

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YENİ MBD2 İNHİBİTÖR ADAYLARININ İN VİTRO
SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

KASIM KAĞAN KOCA

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: PROF. DR. UYGAR HALİS TAZEBAY

ŞUBAT 2025

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YENİ MBD2 İNHİBİTÖR ADAYLARININ İN VİTRO
SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

KASIM KAĞAN KOCA

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: PROF. DR. UYGAR HALİS TAZEBAY
II. DANIŞMAN: DR. ÖĞR. ÜYESİ ZİHNİ ONUR ÇALIŞKANER

ŞUBAT 2025

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL

**INVESTIGATING THE IN VITRO CYTOTOXIC
EFFECTS OF NEW MBD2 INHIBITOR CANDIDATES**

KASIM KAĞAN KOCA

A THESIS OF MASTER OF SCIENCE
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND
GENETICS

ADVISOR: PROF. DR. UYGAR HALİS TAZEBAY
Co-ADVISOR: ASST. PROF. DR. ZİHNİ ONUR ÇALIŞKANER

FEBRUARY 2025

YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulunun 03/02/2025 tarih ve 2025/08 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 28/02/2025 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Kasım Kağan KOCA'nın tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Uygur Halis TAZEBAZ

ÜYE

: Prof. Dr. Ayten KANDİLCİ

ÜYE

: Dr. Öğr. Üyesi Tuğba BAL

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulunun

...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR



Aileme
ve
biricik sevgilime

ÖZET

Önemli ve çok yönlü bir epigenetik düzenleyici olan Methyl-CpG-binding Domain Protein 2 (MBD2)'nin, pluripotensi, hücre çoğalması, bazı bağışıklık hücrelerinin olgunlaşması, glikolitik yolak vb. birçok hücrel mekanizmada ve kanser başta olmak üzere bazı hastalıklarda rol oynadığı bildirilmiştir. MBD2'nin farklı hücre tiplerindeki (kök hücre, somatik hücre vb.) düzenleyici rolüne ve kanserde terapötik hedef olma potansiyeline rağmen şimdiye kadar tanımlanmış tek kimyasal inhibitörü KCC-07'dir. Bu tez kapsamında, daha önce *in silico* yöntemlerle tanımlanan ve MBD2'nin metillenmiş DNA-bağlanma domenini hedef alan aday inhibitörlerin, sağlıklı (HFF-1) ve farklı kanser hücre hatlarındaki (HUH-7, U-2 OS, PC-3, MCF-7) sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Bu küçük kimyasal moleküllerin hücre canlılıklarına etkisi, WST-1 proliferasyon deneyi ve akım sitometrisi (Annexin V boyama) kullanılarak, KCC-07 ile karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir.

Elde edilen sonuçlar, Bileşik 1 ve Bileşik 3'ün hücreler üzerinde anlamlı bir sitotoksik etkiye sahip olmadığını ortaya koymuştur. Buna karşın, bir diğer aday olan Bileşik 2; HUH-7, U2-OS ve MCF-7 gibi agresif veya metastatik karaktere sahip kanser hatlarının proliferasyonu ve canlılığı üzerinde %95'e varan inhibisyon sağlamıştır. Ayrıca, tüm kanser hücre hatlarında bu aday molekül için hesaplanan LC₅₀ değerlerinin, KCC-07 için hesaplanan değerlere oranla 7 kata kadar daha düşük olduğu saptandı. Kısacası; Bileşik 2, KCC-07'ye görece daha düşük doz ve daha kısa sürelerde, daha etkili bir sitotoksikite sergilemiştir. Değerlendirmelerimize göre kimyasal moleküllere en dirençli (PC-3) ve en hassas (HUH-7) kanser hatları ile HFF-1 hücre hattında, büyüme eğrilerinde görülen düşüşün nedeni araştırılmıştır. HFF-1 ve PC-3 hücrelerinde KCC-07 ve Bileşik 2'nin genel itibarıyla apoptoza neden olduğu fakat bu moleküller varlığında HUH-7 hücrelerindeki ölümün nekrozdan kaynaklandığı tespit edilmiştir.

Sonuçta; bu tez, tarafımızdan sentezlenen üç orijinal kimyasal molekülün hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerine dair ilk bulguları raporlamıştır. İkinci olarak çalışmamız, literatürde yalnızca medulloblastomda çalışılmış KCC-07'nin farklı kanser hatlarındaki sitotoksik etkilerini ilk defa kapsamlı olarak inceleyen bir nevi "KCC-07 kanser paneli" ortaya koymuştur. Böylece, bahsedilen iki önemli özgün yönü ile bu tez, epigenetik ilaç olma potansiyeline sahip yeni MBD2 inhibitör adaylarının fonksiyonel etkilerinin incelendiği araştırma projesi (TÜSEB 2022-B-02-22387) kapsamındaki ilk bulguları bize kazandırmıştır.

Anahtar Kelimeler: Epigenetik, DNA metilasyonu, histon deasetilasyonu, KCC-07, ilaç keşfi.

ABSTRACT

Methyl-CpG-binding Domain Protein 2 (MBD2) is a crucial and multifaceted epigenetic regulator implicated in various cellular processes, including pluripotency, cell proliferation, the maturation of certain immune cells, glycolytic pathways, and several diseases, particularly cancer. Despite its regulatory role in different cell types (e.g., stem cells, somatic cells) and its potential as a therapeutic target in cancer, KCC-07 remains the only chemically identified inhibitor of MBD2 to date.

In this thesis, the cytotoxic effects of candidate inhibitors—previously identified through *in silico* approaches and targeting the methylated DNA-binding domain of MBD2—were investigated in healthy (HFF-1) and various cancer cell lines (HUH-7, U-2 OS, PC-3, MCF-7). The impact of these small chemical molecules on cell viability was comparatively analyzed with KCC-07 using the WST-1 proliferation assay and flow cytometry (Annexin V staining).

The results demonstrated that Compound 1 and Compound 3 did not exhibit significant cytotoxic effects on the tested cell lines. In contrast, Compound 2 inhibited the proliferation and viability of aggressive or metastatic cancer cell lines such as HUH-7, U2-OS, and MCF-7 by up to 95%. Moreover, the LC_{50} values for this candidate molecule in all cancer cell lines were up to seven times lower than those calculated for KCC-07. Briefly, Compound 2 exhibited more effective cytotoxicity than KCC-07 at lower doses and shorter exposure times. Then, we sought the reason for the decline in growth curves in the most resistant (PC-3) and most sensitive (HUH-7) cancer lines and the HFF-1 cell line to the chemical molecules according to our findings. It was determined that KCC-07 and Compound 2 mainly caused apoptosis in HFF-1 and PC-3 cells, but the death of HUH-7 cells in the presence of these molecules resulted from necrosis.

In conclusion, this thesis reports the first findings on the cytotoxic effects of three newly synthesized original chemical molecules. Secondly, our study provides a comprehensive “KCC-07 cancer panel” by systematically evaluating the cytotoxic effects of KCC-07—previously studied only in medulloblastoma—across different cancer cell lines. With its two defined specific aspects, this thesis has given us the preliminary insights of an ongoing research project (supported by TÜSEB 2022-B-02-22387), which investigates the functional effects of novel MBD2 inhibitor candidates with potential epigenetic therapeutic applications.

Keywords: Epigenetics, DNA methylation, histone deacetylation, KCC-07, drug discovery.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimime başlamamda öncü olan, bana inanıp bana güvenen ve dersleriyle akademik anlamda hem bilgili hem de etik olmamı sağlayan birinci danışmanım Prof. Dr. Uygur Halis TAZEYAY'a çok teşekkür ederim.

Bu yüksek lisans tezinin ortaya çıkmasında, yürütülmesinde ve sonuçlandırılmasında değerli katkılarını; akademik ve sosyal hayattaki desteklerini ve yol gösterici fikirlerini hiçbir zaman esirgemeyen ikinci/eş tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Zihni Onur ÇALIŞKANER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamın başında yanımda olan, yardımını ve fikirlerini hiçbir zaman esirgemeyen ve hücre kültürü konusunda bilgi birikiminin oluşmasına katkı sağlayan değerli hocam Dr. Merve TUZLAKOĞLU ÖZTÜRK'e teşekkürü borç bilirim.

İnhibitör adaylarının sentezi sonrası, saflıklarının ve molekül yapılarının doğrulanması noktasındaki desteklerinden dolayı G.T.Ü. Kimya Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. İrem KULU'ya teşekkür ederim.

Tanıştığımız ilk andan beri desteğini ve dostluğunu her zaman yanımda hissettiğim, fikirlerini ve bilgilerini benimle her daim paylaşan arkadaşım, proje partnerim ve dostum Gizem KUGU'ya çok teşekkür ederim.

Hayatımın her anında bana koşulsuz destek veren, sevgileri ve emekleriyle bugünlere gelmemi sağlayan, her zaman en büyük güç kaynağım olan sevgili annem Aslıhan ve babam Mustafa; yanımda olmaktan asla vazgeçmeyen, desteği ve varlığıyla hayatımı güzelleştiren canım ikizim Bekir Bozkurt; hayatıma neşe katan sevgili kardeşlerim Zehra Yağmur ve Demirhan Yavuz'a tüm kalbimle teşekkür ederim.

Hayatımın her anında yanımda olan, sevgisi, desteği ve inancıyla bana güç veren; mutluluğumu kendi mutluluğu gibi gören, varlığıyla hayatımı daha anlamlı ve huzurlu kılan sevgilim Elif KIRDI'ya çok teşekkür ederim.

Bu tez, Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı (TÜSEB) tarafından desteklenen 2022-B-02-22387 nolu B Grubu Araştırma Projesi kapsamında tamamlanmıştır.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLOLAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Epigenetik	1
1.1.1. Histon Modifikasyonları	2
1.1.2. DNA Metilasyonu	4
1.1.3. RNA aracılı epigenetik mekanizmalar (RNA interference)	6
1.2. DNA Metilasyonu ve Epigenetik Etkileşimleri	8
1.2.1. Histon Deasetilasyonu	8
1.2.2. DNA Metilasyon Okuyucuları	9
1.3. MBD (Metillenmiş-DNA Bağlama Domeni) Protein Ailesi	10
1.3.1. MeCP2 ve MBD1-6	13
1.3.2. SETDB1/2 ve BAZ2A/B	13
1.4. MBD2	13
1.4.1. MBD2 Yapısı ve Fonksiyonu	14
1.4.2. MBD2 İnhibitörü	16
1.5. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	17
2. MATERYAL	19
2.1. Hücre hatları	19
2.2. Kimyasallar Maddeler	19
2.3. Cam, Plastik ve Sarf Malzemeler	20
2.4. Cihazlar	20
3. YÖNTEM	21
3.1. Hücre Kültürü, Alt Kültürleme ve Dondurma	21
3.2. İnhibitör Adaylarının Sitotoksikite Analizi	22
3.3. %50 Öldürücü Konsantrasyon (LC ₅₀) Hesaplanması	24
3.4. Akım Sitometrisi İle Apoptoz Tayini	26
3.5. Verilerin İstatistiksel Analizi	26
4. SONUÇLAR ve YORUMLAR	27
4.1. Küçük Kimyasal Moleküllerin Hücre Hatlarının Canlılığı ve Proliferasyonu Üzerindeki Sitotoksik Etkileri	27
4.1.1. Kimyasal Moleküllerin HFF-1 (Sağlıklı) Hücre Hattına Etkileri	27
4.1.2. Kimyasal Moleküllerin HUH-7 Hücre Hattına Etkileri	30
4.1.3. Kimyasal Moleküllerin U2-OS Hücre Hattına Etkileri	33
4.1.4. Kimyasal Moleküllerin PC-3 Hücre Hattına Etkileri	36
4.1.5. Kimyasal Moleküllerin MCF-7 Hücre Hattına Etkileri	39
4.1.6. Kimyasal Moleküllerin Konsantrasyona Bağlı Etkilerinin Hücre Hatları Özelinde Detaylı İncelemesi	42

4.1.7. Hücre Hatlarının KCC-07 ve Aday Moleküllere Hassasiyetinin Karşılaştırmalı Analizi	48
4.2. Kimyasal Moleküllerin Hücrelerde Neden Olduğu Ölüm Mekanizmasının İncelenmesi	51
4.2.1. HFF-1 Hücre Hattında Apoptoz Analizi	51
4.2.2. PC-3 Hücre Hattında Apoptoz Analizi	54
4.2.3. HUH-7 Hücre Hattında Apoptoz Analizi	56
5. TARTIŞMA	58
KAYNAKLAR	67
ÖZGEÇMİŞ	76
EKLER	77



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrat Derece
7-AAD	: 7-Aminoaktinomisin D
APC	: Alofikosiyanin
CpG	: Sitozin-fosfat-Guanin
dk	: Dakika
DMEM	: Dulbecco'nun Modifiye Eagle Besiyeri
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DNMT	: DNA Metiltransferaz
D-PBS	: Dulbecco'nun Fosfat Tamponlu Tuzlu Suyu
EDTA	: Etilendiamintetraasetikasit
FBS	: Fetal Sığır Serum
FDA	: Food and Drug Administration
FITC	: Floresan İzotiyosiyanat
g	: Gram
HAT	: Histon Asetiltransferaz
HDAC	: Histon Deasetilaz
HML	: Homotalik Çiftleşme Solu
HMR	: Homotalik Çiftleşme Sağ
kDa	: (kilo) Dalton
LSD1	: Lizin-Spesifik Demetilaz 1
MBD	: Metil Bağlama Domeni
mg	: Miligram
Mi-2/NuRD	: Nükleozom Remodelleme ve Deasetilaz
miRNA	: mikro RNA
ml	: Mililitre
nm	: Nanometre
PDB	: Protein Data Bankası
PI	: Propidyum İyodür
RNA	: Ribonükleik Asit
rpm	: Dakika Başına Rotasyon
sa	: Saat
SIR	: Sessiz Bilgi Düzenleyici Protein
siRNA	: kısa müdahaleci RNA
sn	: Saniye
TTF-1	: Tiroid transkripsiyon faktörü 1
v	: Hacim
WST-1	: Suda Çözünabilir Tetrazolium-1
α	: Alfa
β	: Beta
μ g	: Mikrogram
μ l	: Mikrolitre
μ m	: Mikrometre
μ M	: Mikromolar

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1: DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve RNA interference gibi epigenetik mekanizmaların şematik gösterimi.	2
Şekil 1.2: Histon Modifikasyonları.	4
Şekil 1.3: DNA Metilasyonu.	6
Şekil 1.4: RNA aracılı epigenetik düzenleme ve transkripsiyonel susturma.	7
Şekil 1.5: DNA metilasyonu ve histon deasetilazların nükleozomlar üzerindeki dinamik etkileşimi.	10
Şekil 1.6: MBD protein ailesinin keşfedilen ilk üyesi olan insan MeCP2 proteinin MBD bölgesinin yapısal konformasyonu (92 aa uzunluğunda) PDB:1QK9.	11
Şekil 1.7: MBD protein ailesi üyeleri ve işlevsel domenleri.	12
Şekil 1.8: MBD2'nin tahmini yapısal konformasyonu. (AlphaFold: AF-Q9UBB5-F1).	14
Şekil 1.9: MBD2'nin MBD bölgesinin (79 aa uzunluğunda) çift zincirli DNA'da metillenmiş mCG bölgeleriyle olan etkileşimi PDB: 6CNQ.	15
Şekil 3.1: İnhibitör adaylarının analizi için kullanılan deneysel tasarım.	25
Şekil 4.1: HFF-1 hücre hattının KCC-07 (A), Bileşik 1 (B), Bileşik 2 (C) ve Bileşik 3 (D) varlığında 3 günlük büyüme eğrisi	27
Şekil 4.2: KCC-07 (A), Bileşik 1 (B), Bileşik 2 (C) ve Bileşik 3 (D)'ün HFF-1 hücre hattı üzerindeki konsantrasyona bağlı hesaplanan %50 öldürücü doz (LC ₅₀) değerleri.	28
Şekil 4.3: KCC-07 ve Bileşik 2 için farklı günlerde hesaplanan LC ₅₀ değerlerinin (HFF-1) karşılaştırması.	29
Şekil 4.4: HUH-7 hücre hattının KCC-07 (A), Bileşik 1 (B), Bileşik 2 (C) ve Bileşik 3 (D) varlığında 3 günlük büyüme eğrisi.	30
Şekil 4.5: KCC-07 (A), Bileşik 1 (B), Bileşik 2 (C) ve Bileşik 3 (D)'ün HUH-7 hücre hattı üzerindeki konsantrasyona bağlı hesaplanan %50 öldürücü doz (LC ₅₀) değişimi.	32
Şekil 4.6: KCC-07 ve Bileşik 2 için farklı günlerde hesaplanan LC ₅₀ değerlerinin (HUH-7) karşılaştırması.	33
Şekil 4.7: U2-OS hücre hattının KCC-07 (A), Bileşik 1 (B), Bileşik 2 (C) ve Bileşik 3 (D) varlığında 3 günlük büyüme eğrisi	34
Şekil 4.8: KCC-07 (A), Bileşik 1 (B), Bileşik 2 (C) ve Bileşik 3 (D)'ün U2-OS hücre hattı üzerindeki konsantrasyona bağlı hesaplanan %50 öldürücü doz (LC ₅₀) değişimi.	35
Şekil 4.9: KCC-07 ve Bileşik 2 için farklı günlerde hesaplanan LC ₅₀ değerlerinin (U2-OS) karşılaştırması.	36
Şekil 4.10: PC-3 hücre hattının KCC-07 (A), Bileşik 1 (B), Bileşik 2 (C) ve Bileşik 3 (D) varlığında 3 günlük büyüme eğrisi.	37
Şekil 4.11: KCC-07 (A), Bileşik 1 (B), Bileşik 2 (C) ve Bileşik 3 (D)'ün PC-3 hücre hattı üzerindeki konsantrasyona bağlı olarak hesaplanan %50 öldürücü doz (LC ₅₀) değişimi.	38

Şekil 4.12:	KCC-07 ve Bileşik 2 için farklı günlerde hesaplanan LC ₅₀ değerlerinin (PC-3) karşılaştırması	39
Şekil 4.13:	MCF-7 hücre hattının KCC-07 (A), Bileşik 1 (B), Bileşik 2 (C) ve Bileşik 3 (D) varlığı/yokluğunda 3 günlük büyüme eğrisi.	40
Şekil 4.14:	KCC-07 (A), Bileşik 1 (B), Bileşik 2 (C) ve Bileşik 3 (D)'ün MCF-7 hücre hattı üzerindeki konsantrasyona bağlı hesaplanan %50 öldürücü doz (LC ₅₀) değişimi.	41
Şekil 4.15:	KCC-07 ve Bileşik 2 için farklı günlerde hesaplanan LC ₅₀ değerlerinin (MCF-7) karşılaştırması.	42
Şekil 4.16:	KCC-07, Bileşik 1, Bileşik 2 ve Bileşik 3'ün 24. ve 48. saatteki HFF-1 hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisinin karşılaştırılması.	43
Şekil 4.17:	KCC-07, Bileşik 1, Bileşik 2 ve Bileşik 3'ün 24. ve 48. saatteki HUH-7 hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisinin karşılaştırılması.	44
Şekil 4.18:	KCC-07, Bileşik 1, Bileşik 2 ve Bileşik 3'ün 24. ve 48. saatteki U2-OS hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisinin karşılaştırılması.	46
Şekil 4.19:	KCC-07, Bileşik 1, Bileşik 2 ve Bileşik 3'ün 24. ve 48. saatteki PC-3 hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisinin karşılaştırılması.	47
Şekil 4.20:	KCC-07, Bileşik 1, Bileşik 2 ve Bileşik 3'ün 24. ve 48. saatteki MCF-7 hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisinin karşılaştırılması.	48
Şekil 4.21:	KCC-07 (A), Bileşik 1 (B), Bileşik 2 (C) ve Bileşik 3 (D)'ün 24. saatte hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisinin karşılaştırılması.	49
Şekil 4.22:	KCC-07 (A), Bileşik 1 (B), Bileşik 2 (C) ve Bileşik 3 (D)'ün 48. saatte hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisinin karşılaştırılması.	50
Şekil 4.23:	HFF-1 hücre hattında Kontrol (0 µM) (A), 25 µM KCC-07 (B), 75 µM KCC-07 (C), 25 µM Bileşik 2 (D) ve 75 µM Bileşik 2 (E) muamelesinin canlı-ölü (pro-apoptotik/apoptotik/nekrotik) hücre popülasyon oranları üzerindeki etkisi.	53
Şekil 4.24:	PC-3 hücre hattında Kontrol (0 µM) (A), 25 µM KCC-07 (B), 75 µM KCC-07 (C), 25 µM Bileşik 2 (D) ve 75 µM Bileşik 2 (E) muamelesinin canlı-ölü (pro-apoptotik/apoptotik/nekrotik) hücre popülasyon oranları üzerindeki etkisi.	55
Şekil 4.25:	HUH-7 hücre hattında Kontrol (0 µM) (A), 25 µM KCC-07 (B), 75 µM KCC-07 (C), 25 µM Bileşik 2 (D) ve 75 µM Bileşik 2 (E) muamelesinin canlı-ölü (pro-apoptotik/apoptotik/nekrotik) hücre popülasyon oranları üzerindeki etkisi.	57

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1.1: MBD2 ticari inhibitörü ve inhibitör adayı moleküller	18
Tablo 2.1: Hücre Hatları	19
Tabla 2.2: Kimyasal Maddeler	19
Tablo 2.3: Cam, Plastik ve Sarf Malzemeler	20
Tablo 2.4: Cihazlar	20
Tablo 3.1: LC ₅₀ R-kare değerleri.	24

1. GİRİŞ

1.1. Epigenetik

Epigenetik, DNA diziliminde herhangi bir değişiklik olmaksızın gen ekspresyonunun düzenlenmesini sağlayan bir mekanizmadır. Diğer bir deyişle, birçok hücreli organizmadaki hücrelerin aynı genetik materyale sahip olmasına rağmen farklı işlevler kazanmasına olanak tanıyan moleküler bir süreçtir. Epigenetik mekanizmalar, genlerin hangi hücrede ne zaman ve ne seviyede aktif olacağını kontrol eder. Ayrıca, çevresel faktörlerin gen aktivitesini nasıl etkilediğini ve bu değişimlerin hücresel hafızada nasıl depolandığı da epigenetik mekanizmalar ile açıklanabilmektedir. Epigenetik düzenlemeler, hücre içi sinyaller ve çevresel faktörlerle tetiklenerek organizmanın gelişimi, homeostazı ve hastalıklara yatkınlığı gibi farklı biyolojik süreçler üzerinde önemli bir kontrol sağlar [1]. Şekil 1.1’de şematize edildiği üzere epigenetik düzenlemeler üç ana başlıkta sınıflandırılmaktadır:

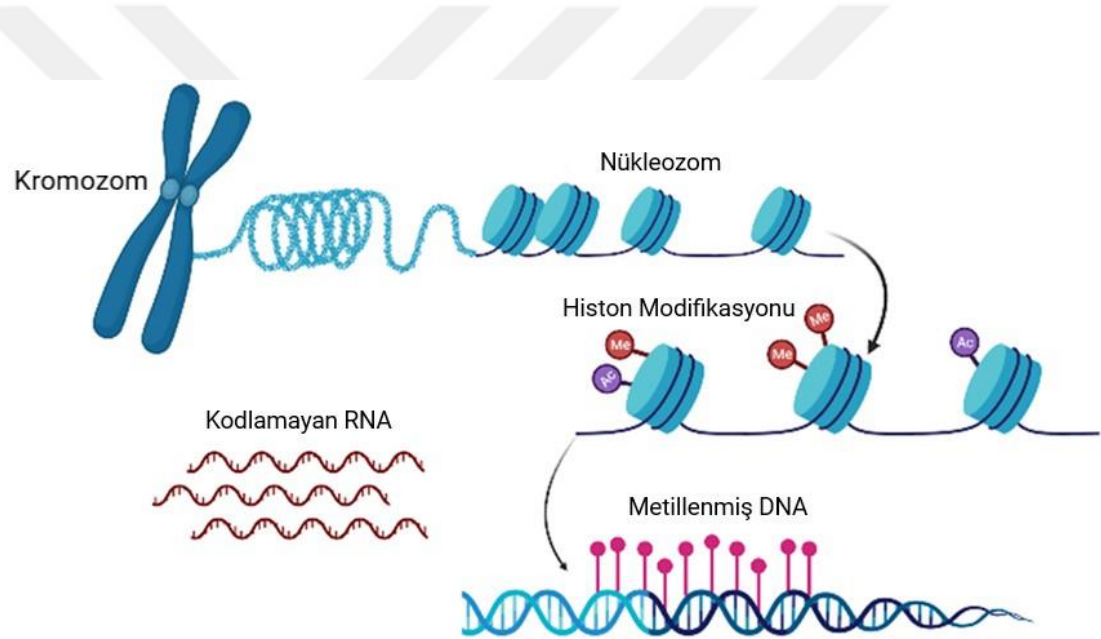
Bu değişikliklerden ilki doğrudan genetik materyal üzerinde gerçekleşen **DNA metilasyonu**dur. DNA üzerinde özellikle promotör bölgelerde veya yakınlarında CpG dinükleotid tekrarlarına eklenen metil grupları, gen ifadesinin susturulmasıyla ilişkilidir, böylece ilgili genin ekspresyonu baskılanır. DNA metilasyonu, organizmaların normal gelişim süreçlerinde kritik bir rol oynadığı gibi kanser başta olmak üzere farklı hastalıklarda anormal metilasyon desenleri (metilasyon patterni) gözlemlenebilir [2].

Bir diğer önemli epigenetik mekanizma kromatin yapısını değiştiren **histon modifikasyonları**dır. DNA, ökaryotlarda histon adı verilen bazik proteinlere sarılıdır ve bu histonlar, genetik materyalin kompaktlığını ve erişilebilirliğini kontrol eder. Histonların metilasyon, asetilasyon, fosforilasyon gibi kimyasal değişikliklere uğraması, DNA'ya bağlanan diğer proteinlerin (RNA polimeraz, transkripsiyon faktörleri vb.) o bölgeye erişimini etkileyerek gen aktivitesini değiştirir. Asetilasyon genellikle gen aktivitesini artırırken, metilasyon hem baskılama hem de aktivasyonla ilişkili olabilir [3].

Son olarak, kodlamayan **RNA aracılı epigenetik mekanizmalar (RNA interference, RNAi)**, özellikle küçük RNA moleküllerinin (siRNA ve miRNA gibi) gen

ekspresyonunu kontrol etmesi ile bilinir. Bu kodlamayan RNA'lar, hedef genlerin doğrudan kendisine veya mRNA transkriptine bağlanarak onların ifadesinin durdurulmasını sağlar. Bu mekanizmaların çevresel streslere tepki olarak devreye girebileceği ve organizmaların adaptif tepkiler geliştirmesine katkıda bulunabileceği düşünülmektedir [4].

Epigenetik değişikliklerin en dikkat çekici özelliklerinden biri de bazı durumlarda **nesiller arası aktarım** potansiyelidir. Yani, bireyin hayatı boyunca yaşadığı çevresel etkiler, sonraki nesillerde de gözlemlenebilecek kalıcı epigenetik işaretler bırakabilir. Bu durum, organizmaların kalıtsal bilgiyi; yalnızca genetik materyalle değil, aynı zamanda yaşadıkları çevreye ve deneyimlere bağlı olarak genom üzerinde kazandıkları epigenetik profille aktardığını bizlere göstermektedir [4].



Şekil 1.1: DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve RNA interference gibi epigenetik mekanizmaların şematik gösterimi [5].

1.1.1. Histon Modifikasyonları

Ökaryotik hücrelerde DNA, histon adı verilen proteinler üzerine sarılarak nükleozom adı verilen yapıları oluşturur. Nükleozomlar kromatin boyunca, genomun paketlenmesinden ve topolojisinden sorumlu tekrarlanan yapısal birimleri oluşturur. Histonlar üzerinde gerçekleşen post-translasyonel modifikasyonlar, DNA'nın histon proteinlerine olan afinitesini değiştirerek ilgili bölgedeki kromatin yapısının daha kompakt veya gevşek olmasına neden olur. Bu modifikasyonlar genellikle histon proteinlerinin N-terminal kuyruklarında meydana gelen asetilasyon, metilasyon,

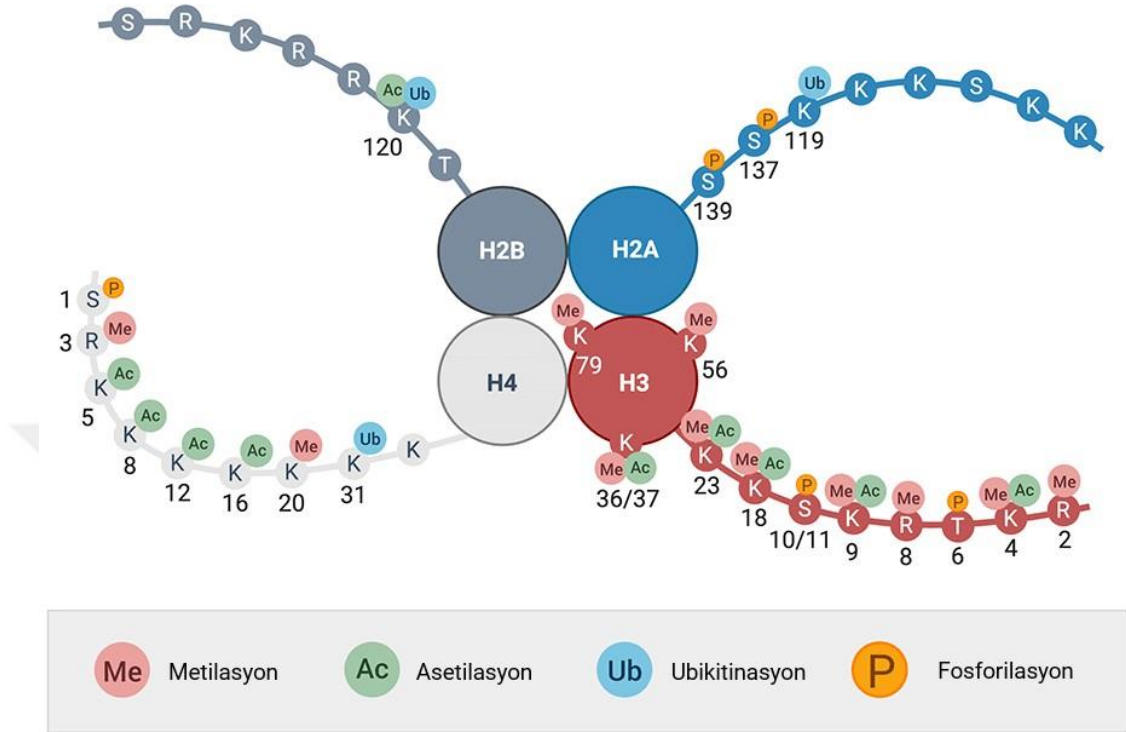
fosforilasyon ve ubikitinasyon gibi kimyasal değişiklikleri içerir (Şekil 1.2). Histonların N-terminal kuyruklarına eklenen kimyasal grupların kromatinde neden olduğu yapısal değişiklikler, genetik materyalin erişilebilirliğini düzenler [6]. Yani, ilgili kromatin bölgesi açılarak gen ifadesine imkan sağlanır veya daha kompakt hale gelerek ekspresyon baskılanmış olur.

Histon modifikasyonlarının bu dinamik etkisi, **histon kodu** hipotezi ile açıklanmaktadır. Bu hipoteze göre, farklı histon modifikasyonları, belirli genlerin ne zaman ve nasıl aktive olacağını veya baskılanacağını belirleyen epigenetik işaretler olarak işlev görür [7]. Fakat histon modifikasyonlarının gen ekspresyonunu doğrusal bir şekilde düzenleyen dijital bir bilgi taşıyıcısı gibi işlev gördüğü düşüncesi, daha sonra yapılan araştırmalarla büyük ölçüde sorgulanmıştır [8, 9].

Asetilasyon, histon modifikasyonları içinde en çok çalışılan mekanizmalardan biridir. Özellikle, histon H3'ün K9 ve K14 pozisyonlarındaki lizinlerin asetillenmesi, gen ekspresyonunun artmasıyla ilişkilendirilmiştir [10]. Asetilasyon, genellikle histonlardaki pozitif yüklü lizinlerin negatif yüklü DNA ile etkileşimini azaltarak kromatinin daha gevşek bir yapıya geçmesine neden olur ve bu da transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya erişimini kolaylaştırır. Bu olayın, cis modeli olarak adlandırılan mekanizma ile DNA'ya doğrudan etkisi olduğu düşünülmektedir [11]. Bununla birlikte, asetilasyonun trans model ile de gen aktivitesini etkilediğı gösterilmiştir. Bu modelde, asetillenmiş lizinler, kromatin/nükleozom yapısını düzenleyici proteinlerin bağlanma noktası haline gelir. Örneğin, asetillenmiş lizinleri tanıyan bromo domain içeren SWI/SNF kompleksi gibi proteinler, kromatinin yapısını değiştirerek gen ekspresyonunu aktive eder [12]. Bu bağlamda, asetilasyonun hem doğrudan DNA yapısına etki ettiğı hem de kromatin düzenleyici proteinlerle etkileşime girerek transkripsiyonu düzenlediğı ortaya konmuştur.

Histon metilasyon ise daha karmaşık bir rol oynar; hem gen aktivasyonu hem de gen baskılanması ile ilişkilendirilebilir. Örneğin, H3 histonunun 9. lizinine (H3K9) eklenen metil grupları, genellikle heterokromatin oluşumuna ve gen susturulmasına neden olurken; H3'ün 4. lizinine (H3K4) eklenen üç metil grubu, aktif gen bölgelerinde bulunur ve transkripsiyonu teşvik eder [13]. Farelerde yapılan bir çalışma, H3'ün 27. lizininin (H3K27) metilasyonunun baskılayıcı bir işaret olduğunu ve bu modifikasyonun Polikomb Repressif Kompleksi 2 (PRC2) aracılığıyla gerçekleştirildiğini göstermiştir [14]. Bu kompleksin, özellikle embriyonik gelişim

sürecinde kritik rol oynadığı ve genetik programların düzenlenmesinde önemli olduğu tespit edilmiştir [15, 16].



Şekil 1.2: Histon Modifikasyonları [17]. Dört ana post-translasyonel modifikasyon; asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon ve ubikitinasyon gösterilmiştir. Bu modifikasyonları genellikle histon proteinlerinin N-terminal kuyruklarında olmasının yanı sıra C-terminal uçlarında ve nükleozom çekirdeğindeki küresel bölgede de meydana gelir.

1.1.2. DNA Metilasyonu

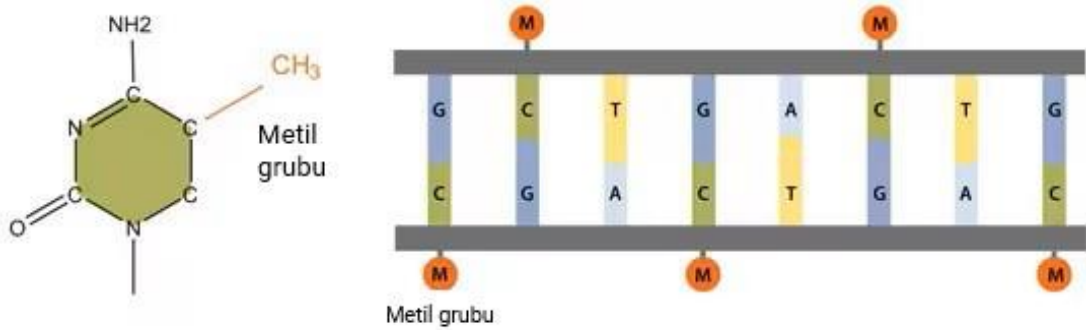
DNA metilasyonu, gen ekspresyonunu düzenleyen ve transpozonların hareketliliğini baskılayan önemli bir epigenetik mekanizmadır. Metilasyon, genellikle tekrarlayan nükleotid dizilerinde meydana gelir ve bu dizilerin susturulmasına yardımcı olur [18]. Bu mekanizma Şekil 1.3'te gösterildiği gibi, genellikle sitozin-fosfat-guanin (CpG) tekrar bölgelerinde gerçekleşir ve bu bölgelerde bulunan sitozinin 5. karbonuna metil grubu eklenmesiyle oluşur [19]. Ancak, metillenmiş 5-metilsitozinlerin (5-mC) deaminasyon yoluyla timine dönüşme eğilimi, CpG dinükleotidlerinin genom boyunca nadir bulunmasına neden olur. Buna karşılık, CpG adaları olarak bilinen bölgeler genellikle metillenmemiş halde kalır ve bu bölgeler genellikle gen promotörlerinde yer alır [20].

DNA metilasyon profili, hücre içi ve çevresel faktörlere yanıt olarak düzenlenir ve DNA metiltransferazlar (DNMT'ler) aracılığıyla oluşturulur. DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B en bilinen ökaryotik DNA metiltransferazlardır ve bu enzimlerden herhangi birinin kaybı, organizmada ölümcül sonuçlar doğurur [21]. DNMT1, özellikle somatik hücrelerde en bol bulunan metiltransferazdır ve çoğunlukla DNA replikasyonu sırasında hemimetillenmiş DNA'yı tanıyarak yeni sentezlenen DNA ipliğine, kalıp zincirdeki metilasyon patternini kopyalar [22, 23]. Diğer bir ifadeyle, DNMT1 kromatin üzerindeki global metilasyon profilinin sürdürülebilirliğinden sorumlu metiltransferazdır ve embriyonik gelişim, genomik imprinting ve X kromozomu inaktivasyonu gibi kritik süreçlerde işlev görür [24, 25]. DNMT1'in bu metilasyon profilini koruyucu rolü, genetik bilginin aktarımına ek olarak epigenetik kalıpların da nesilden nesile aktarılmasını sağlar, bu da “epigenetik şablonlama” terimi ile açıklanmıştır [26]. DNMT3A ve DNMT3B ise “de novo” DNA metilasyonundan sorumlu enzimlerdir. Sonuçta, metillenmiş CpG nükleotidleri iki şekilde gen ifadesini baskılama yönünde etki gösterir; 1) transkripsiyon faktörleri ve RNA polimeraz gibi proteinlerin DNA'ya bağlanmasına fiziksel engel teşkil eder, 2) histon modifiye edici enzimleri ve nükleozom yapısını yeniden şekillendiren kompleksleri (remodeling complex) ilgili bölgeye çeken bir epigenetik işaret oluşturur. (Kaynak verilebilir)

DNA metilasyonu, yalnızca genetik düzenlemelerle sınırlı kalmaz; aynı zamanda çevresel faktörlerin etkisiyle de değişebilir. Bu durum, bireylerin yaşamları boyunca karşılaştıkları stres faktörleri, beslenme düzeni, toksinlere maruz kalma gibi çevresel etkilerin epigenetik profil üzerinde nasıl kalıcı değişikliklere yol açabileceğini gösterir. Örneğin, doğum öncesi dönemdeki beslenme yetersizliklerinin DNA metilasyon profillerinde değişikliklere neden olduğu ve bu değişikliklerin ileriki yaşamda kardiyovasküler hastalık riskini artırdığı bildirilmiştir [27]. Ayrıca, sigara dumanı, hava kirliliği ve bazı kimyasallara maruz kalma gibi çevresel stresörlerin DNA metilasyonunu etkileyerek, kanser, nörodejeneratif hastalıklar ve otoimmün bozukluklar gibi ciddi hastalıkların gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir [28].

Kanser, anormal DNA metilasyonunun görüldüğü ve/veya neden olduğu en iyi incelenmiş hastalıklardan biridir. Kanserli hücrelerde, genellikle tümör baskılayıcı genlerin promotör bölgelerinde sıklıkla, aşırı metilasyon (hipermetilasyon) ve bu genlerin susturulduğu görülür. Örneğin, p16INK4a tümör baskılayıcı genin promotör bölgesindeki hipermetilasyon, başta kolorektal ve akciğer kanserleri olmak üzere

birçok kanser türünde yaygındır [29]. Bu tür değişiklikler, hücre bölünmesi ve ölüm süreçlerinde dengesizliklere yol açarak, tümör oluşumuna zemin hazırlar.



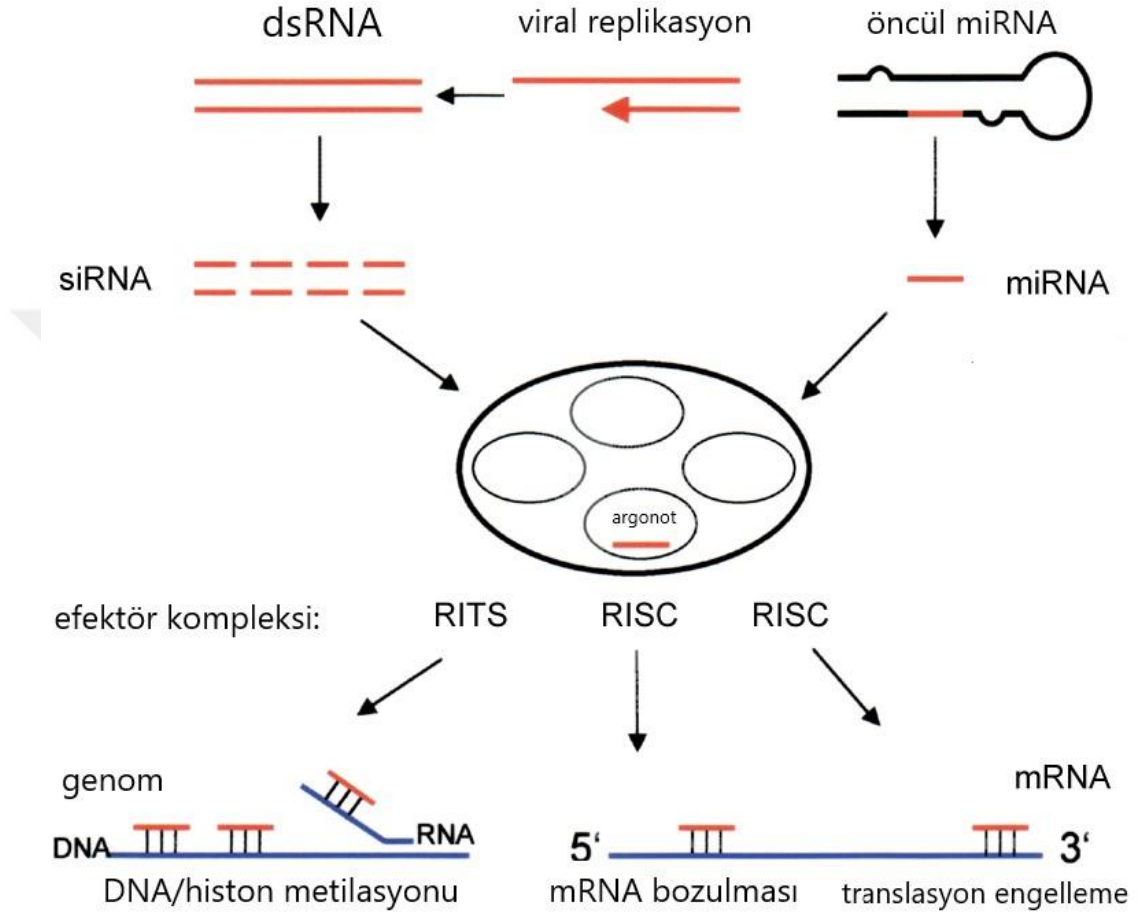
Şekil 1.3: DNA metilasyonu. Sitozin-fosfat- Guanin (CpG) nükleotid dizilerindeki sitozinin 5. karbonuna metil grubu eklenmesi, transkripsiyon faktörlerinin promotörlere bağlanmasını engeller [30].

1.1.3. RNA aracılı epigenetik mekanizmalar (RNA interference)

RNA interferans (RNAi), gen susturulmasında küçük RNA moleküllerinin (siRNA ve miRNA) moleküllerinin aracılık ettiği kritik bir epigenetik düzenleme mekanizmasıdır. Bu mekanizma Şekil 1.4'te gösterildiği üzere, özellikle transkripsiyon sonrası süreçte mRNA'ların hedeflenmesi ve yıkımı yoluyla gen ekspresyonunu kontrol eder [31]. Örneğin, miR-21 adlı mikroRNA'nın, kanser hücrelerinde aşırı eksprese olduğu ve tümör baskılayıcı genleri hedef alarak apoptozu baskıladığı gösterilmiştir [32]. Ayrıca, siRNA'lar, transpozonlar gibi mobil genetik elemanları susturarak genomik stabilitenin korunmasına katkıda bulunur [33]. RNA interferansının, virüs enfeksiyonlarına karşı bir savunma mekanizması olarak da işlev gördüğü bilinmektedir. Örneğin, hepatit C virüsüne karşı siRNA'ların kullanıldığı bir çalışmada, siRNA'ların virüs replikasyonunu önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir [34].

RNAi'nin gen ifadesini epigenetik olarak düzenleme yeteneği, küçük RNA'ların promotör bölgelerine bağlanarak gen susturmasını sağlamasıyla da mümkündür [35]. Bazı genler, transkripsiyon sonrası ürettikleri kodlama yapmayan küçük RNA'lar sayesinde kendi ifadelerini sürdürebilirler; örneğin Hnf4 ve MyoD, ilgili hücre türlerine özgü genlerin transkripsiyonunu artırarak bu süreci destekler. Bu süreç, epigenetik RNA sinyalizasyonunun bir parçası olarak düşünülebilir ve hücre

farklılaşması ile gelişim süreçlerinde önemli rol oynar [36]. Düzenleyici RNA'lar ayrıca, kromatin modifiye edici kompleksler ve DNA metiltransferazlar gibi proteinleri belirli gen bölgelerine yönlendirerek gen ekspresyonunun epigenetik kontrolünü sağlarlar [2].



Şekil 1.4: RNA aracılı epigenetik düzenleme ve transkripsiyonel susturma [37].

Genom modifikasyonları DNA veya histon metilasyonları potansiyel olarak hedef genden sentezlenen DNA'ya veya yeni oluşan RNA'ya baz çifti oluşturan küçük RNA'lar tarafından hedeflenebilir. Aynı zamanda küçük RNA'ların mRNA üzerine oluşturacakları baz çifti oluşumu mRNA bozulmasına ve translasyonel engellemeye varan sonuçlar doğurabilir. Doğrudan doğruya bu transkripsiyonel engellemenin yanı sıra translasyonel engellemeyi de beraberinde getirir.

MikroRNA'lar (miRNA'lar), RNAi'nin önemli bileşenlerindendir. İnsanlarda bugüne kadar yaklaşık 2000 miRNA keşfedilmiştir ve her biri, 100 ila 200 mRNA'yı hedef alarak onların yıkımını sağlar [31]. Bu küçük RNA'ların, hedef mRNA'ları genellikle

yıkım yoluyla düzenlediği, bazı durumlarda ise translasyon seviyesinde müdahalede bulunduğu bilinmektedir [38]. İlginç bir şekilde, insan protein kodlayan genlerin yaklaşık %60'ı miRNA'lar tarafından düzenlenir [39]. Bu miRNA'ların önemli bir kısmı, DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları yoluyla epigenetik olarak kontrol edilir [40].

1.2. DNA Metilasyonu ve Epigenetik Etkileşimleri

DNA metilasyonu, DNA üzerinde özellikle CpG dinükleotid bölgelerinde metil gruplarının eklenmesi ile gerçekleşir. Bu epigenetik modifikasyon, genellikle gen ekspresyonunu baskılar ve genlerin susturulmasında kritik bir rol oynar. Metil grupları, DNA'nın yüzeyine eklenerek transkripsiyon faktörlerinin ve RNA polimeraz II gibi transkripsiyonel aktivatörlerin bağlanmasını engeller [41]. Bu süreç hem embriyonik gelişimde hem de hücrel farklılaşmada önem taşır ve çeşitli hastalıklarla, özellikle de kanserle ilişkili epigenetik değişikliklerin başında gelir [42].

DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları, gen ekspresyonunu düzenlemede birbirine bağımlı olarak işlev gösterir ve genellikle susturulmuş gen bölgelerinde birlikte bulunurlar. Özellikle CpG adacıkları üzerindeki DNA metilasyonu, gen susturulmasında önemli bir rol oynayan histon deasetilaz (HDAC) ve yeniden modelleme komplekslerinin susturulacak DNA bölgesine çekilmesi için bir epigenetik işaret oluşturur. Bu noktada, Methyl-CpG Binding Domain (MBD) proteinleri, metillenmiş DNA'ya bağlanarak histon deasetilazları (HDAC) bölgeye çeker ve böylece histon deasetilasyonu başlatarak kapalı bir kromatin yapısı oluşturur [26, 43].

1.2.1. Histon Deasetilasyonu

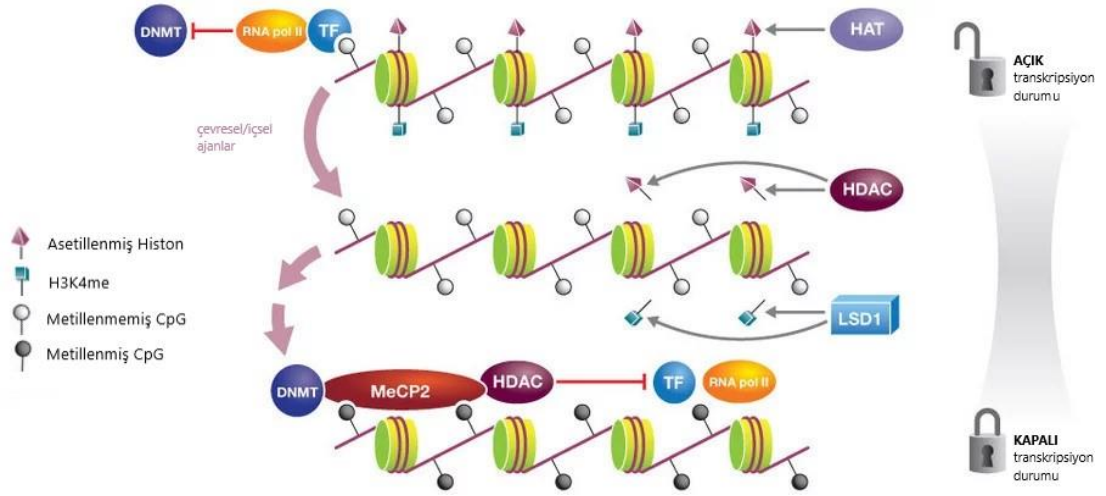
DNA metilasyonunun, metillenmiş bölge üzerinde histon deasetilasyonunu tetiklemesi gen susturulmasında kritik bir mekanizmadır. Metillenmiş DNA'ya bağlanan MBD proteinleri, HDAC komplekslerini bölgeye yönlendirir ve histon kuyruklarından asetil gruplarının çıkarılmasına yol açar. Histon deasetilasyonu, asetilasyonla histonların kaybettiği pozitif yükü geri kazandırarak DNA'nın histonlarla olan elektrostatik etkileşimini artırır ve kromatinin kapalı/kompakt konformasyonda kalmasını teşvik eder. Bu kapalı konformasyon, transkripsiyon faktörlerinin ve ökaryotik RNA polimeraz II'nin ilgili genlerin promotörlerine bağlanmasını engeller [44]. Bu

mekanizma, DNA metilasyonu ile histon deasetilasyonu arasındaki “karşılıklı iletişimi” gösterir; burada bir modifikasyon, stabil gen baskısını sağlamak için diğerini güçlendirir. Özellikle, bu epigenetik mekanizmanın kanser gibi hastalıklarda tümör baskılayıcı genlerin güçlü bir şekilde kapatılmasında önemli rol oynadığı gösterilmiştir [45].

1.2.2. DNA Metilasyon Okuyucuları

DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları arasındaki etkileşim ve koordinasyon, çeşitli epigenetik düzenleyiciler aracılığıyla sağlanır. DNA metiltransferazlar (DNMT'ler) tarafından oluşturulan 5-mC işareti, “metilasyon okuyucuları” (methylation readers) olarak adlandırılan bir grup aracı protein tarafından tanınır. Bu epigenetik modülatörler, metillenmiş CpG motiflerini spesifik olarak tanıyan ve metillenmiş-DNA bağlanma domeni olarak adlandırılan özel bir fonksiyonel birime sahiptir. Ayrıca bu proteinler, yapılarında yer alan bir diğer özelleşmiş domen sayesinde HDAC kompleksleri ile etkileşime girerler [23]. Bu etkileşimler, yukarıda açıklandığı üzere kromatin yapısının kapalı bir konuma gelmesine ve gen ekspresyonunun baskılanmasına katkıda bulunur [46].

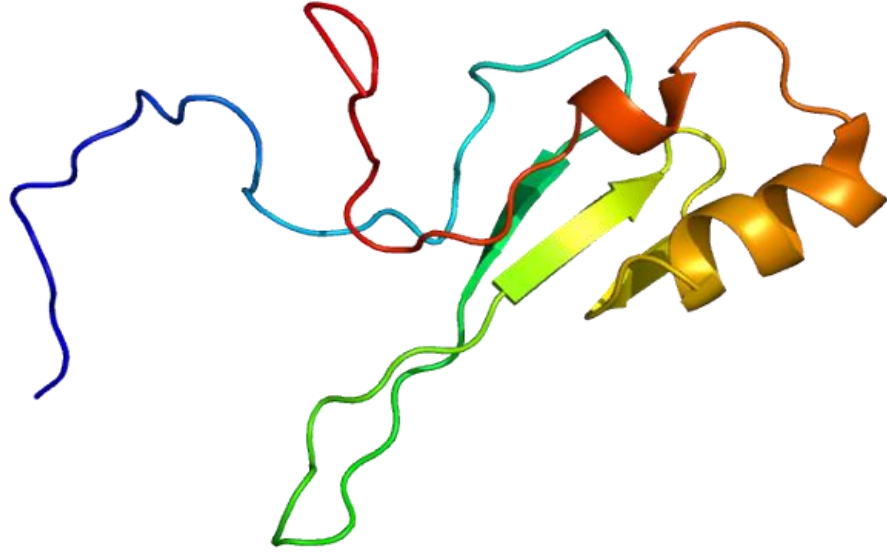
Anlaşıldığı üzere, DNA metilasyonu ve histon deasetilasyonu arasındaki koordinasyon sürecinin de yanlış düzenlenmesi, kanser dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarda rol oynayan anormal gen susturulmasına yol açabilir [45]. Dolayısıyla, DNA metilasyonu ve histon modifikasyonlarının anlaşılması kadar; bahsi geçen epigenetik süreçlerin birlikte düzenlenmesinin altında yatan kesin mekanizmaların anlaşılması, hastalık durumlarında normal gen ifadesinin geri kazanılmasını sağlayacak terapötik yaklaşımların geliştirilmesine katkı sunacaktır [46].



Şekil 1.5: DNA metilasyonu ve histon deasetilazların nükleozomlar üzerindeki dinamik etkileşimi [47].

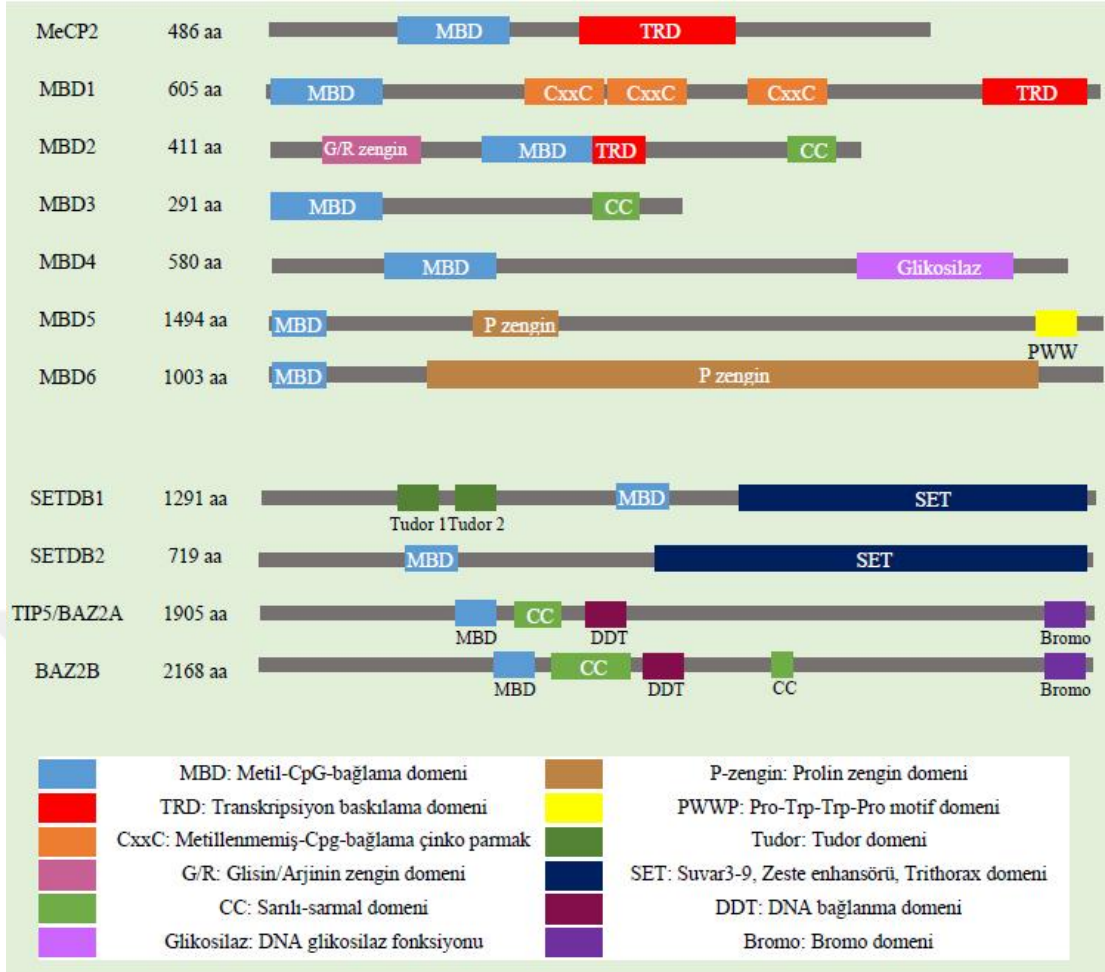
1.3. MBD (Metillenmiş-DNA Bağlama Domeni) Protein Ailesi

Metillenmiş-DNA Bağlama Domeni (MBD), DNA'daki simetrik olarak metillenmiş CpG dinükleotidlerini tanıyan özelleşmiş bir peptid bölgesidir [48]. Bu domen, metillenmemiş DNA'ya karşı oldukça düşük bir bağlanma eğilimi gösterirken, metillenmiş CpG nükleotid motifleriyle yüksek özgüllükle etkileşir. MBD'nin yapısal özellikleri, bir α/β sandviç mimarisiyle tanımlanır; bu yapı, DNA'ya spesifik bağlanmayı mümkün kılan, Şekil 1.6'da görüldüğü üzere kıvrımlı beta yaprakları ve alfa helikslerden oluşur [49].



Şekil 1.6: MBD protein ailesinin keşfedilen ilk üyesi olan insan MeCP2 proteininin MBD bölgesinin yapısal konformasyonu (92 aa uzunluğunda) PDB:1QK9 [50].

MBD protein ailesi Şekil 1.7 özetlenmiştir [51]. Günümüzde bu aile, MBD'e sahip olduğu bilinen on bir proteinden oluşmaktadır. MBD ailesinin üyeleri arasında MeCP2, MBD1, MBD2, MBD4 ve BAZ2 gibi metilasyon okuyucuları bulunur. Her üyenin sahip olduğu MBD ve diğer domenlerin mimarisi bu proteinlerin metillenmiş DNA'ya ve diğer epigenetik düzenleyici proteinlere bağlanma özelliklerini farklı kılar. Özellikle MeCP2, MBD1 ve MBD2 metillenmiş CpG bölgelerine ve HDAC komplekslerine güçlü bir bağlanma eğilimi gösterirken; MBD3 ve SETDB1 gibi bazı üyeler, DNA-protein ve protein-protein etkileşimlerinde farklı bir tutum sergiler [52, 53], [54].



Şekil 1.7: MBD protein ailesi üyeleri ve işlevsel domenleri.

MBD protein ailesi, DNA metilasyonu ve histon modifikasyonlarının birbirine bağlı olduğu karmaşık epigenetik süreçlerin temel bir bileşenidir. Bu proteinlerin yapılarının ve moleküler mekanizmalarının daha iyi anlaşılması, embriyonik gelişim, kök hücre programlaması gibi biyolojik süreçlerin kontrol edilmesine; kanser ve nörolojik hastalıklar gibi çeşitli bozuklukların ise tedavisi için yeni stratejilerin geliştirilmesine katkıda bulunabilir [46, 55].

1.3.1. MeCP2 ve MBD1-6

MBD protein ailesinin en bilinen üyeleri MeCP2, MBD1-6'dır. Bu proteinler yaklaşık 70-85 amino asit uzunluğunda bir metillenmiş-DNA bağlama domenine (MBD) sahiptir [51, 55]. MeCP2, yalnızca DNA metilasyonuna bağlanmakla kalmaz; aynı zamanda HDAC komplekslerini ve diğer kromatin yeniden modelleme faktörlerini de toplayarak gen baskılanmasında etkin bir rol oynar [44]. Örneğin, MeCP2'nin

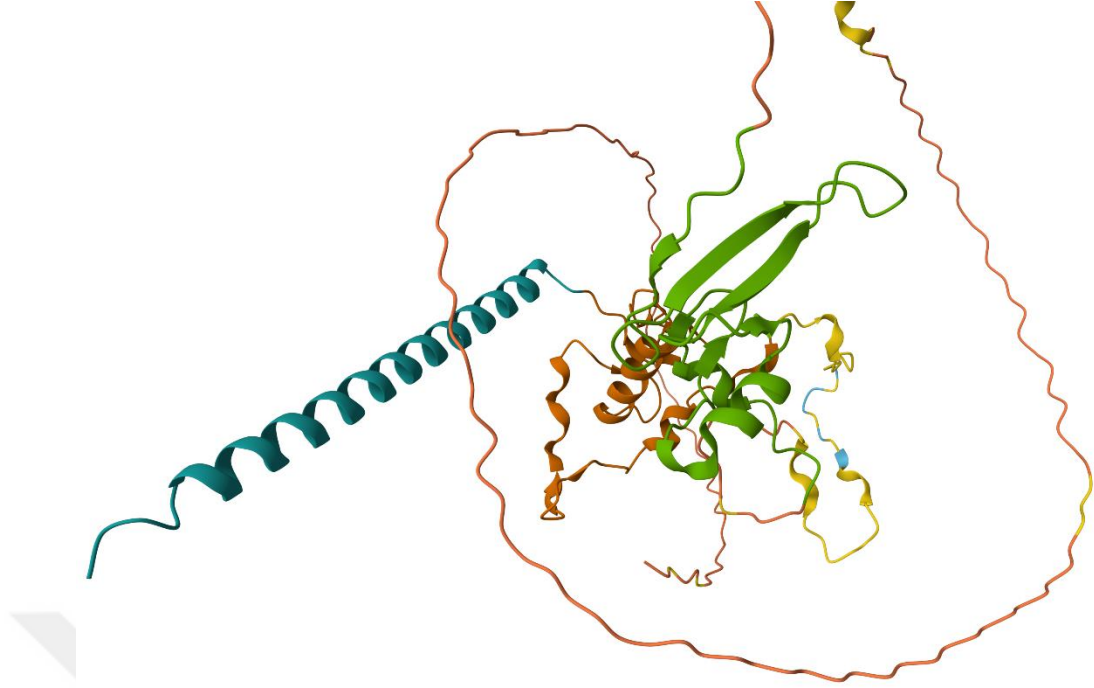
nörolojik hastalıklarla, özellikle Rett sendromu ile olan bağlantısı, bu proteinin epigenetik regülasyondaki önemini ortaya koymaktadır [56]. MBD1, MBD2, MBD3, MBD4 ve MBD6 gibi diğer üyeler, metillenmiş DNA'ya bağlanarak gen susturulmasını teşvik eder. Örneğin, MBD2, Histon Deasetilazların da içinde bulunduğu Nucleosome Remodeling and Deacetylase (NuRD) kompleksini hedef gen promotörlerine çekerek gen ekspresyonunu baskılar [57, 58]. MBD3 ise DNA metilasyonuna doğrudan bağlanmaz, ancak NuRD kompleksinin bir parçası olarak kromatin yeniden modelleme süreçlerinde görev alır [59].

1.3.2. SETDB1/2 ve BAZ2A/B

Yukarıda bahsedilen MBD ailesi üyeleri, DNA metilasyonu ve histon deasetilasyonunun koordinasyonunda aracılık ederken, ailedeki diğer üyelerin etki mekanizması farklıdır. Örneğin, SETDB1 ve SETDB2 histon metiltransferaz olarak ökaryotik hücrelerde görev yapar; H3K9 metilasyonu yoluyla heterokromatin oluşumunu teşvik eder ve böylece gen susturulmasını destekler [6]. BAZ2A ve BAZ2B, TTF-I aracılığıyla nükleolar gen susturulmasında yer alır ve ribozomal DNA'nın transkripsiyonel kontrolünü sağlar [60].

1.4. MBD2

MBD2 (Methyl-CpG-binding Domain Protein 2), MBD ailesinin en yaygın ve iyi bilinen üyesidir. MBD2, metillenmiş DNA'ya bağlanarak histon deasetilaz (HDAC) komplekslerini ve diğer kromatin düzenleyici faktörleri hedef gen bölgelerine yönlendirir, bu da genetik materyalin sıkılaşmasını ve transkripsiyonun baskılanmasını sağlar [57, 61].

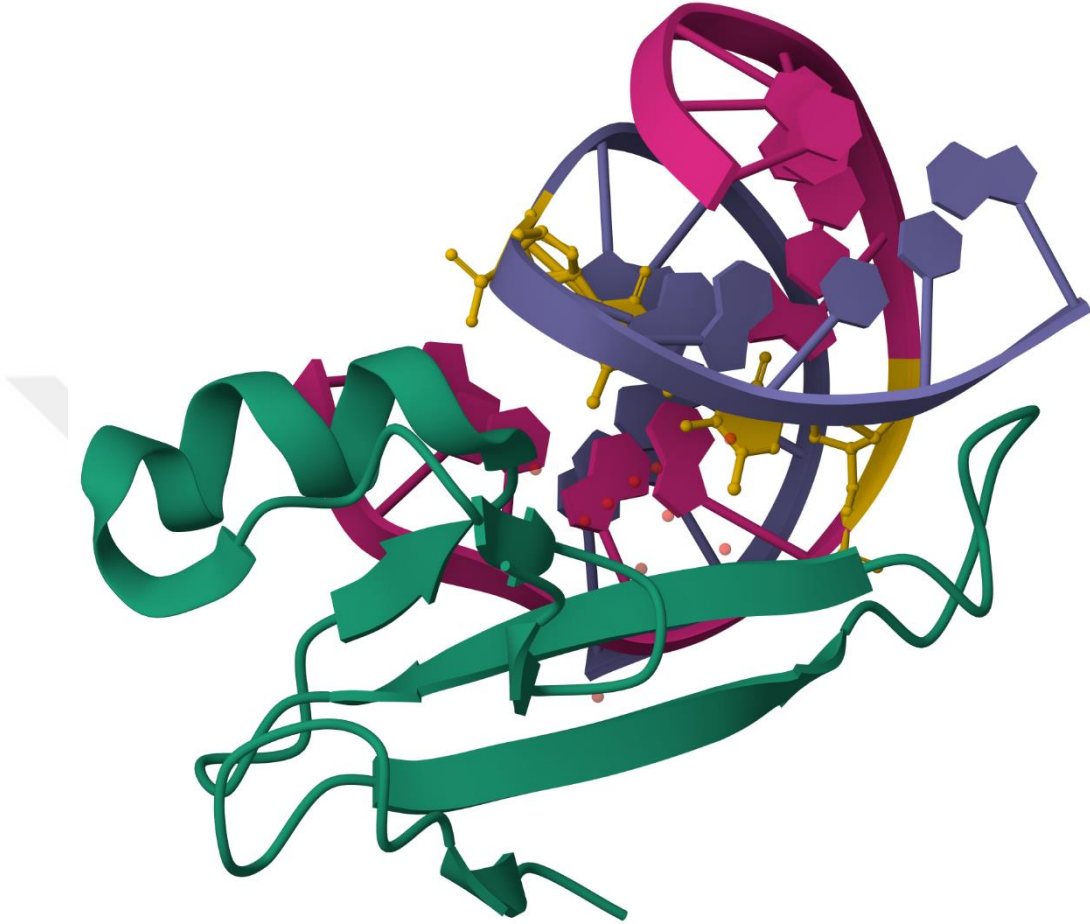


Şekil 1.8: MBD2'nin tahmini yapısal konformasyonu [62]. (AlphaFold: AF-Q9UBB5-F1).

1.4.1. MBD2 Yapı ve Fonksiyonu

MBD protein ailesinin önemli bir üyesi olan insan MBD2 geni, 411 amino asitlik MBD2a (yaklaşık 43 kDa), 262 amino asitlik MBD2b (yaklaşık 29 kDa) ve 301 amino asitlik MBD2c (MBD2t) (yaklaşık 32 kDa) olmak üzere üç farklı izoform kodlamaktadır [57, 63, 64, 65]. MBD2a izoformu, neredeyse her dokuda baskın olarak ifade edilen bir varyant iken, ikinci yaygın izoform MBD2c, genin alternatif kırılma ürünü olarak özellikle testislerde, embriyonik kök hücrelerde (ESCs) ve insan pluripotent kök hücrelerinde (PSCs) yüksek seviyede ifade edilir ve fonksiyoneldir. Metil-CpG Bağlama Domeni (MBD), 145-225 amino asit aralığını (yaklaşık 80 amino asit) kapsayan ve tüm izoformlarda korunan bir yapıya sahiptir [66, 51, 65]. Bu bölge Şekil 1.8'de açık yeşil ile gösterilmektedir, metillenmiş CpG dizilerini yüksek özgüllükle tanıyan alfa/beta sandviç yapısına sahiptir ve proteinin en önemli fonksiyonel birimini oluşturur. DNA üzerinde DNMT aracılığıyla metillenmiş mCGG, mCAG, mCAT, mCC, mCT di-/tri-nükleotid motiflerini seçici olarak tanıyarak metillenmiş promotörlere bağlanır. Şekil 1.9'da metillenmiş mCG dinükleotidleri (sarı renkle gösterilmiştir) ile kompleks oluşturan MBD2 proteinin MBD bölgesinin (MBD2_{MBD}) (koyu yeşil olarak gösterilen) kristal yapısı gösterilmiştir [67]. Ayrıca, MBD2'nin Şekil 1.8'de turkuaz rengine sahip C-terminal bölgesindeki sarılı-sarmal

domenide, protein-protein etkileşimlerini kolaylaştırarak histon deasetilaz kompleksleri HDAC, Mi-2/NuRD (Nükleozom Remodelleme ve Deasetilaz) gibi diğer epigenetik modülatörlere bu bölgeye yerleşme olanağı sağlar [51, 55, 67].



Şekil 1.9: MBD2'nin MBD bölgesinin (79 aa uzunluğunda) çift zincirli DNA'da metillenmiş mCG bölgeleriyle olan etkileşimi PDB: 6CNQ [68].

MBD2'nin işlevi, DNA metilasyonunun bir işaret olarak kullanıldığı birçok biyolojik süreçte kendini gösterir. Örneğin, embriyonik gelişim sırasında MBD2, hücrel farklılaşmayı desteklemek için genetik programların yeniden düzenlenmesinde rol oynar [69, 70]. MBD2'nin, bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde ve kanser gelişiminde kritik bir role sahip olduğu bilinmektedir. MBD2 ayrıca, bağışıklık hücrelerinde inflamatuvar genlerin düzenlenmesini sağlar ve bağışıklık tepkilerinin doğru bir şekilde koordine edilmesine yardımcı olur [71]. Tümör biyolojisinde ise MBD2'nin ekspresyonunun artması, tümör baskılayıcı genlerin susturulması ve hücrel proliferasyonun kontrol dışı hale gelmesi ile ilişkilendirilmiştir. Örneğin, MBD2'nin kolorektal kanserde tümör baskılayıcı genlerin susturulmasında rol

oynadığı ve Wnt sinyal yollarını etkilediği gösterilmiştir. Özellikle, fare modellerinde MBD2 kaybı tümör oluşumunu yavaşlattığı bildirilmiş ve birçok çalışmada bu proteinin onkogenik süreçlerdeki etkisi vurgulanmıştır [65, 72].

1.4.2. MBD2 İnhibitörü

MBD2-aracılı epigenetik regülasyonun, nöronal aktivite ve gelişim, çeşitli bağışıklık hücrelerinin çoğalması ve olgunlaşması, hematopoez, pluripotensi ve kanser başlangıcı/progresi gibi önemli biyolojik süreçlerde etkin rol oynadığını gösteren bir dizi çalışma mevcuttur [73, 74, 75, 76]. Bu çalışmalardan bazıları, MBD2 inhibisyonunun, farklı kanserlerde özellikle tümör baskılayıcı genler üzerindeki transkripsiyonel susturulmayı tersine çevirerek kanser hücrelerinin ölümüne neden olduğunu göstermektedir. Ancak, bazı HDAC ve DNMT inhibitörlerinin FDA tarafından onay alması ve epigenetik ilaçlara (epiDrugs) olan ilginin artması, özellikle ikili epigenetik inhibitörlere olan ilgi, bu alanda hızla büyüyen bir araştırma ve geliştirme trendine işaret etmektedir [77, 78]. Bu noktada, MBD2'nin DNA metilasyonu ve histon deasetilasyonunu bağdaştıran işlevi, bu modülatöre karşı geliştirilen inhibitörlerin “dual epigenetik etkisi”ne (DNA metilasyonu-histon deasetilasyon eksenini üzerindeki) dikkat çekmektedir.

MBD2'nin tanımlanmış ve ticari olarak ulaşılabilir tek kimyasal inhibitörü KCC-07'dir. KCC-07'nin, MBD2_{MBD}'ne seçici olarak bağlandığı ve tümör hücrelerinde hipermetilasyon ile susturulmuş bazı genlerin ifadesini tersine çevirdiği ilk defa 2015 yılında yayımlanan patent dokümanı (patent no: US10227654B2) ile duyurulmuştur. Sonrasında, Zhu ve ark. KCC-07 aracılı farmakolojik MBD2 inhibisyonunun, medullablastom (MB) hücre hatlarında ve fare modelinde BAI1-p53 tümör baskılayıcı eksenindeki hipermetilasyona bağlı epigenetik susturulmayı ortadan kaldırarak MB formasyonunda önemli bir gerileme sağladığını rapor etmişlerdir [79]. Fakat KCC-07'nin kanser hücrelerinde ortaya konan etkileri yalnızca bu çalışma ile sınırlıdır.

1.5. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

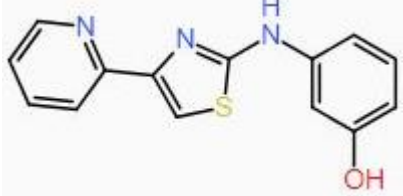
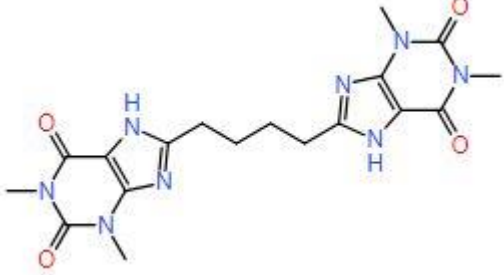
MBD2'nin iyi tanımlanmış yapısı, biyolojik süreçlerdeki etkin fonksiyonu ve DNA metilasyonu ile histon deasetilasyonu gibi iki temel epigenetik mekanizma üzerindeki dual etkisi, bu proteine özgü inhibitörlerin alternatif epigenetik ilaç adayları olarak öne çıkmasını sağlamaktadır. Ancak, MBD2'nin kritik ve çok yönlü konumuna; özellikle kanser başta olmak üzere farklı hastalıklar gibi önemli biyolojik süreçlerdeki etkilerine dair yapılmış çok sayıda çalışmaya rağmen, temel araştırmalarda ve klinik çalışmalarda ilaç adayı olarak kullanılabilecek küçük kimyasal inhibitörlerin sayısı oldukça sınırlıdır. Özellikle, mevcut ticari olarak erişilebilir tek MBD2 inhibitörü olan KCC-07'nin varlığına rağmen, bu protein özelinde veya hücrelerdeki genel epigenetik düzenlemeler açısından daha fazla inhibitöre olan ihtiyaç dikkat çekmektedir.

Bu ihtiyaca yönelik olarak yapılmış olan hesaplamalı analizler, Tablo 1.1'de gösterilen inhibitör adaylarının KCC-07'ye göre MBD2'nin metillenmiş-DNA bağlanma domenine daha etkin bir şekilde bağlandığını göstermiştir [80]. Gerçekleştirilmiş ADMET analizi, bilgisayar in silico çalışmada tespit edilen aday moleküllerin sağlıklı hücreler üzerinde daha az toksik yan etkiye neden olabileceği öne sürmesine [80] karşın, bu moleküllerin in vitro etkileri hakkında henüz gerçek bir bulgu bulunmamaktadır. Dolayısıyla yapılan tez çalışmasında, in silico'da en yüksek bağlanma afinitesine sahip aday moleküllerden üç tanesinin sağlıklı ve kanser hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkilerinin tespit edilmesi amaçlanmaktadır.

Bu bağlamda, özgün yönleri ilgili tezin literatüre önemli katkılar yapacağını göstergeleridir: 1) Literatürde mevcut olmayan ve ilk kez tarafımızdan sentezlettirilen küçük kimyasal moleküllerin farklı hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkileri ilk defa bu tez kapsamında incelenmiştir. Tez kapsamında elde edilen veriler, bu aday moleküllerin spesifik MBD2 inhibitörü olma potansiyelinin (KCC-07 ile karşılaştırmalı olarak) araştırıldığı projenin (TÜSEB 2022-B-02-22387) ilk bulgularını teşkil etmiştir. 2) Yalnızca medulloblastomda test edilmiş KCC-07'nin, farklı kanser hücrelerindeki sitotoksik etkilerine ilişkin kapsamlı sonuçlar ilk defa bu tez ile birlikte literatüre kazandırılmıştır.

Tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar, Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı (TÜSEB) tarafından 2022-B-02-22387 nolu proje ile desteklenmiştir.

Tablo 1.1: Ticari MBD2 inhibitörü (KCC-07) ve inhibitör adayı küçük kimyasal moleküller.

Kimyasal Moleküller	Formülü	Moleküler Ağırlığı	Kimyasal Yapısı
KCC-07	$C_{14}H_{11}N_3OS$	269.32 g/mol	
Bileşik 1	$C_{18}H_{22}N_8O_4$	414.4 g/mol	
Bileşik 2	$C_{21}H_{20}N_4O_3$	376.4 g/mol	
Bileşik 3	$C_{16}H_{12}N_6O_6$	384.30 g/mol	

2. MATERİYAL

2.1. Hücre Hatları

Tablo 2.1: Hücre hatları.

Hücre Hattı	Firma	Katalog Numarası
HFF-1	ATCC	SCRC-1041
HUH-7	JCRB Cell Bank	JCRB0403
U2OS	ATCC	HTB-96
MCF-7	ATCC	HTB-22
PC-3	ATCC	CRL-1435

2.2. Kimyasal Maddeler

Tablo 2.2: Kimyasal Maddeler.

Ürün	Firma	Katalog Numarası
7-AAD	ThermoFisher	00-6993-50
Annexin V Bağlama Tamponu	BioLegend	422201
Annexin-APC	BioLegend	640920
Annexin-FITC	ThermoFisher	V13242
DMEM	Gibco	41966029
DMSO	Neofroxx	1264ML250
D-PBS	Gibco	14190094
FBS	Gibco	10500064
KCC-07 Inhibitor	BLD Pharm	BD01286495-50mg
Penisilin/Streptomisin	Gibco	15140122
PI	ThermoFisher	V13242
Trypsin-EDTA	Pan Biotech	P10-0231SP
WST-1 Cell Proliferation Reagent	Roche	11644807001

2.3. Cam, Plastik ve Sarf Malzemeler

Tablo 2.3: Cam, Plastik ve Sarf Malzemeler.

Ürün	Firma	Katalog Numarası
6 kuyucuklu plaka	TPP	92006
96 kuyucuklu mikrolaka	TPP	92096
Flask 25/75	TPP	90026/76
Neubauer Lamı	Isolab	IS.075.03.001
Cell Strainer/Filtre (40 µm)	Falcon	352340
Ependorf Tüp	Capp	5101501C
Pipet ucu	Capp	5130010/70/130
Parafilm	Isotherm	DPRF0000001
Kriyotüp	Ecotech Biotech	DMSO100
BD 5 ml Polypropylene Tube	Falcon	352052
Serolojik Pipet-Disposable	Capp	SP-5-C/10-C/25-C

2.4. Cihazlar

Tablo 2.4: Cihazlar.

Ürün	Firma	Katalog Numarası
Akım sitometrisi	BD	Accuri C6
CO ₂ İnkübatörü	Wiggins	WCI-180
Laminar flow kültür kabini	Cesna Laboratuvar Sistemleri	CSN-SC100-II
Varioskan Plate Reader	Thermo Scientific	3001-1571
+4 °C soğutucu	ALTUS	D54271
-20 °C soğutucu	ALTUS	D54271
-80 °C soğutucu	DAIHAN Scientific	UniFreez U700
Buz makinesi	BREMA Ice Flaker	GB 903 HC
Masa üstü soğutmalı santrifüj	Nuve	NF 800R
Mikropipet 0.2-2 µl	Gilson	F144054M
Mikropipet 2-20 µl	Gilson	F144056M
Mikropipet 20-200 µl	Gilson	F144058M
Mikropipet 200-1000 µl	Gilson	F144059M
Çok kanallı Mikropipet 20-200 µl	Isolab	011.21.200
Pipet tutucu (şarjlı pipetör)	Isolab	010.01.006
Ters (inverted) ışık mikroskobu	SOPTOP	ICX41
Su banyosu	Weightlab Instruments	WF-SB11
Sıvı azot tankı	Taylor Wharton	LS4800

3. YÖNTEM

Yapılacak çalışmada *in silico* yöntemlerle keşfedilmiş olan Tablo 1.1'deki MBD2 inhibitör adaylarının çeşitli insan hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkilerinin araştırılmasını içermektedir. Belirlenen küçük kimyasal moleküllerin sitotoksik etkileri hücre kültürü ortamında *in vitro* olarak test edilmiştir.

3.1. Hücre Kültürü, Alt Kültürleme ve Dondurma

HFF-1 (human foreskin fibroblast), HUH-7 (human hepatocellular carcinoma), U-2 OS (human osteosarcoma), PC-3 (prostatic adenocarcinoma) ve MCF-7 (mammary adenocarcinoma) hücre hatları %10 (v/v) FBS ve %1 (v/v) Pen/Str içeren DMEM'de büyütülmüştür. Hücreler 37°C'de ve %5 CO₂ koşullarında nemlendirilmiş inkübatörde büyütülmüştür. Hücrelerin besiyerleri ortalama 2-3 günde bir taze besiyeriyle değiştirilmiştir. Yeterli yoğunluğa ulaşan hücreler ise pasajlanmıştır.

Hücrelerin yoğunluğu (confluency), büyütüldükleri hücre kültürü kaplarında yaklaşık %70-80 oranına ulaştığında alt kültürleri (pasaj) yapılmıştır. Hücre kültüründeki besi yeri vakum yardımıyla uzaklaştırıldıktan sonra yaklaşık 1-1,5 ml (T-25 flask için) 1X PBS ile yıkama yapılmıştır. Hücrelerin arasında ve yüzeyle olan bağlantılarını koparmak için hücrelerin üstüne 500-750 µl 1X Trypsin-EDTA eklenerek yaklaşık 2-3 dk 37°C, %5 CO₂ inkübatöründe enzimatik reaksiyon için bekletilmiştir. Trypsinin enzimatik reaksiyonunu durdurmak için hücre kültürü kabına besiyeri eklenir ve karışım pipetlenerek santrifüj tüpüne aktarılır. Oda sıcaklığında 1500 rpm'de 5 dk santrifüjlenerek hücrelerin besiyerinden ayrılması sağlanır. Ardından üst sıvı çekilerek belirlenen oranda (1:2 veya 1:3) seyreltilmek amacıyla hücre pelletinin üstüne taze besiyeri eklenir. Hücre çökeltisi homojen olarak çözündürüldükten sonra taze besi yeri bulunan hücre kültürü kaplarına damla damla ilave edilir ve 37°C'de nemli ve %5 CO₂ ortamında inkübatöründe büyümesi sağlanır.

Hücrelerin sıvı nitrojende dondurularak saklanması için dondurma besiyeri kullanılmıştır. Dondurma besiyeri, %90 (v/v) FBS ve %10 (v/v) DMSO karıştırılarak hazırlanmıştır. Dondurulmak istenen hücreler pasaj sırasında santrifüj edildikten sonra, hücre pelleti dondurma besiyeri (%10 DMSO içeren FBS) ile uygun yoğunlukta (maksimum 10x10⁶ hücre/ml) süspanse edildi. Cryotüpleri içerisine aktarılan hücre

süspansiyonları -80°C’de ön dondurma aşamasından sonra uzun süreli muhafaza için sıvı azot tankına (-196 °C) aktarıldı. Hücreler tekrar çözülmek istendiğinde, su banyosunda sıvı-katı hale gelene kadar bekletilen hücre süspansiyonu üzerine büyüme besiyeri eklendikten sonra santrifüj edildi (1500 rpm’de 5 dk.) ve dondurma besiyeri uzaklaştırıldı. Uygun miktarda taze besiyeriyle hücre çökeltisi süspanse edilerek uygun hücre kültürü kabına alınarak 37°C’de ve %5 CO₂ koşullarında inkübatörde büyütülmüştür.

3.2. İnhibitör Adaylarının Sitotoksite Analizi

MBD2 inhibitörü (KCC-07) ve aday moleküllerinin (Bileşik 1, 2 ve 3) hücre canlılığı ve proliferasyona olan etkilerini analiz etmek amacıyla Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche, 11644807001) reaktifi kullanılmıştır. Belirlenen konsantrasyon aralığında (0-100 µM) kimyasal molekül (KCC-07 ve aday bileşikler) veya %1 (v/v) DMSO (kimyasalların çözülmesi için kullanılan “vehicle” kontrol) varlığında, belirlenen optimum büyüme koşullarında (ekilen hücre sayısı, yüzey alanı, ekim hacmi vb.) 96 kuyucuklu mikrolakalara Şekil 3.1’deki düzende hücre ekimi yapılmıştır. Farklı zaman noktalarında (2., 24., 48. ve 72. saat) üretici firma tarafından belirtilen protokol takip edilerek hücrelerin 4 günlük büyüme eğrisi karşılaştırmalı (KCC-07 ile bileşikler arasında) olarak analiz edilmiştir.

HFF-1, HUH-7, U-2 OS, PC-3 ve MCF-7 hücre hatlarının kültürdeki optimum yoğunluğu (ortalama %60-70 confluency) göz önünde bulundurularak 50 µl’de 10^3 hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyucuklu mikrolakaya üçer replika ekim yapıldı. Hücrelerin yüzey adezyonu ve ortama adaptasyonu için 18-24 saat (bir gece) kültür koşullarında (37°C’de ve %5 CO₂’te) inkübe edildi. Ertesi gün, inhibitör ve aday moleküllerin belirlenen konsantrasyonlarını (0 µM (vehicle), 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 75 µM ve 100 µM) içeren 50 µl besiyeri, daha önce hücre ekilen (50 µl besi yeri içinde) ilgili kuyucuklara (Şekil 3.1) ilave edildi (final besiyeri hacmi 100 µl/kuyu) ve belirlenen zaman periyodunda kültürüne devam edildi. Her bir günlük zaman noktasında kontrol ve deney gruplarının % canlılığı karşılaştırmalı olarak WST-1 Cell Proliferation Reagent kullanılarak, spektrofotometrik yöntemle tayin edildi.

WST-1 metodu üretici firmanın tavsiye ettiği protokol izlenerek yapıldı. Ekim yapılan her bir kuyucuğa 10 µl WST-1 reaktifi eklendi ve 2 saat boyunca hücre kültürü

koşullarında (37°C’de ve %5 CO₂’te) inkübe edildi. Daha sonra, mikrolaka okuyucu (Thermo, Varioskan Flash) kullanılarak her kuyucuğun 440 nm’deki absorbansı, yalnızca besiyeri içeren bir arka plan kontrolüne (blank) karşı ölçüldü. Spektrofotometrik referans/kontrol dalga boyu olarak 660 nm kullanıldı. Ölçülen absorbans (A₄₄₀) verilerinden blank substraksiyonu yapıldıktan sonra elde edilen değerler farklı hesaplamalarda (zamana veya doza göre kat artış, canlılık, LC₅₀ vb.) kullanıldı.



3.3. %50 Öldürücü Konsantrasyon (LC₅₀) Hesaplanması

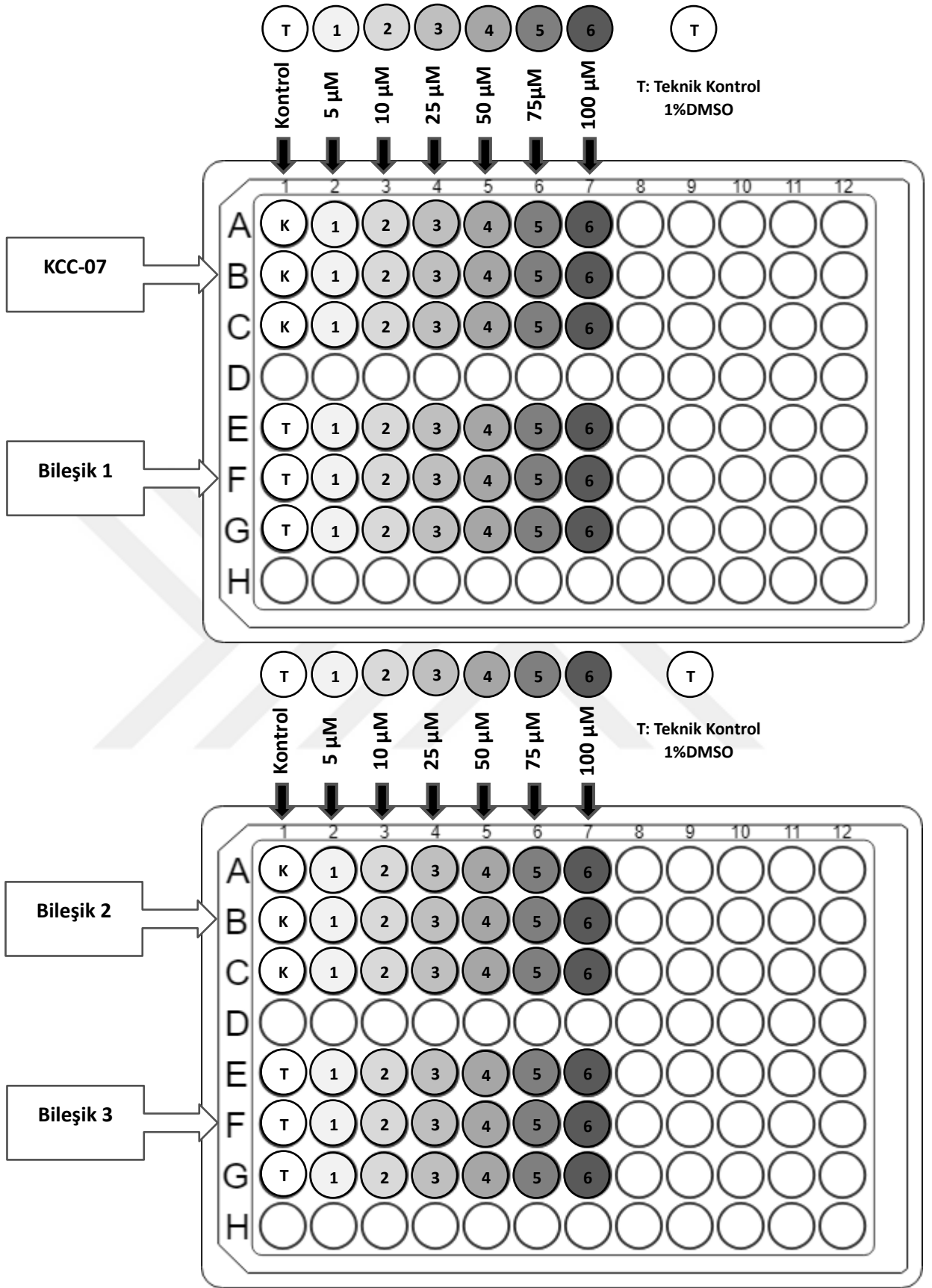
LC₅₀ değerleri, aşağıdaki denkleme dayanan dört parametrelili lojistik regresyon (4PL) modeli (3.1) kullanılarak belirlenmiştir:

$$Y = Bottom + \frac{Top - Bottom}{1 + 10^{((LogLC50 - X) * HillSlope)}} \quad (3.1)$$

Burada X, inhibitör konsantrasyonunun logaritmasını, Y ise her saat için kontrol grubuna (0 µM) kıyasla hücrelerdeki sağ kalım değerlerinden elde edilen kat farkını, HillSlope ise doz-tepki eğrisinin eğimini ifade etmektedir. LC₅₀ değerleri, inhibitör konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak sağ kalımları dikkate alan doğrusal olmayan regresyon yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır. Ve LC₅₀ grafiklerinin regresyon uyum (fit) analizi için hesaplanan R-kare (R²) değerleri Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1: LC₅₀ R-kare değerleri.

Kimyasal moleküller	Süre	Hücre Hatları				
		HFF-1	HUH-7	U2-OS	PC-3	MCF-7
KCC-07	2saat	0,8643	0,698	0,8439	0,9324	0,5188
	24 saat	0,6711	0,7433	0,6237	0,5979	0,9477
	48 saat	0,7566	0,8137	0,4468	0,3344	0,9123
	72 saat	0,6914	0,9622	0,8388	0,1185	0,9191
Bileşik 1	2saat	0,08396	0,2247	0,05513	-	0,1863
	24 saat	0,1553	0,08913	-	0,3755	0,08408
	48 saat	0,2582	0,1695	0,001298	0,2797	0,2825
	72 saat	0,07445	0,06713	0,04364	0,2905	0,4989
Bileşik 2	2saat	0,8839	0,9127	0,9751	0,8382	0,9702
	24 saat	0,9226	0,9886	0,9966	0,8671	0,9595
	48 saat	0,9447	0,994	0,9984	0,8496	0,9877
	72 saat	0,9358	0,9633	0,9988	0,9995	0,9728
Bileşik 3	2saat	0,1143	0,03302	0,1342	0,01176	0,7926
	24 saat	0,04897	0,02487	-	0,1037	0,02156
	48 saat	0,1465	0,3406	0,154	0,1235	0,4495
	72 saat	0,03553	0,05788	0,4208	0,07661	-



Şekil 3.1: İnhibitör adaylarının analizi için kullanılan deneysel tasarım.

3.4. Akım Sitometrisi İle Apoptoz Tayini

En iyi etkinin görüldüğü kanser hücre hatlarında MBD2 inhibitörü (KCC-07) ve aday moleküllerin (Bileşik 1, 2 ve 3) zamana ve doza bağlı neden olduğu hücre ölüm mekanizması akım sitometrisi kullanılarak tespit edilmiştir. Bu bağlamda, hücre hattı olarak HUH-7, PC-3 ve sağlıklı hücre hattı HFF-1, madde konsantrasyonu olarak 25 μ M ve 75 μ M, süre olarak 48. saat seçilmiştir. Hücreler, WST-1 sitotoksosite analizindeki aynı parametreler (hücre sayısı/yüzey alanı, besiyeri hacmi/flask hacmi vb.) taklit edilerek 6 kuyucuklu plakaya (final besiyeri hacmi 500 μ l/kuyucuk) ikişer replika olacak şekilde ekildi. Bir gece (18-24 saat) inkübasyonun ardından hücreler karar verilen süre boyunca KCC-07 veya en yüksek sitotoksik etkiye sahip aday molekül (Bileşik 2) ile muamele edildi.

24. ve 48. saatte ikişer replika olarak ekilmiş hücreler aynı santrifüj tüpünde (pool) toplandı. Hücreler 1500 rpm'de 5 dk +4 °C'de santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü ve besi yeri uzaklaştırıldı. Pelletler 10 ml soğuk PBS ile yıkandı ve sayıldı. Sayılan hücreler 5×10^5 hücre olacak şekilde ayrı bir tüpe aktarıldı ve tekrar santrifüj edilerek bir kere daha soğuk PBS ile yıkandı. Son santrifüjden sonra hücreler 0,5 ml Annexin V-bağlanma tamponunda konsantrasyonu mililitrede 1×10^6 hücre olacak şekilde süspanse edildi. Polipropilen tüpe aktarılan 100 μ l hücre süspanسیونuna 5 μ l Annexin-V antikorları (Biolegend, #640920) ve 1 μ l 7-AAD floresan hücre boyası eklenerek 15 dk oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda, üzerine 400 μ l Annexin V-bağlanma tamponu ilave edilen her bir örnek vakit kaybetmeden akım sitometrisi cihazından geçirildi. Elde edilen sonuçların analizi ve grafiksel gösterimi FlowJo (FlowJo, LLC) hücre analiz yazılımı ile yapıldı.

3.5. Verilerin İstatistiksel Analizi

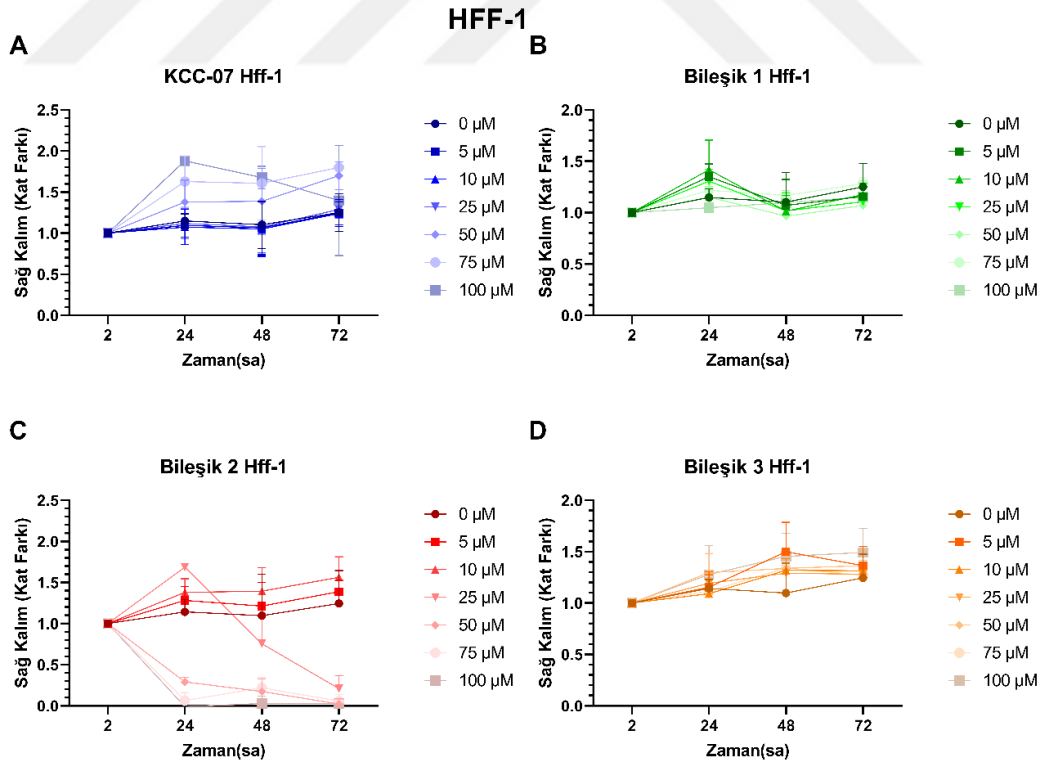
Sitotoksosite çalışmalardan elde edilen verilerin istatistiksel analizi ve grafik çizimleri GraphPad Prism 9 yazılımı kullanılarak yapıldı. Birbirinden bağımsız biyolojik replikalardan elde edilen verilerin istatistiksel anlamlılığı, deney tasarımına (teknik replika sayısı, hücre sayısı vb.) uygun olan veri değerlendirme ölçütü (Student's t-test, 2-way ANOVA testi vb.) seçilerek kontrol edildi.

4. SONUÇLAR VE YORUMLAR

4.1. Küçük Kimyasal Moleküllerin Hücre Hatlarının Canlılığı ve Proliferasyonu Üzerindeki Sitotoksik Etkileri

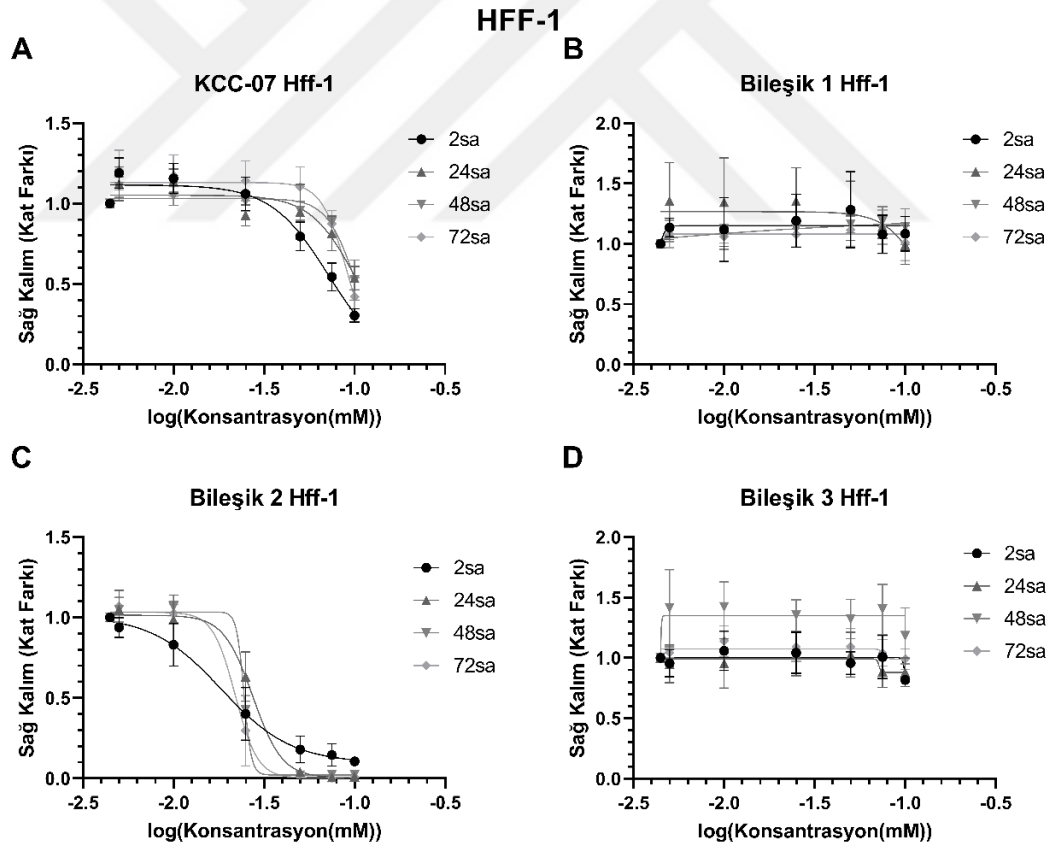
4.1.1. Kimyasal Moleküllerin HFF-1 (Sağlıklı) Hücre Hattına Etkileri

HFF-1 hücrelerinin 4 günlük çoğalma eğrisi (Şekil 4.1) incelendiğinde, Bileşik 1 ve Bileşik 3 varlığında başlangıç gününe göre hücre canlılığının kontrol grubu (vehicle/0 μ M) ile benzer seyrettiği görülmüştür (Şekil 4.1B, Şekil 4.1D). KCC-07'nin özellikle 50, 75 ve 100 μ M konsantrasyonda ilk 24 saate kadar hücre çoğalmasını baskılayamadığı ve kontrole kıyasla 1,5 ila 2 kata kadar arttığı fakat 24. ve 48. saat aralığında 50 ve 75 μ M'da hücre çoğalmasında bir tutulma (arrest) olduğu görülmüştür (Şekil 4.1A). 48. saatten sonra 50 ve 75 μ M konsantrasyonda bir toparlanma (recovery) olduğu fakat 100 μ M KCC-07 varlığında 24. saatten 72. saate doğru total hücre sayısının %60 azaldığı tespit edilmiştir.



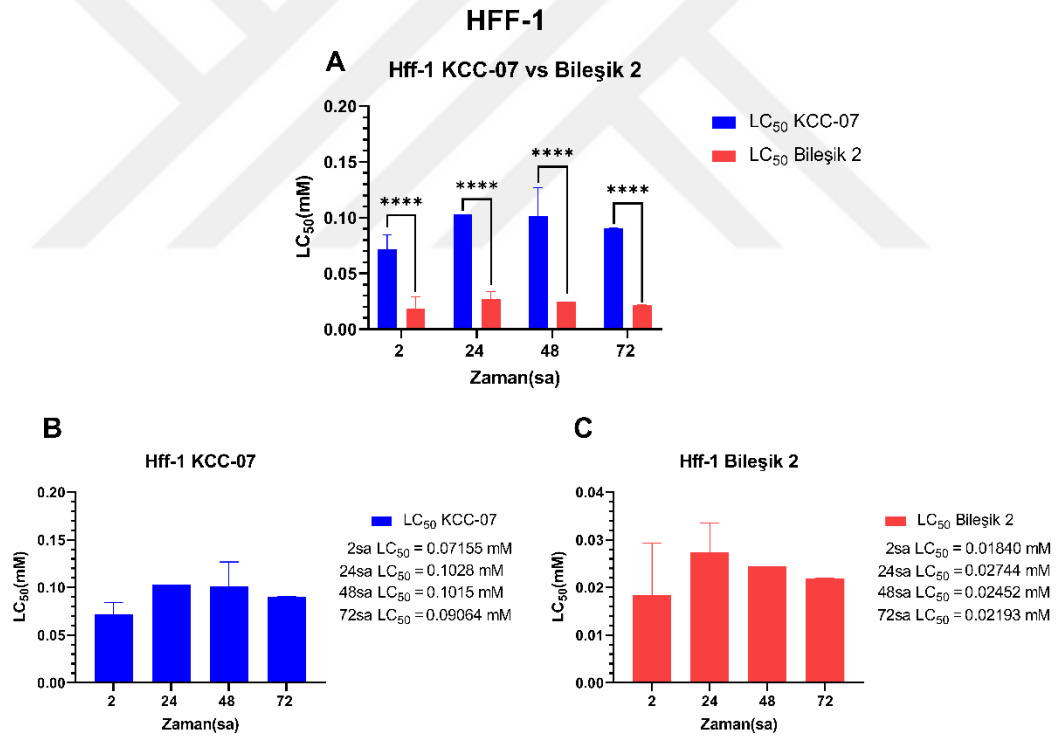
Şekil 4.1: HFF-1 hücre hattının KCC-07 (A), Bileşik 1 (B), Bileşik 2 (C) ve Bileşik 3 (D) varlığında 3 günlük büyüme eğrisi (her doz için ilgili günde ölçülen WST-1 absorbans değeri, başlangıç gününde (2. saat) ölçülen değere bölünerek çoğalma hızındaki değişim (veya sağ kalım) kat artış/azalış ifade edilmiştir).

Daha düşük doz aralığında (0-25 μ M) Bileşik 2 varlığında hücre sayısında ilk 24 saatte yaklaşık 1,5 kata kadar bir artış olduğu görülmüştür. Fakat 24. saatten itibaren 5 ve 10 μ M konsantrasyonda büyüme eğrisi kontrole benzer bir şekilde seyrederken, 25 μ M Bileşik 2 muamelesi 72. saat sonunda HFF-1 canlı hücre sayısında yaklaşık 10 katlık bir azalmaya yol açmıştır. Yüksek konsantrasyonlarında (50-100 μ M) Bileşik 2 muamelesinin HFF-1 büyüme eğrisi üzerinde daha dramatik bir etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Her üç konsantrasyon (50, 75 ve 100 μ M) için yalnızca ilk 24 saatte hücre canlılığında keskin bir düşüş (yaklaşık 6 ila 9 katlık) yaşanmıştır. 75 ve 100 μ M konsantrasyonda ilk gün itibariyle meydana gelen %85-90'lık düşüş diğer günler boyunca da devam etmiştir. 50 μ M için ise, hücre sayısındaki azalışın 48. ve 72. saatte (başlangıca oranla) sırasıyla %20 ve %5'in altına düştüğü saptanmıştır (Şekil 4.1C).



Şekil 4.2: KCC-07 (A), Bileşik 1 (B), Bileşik 2 (C) ve Bileşik 3 (D)'ün HFF-1 hücre hattı üzerindeki konsantrasyona bağlı hesaplanan %50 öldürücü doz (LC_{50}) değerleri.

KCC-07 ve inhibitör adaylarının büyüme eğrisi üzerindeki etkileri, LC₅₀ (%50 lethal concentration) değerleri hesaplanarak da doğrulanmıştır (Şekil 4.2). Maddelerin her gün için hesaplanan LC₅₀ değişimleri, Bileşik 1 (Şekil 4.2B) ve Bileşik 3'ün (Şekil 4.2D) yüksek dozlarında bile HFF-1 hücreleri üzerinde anlamlı net bir öldürücü etkisinin olmadığını ifade etmektedir. Diğer yandan, KCC-07 ve Bileşik 2'nin çok düşük dozlarının 2. saatte dahi HFF-1 hücre hatları üzerinde öldürücü etki gösterdiği ve devam eden günlerde bu letal etkiyi sürdürdüğü görülmektedir (Şekil 4.2A, Şekil 4.2C). KCC-07 için 2. saatte 50, 75 ve 100 µM konsantrasyonların HFF-1 hücreleri üzerinde sırasıyla %20, %45 ve %70 oranında; Bileşik 2 için ise 5 µM'dan 100 µM'a doğru sırasıyla %5, %15, %60, %80, %85 ve %90 oranında öldürücü olduğu saptanmıştır. Bu iki molekülün diğer günlerdeki konsantrasyon-öldürücü etki (lethality) ilişkisinin benzer olduğu saptanmıştır.



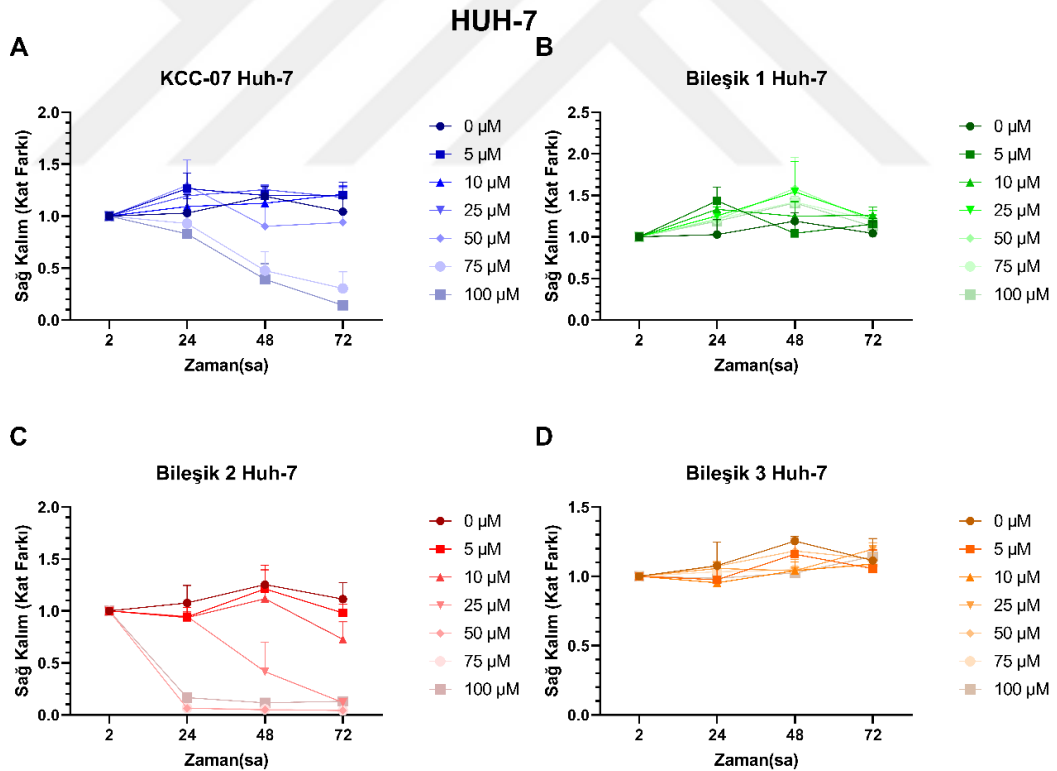
Şekil 4.3: KCC-07 ve Bileşik 2 için farklı günlerde hesaplanan LC₅₀ değerlerinin (HFF-1) karşılaştırması (2-way ANOVA, ****p<0.0001).

Bileşik 1 ve 3 için herhangi bir anlamlı LC₅₀ hesaplanamadığından (Şekil 4.2B, Şekil 4.2D) detaylı karşılaştırmaya dahil edilmemiştir. Fakat KCC-07'nin HFF-1 hücreleri üzerindeki %50 letal dozu 2. saatte 71.55±19.5 µM olarak hesaplanırken, Bileşik 2 için 2. saatte yalnızca 18,4±11 µM'dır (Şekil 4.3B, Şekil 4.3C). Şekil 4.3A

incelendiğinde, Bileşik 2 için hesaplanan LC₅₀ değerlerinin KCC-07'ye nispeten 4 zaman noktasında da ortalama 4 kat daha az olduğu ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p < 0.0001$) tespit edilmiştir (Şekil 4.3A).

4.1.2. Kimyasal Moleküllerin HUH-7 Hücre Hattına Etkileri

Aday moleküller ve KCC-07, HUH-7 hücrelerinin çoğalma profili üzerinde HFF-1'e benzer bir etki göstermiştir. KCC-07'nin 75 μ M ve 100 μ M konsantrasyonlarının 24. saat itibariyle hücre sayısında %10 ila %15'lik düşüşe neden olduğu görülmüştür. 24. ve 48. saatler arasında, 50-100 μ M KCC-07 uygulanan gruplarda hücre canlılığındaki azalma eğilimi (başlangıca göre %40-45 azalma) giderek devam etmiştir. 50 μ M dozda, 72. saatte büyüme eğrisinde hafif bir toparlanma (recovery) tespit edilirken, 75 ve 100 μ M'da aksine hızlı düşüş devam etmiştir. Sonuçta yüksek KCC-07 konsantrasyonlarında (75 ve 100 μ M), 2. saate kıyasla canlı hücre sayısının %85 ila %75 arası azaldığı saptanmıştır (Şekil 4.4A).

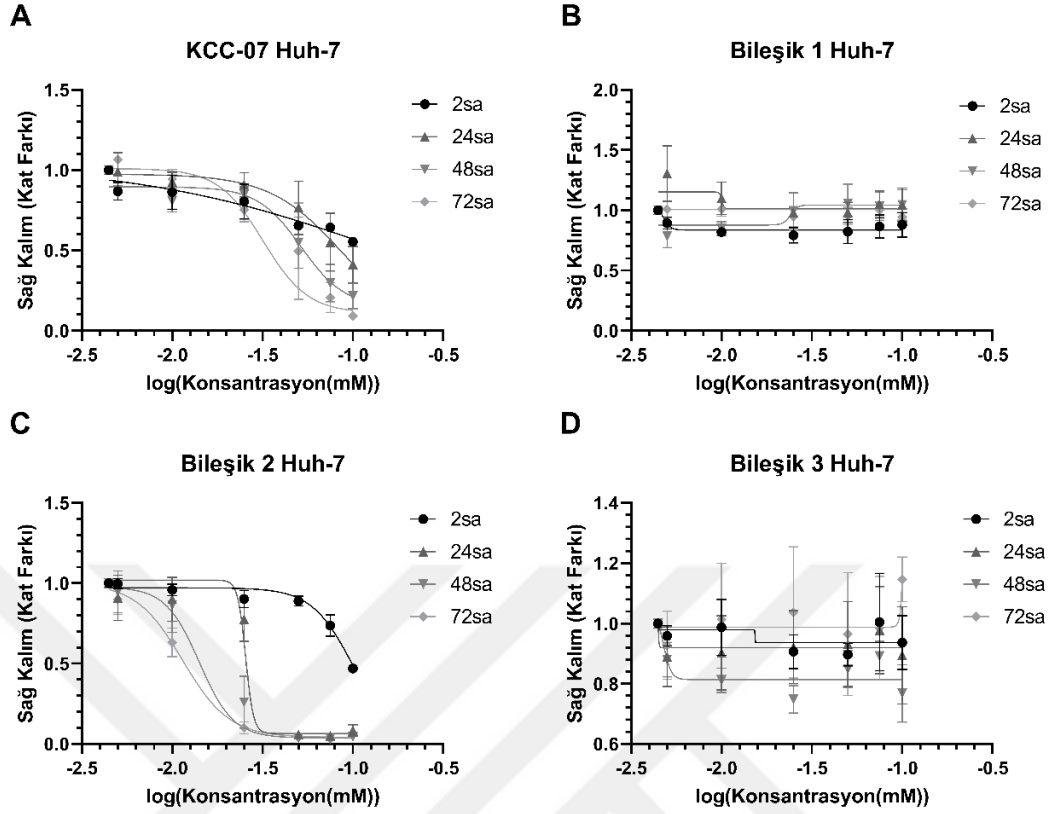


Şekil 4.4: HUH-7 hücre hattının KCC-07 (A), Bileşik 1 (B), Bileşik 2 (C) ve Bileşik 3 (D) varlığında 3 günlük büyüme eğrisi (her doz için ilgili günde ölçülen WST-1 absorbans değeri, başlangıç gününde (2. saat) ölçülen değere bölünerek çoğalma hızındaki değişim (veya sağ kalım) kat artışı/azalış ifade edilmiştir).

KCC-07'nin aksine Bileşik 2'nin; ilk 24 saatte orta-düşük dozlarında (5-50 μ M) dahi büyüme eğrisinde bir tutulmaya (arrest), 75 ve 100 μ M'da başlangıca göre çok keskin bir düşüşle %85-%90 arasında canlı hücre kaybına rastlanmıştır (Şekil 4.4C). Yüksek konsantrasyonlarda hücreler tekrar çoğalma eğilimi gösterememiş ve son güne kadar düşük canlılık devam etmiştir. Bileşik 2'nin orta dozlarda da (25 ve 50 μ M) 24. saatten 72. saate doğru kademeli bir düşüş gözlemlenmektedir. Fakat Bileşik 1 ve Bileşik 3 muamelesi HUH-7 hücre hattında kontrole göre anlamlı bir fark oluşturmamıştır (Şekil 4.4B, Şekil 4.4D).

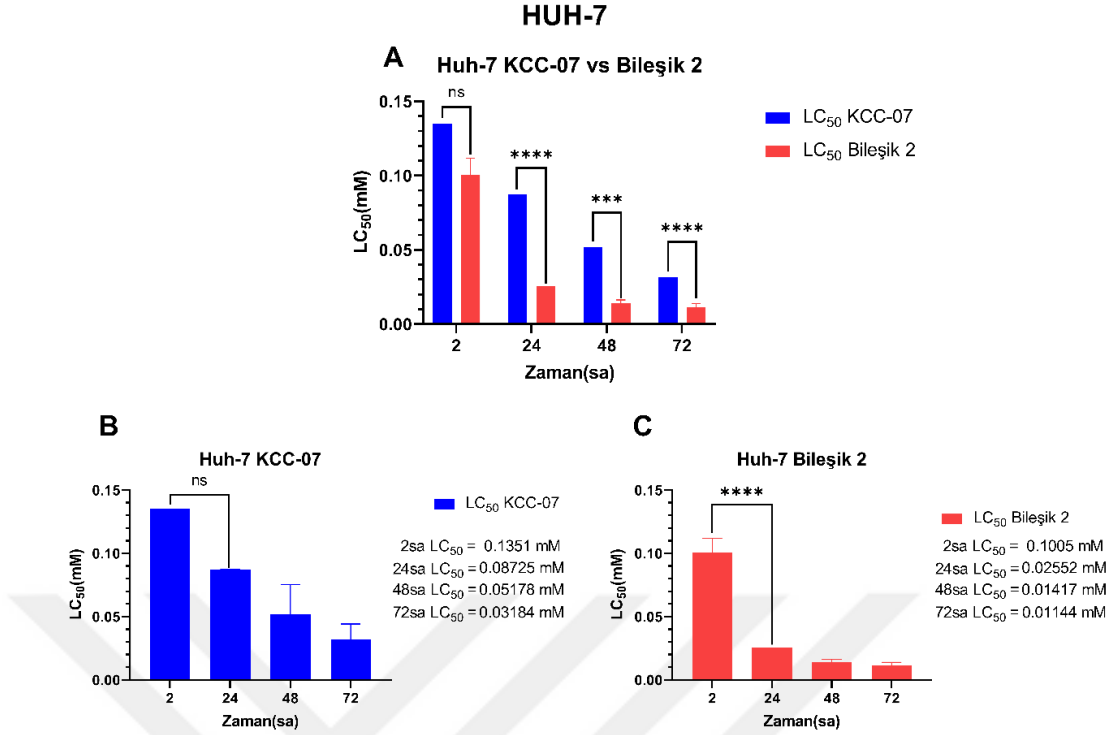
HFF-1 hücrelerine benzer şekilde Bileşik 1 ve Bileşik 3, HUH-7 hücrelerinde net bir letal sitotoksiste sergilememiştir (Şekil 4.5B, Şekil 4.5D). Diğer yandan, KCC-07 ve Bileşik 2'nin çok düşük dozlarının dahi, ilk 24 saatten itibaren HUH-7 hücre hatları üzerinde öldürücü etkisini arttırarak sürdürdüğü görülmektedir (Şekil 4.5A, Şekil 4.5C). KCC-07 için 2. saatten itibaren 72. saate kadar 50, 75 ve 100 μ M konsantrasyonlarında sırasıyla %10, %45 ve %50 oranında; Bileşik 2 için ise 25 μ M'dan 100 μ M'a doğru sırasıyla %25, %70, %80 ve %85 oranında öldürücülük (lethality) hesaplanmıştır. Bileşik 1 ve 3 için herhangi bir anlamlı LC_{50} hesaplanamamıştır (Şekil 4.5B, Şekil 4.5D). Bir başka deyişle, Bileşik 1 ve Bileşik 3'ün HUH-7 hücreleri üzerinde net bir öldürücü etkiye sahip olmadığı sonucuna varılmıştır.

HUH-7



Şekil 4.5: KCC-07 (A), Bileşik 1 (B), Bileşik 2 (C) ve Bileşik 3 (D)'ün HUH-7 hücre hattı üzerindeki konsantrasyona bağlı hesaplanan %50 öldürücü doz (LC_{50}) değişimi.

KCC-07'nin 2, 24, 48 ve 72. saatteki LC_{50} değerlerinin sırasıyla $135.1 \mu M$, $87.25 \mu M$, $51.78 \pm 21.5 \mu M$ ve $31.84 \pm 9 \mu M$ olduğu saptanmıştır (Şekil 4.6B). Bileşik 2, HUH-7 hücre hattında sitotoksik etkiyi KCC-07'ye kıyasla daha düşük konsantrasyonlarda göstermektedir; LC_{50} değerlerinin sırasıyla 2. saatte $100.5 \pm 20.5 \mu M$, 24. saatte $25.52 \mu M$, 48. saatte $14.17 \pm 2 \mu M$ ve 72. saatte $11.4 \pm 3 \mu M$ olduğu hesaplanmıştır (Şekil 4.6C). Bu sonuç; KCC-07'ye kıyasla Bileşik 2'nin daha düşük konsantrasyonlarının (3 ila 5 kat daha az) HUH-7 hücre hattında %50 öldürücü etkiyi sergileyebileceğine işaret etmektedir (Şekil 4.6A).

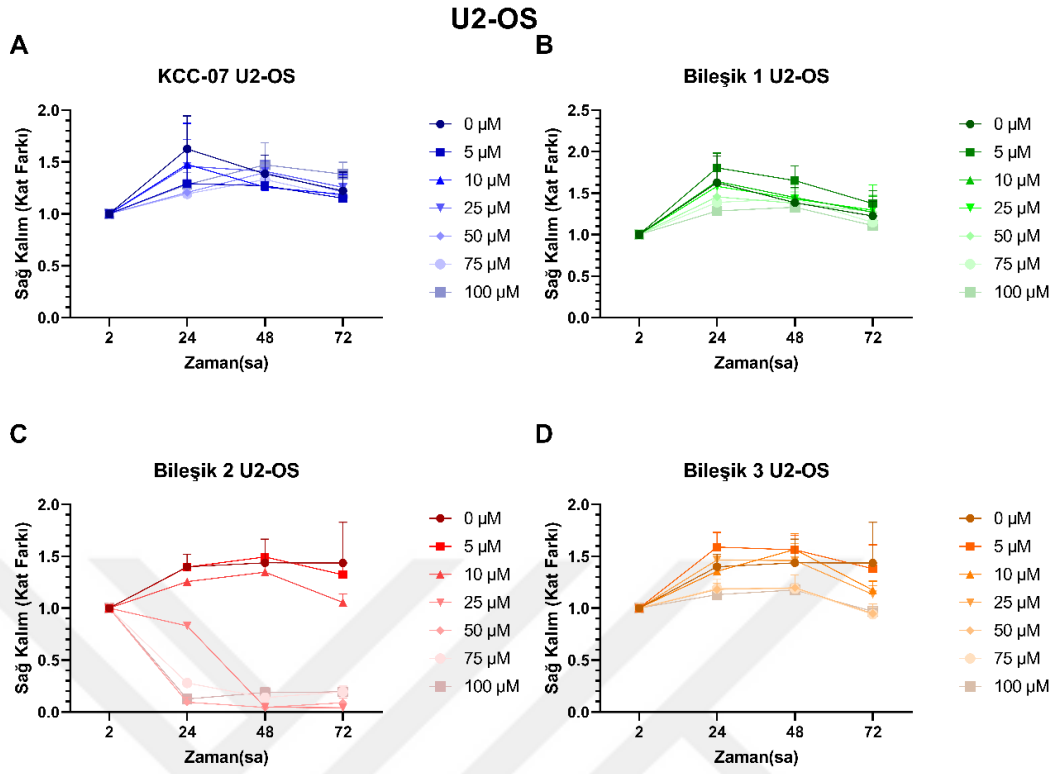


Şekil 4.6: KCC-07 ve Bileşik 2 için farklı günlerde hesaplanan LC₅₀ değerlerinin (HUH-7) karşılaştırması (2-way ANOVA, ****p<0.0001, ***p<0.001, ns=not significant).

4.1.3. Kimyasal Moleküllerin U2-OS Hücre Hattına Etkileri

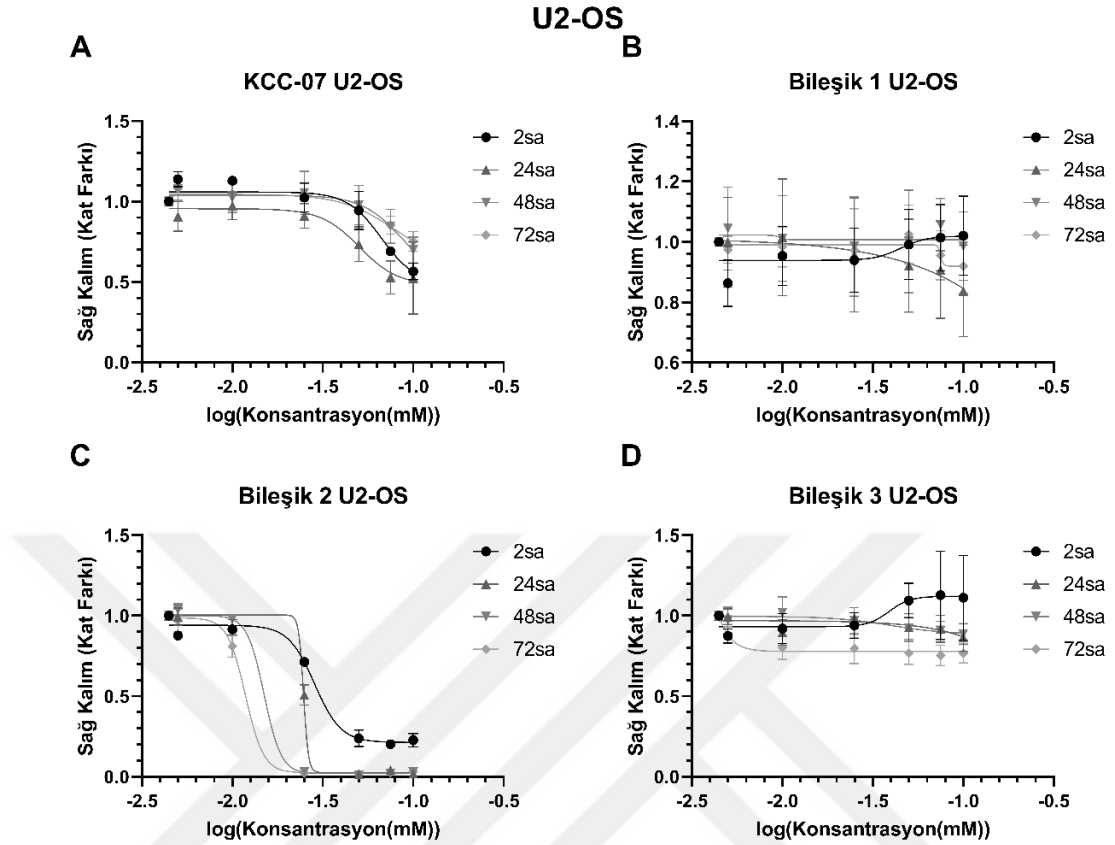
Diğer hücre hatlarındaki etkiye benzer şekilde, Bileşik 1 ve Bileşik 3'ün U2-OS hücrelerinin büyüme eğrisi üzerinde anlamlı bir biyolojik etki göstermediği tespit edilmiştir (Şekil 4.7B, Şekil 4.7D).

Fakat Bileşik 2'nin 25 µM'dan başlayan konsantrasyonlarında U2-OS hücre çoğalmasını kontrole göre ilk 24 saatte %20 civarında azalttığı ve devam eden günlerde bu etkiyi sürdürdüğü görüldü (Şekil 4.7C). Özellikle bu etkinin, 50, 75 ve 100 µM dozlarda çok daha bariz olduğu; hücre canlılığını %75-%85 arasında azalttığı tespit edildi. 48. saat itibarıyla 25 µM'lık gruptaki hücreler de yüksek dozlardaki düşüş trendini yakaladığı ve canlılığın %15 seviyelerine düştüğü gözlemlenmektedir. 25-100 µM'lık Bileşik 2 muamelesinin 72. saate kadar U2-OS hücrelerinin toparlanmasına müsaade etmediği; 10 µM ve daha az konsantrasyonlarda uygulanan Bileşik 2'nin vehicle kontrole göre büyüme eğrisinde anlamlı bir fark oluşturmadığı sonucuna varılmıştır (Şekil 4.7C).



Şekil 4.7: U2-OS hücre hattının KCC-07 (A), Bileşik 1 (B), Bileşik 2 (C) ve Bileşik 3 (D) varlığında 3 günlük büyüme eğrisi (her doz için ilgili günde ölçülen WST-1 absorbans değeri, başlangıç gününde (2. saat) ölçülen değere bölünerek çoğalma hızındaki değişim (veya sağ kalım) kat artışı/azalış ifade edilmiştir).

Diğer hücre hatlarındaki etkisin aksine KCC-07'nin orta-yüksek dozlarında büyüme eğrisinde önce hafif bir çoğalma eğilimi, sonrasında ise bir düşüş olduğu görüldü (Şekil 4.7A). Bu yukarı yönlü eğilim, yüksek KCC-07 konsantrasyonlarında (50-100 μM), 48. saatten sonra yerini düşüşe bırakmış ve sonuçta bu doz aralığında 2-72 saat arasında net bir çoğalma görülmemiştir.

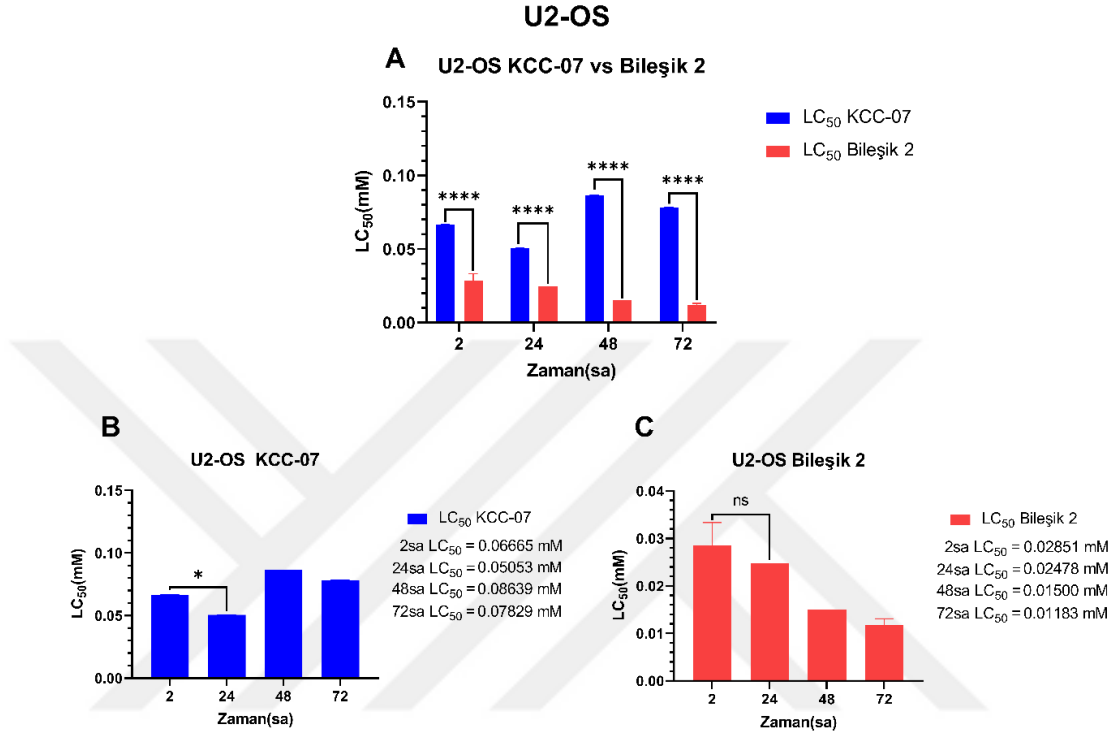


Şekil 4.8: KCC-07 (A), Bileşik 1 (B), Bileşik 2 (C) ve Bileşik 3 (D)'ün U2-OS hücre hattı üzerindeki konsantrasyona bağlı hesaplanan %50 öldürücü doz (LC_{50}) değişimi.

HFF-1 hücrelerine benzer şekilde Bileşik 1 ve Bileşik 3, U2-OS hücrelerinde net bir sitotoksik etki sergilememiştir (Şekil 4.8B, Şekil 4.8D). Diğer yandan, KCC-07 ve Bileşik 2 için bu durum daha farklıdır. KCC-07 için ilk 24 saate kadar 75 ve 100 μ M konsantrasyonunda U2-OS hücre hatları üzerinde %30-35'e varan bir öldürücü etki göstermiştir (Şekil 4.8A). Bileşik 2'ninise, görece daha düşük konsantrasyon olan 25 μ M'da bile 24. saatten itibaren %50-60'a varan bir öldürücü etkiye neden olduğu tespit edildi. Bileşik 1 ve 3 için herhangi bir anlamlı LC_{50} hesaplanamamıştır (Şekil 4.8B, Şekil 4.8D).

KCC-07'nin LC_{50} değerleri 2, 24, 48 ve 72. saatte sırasıyla 66.65 μ M, 50.53 μ M, 86.39 μ M ve 78.29 μ M olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.9B). Bileşik 2'nin U2-OS hücrelerindeki LC_{50} değerleri ise; sırasıyla 2. saatte 28.51 ± 5 μ M, 24. saatte 24.78 μ M, 48. saatte 15 μ M ve 72. saatte 11.83 ± 1 μ M olarak tespit edildi (Şekil 4.9C). Böylelikle HFF-1 hücre hattına benzer şekilde, U2-OS için de Bileşik 2'nin KCC-

07'ye kıyasla 2 ila 7 kat daha düşük LC_{50} değerine sahip olduğu; yani aynı sitotoksik etkiyi yakalamak için çok daha az Bileşik 2'nin yeterli olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 4.9A).

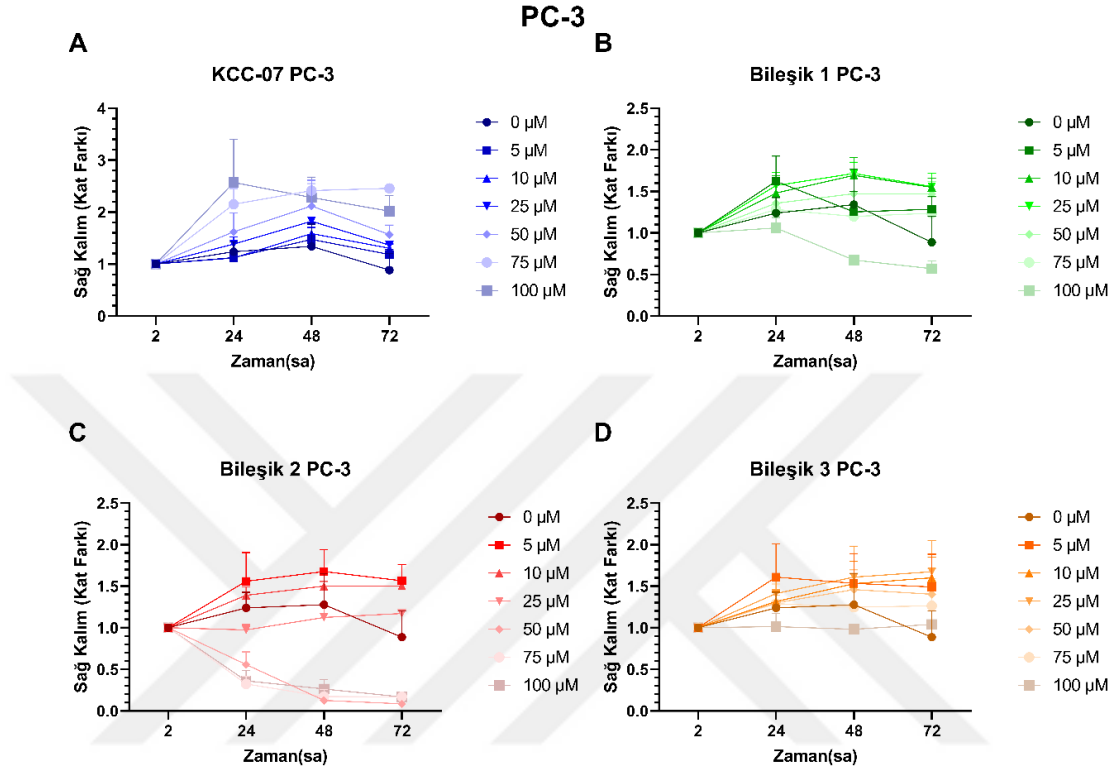


Şekil 4.9: KCC-07 ve Bileşik 2 için farklı günlerde hesaplanan LC_{50} değerlerinin (U2-OS) karşılaştırması (2-way ANOVA, **** $p < 0.0001$, * $p < 0.05$, ns=not significant).

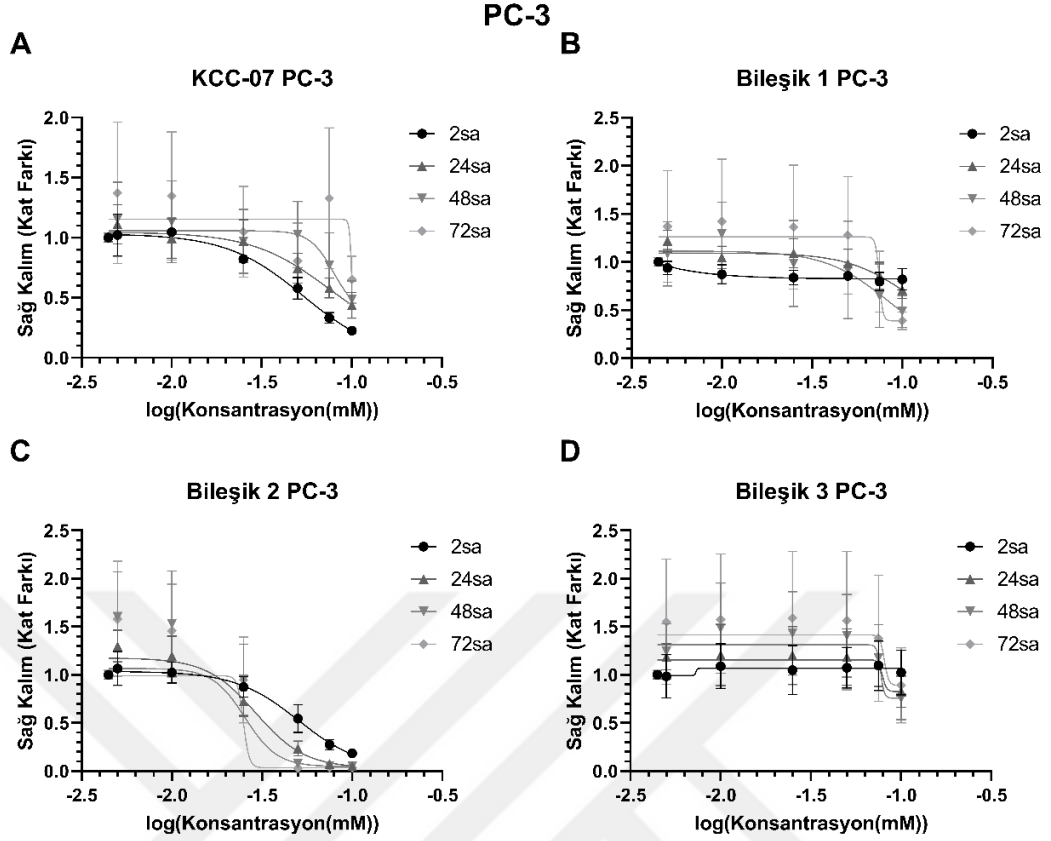
4.1.4. Kimyasal Moleküllerin PC-3 Hücre Hattına Etkileri

Küçük kimyasal moleküllerin PC-3 hücreleri üzerindeki etkileri incelendiğinde; başlangıç zamanına ve kontrole (0 μ M) göre KCC-07, Bileşik 1 ve Bileşik 3'ün büyüme eğrisini anlamlı şekilde değiştirmediği tespit edilmiştir (Şekil 4.10B, Şekil 4.10D). İlginç olarak bu hücrelerde Bileşik 1 ve 3'ün test edilen en yüksek konsantrasyonunda (100 μ M) hücre çoğalmasında bir tutulum (arrest) gözlemlenmiştir (Şekil 4.10B, Şekil 4.10D). Fakat kontrol grubu (vehicle) ile karşılaştırıldığında hücre canlılığındaki bu tutulum ve/veya düşme eğiliminin anlamlı olmadığı kanaatine varıldı. Bileşik 2'nin ise 25 μ M'dan itibaren ilk 24 saatte hücre çoğalmasını azalttığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.10C). Özellikle, Bileşik 2'nin 50 μ M ve üstü konsantrasyonlarda kontrole göre 24. saate kadar canlı hücre sayısında %40-50 oranda

bir düşüşe neden olduğu ve devam eden günlerde bu eğilimi istikrarlı şekilde devam ettirdiği görülmüştür. Görece düşük doz olan 25 μM 'da ilk 24 saatte fark edilen tutulumun ise devam eden periyotta ortadan kalktığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.10C).



Şekil 4.10: PC-3 hücre hattının KCC-07 (A), Bileşik 1 (B), Bileşik 2 (C) ve Bileşik 3 (D) varlığında 3 günlük büyüme eğrisi (her doz için ilgili günde ölçülen WST-1 absorbans değeri, başlangıç gününde (2. saat) ölçülen değere bölünerek çoğalma hızındaki değişim (veya sağ kalım) kat artış/azalış ifade edilmiştir).

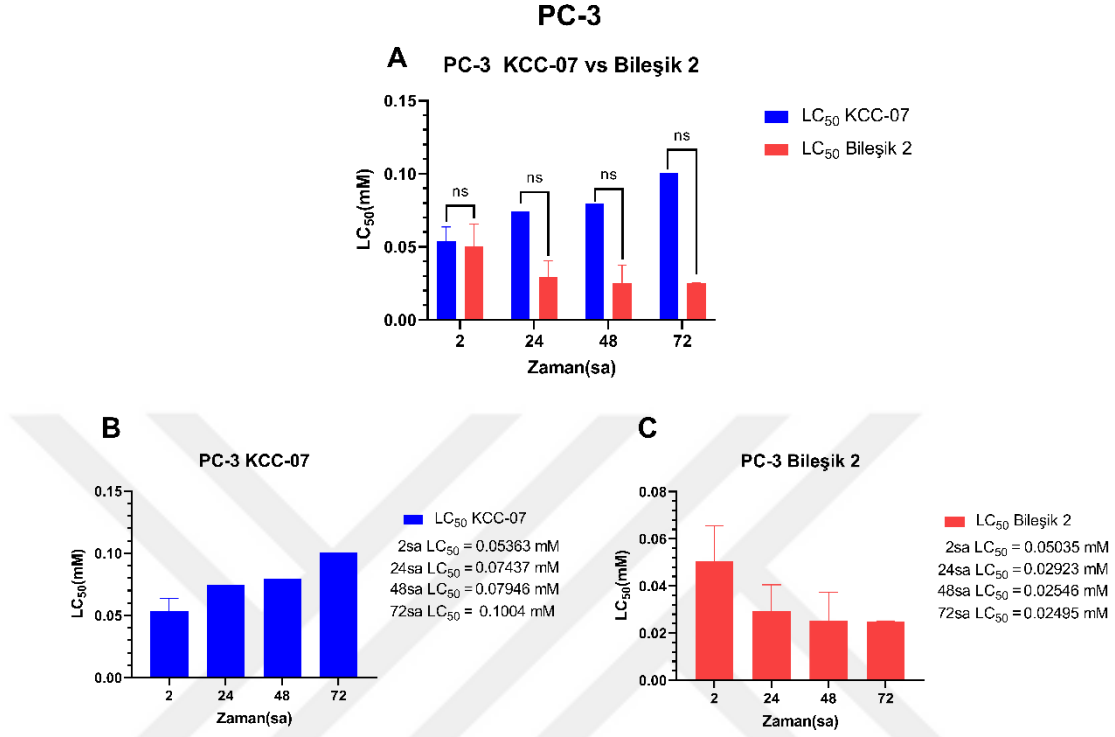


Şekil 4.11: KCC-07 (A), Bileşik 1 (B), Bileşik 2 (C) ve Bileşik 3 (D)'ün PC-3 hücre hattı üzerindeki konsantrasyona bağlı olarak hesaplanan %50 öldürücü doz (LC_{50}) değişimi.

Benzer şekilde Bileşik 1 ve Bileşik 3, PC-3 hücrelerinde de net bir öldürücülük (lethality) sergilememiştir (Şekil 4.11B, Şekil 4.11D). KCC-07 için ilk 24 saate kadar 50, 75 ve 100 μ M konsantrasyonlarda PC-3 hücre hatları üzerinde %40 ila %70 arasında bir öldürücü etki sürdürdüğü daha sonrasında bu ölümcül etkinin azalarak devam ettiği görülmektedir (Şekil 4.11A). Bileşik 2 için ise ilk saatlerde bile görece düşük konsantrasyon olan 25 μ M'da bile %10'a 24. saatten itibaren ise %30'lara varan bir öldürücülük seviyesine çıkmaktadır.

Bileşik 1 ve 3 için herhangi bir anlamlı LC_{50} hesaplanamamıştır (Şekil 4.11B, Şekil 4.11D). Fakat KCC-07'nin LC_{50} değerleri 2, 24, 48 ve 72. saatte sırasıyla 53.63 ± 14 μ M, 74.37 μ M, 79.46 μ M ve 100.40 μ M olarak bulunmuştur (Şekil 4.12B). Bileşik 2'nin PC-3 hücre hattındaki LC_{50} değerleri ise sırasıyla 2. saatte 50.35 ± 17.5 μ M, 24. saatte 29.23 ± 10 μ M, 48. saatte 25.46 μ M ± 12 μ M ve 72. saatte 24.95 μ M olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.12C). Şimdiye kadar Bileşik 2'nin KCC-07'ye göre daha etkin öldürücülüğü (daha az dozla öldürücü etki) PC-3 hücrelerinde devam etmiştir; KCC-

07'ye kıyasla Bileşik 2 için hesaplanan LC₅₀ miktarının 3 ila 4 kat daha düşük olduğu ortaya konmuştur (Şekil 4.12A).

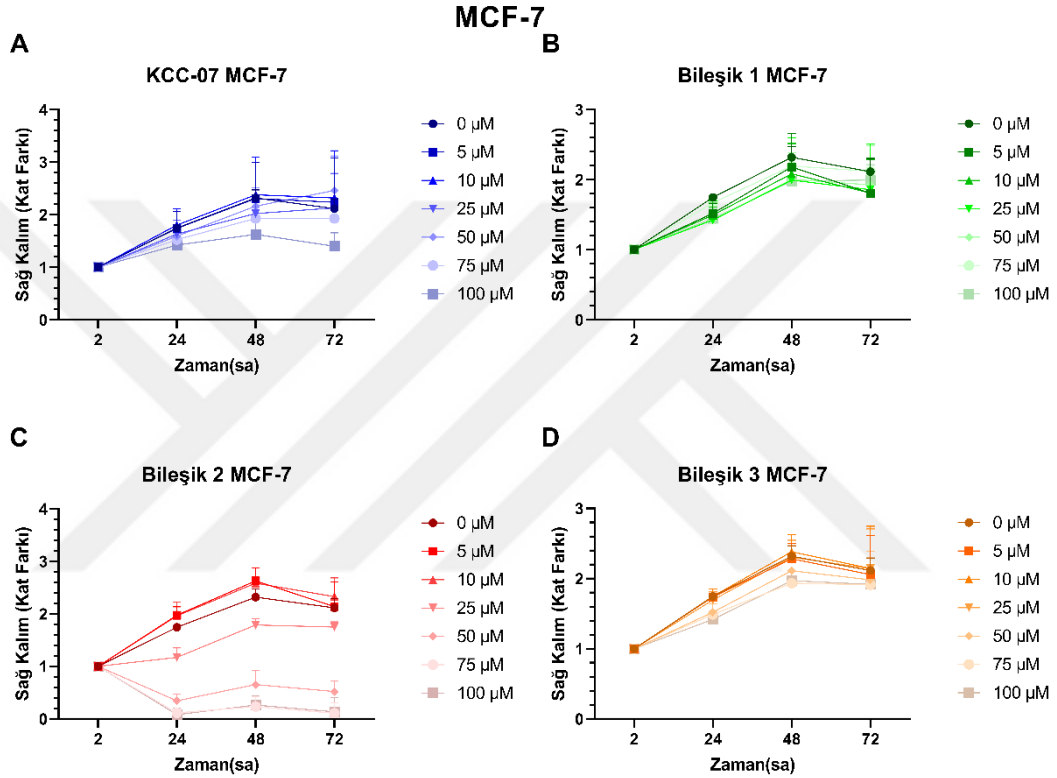


Şekil 4.12: KCC-07 ve Bileşik 2 için farklı günlerde hesaplanan LC₅₀ değerlerinin (PC-3) karşılaştırması (2-way ANOVA, ns=not significant).

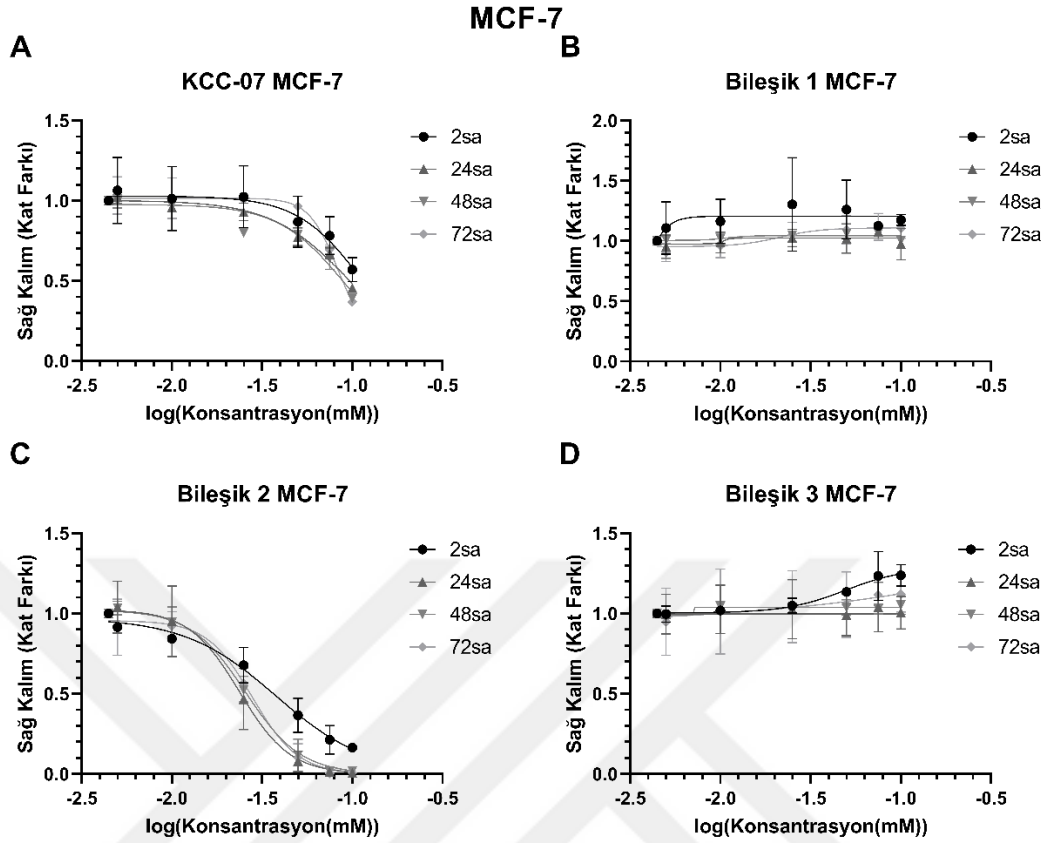
4.1.5. Kimyasal Moleküllerin MCF-7 Hücre Hattına Etkileri

Kimyasal moleküller varlığında MCF-7 hücrelerinin üç günlük büyüme eğrisi takip edilmiştir. Bu hücre hattının KCC-07, Bileşik 1 ve Bileşik 3'e karşı hassas olmadığı ve proliferatif indeksin kontrol grubuna benzer seyrettiği görüldü. Bu üç moleküle ait kontrol ve deney gruplarında, hücre sayısı başlangıçtan son güne (72. saat) kadar yaklaşık 2 ila 2,4 katlık bir artış sergilemiştir (Şekil 4.13A, Şekil 4.13B, Şekil 4.13D). Yalnızca 100 µM KCC-07 muamelesinin, 72. saatteki canlı hücre sayısında 2. saate oranla yaklaşık 1,2 katlık anlamlı olmayan bir dalgalanmaya; yani üç günlük periyotta büyüme eğrisinde tutuluma neden olduğu tespit edildi. Diğer taraftan, Bileşik 2'nin diğer kanser hücre hatlarının proliferasyonu üzerindeki inhibe edici karakterine MCF-7 hücrelerinde de rastlanmıştır. Madde uygulanmayan grupta (vehicle) büyüme eğrisi başlangıca göre yaklaşık 2,4 katlık bir artışla seyrederken, 50 ila 100 µM aralığında Bileşik 2 muamelesinin, canlı hücre sayısını 0. güne nispeten ortalama 7,5 kata kadar

azalttığı saptandı (Şekil 4.13A). Daha düşük doz olan 25 μM 'da dahi, Bileşik 2 muamelesinin, büyüme eğrisinin erken günlerinde (24 saat) kontrole göre fark edilebilir bir duraklamaya (arrest) sebep olduğu fakat hücrelerin 1. gün sonrasında bu baskılamayı kırarak 1,6 kata kadar çoğaldığı tespit edildi. Yine de bu çoğalma eğiliminin 0 μM konsantrasyona (kontrol) görece oldukça kısıtlı kaldığı görülmektedir (Şekil 4.13C).



Şekil 4.13: MCF-7 hücre hattının KCC-07 (A), Bileşik 1 (B), Bileşik 2 (C) ve Bileşik 3 (D) varlığında 3 günlük büyüme eğrisi (her doz için ilgili günde ölçülen WST-1 absorbans değeri, başlangıç gününde (2. saat) ölçülen değere bölünerek çoğalma hızındaki değişim (veya sağ kalım) kat artış/azalış ifade edilmiştir).



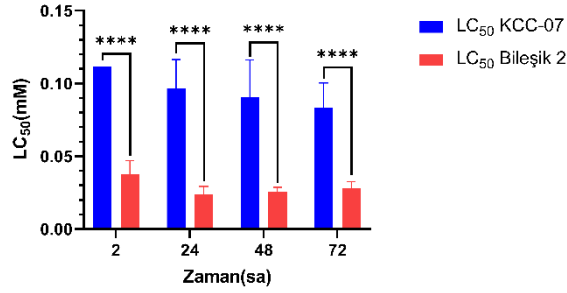
Şekil 4.14: KCC-07 (A), Bileşik 1 (B), Bileşik 2 (C) ve Bileşik 3 (D)'ün MCF-7 hücre hattı üzerindeki konsantrasyona bağlı hesaplanan %50 öldürücü doz (LC_{50}) değişimi.

Bileşik 1 ve 3 için herhangi bir anlamlı LC_{50} hesaplanamamıştır (Şekil 4.14B, Şekil 4.14D). KCC-07'nin MCF-7 hücrelerindeki en düşük %50 öldürücü dozu 72. saatte $83.15 \pm 18 \mu M$ olarak hesaplanırken, Bileşik 2 için ise en düşük LC_{50} , 24. saatte $23.73 \pm 6 \mu M$ 'dir. Diğer hücre hatlarındaki LC_{50} sonuçlarına benzer şekilde; Bileşik 2'nin bütün günler için hesaplanan LC_{50} değerlerinin KCC-07 için tespit edilen değerlerden yaklaşık 3,5 ila 4 kat daha düşük olduğu fark edilmektedir (Şekil 4.15A)

Görüldüğü üzere, Bileşik 2'nin daha düşük konsantrasyonlarının daha kısa sürede, MCF-7 (Şekil 4.15A) dahil test edilen tüm hücre hatlarında (Şekil 4.6A, 4.9A, 4.12A) %50 öldürücü etkiye ulaşmada yeterli olduğu sonucuna varılmaktadır.

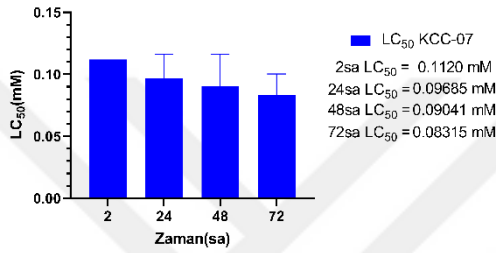
MCF-7

A MCF-7 KCC-07 vs Bileşik 2



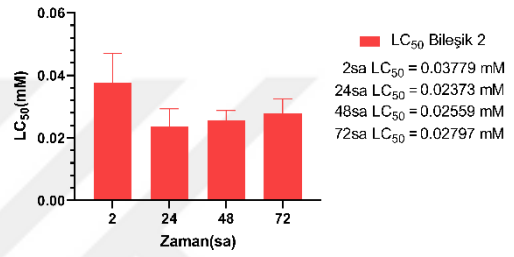
B

MCF-7 KCC-07



C

MCF-7 Bileşik 2



Şekil 4.15: KCC-07 ve Bileşik 2 için farklı günlerde hesaplanan LC₅₀ değerlerinin (MCF-7) karşılaştırması (2-way ANOVA, ****p<0.0001).

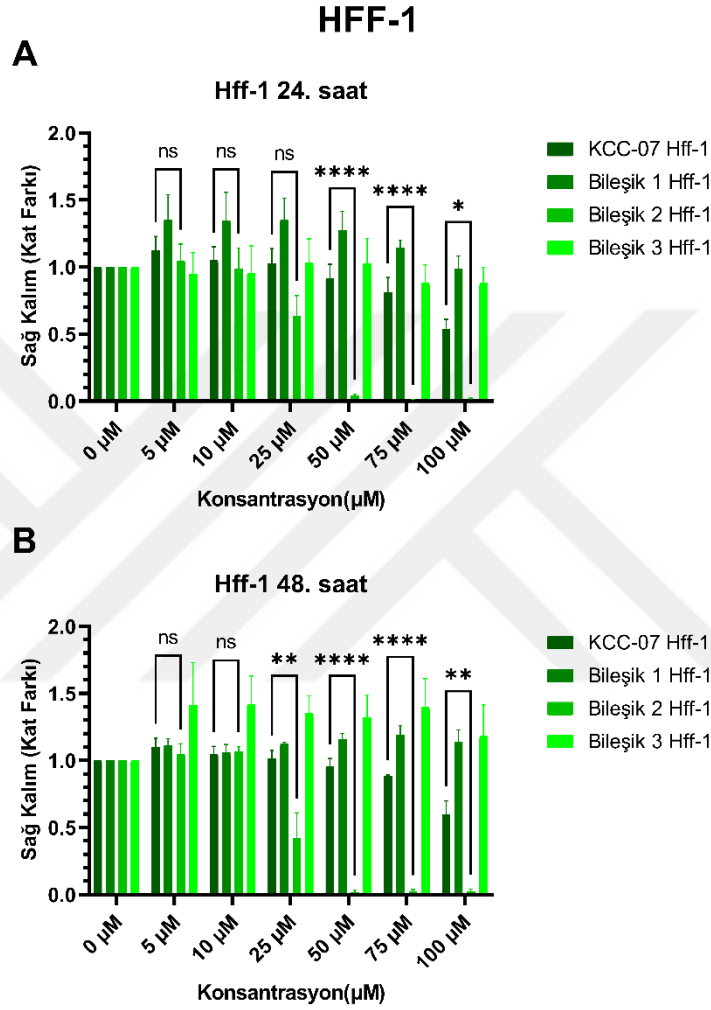
4.1.6. Kimyasal Moleküllerin Konsantrasyona Bağlı Etkilerinin Hücre Hatları Üzerinde Detaylı İncelemesi

KCC-07 ve inhibitör aday moleküllerin (Bileşik 1, Bileşik 2 ve Bileşik 3) hücre hatları (HFF-1, HUH-7, U2-OS, PC-3 ve MCF-7) üzerinde 24. ve 48. saatte meydana getirdiği etkiler daha detaylı olarak irdelenmiştir. Bu sayede, moleküllerin her hücre hattı özelinde ortaya koyduğu doza-bağlı sitotoksik etki karşılaştırmalı olarak daha açık ve anlaşılır grafiklerle sunulmuştur (Şekil 4.16–Şekil 4.20).

İlgili grafikler (Şekil 4.16–Şekil 4.20) incelendiğinde, KCC-07 ve Bileşik 2'nin 24. ve 48. saatlerde ortaya koyduğu sitotoksik etki, konsantrasyon-bağlı şekilde muntazam artış göstermiştir. Fakat Bileşik 1 ve Bileşik 3 için hiçbir hücre hattında tutarlı ve istatistiksel olarak anlamlı bir konsantrasyon-sitotoksikite korelasyonu saptanamamıştır.

HFF-1 hücre hattında her iki zaman noktasında da tüm konsantrasyonlarda (5-100 µM) en sitotoksik ajan olarak Bileşik 2 ön plana çıkmaktadır. Özellikle KCC-07 ile karşılaştırıldığında, HFF-1 hücrelerinde 25-100 µM aralığında Bileşik 2'de görülen

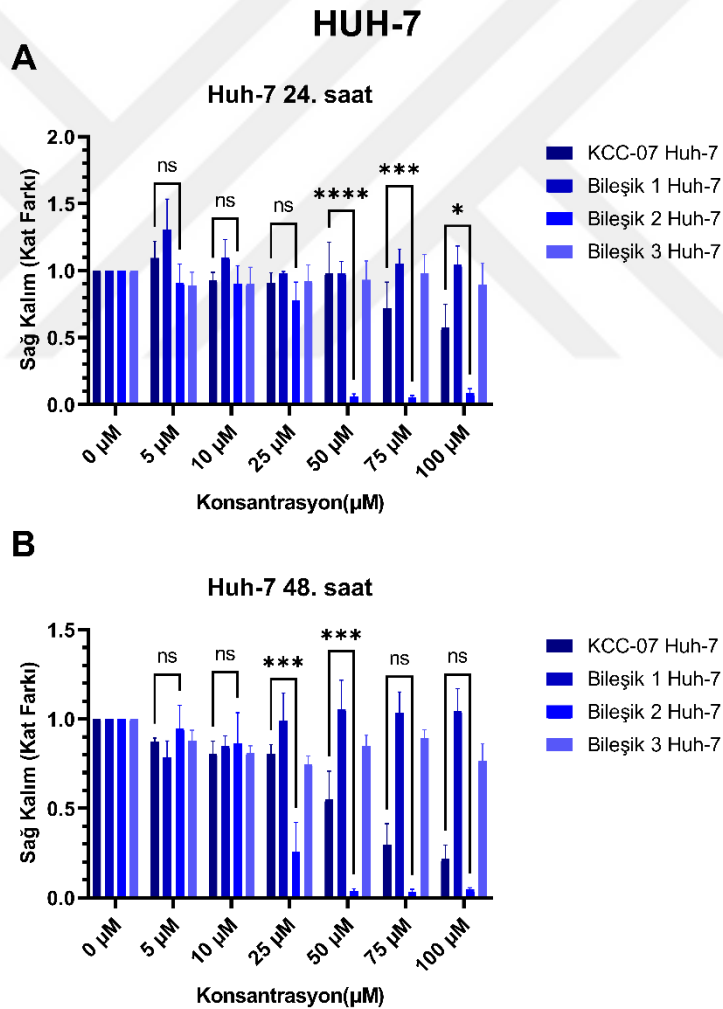
açık farkın (48. saat) sırasıyla; 2,4 kat, 50,2 kat, 40,1 kat ve 28 kat olduğu tespit edildi (Şekil 4.16B). Bileşik 2'nin KCC-07'ye göre yüksek öldürücü etkisinin (25, 50, 75 ve 100 μ M'da), yapılan 2-way ANOVA analizi sonucu istatistiki olarak anlamlı olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.16: KCC-07, Bileşik 1, Bileşik 2 ve Bileşik 3'ün 24. ve 48. saatteki HFF-1 hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisinin karşılaştırılması (hücre canlılığı, her doz için 1. günde ölçülen WST-1 absorbans değeri, aynı günde kontrol için ölçülen değere bölünerek kat artış/azalış olarak hesaplanmıştır) (2-way ANOVA, ****p<0.0001, **p<0.01, *p<0.05, ns=not significant).

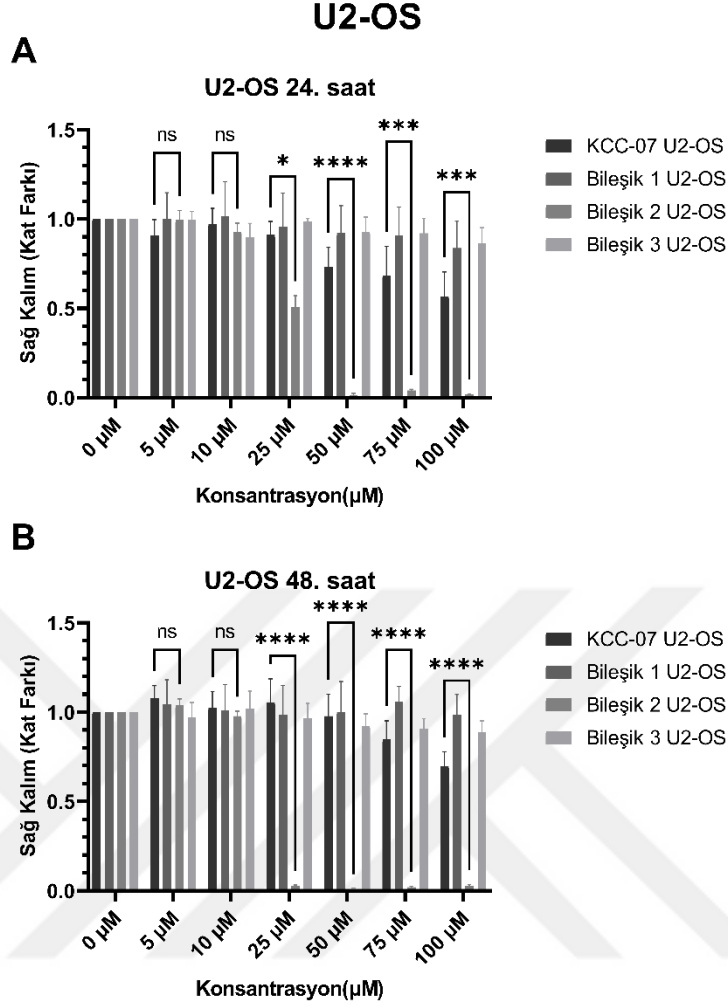
HUH-7 hücre hattı incelendiğinde, KCC-07'nin en yüksek konsantrasyonu (100 μ M) hücre canlılığında 24. saatte %43, 48. saatte ise %79 azalmaya sebep olmuştur (Şekil 4.17). Aynı doz ve zaman noktalarında (24 ve 48. saat) Bileşik 2'nin kontrole (0 μ M) göre canlılıkta neden olduğu düşüş sırasıyla %92 (Şekil 4.17A) ve %96 (Şekil 4.17B)

olarak ölçülmüştür. HUH-7 hücre canlılığında; 24. saatte 50-100 μM aralığında, 48. saatte ise yalnızca 25 μM ve 50 μM madde varlığında KCC-07 ve Bileşik 2 arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar tespit edilmiştir. 50 μM , 75 μM ve 100 μM Bileşik 2 muamelesi (24 saat), KCC-07'nin aynı dozlarına oranla HUH-7 hücre büyümesi üzerinde sırasıyla 16,6, 14,3 ve 6,9 kat daha fazla inhibisyonla sonuçlanmıştır (Şekil 4.17A). İki günlük inkübasyonun sonunda, yüksek konsantrasyonda (75 ve 100 μM) KCC-07 ve Bileşik 2 arasındaki fark kapanırken, 25 μM ve 50 μM için bu istatistiksel olarak anlamlı fark 3,1 ve 15,2 kat olarak devam etmiştir (Şekil 4.17B). Böylece, Bileşik 2'nin HUH-7 üzerinde de KCC-07'ye kıyasla daha sitotoksik olduğu ortaya konmuştur.



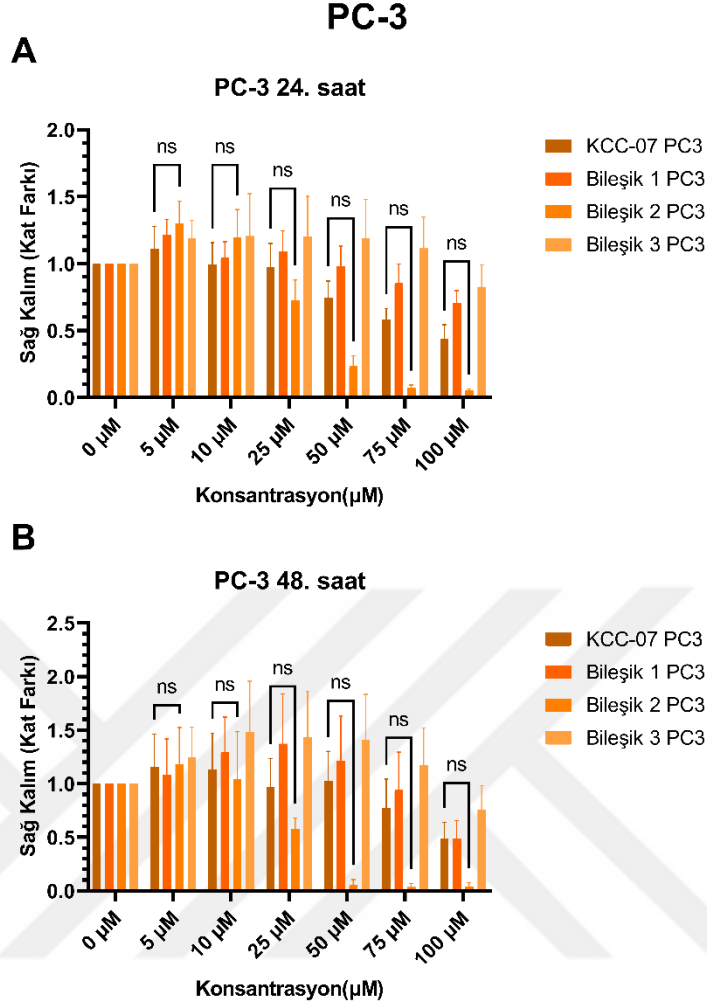
Şekil 4.17: KCC-07, Bileşik 1, Bileşik 2 ve Bileşik 3'ün 24. ve 48. saatteki HUH-7 hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisinin karşılaştırılması (hücre canlılığı, her doz için 1. günde ölçülen WST-1 absorbans değeri, aynı günde kontrol için ölçülen değere bölünerek kat artış/azalış olarak ifade edilmiştir) (2-way ANOVA, ****p<0.0001, ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05, ns=not significant).

Moleküllerin birbirine göre U2-OS hücre hattı üzerindeki etkileri incelendiğinde KCC-07 ve Bileşik 2 arasında 25-100 μ M konsantrasyon aralığında başlayan (1. Gün) istatistiksel olarak anlamlı farkın (Şekil 4.18A), 2. günde daha da derinleştiği (Şekil 4.18B) göze çarpmaktadır. İlk gün (24. saat) Bileşik 2 varlığında (25, 50, 75 ve 100 μ M) ölçülen değerler KCC-07 için tespit edilen değerlere oranlandığında; aday molekül Bileşik 2'nin hücre ölümü/çoğalması üzerinde sırasıyla 1,8 kat, 47 kat, 16,9 kat ve 2,9 kat daha etkili olduğu görülebilir (Şekil 4.18A). İkinci güne gelindiğinde aynı konsantrasyon aralığı için hesaplanan oranın sırasıyla 39, 139,5, 42,5 ve 24,1 kata çıktığı tespit edilmiştir. Özellikle 50 μ M KCC-07 ve Bileşik 2 arasındaki, U2-OS hücreleri üzerinde oluşturduğu 139,5 katlık sitotoksosite farkı dikkate değerdir (Şekil 4.18B). Diğer hücre hatlarında olduğu gibi Bileşik 1 ve Bileşik 3'ün KCC-07'ye karşı U2-OS hücre ölümünde ve/veya çoğalmasında anlamlı bir değişim oluşturmadığı gözlemlenmiştir.



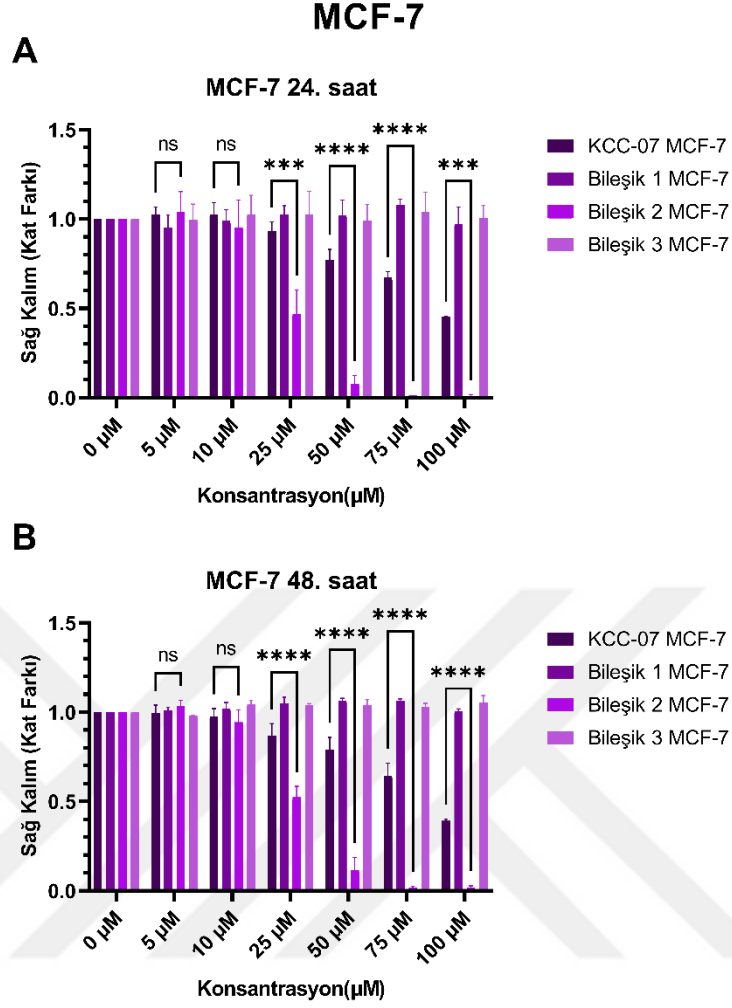
Şekil 4.18: KCC-07, Bileşik 1, Bileşik 2 ve Bileşik 3'ün 24. ve 48. saatteki U2-OS hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisinin karşılaştırılması (hücre canlılığı, her doz için 1. günde ölçülen WST-1 absorbans değeri, aynı günde kontrol için ölçülen değere bölünerek kat artış/azalış olarak ifade edilmiştir) (2-way ANOVA, ****p<0.0001, ***p<0.001, *p<0.05, ns=not significant).

PC-3 hücre hattında 1. günde Bileşik 2'nin KCC-07'ye oranla daha öldürücü olduğu tespit edildi. Her ne kadar biyolojik olarak 50 µM'da 3,2 kat, 75 µM'da 8,1 kat ve 100 µM'da 8,4 katlık bir oran farkı hesaplansa da bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı çıkmamıştır (Şekil 4.19A). Benzer şekilde, Bileşik 2 sitotoksitesinin KCC-07'ye kıyasla 48. saatte de sırasıyla (Bileşik 2 lehine) 18 (50 µM için), 22 (75 µM için) ve 11,7 (100 µM için) kat daha fazla olduğu; fakat bu sonucun da istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır (Şekil 4.19B).



Şekil 4.19: KCC-07, Bileşik 1, Bileşik 2 ve Bileşik 3’ün 24. ve 48. saatteki PC-3 hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisinin karşılaştırılması (hücre canlılığı, her doz için 1. günde ölçülen WST-1 absorbans değeri, aynı günde kontrol için ölçülen değere bölünerek kat artış/azalış olarak ifade edilmiştir) (2-way ANOVA, ns=not significant).

Son olarak, MCF-7 hücre hattında da Bileşik 2 ve KCC-07 arasındaki sitotoksosite eğilimi benzer seyretmiştir (Şekil 4.20). Birinci gün 25 μ M, 50 μ M, 75 μ M ve 100 μ M konsantrasyonda hesaplanan 2, 9,8, 51,3 ve 63,2 katlık Bileşik 2 lehine fark (Şekil 4.20A), 2. günde hafif bir kapanma eğilimi göstererek sırasıyla 1,6, 6,8, 41 ve 22,1 kat olarak devam etmiştir (Şekil 4.20B). Bileşik 2’nin KCC-07’ye göre saptanan daha yüksek öldürücü etkisi, yapılan 2-way ANOVA analizi sonucu istatistiki olarak da anlamlı bulunmuştur.

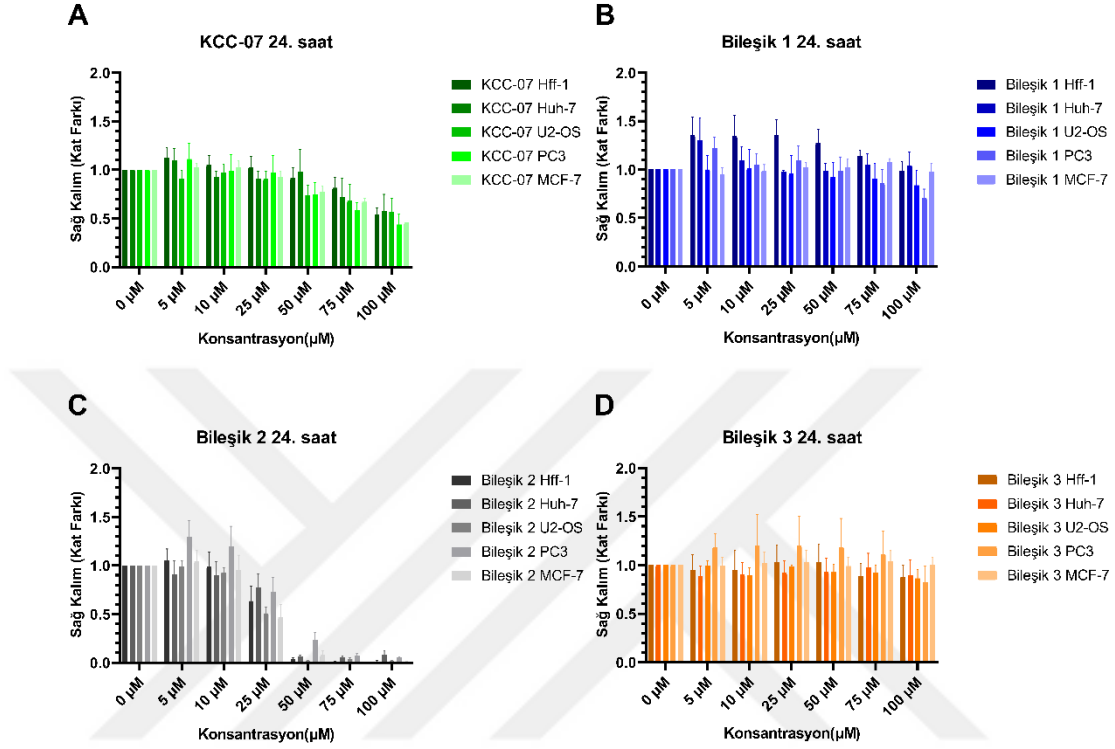


Şekil 4.20: KCC-07, Bileşik 1, Bileşik 2 ve Bileşik 3'ün 24. ve 48. saatteki MCF-7 hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisinin karşılaştırılması (hücre canlılığı, her doz için 1. günde ölçülen WST-1 absorbans değeri, aynı günde kontrol için ölçülen değere bölünerek kat artış/azalış olarak ifade edilmiştir) (2-way ANOVA, ****p<0.0001, ***p<0.001).

4.1.7. Hücre Hatlarının KCC-07 ve Aday Moleküllere Hassasiyetinin Karşılaştırmalı Analizi

Bu bölüme kadar yapılan analizler, kimyasal moleküllerin yaptığı sitotoksik etkilerin her bir hücre hattı özelinde karşılaştırılmasına olanak sağlamıştır. Fakat hücre hatlarının kimyasal moleküllere olan sitotoksik hassasiyeti/direncinin daha net karşılaştırılabilmesi amacıyla elde edilen veriler farklı bir şekilde grafiğe dökülmüştür. KCC-07, Bileşik 1, Bileşik 2 ve Bileşik 3'ün hücre hatları (HFF-1, HUH-7, U2-OS, PC-3 ve MCF-7) üzerinde oluşturduğu direnç/hassasiyet 24. (Şekil 4.21) ve 48. (Şekil 4.22) saatler için karşılaştırılmıştır. Bileşik 1 ve Bileşik 3 karşı tüm hücre hatlarında,

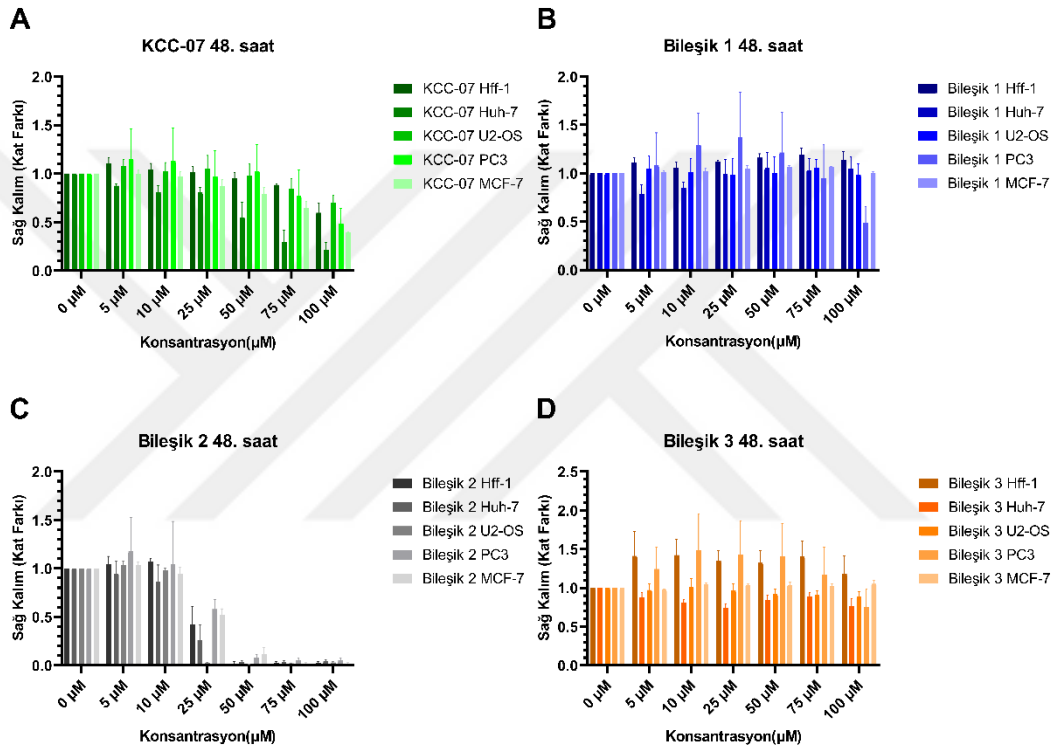
24. saat (Şekil 4.21B, Şekil 4.21D) ve 48. saatte (Şekil 4.22B, Şekil 4.22D) benzer bir direnç olduğu görülmektedir. Başka bir ifadeyle, Bileşik 1 ve Bileşik 3'ün hiçbir hücre hattı üzerinde anlamlı ve net bir sitotoksik etki göstermediği sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.21: KCC-07 (A), Bileşik 1 (B), Bileşik 2 (C) ve Bileşik 3 (D)'ün 24. saatte hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisinin karşılaştırılması (hücre canlılığı, her doz için 1. günde ölçülen WST-1 absorbans değeri, aynı günde kontrol için ölçülen değere bölünerek kat artış/azalış olarak ifade edilmiştir).

Ancak hücre hatlarının 24. saatte, KCC-07 ve Bileşik 2'ye karşı hassasiyetlerinde özellikle orta-yüksek konsantrasyonlarda küçük farklılıklar tespit edilmiştir. Örneğin; 50 µM KCC-07 muamelesinden en çok etkilenen hücre hatlarının U2-OS, PC-3 ve MCF-7 olduğu, diğer taraftan HFF-1 ve HUH-7 hücrelerinin en dirençli hat olduğu saptanmıştır (Şekil 4.21A). Bileşik 2'nin 5-50 µM aralığındaki konsantrasyonları incelendiğinde, PC-3 hücre hattının Bileşik 2'ye en dirençli olduğu anlaşılmaktadır (Şekil 4.21C). 10 ve 25 µM'da ise U2-OS ve MCF-7'nin Bileşik 2'ye en hassas hücreler olduğu görülmektedir. Nispeten daha yüksek konsantrasyonlarda (>50 µM) yüksek sitotoksiteden dolayı hücre hatları arasındaki hassasiyet farkı belirsizleşmektedir (Şekil 4.21C).

48. saate gelindiğinde KCC-07 ve Bileşik 2'nin hücreler üzerindeki etkisi bir önceki güne göre daha belirgin hale gelmiştir. En düşük dozdan itibaren (5-100 μ M) KCC-07 muamelesi sonrasında, HUH-7 hücre hattında gözle görülür bir ölüm (%50 ila 80 arasında) olduğu ve bu maddeye en hassas hücre hattının HUH-7 olduğu saptandı (Şekil 4.22A). Özellikle bu hassasiyet farkının, 50-100 μ M aralığında çok daha belirgin olduğu fark edilmiştir. Buna karşın, HFF-1 ve U2-OS'in her madde konsantrasyonunda KCC-07'ye en dirençli hücreler olduğu görüldü (Şekil 4.22A).



Şekil 4.22: KCC-07 (A), Bileşik 1 (B), Bileşik 2 (C) ve Bileşik 3 (D)'ün 48. saatte hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisinin karşılaştırılması (hücre canlılığı, her doz için 1. günde ölçülen WST-1 absorbans değeri, aynı günde kontrol için ölçülen değere bölünerek kat artış/azalış olarak ifade edilmiştir).

KCC-07 ile benzer şekilde, 48. saatte Bileşik 2'ye de en duyarlı (5-25 μ M aralığında) hücre hattı HUH-7 olmuştur (Şekil 4.22C). İstisna olarak, 25 μ M'da Bileşik 2 muamelesinden en fazla U2-OS'in etkilendiği görülmektedir. Bir önceki günde elde edilen sonuç değişmeyerek Bileşik 2 uygulamasına en dayanıklı hücre hattının ise PC-3 olduğu tespit edildi. Nispeten daha yüksek konsantrasyonlarda (≥ 50 μ M) yüksek sitotoksiteden dolayı hücre hatları arasındaki hassasiyet farkının ortadan kaybolduğu görülmektedir (Şekil 4.22C).

Sonuç olarak, KCC-07 ve Bileşik 2'nin tüm dozlarda test edilen tüm hücre hatlarında (24. ve 48. saatte) değişen oranlarda ölüme neden olduğu, genel olarak HUH-7'nin KCC-07 ve Bileşik 2'ye en hassas, PC-3'ün ise en dayanıklı hücre hattı olduğu sonucuna varılmıştır.

4.2. Kimyasal Moleküllerin Hücrelerde Neden Olduğu Ölüm Mekanizmasının İncelenmesi

KCC-07 ve Bileşik 2'nin hücre hatları üzerinde en toksik moleküller olduğunun tespit edilmesi akabinde, bu moleküllerin hücrelerin büyüme eğrisinde meydana getirdikleri canlılık düşüşünün veya tutulumunun nedenleri incelenmiştir. Bu amaçla, genel değerlendirme itibarıyla her iki maddeye de en hassas (HUH-7) ve en dirençli (PC-3) kanser hücre hatları ile sağlıklı hücre hattı olan HFF-1'deki ölüm mekanizması Annexin V–PI/7AAD boyaması ile analiz edilmiştir. Hücrelerin büyüme eğrileri ve madde konsantrasyonları göz önünde bulundurulduğunda, en iyi etki veya farklılığın genel olarak 48. saatte ve 25 ila 75 μ M konsantrasyonlarda (KCC-07 ve Bileşik 2 için) ortaya çıktığı dikkat çekmektedir. Bu nedenle, bilinen MBD2 inhibitörü (KCC-07) ve en etkili inhibitör adayları olan Bileşik 2'nin karar verilen zaman-konsantrasyon kombinasyonunun HFF-1, HUH-7 ve PC-3 hücre hatlarının büyüme profilinde sebep olduğu etki ve farklılığın nedeni, akım sitometrisi kullanılarak apoptoz ve nekroz oranları üzerinden daha detaylı araştırılmıştır.

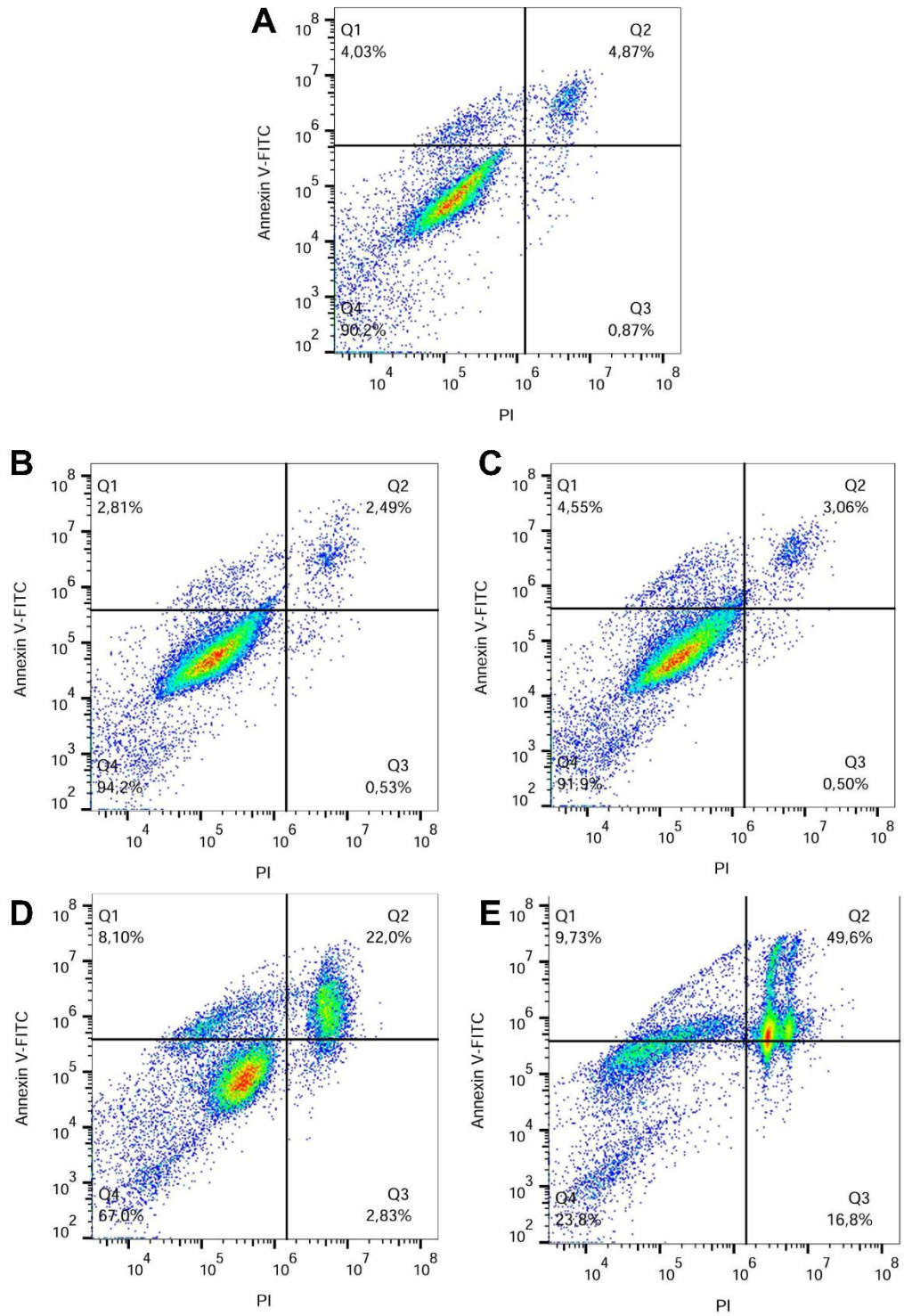
4.2.1. HFF-1 Hücre Hattında Apoptoz Analizi

Yukarıda belirtildiği üzere 48 saatlik 25 ve 75 μ M KCC-07/Bileşik 2 inkübasyonunun neden olduğu canlı-ölü hücre oranındaki değişim ilk olarak HFF-1 hücre hattında incelenmiştir.

Çift boyasız (double negative) kontrole göre yerleştirilen kadrant, grafik (dot plot) üzerinde Q1 pro-apoptotik (Annexin V (+), PI (-)), Q2 apoptotik (Annexin V (+), PI (+)), Q3 nekrotik (Annexin V (-), PI (+)) ve Q4 canlı (Annexin V (-), PI (-)) hücre popülasyonlarını göstermektedir (Şekil 4.23). Kontrol grubu incelendiğinde (Şekil 4.23A) toplam hücre popülasyonunun %90,2'si canlıyken, yaklaşık %4,9'u apoptotik olmak üzere geri kalan hücrelerin (~%9,9) ölü (apoptotik/nekrotik) veya ölüm öncesi fazda (pro-apoptotik) olduğu saptanmıştır. KCC-07'nin 25 ve 75 μ M konsantrasyonları incelendiğinde hücre popülasyonlarının kontrole benzer bir dağılım

gösterdiği ve canlı hücre oranının yüksek olduğu (>%90) gözlemlenmiştir (Şekil 4.23B, Şekil 4.23C).

Bileşik 2 uygulaması sonucu canlı-ölü hücre oranının dramatik bir şekilde değiştiği tespit edildi. 25 µM konsantrasyonda apoptotik hücre oranının kontrole göre yaklaşık 4,5 katlık artışla %22'ye; nekrotik hücre popülasyonunun ise 3,2 katlık artışla %2,83'e yükseldiği görüldü (Şekil 4.23D). Pro-apoptotik hücre oranı da kontrole göre yaklaşık 2 kat artmıştır. Bileşik 2 konsantrasyonu 75 µM'a çıkarıldığında apoptoz oranının yaklaşık %50'ye, nekroz oranının ise %17 seviyesine yükseldiği tespit edildi (Şekil 4.23E). Esasında 75 µM konsantrasyonda apoptotik ve pro-apoptotik hücre oranının daha yüksek olduğu düşünülmektedir. Bileşik 2 muamelesi sonrasında hücre morfolojisinde ve granületisinde bariz değişimler göze çarpmaktadır. Bu değişime bağlı olarak hücrelerin Annexin V/PI boyanma şiddeti farklı olabileceğinden dolayı yerleştirilen kadran popülasyonu yarıdan kesmektedir. Standart bir referans oluşturması açısından kadran çift boyasız kontrole göre yerleştirilmiş ve sonrasında figürlerde sabit tutulmuştur. Fakat buna rağmen yüksek konsantrasyondaki Bileşik 2'nin Q1 ve Q2 kapılarındaki artış oldukça açıktır. Kısacası, bu sonuçlar bize Bileşik 2'nin özellikle apoptoz üzerinden hücre ölümünü teşvik ettiğini düşündürmektedir.



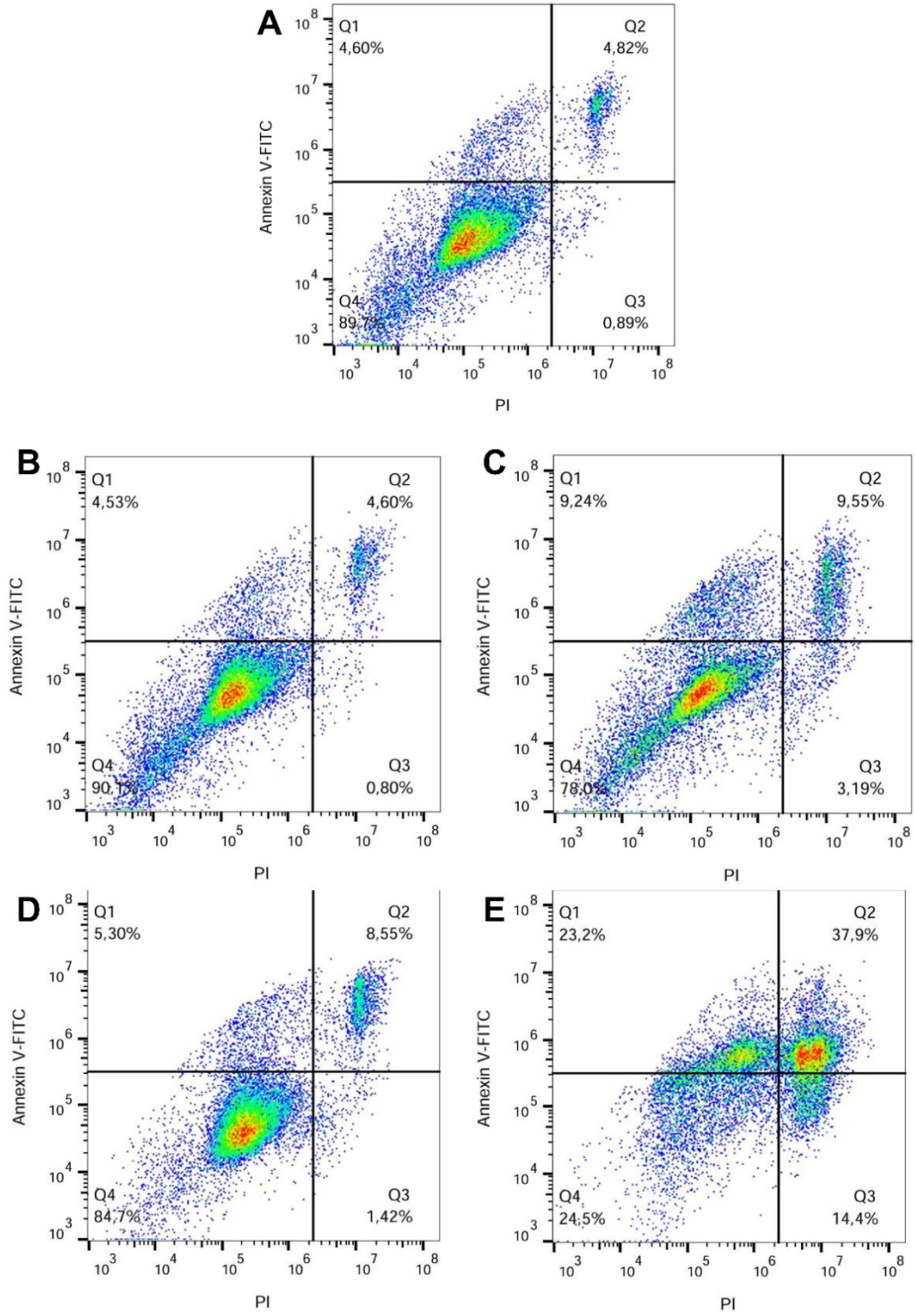
Şekil 4.23: HFF-1 hücre hattında Kontrol (0 μ M) (A), 25 μ M KCC-07 (B), 75 μ M KCC-07 (C), 25 μ M Bileşik 2 (D) ve 75 μ M Bileşik 2 (E) muamelesinin canlı-ölü (pro-apoptotik/apoptotik/nekrotik) hücre popülasyon oranları üzerindeki etkisi.

4.2.2. PC-3 Hücre Hattında Apoptoz Analizi

İkinci olarak, önceki analizlerde KCC-07 ve Bileşik 2'ye en dirençli olduğu gösterilen PC-3 hücre hattındaki ölüm mekanizması akım sitometrisi ile araştırılmıştır (Şekil 4.24).

Kontrol grubu incelendiğinde; toplam hücre popülasyonunun %89,7 canlıyken, %10,3'si pro-apoptotik, apoptotik veya nekrotik olduğu saptanmıştır (Şekil 4.24A). 25 μ M konsantrasyonda KCC-07 muamelesi de kontrole oldukça benzer bir sonuç ortaya koymuştur (Şekil 4.24B). Fakat KCC-07'nin daha yüksek dozunda (75 μ M) pro-apoptotik ve apoptotik hücre oranlarında kontrole göre yaklaşık ikişer katlık artış meydana geldiği ve sırasıyla %9,24 ve %9,55 olduğu görüldü. Ayrıca nekroz oranının da kontrole göre %3,2'ye yükseldiği fark edildi (Şekil 4.24C).

Bileşik 2'nin görece düşük konsantrasyonunda (25 μ M) canlı hücre oranında kontrole göre ılımlı bir düşüş ve ölü hücre oranlarında ise hafif bir artış dikkat çekmektedir. Pro-apoptotik, apoptotik ve nekrotik PC-3 popülasyon oranları sırasıyla; %5,3, %8,55 ve %1,42 olarak tespit edildi (Şekil 4.24D). Bileşik 2'nin 75 μ M konsantrasyonunda apoptotik hücrelerin kontrole göre belirgin bir oranda arttığı (~7,9 kat) ve %38 civarına ulaştığı görülmektedir (Şekil 4.24E). İlginç olarak, bu konsantrasyonda Bileşik 2 ile muamele edilen PC-3 hücrelerinde nekrotik hücre oranının kontrole göre çok daha belirgin bir artışla (~16,2 kat) %14,4 olduğu gözlemlenmiştir. Dolayısıyla yüksek dozda Bileşik 2'nin PC-3 hücrelerinde hem apoptoz hem de nekroz ile ölüme sebep olduğu anlaşılmaktadır (Şekil 4.24E).



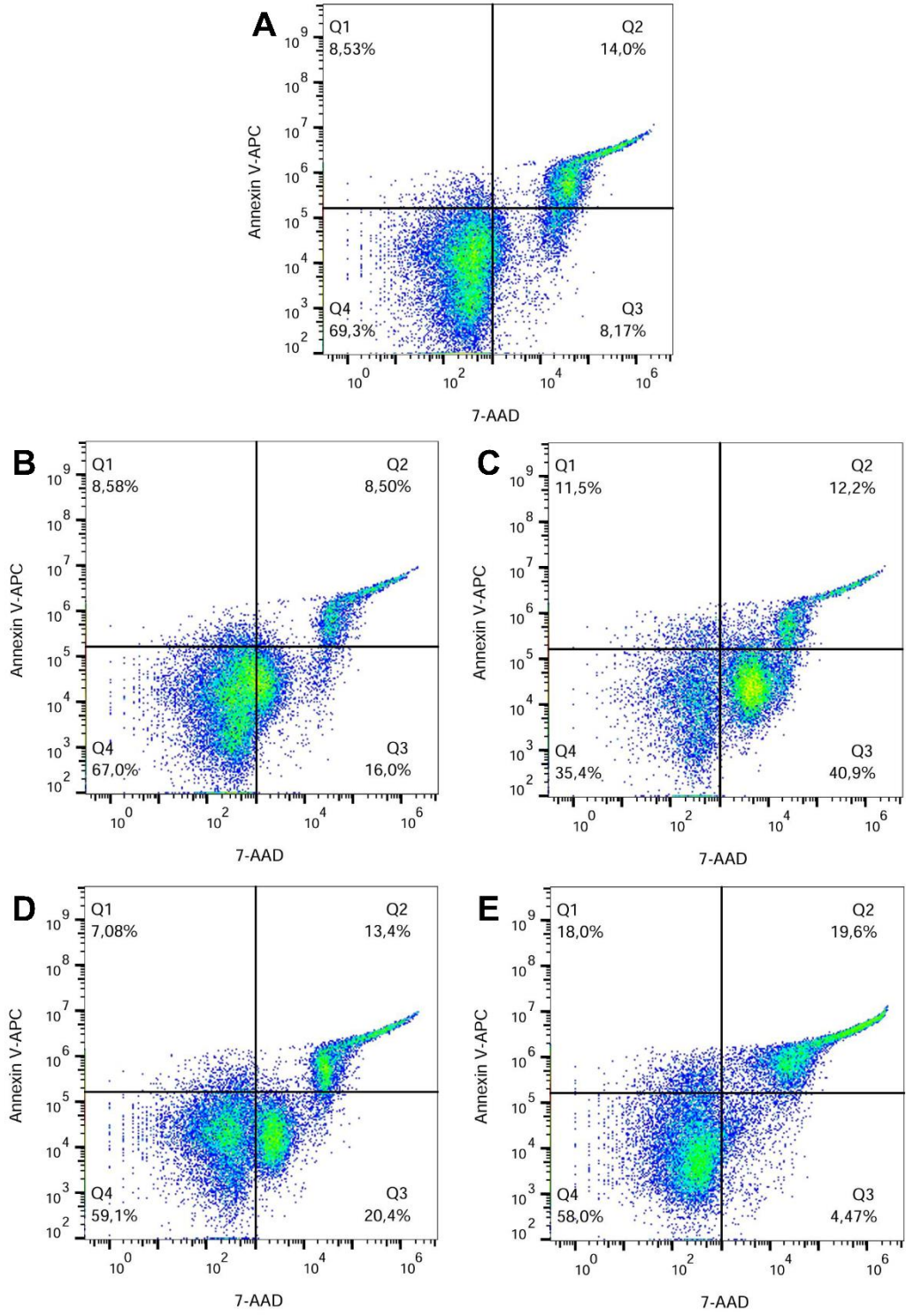
Şekil 4.24: PC-3 hücre hattında Kontrol (0 μ M) (A), 25 μ M KCC-07 (B), 75 μ M KCC-07 (C), 25 μ M Bileşik 2 (D) ve 75 μ M Bileşik 2 (E) muamelesinin canlı-ölü (pro-apoptotik/apoptotik/nekrotik) hücre popülasyon oranları üzerindeki etkisi.

4.2.3. HUH-7 Hücre Hattında Apoptoz Analizi

Son olarak KCC-07 ve Bileşik 2'ye en hassas olduğu tespit edilen HUH-7 hücre hattında Annexin V-APC/7-AAD boyaması ile apoptoz tayini yapılmıştır (Şekil 4.25).

25 μ M KCC-07 muamelesi HUH-7 hücrelerinde en belirgin artışı nekrotik hücre oranında (%16) sağlamıştır. Kontrole göre nekrotik HUH-7 hücre popülasyonunda meydana gelen artış, yaklaşık 2 kat olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.25C). Artan KCC-07 konsantrasyonuna (75 μ M) cevaben nekrotik hücre oranının; kontrole göre 5 kat, 25 μ M KCC-07 muamelesine göre 2,5 kat artışla %40,9'a ulaştığı dikkat çekmektedir (Şekil 4.25C). Bu konsantrasyonda apoptotik hücre oranında kontrole ve 25 μ M'a göre anlamlı bir değişim saptanmamıştır.

25 μ M Bileşik 2 muamelesi, kontrole göre yalnızca nekrotik hücre oranında anlamlı bir değişime yol açmıştır. Canlı hücre popülasyonunun 25 μ M Bileşik 2 uygulaması sonrası nekrotik profile doğru kaydığı; kontrole göre 2,5 katlık artışla %20,4'e yükseldiği görüldü (Şekil 4.25D). 75 μ M Bileşik 2 muamelesinin HUH-7 hücre hattında, KCC-07 ve 25 μ M Bileşik 2'ye kıyasla oldukça farklı bir ölüm profili sergilediği tespit edildi. Pro-apoptotik (%18) ve apoptotik (%19,6) hücre oranları, kontrole göre sırasıyla 2 ve 1,4 kat artış göstermiştir (Şekil 4.25E). Sonuçlar birlikte ele alındığında, KCC-07 ve görece düşük konsantrasyonda (25 μ M) Bileşik 2'nin benzer şekilde nekroza yol açtığını; buna karşın daha yüksek dozda (75 μ M) Bileşik 2 muamelesinin HUH-7 hücrelerinin ölüm nedenini nekrotik mekanizmadan apoptotik yolağa kaydırıldığını ortaya koymaktadır.



Şekil 4.25: HUH-7 hücre hattında Kontrol (0 μ M) (A), 25 μ M KCC-07 (B), 75 μ M KCC-07 (C), 25 μ M Bileşik 2 (D) ve 75 μ M Bileşik 2 (E) muamelesinin canlı-ölü (pro-apoptotik/apoptotik/nekrotik) hücre popülasyon oranları üzerindeki etkisi.

5. TARTIŞMA

Epigenetik, hücre karakterinin belirlenmesini ve genetik bilginin hücresel fonksiyonlara ifade edilmesini düzenleyen en kritik süreçleri kapsar. Ökaryotlarda DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve küçük kodlama yapmayan RNA'lar aracılığıyla gerçekleşen epigenetik modifikasyonlar, kromatin yapısını ve DNA'nın ulaşılabilirliğini değiştirerek genlerin üzerinde sıkı bir kontrol mekanizması sağlar ve ökaryotik hücreler üzerindeki pek çok işlevi ortaya çıkarmıştır [81, 82]. Günümüzde, kanser başta olmak üzere tüm hastalıklar ile normal hücresel mekanizmaların anlaşılmasında klasik genetik ve biyokimya temelli yaklaşımlar (mutasyon analizi, kopya sayısı ve ekspresyon analizi, biyokimyasal ölçümler vb.) artık yetersiz kalmaktadır. Özellikle kanserlerde gen dizisinde meydana gelen değişimlerin araştırılması, hastalık prognozunun ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde tek başına bir anlam ifade etmemektedir [83, 84]. Bu noktada, kanserlerdeki epigenetik profilin veya epigenomun araştırılması ve ilgili hücrelerde değişikliğe uğramış/anormal fonksiyon gösteren epigenetik mekanizmaları hedefleyen tedavi yaklaşımları odak noktası haline gelmiştir [29, 85].

Literatürde MBD2, DNA metilasyonu ve histon deasetilasyonu gibi iki önemli epigenetik mekanizma arasındaki koordinasyonun merkezi bileşenlerinden biri olarak karşımıza çıkmaktadır. MBD2, spesifik olarak metillenmiş CpG bölgelerine bağlanarak NuRD (Nucleosome Remodeling and Deacetylase) kompleksini ilgili promotör üzerinde toplamaktadır. MBD2'nin bu fonksiyonu metillenmiş bölgelerdeki histon kuyruklarının deasetilasyonuna ve böylece histon-DNA etkileşiminin artmasına aracılık ederek gen ifadesinin baskılanmasını sağlar. MBD2'nin farklı kanserlerde özellikle p53, p21, p14^{ARF}, DAPK1, KLK10, BAI1 gibi tümör baskılayıcı genlerin susturulmasında rol oynadığı ve MBD2'nin transgenik fare modellerinde knockout veya hücre hatlarında RNAi-aracılı susturulmasının (knockdown) bu genlerin ifadesinde artış sağlayarak tümör büyümesi yavaşlattığı rapor edilmiştir [29, 86, 72, 87, 79]. MBD2'nin farklı kanser türlerinde yüksek seviyedeki ekspresyonu ve önemli sinyal yolları (proliferasyon, migrasyon, epitelial-mezenkimal geçiş vb.) üzerindeki etkileri çok sayıda çalışmayla sabittir. Mahmood ve arkadaşlarının 2024 yılında meme kanseri üzerine olan çalışmasında, meme kanseri ve yaygın diğer kanser türleri (akciğer, kolon, prostat, karaciğer, over, endometrium, glioblastom vb.) ile

meme kanseri hücre hatlarında MBD2 ekspresyon seviyesinin sağlıklı kontrollere göre anlamlı olarak yüksek olduğunu göstermişlerdir [88]. Bunun yanı sıra, MBD2 ifadesinin metastatik kolorektal [89], metastatik akciğer adenokarsinom [90] (LUAD) ve renal hücre karsinom [91] hastalarında da artmış olduğu bildirilmiştir. Solid kanserlere ek olarak kronik miyeloid lösemi [92], akut miyeloid lösemi [93] ve T-hücreli akut lenfoblastik lösemi hastaları ve/veya fare modellerinde de artmış MBD2 seviyesi dikkat çekmektedir.

MBD2'nin kanser tedavisinde önemli bir epigenetik düzenleyici olduğunu işaret eden çalışmaların sayısı her geçen gün artmaktadır. Bu çalışmalardan dikkat çeken sonuçlardan bazıları aşağıda listelenmiştir:

- MBD2'nin K562 hücre hattında homozigot delesyonu (MBD2^{-/-} knockout), kronik miyeloid lösemi (CML) hücrelerinin proliferasyonunu in vitro'da inhibe etmiş hem de in vivo fare modellerinde tümör formasyonunu yavaşlatmıştır. MBD2^{-/-} genotipi, CML blast hücrelerinde JAK2/STAT3 yolağının down regülasyonunu sağlamıştır.
- RKO fare kolon kanseri hücre hattında, MBD2'nin hipermetile p14^{ARF} tümör baskılayıcı genin transkripsiyonel susturulmasında etkili olduğu ve MBD2'nin RNAi aracılığıyla susturulmasının p14^{ARF} geninin ifadesinde anlamlı artış sağladığı bildirilmiştir [87].
- Renal hücre karsinomunda (RCC) da MBD2'nin benzer bir etkisi gösterilmiştir. Yukarıda da belirtildiği üzere RCC hastalarında MBD2 ifadesinin artmış olduğu rapor edilmiştir [91]. Aynı çalışmada, RCC hücre hatlarında MBD2'nin aşırı ifadesi p53 ve p21'in ifadesinde azalma, siklin D1 ifadesinde ise artışla sonuçlanmıştır. siRNA aracılı MBD2 susturulması ise RCC hücre hattında EMT belirteçlerinin ifadesi ile hücrelerin migrasyon ve invazif karakterinin in vitro'da azaldığı tespit edilmiştir.
- Zhang ve arkadaşları, MBD2 baskılanmasının metastatik akciğer adenokarsinomunda (LUAD) benzer etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur [90]. MBD2'nin LUAD hücre hatlarında (A549 and H1975) baskılanması (knockdown), TGF-β1 yolağının inhibisyonuna bağlı olarak EMT, hücre göçü ve invazyonunda düşüş ile sonuçlanmıştır. Bu sonuç in vivo'da da doğrulanmıştır. LUAD fare modellerinin MBD2 siRNA yüklü lipozomlarla

tedavisi sonrası, primer tümör hacminde ve metastatik lezyonlarda kontrole göre belirgin bir gerileme tespit edilmiştir.

- Dan Zhu ve arkadaşları insan glioblastom primer ve hücre hattı kültürlerinde, MBD2'nin doğrudan anti-anjiyogenik/tümör baskılayıcı gen olan BAI1 geninin (ADGRB1) promotörüne bağlanarak bu genin epigenetik baskılanmasında rol oynadığını göstermişlerdir [94]. MBD2'nin shRNA ile inhibisyonu sonucunda BAI1 ifadesinin restorasyonu ve buna bağlı olarak hücre migrasyonunda ve anjiyogenik aktivitede in vitro ve in vivo'da düşüş olduğu bildirilmiştir.

Literatürdeki tüm çalışmalarda MBD2'nin baskılanması RNAi aracılığıyla (knockdown) veya genom mühendisliği teknikleri (knockout) ile yapılmıştır. MBD2 inhibisyonunun kanserlerdeki önemine binaen sentezlenen ilk ve tek ticari olarak ulaşılabilir MBD2 inhibitörü KCC-07'dir. Küçük kimyasal molekül (KCC-07) aracılı MBD2 inhibisyonunun etkilerinin araştırıldığı tek çalışma yine Dan Zhu ve arkadaşları tarafından literatüre kazandırılmıştır. Benzer şekilde, nadir beyin tümörlerinden olan medulloblastom (MB) hücrelerinde de MBD2'nin, Mdm2-aracılı p53 degradasyonunu engellediği bilinen BAI1'in transkripsiyonel susturulmasına aracılık ettiği doğrulanmıştır. Aynı ekip tarafından sentezlenen ve patentlenen KCC-07 muamelesinin, MBD2 inhibisyonuna bağlı olarak MB hücrelerinde BAI1 ekspresyonunu artırdığı ve antiproliferatif BAI1/p53/p21 sinyal yolunu aktive ettiği ortaya konmuştur [79]. Fare modelinde de KCC-07'nin kan-beyin bariyerinden geçebildiği, artan p53 aktivasyonuna bağlı olarak MB tümör boyutunun önemli ölçüde küçüldüğü ve MB-farelerde ortalama yaşam süresinin uzadığı tespit edilmiştir.

MBD2'nin farklı kanserlerde bir nevi onkogenik etkisine ve inhibitör eksikliğine binaen, daha önce hesaplamalı (in silico) yöntemlerle keşfedilmiş ve sentezlettirilmiştir [80]. Fakat orijinal olan bu moleküllerin (Bileşik1, Bileşik 2 ve Bileşik 3) in vitro etkilerine dair hiçbir bulgu mevcut değildir. Yürütülen proje kapsamında (TÜSEB 2022-B-02-22387) MBD2 inhibitör adaylarının KCC-07 ile karşılaştırmalı olarak 1) farklı hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkilerinin, 2) MBD2-metillenmiş DNA bağlanması üzerindeki muhtemel inhibe edici mekanizmasının araştırılması hedeflenmiştir. Dolayısıyla yürütülen tez çalışması MBD2 inhibisyonundan bağımsız olarak bu aday moleküllerin hücre canlılığı ve proliferasyonu üzerindeki etkilerine odaklanmıştır. Aynı zamanda, yalnızca

medulloblastomdaki sitotoksik etkileri çalışılan KCC-07'nin farklı kanser hücre hatlarındaki etkileri ilk defa bu tez kapsamında incelenmiştir.

Hücrelerin 4 günlük çoğalma eğrileri incelendiğinde (Şekil 4.1, Şekil 4.4, Şekil 4.7, Şekil 4.10 ve Şekil 4.13) Bileşik 1 ve Bileşik 3'ün HFF-1 ile HUH-7, U2-OS, PC-3 ve MCF-7 hücre hatları üzerinde kontrole göre kayda değer bir sitotoksik etki bırakmadığı gözlemlenmiştir. Bunun iki muhtemel sebebi olduğu düşünülmektedir. Birincisi, daha önce yapılan kimyasal analizlerde özellikle Bileşik 1 ve Bileşik 3'ün kompleks yapısına bağlı düşük çözünürlüğü olabilir (sonuç gösterilmemiştir). Küçük kimyasal moleküllerin düşük çözünürlüklerinin, onların farmakolojik etkilerini ve/veya hücre membranından geçişlerini kısıtlayabileceği bilinmektedir [95, 96]. İkinci olarak, bu moleküller her ne kadar *in silico*'da yüksek bağlanma skorları ortaya koymuş olsa da gerçekte hücre içindeki MBD2_{MBD}'ye etkin şekilde bağlanamadığı ve inhibe edemediği akla gelmektedir. Fakat bu varsayım ancak proje kapsamında devam eden detaylı analizlerle aydınlatılabilecektir. Diğer taraftan, Bileşik 1 ve 3'ün 0-100 μ M aralığında tespit edilen düşük sitotoksik etkisi bu moleküllerin; epigenetik ilaç (Epi-Drug) adayı olarak kullanılma ihtimalini düşüren bir sonuç olsa da temel araştırmalarda MBD2 inhibitörü olarak hizmet edebilme potansiyeli hala saklıdır. Devam eden analizlerde bu moleküllerin MBD2 fonksiyonunu inhibe ettiği ispatlandığı durumda, Bileşik 1 ve 3'ün hücreler üzerindeki düşük öldürücü etkisi, MBD2 ve ilişkili epigenetik mekanizmaların araştırılacağı çalışmalar için bir avantaja dönüşecektir.

Bileşik 2 ve KCC-07'nin ise test edilen her hücre hattında ilk 24 ve 48 saat içerisinde farklı dozlarda kayda değer öldürücü etkileri olduğu görülmüştür. Genel olarak, KCC-07'nin 50 μ M ve üzeri, Bileşik 2'nin ise 25 μ M ve üzeri konsantrasyonlardaki sitotoksik etkilerinin kontrole göre anlamlı olduğu gözlemlenmektedir (Şekil 4.21, Şekil 4.22). KCC-07 ve özellikle Bileşik 2'nin kanser hücre hatlarındaki inkübasyon süresi arttıkça LC₅₀ değerinin kademeli şekilde azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.3, Şekil 4.6, Şekil 4.9, Şekil 4.12 ve Şekil 4.15). Bu bize, KCC-07 ve Bileşik 2'nin 72 saat süresince hücre kültür ortamında bozunmadan stabil olarak kaldığını ve %50 öldürücülük için gereken madde konsantrasyonunun süre uzadıkça ters orantılı olarak azaldığını göstermektedir. İstisnasız tüm hücre hatlarında, her zaman noktasında (2, 24, 48, 72 saat) Bileşik 2 için hesaplanan LC₅₀ değerinin, KCC-07 için hesaplanana oranla ortalama 2 ila 7 kat daha düşük olduğu; yani aynı sitotoksik etki için Bileşik

2'nin KCC-07'ye görece çok daha düşük dozlarının yeterli olduğu sonucuna varılmıştır. Yapılan in silico çalışmada gösterildiği üzere Bileşik 2 için hesaplanan bağlanma enerjisinin (-9,26 kcal/mol), KCC-07 için hesaplanandan (-7,89 kcal/mol) daha yüksek ve buna bağlı olarak tahmin edilen inhibisyon sabitinin (K_i : reaksiyon hızını yarıya düşürmek için gereken madde konsantrasyonu) daha düşük olduğu bildirilmiştir [80]. Bileşik 2'nin bir MBD2 inhibitörü olduğunu varsayarsak, tezimizde elde ettiğimiz sonuçların bu hesaplamalı çalışma ile tutarlı olduğu düşünülmektedir. Fakat tekrar vurgulamak gerekirse, Bileşik 2 ve diğer moleküllerin MBD2 fonksiyonu üzerindeki inhibe edici etkisi henüz spekülatiftir. Devam eden çalışmalarla MBD2 inhibitörü olduğunun doğrulanmasının akabinde Bileşik 2'nin kanser hücre hatları üzerindeki KCC-07'ye göre daha üstün ve etkin olan sitotoksik etkisi daha açıklanabilir ve anlamlı olacaktır. Kaldı ki, ilerleyen aşamalarda Bileşik 2 yeni bir MBD2 inhibitörü olarak tanımlanamasa bile; tezimizden elde ettiğimiz veriler, kanser hücre hatlarında 48 saat itibarıyla ortalama %90 öldürücülük sağlayan yeni bir kemoterapötik ajan adayını (MBD2'den bağımsız) öne sürmektedir. Tezin devamında planlanan detaylı yolak analizleri, Bileşik 2 ve diğer moleküllerin, ilgili hücre hatlarında hangi sinyal yollarını etkilediği (MBD2-bağımlı veya -bağımsız) ve bu moleküllerin farklı muhtemel hedefleri olup olmadığını kapsamlı ve net şekilde ortaya koyacaktır.

Sağlıklı insan deri fibroblast (HFF-1) ile HUH-7 (human hepatocellular carcinoma), U-2 OS (human osteosarcoma), PC-3 (prostatic adenocarcinoma) ve MCF-7 (mammary adenocarcinoma) gibi kanser hücre hatlarının, bilinen MBD2 inhibitörüne (KCC-07) ve aday inhibitör moleküllere karşı farklı hassasiyette olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.21 ve Şekil 4.22). Örneğin 48. saatte KCC-07'nin tüm konsantrasyonlarına en hassas hücre hattının HUH-7 olduğu saptanmıştır (Şekil 4.22A). Aynı günde, 5, 10 ve 50 μ M konsantrasyonlarda KCC-07'ye en dirençli hücrenin PC-3, diğer dozlarda ise U2-OS olduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde, 48. saatte nerdeyse tüm dozlarda Bileşik 2'ye en hassas ve en dirençli hücreler sırasıyla HUH-7 ve PC-3 olmuştur (Şekil 4.22C). PC-3'ye ait büyüme eğrisi incelendiğinde en yüksek konsantrasyonda KCC-07 muamelesinin dahi hücrelerin proliferasyonunu engellenmediği saptanmıştır. Hatta KCC-07 konsantrasyonu arttıkça büyüme profilinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan hafif bir artış görülmektedir (Şekil 4.10A). Dahası, KCC-07 inkübasyon süresi arttıkça LC_{50}

değerinin -yani hücrelerin öldürülmesi için gerekli madde konsantrasyonun- artış göstermesi dikkat çekicidir (Şekil 4.12B). Mahmood ve ark. yaptığı çalışmada sağlıklı dokuya göre karaciğer tümör dokularında artmış MBD2 ifadesi tespit edilirken, sağlıklı ve kanserli prostat dokuları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir [88]. Prostat kanser dokuları ile PC-3'ün de dahil olduğu prostat kanser hücre hatları için benzer bir sonuç Patra ve arkadaşları tarafından da bildirilmiştir [97]. Bu çalışmada, sağlıklı veya benign prostat dokuları ile hücre hattında MBD2 varlığı orta seviyede tespit edilirken, PC-3 ve diğer prostat kanser hücre hatlarında MBD2 ifadesinin düşük veya saptanamayacak düzeyde olduğu bulunmuştur. Ayrıca The Human Protein Atlas veri tabanı incelendiğinde [98] PC-3 ve U2-OS'in MBD2 ifadesinin en düşük olduğu hücre hatları arasında olduğu fark edilmektedir. Literatürdeki bu veriler ışığında, zaten düşük MBD2 ifadesine sahip PC-3 ve U2-OS hücrelerinin KCC-07-aracılı MBD2 inhibisyonundan en az etkilenmiş olabileceği tahmin edilmektedir. MBD2'nin pek çok kanserde artmış ifadesine veya tümör çoğalmasındaki rolüne karşıt olarak, serviks kanser hücre hatlarında MBD2 ve MeCP2'nin miR-221/222 tarafından baskılandığı ve bunun tümör çoğalmasını teşvik ettiği rapor edilmiştir [99]. Benzer şekilde, MBD2 ve MBD3 ifadesinin gastrik kanser hastalarında sağlıklı kontrole kıyasla düşük olduğu ve tümör seviyesi ile MBD2/3 ekspresyon seviyesi arasında ters korelasyon olduğu saptanmıştır [100]. Bu bilgiler ışığında, MBD2'nin bahsi geçen kanserler gibi prostat kanseri hücre hatlarının biyolojik özellikleri (proliferasyon, EMT, migrasyon gibi) üzerinde zıt bir işleve sahip olabileceği varsayımı yapmak yanlış olmayacaktır. Fakat PC-3 hücrelerinde elde edilen sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olmayışı, MBD2'nin prostat kanserindeki kafa karıştırıcı rolünün anlaşılması için bu deneylerin farklı prostat kanseri hatlarında tekrar edilmesi gerekliliğini de akla getirmektedir.

Diğer taraftan, MBD2'nin hepatoselüler karsinomda biyobelirteç olarak kullanılabilecek derecede (ve kontrole göre yüksek) ekspresyon seviyesine sahip olduğunu ve RNAi aracılı MBD2 susturulmasının HCC proliferasyonunu belirgin şekilde durdurduğu rapor edilmiştir [101, 102]. Yaptığımız analizde, HUH-7 hücre hattının KCC-07'nin en düşükten en yükseğe tüm konsantrasyonlarında en hassas kanser hattı olması literatürdeki bu veriler ile uyumlu ve tutarlıdır.

KCC-07'nin en yüksek konsantrasyonunun (100 μ M) etkilediği bir diğer hücre hattı olarak MCF-7 karşımıza çıkmaktadır. Bu konsantrasyonda 72 saat süresince hücre proliferasyonunda bir tutulum olduğu ve hücre sayısının net olarak değişmediği

gözlemlenmiştir. KCC-07'nin görece daha düşük konsantrasyonlarında (25, 50 ve 75 μ M) ise 2-72 saat aralığında başlangıca göre bir çoğalma olsa da büyüme eğrisindeki profil kontrolün altında seyretmiştir (Şekil 4.13A). Mian ve arkadaşlarının yayımladığı üzere, MBD2 ifadesinin shRNA aracılığıyla baskılanması insan meme epitel kanser hücre hatlarının (SK-BR-3, MDA-MB-231, MDA-MB-435) beş günlük büyüme eğrisi üzerinde benzer bir etki ortaya koymuştur [72]. shRNA-aracılı knockdown etkinliğinin %80 üstü olduğu görülen hücre hatlarının (SK-BR-3, MDA-MB-435) büyüme eğrisi 5 gün boyunca yatayda seyrederken, shRNA baskılamasının %70 civarı olduğu tespit edilen MDA-MB-231 hücrelerinde kontrolün altında seyreden bir çoğalma olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla bu çalışmada MBD2 inhibisyon dozuna/oranına bağlı olarak proliferasyonda tam bir tutulum veya hafif bir çoğalma indeksi olduğu sonucuna varılmıştır. MCF-7 hücrelerinin çoğalma eğrisinde KCC-07 konsantrasyonuna bağlı bu etki, ilgili çalışmadaki sonuçlarla örtüştüğü görülmektedir. Bahsi geçen çalışmada, MBD2'nin meme kanser hücre hatlarında doğrudan DAPK1 ve KLK10 gibi tümör baskılayıcı genlerin promotörlerine bağlanarak bu genlerin susturulmasına aracılık ettiği ortaya konmuştur. Cheishvili ve arkadaşları ise meme kanseri hücre hatlarında (MCF-7 ve ZR-75-1), MBD2 susturulmasının ve DNMT inhibitörü (5-azaCdR) tedavisinin sinerjistik etkiler gösterdiği, hipermetilasyonla susturulmuş apoptotik genlerin reaktivasyonu sağladığı; böylece, EMT ve metastaz ile ilişkili genlerin ifadesinde düşüş, anti-apoptotik genlerin ifadesinde artışa yol açtığı sonucuna varmışlardır [103]. Bununla birlikte, Sahu ve arkadaşları MCF-7 ve diğer meme kanser hücre hatlarında MBD2'nin doğrudan tümör baskılayıcı BRCA1 promotörüne bağlanarak ekspresyonunu downregüle ettiğini göstermişlerdir [104]. Literatürdeki bu bilgiler, çalışmamızda uyguladığımız KCC-07'nin, MBD2 inhibisyona bağlı olarak MCF-7 hücrelerinde bu tümör baskılayıcı genlerin ifadesini geri kazanarak hücre çoğalmasını durdurduğu fikrini akla getirmektedir.

Dirençli olduğu düşünülen PC-3 hücre hattı için akım sitometrisi sonuçları incelendiğinde, kontrol grubunda toplam hücre popülasyonun %89,7'sinin canlı olduğu saptanmıştır (Şekil 4.24A). KCC-07'nin 25 μ M konsantrasyonunda hücre popülasyonlarının kontrole benzer bir dağılım gösterdiği ve canlı hücre oranının yüksek olduğu (>%90) görülmüştür (Şekil 4.23B). Fakat KCC-07'nin daha yüksek olan dozunda (75 μ M) pro-apoptotik ve apoptotik hücre popülasyonlarında kontrole oranla 2 katlık bir artış meydana gelmiştir. Aynı zamanda nekrotik hücre

popülasyonunda da kontrole oranla %3,2'ye varan bir yükseliş gözlemlenmiştir (Şekil 4.23C). 25 μ M Bileşik 2'nin canlı hücre oranında kontrole göre minimal bir düşüş ve ölü hücre oranında ise hafif bir yükseliş meydana getirdiği dikkat çekmektedir (Şekil 4.23D). Bileşik 2'nin 75 μ M konsantrasyonunda ise apoptotik hücre popülasyonunun gözle görülür bir şekilde yaklaşık 8 kat arttığı ve %38 civarına yükseldiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.23E). Özellikle dikkat çeken nokta, Bileşik 2'nin yüksek konsantrasyonda nekrotik hücre oranının kontrole göre çok daha belirgin bir artışla 16 kat arttığı ve %14,4 olduğu saptanmıştır. Sonuçta yüksek dozda Bileşik 2'nin PC-3 hücrelerini hem apoptotik hem de nekrotik yollardan ölüme götürdüğü sonucuna varılmıştır. PC-3 hücrelerine ait WST-1 proliferasyon sonuçları incelendiğinde 48. saatte KCC-07 varlığındaki canlı hücre oranının %70-75 arasında, Bileşik 2 varlığında ise canlılığın %5-10 arasında olduğu görülmektedir. Dolayısıyla akım sitometrisi sonuçları, PC-3 hücreleri için elde edilen sitotoksosite sonuçlarını doğrulamış bulunmaktadır.

En hassas olduğu düşünülen HUH-7 hücre hattı için akım sitometrisi sonuçları incelendiğinde, KCC-07 için nekrotik hücre popülasyonunda kontrole oranla 25 μ M'da 2 kat, 75 μ M'da ise 8 kata ulaşan bir artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.25B-C). Böylelikle KCC-07'nin HUH-7 hücrelerini nekrotik yoldan öldürdüğü sonucuna varılmıştır. Literatürde MBD2'nin nekrozu indüklediğine veya nekrotik hücre ölümü yolağı ile ilişkisine dair henüz bir bilgi bulunmamaktadır. Bu açıdan HUH-7 hücre hattında elde ettiğimiz sonuç, MBD2 ve KCC-07'nin apoptoz-nekroz dengesine etkisi hakkında yeni çalışmalara kapı aralayacak bir ipucu sağlamaktadır. Bileşik 2'nin 25 μ M konsantrasyonunda nekrotik hücre popülasyonunda kontrole oranla 2,5 katlık artış, 75 μ M konsantrasyonda ise nekrotik hücrelerin pro-apoptotik/apoptotik popülasyona geçiş göstererek apoptotik (erken/geç) hücre oranında kontrole göre yaklaşık 1,7 katlık artış sağladığı tespit edilmiştir. Bu durum, Bileşik 2'nin düşük konsantrasyonda KCC-07 ile benzer şekilde nekrozu teşvik ettiğini, yüksek konsantrasyonlarda ise HUH-7 hücrelerini apoptotik yola sevk ettiği ile açıklanabilir. Fakat Bileşik 2'ye (75 μ M) ait akım sitometrisi sonuçlarındaki canlı hücre ve ölü hücre oranlarının WST-1 verileri ile tam olarak örtüşmediği fark edilmiştir. Bunun iki deneysel nedeni olabileceğini düşünmekteyiz. Birincisi; Bileşik 2'nin görece yüksek konsantrasyonlarında (75 ve 100 μ M) ışık mikroskobu altında HUH-7 hücrelerin morfolojik özelliklerini kaybettiği ve süspanse hale geldiği gözlemlenmiştir. Akım

sitometrisi için hücrelerin toplanması sırasında süspanse olan ölü hücrelerin kaçırılmış olması muhtemeldir. İkinci nedenin; 48 saat boyunca yüksek konsantrasyonda Bileşik 2'ye maruz kalarak aşırı hassaslaşmış HUH-7 hücrelerinin ikili boyama (Annexin-V/7-AAD) sırasında parçalanması (hücre debris oluşturması) veya bir şekilde boyama profilinin değişmesinden kaynaklanabileceğini varsaymaktayız.

HFF-1 hücrelerinin KCC-07 muamelesi sonrasında 48. saatte canlı hücre oranının kontrole göre değişmediği (~%90) ve ölüm (nekroz/apoptoz) oranının düşük seyrettiği fark edilmiştir (Şekil 4.23B-C). Fakat Bileşik 2'nin 25 µM konsantrasyonunda kontrole (nekrotik: %0,87, geç apoptotik: %4,87) göre; nekrozda (%2,83) 3,2 kat, geç apoptotik popülasyonda (%22) 4,5 kat artış tespit edilmiştir. HFF-1 hücrelerinde 75 µM konsantrasyona çıkıldığında kontrole oranla; nekrotik hücrelerde (%16,8) 19,3 kat, geç apoptotik fraksiyonda (%49,6) ise 10 katlık bir artış olduğu görülmüştür. Böylelikle, HFF-1 hücrelerinin WST-1 büyüme eğrilerinde görülen (25 ve 75 µM Bileşik 2 için) keskin düşüşün nedeninin apoptozdan kaynaklandığı ortaya konmuştur. Ayrıca, KCC-07 ve Bileşik 2'nin HFF-1 hücrelerindeki sitotoksikite (Şekil 4.4) ve LC₅₀ (Şekil 4.5) farkı akım sitometrisi ile bir kez daha doğrulanmıştır.

Bu veriler ışığında, MBD2'nin kanserlerdeki ifadesinin ve fonksiyonlarının hücre tipine, farklı protein repertuarına ve diğer MBD üyeleri (MeCP2, MBD1, MBD3 vb.) ile farklı MBD2 izoformları (MBD2a, MBD2b gibi) varlığına bağlı olarak değişiklik gösterebileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, farklı kanserlerde yapılan in vitro ve in vivo çalışmalar, MBD2'nin tedaviye yönelik epigenetik bir hedef olduğuna işaret etmektedir. Bu çalışmalarda genetik temelli yöntemlerle MBD2 susturulmuştur. Dolayısıyla tek kimyasal MBD2 inhibitörünün kanser hücre hatları üzerindeki etkilerine dair literatürde hiçbir bulgu mevcut değildir. Bu yönüyle yürüttüğümüz tez çalışması KCC-07'nin farklı kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ve ölüm mekanizmalarına dair ilk bilgileri literatüre kazandırmıştır. Bununla birlikte, her ne kadar MBD2 inhibitörü olduğu henüz kanıtlanmasa da Bileşik 2 olarak ifade edilen aday molekülün her hücre hattında KCC-07'ye göre daha sitotoksik olduğu tespit edilmiştir. Özellikle bu molekülün daha düşük LC₅₀ değerine sahip olması, MBD2 inhibisyonuna bağımlı veya bağımsız olarak bu kimyasal molekülün bir kemoterapi ajanı olarak daha düşük dozlarda etkili çalışabileceğini, böylece klinik uygulamalarda yan etkilerin, maliyetlerin ve çevresel yükün azalmasına katkı sağlayabileceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Alberts B., Johnson A., Lewis J., Morgan D., Raff M., Roberts K., Walter P., (2015), “Molecular Biology of the Cell”, 6th Edition, Garland Science.
- [2] Allis C.D., Jenuwein T., Reinberg D., (2007), “Epigenetics”, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [3] Bird A., (2007). Perceptions of epigenetics. *Nature*, 447 (7143), 396–398.
- [4] Heard E., Martienssen R.A., (2014). Transgenerational Epigenetic Inheritance: Myths and Mechanisms. *Cell*, 157 (1), 95–109.
- [5] Zhu H., Ding G., Liu X., Huang H., (2023). Developmental origins of diabetes mellitus: Environmental epigenomics and emerging patterns. *Journal of Diabetes*, 15 (7), 569–582.
- [6] Kouzarides T., (2007). Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*, 128 (4), 693–705.
- [7] Jenuwein T., Allis C.D., (2001). Translating the Histone Code. *Science*, 293 (5532), 1074–1080.
- [8] Henikoff S., Shilatifard A., (2011). Histone modification: Cause or cog? *Trends in Genetics*, 27 (10), 389–396.
- [9] Allis C.D., Jenuwein T., (2016). The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nature Reviews Genetics*, 17 (8), 487–500.
- [10] Zentner G.E., Henikoff S., (2013). Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nature Structural & Molecular Biology*, 20 (3), 259–266.
- [11] Bannister A.J., Kouzarides T., (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*, 21 (3), 381–395.
- [12] Tang L., Nogales E., Ciferri C., (2010). Structure and function of SWI/SNF chromatin remodeling complexes and mechanistic implications for transcription. *Progress in biophysics and molecular biology*, 102 (2–3), 122–128.
- [13] Greer E.L., Shi Y., (2012). Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nature Reviews Genetics*, 13 (5), 343–357.
- [14] Boyer L.A., Plath K., Zeitlinger J., Brambrink T., Medeiros L.A., Lee T.I., Levine S.S., Wernig M., Tajonar A., Ray M.K., Bell G.W., Otte A.P., Vidal M., Gifford D.K., Young R.A., Jaenisch R., (2006). Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature*, 441 (7091), 349–353.

- [15] Barski A., Cuddapah S., Cui K., Roh T.-Y., Schones D.E., Wang Z., Wei G., Chepelev I., Zhao K., (2007). High-Resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome. *Cell*, 129 (4), 823–837.
- [16] Margueron R., Reinberg D., (2011). The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature*, 469 (7330), 343–349.
- [17] Zhao Y., Garcia B.A., (2015). Comprehensive Catalog of Currently Documented Histone Modifications. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7 (9), a025064.
- [18] Slotkin R.K., Martienssen R., (2007). Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nature Reviews Genetics*, 8 (4), 272–285.
- [19] Moore L.D., Le T., Fan G., (2013). DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology*, 38 (1), 23–38.
- [20] Deaton A.M., Bird A., (2011). CpG islands and the regulation of transcription. *Genes & Development*, 25 (10), 1010–1022.
- [21] Okano M., Bell D.W., Haber D.A., Li E., (1999). DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development. *Cell*, 99 (3), 247–257.
- [22] Li E., Bestor T.H., Jaenisch R., (1992). Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*, 69 (6), 915–926.
- [23] Goll M.G., Bestor T.H., (2005). EUKARYOTIC CYTOSINE METHYLTRANSFERASES. *Annual Review of Biochemistry*, 74 (1), 481–514.
- [24] Bachman K.E., Park B.H., Rhee I., Rajagopalan H., Herman J.G., Baylin S.B., Kinzler K.W., Vogelstein B., (2003). Histone modifications and silencing prior to DNA methylation of a tumor suppressor gene. *Cancer Cell*, 3 (1), 89–95.
- [25] Li E., Beard C., Jaenisch R., (1993). Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature*, 366 (6453), 362–5.
- [26] Bird A., (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Development*, 16 (1), 6–21.
- [27] Tobi E.W., Slieker R.C., Stein A.D., Suchiman H.E.D., Slagboom P.E., van Zwet E.W., Heijmans B.T., Lumey L., (2015). Early gestation as the critical time-window for changes in the prenatal environment to affect the adult human blood methylome. *International Journal of Epidemiology*, 44 (4), 1211–1223.
- [28] Jirtle R.L., Skinner M.K., (2007). Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nature Reviews Genetics*, 8 (4), 253–262.

- [29] Baylin S.B., Jones P.A., (2011). A decade of exploring the cancer epigenome — biological and translational implications. *Nature Reviews Cancer*, 11 (10), 726–734.
- [30] Web 1, (2024), <https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/technical-documents/technical-article/genomics/epigenetics/introduction-to-dna-methylation>, (Erişim Tarihi: 14/11/2024).
- [31] Bartel D.P., (2018). Metazoan MicroRNAs. *Cell*, 173 (1), 20–51.
- [32] Lu J., Getz G., Miska E.A., Alvarez-Saavedra E., Lamb J., Peck D., Sweet-Cordero A., Ebert B.L., Mak R.H., Ferrando A.A., Downing J.R., Jacks T., Horvitz H.R., Golub T.R., (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 435 (7043), 834–838.
- [33] Castel S.E., Martienssen R.A., (2013). RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 14 (2), 100–112.
- [34] Janssen H.L.A., Reesink H.W., Lawitz E.J., Zeuzem S., Rodriguez-Torres M., Patel K., van der Meer A.J., Patick A.K., Chen A., Zhou Y., Persson R., King B.D., Kauppinen S., Levin A.A., Hodges M.R., (2013). Treatment of HCV Infection by Targeting MicroRNA. *New England Journal of Medicine*, 368 (18), 1685–1694.
- [35] Martienssen R., Moazed D., (2015). RNAi and Heterochromatin Assembly. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7 (8), a019323.
- [36] Mattick J.S., Amaral P.P., Dinger M.E., Mercer T.R., Mehler M.F., (2009). RNA regulation of epigenetic processes. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 31 (1), 51–9.
- [37] Matzke M.A., Matzke A.J.M., (2004). Planting the Seeds of a New Paradigm. *PLoS Biology*, 2 (5), e133.
- [38] Guo H., Ingolia N.T., Weissman J.S., Bartel D.P., (2010). Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*, 466 (7308), 835–840.
- [39] Friedman R.C., Farh K.K.-H., Burge C.B., Bartel D.P., (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research*, 19 (1), 92–105.
- [40] Esteller M., (2011). Non-coding RNAs in human disease. *Nature Reviews Genetics*, 12 (12), 861–874.
- [41] Smith Z.D., Meissner A., (2013). DNA methylation: roles in mammalian development. *Nature Reviews Genetics*, 14 (3), 204–220.

- [42] Jones P.A., Baylin S.B., (2007). The Epigenomics of Cancer. *Cell*, 128 (4), 683–692.
- [43] Jones P.A., (2012). Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 13 (7), 484–492.
- [44] Nan X., Ng H.-H., Johnson C.A., Laherty C.D., Turner B.M., Eisenman R.N., Bird A., (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*, 393 (6683), 386–389.
- [45] Esteller M., (2008). Epigenetics in Cancer. *New England Journal of Medicine*, 358 (11), 1148–1159.
- [46] Cedar H., Bergman Y., (2009). Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nature Reviews Genetics*, 10 (5), 295–304.
- [47] Web 2, (2024), <https://www.caymanchem.com/news/dna-methylation-fingerprints-of-the-epigenome>, (Erişim Tarihi: 15/11/2024).
- [48] Nan X., Meehan R.R., Bird A., (1993). Dissection of the methyl-CpG binding domain from the chromosomal protein MeCP2. *Nucleic Acids Research*, 21 (21), 4886–4892.
- [49] Ohki I., Shimotake N., Fujita N., Jee J.-G., Ikegami T., Nakao M., Shirakawa M., (2001). Solution Structure of the Methyl-CpG Binding Domain of Human MBD1 in Complex with Methylated DNA. *Cell*, 105 (4), 487–497.
- [50] Web 3, (2024), <https://www.rcsb.org/structure/1qk9>, (Erişim Tarihi: 20/11/2024).
- [51] Du Q., Luu P.L., Stirzaker C., Clark S.J., (2015). Methyl-CpG-binding domain proteins: Readers of the epigenome. *Epigenomics*, 7 (6), 1051–1073.
- [52] Zemach A., Grafi G., (2003). Characterization of Arabidopsis thaliana methyl-CpG-binding domain (MBD) proteins. *The Plant Journal*, 34 (5), 565–572.
- [53] Roloff T.C., Ropers H.H., Nuber U.A., (2003). Comparative study of methyl-CpG-binding domain proteins. *BMC Genomics*, 4 (1), 1.
- [54] Bhattacharya S.K., Ramchandani S., Cervoni N., Szyf M., (1999). A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. *Nature*, 397 (6720), 579–583.
- [55] Baubec T., Ivánek R., Lienert F., Schübeler D., (2013). Methylation-Dependent and -Independent Genomic Targeting Principles of the MBD Protein Family. *Cell*, 153 (2), 480–492.

- [56] Amir R.E., Van den Veyver I.B., Wan M., Tran C.Q., Francke U., Zoghbi H.Y., (1999). Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nature Genetics*, 23 (2), 185–188.
- [57] Hendrich B., Bird A., (1998). Identification and Characterization of a Family of Mammalian Methyl-CpG Binding Proteins. *Molecular and Cellular Biology*, 18 (11), 6538–6547.
- [58] Saito M., Ishikawa F., (2002). The mCpG-binding Domain of Human MBD3 Does Not Bind to mCpG but Interacts with NuRD/Mi2 Components HDAC1 and MTA2. *Journal of Biological Chemistry*, 277 (38), 35434–35439.
- [59] Zhang Y., Ng H.-H., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Bird A., Reinberg D., (1999). Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes & Development*, 13 (15), 1924–1935.
- [60] Strohner R., Nemeth A., Jansa P., Hofmann-Rohrer U., Santoro R., Längst G., Grummt I., (2001). NoRC--a novel member of mammalian ISWI-containing chromatin remodeling machines. *The EMBO journal*, 20 (17), 4892–900.
- [61] Spruijt C.G., Gnerlich F., Smits A.H., Pfaffeneder T., Jansen P.W.T.C., Bauer C., Münzel M., Wagner M., Müller M., Khan F., Eberl H.C., Mensinga A., Brinkman A.B., Lephikov K., Müller U., Walter J., Boelens R., van Ingen H., Leonhardt H., Carell T., Vermeulen M., (2013). Dynamic Readers for 5-(Hydroxy)methylcytosine and Its Oxidized Derivatives. *Cell*, 152 (5), 1146–1159.
- [62] Web 4, (2024), <https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q9UBB5>, (Erişim Tarihi: 20/11/2024).
- [63] Jin S.-G., Jiang C.-L., Rauch T., Li H., Pfeifer G.P., (2005). MBD3L2 Interacts with MBD3 and Components of the NuRD Complex and Can Oppose MBD2-MeCP1-mediated Methylation Silencing. *Journal of Biological Chemistry*, 280 (13), 12700–12709.
- [64] Ng H.-H., Zhang Y., Hendrich B., Johnson C.A., Turner B.M., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Reinberg D., Bird A., (1999). MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nature Genetics*, 23 (1), 58–61.
- [65] Wood K.H., Zhou Z., (2016). Emerging Molecular and Biological Functions of MBD2, a Reader of DNA Methylation. *Frontiers in Genetics*, 7
- [66] Buchmuller B.C., Kosel B., Summerer D., (2020). Complete Profiling of Methyl-CpG-Binding Domains for Combinations of Cytosine Modifications at CpG Dinucleotides Reveals Differential Read-out in Normal and Rett-Associated States. *Scientific Reports*, 10 (1), 4053.

- [67] Liu K., Xu C., Lei M., Yang A., Loppnau P., Hughes T.R., Min J., (2018). Structural basis for the ability of MBD domains to bind methyl-CG and TG sites in DNA. *Journal of Biological Chemistry*, 293 (19), 7344–7354.
- [68] Web 5, (2024), <https://www.rcsb.org/structure/6CNQ>, (Erişim Tarihi: 20/11/2024).
- [69] Lopez-Serra L., Esteller M., (2008). Proteins that bind methylated DNA and human cancer: reading the wrong words. *British Journal of Cancer*, 98 (12), 1881–1885.
- [70] Klose R.J., Bird A.P., (2006). Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends in Biochemical Sciences*, 31 (2), 89–97.
- [71] Menafr  R., Stunnenberg H.G., (2014). MBD2 and MBD3: elusive functions and mechanisms. *Frontiers in Genetics*, 5
- [72] Mian O.Y., Wang S.Z., Zhu S.Z., Gnanapragasam M.N., Graham L., Bear H.D., Ginder G.D., (2011). Methyl-Binding Domain Protein 2–Dependent Proliferation and Survival of Breast Cancer Cells. *Molecular Cancer Research*, 9 (8), 1152–1162.
- [73] Boland M.J., Nazor K.L., Loring J.F., (2014). Epigenetic Regulation of Pluripotency and Differentiation. *Circulation Research*, 115 (2), 311–324.
- [74] Cheng Y., He C., Wang M., Ma X., Mo F., Yang S., Han J., Wei X., (2019). Targeting epigenetic regulators for cancer therapy: mechanisms and advances in clinical trials. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 4 (1), 62.
- [75] Moore L.D., Le T., Fan G., (2013). DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology*, 38 (1), 23–38.
- [76] Perri F., Longo F., Giuliano M., Sabbatino F., Favia G., Ionna F., Addeo R., Della Vittoria Scarpato G., Di Lorenzo G., Pisconti S., (2017). Epigenetic control of gene expression: Potential implications for cancer treatment. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 111, 166–172.
- [77] Ganesan A., Arimondo P.B., Rots M.G., Jeronimo C., Berdasco M., (2019). The timeline of epigenetic drug discovery: from reality to dreams. *Clinical Epigenetics*, 11 (1), 174.
- [78] Nepali K., Liou J.-P., (2021). Recent developments in epigenetic cancer therapeutics: clinical advancement and emerging trends. *Journal of Biomedical Science*, 28 (1), 27.
- [79] Zhu D., Osuka S., Zhang Z., Reichert Z.R., Yang L., Kanemura Y., Jiang Y., You S., Zhang H., Devi N.S., Bhattacharya D., Takano S., Gillespie G.Y., Macdonald T., Tan C., Nishikawa R., Nelson W.G., Olson J.J., Van Meir E.G., (2018). BAI1 Suppresses Medulloblastoma Formation by Protecting p53 from Mdm2-Mediated Degradation. *Cancer Cell*, 33 (6), 1004-1016.e5.

- [80] Çalışkaner Z.O., (2022). Computational discovery of novel inhibitory candidates targeting versatile transcriptional repressor MBD2. *Journal of Molecular Modeling*, 28 (10), 296.
- [81] Phillips T., (2008). The role of methylation in gene expression. *Nature Education*, 1 (1), 116.
- [82] Kan R.L., Chen J., Sallam T., (2022). Crosstalk between epitranscriptomic and epigenetic mechanisms in gene regulation. *Trends in Genetics*, 38 (2), 182–193.
- [83] Lee J.E., Kim M.-Y., (2022). Cancer epigenetics: Past, present and future. *Seminars in Cancer Biology*, 83, 4–14.
- [84] Davalos V., Esteller M., (2023). Cancer epigenetics in clinical practice. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 73 (4), 376–424.
- [85] Farani M.R., Sarlak M., Gholami A., Azaraian M., Binabaj M.M., Kakavandi S., Tambuwala M.M., Taheriazam A., Hashemi M., Ghasemi S., (2023). Epigenetic drugs as new emerging therapeutics: What is the scale's orientation of application and challenges? *Pathology - Research and Practice*, 248, 154688.
- [86] Lai A.Y., Wade P.A., (2011). Cancer biology and NuRD: a multifaceted chromatin remodelling complex. *Nature Reviews Cancer*, 11 (8), 588–596.
- [87] Martin V., Jørgensen H.F., Baur Chaubert A.S., Berger J., Barr H., Shaw P., Bird A., Chaubert P., (2008). MBD2-Mediated Transcriptional Repression of the p14ARF Tumor Suppressor Gene in Human Colon Cancer Cells. *Pathobiology*, 75 (5), 281–287.
- [88] Mahmood N., Arakelian A., Szyf M., Rabbani S.A., (2024). Methyl-CpG binding domain protein 2 (Mbd2) drives breast cancer progression through the modulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *Experimental & Molecular Medicine*, 56 (4), 959–974.
- [89] Yuan K., Xie K., Fox J., Zeng H., Gao H., Huang C., Wu M., (2013). Decreased Levels of miR-224 and the Passenger Strand of miR-221 Increase MBD2, Suppressing Maspin and Promoting Colorectal Tumor Growth and Metastasis in Mice. *Gastroenterology*, 145 (4), 853-864.e9.
- [90] Zhang L., Wang S., Wu G.-R., Yue H., Dong R., Zhang S., Yu Q., Yang P., Zhao J., Zhang H., Yu J., Yuan X., Xiong W., Yang X., Yong T., Wang C.-Y., (2023). MBD2 facilitates tumor metastasis by mitigating DDB2 expression. *Cell Death & Disease*, 14 (5), 303.
- [91] Li L., Li N., Liu N., Huo F., Zheng J., (2020). MBD2 Correlates with a Poor Prognosis and Tumor Progression in Renal Cell Carcinoma. *OncoTargets and Therapy*, Volume 13, 10001–10012.

- [92] Zhou K., Zhou M., Cheng L., Chen X., Wang X., Chu Y., Yu Q., Zhang S., Wang N., Zhao L., Wang D., Huang L., Wang C., Yuan W., Zhou J., (2021). Loss of MBD2 attenuates MLL-AF9-driven leukemogenesis by suppressing the leukemic cell cycle via CDKN1C. *Oncogenesis*, 10 (11), 79.
- [93] Cheng L., Tang Y., Chen X., Zhao L., Liu S., Ma Y., Wang N., Zhou K., Zhou J., Zhou M., (2018). Deletion of MBD2 inhibits proliferation of chronic myeloid leukaemia blast phase cells. *Cancer Biology & Therapy*, 19 (8), 676–686.
- [94] Zhu D., Hunter S.B., Vertino P.M., Van Meir E.G., (2011). Overexpression of MBD2 in Glioblastoma Maintains Epigenetic Silencing and Inhibits the Antiangiogenic Function of the Tumor Suppressor Gene BAI1. *Cancer Research*, 71 (17), 5859–5870.
- [95] Bhalani D. V., Nutan B., Kumar A., Singh Chandel A.K., (2022). Bioavailability Enhancement Techniques for Poorly Aqueous Soluble Drugs and Therapeutics. *Biomedicines*, 10 (9), 2055.
- [96] Lipinski C.A., (2000). Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 44 (1), 235–249.
- [97] Patra S.K., Patra A., Zhao H., Carroll P., Dahiya R., (2003). Methyl-CpG–DNA binding proteins in human prostate cancer: expression of CXXC sequence containing MBD1 and repression of MBD2 and MeCP2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 302 (4), 759–766.
- [98] Web 6, (2025), <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000134046-MBD2/cell+line>, (Erişim Tarihi: 18/01/2025).
- [99] Pan Z.-X., Zhang X.-Y., Chen S.-R., Li C.-Z., (2019). Upregulated exosomal miR-221/222 promotes cervical cancer via repressing methyl-CpG-binding domain protein 2. *European review for medical and pharmacological sciences*, 23 (9), 3645–3653.
- [100] Pontes T.B., Chen E.S., Gigeck C.O., Calcagno D.Q., Wisnieski F., Leal M.F., Demachki S., Assumpção P.P., Artigiani R., Lourenço L.G., Burbano R.R., Arruda Cardoso Smith M., (2014). Reduced mRNA expression levels of MBD2 and MBD3 in gastric carcinogenesis. *Tumor Biology*, 35 (4), 3447–3453.
- [101] Liu W., Wang N., Lu M., Du X.-J., Xing B.-C., (2016). MBD2 as a novel marker associated with poor survival of patients with hepatocellular carcinoma after hepatic resection. *Molecular medicine reports*, 14 (2), 1617–23.
- [102] Stefanska B., Suderman M., Machnes Z., Bhattacharyya B., Hallett M., Szyf M., (2013). Transcription onset of genes critical in liver carcinogenesis is epigenetically regulated by methylated DNA-binding protein MBD2. *Carcinogenesis*, 34 (12), 2738–2749.

[103] Cheishvili D., Chik F., Li C.C., Bhattacharya B., Suderman M., Arakelian A., Hallett M., Rabbani S.A., Szyf M., (2014). Synergistic effects of combined DNA methyltransferase inhibition and MBD2 depletion on breast cancer cells; MBD2 depletion blocks 5-aza-2'-deoxycytidine-triggered invasiveness. *Carcinogenesis*, 35 (11), 2436–2446.

[104] Sahu R.K., Tandon S., Singh S., Das B.C., Hedau S.T., (2024). Methyl CpG binding protein MBD2 has a regulatory role on the BRCA1 gene expression and its modulation by resveratrol in ER+, PR+ & triple-negative breast cancer cells. *BMC Cancer*, 24 (1), 566.



ÖZGEÇMİŞ

Kasım Kağan KOCA, 2016 yılında başladığı Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünü bölüm beşincisi olarak başarılı bir şekilde 2021 yılında mezun oldu. Lisansın ilk yıllarından itibaren aktif olarak rekombinant enzim laboratuvarında çalışarak geçiren Kasım, bitirme projesini laboratuvar ölçekli biyoreaktörde *Pichia pastoris*'te lakkaz enziminin üretimi ve karakterizasyonu ve aynı zamanda TÜBİTAK STAR programında *Pichia pastoris*'te epoksit hidrolaz enziminin karakterizasyonunda araştırmacı lisans bursiyeri olarak çalışmıştır. 2023 yılında yüksek lisans eğitimine Gebze Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında başlamış

EKLER

Ek-A: Büyük Resim/Fotoğraf/Harita ve CD ekleri

Tablo A1.1: Telif hakkı bulunan şekiller için alınan izinler.

Şekil No	Lisans Tarihi	Lisans No	Telif Sahibi
Şekil 1.1	-	CC 4.0	-
Şekil 1.2	23.01.2025	5954990517037	Elsevier
Şekil 1.3	30.01.2025		Merck
Şekil 1.4	-	CC 4.0	-
Şekil 1.5	29.01.2025		CaymanChem
Şekil 1.6	23.01.2025	5954991004062	Elsevier
Şekil 1.7	-	CC 4.0	-
Şekil 1.8	-	CC 4.0	-
Şekil 1.9	-	CC 4.0	-