

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERİ HÜCRE SERİLERİNDE
14-3-3SİGMA EKSPRESYON VE METİLASYON DÜZEYLERİNİN
KEMOTERAPİ DİRENCİ GELİŐİMİNDEKİ ETKİLERİ**

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim
Doktora Tezi

Vildan BOZOK ÇETİNTAŞ

Tez DanıŐmanı
Prof. Dr. Nejat TOPÇUOĞLU

İZMİR
2011

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERİ HÜCRE SERİLERİNDE
14-3-3SİGMA EKSPRESYON VE METİLASYON DÜZEYLERİNİN
KEMOTERAPİ DİRENCİ GELİŐİMİNDEKİ ETKİLERİ**

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim
Doktora Tezi

Vildan BOZOK ÇETİNTAŞ

Tez DanıŐmanı
Prof. Dr. Nejat TOPÇUOĞLU

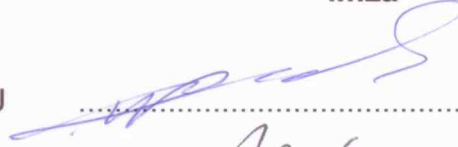
İZMİR
2011

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

Adı Soyadı

İmza

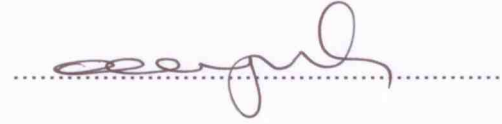
Başkan : Prof.Dr.Nejat TOPÇUOĞLU
(Danışman)



Üye : Prof.Dr.Meral SAKIZLI



Üye : Prof.Dr.Özgür ÇOĞULU



Üye : Doç.Dr.Zuhal EROĞLU



Üye : Yard.Doç.Dr.Buket KOSOVA



Doktora Tezinin kabul edildiği tarih: 27.06.2011

ÖNSÖZ

Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı Başkanımız ve danışmanım Sayın Prof. Dr. Nejat Topçuoğlu' na bana olan güveniniz, desteğiniz ve benim bu yola devam edebilmem için gösterdiğiniz çabaya sonsuz teşekkür ederim.

Yüksek lisans ve doktora eğitimimin her aşamasında desteğini esirgemeyerek bana yol gösteren, tezlerimle birlikte her türlü problemim için de danışmanım olan Sayın Doç. Dr. Zuhâl Eroğlu' na çok teşekkür ederim.

Karşılaştığımız problemlerde B, C, D... planları ile çözüm yolu üreterek yardımlarını esirgemediği ve birikimlerini benimle paylaştığı için Doç. Dr. Cumhur Gündüz' e çok teşekkür ederim.

Hocam, arkadaşım, dostum, nikâh şahidimiz, teyzemiz, Yard. Doç. Dr. Buket Kosova' ya gerçekten istediğim şeyleri yapabileceğimi gösterdiği ve enerjimi bittiğinde verdiği motivasyonlar için çok teşekkür ederim.

Ana Bilim Dalımızda; yıllardır aynı odayı paylaştığım arkadaşlarım Nur, Çığır ve Burçin'e, bugüne kadar paylaştığımız iyi veya kötü her günümüz için; sevgili kardeşlerim Aslı ve Ali' ye, samimiyetiniz ve her zaman yardımına koştuğunuz için; sevgili Özlem ve Sunde'ye, hücre kültürü laboratuvarında ki manevi desteğiniz için; Anabilim Dalımızın taze kanları Duygu, Çağdaş, Ayşegül, Müsteyde, Ezgi, Sevcan ve Tuğçe' ye, ayrıca Ana Bilim Dalımızın gizli kahramanları Anıl ve Gönül' e,

Fizyoloji Ana Bilim Dalından Uz. Dr. Oğuz Gözen'e plazmit transfeksiyonu aşamasındaki yardımları için,

Göğüs Hastalıkları Ana Bilim Dalından Sayın Doç. Dr. Gürsel Çok' a çalışmamın klinik aşamasında verdiğiniz destek için,

Hepinize çok teşekkür ederim...

Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalından Doç. Dr. Mehmet N. Orman' a çalışmamın istatistik aşamasındaki yardımlarınız için,

Abdülmecit Arıkan, Emre Tepedelen ve Bircan Isca Demir' e destekleri ile laboratuvar çalışmalarına katkıda buldukları için,

Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü' ne, tez projemin finansal desteğini sağladıkları için ayrıca teşekkürlerimi sunmak istiyorum.

Burada isimlerini anmadan geçemeyeceğim; Dr. Öner Özer ve Dr. Baysal Karaca, laboratuvarında çalışmanın temellerini bana öğrettiğiniz için; Prof. Dr. Rezan Tatlıdil, Prof. Dr. Haluk Soyuer, Doç. Dr. Türker Susmuş, bana yeni bir bakış açısı kattığınız için,

Bana öğrettiğiniz herşey için binlerce teşekkür...

Asıl gönül borcum aileme...

Anne ve babama; hep yanı başımda hissettiğim desteğiniz ve yaptığınız fedakarlıklar için, kardeşlerim Gülden ve Ayşe'ye; her zaman bana inandığınız ve yanımda olduğunuz için,

Sevgili eşim Bora' ya; hiç bitmeyen telaşlarımda her zaman yanımda olduğun, yaşadığımız ve yaşayacağımız tüm mutluluklar için,

ve oğlum Alp' e; yüzündeki gülümseme ile bana mutlulukların en büyüğünü yaşattığın ve senden çaldığım zamanlarda ders çalışmama izin verdiğin için....

Hepsine, herkese sonsuz teşekkürler...

Vildan Bozok Çetintaş

İzmir, 2011

İÇİNDEKİLER

1. BÖLÜM: GİRİŞ

1.1. GİRİŞ	1
1.2. GENEL BİLGİLER	3
1.2.1. Akciğer kanseri	3
1.2.2. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri	4
1.2.2.1. Etiyoloji	5
1.2.2.2. Histolojik sınıflandırma ve evreleme	6
1.2.2.3. Tedavi	6
1.2.2.3.1. Cerrahi tedavi.....	8
1.2.2.3.2. Radyoterapi.....	9
1.2.2.3.3. Kemoterapi.....	9
1.2.3. Cisplatin	11
1.2.3.1. Biyokimyasal etki mekanizması	13
1.2.3.1.1. Cisplatinin hücre içine alınışı (influx).....	13
1.2.3.1.2. DNA - adduct formlarının oluşması.....	14
1.2.3.1.3. Cisplatin – DNA - adduct formlarının tanınması.....	16
1.2.3.1.4. DNA hasarı sinyallerinin iletim yolları.....	16
1.2.3.1.5. Endoplazmik retikulum stresi.....	19
1.2.3.2. Direnç mekanizmaları	20
1.2.3.2.1. Cisplatinin hücre içine alınışı / hücre dışına atılışı.....	20
1.2.3.2.2. Cisplatinin tiyol içeren moleküller ile inaktivasyonu.....	21
1.2.3.2.3. DNA tamirinin artması.....	22
1.2.3.2.3.1. Nükleotid eksizyon tamiri.....	22
1.2.3.2.3.2. Yanlış eşleşme eksizyon tamiri.....	23
1.2.3.2.4. Adduct toleransı.....	23
1.2.3.2.4.1. Replikatif by-pass.....	23
1.2.3.2.4.2. Apoptozis.....	24
1.2.4. 14-3-3 proteinleri	26
1.2.4.1. 14-3-3 proteinlerinin yapısı	27
1.2.4.2. 14-3-3 hedef proteinleri	29
1.2.4.2.1. 14-3-3 ile bağlanan onkogenik ve proliferatif proteinler.....	30
1.2.4.2.2. 14-3-3 ile bağlanan tümör supressor proteinler.....	31
1.2.4.2.3. 14-3-3 ile bağlanan hücre döngüsü proteinleri.....	32
1.2.5. 14-3-3sigma izoformu	34
1.2.5.1. 14-3-3sigma proteininin fonksiyonları	36
1.2.5.2. 14-3-3sigma ekspresyonunun düzenlenmesi	39
1.2.5.3. 14-3-3sigma ekspresyonunun epigenetik mekanizmalarla susturulması	40
1.2.5.4. 14-3-3sigma ekspresyonunun diyagnostik değeri	42
1.2.5.5. 14-3-3sigma ekspresyonu ve kemoterapi yanıtı	43

2.	BÖLÜM: GEREÇ VE YÖNTEM	46
2.1.	Hücre kültürleri	46
2.1.1.	Kontrol hücre serisi kültürleri.....	46
2.1.2.	Cisplatin dirençli hücre serisi kültürlerinin oluşturulması	48
2.2.	Sitotoksosite deneyleri	50
2.2.1.	XTT sitotoksosite deneyleri.....	50
2.2.2.	WST-1 sitotoksosite deneyleri	52
2.3.	Hücre serilerinden DNA izolasyonu ve 14-3-3sigma metilasyon analizleri	53
2.3.1.	DNA izolasyonu.....	53
2.3.2.	DNA' nın bisüfitlenmesi.....	54
2.3.3.	14-3-3sigma metilasyon analizi.....	56
2.4.	Hücre serilerinden RNA izolasyonu ve 14-3-3sigma ekspresyon analizleri	57
2.4.1.	RNA izolasyonu.....	57
2.4.2.	cDNA elde edilmesi.....	58
2.4.3.	Kantitatif gerçek zamanlı PCR	59
2.5.	SDS-PAGE ve western blot analizleri	62
2.5.1.	Protein izolasyonu.....	62
2.5.2.	Protein tayini.....	63
2.5.3.	Solüsyonların hazırlanması.....	64
2.5.4.	Proteinlerin yüklenmesi ve elektroforez.....	65
2.5.5.	Transfer.....	65
2.5.6.	Bloklama.....	65
2.5.7.	Primer ve sekonder antikor ile muamale.....	66
2.6.	Hücre serilerine plazmit transfeksiyonu	67
2.6.1.	Luria broth (LB) besiyeri hazırlanması.....	67
2.6.2.	Agar plakların hazırlanması.....	68
2.6.3.	Plazmitlerin stab kültürden elde edilmesi.....	69
2.6.4.	Plazmit DNA izolasyonu.....	70
2.6.5.	Gliserol stoklarının hazırlanması.....	72
2.6.6.	Plazmit transfeksiyonu.....	72
2.6.6.1.	Transfeksiyonun optimizasyonu.....	72
2.6.6.2.	Sitotoksosite deneyleri için plazmit transfeksiyonu.....	76
2.7.	Hücre serilerine siRNA transfeksiyonu	76
2.7.1.	siRNA dizileri ve resüpsiyonu	76
2.7.2.	siRNA transfeksiyon kontrolleri.....	78
2.7.2.1.	SiGLO green transfeksiyon indikatörü.....	78
2.7.2.2.	siRNA kontrolleri.....	78
2.7.3.	siRNA transfeksiyonu için hücrelerin hazırlanması.....	80
2.7.4.	siRNA transfeksiyon protokolü.....	80
2.8.	Hücre serilerine azasitidin uygulanması	82
2.8.1.	Optimum azasitidin konsantrasyonunun belirlenmesi.....	82
2.8.2.	Azasitidin ve transfeksiyon solüsyonlarının sitotoksik etkilerinin belirlenmesi.....	83
2.9.	Sitokrom c salınımının analizi	84
2.9.1.	Sitokrom c salınımı analizinde kullanılacak solüsyonların hazırlanması.....	85
2.9.2.	Sitokrom c salınımı analiz edilecek örneklerin hazırlanması.....	86
2.9.3.	Deney protokolü.....	88
2.10.	Gen ekspresyon array analizleri	90
2.10.1.	RT-PCR array' in dizayn edilmesi.....	90
2.10.2.	RT-PCR array deney protokolü.....	94
2.11.	İstatistiksel analizler	96

3. BÖLÜM: BULGULAR	97
3.1. A549 ve Calu1 hücre serilerinin cisplatin IC ₅₀ dozları.....	98
3.2. Dirençli hücre serilerinin oluşturulması	99
3.3. Dirençli hücre serilerinin cisplatin IC ₅₀ dozları.....	100
3.4. Kontrol ve dirençli hücre serilerinin 14-3-3sigma profillerinin karşılaştırılması....	102
3.4.1. Hücre serilerinin 14-3-3sigma gen ekspresyonları	102
3.4.2. Hücre serilerinin 14-3-3sigma ekspresyonlarının protein düzeyinde değerlendirilmesi.....	104
3.4.3. Hücre serilerinin 14-3-3sigma metilasyon bulguları	104
3.5. Calu1 hücre serisine 14-3-3sigma plazmit transfeksiyonunun gen ekspresyon düzeyi ve cisplatin yanıtına etkileri.....	105
3.6. Hücre serilerine 14-3-3sigma siRNA transfeksiyonunun gen ekspresyon düzeyleri ve cisplatin yanıtına etkileri.....	106
3.7. Hücre serilerine azasitidin uygulanmasının 14-3-3sigma gen ekspresyonu ve cisplatin yanıtına etkileri.....	110
3.8. Hücre serilerinde Sitokrom-c salınımı bulguları.....	113
3.9. Hücre serilerinin gen ekspresyon profilleri.....	114
3.9.1. Calu1 hücre serisine 14-3-3sigma plazmit transfeksiyonunun gen ekspresyon profili üzerine etkileri.....	114
3.9.2. 14-3-3sigma siRNA transfeksiyonunun A549 hücre serisinde gen ekspresyon profiline etkileri.....	116
3.9.3. Cisplatin dirençli hücre serilerinin gen ekspresyon profilleri.....	117
3.9.4. 14-3-3sigma-siRNA transfeksiyonunun cisplatin dirençli hücre serilerinde gen ekspresyon profiline etkileri.....	122
3.9.5. Azasitidin uygulamasının cisplatin dirençli hücre serilerinde gen ekspresyon profiline etkileri.....	126
4. BÖLÜM: TARTIŞMA	131
4.1. 14-3-3sigma ekspresyonu ve cisplatin yanıtı.....	133
4.2. 14-3-3sigma ve p21 ilişkisi.....	135
4.3. 14-3-3sigma/p53/BRCA1 ilişkisi.....	136
4.4. Dirençli hücre serilerinin gen ekspresyon profilleri ve apoptoz yanıtları.....	137
4.5. Azasitidin uygulaması ve cisplatin yanıtı.....	140
5. BÖLÜM: SONUÇ VE ÖNERİLER	142
6. BÖLÜM: ÖZET VE ABSTRACT	144
6.1. Özet.....	144
6.2. Abstract.....	145
7. BÖLÜM: KAYNAKLAR	146
8. ÖZGEÇMİŞ	156

TABLO DİZİNİ

Tablo 1.1: TNM alt evrelendirme sistemi.....	7
Tablo 1.2: KHDAK' de TNM Sınıflandırılmasına Göre Evreleme.....	8
Tablo 1.3: KHDAK tedavilerinde hayatta kalma süreleri ve kemoterapiye yanıt oranları	10
Tablo 1.4: Cisplatin DNA- adduct formlarının yüzdeleri, DNA' yı bükme ve DNA' dan çözülme açıları.....	15
Tablo 1.5: 14-3-3 proteinleri ile bağlanan hücre döngüsü düzenleyicileri.....	33
Tablo 1.6: Epitel kökenli farklı tümör tiplerinde 14-3-3sigma geninin metilasyon yoluyla susturulması.....	42
Tablo 2.1. Metilasyon Spesifik PCR Reaksiyonu bileşenleri ve konsantrasyonları.....	57
Tablo 2.2. cDNA sentez reaksiyonu bileşenleri ve konsantrasyonları.....	59
Tablo 2.3. 14-3-3sigma gen ekspresyonunun analizinde kullanılan primer ve proplar.....	60
Tablo 2.4. RT-PCR reaksiyonu bileşenleri ve konsantrasyonları.....	61
Tablo 2.5. LightCycler Tagman PCR Protokolü.....	62
Tablo 2.6. Transfeksiyon kompleksinin optimizasyonunda kullanılan oranlar.....	73
Tablo 2.7. 14-3-3sigma özgül siRNA dizilerinin özellikleri.....	76
Tablo 2.8. RT-PCR array gen listesi	91
Tablo 2.9. LightCycler 480 cihazında kullanılan RT-PCR array çalışma programı.....	95
Tablo 3.1. Kontrol ve dirençli hücre serilerinden elde edilen 72. saat sitotoksosite veri setlerinin karşılaştırılması.....	101
Tablo 3.2. Kontrol ve dirençli hücre serilerinin 14-3-3sigma gen ekspresyonlarının rölatif oranlarının karşılaştırılması.....	103
Tablo 3.3. 14-3-3sigma plazmit transfeksiyonunun Calu1 hücre serisinde gen ekspresyon düzeyi ve cisplatin IC ₅₀ dozuna etkileri	105
Tablo 3.4. 14-3-3sigma-siRNA transfeksiyonunun A549 hücre serisi ve alt gruplarında gen ekspresyon düzeyi ve cisplatin IC ₅₀ dozuna etkileri	108
Tablo 3.5. 14-3-3sigma siRNA transfeksiyonunun CD-Calu1 hücre serisinde gen ekspresyon düzeyi ve cisplatin IC ₅₀ dozuna etkileri	109
Tablo 3.6. Calu1 hücre serisine 14-3-3sigma plazmit transfeksiyonundan sonra ekspresyon düzeyleri artış ve azalış yönünde değişen genler.....	115
Tablo 3.7. 14-3-3sigma siRNA transfeksiyonu yapılan A549 hücre serisinde artan ve azalan gen ekspresyon düzeyleri.....	117
Tablo 3.8. CD-A549 hücre serisinde oluşan gen ekspresyon değişimleri.....	118
Tablo 3.9. CD-Calu1 hücre serisinde oluşan gen ekspresyon değişimleri.....	120
Tablo 3.10. CD-A549 hücre serisinde 14-3-3sigma' nın baskılanması ile ekspresyonu artan ve azalan genler.....	123
Tablo 3.11. 14-3-3sigma ekspresyonunun baskılanması ile A549 ve CD-A549 hücre serilerinde ekspresyonu değişen genler.....	124
Tablo 3.12. CD-Calu1 hücre serisine 14-3-3sigma-siRNA transfeksiyonu ile ekspresyonu artan ve azalan genler.....	125
Tablo 3.13. Azasitidin uygulanan CD-A549 hücre serisinde ekspresyon düzeyi artan ve azalan hücre döngüsü genleri.....	126
Tablo 3.14. Azasitidin uygulanan CD-A549 hücre serisinde ekspresyon düzeyi artan ve azalan genler.....	127
Tablo 3.15. Azasitidin uygulanan CD-Calu1 hücre serisinde ekspresyon düzeyi artan genler.....	129

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1.1: Cisplatin' in biyokimyasal etki mekanizması.....	13
Şekil 1.2: Cisplatin ile oluşan DNA-adduct formları.....	15
Şekil 1.3: Cisplatin direncinin moleküler mekanizmaları.....	25
Şekil 1.4: 14-3-3 proteinlerinin yapısı.....	28
Şekil 1.5: 14-3-3 proteinleri ile apoptozun inhibisyonu.....	31
Şekil 1.6: 14-3-3 proteinleri ile hücre döngüsünün düzenlenmesi	33
Şekil 1.7: 14-3-3sigma proteinlerinin yapısı.....	35
Şekil 1.8: Hücre döngüsünün transkripsiyonal düzenlenmesinde 14-3-3 proteinleri.....	37
Şekil 1.9: 14-3-3sigma' nın fonksiyonları ve düzenlenmesi.....	39
Şekil 2.1: Düşük ve yüksek yoğunluktaki A549 hücre serileri.....	47
Şekil 2.2: Calu-1 hücre serisi.....	47
Şekil 2.3: Cisplatin dirençli A549 hücre serisi (CD-A549).....	48
Şekil 2.4: Cisplatin dirençli Calu1 hücre serisi (CD-Calu1).....	49
Şekil 2.5: XTT ve WST sitotoksosite deneylerinde kullanılan 96 kuyucuklu plate formatı ve uygulanan cisplatin konsantrasyonları.....	51
Şekil 2.6: ELISA okuyucuda ölçümü yapılan cisplatin sitotoksosite deneyinin 1. gün verileri.....	52
Şekil 2.7: 14-3-3sigma DNA dizisindeki CpG adacıkları ve MS-PCR ile çoğaltılan gen bölgesi.....	56
Şekil 2.8: GADPH standart eğrisi.....	61
Şekil 2.9: Protein tayininde kullanılan BSA standart eğrisi.....	63
Şekil 2.10: Plazmit pcDNA3 HA 14-3-3sigma' nın özellikleri.....	68
Şekil 2.11: Plazmit pEGFP-N1 Haritası	69
Şekil 2.12: Plazmit DNA' sının elde edilmesi sırasında uygulanan aşamalar.....	70
Şekil 2.13: pEGFP-N1 Plazmit transfeksiyonun optimizasyonu.....	74
Şekil 2.14: Calu-1 hücre serisine pEGFP-N1 plazmit transfeksiyonu.....	75
Şekil 2.15: A549 hücre serisine transfeksiyon indikatörü siGLO transfeksiyonu.....	79
Şekil 2.16: Homojenizasyon işleminden sonra Js-1 ile boyanmış hücre lizati.....	87
Şekil 2.17: Sonikasyon işleminden sonra Js-1 ile boyanmış hücre lizati.....	88
Şekil 2.18: Sitokrom c analizinde kullanılan mikropate.....	89
Şekil 2.19: RT-PCR array formatı.....	94
Şekil 2.20: RT-PCR array analizi sonucunda elde edilen amplifikasyon eğrileri.....	95
Şekil 3. 1. A549 ve Calu1 hücre serilerinden çalışma yapılan alt gruplar	98
Şekil 3.2. Kontrol ve cisplatin dirençli hücre serilerinden izole edilen proteinlerde western blot yöntemi ile belirlenen 14-3-3sigma protein bantları	104
Şekil 3.3. A549 kontrol/dirençli ve Calu1 kontrol/dirençli hücre serilerinde 14-3-3sigma metilasyon spesifik PCR ürünlerinin % 2' lik jel görüntüsü.....	105
Şekil 4.1. Hücre serilerinde 14-3-3sigma gen ekspresyonunun baskılanması ile ekspresyon düzeyi artan ve azalan genler arasındaki etkileşimler.....	140

GRAFİK DİZİNİ

Grafik 2.1. Dirençli hücre serilerinin oluşturulması sırasında kullanılan cisplatin dozları.....	49
Grafik 2.2. Calu-1 hücre serisinde 14-3-3sigma plazmit transfeksiyonu yapıldıktan 48, 72, 96 saat sonra gen ekspresyon düzeyleri.....	75
Grafik 2.3. A549 hücre serisine siRNA transfeksiyonundan sonra GADPH ekspresyonu.....	81
Grafik 2.4. A549 hücre serisine siRNA transfeksiyonundan sonra 14-3-3sigma ekspresyonu..	81
Grafik 2.5. A549 hücre serisine azasitidin uygulandıktan sonra 14-3-3sigma ekspresyon düzeyleri.....	83
Grafik 2.6. Azasitidin, dharmafect ve fugene solüsyonlarının sitotoksik etkileri.....	84
Grafik 2.7. Sitokrom c standart eğrisi.....	90
Grafik 3.1. A549 hücre serisinin 24, 48 ve 72. saatlerde cisplatin yanıtı ve 72. saat IC ₅₀ değeri.....	99
Grafik 3.2. Calu1 hücre serisinin 24, 48 ve 72. saatlerde cisplatin yanıtı ve 72. saat IC ₅₀ değeri	99
Grafik 3.3. CD-A549 hücre serisinin oluşturulması sırasında elde edilen IC ₅₀ dozları.....	100
Grafik 3.4. CD-Calul1 hücre serisinin oluşturulması sırasında elde edilen IC ₅₀ dozları.....	100
Grafik 3.5. CD-A549 hücre serisinin 24, 48 ve 72. saatlerde cisplatin yanıtı ve 72. saat IC ₅₀ değeri	101
Grafik 3.6. Kontrol ve cisplatin dirençli A549 hücre serilerinin 72. saat IC ₅₀ dozlarının karşılaştırılması.....	101
Grafik 3.7. CD-Calul1 hücre serisinin 24, 48 ve 72. saatlerde cisplatin yanıtı ve 72. saat IC ₅₀ değeri	102
Grafik 3.8. Kontrol ve cisplatin dirençli Calul1 hücre serilerinin 72. saat IC ₅₀ dozlarının karşılaştırılması.....	102
Grafik 3.9. Kontrol ve dirençli hücre serilerinin 14-3-3sigma gen ekspresyonlarının karşılaştırılması.....	103
Grafik 3.10. 14-3-3sigma plazmit transfeksiyonu yapılan Calul1 hücre serisinde cisplatin yanıtı ve 72. saat IC ₅₀ değeri	106
Grafik 3.11. A549, CD-A549 ve CD-Calul1 hücre serilerine 14-3-3sigma siRNA transfeksiyonun gen ekspresyon düzeylerine etkileri.....	107
Grafik 3.12. 14-3-3sigma-siRNA transfeksiyonu yapılan A549 hücre serisinde cisplatin yanıtı ve 72. saat IC ₅₀ değeri.....	107
Grafik 3.13. CD-A549-siRNA hücre serisinde cisplatin yanıtı ve IC ₅₀ değeri.....	108
Grafik 3.14. 14-3-3sigma-siRNA transfeksiyonu yapılan ve yapılmayan CD-Calul1 hücre serisinde cisplatine verilen yanıt ve IC ₅₀ değeri.....	109
Grafik 3.15. (A) Azasitidin uygulamasının hücre serilerindeki 14-3-3sigma gen ekspresyon düzeylerine ve (B) cisplatin IC ₅₀ dozlarına etkisi	110
Grafik 3.16. A549-Aza hücre serisinde cisplatin yanıtı ve 72. saat IC ₅₀ değeri.....	111
Grafik 3.17. Azasitidin uygulanan ve uygulanmayan CD-A549 hücre serisinde cisplatine verilen yanıt ve IC ₅₀ değerleri.....	111
Grafik 3.18. Calul1-Aza hücre serisinde cisplatin yanıtı ve IC ₅₀ değeri.....	112
Grafik 3.19. Azasitidin uygulanan ve uygulanmayan CD-Calul1 hücre serisinde cisplatin yanıtı ve IC ₅₀ değeri.....	112
Grafik 3.20. Hücre serilerinde cisplatin ile apoptozun indüklenmesinden 24 ve 48 saat sonra sitokrom c düzeyleri.....	113
Grafik 3.21. Calul1 ve Calul1-plazmit hücre serilerinde gen ekspresyon değişimlerinin karşılaştırılması.....	115
Grafik 3.22. 14-3-3sigma siRNA transfeksiyonu yapılan A549 hücre serisinde gen ekspresyon düzeylerinin değişimi.....	116
Grafik 3.23. CD-A549 hücre serisinin gen ekspresyon değişimleri.....	119
Grafik 3.24. CD-Calul1 hücre serisinin gen ekspresyon değişimleri.....	121

Grafik 3.25. 14-3-3sigma-siRNA transfeksiyonu yapılan CD-A549 hücre serisinde gen ekspresyonlarının değişimi.....	122
Grafik 3.26. 14-3-3sigma-siRNA transfeksiyonu yapılan CD-Calul hücre serisinde gen ekspresyonlarının değişimi.....	124
Grafik 3.27. Azasitidin uygulanan CD-A549 hücre serisinde meydana gelen gen ekspresyonu değişimleri.....	128
Grafik 3.28. CD-Calul-Aza hücre serisinde ekspresyon düzeyi artan apoptoz genleri ve artış oranları.....	129
Grafik 3.29. CD-Calul-Aza hücre serisinde ekspresyon düzeyi artan hücre döngüsü genleri ve artış oranları.....	130

KISALTMALAR

- 5-Aza:** 5-Aza-2'deoksisisitidin
AKT: v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1, Protein Kinaz B
BAD: BCL2-associated agonist of cell death
Bax: Bcl2-associated X protein
Bcl2: B-cell CLL/lymphoma 2
Bcr: Breakpoint cluster region; Kırılma bölgesi dizisi
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
Cds1: CDP-diacylglycerol synthase
CHK1: Checkpoint kinase 1; Hücre siklusu kinazı 1
DNA: Deoksiribonükleik asit
EFP: E3 Ubikitin Ligaz
EGFR: Epidermal growth factor receptor
EIF2A: Eukaryotic translation initiation factor 2A
ER: Endoplazmik retikulum
ERCC1: Excision repair cross-complementing 1
Foxo: Forkhead transcription factors
GAPDH: Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz
GSH: Glutathione
H1: Histon 1
HDACs: Histon deasetilazlar
HMG: High mobility group proteinleri
hMLH1: MutL homolog 1
KHAK: Küçük hücreli akciğer kanseri
MAPK: Mitogen-activated protein kinase 1
MBD2: Metil-CpG-bağlayıcı protein 2
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
PI3K : Phosphotidylinositol 3 kinase
PKA: Protein Kinaz A
PKC: Protein Kinaz C
RB: Retinoblastoma tümör supressor proteini

RNA: Ribonükleik asit
RPA: Replikasyon protein A
SAGE: Serial analyses of gene expression
SFN: Stratifin
TFIIH: Trankripsiyon faktörü IIH
TP53: Tümör protein 53
TSA: Trichostatin A
UPR: Unfolded protein response (Katlanmamış protein yanıtı)
VEGF: Vascular endothelial growth factor
XIAP: X-bağlı apoptozis inhibitörü
XPA: Xeroderma pigmentosum, complementation group A
XPC: Xeroderma pigmentosum complementary group C
XPF: Xeroderma pigmentosum complementary group F