



ANKARA
2016



SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

Bu proje 113478 proje no ile TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir. Teşekkür ederiz.



SUNUM AKIŐI

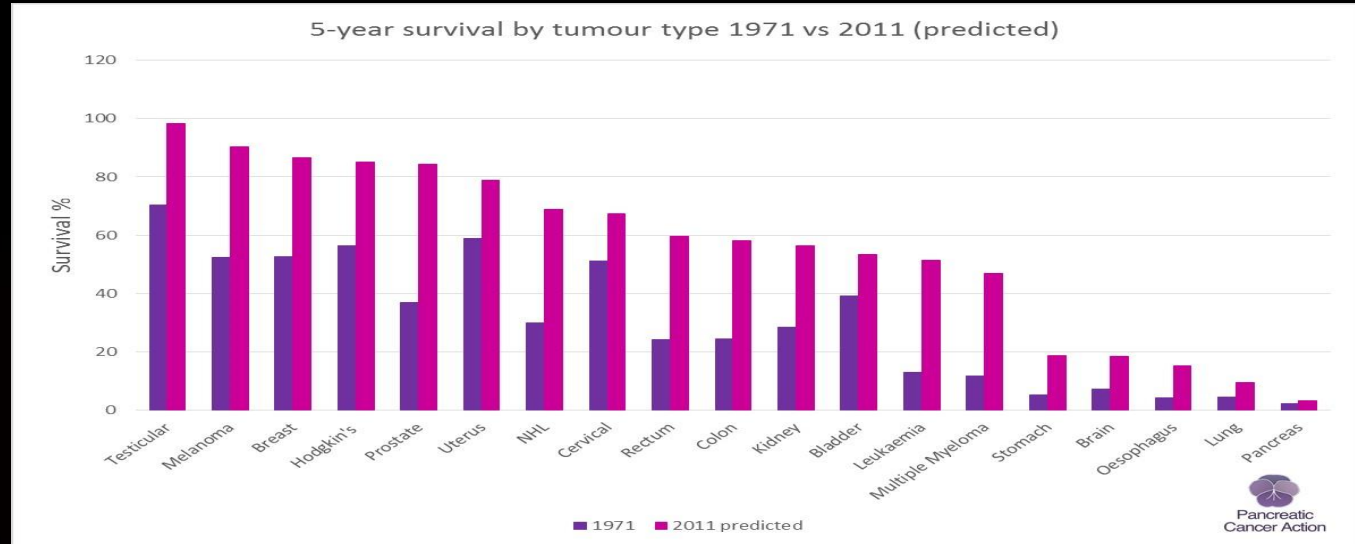
GENEL BİLGİLER
METERİYAL VE METOD
BULGULAR
SONUÇLAR

GENEL BİLGİLER

Kansere karşı etkin tedavi protokolleri geliştirilmesi çalışmalarında son 30 yılda bazı kanser türlerinde önemli gelişmeler sağlanmasına rağmen, genel başarı oranına bakıldığında

beş yıllık sağ kalım

açısından istenen düzeyde bir ilerlemenin sağlanamadığı görülmektedir (Jemal vd.,2010).



Quaresma, Coleman and Rachet, 2014 40-year trends in an index of survival for all cancers combined and survival adjusted for age and sex for each cancer in England and Wales, 1971 – 2011: a population based study. The Lancet [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-673\(14\)61396.9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-673(14)61396.9)



- ✓ Bu durum ve Dünya genelinde artan kanser insidansı kansere yaklaşım ve tedavide yeni yaklaşımların oluşturulması gereğini doğurmuştur.
- ✓ Bu yönde yapılan çalışmalarda elde edilen veriler giderek artan bir oranda kanserin kök hücre özelliği taşıyan bir grup hücre tarafından oluşturulduğunu göstermiş ve bu hücreler daha sonra **kanser kök hücreleri** olarak adlandırılmıştır (Dick , 2009; Reya vd.,2001).

Kanser kök hücre modelinde tümör hücrelerinden küçük bir hücre grubu

kanserin başlatılması,

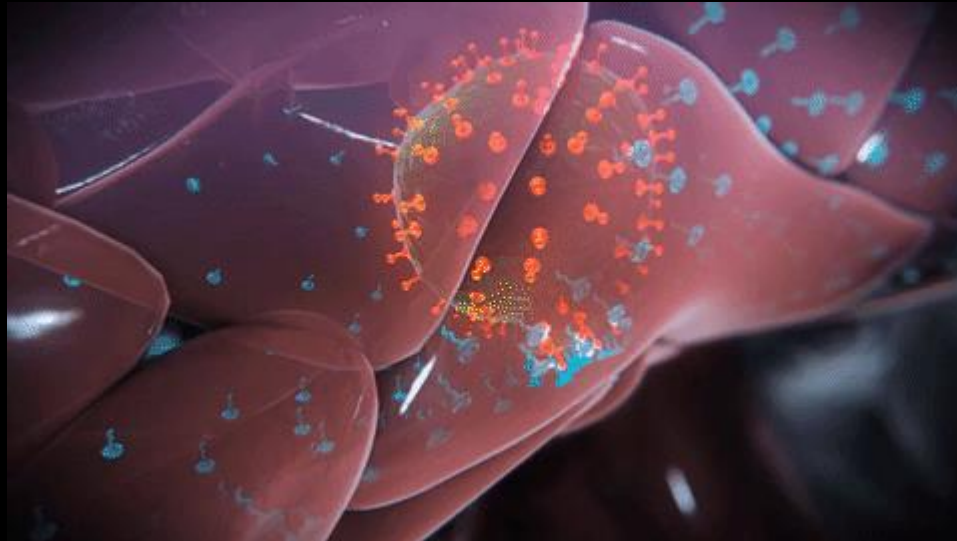
progresyonu,

metastazı,

rekürrensi

ve tedaviye cevabından

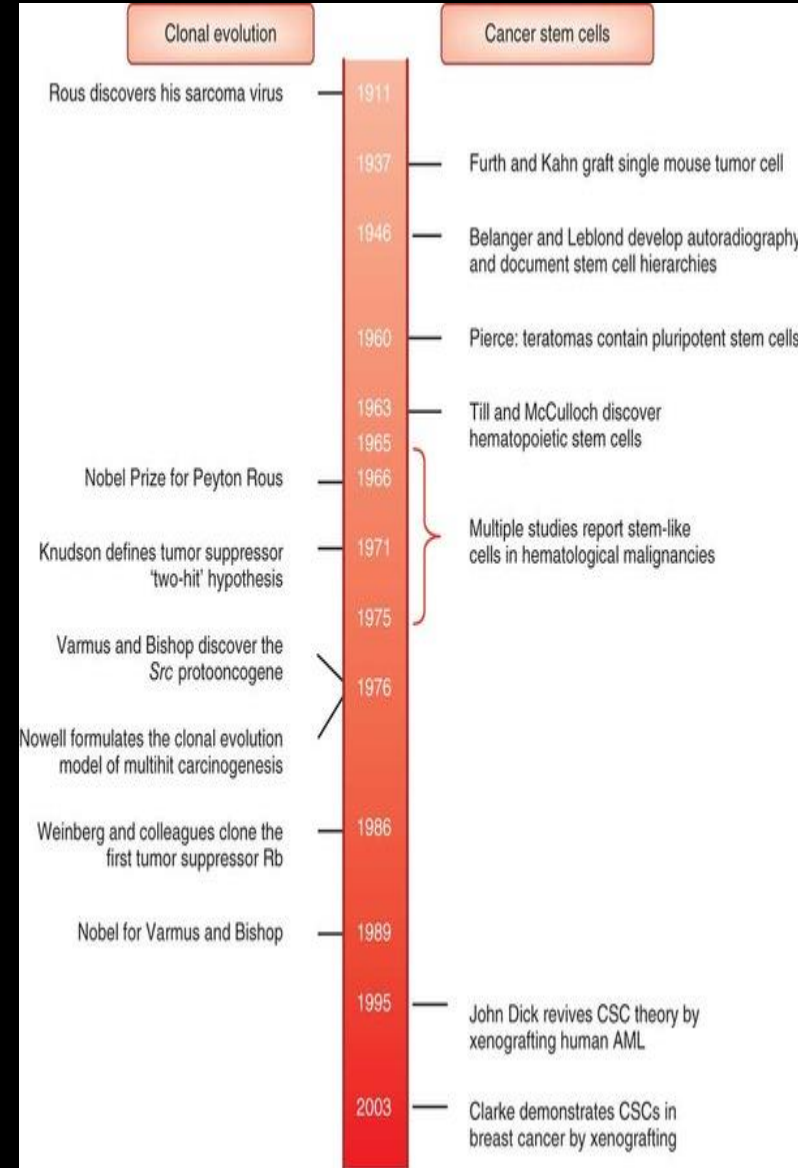
sorumlu tutulmaktadır.



❑ Kanser kök hücrelerin belirlenmesine katkı sağlayan ilk çalışmalar hematopoetik dokuda yapılmıştır. Burada hem normal hem de malign hematopoetik hücreler kullanılmıştır.

❑ Normal hematopoetik dokuda hücrelerin hiyerarşik bir şekilde farklılaştıkları 1961 yılında ortaya konmuştur (Till ve McCulloch, 1961).

✓ Bu tanımlama kanser dokularında da benzer bir durumun olabileceğini düşündürmüştür

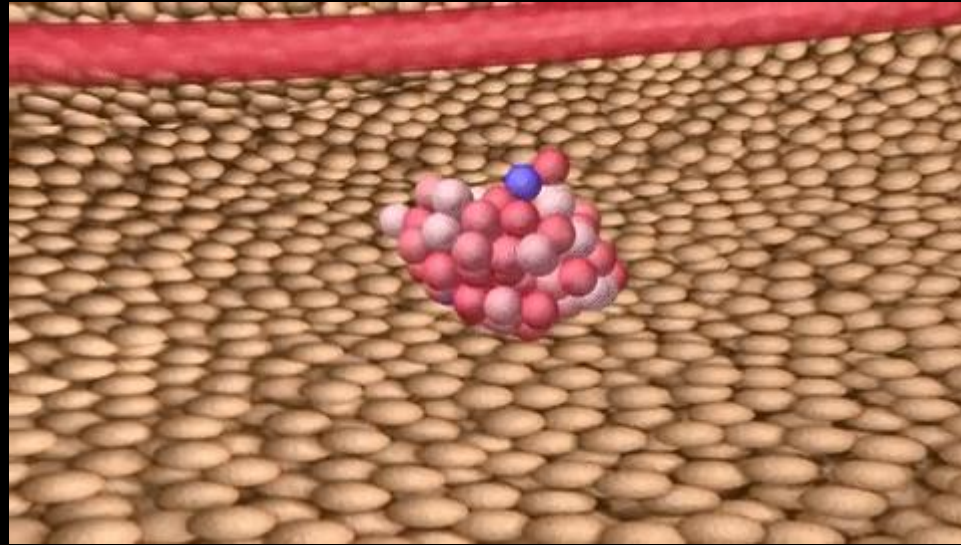


The cancer stem cell: premises, promises and challenges

• [Hans Clevers](#) Nature Medicine 313–319 (2011)

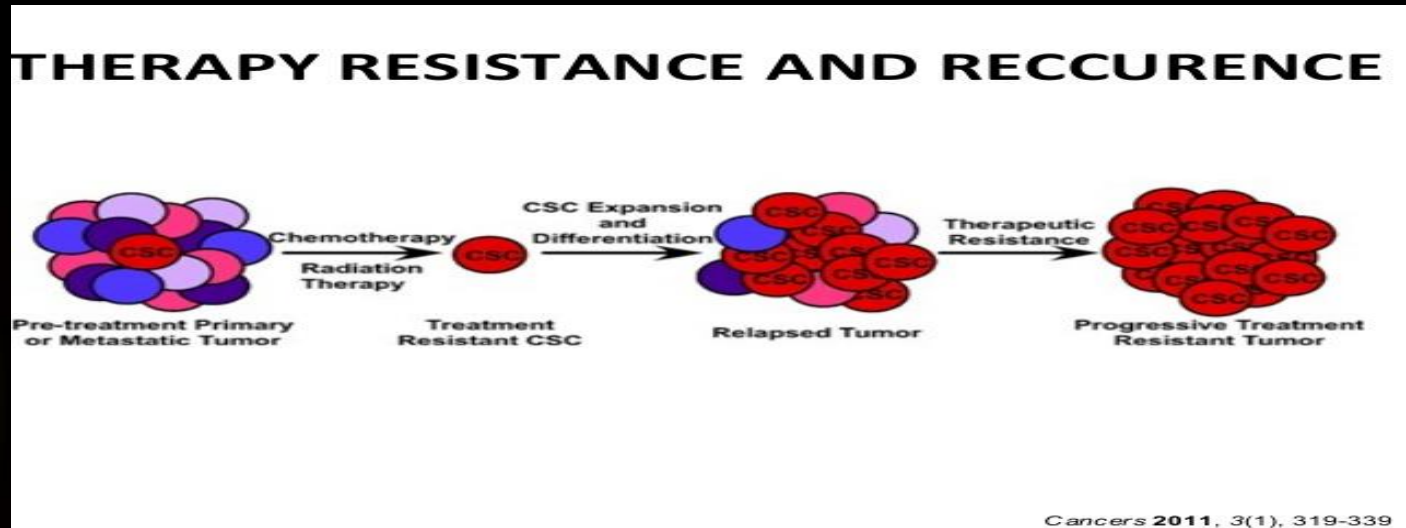


Daha sonraki yıllarda ise **meme ve beyin** başta olmak üzere hemen hemen bütün solid tümörlerde kanser kök hücrelerin varlığı gösterilmiştir (Al-Hajj vd., 2003; Singh vd., 2003).



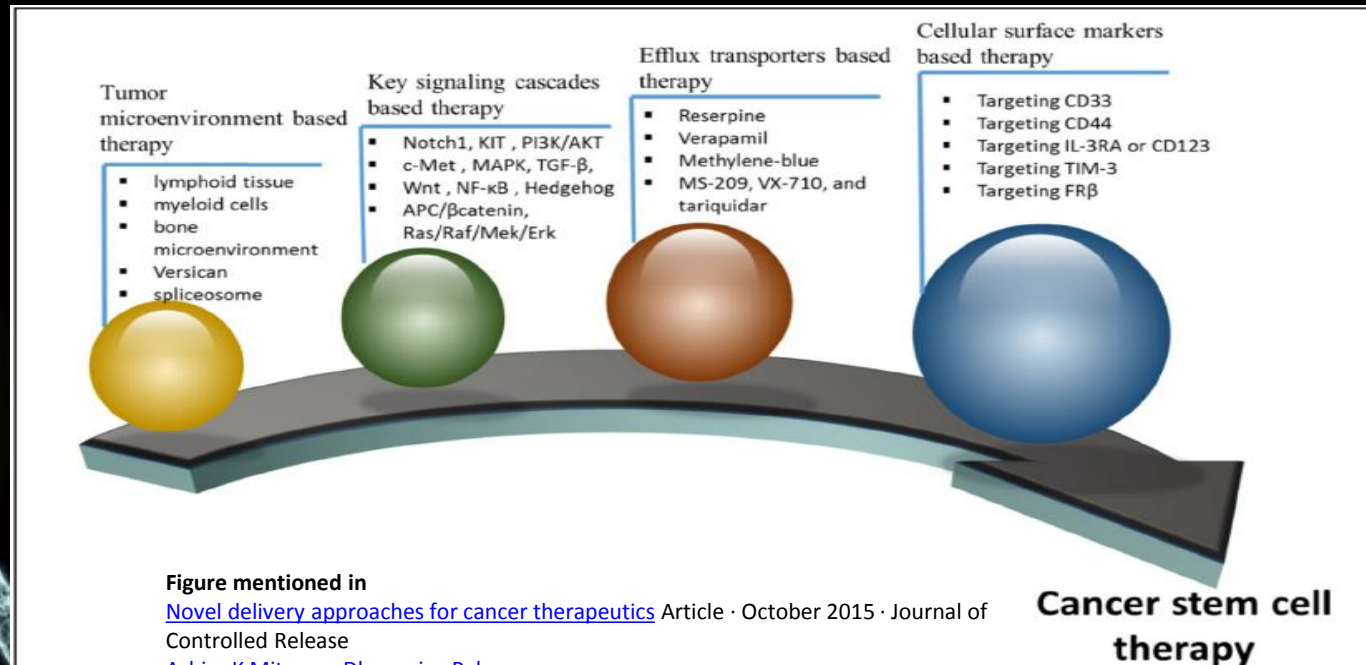
Yapılan çalışmalarda kanser kök hücrelerinin sitotoksik ajanlara ve radyasyona karşı intrinsik veya kazanılmış bir direnç gösterdiği belirlenmiştir.

Bu direncin altında yatan mekanizmaların DNA hasarını tanıma ve onarma kabiliyetindeki artış, apoptotik yollardaki aktivite azlığı, kemoterapötik ajanların hücre içerisine alınmasındaki yetersizlik bu ajanların hücre dışına atılımındaki artışa bağlı olabileceği rapor edilmiştir (Gottesman vd., 2002; Guan vd., 2003; Guzman ML., 2001).



Kanser kök hücrelerini hedefleyen tedaviler genellikle

- kanser kök hücreleri yüzey markırlarına selektif antikolar aracılığıyla kanser kök hücrelerinin hedeflenmesi
- kendini yenilemede etkin (**self-renewal**) sinyal yollarının bloklanması
- kemoterapi ve radyoterapiye direnç sağlayan yolların engellenmesi
- kanser kök hücrelerinin diferasyasyon yönünde indüksiyonu şeklinde biçimlenmeye başlamıştır (Bao vd., 2006; Schatton vd., 2009; Zhou vd., 2009).

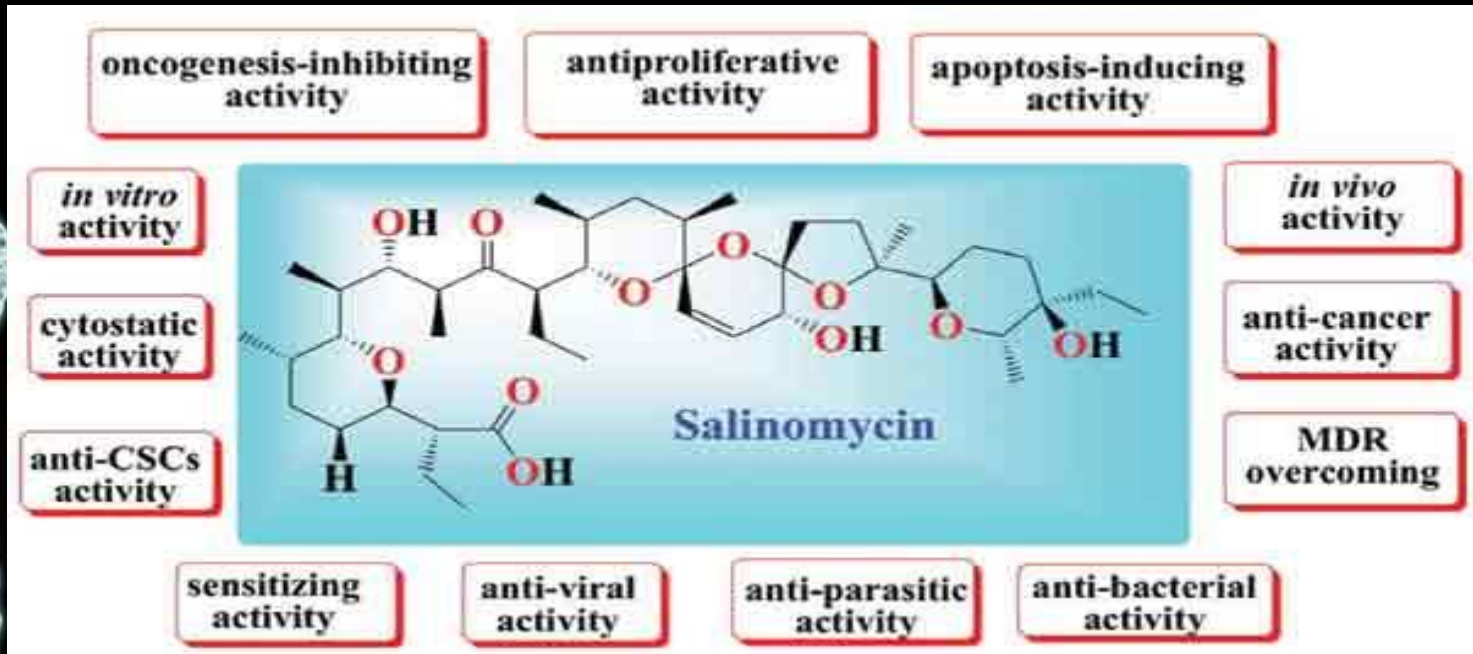




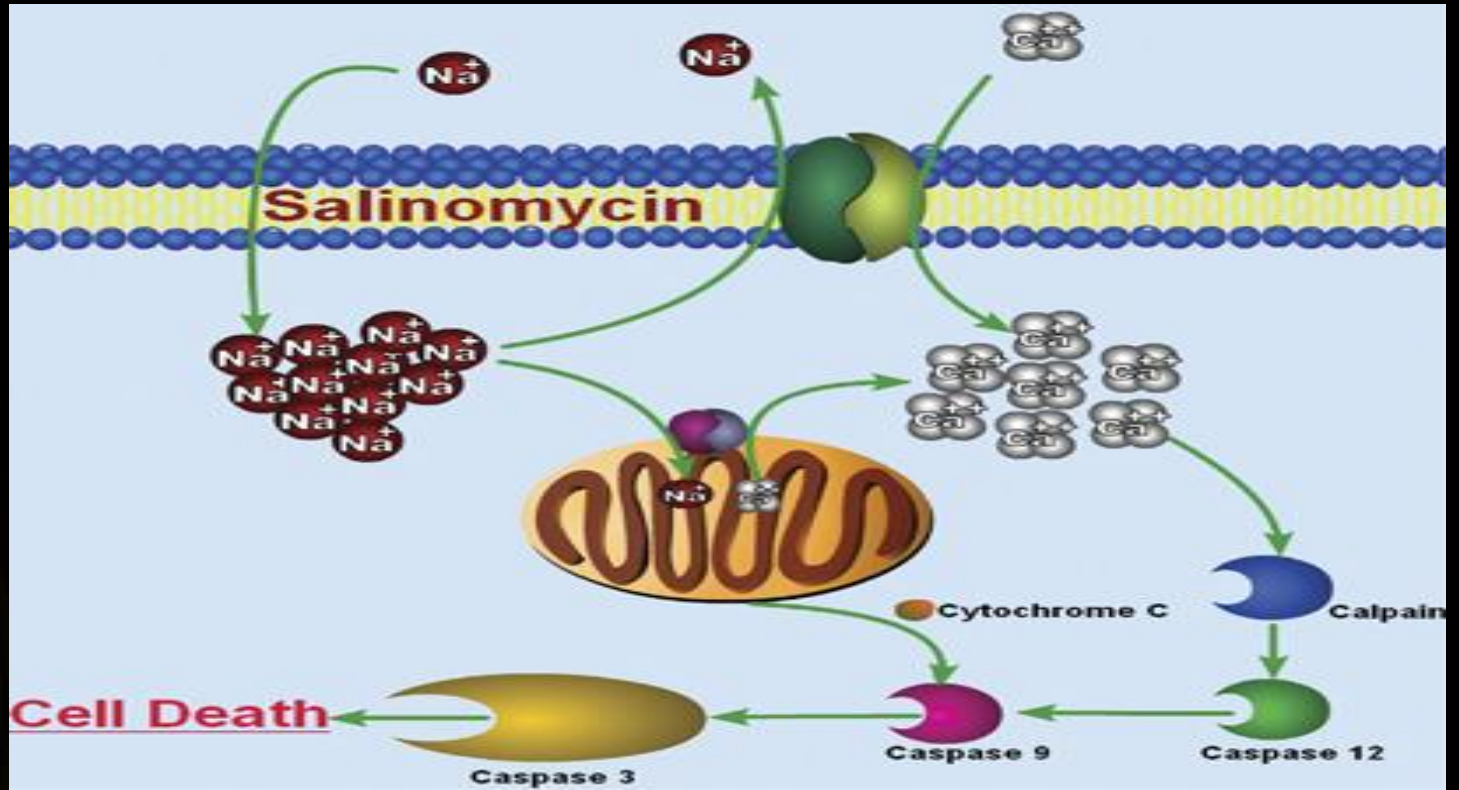
Yakın zamanda Kolon kanserinde Wnt ve *Notch* yolaklarını inhibe eden moleküllerin geliştirildiğinin rapor edilmesi bu ümitleri güçlendirmiştir (Van Es ve Clevers, 2005).



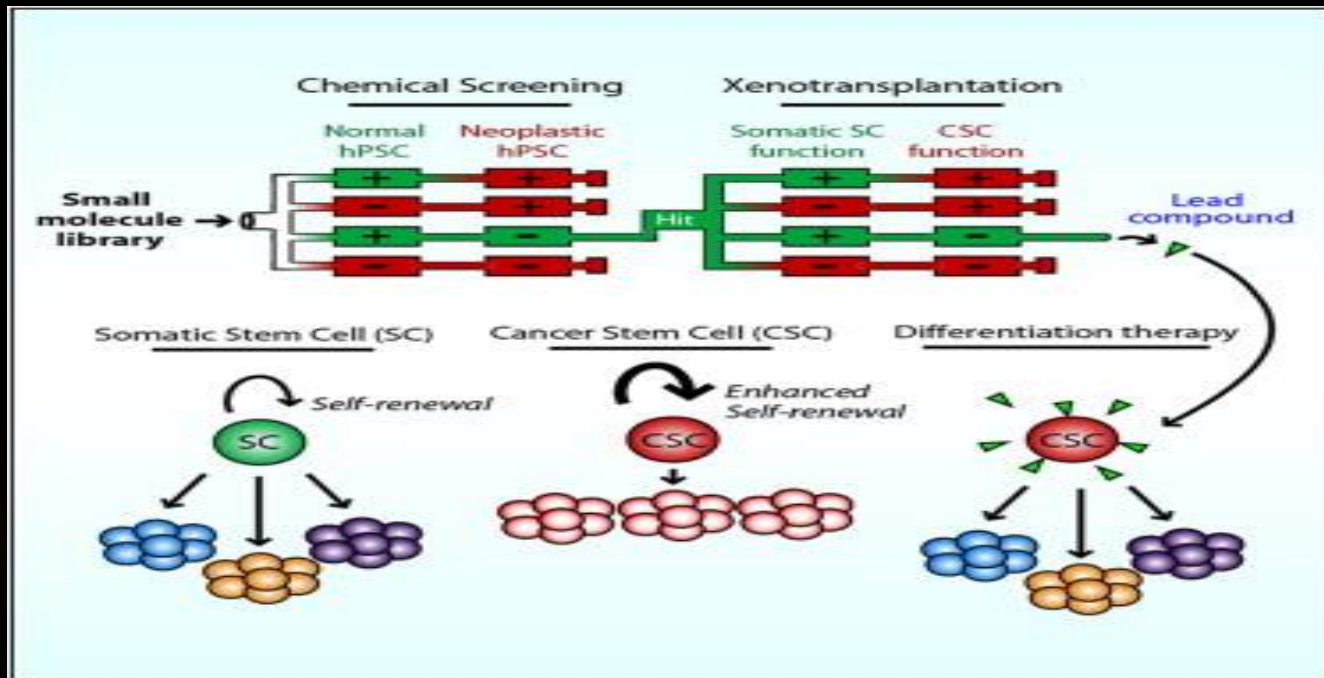
Diferansiyasyon çalışmalarında ise kanser kök hücreleri matur kanser hücrelerine dönüşmeye zorlanmaktadır. **Salinomisin (Salinomycine)** bu yönde başarılı sonuçların alındığı ilk bileşik olmuştur. Bu çalışmada **Salinomisin (salinomycine)** meme kanseri kök hücrelerinin sayısını diferasyon yoluyla **azalttığı** belirlenmiştir.



Anti bakteriyel bir ilaç olarak bilinen salinomisinin fare meme kanseri kök hücreleri üzerinde paklitakselden (**paclitaxel**) 100 kat daha potent anti-kanser etki göstermesi ilgi çekici olmuştur (Todaro vd., 2008; Gupta vd., 2009).

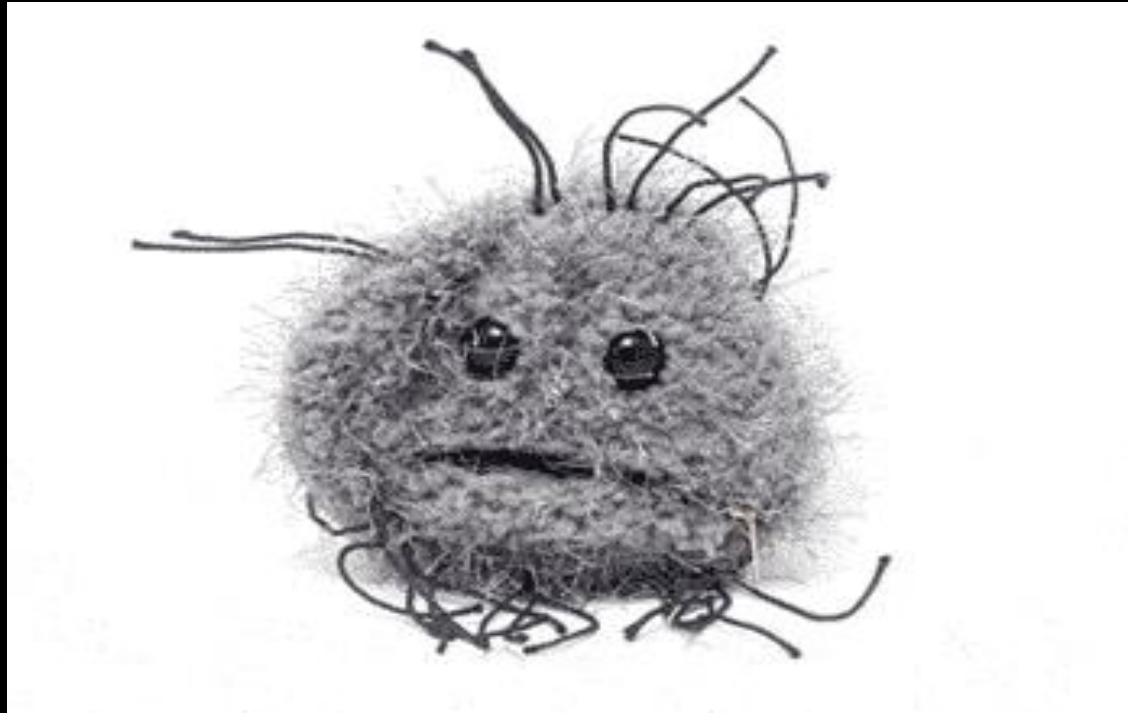


Yakın dönemde kanser kök hücrelerinin farklılaşmış kanser hücrelerine dönüşümünde etkili birleşikleri belirlemek amacıyla yapılan geniş ölçekli bir çalışmada çok sayıda birleşik arasında yalnızca dört tanesinin (**Indatraline, Thioridazine, Azathioprine ve Mefloquine**) normal kök hücre sayılarında bir değişikliğe yol açmadan kanser kök hücrelerini farklılaşmış kanser hücrelerine dönüştürdüğü belirlenmiştir.



Identification of Drugs Including a Dopamine Receptor Antagonist that Selectively Target Cancer Stem Cells
[Eleftherios Sachlos](#), [Ruth M. Risueño](#), [Sarah Laronde](#). Cell. Volume 149, Issue 6, 8 June 2012, Pages 1284–1297

Homeopoetik kanser kök hücreleri üzerinde yapılan bu çalışmada normal hematopoetik kök hücreler etkilenmezken kanser kök hücrelerinin sayısı farklılaşmış kök hücrelere dönüşerek azalmıştır. Bu çalışma kanser kök hücrelerinin sayısının **farklılaştırılarak** azaltılmasına dayalı tedaviler yönünde ilk geniş ölçekli çalışma niteliğini taşımaktadır (Rho vd., 2011).



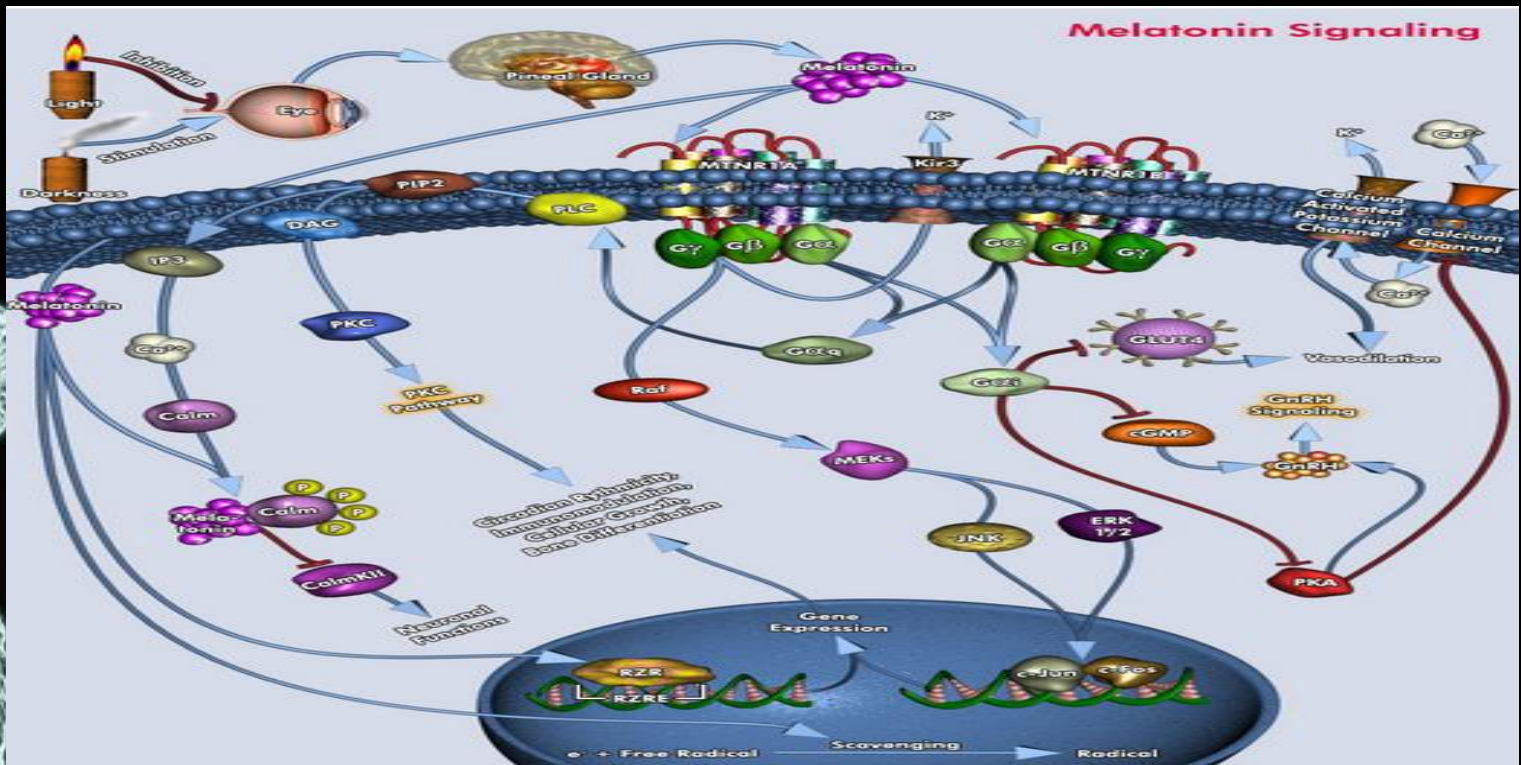
Bir pineal bez hormonu olan melatonin (5-methoxy-N-acetyltryptamine), epifiz bezinde triptofan aminoasitinden sentezlenmekte ve plazmada proteinlere (albumin vb.) bağlı olarak bulunmaktadır (Kveder ve Mclsaac, 1961).



Melatoninin salgılanmasındaki hız belirleyici en önemli faktörlerden birisi çevrenin **aydınlık veya karanlık** olmasıdır (Claustrat vd., 2005). Genellikle; ışık melatonin hızını azaltırken, karanlık arttırmaktadır. Melatonin, pineal bezden başka retina ve bağırsakta da sentezlendiği gösterilmiştir. Kan melatonin düzeyine en çok katkı pineal bezden sağlanmakta, diğer dokuların katkısı yok denecek kadar az olmaktadır.



Melatoninin hücre zarı, sitoplazma ve çekirdeğinde bulunan üç farklı reseptör tipinin bulunduğu belirlenmiştir. Melatonin bu reseptör çeşitliliğiyle de farklı bir özellik sergilediği görülmektedir. Bu reseptörelere hücre zarında G protein aracılı etki gösteren **melatonin reseptör 1 (MT1)** ve **melatonin reseptör 2 (MT2)** şeklinde iken sitoplazmada **Ca-kalmodulin reseptörleri**, çekirdekte **retinoid Z** ve **retinoid O** reseptörleri şeklinde karşımıza çıkmaktadır (Stephen vd., 1981; Uz vd., 2005; Bartsch vd., 1981) .



The receptors transport the outside chemical signal (the melatonin) to the inside and activate (or repress) a number of different signal transduction pathways. See the figure below (taken from [Qiagen](#)):

Reseptör çeşitliliği bulunması sayesinde melatonin farklı dokularda farklı işlevler gösterebilen çok yönlü bir molekül olarak dikkat çekmektedir. İşlev ve etkileri arasından şu ana kadar bildirilmiş olanlardan ön plana çıkanları

kronobiyolojik düzenleyici,

uyku düzenleyici,

antioksidan,

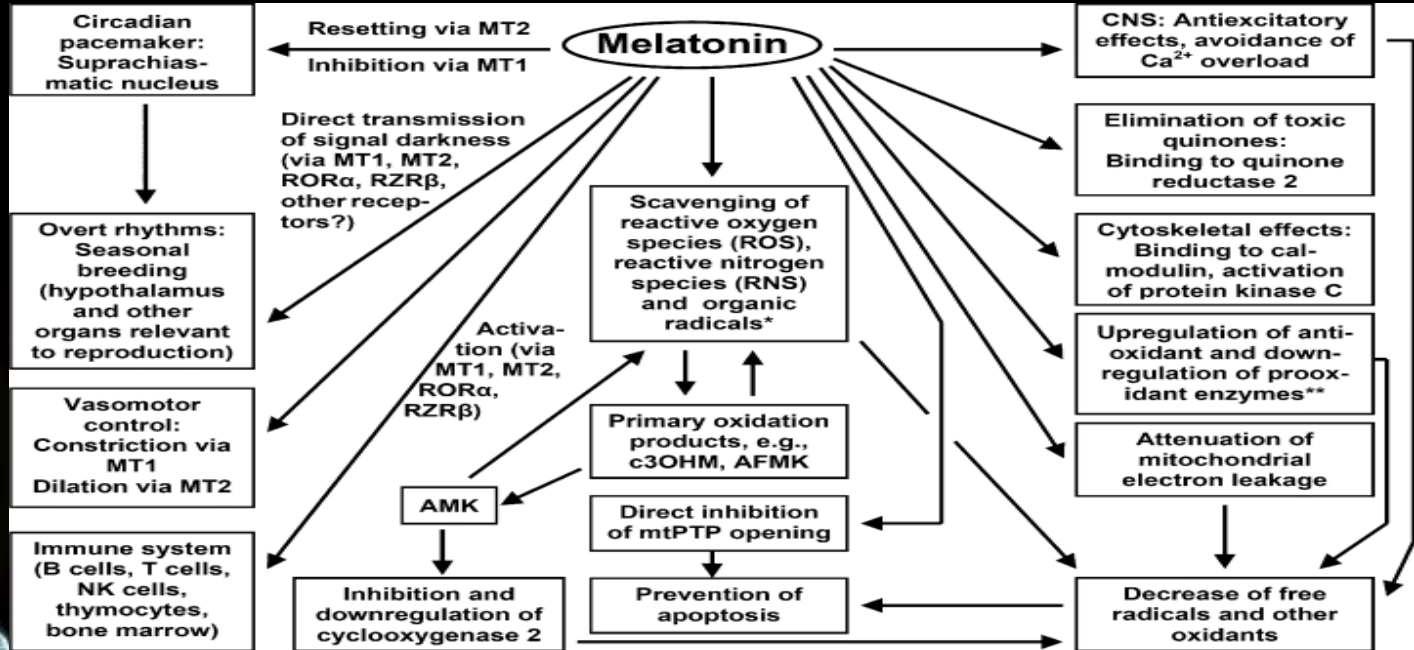
immün destekleyici,

anti-kanser,

kan basıncı düzenleyici,

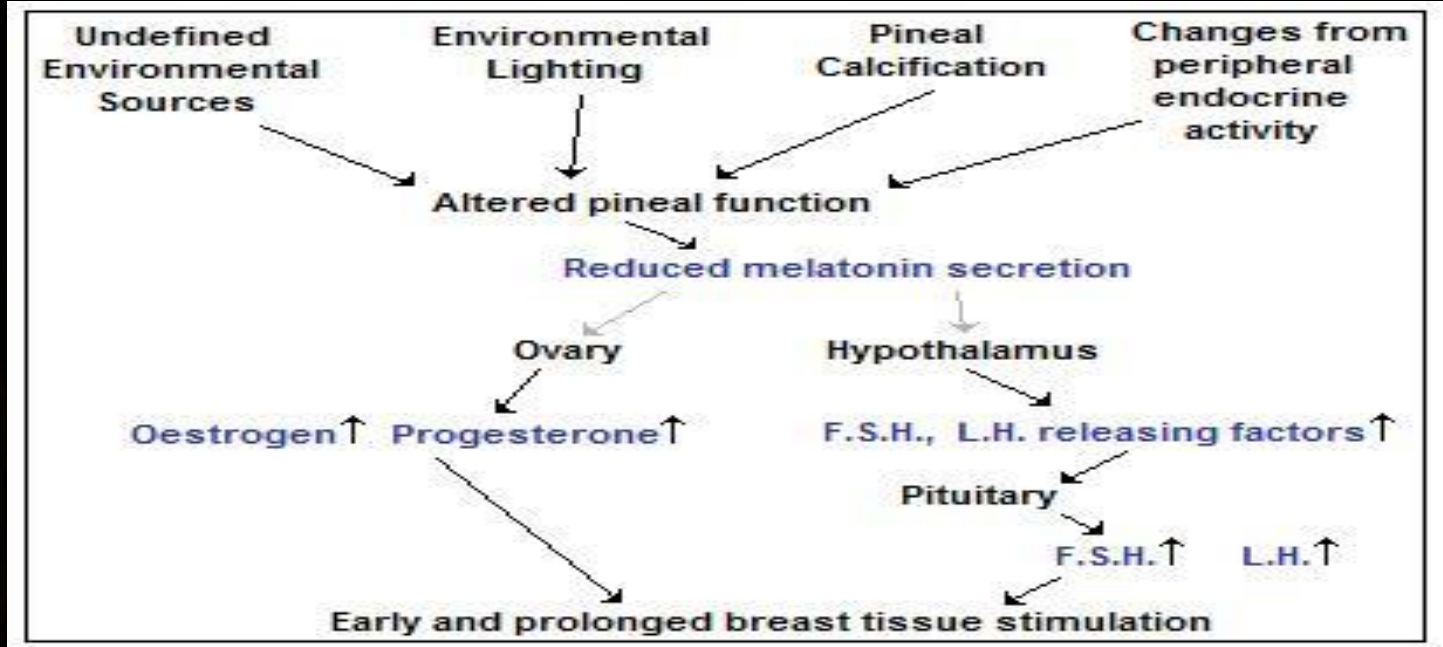
üreme fonksiyonları düzenleyici

şeklinde sıralayabiliriz. (Venkataramanujan vd., 2008).

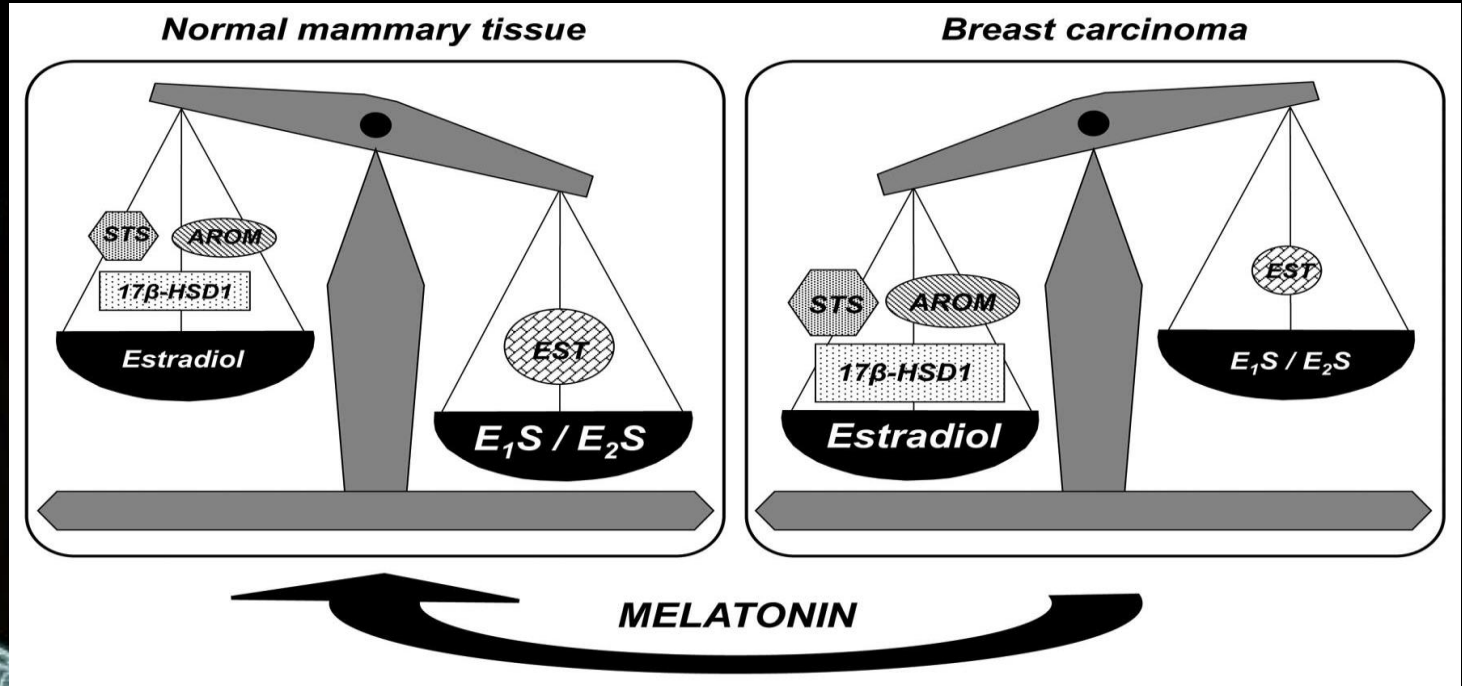


The receptors transport the outside chemical signal (the melatonin) to the inside and activate (or repress) a number of different signal transduction pathways. See the figure below (taken from [Qiagen](#)):

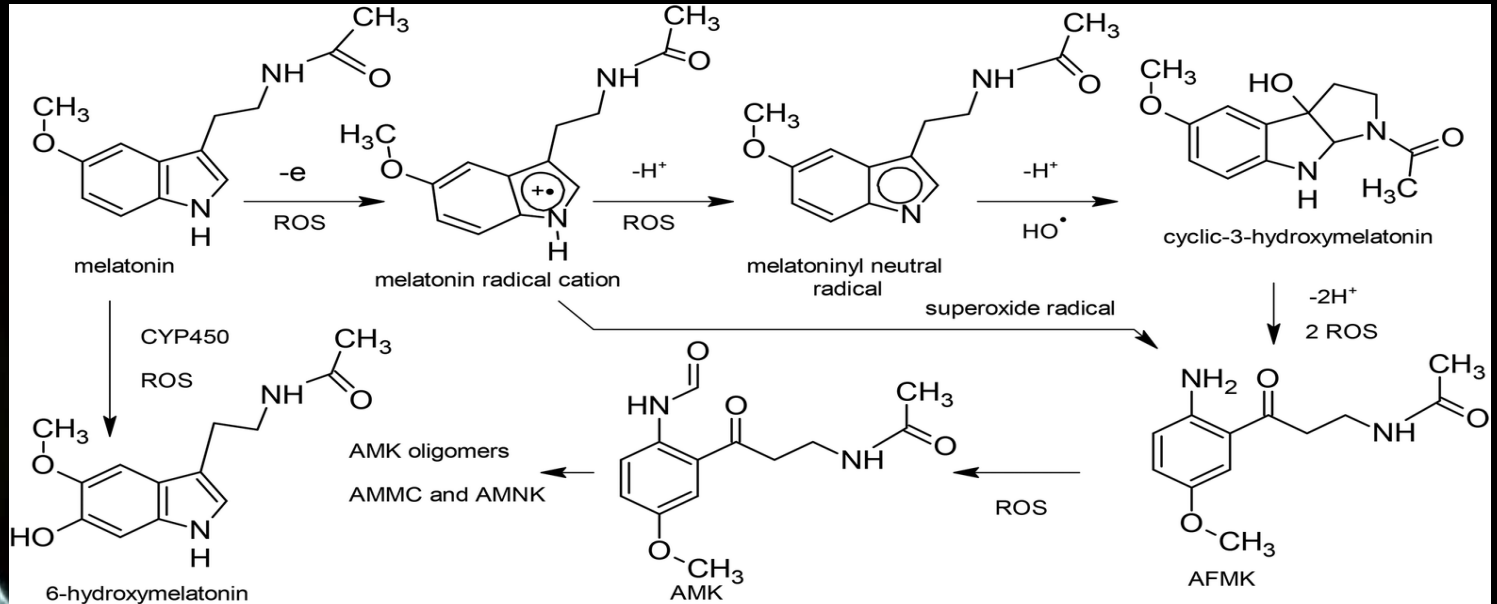
Hindistan'da yürütülen bir çalışmada ileri meme kanseri kadınlarda kontrol grupları ile karşılaştırıldığında üriner melatonin seviyelerinin düşük olduğu bulunmuştur (Stephen vd., 1981). Bu veriler ER (Östrojen reseptörü)-pozitif meme kanserli kadınlar üzerinde yapılan diğer bir çalışmada üriner melatonin seviyeleri ile birlikte kan melatonin (6-sulfatoxymelatonin) seviyelerinin de düşük olduğunun bulunmasıyla desteklenmiştir.



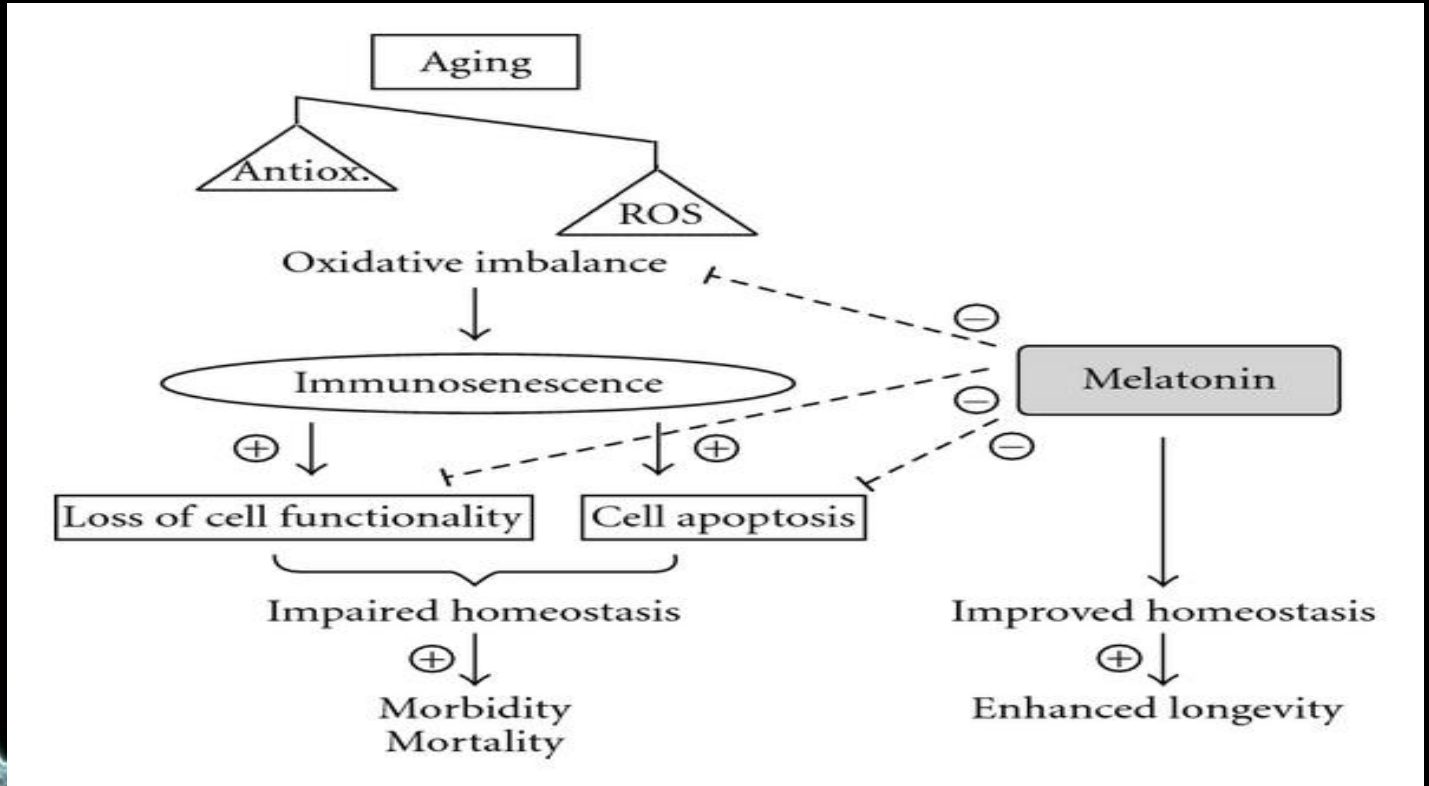
Işık-melatonin-meme-kanseri hipotezini destekleyen çalışmalar insan meme kanseri dokusu transfer edilmiş atimik fareler üzerinde de yapılmıştır. Burada sürekli ışığa maruz bırakılan farelerle, normal gece/gündüz ortamında bulundurulan fareler karşılaştırıldığında tümör büyümesinde 7 kat artış olduğu belirlenmiştir. Sürekli ışık altında buluna farelerde linoeik asit ve onun metaboliti olan 1,3-hydroxyoctadecadienoic düzeylerinde artış olduğu ve bununla sirkadiyen melatonin sinyallerinde inhibisyona yol açtığı belirlenmiştir (Blask vd., 2003)



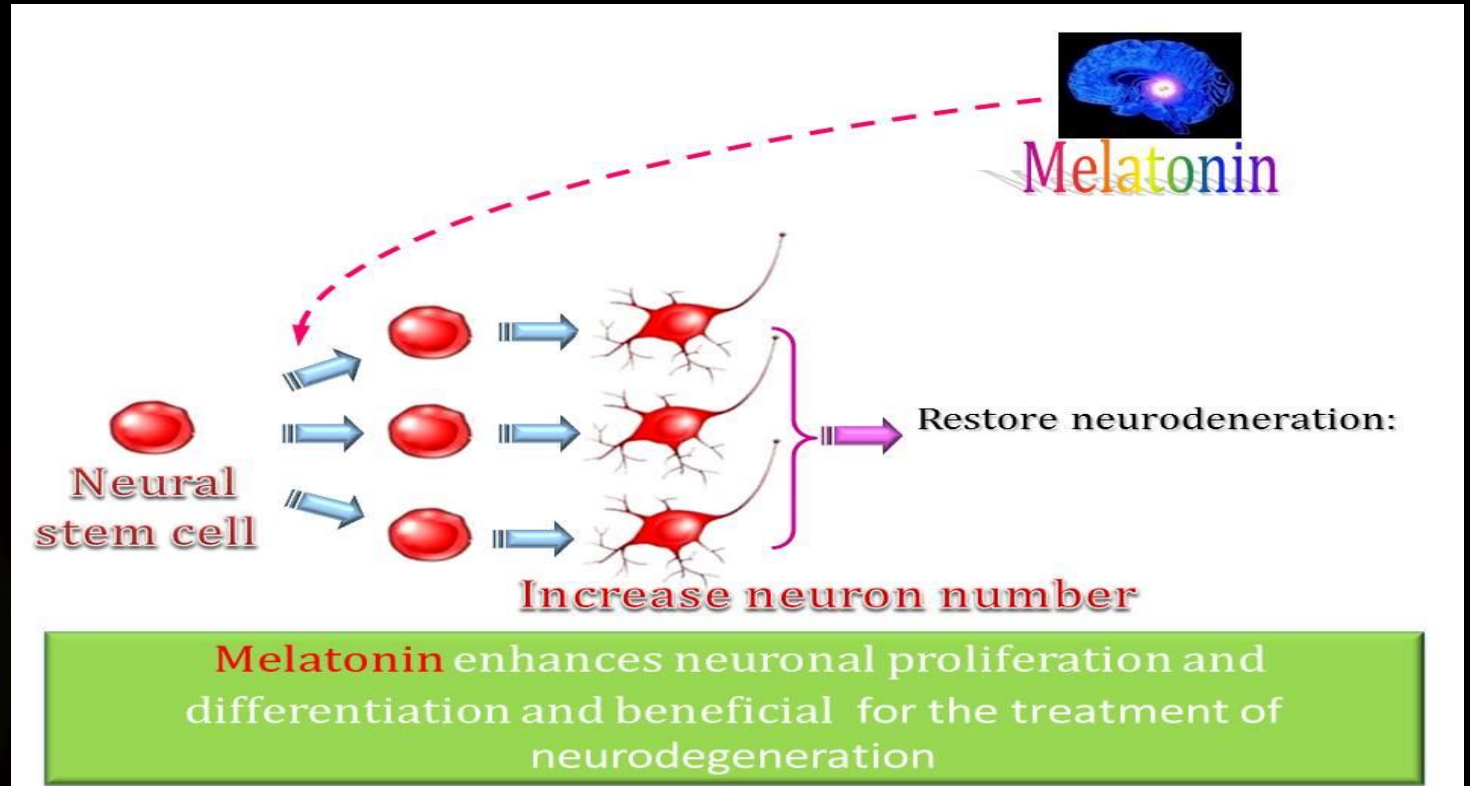
- Melatoninin ayrıca antioksidan etkilerinin olduğu yapılan değişik çalışmalarda rapor edilmiştir. Melatonin önemli özelliklerinden biride hücrelerin hemen her tarafına ve hücre çekirdeğine ulaşabildiği gibi, beyin gibi diğer dokulara da geçebilmesidir. Böylece antioksidan etkilerini çok geniş bir alanda gösterebilmektedir.
- Melatonin oksidan maddelere etki ettikten sonra ara kademelerde ve sonuçta oluşan ara ürünleri yine antioksidan etki gösterebilmektedir. Bu özellik bir antioksidan ajan için çok değerlidir ve “suicidal veya terminal antioksidan” olarak nitelendirilir (Martinez-Cayuela, 1995).



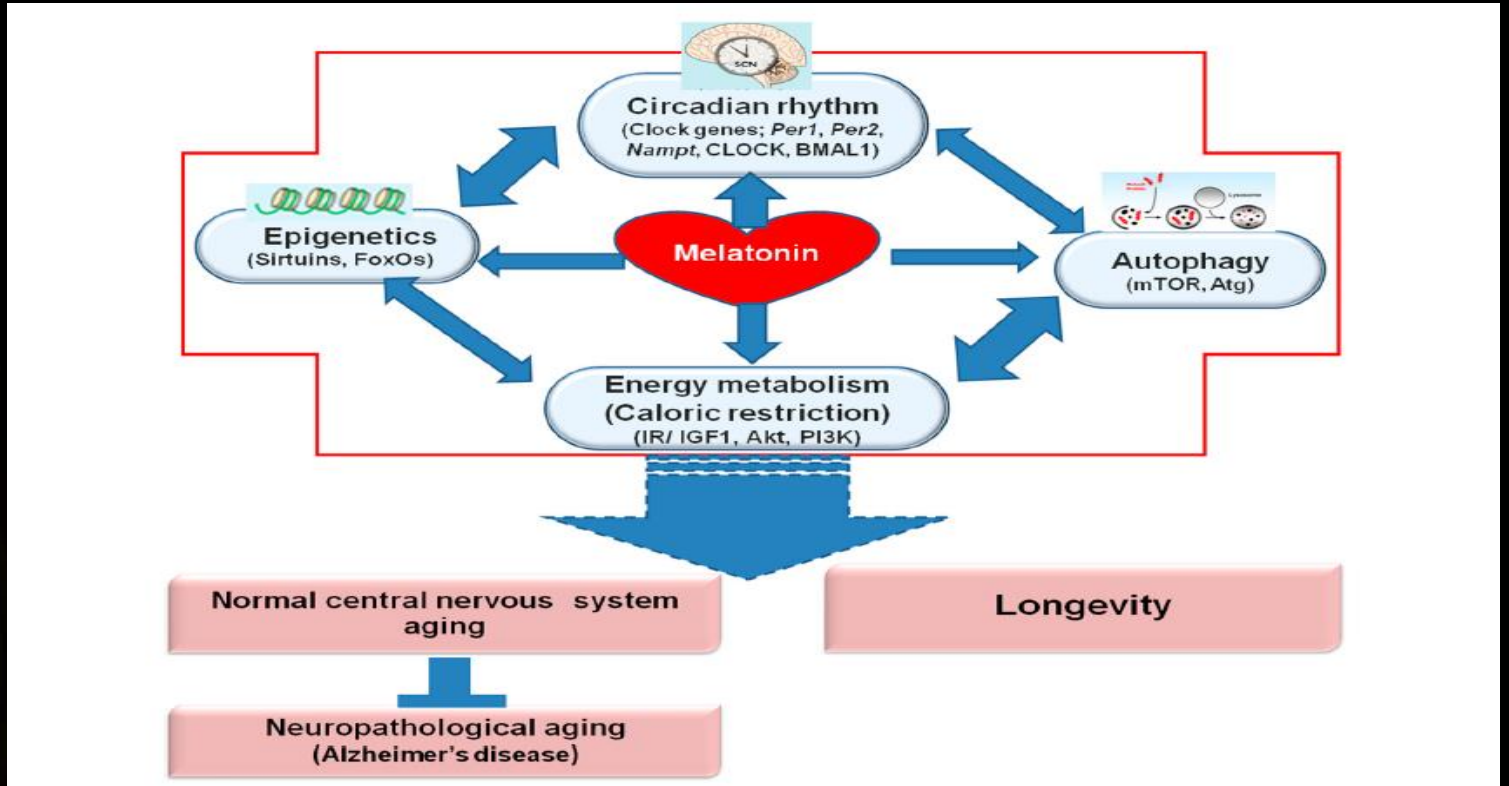
Melatonin yaşa bağlı olarak seviyesindeki azalma immün yaşlanmanın (**immunosenescence**) en önemli etkenlerinden biri olabileceği düşünülmektedir. Bunun için yapılan bir çalışmada, melatonin seviyelerinin belirgin düşük olduğu saptanan yaşlı farelerin yaklaşık % 50'sinde süreç içerisinde spontan lenfoma, akciğer adenokarsinom veya sarkoma geliştiği gözlenmiştir. Bu yüzden melatoninin yaşlılarda bağışıklık fonksiyonu artırmada olumlu bir rolü olduğu ve stres, neoplastik hastalık ya da enfeksiyon gibi bağışıklığın zayıfladığı durumlarda etkili bir tedavi ajanı olarak kullanılabileceği düşünülmektedir (Reiter vd., 2007; Carrillo-Vico vd., 2005).



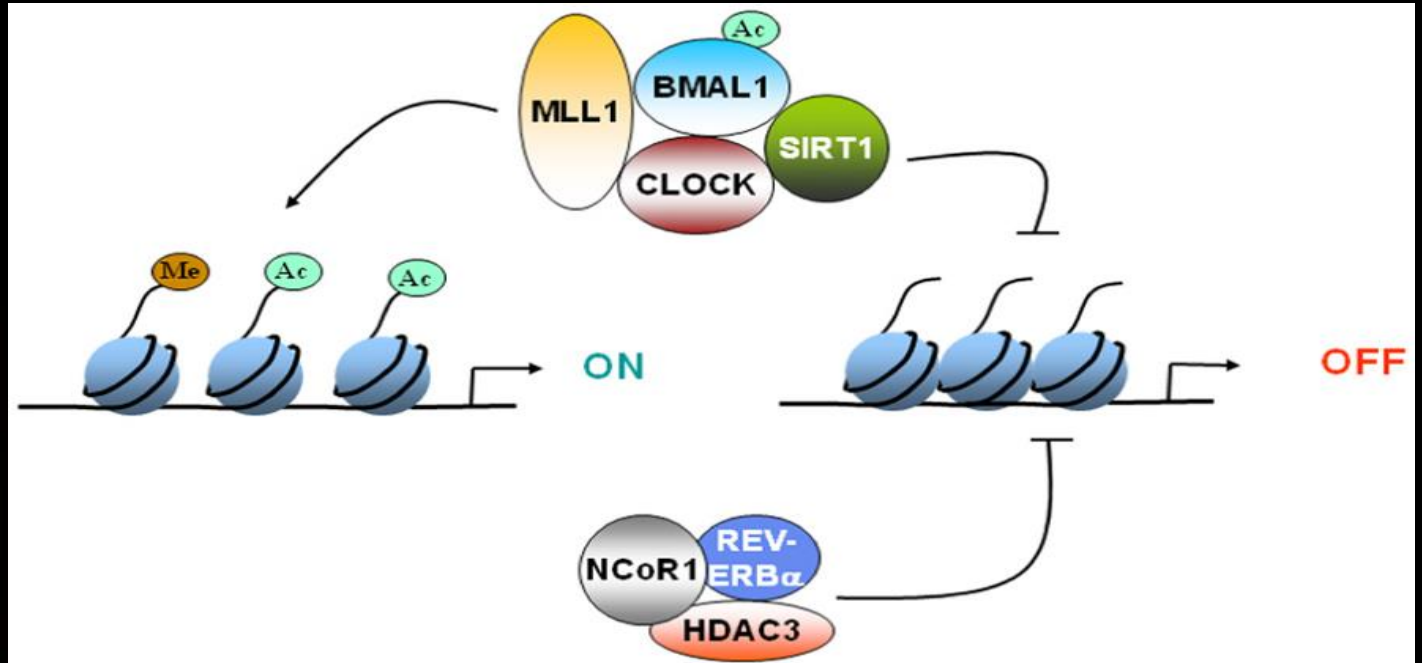
Moriya ark (2005) tarafından yapılan bir çalışmada in vitro kültür sistemi kullanılarak fare embriyo striatumdan üretilen nöral kök hücrelerinin çoğalması ve nöral/Astroglial farklılaşma üzerine melatonin etkileri araştırılmıştır. Melatonin nöral kök hücrelerinde EGF aracılı proliferasyonunu baskıladığı gösterilmiştir



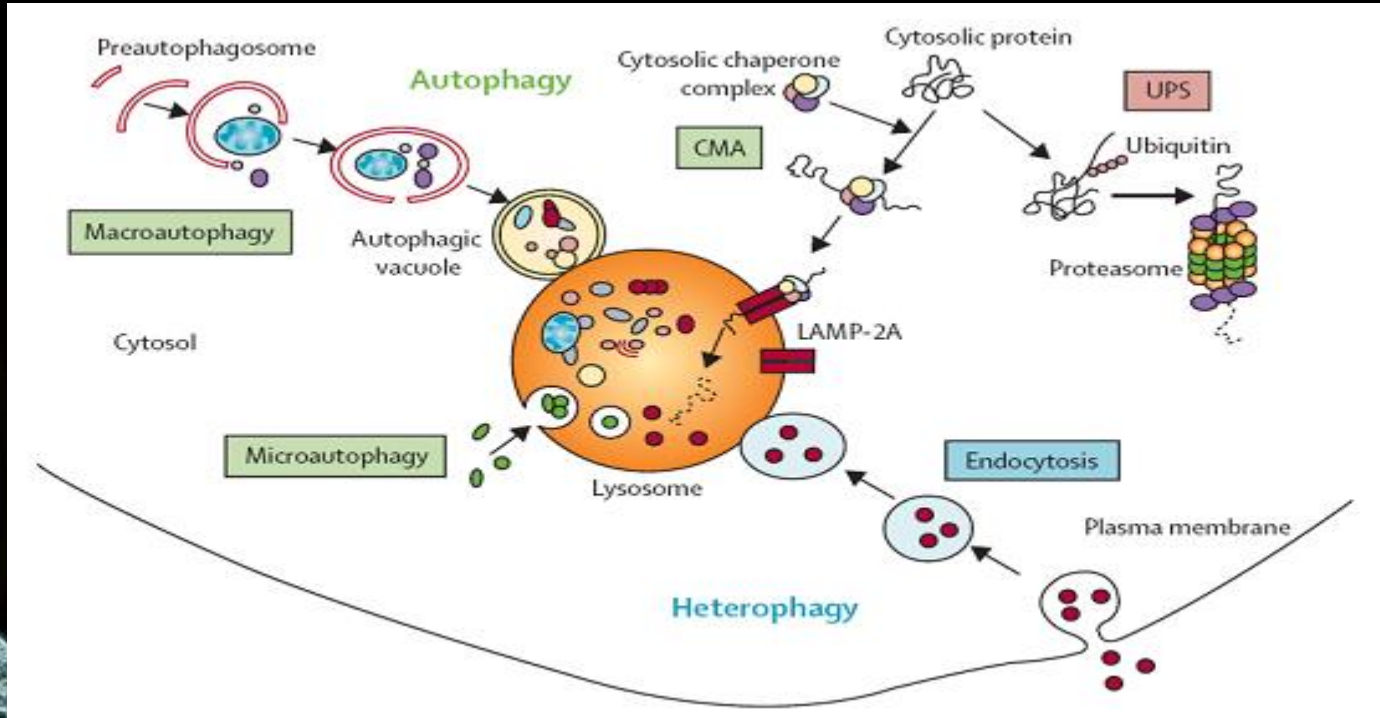
Ayrıca, melatonin nöral kök hücrelerinde farklılaşmayı azaltığı gözlemlenmiştir. ES-E14TG2a hücrelerinin *Oct4*, *REX-1*, *Sox2*, ve *Zfp206* gibi kök hücre farklılaşmama markırlarının mRNA düzeylerine bakılarak melatonin bu kök hücrelerde farklılaşmayı inhibe ettiği belirlenmiştir (Huangfu vd., 2008).



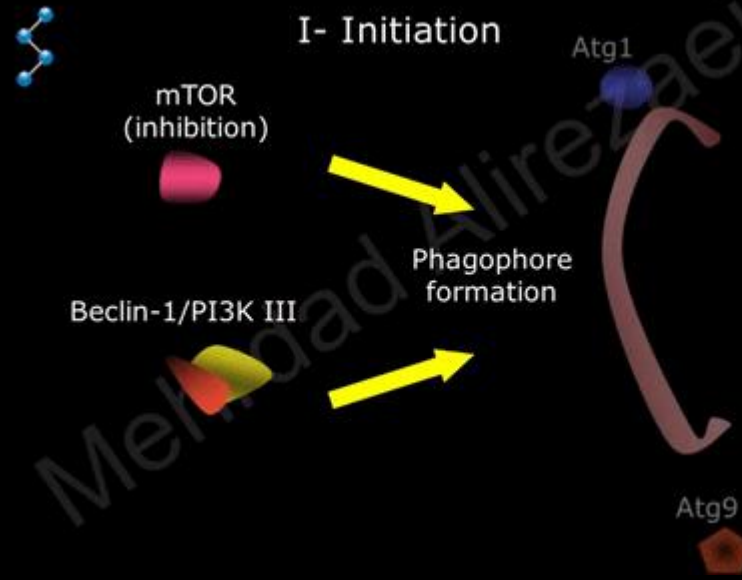
Melatonin ayrıca, *HDAC (Histone Deacetylase)*'nin çeşitli izoformları olan *HDAC3*, *HDAC5* ve *HDAC7* mRNA ekspresyonunu artırdığı belirlenmiştir, 24 saat süre ile melatonin uygulanmasının kromatin şekillenmesi ve gen transkripsiyonu ile ilişkili olan *histon H3* asetilasyonunu belirgin şekilde artırdığı saptanmıştır. Bu sonuçlar melatoninin nöral kök hücrelerinin farklılaşması ve epigenetik modülasyonunda rol oynayabileceğini düşündürmektedir (Sharma, v., 2008).




- ✓ Otofaji kendi kendini (auto) yeme (phagy) anlamına gelmektedir ve hücre biyolojisinde hücre içi makromoleküllerin ve organellerin lizozomal enzim aktivitesiyle yıkılma mekanizmasıdır (Gozuacik ve Kimchi 2004).
- ✓ Genel olarak bakıldığında son on yılda yapılan çalışmalar otofajinin; metabolizmanın düzenlenmesi, morfogenez, hücre farklılaşması, yaşlanma gibi fizyolojik hücrel olaylarda ve bağışıklık sisteminin bir parçası olarak hücre içi patojenlerin yıkımında rol oynadığını göstermektedir (Shintani ve Klionsky 2004, Mizushima ve ark 2008, Rajawat ve Bossis 2008).



Kanser ve otofaji arasındaki ilişkinin araştırıldığı birçok çalışmada, büyüme faktörlerinden yoksun tümör hücrelerinde otofajide artış olduğu, hücrelerin ölümden otofaji ile kaçtığı ve hücrelerdeki otofaji inhibe edildiğinde, hücrelerin apoptoz ile öldüğü gözlenmiştir (Boya ve ark 2005, Lum ve ark 2005).





Melatonin uygulamasından sonra otofajik işlemlerinde kısmi bir azalma olduğunu rapor edilmiştir. Koh (2011)'un yaptığı bir çalışmada, melatoninin mTOR sinyal yolu aktivasyonu ile iskemik beyin hasarını önlediği gösterilmiştir (Koh 2011).



Abd

Mehrdad Alirezai



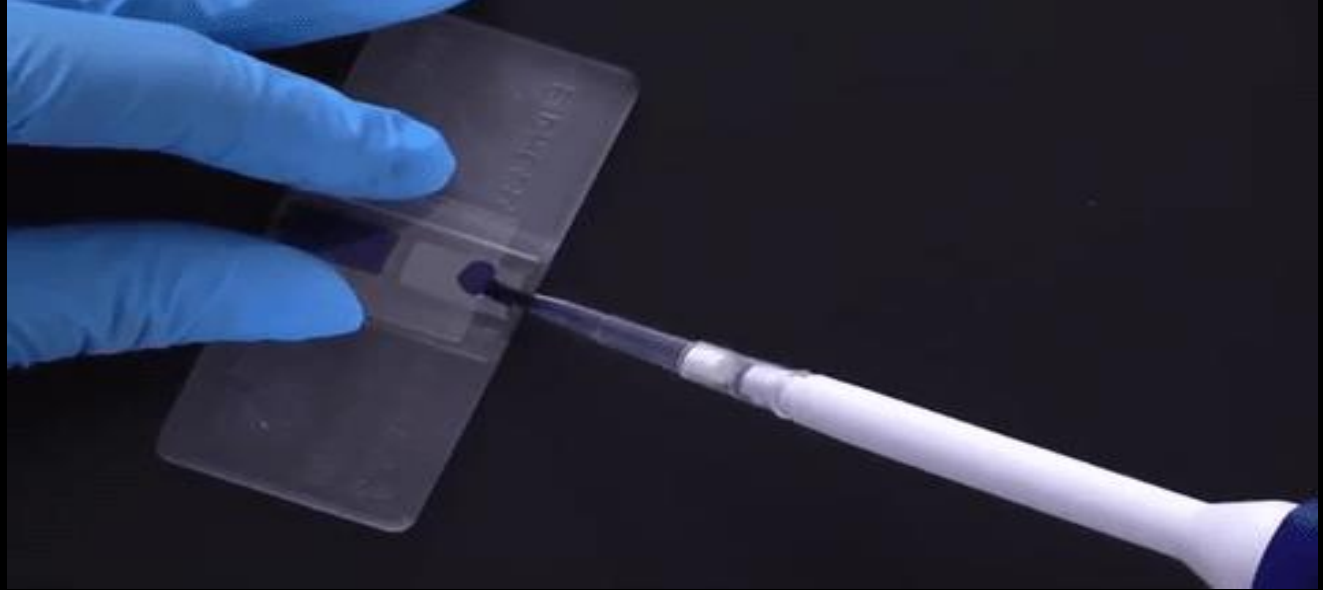
GEREÇ VE YÖNTEM

Hücreler, Hücre Kültürü ve Stoklama



Projede MCF-7 meme kanseri hücre hattı ve kontrol grubu olarak kanser hücresi olmayan HEK-293 embriyonik böbrek hücre hattı kullanıldı. MCF-7 ve HEK-293 hücre hattı ATCC'den temin edildi. Temin edilen bu hücreler, %10 FBS (Fetal Bovine Serum) (Biochrome, Almanya) ve %1 penisilin/streptomisin (100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin) (Biochrome, Almanya) içeren RPMI (Biochrome, Almanya) kültür vasatında farklı flasklarda kültürü yapıldı

Hücre Sayımı



Hücre süspansiyonu ($100 \mu\text{l}$) 1.5 ml 'lik ependorf tüpe aktarıldı ve üzerine dilüsyon faktörü 2 olmak üzere $100 \mu\text{l}$ %0.04 trypan blue boya solüsyonu eklendi ve hafiften pipetaj yapıldı. Boyanmış hücre süspansiyonu 5 dakika oda ısısında bekletildi, daha sonra hematositometri lamına $20 \mu\text{l}$ hücre süspansiyonundan yüklendi ve canlı hücreler ışık invert mikroskop altında (100X büyütme) 5 farklı bölgede sayıldı ve sayı ortalaması alındı.

Hücre Canlılık Analizler

MTT Assay

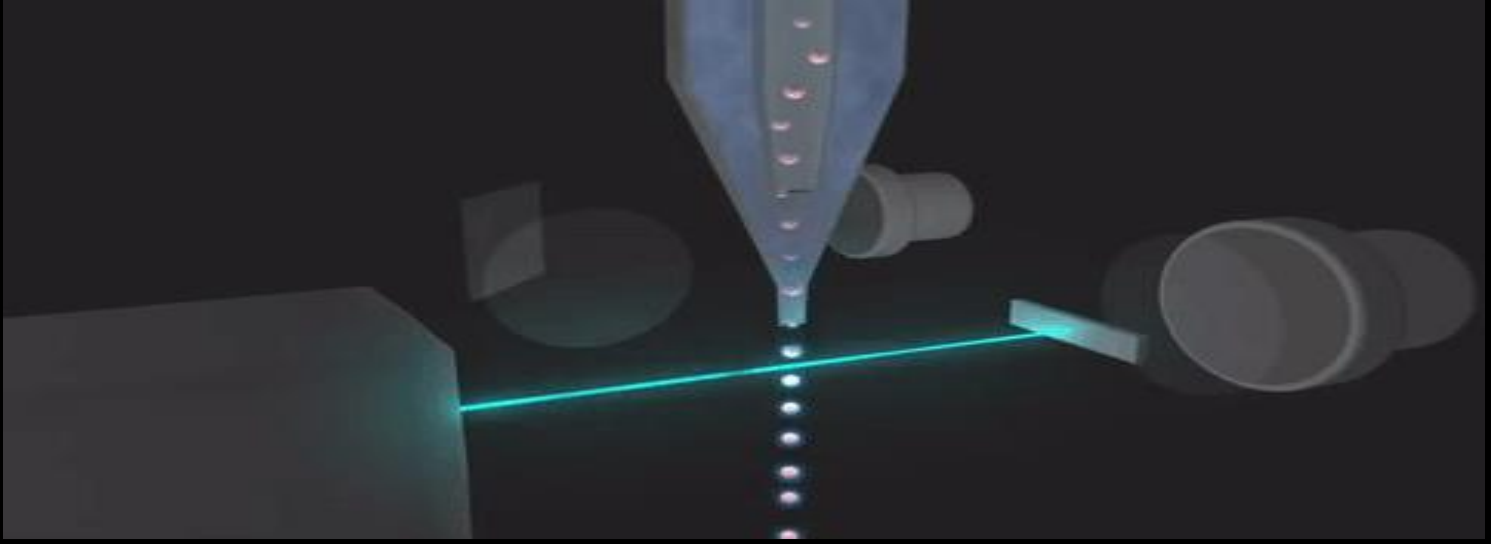
Abnova



Seed cells in 96 well plate

Yaklaşık 5×10^3 hücre 100 ul %10 FBS + %1 PC'li medyum içinde 96'lık well plate'e ekildi ve 24 saat 37°C , %5 CO_2 etüvde inkübe edildi. Bu sürenin sonunda eski medyum uzaklaştırıldı ve hücreler PBS ile yıkandıktan sonra farklı kombinasyonlarda melatonin içeren 100 ul medyum 24, 48, 72 saat muamele edildi (Etken madde kombinasyonları 5, 10, 15, 20, 40, 80, 100, 200, 400, 800 uM olacak şekilde uygulandı). Bu sürenin sonunda her kuyucuğa 10 ul 12 mM'lik Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide solüsyonu eklendi ve 4 saat 37°C , %5 CO_2 etüvde inkübe edildi. Süre sonunda kuyucuklardan medyum uzaklaştırıldı ve yerine 50 ul DMSO eklendi ve 37°C , %5 CO_2 etüvde 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası karışım pipetaj yapıldı ve micro-plate reader cihazında 490 nm dalga boyunda absormansı ölçüldü

Flow Sitometri ile Kök Hücre Ayrımı



Sayılan hücreler istenilen miktara göre etiketli FACS test tüplerine aktarıldı. Hücreler 100 µl %2 FBS/HBSS içerisinde süspanse edildi. Her bir konjuge antikordan (CD44-APC, Sigma-Aldrich Corporation, Almanya; CD24-FITC, Sigma-Aldrich Corporation, Almanya) 10^6 hücreye 20 µl olacak Şekilde alındı ve karanlık ortamda uygun test tüpüne eklendi. DAPI, bu tp dahil tüm tüplere en son aŐamada eklendi. Tüpler karanlık ortamda (alüminyum folyo ile örtülerek) 4°C'de 10 dakikada bir çalkalanarak bir saat boyunca bekletildi. Her bir tp içerisindeki hücreler, bağlanmayan antikoru uzaklaŐtırmak için 3 ml %2 FBS/HBSS ile yıkandı. HBSS ile ekstra bir yıkamadan sonra hücre çökeltisi, 400 µl DAPI (0,4 ng/ml) ile sulandırıldı ve FACS cihazı (FACS Aria III – BD Pharmingen, ABD) ile hücreler ayrıldı.

Kantitatif Real Time PCR (qPCR)

Total RNA İzolasyonu

RNA Extraction by TRIzol®

Abnova



Transfer the aqueous phase to a fresh tube

Flow sitometri ile izole edilen kök hücrelerden total RNA izolasyonu üzerine 500 μ l TRI Reagent® (Sigma, ABD, #MKBP6595V)/Kloroform yöntemi ile yapıldı. RNA konsantrasyonu mikro-spectrophotometer cihazında ölçüldü. RNA ların intaktlığı jel elektroforezinde 18S,28S bant kalitelerine bakılarak değerlendirildi. İzole edilen RNA bekletilmeden cDNA sentezinde kullanıldı ya da kullanılana kadar -85°C derin dondurucuda muhafaza edildi.

Primer Dizaynı

#SeqRout

PCR AMPLIFICATION

Bax, Bcl-2, Oct4, Sox2, Nanog ve *Gapdh* genlerine spesifik primerler Integrated DNA Technology (IDT) PrimerQuest* online programı kullanılarak dizayn edildi. Primerler Biomers Inc. (Ulm, Almanya) firması tarafından sentez edildi.

cDNA Sentezi



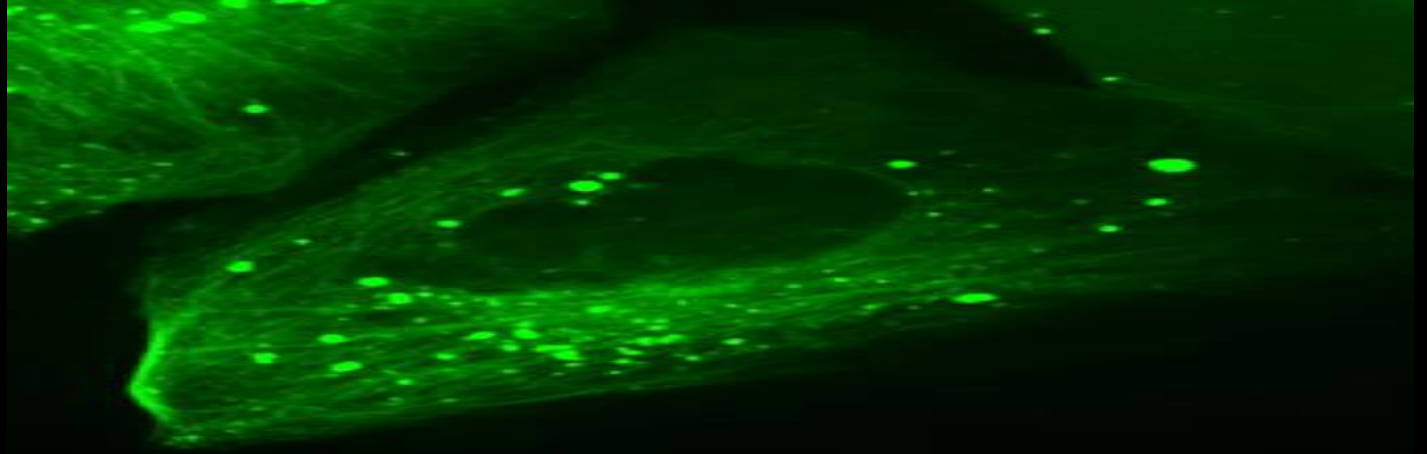
Total RNA'dan cDNA oluşumu RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific, ABD, #K1622) kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Bunun için daha DNA'dan saflaştırma işlemi gerçekleştirildi. 1 μg RNA, 1 μL 10x reaksiyon solüsyonu (MgCl_2 'li) ve 1 μL DNase I ile total hacim 10 μL olacak şekilde hazırlanıp 37oC'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda DNase inaktive etmek için 1 μL 50 mM EDTA eklenerek 65oC'de 10 dakika tekrar inkübe edildi. Daha sonra aşağıdaki solüsyon karışımı hazırlanarak RNA üzerine eklendi ve sırasıyla bekletilmeden 65oC 5 dakika, 42oC'de 60 dakika, 25oc'de 5 dakika inkübe edildi.

Kantitatif Real Time PCR



cDNA kullanılarak gen ekspresyon analizini gerçekleştirmek için LightCycler® 480 II (Roche, Almanya) cihazı kullanıldı. Bunun için tüp içerisine 5 μ l Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific, ABD) , 0.1 μ l (25 pmol) forward ve reverse primer, \leq 500 ng olacak şekilde daha önceden alikotlanan ve buz üzerinde çözdürülen cDNA ilave edildi ve 10 μ l'ye tamamlayacak miktarda ddH₂O eklendi. PCR'ın her bir bileşenleri 96'lık platelere ilave edildi ve örnekler cihaza yerleştirilerek program başlatıldı. Ekspresyon analizlerinden önce optimizasyon çalışmaları tamamlandı. Optimize deneyler 2 kez tekrarlandı

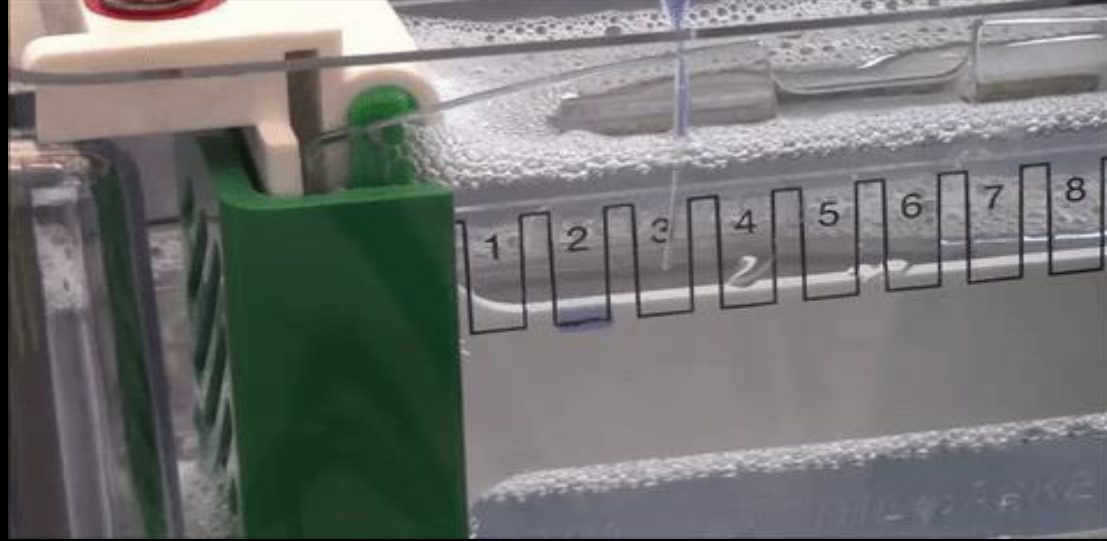
Otofaji Analizi



Melatoninin kanser kök hücrelerinde otofajik etkisi immünofloresan yöntemi ve westernblot protein analizi ile gerçekleştirildi. İmmünofloresan yönteminde LC3-II agregasyonu, western blot yöntemi ile LC3-I ve -II proteinlerinin analizini yapmadan önce her bir basamak optimize edildi.

Çalışmamız için total MCF-7 ve HEK293 hücrelerine 48 saat boyunca 35 μ M melatonin ve otofaji belirteci olan C2Cer 25 μ M konstrasyonlarla muamele edildi. Süre sonunda CD44+/CD24- belirteçlere sahip kök hücreler izole edilerek floresan işaretli antibodilerle muamele edildi. Otofaji vakuelleri floresan mikroskobu altında incelendi. C2Cer maddesinin sulandırılmasında dimetil sülfoksit (DMSO) kimyasalı kullanılmasından dolayı, kontrol grubu olarak DMSO'da ilave edildi ve otofajik etkisi gözlemlendi.

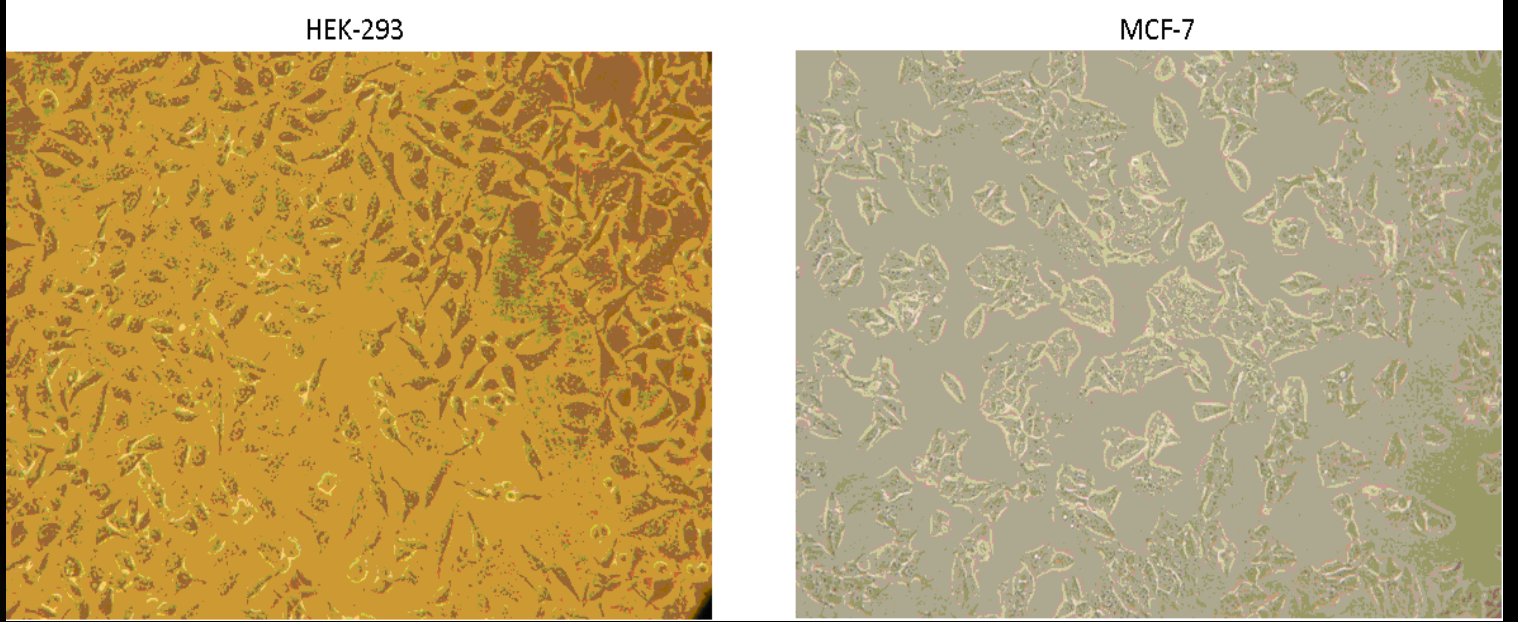
Western Blot Analizi



- ✓ Protein analizi için western blot tekniği kullanıldı Bunun için western blot çalışmasında kullanılacak proteinler hücre hatlarından ticari kit (Millipore, kat. no: 2910) kullanılarak izole edildi.
- ✓ SDS-PAGE analizlerinde kullanılacak olan jeller için 10x10 cm'lik jel kalıpları kullanıldı (Bio-Rad, Mini-PROTEAN®Tetra Cell). Separating (ayırma) ve stacking (yükleme) olmak üzere iki ayrı jel karışımı hazırlandı.
- ✓ Elektroforez sonrası jel kabından çıkarıldı ve Trans-BlotR Turbo™ Transfer sistemi (Bio-Rad Laboratories, Inc., #170-4155) kullanılarak 1,3 A elektrik akımında PVDF membrana protein transferi gerçekleştirildi.
- ✓ SDS-PAGE sonrası uygun antibodyler kullanılarak immnoblottlama gerçekleştirildi ve kemilüminesans tarama cihazında görüntüsü alındı..

BULGULAR

Projede MCF-7 meme kanseri hücre hattı ve kontrol grubu olarak kanser hücresi olmayan HEK-293 embriyonik böbrek hücre hattı kullanıldı.



Şekil . Kullanılan HEK293 ve MCF-7 hücre hatlarının inverted mikroskopta 100X büyütmedeki görünüşleri.

Melatonin MCF-7 hücrelerinin poliferasyonunu inhibe eder

Total hücre hatları üzerinde MTT ile belirlenen etkin dozları konfirme etmek için Annexin V assay uygulandı. MTT anazi ile uyumlu sonuçlar elde edildi. MTT assay ile belirlenen dozun MCF7 hücre hattında apoptozu indüklediği görüldü. Annexin V analizinde HEK293 hücre hattında 25 μ M melatonin uygulanmas sonrasında apoptozisde istatikselsel olarak anlamlı ($p < 0.0324$) bir azalma gözlenirken MCF-7 hücre hattında apoptozisde istatikselsel olarak anlamlı ($p < 0.006$) bir artış gözlemlendi

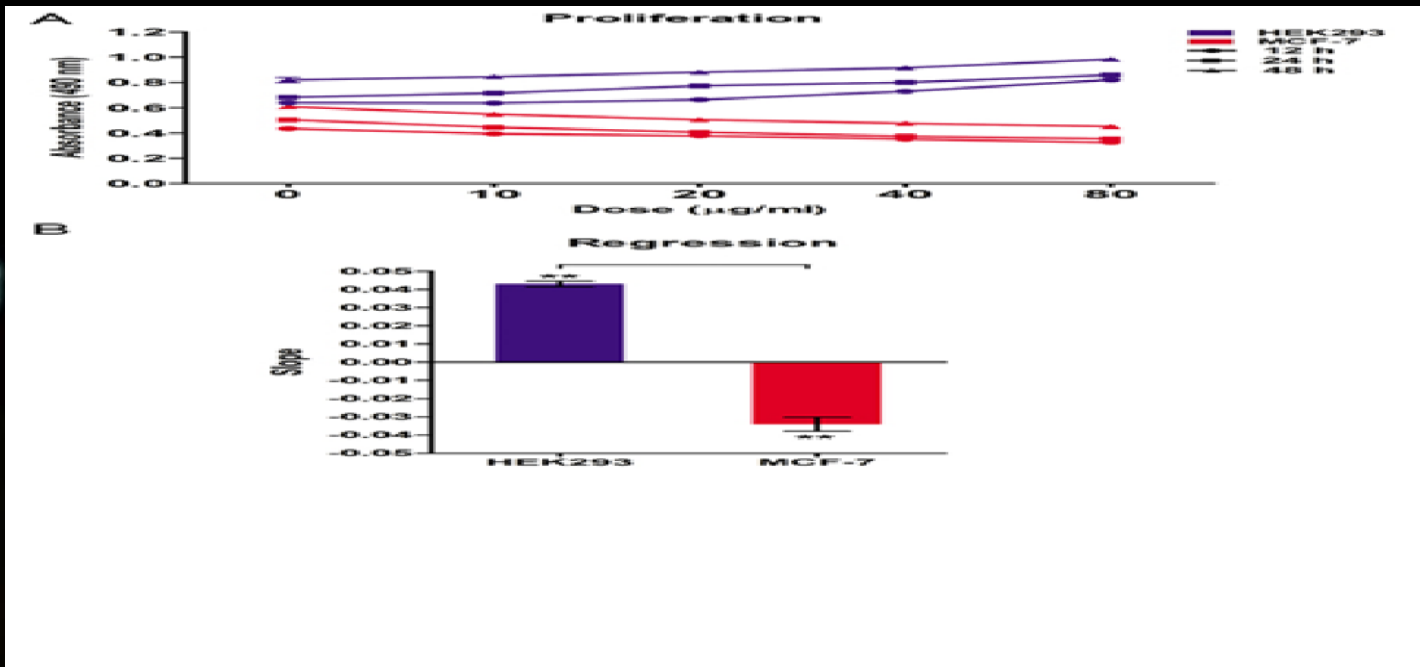


Figure 1. The MTT assay results that made to determining viability and effective dose of melatonin (IC50) in the HEK293 and MCF-7 cell lines.

Melatonin CD44+/CD24-/düşük fenotip subpopulasyonunu süprese eder.

Hücre hatlarından Melatonin uygulamasından sonra kök hücre tayini ve elde edilmesi Flow Sitometri yoluyla yapıldı. C44+/CD24- hücrelerin bulunduğu bölge Q1 bölgesi olarak kaplandı. Bu analiz sonucunda 25 µM melatonin uygulanan HEK293 hücre hatında kök hücre miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış ($p=0.0034$) gözlemlenirken MCF-7 hücre hattında kanser kök hücre miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma ($p=0.002$) saptandı.

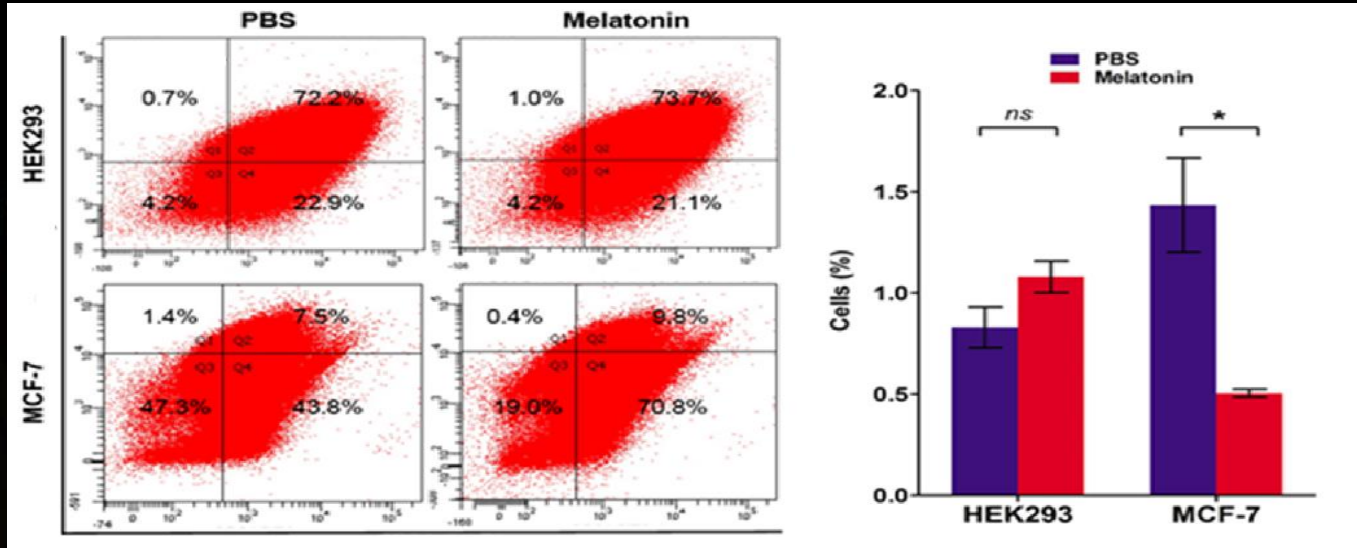
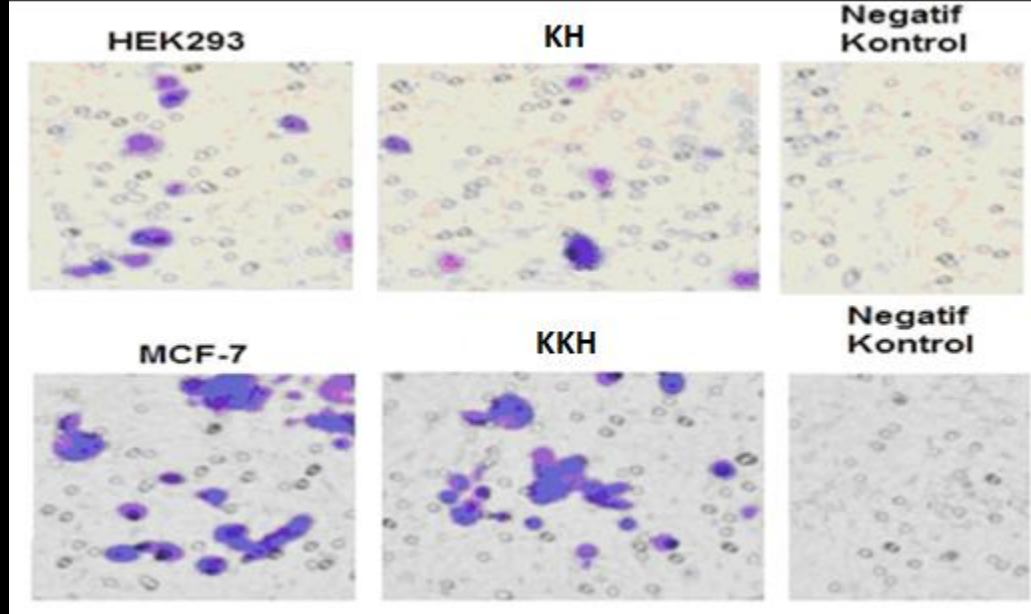


Figure . Graphic results of flow cytometry performed for stem cell count after administration of melatonin on cell lines.

Elde edilen kök hücrelerde koloni formasyonu gözlemlendi



Flow sitometri yoluyla HEH293 ve MCF7 hücre hatlarından elde ettiğimiz kök hücreleri kök hücrelerin soft ağarda koloni oluşturma karakterinden faydalanarak soft agar koloni formasyon assay yoluyla konfirme ettik. Burada pozitif kontrol olarak kök hücre eldesinde kullanılan hücre hatları, negatif kontrol olarakta kültür mediumu kullanıldı. Soft agarda kültürasyon sonrasında pozitif kontrol grubu ve kök hücre grubunda koloni formasyonu gözlemlenirken negatif kontrol grubunda gözlemlenmedi

Melatonini MCF7 hücrelerinde apoptozu indükler

Hücreler üzerinde melatonin apoptotik etkileri Flow sitometri kullanılarak Annexin analizi yoluyla değerlendirildi. Sonuçlar melatonin MCF-7 hücrelerinde önemli oranda apoptozu artırdığı gözlemlendi. Bunun yanında melatoninin HEK293 hücrelerinde apoptozu azaltmaktaydı. ($P < 0.01$; Figure 2A)

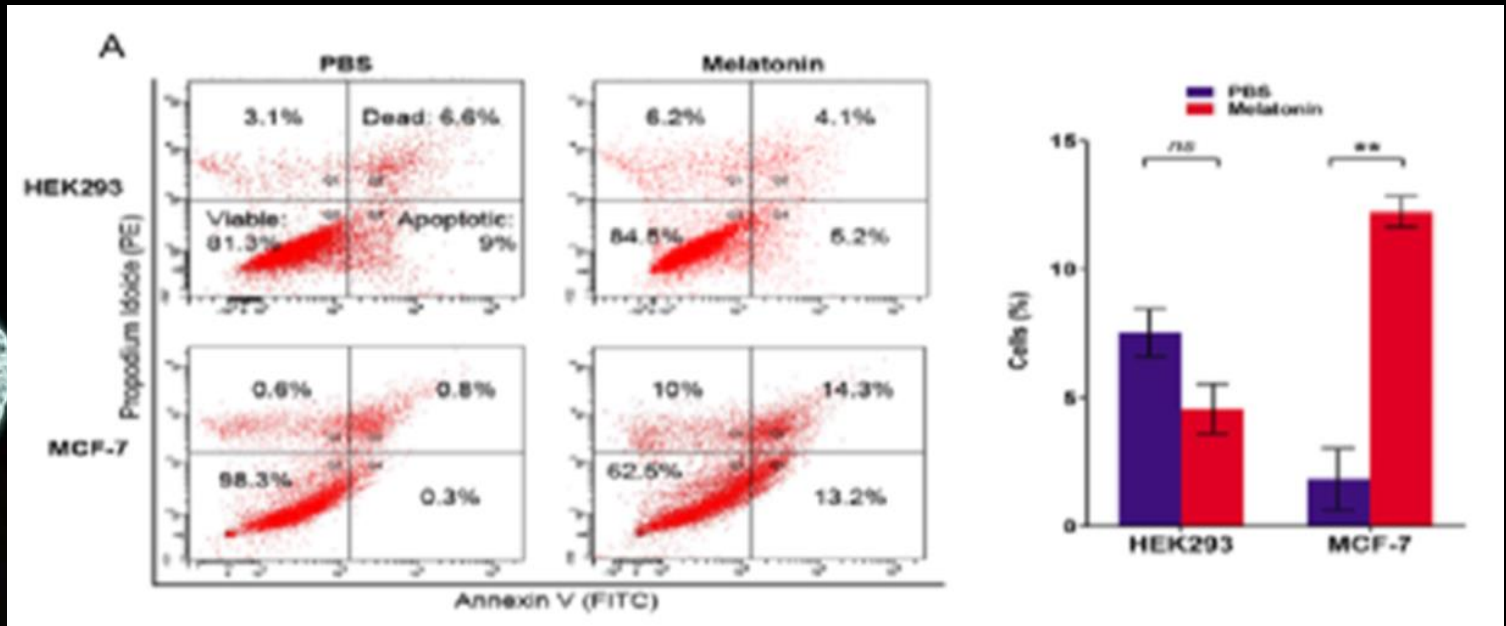
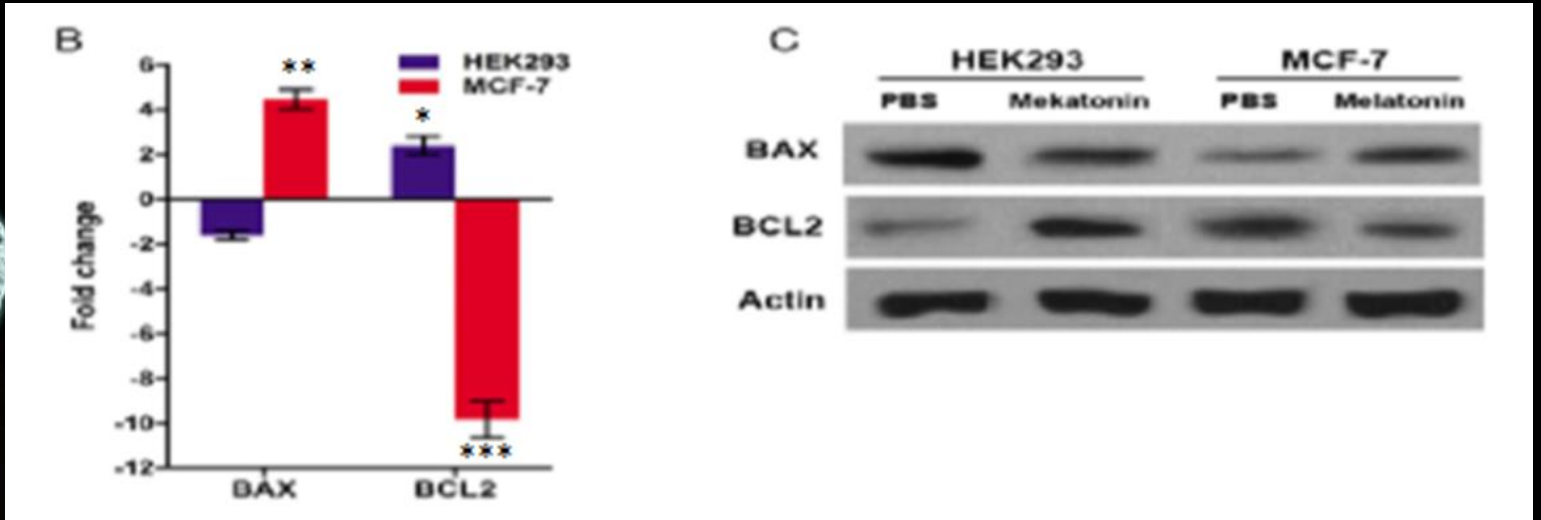


Figure : DotBlotScatter and Bar Chart results of Annexin V analysis that conducted to confirm effective dose determined by MTT (A, B). Data displays the mean \pm standard deviation of three independent experiments. **p < 0.01; ***p < 0.001. Abbreviations: FITC, fluorescein isothiocyanate; PI, propidium iodide; Q, quadrant.

Melatonin MCF7 hücrelerinde apoptoz etkili gen ekspresyonlarını artırır

Annexin V analiz sonuçlarını konfirme etmek için melatonin uygulanan hücrelerde apoptoz yolağında bulunan genlerin ekspresyonlarına bakıldı. MCF-7 hücrelerinde BAX gen ekspresyonu artarken ($P < 0.001$), BCL2 gen ekspresyonlarının azaldığı ($P < 0.0001$) saptandı. HEK-293 hücrelerinde ise BAX gen ekspresyonun azaldığı ($P < 0.01$), BCL2 gen ekspresyonun ise arttığı ($P < 0.01$) belirlendi.



The results of the western blot results and gene expression of BAX and BCL2 gene performed to verify these results. Data displays the mean \pm standard deviation of three independent experiments. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. Abbreviations: FITC, fluorescein isothiocyanate; PI, propidium iodide; Q, quadrant.

Melatonin MCF7 hücrelerinde kök hücre markır gen ekspresyon düzeylerini önemli oranda etkiler

Melatonin uygulanan MCF-7 ve HEK-293 hücrelerinde NANOG gen ekspresyonlarının azaldığı gözlemlendi. Bunun yanında OCT4 gen ekspresyonu MCF7 hücrelerinde azalırken ($P<0.05$) HEK 293 hücrelerinde ($P<0.05$) arttı . SOX2 gen ekspresyon seviyelerinin ise her iki grupta da arttığı ($P<0.05$) gözlemlendi.

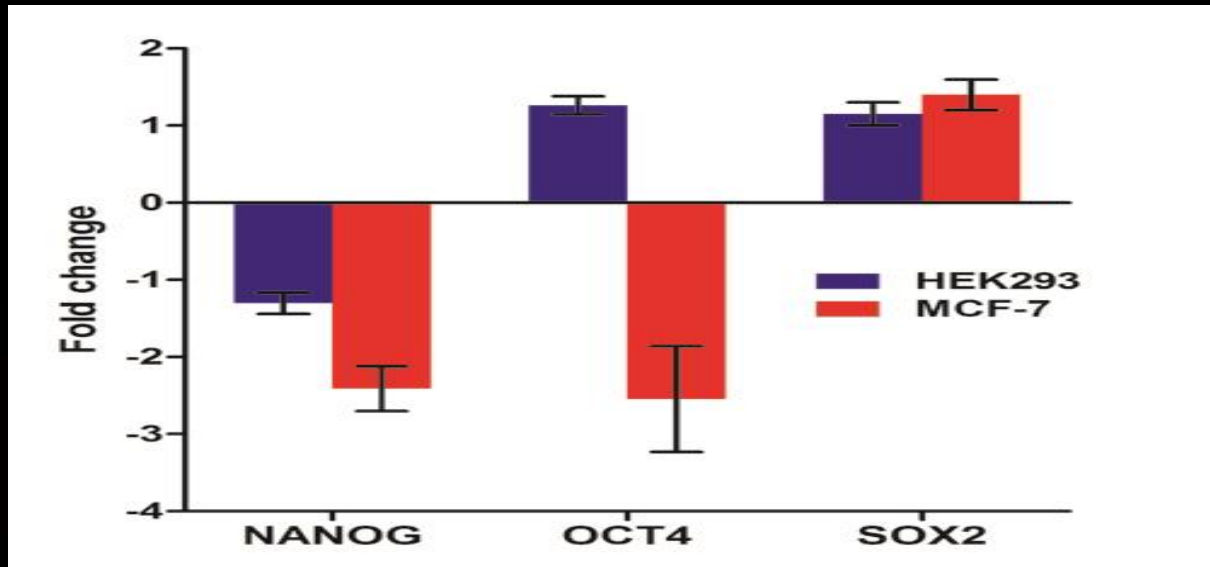
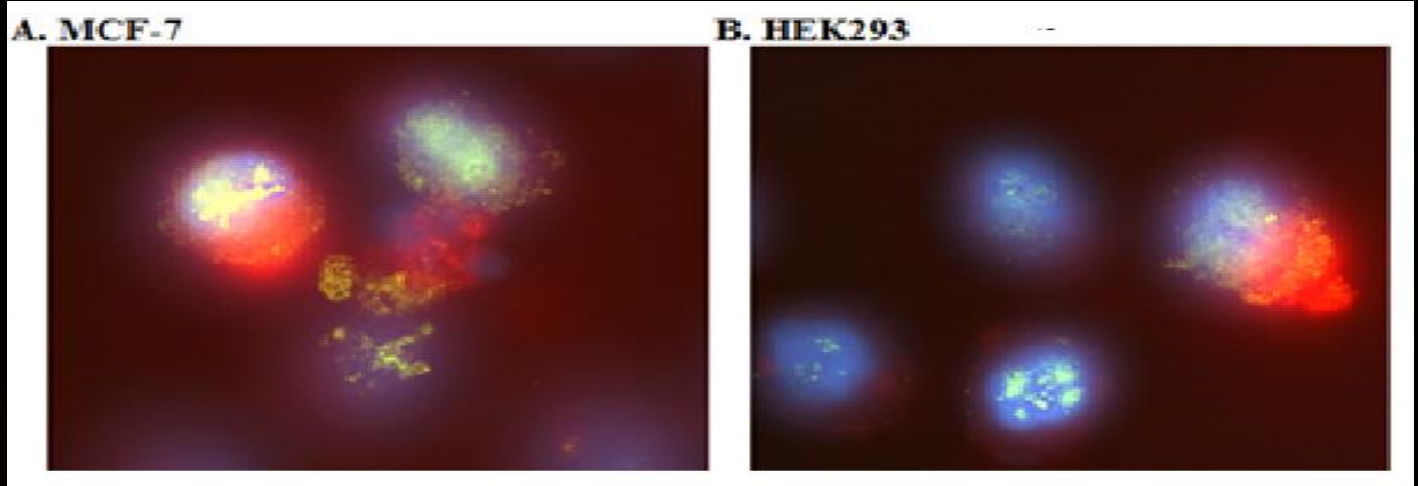


Figure . Comparison of SOX2, OCT4, and NANOG gene expression results in the melatonin-treated and untreated cell lines

Otofaji Analizi İçin İmmüno Floresan Optimizasyonu

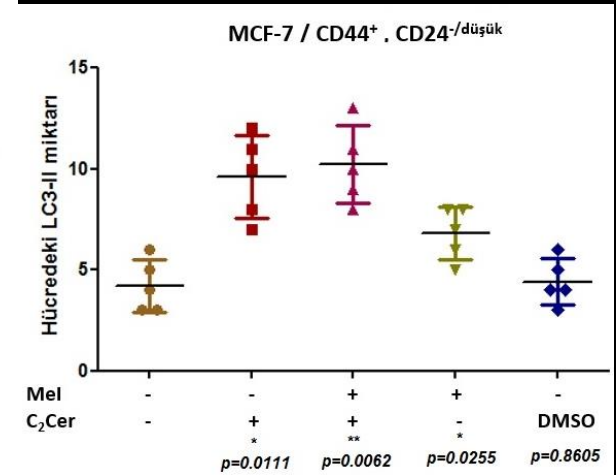
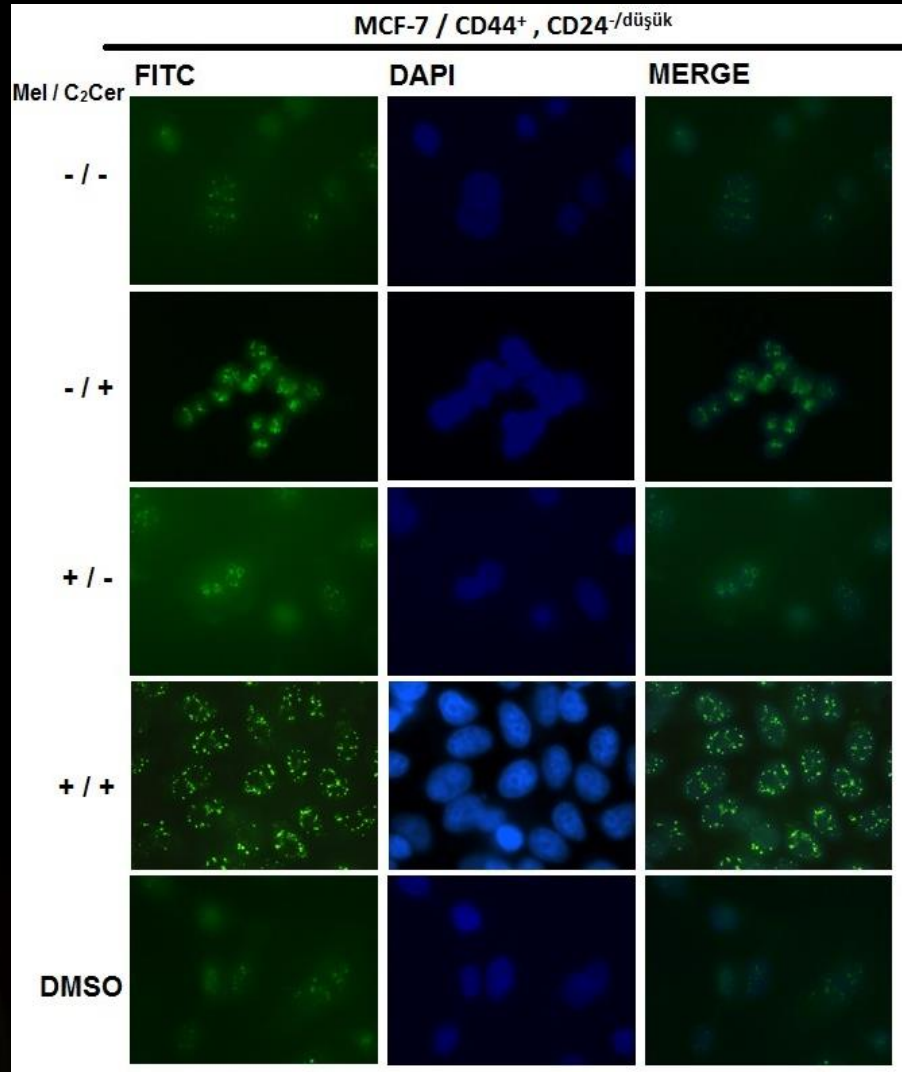
MCF-7 ve HEK293 hücrelerinden CD44⁺/CD24⁻ belirteçli kök hücreler izole edildikten sonra LC3-II'nin floresan görüntülenmesi için kök hücrelerin lamlara fiksasyonu metanol ile gerçekleştirildi. Protokollere uygun olarak slaytlar primer ve sekonder antibadilerle muamele edildi ve LC3-II görüntüledi. CD44-Alexa Flour-680 antibadisi ile LC3-II antibadisi birlikte kullanılarak sonuçlar elde edildi



Şekil 3.3. Kök hücrede CD44-Alexa Flour-680 ve LC3-II-FITC immüno floresan görüntüsü. İzolen edilen kök hücreler 24 saat lamel kültüründen sonra CD44-Alexa Flour-680 ve LC3-II-FITC antibadileri ile müamele edildi (Mavi: çekirdek boyası DAPI, yeşil: LC3-II, kırmızı: CD44).

Melatonin Meme Kanseri Kök Hücrelerindeki LC3 Agregasyon ve Otofajik Vakuollerin Oluşumunu Tetikler

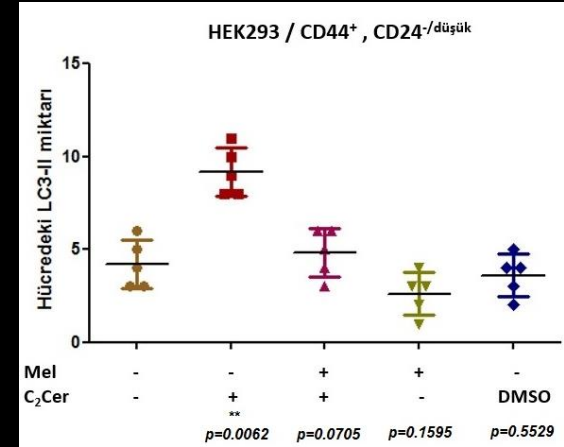
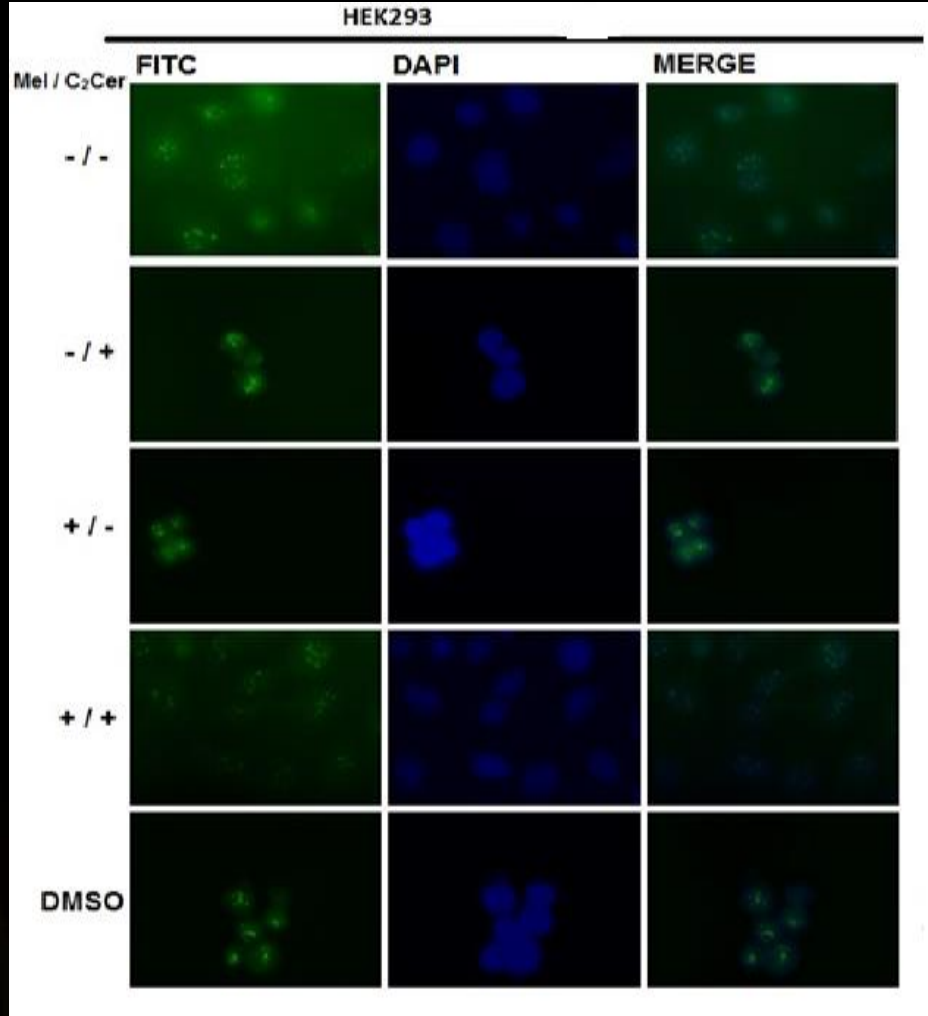
Melatonin, C2Cer ve DMSO kombinasyonları oluşturuldu ve analiz sonucunda LC3-II sinyalleri sayıldı. MCF-7'den elde edilen CD44+/CD24- belirteçli kök hücrelerde sadece melatonin uygulanan grupta otofajide 2 kat artış olduğu gözlendi ($p=0,0255$). MCF-7 CD44+/CD24- hücrelerinde melatonin uygulanan gruptaki otofaji artışı, sadece C2Cer verilen kontrol grubundaki otofaji artışı kadar yüksek değildi. Ayrıca MCF-7 CD44+/CD24- hücrelerinde kontrol olarak deney gruplarına ilave edilen DMSO'nun ise melatonin uygulanmayan grup ile otofaji artışı yakın değerler gösterdi ($p=0,8605$)



Şekil . LC3-II protein translokasyonu. MCF-7'den izole edilen kök hücrelerde LC3-II'nin immüno Floresan görüntüsü (x100).

Melatonin Meme Kanseri Kök Hücrelerindeki LC3 Agregasyon ve Otofajik Vakuollerin Oluşumunu Tetikler

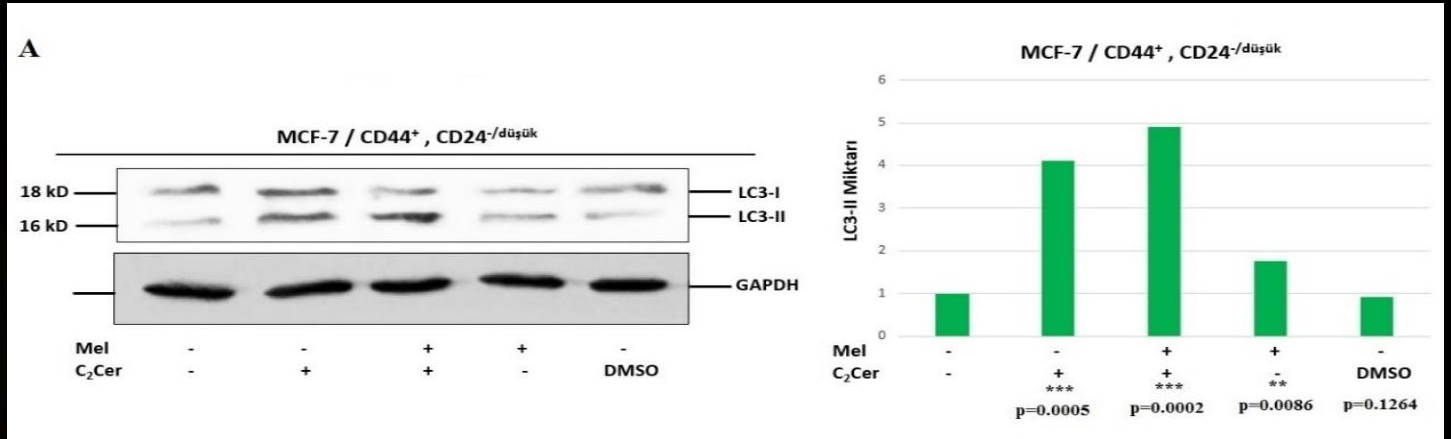
HEK293'ten elde edilen CD44⁺/CD24⁻ belirteçli kök hücreler içinde melatonin, C₂Cer ve DMSO maddelerin kombinasyonları oluşturuldu ve analiz edildi. HEK293 CD44⁺/CD24⁻ hücrelerinde sadece melatonin uygulanan grup melatonin uygulanmayan grup ile kıyaslandığında otofaji de azalma tespit edildi (p=0,1595). Ayrıca HEK293 CD44⁺/CD24⁻ hücrelerinde kontrol olarak deney gruplarına ilave edilen DMSO'nun ise melatonin uygulanmayan grup ile otofaji artışı yakın değerler gösterdi (p=0,552).



Şekil 3.3.1.2. LC3-II protein translokasyonu. HEK293'ten izole edilen kök hücrelerde LC3-II'nin immüno Floresan görüntüsü (x100).

Melatonin Meme Kanseri Kök Hücrelerinde LC3-I'in LC3-II'ye Dönüşümünü Uyarır

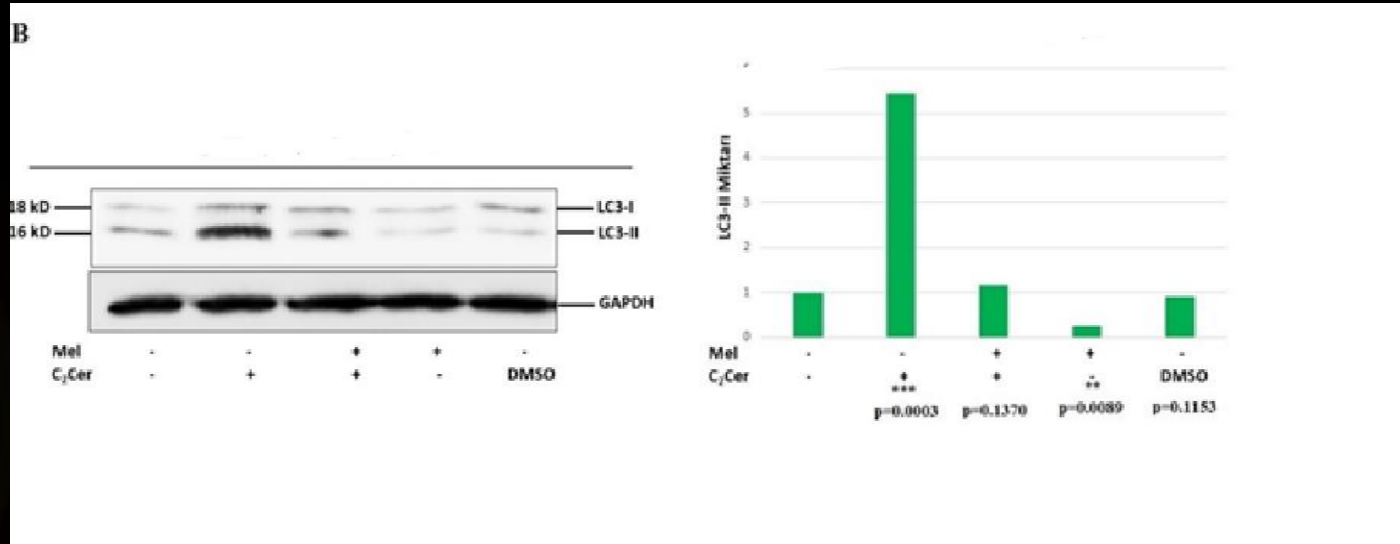
Western blot sonuçlarında melatoninin MCF-7'den elde edilen kök hücrelerde sadece melatonin uygulanan grup ile melatonin uygulanmayan grup kıyaslandığında LC3-I'in LC3-II'ye dönüşümünün arttığı gözlenmiştir ($p=0,0086$). C_2 Cer ve melatonin birlikte uygulanan gruba bakıldığında en fazla LC3-II oluşumunun olduğu tespit edilmiştir ($p=0,0002$). DMSO uygulanan grupta ise imminofloresan sonuçlarında olduğu gibi madde uygulanmayan kontrol grubu ile yakın bant yoğunluğu gösterdi ($p=0,1264$). Elde edilen verilere göre melatonin uygulanan MCF-7'den elde edilen $CD44^+/CD24^-$ belirteçli kök hücrelerde otofajik etki göstermektedir



Şekil LC3-II ve LC3-I western blot sonuçları. (A) MCF-7 $CD44^+/CD24^-$ belirteçli kök hücreler

Melatonin Meme Kanseri Kök Hücrelerinde LC3-I'in LC3-II'ye Dönüşümünü Uyarır

HEK293'ten elde edilen kök hücrelerde sadece melatonin uygulanan grup ile melatonin uygulanmayan grup kıyaslandığında LC3-I'in LC3-II'ye dönüşümü yarı yarıya azalmıştır ($p=0,0089$). C_2 Cer ve melatonin birlikte uygulanan gruba bakıldığında ise melatonin, C_2 Cer'in otofajik etkinliğini azaltarak LC3-II oluşumunu engellemiştir. C_2 Cer ve melatonin birlikte uygulanan gruptaki LC3-II miktarındaki bu azalma madde uygulanmayan gruba yakın bir bant yoğunluğu göstermiştir ($p=0,1370$). DMSO uygulanan grupta ise madde uygulanmayan kontrol grubu ile yakın bant yoğunluğu gözlemlendi



SONUÇLAR

- ✓ Bu analizler sonucunda HEK293 hücre hattında apoptozisde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü ($p=0.0324$). Bu sonuç normal HEK293 hücre hattında melatonin apoptozisi önleyici bir etkisinin olduğunu göstermektedir.
- ✓ Annexin V analizi sonucunda melatonin MCF7 hücrelerinde ise apoptozisi istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artırdığını belirledik. Daha önce MCF7 hücre hattı üzerine melatonin tek başına ve kombine uygulamaları yoluyla yapılan çalışmalarda melatonin bu hücre hatında özellikle P53 ve p21 ekspresyonlarını artırarak apoptozisi indüklediği görülmüştür (Cos S vd., 1991; Mediavilla vd., 1999; Bizzarri vd., 2003; Proietti vd., 2011).

SONUÇLAR

- ✓ Melatonin MCF7 hücre hattı yanında diğer değişik kanser türleri (endometrium, over, kolorektal) üzerinde de benzer etkiler gösterdiği yapılan değişik çalışmalarda gösterilmiştir (Sandyk vd., 1992; Wenzel vd.,2005).
- ✓ Bizim sonucumuz literatürdeki bu verilerle uyumludur.

SONUÇLAR

- ✓ Melatonin uygulaması sonrasında HEK293 hücre hatında kök hücre miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış ($P=0.0034$) saptanırken MCF-7 hücre hattında kanser kök hücre miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma ($p=0.002$) saptandı.
- ✓ Daha önceki analiz sonuçlarıyla birlikte değerlendirildiğinde melatonin HEK293 hücre hattında hem apoptozisi artırdığı hemde kök hücre miktarında artışa yol açtığı görülmektedir.
- ✓ Bu sonuçlara bağlı olarak HEK293 hücre hattındaki kök hücre artışının kök hücre farklılaşması ve apoptozisindeki azalmadan kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

SONUÇLAR

- ✓ MCF-7 hücre hattında ise, kanser kök hücre miktarında azalma total MCF hücre hattındaki apoptozis artışı ile birlikte değerlendirildiğinde bunun kanser kök hücrelerinde farklılaşma ve apoptozis artışı ile ilişkili olabileceğini akla getirmiştir.
- ✓ Melatonin kanser kök hücreleri üzerindeki etkisi ile ilişkili literatür bilgisi bulunmamasına rağmen bu sonucun daha önce kanser kök hücreleri üzerinde elde edilen başarılı uygulamalarla (**Indatraline, Thioridazine, Azathioprine ve Mefloquine**) uyumlu olduğu görülmektedir

SONUÇLAR

- ✓ HEK293 kök hücrelerinde Bax genin ekspresyonunun azalmasına karşın Bcl-2 gen ekspresyonunun artması melatonin normal HEK293 kök hücreleri üzerinde antiapoptotik etkinlik sergilediği yönünde değerlendirildi.
- ✓ HEK293 kök hücrelerinde Bax genin ekspresyonunun azalmasına karşın Bcl-2 gen ekspresyonunun artması melatonin normal HEK293 kök hücreleri üzerinde antiapoptotik etkinlik sergilediği yönünde değerlendirildi.

SONUÇLAR

- ✓ Yaptığımız çalışmada ayrıca Melatonin MCF7 kanser kök hücrelerinde Bax gen ekspresyonu 4,027822 kata artırırken Bcl-2 gen ekspresyonunun 10.665 kat azalttığını saptandı.
- ✓ Bu sonuç melatonin MCF7 kanser kök hücrelerinde apoptozisi artırdığı şeklinde yorumlanmıştır. Elde edilen bu sonuç literatürde melatoninle ilişkili benzer bir çalışma bulunmadığı için karşılaştırılamamıştır.

SONUÇLAR

- ✓ Melatonin kanser kök hücreleri üzerinde farklılaştırma yönündeki etkisinde daha önce literatürde kanser kök hücre markırları olarak belirlenen genlerin (Nanog, Sox2, Oct4) ekspresyon düzeylerine bakılarak değerlendirildi.
- ✓ Analiz sonucunda melatonin normal HEK293 kök hücrelerinde kök hücre markırı özelliği taşıyan bu genlerin ekspresyonunu artırdığı saptandı.
- ✓ Bu veri literatürde yer alan melatonin nöral kök hücrelerinde farklılaşmayı azalttığı yönündeki veri ile uyumlu bulunmuştur (Huangfu vd., 2008)


SONUÇLAR

- ✓ MCF7 kanser kök hücrelerinde ise melatonin kanser kök hücre markırı olan genlerin ekspresyonlarını azaltmıştır.
- ✓ Bu durum melatonin MCF7 kanser kök hücrelerinde kök hücre karakterin sürdürülmesinde etkin genlerin ekspresyonun azaltarak farklılaşmayı indüklediği yönünde değerlendirilmiştir.
- ✓ Melatonin kanser kök hücrelerindeki etkisini karşılaştırabileceğimiz literatürde bir yayın bulunmamaktadır. Bu nedenle bu yönde bir karşılaştırma yapılamamıştır.

SONUÇLAR

- ✓ Yapılan bu çalışmalar sonucunda projede amaçlanan sonuçları büyük oranda elde ettik. Projemize başlarken melatonin normal kök hücrelerde farklılaşma ve apoptozise yol açmadan meme kanseri kök hücreleri üzerinde farklılaşma ve apoptozis yönünde etki göstereceğini beklemekteydik.
- ✓ Çalışmamız sonucunda melatonin normal HEK293 kök hücrelerinde apoptozis ve farklılaşmayı azalttığını, MCF7 kanser kök hücrelerini ise apoptoz ve farklılaşmaya yönelttiğini belirledik.
- ✓ Elde ettiğimiz bu sonuçlar melatonin kanser kök hücrelerindeki bu etkinliğini ortaya koyan ilk sonuçlar olma niteliğini taşımaktadır.

SONUÇLAR

- 
- ✓ Sonuçlar neticesinde, melatonin MCF-7 kanser kök hücrelerinde bir ölüm mekanizması olan otofaji artışı tetiklemektedir. Bunun yanı sıra melatonin HEK293 kök hücrelerinde otofaji yolağını baskılama yönünde etki göstermektedir. Önceden belirtildiği üzere otofajinin pro- ya da anti- özellik göstermesi sebebi ile kansere olumlu ya da olumsuz etki edebilir (Klongpanichapak ve ark 2008).
 - ✓ Literatürle uyumlu bulduğumuz sonuçlarımız neticesinde melatonin MCF-7 CD44+/CD24- kök hücrelerinde pro-otofajik etki gösterirken, HEK293'den elde edilen CD44+/CD24- kök hücrelerinde anti-otofajik etki göstermektedir.

SONUÇLAR

- ✓ Elde ettiğimiz sonuçların projeden beklediğimiz sonuçlar olması bu yönde daha ileri çalışmalarla yönelmemizi gerekli kılmıştır.
- ✓ Çalışmamız sonucunda melatonin kanser kök hücrelerinde belirlediğimiz bu etkisinin hayvan deneyleri ve yolak analizleri ile desteklenmesi gereklidir.



Hepsine ve hepinize teşekkürler...