

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SODYUM BÜTİRAT'IN ENDOMETRİOZİS
SİNYAL İLETİM YOLLARINA ETKİSİNİN
ANALİZİ

Pelin BALÇIK ERÇİN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

GEBZE

2008

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SODYUM BÜTİRAT’IN ENDOMETRİOZİS
SİNYAL İLETİM YOLLARINA ETKİSİNİN
ANALİZİ

Pelin BALÇIK ERÇİN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Asuman D. ZERGEROĞLU

GEBZE

2008

ÖZET

Tez Konu Başlığı: Sodyum Bütirat'ın Endometriozis Sinyal İletim Yollarına Etkisinin Analizi

Yazar Adı: Pelin BALÇIK ERÇİN

Günümüzde özellikle infertil hasta popülasyonunda normal hasta popülasyonuna göre daha yüksek oranda karşılaşılan endometriozis; endometrial dokunun endometrium dışında yerleşim ve büyüme göstermesi olarak tanımlanmaktadır. Uzun yıllardan beri bilinmesine karşın endometriozisin etiyopatolojisi ve net tedavi mekanizması açıklığa kavuşturulamamıştır. Histon Deasetilaz İnhibitörleri özellikle kanser tedavisinde yeni bir tedavi seçeneği olarak son yıllarda çalışılmaktadır.

Çalışmamızda Histon Deasetilaz inhibitörlerinden olan Sodyum Bütirat'ın endometriozis hastalığının tedavisinde seçenek olup olamayacağı araştırılmıştır. İnsan endometrial adenokarsinom hücre hattı, normal endometrium ve endometriozis dokularından elde edilen primer hücre kültürlerinde doza ve zamana bağlı olarak hücre proliferasyonunu incelenmiştir. Tüm hücre proliferasyonlarında düşüş 10mM ve üstü dozlarda belirgin olarak sırasıyla 48 ve 24. saaten itibaren gözlenmiştir. Hücrelerde kontrol grubuna oranla anlamlı azalma 96. saatte 10-15 mM ve 72.saatte 30 mM NaBu konsantrasyonlarında saptanmıştır. Bunu izleyen deneylerde Mitojen Aktive Eden Protein Kinaz sinyal iletim yolunda meydana gelen değişimler SDS PAGE ve western blot yöntemiyle belirlenmeye çalışılmıştır. Hücrelerimizde ERK1/2 fosforilasyonunda doza ve zamana bağlı olarak azalma belirlenmiştir. Buna rağmen deneylerin tekrar edilmesi sonuçların netleştirilmesi açısından gereklidir.

Çalışmamız orijinal fakat şu andaki veriler doğrultusunda primer bir araştırmadır. Bu nedenle konuyla ilgili moleküler düzeyde çalışmaların yapılması gerekmektedir.

SUMMARY

Title: Effect of Sodium Butyrate at Endometriosis Signal Transduction Pathways

Author: Pelin BALÇIK ERÇİN

Endometriosis is characterized by the presence of uterine endometrial tissue outside of its normal location. Etiopathology of the disease has been known for many years, but the failure of traditional treatments have made investigators search for new drugs and treatments. HDAC inhibitors are candidate molecules to treat several cancers.

In this work, we tested an HDAC inhibitor, sodium butyrate (NaBu), *in vitro* whether it would be an alternative molecule for the treatment of the disease. Thus, in addition to an endometrial cancer cell line, we also generated primary cultures of human endometrium and of endometriosis. The dose- and time-dependent effects of NaBu on proliferation of these cells were analyzed. We observed that 10mM and above concentrations of NaBu reduced cell proliferation at 48h and 24h, respectively. Furthermore, we tried to determine whether NaBu caused alterations in MAPK signaling pathways by utilizing SDS-PAGE and Western Blotting methods. Our results showed that NaBu reduced ERK1/2 phosphorylation in a time- and dose-dependent manner. However, in order to clarify our results some of the experiments are needed to be repeated.

This work on the effect of NaBu on endometriosis is novel but primary considering present findings, therefore it is essential to obtain more data through molecular research in this area.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında bilgi ve görüşleriyle bana yol gösteren, desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Yard. Doç. Dr. Asuman D. ZERGEROĞLU'na teşekkürü bir borç bilirim.

Değerli bilgilerini ve görüşlerini benimle paylaşan, kendisiyle çalışmaya başladıktan sonra hayata bakışımı ve değerlendirme şeklimi farklılaştıran sevgili hocam Sayın Prof. Dr. N. Erkut ATTAR'a ve hem bir doktor, hem de bir bilim insanı olarak desteğini her zaman hissettiğim Sayın Yard. Doç. Dr. Rukset ATTAR'a,

Sağlığımı borçlu olduğum Sayın Prof. Dr. Kubilay KARŞIDAĞ'a,

Tez sürecinde yardımlarını esirgemeyen laboratuvar arkadaşlarıma,

Desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen aileme, verdiğim tüm kararların arkasında durup benimle olan, hayatı benimle paylaşan sevgili eşim İhsan ERÇİN'e,

Tez sürecinde hayatımıza katılan yaşama sevincim, canım oğlum Metehan ERÇİN'e sonsuz teşekkürler...

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	IV
SUMMARY	V
TEŞEKKÜR	VI
İÇİNDEKİLER	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	XI
TABLolar DİZİNİ	XII
1. GİRİŞ	1
2. ENDOMETRİOZİS	3
2.1. Endometriosis Tedavi Seçenekleri	3
3. HİSTONLAR, ASETİLASYON ve DEASETİLASYON	5
3.1. Histon Deasetilazlar	6
3.1.1. Histon Deasetilaz İnhibitörleri	8
4. MİTOJENLE AKTİVE OLAN PROTEİN KİNAZ SİNYAL YOLU	9
4.1. Ekstrasellüler Sinyal Düzenleyici Kinaz (ERK) Ailesi	10
4.2. p38 MAPK Ailesi	12
4.3. c-Jun NH2-Terminal Kinaz Ailesi	14
4.4. MAP Kinaz Sinyal İletim Yolunda Aktive Olan Protein Kinazlar ve Hücrenin Cevabı	14

4.4.1. RSK Alt Grubu Kinaz Ailesi	15
4.4.2. MSK Alt Grubu Kinaz Ailesi	16
4.4.3. MNK Alt Grubu Kinaz Ailesi	18
5. KONUS İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR	20
6. MATERYAL ve METOD	23
6.1. Materyal	23
6.1.1. Kimyasal Maddeler	23
6.1.2. Cihazlar	23
6.1.3. Kullanılan Solüsyonlar	24
6.2. Metod	28
6.2.1. Primer Kültür ve Hücre Soyu	28
6.2.2. Hücre Stoklama	29
6.2.3. Hücre Morfolojilerinin Değişiminin Belirlenmesi	29
6.2.4. MTS ile NaBu Etkisinin Belirlenmesi	29
6.2.5. Proteinlerin İzolasyonu	30
6.2.6. SDS PAGE ve Western Blot	31
7. BULGULAR	33
7.1. Sodyum Bütiratın Hücre Morfolojisine Etkisi	33
7.2. Sodyum Bütiratın Hücre Proliferasyonuna Etkisi	37
7.3. MAP Kinaz Sinyal İletim Yolu	40
8. TARTIŞMA VE SONUÇ	42
9. KAYNAKLAR	45

10. ÖZGEÇMİŞ

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

CDK	Siklin bağımlı kinaz
D-MEM:F-12	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
ECL	Elektrokimyasal lüminesans
ER α	Östrojen reseptör α
ERK	Ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinaz
FBS	Fetal bovine serum
GnRH	Gonadotropin releasing hormon
GCHR	Glicocorticoid reseptör
HAT	Histon asetilaz transferaz
HCl	Hidrojen klorür
HDACI	Histon deasetilaz inhibitörü
JNK	c-Jun NH ₂ - terminal kinaz
MAPK	Mitojenle aktive olan protein kinaz
MAPKK	MAP kinaz kinaz kinaz
MK	MAPK-aktive olan protein kinazlar
MNK	MAPK etkileyen kinazlar
MSK	Mitojen ve stres aktive protein kinaz
NaBu	Sodyum Bütirat
NaCl	Sodyum klorür
NaHCO ₃	Sodyum bikarbonat
RAR α	Retinoik reseptör- α
RSK	Ribozomal S6 kinazlar
SAPK	Stres ile aktive olan protein kinaz
SDS	Sodyum dodesil sülfat

SOS	Son of sevenless
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiamin
TSA	Trichostatin A
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.1 Nükleozom yapısı	5
4.1 MAPK Sinyal iletim yolu	11
4.2 RSK aktivasyonu ve hücresel cevap	16
4.3 ERK ve p38'in MNK etkisi ve hücre cevabı	17
4.4 MNK sistemi ve hücresel cevap	19
6.1 Hücre lizatında protein miktarının BSA yardımıyla belirlenmesi	30
7.1 Normal endometrium hücreleri NaBu uygulaması sonrası morfolojik görünüm	34
7.2 Endometrioma hücreleri NaBu uygulaması sonrası morfolojik görünüm	35
7.3 Ishikawa hücreleri NaBu uygulaması sonrası morfolojik görünüm	36
7.4 Üç farklı hastadan alınmış Endometrium dokularından yapılan primer hücre kültürlerinde Sodyum Bütirat'ın doza ve zamana bağlı etkisi	38
7.5 Üç farklı hastadan alınmış Endometrioma dokularından yapılan primer hücre kültürlerinde Sodyum Bütirat'ın doza ve zamana bağlı etkisi	39
7.6 Sodyum Bütirat uygulamasının Ishikawa hücrelerine etkisi	40
7.7 Ishikawa hücreleri p-ERK seviyelerindeki değişiklikler	41
7.8 Normal Endometrium hücresi p-ERK seviyelerindeki değişiklikler	41
7.9 Endometrioma hücresi p-ERK seviyelerindeki değişiklikler	41

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo

Sayfa

3.1 HDAC ile Asetillenen proteinler

9

1. GİRİŞ

Endometriozis; endometrium gland ve stromasının uterus kavitesi dışında bulunması ile tanımlanan bir hastalıktır (Kennedy *et al.*, 2005). Normal endometriumun heterotropik yerleşimine bağlı olarak gelişen endometriozis; benign, östrojen-bağımlı bir durum olup, üreme çağındaki kadınlarda %10-15, infertil kadınlarda ise %40-60 oranında görülen bir patolojidir (Giudice and Kao, 2004). Hastalığın oluşum mekanizmasını açıklamaya yönelik çok sayıda hipotez bulunmasına karşın halen hastalığın nedeni açıklığa kavuşturulamamıştır.

Endometriozis odakları malign bir yapı göstermemesine rağmen endometriotik odaklarda; VEGF, Bcl-2, Fas ve p53 gibi karsinogenez de önem teşkil eden protein miktarlarında endometriotik odaklarda normal endometriumu göre farklılıklar saptanmıştır (Harada *et al.*, 2007). Ayrıca endometriozis hastalarında over kanseri oranlarının normal hasta popülasyonuna oranla yüksek olduğu tespit edilmiştir (Brinton *et al.*, 1997).

Endometriozis ilk olarak 1860 yılında saptanmasına ve günümüzdeki yoğun çalışmalara rağmen henüz kesin bir tedavi seçeneği bulunmamaktadır. Günümüzde endometriozis tedavisinde çeşitli hormonal terapi uygulamaları kullanılmaktadır. Oral kontraseptifler; uzun süreli kullanımda endometriozis odaklarından kaynaklanan ağrıda azalma sağlamasına karşın, hastaların menstrual siklus sürelerini kısaltmakta ve fertilitiyi engellemektedir. Gonadotropin salgılatıcı hormon agonistleri, gonadotropin hormonlarının salgılanmasını bloke ederek etkili olmaktadır, fakat hastada menopoz benzeri tablo görülmektedir. Hastada sıcak basması, vajinal kuruluk ve kemik mineral ölçümlerinde azalma tespit edilmiştir. Danazol hipoestrojenik etki gösteren overlerde hormon baskılayan ajandır, fakat bu ajanın kullanımı sonrasında hastada kemik mineral ölçümlerinde azalma, akne oluşumu ve yüzde kıllanma yan etkileri görülebilmekte ve maksimum hastaya altı ay süreyle uygulanmaktadır. Son yıllarda meme kanserlerinde denenmekte olan aromataz inhibitörlerinin endometriosis üzerindeki etkisi araştırılmakta ve sonuçlar umut verici bulunmaktadır. Aromataz inhibitörleri, östrojen biyosentezini baskılayarak endometriozis tedavisinde etkin olmaktadır ancak overlerde de östrojen biyosentezinin baskılandığı belirlenmiştir (Jackson *et al.*, 2006).

Yakın zamanlı çalışmalarda Histon deasetilaz (HDAC) enzimlerinin gen ekspresyonun düzenlenmesinde ve kromatin toplanmasında önemli rolü olduğunun belirlenmesiyle, insan kanser tedavilerinde HDAC inhibisyonunun yeni tedavi seçeneklerinden biri olabileceği düşünülmektedir (Sonnemann *et al.*, 2005). HDAC inhibitörleri (HDACI) anti-neoplastik ajan sınıfının üyesi olarak hücre proliferasyonu, hayatta kalma, farklılaşma ve apoptosis de rol alan çeşitli genlerin aktivasyonuna yol açtığı belirtilmiştir (Xu *et al.*, 2007), ayrıca tümör hücrelerinde büyüme duraklamasını, hücrenin değişimini ve apoptozisi indüklediği tespit edilmiştir (Chen *et al.*, 1998, Wang *et al.*, 1998). HDAC inhibitörleri dört sınıf altında gruplandırılmaktadır; Hidroksamik asitler, kısa zincir yağ asitleri, epoksidler, benzamidler. Sodyum bütirat (NaBu) kısa zincir yağ asitlerindendir ve son yıllarda yapılan çalışmalarda çeşitli kanser tiplerinde anti karsinojenik etkisinin HDAC modülasyonunu düzenleyerek aktive ettiği belirlenmiştir, ancak mekanizması tam olarak anlaşılmamıştır (Monneret, 2005). HDACI, gelecekte kanser tedavisinde bir seçenek olabilme ihtimali değerlendirilerek yoğun bir şekilde çalışılmaktadır.

Çalışmamızda, bilgiler doğrultusunda bir HDACI olan NaBu'nun endometriozis tedavisinde gelecekte bir alternatif olabilme ihtimali araştırılmıştır. NaBu'nun, insan endometrial adenokarsinom hücre soyu, insan endometrioma ve normal endometrium primer hücre kültürlerinde farklı dozlarda ve farklı zamanlarda hücre morfolojisine, hücre proliferasyonu ve MAPK, JNK ve p38 sinyal iletim yolları üzerine etkileri incelenmeye çalışılmıştır.

2. ENDOMETRİOZİS

Endometrium hücrelerinin heterotropik olarak yerleşimi ve gelişimiyle tanımlanan endometriozis , östrojen bağımlı bir hastalık olması nedeniyle sıklıkla üretken çağıdaki kadınların hastalığı olmakla birlikte, adolesanlarda ve postmenopozal kadınlarda da görülür. Postmenopozal kadınlarda görülmesi özellikle hormon replasman tedavisi ile ilişkisini belirtmektedir (Kennedy *et al.* 2005, Matorras *et al.*, 2002).

Hastalığın klinik belirtilerinin ortaya çıkışından kesin tanı konana kadar geçen sürenin birçok etkene bağlı olarak büyük değişiklikler göstermesi, prevalansın belirlenmesini de etkileyerek literatürde farklı verilerin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Amerika ve İngiltere kaynaklı çalışmalarda pelvik ağrı nedeniyle laparoskopi yapılan kadınların %10-25'inde endometriozis saptandığı bildirilmiştir (Strathy, 1982). Bu oran dismenoresi olan kadınlarda %40-60, infertilite problemi olanlarda ise %20-40 olarak bildirilmiştir. İnfertil kadınlarda, aynı yaş ve popülasyondaki kontrol grubuna göre 10 kat daha fazla endometriozis görülmektedir (Verkauf, *et al.*, 1987; Fedele, *et al.*, 1990).

2.1.Endometriozis Tedavi Seçenekleri

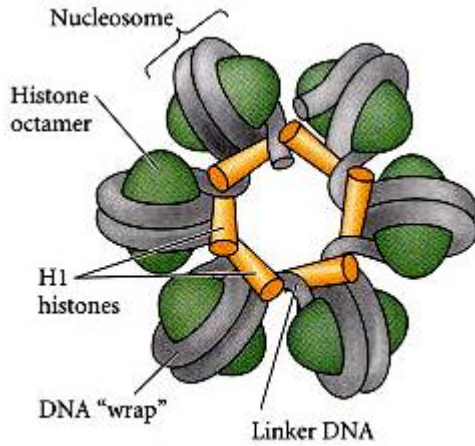
Endometriozis tedavisinde cerrahi müdahale, ilaç tedavisi veya her ikisi kombine olarak kullanılmaktadır. Abbott ve arkadaşlarının 2004 yılında yayınlanan çalışmalarında 39 hastanın 12 aylık takibi sonrasında, cerrahi müdahale yapılan hastaların %80'nin semptomlarında düzelme gözlenirken, placebo verilen hastaların % 32'sinde semptomlarda düzelme belirlenmiştir, ancak cerrahi müdahale geçirilmesine karşın hastaların %20'sinde düzelme olmamış ve semptomlar devam etmiştir. Bu oran cerrahi müdahale açısından büyük bir oran olarak kabul edilmektedir (Abbott *et al.*, 2004). Kontrol grubunun rasgele seçildiği çalışmada cerrahi ve medikal tedavinin karşılaştırılmasında cerrahi müdahale geçiren hastalarda %51 oranında bir yıl içerisinde semptomların tekrar görüldüğü açıklanmıştır (Hornstein *et al.*, 1997). Cerrahi müdahale sonrası uzun süreli takipte ise 3 yıl sonrasında %7-30 oranında semptomların tekrarlandığı, 5 yıl sonrasında ise bu oranın %40-50 oranına ulaştığı belirlenmiştir (Valle and Sciarra, 2003).

Endometriozis hastalarında kullanılan Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH) analogları endometriozis tedavisinde en yaygın olarak kullanılan medikal tedavidir. Bu analoglar gonadotropik sekresyonunu inhibe ederek serum östrojen seviyesini düşürmektedirler. GnRH analogları kullanan hastaların, 24 haftalık kullanım sonrasında endometriozis semptomlarında %50 oranında azalma belirlenmiştir (Cirkel *et al.*, 1995). Yapılan diğer çalışmada ise GnRH analogları ile diğer medikal tedavi seçenekleri olan oral kontraseptiflerin karşılaştırılmasında anlamlı farklılık saptanmamıştır (Child *et al.*, 2001). GnRH analoglarının kullanımı sonrasında hipo-östrojenik etkisi ile menopozal semptomlar olan sıcak basması, vajinal kuruluk, duygusallık, libidoda azalma olabilmektedir. Uzun süreli GnRH analoglarının 6 ay süreli kullanımı sonrasında yapılan kemik mineral ölçümlerinde %3,2 oranında, 12 aylık takip sonrasında ise %6,3 oranında kayıp olduğu belirtilmiştir (Valle and Sciarra, 2003).

Yeni tedavi seçeneği olarak görülen Aromataz inhibitörlerinin endometriozis hastalarında kullanımına başlanmıştır. Aromataz P450 östrojen biyosentezinde anahtar enzim olarak rol oynamaktadır (Attar and Bulun, 2006). P450 enzimi androstenedione ve testosteronun estrone ve östrodiol dönüşümünü katalize etmektedir. Normal endometrium dokusu ve endometriozis dokusu incelemelerinde aromataz aktivitesinin endometriotik dokularda belirgin olarak yüksek olduğu belirlenmiştir (Bulun *et al.*, 2004). Bu, endometriotik lezyonların lokal olarak östrojen biyosentezi yaptıklarının göstergesidir. Aromataz inhibitörleri ile yapılan ilk klinik çalışmada hastanın 9 aylık takip sonrasında kemik mineral ölçümünde % 6,2 oranında azalma belirlenmiştir (Takayama, 1998). 2004 yılında yapılan çalışmada ise 10 endometriozis hastasının gruplanması sonrasında bir grup hasta aromataz inhibitörü, diğer grup hasta ise progestin ile tedavi başlanmış fakat hastalara dışarıdan kalsiyum ve D vitamini takviyesi yapılmıştır. Sonuçların karşılaştırılmasında aromataz inhibitörü kullanılan hastalarda pelvik ağrılarda ve lezyonlarda belirgin azalma belirlenmiş ve kemik ölçümlerinde farklılık tespit edilmemiştir (Ailawadi *et al.*, 2004). Yapılan çalışmalar aromataz inhibitörleri için umut vaat edici olmasına karşın aromataz inhibitörlerinin overlerde de inhibisyona yol açması nedeniyle daha detaylı araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

3.HİSTONLAR, ASETİLASYON VE DEASETİLASYON

DNA'nın etrafını saran proteinlere histon adı verilmektedir. DNA'nın etrafında bulunan bir histon oktamerinin 1.8 kez dönmesiyle oluşan yapıya nükleozom adı verilmektedir. Ökaryotik hücrelerde beş tip histon; H1, H2A, H2B, H3 ve H4 tanımlanmıştır. DNA'nın etrafında nükleozom yapısının oluşumunda rol oynayan histonlar; H3, H4, H2A, H2B'dir. Bunlardan H3, H4 silindirik yapıda tetramer, H2A, H2B ise iki dimer yapıdan oluşmaktadır (Şekil 3.1). Histonlar küçük, basit yapılı, lizin ve arginin aminositlerince zengin yapıdadırlar. Negatif yapılı nükleozomun omurga yapısıyla pozitif yüklü lizin ve arginin rezidüleri ve silindirik yapının dışında bulunan H1 histon DNA' yı sıkıca kuşatmaktadır (Kornberg *et al.*, 1999). Nükleozomik histonlarda C- terminal ve N-terminal olarak iki bölüm bulunmaktadır. C-terminal kısım nükleozomik silindirin iç kısmında, N terminal kısım ise lizin rezidülerince zengin ve nükleozomun dış kısmında bulunmaktadır. Nükleozomik dört histonun uç kısımları posttranskripsiyonel modifikasyonlarda; asetilasyon, fosforilasyon ve metilasyonda rol oynamaktadır (Monneret, 2005).



Şekil 3.1: Nükleozom Yapısı (Gilbert, 2000).

Kromatinin yeniden modellenmesi ve nükleozomda oluşan dinamik değişimler gen ekspresyonun değişiminde ve buna paralel olarak hücresel fonksiyonların düzenlenmesi, farklılaşma ve proliferasyon olaylarında rol oynamaktadır (Huang *et al.*, 2006). Histonlarda oluşan metilasyon reaksiyonu; H3 histonun K4ve K27, H4 histonun K20 bölgesinde ve arginin rezidülerinde meydana gelmektedir, fakat metilasyon reaksiyonu asetilasyon reaksiyonuna oranla daha az dinamik bir süreçtir (Zhang *et al.*, 2001).

Histonların N -terminal ucunda meydana gelen asetilasyon reaksiyonu kromatin yapı değişiminde ve post transkripsiyonel modifikasyonda önemlidir (Strahl and Allis, 2000). Asetilasyon özellikle H3 ve H4 histonların N terminal uçlarındaki lizin rezidülerinin ε-amino gruplarında meydana gelmektedir. Reaksiyon histon asetilaz transferaz (HAT) enzimlerinin pozitif yüklü olan lizin aminoasitlerini nötralize etmesiyle histon ve DNA arasındaki bağı azaltmasıyla nükleozom yapısının değişimi meydana gelmektedir. Konformasyonel değişim transkripsiyonu ve RNA polimerazı aktive etmektedir (Kim *et al.*, 2003). Reaksiyon asetik grupların lifinden koparılmasını sağlayan histon deasetilaz enzimleri (HDAC) tarafından geri dönüşümlü olarak gerçekleşmektedir. HAT ve HDAC aktiviteleri hedef gen kompleksinin transkripsiyon faktörleri ve onların kofaktörleri için spesifik işlev görmektedir.

3.1.Histon Deasetilazlar

Günümüze kadar 18 HDAC enzimi tanımlanmış ve mayalarda bulunan HDAC enzimleri ile olan homolojileri temel alınarak 3 alt sınıfta gruplandırılmıştır. I. Grup mayalarda bulunan RPD3 deasetilaz enzimiyle katalitik bölgelerinde benzerlik görülen 22-55 kDa moleküler ağırlığında bulunan HDAC 1, 2, 3 ve 8 bulunmaktadır. I.grup enzimler nükleusta bulunurlar. II. grupta moleküler ağırlıkları büyük olan ve 120-135 kDa aralığında değişen HDAC 4,5,6 ve 9 bulunmaktadır. Bu grupta bulunan enzimler ya birincil olarak sitoplazmada bulunmakta ya da nükleus ile sitoplazma arasında geç etmektedirler. Bu grupta bulunan enzimler mayalarda bulunan HDAC 1 deasetilaz enzimiyle bağlantılı bulunmuşlardır. HDAC 6 ve 10 iki katalitik bölge içermektedirler ve alt grubu oluşturmaktadırlar. III. Grup HDAC enzimleri NAD bölgeleri içermektedir ve bu enzim grubu Sir2 ailesi deasetilazlar olarak da adlandırılmaktadırlar. Sir2 ailesinde bulunan HDAC lar I. ve II. grupta bulunan HDAC'ları inhibe eden bileşikler tarafından inhibe edilemezler ve birincil substratlarında histon içermezler (Dokmanovic *et al.*, 2005).

Histonlarda bulunan N-terminal domain, transkripsiyonun regülasyonunda anahtar rol oynamaktadır. Asetilasyon, nükleozomun yeniden şekillenmesinde ve transkripsiyonel aktivasyonda etken olmaktadır. Ayrıca, HDAC' lar tarafından asetillenen hücrenin fonksiyonunu etkileyen çok sayıda histon-olmayan proteinler de tanımlanmıştır (Tablo 3.1). Bu proteinler; transkripsiyon faktörleri, transkripsiyon düzenleyicileri, sinyal iletim sisteminde görevli araçlar, DNA tamir edici enzimler, nüklear aktarma düzenleyiciler, şaperon proteinler, yapısal proteinler,

inflamasyonda görevli aracı proteinler ve viraj proteinler başlığı altında yaklaşık olarak 50 adet tanımlanmıştır (Xu *et al.* , 2007).

Tablo 3.1: HDAC ile Asetillenen Proteinler (Xu *et al.*, 2007)

<u>DNA'ya bağlanan transkripsiyon faktörleri</u>	p53, c-Myc, AML1, BCL-6, E2F1, E2F2,E2F3, GATA-1, GATA-2, GATA-3,GATA-4, Yine Yang 1 (YY1), NF-kB(RaIA/p65), MEF2, CREB, HIF-1a, BETA2,POP-1, IRF-2, IRF-7, SRY, EKLF
<u>Steroid Reseptörler</u>	AR, ER α , GCH-R
<u>Transkripsiyon koregulatorleri</u>	Rb, DEK, MSL-3, HMGI(Y)/HMGA1, CtBP2, PGC-1a
<u>Sinyal iletimde görevli proteinler</u>	STAT3, Smad7, b-catenin, IRS-1
<u>DNA tamir edici enzimler</u>	Ku70, WRN, TDG, NEIL2, FEN1
<u>Nüklear aktarma düzenleyiciler</u>	Rch1, importin-a7
<u>Şaperon proteinler</u>	HSP90
<u>Yapısal protein</u>	α -Tubulin
<u>İnflamasyonda görevli aracı protein</u>	HMGB1
<u>Viral proteinler</u>	E1A, L-HDAg, S-HDAg, T antigen, HIV Tat

HAT ve HDAC arasındaki denge; hücrelerin gen regülasyonun düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. HAT aktivesinde azalma veya HDAC aktivesinde artış olması hücrelerin malign dönüşümünde rol oynamaktadır (Kouzarides, 1999). Örneğin; Retinoik reseptor- α (RAR α) ile promyelotik Lösemi Zinc Finger (PLZF) veya Promiyelotik Lösemi protein (PML) arasındaki kromozomal translokasyon Akut Promiyelotik Lösemi'ye (APL) neden olur. Bu kanserlerde

HDAC enzimlerinin düzelmesiyle hastalıkta iyileşme gözlemlenmektedir (Fenrick *et al.*, 1998). Benzer çalışmalar HDAC inhibitörlerinin kansere karşı alternatif bir çözüm olabileceğini gündeme getirmiştir. Özellikle HDAC inhibitörlerinin hücreleri G1 fazında bazen de G2 fazında duraklamasını sağlaması, hücre siklusunda rol alan siklin-bağımlı kinaz (CDK) inhibitörü WAF1'i aktive etmesi ve siklin-bağımlı kinaz A ve D'nin azaltarak düzenlemelerini sağlamaktadır. Ayrıca yapılan çalışmalarda *in vivo* ve *in vitro* olarak hücrelerde apoptozisi indüklediği belirtilmiştir.

3.1.1.Histon Deasetilaz İnhibitörleri (HDACI)

Histon deasetilaz inhibitörleri yapısal özellikleri temel alınarak sınıflandırılmışlardır. HDAC8/hidrosamat kompleksin kristalize yapısının belirlenmesiyle HDAC'ların üç temel katalitik bölgesi belirlenmiştir (Somoza *et al.*, 2004). Asetile olmuş lizin substratının deasetilasyonu için aktif zinc bölgesinin inhibe olması gerekmektedir. HDACI yapısal özelliklerine göre; Hidroksimatlar, siklik peptitler, alifatik asitler ve benamidler olarak alt gruplarda sınıflandırılmaktadırlar (Marks *et al.*, 2003) . Farklı HDAC enzimleri hücrede farklı biyolojik aktivite göstermektedir. Özellikle HDAC1 ve HDAC2 transforme hücrelerin proliferasyonunda aktif rol oynamaktadırlar. Trichostatin A (TSA) ilk olarak bulunan HDAC inhibitörüdür ve hidroksimat grubundadır. Bu grupta Hidroksamik asit katalitik bölgede bulunan çinko (Zn) iyonuna bağlanarak inhibisyonunu sağlamaktadır. Yapısal olarak TSA'ya benzeyen suberoylanilide hidroksamid asit (SAHA) ve TSA, HDAC1 ve HDAC2 gruplarında inhibisyon göstermelerine karşın HDAC3 grubunda inhibisyona sebep olmadığı belirlenmiştir (Richon *et al.* , 1998).

Siklik peptitler ise HDACI bulunan diğerkompleks gruptur. Bu gruptaki FK228, apicidin ve diğerkşaperonlar nanomolar konsantrasyonlarında etkindirler. Siklik tetrapeptitler trifluoroethyl and pentafluoroethyl keton grubu içerirler ve aktif bölgedeki Zn bağlanarak inhibisyonu gerçekleştirmektedirler (Jose *et al.*, 2004).

Alifatik asit grubunda bulunan fenilbütrat ve valproik asit yüksek konsantrasyonlarda (micromolar) etkindirler. Yapılan çalışmalarda 4-phenylbutyrate ile TSA'nın (BL1521) birleştirilmesi ile hibrid molekül yapılmış ve BL1521'nin düşük konsantrasyonda etken olduğu gösterilmiştir.

Benzamid grupta bulunan MS275'in HDAC1 üzerinde 0.3µM'da etken olduğu (IC50), HDAC3 üzerine 0.8 µM'da etken olduğu fakat HDAC 8 üzerine inhibisyon etkisinin bulunmadığı belirtilmiştir (Hu *et al.*, 2003).

Alifatik asit grubunda bulunan kısa yağ asidi zincirinde sınıflanan sodyum N-bütirat uzun zamandan beri bilinen HDAC inhibitörlerindendir. Büyümeyi baskılayıcı etkisinin bulunduğu ve hücresele farklılaşmayı sağladığı, malign hücre soylarıyla yapılan çalışmada gösterilmiştir (Mandal *et al.*,1996). Memeli hücrelerinde Bcl-2 salınımının seviyesi hücrenin apoptoza yönelmesinde belirleyici rol oynamaktadır. Bütirat ile indüklenen hücrelerde apoptotik etki gözlemlenmiştir (Kelly *et al.*, 2002).

4.MİTOJENLE AKTİVE OLAN PROTEİN KİNAZ SİNYAL YOLU

İnsan Genom Projesi'nin verilerine göre, insan genomundaki yaklaşık 32.000 genin %20'si sinyal iletiminde görev alan proteinleri kodlamaktadır (Brown, 2002). Bu proteinler arasında, hücre membranında yerleşen reseptörler, G-proteinler ve sinyal ileten enzimler yer almaktadır. Protein kinazlar, sinyal iletimi sırasında protein fosforilasyonu ve aktivasyonunu sağlarlar. Protein kinazlar, membran yerleşimli olanlar ve sitoplazmik tirozin kinazlar olarak iki ana gruba ayrılır. Bu proteinler, katalitik özelliklerine göre (fosforilasyona uğrayan

aminoasit türü) tirozin ve serin/treonin kinazlar olarak da sınıflandırılmaktadır (Pawson *et al.*, 2002).

Protein kinazlar ve diğer iletim sistemleri hücrelerin ve organizmaların fonksiyonlarını belirlemektedir. Proteinlerin kinaz kaskadı ile iletim sistemi Mitojen Aktive Protein (MAP) kinaz sinyal iletim sistemi olarak adlandırılmaktadır. Bu kaskad en az üç tane protein kinaz serisi içererek çoklu fonksiyonlu MAP kinaz sistemini etkilemektedir (Lewis *et al.*, 1998). MAP kinaz sinyal iletim yolu embriyogenez, hücre farklılaşması, hücre proliferasyonu ve hücre ölümü kaskadlarında major rol oynamaktadır (Pearson *et al.*, 2001).

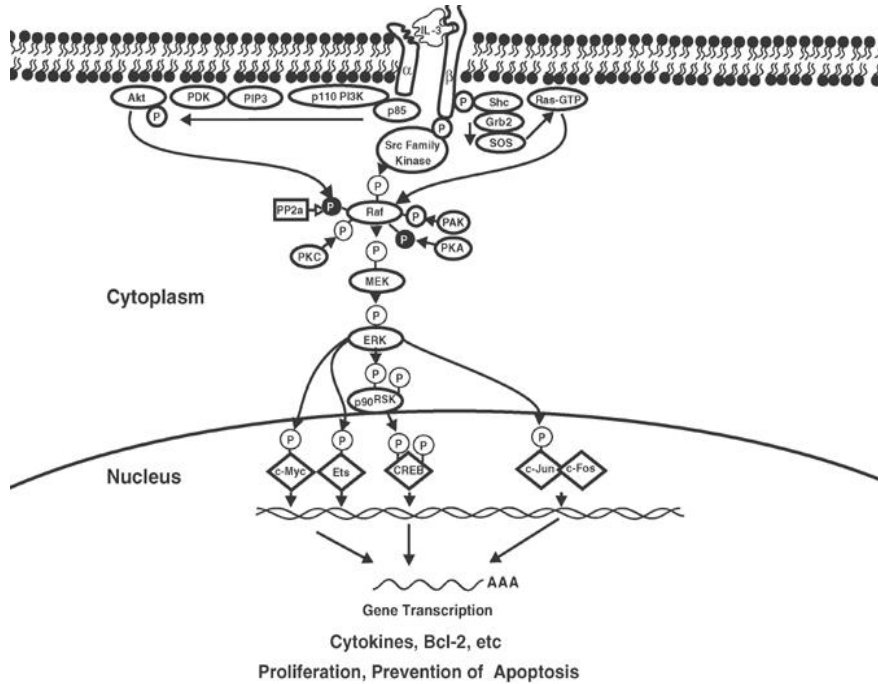
MAP kinazlar, “Mitogen-activated protein kinases” süper ailesinde yer alırlar (Liem *et al.*, 2002). Ökaryotik hücrelerin tümünde mevcut olan bu proteinler hücre membranından çekirdeğe bilgi aktarılmasında çok önem taşımaktadır. MAP kinazlar; Ekstraselüler Sinyal Düzenleyici Kinaz (ERK) ailesi, p38 MAP kinaz ailesi ve c-Jun NH₂- terminal kinaz (JNK) ailesi olmak üzere üç ana gruba ayrılmaktadır.

MAP kinaz yolu, reseptör aracılı uyarının hücre içine iletiminden sorumlu bir kinaz yolağı olarak çalışır. Yolak sistemi hem sinyalin amplifikasyonu hem de düzenleyici etkileşimler (sinyalin süresi, şiddeti ve kinetiği) açısından önem taşır. Sinyalin iletimi G-protein aktivasyonu (Ras aktivasyonu) ile başlar ve MAPKKK’nın (MAP kinaz kinaz kinaz) aktivasyonundan sonra sırasıyla MAPKK (MAP kinaz kinaz) ve MAPK (MAP kinaz) aktive olur. MAPK ise sitoplazmik substratlarını (hücre iskeleti elemanları, diğer protein kinazlar) ve/veya nükleusta bulunan transkripsiyon faktörlerini fosforilasyon yoluyla aktive eder ve hücrenin biyolojik cevabı oluşur (Kolch *et al.*, 2000).

4.1. Ekstrasellüler Sinyal Düzenleyici Kinaz (ERK) Ailesi

Memelilerde bulunan ERK1/2 klasik mitojen aktive kinaz kaskadında tanımlanmaktadır. Bu kaskad MAPKKKları, A-Raf, B-Raf ve Raf-1, MAPKK lar MEK1 ve MEK2 son olarak da ERK1 ve ERK2 iletimini içermektedir. ERK1 ve ERK2 %83 oranında korunmuş ve benzer aminoasit dizisi ile belirlenmiştir (Chen *et al.*, 2001). Kaskad büyüme faktörleri, serum ve phorbol ester ile şiddetli aktive olurken, sitokinler, osmotik stres ve G protein-bağı reseptörler tarafından daha az aktive olmaktadır (Lewis *et al.*, 1998).

Hücre yüzey reseptörleri ve G-protein bağlı reseptörler Raf/MEK/ERK kaskadını farklı izoformlardaki küçük GTP-bağlanma proteinlerinden olan Ras ile sinyali aktive ederler (Roux *et al.*, 2004). Zarın sitoplazmik bölgesinde yer alan Ras, SOS'un (son of sevenless) Guanin nükleotid exchange faktörü stimüle etmesiyle inaktif formdan (Ras-GDP) aktif forma (Ras-GTP) dönüşür. Ras aktivasyonu tersinir bir süreçtir. Ras proteinini GTP bağlı iken aktif duruma geçer ve GTP'yi hidrolize ederek aktivitesine son verir. Proteinin GTPaz aktivitesi başka proteinlerle etkileşimi aracılığıyla düzenlenir. Aktive olan Ras proteinleri Raf kinazlara yüksek afinite ile bağlanırlar ve Raf kinazların hücre membranına yerleşimini ve aktivasyonunu sağlarlar (Kolch *et al.*, 2000). Aktive olan Raf MEK1 ve MEK2'yi spesifik olarak fosforlanmasını sağlar ve ERK1/2'nin korunmuş aktivasyon bölgesi olan Thr-Glu-Tyr (TEY) aktive eder (Şekil 4.1). Sinyal kaskadının aktive olarak ilerlemesi için Ras moleküllerinin %5'inin aktif duruma geçmesi ERK1/2'nin aktivasyonu için yeterlidir (Hallberg *et al.*, 1994).



Şekil 4.1: MAPK Sinyal İletim Yolu (Chang *et al.*, 2003)

Durgun hücrelerde ERK1/2 proteinleri dağılmış olarak bulunmakta belirli bir lokalizasyon göstermemektedirler fakat uyarının oluşmasıyla nükleusta birikme olmaktadır (Lenormand *et al.*, 1993). Aktive olmuş ERK1/2 çok sayıda hedef proteinin fosforlanarak aktive olmasını sağlar; membran proteinleri CD120a, Syk ve kalneksin, nüklear substratlar SRC1, Pax6, NF-AT, Elk-1, MEF2, c-Fos, c-Myc, ve STAT3 bu moleküller arasındadır. Ayrıca birçok mitojen aktive protein kinaz alt grupları; mitojen ve stres aktive protein kinazlar

(MSK), MAPK- etkileyen kinazlar (MNK), 90-kDa Ribozomal S6 kinazlar (RSK). MNK ve MSK'lar hem p38 hem de ERK kaskadından aktive olmasına karşın RSK ailesi üyeleri yalnızca ERK tarafından aktif forma geçmektedirler (Frodin *et al.* , 1999).

4.2.p38 MAPK AİLESİ

Hücrenin destekleyici sitokinlerle (örn. Interlökin 1), tümör nekrozis faktör $\square$ (TNF $\square$), ısı, osmotik şok, bakteriyel toksinler gibi hücrel stres yaratan uyarılarla uyarılması sonucunda hücrede MAP kinaz sinyal iletim yolu farklı bir yol izler (Paul *et al.*, 1997). Stres ile aktive olan protein kinaz (Stress-activated protein kinases SAPK) iletim yolunda başlıca p38 MAP kinaz ve c-jun-amino-terminal kinaz (JNK) olarak da adlandırılır. Bu sinyal yolunun aktivasyonu sonucunda hücrenin cevabı da farklı olur. Hücrede strese cevap oluşur; hücre siklusunda duraklama ve hücrenin apoptozise yönlendirilmesi meydana gelir.

p38 kaskadı birden fazla MAPKKK'lar içerir; MEKK 1-4, MLK2 ve 3, DLK, ASK1, Tpl2 (Cot), ve Tak1;MAPKK'lar olan MEK3 (MKK3)ve MEK6 ve (MKK6) ve p38'in dört farklı izoformu (α , β , γ ve δ) aktive olarak kaskad ilerler. (Kyriakis *et al.*, 2001). p38 aminoasit diziliminde ERK2 ile %50 benzerlik göstermekte ayrıca mayalarda yüksek osmolarite de aktive olan *hog1* geninin ürünüyle de yüksek homoloji göstermektedirler (Han *et al.*, 1994). Memeli hücrelerinde p38 izoformları çevresel stresten ve sitokinlerden güçlü bir şekilde aktive olmaktadır. p38 i aktive eden sistemler genellikle JNK'ı da aktive etmektedir.

Memeli hücreleri UV, hipoksia, oksidatif stres, çeşitli sitokinlere maruz kaldıklarında, MEK3 ve MEK6 rutin olandan fazla aktive olurlar. MEK3 ve MEK6 kaskadı da yüksek afinite ile p38'i aktive etmektedirler. MEK6 p38'in tüm izoformlarını aktive ederken, MEK3 sadece p38 α ve p38 β 'yı aktive etmektedir. MEK3 ve 6 ERK ya da JNK kaskadında görev almamaktadır. MEK4 ise hem p38 kaskadında hem de JNK kaskadında görülmektedir (Brancho *et al.*, 2003).

p38'in aktivasyonunu sağlayan bölgede korunmuş Thr-Gly-Tyr (TGY) bölgesi gözlenmiştir. Fosforlanarak aktive duruma geçen TGY motifi ERK ve JNK'dan farklı yapıdadır ve farklı substratlara (MEK3 ve MEK6) spesifik özellik göstermektedir (Wilson *et al.*, 1996).

Durgun hücrede p38 hem sitoplazmada hem de nükleusta bulunmaktadır. Fakat uyarılmış hücrede p38'in hücreSEL lokalizasyonu henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Bazı çalışmalara göre hücrenin uyarılmasını takiben p38'in sitoplâzmadan nükleusa geçtiği belirtilmesine karşın diğer çalışmalarda aktive olmuş p38'in sitoplazmada bulunduğu belirtilmiştir (Bobick and Kulyk 2008, Raingeaud *et al.* 1995, Ben-Levy *et al.*, 1998). p38 aktivitesi immün cevap ve inflamasyonda kritik rol oynamaktadır. Makrofajların, nötrofillerin ve T hücrelerin aktivasyonunda p38 görev almaktadır. Solunumla ilgili oluşan yarılmalarda, kemotaksisde, eksositoz, yapışma ve apoptozisde makrofajların ve nötrofillerin fonksiyonel cevaplarında ve T hücrelerin farklılaşmasında, apoptozisde ve gamma interferon üretiminde rol oynamaktadırlar (Ono and Han, 2000). İmmün sistemde rol oynayan bu cevabın oluşması sırasında p38 birçok hücreSEL hedef proteinleri fosforile etmektedir. Bu proteinler arasında, sitozolik fosfolipaz A2, mikrotübül bağlantılı protein Tau ve transkripsiyon faktörleri ATF1 ve 2, MEF2A, Sap-1, Elk1, NFκB, Ets-1 ve p53 yer alır (Kyriakis and Avruch 2001).

Ayrıca mitojen ve stres aktive protein kinaz 1 ve 2 (MSK), MAPK- etkileyen kinazlar 1 ve 2 (MNK), MAPK-aktive olan protein kinazlar 2 ve 3 (MK) p38'in aktive ettiği diğer proteinlerdir.

4.3.c-Jun NH2- Terminal Kinase (JNK) AİLESİ

İlk olarak sikloheksemid uygulanan farelerden 54-kDa büyüklüğünde izole edilerek tespit edilmiştir (Kyriakis and Avruch, 1990). Kısa süre sonra c-Jun fizyon proteinlere yüksek adsorpsiyon göstermeleri ile tanımlanmışlar ve 46 kDa ve 54 kDa ağırlıklarında oldukları belirtilmiştir (Hibi *et al.*, 1993). Yapılan çalışmalarda üç genin kodladığı 10 veya daha fazla farklı formda protein belirlenmiştir. JNK1, JNK2 ve JNK3 %85 oranında benzerlik göstermektedirler (Gupta *et al.*, 1996). JNK ailesi üyeleri; UV radyasyonu, büyüme faktörlerinden yoksun ortamda bulunma, DNA'ya zarar veren ajanlar ve bazı G protein bağlı reseptörler ile aktive olurlar (Garcia-Velasco *et al.*, 2002; Kyriakis and Avruch, 2001).

Diğer MAPK ailesi üyelerinde olduğu gibi JNK ailesi üyeleri de fosforilasyonda aktivasyonu sağlayan iki tirozin ve treonin'den oluşan iki alan içermektedir. Aktivasyon bölgesinde JNK aktivasyon bölgesi olan Thr-Pro-Tyr (TPY) prolin ayırıcı rol oynamaktadır. JNK kaskadında MEK4 ve MEK7 'nin aktivasyonunu diğer kinaz proteinler olan MEKK1-4, MLK2 ve -3, Tpl-2, DLK, TAO1 -2, TAK1 ve ASK1 -2 takip edebilir. JNK'lar uyarılma sonrasında sitoplazmadan nükleusa geçerler. Transkripsiyon faktörü olan c-Jun Ser63 ve Ser73 bölgesinden fosforile olarak aktif duruma geçer (Weston and Davis, 2002). Ayrıca ATF-2, NF-ATc1, HSF-1 ve STAT3 transkripsiyon faktörlerinin de JNK lar tarafından aktif duruma getirildiği gösterilmiştir (Chen *et al.*, 2001, Kyriakis and Avruch 2001).

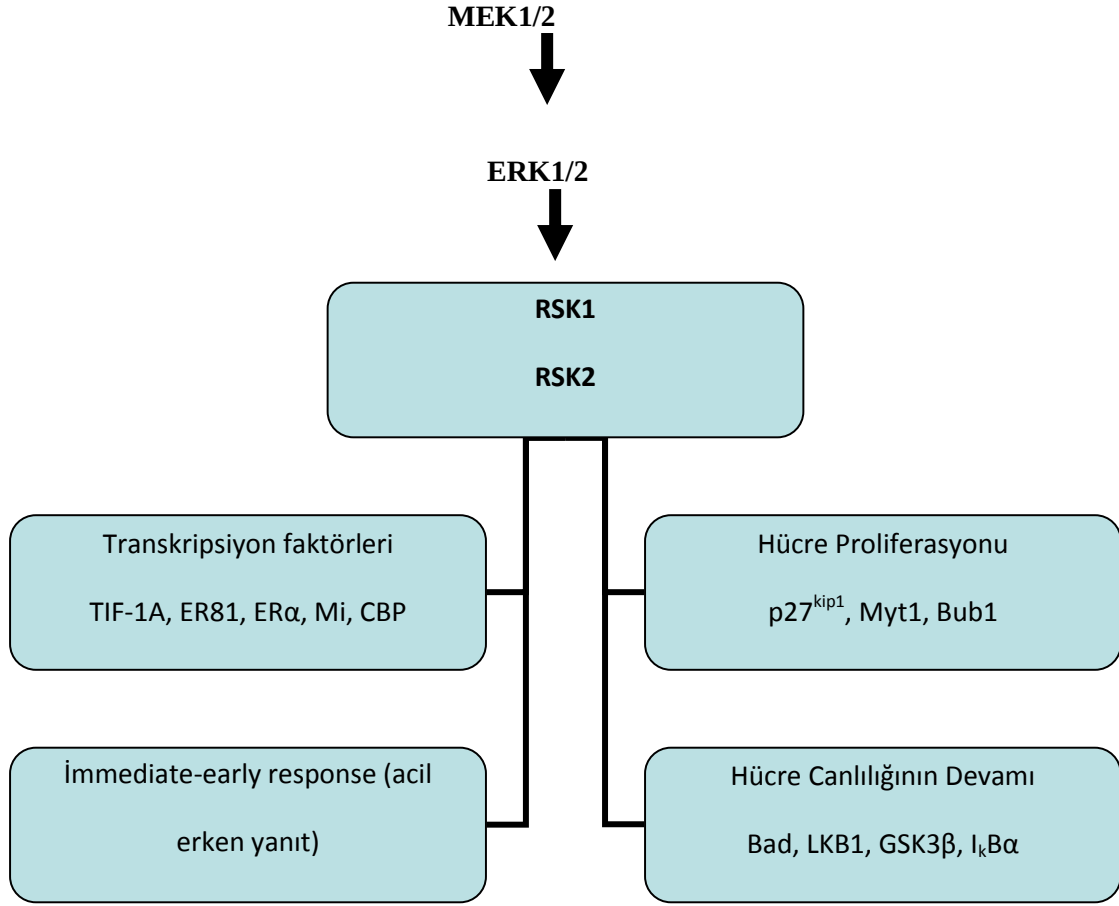
4.4. MAP Kinaz Sinyal İletim Yolunda Aktive Olan Protein Kinazlar ve Hücrenin Cevabı

Mitojen Aktive Protein Kinaz sinyal iletim yolunda sinyalin izlediği kaskada bağlı olarak farklı protein kinazlar fosforlanarak aktive olmakta ve/veya transkripsiyonal faktörler aktive olabilmektedir.. Bu etkileşim hücrenin cevabının oluşmasında etkindir. Kaskad ERK1/2, p38 veya JNK ailesinin aktivasyonunda farklı veya ortak kinazlar aktive olmaktadır. ERK1/2 kinaz kaskadının iletiminde RSK1, RSK2, RSK3, RSK4 ve MNK2 aktive olmaktadır. Stres ile uyarımla aktive olan p38 kinaz kaskadında MK2, MK3 ve bazen MK5 aktive olmakta fakat MSK1, MSK2 ve MNK1 hem ERK1/2 hem de p38 kinaz kaskadında aktive olmaktadır.

4.4.1. RSK Alt Grubu Kinaz Ailesi

İlk olarak *Xenopus laevis* özütünden izole edilerek RSK1 tanımlanmıştır. RSK1 40S Ribozomal alt ünite proteini S6'nın fosforlanarak aktive olmasını sağlamaktadır (Erikson and Maller, 1985). İnsanda RSK'nın dört izoformu (RSK1, RSK2, RSK3 ve RSK4) tanımlanmıştır, bu formlar %73-80 oranında homoloji göstermektedir. RSK'nin bütün izoformlarında C-terminal de bulunan D domain bölgesi ERK1/2'ye bağlanımda ve aktivasyonunda rol oynamaktadır (Smith *et al.*, 1999). RSK'da bulunan D domain bölgesi Leu-Ala-Gln-Arg-Arg aminoasit dizisini içermektedir. Bu dizilimde ERK ile bağlanımda Leu ve Arg anahtar rol oynamaktadır (Roux *et al.*, 2003). HeLa, COS-7 ve HEK293 hücre soylarında durgun fazda RSK1,RSK2,RSK3 ve ERK1/2'nin sitoplâzmada bulunduğu uyarım sonrasında bu proteinlerin bir kısmının nükleusa geçtiği gösterilmiştir (Lenormand *et al.*, 1993, Richards *et al.*, 2001, Vaidyanathan *et al.*, 2003). RSK'ların ve ERK1/2'nin aktivasyonu sonrasında çok sayıda transkripsiyon faktörü aktive olmaktadır. Serum yanıt faktör (SRF), cAMP cevap element-bağlanma protein (CREB) gibi immediate-early genlerin ürünleri olan c-Fos, c-Jun ve Nur77 RSK tarafından fosforile olmaktadır.c-Fos'un hiperfosforile olduğu durumda RSK ve ERK proteinlerinin sürekli aktif durumda olduğu gösterilmektedir (Murphy *et al.*, 2004).

Hücre siklusunda ERK ve RSK'lar genellikle G2 fazda etkindirler. Erk1/2'nin hücre siklusundaki rolü genellikle *Xenopus* oosit maturasyonunda çalışılmıştır. İmmatür oositler ilk mayotik bölünmede G2 fazında duraklama göstermektedir (Nebreda and Ferby *et al.*, 2000). Oositin G2/M fazında RSK2 Myt1'in C terminaline bağlanarak ve fosforile ederek aktivasyonunu sağlamaktadır (Shimamura *et al.*, 2000). Hücre canlılığını devam ettirmede farklı hücrelerde RSK'ların rol oynadığı gösterilmiştir. RSK2'nin primer kortikal nöronlarda hücrenin canlılığını devam ettirmede rol oynadığı gösterilmiştir. Apoptozisde proapoptotik olarak rol oynayan Bad, RSK2 tarafından Ser112'den fosforile olmakta ve hücrede apoptotik iletim baskılanmaktadır. RSK2'nin proapoptotik Bad üzerine etki ederek baskılaması hem nörotrofik faktör üzerinde hem de hematopoietik hücre soyunda gösterilmiştir (Bonni *et al.*, 1999). Şekil 4.2'de RSK'nın hücre üzerine etkisi gösterilmiştir.

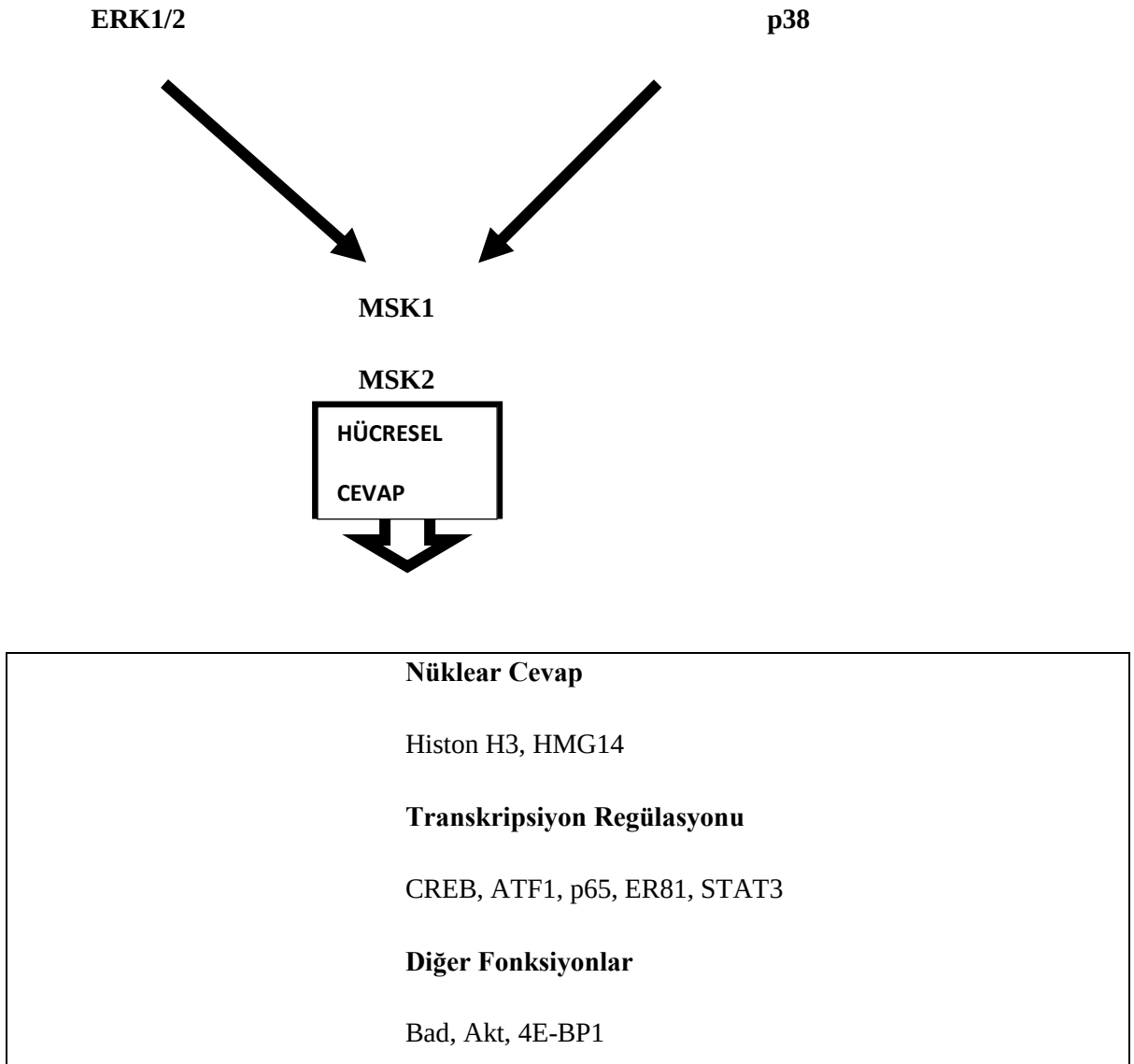


Şekil 4.2: RSK aktivasyonu ve hücrel cevap (Roux *et al.*, 2004)

4.4.2. MSK Alt Grubu Kinaz Ailesi

Mitojen ve Stres Aktive Kinaz (MSK) ailesi ilk olarak MSK1 ve MSK2'nin 1998 yılında tanımlanması ile belirlenmiştir (Deak *et al.*, 1998). MSK'lar RSK'lar ile %40 oranında homoloji göstermekte ve MSK grubunun üyeleri MSK1 ve MSK2 arasında ise %73 oranında homoloji belirlenmiştir. RSK'lar sitoplazmada bulunmasına karşın MSK'lar durgun hücrede nükleusta lokalize olmaktadır. MSK'lar yapısal olarak RSK' larda olduğu gibi iki katalitik domain içermekte ve C – ve N- terminal bölgesi bulunmaktadır. MSK1 ve 2 C- terminalde bulunan D domainde Leu-Ala-Lys-Arg-Arg-Lys aminoasit dizilimine sahiptirler (Tomas-Zuber *et al.*, 2001). MSK1 ve MSK2, ERK1/2 ve p38 tarafından aktive olmaktadır (Şekil 4.3). Fakat JNK tarafından *in vivo* ortamda aktivasyon gerçekleşmemektedir (Pierrat *et al.*, 1998; Deak *et al.*, 1998). Transkripsiyon faktörü olan CREB MSK1 ve 2 tarafından fosforile edilmektedir. RSK1'inde fosforile ettiği bu transkripsiyon faktöründe RSK1'in MSK1'e göre daha küçük K_m değerlerinde etken olduğu belirtilmektedir (Roux *et al.*, 2004). MSK1 ve 2 bulunmayan fare çalışmalarında stres ile

indüklenen CREB ve ATF1 transkripsiyon faktörleri tamamıyla bozuk olarak tespit edilmişlerdir. Mitojenle indüklenen MSK1 ve 2 bulunmayan hücrelerde CREB ve ATF1 kısmen inaktif bulunmuş ve bu hücrelerde RSK aktivesi hücreyel aktivitede rol oynamış olmasına karşın *c-fos*, *juna* ve *erg1* genlerinde %50 oranında azalma ve stres ile uyarıma cevap oluşmamaktadır (Wiggin *et al.*, 2002). MSK1 ve 2 tümör nekrozis faktör NF-κB fosforilasyonunda rol oynamaktadır. MSK1 ve 2 bulunmayan fare fibroblast çalışmalarında hücrenin strese cevabında rol oynaması beklenen NF-κB transkripsiyon faktörü görev yapmamıştır (Vermeulen *et al.*, 2003). UV radyasyon uygulaması sonrasında MSK1 ve 2'nin hücrede Akt ve Bad fosforilasyonunda rol aldığı gösterilmiştir (She *et al.*, 2002; Nomura *et al.*, 2001).

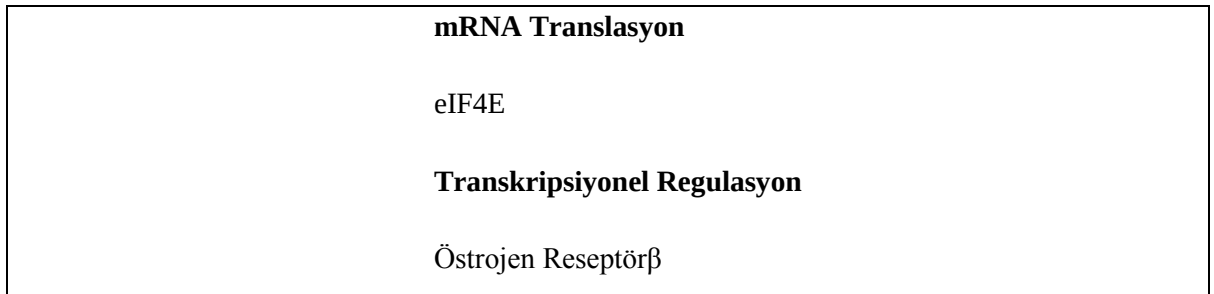
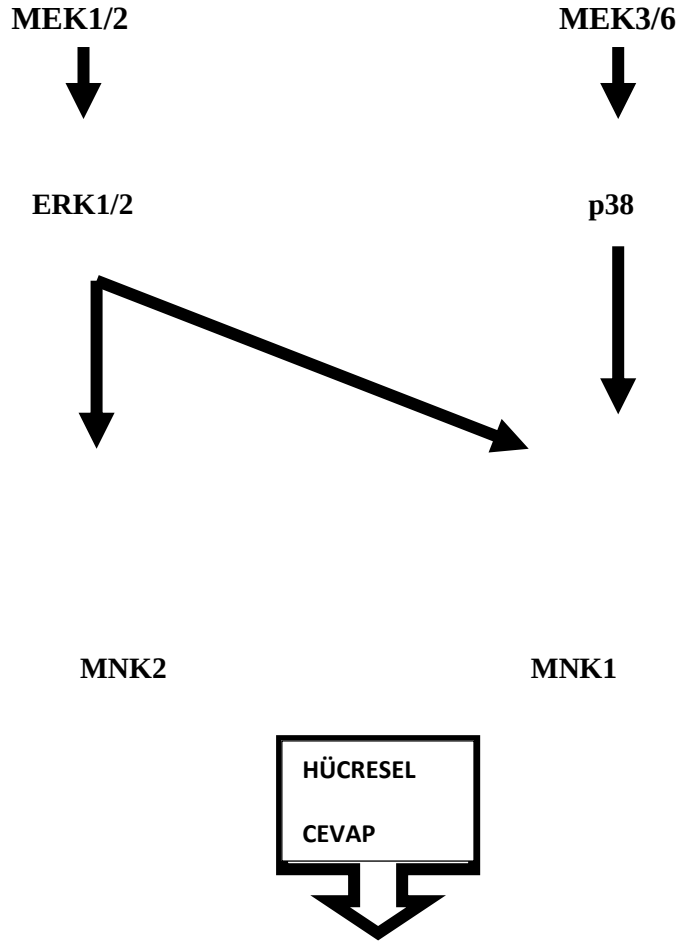


Şekil 4.3: ERK ve p38'in MSK etkisi ve hücre cevabı (Roux *et al.*, 2004)

4.4.3.MNK Alt Grubu Kinaz Ailesi

MAPK-bağılantılı kinazlar (MNK) 1 ve 2, ERK2'ye bağlanan proteinlerin araştırılması sonucunda ilk olarak 1997 yılında tanımlanmışlardır (Waskiewicz *et al.*, 1997). MNK1 ve MNK2 arasında %70 oranında aminoasit (aa) diziliminde benzerlik saptanmıştır. Farklılık C terminal bölgesinde bulunmaktadır. *mnk1* geni 424 aa. dizilimli tek izoform meydana getirirken, *mnk2* geninin 465 aa. dizilimli MNK2A ve 414 aa. dizilimli MNK2B olarak farklı 2 izoformu bulunmaktadır (Slentz-Kesler *et al.*, 2000). MNK1 ve MNK2A sitoplâzmada bulunmasına karşın MNK2B durgun hücrede nükleusta bulunmaktadır.

MNK ailesinin fosforilasyonunda ERK ve p38 kaskadı rol oynamaktadır. ERK1/2 MNK'nın her iki izoformunu da fosforile edebilirken, p38 yalnızca MNK1'i aktive etmektedir (Waskiewicz *et al.*, 1997) (Şekil 4.4). MNK1 durgun hücrede düşük bazal aktivite göstermesine karşın stres ile uyarılmış hücrede artış göstermektedir. Ökaryot başlatma faktör 4F (eukaryotic initiation factor 4F, eIF4F) kompleksi hücre büyümesinde ve hücre proliferasyonunda önemli rol oynamaktadır. eIF4F, mRNA'ların 43S öncül-başlangıç kompleksini tanımasını sağlar. Bu komplekse sonra eIF4B bağlanır. eIF4B, eIF4F'deki *RNA helikazı* aktifleştirir. Helikaz, mRNA'daki ikincil yapıları çözüp küçük alt birime bağlanmasına yardım eder. Yapılan bir çalışma mitojen ve stres uyarımı ile eIF4E aktivasyonunun ERK ve p38 kaskadı ile gerçekleşebildiğini göstermiştir (Flynn *et al.*, 1997). MNK1 ve MNK2A'nın bağlanamamasına karşın MNK2B östrojen reseptör β 'ya bağlanma yetisine sahiptir. Steroid östrodiol MNK2B artışına bağlı olarak artış göstermektedir (Slentz-Kesler *et al.*, 2000). Aşağıdaki diyagramda (Şekil 4.4) MNK sistemi ve hücresel cevap kısaca gösterilmiştir.



Şekil 4.4: MNK sistemi ve hücresel cevap

5.KONUyla İLGİLİ ÇALIŞMALAR

NaBu'nın hücre proliferasyonuna, hücre siklusuna ve apoptozise etkileri çeşitli kanser hücrelerinde incelenmiştir. NaBu'nın endometrial hücrelere etkisi ile ilgili detaylı çalışma çok azdır.

Prostat kanser hücre soylarından androjen reseptörü [AR] pozitif (+) LNCaP hücreleri ve AR (-) PC-3 hücreleri ile yapılan çalışmada, bu hücrelere sodyum bütirat ve retinamid N-(4-hydroxyphenyl)-retinamide (4-HPR)'in birlikte ve ayrı ayrı muamelesi sonrasında, hücrelerin büyümesinde konsantrasyona bağlı olarak duraklama sağladıkları gösterilmiştir. Hücrelere 2 mM NaBu ve/veya 4-HPR ile 3 saatlik muamele sonrasında, (1M LNCaP, 3M PC-3), bu hücrelerin MAP Kinaz sinyal iletim yolunda ERK, p38 ve JNK aktivitelerindeki değişimler incelenmiştir. PC-3 hücrelerinde p38 aktivasyonunda fark görülmemesine karşın, LNCaP hücrelerinde, NaBu uygulanması sonrasında p38 aktivasyonunda artış tespit edilmiştir. Elde edilen diğer bir bulgu da her iki kimyasalın ayrı ayrı ve ikisinin birden uygulanması sonrasında ERK'in baskılanmasıdır. JNK iletim yolu, kimyasal maddeler ayrı ayrı kullanıldıklarında aktif durumda iken birlikte kullanımda JNK aktivasyonunun baskılandığı belirlenmiştir (Kuefer *et al.*, 2007) .

K562 kronik miyeloid lösemi hücreleri ile yapılan çalışmada 3 gün 0,3mM NaBu ile muamele edilen hücrelerde, p38 aktivitesinde artış ve hücre ölümünde kontrol grubuna göre anlamlı fark olduğu saptanmıştır (Chen *et al.*, 2008).

Chen ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptığı bir diğer çalışmada, HDACI olan NaBu'nın Mezenkimal kök hücre (MSC) üzerine etkisi incelenmiştir. MSC hücrelerinin farklı büyüme ortamlarında osteoblast ve adiposit hücrelerine dönüşme yeteneği bulunmaktadır. Farklılaşma sırasında Runx2 ve PPARc2 transkripsiyon faktörleri rol oynamaktadır. NaBu'nın Runx2 ekspresyonunu arttırdığı, osteogenik farklılaşmaya sebep olduğu, bunun yanında adipogenik farklılaşmayı ve PPARc2 ekspresyonunu baskıladığı belirtilmiştir. Bu farklılaşmada rol oynayan iletim sistemi incelendiğinde, hücrelerde ERK yolağının NaBu uygulamasını takiben aktive olduğu ve ERK inhibitör uygulaması sonucunda osteogenik aktivasyonun baskılandığı belirlenmiştir (Chen *et al.*, 2007).

Sodyum bütiratın MAP Kinaz sinyal iletim yoluna etkisinin incelendiği bir diğer çalışmada ise onkogenik ras-transforme sıçan karaciğer epitelyum hücreleri kullanılmıştır. Hücrelerin 48 saat NaBu ile muamelesi sonrasında sinyal iletim sistemi incelenmiş ve ERK1/2'nin azaldığı, p38 sinyal iletim sisteminin arttığı ancak JNK iletim sisteminin etkilenmediği belirlenmiştir (Jung *et al.*, 2005a).

İnsan kolon kanseri hücre soyu olan LS174T hücreleri ile yapılan çalışmada ise hücrelere farklı konsantrasyonda NaBu eklenerek 2 gün sonrasında incelenmiştir; 1mM ve 2mM NaBu konsantrasyonlarında apoptotik DNA fragmantasyonu belirlenmemiş, flow sitometri analizlerinde hücre siklusunda duraklama tespit edilmiştir. Aynı çalışmada, 1mM NaBu konsantrasyonunda serumdan arındırılmış büyüme medyumunda hücrelerin %90'nın G0/G1 fazında, %6'sı S fazında, %4 G2/M fazında belirlenmiştir. Serum içeren medyum ile analiz sonrasında ise hücrelerin %84'ü G0/G1 fazında, %11'i S fazında ve %5'i G2/M fazında tespit edilmiştir. 2mM NaBu konsantrasyonunda yapılan flow sitometri analizinde ise hücrelerin %91 G0/G1 fazında, %3'ü S fazında, %6'sı G2/M fazında belirlenmiştir. Sonuç olarak, NaBu'nun hücreleri apoptotik yolla değil hücre döngüsü esnasında duraklamaya yönlendirdiği gösterilmiştir (Hatayama *et al.*, 2007).

Endometriozis ve MAPK sinyal iletim yolu üzerine çalışma, 2004 yılında Yoshino ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Endometriozisin oluşumunda inflamatuvar etkenlerin rol oynamakta olduğu bilinmektedir ve yapılan çalışmada, ötopik ve ektopik endometrial hücrelerin, interlokin-1 β , tümör nekrozis faktör α ve H₂O₂ ile muamelesi sonrasında ERK, p38 ve JNK iletim sistemleri incelenmiştir. Bu çalışmada interlokin-1 β , tümör nekrozis faktör α ve H₂O₂ kimyasallarının üçü de kontrol grubuna göre artmış ERK, p38 ve JNK aktivasyonu belirlenmiştir. Ektopik ve ötopik hücreler arasında yalnızca endometriotik dokudan yapılan hücre kültüründe fosforile p38 oranı anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (Yoshino *et al.*, 2004).

Çalışmamızda NaBu'nun endometriozis hücre kültürlerinin proliferasyonuna, MAPK sinyal ileti yollarına etkileri araştırılmaya çalışılmıştır. Bu konuda çalışma ilk kez yapılmaktadır.

6.MATERYAL VE METOD

6.1.Materyal

6.1.1.Kimyasal Maddeler

D-MEM:F-12(1:1) (Gibco,32500-035), Foetal Bovine Serum (Gibco,10108-165), PBS Dulbecco's (Gibco,14190-094), Penisilin/Streptomisin (Gibco,15140-122), Trypsin-EDTA (10X) (Sigma,T4049), Dimetil sülfoksit (Sigma,D5879), Trypan blue solution (%0,4) (Sigma, T8154), Cell titer 96 A Queous one Solution Assay (MTS Kit) (Promega, G3558B), Sodyum bikarbonat (Sigma,S8875), Sodyum klorür (Sigma,S3014), Sodyum aset at (Sigma,S28), Phenol red (Merck,107241), Bromophenol blue (Sigma,B0126), Et-Br (Sigma,E7637), Potasyum klorür (Sigma,P5405), Trizma base (Sigma,T6066), APS (Sigma,A9164), SDS (Sigma,L3771), Gliserol (Sigma,G5516), TritonX (Sigma,T8767), Tween 20 (Sigma,P9416),Pepstatin A(Sigma,P5318), Aprotinin (Sigma, A3428), Leupeptin (Sigma,L2023), β -gliserolfosfat (Fluka,50020), Phenylmthylsulfonyl fluoride (Sigma,P7626), Akrilamid/Bisakrilamid (Sigma,A3699), Temed (Sigma,T-7024), p-ERK (Santa Cruz), p-JNK (Santa Cruz), Aktin (Santa Cruz), Sodyum Bütirat (Sigma Aldrich B5887).

6.1.2.Cihazlar

CO₂ inkübatörü (Thetmo Forma), Işık mikroskobu (Nicon Inverted Microscope), Sıcak su banyosu (Memmert), Mikro pipetör (2-200 μ l) (Gilson, Eppendorf), Multi pipetör (200 μ l) (Gilson), Elisa Reader (ELx800, Universal Microplate Reader, BIO-TEK INS.), Santrifüj (+4°C, Biofuge 15 R Heraey), Laminar akımlı kabin (Heraeus), Otoklav (Hirayama, Hiclive, HVE-50), Buzdolabı (+4°C , -20°C ve -80°C derin dondurucu), Manyetik karıştırıcı (Ikamag RH), Vorteks (IKA), Pipet tabancası (Gilson), Steril tek kullanımlık polistren kaplar (Nunc); Kültür kapları (25cm², 75cm², 150cm²), Santrifüj tüpleri (15ml ve 50ml), Dondurma tüpleri, Petri kapları, Thoma lamı (Neubauer), Enjektör (1-20cc) (Set), Cam pipet (Iso-Lab), 0,22 μ filtre (Schleicher&Schuell)

6.1.3.Kullanılan Solüsyonlar

1) 10X D-MEM:F-12: 12 gr D-MEM:F-12, 90 ml steril distile su içinde çözülerek toplam hacim steril distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. 0,22 µ por çaplı filtre ile steril edilerek +4°C'de saklanmıştır.

2) 10X NaHCO₃: 2,44 gr NaHCO₃, 90 ml steril distile suda çözülerek toplam hacim steril distile su eklenerek 100 ml'ye tamamlanmıştır. 0,22 µ por çaplı filtre ile steril edilerek +4°C'de saklanmıştır.

3) Besiyeri: %10 FBS (Fetal Bovine Serum), 50 ml 10X D-MEM:F-12, 50 ml 10X NaHCO₃ (Sodyum bikarbonat) ve %1 Penisilin-Streptomisin steril distile su eklenerek hacim 500 ml'ye tamamlandıktan sonra pH 7,2-7,4'e %9,2'lik NaHCO₃ veya 1N HCl ile ayarlanarak, +4°C'de saklanmıştır.

4) 1X Stok Medyum: %90 FBS içine % 10 5 ml DMSO eklenerek +4°C'de saklanmıştır.

5) Puck's Saline A Solüsyonu: 0,4 gr NaCl, 0,2 gr KCl, 0,5 gr D-Glikoz, 0,5 ml Fenol kırmızısı (% 0,5'lik solüsyon) steril distile su ile 500 ml'ye tamamlanarak 0,22 µ por çaplı filtre ile steril edilmiş ve pH 7,2'ye ayarlanmıştır ve +4°C'de saklanmıştır.

6) 1X Tripsin-EDTA Solüsyonu: Puck's saline A solüsyonuna, %10 10X Tripsin-EDTA solüsyonundan eklenerek pH 7,2-7,4'e ayarlanarak, +4°C'de saklanmıştır.

7) % 9,2'lik NaHCO₃: 9,2 gr NaHCO₃ 90 ml steril distile suda çözülerek toplam hacim steril distile su eklenerek 100 ml'ye tamamlanmıştır. 0,22 µ por çaplı filtre ile steril edilerek +4°C'de saklanmıştır.

8) 1 N HCl: 8,28 ml % 37'lik HCl'ye, 91,72 ml steril distile su eklenerek 0,22 µ por çaplı filtre ile steril edilmiş ve +4°C'de saklanmıştır.

9) 1X PBS (Phosphate Buffered Saline): 137mM NaCl, 1,47mM KH_2PO_4 , 8,26mM NaH_2PO_4 , 500 ml steril distile suda hazırlanmıştır. 0,1M'lık NaHCO_3 ile pH 7,3'e ayarlanarak, 0,22 μ por çaplı filtre ile steril edilerek küçük hacimlerde -20C'de saklanmıştır.

10) 1M Tris: 1M Tris- HCl steril distile su ile hazırlanarak 0,1M NaHCO_3 ile pH 8'e ayarlanmış ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

11) 1M NaCl: 11,688 g NaCl son hacim 200 ml olacak şekilde distile suda çözünmüş ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

12) 1M MgCl_2 : 4,761 g MgCl_2 son hacim 50 ml olacak şekilde distile su ile çözünmüş ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

13) 1M TrisBase: 24,22 g Trisma Base son hacim 200 ml olacak şekilde distile suda çözünmüş ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

14) 0,5M TrisHCl: 15,76 g son hacim 200 ml olacak şekilde distile suda çözünmüş, pH 6,8'e ayarlanarak oda sıcaklığında saklanmıştır.

15) %10 APS: 1 g APS 10 ml distile su ile çözünmüş 500 μ l olacak şekilde ependorf tüplerine alınarak -20°C 'de saklanmıştır.

16) %10 SDS: 10 g SDS son hacim 100 ml olacak şekilde distile suda çözünmüş ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

17) %10 Gliserol: 10 ml gliserol PBS ile 100 ml'e tamamlanmış ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

18) %1 Triton X: 0,5 ml Triton X 49,5 ml PBS ile 50 ml'e tamamlanmış ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

19) %10 Tween 20: 5 ml Tween 20 45 ml distile su ile 50 ml'e tamamlanmış ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

20) 1X TBS: 10mM Tris pH 8.0, 150mM NaCl hazırlanarak oda sıcaklığında saklanmıştır.

21) Protein Yükleme Solüsyonu: %10 SDS %23, 0,5 M Tris pH: 6,8 6,25 mM, 1 M DTT 10 mM, % 10 Gliserol , %0,01 Bromofenol blue çok az miktar, dH₂O olarak hazırlanarak oda sıcaklığında saklanmıştır.

22) Lizis stok solüsyonu: 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂ ,% 10 Gliserol, 20 mM Tris (pH:7.5-8), %1 Triton X-100, dH₂O içinde 10µl Pepstatin, 10µl Leupeptin, 10µl PMSF, 10µl Aprotinin, 10µl β-gliserolfosfat, 2µl Sodyum orthovanadate eklenerek +4°C saklanmıştır.

23) Protein Bloklama Solüsyonu (TTM): 0,5 ml %10 Tween 20 ve 5 g süt tozu, 1X TBS ile 100 ml'ye tamamlanarak +4°C saklanmıştır.

24) Membran yıkama solüsyonu: 500 µl %10 Tween 20, 49,5 µl 1X TBS ile 50 ml'ye tamamlanarak oda sıcaklığında saklanmıştır.

25) Yükleme Solüsyonu: 4 ml % 10 SDS, 0,5M Tris pH:6,8 dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanarak oda sıcaklığında saklanmıştır.

26) Ayırma Solüsyonu: 4 ml % 10 SDS, 1,5M Tris pH:8,8 dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanarak oda sıcaklığında saklanmıştır.

27) Yükleme Jeli (% 4,5): 3 ml bisakrilamid, 12 ml distile su, 5 ml yükleme solüsyonu, 60 µl % 10 APS ve 20 µl TEMED kullanılarak hazırlanmıştır.

28) Ayırma Jeli (%12): 16 ml bisakrilamid, 14 ml distile su, 10 ml ayırma solüsyonu, 80 µl % 10 APS ve 20 µl TEMED kullanılarak hazırlanmıştır.

29) Proteaz inhibitörleri

Pepstatin A: 0,0003 g Pepstatin A 3 ml metanolde çözünmüş ve 300 µl olacak şekilde epondorf tüplerine alınarak -20°C 'de saklanmıştır.

Aprotinin: 0,0003 g Aprotinin 3 ml distile suda çözünmüş ve 300 µl olacak şekilde epondorf tüplerine alınarak -20°C 'de saklanmıştır.

Leupeptin: 0,0003 g Leupeptin 3 ml distile suda çözünmüş ve 300 µl olacak şekilde epondorf tüplerine alınarak -20°C 'de saklanmıştır.

β-gliserol fosfat: 7,653 g β-gliserol fosfat 5 ml distile su ile çözülerek final konsantrasyon 5M'a ayarlanmıştır. Çözelti buzda hazırlanmış ve 500 µl olacak şekilde epondorf tüplerine alınarak -20°C 'de saklanmıştır.

Phenylmthylsulfonyl fluoride(PMSF): 0,087 g PMSF 10 ml distile suda çözülerek final konsantrasyon 50mM'a ayarlanmıştır. Çözelti buzda hazırlanmış ve 500 µl olacak şekilde epondorf tüplerine alınarak -20°C 'de saklanmıştır.

Sodyum ortovanadate: 0,92 g sodyum ortovanadat 5 ml distile suda çözünmüş ve HCl ile pH:10'a ayarlanmıştır. Konsantrasyon 0,5 M olarak ayarlanmış ve 500 µl olacak şekilde epondorf tüplerine alınarak -20°C 'de saklanmıştır.

30) 10X Rezervuar Tamponu: 1,92 M Glisin, 250 mM Tris pH:8, %1 SDS ve distile su kullanılarak hazırlanır oda sıcaklığında saklanır.

31) 1X Western blot buffer: 200 ml 10X Rezervuar buffer, 200 ml Metanol (%10 metanol) dH₂O ile

2000 ml'e tamamlanır.

32) **Jel Boyama Solüsyonu:** 0.25 g Coomassi Brilliant Blue 125 ml metanolde çözülür. Üzerine 25 ml asetik asit ve 100 ml distile su eklenir.

33) **BCA A Solüsyonu:** 1 g sodium bicinchoninate (BCA), 2 g sodium carbonate, 0.16 g sodium tartrate, 0.4 g NaOH, 0.95 g sodium bicarbonate, 100 ml dH₂O, 10 M NaOH kullanılarak pH:11.25'e ayarlanır.

34) **BCA B Solüsyonu:** 0.4 g bakır sülfat , 10 ml dH₂O içinde çözülür.

35) **Sodyum Bütitrat:** 100mM final konsantrasyonda steril distile su içinde çözülerek stok hazırlanmıştır.

6.1.4. Antikorlar: p-ERK sc 7383 (Santa Cruz), Aktin sc 8432 (Santa Cruz), JNK2 sc 7345 (Santa Cruz), p38 (Santa Cruz, sc 7972), p-JNK sc 6254 (Santa Cruz), p-p38 9212 (Cell Signaling), İkincil antikor sc 2005 (Santa Cruz)

6.2. Metod

6.2.1. Primer Kültür ve Hücre Soyu

Doku örnekleri toplanması, bireylerin yaşları, kökenleri ve etik kurallara bağlı kalınarak yapılmıştır. Dört adet endometriozis hastası ve dört adet normal bireylerden alınan sekiz farklı dokudan primer kültür yapılmıştır. Primer kültürler haricinde İnsan Endometrial adenokarsinom hücre soyu olan Ishikawa hücreleri İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Bilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Ayhan Bilir tarafından bölümümüze hediye edilmiştir.

Ameliyathanede steril şartlarda alınan dokular 5 ml. HBSS solüsyonu içine alındıktan sonra 2 steril bistrü yardımıyla macun kıvamına gelinceye kadar fiziksel olarak parçalanmıştır. Daha sonra doku parçaları tüplere aktararak 10 ml HBSS içinde 10 mg kollojenaz (Collagenase B) 20 mg DNase I solüsyonu 1:1 oranında doku parçaları üzerine eklenerek 37 °C de ki çalkalamalı su banyosunda 30 dakika enzim ile muameleye bırakılmıştır. Bu işlemin takibinde üzerilerine 1-1,5 ml D-MEM:F-12 besiyeri eklenmiş ve 1500 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı atılarak yıkama işlemi tekrarlanmıştır. Elde edilen pellete D-MEM:F-12 besiyeri eklenerek 25 cm²’lik flakslara ekim yapılmıştır. Invert mikroskop altında hücrelerin yapışmaları kontrol edilmiş ve besiyerleri yenilenmiştir.

İnsan endometrial adenokarsinom hücre soyu olan Ishikawa hücreleri, yaklaşık 20 yıldır çalışılmaktadır. Ishikawa hücreleri östrojen ve progesteron reseptörlerine sahiptir, bu sebeple reproduktif biyoloji ve moleküler biyoloji çalışmalarında kullanılmaktadır.

6.2.2.Hücre Stoklama

Tripsinlenerek petri yüzeyinden kaldırılan hücreler 1000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilerek besiyeri uzaklaştırılmış ve dondurma medyum içinde süspanse edilerek 1,5 ml’lik kriyo tüplere alınmış ve -80C’de saklanmıştır. Daha sonra sıvı nitrojene aktarılmıştır.

6.2.3.Hücre Morfolojilerinin Değişiminin Belirlenmesi

Ishikawa hücre soyu hücreleri, normal endometrium ve endometrioma primer hücre kültüründe yetiştirilen hücreler NaBu’ın hücreler üzerine morfolojik etkilerini gözlemek amacı ile 96 kuyucuklu plate’e 100 µl’de 1x10³ hücre olacak şekilde ekim yapılmış, yapışmasına izin verilmiştir. Daha sonra NaBu eklenerek 24, 48, 72 ve 96. saatlerde mikroskop altında 4x10’luk büyütmede hücrelerin fotoğrafları çekilmiştir

6.2.4.MTS ile NaBu Etkisinin Belirlenmesi

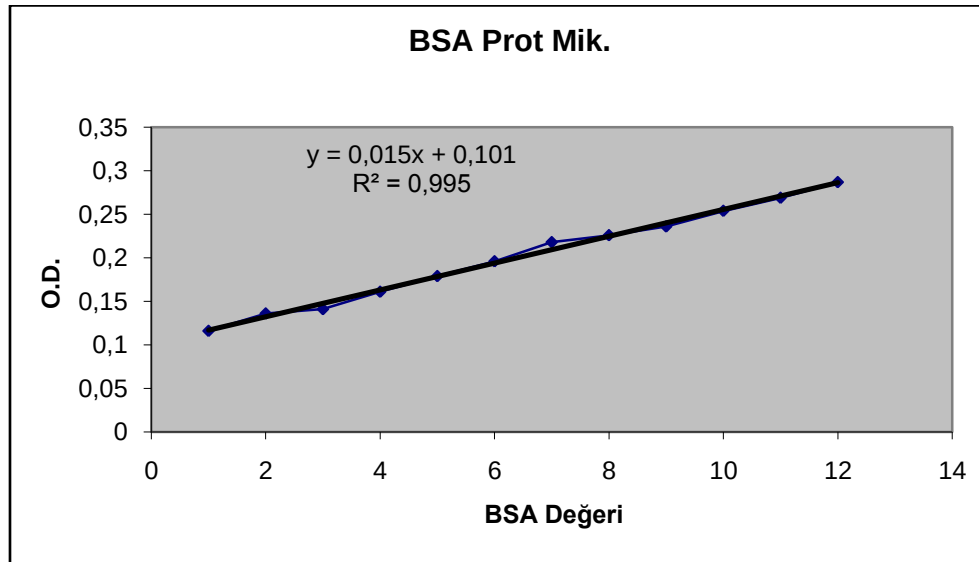
Her bir kuyucukda 1×10^4 hücre/ml olacak şekilde 96 kuyucuklu plağa duplike olarak ekim yapılmıştır. Hücrelerin Lag periyotları için 24 saat beklendikten sonra 1, 5, 10, 15, 30 mM NaBu eklenerek 0-96 saatler arası hücre büyümleri doza ve zamana bağlı olarak incelenmiştir.

Her kuyucuğa 20µl MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium salt) bileşiği eklenerek 2 saat inkübasyon takibinde 490nm dalga boyunda mikropate okuyucuda değerlendirilmiştir ve standart sapmalar hesaplanarak, ortalamalar hesaplanmış ve Microsoft Excel programında grafikler çizilmiştir.

6.2.5. Protein İzolasyonu

Hücreler 5 ml besiyeri içeren 60x20 petrilere 5×10^6 hücre/petri olacak şekilde ekilerek 37°C de inkübe edilmiştir. 24 saat sonra 10 ve 30 mM NaBu eklenerek ve eklenmeden, 6, 12, 24 ve 48 saatlerde hücre lizisleri yapılmıştır. Lizis işlemi için; tripsinlenen hücreler 1000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendikten sonra, üst sıvı atılarak 2 ml 1X PBS ile resüspanse edildikten sonra hücreler 1000 rpm'de 5 dakika tekrar santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra, içerisinde proteaz inhibitörleri bulunan 100 µl soğuk protein lizis tamponu eklenmiştir. Hücreler buz içerisinde bulunan ependorf tüplerine alınarak şırınga yardımı ile parçalanmıştır. Daha sonra 14000 rpm'de, +4°C'de 3 dakika santrifüjlenerek hemen kullanılmış ya da daha sonra kullanılmak üzere -20°C'ye kaldırılmıştır. Protein miktarı BSA standartları kullanılarak BCA testi ile belirlenmiştir.

Materyal kısmında belirtilen BCA, A ve B solüsyonlarından 50:1 oranında karışım hazırlanmıştır. Standart BSA (1 mg/ml) ve 3-5µl örnek kuyucuklara konulmuş, üzerine 200µl karışım solüsyon eklenerek 37 °C'de 30 dak. karanlık ortamda bekletildikten sonra ELISA reader'da 490 nm dalga boyunda okutulmuştur. Değerler Microsoft Excel programında değerlendirilerek, grafik çizilmiştir. BSA değerleri ve OD karşılaştırmalarıyla protein miktarları tayin edilmiştir (Şekil 6.1).



Şekil 6.1. Hücre lizatında protein miktarının BSA yardımıyla belirlenmesi.

6.2.6. SDS-PAGE ve Western Blot

Sodyum Dodesil Sülfat Polyakrilamid Jel Electroforez (SDS-PAGE) proteinleri molekül ağırlıklarına göre ayırmak için kullanılan bir yöntemdir. İki aşamalı jelde yürütülen proteinlerde elektrik yükleri eşitlenerek; ayırma jelinde proteinler molekül ağırlıklarına göre ayrıştırılır.

Çalışmamızda araştırdığımız proteinlerin moleküllerinin moleküler ağırlıkları doğrultusunda SDS PAGE; % 4,5'lik yükleme jeli ile % 12'lik ayırma jeli kullanılmıştır. Cam plateler sıvı sızdırmayacak şekilde birleştirilmiştir. Öncelikle ayırma jeli cam plateler arasına

dökülür ve jelin üzerini kaplayacak şekilde yavaşça isopropanol eklenerek, iki jel arasında ara yüzey oluşturulur. Jelin polimerizasyonu sonrasında izopropanol uzaklaştırılarak, yüzey distile su ile yıkanarak kurutulmuştur. Yükleme jeli üst kısma doldurularak tarak yerleştirilmiştir. Polimerizasyon sonrasında jel elektroforez tankına yerleştirilir. Tank içine 1X rezervuar tamponu doldurulmuştur. Kuyucuklar içinde polimerizasyonu önlemek için kuyular bir şırınga yardımıyla yıkanır. Marker ve daha önceden hazırlanan protein örneklerine yükleme boyası eşit hacimde eklenerek, 5 dakika kaynatıldıktan sonra kuyulara yüklenmiştir. İlk kuyuya 20 µl RPN800V Full Range Rainbow™ Recombinant Protein Molecular Weight Marker ve diğer kuyulara 30µg-50µg protein örnekleri yüklenmiştir. Örnekler ayrılma jeline gelene kadar 25mA'de yürütülmüştür. Daha sonra loading buffer jelin alt kısmına ulaşana kadar yaklaşık 5-6 saat 35mA'de yürütülmüştür.

Transfer işleminden önce jel 15-20 dakika transfer bufferda eşitlemeye alınmıştır. Jeldeki ayrılmış proteinler Polivinilidinden diflorid (PVDF) membrana aktarılmıştır. Aktarma işleminde (-) den (+) akım yönüne bağlı kalınarak yerleştirme yapılır. Üç blotlama kağıdı ve sünger transfer buffer ile ıslatılır ve üst üste konur. Üzerine jel yerleştirilir. Membran ayrı bir kapta metanol ile ıslatıldıktan sonra jel üzerine membran yerleştirilir. Membran ile jel arasında hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek üzerine tekrar ıslatılmış 3 filtre kağıdı ve sünger konularak, sandviç kapatılır. Kaset 1X Western blot buffer bulunan tanka yerleştirilerek, 200 mA'da gece boyunca transfer işlemi gerçekleştirilmiştir.

Transfer işlemi gerçekleştirilen membran 1X TBS, %0,1 Tween, %5 süt tozu içeren solüsyonda (TTM) 60 dakika yavaşça bloklama işlemi için çalkalanmıştır. Membran içerisinde aranılan proteinin belirlenmesinde kullanılacak olan 0,2-0,5 µg/ml konsantrasyonda birincil antikor (p-ERK, Santa-Cruz Biotechnology) bulunan protein bloklama solüsyonu ile 1 saat oda sıcaklığında çalkalanarak inkübe edilmiştir. Daha sonra membran, membran yıkama solüsyonunda 5, 10, 5 dakika 3 kere yıkanmıştır. Membran içerisinde horse radish peroksidaz ile birleştirilmiş 0,3 µg/ml konsantrasyonda ikincil antikor (IgG-HRP, Santa-Cruz Biotechnology) içeren protein bloklama solüsyonu ile 1 saat oda sıcaklığında çalkalanarak inkübe edilmiştir. Daha sonra membran tekrar membran yıkama solüsyonu ile 5, 10, 5 dakika boyunca 3 kez yıkanmıştır. Membran karanlık odada ECL (enhanced chemi-luminescence Amersham, UK) kiti ile 1 dakika muamele edilmesini takiben hızlıca kasete aktarılmış ve filmler 5-30 dakika arasında tutulduktan sonra geliştirilen bantlar elde edilmiştir.

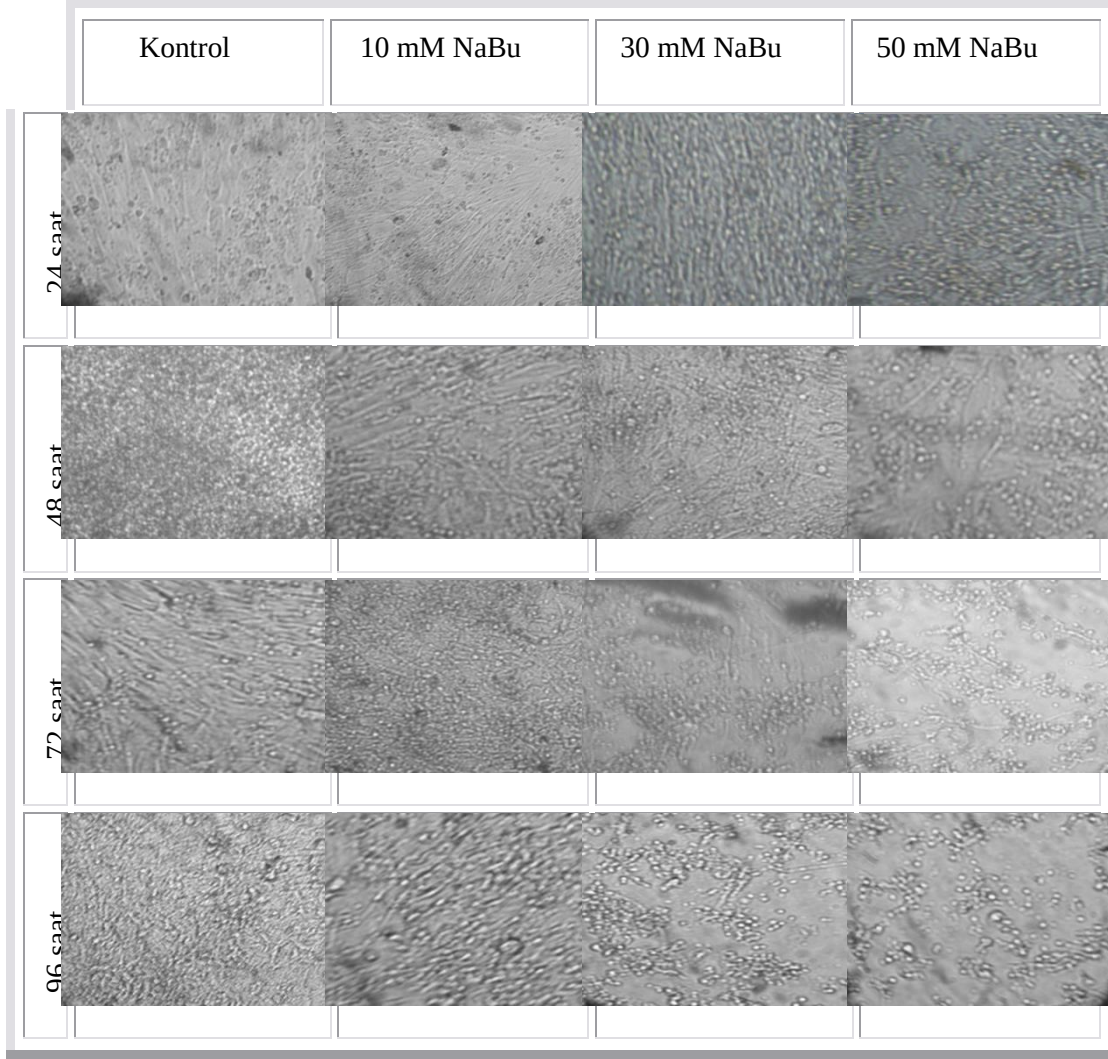
Diğer birincil antikorlar olan p38 ve JNK (Santa-Cruz Biotechnology) uygulamalarında ilk olarak p-ERK protokolü uygulanarak denenmiştir. Bant elde edilememesini takiben farklı konsantrasyonlarda ve farklı inkübasyon süreleri denenmiştir. Her iki antikor için pozitif kontrol hücresi olan NIH/3T3 hücrelerinin lizisleri yapılarak antikorlar denenmiştir. Fakat deney sonuçlarında geliştirilen filmlerde bant görüntülenmesi elde edilememiştir.

7.BULGULAR

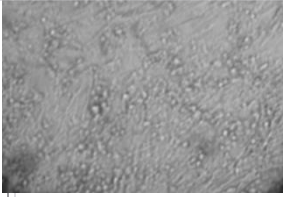
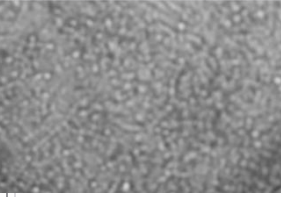
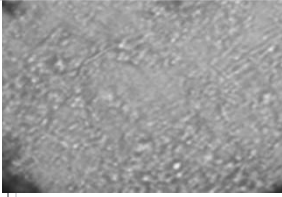
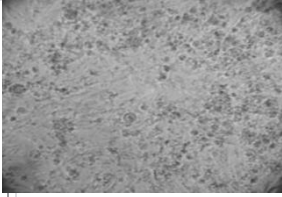
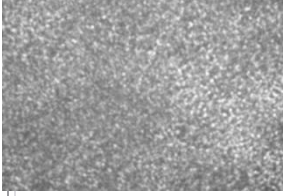
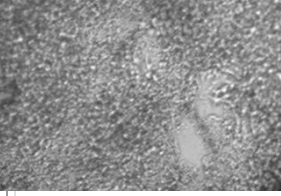
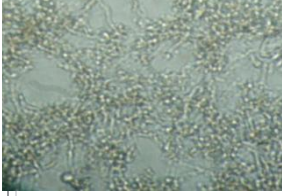
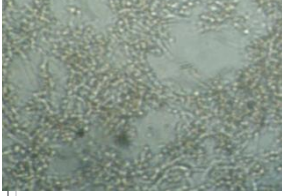
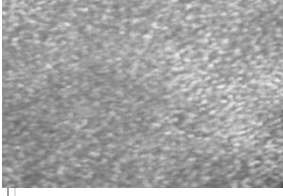
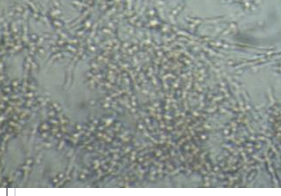
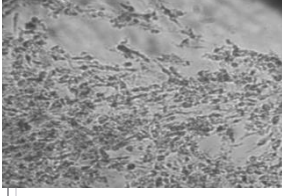
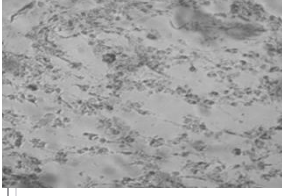
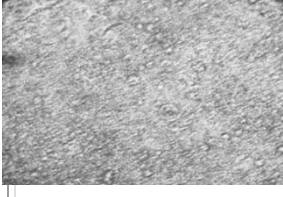
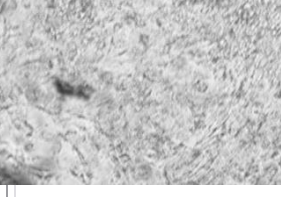
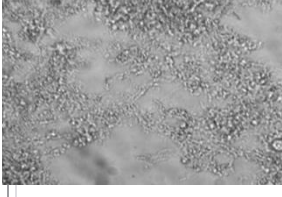
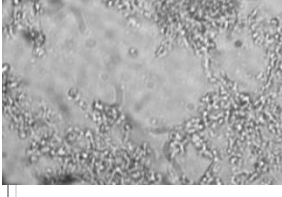
7.1.Sodyum Bütiratın Hücre Morfolojisine Etkisi:

Hücrelere NaBu'nun etkisini doza ve zamana bağlı olarak belirlemek için, 96 kuyucuklu plak'ların her bir kuyusuna 1×10^4 hücre/ml olacak şekilde çiftli ekim yapılmış ve 24 saat lag periyodunu takiben 0-50 mM dozlarda NaBu eklenmiştir. Hücreler 0-96 saat takip edilerek morfolojik değişimleri belirlenmiştir. Üç farklı hücre morfolojisi endometrium (Şekil 7.1), endometriosiz (Şekil 7.2) ve endometriyal kanser hücreleri (Şekil 7.3) doza ve zamana bağlı olarak incelenmiştir.

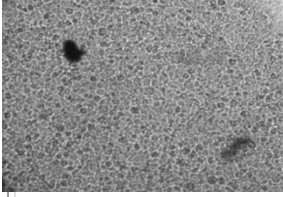
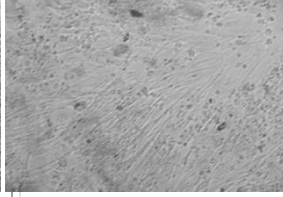
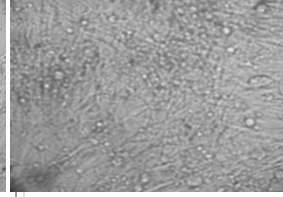
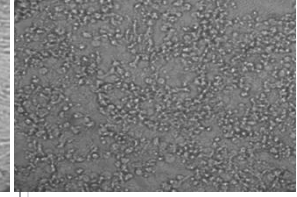
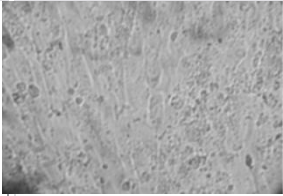
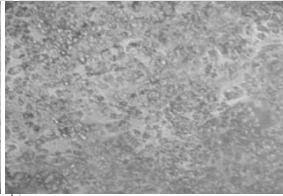
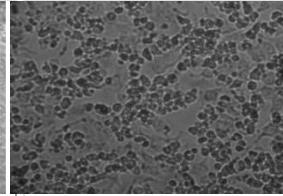
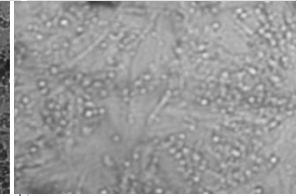
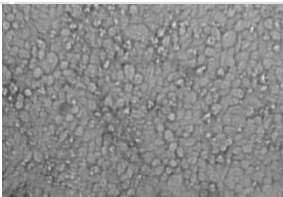
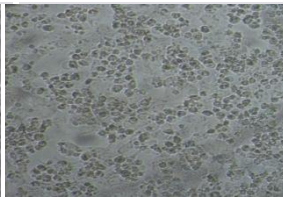
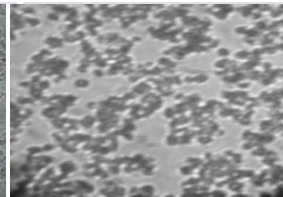
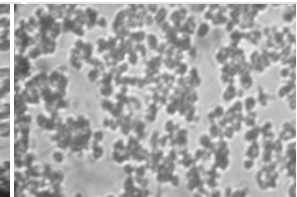
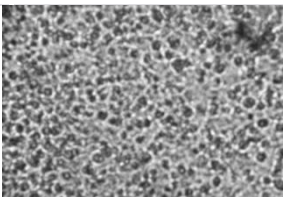
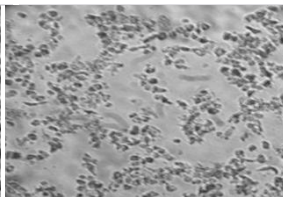
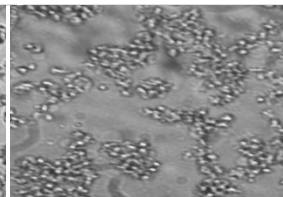
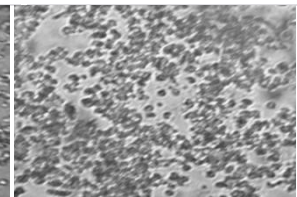
Tüm hücre gruplarında; 10 mM NaBu uygulanan hücrelerin kontrol grubu ile karşılaştırılmasında hücre sayısında 96. saatten başlayan azalma gözlenmiştir. Bu durum 30 mM dozda 48.saatte ve 50 mM dozda 24. saatten itibaren gözlenmiştir (Şekil 7.1, Şekil 7.2, Şekil 7.3).



Şekil 7.1: Normal Endometrium hücreleri NaBu uygulaması sonrası morfolojik görünüm (10x)

	Kontrol	10 mM NaBu	30 mM NaBu	50 mM NaBu
24				
48				
72				
96				

Şekil 7.2: Endometrioma hücreleri NaBu uygulaması sonrası morfolojik görünüm (10x)

	Kontrol	10 mM NaBu	30 mM NaBu	50 mM NaBu
24				
48				
72				
96				

Şekil 7.3: Ishikawa hücreleri NaBu uygulaması sonrası morfolojik görünüm (10x)

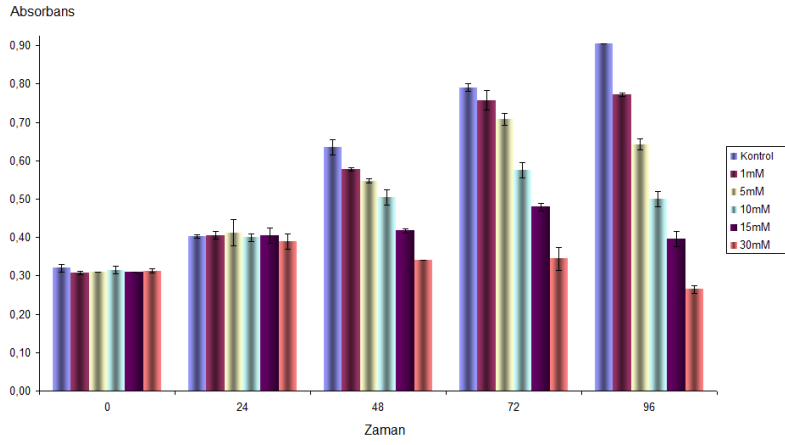
7.2.Sodyum Bütiratın Hücre Proliferasyonuna Etkisi:

Ishikawa hücre soyu hücreleri, normal endometrium ve endometrioma primer hücre kültüründe yetiştirilen hücreler 1×10^3 hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyulara çiftli ekim yapılmıştır. 24 saat sonrasında hücrelere 1, 5, 10, 15 ve 30 mM konsantrasyonlarında NaBu eklenmiştir. 24, 48, 72 ve 96. saatlerde hücre proliferasyonunda meydana gelen değişimler belirlenmiştir. Değerler Microsoft Excel programında ortalamaları alınarak grafikleri çizilmiştir.

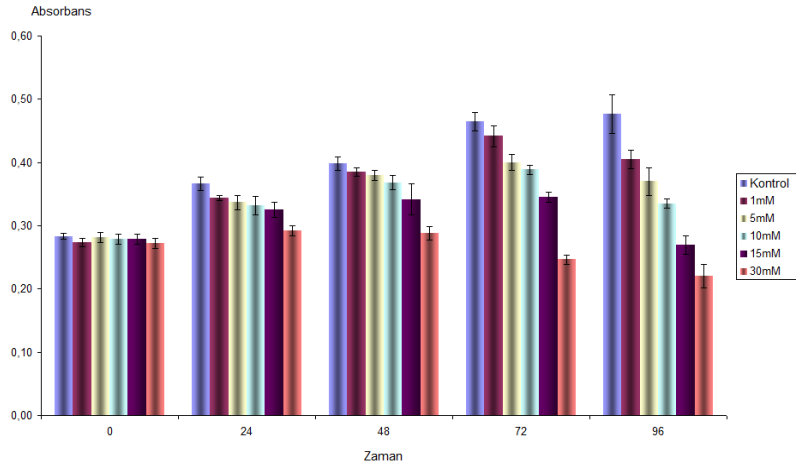
NaBu endometrium hücrelerinin proliferasyonunu doza ve zamana bağlı olarak inhibe etmiştir. Üç farklı endometrium hücre kültürü ile yapılan bağımsız deneylerde NaBu'nun Şekil 7.4 A, B ve C'de 10mM ve üstü konsantrasyonlarda hücre proliferasyonu dereceli olarak zamana bağımlı azalmıştır.

Endometrioma ve Ishikawa hücrelerinde NaBu uygulaması sonrasında hücre proliferasyonunda benzer şekilde endometrium hücrelerin olduğu gibi doza ve zamana bağlı olarak azalma belirlenmiştir (Şekil 7.5 A, B, C; Şekil 7.6).

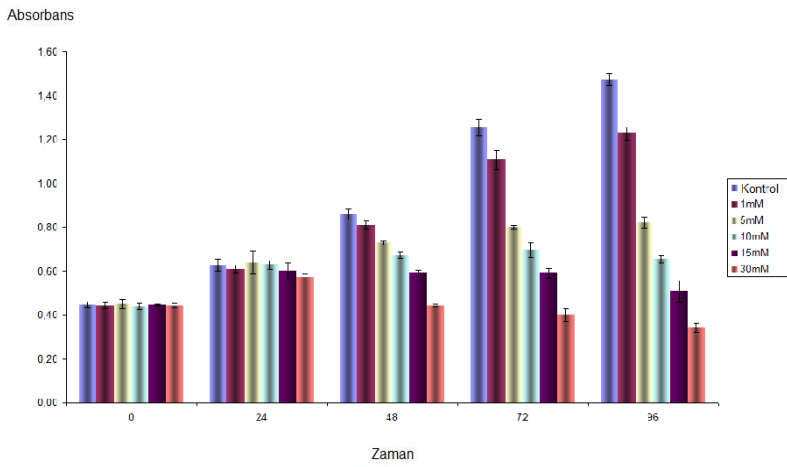
A.



B.

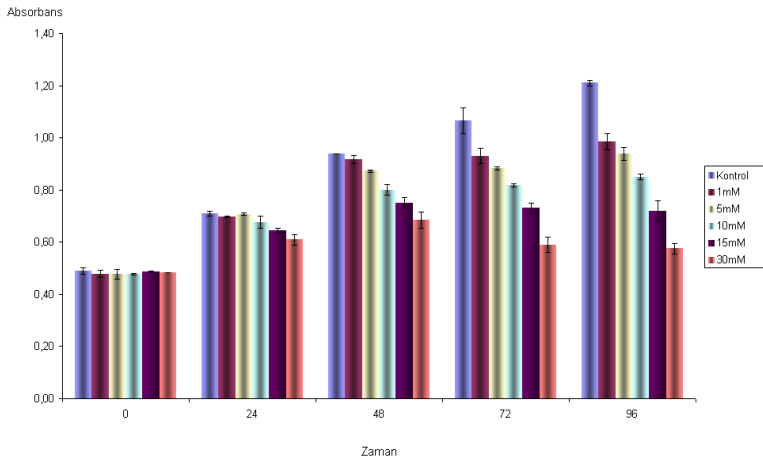


C.

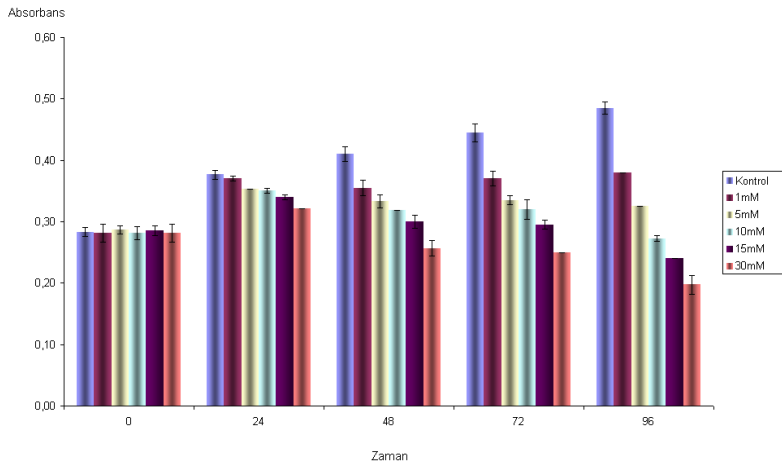


Şekil 7.4 : Üç farklı hastadan alınmış Endometrium dokularından (A, B, C) yapılan primer hücre kültürlerinde Sodyum Bütirat'ın doza ve zamana bağlı etkisi

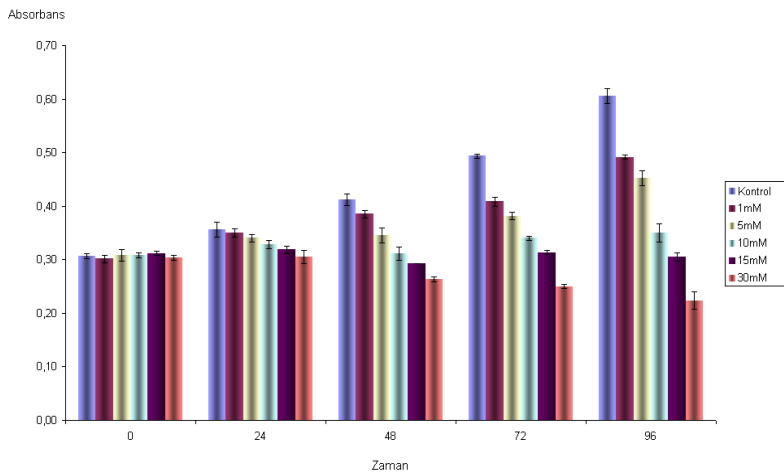
A.



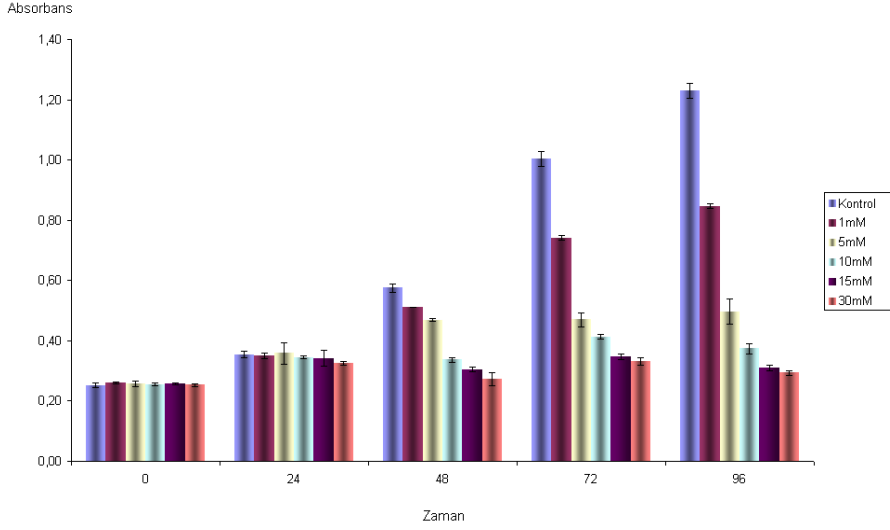
B.



C.



Şekil 7.5: Üç farklı hastadan alınmış Endometrioma dokularından (A, B, C) yapılan primer hücre kültürlerinde Sodyum Bütirat'ın doza ve zamana bağlı etkisi.



Şekil 7.6: Sodyum Bütirat uygulamasının Ishikawa hücrelerine etkisi

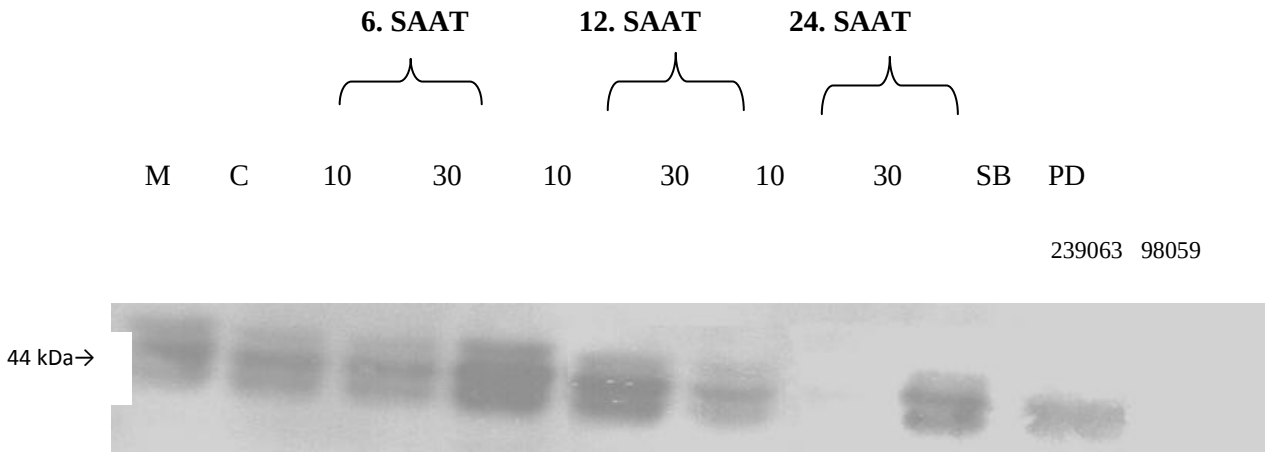
7.3.MAP Kinaz Sinyal İletim Yolu:

Normal endometrium ve endometrioma kist cidarından elde edilen primer hücre kültürü hücreleri kullanılarak 6.2.8. bölümde bahsedilen yöntem kullanılmıştır. İki konsantrasyon seçilerek (10mM ve 30mM) hücrelere uygulandıktan sonra 6, 12, 24 ve 48. saatlerde hücreler lizis edilerek, proteinler SDS PAGE yöntemiyle ayrıştırılmış ve western blot yöntemiyle p-ERK, p-JNK ve p-p38 antikorlarıyla hedeflenen proteinler incelenmiştir.

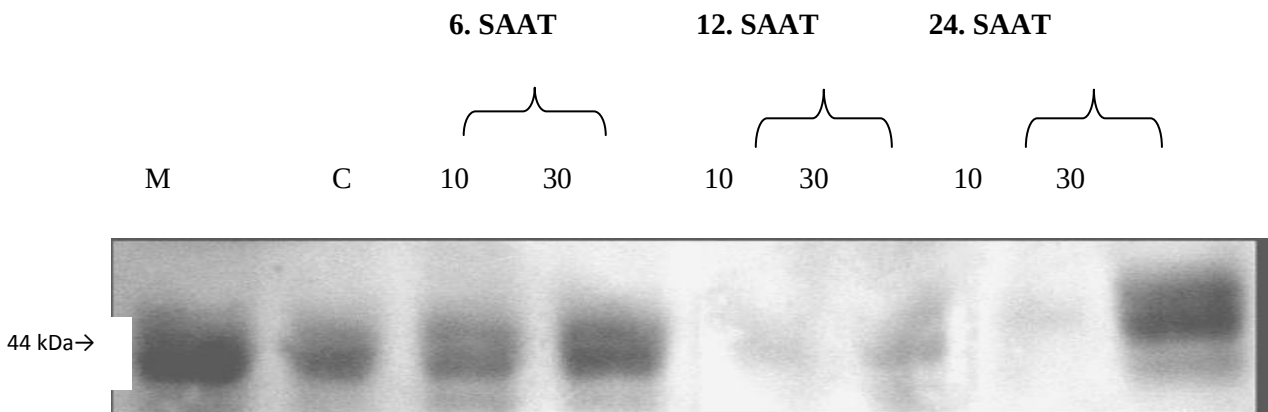
Şekil 7.7’de Ishikawa hücrelerinde, Şekil 7.8’de endometrium hücrelerinde ve Şekil 7.9’da endometrioma hücrelerinde gözlemlendiği gibi 10 ve 30mM NaBu muameleri sonucunda ERK fosforilasyonunda meydana gelen değişiklikler zamana bağlı olarak değerlendirilmeye çalışılmıştır. Ishikawa ve endometrium hücrelerinde 10mM doz uygulaması sonucunda ilk 6 saatte p-ERK seviyelerinde değişiklik gözlenmezken, endometrioma hücrelerinde ERK fosforilasyonunda düşüş gözlenmiştir. 12. saat uygulamalarında Ishikawa hücrelerinde ERK fosforilasyon seviyelerinde değişiklik gözlenmezken, endometrium ve endometrioma hücrelerinde ise azalma belirlenmiştir. 24. saatlerde tüm hücrelerdeki ERK fosforilasyonlarında azalma belirlenmiştir. 30mM

uygulamalarında ise 6. saatte tüm hücrelerde ERK fosforilasyonlarında artış, 12. saatte azalış ve 24. saatlerde tekrar artış belirlenmiştir.

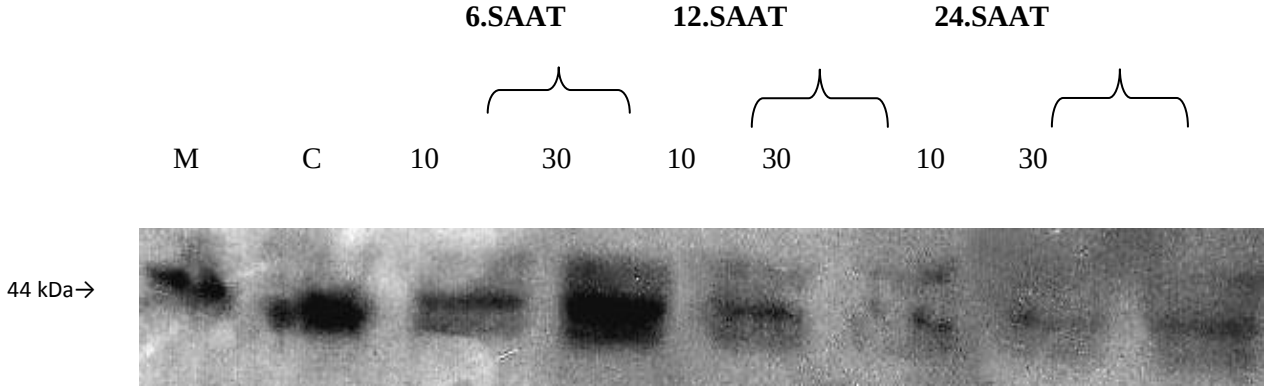
Tüm bu bulgulara rağmen bu deneylerin tekrar edilmesi ve β -aktin, ERK, JNK ve p38 antikorları kullanılarak eşit yükleme yapıldığının gösterilmesi sonuçlara açıklık getirecektir. Şekil 7.7’de görüldüğü gibi son iki kuyuya sırasıyla p38 (SB239063) ve ERK (PD 98059) inhibitörü ile 24 saat muamele edilmiş hücre lizatı yüklenmiştir. Görüntüleme sonucunda MAPK yolu inaktive edilen hücrelerde ERK fosforilasyonu tamamiyle önlenmiştir (Şekil 7.7).



Şekil 7.7: Ishikawa hücreleri p-ERK seviyelerindeki değişiklikler (M: belirteç, C: kontrol, 10mM ve 30mM NaBu uygulaması), PD 98059 (50 μ M), SB 239063 (40 μ M)



Şekil 7.8: Normal endometrium hücreleri p-ERK seviyelerindeki değişiklikler



Şekil 7.9: Endometrioma hücreleri p-ERK seviyelerindeki değişiklik

8.TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu tez çalışmasında, endometrium, endometriosis ve endometrial kanser hücre proliferasyonlarına bir HDAC inhibitörü olan NaBu 'ın etkisi doz ve zaman bağımlı olarak incelenmiştir. Morfolojik incelemelerde kontrol gruplarıyla karşılaştırıldıklarında tüm hücrelerde doza ve zamana bağımlı olarak hücre sayılarında azalmalar ve morfolojilerinde değişiklikler meydana geldiğini belirledik. Hücrelere 10mM, 30mM ve yüksek bir doz olan 50mM'da NaBu ile muamele edildiğinde ve kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında mikroskopik olarak fark edilen etkinin sırasıyla 96. saatten, 48. saatten ve 24. saatten itibaren başladığını belirledik. Bu deneylerin takibinde tüm hücreler 0-96 saat süresince 0-30mM NaBu dozlarıyla muamele edilmiş ve hücrelerde meydana gelebilecek anti-proliferatif değişiklikler biyokimyasal olarak ölçülmüştür. Hücrelerde kontrol grubuna oranla anlamlı azalma 96. saatte 10-15 mM ve 72.saatte 30 mM NaBu konsantrasyonlarında saptanmıştır.

Endometriozis hastalığında; daha öncede vurgulandığı üzere kanserde olduğu gibi kendi yerleşim yerleri dışında endometriotik odaklar oluşmakta ve karsinogenezde de önem teşkil eden protein miktarlarında farklılık bulunmaktadır (Harada *et al.*, 2007) . Yakın zamanlı bulgulara uterin kavitede siklik bir döngü içinde artan ve azalan endometrium hücrelerinde ERK aktivasyonunun artışı gösterilmiştir. ERK yolağının aktivasyonunun proliferasyon artışıyla bağlantılı olduğu belirtilerek özellikle anormal artmış ERK aktivasyonunun hücre canlılığını devam ettirmede rol aldığı böylelikle hastalığın oluşumunda rol oynayabileceğine dikkat çekilmiştir (Murk *et al.*, 2008).

Bilindiği gibi MAPK'lar gen ekspresyonu, mitoz, hücre hareketi, metabolizma ve apoptosisi gibi çeşitli hücrel aktiviteyi fosforilasyonla gerçekleştiren sinyal molekülleridir (Johnson and Lapadat *et al.*, 2002). MAPK'ların hücrel çevreden gelen yanıtları kontrol edebilmesi onları kanser gibi pek çok hastalıkların araştırılmasında öncelikli hale getirmiştir. Çalışmalarımızda NaBu'nun anti-proliferatif etkisi incelenirken bu olayda rol oynayabilecek ERK1/2, p38 ve JNK proteinlerin fosforilasyonları araştırılmıştır.

HDAC'lerinin kanserlere karşı engelleyici veya terapötik özellikler taşıdıkları bilinmektedir. Bu anti-karsinojenik etkiler transkripsiyonal baskılanma ve/ veya çeşitli pro-apoptotik ya da anti-apoptotik genlerin aktivasyonuna bağlantılıdır (Davie *et al.*, 2003). Çeşitli araştırmalarda NaBu'nun anti-kanser etkisini HDAC aktivitesini modüle etmeden gösterdiği belirtilmiş ve NaBu'nun kimyasal koruyucu etkisinin E1A+Hras hücrelerinde öncelikli olarak MEK/ERK yoluyla düzenlendiği vurgulanmıştır (Kukushki and Abramova *et al.*, 2002). Buna ilaveten insan lösemi hücrelerinde NaBu tarafından indüklenen apoptozisin MEK/ERK, p21CIP/WAF1 aktivitelerindeki bozulmalarla bağlantılı olduğu belirtilmiştir (Rahmani and. Yu *et al.*, 2003). NaBu muamelesinin ERK1/2 aktivasyonunu aşağı düzenlenmesine, p-38 MAPK'ın ise yukarı düzenlenmesine neden olduğu çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir. Bu durum genelde proliferasyonun durdurulması ve apoptozis ile bağdaştırılmıştır. Örneğin onkogenik ras-transforme sıçan karaciğer hücrelerinde 48 saat NaBu uygulamasının ERK1/2' yi azalttığı, p38 MAPK aktivasyonunu arttırdığı fakat JNK iletim sistemini etkilemediği belirlenmiştir. (Jung *et al.*, 2005a). Diğer bir araştırmada p38MAPK'ın NaBu tarafından indüklenen apoptozisi inhibe edici rolü olduğu vurgulanmıştır (Jung *et al.*, 2005b). K562 kronik miyeloid lösemi hücrelerinde NaBu ile muamele edilen hücrelerde, p38 aktivitesinde ve hücre ölümünde artış belirlenmiştir (Chen *et al.*, 2008). NaBu uygulamalarıyla ERK, p38 ve JNK aktivitelerindeki değişimlerle ilgili diğer çalışmada LNCaP ve PC-3 prostat kanser hücre soylarında NaBu'nun hücre büyümelerini konsantrasyona bağımlı duraklattığı, ERK1/2'nin baskılandığı, PC-3 hücrelerinde p38 aktivasyonunda değişiklik gözlenmezken LNCaP hücrelerinde aktivasyonda artış olduğu ve JNK yolunun aktive olduğu belirtilmiştir (Kuefer *et al.*, 2007). Diğer prostat kanseri hücresi DU145'in NaBu ile muamele sonrasında p38 ve JNK yolağının aktivasyonu, buna karşın ERK yolağının inaktivasyonu gözlemlenmiştir (Cho *et al.*, 2006). İnsan kolon kanseri (LS174T) hücrelerinde NaBu'nun 48 saatte apoptotik DNA fragmentasyonuna neden olduğu ve hücre döngüsünde duraklamaya sebep olduğu belirtilmiştir (Hatayama *et al.*, 2007).

Çalışmamızda NaBu'nun anti-proliferatif etkisinin MAPK'daki değişimlerle bağlantılı olabileceği hipotezinden giderek, ERK1/2, p38 ve JNK fosforilasyonlarında olası değişiklikleri belirlemek amacıyla protein analizleri yapılmıştır. Deneylerimiz sonucunda hücrelerin 10 ve 30mM

dozlarına değişik cevaplar verdiğini gözlemledik. Ishikawa ve endometrium hücrelerinde 10mM NaBu uygulamalarında 6. saatinde Ishikawa ve endometrium hücrelerinde ERK1/2 fosforilasyonunda değişiklik gözlenmezken endometrioma hücrelerinde kontrole karşılaştırıldığında azalma olduğu gözlenmiştir. 12. saatlerde Ishikawa hücrelerinde değişiklik gözlenmezken diğer iki hücre grubunda hem 10mM hem de 30mM konsantrasyonlarda ERK1/2 fosforilasyonunda azalma belirlenmiştir. 24. saatlerde hücrelerin ERK fosforilasyonları incelendiğinde 10mM konsantrasyonda fosforilasyonlar tamamiyle düşerken 30mM NaBu uygulamaları p-ERK seviyesini yükseltmiştir. Bu durumun yapılan birkaç deneyde 48. saatte'de devam ettiğini gözlemledik. Sonuçların daha açık ve net olabilmesi için deneylerin tekrar edilmesi gerektiğini düşünmekteyiz. Endometrial hücrelerde diğer araştırma sonuçlarıyla paralel şekilde, doza bağlı olarak NaBu uygulamasının ERK fosforilasyonun aşığı düzenlenmesinde rolü olduğunu belirledik. Daha sonra aynı şekilde, hücrelerde p38 ve JNK fosforilasyonlarındaki değişmeleri incelenmeye çalıştık. Ne yazık ki tekrarlarımıza rağmen kullandığımız antikolarla herhangi bir sonuç elde edemedik. Sorunun kullanılan antikor kaynaklı olabileceğini düşünmekteyiz. Bu nedenle bu deneylerin başka antikolar kullanılarak tekrar edilmesi söz konusudur. Sonuç olarak bu aşamada diğer çalışmalarda olduğu gibi NaBu'nun anti-proliferatif etkisinin ERK1/2, p38 ve JNK üçlüsü ile bağlantılı olduğunu söylemek güçtür. Bu nedenle, bunu izleyen çalışmalarda p38, JNK moleküllerinin analizlerinin tekrar edilmesi, PI3K/AKT gibi hayatta kalımı sağlayan diğer temel sinyal yollarını analiz edilmesi ve sonrasında NaBu'nun apoptotik etkisinin incelenmesi hedeflenmektedir. Apoptosizi değerlendirirken; Acridin-orange boyama florasans, çiftli PI ve Annexin boyama gibi flowsitometrik analizlerin yapılması, çeşitli kazpazların ve sitokrom C aktivitelerinin biyokimyasal olarak ölçülmesi amaçlanmaktadır. Tüm bunlara ilaveten hücre proliferasyonunda, ve apoptozisde rol oynayan önemli anahtar moleküllerin RT-PCR gibi moleküler yöntemler kullanımıyla değerlendirilmesi de hedeflerimiz doğrultusundadır.

KAYNAKLAR

Abbott, J., Hawe, J., Hunter, D., Holmes, M., Finn, P. and Garry, R. 2004. Laparoscopic excision of endometriosis: a randomized, placebo-controlled trial. *Fertil Steril*. 82:878-84.

Ailawadi, R.K., Jobanputra, S., Kataria, M., Gurates, B. and Bulun, S.E. 2004. Treatment of endometriosis and choronic pelvicpain with letrozole and nore-thindrone acetate: a pilot study. *Fertil Steril*. 81: 290-296.

Attar, E. and Bulun, S.E. 2006. Aromatase and other steroidogenic genes in endometriosis: translational aspects *Human Reproduction Update*. 12:49-56.

Bobick, B.E., Kulyk, W.M. 2008. Regulation of cartilage formation and maturation by mitogen-activated protein kinase signaling. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 80:131-54.

Bonni, A., Brunet, A., West, A.E., Datta, S.R., Takasu, M. A. and Greenberg. M.E. 1999. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription. *Science*. 286:1358-1362.

Brancho, D., Tanaka, N., Jaeschke, A., Ventura, J.J., Kelkar, N., Tanaka, Y., Kyuuma, M., Takeshita, T., Flavell, R. A. and Davis, R.J. 2003. Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo. *Genes Dev*. 17:1969–1978.

Brinton, L.A., Gridley, G., Persson, I., Baron, J., Bergqvist, A. 1997. Cancer risk after a hospital discharge diagnosis of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol*. 176:572-9.

Bulun, S.E., Fang, Z., Imir, G., Gurates, B., Tamura, M., Yilmaz, B., Langoi, D., Amin, S., Yang, S. and Deb, S. 2004. Aromatase and endometriosis. *Semin Reprod Med*. 22,45-50.

Chang F., Steelman L.S., Lee, J.T., Shelton, J.G., Navolanic, P.M., Blalock, W.L., Franklin, R.A., McCubrey, J.A. 2003. Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention. *Leukemia*. 17:1263-1293.

Chen, C.H., Lin, J.Y., Liu, F.H., Chang, J.L., Huang, H.M. 2008. Basic fibroblast growth factor inhibits p38-mediated cell differentiation and growth inhibition by activin A but not by histone deacetylase inhibitors in CML cells. *Ann Hematol*. 87:175–182.

Chen, M.H., Yang, W.K., Whang-Peng, J., Lee, L.S., Huang, TS. 1998. Differential inducibilities of GFAP expression, cytostasis and apoptosis in primary cultures of human astrocytic tumours. *Apoptosis*. 3:171-82.

Chen, T.H., Chen, W.M., Hsu, K.H., Kuo, C.D., Hung, S.C. 2007. Sodium butyrate activates ERK to regulate differentiation of mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 355:913-8

Chen, Z., Gibson, T.B., Robinson, F., Silvestro, L., Pearson, G., Xu, B., Wright, A., Vanderbilt, C., and Cobb, M.H. 2001. MAP kinases. *Chem. Rev*. 101:2449–2476.

Child, T.J. and Tan, S.L. 2001. Endometriosis: actiology, pathogenesis and treatment. *Drugs*. 61:1735-50.

Cirke, U., Ochs, H., Schneider, H.P.G. 1995. A randomized, comparative trial of triptorelin depot (D-Trp6-LHRH) and danazol in the treatment of endometriosis. *Eur J Obst Gynecol Reprod Biol*. 59:61-69.

Davie J.R. 2003. Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *J. Nutr*. 133: 2485–2493

Deak, M., Clifton, A.D., Lucocq, J.M. and Alessi, D.R. 1998. Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *EMBO J*. 17:4426–4441.

Dokmanovic, M. and Marks, P.A. 2005. Prospects: Histone deacetylase inhibitors. *Journal of Cellular Biochemistry*. 96:293–304.

Erikson, E. and Maller, J.L. 1985. A protein kinase from *Xenopus* eggs specific for ribosomal protein S6. *Proc Natl Acad Sci. USA* 82:742–746.

Fedele, L., Parazzini, F., Bianchi, S., Arcaini, L., Candiani, G.B. 1990. Stage and localization of pelvic endometriosis and pain. *Fertil Steril*. 53:155-158.

Fenrick, R., Hiebert, S.W. 1998. Role of histone deacetylases in acute leukemia. *J Cell Biochem*. 30-31:194-202.

Flynn, A., Vries, R.G. and Proud, C.G. 1997. Signalling pathways which regulate eIF4E. *Biochem Soc Trans*. 25:192S.

Frodin, M. and Gammeltoft, S. 1999. Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. *Mol Cell Endocrinol*. 151:65–77.

Garcia-Velasco, J.A., Mulayim, N., Kayisli, U.A. and Arici, A. 2002. Elevated soluble Fas ligand levels may suggest a role for apoptosis in women with endometriosis. *Fertil Steril*. 78:855-859.

Gilbert, S.F. 2000. Developmental Biology. Principles of development in biology. 6th ed. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts, USA.

Giudice, L.C. and Kao, L.C. 2004. Endometriosis. *The Lancet*. 364:1789- 1799.

Gupta, S., Barrett, T., Whitmarsh, A.J., Cavanagh, J., Sluss, H.K., Derijard, B., Davis, R.J. 1996. Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J*. 15:2760–2770.

Hallberg, B., Rayter, S.I. and Downward, J. 1994. Interaction of Ras and Raf in intact mammalian cells upon extracellular stimulation. *J Biol Chem*. 269:3913–3916.

Han, J., Lee, J.D., Bibbs, L. and Ulevitch, R.J. 1994. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science*. 265:808–811.

Harada, T., Taniguchi, F., Izawa, M., Ohama, Y., Takenaka, Y., Tagashira, Y., Ikeda, A., Watanabe, A., Iwabe, T., Terakawa, N. 2007. Apoptosis and endometriosis. *Front Biosci*. 12:3140-3151.

Hatayama, H., Iwashita, J., Kuwajima, A., Abe, T. 2007. The short chain fatty acid, butyrate, stimulates MUC2 mucin production in the human colon cancer cell line, LS174T. *Biochem Biophys Res Commun*. 356:599–603.

Hibi, M., Lin, A., Smeal, T., Minden, A., Karin, M. 1993. Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev*. 7:2135-48.

Hornstein, MD., Hemmings, R., Yuzpe, A.A., Heinrichs, WL. 1997. Use of nafarelin versus placebo after reductive laparoscopic surgery for endometriosis. *Fertil Steril*. 68: 860-64.

Hu, E., Dul, E., Sung, C.M., Chen, Z., Kirkpatrick, R., Zhang, G.F., Johanson, K., Liu, R., Lago, A., Hofmann, G., Macarron, R., De Los Frailes, M., Perez, P., Krawiec, J., Winkler, J., Jaye, M. 2003. Identification of novel isoform-selective inhibitors within class I histone deacetylases. *J Pharmacol Exp Ther*. 307:720–728.

Huang, L. 2006. Targeting histone deacetylases for the treatment of cancer and inflammatory diseases. *J Cell Physiol*. 203: 211-216.

Jackson, B. and Tenler, D.E. 2006. Managing the misplaced Approach to Endometriosis. *Can Fam Physician*. 52:1420-1424.

Johnson G.L. and Lapadat R., 2002. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298: 1911–1912.

Jose, B., Oniki, Y., Kato, T., Nishino, N., Sumida, Y., Yoshida M. 2004. Novel histone deacetylase inhibitors: Cyclic tetrapeptide with trifluoromethyl and pentafluoroethyl ketones. *Bioorg Med Chem Lett.* 14:5343–5346.

Jung, J.W., Cho, S.D., Ahn, N.S., Yang, S.R., Park, J.S., Jo, E.H., Hwang, J.W., Aruoma, O.I., Kang, K.S., Lee, Y.S. 2005a. Augmentation of Sodium Butyrate-Induced Apoptosis by p38 MAP Kinase Inhibition in Rat Liver Epithelial Cells *Antioxidants & Redox Signaling*. 11-12: 1767-1772

Jung, J.W., Cho, S.D., Ahn, N.S., Yang, S.R., Park, J.S., Jo, E.H., Hwang, J.W., Jung, J.Y., Kim, S.H., Kang, K.S., Lee, Y.S. 2005b. Ras/MAP kinase pathways are involved in Ras specific apoptosis induced by sodium butyrate. *Cancer Lett.* 225:199-206.

Kelly, W.K., O'Connor, O.A., Marks, P.A. 2002. Histone deacetylase inhibitors: from target to clinical trials. *Expert Opin Invest Drugs.* 11:1695-713.

Kennedy, S., Bergqvist, A., Chapron, C., D'Hooghe, T., Dunselman, G., Greb, R., Hummelshoj, L., Prentice, A., Saridogan, E.; ESHRE Special Interest Group for Endometriosis and Endometrium Guideline Development Group. 2005. ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Hum. Reprod.* 10:2698-704.

Kim, D.H., Kim, M.; Kwon, H J. 2003. Histone deacetylase in carcinogenesis and its inhibitors as anti-cancer agents. *Biochem. Mol. Biol.* 36: 110-9.

Kolch, W. 2000. Meaningful relationships: The regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J.* 351:289-305

Kornberg, R.D.; Lorch, Y. 1999. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental partical of the eukaryote chorosome . *Cell.* 98:285-294.

Kouzarides, T. 1999. Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation. *Curr Opin Genet Dev.* 9:40-8.

Kuefer, R., Genze, F., Zugmaier, W., Hautmann, R., Rinnab, L., Gschwend, J.E., Angelmeier, M. 2007. Estrada A and Buechele B Antagonistic Effects of Sodium Butyrate and N-(4-Hydroxyphenyl)-retinamide on Prostate Cancer. *Neoplasia.* 9:246 – 253.

Kukushkin A.N., Abramova M.V., Svetlikova S.B, Darieva Z.A., Pospelova T.V. and. Pospelov V.A. 2002. Downregulation of c-fos gene transcription in cells transformed by E1A and cHa-ras

oncogenes: a role of sustained activation of MAP/ERK kinase cascade and of inactive chromatin structure at c-fos promoter. *Oncogene* 21.

Kyriakis, J.M., and Avruch, J. 1990. pp54 microtubule-associated protein2 kinase. A novel serine/threonine protein kinase regulated by phosphorylation and stimulated by poly-L-lysine. *J Biol Chem.* 265:17355–17363.

Kyriakis, J.M. and Avruch, J. 2001. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev.* 81:807–869.

Lenormand, P., Sardet, C., Pages, G., L'Allemain, G., Brunet, A. and Pouyssegur, J. 1993. Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42mapk and p44mapk) but not of their activator MAP kinase kinase (p45mapkk) in fibroblasts. *J. Cell Biol.* 122:1079–1088.

Lewis, T.S., Shapiro, P.S., Ahn, N.G. 1998. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res.* 74:49-139.

Liem, A.A., Chamberlain, M.P., Wolf, C.R., Thompson, A.M. 2002. The role of signal transduction in cancer treatment and drug resistance. *EJSO.* 28:679-84.

Mandal, M., Kumar, R. 1996. Bcl-2 expression regulates sodium butyrate-induced apoptosis in human MCF-7 breast cancer cells. *Cell Growth Differ.* 7:311-318.

Matorras, R., Elorriaga, M.A., Pijoan, J.I., Ramon, O., Rodriguez-Escudero, F.J. 2002. Recurrence of endometriosis in women with bilateral oophorectomy (with or without total hysterectomy) who received hormone replacement therapy. *Fertil Steril.* 77:303-8.

Monneret, C. 2005. Histone deacetylase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry.* 40:1–13.

Murphy, L.O., MacKeigan, J. P. and Blenis, J. 2004. A network of immediate early gene products propagates subtle differences in mitogen-activated protein kinase signal amplitude and duration. *Mol Cell Biol.* 24:144–153.

Nebreda, A.R., and Ferby, I., 2000. Regulation of the meiotic cell cycle in oocytes. *Curr Opin Cell Biol.* 12:666–675.

Nomura, M., Kaji, A., Ma, W.Y., Zhong, S., Liu, G., Bowden, G.T., Miyamoto, K.I. and Dong, Z. 2001. Mitogen- and stress-activated protein kinase 1 mediates activation of Akt by ultraviolet B irradiation. *J Biol Chem* 276:25558–25567.

Ono, K. and Han, J. 2000. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal*. 12:1–13.

Paul A., Wilson S., Belham CM., Robinson CJ., Scott PH., Gould GW., Plevin R. 1997. Stress-activated protein kinases: activation, regulation and function. *Cell Signal*. 6: 403-410

Pawson, T. 2002. Regulation and targets of receptor tyrosine kinases. *Eur J Cancer*. 38:3-10.

Pawson, T., Raina, M., Nash, P. 2002. Interaction domains: From simple binding events to complex cellular behavior. *FEBS Letters*. 513:2-10.

Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K., Cobb, M.H. 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev*. 22:153-83.

Philippe, P.R. and Blenis, J. 2004. ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 68:320–344.

Pierrat, B., Correia, J.S., Mary, J.L., Tomas-Zuber, M. and Lesslauer, W. 1998. RSK-B, a novel ribosomal S6 kinase family member, is a CREB kinase under dominant control of p38alpha mitogen-activated protein kinase (p38alphaMAPK). *J Biol Chem*. 273:29661–29671.

Rahmani M., Yu, E. Reese C., Ahmed W., Hirsch, K., Dent P. and Grant S. 2003. Inhibition of PI-3 kinase sensitizes human leukemic cells to histone deacetylase inhibitor-mediated apoptosis through p44/42 MAP kinase inactivation and abrogation of p21^{CIP1/WAF1} induction rather than AKT inhibition. *Oncogene* 22: 6231–6242.

Raingeaud, J., Gupta, S., Rogers, J.S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R.J. and Davis, R.J. 1995. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem*. 270:7420–7426.

Richards, S.A., Dreisbach, V.C., Murphy, L.O. and Blenis, J. 2001. Characterization of regulatory events associated with membrane targeting of p90 ribosomal S6 kinase 1. *Mol Cell Biol*. 21:7470–7480.

Richon, V.M., Emiliani, S., Verdin, E., Webb, Y., Breslow, R., Rifkind, R.A. and Marks, P.A. 1998. A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases. *Proc Natl Acad Sci. USA* 95:3003–3007.

Roux, P.P., Richards, S.A. and Blenis, J. 2003. Phosphorylation of p90 ribosomal S6 kinase (RSK) regulates extracellular signal-regulated kinase docking and RSK activity. *Mol. Cell Biol.* 14:4796-804.

Roux, P.P., Shahbazian, D., Vu, H., Holz, M.K., Cohen, M.S., Taunton, J., Sonenberg, N. and Blenis, J. 2007. RAS/ERK signaling promotes site-specific ribosomal protein S6 phosphorylation via RSK and stimulates cap-dependent translation. *J Biol. Chem.* 19:14056-64.

She, Q.B., Ma, W.Y., Zhong, S. and Dong, Z. 2002. Activation of JNK1, RSK2, and MSK1 is involved in serine 112 phosphorylation of Bad by ultraviolet B radiation. *J Biol Chem.* 277:24039–24048.

Shimamura, A., Ballif, B.A., Richards, S.A. and Blenis, J. 2000. Rsk1 mediates a MEK-MAP kinase cell survival signal. *Curr Biol.* 10:127–135.

Slentz-Kesler, K., Moore, J.T., Lombard, M., Zhang, J., Hollingsworth, R. and Weiner, M.P. 2000. Identification of the human Mnk2 gene (MKNK2) through protein interaction with estrogen receptor beta. *Genomics.* 69:63–71.

Smith, J.A., Poteet-Smith C.E., Malarkey K. and Sturgill, T.W. 1999. Identification of an extracellular signal-regulated kinase (ERK) docking site in ribosomal S6 kinase, a sequence critical for activation by ERK in vivo. *J Biol Chem.* 274:2893–2898.

Somoza, J.R., Skene, R.J., Katz, B.A., Mol, C., Ho, J.D., Jennings, A.J., Luong, C., Arvai, A., Buggy, J.J., Chi, E., Tang, J., Sang, B.C., Verner, E., Wynands, R., Leahy, E.M., Dougan, D.R., Snell, G., Navre, M., Knuth, M.W., Swanson, R.V., McRee, D.E., Tari, L.W. 2004. Structural snapshots of human HDAC8 provide insights into the class I histone deacetylases. *Structure (Camb).* 12:1325–1334.

Sonnemann, J., Gange, J., Kumar, K.S., Muller, C., Bader, P., Beck, J.F. 2005. Histone deacetylase inhibitors interact synergistically with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) to induce apoptosis in carcinoma cell lines. *Invest New Drugs.* 23:99-109.

Strahl, B.D. and Allis, C.D. 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature.* 403:41–45.

Strathy, J.H., Molgaart, C.A., Coulam, C.B., Melton, L.J. 1982. Endometriosis among fertile and infertile woman. *Fertil Steril.* 38:667.

Takayama K, Zeitoun K, Gunby RT, Sasano H, Carr BR, Bulun SE. 1998. Treatment of severe postmenopausal endometriosis with an aromatase inhibitor. *Fertil Steril* 69:709-713

- Tomas-Zuber, M., Mary, J.L., Lamour, F., Bur, D. and Lesslauer, W. 2001. C-terminal elements control location, activation threshold, and p38 docking of ribosomal S6 kinase B (RSKB). *J Biol Chem.* 276:5892–5899.
- Vaidyanathan, H. and Ramos, J.W. 2003. RSK2 activity is regulated by its interaction with PEA-15. *J Biol Chem.* 278:32367–32372.
- Valle, R.F. and Sciarra, J.J. 2003. Endometriosis: Treatment strategies. *Ann NY Acad Sci.* 997:229-39.
- Verkauf, B.S. 1987. The incidence symptoms and science of endometriosis in fertile and infertile woman. *J Fla Med Assoc.* 74:671.
- Vermeulen, L., De Wilde, G., Van Damme, P., Vanden Berghe, W. and Haegeman, G. 2003. Transcriptional activation of the NF-kappaB p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1). *EMBO J.* 22:1313–1324.
- Wang, X.M., Wang, X., Li, J., Evers, B.M. 1998. Effects of 5-azacytidine and butyrate on differentiation and apoptosis of hepatic cancer cell lines. *Ann Sur.* 227:922-31.
- Waskiewicz, A. J., Flynn, A., Proud, C.G. and Cooper, J.A. 1997. Mitogen activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *EMBO J.* 16:1909–1920.
- Wiggin, G. R., Soloaga A., Foster, J. M., Murray-Tait, V., Cohen, P. and Arthur, J.S. 2002. MSK1 and MSK2 are required for the mitogen- and stressinduced phosphorylation of CREB and ATF1 in fibroblasts. *Mol Cell Biol.* 22:2871–2881.
- Wilson, K.P., Fitzgibbon, M.J., Caron, P.R., Griffith, J.P., Chen, W., McCaffrey, P.G., Chambers, S.P. and Su, M.S. 1996. Crystal structure of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 271:27696–27700.
- Xu, W.S., Parmigiani¹, R.B. and Marks, P.A. 2007. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene.* 26:5541–5552.
- Yoshino, O., Osuga, Y., Hirota, Y., Koga, K., Hirata, T., Harada, M., Morimoto, C., Yano, T., Nishii, O., Tsutsumi, O., Taketani, Y. 2004. Possible pathophysiological roles of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) in endometriosis. *Am J Reprod Immunol.* 52:306-11.
- Zhang Y., Reinberg D. 2001. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.* 15:2343-60

ÖZGEÇMİŞ

1977 yılında Elazığ'da doğdu. 1999 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Lisans programından mezun oldu. 2002 yılında İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesinde Reprodüktif Endokrinoloji ve İnfertilite Bilim Dalında çalışmaya başladı. 2004 yılında Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı.