



**MCF-7 MEME KANSERİ HÜCRE KÜLTÜRÜNDE  
DOSETAKSELİN SİN3A, MDM2 VE P53 GEN  
EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİ**

**Nezahat KURT**  
**Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı**  
**Prof. Dr. Nuri BAKAN**

**Doktora Tezi - 2016**

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

**MCF-7 MEME KANSERİ HÜCRE KÜLTÜRÜNDE  
DOSETAKSELİN SİN3A, MDM2 VE P53 GEN  
EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİ**

**Nezahat KURT**

**Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı  
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Nuri BAKAN**

**ERZURUM  
2016**

T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

MCF-7 MEME KANSERİ HÜCRE KÜLTÜRÜNDE  
DOSETAKSELİN SİN3A, MDM2 VE P53 GEN EKSPRESYONU  
ÜZERİNE ETKİSİ

Nezahat KURT

Tez Savunma Tarihi : 29/06/2016  
Tez Danışmanı : Prof. Dr. Nuri BAKAN  
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Fatma Zühal İMULDUZ  
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Mustafa GÜL  
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Muhammed Fevzi POLAT  
Jüri Üyesi : Doç. Dr. Bahattin AVCI

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

  
Prof. Dr. Yavuz Selim SAĞLAM

Enstitü Müdürü

Doktora Tezi  
ERZURUM - 2016

# İÇİNDEKİLER

<b>TEŞEKKÜR</b> .....	I
<b>ÖZET</b> .....	II
<b>ABSTRACT</b> .....	III
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	IV
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	VI
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	IX
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	3
2.1. Kanser .....	3
2.1.1. Kanser Nedir?.....	3
2.1.2. Kanser ve Hücre Döngüsü.....	4
2.1.3. Kanser Nedenleri .....	7
2.1.4. Kanser hücrelerinin genel özellikleri .....	8
2.1.5. Kanser yayılma yolları.....	9
2.1.6. Kanser ve Genetik .....	10
2.1.7. Kanser ve Apoptoz .....	13
2.1.8. Kanser ve P53 .....	15
2.1.9. Kanser ve MDM2 .....	18
2.1.10. Kanser ve Sin3A .....	23
2.2. Meme Kanseri .....	24
2.2.1. Epidemiyoloji.....	25
2.2.2. Etyolojisi .....	26
2.2.3. Evreleme .....	27
2.3. Dösetaksel.....	29
<b>3. MATERYAL VE METOT</b> .....	32
3.1. Materyal .....	32
3.1.1. Örnekler .....	32
3.1.2. Kullanılan Kimyasal, Cihaz ve Ekipmanlar .....	32
3.2. Metot .....	34
3.2.1. Hücre Kültürü.....	34
3.2.3. Hücre Sitotoksisite Analizi.....	36
3.2.4. İmmüsitokimyasal Boyama.....	38

3.2.5. Ters Trankriptaz Polimeraz Zincir <i>Reaksiyonu</i> Analizleri.....	41
3.2.6. İstatistiksel Analiz .....	43
<b>4. BULGULAR</b> .....	<b>44</b>
4.1. Sitotoksisite analizi sonuçları.....	44
4.2. TUNEL Boyama Sonuçları .....	45
4.3. Real Time-PCR Analizi Sonuçları .....	53
<b>5. TARTIŞMA</b> .....	<b>55</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b> .....	<b>63</b>
<b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>64</b>
<b>EKLER</b> .....	<b>72</b>
EK-1 Özgeçmiş.....	72
EK-2. Etik Kurul Onay Formu .....	73

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca ve bu tezi hazırlamamda bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, benden her türlü desteğini, hoşgörüsünü ve karşılaştığım her türlü sorunda yardımını esirgemeyen tez hocam Prof. Dr. Nuri BAKAN'a en derin saygı ve şükranları sunarım.

Eğitimim boyunca her zaman yakın ilgi ve bilimsel desteklerini gördüğüm hocalarım Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ebubekir BAKAN'a, Prof. Dr. Yaşar Nuri ŞAHİN'e, Prof. Dr. F. Zuhale UMUDUM'a, Prof. Dr. Fatih AKÇAY'a, Prof. Dr. Ahmet KIZILTUNÇ'a, Prof. Dr. Hülya AKSOY'a, Prof. Dr. M. Sait KELEŞ'e, Prof. Dr. Abdulkadir YILDIRIM'a ve Yrd. Doç. Dr. Nurinnisa ÖZTÜRK'e, değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Fatma Betül ÖZGERİŞ'e, Arş. Gör. Elif POLAT'a, Arş. Gör. Mehmet Ali GÜL'e, Arş. Gör. Özge Nur TÜRKERİ'ye, Arş. Gör. Dr. Engin ŞEBİN'e, Arş. Gör. Ebubekir KARAOĞLU'na, tez çalışmamda büyük yardımları olan Doç. Dr. Adem KARA'ya, Yrd. Doç. Dr. Seçkin ÖZKANLAR'a ve Yrd. Doç. Dr. Eda BALKAN'a ve bu çalışmayı 2012/10 BAP proje numarası ile destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne, bölümümüz sekreteri Keriman ERDEN'e, tüm Anabilim Dalı ve Laboratuvar çalışanlarımıza, her zaman yanımda olan ve desteklerini benden esirgemeyen eşime, aileme ve kızıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Nezahat KURT

## ÖZET

### **MCF-7 Meme Kanseri Hücre Kültüründe Doksetaksin Sin3a, MDM2 ve P53 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi**

**Amaç:** Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser tiplerinden birisidir ve tedavisinde kemoterapi önemli bir etkiye sahiptir. Son zamanlarda kemoterapötik ajanların apoptozda rol olan genler üzerine etkisini araştıran birçok çalışma yapılmaktadır. Mevcut çalışmada meme kanseri tedavisinde kullanılan ve mikrotübül inhibitörü olan dosetaksin MCF-7 hücreleri üzerindeki apoptotik ve sitotoksik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

**Materyal ve Metot:** Meme kanseri hücre hatlarına farklı dozlarda dosetaxsel uygulanarak 12 adet deney grubu oluşturuldu ve tüm gruplar 24 ve 48 saatlik inkübasyonlara bırakıldı. Sitotoksiteyi belirlemek amacıyla MTT analizi uygulandı. Histokimyasal olarak apoptozinin tespit edilmesinde TUNEL metodu kullanıldı. P53, MDM2 ve Sin3A gen ekspresyon düzeyleri Real-Time PCR'la ölçüldü.

**Bulgular:** MTT sitotoksite analizi sonucunda 100 nM dosetaxsel etkin doz olarak belirlenmiştir. Aynı zamanda P53, MDM2 ve Sin3A gen ekspresyonları 100 nM ve 1µM dosetaxsel uygulanan gruplarda artış gösterirken en yüksek değeri yine 100 nM dosetaxsel grubunda tespit edilmiştir. TUNEL boyamada, artan dosetaxsel dozuyla apoptozda bir yükselme gözlenmiştir.

**Sonuç:** Dosetaxsel apoptozisde görev alan P53 gen ekspresyonunu arttırarak kanser hücrelerini apoptoza yönlendirdiğini aynı zamanda Sin3A'nın da ekspresyonun arttırarak onu MDM2'nin degradasyonuna karşı koruduğu sonucuna varabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Apoptoz, Dosetaxsel, MDM2, P53, Sin3A

## **ABSTRACT**

### **The Effect of Docetaxel on Sin3A, MDM2 and P53 Expressions in MCF-7 Breast Cancer Cell Culture**

**Aim:** Breast cancer is the most common type of cancer in women, and chemotherapy is of utmost importance in its treatment. Recently, many studies have investigated the effect of chemotherapeutic agents on the genes responsible for apoptosis. In present study, it is aimed to investigate the apoptotic and cytotoxic effects of docetaxel, which is microtubule inhibitor and used for treatment of breast cancer, on the MCF-7 cells.

**Materials and Methods:** Twelve experimental groups were formed applying different dose of docetaxel to breast cancer cells line and, all groups were incubated for 24 and 48 hours. MTT analysis was performed to determine the cytotoxicity. TUNEL method was used for histochemical detection of apoptosis. P53, MDM2 and Sin3A gene expression levels were measurement by Real-Time PCR.

**Results:** The results of MTT cytotoxicity analysis showed an effective dose of 100nM docetaxel. P53, MDM2 and Sin3A gene expressions were shown to increase in groups to which 100 nM and 1  $\mu$ M docetaxel doses were applied, with the highest values being identified in 100 nM docetaxel group. The TUNEL staining showed the higher the docetaxel doses, the higher the apoptosis.

**Conclusion:** It was concluded that the docetaxel directs the cancer cells to apoptosis by increasing P53 gene expression and also protects the P53 against the degradation by MDM2 increasing Sin3A gene expression.

**Keywords:** Apoptosis, Docetaxel, MDM2, P53, Sin3A



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>APC</b>	: Adenomatous Polyposis Coli
<b>Bax</b>	: Bcl-2-Associated X Protein
<b>Bcl-2</b>	: B-Cell Lymphoma 2
<b>BRCA1</b>	: Breast Cancer 1
<b>BRCA2</b>	: Breast Cancer 2
<b>CDI</b>	: Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörleri
<b>CDK</b>	: Siklin Bağımlı Kinazlar
<b>cDNA</b>	: Komplementer DNA
<b>CYC/CLN</b>	: Siklin
<b>DCIS</b>	: Hücre İçi Duktal Karsinoma
<b>DMEM</b>	: Hücre Kültürü Medyumu
<b>DMSO</b>	: Dimetil Sülfoksit
<b>DNA-PK</b>	: DNA Bağımlı Protein Kinaz
<b>DTX</b>	: Doksetaksel
<b>G<sub>1</sub></b>	: Gap 1
<b>G<sub>2</sub></b>	: Gap 2
<b>HDAC</b>	: Histon Deasetilaz Kompleksi
<b>M</b>	: Metafaz
<b>MCF-7</b>	: Meme Kanseri Hücre Hattı
<b>MDM2</b>	: Murine Double Minute-2
<b>MTT</b>	: 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
<b>NBS1</b>	: Nibrin
<b>P53</b>	: Protein 53
<b>PAH</b>	: Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar
<b>PAH</b>	: Phenylalanine Hydroxylase
<b>PBS</b>	: Phosphate Buffer Saline

<b>PCNA</b>	: Proliferating Cell Nuclear Antigen
<b>PCR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>PTX</b>	: Paklitaksel
<b>Rb</b>	: Retinoblastoma
<b>S</b>	: Sentez
<b>Sin3A</b>	: Swi-independent
<b>TFIID</b>	: Transcription Factor II D
<b>TAX</b>	: Taxan
<b>TUNEL</b>	: Terminal Deoxytransferase Mediated Bio-dUTP Nick end Labeling

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 2.1.</b> Çeşitli stres sinyallerine karşı P53'ün cevabı <sup>9</sup> .....	17
<b>Şekil 2.3.</b> MDM2 proteinin yapısı <sup>49</sup> .....	19
<b>Şekil 2.4.</b> MDM2 ve P53 proteini ilişkisi. A) MDM2'nin P53 ile aktif hale getirilmesi. B) P53'ün transaktivasyon bölgesinin MDM2 ile baskılanarak P53 fonksiyonunun engellenmesi. C) P53'ün MDM2 proteini ile parçalanması <sup>49</sup> . .....	22
<b>Şekil 2.5.</b> Paklitaksel (A) ve dosetakselin (B) yapısı. Farklılıklar mavi ve kırmızı ile işaretlenmiştir <sup>109</sup> .....	30
<b>Şekil 3.1.</b> Stereolojik TUNEL pozitif hücre yoğunluğunun analizini gösterir ekran resmi (oklar TUNEL pozitif hücre).....	40
<b>Şekil 4.1.</b> 24 saat süreli DTX uygulaması yapılan MCF-7 hücrelerinde hücre canlılığı analizi sonuçları.....	45
<b>Şekil 4.2.</b> 48 saat süreli DTX uygulaması yapılan MCF-7 hücrelerinde hücre canlılığı analizi sonuçları.....	45
<b>Şekil 4.3.</b> 24 saat inkübasyon süreli Kontrol grubuna ait TUNEL pozitif hücre yoğunluğu, TUNEL boyama .....	47
<b>Şekil 4.4.</b> 24 saat inkübasyon süreli 10 nM DTX uygulanan gruba ait TUNEL pozitif hücre yoğunluğu, TUNEL boyama. ....	47
<b>Şekil 4.5.</b> 24 saat inkübasyon süreli 100 nM DTX uygulanan gruba ait TUNEL pozitif hücre yoğunluğu, TUNEL boyama. ....	48
<b>Şekil 4.6.</b> 24 saat inkübasyon süreli 1 µM DTX uygulanan gruba ait TUNEL pozitif hücre yoğunluğu, TUNEL boyama. ....	48
<b>Şekil 4.7.</b> 24 saat inkübasyon süreli 10 µM DTX uygulanan gruba ait TUNEL pozitif hücre yoğunluğu, TUNEL boyama. ....	49
<b>Şekil 4.8.</b> 24 saat inkübasyon süreli 100 µM DTX uygulanan gruba ait TUNEL pozitif hücre yoğunluğu, TUNEL boyama. ....	49
<b>Şekil 4.9.</b> 48 saat inkübasyon süreli Kontrol grubuna ait TUNEL pozitif hücre yoğunluğu, TUNEL boyama. ....	50
<b>Şekil 4.10.</b> 48 saat inkübasyon süreli 10 nM DTX uygulanan gruba ait TUNEL pozitif hücre yoğunluğu, TUNEL boyama. ....	50
<b>Şekil 4.11.</b> 48 saat inkübasyon süreli 100 nM DTX uygulanan gruba ait TUNEL pozitif hücre yoğunluğu, TUNEL boyama. ....	51

<b>Şekil 4.12.</b> 48 saat inkübasyon süreli 1 µM DTX uygulanan gruba ait TUNEL pozitif hücre yoğunluğu, TUNEL boyama.....	51
<b>Şekil 4.13.</b> 48 saat inkübasyon süreli 10 µM DTX uygulanan gruba ait TUNEL pozitif hücre yoğunluğu, TUNEL boyama.....	52
<b>Şekil 4.14.</b> 48 saat inkübasyon süreli 100 µM DTX uygulanan gruba ait TUNEL pozitif hücre yoğunluğu, TUNEL boyama.....	52



## TABLULAR DİZİNİ

<b>Tablo 3.1.</b> Kullanılan kimyasallar / kitler .....	322
<b>Tablo 3.2.</b> Kullanılan cihazlar/aletler .....	333
<b>Tablo 4.1.</b> 24 ve 48 saat süreli DTX uygulaması yapılan MCF-7 hücrelerinde MTT sonuçları .....	444
<b>Tablo 4 .2.</b> Tüm gruplara ait 24 ve 48 saat inkübasyon periyotlu DTX uygulamaları sonrası 10.000 $\mu\text{m}^2$ alana düşen TUNEL pozitif hücre yoğunlukları.....	466
<b>Tablo 4.3.</b> Tüm gruplara ait 24 ve 48 saatlik P53 gen ekspresyon düzeyleri .....	533
<b>Tablo 4.4.</b> Tüm gruplara ait 24 ve 48 saatlik MDM2 gen ekspresyon düzeyleri.....	544
<b>Tablo 4.5.</b> Tüm gruplara ait 24 ve 48 saatlik Sin3A gen ekspresyon düzeyleri .....	544



# 1. GİRİŞ

Günümüzde kanser ve kanser nedenli ölümlerin artış göstermesi dünyanın en önemli problemlerinden biri olarak karşımıza çıkmaktadır.<sup>1</sup> Dünyada meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser türü olup kanser ilişkili mortalitede akciğer kanserinden sonra %15'lik oranıyla ikinci sırada yer alır.<sup>2, 3</sup> Ülkemizde ise 2013 verilerine göre meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser türü olup kanser tanısı alan her dört kadından birinin meme kanseri olduğu bildirilmiştir.<sup>4</sup> Kanser tedavisinde mortaliteyi azaltmak ve sağkalımı artırmak için farklı birçok tedavi modaliteleri kullanılır. Bunlar: cerrahi, radyoterapi, kemoterapi-hormon tedavisi ve yeni tedavi yöntemlerinden immunoterapi, sinyal ileti sistemi inhibitörleri, gen tedavisi ve anjiyogenez inhibitörleri olarak sayılabilir.<sup>5, 6</sup>

Meme kanserinde etkili bir kemoterapötik ajan olarak kullanılan Dosetaksel  $\beta$ -tübülinlere bağlanıp, mikrotübülinlerin depolimerizasyonunu inhibe ederek hücre döngüsü arrestine ve apoptoza neden olur.<sup>7</sup> P53 hücre döngüsü kontrol noktasına ve apoptoza önemli katkı sağlayan bir transkripsiyon faktörüdür. MDM2 ise P53'ün düzenlenmesinde merkezi bir role sahiptir. Hücrelerde hasar durumunda P53 ve MDM2 arasındaki kompleks bozularak, P53 proteininin normal işlevlerinin yerine getirilmesi sağlanmaktadır. Ancak kanser hücrelerinde MDM2 geni çok fazla eksprese edildiğinden dolayı P53 aktivasyonu inhibe edilmekte ve hücre döngüsü devam etmektedir.<sup>8</sup> Sin3A'nın ise P53'ün stabilize ettiği bilinmektedir.<sup>9</sup>

Önemli sağlık sorunu olan kanserden korunmak, hastalığın seyrini düzeltmek veya bu hastalığa yakalanan insanların yaşam standartlarını düzeltmek amacıyla araştırmacılar tarafından her yıl binlerce çalışma yapılmaktadır. Yapılan bu çalışmada, östrojen reseptör pozitif meme kanseri hücre hattında (MCF-7) bir kemoterapötik ajan

olan mikrotübül inhibitörü Dosetaksel kullanımının P53, MDM2 ve Sin3A gen ekspresyonu ve apoptoz üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kanser

#### 2.1.1. Kanser Nedir?

Kanser kontrolsüz hücre proliferasyonu ile karakterize bir grup hastalık olarak tanımlanmaktadır. İlk olarak Hipokrat (460-370 M.Ö.) tarafından ifade edilen ‘cancer’ terimi, Galen (130-200 M.Ö) tarafından şişlik anlamına gelen ‘onkos’ olarak ifade edilmiştir.<sup>10</sup>

Tümör; bölünme yeteneği olan bir hücrenin herhangi bir nedenden dolayı normal ve kontrollü bölünme yeteneğini kaybetmesi, anormal ve kontrolsüz çoğalması ile karakterize tablonun genel adıdır. İki şekilde gerçekleşen bu olayda benign (iyi huylu) tümör metastaz yapmayan, lokal eksizye edilebilen, hayatta kalma süresini etkilemeyen tümördür. Malign (kötü huylu) tümör ise komşu organlara veya uzak bölgelere yayılarak (metastaz), onları harap eden, anjiyogenesis özelliğine sahip, apoptozdan korunan ve anti-büyüme sinyallerine duyarlılık göstermeyen, hayatta kalma süresini azaltıp, ölüme neden olabilen tümördür.<sup>11, 12</sup> Tümör dokusunu oluşturan iki dokudan biri olan parankim doku çoğalan (neoplastik) hücrelerden oluşurken diğeri olan stromal doku (nonneoplastik reaktif) bağ dokusu ve kan damarlarından oluşan destek dokudur. Epitel hücrelerden gelişen tümörler kanser, mezemkimal hücrelerden gelişen tümörler ise sarkom olarak adlandırılır. Kanserler köken aldıkları epitele göre (squamoz hücreli karsinom, glandüler yapı oluşturursa; adenokarsinom) veya organın adına göre (renal hücreli kanser, hepatosellüler kanser gibi) adlandırılabilir.<sup>11, 13</sup>

Benign veya malign olan tümörler arasındaki ayrım dört faktör temel alınarak yapılır. Bunlar; diferansiasyon ve anaplazi, büyüme hızı, lokal invazyon ve metastazdır.



- a. **Diferansiasyon ve anaplazi:** Tümörün parankimal hücrelerinin köken aldıkları hücreye morfolojik ve fonksiyonel olarak benzemesine diferansiasyon denir. Malign tümör hücrelerinin köken aldıkları ana doku hücrelerine morfolojik ve fonksiyonel açıdan benzememesine (undiferansiye olmalarına) anaplazi denir. Az diferansiye veya undiferansiye tümörlerde primitif özellikte spesifikize olmamış (embrioner görünümlü) hücreler olmasıdır.
- b. **Büyüme hızı:** Malign tümörler çok daha hızlı büyürken, benign tümörler yavaş büyürler.
- c. **Lokal invazyon:** Çoğu benign tümör yavaş büyür ve çevrelerinde fibröz bağ dokusundan oluşan kapsülleri vardır. Kapsül, tümörü konağın tümöral olmayan dokularından ayırır. Kanserler komşu dokulara infiltrasyon, invazyon, ve destrüksiyon yaparak yayılım gösterirler.
- d. **Metastaz:** Malign tümör hücrelerinin, buldukları yerden lenfatik veya hematojen yol ile ayrılıp uzaklara taşınması ve primer tümör kitlesi ile bağlantısı olmayan yeni kitleler oluşturmalarıdır. Metastaz, hasta surveyini azaltan en önemli prognostik parametredir ve maligniteyi gösteren en önemli kriterdir. Metastaz ve lokal invazyon malign tümörleri benign tümörlerden ayıran en önemli özelliklerdir.<sup>11</sup>

### 2.1.2. Kanser ve Hücre Döngüsü

Doğal büyüme sürecinin bir parçası olarak veya kaybolan hücrelerin yerine yenilerini koymak üzere organizmanın ek hücrelere ihtiyacı olduğunda yeni hücreler hücre bölünmesi ve proliferasyonla üretilirler. Somatik hücreler, mevcut hücrelerin belirli bir düzen içinde içeriklerini kopyalaması ve sonra iki yavru hücre oluşturmak üzere bölünmesiyle oluşur. Bu kopyalama serisine hücre döngüsü (siklusu) adı verilir ve

bu mekanizma ökaryotik üremenin esas mekanizmasıdır. Hücre siklusu iki safhaya ayrılır; interfaz ve mitoz.<sup>13, 14</sup>

**a. İnterfaz:** Hücresel büyüme DNA sentezi bu safhada meydana gelir ve bunun sonucunda hücresel materyaller kopyalanır, yeni iki yavru hücre için yeterli materyal sağlanır. G<sub>1</sub> (gap 1), S (sentez) ve G<sub>2</sub> (gap2) fazlarından oluşur. G<sub>1</sub> fazında hücre metabolik olarak aktif olup DNA kopyalamaksızın sürekli büyür. G<sub>1</sub> fazını DNA replikasyonunun yer aldığı S fazı izler. G<sub>2</sub> fazında ise hücre büyümesi devam eder ve mitoz hazırlık için proteinlerin sentezi gerçekleşir.<sup>13, 14</sup>

**b. Mitoz:** Genetik bilginin bölünmesi hücre siklusunun bu evresinde gerçekleşir. Profaz, prometafaz, metafaz, anafaz ve telofaz olmak üzere beş faza ayrılır. Hücre döngüsünün en etkileyici evresi yavru kromozonların birbirinden ayrıldığı ve hücre bölünmesinin (sitokinez) ile sonlanan mitoz (M) evresidir.<sup>13, 14</sup>

Hücre siklusu, siklinler (cyc/cln), siklin bağımlı kinazlar (CDK) ve siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CDI) tarafından kontrol edilir. Bu proteinlerin düzeyleri hücre siklusunun farklı fazlarında farklılıklar gösterir. Memeli hücrelerinde hücre siklusunun düzenlenmesinde işlevleri en iyi bilinen on bir adet siklin bağımlı kinaz (CDK 1-11) ve 16 siklin [siklin D (D1, D2 ve D3); siklin E (E1, E2), siklin A (A1, A2) ve B (B1, B2)] rol oynamaktadır.<sup>15, 16</sup> Siklin D ve E, G<sub>1</sub>/S fazlarının sınırında geçici olarak sentez edilir ve hücre S fazına girdiğinde hızla yıkılır, Siklin A ve B, S/G<sub>2</sub>/M faz geçişlerinde sentezlenir, siklin A1 mayoz ve embriyogenesiste, siklin A2 çoğalan vücut hücrelerinde bulunur. Siklin B1'in siklin B2'nin fonksiyonlarını kontrol ettiği düşünülmektedir. CDK'lar protein fosforilasyonu yapan enzimlerdir. CDK aktivitesi DNA sarmalının açılması için de gereklidir. Replikasyon öncesi kompleksin (PRC: Prereplicative kompleks) birkaç bileşeni fosforile olur. Yeni replikasyon orijinleri mitozun sonunda CDK aktivitesi düşene kadar yeni PRC kompleksleri oluşturamaz. Bundan dolayı her

hücre siklusunda DNA bir kez replike olur.<sup>17</sup> Siklin bağımlı kinazlar G1-S-G2 ve mitozaya geçişi kontrol eder. Siklinler, işlevlerini gerçekleştirdikten sonra, ubiquitin-proteazom yoluyla yıkılırlar.<sup>16, 18</sup>

- Erken G1 evresinde sentezlenen siklin D, CDK4 ve CDK6'ya bağlanır. Geç G1 evresinde siklin E sentezlenir ve CDK2'ye bağlanır. Bu üç kompleks, diğer araçlarla birlikte hücrenin S evresine girmesine ve S evresinde ilerlemesini sağlar.
- Siklin A, CDK2 ve CDK1'e bağlanır ve bu kompleksler, hücrenin S fazını terk edip G2 evresine girmesini sağlar ve Siklin B'nin oluşumunu indükler.
- Siklin B, CDK1'e bağlanır ve bu kompleks hücrenin G2 fazını terk edip M evresine girmesine izin verir.

Hücreler, evreler arasındaki geçişte kontrol noktaları (checkpoints) olarak bilinen kontrol mekanizmalarını kullanılır. Bu kontrol noktaları, G1, G2, ve M fazında aktivite göstermekte olup uygun hücre büyümesi, doğru DNA sentezi, mükemmel kromozom ayrılması gibi gerekli olayların titizlikle tamamlanmasını sağlarlar. Hücre, bunları hücre döngüsünde inhibitör yolların ve/veya aktive olmuş yolların baskılanması ile sağlar. Büyüme faktörleri, hücre siklusu kontrol sistemine sinyal göndererek hücre döngüsü olaylarını düzenler. Bu düzenlenme, bir tip sinyal transdüksiyonudur. Eğer bu kontrol noktalarında bir büyüme faktörü salınırsa, hücre döngüsü devam edecek, salınmazsa, hücre döngüsü duracaktır. DNA hasarı durumunda aktive olan P53, G1 evresinde hücre siklusunu durdurarak DNA tamirini başlatır. Eğer DNA hasarı tamir edilemezse apoptoz tetiklenir.<sup>19</sup>

Hücre büyümesi, farklılaşması ve çoğalmasında rolü olan protoonkogenlerde meydana gelen mutasyonlar tümör gelişimine, tümör baskılayıcı genlerde meydana

gelen mutasyonlar hücre siklusunun inhibisyonunu engelleyerek anormal hücre büyümesine neden olur. Çevresel faktörlerle meydana gelen DNA hasarı hücre siklus kontrol mekanizmalarının bozulmasına neden olur. Pek çok kanser tipinde hücre siklus kontrol noktalarında mutasyonlar belirlenmiştir.<sup>15</sup> Gen mutasyonlarından dolayı G1-S geçişindeki değişimler kansere neden olabilir. Kanser hücrelerinin karakteristik özelliklerinden biri büyüme uyarımından bağımsız olarak G1 fazına tekrar girebilmeleridir. Retinoblastoma (Rb) fosforillenme/defosforillenme dengesizliği olduğunda, G1-S fazları arası geçişlerde olan değişiklikler hücrelerin çoğalmasını değiştirebilir.<sup>20</sup>

### **2.1.3. Kanser Nedenleri**

Birçok etkenin bir arada olmasıyla oluşan bir hastalık olan kanserin etiolojisinde tek bir etkenden söz etmek mümkün değildir. Araştırmacılar kanserin %70-80'inin muhtemelen çevresel faktörlerden kaynaklandığına inanmaktadır. Kanser oluşum etiolojisini edinsel ya da genetik mutasyona bağlı olarak bir takım farklılaşmalar şekillendirir.<sup>21</sup> Bu gelişimde, hücreye dışarıdan etki edebilecek bazı dış genotoksik faktörler (sigara, irritasyon, virüs) ya da bazı iç faktörler (herediter mutasyonlar, kendini onarma mekanizması ve hormonlar gibi) kanser oluşumunda etkin rol almaktadırlar. Hücrelerin sürekli mutasyonel faktörlere ya da kanserojenlere maruz kalmaları, hücrelerde anormal bir karakteristiğin ortaya çıkmasına ve hücre büyümesinde rol alan bazı genlerin ekspresyonlarında anormalliklere sebep olmaktadır. Bu anormal değişimler, dokularda amaçsız çoğalan ve bölünmesi hücresel sinyal mekanizmalarının kontrolü dışında gerçekleşen kanser tiplerinin oluşmasına neden olmaktadır. Ayrıca mutasyon geçirerek kontrolsüz çoğalan hücreler mutasyona bağımlı hücreler haline gelirler.<sup>22</sup> Genel olarak kansere sebep olan maddelere kanserojen adı verilmektedir.

Radyasyon ve birçok kimyasal kanserojen etkilerini DNA hasarı yaparak ve mutasyon oluşturarak gösterirler. Karsinojenler kimyasal, fiziksel, biyolojik ve genetik olarak 4 sınıfta inceleyebiliriz.<sup>23,24</sup>

**a. Kimyasal kanserojenler:** Bu sınıfta yer alan kanserojen maddeler 3 ana sınıfa ayrılır:

- **Organik Kimyasallar:** Polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) ve dialkilnitrozaminler.
- **İnorganik Kimyasallar:** Arsenik, kadmiyum, nikel, kurşun ve berilyum.
- **Diğer :** Alkol, diyet, sigara, hormonlar ve eksoz gazı

**b. Fiziksel Karsinojenler:** Güneş ışınları ve Ultraviyole ışınlar

**c. Biyolojik Karsinojenler:** Virüsler (Retrovirüsler, Hepadna virüs, Papilloma virüs ve Herpes virüs)

**d. Genetik Karsinojenler:** DNA dizi polimorfizmi ve onkogenler.

Kişinin bu kanserojenler maruz kalması; diyet, yaşam tarzı, mesleği ve diğer nedenlerden dolayı olabilir.

#### 2.1.4. Kanser hücrelerinin genel özellikleri

Kanser hücrelerini normal hücrelerden ayıran özellikler:

- **Otonomi:** Birçok tümör hücrelerinin büyüme faktörlerine gereksinimi normal eşdeğer hücrelere göre daha az olduğundan ve bazı durumlarda çoğalmak için gerekli olan büyüme faktörlerini kendileride salgılayabildiğinden dolayı, kanser hücreleri çevresel faktörlerden bağımsız ve sürekli çoğalırlar.
- **İnvazyon:** Kanser hücrelerinde hücre-hücre ve hücre-matrix etkileşimi de normal hücrelere göre daha düzensizdir. Bununla birlikte, yüzey adezyon moleküllerinin

ekspresyonundaki azalmadan dolayı kanser hücrelerinin çoğunun tutunma yeteneği normal hücrelere göre daha düşüktür. Sonuçta kanser hücreleri diğer hücre ve doku bileşenleri ile etkileşimine bağlı kısıtlamalardan kurtulur ve kanser hücrelerinin invazyon ve metastaz yapma yeteneği artar.<sup>25, 26</sup>

- **Metastaz:** Normal hücreler vücuttaki yerlerini korurlar ve genellikle göç etmezler. Oysa kanser hücreleri kaynaklandığı yerden uzağa yayılması ile karakterize edilirler. Malign hücrelerin önemli bir özelliği proteaz enzimleri salgılamasıdır, bu enzimler malign hücrenin komşu dokunun hücre dışı matriks bileşenlerini parçalayarak komşu dokuya girmesini kolaylaştırır.<sup>27, 28</sup>
- **Apoptoziste bozulma:** Genellikle normal hücreler DNA hasarına karşı apoptotik sinyallerden kaçarlar. Bu yüzden kanser hücreleri normal hücrelerden çok daha uzun yaşarlar.
- **Sınırsız replikasyon:** Tümör hücreleri aynı zamanda kromozomları kısaltmaktan koruyan telomeraz enziminin sınırsız replike olabileme yeteneğine sahiptirler.<sup>23, 29</sup>
- **Anjiyogenezis:** Normal hücrelerde olduğu gibi, tümör hücreleri de besin ve oksijen alımı bunun yanında karbondioksit ve metabolik atıkların uzaklaştırılması için anjiyogeneze ihtiyaç duyarlar, fakat sürekli anjiyogenez yani damar oluşumu ve büyümesi tümör hücresinin özelliğidir.<sup>30</sup>

### 2.1.5. Kanserin yayılma yolları

Kanserler başlıca; vücut boşlukları ve yüzeyleri, kan damarları ve lenf damarları yoluyla yayılırlar.

- **Vücut boşlukları ve yüzeyleri:** Malign tümörler vücut boşluklarını çevreleyen yüzeylere ulaştığında, tümörden kopan hücreler vücut boşluğundaki komşu doku ve organlarda tohum rolü görecektir.<sup>31</sup>

- **Kan damarları:** Venöz damarların çeperi kanser hücreleri tarafından kolayca invaze edilebilir ve koparak kan akımına karışan kanser hücreleri başka organ ve dokulara yayılabilir. Kan dolaşımı yoluyla metastazlar en sık karaciğer ve akciğerde görülür. Tiroid folliküler karsinom, renal hücreli karsinom ve hepatosellüler karsinom hematogen yolla yayılan kanserlerdir. Arter duvarları ise tümör invazyonuna oldukça dirençlidir.<sup>25, 31, 32</sup>
- **Lenf damarları:** Bölgesel lenf düğümlerine ulaşan kanser hücreleri burada tutulur ve kanserin yayılmasına bir süre engel oluşturulur. Ancak lenf düğümü kanser hücreleri ile dolduğunda veya lenf düğümüne ulaşan kanser hücrelerinin burada yerleşip büyümelerinden bir müddet sonra diğer lenf düğümlerine yayılma olabilir. Bölgesel lenf düğümlerinde büyüme saptanması, malign tümör varlığında bile her zaman metastaz varlığı anlamına gelmemelidir. Çünkü tümör hücre artıkları veya tümör antijenleride reaktif tabiatta bir büyümeye neden olabilir.<sup>25, 31</sup>

#### **2.1.6. Kanser ve Genetik**

Bütün hücreler proliferasyon, diferansiasyon, yaşlanma ve ölüm seçeneklerini belirleyen genetik programlama ile doğar ve gerektiğinde işleme koyar. Hücre büyümesi ve çoğalmasını düzenleyen proteinlerin sentezini kontrol eden genlere genel olarak protoonkogen denir. Protoonkogenlerde herhangi bir nedenden dolayı meydana gelen mutasyon sonucu oluşan yeni gene onkogen denir. Kanserde temel sorun hücre proliferasyonundaki kontrolün kaybıdır. Günümüzde tüm kanser türlerinin somatik hücrelerdeki mutasyon ya da mutasyonlar sonucu oluştuğu ve mutasyonlarında bir seri genin ekspresyonunu etkilediği artık bilinen bir gerçektir. Kanser oluşumunda etkili üç tip gen bulunmaktadır. Bunlar onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA tamir genleridir.<sup>30</sup>

### 2.1.6.1. Onkogenler

Normal hücre büyümesi ve çoğalmasını kontrol eden proteinleri kodlayan genler protoonkogenlerdir. Protoonkogen, kendiliğinden gen içindeki bir mutasyon veya dış kontrolün değişmesi sonucu farklılaşır ve normalden daha fazla ifade edilmeye başlarsa bu değişiklikler hücrede kontrolsüz büyüme ve malignensiye sebep olur ve bu protoonkogenlerin mutatt şekillerine onkogen denmektedir.<sup>25, 26</sup> Onkogenler protoonkogenlerden çok daha fazla miktarda hücrelerde eksprese olurlar ve bu nedenle gen ekspresyonundaki bu anormallikler normal çalışan bir protoonkogeni hücreyi transformasyona götüren bir onkogen haline dönüştürmek için yeterlidir.<sup>33</sup> Protoonkogenler tarafından kodlanan proteinlerin çoğu normal hücre çoğalmasını kontrol ederlerken, onkogenler genetik hasar sonucu mutasyona uğradığı için, denetlenemeyen ve proteini hücre transformasyonu oluşturabilen genlerdir. Onkoprotein adı verilen ve onkogenler tarafından kodlanan proteinlerin büyük çoğunluğu büyüme faktörlerinden gelen uyarılarıyla hücre çoğalmasını ve sağ kalımını düzenleyen sinyal ileti yollarının birer üyesi olarak görev yaparlar.<sup>26, 34</sup>

Hücre yüzeyi, sinyal iletim yolu veya nükleusta görevli olabilen onkogenlerin büyük bir bölümü tirozin kinaz aktivitesi gösteren reseptörleri kodlar. Bu reseptörlerin hücre dışı büyüme faktörleri ile etkileşen amino uçlarında gerçekleşen değişiklikler bunların birer onkogen proteinine dönüşmesine neden olur. Büyüme faktörlerinin uyarılmasıyla aktive olan hücre içi sinyal iletim yolları, sonunda hücre döngüsü bileşenlerini düzenleyerek, G<sub>1</sub>'deki kontrol noktasından geçişi sağlar ve büyüme faktörü uyarımına yanıt olarak hücre döngüsü ilerlerler.<sup>26, 32</sup>



### 2.1.6.2. Tümör Baskılayıcı Genler

Hücre bölünmesini yavaşlatan genler olarak bilinen tümör baskılayıcı genler, bu genlerdeki bozukluklar halinde anormal hücrelerin gelişimini baskılayamayacağından kanser gelişimi söz konusu olur.<sup>26</sup>

Tümör baskılayıcı genler, büyüme inhibitör yolunun değişik bileşenlerini kodlamaktadır. Normalde hücre bölünmesini baskılayan proteinleri kodlayan tümör baskılayıcı genlerin, birinde veya birkaçındaki mutasyon tümör oluşumuna neden olmaktadır. Protoonkogenlerden onkogenleri oluşturan mutasyonların aksine, tümör baskılayıcı genler onkogeneze fonksiyon kayıpları ile katkıda bulunur. Yine onkogenlerin aksine mutant tümör baskılayıcı genlere bağlı kontrolsüz hücre büyümesi, genetik olarak resesiftir ve etkili olması için her iki kromozom çiftinin de defektif geni içermesi gerekmektedir. Kromozom çiftlerinden biri sağlamsa hastalık ortaya çıkmamakta fakat bu bireyin her hücresinde genin bir hasarlı kopyası bulunmaktadır. pRb, P53 veya p21 proteinini kodlayan genlerin her iki kopyasında bulunan mutasyonun, hücre büyümesinin baskılanmasını engellemesi sonucu tümör oluşmaktadır. Tümör suppressor genler, ilk kez kalıtsal kanserlerde tanımlanmıştır. İlk bulunan kanser baskılayıcı gen, Rb genidir. Rb loküsünde heterozigot olan hücre normaldir ve normal Rb geninde heterozigotluğun kaybı kanser gelişmesine yol açmaktadır. Rb geni normal kopyalarının her ikisinin kaybı ile neoplastik değişim ortaya çıktığı için, bu ve diğer kanser baskılayıcı genler sıklıkla resesif kanser genleri olarak isimlendirilmektedir. Kalıtsal olarak geçen tümör baskılayıcı genlerdeki defektler, çocukluk çağında artmış tümör insidansına yol açabilir. Tümör baskılayıcılarını şifreleyen lokusdaki her iki normal allelin kaybı/inaktivasyonu, çocukluk ve erişkin dönem kanserlerini oluşturabilir.<sup>35, 36</sup> Rb geni gibi bir mutant P53 alelinin kalıtımla geçmesi kişiyi malign tümör gelişimine duyarlı kılmaktadır. DNA

hasarında ilk olarak çekirdekte etkili olan P53 etkili olmaktadır. p21 gen transkripsiyonunun artmasıyla pRb fosforilasyonu oluşmamakta ve hücre G1 fazında bekletilmektedir. Bu durum DNA hasarının onarılması için hücreye zaman kazandırmaktadır. Onarım gerçekleşmezse hücreler apoptozise yönelmektedir. P53 kaybı veya mutasyonu olan hücrelerde ise DNA onarımı gerçekleşmemekte ve hasarlı hücreler proliferasyon olarak tümör dokusu oluşturmaktadır.<sup>37</sup>

### **2.1.6.3. DNA Tamir Genleri**

İnsan hücreleri DNA hasarını onarabilme yeteneğine sahiptirler. Hücreler, DNA'da çevresel etkiyle ve replikasyon esnasında oluşan spontan hasarların onarılmaması durumunda, neoplastik transformasyona uğramaktadır. DNA onarım genleri, organizmanın diğer genlerdeki (protoonkogen, tümör baskılayıcı gen, apoptoz genleri) onarılması mümkün hasarları onararak, dolaylı olarak hücre proliferasyonunu etkilemektedir. DNA onarım genlerinde işlev kaybı için, her iki alel birden inaktive olmalıdır. Böylece bu genlerin tümör baskılayıcı genler gibi davrandığı düşünülebilir. DNA onarım genlerinde kalıtsal mutasyon olanlarda kanser riski bulunmaktadır.<sup>37</sup> Onarım ile ilgili genler, hasarın doğrudan giderilmesi, yanlış-eş onarımı, nükleotit-kesme çıkarma onarımı ve baz kesme çıkarma gibi onarım metabolik yollarının genlerini kapsar. OGG1, ERCC1, XRCC1, BRCA2, NBS1 DNA tamir genlerinden sadece birkaç tanesidir.<sup>34</sup>

### **2.1.7. Kanser ve Apoptoz**

Yaşamsal işlevini bitiren hücreler programlanmış hücre ölümü ile yok edilmektedirler. Kendilerini hayatta tutacak faktörlerden mahrum kalan hücreler, bir hücre için intihar programını aktive ederler ve 'apoptoz' adı verilen programlanmış hücre ölümü süreci yoluyla ölürlür. Apoptoz sürecine giren hücrelerin boyutları küçülür

ancak yok olmazlar. Plazma membranları korunur ancak membran boyutları en sonunda küçülür. Asimetri özelliklerini ve bir dokudaki komşu hücrelere tutunma özelliklerini kaybederler. Normalde iç membran bölümünde sitozole yönelmiş biçimde bulunan fosfatidilserinler ters çevrilir ve dış yüzeye geçerler. ATP'ye ihtiyaç duyan bu süreçte apoptotik hücrelerin mitokondrilerinden sitokrom c salınır ve sitokrom c memeli hücrelerinde kaspaz aktivasyonunun başlatılmasında anahtar rol oynar. Kromatin iplikleri parçalara ayrılır ve yoğunlaşır. Membran yüzeyindeki fosfatidilserinlere bağlanan fagositik hücreler apoptotik hücreleri yutar ve böylece hücre ölümünden kaynaklanacak olan inflamasyonun önüne geçilir. Apoptozis birkaç saat içinde tamamlanır.<sup>13, 14</sup>

Programlı hücre hücre ölümü, erişkin dokuların korunmasında ve embriyo gelişiminde rol oynayan normal fizyolojik bir süreçtir. Erişkinlerde apoptoz hücre proliferasyonunun dengelenmesi ve dokularda var olan toplam hücre sayısını sabit tutulmasından sorumludur.

Hücrede apoptozun düzenlenmesinde sistein proteazlar (kaspazlar; kaspaz-8, 9 ve 3) ve Bcl-2 (kaspaz aktivasyonunu düzenlerler) gen ailesi olmak üzere iki protein ailesi önemli rol oynar. Apoptozu düzenleyen genlerin mutasyonu da kanser oluşumuna yol açmaktadır. Hücrenin yaşaması apoptozu uyaran ve inhibe eden genlere bağlıdır. Bu genler; Bcl-2, Bax ve P53 genleridir.<sup>35</sup> Hasarlı hücrelerin elimine edilmeleri apoptozun önemli bir fonksiyonudur. Bir hücre tamir olamayacak kadar hasarlandıysa, bir virüs ile enfekte olduysa, iyonize radyasyon ya da toksinlere maruz kaldıysa tümör baskılayıcı protein P53 hücre siklusunu durdurur ve apoptozu uyarır.<sup>14</sup>

Hücre bölünmesi ve apoptoz arasındaki homeostatik denge bozulduğunda ortaya kanser çıkar. Kanser ilişkili apoptozun aktivasyonunda ve inhibisyonunda rol oynayan

genlere proapoptotik genler veya antiapoptotik genler denilmektedir. Proapoptotik genler Bad, Bax, P53, Bid, Bcl-xs, Bak, Bim, Puma ve Noxa'dır. Antiapoptotik genler ise Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1'dir. Bir hücrenin apoptoza gideceğini belirlemede o hücrenin içindeki Bcl-2/Bax oranı önemlilik arz etmektedir. Eğer hücrede Bax oranı fazla ise hücre apoptoza gider, fakat tam tersi bir şekilde hücrede Bcl-2 geni fazla ise apoptoz inhibisyona uğrar.<sup>38-41</sup> Kanser hücrelerinde, tümör baskılayıcı geni olan P53 geni apoptozu kaspaz 3, 7, 8 ve 9 enzimlerini aktive ederek sağlamaktadır. Fakat kanser hücrelerinde P53 geni mutasyona uğradığından, bu mutasyonlar her kanser türü için farklı spektrumda görülür ve P53 geninin inaktivasyonuna ve bunun sonucu olarak da apoptoz engellenerek malignant gelişime neden olur.<sup>42-44</sup>

### **2.1.8. Kanser ve P53**

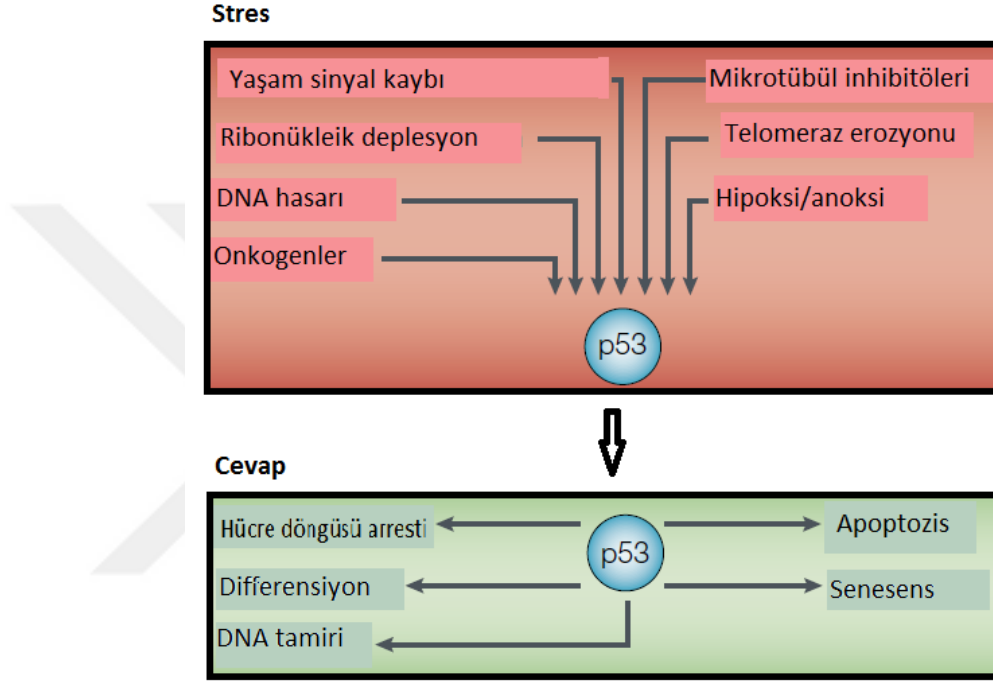
P53 ilk defa yaklaşık 30 yıl önce heksamerik DNA helikaz ve Simian Virus (SV-40) büyük-T antijenine bağlanan 53kD ağırlığında bir protein olarak keşfedilmiştir. Neoplastik rodentlerde ve insan hücrelerinde, P53'ü kodlayan TP53 geni, zayıf onkojenik özellikleri nedeniyle başlangıçta onkogen olarak tanımlanmıştır. İnsan ve fare tümör hücrelerinden elde edilen TP53 cDNA'larında mutasyonlar incelenmiş ve daha sonra yapılan çalışmalarda yaban TP53'e sahip rodent fibroblastlarında neoplastik transformasyonun ayrıca kanser hücrelerinin gelişiminin baskılandığı gösterilmiştir. TP53 ile ilgili yapılan çalışmaların artmasıyla birlikte tümör baskılayıcı bir gen olduğu ve ayrıca birçok kanser türünde mutasyona uğradığı bildirilmiştir.<sup>45, 46</sup>

Tümör süpresör gen ailesi üyesinden biri olan TP53, 17p 13.1 kromozomunda bulunur. Son yirmi yıldır kanser biyolojisinde yaygın olarak en çok çalışılan genidir. Hücrel büyüme ve ölüme kritik fonksiyona sahip olan P53 apoptozdan farklı olarak DNA tamiri ve büyümenin durması proseslerinde yer alır. Birçok kanser türünde P53

geninin homozigot kaybı söz konusudur. Rb geni gibi bir mutant P53 allelinin kalıtımla geçmesi sonucunda kişiyi tümör gelişimine duyarlı hale getirir. Hücre radyasyona veya karsinojen etkenlere maruz kaldığı zaman TP53 geni P53 proteinini sentezler. P53 proteininin hücre çekirdeğinde birikmesi sonucunda bir siklin bağımlı kinaz (CDK) inhibitörü olan p21 kodlanır ve böylece hücrenin S fazına girmesi için gerekli olan pRb fosforillenerek hücre G1 fazında bekletilir. Bu durumda hücrenin hasara uğramış DNA'sının uyarılması için zaman kazanılmış olur.<sup>47</sup> Yani P53 hem hücre siklusunun ilerlemesini hem de apoptozu düzenler. DNA hasarı P53 sentezini indükler, P53 de CDK inhibitörü p21'in transkripsiyonunu hızlandırır. P21 bir taraftan CDK/siklin kompleksinin genel inhibitörü olarak, diğer taraftan da çoğalan hücre nükleer antijen (PCNA)'ine bağlanarak DNA'nın replikasyonunu engeller ve hücre siklusunu durdurur ve replikasyon öncesi hasarlı DNA için zaman kazanılmış olur. P53'ün kaybı hücre hasarına bağlı bu duraklamayı ortadan kaldırarak mutasyon sıklığının artmasına ve hücre genomunda kararsızlığa neden olur. Bu genomik kararsızlık kanser hücrelerinin genel özelliği olup tümör gelişimi sırasında onkogenlerde ve tümör baskılayıcı genlerde yeni değişikliklerin ortaya çıkmasına neden olur.<sup>13</sup>

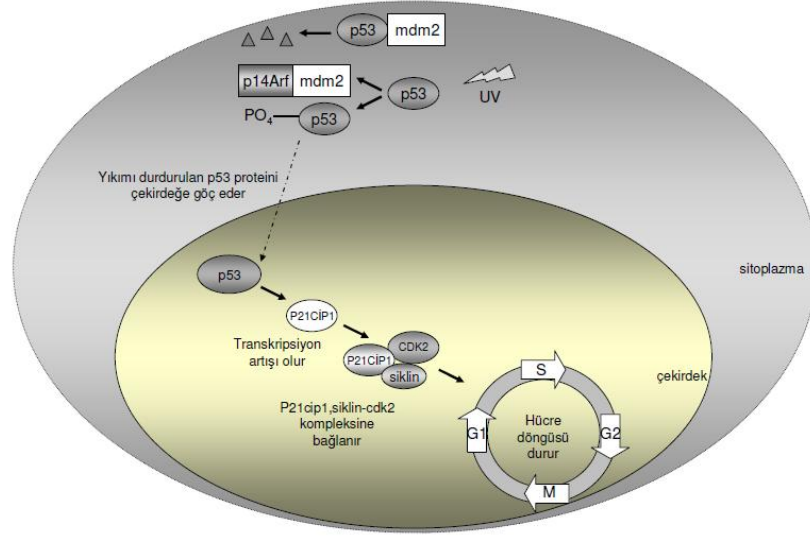
P53 delesyon, anlamsız mutasyonlar ya da insersiyon gibi mutasyonlara maruz kalan APC, BRCA1 ve ATM gibi tümör baskılayıcı genlerin aksine, yanlış anlamlı mutasyonlar sonucu sadece tümör baskılayıcı işlevi ile ilgili fonksiyonlarını kaybetmekte ve bu da onkojenik bir işlev kazanmasına yol açabilmektedir. Gende meydana gelen nokta mutasyonları tekli aminoasit yer değişimleriyle P53'ün DNA bağlanma bölgesinde bozulmalara neden olabilmektedir. Bildirilen 20.000 mutasyon oranıyla birlikte kanserlerin % 50'sinde P53 gen mutasyonlarının olduğu bilinmektedir.<sup>46, 48</sup>

P53 geninin lösemi, lenfoma, sarkom ve beyin tümörleri ile meme, barsak ve akciğer karsinomları gibi birçok değişik insan kanserinde sıklıkla işlevini kaybettiği görülmüştür. Ayrıca kalıtsal P53 mutasyonları ender görülen ve mutasyon taşıyan bireylerde belirli kanser türlerinin ortaya çıkmasına neden olan kalıtsal bir kanser sendromunun kuşaktan kuşağa aktarılmasından sorumludur.<sup>13</sup>



**Şekil 2.1.** Çeşitli stres sinyallerine karşı P53'ün cevabı<sup>9</sup>

P53'ün apoptoz üzerindeki etkisi, Bcl-2 ailesinin hücre ölümünü başlatan bir üyenin transkripsiyonunu aktifleştirmekle başlar. P53 yoksunluğunda hücreler apoptoza giremez ve DNA hasarına rağmen apoptozun gerçekleşmemesi tümörlerin kemoterapiye direnç göstermesine neden olur. P53 eksikliğine ek olarak büyüme faktörlerinin eksikliği de veya oksijen yokluğu gibi başka uyarılara bağlı gerçekleşen apoptoz da engellenir.<sup>13</sup>



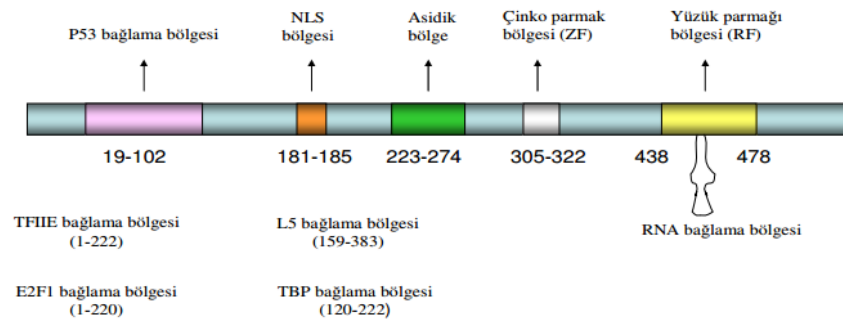
**Şekil 2.2.** P53 yolu ve MDM2 ile ilişkisi<sup>49</sup>

### 2.1.9. Kanser ve MDM2

Murine double minute-2 (MDM2) geni, ilk olarak immortal murin hücre hattının spontan transformasyonundan sorumlu gen olarak tanımlanmıştır.<sup>8</sup> Kromozom üzerinde 12q 13.14 bölgesinde lokalize ve 1–2 megabaz (Mb) büyüklüğündeki yapı üç adet gen içermektedir. Bu genlerden ikincisine MDM2 adı verilmiştir. MDM2 geni, yaklaşık 25 kb büyüklüğündedir ve en az 12 ekzon içermektedir P1 ve P2 olmak üzere iki promotörü bulunur. P1 promotörü birinci ekzonun önünde bulunur ve P53'ün bağlanabileceği bir dizi içermez. P2 promotörü ise birinci intronun içindedir ve P53'ün bağlanabileceği diziyi içerir. Her iki promotör de guanin (G) ve sitozin (C) nükleotitleri sayısı bakımından zengindir ve G ve C'den zengin promotörlerde gözlenen çoklu başlama bölgeleri her iki promotörde da bulunmaktadır.<sup>50, 51</sup> MDM2 geni, fare hücrelerine aktarıldığında tümör oluşumuna neden olduğundan bir onkogen olarak tanımlanmıştır. Daha sonra yürütülen çalışmalarda, P53 tümör supressör proteini ile kompleks oluşturabilen 90 kilodalton (kD) büyüklüğünde bir protein olduğu anlaşılan

MDM2 geninin kodladığı MDM2 proteini P53'ü kontrol altında tutarak P53'ün apoptoz etkisini engellemektedir.<sup>8, 52, 53</sup>

MDM2 proteini 491 amino asitten oluşmaktadır ve korunmuş olan çeşitli bölgeler içerir. İlk korunmuş bölge 19-102 amino asitleri arasında yer alan P53 bağlanma (“P53 binding”) bölgesi, MDM2'nin P53 proteininin transkripsiyonunu aktive etme görevini inhibe ettiği bölgedir.<sup>54</sup> 181-185 amino asitleri arasında yer alan “çekirdeğe yerleşme dizisi”( NLS: nuclear localization sequence) bölgesi, MDM2'nin çekirdek ve sitoplazma arasında aracılık etmesi için gereklidir. Bir sonraki korunmuş bölge, 221-272 amino asitleri arasında yerleşmiş olan, %40 glutamik asit ve aspartik asit rezidüleri içeren “asidik” bölgedir. Bu bölge MDM2'nin ribozomal protein L5 ve 5S ribozomal RNA (rRNA) ile etkileşimde bulunmasına aracılık eder. Bu asidik bölgeyi 305-322 amino asitleri arasında yer alan çinko parmak bölgesi takip eder. MDM2 proteininin son korunmuş bölgesi, karboksil ucunda 438-478 amino asitleri arasında yer alan “yüzük parmak” (ring finger) bölgesidir. Bu bölge ise iki adet çinko parmak yapısı içermekte ve MDM2'nin in vitrodaki yapılarla ve spesifik RNA dizilerine bağlanmasını sağlamaktadır.<sup>55</sup>



Şekil 2.3. MDM2 proteinin yapısı<sup>49</sup>



Çeşitli nedenlerden dolayı kanser tevadisi için kayda değer hedef olduğu düşünülen bir onkogen fonksiyonlu intraselluler proteindir. Bir E3 ubikütin ligaz olan MDM2 ubikütin aracılı degradasyonla önemli ölçüde P53'ü negatif olarak düzenler. Koordineli hücre siklusu durdurulması ve apoptozu suprese ederken, hücreyi yaşamaya ve büyümeye teşvik eder.<sup>56</sup> MDM2'nin cell-type-specific delesyonu P53'ü kurtarır ve cell-type-specific hücre ölümünü indükler. MDM2 erken kanser gelişiminde P53 yolağını bozan alternatif bir mekanizma gibi wild-type P53'lü malignensilerde oldukça çok eksprese edilir.<sup>57, 58</sup> Çoğu tümörlerde MDM2'nin aşırı ekspresyonu edinilmiş mutasyona bağlanılır. MDM2 uygun antagonistiyle bloke edildiğinde tümör gelişiminin de bloklandığı görülmüştür.<sup>59</sup> Tümör hücre siklusu kontrolüne dayalı P53-MDM2 düzenleyici rolünü açıklayan literatürde pek çok bilgi mevcuttur ancak MDM2 P53'ten bağımsız birçok etkilere de sahiptir ve tümör büyümesi aynı zamanda tümör damar sistemine, tümör stromasına ve MDM2 bağlamında henüz tam olarak açıklanamayan faktörlere bağlıdır.<sup>60, 61</sup>

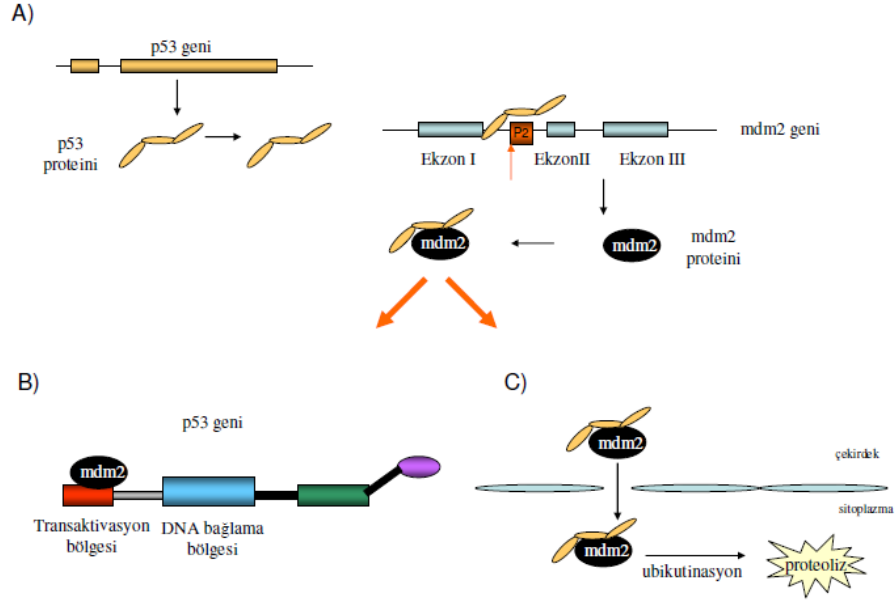
MDM2'nin P53 bağlanma bölgesi ve ubikütinasyon bölgesi fosforilasyonların olduğu fonksiyonel bölgeleridir. DNA hasarında aktive olan DNA-PK tarafından 17. serin amino asidi üzerinden fosforillenen MDM2, P53 ile kompleks oluşturamaz ve P53 aktif formda kalır.<sup>62, 63</sup> DNA hasarı ve iyonize edici radyasyon sonucunda da P53'ün genetik bir hastalık olan Ataksia Telangiectasia'den sorumlu olan genin ürünü ATM proteini tarafından 15. serin amino asitinden fosforile edildiği ve bu nedenle aktifleştiği gözlenmiştir. DNA kırıklarında oluşan hücresel cevabı düzenleyen bir proteindir olan ATM, P53'ü fosforilleyerek, P53-MDM2 ilişkisini bozduğu ve böylece hasarın tamiri için hücreye zaman kazandırılmasına yardımcı olduğu düşünülmektedir.<sup>64, 65</sup>

MDM2 geninin P53'ü inhibisyon mekanizması üç şekilde gerçekleşmektedir;<sup>66-69</sup>

1. MDM2, P53'ün transkripsiyon bölgesine bağlanarak, ekspresyonunu inhibe eder. MDM2 bu bölgeye bağlanabilmek için transkripsiyon faktörü kompleksi TFIID ile rekabet etmektedir. Bu şekilde P53'ün transkripsiyonu aktive etmek için kullandığı bölgeyi maskeler ve P53'ün fonksiyonunu inhibe eder.
2. MDM2, P53 proteininin proteazlar tarafından parçalanmasını tetikler ya da MDM2 proteini karboksil ucundaki “çinko parmak” bölgesini kullanarak “E3 ubiquitin ligaz” aktivitesi yapar ve P53 proteininin inhibisyonuna direkt olarak etki etmektedir
3. MDM2, P53 geninin asetilasyonunu engeller. Asetilasyon, P53'ün DNA dizisine özel bir şekilde bağlanmasını hızlandırır. MDM2, P53'ün p300 (bir koaktivatör) aracılı asetilasyonunu inhibe ederek, P53'ün transkripsiyonu aktive etme fonksiyonunu inhibe etmektedir.

Hücrelerde P53 ve MDM2 genlerinin sentezlenmesinde bir denge söz konusudur. P53, kendi inhibitörü olan MDM2'nin ekspresyonunu arttırarak hücredeki bu dengenin korunmasını sağlamaktadır. Hücrede herhangi bir hasar oluştuğunda P53 ve MDM2'de meydana gelen modifikasyonlar bu iki protein arasındaki etkileşimi inhibe eder ve bu sayede P53 geni aktif hale geçer. MDM2 geni aşırı eksprese olduğu zaman ise P53 proteini fazla miktarda yıkılarak fonksiyon göremez hale gelir. Hücrelerde hasar durumunda P53 ve MDM2 geni arasındaki kompleks bozularak, P53 proteininin normal işlevlerinin yerine getirilmesi sağlanmaktadır. Ancak kanser hücrelerinde MDM2 geni çok fazla eksprese edildiğinden dolayı P53 aktivasyonu inhibe edilmekte ve hücre döngüsü devam etmektedir.<sup>8, 69, 70</sup> MDM2 proteini, P53 proteininin fonksiyonlarını negatif olarak düzenlerken her iki protein “otodüzenleyici feedback döngüsü” (autoregulatory feedback loop) adı verilen bir yolakla hareket eder ve bu yolakta önce P53 proteininin

MDM2 genine bağlanıp onu aktifleştirmesi, daha sonra aktifleşen MDM2 proteininin P53 proteinini inhibe etmesi söz konusudur.<sup>71</sup>



**Şekil 2.4.** MDM2 ve P53 proteini ilişkisi. A) MDM2'nin P53 ile aktif hale getirilmesi. B) P53'ün transaktivasyon bölgesinin MDM2 ile baskılanarak P53 fonksiyonunun engellenmesi. C) P53'ün MDM2 proteini ile parçalanması<sup>49</sup>.

MDM2 ve kanser arasında belirlenen ilişkilere ilave bilgiler, normal dokularının MDM2'yi aşırı miktarda eksprese ettiği kansere eğilimli olan "Li-Fraumeni" sendromunun tanımlanmasıyla elde edilmiştir. Bu bireyler iki wild-tip P53 alleleline sahiptirler ve P53 ile indüklenen bir gen olan p21 genini aşırı miktarda eksprese etmezler ve bu nedenle MDM2'nin aşırı ekspresyonunun P53'ten bağımsız olduğunu göstermektedir. "Li-Fraumeni" sendromlu bireylerin normal dokularında MDM2'nin aşırı miktarda ekspresyonu, MDM2'nin bu bireylerde yüksek miktarda olan tümör insidansına direkt olarak etki edebileceğini düşündürmektedir.<sup>8, 72</sup>

### 2.1.10. Kanser ve Sin3A

Sin3 (Swi-independent), 1987 yılında birbirinden bağımsız iki grup tarafından tomurcuklanan mayalarda switching eşleşme tipinin fenomeninin araştırılmasıyla tespit edilmiştir ve aynı zamanda SDII olarak da bilinmektedir. İlk olarak mayalarda iskelet proteini olarak keşfedilen Sin3 şuan DNA hasar tamiri, organ gelişimi, hücre siklusu, senesens, onkogenezis gibi farklı hücresel fonksiyonlar yer aldığı bilinmektedir. Ancak moleküler mekanizması tam olarak anlaşılmış değildir. Sin3 HO endonükleazın negatif bir regülatör proteini olarak belirtilmiştir.<sup>73, 74</sup> Daha sonra yapılan çalışmalarda Sin3'ün histon deasetilaz (HDAC) komplekslerin yapısı, DNA'nın regülasyonu, histon metilasyonu, nükleozomun yeniden şekillenmesi ve N-asetilglukozamin transferaz aktivitesi gibi kritik birçok biyolojik fonksiyonda yer aldığını ortaya çıkarmıştır.<sup>75-77</sup> Sin3'ün yapısı, fonksiyonu ve ilgili protein kompleksleri üzerine çalışmalar devam etmektedir.<sup>75</sup>

Sin3 geni 5.8 kb DNA fragmentinden oluşmaktadır ve proteini ise 175 kD ağırlığında olup 1538 a.a. içermektedir.<sup>78</sup> Proteinin en belirgin özelliği her bir 100 rezüdüde tekrarlayan, biri hidrofilik, diğeri ise hidrofobik olmak üzere iki tane  $\alpha$  helix içeren dört çift amfipatik alfa heliks (PAH) yapısıdır. PAH1, PAH2, PAH3, PAH4, histon deasetilaz etkileşme domaini (HID) ve yüksek ölçüde korunmuş bölge (HCR) olmak üzere 6 domaine sahiptir.<sup>75, 79</sup> Memelilerde iki farklı genden kodlanan Sin3A ve sin3B olmak üzere iki izoform tanımlanmıştır. İki izoform arasındaki farklılık Sin3B'nin PAH1'den önce daha kısa bir amino-asit kuyruğa sahip olmasıdır.<sup>80, 81</sup>

DNA-bağlı proteinlerle beraber Sin3, farklılaşmış hücrelerde kalıcı gen sessizliği ve hetero-kromatin formasyonuna sebep olan kromatin işaretlerinin koordineli modifikasyonu için bir model sağlayan kompleks bir formdadır. Açık bir şekilde enerji

metabolizması, hücresel proliferasyonu ve hücre yaşamını gibi kompleks hücresel yolları düzenler.<sup>76</sup> Sin3A proteinler hedef genlerin ekspresyonunu baskılamak için kromatin bağlı transkripsiyon faktörlere HDAC'ları yapılandırabilir.<sup>82</sup> Sin3A hücre ölümü ve mitokondrial biyogenezisi içeren homeostazis ve gelişim için önemli prosesleri regüle eder. Aynı zamanda Mad-class nükleer faktörün zorunlu bir partneridir ve Myc-bağımlı transkripsiyonun Mad-aracılı baskılanması için gereklidir.<sup>83, 84</sup> Sin3A HDAC'lerle kompleksler oluşturur ve bu durum histon proteininin deasetilasyonu konformasyonel değişiklikler yarattığı için transkripsiyonel represyon veya sessizleşmeye neden olarak, transkripsiyon faktörlerine erişimi kısıtlar ve transkripsiyon faktörlerinin ve RNA polimerazın ilgili genlere bağlanmasını kısıtlar.<sup>85, 86</sup>

Sin3'ün hem onkojenik hem de tümör baskılayıcı fonksiyonları bağımsız çalışmalarla bildirilmiştir. Sin3A transforme hücreler için esansiyel olduğu gösterilmiştir. Ayrıca Sin3A'nın düşük ekspresyonu tümör hücrelerinin artmış apoptozisiyle ve hem ekstrinsik hem de intrinsik yıkım sinyal yolağını içeren birkaç genin yükselmiş ekspresyonuyla ilişkilidir. Triple negatif meme kanseri hücrelerinde Sin3A fonksiyon müdahalesi epigenetik yeniden programlanmasını ve diferensiyonunu indüklediği gösterilmiştir. Yine yapılan çalışmada Sin3A aktivitesinin P53 bağımsız apoptozisi önlediği gösterilmiştir.<sup>87</sup>

## **2.2. Meme Kanseri**

Meme kanserleri, meme parenkim epitelinden, özellikle de terminal duktal lobüler ünitenin hücrelerinden geliştiği düşünülen adenokarsinomlardır. Meme kanseri insanlık tarihinde tanımlanmış ilk kanser türlerinden biridir. İlk olarak tarihçi Herodot (M.Ö. 484-425), bir yazısında Darius'un karısı Atossa'nın memesinde ülserleşmiş bir tümör olduğunu ve bunun Pers'li doktor Democedes tarafından tedavi edildiğini belirtmiştir. Hipokrat (M.Ö 460-370), ilk olarak meme tümörlerini iyi huylu ve kötü huylu olarak

ikiye ayırmış; kötü huylu olanın yayılabildiğini ve ölüme sebep olduğunu yazmıştır. Daha sonraları İskenderiye’de yaşayan D.r Leonides (M.S 80), mastektomi ameliyatını anlatmış; Alman cerrah Wilhelm Fabry von Hilden (M.S. 1560-1624) aksiler lenf düğümlerinin de çıkartılması gerektiğini belirtmiştir. Fransız cerrah Henri François Le Dran (1685-1770) 1757 yılında meme kanserinin başlangıçta lokal bir hastalık olduğunu, büyüdükçe aksiller lenf düğümlerine ve buradan da genel dolaşıma geçerek uzak organlara yayıldığını bildirmiştir. William Stewart Halsted, 1894’te ilk radikal mastektomi yapmış ve yaptığı 50 vakalık radikal mastektomi serisi meme cerrahisinin temelini oluşturmuştur. 1948 yılında Patey ve Dyson ‘Modifiye Radikal Mastektomi’ tekniklerini açıklamışlardır. Son yıllarda ‘meme koruyucu cerrahi’ teknikleri popülerlik kazanmıştır.<sup>88</sup>

### **2.2.1. Epidemiyoloji**

Dünyada, kadınlarda en sık görülen kanser türü olan meme kanseri, kanser ilişkili mortalitede akciğer kanserinden sonra %15’lik oranıyla ikinci sırada yer alır.<sup>2, 3</sup> 100.000 kadında 45 yaşına kadar olanlarda 20.8’inde hastalık görülürken, bu değer 45-60 yaş aralığında 186.7 kadında olduğu, 60-75 yaş aralığında ise 238.5 kadında olduğu bildirilmiştir.<sup>89</sup> Erkeklerde meme kanseri yaklaşık % 1 sıklıkta görülür.<sup>90</sup> Kadınlar için yaşam boyu meme kanserine yakalanma riski yaklaşık 1/8’dir. Bu risk güçlü aile hikayesi olanlarda ve ‘‘Breast Cancer’’ (BRCA)-1 ya da BRCA-2 gen mutasyonu taşıyanlarda daha yüksektir<sup>91</sup>. Geçen 40 yıl boyunca meme kanseri sıklığı özellikle gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde sürekli şekilde artmaktadır. Meme kanserindeki artış, tarama yöntemlerinin daha sık ve düzenli kullanılmasına bağlı tanı oranındaki artışa ve toplumların ortalama yaşam sürelerinin uzamasıyla hastalığın ileri yaş grubunda daha sık görülmesi ile açıklanmaktadır. Diğer bir yandan postmenapozal

hormon replasman tedavilerindeki azalmadan dolayı da meme kanseri insidansındaki artışın düşüğe geçtiği gözlenmiştir.<sup>92</sup>

### 2.2.2. Etyolojisi

Meme kanseri risk faktörleri arasında genetik yatkınlık, BRCA1 ve BRCA2 genlerinin taşınmasının yanı sıra önceden geçirilen kötü huylu meme hastalıkları, erken menarş, geç menopoz, obez postmenopozal kadınlar, alkol kullanımı, düşük doz radyasyon, diabetes mellitus, ilk doğumunu geç yaşta yapmış kadınlar, pestisitlere maruz kalma, uzun süreli oral kontraseptif ilaç alımı gibi durumlar yer almaktadır. Ayrıca östrojen, oksidatif stres, apoptozun engellenmesi de meme kanseri oluşumunda önemli rol oynayan faktörlerdir.<sup>93</sup>

Genellikle meme kanserlerinin yaklaşık % 10-15'i aile öyküsüyle ilişkilidir, bunların da küçük bir bölümünde, dominant geçen meme kanserine eğilim genleri söz konusudur. Kalıtsal olarak aktarılan hastalıkların birçoğu gibi meme kanserinin genetik tipleri de hastalığın daha erken yaşta ortaya çıkması, bilateral oluşu ve yüksek bir penetrasyon ile karakterizedir.<sup>94, 95</sup> 1. Kromozom üzerinde bulunan otozomal dominant gen olan BRCA-1'de mutasyonların oluşması sonrası bu genin ailevi meme kanseri ve over kanserinde etyolojik rol oynadığı kabul edilmektedir. Meme kanserlerinin büyük bir kısmını oluşturan ve herediter geçiş göstermeyen sporadik olgularda ise BRCA-1'in rolü görülmemiştir.<sup>96</sup> 13. kromozomda üzerinde bulunan BRCA-2 ise ön değerlendirmelere göre ailevi olgularda hastalığın erken ortaya çıkışında ve bilateral hastalıkta rol oynadığı düşünülen gendir.<sup>97</sup>

Meme kanseri riski sıklıkla erken menarş, nulliparite ve/veya geç yaşta az sayıda çocuk doğurmuş kadınlarda, infertil hastalarda, geç yaşta menapozu girmiş kadınlarda

artmıştır.<sup>98</sup> Ayrıca laktasyonun meme kanserinde koruyucu bir faktör olduğu bulunmuştur.<sup>99</sup>

Meme kanseri olgularında hormonların önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir.<sup>100, 101</sup> Meme kanserinin görülmesinde östrojenlerin yüksek düzeyde bir etkinliğe sahip olması, meme kanseri vakalarının kadınlarda erkeklerden daha fazla (100 kat) görülmesine sebep olmaktadır.<sup>100, 102</sup> Östrojen, steroid yapıda olan bir cinsiyet hormonu olup E1, E2 ve Östriol (E3) en önemli doğal östrojenler arasında yer alır. Östrojen hormonunun biyosentezi vücutta ovaryumlarda olgun foliküllerin granuloza hücreleri tarafından gerçekleşmektedir ve gebelik döneminde ise plasentadan östrojen sentezi olmaktadır. Vücut periferinde intrakrin östrojen sentezi premenopozal kadınlarda toplam östrojen oluşumunun %75'ni, postmenopozal dönemdeki kadınlarda %100'e yakınına oluşturmaktadır.<sup>103</sup>

### **2.2.3. Evreleme**

Meme kanseri tümör oluşumu ve etrafındaki dokulara sıçrama özelliklerine göre çeşitli evrelere ayrılmıştır. Amerikan Ulusal Kanser Merkezine göre meme kanseri evreleri.<sup>104</sup>

#### **2.2.3.1. Evre 0**

Anormal hücrelerle karakterize ve invaziv olmayan Evre 0, hücre içi duktal karsinoma (DCIS) olarak tanımlanır. Bu evrede kanser hücreleri oluştukları duktuslar içerisinde kalmış ve göğüsün yağ dokusuna ya da lenf düğümü gibi vücudun diğer organlarına yayılmıştır. DCIS genellikle mamogram üzerinde küçük kalsiyum birikimleri (mikrokalsifikasyonlar) olarak görünür.



### **2.2.3.2. Evre I**

İnvaziv meme kanserinin erken evresi olarak kabul edilen Evre 1, kanser başlangıcı sayılıp meme dokusuna yayılmamıştır. Tümoral doku büyüklüğü 2 cm den büyük değildir.

### **2.2.3.3. Evre II**

Tümör boyutu en fazla 5 cm olup, dört farklı şekilde görülür.

- Tümör 2 cm den büyük değildir. Kanser koltukaltı lenf düğümlerine metastaz yapmıştır.
- Tümör 2-5 cm ebatlarındadır ve koltukaltı lenf düğümlerine metastaz yapmamıştır.
- Tümör 2-5 cm ebatlarındadır ve koltukaltı lenf düğümlerine metastaz yapmıştır.
- Tümör 5 cm ebadındadır ve koltukaltı lenf düğümlerine metastaz yapmamıştır.

### **2.2.3.4. Evre III**

Bu evre ilerlemiş kanser olup üç alt tipe ayrılır:

- Evre IIIA: Tümör 5 cm'den büyük, kanser koltukaltı lenf düğümüne metastaz yapmış ve etrafındaki dokulara tutunmuştur.
- Evre IIIB: Göğüs duvarında ya da meme derisinde herhangi bir ebatla tümör ile karakterize olan bu evrede kanser koltukaltı lenf düğümüne metastaz yapmış ve çevre dokulara tutunmuş olarak bulunurken, göğüs lenf düğümlerine de sıçramıştır.
- Evre IIIC: Bu evrede tümör herhangi bir ebatla olabilir ve çeşitli dokulara metastaz yapmıştır. Yani kanser koltukaltı ve göğüs lenf düğümlerine, lenf düğümlerinin önüne ve arkasına sıçrayarak buralara yayılırlar.

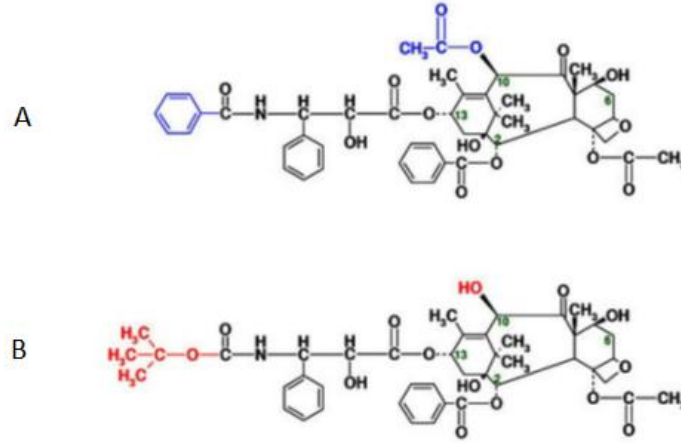
### 2.2.3.5. Evre VI

Bu evre uzak metazistik kanserdir ve vücudun çeşitli bölgelerine (karaciğer, kemik gibi) metazistik yapmıştır.

### 2.3. Doksetaksel

Taksol, NCI tarafından 1971 yılında doğal antikanser bileşikler bulmak için yapılan programda ABD'de yetişen *Taxus brevifolia*'nın kabuğundan izole edilmiştir<sup>105</sup>. Taksol, FDA tarafından 1992 yılı içinde ovaryum ve 1994 yılında meme kanserli hastalara verilmek üzere ruhsatlandırılmıştır ve etkin maddesine paklitaksel (PTX) adı verilmiştir.<sup>106</sup>

Taksolün yarısentez ile temini çalışmaları sırasında, taxotere adı verilen bir taksol analogu sentezlenmiştir. Taxotere 1996 yılında antikanser ilaç olarak ruhsatlandırılmıştır. Preparatı TAXOTERE (Rhone-Poulenc Rorer Pharmaceutical, Inc., Collegeville, PA.) olarak isimlendirilirken, etkin maddesine dosetaksel (DTX) adı verilmiştir.<sup>106</sup> DTX taksoid familyasına ait bir antikanser ajandır ve paklitakselin analogu olan DTX Avrupa'ya ait porsuk ağacı olan *Taxus baccata L.*'den ekstrakte edilen 10-deasetil bakkatin III yarısentezi ile elde edilir. Mikrotübül polimerizasyonunun inhibitörü olarak paklitakselden daha etkili olduğu gösterilmiştir.<sup>107</sup> Molekül ağırlığı 807,9 g/mol'dür. DMSO ve etanolde çözünürken, sudaki çözünürlüğü oldukça düşüktür. PTX ile karşılaştırıldığında iki modifikasyon sunar: bir hidroksil grubunun bakkatin III'ün 10'pozisyonu üzerindeki 3' asetil grubu ile yer değiştirmesi ve bir OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> grubunun C-13 yan zinciri ile yer değiştirmesidir. Bu iki yapısal modifikasyondan dolayı DTX, PTX ile karşılaştırıldığında suda daha yüksek çözünürlük ve tübülünlere karşı daha yüksek afinite göstermektedir.<sup>108</sup>



**Şekil 2.5.** Paclitaxel (A) ve dosetakselin (B) yapısı. Farklılıklar mavi ve kırmızı ile işaretlenmiştir.<sup>109</sup>

DTX meme, over, prostat ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri gibi pek çok maligniteye karşı antitümör etkisi gösterir. *In vitro* çalışmalar hücre replikasyonunun inhibisyonunda DTX'in PTX'den 2,5 kat fazla potansiyeli olduğunu göstermiştir. Bunun nedeni ise DTX'in hücre mitozunu hem S hem de G2/M fazında engelleme yeteneği varken, PTX'in yalnızca G2/M fazında engelleme yeteneğine sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Buna ilave olarak, DTX hücre içine alınımının daha iyi, hücreden atılmasının daha yavaş olması ve tümör dokusundan daha uzun terminal eliminasyon yarı ömrü sayesinde tümör hücrelerinde PTX'e oranla daha uzun alıkonma zamanına sahiptir.<sup>110-113</sup>

Dosetaxel üç farklı şekilde doğrudan veya dolaylı olarak apoptoza neden olur. Dosetakselin temel terapötik etkisi mikrotübül dinamiklerinin baskılanmasıdır (birleştirme ve ayırma). Diğer yöntemler ise hücre siklusunun bozulması ve Bcl-2' nin fosforilasyonudur. Birincisi, DTX hücrelerdeki mitotik ve interfaz hücresel fonksiyon için zorunluluk olan, mikrotübüller ağı bozulmasında rol alan antineoplastik bir ajandır. Boş tübülünleri bağlayarak tübülünlerin stabil mikrotübüller halinde birleşmesini destekler ve eş zamanlı olarak ayrılmalarını inhibe eder. Bu aktivite normal fonksiyonu olmayan mikrotübül yığınları üretimine ve mikrotübüllerin

stabilizasyonuna sebep olur, bu durum hücrelerde mitozun inhibisyonu ile sonuçlanır. İkincisi, DTX hücrelerin yaşam döngüsündeki 3 fazı engelleyerek çalıştığı düşünülmektedir. Hücre döngüsünü S (synthesis) fazı, G2 (growth 2) fazı ve M (mitotic) faz aşamalarında bloke etmektedir. S fazında DNA eşlenmesi olmakta, G2 fazında büyüme ve M fazında bölünmek için hazır hale gelmektedir. Hücre döngüsünün bu üç fazının engellenmesi ile DTX hücrelerin bir sonraki faza ilerlemesini olanaksız hale getirmekte, böylelikle apoptozisi tetiklemektedir. DTX'in üçüncü yolu ise Bcl-2' nin fosforilasyonunu indükleyerek apoptozisi başlatmasıdır. Kanseri hücrelerinde Bcl-2'nin yüksek ekspresyonu, apoptozisi önlemektedir. DTX Bcl-2 fosforilasyonunu sağlayarak inaktive eder ve hücre ölümünün gerçekleşmesini sağlar. Bu in vitro değerlendirme MCF-7 meme kanseri hücre hattını da içeren insan hücre hatlarında yapılmıştır.<sup>114</sup>

DTX metastatik meme kanserinde tek başına kullanılan aktif bir maddedir. Özellikle antrasiklin ile uygulanan standart tedavinin başarısız olduğu hastalarda belirgin etkinlikleri görülmüştür.<sup>106, 115</sup> DTX ile yapılan çalışmalarda meme kanserinde %50-68 oranında başarı sağlanmıştır. Daha önce kemoterapi almış hastalarda cevap oranları %29-57'ye düşerken, daha önceden antrasikline karşı dirençli olan hastalarda ise belirgin derecede yüksek olduğu saptanmıştır. DTX meme kanserindeki optimum dozu henüz saptanamamıştır. DTX ile karşılaştırıldığında, her iki bileşiğin meme kanserinde etkili olduğu görülse de genellikle DTX'e karşı alınan yanıt PTX daha fazladır. Günümüzde yapılan çalışmalarla her iki taksoit maddenin diğer tedavi protokollerinde yer alan maddelerle karşılaştırmalı ve beraber tedavileri üzerine araştırmalar devam etmektedir.<sup>116, 117</sup>

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Örnekler

Meme kanser hücre hattı (MCF7), -196 °C'de 7. Pasaj olarak Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Laboratuvarından temin edildi.

##### 3.1.2. Kullanılan Kimyasal, Cihaz ve Ekipmanlar

Tablo 3.1'de çalışmada kullanılan kimyasallar, kitler ve bunların temin edildiği firmalar gösterilmiştir. Çalışmada kullanılan cihaz ve aletlerle ilgili bilgi ise Tablo 3.2'de verilmiştir.

**Tablo 3.1.** Kullanılan kimyasallar / kitler

Kimyasal/Kit adı	Firma
Dosetaksel (Taksotere)	Sanofi Aventis
Hücre kültürü medyumu	Bio-ANF-1
Fetal bovine serum	Sigma
L-glutamine	Sigma
Tripsin	Sigma
Fosfat tampon (PBS)	Sigma
EDTA	Sigma
MTT kiti	Roche
TUNEL kit	Roche
Taxotere	Rhone-Poulenc Rorer Pharmaceutical

MDM2 primer	Roche
Sin3A primer	Roche
P53 primer	Roche
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kiti	Roche

**Tablo 3.2.** Kullanılan cihazlar/aletler

Cihaz/Alet	Firma
Etüv	Nuaire
Santrifüj	Beckman
Derin dondurucu(-80°C)	Sanyo
Işık mikroskobu	Leica
Real-Time PCR	Roche
Poly-L-lysine kaplı lamalar	Thermo
Mikroplak okuyucu spektrofotometre	BioTek
25 cm <sup>2</sup> 'lik flask	Isolab
96 kuyucuklu mikroplak	Termo
Falkon tüp	Isolab
Pipetler (2-20µL, 20-200µL, 100-1000µL)	Ependorf
DNA-RNA izolasyon cihazı	Roche
Petri kabı	Termo

## **3.2. Metot**

### **3.2.1. Hücre Kültürü**

#### **3.2.1.1. Hücre Kültür Medyumunun Hazırlanışı**

Hücre kültürü medyumunu (DMEM);

- 75 mL hazır amniyon hücre kültürü mediyumu
- 15 mL fetal bovine serum
- 1,5 mL Penisilin-Streptomisin-Amfoterisin B
- 2 mL L-glutamine

kariştirilerek kullanıma hazır hale getirildi.

#### **3.2.1.2. Hücre Kültürü İnkübasyon Koşulları**

Hücrelerin çoğalması için, tüm hücreler hücre medyumunu içerisinde, CO<sub>2</sub> konsantrasyonunun %5 olduğu bir ortamda 37 °C sıcaklıktaki etüvde 25 cm<sup>2</sup>'lik flasklarda steril şartlarda inkübe edildi.

#### **3.2.1.3. Hücrelerin Pasajlanması**

Üremekte olan hücreler flaskların zemininin %80-90'ını kapladığında (confluent) hücreler pasajlandı.<sup>118, 119</sup> Bu amaçla üremekte olan hücreler yeteri kadar çoğaldığında;

- Flasklarda bulunan kültür medyumunu uzaklaştırılarak steril fosfat tamponu (PBS- 25 cm<sup>2</sup> için 2 mL) ile yıkandı.
- PBS'i de uzaklaştırdıktan sonra zemine yapışan hücreleri kaldırmak için 3 ml tripsin-EDTA solüsyonu ilave edildi ve etüvde 10 dk. bekletildi.
- Flaskın içeriği elle hafif hafif çalkalanarak süspansiyon halinde getirildi ve 15 mL lik bir falkon tüp içerisine aktarıldı. Süspanse karışımın üzerine tripsinin inkübasyonu için kullanılan karışımın 2 katı kadar medyum eklendi.

- Süspansiyon 1300 rpm'de 10 dk.'lik santrifüj edildikten sonra üst kısımda bulunan tripsin-EDTA solüsyonu uzaklaştırıldı.
- Tüpün dibinde pellet şeklinde bulunan hücrelerin üzerine taze hazırlanmış hücre kültür medyumundan 3 mL ilave edilerek oluşan süspansiyon 5 adet 25 cm<sup>2</sup>'lik flasklara bölünerek tekrar pasajlandı.
- Yeniden pasajlanan hücreler 37 °C'de %5 lik CO<sub>2</sub> ortamında inkübasyona bırakıldı.

#### **3.2.1.4. Hücrelerin Dondurulma ve Saklanma İşlemleri**

- Tripsin-EDTA solüsyonu ile yüzeye yapışan hücreler kaldırılarak santrifüj edildi.
- Tripsin-EDTA solüsyonu uzaklaştırılarak pellet halinde bulunan hücrelerin üzerine 1ml medyum ilave edildi ve sayıldı.
- Tripsin, hacminin en az iki katı serumlu medyumla inkübe edildi.
- Hücreler pipetlenerek tek hücre süspansiyonu haline getirilip bir falkon tüpe aktarıldı. Üzerine 2-3 mL daha medyum ilave edildi.
- Hücre süspansiyonu 1300 rpm'de 10 dk. santrifüj edildikten sonra üstte kalan kısım uzaklaştırıldı.
- Pelletin üzerine 900 µL hücre medyumunu koyularak sayıldı.
- Dondurma tüpleri içerisine 100 µL dimetil sülfoksit (DMSO) ve 900 µL hücre medyumunu ile süspanse edilen hücre solüsyonu eklendi.
- Tüpler dondurma kabına yerleştirilerek -80 °C'de derin dondurucuda gerektiğinde kullanılmak üzere saklandı.

#### **3.2.1.5. Hücre Sayılarının Hesaplanması**

Eppendorf tüpe 1 mL kültür medyumunu ile sulandırılan hücrelerden 10 µL alınarak üzerine 90 µL tripan blue boyası eklenerek karıştırıldı. Bu karışım Neubauer lamı



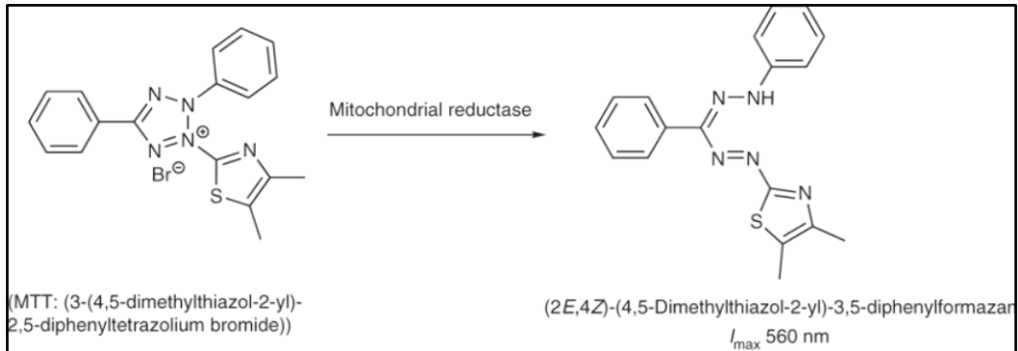
üzerine konularak 5 bölmedeki hücre sayımları yapıldı. Daha sonra bulunan bu sayı, dilüsyon faktörü 50.000 ile çarpıldı. Çıkan sonuç 1 mL medyumda kaç milyon hücre olduğunu göstermektedir. Ekim yapılırken, hesaplanan bu sayı dikkate alındı ve hücrelerin petriye ekimleri yapıldı. Böylece her 100 mm<sup>2</sup> lik kültür petrisine 5x10<sup>6</sup> hücre ve 96 kuyucuklu kültür plağının her kuyucuğuna 5000 hücre transferi sağlandı.

### 3.2.2. Dose taxel uygulanması

Ticari adı Taxotere olan DTX uygulaması için, her bir örneğin çift çalışılması amacıyla örnek sayısının iki katı kadar kuyucuk kullanıldı. 24 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinin denenmesi amacıyla iki adet 96'lık plak hazırlandı. Eşit sayıda hücre bulunan kuyucuklardan her ikisine sırasıyla 10 nM, 100 nM, 1 µM, 10 µM ve 100 µM konsantrasyonlarda 200µL DTX eklendi ve inkübe edildi.

### 3.2.3. Hücre Sitotoksite Analizi

Hücre sitotoksite analizi için MTT [3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] analizi yöntemi kullanılmıştır. MTT analizi, canlı hücrede metabolik aktiviteden dolayı MTT'in indirgenmesi sonucu azalmasına bağlı olarak enzimatik aktivite değişiminin kolorimetrik olarak ölçümüne dayanan bir analiz yöntemidir.



Buradan elde edilen sonuç, hücre çoğalmasının ne düzeyde olduğunu göstergesidir. Bu metot yardımıyla, hücrelere uygulanan terapötiklerin, hücreler üzerindeki sitotoksik ya da proliferatif etkinlikleri belirlenebilmektedir.

DTX kullanımının MCF7 hücre hattı üzerinde oluşan sitotoksik etkileri, MTT kitinin prospektinde yer alan talimata göre değerlendirilmiştir. MTT uygulanmasından 1 gün önce 96'lık plak içerisinde her kuyucuğa 5000 hücre gelecek şekilde 100 µL kültür medyumunu ile hücrelerin ekimi yapıldı. Mikroplak 24 saat 37°C ve %5 CO<sub>2</sub> ayarlı inkübatörde bekletilerek hücrelerin yüzeye yapışmaları sağlandı.

DTX uygulamalarından sonra hücre hatları 24 ve 48 saat süreli inkübasyonda tutuldu, MTT yöntemi uygulandı. Analize başlanmadan önce 96'lık plaklarda bulunan medyumun 100 µL'si uzaklaştırıldı.

#### **MTT analizi;**

1- 96'lık plakların kuyucuklarında bulunan 100 µl medyum ve hücre karışımı üzerine, tiazolil mavi tetrazolium bromür solüsyonundan 10 µL ilave edildi. Bu solüsyon ilavesini takiben 96'lık plaklar inkübatöre alınarak 3 saat bekletildi.

2- Üç saatlik inkübasyonun ardından hücrelerin yüzeyinde bulunan medyum bir pipet yardımıyla uzaklaştırıldıktan sonra, 100 µL MTT çözücü solüsyonu ilave edildi ve 20 dk daha inkübatörde bekletildi.

3- İnkübasyonu yapılan hücrelerin absorbans değeri, spektrofotometrik olarak 570 nm de 3 tekrarlı olarak ölçüldü.

Microsoft Excel programı yardımı ile uygulanan doza karşı % hücre sitotoksisite eğrisi çizilerek, %50 baskılayıcı konsantrasyon (IC50) değeri logaritmik eğim grafiği ile hesaplandı.

### **3.2.4. Histokimyasal Boyama**

#### **3.2.4.1. Hücrelerin Lam Üzerinde Üretilmesi**

- Poly-L-lysine kaplı lamlar, 10 cm çapındaki petri kutularına hücre ekimi yapılmadan önce yerleştirilerek class II tip biyogüvenlik kabini içerisinde 4 saat süreyle ultraviyole ışık altında sterilize edildi.
- 25 cm<sup>2</sup>'lik flasklarda çoğaltılan hücrelerden, UV ışık altında steril edilen petrilere her bir petri içerisindeki lamların üst yüzeylerine eşit miktarda (100 µL medyumda süspansiyon yaklaşık 5000) hücre gelecek şekilde ekim yapıldı.
- Lam üzerine hücrelerin yapışmasını takiben (ortalama 24 saat sonra) DTX uygulamaları yapıldı.
- Kontrol grubundakilere aynı miktarda kültür medyumunu konuldu.
- 24 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinin bitimini takiben petri içindeki medyum pipet yardımıyla uzaklaştırıldıktan sonra PBS eklenerek hücre yıkama işlemi gerçekleştirildi.

#### **3.2.4.2. Fiksasyon**

PBS ile yıkanan ve lam üzerinde yapışık bulunan hücreler -20 °C'de soğutulmuş metanol içerisinde 10 dakika tespit edildi. Tespit edilen lamlar PBS ile yıkanarak kurutuldu. Boyama işlemine başlayıncaya kadar -20 °C'de saklandı.

#### **3.2.4.3. TUNEL Boyama**

TUNEL (Terminal Deoxytransferase Mediated Bio-dUTP Nick end Labeling) boyama, apoptozisin saptanmasında kullanılan bir histokimyasal yöntemdir. DNA kırıklarının in situ olarak tanınmasını sağlar. Bu çalışmada, boyama işlemi için TUNEL

boyama kiti kullanılmıştır. Boyama işlemi, kit içerisinde bulunan deney protokolü doğrultusunda yapılmıştır:

- Boyama işlemine alınacak lamlar derin dondurucudan (-20 °C) çıkarılıp oda ısısına gelinceye kadar 30 dk. bekletildi ve 100 µL PBS ile yıkandı.
- Daha sonra 100 µL Proteinaz K damlatılarak 10 dk nemlendirici kab içerisinde bekletildi.
- 5 dk. süre ile 3 kez 100 µL PBS solüsyonuyla yıkandı.
- Endojen peroksitlerin bloklanması için %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solüsyonunda 10 dk nemlendirici kab içerisinde bekletildi.
- Daha sonra 5 dk süre ile 3 kez 100 µL PBS solüsyonuyla yıkandı.
- 100 µL TUNEL solüsyonu ilave edildikten sonra 60 dk nemlendirici kab içerisinde 37 °C'de bekletildi.
- 5 dk süre ile 2 kez 100 µL PBS solüsyonuyla yıkandı.
- 100 µL Converter-POD solüsyonunda 30 dk nemlendirici kab içerisinde 37 °C'de yıkandı.
- 100 µL DAB kromojende 7 dk muamele edildi.
- Daha sonra 3 kez 5 dk süreli 100 µL PBS ile yıkanarak çekirdek boyaması için Harris'in Hematoksilen solüsyonunda 5 dk bekletildikten sonra dereceli alkol ve ksilol serilerinden geçirilip 2 damla entellan ile kapatıldı.

#### **3.2.4.4. Apoptotik Hücrelerin Değerlendirilmesi**

TUNEL boyama sonuçlarının gruplar arası karşılaştırmalarını yapmak için, "Stereolojik Optic Fractionator Frame" metodu kullanılmıştır. Bu analizler stereoloji workstation sistemi (BioPrecision MAC 5000 controller system) ve stereoloji

software (Stereo Investigator version 9.0, Microbrightfield, Rochester, VT) ataçmanlı ışık mikroskop altında yapılmıştır (Şekil 3.1). Çalışmamızda, MCF-7 hücre preparatları üzerinde apoptotik hücreler, “Unbiased Counting Frame and Fractionator” metodu kullanılmış ve tüm gruplara ait her bir preparattaki TUNEL pozitif hücre yoğunluğu aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$PHY = PHS / (\text{ÇA} \times \text{ÇS})$$

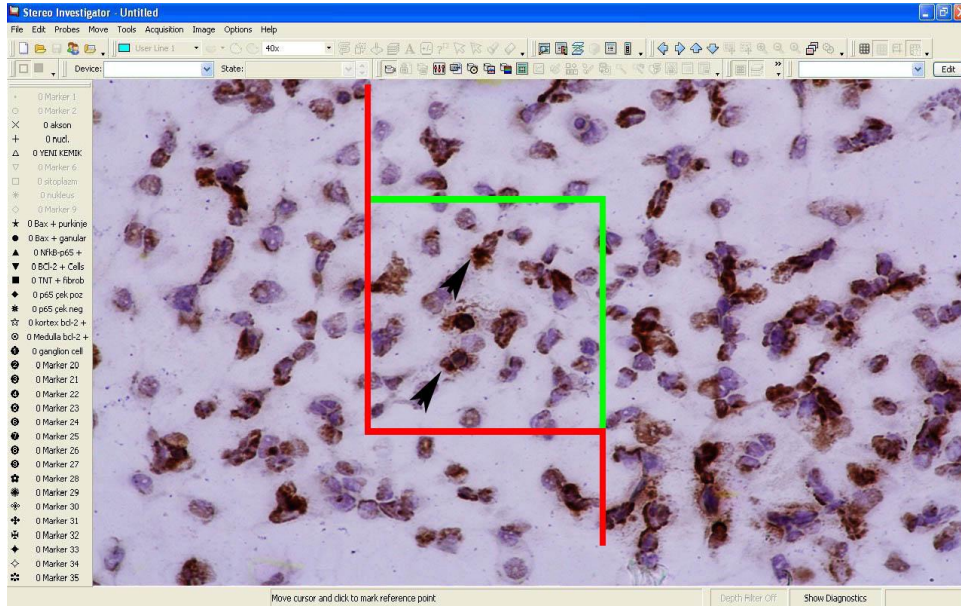
PHY;  $\mu\text{m}^2$  alana düşen TUNEL pozitif hücre yoğunluğu,

PHS; TUNEL pozitif hücre sayısı,

ÇA; çerçeve alanı ( $\mu\text{m}^2$ )

ÇS; çerçeve sayısı.

Elde edilen veriler her bir grup için iki tekrarlı ölçüme dayanmakta olup, her gruptan 3 paralel preparat boyanmıştır.



**Şekil 3.1.** Stereolojik TUNEL pozitif hücre yoğunluğunun analizini gösterir ekran resmi (oklar TUNEL pozitif hücre)

### 3.2.5. Ters Trankriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizleri

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), hücrede doğal olarak meydana gelen replikasyona benzer şekilde, istenilen bir DNA parçasının kopyalarının enzimatik olarak sentezlenmesini sağlayan hızlı bir in vitro yöntemdir. Kopyalama, komplementer DNA (cDNA) üzerindeki hedef dizilerde kendilerine özgü bölgelere bağlanan primer denilen oligonükleotitler tarafından yönlendirilir. PCR'de yeni DNA zincirlerinin sayısı her döngüde 2 katına çıkar ve yeni zincirler bir sonraki döngüde kalıp görevi görür. Yirmibeş-otuzbeş döngü ile birkaç saat gibi kısa bir sürede istenilen DNA kısmının milyarlarca kopyası elde edilebilir. RNA molekülü PCR ile çoğaltılamadığından PCR aşamasından önce RNA ters transkriptaz (reverse transcriptase) enzimi kullanılarak cDNA (komplementer DNA)'ya çevrilir. Ardından DNA, PCR ile çoğaltılmaktadır. Bu sentez aşamaları Ters Trankriptaz PCR (Reverse Transcription PCR, RT-PCR) olarak adlandırılmaktadır.

#### 3.2.5.1. RNA İzolasyonu

Örneklerden RNA izolasyonu için Roche MagNA Pure Compact RNA izolasyon kiti kullanılmıştır. RNA izolasyon işlemi, kit içerisinde bulunan deney protokolü doğrultusunda yapılmıştır. Öncelikle hücre kültürleri 300xg'de 10 dk. santrifüj edilerek medyumunu uzaklaştırılmış ve hücre pelletleri üzerine 100 µL PBS ilave edilerek hücreler tekrar süspanse haline getirilmiştir. Daha sonra 100 µL Lysis Buffer eklendi. Oluşan lizattan 200 µL numune tüpüne transfer edildi. Numune tüpü ROCHE MagNA Pure Compact otomatik DNA-RNA izolasyon cihazına konuldu. Kit içeriğinde bulunan Reagent kartuşlarının barkodları cihaza tanıtılarak kartuşlar cihaza yüklendi. İzolasyon sonunda elüsyon tüpünde 50 µl örnek elde edildi. RNA miktarları ve saflıkları NanoDrop cihazında spektrofotometrik olarak ölçüldü.

### 3.2.5.2. Komplementer DNA Sentezi

Komplementer DNA (cDNA) sentezi için Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kiti kullanılmıştır. cDNA sentezi işlemi, kit içerisinde bulunan deney protokolü doğrultusunda yapılmıştır. 200 µL'lik PCR tüplerine örneklerden 10 µL konulmuş ve her birinin üzerine 2 µL Sequens Spesific Primer (P53, Sin3A, MDM2), 1 µL distile su ilave edilmiştir. Daha sonra Reverse Transcriptor PCR cihazında 65 °C'de 10 dk. RNA'nın denatürasyonu için inkübe edildi. Denatüre RNA örnekleri üzerine 4 µL Reaction Buffer, 0,5 µL RNase inhibitor, 2 µL Deoxynucleotide Mix ve 0,5 µL Reverse Transcriptase'dan oluşam karışımdan ilave edilerek 55 °C'de 30 dk. inkübe edildi. Primer olarak;

Sin3A Forward: 5'-TTGTCTCCAATGCTGTTCGC-3',

Reverse: 3'-GGTTGGCGAATCCTGCGCTC-5'

MDM2 Forward: 5'-CGAGCTTGGCTGCTTCTGGG-3',

Reverse: 3'-GCTGGAATCTGTGAGGTGGT-5'

P53 Forward: 5'-TCTCCCCAGCAAAAGAAAAA-3'

Reverse: 3'-CTTCGGGTAGCTGGAGTGAG-5'

β aktin Forward: 5'-TCCCTGGAGAAGAGCTACG-3'

Reverse: 3'-GTAGTTTCGTGGATGCCACA-5'

kullanıldı.

### 3.2.5.3. Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile P53 ve MDM2 ve

#### Sin3A Gen Ekspresyonlarının Ölçülmesi

Her bir örneğe ait cDNA'lar kullanılarak genlerinin ekspresyonları (P53, MDM2 ve Sin3A) Roche LightCycler 480 Real-Time PCR cihazında çalışılmıştır. Real-Time PCR cihazında sentez işlemi gerçekleşirken, her bir kuyucuktaki amplifikasyon miktarını kantitatif olarak eş zamanlı olarak ölçülmektedir. 96 lık bir plağa her bir örnek

için 7 kuyucuk kullanılacak şekilde yükleme yapılmıştır. Her bir örnek için 5µL cDNA, 8 µL ddH<sub>2</sub>O, 5 µL Probe Master mix, 2 µL primer (P53, MDM2 ve MDM2) aktarıldı. Standart olarak, konsantrasyonu 10-10000 µM arasında değişen dört adet Aktin B (ACTB) standardı (10,100,1000 ve 10000 µM) kullanıldı.

Real Time PCR da Costom Assay PCR programı seçildi.

Denaturation : 10 dk, 95 °C

Amplification : 10 sn, 95 °C

30 sn, 60 °C 45 spin

60 sn, 72 °C

Cooling : 30 sn, 40 °C

Ardından plaktaki yükleme cihaza tanıtılıp program başlatıldı. Real Time PCR programı tamamladıktan sonra Absolute kuantifikasyonda analiz yapıldı. Standartlar (ACTB) baz alarak cihazın örneklere P53, MDM2 ve Sin3A'ya verdiği değerler not edildi.

### 3.2.6. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler için Statistical Package for Social Sciences (SPSS) for Windows 20.0 programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metotlar [Ortalama (X), Standart sapma (SD)] ve normal dağılım gösteren verilerin karşılaştırılmasında One-Way ANOVA testi ve gruplar arası karşılaştırmalar için ise Post Hoc Tukey analiz testi kullanıldı. Sonuçlar % 95'lik güven aralığında, anlamlılık ise  $p < 0.05$  olarak değerlendirildi.



## 4. BULGULAR

### 4.1. Sitotoksisite Analizi Sonuçları

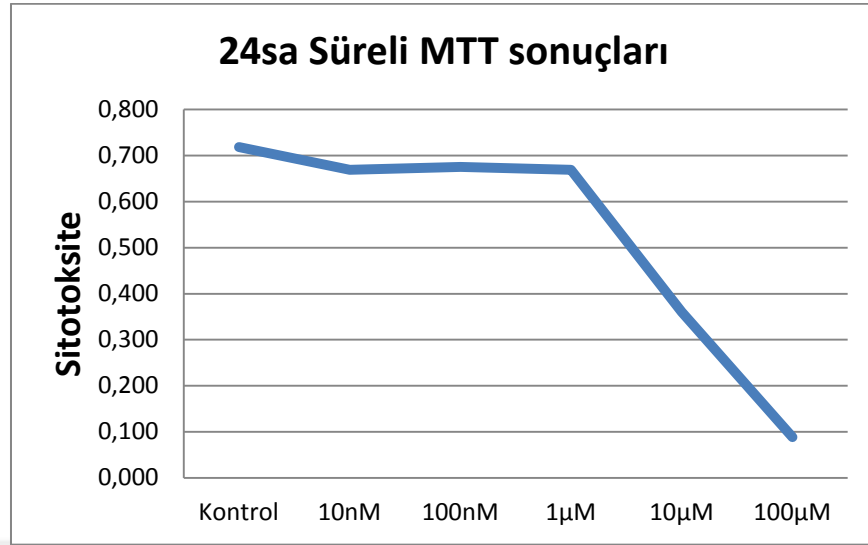
DTX uygulaması yapılan MCF-7 hücre hatlarında MTT yapılan analizlerde 24 saat inkübasyon sonuçlarına göre; hiçbir uygulama yapılmayan MCF-7 kontrol hücrelerinin canlılığının en yüksek olduğu belirlenirken, artan konsantrasyonlarda uygulanan DTX in hücre canlılığını önemli oranda azalttığı belirlenmiştir ( $P<0.05$ ). En düşük hücre canlılığı oranının  $100\mu\text{M}$  lık DTX uygulanan grupta olduğu belirlenirken bu dozun MCF-7 hücreleri için toksik olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.1).

48 saat süreli DTX uygulaması yapılan MCF-7 hücrelerinin MTT analiz sonuçlarında ise; kontrol,  $10\text{nM}$  ve  $100\text{nM}$  DTX uygulanan grupların hücre canlılık oranlarında istatistiksel olarak önemli farklılığın olmadığı belirlenmiştir ( $P>0.05$ ).  $1\mu\text{M}$  DTX uygulanan grupta hücre canlılığının kontrol grubuna göre anlamlı oranda azaldığı belirlenirken,  $10\mu\text{M}$  ve  $100\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda DTX uygulamasının MCF-7 hücreleri üzerinde çok büyük oranda toksik etki oluşturduğu belirlenmiştir ( $P<0,05$ ) (Şekil 4.2). 24 ve 48 saat süreli DTX uygulanan MCF-7 hücreleri sitotoksite değerleri Tablo 4.1, Şekil 4.1 ve Şekil 4.2’de sunulmuştur.

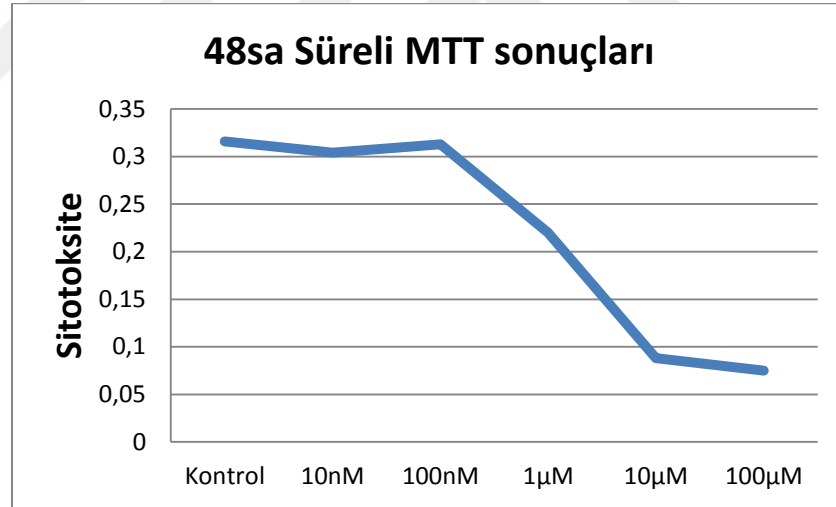
**Tablo 4.1.** 24 ve 48 saat süreli DTX uygulaması yapılan MCF-7 hücrelerinde MTT sonuçları

Gruplar	24sa	48sa
<b>Kontrol</b>	$0.718\pm 0.015^a$	$0.316\pm 0.081^a$
<b>10nM</b>	$0.669\pm 0.030^a$	$0.304\pm 0.031^a$
<b>100nM</b>	$0.675\pm 0.047^a$	$0.313\pm 0.066^a$
<b>1<math>\mu\text{M}</math></b>	$0.669\pm 0.039^a$	$0.220\pm 0.029^b$
<b>10<math>\mu\text{M}</math></b>	$0.360\pm 0.028^b$	$0.088\pm 0.010^c$
<b>100<math>\mu\text{M}</math></b>	$0.088\pm 0.032^c$	$0.075\pm 0.014^c$
<b>p</b>	$<0.05$	$<0.05$

(abc) harflendirmeleri aynı sütundaki istatistiksel farkı göstermektedir.



**Şekil 4.1.** 24 saat süreli DTX uygulaması yapılan MCF-7 hücrelerinde hücre canlılığı analizi sonuçları



**Şekil 4.2.** 48 saat süreli DTX uygulaması yapılan MCF-7 hücrelerinde hücre canlılığı analizi sonuçları

#### 4.2. TUNEL Boyama Sonuçları

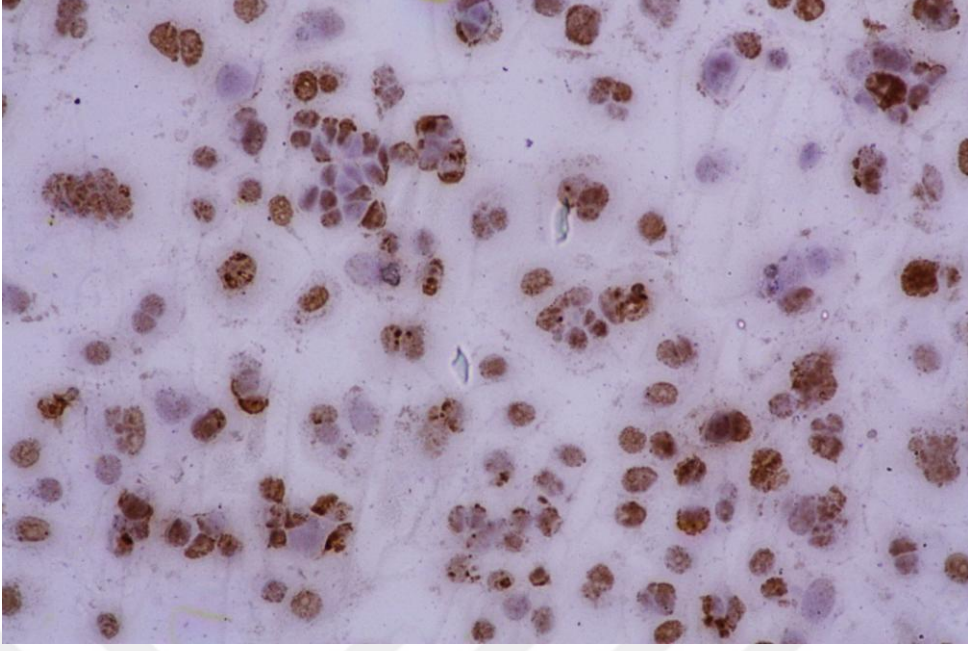
TUNEL boyamalarının stereolojik değerlendirmelerinde, 24 saat süreli DTX uygulanan gruplarda en düşük pozitif hücre yoğunluğunun kontrol grubunda olduğu görülürken dereceli olarak artan dozetaksel konsantrasyonu artışı ile apoptotik hücre yoğunluğunun arttığı belirlendi ( $P < 0,05$ ). 48 saat süreli DTX uygulamasında ise kontrol,

10 nM ve 100 nM DTX uygulamaları arasında istatistiksel bir farklılık belirlenmezken ( $P>0,05$ ), 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  ve 100  $\mu\text{M}$  DTX uygulanan gruplarda ise diğer düşük konsantrasyonlu gruplara göre anlamlı bir artış belirlendi ( $P<0,05$ ). TUNEL boyama sonuçlarının değerlendirme ve gruplar arası karşılaştırmaları Tablo 4.2 ve mikroskopik görüntüleri Şekil 4.3-14'te sunulmuştur.

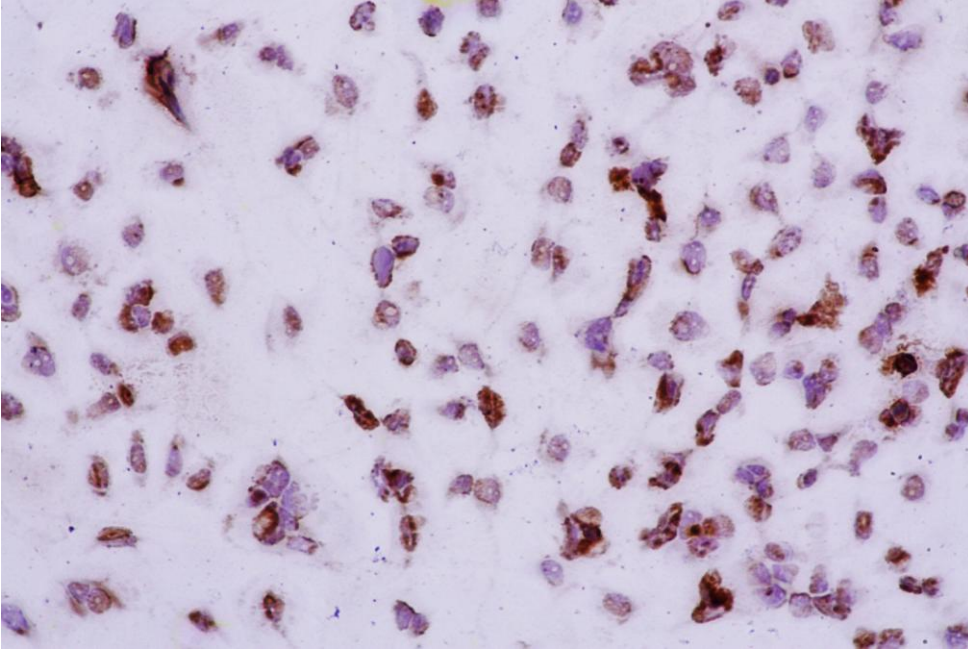
**Tablo 4 .2.** Tüm gruplara ait 24 ve 48 saat inkübasyon periyotlu DTX uygulamaları sonrası 10.000  $\mu\text{m}^2$  alana düşen TUNEL pozitif hücre yoğunlukları

<b>Gruplar</b>	<b>24sa</b>	<b>48sa</b>
<b>Kontrol</b>	1.21±0.17 <sup>a</sup>	1.45±0.21 <sup>a</sup>
<b>10 nM</b>	2.11±0.11 <sup>b</sup>	1.67±0.16 <sup>a</sup>
<b>100 nM</b>	2.30±0.22 <sup>b</sup>	1.65±0.18 <sup>a</sup>
<b>1 <math>\mu\text{M}</math></b>	2.76±0.09 <sup>c</sup>	2.47 ±0.19 <sup>b</sup>
<b>10 <math>\mu\text{M}</math></b>	3.16±0.14 <sup>c</sup>	3.36±0.24 <sup>b</sup>
<b>100 <math>\mu\text{M}</math></b>	3.21±0.20 <sup>c</sup>	3.65±0.26 <sup>b</sup>
<b>p</b>	>0.05	<0.05

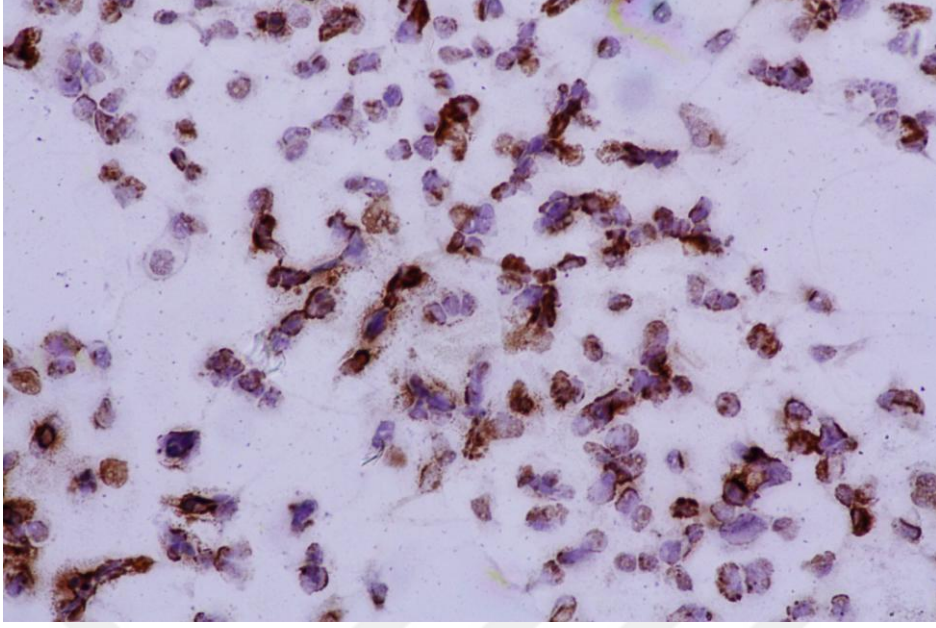
Harflendirmeler aynı sütundaki gruplar arası istatistiksel farklılığı göstermektedir



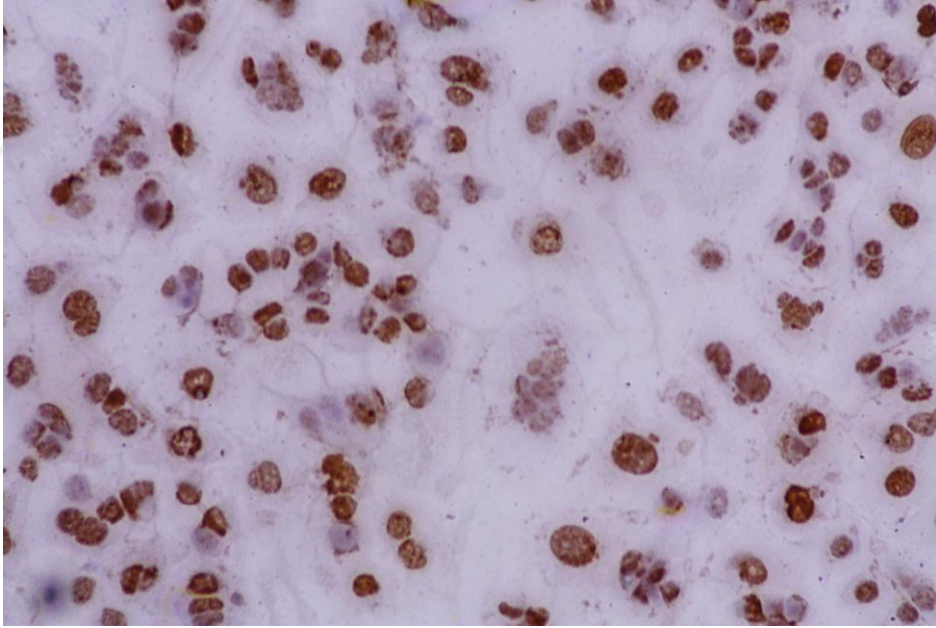
**Şekil 4.3.** 24 saat inkübasyon süreli Kontrol grubuna ait TUNEL pozitif hücre yoğunluğu, TUNEL boyama



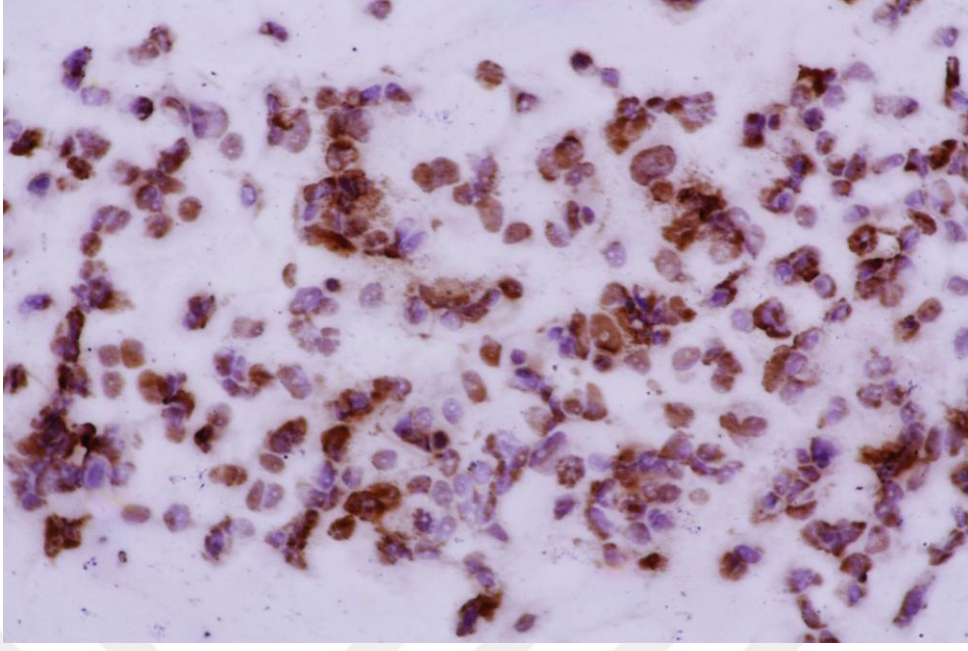
**Şekil 4.4.** 24 saat inkübasyon süreli 10 nM DTX uygulanan gruba ait TUNEL pozitif hücre yoğunluğu, TUNEL boyama.



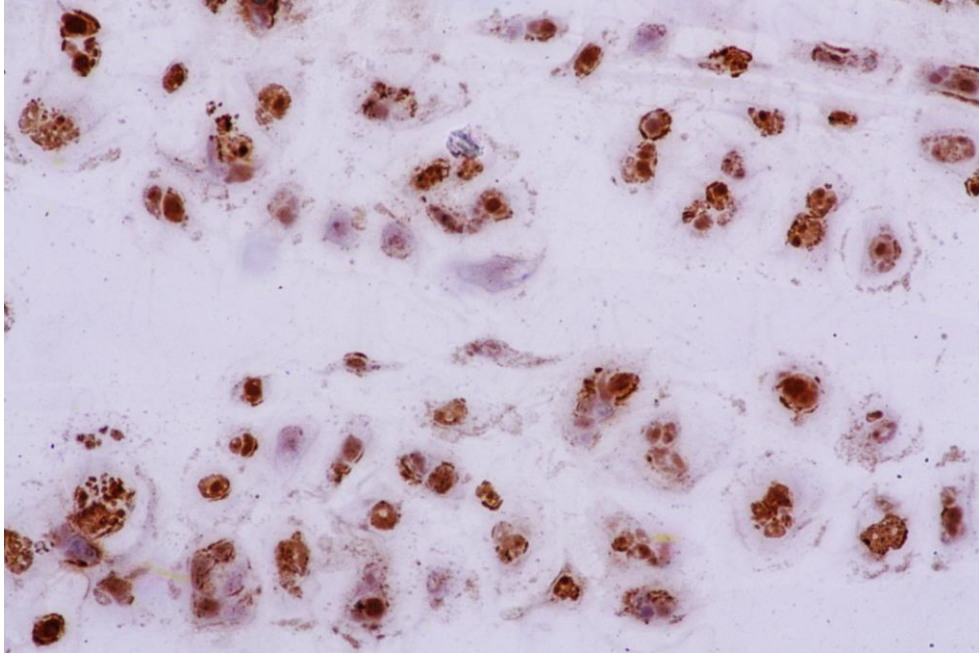
**Şekil 4.5.** 24 saat inkübasyon süreli 100 nM DTX uygulanan gruba ait TUNEL pozitif hücre yoğunluğu, TUNEL boyama.



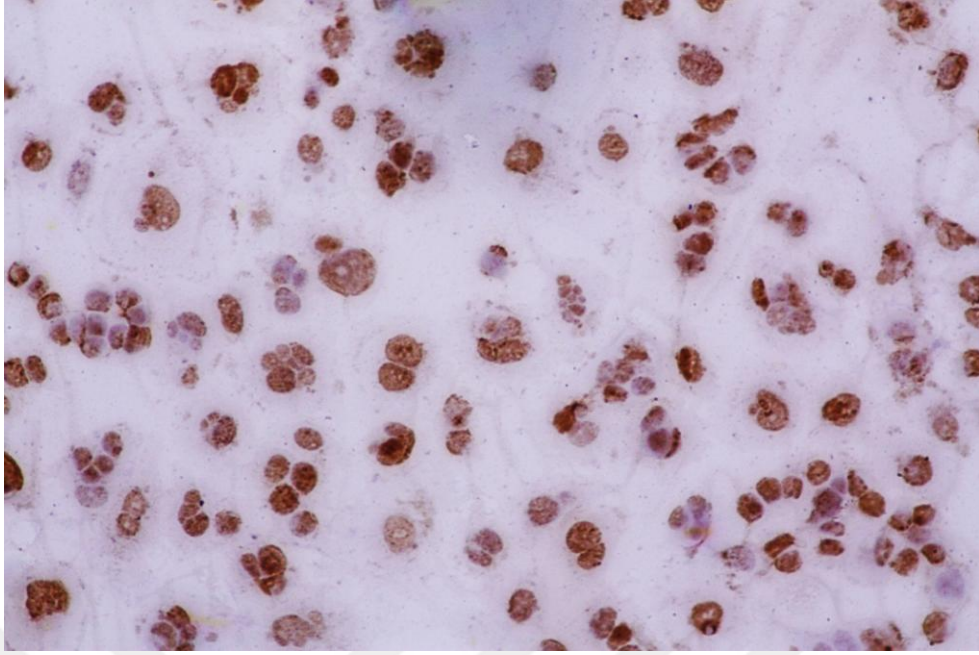
**Şekil 4.6.** 24 saat inkübasyon süreli 1 µM DTX uygulanan gruba ait TUNEL pozitif hücre yoğunluğu, TUNEL boyama.



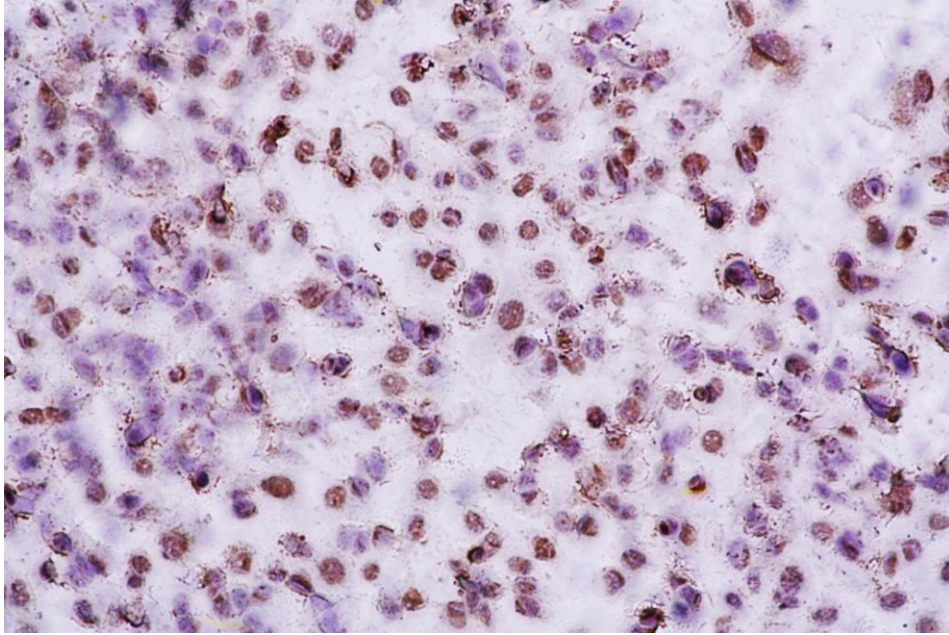
**Şekil 4.7.** 24 saat inkübasyon süreli 10 µM DTX uygulanan gruba ait TUNEL pozitif hücre yoğunluğu, TUNEL boyama.



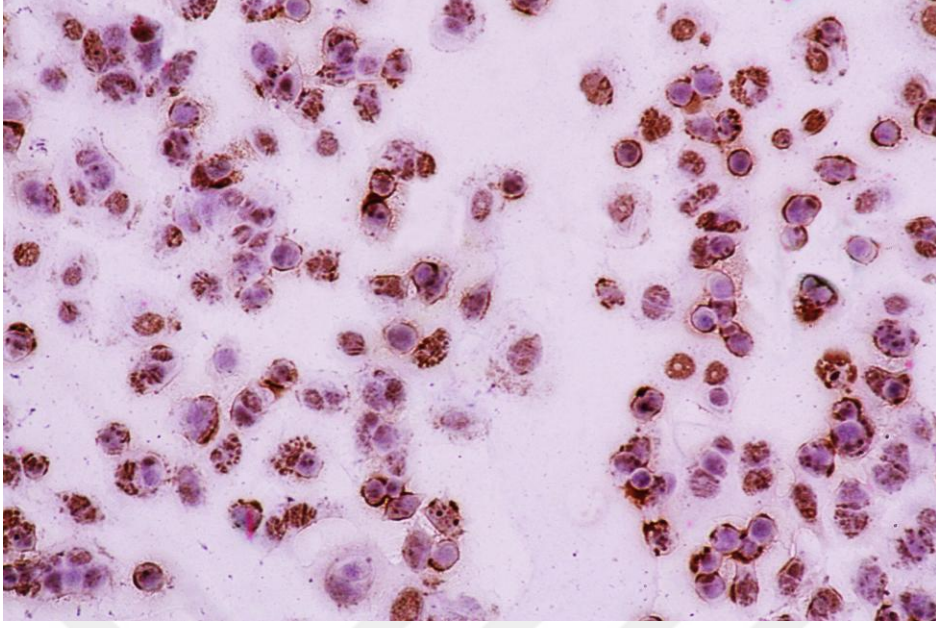
**Şekil 4.8.** 24 saat inkübasyon süreli 100 µM DTX uygulanan gruba ait TUNEL pozitif hücre yoğunluğu, TUNEL boyama.



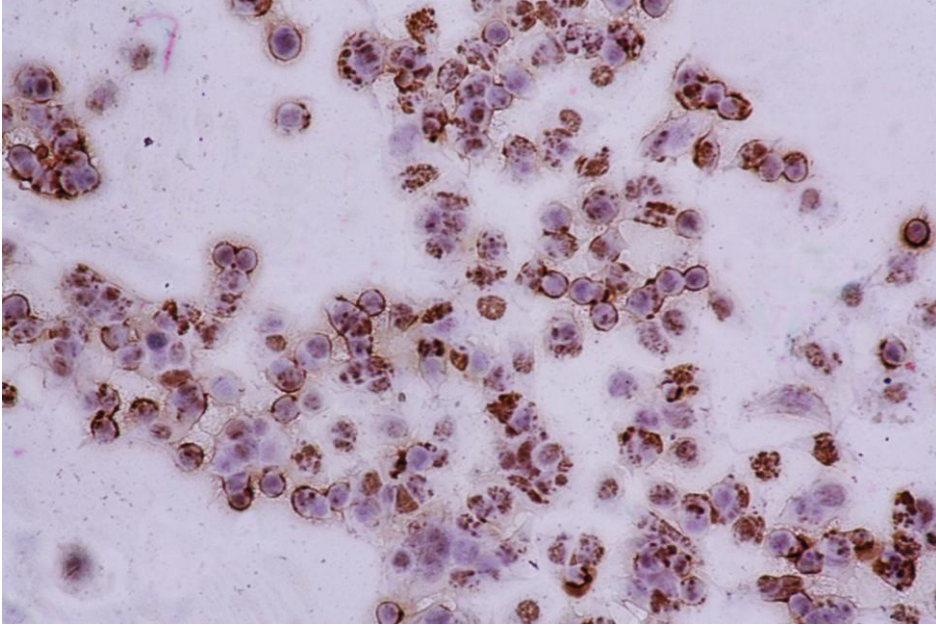
**Şekil 4.9.** 48 saat inkübasyon süreli Kontrol grubuna ait TUNEL pozitif hücre yoğunluğu, TUNEL boyama.



**Şekil 4.10.** 48 saat inkübasyon süreli 10 nM DTX uygulanan gruba ait TUNEL pozitif hücre yoğunluğu, TUNEL boyama.

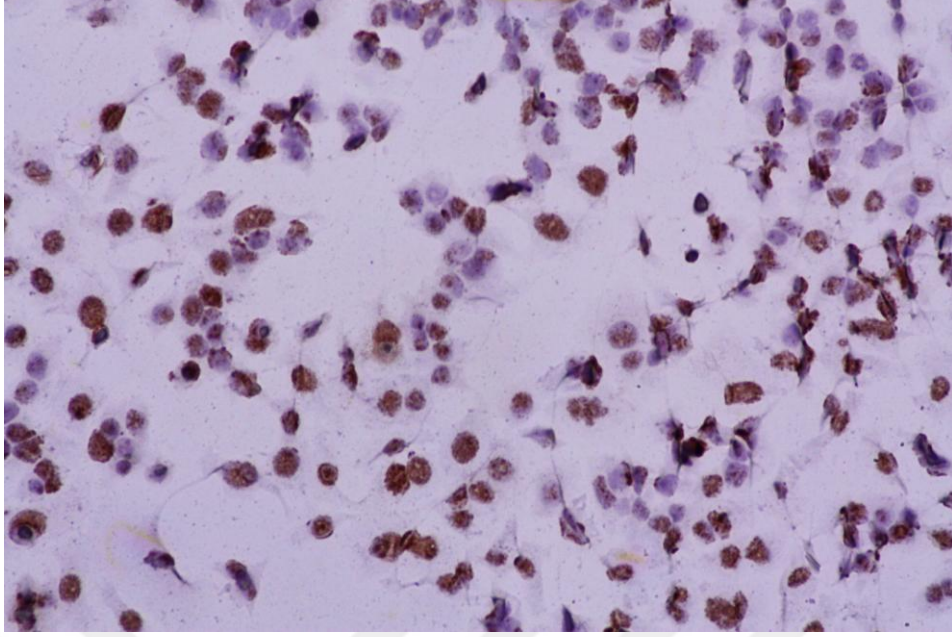


**Şekil 4.11.** 48 saat inkübasyon süreli 100 nM DTX uygulanan gruba ait TUNEL pozitif hücre yoğunluğu, TUNEL boyama.

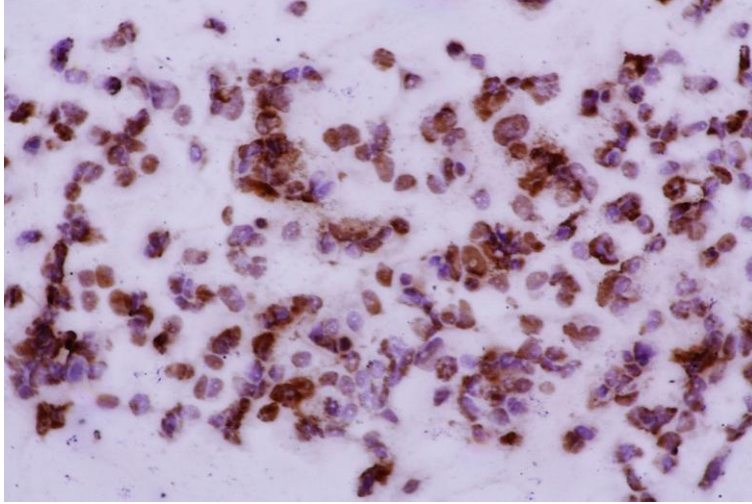


**Şekil 4.12.** 48 saat inkübasyon süreli 1 µM DTX uygulanan gruba ait TUNEL pozitif hücre yoğunluğu, TUNEL boyama.





**Şekil 4.13.** 48 saat inkübasyon süreli 10 µM DTX uygulanan gruba ait TUNEL pozitif hücre yoğunluğu, TUNEL boyama.



**Şekil 4.14.** 48 saat inkübasyon süreli 100 µM DTX uygulanan gruba ait TUNEL pozitif hücre yoğunluğu, TUNEL boyama.

### 4.3. Real Time-PCR Analizi Sonuçları

Tüm gruplara aynı koşullarda, farklı konsantrasyonlardaki DTX uygulamasının 24 saat inkübasyonlarının ardından Real Time-PCR analiz sonuçlarına göre en düşük P53 ekspresyon, yüksek doz DTX uygulanan gruplarda gözlenirken, en yüksek ekspresyon 100 nM DTX uygulanan grupta olduğu görülmüştür. 48 saatlik inkübasyonlar sonucu ise DTX uygulanan tüm gruplardaki P53 ekspresyonlarının kontrol grubuna göre az bir artış gözlenmiştir. 24 ve 48 saatlik inkübasyonlar sonucu Kontrol ve DTX uygulan gruplara ait P53 ekspresyonları Tablo 4.3'te verilmiştir.

**Tablo 4.3.** Tüm gruplara ait 24 ve 48 saatlik P53 gen ekspresyon düzeyleri

Gruplar	P53/ACTB	P53/ACTB
	24sa	48sa
<b>Kontrol</b>	0.25	0.21
<b>10 nM DTX</b>	0.28	0.32
<b>100 nM DTX</b>	4.79	0.18
<b>1 µM DTX</b>	2.81	0.27
<b>10 µM DTX</b>	0.19	0.29
<b>100 µM DTX</b>	0.18	0.21

24 saatlik inkübasyonlarda MDM2 gen ekspresyonları karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre tüm gruplarda artış gözlenirken, en yüksek ekspresyon 100 nM DTX uygulanan grupta belirlenmiştir. 48 saatlik inkübasyonlar için ise kontrol grubuna göre en çok artış 1 µM DTX uygulanan grupta gözlenirken, en düşük ekspresyon 100 µM DTX grubunda belirlenmiştir. 24 ve 48 saatlik inkübasyonlar sonucu Kontrol ve DTX uygulan gruplara ait MDM2 ekspresyonları Tablo 4.4 'te verilmiştir.

**Tablo 4.4.** Tüm gruplara ait 24 ve 48 saatlik MDM2 gen ekspresyon düzeyleri

<b>Gruplar</b>	<b>MDM2/ACTB 24h</b>	<b>MDM2/ACTB 48h</b>
<b>Kontrol</b>	0.37	0.42
<b>10 nM DTX</b>	0.52	0.11
<b>100 nM DTX</b>	9.62	0.32
<b>1 µM DTX</b>	3.42	1.02
<b>10 µM DTX</b>	0.52	0.66
<b>100 µM DTX</b>	0.49	0.59

24 saatlik inkübasyonlarda Sin3A gen ekspresyonları karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre 100 nM ve 1 µM DTX uygulanan gruplarda artış diğer gruplarda ise azalma gözlenmiştir. 48 saatlik inkübasyonlarda ise Kontrol grubuna göre 10 nM ve 10 µM DTX uygulanan gruplarda artış, diğer gruplarda azalış gözlenmiştir. 24 ve 48 saatlik inkübasyonlar sonucu Kontrol ve DTX uygulan gruplara ait Sin3A ekspresyonları Tablo 4.5'te verilmiştir.

**Tablo 4.5.** Tüm gruplara ait 24 ve 48 saatlik Sin3A gen ekspresyon düzeyleri

<b>Gruplar</b>	<b>Sin3A/ACTB 24h</b>	<b>Sin3A/ACTB 48h</b>
<b>Kontrol</b>	0.23	0.15
<b>10 nM DTX</b>	0.17	0.22
<b>100 nM DTX</b>	4.12	0.15
<b>1 µM DTX</b>	2.24	0.17
<b>10 µM DTX</b>	0.16	0.23
<b>100 µM DTX</b>	0.17	0.16

## 5. TARTIŞMA

Meme kanseri kadınlarda görülen kanser tipleri arasında birinci sırada yer almaktadır ve her sekiz kadından biri meme kanserine yakalanma riskine sahiptir. Son yıllarda tanı, tedavi ve takibindeki ilerlemelerden dolayı yaşam kalitesi ve hastalısız sağ kalım olarak iyi bir konuma gelmiştir. Ancak, son zamanlarda meme kanseri insidansında bir artış gözlenirken, meme kanserine bağlı ölüm oranlarında ise bir azalma dikkati çekmektedir. Sağ kalımdaki bu artışta cerrahi tedavi sonrası uygulanan adjuvan tedavilerin katkısı büyüktür. Hastalığın tedavisinde erken evrelerde cerrahi ve radyoterapi ile birlikte adjuvan amaçlı olarak uygulanan hormonal tedavi ya da kemoterapi hastaların sağ kalımında önemli iyileştirmeler sağlamıştır.<sup>120, 121</sup>

DTX meme, over ve akciğer kanser hastaların tedavisi için klinik olarak kullanılmaktadır. Bu kemoterapötik ajan mikrotübüllerde  $\beta$ -tübülinelere bağlanır ve hücre siklusu işleyişi için çok önemli olan mikrotübüller dinamiğinin bozulmasını arttırır. Düşük konsantrasyonlarda mitotoik ipcikleri önemli ölçüde etkiler, ancak hücre siklusu arrestine ve anormal kromozomal ayrılmaya sebep olan mikrotübül iskeletine etki etmez. Yüksek konsantrasyonlarda ise masif mikrotübül hasarına sebep olur.<sup>122</sup> Kanser hücreleri sağlıklı hücrelerden daha hızlı bölündüğü için, bu ilaç tedavisiyle indüklenen hücre siklusu arrestine daha çok yatkındır. Hücre ölüm düzeyi doz-bağımlıdan ziyade zaman-bağımlıdır. Yapılan çalışmalarda her ikisi de göz önünde bulundurulur. DTX'in sitotoksik etkileri  $IC_{50}$  değerleri kullanılarak belirlenir.<sup>7, 123</sup>

Breast Cancer International Research Group (BCIRG)-001 tarafından yapılan TAX (Taxan) 316 çalışmasında, antrasikline eş zamanlı DTX ilavesinin katkısı değerlendirilmiştir. DTX, Doksorubicin, Siklofosfamid (TAC) rejimi ile 5-Flourourasil, Doksorubisin, Siklofosfamid (FAC) rejimi karşılaştırıldığında hastalık nüks riskinde %28lik, ölüm riskinde ise %30luk bir azalma olduğu gözlenmiştir. Ancak TAC

grubunda kemoterapi toksisitesi olarak grade 3-4 nötropeni oranı anlamlı olarak fazla gözlenmiştir.<sup>124</sup> MDA-MB231 hücrelerinde 50 µM taksan tedavisinin 12 saatten itibaren hücre canlılığını etkilediği ve 36 saatten sonrada yaklaşık olarak %30 hücre ölümüne neden olduğu bildirilmiştir.<sup>125</sup> Mevcut çalışmamızda, DTX'in doz ve zaman bağımlı sitotoksik etkileri araştırılmıştır. DTX uygulaması sırasında MCF-7 hücre hatlarında yapılan MTT analizlerinde 24 saat inkübasyon sonuçlarına göre; MCF-7 Kontrol hücrelerinin canlılığının en yüksek olduğu belirlenirken, artan konsantrasyonlarda uygulanan DTX'in hücre canlılığını önemli oranda azalttığı görülmüştür. En düşük hücre canlılığı oranının 100µM'lık DTX uygulanan grupta olduğu görülmüş ve bu dozun MCF-7 hücreleri için toksik olduğu belirlenmiştir. 48 saat süreli DTX uygulaması yapılan MCF-7 hücrelerinin MTT analiz sonuçlarında ise; kontrol, 10nM ve 100nM DTX uygulanan grupların hücre canlılık oranlarında önemli farklılığın olmadığı görülmüştür. 1µM DTX uygulanan grupta hücre canlılığının kontrol grubuna göre anlamlı oranda azaldığı belirlenirken, 10µM ve 100µM DTX uygulamasının MCF-7 hücreleri üzerinde çok büyük oranda toksik etki oluşturduğu gözlenmiştir.

Günümüzde normal olmayan hücrelerin ortadan kaldırılması için apoptozisin tetiklenmesi amacıyla, kanser tedavisinde etkin olarak kullanılan DTX gibi birçok kemoteropatik ajanların apoptotik etkilerinden yararlanılmaktadır. Mikrotübül dinamiğinin baskılanmasında mikrotübül-hedefleyici ilaçlar, metafaz anafaz geçişini inhibe eder, mitozisi bloke eder ve apoptozisi indükler.<sup>122</sup> Taksanlar beta subünitlerine ya da mikrotübüllere bağlanır ve hücre ölümüyle sonuçlanan katastrofik G2/M tutukluğunu indükler.<sup>126</sup> DTX maling hücre tiplerinin birçoğunda paksitaxelden daha sitotoksiktir. Uzamış ve yüksek doz tedaviden sonra kümülatif sistemik toksisiteye

sebebi olduğu için daha düşük doz taksanların antikanser etkilerinin kuvvetlendirmek için uygulanmaktadır.<sup>127</sup>

Tümör supresör gen ailesi üyesinden biri olan P53, son yirmi yıldır kanser biyolojisinde yaygın olarak en çok çalışılan gendir. P53 proteini spesifik bir anti-proliferatif inhibitör ve apoptotik bir protein olup, malignitelerin çoğunda mutant olarak görülmüştür.<sup>42, 128</sup> P53 proteininin işlev kaybı, onun hücre büyümesi, hücre bölünme kontrolündeki etkinliğinin ve apoptoz uyarılmasındaki etkisinin kaybedilmesine yol açtığı bildirilmiştir.<sup>129</sup> Kanser hücrelerinde yapılan çalışmalarda P53 gen mutasyon aracılı apoptozun inaktive olduğu belirtilmiştir.<sup>42, 128, 129</sup> P53 geni, aynı zamanda P21 gen ekspresyonunu kontrol ederek hücre proliferasyonunda rol alan CDK'ların sentezini de sağlamaktadır. Bu sebeple, P53 mutasyonu geçirmiş hücreler üzerinde kontrolsüz bir çoğalmanın gerçekleştiği bildirilmiştir.<sup>130</sup> P53 gen mutasyonları birçok kanser türünde sık görülen (meme kanserlerinin 2/3'ünde) bir durumdur.<sup>131</sup> Bu gen, sitotoksik ajanlara karşı tümör hücrelerinin duyarlılığının önemli bir belirteci ve DNA hasarında hücrel cevabın oluşmasını sağlamaktadır. P53 yoksunluğunda hücreler apoptoza giremez ve DNA hasarına rağmen apoptozun gerçekleşmemesi tümörlerin kemoterapiye direnç göstermesine neden olmaktadır.<sup>13</sup> P53 geni aynı zamanda p21, MDM2, Bcl-2 ve BAX'ı içeren birçok gen için bir transkripsiyon faktördür. Taxan direncinde P53'ün rolü hakkında fikir birliğine varılamamıştır. Bazı çalışmalar P53 eksikliğinin kemoterapiye hassasiyeti arttırdığını belirtirken<sup>132, 133</sup>, diğer çalışmalar paklitaksel-indüklü apoptozisin P53'ten bağımsız olduğunu öne sürmüşlerdir.<sup>134, 135</sup>

Al-Abd ve ark.<sup>136</sup> tümör hücrelerinde DTX, doksorubisin ve Resveratrolün apoptotik genler üzerine olan etkilerini araştırmış ve bu araştırma sonucunda MCF-7 hücre hattında DTX uygulamasıyla P53 gen ekspresyonunda sadece Doksorubisin ve Resveratrol uygulanan gruplara göre daha yüksek bir artış gözlenirken, DTX-

Resveratrol kombinasyonunun uygulamasında marjinal bir yükselme olduğunu belirtmişlerdir. Yine aynı çalışmada aynı ilaç uygulamalarının HeLa hücre hattında P53 gen ekspresyonunda herhangi bir değişiklik olmadığını saptamışlardır. Liu ve ark.<sup>137</sup> mutant, wild-tip ve P53 yoksun prostat kanserli hücrelerde DTX'in etkilerini araştırdıkları çalışmada, apoptozun wild-tip P53 taşıyan prostat kanserli hücrelerde daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca DTX'in wild-tip hücrelerde P53'ün foforilasyonunu artırırken mutant hücrelerde böyle bir etki yapmadığını öne sürmüşlerdir. Swisher ve ark. nın çalışmalarında, P53 plazmidi uyguladıkları akciğer kanserli hastalarda kanser büyümesinin yavaşladığını, bazı hastalarda ise durduğunu rapor etmişlerdir.<sup>138</sup> Yapılan diğer bir çalışmada MCF-7 hücre hattına Adriamisin uygulaması ile P53 miktarının azaldığı belirlenirken<sup>139</sup>, Singh ve ark. resveratrol ve cyclophosphamide uygulaması ile P53 ekspresyonunun arttığını rapor etmişlerdir.<sup>140</sup> Çalışmamızda buna paralel olarak DTX uygulamasıyla P53 ekspresyonunda artış kaydedilmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki DTX uygulamasının 24 saat inkübasyonlarının ardından Real Time-PCR analiz sonuçlarına göre en düşük P53 ekspresyon, yüksek doz DTX uygulanan gruplarda (10 µM ve 100 µM) gözlenirken, en yüksek ekspresyon 100 nM DTX uygulanan grupta olduğu görülmüştür. Yüksek dozlardaki bu sonuç DTX'in yüksek konstrasyona bağlı tokisisitesiden kaynaklı olduğu düşünülmektedir. 48 saatlik inkübasyonlar sonucu ise DTX uygulanan tüm gruplardaki P53 ekspresyonlarının kontrol grubuna göre az bir artış gözlenmiştir. Bu hem DTX etkinliğinin zamanla azalması hem de P53'ün çabuk degrade olmasıyla açıklanabilir. DTX'in P53 gen ekspresyonu üzerindeki en iyi etkinliğini 24 saatte ve 100nM'lık konsantrasyonda gösterdiği söylenebilir.

MDM2 gen bölgesinden kodlanan MDM2 proteini, P53'ü bağlayarak, P53'ün G1/S geçişinde hücre siklusunu durdurmasını ve apoptotik etkisini engellemektedir.<sup>71</sup> MDM2

proteini P53'e bağlanarak ve 'E3 ubiquitin ligase' aktivitesi ile P53'ü yıkmaktadır. Dolayısıyla P53'e karşı çalışan bir proteindir. Hücrede meydana gelebilecek bir takım patolojik değişikliklere (asetilasyon, metilasyon gibi) bağlı olarak MDM2 geni eksprese edilemez. Bu yüzden MDM2 proteini P53'e bağlanamaz ve serbest haldeki P53 transkripsiyonel aktivitesini göstererek G1 ve G2 kontrol noktalarında siklusun durdurulmasına ve Bax geni aktivasyonu ile apoptoza neden olmaktadır.<sup>71, 141</sup> MDM2 geninde oluşabilecek bir mutasyon MDM2 protein ekspresyonu artışına sebep olacağından, P53 geni kontrolsüz olarak baskılanır ve hücre proliferasyonda artış gözlenir.<sup>142</sup> Yapılan bir çalışmada, immünohistokimyasal yöntemle değerlendirilen MDM2 ekspresyonu ile prognoz arasında anlamlı ilişki tespit edilememiştir.<sup>143</sup>

Mutant MDM2 geni kanser gelişimi için etiyolojik bir neden olabileceğinden ve P53 geni negatif baskılayıcısı olduğundan kanser çalışmaları ve P53 aracılı apoptozun belirlenebilmesi için önemli bir alan oluşturmaktadır. Sjöström ve ark.<sup>144</sup> ilerlemiş meme kanserinde kemoterapiye cevap için P53, p21 ve MDM2 değerleri ile ilgili yaptıkları immünohistokimyasal değerlendirmede 5-Flourourasil-Methotrexat kombinasyonuna MDM2'nin cevabı çok yüksekken, DTX'e cevabın düşük olduğunu bildirmişlerdir. Gan ve ark.<sup>145</sup> ise, DTX uyguladıkları prostat kanseri hücre hattında MDM2 proteininde azalma P53 proteinin de artış olduğunu, ancak P53 geni ekspresyonunda bir değişiklik olmadığını belirtmişlerdir. P53 gen ekspresyonunda bir artış olmadan P53 proteinindeki artışın MDM2 protein düzeyinin azalmasına bağlı olduğunu, MDM2'nin P53'e bağlanmadığını ve P53'ün böylece degrade olmadığını savunmuşlardır. Mevcut çalışmamızda 24 saatlik inkübasyonlarda MDM2 gen ekspresyonları karşılaştırıldığında, kontrol grubuna göre 10 ve 100 nM DTX grubunda artış gözlenirken, en yüksek ekspresyon 100 nM DTX uygulanan grupta olduğu görülmüştür. Yüksek doz DTX uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre herhangi bir



artış tespit edilememiştir. 48 saatlik inkübasyonlar için ise kontrol grubuna göre en çok artış 1 µM DTX uygulanan grupta gözlenirken yine en düşük ekspresyon yüksek doz DTX uygulanan gruplarda olduğu belirlenmiştir.

Sin3 DNA hasar tamiri, hücre döngüsü, senesens, organ gelişimi, onkogenezis gibi farklı hücresel fonksiyonları içeren önemli bir protein olarak bilinmektedir. Birkaç proteinle interaksiyonunun gösterilmiş olmasına rağmen, farklı hücresel aktivitelerdeki Sin3'ün moleküler mekanizmasındaki rolü henüz açıklanamamıştır.<sup>76</sup> Son çalışmalarla Sin3A'nın çok kritik biyolojik fonksiyonu kor HDAC'ın yapılandırılması olduğu da belirtilmiştir.<sup>146</sup> Sin3A/HDAC ko-reseptör kompleksi hücre siklusun kontrolü ve apoptozisin gelişiminde önemli bir regülatördür.<sup>147</sup> Sin3'ün hem onkojenik hem de tümör baskılayıcı fonksiyonları bildirilmiştir ve Sin3A transforme hücreler için esansiyel olduğu gösterilmiştir.<sup>148</sup> Ayrıca Sin3A'nın düşük ekspresyonu tümör hücrelerinin artmış apoptozisiyle ve hem ekstrinsik hem de intrinsik yıkım sinyal yolağını içeren birkaç genin yükselmiş ekspresyonuyla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Yine yapılan çalışmada, Sin3A aktivitesinin P53'ten bağımsız apoptozisi önlediği gösterilmiştir.<sup>87</sup> Ellison-Zelski ve ark.<sup>149</sup> nin yapmış olduğu çalışmada, meme kanseri hücrelerinin gelişimi ve gen ekspresyonunun kontrolünde Sin3A'nın fonksiyonunu incelenmiştir. Sin3A yokluğu hücre siklusu işleyişini etkilemeksizin apoptozisin artışıyla meme kanseri hücrelerinin gelişimini inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir. Yine hem ERα-pozitif hem de ERα-negatif hücre hatları analizinde gelişim üzerinde Sin3A'nın etkilerinin hücre tipine spesifik olduğunu ve Sin3A ekspresyonunun sadece ERα-pozitif hücrelerde maksimum gelişim sağladığını, ayrıca dikkate değer bir şekilde Sin3A proteininin östrojen tarafından yükseldiğini bildirmişlerdir. Dahası MCF-7 hücrelerine Sin3A geni transfer edip apoptik genlerin ekspresyonunu inceledikleri çalışmada, Sin3A'nın anahtar proapoptotik genlerin ekspresyonlarını baskıladığını

göstermişlerdir. Bunun sonucunda Sin3A'nın ER $\alpha$ -pozitif meme kanseri hücrelerinde gelişme, yaşam süresi ve gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli olduğunu vurgulamışlar ve Sin3A'nın yeni terapötik hedef olabileceğini öne sürmüşlerdir.

Murphy ve ark.<sup>150</sup>, MCF-7 ve A2780 over kanseri hücrelerini DNA hasarı oluşturan ajanla muamele ederek, P53 ve Sin3A arasındaki etkileşimi incelemişler. Bunu sonucunda MCF-7 hücrelerinde Sin3A-P53 kompleksinin yaklaşık olarak dört kat arttığını gözlemlemişlerdir. Aynı çalışmada Sin3A'nın hem wild-tip hem de mutant P53'e bağlandığını bildirmişlerdir. Zilfou ve ark.<sup>151</sup>, MCF-7 meme kanseri hücrelerinde yaptıkları çalışmada Sin3A'nın P53'ü stabilize ettiğini ve MDM2 tarafından P53'ün degrade olmasını inhibe ettiğini öne sürmüşlerdir.

Mevcut çalışmamızda, 24 saatlik inkübasyonlarda Sin3A gen ekspresyonları karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre 100 nM ve 1  $\mu$ M DTX uygulanan gruplarda artış gözlenmiştir. Aynı dozlarda P53'te de artışın olması bizim çalışmamızın yukardaki çalışmayı destekler nitelikte olduğunu göstermiştir. 48 saatlik inkübasyonlarda ise Kontrol grubuna göre 10 nM ve 10  $\mu$ M DTX uygulanan gruplarda artış, diğer gruplarda azalış gözlenmiştir.

Apoptozda hücre ölümü, fizyolojik bir süreç olarak uyarılır ve enflamatuvar yanıt oluşmadan gerçekleşir. Apoptotik süreçte Bax, Bcl-xS, Bad, Bak ve Bik gibi proapoptotik genler apoptozu uyarırken, Bcl-2, Bcl-xL, Bag-1, ve Mcl-1 gibi anti-apoptotik genler apoptozun baskılanmasını sağlarlar.<sup>152</sup> Çalışmamızda da, P53-aracılı apoptozise yönelik TUNEL boyama neticesinde farklı konsantrasyonlarda DTX uygulanan 24 saat süreli gruplarda en düşük pozitif hücre yoğunluğunun kontrol grubunda olduğu görülürken, dereceli olarak artan dozetaksel konsantrasyonu artışı ile apoptotik hücre yoğunluğunun arttığı belirlenmiştir. 48 saat süreli DTX uygulamasında

ise kontrol, 10 nM ve 100 nM DTX uygulamaları arasında istatistiksel bir farklılık belirlenmezken, 1 µM, 10 µM ve 100 µM DTX uygulanan gruplarda ise diğer düşük konsantrasyonlu gruplara göre anlamlı bir artış gözlenmiştir.

Meme kanseri üzerine yapılan çalışmalarda, günümüzde kanser riski ya da ilerleyişi ile ilişkili ve aynı zamanda anti-kanser ilaçların toksisitesi ve tedavideki etkinliği gibi pek çok önemli konuda hastalığın teşhis ve tedavi sürecinde öncü olabilecek aydınlatıcı bilgiler sunulmaktadır.<sup>153-155</sup> Kemoterapi, kanser tedavisinde önemli bir etkiye sahiptir. Ancak başarılı tedaviye önemli bir engel bazı hücre tiplerindeki kusurlardır. Sonuç olarak antikanser ajanlarına hücrel direncin bilinmeyen temelleri üzerine pek çok çalışmalar yapılmaktadır. Mevcut çalışmamızda bir mikrotübül inhibitörü antikanser ajanı olan DTX'in, apoptozisde anahtar rol oynayan P53 geni, P53 inhibitörü olan MDM2 ve P53'ün regülatörü Sin3A gen ekspresyonları üzerine etkisi araştırılmıştır. Bunun sonucunda DTX'in etkin dozunun etkisini en iyi 24 saatte gösterdiği belirlenmiştir. Bulgularımıza göre literatürle paralel olarak DTX'in P53 gen ekspresyonunu arttırdığı gözlenmiştir. Ancak P53'teki artışa göre daha yüksek bir artış MDM2 geninde olmuştur. Bu da gösteriyor ki DTX apoptozun başlaması için P53'ü arttırırken, diğer yandan artan P53 miktarına cevap olarak ya da P53-bağımsız yollarla MDM2'yi de arttırmış olabilir. Aynı zamanda DTX uygulamasıyla MCF-7 hücre hattında Sin3A gen ekspresyonunda da bir artış gözlemiştir. Ancak literatürde DTX'in Sin3A üzerine etkisini araştıran bir çalışmaya rastlanamamıştır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmada elde edilen veriler özetlendiğinde:

1. MCF-7 meme kanseri hücre hattında mikrotübül inhibitörü olan kemoterapötik ajan DTX'in zaman ve doz bağımlı sitotoksosite analiz sonuçlarına göre etkin dozu 100 nM olarak belirlenmiştir.
2. DTX'in uygulanmasıyla apoptotik hücrelerin belirlenmesi amacıyla TUNEL boyama yapılmış ve buna göre artan DTX dozuyla beraber TUNEL-pozitif hücre sayısının arttığı gözlenmiştir.
3. DTX'in, hücre döngüsünde ve apoptozu başlatmasında anahtar rol oynayan P53'ün ekspresyonunu arttırırken aynı zamanda P53'ün negatif regülatörü olan MDM2'nin gen ekspresyonunu da arttırdığı görülmüştür.
4. P53'ün bir diğer düzenleyicisi olan Sin3A'nın gen ekspresyonu da DTX uygulamasıyla artış göstermiştir.

Bu veriler doğrultusunda mevcut çalışmada, DTX'in apoptozisde görev alan P53 gen ekspresyonunu arttırarak kanser hücrelerini apoptoza yönlendirdiğini, aynı zamanda Sin3A'nın da ekspresyonun arttırarak onu MDM2'nin degradasyonuna karşı koruduğu sonucuna varabilir. Ancak bu mekanizmanın açıklanabilmesi için yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Kemoterapötik ajanların P53 ve MDM2 üzerine etkilerini araştıran birçok çalışma mevcut iken Sin3A'ya etkisi üzerine çalışmalar kısıtlıdır. Mevcut çalışmanın bu konuda öncülük edebilir nitelikte olacağı varsayılmaktadır. Kemoterapötik ilaçlar değerlendirilirken sadece P53'ü indüklemesi göz önüne alınmaması ve aynı zamanda P53'ü düzenleyici rolü bulunan diğer etkenlerinde göz önünde bulundurulup değerlendirilmesi önerilmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International journal of cancer*, 2010, 127: 2893-917.
2. Hortobagyi GN, de la Garza Salazar J, Pritchard K, Amadori D, Haidinger R, Hudis CA, Khaled H, Liu MC, Martin M, Namer M, O'Shaughnessy JA, Shen ZZ, Albain KS, Investigators A. The global breast cancer burden: variations in epidemiology and survival. *Clin Breast Cancer*, 2005, 6: 391-401.
3. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin*, 2007, 57: 43-66.
4. GÜLTEKİN M, BOZTAŞ G. Türkiye kanser istatistikleri. *Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu*, 2014, 43.
5. Dellabona P, Moro M, Crosti MC, Casorati G, Corti A. Vascular attack and immunotherapy: a 'two hits' approach to improve biological treatment of cancer. *Gene Ther*, 1999, 6: 153-4.
6. Torrero MN, Li S. Growth factor receptors: targets for gene therapy and immunotherapy for cancer treatment. *Gene Therapy and Molecular Biology*, 2004, 8: 175-180.
7. McGrogan BT, Gilmartin B, Carney DN, McCann A. Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1785: 96-132.
8. Freedman DA, Wu L, Levine AJ. Functions of the MDM2 oncoprotein. *Cell Mol Life Sci*, 1999, 55: 96-107.
9. Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nature Reviews Cancer*, 2002, 2: 594-604.
10. Sigerist HE. The historical development of the pathology and therapy of cancer. *The bulletin of the New York Academy of Medicine*, 1932, 8: 642-53.
11. D Ş. *Referans Patoloji*. Baskı. İstanbul Tıp Kitapevi, 2009.
12. D H, RA W. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell Metabolism*, 2011, 144: 646-674.
13. Cooper GM, RE. H. *The Cell. Hücre, moleküler yaklaşım*, Baskı. İzmir, İzmir Tıp Kitapevi, 631- 668.
14. N C, S V. *Lippincott's Illustrated Reviews: Hücre ve Moleküler Biyoloji*. 1. Baskı Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri, 2012: 215-225.
15. K V, DR V, N BZ. The cell cycle : a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif*, 2003, 36: 131-49.
16. K V, ZN B, DR v. Cell cycle and apoptosis. *Cell Prolif*, 2003, 36: 165-75.
17. TJ K, GW B. Regulation of chromosome replication. *Annu Rev Biochem*, 2000, 69: 829-80.
18. I F. Cancer: A cell cycle defect. *Radiography*, 2008, 14: 144-9.
19. V K, AK A, J A. *Robbins basic pathology*. 8. Baskı Baskı. USA, WB Saunders Company, 2012: 208-320.
20. WG K, JM L. Cell cycle checkpoint genes and aneuploidy: A short review. *Current Genomics* 2001, 2: 171-80.
21. Weinberg RA *The biology of cancer*. 1. Baskı Baskı. New York, Garland Science
22. RW. R. *Cancer biology*. 3. Baskı Baskı. USA, Oxford University Press, 2007.
23. Geoffrey M. Cooper REH. *The Cell AMolecular Approach*. Fourty Edition Baskı. 2007.

24. Cotran SR, Kumar, V., Robbins, S.L. *Robbins Pathologic Basis of Disease, Chapter: 6.* Baskı. Philadelphia, Philadelphia, 1989: 239-306.
25. Kazancıgil AA, W.A.D., Kissane, J.M.). *Anderson patoloji Çevirisi. Güven yayıncılık San. ve Tic. A.Ş., Ankara.* Baskı. 1982.
26. Geoffrey M. Cooper REH. *The Cell A Molecular Approach.* Fourth Baskı. 2007: 720-721.
27. Keleg S, Buchler P, Ludwig R, Buchler MW, Friess H. Invasion and metastasis in pancreatic cancer. *Mol Cancer*, 2003, 2: 14.
28. Bozzuto G, Ruggieri P, Molinari A. Molecular aspects of tumor cell migration and invasion. *Ann Ist Super Sanita*, 46: 66-80.
29. Lowe SW, Lin AW. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*, 2000, 21: 485-95.
30. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144: 646-74.
31. Walter JB, Israel, M.S.:. *General Pathology.* 4th Edition, Baskı. Churchill Livingstone Longman, Edinburg and London, , 1974: . pp. 305-375.
32. Cotran SR, Kumar, V., Robbins, S.L. *Robbins Pathologic Basis of Disease.* Baskı. 2006: 239-306.
33. Geoffrey M. Cooper REH. *The Cell: A Molecular Approach.* Third edition Baskı. 2006.
34. EKMEKÇİ PDA. *Gen, Genetik değişim ve hastalıklar.* Baskı. Gazi Kitabevi Tic.Ltd.şti, 2006.
35. BP K. Targets of oncogenes and tumor suppressors: key for understanding basic mechanisms of carcinogenesis. *Biochemistry (Mosc)*, 2000, 65: 2-27.
36. Almasan A, Yin Y, Kelly RE, Lee EY, Bradley A, Li W, Bertino JR, Wahl GM. Deficiency of retinoblastoma protein leads to inappropriate S-phase entry, activation of E2F-responsive genes, and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92: 5436-40.
37. YOKUŞ B, DÜ Ç. Kanser Biyokimyası. *Dicle Üniv Vet Fak Derg*, 2012, 1 7-18.
38. Moll UM, Zaika A. Nuclear and mitochondrial apoptotic pathways of p53. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 2001, 493: 65-9.
39. Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis*, 2000, 5: 415-8.
40. Ersöz M. İnsan Meme Kanseri (MCF 7) ve Fibroblast (L-929) Hücre Kültürlerinde Poliakrilik Asidin Toksisitesinin İncelenmesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Anabilim Dalı. Yüksek Lisans, İstanbul: Yıldız Teknik Üniversitesi, 2007.
41. Dalay N. Kanser. İçinde: *Hücre: Moleküler Yaklaşım*, Sakızlı M, Atabey N (editörler). *The Cell: A Molecular Approach*, Cooper GM, Hausman RE. 3. Baskı. İzmir, İzmir Tıp Kitabevi, 2006: 631-671.
42. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. P53 Mutations in Human Cancers. *Science*, 1991, 253: 49-53.
43. Roemer K. Mutant p53: gain-of-function oncoproteins and wild-type p53 inactivators. *Biol Chem*, 1999, 380: 879-87.
44. Solakoğlu Z. Apoptoz varlığı ya da yokluğu Bir hastalık nedeni. *Klinik Gelişim Dergisi*, 2009, 22: 20-25.
45. Staib F, Robles AI, Varticovski L, Wang XW, Zeeberg BR, Sirotnin M, Zhurkin VB, Hofseth LJ, Hussain SP, Weinstein JN, Galle PR, Harris CC. The p53 tumor suppressor network is a key responder to microenvironmental components of chronic inflammatory stress. *Cancer Res*, 2005, 65: 10255-10264.
46. S.P. H, C.C. H. p53 Biological Network: At the Crossroads of the Cellular-Stress Response

- Pathway and Molecular Carcinogenesis. *J. Nippon Med. Sch*, 2006, 73: 54-64.
47. Maeda N, Fan H, Yoshikai Y. Oncogenesis by retroviruses: old and new paradigms. *Rev Med Virol*, 2008, 18: 387-405.
  48. S.H. L, Clarke F.C. Regulation of p53 localization. *Eur. J. Biochem*, 2001, 268: 2779-83.
  49. Efsun E. HEPATOSELLÜLER KARSİNOMDA MDM2 GEN POLİMORFİZMLERİ. Biyoteknoloji. Ankara: Ankara Üniversitesi, 2006.
  50. Jones SN, Ansari-Lari MA, Hancock AR, Jones WJ, Gibbs RA, Donehower LA, Bradley A. Genomic organization of the mouse double minute 2 gene. *Gene*, 1996, 175: 209-13.
  51. de Oca Luna RM, Tabor AD, Eberspaecher H, Hulboy DL, Worth LL, Colman MS, Finlay CA, Lozano G. The organization and expression of the mdm2 gene. *Genomics*, 1996, 33: 352-7.
  52. Schlott T, Reimer S, Jahns A, Ohlenbusch A, Ruschenburg I, Nagel H, Droese M. Point mutations and nucleotide insertions in the MDM2 zinc finger structure of human tumours. *J Pathol*, 1997, 182: 54-61.
  53. Schlott T, Reimer S, Jahns A, Ohlenbusch A, Ruschenburg I, Nagel H, Droese M. Point mutations and nucleotide insertions in the MDM2 zinc finger structure of human tumours. *Journal of Pathology*, 1997, 182: 54-61.
  54. Marechal V, Elenbaas B, Piette J, Nicolas JC, Levine AJ. The ribosomal L5 protein is associated with mdm-2 and mdm-2-p53 complexes. *Mol Cell Biol*, 1994, 14: 7414-20.
  55. Elenbaas B, Dobbstein M, Roth J, Shenk T, Levine AJ. The MDM2 oncoprotein binds specifically to RNA through its RING finger domain. *Mol Med*, 1996, 2: 439-51.
  56. Vazquez A, Bond EE, Levine AJ, Bond GL. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2008, 7: 979-987.
  57. Grier JD, Xiong S, Elizondo-Fraire AC, Parant JM, Lozano G. Tissue-specific differences of p53 inhibition by Mdm2 and Mdm4. *Mol Cell Biol*, 2006, 26: 192-8.
  58. Eischen CM, Lozano G. p53 and MDM2: antagonists or partners in crime? *Cancer Cell*, 2009, 15: 161-2.
  59. Shangary S, Wang S. Small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction to reactivate p53 function: a novel approach for cancer therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2009, 49: 223-41.
  60. Bouska A, Eischen CM. Mdm2 affects genome stability independent of p53. *Cancer Res*, 2009, 69: 1697-701.
  61. Thomasova D, Mulay SR, Bruns H, Anders HJ. p53-independent roles of MDM2 in NF-kappaB signaling: implications for cancer therapy, wound healing, and autoimmune diseases. *Neoplasia*, 2012, 14: 1097-101.
  62. Hay TJ, Meek DW. Multiple sites of in vivo phosphorylation in the MDM2 oncoprotein cluster within two important functional domains. *FEBS Lett*, 2000, 478: 183-186.
  63. Mayo LD, Turchi JJ, Berberich SJ. Mdm-2 phosphorylation by DNA-dependent protein kinase prevents interaction with p53. *Cancer Res*, 1997, 57: 5013-5016.
  64. Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell*, 1997, 91: 325-334.
  65. Canman CE, Lim DS, Cimprich KA, Taya Y, Tamai K, Sakaguchi K, Appella E, Kastan MB, Siliciano JD. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science*, 1998, 281: 1677-1679.

66. Ito A, Lai CH, Zhao X, Saito S, Hamilton MH, Appella E, Yao TP. p300/CBP-mediated p53 acetylation is commonly induced by p53-activating agents and inhibited by MDM2. *EMBO J*, 2001, 20: 1331-40.
67. Thut CJ, Goodrich JA, Tjian R. Repression of p53-mediated transcription by MDM2: a dual mechanism. *Genes and Development*, 1997, 11: 1974-86.
68. Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*, 1997, 387: 296-9.
69. Eren E. Hepatoselüler Karsinomda Mdm2 Gen Polimorfizmleri. Biyoteknoloji Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi, Ankara: Ankara Üniversitesi, 2006.
70. Freedman DA, Levine AJ. Nuclear export is required for degradation of endogenous p53 by MDM2 and human papillomavirus E6. *Mol Cell Biol*, 1998, 18: 7288-93.
71. Piette J, Neel H, Marechal V. Mdm2: Keeping p53 under control. *Oncogene*, 1997, 15: 1001-1010.
72. Picksley SM, Spicer JF, Barnes DM, Lane DP. The p53-MDM2 interaction in a cancer-prone family, and the identification of a novel therapeutic target. *Acta Oncologica*, 1996, 35: 429-434.
73. Sternberg PW, Stern MJ, Clark I, Herskowitz I. Activation of the yeast HO gene by release from multiple negative controls. *Cell*, 1987, 48: 567-577.
74. Nasmyth K, Stillman D, Kipling D. Both positive and negative regulators of HO transcription are required for mother-cell-specific mating-type switching in yeast. *Cell*, 1987, 48: 579-587.
75. Grzenda A, Lomber G, Zhang J-S, Urrutia R. Sin3: master scaffold and transcriptional corepressor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 2009, 1789: 443-450.
76. Kadamb R, Mittal S, Bansal N, Batra H, Saluja D. Sin3: insight into its transcription regulatory functions. *Eur J Cell Biol*, 2013, 92: 237-46.
77. McDonel P, Demmers J, Tan DW, Watt F, Hendrich BD. Sin3a is essential for the genome integrity and viability of pluripotent cells. *Dev Biol*, 2012, 363: 62-73.
78. Wang H, Stillman DJ. In vitro regulation of a SIN3-dependent DNA-binding activity by stimulatory and inhibitory factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1990, 87: 9761-9765.
79. He Y, Radhakrishnan I. Solution NMR studies of apo-mSin3A and -mSin3B reveal that the PAH1 and PAH2 domains are structurally independent. *Protein Sci*, 2008, 17: 171-5.
80. Ayer DE, Lawrence QA, Eisenman RN. Mad-Max transcriptional repression is mediated by ternary complex formation with mammalian homologs of yeast repressor Sin3. *Cell*, 1995, 80: 767-776.
81. Halleck MS, Pownall S, Harder KW, Duncan AM, Jirik FR, Schlegel RA. A widely distributed putative mammalian transcriptional regulator containing multiple paired amphipathic helices, with similarity to yeast SIN3. *Genomics*, 1995, 26: 403-406.
82. Wang H, Stillman DJ. Transcriptional repression in *Saccharomyces cerevisiae* by a SIN3-LexA fusion protein. *Mol Cell Biol*, 1993, 13: 1805-1814.
83. Pile LA, Spellman PT, Katzenberger RJ, Wassarman DA. The SIN3 Deacetylase Complex Represses Genes Encoding Mitochondrial Proteins IMPLICATIONS FOR THE REGULATION OF ENERGY METABOLISM. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278: 37840-37848.
84. Rao G, Alland L, Guida P, Schreiber-Agus N, Chen K, Chin L, Rochelle JM, Seldin MF, Skoultschi AI, DePinho RA. Mouse Sin3A interacts with and can



- functionally substitute for the amino-terminal repression of the Myc antagonist Mxi1. *Oncogene*, 1996, 12: 1165-1172.
85. Grunstein M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*, 1997, 389: 349-52.
86. Kouzarides T. Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation. *Curr Opin Genet Dev*, 1999, 9: 40-8.
87. Cowley SM, Iritani BM, Mendrysa SM, Xu T, Cheng PF, Yada J, Liggitt HD, Eisenman RN. The mSin3A chromatin-modifying complex is essential for embryogenesis and T-cell development. *Mol Cell Biol*, 2005, 25: 6990-7004.
88. Bahadır F. Östrojen Reseptörü Negatif İnvaziv Meme Karsinomlarını Morfolojik - İmmunfenotipik Analizi ve Yeni Fonksiyonel Meme Karsinomu Sınıflamasındaki Yeri. Patoloji Laboratuvarı. İstanbul: İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 2008.
89. Kai K. *Survival Models with Gene Groups as Covariates*. Department of Statistic. Baskı. Dortmund, Dortmund University, 2012.
90. Fentiman IS, Fourquet A, Hartobagyi GN. Male breast cancer. *Lancet*, 2006, 367: 595-604.
91. Hortobagyi GN, Esserman L, Buchholz TA. Neoplasm of the breast. İçinde: Holland JF, Frei E (Çeviri editörleri). *Cancer medicine*, 7th ed Baskı. London, BC Decker Inc, 2006: 1584-1643.
92. Ravdin PM, Cronin KA, Howlader N, Berg CD, Chlebowski RT, Feuer EJ, Edwards BK, Berry DA. The decrease in breast-cancer incidence in 2003 in the United States. *N Engl J Med*, 2007, 356: 1670-4.
93. Kosova F, Arı Z. Adipositokinler ve Meme Kanseri. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2008, 22: 377-384.
94. Kalache A, Vessey M. Risk factors for breast cancer. *Clinics in oncology*, 1982, 1.
95. Sattin R, Rubin G, Wingo P, Webster L, Ory H. Oral-contraceptive use and the risk of breast cancer. The Cancer and Steroid Hormone Study of the Centers for Disease Control and the National Institute of Child Health and Human Development. *New England Journal of Medicine*, 1986, 315: 405-11.
96. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*, 1994, 266: 66-71.
97. Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D, Collins N, Nguyen K, Seal S, Tran T, Averill D, et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science*, 1994, 265: 2088-90.
98. Wohlfahrt J, Melbye M. Age at any birth is associated with breast cancer risk. *Epidemiology*, 2001, 12: 68-73.
99. Tavassoli F, Devilee P. ur.(2003) World Health Organisation classification of tumours: Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs.
100. Meites J. Relation of prolactin and estrogen to mammary tumorigenesis in the rat. *Journal of the National Cancer Institute*, 1972, 48: 1217-1224.
101. Cuzick J, Powles T, Veronesi U, Forbes J, Edwards R, Ashley S, Boyle P. Overview of the main outcomes in breast-cancer prevention trials. *The Lancet*, 2003, 361: 296-300.
102. Santen R, Cavalieri E, Rogan E, Russo J, Guttenplan J, Ingle J, Yue W. Estrogen Mediation of Breast Tumor Formation Involves Estrogen Receptor-Dependent, as Well as Independent, Genotoxic Effects. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2009, 1155: 132-140.

103. Chetrite G, Cortes-Prieto J, Philippe J, Wright F, Pasqualini J. Comparison of estrogen concentrations, estrone sulfatase and aromatase activities in normal, and in cancerous, human breast tissues. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 2000, 72: 23-27.
104. 21.08.2012 hwcgetb.
105. Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc*, 1971, 93: 2325-7.
106. Arbuck SG, Blaylock BA. Taxol: clinical results and current issues in development. *Taxol: Science and Applications*, 1995, 379.
107. Keum C-G, Noh Y-W, Baek J-S, Lim J-H, Hwang C-J, Na Y-G, Shin S-C, Cho C-W. Practical preparation procedures for docetaxel-loaded nanoparticles using polylactic acid-co-glycolic acid. *International journal of nanomedicine*, 2011, 6: 2225.
108. Ali SM, Hoemann MZ, Aube J, Mitscher LA, Georg GI, McCall R, Jayasinghe LR. Novel cytotoxic 3'-(tert-Butyl) 3'-diphenyl analogs of paclitaxel and docetaxel. *Journal of medicinal chemistry*, 1995, 38: 3821-3828.
109. Andersen A, Warren DJ, Brunsvig PF, Aamdal S, Kristensen GB, Olsen H. High sensitivity assays for docetaxel and paclitaxel in plasma using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with UV detection. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 2006, 6: 2.
110. Diaz JF, Andreu JM. Assembly of purified GDP-tubulin into microtubules induced by taxol and taxotere: reversibility, ligand stoichiometry, and competition. *Biochemistry*, 1993, 32: 2747-2755.
111. Bissery M-C, Guénard D, Guéritte-Voegelein F, Lavelle F. Experimental antitumor activity of taxotere (RP 56976, NSC 628503), a taxol analogue. *Cancer Res*, 1991, 51: 4845-4852.
112. Escobar PF, Rose PG. Docetaxel in ovarian cancer. 2005.
113. Marchettini P, Stuart AO, Mohamed F, Yoo D, Sugarbaker PH. Docetaxel: pharmacokinetics and tissue levels after intraperitoneal and intravenous administration in a rat model. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 2002, 49: 499-503.
114. <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01248>.
115. Eisenhauer EA, Vermorken JB. The taxoids. *Drugs*, 1998, 55: 5-30.
116. Lacroix H, Ligeza C. Docetaxel (Taxotere)-an update. *Expert opinion on investigational drugs*, 1998, 7: 273-281.
117. Lyseng-Williamson KA, Fenton C. Docetaxel. *Drugs*, 2005, 65: 2513-2531.
118. Yıldırım H. Karbonik Anhidraz 9 Geninin Transkripsiyonel Kontrolünün Moleküler Analizi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi, Balıkesir: Balıkesir Üniversitesi, 2009.
119. Freshney I. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. 5. Baskı. New Jersey, John Wiley and Sons, 2005.
120. AKTAŞ SH, AKBULUT H. KEMOTERAPİNİN KOLON KANSERİ, MEME KANSERİ VE MİDE KANSERİNDE VEGF DÜZEYLERİNE ETKİSİNİN İN VİVO VE İN VİTRO İNCELEMESİ.
121. Peto R, Boreham J, Clarke M, Davies C, Beral V. UK and USA breast cancer deaths down 25% in year 2000 at ages 20–69 years. *The Lancet*, 2000, 355: 1822.
122. Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4: 253-65.
123. Torres K, Horwitz SB. Mechanisms of Taxol-induced cell death are concentration dependent. *Cancer Res*, 1998, 58: 3620-6.

124. Martin M, Pienkowski T, Mackey J, Pawlicki M, Guastalla JP, Weaver C, Tomiak E, Al-Tweigeri T, Chap L, Juhos E, Guevin R, Howell A, Fornander T, Hainsworth J, Coleman R, Vinholes J, Modiano M, Pinter T, Tang SC, Colwell B, Prady C, Provencher L, Walde D, Rodriguez-Lescure A, Hugh J, Loret C, Rupin M, Blitz S, Jacobs P, Murawsky M, Riva A, Vogel C. Adjuvant docetaxel for node-positive breast cancer. *N Engl J Med*, 2005, 352: 2302-13.
125. Karaca E. Role of aven in apoptotic response following paclitaxel and docetaxel treatment in mda-mb231 breast cancer cells. 2008.
126. Stone AA, Chambers TC. Microtubule inhibitors elicit differential effects on MAP kinase (JNK, ERK, and p38) signaling pathways in human KB-3 carcinoma cells. *Experimental cell research*, 2000, 254: 110-119.
127. Aapro M. The scientific rationale for developing taxoids. *Anti-cancer drugs*, 1996, 7: 33-36.
128. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res*, 1994, 54: 4855-78.
129. Waldman T, Kinzler KW, Vogelstein B. p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res*, 1995, 55: 5187-90.
130. Fridman JS, Lowe SW. Control of apoptosis by p53. *Oncogene*, 2003, 22: 9030-40.
131. Cetin-Atalay R, Ozturk M. p53 mutations as fingerprints of environmental carcinogens. *Pure and applied chemistry*, 2000, 72: 995-999.
132. Hawkins DS, Demers GW, Galloway DA. Inactivation of p53 enhances sensitivity to multiple chemotherapeutic agents. *Cancer Res*, 1996, 56: 892-8.
133. Vikhanskaya F, Vignati S, Beccaglia P, Ottoboni C, Russo P, D'Incalci M, Broggin M. Inactivation of p53 in a human ovarian cancer cell line increases the sensitivity to paclitaxel by inducing G2/M arrest and apoptosis. *Exp Cell Res*, 1998, 241: 96-101.
134. Wahl AF, Donaldson KL, Fairchild C, Lee FY, Foster SA, Demers GW, Galloway DA. Loss of normal p53 function confers sensitization to Taxol by increasing G2/M arrest and apoptosis. *Nat Med*, 1996, 2: 72-9.
135. Debernardis D, Sire EG, De Feudis P, Vikhanskaya F, Valenti M, Russo P, Parodi S, D'Incalci M, Broggin M. p53 status does not affect sensitivity of human ovarian cancer cell lines to paclitaxel. *Cancer Res*, 1997, 57: 870-4.
136. Al-Abd AM, Mahmoud AM, El-Sherbiny GA, El-Moselhy MA, Nofal SM, El-Latif HA, El-Eraky WI, El-Shemy HA. Resveratrol enhances the cytotoxic profile of docetaxel and doxorubicin in solid tumour cell lines in vitro. *Cell Prolif*, 2011, 44: 591-601.
137. Liu C, Zhu Y, Lou W, Nadiminty N, Chen X, Zhou Q, Shi XB, deVere White RW, Gao AC. Functional p53 determines docetaxel sensitivity in prostate cancer cells. *The Prostate*, 2013, 73: 418-427.
138. Swisher SG, Roth JA, Nemunaitis J, Lawrence DD, Kemp BL, Carrasco CH, Connors DG, El-Naggar AK, Fossella F, Glisson BS, Hong WK, Khuri FR, Kurie JM, Lee JJ, Lee JS, Mack M, Merritt JA, Nguyen DM, Nesbitt JC, Perez-Soler R, Pisters KM, Putnam JB, Jr., Richli WR, Savin M, Schrumpp DS, Shin DM, Shulkin A, Walsh GL, Wait J, Weill D, Waugh MK. Adenovirus-mediated p53 gene transfer in advanced non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst*, 1999, 91: 763-71.
139. Kaabinejadian S, Fouladdel S, Ramezani M, Azizi E. p53 expression in MCF7, T47D and MDA-MB 468 breast cancer cell lines treated with adriamycin using RT-PCR and immunocytochemistry. *Journal of Biological Sciences*, 2008, 8: 380-385.

140. Singh N, Nigam M, Ranjan V, Zaidi D, Garg VK, Sharma S, Chaturvedi R, Shankar R, Kumar S, Sharma R, Mitra K, Balapure AK, Rath SK. Resveratrol as an adjunct therapy in cyclophosphamide-treated MCF-7 cells and breast tumor explants. *Cancer Sci*, 2011, 102: 1059-67.
141. Daujat S, Neel H, Piette J. MDM2: life without p53. *Trends in Genetics*, 2001, 17: 459-64.
142. Kinyamu HK, Archer TK. Estrogen receptor-dependent proteasomal degradation of the glucocorticoid receptor is coupled to an increase in mdm2 protein expression. *Mol Cell Biol*, 2003, 23: 5867-81.
143. Cheung AN, Shen DH, Khoo US, Chiu MP, Tin VP, Chung LP, Ngan HY. Immunohistochemical and mutational analysis of p53 tumor suppressor gene in gestational trophoblastic disease: correlation with mdm2, proliferation index, and clinicopathologic parameters. *International Journal of Gynecological Cancer*, 1999, 9: 123-130.
144. Sjostrom J, Blomqvist C, Heikkila P, Boguslawski KV, Raisanen-Sokolowski A, Bengtsson NO, Mjaaland I, Malmstrom P, Ostenstadt B, Bergh J, Wist E, Valvere V, Saksela E. Predictive value of p53, mdm-2, p21, and mib-1 for chemotherapy response in advanced breast cancer. *Clin Cancer Res*, 2000, 6: 3103-10.
145. Gan L, Wang J, Xu H, Yang X. Resistance to docetaxel-induced apoptosis in prostate cancer cells by p38/p53/p21 signaling. *The Prostate*, 2011, 71: 1158-1166.
146. Hassig CA, Fleischer TC, Billin AN, Schreiber SL, Ayer DE. Histone deacetylase activity is required for full transcriptional repression by mSin3A. *Cell*, 1997, 89: 341-347.
147. Dannenberg J-H, David G, Zhong S, van der Torre J, Wong WH, DePinho RA. mSin3A corepressor regulates diverse transcriptional networks governing normal and neoplastic growth and survival. *Genes & Development*, 2005, 19: 1581-1595.
148. Ho J, Benchimol S. Transcriptional repression mediated by the p53 tumour suppressor. *Cell death and differentiation*, 2003, 10: 404-408.
149. Ellison-Zelski SJ, Alarid ET. Maximum growth and survival of estrogen receptor-alpha positive breast cancer cells requires the Sin3A transcriptional repressor. *Mol Cancer*, 2010, 9: 263.
150. Murphy M, Ahn J, Walker KK, Hoffman WH, Evans RM, Levine AJ, George DL. Transcriptional repression by wild-type p53 utilizes histone deacetylases, mediated by interaction with mSin3a. *Genes Dev*, 1999, 13: 2490-501.
151. Zilfou JT, Hoffman WH, Sank M, George DL, Murphy M. The corepressor mSin3a interacts with the proline-rich domain of p53 and protects p53 from proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol*, 2001, 21: 3974-85.
152. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 2007, 35: 495-516.
153. Sapino A. Predictive Pathology in the Target Therapy Era in Breast Cancer. *Curr Drug Targets*, 2016.
154. Wang T, Narayanaswamy R, Ren H, Torchilin VP. Combination therapy targeting both cancer stem-like cells and bulk tumor cells for improved efficacy of breast cancer treatment. *Cancer Biol Ther*, 2016: 0.
155. Mirzania M. Approach to the Triple Negative Breast Cancer in New Drugs Area. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res*, 2016, 10: 115-9.

## EKLER

### EK-1 Özgeçmiş

#### EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
<p><b>Adı Soyadı:</b> Nezahat KURT <b>Doğum tarihi:</b> 11.06.1980 <b>Doğum yeri:</b> Horasan/Erzurum <b>Medeni hali:</b> Evli, 1 çocuk <b>Uyruğu:</b> T.C. <b>Adres:</b> Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, 25240 ERZURUM <b>Tel:</b> 0442 234 6612 <b>Faks:</b> 0449 234 6611 <b>E-mail:</b> nezahat.kurt@atauni.edu.tr</p>
Eğitim
<p><b>Lise:</b> Horasan Lisesi (1997) <b>Lisans:</b> Atatürk Üniversitesi Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi (1998- <b>Yüksek lisans:</b> Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı (2007-2008) <b>Doktora:</b> Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı (2009-2012)</p>
Yabancı Dil Bilgisi
<p>İngilizce: İyi derecede (ÜDS 73,75 (Mart-2007)) Almanca: ..... Rusça: .....</p>
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
..... .....
İlgi Alanları ve Hobiler
..... .....

## EK-2. Etik Kurul Onay Formu



ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ TIP  
FAKÜLTESİ İLAÇ DIŞI KLİNİK  
ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Bölümü : Dekanlık  
Servisi : İlaç Dışı Klinik Araştırmalar Etik Kurulu  
Sayı : B.30.2.A.TA.0.01.00/183  
Konu : Etik Kurul Kararı


11.09.2013

### TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA

İlg: 23.08.2013 tarih ve 100 sayılı yazınız.

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi İlaç Dışı Klinik Araştırmalar Etik Kurulumun 02.09.2013 tarih ve 6 nolu toplantısında, Öğretim Üyesi Prof.Dr.Nuri BAKAN tarafından hazırlanan "Dosectaxel'in Meme Kanseri Hücre Kültüründe Sin3A, MDM2 ve P53 ekspresyonu üzerine etkisinin RT-PCR Metoduyla Araştırılması ve p53 Aracılı Apoptosis Aktivasyonunun İmmunofloresan İncelenmesi" isimli bilimsel çalışma protokolü ve ekli belgeleri gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler ile gönüllü bilgilendirme formu dikkate alınarak incelenmiş ve çalışmanın Etik Kurallara uygun olduğuna mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

  
Prof. Dr. Hülya AKSOY  
Etik Kurul Başkan V.

Eki \_\_\_\_\_ :  
1 Adet Etik Kurul Kararı



T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**DOKTORA TEZ SAVUNMA SINAVI TUTANAĞI**  
(Tez başlığa değişiklik önerisi olanlar için)  
(FORM: 22)

**ÖĞRENCİ BİLGİLERİ**

Adı ve Soyadı : Nezihat KURT  
Programı (Bölüm/Y.Ököl) : Tıp Fakültesi  
Anabilim Dalı : Tıbbi Biyokimya

Danışmanı : Prof. Dr. Nuri BAKAN  
Ornek Danışman : Metin Örnekköten beyarı bildirir.

Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 29.06.2016 ve 2016.20.5/y sayılı kararıyla oluşturulan tez savunma sınavı jürisi, **Dosetaxelin Meme Kanseri Hücre Kültüründe Sin3A, MDM2 Ve P53 Ekspresyonu Üzerine Etkisinin RT-PCR Metoduyla Araştırılması Ve P53 Aracılı Apoptosis Aktivasyonunun İmmunfloresan İncelenmesi.**

başlıklı doktora tezini incelemiş ve adayı 29.06.2016 tarihinde, saat 15 : 00'da tez savunma sınavına tabi tutmuştur.

**DEĞERLENDİRME VE SONUÇ:**

- Jüri raporlarının tartışılması sonucunda başarıyla savunulan tezin **KABUL EDİLMESİNE**,
- Jüri raporlarının tartışılması sonucunda, ..... ay ek süre verilerek tezin **DÜZELTİLMESİNE**,
- Jüri raporlarının tartışılması sonucunda tezin **REDDİDİLMESİNE**,
- ancak konu ve içeriği değişmeksizin tez başlığına **MCF-7 Meme Kanseri Hücre Kültüründe Dosetaxelin Sin3A, MDM2 Ve P53 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi** olarak düzenlenmesine,

**OY BİRLİĞİ**

**OY ÇOKLUĞU** ile karar verilmiştir.

Tez Sınav Jürisi	Unvanı, Adı Soyadı	İmza
Başkan	:Prof. Dr. Nuri BAKAN	
Üye	:Prof. Dr. Fatma Zühra UMUDUM	
Üye	:Prof. Dr. Mustafa GÜL	
Üye	:Prof. Dr. Muhammed Fevzi POLAT	
Üye	<del>Doç. Dr.</del> Dr. Bahattin AVCI	
Üye	:	