

T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**MCF-7 VE HepG2 HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE  
DESFEROKSAMİN'İN NdrG1 mRNA VARYANTLARI  
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**DOKTORA TEZİ**

**Dr. Osman ŞALIŞ**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Abdulkerim BEDİR**

**Samsun  
Ocak-2011**

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden her zaman yararlandığım, tezimin hazırlanması aşamalarında yardım ve destek aldığım değerli hocam Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Abdulkerim Bedir'e ve Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Cafer Eroğlu'na, Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri; Doç Dr.Nermin Kılıç, Doç. Dr. Ramazan Amanvermez, Yrd. Doç. Dr. Bahattin Avcı, Yrd. Doç. Dr. Birşen Bilgici, Yrd. Doç. Dr. Hasan Alaçam, Yrd. Doc. Dr. Ali Okuyucu, Yrd. Doç. Dr. Özgür K. Tuncel'e teşekkür ederim.

Tecrübelerinden faydalandığım sevgili arkadaşlarım Uzm. Dr. Aynur Düzgün, Uzm. Dr. Tülay Özdemir ve Uzm Dr. Rukiye Nar'a, Uzm. Dr. Seher Aydoğan, Uzm. Dr. Murat Günay, birlikte çalıştığım çok değerli arkadaşlarım Dr. Veli Kılınç, Dr. Ayşegül Bahadır, Dr. Şimal Gürler, Dr. Uğur Düz, Dr. Mesut Kılıçoğlu, Dr. Sedat Gülten, Dr.Yasemin Küçük, Şennur Sungur, Hande Koldaş'a ve tüm Biyokimya Anabilim Dalı çalışanlarına teşekkür ederim.

Her zaman bana destek olan sevgili anneme, babama, kardeşlerime, eşime, kızım Esmanur ve oğlum Mehmet Emin'e, Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Hastanesi tüm yönetici ve çalışanlarına sonsuz sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

**Not:** Bu çalışma (PYO.TIP. 1904.11.028.26 NO'lu proje) Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi araştırma fonu tarafından desteklenmiştir.

## ÖZET

MCF-7 ve HepG2 hücre kültürlerinde desferoksamin'in NdrG1 mRNA varyantları üzerindeki etkilerinin araştırılması

Metastaz supresör gen olarak bilinen N-myc downstream-regulated gene1(NdrG1), prostat, kolon ve meme kanserlerinde downregüle olurken, karaciğer kanserlerinde upregüle olmaktadır. Yapılan çalışmaların sonuçları NdrG1 geninin farklı kanser türlerinde farklı şekilde etkilendiğini göstermektedir. NdrG1 geninin düzenlenmesinde transkripsiyonel, posttranskripsiyonel ve translasyonel mekanizmalar rol almaktadır. NdrG1 gen upregülasyonu ile metastaz ve tümör hücre büyümesi önemli ölçüde durdurulmakta ancak bunun nasıl gerçekleştiği tam olarak bilinmemektedir. Çalışmamızda biyoinformatik analiz ile NdrG1 mRNA varyantları için spesifik primer ve probler geliştirilerek, MCF-7 (Human breast adenocarcinoma) ve HepG2 (Hepatoselüler karsinom) hücre hatlarında Desferoksaminin (DFO), 1.10 phenantrolin (PHEN) ve Trikostatin A (TSA)'nın NdrG1 varyant dinamiğini nasıl etkilediğini araştırdık. Bu amaçla MCF-7 ve HepG2 hücrelerini uygun medyumlar içerisinde kültüre ettik. xCELLigence cihazı ile büyüme eğrileri analizi yapılarak uygun hücre yoğunluğunu belirledik. 96-kuyucuklu pleytlere ekilen hücreler 24 saat boyunca 25 µM PHEN, 150 µM DFO, 500nM TSA ve bunların kombinasyonu ile muamele ederek RNA'ları izole edildi. Elde edilen RNA'lar cDNA'ya çevrildi. Uygun primerler kullanılarak NdrG1 mRNA varyantlarına kantitatif Real Time PCR yöntemiyle bakılarak relatif gen ekspresyon analizi (REST) yapıldı. Referans gen olarak GAPDH alındı. Normalizatör olarak kontrol grubu kullanıldı. HepG2 ve MCF-7 hücrelerinin demir şelatörleri ve TSA ile muamelesi sonucunda NdrG1 mRNA varyantlarında anlamlı ( $p < 0,001$ ) artışlar oldu. HepG2 hücrelerinin DFO ile muamelesi sonucu NdrG1 varyant1 kontrole göre 3,196, Varyant2 ise 2,49 kat artış oldu. MCF-7 hücrelerinde ise NdrG1 varyant1 kontrole grubuna göre 5,9, Varyant2 ise 10,6 kat arttı. HepG2 hücrelerinin PHEN ile muamelesi sonucunda NdrG1 varyant1 ve varyant2 artışı birbirine yakın değerlerde gerçekleşirken, MCF-7 hücrelerinin PHEN ile muamelesi sonucunda NdrG1 varyant1 kontrole göre 6,03, Varyant 2'de ise 16,7 kat arttı. Sonuçta PHEN, DFO ve TSA'nın NdrG1 mRNA varyantlarını gen ekspresyon düzeyinde regülasyona uğrattığı gösterildi.

**Osman Şalış, Doktora Tezi**

**Ondokuz Mayıs Üniversitesi Samsun, Ocak-2012**

## **ABSTRACT**

Investigation of the effects of desferoxamine on NdrG1 mRNA variants in MCF-7 and HepG2 cell lines

N-myc downstream-regulated gene (NdrG1), also known as metastasis suppressor gene, is downregulated in prostate, colon and breast cancers whereas it is upregulated in hepatic cancers. Results of previous studies indicate that NdrG1 is affected differently in different cancers. Transcriptional, posttranscriptional and translational mechanisms play a role in the regulation of NdrG1. NdrG1 gene upregulation stops the metastasis and cell growth dramatically but this blocking is not fully understood. In this study we investigated the effects of Desferrioxamin (DFO) which is an anticancer agent in MCF-7 (Human Breast Adenocarcinoma) and HepG2 (Hepatocellular carcinoma) cell lines, 1.10 phenantroline (PHEN) and trichostatin A (TSA) on NdrG1 variant dynamics by developing specific primers and probes for NdrG1 mRNA variants using bioinformatic analysis. We cultured MCF-7 and HepG2 cells in appropriate mediums. We determined the appropriate cell density by growth curve analysis using xCELLigence. Cells which were cultured in 96-pitted culture plates were treated with 25  $\mu$ M PHEN, 150  $\mu$ M DFO, 500nM TSA and combination of these for 24 hours. RNAs were then extracted. Derived RNAs were converted into cDNAs. Using appropriate primers and Real Time PCR on NdrG1 mRNA variants, relative gene expression analysis (REST) was performed. GAPDH was accepted as reference gene. Control group was used as normaliser. TSA and iron chelator treatments of HepG2 and MCF-7 cells caused a significant increase in NdrG1 mRNA variants ( $p < 0,001$ ). DFO treatments of HepG2 cells caused a 3.196 fold increase in NdrG1 variant1 and 2.49 fold increase in variant 2 compared to controls. DFO treatments of MCF-7 cells caused a 5.9 fold increase in NdrG1 variant1 and 10.6 fold increase in variant 2 compared to controls. PHEN treatments of HepG2 cells caused similar increases in NdrG1 variant1 and variant2 whereas PHEN treatments of MCF-7 cells caused 6.03 fold increase in variant1 and 16.7 fold increase in variant2 compared to controls. As a conclusion PHEN, DFO and TSA were shown to regulate NdrG1 mRNA variants at the level of gene expression.

**Osman Şalış, PhD Thesis**

**University of Ondokuz Mayıs Samsun, January-2012**

## KISALTMALAR

$\mu\text{M}$	Mikromolar
Aa	Amino asit
ADP	Adenosin difosfat
ATP	Adenozin trifosfat
AZA	5-aza-2'-deoxycytidine (5-AZA-CdR, decitabine)
bHLH	Bazik heliks-loop-heliks domain
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Bp	Base pair
BPOZ	Bood POZ containing gene type
C	Sitozin
CAMK-II	Kalmodulin kinaz II
CMT	Charcot-Marie-Tooth
CMT4D	Charcot-Marie-Tooth disease type 4D
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
CP	Crossing Point
CpG	Sitozin Guanin dinükleotidi
Ct	Cycle Treshold
DFO	Desferoksamin
DLD-1	Human, colon, adenocarcinoma
DMSO	Dimetilsülfooksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
Drg-1	Differentiation-related gene-1
EGFR	Epidermal büyüme faktör reseptörü
eIF2- $\alpha$	Eucaryotic initiation factor-2 alfa
EPO	Eritropoetin
Erk 1/2	Extracellular-signal-regulated kinases
ETZ	Elektron Transport Zinciri
FAD	Flavin adenin dinükleotid
FBS	Fetal Bovin Serum
Fe	Demir
Fe <sup>2+</sup>	Ferroz demir

Fe <sup>3+</sup>	Ferrik demir
G	Guanozin
GAPDH	Gliseraldehid 3-fosfat dehidrogenaz
H1299	Human non-small cell lung carcinoma cell line
HAT	Histon asetiltransferaz
HDAC	Histon Deasetilaz
HepG2	Hepatoselüler karsinom
HIF-1 $\alpha$	Hypoxia-inducible factor 1 alpha
HL-60	İnsan lösemi hücre hatlarında
HMSNL	Hereditör motor ve duyuşal nöropati-Lom
HPAF-II:	Orta dercede diferansiye pankreas kanser hücre hattı
HRE	Hipoksi respons element
HT-29	Colon cancer cells
IRE1	Inositol requiring kinase 1
IREs	İron responsive elementler
IRP	İron regulatory proteins
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
Kb	Kilobaz
KC-II	Kazein kinaz II
LDH	Laktat Dehidrogenaz
MBI	Myc-binding proteins
MCF-7	Human breast adenocarcinoma
MDR-1	Multidrug Resistant Gene-1
MEFs	Mürin embriyo fibroblast
Miz-1	Myc-interacting zinc finger protein-1
mRNA	Messenger Ribonucleic acid
Ni (II)	Nikel
nM	Nanomolar
NMSL	Neuropathy, hereditary motor and sensory, LOM type
n-Myc	Neuroblastoma-derived myelocytomatosis
NO	Nitrit oksit
P(H1)	Probability of alternate hypothesis
PaCa	Pancreatic carcinoma

PAS	Per-AHR-ARNT-Sim domain.
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PHEN	Fenantrolin
PKA	Protein kinaz A
PKC	Fosfopantetein, protein kinaz C
PP	Peroxisome Proliferators
PPAR- $\gamma$	Peroxisome Proliferator Activated Receptor- $\gamma$
PPRE	Peroksizom proliferatör PP respons element
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome Ten
QPCR	Kantitatif real time PCR
Raf	Rat sarcoma
Ras	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
REF	Referans
REST	Relative expression software tool
RNA	Ribonucleic acid
RR	Ribonükleotid Redüktazı
RTCA	Real Time Cell Analysis
RT-PCR	Real Time-Polymerase Chain Reaction
RXR	Retinoid X receptor
S.E.	Standart hata
SK-N-MC	İnsan nöroblastoma hücre hattı
SW480	Human colon adenocarcinoma cell line
SW620	Human, Caucasian, colon, adenocarcinoma
TAD C	Koaktivatörlerle (CBP, p300) etkileşmeyi sağlar.
TARG1	Transforming growth factor alpha regulated gene 1
TfR	Transferrin reseptörü
Tm	Erime derecesi
TRG	Hedef gen
REF	Reference
tRNA	Transfer RNA
TSA	TrikostatinA

U9	İnsan lösemi hücre hattı
UP	Upregülasyon
UPL	Universal Probe Library
V1	Varyant1
V2	Varyant2
VHL	Von Hippel-Lindau
xCELLigence	Real time cell analyzer
XL-PCR	Long PCR



## İÇİNDEKİLER

<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>iii</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>v</b>
<b>KISALTMALAR</b> .....	<b>vi</b>
<b>TABLolar</b> .....	<b>xiv</b>
<b>ŞEKİLLER</b> .....	<b>xvi</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>4</b>
2.1. NDRG1 .....	4
2.1.1. Tarihçe .....	4
2.1.2. NdrG1 gen .....	4
2.1.3. NdrG1 Proteini.....	5
2.2. NDRG1 HASTALIK İLİŞKİSİ.....	9
2.2.1. NdrG1-HNSNL.....	9
2.3. NDRG1 KANSER İLİŞKİSİ .....	10
2.4. NDRG1 GEN DÜZENLENMESİ (TRANSKRİPSİYONEL REGÜLASYON).....	10
2.4.1. PPAR $\gamma$ /RXR yolağı .....	11
2.4.2. DNA metilasyon yolağı .....	13
2.4.3. Histon Asetilasyon-Deasetilasyon Yolağı .....	14
2.4.4. P53 yolağı .....	16
2.4.5. c-Myc, N-myc yolağı.....	18
2.4.6. HIF-1 $\alpha$ yolağı.....	20
2.4.7. PTEN-NdrG1 yolağı.....	23

<b>2.5. DEMİR ŞELATÖRLERİ .....</b>	<b>24</b>
2.5.1. Desferoksamin .....	24
2.5.2. 1,10-Fenantrolin.....	25
<b>2.6. HDAC İNHİBİTÖRÜ.....</b>	<b>26</b>
2.6.1. Trikostatın A .....	26
<b>2.7. DEMİR .....</b>	<b>27</b>
2.7.1. Yapısı .....	27
2.7.2. Fonksiyonu.....	27
2.7.3. Demir Emilimi ve Dağılımı .....	28
2.7.4. Demir Metabolizması .....	29
<b>2.8. FERRİTİN.....</b>	<b>29</b>
<b>2.9. TRANSFERRİN.....</b>	<b>30</b>
<b>2.10. DEMİR ŞELASYONU VE NDRG1 İLİŞKİSİ .....</b>	<b>32</b>
<b>2.11. NDRG1 VARYANLARI.....</b>	<b>34</b>
2.11.1. NdrG1 Varyant1 .....	34
2.11.2. NdrG1 Varyant2 .....	37
<b>3. MATERYAL – METOT .....</b>	<b>38</b>
<b>3.1. KULLANILAN ARAÇ VE GEREÇLER .....</b>	<b>38</b>
<b>3.2. KULLANILAN KİMYASALLAR.....</b>	<b>39</b>
<b>3.3. HepG2 HÜCRE KÜLTÜRÜ .....</b>	<b>40</b>
3.3.1 HepG2 Hücre Kültür solüsyonları .....	40
3.3.2 HepG2 Hücre Kültür Protokolleri.....	43
<b>3.4. MCF-7 HÜCRE KÜLTÜRÜ .....</b>	<b>44</b>
3.4.1. Hücre Kültür solüsyonları.....	44
3.4.2. MCF-7 Hücre Kültür Protokolleri .....	46
<b>3.5. HÜCRE KİNETİĞİ (PROLİFERASYON DENEYİ) VE IC<sub>50</sub> (İNHİBİTÖR KONSANTRASYON) HESAPLAMASI .....</b>	<b>47</b>

<b>3.5.1. HepG2 Hücre Kültüründe xCELLigence Real time ile Proliferasyon Deneyi.....</b>	<b>47</b>
<b>3.5.2. MCF7 Hücre Kültüründe xCELLigence Real time ile Proliferasyon Deneyi.....</b>	<b>49</b>
<b>3.5.3. xCELLigence Real Time Hücre Analiz Sistemi İle HepG2 Hücrelerinde DFO ve PHEN İle Muamele sonucu Proliferasyon Takibi .....</b>	<b>50</b>
<b>3.5.4. xCELLigence Real Time Hücre Analiz Sistemi İle MCF-7 Hücrelerinde DFO ve PHEN İçin IC<sub>50</sub> Hesaplaması .....</b>	<b>53</b>
<b>3.6. HÜCRE KÜLTÜRLERİNDEN RNA İZOLASYONU .....</b>	<b>57</b>
3.6.1. HepG2 Hücrelerinden RNA İzolasyonu .....	57
3.6.2. MCF-7 hücrelerinde RNA izolasyonu .....	60
3.6.3. RNA İZOLASYON PROTOKOLÜ .....	62
<b>3.7. GEN EKSPRESYON ÇALIŞMASI .....</b>	<b>64</b>
3.7.1. Hücre RNA izolatlarından cDNA sentezi.....	64
3.7.2. Biyoinformatik analiz .....	65
3.7.3. Q-PCR Çalışması.....	68
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>73</b>
<b>4.1. HEPG2 VE MCF-7 HÜCRELERİNDE PROLİFERASYON VE CANLILIK ANALİZİ..</b>	<b>73</b>
4.1.1. MCF-7 Hücrelerinde Proliferasyon Ve Canlılık Analizi.....	73
4.1.2. HEPG2 Hücrelerinde Proliferasyon Ve Canlılık Analizi .....	73
<b>4.2. xCELLigence REAL TIME HÜCRE ANALİZ SİSTEMİ İLE MCF-7 ve HepG2 HÜCRELERİNDE DFO ve PHEN İÇİN IC<sub>50</sub> HESAPLAMASI.....</b>	<b>74</b>
4.2.1. MCF-7 Hücrelerinde DFO İçin IC <sub>50</sub> Hesaplama .....	74
4.2.2. MCF-7 hücrelerinde PHEN için IC <sub>50</sub> hesaplaması .....	76
4.2.3. HepG2 hücrelerine DFO uygulama sonrası proliferasyon takibi .....	79
4.2.4. HepG2 hücrelerine PHEN uygulama sonrası proliferasyon takibi.....	81
<b>4.3. HEPG2 VE MCF-7 HÜCRELERİNE İLAÇ UYGULANDIKTAN SONRA İZOLE EDİLEN RNA KONSANTRASYON ÖLÇÜMÜ .....</b>	<b>83</b>
4.3.1. HepG2 Hücrelerinde RNA Konsantrasyon Ölçümü.....	83
4.3.2. MCF-7 Hücrelerinde RNA Konsantrasyon Ölçümü .....	84

<b>4.4. KANTİTATİF REAL TİME-PCR SONUÇLARI</b> .....	<b>84</b>
<b>4.5. KOMPATİF Ct METODU İLE GEN EKSPRESYON ANALİZİ</b> .....	<b>88</b>
4.5.1 Relatif kantitasyon .....	88
4.5.2. Komparatif Ct (Threshold Siklus) Metodu .....	88
<b>5. TARTIŞMA</b> .....	<b>103</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b> .....	<b>109</b>
<b>7. KAYNAKLAR</b> .....	<b>111</b>
<b>8. ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>127</b>

## TABLULAR

<b>Tablo I</b>	PBS solüsyon hazırlığı.....	41
<b>Tablo II</b>	HepG2 Komplet DMEM Medyum Hazırlığı.....	42
<b>Tablo III</b>	Freeze medyum.....	42
<b>Tablo IV</b>	PBS solüsyon hazırlığı.....	45
<b>Tablo V</b>	MCF-7 RPMI 1640 Komplet Medyum Hazırlığı.....	46
<b>Tablo VI</b>	Freeze medyum.....	46
<b>Tablo VII</b>	HepG2 hücrelerinin Proliferasyon takibi için E-pleyt dizaynı	48
<b>Tablo VIII</b>	MCF-7 hücrelerinin Proliferasyon takibi için E-Pleyt dizaynı	49
<b>Tablo IX</b>	HepG2 hücreleri için 48 Well E-pleyt dizaynı .....	53
<b>Tablo X</b>	MCF-7 hücreleri için 48 Well E-pleyt dizayn .....	57
<b>Tablo XI</b>	HepG2 Hücre RNA İzolatları için pleyt dizaynı.....	59
<b>Tablo XII</b>	RNA izolasyon çalışma solüsyonlarının hazırlanması.....	59
<b>Tablo XIII</b>	MCF-7 Hücre RNA İzolatları için pleyt dizaynı .....	61
<b>Tablo XIV</b>	RNA izolasyon çalışma solüsyonları hazırlanması .....	62
<b>Tablo XV</b>	RNA izolasyon protokolü.....	63
<b>Tablo XVI</b>	RNA izolatlarından cDNA sentez protokolü.....	65
<b>Tablo XVII</b>	NdrG1 varyant1 primer dizaynı.....	67
<b>Tablo XVIII</b>	NdrG1 varyant2 primer dizaynı.....	68
<b>Tablo XIX</b>	GAPDH Q-PCR için Master Mix İçeriği .....	70
<b>Tablo XX</b>	NdrG1 Varyant1 Q-PCR için Master Mix İçeriği .....	71
<b>Tablo XXI</b>	NdrG1 Varyant2 Q-PCR için Master Mix İçeriği .....	72
<b>Tablo XXII</b>	HepG2 hücrelerinin RNA kantitasyonu .....	83
<b>Tablo XXIII</b>	MCF-7 hücrelerinin RNA kantitasyonu .....	84
<b>Tablo XXIV</b>	HepG2 ile yapılan PCR çalışmalarından elde edilen Ct değerleri .....	85
<b>Tablo XXV</b>	MCF-7 ile yapılan PCR çalışmalarından elde edilen Ct değerleri.....	86
<b>Tablo XXVI</b>	HepG2 hücrelerinde DFO uygulama sonrası REST analiz sonuçları .....	89
<b>Tablo XXVII</b>	HepG2 hücrelerine PHEN uygulama sonrası REST analiz	

	sonuçları .....	90
<b>Tablo XXVIII</b>	HepG2 hücrelerine TSA uygulama sonrası REST analiz sonuçları.....	91
<b>Tablo XXIX</b>	HepG2 hücrelerine TSA+DFO uygulama sonrası REST analiz sonuçları .....	92
<b>Tablo XXX</b>	HepG2 hücrelerine TSA+PHEN uygulama sonrası REST analiz sonuçları .....	93
<b>Tablo XXXI</b>	MCF-7 hücrelerine DFO uygulama sonrası REST analiz sonuçları .....	94
<b>Tablo XXXII</b>	MCF-7 hücrelerine PHEN uygulama sonrası REST analiz sonuçları.....	95
<b>Tablo XXXIII</b>	MCF-7 hücrelerine TSA uygulama sonrası REST analiz sonuçları.....	96
<b>Tablo XXXIV</b>	MCF-7 hücrelerine TSA+DFO uygulama sonrası REST analiz sonuçları.....	97
<b>Tablo XXXV</b>	MCF-7 hücrelerine TSA+PHEN uygulama sonrası REST analiz sonuçları .....	98
<b>Tablo XXXVI</b>	HepG2 hücrelerinde gen ekspresyonu analiz sonuçları.....	99
<b>Tablo XXXVII</b>	MCF-7 hücrelerinde gen ekspresyonu analiz sonuçları .....	101

## ŞEKİLLER

<b>Şekil 1</b>	NdrG1 gen lokalizasyonu .....	5
<b>Şekil 2</b>	NdrG1 protein yapısı .....	5
<b>Şekil 3</b>	NdrG protein homolojisi .....	6
<b>Şekil 4</b>	NdrG1 protein fosforilasyon bölgeleri .....	8
<b>Şekil 5</b>	NdrG1 transkripsiyonal regülasyonu .....	11
<b>Şekil 6</b>	PPARs/RXR Reseptör yolları .....	12
<b>Şekil 7</b>	DNA metilasyon bölgesi .....	13
<b>Şekil 8</b>	CpG adaları.....	13
<b>Şekil 9</b>	Histon asetilasyon .....	15
<b>Şekil 10</b>	Asetilasyon-Deasetilasyon .....	15
<b>Şekil 11</b>	P53 gen lokalizasyonu .....	17
<b>Şekil 12</b>	HIF-1 $\alpha$ transkripsiyon yolağı mekanizması .....	21
<b>Şekil 13</b>	PTEN gen lokalizasyonu .....	23
<b>Şekil 14</b>	PTEN NdrG1 ilişkisi .....	24
<b>Şekil 15</b>	Desferoksaminin açık formülü .....	25
<b>Şekil 16</b>	1,10 Phenanthroline açık formülü.....	26
<b>Şekil 17</b>	Trikostatin A açık formülü .....	26
<b>Şekil 18</b>	NdrG1 V1 5'UTR bölgeye ait yapı.....	36
<b>Şekil 19</b>	NdrG1 V2 5'UTR bölgeye ait yapı.....	37
<b>Şekil 20</b>	GAPDH primer-prob dizaynı .....	66
<b>Şekil 21</b>	NdrG1 Varyant1 primer-prob dizaynı .....	67
<b>Şekil 22</b>	NdrG1 5' UTR bölgesi ve primer dizaynı.....	68
<b>Şekil 23</b>	MCF-7 hücrelerinin 72 saatlik inkübasyon büyüme eğrileri.....	73
<b>Şekil 24</b>	HepG2 hücrelerinin 72 saatlik inkübasyon büyüme eğrileri.....	74
<b>Şekil 25</b>	MCF-7 hücrelerinde DFO uygulandıktan sonra ilk 24 saat proliferasyon ve canlılık real time hücre analiz grafiğı .....	75
<b>Şekil 26</b>	MCF-7 hücrelerinde DFO uygulandıktan sonra 48. saat proliferasyon ve canlılık real time hücre analiz grafiğı .....	75
<b>Şekil 27</b>	MCF-7 hücrelerinde DFO uygulandıktan sonra 72. saat proliferasyon ve canlılık real time hücre analiz grafiğı .....	76

<b>Şekil 28</b>	MCF-7 hücrelerinde DFO uygulandıktan sonra ilk 24, 48 ve 72. saatlerde hesaplanan IC <sub>50</sub> değerleri ve grafiği görülmektedir .....	76
<b>Şekil 29</b>	MCF-7 hücrelerine PHEN uygulamanın ardından ilk 24 saat proliferasyon ve canlılık real time hücre analiz grafiği .....	77
<b>Şekil 30</b>	MCF-7 hücrelerine PHEN uygulamanın ardından ilk 48 saat proliferasyon ve canlılık real time hücre analiz grafiği .....	77
<b>Şekil 31</b>	MCF-7 hücrelerine PHEN uygulamanın ardından ilk 72 saat proliferasyon ve canlılık real time hücre analiz grafiği .....	78
<b>Şekil 32</b>	MCF-7 hücrelerinde PHEN için 24, 48 ve 72. saatlerde hesaplanan IC <sub>50</sub> değerleri ve grafiği görülmektedir.....	79
<b>Şekil 33</b>	HepG2 hücrelerinde DFO uygulandıktan sonra 24. saat proliferasyon ve canlılık real time hücre analiz grafiği .....	80
<b>Şekil 34</b>	HepG2 hücrelerinde DFO uygulandıktan sonra 48. saat proliferasyon ve canlılık real time hücre analiz grafiği .....	80
<b>Şekil 35</b>	HepG2 hücrelerinde DFO uygulandıktan sonra 72. saat proliferasyon ve canlılık real time hücre analiz grafiği .....	81
<b>Şekil 36</b>	HepG2 hücrelerinde PHEN uygulandıktan sonra ilk 24 saat proliferasyon ve canlılık real time hücre analiz grafiği .....	82
<b>Şekil 37</b>	HepG2 hücrelerinde PHEN uygulandıktan sonra 48. saat proliferasyon ve canlılık real time hücre analiz grafiği .....	82
<b>Şekil 38</b>	HepG2 hücrelerinde DFO uygulandıktan sonra 72. saat proliferasyon ve canlılık real time hücre analiz grafiği .....	83
<b>Şekil 39</b>	HepG2 hücrelerine DFO uygulama sonrası REST analiz grafiği .....	90
<b>Şekil 40</b>	HepG2 hücrelerine PHEN uygulama sonrası REST analiz grafiği .....	91
<b>Şekil 41</b>	HepG2 hücrelerine TSA uygulama sonrası REST analiz grafiği .....	92
<b>Şekil 42</b>	HepG2 hücrelerine TSA+DFO uygulama sonrası REST analiz grafiği .	93
<b>Şekil 43</b>	HepG2 hücrelerine TSA+PHEN uygulama sonrası REST analiz grafiği	94
<b>Şekil 44</b>	MCF hücrelerine DFO uygulama sonrası REST analiz grafiği .....	95
<b>Şekil 45</b>	MCF hücrelerine PHEN uygulama sonrası REST analiz grafiği .....	96
<b>Şekil 46</b>	MCF hücrelerine TSA uygulama sonrası REST analiz grafiği .....	97
<b>Şekil 47</b>	MCF hücrelerine TSA+DFO uygulama sonrası REST analiz grafiği .....	98



<b>Şekil 48</b>	MCF hücrelerine TSA+PHEN uygulama sonrası REST analiz grafiği	99
<b>Şekil 49</b>	HepG2 REST analiz toplu sonuç grafiği .....	100
<b>Şekil 50</b>	MCF-7 REST analiz toplu sonuç grafiği .....	101
<b>Şekil 51</b>	HepG2 ve MCF-7 hücre kontrol gruplarının $\Delta C_t$ değerlerinin referans gene oranlanması sonucu oluşan Ndr1 V1 ve Ndr1 V2 değerleri grafiği .....	102

## 1. GİRİŞ

İnsan N-myc downstream-regulated gene1 (NdrG1) geni, NdrG gen ailesinin bir üyesi olup (Stafford ve ark., 2008; Thomas ve ark., 2008; Kurdistani, 1998) NdrG1 isimli proteini kodlar. NdrG1 geni hemen hemen tüm hücrelerde bulunmasına karşın, prostat, beyin, böbrek, plasenta, ovaryum, testisler ve intestinal hücrelerde daha yüksek seviyelerde eksprese edilir (Lachat ve ark., 2002). NdrG1 proteini % 47.8 sitozolde, % 26.1 nükleusta ve % 8.7 mitokondride eksprese edilir (Zhou ve ark., 2001; Lachat ve ark. 2002; Qu ve Ark., 2002). NdrG1 proteininin fonksiyonu tam olarak anlaşılmasına rağmen, hücre diferansiyasyonu (Taketomi ve ark., 2003; Guan ve ark., 2000), proliferasyon ve büyümenin baskılanması (Piquemal ve ark., 1999), neoplazi, tümör progresyonu ve metastaz (Van Belzen ve ark., 1997; Bandyopadhyay, 2004), ağır metallere cevap (Zhou ve ark., 1998; Salnikow ve ark., 2000), hipoksi cevabı (Salnikow ve ark., 2000; Salnikow ve ark., 2002) ve DNA hasar cevabı (Kurdistani, 1998) gibi çeşitli hücre içi olaylarda rol almaktadır. Özellikle prostat, kolon ve göğüs kanserlerinde metastazın baskılanmasında çok önemli bir role sahiptir (Stafford ve ark., 2008; Bandyopadhyay, 2004; Guan ve ark., 2000).

Gastrik kanserlerde NdrG1 ekspresyonunun histokimyasal analizinde, hastalar için kötü prognoz ile nükleer lokalizasyonun korele olduğu, nükleer translokasyonun hücre invazyon potansiyelini artırdığı öne sürülmüştür (Inagaki ve ark., 2009). Bazı dokularda sadece NdrG1 gen transkripsiyonu artarken protein seviyesinin artmadığı dolayısı ile transkripsiyonel ve translasyonel düzenlemelerin kompleks düzenleyici mekanizmalar içerdiği görülmektedir (Quandt ve ark., 1995).

NdrG1 prostat, kolon ve meme kanserlerinde downregüle olan metastaz supresör gen olarak bilinmektedir. İnsan kolon kanser hücrelerinin diferansiyasyonu indüklendiğinde NdrG1 gen ekspresyonu artmaktadır (Van Belzen ve ark., 1997). NdrG1 gen upregülasyonu çoğu tümörlerde büyüme hızını azaltırken, tam tersine karaciğer kanserlerinde yukarıda belirtilenin aksine NdrG1 geninin upregüle olduğu gözlenmiştir (Chua ve ark., 2007). Bu da NdrG1 geninin farklı kanser türlerinde farklı şekilde etkilendiğini göstermektedir.

Yaptığımız literatür araştırmalarında NdrG1 geninin 2 farklı mRNA'ya sahip olduğu (Varyant1: 3520 baz, Varyant2: 2123 Baz) ve bu farkın da en önemli nedeninin yaklaşık 397 bazlık 5'-UTR bölge olduğu anlaşılmıştır. Aynı proteini kodlamakla

birlikte neden 2 farklı mRNA varyantı olduğu konusunda literatürde doyurucu bir bilgiye rastlanmamıştır. Ayrıca kanser hücrelerinin her zaman aynı şartlar altında neden aynı tepkiyi vermediği ve gen ekspresyonu-translasyonu arasında her zaman paralellik olmaması da dikkatlerden kaçmamaktadır.

Farklı fizyolojik ve patolojik durumlar (hipoksi, hücre diferansiyasyonu, ağır metal, neoplazi gibi) sadece Ndr1 gen transkripsiyonunu değil aynı zamanda mRNA stabilitesini ve translasyonunu da etkilemektedir (Lachat ve ark 2002). Ndr1 geninin düzenlenmesinde farklı hücre tiplerinde farklı mekanizmalar rol alabilmektedir. Bu kompleks düzenlemeler, transkripsiyonel (HIF-1 $\alpha$ , Ni (II), p53, N-Myc, c-Myc, PPAR- $\gamma$ /RXR, DNA metilasyonu ve histon asetilasyonu gibi), posttranskripsiyonel ve translasyonel seviyelerdeki major yolları içerir (Guan ve ark., 2000; Kalaydjieva ve ark., 2000).

Demir, başta DNA sentezi olmak üzere birçok hücrel prosede önemli role sahiptir (Andrews, 1986, 1995, 1999; Kurdistani, 1998). DFO gibi Fe şelatörleri kullanılarak yapılan çalışmalarda Fe deprivasyonunun G1/S arresti yaptığı ve apoptoza yol açtığı görülmüştür (Kurdistani, 1998). Tümör hücreleri normal hücrelere göre Fe depleksiyonuna daha hassastır. Bunun sebebi de muhtemelen artmış Fe ihtiyacıdır (Larrick ve Cresswell, 1979; Trinder ve ark., 1996). Ayrıca neoplastik hücreler yüksek miktarda Fe-içeren enzim olan RR (Ribonükleotid Redüktazı) eksprese etmektedir. Bu enzimin rol aldığı reaksiyon DNA sentezi sırasında kritik hız sınırlayıcı basamaktır ve ayrıca şelatörlerin önemli bir moleküler hedefidir (Chaston ve ark., 2003, Hershko, 1994, Lovejoy ve Richardson, 2003 , Green ve ark., 2001).

Deferoksamin (DFO) ve heterosiklik bir bileşik olan 1,10-Fenantrolin (PHEN) serbest demiri güçlü bir şekilde bağlayarak vücuttan idrarla atılmasını sağlayan şelatör ajanlardır. Birçok in-vivo ve in-vitro çalışma yanında klinik denemeler, DFO ve diğer şelatörlerin etkili anti-tümör ajanlar olduğunu göstermiştir (Lovejoy ve Richardson, 2003; Chaston ve ark., 2003; Richardson, 1994; Richardson ve ark., 1994). DFO gibi şelatörler kullanılarak yapılan çalışmalarda bütün genler değerlendirildiğinde Ndr1 gen mRNA'sı upregüle olmuştur (Nghia ve Richardson, 2004). Fe'nin gen ekspresyonu ve proliferasyondaki rollerini değerlendirirken bu molekülün daha fazla incelenmesi gerektiği anlaşılmaktadır. Çünkü Ndr1 gen ekspresyonu ile metastazın ve tümör hücre

büyümesinin önemli ölçüde durdurulduğu gösterilmiş ancak çalışmalarda Ndr1 mRNA varyant farklılığı dikkate alınmamıştır.

Nükleozomun çekirdeğinde bulunan histonların yüzeyel kısımlarının N-terminal bölgelerindeki lizin kalıntıları asetilasyona ve deasetilasyona uğrar. Bu reaksiyonlar histon asetiltransferaz (HAT) ve histon deasetilaz (HDAC)'lar tarafından katalizlenir. Hiperasetilasyon sonrası nükleozomlar arası bağlantılar zayıflar, histon uçları DNA'yı sınırlamaz ve böylece transkripsiyon faktörleri DNA'ya bağlanabilir.

Birçok hücre tipinde butirat ve Trichostatin A (TSA) gibi HDAC inhibitörleri Ndr1 gen ekspresyonunu arttırarak hücre diferansiyasyonuna neden olmaktadır (Semenza and Wang, 1991). Yapılan çalışmalarda kanser hücrelerinde HDAC inhibitörleri ile Ndr1 gen ekspresyonunun indüklendiği görülmüştür (Guan ve ark., 2000). Ancak HDAC inhibitörlerinin Ndr1 gen varyantları üzerinde herhangi bir etkisinin olduğuna dair bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu bilgilerin ışığında, çalışmamızda; Ndr1-metastaz ilişkisi bakımından zıt davranış gösteren MCF-7 ve HepG2 hücrelerinde Ndr1 varyantlarının gen ekspresyonlarında bir farklılığın olup olmadığı ve demir şelatörleri olan DFO, PHEN ve HDAC inhibitörü olan TSA'nın bu varyantları nasıl etkileyeceğini göstermeyi amaçladık.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. NDRG1**

#### **2.1.1. Tarihçe**

N-myc downstream-regulated gene1, mutasyonu demiyelinizan nöropatiyle ilişkilendirilen ve insan kromozomunda 8q24'de (Kalaydjieva ve ark., 1996) lokalize edilen bir gen olarak tanımlanmıştır. NdrG1'in otozomal resesif geçişli ve Schwann hücre işlevlerini etkileyen bir bozuklukla bağlantılı olduğu düşünülmüştür. Hastalık ilk olguların bulunduğu yer olan kasabaya ithafen hereditör motor ve duyuşal nöropati-Lom (HMSNL) olarak isimlendirilmiştir ki; bu hastalık önceden Charcot-Marie-Tooth (CMT) sendromu olarak bilinmekteydi (Kalaydjieva ve ark., 1998; Okuda ve ark., 2004).

#### **2.1.2. NdrG1 gen**

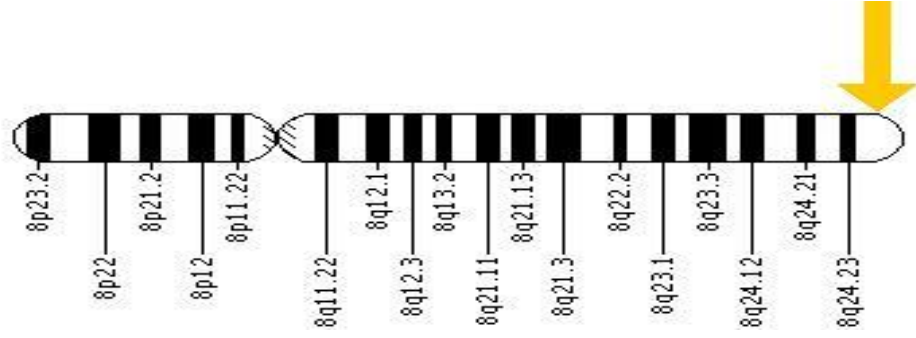
NdrG1, HMSNL ile ilişkili olarak tanımlanmış ise de; Charcot-Marie-Tooth hastalığı 4D tipinin moleküler etiyojijisindeki spesifik rolüne rağmen, son zamanlarda tümör progresyonunun bir göstergesi ve hücreşel diferansiyasyonun tetikleyicisi olarak görölmektedir (Thomas ve ark., 2008). Bu nedenle NdrG1 geni; prostat, kolon ve meme kanserlerinde downregüle olan metastaz süpressör gen olarak bilinmektedir.

##### **2.1.2.1. Adlandırma**

NdrG1 geni daha önceleri DRG1, CAP43, CMT4D, GC4, HMSNL, NDR1, NMSL, PROXY1, RIT42, RTP, TARG1, TDD5 olarak da isimlendirilmiştir. Bu çalışmada NdrG1 olarak bahsedilecektir. Çünkü son toplanan gen adlandırma konsorsiyumu bu terminolojinin kullanılmasını kararlaştırmıştır.

##### **2.1.2.2. Lokalizasyon**

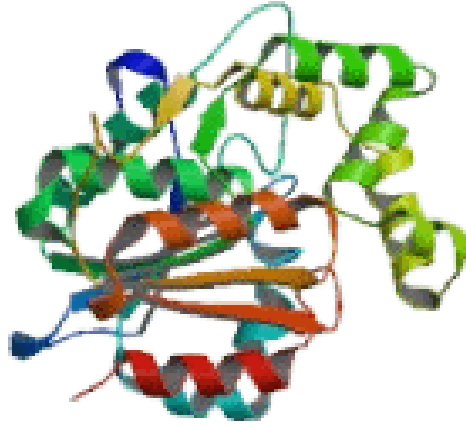
NdrG1 geni, insanda 8q24.3 (Şekil 1) kromozom bölgesinde haritalanır. 134, 249, 413 ile 134, 309, 546 baz çifti arasında yer alır. 60.085 baz çiftinden oluşun ve 16 ekzon bölgesi içeren gen yaklaşık 3 kb mRNA kodlar.



**Şekil 1:** NdrG1 gen lokalizasyonu (U.S. National Library of Medicine® Reviewed January 2010 ).

### 2.1.3 NdrG1 Proteinini

NdrG1 proteini, NdrG protein ailesinin 43 kDa ağırlığındaki bir üyesidir. 394 aminoasitten oluşur ve  $\alpha/\beta$  hidrolaz üst ailesi içerisinde yer alır.  $\alpha/\beta$  hidrolaz üst ailesi içerisinde yer almasına rağmen hidrolitik katalitik bir bölgeye sahip değildir. Çok hücreli organizmalarda yüksek oranda bulunur ve hücrel stres sinyallerine yanıt olarak eksprese edilir (Kurdistani, 1998). (Şekil 2)

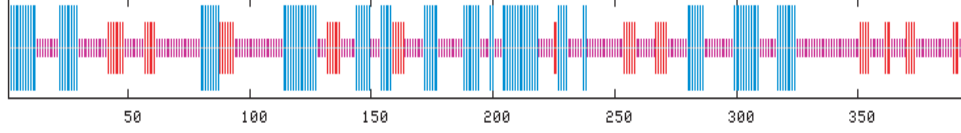


**Şekil 2:** NdrG1 protein yapısı (www.uscnk.com/directory/N-myc-Downstream-Regulated-Gene-1.2011)

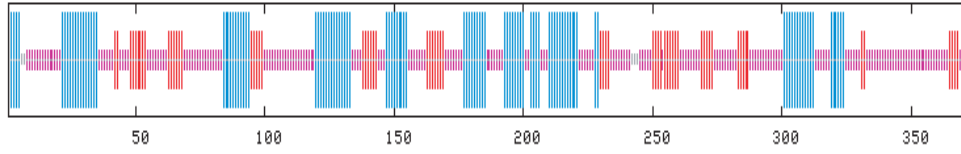
#### 2.1.3.1. NdrG1 protein ailesi ve homoloji

Bu ailenin diğer üyeleri NdrG2, NdrG3 ve NdrG4, NdrG1'e homologtur ve NdrG1 proteininin aminoasit sekansı NdrG2 ile %53, NdrG3 ile %62, NdrG4 ile %62 oranında homoloji göstermektedir (Zhang ve ark., 2006) (Şekil 3).

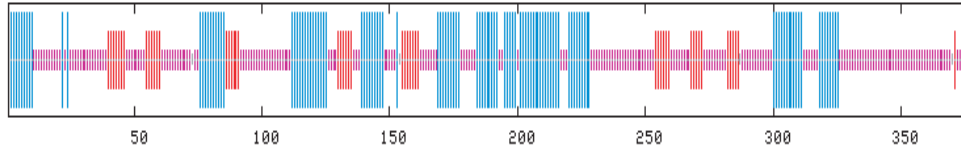
Ndrg1.



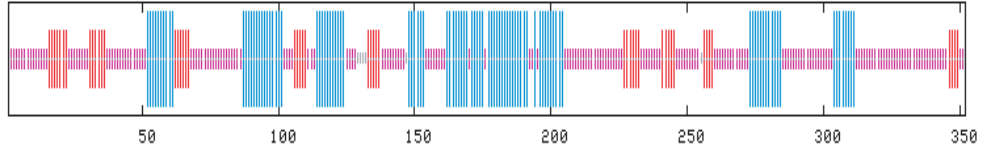
Ndrg2



Ndrg3.



Nrg4.



**Şekil 3:** Ndrg protein homolojisi ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=%20/NPSA/npsa\\_server.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=%20/NPSA/npsa_server.html),2010)

Ndrg1'in C terminal kuyruğunda bulunan GTRRSHTSE sekansının üçlü tekrarları ailenin diğer üyelerinde bulunmaz. Bu tekrarların işlevi henüz ortaya konmamıştır. Her ne kadar Ndrg protein ailesi belirli aminoasit sekanslarını paylaşıyorlar da işlevsel peptid örüntüleri henüz keşfedilmemiştir. N-Myc viral onkogeni C terminal bölgesinde heliks-halka-heliks lösün fermuar alanı aracılığıyla Max alt ailesinin proteinleriyle beraber heterodimerler oluşturarak işlev gören bir transkripsiyon faktörüdür. Bu işlev 'E-kutu' (Perini ve ark., 2005) olarak bilinen CACGTG DNA konsensus sekansının tanınması aracılığıyla gen promoterlerine heterodimerik bağlanma tarafından takip edilir ve bu DNA bağlanma bölgesi aynı zamanda C terminal

bölgesinde de yer alır. N ucu proteinin birçok işlevi için gerekli olan iki myc kutusu (MB(Myc-binding proteins)I ve MBII) içerir (Oster ve ark., 2002), merkezde MBIII bulunur ve hücre transformasyonu ve apoptozda görev alır. Apoptoz indüksiyonu, G2 ve transformasyon duraklamasında görev alan MBIV de merkezde yer alır ve bu işlevler DNA bağlanma aktivitesini yansıtır (Cowling ve ark., 2006).

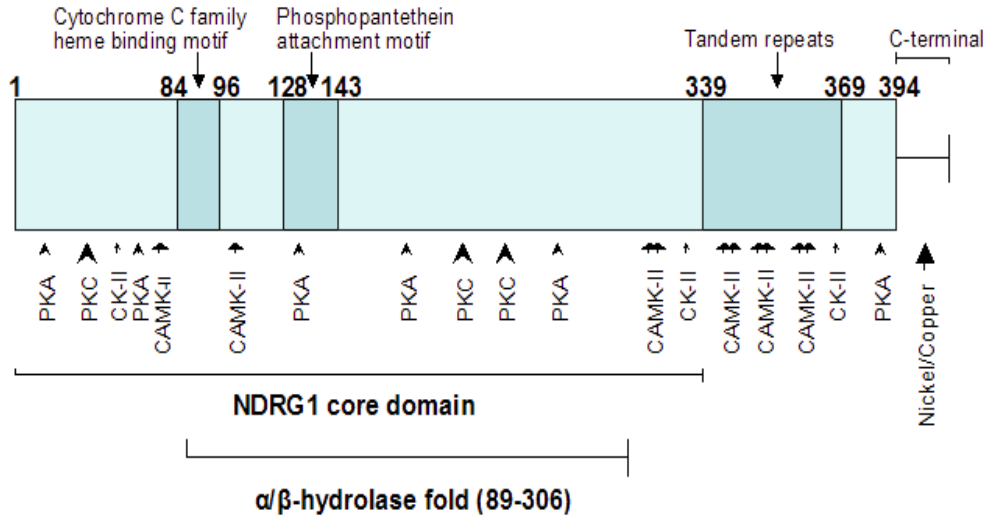
### **2.1.3.2. Ndrg1 proteinin doku ve hücre dağılımı**

Ndrg2 erişkin iskelet kası ve beyinde, Ndrg3 beyin ve testiste, Ndrg4 kalp ve beyinde eksprese edilirken, Ndrg1 proteini hemen hemen tüm hücrelerde bulunur ancak prostat, beyin, böbrek, plasenta, ovaryum, testisler ve intestinal hücrelerde daha yüksek seviyelerde eksprese edilir (Lachat ve ark 2002). Bu da her birinin dokuya özgü işlevi olduğunu düşündürmektedir. Bu proteinlerin her biri insan lizozomal asit lipazına benzer şekilde bir  $\alpha/\beta$  hidrolaz katlantısı içerir (Qu ve ark., 2002). Ndrg1 % 47.8 sitozolde, % 26.1 nükleusta ve % 8.7 mitokondride, düşük miktarlarda da vakuollerde, plazma membranında ve peroksizomlarda eksprese edilir (Zaklina ve Richardson, 2006; Qu ve ark., 2002 ).

### **2.1.3.3. Ndrg1 protein fosforilasyon bölgeleri**

Ndrg1 yediden fazla fosforilasyon bölgesine sahiptir ve bunların arasında fosfopantetein, protein kinaz C (PKC), kazein kinaz II (KC-II), tirozin kinaz, protein kinaz A (PKA) ve kalmodulin kinaz II (CAMK-II) bağlanma bölgeleri bulunur (Kokame ve ark 1996). (Şekil 4) Bu fosforilasyon bölgelerinin varlığından dolayı, Ndrg1 proteininin fonksiyonlarının en azından bir kısmının fosforilasyon ile kontrol edilebileceği düşünülmektedir (Guan ve ark., 2000).





Şekil 4: NdrG1 protein fosforilasyon bölgeleri (Agarwala KL ve ark., 2000).

#### 2.1.3.4. NdrG1 gen ve protein fonksiyonu

NdrG1 geni, tüm vücut hücrelerinde aktiftir fakat yüksek oranda özelleşmiş Schwann hücrelerinde aktivitesi daha fazladır. Schwann hücreleri sinir hücrelerini destekler, korur ve özellikle sinir impulslarının iletimini sağlar. Schwann hücreleri aynı zamanda miyelin üretir. NdrG1 proteini sinir aksonlarının hayatiyeti, Schwann hücre diferansiasyonu, miyelinin sürdürülmesi ve sinyal iletimi için gereklidir (Okuda ve ark., 2004). Herediter motor ve sensori nöropatilerde NdrG1 gen mutasyonu olduğu gösterilmiştir (Kalaydjieva ve ark., 2000). Bu gen hücrel transformasyonda baskılanır fakat genin upregüle olması büyümeyi baskılar ve diferansiasyonu artırır. Hücrel stres oluşturan hipoksik durumlar (Park ve ark., 2000), retinoik asit (Piquemal ve ark., 1999), androjenler (Agarwala ve ark., 2000) ve nikel bileşikler (Zhou ve ark., 1998) NdrG1 genini upregüle eder.

NdrG1 geni; prostat, kolon ve meme kanserlerinde downregüle olan metastaz süpressör gen olarak bilinmektedir. İnsan kolon kanser hücrelerinin diferansiasyonu indüklendiğinde NdrG1 gen ekspresyonu artmaktadır (Van ve ark., 1997). NdrG1 gen upregülasyonu tümör büyüme hızını azaltmaktadır. Farelerde yapılan bir çalışmada, NdrG1 ekspresyonundaki artışın prostat kanser hücrelerinin akciğerlere metastazını önlediği gösterilmiştir (Le ve Richardson, 2004). Buna karşılık özellikle karaciğer kanserlerinde yukarıda belirtilen kanserlerin tersine NdrG1'in upregüle olduğu gözlenmiştir (Chua ve ark., 2007). Bu da NdrG1 geninin farklı kanser türlerinde farklı şekilde etkilendiğini göstermektedir.

Ndr1 geni, fonksiyonu iyi anlaşılmamış olan Ndr1 protein yapımını sağlar. Ndr1 proteini hücre büyümesinin durdurulmasında, hücre matürasyonunda ve diferansiasyonunda rol almaktadır. Muhtemelen bu görevi, hücrelerin nükleusu ve diğer bölümleri arasında sinyal iletiminde rol alarak sağlamaktadır. Ndr1 proteini aynı zamanda organizmada yağların dağılımına yardımcı olan proteinler gibi diğer proteinlerle de etkileşim gösterir (U.S. National Library of Medicine® Reviewed January 2010 ).

Ndr1 proteini ile ilgili birçok değişik hücrel stres yanıt mekanizması öne sürülmüştür. Fonksiyonu tam olarak anlaşılamamasına rağmen, hücre diferansiyasyonu (Taketomi ve ark., 2003; Guan ve ark., 2000), proliferasyon ve büyümenin baskılanması (Piquemal ve ark., 1999), neoplazi, tümör progresyonu ve metastaz (Van ve ark., 1997; Bandyopadhyay, 2004), ağır metallere cevap (Zhou ve ark., 1998; Salnikow ve ark., 2000), hipoksi cevabı (Salnikow ve ark., 2000; Salnikow ve ark., 2002) ve DNA hasar cevabı (Kurdistani, 1998) gibi çeşitli hücre içi olaylarda rol almaktadır.

Farklı fizyolojik ve patolojik durumlar (hipoksi, hücre diferansiyasyonu, ağır metal, neoplazi gibi) sadece Ndr1 gen transkripsiyonunu değil aynı zamanda mRNA stabilitesini ve translasyonunu da etkilemektedir (Lachat ve ark., 2002).

## **2.2. NDRG1 HASTALIK İLİŞKİSİ**

### **2.2.1. Ndr1-HNSNL**

Hereditör motor ve duyuşal nöropati, genetik olarak heterojen bir hastalıktır. Bu hastalık, demiyelinizan (CMT1, CMT3 ve CMT4) ve aksonal form (CMT2) olarak sınıflandırılmıştır (Berger ve ark., 202). Ndr1 geni ile ilgili olan durum ise, CMT hastalığı tip 4D olarak sınıflanmıştır (CMT 4D). Buna karşın diğer tiplerin Ndr1 gen ile ilişkili olmadığı saptanmıştır. Klinik olarak sınıflanan bütün bu periferik sinir sistemi bozuklukları çeşitli genomik lokasyonlarda haritalanmıştır (Kalaydjieva ve ark., 1998; Berger ve ark., 2002).

Hastalığın belirtileri periferik sinir sistemiyle sınırlıdır. Ndr1 proteini Schwann hücre sitoplazmasında bolca eksprese edilirken, miyelin kılıflar veya aksonlarda eksprese edilmediği ve Ndr1<sup>-/-</sup> farelerde ve insanlarda demiyelinizasyonla beraber nöral doku dejenerasyonunun periferik sinirlere sınırlı kaldığı gösterilmiştir (Okuda ve ark., 2004). Periferik sinirlerde Ndr1 gen ekspresyon düzeyi, incelenen diğer dokulardan çok daha fazla bulunmuştur (Kalaydjieva ve ark., 2000).

Bununla beraber miyelinopatiler ve aksonopatilerin patolojileri sıklıkla birbirine benzer çünkü ikisi de birbiriyle ilişkili hücre tipleri olan Schwann hücreleri ve nöronların hastalıklarıdır. Bu farklı hastalık sınıfları otomozal dominant demiyelinizan (CMT1), otozomal resesif demiyelinizan (CMT4), primer aksonal nöropatiler (CMT2: otozomal dominant veya resesif) ve Dejerine-Sottas sendromunu da içeren (CMT3) hipodemyelinizan veya dismiyelinizan patolojilere, basınç felçlerine yatkınlık nöropatileri veya konjenital hipomiyelinizasyonla beraber herediter nöropatiler olarak daha ileri sınıflamaya tabi tutulmuştur. İnsanlarda demiyelinizan formlar aksonal formlardan daha sık görülmektedir.

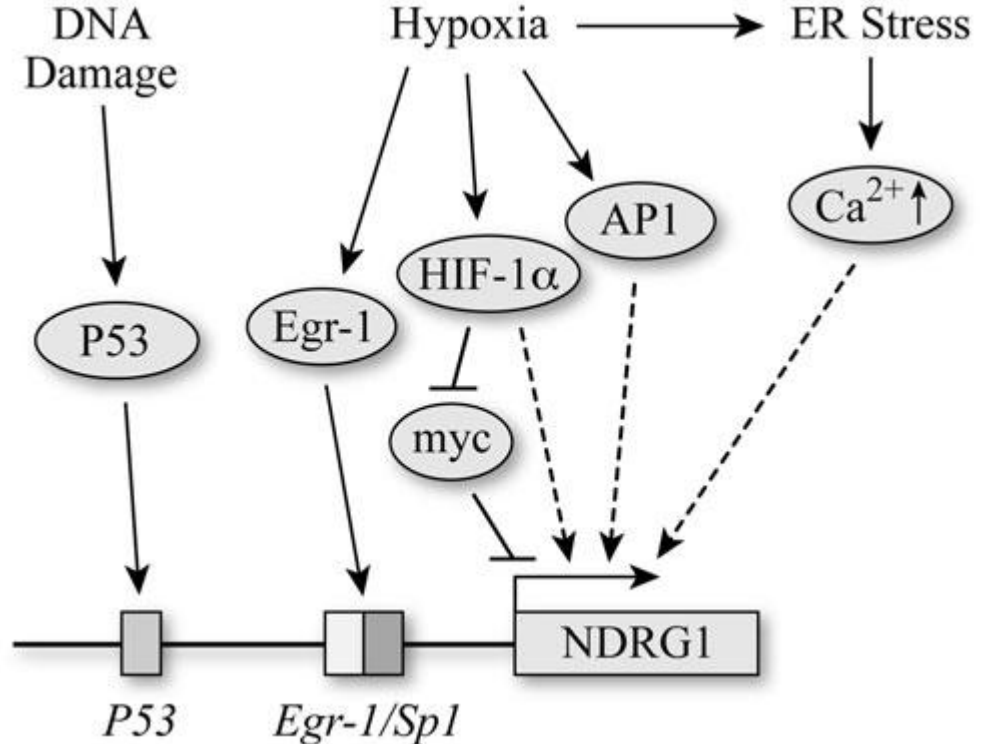
CMT4D klinik fenotipi, yaşamın ilk onyılında duruş bozukluğu olarak başlayan ve ikinci onyılıda üst ekstremitayı etkileyen ve birçok vakada üçüncü onyılıda sensorinöral sağırlıkla ortaya çıkan bir nöropati ile karakterizedir. Demiyelinizan nöropati olarak sınıflanmasının sebebi motor sinir ileti hızında şiddetli azalma ve sinir biyopsilerinde görülen demiyelinizasyondur (Kalaydjieva ve ark., 1998). Tüm hastalarda alt ekstremita güçsüzlüğü görülür ve sıklıkla kas erimesiyle ilişkilidir.

HMSNL mutasyonunun sebebi ekson 7, nükleotid pozisyonu 564'te arginin yerine translasyon sonlandırma sinyalinin geçmesiyle sonuçlanan bir C'den T'ye transizyondur ve Ndr1 gen kodonu pozisyon 148'de bir mutasyon ortaya çıkararak (Lachat ve ark 2002) Ndr1 proteininin kısa kalmasına sebep olur. R148X mutasyonu etkilenen tüm HMSNL (CMT4D) bireylerinde homozigot konumda bulunur. Mutasyon, haplotip analizleriyle tahmin edilen taşıyıcı durumlarıyla %100 uyum içindedir.

### **2.3. NDRG1 KANSER İLİŞKİSİ**

### **2.4. NDRG1 GEN DÜZENLENMESİ (TRANSKRİPSİYONEL REGÜLASYON)**

Ndr1 gen düzenlenmesinde farklı hücre tiplerinde farklı mekanizmalar rol alır. Bu kompleks düzenlemeler, transkripsiyonel (HIF-1 $\alpha$ , Ni (II), p53, N-Myc, c-Myc, PPAR- $\gamma$ /RXR, DNA metilasyonu ve histon asetilasyonu gibi), posttranskripsiyonel ve translasyonel seviyelerdeki major yolları içerir (Guan ve ark., 2000; Kalaydjieva ve ark., 2000). (Şekil: 5)



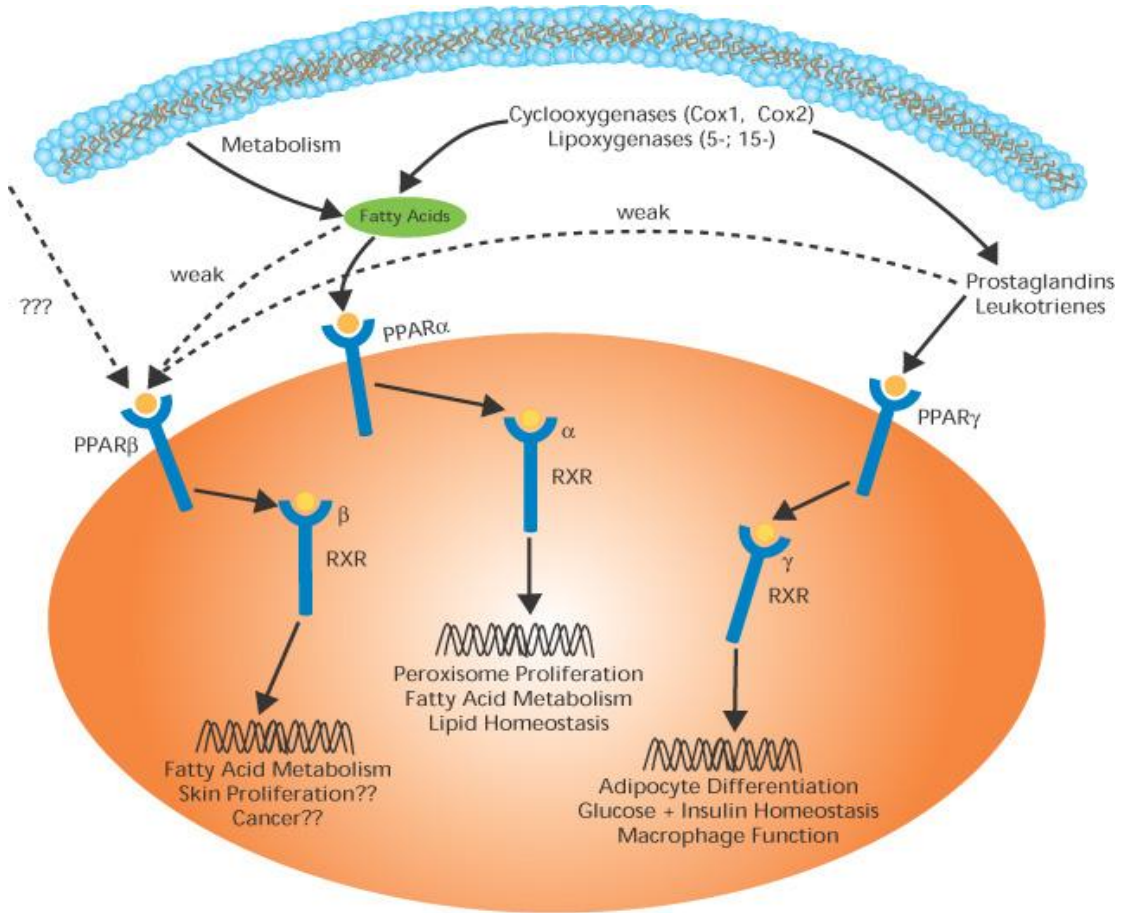
Şekil 5: NdrG1 transkripsiyonal regülasyonu (Thomas P. ve Ark., 2008 )

#### 2.4.1. PPAR $\gamma$ /RXR yolağı

NdrG1 gen düzenlenmesinin transkripsiyon aşamasında rolü olan yollardan birisi PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator activated receptor- $\gamma$ )/RXR (retinoid X receptor) yolağıdır. PPAR $\gamma$ /RXR reseptörleri, retinoik asit, vitamin D, tiroit hormonu ve steroid hormon reseptörlerini de içine alan nükleer reseptör üst ailesinin bir üyesidir (Mangelsdorf ve ark., 1995). Bu nükleer reseptörün üç izotipi mevcuttur. Bunlar PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$  ve PPAR $\delta$  (aynı zamanda  $\beta$  olarak adlandırılır)'dır ve farklı genler tarafından kodlanırlar. PPAR $\alpha$  peroksisom proliferatör (PP) cevaptan sorumlu iken, PPAR $\gamma$  direk olarak peroksisomlar ve peroksisom proliferasyonu ile ilgili olmayıp, adipogenez ve diferansiasyon ile ilişkilidir. PPARs 9-cis RXR ile heterodimerizedir ve hedef gen promoter bölgesindeki PP respons element (PPRE)'e bağlanarak transkripsiyonel aktiviteyi başlatırlar (Chao ve ark., 2000). Birçok invitro çalışma ve hayvan modellerinde doğal ve sentetik ajanların PPAR $\gamma$ 'yı aktive ederek kanser hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir. PPAR $\gamma$ ; akciğer, kolon, mesane ve prostat gibi birçok kanser tipinde apoptoz ve proliferasyonun düzenlenmesinde rol oynar. Bu ajanlar etkilerini hem PPAR $\gamma$ 'ya bağımlı mekanizmalarla hem de bağımsız mekanizmalarla gösterebilmektedir (Papers, Volume 18: 237-244, 2007).

Sentetik antidiyabetik ilaç olan troglitazon gibi ilaçlar ve linoleik asit gibi poliansatüre yağ asitleri PPAR $\gamma$ 'nın ligantlarıdır (Lehmann ve ark., 1995; Lehmann ve ark., 1997). PPAR $\gamma$  diğer nükleer hormon reseptörlerine benzer şekilde fonksiyon yaparlar (Fajas ve ark., 2001; Qi ve ark., 2000 ). Ligantlar PPAR $\gamma$ 'a bağlanınca, PPAR $\gamma$  RXR ile heterodimerik kompleks oluşturur ve transkripsiyonu düzenler. (Şekil 6)

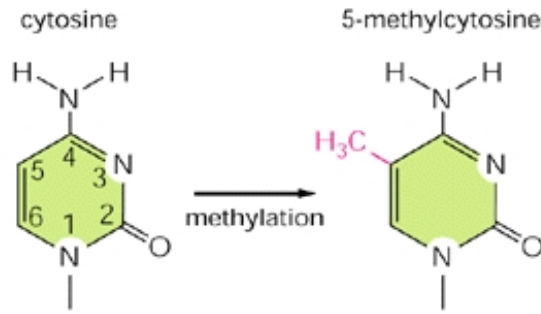
Adipoziter ve kolonik epitelyal hücre diferansiasyonunun kontrolünde PPAR $\gamma$ /RXR kompleksinin transkripsiyonel faktör olarak rol aldığı ve Ndr $g1$  genini upregüle ettiği öne sürülmektedir (Mueller, 1989; Tontonoz ve ark., 1997). Bu mekanizmalar antikanser tedavide yeni yaklaşımlar ortaya koymaktadır (Papers, Volume 18: 237-244, 2007).



Şekil 6: PPARs/RXR Reseptör yolları (Fajas L. ve ark., 2001)

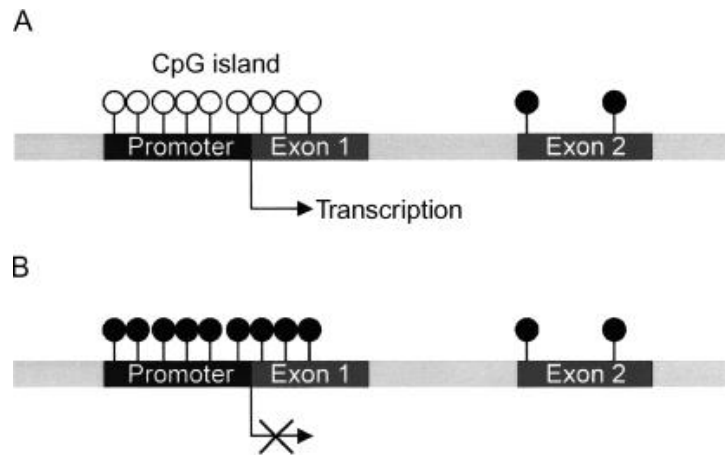
### 2.4.2. DNA metilasyon yolağı

Epigenetik kontrol tümör metastazının baskılanmasında önemli mekanizmalardan birisidir (Esteller, 2005). DNA metilasyonu, DNA metiltransferazlar tarafından gerçekleştirilen enzimatik bir modifikasyondur. Bir CpG dinükleotidindeki sitozinin 5. karbonundaki yapıya metil grubu eklenmesini ifade eder (Şekil 7).



Şekil 7: DNA metilasyon bölgesi (Bruce Alberts ve ark., 1994)

DNA metilasyonu, insanlarda ve pek çok memelide bilinen tek doğal DNA modifikasyonudur ve yalnızca Guanozin (G) tarafından takip edilen Sitozin (C) bazını etkiler. Böylelikle, bu organizmalarda, DNA metilasyonu CpG alanlarında gözlenir (Şekil 8).

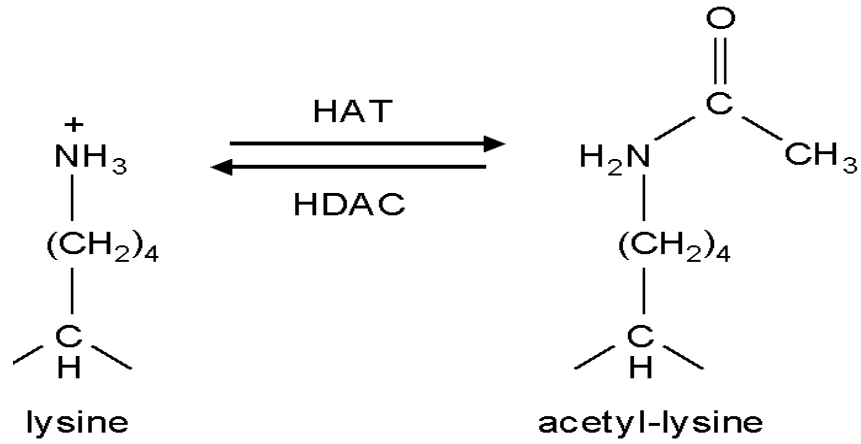


Şekil 8: CpG adaları

Tümör metastazı; primer tümör hücrelerinin ilgili organ sınırına veya organ sınırını da geçerek farklı organlara doğru göçünü ve göç ettiği yerde kolonize olmasını ifade eder (Welch, Biochem Cell Biol, 2008; Columbus ve ark., 2010). Genellikle metastazın, anormal epigenetik regülasyon (Chiang ve Massagu, 2010) ve metastaz supressör (Welch, Biochem Cell Biol, 2008) gen gibi genlerde DNA tamir mekanizmasının inaktivasyonu sonucunda oluştuğu kabul edilmektedir. Ndrgr1 geni metastaz supresyonunda önemli bir role sahiptir (Welch, Int J Biochem Cell Biol, 2008; Bandyopadhyay, 2004; Guan ve ark., 2000). DNA metilasyon inhibisyonu ve histon asitilasyon aktivasyonu Ndrgr1 gen aktivasyonunu artırmaktadır. Böylelikle Ndrgr1 gen düzenlenmesinde epigenetik kontrolün rolü olabileceği gösterilmiştir (Guan ve ark., 2000). DNA metilasyonunun AZA (5-aza-2'-deoxycytidine (5-AZA-CdR, decitabine) tarafından inhibisyonu, kolon kanserlerini de içine alan birçok hücre tipinde diferansiasyonu indüklemektedir (Jones ve Taylor, 1980). İki kolon kanser hücre serisinde, primer kolon kanser hücre serisi SW480 ve lenf nodu-uzak organ metastazı olan metastatik kolon kanser hücre serisi SW620'de yapılan bir çalışmada, SW620 hücre hattında Ndrgr1 geninin sessizleştirildiği tesbit edilmiştir (Qian ve Hong, 2011). İnsan Ndrgr1 promoter bölgesinde CpG adaları bulunduğu varsayılır. DNA metilasyonu AZA ile inhibe edildiği zaman, SW620 hücrelerinde Ndrgr1 gen ekspresyonu önemli derecede artmıştır. SW620 hücrelerindeki Ndrgr1 genindeki bu sessizleştirme tamamıyla promoter bölgedeki metilasyona bağlı değildir (Qian ve Hong, 2011). Ndrgr1'in promoter bölgesinde çok sayıda CpG adalarının bulunması nedeniyle Ndrgr1 gen ekspresyonunun DNA metilasyonu ile baskılanabileceği düşünülmüş, ancak Ndrgr1 gen ekspresyonunun düzenlenmesinde DNA metilasyonunun parsiyel olarak rol alabileceği gösterilmiştir (Guan ve ark., 2000). Bu sonuçlar Ndrgr1 gen kontrolünde başka mekanizmaların da olabileceğini göstermektedir.

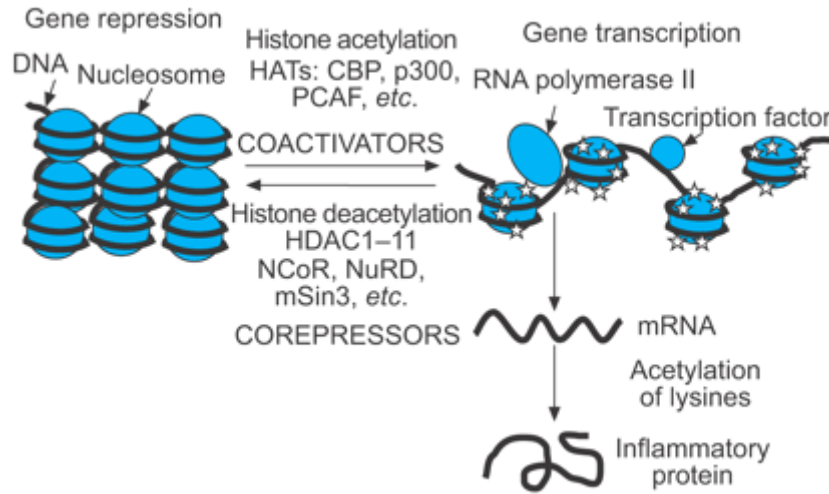
#### **2.4.3. Histon Asetilasyon-Deasetilasyon Yolağı**

Nükleozomun çekirdeğinde bulunan histonların yüzeyel kısımlarının N-terminal bölgelerindeki lizin kalıntıları asetilasyona ve deasetilasyona uğrarlar (Şekil 9). Bu reaksiyonlar histon asetiltransferaz (HAT) ve histone deasetilaz (HDAC)'lar tarafından katalizlenir. Asetilasyonda Asetil Koenzim A'dan Lizin kalıntısına asetil transferi yapılır ve deasetilasyonda ise asetil grubu Koenzim A'ya transfer edilir.



**Şekil 9:** Histon asetilasyon (Mole. Cell. Biology, 2005)

Asetilasyon pozitif yüklü lizin rezidülerini nötralize eder ve Histon uçları ile yapısal proteinler arasındaki bağlantıları destabilizasyona uğratar. Hipoasetilasyonda nükleozomlar arası güçlü bağlar varken, hiperasetilasyon sonrası nükleozomlar arası bağlantılar zayıflar, histon uçları DNA'yı sınırlamaz ve transkripsiyon faktörleri DNA'ya bağlanabilir (Şekil 10).



**Şekil 10:** Asetilasyon-Deasetilasyon (P.J. Barnes ve ark., 2005)

PaCa (pancreatic carcinoma) hücrelerinin AZA ve TSA ile muamelesi sonucunda NdrG1 protein ekspresyonunun artması NdrG1 geninin epigenetik düzenlenmesinin asetilasyon ve deasetilasyon ile de olabileceği ihtimalini göstermiştir (Angst ve ark., 2010). Transkripsiyonel düzenlemede, histon asetilasyonunun önemli role sahip olduğu yapılan birtakım çalışmalar ile tesbit edilmiştir (Semenza ve Wang,

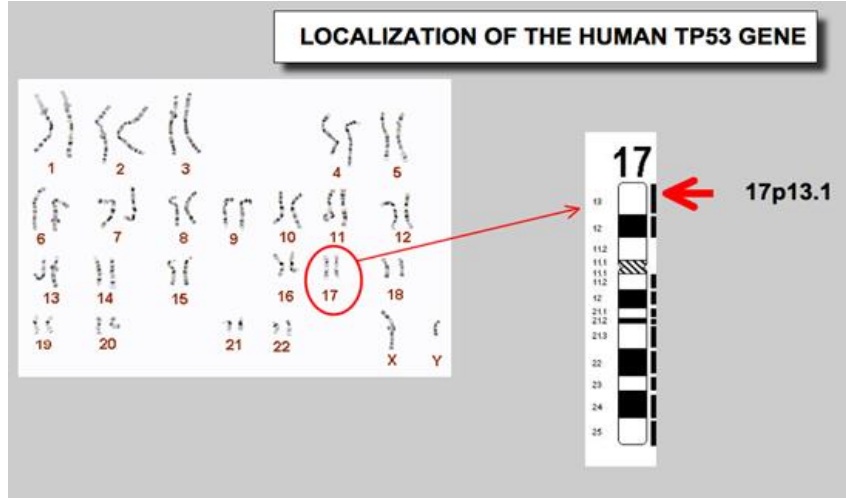


1991). Birçok hücre tipinde butirat ve TSA gibi histon deasetilaz inhibitörleri Ndr1 gen ekspresyonunu arttırarak hücre diferansiyasyonuna neden olmaktadır (Semenza ve Wang, 1991). TSA'nın Ndr1 mRNA seviyesinde değişiklik yapmaksızın Ndr1 protein miktarını arttırdığı gösterilmiştir (Semenza ve Wang, 1991). TSA, c-myc'nin Ndr1 gen promoter bölgesinde yaptığı baskılamayı azaltmaktadır ve bu azaltmada histon deasetilazların inhibisyonunun rolü olduğu düşünülmektedir.

Ndr1 geni iyi diferansiye pankreas hücrelerinde eksprese edilirken, kötü diferansiye pankreas hücrelerinde eksprese edilmemektedir (Angst ve ark., 2006). Pankreas kanser hücreleri büyümeyi inhibe eden ve hücreyi ölüme götüren yollardan başarılı bir şekilde kaçmaktadır (Hamacher ve ark., 2008). Bu kaçış yollarından bir tanesi de kanser hücrelerinin epigenetik düzenlemeyle, tümör süpresör genini sessizleştirmesidir (Park ve ark., 2008). Bu epigenetik düzenleme promoter bölgedeki CpG adalarının hipermetilasyonu ve-veya transkripsiyonel baskılanmaya yol açan postranslasyonel histon modifikasyonu aracılığı ile yapılmaktadır (Park ve ark., 2008). Diğer yandan HDAC inhibitörleri kolon kanser hücre hatlarında Ndr1 gen ekspresyonunu arttırmaktadır (Guan ve ark., 2000). Farelerin embriyonik hücre hatlarında yapılan bir başka çalışmada ise HDAC inhibitörü olan TSA'nın, Ndr1 genini baskılayan N-myc/Max'ın baskılayıcı etkisini ortadan kaldırarak dolaylı bir yolla Ndr1 gen ekspresyonunu arttırdığını gösterilmiştir (Shimono ve ark., 1999). Orta derecede diferansiye pankreas kanser hücre hattı olan HPAF-II hücreleri TSA ve AZA ile muamele edilmiş ve Ndr1 ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir. Histon deasetilaz inhibitörü olan TSA ve DNA metilasyon inhibitörü olan AZA birlikte kullanıldıklarında sinerjistik etki göstermektedirler. Böylece pankreas kanser hücreleri, kolon kanser hücreleri ve diğer birçok hücre hattında epigenetik düzenlemenin Ndr1 gen düzenlenmesinde rol alabileceği gösterilmiştir (Angst ve ark., 2010). Bu bulgular, gen düzenlenmesinde, hücre büyümesinde ve hücre diferansiyasyonunda DNA metilasyonu ve histon asetilasyonunun birlikte anahtar bir rol oynayabileceğini göstermekle birlikte tüm mekanizmayı yeterince izah etmemekte ve gen düzenlenmesinde başka mekanizmaların da olabileceğini düşündürmektedir (Guan ve ark., 2000).

#### **2.4.4. P53 yolağı**

22000 bp den oluşan P53 geni 17'inci kromozomun kısa kolunda bulunur. 11 exon bölgesi içeren gen 2.2 Kb mRNA'yı kodlar (Şekil 11).



**Şekil 11:** P53 gen lokalizasyonu (the database of p53)

P53 geni ilk kez 1979 yılında iki ayrı grup olan Lane-Crawford ve Linzer-Levine tarafından SV40 tümör virüsünün onco proteini (Large T antijen) ile kompleks yapan bir protein olarak tanımlanmıştır.

1980 lerde birçok p53 cDNA klonları tanımlanmış ve bunlar Ras onkojeni ile kombine edilince hücreleri transforme edebildiği gösterilmiş (Eliyahu ve ark., 1984) ve bundan dolayı p53 onkogen olarak tanımlanmıştır.

Son yıllarda transforme edilen p53 cDNA klonlarının mutasyonlu olduğu anlaşılmış ve wild tip cDNA klonları onkojenlerle kombine edilince hücrelerin transformasyonun engellendiği görülmüştür (Finlay ve ark., 1989). Fare tümörlerinde (Ben-David ve Ark., 1998), insan hücre kültürlerinde (Wolf ve ark., 1985) ve insan kolon kanserinde (Baker, 1989) p53 alellerinde mutasyonlar tesbit edilmiş ve bu çalışmalar ışığında wild tip p53 tümör süpresör olarak sınıflanmıştır.

Tümör süpresör gen olan p53'ün, Ndr1 gen ekspresyonunun düzenmesinde rol aldığı ve Ndr1'in ekspresyonunu artırdığı öne sürülmüştür (Kurdistani, 1998; Stein S. ve ark., 2004). Kolon kanser hücre hattı olan DLD-1 hücrelerinde p53 indüksiyonunu takiben Ndr1'in upregüle olduğu ve p53 bağımlı apoptosiz için gerekli genlerden birinin Ndr1 olduğu gösterilmiştir (Stein ve ark., 2004). Ndr1 ekspresyonunun DNA hasarlayıcı ajanlar tarafından artırılmasının, p53 bağımlı olabileceği ifade edilmektedir (Kurdistani, 1998; Stein ve ark., 2004). Mutant p53 bulunduran SK-N-MC hücreleri (insan nöroblastoma hücre hattı) kullanılarak yapılan bir çalışmada, DFO ve 2-hydroxy-

naphthylaldehyde isonicotinoyl hydrazone ile inkübasyon sonrasında Ndrgl mRNA seviyeleri artmıştır. Bu sonuç Ndrgl upregülasyonunun p53 bağımsız mekanizma ile de gerçekleşebileceğini göstermektedir (Bandyopadhyay, 2004; Le ve Richardson, 2004).

Ndrgl geninin proksimal promoterinde bir p53 bağlanma bölgesi bulunmuştur (Stein ve ark., 2004). Bağlanma elementi bulunmadığında p53 aracılı transkripsiyonel aktivasyon belirgin olarak azalmaktadır. p53 tümör baskılayıcı işlevleri arasında hücre döngüsünü durdurabilme ve apoptoz yeteneği bulunmaktadır. p53 ile indüklenen Ndrgl gen ekspresyonunun hücre proliferasyonunu baskıladığını fakat metastatik akciğer kanseri hücrelerinde apoptotik bir etkisi olmadığını gösterilmiştir (Stein ve ark., 2004 ). Bu da Ndrgl'in metastatik tümör hücrelerinde hücre büyümesinin baskılanmasında Ndrgl'geninin rol aldığını düşündürmektedir.

Metastatik hücre serilerinde Ndrgl geni ektopik p53 ekspresyonu tarafından indüklenmezken (H1299-p53) non-metastatik hücre serilerinde indüklenebilir (DLD-1-p53, HCT116p53+/+). Bu verilerin kombinasyonu Ndrgl'in metastatik ve non-metastatik hücrelerde farklı görevler üstlendiğini düşündürmektedir. Ndrgl, metastatik H1299 Ndrgl hücre serisinde hücre büyümesi ve proliferasyonunu baskımlarken non-metastatik DLD-1- Ndrgl hücre serisinde bir etki göstermemektedir (Stein ve ark., 2004). Her ne kadar nonmetastatik hücrelerde p53'ün Ndrgl'i düzenlediği gösterilmişse de, Ndrgl geni metastatik hücrelerde p53'ten bağımsız olarak intraselüler kalsiyumun artışıyla da düzenlenebilir (Stein ve ark., 2004; Salnikow ve ark., 1999). Üstelik Ndrgl ekspresyonunun susturulması p53 aracılı apoptozu ortadan kaldırır, bu da Ndrgl'in hücre düzenlenmesinin muhtelif yollarında görev aldığını düşündürür.

#### **2.4.5. c-Myc, N-myc yolağı**

Ndrgl'in isim babası,olan nöroblastoma kaynaklı miyelomatoz (N-myc), tıpkı c-Myc gibi Ndrgl promoterindeki bağlanma bölgesinden bağımsız olarak, histon deasetilaz aracılı bir mekanizmayla Ndrgl'genini baskılar (Shimono ve ark., 1999 ). Ndrgl2 aynı zamanda Myc tarafından Ndrgl2 çekirdek promoter bölgesiyle Miz-1 bağımlı bir etkileşim ile transkripsiyonel olarak baskılanır ve muhtemelen promoter ile bir histon deasetilazın etkileşimini gerektirir (Zhang ve ark., 2006). Myc tarafından düzenlenmesi Ndrgl'nin hücre diferansiyasyonundaki rolünü göstermektedir.

Fare Ndrgl geninin proksimal promoter bölgesinde E-kutusuyla kısmen homolog bir sekans bulunmuş olsa da mutasyon araştırmaları Ndrgl promoterine N-

Myc bağlanması düzenleme mekanizmalarıyla ilişkisiz olduğunu göstermiştir (Shimono ve ark., 1999). Birçok hedef genin E-kutucu heterodimer bağlanmaya uygun c-Myc tarafından aktive edildiği gösterilmiştir (Tsuneoka ve ark., tarih?) fakat diğer araştırmalarda genlerin Myc aracılı supresyonunun her zaman Myc proteinin DNA'ya doğrudan bağlanması aracılığıyla olmadığı (Ndr1 de olduğu gibi) bulunmuştur (Shimono ve ark., 1999). Yani genel olarak DNA'ya E-kutucu elementlerinde Myc/Max heterodimer doğrudan bağlanması gen aktive edici bir olayın parçasıyken (Ndr2 represyonu ise bu kurala bir istisnadır) (Zhang J ve ark., 2006), Myc aracılı transkripsiyonel represyon (Ndr1'de olduğu gibi) hedef genin proksimal promotörüne Myc doğrudan bağlanmasının olmadığı bir mekanizma ile gerçekleşmektedir (Shimono ve ark., 1999).

Myc ekspresyonunun düzenlenmesi birçok insan kanserinde bozulur ve sıklıkla agresif ve az diferansiyasyonla tümörlerle ilişkilendirilir. Myc proteini hücre büyümesi ve proliferasyonunda, hücre döngüsü progresyonunda, transkripsiyonda, telomeraz aktivitesinde, hücre metabolizmasında, diferansiyasyonunda, apoptozda, anjiogenezde ve hücre motilitesinde anahtar düzenleyici role sahiptir. Düzenleme bozulduğunda genomik instabilite, kontrolsüz proliferasyon, büyüme faktörü bağımsızlığı, immün sağkalım sonlanması, transformasyon ve apoptoz ortaya çıkabilir (Vita ve ark., 2006). c-Myc onkoprotein transkriptom kompozisyonu üzerinde geniş bir etkisi vardır. c-Myc hem transkripsiyonun genel bir düzenleyicisi hem de hücre döngüsü regülasyonu, metabolizması, ribozom biyogenezini, protein sentezi ve mitokondriyal işlevi düzenleyen spesifik düzenleyici grupların bir üyesi gibi davranır. Henriksson ve ark tarafından c-Myc hedef gen ağının sineklerden insanlara tüm genlerin %15'ini oluşturduğu öne sürülmüştür. Bununla beraber fizyolojik olsun, tümörojenik olsun c-Myc hedefleri olarak negatif etkili genlerin kategorizasyonu tamamlanmamıştır (Henriksson ve ark., 1996).

Spesifik Myc hedefleri için kanıtların yetersizliğine rağmen fare embriyonik gelişiminde N-Myc/c-Myc azalmasını takiben Ndr1 mRNA'sının biriktiği ve N-Myc eksikliği olan embriyolarda Ndr1 ekspresyonunun belirgin olarak arttığı bilinmektedir (Shimono ve ark., 1999). İn vitro koşullarda Ndr1 represyonu için mekanizmanın genel transkripsiyon üzerindeki negatif etki olduğu öne sürülmüştür (Shimono ve ark., 1999).

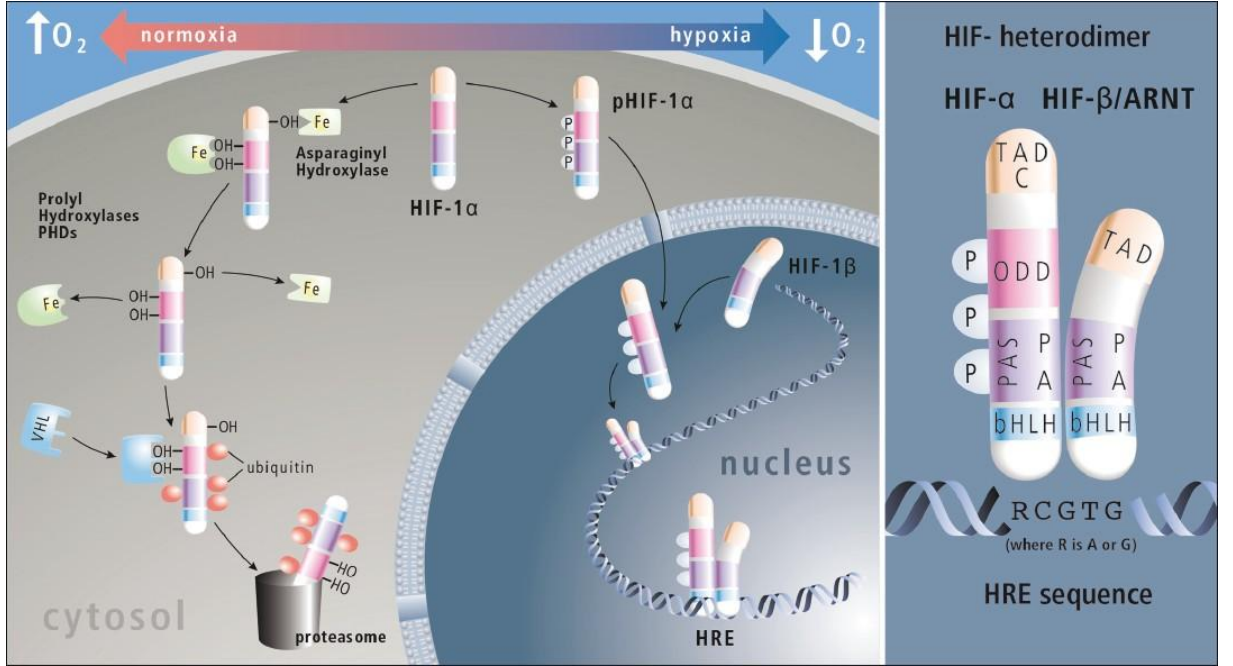
İnsan lösemi hücre hatlarında (HL-60 ve U937) yapılan bir çalışmada hem Neuroblastoma-derived myelocytomatosis, hem de myelocytomatosis onkogeninin doğrudan Ndr1 promoter bölgesine bağlanarak Ndr1 gen ekspresyonunu downregüle ettiği ve Ndr1 ekspresyonu ile N-myc ve c-myc arasında zıt bir ilişki olduğu gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2008). Ayrıca aynı çalışmada, Ndr1 geninin promoter bölgesinin myc tarafından transkripsiyonel baskılanma sürecinde histondeasetilazların aktivitesinin sıklıkla gerekli olabileceği bildirilmiştir (Zhang ve ark.,2008). Bu baskılanma sürecinde, c-myc ile histondeasetilazların kompleks meydana getirip Ndr1 geninin promoter bölgesine bağlanarak gen ekspresyonunu baskıladığı ifade edilmektedir.

#### **2.4.6. HIF-1 $\alpha$ yolağı**

HIF-1, hipoksi ile ortaya çıkan transkripsiyon faktörüdür (Salnikow ve ark., 2000) ve heterodimerik ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) özelliğe sahiptir. Hücrelerin hipoksiye adaptasyonunu sağlar. Posthipoksik hücrelerde yarı ömrü 5 dakikadan azdır.

HIF-1 $\alpha$  826 aa'lık polipeptitten oluşur ve hipoksik hücrelerde eksprese edilir (Semenza ve Wang, 1992). Amino-terminal uç 2 domaine sahiptir. Bazik heliks-loop-heliks domain (bHLH) ve PAS ( Per-AHR-ARNT-Sim) domain. Bu domainler heterodimerizasyon ve DNA'ya bağlanmayı sağlar. Karboksi-terminal uç bölgede de 2 domaine sahiptir. TAD N ve TAD C koaktivatörlerle (CBP, p300) etkileşmeyi sağlar. DNA'da HRE (hipoksi respons element) içinde 5'-RCGTG-3' sekansına bağlanır ( Green, 2004).

Prolil hidroksilaz HIF-1 $\alpha$ 'nın Von Hippel-Lindau (VHL) proteinine bağlanmasını sağlar. Bu protein Ubiquitin E3 ligazı aktive eder ve bu da HIF-1 $\alpha$  degradasyonuna yolaçar. Hipoksi veya demir eksikliğinde veya her ikisinin eksikliğinde prolil hidroksilaz fonksiyonu başarısız olur. HIF-1 $\alpha$  hücrede sitoplazmada birikir. Sitoplazmada biriken HIF-1 $\alpha$  nükleusa geçer ve HIF-1 $\beta$  ile kompleks oluşur. Bu kompleks hedef genlerin promoter bölgesinde bulunan Hypoxia response element (HREs)'e bağlanarak çok sayıda genin regülasyonunda rol oynayabilir (Şekil 12).



**Şekil 12:** HIF-1 $\alpha$  transkripsiyon yolağı mekanizması (Louise Østergaard ve Max Gassmann, 2011)

Hipoksik şartlarda inkübasyon sonrası *Nrdg1* upregulasyonunda HIF-1 $\alpha$  transkripsiyon faktörünün rol aldığı öne sürülmüştür (Salnikow ve ark., 2000). Ancak Masuda ve arkadaşları *Nrdg1* gen promoter bölgesinin -1122 baz çiftine kadar HRE bulunmadığını öne sürmüşlerdir (Masuda ve ark., 2003). Promoter analiz programı (Genomatix Suite 3.0) kullanılarak yapılan analizde, promoter up-stream -1376 ve -7503'de varsayılan HREs tanımlanmıştır (Le ve Richardson, 2004). Bu bulgu etkili *Nrdg1* transaktivasyonunda HIF-1 $\alpha$  'nın transkripsiyonel enhanser olarak rol alabileceğini göstermektedir. İlginç olarak HIF-1 $\alpha$  için bu enhanserin rolü hipoksi sonrası eritropoetin geni için de bildirilmiştir (Semenza ve ark., 1991). *Nrdg1* upregulasyonunda HIF-1 $\alpha$ 'in rolünü doğrudan incelemek için Richardson D.R. ve arkadaşları HIF-1 $\alpha$ -KO (HIF-1 $\alpha$ <sup>-/-</sup>) mürin embriyo fibroblast (MEFs) hücrelerini elde etmişlerdir (Le ve Richardson, 2004). Ryan H.E. ve arkadaşlarının yapmış olduğu daha önceki çalışmalarda bu hücrelerin Wild-tip HIF-1 $\alpha$  proteinini eksprese etmediğini göstermiştir (Li ve ark., 1996; Ryan ve ark., 2000). Richardson D.R. ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada ise Wild-tip veya HIF-1 $\alpha$ -KO MEFs hücreleri DFO (250  $\mu$ M) ve 311 (25 $\mu$ M) ve hipoksi (0.5-5 O<sub>2</sub>) ile 8 saat inkübasyona maruz bırakmışlar ve daha sonra *Nrdg1*, HIF-1 $\alpha$  ve VEGF-1 mRNA ekspresyonlarını değerlendirmişlerdir

(Le ve Richardson, 2004). Wild tip ( $HIF-1\alpha^{+/+}$ ) veya  $HIF-1\alpha$ -KO( $HIF-1\alpha^{-/-}$ ) hücrelerinin Fe şelatörleri ile inkübasyonu *Nrdg1* mRNA seviyelerini artırmıştır. Oysa *Nrdg1* up-regulasyon derecesi KO hücrelerinde wild-tip hücrelere göre daha düşük bulunmuştur. Aksine hipoksik koşullarda sadece wild-tip hücreleri *Nrdg1* ekspresyonlarını artırabilmiştir. Richardson D.R. ve arkadaşları KO hücrelerinde  $HIF-1\alpha$  yokluğunu doğrulamak için full-length transkripti amplifiye edecek primerleri dizayn etmişler ve uygun kontrol grubu ile mukayese edildiğinde hipoksi veya Fe şelatörleri ile inkübe edilen wild-tip MEFs hücrelerinde  $HIF-1\alpha$  mRNA ekspresyonlarının hafif arttığını görmüşlerdir (Le ve Richardson, 2004). Aksine  $HIF-1\alpha$ -KO hücrelerinde full length  $HIF-1\alpha$  transkriptlerine rastlanmamıştır. Ayrıca Fe şelasyonu ve  $O_2$  deprivasyonu sonrası  $HIF-1\alpha$ 'nın down-stream hedefi olan VEGF-1 ekspresyonunu da araştırmışlar ve  $HIF-1\alpha$ -KO hücrelerinde, Fe şelasyonu veya hipoksiyi takiben VEGF-1 ekspresyonunun artmadığını göstermişlerdir. Aksine Uygun kontrol grubu ile mukayese edildiğinde hipoksi veya Fe şelatörleri ile inkübe edilen wild-tip MEFs hücrelerinde VEGF-1 mRNA ekspresyonlarının anlamlı artışı ( $p<0,01$ ) gözlenmiştir. Nitekim VEGF-1 mRNA ekspresyonundan farklı olarak, *Nrdg1* transaktivasyonu  $HIF-1\alpha$  bağımlı ve bağımsız mekanizmalar ile gerçekleşmiştir (Le ve Richardson, 2004).

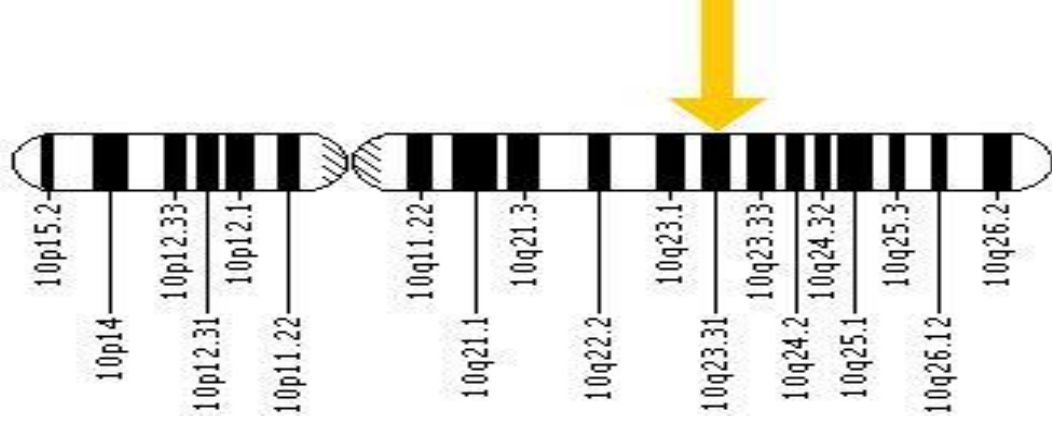
*Nrdg1* homosistein ve hipoksi tarafından upregüle edilen,  $HIF-1$  bağımlı ve bağımsız mekanizmalara sahip olan stres cevap gen olarak da tanımlanmıştır. Hipoksik şartlarda inkübasyon sonrası *Nrdg1* upregulasyonunda  $HIF-1\alpha$  transkripsiyon faktörünün rol aldığı öne sürülmüştür. *Nrdg1* transaktivasyonunda  $HIF-1\alpha$  'nın transkripsiyonel enhanser olarak rol alabileceğini göstermektedir (Le ve Richardson, 2004).

*Nrdg1* indüksiyonu hipoksiyle başlatılabilir ve  $HIF-1\alpha$  ile düzenlenebilir fakat *Nrdg1* geni aynı zamanda intraselüler  $Ca^{+2}$  artışıyla da  $HIF-1\alpha$ -bağımsız bir sinyal yolağı yardımıyla aktive edilebilir (Salnikow ve ark., 2002). Demir şelasyonu sonrası oluşan *Nrdg1* upregulasyonun  $HIF-1\alpha$  bağımlı ve bağımsız mekanizmalar tarafından düzenlendiği gösterilmiştir.

Hipoksik şartlarda inkübasyon sonrası *Nrdg1* upregulasyonunda  $HIF-1\alpha$  transkripsiyon faktörünün rol aldığı öne sürülmektedir. *Nrdg1* geninin promoter bölgesinde HRE bulunmaktadır. Bu bulgu bize *Nrdg1* transaktivasyonunda  $HIF-1\alpha$ 'nın transkripsiyonu uyarıcı rol alabileceğini göstermektedir (Le ve Richardson, 2004).

#### 2.4.7. PTEN-Ndr g1 yolağı

Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome Ten ( PTEN) 10q23.3 lokalizasyonunda yer alır ve 105.337 bp'den oluşur (Şekil 13).



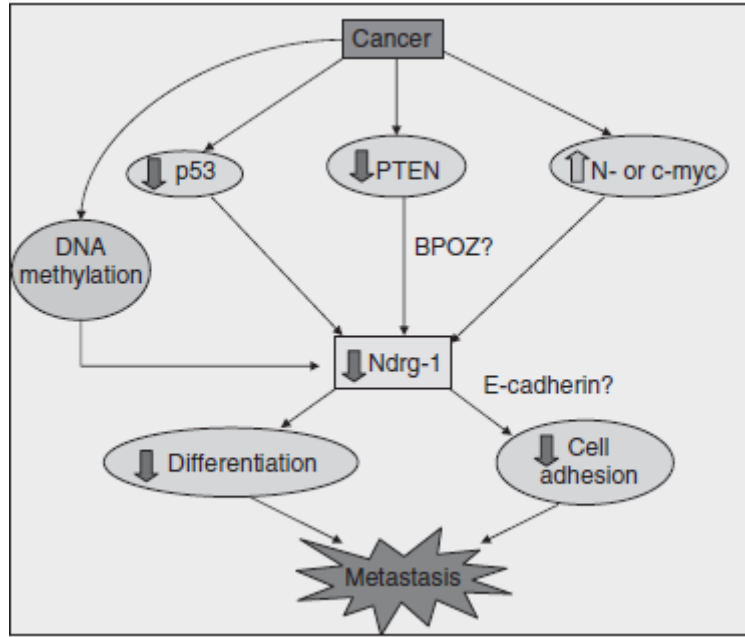
Şekil 13: PTEN'gen lokalizasyonu

PTEN geni prostat kanserini de içeren birçok kanser tipinde inaktivedir veya delesyona uğramıştır (Grunwald ve ark., 2002; Cantley ve Neel, 1999 ). PTEN gen kaybı veya delesyonu tümör oluşumunda %50 nin üzerinde rol oynar (Facher ve Law, 1998). Prostat kanser hücre serilerinde normal PTEN gen Re-ekspresyonu morfolojik değişikliğe (Sharrard ve Maitland, 2000 ) ve apoptoza yol açmıştır (Davies ve ark., 1999). Protein-protein etkileşimi, lokalizasyon ve posttranslasyonel modifikasyon gibi birçok faktör PTEN protein aktivitesini etkilemektedir (Bonifant ve Ark., 2007). Kötü diferansiye prostat tümörlerinde PTEN ve Ndr g1 geninin birlikte baskılandığı, oysa bu genlerin yüksek seviyedeki ekspresyonlarının artan yaşam süresi ile ilişkili olduğu tesbit edilmiştir (Bandyopadhyay, 2003, 2004).

PTEN gen inhibisyonu Ndr g1 ekspresyonunu baskımlarken, PTEN'gen nin overekspresyonu Ndr g1 gen ekspresyonu seviyesinin artışıyla sonuçlanmıştır (Bandyopadhyay, 2004). Ndr g1'in promoter bölgesinde PTEN'e ait bağlanma bölgesi bulunmamasına rağmen, bu etkisini BPOZ (Bood POZ containing gene type) sinyal yolağı aracılığı ile gösterdiği değerlendirilmiştir (Unoki ve Nakamura, 2001) (Şekil 14). İnvivo ve invitro çalışmalarda PTEN inaktivasyonu kanser hücrelerinde invazyon ve metastazı artırmıştır (Kovacevic ve ark., 2008). Sonuç olarak PTEN ve Ndr g1 gen



ekspresyonu birlikte yüksek seviyelerde bulunması prostat ve göğüs kanserlerinde daha iyi bir yaşam süresiyle korele olarak bulunmuştur (Bandyopadhyay, 2004).

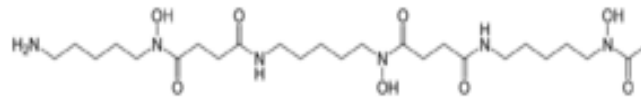


Şekil 14: PTEN Ndr-1 ilişkisi (Zaklina ve Richardson, 2006)

## 2.5. DEMİR ŞELATÖRLERİ

### 2.5.1. Desferoksamin

Desferoksamin (aynı zamanda Deferoksamin, desferioksamin B, desferokamine B, DFO-B, DFOA, DFB veya desferal olarak da bilinir) Aktinobakter sınıfından streptomyces pilosus tarafından üretilen ve serbest  $Fe^{3+}$ 'ü güçlü bir şekilde bağlayarak vücuttan idrarla atılmasını sağlayan şelatör bir ajandır (Miller ve Marvin, 1989).  $C_{25}H_{48}N_6O_8$  şeklinde kapalı kimyasal formüle ve  $560.684 \text{ g/mol}$  molekül ağırlığına sahiptir. Açık formülü aşağıdaki gibidir (Şekil 15)



Şekil 15: Desferoksaminin açık formülü

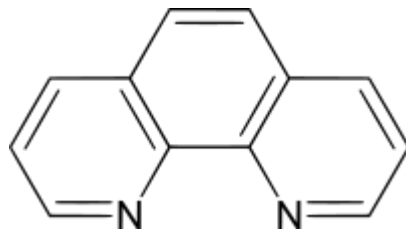
IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) isimlendirmesi: N'-{5-[acetyl(hydroxy)amino]pentyl}-N-[5-({4-[(5-aminopentyl)(hydroxy)amino]-4-oxobutanoyl}amino)pentyl]-N-hydroxysuccinamide'dir.

Başta karaciğer olmak üzere organ ve doku hasarına yolaçan fazla demiri azaltarak hasar önleyici rol oynar. DFO spesifik hücre tiplerinde inflamatuvar mediatörlerin salınımını (Choi ve ark., 2004) ve ekspresyonlarının düzenlenmesini (Lee ve ark., 2007) sağlayabilir.

Hücre proliferasyon ve apoptoz çalışmalarında sıklıkla kullanılan bir moleküldür. İn vivo ve in vitro çalışmalarda molekülün antiproliferatif etkilerini, damar düz kas hücrelerinde G<sub>1</sub> fazında arrest yaparak oluşturduğu gösterilmiştir (Porreca ve ark., 1994). Aynı zamanda p53'ü indüklediği gösterilmiştir (An ve ark., 1998). HL-60 hücrelerinde demir şelasyonu yapıldığında apoptoz indüklenmiştir (Fukuchi ve ark., 1994). Bu hücrelerin 1µM deferoksamin ile 48 saat muamelesi sonucunda DNA da fragmantasyon ortaya çıkmıştır. 0.1 µM deferoksamin ile 24 saatten daha az bir sürede apoptoz olduğu, 48 saat süreyle muamele sonucunda nükleer kollaps olduğu gözlenmiştir (Fukuchi ve ark., 1998; Chenoufi ve ark., 1998; Leardi ve ark 1998).

### 2.5.2. 1,10-Fenantrolin

Diğer bir demir şelatörü 1-10 Fenantrolin (PHEN) heterosiklik organik bir bileşiktir. Birçok metal iyonu ile güçlü kompleks yapar. Demir ile yaptığı kompleks [Fe(phen)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup>, "ferrion," Fe(II)'nin fotometrik yöntemle belirlenmesi için kullanılır (Belcher, R. 1973). Ferrion hücre biyolojisinde metalloproteazlar için gerekli olan permeabilitenin inhibisyonunu sağlar. C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub> şeklinde kapalı kimyasal formüle ve 180.21 g/mol molekül ağırlığına sahiptir. Açık formül aşağıda gösterilmiştir (Şekil 16) (Le ve Richardson, 2004)



1,10-phenanthroline

**Şekil 16:** 1,10 Phenanthroline açık formülü

1,10-fenantrolin metallopeptidazların inhibitörüdür. İlk olarak karboksipeptidaz A da gözlemlenerek rapor edilmiştir (Felber ve ark., 1962). Enzim inhibisyonu, katalitik aktivite için gerekli olan metal iyonunun şelesyonu ile oluşur. 1,10-fenantrolinin hedefleri başlıca çinko gerektiren metallopeptidazlardır (Salvesen ve GS Nagase, 2001).

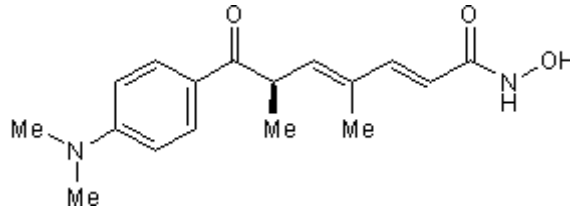
## 2.6. HDAC İNHİBİTÖRÜ

### 2.6.1. Trikostatın A

Trikostatın A (TSA), *Streptomyces hygroscopicus* tarafından üretilen antifungal antibiyotik bir ajan olup güçlü ve spesifik histon deasetilaz (HDAC) inhibitörüdür (Tsuji n. ve ark., 1976). HDAC Clas I ve HDAC Clas II enzimini inhibe eder. HDAC Clas III'ü inhibe etmez (Vanhaecke ve ark., 2004).

Kimyasal adı, (2E,4E,6R)-7-(4-(Dimethylamino) phenyl) -N-hydroxy-4, 6-dimethyl -7-oxo-2,4-heptadienamide dir.

Kimyasal formülü  $C_{17}H_{22}N_2O_3$ 'dir. Molekül ağırlığı 302.37 g/mol dür. Açık formülü aşağıda gösterilmiştir (Şekil 17).



Şekil 17: Trikostatın A açık formülü

Nükleozomun çekirdeğinde bulunan histonların yüzeyel kısımlarının N-terminal bölgelerindeki lizin kalıntıları asetilasyona ve deasetilasyona uğrar. Bu reaksiyonlar histon asetiltransferaz (HAT) ve HDAC'lar tarafından katalizlenir. Hiperasetilasyon sonrası nükleozomlar arası bağlantılar zayıflar, histon uçları DNA'yı sınırlamaz ve transkripsiyon faktörleri DNA'ya bağlanabilir. Birçok hücre tipinde butirat ve TSA gibi HDAC inhibitörleri Ndrgl gen ekspresyonunu arttırarak hücre diferansiyasyonuna neden olmaktadır (Semenza ve Wang, 1991).

## **2.7. DEMİR**

### **2.7.1. Yapısı**

Demir kimyasal bir element olup sembolü Fe (ferrum)'dir ve atomik numarası 26 dır.

### **2.7.2. Fonksiyonu**

Demir organizmada, esas olarak enerji metabolizmasında yer alır. Dokulara oksijen transportu, elektron transferi, DNA sentezi ve pek çok yaşamsal önemi olan enzimin yapı ve fonksiyonu için gereklidir. Kolaylıkla ferröz ( $Fe^{2+}$ ) ve fenik/ferrik ( $Fe^{3+}$ ) şeklinde değişebilen redoks kimyası ile insan varlığı demire bağımlıdır ve demir metabolizmasındaki değişiklikler insan sağlığını önemli şekilde etkilemektedir (Ponka, 1997; Ponka ve ark. 1998 ).

Demir fizyolojik olarak esansiyel fakat biyokimyasal olarak önemli bir elementtir. Organizmanın günlük demir ihtiyacı 8-10 mg kadardır. Diyetle alınan bu demirin yaklaşık olarak %10-15 kadarı emilmektedir. Bu miktar gebelik, emzirme ve adet dönemlerindeki kadınlarda biraz daha fazladır. Demirin aşırı alımı toksiktir, çünkü aşırı miktarda alınan iki değerli demir (ferros demir) vücuttaki peroksitlerle reaksiyona girerek serbest radikaller oluşturur. İnsan vücudu demirin emilimini çok sıkı kontrol eden bir mekanizmaya sahipse de vücuttan atılmasına ilişkin kısıtlı bir yetiye sahiptir. Dolayısıyla, alınan aşırı miktardaki demir, sindirim sisteminin tüm bölgelerindeki hücrelere zarar verebilir ve kan dolaşım sistemine girebilir. Kan dolaşımına giren demir, kalp, karaciğer ve diğer organların hücrelerine de zarar vermeye başlar ve bu da, uzun süreli organ hasarları veya aşırı dozdan ölümlere kadar gidebilir. Enfeksiyon hastalıkları, inflamatuvar olaylar, iskemi ve reperfüzyon yapan çok geniş spektrumlu patolojik olaylarda biyolojik olarak süperoksit oluşumu meydana gelir. Bir serbest radikal olan süperoksit ve hidrojen peroksit demirin serbest hale gelmesine yol açar. Demirin bunlarla reaksiyonu ile de çok daha güçlü serbest radikal olan hidroksil radikal ortaya çıkar (Fenton reaksiyonu) (McCord, Hematology 35: 1,5-12, 1998). Bu hidroksil radikal tüm biyolojik makromolekülleri etkiler. Polisakkaritleri depolimerize eder, DNA kırıklarına yol açar, enzimleri inaktive eder ve lipid peroksidasyonunu başlatır. Lipid peroksidasyonu, serbest demirle geometrik olarak çoğalır ve çok önemli patolojik durumlara neden olur. İskemik kalp hastalıkları, maligniteler, nörodejeneratif hastalıklar (Parkinson, Alzheimer) ile organizmada serbest demirin yol açtığı oksijen radikalleri

arasında yakın ilgi olduğunu gösteren çalışmalar vardır (McCord, Hematology 35: 1,5-12, 1998). Özellikle demirden zengin beslenen ülkelerde hemokromatosis gen sıklığının da %10-13 gibi beklenmeyen şekilde yüksek bulunuşu hemokromatosisli olguların semptomatik hale gelme riskini artırdığı düşüncesini gündeme getirmiştir (Ervvards ve ark., 1998). Demirden fakir beslenen ülkelerdeki insanlar ve vegeteryanlarda hemokromatosisin az görülmesi belki de geni taşıyan kişilerde koruyucu olmaktadır (Andrevvs ve Bridgens, 1998). Demir, yaşayan canlılar için eksikliği de fazlalığı da önemli sorunlara yol açan esansiyel bir elementtir. Son yıllarda demir emiliminin moleküler kontrolü, demir transportu ve hücrenel demir alımı ile ilgili çok geniş araştırmalar ve buluşlar olmakla birlikte halen tam bilinmeyen bazı noktalar bulunmaktadır.

### **2.7.3. Demir Emilimi ve Dağılımı**

Vücut demir depoları, diyetle alınan ve gastrointestinal, üriner sistem ve derideki hücrelerin yıkımı ile atılan demir arasında sabit bir denge sağlar. Hergün ortalama 1 mg demir atılmakta ve bu atılan miktar kadar demir diyetle sağlanmaktadır. Hızlı büyüme dönemlerinde vücut kitlesinde artış nedeniyle bu miktar yeterli olmaz. Demiri organizmadan günde 1 mg'dan fazla atacak bir sistem yoktur ve vücut demir depolarının dengesi esas olarak demir emilimindeki düzenle sağlanmaktadır (Ponka ve ark., 1998). İnsolubl ve serbest halde iken potansiyel toksisitesi nedeniyle demiri solubl halde tutacak, tehlikesizce bağlayıp taşıyacak ve depolayacak özgül mekanizmalar ve proteinler vardır (Ponka ve ark. 1998 ). Emilim yeri duodenum ve üst jejunum olan demirin organizmada, farklı fonksiyonlara yönelen farklı formlarının hücrelere giriş için seçtiği yolların farklı olduğu gösterilmiştir (Umbereit ve ark., 1998).

Diyette demir; Hem demiri ve çeşitli demir tuzu kompleksleri halinde bulunur. Bitkisel kaynaklı demir, metalloproteinler şeklinde, solüble demir ve fitat gibi kullanılabilirliğini engelleyen çeşitli şelat edici bileşiklerle birlikte dir. Hayvansal kaynaklı demir ya hem ya da ferritin, hemosiderin ve ferrik sitrat gibi non hem demiri şeklindedir (Ervvards ve ark., 1998; Andrevvs ve Bridgens, 1998; Umbereit ve ark., 1998). Ferröz demir, ferrik demirden daha iyi emilir.

#### 2.7.4. Demir Metabolizması

Protein ve karbonhidrat kompleksleri ile alınan demir, mide ve duodenumun asit pH'sında sindirilir, demir tuzları şeklinde ayrılır. Çoğu diyet demiri ferrik demir şeklindedir. Duodenuma transferde gastrik sıvılar nötralize edilir ve lümendeki pH artar.  $Fe^{3+}$  tuzları uygun şelatörler yoksa (askorbat, sitrat, organik asitler, amino asitler) insoluble hale gelir. Bu şelatörler ferrik demiri solüble halde tutar. Burada fitatlar, okzalatlara, karbonatlar, fosfatlar ve tannatlar, demirle irreversible şelatlar yaparak emilimi engellerler (Umbreit ve ark., 1998). Mukozal yüzeyde, uygun şelatörlerle solüble halde tutulan ferrik demir, onu gene solüble halde tutacak musine transfer edilir. Transferrinin diyet demirinin emiliminde rolü olmadığı, çünkü duodenal epitel hücrelerinin emici yüzeyinde transferrin reseptörü olmadığı gösterilmiştir. Bu yüzeyde demiri solüble halde tutan müsindir. Müsine şelasyon, çinko, manganez, kobalt ve kurşun gibi mtlallerle kompetitif olarak inhibe edilir. Kalsiyumla inhibisyon, emici hücrenin bu yüzeyinde değil, plazmaya geçiş kısmındadır. Bu metaller demirden farklı integrinleri kullandığı için, demirle zenginleştirilmiş diyetle bunların eksikliği görülmemektedir (Umbreit ve ark., 1998).

#### 2.8. FERRİTİN

Ferritin hücre içinde fonksiyonu olmayan demiri depolar ve intrasellüler olarak detoksifiye eder. Demir önce lümeden mukozal integrinlere transfer olur.  $Fe^{3+}$   $\beta_3$  integrinle alınır.  $\beta_3$  integrin ile intestinal hücreye alınan demir sitoplazmik demir bağlayıcı proteinler olan, mobilferrin (monomerik) ve paraferritin (multipolipeptit) transfer edilir. Paraferritin; mobilferrin-integrin-flavinmonooksijenaz kompleksidir. Paraferritin bir ferriredüktazdır ve demirin demir içeren proteinlere girmesini ve kullanılmasını sağlar. Paraferritin ile bağlanıp ve  $Fe^{2+}$  şekline redükte edilen demir, sitoplazmada taşınır ve mitokondriye transfer edilir, intestinal emici hücrede de ferritin sentezi vardır ve fazlası burada depolanır. Absortif bazolateral membranında klasik hücrelerin halotransferrin (apo) reseptörü vardır. Organizmanın demir durumuna göre transferrine devredilir ve demir plazmaya geçerek taşınır. Transferrinle hücrelere taşınan demir, hücrede transferrin reseptörleri ile alınıp sitokromlar, hemoglobin ve non-proteinlerinin sentezi için kullanılır (Umbreit ve ark., 1998). Demirin hücrede mitokondriyal bir enzim olan ferroşelataza nasıl taşındığı halen tam bilinmiyor.

Mitokondriyal ferroşelataz demiri porfirin halkasına ve hem sentezine katar (Ponka ve ark. 1998; Umbereit ve ark., 1998).

İntestinal demir alımı; organizmanın demir ihtiyacına göre, bir transferrin reseptör analogu olan mobilferrin-integrin yolu ile sağlanır. İntegrin bir adezyon molekülü olarak rol oynar ve hücre zarında demiri taşımaktan çok, demir girişini kolaylaştıran bir görev ile, sitoplazmik mobilferrine demiri verir (Umbereit ve ark., 1998). Emici hücredeki demir konsantrasyonu, vücut demir depoları ile oranlıdır. Bu da mobilferrinin bağlanma yerlerinin demirle satüre olduğu durumda, demir emilimini durdurduğunu düşündürür (Umbereit ve ark., 1998).

Eritrositlerin lümeden demir alımı lümendeki demir miktarına, konsantrasyonuna ve enterositteki demir deposuna bağlıdır. Fazla demir varsa emilim artar fakat konsantrasyon arttıkça da emilim azalır. Duodenal enterositin plazma yüzeyi tarafındaki transferrin reseptör mRNA'larının demir eksikliğinde 2-3 kat arttığı gösterilmiştir (Umbereit ve ark., 1998).

## 2.9. TRANSFERRİN

Transferrin 2 atom demir taşır ve hücre demiri en iyi şekilde diferrik transferrinden alır (reseptör affinitesi en fazla). Transferrin 80 kD'luk bir glukoproteindir. Transferrin ortalama 1/3'ü demirle satüredir ve %10'unda diferrik transferin şeklindedir. Transferrin geni 3. kromozomdadır. Aynı bölgede transferrin reseptörü (TfR) laktoferrin ve seruloplasmin genleri de vardır (Ponka 1997; Ponka ve ark. 1998; Cook ve ark., 1994; Veiss ve ark., 1997).

Demir solüsyonlarda iki oksidasyon durumunda bulunur. Ferroz ( $Fe^{2+}$ ) ve ferrik ( $Fe^{3+}$ ). ya elektron alır yada verir. Yani kolaylıkla redoks durumunu değiştirebilir. Bu redoks reaksiyonları demirin biyokimyasal fonksiyonları için çok önemli olurken, organizma için de zararlı olabilir. Bu nedenle daima şelate edilmiş şekilde bulunur, transferrinle taşınır, ferritinde depolanır. Serbest halde tutulmamaya çalışılır. İyi şelate edilmemişse tek elektron redoks reaksiyonlarını katalize ettiği için, zararlı oksijen radikallerinin oluşumunda anahtar rol oynar ve hayati hücre yapılarında peroksidatif hasara yol açar (Ponka ve ark. 1998; Ervvars ve ark., 1998).

Bu nedenle her yere sıkıca fakat reversible bağlandığı transferrinle taşınır. Transferrin özgül hücre membran reseptörlerince tanınır ve transferin reseptör kompleksi şeklinde hücreye girer (Ponka, 1997; Ervvars ve ark., 1998). Transferin iki

atom  $Fe^{3+}$  bağlar ve iki lopludur. Demirin bağlanması ve ayrılması ile biçim değiştirir. Organizmada çoğu hücre, fizyolojik demir alımından sorumlu özgül hücre membran reseptörleri ile transferinden demir alır. Matür eritrositler dışında her hücrede TfR'leri bulunur. En yüksek konsantrasyonda TfR içeren hücreler; hemoglobin sentezleyen hücreler, plesanta, neoplastik hücreler, hızla bölünüp çoğalan hücrelerdir. Eritroid hücreler demiri sadece transferrinden alırlar (Ponka 1997; Cook ve ark., 1994).

Transferrin gen ekspresyonu dokuya özgül olarak artar. Demir eksikliğine ve humoral faktörlere duyarlıdır. Karaciğer plazma transferrinin en önemli kaynağıdır. Demir eksikliğinde sentez hızı 3-4 kat artarken, inflamatuvar aktivasyonla azalır. Hipoksi ile uyarılan eritropoetin (EPO) gibi, hipoksi ile uyarılmış transferrin sentezi olmaktadır. Bu da hipoksida demir depolarının mobilizasyonunu ve Hb sentezini sağlar (Ponka ve ark. 1998). Ayrıca, EPO ile transferrin reseptör ekspresyonu posttranskripsiyonel olarak indüklenir ve eritroid progenitör hücrelerin demir alımı artar. EPO, İRE (iron responsive element) bağlanma aktivitesini de artırarak hücrelere demir alımını artırır (Veiss ve ark., 1997).

Noneritroid reseptörünün demire bağlı regülasyonunun post transkripsiyonel olarak ve IREs tarafından yönlendirildiği gösterilmiştir (Ponka, 1997; Ervvars ve ark., 1998; Ervvars ve ark., 1998). IREs ilk kez ferritin H ve L zinciri mRNA sında tanımlanmış, demir eksikliği olan hücrelerde ferritin mRNA translasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (5' bölgede). Sonra benzer İRE tipi tanımlanmıştır. (Transferrin reseptör mRNA'nın 3' UTR'si içinde). Bu IRE'ler hücrel demir düzeyine göre, TfR mRNA'sını stabilize etmekte ve yıkımını önlemektedirler. Ayrıca ALAS2 5' UTR mRNA'sında (Hb sentezi) IRE'ler vardır (Brittenham, 1994).

Oksidatif streslerle oluşan (en çok demir fazlalığında)  $H_2O_2$ , İRE bağlanma aktivitesini artırır. Bu da TfR artmasına ve ferritin yapımının azalmasına yol açar. Böylece fazla  $H_2O_2$ 'nin oksidatif stresi daha da artırdığını, demir alımını artırıp depolanmasını artırarak (yani organizmada demiri artırarak) oksidatif hasarı, fenton reaksiyonunu ağırlaştırdığı düşünülmektedir (Ponka ve ark. 1998).

NO (nitrik oksit); kan basıncı, trombosit agregasyonu, makrofaj mediated sitotoksitate ve nöral işlemlerde yer alan fizyolojik cevapların kontrolunda görevli bir mediatördür. NO sentezi artarsa IRE-IRP (iron regulatory protein) bağlanması artar ve ferritin sentezi azalır (Ponka ve ark. 1998).



Ferritinin (ferritine giren ferröz demirdir) ferooksidaz aktivitesi vardır ve ferröz demiri ferrik demir haline çevirir (Ponka ve ark. 1998; Brittenham, 1994). Demir fazlalığında, ferritin lizozomlar tarafından alınır ve degrade edilerek hemosiderin denilen insoluble hale getirilir (Ponka ve ark. 1998). Ferritinde depolanan ferrik demirin; küçük moleküler ağırlıklı şelatörlerce ayrılabilirdiği (sitrat, desferrioksamin) bu olayın ferritin degradasyonu ile oluştuğu ileri sürülmektedir (Ponka ve ark., 1998). Ayrıca eritroid hücrelere sadece transferrinle demir verilirken, hepatositlerin ferritinden de demir aldığı, membranlarında ferritin reseptörü olduğu gösterilmiştir (Ponka ve ark. 1998).

## **2.10. DEMİR ŞELASYONU VE NDRG1 İLİŞKİSİ**

Demir (Fe) proliferasyon için kritik rol oynamasına rağmen hücre siklus progresyonundaki rolü açık değildir. Bununla beraber demir, DNA sentezi gibi birçok hücrenel olayda önemli role sahiptir (Bruce ve ark., 1994; Estrov ve ark., 1987). Des R. Richardson ve arkadaşlarının 2004 yılında yapmış oldukları bir çalışmada hücre proliferasyon sürecinde kilit rol oynayan moleküllerin ekspresyonu üzerinde demir şelatörlerinin etkilerini değerlendirilerek ilgili mekanizmaları araştırılmıştır. Yapılan çalışmalarda hücreler DFO ve 311 isimli iki farklı demir şelatörü veya DNA hasar verici ajanı aktinomisin-D ile inkübe edildikten sonra gen ekspresyonlarını değerlendirmek için gen dizilişleri kullanılmıştır. Gen değerlendirilmeleri sonucunda demir şelasyonu ile spesifik olarak NdrG1 geninin upregüle olduğu görülmüştür. NdrG1 gen fonksiyonu açık olmamakla beraber yapılan çalışmalar tümör büyümesini önemli ölçüde durdurduğunu ve güçlü metastaz supresör olarak rol oynadığını göstermiştir. Hücrelerin şelatörler ile inkübasyonu NdrG1 mRNA ve protein ekspresyonunu ciddi oranda artırmıştır. Buna karşılık demir kompleksleri ile muamele edildiğinde veya demir bağlama bölgeleri inaktif iken artırmamıştır. Ayrıca şelasyon sonrası NdrG1 upregülasyonu transkripsiyonel seviyede meydana gelmiştir. Bu upregülasyonun, HIF-1 $\alpha$  bağımlı ve bağımsız mekanizmalarla alakalı olabileceği öne sürülmüştür. Böylece Des R. Richardson ve arkadaşları araştırmaları sonucunda demir metabolizması ve proliferasyon kontrolü arasında yeni bağlantının NdrG1 olduğunu öne sürmüşlerdir. DFO gibi Fe şelatörleri kullanılarak yapılan çalışmalar göstermiştir ki Fe deprivasyonu G1/S arresti ve apoptosis ile sonuçlanmaktadır (Bruce ve ark., 1994; Becton ve Bryles, 1988). Bunun sebebi de belirgin TfR1 ekspresyonunun da yansıttığı şekilde

muhtemelen artmış Fe ihtiyacına bağlıdır (Larrick ve Cresswell, 1979; Trinder ve ark., 1996). Neoplastik hücreler yüksek miktarda Fe içeren ribonükleotid redüktazı (RR) ifade etmektedir. Bu enzimin rol aldığı reaksiyon DNA sentezi sırasında kritik hız sınırlayıcı basamaktır ve ayrıca şelatörlerin önemli bir moleküler hedefidir (Becton ve Bryles, 1988; Lovejoy ve Richardson, 2002; Becker ve ark., 2003; Chaston ve ark., 2003). Fe şelasyonu sonrası oluşan G1/S arrestinin, Fe şelatörlerinin DNA sentezi için gerekli olan deoksiribonükleotid sentezini sağlayan ribonükleotid redüktaz sentezini önlemelerine bağlı olduğu düşünülmektedir (Becton ve Bryles, 1988). Fe şelatörlerinin etkileri karışıktır ve RR'ye ek olarak sayısız moleküler hedef ile etkileşmektedirler (Lovejoy ve Richardson, 2002; Chaston ve ark., 2003; Larrick ve Cresswell, 1979; Richardson ve ark., 1994; Richardson ve Baker, 1992; Trinder ve ark., 1996).

Birçok in-vivo ve in-vitro araştırma yanında klinik denemeler, DFO ve diğer şelatörlerin etkili antitümör ajanlar olduğunu göstermiştir (Lovejoy ve Richardson, 2002; Chaston ve ark., 2003).

Bugüne kadar Fe metabolizmasını anlama yolunda önemli ilerlemeler olmasına rağmen Fe şelasyonu sonrası G1/S arrestinde rol alan moleküler mekanizmalar çok az anlaşılabilmiştir. Hücre siklus progresyonunda demirin rolünün anlaşılması kanser tedavisinde şelatörlerin hayat kurtarıcı olup olmadığını ortaya çıkaracaktır. Bundan dolayı günümüzde antitümör ajan olarak Demir şelatörlerinin kullanımı ile bağlantısını göz önüne alarak bu konuyu araştırmak gerekmektedir (Bruce ve ark., 1994).

Ndr1 geninin meme, prostat ve invaziv kolorektal kanserler gibi tümör hücrelerinde downregüle olduğu gösterilmiştir. Aksine insan kolon kanser hücreleri differansiyasyonu indüklendiğinde Ndr1 gen ekspresyonu artmıştır (Bandyopadhyay, 2004). Daha ileri çalışmalar ile Ndr1'in Ni(II) ve hipoksi (HIF-1 $\alpha$  yoluyla) ile indüklendiği gösterilmiştir. Bu bulgular Ndr1'in büyüme inhibisyonunda rolü olduğunu ve Ndr1 downregülasyonun malignensi fenotipine katkıda bulunduğunu doğrulamaktadır. Prostat kanserindeki son çalışmalar Ndr1 protein seviyelerinin hasta hayatta kalma süreleri ile korele olduğunu göstermiştir. Mice'ların akciğerlerinde, Ndr1 ekspresyonu metastatik prostat kanser hücre kolonizasyonunu önlemiştir; bu da genin metastatik supresör proteinini kodladığını göstermektedir.

Kurdistani ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Ndr1 ekspresyonunun meme ve prostat kanser hücrelerinde normal hücrelere göre downregüle olduğu gösterilmiştir.

Nrdg1 ekspresyonunun protoonkogenler N-myc ve c-myc tarafından da inhibe edildiği gösterilmiştir. Ayrıca Nrdg1 overekspresyonu belirgin şekilde tümör büyümesini ve metastazını azaltmıştır. Bu sonuçlar Nrdg1'in metastaz supresör gen olarak tanımlanmasına yol açmıştır. Nrdg1'in hücre siklus progresyonunda zayıf karakterize edilmiş rolü dikkate alındığında Nrdg1 ekspresyonunun Fe ile regule edildiği bulgusu önem kazanmaktadır. Aslında Fe şelasyonu sonrası G1/S arrestinin, şelatörlerin RR gibi farklı hedeflere olan etkisine bağlı olabileceği açığa çıkmaya başlamıştır. Fe şelatörlerinin moleküler hedef genleri, antitümör aktivite indüklenmesinde yararlı olabilir.

Büyüme ve diferansiyasyonundaki rolünü gösteren çalışmalar olmasına rağmen Nrdg1'in gerçek fonksiyonu hala belirgin değildir. Fe deprivasyonu ile Nrdg1 up-regulasyonunun fizyolojik rolü dikkate alınarak Nrdg1'in proliferasyon inhibisyonundaki yeteneğinin büyüme arrestine neden olan Fe deprivasyonu aracılı indüklenen bir mekanizma ile olabileceği öne sürülmüştür.

Bundan dolayı Fe deprivasyonu sonucu RR aktivitesinin inhibisyonu ile beraber hücre siklus progresyonuna neden olan Fe deprivasyonuna moleküler olaylar ile cevap verilir.

Doku ve hücre içi kompartmanlardaki dağılım farklılığı, farklı sinyal yolları ile ilişkisi, değişik kanser türlerinde upregulasyonu, tümör supresyonu yapıcı etkisi ve hücre diferansiyasyonundaki rollerinden dolayı Nrdg1 üzerindeki çalışmalar oldukça ilgi çekmektedir.

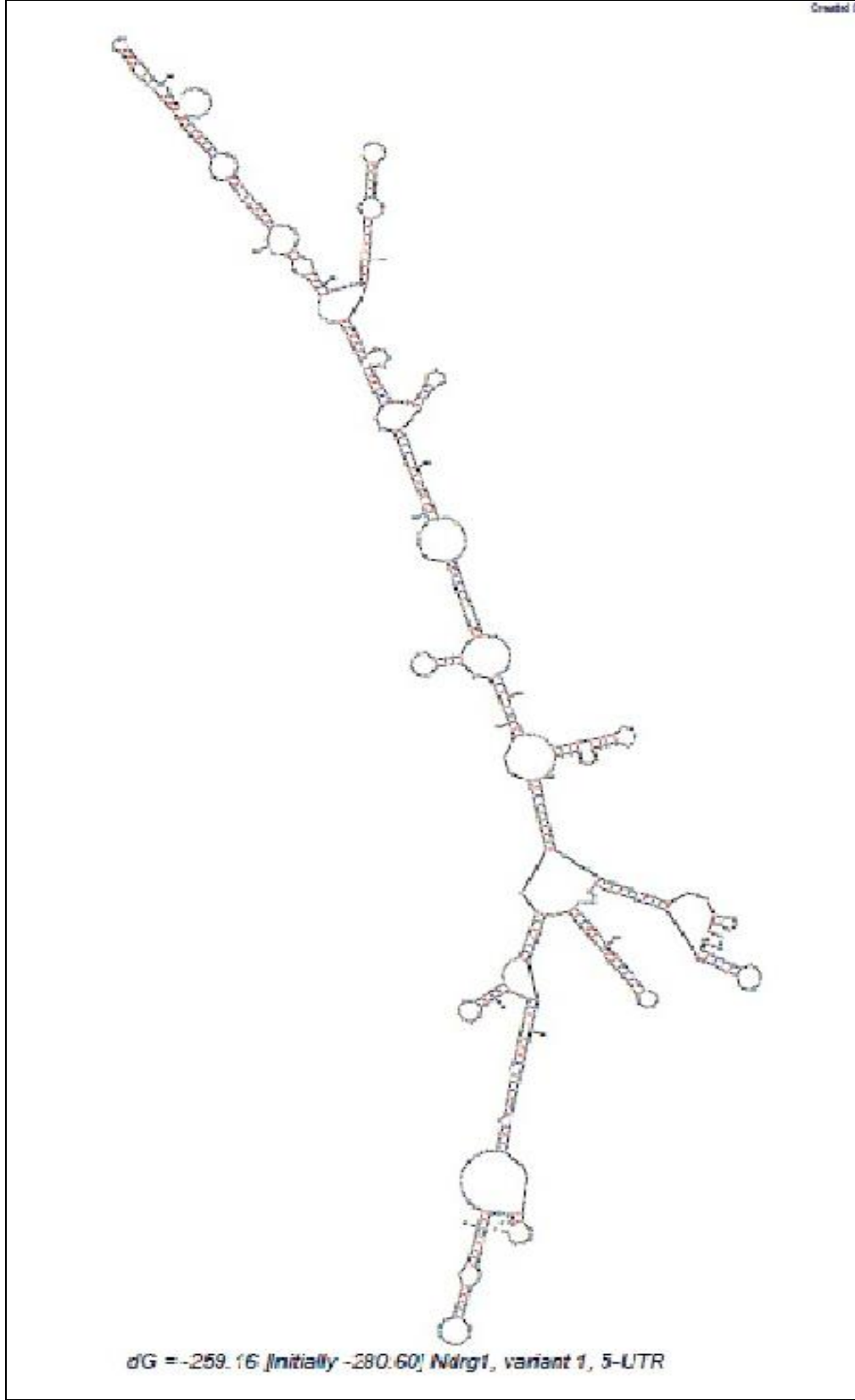
## **2.11. NDRG1 VARYANTLARI**

Yaptığımız literatür araştırmaları sonucu insan Nrdg1 geninin Varyant1 ve Varyant2 şeklinde 2 farklı mRNA varyantına sahip olduğu ve bu farkın da en önemli nedeninin yaklaşık 397 bazlık 5'-UTR bölgesi olduğu anlaşılmıştır. Ancak literatürde Nrdg1 ile ilgili yapılan tüm çalışmalarda varyantların ayrı ayrı çalışılmadığı ve bundan dolayı hangi kanser tipinde hangi varyantın azaldığı ya da arttığının belirlenmemiş olduğu tarafımızca tespit edildi.

### **2.11.1. Nrdg1 Varyant1**

Aynı proteini kodlayan 2 farklı mRNA'dan biri olan varyant1 (V1) 3520 bazdan oluşmaktadır. V1, 5'-UTR bölgesinde Varyant2'den farklı olarak 397 bazlık bir bölgeye

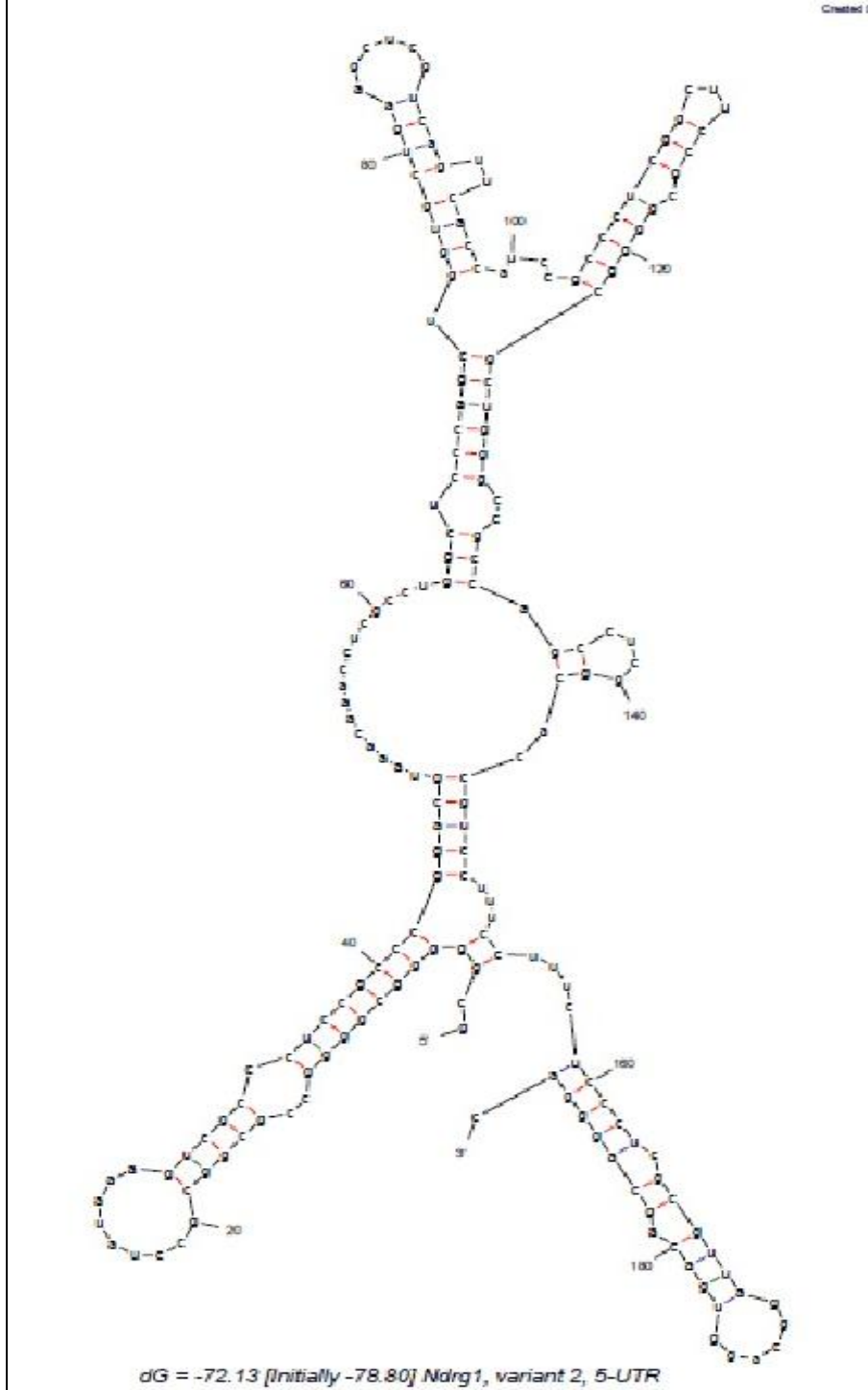
sahiptir. Yaptığımız literatür incelemesinde neden aynı proteini kodlayan 2 farklı mRNA olduğu konusunda doyurucu bir bilgiye rastlanmamıştır. Şekil 18 de Varyant1'5' UTR bölgesine ait olan yapı görülmektedir.



**Şekil 18:** Ndrp1 V1 5'UTR bölgeye ait yapı

### 2.11.2. Ndrp1 Varyant2

Varyant2 (V2) mRNA 3123 bazdan meydana gelmiştir. V2, 5' UTR (nonkoding bölge) bölgesinde V1'e göre 397 bazlık daha kısa bir bölgeye sahiptir. Varyant2 konusunda da literatür taramasında yeterli ve doyurucu bir bilgiye rastlanmamıştır. Şekil 19'da Varyant2 5' UTR bölgesine ait yapı görülmektedir.



Şekil 19: Ndrp1 V2 5' UTR bölgesine ait yapı

### **3. MATERYAL – METOT**

#### **3.1. KULLANILAN ARAÇ VE GEREÇLER**

1. Santrifüj (MSE, MISTRAL 3000I, seri no: 5691/02/075, U.K.)
2. Santrifüj (Jouan, C4i, seri no: 30411037, France)
3. Mikropipetler (Sealpette Jencons 0.5-10, Treff Lab 20- 200, 100-1000, Genex Beta 10-100, 50, 2-20, Dialab 200-1000, Rainin Pipet-plus R 20, Socorex 50-200, Eppeddorf 20, 100, 200, 1000, Germany).
4. Mikrosantrifüj (SIGMA 3K30, seri no: 76262, USA)
5. Mikrosantrifüj (Jouan A-14, seri no: 39903105, France)
6. 1,5 ml nükleaz içermeyen eppendorf (Cat No.616201 Grenier Bio-one, USA)
7. 0,2 ml PCR tüp (Cat No.683201 Grenier Bio-one, USA)
8. Derin dondurucu -70°C, (NUAIRE, Seri no: 9394248, USA)
9. Derin dondurucu -80°C, (NUAIRE, Seri no: Z17N-205195-ZN, USA)
10. Benmari (ASTEL, TIP J18 BAIN UNIVERSAL, N seri: 3940517, Jouan, France)
11. Benmari (Termal Lab. Aletleri, seri no: 821911, Türkiye)
12. Vorteks VM3, (Windaus, 3392, Germany)
13. LightCycler 480 II, (seri no: 28218, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
14. Laminar-flow (Bilser, Seri no: 6087, Ankara, Türkiye)
15. Laminar-flow (Nuaire, Model no: Nu-425-400E, seri no: 116026070307, USA)
16. LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, (04729692001 white, lot: 09016400, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
17. Ultrasonic Cleaner, (seri no: 030607, Germany)
18. Spektrofotometre, (IMPLEN NanoPhotometer, Seri no: 1271,U.K.)
19. pH metre, (Microprocessor pH meter, EDT Instruments RE 357, 702 U.K.)
20. Elektronik terazi (Chyo Balanced Corporation, JL-180, seri no: 300258, Japan)
21. Cellstar Tissue Culture Flask (25 cm2) kırmızı kapak (Cat No.690175 Grenier bio-one, Austria)
22. Cellstar 96 well Cell Culture Plate, (Cat no.655 180 Grenier bio-one, Austria)
23. 10 µl (cat. no. 765288), 20 µl (cat. no.774288) 100 µl (cat. no.772288), 200 µl, 1000 µl (cat. no.740288) pipet uçları, steril, (Grenier bio-one, Austria)
24. 10 µl pipet ucu, steril, (Neptune BT10XL, lot: 56522 Mexico)

25. CO<sub>2</sub> inkübatör, (Sanyo MCO-17AIC, seri no: 00605796, Japan)
26. İnvirt mikroskop, (Nikon eclipse TS100, seri no: 0101743, Japan)
27. Real Time Cell Analiz sistemi-RTCA-SP (xCELLigence System monitors) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
28. E-plate 16 1x6 Roche ACEA Bioscience, Inc. CA 92121 (Cat no: 05469830001 San Diego)

### 3.2. KULLANILAN KİMYASALLAR

1. DMEM Medium, with 1 g/L D-glucose, with Na Piruvat, without L-Glutamin, (Lot: 01-050-1A, Biological Industries, İsrail)
2. RPMI Medium, 1640, with L-Glutamin, with HEPES 25 mM 500 mL, (Lot: 01-106-1A, Biological Industries İsrail)
3. Deferoxamine mesylate salt (Product no: D9533 Sigma MW: 656,79 g/mol)
4. 1,10-Phenanthroline monohydrate (Product no: 320056 Sigma-Aldrich MW: 198,22 g/mol)
5. Trichostatin A, (Item no:89730, Cayman Chemical, MW: 302,4)
6. L-Glutamin, 200 mM, (Cat: 0.3-0.20-1C, Biological Industries, İsrail)
7. Fetal Bovine Serum, Heat inactivated, Sterile filtered, (Cat No: F7678 Sigma Aldrich, USA)
8. Trypsin-EDTA (%0.25 Trypsin, %0.02 EDTA) (Cat No; 03052-1B Biological Industries Kibbutz Beit Haemek, ISRAEL)
9. 10.000 Ü. Penisilin/10 mg Streptomisin 100X (Cat No; P0781, 100 ml, Sigma-Aldrich, USA)
10. Dimethylsulfoxid (DMSO) (MERCK-Schuchardt, Cat. No: 802912, Germany)
11. PBS (Phosphat Buffer Salin), 10 mM, pH 7.4
  - NaCl, 136 mM (Merck, Cat. No: 6400) MW: 58,44 Germany)
  - KCl, 2.7 mM (Merck, Cat. No: 4935) MW: 74,56 Germany)
  - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM (Merck, Cat. No: 6586) MW: 141,96 Germany)
  - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM (Merck, Cat. No: 4871) MW: 136,09 Germany)
12. pH 4, pH 7, pH 10 kalibratörler (Orion Application Solution 910104, 910107, 910110 CAS Reg. No 7732-18-5, GmBh)



13. High-pure PCR RNA isolation kit (Cat. No.11 828 665 001 Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany )
14. Transcriptor first strand cDNA synthesis kit (Cat no. 04 379 012 001 Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany )
15. LightCycler 480 Probe Master (04 707 494 001 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
16. Human GAPDH forward-reverse (19/19 b) primer çifti- LNA Taqman probe seti (UPL60, Cat No.04688589001 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
17. Human Ndr1 Varyant1 forward-reverse (18/18 b) primer çifti- LNA Taqman probe seti (LNA prob 72, Cat No. 04688953001 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
18. Human Ndr1 Varyant2 forward-reverse (19/21 b) primer çifti- LNA Taqman probe seti (LNA prob 21, Cat No.04687663001 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)

### **3.3. HepG2 HÜCRE KÜLTÜRÜ**

HepG2; insan hepatoselüler karsinom hücresidir. Çoğalması adheren özellik taşır. Epitelyal morfoloji gösterir. Doubling time 48 saattir. Pasaj 17 HepG2 hücreleri Ankara Üniversitesi Hepatoloji Enstitüsü'nden Prof. Dr. Mithat Bozdayı'dan temin edildi. Hücreler aşağıda verilen protokole göre pasajlandı.

#### **3.3.1 HepG2 Hücre Kültür solüsyonları**

##### **3.3.1.1. DMEM Medyum pH; 7.4**

- Biological Industries Kibbutz Beit Haemek 25115 ISRAEL
- Lot: 01-050-1A
- 1 g/L D-glucose ve Na Piruvat içerir, L-Glutamin içermez.
- Likit, kullanıma hazır, 2-8 °C'de son kullanım tarihine kadar saklandı.

##### **3.3.1.2. Fetal Bovin Serum (FBS)**

- Sigma Aldrich, 500 ml, USA
- Katalog No: F7678
- Isı ile inaktive edilmiş, steril filtre edilmiş, böcek hücre kültüründe test edilmiş Stok solüsyon 15 ml'lik falkon tüplere 10'ar ml alikotlanarak -70 °C'de saklandı.

### 3.3.1.3. L-Glutamin 200 mM, 20 ml

- Biological Industries Kibbutz Beit Haemek 25115 ISRAEL
- Katalog No: 03-022-1C, Lot: 567256
- Stok solüsyon 15 ml'lik falkon tüplere 2'şer ml alikotlanarak -70 °C'de saklandı.

### 3.3.1.4. Tripsin-EDTA (% 0,25 tripsin, % 0,02 EDTA) 100 ml

- Biological Industries Kibbutz Beit Haemek 25115 ISRAEL
- Katalog No: 03052-1B
- Stok solüsyon 15 ml'lik falkon tüplere 10'ar ml alikotlanarak -70 °C'de saklandı.

### 3.3.1.5. 10.000 ü PENİSİLİN/10 mg STREPTOMİSİN, 100X stok

- Sigma-Aldrich, 100 ml, USA
- Katalog No: P0781
- 15 ml'lik falkon tüplere 5'er ml olacak şekilde alikotlanarak -70 °C'ye kaldırıldı.

### 3.3.1.6. Fosfat Buffer Salin (PBS) 10 mM pH;7.4 1 L

**Tablo I:** PBS solüsyon hazırlığı

Madde	Miktar	Firma
NaCl 136 mM	8 g	Merck, cat. no.6400, S-12, Germany
KCl, 2.7 mM	0.2 g	Merck, cat. no 4935, P-11, Germany
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 10 mM	1.44 g	Merck, cat. no 6586, S-7a, Germany
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 10 mM	1.36 g	Merck, A997671 851, P-3, Germany
dH <sub>2</sub> O	800 ml	

- 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.36 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tartılarak 800 ml dH<sub>2</sub>O ile çözünmesi sağlandı.
- pH 7.4'e ayarlanarak dH<sub>2</sub>O ile 1 litreye tamamlandı.
- 0.22 µm'lik filtre ile filtre edildi. Sterilizasyon için otoklavda tutuldu. 2-8°C'de saklandı.

### 3.3.1.7. HepG2 Hücre Kültür Komplet Medyum Hazırlığı

- FCS, -70 °C'den 37 °C'ye alınarak çözülmesi sağlandı.

- Penisilin/streptomisin 100X stok solüsyonu, -70 °C'den oda ısısına alınarak çözülmesi sağlandı.
- L-Glutamin 200 mM, -70 °C'den oda ısısına alınarak çözülmesi sağlandı.
- 100 ml komplet DMEM medyum hazırlanması için tablo II'deki miktarlardaki solüsyonlar laminar flow kabininde steril şartlara dikkat edilerek karıştırıldı.
- 0,22 µm'lik filtre ile steril cam şişeye filtre edilip 3 tane 50 mL'lik falkon tüpe konular ve ışıktan koruyarak 2-8 °C'de saklandı.

**Tablo II:** HepG2 Komplet DMEM Medyum Hazırlığı

Madde	Volüm	Final konsantrasyon
FBS	10 ml	% 10
Penisilin/streptomisin 100x	1 ml	1x
L-Glutamin 200 Mm	2 ml	% 2 (4 mM)
DMEM	87 ml	

### 3.3.1.8. DMEM Freeze-Medyum Hazırlığı, 10 ml

- DMEM komplet medyum benmaride 37 °C'ye getirildi.
- Kültür şartlarında, hücreler dondurulmadan önce % 10 DMSO olacak şekilde DMSO eklendi.
- Freeze-medyum sadece dondurulacak hücreler için kullanılır.
- Taze hazırlanmalıdır.

**Tablo III:** Freeze medyum

	Volüm	Final konsantrasyonu
DMEM Komplet Medyum	9 ml	% 90
DMSO	1 ml	% 10

### **3.3.2 HepG2 Hücre Kültür Protokolleri**

#### **3.3.2.1. -80 °C’de dondurularak saklanan hücrelerin çözülmesi**

- 80 °C’den çıkarılan hücreler hızla çözüldü.
- 600 xg’de, 37 °C’de 5 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant atılıp üzerine DMEM komplet medyum eklendi ve karıştırıldı.
- Hücreler pasteur pipeti ile flaska pipetlendi ve üzerine DMEM komplet medyum eklenerek 5 ml’ye tamamlandı.
- CO<sub>2</sub> inkübatöre kaldırıldı.

#### **3.3.2.2. HepG2 hücrelerinin pasajlanması**

- Flasktaki hücreler % 70-80 konflüent olduğunda pasajlama yapıldı.
- Flasktaki komplet medyum uzaklaştırıldı.
- Pasteur pipeti ile ~ 2-3 ml steril PBS alınarak flaska aktarılır ve hücreler yıkandı.
- PBS uzaklaştırıldı.
- Pasteur pipeti ile yüzeyi kaplayacak kadar Tripsin-EDTA flaska ilave edildi ve 3 dk süreyle CO<sub>2</sub> inkübatörde bekletildi.
- Mikroskopta hücrelerin ayrılması izlendikten sonra pasteur pipeti ile Tripsin-EDTA’nın üzerine ~ 3-4 ml komplet medyum ilave edildi ve karıştırıldı.
- Komplet medyum ve hücreler 15 ml’lik falkon tüpte toplandı.
- 600 xg’de, oda ısısında 5 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant atılarak 5 ml komplet medyum ile resüspanse edildi.
- 4 flaska ~1’er ml dağıtıldı ve komplet DMEM ile 5 ml’ye tamamlandı.
- CO<sub>2</sub> inkübatöre alındı.
- Medium değiştirme haftada 2 ya da 3 kez yapıldı.

#### **3.3.2.3. HepG2 hücrelerinin dondurulması**

- Flaskın mediumu uzaklaştırıldı.
- Pasteur pipeti ile ~ 2-3 ml PBS eklenerek yıkandı.
- Pasteur pipeti ile yüzeyi kaplayacak kadar Tripsin-EDTA eklenerek 3 dk CO<sub>2</sub> inkübatörde bekletildi.
- Mikroskopta hücre ayrılması izlendikten sonra ~2-3 ml komplet DMEM medyum eklenerek hücreler 15’lik falkonda toplandı.

- 600 xg'de, oda ısısında 5 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant atılıp üzerine 5 ml freeze-medium eklendi.
- 1'er ml alikotlanarak -80 °C'de saklandı.

### **3.4. MCF-7 HÜCRE KÜLTÜRÜ**

MCF-7; insan meme adenokarsinom hücreleridir. Çoğalması adheren özellik taşır. 37 °C'de %5 karbondioksit ortamında kültüre edilmelidir. Epitelyal morfolojiye sahiptir. Doubling Time: 29 saattir. MCF-7 hücreleri, T.C. Tarım ve Köyşleri Bakanlığı Şap Enstitüsü Müdürlüğü'nden satın alındı.

#### **3.4.1. Hücre Kültür solüsyonları**

##### **3.4.1.1. RPMI 1640 Medyum**

- Biological Industries Kibbutz Beit Haemek 25115 ISRAEL
- Lot: 01-050-1A
- L-Glutamin ile HEPES 25 mM içerir
- Likit, kullanıma hazır, 2-8 °C'de son kullanım tarihine kadar saklanabilir.

##### **3.4.1.2. Fetal Bovin Serum (FBS)**

- Sigma Aldrich, 500 ml, USA
- Katalog No: F7678
- Isı ile inaktive edilmiş, steril filtre edilmiş, Stok solüsyon 15 ml'lik falkon tüplere 10'ar ml alikotlanarak -70 °C'de saklandı.

##### **3.4.1.3. L- Na-pürivat, 100 mM**

- Biological Industries Kibbutz Beit Haemek 25115 ISRAEL
- Cat no: 03042-1B
- Stok solüsyon 15 ml'lik falkon tüplere 2'şer ml alikotlanarak -70 °C'de saklandı.

##### **3.4.1.4. Tripsin-EDTA (% 0,25 tripsin, % 0,02 EDTA) 100 ml**

- Biological Industries Kibbutz Beit Haemek 25115 ISRAEL
- Katalog No: 03052-1B
- Stok solüsyon 15 ml'lik falkon tüplere 10'ar ml alikotlanarak -70 °C'de saklandı.

### 3.4.1.5. 10.000 ü PENİSİLİN/10 mg STREPTOMİSİN, 100X stok

- Sigma-Aldrich, 100 ml, USA
- Katalog No: P0781
- 15 ml'lik falkon tüplere 5'er ml olacak şekilde alikotlanarak -70 °C'ye kaldırıldı.

### 3.4.1.6. Fosfat Buffer Salin (PBS) 10 mM pH;7.4 1 L

**Tablo IV:** PBS solüsyon hazırlığı

Madde	Miktar	Firma
NaCl 136 mM	8 g	Merck, cat. no.6400, S-12, Germany
KCl, 2.7 mM	0.2 g	Merck, cat. no 4935, P-11, Germany
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 10 mM	1.44 g	Merck, cat. no 6586, S-7a, Germany
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 10 mM	1.36 g	Merck, A997671 851, P-3, Germany
dH <sub>2</sub> O	800 ml	

- 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.36 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tartılarak 800 ml dH<sub>2</sub>O ile çözünmesi sağlandı.
- pH 7.4'e ayarlanarak dH<sub>2</sub>O ile 1 litreye tamamlandı.
- 0.22 µm'lik filtre ile filtre edilir. Otoklavda Sterilizasyonu yapıldı ve 2-8°C'de saklandı.

### 3.4.1.7. MCF-7 Hücre Kültür Komplet Medyum Hazırlığı

- FCS, -70 °C'den 37 °C'ye alınarak çözülmesi sağlandı.
- Penisilin/streptomisin 100X stok solüsyonu, -70 °C'den oda ısısına alınarak çözülmesi sağlandı
- Na-Pürivat, 100 mM, -70 °C'den oda ısısına alınarak çözülmesi sağlandı.
- 100 ml komplet RPMI 1640 medyum hazırlanması için tablo V'deki miktarlardaki solüsyonlar laminer flow kabininde steril şartlara dikkat edilerek karıştırıldı.
- 0,22 µm'lik filtre ile steril cam şişeye filtre edilip 3 tane 50 mL'lik falkon tüpe konuldu ve ışıktan koruyarak 2-8 °C'de saklandı.

**Tablo V:** MCF-7 RPMI 1640 Komplet Medyum Hazırlığı

Madde	Volüm	Final konsantrasyon
-------	-------	---------------------

FBS (fetal calf serum)	10 mL	% 10
Penisilin/Streptomisin, 100x	1 mL	% 1 (1x)
Na-Pürivat, 100 Mm	1 mL	% 1 (1 mM)
RPMI 1640	88 mL	

- Belirtilen miktarlar steril cam şişeye steril şartlarda pipetlendi ve RPMI 1640 ile 100 mL'ye tamamlanarak 0.22 µm'lik filtre ile filtre edildi.

#### 3.4.1.8. RPMI 1640 Freeze-Medyum Hazırlığı, 10 ml

- RPMI 1640 komplet medyum benmaride 37 °Cye getirildi.
- Kültür şartlarında, hücreler dondurulmadan önce % 10 DMSO olacak şekilde DMSO eklendi.
- Freeze-medyum sadece dondurulacak hücreler için kullanıldı.
- Taze hazırlandı.

**Tablo VI:** Freeze medyum

	Volüm	Final konsantrasyonu
RPMI 1640 Komplet Medyum	9 ml	% 90
DMSO	1 ml	% 10

#### 3.4.2. MCF-7 Hücre Kültür Protokolleri

##### 3.4.2.1. -80 °C'de dondurularak saklanan hücrelerin çözülmesi

- -80 °C'den çıkarılan hücreler hızla çözüldü.
- 600 xg'de, 37 °C'de, 5 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant atılır. Üzerine komplet RPMI 1640 medyum eklenir, karıştırıldı.
- Hücreler pasteur pipeti ile 25 cm<sup>2</sup> flask'a pipetlenir ve üzerine komplet RPMI 1640 medyum eklenerek 5 mL'ye tamamlandı.
- CO<sub>2</sub> inkübatöre kaldırıldı.

##### 3.4.2.2. MCF-7 hücrelerinin pasajlanması

- Flasktaki hücreler %70-80 konflü olduğunda pasajlama yapıldı.
- Flasktaki RPMI 1640 komplet medyum uzaklaştırıldı.

- Pasteur pipeti ile ~ 2-3 mL steril PBS alınarak flaska aktarıldı ve yıkandı.
- PBS uzaklaştırıldı.
- Pasteur pipeti ile flaskı kaplayacak kadar Tripsin-EDTA flaska ilave edildi ve 3 dk süreyle CO<sub>2</sub> inkübatörde bekletildi.
- Mikroskopta hücrelerin ayrılması izlendikten sonra pasteur pipeti ile Tripsin-EDTA'nın üzerine ~ 3-4 mL RPMI 1640 komplet medyum ilave edildi ve karıştırıldı.
- 15'lik falkon tüpe alındı.
- 600 xg'de, oda ısısında, 5 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant atılarak 5 mL RPMI 1640 komplet medyum ile resüspanse edildi ve hücre sayımı yapıldı.
- 4 flaska ~1'er mL dağıtıldı ve RPMI 1640 komplet medyum ile 5 mL'ye tamamlandı.
- CO<sub>2</sub> inkübatöre alındı.
- Medyum değiştirme haftada 2 ya da 3 kez yapıldı.

#### **3.4.2.3. MCF-7 hücrelerinin dondurulması**

- Flaskın mediyumu uzaklaştırıldı.
- Pasteur pipeti ile ~ 2-3 ml PBS eklenerek yıkandı.
- Pasteur pipeti ile yüzeyi kaplayacak kadar Tripsin-EDTA eklenerek 3 dk CO<sub>2</sub> inkübatörde bekletildi.
- Mikroskopta hücre ayrılması izlendikten sonra ~2-3 ml komplet DMEM medyum eklenerek hücreler 15'lik falkonda toplandı.
- 600 xg'de, oda ısısında 5 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant atılıp üzerine 5 ml freeze-medium eklendi.
- 1'er ml alikotlanarak -80 °C'de saklandı.

### **3.5. HÜCRE KİNETİĞİ (PROLİFERASYON DENEYİ) VE IC<sub>50</sub> (İNHİBİTÖR KONSANTRASYON) HESAPLAMASI**

#### **3.5.1. HepG2 Hücre Kültüründe xCELLigence Real time ile Proliferasyon Deneyi**

İlaç uygulamadan önce hücreleri logaritmik artış fazında yakalamak ve en uygun hücre sayısını belirlemek için proliferasyon deneyi yapıldı.

##### **3.5.1.1. Deneyin kurgusunda farklı sayıda hücre içeren kuyuların hazırlanması**



Deneyin kurgusunda farklı sayıda hücre içeren kuyular hazırlandı. Seri dilüsyon ile 30000, 15000, 7500, 3750, 1875 hücre içeren kuyular oluşturuldu.

**Tablo VII:** HepG2 hücrelerinin Proliferasyon takibi için E-pleyt dizaynı

<b>30,000</b>	<b>30,000</b>	<b>30,000</b>	7500	7500	7500	<b>1875</b>	<b>1875</b>
15,000	15,000	15,000	<b>3750</b>	<b>37500</b>	<b>3750</b>	<b>1875</b>	<b>KM</b>

### 3.5.1.2. HepG2 kültür hücrelerinin 16 well E-pleyte Ekilmesi

1. E-pleyte 100 µL komplet medium pipetlendi ve 15 dakika CO<sub>2</sub> inkübatörde bekletildi.
2. Back ground okuma alındı.
3. Konflüent olan HepG2 kültür hücrelerine ait flaskadaki medyum boşatıldı.
4. Pasteur pipeti ile ~ 2-3 mL steril PBS alınarak flaska aktarıldı ve yıkandı. PBS uzaklaştırıldı.
5. Pasteur pipeti ile flaskı kaplayacak kadar tripsin-EDTA (%0,25-%0.02) konuldu.
6. 3 dakika CO<sub>2</sub> inkübatörde bekletildi.
7. Üzerine yaklaşık 3 mL DMEM komplet medyum konuldu.
8. Pasteur pipet ile bir-kaç kez al/ver yapılır. Hücre sayımı yapıldı.(0,60x10<sup>3</sup> /µL hücre sayıldı)
9. E-pleyte ilk 3 kuyuya 60000 hücre 100'er µL pipetlendi. Nazikçe al ver yapıldı.
10. 60000 hücre içeren kuyudan 100 µL alındı ve diğer kuyuya pipetlendi. Nazikçe al ver yapıldı.
11. 10. Maddedeki işlemler 4 defa tekrarlanarak seri dilüsyon yapıldı.
12. En son kuyudan 100 µL dışarı atıldı.
13. Bütün kuyulara 100 µL komplet medyum daha pipetlenerek her kuyunun toplam volümü 200 µL'ye ayarlandı.
14. 24 saatte bir kuyulardan hücreleri kaldırmadan 100 µL medyum alınıp 100 µL taze komplet medyum eklendi.
15. 72 saat 37 °C'de CO<sub>2</sub> inkübatöründe inkübe edildi.

### 3.5.1.3. Değerlendirme ve hücre sayısının belirlenmesi

72 saatlik inkübasyon sonucunda xCELLigance Real Time ile büyüme eğrileri analizi yapıldı ve optimal hücre sayısı her kuyu için 9000 olarak belirlendi ve çalışmamız bu hücre sayısı üzerinden yürütüldü.

### 3.5.2. MCF7 Hücre Kültüründe xCELLigence Real time ile Proliferasyon Deneyi

İlaç uygulamadan önce hücreleri logaritmik artış fazında yakalamak ve en uygun hücre sayısını belirlemek için proliferasyon deneyi yapıldı.

#### 3.5.2.1. Deneyin kurgusunda farklı sayıda hücre içeren kuyuların hazırlanması

Deneyin kurgusunda farklı sayıda hücre içeren kuyular hazırlandı. Seri dilüsyon ile 32000, 16000, 8000, 4000, 2000 hücre içeren kuyular oluşturuldu.

**Tablo VIII:** MCF7 Hücrelerinin Proliferasyon takibi için 16 well E-Pleyt dizaynı

32,000	32,000	32,000	8000	8000	8000	2000	2000
16000	16000	16000	4000	4000	4000	2000	KM

#### 3.5.2.2. Hücrelerin 16 well E-pleyde Ekilmesi

- E-pleyde 100 µL komplet medium pipetlendi ve 15 dakika CO<sub>2</sub> inkübatörde bekletildi.
- Back ground okuma alındı.
- Konflü olan MCF7 kültür hücrelerine ait flasttaki medyum boşatıldı.
- Pasteur pipeti ile ~ 2-3 mL steril PBS alınarak flaska aktarılır ve yıkandı. PBS uzaklaştırıldı.
- Pasteur pipeti ile flastı kaplayacak kadar tripsin-EDTA (%0,25-%0.02) konuldu.
- 3 dakika CO<sub>2</sub> inkübatörde bekletildi.
- Üzerine yaklaşık 3 mL RPMI 1640 komplet medyum konuldu.
- Pasteur pipet ile bir-kaç kez al/ver yapılır. Hücre sayımı yapıldı.(0,64x10<sup>3</sup>/µL hücre)
- E-pleyde ilk 3 kuyuya 64000 hücre 100'er µL pipetlendi. Nazikce al ver yapıldı.
- 64000 hücre içeren kuyudan 100 µL alındı ve diğer kuyuya pipetlendi. Nazikce al ver yapıldı.
- 10. Maddedeki işlemler 4 defa tekrarlanarak seri dilüsyon yapıldı.
- En son kuyudan 100 µL dışarı atıldı.
- Bütün kuyulara 100 µL komplet medyum daha pipetlenerek her kuyunun toplam volümü 200 µL'ye ayarlandı.

- 24 saatte bir kuyulardan hücreleri kaldırmadan 100 µL medyum alınıp 100 µL taze komplet medyum eklendi.
- 48-72 saat 37 °C’de CO<sub>2</sub> inkübatöründe inkübe edildi.

### **3.5.2.3. Değerlendirme ve hücre sayısının belirlenmesi**

72 saatlik inkübasyon sonucunda xCELLigence Real Time cihazı ile büyüme eğrileri analizi yapıldı ve optimal hücre sayısı belirlendi. MCF7 için optimal hücre sayısının her kuyu için 16000 olduğu kanaatine varıldı ve deneyin kurgusu bu hücre sayısı üzerinden yürütüldü.

### **3.5.3. xCELLigence Real Time Hücre Analiz Sistemi İle HepG2 Hücrelerinde DFO ve PHEN İle Muamele sonucu Proliferasyon Takibi**

#### **3.5.3.1. HepG2 Hücre Kültür Gruplarına Uygulanacak İlaç Dozlarını İçeren Medyum Hazırlığı**

Çalışma Gruplarının İçerikleri

1. Komplet medyum (kontrol)
2. 150 µM DFO içeren komplet medyum
3. 75 µM DFO içeren komplet medyum
4. 37,5 µM DFO içeren komplet medyum
5. 18,75 µM DFO içeren komplet medyum
6. 9,37 µM DFO içeren komplet medyum
7. 4,68 µM DFO içeren komplet medyum
8. 2,34 µM DFO içeren komplet medyum
9. 100 µM PHEN içeren komplet medyum
10. 50 µM PHEN içeren komplet medyum
11. 25 µM PHEN içeren komplet medyum
12. 12,50 µM PHEN içeren komplet medyum
13. 6,25 µM PHEN içeren komplet medyum
14. 3,12 µM PHEN içeren komplet medyum
15. 1,56 µM PHEN içeren komplet medyum

### **3.5.3.2. İlaç Dozlarının Hesaplanması Ve İlaç İçeren Medyumların Hazırlanması**

#### **3.5.3.2.1. 300 µM, 2X DFO İçeren Komplek Medyum Hazırlanması**

- 15 mg DFO tartılıp 1 mL DMEM medyum içinde çözülerek 22,83835 mM DFO stok solusyonu elde edildi.
- Stok DFO solusyonundan 26,27 µL alınıp 2 mL komplek medyuma (1973,73 µL) tamamlanarak 300 µM DFO elde edildi.
- Filtre edildi.
- DMEM komplek medyum ile seri dilüsyon yapılarak 300, 150, 75, 37.5, 18.75, 9.375 ve 4.687 µM DFO içeren komplek medyumlar elde edildi.

#### **3.5.3.2.2. 150 µM, 1X DFO İçeren Komplek Medyum Hazırlanması**

- Yukarıda hazırlığı anlatılan 22,83835 mM stok DFO solusyonundan 13,14 µL alınıp 2 mL komplek medyuma (1986,86 µL) tamamlanarak 150 µM DFO elde edildi.
- Filtre edildi.
- DMEM komplek medyum ile seri dilüsyon yapılarak 150, 75, 37.5, 18.75, 9.375 ve 4.687 µM DFO içeren komplek medyumlar elde edildi.

#### **3.5.3.2.3. 200 µM, 2X PHEN İçeren Komplek Medyum Hazırlanması**

- 50 mg PHEN tartılıp 0,5 mL DMSO içinde çözülerek 504489,96 µM PHEN stok solusyonu elde edildi.
- -80 °C de saklandı.
- Stok PHEN solusyonundan 10 µL alındı ve 1ml DMEM Komplek Medyuma (990 µL) tamamlanarak 5044,8996 µM PHEN solusyonu elde edildi.
- 5044,8996 µM'lık ara dilüsyondan 79,28 µL alınıp 2 mL komplek medyuma tamamlanarak (1920,72 µL) 200 µM PHEN solusyonu elde edildi.
- Filtre edildi.
- DMEM komplek medyum ile seri dilüsyon yapılarak 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.875 µM PHEN içeren komplek medyumlar elde edildi.

#### **3.5.3.2.4. % 0,02 DMSO İçeren Kontrol Grubu Hazırlanması**

- Stok DMSO dan 10 µL alınır ve 1ml DMEM Komplek Medyuma (990 µL) tamamlanarak 100 kat dilüe edildi.
- 100 kat ara dilüsyondan 79,28 µL alınıp 1920,72 µL komplek medyum ile 2 mL'ye

tamamlandı (2000/79,28= 25,22 kat dilüe).

- Toplam olarak 25,22x100= 2522 kat dilüe edilerek 2X, % 0,039 DMSO elde edildi.
- 100 kat ara dilüsyondan 39,64 µL alınıp 1960,36 µL medium ile 2 mL'ye tamamlanarak 1X, % 0,02 DMSO solusyonu elde edildi.
- Solusyonlar filtre edildi.

#### **3.5.3.2.5. 100 µM, 1X PHEN İçeren Komplet Medyum Hazırlanması**

- Yukarıda elde edilişi anlatılmış olan 5044,8996 µM'lık PHEN solusyonundan 39,64 µL alınıp komplet medium ile (1960,36 µL) 2 mL'ye tamamlanarak 100 µM 1X PHEN solusyonu elde edildi.
- Filtre edildi.
- DMEM komplet medium ile seri dilüsyon yapılarak 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.875 µM PHEN içeren komplet mediumlar elde edildi.

#### **3.5.3.3. Hepg2 Hücrelerin 48 Well E-Pleyte Ekilmesi Ve Hazırlanan İlaçlı Grupların Uygulanması**

- E-pleyte 100 µL komplet medium pipetlendi ve 15 dakika CO<sub>2</sub> inkübatörde bekletildi.
- Back ground okuma alındı.
- Konflü olan HepG2 kültür hücrelerine ait flasttaki medyum boşatıldı.
- Pasteur pipeti ile ~ 2-3 mL steril PBS alınarak flaska aktarıldı ve yıkandı. PBS uzaklaştırıldı.
- Pasteur pipeti ile flaskı kaplayacak kadar tripsin-EDTA (%0,25-%0.02) konuldu.
- 3 dakika CO<sub>2</sub> inkübatörde bekletildi.
- Üzerine yaklaşık 5 mL DMEM komplet medyum konuldu.
- Pasteur pipet ile bir-kaç kez al/ver yapılarak hücre sayımı yapıldı.
- 3x16'lık E-pleyte 9000 hücre/ kuyu başına olacak şekilde komplet DMEM-hücre karışımı otomatik pipetle 100'er µL dağıtıldı.
- 24 saat 37 °C'de CO<sub>2</sub> inkübatöründe inkübe edildi.
- 24. saatte pleytin tabanına değmeden tüm kuyulardan 100 µL medium alınarak atıldı.
- Daha sonra 2x konsantrasyonda hazırlanan ilaçlı gruplar ve kontrol için normal komplet medium 100 µl pipetlendi.

- 24 saat 37 °C’de CO<sub>2</sub> inkübatöründe inkübe edildi.
- Her 24 saatte bir medium değiştirilirdi ancak 1X kimyasal ajanlar uygulandı.

#### 3.5.3.4. HepG2 hücreleri için Well E-Pleyt Düzeni

Her kuyusunda 9000 HepG2 hücre içeren ve 24 saat inkübe edilen E-Pleyte aşağıda gösterilmiş olan dizayna göre hazırlanan ilaç dozları uygulandı.

**Tablo IX:** HepG2 hücreleri için 48 Well E-pleyt dizaynı

	1	2	1	2	1	2
<b>A</b>	KONT	75 µM DFO	9,375 µM DFO	100 µM PHEN	25 µM PHEN	3,125 µM PHEN
<b>B</b>	KONT	37,5 µM DFO	9,375 µM DFO	100 µM PHEN	12,5 µM PHEN	3,125 µM PHEN
<b>C</b>	KONT	37,5 µM DFO	4,687 µM DFO	100 µM PHEN	12,5 µM PHEN	1,562 µM PHEN
<b>D</b>	150 µM DFO	37,5 µM DFO	4,687 µM DFO	50 µM PHEN	12,5 µM PHEN	1,562 µM PHEN
<b>E</b>	150 µM DFO	18,75 µM DFO	4,687 µM DFO	50 µM PHEN	6,25 µM PHEN	1,562 µM PHEN
<b>F</b>	150 µM DFO	18,75 µM DFO	2,343 µM DFO	50 µM PHEN	6,25 µM PHEN	
<b>G</b>	75 µM DFO	18,75 µM DFO	2,343 µM DFO	25 µM PHEN	6,25 µM PHEN	
<b>H</b>	75 µM DFO	9,375 µM DFO	2,343 µM DFO	25 µM PHEN	3,125 µM PHEN	

24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonucunda xCELLigance Real Time ile DFO ve PHEN uygulandıktan sonra proliferasyon takibi yapıldı.

#### 3.5.4. xCELLigance Real Time Hücre Analiz Sistemi İle MCF-7 Hücrelerinde DFO ve PHEN İçin IC<sub>50</sub> Hesaplaması

##### 3.5.4.1. MCF-7 Hücre Kültür Gruplarına Uygulanacak İlaç Dozlarını İçeren Medyum Hazırlığı

### Çalışma Gruplarının İçerikleri

1. Komplet medyum (kontrol)
2. 150,00  $\mu\text{M}$  DFO içeren komplet medyum
3. 75,00  $\mu\text{M}$  DFO içeren komplet medyum
4. 37,50  $\mu\text{M}$  DFO içeren komplet medyum
5. 18,75  $\mu\text{M}$  DFO içeren komplet medyum
6. 9,37  $\mu\text{M}$  DFO içeren komplet medyum
7. 4,68  $\mu\text{M}$  DFO içeren komplet medyum
8. 2,34  $\mu\text{M}$  DFO içeren komplet medyum
9. 100,00  $\mu\text{M}$  PHEN içeren komplet medyum
10. 50,00  $\mu\text{M}$  PHEN içeren komplet medyum
11. 25,00  $\mu\text{M}$  PHEN içeren komplet medyum
12. 12,50  $\mu\text{M}$  PHEN içeren komplet medyum
13. 6,25  $\mu\text{M}$  PHEN içeren komplet medyum
14. 3,12  $\mu\text{M}$  PHEN içeren komplet medyum
15. 1,56  $\mu\text{M}$  PHEN içeren komplet medyum

#### 3.5.4.2. İlaç Dozlarının Hesaplanması ve İlaç İçeren Medyumların Hazırlanması

##### 3.5.4.2.1. 300 $\mu\text{M}$ , 2X DFO İçeren Komplet Medyum Hazırlanması

- 15 mg DFO tartılıp 1 mL RPMI 1640 medyum içinde çözülerek 22,83835 mM DFO stok solusyonu elde edildi.
- Stok DFO solusyonundan 26,27  $\mu\text{L}$  alınıp 2 mL komplet medyuma (1973,73  $\mu\text{L}$ ) tamamlanarak 300  $\mu\text{M}$  DFO elde edildi.
- Filtre edildi.
- RPMI 1640 komplet medyum ile seri dilüsyon yapılarak 300, 150, 75, 37.5, 18.75, 9.375 ve 4.687  $\mu\text{M}$  DFO içeren komplet medyumlar elde edildi.

##### 3.5.4.2.2. 150 $\mu\text{M}$ , 1X DFO İçeren Komplet Medyum Hazırlanması

- Yukarıda hazırlığı anlatılan 22,83835 mM stok DFO solusyonundan 13,14  $\mu\text{L}$  alınıp 2 mL komplet medyuma (1986,86  $\mu\text{L}$ ) tamamlanarak 150  $\mu\text{M}$  DFO elde edildi.
- Filtre edildi.
- RPMI 1640 komplet medyum ile seri dilüsyon yapılarak 150, 75, 37.5, 18.75, 9.375 ve 4.687  $\mu\text{M}$  DFO içeren komplet medyumlar elde edildi.

#### **3.5.4.2.3. 200 µM, 2X PHEN İçeren Komplet Medyum Hazırlanması**

- 50 mg PHEN tartılıp 0,5 mL DMSO içinde özölerek 504489,96 µM PHEN stok solusyonu elde edildi.
- -80 °C de saklandı.
- Stok PHEN solusyonundan 10 µL alındı ve 1ml RPMI 1640 Komplet Mediuma (990 µL) tamamlanarak 5044,8996 µM PHEN solusyonu elde edildi.
- 5044,8996 µM'lık ara dilüsyondan 79,28 µL alınıp 2 mL komplet mediuma tamamlanarak (1920,72 µL) 200 µM PHEN solusyonu elde edildi.
- Filtre edildi.
- RPMI 1640 komplet medium ile seri dilüsyon yapılarak 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.875 µM PHEN içeren komplet mediumlar elde edildi.

#### **3.5.4.2.4. % 0,02 DMSO İçeren Kontrol Grubu Hazırlanması**

- Stok DMSO dan 10 µL alınır ve 1ml RPMI 1640 Komplet Mediuma (990 µL) tamamlanarak 100 kat dilüe edildi.
- 100 kat ara dilüsyondan 79,28 µL alınıp 1920,72 µL komplet medium ile 2 mL'ye tamamlandı (2000/79,28= 25,22 kat dilüe).
- Toplam olarak 25,22x100= 2522 kat dilüe edilerek 2X, % 0,039 DMSO elde edildi.
- 100 kat ara dilüsyondan 39,64 µL alınıp 1960,36 µL medium ile 2 mL'ye tamamlanarak 1X, % 0,02 DMSO solusyonu elde edildi.
- Solusyonlar filtre edildi.

#### **3.5.4.2.5. 100 µM, 1X PHEN İçeren Komplet Medyum Hazırlanması**

- Yukarıda elde edilişı anlatılmış olan 5044,8996 µM'lık PHEN solusyonundan 39,64 µL alınıp komplet medium ile (1960,36 µL) 2 mL'ye tamamlanarak 100 µM 1X PHEN solusyonu elde edildi.
- Filtre edildi.
- RPMI 1640 komplet medium ile seri dilüsyon yapılarak 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.875 µM PHEN içeren komplet mediumlar elde edildi.



### 3.5.4.3. Hücrelerin 48 well E-pleyde Ekilmesi ve hazırlanan ilaçlı grupların uygulanması

- E-pleyde 100 µL komplet medium pipetlendi ve 15 dakika CO<sub>2</sub> inkübatörde bekletildi.
- Back ground okuma alındı.
- Konflü olan MCF-7 kültür hücrelerine ait flastaki medyum boşatıldı.
- Pasteur pipeti ile ~ 2-3 mL steril PBS alınarak flaska aktarıldı ve yıkandı. PBS uzaklaştırıldı.
- Pasteur pipeti ile flastı kaplayacak kadar tripsin-EDTA (%0,25-%0.02) konuldu.
- 3 dakika CO<sub>2</sub> inkübatörde bekletildi.
- Üzerine yaklaşık 5 mL RPMI 1640 komplet medyum konuldu.
- Pasteur pipet ile bir-kaç kez al/ver yapılarak hücre sayımı belirlendi.
- 3x16'lık E-pleyde 16000 hücre/ kuyu başına olacak şekilde komplet RPMI 1640-hücre karışımı otomatik pipetle 100'er µL dağıtıldı.
- 24 saat 37 °C'de CO<sub>2</sub> inkübatöründe inkübe edildi.
- 24. saatte pleytin tabanına değmeden tüm kuyulardan 100 µL medium alındı ve atıldı.
- Daha sonra 2x konsantrasyonda hazırlanan ilaçlı gruplar ve kontrol için normal komplet medium 100 µl pipetlendi.
- 24 saat 37 °C'de CO<sub>2</sub> inkübatöründe inkübe edildi.
- Daha uzun süren çalışmalarda her 24 saatte bir medium değiştirildi ancak kimyasal ajanlar 1X olarak uygulandı.

### 3.5.4.4. MCF-7 hücreleri için Well E-Pleyt Düzeni

Her kuyusunda 16000 MCF-7 hücresi içeren ve 24 saat inkübe edilen E-Pleyte aşağıda gösterilmiş olan dizayna göre hazırlanan ilaç dozları uygulandı.

**Tablo X:** MCF-7 hücreleri için 48 Well E-pleyt dizayn

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
<b>A</b>	KONT	75 µM	9,375 µM	100 µM	25 µM	3,125 µM

		DFO	DFO	PHEN	PHEN	PHEN
<b>B</b>	KONT	37,5 µM	9,375 µM	100 µM	12,5 µM	3,125 µM
		DFO	DFO	PHEN	PHEN	PHEN
<b>C</b>	KONT	37,5 µM	4,687 µM	100 µM	12,5 µM	1,562 µM
		DFO	DFO	PHEN	PHEN	PHEN
<b>D</b>	150 µM	37,5 µM	4,687 µM	50 µM	12,5 µM	1,562 µM
	DFO	DFO	DFO	PHEN	PHEN	PHEN
<b>E</b>	150 µM	18,75 µM	4,687 µM	50 µM	6,25 µM	1,562 µM
	DFO	DFO	DFO	PHEN	PHEN	PHEN
<b>F</b>	150 µM	18,75 µM	2,343 µM	50 µM	6,25 µM	
	DFO	DFO	DFO	PHEN	PHEN	
<b>G</b>	75 µM	18,75 µM	2,343 µM	25 µM	6,25 µM	
	DFO	DFO	DFO	PHEN	PHEN	
<b>H</b>	75 µM	9,375 µM	2,343 µM	25 µM	3,125 µM	
	DFO	DFO	DFO	PHEN	PHEN	

24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonucunda xCELLigance Real Time ile DFO ve PHEN için IC<sub>50</sub> hesaplamaları yapıldı.

### 3.6. HÜCRE KÜLTÜRLERİNDEN RNA İZOLASYONU

#### 3.6.1. HepG2 Hücrelerinden RNA İzolasyonu

##### 3.6.1.1. HepG2 hücreleri için çalışma medyumlarının hazırlanması

Çalışma grupları

- Komplet medyum (kontrol)
- 500 nM TSA içeren komplet medyum
- 150 µM DFO içeren komplet medyum
- 25 µM PHEN içeren komplet medyum
- 500 nM TSA + 150 µM DFO içeren komplet medyum
- 500 nM TSA + 25 µM PHEN içeren komplet medyum

Yukarıda hazırlığı verilen 150 µM DFO içeren komplet medyum ve 25 µM PHEN içeren komplet medyum'a ilaveten 500 nM TSA içeren komplet medyum hazırlandı.

#### **3.6.1.1.1. 2X, 1000 nM TSA içeren Komplet Medium Hazırlanması**

- 5 mM TSA stoğu elde etmek için 1 mg TSA 661,37 µL DMSO içinde çözüldü.
- Stok 200 kat dilüe edilerek 25 µM TSA elde edildi.
- 120 µL 25 µM TSA dilüsyondan alınıp 2880 µL komplet medium ile 3 mL ye tamamlanarak 1000 nM TSA elde edildi.
- Filtre edildi.
- Final DMSO oranı 10,000' de 1 oldu.

#### **3.6.1.1.2. % 0,02 DMSO içeren Kontrol Grubu Hazırlanması**

- Stok DMSO dan 10 µL alınır ve 1ml DMEM Komplet Mediuma (990 µL) tamamlanarak 100 kat dilüe edildi.
- 100 kat ara dilüsyondan 79,28 µL alınıp 1920,72 µL komplet medium ile 2 mL'ye tamamlandı (2000/79,28= 25,22 kat dilüe).
- Toplam olarak 25,22x100= 2522 kat dilüe edilerek 2X, % 0,039 DMSO elde edildi.
- 100 kat ara dilüsyondan 39,64 µL alınıp 1960,36 µL medium ile 2 mL'ye tamamlanarak 1X, % 0,02 DMSO solusyonu elde edildi.
- Solusyonlar filtre edildi.

#### **3.6.1.2. HepG2 Hücre RNA İzolatları İçin Hücre Ekimi**

- % 70-80 konfluent olan HepG2 kültür hücrelerine ait flasktaki medyum boşaltıldı.
- Pasteur pipeti ile ~2-3 ml steril PBS alınarak flaska aktarılır ve hücreler yıkandıktan sonra PBS uzaklaştırıldı.
- Flaska yüzeyi kaplayacak kadar tripsin-EDTA (% 0.25-% 0.02) konuldu.
- 3 dakika CO<sub>2</sub> inkübatörde bekletildi.
- Üzerine yaklaşık 5 ml komplet DMEM medyum konuldu.
- Pasteur pipet ile bir-kaç kez al/ver yapıldı. Hücre sayımı yapıldı.
- 96'lık pleyte her bir kuyucuğa 9000 hücre/200 µl olacak şekilde steril 5 ml'lik uç kullanılarak DMEM-hücre karışımı otomatik pipetle dağıtıldı.
- %70 konflüent olana kadar 37 °C'de CO<sub>2</sub> inkübatöründe inkübe edilir. (~24 saat)

**Tablo XI:** HepG2 Hücre RNA İzolatları için pleyt dizaynı

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Kont	Kont	Kont	Kont	Kont	Kont	Kont	Kont	Kont	Kont	Kont	Kont
<b>B</b>	Phen 25µM	Phen 25µM	Phen 25µM	Phen 25µM	Phen 25µM	Phen 25µM	Phen 25µM	Phen 25µM	Phen 25µM	Phen 25µM	Phen 25µM	Phen 25µM
<b>C</b>	DFO 150µM	DFO 150µM	DFO 150µM	DFO 150µM	DFO 150µM	DFO 150µM	DFO 150µM	DFO 150µM	DFO 150µM	DFO 150µM	DFO 150µM	DFO 150µM
<b>D</b>	TSA 500nM	TSA 500nM	TSA 500nM	TSA 500nM	TSA 500nM	TSA 500nM	TSA 500nM	TSA 500nM	TSA 500nM	TSA 500nM	TSA 500nM	TSA 500nM
<b>E</b>	TSA+ Phen	TSA+ Phen	TSA+ Phen	TSA+ Phen	TSA+ Phen	TSA+ Phen	TSA+ Phen	TSA+ Phen	TSA+ Phen	TSA+ Phen	TSA+ Phen	TSA+ Phen
<b>F</b>	TSA + DFO	TSA + DFO	TSA + DFO	TSA + DFO	TSA + DFO	TSA + DFO	TSA + DFO	TSA + DFO	TSA + DFO	TSA + DFO	TSA + DFO	TSA + DFO

### 3.6.1.3. HepG2 hücrelerine çalışma medyumlarının uygulanması

- Yukarıda anlatılan hücre ekimi sonucu 24 saatte % 70 konflüent olan hücrelerin medyumundan 100 µL multikanal pipetle uzaklaştırıldı.
- Her bir kuyucuğa Tablo XI'de gösterilen pleyt dizaynına uygun olarak, 2X ilaç içeren komplet DMEM medyumlar 100'er µL pipetlendi. Kontrol grubu içeren kuyulara ise normal komplet medyumdan 100'er µL pipetlendi.
- Pleyt 37 °C'de CO<sub>2</sub> inkübatöründe 24 saat inkübe edildi.
- Çalışmada aynı gruptan 6'şar kuyu birleştirilerek çift numune elde edildi.
- 24 saat sonra hücrelerde RNA izolasyonu sonrasında gen ekspresyon çalışması yapıldı.

### 3.6.1.4. RNA izolasyon solüsyonlarının hazırlanması

**Tablo XII:** RNA İzolasyon çalışma solüsyonlarının hazırlanması

İçerik	Hazırlama	Saklama /Stabilite	Kullanım alanı
DNase 1	0.55 ml Elüsyon Buffer içinde çözülür.	Alikotlanır, -15-25 °C'de 12 ay stabildir.	DNA kontaminasyonunu engellemek için kullanılır.
Wash Buffer 1	20 ml absölu etanol, Wash Buffer I üzerine eklenir ve iyice	15 -25 °C'de son kullanma tarihine kadar stabildir.	Rezidüel kirlilikleri uzaklaştırmak için kullanılır.

	karıştırılır.		
Wash Buffer II	40 ml absölvü etanol, Wash Buffer II üzerine eklenir ve iyice karıştırılır.	15 –25 °C’de son kullanma tarihine kadar stabildir.	Rezidüel kirlilikleri uzaklaştırmak için kullanılır.

### 3.6.1.5. Numune materyal

Pasaj-18 HepG2 hücreleri kullanıldı.

### 3.6.2. MCF-7 hücrelerinde RNA izolasyonu

#### 3.6.2.1. MCF-7 Hücreleri İçin Çalışma Medyumlarının Hazırlanması

Çalışma grupları:

- Komplet medyum (kontrol)
- 500 nM TSA
- 150 µM DFO
- 25 µM PHEN içeren komplet medyum
- 500 nM TSA + 150 µM DFO
- 500 nM TSA + 25 µM PHEN

Yukarıda hazırlığı verilen 150 µM DFO içeren komplet medyum ve 25 µM PHEN içeren komplet medyum’a ilaveten 500 nM TSA içeren komplet medyum hazırlandı.

#### 3.6.2.1.1. 2X, 1000 nM TSA içeren Komplet Medyum Hazırlanması

- 5 mM TSA stoğu elde etmek için 1 mg TSA 661,37 µL DMSO içinde çözüldü.
- Stok 200 kat dilüe edilerek 25 µM TSA elde edildi.
- 120 µL 25 µM TSA dilüsyondan alınıp 2880 µL komplet medyum ile 3 mL ye tamamlanarak 1000 nM TSA elde edildi.
- Filtre edildi.
- Final DMSO oranı 10,000’ de 1 oldu.

#### 3.6.2.1.2. % 0,02 DMSO içeren Kontrol Grubu Hazırlanması

- Stok DMSO dan 10 µL alınır ve 1ml RPMI 1640 Komplet Medyuma (990 µL) tamamlanarak 100 kat dilüe edildi.
- 100 kat ara dilüsyondan 79,28 µL alınıp 1920,72 µL komplet medyum ile 2 mL’ye

tamamlandı (2000/79,28= 25,22 kat dilüe).

- Toplam olarak 25,22x100= 2522 kat dilüe edilerek 2X, % 0,039 DMSO elde edildi.
- 100 kat ara dilüsyondan 39,64 µL alınıp 1960,36 µL medium ile 2 mL'ye tamamlanarak 1X, % 0,02 DMSO solusyonu elde edildi.
- Solusyonlar filtre edildi.

### 3.6.2.2. MCF-7 Hücre RNA İzolatları İçin Hücre Ekimi

- Konflü olan MCF-7 kültür hücrelerine ait flaskadaki medyum boşatıldı.
- Pasteur pipeti ile ~ 2-3 mL steril PBS alınarak flaska aktarıldı ve yıkandı. PBS uzaklaştırıldı.
- Pasteur pipeti ile flaskı kaplayacak kadar tripsin-EDTA (%0,25-%0.02) konuldu.
- 3 dakika CO<sub>2</sub> inkübatörde bekletildi.
- Üzerine yaklaşık 5 mL RPMI 1640 komplet medyum konuldu.
- Pasteur pipet ile bir-kaç kez al/ver yapıldı. Hücre sayımı yapıldı.
- 96 well (cleare cell culture trated) plate 16000 hücre/ kuyu başına olacak şekilde komplet RPMI 1640-hücre karışımı otomatik pipetle 200'er µL dağıtıldı.
- 24 saat 37 °C'de CO<sub>2</sub> inkübatöründe inkübe edildi.

**Tablo XIII:** MCF-7 hücre RNA izolatları için pleyt dizayını

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Kont	Kont	Kont	Kont	Kont	Kont	Kont	Kont	Kont	Kont	Kont	Kont
<b>B</b>	Phen 25µM	Phen 25µM	Phen 25µM	Phen 25µM	Phen 25µM	Phen 25µM	Phen 25µM	Phen 25µM	Phen 25µM	Phen 25µM	Phen 25µM	Phen 25µM
<b>C</b>	<b>DFO</b> 150µM	<b>DFO</b> 150µM	<b>DFO</b> 150µM	<b>DFO</b> 150µM	<b>DFO</b> 150µM	<b>DFO</b> 150µM	<b>DFO</b> 150µM	<b>DFO</b> 150µM	<b>DFO</b> 150µM	<b>DFO</b> 150µM	<b>DFO</b> 150µM	<b>DFO</b> 150µM
<b>D</b>	TSA 500nM	TSA 500nM	TSA 500nM	TSA 500nM	TSA 500nM	TSA 500nM	TSA 500nM	TSA 500nM	TSA 500nM	TSA 500nM	TSA 500nM	TSA 500nM
<b>E</b>	TSA+ Phen	TSA+ Phen	TSA+ Phen	TSA+ Phen	TSA+ Phen	TSA+ Phen	TSA+ Phen	TSA+ Phen	TSA+ Phen	TSA+ Phen	TSA+ Phen	TSA+ Phen
<b>F</b>	<b>TSA + DFO</b>	<b>TSA + DFO</b>	<b>TSA + DFO</b>	<b>TSA + DFO</b>	<b>TSA + DFO</b>	<b>TSA + DFO</b>	<b>TSA + DFO</b>	<b>TSA + DFO</b>	<b>TSA + DFO</b>	<b>TSA + DFO</b>	<b>TSA + DFO</b>	<b>TSA + DFO</b>

### 3.6.2.3. MCF-7 hücrelerine çalışma medyumlarının uygulanması

- Yukarıda anlatılan hücre ekimi sonucu 24 saatte % 70 konflüent olan hücrelerin medyumundan 100 µL multikanal pipetle uzaklaştırıldı.
- Her bir kuyucuğa Tablo XII’de gösterilen pleyt dizaynına uygun şekilde 2X ilaç içeren komplet RPMI 1640 medyumlar 100’er µL pipetlendi. Kontrol grubu içeren kuyulara ise % 0,02 DMSO içeren normal komplet medyum 100’er µL pipetlendi.
- Pleyt 37 °C’de CO<sub>2</sub> inkübatöründe 24 saat inkübe edildi.
- Çalışmada aynı gruptan 6’şar kuyu birleştirilerek çift numune elde edildi.
- 24 saat sonra hücrelerde RNA izolasyonu sonrasında gen ekspresyon çalışması yapıldı.

### 3.6.2.4. RNA izolasyon solüsyonlarının hazırlanması

**Tablo XIV:** RNA İzolasyon çalışma solüsyonlarının hazırlanması

İçerik	Hazırlama	Saklama /Stabilite	Kullanım alanı
DNase 1	0.55 ml Elüsyon Buffer içinde çözülür.	Alikotlanır, -15-25 °C’de 12 ay stabildir.	DNA kontaminasyonunu engellemek için kullanılır.
Wash Buffer 1	20 ml absöü etanol, Wash Buffer I üzerine eklenir ve iyice karıştırılır.	15 -25 °C’de son kullanma tarihine kadar stabildir.	Rezidüel kirlilikleri uzaklaştırmak için kullanılır.
Wash Buffer II	40 ml absöü etanol, Wash Buffer II üzerine eklenir ve iyice karıştırılır.	15 -25 °C’de son kullanma tarihine kadar stabildir.	Rezidüel kirlilikleri uzaklaştırmak için kullanılır.

### 3.6.2.5. Numune materyali

Pasaj 23 MCF-7 hücreleri kullanıldı

### 3.6.3. RNA İZOLASYON PROTOKOLÜ

High-pure PCR RNA isolation kiti (Roche Diagnostics, Germany) kullanılarak MCF-7 ve HepG2 hücre kültürlerinden Tablo XV’deki protokole göre RNA izolasyonu yapıldı. Spektrofotometre ile ölçüm yapıldı.

**Tablo XV:** RNA izolasyon protokolü

1.	Kuyulardaki medium multikanal pipet ile tabana değmeden uzaklaştırılır.
2.	Kuyular 150 µl 37 °C'ye ısıtılmış PBS ile 1 kez yıkanır.
3.	Bütün kuyulara 50 µl Tripsin EDTA pipetlenir.
4.	Plate 3 dakika CO <sub>2</sub> inkübatörde bekletilir.
5.	Kuyulara 100'er µl MCF-7 için RPMI 1640, HepG2 için DMEM komplet medium eklenir.
6.	1000' lik pipetle 6 kuyu birleştirilip 1,5 mL' lik eppendorfa alınır.
7.	Eppendorflar 1000 g' de 5 dakika 8 °C'de santrifuj edilir.
8.	Süpernatant atılır.
9.	Hücreler, 200 µl PBS ile resüspanse edilir.
10.	Lysis/-Binding Buffer' dan 200 µl (yeşil kapak) eklenir ve 15 s. vortekslenir.
11.	Filtreli tüp, toplayıcı tüpe yerleştirilir ve numune filtreli tüpe pipetlenir (maksimum 700 µl)
12.	Numuneler oda sıcaklığında, 1 dakika, 14000 rpm'de santrifuj edilir.
13.	Toplayıcı tüpten artık uzaklaştırılır ve filtreli tüp tekrar yerleştirilir.
14.	Steril bir reaksiyon tüpüne her numune için 90 µl DNase Incubation Buffer (beyaz kapak) pipetlenir, üzerine 10 µl DNase I eklenerek karıştırılır. Solüsyon filtreli tüpe transfer edilir.
15.	15 dakika, +15 +25°C'de inkübe edilir.
16.	Filtreli tüpe 500 µl Wash Buffer I pipelenir ve oda sıcaklığında 1 dakika 14000 rpm'de santrifuj edilir.
17.	Artık uzaklaştırılır ve filtreli tüp toplayıcı tüpe yerleştirilir.
18.	Filtreli tüpe 500 µl Wash Buffer II (mavi kapak) pipetlenir ve oda sıcaklığında 1 dakika 14000 rpm'de santrifuj edilir.
19.	Artık uzaklaştırılır ve filtreli tüp toplayıcı tüpe yerleştirilir.
18.	Filtreli tüpe 200 µl Wash Buffer II (mavi kapak) pipetlenir ve oda sıcaklığında 2 dakika maksimum hızda (~14000 rpm) santrifuj edilerek gerideki Wash buffer'ın uzaklaşması sağlanır.
19.	Ekstra santrifugasyon ile rezidü wash bufferın uzaklaşması sağlanır
20.	Toplayıcı tüp atılarak filtreli tüp temiz, steril 1,5 ml'lik mikro-santrifuj tüpüne yerleştirilir.



21.	RNA' yı elüe etmek için, Filtreli tüpe 50 µl Elution Buffer pipetlenir.
22.	Oda sıcaklığında 1 dakika, 14000 rpm'de santrifüj edilir.
23.	Mikrosantrifüj tüpte biriken elüe RNA'dır.
24.	Elüe RNA direk REAL TIME-PCR için kullanılır ya da -80°C'de daha sonra analiz edilmek üzere saklanır

### 3.7. GEN EKSPRESYON ÇALIŞMASI

#### 3.7.1. Hücre RNA izolatlarından cDNA sentezi

Transcriptor first strand cDNA synthesis kiti (Roche Diagnostics, Germany) kullanılarak Thermal Cycler cihazında tablo XVI'da gösterilen protokol ile cDNA sentezi yapıldı.

**Tablo XVI:** RNA izolatlarından cDNA sentez protokolü

1.	Kullanmadan önce tüm reaktiflerin çözünmesi sağlanır.
2.	Protokol uygulamadan önce tüm reaktifler kısa süreli santrifüj edilir.
3.	Reaksiyon düzenlenirken tüm reaktifler buz üzerinde tutulmalıdır.
4.	Buz üzerinde ya da soğuk kolon üzerinde tutulan steril, nuclease-free, thin-walled PCR tüpüne, reaksiyon başına 50 µl olacak şekilde template-primer karışımı hazırlanır. Bu karışımda; 17,5 µl PCR-grade distile su 30 µl (1 µg) Total RNA template 2,5 µl (2.5 µM) Anchored-oligo(dT)18 Primer bulunur.
5.	Template-primer karışımı içeren tüpler 10 dakika 65°C'de termal cycler cihazında tutulur. Bu basamak RNA sekonder yapısının denaturasyonunu sağlar. ( Bu amaçla GeneAmp 9700 Thermal Cycler, 'cdna1' programı kullanıldı)
6.	Tüpler daha sonra acele olarak soğuk ortama alınır.
7.	Template-primer karışımını içeren tüplere aşağıdaki maddeler pipetlenir. <ul style="list-style-type: none"> <li>• 10 µl, 5X Transkriptör Revers Transkriptaz Reaksiyon Buffer</li> <li>• 1,25 µl (20 U) Protekör RNaz İnhibitör</li> <li>• µl her biri 1 mM olan Deoksinükleotid Miks</li> <li>• 1,25 µl (10 U) Transkriptör Revers Transkriptaz</li> </ul>
8.	Toplam 50 µl olan tüpteki reaktifler iyice karıştırılır. Vorteks yapılmamalıdır.

9.	Tüpler GeneAmp 9700 termal Cyler cihazına yerleştirilir ve cdna-oligo-trans' programı ayarlanır.
10.	60 dakika, 50°C'de inkübasyona bırakılır.
11.	Transcriptor Reverse Transcriptase inaktivasyonu için tüp, 85°C'de 5 dakika bekletilir.
12.	Tüpler buz üzerine alınarak reaksiyon durdurulur.
13.	Reaksiyon tüpü +2-+8°C'de 1-2 saat ya da -15-25°C'de daha uzun süre saklanabilir.
14.	Elde edilen cDNA purifikasyona gerek olmadan PCR için kullanılabilir.
15.	PCR için 20 µl reaksiyon hacmi içinde 2-5 µl cDNA kullanılmalıdır.

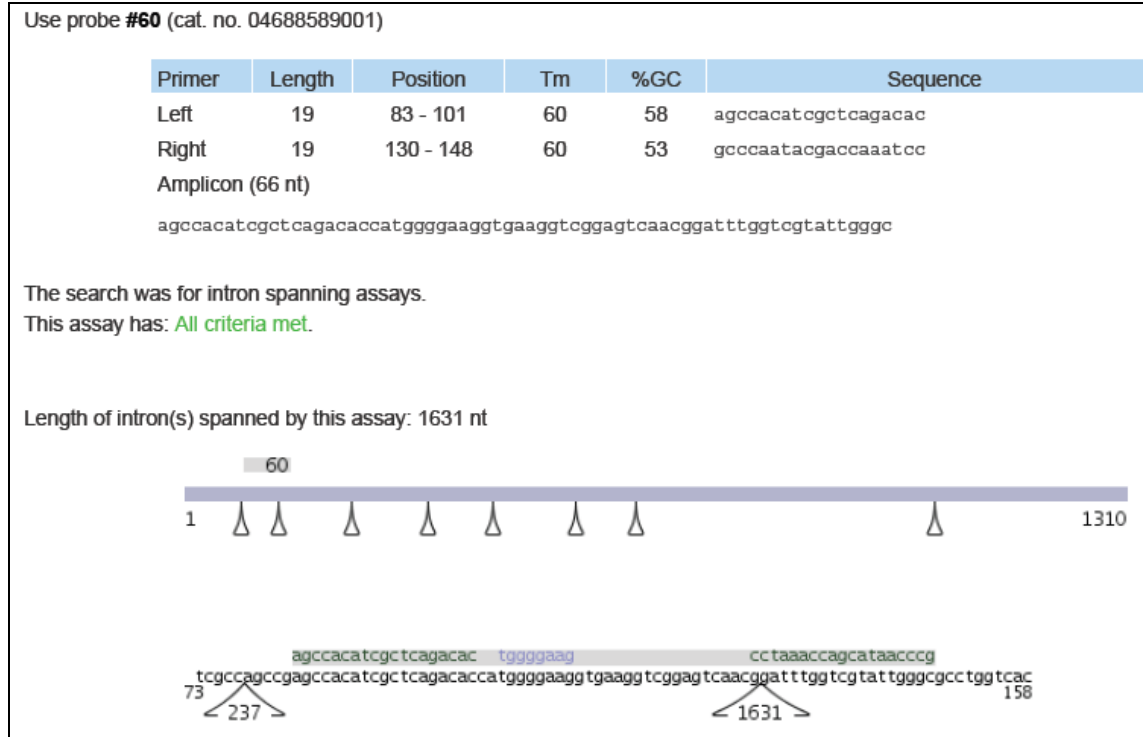
### 3.7.2. Biyoinformatik analiz

İyi düzenlenmiş primerler ve problemler doğru bölgelere bağlanarak amplifikasyon sağlarlar ve genomik DNA kontaminasyonundan kaynaklanan yanlış pozitif sonuçları önleyebilirler. Primer ve problemlerin düzenlenmesi için hazırlanmış çeşitli bilgisayar programları kullanılmaktadır. Primer ve prob dizaynında dikkat edilecek başlıca noktalar şunlardır.

- Tm dereceleri, primer için 58-60°C, prob için 68-70°C olmalı.
- G-C içerikleri % 30-80 aralığında olmalı.
- Primerler 15-30 baz uzunluğunda olmalı.
- Primerin 3' ucundaki son 5 nükleotitteki total G-C içeriği 2'yi aşmamalı.
- Maksimum ampikon büyüklüğü 400 bp'i aşmamalı (ideali 50-150 bp).
- Problemler ardışık benzer nükleotit içermemeli (özellikle 4 veya daha fazla G).
- Problemlerdeki % 30-80 aralığındaki G-C içeriğinde C, G'den fazla olmalı.
- Problemlerin 5' ucunda G olmamalı

Çalışmada Referans gen olarak Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) kullanıldı. GAPDH ekspresyonunun belirlenmesi için primer-prob dizaynı, Roche Universal Probe Library (UPL) programı kullanılarak yapıldı. BLAST (NCBI; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) analizleri ile doğrulukları teyit edildi. Aşağıdaki tablolarda primer-prop dizaynları görülmektedir.

### 3.7.2.1. GAPDH Primer-Prob Dizaynı



Şekil 20: GAPDH primer-prob dizaynı (GAPDH UPL prob 60:tggggaag)

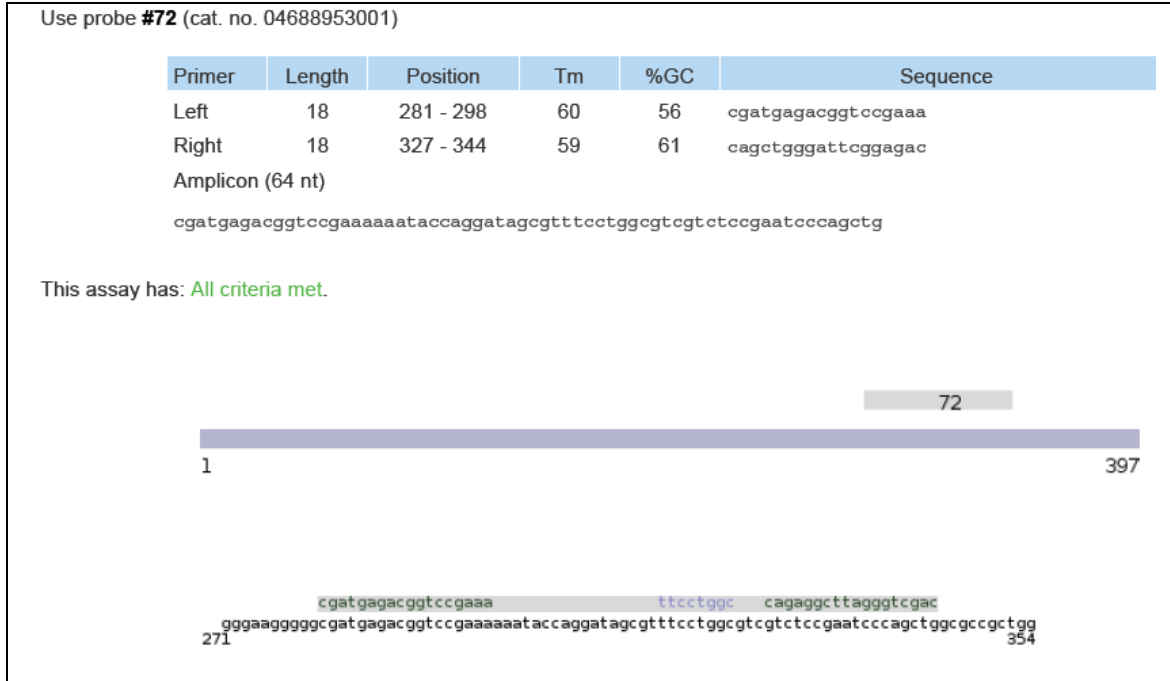
### 3.7.2.2. NdrG1 Varyant1 Primerleri ve Probenin Belirlenmesi

NdrG1 ekspresyonunun belirlenmesi için NdrG1 primer-prob dizaynı, Roche UPL programı kullanılarak yapıldı (NdrG1 Varyant1 prob72: TTCCTGGC). BLAST analizi ile doğrulukları teyit edildi.

NdrG1 Varyant1'e spesifik primerler geliştirerek sadece NdrG1 varyant1 mRNA'nın çoğaltılmasını sağladık. NdrG1 varyant1 5'UTR bölgesinde 586 baz bulunmaktadır. Bunun için 5'UTR bölgesinde bulunan (Varyant2 de bulunmayan) 397 bazlık bölgeyi seçtik Forward Primer 5'281-3'298, Reverse Primer 5'327-3'344 bölgelerinden UPL programı kullanılarak yapıldı. Böylece 5'UTR bölgesinde 397 baz daha eksik olan Varyant2'nin çoğalması engellenmiş oldu.

Tablo XVII: NdrG1 Varyant1 primer dizaynı

Forward Primer	5' Pozisyon	3' Pozisyon	Uzunluk
CGATGAGACGGTCCGAAA	281	298	18
Reverse Primer	5' Pozisyon	3' Pozisyon	Uzunluk
CAGCTGGGATTCGGAGAC	327	344	18



**Şekil 21:** NdrG1 Varyant1 primer-prob dizaynı

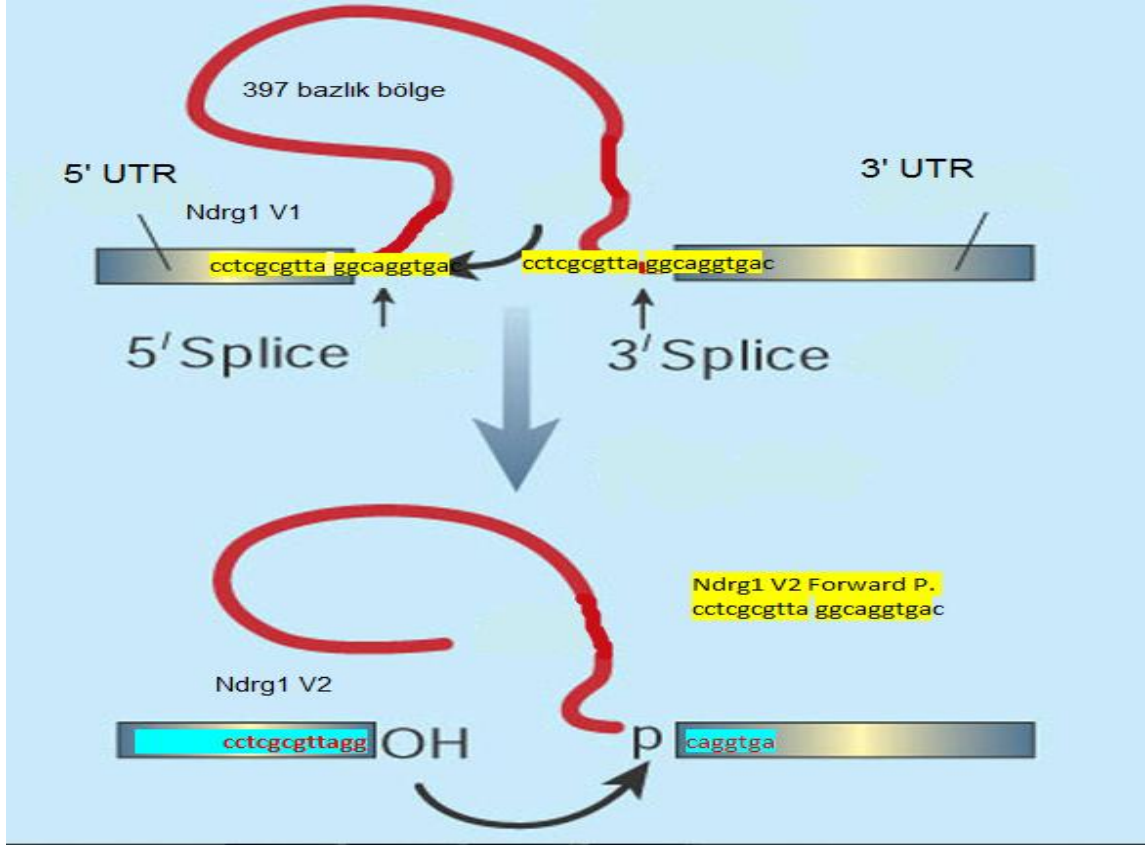
### 3.7.2.3. NdrG1 Varyant2 Primer-Prob Dizaynı

NdrG1 ekspresyonunun belirlenmesi için NdrG1 variant 2 forward primeri Des R. Richardson ve arkadaşlarının (Nghia T.V. Le ve Des R. Richardson, 2004) çalışmasından faydalanılarak belirlendi. NdrG1 variant 2 reverse primeri ve probu Roche UPL programı kullanılarak dizayn edildi (NdrG1 Varyant2 UPL Prob 21: TGGCTCTG). BLAST analizi ile doğrulukları teyit edildi.

NdrG1 Varyant2'ye spesifik primerler geliştirerek Yalnızca NdrG1 Varyant2'nin çoğaltılması sağlandı. NdrG1 Varyant2 UTR bölgesinde 189 baz bulunmaktadır. Bunun için; Forward primer'in 12 bazlık kısmı 5' uç bölgesinde (5' 161 - 3' 172 bazlar arası) seçilirken diğer 7 bazlık (5' 173 – 3' 179 bazlar arası) kısmı 397 bazlık kısım çıktıktan sonraki bölgeden seçildi. Böylece bu primerin sadece Varyant2'ye spesifik olması sağlandı. Reverse Primer 5' 343-3' 325 arası bazlar seçildi.

**Tablo XVIII:** NdrG1 Varyant2 primer dizaynı

Forward Primer	5' Pozisyon	3' Pozisyon	Uzunluk
CCTCGCGTTAGGCAGGTGA	161	179	19
Reverse Primer	5' Pozisyon	3' Pozisyon	Uzunluk
GAGTCCCACACAGCGTGAC	343	325	19



Şekil 22: NdrG1 5' UTR bölgesi ve primer dizaynı

### 3.7.3. Q-PCR Çalışması

Relatif gen ekspresyon analizi yapılırken dikkat edilmesi gereken konular:

1. RNA izolasyonu High Pure RNA izolasyon kiti kullanılarak yapılmalı ve elüsyon hacmi hücre sayısı az ise RNA dilüsyonunu önlemek amacıyla düşük volümle yapılmalı (~ 50 µL)
2. İzolasyon sonrası RNA'lar nanospektrofotometre ile ölçülerek cDNA sırasında kullanılacak RNA miktarı belirlenmeli. Eğer düşük miktarda RNA izole edilmişse cDNA sentezi sırasında olabildiğince yüksek RNA kullanılmalı.
3. cDNA sentezi için kullanılacak RNA konsantrasyonları, farklı gruplar arasında birbirine yakın olmalıdır. Gerekirse RNA dilüsyonu yapılarak yakın konsantrasyonlara getirilebilir.
4. cDNA sentezi Transkriptör First Strand cDNA sentez kiti kullanılarak yapılmalı.
5. cDNA sentezi oligod(T) primer kullanılarak, her bir mRNA'ya ait tek bir cDNA sentezi sağlanarak daha spesifik yapılabilir. (Random heksamer ile bir mRNA'dan birkaç cDNA oluşabilir)

6. Düşük konsantrasyondaki RNA kullanılarak yapılan cDNA sentezinde Random hegzamer kullanılarak verim artırılabilir.
7. QPCR’da kullanılacak primer ve probler Roche UPL programı kullanılarak dizayn edilebilir. Hiçbir sorun ile karşılaşılmadı.
8. Kullanılacak primerler sipariş edilmeden önce mutlaka biyoinformatik analize tabi tutulmalı.
9. Primerler 100 pmol/μL olacak şekilde sulandırıldıktan sonra aliqoutlanarak saklanmalı. PCR çalışılacağı zaman aliqout 10 pmol/μL’e dilüe edilerek kullanılmalı.
10. Problar tekrarlayan don-çözlerden kaçınmak için aliqoutlanarak saklanmalı.
11. Normalizasyon için kullanılacak referans genin ekspresyonu hücrenin maruz kaldığı koşullardan etkilenmeden eksprese olabilmelidir. Bu amaçla kullanılan ‘housekeeping gen’lerden en sık kullanılanları GAPDH, β-actin, siklofilin ve 28S rRNA’dır.
12. Seçilen referans gen, çalışılacak genin ekspresyon düzeyine yakın olmalıdır. Örneğin yüksek oranda eksprese olan bir gen için düşük düzeylerde ekspresyonu olan bir referans gen uygun değildir.
13. Yapılan çalışmada numuneler standart deviasyonun hesaplanabilmesi için en az 3 tekrarlı olarak çalışılmalı.
14. Çalışılacak olan her bir gen background hesabında yanlışlığa yol açmaması için mutlaka ayrı pleytte çalışılmalı veya aynı pleytte çalışılacaksa ayrı ayrı subsetler tanımlanarak çalışılmalı.
15. QPCR relative kantitasyon Komparatif CP Metodu ( $\Delta\Delta CP$  metodu) ile çalışılacaksa Efficiency mutlaka 2’ye ayarlanmalı.
16. 15 CP’nin altı ve 40 CP’nin üzeri analizde değerlendirmeye alınmamalıdır. 35-40 CP gri zondur gen ekspresyonu çok düşük düzeydedir ve “0” kabul edilebilir.
17. Bizim çalışma gruplarının relatif gen ekspresyon analizi QIAGEN 2009 relative expression software (REST) kullanılarak yapıldı.  
Her bir ilaç grubundan 6’şar kuyu birleştirilerek 2 RNA izolatu elde edildi.  
Her bir RNA izolatından Revers Transkriptaz ile 2’şer tane cDNA elde edildi.  
Her bir cDNA’dan 2’şer tane QPCR çalışılarak her bir ilaç grubu 8 tekrarlı çalışılmış oldu.

### 3.7.3.1. GAPDH için Q-PCR Çalışması

- Her reaksiyon için toplam 18 µL olacak şekilde master mix hazırlandı (Tablo XIX).

**Tablo XIX.** GAPDH Q-PCR için Master Mix İçeriği

Malzeme	Hacim	Başlangıç Kons.	Final Kons.
PCR-grade distile su	5,8 µL		
Prim <sub>forw</sub> GAPDH	1 µL	10 µM	0,5 µM
Prim <sub>rev</sub> GAPDH	1 µL	10 µM	0,5 µM
LNA Hidroliz Prob (LNA 60)	0,2 µL	10 µM	0,1 µM
LC 480 Prob Master	10 µL	2X	1X
<b>Toplam Hacim</b>	18 µL		

- Çalışılacak tüm pleytin kuyucuklarına 18'er µL master mix pipetlendi.
- Her numune için uygun kuyucuklara 2'şer µL cDNA Template pipetlendi.
- Pipetlemeler bittikten sonra pleyt sealing foil ile kapatıldı.
- 2 dakika oda sıcaklığında 1500xg'de santrifüj edildi.
- LightCycler 480 II (Roche Diagnostics GmbH, Germany) cihazında aşağıdaki programa göre PCR çalışması yapıldı.

#### GAPDH Q-PCR programı:

Program adı	Siklus	Sıcaklık (°C)	Süre	Analiz modu
Pre-inkübasyon	1	95 °C	10 dk.	None
Amplifikasyon	45	95 °C	10 sn.	Kantifikasyon
		55 °C	15 sn	
		72 °C	1 sn	
Soğutma	1	40 °C	10 sn.	None

### 3.7.3.2. NdrG1 Varyant1 için Q-PCR Çalışması

- Her reaksiyon için toplam 18 µL olacak şekilde master mix hazırlandı (Tablo XX).

**Tablo XX.** NdrG1 Varyant1 Q-PCR için Master Mix İçeriği

Malzeme	Hacim	Başlangıç Kons.	Final Kons.
---------	-------	-----------------	-------------

PCR-grade distile su	5,8 µL		
Prim <sub>forw</sub> Ndr1 V1	1 µL	10 µM	0,5 µM
Prim <sub>rev</sub> Ndr1 V1	1 µL	10 µM	0,5 µM
LNA Hidroliz Prob (LNA 72)	0,2 µL	10 µM	0,1 µM
LC 480 Prob Master	10 µL	2X	1X
<b>Toplam hacim</b>	18 µL		

- Çalışılacak tüm pleytin kuyucuklarına 18'er µL master mix pipetlendi.
- Her numune için uygun kuyucuklara 2'şer µL cDNA Template pipetlendi.
- Pipetlemeler bittikten sonra pleyt sealing foil ile kapatıldı.
- 2 dakika oda sıcaklığında 1500xg'de santrifüj edildi.
- LightCycler 480 II (Roche Diagnostics GmbH, Germany) cihazında aşağıdaki programa göre PCR çalışması yapıldı.

#### Ndr1 V1 Q-PCR programı

Program adı	Siklus	Sıcaklık (°C)	Süre	Analiz modu
Pre-inkübasyon	1	95 °C	10 dk.	None
Amplifikasyon	45	95 °C	10 sn.	Kantifikasyon
		55 °C	15 sn	
		72 °C	1 sn	
Soğutma	1	40 °C	10 sn.	None

#### 3.7.3.3. Ndr1 Varyant2 için Q-PCR Çalışması

- Her reaksiyon için toplam 18 µL olacak şekilde master mix hazırlandı (Tablo XX).

**Tablo XXI.** Ndr1 Varyant2 Q-PCR için Master Mix İçeriği

Malzeme	Hacim	Başlangıç Kons.	Final Kons.
PCR-grade distile su	5,8 µL		
Prim <sub>forw</sub> Ndr1 V2	1 µL	10 µM	0,5 µM
Prim <sub>rev</sub> Ndr1 V2	1 µL	10 µM	0,5 µM
LNA Hidroliz Prob (LNA 21)	0,2 µL	10 µM	0,1 µM



LC 480 Prob Master	10 µL	2X	1X
<b>Toplam hacim</b>	18 µL		

- Çalışılacak tüm pleytin kuyucuklarına 18'er µL master mix pipetlendi.
- Her numune için uygun kuyucuklara 2'şer µL cDNA Template pipetlendi.
- Pipetlemeler bittikten sonra pleyt sealing foil ile kapatıldı.
- 2 dakika oda sıcaklığında 1500xg'de santrifüj edildi.
- LightCycler 480 II (Roche Diagnostics GmbH, Germany) cihazında aşağıdaki programa göre PCR çalışması yapıldı.

#### **NdrG1 V2 Q-PCR programı**

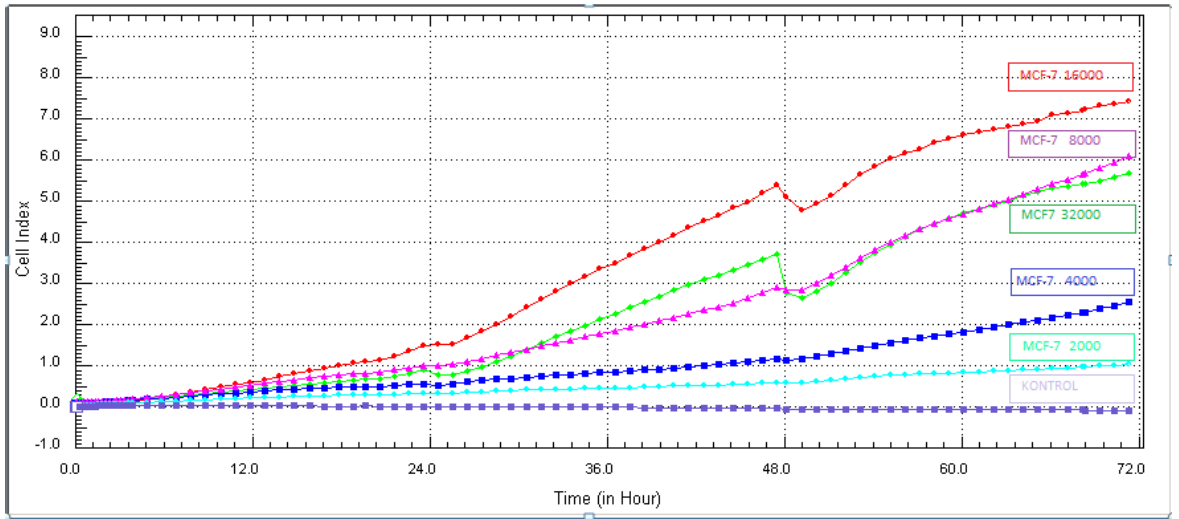
<b>Program adı</b>	<b>Siklus</b>	<b>Sıcaklık (°C)</b>	<b>Süre</b>	<b>Analiz modu</b>
Pre-inkübasyon	1	95 °C	10 dk.	None
Amplifikasyon	45	95 °C	10 sn.	Kantifikasyon
		55 °C	15 sn	
		72 °C	1 sn	
Soğutma	1	40 °C	10 sn.	None

## 4. BULGULAR

### 4.1. HEPG2 VE MCF-7 HÜCRELERİNDE PROLİFERASYON VE CANLILIK ANALİZİ

#### 4.1.1. MCF-7 Hücrelerinde Proliferasyon Ve Canlılık Analizi

Elektriksel impedans sinyaline dayalı hücre sayısını, canlılığını ve proliferasyonunu monitörize etmeye imkan veren xCELLigence real time hücre analiz sistemi ile 72 saat izlem yapıldı. MCF-7 hücrelerine ait hücre indeks değerlerinin zamana karşı grafiği şekil 23’de görülmektedir.

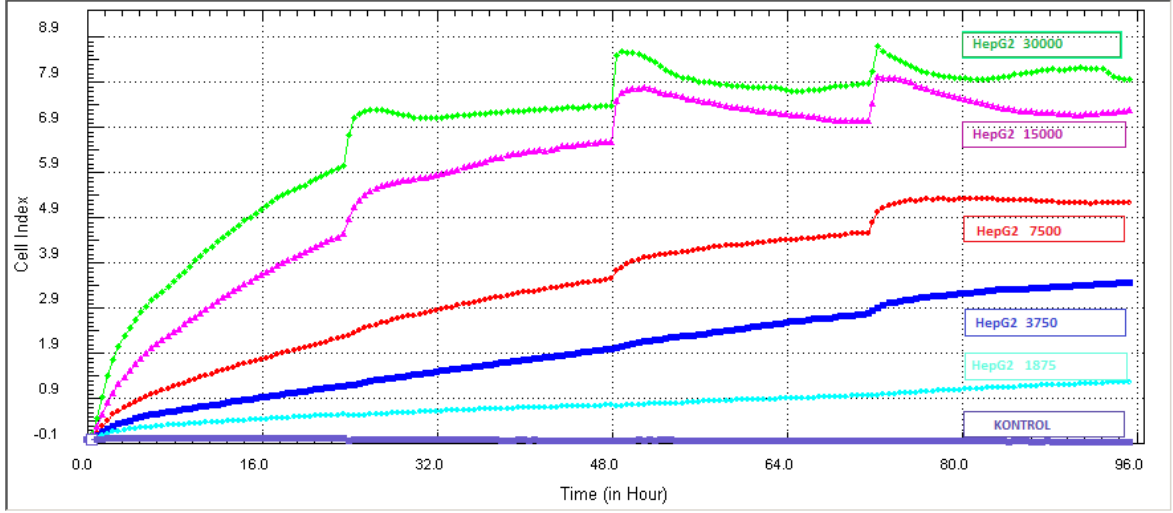


Şekil 23: MCF-7 hücrelerinin 72 saatlik inkübasyon büyüme eğrileri

72 saat inkübasyon sonucunda MCF-7 hücrelerinin büyüme eğrileri analizi değerlendirilerek optimal hücre sayısı belirlendi. Optimal hücre sayısının her kuyu için 16.000 olduğu kanaatine varıldı ve deney bu hücre sayısı üzerinden yürütüldü.

#### 4.1.2. HEPG2 Hücrelerinde Proliferasyon Ve Canlılık Analizi

72 saat inkübasyon sonucunda xCELLigence Real Time ile büyüme eğrileri analizi yapıldı ve optimal hücre sayısı belirlendi. HepG2 için optimal hücre sayısının her kuyu için 9000 olduğu kanaatine varıldı ve deney bu hücre sayısı üzerinden yürütüldü. HepG2 hücrelerine ait hücre indeks değerlerinin zamana karşı grafiği şekil 24’de görülmektedir



**Şekil 24:** HepG2 hücrelerinin 72 saatlik inkübasyon büyüme eğrileri

## 4.2. xCELLigence REAL TIME HÜCRE ANALİZ SİSTEMİ İLE MCF-7 ve HepG2 HÜCRELERİNDE DFO ve PHEN İÇİN IC<sub>50</sub> HESAPLAMASI

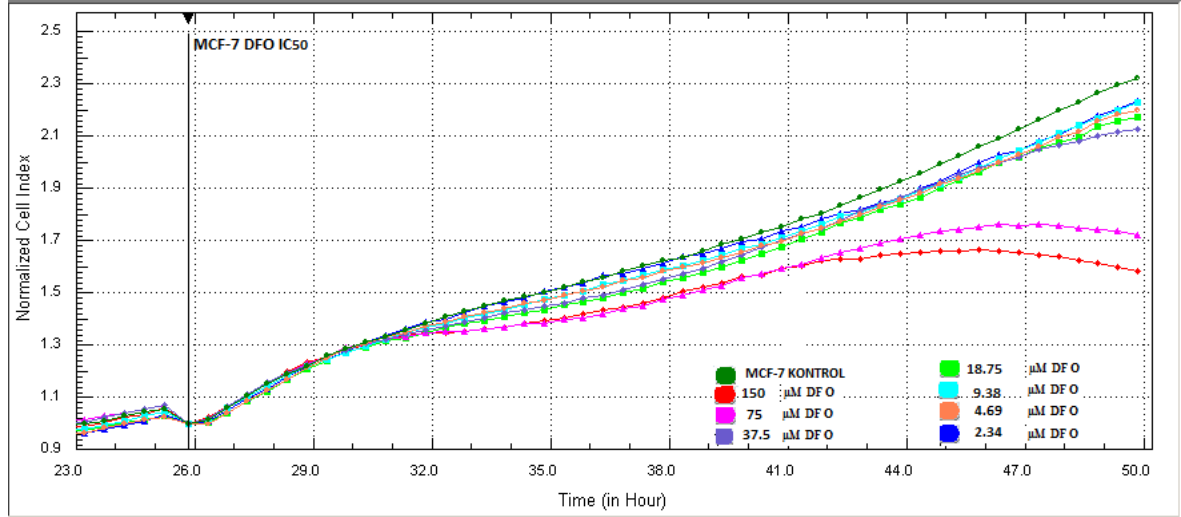
### 4.2.1. MCF-7 Hücrelerinde DFO İçin IC<sub>50</sub> Hesaplama

Elektriksel impedans sinyaline dayalı hücre sayısını, canlılığını ve proliferasyonunu monitörize etmeye imkan veren xCELLigence real time hücre analiz sistemi ile 96 saat izlem yapıldı. 24. saatten itibaren kontrol grubu baz alınarak normalize edilmiş hücre indeks değerlerinin zamana karşı grafiği oluşturuldu. Her kuyuda 16.000 hücre bulunan E-plateye daha önce belirlenen dozlarda kimyasallar uygulandı. 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonucunda xCELLigence Real Time ile DFO için IC<sub>50</sub> hesaplamaları yapıldı. İlaçların uygulanmasından sonraki 24. saattaki grafiği şekil 25’de, 48. saat grafiği şekil 26’de ve 72. saatteki grafiği ise şekil 27’da gösterilmiştir.

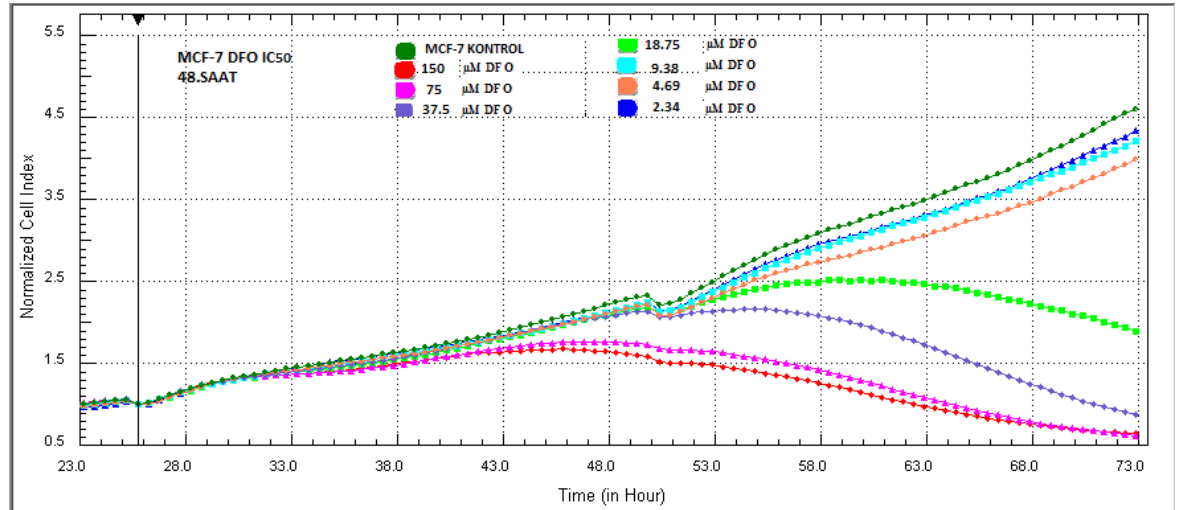
Çalışmadan şu sonuçlar çıkarıldı:

1. MCF-7 hücrelerinde 24 saatten önce DFO nun ciddi bir etkisi görülmemektedir.
2. 2,343 ve 4,687  $\mu$ M DFO içeren grupta 24-48. saat arası ve sonrası Cell indeks artışı mevcuttur.
3. 9,375  $\mu$ M DFO içeren grupta 48-72 saat diliminde plato formasyonu oluşmaya başladı.
4. 18,75  $\mu$ M DFO içeren grup 24-48 saat diliminde stostatik-sitotoksik, 48-72 saat diliminde sitotoksik etki gösterdi.

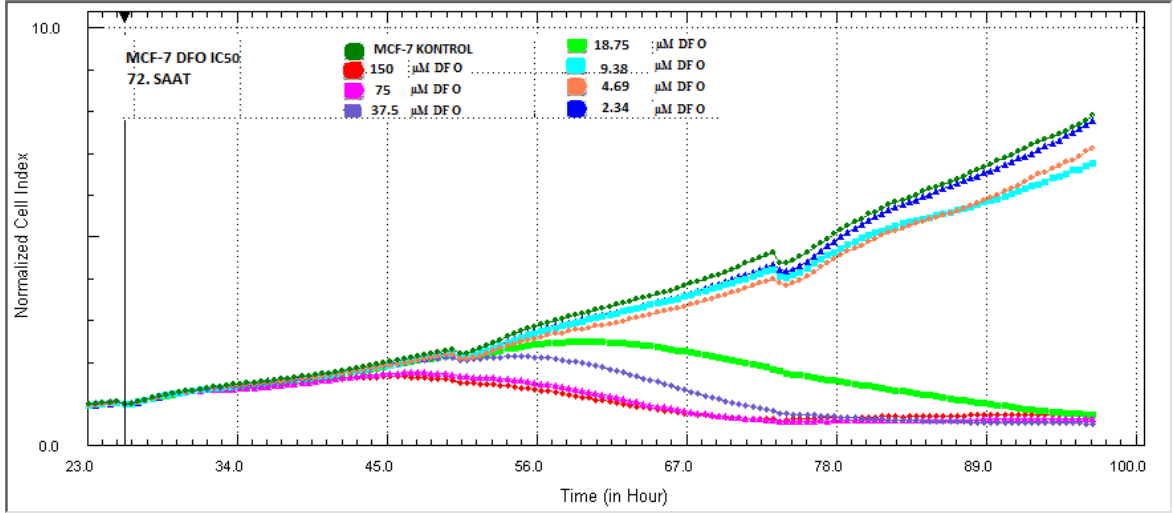
5. 37,5  $\mu\text{M}$  DFO içeren grup 24-48 saat diliminde başlayan sitotoksik etki 48-72 saat diliminde de devam etti.
6. 75  $\mu\text{M}$  DFO içeren grupta 24.saat sonuna doğru başlayan sitotoksik etki 48-72 saatler arasında daha belirgin olarak devam etti.
7. 150  $\mu\text{M}$  DFO içeren grup 75  $\mu\text{M}$  DFO içeren grup ile paralellik gösterdi.



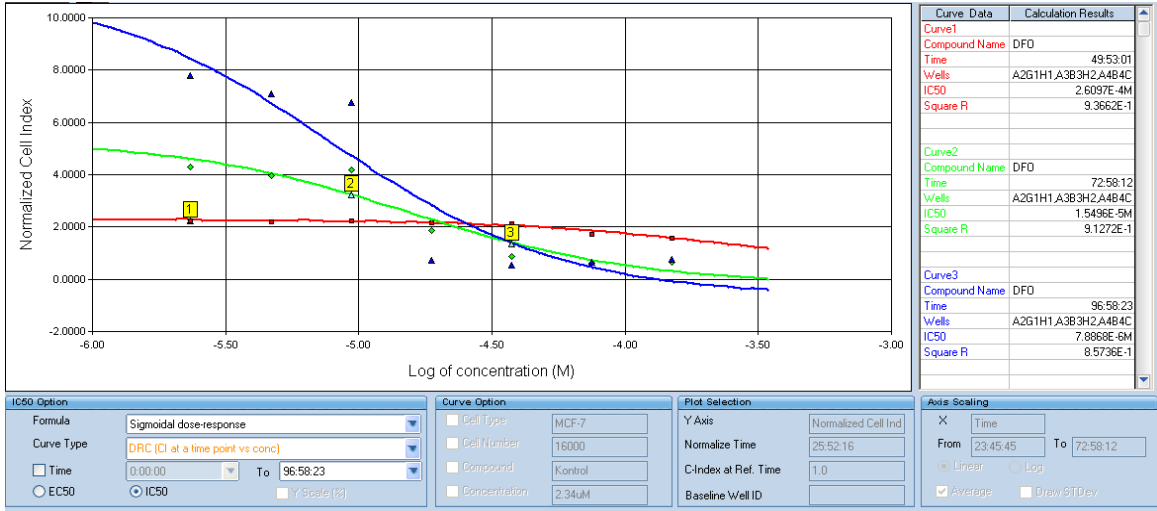
**Şekil 25:** MCF-7 hücrelerinde DFO uygulandıktan sonra ilk 24 saat proliferasyon ve canlılık real time hücre analiz grafiği.



**Şekil 26:** MCF-7 hücrelerinde DFO uygulandıktan sonra 48. saat proliferasyon ve canlılık real time hücre analiz grafiği



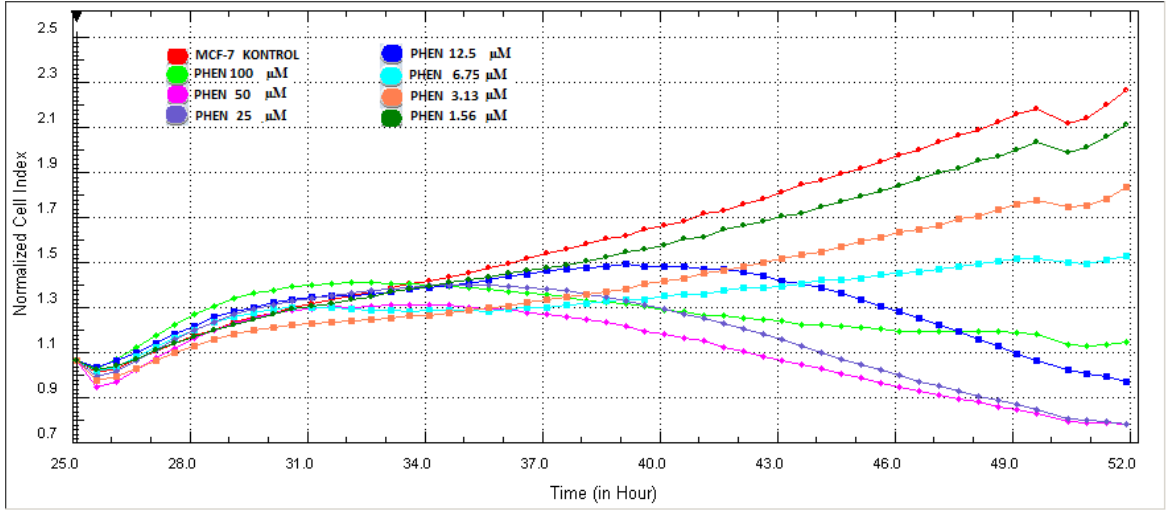
Şekil 27: MCF-7 hücrelerinde DFO uygulandıktan sonra 72. saat proliferasyon ve canlılık real time hücre analiz grafiği



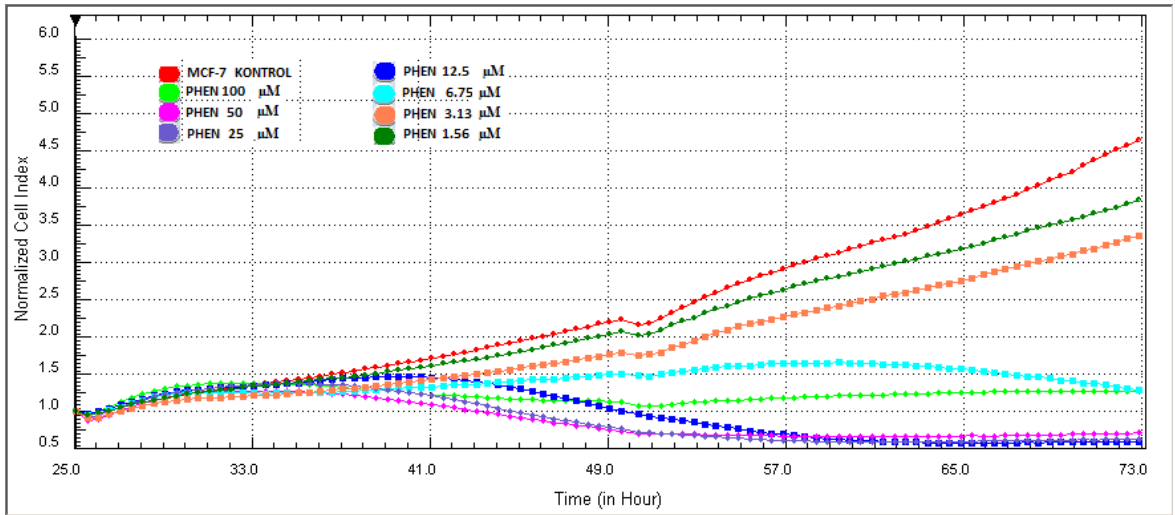
Şekil 28: MCF-7 hücrelerinde DFO uygulandıktan sonra ilk 24, 48 ve 72. saatlerde hesaplanan IC<sub>50</sub> değerleri ve grafiği görülmektedir.

#### 4.2.2. MCF-7 hücrelerinde PHEN için IC<sub>50</sub> hesaplaması

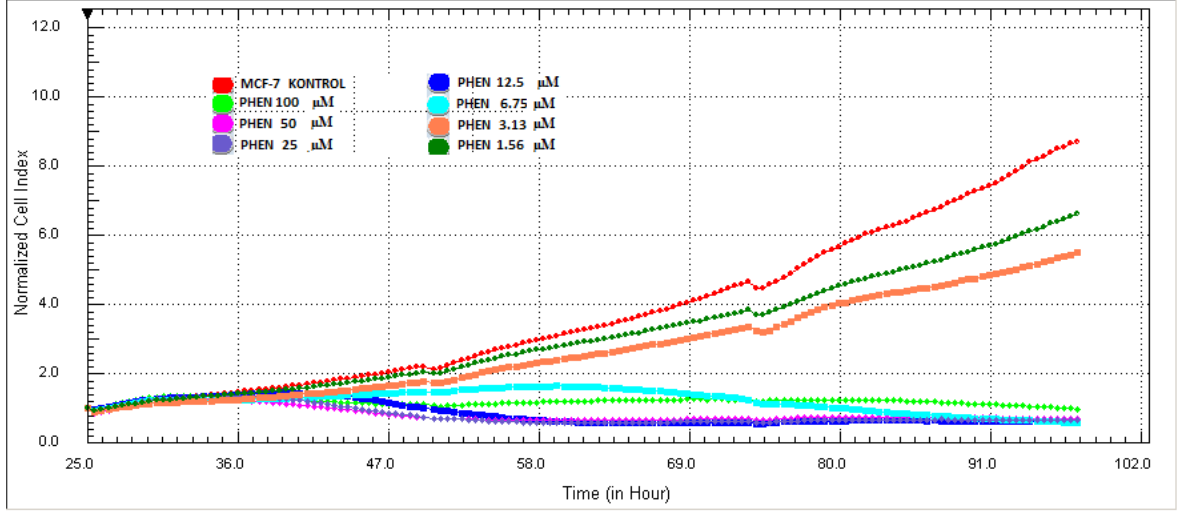
24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonucunda xCELLigance Real Time ile PHEN için IC<sub>50</sub> hesaplamaları yapıldı ve deney PHEN için hesaplanan IC<sub>50</sub> üzerinden yürütüldü. Her kuyuda 16.000 hücre bulunan E-plateye daha önce belirlenen dozlarda kimyasallar uygulandı. 24. saatten itibaren kontrol grubu baz alınarak normalize edilmiş hücre indeks değerlerinin zamana karşı grafiği oluşturuldu. İlaçların uygulanmasından sonraki 24. saattaki grafiği şekil 29'de, 48. saat grafiği şekil 30'da ve 72. saatteki grafiği ise şekil 31'da gösterilmiştir.



Şekil 29: MCF-7 hücrelerine PHEN uygulamanın ardından ilk 24 saat proliferasyon ve canlılık real time hücre analiz grafiği



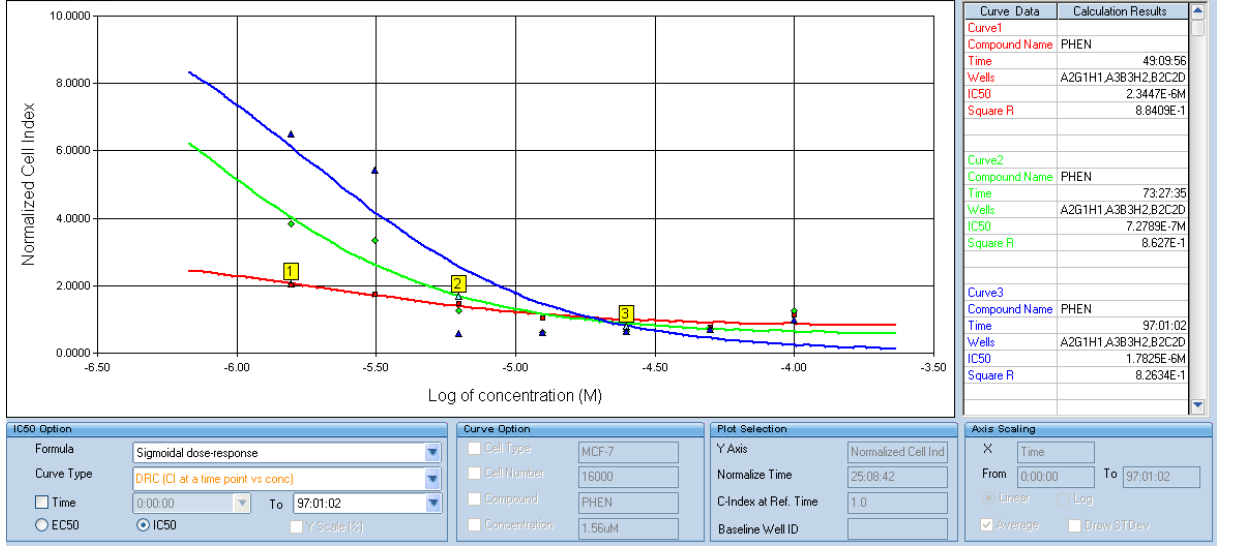
Şekil 30: MCF-7 hücrelerine PHEN uygulamanın ardından ilk 48 saat proliferasyon ve canlılık real time hücre analiz grafiği



**Şekil 31:** MCF-7 hücrelerine PHEN uygulamanın ardından ilk 72 saat proliferasyon ve canlılık real time hücre analiz grafiği

Çalışmadan şu sonuçlar çıkarıldı:

1. 1.56 ve 3,125 µM PHEN içeren grupta 18-72. saatler arası Cell indeks artışı oldu.
2. 6,25 µM PHEN içeren grupta 24-40 saat diliminde plato formasyonu 40. saatten sonra ise sitostatik-sitotoksik etki oluştu.
3. 12.5 µM PHEN içeren grup 24-48 saat diliminde sitostatik-sitotoksik, 48-72 saat diliminde sitotoksik etki gösterdi.
4. 25 ve 50 µM PHEN içeren grupta 24-48 saat diliminde başlayan sitotoksik etki 48-72 saat diliminde de devam etti
5. 100 µM PHEN içeren grupta 20. saat sonuna doğru başlayan sitotoksik etki 48-72 saatler arasında daha belirgin olarak devam etti.



**Şekil 32:** MCF-7 hücrelerinde PHEN için 24, 48 ve 72. saatlerde hesaplanan IC<sub>50</sub> değerleri ve grafiği görülmektedir.

#### 4.2.3. HepG2 hücrelerine DFO uygulama sonrası proliferasyon takibi

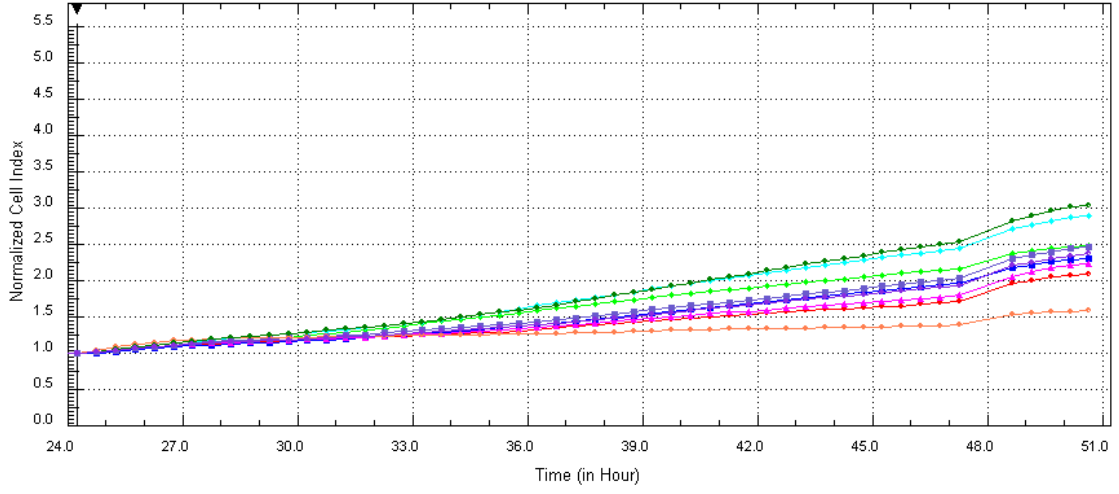
Elektriksel impedans sinyaline dayalı hücre sayısını, canlılığını ve proliferasyonunu monitörize etmeye imkan veren xCELLigence real time hücre analiz sistemi ile 96 saat izlem yapıldı. 24. saatten itibaren kontrol grubu baz alınarak normalize edilmiş hücre indeks değerlerinin zamana karşı grafiği oluşturuldu. 24, 48 ve 72 saat DFO inkübasyon sonucunda xCELLigence ile izlem yapıldı. Her kuyuda 9.000 hücre bulunan E-plateye daha önce belirlenen dozlarda kimyasallar uygulandı. İlaçların uygulanmasından sonraki ilk 24 saattaki grafiği şekil 33’de, 48. saat grafiği şekil 34’de ve 72. saat grafiği şekil 35’de verilmiştir.

Çalışmadan şu sonuçlar çıkarıldı:

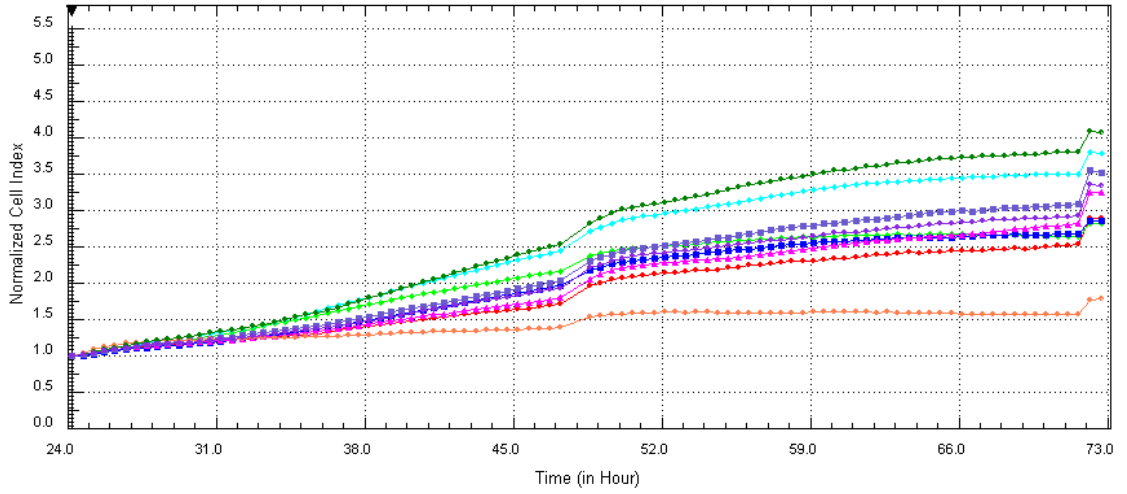
1. HepG2 hücrelerinde 40. saatten önce DFO nun ciddi bir etkisi görülmemektedir.
2. 2,343 ve 4,687  $\mu\text{M}$  DFO içeren grupta 24-48. saat arası ve sonrası Cell indeks artışı mevcuttur.
3. 9,375  $\mu\text{M}$  DFO içeren grupta 48-72 saat diliminde plato formasyonu oluşmaya başlamıştır.
4. 18,75  $\mu\text{M}$  DFO içeren grup 24-48 saat diliminde sitostatik 48-72 saat diliminde sitotoksik etki gösterdi.
5. 37,5  $\mu\text{M}$  ve 75  $\mu\text{M}$  DFO içeren grup 24-48 saat diliminde başlayan sitostatik etki 48-72 saat diliminde sitotoksik etkiye dönüştü.
6. 150  $\mu\text{M}$  DFO içeren grup yaklaşık 35. saatten itibaren plato çizmeye başladı ve 40.



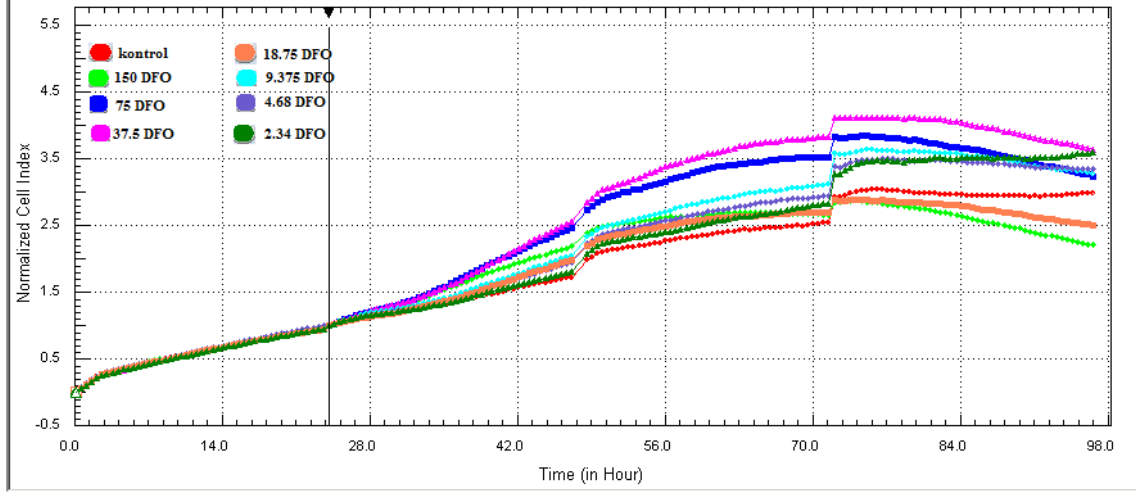
saatten itibaren sitotoksik etki oluştu.



**şekil 33:** HepG2 hücrelerinde DFO uygulandıktan sonra ilk 24 saat proliferasyon ve canlılık real time hücre analiz grafiği.



**şekil 34:** HepG2 hücrelerinde DFO uygulandıktan sonra 48. saat proliferasyon ve canlılık real time hücre analiz grafiği



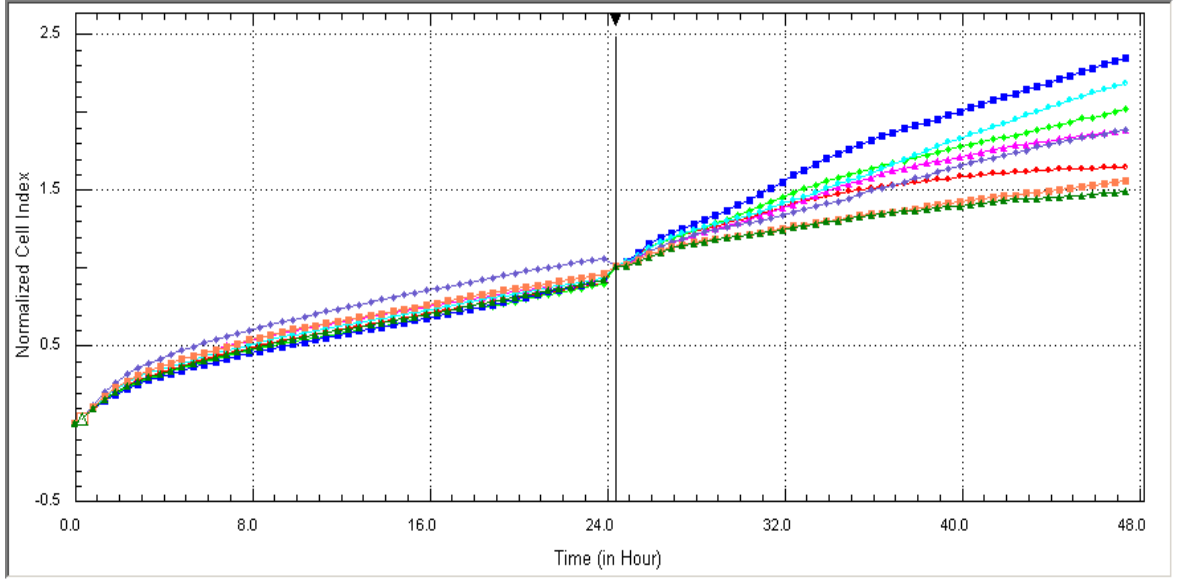
**Şekil 35:** HepG2 hücrelerinde DFO uygulandıktan sonra 72. saat proliferasyon ve canlılık real time hücre analiz grafiği

#### 4.2.4. HepG2 hücrelerine PHEN uygulama sonrası proliferasyon takibi

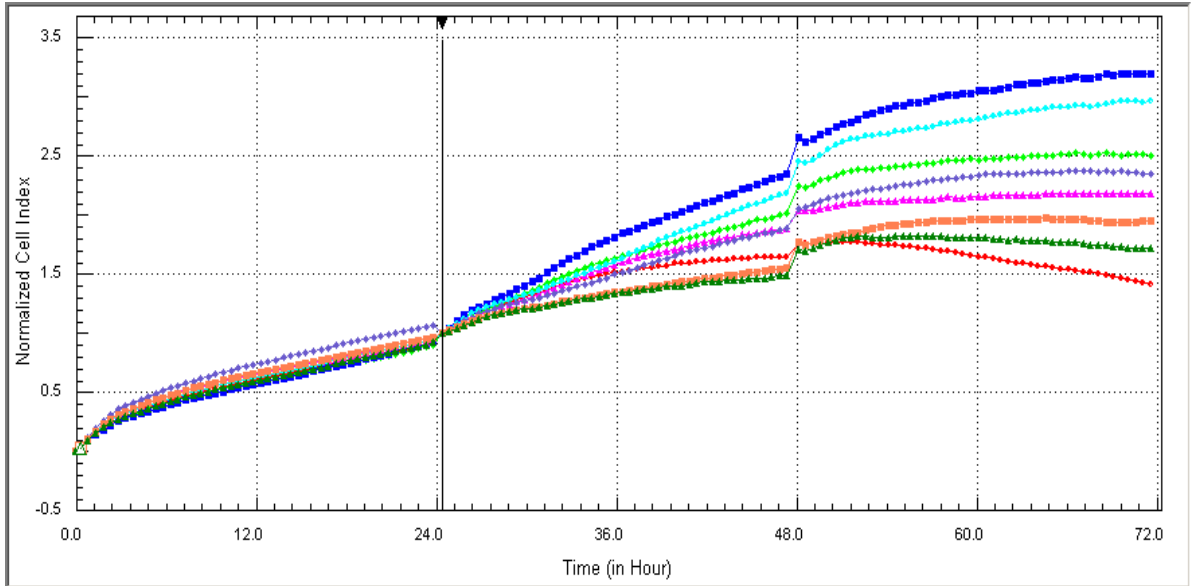
24, 48 ve 72 saat PHEN ile inkübasyon sonucunda xCELLigance ile proliferasyon izlendi. Her kuyuda 9.000 hücre bulunan E-plateye daha önce belirlenen dozlarda kimyasallar uygulandı. 24. saatten itibaren kontrol grubu baz alınarak normalize edilmiş hücre indeks değerlerinin zamana karşı grafiği oluşturuldu. İlaçların uygulanmasından sonraki ilk 24 saattaki grafiği şekil 36’da, 48. saat grafiği şekil 37’de ve 72. saat grafiği şekil 38’de verilmiştir.

Çalışmadan şu sonuçlar çıkarıldı:

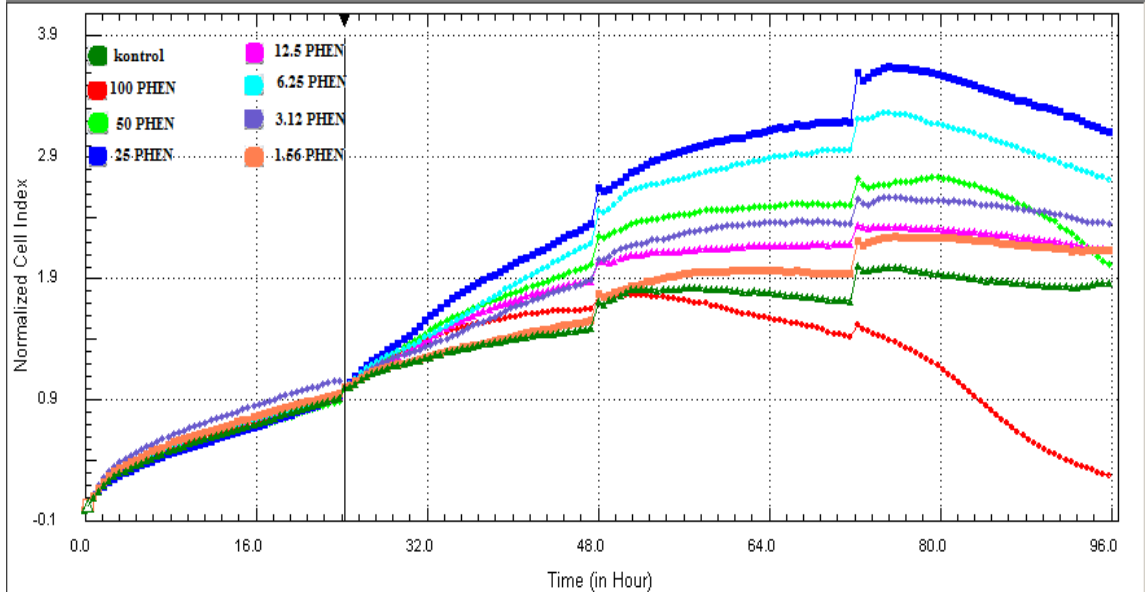
1. 1.56 ve 3,125  $\mu\text{M}$  PHEN içeren grupta 18-72. saatler arası Cell indeks artışı oldu.
2. 6,25  $\mu\text{M}$  PHEN içeren grupta 40-48 saat diliminde plato formasyonu 50. saattan sonra ise sitostatik-sitotoksik etki oluştu.
3. 12.5  $\mu\text{M}$  PHEN içeren grup 24-48 saat diliminde sitostatik 48-72 saat diliminde sitotoksik etki göstermektedir.
4. 25 ve 50  $\mu\text{M}$  PHEN içeren grupta 40. saat diliminde başlayan sitostatik etki 50-72 saat diliminde sitotoksik etkiye dönüştü.
5. 100  $\mu\text{M}$  PHEN içeren grupta 20. saat sonuna doğru başlayan sitotoksik etki 48-72 saatler arasında daha belirgin olarak devam etti.



**Şekil 36:** HepG2 hücrelerinde PHEN uygulandıktan sonra ilk 24 saat proliferasyon ve canlılık real time hücre analiz grafiği.



**Şekil 37:** HepG2 hücrelerinde PHEN uygulandıktan sonra 48. saat proliferasyon ve canlılık real time hücre analiz grafiği



**Şekil 38:** HepG2 hücrelerinde PHEN uygulandıktan sonra 72. saat proliferasyon ve canlılık real time hücre analiz grafiği

### 4.3. HEPG2 VE MCF-7 HÜCRELERİNE İLAÇ UYGULANDIKTAN SONRA İZOLE EDİLEN RNA KONSANTRASYON ÖLÇÜMÜ

#### 4.3.1. HepG2 Hücrelerinde RNA Konsantrasyon Ölçümü

HepG2 hücrelerinden RNA izole edildi, nanofotometrede ile ölçüm yapıldı. Ölçüm sonuçları tablo XXII de gösterilmiştir.

**Tablo XXII:** HepG2 hücrelerinin RNA kantitasyonu

HepG2 RNA	Kons. µg/mL	A230	A260	A280	A320	A260/280	A260/230
<b>KONTROL</b>	33,6	0,055	0,084	0,044	0,003	1,909	1,527
<b>KONTROL</b>	31,2	0,052	0,078	0,042	0,003	1,857	1,5
<b>25 µM PHEN</b>	23,2	0,043	0,058	0,031	0,003	1,871	1,349
<b>25 µM PHEN</b>	20,8	0,041	0,052	0,028	0,003	1,857	1,268
<b>150µM DFO</b>	28,4	0,045	0,071	0,037	0,002	1,919	1,578
<b>150µM DFO</b>	24	0,046	0,06	0,032	0,002	1,875	1,304
<b>500 nM TSA</b>	17,2	0,039	0,043	0,024	0,004	1,792	1,103
<b>500 nM TSA</b>	11,6	0,024	0,029	0,016	0,002	1,812	1,208
<b>TSA+ PHEN</b>	14,4	0,034	0,036	0,02	0,003	1,8	1,059

<b>TSA+ PHEN</b>	13,2	0,028	0,033	0,018	0,001	1,833	1,179
<b>TSA+DFO</b>	20	0,036	0,05	0,027	0,003	1,852	1,389
<b>TSA+DFO</b>	14,8	0,054	0,037	0,023	0,001	1,609	0,685

#### 4.3.2. MCF-7 Hücrelerinde RNA Konsantrasyon Ölçümü

MCF-7 hücrelerinden RNA izole edildi, nanofotometrede ile ölçüm yapıldı. Ölçüm sonuçları tablo XXIII' de gösterilmiştir

**Tablo XXIII:** MCF-7 hücrelerinin RNA kantitasyonu

<b>MCF-7 RNA</b>	<b>Kons./µg/mL</b>	<b>A 230</b>	<b>A 260</b>	<b>A280</b>	<b>A320</b>	<b>A 260/280</b>	<b>A 260/230</b>
<b>KONTROL</b>	54	0,142	0,135	0,087	0,006	1,552	0,951
<b>KONTROL</b>	48	0,075	0,12	0,062	0,002	1,935	1,6
<b>25 µM PHEN</b>	36	0,049	0,09	0,047	0,004	1,915	1,837
<b>25 µM PHEN</b>	25,2	0,048	0,063	0,035	0,005	1,8	1,312
<b>150µM DFO</b>	49,2	0,074	0,123	0,065	0,006	1,892	1,662
<b>150µM DFO</b>	30,8	0,054	0,077	0,042	0,005	1,833	1,426
<b>500 nM TSA</b>	30,8	0,039	0,077	0,039	0,002	1,974	1,974
<b>500 nM TSA</b>	30,8	0,058	0,077	0,042	0,005	1,833	1,328
<b>TSA+ PHEN</b>	27,6	0,051	0,069	0,039	0,006	1,769	1,353
<b>TSA+ PHEN</b>	23,2	0,037	0,058	0,031	0,004	1,871	1,568
<b>TSA+DFO</b>	33,2	0,05	0,083	0,045	0,005	1,844	1,66
<b>TSA+DFO</b>	33,2	0,048	0,083	0,044	0,004	1,886	1,729

#### 4.4. KANTİTATİF REAL TIME-PCR SONUÇLARI

Farklı çalışma gruplarındaki GAPDH, NDRG1 Varyant1 ve NDRG1 Varyant2 gen ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi için HepG2 hücreleri ile yapılan PCR çalışmalarından elde edilen Ct değerleri tablo XXIV'de, MCF-7 hücreleri ile yapılan PCR çalışmalarından elde edilen Ct değerleri de tablo XXV'de gösterilmiştir.

**Tablo XXIV:** HepG2 ile yapılan PCR çalışmalarından elde edilen Ct değerleri

	<b>GAPDH</b>	<b>NDRG1 V1</b>	<b>NDRG1 V2</b>
<b>Kontrol</b>	23,18	32,38	25,07
<b>Kontrol</b>	23	32,68	25,09
<b>Kontrol</b>	23	32,3	24,8
<b>Kontrol</b>	23,13	32,68	25,04
<b>Kontrol</b>	23,54	32,07	25,47
<b>Kontrol</b>	23,04	32,03	25,16
<b>Kontrol</b>	23,6	32,06	25,59
<b>Kontrol</b>	23,59	32,32	25,58
<b>PHEN</b>	23,26	30,66	22,73
<b>PHEN</b>	23,26	30,35	22,72
<b>PHEN</b>	23,32	30,5	22,71
<b>PHEN</b>	23,2	30,38	22,7
<b>PHEN</b>	24,25	31,33	24,59
<b>PHEN</b>	24,84	31,49	24,76
<b>PHEN</b>	24,81	30,64	24,1
<b>PHEN</b>	24,83	30,5	24,16
<b>DFO</b>	23,44	30,8	23,94
<b>DFO</b>	22,96	30,72	23,85
<b>DFO</b>	22,2	30,85	23,71
<b>DFO</b>	23,25	30,74	23,6
<b>DFO</b>	24,10	31,08	24,54
<b>DFO</b>	24,14	31,04	24,54
<b>DFO</b>	24,16	31,2	24,75
<b>DFO</b>	24,32	31,17	24,83
<b>TSA</b>	25,28	31,82	26,17
<b>TSA</b>	25,18	31,81	26,22
<b>TSA</b>	25,51	31,9	26,1
<b>TSA</b>	25,39	31,88	26,19
<b>TSA</b>	26,04	32,37	27,04

<b>TSA</b>	26,15	32,08	26,93
<b>TSA</b>	25,9	31,99	27,04
<b>TSA</b>	26,14	32,1	27,01
<b>TSA + PHEN</b>	25,89	31,17	25,51
<b>TSA + PHEN</b>	25,91	31,48	25,57
<b>TSA + PHEN</b>	25,68	31,59	25,58
<b>TSA + PHEN</b>	25,81	31,42	25,44
<b>TSA + PHEN</b>	25,88	31,7	25,51
<b>TSA + PHEN</b>	25,81	31,71	25,55
<b>TSA + PHEN</b>	25,85	31,82	25,68
<b>TSA + PHEN</b>	25,94	31,77	25,71
<b>TSA + DFO</b>	24,63	31,71	25
<b>TSA + DFO</b>	24,79	31,66	24,96
<b>TSA + DFO</b>	24,79	31,55	24,95
<b>TSA + DFO</b>	24,9	31,32	24,98
<b>TSA + DFO</b>	26,46	31,01	26,71
<b>TSA + DFO</b>	26,59	31,05	26,7
<b>TSA + DFO</b>	26,59	31,33	26,79
<b>TSA + DFO</b>	26,65	31,34	26,78

**Tablo XXV:** MCF-7 ile yapılan PCR çalışmalarından elde edilen Ct değerleri

	<b>GAPDH</b>	<b>NDRG1 V1</b>	<b>NDRG1 V2</b>
<b>Kontrol</b>	25	34,81	27,17
<b>Kontrol</b>	25,06	34,85	27,17
<b>Kontrol</b>	25,01	35,19	27,18
<b>Kontrol</b>	25	35,08	27,06
<b>Kontrol</b>	24,82	35,65	26,65
<b>Kontrol</b>	24,25	34,95	26,6
<b>Kontrol</b>	24,76	35,54	26,68
<b>Kontrol</b>	24,7	34,77	26,66

<b>PHEN</b>	23,5	31,72	21,56
<b>PHEN</b>	23,07	31,56	21,6
<b>PHEN</b>	23,55	31,52	21,44
<b>PHEN</b>	23,57	31,35	21,55
<b>PHEN</b>	24,76	32,02	22,65
<b>PHEN</b>	24,76	31,91	22,63
<b>PHEN</b>	24,64	31,97	22,57
<b>PHEN</b>	24,67	31,97	22,53
<b>DFO</b>	23,76	32,6	23,17
<b>DFO</b>	23,93	32,63	23,19
<b>DFO</b>	23,59	31,52	22,22
<b>DFO</b>	23,55	31,47	22,21
<b>DFO</b>	24,66	31,68	23,01
<b>DFO</b>	24,66	31,76	22,99
<b>DFO</b>	24,41	31,67	22,78
<b>DFO</b>	24,6	31,57	22,83
<b>TSA</b>	27,56	34,59	27,69
<b>TSA</b>	27,59	34,16	27,65
<b>TSA</b>	28,81	34,75	30,02
<b>TSA</b>	28,81	34,76	29,95
<b>TSA</b>	27,58	35,27	27,52
<b>TSA</b>	27,58	35,13	27,52
<b>TSA</b>	27,58	35,39	27,58
<b>TSA</b>	27,58	35,17	27,55
<b>TSA + PHEN</b>	26,49	32,92	24,74
<b>TSA + PHEN</b>	26,46	32,83	24,74
<b>TSA + PHEN</b>	26,17	32,83	24,66
<b>TSA + PHEN</b>	26,23	32,81	24,26
<b>TSA + PHEN</b>	26,49	32,85	24,36
<b>TSA + PHEN</b>	26,58	32,9	24,46
<b>TSA + PHEN</b>	26,48	33,02	24,34



<b>TSA + PHEN</b>	26,51	32,76	24,34
<b>TSA + DFO</b>	26,08	31,51	24,34
<b>TSA + DFO</b>	26,04	31,47	24,43
<b>TSA + DFO</b>	26,1	31,34	24,26
<b>TSA + DFO</b>	26,11	31,65	24,43
<b>TSA + DFO</b>	25,79	31	23,89
<b>TSA + DFO</b>	25,85	31,05	23,87
<b>TSA + DFO</b>	25,99	30,9	24,13
<b>TSA + DFO</b>	26	31,24	24,17

#### **4.5. KOMPARATİF Ct METODU İLE GEN EKSPRESYON ANALİZİ**

##### **4.5.1 Relatif kantitasyon**

Gen ekspresyonunun relatif kantitasyonu, farklı dokulardaki spesifik genlerin ekspresyon düzeyleri arasındaki farklılıkları belirlemeye izin verir. Bu farklılık, absölu kantitasyonda olduğu gibi bir değer olarak değil, n-katı şeklinde ifade edilir. Real-time PCR kantitasyonunda hedef numunenin başlangıç miktarındaki küçük farklılıklar, amplifikasyon ürününe katlanarak yansır. Bu durum özellikle farklı bireylerden alınan örneklerle başlanan reaksiyonlarda izlenir. Bu relatif kantitasyonda yanlış sonuçlara sebep olur. Bir internal kontrol kullanılarak bu başlangıç farklılıklarını standardize etmek bu yüzden çok faydalıdır. İdeal bir internal kontrol tüm dokulardan ekspresse olabilmelidir. Bu amaçla kullanılan ‘housekeeping gen’ler ökaryotlarda çok çeşitli olmakla birlikte en sık GAPDH,  $\beta$  actin, Asidik ribozomal fosfoprotein (36B4) ve rRNA kullanılmaktadır. Bu genler referans gen olarak da isimlendirilmektedir (Zhong ve ark., 1999). Çalışmamızda referans gen olarak GAPDH kullanıldı.

##### **4.5.2. Komparatif Ct (Threshold Siklus) Metodu**

$\Delta\Delta Ct$  metodu olarak da isimlendirilen bu metot, standart eğri metoduna benzer ancak konsantrasyonların yerine Ct değerleri kullanılır. Hedef genin Ct değeri bir referans genin Ct değerine oran olarak normalize edilir. Daha sonra normalize Ct değerleri kalibratöre oranlanır. Sonuçlar kalibratörün n-katı şeklinde verilir. Komparatif Ct metodu  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  formülü ile ifade edilir. Burada:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{hedef gen}) - \Delta Ct(\text{kalibratör})$$

$$\Delta Ct(\text{hedef gen}) = Ct(\text{hedef gen}) - Ct(\text{referans gen})$$

$$\Delta Ct(\text{kalibratör}) = Ct(\text{kalibratör}) - Ct(\text{referans gen})$$

Karşılaştırmalı Ct metodunun uygulanabilirliği validasyon (relatif verimlilik) çalışması ile değerlendirilir. Bunun için iki şart gereklidir: Birincisi, hedef gen amplifikasyonunun verimliliği ile referansın gen amplifikasyon verimliliğinin yaklaşık eşit ve % 100'e yakın olmasıdır. İkincisi de farklı başlangıç konsantrasyonlarında  $\Delta Ct$  değerinin değişmemesi yani logaritmik konsantrasyona karşı  $\Delta Ct$  grafiğinde slope değerinin sıfıra yakın ( $<0,1$ ) olmasıdır (Wong ve ark., 2005).

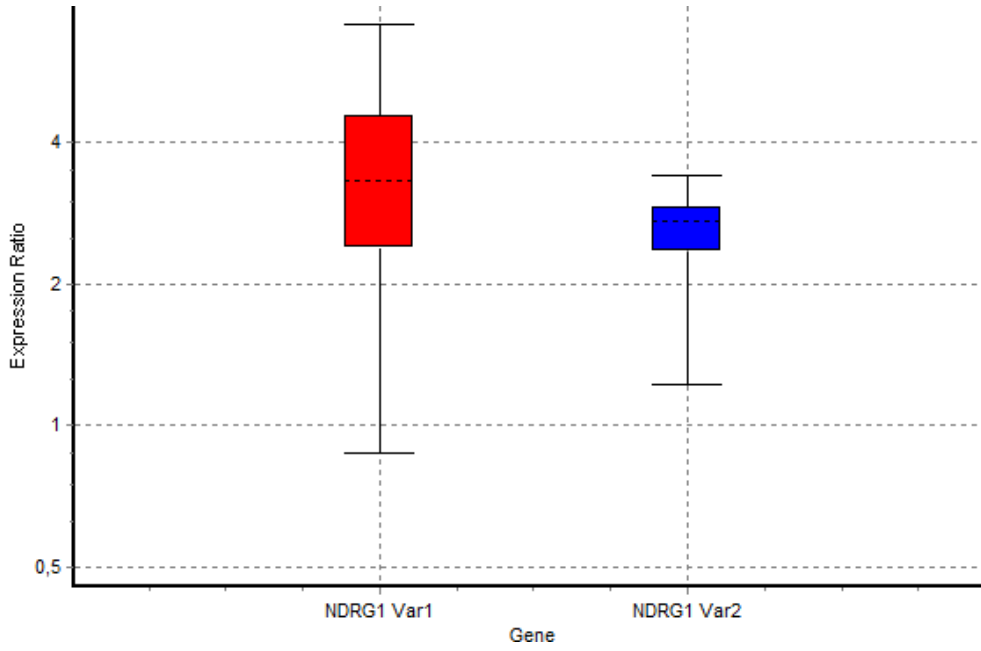
Çalışma gruplarının relatif gen ekspresyon analizi, GAPDH geni referans gen ve kontrol grupları da kalibratör olarak kabul edilerek, QIAGEN 2009 relative expression software (REST) programı kullanılarak yapıldı.

24 saat boyunca 150  $\mu\text{M}$  DFO uygulanan HepG2 hücrelerinde çalışılan NdrG1 Varyant1 ve Varyant2 gen ekspresyon analiz sonuçları tablo XXVI ve şekil 39'da gösterilmiştir. Burada NdrG1 Varyant1 ve Varyant2 genlerinin anlamlı bir şekilde ( $p=0,000$ ) upregüle olduğu görülmüştür.

**Tablo XXVI:** HepG2 hücrelerinde DFO uygulama sonrası REST analizi sonuçları

Gen	Verimlilik	Ekspresyon	Standart Hata	95% C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	1,0	1,000				
NDRG1 Var1	1,0	3,196	1,960 - 5,096	0,999 - 6,655	0,000	UP
NDRG1 Var2	1,0	2,490	2,028 - 3,010	1,312 - 3,314	0,000	UP

(P(H1): Anlamlılık değeri, UP: Upregülasyon, C.I.: Confidens İntervale)



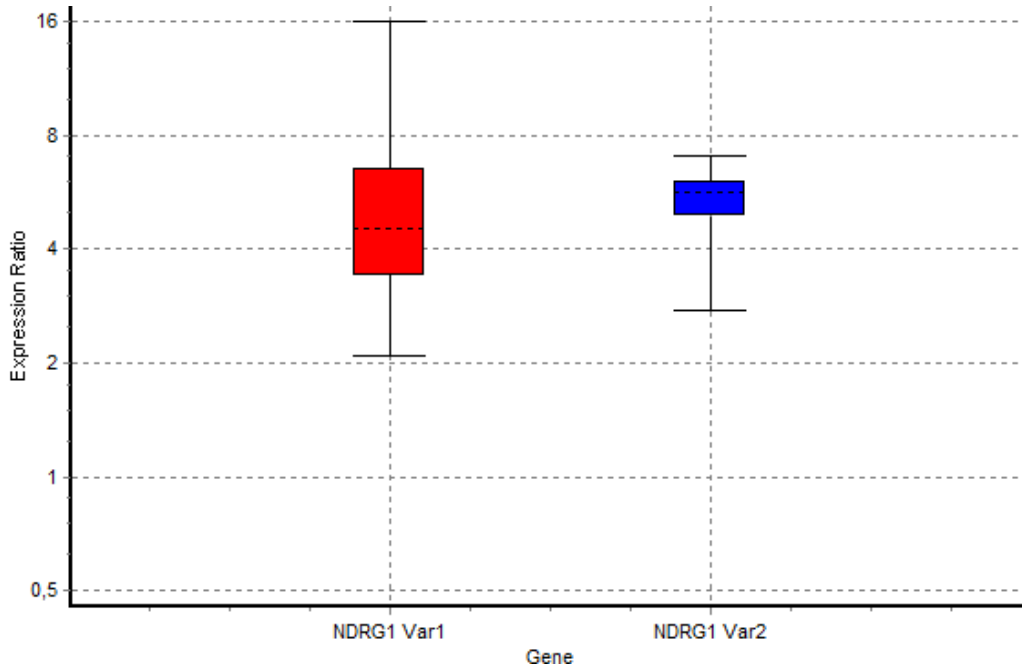
**Şekil 39:** HepG2 hücrelerine DFO uygulama sonrası REST analiz sonuçları

Aynı şekilde 25µM PHEN uygulanan HepG2 hücrelerinde de NdrG1 Varyant1 ve Varyant2 genlerinin anlamlı bir şekilde ( $p < 0,001$ ) upregüle olduğu görülmüştür. Bu çalışmanın sonuçları da tablo XXVII ve şekil 40’de gösterilmiştir.

**Tablo XXVII:** HepG2 hücrelerinde PHEN uygulama sonrası REST analiz sonuçları

Gen	Verimlilik	Ekspresyon	Standart Hata	95% C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	1,0	1,000				
NDRG1 Var1	1,0	4,908	2,735 - 8,337	2,326 - 14,549	0,001	UP
NDRG1 Var2	1,0	5,196	3,973 - 6,320	2,952 - 6,937	0,000	UP

(P(H1): Anlamlılık değeri, UP: Upregülasyon, C.I.: Confidens İntervale)



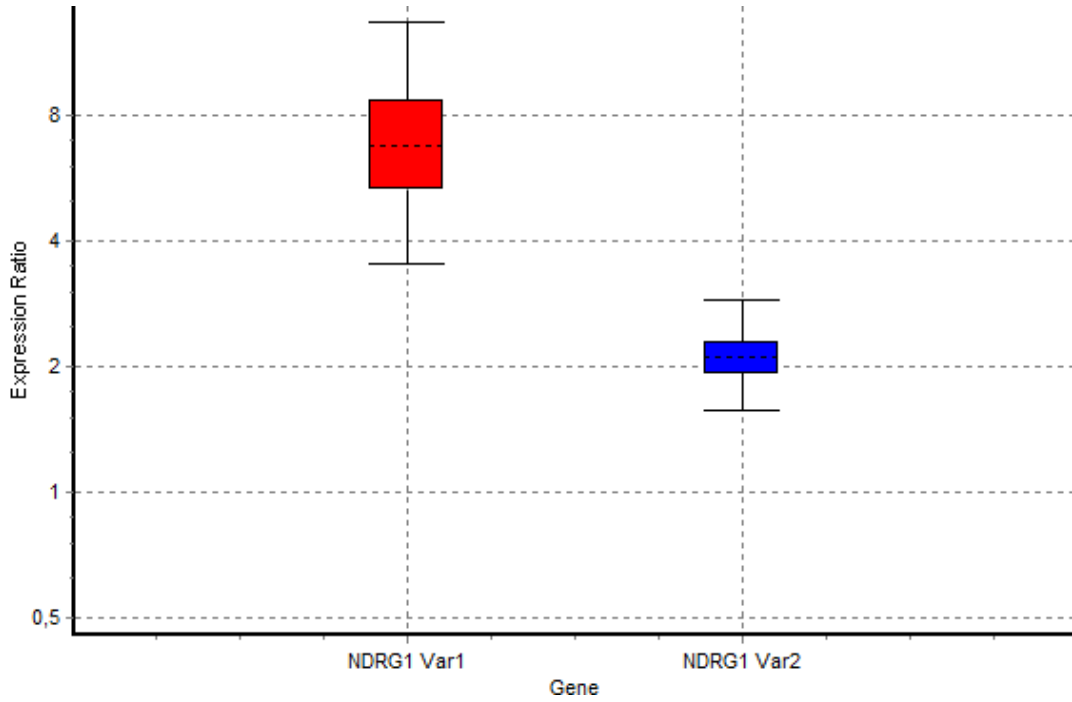
**Şekil 40:** HepG2 hücrelerine PHEN uygulama sonrası REST analiz sonuçları

Yine benzer şekilde tablo XXVIII ve şekil 41’de, 500 nM TSA uygulanan HepG2 hücrelerinde de NdrG1 Varyant1 ve Varyant2 genlerinin anlamlı bir şekilde ( $p=0,000$ ) upregüle olduğu görülmüştür.

**Tablo XXVIII:** HepG2 hücreleride TSA uygulama sonrası REST analiz sonuçları

Gen	Verimlilik	Ekspresyon	Standart Hata	95% C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	1,0	1,000				
NDRG1 Var1	1,0	6,774	4,564 - 9,643	3,762 - 12,670	0,000	UP
NDRG1 Var2	1,0	2,109	1,853 - 2,444	1,689 - 2,720	0,000	UP

(P(H1): Anlamlılık değeri, UP: Upregülasyon, C.I.: Confidens İntervale)



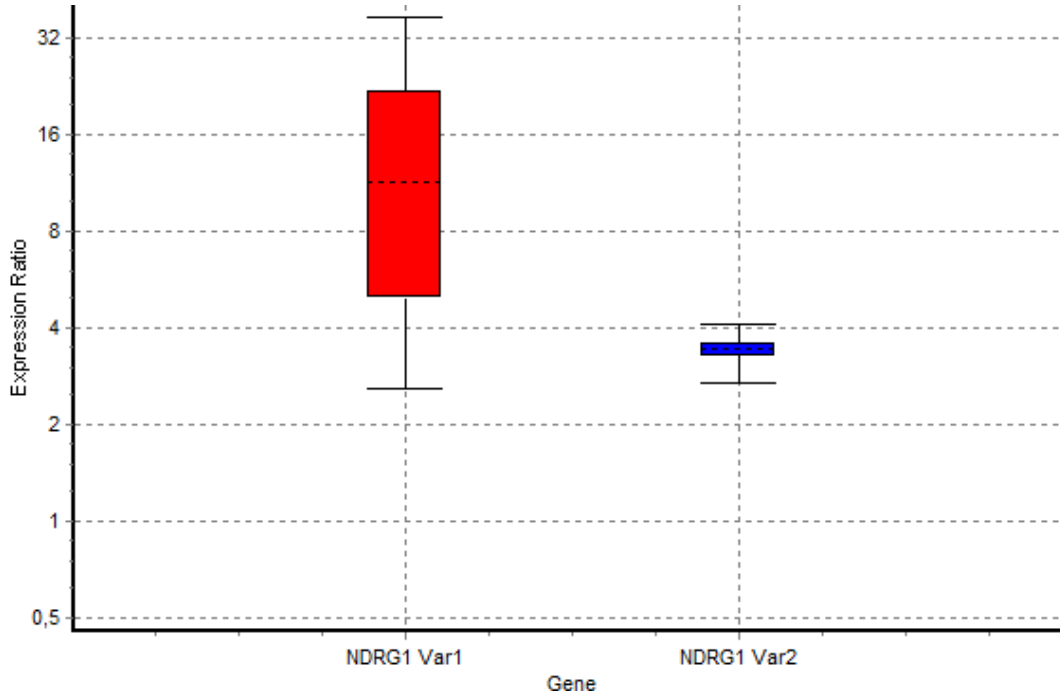
**Şekil 41:** HepG2 hücrelerine TSA uygulama sonrası REST analiz sonuçları

500 nM TSA+150µM DFO uygulanan HepG2 hücrelerinde NdrG1 Varyant1 ve Varyant2 genlerinin anlamlı bir şekilde ( $p=0,001$  ve  $p=0,000$ ) upregüle olduğu görüldü. Tablo XXIX ve Şekil 42’de bu çalışmanın sonuçları görülmektedir.

**Tablo XXIX:** HepG2 hücrelerine TSA+DFO uygulama sonrası REST analiz sonuçları

Gen	Verimlilik	Ekspresyon	Standart Hata	95% C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	1,0	1,000				
NDRG1 Var1	1,0	10,259	4,116 - 26,695	2,892 - 34,467	0,001	UP
NDRG1 Var2	1,0	3,437	3,117 - 3,784	2,891 - 4,028	0,000	UP

(P(H1): Anlamlılık değeri, UP: Upregülasyon, C.I.: Confidens İntervale)



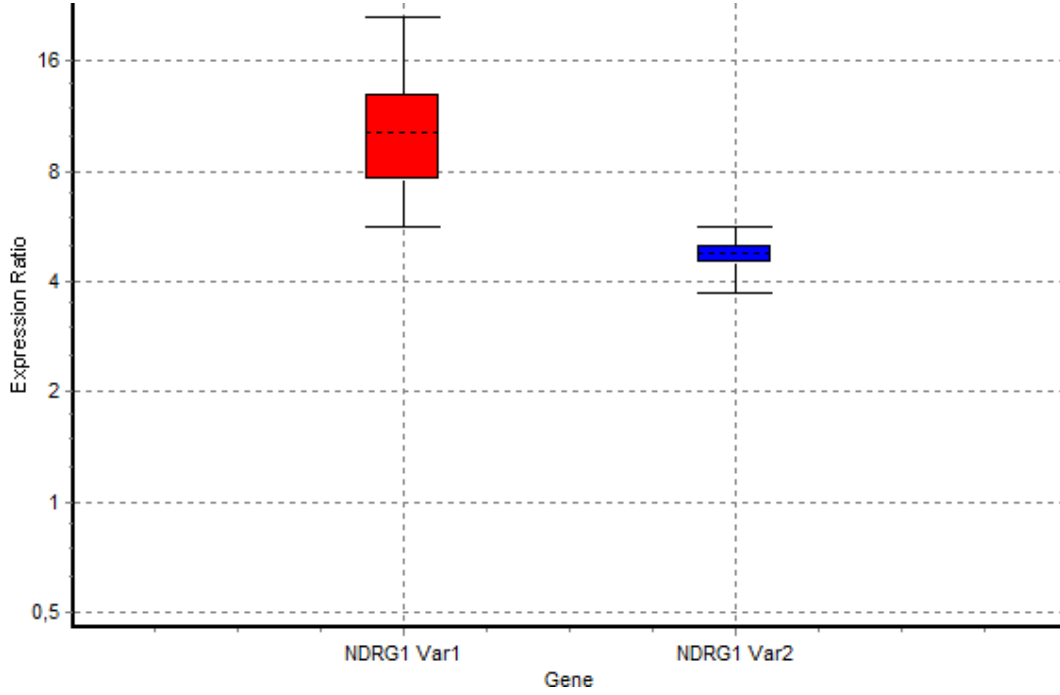
**Şekil 42:** HepG2 hücrelerine TSA+DFO uygulama sonrası REST analiz sonuçları

Yine benzer şekilde 500 nM TSA+25µM PHEN uygulanan HepG2 hücrelerinde de NdrG1 Varyant1 ve Varyant2 genlerinin anlamlı bir şekilde (p=0,000) upregüle olduğu Tablo XXX ve Şekil 43'de görülmektedir.

**Tablo XXX:** HepG2 hücrelerine TSA+PHEN uygulama sonrası REST analiz sonuçları

Gen	Verimlilik	Ekspresyon	Standart Hata	95% C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	1,0	1,000				
NDRG1 Var1	1,0	9,978	6,779 - 13,735	5,880 - 18,128	0,000	UP
NDRG1 Var2	1,0	4,732	4,258 - 5,169	3,949 - 5,618	0,000	UP

(P(H1): Anlamlılık değeri, UP: Upregülasyon, C.I.: Confidens İntervale)



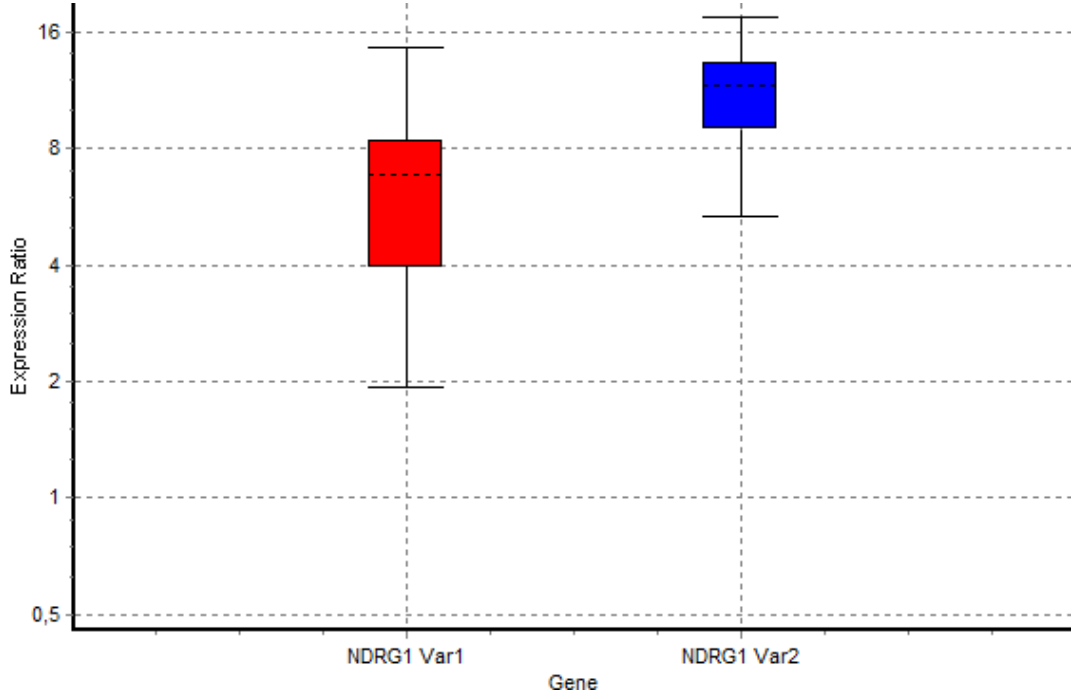
**Şekil 43:** HepG2 hücrelerine TSA+PHEN uygulama sonrası REST analiz sonuçları

150  $\mu$ M DFO uygulanan MCF-7 hücrelerinde NdrG1 Varyant1 ve Varyant2 genlerinin anlamlı bir şekilde ( $p=0,000$ ) upregüle olduğu Tablo XXXI ve Şekil 44'de görülmektedir.

**Tablo XXXI:** MCF-7 hücrelerine DFO uygulama sonrası REST analiz sonuçları

Gen	Verimlilik	Ekspresyon	Standart Hata	95% C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	1,0	1,000				
NDRG1 Var1	1,0	5,907	3,630 - 11,461	2,057 - 14,026	0,000	UP
NDRG1 Var2	1,0	10,676	6,969 - 14,123	5,788 - 16,095	0,000	UP

(P(H1): Anlamlılık değeri, UP: Upregülasyon, C.I.: Confidens İntervale)



**Şekil 44:** MCF-7 hücrelerine DFO uygulama sonrası REST analiz sonuçları

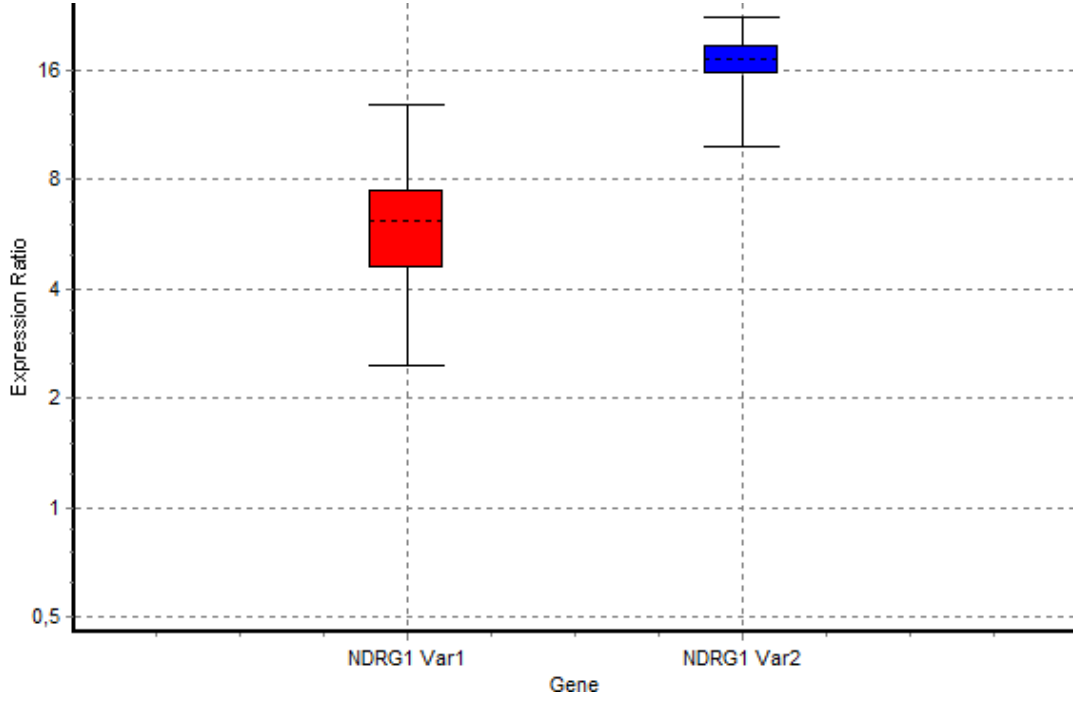
25µM PHEN uygulanan MCF-7 hücrelerinde de NdrG1 Varyant1 ve Varyant2 genlerinin ekspresyonu anlamlı bir şekilde ( $p=0,000$ ) artmış olup Tablo XXXII ve Şekil 45’da analiz sonuçları görülmektedir.

**Tablo XXXII.** MCF-7 hücrelerine PHEN uygulama sonrası REST analiz sonuçları

Gen	Verimlilik	Ekspresyon	Standart Hata	95% C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	1,0	1,000				
NDRG1 Var1	1,0	6,031	3,635 - 10,552	2,768 - 12,091	0,000	UP
NDRG1 Var2	1,0	16,795	14,527 - 19,560	10,653 - 22,139	0,000	UP

(P(H1): Anlamlılık değeri, UP: Upregülasyon, C.I.: Confidens İntervale)





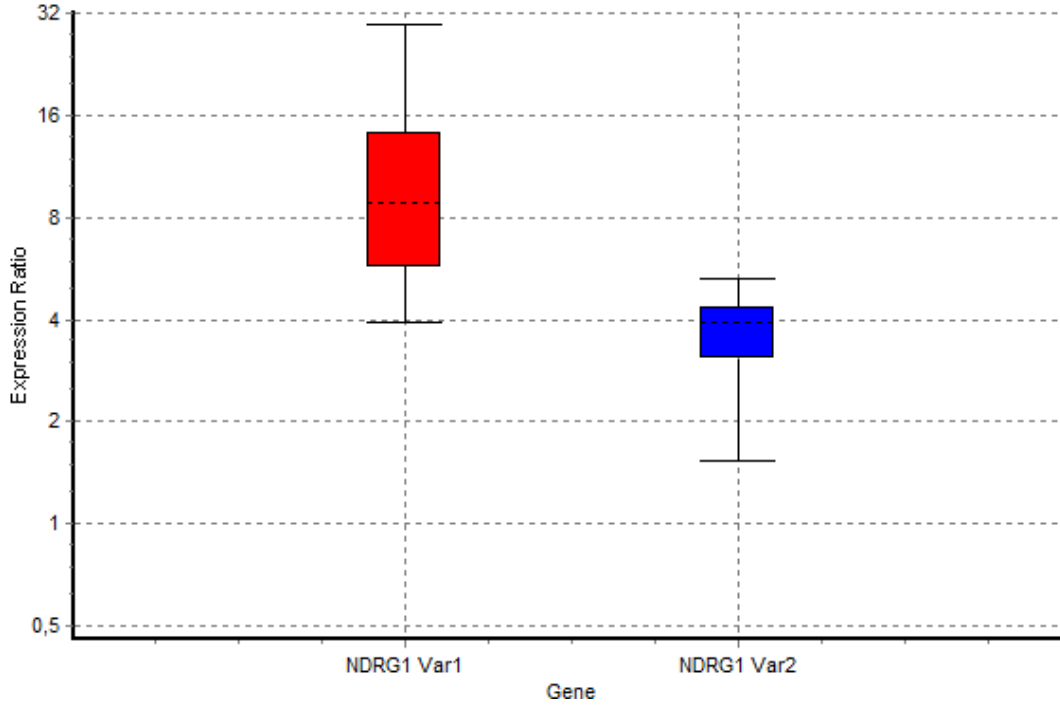
**Şekil 45:** MCF-7 hücrelerine PHEN uygulama sonrası REST analiz sonuçları

500 nM TSA uygulanan MCF-7 hücrelerinde de NdrG1 Varyant1 ve Varyant2 genlerinin ekspresyonu anlamlı bir şekilde ( $p=0,000$ ) artmıştır. Bu çalışmanın analiz sonuçları da Tablo XXXIII ve Şekil 46’da görülmektedir.

**Tablo XXXIII:** MCF-7 hücrelerine TSA uygulama sonrası REST analiz sonuçları

Gen	Verimlilik	Ekspresyon	Standart Hata	95% C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	1,0	1,000				
NDRG1 Var1	1,0	9,605	5,170 - 17,628	4,165 - 28,983	0,001	UP
NDRG1 Var2	1,0	3,416	1,946 - 4,595	1,626 - 5,252	0,001	UP

(P(H1): Anlamlılık değeri, UP: Upregülasyon, C.I.: Confidens İntervale)



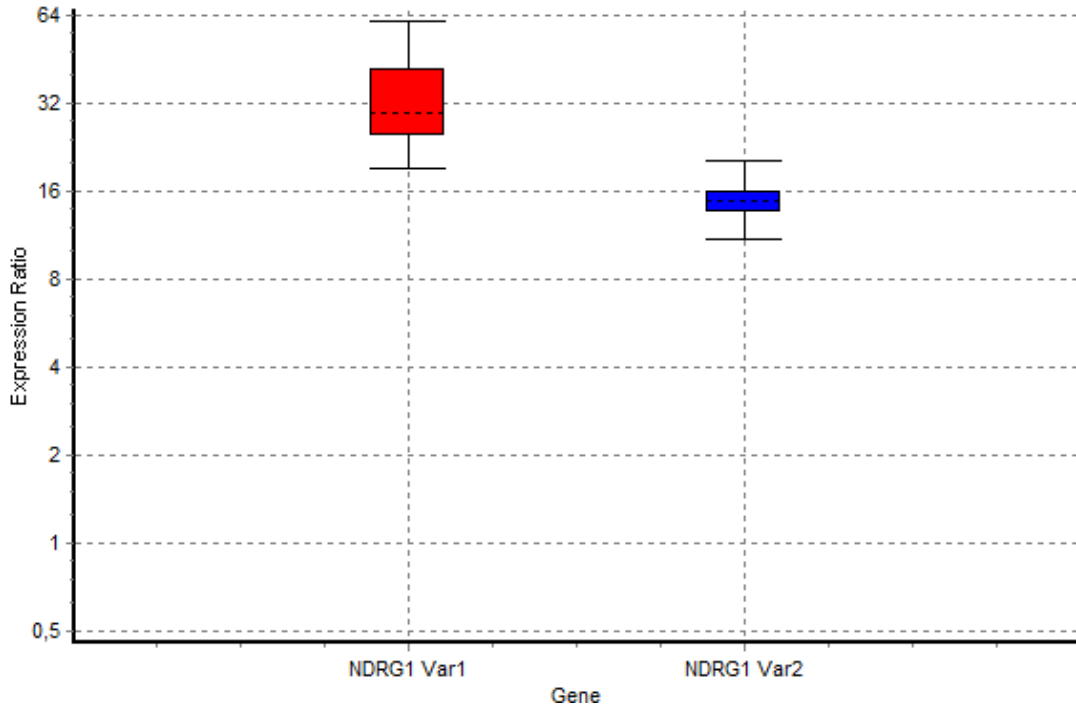
**Şekil 46:** MCF-7 hücrelerine TSA uygulama sonrası REST analiz sonuçları

500 nM TSA+150µM DFO uygulanan MCF-7 hücrelerinde de NdrG1 Varyant1 ve Varyant2 genlerinin ekspresyonu anlamlı bir şekilde ( $p=0,001$ ) artmıştır. Bu çalışmanın analiz sonuçları da Tablo XXXIV ve Şekil 47’de görülmektedir.

**Tablo XXXIV:**MCF-7 hücrelerine TSA+DFO uygulama sonrası REST analiz sonuçları

Gen	Verimlilik	Ekspresyon	Standart Hata	95% C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	1,0	1,000				
NDRG1 Var1	1,0	32,111	23,752 - 46,505	20,007 - 56,671	0,001	UP
NDRG1 Var2	1,0	14,685	12,732 - 16,790	11,484 - 18,728	0,001	UP

(P(H1): Anlamlılık değeri, UP: Upregülasyon, C.I.: Confidens İntervale)



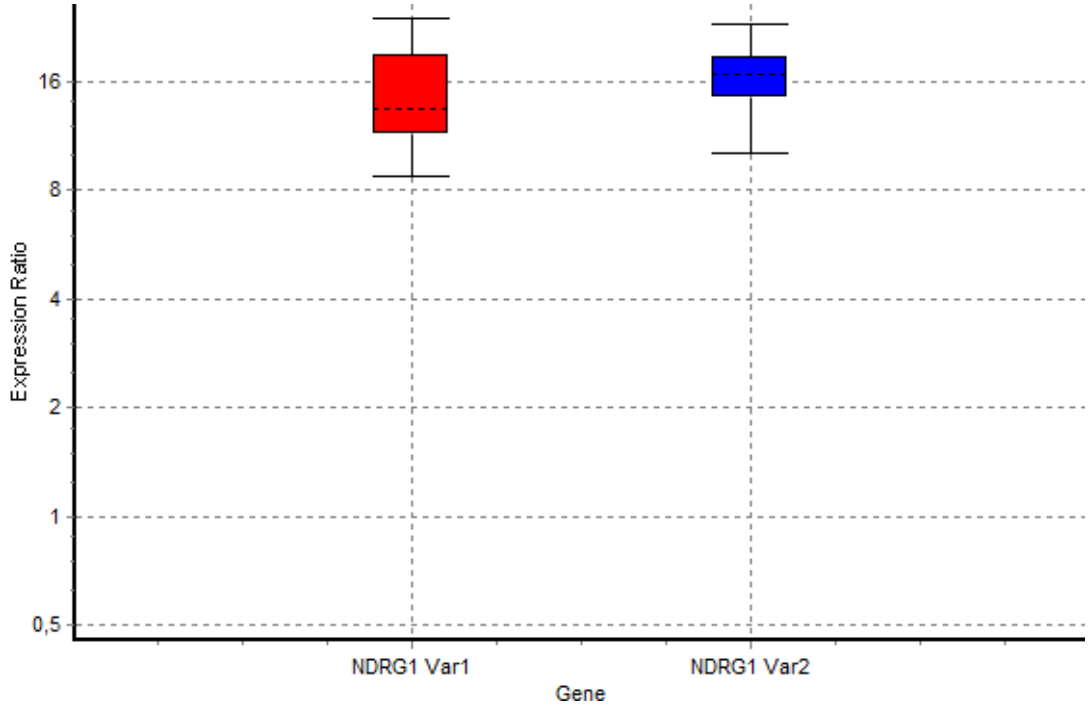
**Şekil 47:** MCF-7 hücrelerine TSA+DFO uygulama sonrası REST analiz sonuçları

Tablo XXXV ve Şekil 48'da 500 nM TSA+25µM PHEN uygulanan MCF-7 hücrelerinde de NdrG1 Varyant1 ve Varyant2 genlerinin ekspresyonu anlamlı bir şekilde ( $p=0,000$  ve  $p=0,001$ ) arttığı görülmektedir.

**Tablo XXXV:** MCF-7 hücrelerine TSA+PHEN uygulama sonrası REST analiz sonuçları

Gen	Verimlilik	Ekspresyon	Standart Hata	95% C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	1,0	1,000				
NDRG1 Var1	1,0	14,333	10,705 - 20,814	9,093 - 22,920	0,000	UP
NDRG1 Var2	1,0	16,111	12,817 - 19,696	10,952 - 22,382	0,001	UP

(P(H1): Anlamlılık değeri, UP: Upregülasyon, C.I.: Confidens İntervale)



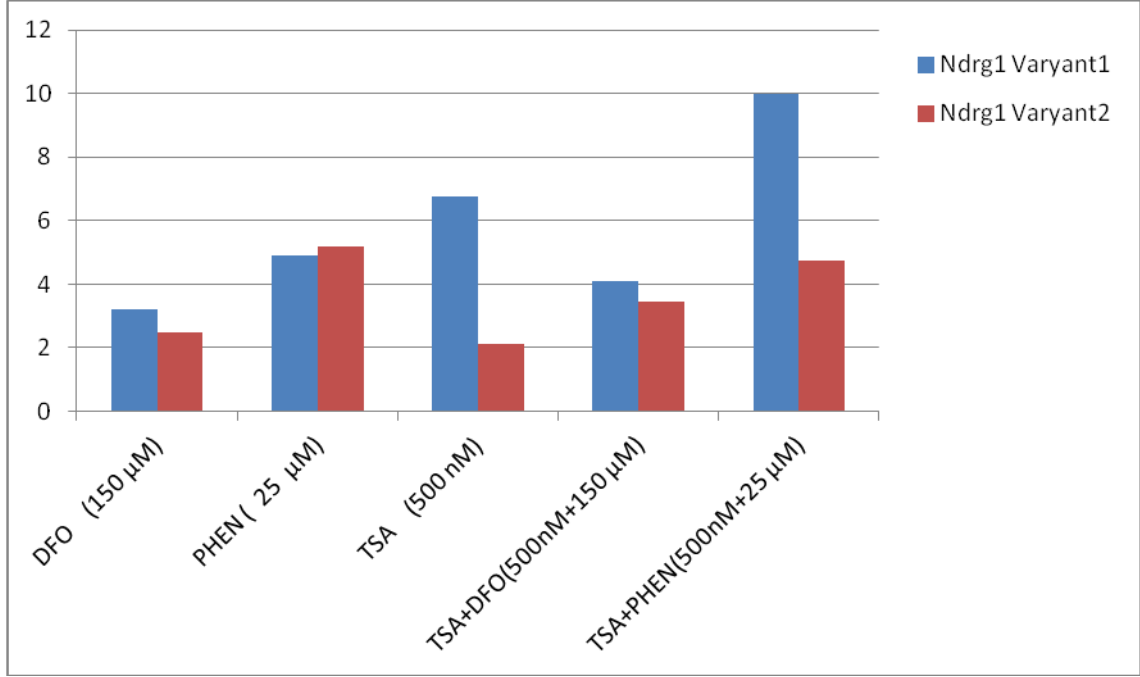
**Şekil 48:** MCF hücrelerine TSA+PHEN uygulama sonrası REST analiz sonuçları

HepG2 hücrelerinde çalışılan tüm çalışma gruplarının kontrol grubuna göre NdrG1 Varyant1 ve Varyant2 gen ekspresyonundaki artış miktarları tablo XXXVI ve Şekil 49’de toplu olarak gösterilmiştir.

**Tablo XXXVI:** HepG2 hücrelerinde gen ekspresyonu analiz sonuçları

KULLANILAN MADDELER	Gen Ekspresyonu Artış Miktarı*	
	NdrG1 Varyant 1	NdrG1 Varyant 2
150 µM DFO	3,196	2,49
25 µM PHEN	4,908	5,196
500 nM TSA	6,774	2,109
500 nM TSA + 150 µM DFO	4,116	3,437
500 nM TSA + 25 µM PHEN	9,978	4,732

\* Artış miktarı kontrol grubunun katı olarak ifade edilmektedir.



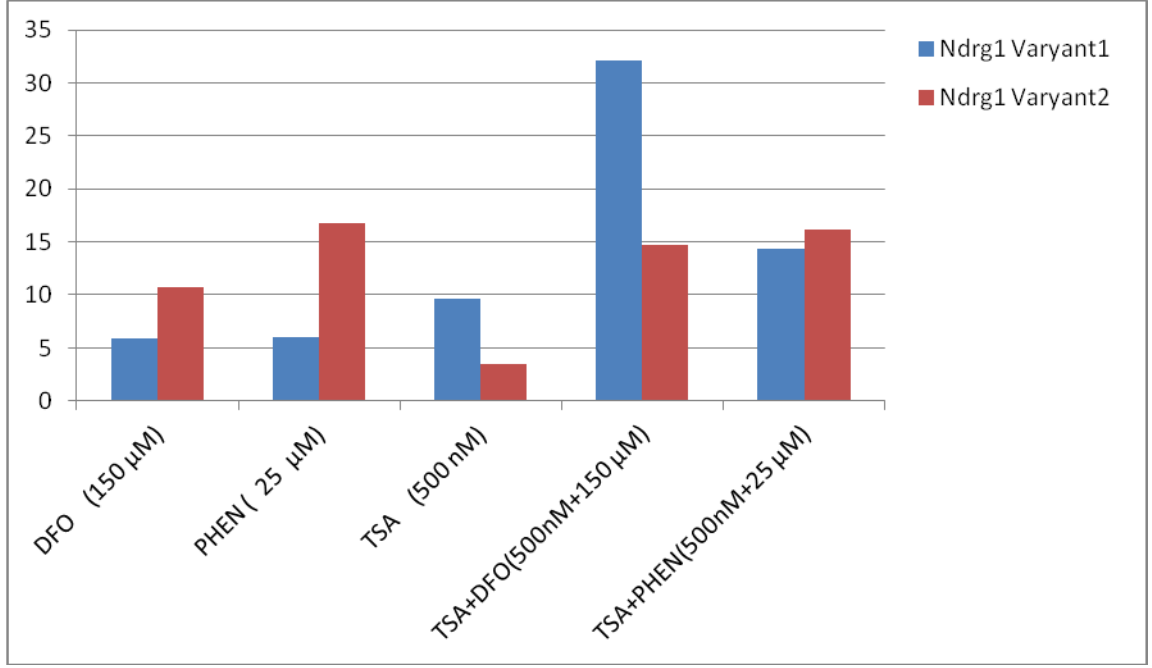
**Şekil 49:** HepG2 hücrelerinde gen ekspresyon düzeyleri

MCF-7 hücrelerinde çalışılan tüm çalışma guruplarının kontrol grubuna göre NdrG1 Varyant1 ve Varyant2 gen ekspresyonundaki artış miktarları tablo XXXVII ve Şekil 50’de toplu olarak gösterilmiştir.

**Tablo XXXVII:** MCF-7 hücrelerinde gen ekspresyonu analiz sonuçları

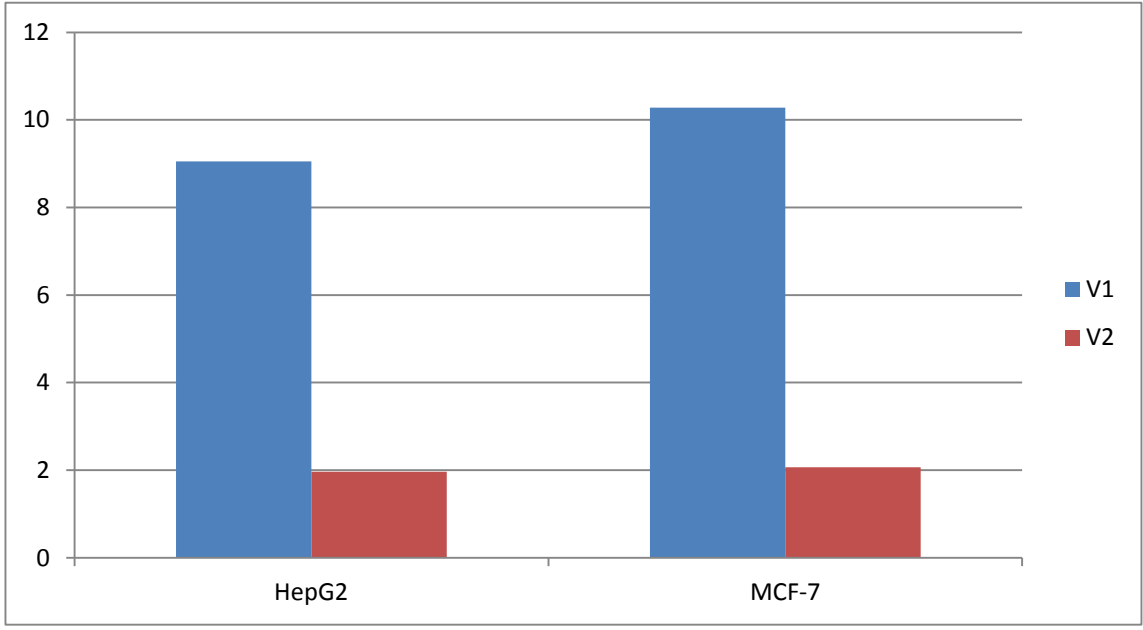
KULLANILAN MADDELER	Gen Ekspresyonu Artış Miktarı*	
	NdrG1 Varyant 1	NdrG1 Varyant 2
150 µM DFO	5,907	10,676
25 µM PHEN	6,031	16,791
500 nM TSA	9,605	3,416
500 nM TSA + 150 µM DFO	32,111	14,685
500 nM TSA + 25 µM PHEN	14,333	16,111

\* Artış miktarı kontrol grubunun katı olarak ifade edilmektedir.



**Şekil 50:** MCF-7 hücrelerinde gen ekspresyon düzeyleri

Ayrıca, MCF-7 ve HepG2 hücrelerinin kontrol gruplarındaki NdrG1 Varyant1 ve Varyant2 gen ekspresyon düzeyleri hakkında bilgi edinmek için kontrol gruplarındaki referans gene (GAPDH) Ct değerleri NdrG1 Varyant1 ve Varyant2 Ct değerlerinden çıkarılarak  $\Delta$ Ct değerleri bulundu. Sonuçlar analiz edildiğinde HepG2 hücrelerinde, referans gene oranla NdrG1 V1 yaklaşık 9 kat, V2 ise 2 kat ve benzer şekilde MCF-7 hücrelerinde de NdrG1 V1 10 kat, V2 ise 2 kat fazla eksprese edildiği görüldü. Şekil 51:



**Şekil 51:** HepG2 ve MCF-7 hücrelerinde Ndr1 V1 ve Ndr1 V2 ekspresyon düzeyleri

## 5. TARTIŞMA

Ndr1, HSML ile ilişkili olarak tanımlanmış ise de; Charcot-Marie-Tooth hastalığı 4D tipinin moleküler etiolojisindeki spesifik rolüne rağmen son zamanlarda tümör progresyonunun bir göstergesi ve hücrel diferansiyasyonun tetikleyicisi olarak görülmektedir (Thomas ve ark., 2008). Ayrıca Ndr1 geni; prostat, kolon ve meme kanserlerinde downregüle olan metastaz süpresör gen olarak da bilinmektedir. Ndr1 geni hemen hemen tüm hücrelerde bulunmasına karşın, prostat, beyin, böbrek, plasenta, ovaryum, testisler ve intestinal hücrelerde daha yüksek seviyelerde eksprese edilir (Lachat ve ark., 2002). Ndr1 gen upregülasyonu tümör büyüme hızını baskılamının yanında farelerde yapılan bir çalışmada, Ndr1 gen ekspresyonundaki artışın, prostat kanser hücrelerinin akciğerlere metastazını da önlediği gösterilmiştir (Le ve Richardson, 2004). Diğer bir çalışmada ise insan kolon kanser hücrelerinin diferansiyasyonu indüklendiğinde Ndr1 gen ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (Van ve ark., 1997). Ndr1 gen upregülasyonunun tanımlanan tümör baskılayıcı özelliğine karşın, karaciğer kanserlerinde tam tersi bir etki ile Ndr1'in upregüle olduğu gözlenmiştir (Chua ve ark., 2007; Xinrui ve ark., 2007). Bu da Ndr1 geninin farklı kanser türlerinde farklı şekilde etkilendiğini göstermektedir. Bu farklılığın temelinde mRNA varyantlarının olabileceğine dair herhangi bir çalışmaya rastlanmaması, PHEN'in bu hücreler üzerine etkilerinin bilinmiyor olması ve ayrıca TSA'nında varyantlar üzerine olan etkisinin bilinmiyor olması bizi bu yönde araştırmaya sevk etmiştir

Biz bu çalışmada Ndr1-metastaz ilişkisi bakımından zıt davranış gösteren MCF-7 ve HepG2 hücrelerini tercih ettik. Literatüre bakıldığında Ndr1 geninin meme kanserinde downregüle olduğu, karaciğer kanserinde ise upregüle olduğu görülecektir. Zira, Ndr1 upregülasyonu MCF-7 hücrelerinde metastaz ile negatif bir ilişki gösterirken; neden HepG2 hücrelerinde tam tersine pozitif bir ilişki gösterdiği bilinmemektedir (Chua ve ark., 2007; Xinrui ve ark., 2007).

Bu nedenle, Ndr1 ekspresyonu açısından birbirine zıt davranış gösteren 2 ayrı hücre hattında, uygulanan ilaç kombinasyonlarının Ndr1 gen ekspresyonunu nasıl etkilediği araştırıldı.

Ndr1 proteininin fonksiyonu tam olarak anlaşılmasına rağmen, hücre diferansiyasyonu (Taketomi ve ark., 2003; Guan ve ark., 2000), proliferasyon ve büyümenin baskılanması (Piquemal ve ark., 1999), neoplazi, tümör progresyonu ve



metastaz (Van ve ark., 1997; Bandyopadhyay ve ark., 2004), ağır metallere cevap (Zhou ve ark., 1998; Salnikow ve ark., 2000), hipoksi cevabı (Salnikow ve ark., 2000, 2002) ve DNA hasar cevabı (Kurdistani, 1998) gibi çeşitli hücre içi olaylarda rol almaktadır. Özellikle prostat, kolon ve göğüs kanserlerinde metastazın baskılanmasında çok önemli bir role sahiptir (Stafford ve ark., 2008; Bandyopadhyay ve Ark., 2004; Guan ve ark., 2000).

Ndr $g1$  gen düzenlenmesi oldukça komplekstir ve farklı hücre tiplerinde farklı mekanizmalar rol alır. Bu kompleks düzenlemeler, transkripsiyonel (HIF-1 $\alpha$ , Ni (II), p53, N-Myc, c-Myc, PPAR- $\gamma$ /RXR, DNA metilasyonu ve histon asetilasyonu gibi), posttranskripsiyonel ve translasyonel seviyelerdeki major yolları içerir (Guan ve ark., 2000, Kalaydjieva ve ark., 2000).

N-myc, Ndr $g1$  promoterindeki bağlanma bölgesinden bağımsız olarak, histon deasetilaz aracılı bir mekanizmayla Ndr $g1$ 'i baskılar (Shimono ve ark., 1999). Myc ekspresyonunun düzenlenmesi birçok insan kanserinde bozulur ve sıklıkla agresif ve az diferansiye tümörlerle ilişkilendirilir. Myc proteini hücre büyümesi ve proliferasyonunda, hücre döngüsü progresyonunda, transkripsiyonda, diferansiyasyonunda, apoptozda, anjiogenezde ve hücre motilitesinde anahtar düzenleyici role sahiptir. Düzenlenme bozulduğunda genomik instabilite, kontrolsüz proliferasyon, büyüme faktörü bağımsızlığı, immün sağkalım sonlanması, transformasyon ve apoptoz ortaya çıkabilir (Vita ve ark., 2006).

DNA metilasyon inhibisyonu ve histon asetilasyon aktivasyonu Ndr $g1$  gen aktivasyonunu artırmaktadır. Böylelikle Ndr $g1$  gen düzenlenmesinde epigenetik kontrolün rolü olabileceği gösterilmiştir (Guan ve ark., 2000). Ndr $g1$ 'in promoter bölgesinde çok sayıda CpG adalarının bulunması nedeniyle Ndr $g1$  gen ekspresyonunun DNA metilasyonu ile baskılanabileceği düşünülmüş, ancak Ndr $g1$  gen ekspresyonunun düzenlenmesinde DNA metilasyonunun parsiyel olarak rol alabileceği gösterilmiştir (Guan ve ark., 2000).

Transkripsiyonel düzenlemede, histon asetilasyonunun önemli role sahip olduğu yapılan birtakım çalışmalar ile tesbit edilmiştir (Semenza and Wang, 1991). Asetilasyon pozitif yüklü lizin rezidülerini nötralize eder ve Histon uçları ile yapısal proteinler arasındaki bağlantıları destabilizasyona uğratar. Hipoasetilasyonda nükleozomlar arası

güçlü bağlar varken, hiperasetilasyon sonrası nükleozomlar arası bağlantılar zayıflar, histon uçları DNA'yı sınırlamaz ve transkripsiyon faktörleri DNA'ya bağlanabilir.

Birçok hücre tipinde butirat ve TSA gibi histon deasetilaz inhibitörleri Ndr1 gen ekspresyonunu arttırarak hücre diferansiyasyonuna neden olmaktadır (Semenza ve Wang, 1991). Bu bulgular, gen düzenlenmesinde, hücre büyümesinde ve hücre diferansiyasyonunda DNA metilasyonu ve histon asetilasyonunun birlikte anahtar bir rol oynayabileceğini göstermekle birlikte tüm mekanizmayı yeterince izah etmemekte ve gen düzenlenmesinde başka mekanizmaların da olabileceğini düşündürmektedir (Guan ve ark., 2000).

Yapılan çalışmalarda HDAC inhibitörleri ile Ndr1 gen ekspresyonunun indüklendiği görülmekte ancak hangi varyantı etkilediği ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Bu sebeple tek başına TSA ve bunun demir şelatörleri ile kombinasyonunun Ndr1 gen mRNA varyant ekspresyonunu nasıl etkilediği araştırıldı

Biz çalışmamızda MCF-7 hücrelerinin bir histon deasetilaz inhibitörü olan TSA ile 24 saat süreyle muamelesi sonucunda Ndr1 geninin her iki varyantında kontrol gurubuna göre anlamlı derecede arttığını gözlemledik ( $P(H1)=0,001$ ). Ndr1 Varyant1 mRNA ekspresyonu kontrol gurubuna göre 9.6 kat, Ndr1 Varyant2 ise 3.4 kat arttı. HepG2 hücrelerinde ise Ndr1 Varyant1 6.7 kat ( $P(H1)=0,000$ ), Ndr2 V2 ise 2.1 kat ( $P(H1)=0,000$ ) arttı. Hem MCF-7 hemde HepG2 hücrelerinin TSA ile etkileşimi sonrası Ndr1 V1 mRNA seviyesindeki yükseklik dikkat çekmektedir.

Kombine gruplardan TSA+DFO HepG2 hücrelerinde birlikte kullanıldıklarında DFO, TSA'nın V1 üzerine olan artırıcı etkisini baskıladı. MCF-7 hücrelerinde DFO ve TSA kombinasyonu sinerjetik bir etki ile V1'i artırırken V2'de aditif bir etki ile artış sağladı.

HIF-1 Hipoksi ile ortaya çıkan transkripsiyon faktörüdür (Salnikow ve ark., 2000) ve heterodimerik ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) özelliğe sahiptir. Hücrelerin hipoksiye adaptasyonunu sağlar. Prolil hidroksilaz HIF-1 $\alpha$ 'nın Von Hippel-Lindau (VHL) proteinine bağlanmasını sağlar. Bu protein Ubiquitin E3 ligazı aktive eder ve bu da HIF-1 $\alpha$  degradasyonuna yolaçar. Hipoksi veya demir eksikliğinde veya her ikisinin eksikliğinde prolil hidroksilaz fonksiyonu başarısız olur. HIF-1 $\alpha$  hücrede stoplazmada birikir. Stoplazmada biriken HIF-1 $\alpha$  nükleusa geçer ve HIF-1 $\beta$  ile kompleks oluşur. Bu

kompleks promoter bölgede bulunan Hypoxia Response Element (HREs)'e bağlanarak çok sayıda genin regülasyonunda rol oynayabilir. Hiposik şartlarda inkübasyon sonrası Nrdg1 upregulasyonunda HIF-1 $\alpha$  transkripsiyon faktörünün rol aldığı öne sürülmüştür (Salnikow ve ark., 2000). Nrdg1 homosistein ve hipoksi tarafından upregüle edilen, HIF-1 bağımlı ve bağımsız mekanizmalara sahip olan stres cevap gen olarak da tanımlanmıştır (Salnikow ve ark., 2000).

Nrdg1 indüksiyonu hipoksiyle başlatılabilir ve HIF-1 $\alpha$  ile düzenlenebilir fakat Nrdg1 geni aynı zamanda intraselüler Ca<sup>+2</sup> artışıyla da HIF-1 $\alpha$ -bağımsız bir sinyal yolağı yardımıyla aktive edilebilir (Salnikow ve ark., 2002). Demir şelasyonu sonrası oluşan Nrdg1 upregulasyonun HIF-1 $\alpha$  bağımlı ve bağımsız mekanizmalar tarafından düzenlendiğı gösterilmiştir.

Fe deprivasyonu ile Nrdg1 upregulasyonunun fizyolojik rolü dikkate alınarak Nrdg1'in proliferasyon inhibisyonundaki yeteneğinin büyüme arrestine neden olan Fe depleasyonu aracılı indüklenen bir mekanizma ile olabileceğı öne sürülmüştür (Bandyopadhyay ve ark., 2004). Bundan dolayı Fe depleasyonu sonucu RR aktivitesinin inhibisyonu ile beraber hücre siklus progresyonuna neden olan Fe deprivasyonuna multiple moleküler olaylar ile cevap verilir.

Birçok in-vivo ve in-vitro araştırma yanında klinik denemeler, DFO ve diğer şelatörlerin etkili antitümör ajanlar olduğunu göstermiştir (Lovejoy ve Richardson, 2002; Chaston, 2003). Hücrelerin şelatörler ile inkübasyonu Nrdg1 mRNA ve protein ekspresyonunu ciddi oranda artırmıştır. Bu transkripsiyonel seviyedeki upregulasyon, HIF- 1 $\alpha$  bağımlı ve bağımsız mekanizmalarla alakalı olabileceğı öne sürülmüştür. Böylece demir metabolizması ve proliferasyon kontrolü arasında yeni bağlantının Nrdg1 olduğunu öne sürmüştür (Van ve ark., 1997; Becton ve Bryles, 1999). Deneyimizde MCF-7 hücrelerinin 24 saat süreyle DFO ile muamelesi sonucu Nrdg1 V1 mRNA seviyesinde 5.9 kat V2 de ise 10.6 kat artış oldu. Her iki varyant da kontrol grubundan anlamlı derecede farklı çıktı P(H1)=0,000. DFO, MCF-7 hücrelerinde transkripsiyonel regülasyon ile özellikle Nrdg1 V2 mRNA düzeyinde artışa yol açtı. HepG2 hücrelerinin DFO ile muamelesi sonucu Nrdg1 V1 mRNA ekspresyon seviyesinde kontrol grubuna göre anlamlı bir artışla (P(H1)=0,000) 3.2, V2 ekspresyonunda ise 2.5 kat artış oldu.

Çalışmamızda MCF-7 hücrelerinin diğer bir şelatör olan PHEN ile 24 saat süreyle muamelesi sonucunda Ndr $g$ 1 geninin her iki varyantında kontrol gurubundan anlamlı derecede farklı çıktı ( $P(H1)=0,000$ ). Ndr $g$ 1 Varyant1 mRNA ekspresyonu kontrol gurubuna göre 6 kat, Ndr $g$ 1 Varyant2 ise 16.79 kat arttı. HepG2 hücrelerinde ise Ndr $g$ 1 Varyant1 4.9 kat ( $P(H1)=0,001$ ), Ndr $g$ 2 V2 ise 5.19 kat ( $P(H1)=0,000$ ) arttı. Özellikle MCF-7 hücrelerinin PHEN ile etkileşimi sonrası Ndr $g$ 1 V2 mRNA seviyesindeki yüksek oran dikkat çekmektedir.

Demirin gen ekspresyonundaki rolüne bakıldığında bu molekülün daha fazla incelenmesi gerektiği anlaşılmaktadır. Ndr $g$ 1 ekspresyonu ile metastaz ve tümör hücre büyümesi önemli ölçüde durdurulmaktadır ancak bunun nasıl gerçekleştiği tam olarak bilinmemektedir. Demir şelatörlerinin yapmış olduğu bu etkinin daha ayrıntılı olarak irdelenmesi gelecekte şelatörlerin tedavide kullanılıp kullanılmayacağı ile ilgili bizlere daha iyi fikirler sunabilir.

Bugüne kadar Fe metabolizmasını anlama yolunda önemli ilerlemeler olmasına rağmen Fe şelasyonu sonrası G1/S arrestinde rol alan moleküler mekanizmalar çok az anlaşılabilmiştir. Hücre siklus progresyonunda demirin rolünün anlaşılması kanser tedavisinde şelatörlerin hayat kurtarıcı olup olmadığını ortaya çıkaracaktır (Bruce ve ark., 1994; Hershko, 1994).

Nrd $g$ 1 overekspresyonu belirgin şekilde tümör büyümesini ve metastazını azaltmıştır. Bu sonuçlar Nrd $g$ 1'in metastaz supresör gen olarak tanımlanmasına yol açmıştır. Nrd $g$ 1 ekspresyonunun Fe ile regule edildiği bulgusu önem kazanmaktadır. Fe şelatörlerinin moleküler hedef genleri, antitümör aktivite indüklenmesinde yararlı olabilir.

Bu çalışmada, MCF-7 hücrelerinin TSA+DFO kombinasyonu ile 24 saat süreyle muamelesi sonucunda Ndr $g$ 1 geninin her iki varyantında da kontrol gurubuna göre artış oldu. Ndr $g$ 1 Varyant1 mRNA ekspresyonu kontrol gurubuna göre 32.1 kat ( $P(H1)=0,001$ ), Ndr $g$ 1 Varyant2 ise 14.6 kat ( $P(H1)=0,001$ ), arttı. HepG2 hücrelerinde ise Ndr $g$ 1 Varyant1 10.2 kat ( $P(H1)=0,001$ ), Ndr $g$ 2 V2 ise 3.4 kat ( $P(H1)=0,000$ ) arttı. TSA ve DFO nun birlikte kullanımı MCF-7 Hücrelerinde Ndr $g$ 1 V1 ekspresyonunda sinerjik bir etki ile artış sağlarken V2 de aditif bir etki oluşturdu. HepG2 hücrelerinin TSA ve DFO kombinasyonu ile etkileşimi sonrası Ndr $g$ 1 V1 mRNA seviyesinde aditif bir etki oluşurken, Ndr $g$ 1 V2 de baskılanma oldu.

MCF-7 hücreleri TSA+PHEN kombinasyonu ile 24 saat süreyle muamelesi sonucunda Ndr1 geninin her iki varyantında da kontrol gurubuna göre artış oldu. Ndr1 Varyant1 mRNA ekspresyonu kontrol gurubuna göre 14.3 kat ( $P(H1)=0,000$ ), Ndr1 Varyant2 ise 16.1 kat ( $P(H1)=0,001$ ), arttı. HepG2 hücrelerinde ise Ndr1 Varyant1 9.9 kat ( $P(H1)=0,001$ ), Ndr2 V2 ise 4.7 kat ( $P(H1)=0,000$ ) arttı. TSA ve PHEN nun birlikte kullanımı MCF-7 Hücrelerinde hem Ndr1 V1 ekspresyonunda hemde V2 ekspresyonunda baskılanma meydana geldi. HepG2 hücrelerinin TSA ve PHEN kombinasyonu ile etkileşimi sonrası hem Ndr1 V1 mRNA seviyesinde hemde Ndr1 V2 de baskılanma oldu.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Her iki hücrede de (kontrol grubunda) referans gene göre V1 hakimiyeti mevcut. (V1: 9 kat, V2: 2 kat civarı)
2. 24 saat boyunca ilaç uygulamasının ardından HepG2 hücrelerinde Varyant1 hakimiyeti oluştu.
3. MCF-7 hücrelerinde Varyant2 hakimiyeti oluştu.
4. HepG2 ve MCF-7 hücrelerinin demir şelatörleri ile 24 saat muamelesi sonucunda NdrG1 mRNA varyantları gen ekspresyonu düzeyinde artışa uğradı.
5. HepG2 ve MCF-7 hücrelerinin HDAC inhibitörü ile 24 saat muamelesi sonucunda NdrG1 mRNA varyantları gen ekspresyonu düzeyinde artışa uğradı.
6. HepG2 hücrelerinin DFO ile 24 saat muamelesi sonucunda NdrG1 varyant1 artışı daha fazla oluştu (Kontrole göre V1;3,196, V2;2,49 kat artış oldu). MCF-7 hücrelerinin DFO ile muamelesi sonucunda NdrG1 varyant2 daha fazla arttı (Kontrole göre V1;5,907, V2;10,676 kat artış oldu)
7. HepG2 hücrelerinin PHEN ile 24 saat muamelesi sonucunda NdrG1 varyant1 ve Varyant2 artışı birbirine yakın değerde gerçekleşirken, MCF-7 hücrelerinin PHEN ile muamelesi sonucunda NdrG1 varyant2 artışı daha fazla oldu (Kontrole göre V1;6,031, V2;16,791 kat artış oldu).
8. TSA her iki hücre grubunda da Varyant1'i daha fazla artırdı.
9. Kombine gruplardan TSA+DFO HepG2 hücrelerinde birlikte kullanıldıklarında DFO, TSA'nın V1 üzerine olan artırıcı etkisini baskıladı. MCF-7 hücrelerinde DFO ve TSA kombinasyonu sinerjetik bir etki ile V1'i artırırken V2'de aditif bir etki ile artış sağladı.
10. TSA ve PHEN, HepG2 hücrelerinde birlikte kullanıldıklarında TSA, PHEN'in V1 üzerine olan artırıcı etkisini düşük oranda baskılamakta, PHEN'in V2 üzerine olan artırıcı etkisini daha fazla baskıladı. MCF-7 hücrelerinde ise TSA ve PHEN kombinasyonu V1'de artış yönünde aditif bir etki gösterirken, TSA, PHEN'in V2 üzerine olan artırıcı etkisini bastırdı.
11. Sonuç olarak; HepG2 ve MCF-7 hücrelerinin demir şelatörleri ve TSA ile muamelesi sonucu NdrG1 gen mRNA varyantları transkripsiyonel regülasyona uğradı.

### **Öneriler;**

- Ndrgl mRNA varyantlarındaki bu artışların ürüne (proteine) yansıyor yansımadığının gösterilmesi, gen ve proteinin fonksiyonunu anlamada önemli olacaktır.
- Posttranslasyonel düzenlemeler göz önüne alınarak birbirine zıt davranış gösteren hücrelerdeki proteinlerin fosforilli olup olmadığının araştırılması oldukça önemli olacaktır.
- HDAC inhibitörü olan TSA'nın Ndrgl gen mRNA varyantlarını transkripsiyonel seviyede regülasyona uğratarak artış yönünde düzenlenmesi göz önüne alındığında, mekanizmanın daha iyi anlaşılabilmesi için ChIP deneyi ile epigenetik mekanizmanın araştırılması oldukça önemli olacaktır.

## 7. KAYNAKLAR

A service of the U.S. National Library of Medicine® Reviewed January 2010

Agarwala KL, Kokame K, Kato H, Miyata T. Phosphorylation of RTP, an ER stress-responsive cytoplasmic protein, *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 16; 272: 641-7

An WG et al, Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Nature* 1998; 392; 405-408,

Andrews NC, Bridgens KR: Disorders of Iron Metabolism and Sideroblastic Anemia in: Nathan and Oski' s Hematology of Infancy and Childhood W.B. Saunders Company, Philadelphia, 423–438, 1998

Andrews NC. Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med.* 1986-1995, 1999 ; 341

Angst E, Dawson DW, Nguyen A, Park J, Go VL, Reber HA, Hines OJ, Eibl G. Epigenetic regulation affects N-myc downstream-regulated gene 1 expression indirectly in pancreatic cancer cells. *Pancreas.* 2010; 39: 675-9

Angst E, Sibold S, Tiffon C, et al. Cellular differentiation determines the expression of the hypoxia-inducible protein NDRG1 in pancreatic cancer. *Br J Cancer.* 2006; 95: 307Y313

Ashcroft M., Taya Y., Vousden K.H., Stress signals utilize multiple pathways to stabilize p53, *Mol Cell Biol,* 2000; 20: 3224-3233

Baker SJ, et al.. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. 1989; *Science* 244: 217–221



- Bandyopadhyay S, Pai SK, Hirota S, et al. "Role of the putative tumor metastasis suppressor gene Drg-1 in breast cancer progression.". *Oncogene* 2004; 23: 5675–81
- Bandyopadhyay, S., Pai, S. K., Gross, S. C., Hirota, S., Hosobe, S., Miura, K., Saito, K., Commes, T., Hayashi, S., Watabe, M. and Watabe, K. The Drg-1 gene suppresses tumor metastasis in prostate cancer. *Cancer Res.* 2003; 63: 1731–1736
- Becker EM, Lovejoy DB, Greer JM, Watts R, Richardson DR. Identification of the di-pyridyl ketone isonicotinoyl hydrazone (PKIH) analogues as potent iron chelators and anti-tumour agents. *Br J Pharmacol.* 138: 819-830, 2003
- Becton DL, Bryles P. Deferoxamine inhibition of human neuroblastoma viability and proliferation. 1988; *Cancer Res.* 48: 7189-7192
- Belcher, R. "Application of chelate Compounds in Analytical Chemistry" *Pure and Applied Chemistry*, 1973; 34: 13-27
- Ben-David M, Hanley, TA and Schell, DM. Fertilization of terrestrial vegetation by spawning the role of flooding and predator activity. 1998; *Oikos* 83: 47-55
- Berger, P et al. Molecular cell biology of Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurogenetics*, 2002; 4: 1–15
- Bonifant CL, Kim JS and Waldman T NHERFs, NEP, MAGUKs, and more: interactions that regulate PTEN. *J. Cell. Biochem.* 2007; 102: 878–885
- Brittenham GM: New advances in iron metabolism, iron deficiency, and iron overload current opinion in Hematology. 1994; 1: 101–106
- Bruce Alberts, Dennis Bray, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and James D Watson. *The Molecular Genetic Mechanisms That Create Specialized Cell Types* 1994

- Cantley, L. C. and Neel, B. G. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. 1999; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96: 4240–4245
- Chao Qi, Yijun Zhu and Janardan K. Reddy Peroxisome proliferator-activated receptors, coactivators, and downstream targets. Cell Biochemistry and Biophysics 2000; 32: 187-204
- Chaston TB, Lovejoy DB, Watts RN, Richardson DR, Examination of the anti-proliferative activity of iron chelators: multiple cellular targets and the different mechanism of action of Triapine compared with desferrioxamine and the potent pyridoxal isonicotinoyl hydrazone analogue 311, Clin Cancer Res, 2003; 9: 402-414,
- Chenoufi N, et al., Deferoxamine arrests in vitro the proliferation of porcine hepatocyte in G1phase of the cell cycle. Liver 1998; 18: 60-66
- Chiang AC, Massagu J Molecular basis of metastasis. N Engl J Med 2010; 359: 2814–2823
- Choi SC, Hwang JY, Park C, Oh BS, Kim Y, Kimm KC, Park KI, Chung HT, Jun CD. Iron chelator triggers inflammatory signals in human intestinal epithelial cells: involvement of p38 and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. J Immunol. 2004; 172: 7069-77
- Chua MS, Sun H, Cheung ST, Mason V, Higgins J, Ross DT, Fan ST, So S., Overexpression of NDRG1 is an indicator of poor prognosis in hepatocellular carcinoma, Modern Pathology, 2007; 20: 76–83

- Columbus J, Chiang Y, Shao W et al Insulin treatment and high fat diet feeding reduces the expression of three TCF genes in rodent pancreas. *J Endocrinol* 2010; 207: 77–86
- Cook JD, Baynes RD, Skikne B: The physiological significance of circulating transferrin receptors. *Nutrient Regulation during Pregnancy, Lactation and Infant Growth* Edited by Lindsay Ailen Iane King, Plenum Press, NewYork, 1994; 119–126
- Cowling A. et al. A conserved Myc protein domain, MBIV, regulates DNA binding, apoptosis, transformation, and G2 arrest. *Mol. Cell. Biol.* 2006; 26: 4226–4239
- Darnell G, Richardson DR, The potential of iron chelators of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class as effective antiproliferative agents III: the effect of the ligands on molecular targets involved in proliferation, *Blood*, 1999; 94: 781-792
- Davies MA, Koul D, Dhesi H, Berman R, McDonnell TJ, McConkey D Yung WK and Steck PA Regulation of Akt/PKB activity, cellular growth, and apoptosis in prostate carcinoma cells by MMAC/PTEN. *Cancer Res.* 1999; 59: 2551–2556
- Eliyahu D, Raz A, Gruss P, Givol D, and Oren M. Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature* 1984; 312: 646-649
- Ervvards CO, Griften LM ve ark: Screening for Hemochromatosis: Phenotype Versus Genotype, *Seminers in Hematology*, 1998; 35: 72- 76
- Esteller M, DNA methylation and cancer therapy: new developments and expectations, *Curr Opin Oncol*, 2005; 17: 55-60
- Estrov Z, Tawa A, Wang XH, et al. In vitro and in vivo effects of deferoxamine in neonatal acute leukemia. *Blood.* 1987; 69: 757-761

- Facher EA and Law JC PTEN and prostate cancer. *J. Med. Genet.* 1998; 35: 790
- Fajas L, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma: from adipogenesis to carcinogenesis. *J. Mol. Endocrinol.* 2001; 27: 1-9
- Felber JP, Coombs, TL & Vallee, BL "The mechanism of inhibition of carboxypeptidase A by 1,10-phenanthroline". *Biochemistry* 1962; 1: 231–238
- Finlay CA, Hinds RW and Levine AJ The p53 protooncogene can act as a suppressor of transformation. 1989; *Cell* 57: 1083-1093
- Fukuchi K. Tomoyasu S., Watanabe H., Kaetsu S., Suruoka N., Gomi K., Iron deprivation results in an increase in p53 expression, *Biol Chem Hoppe Seyler, Mueller E.*, 1995; 19896: 627-630
- Fukuchi K. Tomoyasu S. Tsuruoka N. Gomi K., Iron deprivation-induced apoptosis in HL-60 cells, *FEBS Lett.* 1994; 350: 139-142
- Fukuchi K. et al., DNA damage induces p21 protein expression by inhibiting ubiquitination in ML-1 cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1998; 1404: 405-411
- Green DA, Antholine WE, Wong SJ, Richardson DR, Chitambar CR. Inhibition of malignant cell growth by 311, a novel iron chelator of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class: effect on the R2 subunit of ribonucleotide reductase. *Clin Cancer Res.* 2001; 7: 3574-3579
- Gregg L. Semenza Hydroxylation of HIF-1: Oxygen Sensing at the Molecular Level, *Physiology*, 2004; 19: 176-182
- Grunwald V, DeGraffenried L, Russel D, Friedrichs WE, Ray RB and Hidalgo M Inhibitors of mTOR reverse doxorubicin resistance conferred by PTEN status in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2002; 62: 6141–6145

- Guan RJ, Ford HL, Fu Y, Li Y., Shaw L.M., Pardee A.B., Drg-1 as a differentiation-related, putative metastatic suppressor gene in human colon cancer, *Cancer Res*, 2000; 60: 749–755
- Hamacher R, Schmid RM, Saur D, et al. Apoptotic pathways in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol Cancer*, 2008; 7: 64
- Han ShouWeia; Roman Jessea, Peroxisome proliferator-activated receptor [gamma]: a novel target for cancer therapeutics? *Anti-Cancer Drugs*, 2007; 18: 2 Mueller E. 1989-244
- Henriksson, M. et al. Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation. *Adv. Cancer Res*, 1996; 68: 109–182
- Hershko C, Control of disease by selective iron depletion: a novel therapeutic strategy utilizing iron chelators, *Baillieres Clin Haematol*, 1994; 7: 965-1000
- [http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=%20/NPSA/npsa\\_server.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=%20/NPSA/npsa_server.html)
- Inagaki Y, Tang W, Xu HL, Guo Q, Mafune K, Konishi T, Nakata M, Sugawara Y, Kokudo N Localization of N-myc downstream regulated gene 1 in gastric cancer tissue. *Dig Liver Dis* 2009; 41: 96–103
- Jones PA, Taylor SM, Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation, *Cell*, 1980; 20: 85–93
- Kalaydjieva L, Gresham D, Gooding R, Heather L, Baas F, de Jonge R, Blechschmidt K, Angelicheva D, Chandler D, Worsley P, Rosenthal A, King RH, Thomas PK, N-myc downstream-regulated gene 1 is mutated in hereditary motor and sensory neuropathy-Lom, *Am J Hum Genet*, 2000; 67: 47–58

- Kalaydjieva, L. et al. Gene mapping in Gypsies identifies a novel demyelinating neuropathy on chromosome 8q24. *Nat. Genet.* 1996; 14: 214–217
- Kalaydjieva, L. et al. Hereditary motor and sensory neuropathy-Lom, a novel demyelinating neuropathy associated with deafness in gypsies. Clinical, electrophysiological and nerve biopsy findings. *Brain*, 1998; 121: 399–408
- Kim K. et al. Function of Drg1/Rit42 in p53-dependent mitotic spindle checkpoint. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 38597–38602
- Kokame K, Kato H, Miyata T, Homocysteine-respondent genes in vascular endothelial cells identified by differential display analysis, *J Biol Chem*, 1996; 271: 29659–29665
- Kovacevic, Z, Fu, D. and Richardson, DR. The iron-regulated metastasis suppressor, NdrG-1: identification of novel molecular targets. *Biochim. Biophys. Acta* 2008; 1783: 1981–1992
- KS, Welch DR Metastasis suppressors genes in cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40: 874–891
- Kurdistani SK, Arizti P, Reimer CL, Sugrue MM, Aaronson SA, Lee SW, Inhibition of tumor cell growth by RTP/rit42 and its responsiveness to p53 and DNA damage, *Cancer Res*, 1998; 58: 4439–4444
- Lachat P, Shaw P, Gebhard S, van Belzen N, Chaubert P, Bosman FT, Expression of NDRG1, a differentiation-related gene, in human tissues, *Histochem, Cell Biol.* 2002; 118: 399–408
- Larrick JW, Cresswell P, Modulation of cell surface iron transferrin receptors by cellular density and state of activation, *J Supramol Struct*, 1979; 11: 579-586

- Le NT, Richardson DR, Iron chelators with high antiproliferative activity up-regulate the expression of a growth inhibitory and metastasis suppressor gene: a link between iron metabolism and proliferation, *Blood*, 2004; 104: 2967–2975
- Le NT, Richardson DR, The role of iron in cell cycle progression and the proliferation of neoplastic cells, *Biochim Biophys Acta*, 2002; 1603: 31-46
- Le NT and Richardson DR. Iron chelators with high antiproliferative activity up-regulate the expression of a growth inhibitory and metastasis suppressor gene: a link between iron metabolism and proliferation. *Blood* 2004; 104: 2967–2975
- Leardi A, et al, Desferioxamine increases iron depletion and apoptosis induced by ara-C of human myeloid leukaemic cells. *Br. J. Haematol.* 1998; 102: 746-752
- Lee HJ, Lee J, Lee SK, Lee SK, Kim EC. Differential regulation of iron chelator-induced IL-8 synthesis via MAP kinase and NF-kappaB in immortalized and malignant oral keratinocytes. *BMC Cancer*, 2007; 7:176
- Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ), *J Biol Chem*, 1995; 270: 12953–12956
- Lehmann JM, Lenhard JM, Oliver BB, Ringold GM, and Kliewer SA. Peroxisome proliferator-activated receptors  $\alpha$  and  $\gamma$  are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 3406–3410
- Li W et al. Nickel enhancement of  $\alpha$ -tubulin acetylation in cultured 3T3 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1996; 140: 461–470
- Liang SX, Richardson DR, The effect of potent iron chelators on the regulation of p53: examination of the expression, localization and DNA-binding activity of p53 and the transactivation of WAF1, *Carcinogenesis*, 2003; 24: 1601-1614

- Louise Østergaard, Max Gassmann, Hypoxia Inducible Factor and Hypoxia-mediated Pulmonary Hypertension Winterthurerstrasse 2011; 260, 8057 Zürich, Switzerland
- Lovejoy DB, Richardson DR, Iron chelators as anti-neoplastic agents: current developments and promise of the PIH class of chelators, *Curr Med Chem*, 2003; 10: 1035-1049
- Lovejoy DB, Richardson DR, Novel “hybrid” iron chelators derived from aroylhydrazones and thiosemicarbazones demonstrate selective antiproliferative activity against tumor cells, *Blood*, 2002; 100: 666-676
- M.VVeiss G, Houston T ve ark: Regulation of Cellular Iron Metabolism by Erythropoietin: Activation of Iron- Regulatory Protein and Up regulation of transferrin Receptor Expression in Erythroid Cells: *Blood*, 1997; 39: 680 – 687
- Mangelsdorf D J, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, The nuclear receptor superfamily: the second decade, *Cell*, 1995; 83: 835–839
- Mueller E 1989, Volume 18: 2. -244 doi, 2007: 10.1097/CAD.0b013e328011e67d  
Review Papers
- Masuda K, Ono M, Okamoto M, et al. Downregulation of Cap43 gene by von Hippel-Lindau tumor suppressor protein in human renal cancer cells. *Int J Cancer*. 2003; 105: 803-810
- McCord M: Iron, Free Radicals, and Oxidative Injury seminars in Hematology 1989; 35: 1,5-12
- Miller, Marvin J. "Syntheses and therapeutic potential of hydroxamic acid based siderophores and analogs". *Chemical Reviews* 1989; 89: 1563–1579



- Mueller E, Sarraf P, Tontonoz P, Evans RM, Martin KJ, Zhang M, Fletcher C, Singer S, Spiegelman BM. Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR $\gamma$ , *Mol Cell*, 1998; 1: 465–470
- Nghia TV Le and Des R. Richardson Iron chelators with high antiproliferative activity up-regulate the expression of a growth inhibitory and metastasis suppressor gene: a link between iron metabolism and proliferation *The American Society of Hematology* 2004; 104: 2967-2975
- Okuda T et al. Ndr1-deficient mice exhibit a progressive demyelinating disorder of peripheral nerves. *Mol. Cell. Biol.* 2004; 24: 3949–3956
- Oster SK. et al. The myc oncogene: marvellously complex. *Adv. Cancer Res.* 2002; 84: 81–154
- P.J. Barnes, I.M. Adcock and K. Ito Histone acetylation and deacetylation: importance in inflammatory lung diseases *Eur Respir J* 2005; 25: 552–563
- Park JY, Helm JF, Zheng W, et al. Silencing of the candidate tumor suppressor gene solute carrier family 5 member 8 (SLC5A8) in human pancreatic cancer. *Pancreas.* 2008; 36: e32-39
- Perini G. et al. In vivo transcriptional regulation of N-Myc target genes is controlled by E-box methylation. *Proc. Natl Acad. Sci.* 2005; USA, 102: 12117–12122
- Piquemal D, Joulia D, Balaguer P, Basset A, Marti J, Commes T, Differential expression of the RTP/Drg1/Ndr1 gene product in proliferating and growth arrested cells, *Biochim Biophys Acta*, 1999 ; 1450: 364
- Ponka I'. Tissue Specific Regulation of Iron Metabolism and Heme Synthesis: Distinct Control Mechanisms in Erythroid Cells. *Blood.* 1997; 88: 1-7, 135

- Ponka P, Beaumont C, Richardson R: Function and Regulation of Transferrin and Ferritin, *Seminars in Hematology* 1998; 35: 35 – 54
- Porreca E, et al., Antiproliferative effect of desferrioxamine on vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo. *Arterioscler. Thromb.* 1994; 14: 299-304
- Qi C, et al., Peroxisome proliferator-activated receptors, coactivators, and downstream targets. *Cell. Biochem. Biophys*, 2000; 32: 187-204
- Qian Li, Hong Chen. Transcriptional silencing of N-My downstream-regulated gene 1(NDRG1) in metastatic colon cancer cell line SW620. *Clin Exp Metastasis*, 2011; 28: 127-135
- Qu X, Zhai Y, Wei H, Zhang C, Xing G, Yu Y, He F., Characterization and expression of three novel differentiation-related genes belong to the human NDRG gene family, *Mol Cell Biochem*, 2002; 229: 35–44
- Quandt K, Frech K, Karas H, Wingender E, Werner T, MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data, *Nucleic Acids Res*, 1995; 23: 4878–4884
- Richardson D, Baker E. Two mechanisms of iron uptake from transferrin by melanoma cells: the effect of desferrioxamine and ferric ammonium citrate. *J Biol Chem.* 1992; 267: 13972-13979
- Richardson D, Ponka P, Baker E. The effect of the iron(III) chelator, desferrioxamine, on iron and transferrin uptake by the human malignant melanoma cell. *Cancer Res.* 1994; 54: 685-689
- Richardson DR, Milnes K, The potential of iron chelators of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class as effective antiproliferative agents II: the mechanism of action

of ligands derived from salicylaldehyde benzoyl hydrazone and 2-hydroxy- 1-naphthylaldehyde benzoyl hydrazone, *Blood* 1997; 89: 3025-3038

Richardson DR, Baker E. Two saturable mechanisms of iron uptake from transferrin in human melanoma cells: the effect of transferrin concentration, chelators and metabolic probes on transferrin and iron uptake. *J Cell Physiol.* 1994;161: 160-168

Ryan HE, Poloni M, McNulty W, et al. Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  is a positive factor in solid tumor growth. *Cancer Res.* 2000; 60: 4010-4015

Salnikow K, Kluz T, Costa M, Cap43 gene expression. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1999; 160: 127–132

Salnikow K, Su W, Blagosklonny MV, Costa M. Carcinogenic metals induce hypoxia-inducible factor-stimulated transcription by reactive oxygen species-independent mechanism. *Cancer Res.* 2000 60: 3Mueller E, 19895-3Mueller E.

Salnikow K, An WG, Melillo G, Blagosklonny MV, Costa M, Nickel-induced transformation shifts the balance between HIF-1 and p53 transcription factors, *Carcinogenesis*, 1999; 20: 1819–1823

Salnikow K, Kluz T, Costa M, Piquemal D, Demidenko ZN, Xie K, Blagosklonny MV, The regulation of hypoxic genes by calcium involves c-Jun/AP-1, which cooperates with hypoxia-inducible factor 1 in response to hypoxia, *Mol Cell Biol*, 2002; 22: 1734–1741

Salnikow K, Su W, Blagosklonny MV, Costa M, Carcinogenic metals induce hypoxia-inducible factor-stimulated transcription by reactive oxygen species-independent mechanism, *Cancer Res* 2000, 60: 3Mueller E, 19895–3Mueller E, 19898

Salnikow K. et al. (1999) Role of Ca<sup>2+</sup> in the regulation of nickel-inducible

- Salvesen, GS & Nagase, H "Inhibition of proteolytic enzymes". *Proteolytic enzymes: a practical approach*, 2 edn 2001; 1: 105–130
- Semenza GL and Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 1992;12: 5447–5454
- Semenza GL, Nejfelt MK, Chi SM, Antonarakis SE. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991; 88: 5680-5684
- Shahbazian MD, Grunstein M Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu Rev Biochem* 2007; 76: 75–100
- Sharrard, R. M. and Maitland, N. J. Phenotypic effects of overexpression of the MMAC1 gene in prostate epithelial cells. *Br. J. Cancer* 2000; 83: 1102–1109
- Shimono A, Okuda T, Kondoh H. N-myc dependent repression of ndr1, a gene identified by direct subtraction of whole mouse embryo cDNAs between wild type and N-myc mutant. *Mech Dev*. 1999; 83:39Y52
- Stafford LJ, Vaidya KS, Welch DR Metastasis suppressors genes in cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40: 874–891
- Stein S, Thomas EK, Herzog B, Westfall MD, Rocheleau JV, Jackson RS 2nd, Wang M, Liang P, NDRG1 is necessary for p53-dependent apoptosis, *J Biol Chem*, 2004; 279: 48930–48940
- Stein S, Thomas K, Herzog B, Westfall, MD, Rocheleau JV, Jackson, 2nd, R. S., Wang, M. and Liang, P. NDRG1 is necessary for p53-dependent apoptosis. *J. Biol. Chem*. 2004; 279: 48930–48940

- Stein, S. et al. NDRG1 is necessary for p53-dependent apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 48930–48940
- Taketomi Y, Sugiki T, Saito T, Ishii S, Hisada M, Suzuki-Nishimura T, Uchida MK, Moon TC, Chang HW, Natori Y, Miyazawa S, Kikuchi-Yanoshita R, Murakami M, Kudo I, Identification of NDRG1 as an early inducible gene during in vitro maturation of cultured mast cells, *Biochem Biophys Res Commun*, 2003; 306: 339–346
- Thelander L, Reichard P, Reduction of ribonucleotides, *Annu Rev Biochem*, 1979; 48: 133-158
- Thomas P. Ellen TP, Ke Q, Zhang P et al NDRG1, a growth and cancer related gene: regulation of gene expression and function in normal and disease states. *Carcinogenesis* 2008; 29: 2–8
- Thomas P. Ellen, Qingdong Ke, Ping Zhang and Max Costa NDRG1, a growth and cancer related gene: regulation of gene expression and function in normal and disease states *Carcinogenesis* 2008; 29: 2–8
- Tontonoz P, Singer S, Forman BM, Sarraf P, Fletcher JA, Fletcher CD, Brun RP, Mueller E, Altieri S, Oppenheim H, Evans RM, and Spiegelman BM. Terminal differentiation of human liposarcoma cells induced by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  and the retinoid X receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997; 94: 2Mueller E, 1989–241
- Trinder D, Zak O, Aisen P, Transferrin receptor-independent uptake of different transferrin by human hepatoma cells with antisense inhibition of receptor expression, *Hepatology*, 1996; 23: 1512-1520
- Tsuji n. et al. A new antifungal antibiotic, trichostatin. *J Antibiot (Tokyo)*. 1976; 29:1-6

Tsuneoka M. et al. c-myc activates RCC1 gene expression through E-box elements. *Oncogene*, 14: 2301–2311, 1997

Umbreit JN, Conrad ME ve ark: Iron Absorption and Cellular Transport: The mobilferrin / Paraferitin Paradigm. *Seminers in Hematology*, 1998; 13 – 36

Unoki M, Nakamura Y. Growth-suppressive effects of BPOZ and EGR2, two genes involved in the PTEN signaling pathway. *Oncogene*. 2001; 27: 20: 4457-65

Uscn Life Science Inc. | All rights reserved | © 2009-2011 WebSite ICP 09014367

Van Belzen N, Dinjens WN, Diesveld MP, Groen NA, Nozawa Y, Vlietstra R, Trapman J, Bosman FT, A novel gene which is up-regulated during colon epithelial cell differentiation and down-regulated in colorectal neoplasms, *Lab Invest*, 1997; 77: 85-92

Vanhaecke T, Papeleu P, Elaut G, Rogiers V "Trichostatin A-like hydroxamate histone deacetylase inhibitors as therapeutic agents: toxicological point of view". *Curr Med Chem* 2004; 11: 1629–43. PMID 15180568

Vita M. et al. The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. *Semin. Cancer Biol.* 2006; 16: 318–330

Wolf D, Rotter V. Major deletions in the gene encoding the p53 tumor antigen cause lack of p53 expression in HL-60 cells. *Proc Natl Acad Sci* 1985; 82: 790–794

[www.uscnk.com/directory/N-myc-Downstream-Regulated-Gene-1.2011](http://www.uscnk.com/directory/N-myc-Downstream-Regulated-Gene-1.2011)

Zaklina Kovacevic and Des R.Richardson The metastasis suppressor, NdrG-1: a new ally in the fight against cancer *Carcinogenesis* 2006; 27: 2355–2366

Zhang J, Chen S, Zhang W, Zhang J, Liu X, Shi H, Che H, Wang W, Li F, Yao L  
Human differentiation-related gene NDRG1 is a Myc downstream-regulated gene  
that is repressed by Myc on the core promoter region, *Gene*, 2008; 417: 5-12

Zhang J. et al. The repression of human differentiation-related gene NDRG2 expression  
by Myc via Miz-1-dependent interaction with the NDRG2 core promoter. *J. Biol.  
Chem.* 2006; 281: 39159–39168

Zhou D, Salnikow K, Costa M. Cap43, a novel gene specifically induced by Ni<sup>2+</sup>  
compounds, *Cancer Res*, 1998; 58: 2182–2189

Zhou RH, Kokame K, Tsukamoto Y, Yutani C, Kato H, Miyata T, Characterization of  
the human NDRG gene family: a newly identified member, NDRG4, is specifically  
expressed in brain and heart, *Genomics*, 2001; 73: 86–97

## 8. ÖZGEÇMİŞ

1966 yılında Çorum/Sungurlu/Büyük Ekmekçi köyünde doğdum. Liseyi Çorum Atatürk Lisesinde tamamladım. 1987 yılında Ondokuzmayıs Üniversitesi Tıp Fakültesini kazandım ve 1993 yılında mezun oldum. Aynı yıl Erzincan ili Refahiye ilçesi sağlık ocağına atandım. 1994 yılında Erzincan Sağlık Müdürlüğüne İl Sağlık Müdürü olarak atandım. 1995 yılında Samsun Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Hastanesine atandım. 2002 yılında Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Hastanesine başhekim yardımcısı olarak atandım. 2006 yılında aynı hastaneye başhekim olarak atandım. 2008 yılında Daha önce ara verdiğim OMÜ Tıp Fak. Biyokimya AD. Doktora öğrenimime aftar yararlanarak tekrar başladım. 2012 yılında doktora öğrenimimi tamamladım. Evli ve 2 çocuk babasıyım.

### **Katıldığım Kurslar ve Eğitimler**

Mezuniyet sonrası kardiyoloji günleri 1997 sertifikasyon eğitimi. TTB sürekli tıp kredilendirme kurulu tbc, sertifikasyon eğitimi 1999. The MBA Club değer yaratma, problem çözme teknikleri, hasta memnuniyeti ve toplam kalite yönetimi alanında sertifikasyon eğitim 2004. Kalder & Kavrakoğlu danışmanlık sertifikasyon eğitim 2004. TTB iş hekimliği sertifikasyonu. Psikon, kendini geliştirme ve çocuk eğitimi 2004. Sağlık Bakanlığı üst düzey yönetici sertifikasyon eğitimi 2004. TS-EN-ISO 9001:2000 kalite yönetim sistemleri ,kalite sistem dökümantasyon, iç kalite tetkikleri sertifikasyonları. Sağlık Bakanlığı Temel sağlık hizmetleri liderlik iletişim, süreç yönetimi, kişisel gelişim, ekip çalışması eğitimleri ve sertifikasyonları. Sağlık Bakanlığı Avrupa Bİrlığı Koordinasyon Daire Başkanlığı Avrupa birliği ve sağlık alanında ve. Hasta hakları hizmet içi sertifikasyon eğitimi. Hasta hakları 2.kademe hizmet içi eğitim sertifikasyonu 2004. Mested eğitim kongresi sertifikasyonu 2005. PSiKON eğitim kongresi 2005. Avrupa Birliği 2.kademe sertifikasyon Eğitim 2005. 1.basamak hipnoz eğitim 2006 (Yeditepe Ün.). 2.basamak hipnoz eğitim 2006 (Yeditepe Ün.). 3.basamak hipnoz eğitimi 2006 (Yeditepe Ün.). Uygulamalı temel hipnoz kursu 2007. Şema terapi uygulamalı eğitimi 2007. Psikoterapi Enstitüsünde 600 saatlik davranışsal, bilişsel, dinamik ve varoluşsal tüm modelleri kapsayan Bütüncül Psikoterapi ve Hipnoz Eğitim programı eğitimini tamamladım. 2010 yılı 4. Ulusal Ruh Sağlığı Hemşireliği Kongresi Düzenleme kurulu üyeliği. 2010 yılı 1. Ruh Sağlığı Hastaneleri Sempozyumu Düzenleme kurulu üyeliği.