T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KAFEİK ASİT FENETİL ESTERİN HÜCRE DÖNGÜSÜ KONTROL NOKTASI PROTEİNLERİ OLAN Bub1 VE Bub3 ÜZERİNE ETKİSİNİN *Saccharomyces cerevisiae* KULLANILARAK İNCELENMESİ

Zeynep Narin AZMAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman
Yrd. Doç. Dr. Hilal ARIKOĞLU

KONYA-2015

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KAFEİK ASİT FENETİL ESTERİN HÜCRE DÖNGÜSÜ KONTROL NOKTASI PROTEİNLERİ OLAN Bub1 VE Bub3 ÜZERİNE ETKİSİNİN *Saccharomyces cerevisiae* KULLANILARAK İNCELENMESİ

Zeynep Narin AZMAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman
Yrd. Doç. Dr. Hilal ARIKOĞLU
Yrd. Doç. Dr. Sultan ÇİFTÇİ YILMAZ

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 14202037 proje numarası ile desteklenmiştir

KONYA-2015

ii. ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca burs desteği sağlayan, tez çalışmamı maddi olarak destekleyen*, bilimsel kongre ve sempozyumlara katılımımızı sağlayan TÜBİTAK Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu'na teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim sırasında ve tez dönemimde; sonsuz desteğini ve ilgisini esirgemeyen, akademik hayatı ile her zaman kendime örnek alacağım sevgili hocam, Sayın Yrd. Doç. Dr. Hilal ARIKOĞLU'na saygılarımı sunar, teşekkür ederim.

Tıbbi Biyoloji ve her konudaki bilgi birikimiyle yoluma ışık tutan, yüksek lisans eğitimim sırasında desteğini hep hissettiğim Sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Sultan ÇİFTÇİ YILMAZ' a teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında yardımlarını esirgemeyen kıymetli hocalarım Doç. Dr. Aysel KIYICI ve Yrd. Doç. Dr. Müfide ÖNCEL' e teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında her konudaki bilgi birikimiyle yoluma ışık tutan, engin bilgi ve tecrübesini esirgemeyen Sayın hocam Prof. Dr. H. Ramazan YILMAZ'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimimde yanımda olan ve desteklerini eksik etmeyen sevgili Yrd. Doç. Dr. Mahinur ULUSOY ve değerli arkadaşlarım Öğr. Gör. Arife DENİZ, Öğr. Gör. Güneş BOLATLI ve Araş. Gör. Gözde YALÇIN' a teşekkür ederim.

Bu tez çalışmamı ithaf ettiğim, bugünlere gelmemde beni her zaman destekleyen, hiçbir zaman esirgemedikleri maddi manevi destekleriyle bana güç veren, ideallerimin arkasında duran ve her daim gösterdikleri anlayışlarından ötürü annem Selma AKPINAR ve babam Mustafa AKPINAR'a teşekkür ederim.

Hayatımın her anında yanımda olan ve her zaman desteğini hissettiğim kardeşlerim Sefa Nur AKPINAR ve Ali Birand AKPINAR'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim sırasında ve tezin yazılış aşamasında kendi zamanından fedakârlık yaparak bana destek ve yardımcı olan sevgili hayat arkadaşım Burak AZMAN' a teşekkür ederim.

* Bu tez çalışması TÜBİTAK tarafından 112S254 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir.

iii. İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR iv

1. GİRİŞ 1
1.1. Kafeik Asit Fenetil Ester 2
1.1.1. Yapısı ve Kimyasal Özellikleri 3
1.1.2. Kafeik Asit Fenetil Esterin Saklama koşulları 3
1.1.3. Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE)' in işlevsel özellikleri 4
1.2. *Saccharomyces cerevisiae* 9
1.2.1. Model Organizma Olarak *Saccharomyces cerevisiae* 9
1.2.2. Büyüme ve Yaşam Döngüleri 10
1.2.3. *Saccharomyces cerevisiae* Genomu 13
1.3. Hücre Döngüsü 13
1.3.1. Hücre Döngüsü Kontrol Noktaları 14
2. GEREÇ VE YÖNTEM 16
2.1. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler 16
2.2. *Saccharomyces cerevisiae* Suşları 17
2.2.1. Yabanıl Tip (Wild Type – wt) 17
2.2.2. Bub1 – YGR 188 C 18
2.2.3. Bub3 – YOR 026 W 19
2.3. İlk Kültür 19
2.4. Pilot Deney 20
2.5. Spot Test 21
2.6. Canlılık Testi 22
2.7. Büyüme Eğrisi Analizi 22
2.8. Hücre Döngüsü Analizi 23
2.9. RNA İzolasyonu ve Gen İfadesi Analizi 24
2.9. Kromozom Transmisyon Doğruluğu (CTF) Analizi 25
2.9.1. Lityum Asetat / PEG Yöntemi ile Transformasyon 26
2.10. İstatistik Analizler 28
2.11. Etik Kurul Onayı ve Bilimsel Araştırma Proje Desteği 28
3. BULGULAR 29
3.1. Pilot Deney 29
3.2. Spot Test 30
3.3. Canlılık Testi 31
3.4. Büyüme Eğrisi 32
3.5. Hücre Döngüsü Analizi 33
3.6. RNA İzolasyonu ve RT-PZR 33
3.7. Kromozom Transmisyon Doğruluğu (CTF) Analizi 34
4. TARTIŞMA 35
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 40

6. KAYNAKLAR 42
7. EKLER 47
8. ÖZGEÇMİŞ 48

iv. SİMGELER ve KISALTMALAR

APC : Anaphase promoting factor – Anafaz düzenleyici faktör

***bub1*Δ :** Bub1 Knock-out suş

***bub3*Δ :** Bub3 Knock-out suş

CAPE : Caffeic Acid Phenetyl Ester – Kafeik asit fenetil ester

CAT : Katalaz

CDK : Cyclin Dependent Kinase – Siklin Bağımlı Kinaz

CTF : Chromosome Transmission Fidelity – Kromozom Transmisyon Doğruluğu

DMSO : Di Metil Sülfoksit

eNOS: Endoteliyal nitrik oksit sentetaz

iNOS: İndüklenebilir nitrik oksit sentetaz

kb : Kilobaz

LiAc : Lityum asetat

MDA : Malondialdehit

MPO: Myeloperoksidaz

NO : Nitrik oksit

PEG : Polietilen glikol

PZR : Polimeraz zincir reaksiyonu

Q PZR : Quantitatif Polimerase Chain Reaction – Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu

S. cerevisiae : *Saccharomyces cerevisiae*

SAC : Spindle Assembly Checkpoint – İğ iplikleri kontrol noktası

SEM : Scanning Electron Microscope – Taramalı elektron mikroskobu

SOD : Süperoksit dismutaz

WT : Yabanıl tip (Wild Type)

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Kafeik Asit Fenetil Esterin Hücre Döngüsü Kontrol Noktasi Proteinleri Olan Bub 1 Ve Bub 3 Üzerine Etkisinin *Saccharomyces cerevisiae* Kullanılarak İncelenmesi

Zeynep Narin AZMAN

Danışmanlar

Yrd. Doç. Dr. Hilal ARIKOĞLU

Yrd. Doç. Dr. Sultan ÇİFTÇİ - YILMAZ

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ/ KONYA-2015

Propolis ve fenolik bileşenleri bir çok alanda araştırma konusu olmuştur. Sunulan bu çalışmada propolisin en etkili bileşenlerinden CAPE' nin etkileri *Saccharomyces cerevisiae* kullanılarak değerlendirilmesi amaçlanmış, hücre döngüsü kontrol noktası proteinlerini kodlayan Bub 1 ve Bub 3 genlerinin knock-out olduğu suşlar üzerine CAPE uygulaması yapılarak meydana gelen değişikliklerin izlenmesi ile CAPE' nin etki mekanizmasının saptanması hedeflenmiştir.

Çalışmada knock-out suşların CAPE varlığında canlılıkları test edildi. Spot test ile azalan konsantrayonlarda besiyerine ekim yapılarak büyümeleri, kontrol suşu ve knock-out suşlar arasındaki büyüme farklılıkları incelendi. Canlılık testi ile koloni oluşturma güçleri analiz edilen suşların daha sonra sıvı kültürlerinde büyüme eğrileri analiz edildi. FACS ölçümleri ile hücre döngülerinde CAPE' ye maruz kalmaktan kaynaklanan bir değişim olup olmadığı analiz edildi. RT-PZR ile ifade düzeyleri incelendi. Kromozom transmisyon doğruluğu analiz edilerek suşlar üzerinde kromozom instabilitesi test edildi.

Yapılan spot testlerin sonucunda CAPE' nin knock-out suşların büyümesinde azalmaya neden olduğu gözlendi. Canlılık testi ile oluşturabildikleri koloniler sayılarak karşılaştırıldığında CAPE varlığında koloni oluşturma güçlerinin de zayıfladığı bulundu. Büyüme eğrileri analizinde bölünme hız ve sıklıklarında da azalma olduğu tespit edildi. Yapılan hücre döngüsü analiz çalışmalarından ve RT PZR bulgularından anlamlı sonuçlar elde edilemedi.

CAPE' nin birçok kanser türünü inhibe ettiği bilinmektedir. İlişkili olduğu mekanizmalar araştırmacılar tarafından incelenmeye devam etmektedir. Yapılacak ileri çalışmalar etki ettiği mekanizmaları belirleyebilecektir. CAPE' nin etki ettiği moleküler mekanizmaların bilinmesi, ilaç alternatiflerinin araştırılıp üretilebilmesi için oldukça önemlidir.

Anahtar Kelimeler: Bub 1, Bub 3, CAPE, Hücre Döngüsü Kontrol Noktası, *Saccharomyces cerevisiae*

SUMMARY

TURKISH REPUBLIC
SELÇUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCE INSTITUTE

Investigating the Effect of Caffeic Acid Phenethyl Ester on cell cycle checkpoint proteins Bub 1 and Bub 3 by using *Saccharomyces cerevisiae*

Zeynep Narin AKPINAR AZMAN
Department of Medical Biology

MASTER THESIS / KONYA-2015

Propolis and its phenolic compounds have been subjected to many studies. In this study our aim was to investigate the effect of propolis' most effective compound CAPE on cell cycle checkpoint proteins Bub 1 and Bub 3, and the effect on chromosome instability which is a hallmark of cancer cells by using *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism.

In this study we tested the viability of knock-out *S. cerevisiae* strains on CAPE+ and CAPE- media. We use spotting assay to investigate the growth of the cells in CAPE treatment. The ability of colony formation had been investigated by viability assay and then test the growth curve of strains in liquid media. FACS measurements showed the alterations in cell cycle. Gene expressions investigated by RT PCR. We analyzed chromosome transmission fidelity for test chromosomal instability.

According to our result of spotting assay, CAPE inhibits the growth of knock-out strains. When we counted the number of the colonies that knock-out strains, we saw that CAPE effects on colony formation. In cell cycle analyzes we find that the rate of cell division and rate reduce with CAPE. Cell cycle analyzes and RT PCR results have no significant results.

It is known that CAPE inhibits many cancer species. The related mechanism not clear so researchers focus on this. Next studies can help understand the molecular mechanism of CAPE effectiveness and medicine technology.

Key words: Bub 1, Bub 3, CAPE, Cell cycle check point, *Saccharomyces cerevisiae*

1. GİRİŞ

Kafeik asit fenetil ester (CAPE), arı kovanlarından elde edilen propolisin aktif bileşenlerinden biridir. Propolis, işçi bal arıları tarafından çeşitli bitkilerin yaprak, gövde ve tomurcuklarından toplanıp kovanda biriktirilen reçinemsi bir özüttür. İçerdiği bileşikler, propolisin toplandığı bitki türüne göre farklılık gösterir. Arılarca kovana toplanan propolis, kovanların çatlak ve yarıklarının kapatılmasında, kovanın içine mikroorganizmaların girmesinin engellenmesinde ve kovanın dezenfeksiyonunda kullanılır (Hepşen ve ark 1996). Propolis içeriğinde CAPE bulunabildiği gibi bulunmama durumu da olabilir. Eski yıllardan beri çeşitli hastalıkların tedavisinde halk hekimleri tarafından kullanılagelen alternatif tıp ilaçlarından biri durumundadır.

Son dönemlerde yapılan çalışmalar propolis bileşeni CAPE' nin, kanser hücrelerinin %70-80'inde görülen ve kanserin en önemli belirteçlerinden biri sayılan kromozom instabilitesi üzerinde etkili olduğunu ortaya koymuştur (Foijer 2010, Yılmaz ve ark 2010, Thompson ve Compton 2011). CAPE'nin kromozom instabilitesi üzerinde etkili olduğu bilinmekle beraber genetik ve moleküler seviyede etki gösterdiği mekanizmalar hakkında bir çalışma mevcut değildir. Kromozom instabilitesinin kanser vakalarında çok sık görülmesi nedeniyle, kromozom instabilitesini hedef alan ilaçlar, günümüzde Türkiye ve dünyada ölüme neden olan hastalıklar arasında ikinci sırada yer alan, kanserin tedavisinde çok büyük bir önem taşımaktadır.

Saccharomyces cerevisiae (*S. cerevisiae*) günümüze kadar birçok hastalığın moleküler mekanizmasının anlaşılması ve ilaç hedeflerinin tespitinde çok önemli bir rol oynamıştır. Birçok hücresel mekanizmanın *S. cerevisiae*' den insana korunmuş olmasının yanı sıra kısa jenerasyon süreci ve en önemlisi genetik manipülasyonunun çok kolay olması açısından, *S. cerevisiae* genom ve proteom araştırmaları yapmak için mükemmel bir model organizmadır. Bu yolla elde edilen bilgiler, sonraki aşama olarak insan hücresi ve deney hayvanlarına uygulanmasıyla; hastalık mekanizmasının ve ilaç hedeflerinin bulunmasındaki sürecin hızlanmasında, maliyetin azalmasında ve etik açıdan insan ve hayvan materyalleri üzerinde yapılacak denemelerin büyük ölçüde azalması bakımından avantajlar sağlanmaktadır.

Kromozom instabilitesi *S. cerevisiae*'de yoğun bir şekilde çalışılmış ve knock-out olduğunda bu duruma sebebiyet veren 130 gen tespit edilmiştir (Yuen ve ark 2007). Yaptığımız çalışmada knock-out olduğunda kromozom instabilitesine sebep olan bu 130 gen kapsamında olduğu bilinen Bub 1 ve Bub 3 genlerinin knock-out olduğu *S. cerevisiae* hücre suşları üzerine CAPE'nin etkilerinin araştırılması amaçlandı.

İlk etapta CAPE'nin canlılık üzerine etkisi göz önünde bulundurularak konsantrasyon optimizasyonu yapılmasını takiben Bub 1 ve Bub 3 genlerinin knock-out olduğu suşların buradan tespit edilen konsantrasyonda CAPE uygulamasına karşı gösterdikleri hücresel değişiklikler; gen ifade düzeyinin tayini ve hücre döngüsü analizi gibi tespit yöntemleriyle belirlenmesi hedeflendi. Bunun yanı sıra çalışılan genler, genetik olarak içine yapay bir kromozom konulmuş ve kromozom segregasyonunun, dolayısıyla kromozom instabilitesinin rahatlıkla takip edilebileceği suşlarda knock-out edilerek, CAPE'nin kromozom instabilitesi üzerine etkisinin incelenmesi planlandı.

Çalışmamızdan elde edilecek sonuçların, benzer mekanizmaların diğer model organizmalar ve insan hücrelerinde incelenmesine ışık tutacağı ve kanser için yeni tedavi kapılarının açılmasına ya da yeni ilaç türlerinin keşfine katkıda bulunabileceğini düşünmekteyiz.

1.1. Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE)

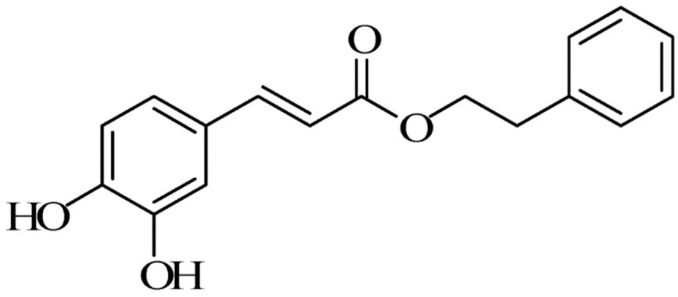
Propolis özütünde tespit edilen birçok kimyasaldan biri olan kafeik asit fenetil ester (CAPE)' in çok sayıda işlevsel özelliğinin olduğu ortaya konulmuştur. Bu işlevleri; oksidatif stres azaltıcı (Uysal ve ark 2015), döngü durdurucu (sitostatik) (Grunberger ve ark 1988), çoğalma önleyici (antiproliferatif) (Hepşen ve ark 1997), apoptotik (Nagaoka ve ark 2003), yükseltgenmeyi önleyici (antioksidan) (Özyurt 2002, Yılmaz ve ark 2004, 2005, Iraz ve ark 2006, Özyurt ve ark 2007), enfeksiyon giderici (antienflamatuar) (Sang ve ark 2002), reperfüzyon hasarını önleyici (Koltuksuz ve ark 2000, Özer 2004), immün sistem güçlendirilmesi ve modüle edilmesi (Park ve ark 2004), bakteriyel enfeksiyon önleyici (antibakteriyel) (Son ve ark 2002, Fadıllıoğlu ve ark 2010, Çakır ve ark 2011), viral enfeksiyon önleyici (antiviral) (Michaluart ve ark 1999, Koltuksuz ve ark 2001), kanser önleyici

(antikarsinojenik) (Yılmaz ve ark 2004, 2005, Çakır ve ark 2011) ve metastaz önleyici (antimetastatik) (Borelli ve ark 2002) şeklinde sıralanmaktadır.

Birçok çalışmada CAPE'nin in vitro veya in vivo olarak kolon kanseri (Xiang ve ark 2006), meme kanseri (Omene ve ark 2011), pankreatik kanser (Chen ve ark 2008), melanoma (Kudugunti ve ark 2011), akciğer kanseri (Chen ve ark 2004), gastrik kanser (Wu ve ark 2007), glioma (Kuo ve ark 2006) gibi kanser türlerini inhibe ettiği gözlenmiştir.

1.1.1. Yapısı ve Kimyasal Özellikleri

Kafeik asit fenetil ester (CAPE) yapıca flavonoidlere benzeyen ve iki halkasal yapı içeren, bal arısı propolisinin aktif kimyasal bir bileşenidir. Halkalardan bir tanesi molekülün hemen hemen bütün kimyasal özelliklerini gösteren fonksiyonel gruplar olan iki adet -OH grubu taşır (Şekil 1.1). Bu hidroksil grupları, aktif bir şekilde elektron alıp vererek oksitleyici ve redükleyici özellik gösterir.



Şekil 1.1. Kaffeik asit fenetil ester (CAPE)' in moleküler yapısı (Zhang ve ark 2014).

CAPE çok uzun alifatik ve aromatik özellikli C grupları taşıdığı için aynı zamanda lipofilik özellikte olup kolayca zar yapılarını geçip etki edeceği bölgeye ulaşabilmektedir. CAPE'nin zardan geçiş katsayısının 13,82 olduğu tespit edilmiştir. Böylece bu kimyasal madde hücre kültürü ve deney hayvanı araştırmalarında her türlü yoldan kolaylıkla verilebilmekte ve bu nedenle ilgili hücre veya vücut bölgesine ulaşımının kolay olduğu savunulmaktadır.

1.1.2. Kafeik Asit Fenetil Esterin Saklama Koşulları

Laboratuvar prosedürlerine bakacak olursak, uzun süreli depolamalarda kafeik asidin -20°C' de saklanması önerilmektedir. Bu şekilde 1 yıl stabil kalabilecektir.

Fenetil kaffeat/CAPE suda çözülebilir değildir fakat serbest olarak organik çözücülerde örneğin; etonol, metanol, aseton, asetonitril veya DMSO vs. rahatlıkla çözülebilir. Fenetil kaffeatın maksimum çözünürlüğü l0 mg/ml'dir. Eğer bir çözücü içinde saklanacaksa, -20°C' de en fazla 6 ay saklanabilir. Ancak sulu solüsyonların bir günden fazla stoklanması tavsiye edilmemektedir.

1.1.3. Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE)'in İşlevsel Özellikleri

CAPE, arıların bitkilerden topladığı özütün içerisinde bulunan keskin ve güzel kokulu propolis (Şekil 1.2) maddesinin aktif bileşenlerinden birisidir. Eski yıllarda propolis halk tıbbı çerçevesinde enflamasyon giderici (Dobrowolski ve ark 1991, Zewail ve ark 2003), bağışıklık sistemi düzenleyici (Dimov ve ark 1992), antioksidan (Pascual ve ark 1994), antimutajenik (Volpert ve Elstner 1993), antimikrobik (Amaros ve ark 1992) gibi birçok sebeple tedavi amaçlı olarak kullanılmış, iyileştirici rolünün olduğu gösterilmiştir.



Şekil 1.2. İşlem görmemiş propolis.

Bu bileşim ayrıca bazı enzimlerin potansiyel engelleyicisidir. Bu enzimler: Ornitin karboksilaz 5-alfa redüktaz, proteaz, lipooksigenaz, human immunodefîciency virüs-1 (FHV-1) integraz sayılabilir. Ayrıca nüklear

transkripsiyon faktörü olan Nüklear Faktör Kappa-B (NF-KB)' nin aktivasyonunu inhibe eden etkili ve spesifik bir inhibitördür.

Döngü durdurucu etki

CAPE ile ilgili ilk çalışmalar, tümör hücreleri üzerine olan sitotoksitite, transformasyon ve gen ifade düzeyleri üzerine olmuştur. Daha sonraları apoptozis üzerine olan etkileri ile NF-KB üzerinden etkinlik gösterdiği tahmin edilen enflamasyon çalışmaları üzerine yoğunlaşılmıştır. Grunberger ve ark (1988) hücre kültür ortamında farklı hücre tiplerinin sayısı üzerine sentetik CAPE'nin sitostatik etkisi incelenmiş ve önemli bazı bulgular elde edilmiştir.

Antiproliferatif ve apoptotik etki

Hepşen ve ark (1997) CAPE' nin intrakameral ve subkonjonktival uygulamasının lens epitel hücrelerinin çoğalma ve transformasyonuna etki edip etmediğini araştırmışlar, bundan hareketle posterior kapsül opasifikasyonunun bu yolla engellenip engellenmediğini ortaya koymaya çalışmışlardır. Bu çalışmanın sonucunda kontrol grubunda çok şiddetli opasifikasyon veya komple opasifikasyon gözlemlenirken CAPE uygulanan grupta kapsüller berrak kalmış veya minör opasifikasyon gözlemişlerdir. Araştırıcılar bundan hareketle CAPE'nin özellikle ekstrakapsüler katarakt çıkarılmasından sonra ve intraoküler lens implantasyonundan sonra gelişmesi muhtemel olan posterior kapsül opasifikasyonunun önlenmesinde kullanılabileceğini göstermişlerdir (Hepşen ve ark 1997).

Diğer bir çalışmada ise CAPE'nin adenovirüs ile transforme edilmiş fibroblastlarda apoptozu indükleyerek hücre ölümüne sebep olduğu, diğer taraftan da tümör özelliği taşımayan sıçan embriyo fibrolastlarında hücre çoğalmasını engellediği bulunmuştur (Chiao ve ark 1995).

İnsan keratinositlerin proliferasyonunu CAPE'nin ne ölçüde etkilediği konusunda yapılan bir çalışmada hücre kültürü ortamında 10 pg/ml konsantrasyonunda yüksek düzeyde çoğalmasını önemli ölçüde engellediği ortaya konulmuştur. Dolayısıyla aşırı çoğalma gösteren deri hastalıklarında kullanılması önerilmiştir (Zheng ve ark 1995).

Hücrelerin CAPE'nin etkisi ile apoptoza uğraması transforme hücrelerdeki normal redoks durumu kaybı ile ortaya konmuştur. CAPE'nin tetradekonilforbol asetat (TPA) ile oluşturulan tümör ilerlemesi kültürü yapılan HeLa hücrelerinde DNA, RNA ve protein sentezlerini azaltarak etki yaptığı bulunmuştur (Huang ve ark 1996).

Yükseltgenmeyi önleyici (antioksidan) etki

Yapılan bir çalışmada (Özyurt 2002) kanser tedavisinde kullanılan antikanserojenik antibiyotiklerden Bleomisin (BLM) kullanımına bağlı olarak gelişen akciğer fibrozisi üzerinde durulmuştur. Bu akciğer fibrozisinde asıl etkenin serbest oksijen radikalleri olduğu düşünülmektedir. Çalışma kapsamında CAPE'nin fibrozis üzerine etkisi incelenmiş antioksidan enzimlerden Süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) aktivitelerinde BLM grubunda kontrol grubuna göre anlamlı azalma MPO aktivitesinde ise artış görülmüştür. CAPE, CAT ve SOD aktivitelerini kontrol seviyesine yükseltirken miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesini kontrol seviyesine indirmiştir. Nitrik oksit (NO), Malondialdehit (MDA) ve OH-Prolin seviyelerinde BLM grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı artış gözlenmiş CAPE, fibrozisli dokudaki NO, MDA ve OH-prolin miktarını düşürerek kontrol seviyesine indirmiştir. Tüm bu sonuçlardan hareketle CAPE' nin antioksidan ve serbest radikal süpürücü etkisi diğer enzimatik olmayan antioksidanlardan yüksek bulunmuştur.

Enflamasyon giderici (antienflamatuar) etki

Fibrozisli dokuya nötrofil göçünün fazla olduğunun göstergesi olan yüksek MPO aktivitesi CAPE ile normale döndürülebilmiştir. BLM muhtemelen NO oluşumunu sağlayan indüklenebilir nitrik oksit sentetaz (iNOS) ve endoteliyal nitrik oksit sentetaz (eNOS) enzimlerini aktive edip argininden daha fazla NO oluşumuna neden olmaktadır. CAPE bu etkiyi de normale döndürebilme yeteneği göstermiştir (Özyurt 2002). Potent bir proenflamatuar aracı olan NO, fibrozisin erken safhalarında sentezlenip oksidadif hasara katkıda bulunarak enflamasyon sürecinde önemli bir basamak oluşturur. CAPE' nin burada antienflamatuar etkisinin de olduğu görülmektedir.

Bir diğer çalışmada (Sang ve ark 2002) oto immun bağımlı doku yıkımlarında ve enflamatuar durumlarda bulunduğu bilinen NO'in sentez ve fonksiyonu üzerine

CAPE'nin etkisi incelenmiştir. Burada NO sentezinden sorumlu iNOS ifadesi ve iNOS enzim aktivitesi üzerine CAPE'nin aktivitesi araştırılmıştır. Bunun için RAW 264.7 makrofaj hücre dizisinde, lipopolisakkaritler (LPS) ve interferon-gama (IFN-y) ile indüklenen iNOS sentezi ve NO üretimi incelenmiştir. Buradan sonuçla, CAPE'nin konsantrasyon bağımlı bir tarzda LPS ve EFN-y ile indüklenen iNOS promotor aktivitesini, bağlantılı olarak iNOS mRNA transkripsiyonunu ve sonuç olarak da iNOS sentezini inhibe ederek NO üretimini azaltmış ve normal seviyeye yaklaştırmıştır. iNOS gen ifadesini CAPE' nin, iNOS promotorundaki transkripsiyon faktörü olan NF-KB' nin bağlanma bölgeleri üzerindeki aksiyon yolu ile baskıladığı görülmüştür (Sang ve ark 2002).

Reperfüzyon hasarını önleyici etki

CAPE'nin reperfüzyon hasarını önleyici etkisi yine birçok dokuda çalışılmıştır. Koltuksuz ve ark (2000) iskemi (belli bir bölgede kan akımının azalması) oluşturulan testislerde reperfüzyon hasarını CAPE'nin bloke edip etmediğini inceledikleri çalışmalarında, CAPE'nin reperfüzyon sonrası açığa çıkan ve hücre zarında lipit peroksidasyonu yaparak hücresel hasara sebep olan reaktif oksijen türlerini süpürücü etki ederek reperfüzyon hasarına engel olduğunu bulmuşlardır

Benzer bir çalışmada İskemi-reperfüzyon uyarılı miyokardiyal hasarın da CAPE tarafından önemli ölçüde azaltıldığı bulunmuştur (Özer ve ark 2004).

Bağışıklık düzenleyici (immünomodülatör) etki

CAPE'nin in vivo olarak bağışıklık düzenleyici etkisinin araştırıldığı bir çalışmada dişi Balb-c fareleri kullanılmış ve çeşitli dozlarda hazırlanan CAPE oral yolla verilmiştir. Bağışıklık düzenleyici aktivite vücut ve organ ağırlıklarının ölçülmesi, lenfosit blastogenezisi, Plaque-forming cell (PFC) testi, lenfosit subpopülasyonunun flow-sitometrik yöntemle tayini ve sitokin üretiminin takibi yollarıyla değerlendirilmiştir.

CAPE uygulanan gruplarda timus ağırlığının yanısıra, timus ve dalak hücresel bileşiminde azalma görülmüştür. Ayrıca sitokinin, interlökin (IL)-2, 1L-4 ve IFN- y 'nın 20 mg/kg CAPE dozunun üzerinde önemli oranda arttığı bulunmuş, bazı hücre

türlerinde sayısal artışlar tespit edilmiştir. Tüm bu sonuçlar CAPE'nin *in vivo* olarak, immünomodülatör etkisinin olduğunu göstermektedir (Park ve ark 2004).

Metastazı önleyici (antimetastatik) etki

Yukarıdaki çalışmadaki hücre ve anologlar farklı bir çalışmada daha ele alınmış ve CAPE ve analoglarının akciğerde murin kolon 26-L5 karsinoma hücrelerinin metastatik gelişimi üzerine etkisi incelenmiştir. Tümör aşılanmasından sonraki 7 günde oral yolla verilen CAPE'nin tümör ağırlığını ve tümör nodüllerinin sayısını kontrol grubuna göre yarı yarıya azalttığı bulunmuştur. Aynı şekilde 4-phenylbutyl caffeate, 8-phenyl -7- octenyl caffeate, 2-cyclohexylethyl caffeate ve n-octyl caffeate analoglarının da oral yolla verilmesi sırasıyla %55, %43, %55 ve %35 oranlarında akciğerde metastaz ile oluşan tümör nodüllerini azaltmıştır (Park ve ark 2004). Tüm bu sonuçlardan CAPE ve onun analoglarının kolon kanserini inhibe edebileceği anlaşılmaktadır.

Kromozom instabilitesini azaltıcı etki

Kromozom instabilitesi karmaşık bir olay olup birçok farklı moleküler mekanizma temelli olabilir. Bu moleküler mekanizmalar literatürde genelde; iğ ipliklerinin oluşmasındaki kontrol noktalarındaki bozukluklar, sentrozom anomalileri, kromozom kohezyonu bozuklukları, mikrotübül-kinetokor dinamiğinde olan değişimler, hücre döngüsü regülasyonundaki bozukluklar (Foijer 2010, Thompson ve ark 2010, Fang ve Zhang 2011) olarak başlıklandırılmışlardır. Farklı kanser türlerinde görülen kromozom instabilitesi, farklı moleküler mekanizmalardan kaynaklanabilmektedir. CAPE'nin kromozom instabilitesine sebep olan hangi moleküler mekanizmalara karşı etkili olduğunun bulunması, CAPE'nin hangi kanserlere karşı ve ne şekilde etkili olacağına ve ne tür yan etkileri olabileceğine dair literatüre çok önemli bilgiler sağlayacaktır.

Bu konuda Yılmaz ve ark (2010) tarafından yapılan çalışmada, CAPE'nin, sıçanlarda cisplatin uygulanması ile indüklenmiş kromozom instabilitesini etkin bir şekilde azalttığı rapor edilmiştir (Yılmaz ve ark 2010). Kanser hücrelerinin %70-80' inde görülen kromozom instabilitesinin (Foijer 2010) genelde ilerlemiş tümör

vakalarıyla, kemoterapiye direnç ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Thompson ve Compton 2011). Bu nedenle CAPE özellikle kromozom instabilitesini hedeflemesi ve kemoterapiye karşı direnç ile ilişkili genlerin ifadesini etkilemesi açısından kanser tedavisinde çok büyük bir potansiyele sahiptir (Yılmaz ve ark, Wu ve ark 2011).

1.2. *Saccharomyces cerevisiae*

Tek hücreli mantarlar olan mayalar, sınıflandırmadaki yerlerini askospor ve koloni oluşturması ile almışlardır. Bitki yaprakları, çiçekler, toprak ve tuzlu sular gibi doğal habitatlarda yaşamak mayaların en belirgin özelliklerindendir. *Saccharomyces* türleri simbiyotik yaşayan ve tomurcuklanma ile çoğalan organizmalardır.

Geçtiğimiz 20 yıl içinde *S. cerevisiae,* yapılan bir çok moleküler genetik çalışmada model organizma olarak kullanılmıştır. Rekombinasyon, replikasyon, hücre bölünmesi ve metabolizma gibi özelliklerin mayalardan yüksek ökaryotlara kadar korunmuş olması mayaları ideal model organizmalar haline getirmiştir.

Maya türleri arasında en bilinen ve kullanılanı *S. cerevisiae'* lerdir. Ekmek mayası olarak da bilinen bu tür, fermentasyon mayası ve ekmek mayası olarak sanayide kullanılmaktadır.

1.2.1. Model Organizma Olarak *Saccharomyces cerevisiae*

Biyolojik çalışmalar için *S. cerevisiae* en ideal ökaryotik mikroorganizmadır. Tüm genom sekansının bilinmesi insanlar ve diğer ökaryotlar için yapılacak çalışmalara da yararlı bir referans olmuştur. Ayrıca genetik manipülasyonunun kolaylığı genom genelinde araştırmaların kolaylıkla yapılabilmesi olanağını sağlamaktadır.

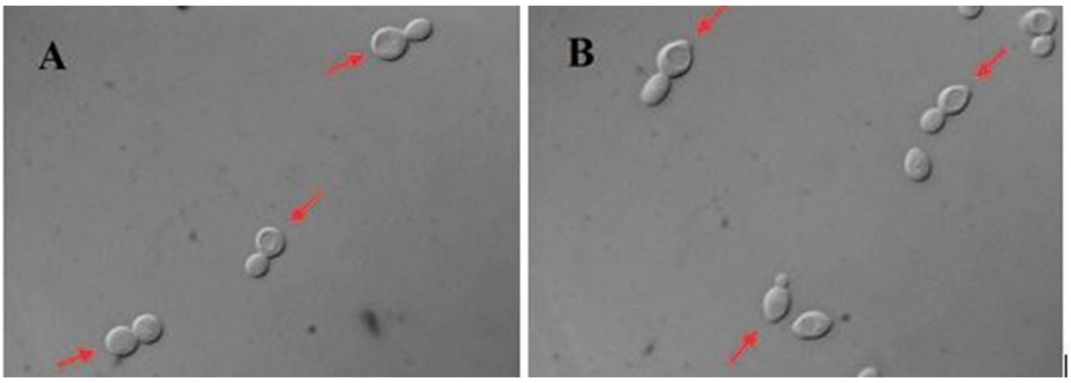
Ökaryot organizmalar olmalarına rağmen prokaryotların ve virüslerin sahip olduğu bir takım avantajlara sahiptirler. Mayaları biyolojik çalışmalara daha elverişli kılan bazı özellikleri; hızlı çoğalma, besiyerinde çoğaltma kolaylığı, mutant suşların izolasyonunun kolaylığı, iyi tanımlanmış genetik sistemi ve en önemlisi çok yönlü DNA transformasyon sistemi şeklinde sıralanabilir. Patojenik olmamaları basit önlemler alarak çalışılmasını mümkün kılmaktadır.

Diğer birçok mikroorganizmanın aksine *S. cerevisiae* yaşam döngüsünde hem haploid hem diploid forma sahiptir. Bu sayede mutasyonlar kolayca izole edilip haploid suşlar ile açığa çıkarılabilir ve tamamlayıcı testler diploid suşlara uygulanabilir.

DNA transformasyonunun gelişmesi ile *S. cerevisiae*' nin gen klonlama ve genetik mühendisliği teknikleri için de kullanılabilir hale gelmesi bu organizmanın bir diğer avantajıdır.

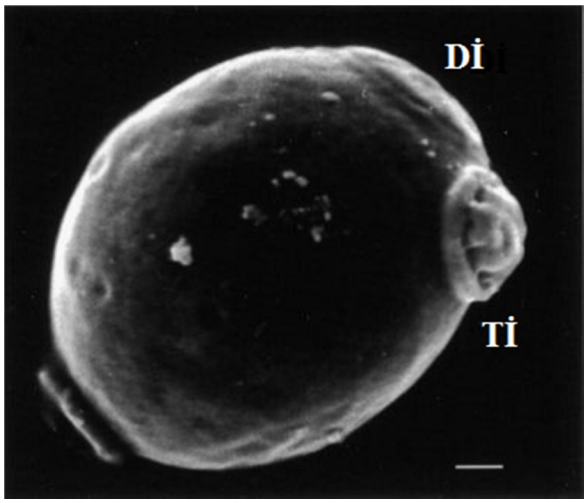
1.2.2. Büyüme ve Yaşam Döngüleri

Mayalarda vejetatif büyüme temel olarak nükleer bölünme ve hücre duvarının oluşumunu takiben tomurcuklanma yolu ile ana hücreden yavru hücrenin oluşmasıyla meydana gelir. Haploid ve diploid hücreler arasında büyümenin evresine ya da suş tipine bağlı olarak büyüklük farklılıkları görülür. Tipik olarak diploid hücreler 5x6 µm elipsoid ve haploid hücreler tipik olarak 4 µm çapında sferoid yapıdadır (Şekil 1.3).



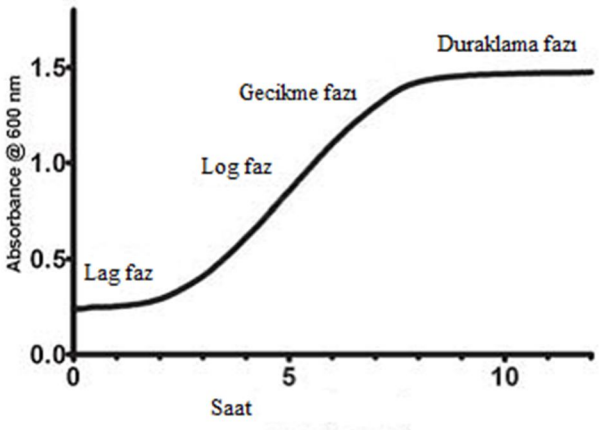
Şekil 1.3. A) Haploid formda sferoid yapıda hücreler ile B) Diploid formda limon şekilli hücrelerin mikroskop görüntüsü (Schneiter 2004).

Diploid kültürler ile karşılaştırıldığında, büyümedeki geometrik artış nedeniyle haploid hücrelerin koloni oluşturma eğilimi daha yüksektir. Haploid hücreler kendilerine bitişik radial tomurcuklar oluştururlarken diploid hücreler zıt kutuplarda aksial tomurcuklar oluştururlar (Şekil 1.4). Bir hücrenin yaşı yüzeyinde bulunan tomurcuk izlerinden tahmin edilebilir. Maya hücrelerinin ömrü 30-40 tomurcuktan sonra son bulur.



Şekil 1.4. Maya tomurcuk izleri SEM görüntüsü. Dİ;Doğum izi hücre ana hücreden ayrılırken oluşan iz, Tİ; Tomurcuk izi Hücre yavru hücre oluşturduktan sonra sahip olduğu iz (Powell ve ark 2003).

S. cerevisiae suşlarının YPD besiyeri içinde oluşturabilecekleri en yüksek yoğunluk 2 X 10^8 hücre/ml'dir. Bu değer hücrelerin bulunduğu besiyerinin pH' sı, besin içerikleri gibi değerler ile bağlantılıdır (Şekil 1.5).

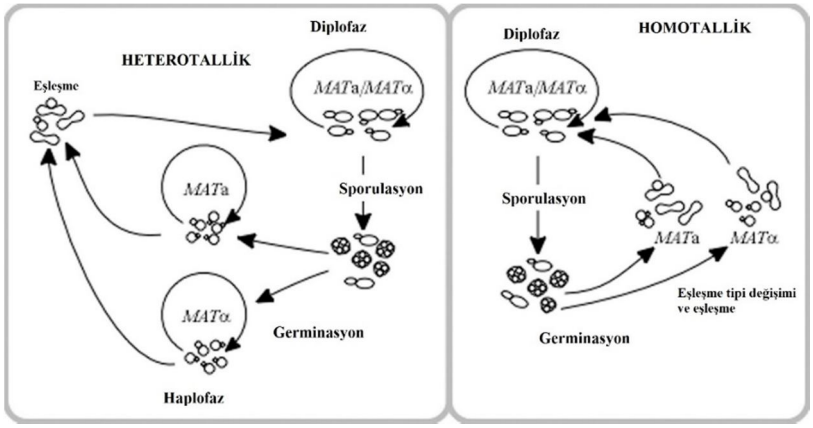


Şekil 1.5. Maya büyüme eğrisi (Held ve ark 2010).

S. cerevisiae suşları homotallik ve heterotallik olarak bulunabilirler (Şekil 1.6). Heterotallik ve homotallik diploid formların her ikiside besin eksikliği, besiyerinde potasyum asetat bulunması gibi durumlarda spor oluştururlar. Azot açığında diploid hücreler mayoz bölünme, sporulasyon geçirir ve haploid sporları içeren askus form oluşur.

Sporulasyon boyunca diploid hücreler askus denilen bir kese içinde tıpkı sporlar gibi 4 haploid hücre oluşturmak üzere mayoz geçirirler.

Sporulasyon görülme sıklığı suşlar arasında farklılık gösterir. Laboratuvar suşlarının bir çoğunda %50 üzerinde sıklıkla sporulasyon görülür. a ve α tipleri MAT a ve MAT α heterozigot allellerinin kontrolü altında olduğu için her bir askus MAT a ve MAT α haploid formalarından iki tane içerir.



Şekil 1. 6. Heterotallik ve Homotallik yaşam döngüleri (Schneiter 2004).

Maruz kalınan besin durumlarına göre sporlar gelişmeye başlayabilir, vejetatif büyümeyi başlatabilir ve iki eşeyin döllenmesi söz konusu olabilir. Ancak haploid formlar mikromanipülasyon ile mekanik olarak ayrıştırılırsa, heterotallik suşların haplofazları stabil şekilde kalabilir. Bu da haploid fazların preparasyonuna olanak sağlar.

Haploid hücrelerin yaşam döngüsü basitçe mitoz ve büyümeden oluşur. Eşeyli üremede maya eşleşmesinde etkili olan polipeptid faktörler hücre döngüsünü başlangıç noktasında durdurur. Bu faktörler maya hücrelerini S fazına ilerletmek yerine haploid hücrelerin birbiri ile birleşmesini sağlar. Başlangıç G1' den S fazına geçişi kontrol eden geç G1 noktasıdır.

Haploid formda yaşamını sürdüren Mat a ve Mat α hücrelerin birleşmeleri üzerine hücre bölünmesi kısa süreli durgunluk aşamasına girer. Bu aşamada önce sitoplazma ve bunu takiben nukleuslar arasında füzyon gerçekleşir. Bu füzyonların ardından bölünme aşamasına gelindiğinde ana hücre içinde kardeş (yavru) hücre

büyümeye başlar. Önce nukleus bölünmesi sonra da zardan tomurcuklanmayla sitoplazma bölünmesi gerçekleşir ve hücreler ayrılır.

1.2.3. *Saccharomyces cerevisiae* Genomu

Haploid formda 16 diploid formda 32 kromozom bulunduran *Saccharomyces cerevisiae* kromozomal DNA' sının total büyüklüğü Nisan 1996' da 12,052 (kilobaz - kb) olarak belirlenmiştir. 6,183 kb üzerinde açık okuma çerçevesi bulunmaktadır (open reading frame – ORF) ve bunların da 5800 kb' lık bir kısmı protein kodlayan esas genlere tekabül eder.

Çok hücreli organizmaların genomlarının aksine, maya genomu oldukça yoğundur. İnsanlarda proteine kodlanan DNA bölgesi genomun ortalama %2'sinin biraz üzerinde iken maya genomunda bu oran %72' dir.

Maya genlerinin yaklaşık %30'u yapılan çalışmalar ile karakterize edilmiştir. Geri kalan %70'lik kısmın ise işlevi bilinmemektedir. Ribozomal RNA genleri kromozom 12 üzerinde ard arda yaklaşık 120 tekrar şeklinde bulunmaktadır. DNA dizileme verilerine göre maya genomu 262 tRNA geni içermektedir. Bunlara ek olarak kromozomlar hareketli DNA elemanları da içermektedir ancak bu elemanların sayı ve pozisyonları suşlar arasında farklılık göstermektedir. Mitokondrial DNA ise mitokondrial translasyon sistemini ve mitokondrial proteinlerin %15' ini kodlayan genleri taşır.

İki µm çapında plazmidler *S. cerevisiae* suşlarının çoğunda bulunur. Bu plazmidlerin yalnızca kendi replikasyonlarında görevli olduğu düşünülür. Nib1 adlı bir gen üzerinde oluşacak bir mutasyon plazmid miktarının gereğinden fazla artmasına neden olmaktadır.

1.3. Hücre Döngüsü

Hücre döngüsü genetik materyalin kopyalandığı ve mitoz ile yeni oluşturulan kardeş hücrelere dağıtıldığı, düzenli moleküler ve hücresel olaylar dizisidir. Hücre döngüsü morfolojik ve biyokimyasal olarak birbirinden tamamen ayrılan iki aşamaya ayrılabilir. Bu aşamalar bölünmenin gerçekleştiği M fazı ve DNA' nın kopyalandığı S fazı olarak adlandırılabilir. Bu iki faz birbirlerinden G (Gap – boşuk) fazlarıyla ayrılır. S fazından önce G1 ve S fazı ile M fazı arasında G2 fazı vardır.

Hücre döngüsü ilerlerken bir takım denetimlerin de sürmesi gerekmektedir. Bunların arasında DNA replikasyonunun tamamlanması için yeterli deoksiribonükleotidlerin bulunması, yeni sentezlenen DNA' nın gözden geçirilerek bir hasar var ise düzeltilmesi, genetik materyalin eksiksiz kopyalandığından emin olunması, mitotik iğ yapısının düzenli olması ve oluşacak kardeş hücreler arasında hücresel materyallerin eşit şekilde dağılımı sıralanabilir. Ayrıca döngünün öncesinde ya da sonrasında, hücrenin tekrar döngüye girip girmeyeceğinin; farklılaşma ya da apoptoza gidip gitmeyeceğinin belirlenmesi gerekmektedir.

Siklinler vasıtasıyla hücre döngüsünde ilerleme, düzenleyici ya da efektör rollere sahip faktörler tarafından belirlenir. Siklin / Siklin Bağımlı Kinazlar (Cyclin Dependent Kinases – CDK)' ın efektör bölgelerinde CDK inhibitörleri olarak adlandırılan (CDKI), siklin/CDK komplekslerinin birleştirilmesini ve etkinliğini düzenleyen düzenleyici faktörler bulunur. CDKI' lar hem CDK' larla hem de siklinlerle kompleks oluşturan küçük proteinlerdir. Bunların rolü esas olarak siklin/CDK komplekslerinin etkinliğini inhibe etmek ve hücre çevriminin ilerleyişini negatif olarak düzenlemektir. Bu proteinler büyümenin artışı ya da baskılanması sinyalini veren moleküler basamaklar dizisinin çoğunun alıcı ucunu oluştururlar.

Saccharomyces cerevisiae' de tıpkı CDK' lar gibi işlev gören CDC proteinleri bulunmaktadır. Hücre döngüsü sıcaklığa duyarlı, *cdc*Δ adlı mutant suşlar ile çalışılmıştır. Örneğin; *cdc28*Δ olarak adlandırılan mutant hücre döngüsü başlangıç noktasında, döngünün duraklamasına neden olur ve bu da cdc28' in G1' deki kritik düzenleyici noktadan geçişte gerekli olduğunu gösterir. Diğer *cdc*Δ mutanlarla yapılan çalışmalar da kanıtlamıştır ki CDC' ler hücre döngüsü başlangıç noktasında ve mitoza girişte kritik rol oynarlar.

1.3.1. Hücre Döngüsü Kontrol Noktaları

Hücre döngüsü kontrol noktaları *S. cerevisiae* mutantları' nda iyi çalışılmış mekanizmalardan biridir. Mitotik döngünün gerçekleşmesi, döngü başlangıcı olarak adlandırılan bir sınır noktasının aşılmasını gerektirir. Bu sınır noktasının aşılamaması, hücrelerin döngünün G1 fazında bloke olmalarına neden olur. S fazı sonrasında G2/M fazları arasında da başka bir sınır noktası bulunmaktadır. Bu sınır noktasını aşamayan hücreler mitoz öncesi tetraploid bir halde kalırlar. Fizyolojik

açıdan bu sınır noktası ikinci mayozda eşey hücrelerinde etkindir. Mayotik döngünün birinci asimetrik bölünmesini geçiren hücreler döllenme ile tamamlanan ikinci mayoz tamamlanana kadar G2 fazında kalırlar. Bu sınır noktaları hücre döngüsü kontrol noktaları olarak adlandırılır.

Mitotik iğ kontrol noktası ise tüm kromozomlar mitotik iğ ile bipolar bağlantlarını tamamlayana kadar anafaza geçişi önlemekle görevlidir. Mitotik kontrol noktasından başarıyla geçilmesi anafaz ilerletici faktör (Anaphase Promoting Complex – APC)' ün aktive olmasını sağlar. Böylece kardeş kromatidler arasındaki bağ çözülerek anafaz başlar.

İğ kontrol noktası (SAC-Spindle Assembly Checkpoint) evrimsel olarak Bub 1- Bub 3-Mad 1-Mad 2- Bub R1(*S. cerevisiae* - Mad3)-mps1 ve aura B proteinlerini içerir. Bunlar evrimsel olarak korunmuş proteinlerdir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD ve Mevlana Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD' nda gerçekleştirilmiştir. Üç temel basamak şeklinde planlanan çalışmamızda malzemelerin temini sonrası, deneylerin optimizasyonları yapıldı. Optimize edilen koşullara göre deneyler tamamlandı. Deneylerin tamamı üçlü tekrarlar şeklinde çalışıldı.

2.1. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler

Çalışmada kullanılan cihaz ve sarf malzemeri sırasıyla Çizelge 2.1 ve Çizelge 2.2' de görüldüğü gibidir.

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan cihazlar.

Cihaz	**Marka**
Sınıf II Biyogüvenlik kabini	Metisafe
Otoklav	JSR
Işık mikroskobu	Olympus
Çalkalamalı inkübatör	New Brunswick
Kar Buz makinası	Scotsman
Santrifüj	Nüve
Mikrosantrifüj	VWR
Nanodrop	Maestrogen
pH metre	Hanna
Spektrofotometre	Schimadzu
Real-time PCR	Roche
Termal Cycler	Bio-Rad
Elektroforez düzeneği	Bio-Rad
Jel görüntüleme cihazı	Bio-Rad
Hassas terazi	Kern
Su banyosu	WiseBath
Vorteks	Dragon Lab
Isı Bloğu	VWR
Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı	M Tops
Çalkalayıcı	WiseShake
Otomatik pipet	Brand
+4 Buzdolabı	Arçelik
-20 Derin dondurucu	Sanyo
-80 Derin dondurucu	New Brunswick

Çizelge 2.2. Kullanılan kimyasal ve sarf malzeme listesi.

Kimyasal/Sarf Malzeme	**Marka**
Dimetilsülfoksit (DMSO)	VWR
Kloroform	Merck
Ethanol	Merck
2-propanol	Merck
cDNA Sentez Kiti	Qiagen
96-kuyucuklu plate	Costar
Otomatik pipet ucu (10' luk, 100' lük, 1000' lik)	VWR
Maya ekstraktı	Lab M
Pepton	Lab M
Glikoz	VWR
Agar	Sigma
Gliserol	Sigma
CAPE	Sigma
Kanamisin	Sigma
Etil alkol	Merck
Trizma Base	Sigma
Rnaz A	Thermo
Proteinaz K	Thermo
Propidyum iyodür	Sigma
EDTA	Sigma
SDS	Sigma
Asit Fenol	Sigma
Sodyum Klorür	Sigma
Sodyum Hidrooksit	Sigma
Lityum Asetat	Sigma
Polietilen Glikol	Merck
Borik Asit	VWR
Sodyum asetat	VWR
2- mercaptoetanol	Merck
Agaroz	Sigma

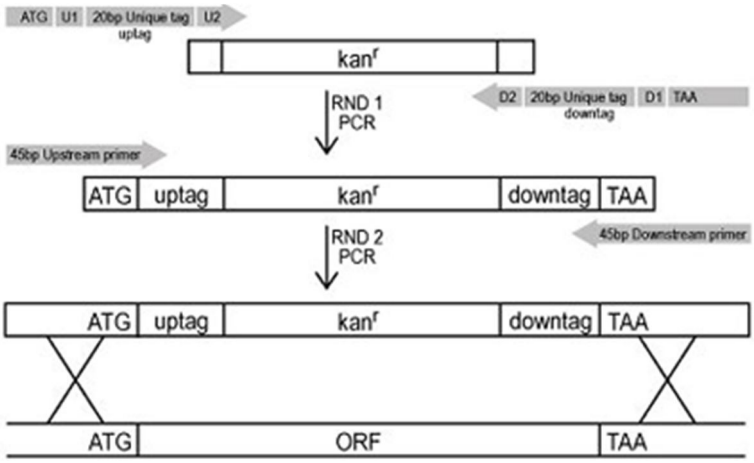
2.2. *Saccharomyces cerevisiae* Suşları

Suşlar Thermo – Scientific YSC 1053 YKO Mat a kütüphanesinden sağlandı.

2.2.1. Yabanıl Tip (Wild Type – wt)

Kullanılan wt suşu BY4741 (haploid, Mat a) suş kaynaklıdır. Bub 1 ve Bub 3 gen delesyonları bu suşda, genlerin kendi lokasyonuna KanMX kasetinin homolog

rekombinasyonu ile sağlanmıştır (Şekil 2.1). Tüm suşlar General Electric Healthsciences firmasından temin edilmiştir (Dharmacon, YSC1053, ABD).



Şekil 2. 1. Homolog rekombinasyon ile gen yerine kanamisin kasedinin yerleştirilmesi.

2.2.2. Bub1 – YGR 188 C

Bub1 (YGR188C) geni yedinci kromozom üzerinde lokalize olup 1021 aminoasitlik bir protein kodlar. Bub 1 proteini iğ iplikleri kontrolünde görevli olan esansiyel olmayan bir protein kinazdır.

Proteini kinetokora yerleşmiştir. Mitotik iğ oluşumunun kontrolünde görevlidir. Knock-out olması durumunda kromozomda, kromozom segregasyonunda ve G2/M geçişinde anomaliler görülür.

Bub1 proteini hücre döngüsü kontrolünde anafaz boyunca gerekli protein kinazdır. Mad1 ve Bub 3 proteinleri ile kompleks oluşturur. İğ ipliklerinde hasar olması ya da mitotik iğ oluşumunda bir hata olması durumunda anafazda ilerlemeyi durdurur. Bu görevi APC' yi inhibe ederek yerine getirir. Cdc28p ile ilişkili fosforilasyon gerçekleştirerek anafazda degredasyon sağlar ve böylelikle döngüyü durdurmuş olur. Skp1p proteini aracılığıyla sentromer DNAsına bağlanır (www.yeastgenome.org).

2.2.3. Bub3 – YOR 026 W

Bub3 (YOR026W) geni onbeşinci kromozom üzerinde yer alır. 341 aminoasitlik esansiyel olmayan bir protein kodlar. Bu protein iğ ipliklerinin kontrolünde görevlidir. Tıpkı Bub1 gibi Bub 3 proteini de iğ ipliklerinde hasar olması ya da mitotik iğ oluşumunda bir hata olması durumunda APC' yi inhibe ederek anafazda ilerlemeyi durdurur.

Bub3 mitotik kontrol noktası kompleksinin ubikitin bağlanıcı alt birimini oluşturur. Mitotik DNA integrasyonu kontrolünde görev alır. Kondanse nükleer kromozom kinetokorlarında lokalize olur. Knock-out olması durumunda kromozom anomalilerinde artış gözlenir.

Metafaz ve profaz boyunca kinetokorda lokalizedir. Bağlanmamış kinetokor olması durumunda anafazı geciktirerek bağlanma için zaman kazanılmasını sağlar. Mad 1 ve Bub 1 ile kompleks oluşturur (www.yeastgenome.org).

2.3. İlk Kültür

İlk kültürler Çizelge 2.3' de gösterildiği gibi hazırlanan 1X YPD katı besiyerinde gerçekleştirildi. Dondurulmuş halde bulunan hücreler, tamamen çözünmesine izin verilmeden buz üzerinden kazıntı şeklinde alınıp 1X YPD – Agar besiyerine ekimleri yapıldı. 48 saat yatay konumda 30 °C' de inkübasyona bırakıldı.

Çizelge 2.3. 1X YPD – Agar hazırlanışı.

Maya ekstraktı	10g
Pepton	20g
Glikoz	20g
Agar	20g
dH_2O	1 lt' ye kadar

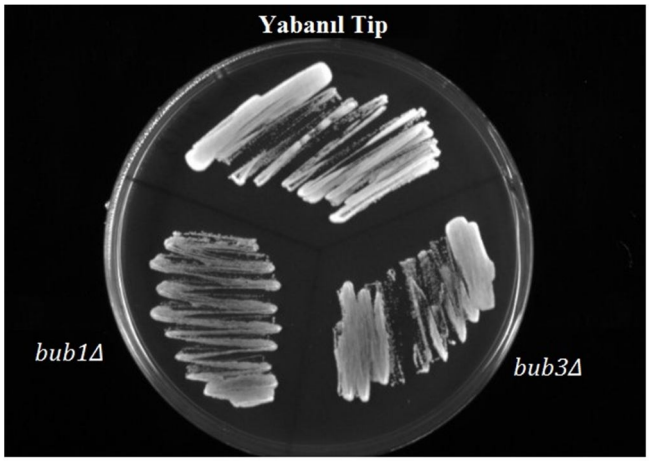
Elde edilen hücrelerden suşlara özel gliserol stokları hazırlandı.

Çizelge 2. 4. %60 Gliserol hazırlanışı.

%87 gliserol	350 ml
dH_2O	300ml

25 ml hazırlanan bu stoklar %60'lık gliserol (Çizelge 2. 4) ve 75 ml 2X YPD besiyerinin karıştırılmasıyla %15 gliserol içerecek şekildeydi. Hazırlanan stoktan ependorf tüpler içine 1' er ml aktarıldı. Eküvyon çubuklarıyla katı besiyerinden toplanan kültürler bu karışımın içine eklendi (Şekil 2.2). Vorteks yardımıyla homojen karışım sağlandı ve kuru buz üzerinde dondurulduğu.

Yapılacan tüm çalışmalarda bu stoklar kullanılarak aynı yöntemle suşların inkübasyonu yapılarak kullanıldı.



Şekil 2. 2. İlk Kültür.

2.4. Pilot Deney

Hücrelerin etkilendiği optimum CAPE miktarını belirlemek için pilot çalışmalar yapıldı. Cigut ve ark (2011) CAPE ve *Saccharomyces cerevisiae* kullanarak yaptıkları çalışmada belirledikleri, CAPE 0,05g/L oranı dikkate alınarak kontrol hücresini öldürmeyecek CAPE konsantrasyonu optimize edildi ve spot test yapıldı.

Bu çalışmada kullanılmak üzere konsantrasyonu 50 µg/ml olacak şekilde CAPE stokları hazırlandı. Son hacmin 2ml olması için bir tüpe alınan 0.1g toz

halindeki CAPE' nin üzerine 2ml' ye tamamlanacak şekilde %100 dimetilsülfoksit (DMSO) eklendi. İyice karıştırılarak CAPE' nin DMSO içinde tamamen çözünmesi sağlandı. Homojen hale gelen karışım membran filtre ile filtrelenerek sterilize edildi.

DMSO içinde çözünmüş halde olan CAPE' nin 0, 10, 50, 100, 200 µg/ml konsantrasyonları test edildi. Besiyerlerine elde edilmek istenen son konsantrasyona uygun olarak CAPE eklendi. Üst sınır olan 200 µg/ml konsantrasyonu dışındaki konsantrasyonların her birine koşulları eşitlemek için CAPE çözeltisindeki DMSO miktarını karşılayacak kadar DMSO eklendi (Çizelge 2.5).

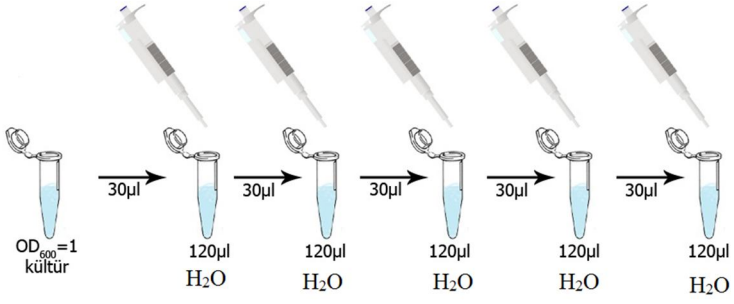
Çizelge 2. 5. 25ml Besiyeri içine eklenen CAPE ve DMSO miktarları.

	0µg/ml	**10µg/ml**	**50µg/ml**	**100µg/ml**	**200µg/ml**
CAPE	0 µl	5 µl	25 µl	50 µl	100 µl
DMSO	100 µl	95 µl	75 µl	50 µl	0 µl

Uygun konsantrasyonlarda CAPE eklenerek hazırlanan besiyeri ile spot test adı verilen canlılık testi gerçekleştirilerek hücrelerin yaşabilirliği test edildi.

2.4. Spot Test

Bub 1 ve Bub 3 genlerinin knock-out olduğu suşlar ve wt, 30°C' deki inkübatörde, 200 rpm de çalkalanarak 1 gece boyunca (yaklaşık 12-18 saat) log faza kadar büyütüldü. Her bir kültürün yoğunluğu OD_{600}= 1 olacak şekilde eşitlendi. 2 defa distile su ile yıkama işleminden geçirdikten sonra suşlar wt en üstte olacak biçimde sıralandı ve seri 5 dilüsyonu hazırlandı (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Spot test uygulama şeması.

Her bir dilüsyon basamağında kültür 1/5 oranında seyreltildi (Şekil 2.3). Daha önce optimize edilen CAPE konsantrasyonu olan 30 µg CAPE ve kontrol olarak 0 µg CAPE içerikleriyle katı besiyeri hazırlandı, besiyerine çok kanallı pipetler yardımı ile kültürlerin 3'er µl ekimleri yapıldı.

Ekim yapılan petri kutuları yatay biçimde 2-5 gün 30 °C inkübatörde bekletildi. Sonuçlar fotoğraflandı.

2.5. Canlılık Testi

Spot test sonucu elde ettiğimiz büyüme farklılıkları göz önünde bulundurularak knock-out suşların koloni oluşturma güçlerini test etmek için canlılık testi yapıldı. Bu testin spot testten farkı besiyerine spotlar şeklinde değil tamamen yayma şeklinde ekim yapılması ve test sonucunda kolonilerin sayılabilir olması.

Bub 1 ve Bub 3 genlerinin knock-out olduğu suşlar ve wt 30 °C' deki inkübatörde, 200 rpm' de çalkalanarak 1 gece boyunca (yaklaşık 12-18 saat) log faza kadar büyütüldü. Her bir kültür OD_{600}= 1 olacak şekilde eşitlendi. 2 defa distile su ile yıkama işleminden geçirdikten sonra pellet 1ml distile su ile süspanse edildi. 10ml distile su içine 10 µl OD_{600}= 1 kültürden eklendi.

Koloni oluşturabilme gücü incelenecek olduğu için 20 µg CAPE konsantrasyonu da kullanıldı. Elde edilen 10 ml lik kültürün 30 µl' si cam boncuklar yardımıyla her bir konsantrasyonda hazırlanan katı besi yerine dağıtıldı. Her birinin 3' lü tekrarları yapıldı.

Ekim yapılan petri kutuları yatay biçimde 2-5 gün 30 °C inkübatörde bekletildi. Sonuçlar fotoğraflandı. Oluşturdukları koloniler sayıldı.

2.6. Büyüme Eğrisi Analizi

Bub 1 ve Bub 3 genlerinin knock-out olduğu suşlar ve wt 30 °C' deki inkübatörde, 200 rpm' de çalkalanarak 1 gece boyunca (yaklaşık 12-18 sa) log faza kadar büyütüldü.

Her bir kültür OD_{600}= 1 olacak şekilde eşitlendi. 2 defa distile su ile yıkama işleminden geçirdikten sonra OD_{600}= 0.1 olacak biçimde 5ml 1X YPD içinde 0, 20 ve 30 µg CAPE konsantrasyonlarında büyümeye bırakıldı. 0 µg konsantrasyon için tüplere 3 µl DMSO, 30 µg konsantrasyon için tüplere 3 µl CAPE ve 20 µg konsantrasyon için tüplere 2 µl CAPE ile 1 µl DMSO eklendi. 30 °C ve 200 rpm' de inkübasyona bırakıldı. Her 3 saatte bir OD_{600} ölçüldü. OD_{600} artışından büyüme hızları belirlendi.

2.7. Hücre Döngüsü Analizi

CAPE'nin hücre döngüsüne bir etkisinin olup olmadığının incelenmesi için Flow sitometri tekniği kullanıldı. Ölçümler BD FACSDiVa cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.

1. 50 ml YPD içinde wt, *bub1Δ* ve *bub3Δ* suşları log faza kadar büyütüldü. Spektrofotometre ölçümleri yapılarak OD_{600}= 0,3 olacak şekilde her suştan 2' şer adet 8 ml'lik kültürler hazırlandı. Her bir suş için hazırlanan kültürlerden birine 4,8 µl DMSO ve diğerine 4,8 µl CAPE eklendi. MATa karakterinde olan hücrelerin tümüne 80 µl α-faktör eklendi ve 30 ºC 250 rpm'de 90 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücrelere α-feromonu verilerek hücrelerin G1 fazında durdurulmaları sağlandı. Mikroskopta hücreler incelenip MATa karakteri ve α-feromonun birleşme gerçekleştirip gerçekleştirmediği belirlendi. Bu birleşmenin anlaşılması için hücreler morfolojik olarak değerlendirildi ve shmoo adı verilen şekli alıp almadıkları kontrol edildi. Shmoo şeklini alan hücrelerde birleşme olduğu kabul edildi (Şekil 2.4).



Şekil 2. 4. MATa karakteri ve α – feromonu birleşimi sonucu oluşan hücrelerin morfolojisi – shmoo formu.

2. Hücreler kontrol edilip senkronize oldukları görüldükten sonra 1 ml örnek alındı ve hücreler yıkanıp α-faktör olmayan besiyerine konuldu ve her 15 dakikada bir 1'er ml örnek alındı. 90 dakika boyunca toplanan örnekler 13000 rpm'de 1 dakika

santrifüjlenerek 1 ml %70 EtOH + 0,2 M Tris (pH 7,4) ile fikse edildi. Fiksasyon sonrası hücreler en az 12 saat +4ºC de bekletildi.

3. 12 saat sonra hücreler 13000rpm'de 1 dakika santrifüjlendikten sonra 2 defa 500 µl 0,2 M Tris (pH 7,4) ile yıkandı. Yıkanan hücrelere 90 µl 0,2 M Tris (pH 7,4) ve 10 µl RNaz A (AppliChem A-2760-10mg/ml) eklenerek 37 ºC' de 4 saat inkübasyona bırakıldı.

4. 4 saat sonunda 5µl Proteinaz K (Sigma P-6556) eklenerek 50ºC'de 1 saat inkübe edildi.

5. İnkübasyon sonrasında hücreler 13000 rpmde 1 dakika santrifüjlendikten sonra 2 defa 500 µl 0,2 M Tris (pH 7,4) ile yıkandı.

6. 1ml 0,2 M Tris (pH 7,4) ve 15 µl propidyum iyodür (Sigma 81845) eklenerek 3-4 gün +4 ºC' de beklemeye bırakıldı.

2.8. RNA İzolasyonu ve Gen İfadesi Analizi

Deney için 5 ml YPD (zengin) besiyeri ile hazırlanan kültür gece boyunca 250 rpm 30 °C'de inkübe edilerek, hücrelerin mid-log fazına kadar büyümeleri sağlandı. Kültürlerin bulunduğu tüplerin birine CAPE (30µg/ml), diğerine aynı miktarda DMSO eklenerek ve 30°C'de 2 saat daha büyümeleri için inkübe edildi.

İnkübasyon sonrası yüksek devirde santrifüj edilen hücreler 1 ml DEPC' li H_2O ile yıkanıp küçük tüplere alındı. Bu aşamadan itibaren çalışmaya protokoldeki şekilde, buz üzerinde devam edildi.

1. 13000 rpm'de 2 dk santrifüjlenen hücrelere 400 µl TES(10 mM Tris pH 7.5, 10 mM EDTA, %0.5 SDS; Sterilize edilmiş ve oda sıcaklığında) eklendi.

2. Üzerine 400 µl' de asit fenol ilave edildikten sonra 10 dakika vortekslendi (her 1 dakikadan sonra tüpler 15 saniye buz üzerinde bekletildi). Tüpler 45 dakika 65°C'de inkübe edildi (Her 15 dakikada bir defa vortekslendi).

3. İnkübasyon sonrası 5dk buz üzerinde bekletilen hücreler 4°C'de 5dk 13000 rpmde santrifüjlendi. Üst faz yeni bir tüpe alınır ve 400 µl asit fenol eklendikten sonra yeniden 4°C'de 5 dk 13000 rpmde santrifüjlendi.

4. Üst faz tekrar yeni bir tüpe alındı ve 400 µl kloroform eklendi. Son kez 4°C'de 5 dk 13000 rpmde santrifüjlendi.

5. Pellet 40 µl 3 M NaCl pH 5.3 (18g NaCl ve 100ml' ye kadar distile su eklenerek hazırlandı) + %95 Etil Alkol (-80°C'de bekletilmiş) ile süspanse edildi ve -80 °C'de bekletildi (en az bir gece).

6. Elde edilen RNA'lardan cDNA elde etmek için Qiagen Reverse Transcription Kit (Kat. No. 205311) kullanıldı. Her bir reaksiyon için 1 µg RNA kullanıldı.

Kit ile cDNA eldesinin ardından, kantitafit polimeraz zincir reaksiyonu (q-PZR, RT-PZR) yapıldı. q-PZR için Quiagen Rotor Gene-Q cihazı kullanıldı.

2.9. Kromozom Transmisyon Doğruluğu Analizi

Bub 1 ve Bub 3 genlerinin knock-out olduğu suşlarda kromozom instabilitesini test etmek için kromozom transmisyon doğruluğu (CTF, Chromosome Transmission Fidelity) analiz edildi.

Bu çalışmada; içine genetik olarak dizayn edilmiş, sentrozomu bulunan ve normal kromozom segregasyon özellikleri taşıyan mini kromozom yerleştirilmiş bir suş kullanıldı. Bu suşun en önemli özelliği oluşan kolonilerin kırmızı renk olmasına neden olan ade2-101 mutasyonu içermesi idi. Mini kromozom üzerinde bulunan *SUP11* bu mutasyonu baskılamakta ve kolonilerin beyaz renkte olmalarını sağlamaktadır. Kromozom instabilitesi taşıyan hücrelerin bölünme esnasında mini kromozomları konusunda tıpkı diğer kromozomlarında olduğu gibi yavru hücrelere ayrılmada problemler yaşayacak ve mini kromozomunu kaybeden hücreler kırmızı renkli koloniler oluşturacak, kromozom instabilitesi olmayan, mini kromozomunu kaybetmeyen hücreler ise beyaz renkli olacaklardır.

Bu yöntemin uygulanabilmesi için Bub 1 ve Bub 3 genleri, mini kromozom içeren suşlar üzerinde knock-out edildi. Knock-out işlemi için, knock-out suşlarda gen yerinde bulunan kanamisin kaseti, genin alt ve üst DNA dizilimindeki homolog bölgeler ile PZR tekniği kullanılarak amplifiye edildi ve PZR ürünleri QIAquick PZR Purification Kit ile ayrıştırıldı.

Elde edilen DNA fragmanı yapay kromozomu bulunan suşa Lityum asetat/Polietilen glikol (PEG) yöntemi ile transfer edildi ve homolog rekombinasyon yardımı ile knock-out suşlar elde edildi. Knock-out suşlar kanamisin rezistansına sahip olacağından bu hücreler kanamisin içeren besiyerinde büyüyebilmeleri ile test edildi. Kasetin varlığının doğrulanması, kanamisin içeren besiyerinde büyüyen koloniler ile koloni PZR yapılarak sağlandı.

2.9.1. Lityum Asetat / PEG Yöntemi İle Transformasyon

5 ml sıvı kültür içinde knock-out suşların bir gece inkübasyonları yapıldı. Sabah 5 ml kültüre 45 ml taze 1X YPD eklendi ve 3 saat daha inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası kültürler santrifüjlenerek hücrelerin dibe çökmesi sağlandı ve iki defa steril distile su ile yıkandı.

Çizelge 2.6. 0,1M LiAc hazırlamak için gerekli malzeme ve miktarlar.

Lityum Asetat	13,2g
dH_2O	200ml' ye kadar

Yıkanan hücreler 2ml 0,1 M LiAc (Çizelge 2.6) + 1X TE (Çizelge 2.7) ile suspanse edildi ve 30 dakika buz üzerinde bekletildi. 30 dakika beklemenin ardından her bir suş için yeni tüp içine 5 µl Salmon sperm DNA (5dk 100°C' de ısıtılmış ve birkaç saniye buz üzerinde tutulmuş), 100 ng DNA (PZR ürünü) ve 100 µl buz üzerinde bekletilen kültür eklendi. Yavaşça karıştırıldı ve %40' lık polietilen glikol (PEG) eklendi. Bu aşamadan sonra hiçbir şekilde karıştırılmadı. 45 dakika 30°C' de ardından da 15 dakika 42°C' de bekletildi ve süre sonunda tüplere hızlıca 500 µl steril distile su eklendi.

Çizelge 2.7. 1X TE hazırlamak için gerekli malzeme ve miktarlar.

100mM Tris	2.42g
10mM EDTA	4ml
dH_2O	200ml' ye kadar

Bir dakika santrifüjlendikten sonra iki defa steril distile su ile yıkandı. 500 µl 1X YPD ile suspanse edilip 4,5 ml 1X YPD içine eklendi ve bir gece oda ısısında büyümeye bırakıldı. 24 saat dolduktan sonra kanamisin içeren YPD besiyerine ekimleri yapıldı ve 2-3 gün 30 °C inkübatörde yatay bir konumda tutuldu.

Çizelge 2. 8. PZR karışımı hazırlanması için gerekli malzemeler ve miktarları.

dH2O	6.425 µl
10X Tampon	1 µl
$MgCl_2$ (25 mM)	0.7 µl
dNTP mix (10 mM)	0.7 µl
İleri primer	0.06 µl
Geri primer	0.06 µl
Taq polimeraz enzimi (5u / µl, 500 u)	0.055 µl
DNA	Koloniden sağlandı

Elde edilen koloniler ile koloni PZR yapılarak transformasyonun doğruluğu test edildi (Çizelge 2.8, Çizelge 2.9).

Çizelge 2. 9. Kullanılan PZR Protokolü.

Reaksiyon	***bub1*Δ**	***bub3*Δ**
İlk denatürasyon	94°C - 5dk	94°C - 5dk
Denatürasyon	94°C - 30sn	94°C - 30sn
Bağlanma	56°C - 45sn	55°C - 45sn
Uzama	68°C - 30sn	68°C - 30sn
	Toplam 35 döngü	
Son uzama	68°C - 2 dk	68°C - 2 dk

PZR sonucunda elde edilen reaksiyon ürünleri 1 g agaroz ve 100 ml TBE (Çizelge 2.10) ile hazırlanmış %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldü ve UV görüntüleme cihazında değerlendirilerek fotoğraflandı.

Çizelge 2. 10. 1X TBE hazırlamak için gerekli malzeme ve miktarlar.

Trisma base	10,8g
Borik asit	5,5g
EDTA (0,5M pH 8)	40ml
dH_2O	1l' ye kadar

Örnekler jelde 120 volt (V)'da 20-30 dk süresince yürütüldü. Jel, ultraviyole görüntüleme cihazında görüntülendi ve fotoğraflandı.

2.10. İstatistik Analizler

Tüm istatistik analizler SPSS 20 istatistik programı kullanılarak yapıldı. Tüm analizler için P değeri <0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

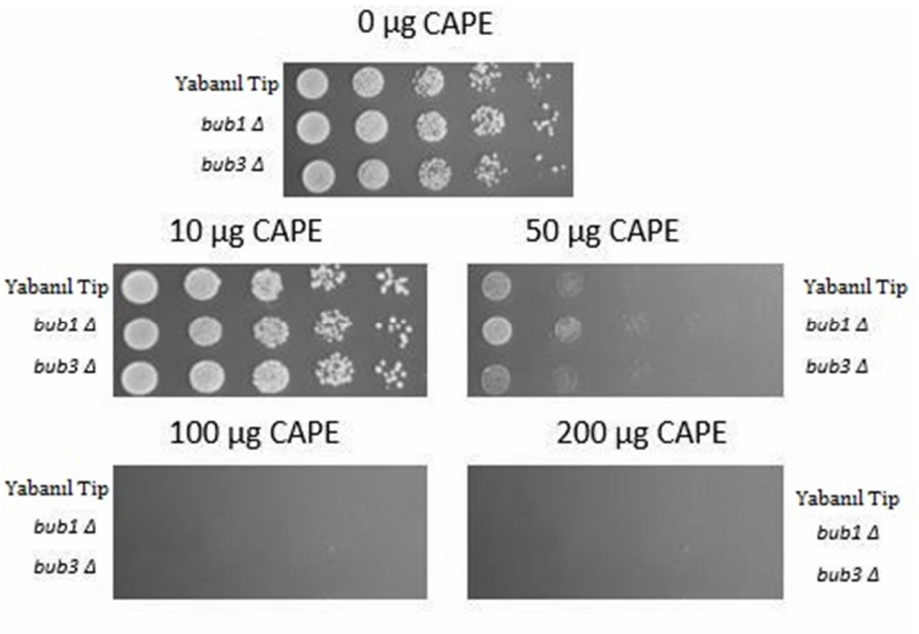
2.11.Etik Kurul Onayı ve Bilimsel Araştırma Proje Desteği

Bu tez çalışması Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu' nun 2014/323 sayılı izni ve Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü' nce desteklenerek gerçekleşmiştir (Proje No: 14202037) .

3. BULGULAR

3.1. Pilot Deney

Konsantrasyon optimizasyonu için yapılan pilot deneyde 50, 100, 200 µg/ml CAPE konsantrasyonlarında yabanıl tip (Wild Type - wt) de dahil hiç bir hücrenin yaşabilirliğini sürdüremediği gözlendi (Şekil 3.1). Buna ek olarak 10 µg/ml CAPE konsantrasyonu ile kontrol olarak kullanılan 0 µg/ml CAPE konsantrasyonu arasında hiçbir farklılık gözlenmedi. 0 µg/ml kontrol konsantrasyonunda bütün suşların wt ile eşit düzeyde büyüme sergilemesi beklenirken bazı suşların büyüyemediği gözlendi. Buna neden olan faktörün, kontrol olarak hazırlanan besiyerine CAPE miktarına eşdeğer olarak eklenen DMSO olabileceği, eklenen DMSO' nun hücreleri etkileyerek bölünmelerine engel olabileceği düşünüldü.

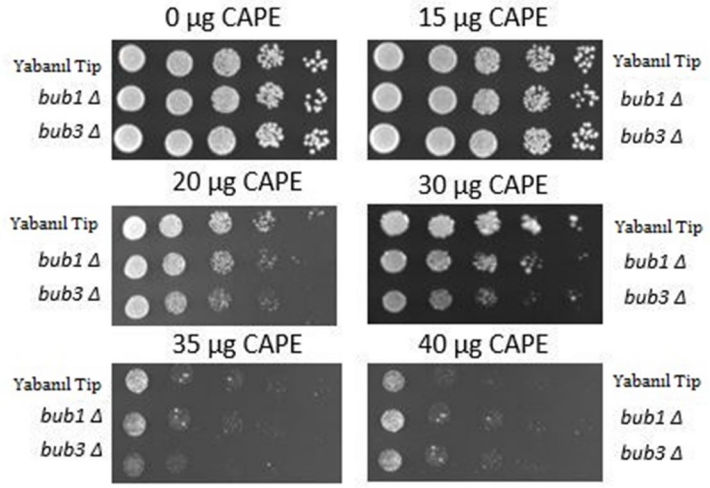


Şekil 3. 1. Birinci pilot deney sonuçları.

Alınan sonuçlar neticesinde tekrar dizayn edilen pilot deneyde 10 µg/ml ve 50 µg/ml arasındaki 5 konsantrasyon (15, 20, 30 ,35 , 40 µg/ml) test edildi (Çizelge 3.1). 20 ve 30 µg/ml konsantrasyonlarında wt normal büyüme gösterirken diğer suşların büyümelerinde farklılıklar gözlendi. 30 µg üzerindeki CAPE konsantrasyonlarında wt büyümesinde azalmalar görüldüğü için dikkate alınmadı.

Çizelge 3. 1. 25ml içinde kullanılan CAPE ve DMSO miktarları.

	0µg/ml	**15µg/ml**	**20µg/ml**	**30µg/ml**	**35µg/ml**	**40µg/ml**
CAPE	0 µl	5 µl	10 µl	15 µl	17,5 µl	20 µl
DMSO	20 µl	15 µl	10 µl	5 µl	2,5 µl	0 µl

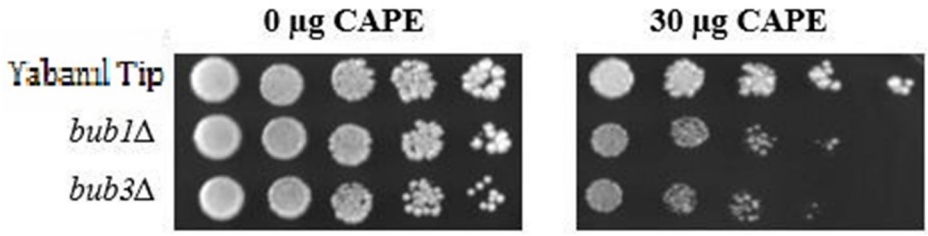


Şekil 3.2. İkinci pilot deney sonuçları.

20-25 ve 30 µg konsantrasyonların arasında gözle görülür bir farklılık olmaması ve bu çalışma sonucunda sayısal veriler elde edilmemesi sebebiyle görsel olarak değerlendirildi ve en belirgin farklılık görülen 30 µg CAPE konsantrasyonu spot test için optimum konsantrasyon olarak belirlendi (Şekil 3.2). 20 ve 25 µg arasında belirgin bir fark gözlenmediğinden 30 µg ile arasındaki farkı göstermek adına 20 µg ve 30 µg konsantrasyonlar koloni oluşumunu test etmek (canlılık testi) için seçilen optimum konsantrasyonlar oldu.

3.1. Spot Test

Yapılan Spot test sonuçlarında kontrol olarak kullanılan CAPE' siz besiyerinde wt ve knock-out suşlar arasında büyüme farkı gözlenmezken pilot deney ile optimize edilmiş olan 30 µg/ml CAPE konsantrasyonlu besiyerinde yabanıl tipin kontrol durumuyla neredeyse eşit düzeyde büyüme gösterdiği, knock-out suşların büyümesinde ise azalma olduğu gözlendi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Spot test bulguları.

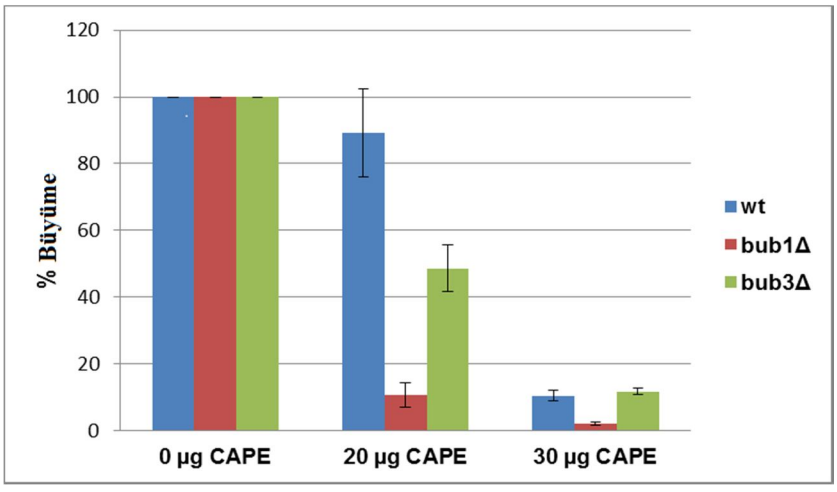
3.2. Canlılık Testi

Canlılık testinde spot testten farklı olarak 20 µg/ml CAPE konsantrasyonu suşların koloni oluşturabilme güçlerinin gösterilmesinde ara basamak olarak kullanıldı. Her bir suş için her bir konsantrasyonun üçlü tekrarları yapıldı. Oluşan koloniler sayıldı (Çizelge 3.2) ve grafikler çıkarıldı .

Çizelge 3. 2. Suşların oluşturdukları ortalama koloni miktarları.

	yabanıl tip	***bub1*Δ**	***bub3*Δ**
0µg/ml CAPE	464	430	429
20µg/ml CAPE	268	265	227
30µg/ml CAPE	32	7	1

Her bir suşun 0 µg/ml CAPE konsantrasyondaki büyümesini %100 büyüme olarak ele aldığımızda büyümelerde % oranında düşüş olduğu görüldü (Şekil 3.4).



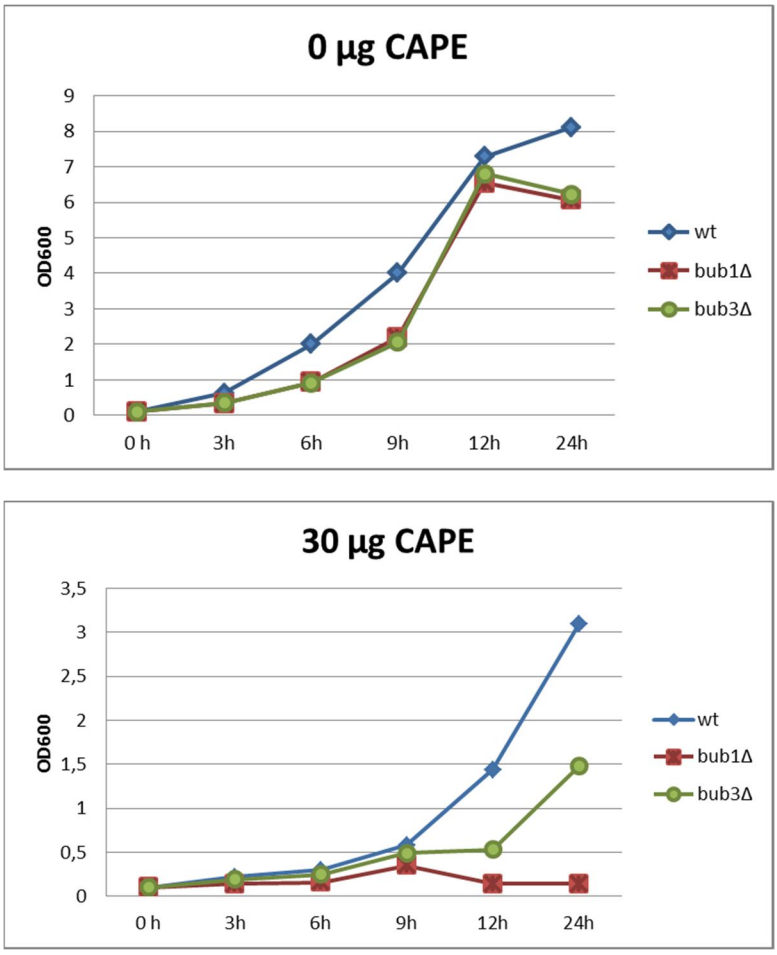
Şekil 3. 4. Canlılık testi ile suşların oluşturduğu koloni yüzdeleri.

3.3. Büyüme Eğrisi

Saccharomyces cerevisiae suşlarının büyüme eğrisine bakıldığında dört ayrı faz görülebilmektedir. Büyüme eğrisini analiz ettiğimiz bu deneyde suşların log faza ve yavaşlama fazına ulaşma durumları incelendi (Çizelge 3.3 , Şekil 3.5).

Çizelge 3. 3. Büyüme eğrisi bulguları.

OD 600 ortalama		başlangıç	3 saat	6 saat	9 saat	12 saat	24 saat
0 µg/ml CAPE	wt	0,1	0,62	2	4,01	7,29	8,11
	bub1Δ	0,1	0,34	0,93	2,19	6,55	6,06
	bub3Δ	0,1	0,35	0,91	2,06	6,81	6,23
30 µg/ml CAPE	wt	0,1	0,22	0,3	0,58	1,44	3,09
	bub1Δ	0,1	0,14	0,16	0,35	0,14	0,14
	bub3Δ	0,1	0,19	0,25	0,49	0,53	1,48

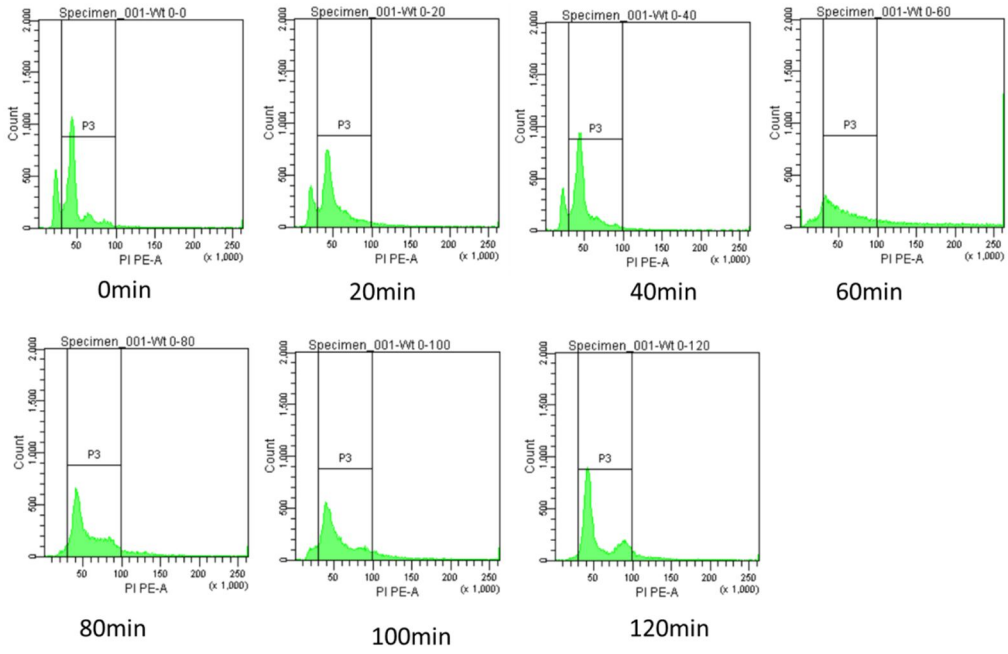


Şekil 3. 5. Büyüme eğrisi grafikleri.

CAPE varlığında ve yokluğunda yabanıl tip log faza daha kısa sürede ulaşırken, knock-out suşlar CAPE varlığında log faza daha geç ulaşmaktadır.

3.4. Hücre Döngüsü Analizi

Kontrol grubu olan CAPE uygulanmamış wt suşunda görüldüğü gibi (Şekil 3.6), yaptığımız bu çalışmadan CAPE' nin uygulandığı suşların hücre döngüsünde anlamlı bir etkisinin olmadığı tespit edildi. Beklentimiz 0 dakikada N sayısında bir pik tespit edilip, hücrenin mitoz bölünmeye geçiş yapması sırasında 2N'e kayan bir pik gözlenmesidir. Belli bir süre sonra senkronizasyonu bozulan suşlarda farklı pik' leri görmek de mümkün olmaktadır.



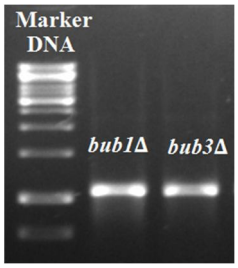
Şekil 3. 6. Yabanıl tip suşu FACS analiz sonuçları.

3.5. RNA izolasyonu ve RT-PZR

CAPE uygulamasından sonra RNA izolasyonu ve sonrasında elde edilen RNA' lardan cDNA elde edildi. Daha sonra olası bir DNA kontaminasyonunu ortadan kaldırmak için DNaz ile muamele edildi. Yapılan qPZR neticesinde gen ifade düzeylerinde anlamlı bir değişiklik tespit edilmedi.

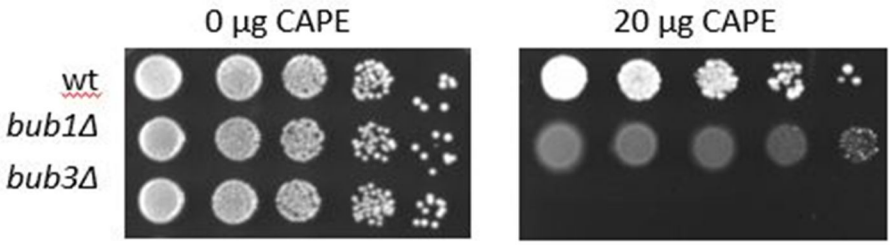
3.6. CTF Analizi

Yapılan transformasyon sonucunda elde edilen koloniler ile koloni PZR yapıldı. Koloni PZR sonuçları transformasyonun doğru biçimde gerçekleştiğini kanıtladı (Şekil 3.7).



Şekil 3. 7. Koloni PZR sonucu. 1kb' lık marker DNA kullanılmıştır. *bub1*Δ : Bub1 geni yerine kanamisin kasedinin yerleştirilmiş formu. *bub3*Δ : Bub3 geni yerine kanamisin kasedinin yerleştirilmiş formu.

Doğruluğu kanıtlanan yeni knock-out suşlar ile spottest yapıldı. Daha önceki suşlar üzerinde optimize edilen CAPE konsantrasyonlarında knock-out suşlar yaşayabilirliklerini sürdüremedikleri tespit edildi.



Şekil 3.8. CTF analizi sonucu, CAPE varlığında canlılığını kaybeden hücreler.

4. TARTIŞMA

Kalıtımsal ve çevresel faktörlerin etkileşimi sonucu ortaya çıkan, her yaş grubundan insanı tehdit eden kanser çağın hastalığı olarak tarihe geçmiştir. Bilim dünyasının büyük bir kısmı bu hastalığa karşı tedavi yöntemleri geliştirmek adına araştırmalar yapmaktadır. Bu araştırmalar neticesinde karşılaşılan genetik bozukluklardan biri kromozom instabilitesidir (Langie ve ark 2015). Kromozom instabilitesi kanser hücrelerinde %70-80 oranında görülen bir olaydır (Foijer 2010).

Propolisin aktif bileşenlerinden biri olan kafeik asit fenetil ester' in kromozom instabilitesini azaltıcı yönde etkisi olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalar kromozom instabilitesinin genelde ilerlemiş tümör vakalarıyla ve kemoterapiye direnç ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Thompson ve Compton 2011). Farklı kanser türlerinde görülen kromozom instabilitesi, farklı moleküler mekanizmalardan kaynaklanabilmektedir. CAPE'nin kromozom instabilitesine sebep olan hangi moleküler mekanizmalara karşı etkili olduğunun bulunması, CAPE'nin hangi kanserlere karşı ve ne şekilde etkili olacağına ve ne tür yan etkileri olabileceğine dair çok önemli bilgiler sağlayacak ve literatürde kromozom instabilitesi ile ilgili çalışma eksikliğinden kaynaklanan boşluğu dolduracaktır. Bu nedenle CAPE, spesifik olarak kromozom instabilitesini hedeflemesi ve kemoterapiye karşı direnç ile ilgili genlerin ifadesini etkilemesi açısından kanser tedavisinde çok büyük bir potansiyele sahiptir.

S. cerevisiae'nin genomunun çok iyi bilinmesi DNA replikasyonu, rekombinasyon, organellerin fonksiyonu, hücre ölümü ve hücre döngüsü gibi birçok hücre içi olayın genom düzeyinde çalışılmasına olanak vermiştir (Pereira ve ark 2012). Kanser hücrelerinde sıkça görülmesi nedeniyle kromozom instabilitesi mekanizmaları iyi bir model organizma olan *S. cerevisiae* kullanılarak çalışılmaktadır (Stirling ve ark 2011). Günümüze kadar *S. cerevisiae* ile yapılan çok sayıda çalışmada, mutasyona veya delesyona uğradığında kromozom instabilitesine sebep olan genler birçok farklı yöntemle tespit edilmiştir (Stirling ve ark 2011a, 2011b, Yuen ve ark 2007). Yuen ve arkadaşları üç farklı metod ile doğrulayarak kromozom instabilitesine etki eden 239 adet geni tespit etmiş daha sonra bunları kontrol ederek 130 genin kromozom instabilitesine etki ettiğini rapor etmişlerdir.

Bizim çalışmamızda yer alan Bub 1 ve Bub 3 genleri bu 130 genin içinde yer almaktadır.

S. cerevisiae hücre yapısı insan hücreleri ile farklılık gösterdiği için çalışmamızda öncelikle hücre yüzeyindeki pompalar yardımıyla CAPE' yi hücre dışına atıp atmadıkları araştırıldı. Cigut ve ark (2011) CAPE ve *S. cerevisiae* ile yaptıkları çalışmada, CAPE'nin *S. cerevisiae* tarafından hücre içine alındığını rapor etmişlerdir. Bu çalışmayı referans alarak çalışmamızda CAPE ve *S. cerevisiae* birlikte kullanıldı ve optimal değerlerde CAPE uygulamasıyla *S. cerevisiae* suşları izlendi.

CAPE' nin *S. cerevisiae* suşları üzerine çeşitli durumlarda kontrol hücrelerine göre büyüyüp büyümediğini Luhua ve ark (2008) yaptıkları çalışmada incelemişler ve kontrol suşu (BY4743) ve bir mutant suş (BY4743 *yap1*Δ) olmak üzere iki farklı suş kullanılan bu çalışmada paraquat ve t-butil-hidroperoksid varlığında suşların büyümesi izlenmiş ancak kontrol suşu çoğalmaya devam ederken mutant suşun büyümesinde inhibisyon olduğu gözlenmiştir.

Salomon ve Sessa 2010' yılında içine GAL-1 kasedi taşıyan bir plazmidi *S. cerevisiae* içine yerleştirdikleri çalışmalarında, içine boş plazmid yerleştirilen kontrol *S. cerevisiae* suşlarına göre büyümelerinde galaktoz varlığında inhibisyon gözlemlemişlerdir.

Buna benzer biçimde çalışmamızda kontrol suşu wt (YMB1001) ve knock-out suşlar (*bub1*Δ ve *bub3*Δ) kullanıldı ve suşların CAPE varlığında ve yokluğunda çoğlamaları izlendi. Yine Luhua ve arkadaşları (2008) ile benzer olarak optimal CAPE konsantrasyonunda kontrol suşunun normal çoğalma miktarında değişiklik olmazken mutant suşların çoğalma miktarlarında ciddi miktarda düşüş olduğunu belirlendi.

Yapılan çalışmalar kromozom instabilitesinin genelde ilerlemiş tümör vakalarıyla, kemoterapiye direnç ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Thompson ve Compton 2011). Çalışmamızda kullandığımız mutant suşların kromozom instabilitesi taşıyan suşlar olması ve CAPE' ye maruz kaldıklarında gözlenen çoğalma inhibisyonu nedeniyle kanser hücrelerinde de benzer biçimde seyrebileceğini

düşünüyoruz. Bu nedenle CAPE'nin spesifik olarak kromozom instabilitesini hedeflemesi ve kemoterapiye karşı direnç ile ilişkili genlerin ifadesini etkilemesi açısından kanser tedavisinde çok büyük bir potansiyele sahip olacağını öngörmekteyiz (Wu ve ark 2011).

Chen ve arkadaşlarının (2004) akciğer kanser hücreleri ile yaptıkları çalışmada, CAPE uyguladıktan sonra, 48 saat gibi bir zaman dilimi sonunda kontrol grubuna kıyasla, kanser hücrelerinde %46'ya varan bir büyüme inhibisyonu olduğunu açıklanmıştır. Yine kanser hücrelerinde apoptotik hücre miktarı %67 oranında artmış ve bazı hücreler S/G2 fazında durmuştur. Aynı zamanda hücrenin mitoz bölünmeye girmesi için gerekli olan siklin B1 proteininde de CAPE uygulaması ile birlikte azalma meydana geldiğini kanıtlamışlardır.

CAPE'ye dair diğer önemli bir çalışma da Yılmaz ve arkadaşları (2010) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada, CAPE'nin, ratlarda cisplatin uygulanması ile indüklenmiş kromozom instabilitesini etkin bir şekilde azalttığı rapor edilmiştir.

Kanser tedavisinde kemoterapik bir ajan olarak kullanılan cisplatin ile genom düzeyinde yapılan ilk çalışmalarda *S. cerevisiae* kullanılmış ve bu çalışmalarla cisplatinin etki ettiği DNA tamiri gibi hücresel mekanizmalar araştırılmıştır (Simon ve ark 2000, Lum ve ark. 2004, Wu ve ark 2004) Daha sonra insan hücre hattıyla yapılan çalışmalar, *S. cerevisiae* ile yapılan çalışmalışmalarla ciddi oranda benzerlik göstermiştir. Zewail ve arkadaşları 2003 yılında yaptıkları çalışmada klinik olarak immünsupresan ve antiinflamatuar amaçlı kullanılan Wortmannin ilacını 6,000 civarında farklı genin delesyonunun yapıldığı *S. cerevisiae* suşu üzerinde denemiş ve bu ilaca direnç veya duyarlılık gösteren genleri tespit etmişlerdir. Benzer bir çalışma ile Tucker ve Fields' in 2004 yılında yaptıkları çalışmada karşımıza çıkmaktadır. Günümüzde dünyada yaygın olarak kullanılan bir ağrı kesici olan ibuprofen ilacına hassasiyet gösteren genleri tespit etmişlerdir. Baetz ve arkadaşları ise 2004 yılında *S. cerevisiae* sayesinde anjiyogenez ve metastazı inhibe ettiği bilinen dihidromotuporamin C bileşiğinin sifingolipid metabolizmasını etkilediğini göstermişlerdir.

Ling ve arkadaşları 2014 tarihli çalışmalarında CAPE' nin prostat kanseri hücreleri üzerine etkisini incelemişlerdir. Bu çalışmada 0, 10 ve 20 µg/ml CAPE' ye

maruz bırakılan kanser hücrelerinin çoğlamaları izlenmiş 14 gün sonunda 10 ve 20 µM konsantrasyonlarda kanser hücrelerinin büyümelerinde büyük oranda inhibisyon gözlemlemişlerdir.

Bu çalışmaya benzer olarak çalışmamızda 0, 20 ve 30 µg/ml CAPE uygulamasıyla suşların çoğalması 2-3 gün boyunca izlendi ve oluşturabildikleri koloni miktarlarını değerlendirdik. Bu değerlendirmeler neticesinde 20 ve 30 µg/ml CAPE konsantrasyonlarında oluşturulan koloni miktarlarında büyük oranda düşüş gözlemlendi. Tüm çalışmaları üçlü tekrarlar şeklinde gerçekleştirdik. Yapılan istatistik analizler sonucunda 20 ve 30 µg/ml CAPE konsantrasyonlarında gözlemlenen büyüme inhibisyonunun anlamlı derecede farklılık gösterdiği kaydedildi ($p < 0,05$).

Luhua ve arkadaşlarının 2008 yılında yaptıkları çalışmada test ettikleri bir diğer mekanizma ise büyüme eğrisidir. Çalışmalarında spot testte de kullandıkları paraquatı kullanarak sıvı kültürde büyümeleri izlemişlerdir. Spot testte de olduğu gibi büyüme inhibisyonu gözlemlemişlerdir. Bu analizde farklı olarak mutant suşların büyüme eğrilerinde geç kaldıklarını, mutant hücrelerin log faza kontrol hücrelerinden daha geç ulaştıklarını göstermişlerdir.

Kuo ve arkadaşlarının glioma hücreleri ile yaptıkları 2006 tarihli çalışmada, CAPE'nin glioma hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği rapor edilmiştir. 24 saatlik bir CAPE uygulaması ardından G1 fazındaki hücre miktarında artış gözlenmiştir ki bu bulgu aynı uygulamayla G1 fazından S fazına geçilmesi için gerekli olan Siklin E proteinin azalmasıyla doğru orantı göstermektedir. Bununla beraber Sikline bağlı kinaz inhibitörlerinde de artış gözlenmiştir.

Luhua ve arkadaşlarına (2008) benzer şekilde Azad ve arkadaşları 2014' de *S. cerevisiae* suşlarını 5, 10, 20, 30 ve 50 µM ebselen ile muamele etmiş ve *S. cerevisiae* hücrelerinin büyümelerinde inhibisyon gözlemlemişlerdir.

Çalışmamızda ise CAPE varlığında ve yokluğunda sıvı kültürlerde inkübasyonu yapılan hücrelerin spektrofotometrik ölçümleri Luhua ve arkadaşlarının (2008) çalışmasına benzer biçimde log faza hücrelerin geç ulaştığını göstermektedir.

Hücre döngüsü ile ilgili yapılan bir çalışmada Mat a olan *S. cerevisiae* suşlarına hücre döngüsünün senkronizasyonu için α – feromonu verilmiş ve hücreler G1 fazında durdurulmuş, sonrasında döngüye senkronize devam etmeleri ile 15 dakika aralıklarla toplanan hücrelerin DNA miktarları FACS cihazı ile ölçülmüştür. Sonuç olarak CAPE' nin *bub1*Δ ve *bub3*Δ suşlarında hücre döngüsü üzerine etkisinin olmaığı tespit edilmiştir (Mishra ve ark 2011).

Elde ettiğimiz sonuçlar CAPE' nin kromozom instabilitesi yüksek *bub1*Δ ve *bub3*Δ suşları üzerinde büyümeyi inhibe edici etkisinin olduğunu göstermiştir. Bu bulgular sonraki aşamalarda kanser hücre hatları ile yapılacak deneylere temel oluşturabilecek niteliktedir. Bir sonraki aşama olan Bub 1 ve Bub 3 gen ifadesi azalmış kanser hücre hatlarında CAPE' nin benzer şekilde inhibe edici etkisinin araştırılması elde ettiğimiz sonuçların hastalık tedavisinde kullanım potansiyelinin daha iyi anlaşılması açısından önem taşımaktadır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda kafeik asit fenetil ester (CAPE)'in kromozom instabilitesine neden olan hücre döngüsü kontrolü bozuklukları üzerine etkisinin model organizma olan *Saccharomyces cerevisiae* kullanılarak incelenmesi amaçlandı. Elde edilecek bulgular ile CAPE etki mekanizması hakkında bilgiler elde edilmesi ve ileri düzey çalışmalara temel oluşturması hedeflendi.

Kanserin en önemli belirteçlerinden biri olan kromozom instabilitesi yalnız kromozom sayılarındaki anormallikleri ifade etmekle kalmayıp genomik kararsızlıkları da kapsamaktadır. Hücre döngüsü kontrol noktası proteinlerini kodlayan genlerde meydana gelen herhangi bir değişim (mutasyon, delesyon vs.) genomik kararsızlığa ve dolayısıyla kromozom instabilitesi sebebi ile meydana gelen karsinogeneze sebebiyet verebilmektedir. Kontrol noktası proteinlerinde meydana gelen hasarlar, hücre döngüsündeki hataların tanınmasına ve tamir edilmesine engel olarak, hücre döngüsünü sürdürecektir. Bu durum sağlıklı olmayan hücrelerin döngüyü tamamlamasına ve bunu yeni oluşturacağı tüm hücrelere aktarmasına neden olacaktır. Hatalı genomların yeni oluşacak hücreler aracılığıyla yayılması kanserleşmeye neden olabilmektedir. CAPE'nin antikarsinojenik etkisi göz önünde bulundurularak yapılan bu çalışmada *Saccharomyces cerevisiae* hücre döngüsü kontrol noktası proteinlerini kodlayan Bub 1 ve Bub 3 genlerinin knock-out olduğu suşlar üzerine Kafeik Asit Fenetil Esterin hücresel etki mekanizmalarının anlaşılması için çalışmalar yapıldı.

İlk etapta CAPE' nin herhangi bir etkisinin olup olmadığı spot test ile analiz edildi ve bulgular neticesinde CAPE' nin kromozom instabilitesi taşıyan knock-out suşlar üzerinde büyüme inhibisyonu gösterdiği anlaşıldı. Yapılan canlılık testleri ile suşların koloni oluşturabilme güçleri ve yaşayabilirlikleri test edildi. Bu aşamada da CAPE' den benzer bir sonuç alınarak canlılıklarına etki ettiği gözlendi.

Çalışmanın ilerleyen aşamalarında büyüme eğrisi üzerine CAPE' nin etkisi incelendi. Hücre döngüsünde yavaşlama ve gecikme olduğu, hücrelerin olgun fazları olan log faza erişmelerinde gecikmeler olduğu gözlendi. Bu çalışma ele alınarak yapılan hücre döngüsü çalışmalarında belirli aralıklarla toplanan hücrelerin DNA

miktarları kontrol edildi. Döngünün farklı evrelerinde DNA miktarında farklılıklar beklenirken anlamlı sonuçlar elde edilemedi.

Elde ettiğimiz veriler neticesinde CAPE varlığında wt canlılığını korurken *bub1*Δ ve *bub3*Δ suşların canlılıklarını sürdürememesi yapılacak çalışmalara veri sağlanması bakımından önemlidir. Bununla birlikte çalışmamızda CAPE' nin etki mekanizmasının ortaya konulamaması nedeniyle yapılacak yeni çalışmalarla etki mekanizmasının ortaya konulması tedaviye yönelik yaklaşımlara ışık tutacaktır.

6. KAYNAKLAR

Amaros M, Sauvager F, Gire L, Cormier M, 1992. In-vitro antiviral activity of propolis. Apidologie, 23, 231-40.

Amoros M, Lurton E, Boustie A, Girre L, 1994. Comparison of the anti-herpes simplex virus activities of propolis and 3-methylebut-2-enly caffeate. Jnat Prod, 57, 644-7.

Azad GK, Tomar RS, 2014. Ebselen, a promising antioxidant drug: mechanisms of action and targets of biological pathways. Mol Biol Rep, 41, 4865-79.

Baetz K., McHardy L., Gable K., Tarling T., Rebérioux D., Bryan J., Andersen R.J., Dunn T., Hieter P., Roberge M, 2004.Yeast genome-wide drug-induced haploinsufficiency screen to determine drug mode of action. Proc Natl Acad Sci USA, 1014525-30.

Bankova V, Dyulgerov A, Popov S, Evstatieva L, Kuleva L, Pureb O, Zamjansan Z, 1992. Propolis produced in Bulgaria ahd Mongolia: Phenolic compounds and plant origin. Apidologie, 23, 79-85.

Borrelli F, Izzo AA, Di Carlo G, Maffia P, Russo A, Maiello FM, Capasso F, Mascolo N, 2002. Effect of a propolis extract and caffeic acid phenethyl ester on formation of aberrant crypt foci and tumors in the rat colon. Fitoterapia,73, 38-43.

Cakır T, Özkan E, Dulundu E, Topaloğlu Ü, Şehirli AÖ, Ercan F, Şener E, Şener G, 2011. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats. J Pharm Pharmacol, 63, 1566-71.

Carmona-Gutierrez D, Jungwirth H, Eisenberg T, Madeo F, 2010. Cell cycle control of cell death in yeast. Cell Cycle, 9, 4046.

Chen MF, Wu CT, Chen YJ, Keng PC, Chen WC, 2004. Cell killing and radiosensitization by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in lung cancer cells. J Radiat Res (Tokyo), 45, 253-60.

Chen MJ, Chang WH, Lin CC, Liu CY, Wang TE, Chu CH, Shih SC, Chen YJ, 2008.Caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis of human pancreatic cancer cells involving caspase and mitochondrial dysfunction. Pancreatology, 8, 566-76.

Chiao C, Carothers AM, Grunberger D, Salaman G, Prostan GA, Barret JC, 1995. Apoptosis and altered redox state induced by CAPE in transformed rat fibroblast cells. Cancer Res, 55, 3576-83.

Cigut T, Polak T, Gašperlin L, Raspor P, Jamnik P, 2011. Antioxidative activity of propolis extract in yeast cells. J. Agric. Food Chem, 59, 11449-55.

Cooper GM, Hausman RE, 2007. The cell: a molecular approach. Fourth ed. Massachusetts, Sinauer Associates, Inc. p 591-625

Dığrak M, Yıldız S, 1995. Propolisteki yağ asitleri ve antimikrobiyal etkisi üzerinde *vitro* araştırmalar. Gıda, 20, 249-55.

Dimov V, Ivanovska N, Bankova V, Popov S, 1992. Immunomodulatory action of propolis: IV. prophylactic activity aganist gram (-) infections and adjuvant effect of the water-soluble derivate. Vaccine, 10, 817-21.

Dobrowolski JW, Vohoraq SB, Sharma K, Shah SA, Nagvi SAFI, Dandiya PC, 1991. Antibakterial, antifungal, antiamoebic, antiinflamatory and antipyretic studies on propolis bee products. J Ethnopharmacol, 35, 77-82.

Douglas FJ, 1984. Carcinogenesis and mutagenesis testing. Scientific Services Inc, 3, 29.

Fadillioglu E, Gursul C, Iraz M, 2010. Effects of caffeic acid phenethyl ester on thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in rats. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 34, 1440-5.

Fang X, Zhang P, 2011. Aneuploidy and tumorigenesis. Semin Cell Dev Biol, 22, 595-601.

Focht J, Hansen SH, Nielsen JV, Van den Berg-Segers A, Riezler R, 1993. Bactiricidal effect of propolis in vitro against agents causing upper respiratory tract infections. Arzneim Forsch/Drug Res, 43, 921-23.

Foijer F, 2010. CINister thoughts. Biochem Soc Trans, 38,1715-21.

Garbys J, Konecki J, Krol W, Scheller S, Shani J, 1986. Free amino acids in bee hive products (Propolis) as identifed and quantified by gas-liquid chromatography. Pharmacol Res Comm, 18,513-18.

Garcia-Viguera C, Ferreres F Tomas-Barberan FA, 1993. Study of Canadian propolis by GC-MS and HPLC. Z Naturfosch, 48, 731-35.

Grange JM, Davey RW, 1990. Antibacterial properties of propolis (Bee glue). J Royal Soci, Med, 83, 156-60.

Grunberger D, Banerjee R, Eisinger K, Oltz EM, Efros L, Caldwell M, Estevez V, Nakanishi K, 1988. Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. Experientia, 44, 230-32.

Hartwell LH, 2002. Yeast and cancer, Nobel Lecture. Biosci Rep, 22, 373-94.

Held MI, Sulaiman SA, Charles AK, 2010. The potential role of honey and its polyphenols in preventing heart diseases: a review. Afr J Tradit Complement Altern Med, 7, 315-21.

Hepşen ÎF, Bayramlar H, Gültek A, Özen S, Tilgen F, Evereklioğlu C, 1997. Caffeic acid phenetly ester to inhibit posterior capsule opacification in rabbits cataract. Refract Surg, 1572-6.

Hepşen İF, Tilgen F, Er H, 1996. Propolis:Tıbbi özellikleri ve ofîtalmolojik kullanımı. T. Özal Tıp Dergisi, 3, 386-39.

Huang MT, Ma W, Yen P, Xie JG, Han J, Frenkel K, Grunberger D, Conney AH, 1996. Inhibitory effect of CAPE on 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion in mouse skin and the synthesis of DNA, RNA and promotion HeLa cells. Carcinogenesis, 17, 761-765.

Ikeno K, Ikeno T, Myazawa C, 1991. Effect of propolis on dental caries in rats. Carries Res, 25, 347-51.

Iraz M, Ozerol E, Gulec M, Tasdemir S, Idiz N, Fadillioglu E, Naziroglu M, Akyol O, 2006. Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) administration on cisplatin-induced oxidative damage to liver in rat. Cell Biochem Funct, 24, 357-61.

Jones GM, Stalker J, Humphray S, West A, Cox T, Rogers J, Dunham I, Prelich G, 2008. A systematic library for comprehensive overexpression screens in *Saccharomyces cerevisiae*. Nat Methods, 5, 239-41.

Kennedy CH, Mitcell CE, Fukushima NH, Neft RE, Lechner JF, 1996. Induction of genomic instibility in normal human branchial epithelial cells by 238 Pu alpha-particles. Carsinogenesis, 17, 1671-6.

Khayyal MT, El-Ghazaly MA, el-Khatip AS, 1993. Mechanisms involved in the antiinflammatory effect of propolis extract. Drugs Exp Clin Res, 19, 197-203.

Koltuksuz U, Mutuş HM, Kutlu R, Ozyurt H, Cetin S, Karaman A, Gürbüz N, Akyol O, Aydin NE, 2001. Effects of caffeic acid phenethyl ester and epidermal growth factor on the development of caustic esophageal stricture in rats. J Pediatr Surg, 36, 1504-9.

Koltuksuz U, Uz E, Karaman A, Özyurt H, Aydinç M, Akyol Ö, 2000. The effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) applied before detorsion on testicular reperfusion injury in rats. Urol Res, 28, 360-3.

Krol W, Czuba Z, Scheller S, Gabrys J, Grabiec S, Shani J, 1990. Anti-oxidant property of etanolic extract of propolis (EEP) evaluated by inhibiting the chemiluminescence oxidation of luminol. Biochem Int, 21, 593-97.

Krol W, Scheller S, Shani J, Pietsz G, 1993. Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of staphylococcus aereus. Arzneimittelforschung, 43, 607-9.

Kudugunti SK, Thorsheim H, Yousef MS, Guan L, Moridani MY, 2011. The metabolic bioactivation of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) mediated by tyrosinase selectively inhibits glutathione S-transferase. Chem Biol Interact, 192, 243-56.

Kuo HC, Kuo WH, Lee YJ, Lin WL, Chou FP, Tseng TH, 2006. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on the growth of C6 glioma cells in vitro and in vivo. Cancer Lett, 234, 199-

208.

Langie SA, Koppen G, Desaulniers D, Al-Mulla F, Al-Temaimi R, Amedei A, Azqueta A, Bisson WH, Brown D, Brunborg G, Charles AK, Chen T, Colacci A, Darroudi F, Forte S, Gonzalez L, Hamid RA, Knudsen LE, Leyns L, Lopez de Cerain Salsamendi A, Memeo L, Mondello C, Mothersill C, Olsen AK, Pavanello S, Raju J, Rojas E, Roy R, Ryan E, Ostrosky-Wegman P, Salem HK, Scovassi I, Singh N, Vaccari M, Van Schooten FJ, Valverde M, Woodrick J, Zhang L, van Larebeke N, Kirsch-Volders M, Collins AR, 2015. Causes of genome instability: the effect of low dose chemical exposures in modern society. Carcinogenesis, 36, 61-88.

Liao HF, Chen YY, Liu JJ, Hsu ML, Liao HJ, Shieh CJ, Chen YJ, 2003. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on angiogenezis, tumor invasion and metastasis. J Agric Food Chem, 51, 7907-12.

Ling XH, Han ZD, Xia D, He HC, Jiang FN, Lin ZY, Fu X, Deng YH, Dai QS, Cai C, Chen JH, Liang YX, Zhong WD, Wu CL, 2014. MicroRNA-30c serves as an independent biochemical recurrence predictor and potential tumor suppressor for prostate cancer. Mol Biol Rep, 41, 2779-88.

Luhua S, Ciftci-Yilmaz S, Harper J, Cushman J, Mittler R, 2008. Enhanced tolerance to oxidative stress in transgenic Arabidopsis plants expressing proteins of unknown function. Plant Physiol, 148, 280-92.

Lum PY, Armour CD, Stepaniants SB, Cavet G, Wolf MK, Butler JS, Hinshaw JC, Garnier P, Prestwich GD, Leonardson A, Garrett-Engele P, Rush CM, Bard M, Schimmack G, Phillips JW, Roberts CJ, Shoemaker DD, 2004. Discovering modes of action for therapeutic compounds using a genome-wide screen of yeast heterozygotes. Cell, 116, 121-37.

Michaluart P, Masferrer JL, Carothers AM, Subbaramaiah K, Zweifel BS, Koboldt C, Mestre JR, Grunberger D, Sacks PG, Tanabe T, Dannenberg AJ, 1999. Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester on the activity and expression of cyclooxygenase-2 in human oral epithelial cells and in a rat model of inflammation. Cancer Res, 59, 2347-52.

Mirzoeva OK, Sudina GF, Pushkareva MA, Korshunova GA, Sumbatian NV, Varfolomeev SD, 1995. Lipophilic derivatives of caffeic acid as lipooxygenase inhibitors with antioxidant properties. Bioorg Khim, 21, 143-51.

Mishra GA, Pimple SA, Shastri SS, 2011. An overview of prevention and early detection of cervical cancers. Indian J Med Paediatr Oncol, 32, 125-32.

Nagaoka T, Banskota AH, Tezuka Y, Harimaya Y, Kadota S, 2003. Inhibitory Effect of caffeic acid phenethyl ester analogues on experimantal lung metastasis of murine colon 26- L5 carcinoma cells. Biol Pharm Bull, 26, 638-41.

Omene CO, Wu J, Frenkel K, 2011. Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) derived from propolis, a honeybee product, inhibits growth of breast cancer stem cells. Invest New Drugs, 30, 1279-88.

Özer MK, Parlakpınar H, Acet A, 2004. Reduction of ischemia-reperfusion induced myocardial infarct size in rats by caffeic acid phenetyl ester (CAPE). Clin Biochem, 2004, 37, 702-5 .

Özyurt H, Özyurt B, Koca K, Özgöçmen S, 2007. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) protects rat skeletal muscle against ischemia-reperfusion-induced oxidative stress. Vascul Pharmacol, 47, 108-12.

Park JH, Lee JK, Kim HS, Chung ST, Eom JH, Kim KA, 2004. Immunomodulatory effect of caffeic acid phenetly ester in Balb/mice. Int Immunopharmacol, 4,429-36.

Pascual C, Gonzales R, Torricella RG, 1994. Scavenging action of propolis extract aganist oxygen radicals. Jethnopharmacol, 41, 9-13.

Pereira C, Coutinho I, Soares J, Bessa C, Leão M, Saraiva L, 2012. New insights into cancer-related proteins provided by the yeast model. FEBS J, 279, 697-712.

Powell CD, Quain DE, Smart KA, 2003. Chitin scar breaks in aged *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology, 149, 3129-37.

Saccharomyces cerevisiae Genome Database, Erişim tarihi Temmuz 2015. Erişim adresi, www.yeastgenome.org, 1-86.

Salomon D, Sessa G, 2010. Identification of growth inhibition phenotypes induced by expression of bacterial type III effectors in yeast. J Vis Exp, 30, 37.

Sang YS, Park EH, Hur GM, Ryu VS, Lee YS, Lee JY, Kim YMK, Jin C, 2002. Caffeic acid phenetly ester inhibits nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. Cancer Letters, 175, 53-61.

Scheller S, Wilczok T, Timielski S, Krol W, Gabrys J, Shani JB, 1990. Free radical scavenging by ethanol extract of popolis. Int J Radiat Biol, 57, 461-65.

Schneiter R, 2004. Genetics, Molecular and Cell Biology of Yeast.

Simon JA, Szankasi P, Nguyen DK, Ludlow C, Dunstan HM, Roberts CJ, Jensen EL, Hartwell LH, Friend SH, 2000. Differential toxicities of anticancer agents among DNA repair and checkpoint mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. Cancer Res, 60, 328-33.

Son S, Lewis BA, 2002. Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: structure-activity relationship. J Agric Food Chem, 50, 468-72.

Sopheak S, Lobkowsky BE, Betty AL, 2001. Caffeic acid phenetly ester (CAPE): Synthesis and X-ray crystallographic analysis. Chem Pharm Bull, 49, 236-238.

Stangaciu S, Castaldo S, Capasso F, 2002. Propolis, an old remedly used in modem medicine. Fitoterapia, 73, l-6.

Stirling PC, Bloom MS, Solanki-Patil T, Smith S, Sipahimalani P, Li Z, Kofoed M, Ben-Aroya S, Myung K, Hieter P, 2011a. The complete spectrum of yeast chromosome instability genes identifies candidate CIN cancer genes and functional roles for ASTRA complex components. PLoS Genet, 7.

Stirling PC, Crisp MJ, Basrai MA, Tucker CM, Dunham MJ, Spencer FA, Hieter P, 2011b. Mutability and mutational spectrum of chromosome transmission fidelity genes, Chromosoma.

Thompson SL, Bakhoum SF, Compton DA, 2010. Mechanisms of chromosomal instability. Curr Biol, 20, 285-95.

Thompson SL, Compton DA, 2011. Chromosomes and cancer cells. Chromosome Res, 19, 433-44.

Tong AH, Evangelista M, Parsons AB, Xu H, Bader GD, Pagé N, Robinson M, Raghibizadeh S, Hogue CW, Bussey H, Andrews B, Tyers M, Boone C, 2001. Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants. Science, 294, 2364-8.

Tucker CL, Fields S, 2004. Quantitative genome-wide analysis of yeast deletion strain sensitivities to oxidative and chemical stress. Comp Funct Genomics, 5, 216-24.

Uysal E, Yılmaz HR, Ugan Y, Altuntas A, Dogru A, Kutlucan A, Tunc SE, 2015. Protective Effects of Caffeic Acid Phenethyl Ester on Cyclophosphamide-Induced Hemorrhagic Cystitis in Rats. J Biochem Mol Toxicol, Baskıda.

Volpert R, Elstner EF, 1993. Biochemical activities of propolis extracts: 2. photodynamic activities. Z Naturforssch, 48, 858-62.

Watanabe MA, Amarante MK, Conti BJ, Sforcin JM, 2011. Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review. J Pharm Pharmacol, 63, 1378-86.

Wennerberg J, 1996. Predicting response to therapy of squamous cell carcinoma of the head and neck. Anticancer-Res, 16, 2389-96.

Wu CS, Chen MF, Lee IL, Tung SY, 2007. Predictive role of nuclear factor-kappaB activity in gastric cancer: a promising adjuvant approach with caffeic acid phenethyl ester. J Clin Gastroenterol, 41, 894-900.

Wu HI, Brown JA, Dorie MJ, Lazzeroni L, Brown JM, 2004. Genome-wide identification of genes conferring resistance to the anticancer agents cisplatin, oxaliplatin, and mitomycin. C Cancer Res, 64, 3940-8.

Wu J, Omene C, Karkoszka J, Bosland M, Eckard J, Klein CB, Frenkel K, 2011.Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), derived from a honeybee product propolis, exhibits a diversity of anti-tumor effects in pre-clinical models of human breast cancer. Cancer Lett, 308, 43-53.

Xiang D, Wang D, He Y, Xie J, Zhong Z, Li Z, Xie J, 2006. Caffeic acid phenethyl ester induces growth arrest and apoptosis of colon cancer cells via the beta-catenin/T-cell factor signaling. Anticancer Drugs, 17, 753-62.

Yang YH, 2011. Caffeic Acid phenethyl ester possessing various immunomodulatory effects is a potentially effective therapy for asthma. Pediatr Neonatol, 52, 307-8.

Yilmaz HR, Sogut S, Ozyurt B, Ozugurlu F, Sahin S, Isik B, Uz E, Ozyurt H, 2005. The activities of liver adenosine deaminase, xanthine oxidase, catalase, superoxide dismutase enzymes and the levels of malondialdehyde and nitric oxide after cisplatin toxicity in rats: protective effect of caffeic acid phenethyl ester. Toxicol Ind Health, 21, 67-73.

Yilmaz HR, Uz E, Altunbasak A, Sakalli E, Ozçelik N, 2010. Anticlastogenic effect of caffeic acid phenethyl ester on cisplatin-induced chromosome aberrations in rat bone marrow cells. Toxicol Ind Health, 26, 33-7.

Yilmaz HR, Uz E, Yucel N, Altuntas I, Ozcelik NJ, 2004. Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat liver. Biochem Mol Toxicol, 18, 234-8.

Yuen KW, Warren CD, Chen O, Kwok T, Hieter P, Spencer FA, 2007. Systematic genome instability screens in yeast and their potential relevance to cancer. Proc Natl Acad Sci USA, 104, 3925-30.

Zewail A, Xie MW, Xing Y, Lin L, Zhang PF, Zou W, Saxe JP, Huang J, 2003. Novel functions of the phosphatidylinositol metabolic pathway discovered by a chemical genomics screen with wortmannin. Proc Natl Acad Sci USA, 100, 3345-50.

Zhang P, Tang Y, Li NG, Zhu Y, Duan JA, 2014. Bioactivity and chemical synthesis of caffeic acid phenethyl ester and its derivatives. Molecules, 19, 16458-76.

Zheng ZS, Xue GZ, Grunberger D, Prystowsky JH, 1995. Caffeic acid phenetly ester inhibits proliferation of human keratinocytes and interferes with the EGF regulation of ornithine decarboxylase. Oncol Res, 7, 445-452.

8. ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Zonguldak'te doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Konya'da tamamladı. 2012 yılında Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümünü bitirdi. 2013 yılında Konya Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı. 2015 yılı başlarında Mevlana Üniversitesi Tıp Fakültesinde çalışmaya başlamıştır.