

EGE ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMA
PROJE KESİN RAPORU
EGE UNIVERSITY SCIENTIFIC
RESEARCH PROJECT REPORT

PROJE NO: 08/Tıp/15
(Doktora)
KHDAK HÜCRE SERİLERİNDE
14-3-3SİGMA' NIN KEMOTERAPİ
DİRENCİ GELİŞİMİNDEKİ
ROLÜNÜN BELİRLENMESİ

PROJE YÖNETİCİSİ
Doç. Dr. Zuhale EROĞLU
YARDIMCI ARAŞTIRICILAR
Ar. Gör. Dr. Vildan BOZOK ÇETİNTAŞ
Ar. Gör. Aslı TETİK
Yard. Doç. Dr. Buket KOSOVA
Doç. Dr. Cumhur GÜNDÜZ
Doç. Gürsel ÇOK
Prof. Dr. Metin KORKMAZ

Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ABD
Faculty of Health Science
Department of Medical Biology

Bornova-İZMİR
2011

ÖNSÖZ

Akciğer kanseri tüm dünyada görülme sıklığı giderek artan ve tedavisinden sınırlı olarak yarar sağlanabilen önemli bir hastalıktır. Olguların aynı kemoterapotik ajanlarla tedavi edilmelerine karşın aynı ilaçlara aynı yanıtı vermemeleri, klinisyenler için büyük bir sorun oluşturmakta ve deneme/yanılma yoluyla ilaç kombinasyonlarının seçilmesine zorlamaktadır. Olguların farklılıklarının ortaya çıkarılarak kişiye özel tedavilerin oluşturulabilmesi için ilaç direncinin moleküler mekanizmalarının anlaşılması son derece önem kazanmış durumdadır.

Direnç gelişimi, ilaç birikiminin azalması, ilacın hücre içi dağılımının değişmesi, ilaç-hedef etkileşiminin azalması, detoksifikasyon yanıtının artması, hücre döngüsünün yeniden düzenlenmesi, DNA tamirinin artması ve apoptotik yanıtın azalması gibi yollarla meydana gelebilmektedir. Birbirleriyle ilişkili olan bu mekanizmaların aktivasyonları ve/veya inaktivasyonları genetik ve epigenetik düzenlenmeler ile sağlanabilmektedir.

Hücre döngüsü, apoptoz, sinyal yolları gibi birçok yaşamsal yolda görev alan anahtar enzimlerden birisi de 14-3-3sigma'dır. Göğüs, kolon, akciğer ve pankreas kanserleri ile yapılan çalışmalarda, artmış 14-3-3sigma gen ekspresyonu ve azalmış metilasyon durumuna sahip olguların tedaviye daha az cevap verdiği bildirilmektedir. Fakat, bunun aksi sonuçların gözleendiği endometrium ve over kanserlerinde düşük ekspresyon düzeyinin hayatta kalma süresini kısalttığı belirtilmektedir.

Çalışmamızda 14-3-3sigma gen ekspresyonunun ve metilasyon durumunun, küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre serilerinde cisplatin direnci gelişimindeki etkilerinin ortaya konması amaçlanmıştır. Hipotezimiz; 14-3-3sigma ekspresyonunun artış veya azalış yönünde manupüle edilerek cisplatin yanıtının arttırılabileceği üzerine kurulmuştur. Çalışma kapsamında iki akciğer kanseri hücre serisi kemoterapotik bir ilaç olan cisplatine dirençli duruma getirildikten sonra 14-3-3sigma ekspresyonları inhibisyon ve aktivasyon yönünde değiştirilerek bu durumun cisplatin yanıtına olan etkisi analiz edilmiştir. Bu çalışmanın bulgularının cisplatin direnci ile ilişkili moleküler değişimlerden sorumlu mekanizmaların daha ileri düzeyde aydınlatılmasında kullanılabileceği gibi akciğer kanserinde yeni ilaç hedeflerinin belirlenmesinde de yararlı olacağı inancını taşımaktayız.

Çalışmamız için katkıda bulunan Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna ve Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırma Projeleri Alt Komisyonuna desteklerinden dolayı teşekkür ediyoruz.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

Çizelge Dizini -----	III
Kısaltma ve Semboller Dizini-----	V
Öz (Abstract)-----	VI
1. Giriş-----	1
2. Literatür Özeti-----	2
2.1. Akciğer Kanseri-----	2
2.2. Cisplatin -----	4
2.2.1. Biyokimyasal Etki Mekanizması-----	5
2.2.2. Direnç Mekanizmaları-----	5
2.3. 14-3-3sigma proteini-----	6
2.3.1. 14-3-3sigma proteininin fonksiyonları-----	7
2.3.2. 14-3-3sigma ekspresyonunun epigenetik mekanizmalarla susturulması-----	8
2.3.3. 14-3-3sigma ekspresyonu ve kemoterapi yanıtı-----	9
3. Materyal ve Yöntem-----	10
3.1. Hücre Kültürleri-----	11
3.2. Cisplatin Dirençli Hücre Serisi Kültürlerinin Oluşturulması-----	12
3.3. Sitotoksite Deneyleri-----	13
3.4. Hücre Serilerinden DNA İzolasyonu ve 14-3-3sigma Metilasyon Analizleri-----	15
3.4.1. DNA izolasyonu-----	15
3.4.2. DNA' nın bisülfittenmesi-----	16
3.4.3. 14-3-3sigma Metilasyon Analizi-----	17
3.5. Hücre Serilerinden RNA izolasyonu ve 14-3-3sigma ekspresyon analizleri-----	19
3.5.1. RNA izolasyonu-----	19
3.5.2. cDNA elde edilmesi-----	20
3.5.3. Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR (RT-PCR)-----	21
3.6. SDS-PAGE ve western blot analizleri-----	23
3.6.1. Protein izolasyonu-----	23
3.6.2. Protein tayini-----	24
3.6.3. Solüsyonların Hazırlanması-----	24
3.6.4. Proteinlerin yüklenmesi ve elektroforez-----	25
3.6.5. Transfer-----	26
3.6.6. Bloklama-----	26
3.6.7. Primer ve sekonder antikor ile muamele-----	26
3.7. Hücre Serilerine siRNA transfeksiyonu-----	27
3.7.1. siRNA Dizileri ve Resüpsansiyonu-----	27
3.7.2. siRNA Transfeksiyon Kontrolleri-----	28
3.7.2.1. siGLO Green Transfeksiyon İndikatörü-----	28
3.7.2.2. siRNA kontrolleri-----	29
3.7.3. siRNA Transfeksiyonu İçin Hücrelerin Hazırlanması-----	30
3.7.4. siRNA Transfeksiyon protokolü-----	30
3.8. Hücre serilerine Azasitidin uygulanması-----	31
3.8.1. Optimum Azasitidin konsantrasyonun belirlenmesi-----	32
3.9. Sitokrom C salınımının analizi-----	32
3.9.1. Sitokrom c salınımı analizinde kullanılacak solüsyonların hazırlanması-----	33
3.9.2. Sitokrom c salınımı analiz edilecek örneklerin hazırlanması-----	34
3.9.3. Deney Protokülü-----	35
3.10. İstatistiksel Analizler-----	37
4. Bulgular-----	37

4.1.	A549 ve Calu1 hücre serilerinin cisplatin IC ₅₀ dozları-----	37
4.2.	Dirençli hücre serilerinin oluşturulması -----	38
4.3.	Dirençli hücre serilerinin cisplatin IC ₅₀ dozları-----	39
4.4.	Kontrol ve dirençli hücre serilerinin 14-3-3sigma profillerinin karşılaştırılması-----	41
4.4.1.	Hücre serilerinin 14-3-3sigma gen ekspresyonları -----	41
4.4.2.	Hücre serilerinin 14-3-3sigma ekspresyonlarının protein düzeyinde Değerlendirilmesi-----	42
4.4.3.	Hücre serilerinin 14-3-3sigma metilasyon bulguları -----	43
4.5.	Hücre serilerine 14-3-3sigma siRNA transfeksiyonunun gen ekspresyon düzeyleri ve cisplatin yanıtına etkileri-----	43
4.6.	Hücre serilerine azasitidin uygulanmasının 14-3-3sigma gen ekspresyonu ve cisplatin yanıtına etkileri-----	46
4.7.	Hücre serilerinde Sitokrom-c salınımı bulguları-----	49
5.	Tartışma, Sonuç ve Öneriler -----	50
6.	Kaynaklar -----	54

Tablo 1: KHDAK tedavilerinde hayatta kalma süreleri ve kemoterapiye yanıt oranları-----	3
Tablo 2: Metilasyon Spesifik PCR reaksiyonu bileşenleri ve konsantrasyonları-----	18
Tablo 3: cDNA sentez reaksiyonu bileşenleri ve konsantrasyonları-----	20
Tablo 4: 14-3-3sigma gen ekspresyonunun analizinde kullanılan primer ve probalar-----	21
Tablo 5: RT-PCR reaksiyonu bileşenleri ve konsantrasyonları-----	22
Tablo 6: LightCycler Tagman PCR Protokolü-----	23
Tablo 7: 14-3-3sigma özgül siRNA dizilerinin özellikleri-----	27
Tablo 8: Kontrol ve dirençli hücre serilerinden elde edilen 72. saat sitotoksosite veri setlerinin karşılaştırılması-----	40
Tablo 9: Kontrol ve dirençli hücre serilerinin 14-3-3sigma gen ekspresyonlarının rölatif oranlarının karşılaştırılması-----	42
Tablo 10: 14-3-3sigma-siRNA transfeksiyonunun A549 hücre serisi ve alt gruplarında gen ekspresyon düzeyi ve cisplatin IC ₅₀ dozuna etkileri -----	45
Tablo 11: 14-3-3sigma siRNA transfeksiyonunun CD-Calul hücre serisinde gen ekspresyon düzeyi ve cisplatin IC ₅₀ dozuna etkileri -----	45

Şekil 1: Düşük ve yüksek yoğunluktaki A549 hücre serileri. ATCC No: CCL-185-----	11
Şekil 2: Calu-1 hücre serisi-----	12
Şekil 3: XTT sitotoksosite deneylerinde kullanılan 96 kuyucuklu plate formatı ve uygulanan cisplatin konsantrasyonları-----	14
Şekil 4: ELISA okuyucuda ölçümü yapılan cisplatin sitotoksosite deneyinin 1. gün verileri-----	15
Şekil 5: 14-3-3sigma DNA dizisindeki CpG adacıkları ve MS-PCR ile çoğaltılan gen bölgesi-----	18
Şekil 6: GADPH standart eğrisi-----	22
Şekil 7: Protein tayininde kullanılan BSA standart eğrisi-----	24
Şekil 8: A549 hücre serisine transfeksiyon indikatörü siGLO transfeksiyonu-----	29
Şekil 9: Sitokrom c analizinde kullanılan mikropate-----	36
Şekil 10: Kontrol ve cisplatin dirençli hücre serilerinden izole edilen proteinlerde western blot yöntemi ile belirlenen 14-3-3sigma protein bantları-----	43
Şekil 11: A549 kontrol/dirençli ve Calul kontrol/dirençli hücre serilerinde 14-3-3sigma metilasyon spesifik PCR ürünlerinin % 2' lik jel görüntüsü-----	43

Grafik 1: Dirençli hücre serilerinin oluşturulması sırasında kullanılan cisplatin dozları-----	13
Grafik 2: A549 hücre serisine siRNA transfeksiyonundan sonra GADPH ekspresyonu-----	31
Grafik 3: A549 hücre serisine siRNA transfeksiyonundan sonra 14-3-3sigma ekspresyonu-----	31
Grafik 4: A549 hücre serisine azasitidin uygulandıktan sonra 14-3-3sigma ekspresyon düzeyleri-----	32
Grafik 5: Sitokrom c standart eğrisi-----	36
Grafik 6: A549 hücre serisinin 24, 48 ve 72. saatlerde cisplatin yanıtı ve 72. saat IC ₅₀ değeri-----	38
Grafik 7: Calul hücre serisinin 24, 48 ve 72. saatlerde cisplatin yanıtı ve 72. saat IC ₅₀ değeri -----	38
Grafik 8: CD-A549 hücre serisinin oluşturulması sırasında elde edilen IC ₅₀ dozları-----	39
Grafik 9: CD-Calul hücre serisinin oluşturulması sırasında elde edilen IC ₅₀ dozları-----	39
Grafik 10: CD-A549 hücre serisinin 24, 48 ve 72. saatlerde cisplatin yanıtı ve	

72. saat IC ₅₀ değeri -----	40
Grafik 11. Kontrol ve cisplatin dirençli A549 hücre serilerinin 72. saat IC ₅₀ dozlarının karşılaştırılması-----	40
Grafik 12. CD-Calul hücre serisinin 24, 48 ve 72. saatlerde cisplatin yanıtı ve 72. saat IC ₅₀ değeri -----	41
Grafik 13. Kontrol ve cisplatin dirençli Calul hücre serilerinin 72. saat IC ₅₀ dozlarının karşılaştırılması-----	41
Grafik 14. Kontrol ve dirençli hücre serilerinin 14-3-3sigma gen ekspresyonlarının karşılaştırılması-----	42
Grafik 15. A549, CD-A549 ve CD-Calul hücre serilerine 14-3-3sigma siRNA transfeksiyonun gen ekspresyon düzeylerine etkileri-----	44
Grafik 16. 14-3-3sigma-siRNA transfeksiyonu yapılan A549 hücre serisinde cisplatin yanıtı ve 72. saat IC ₅₀ değeri-----	44
Grafik 17. CD-A549-siRNA hücre serisinde cisplatin yanıtı ve IC ₅₀ değeri-----	45
Grafik 18. 14-3-3sigma-siRNA transfeksiyonu yapılan ve yapılmayan CD-Calul hücre serisinde cisplatine verilen yanıt ve IC ₅₀ değeri-----	46
Grafik 19. (A) Azasitidin uygulamasının hücre serilerindeki 14-3-3sigma gen ekspresyon düzeylerine ve (B) cisplatin IC ₅₀ dozlarına etkisi -----	47
Grafik 20. A549-Aza hücre serisinde cisplatin yanıtı ve 72. saat IC ₅₀ değeri-----	47
Grafik 21. Azasitidin uygulanan ve uygulanmayan CD-A549 hücre serisinde cisplatine verilen yanıt ve IC ₅₀ değerleri-----	48
Grafik 22. Calul-Aza hücre serisinde cisplatin yanıtı ve IC ₅₀ değeri-----	48
Grafik 23. Azasitidin uygulanan ve uygulanmayan CD-Calul hücre serisinde cisplatin yanıtı ve IC ₅₀ değeri-----	48
Grafik 24. Hücre serilerinde cisplatin ile apoptozun indüklenmesinden 24 ve 48 saat sonra sitokrom c düzeyleri-----	49

Kısaltma ve Semboller Dizini

5-Aza: 5-Aza-2'deoksisitidin

BAD: BCL2-associated agonist of cell death

Bax: Bcl2-associated X protein

Bcl2: B-cell CLL/lymphoma 2

BSA: Bovin serum albümin

c-ABL: c-abl oncogene 1, receptor tyrosine kinase

CaMK1: Kalsiyum/Kalmodilin bağımlı kinaz

CDC2: Cell division cycle 2

CDC25C: Cell division cycle 25 homolog C

CDKs : Cyclin dependent kinases; Siklin bağımlı kinazlar

CHK1: Checkpoint kinase 1; Hücre siklusu kinazı 1

DNA: Deoksiribonükleik asit

EFP: E3 Ubikitin Ligaz

EGFR: Epidermal growth factor receptor

GAPDH: Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz

GSH: Glutathione

HMG: High mobility group proteinleri

hMLH1: MutL homolog 1

KHAK: Küçük hücreli akciğer kanseri

MDR: Multi Drug Resistance

MDM2: Murine double minute 2

MMR: Mismatch (yanlış eşleşme) eksizyon tamiri

NER: Nucleotid Excision Repair

NSCLC: Non small cell lung cancer

RNA: Ribonükleik asit

SAGE: Serial analyses of gene expression

SFN: Stratifin

TP53: Tümör protein 53

ÖZ

Bu çalışmada 14-3-3sigma gen ekspresyonunun ve metilasyonun, küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) hücre serilerinde cisplatin direnci gelişimindeki etkisi olup olmadığı araştırılmıştır. A549 ve Calu1 KHDAK hücre serileri kemoterapotik bir ilaç olan cisplatine dirençli duruma getirildikten sonra RT-PCR ve Western Blot yöntemleri ile 14-3-3sigma ekspresyon düzeyleri ve MS-PCR yöntemi ile metilasyon durumlarındaki değişiklikler analiz edilmiştir. Dirençli hücre serilerinde belirgin olarak artış gösteren 14-3-3sigma gen ekspresyon düzeyinin, siRNA transfeksiyonu ile baskılanması sonucu A549 ve cisplatin dirençli Calu1 hücre gruplarında cisplatin yanıtının anlamlı olarak arttığı belirlenmiştir. Elde ettiğimiz bu bulguların 14-3-3sigma' nın yeni bir ilaç hedefi olarak kullanılabileceğini destekler nitelikte olduğu saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: 14-3-3sigma, Cisplatin direnci, KHDAK,

The Effects of 14-3-3sigma on Chemotherapy Resistance in Non Small Cell Lung Cancer Cell Lines

ABSTRACT

In this study, we investigated whether gene expression and methylation of 14-3-3sigma effects the development of cisplatin resistance in non small cell lung cancer (NSCLC). 14-3-3sigma expression levels were analyzed by RT-PCR and Western Blot methods, whereas methylation status alterations were analyzed by MS-PCR after getting the NSCLC cell lines A549 and Calu1 resistant to the chemotherapeutic agent cisplatin. 14-3-3sigma gene expression levels dramatically increased in the resistant cell lines, and by silencing it through siRNA transfection the response to cisplatin significantly increased in the A549 and CD-Calu1 cell groups. Our findings support that 14-3-3sigma could be used as a new drug target.

Key Words: 14-3-3sigma, Cisplatin resistance, NSCLC

1. GİRİŞ

Akciğer kanseri tüm dünyada görülme sıklığı giderek artan ve tedavisinden sınırlı olarak yarar sağlanabilen önemli bir hastalıktır. Olguların aynı kemoterapotik ajanlarla tedavi edilmelerine karşın aynı ilaç yanıtını vermemeleri klinisyenler için büyük bir sorun oluşturmakta ve deneme/yanılma yoluyla ilaç kombinasyonlarının seçilmesine zorlamaktadır. Bu nedenle olgulardaki farklılıklarının ortaya çıkarılarak kişiye özel tedavilerin oluşturulabilmesi için ilaç direncinin moleküler mekanizmalarının anlaşılması son derece önem kazanmış durumdadır.

Direnç gelişimi ilaç birikiminin azalması, ilacın hücre içi dağılımının değişmesi, ilaç-hedef etkileşiminin azalması, detoksifikasyon yanıtının artması, hücre döngüsünün yeniden düzenlenmesi, DNA tamirinin artması ve apoptotik yanıtın azalması gibi yollarla meydana gelebilmektedir. Birbirleriyle ilişkili olan bu mekanizmaların aktivasyonları ve/veya inaktivasyonları genetik ve epigenetik düzenlenmeler ile sağlanabilmektedir.

Hücre döngüsü, apoptoz, sinyal yolları gibi birçok yaşamsal yolda görev alan anahtar enzimlerden birisi 14-3-3sigma'dır. Göğüs, kolon, akciğer ve pankreas kanserleri ile yapılan çalışmalarda, artmış 14-3-3sigma gen ekspresyonu ve azalmış metilasyon durumuna sahip olguların tedaviye daha az cevap verdiği bildirilmektedir. Fakat, bunun aksi sonuçların gözlemlendiği endometrium ve over kanserlerinde düşük ekspresyon düzeyinin hayatta kalma süresini kısalttığı belirtilmektedir.

Çalışmamızda 14-3-3sigma gen ekspresyonunun ve metilasyon durumunun, küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre serilerinde cisplatin direnci gelişimindeki etkilerinin ortaya konması amaçlanmıştır. Hipotezimiz; 14-3-3sigma ekspresyonunun artış veya azalış yönünde manüple ederek cisplatin yanıtının arttırılabileceği üzerine kurulmuştur. Çalışma kapsamında iki akciğer kanseri hücre serisi kemoterapotik bir ilaç olan cisplatine dirençli duruma getirildikten sonra 14-3-3sigma ekspresyonları inhibisyon ve aktivasyon yönünde değiştirilerek bu durumun cisplatin yanıtına olan etkisi analiz edilmiştir. Bu çalışmanın bulguları cisplatin direnci ile ilişkili moleküler değişimlerden sorumlu mekanizmaların daha ileri düzeyde aydınlatılmasında kullanılabileceği gibi, akciğer kanserinde yeni ilaç hedeflerinin belirlenmesinde de yararlı olacağı inancındayız.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri tüm dünyada sıklığı giderek artan bir sağlık problemi olup kansere bağlı ölüm nedenleri arasında ilk sırada yer almaktadır. Heryıl dünyada bir milyondan fazla kişinin akciğer kanserinden öldüğü bildirilmektedir. Akciğer kanserli olguların ancak % 15' inin tanı konduktan sonra hayatta kalma süreleri 5 yıldan fazladır (1).

Akciğer kanserlerinin büyük çoğunluğu epitel hücrelerinden köken alan tümörler yani karsinomlardır. Bu kanser türlerinde histopatolojik sınıflandırma klinik yaklaşım ve hastalığın prognozu açısından oldukça önemli olup histolojik tiplerine göre 2 gruba ayrılırlar (2);

1. Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK; Small cell lung cancer-SCLC): Akciğer kanserlerinin % 20' sini oluşturmaktadır.
2. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK; Non-small cell lung cancer-NSCLC): Adenokarsinom, Squamoz (Epidermoid) ve büyük hücreli karsinomaları içermekte ve akciğer kanserlerinin % 80' nini oluşturmaktadır. Bu kanser türlerinin prognozları ve tedavi yaklaşımları benzer olduğundan küçük hücreli dışı akciğer kanseri olarak aynı grupta toplanmaktadırlar.

Ülkemizde akciğer kanseri için epidemiyolojik veriler oldukça yetersizdir. İzmir Kanser İzlem Denetim Merkezi' nin 1993-1994 yıllarını kapsayan çalışmasına göre akciğer kanseri tüm kanserler içinde özellikle erkeklerde % 38,6 görülme oranı ile en büyük grubu oluşturmaktadır. Kadınlarda ise bu oran % 5,2 olup tüm kanserler içinde 6. sırada yer almaktadır. İzmir il sınırları içinde yaşayan olgular baz alınarak hesaplanan yaşa-standardize insidansın, erkeklerde 61,6/100000, kadınlarda 5,1/10000 olduğu bildirilmektedir (3). Türkiye'de akciğer kanseri yaş ortalamasının 1992' de 56,4; 1998' de 57,9; 2004 ise 59,1 olduğu belirtilmektedir (4).

KHDAK' nin tedavisinde genel olarak hastalara cerrahi girişim, radyoterapi veya kemoterapi uygulanmaktadır. Erken evredeki olgularda cerrahi tedavi ile yaşam süreleri kabul edilebilir sınırlarda uzatılabilmekte, ancak olguların yaklaşık $\frac{3}{4}$ ' üne tanı anında cerrahi girişim yapılamamaktadır. Bu nedenle kemoterapi ve / veya radyoterapi öncelikli tedavi yöntemleri arasında yer almaktadır.

Tablo 1: KHDAK tedavilerinde hayatta kalma süreleri ve kemoterapiye yanıt oranları

Yazar	n	Kemoterapi	Yanıt (%)	Ort. sağ kalım (ay)	1-yıl sağ kalım (%)
Rodriguez et. al 2001	408	Cisplatin-Docetaxel		10.9	47
	406	Carboplatin-docetaxel		9.1	38
	404	Cisplatin vinorelbine		10	42
Scagliotti et. al 2001	201	Cisplatin-Vinorelbine	30	9.5	37
	201	Carboplatin-Paclitaxel	32	9.9	43
	205	Cisplatin-gemcitabine	30	9.8	37
Van Meerbeeck et. al 2001	161	Paclitaxel-gemcitabine	27	6.9	26.5
	160	Cisplatin-gemcitabine	26	8.8	33
	159	Cisplatin-Paclitaxel	31	8.1	36
Alberola et. al 2001	166	Cisplatin-gemcitabine	43	8.7	35
	176	Gemcitabine-vinorelbine-Cisplatin	39	7.9	31
	175	Gemcitabine-vinorelbine-ifosfamide	26	8.1	35
Gridella et. al 2001	233	Vinorelbine	18.5	8.8	41
	233	Gemcitabine	17.3	6.6	26
	232	Gemcitabine-vinorelbine	20	7.6	31

Kemoterapi, "ilaçla tedavi" anlamına gelmekle birlikte, daha çok kanser hücrelerini etkileyen kanser ilaçları kullanılarak yapılan tedavi şeklidir. Kemoterapi akciğer kanserlerinde primer tedaviden önce (neoadjuvant) veya sonra (adjuvant) uygulanabilmektedir. Kemoterapinin etkisi, genellikle kombine ilaç tedavisi ve radyoterapi ile birlikte uygulanarak arttırılmaktadır. Standart kemoterapi kombinasyonlarında cisplatin ve ilave olarak; carboplatin, paclitaxel, docetaxel, gemcitabine, vinorelbine, ifosfamide ve etoposide kullanılmaktadır (5). Tablo 1' de

KHDAK tedavisinde kullanılan ilaç kombinasyonları ve olguların yanıt oranları gösterilmiştir. Tedaviye en yüksek yanıt oranı % 43 olup, hastaların bir yıl hayatta kalma şanslarını ancak % 35 oranında sağlayabilmektedir.

2.2. Cisplatin

Cisplatin [cis-diammine-dichloroplatinum (II)] kemoterapide sıklıkla kullanılan bir platin bileşiğidir. İlk defa 1970 yılında *Escherichia coli*’nin büyüme inhibitörü olarak keşfedilmiş, daha sonraki yıllarda anti kanser etkisi farkedilerek testis, over, serviks, baş ve boyun, küçük hücreli dışı akciğer, lenfoma gibi bir çok kanser türünün tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (6). Ancak cisplatin tedavisinde gözlenen toksisite veya ilaç direnci gibi faktörler, bu ilacın kullanımında sınırlayıcı nedenler olarak belirtilmektedir. Cisplatinin toksik etkileri; nefrotoksisite, bulantı ve nörotoksisite, hepatotoksisite ve ototoksisite olarak sıralanabilmektedir. Tedavi sırasında diüretikler nefrotoksisiteyi önleyebilmesine rağmen periferik nöropati, işitme kaybı ve kulak çınlamasına neden olan nörotoksisite tedavi dozunu sınırlandıran en önemli toksik etken olarak ortaya çıkmaktadır (7).

Cisplatin direnci hiçbir hücre tipinde biyokimyasal çalışmalar ile tam olarak aydınlatılamamış ancak bu fenomen ile çok sayıda mekanizmanın ilişkili olduğu belirlenmiştir. Cisplatin direncinin gelişmesine neden olabilecek faktörler; ilaç birikiminin azalması, tiyol içeren bileşiklerin inaktivasyonu, cisplatin-DNA adduct formlarının tamir ve toleranslarının artması, apoptoz yollarında görevi olan proteinlerde meydana gelen değişiklikler olarak sıralanabilmektedir.

Cisplatinin antitümör etkisi, genomik DNA’ya bağlanarak adduct formları oluşturmasıyla başlamaktadır. “**Adduct**” Türkçe’de tam karşılığı olmayan bir terim olup, cisplatinin bağlanması ile normal yapısı bozularak bükülmüş DNA zinciri anlamını taşımaktadır. Cisplatinin bağlanmasıyla meydana gelen hasar, normal transkripsiyonu ve/veya replikasyonu engelleyerek, kanser hücresinin ölümüne neden olan sitotoksik süreçleri tetiklemektedir.

2.2.1. Biyokimyasal Etki Mekanizması

Cisplatinin hücreye alımı sırasında oluşan biyokimyasal mekanizmalar henüz tam olarak belirlenememiştir. Ancak bazı çalışmalarda cisplatinin hücre içine büyük oranda pasif difüzyon ile alındığı ve bunun nedeni olarak da cisplatinin 60 dakika boyunca hücre içinde lineer olarak artışı ve 1 mM konsantrasyona kadar satüre edilememesi gösterilmektedir (7).

Hücreye giren bütün platinleyici ajanlar, klor yada oksalat iyonlarını kaybederek iki su molekülünün kazanılmasına ve bu şekilde pozitif yük kazanan moleküllerin hücre içinde diğer nükleofilik moleküller ile (DNA, RNA, proteinler) etkileşebilir duruma gelmesine neden olmaktadır. Cisplatin ve diğer platin içeren ajanların sitotoksik olarak hücre DNA' sını hedef aldıkları bildirilmektedir ((8)). Bunun nedeni olarak DNA' nın büyük oluğunda yer alan Adenin ve Guaninin imidazol halkalarındaki N7 atomlarının, platin içeren ajanların DNA' ya bağlandıkları en ulaşılabilir ve reaktif nükleofilik bölge olması gösterilmiştir. Bu bağlanmalarla DNA' daki pürin bazlarında; tekli adduct (monoadduct), zincir içi çapraz bağlar ve zincirler arası çapraz bağlar şeklinde 3 farklı yapı oluşabilmektedir.

Platinleyici ajanların bir su molekülünü kaybetmesiyle tekli adduct formları meydana gelmekte ancak daha sonra bu formların % 90' ı çapraz bağlar oluşturmak üzere reaksiyona girmektedir. Oluşan çapraz bağların büyük bir kısmı zincir içinde ve iki Guanin molekülü arasında (1, 2-d(GpG)) gerçekleşmektedir. İleri düzeydeki DNA-adduct formları ise zincirler arası çapraz bağlar şeklinde gözlenmekte ve DNA' da bükülmelere neden olmaktadır (9).

2.2.2. Direnç Mekanizmaları

Cisplatin direnci; ilacın hücre içine alımının azalması veya hücre dışına atılımının artması, glutathione veya metallothionein ile bağlanması, ilaç detoksifikasyonu, DNA tamiri ve replikatif by-pass gibi olaylarla gelişebilmektedir.

Cisplatinin hücre içine alınımında bazı membran proteinlerinin rol aldığı bildirilmekte ancak sodyum-potasyum ATPase inhibitörü **oubain'** in ilaç alınımını inhibe ettiği belirtilmektedir. Cisplatinin hücre içine alınımı sodyum-potasyum

pompaları ile olmamasına rağmen, birikimi potasyuma bağımlıdır. Bu yüzden cisplatin birikiminin membranın potansiyel enerjisine bağlı olduğu ileri sürülmektedir (10). Ayrıca aldehitler schiff bazı oluşturarak cisplatinin hücre içine alınımını inhibe etmektedirler (11). Bu sonuçlar bize cisplatinin hücre içine alınımında bir transport sisteminin ve taşıyıcı proteinlerin olduğunu göstermektedir.

Uzun süre cisplatin içeren ortamda tutularak oluşturulan dirençli hücre serilerinde DNA tamir oranı belirgin olarak artmaktadır (12). Bu bakımdan DNA tamiri cisplatin direncinin belirlenmesinde önemli bir mekanizmadır. Zincir içi yada zincirler arası çapraz bağların neden olduğu konformasyonel değişikliğin, cisplatin - DNA adductlarındaki DNA hasarının tanınmasını sağladığı düşünülmektedir. DNA adduct'ları nükleotid eksizyon tamiri (Nucleotid Excision Repair; NER) veya yanlış eşleşme (Mismatch Repair; MMR) eksizyon tamiri yolları ile düzeltilebilmektedir.

Hücresinin cisplatin ile oluşan DNA adduct formlarını tolere etmesi, replikatif by-pass ve apoptozis olmak üzere iki yolla mümkün olabilmektedir. Yanlış eşleşme (Mismatch) eksizyon tamirinin (MER) yetersiz olduğu hücreler cisplatine daha dirençlidirler ve bu nedenle cisplatin adductlarını daha kolay tolere edebilirler. Bu hipotezle ilişkili olarak hMLH1 yada hMLH6 eksikliği olan hücrelerde cisplatin - DNA adductları 2.5 – 6 kat daha fazla by-pass edilebilmektedir (12). Ökaryotik polimerazların da cisplatin adduct formlarını replike etme yetenekleri olduğu belirtilmektedir. İnsan polimerazları; β , γ , η , maya polimerazı ζ ve HIV virusu tip I reverse transkriptaz'ın 1,2-d(GpG) cisplatin adductlarının % 5 -10' unu by-pass edebildiği bildirilmektedir (12). Adduct toleransı, replikatif by-pass'ın yanısıra apoptozisin inhibisyonu yolu ile de kazanılabilmektedir. Over kanseri ve lenfoma hücrelerinde cisplatin direnci apoptotik yanıtın azalması ile ilişkilendirilmekte ve dirençli over kanseri hücrelerinde apoptozisin başlatılabilmesi için daha yüksek dozlarda cisplatine gerek duyulduğu belirtilmektedir (12).

2.3.14-3-3sigma proteini

Yedi izoformu olan 14-3-3 proteinlerinin hücre içi sinyal yollarında birçok farklı görevleri bulunmaktadır. Bu proteinlerin çoğu homodimerler şeklinde bulunuyorken, bir kısmı da farklı 14-3-3 izoformlarıyla heterodimerler şeklinde

bulunabilmektedir. Ekspresyonu epitel hücrelerine özgül olan 14-3-3sigma ise homodimerler şeklinde bulunmayı tercih etmekte ve diğer izoformlarla bağlanmamaktadır. Dimerik yapının oluşması sırasında iki 14-3-3sigma molekülü iki çift köprü ile bağlanmaktadır. Sadece 14-3-3sigma izoformuna özgül olan bu köprülerden birincisi Lys⁹ ve Glu⁸³, ikincisi Phe²⁵ ve Tyr⁸⁴ aminoasit rezidüleri arasında oluşmaktadır (13). Diğer aminoasit rezidüleri; Ser⁵, Glu²⁰ ve Glu⁸⁰ homodimerik formun desteklenmesini sağlamaktadırlar. Bu üç rezidü de meydana gelen mutasyonların 14-3-3sigma proteinlerinin homodimer oluşturma yeteneğini azalttığı ve az miktarda heterodimer oluşmasına neden olduğu bildirilmektedir (14).

14-3-3sigma, DNA hasarı yanıtında hücre döngüsünü durdurmakta ve onkogeneze diğer izoformlardan daha özgül bir rol oynamaktadır (13). DNA hasarından sonra ekspresyonu artan tek 14-3-3 izoformu 14-3-3sigma' dır. 14-3-3sigma' nın kanser ile ilişkisi ilk olarak kolorektal kanser hücre serisinde gen ekspresyon modelleri araştırılırken γ radyasyondan ve diğer DNA hasarlayıcı ajanlardan sonra ekspresyonunun aşırı derecede artması ile bulunmuş ve bu artışın p53 proteinine bağlı olduğu belirlenmiştir (15; 16). Dışarıdan 14-3-3sigma ekspresyonunun indüklenmesi ise hücre döngüsünün G2 fazında durmasına neden olmuştur (16).

14-3-3sigma ekspresyonunun indüklenmesi transkripsiyon başlangıç bölgesinin 1.8 kb üzerindeki p53 bağlanma bölgesi ile kontrol edilmektedir. DNA hasarından sonra hücre döngüsünün G2/M kontrol noktasında durdurulabilmesi için P53 yolu ile 14-3-3sigma transkripsiyonunun başlatılması gerekmektedir.

2.3.1. 14-3-3sigma proteininin fonksiyonları

DNA hasarından sonra transkripsiyon faktörü p53'ün, Ser-16 pozisyonundan defosforillenmesi, 14-3-3 proteinleri (γ , ϵ veya τ) ile bağlanma bölgesi oluşturulmasına neden olmaktadır (17; 18). p53' ün 14-3-3 proteinleri ile bağlanması diziye özgül olarak DNA' ya bağlanabilmesini sağlamak ve 14-3-3sigma' nın transkripsiyon bölgesine bağlanması ile sigma izoformunun ekspresyonu indüklenmektedir. 14-3-3sigma, hücre döngüsünün G1 ve G2 kontrol noktalarında CDK2/SiklinE ve CDC2/SiklinB komplekslerinin sitoplazmik lokalizasyonlarını sağlayarak mitoz bölünmeyi

durdurabilmektedir. Ayrıca 14-3-3sigma' nın DNA hasarından sonra kendi kendine de p53' ü aktive edebildiği bildirilmektedir (19).

BRCA1 tümör supressor proteini de p53 ile birlikte 14-3-3sigma ekspresyonunu indükleyebilmektedir (20). Bunun yanında bir p53 homoloğu olan p63' ün bir izoformu olan $\Delta Np63\alpha$, transaktif bölgesi olmamasına rağmen 14-3-3sigma promoter bölgesine bağlanabilmektedir. Ancak bu bağlanma p53' ün aksine 14-3-3sigma transkripsiyonunu inhibe etmektedir (21). İnsan hücrelerinde tandem afinite purifikasyon ve multidimensional protein belirleme teknolojileri kullanarak 14-3-3sigma ile ilgili olan 117 hedef protein belirlenmiştir (22). Bu proteinlerden fonksiyonları bilinen 92 tanesinin onkojenik sinyal yollarında (APC, A-RAF, B-RAF, C-RAF) ve hücre döngüsünün düzenlenmesinde (WEE1, AJUBA, c-TAK, PTOV-1) görevleri olduğu belirtilmektedir.

Protein Kinaz B (AKT; v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1), hem proliferasyon hem de antiapoptotik sinyal yollarındaki aktivasyonu nedeniyle kanser oluşumunda önemli bir role sahip iken, 14-3-3sigma' nın Protein Kinaz B' nin onkojenik aktivitesini inhibe edebildiği gösterilmiştir (23).

2.3.2. 14-3-3sigma ekspresyonunun epigenetik mekanizmalarla susturulması

Epigenetik, gen ekspresyonlarının düzenlenmesi ve genomik bütünlüğün sağlanmasında rol oynayan önemli mekanizmalardır. Bu mekanizmalardan biri olan CpG adacıklarındaki 5' sitozinlerin metillenmesi “DNA metilasyonu” olarak isimlendirilmekte ve son yıllarda birçok hastalık üzerindeki etkileri dikkat çekmektedir. Genlerimizin % 60' ının 5' bölgesinde bulunan CpG adacıkları gelişim döneminde çoğunlukla unmetile şeklinde iken gelişim boyunca bir kısmı metile duruma gelmekte ve kalıcı olarak susturulmaktadır.

Metilasyonun kanserin başlangıç evrelerinde meydana gelmesi nedeniyle, erken tanı için iyi bir araç olabileceği düşünülerek bu konuda çok fazla sayıda çalışma yapılmaktadır. Günümüzde metilasyonun geri döndürülmesi veya hipermetilasyonun oluşturulmasında 5-Azasitidin ve histon deasetilaz inhibitörleri gibi ilaçlar kullanılabilmektedir. Birçok kanser türünde FHIT, $\Delta Np63$, Cadherin-1, RAS, RARb,

P16, DAPK gibi çok sayıda tümör baskılayıcı gen DNA hipermetilasyonu yolu ile susturulmaktadır.

14-3-3sigma ekspresyonunun metilasyona bağılı olarak susturulduğu ilk olarak meme kanserinde bulunmuş (24), daha sonra ise prostat (25), tiroid (26), akciğer (27), uterus-serviks (28) gibi çok sayıda kanser türünde de belirlenmiştir.

Azasitidin ile birlikte histon deasetilaz inhibitörü 4 (Phenylbutyric acid - Pba) ile tedavi edilen melanoma hücre serilerinde 14-3-3sigma ekspresyonunun daha fazla arttığı ve hücrelerin çoğunluğunun G2/M fazında durdurularak böylece hücre proliferasyonunu tamamen inhibe ettiği belirtilmektedir. Malign melanomada metilasyon yoluyla 14-3-3sigma ekspresyonunun inhibe edilmesi, hücre döngüsü kontrolünün kaybedilmesi ve tümörün ilerlemesi ile ilişkilendirilmektedir (29).

2.3.3. 14-3-3sigma ekspresyonu ve kemoterapi yanıtı

Kemoterapotik ilaçların kullanılmasıyla oluşan DNA hasarına yanıt olarak hücrelerde, hücre döngüsü inhibisyonu yada programlı hücre ölümü meydana gelmektedir. Hücre döngüsünün inhibisyonu G1 yada G2 kontrol noktalarının aktive edilmesi ile yada genotoksik stresden sonra apoptoz yolu ile sağlanabilmektedir. Ancak kanserlerde genellikle bu prosesleri düzenleyen yolların bozulması genetik instabilite ve onkogeneze neden olmaktadır.

Hücre döngüsünün G1 evresindeki hücre ölümü, p53 tümör süpresor geninin hedefi olan siklin bağımlı kinaz (Cdk) inhibitörü olan p21' in indüklenmesine bağımlıdır. G2 evresinde ise hücre ölümüne neden olan proteinlerden birisi DNA hasarından sonra indüklenen 14-3-3sigma' dır. Chk2 (Hücre siklusu kontrol noktası kinazı2 - Checkpoint kinaz-2), hücre siklusu inhibisyonu ve apoptozis arasında biyolojik reostat işlevi görerek DNA hasarı yanıtını belirlemektedir (30). Bu bakımdan Chk2 inhibitörlerinin kanser tedavisinde yeni ilaç hedefleri olabileceği düşünülmektedir.

Akt ile bağlanarak aktivasyonunun inhibe edebildiği gösterilmiş olan 14-3-3sigma'nın PI3K/Akt yolağı aktif olan kanserlerde yeni bir antikanser ilaç olabileceği bildirilmektedir (23). Nazofarinks kanserlerinde 14-3-3sigma' nın aşırı

ekspresyonu tümör hücrelerinin büyümelerini durdurmakta ve DNA sentezini engellemektedir (31). Ayrıca 14-3-3sigma ekspresyonu yüksek olan hücrelerde kemoterapotik bir ilaç olan 2-methoxyestradiol' un apoptoza duyarlılığı arttırdığı gözlenmektedir. 14-3-3sigma ekspresyonu pozitif ve negatif hücreler nude-farelere enjekte edildikten sonra, 14-3-3sigma ekspresyonu yüksek olan fare tümörlerinin düşük hacimli olduğu da bildirilmektedir.

p53 ve 14-3-3sigma ekspresyonu DNA hasarına neden olan kemoterapotiklerden Adryamycin' e yanıt olarak artmaktadır. Artmış 14-3-3sigma ekspresyonu, Mdm2 aracılığıyla p53 ubiquitinasyonunu engelleyerek p53' ü stabilize etmektedir. 14-3-3sigma' nın p53 fonksiyonları üzerinde pozitif geri bildirim etkisi bulunmaktadır. Ayrıca 14-3-3sigma' nın aşırı ekspresyonu onkogenlerin aktive ettiği tümör oluşumunu da inhibe etmektedir (19).

Adryamycin' e dirençli göğüs kanseri hücre serisinden elde edilen p53 mutasyonu taşıyan MBA-MD-436 hücrelerinde adryamicine' e yanıt olarak p73 ve 14-3-3sigma ekspresyonu azalmakta ve P73 tarafından transkripsiyonu aktive edilen 14-3-3sigma, p73' ü stabilize etmektedir (32). Ayrıca aynı hücre serilerinde 14-3-3sigma ekspresyonunun plazmit ile artırılması da adryamicin duyarlılığını arttırmaktadır. Sonuç olarak, p73 ile indüklenen 14-3-3sigma' nın özellikle p53 mutasyonu taşıyan göğüs kanserlerinde kemoterapotik ilaçlara duyarlılığın düzenlenmesinde önemli rol oynadığı belirtilmektedir (32).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

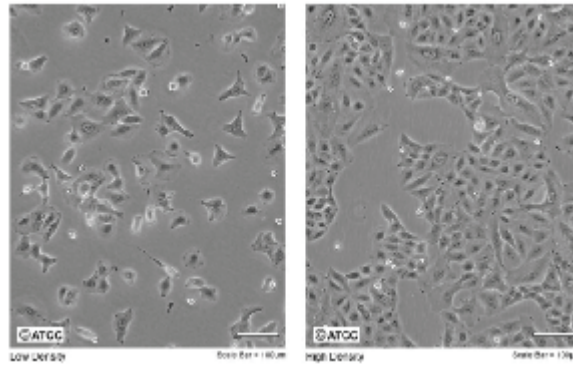
Çalışmamızda kontrol hücre serileri olarak hiçbir uygulama yapılmamış **A549** ve **Calu1** Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK) hücre serileri ve bu hücre serilerine cisplatin verilerek dirençli hale getirilen **CD-A549** ve **CD-Calu1** formları kullanılmıştır. Kontrol ve dirençli hücre serilerinde 14-3-3sigma ekspresyon ve metilasyon düzeyleri analiz edilerek, direnç gelişimi sırasında 14-3-3sigma geninin protein ürününün ve mRNA ekspresyon düzeylerinin değişikliğe uğrayıp uğramadığı araştırılmıştır. Hücre serilerinde 14-3-3sigma ekspresyonu; siRNA transfeksiyonu ile

inhibisyon yönünde, azasitidin uygulaması ile ise aktivasyon yönünde değiştirilmiş ve bu uygulamaların cisplatin yanıtına olan etkileri incelenmiştir.

3.1. Hücre Kültürleri

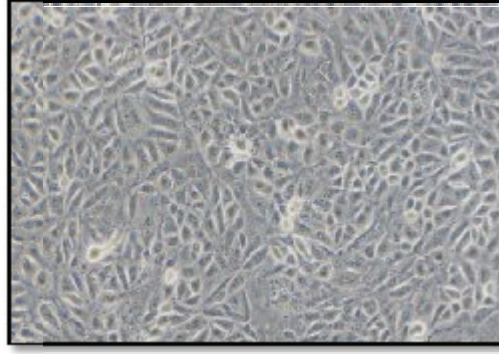
Kontrol Hücre Serisi Kültürleri

A549 hücre serisi kültürleri: A549, insan akciğer epitelinde elde edilmiş adenokarsinom hücre serisidir (Şekil 1). A549 hücre serilerinin üretilmesinde Ham's F12K besiyeri (BioInd, #11-095-1) + % 10 Fetal Bovin Serum (FBS; BioInd, #04-121-1B) kullanılmış ve kontaminasyonun engellenmesi için besiyerine 5 ml penisilin-streptomisin ilave edilmiştir (BioInd, #03-031-1B). Pasajlama için öncelikle hücreler serumuz besiyeri ile yıkanmış, daha sonra, % 0.005' lik tripsin-EDTA (BioInd, #03-052-1B) ile yıkanarak 37°'de 5 dakika inkübe edildikten sonra flaskten ayrılan hücreler serumlu besiyerine alınarak pasaj yapılmıştır.



Şekil 1. Düşük ve yüksek yoğunluktaki A549 hücre serileri. ATCC No: CCL-185, (<http://www.lgcstandards-atcc.org/Attachments/1753.jpg>)

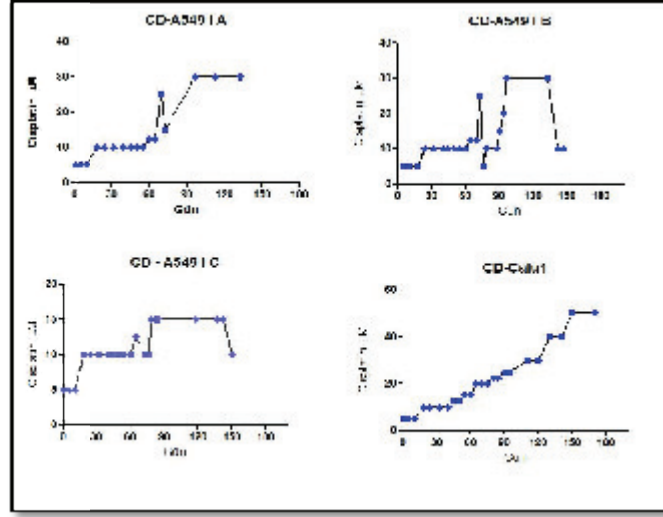
Calu1 Hücre serisi kültürleri: Calu1 hücre serisi, insan akciğer epitelinde elde edilmiş olan, grade III - epidermoid karsinoma hücre serisidir (Şekil 2). Literatür bilgilerine dayanarak 14-3-3sigma geninin metile olması nedeniyle seçilmiştir. Bu hücre serisinin üretilmesinde DMEM (BioInd, #01-050-1A) + % 10 Fetal Bovin Serum (BioInd, #04-121-1B) kullanılmış, kontaminasyonun engellenmesi için besiyerine 5 ml penisilin-streptomisin ilave edilerek pasajlama işlemi A549 hücre serisindeki gibi yapılmıştır.



Şekil 2. Calu-1 hücre serisi (ATCC No: HTB-54, 100X büyütme)

3.2. Cisplatin Dirençli Hücre Serisi Kültürlerinin Oluşturulması

Bazı kaynaklarda dirençli hücre serilerinin oluşturulması için hücrelerin 0.1 µg/ml’ den başlayarak 5 µg/ml konsantrasyona kadar cisplatine maruz bırakıldığı belirtilmektedir (33; 34). Çalışmamızda oluşturulan Cisplatin Dirençli A549 (CD-A549) ve Cisplatin Dirençli Calu1 (CD-Calul) hücre serileri ve bu serilere uygulanan cisplatin (*EBEWE Pharma, 10mg/20ml*) dozları grafik 1’ de gösterilmektedir. CD-A549 ve CD-Calul hücre serilerinin oluşturulması aşamasında deneyler A, B ve C serileri olarak üç farklı flaskte yürütülmüş ve hücrelerin çoğalma hızlarına bağlı olarak verilen cisplatin konsantrasyonları arttırılmıştır. Cisplatin direncinin artışı, 5 – 30 µM arasında cisplatin uygulanan CD-A549/A serisinde en iyi olduğu için bundan sonraki aşamalarda bu hücre serisi kullanılmıştır. CD-Calul hücre serisinin A ve B alt hücre serilerinde çoğalma olmadığı için 5 – 50 µM arasında cisplatin uygulanan tek flask’ de deneylere devam edilmiştir.



Grafik 1. Dirençli hücre serilerinin oluşturulması sırasında kullanılan cisplatin dozları

3.3. Sitotoksikite Deneyleri

Cisplatinin hücre canlılığı üzerindeki sitotoksik etkilerini ve inhibitör konsantrasyonlarını (IC_{50}) belirlemek amacıyla, **XTT** (Cell Proliferation Kit - Roche, #11465015001) solüsyonu kullanılmıştır.

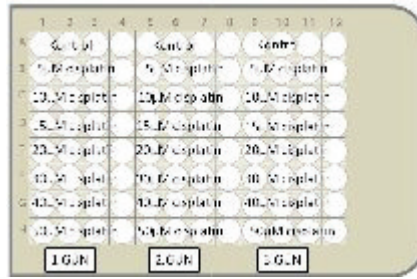
Hücre canlılığının belirlenmesinde kullanılan XTT (*sodium 3'-[1-(phenyl aminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate*), radyoaktif madde gerektirmeyen kalorimetrik bir yöntemdir. Yöntemin esası, metabolik olarak aktif olan canlı hücrelerin, sarı olan XTT tetrazolium tuzlarını keserek turuncu formazan boyası rengine dönüştürmesi ve sıvılarda çözülebilen formazan boyasının spektrofotometre ile kantitatif olarak ölçülebilmesine dayanmaktadır. Bunun için, 96 kuyucuklu plate içerisinde kültüre edilen hücreler sarı XTT solüsyonu ile 1-4 saat inkübe edilmekte ve daha sonra oluşan turuncu formazan boyası ELISA okuyucusunda kantitatif olarak ölçülerek değerlendirilmektedir. Canlı hücrelerin artışı, örnek içerisinde mitokondrial dehidrogenaz aktivitesinin artmasına neden olduğundan, ölçülen formazan absorbanansı ile ilişkilidir.

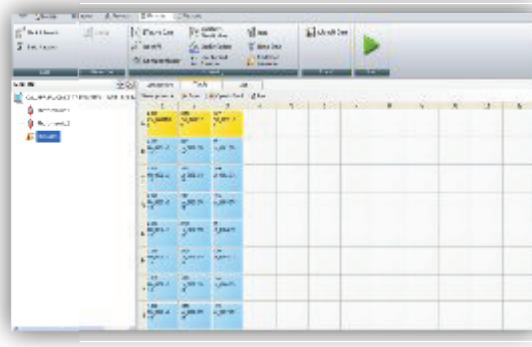
XTT sitotoksikite deneyinde uygulanan basamaklar şu şekilde sıralanabilir:

1. Flask içerisindeki hücreler serumsuz besiyeri ile yıkandıktan sonra tripsin ilave edildi. Flask sallanarak yüzeydeki hücreler tripsin ile yıkandı. 5 dakika etüvde

bekletildikten sonra mekanik vurma ile hücrelerin yapışık oldukları yüzeyden kalkmaları sağlandı ve serumlu besiyeri ilave edilerek hücrelerin bir kısmı falkon tüpüne alındı.

2. Falkon tüp alt-üst edilerek karıştırıldıktan sonra hücre solüsyonundan 50 µl alınarak 50 µl trypan mavisi ile karıştırıldı ve Neubaer lam ile hücre sayımı yapıldı.
3. Her kuyucukta yaklaşık 100000 hücre olacak şekilde 100 µl hücre solüsyonu, 96' lık plate' e her konsantrasyon için üç kez tekrarlanacak şekilde dağıtıldı.
4. Plate, CO₂' li etüvde 24 saat inkübe edilerek hücrelerin yapışmaları sağlandı.
5. İkinci gün belirlenen dozlarda etken madde kuyucuklara dağıtıldı (Şekil 3)





Şekil 4. ELISA okuyucuda ölçümü yapılan cisplatin sitotoksosite deneyinin 1. gün verileri

3.4. Hücre Serilerinden DNA İzolasyonu ve 14-3-3sigma Metilasyon Analizleri

3.4.1. DNA izolasyonu

Hücreler serumsuz ortam ile yıkandı ve tripsin ilave edilerek 37°C’ de 5 dakika inkübasyona bırakıldı. Hücrelerin flask yüzeyinden ayrıldığı inverted mikroskopta kontrol edildikten sonra hücreler serumlu ortam ile karıştırılarak falkon tüpüne aktarıldı. 1200 rpm’ de 10 dakika santrifüj edildikten sonra hücre pelletinin üzerindeki ortam uzaklaştırıldı ve 200 µl serum fizyolojik ile pellet çözöldü. Bundan sonraki aşamalarda “High Pure PCR Template Preparation Kit” (Roche; #11 796 828 001) kullanılarak DNA izolasyonu yapıldı.

DNA izolasyonu;

1. 200 µl hücre solüsyonu steril bir ependorf tüp içerisine alındı.
2. Üzerine 400 µl bağlayıcı tampon (binding buffer) ve 20 µl Proteinaz K pipetlendi. Karıştırıldıktan sonra 72°C’ de 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
3. İnkübasyonun sonunda 100 µl izopropanol eklendi ve pipetaj ile iyice karıştırıldı.
4. Karışım bir toplama (collection) tübünün içine yerleştirilmiş ‘filtre’ tübünün içerisine pipetlendi ve 8000 rpm’ de 1 dakika santrifüj edildi.
5. Altta biriken sıvı toplama tübü ile birlikte atıldı. Filtre yeni bir toplama tübü içerisine yerleştirildi.
6. Filtre tübünün üzerine 500 µl inhibitör giderici tampon (removal buffer) pipetlendi. 8000 rpm’ de 1 dakika santrifüj edildi.

7. Altta biriken sıvı toplama tübü ile birlikte atıldı, filtre yeni bir toplama tübü içerisine yerleştirildi.
8. Filtre tübüne 500 µl yıkama tamponu (wash buffer) pipetlendi. 8000 rpm' de 1 dakika santrifüj edildi.
9. Altta biriken sıvı toplama tübü ile birlikte atıldı. Filtre yeni bir toplama tübü içerisine yerleştirildi.
10. Filtre tübüne tekrar 500 µl yıkama tamponu (wash buffer) pipetlendi ve 8000 rpm' de 1 dakika santrifüj edildi.
11. Toplama tübünde biriken sıvı döküldü ve filtre aynı toplama tübü içerisine yerleştirilerek 14.000 rpm' de 10 saniye santrifüj edildi.
12. Toplama tübü atıldı, filtre tübü steril bir ependorf tüp içerisine yerleştirildi.
13. Önceden 70°C' de ısıtılmış elüsyon tamponundan (elution buffer) 200 µl filtre tübüne pipetlendi. 8000 rpm' de 1 dakika santrifüj edildi.
14. Filtre tübü atıldı. İzole edilen DNA steril tüpe aktararak – 80 °C' de saklandı.

3.4.2. DNA' nın bisülfitlemesi

Sodyum bisülfitin DNA ile kimyasal tepkimesi sonucu metillenmemiş sitozinin urasile dönüşmesi reaksiyonu ve bunun ardından geleneksel PCR yapılması esasına dayanan Metilasyon spesifik PCR için “EZ DNA Methylation Gold Kit” (Zymo Research, #D5006) kullanılarak DNA örneklerinin bisülfitlemesi yapıldı.

Sitozin-Timin Dönüştürücü Tampon Hazırlanması (CT Conversion Reagent):

Ependorf tüp içerisinde 900 µl su, 300 µl dilüsyon tamponu (M-Dilution Buffer), 50 µl çözücü tampon (M-Dissolving Buffer) konularak hazırlandı. Oda sıcaklığında 10 dakika karıştırıldı veya sık sık vortekslendi. İyi sonuçların elde edilmesi için taze olarak hazırlandı ve ışıktan korundu. (Oda sıcaklığında 1 gece, 4°C' de 1 hafta, -20°C' de 1 ay saklanabilir) Dondurulmuş solüsyon 37°C' ye ısıtılıp, vortekslendikten sonra kullanıldı.

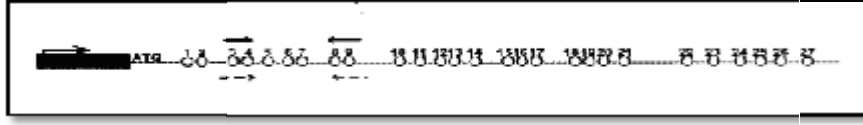
Yıkama Tamponun Hazırlanması (M-wash Buffer):

24 ml yıkama tamponuna kullanımdan önce 96 ml % 100 ethanol ilave edildi. Solüsyonlar hazırlandıktan sonra DNA' nın bisülfitlemesi için aşağıdaki protokol uygulandı;

1. Steril bir ependorf tüp içerisine alınan 20 µl DNA örneği üzerine 130 µl sitozin-timin dönüştürücü tampon ilave edildi. (DNA örneği 20 µl' den az ise su ile tamamlanmalıdır) Örnek tüpe hafifçe vuruldu yada pipetaj ile karıştırıldı. Kısa bir santrifüjden sonra sıvının tüpün alt kısmında toplanması sağlandı.
2. Tüp thermalcycler' a alındı ve 98 °C' de 10 dakika; 64 °C' de 2,5 saat tutuldu.
3. Toplama tübü ile kombine edilen çevirme kolonu (spin column) üzerine 600 µl bağlayıcı tampon (M-Binding Buffer) ilave edildi.
4. Bağlayıcı tampon içeren kolon üzerine 2. aşamadaki örnek eklendi ve birkaç kez alt-üst edilerek karıştırıldı.
5. En yüksek devirde (> 10.000 g) 30 saniye santrifüj edildi ve alttaki sıvı atıldı.
6. Kolon üzerine 100 µl yıkama tamponu (M-Wash Buffer) pipetlendi. En yüksek devirde 30 saniye santrifüj edildi.
7. Kolon üzerine 200 µl 'M-Desulphonation Buffer' ilave edilerek oda sıcaklığında (20 °C – 30 °C) 15 – 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra en yüksek devirde 30 saniye santrifüj edildi.
8. Kolon üzerine 2 kez 200 µl yıkama tamponu ilave edildi ve en yüksek devirde 30 saniye santrifüj edildi.
9. Kolon 1.5 ml steril ependorf tüp içerisine alındı. Matriks üzerine 10 µl elüsyon tamponu (M-Elution Buffer) pipetlendi. En yüksek devirde 30 saniye santrifüj edildi ve bisülfitlenen DNA –70 °C' nin altında saklandı.

3.4.3. 14-3-3sigma Metilasyon Analizi

14-3-3sigma genindeki CpG adacıklarının analizi Metilasyon Spesifik PCR (MS-PCR) yöntemi ile yapıldı (35). Metile ve unmetile DNA dizisine özgül primer çiftleri kullanılarak 3,4,8 ve 9. CG dinükleotidlerini içeren 105/107 bazçiftlik bölge çoğaltıldıktan sonra PCR ürünleri % 2' lik agaroz jelde yürütüldü ve sonuçlar değerlendirildi (Şekil 5).



Şekil 5. 14-3-3sigma DNA dizisindeki CpG adacıkları ve MS-PCR ile çoğaltılan gen bölgesi

Metile 14-3-3sigma dizisi;

TTTGATTTAGAAAGGTTAAGTTGGTAGAGTAGGTCGAACTTATGAGGATATGGTAGTT
TTATGAAAGGCGCTGGAGAAGGGCGAGGAGTTTTTTTGCGAAGAGCGAAAATTGT
TTTAGTAGTTTATAAGAACTGGTGGGCGGTAGAGGGTTGTTGGAGGGTGTGT
TAGTATTGAGTAGAAAAGTAACGAGGAGGGTCGGAGGAGAAGGGGTTTCGAGGTGCG
TGAGTATCGGGAGAAGGTGGAGATTGAGT

Metile bölgeye özgül primerler ; (104 bazçift ürün verir)

Forward Primer: 5'- TGGTAGTTTTTATGAAAGGCGTC-3'

Reverse Primer: 5'- CCTCTAACC GCCCACCACG-3'

Unmetile 14-3-3sigma dizisi;

TTGGTTTTAGGAGTAGTAGTTGTTGTTGTTTGTGTGTTTTTAGAGTTATGGAGAGA
GTTAGTTTGATTTAGAAGGTTAAGTTGGTAGAGTAGGTTGAATGTTATGAGGATATGG
AGTTTATGAAAGGTGTTGTGGAGAAGGGTGAGGAGTTTTTTTGCGAAGAGCGAAAATT
TGTTTTTAGTAGTTTATAAGAACTGGTGGGCGGTAGAGGGTTGTTGGAGGGTGTGT
TTAGTATTGAGTAGAAAAGTAACGAGGAGGGTTGGAGGAGAAGGGGTTTCGAGGTGTG
TGAGTATCGGGAGAAGGTGGAGATTGAGT

Unmetile bölgeye özgül primerler; (106 bazçift ürün verir)

Forward Primer: 5'- ATGGTAGTTTTTATGAAAGGTGTT-3'

Forward Primer: 5'- CCCTCTAACCACCCACCACA-3'

Tablo 2. Metilasyon Spesifik PCR reaksiyonu bileşenleri ve konsantrasyonları

Bileşen	Miktar	Son konsantrasyon
H ₂ O	18.75 µl	
Magnezyum	2 µl	2 mM
Primerler	0.5 µl	0.5 µM
dNTP	1.25 µl	200 µM herbir dNTP
PCR Tamponu	2.5 µl	1 x
Fast start tag polimeraz	0.5 µl	1 Unit
DNA	4 µl	250 ng
Son hacim	25 µl	

Tablo 2’ de belirtildiği gibi PCR karışımı hazırlandıktan sonra son hacmi 25 µl olan örnekler santrifüj edildi ve thermalcycler (*Techne-TC3000*) cihazına yerleştirildi. Thermalcycler’ da ilk denatürasyon 95°C’ de 10 dakika, amplifikasyon 35 siklus (95°C’ de 30 saniye, 56°C’ de 30 saniye, 72 °C’ de 30 saniye) ve son uzatma 72 °C’ de 4 dakika uygulanarak PCR yapıldı. Oluşan PCR ürünleri % 2’ lik agaroz jelde yürütülerek sonuçlar değerlendirildi.

3.5.Hücre Serilerinden RNA izolasyonu ve 14-3-3sigma ekspresyon analizleri

3.5.1. RNA izolasyonu

Hücre serilerinden RNA izolasyonu “*MagNA Pure LC RNA Isolation Kit*” (Roche, #03542394001) kullanılarak Magna Pure LC (Roche-applied science) nükleik asit izolasyon cihazında yapılabilmektedir (36). Ancak bu cihazda kit kaybının olmaması için en az 8 örneğin çalışılması gerekmektedir. Cihazın “*RNA HP Blood external lysis*” protokolü, RNA örneklerinin bağlayıcı tampon ile karıştırılarak izolasyon işlemine kadar – 86°C’ de saklanabilmesini sağlamaktadır.

Çalışmamızda RNA izolasyonu için hücreler tripsin ile kaldırıldıktan sonra santrifüj edildi ve hücre pelleti 200 µl serum fizyolojik ile çözüldü. 700 µl DTT içeren bağlayıcı tampon ile hücre solüsyonu iyice karıştırıldı ve örnekler daha sonra izolasyonu yapılmak üzere – 86°C’ de saklandı.

Solüsyonların hazırlanması;

Lizis bağlayıcı tampon (Lyses Binding Buffer): Son konsantrasyonu % 1 olacak şekilde DTT ile karıştırıldı.

Manyetik partiküller (MagneticGlass Particles): Kullanılmadan önce vortekslenerek iyice karıştırıldı ve homojen olması sağlandı.

Dnase: Kit içerisinde liyofilize halde bulunan Dnase (5a), 10 ml Dnase inkübasyon tamponu (*Dnase Incubation buffer (5b)*) ile karıştırıldı ve çözüldükten sonra -20 °C’ de saklandı.

Proteinaz K: Kit içerisinde liyofilize halde bulunan Proteinaz K (7a) üzerine 3 ml ‘*Proteinaz K tamponu (7b)*’ pipetlendi ve kapağı kapatılarak iyice karıştırıldı. Tamamen eridikten sonra 2 ml daha Proteinaz K tamponu (7b) pipetlenerek iyice karıştırıldı ve -20 °C’ de saklandı.

Solüsyonlar hazırlandıktan sonra Magna Pure nükleik asit izolasyon cihazına gerekli miktarlarda kondu. Pipet uçları ve diğer sarf malzemeleri yerleştirildi. Örneklerden 900' er µl örnek kasetine pipetlendi ve kaset cihaza yerleştirildi. “*RNA HP Blood external lysis*” protokolü seçilerek izolasyon işlemi başlatıldı. Yaklaşık 1 saat sonra izolasyonu tamamlanmış olan RNA örnekleri tüplere alındı ve konsantrasyonlarının belirlenmesi için nanodrop spektrofotometrede (*ND-1000*) okutuldu. RNA kalitesi, optik yoğunluk (OD) ölçümleri sonucunda A_{260} / A_{280} oranı kullanılarak değerlendirildi. Saf RNA için $OD_{260/280} = 2.0 \pm 0.1$ normal sınırlar olarak kabul edildi.

3.5.2. cDNA elde edilmesi

Hücre serilerinden izole edilen RNA örneklerinden komplementar DNA' nın sentezlenmesi için “*Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit*” (Roche, # 04896866001) kullanıldı.

1. 5 µg total RNA örneği 1 µl Ankor-oligo(dT) primer ile karıştırıldı ve distile su ile 13 µl' ye tamamlandı.
2. 65°C' de 10 dakika denatüre edildikten sonra buz üzerine alındı.
3. Tablo 3' de son konsantrasyonları verilmiş olan kit bileşenleri ile ters transkripsiyon karışımı (RT-Mix) hazırlandı. 7 µl ters transkripsiyon karışımı denatüre edilmiş primer-örnek karışımına pipetlendi. Vorteks kullanılmadan iyice karıştırılarak santrifüj edildikten sonra thermalcycler cihazına yerleştirildi.

Tablo 3. cDNA sentez reaksiyonu bileşenleri ve konsantrasyonları

Bileşen	Miktar	Son Konsantrasyon
Ters Transkripsiyon Karışımı		
Reaksiyon Tamponu	4 µl	1× (8 mM MgCl ₂)
Koruyucu RNase İnhibitör 40 U/µl	0.5 µl	20 U
Deoksinükleotid karışımı, 10 mM herbiri	2 µl	1 mM herbiri
Transkriptör Ters Transkriptaz, 20 U/ µl	0.5 µl	10 U
Denatüre Primer-örnek karışımı	13 µl	
Son hacim	20 µl	

4. Thermalcycler protokolü; 55 °C’ de 30 dakika, 85 °C’ de 5 dakika olarak uygulandıktan sonra cDNA örnekleri RT-PCR’ da kullanılmak üzere -20 °C’ de saklandı.

3.5.3. Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR (RT-PCR)

14-3-3sigma ve Gliseraldehit-3-Fosfat Dehidrogenaz (GADPH) gen ekspresyon analizlerinin yapılması için TaqMan probu kullanılarak RT-PCR yöntemi uygulandı. Bu yöntem için gerekli primer ve problemlerin seçimi “Universal probe library, www.roche-applied-science.com” veri sitesi kullanılarak yapıldı (Tablo 4).

TagMan RT-PCR Prensipli: TagMan yönteminde kullanılan UPL problemleri 5’ ve 3’ uçlarından florokrom maddelerle işaretlidir. Probun 5’ ucunda **raportör florokrom** (6-karboksi floresein=6-FAM), 3’ ucunda ise **baskılayıcı florokrom** (6-karboksi-tetrametil-rodamin= TAMRA) bulunmaktadır. Prob, hedef zincir üzerinde primerlerin bağlanma bölgesinin arasında kalan bir bölgeye bağlanmaktadır. 3’ ucundaki baskılayıcı florokrom, prob dizisiyle hibridize olduğu sürece raportör florokromun sinyal oluşturmaması engellenmektedir. Primer uzaması probun bağlandığı noktaya kadar geldiğinde, sentezin devam edebilmesi için Taq DNA Polimeraz enzimi 5’→3’ ekzonükleaz aktivitesini kullanarak probu 5’ uçtan yıkmaya başlamakta, böylece raportör florokrom serbest hale geçerek sinyal oluşturmaktadır. Oluşan sinyal miktarı, her siklusa oluşan ampikon miktarına paralel olarak artmaktadır.

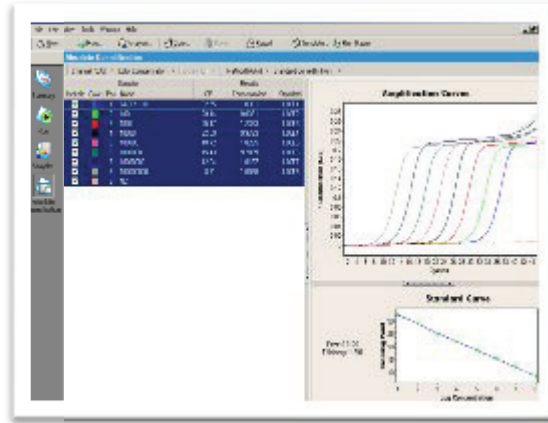
Tablo 4. 14-3-3sigma gen ekspresyonunun analizinde kullanılan primer ve problemler

Gen	İleri primer	Geri primer	Prob no	Ampikon büyüklüğü
14-3-3 sigma	ggctgagaactgg acagtggg	ctttattgagaggaaa catggtca	Prob 3 (#04685008001)	146 nükleotid
GADPH	agccacatcgctcagaca cc	gcccaatacgaccaaatcc	Prob 60 (#04688589001)	66 nükleotid

Standardizasyon: 14-3-3sigma gen ekspresyonunun rölatif kantitasyonu için yapısal gen (housekeeping) olarak GAPDH kullanıldı. Konsantrasyonları bilinen 8 GAPDH standartı (10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 ve 10^1 kopya) ile standart amplifikasyon eğrisi oluşturularak aynı cDNA örneğinden çalışılan **Hedef** (Target; 14-3-3sigma) gen kopya

sayısının **Referans** (GADPH) gen kopya sayısına oranlanmasıyla rölatif kantitasyon değeri hesaplandı (Şekil 6).

TagMan PCR Enziminin Hazırlanması: Reaksiyon karışımı (1b) ve enzim (1a) numaralı tüpler santrifüj edildi. 1a’ dan 10 µl alınarak, 1b tüpüne eklendi ve pipetajla karıştırıldı.



Şekil 6. GADPH standart eğrisi

Tablo 5. RT-PCR reaksiyonu bileşenleri ve konsantrasyonları

Bileşen	Miktar	Son Konsantrasyon
H ₂ O	5.2	
Upl Prob (10 µM)	0.1 µl	100 nM
İleri Primer (20 µM)	0.1 µl	200 nM
Geri Primer (20 µM)	0.1 µl	200 nM
TagMan Enzimi (5x)	2 µl	1x
PCR Karışımı hacmi	7,5 µl	
cDNA	2,5 µl	
Son hacim	10 µl	

PCR Karışımı: Tablo 5’ de belirtildiği şekilde hazırlandıktan sonra, 7.5 µl PCR karışımı kapiller tüplere dağıtıldı, total hacim 10 µl olacak şekilde üzerlerine 2,5 µl örnek cDNA, negatif kontrol veya standart pipetlendi. Kapiller tüpler santrifüj edildi ve Lightcycler 2.0 (Roche-applied science) gerçek zamanlı PCR cihazına yerleştirilerek program başlatıldı (Tablo 6). Çalışmanın sonunda cihazda bulunan “*Absolute Quantification Software*” programı kullanılarak 14-3-3sigma gen ekspresyonu hesaplandı.

Tablo 6. LightCycler Tagman PCR Protokolü

	Denatürasyon	Amplifikasyon		Soğutma
Döngü Programı Verileri	Değer	Değer		Değer
Döngü	1	40		1
Analiz Modu	-	Kantitasyon		
Hedef Dereceleri	Segment 1	Segment 1	Segment 2	Segment 1
Hedef Derece (°C)	95	94	60	40
İnkübasyon zamanı (sn)	600	15	60	30
Sıcaklık Geçiş Oranı (°C/sn)	20.0	20,0	20,0	20,0
İkinci Hedef Derecesi (°C)		0	0	
Basamak derecesi (°C)		0,0	0,0	
Döngü		0	0	
Kazanç modu		-	Tek	

3.6.SDS-PAGE ve western blot analizleri

Hücre serilerindeki 14-3-3sigma ve Beta Aktin proteinlerinin ekspresyon düzeyleri, spesifik antikorlar yardımı ile belirlendi. Hücre serilerinden protein elde edildikten sonra sırasıyla aşağıdaki işlemler yapıldı.

1. SDS Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE);
2. Proteinlerin jelden membrana transfer edilmesi;
3. Spesifik olmayan bağlanmaların inhibisyonu (Bloklama);
- 4.Spesifik antikorlar ile hibridizasyon (Primer ve sekonder antikorlar) ve görüntüleme.

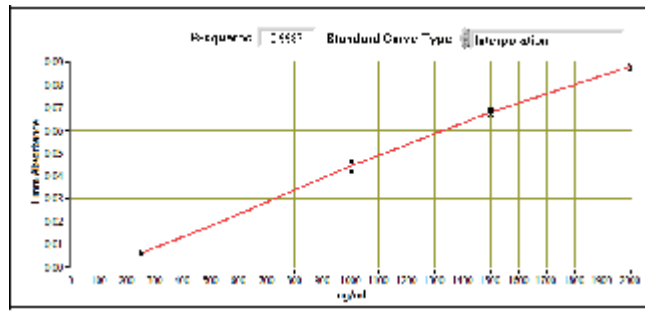
3.6.1. Protein izolasyonu

Hücre serilerinden protein izolasyonu “Complete Lyses–M” (Roche, #04719964001) solüsyonu kullanılarak yapıldı. 10 ml Lizis–M solüsyonu içerisinde 1 adet proteaz inhibitör tablet çözüldü. Hücreler serumsuz ortam ile yıkandıktan sonra tripsinlendi ve 37°C’ de 5 dakika inkübasyona bırakıldı. İnverted mikroskopta hücrelerin flask yüzeyinden ayrıldıkları kontrol edildikten sonra hücreler serumsuz ortam ile karıştırılarak falkon tüpüne alındı. 1200 rpm’ de 10 dakika santrifüj edildi. Pellet üzerindeki ortam uzaklaştırıldı ve 300 µl Lizis–M solüsyonu pipetlendi, vorteksenerek hücreler süspansiyon haline getirildi. 10 dakika oda sıcaklığında 1200 rpm karıştırıcıda inkübe edildi. 20,000 x g’ de 15 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant temiz bir tüpe aktarıldı ve protein tayini yapıldı.

3.6.2. Protein tayini

Hücre serilerinden elde edilen proteinlerin total konsantrasyonlarının belirlenmesi “Bradford solüsyonu” (Fermentas, #R1271) ve “Bovin Serum Albümin” (BSA) standart set (Fermentas, #R1281) kullanılarak nano drop spektrofotometrede yapıldı. Öncelikle 2 mg/mL, 1.5 mg/mL, 1 mg/mL, 0.75 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.125 mg/mL ve 0.125 mg/mL BSA standartları kullanılarak standart eğri oluşturuldu (Şekil 2.9). Bunun için her bir standarttan 2 µl alınarak 100 µl Bradford solüsyonu ile karıştırıldı. 5 dakika karıştırıcı üzerinde inkübe edildikten sonra her bir standart beşer kez 525 nm dalga boyunda okutuldu ve standart eğri oluşturuldu.

Protein örnekleri için; 2 µl örnek 100 µl Bradford solüsyonuna pipetlendi ve oda ısısında 5 dakika inkübe edildi. İyice karıştırıldıktan sonra 2 µl alınarak nanodrop spektrofotometrede okutuldu. Her bir örnek için 3 okuma yapıldı ve ortalama protein konsantrasyonu hesaplandı.



Şekil 7. Protein tayininde kullanılan BSA standart eğrisi

3.6.3. Solüsyonların Hazırlanması

4x Ayırıcı Tampon (Seperating Buffer)	(1,5 M Tris/HCL pH: 8,8; %0,4 SDS) 18,2 gr Tris/HCL + 0,4 gr SDS distile su içerisinde çözülerek 100 ml' ye tamamlanır.
4x Yığıcı Tampon (Stacking Buffer)	(0,5 M Tris/HCL pH: 6,8; %0,4 SDS) 6,1 gr Tris/HCL + 0,4 gr SDS distile su içerisinde çözülerek 100 ml' ye tamamlanır.
%8 Ayırıcı Jel	Distile su: 4,7 ml (29:1) % 30 Akrilamid-Bisakrilamid Solüsyonu: 2,7 ml 4x Ayırıcı Tampon: 2,5 ml %10 APS: 0,1 ml TEMED: 0,006 ml

%8 Yıgıcı Jel	Distile su: 5,7 ml (29:1) % 30 Akrilamid-bisakrilamid solüsyonu: 1,7 ml 4x Yıgıcı tampon: 2,5 ml %10 APS: 0,1 ml TEMED: 0,01 ml
%10 APS	0,025 gr APS, 250 µl distile suda çözülür
1X Phosphate Buffered Saline (PBS)	1 adet PBS tablet 100 ml distile suda çözülür
0.5 M Tris-HCl pH: 6.8	7,88 gr Tris-HCL 70 ml distile suda çözülür. 2N NaOH ile pH ayarı yapılır (~400µl NaOH) distile suyla 100 ml' ye tamamlanır
2N NaOH %10 SDS	0,8 gr NaOH, 10 ml distile su içinde vortex yapılarak çözülür 1 gr SDS, 10 ml distile suda çözülür
4x Yükleme Tamponunu	Distile su: 3,8 ml 0,5 M Tris/HCl (pH:6.8): 1 ml Gliserol: 0,8 ml %10 SDS: 1,6 ml %1 Bromofenol Blue: 0,4 ml Beta merkaptetanol: 0,4 ml
10x Yürütme Tamponu	30 gr Tris baz + 144 gr Glisin + 10 gr SDS + 4,5 ml konsantre HCl toplam hacim 1 L olacak şekilde çözülür.
Transfer Tamponu	100 ml Tris-Glisin tamponu + 200 ml Metanol + 800 ml distile su karıştırılarak hazırlanır.
10X Tris Buffered Saline (TBS)	1 litre TBS için: 24,2 gr Tris base, 80 gr NaCl (1X HCl ile pH:7.6' ya ayarlanır.)
TBS/T Tamponu	10x konsantrasyondaki hazır TBS tamponu distile su ile 1x' e sulandırıldıktan sonra içerisine Tween-20 ilave edilir.
Bloklama Tamponu	(1X TBS, %0,1 Tween-20, %5 süt tozu) 150 ml için: 135 ml distile suya 15 ml 10X TBS eklenir. Karıştırıldıktan sonra 7,5 gr süt tozu eklenir. Karıştırırken 0,15 ml Tween-20 pipetlenir.
Yıkama Tamponu (TBS/T)	1X TBS, % 0,1 Tween-20
Primer antikor tamponu	(1XTBS, % 0.1 Tween-20, %5 BSA) 20 ml için: 18 ml distile suya 2 ml 10X TBS eklenir. 1 gr BSA ilave edilerek karıştırılır ve 20 µl Tween-20 pipetlenir.

3.6.4. *Proteinlerin yüklenmesi ve elektroforez:* Protein lizatları % 8' lik SDS-PAGE jelde konsantrasyonları 18 µg olacak şekilde kuyucuklara yüklendikten sonra 80 V' ta 2 saat süre ile yürütüldü. "Yüklenecek protein miktarı (µg) / örnek konsantrasyonu (µg/ µl) = yüklenecek örnek hacmi (µl)" formülü ile jele yüklenecek protein miktarları belirlendi. Her örnek için, hesaplanan hacimde protein üzerine örnek yükleme tamponu ilave edildi. Hazırlanan protein örnekleri jele yüklenmeden önce 5 dakika 95°C'de

kaynatılarak SDS' nin proteinlerin etrafını kuşatarak proteinleri denatüre etmesi sağlandı (tampon içerisinde bulunan SDS deterjanının proteinlere bağlanması ile proteinler negatif yüklü hale gelir). Protein örnekleri % 8'lik SDS-PAGE jeline yüklenerek SDS-protein komplekslerinin molekül ağırlıklarına göre ayrışmaları sağlandı.

3.6.5. *Transfer*: SDS-PAGE jelde yürütülen protein örnekleri, ıslak transfer metoduyla membrana transfer edildi. Bu amaçla; metanolden geçirilmiş PVDF (Immobilon-P polyvinylidene difluoride, PVDF, Sigma) membran, filtre kurutma kağıtları ve transfer sistemi, transfer tamponunda 10-15 dakika süreyle bekletildi. Jel örneği, filtre kurutma kağıtları ve membran arasına yerleştirilerek transfer için sandviç modeli oluşturuldu. Buz kalıbı içerisinde soğuk ortamda 40 volt - 110 mA' de ve 2 saat süreyle transfer işlemi gerçekleştirildi. Transferden sonra PVDF membran TBS/T yıkama tamponuna alınarak 3 kez yıkandı ve bloklama aşamasına geçildi.

3.6.6. *Bloklama*: 50 ml TBS/T içerisinde 2.5 gr süt tozu (non-fat dry milk – Bio Rad) çözülerek bloklama tamponu hazırlandı. Hazırlanan bloklama tamponu içerisine alınan membran, 1 gün süreyle karıştırıcı üzerinde ve +4 °C' de inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonrası membran 3 kez TBS/T ile yıkandı.

3.6.7. *Primer ve sekonder antikor ile muamele*: Beta Aktin primer antikorun hazırlanması (1:1000): 6 ml TBS/T tamponu içerisinde 0,15 gr BSA çözüldükten sonra içerisine 6 µl beta aktin antikor (Cell Signalling Technology) ilave edilerek hazırlandı.

14-3-3sigma primer antikorun hazırlanması (1:1000): 6 ml TBS/T tamponu içerisinde 0,15 gr BSA çözüldükten sonra içerisine 6 µl 14-3-3sigma antikor (Milipore) ilave edilerek hazırlandı.

Membranlar primer antikorlar ile 1 gece karıştırıcıda inkübe edildi. Ertesi gün membranlar, 1:2500 konsantrasyonda olacak şekilde 5 ml TBS/T + 2 µl IgG ilave edilmesiyle hazırlanan sekonder antikor ile oda ısısında 1,5 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. İlk yarım saatlik süre dolduğunda, bir sonraki basamakta kullanılacak olan Alkalen Fosfataz enzimi (5 ml TBS/T + 4 µl Streptavidin + 4 µl alkalen fosfataz) hazırlanarak oda ısısında inkübasyona bırakıldı.

Sekonder antikor ile muamelenin sonunda membranlar 3 kez TBS/T ile yıkandı. Hazırlanan enzim reaktifi membranın üzerine dökülerek 1 saat süreyle oda ısısında inkübasyona bırakıldı ve süre sonunda 3 kez TBS/T ile yıkandıktan sonra renk reaktifi hazırlandı. Renk reaktifi; 12 ml distile su içerisine + 0,5 ml 25x AP Renk Tamponu eklenerek + 62,5 µl Solüsyon A + 62,5 µl Solüsyon B ilave edilmesiyle hazırlandı. Membranın üzerine renk reaktifi ilave edildikten sonra bantların belirmesi beklendi. Birkaç dakika sonra bantlar gözlemlendiğinde renk reaktifi döküldü ve membran distile su ile yıkandı, jel görüntüleme sistemi ile görüntülendi.

3.7. Hücre Serilerine siRNA transfeksiyonu

3.7.1. siRNA Dizileri ve Resüspansiyonu

Çalışmamızda hücre serilerinde 14-3-3sigma ekspresyonunun susturulması amacıyla, bu genin mRNA dizisine özgül 4 ayrı bölgeye bağlanabilen siRNA dizileri kullanılarak transfeksiyon yapıldı (Tablo 7).

Tablo 7. 14-3-3sigma özgül siRNA dizilerinin özellikleri

siRNA No	Hedef Dizi	MW (g/mol)	Nano mol	Mgr
Oligo-1	CAAGACCACUUUCGACGACGAGCTCGTCGT	13,444.8	20	268.8
Oligo-2	CGACAAGAAGCGCAUCAUU	13,429.9	20	268.5
Oligo-3	CGAGACAACCUGACACUGU	13,444.9	20	268.8
Oligo-4	AGACUGAGCUCCAGGGCGU	13,474.9	20	269.4

14-3-3sigma mRNA dizisi ve hedef siRNA bağlanma bölgeleri

TTGGTCCCAGGCAGCAGTTAGCCCGCCGCCCGCCTGTGTGTCCCCAGAGCCATGGAGAGAGCCAGTCTGATCCAGAAGGCCAAGCTGGCAGAGCAGGCCGAACGCTATGAGGACATGGCAGCCTTCATGAAAGGCGCCGTGGAGAAGGGCGAGGAGCTCTCCTGCGAAGAGCGAAACCTGCTCTCAGTAGCCTATAAGAACGTGGTGGGCGGCCAGAGGGCTGCCTGGAGGGTGCTGTCCAGTATTGAGCAGAAAAGCAACGAGGAGGGCTCGGAGGAGAAGGGGCCCCGAGGTGCGTGAGTACCGGGAGAAGGTGGAGACTGAGCTCCAGGGCGTGTGCGACACCGTGCTGGGCCTGCTGGACAGCCACCTCATCAAGGAGGCCGGGACGCCGAGAGCCGGGTCTCTACCTGAAGATGAAGGGTGACTACTACCGCTACCTGGCCGAGGTGGCCACCGGTGACGACAAGAAGCGCATCATTGACTCAGCCCGGTCAGCCTACCAGGAGGCCATGGACATCAGCAAGAAGGAGATGCCGCCACCAACCCCATCCGCCTGGGCCTGGCCCTGAACTTTTCCGTCTTCCACTACGAGATCGCCAACAGCCCCGAGGAGGCCATCTCTCTGGC**CAAGACCAC****TTTCGACGAG**GCCATGGCTGATCTGCACACCCTCAGCGAGGACTCCTACAAAGACAGCACCTCATCATGCAGCTGCTGCGAGACAACCTGACACTGTGGACGGCCGACAACGCCGGGGAAGAGGGGGGCGAGGCTCCCCAGGAGCCCCAGAGCTGAGTGTGGCCGCCACCGCCCGCCCTGCCCTCCAGTCCCCCACCCTGCCGAGAGGACTAGTATGGGGTGGGAGGCC

CACCCTTCTCCCCTAGGCGCTGTTCTTGCTCCAAAGGGCTCCGTGGAGAGGGACTGGCA
GAGCTGAGGCCACCTGGGGCTGGGGATCCCACTCTTCTTGAGCTGTTGAGCGCACCTA
ACCACTGGTCATGCCCCACCCCTGCTCTCCGCACCCGCTTCCTCCCGACCCCAAGGACCA
GGCTACTTCTCCCCTCCTCTTGCCTCCCTCCTGCCCCCTGCTGCCTCTGATCGTAGGAATTG
AGGAGTGTCGCGCCTTGTGGCTGAGAACTGGACAGTGGCAGGGGGCTGGAGATGGGTGT
GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGCGCGCGCGCCAGTGCAAGACCGAGATTG
AGGGAAAGCATGTCTGCTGGGTGTGACCATGTTTCCTCTCAATAAAGTTCCCCTGTGAC
ACTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

siRNA Resüspanسیون Protokolü

1. 20 nmol siRNA içeren tüpler santrifüj edilerek siRNA peletinin tüpün alt kısmında toplanması sağlandı.
2. 5X siRNA tamponu RNase içermeyen su ile 1X' e sulandırıldı.
(200 µl 5X tampon + 800 µl DEPC)
3. siRNA tüplerinde hava kabarcığı oluşması engellenerek 1000 µl 1X tampon pipetlendi. 3-5 kez pipetaj yapılarak karıştırıldı ve bu şekilde 20 µM stok solüsyonu elde edildi.
4. Orbital karıştırıcı üzerinde oda ısısında 30 dakika bekletildi. Santrifüj edildikten sonra 50 µl hacimlere bölünerek -20°C' de saklandı.
5. Kullanılacak olan 50 µl siRNA tüpüne 450 µl tampon pipetlendi ve 2 µM konsantrasyon elde edildi.
6. Dört siRNA tüpünden 25'er µL alınarak toplam 100 µL, 2 µM siRNA solüsyonu 6 kuyucuklu plate' de transfeksiyon için kullanıldı.

3.7.2. siRNA Transfeksiyon Kontrolleri

3.7.2.1. siGLO Green Transfeksiyon İndikatörü

siGLO transfeksiyon indikatörleri nukleusa lokalize olarak memeli hücrelerinde tam transfeksiyonu gösterebilen floresanlı oligonüklotidlerdir. siGLO green, 6-FAM floresan boyası ile işaretlidir (Dharmacon, #D-001630-01-20). Optimal siRNA transfeksiyon koşullarının ve hedef siRNA ile birlikte transfeksiyon yapılarak transfeksiyonun etkinliğinin belirlenmesi için kullanılmıştır (Şekil 8).

siGLO green resüspanسیونu;

1. 20 nmol siGLO transfeksiyon indikatörünü içeren tüp santrifüj edildi ve pelletin tüpün alt kısmında toplanması sağlandı.
2. 1 mL 1x siRNA tamponu ile çözülerek 20 µM stok siGLO hazırlandı.

3. Oda ısısında yavaşça karıştırılarak 20 – 30 dakika inkübe edildi ve tamamen erimesi sağlandı. Kısa bir santrifüj yapıldıktan sonra küçük hacimlere bölündü ve -20°C’de ışıktan korunarak saklandı.

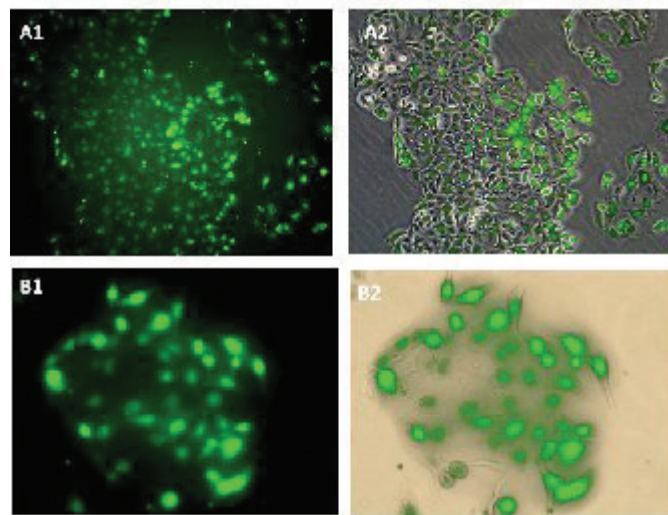
3.7.2.2. siRNA kontrolleri

Negatif Kontrol: İnsan genomunda hiçbir bölgeye bağlanmayan 4 siRNA dizisi içermektedir.

Pozitif Kontrol: İnsan genomunda GADPH mRNA’ sına özgül siRNA dizisini içermektedir.

siRNA transfeksiyonu için 6 kuyucuklu plate’ de oluşturulan hücre grupları aşağıdaki şekilde düzenlendi;

1. 14-3-3sigma: 14-3-3sigma özgül siRNA’ nın uygulandığı grup,
2. Pozitif kontrol (GADPH siRNA),
3. Negatif kontrol (non-targeting siRNA, genom üzerinde hiçbir bölgeyi hedeflemeyen RNA dizisidir)
4. siGLO: Transfeksiyon indikatörü (siGLO) uygulanan grup
5. Yalancı “mock” transfeksiyon : Sadece transfeksiyon ajanı dharmafect-1 uygulanan grup
6. Hiçbir uygulama yapılmamış (untreated) grup



Şekil 8. A549 hücre serisine transfeksiyon indikatörü siGLO transfeksiyonu. DharmAFECT-1 solüsyonu kullanılarak transfeksiyon yapıldı. 24 saat sonra inverted floresan mikroskopta fotoğraflar çekildi (Dharmafect-1 konsantrasyonu: 0.15

µg/kuyucuk, Hücre sayısı: 6 kuyucuklu plate’ de 600.000 hücre/kuyucuk, siGLO konsantrasyonu: 100 nmol) A1: Floresan ışık görüntüsü, A2: Faz kontrast + floresan görüntüsü birleştirilmiş, 200x büyütme; B1: Floresan ışık görüntüsü, B2: Faz kontrast + floresan görüntüsü birleştirilmiş, 400x büyütme.

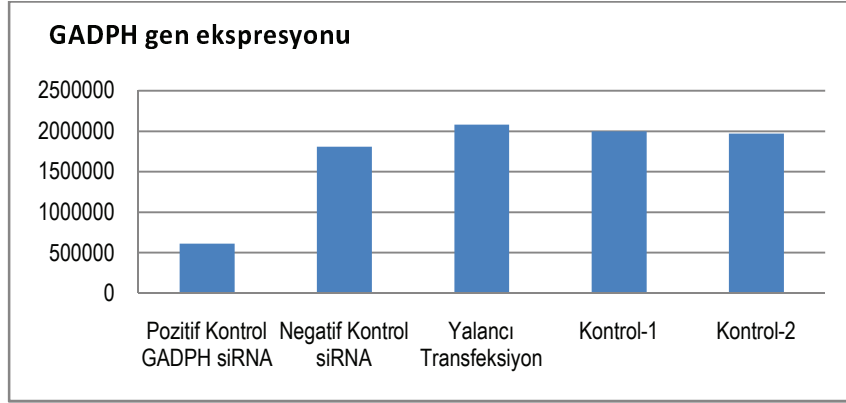
siRNA transfeksiyonundan sonra 14-3-3sigma ve GADPH ekspresyon düzeylerinde meydana gelen değişiklikler RT-PCR ile kontrol edildi (Grafik 2 ve 3).

3.7.3. siRNA Transfeksiyonu İçin Hücrelerin Hazırlanması

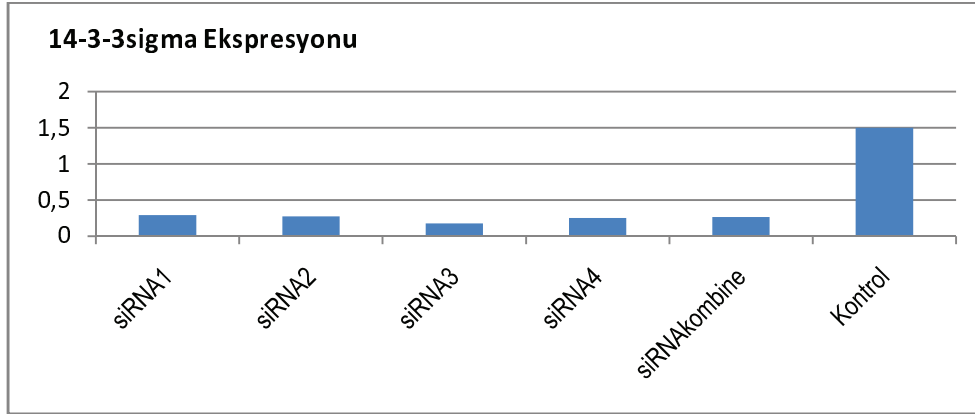
Hücrelerin içinde bulunduğu ortam döküldü ve hücreler 10 ml antibiyotiksiz – serumsuz ortam ile yıkandı. Tripsin ilave edilerek kültür kabının tüm yüzeyine yayılması sağlandı. 10 – 30 sn içinde tripsin döküldükten sonra 37°C’ de 5 dakika bekletildi. Serumlu ortam ilave edildikten sonra 50 µl hücre süspanisyonu alınarak tripan mavisi ile sayıldı. 6-kuyucuklu plate’ de herbir kuyucuk 800.000 hücre içerecek şekilde pipetlendi. 24 saat % 5 CO₂ etüvde inkübe edildi.

3.7.4. siRNA Transfeksiyon protokolü

1. Herbir siRNA tübünden 2 µM siRNA solüsyonu hazırlandı.
2. İki ayrı tüpte antibiyotiksiz ve serumsuz besiyeri ile siRNA ve transfeksiyon solüsyonu hazırlandı.
 1. Tüp: 100 µl siRNA (25 µl herbir 2 µM siRNA tüpünden) + 100 µl besiyeri
 2. Tüp: 4 µL Dharmafect-1 transfeksiyon solüsyonu + 196 µL besiyeri. Tüpler oda ısısında 5 dakika bekletildi.
3. 1. Tüpteki içerik alınarak 2. tüpe pipetlendi. Pipetaj ile karıştırıldı ve oda ısısında 20 dakika bekletildi.
4. Kuyucuklardaki ortam çekildi ve hücreler antibiyotiksiz, serumsuz ortam ile yıkandı. Daha sonra 1600 µl antibiyotiksiz %10 FBS içeren ortam ilave edildi.
5. 400 µl Transfeksiyon karışımı ilave edilerek yavaşça karıştırıldı.
6. Hücreler 37 °C %5 CO₂ ‘li etüvde mRNA analizi için 24-48 saat, protein analizi için 48-72 saat inkübe edildi.



Grafik 2. A549 hücre serisine siRNA transfeksiyonundan sonra GADPH ekspresyonu. 1. 100 nM Pozitif kontrol (GADPH) siRNA, 2. 100 nM Negatif kontrol siRNA, 3. Yalancı transfeksiyon (sadece transfeksiyon reagent Dharmafect-1 verilen hücreler), 4 ve 5. Hiçbirşey uygulanmamış hücreler.



Grafik 3. A549 hücre serisine siRNA transfeksiyonundan sonra 14-3-3sigma ekspresyonu. 1. 100 nM siRNA oligo-1, 2. 100 nM siRNA oligo-2, 3. 100 nM siRNA oligo-3, 4. 100 nM siRNA oligo-4, 5. siRNA kombine (25 nM herbir siRNA), 6. Hiçbirşey uygulanmamış hücreler

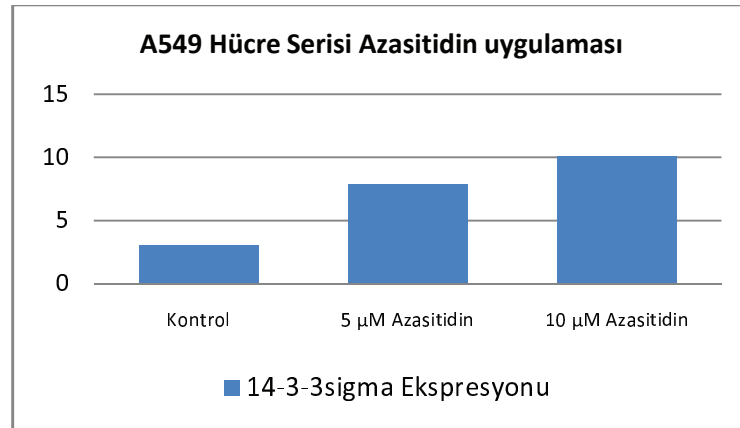
3.8.Hücre serilerine Azasitidin uygulanması

Bir nükleozit analogu olan 5-aza-2-deoksisitidin (Azasitidin), DNA metil transferaz enzimlerini yıkarak geri dönüşümsüz olarak inhibe etmekte ve böylece genomda hipometilasyona neden olmaktadır. Hücre serilerine azasitidin uygulanması genomdaki hipermetilasyona bağlı susturulmanın kaldırılmasını sağlamaktadır (37; 38). Çalışmamızda hücre serilerine azasitidin uygulaması ile 14-3-3sigma gen ekspresyonu arttırılmış ve bu durumun cisplatin yanıtına olan etkisi araştırılmıştır.

3.8.1. Optimum Azasitidin konsantrasyonunun belirlenmesi

Azasitidin uygulama protokolü;

- 10 mg Azasitidin (Sigma, #A3656) 438 µl DMSO ile sulandırılarak 100 mM ana stok elde edildi.
- 6 kuyucuklu plate herbir kuyucuk 10^6 hücre içerecek şekilde hazırlandı. 24 saat hücrelerin yapışmaları için beklendikten sonra % 4 FBS içeren ortam ile besiyeri değiştirildi ve kuyucuklara 1, 3, 5 ve 10 µM azasitidin verildi.
- 3. ve 5. günlerde de aynı işlem yapıldıktan sonra hücreler 2 gün azasitidin bulunmayan ortamda bırakıldı.
- 8. Gün RNA izolasyonu yapıldı ve 14-3-3sigma ekspresyon düzeyleri analiz edildi. En yüksek artışın 5 ve 10 µM azasitidin ile olduğu belirlendi (Grafik 4).



Grafik 4. A549 hücre serisine azasitidin uygulandıktan sonra 14-3-3sigma ekspresyon düzeyleri.

3.9. Sitokrom C salınımının analizi

Hücrede apoptozu indükleyen uyaranlara yanıt olarak mitokondriden salınan sitokrom c proteinin miktarının analizi *Cytochrome C ELISA Kit* (Chemicon, #APT200) kullanılarak yapıldı (39).

Test prensibi: Örnekteki yada standartdaki sitokrom c, mikrotiter plate üzerine emdirilmiş olan anti-sitokrom c monoklonal antikoruna bağlandıktan sonra biyotinle konjuge edilmiş monoklonal anti-sitokrom c antikoruna ilave edilerek ilk antikora

bağlanması sağlandı. İnkübasyondan sonra bağlanmamış biyotinle konjuge olan anti-sitokrom c, yıkama aşamasında uzaklaştırıldı. Biyotinle konjuge anti-sitokrom c' ye streptavidin-HRP ilave edildi ve bağlanmamış streptavidin-HRP yıkama aşaması ile uzaklaştırıldı. Örnekteki sitokrom c miktarı, kuyucuklara HRP' nin substrat solüsyonu ilave edildikten sonra renk reaksiyonunun absorbansının 450 nm' de ölçülmesi ve 7 adet sitokrom c dilüsyonu ile çizilen standart eğriye göre belirlendi.

3.9.1. Sitokrom c salınımı analizinde kullanılacak solüsyonların hazırlanması

1 M' lık Tris-HCl, pH 7,5 (MW=121,14)	121,14 gr tris 800 ml H ₂ O içinde çözüldü. Üzerine HCl ekleyerek pH' ı istenilen değere getirildi (~50 ml) 1 lt' ye tamamlandı	Otoklavlayarak sterilize edildikten sonra oda ısısında saklanır
50 mM Leupeptin (MW = 475,60)	10 mg Leupeptin + 420,6 µl distile su	+4°C' de 1 ay, -20°C' de 6 ay stabildir
50 mM PepstatinA (MW: 685,91)	10 mg Pep A + 291,6 µl DMSO	+4°C' de 1 hafta, -20°C' de 6 ay stabildir. Solüsyon sarı renge dönüşmüş ise hidrolize olmuştur.
10 mM Aprotinin (MW: 6511,52)	10 mg Apr + 153,6 µl distile su	+4°C' de 1 ay, -20°C' de 1 yıl stabil, Işıktan korunmalıdır.
1 M PMSF (MW: 174,19)	0,1 gr PMSF + 574 µl DMSO	Çok hızlı inaktive olduğundan solüsyonlara taze olarak eklenmelidir. +4°C' de 9 ay, -20°C' de birkaç yıl saklanabilir.

Solüsyon 1: 10 mM Tris-HCl; pH 7,5; 0,3 M Sukroz; 10 µM Aprotinin A; 10 µM pepstatin, 10 µM Leupeptin; 1 mM PMSF

- 200 µl 1 M' lık Tris-HCl, pH 7,5 stok'u → 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
- 2,0538 gr Sukroz (MW = 342,30) → 0,3 M Sukroz
- 20 µl 10 mM Aprotinin A stok (MW = 6511,52) → 10 µM Aprotinin A
- 4 µl 50 mM Pepstatin A stok (MW = 685,91) → 10 µM Pepstatin
- 4 µl 50 mM Leupeptin stok (MW = 475,60) → 10 µM Leupeptin
- 20 µl 1 mM PMSF stok (MW = 174,19) → 1 mM PMSF

- Toplam hacmi H₂O ile 20 ml' ye tamamlandı.

Solüsyon 2: 10 mM Tris-HCl; pH 7,5; 1% Triton X-100; 150 mM NaCl; 10 µM Aprotinin A; 10 µM Pepstatin; 10 µM Leupeptin; 1 mM PMSF

- 200 µl 1 M' lik Tris-HCl, pH 7,5 stok'u → 10 mM Tris-HCl
- 200 µl Triton X-100 → %1 Triton X-100
- 0,17532 gr NaCl (MW = 58,44) → 150 mM NaCl
- 20 µl 10 mM Aprotinin A stok (MW = 6511,52) → 10 µM Aprotinin A
- 4 µl 50 mM Pepstatin A stok (MW = 685,91) → 10 µM Pepstatin
- 4 µl 50 mM Leupeptin stok (MW = 475,60) → 10 µM Leupeptin
- 20 µl 1 mM PMSF stok (MW = 174,19) → 1 mM PMSF
- Toplam hacmi H₂O ile 20 ml' ye tamamlandı.

Yıkama Solüsyonu (10X): Saf su ile sulandırılarak 1X konsantrasyonda kullanıldı.

Biotin ile konjuge anti-sitokrom c monoclonal antikoru ve enzim ile konjuge streptavidin: Kullanılmadan önce 'Assay Diluent' ile biyotinle konjuge antikor 1:100 ve enzim ile konjuge streptavidin 1: 1000 oranında seyreltilti. Kullanılan solüsyonlar taze olarak hazırlandı.

Sitokrom c Standardı: 500 µL deiyonize su kullanılarak, konsantrasyonu 40 ng/mL olacak şekilde çözüldü. Bu stok solüsyonundan seri dilüsyonlar yapılarak elde edilen 7 konsantrasyon kullanılarak standart eğri çizildi. Sulandırıldıktan sonra küçük hacimlere bölünerek -80 °C' de saklandı.

3.9.2. Sitokrom c salınımı analiz edilecek örneklerin hazırlanması

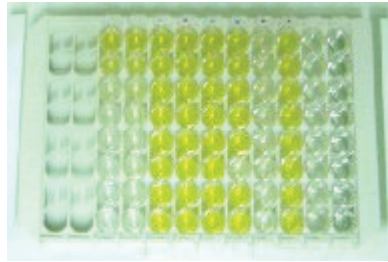
1. Sitokrom c salınımı analiz edilecek hücre serilerinden kontrol, 24 saat ve 48 saat' lik olmak üzere üçer flask oluşturuldu.
2. İkinci gün, 48 saat için oluşturulan hücre flasklerine IC₅₀ konsantrasyonlarında cisplatin verildi (A549: 30 µM, CD-A549: 200 µM, Calu1: 13 µM, CD-Calu1: 300 µM).
3. Üçüncü gün, 24 saat için oluşturulan flasklere cisplatin verildi (A549: 30 µM, CD-A549: 200 µM, Calu1: 13 µM, CD-Calu1: 300 µM).

4. Dördüncü gün, hücreler 3 defa PBS ile yıkandıktan sonra tripsinlenerek kaldırıldı.
5. Hücre sayımı yapıldıktan sonra 1×10^6 hücre falkon tüpüne alındı ve santrifüj edildi.
6. Süpernatant atıldı ve hücre pelleti 300 μ l **solüsyon 1** ile çözüldü.
7. Homojenizator ile 5 dakika buz üzerinde homojenize edildi. (Bu aşamada homojenizattan bir damla alınarak Trypan blue boyası ile karıştırıldı ve ışık mikroskopunda hücrelerin parçalanması kontrol edildi)
8. Örnek 4 °C' de 10,000xg 60 dakika santrifüj edildi.
9. Süpernatant alınarak **sitoplazmik fraksiyon** olarak kullanıldı.
10. Presipite olmuş fraksiyon, soğuk 300 μ l **solüsyon 2**' de çözüldü.
11. Örnek ultra sonikatör kullanılarak 3 kez (her seferinde 20 saniye) buz üzerinde sonike edildi. (Output control=2, Duty cycle=90%)
12. 4 °C' de 10,000xg, 30 dakika santrifüj edildi.
13. Süpernatant alınarak **mitokondriyal fraksiyon** olarak kullanıldı.

3.9.3. Deney Protokülü

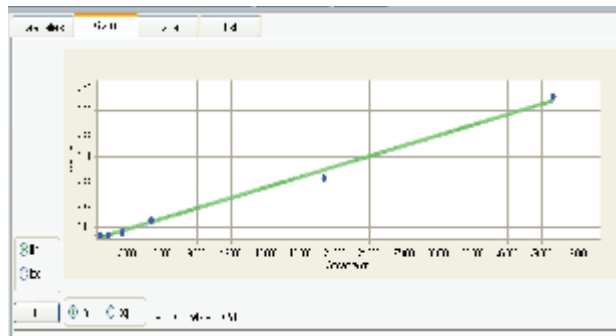
1. Standart eğri için, 40 ng/mL Sitokrom c stok solüsyonundan 'Assay Diluent' ile 1:2 oranında sulandırılarak 20 ng/mL, 10 ng/mL, 5 ng/mL, 2.5 ng/mL, 1,125 ng/mL, 0.562 ng/mL, 0,281 ng/mL konsantrasyonları hazırlandı. Kuyucuklara her konsantrasyondan 100'er μ l ve blank solüsyonu olarak 100 μ l 1X Assay Tampon pipetlendi.
2. Kullanılmadan önce bütün solüsyonlar çalkalandı.
3. Her örnek, standart ve blank çift olarak çalışıldı.
4. 100 μ L örnek yada sitokrom c standardı anti-sitokrom c antikoru kaplı plate üzerine pipetlendi.
5. Plate kaplandı ve oda ısısında 2 saat inkübe edildi.
6. Kuyucuklar boşaltıldı ve her kuyucuk 4 kez yaklaşık 300 μ L yıkama solüsyonu ile yıkandı. Son yıkamadan sonra kuyucuklar boşaltıldı ve emici bir kağıt yada havlu ile kalan yıkama tamponu çekildi.
7. Her kuyucuya 100 μ l sulandırılmış biotin ile konjuge anti-sitokrom c antikoru pipetlendi.
8. Plate kaplandı ve oda ısısında 2 saat inkübe edildi.

9. Kuyucuklar boşaltıldı ve her kuyucuk 4 kez yaklaşık 300 μ L yıkama solüsyonu ile yıkandı. Son yıkamadan sonra kuyucuklar boşaltıldı, emici bir kağıt yada havlu ile kalan yıkama tamponu çekildi.
10. 100 μ L sulandırılmış enzim ile konjuge streptavidin pipetlendi.
11. Plate kaplandı ve oda ısısında 1 saat inkübe edildi.
12. Kuyucuklar boşaltıldı ve her kuyucuk 4 kez yaklaşık 300 μ L yıkama solüsyonu ile yıkandı. Son yıkamadan sonra kuyucuklar boşaltıldı, emici bir kağıt yada havlu ile kalan yıkama tamponu çekildi.



Şekil 9. Sitokrom c analizinde kullanılan mikropate. Stop solüsyonu ilave edildikten sonra ELISA okuyucuda 450 nm’ de okutuldu.

13. TMB oda sıcaklığında ısıtıldı. Her kuyucuğa 100 μ L TMB/E substrat pipetlendi. Ayrıca blank kuyucuk için de 100 μ L pipetlendi ve oda ısısında 5 dakika inkübe edildi.
14. 100 μ L stop solüsyonu pipetlenerek (blank kuyucuk da dahil) enzim reaksiyonu durduruldu. Bu aşamada enzim aktivasyonu tamamen durdurulmuş oldu ve iyi sonuçlar alınması için plate hızlı bir şekilde 450 nm’ de okutuldu (Şekil 9)



Grafik 5. Sitokrom c standart eğrisi

3.10. İstatistiksel Analizler

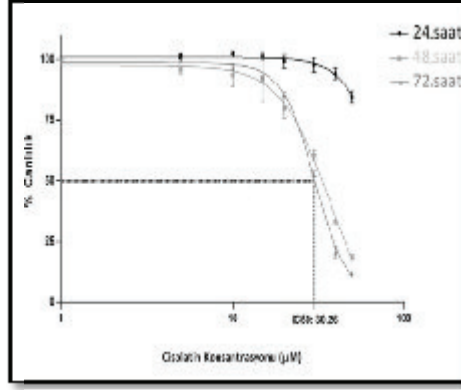
Hücre serilerinin 14-3-3sigma ekspresyon düzeyleri **GraphPad Prism** istatistik programı kullanılarak student t testi ile karşılaştırıldı. Sitotoksite deneylerinden elde edilen XTT ve WST absorbans değerleri **GraphPad Prism** istatistik programına yüklenerek cisplatin dozlarının logaritmik değerlerine karşı **Nonlinear Regression Analizi** yapıldı ve % 50 inhibitör konsantrasyonu (IC_{50}) hesaplandı. Farklı deneylerden elde edilen $LogIC_{50}$ değerleri aynı programda karşılaştırılarak veri setlerinin istatistiksel farklılıkları, standart hata oranları ve güven aralıkları elde edildi.

4. BULGULAR

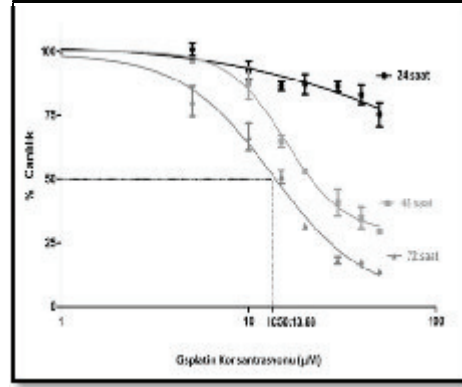
Çalışmamızın ilk aşamasında A549 ve Calu1 hücre serilerinin cisplatin duyarlılıkları belirlendikten sonra dirençli serilerinin oluşturulması amacıyla hücrelere cisplatin uygulanmaya başlandı. Dirençli hücre serilerinin elde edilmesi 6 aylık uygulama periyodu sonrasında gerçekleşti. Bu süre içinde, cisplatinin inhibitör konsantrasyonundaki artış sitotoksite deneyleri ile kontrol edildi. Çalışmamızın ikinci aşamasında ise kontrol ve cisplatin dirençli hücre serilerinde 14-3-3sigma gen ekspresyonunun artışını ve susuturulmasını sağlamak amacıyla siRNA transfeksiyonu ile 5-Aza-2-Deoksisitidin (azasitidin) uygulamaları yapıldı.

4.1. A549 ve Calu1 hücre serilerinin cisplatin IC_{50} dozları

XTT yöntemi kullanılarak cisplatinin IC_{50} dozunun A549 hücre serisinde 72. saatte **30,26 μ M**, Calu1 hücre serisinde ise **13,68 μ M** olduğu tespit edilmiştir (Grafik 6 ve 7). Cisplatin IC_{50} dozları karşılaştırıldığında, Calu1 hücre serisinin cisplatine A549 hücre serisinden 2,2 kat daha duyarlı olduğu saptanmıştır.



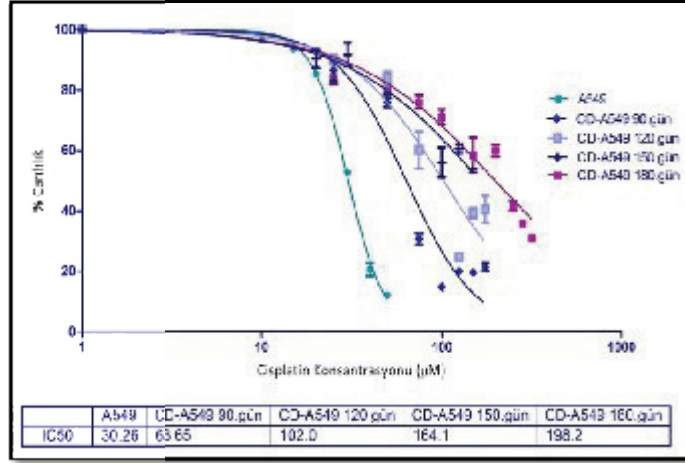
Grafik 6. A549 hücre serisinin 24, 48 ve 72. saatlerde cisplatin yanıtı ve 72. saat IC_{50} değeri



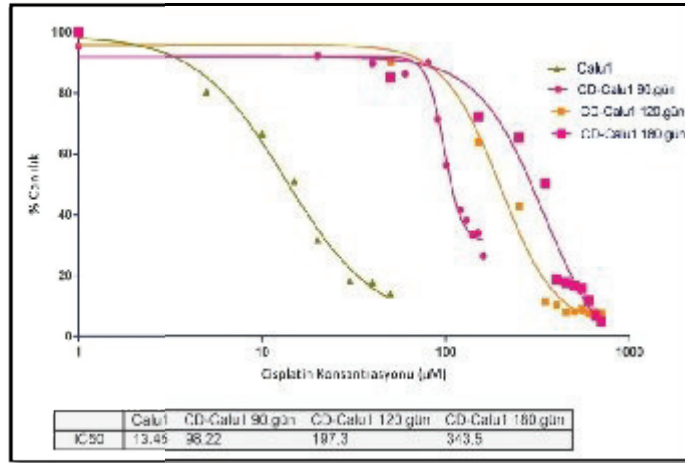
Grafik 7. Calu1 hücre serisinin 24, 48 ve 72. saatlerde cisplatin yanıtı ve 72. saat IC_{50} değeri

4.2. Dirençli hücre serilerinin oluşturulması

A549 ve Calu1 hücre serilerinin dirençli formları olan CD-A549 ve CD-Calul hücre serilerinin oluşturulması için hücrelere 6 ay (180 gün) boyunca cisplatin uygulanmış ve bu süre içinde cisplatinin inhibitör konsantrasyonları XTT ve WST sitotoksosite analizleri ile takip edilmiştir. Grafik 8 ve 9' da dirençli CD-A549 ve CD-Calul hücre serilerinin oluşturulması sırasında 30,26 - 198,2 μM ve 13,45 - 343,5 aralıklarında artış meydana gelen IC_{50} dozları, uygulanan günlere göre gösterilmiştir.



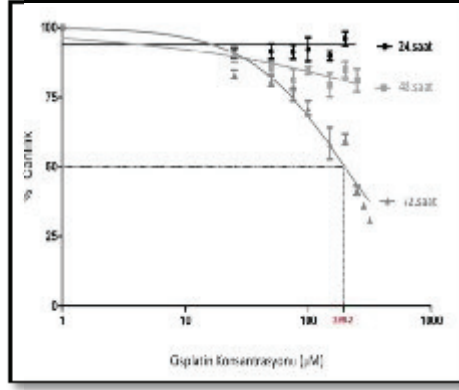
Grafik 8. CD-A549 hücre serisinin oluşturulması sırasında elde edilen IC₅₀ dozları



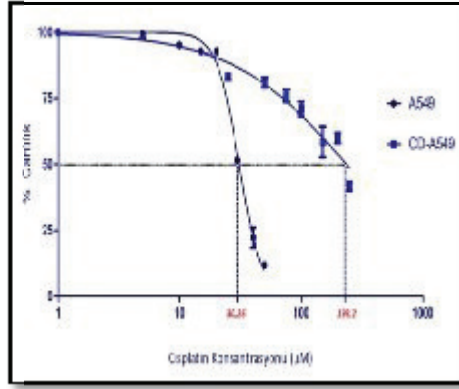
Grafik 9. CD-Calul hücre serisinin oluşturulması sırasında elde edilen IC₅₀ dozları

4.3. Dirençli hücre serilerinin cisplatin IC₅₀ dozları

CD-A549 hücre serisinde 180. günde cisplatinin 72. saat IC₅₀ dozu **198,2 µM** (Grafik 10), CD-Calul hücre serisinde ise **343,5 µM** olarak bulunmuştur (Grafik 12). Cisplatin direnci bakımından karşılaştırıldığında, bu iki hücre serisine aynı sürelerde ilaç uygulanmasına karşın Calul hücre serisinin cisplatine **25 kat**, cisplatin duyarlılığı daha düşük olan A549 hücre serisinin ise **6,55 kat** direnç geliştirdiği belirlenmiştir (Grafik 11 ve 13, Tablo 8).



Grafik 10. CD-A549 hücre serisinin 24, 48 ve 72. saatlerde cisplatin yanıtı ve 72. saat IC_{50} değeri

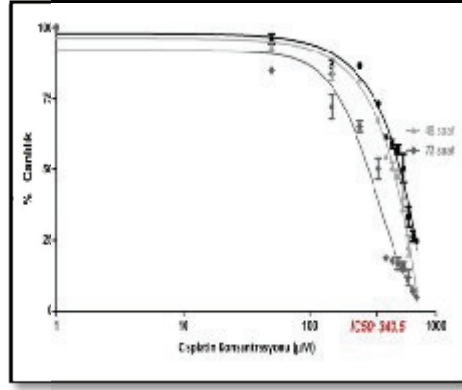


Grafik 11. Kontrol ve cisplatin dirençli A549 hücre serilerinin 72. saat IC_{50} dozlarının karşılaştırılması.

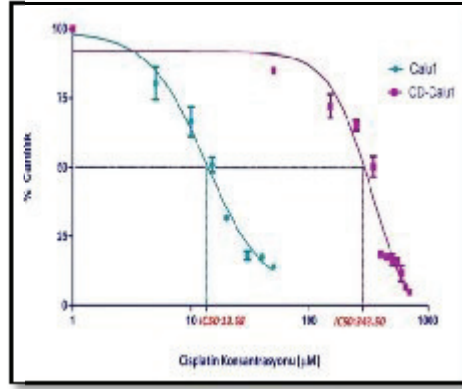
Tablo 8. Kontrol ve dirençli hücre serilerinden elde edilen 72. saat sitotoksosite veri setlerinin karşılaştırılması

Hücre Serisi	IC_{50} * (72. saat)	Standart hata	% 95 Güven Aralığı	R2	P**
A549	30,26	1,02	28,66 - 30,90	0,99	< 0,0001
CD - A549	198,2	1,06	175,3 - 224,3	0,92	
Calu1	13,68	1,07	10,78 - 16,79	0,97	0,0028
CD - Calu1	343,5	1,12	270,8 - 435,7	0,95	

*mikromolar, **Nonlinear Regresyon analizi



Grafik 12. CD-Calul hücre serisinin 24, 48 ve 72. saatlerde cisplatin yanıtı ve 72. saat IC_{50} değeri



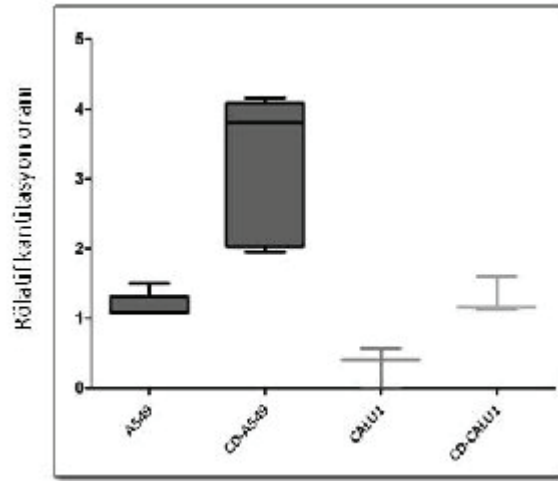
Grafik 13. Kontrol ve cisplatin dirençli Calul hücre serilerinin 72. saat IC_{50} dozlarının karşılaştırılması

4.4. Kontrol ve dirençli hücre serilerinin 14-3-3sigma profillerinin karşılaştırılması

4.4.1. Hücre serilerinin 14-3-3sigma gen ekspresyonları

14-3-3sigma gen ekspresyonunun rölatif kantitasyon oranı A549 hücre serisinde **1,17**, CD-A549 hücre serisinde **3,20** olarak belirlenmiştir (Grafik 14). Bu verilere göre 14-3-3sigma gen ekspresyonunun CD-A549 hücre serisinde anlamlı bir artış gösterdiği saptanmıştır ($p=0,0123$; Tablo 9).

14-3-3sigma gen ekspresyonunun rölatif kantitasyon oranı Calul hücre serisinde **0,33**, CD-Calul hücre serisinde ise **1,29** olarak bulunmuştur (Grafik 14). Kontrol ile CD-Calul hücre serilerinin sonuçları karşılaştırıldığında, cisplatin uygulaması ile 14-3-3sigma gen ekspresyonunun belirgin olarak arttığı saptanmıştır ($p=0,013$; Tablo 9).



Grafik 14. Kontrol ve dirençli hücre serilerinin 14-3-3sigma gen ekspresyonlarının karşılaştırılması

Tablo 9. Kontrol ve dirençli hücre serilerinin 14-3-3sigma gen ekspresyonlarının rölatif oranlarının karşılaştırılması

Hücre Serisi	14-3-3sigma gen ekspresyonu*	Standart hata	% 95 Güven Aralığı	P**
A549	1,17 ± 0,18	0,08	0,94 - 1,86	0,0123
CD - A549	3,20 ± 1,08	0,48	1,40 - 4,55	0,013
Calu1	0,33 ± 0,29	0,17	-0,40 - 0,63	
CD – Calu1	1,29 ± 0,26	0,15	1,06 - 1,95	

*Rölatif kantitasyon oranı, Ortalama ± standart sapma; **Student's t testi

4.4.2. Hücre serilerinin 14-3-3sigma ekspresyonlarının protein düzeyinde değerlendirilmesi

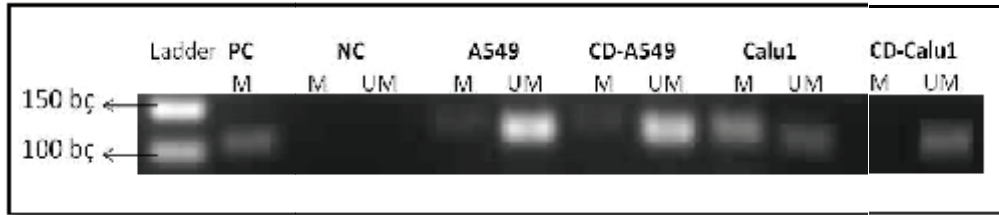
A549 ve Calu1 hücre serileri ile dirençli alt gruplarından izole edilen proteinler, 14-3-3sigma ve β -aktin spesifik antikorlar kullanılarak western blot analiziyle incelendiğinde, A549/CD-A549 ve Calu1/CD-Calul1 hücre serileri arasında protein düzeyi bakımından belirgin bir farklılık bulunamamıştır (Şekil 10).



Şekil 10. Kontrol ve cisplatin dirençli hücre serilerinden izole edilen proteinlerde western blot yöntemi ile belirlenen 14-3-3sigma protein bantları (14-3-3sigma~30 kDa ve Beta-aktin ~ 45 kDa).

4.4.3. Hücre serilerinin 14-3-3sigma metilasyon bulguları

14-3-3sigma geninin promoter bölgesindeki 3, 4, 8 ve 9. CpG dinükleotidlerinin metilasyon spesifik PCR (MS-PCR) analizi ile değerlendirilmesi sonucunda A549 ve CD-A549 hücre serilerinde her iki alelinde **unmetile** olduğu belirlenmiştir (Şekil 11). Calu1 hücre serisinde ise bir alel **metile**, diğer alel **unmetile** iken, CD-Calul hücre serisinde her iki alelin **unmetile** olduğu saptanmıştır (Şekil 11).



Şekil 11. A549 kontrol/dirençli ve Calu1 kontrol/dirençli hücre serilerinde 14-3-3sigma metilasyon spesifik PCR ürünlerinin % 2' lik jel görüntüsü (bç: bazçift, PC: Pozitif kontrol, NC: Negatif kontrol, M: Metile, UM: Metile değil - Unmetile)

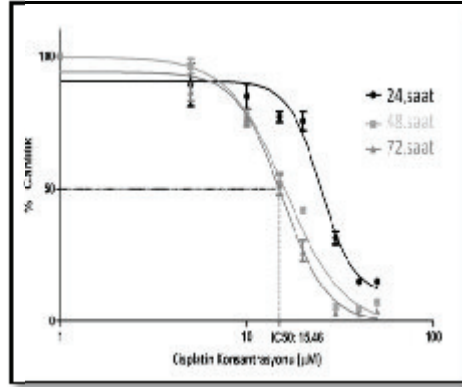
4.5. Hücre serilerine 14-3-3sigma siRNA transfeksiyonunun gen ekspresyon düzeyleri ve cisplatin yanıtına etkileri

Araştırmamızın bir diğer basamağında 14-3-3sigma gen ekspresyonunun susturulması amacıyla, hücre serilerine 14-3-3sigma mRNA' sına özgül 100 nM siRNA transfeksiyonu yapılmıştır. Bu işlemin A549, CD-A549 ve CD-Calul hücre serilerinde ekspresyon düzeylerinin sırasıyla % 66,67; % 77,00 ve % 86,70 oranlarında baskılanmasına neden olduğu belirlenmiştir (Grafik 15).



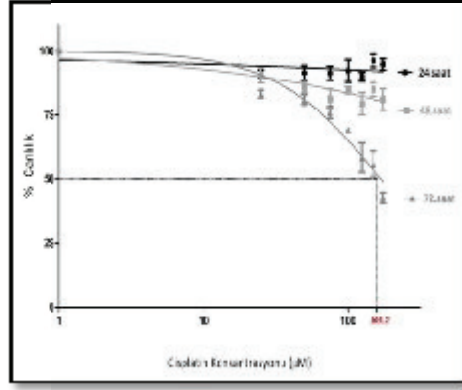
Grafik 15. A549, CD-A549 ve CD-Calul hücre serilerine 14-3-3sigma siRNA transfeksiyonunun gen ekspresyon düzeylerine etkileri

Hücre serileri ayrı ayrı incelendiğinde; siRNA transfeksiyonundan sonra A549 hücre serisinde cisplatin IC₅₀ dozunun **30,26 µM**’ dan **15,46 µM**’ a düştüğü gözlenmiştir (Grafik 16). Bu düşüş bize 14-3-3sigma ekspresyonunun baskılanmasının, cisplatin duyarlılığını anlamlı olarak arttırdığını göstermiştir (**p< 0.0001**; Tablo 10).



Grafik 16. 14-3-3sigma-siRNA transfeksiyonu yapılan A549 hücre serisinde cisplatin yanıtı ve 72. saat IC₅₀ değeri

CD-A549 hücre serisinde ise siRNA transfeksiyonu sonrasında cisplatinin IC₅₀ dozu **169,2 µM** olarak bulunmuştur (Grafik 17). 14-3-3sigma gen ekspresyonunun baskılanması CD-A549 hücre serisinin cisplatin duyarlılığını arttırarak IC₅₀ dozunu 198,2 µM’ dan 169,2 µM’ a düşürmüştür (Tablo 10), ancak bu düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlenmiştir (**p=0.13**).



Grafik 17. CD-A549-siRNA hücre serisinde cisplatin yanıtı ve IC₅₀ değeri

Tablo 10. 14-3-3sigma-siRNA transfeksiyonunun A549 hücre serisi ve alt gruplarında gen ekspresyon düzeyi ve cisplatin IC₅₀ dozuna etkileri

Hücre Serisi	14-3-3sigma ekspresyonu	% Azalma*	Cisplatin IC ₅₀ **	% Artış***	%95 Güven Aralığı	p
A549 kontrol	1,17	68	30,26	195	29,00 - 31,58	< 0,0001
A549 + siRNA	0,37		15,46		14,29 - 16,72	
CD-A549 kontrol	3,20	70	198,2	117	175,3 - 224,2	0,13
CD-A549 + siRNA	0,96		169,2		144,9 - 197,5	

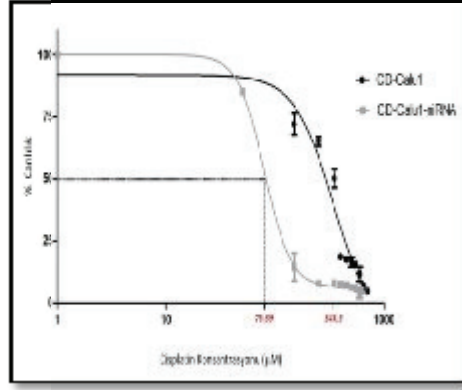
*14-3-3sigma siRNA transfeksiyonu ile baskılanan % gen ekspresyonu, **mikromolar, ***14-3-3sigma siRNA transfeksiyonu ile artan % cisplatin duyarlılığı, SH: Standart Hata

CD-Calul1 dirençli hücre serisini incelediğimizde ise 14-3-3sigma mRNA' sına özgül siRNA transfeksiyonundan sonra cisplatinin IC₅₀ dozu **79,69 µM** olarak bulunmuştur (Grafik 18). 14-3-3sigma gen ekspresyonunun baskılanmasının, bu hücre serisinde IC₅₀ dozunu **343,5 µM**' dan **79,69 µM**'a düşürdüğü ve cisplatin duyarlılığını anlamlı olarak arttırdığı belirlenmiştir (**p=0.0001**; Tablo 11).

Tablo 11. 14-3-3sigma siRNA transfeksiyonunun CD-Calul1 hücre serisinde gen ekspresyon düzeyi ve cisplatin IC₅₀ dozuna etkileri

Hücre Serisi	14-3-3sigma gen ekspresyonu*	Cisplatin IC ₅₀ dozu**	Standart hata	%95 Güven Aralığı	R2	p
CD-Calul1	1,29	343,5	1,12	270,8 – 435,7	0,95	< 0.0001
CD-Calul1-siRNA	0,28	79,69	1,03	74,62 – 85,10	0,99	

*rölatif oran; **mikromolar



Grafik 18. 14-3-3sigma-siRNA transfeksiyonu yapılan ve yapılmayan CD-Calul1 hücre serisinde cisplatine verilen yanıt ve IC₅₀ değeri

4.6. Hücre serilerine azasitidin uygulanmasının 14-3-3sigma gen ekspresyonu ve cisplatin yanıtına etkileri

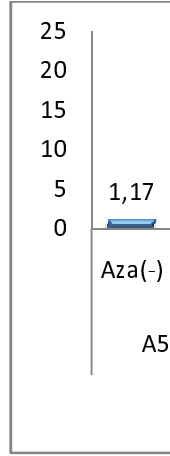
Çalışmamızda ayrıca hücre serilerinde yüksek düzeyde 14-3-3sigma ekspresyonu sağlamak amacıyla 5 µM 5-Aza-2-deoksisitidin (Azasitidin) uygulanmış (Grafik 19A) ve yüksek ekspresyon düzeylerinin cisplatin yanıtına etkileri araştırılmıştır.

A549 hücre serisine azasitidin uygulandıktan sonra kurulan sitotoksisite deneyinde cisplatinin IC₅₀ dozu **12,96 µM** olarak bulunmuş (Grafik 19B ve 20), bu uygulamanın A549-Aza hücre serisinde cisplatinin IC₅₀ dozunu % 58 oranında düşürdüğü saptanmıştır (**p=0,0008**).

CD-A549-Aza hücre serisinde ise cisplatinin IC₅₀ dozunun **133,8 µM** olduğu (Grafik 19B ve 21) ve azasitidin uygulamasının bu hücre serisinin cisplatin duyarlılığını % 68 oranında arttırdığı tespit edilmiştir (**p=0,0176**).

Calul1-Aza hücre serisinde ise azasitidin uygulanmasının cisplatin yanıtını değiştirmedığı belirlenmiştir (**p=0.8912**; Grafik 15 ve 22).

Dirençli olan CD-Calul1 hücre serisine azasitidin uygulandıktan sonra cisplatinin IC₅₀ dozunun **86,19 µM** olduğu (Grafik 15 ve 23) ve bu uygulamanın cisplatin duyarlılığını % 75 oranında arttırdığı saptanmıştır (**p=0,0086**).



Grafik 19. (A) Azasitik ekspresyon düzeylerine ve

Grafik 20. A549-Az

ERROR: typecheck
OFFENDING COMMAND: image

STACK:

-dictionary-
-mark-
-savelevel-
-mark-
-savelevel-