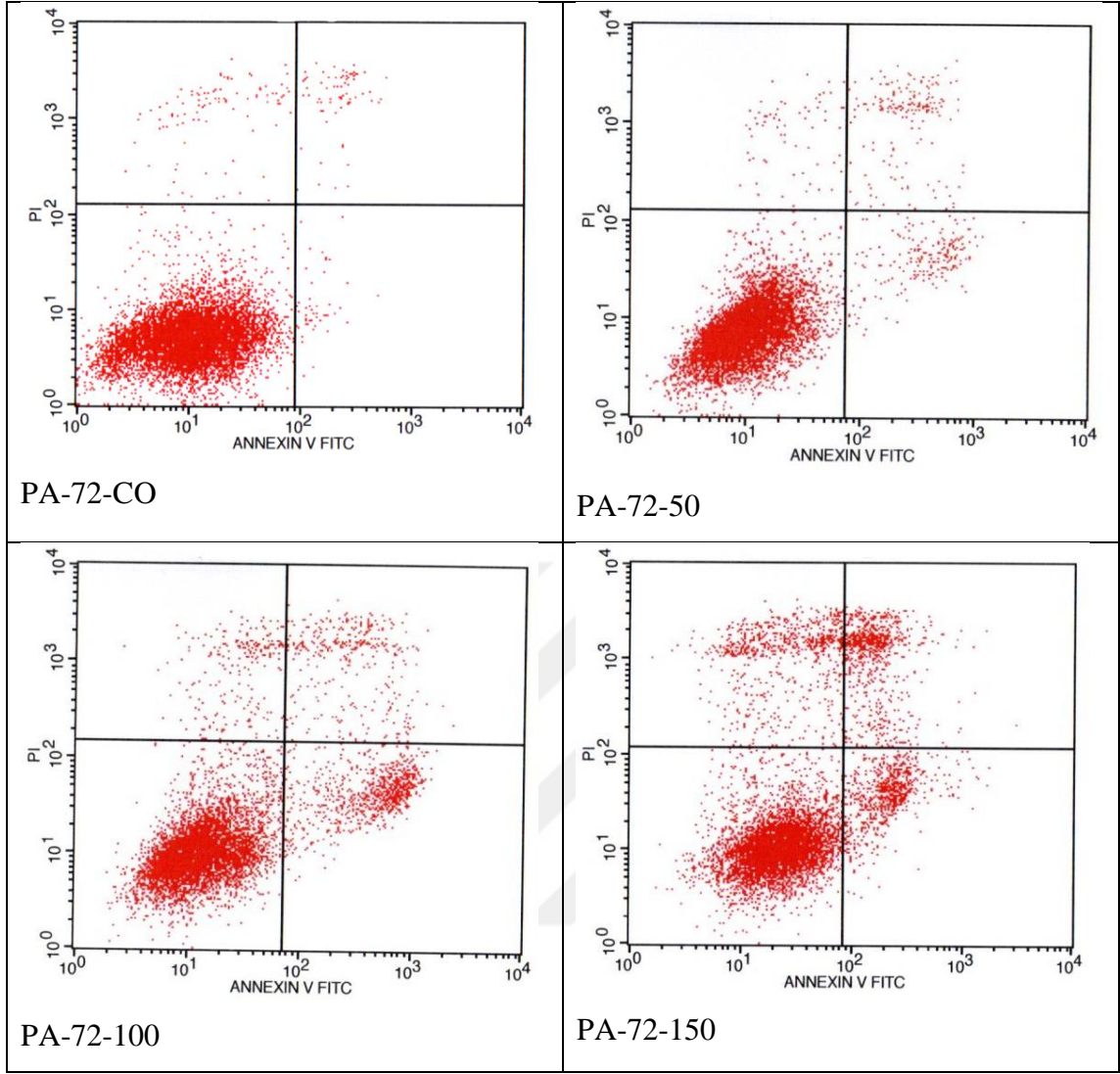


**Çizim 4.3.** Doza ve zamana bağlı Pachymic Asit uygulaması sonrası Annexin V /PI akım sitometri analiz görüntüleri.

**Çizelge 4.2.** MDA-MB231 hücrelerinin 48. saat doza bağlı olarak Pachymic Asit uygulanması sonrası apoptotik, nekrotik ve canlı hücre yüzde değişimi.

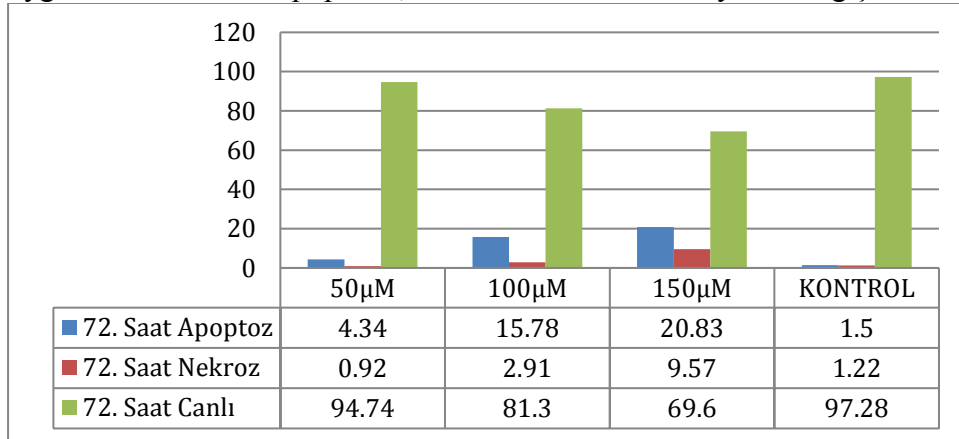


MDA-MB231 72 saat kontrol hücrelerinde canlılık %97.3, erken apoptoz %0.61, geç apoptoz %0.89 ve nekrotik hücre %1.22 olarak bulunmuştur. Hücrelere 50 µM PA uygulandığında canlı hücre %94.7, erken apoptoz %2.23, geç apoptoz %2.1 ve nekrotik hücre %0.92 olarak bulunmuştur. Hücrelere 100 µM PA uygulandığında canlı hücre %81.3, erken apoptoz %11, geç apoptoz %4.80 ve nekrotik hücre % 2.9 olarak bulunmuştur. Hücrelere 150 µM PA uygulandığında canlı hücre %69.6, erken apoptoz %10.39, geç apoptoz %10.44 ve nekrotik hücre %9.57 olarak bulunmuştur. Kontrol grubu hücrelerindeki apoptotik oran ile 50 µM PA uygulanan hücrelerdeki apoptotik oran karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık saptanmıştır ( $p<001$ ). Kontrol grubu ile 100 ve 150µM PA uygulanan hücrelerde apoptoz hücre yüzdesi anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ( $p< 0.0005$ ). Uygulanan PA doz konsantrasyonu arttırıldıkça 72. saatte apoptoza giren hücre yüzdeleri de artmıştır. PA 50µM'lık doz uygulamasında nekrotik hücre yüzdesi kontrol grubuna göre azalmış olarak bulunmuştur ( $p>0.05$ ). Ancak 100 ve 150 µM'lık doz uygulamalarında nekrotik hücre yüzdesi konsantrasyon ile uyumlu olarak artış göstermiştir ( $p<0.0005$ ).



**Çizim 4.4.** Doza ve zamana bağlı Pachymic Asit uygulaması sonrası Annexin V /PI akım sitometri analiz görüntüleri.

**Çizelge 4.3.** MDA-MB231 hücrelerinin 72. saat doza bağlı olarak Pachymic Asit uygulanması sonrası apoptotik, nekrotik ve canlı hücre yüzde değişimi.





### 4.3. İnsan Meme Kanseri MDA-MB231 Hücre Kültüründe Pachymic Asidin Endoplazmik Retikulum Stresi ile İlişkili Genlerin İfadesi Üzerine Etkileri

İncelenen genler için eş zamanlı PCR cihazından pik profilleri elde edilmiştir. Her hücrede sabit düzeyde ifade edilebilen referans gen olarak B2M (Beta-2-microglobulin) kullanılmıştır. Elde edilen pik profillerinden Ct değerleri cihaz tarafından otomatik olarak hesaplanmıştır. Ct değerleri REST Analiz programına girilerek gen ifadelerindeki değişiklikler referans gen karşılaştırması yapılarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.4 ve 4.5)

**Çizelge 4.4.** REST analizi sonrasında yüksek ekspresyon seviyeleri gösteren genler

Süre	Doz	CASP 12	ASK1	IRE1	GADD 34	CHOP	PERK	API	ATF4	TRAF 2	S1P	ATF6
24	50µM	3,149	1,608	1,729	2,25	2,37	1,385	2,181	1,371	1,5	1,231	1,343
	100µM	7,413	3,891	4,287	2,99	2,667	1,688	2,078	1,558	1,5	1,266	1,288
	150µM	67,649	33,128	27,761	6,498	5,56	5,011	4,028	3,215	3,745	2,949	2,497
	Kontrol	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
48	50µM	0,6461	1,479	0,9427	1,597	1,24	0,9593	1,129	0,9828	1,106	1,261	0,8526
	100µM	0,9692	1,542	1,117	1,459	1,521	1,061	1,444	1,193	1,017	1,306	0,9298
	150µM	1,27	2,648	2,014	2,227	3,47	1,231	1,479	1,879	1,169	1,248	0,917
	Kontrol	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
72	50µM	1,05	1,061	0,9965	1,682	1,292	1,098	1,01	1,072	1,385	1,094	0,9201
	100µM	2,092	1,189	1,244	1,141	1,145	0,9726	1,39	0,9265	1,244	1,039	1,24
	150µM	17,63	4,857	6,063	2,211	3,797	1,333	1,959	1,586	1,343	1,057	1,343
	Kontrol	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1



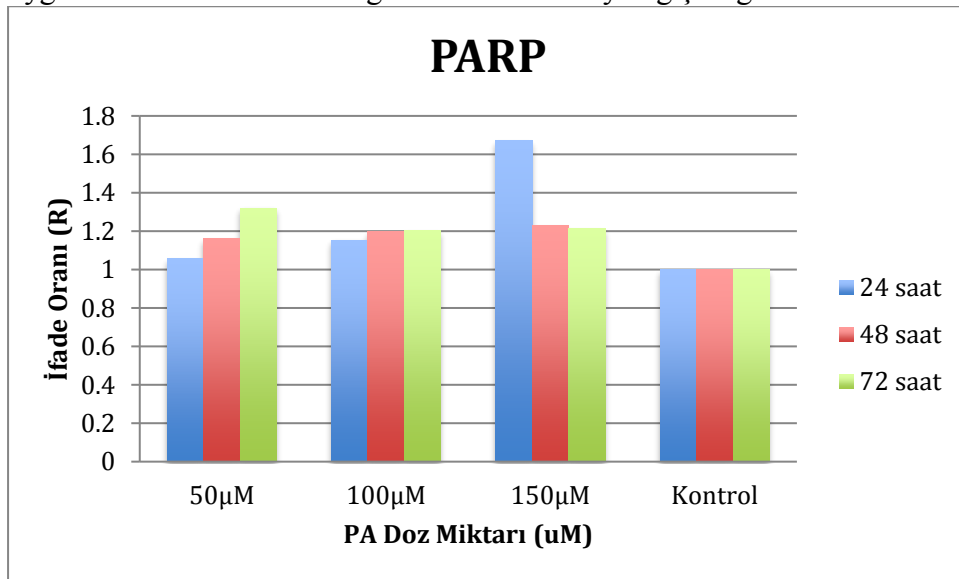
**Çizelge 4.5.** REST analizi sonrasında control grubu ile yaklaşık aynı ekspresyon seviyeleri gösteren genler

Süre	Doz	PARP	BCLXL	CASP3	CASP8	EIF2A
24	50µM	1,057	0,78187	0,97942	0,52304	1,21
	100µM	1,153	1,014	1,495	0,53219	1,068
	150µM	1,67	1,27	1,966	0,72699	1,84
	Kontrol	1	1	1	1	1
48	50µM	1,161	0,93952	1,177	1,709	1,121
	100µM	1,198	1,141	1,366	1,244	1,125
	150µM	1,227	0,86155	1,279	1,711	1,11
	Kontrol	1	1	1	1	1
72	50µM	1,32	1,329	1,333	1,214	0,99309
	100µM	1,202	1,11	1,474	1,035	1,091
	150µM	1,214	0,90752	1,032	0,70956	1,068
	Kontrol	1	1	1	1	1

#### 4.3.1. PARP Gen İfade Değerlendirilmesi

PARP gen ifade düzeyinde 24. saatte 50 ve 100µM PA doz grubunda anlamlı bir farklılık gözlemlenmezken ( $p>0.05$ ) 150µM PA doz grubunda gen ifadesinin anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir ( $p<0.05$ ).

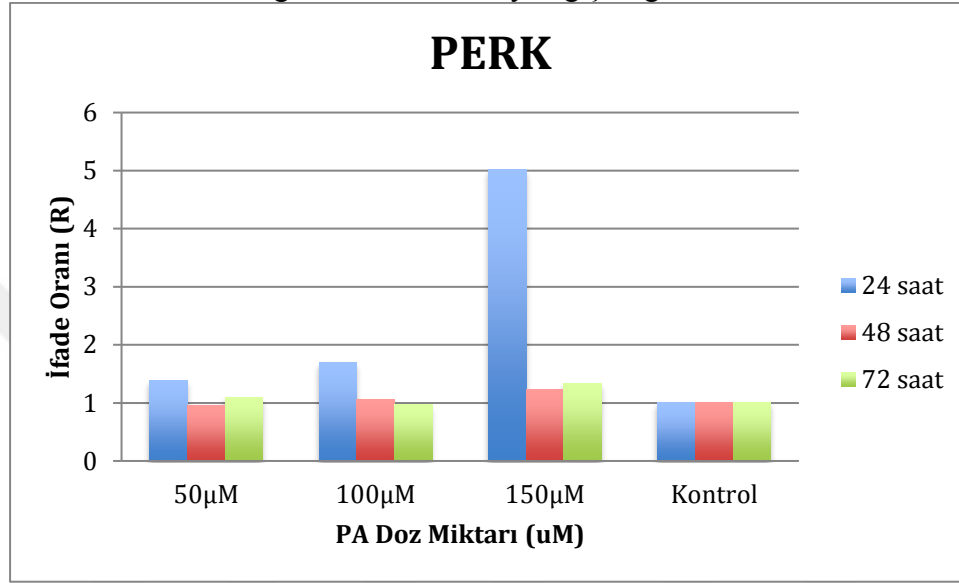
**Çizelge 4.6.** MDA-MB231 hücrelerinin doz ve zamana bağlı olarak Pachymic Asit uygulanması sonrası PARP geninin ifade düzeyi değişikliği.



#### 4.3.2. PERK Gen İfade Değerlendirilmesi

PERK gen ifade düzeyinin 24. saatte 150  $\mu$ M PA doz grubunda anlamlı düzeyde arttığı belirlenmiştir ( $p<0.005$ ).

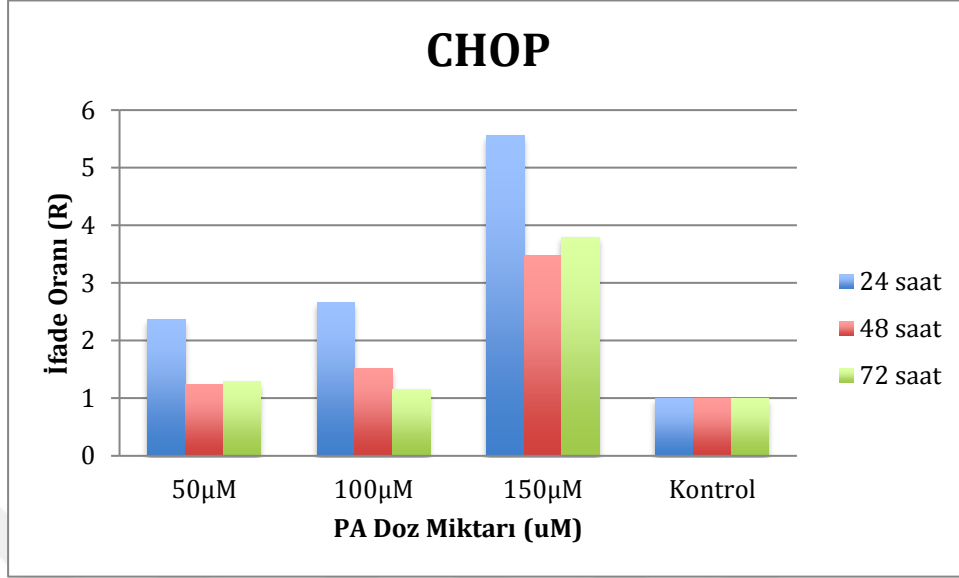
**Çizelge 4.7.** MDA-MB231 hücrelerinin doz ve zamana bağlı olarak Pachymic Asit uygulanması sonrası PERK geninin ifade düzeyi değişikliği.



#### 4.3.3. CHOP Gen İfade Değerlendirilmesi

CHOP geni ifade düzeyinin 150  $\mu$ M PA doz grubunda 24., 48. ve 72. saatlerin hepsinde anlamlı olarak arttığı belirlenmiştir ( $p<0.005$ ). PA uygulamasında 24. ve 48. saatlerde doza bağlı olarak orantısal bir artış görülmüştür.

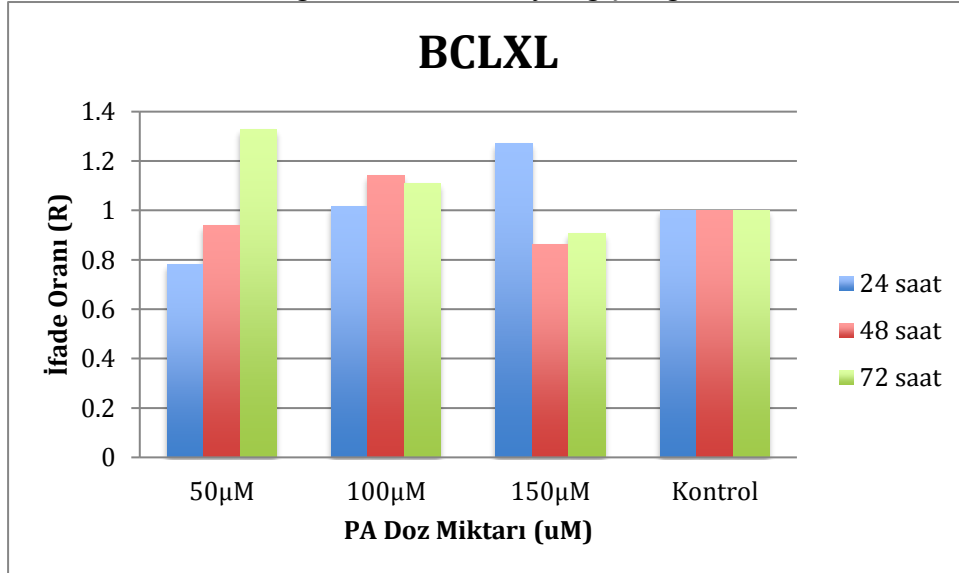
**Çizelge 4.8.** MDA-MB231 hücrelerinin doz ve zamana bağlı olarak Pachymic Asit uygulanması sonrası CHOP geninin ifade düzeyi değişikliği.



#### 4.3.4. BCLXL Gen İfade Değerlendirilmesi

BCLXL geninde doza ve zamana bağlı olarak anlamlı bir değişim olmamıştır.

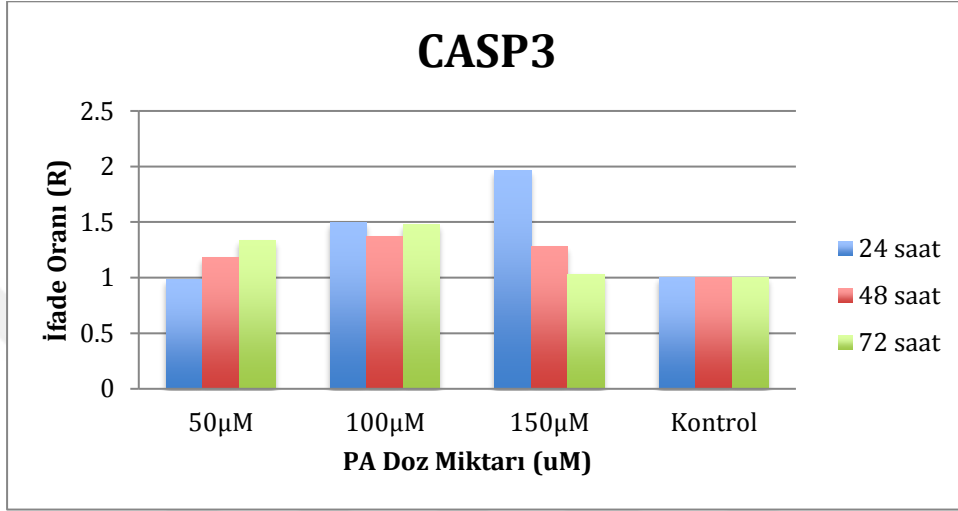
**Çizelge 4.9.** MDA-MB231 hücrelerinin doz ve zamana bağlı olarak Pachymic Asit uygulanması sonrası BCLXL geninin ifade düzeyi değişikliği.



#### 4.3.5. CASP3 Gen İfade Değerlendirilmesi

CASP3 geninde doza ve zamana bağlı olarak anlamlı bir değişim olmamıştır ( $p>0.05$ ).

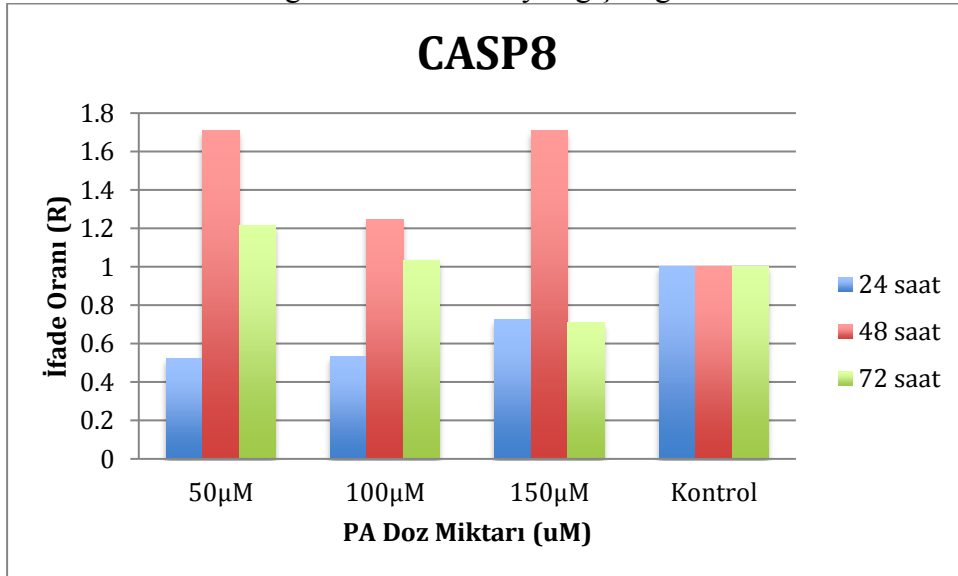
**Çizelge 4.10.** MDA-MB231 hücrelerinin doz ve zamana bağlı olarak Pachymic Asit uygulanması sonrası CASP3 geninin ifade düzeyi değişikliği.



#### 4.3.6. CASP8 Gen İfade Değerlendirilmesi

CASP8 gen ifadesi 24. Saat doz uygulamasında üç farklı dozda da anlamlı olarak azalma görülmüştür ( $p<0.05$ ).

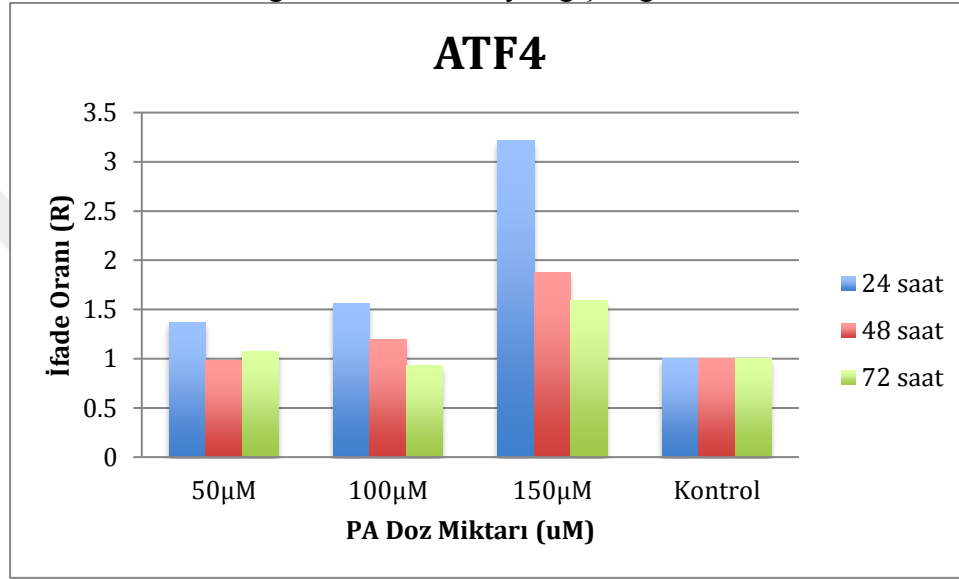
**Çizelge 4.11.** MDA-MB231 hücrelerinin doz ve zamana bağlı olarak Pachymic Asit uygulanması sonrası CASP8 geninin ifade düzeyi değişikliği.



#### 4.3.7. ATF4 Gen İfade Değerlendirilmesi

ATF4 gen ifade düzeyinin incelenen üç farklı saat diliminde, 150µM PA doz grubunda anlamlı düzeyde arttığı belirlenmiştir ( $p<0.05$ ).

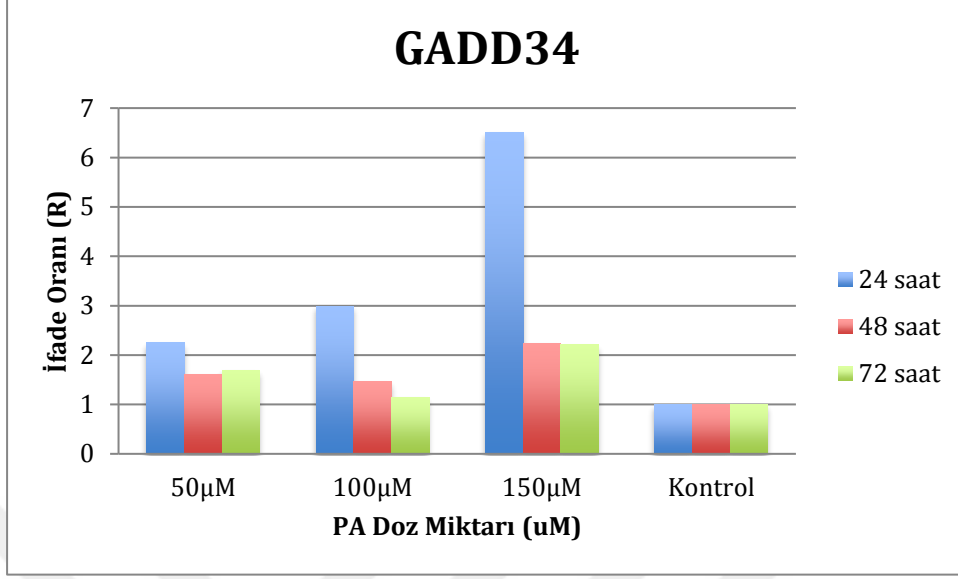
**Çizelge 4.12.** MDA-MB231 hücrelerinin doz ve zamana bağlı olarak Pachymic Asit uygulanması sonrası ATF4 geninin ifade düzey değişikliği.



#### 4.3.8. GADD34 Gen İfade Değerlendirilmesi

GADD34 gen ifadesi 24. Saat doz uygulamasında üç farklı dozda da anlamlı olarak artış görülmüştür ( $p<0.05$ ).

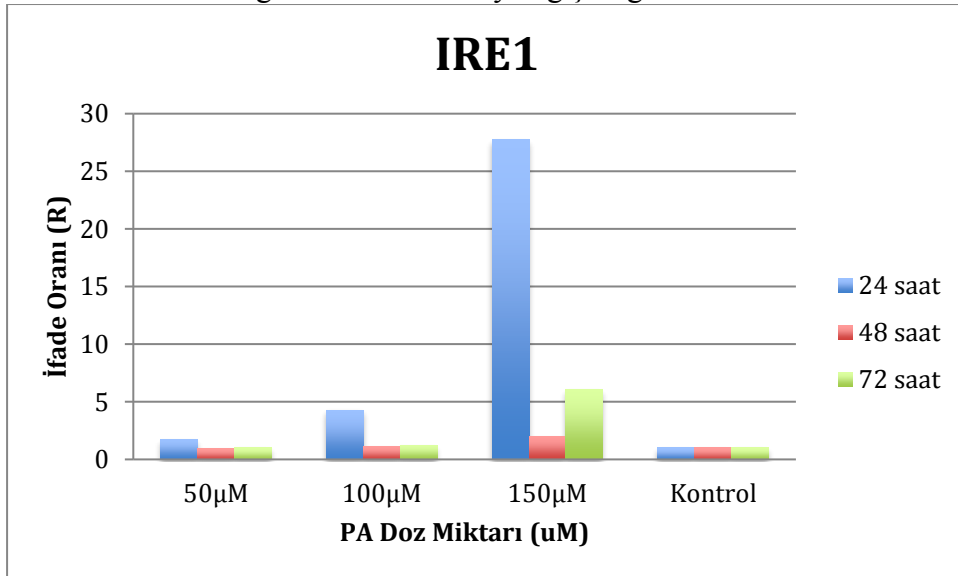
**Çizelge 4.13.** MDA-MB231 hücrelerinin doz ve zamana bağlı olarak Pachymic Asit uygulanması sonrası GADD34 geninin ifade düzey değişikliği.



#### 4.3.9. IRE1 Gen İfade Değerlendirilmesi

IRE1 gen ifade düzeyinin incelenen üç farklı saat diliminde, 150µM PA doz grubunda anlamlı düzeyde arttığı belirlenmiştir ( $p < 0.05$ ).

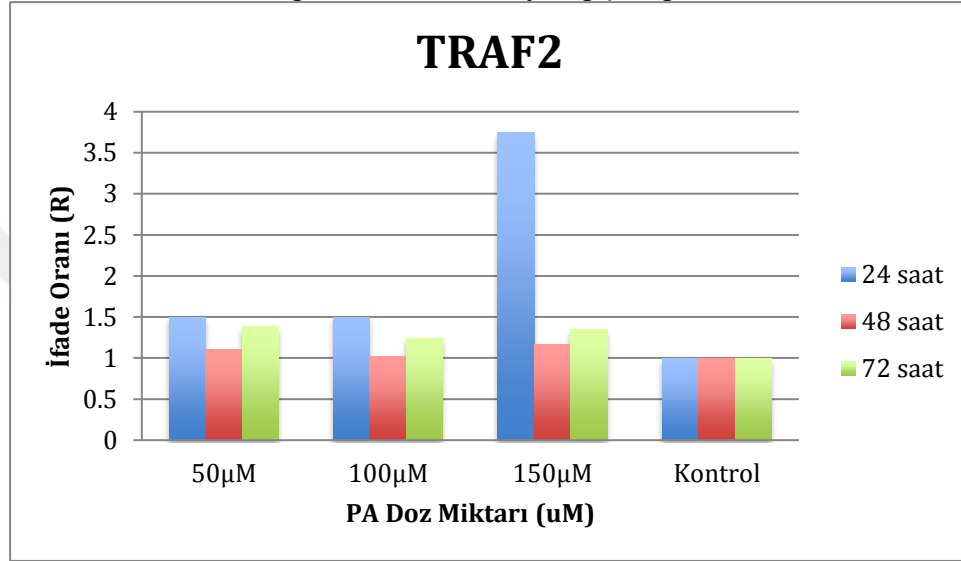
**Çizelge 4.14.** MDA-MB231 hücrelerinin doz ve zamana bağlı olarak Pachymic Asit uygulanması sonrası IRE1 geninin ifade düzey değişikliği.



#### 4.3.10. TRAF2 Gen İfade Değerlendirilmesi

TRAF2 gen ifade düzeyinin 24. saat diliminde, 150 $\mu$ M PA doz grubunda anlamlı düzeyde arttığı belirlenmiştir ( $p < 0.05$ ).

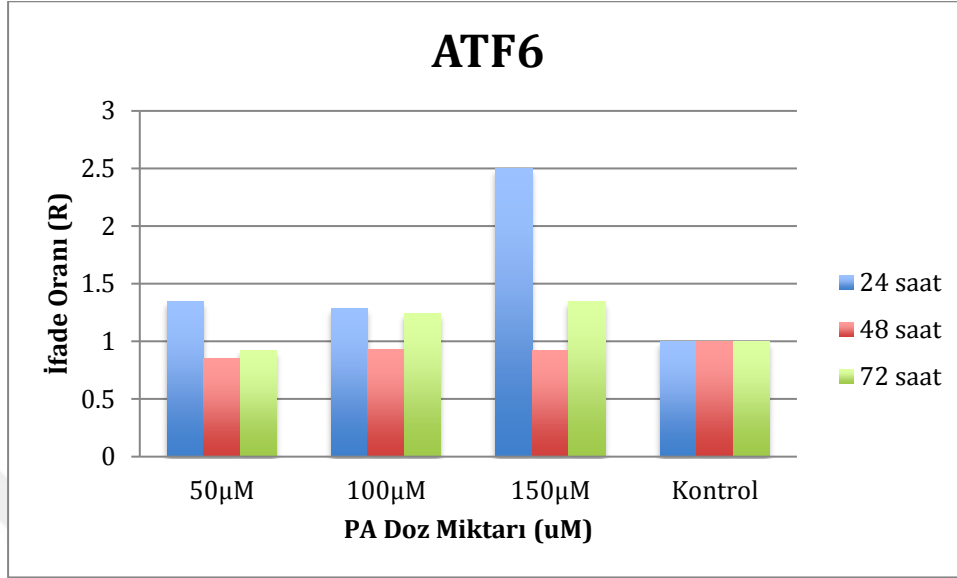
**Çizelge 4.15.** MDA-MB231 hücrelerinin doz ve zamana bağlı olarak Pachymic Asit uygulanması sonrası TRAF2 geninin ifade düzey değişikliği.



#### 4.3.11. ATF6 Gen İfade Değerlendirilmesi

ATF6 geninde doza ve zamana bağlı olarak anlamlı bir değişim olmamıştır ( $p > 0.05$ ).

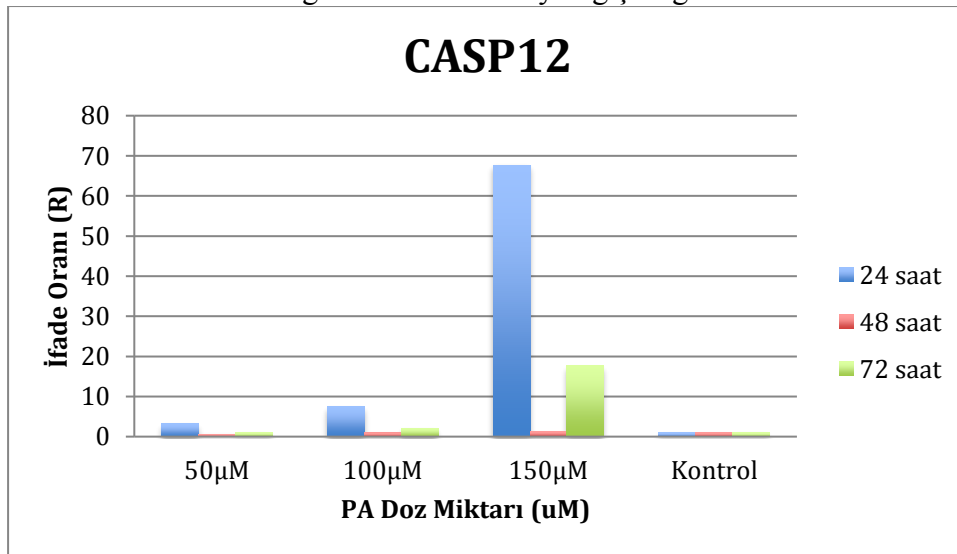
**Çizelge 4.16.** MDA-MB231 hücrelerinin doz ve zamana bağlı olarak Pachymic Asit uygulanması sonrası ATF6 geninin ifade düzey değişikliği.



#### 4.3.12. CASP12 Gen İfade Değerlendirilmesi

CASP12 gen ifade düzeyinin 24. saat diliminde tüm PA doz gruplarında anlamlı düzeyde arttığı belirlenmiştir ( $p < 0.05$ ). Gen ifade düzenin 48. saat diliminde anlamlı bir değişiklik saptanmazken 72. saat diliminde 100 µM ve 150 µM PA doz grubunda gözlenen artış anlamlı olduğu istatistiksel analiz ile gösterilmiştir ( $p < 0.05$ ).

**Çizelge 4.17.** MDA-MB231 hücrelerinin doz ve zamana bağlı olarak Pachymic Asit uygulanması sonrası CASP12 geninin ifade düzey değişikliği.

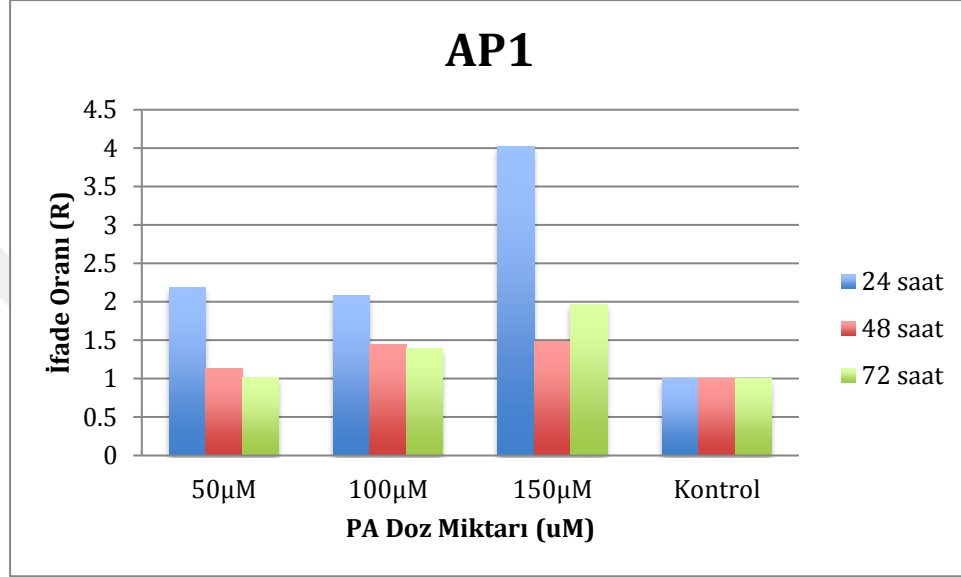




#### 4.3.13. AP1 Gen İfade Değerlendirilmesi

AP1 gen ifadesi 24. Saat doz uygulamasında üç farklı dozda da anlamlı olarak artış görülmüştür ( $p<0.05$ ).

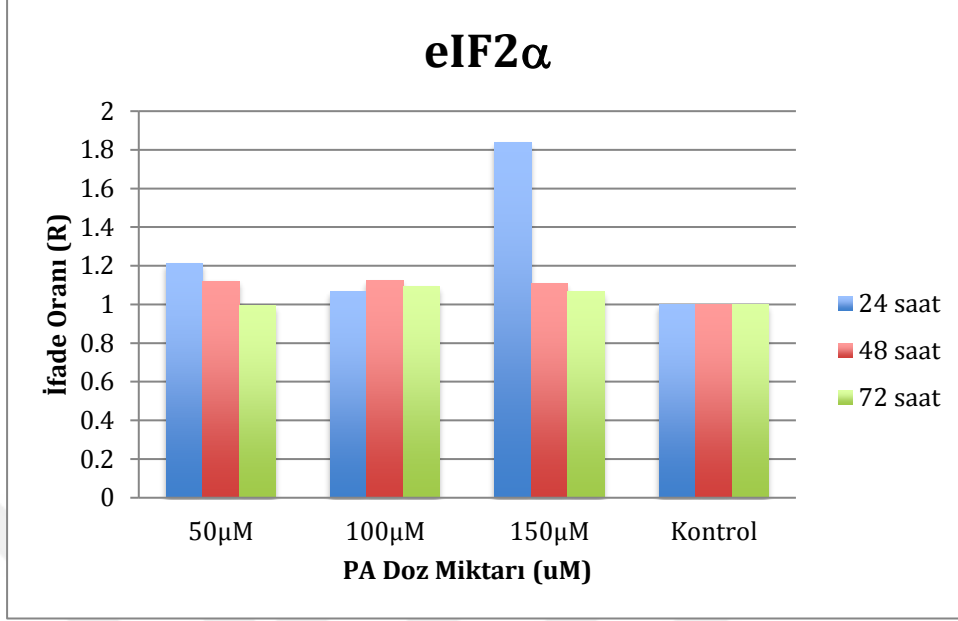
**Çizelge 4.18.** MDA-MB231 hücrelerinin doz ve zamana bağlı olarak Pachymic Asit uygulanması sonrası AP1 geninin ifade düzeyi değişikliği.



#### 4.3.14. eIF2α Gen İfade Değerlendirilmesi

eIF2α gen ifade düzeyinin 24. saat diliminde, 150µM PA doz grubunda anlamlı düzeyde arttığı belirlenmiştir ( $p<0.05$ ).

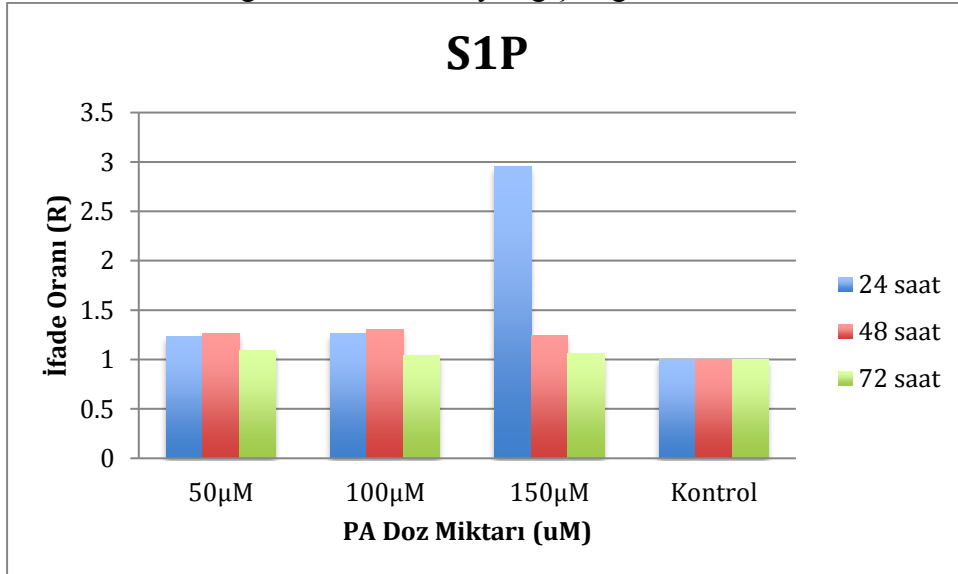
**Çizelge 4.19.** MDA-MB231 hücrelerinin doz ve zamana bağlı olarak Pachymic Asit uygulanması sonrası eIF2 $\alpha$  geninin ifade düzey değişikliği.



#### 4.3.15. S1P Gen İfade Değerlendirilmesi

S1P gen ifade düzeyinin 24. saat diliminde, 150µM PA doz grubunda anlamlı düzeyde arttığı belirlenmiştir ( $p < 0.05$ ).

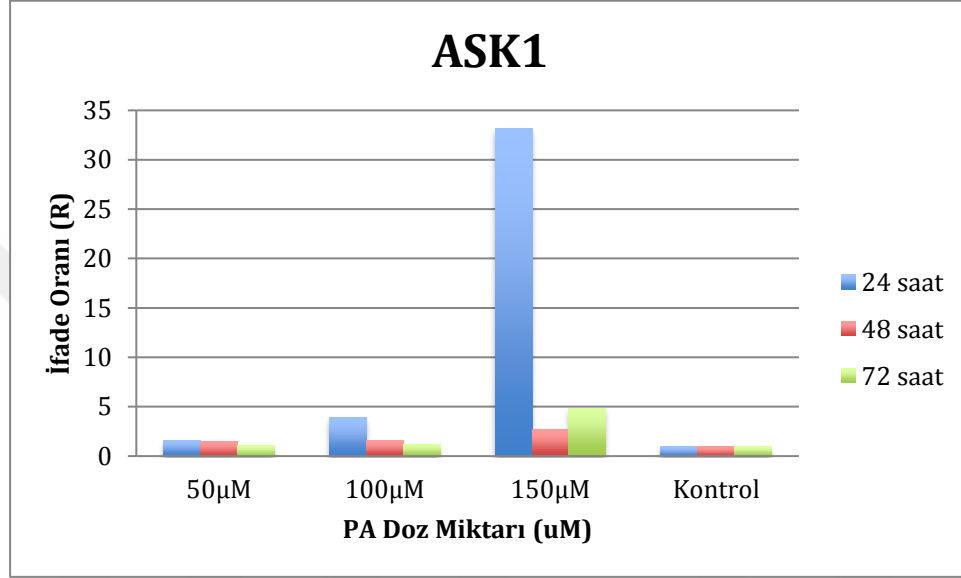
**Çizelge 4.20.** MDA-MB231 hücrelerinin doz ve zamana bağlı olarak Pachymic Asit uygulanması sonrası S1P geninin ifade düzey değişikliği.



#### 4.3.16. ASK1 Gen İfade Değerlendirilmesi

ASK1 gen ifade düzeyinin incelenen üç farklı saat diliminde, 150µM PA doz grubunda anlamlı düzeyde arttığı belirlenmiştir ( $p<0.05$ ).

**Çizelge 4.21.** MDA-MB231 hücrelerinin doz ve zamana bağlı olarak Pachymic Asit uygulanması sonrası ASK1 geninin ifade düzey değişikliği.



## 5. TARTIŞMA

Bitkilerden elde edilen triterpenoidler genellikle birçok Asya Ülkesinde tıbbi amaçlarla kullanılmaktadır. Pachymic asit, *Poria cocos* alkolik özütünün ana bileşenidir (Ling ve diğ. 2010). Pachymic asitin çeşitli tümör hücre kültürlerinde (osteosarkom, gastrik kanser, safra kesesi kanseri, nazofarinjeal kanser, meme kanseri, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, over kanseri, pankreas kanseri ve prostat kanseri hücre hatları) sitotoksik etkinliği çalışılmış ve proliferasyon, migrasyon, invazyonu inhibe ettiği apoptotozu tetiklediği gösterilmiştir. Meme kanseri hücre kültürleri ile olan çalışmalarda PA'nın invasyon ve migrasyon üzerindeki etkileri ortaya konulmuştur (Gapter ve diğ. 2005, Ling ve diğ. 2010, Cheng ve diğ. 2015, Gao ve diğ. 2015, Ling ve diğ. 2011, Hong ve diğ. 2012, Zhang ve diğ. 2017, Chen ve diğ. 2015, Lu ve diğ. 2017, Wen ve diğ. 2018). PA'nın meme kanseri hücre kültürlerindeki apoptotik etkileri ve buna yol açan moleküler yollar henüz netlik kazanmamış olup bu çalışmada ilk moleküler veriler elde edilmiştir.

Çalışmamızda Pachymic asidin endoplazmik retikulum stres yollarına olan etkisi incelenmiştir. Meme kanseri hücre hattı (MDA-MB-231) kültüre edilerek, pachymic asit ile farklı konsantrasyon (50, 100 ve 150  $\mu$ M) ve sürelerde (24, 48, 72 saat) muamele edilmiştir. Bu işlem sonrasında hücre canlılığında azalma tespit edilmiştir. PA'nın hücre canlılığına olan etkisi gerçek zamanlı hücre elektronik algılama sistemiyle belirlenmiştir. PA'nın apoptotik etkileri akış sitometrisi yöntemi ile analiz edilmiştir. ER stress yolağında yer alan CASP12, PARP, PERK, CHOP, ATF4, GADD34, IRE1, TRAF2, BCLXL, CASP3, CASP8, ATF6, AP1, eIF2a, S1P ve ASK1 genlerinin ekspresyon farklılıkları gerçek zamanlı PCR ile belirlenmiştir.

Meme kanseri hücrelerinin zamana bağlı çoğalması ve uygulanan farklı dozlardaki PA'nın meme kanseri hücreleri üzerindeki etkileri xCELLigence RTCA sistemi ile incelenmiştir. Bu çalışmada, PA'nın sitotoksik etkilerinin incelenmesi amacıyla 30, 50, 100, 150, 200 ve 250  $\mu$ M olmak üzere altı farklı doz meme kanseri hücrelerine uygulanmış ve etkileri 72 saat boyunca takip edilmiştir. Hücre içeren ve madde eklenmeyen kuyular kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. PA'nın 200 ve 250 $\mu$ M'lık derişimleri MDA-MB231 hücreleri üzerinde toksik etki göstermiş ve hücre canlılığı ile proliferasyonunda, madde eklenmesinden kısa bir süre sonra önemli derecede azalmaya yol açmıştır. 30 $\mu$ M'lık doz uygulamasında, hücreler kontrol grubuna

yakın proliferasyon göstermiştir. 50, 100 ve 150 $\mu$ M'lık doz uygulamalarında hücre indeks eğrisinde azalma olmuştur. Bu azalma, 200 ve 250 $\mu$ M'lık doz uygulamasında olduğu gibi hücrelerde ciddi toksik etki yaratmamıştır. Bu durum PA'nın meme kanseri hücreleri üzerinde etkili bir madde olabileceğini destekler niteliktedir. Çalışma sonunda hesaplamalar yapıldığında IC<sub>50</sub> değeri de 150 $\mu$ M olarak belirlenmiştir. Bu sebepten çalışmaya PA'nın 50, 100 ve 150 $\mu$ M'lık derişimleri ile devam edilmiştir.

Çalışmamızda cevabını aradığımız önemli sorulardan biri PA'nın meme kanseri hücrelerine olan sitotoksik etkisinin ER stresine bağlı apoptotik yolu aktive edip etmediğidir. Bu sebeple PA'nın meme kanseri hücreleri üzerindeki apoptotik etkileri Annexin V-FITC Kit (Beckman Coulter, France) kullanılarak akım sitometrisinde analiz edilmiştir.

Yaptığımız çalışmada farklı PA dozları (50, 100 ve 150 $\mu$ M) uygulanan meme kanseri hücrelerinde 24 saatlik ölçümde, apoptotik oran doz sırasına göre %12.19, %13.56 ve %18.09 olarak bulunmuştur. Hücre canlılığının doza bağlı olarak apoptoz ile ters orantılı olduğu gözlenmiştir. 48 saatlik ölçümde, apoptotik oran doz sırasına göre %2, %3.08 ve %8.25 olarak bulunmuştur. 72 saatlik ölçümde, apoptotik oran doz sırasına göre %4.34, %15.78 ve %20.83 olarak bulunmuştur. AnnexinV analizlerinin sonuçları PA'nın meme kanseri hücreleri üzerinde ilk 24 saat içinde anlamlı apoptotik etkisi olduğunu göstermiştir. İlk 24 saatlik PA tedavisi sonrasında hücrelerdeki apoptoz oranı azalmıştır. Bu durum hücre hayatta kalım sinyallerinin devreye girdiğini ve 24 saat sonrasında gerçekleşen hücre ölümünün PA etkisi ile olmayabileceğini düşündürmüştür.

PA'nın farklı kanser hücreleri üzerinde apoptotik etkisinin olduğunu gösteren yayınlar bulunmaktadır. Bu çalışmalara örnek olarak, pankreas kanseri (PANC-1 ve MIAPaCa-2) hücre hatlarıyla yapılan bir çalışmada pachymic asit ile çalışılmış ve PA'nın sitotoksik, apoptotik etkileri ve gen ekspresyon farklılıkları incelenmiştir. PA, PANC-1 (IC<sub>50-24h</sub>=23,49 $\mu$ M) ve MIAPaCa-2 (IC<sub>50-24h</sub>=26,61 $\mu$ M) hücre hatlarında proliferasyonu inhibe ettiği belirlenmiştir. Her iki hücre hattının pachymic asit ile 24 saat farklı konsantrasyonlardaki tedavisi sonucu apoptozda artış gözlenmiştir (Cheng ve diğ. 2015). Küçük hücreli olmayan akciğer kanser A549 hücreleriyle yapılan bir çalışmada ise pachymic asit tedavisi hücre proliferasyonunu baskılamış ve apoptoza sebep olmuştur (Ling ve diğ. 2010). PA ile yapılan bir başaka çalışmada nazofarinjeal (NPC) kanser hücre hattı CNE-1, CNE-2 ve normal insan karaciğer hücre hattı LO-2 kullanılmış ve PA

konsantrasyonu arttıkça apoptotic oranın anlamlı bir şekilde arttığı ve PA'nın NPC hücrelerinde apoptoza sebep olduğu saptanmıştır (Zhang ve diğ. 2017). SGC-7901, MKN-49P gastrik kanser hücre hatları ve normal gastrik hücre hattı GES-1 ile yapılan bir çalışmada PA'nın farklı konsantrasyonları (0, 15, 30, 60µmol/l) uygulamış ve PA'nın hücre canlılığını doz ve zamana bağlı olarak SGC-7901, MKN-49P hücrelerinde azalttığı ancak GES-1 üzerinde hiçbir baskılayıcı etkisi olmadığı gösterilmiştir (Lu ve diğ. 2017). Yapılan başka bir çalışmada ise PA'nın büyüme ve apoptoza olan etkileri insan ölümsüzleştirilmiş hücre hattı (HOS) ve primer osteosarkom hücreleri kullanılarak incelenmiştir. İki hücre grubunda da doza bağımlı olarak apoptotik oranda artış saptanmıştır (Wen ve diğ. 2018).

Endoplazmik retikulum (ER), yeni sentezlenmiş salgi ve membrane proteinlerinin translasyon sonrası katlandığı bir organeldir. ER sadece doğru katlanmış proteinlerin ER'den çıkmasını ve katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin tutulmasını ve bozulmalarını sağlamak için sıkı bir kalite kontrol sistemi içerir. Bir dizi biyokimyasal ve fizyolojik uyarın ER iç dengesini değıştirebilir, ER'de stress oluşmasını ve ER lümeninde katlanmamış veya yanlış katlanmış protein birikmesine sebep olabilir. ER bu durum ile başa çıkabilmek için katlanmamış protein cevabı (UPR) olarak adlandırılan stress yanıtı sinyalizasyon yollarını devreye sokar (Shen ve diğ. 2004). UPR, oluşan stres koşullarının sertliğine, hücrenin maruz kalma süresine bağılı olarak, oluşan strese adaptasyon veya apoptoz yolağı ile hücre ölümü gibi farklı sonuçlara yol açabilen özelleşmiş hücresel bir işlemdir (Rozpedek ve diğ. 2016). ER stress koşullarında, ER stress reseptörleri hücresel değışiklikleri tanır ve UPR'yi active etmek için sinyal iletimini başlatır (Nishida ve diğ. 2017). UPR'nin aktivasyonu PERK, ATF6 ve IRE1 olarak adlandırılan üç farklı ER transmembran protein yolları ile olmaktadır. ER'de bulunan GRP78 (BiP) bir şaperon proteini ve UPR düzenleyicisidir. IRE, PERK ve ATF6 yollarının aktivasyonunda ve ER stress cevabının oluşturulmasında görev almaktadır (Gundeflli 2008, Hussain 2007, Rasheva 2009, Seydel 2012, Szegezdi ve diğ. 2006).

Bu çalışmada endoplazmik retikulum stress yollarında yer alan genler arasından 16 gen (CASP12, PARP, PERK, CHOP, ATF4, GADD34, IRE1, TRAF2, BCLXL, CASP3, CASP8, ATF6, AP1, eIF2a, S1P ve ASK1) ekspresyonu incelenmiştir. 24 saatlik PA tedavisi sonrasında 50, 100 ve 150µM'lık artın doza bağılı olarak CASP12, ASK1, IRE1, GADD34, CHOP, PERK ve ATF4 genlerinde anlamlı düzeyde artış gözlenmiştir. AP1, TRAF2, S1P ve ATF6 genlerinde 24 saatlik 150uM PA tedavisi sonrasında ekspresyonun

anlamli düzeyde arttiğı gözlenirken 24 saatlik 50 ve 100uM'lık PA uygulaması sonrasında bu 4 genin ekspresyonlarında dozlar arası farklılık saptanmamıştır. BCLXL ve CASP8 gen ekspresyonlarında zamana ve doza bağlı bir değişim saptanmamıştır. ER stresi ile ilgili incelediğimiz genlerin ekspresyon düzeylerinde artış saptanması bize, PA'nın meme kanseri hücrelerinde ER stresine neden olduğunu göstermiştir.

Çalışmamızda, CASP12 ekspresyonun 24 saatlik PA uygulaması sonrasında 50µM'lık dozda kontrol grubuna göre 3 kat, 100µM'lık dozda 7 kat, 150µM'lık dozda ise 68 kat artış olduğu gözlenmiştir. 48 ve 72. saatlerde CASP12 gen ekspresyon düzeyi incelendiğinde, 48. saatte hücrelerde CASP12'nin normal ekspresyon seviyesine geldiği, 72. saatte ise 50µM'lık doz grubunda normal, 100 ve 150µM'lık doz gruplarında ise ekspresyonun arttiğı gözlenmiştir.

Apoptoz için gerekli olan kaspazların bir kısmı ER ile ilişkilidir. Bu kaspazlardan biri olan kaspaz-12, ER membranında lokalizedir ve ER aracılı apoptoz için önem teşkil eden bir kaspazdır (Boelens ve diğ. 2007). Apoptoz sırasında kaspaz-12 aktivasyonu fare, sıçan, tavşan, inek ve insan hücrelerinde bildirilmiştir (Szegezdi ve diğ. 2003). Morishima ve ark. yaptıkları bir çalışmada kaspaz-12 'nin UPR başlatıcı bir kaskad olduğunu, mitokondri veya ölüm reseptörleri aktivasyonuna bağlı olmadığını bildirmişlerdir (Morishima ve diğ. 2002). ER stresi oluşumu sonrası kaspaz-12'nin aktifleşme yolağı tam bilinmemekle birlikte prokaspaz-12, IRE1 ve TRAF2 ile doğrudan birleşme yolu ile aktifleşebildiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Boelens ve diğ. 2007). Yaptığımız çalışmada farklı doz ve zamanlarda CASP12 gen ekspresyonundaki değişikler IRE1 gen ekspresyonundaki değişiklikler ile benzerlik göstermiştir. Aynı zamanda ve aynı doz gruplarında kontrol ile karşılaştırıldığında benzer farklıklar saptanmıştır. Bu durum literatürle uyumlu olarak prokaspaz-12 aktivasyon yolağında IRE1 geninin yer alabileceğini göstermektedir. Bunun yanı sıra 24 saatlik 150uM'lık PA tedavisi sonucunda CASP12 genindeki artış ve bu saat ile doz grubundaki hücrelerin apoptotik oran artışı benzer bulunmuştur. Bu durum PA'nın kaspaz-12 aktivasyonuna neden olarak ER-stres aracılı apoptoza sebebiyet verdiğini düşündürmüştür.

Çalışmamızda, ASK1 ekspresyonun 24 saatlik PA uygulaması sonrasında 50µM'lık dozda kontrol grubuna göre yaklaşık 2 kat, 100µM'lık dozda 4 kat, 150µM'lık dozda ise 33 kat artış olduğu gözlenmiştir. 48 ve 72. saatlerde ASK1 gen ekspresyon düzeyi incelendiğinde, 48. saatte hücrelerde 50 ve 100µM'lık doz gruplarında ASK1'in normal

ekspresyon seviyesine geldiği ve 150µM'lık doz grubunda ise yaklaşık 3 katlık ekspresyon artışının olduğu, 72. saatte ise 50 ve 100µM'lık doz gruplarında normal, 150µM'lık doz grubunda 5 kat ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir. IRE1 ekspresyonunun 24 saatlik PA uygulaması sonrasında 50µM'lık dozda kontrol grubuna göre yaklaşık 2 kat, 100µM'lık dozda 4 kat, 150µM'lık dozda ise 28 kat artış olduğu gözlenmiştir. 48 ve 72. saatlerde IRE1 gen ekspresyon düzeyi incelendiğinde, 48. saatte hücrelerde 50 ve 100µM'lık doz gruplarında IRE1'in normal ekspresyon seviyesine geldiği ve 150µM'lık doz grubunda ise yaklaşık 2 katlık ekspresyon artışının olduğu, 72. saatte ise 50 ve 100µM'lık doz gruplarında normal, 150µM'lık doz grubunda 2 kat ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir.

ASK1 ve CASP12 genlerinde olduğu gibi IRE1 gen ekspresyonu da tüm doz ve zaman gruplarında benzer şekilde değişim göstermiştir. Literatürde prokaspaz-12'nin IRE1 ve TRAF2 genleri ile birleşerek hücreyi apoptoza sürükleyebilecek yolları aktifleştirdiği bildirilmiştir. Aynı zamanda literatürde ASK1'in aktive edilmesi ER stres aracılı apoptoz için gerekli olduğu gösterilmiştir. IRE1, ER stresine bağlı nöronal ölüm ile ilişkilidir ve özellikle ASK1 ile birleştiği ve böylece ER stresinin bir IRE1-TRAF2-ASK1 kompleksinin oluşumuna sebep olduğu ve ASK1-JNK yolağının aktive edildiği bildirilmiştir (Song ve diğ. 2014). 24 saatlik 150µM PA uygulamasının CASP12 gen ekspresyonundaki 68 katlık artış, ASK1 genindeki 33 ve IRE1 genindeki 28 katlık ekspresyon artışı bu üç gen arasında literatürde bildirildiği gibi bir ilişki olabileceğini göstermiştir.

Yapılan çalışmalarda TRAF2 geninin ER stresi sonucunda IRE1, ASK1 ve CASP12 genleri ile kararlı bir kompleks oluşturduğu gösterilmiştir (Boelens ve diğ. 2007, Song ve diğ. 2014). Çalışmamızda IRE1, ASK1 ve CASP12 gen ekspresyonlarında yüksek ve anlamlı bir artış gözlenmiştir. Ancak TRAF2 geninde, IRE1 ve CASP12'de olduğu gibi yüksek ekspresyon artışı saptanmamıştır. TRAF2 ekspresyonu 24 saatlik PA uygulaması sonrasında 50 ve 100µM'lık dozlarda normal ekspresyon seviyesinde, 150µM'lık dozda ise 4 kat artış olduğu gözlenmiştir. 48 ve 72. saatlerde TRAF2 gen ekspresyon düzeyi incelendiğinde, her iki saat diliminde de hücrelerin normal ekspresyon seviyelerinde olduğu gözlenmiştir. IRE1, ASK1 ve CASP12'nin aktivasyonunda rol oynayan TRAF2'nin beklenen yükseklikte ekspresyona uğramaması, IRE1, ASK1 ve CASP12 genlerinin aktivasyonunda başka gen ürünlerinin olabileceğini akla getirmiştir. Örnek olarak literatürde CASP12 aktivasyonunun sadece TRAF2 aracılığıyla olmadığı m-kalpain ve kaspaz-7 ile de aktifleşebildiği gösterilmiştir (Nakagawa 2000, Rao ve diğ. 2017).



Yaptığımız çalışmada, GADD34 ekspresyonunun 24 saatlik PA uygulaması sonrasında 50µM'lık dozda kontrol grubuna göre yaklaşık 2 kat, 100µM'lık dozda 3 kat, 150µM'lık dozda ise 6 kat artış olduğu gözlenmiştir. 48 ve 72. saatlerde GADD34 gen ekspresyon düzeyi incelendiğinde, 48. saatte hücrelerde 50 ve 100µM'lık doz gruplarında GADD34'ün normal ekspresyon seviyesine geldiği ve 150µM'lık doz grubunda ise yaklaşık 2 katlık ekspresyon artışının olduğu, 72. saatte ise 50 ve 100µM'lık doz gruplarında normal, 150µM'lık doz grubunda 2 kat ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir.

GADD34, ekspresyon profile CHOP'a benzer olan ve stres ile uyarılabilen bir gen dir (Novoa ve diğ. 2001). GADD34'ün uyarılması protein fostataz 1 (PP1) aracılığıyla eIF2a'nin defosforilasyonu neden olur. Bu defosforilasyon, genel protein sentezinin tekrar başlamasına sebep olurken (Krokowski ve diğ. 2017) CHOP aktivitesini de inhibe eder (Novoa ve diğ. 2001). Bu negatif geri besleme protein sentezinin restorasyonunda geniş bir role sahiptir (Rozpedek ve diğ. 2016). Çalışmamızda, eIF2a ekspresyonu 24 saatlik PA uygulaması sonrasında 50 ve 100µM'lık dozlarda normal ekspresyon seviyesinde, 150µM'lık dozda ise 2 kat artış olduğu gözlenmiştir. 48 ve 72. saatlerde eIF2a gen ekspresyon düzeyi incelendiğinde, her iki saat diliminde de hücrelerin normal ekspresyon seviyelerinde olduğu gözlenmiştir. . ER stres cevap yolağında yer alan moleküllerin ikili etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Bu iki gen ekspresyonundaki durum GADD34'ün negatif geri besleme yolağını devreye soktuğunu ve eIF2a'nın defosforile olmuş olabileceğini düşündürmüştür. PA'nın eklenmesini takip eden 12 saatlik dilim içerisinde eIF2a gen ifade düzeyinin incelenmesi durumunda kontrol grubuna göre daha yüksek ekspresyon sonuçları elde edilebilmesi olası bir durumdur.

Çalışmamızda, CHOP ekspresyonunun 24 saatlik PA uygulaması sonrasında 50µM'lık dozda kontrol grubuna göre yaklaşık 2 kat, 100µM'lık dozda 3 kat, 150µM'lık dozda ise 6 kat artış olduğu gözlenmiştir. 48 ve 72. saatlerde CHOP gen ekspresyon düzeyi incelendiğinde, 48. saatte hücrelerde 50 ve 100µM'lık doz gruplarında CHOP'un normal ekspresyon seviyesine geldiği ve 150µM'lık doz grubunda ise yaklaşık 3 katlık ekspresyon artışının olduğu, 72. saatte ise 50 ve 100µM'lık doz gruplarında normal, 150µM'lık doz grubunda 4 kat ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir. ATF4 ekspresyonunun ise 24 saatlik PA uygulaması sonrasında 50µM'lık dozda normal ekspresyon seviyesinde, 100µM'lık dozda 2 kat, 150µM'lık dozda ise 3 kat artış olduğu gözlenmiştir. 48 ve 72. saatlerde ATF4 gen ekspresyon düzeyi incelendiğinde, 48. saatte hücrelerde 50 ve 100µM'lık doz gruplarında

ATF4'ün normal ekspresyon seviyesine geldiği ve 150µM'lık doz grubunda ise yaklaşık 2 katlık ekspresyon artışının olduğu, 72. saatte ise 50 ve 100µM'lık doz gruplarında normal, 150µM'lık doz grubunda 2 kat ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir.

CHOP, programlanmış hücre ölümü ve doku rejenerasyonunda görev aldığına inanılan, hedef genlerin promotörüne bağlanan ve bunları aktive eden bir transkripsiyon faktörüdür. IRE1, ATF4 ve ATF6'nın uyarılması ve artan miktarları ile CHOP aktive olduğu bildirilmiştir (Novoa ve diğ. 2001). Çalışmamızda CHOP geninin farklı zaman dilimlerinde, 150µM'lık PA doz tedavisinde ekspresyon seviyesinin artmış olması IRE1 gen ekspresyon seviyesindeki artış ile ilişkilendirilebilmektedir. ATF4 ve ATF6 gen ekspresyon seviyelerindeki artışın CHOP genindeki artışa sebep olabileceği düşünülmemektedir. ATF4, ER stres belirteçlerinden biridir. Birçok hücre tipinde yüksek düzeyde eksprese edilir fakat ER stresi sırasında eIF2α fosforile olmadan etkili bir şekilde translasyonu gerçekleştirmez. eIF2α'nın PERK tarafından baskılanması ATF4'ün artmasına neden olur (Iwasaki ve diğ. 2015).

Çalışmamızda, PERK ekspresyonunun 24 saatlik PA uygulaması sonrasında 50µM'lık dozda normal ekspresyon seviyesinde, 100µM'lık dozda 2 kat, 150µM'lık dozda ise 5 kat artış olduğu gözlenmiştir. 48 ve 72. saatlerde PERK gen ekspresyon düzeyi incelendiğinde, her iki saat diliminde de hücrelerin normal ekspresyon seviyelerinde olduğu gözlenmiştir.

Literatürde ER stres cevabında PERK yolağının IRE1 ve ATF6 yolağından sonra aktif hale geldiği bildirilmiştir. Bu durum PERK yolağının daha çok hücre ölümü yönünde hareket etmesinden dolayı hücre için en son seçenek olarak değerlendirilmiştir (Ma ve diğ. 2010). Çalışmamızda 24 saat 150µM'lık PA tedavi sonrası PERK gen ekspresyon artışının diğer genlere nazaran (IRE1, ASK1, CASP12 vb) az olmasının nedeni apoptoz için öncelikle JNK yolağı ve CASP12 yolağının aktive edilmiş olabileceği düşünülmüştür.

AP1 ekspresyonunun 24 saatlik PA uygulaması sonrasında 50 ve 100µM'lık dozlarında 2 kat, 150µM'lık dozda ise 4 kat artış olduğu gözlenmiştir. 48 ve 72. saatlerde AP1 gen ekspresyon düzeyi incelendiğinde, 48. saatte hücrelerde tüm doz gruplarında AP1'in normal ekspresyon seviyesine geldiği, 72. saatte ise 50 ve 100µM'lık doz gruplarında normal, 150µM'lık doz grubunda 2 kat ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir. AP1 gen ürünü JNK apoptotik yolak üzerinde görev almaktadır ve bu gen ürününün, 24 saat 150µM PA tedavisi sonrasında JNK yolağında yer aldığı düşünülmektedir.

ATF6 ekspresyonu 24 saatlik PA uygulaması sonrasında 50 ve 100µM'lık dozlarda

normal ekspresyon seviyesinde, 150µM'lık dozda ise 2 kat artış olduğu gözlenmiştir. 48 ve 72. saatlerde ATF6 gen ekspresyon düzeyi incelendiğinde, her iki saat diliminde de hücrelerin normal ekspresyon seviyelerinde olduğu gözlenmiştir. S1P ekspresyonu 24 saatlik PA uygulaması sonrasında 50 ve 100µM'lık dozlarda normal ekspresyon seviyesinde, 150µM'lık dozda ise 3 kat artış olduğu gözlenmiştir. 48 ve 72. saatlerde S1P gen ekspresyon düzeyi incelendiğinde, her iki saat diliminde de hücrelerin normal ekspresyon seviyelerinde olduğu gözlenmiştir.

ATF6'nın uyarılması ile ATF6 Golgi kompleksine göç eder. ATF6 burada S1P enzimi tarafından lüminal bölgeden, S2P enzimi tarafından ise transmembran bölgeden kesilir. Bu olay sonucunda ATF6 nükleusa göç ederek aktif bir transkripsiyon faktörü olarak görev alır (Wang ve diğ. 2014, Kadowaki 2013). Bu durumda ATF6 gen ekspresyonunun S1P ve S2P gen ekspresyonları ile benzer olması beklenmektedir. Çalışmamızda ATF6 ve S1P gen ekspresyonları incelenmiş ve iki gende de sonuçlar benzer saptanmıştır.

Çalışmamızda, PARP ekspresyonu 24 saatlik PA uygulaması sonrasında 50 ve 100µM'lık dozlarda normal ekspresyon seviyesinde, 150µM'lık dozda ise 2 kat artış olduğu gözlenmiştir. 48 ve 72. saatlerde PARP gen ekspresyon düzeyi incelendiğinde, her iki saat diliminde de hücrelerin normal ekspresyon seviyelerinde olduğu gözlenmiştir. CASP3 ekspresyonu ise 24 saatlik PA uygulaması sonrasında 50 ve 100µM'lık dozlarda normal ekspresyon seviyesinde, 150µM'lık dozda ise 2 kat artış olduğu gözlenmiştir. 48 ve 72. saatlerde CASP3 gen ekspresyon düzeyi incelendiğinde, her iki saat diliminde de hücrelerin normal ekspresyon seviyelerinde olduğu gözlenmiştir.

Nükleer bir enzim olan PARP DNA iplik kırıklarının tamirinde önemli rol oynamaktadır. Bu enzim oksidatif hasar veya diğer stres faktörleriyle oluşan DNA iplik kırıklarını tanıyarak bağlanır ve hücrenin DNA hasarından korunmasını sağlar. Aynı zamanda kaspaz-3'ün bir hedefi olan PARP'ın yıkılımı apoptotik mekanizma süreçlerinden birisi olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Brock ve diğ. 2004). Çalışmamızda PARP ve CASP3 gen ekspresyonlarının özellikle 24 saatlik 150uM PA tedavisinde yüksek saptanmaması hücrenin hayatta kalma yollarından daha ziyade apoptoz yolağına girmiş olduğunun göstergesidir.

## 6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Çalışmamızda elde edilen bulgular ve literatüre verilerinden elde edilen bilgiler ışığında, Pachymic asidin meme kanseri hücreleri üzerinde sitotoksik ve apoptotik etkileri olduğu belirlenmiştir. Bu etkiler ilk 24 saatte ve 150µM'lık doz tedavisinde önem arz etmektedir. PA'nın anlamlı dozunun 24 saatlik aralıklar ile uygulanması kanser hücrelerinde apoptozun sürekliliğinin sağlanıp meme kanserinde tedaviye farklı bir yön verebileceğini düşünmekteyiz. Bu bağlamda sonraki çalışmalarda bu etkilerin, ileri gen analizlerinin yapıp deneysel hayvan modelleri ile desteklenmesi gerekmektedir. Ayrıca bu çalışmada PA'nın sadece meme kanseri hücre hattı üzerindeki etkileri incelenmiş olup sağlıklı hücrelerdeki etkileri bilinmemektedir. PA'nın tümör spesifik özelliğinin olup olmadığının araştırılması gerekmektedir. Olumlu sonuçlar alındığı takdirde PA'nın meme kanseri tedavisinde yeni ilaç markırı olabileceği düşünmekteyiz.

## KAYNAKLAR

- Abcam. <http://www.abcam.com/pathways/er-stress-interactive-pathway> Erişim: 18.05.2018
- Boelens J, Lust S, Offner F, ve diğ. The endoplasmic reticulum: a target for new anticancer drugs. *In Vivo*. 2007; 21(2): 215-26.
- Bosch A, Eroles P, Zaragoza R ve diğ. Triple-negative breast cancer: molecular features, pathogenesis, treatment and current lines of research. *Cancer Treat Rev*. 2010; 36(3): 206-15
- Brock WA, Milas L, Bergh S ve diğ. Radiosensitization of human and rodent cell lines by INO-1001, a novel inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase. *Cancer Lett*. 2004; 205(2): 155-60.
- Chavez KJ, Garimella SV, Lipkowitz S. Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. *Breast Dis*. 2010; 32(1-2): 35-48.
- Chen Y, Lian P, Liu Y ve diğ. Pachymic acid inhibits tumorigenesis in gallbladder carcinoma cells. *Int J Clin Exp Med*. 2015; 8(10): 17781-8.
- Cheng S, Swanson K, Eliaz I, ve diğ. Pachymic acid inhibits growth and induces apoptosis of pancreatic cancer in vitro and in vivo by targeting ER stress. *Plos One*. 2015; 10(4): 122270.
- Dubey AK, Gupta U, Jain S. Breast cancer statistics and prediction methodology: a systematic review and analysis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015; 6(10): 4237-45.
- Eliyatkın N, Yalçın E, Zengel B ve diğ. Meme karsinimunda moleküler sınıflama: Gelenekselden yeni döneme yolculuk. *J Breast Health*. 2015; 11:59-66.
- Gao AH, Zhang L, Chen X, ve diğ. Inhibition of ovarian cancer proliferation and invasion by pachymic acid. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015; 8(2): 2235-41.
- Gapter L, Wang Z, Glinski J ve diğ. Induction of apoptosis in prostate cancer cells by pachymic acid from *Poria cocos*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 332(4): 1153-61.
- Gómez-Flores-Ramos L, Álvarez-Gómez RM, Villarreal-Garza C ve diğ. Breast cancer genetics in young women: What do we know? *Mutat Res*. 2017; 774: 33-45.
- Gundefli H, Dincer P. Endoplazmik retikulum stresinin moleküler mekanizması ve kas patolojisi arasındaki ilişki. *Hacettepe Tıp Dergisi*. 2008; 109-114.
- Gültekin M, Boztaş G. Türkiye kanser istatistikleri. 2014. (Erişim: 17.05.2018) [http://kanser.gov.tr/Dosya/ca\\_istatistik/2009kanseraporu.pdf](http://kanser.gov.tr/Dosya/ca_istatistik/2009kanseraporu.pdf)
- Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res*. 2011; 13(4): 215.
- Hong R, Shen MH, Xie XH, ve diğ. Inhibition of breast cancer metastasis via PITPNM3 by pachymic acid. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012; 13(5): 1877-80.
- Hussain SG, Ramaiah KVA. Endoplasmic reticulum: stress, signalling and apoptosis. *Current Sci*. 2007; 93: 1684-96.
- Iwasaki N Sugiyama Y Miyazaki S. An ATF4 Signal Modulating Machine Other Than GADD34 Acts in ATF4 to CHOP Signaling to Block Expression in ER Stress Related Autophagy. *Cell Biochem*. 2015; 116(7): 1300-9.
- Kadowaki H, Nishitoh H. Signaling pathways from the endoplasmic reticulum and their roles in disease. *Genes (Basel)*. 2013; 4(3): 306-33.

Koçak S, Çelik L, Özbaş S ve diğ. Meme Kanserinde Risk Faktörleri, Riskin Değerlendirilmesi ve Prevansiyon: İstanbul 2010 Konsensus Raporu. *The Journal of Breast Health*. 2011; 7:2

Krokowski D, Guan BJ, Wu J ve diğ. GADD34 Function in Protein Trafficking Promotes Adaptation to Hyperosmotic Stress in Human Corneal Cells. *Cell Rep*. 2017; 21(10): 2895-2910.

Lee AS. GRP78 induction in cancer: therapeutic and prognostic implications. *Cancer Res*. 2007; 67(8): 3496-9.

Lee E, Nichols P, Spicer D ve diğ. GRP78 as a novel predictor of responsiveness to chemotherapy in breast cancer. *Cancer Res*. 2006; 66(16): 7849-53.

Ling H, Jia X, Zhang Y ve diğ. Pachymic acid inhibits cell growth and modulates arachidonic acid metabolism in nonsmall cell lung cancer A549 cells. *Mol Carcinog*. 2010; 49(3): 271-82.

Ling H, Zhang Y, Ng KY ve diğ. Pachymic acid impairs breast cancer cell invasion by suppressing nuclear factor-kB-dependent matrix metalloproteinase-9 expression. *Breast Cancer Res Treat*. 2011; 126(3): 609-20.

Lu C, Ma J, Cai D. Pachymic acid inhibits the tumorigenicity of gastric cancer cells by the mitochondrial pathway. *Anticancer Drugs*. 2017; 28(2): 170-179.

Ma Y, Shimizu Y, Mann MJ ve diğ. Plasma cell differentiation initiates a limited ER stress response by specifically suppressing the PERK- dependent branch of the unfolded protein response. *Cell Stress Chaperones*. 2010; 15(3): 281-93.

Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H ve diğ. An endoplasmic reticulum stress specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem*. 2002; 277(37): 34287-94.

Nakagawa T, Yuan J. Cross talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol*. 2000; 150(4): 887-94.

Nishida T, Hattori K, Watanabe K. The regulatory and signaling mechanisms of the ASK family. *Adv Biol Regul*. 2017; 66: 2-22.

Novoa I, Zeng H, Harding HP ve diğ. Feedback inhibition of the unfolded protein response bu GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha. *J Cell Biol*. 2001; 153(5): 1011-22.

Öztürk M. Meme Kanserinin Genetiği ve Risk Faktörleri. Meme Kanseri Sempozyum Dizisi No: 54. *İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları*. 2006; 15-26.

PubChem. [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pachymic\\_acid#section=2D-Structure](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pachymic_acid#section=2D-Structure)

Erişim: 17.05.2018

Rao RV, Hermel E, Castro-Obregon S ve diğ. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. *J Biol Chem*. 2017; 276(36): 33869-74.

Rasheva VI, Domingos PM. Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis*. 2009; 14: 996-1007.

Rozpedek W, Pytel D, Mucha B ve diğ. The Role of the PERK/eIF2 $\alpha$ /ATF4/CHOP Signaling Pathway in Tumor Progression During Endoplasmic Reticulum Stress. *Curr Mol Med*. 2016; 16(6): 533-44.

Seydel GS, Aksoy K. Endoplazmik Retikulum Stresi ve Apoptozis Mekanizması. *Archives Medical Review Journal*. 2012; 21: 221-23.

Shen X, Zhang K, Kaufman RJ. The unfolded protein response-a stress signaling pathway of the endoplasmic reticulum. *J Chem Neuroanat*. 2004; 28(1-2): 79-92.

- Shu S, Chen B, Zhao X ve diğ. De novo sequencing and transcriptome analysis of *Wolfiporia cocos* to reveal genes related to biosynthesis of triterpenoids. *Plos One*. 2013; 8(8):71350.
- Song J, Park KA, Lee WT. Apoptosis signal regulating kinase 1 (ASK1): potential as a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Int J Mol Sci*. 2014; 15(2): 2119-29.
- Sun YS, Zhao Z, Yang ZN ve diğ. Risk factors and preventions of breast cancer. *Int J Biol Sci*. 2017; 13(11): 1387-1397
- Szegezdi E, Fitzgerald U, Samali A. Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far. *Ann N Y Acad Sci*. 2003; 1010:186-94.
- Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM ve diğ. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep*. 2006; 7: 880-5.
- Thompson M, McInnes RR, Willard HF. *Tıbbi Genetik*. 325-326. Güneş Kitapevi, Ankara. 2005.
- Wang WA, Groenendyk J, Michalak M. Endoplasmic reticulum stress associated responses in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1843(10): 2143-9.
- Wen H, Wu Z, Hu H ve diğ. The anti-tumor effect of pachymic acid on osteosarcoma cells by inducing PTEN and Caspase 3/7-dependent apoptosis. *J Nat Med*. 2018; 72(1): 57-63.
- Xia J, Chen J, Zhang Z ve diğ. A map describing the association between effective components of traditional Chinese medicine and signaling pathways in cancer cells in vitro and in vivo. *Drug Discov Ther*. 2014; 8(4): 139-53.
- Zhang W, Men X, Lei P. Review on anti-tumor effect of triterpene acid compounds. *J Cancer Res Ther*. 2014; 1: 14-9.
- Zhang YH, Zhang Y, Li XY ve diğ. Antitumor activity of the pachymic acid in nasopharyngeal carcinoma cells. *Ultrastruct Pathol*. 2017; 41(3): 245-251.

## ÖZGEÇMİŞ

- 1. Adı Soyadı** : Nilüfer (Üzülmez) Sertdemir
- 2. Doğum Yeri-Tarihi** : Kocaeli - 22.01.1985
- 3. Uyruğu** : T.C.
- 4. Medeni Durumu** : Evli
- 5.Çalıştığı Kurum** : Kocaeli Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

### 6.Eğitim

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji	Marmara Üniversitesi	2007
Yüksek Lisans	Biyoloji	Sakarya Üniversitesi	2010
Doktora	Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji	Kocaeli Üniversitesi	2018

### 7. Yüksek Lisans Tezleri

Kocaeli Bölgesindeki Talasemi Hastalarında Globin Genlerindeki Mutasyon Sıklıklarının Belirlenmesi, 2010  
Tez Danışmanı: Yrd.Doç. Dr. Hüseyin AKSOY  
Ortak Tez Danışmanı: Yrd.Doç.Dr. Naci Çine

### 8. SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

**8.1.** Savlı H, Cine N, Sunnetci D, Uzulmez N, Nagy B, Galimberti S, Baysal K, Linipaiboon T, Lirtrakul P. Gene network and canonical pathway analysis in hematopoietic and soft tissue originated malignancies. IUBMB LIFE. 2009; 61(3):308

**8.2.** Mehtap O, Ateşoğlu EB, Tarkun P, Gönüllü E, Keski H, Topçu Y, **Uzulmez N**, Sunnetçi D, Hacıhanefioğlu A. The Association Between Gene Polymorphisms and Leukocytosis with Thrombotic Complications in Patients with Essential Thrombocythemia and Polycythemia Vera. Turk J Hematol. 2012; 29(2): 162-169

**8.3.** Savlı H, **Uzulmez N**, Ilkay Z, Yavuz D, Sunnetçi D, Hacıhanefioğlu A, Cine N. High throughput fish analysis: a new, sensitive option for evaluation of hematological malignancies. Turk j haematol. 2013 jun;30(2):122-8.