



**(R)-Klavuzon Z'nin Karaciğer Kanseri Hücreleri ve Karaciğer
Kanser Kök Hücreleri Üzerindeki Antikanser Özelliklerinin
İncelenmesi**

Proje No: 113S464

Proje Yürütücüsü: Doç.Dr. Ali Çağır
Araştırmacı: Murat Delman
Danışman: Prof. Dr. Esra Erdal

OCAK 2015
İZMİR

Önsöz

2014 yılında 1002 Hızlı Destek Programı kapsamında TÜBİTAK tarafından desteklenmeye başlayan 113S464 nolu bu proje kapsamında literatürde ilk defa grubumuzca sentezlenen (R)-Klavuzon Z'nin HuH-7 (karaciğer kanser) hücreleri ve Huh-7 EpCAM+/CD133+, Huh-7 EpCAM-/CD133- (karaciğer kanser) kök hücreleri üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkileri araştırılmıştır. Literatürde daha önce kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri bilinen bu maddenin kanser tedavisindeki en önemli direnç mekanizmalarından birisi olan kanser kök hücreleri üzerinde de antiproliferatif etkisinin olup olmadığı belirlenmeye çalışılmıştır. Ayrıca molekülün hücre döngüsü üzerindeki etkisi ile HDAS (histon deasetilaz) enzimleri üzerindeki inhibisyon etkisinin olup olmadığının belirlenmesine çalışılmıştır.

İçindekiler

Şekil Listesi.....	iii
Tablo Listesi.....	iv
Özet.....	v
Abstract.....	vi
1. Giriş.....	1
2. Gereç ve Yöntem.....	8
2.1. Kimyasal Maddeler ve Hücreler	8
2.2. Hücre Kültürü	8
2.3. Manyetik Hücre Seperasyonu ile Kanser Kök Hücrelerinin İzolasyonu (MACS).....	8
2.4. Sitotoksosite Analizi.....	9
2.4.1. Sülfrodamin B Metodu.....	9
2.4.2. MTT Metodu.....	9
2.5. Hücre Döngüsü Analizi	10
2.6. Apoptoz Analizi.....	11
2.7. <i>In vitro</i> Histon Deasetilaz (HDAS) Enzim Aktivite Ölçümü	11
2.8. <i>In vivo</i> Histon Deasetilaz (HDAS) Enzim Aktivitesi Ölçümü.....	11
2.9. Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile p21 ve p27 Ekspresyonunun Belirlenmesi.	12
2.10. Western Blot ile Histon Proteinlerinin Asetilasyon Analizi	12
3. Bulgular.....	14
3.1. Sitotoksosite Analizi.....	14
3.2. Hücre Döngüsü Analizi.....	18
3.3. Apoptoz Analizi.....	19
3.4. <i>In vitro</i> Histon Deasetilaz (HDAS) Enzim Aktivite ölçümü.....	23
3.5. <i>In vivo</i> (hücre temelli) Histon Deasetilaz (HDAS) Enzim Aktivitesi ölçümü.....	24
3.6. Kantitative Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile p21 ve p27 Ekspresyonunun Belirlenmesi.....	25
3.7. Western Blot ile Histon Proteinlerinin Asetilasyon Analizi.....	26
4. Tartışma.....	27
4.1. Sitotoksosite Analizi	27
4.2. Hücre Döngüsü Analizi.....	28
4.3. Apoptoz Analizi.....	28
4.4. <i>In vitro</i> Histon Deasetilaz (HDAS) Enzim Aktivite Ölçümü	29
4.5. <i>In vivo</i> (hücre temelli) Histon Deasetilaz (HDAS) Enzim Aktivitesi Ölçümü.....	30
4.6. Western Blot ile Histon Proteinlerinin Asetilasyon Analizi.....	30
5. Sonuç	32
6. Kaynaklar	34

Şekil Listesi

Şekil 1. (R)-Klavuzon Z molekülünün yapısı.....	6
Şekil 2. (R)-Klavuzon Z molekülünün konsantrasyona bağlı olarak HTC116 p53 ^{-/-} ve HTC116 p53 ^{+/+} hücre hatlarında hücre döngüsü ve apoptotik etkileri.....	7
Şekil 3. (R)-Klavuzon Z molekülünün HTC116 p53 ^{+/+} ve HTC116 p53 ^{-/-} hücre hatlarında konsantrasyona bağlı p53 (tümör baskılayıcı) ve pNBS1 (çift sarmal DNA kırıklarının onarılmasında etken) gen ekspresyon seviyeleri.....	7
Şekil 4. (R)-Klavuzon Z'nin Huh-7 Parental Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin SRB ve MTT deneyleri ile Karşılaştırmalı Analizi.....	14
Şekil 5. (R)-Klavuzon Z'nin HuH7 Parental Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksik Etkisi.....	15
Şekil 6. (R)-Klavuzon Z'nin HuH7 EpCAM ⁺ /CD133 ⁺ Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksik Etkisi.....	15
Şekil 7. (R)-Klavuzon Z'nin HuH7 EpCAM ⁻ /CD133 ⁻ Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksik Etkisi.....	16
Şekil 8. (R)-Klavuzon Z'nin HuH7 Hücre Hatları Üzerindeki Karşılaştırmalı Sitotoksik Etkisi.....	17
Şekil 9. (R)-Klavuzon Z'nin HuH7 Parental Hücrelerinin Hücre Döngüsü Üzerine Etkisi.....	18
Şekil 10. (R)-Klavuzon Z'nin HuH7 EpCAM ⁺ /CD133 ⁺ Hücrelerinin Hücre Döngüsü Üzerine Etkisi.....	18
Şekil 11. (R)-Klavuzon Z'nin HuH7 EpCAM ⁻ /CD133 ⁻ Hücrelerinin Hücre Döngüsü Üzerine Etkisi.....	19
Şekil 12. (R)-Klavuzon Z'nin HuH7 Parental Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkisi.....	20
Şekil 13. (R)-Klavuzon Z'nin HuH7 EpCAM ⁺ /CD133 ⁺ Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkisi.....	21
Şekil 14. (R)-Klavuzon Z'nin HuH7 EpCAM ⁻ /CD133 ⁻ Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkisi.....	22
Şekil 15. (R)-Klavuzon Z'nin HuH7 Hücre Hatlarından İzole Edilen Histon Deasetilaz Enzimleri Üzerindeki <i>in vitro</i> Etkisi.....	23
Şekil 16. (R)-Klavuzon Z'nin HuH7 Hücre Hatlarında Eksprese Edilen Histon Deasetilaz Enzimleri Üzerindeki İnhibitör Etkisi.....	24
Şekil 17. p21 ve p27 PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Görüntüleri.....	25
Şekil 18. (R)-Klavuzon Z'nin HuH7 Parental Hücrelerindeki H3K27 Bölgesinin Asetilasyon ve Metilasyon Profiline Etkisi.....	26

Tablo Listesi

Tablo 1. p21 ve p27 PZR Karışımı.....	25
Tablo 2. p21 ve p27 PZR Koşulları.....	25

Özet

Hepatosellüler karsinoma (HSK); dünya çapında en sık görülen beşinci kanser tipi olup kanser sebebiyle olan ölümlerin üçüncü sıradaki nedenidir. HSK ölümcül bir hastalık olup bu hastalığa sahip insanların 5 yıllık yaşam süreleri oranı % 0-14 gibi düşük bir orana sahiptir. HSK'da yaşam süresi teşhisten itibaren 6 ay gibi kısa bir süre olabilmektedir. Sorafenib ve diğer sinyal inhibitörleri gibi farmasötik ajanlar ve trans-arteriyel kemo-embolizasyon, perkütan etanol enjeksiyonu gibi yöntemler de hastalığın prognozunu iyileştirememektedir. Bu nedenle hepatosellüler karsinoma (HSK) tedavisinde kullanılabilecek yeni ajanların keşfi ve işleyiş mekanizmalarının belirlenmesi büyük önem taşımaktadır.

Hücrelerdeki gen regülasyonunda DNA'nın yanı sıra histon proteinlerinin epigenetik modifikasyonunda çok büyük bir önemi vardır. Epigenetik modifikasyonlardan birisi de histon asetilasyonudur ve hücre çoğalması, farklılaşması ve homeostas için gereklidir. Histon deasetilazlar (HDAS); asetil gruplarını histon proteinlerinden ve histon olmayan bazı diğer proteinlerden uzaklaştırarak kromatinin yoğunlaşmasını ve transkripsiyonel represyonu sağlarlar. Bu süreçteki bozuklukların kansere sebep olabildiği ve pek çok kanser tipinde HDAS'ların aşırı ekspresyonu saptanmıştır. HDAS'ların aşırı aktivite göstermesiyle histonlardan asetil grupları uzaklaştırılıp tümör baskılayıcı genler eksprese edilememektedir. Hepatosellüler karsinoma'da HDAS'ların önemli bir rolü olduğu çok sayıda çalışmayla gösterilmiştir.

Bu sebeple yeni HDAS inhibitörlerinin keşfiyle kromatinin tekrar asetillenmesi ve tümör baskılayıcı genlerin eksprese edilmesi amaçlanmaktadır. Bu çalışmada daha önce ilk defa grubumuzca sentezlenen ve anti-kanser özelliği gösterilen (R)-Klavuzon Z ajanının HSK hücreleri ve karaciğer kanser kök hücreleri (Huh-7 parental, Huh-7 EpCAM⁺/CD133⁺, Huh-7 EpCAM⁻/CD133⁻) üzerindeki sitotoksik etkisi ve önemli yollardaki rolü; sitotoksik aktivite analizi, apoptoz analizi, in vitro ve in vivo HDAS enzim aktivite ölçümü, p21 ve p27 ekspresyon analizi, HDAS inhibisyonu ile ilişkili protein ekspresyon seviyelerinin western blot ile analizi yapılmıştır.

Araştırmalarımız sonucunda (R)-Klavuzon Z'nin Huh-7 parental hücrelerini 1,25 µM , Huh-7 EpCAM⁺/CD133⁺ hücrelerini 2,5 µM, Huh-7 EpCAM⁻/CD133⁻ hücrelerini de 1,25 µM gibi düşük bir konsantrasyonlarda hücre popülasyonlarının sayısını yarisına indirdiği, 1 µM konsantrasyonda üç hücre hattında da G1 fazında birikmeye sebep olduğu, 10 µM konsantrasyonda üç hücre hattı için erken ve geç apoptozu tetiklediği, in vitro koşullarda sınıf I ve Sınıf II histon deasetilazları inhibe etmediği ancak hücre içindeki histon deasetilazları 0,1 µM gibi düşük bir konsantrasyonda dahi inhibe ettiği bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Klavuzon Z, hepatosellüler karsinoma, karaciğer kanseri, kanser kök hücresi, sitotoksik aktivite, apoptoz, histon deasetilaz inhibisyonu

Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the fifth most seen cancer type and the third leading cause of cancers. HCC is a fatal disease and HCC patients have such a low ratio of 5-year survival rate of 0-14%. Survival time in HCC can be as short as 6 months since diagnosis. Prognosis of the disease can not be enhanced with sorafenib, signal inhibitors and trans-arterial chemoembolisation, percutaneous ethanol injection. As a result of these preventions, discovery and identified mechanism of new therapeutic agents are required for HCC treatment.

Besides DNA, epigenetic modification of histone proteins has important roles in gene regulation of cells. One of the epigenetic modification is histone acetylation and is responsible for cell proliferation, differentiation and homeostasis. Histone deacetylases (HDAC) provide chromatin compaction and transcriptional repression by removing acetyl groups from histone proteins and non-histone proteins. Errors in these processes have been shown to cause cancer and high expression of HDACs was detected in various cancer types. As a result of HDAC overexpression and removal of acetyl groups from histones, tumor suppressor genes can not be expressed. The importance of HDACs in HCC were reported in many studies.

Re-acetylation of chromatin and re-expression of tumor suppressor genes with the discovery of novel HDAC inhibitors is a therapeutic target in cancer research. In this project, cytotoxic effects and roles of (R)-Klavuzon Z that was firstly synthesized and shown to have anti-cancer properties in important pathways was investigated on hepatocellular carcinoma cells (Huh-7 parental) and HCC stem cells (Huh-7 EpCAM⁺/CD133⁺, Huh-7 EpCAM⁻/CD133⁻) by cytotoxic activity assay, apoptosis analysis, in vitro and in vivo HDAC enzyme activity measurement, p21 and p27 expression analysis, expression analysis of proteins related to HDAC inhibition by western blotting.

In this study, we found that IC₅₀ value of (R)-Klavuzon Z for Huh-7 parental cells is 1,25 µM, for Huh-7 EpCAM⁺/CD133⁺ cells is 2,5 µM, for Huh-7 EpCAM⁻/CD133⁻ cells is 1,25 µM. We observed G1 arrest for all three cell lines with 1 µM of (R)-Klavuzon Z and increased early and late apoptosis with 10 µM of (R)-Klavuzon Z. We showed that (R)-Klavuzon Z does not inhibit histone deacetylase enzymes in vitro whereas it inhibits histone deacetylase enzymes inside the cells with 0,1 µM of (R)-Klavuzon Z.

Keywords: Klavuzon Z, hepatocellular carcinoma, liver cancer, cancer stem cell, cytotoxic activity, apoptosis, histone deacetylase inhibition

1. GİRİŞ

Hepatosellüler Karsinoma (HSK), dünya çapında en sık görülen beşinci kanser tipi olup kanser sebebiyle olan ölümlerin üçüncü sıradaki nedenidir ve bu hastalığa sahip insanların 5 yıllık yaşam süreleri oranı % 0-14 gibi düşük seviyededir (Jemal ve ark., 2011). HSK'da yaşam süresi teşhisten itibaren 6 ay gibi kısa bir süre olabilmektedir (Sherman ve ark., 2011). Varolan tedaviler arasında kısmi karaciğer reseksiyonu ve karaciğer transplantasyonu gibi uygulamalar vardır. Ancak bu uygulamalara az sayıdaki vakalar uygunluk gösterebilmektedir. Sorafenib ve diğer sinyal inhibitörleri gibi farmasötik ajanlar ve trans-arteriyel kemo-embolizasyon, perkütan etanol enjeksiyonu gibi yöntemler de hastalığın prognozunu iyileştirememektedir (Llovet ve ark., 2008). Bu nedenle HSK tedavisinde kullanılacak alternatif yeni ilaç ve metodların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Somatik kök hücreler, dokularda bulunan ve pek çok hücre bölünmesi geçirip hem kök hücre popülasyonunu hem de farklılaşma geçirerek bulunduğu dokuya özgü hücrelere dönüşebilen hücrelerdir. Kök hücrelerin temel iki özellikleri vardır; kendini yenileme ve farklılaşma. Kendini yenileme; kök hücrenin kendisi gibi aynı gelişim ve replikasyon potansiyeline sahip başka bir kök hücre üretebilmesidir. Farklılaşma ise dokuya özgü özelleşmiş hücreleri üretebilme yeteneğidir. Pek çok organ ve dokuda en uzun yaşam süresine sahip olan hücreler kök hücrelerdir. Bu bölgelerde ölen hücrelerin yerini almak için ya da organın zarar görmesi durumunda yenilenmesi için görevlidirler. Bu uzun süreç içerisinde de diğer hücrelere kıyasla çevresel toksik maddelere daha fazla maruz kalmakta ve bu sebeple genomlarında transformasyona neden olabilecek mutasyonlar görülebilmektedir (Lobo ve ark. 2007). Bu mutasyonlar, normal kök hücrelerin kendini yenilemesinde görevli Wnt, Notch, Hedgehog yolları ile PTEN, TP53 gibi tümör baskılayıcı genlerin regülasyonunu değiştirerek kanser kök hücresine (KHK) dönüşmesine neden olmakta ve bu hücrelere kontrolsüz kendini yenileme ve varolan terapötik ajanlara dirençli tümör oluşturma özelliği kazandırmaktadır (Signore ve ark., 2013). Dolayısıyla dokudaki kanser hücreleri öldürülse bile o bölgede bulunan kanser kök hücreleri (KHK) kendilerini yenileyerek ve değişim geçirerek tekrar kanser hücreleri üretmektedir. Kanser kök hücrelerini apoptoza yönlendirecek spesifik terapötik ajanların geliştirilmesi kanserin tekrar etme olasılığını çok büyük oranda azaltacaktır.

Kanser kök hücrelerinin, hepatosellüler karsinomaya sebep olabileceği kök hücre benzeri özelliklere sahip Huh-7 ve PLC5 hücreleri ile alt popülasyon (side population) hücreleri kullanılarak gösterilmiştir (Chiba ve ark., 2006). Huh-7 hücrelerinde yapılan bir çalışmada MYBL2 transkripsiyon faktörü ile regüle edilen histon deasetilaz 10 (HDAS10)'un ekspresyonunun yüksek miktarda arttığı ve ayrıca c-Myc ve E2F1 transgenik farede HDAC10 protein ekspresyonunun normal karaciğerden HSK karaciğerine doğru hızlı bir şekilde arttığı görülmüştür (Calvisi ve ark. 2011). Ayrıca hem CD133⁺ hem de Aldehid Dehidrogenaz (ALDH1A1) ekspresyonu olan hücreler, CD133⁺/ALDH⁺ ve CD133⁻/ALDH⁻ hücrelere kıyasla hem *in vivo* da hem de *in vitro* da daha fazla tümör oluşturma özelliğine sahiptirler (Ma ve ark., 2008). Hepatosellüler karsinomadan izole edilen CD133⁺ hücreler *in vivo* da yüksek tümör oluşturma özelliğine sahiptirler (Ma ve ark., 2007).

Hepatokarsinogenezin oluşumundan sorumlu viral enfeksiyonlar, hepatotoksik ajanlar, genetik mutasyonlar bazı hücre sinyal yollarını ve gen ekspresyon profillerini değiştirmektedir. Genel olarak

HSK'da tanımlanmış mutasyonların sebep olduğu değişiklikler; onkogenlerin (β -katenin, Axin1, PI-3-kinaz, K-ras) aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin (p53, Rb1, CDKN2A, IGF2R, PTEN) inaktivasyonu şeklinde özetlenebilir (Aravalli ve ark., 2008). Karaciğer kanser kök hücrelerindeki sinyal yolları Wnt/ β -katenin, TGF- β , NOTCH, Hedgehog ve Bmi1 sinyal yolları şeklinde sıralanabilir.

Wnt/ β -katenin sinyal yolağı hepatokarsinogenezde yer alan temel sinyal kaskat yollarından biridir. Bu yolaktaki en önemli faktör β -katenin genidir (de La Coste ve ark., 1998). β -katenin protein seviyesi GSK-3 β kompleksi tarafından fosforilasyon ile regüle edilir. β -katenin fosforillendiği zaman ubiquitin-proteazom yolağı ile hemen degrade edilir (Laurent-Puig 2001). β -katenin degradasyon yolağında oluşabilecek bir inhibisyon, β -katenin'in birikip nükleus'a taşınmasına ve nükleusta hücre büyümesi ve apoptoz ile ilgili genleri aktive etmesine sebep olur (Liu ve ark., 2010). EpCAM, Wnt/ β -katenin yolağının doğrudan bir transkripsiyon hedefidir ve EpCAM⁺ HSK hücreleri tümör oluşumu ve invazyonu ile ilişkilidir (Yamashita ve ark., 2009). Wnt/ β -katenin yolağındaki bozulmalar genetik ya da epigenetik sebeplerden kaynaklanıp başta hepatosellüler karsinoma ve kolon kanseri olmak üzere pek çok kansere neden olur. Mutasyonla ya da mutasyon olmadan ortaya çıkan Wnt/ β -katenin regülasyon bozukluğu HSK'nın üçte birinde görülmekle beraber bu yolağın hastalığın tedavisi için önemini arttırmaktadır (Reya ve ark., 2005, Cerdan 2010). Bu sonuçlar Wnt/ β -katenin yolağının kanser kök hücrelerinin sürekliliğinde önemli rol oynadığını göstermiştir. Wnt sinyal yolağının bazı mutasyonlar sebebiyle HSK hücrelerinde aşırı eksprese edildiği görülmüştür (de La Coste 1998). Ayrıca Wnt/ β -katenin yolağındaki bu artışın karaciğer kök hücre belirteci olan ve HSK'da kötü prognozla ilişkili olan EpCAM (epithelial cell adhesion molecule) ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Yamashita ve ark., 2008).

TGF- β 1 tümör baskılayıcı bir genidir (Tang ve ark., 1998) ve c-Myc/TGF- α transgenik farede TGF- β 1 sinyal yolağının yok edilmesinin hepatokarsinogenezi hızlandırdığı görülmüştür (Santoni-Rigi ve ark., 1999). Bunun yanı sıra, TGF- β 1 HSK hücrelerinde aşırı eksprese olmaktadır ve bu ekspresyon HSK dediferansiyasyonu ile ilişkilidir (Idobe 2003). TGF- β yolağı, hücre migrasyonunu ve invazyonunu arttıran epitel-mezenkimal dönüşümünü tetiklemektedir (van Zijl ve ark., 2009). TGF- β yolağında bulunan TGF- β reseptörlerinin HSK'nın yaklaşık %70'inde ekspresyonunun azaldığı görülmüştür (Ikegami 2009) bunun yanı sıra TGF- β seviyelerinin serum ve idrarda arttığı görülmüştür (Tsai ve ark., 1997).

NOTCH yolağındaki genler transmembran glikoproteinlerini eksprese ederler. Bu glikoproteinler komşu hücre yüzeyindeki Delta/Jagged ailesine ait ligandlarla etkileşime geçtiklerinde, intrasellüler motifleri nükleuse giderek HES-1, DELTEX, CD25, CDKN1 α (cyclin-dependent kinase inhibitor 1 α ; p21^{WAF1}) genlerinin transkripsiyonunu aktive ederler (Androutsellis-Theotokis 2006, Bray 2006). HSK hücrelerinde, normal hücrelere kıyasla yüksek oranda NOTCH1, JAGGED, HES-1 mRNA'sı ve yüksek miktarda NOTCH1-4 protein seviyeleri tespit edilmiştir (Gao 2008). Ayrıca, NOTCH yolağında bulunan genler CD133⁺ hücrelerde CD133⁻ hücrelere kıyasla daha yüksek miktarda bulunmuştur ve son çalışmalarda HepG2 kök hücre benzeri hücrelerde DELTEX ve p300 genlerinin yüksek miktarda eksprese edildiği gösterilmiştir (Oishi 2011, Cao 2011). Ayrıca hepatosellüler karsinomada aktif Notch3 ile Notch ligandı Jagged'in yüksek oranda eksprese edildiği bilinmektedir (Gao ve ark., 2008).

Hedgehog yolağı; Patched (PTCH) ve Smoothened (SMO) isimli iki transmembran proteininden oluşur. Hh ligandı olmadığı zaman PTCH, SMO 'yu inhibe eder. Hh ligandı PTCH'ye bağlandığında inhibisyon ortadan kalkar ve SMO sinyal yoluyla transkripsiyon faktörü GLI (glioma-associated oncogene homolog 1) 'nin nükleus lokalizasyonunu sağlar. GLI proteinleri, GLI1, GLI2, GLI3 olmak üzere üç farklı proteinden oluşurlar. Bunlardan GLI1 ve GLI2; siklinler, IGF-2, β -katenin gibi hücre döngüsü ve büyüme ile ilgili genlerin aktivasyonunu sağlarken GLI3 bu genlerin baskılanmasını sağlar (Kasper ve ark., 2006). Hepatosellüler karsinoma vakalarının %60'ında hedgehog genlerinin aşırı eksprese edildiği bulunmuştur ve Hedgehog yolağının spesifik inhibisyonu GLI transkripsiyon faktörü tarafından regüle edilen genlerin ekspresyonlarının azalması ile sonuçlanmıştır. Hedgehog yolağının HSK hücrelerinde bloke edilmesi ile proliferasyon inhibe olur, apoptoz indüklenir, c-Myc ve CYCLIN D1 ekspresyonu baskılanır. Bu durum Hedgehog yolağının HSK hücrelerinin hedeflenmesinde önemli bir terapötik hedef olabileceğini göstermektedir (Cheng 2009, Chen 2010). Hedgehog yolağında Sonic, Indian, ve Desert olmak üzere üç farklı Hh ligandı mevcuttur (Ingham ve ark., 2001). Sonic karaciğerdeki predominant izoformdur. Yaklaşık %60'a yakın HSK vakalarında Sonic ekspresyonu görülmüştür. Bu yolağın inhibisyonu ile Gli transkripsiyon faktörü tarafından regüle edilen genlerin ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir. Smo'nun aktivasyonu, hepatokarsinogenezde önemli bir rolü olduğu bilinen c-Myc'in aşırı ekspresyonuna sebep olabilir (Sicklick ve ark., 2006).

Kanser kök hücrelerindeki anormal yolakların hedef alınması ile genel olarak kendilerini yenilemeleri ya da tümör oluşturmaları engellenebilir. Bu anlamda Hedgehog yolağı yeni anti-kanser ajanların geliştiriimesinde önemli bir hedeftir. Bazı terapötik ajanların birkaç kanser türünde Sonic hedgehog sinyal yolağını regüle ettiği görülmüştür (Stanton 2010). Ayrıca hepatoblastomada, Hh sinyalinin siklopamin ile bloke edilmesiyle hücre çoğalmasında yüksek oranda azalmalar görülmüştür (Eichenmuller ve ark., 2009).

Bmi1 sinyal yolağı HSK'da malign transformasyonla ilişkilidir (Sasaki ve ark., 2008). Anormal Bmi1 ekspresyonları kanser kök hücrelerinde gösterilmiştir ve karaciğer kanserindeki alt populasyon (side population) hücrelerinin sürekliliğinde ve çoğalmasında önemli bir rolü olduğu bilinmektedir. Bmi1, CD133⁺ karaciğer kanser kök hücrelerinde de yüksek oranda eksprese edilmektedir (Chiba ve ark., 2008).

Wnt/ β -katenin, TGF- β , NOTCH, Hedgehog ve Bmi1 yolaklarının yanında HSK oluşumundan sorumlu diğer bir sinyal yolağı ise PI3K/AKT/mTOR'dur yolağıdır. PI3K/AKT/mTOR yolağının aktivitesi, normal hücrelerde PTEN tarafından azaltılmaktadır (Franke 2008). HSK'da PI3K/AKT/mTOR yolağının aktivitesini arttıran faktörler IGF, EGF, IGFR, EGFR genlerinin aşırı eksprese edilmesi, PI3K mutasyonları, PTEN mutasyonlarıdır (Lee ve ark., 2005). Bu yolağın HSK'daki önemi, yolağın inhibe edilmesiyle HSK hücrelerinin in vitro büyümesinin ve ortotopik implantasyonunun azalması ile gösterilmiştir (Villanueva ve ark., 2008).

Keşiflerinden bugüne kadar histon deasetilazlar (HDAS) enzimleri yeni anti-kanser ajanların geliştirilmesinde önemli bir hedef olarak görülmüştür. Bunun nedeni histonların hücrelerdeki gen ekspresyonunda oynadıkları önemli roldür. Histon deasetilaz aktivitesi hücre çoğalması, farklılaşması ve homeostas için gereklidir. HDAS enzim ailesi 18 üyeden oluşur ve bunlardan 11 tanesi çinkoya bağımlıdır.

HDAS'lar 4 farklı sınıfa ayrılmıştır. Sınıf I: HDAS1, 2, 3 ve 8 ; sınıf IIa: HDAS4, 5, 7 ve 9 ; sınıf IIb: HDAS6 ve 10 ; sınıf III: Sirtuin1-7 ; sınıf IV: HDAS11 olarak kategorize edilmiştir (Spiegel ve ark., 2012). Bazı HDAS'ların aşırı ekspresyonu pek çok kanser tipinde saptanmıştır. HDAS1; gastrik, pankreas, kolorektal, prostat ve hepatosellüler kanserde aşırı eksprese olmuştur ve kötü bir hastalık seyiri ile ilişkilidir. HDAS2; kolon kanserinde mutasyona uğramıştır ve özafagus, prostat, gastrointestinal ve oral kanserlerde yüksek ekspresyona sahiptir. HDAS3 ise KLL, gastrik, prostat, kolorektal kanserle ilişkilendirilmiştir. Sınıf I HDAS'lar hücre canlılığı ve çoğalması için gereklidir (Marks ve ark., 2010). Sınıf I HDAS'ların en çok çalışılmış hedeflerinden birisi siklin-bağımlı kinaz inhibitörü 1'in (cyclin-dependent kinase inhibitor 1) (p21) transkripsiyonel regülasyonudur (Ocker ve ark., 2007). HDAS1 ekspresyonunun engellenmesinin, artan p21 ekspresyonunun bir sonucu olarak azalan proliferasyondan ötürü erken embryonik ölüme sebep olduğu gösterilmiştir (Lagger ve ark., 2002). Buna benzer olarak HDAS2 inaktivasyonu ile p21 ekspresyonunun arttığı, HDAS2 aşırı eksprese edildiği zaman ise p21 seviyesinin düştüğü saptanmıştır (Huang ve ark., 2005). HDAS3 geninin silinmesi ise hücre döngüsünü geciktirerek DNA hasarı ve apoptozu artırır (Bhaskara ve ark., 2008).

Transformasyona uğramış hücrelerdeki anormal HDAS ekspresyonunu engellemek için HDAS inhibitörleri geliştirilmiştir. Kimyasal yapısı ve hedef enzimi temel alınarak farklı sınıflara kategorize edilen bu inhibitörlerin pek çoğu klinik düzeyde araştırılmaktadır. Günümüzde HDAS inhibitörü (HDASi) olarak FDA (Food and Drug Administration) tarafından onay almış varinostat (pan-HDASi) ve romidepsin (siklik peptid) olmak üzere iki ilaç bulunmaktadır (Grant ve ark., 2007). HDAS inhibitörleriyle yapılan çalışmalarda sebebi bilinmemekle beraber bu inhibitörlerin normal hücrelerden çok transforme olmuş hücrelere karşı daha toksik olduğu saptanmıştır. HDAS inhibitörlerinin toksisitelerini artıran reaktif oksijen türleriyle ya da DNA hasarı onarım proteinleri (RAD50, RAD51, MRE11)'nin seviyelerinin düşmesiyle gösterdikleri düşünülmektedir (Lee 2010). Bunun yanı sıra HDAS inhibitörlerinin genel olarak mekanizmaları; gen promotörlerinin asetilasyonunun modifiye edilmesi, histon proteinlerinin N-terminal ucundaki asidik yükleri nötralize ederek kromatinin açılması ve transkripsiyonun artırılması, bazı transkripsiyon faktörlerinin (p53, NF- κ B, E2F1, STAT1, STAT3, YY1) deasetilasyonunun engellenmesi, şaperon proteinleri (Hsp90)'nin ve DNA onarım proteinleri (Ku70) ve tübülün proteinlerinin asetilasyonu, p21'in artırılıp siklinlerin azaltılması ile hücre döngüsünün G1/S geçişinin durdurulması, pro-anjiojenik faktörlerin (VEGF, HIF1 α , TNF- α , IL-1) düşürülmesi ile anjiojenezin azaltılması şeklinde sıralanabilir (Spiegel ve ark., 2012). Bu mekanizmaların dışında, pro-apoptotik proteinleri artırıp (Noxa, Puma) anti-apoptotik proteinleri (Bcl-2, Bcl-XL, XIAP, Mcl-1) azaltarak intrinsik mitokondriyal yolağı aktive ederler. İntrinsik yolağın dışında ekstrinsik yolda görevli ölüm reseptörlerinin (DR4, DR5, Fas) ekspresyonunu artırırlar.

Varolan tüm HDAS inhibitörlerinin G1/S geçişinde hücre döngüsünü durduğu bilinmektedir. Bu durum CDKN1A (p21^{WAF1/CIP1})'nin p53'ten bağımsız bir şekilde indüklenmesi ve retinoblastoma proteininin (pRb) hipofosforillenmesiyle açıklanmaktadır. HDAS inhibitörlerinin farklı mekanizmalarla çalışabilmesi nedeniyle bunların topoizomerez II inhibitörleriyle ya da proteazom inhibitörleriyle birlikte kullanılması düşünülmektedir. Bu şekilde HDASi ile NF- κ B aktivasyonu, agregom fonksiyonunun yok edilmesi ve hücrede proteotoksik stress oluşturulması amaçlanmaktadır.

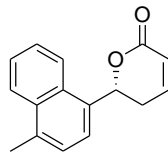
Bunun dışında siklin D ve siklin A genlerinin represyonunun CDK2, CDK4 kinaz aktivitelerinin kaybına ve pRb'nin hipofosforilasyonuna sebebiyet vererek hücre döngüsünü durduğu düşölmektedir. G1/S geçişinde hücre döngüsünün durması; DNA sentezinden sorumlu olan CTP sentaz ve Timidilat sentetaz transkripsiyonunun HDAS inhibitörleriyle baskılanması ve TGF- β sinyalinin akvitesinin artıp c-Myc seviyesinin azalmasıyla da açıklanmaktadır. p53, E2F1, STAT1, STAT3 ve NF-kB gibi transkripsiyon faktörlerinin (TF) aktiviteleri asetilasyon ve deasetilasyon düzeyleri ile doğrudan ilişkilidir ve tüm bu proteinler HDAS inhibitörleriyle muamele sonrası hiperasetillenirler. Dolayısıyla bu transkripsiyon faktörlerinin regüle ettiği bazı genler, aynı genlerin promotörlerinin HDASi sonrası hiperasetilasyonu sonucu değil, transkripsiyon faktörlerinin asetilasyonu sonucu değişmektedir. Güncel sonuçlar DNA hasarına cevap olarak apoptotik genlerin seçici indüksiyonunun transkripsiyon faktörlerinin asetillenmesi ile yakın ilişki olduğunu göstermektedir. p53; Bax, Puma, Noxa gibi pro-apoptotik genlerin transkripsiyonunu arttırarak ve Bax, Bcl-2, Bcl-XL proteinlerine direkt bağlanarak intrinsik apoptotik yolağı tetikleyen bir transkripsiyon faktördür. HDAS inhibitörleri hem doğal formdaki p53'ü hem de mutant p53'ü regüle edip p53 ile sağlanan pro-apoptotik cevap oluşturabilirler. Doğal formdaki p53'ün hiperasetillenmesi proteini stabil hale getirerek sekans spesifik DNA bağlanma aktivitesini arttırarak Noxa gibi p53 hedef genlerin ekspresyonunu indükleyip apoptozu tetikler. CDKN1A (p21) ve Bax gibi bir takım p53 tarafından regüle edilen genler doğal formdaki ya da mutant p53 içeren hücrelerde eşit olarak regüle edilmektedir. Bu bilgiler ışığında HDAS inhibitörlerinin mutant p53 içeren tümörlerde kullanılabileceği düşünölmektedir (Bolden ve ark., 2006).

Hepatosellöler karsinoma'da HDAS'ların önemli bir rolü olduğu çok sayıda çalışmayla gösterilmiştir. HDAS1'in hepatositlerde TGF β 1 ile tetiklenen epitelyum-mezenkimal dönüşümü ve hücre migrasyonu için gerekli olduğu bulunmuştur. HDAS1'in invaziv HSK'lardaki yüksek oranları bu enzimin epitel-mezenkimal dönüşümünü arttırarak HSK hücrelerinin invaziv özelliğini sağladığını düşöndürmektedir (Lei ve ark., 2010). Diğer bir çalışmada HDAS1,2,3 ve Ki-67'nin normal dokuya kıyasla HSK dokularında yüksek seviyede ekprese edildiği gösterilmiştir (Quint ve ark., 2011). Ayrıca HDAS1 inhibisyonunun nükleustaki β -katenin seviyesini, T-hücre faktörü bağımlı transkripsiyonel aktiviteyi, proliferasyonla görevli olan CCND1 ve EGFR seviyelerini düşördüğu saptanmıştır (Cheng ve ark., 2011). Son yıllarda yapılan bir çalışmada HDAS3'ün silinerek ekspresyonunun engellenmesiyle geç S fazında olan hücrelerde histon 3 lizin 9 ve lizin 14 asetilasyonunun, histon 4 lizin 5 ve lizin 12 asetilasyonunun arttığı ve hepatosellöler karsinoma ile sonuçlandığı bulunmuştur (Bhaskara ve ark., 2010). Histon deasetilaz sınıf III üyesi olan SIRT1 tümörlü dokularda tümör olmayan dokulara kıyasla yüksek seviyelerde olduğu ve SIRT1 ekspresyon seviyelerinin ilerlemiş tümör seviyesiyle ilişkilili olduğu tespit edilmiştir. SIRT1 ekspresyonlarının azaltılmasıyla HSK hücrelerinin apoptoz ile çoğalmalarının baskılandığı gösterilmiştir (Choi 2011). TSA ve SAHA'nının doza ve zamana bağlı olarak hepatoma hücrelerinde apoptozu sebep olduğu gösterilmiştir (Carlisi 2008). Ayrıca TSA'nın 4 farklı HSK hücre hattında (Huh-7, PLC/PRF/5, Hep3b ve HepG2) histon H3 asetilasyonunu arttırarak apoptozu indüklediği saptanmıştır (Yang ve ark., 2010).

Kanser hücrelerinde apoptoz yolağı saf dışı bırakıldığından kanserli hücrelerde (veya kanser kök hücrelerinde) apoptozu tetikleyebilecek moleküllerin anti-kanser ajan olma potansiyeli vardır. Apoptoz; programlanmış hücre ölümlü manasına gelir ve pek çok fizyolojik ve patolojik durumlarda rol oynamaktadır. Apoptozda görölen başlıca biyokimyasal değişiklikler; kaspaz aktivasyonu, DNA ve

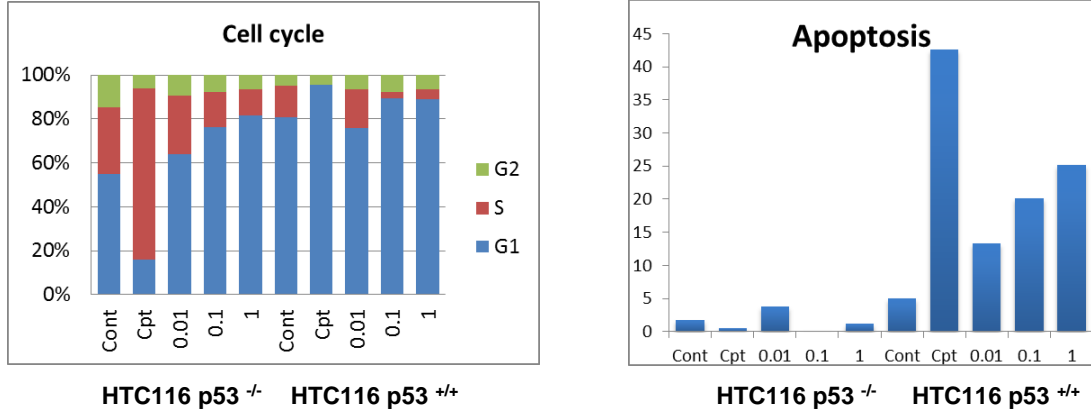
protein degradasyonu ve membran değişimleriyle fagositik hücreler tarafından tanınma şeklinde sıralanabilir. Apoptozun ilk aşamaları; fosfotidil serin'in hücre membranının dış yüzeylerinde ekspresyonunun artmasını, DNA'nın 50-300 kilobaz arasında parçalara ayrılmasını ve sonrasında endonükleazlarla bu parçaların 180-200 baz çifti büyüklüğündeki parçalara degrade olmalarını kapsar. Apoptoz mekanizmasında yer alan kaspaz aktivasyonu; ekstrinsik, intrinsik ve intrinsik endoplazmik retikulum yolağı olmak üzere üç şekilde gerçekleşebilir. Ekstrinsik yolakta, membranda bulunan reseptörlere ilgili ligandların bağlanmasıyla pro-kaspaz 8'in aktivasyonu gerçekleşir ve aktif kaspaz 8 diğer kaspaz enzimlerinin aktivasyonunu tetikler. İntrinsik yolakta, genetik hasar, hipoksi, oksidatif stres tarafından uyarılır. Bu yolakta Bcl-2 ailesi proteinlerinden oluşur. Bunlar pro-apoptotik proteinler (Bax, Bak, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim, Hrk) ve anti-apoptotik proteinler (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1, Mcl-1). Anti-apoptotik proteinler sitokrom c'nin mitokondriden salınımını engellerken pro-apoptotik proteinler bu salınımı artırarak apoptozu tetiklemeye çalışırlar. Kanser hücrelerinde apoptozda azalma ya da apoptozu karşı bir direnç görülmektedir. Kanser hücrelerinin apoptozu yönelmemelerinin sebepleri; pro-apoptotik ve anti-apoptotik protein dengesinin bozulması, kaspaz aktivitelerinin azalması ve ölüm reseptörü sinyal yolağındaki bozulması şeklinde sıralanabilir. Bunların yanı sıra tümör baskılayıcı protein p53 genindeki mutasyonlar ve apoptoz inhibitörü proteinlerindeki regülasyon bozuklukları da kanser hücrelerindeki apoptoz eksikliğinin nedenleri arasındadır (Wong ve ark., 2011).

(R)-Klavuzon Z: Sentezi ilk defa 2009 yılında grubumuzda tamamlanmış olan (R)-Klavuzon Z'nin (Şekil 1) PC3 ve MCF-7 kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri gösterilmiştir (Kasaplar ve ark., 2009). Devam etmekte olan 110T782 projesi kapsamında hücre içi çalışma mekanizmasının aydınlatılması için yapılan ön çalışmalarda p53 proteinini eksprese edebilen (HTC116 p53^{+/+}) ve edemeyen (HTC116 p53^{-/-}) iki kolon kanseri hücre hatlarında hücre döngüsü ve apoptoz çalışmaları yapılmış ve elde edilen bulgular Şekil 2'de özetlenmiştir. Görüleceği üzere p53 gen ekspresyonu yapabilen hücrelerde G1 fazında yığılma oluştuğu ve yine aynı hücre hattında konsantrasyona bağlı olarak apoptozu tetiklediği gözlemlenmiştir (110T782 projesi, henüz yayımlanmamıştır). Aynı hücre hatlarındaki p53 gen ekspresyonu benzer şekilde western blot yöntemiyle de çalışılmış ve (R)-Klavuzon Z'nin 100 nM gibi düşük konsantrasyonlarda p53^{+/+} hücrelerde p53 geninin ekspresyonuna neden olduğu gösterilmiştir (Şekil 3). Aynı çalışmada hücre içinde çift sarmal DNA kırıklarının tamirinde rol oynadığı bilinen pNBS1 (fosforlanmış Nijmegen Breakage Syndrome) geninin p53^{-/-} hücre hatlarında eksprese edildiği gözlemlenmişken, p53^{+/+} hücrelerinde böyle bir tamir mekanizmasının ortadan kalktığı ve DNA kırıkları oluşturularak hücrenin ölüme götürüldüğü düşünülmektedir (110T782 projesi henüz yayımlanmamıştır).

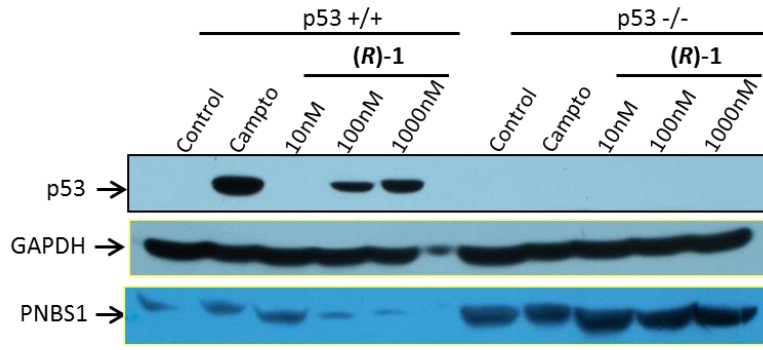


(R)-Klavuzon Z

Şekil 1. (R)-Klavuzon Z'nin yapısı



Şekil 2. (R)-Klavuzon Z molekülünün konsantrasyona bağlı olarak HTC116 p53^{-/-} ve HTC116 p53^{+/+} hücre hatlarında hücre döngüsü ve apoptotik etkileri (Cont: kontrol, Cpt: Kamptotesin)



Şekil 3. (R)-Klavuzon Z molekülünün HTC116 p53^{+/+} ve HTC116 p53^{-/-} hücre hatlarında konsantrasyona bağlı p53 (tümör baskılayıcı) ve pNBS1 (çift sarmal DNA kırıklarının onarılmasında etken) gen ekspresyon seviyeleri

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kimyasal Maddeler ve Hücreler

Bu çalışmada (R)-Klavuzon Z ve insan hepatosellüler hücre hatları olan Huh-7 parental, Huh-7 EpCAM⁺/CD133⁺, Huh-7 EpCAM⁻/CD133⁻ hücre hatları Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Prof . Dr. Esra Erdal'dan temin edilip kullanılmıştır.

2.2. Hücre Kültürü

İnsan hepatosellüler hücre hatları (Huh-7 parental, Huh-7 EpCAM⁺/CD133⁺, Huh-7 EpCAM⁻/CD133⁻); %10 Fetal Bovine Serum, 100 U/ml penisilin-0.1 mg/ml streptomisin, 2 mM L-Glutamin, %1 kısmi amino asit solüsyonu (Non-Essential Amino Acid Solution) içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) hücre büyüme ortamı içinde ve 37 °C %5 CO₂ koşullarında inkübe edilmiştir.

2.3. Manyetik Hücre Seperasyonu ile Kanser Kök Hücrelerinin İzolasyonu (MACS)

Kanser kök hücrelerinin izolasyonu için Miltenyi firmasına ait bir kit kullanılmıştır. HuH-7 hücre hattında, kanser kök hücreleri olarak tanımlanan EpCAM⁺/CD133⁺ hücreleri ve bu özelliği taşımayan EpCAM⁻/CD133⁻ hücreleri ayırmak amacıyla, manyetik hücre seperasyon yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla 10x10⁷ hücre içeren pellet 500 µl manyetik ayırılama solüsyonu (PBS içerisinde %5 Fetal Bovine Serum ve 2mM EDTA) içerisinde süspanse edilerek, sırasıyla 100 µm'lik ve 40 µm'lik filtrelerden geçirilmiş ve 4°C'de 2500 rpm de santrifüjlenmiştir. Hücreler daha sonra 300 µl MACS solüsyonunda seyreltilerek, özgül olmayan antikor bağlanmalarını engellemek için 100 µl FcR (Fc Reseptörü) blokaj solüsyonu (Miltenyi, 130-059-901) ile bloklanmış, toplamda 500 µl olan bu solüsyon içerisine, kitle önerildiği gibi 1/10 dilusyonda olması için 50 µl EpCAM-FITC antikor (anti-EpCAM-FITC, miltenyi 130-080-301) eklenmiştir. Bu antikorla +4 °C karanlıkta 10 dakika inkübe edilen hücreler 2 kez 10 ml MACS tamponu ile yıkayıp 2500 rpm de +4°C'de çöktürülerek bağlanmayan antikorların ortamdan uzaklaştırılması sağlanmıştır.. Elde edilen EpCAM ile işaretli hücreleri içeren pellet, 300 µl manyetik ayırılama solüsyonu içerisinde çözülmüş ve totalde 400 µl olan solüsyona 40 µl anti-FITC manyetik boncuk eklenmiştir.(anti-FITC microbead, miltenyi 130-048-701). Bu hücreler +4°C'de karanlıkta 12 dakika inkübe edilerek boncukların EpCAM ile işaretli hücrelerdeki anti EpCAM antikor ile konjuge olan FITC'lere yapışması sağlanmıştır. Antikor işaretlemesinden sonra yapılan yıkama basamakları tekrarlanmıştır. Manyetik alandaki özel pozitif ayırılama kolonlarına (Miltenyi,130-042-401) bu süspanسیون yüklendikten sonra, manyetik boncuk ile işaretlenmiş hücrelerin kolonda tutulması sağlanarak işaretli olmayan hücrelerin ayırılama solüsyonu içerisinde kolona tutunmadan akması ve yeni bir tüpe toplanması sağlanmıştır. Negatif olan hücreler negatif ayırılama kolonları aracılığıyla (Miltenyi, 130-042-901) pozitif hücrelerden tamamen temizlenerek saf EpCAM⁻ populasyonu elde edilmiştir. Pozitif seleksiyon kolonunda bulunan hücreler yapılan yıkamaların ardından manyetik alanın kaldırılması ve basınç uygulaması ile elde edilmiştir.

Aynı işlemler birinci basamakta elde edilen fraksiyonlar kullanılarak sırasıyla CD133 için, CD133'e karşı üretilmiş konjuge antikor (anti-CD133-APC, miltenyi 130-090-826) ve APC ye karşı üretilmiş manyetik boncuklar (anti-APC microbead, miltenyi 130-090-855) ile tekrar edilmiş ve deney sonunda EpCAM⁺/CD133⁺ ve EpCAM⁻/CD133⁻ hücre populasyonları elde edilmiştir. Ayrımlanan hücrelerin bir miktarı flow sitometri ve immunofloresans boyamalarla confirmasyon için kullanılmıştır. Ayrımlanmış hücrelerle deneyler planlandıktan sonra hücreler hücre dondurma ortamı içinde dondurularak, sıvı azot tankında depolanmıştır.

2.4. Sitotoksosite Analizi

2.4.1. Sülfrodamin B Metodu

(R)-Klavuzon Z'nin hepatosellüler karsinoma (HSK) hücreleri üzerindeki sitotoksitesi hem Sülfrodamin B deneyi ile hem de MTT deneyi ile ölçülmüştür. Sülfrodamin B deney protokolü genel olarak; hücrelerin hazırlanması, hücrelerin (R)-Klavuzon Z ile muamele edilmesi, hücre fiksasyonu ve boyanması, optik dansite ölçümü gibi temel bölümlerden oluşur.

Hücrelerin hazırlanmasında öncelikle besin ortamı hücre tek tabakasından uzaklaştırıldı ve Fosfat Salin Tamponuyla (Phosphate Buffered Saline, PBS) yıkandı. PBS uzaklaştırıldıktan sonra EDTA içerisinde çözülmüş tripsin ile hücreler tutundukları yüzeyden kaldırıldı ve karıştırılarak homojen hücre karışımı haline getirildi. Hücre sayısını belirlemek için hücre karışımı steril polipropilen tüplere aktarılıp 1:1 oranında hazırlanan hücre karışımı ve % 0.4'lük tripan mavisi solüsyonuyla karıştırılarak mikroskop yardımıyla hematositometre ile belirlendi. Hücre konsantrasyonu belirlendikten sonra 96-kuyulu mikrotabanın her bir kuyucuğuna yaklaşık 10×10^3 hücre gelecek şekilde hücre sayısı besin ortamı kullanılarak ayarlandı. Hücreler 50 – 40 – 30 – 20 – 10 – 1 – 0,1 μ M konsantrasyonlarındaki (R)-Klavuzon Z ile muamele edildi. Bu aşamadan sonra hücreler 37 °C'da %5 CO₂ altında 48 saat boyunca inkübe edildi. Hücre fiksasyonu ve boyanması için hücre kültürü süpernatantı uzaklaştırıldıktan sonra her bir kuyucuğa 100 μ L soğuk %10'luk (wt/v) TCA (trikloroasetik asit) eklendi ve 4°C'da 1 saat boyunca inkübe edilir. Daha sonra hücreler steril distile su ile yıkanarak ve 25°C altında hava ile tamamen kurumaları sağlandı. Fiksasyon ve kurutmadan sonra 100 μ L %0.04'lük Sülfrodamin B (SRB) solüsyonu her bir kuyucuğa eklenip 30 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Bunun ardından 4 defa %1'lik (v/v) asetik asit ile çalkalanarak bağlanmayan fazla boya uzaklaştırılıp oda sıcaklığında bekletilerek hava ile kurutuldu. Son aşamada optik dansite ölçümü için 200 μ L 10 mM Tris bazı (pH 10.5) her bir kuyucuğa eklenip orbital karıştırıcıda 5 dakika boyunca karıştırıldı. Son aşamada mikrotabaka okuyucu kullanılarak 510 nm'de optik dansite (OD) ölçüldü.

2.4.2. MTT Metodu

Hücrelerin hazırlanmasında öncelikle besin ortamı hücre tek tabakasından uzaklaştırıldı ve Fosfat Salin Tamponuyla (Phosphate Buffered Saline, PBS) yıkandı. PBS uzaklaştırıldıktan sonra

EDTA içerisinde çözülmüş tripsin ile hücreler tutundukları yüzeyden kaldırıldı ve karıştırılarak homojen hücre karışımı haline getirildi. Hücre sayısını belirlemek için hücre karışımı steril polipropilen tüplere aktarılıp 1:1 oranında hazırlanan hücre karışımı ve % 0.4'lük tripan mavisi solüsyonuyla karıştırılarak mikroskop yardımıyla hematositometre ile belirlendi. Hücre sayısı belirlendikten sonra 96-kuyulu mikrotabanın her bir kuyucuğuna 95 µl medium içerisinde yaklaşık 2000 hücre gelecek şekilde besin ortamı kullanılarak ekildi ve 24 saat kadar %5 CO₂ ve 37 °C'de inkübe edildi. Hücre ekiminden 24 saat sonra seri seyreltme ile hazırlanan 50 – 40 – 30 – 20 – 10 – 1 µM konsantrasyonlarındaki (R)-Klavuzon Z ile muamele edildi. Bu dozlardan alınan hücre yanıtı sonrası hücreler daha dar bir konsantrasyon aralığı olan 20 – 10 – 5 – 2,5 – 1,25 – 0,625 – 0,1 µM konsantrasyonlarındaki (R)-Klavuzon Z ile muamele edildi. İlaç uygulamasından sonra 24 – 48 – 72 saatleri için hücre canlılığı ölçümü yapıldı. Bunun için hücrelerin üstündeki eski medium uzaklaştırılıp hücreler bir defa fosfat tamponu (PBS) ile yıkandı. Daha sonra hücreler medium içinde uygun konsantrasyonda MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromür) ajanı ile muamele edildi ve 4 saat %5 CO₂ ve 37 °C'de inkübe edildi. Dört saatin sonunda 96 kuyulu mikrotabaka 1800 rpm'de 4 °C 'da ve 10 dakika boyunca santrifüj edilip formazan kristallerinin kuyucuğun dibine çökmesi sağlandı. Santrifüj sonrası üstte kalan medium mikrotabaka ters çevrilerek döküldü. Kuyucuğun altında toplanan formazan kristalleri üzerine 100 µl Dimetil Sülfoksit (DMSO) eklenerek hücrelerin içinde bulunan formazan kristalleri çözüldü ve 570 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı. Örneklerden elde edilen absorbanslardan kör (blank) absorbanslarının ortalaması çıkarılarak ortamdaki diğer faktörlerin girişimi elimine edildi. Sonuçlar istatistiki olarak student-t-test ile analiz edildi.

2.5. Hücre Döngüsü Analizi

(R)-Klavuzon Z'nin hücre döngüsü üzerine etkisini anlamak için propidyum iyodür boyaması yapılmıştır. Bunun için 6 kuyucuklu tabakalara 60 x 10³ sayıda hücre inokule edildi ve 24 saat inkübe edildi. (R)-Klavuzon Z; 10 - 1 - 0.1 µM gibi farklı konsantrasyonlarda hücrelere eklendi. İlaç uygulamasının sonunda hücreler 24 – 48 – 72 saat 37 °C'da %5 CO₂ altında inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında tripsin ile hücreler kaldırılıp 800 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılıp hücreler 5 mL fosfat tamponu ile yıkanıp tekrar santrifüjlendi. Bunun sonrasında pelet 1 mL fosfat tamponu ile çözülüp 4 mL -20 °C'daki etanol (%99.8) ile 24 saat boyunca -20 °C'de inkübe edilerek fikse edildi. Fikse edilmiş hücreler 1200 rpm'de 10 dakika 4 °C'de santrifüj edildi. Pellet 5 mL fosfat tamponu ile yıkanarak santrifüj edildi. Santrifüj sonrası pelet % 0.1 Triton X-100 içeren 200 µL fosfat tamponunda çözülüp 20 µL RNaseA (200 µg/mL) eklenerek 37 °C'da %5 CO₂ altında 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 20 µL propidyum iyodür (1 mg/mL) eklenerek oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. Hücre döngüsü dağılımı Flow Sitometre kullanılarak Flow Sitometre konusunda görevli Uzm. Özgür Yılmaz Çakmak uzmanlığında belirlendi ve elde edilen veriler ModFit LT yazılımı ile analiz edildi.

2.6. Apoptoz Analizi

(R)-Klavuzon Z'nin apoptoz üzerine etkilerini anlamak için Annexin V-FITC dedeksiyon kiti (Biovision) ile çalışılmıştır. Bunun için 60×10^3 hücre 6 kuyucuklu tabakalara inoküle edilip 37°C ve %5 CO_2 koşullarında inkübe edildi. 24 saatlik inkübasyon sonrasında $20 \mu\text{L}$ (R)-Klavuzon Z son hacim 2 mL ve son konsantrasyonlar $10^{-1} - 0.1 \mu\text{M}$ olacak şekilde hücrelere eklendi. İlaç uygulanan hücreler aynı inkübasyon koşullarında 24 – 48 - 72 saat inkübe edilip inkübasyon sonrasında tripsin ile hücreler kaldırılıp 800 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüjlendi. Pelet 5 mL fosfat tamponu ile çözülerek tekrar santrifüjlendi ve sonra pelet $200 \mu\text{L}$ bağlanma tamponunda (binding buffer) çözüldü. Çözülme işleminin ardından $2,5 \mu\text{L}$ Annexin V-FITC ve $2,5 \mu\text{L}$ propidyum iyodür eklendi. Boyanan hücreler oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilip (R)-Klavuzon Z'nin apoptotik etkileri Flow Sitometre kullanılarak Flow Sitometre konusunda görevli Uzm. Özgür Yılmaz Çakmak uzmanlığında ölçülüp analiz edildi.

2.7. *In vitro* Histon Deasetilaz (HDAS) Enzim Aktivite Ölçümü

Hepatosellüler karsinoma hücrelerinde (R)-Klavuzon Z'nin deasetilaz etkisini incelemek için floresans temelli bir kit (BIOMOL, HDAC Fluorometric Activity Assay Kit) kullanılmıştır. Deney protokolü kısaca nükleus izolasyonu, nükleustan protein izolasyonu, pozitif kontroller ile örneklerin substratla test edilmesi aşamalarından oluşur. Nükleus izolasyonu için 1×10^7 hücre lizis tamponuyla (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM NaCl, 15 mM MgCl_2 , 250 mM sükröz, %0.5 NP-40, 0.1 mM EGTA) muamele edilip 10 saniye vortekslendi ve 15 dakika buz içerisinde bekletildi. Daha sonra hücreler 4 mL soğuk sükröz desteğiyle (%30 sükröz, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10mM NaCl, 3 mM MgCl_2) 1300 g'de 10 dakika 4°C 'da santrifüjlendi. Santrifüj sonrası çöken nükleus 10 mM Tris-HCl ile çözülüp ve tekrar santrifüjlendi. Çöktürülerek izole edilen nükleustan protein izolasyonu; nükleus ekstraksiyon tamponunda (50 mM HEPES, pH 7.5, 420 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, %10 gliserol) çözülüp 30 saniye sonikasyon sonrasında 10.000 g'de santrifüjlenerek yapıldı. İzole edilen proteinlerin konsantrasyonu Bradford yöntemi kullanılarak saptandı. Deney sırasında 96 kuyucuklu mikrotabanın her bir kuyusuna $5 \mu\text{g}$ protein eklendi. Nükleus proteinlerinin izolasyonundan sonra mikrotabakaya pozitif kontrol (HDAS1)+Trichostatin A (TSA) ve $81 - 27 - 9 - 3 - 1 - 0,5 - 0,1 \mu\text{M}$ konsantrasyonlarındaki (R)-Klavuzon Z uygun bir dizaynda hazırlandı. Bunun sonrasında substrat molekülünün ve gerekli diğer reaktiflerin eklenmesiyle floresans ölçümü gerçekleştirildi. Sonuçlar standartlardan elde edilen değerler ile çizilen standart grafiği kullanılarak analiz edildi.

2.8. *In vivo* Histon Deasetilaz (HDAS) Enzim Aktivitesi Ölçümü

Hepatosellüler karsinoma hücrelerinde (R)-Klavuzon Z'nin deasetilaz etkisini hücrelerin içerisinde *in vivo* olarak incelemek için floresans temelli bir kit (BIOMOL, HDAC Cell-Based Activity Assay Kit) kullanılmıştır. Bu sistem tek bir reaktifin hücrelere eklenmesiyle ve HDAS Sınıf I ve II enzimlerinin aktivitelerinin ölçülmesiyle gerçekleştirilir. Söz konusu reaktif asetillenmiş, yaşayan

hücrelerin içerisine girebilen, floresans üretebilen substratıdır ve HDAS'lar tarafından hücre içerisinde deasetillenebilir. Deasetilasyon ve kit ile sağlanan diğer solüsyonların yardımıyla floresans mikrotabaka ile yapılan tarama çalışmalarına izin vermektedir. Bu deney sisteminde ilk önce hücrelerin (yaklaşık 10.000 hücre/kuyucuk) 96 kuyucuklu mikrotabakaya inokülasyonu ve yüzeye yapışmaları sağlandı. Bunun sonrasında hücreler 5 – 3 – 1 – 0,5 – 0,25 – 0,1 µM konsantrasyonlarındaki (*R*)-Klavuzon Z ile 24 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında hücrelerin üstündeki büyüme ortamı uzaklaştırılıp kit ile sağlanan tampon solüsyonu ile yıkanıp temiz büyüme ortamı eklenerek ortamdaki ilaç molekülleri uzaklaştırıldı. Her bir kuyucuğa asetillenmiş substrat molekülü eklenip 3 saat inkübe edildi. Kit ile sağlanan reaktifler kullanılarak floresans ölçümü 360 nm eksitasyon dalga boyunda ve 460 nm emisyon dalga boyunda saptandı. Histon deasetilaz aktiviteleri standard grafiği kullanılarak belirlendi.

2.9. Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile p21 ve p27 Ekspresyonunun Belirlenmesi

(*R*)-Klavuzon Z'nin hepatosellüler hücrelere uygulanmasının ardından hücrelerde gerçekleşen ve hücre döngüsü inhibisyonunda görevli bazı önemli genlerin (p21 ve p27) ekspresyonu incelenmektedir. Bunun için ilaç uygulanmasının ardından hücrelerden mRNA izolasyonu (PureLink® RNA Mini Kit, Life Technologies) kullanılarak izole edildi. Bunun ardından izole edilen RNA'lar (Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo Scientific) kullanılarak komplementer DNA'ya (cDNA) çevrildi. Kantitatif PCR sırasında kullanılmakta olan primer listesi aşağıda sıralanmıştır;

p21-F: 5'- CCATGTGGACCTGTCACTGT -3'

p21-R: 5'- GAGAAGATCAGCCGGCGTTT -3'

p27-F: 5'- AAGAAGCCTGGCCTCAGAAG -3'

p27-R: 5'- TCCATTCCATGAAGTCAGCGAT -3'

GAPDH-F: 5'-CCA GCA AGA GCA CAA GAG GAA-3'

GAPDH-R: 5'-GGT CTA CAT GGC AAC TGT GAGG-3'

Sentezlenen cDNA'lar ve LightCycler® DNA Master SYBR Green I (Roche) kullanılarak p21 ve p27'nin (*R*)-Klavuzon Z ile değişen ekspresyon profilleri belirlenmektedir (Huang ve ark., 2012).

2.10. Western Blot ile Histon Proteinlerinin Asetilasyon Analizi

(*R*)-Klavuzon Z ile muamele edilmiş hücrelerde histon 3 proteininin lizin 27 asetilasyonunu incelemek amacıyla hücrelerden histon proteinleri izolasyonu ve sonrasında ilgili proteine yönelik antibadi ile western blot yapıldı.

Bu amaçla, hücreler Soğuk PBS ile yıkanıp buz üzerinde kazındı. 3000 g'de 10 dk 4° C'de santrifüjlenip 2 kez 5mM sodium bütirat içeren soğuk PBS ile yıkandı.

Daha sonra hücre pelleti 0.5% Triton X-100, 2mM PMSF, 0.02% NaN₃ içeren Triton Ekstraksiyon Tamponu'nda (TEB), 1x10⁷ hücre /ml olacak şekilde çözünüp 10 dk buz üzerinde lize edildi. Lizat 2000 rpm'de, 10 dk, +4°C' de santrifüj edildikten sonra supernatant atıldı ve pellet tekrar TBE ile çözüldü ve santrifüj edildi. Son olarak pellet, 4 x 10⁷ hücre/ml olacak şekilde 0.2 N HCl içinde çözüldü ve bu asit ekstraksiyonu +4°C'de, karıştırmalı olarak 16 saat inkübe edildi. Asit ekstraksiyonu tamamlanan histonlar 2000 rpm'de 10 dk, +4°C'de santrifüj edildi, süpernatant yeni bir ependorfa alındı. Süpernatant son konsantrasyonu %33 olacak şekilde TCA ile buz üzerinde 30 dk boyunca tüpler ters-düz edilerek inkübe edildi. 16000 g'de 10dk +4°C'de santifüjlendi. Pellet soğuk aseton ile yıkandı, 16000 g'de 5dk +4°C'de santifüjlendi. Aseton ile yıkama adımı tekrarlandı ve sonunda elde edilen pellet 20 dk kurumaya bırakıldı. 100 µl distile su ile çözüldü. İzole edilen proteinlerin konsantrasyonu BCA yöntemi kullanılarak belirlendi.

Histon pteinleri 13-17 kD arasında değişen moleküler ağırlığa sahip oldukları için 18%' lik 1mm kalınlığında, yürütme jeli kullanıldı. İstifleme jeli olarak da 5 %' lik jel hazırlandı.

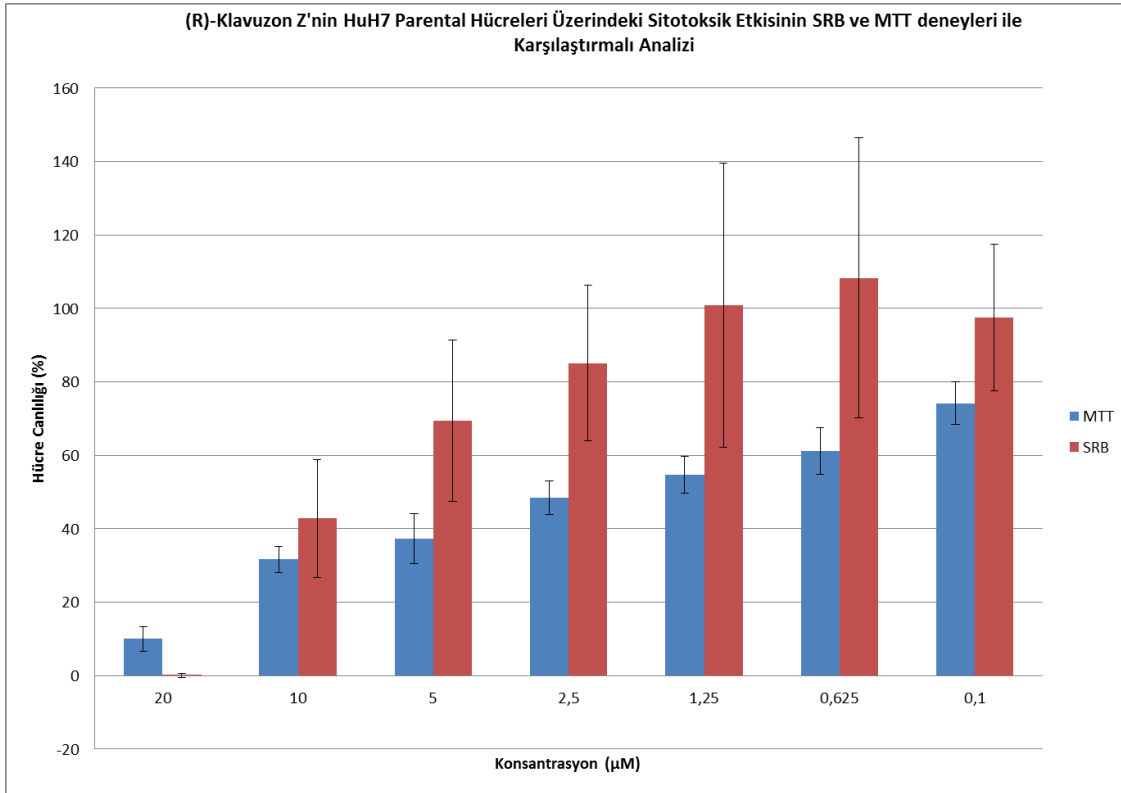
Konsantrasyonları belirlenerek alikatlanan histon proteinlerinden 3.0 µg/kuyu olacak şekilde jele yüklendi. % 10 β-ME içeren 2 X yükleme tamponu (Novex Sample Buffer) ile son konsantrasyon 1 X olacak şekilde karıştırılıp, 95° C' de 5 dk kaynatıldı. 1 dk buz üzerine alındı ve örnekler oda sıcaklığına gelince, tanka yerleştirilmiş tris-glisin elektroforez yürütme tamponu (25 mM Tris, 250 mM Glisin, % 0.1 SDS) içerisindeki jellerin kuyularına yüklendi. Bir kuyuya da proteinlerin büyüklüklerini tahmin etmek amacıyla içinde bilinen büyüklüklerde çeşitli proteinler bulunan önceden boyalı büyüklük belirteci (prestained size marker) yüklendi. Örnekler istifleyici jelin sonuna kadar 70 V'da, ayırıcı jelde ise 110 V sabit gerilimde yaklaşık 4 saat yürütüldü.

Jelde yürütülen proteinler 300 mAmp'de 3 saat boyunca PVDF membrana transfer edildi. Transfer sonrasında membran, blotlama sırasında özgül olmayan bağlanmaların engellenmesi için; % 6 yağsız süt tozu ve % 0.5 Tween-20 içeren TBS tamponu ile muamele edilerek 1 saat oda sıcaklığında, rotatorda çalkalanarak bloklama işlemi gerçekleştirildi. Bloklama aşamasından alınan membranlar 1:1000 oranında seyreltilmiş primer antikolar olan anti-H3K27ac ve anti-H3K27me3 ile muamele edildi. Membran primer antikor solüsyonunda 4°C'de 16 saat, çalkalanarak inkübe edildi. Primer antikor inkübasyonları bittikten sonra membranlar 5'er dakika 4 kez TBS-T ile yıkanıp bağlanmayan antikolar uzaklaştırıldı. Daha sonra sekonder antikor dilüsyonları 1:2500 olacak şekilde 3 % yağsız süt tozu TBS-T (0.025%) içinde hazırlandı. 1 saat oda ısısında yavaşça çalkalanarak inkübe edildi. Primer antikor sonrasında yapılan yıkama işlemi tekrarlandı. Tüm yıkamalar sonrasında deteksiyon kiti (Pierce Supersignal West Pico Chemiluminescent) kullanılarak histon proteinlerinin deteksiyonu yapıldı.

3. BULGULAR

3.1. Sitotoksosite Analizi

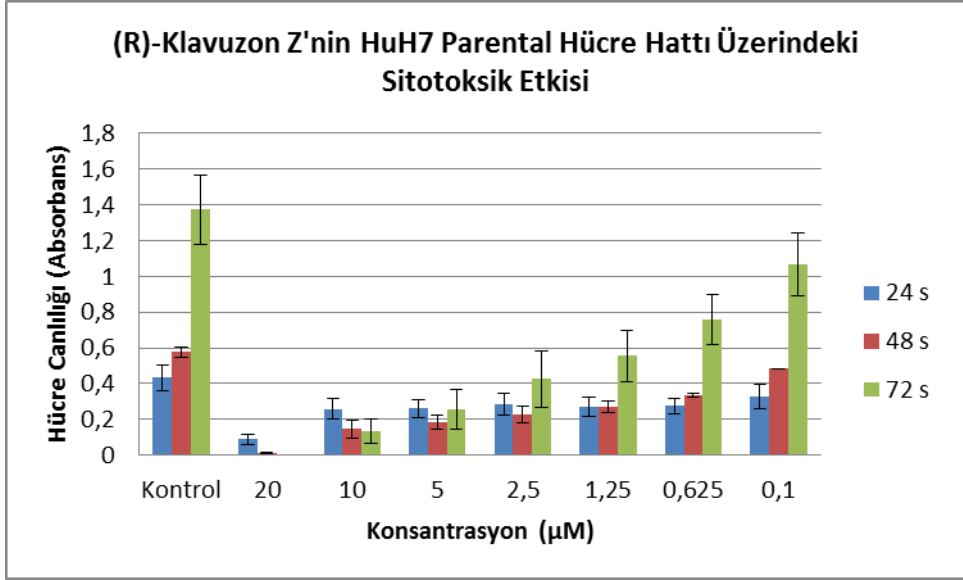
(R)-Klavuzon Z'nin Huh-7 hücre hatları üzerine olan sitotoksik etkisini anlamak için her bir hücre hattından 2000 hücre 96 kuyucuklu mikrotabakaya ekilip 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler 20 – 10 – 5 – 2,5 – 1,25 – 0,625 – 0,1 μM konsantrasyonlarındaki (R)-Klavuzon Z ile 48 saat boyunca muamele edildi. Bu doz aralığı ile hem Sülfrodamin B deneyi hem de MTT deneyi yapıldı. Karşılaştırmalı deney sonuçları aşağıda bulunan Şekil 4'de gösterilmiştir.



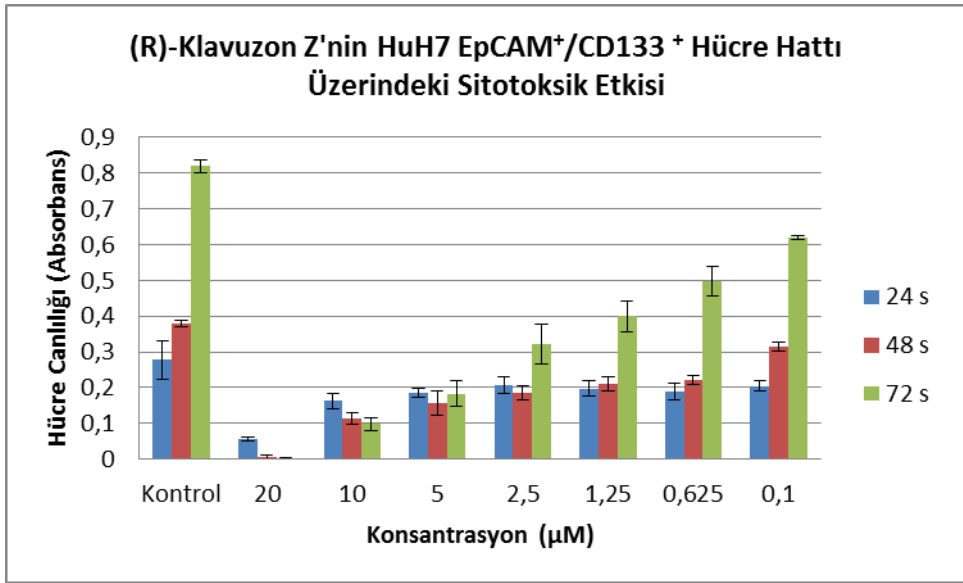
Şekil 4. (R)-Klavuzon Z'nin Huh-7 Parental Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin SRB ve MTT deneyleri ile Karşılaştırmalı Analizi

Sülfrodamin B ile elde edilen sonuçların hata paylarının çok yüksek olması sebebiyle bu çalışmada MTT deneyi ile sitotoksosite analizinin yapılması kararlaştırıldı.

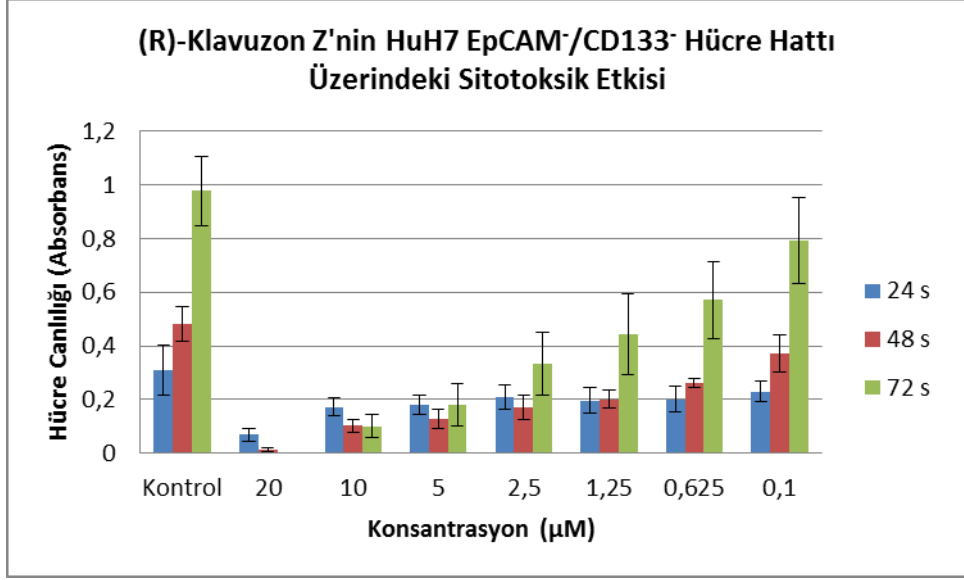
MTT deneyi için hücre ekimi ve inkübasyon sonrası hücrelere 20 – 10 – 5 – 2,5 – 1,25 – 0,625 – 0,1 μM konsantrasyonlarında (R)-Klavuzon Z, 24 – 48 – 72 saatlik inkübasyonlarla uygulandı. Hücre canlılıklarının doz ve zamana bağlı değişim grafikleri her bir hücre hattı için aşağıdaki Şekil 5, Şekil 6, Şekil 7 ve Şekil 8'te gösterilmiştir. İstatistik analizi t-testi ile yapıp $p < 0,05$ değeri elde edildi.



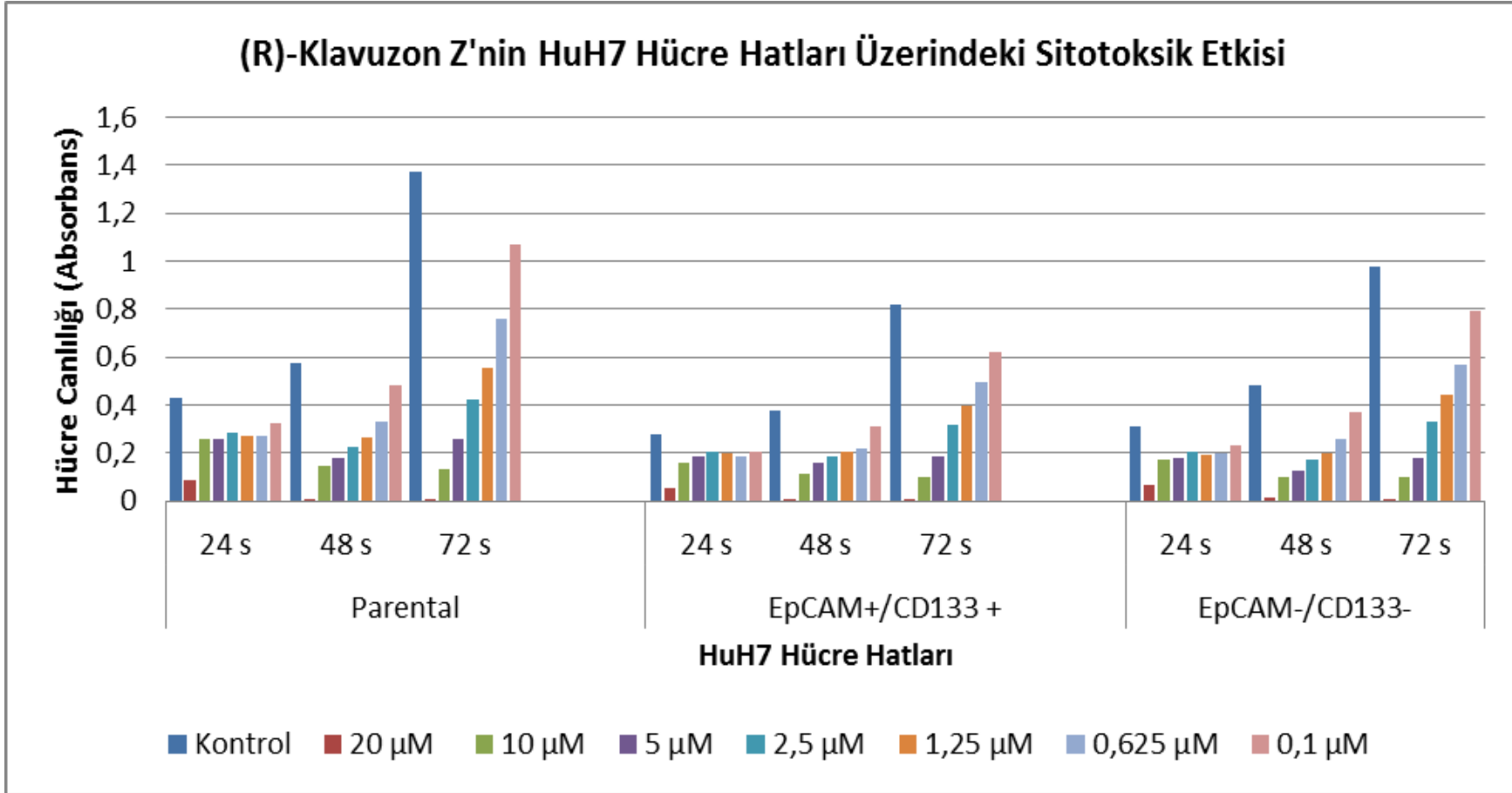
Şekil 5. (R)-Klavuzon Z'nin Huh-7 Parental Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksik Etkisi



Şekil 6. (R)-Klavuzon Z'nin Huh-7 EpCAM⁺/CD133⁺ Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksik Etkisi



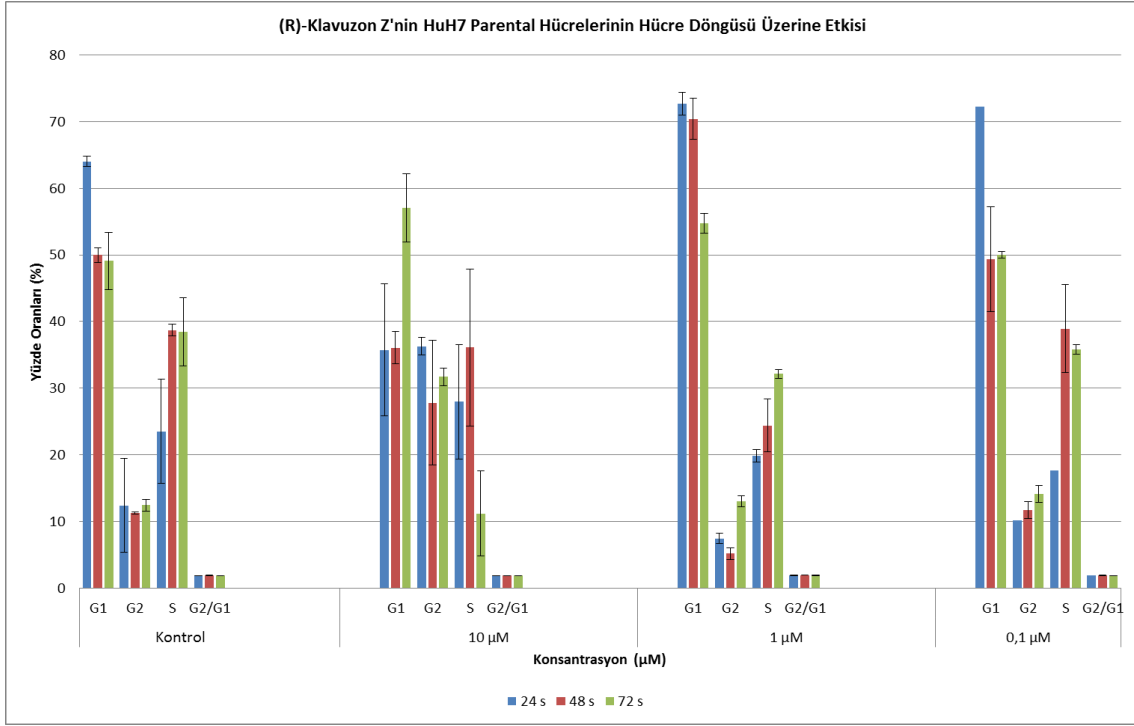
Şekil 7. (R)-Klavuzon Z'nin Huh-7 EpCAM⁺/CD133⁻ Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksik Etkisi



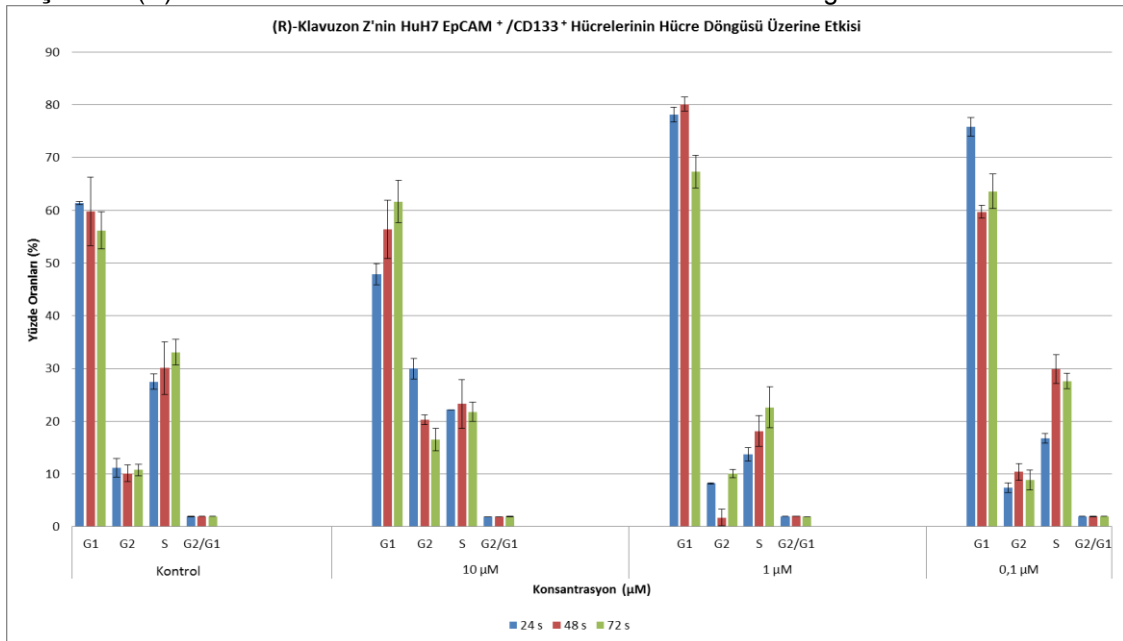
Şekil 8. (R)-Klavuzon Z'nin HuH-7 Hücre Hatları Üzerindeki Karşılaştırmalı Sitotoksik Etkisi

3.2. Hücre Döngüsü Analizi

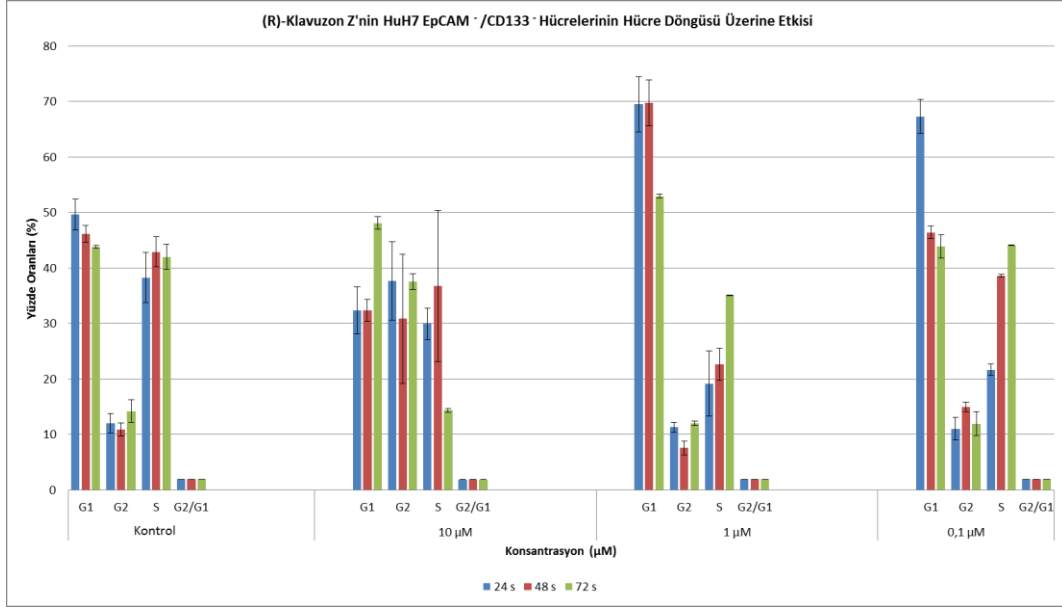
(R)-Klavuzon Z'nin hücre döngüsü üzerindeki etkisi anlamak için 60.000 hücre 6 kuyucuklu mikratabakaya ekilip 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında hücreler 10 – 1 – 0,1 μM konsantrasyonlarındaki ilaç adayı molekül ile muamele edildi. Hücre döngülerinin doz ve zamana bağlı değişim grafikleri her bir hücre hattı için aşağıdaki Şekil 9, Şekil 10, Şekil 11'de gösterilmiştir.



Şekil 9. (R)-Klavuzon Z'nin Huh-7 Parental Hücrelerinin Hücre Döngüsü Üzerine Etkisi



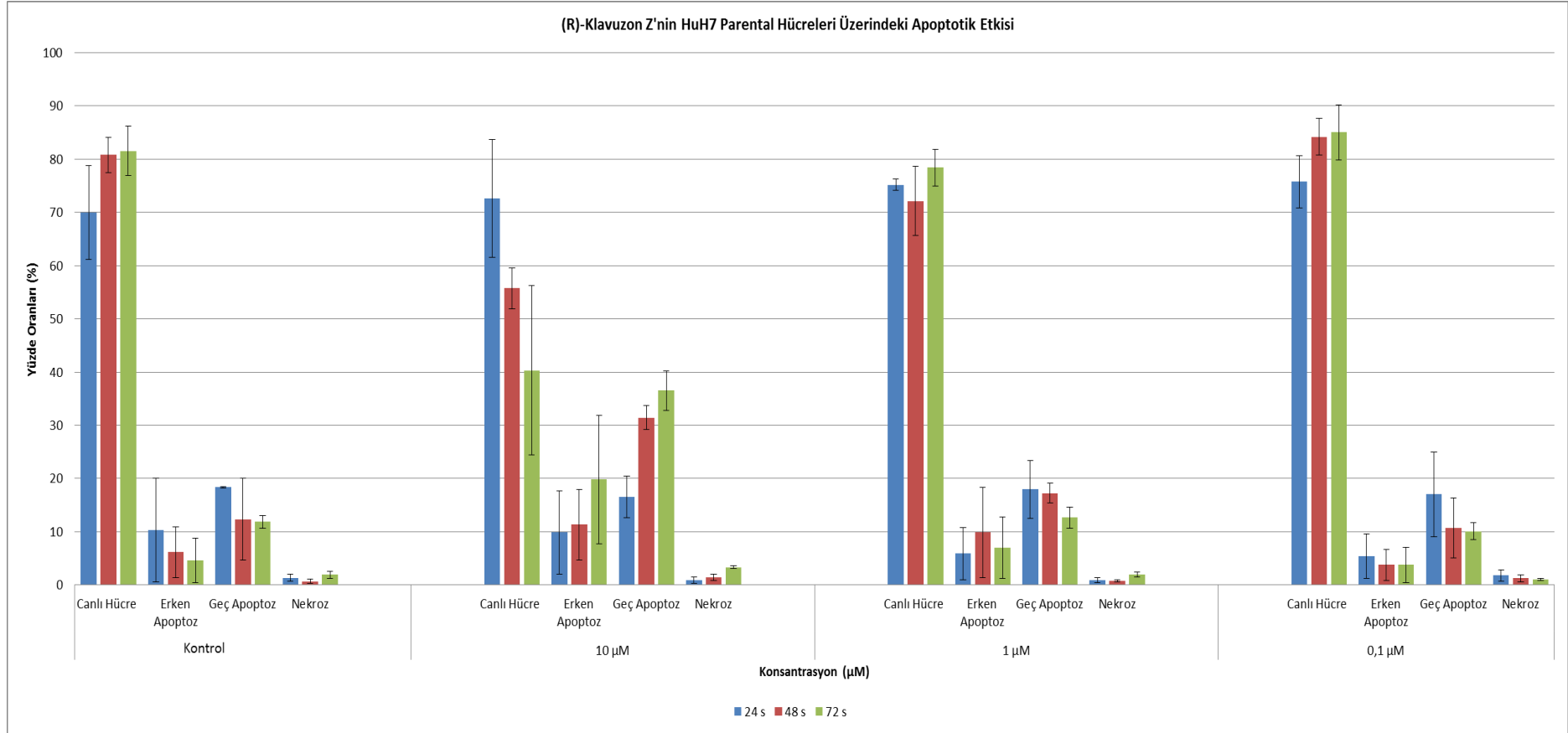
Şekil 10. (R)-Klavuzon Z'nin Huh-7 EpCAM⁺/CD133⁺ Hücrelerinin Hücre Döngüsü Üzerine Etkisi



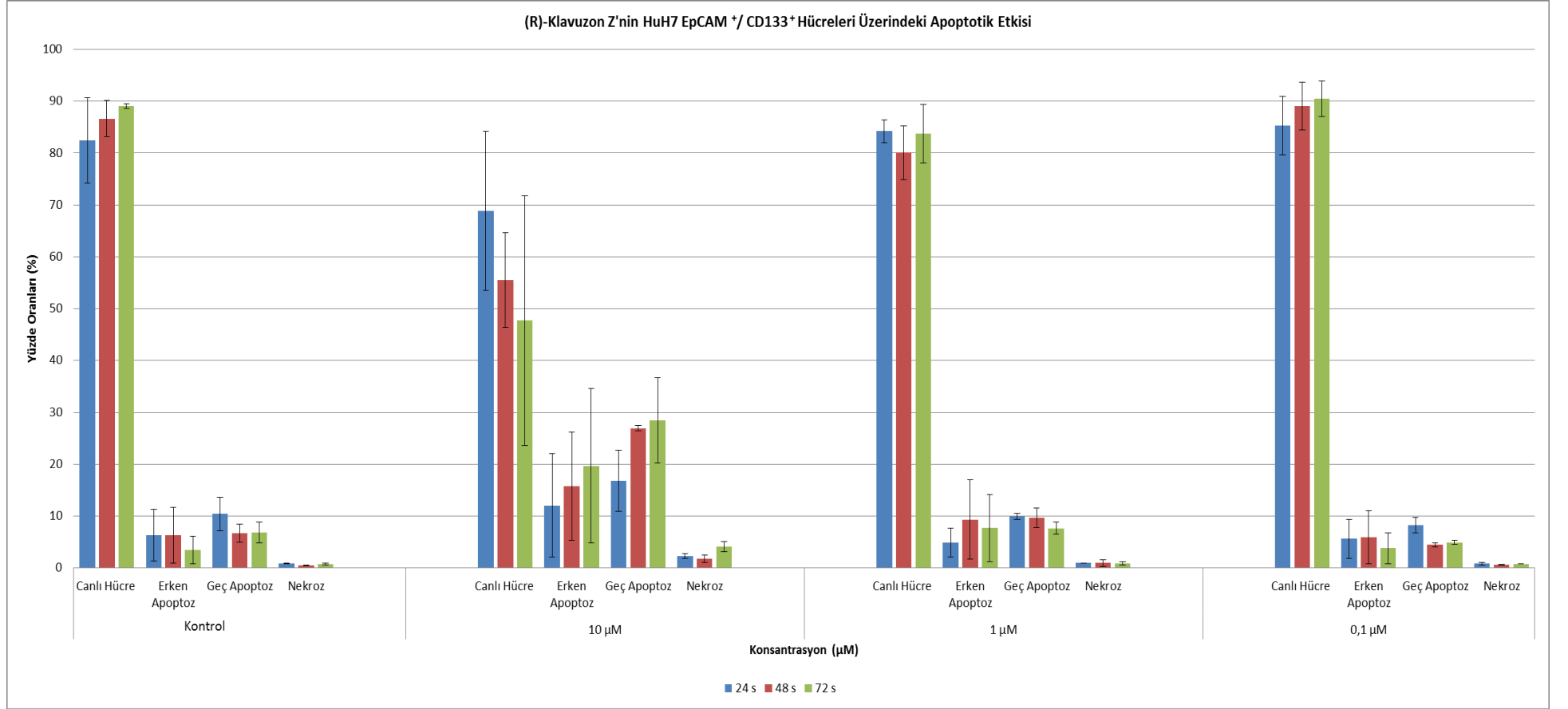
Şekil 11. (R)-Klavuzon Z'nin Huh-7 EpCAM+/CD133+ Hücrelerinin Hücre Döngüsü Üzerine Etkisi

3.3. Apoptoz Analizi

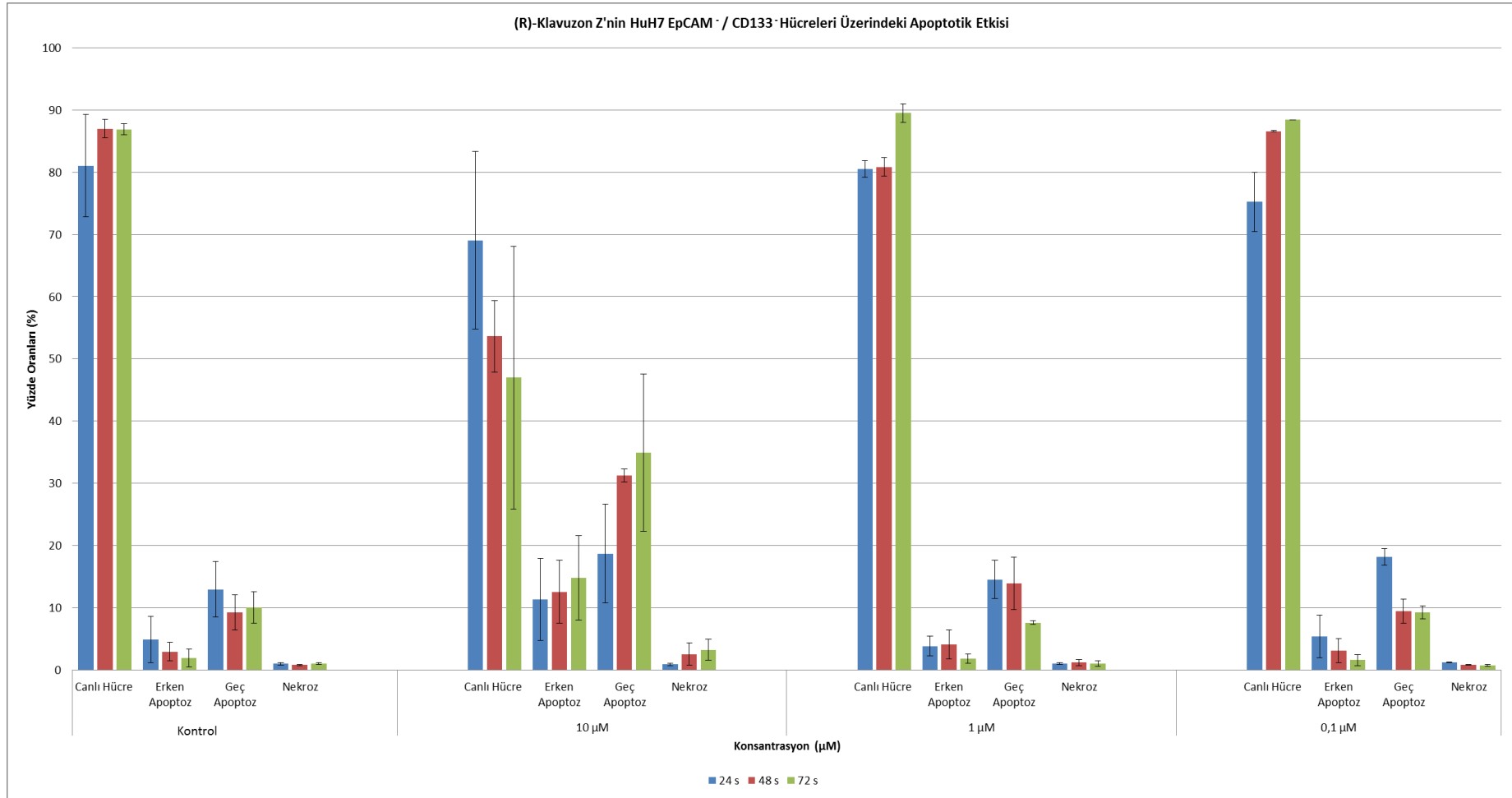
(R)-Klavuzon Z'nin apoptoz üzerindeki etkisi anlamak için 60.000 hücre 6 kuyucuklu mikratabakaya ekilip 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında hücreler 10 – 1 – 0,1 µM konsantrasyonlarındaki ilaç adayı molekül ile muamele edildi. Apoptoz çeşitlerinin ve oranlarının doz ve zamana bağlı değişim grafikleri her bir hücre hattı için aşağıdaki Şekil 12, Şekil 13, Şekil 14'de gösterilmiştir.



Şekil 12. (R)-Klavuzon Z'nin HuH-7 Parental Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkisi



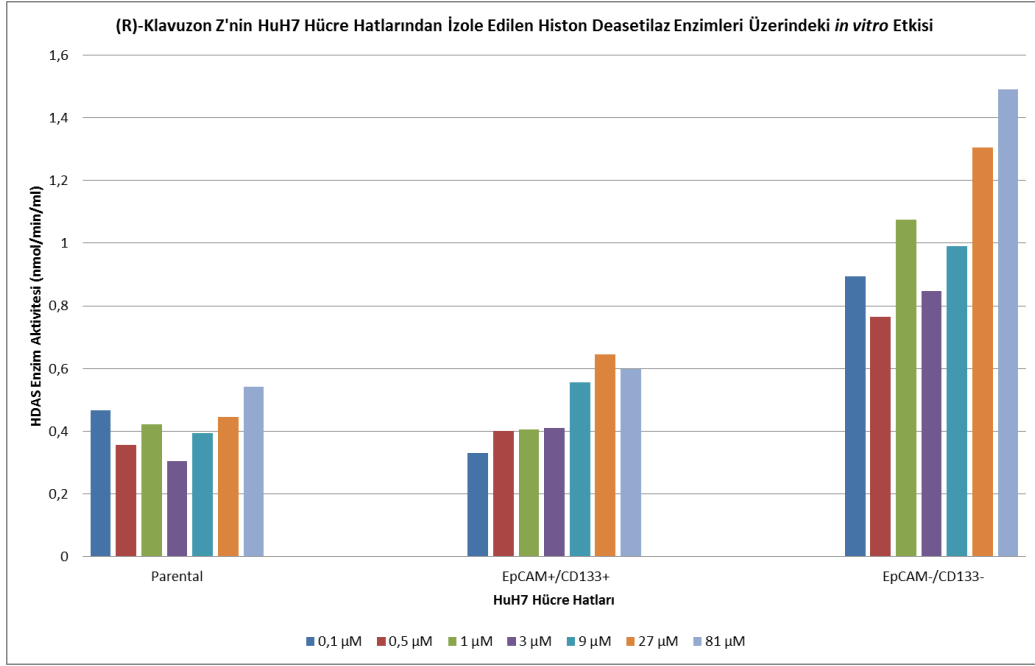
Şekil 13. (R)-Klavuzon Z'nin Huh-7 EpCAM⁺/CD133⁺ Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkisi



Şekil 14. (R)-Klavuzon Z'nin Huh-7 EpCAM⁺/CD133⁺ Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkisi

3.4. *In vitro* Histon Deasetilaz (HDAS) Enzim Aktivite Ölçümü

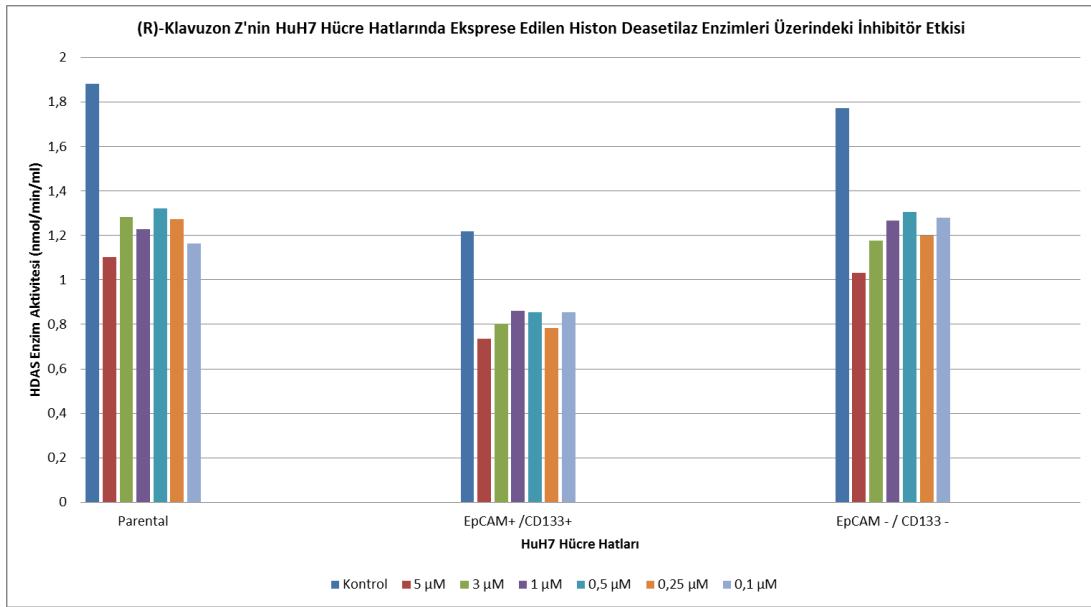
(R)-Klavuzon Z'nin hücre nükleusunda bulunan sınıf I ve sınıf II Histon Deasetilaz enzimleri üzerindeki etkisini incelemek için öncelikle üç hücre hattından nükleus proteini izolasyonu enzim aktivitesi ölçmek için kullanılan HDAC Fluorometric Activity Assay Kitinde (Cayman) tavsiye edilen manuel yöntem ile yapıldı. İzole edilen proteinlerin konsantrasyonları Bradford yöntemi kullanılarak belirlendi. Her bir hücre hattından izole edilen proteinlerden 96 kuyucuklu siyah mikrotabanın her bir kuyucuğundaki reaksiyonlarda kullanılmak üzere 5 µg nükleus proteini (R)-Klavuzon Z ile muamele edildi. Histon Deasetilaz enzim kaynağı olarak kullanılan 5 µg nükleus proteinleri 81 – 27 – 9 – 3 – 1 – 0,5 – 0,1 µM ilaç konsantrasyonları ile kitte önerilen prosedüre göre muamele edildi. Reaksiyon sonucunda (R)-Klavuzon Z'nin *in vitro* koşullardaki Histon Deasetilaz enzimleri üzerindeki etkisi Şekil 15'de gösterilmiştir.



Şekil 15. (R)-Klavuzon Z'nin Huh-7 Hücre Hatlarından İzole Edilen Histon Deasetilaz Enzimleri Üzerindeki *in vitro* Etkisi

3.5. *In vivo* (hücre temelli) Histon Deasetilaz (HDAS) Enzim Aktivitesi Ölçümü

(R)-Klavuzon Z'nin hücreler canlıyken hücrelerin nükleus ve stoplazmalarına ulaşım normal hücresel işlevler devam ediyorken histon deasetilaz enzimlerini inhibe edip etmediğini anlamak için canlı hücrelerden doğrudan enzim aktivite ölçümü yapıldı. Bunun için 10.000 hücre kit ile sağlanan siyah 96 kuyucuklu mikrotabakaya inoküle edilip 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda hücreler 5 – 3 – 1 – 0,5 – 0,25 – 0,1 μM konsantrasyonlarındaki (R)-Klavuzon Z ile muamele edildi. İlaç uygulaması sonrasında hücrelerden elde edilen histon deasetilaz enzim inhibisyonları aşağıdaki Şekil 16'de gösterilmiştir.



Şekil 16. (R)-Klavuzon Z'nin Huh-7 Hücre Hatlarında Ekspres Edilen Histon Deasetilaz Enzimleri Üzerindeki İnhibitör Etkisi

3.6. Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile p21 ve p27 Ekspresyonunun Belirlenmesi

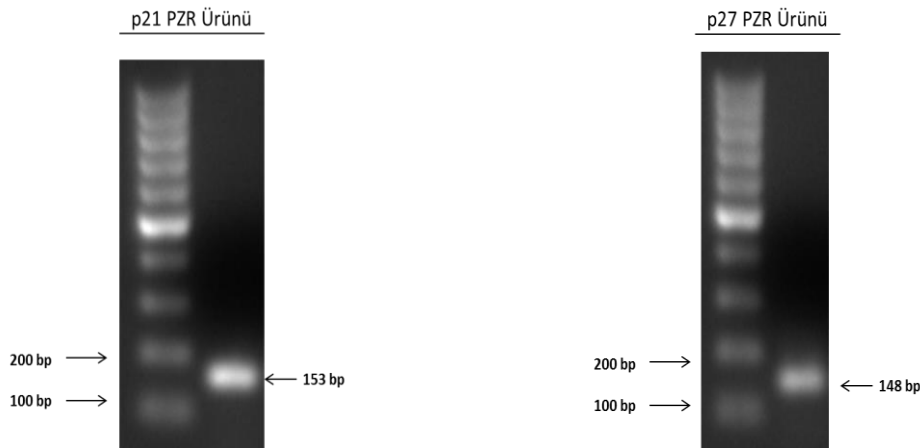
(R)-Klavuzon Z'nin hücre döngülerinde oluşturduğu G1 fazındaki birikimin p21 ve p27 ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle (R)-Klavuzon Z ile muamele edilen Huh-7 hücre hatlarındaki p21 ve p27 ekspresyonlarını incelemek için gerçek zamanlı PZR (real-time PCR) optimizasyonları yapılmıştır. Bu amaçla dizayn edilen primerler Şekil 17'de görüldüğü gibi konvensiyonel PZR ile optimize edilmişlerdir. Optimize edilmiş PCR karışımı ve koşulları aşağıdaki Tablo 1 ve Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 1. p21 ve p27 PZR Karışımı

p21 ve p27 PZR Karışımı	Hacim (µl)
dH ₂ O	14,65
Tampon Solusyonu (KCl içeren)	2
25 mM MgCl ₂	1,2
10 mM dNTP karışımı	0,4
10 µM Forward Primer	0,5
10 µM Reverse Primer	0,5
Taq DNA Polimeraz	0,25

Tablo 2. p21 ve p27 PZR Koşulları

p21 ve p27 PZR Koşulları		
Başlangıç Denatürasyonu	95 °C 3 dakika	1 X
Denatürasyon	95 °C 30 saniye	40 X
Hibridizasyon (Annealing)	58 °C 30 saniye	
Uzama	72 °C 45 saniye	
Son Uzama	72 °C 5 dakika	1 X



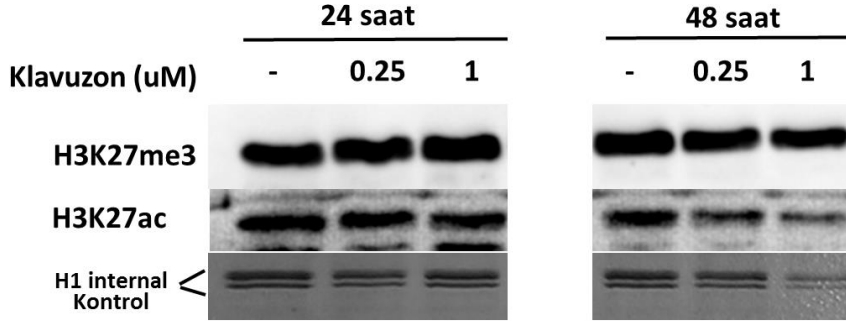
Şekil 17. p21 ve p27 PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Görüntüleri

İki gen için yapılacak ekspresyon analizinin optimizasyonları kullanılacak olan SYBR Green PCR Master Mix ile devam etmektedir.

3.7. Western Blot ile Histon Proteinlerinin Asetilasyon Analizi

In vitro ve in vivo deneyler sonucunda (R)-Klavuzon Z'nin hücrelerdeki histon deasetilaz enzim aktivitesini inhibe ettiği gözlemlendi. Bu global etkinin spesifik bir histon asetilasyon bölgesi olan H3K27'ye spesifik antikor ile histon modifikasyon düzeyinin belirlenmesi için 0.25 μ M ve 1 μ M (R)-Klavuzon Z uygulanan Huh-7 hücrelerinden histon izolasyonu yapılarak, western blot deneyi yapıldı. Bunun için 500.000 hücre; 1 ve 0,25 μ M konsantrasyonlarında (R)-Klavuzon Z ile 24 ve 48 saat boyunca inkübe edildi. (R)-Klavuzon Z'nin Huh-7 parental hücreleri üzerinde doza ve zamana bağlı olarak H3K27 bölgesindeki asetilasyon profiline etkisinin olmadığı gözlemlendi (Şekil 18).

Epigenetik susturma mekanizması, PRC2 (polycomb repressive complex 2) kompleksinin hedef genleri H3K27 metilasyonu ile susturulmasıyla başlar. Eğer K27 önceden asetile ise bu bölgenin metilasyonu için ilk önce PRC2 ile etkileştiği bilinen histon deasetilaz (HDAC) tarafından deasetilasyon gerekmektedir. Bu histon 3 lizin 27 trimetilasyon modifikasyon bölgesine spesifik antikor (anti-H3K27me3) kullanılarak yapılan western blot analizi sonucunda da (R)-Klavuzon Z'nin Huh-7 parental hücreleri üzerinde doza ve zamana bağlı olarak H3K27 bölgesindeki trimetilasyon profiline etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 18). Proje kapsamındaki diğer hücre hatlarıyla western blot çalışmaları devam etmektedir.



Şekil 18. (R)-Klavuzon Z'nin Huh-7 Parental Hücrelerindeki H3K27 Bölgesinin Asetilasyon ve Metilasyon Profiline Etkisi

4. TARTIŞMA

4.1. Sitotoksisite Analizi

Sitotoksisite analizi sonucunda üç hücre hattı için de negatif kontrollerden alınan değerler birbirine çok yakın olması ekim sırasında hücre sayıları arasında fark olmadığının göstergesidir.

(R)-Klavuzon Z'nin; Huh-7 parental hücreleri üzerindeki IC₅₀ değeri 24 saatte 1,25 ve 0,625 µM konsantrasyonlarında , 48 saatte 1,25 µM ve 72 saatte de 1,25 µM konsantrasyon değerleri olarak bulunmuştur. Huh-7 EpCAM⁺/CD133⁺ hücreleri üzerindeki IC₅₀ değeri 24 saatte 10 µM , 48 saatte 2,5 µM ve 72 saatte de 1,25 µM konsantrasyon değerleri olarak bulunmuştur. Huh-7 EpCAM⁻/CD133⁻ hücreleri üzerindeki IC₅₀ değeri 24 saatte 10 µM , 48 saatte 1,25 µM ve 72 saatte de 0,625 µM konsantrasyon değerleri olarak bulunmuştur.

İnkübasyon süreleri temel alındığında (R)-Klavuzon Z'nin üç farklı hücre hattı üzerindeki etkileri farklılık göstermektedir. (R)-Klavuzon Z ; 24 saatlik inkübasyonda, parental hücreler üzerinde yaklaşık 1,25 ve 0,625 µM konsantrasyonlarında IC₅₀ değerine ulaşabiliyorken Huh-7 EpCAM⁺/CD133⁺ ve Huh-7 EpCAM⁻/CD133⁻ hücreleri üzerinde IC₅₀ değerine ulaşamamıştır. Her iki hücre hattı (EpCAM⁺/CD133⁺ ve Huh-7 EpCAM⁻/CD133⁻) da 24 saatlik inkübasyonda Huh-7 parental hücrelere göre daha dirençli davranmıştır. (R)-Klavuzon Z ; 48 saatlik inkübasyonda, parental hücreleri ve Huh-7 EpCAM⁻/CD133⁻ hücreleri üzerinde yaklaşık 1,25 µM konsantrasyonunda IC₅₀ değerine ulaşabiliyorken Huh-7 EpCAM⁺/CD133⁺ hücreleri üzerinde 2,5 µM konsantrasyonunda IC₅₀ değerine ulaşabilmiştir. 48 saatlik inkübasyonda tüm hücre hatları IC₅₀ değerine ulaşabilmektedir ancak EpCAM⁺/CD133⁺ hücreler diğer iki hücre hattından daha dirençli davranmaktadır. (R)-Klavuzon Z ; 72 saatlik inkübasyonda, parental ve EpCAM⁺/CD133⁺ hücreleri üzerinde yaklaşık 1,25 konsantrasyonunda, Huh-7 EpCAM⁻/CD133⁻ hücreleri üzerinde yaklaşık 0,625 µM konsantrasyonunda IC₅₀ değerine ulaşmıştır.

Yapılan sitotoksisite analizi sonucunda (R)-Klavuzon Z'nin hem Huh-7 parental hücrelerini hem de kanser kök hücresi olarak düşünülen Huh-7 EpCAM⁺/CD133⁺ ve Huh-7 EpCAM⁻/CD133⁻ hücrelerini doza ve zamana bağlı olarak öldürebildiği görülmüştür. (R)-Klavuzon Z, 24 saatte Huh-7 parental ve Huh-7 EpCAM⁻/CD133⁻ hücrelerini farklı dozlarda da olsa IC₅₀ değerinde öldürebilmektedir. Huh-7 EpCAM⁺/CD133⁺ hücrelerini 24 saatte IC₅₀ değeri ile öldüremese de, 48 saatte 2,5 µM ve 72 saatte 1,25 µM gibi düşük dozlarda öldürebildiği görülmüştür.

4.2. Hücre Döngüsü Analizi

Hücre döngüsü analizinde, (R)-Klavuzon Z parental hücrelerde 24 saatlik inkübasyonda 10 µM konsantrasyonunda G2 fazında ciddi bir birikime neden olurken G1 fazındaki birikmeyi ciddi bir oranda azaltmıştır. Bunun yanı sıra; 1 ve 0,1 µM konsantrasyonlarında G1 fazında artışa ve G2 fazında azalışa sebep olmuştur. Parental hücreler üzerinde 48 saatte; 10 µM konsantrasyonunda G2 fazında artış varken G1 fazında ciddi bir azalma vardır. 1 µM konsantrasyonu G1 fazında önemli bir artışa sebep olurken G2 ve S fazlarında hafif bir azalmaya neden olmuştur. 0,1 µM konsantrasyonu hücre döngülerinde 48 saatte ciddi değişikliklere sebep olmamıştır. (R)-Klavuzon Z, 72 saatlik inkübasyonda 10 µM konsantrasyonunda G2 fazında ciddi bir artışa sebep olurken , G1 fazında hafif bir artış yapmaktadır bununla beraber S fazında ciddi bir azalışa neden olmaktadır. 1 ve 0,1 µM konsantrasyonlarının 72 saatte hücre döngüleri üzerine etkisinin olmadığı görülmüştür.

Huh-7 EpCAM⁺/CD133⁺ hücreleri üzerinde yapılan hücre döngüsü analizlerinde, 24 saatlik inkübasyonda 10 µM konsantrasyonun G2 fazını ciddi bir oranda arttırdığını ve G1 fazında da azalmaya sebep olduğu görülmüştür. 1 ve 0,1 µM konsantrasyonda G1 fazında bir artış ve S fazında bir azalma olduğu görülmüştür. 48 saatlik inkübasyonda, 10 µM konsantrasyonda G2 fazında bir artış olurken S fazında hafif bir azalma olduğu görülmüştür. 1 µM konsantrasyonda, G1 fazında önemli bir artış varken G2 fazında ciddi bir azalma vardır. Bunun yanı sıra S fazında da hafif bir azalma görülmektedir. 0,1 µM konsantrasyonda G1 fazında hafif bir artış olduğu görülmüştür. 72 saatlik inkübasyonda, 10 ve 1 µM konsantrasyonları G1 fazında hafif bir artışa neden olurken S fazında hafif bir azalmaya neden olmaktadır. 0,1 µM konsantrasyonun hücre döngülerini etkilemediği görülmüştür.

Huh-7 EpCAM⁻/CD133⁻ hücreleri üzerinde yapılan hücre döngüsü analizlerinde, 24 saatlik inkübasyonda 10 µM konsantrasyonun G1 fazını önemli ölçüde azalttığı ve G2 fazını da önemli oranda arttırdığı görülmüştür. S fazında da hafif oranda azalma görülmüştür. 1 ve 0,1 µM konsantrasyonlarında G1 fazında ciddi bir artış yaşanırken S fazında da önemli bir artış görülmüştür. 48 saatlik inkübasyonda, 10 µM konsantrasyonu G1 fazında önemli bir azalmaya sebep olurken, G2 fazında ciddi bir artış yaratmaktadır. 1 µM konsantrasyonda G1 fazının ciddi bir şekilde arttığı ve S fazınında önemli bir ölçüde azaldığı görülmüştür. 0,1 µM konsantrasyonda önemli bir değişim görülmemiştir. 72 saatlik inkübasyonda, 10 µM konsantrasyonda G2 fazında ciddi bir artış olduğu ve S fazında önemli bir azalma yaşandığı görülmüştür. 1 µM konsantrasyonda G1 fazında hafif bir artış gözlemlenirken 0,1 µM konsantrasyonun herhangi bir değişime sebep olmadığı bulunmuştur.

4.3. Apoptoz Analizi

Apoptoz analizlerinde, (R)-Klavuzon Z parental hücrelerde 24 saatlik inkübasyonda 10 µM konsantrasyonunda geç apoptozda küçük bir azalmaya sebep olduğu görülmüştür. 1 ve 0,1 µM konsantrasyonda erken apoptoz oranında ciddi bir azalma olduğu bulunmuştur. 48 saatlik inkübasyonda, 10 µM konsantrasyonda geç apoptozun ciddi bir oranda arttığı ve erken apoptozda da hafif bir artış olduğu görülmüştür. 1 µM konsantrasyonda erken apoptozda hafif bir artış olmuştur. 0,1

μM konsantrasyonda ciddi bir değişiklik yaşanmamıştır. 72 saatlik inkübasyonda, 10 μM konsantrasyonda hücre canlılığının ciddi bir oranda azaldığı, erken ve geç apoptozun ciddi bir oranda arttığı görülmüştür. 1 ve 0,1 μM konsantrasyonda erken ve geç apoptoz oranlarında değişiklik yaşanmamıştır.

Huh-7 EpCAM⁺/CD133⁺ hücreleri üzerinde yapılan apoptoz analizlerinde, 24 saatlik inkübasyonda 10 μM konsantrasyonda hücre canlılığının hafif bir miktarda azaldığı, erken ve geç apoptozun az miktarda arttığı bulunmuştur. 1 ve 0,1 μM konsantrasyonlarda ise önemli bir değişiklik görülmemiştir. 48 saatlik inkübasyonda 10 μM konsantrasyonda, canlı hücre sayısının azaldığı ve önemli bir oranda erken ve geç apoptozun arttığı gözlemlenmiştir. 1 ve 0,1 μM konsantrasyonlarda önemli bir değişiklik görülmemiştir. 72 saatlik inkübasyonda 10 μM konsantrasyonda hücre canlılığının azaldığı , erken ve geç apoptoz oranlarının ciddi oranda arttığı gözlemlenmiştir. 1 ve 0,1 μM konsantrasyonlarda önemli bir değişiklik görülmemiştir.

Huh-7 EpCAM⁻/CD133⁻ hücreleri üzerinde yapılan apoptoz analizlerinde, 24 saatlik inkübasyonda 10 μM konsantrasyonda erken apoptozda önemli bir artışın, geç apoptozda da hafif bir artışın olduğu görülmüştür. 1 ve 0,1 μM konsantrasyonlarda önemli bir değişiklik görülmemiştir. 48 saatlik inkübasyonda, 10 μM konsantrasyonda geç apoptoz oranlarında ciddi bir artış olurken erken apoptoz değerlerinde de önemli bir artış yaşanmıştır. 1 μM konsantrasyonda geç apoptoz oranlarında hafif bir artış gözlemlenmiştir. 0,1 μM konsantrasyon değerinde önemli bir değişiklik yaşanmamıştır. 72 saatlik inkübasyonlarda, 10 μM konsantrasyonda erken ve geç apoptoz oranlarında ciddi artış yaşanmıştır. 1 ve 0,1 μM konsantrasyonlarda önemli bir değişiklik görülmemiştir.

4.4. *In vitro* Histon Deasetilaz (HDAS) Enzim Aktivite Ölçümü

Enzim aktivite ölçümü sonuçlarına göre hiç ilaç uygulanmamış protein örneklerinden Huh-7 EpCAM⁻/CD133⁻ hücrelerinin diğer hücre hatlarından yaklaşık 2,5 kat daha fazla histon deasetilaz enzim aktivitesi gösterdiği bulunmuştur. Aynı hücre hattının daha hızlı proliferasyon olduğu bilindiği üzere bu enzim aktivitesinin hücre hattının proliferasyonu üzerinde etkisinin olabileceği düşünülmüştür.

(R)-Klavuzon Z'nin 0,1 – 0,5 – 1 – 3 μM konsantrasyonlarda *in vitro* koşullarda Huh-7 hücre hatlarının nukleuslarından izole edilmiş histon deasetilaz enzim aktivitesinin üzerinde etkisinin olmadığını aksine 9 – 27 – 81 μM konsantrasyonlar enzim aktivitesini hafif bir oranda arttırdığı gözlemlenmiştir.

Bunun sebebinin enzim reaksiyonunun gerçekleştirildiği pH 8.0 değerinden kaynaklanabileceği ve daha düşük pH değerinde inhibisyon olma şansının yüksek olabileceği düşünülmüştür.

4.5. *In vivo* (hücre temelli) Histon Deasetilaz (HDAS) Enzim Aktivitesi Ölçümü

(R)-Klavuzon Z'nin hücrelerin içindeyken histon deasetilazları inhibe edip edemediğini anlamak için yapılan bu deneyde ilacın üç farklı hücre hattındaki histon deasetilazların enzim aktivitesini yarı yarıya inhibe ettiği bulunmuştur. En yüksek inhibisyon 5 µM değerinde yaşanırken 3 ve 1 µM değerinde inhibisyon biraz azalmakta ve 0,5 – 0,25 – 0,1 µM konsantrasyonlarında inhibisyon oranları çok farklılık göstermemekle beraberinde sabit bir değerde seyretmektedir.

In vitro HDAS aktivite deneyinde elde edemediğimiz inhibisyonun hücre temelli HDAS aktivite deneyinde elde edilmesi molekülün pH ya bağımlı çalıştığı düşüncesini oluşturmuştur. (R)-Klavuzon Z'nin yapısındaki α,β -doymamış lakton yapılarının hücre içerisinde proteinlerin nükleofilik bölgeleri ile Michael türü katılma tepkimeleri vererek biyolojik aktivite gösterdiği düşünülmektedir. Bunun yanında *in vitro* çalışmalarda bu bağlanmanın pH 8 değerinde geridönüşümlü pH 7 civarında ise geridönüşümsüz olduğu gösterilmiştir. Gerçekleştirdiğimiz *in vitro* HDAS inhibisyonu denemelerinde kullanılan kit için önerilen tamonun pH değeri 8'dir ve bu pH değerinde molekülümüzün geridönüşümlü bir şekilde proteinlere bağlanmasından dolayı kuvvetli bir inhibisyon görülmemiş olma ihtimali vardır. Diğer taraftan hücre içerisindeki kompartmanlarda pH değeri 8'den küçük olduğu için daha kuvvetli bir bağlanma ve inhibisyonun görülmüş olması mümkündür. Bunun yanı sıra *in vitro* deneyde sadece nukleusdan izole edilen enzimler bulunmaktadır ancak bu deneyde stoplazmada ve mitokondride de bulunan enzimler vardır. Bu sebeple (R)-Klavuzon Z özellikle stoplazmada görevli histon deasetilaz enzimlerini inhibe ediyor olabilir.

4.6. Western Blot ile Histon Proteinlerinin Asetilasyon Analizi

(R)-Klavuzon Z'nin hücrelerin içinde bulunan histon deasetilaz enzimlerini inhibe ettiği anlaşıldıktan sonra bu inhibisyonun sonucunda kromatinde bulunan histon proteinlerinin asetilasyon seviyelerinin artıp artmadığını kontrol etmek için western blot yöntemi ile Histon 3 lizin 27 bölgesindeki asetilasyon seviyesi anti-H3K27ac antipadisi kullanılarak incelenmiştir. HuH parental hücrelere ilaç uygulaması sonucunda Histon 3 lizin 27 bölgesindeki asetilasyon seviyesinde artış beklenirken uygulanan dozlarda 24 saat ve 48 saatlik inkübasyonların her ikisi için de asetilasyonun artmadığı görülmüştür. Bunun yanı sıra bütçe dahilinde aynı bölgedeki metilasyon profili anti-H3K27me3 antipadisi kullanılarak incelenmiş ve metilasyon seviyesinde de bir değişiklik olmadığı bulunmuştur.

Parentallerde beklenen etkiyi görmememizin sebebi ilaç dozlarının ya da inkübasyon sürelerinin yeterli gelmemesi olabilir. Bununla birlikte, ilacın etki ettiği histon deasetilaz enzimlerinin bu bölgede işlev görmemesi diğer bir sebep olabilir. Bu amaçla, (R)-Klavuzon Z'nin etki ettiği spesifik histon deasetilaz enzimleri saptanmalı ve belirlenen histon deasetilaz enzimlerinin hedef histon bölgeleri çalışılmalıdır. Huh-7 EpCAM⁺/CD133⁺ ve Huh-7 EpCAM⁻/CD133⁻ hücrelerinde western blot ile

asetilasyon seviyelerindeki değişimler hala çalışılmaktadır. Huh-7 parental hücrelerinde bir fark görmememize rağmen Huh-7 EpCAM/CD133- hücre hatlarının histon asetilasyonlarında bir fark görme şansımız vardır. Bunun en büyük sebebi, in vitro histon deasetilaz enzim aktivitesi alışmamızda Huh-7 EpCAM/CD133- hücrelerinin diğer iki hücre hattından yaklaşık 2,5 kat daha fazla enzim aktivitesi göstermiş olmasındır. Dolayısıyla, Huh-7 EpCAM/CD133- hücrelerinde histon asetilasyonunda artış görme şansımız daha yüksektir.

5. SONUÇ

Kanser, nükleozom ve kromatin yapısını oluşturan histonların (H2A, H2B, H3, H4) deasetilasyonu gibi pek çok epigenetik bozukluktan dolayı da ortaya çıkabilen bir hastalıktır. Pek çok kanser türünde histonların deasetilasyonundan sorumlu enzim ailesi olan histon deasetilazların (HDAS) aşırı eksprese edildiği ve buna bağlı olarak nükleozomlardan asetil gruplarının uzaklaştırılıp tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonlarının düştüğü bilinmektedir. Kanser hücrelerindeki aşırı HDAS aktivitesini inhibe ederek kromatinin tekrar asetillenmesi ve tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonlarının artırılması kanser hücrelerini apoptoza yönlendirmekteki en büyük hedeflerden birisidir. Günümüzde kemoterapide kullanılan ajanlar ile farklı kanser hücrelerinin belirli oranda öldürülebilmesine ve hasta ömrünün uzatılabilmesine karşın, hastalık belli zaman aralıklarında tekrarlayabilmektedir. Bunun en büyük sebebinin kanser kök hücreleri olduğu düşünülmektedir. Son yıllarda sadece kanser hücrelerini değil aynı zamanda kanser kök hücrelerini de apoptoza yönlendirebilen ilaçların geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Hepatosellüler karsinoma tedavisi olmayan ölümcül bir hastalıktır. Şimdiye kadar geliştirilmiş protein kinaz inhibitörü olan sorafenib hastalığı tedavi edememektedir ve sorafenib dışında başka bir ilaç FDA tarafından onay alamamıştır.

Bu proje ile (R)-Klavuzon Z ilk kez hepatosellüler karsinom hücresi olan Huh-7 parental ve bu hücre grubundan ayrımlanan Huh-7 EpCAM⁺/CD133⁺ ve Huh-7 EpCAM⁻/CD133⁻ kanser kök hücreleri üzerinde araştırılmıştır. Yapılan sitotoksosite analizi sonucunda (R)-Klavuzon Z'nin Huh-7 parental hücrelerinin sayısını 24 saatte yarıya indirebilirken, Huh-7 EpCAM⁺/CD133⁺ ve Huh-7 EpCAM⁻/CD133⁻ kanser kök hücrelerinin sayısını 48 saatte Huh-7 parental hücrelere gereken dozun iki katı oranındaki bir dozda yarıya indirebildiği görülmüştür. Huh-7 EpCAM⁺/CD133⁺ ve Huh-7 EpCAM⁻/CD133⁻ kanser kök hücreleri parental hücrelere kıyasla (R)-Klavuzon Z'ye karşı iki kat dirençli çıkmıştır. Bunun muhtemel sebebi hücre membranlarında bulunan ABC-transport proteinlerinin parental hücrelere göre kanser kök hücrelerinde daha fazla ifade edilmesidir.

Yapılan in vitro HDAS enzim aktivitesi analizinde molökülümüzün Huh-7 hücre hatlarından izole edilen HDAS'ları in vitro koşulda inhibe etmediği görülmüştür. Ancak in vivo (hücre temelli) yapılan HDAS enzim aktivite deneyinde (R)-Klavuzon Z'nin 0,1 uM gibi düşük bir konsantrasyonda dahi hücrelerdeki HDAS aktivitesini yaklaşık %50 oranında inhibe ettiği bulunmuştur. İn vitro da inhibisyon göremeyip hücre temelli enzim aktivite deneyinde inhibisyon görmemizin muhtemel sebepleri şu şekilde sıralanabilir; in vitro deneyde kullanılan kit tamponu pH 8.00' de çalışmaktadır. Bu pH değeri bizim molökülümüzün enzim ile etkileşmesini engellemiş olabilir. Ancak hücre temelli deneyde (R)-Klavuzon Z, hücre kompartmanları arasındaki pH değişimi nedeniyle pH 8.00 dışındaki bölgelerde aktif hale gelmiş olabilir. Hücre temelli deneyde görülen inhibisyonun diğer bir sebebi, stoplazmada bulunan HDAS enzimleri ile ilişkili olabilir çünkü in vitro deneyde sadece nükleustan izole edilen HDAS'lar ile deney yapılmıştı. Ancak hücre temelli deneyde hem nükleustaki hem de stoplazmadaki enzimlerle çalışılmıştır.

Bu projede ortaya çıkardığımız HDAS enzim aktivitelerinin (R)-Klavuzon Z tarafından inhibe edilmesi, molekülümüzün HDAS inhibitörü olabileceğini ve bu sayede histonların tekrar asetillenerek özellikle karaciğerde ekspresyonu az olan tümör baskılayıcı genlerin (p53, Rb1, CDKN2A, IGF2R, PTEN) ekspresyonlarının arttırılabileceğinin göstergesi olmuştur.

Bu projenin yarattığı en büyük özgün değerlerden birisi hepatosellüler karsinoma kök hücrelerinin öldürülebilmesi için (R)-Klavuzon Z'nin araştırılıp kanser kök hücreleriyle yapılan kısıtlı çalışmalara yeni bir ilaç molekülü ile literatür bilgisi sunulmuş olmasıdır. Elde edilen sonuçlar ile hem hepatosellüler karsinoma hücrelerine hem de kanser kök hücrelerine karşı (R)-Klavuzon Z ile apoptozun sağlanması hedeflenmektedir.

Hücre kültüründe elde ettiğimiz bilgiler farklı mekanizmalar üzerinden hem in vitro koşullarda hem de in vivo koşullarda araştırma yapmak için zemin hazırlamıştır. Bu sayede apoptozun sağlanmasının yanında molekülün dokuda var olan ve kanser kök hücrelerine dönüşme olasılığı yüksek olan hücrelerin sadece yenilenme özelliklerini tetikleyebilme ya da bu hücreleri kanser hücrelerine dönüştürmeyip karaciğer hücrelerine dönüştürme özelliği gelecekte araştırılabilecektir. Yapılacak denemelerle hepatosellüler karsinoma kök hücrelerinin moleküle kemoresistans özelliği incelenebilecektir. Gelecekte farelerde yapılabilecek in vivo deneylerde hastalığın seyrini iyileştirebilmesi, hastalığı durdurabilmesi ve tümör kitlesinin boyutunu küçültebilmesi gibi özelliklerinin test edilebilmesi için zemin oluşturmuştur.

6. Kaynaklar

Androutsellis-Theotokis A, Leker RR, Soldner F, Hoepfner DJ, Ravin R, Poser SW, et al., Notch signalling regulates stem cell numbers in vitro and in vivo, *Nature*, 442(7104):823–6, (2006).

Bhaskara S, Chyla BJ, Amann JM, Knutson SK, Cortez D, Sun Z-W, et al., Deletion of histone deacetylase 3 reveals critical roles in S phase progression and DNA damage control, *Molecular Cell*, 30(1):61–72, (2008).

Bhaskara S, Knutson SK, Jiang G, Chandrasekharan MB, Wilson AJ, Zheng S, et al., Hdac3 is essential for the maintenance of chromatin structure and genome stability, *Cancer Cell*, 18(5):436–47, (2010).

Bray SJ., Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(9):678–89, (2006).

Bozkaya G., Erdal E., Atabey N., Cooperative interaction of MUC1 with the HGF/c-Met pathway during hepatocarcinogenesis, *Mol. Cancer*, 2012

Çağır Ali, Yılmaz Özgür, Kasaplar Pinar., 6-Bicycloaryl substituted (S)- and (R)-5,6-dihydro-2H-pyran-2-ones: asymmetric synthesis, and anti-proliferative properties, *Bioorg Med Chem*. 2009 Jan 1;17(1):311-8. doi: 10.1016/j.bmc.2008.10.069. Epub 2008 Nov 5.

Çakmak, Ö.Y., DNA Fragmentation, Cell Cycle Analysis and Apoptotic Cell Analysis (ANNEXIN-V), in 1st Theoretical Cell Death Research Techniques Course 2011. p. 223-232.

Calvisi DF, Simile MM, Ladu S, Frau M, Evert M, Tomasi ML, et al., Activation of v-Myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog-like2 (MYBL2)-LIN9 complex contributes to human hepatocarcinogenesis and identifies a subset of hepatocellular carcinoma with mutant p53, *Hepatology*, 53(4):1226–36, (2011).

Cao L, Zhou Y, Zhai B, Liao J, Xu W, Zhang R, et al., Sphere-forming cell subpopulations with cancer stem cell properties in human hepatoma cell lines, *BMC Gastroenterology*, BioMed Central, 11(1):71, (2011).

Carlisi D, Vassallo B, Lauricella M, Emanuele S, D'Anneo A, Di Leonardo E, et al., Histone deacetylase inhibitors induce in human hepatoma HepG2 cells acetylation of p53 and histones in correlation with apoptotic effects. *International Journal of Oncology*, 32(1):787–95, (2010).

Cerdan C, Bhatia M., Novel roles for Notch, Wnt and Hedgehog in hematopoiesis derived from human pluripotent stem cells, *The International journal of developmental biology*, 54(6-7):955–63, (2010).

Chen X, Cheng Q, She M, Wang Q, Huang X, Cao L, et al., Expression of sonic hedgehog signaling components in hepatocellular carcinoma and cycloamine-induced apoptosis through Bcl-2 downregulation in vitro, *Archives of Medical Research*, 41(5):315–23, (2010).

Cheng ASL, Lau SS, Chen Y, Kondo Y, Li MS, Feng H, et al., EZH2-mediated concordant repression of Wnt antagonists promotes β -catenin-dependent hepatocarcinogenesis, *Cancer Research*, 71(11):4028–39, (2011).

Cheng WT, Xu K, Tian DY, Zhang ZG, Liu LJ, Chen Y., Role of Hedgehog signaling pathway in proliferation and invasiveness of hepatocellular carcinoma cells, *Int J Oncol*, 34(3):829–36, (2009).

Chiba T, Kita K, Zheng YW, Yokosuka O, Saisho H, Iwama A, Nakauchi H, Taniguchi H, Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties, *Hepatology*, 44(1):240–251, (2006).

Chiba T, Miyagi S, Saraya A, Aoki R, Seki A, Morita Y, et al., The polycomb gene product BMI1 contributes to the maintenance of tumor-initiating side population cells in hepatocellular carcinoma, *Cancer Research*, 68(19):7742–9, (2008).

Choi HN, Bae JS, Jamiyandorj U, Noh SJ, Park HS, Jang KY, et al., Expression and role of SIRT1 in hepatocellular carcinoma, *Oncology Reports*, 26(2):503–10, (2011).

De La Coste A, Romagnolo B, Billuart P, Renard CA, Buendia MA, Soubrane O, et al., Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(15):8847–51, (1998).

Eichenmüller M, Gruner I, Hagl B, Häberle B, Müller-Höcker J, Von Schweinitz D, et al., Blocking the hedgehog pathway inhibits hepatoblastoma growth. *Hepatology*, 49(2):482–90, (2009).

Gahr S, Peter G, Wissniowski TT, Hahn EG, Herold C, Ocker M., The histone-deacetylase inhibitor MS-275 and the CDK-inhibitor CYC-202 promote anti-tumor effects in hepatoma cell lines, *Oncology Reports*, 20(5):1249–56, (2008).

Gao J, Song Z, Chen Y, Xia L, Wang J, Fan R, et al. Deregulated expression of Notch receptors in human hepatocellular carcinoma. *Digestive and liver disease official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*, 40(2):114–21, (2008).

Grant S, Easley C, Kirkpatrick P., Vorinostat. *Nat Rev Drug Discov*, 6:21–22, (2007).

Haberland M, Montgomery RL, Olson EN, The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy, *Nature Reviews Genetics*, 10(1):32–42, (2009).

Huang BH, Laban M, Leung CH-W, Lee L, Lee CK, Salto-Tellez M, et al., Inhibition of histone deacetylase 2 increases apoptosis and p21Cip1/WAF1 expression, independent of histone deacetylase 1, *Cell Death and Differentiation*, 12(4):395–404, (2005).

Huang S-MA, Mishina YM, Liu S, Cheung A, Stegmeier F, Michaud GA, et al., Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling, *Nature*, 461(7264):614–20, (2009).

Huang H., Liu J., L-Carnitin is an endogenous HDAC inhibitor selectively inhibiting cancer cell growth in vivo and in vitro, *Plos One*, 2012

Idobe Y, Murawaki Y, Kitamura Y, Kawasaki H, Expression of transforming growth factor-beta 1 in hepatocellular carcinoma in comparison with the non tumour tissue, *Hepatogastroenterology*, 50 54–59, (2003).

Ikegami T., Transforming growth factor-beta signaling and liver cancer stem cell, *Hepatol Res*. 39: 847-849, (2009).

Ingham PW, McMahon AP. , Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles, *Genes Dev.*, 15: 3059-3087, (2001).

Kasaplar P, Yilmazer O, Cağır A., 6-Bicycloaryl substituted (S)- and (R)-5,6-dihydro-2H-pyran-2-ones: asymmetric synthesis, and anti-proliferative properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17(1):311–8, (2009).

Kasper M, Regl G, Frischauf A-M, Aberger F., GLI transcription factors: mediators of oncogenic Hedgehog signalling, *European Journal of Cancer*, 42(4):437–45, (2006).

Kim JW, Ye Q, Forgues M, Chen Y, Budhu A, Sime J, et al., Cancer-associated molecular signature in the tissue samples of patients with cirrhosis, *Hepatology*, 39(2):518–27, (2004).

Lagger G, O'Carroll D, Rembold M, Khier H, Tischler J, Weitzer G, et al., Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression, *The European Molecular Biology Organization Journal*, 21(11):2672–81, (2002).

Laurent-Puig P, Legoix P, Bluteau O, Belghiti J, Franco D, Binot F, et al., Genetic alterations associated with hepatocellular carcinomas define distinct pathways of hepatocarcinogenesis, *Gastroenterology*, 120(7):1763–73, (2001).

Lee J-H, Choy ML, Ngo L, Foster SS, Marks PA., Histone deacetylase inhibitor induces DNA damage, which normal but not transformed cells can repair, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(33):14639–44, (2010).

Lee JW, Soung YH, Kim SY, Lee HW, Park WS, Nam SW, et al., PIK3CA gene is frequently mutated in breast carcinomas and hepatocellular carcinomas, *Oncogene*, 24(8):1477–80, (2005).

Lei W-W, Zhang K-H, Pan X-C, Wang D-M, Hu Y, Yang Y-N, et al., Histone deacetylase 1 and 2 differentially regulate apoptosis by opposing effects on extracellular signal-regulated kinase 1/2, *Cell death disease*, 1(5):e44, (2010).

Liu L, Zhu X-D, Wang W-Q, Shen Y, Qin Y, Ren Z-G, et al., Activation of beta-catenin by hypoxia in hepatocellular carcinoma contributes to enhanced metastatic potential and poor prognosis, *Clinical Cancer Research*, 16(10):2740–50, (2010).

Lobo NA, Shimono Y, Qian D, Clarke MF., The biology of cancer stem cells, *Annual Reviews* 23(July):675–99, (2007).

Ma S, Chan KW, Lee TK-W, Tang KH, Wo JY-H, Zheng B-J, et al., Aldehyde dehydrogenase discriminates the CD133 liver cancer stem cell populations. *Molecular cancer research*, 6(7):1146–53, (2008).

Machado MCC, Bellodi-Privato M, Kubrusly MS, Molan NAT, Tharcisio T, De Oliveira ER, et al., Valproic acid inhibits human hepatocellular cancer cells growth in vitro and in vivo. *Journal of experimental therapeutics oncology*, 9(2):85–92, (2011).

Marks PA., The clinical development of histone deacetylase inhibitors as targeted anticancer drugs, *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 19(9):1049–66, (2010).

Martin C, Zhang Y., The diverse functions of histone lysine methylation, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(11):838–49, (2005).

Nakamura M, Saito H, Ebinuma H, Wakabayashi K, Saito Y, Takagi T, et al., Reduction of telomerase activity in human liver cancer cells by a histone deacetylase inhibitor, *Journal of Cellular Physiology*, 187(3):392–401, (2001).

Nakanishi K, Sakamoto M, Yasuda J, Takamura M, Fujita N, Tsuruo T, et al., Critical involvement of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in anchorage-independent growth and hematogeneous intrahepatic metastasis of liver cancer, *Cancer Research*, 62(10):2971–5, (2002).

Newell P, Villanueva A, Llovet JM. Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma, *Hepatology*, 49(1):1–5, (2008).

Nian H., Dashwood H., Allyl mercaptan, a garlic derived organosulfur compound, inhibits histone deacetylase and enhances Sp3 binding on the P21WAF1 promoter, *Carcinogenesis*, 2008

Ocker M, Schneider-Stock R. Histone deacetylase inhibitors: signalling towards p21cip1/waf1, *The international journal of biochemistry cell biology*, 39(7-8):1367–74, (2007).

Oishi N, Wang XW., Novel therapeutic Strategies for Targeting Liver Cancer Stem Cells, *International Journal of Biological Sciences*, 7(5):517–35, (2011).

Osawa T, Muramatsu M, Wang F, Tsuchida R, Kodama T, Minami T, et al., Increased expression of histone demethylase JHDM1D under nutrient starvation suppresses tumor growth via down-regulating angiogenesis, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(51):1–5, (2011).

Quint K, Agaimy A, Di Fazio P, Montalbano R, Steindorf C, Jung R, et al. Clinical significance of histone deacetylases 1, 2, 3, and 7: HDAC2 is an independent predictor of survival in HCC. *Virchows Archiv an international journal of*

Reya T, Clevers H., Wnt signalling in stem cells and cancer, *Nature*, 434(7035):843–50, (2005).

Santoni-Rugiu E, Jensen MR, Factor VM, Thorgeirsson SS., Acceleration of c-myc-Induced Hepatocarcinogenesis by Co-Expression of Transforming Growth Factor (TGF)- α in Transgenic Mice Is Associated with TGF- β 1 Signaling Disruption, *The American journal of pathology*, 154(6):1693–700, (1999).

Sasaki M, Ikeda H, Itatsu K, Yamaguchi J, Sawada S, Minato H, et al., The overexpression of polycomb group proteins Bmi1 and EZH2 is associated with the progression and aggressive biological behavior of hepatocellular carcinoma, *Laboratory investigation a journal of technical methods and pathology*, 88(8):873–82, (2008).

Sicklick JK, Li Y-X, Jayaraman A, Kannangai R, Qi Y, Vivekanandan P, et al., Dysregulation of the Hedgehog pathway in human hepatocarcinogenesis, *Carcinogenesis*, 27(4):748–57, (2006).

Signore M, Ricci-Vitiani L, De Maria R. Targeting apoptosis pathways in cancer stem cells. *Cancer Letters*, In Press,:1–9, (2011).

Spannhoff A, Hauser A-T, Heinke R, Sippl W, Jung M., The emerging therapeutic potential of histone methyltransferase and demethylase inhibitors, *Chemmedchem*, 4(10):1568–82, (2009).

Spiegel S, Milstien S, Grant S., Endogenous modulators and pharmacological inhibitors of histone deacetylases in cancer therapy, *Oncogene*, 31(5):537–51, (2011).

Stanton BZ, Peng LF., Small-molecule modulators of the Sonic Hedgehog signaling pathway, *Molecular Biosystems*, 6(1):44–54, (2010).

Suenaga M, Soda H, Oka M, Yamaguchi A, Nakatomi K, Shiozawa K, et al., Histone deacetylase inhibitors suppress telomerase reverse transcriptase mRNA expression in prostate cancer cells, *International journal of cancer*, 97(5):621–5, (2002).

Tan J, Yang X, Zhuang L, Jiang X, Chen W, Lee PL, et al., Pharmacologic disruption of Polycomb-repressive complex 2-mediated gene repression selectively induces apoptosis in cancer cells, *Genes & Development*, 21(9):1050–63, (2007).

Tang B, Böttinger EP, Jakowlew SB, Bagnall KM, Mariano J, Anver MR, et al., Transforming growth factor-beta1 is a new form of tumor suppressor with true haploid insufficiency, *Nature Medicine*, 4(7):802–7, (1998).

Tong Q-S, Zheng L-D, Tang S-T, Ruan Q-L, Liu Y, Li S-W, et al., Expression and clinical significance of stem cell marker CD133 in human neuroblastoma, *International Journal of Clinical Practice*, 4(1):58–62 (2008).

Tsai JF, Jeng JE, Chuang LY, Yang ML, Ho MS, Chang WY, et al., Elevated urinary transforming growth factor-beta1 level as a tumour marker and predictor of poor survival in cirrhotic hepatocellular carcinoma. *British Journal of Cancer*, 76(2):244–50, (1997).

Tsukada Y, Fang J, Erdjument-Bromage H, Warren ME, Borchers CH, Tempst P, et al., Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins, *Nature*, 439(7078):811–6, (2006).

Van Zijl F, Zulehner G, Petz M, Schneller D, Kornauth C, Hau M, et al., Epithelial-mesenchymal transition and hepatocellular carcinoma, *Future oncology*, 5(8):S65–S66, (2009).

Van Zijl F, Zulehner G, Petz M, Schneller D, Kornauth C, Hau M, et al., Epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Future*, 5(8):1169–79, (2009).

Vichai V., Kirtikara K., Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening, *Nature*, 2006

Villanueva A, Chiang DY, Newell P, Peix J, Thung S, Alsinet C, et al., Pivotal role of mTOR signaling in hepatocellular carcinoma, *Progress in physiology*, 135(6):1972–1983, 1983.e1–e11, (2008).

Whetstine JR, Nottke A, Lan F, Huarte M, Smolikov S, Chen Z, et al., Reversal of histone lysine trimethylation by the JMJD2 family of histone demethylases, *Cell*, 125(3):467–81, (2006).

Wong RSY., Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment, *Journal of experimental clinical cancer research*, 30(1):87, (2011).

Woo HJ, Lee SJ, Choi BT, Park Y-M, Choi YH., Induction of apoptosis by trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, is associated with inhibition of cyclooxygenase-2 activity in human non-small cell lung cancer cells, *Experimental and Molecular Pathology*, 78(1):25–35, (2005).

Wu P, Meng L, Wang H, Zhou J, Xu G, Wang S, et al., Role of hTERT in apoptosis of cervical cancer induced by histone deacetylase inhibitor, *Biochemical and biophysical research communications*, 335(1):36–44, (2005).

Xu Y, Qu X, Zhang X, Luo Y, Zhang Y, Luo Y, et al., Midkine positively regulates the proliferation of human gastric cancer cells, *Cancer Letters*, 279(2):137–44, (2009).

Yamashita T, Budhu A, Forgues M, Wang XW., Activation of hepatic stem cell marker EpCAM by Wnt-beta-catenin signaling in hepatocellular carcinoma, *Cancer Research*, 67(22):10831–9, (2007).

Yamashita T, Forgues M, Wang W, Kim JW, Ye Q, Jia H, et al., EpCAM and alpha-fetoprotein expression defines novel prognostic subtypes of hepatocellular carcinoma, *Cancer Research*, 68(5):1451–61, (2008).

Yamashita T, Ji J, Budhu A, Forgues M, Yang W, Wang H-Y, et al., EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features, *Gastroenterology*, 136(3):1012–24 (2009).

Yang L, Xie G, Fan Q, Xie J., Activation of the hedgehog-signaling pathway in human cancer and the clinical implications, *Oncogene*, 29(4):469–81, (2010).

Yang W, Yan H-X, Chen L, Liu Q, He Y-Q, Yu L-X, et al., Wnt/beta-catenin signaling contributes to activation of normal and tumorigenic liver progenitor cells, *Cancer Research*, 68(11):4287–95, (2008).

Zhang Y, Reinberg D. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes & Development* . Cold Spring Harbor Lab 15(18):2343–60 (2001).

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje No: 113S464
Proje Başlığı: (R)-Klavuzon Z'nin karaciğer kanser hücreleri ve karaciğer kanser kök hücreleri üzerindeki antikanser özelliklerinin incelenmesi
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Doç. Dr. Ali Çağır ve Prof. Dr. Esra Erdal, Murat Delman
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Kimya Bölümü, Urla, İzmir 35430 Türkiye
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: Dokuz Eylül Üniversitesi , Tıbbi Biyoloji Bölümü, İnciraltı Kampüsü, İzmir , Türkiye
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: Kasım 2014 – Ocak 2015
Öz (en çok 70 kelime) Hepatosellüler karsinoma (HSK); dünya çapında en sık görülen beşinci kanser tipi olup kanser sebebiyle olan ölümlerin üçüncü sıradaki nedenidir ve tedavisi karaciğer transplantasyonu gibi radikal seçeneklerle sınırlı kalmaktadır. Pek çok kanser tipinde HDAS'ların aşırı ekspresyonu saptanmıştır. HDAS'ların aşırı aktivite göstermesiyle histonlardan asetil grupları uzaklaştırılıp tümör baskılayıcı genler eksprese edilememektedir. Bu çalışmada (R)-Klavuzon Z'nin 1,25 µM konsantrasyonda hücre popülasyonunun sayısını yarısına indirdiği, G1 fazında birikmeye sebep olduğu, hücre içindeki HDAS'ları inhibe ettiği bulunmuştur.
Anahtar Kelimeler: Klavuzon Z, hepatosellüler karsinoma, karaciğer kanseri, kanser kök hücresi, sitotoksik aktivite, apoptoz, histon deasetilaz inhibisyonu
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu? Evet <input type="checkbox"/> Gerekli Değil <input checked="" type="checkbox"/> Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.
Projeden Yapılan Yayınlar: Henüz bir yayın yapılmamıştır.
Ekte Bulunan "ARDEB Başarı Öyküsü Formu", "Kazanımlar" Bölümünde Belirtilen Kriterlere Göre Proje Çıktılarınızın Başarı Öyküsü Niteliği Taşdığını Düşünüyorsanız "ARDEB Başarı Öyküsü Formu"nu doldurunuz.