T.C.

ERCİYES ÜNİVERSİTESİ

BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ

KOORDİNASYON BİRİMİ

ATP2B1 Kalmodülin Kalsinörin ve cMyc Proteinlerinin Arasındaki İlişkilerin Tümör Hücrelerinde İn vitro İncelenmesi

Proje No:8353

Proje Türü

Normal Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Armağan CANER

Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Biyofizik AD.

Araştırmacılar

Müge Gülcihan ÖNAL

Nazmiye BİTGEN

Gülay SEZER

Bu Proje TSA-2019-8353 no ile Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Şubat 2021

KAYSERİ

Rapor:

2018 yılında Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine başvurusu yapılan bu proje Nisan 2919 tarihinde kabul edilerek çalışmaları başlatıldı. Bu projeye 28.133,82 TL destek sağlandı. Bütçenin 27.076,89 TL ile sarf malzemeler alındı. Bütün alınan malzemeler etkin bir şekilde kullanılmıştır.

Projede vaat edilen bütün çalışmalar yapıldı. Projenin amacı Plazma membranı kalsiyum pompası ile c-Myc transkripsiyon faktörü arasındaki ilişkiyi meme kanseri hücrelerinde belirlemektir. Yapılan çalışmalar doğrultusunda, inhibe edilen PMCA, cMyc'nin kanser hücrelerindeki ekspresyonunu down regüle etmektedir. CaM'nin artan ekspresyonu PMCA1 artışına katkı sağlamasa da cMyc'i baskılamıştır. CaN'nin meme kanserinde cMyc üzerinde dolaylı etkisi de gösterildi. CaN artışı ile cMyc inhibe olmaktadır. PMCA inhibe olduğu zaman kanser hücrelerinin apoptoza gitme oranları artmış, hücrelerin migrasyou yavaşlamıştır.

Proje süresince malzemelerin gecikmesi dışında bir sorun yaşanmamıştır. Beklenen sonuçlar elde edilmiştir. Proje kalsiyum yolağını iki farklı uygulama ile kanser hücreleri için terapötik hedef olarak gösterdiği için iki makale yayınlanması hedeflenmektedir.

Bu projeden elde edilen veriler ışığında yeni bir proje planlaması yapılmıştır.

Teşekkür

TSA-2019-8353 no'lu projemize verdiği destekten dolayı Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine teşekkür ediyoruz.

İçindekiler

Özet: 6
Abstract 7
GİRİŞ 8
Kapsam 9
GENEL BİLGİLER 10
GEREÇ VE YÖNTEM 15
Hücre Kültürü 15
Hücre Hattının gelişim eğrisinin belirlenmesi 15
İlaç-doz cevabının belirlenmesi 16
IC50 Değerinin Hesaplanması 16
Apoptoz' un Belirlenmesi 16
Koloni oluşumunun belirlenmesi 17
Hücre migrasyonunun belirlenmesi 17
Western Blot Analizi 18
BULGULAR 20
Hücre Gelişim Eğrisi: 20
OV Uygulanan MDA-MB-231 Hücrelerinin Proliferasyon Eğrileri: 21
OV'un MDA-MB-231 Hücrelerindeki IC50 değerleri ve doz-cevap eğrileri: 24
CsA Uygulanan MDA-MB-231 Hücrelerinin Proliferasyon Eğrileri: 25
CsA'nın MDA-MB-231 Hücrelerindeki IC50 değerleri ve doz-cevap eğrileri: 28
OV ve CsA'nın MDA-MB-231 Hücrelerinde Apoptoza Etkileri 29
OV ve CsA'nın MDA-MB-231 Hücrelerinin Koloni Oluşumuna Etkisi 31
OV ve CsA'nın MDA-MB_231 Hücrelerinin Migrasyonuna Etkisi 33
OV'nin MDA-MB-231 Hücrelerinde Hücre İçi $[Ca^{+2}]_i$ Etkisi 36
CsA'nın MDA-MB-231 Hücrelerinde Hücre İçi $[Ca^{+2}]_i$ Etkisi 38
OV'nin PMCA1, Kalmodulin, Kalsinörin ve cMyc Proteinlerine Etkisi: 40
CsA'nin PMCA1, Kalmodulin, Kalsinörin ve cMyc Proteinlerine Etkisi: 41
TARTIŞMA 42
SONUÇ 46
KAYNAKLAR 47

Özet:

PMCA pompasının farklı proteinler, enzimler ve transkripsiyon faktörleri ile kanser hücreleri için terapötük bir yolak olduğu ve hücrelerinde PMCA pompasının görevi netleşirse tedavi için hedef olabileceği gibi uygulanan tedavinin az dozda daha etkili olabilmesine yardımcı olabileceği de düşünülmektedir. Bu projede PMCA pompası ve direkt etkileşimde olduğu Kalmodulin (CaM) proteini ve CaM sayesinde dolaylı olarak etkileşim içerisinde olduğu düşünülen Kalsinörin (CaN) ve c-Myc yolu açığa çıkarılması amaçlanmıştır. Bunun için MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri PMCA ve CaN inhibitörleri ile inhibe edildi. PMCA'nın inhibe edilmesi için ortovanadat, CaN'nin inhibe edilmesi için siklosporin A kullanıldı. İlaç doz cevap eğrileri belirlendi ve IC50 değerleri hesaplandı. PMCA ve CaN inhibe edildiği zaman kanser hücrelerinin apoptoza gitmeleri, koloni oluşumları ve migrasyonları araştırıldı. Western blot analizleri ile PMCA, CaN, kalmodulin (CaM) ve cMyc proteinlerinin ekspresyonları belirledin. Hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonları Indo 1FF AM kalsiyum indikatörü ile hesaplandı. Bütün bu çalışmalara göre inhibe edilen Ca^{+2} pompası cMyc'nin kanser hücrelerindeki ekspresyonunu down regüle etmektedir. CaM'nin artan ekspresyonu PMCA1 artışına katkı sağlamasa da cMyc'i baskılamıştır. CaN'nin meme kanserinde cMyc üzerinde dolaylı etkisi de gösterildi. CaN artışı ile cMyc inhibe olmaktadır.

Bu proje Ca+2, CaM, CaN, PMCA ve cMyc ilişkisini göstermiş olsa da sadece çok küçük bir bölümüne ışık tutmuştur. İleriki çalışmalarımız için temel ve çok olumlu veriler elde edilmiştir. Bu projeden elde edilen veriler ışığında MDA-MB-231 hücreleri için bu yolak üzerinde terapatik etkiler araştırılacaktır.

Anahtar Kelimeler: Kalsiyum, Meme Kanseri, PMCA, cMyc, Kalsinörin

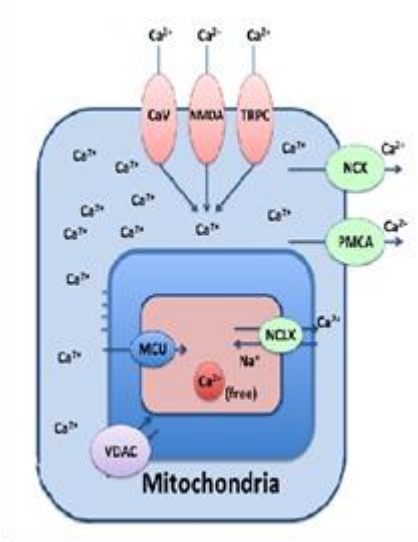
Abstract

The PMCA pump is a therapeutic pathway for cancer cells with different proteins, enzymes, and transcription factors. If the role of the PMCA pump in their cells becomes clear, it can be a target for treatment, and it can also help the treatment to be more effective with fewer doses. The project is aimed to reveal the Calcineurin (CaN) and c-Myc pathway, which is thought to be in direct interaction. For this, MDA-MB-231 breast cancer cells were inhibited by PMCA and CaN inhibitors. Orthovanadate was used to inhibit PMCA and cyclosporine A was used to inhibit CaN. Drug dose-response curves were determined and IC50 values were calculated. When PMCA and CaN are inhibited, cancer cells undergo apoptosis, colony formation, and migration were investigated. Determine the expressions of PMCA, CaN, calmodulin (CaM), and cMyc proteins by Western blot analysis. Intracellular Ca^{2+} concentrations were calculated with Indo 1FF AM calcium indicator. According to all these experiments, the inhibited Ca + 2 pump down-regulates the expression of cMyc in cancer cells. Increased expression of CaM suppressed cMyc although it did not contribute to PMCA1 increase. The indirect effect of CaN on cMyc in breast cancer has also been demonstrated. With the increase in CaN, cMyc is inhibited. Although this project showed the relationship of Ca^{2+}, CaM, CaN, PMCA, and cMyc, it shed light on only a very small part. Basic and very positive data have been obtained for our future studies. The therapeutic effects on this pathway for MDA-MB-231 cells will be investigated in light of the data obtained from this project.

Keyword: Calcium, Breast Cancer, PMCA, cMyc, Calsineurin

GİRİŞ

Ca^{+2} iyonu hücresel fonksiyonların devam etmesi için önemli bir iyon olsa da hücre içerisindeki konsantrasyonundaki ufak bir artış doğal devam eden hücresel fonksiyonların aksamasına sebep olmaktadır. **Hücre içerisindeki Ca^{+2} iyon konsantrasyonu arttıkça da hücre için toksik bir durum meydana gelmektedir.**



Şekil 1. Hücre içi Kalsiyum hareketliliğinin şematik gösterimi

Hücre için çok iyi olan bir iyon, dengesiz artışında hücre için zehir olabilmektedir. Normal bir hücre bu tehlikeden kendisini korumak için çeşitli mekanizmalar geliştirmiştir. Hücre dışarıdan Na^{+} iyonu alması karşılığında hücre içinden Ca^{+2} iyonu çıkartan Na^{+}/Ca^{+2} değiştiricisi, en bilinen hücre içi Ca^{+2} dengesini sağlayan mekanizmadır. Bunun yanı sıra sadece ATP ile çalışan ve tek görevi hücre içi Ca^{+2} iyonlarını hücre dışına çıkartan plazma membranı Ca^{+2} ATPaz (PMCA) pompaları da hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunu dengede tutma görevini üstlenmiştir. Normal bir hücre için Ca^{+2}'nin toksitesi sıkıntılı bir durum olmasına rağmen tümör hücrelerinde Ca^{+2} iyonlarının hücre içerisindeki bu konsantrasyon fazlalığı teropatik hedef haline getirilebilir. Tümör hücrelerinde PMCA pompasının nasıl bir pozisyonda olduğu net olmasa da çeşitli hipotezlere göre hücrenin apoptoza mı yoksa nekroza mı gideceği karar noktasında kritik bir görevi vardır (Bruce 2017). **Çalışmamızdaki hipotezimiz;** *PMCA pompasının farklı proteinler, enzimler ve transkripsiyon faktörleri ile bu görevini yerine getirdiğidir.* **Tümör hücrelerinde PMCA pompasının görevi netleşirse tedavi için hedef olabileceği gibi uygulanan tedavinin az dozda daha etkili olabilmesine yardımcı olabileceği de düşünülmektedir.** Bu yüzden çalışmamızda **PMCA pompası ve direkt etkileşimde olduğu**

Kalmodulin (CaM) proteini ve CaM sayesinde dolaylı olarak etkileşim içerisinde olduğu düşünülen Kalsinörin ve c-Myc yolu açığa çıkarılması amaçlanmıştır.

Kapsam

Çalışmamızın ilham kaynağı hücre içi Ca^{+2} iyonu ve onun değişen konsantrasyonunun tümör hücrelerinin apoptoza gitmesi üzerindeki etkisidir. Kanser tedavisinde tümör hücrelerinin proliferasyonlarının azalması apoptoza gitmelerinin çoğalması amaçlanır. Ancak bireysel temelli düşünüldüğü zaman her tümör hücresinin huyu bireyler arasında değişiklik göstermektedir. Bunun birçok sebebi olabilir. Hücre içi Ca^{+2} iyonunun konsantrasyonu da bunlardan biri olabilir. Kanser hücrelerini tedavi amaçlı kullanılacak ilaçların etkisinin fazla, toksitesinin az olması istenilen bir durumdur. Hücre içi Ca^{+2} iyonlarının konsantrasyonunun iyi yönlendirilmesi kanser tedavisinde ilaca verilecek cevabı da etkileyebilir.

Hücre içi Ca^{+2} iyon konsantrasyonları araştırılmaya başlandığı zaman hücre içi Ca^{+2} iyon konsantrasyonunu dengede tutmak ile görevli PMCA üzerine gitmek gerekmektedir (Şekil 1).

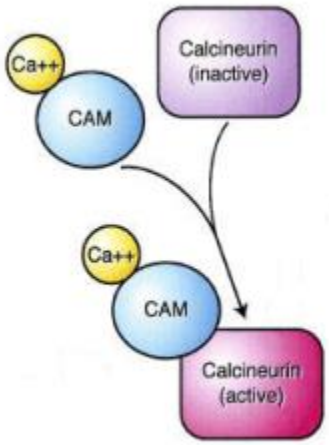
PMCA pompasının bir izomeri olan ATP2B1 proteininin MDA MB 231 meme kanseri hücrelerinde eksprese olduğu bilinmektedir (Lee et al. 2002). Tümör hücrelerinde Ca^{+2} iyonu birikmesinin ATP2B1 proteini üzerinde ne gibi etkisi olduğunu belirlemek için bir PMCA pompası kapatıcısı olan orto-vanadate (OV) kullanılacaktır.

Ca^{+2} iyonu ve PMCA pompası doğrultusunda ilerlendiği zaman PMCA pompasının Ca^{+2} iyonlarını hissetmesini sağlayan bir sitoplazmik protein olan Kalmodulin'in (CaM) de göz önüne alınması gerekmektedir.

Belirtildiği gibi CaM, PMCA pompasının aktive olması için başlangıç noktasındadır. Hücre içerindeki Ca^{+2} iyonları CaM proteinine bağlanarak bir Ca^{+2}+CaM kompleksi oluşturur. Bu kompleks PMCA üzerindeki CaM bağlanma noktasına bağlandığı zaman pompa hücre içerisinden Ca^{+2} iyonlarını dışarı çıkarmak için çalışmaya başlar. OV ile PMCA pompası kapatılarak hücre içi Ca^{+2} iyon birikmesi durumunda CaM proteininin durumu incelenecektir.

Bu çalışmalar sırasında hücre içi Ca^{+2}iyon görüntülenmesi yapılarak aşama aşama Ca^{+2} iyon değişimi gözlenecektir.

Ca^{+2} iyonları ile ATP2B1 ve CaM proteinlerinin hücrenin apoptoza gitmesinde etkisi bulunmaktadır ama bunu nasıl sağladığı net değildir (Bruce 2017). Dolayısıyla CaM proteininden ve Ca^{+2} iyonunun hücre içerisindeki artışından etkilenen bir protein daha vardır; Kalsinörin (Şekil 2.).



Şekil 1. Ca^{+2}, CaM ve CaN arasındaki ilişkinin şematik gösterimi (Mann et al. 2004).

Kalsinörün inhibitörü uygulanan tümör hücrelerinde ATP2B1 ve CaM proteinlerinin nasıl etkilendiği incelenecektir. Ayrıca OV uygulanan hücrelerde kalsiyum birikmesinden dolayı CaN proteininin nasıl etkilendiği incelenecektir.

GENEL BİLGİLER

Ca^{+2}, hücre çoğalması, apoptoz, sinyal iletimi gibi hücrenin dengeli bir şekilde yaşamasında görevli olan bir iyondur.

Hücre içi Ca^{+2} sinyalleri, üç ana kategoride gruplandırılabilen mekanizmalar tarafından kontrol edilir:

1. Ca^{+2}'un sitoplazma içerisine alınma mekanizması,

2. Ca^{+2}'un sitoplazma dışına aktarılma mekanizması ve

3. Ca^{+2}'un sitoplazmada tutulma mekanizması.

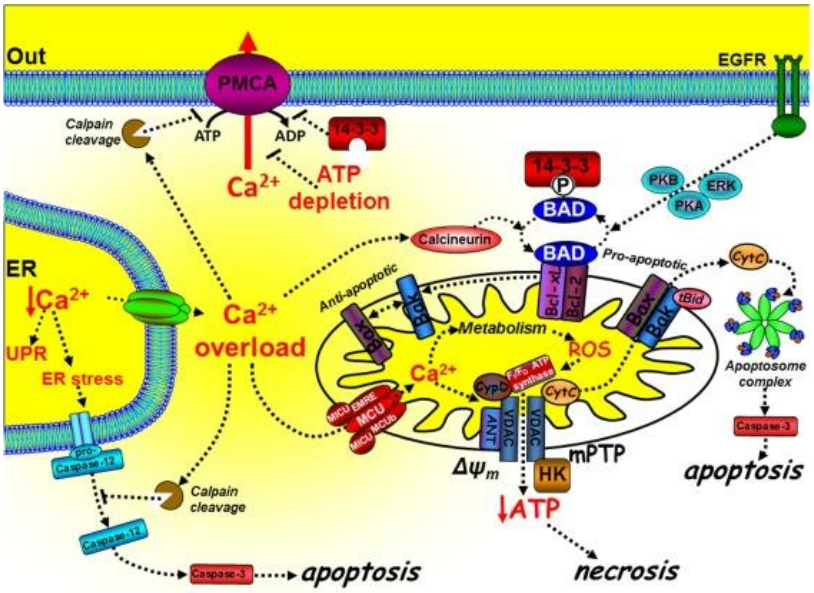
Bu mekanizmalar birbirleri ile dengeli bir şekilde çalışarak, sitozolik Ca^{+2} sinyallerini kontrol eder ve böylece çoğalmayı, aktivasyonu ve apoptozu düzenlerler. Genel olarak sitozolik Ca^{+2}'un geçici bir şekilde çok az yükselmesi (nM seviyede) hücre çoğalmasını artıracak, buna karşın sürekli bir şekilde fazlaca yükselmesi (nM'da nµM'a çıkması) apoptozu indükleyecektir (Qu et al. 2011). Bu nedenle, Ca^{+2}, kanser hücrelerinin proliferasyonunu ve apoptozunu modüle etme

potansiyeline sahiptir (Schwarz, Qu, and Hoth 2013). Hücre içi kalsiyum dengesinde en temel görevde yer alan yapı plazma membranıdır. Plazma membranı kalsiyum giriş çıkışını üzerinde bulunan kanal ve pompalar vasıtasıyla sağlar.

İyon konsantrasyonu değişiklikleri yoluyla oluşan ozmotik değişiklikler hücre hacmi düzenlemesini kontrol ettiği gibi buna ek olarak, kanallar ve taşıyıcılar hücresel pH kontrol eder. Tüm bu faktörler, kanser hücresi büyümesini ve fonksiyonunu etkileyebilir. Bununla birlikte, Ca^{+2} kanalları ve pompaları, kanser hücresinin çoğalmasını ve apoptozunu değiştirmek için farmokolojik hedeftirler (Schwarz, Qu, and Hoth 2013).

Plazma zarı boyunca Ca^{+2}'un hücre dışına akışı, hem Na^{+}/Ca^{+2} değiştiricileri hem de PMCA pompası yoluyla sağlanabilir. Hücre dengesini en çok PMCA pompa'ların dışarıya pompaladıkları kalsiyum ile sağladığı bilinmektedir. PMCA pompaları dört gen (PMCA1-4) tarafından kodlanır (Monteith, Davis, and Roberts-Thomson 2012). PMCA1 (ATP2B1) ve PMCA4 (ATP2B4) her yerde eksprese edilirken, PMCA2 (ATP2B2) ve PMCA3 (ATP2B3) esas olarak uyarılabilir hücrelerde daha dokuya spesifik bir ekspresyona sahiptir (Bruce 2017). PMCA pompası, Ca^{+2} için yüksek afinitesi (Kd~0.2 μM) nedeniyle (Carafoli 1991) sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonunun 300 nM'nin altında yaklaşık 100 nM civarında tutar (Bruce 2017). Hücrenin canlılığına devamı veya apoptoza gitmesi için PMCA pompaları önemli bir noktadır. Ca^{+2}'un aşırı yüklenmesine bağlı olan apoptozu önler. ATP ile çalışan bir pompa olduğu için ve ATP tükenmesinden dolayı PMCA pompa aktivitesi düşer ve bu yüzden apoptoz gelişeceği gibi aynı zamanda ATP tükenmesinden dolayı nekrozda gelişir (Curry et al. 2012). PMCA pompasının aktivitesi, birçok hastalık sürecinin belirleyicisi olan apoptoz ile nekrotik hücre ölümü arasında önemli bir geçiş görevi görür. PMCA pompasının hücre ölümündeki rolünü daha iyi anlamak için bazı önemli yapısal özelliklerin ve düzenleyici mekanizmaların incelenmesi gerekir. Yapısal olarak, PMCA pompaları, 10 transmembran bölge, hem N hem de C terminal sitozolik kuyrukları olan iki sitozolik halkadan oluşur (Strehler and Zacharias 2001; Monteith, Wanigasekara, and Roufogalis 1998). C terminal kuyruğu Kalmodülin (CaM) içerdiği için fonksiyonel olarak önemlidir (James et al. 1988). Ca^{+2} konsantrasyonu hücre içinde yükseldiği zaman, C ucunda bulunan ve inhibitör görevi olan CaM bağlama motifine bağlanma afinitesi azalır ve bu durumda PMCA pompası aktifleşerek Ca^{+2} taşınması artırılıyor. Eğer hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonu düşerse bu CaM bağlama motifi PMCA pompasını bastırmak için harekete geçer (Bruce 2017).

PMCA pompasının hücrenin hayatta kalma veya apoptozu için önemini anlamak için Ca^{+2} iyonuna bağlı olan hücre ölüm mekanizmasını anlamak önemlidir. Hücre ölümün de Ca^{+2} iyonu önemli ama karışık bir noktadır. Sadece sitoplazmadaki Ca^{+2} iyonu değil aynı zamanda endoplazmikretikulum ve mitokondrideki Ca^{+2} iyonu hücrenin ölüme programlanmasına katkı sağlar (Bruce 2017). Şekil 3'de Ca^{+2} iyonu ve PMCA pompasının hücre ölümüne etkisi belirtilmiştir.



Şekil 3. PMCA pompası ve Ca^{+2} iyonunun apoptoz ve nekroz yolaklarını şematize gösterimi (Bruce 2017).

Mitokondride bulunan **tBid**, Bak ve Bax'a bağlanır (Eskes et al. 2000). Bu bağlanmadan dolayı mitokondri membran porları genişler ve **sitokrom C**, mitokondriden hücrenin sitoplazmasına sızar. Sitokrom C kaspazları aktive eden apoptozom kompleksinin bir bölümüne bağlanır (Orrenius, Zhivotovsky, and Nicotera 2003). Bu şekilde geri dönüşümü olmayan apoptotik kaskatı başlatır (Bruce 2017).

Bax, Bak ve Bad proteinleri pro-apoptotiktir. Bcl-2 proteinleri, anti apoptotiktir**. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik denge sayesinde hücre apoptoza gider veya gitmez.** Bad'in fosforilizasyonu apoptoz için çok kritik noktadadır (Datta et al. 2002). Çeşitli ara yollar sayesinde Bad proteini mitokondriden sitoplazmaya geçtiği zaman, fosforilize olduğunda Bcl-2'nin inhibe edilmesini önlemektedir. Yani Bcl-2'nin aktive olmasını sağlayarak apoptozu

engellemektedir. **Bad proteinin defosforilize olduğu zaman Bcl-2 inhibe olur ve hücrenin apoptoza gitmesi tetiklenir** (Zha et al. 1996) **.**

Bad proteininin defosforilize olmasında kalsiyum bağımlı calcineurin görev alır (H.-G. Wang et al. 1999). **PMCA pompası bloke edildiği zaman Ca^{+2} iyonu/calcineurin aktive olur.** Bad proteinin defosforilize olur. Bcl-2, baskılanır ve hücre apoptoza gider (Bruce 2017). **PMCA pompasının, Ca^{+2} iyonuna bağlı olarak hücrenin apoptoza gitmesine bu şekilde katkısı olmuş olur.**

Sitoplazmada Ca^{+2} iyonunun aşırı birikmesi hem apoptozu hem de nekrozu destekleyebilir. Buna göre **PMCA pompasının aktivitesinin veya ekspresyonunun azalması Ca^{+2} iyonu aracılı hücre ölümünü desteklemesi beklenir** (Bruce 2017)**.**

PMCA pompalarının aktivasyonu yukarıda da bahsedildiği gibi CaM proteinleri ile gerçekleşmektedir. CaM, kalsiyum bağlayıcı protein olarak bilinmektedir. Hücre içerisindeki konsantrasyonu ve lokasyonu hücresel aktivitenin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır(Chin and Means 2000). Hücresel Ca^{+2} sinyallerini iletilmesindeki aracıdır. Ca^{+2} sinyallerini çok sayıdaki hedef proteinlerine ileterek sinyalleşmeyi düzenlemektedir (Berchtold and Villalobo 2014).

CaM, biyolojik farklılaşma süresince çok iyi korunmuş 17kDa ağırlığında Ca^{+2} bağlayıcı bir moleküldür. N ve C uçlarından oluşur ve CaM farklı hedeflere bağlandığı zaman bu uçlar sayesinde bağlandığı hedeflere uyum sağlamaktadır (Swulius and Waxham 2008).

CaM, esnek şekilde birbirine bağlanmış küresel iki alan içermektedir. Her alan da iki adet EF hand motif içermektedir. Bu motiflere Ca^{+2} iyonu bağlanmaktadır. CaM'e, 4 Ca^{+2} iyonu bağlanmaktadır. CaM'e Ca^{+2} bağlandığı zaman CaM de konformasyonel değişimler olur. Hedef proteinlerin bağlanması için hidrofobik cepler açılır (Chyan, Irene, and Lin 2017).

CaM'nin enzim aktivitesi yoktur. Onun fonksiyonu Ca^{+2} sinyalini entegre etmek ve diğer enzimlere iletmektir(Swulius and Waxham 2008). Ca^{+2} ile CaM bağlandığında oluşan kompleks yapı hedef bir proteine bağlanma yeteneğine sahip olmaktadır.

CaM, hücredeki toplam proteinlerin %0.1'ini oluşturmaktadır. Özellikle hızlı büyüyen hücrelerde ve hücre bölünmesi farklılaşmış hücrelerde daha fazla eksprese olmaktadır(Chin and Means 2000). CaM'nin bağlandığı hedeflerden biri Kalsinörin (CaN) proteinidir. CaN, serin/treonin fosfotazdır. Hücre içerisinde Ca^{+2} konsantrasyonu yükseldiği zaman tepki olarak CaN'e bağlanır. CaN, T cell aktivasyonu, sinir sistemi gelişimi, kalp büyümesinde önemli rol oynar. CaN, aynı zamanda immunsupresan ilaçların hedefidir (Rumi-Masante et al. 2012).

CaN'nin iki alt birimi vardır. Katalitik alt birim olarak bilinen CaN A ve regülatör alt birim olarak bilinen CaN B'dır. CaN A alt birimi, 60 kDa ağırlığındadır. CaN B, 19 kDa ağırlığındadır (Brun and Godbout 2016a; Chyan, Irene, and Lin 2017).

CaN, PMCA pompası ile CaM aracılığı ile dolaylı yoldan bir ilişki içerisindedir. PMCA pompasının hücresel fonksiyonunun da CaN'nin de etkisi bulunmaktadır(Boczek et al. 2017).

CaN, Ca^{+2}/CaM kompleksinin aktivasyonu ile fosforilize olur ve çeşitli transkiripsiyon faktörlerini etkiler. Bunlardan biri de Myc transkripsiyon faktörüdür (S. Wang et al. 2012; Singh et al. 2010; Shibasaki and McKeon 1995)

Myc, gen transkripsiyonunu artırmak için CACCTG veya CACATG içeren gen promoterleri ile ilişkilendirilen transkripsiyon faktörüdür (Luoto et al. 2010). Pro-onkogen olan Myc ilk olarak retroviral aracılı tümör oluşumunun etiyolojik ajanı olarak keşfedildi. Sonrasında Myc'nin Burkitt lenfomada kromozom lokasyonu ile aktive edildiği gösterildi. Myc, büyük ölçüde birçok biyolojik süreci koordine eden bir transkripsiyon faktörüdür. Myc, insan tümörlerinin yarısından fazlasında eksprese olmaktadır. Myc, aktive olduğu zaman kanserin başlıca belirleyici fonksiyonlarını açığa çıkarır (Gabay, Li, and Felsher 2014). Myc, tümör oluşumunu destekleyebilen güçlü bir onkogendir (Lin et al. 2012). Myc'nin özellikle büyümeyi destekleyen sinyal transdüksiyon yollarının kesişme noktasında yer aldığı belirlendi. Myc, tümör oluşumunda tek başına etkili değildir. İlave fonksiyonlara ihtiyacı vardır. İn vitro yapılan çalışmalarda Myc, inaktif olduğu zaman hücre proliferasyonunda azalma ve apoptozda artış belirlendi (Dang 2012).

GEREÇ VE YÖNTEM

Hücre Kültürü

10ml DMEM (%10 Fetal Bovine serum, %5 L-glutamin+penicilin ile desteklenmiştir) medyum, 75 cm2 'lik flasklara 1 ml de en az 1x106 hücre olacak şekilde hücrelerin ekimi yapıldı. MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı hazırlanılan kültür ortamı içerisinde, %5 CO2 ve 37 ºC sıcaklıktaki etüvde hücre flaskları inkübasyona bırakıldı. Çoğalmakta olan hücreler %80-90 doygunluğa ulaşınca yeniden pasajlandı. Bu amaçla çoğalmakta olan hücreler istenen çoğunluğa ulaştığında; flaskların içerisindeki hücreler %25'lik tripsin/EDTA solüsyonu ile yapıştıkları yüzeyden kaldırılarak santrifüj tüpüne alındı ve 1000 rpm' de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Dipte kalan hücrelere 10 ml hücre mediumu eklendi. 75 cm2'lik flasklara 10 ml'sinde 1x106 hücre olacak şekilde hücreler eklendi. Bu flasklar 37ºC 'de %5 CO2 inkübatöründe inkübasyona bırakıldı.

Hücre Hattının gelişim eğrisinin belirlenmesi

MDA-MB-231 hücreleri çoğaltılarak hücrelerin gelişim eğrilerinin çalışılmasına başlandı. Çalışmanın diğer aşamalarının birbirleri ile kolere ilerlemesi için her seferinde zamanlarına göre hücre sayılarının aynı olması gerekmektedir. Bu yüzden hücrelerin 24, 48 ve 72 saatlik gelişim eğrileri hazırlandı. 24 kuyucuklu platelerin her bir kuyucuğuna ne kadar hücre ekileceği belirlendi. Bunun için 24 saatlik platelere 500000-15625 hücre/ml aralığında, 48 saatlik platelere 250000-7812 hücre/ml aralığında, 72 saat için 125000-3905 hücrel/ml aralığında hücreler eklendi. Hücreler ekildikten sonra çoğalarak kuyucukları tamamen değil %70-80 oranında doldurulması beklendi. İnkübasyon süreleri sonunda herbir kuyucuk içerisinde DNA içeriğinin belirlenmesi için DNA analizleri yapıldı. Hofland ve ark.`nın uyguladıkları yöntem takip edildi (Hofland, van Koetsveld, and Lamberts 1990). Bunun için her bir kuyucuktaki hücreler parçalanarak Hoechts 33258 boyası uygulandı ve çoklu plate okuma (Multi plate reader) veriler analiz edildi. Bu analizler sonucunda 24 saat, 48 saat ve 72 saat inkübasyon süreleri için çalışma süresince kuyucuklara ekilecek hücre sayıları belirlendi.

İlaç-doz cevabının belirlenmesi

Bu aşamada, hücreler iki gruba ayrıldı. Bir gruba farklı konsantrasyonlarda OV, diğer gruba farklı konsantrasyonlarda CsA eklendikten 24, 48 ve 72 saat sonra hücrelerin ilaç dozlarına verdikleri cevapların belirlenmesi amaçlandı. Bunun için bir önceki aşamada belirlenen hücre sayıları zamanlarına uygun olarak iki gruba ayrılarak 24 kuyucuklu platelere eklendi. Hücreler eklendikten 24 saat sonra birinci gruba farklı konsantrasyonlarda OV (10^{-3}M, 10^{-4}M, 10^{-5}M, 10^{-6}M ve 10^{-7}M), diğer gruba farklı konsantrasyonlarda (10^{-4}M, 10^{-5}M, 10^{-6}M, 10^{-7}M ve 10^{-8}M) CsA hücrelere uygulandı. Belirlenen inkübasyon süreleri sonunda herbir kuyucuk içerisinde DNA içeriğinin belirlenmesi için DNA analizleri yapıldı. Hofland ve ark.`nın uyguladıkları yöntem takip edildi (Hofland, van Koetsveld, and Lamberts 1990). Bunun için her bir kuyucuktaki hücreler parçalanarak Hoechts 33258 boyası uygulandı ve çoklu plate okuma (Multi plate reader) cihazında elde edilen veriler analiz edildi. Bu analizler sonucunda 24 saat, 48 saat ve 72 saat inkübasyon süreleri için çalışma süresince kuyucuklara ekilecek hücre sayıları belirlendi. OV ve CsA konsantrasyonlarına bağlı olarak 24, 48 ve 72 saat inkübasyon süresi sonrasında hücre çoğalma (proliferasyon) grafikleri çizildi. Bu çalışma farklı zamanlarda en az üç kez tekrar edildi.

IC_{50} Değerinin Hesaplanması

İlaç doz cevabından elde edilen veriler kullanarak Prism Graph path 8 yazılımı ile OV ve CsA'nın her bir saat için IC_{50} değeri hesaplandı. Bunun için Graphpad programında zamana göre elde edilen DNA miktar verilerinin nonlineer regresyon grafiği üzerinden hesaplamalar yapıldı.

Apoptoz' un Belirlenmesi

MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin OV ve CsA'nın farklı konsantrasyonlarında apoptoza gitme oranları belirlendi. Bunun için kültür edilen hücreler, 12 kuyucuklu platelere ekildi. 24 saat sonra 10^{-3}M, 10^{-4}M, 10^{-5}M, 10^{-6}M ve 10^{-7}M konsantrasyonlarda OV hücrelere uygulandı. Aynı şekilde 10^{-4}M, 10^{-5}M, 10^{-6}M, 10^{-7}M ve 10^{-8}M konsantrasyonlarda CsA hücrelere uygulandı. 24, 48 ve 72 saat sonrasında kuyucuklardan hücre besiyeri çekilip atıldı. 3 kez PBS ile kuyucuklar yıkandı. Metanol ile fikse edildikten sonra kurumaya bırakıldı. Kuruyan plate kuyucuklarına Giemsa boya solüsyonu eklendi ve 8 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresi bitince boya solüsyonu çekilip atılarak su ile kuyucuklar 3 kez yıkandı.

Mikroskop altında OV ve CsA'nın farklı konsantrasyonlarının uygulandığı kuyucuklardaki apoptoz oranları sayıldı. Bunun için her bir konsantrasyon için iki kuyucuk tekrar edildi. Her kuyucuktan 1000 hücre sayılarak bu 1000 hücre içerisindeki apoptotik hücrelerin sayıları belirlendi. Apoptoz deneyleri 3 farklı zamanda tekrar edilmiştir.

Koloni oluşumunun belirlenmesi

MDA-MB-231 hücreleri farklı dozlarda OV ve CsA ile muamele edildi. Sonra bu hücreler çoğalmaları için 37°C'de inkübe edilerek, OV ve CsA ile muamele edilmeyen (non-treatment) hücrelerde koloni oluşma durumuna bakılarak inkübasyonun sonlandırma süresi belirlenmiştir. Koloni oluşumu tespit edilince kültür sonlandırılmıştır. Hücrelerin bulunduğu ortamdan medyum uzaklaştırılarak ve hücreler (her bir plate) metanolle hazırlanmış %10'luk kristal-viyole ile boyanmıştır. Koloniler sayılarak yüzde değerleri hesaplanmıştır.

Hücre migrasyonunun belirlenmesi

MDA-MB-231 hücreleri iki gruba ayrılarak 12 well hücre kültür platelerine ekildikten 24 saat sonra bir grubu uygun doz ve zaman aralığında 10-4M OV ile diğer grup ise 10^{-5}M CsA ile muamale edildi. Steril pipet kullanılarak hücrelerin yapıştığı plate yüzeyi üzerinde yara oluşturuldu. 0. saatte yara oluşturulan hücrelerin kamera ataçmanlı mikroskop kullanılarak fotoğrafı çekildikten sonra bu hücreler tekrar inkübatöre konuldu. 24, 48 ve 72 saat sonrasında hücrelerin yeniden fotoğrafları çekildi. Çekilen fotoğraflarda Image-J görüntü analiz yazılımı ile yara alanları ölçüldü. OV ve CsA ile muamele edilen hücrelerdeki yara kapanma alanları hesaplandı. Zamana ve kontrole göre bu alanlar birbirleri ile değerlendirildi.

Hücre içi Ca^{+2} Konsantrasyonunun Ölçülmesi:

Hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonlarının belirlenmesi için hücreler 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sürelerine göre ayrı ayrı 6 kuyucuklu platelere ekildi. 24 saat sonrasında, hücreler OV ve CsA zamanlarına göre IC50 konsantrasyon miktarları ile muamele edildi. 24, 48 ve 72 saat inkübasyon süreleri sonrasında hücrelerin içinde bulunduğu besiyeri çekildi ve hücreler PBS ile 3 kez yıkandı. Tripsin ile muamele edilerek hücreler plate yüzeylerinden kaldırıldı ve PBS ile tekrar yıkandı. Indo 1 FF AM içeren buffer (135 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 1.5 mM CaCl2, 1.2 mM MgCl2, 11.5 mM glikoz, 11.6 mM HEPES) ile 37^{o}C'de 1 saat inkübe edildi.

İnkübasyon süresi bitiminde hücreler yeniden PBS ile yıkandı. İçerisinde Indo 1FF AM olmayan yukarıda belirtilen buffer içerisinde hücreler görüntülenmesi yapılana kadar 4ºC'de bekletildi.

Indo 1FF-AM, iyi bilinen ve yaygın olarak kullanılan bir ratiyometrik (iki emisyon dalga boylu) Ca^{+2} göstergesidir. Tek dalga boyu ile uyarılır ve iki emisyon dalga boyunda görüntülenir. Yaklaşık 350 nm'de uyarılır ve emisyon piki Ca^{+2} iyonuna bağlı ve Ca^{+2} iyonu serbest olduğu durumlara göre değişir. Ca^{+2} iyonuna bağlı iken emisyon dalga boyu ~ 405 nm ve Ca^{+2} iyonu serbest iken emisyon dalga boyu ~ 485 nm'dir. Bu yüzden hücre görüntüsü alınması ve kalsiyum konsantrasyonu ölçülmesi için UV ile uyarıldıktan sonra DAPI/FITC filtrelerinde görüntüler alınması gerekmektedir. Bunun için Inverted Floresan Mikroskop (Nikon-Eclipse Ti) kullanıldı. Mikroskobun görüntüleme hızı 2.5 mm/sn'dir. Manuel olarak filtre değişimleri sağlandı. Her örnek için aynı görüntü yakalama zamanı kullanıldı. Elde edilen görüntülerden Image -J görüntü analiz yazılımı ile floresan yoğunlukları ölçüldü.

Ölçülen floresan yoğunluğu aşağıda verilen denklem ile Ca^{+2} konsantrasyonuna çevrildi.

$$\left[Ca^{+2}\right] = K_d \frac{(R - R_{min})}{(R_{max} - R)} \frac{S_{f2}}{S_{b2}}$$

Kd = Indo1FF-AM kalsiyum indikatörünün ayrışma sabiti,

R= Kalsiyum bağlı floresan yoğunluğunun, kalsiyuma bağlı değilken ki floresan yoğunluğuna oranı

Rmin= Kalsiyuma bağlı minimum floresan yoğunluğunun kalsiyuma bağlı olmayan maksimum floresan yoğunluğuna oranı

Rmax= Kalsiyuma bağlı maksimum floresan yoğunluğunun kalsiyuma bağlı olmayan minimum floresan yoğunluğuna oranı

Sf2/Sb2= Kalsiyuma bağlı olmayan maksimum floresan yoğunluğunun, minimum floresan yoğunluğuna oranı

Western Blot Analizi

Hedef proteinlerin ekspresyon analizlerini yapmak için kullanılan yöntemdir. MDA-MB-231 hücrelerinde, hedeflenen proteinlerin; PMCA1 (hücre membranında bulunan Ca^{+2} iyon pompası), Kalmodülin, Kalsünörin ve cMyc ekspresyon seviyelerini belirlemek için western blot analizi yapıldı.

MDA-MB-231 hücreleri kültüre edildi. Sonra bu hücreler, kültürün 24. saatinde OV ve CsA'nın zamana göre belirlenen IC_{50} konsantrasyonları ile muamele edildi ve 24, 48 ve 72 saat sonra hücreler toplandı.

Toplanan hücreler, hücre liziz tamponu kullanılarak parçalandı ve bu hücrelerden proteinler izole edildi. İzole edilen proteinlerin konsantrasyonları hesaplandı ve tüm hücrelerden elde edilen proteinler eşit konsantrasyonlarda SDS-PAGE jele yüklendi, yürütme tamponu (Running Buffer) varlığında elektroforez tankında elektrik akımı uygulanarak 2-3 saat jelde proteinlerin yürümesi (ayrılması) sağlandı. Daha sonra proteinler, transfer tamponu varlığında jelden membrana transfer edildi (transfer overnight yapıldı). Sonra hazırlanan membranlarda hedeflenen proteinlerin ekspresyonları görüntüleme sistemi (Bio-Rad) kullanılarak analiz edildi.

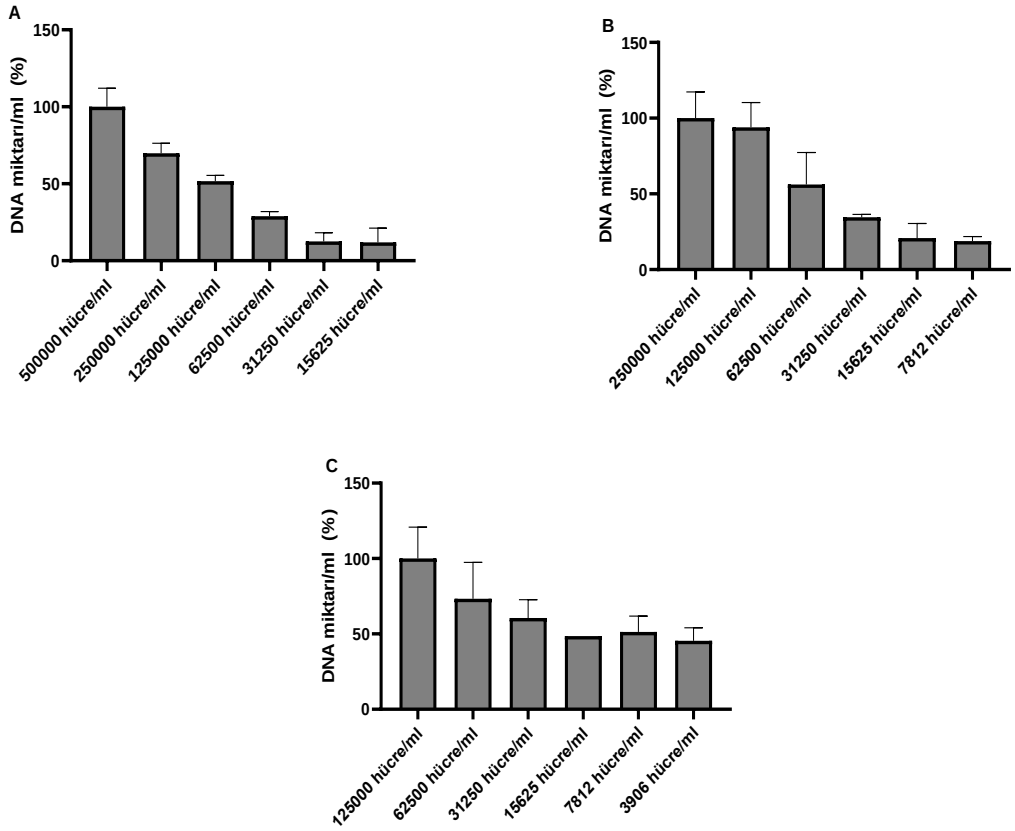
İstatistiksel Analiz

Projedeki bütün istatiksel analizler ve grafiklerin çizimleri Prism GraphPad 8.0 yazılımı ile yapıldı. İstatiksel analizler için one way ANOWA ve Two way ANOWA uygulandı. IC_{50} değerleri non lineer regresyon hesaplamalar ile belirlendi. $p<0,05$ anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Hücre Gelişim Eğrisi:

24 kuyucuklu plate'lere belirli miktarlarda ekilen hücrelerin 24, 48 ve 72 saat sonrasındaki çoğalma sayıları hesaplandı ve grafikleri çizildi. 1 ml hücre besiyeri içine ekilen 500000 hücre, 24 saat sonrasında %100 çoğalırken, 250000 hücre/ml %69,79 oranında çoğalmıştır. 125000 hücre/ml ekilen hücre kuyucuğunda hücreler %51,67 oranında çoğalmıştır. 62500 hücre/ml %28,9 oranında çoğalmıştır. 31250 hücre/ml bulunan kuyucuklardaki hücreler %12,57 oranında çoğalmıştır. 15625 hücre/ml, %11,88 oranında çoğalmıştır (Şekil 4A). **Bu sonuçlara göre 24 saatlik hücre inkübasyonu için 1 ml besiyeri içerisine 125000 hücre ekilecek ve kimyasal ve/veya ilaç uygulaması yapıldı.** Aynı şekilde 48 saatlik inkübasyon için hangi sayıdaki hücrelerin %50 oranında çoğalacağı belirlendi. 1 ml hücre besiyeri içine ekilen 250000 hücre, 48 saat sonrasında %100 çoğalırken, 125000 hücre/ml %93,92 oranında çoğalmıştır. 62500 hücre/ml ekilen hücreler %56.15 oranında çoğalmıştır. 31250 hücre/ml %34,62 oranında çoğaldı. 15625 hücre/ml, %20,82 oranında çoğaldı. 7812 hücre/ml ekilen hücreler 48 saat sonrasında %18,79 oranında çoğalmıştır (şekil 4B). **Bu sonuçlara göre 48 saat inkübasyon için 1 ml besiyeri içerisine 62500 hücre ekildi.**



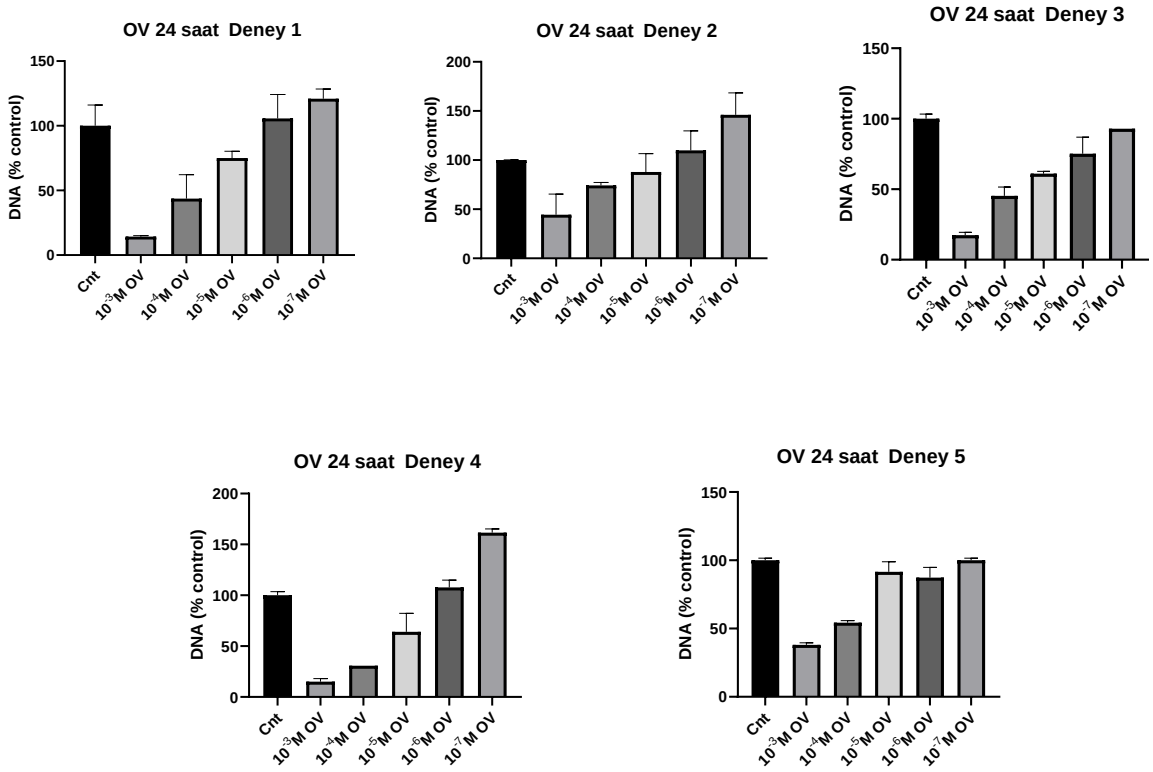
Şekil 4. 24 kuyucuklu pleytlere ekilen hücrelerin gelişim grafiği. A. 24 saat sonrasında hücrelerin gelişimi, B. 48 saat sonra hücrelerin gelişimi C. 72 saat sonra hücrelerin gelişimini gösteren grafik.

72 saatlik inkübasyon süresi için hücre sayısının belirlenmesi için 125000, 62500, 31250, 15625, 7812 ve 3906 hücre 1ml besiyerine ekildi. 72 saat sonrasında çoğalma oranları belirlendi. 125000 hücre/ml, %100 oranında çoğalırken, 62500 hücre/ml %73,3 oranında çoğaldı. 1 ml de 31250 hücre 72 saat sonrasında %60,54 oranında çoğaldı. 15625 hücre/ml %48,6 oranında çoğaldı. 7812 hücre/ml %51 oranında çoğalırken 3906 hücre/ml %45,4 oranında çoğaldı. 1 ml de 15625 hücre ve 7812 hücrelerin çoğalma yüzdeleri birbirlerine çok yakın bulundu (Şekil 4C). **Standart hatada göz önüne alınarak 72 saatlik inkübasyon süresi için 24 kuyucuklu pleytlerin her bir kuyucuğuna 15625 hücre/ml ekilmesine karar verildi.**

OV Uygulanan MDA-MB-231 Hücrelerinin Proliferasyon Eğrileri:

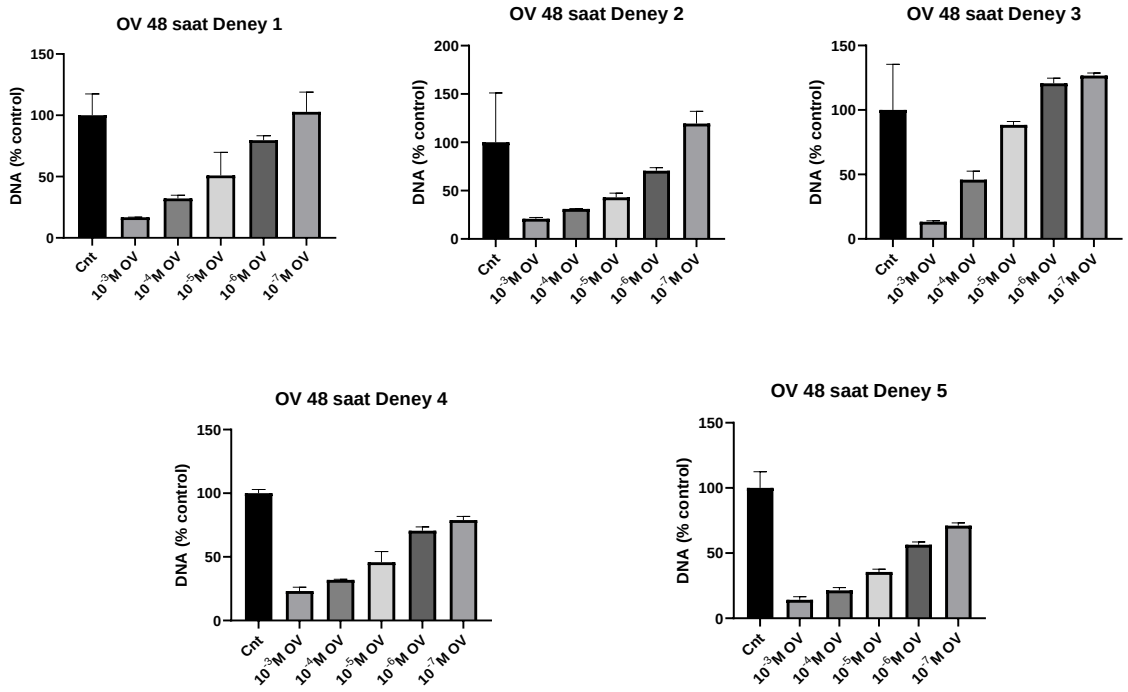
Hücre proliferasyon eğrileri yöntem kısmında da detaylı bir şekilde anlatıldığı gibi DNA miktarları ölçülerek çizildi. OV'un farklı konsantrasyonlarından ölçülen DNA miktarlarının kontrole göre yüzdelik oranları elde edildi ve bu yüzdelik oranların grafiği proje raporuna eklendi. Deneyler en az üç kez tekrarlandı fakat deneyler arasında daha benzer sonuçların elde

edilmesi için OV uygulanan hücrelerdeki proliferasyon deneyleri 5 kez tekrarlandı. 24, 48 ve 72 saat inkübasyon zamanlarına göre grafikler ayrı ayrı belirlendi. 24 saatlik inkübasyon süresi sonrasında uygulanan OV'un en yüksek konsantrasyonu (10-3 M) hücre proliferasyonunu kontrole göre yaklaşık %30 oranında geriletmiştir. OV uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin 24 saat inkübasyon sonrasında proliferasyon grafikleri Şekil 5 de verilmiştir.



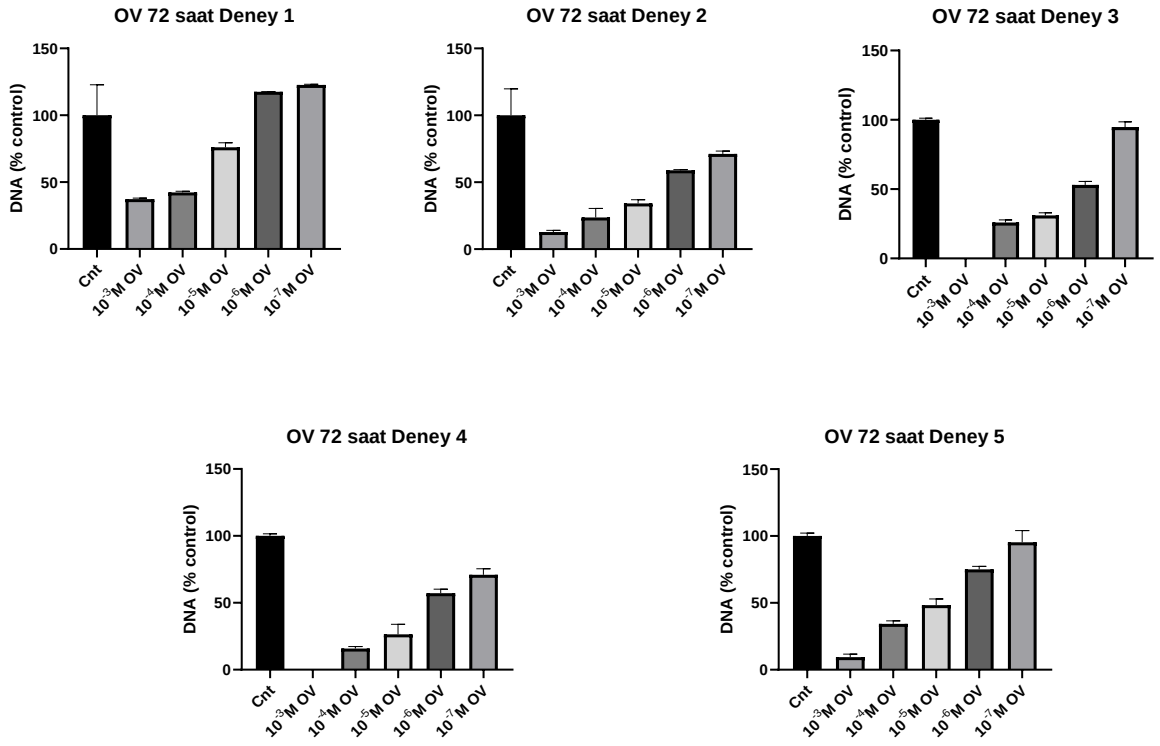
Şekil 5. OV uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin 24 saat inkübasyon sonrasında proliferasyon grafikleri.

OV farklı konsantrasyonlarda MDA-MB-231 hücrelerine uygulandıktan 48 saat sonra 10^{-3} M'da hücre proliferasyonunu kontrole göre yaklaşık %15 oranında artırmıştır. 10^{-4} M OV'un uygulandığı hücreler de proliferasyon oranı kontrole göre yaklaşık %30'dur. OV, 10^{-7} M konsantrasyonunda uygulandığı hücrelerde proliferasyon oranı kontrole yaklaşmıştır. OV uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin 48 saat inkübasyon sonrasında proliferasyon grafikleri Şekil 6'da verilmiştir.



Şekil 6. OV uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin 48 saat inkübasyon sonrasında proliferasyon grafikleri.

MDA-MB-231 hücrelerine farklı konsantrasyonlarda OV uygulandıktan 72 saat sonrasında 10^{-3} M OV'un hücrelerdeki proliferasyona etkisi kontrole göre %10 oranındadır. 10^{-4} M OV uygulanan hücrelerde proliferasyon oranının kontrole göre yaklaşık olarak %20'lere çıkmaktadır. OV uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin 72 saat inkübasyon sonrasında proliferasyon grafikleri Şekil 7'de verilmiştir.

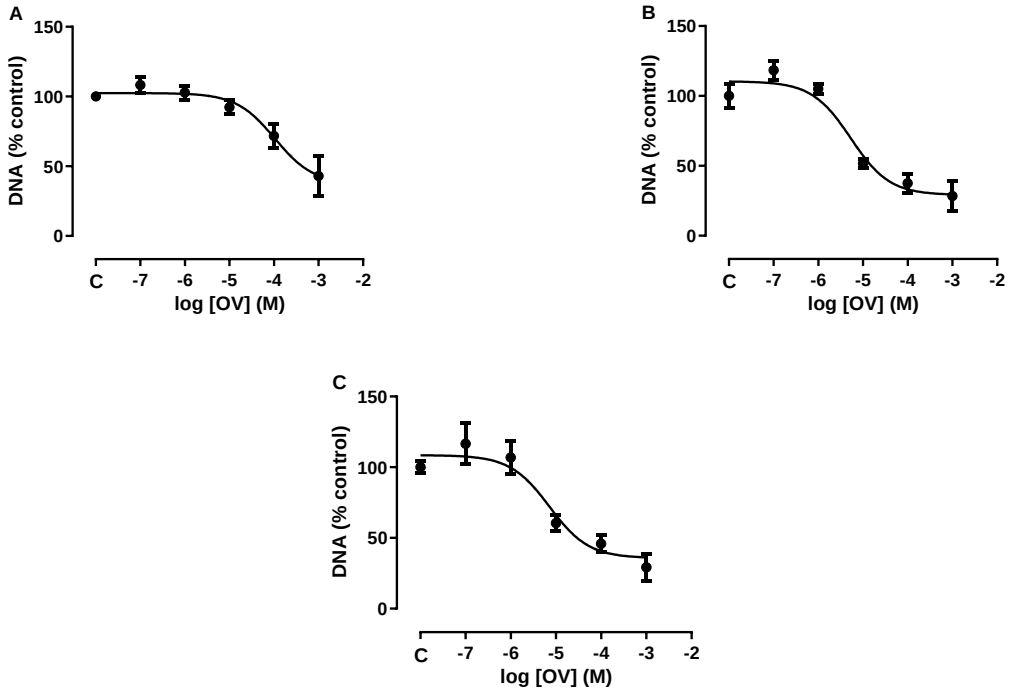


Şekil 7. OV uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin 72 saat inkübasyon sonrasında proliferasyon grafikleri.

Bu grafiklerden de anlaşılacağı gibi OV, MDA-MB-231 hücrelerinin çoğalmasını yüksek konsantrasyonlarda zamana bağlı olarak azaltmaktadır. Bu sonuçlara göre OV'un MDA-MB-231 hücrelerindeki 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri için IC_{50} değerleri hesaplanarak doz cevap eğrileri çizildi.

OV'un MDA-MB-231 Hücrelerindeki IC50 değerleri ve doz-cevap eğrileri:

MDA-MB-231 hücrelerinin, OV'un farklı konsantrasyonlarına göre verdiği cevabın eğrileri inkübasyon zamanları için çizildi. Bu grafiğe göre de yöntem kısmında açıklandığı gibi IC_{50} değerleri hesaplandı. OV uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin 72 saat inkübasyon sonrasında proliferasyon grafikleri Şekil 8'de verilmiştir.



Şekil 8. Farklı konsantrasyonlarda OV uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin doz cevap eğrisi. A. 24 saat, B. 48 saat, C. 72 saat.

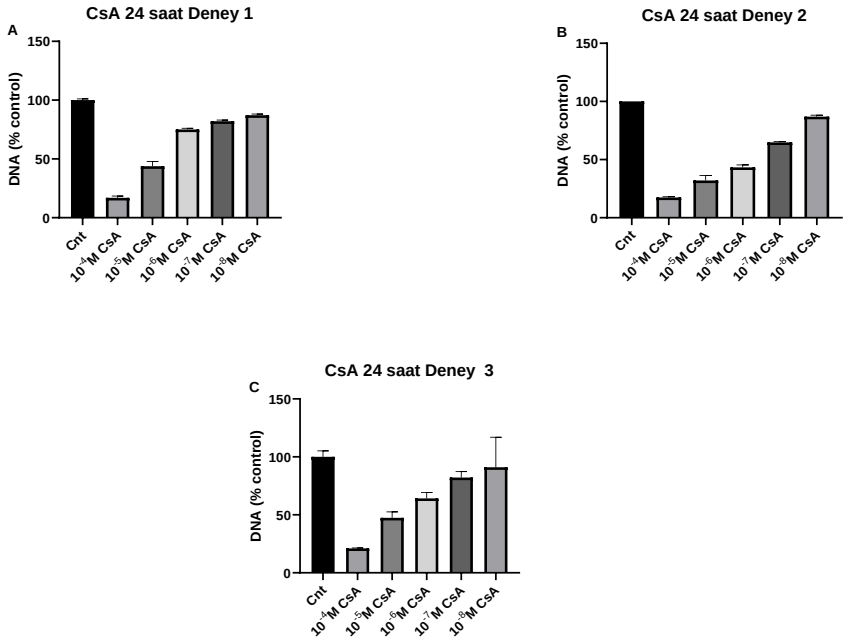
Buna grafiklere göre OV'un 24 saat inkübasyon süresi sonrasında MDA-MB-231 hücreleri için IC50 konsantrasyonu 10^{-4} M'dır. Yani OV 10^{-4} M uygulandıktan 24 saat sonra MDA-MB-231 hücrelerinin %50'sinin çoğalmasını baskılamaktadır. Aynı şekilde 48 saat inkübasyon süresi sonrasında OV'un MDA-MB-231 hücreleri için IC50 değeri $2x10^{-5}$ M olarak hesaplandı. MDA-MB-231 hücreleri için 72 saat inkübasyon süresi sonrasında OV'un IC50 değeri $6,5x10^{-5}$ M'dır.

CsA Uygulanan MDA-MB-231 Hücrelerinin Proliferasyon Eğrileri:

CsA bilinen bir Kalsinörün inhibitörüdür. CsA'nın MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki toksik etkisi zamana ve doza göre belirlendi. CsA ile yapılan deneyler 3 kez tekrarlandı çünkü bu üç deney birbiri ile benzer sonuçlar verdi. CsA'nın yüksek dozlarında MDA-MB-231 hücrelerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyon süreleri sonrasında proliferasyonu baskılanmıştır.

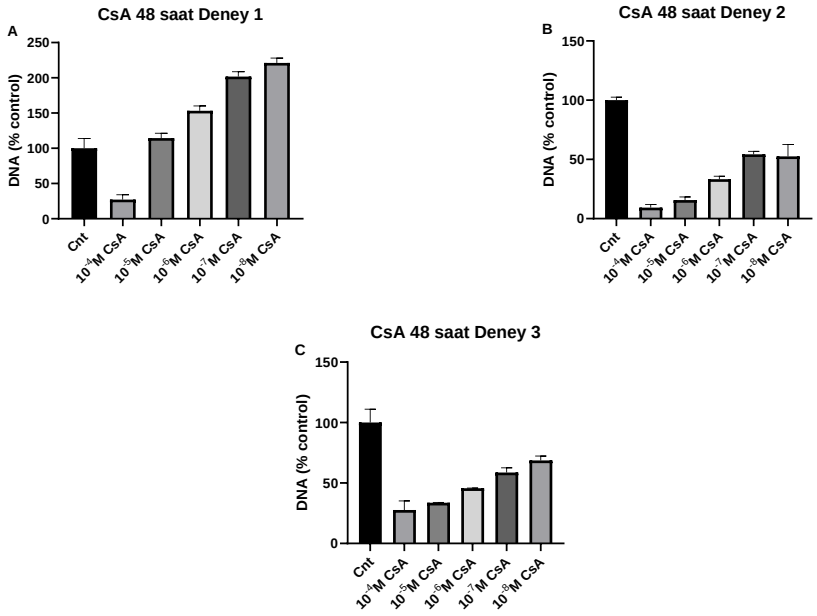
24 saatlik inkübasyon süresi sonrasında CsA uygulanan en yüksek konsantrasyonunda (10^{-4} M) hücre proliferasyonunu kontrole göre yaklaşık %15 oranında geriletmiştir. 10^{-7} M ve 10^{-8} M gibi CsA'un yüksek konsantrasyonları hemen hemen kontrol ile aynı porliferasyon oranına

sahiptir. CsA uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin 24 saat inkübasyon sonrasında proliferasyon grafikleri Şekil 9' da verilmiştir.



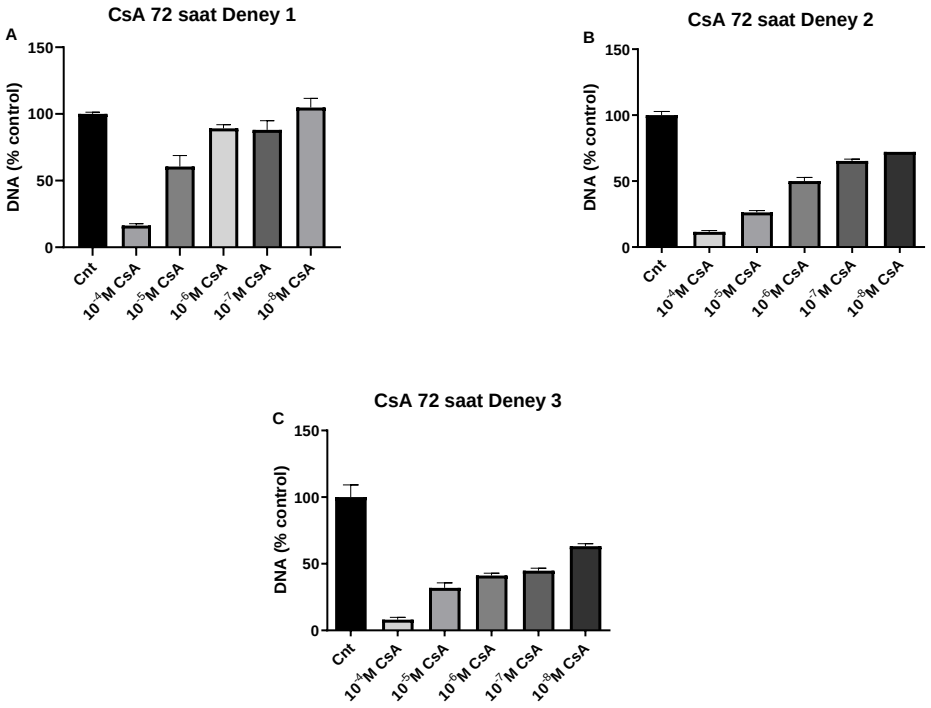
Şekil 9. CsA uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin 24 saat inkübasyon sonrasında proliferasyon grafikleri.

CsA farklı konsantrasyonlarda MDA-MB-231 hücrelerine uygulandıktan 48 saat sonra 10-4 M'da hücre proliferasyonunu kontrole göre yaklaşık %20 oranında artırmıştır. 10-5 M CsA'un uygulandığı hücreler de proliferasyon oranı kontrole göre yaklaşık %30'dur. CsA, 10-8 M konsantrasyonunda uygulandığı hücrelerde proliferasyon oranı kontrole yaklaşmıştır. CsA uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin 48 saat inkübasyon sonrasında proliferasyon grafikleri Şekil 7 de verilmiştir.



Şekil 10. CsA uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin 48 saat inkübasyon sonrasında proliferasyon grafikleri.

MDA-MB-231 hücrelerine farklı konsantrasyonlarda CsA uygulandıktan 72 saat sonrasında 10-4 M CsA'nın hücrelerdeki proliferasyona etkisi kontrole göre %10 oranındadır. 10-5 M OV uygulanan hücrelerde proliferasyon oranın kontrole göre yaklaşık olarak %25'lere çıkmaktadır. CsA uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin 72 saat inkübasyon sonrasında proliferasyon grafikleri Şekil 11'de verilmiştir.



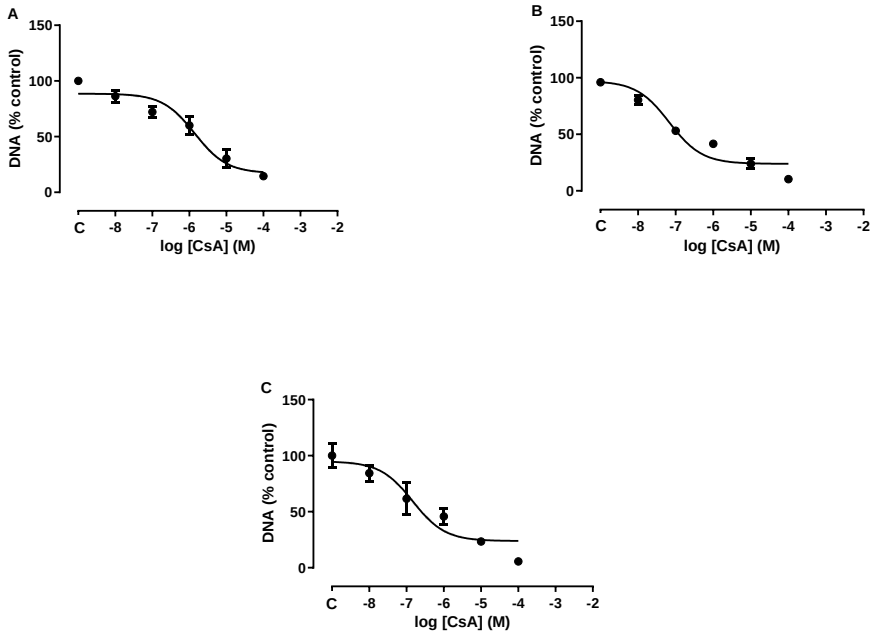
Şekil 11. CsA uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin 72 saat inkübasyon sonrasında proliferasyon grafikleri.

MDA-MB-231 hücrelerine farklı konsantrasyonlarda CsA uygulandıktan 72 saat sonrasında 10^{-4} M CsA'nın hücrelerdeki proliferasyona etkisi kontrole göre %10 oranındadır. 10^{-5} M OV uygulanan hücrelerde proliferasyon oranın kontrole göre yaklaşık olarak %25'lere çıkmaktadır. Bu grafiklerden de anlaşılacağı gibi CsA, MDA-MB-231 hücrelerinin çoğalmasını yüksek konsantrasyonlarda zamana bağlı olarak azaltmaktadır. Bu sonuçlara göre CsA'nın MDA-MB-231 hücrelerindeki 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri için IC50 değerleri hesaplanarak doz cevap eğrileri çizildi.

CsA'nın MDA-MB-231 Hücrelerindeki IC50 değerleri ve doz-cevap eğrileri:

Buna grafiklere göre CsA'nın 24 saat inkübasyon süresi sonrasında MDA-MB-231 hücreleri için IC50 konsantrasyonu $5x10^{-6}$ M'dır. Yani CsA $5x10^{-6}$ M uygulandıktan 24 saat sonra MDA-MB-231 hücrelerinin %50'sinin çoğalmasını baskılamaktadır. Aynı şekilde 48 saat inkübasyon süresi sonrasında CsA'nın MDA-MB-231 hücreleri için IC50 değeri 10^{-7} M olarak hesaplandı. MDA-MB-231 hücreleri için 72 saat inkübasyon süresi sonrasında CsA'nın IC50

değeri $5x10^{-7}$ M'dır. Farklı konsantrasyonlarda CsA uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin 24, 48 ve 72 saat sonrası doz-cevap eğrileri Şekil 12' da verilmiştir.

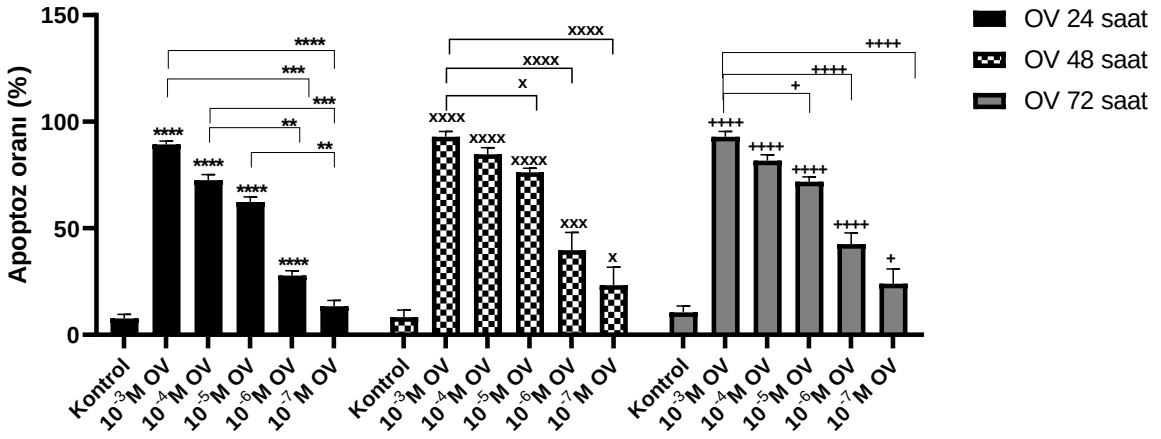


Şekil 12. Farklı konsantrasyonlarda CsA uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin doz-cevap eğrisi. A. 24 saat, B. 48 saat, C. 72 saat.

OV ve CsA'nın MDA-MB-231 Hücrelerinde Apoptoza Etkileri

Farklı konsantrasyonlarda OV ve CsA uygulanan hücreler Giemmsa ile boyanarak apoptoza giden hücreler sayıldı. Her konsantrasyon için 1000 hücre içerisinde kaç hücrenin apoptoza gittiği sayıldı. Grafikler, apoptoz oranlarının yüzdesi hesaplanarak çizildi.

Kontrol, yani su uygulanan hücrelerde 24 saat inkübasyon süresi sonrasında apoptoza giden hücre oranı %7,6'dır. 48 saat inkübasyon süresi sonrasında bu oran %8,3'e çıkmıştır. 72 saatlik inkübasyon süresi sonrasında kontrol hücrelerinin apoptoz oranı %10,5 olmuştur.



Şekil 13. OV'un MDA-MB-231 hücreleri üzerinde zamana ve doza göre apopotoz grafiği.**** , xxxx, ++++ p<0.0001, ***,xxx p<0.001, ** p<0.01, x,+ p<0.05.

10^{-3} M OV uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin 24 saat inkübasyon süresi sonrasındaki apoptoz oranı %89,3'tür. Aynı konsantrasyonun 48 saatlik inkübasyon süresi sonrası hücreleri apoptoza götürme oranı %92,9'dür. Bu oran 72 saatlik inkübasyon süresi sonrasında da aynı kalmıştır.

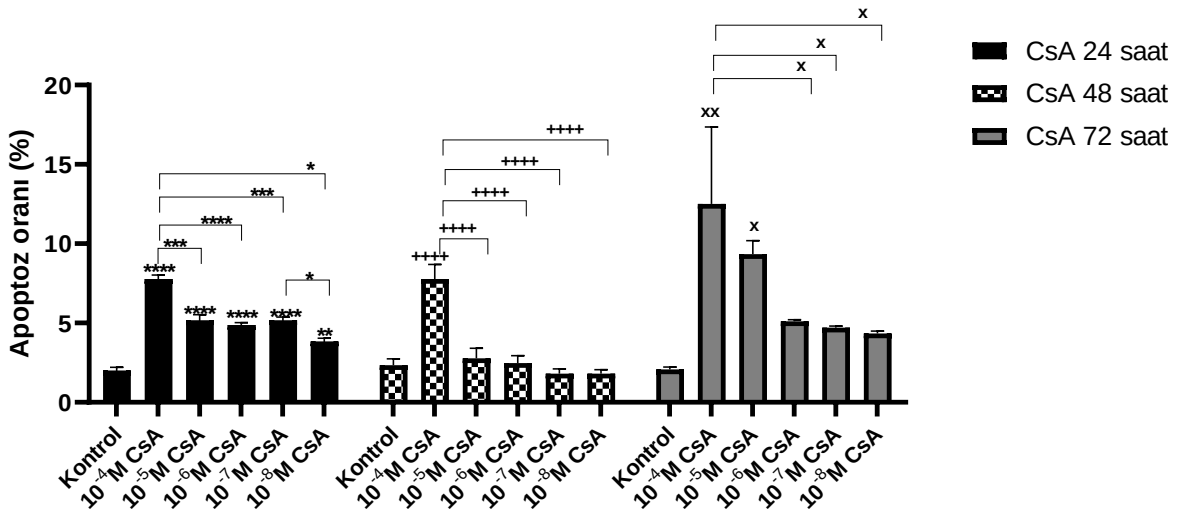
MDA-MB-231 hücrelerine 10^{-4} M OV uygulandıktan 24 saat sonra hücrelerin apoptoza gitme oranı %72,3'tür. Bu oran 48 saat sonrasında %84,7'ye çıkmıştır. 72 saat sonrasında aynı konsantrasyon için hücrelerin apoptoz oranı %81,6 olmuştur.

10^{-5} M OV uygulanan hücrelerin 24 saatlik inkübasyon süresi sonrasında apoptoza gitme oranı %62,3'tür. 48 saat sonrasında %76,2 olmuştur. 72 saat sonrasında %71,8 dir.

10^{-6} M OV uygulanan hücrelerin 24 saatlik inkübasyon süresi sonrasında apoptoza gitmesi %27,8 oranındadır. Aynı konsantrasyonda OV uygulanmasından 48 saat sonrasında hücrelerin apoptoz oranı %39,7 olmuştur. 72 saat sonrasında bu oran %42,5 dir.

10^{-7} M OV uygulanan hücrelerin 24 saatlik inkübasyon süresi sonrasında apoptoza gitme oranı %13,36'dır. 48 saat sonrasında %23,3 olmuştur. 72 saat sonrasında %23,9'dur.

OV uygulanan hücrelerde yüksek oranlarda apoptoza giden hücreler belirlenmişken CsA uygulanan hücreler için durum çok daha farklı olmuştur. Farklı konsantrasyonlarda CsA uygulanan hücreler yüksek konsantrasyonlarda kontrole göre istatistiksel anlamlı olarak daha fazla apoptoza gitseler de (p<0,0001) OV uygulanan hücrelere göre bu oran çok daha düşüktür. CsA uygulanan hücrelere kontrol olarak sadece metanol uygulandı. Buna göre kontrol grubu hücreler 24 saatlik inkübasyon süresi sonrasında %2 oranında apoptoza gitmiştir. Bu hücreler 48 saat inkübasyon süresi sonrasında %2,3, 72 saatlik inkübasyon süresi sonrasında %2,06 oranında apoptoza gittiler.



Şekil 14. CsA'nın MDA-MB-231 hücreleri üzerinde zamana ve doza göre apopotoz grafiği.****, ++++ p<0.0001, *** p<0.001, **,++ , xx p<0.01, *,+ p<0.05.

10^{-4} M CsA uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin 24 saat sonraki apoptoz oranı %7,7'dir. Aynı konsantrasyonun 48 saatlik inkübasyon süresi sonrası hücreleri apoptoza götürme oranı 24 saat sonraki oran ile aynıdır yani %7,7'dir. Bu oran 72 saatlik inkübasyon süresi sonrasında %12,5'lere çıkmıştır.

MDA-MB-231 hücrelerine 10^{-5} M CsA uygulandıktan 24 saat sonra hücrelerin apoptoza gitme oranı %5,1'dir. Bu oran 48 saat sonrasında %2,7 olmuştur. 72 saat sonrasında aynı konsantrasyon için hücrelerin apoptoz oranı %9,3'tür.

10^{-6} M CsA uygulanan hücrelerin 24 saatlik inkübasyon süresi sonrasında apoptoza gitmesi %4,8 oranındadır. Aynı konsantrasyonda CsA uygulanmasından 48 saat sonrasındaMDA-MB-231 hücrelerinin apoptoz oranı %2,4 olmuştur. 72 saat sonrasında bu oran %5,1 dir.

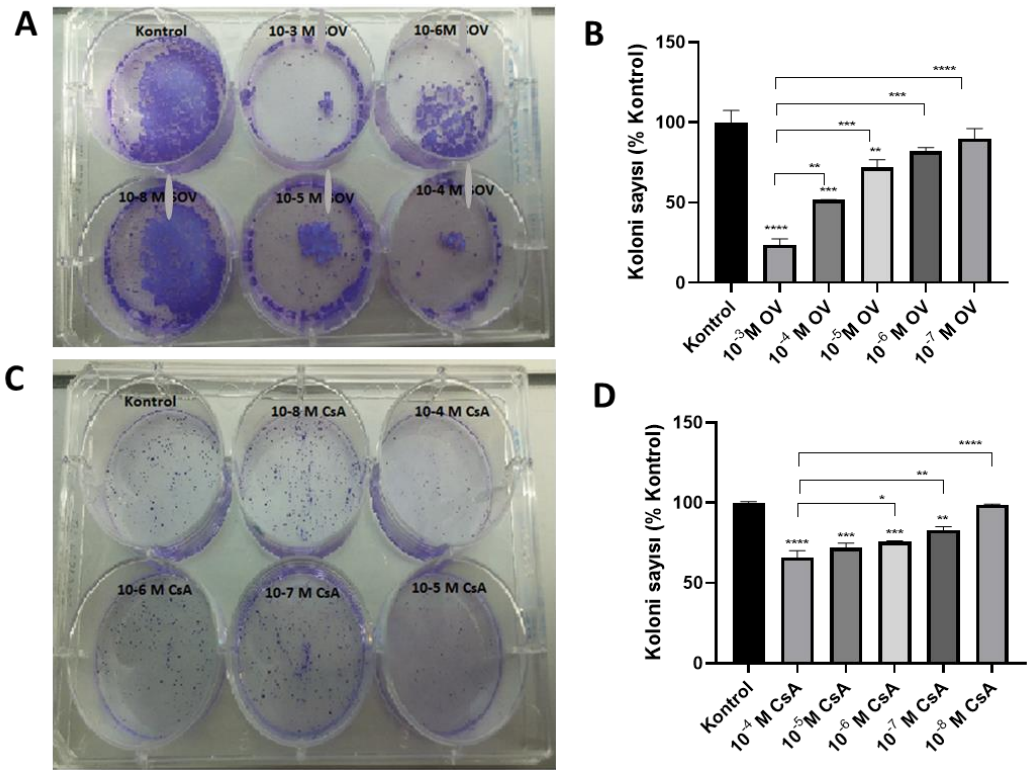
10^{-7} M CsA uygulanan hücrelerin 24 saatlik inkübasyon süresi sonrasında apoptoza gitme oranı %5,1'dir. 48 saat sonrasında %1,8 olurken 72 saatlik inkübasyon süresi sonrasında %4,7 olmuştur.

MDA-MB-231 hücrelerine 10^{-8} M CsA uygulandıktan 24 saat inkübasyon süresi sonrasında hücrelerin apoptoza gitme oranı %3,8'dir. Bu oran 48 saat sonrasında %1,8'e çıkmıştır. 72 saat sonrasında aynı konsantrasyon için hücrelerin apoptoz oranı %4,3 olmuştur.

OV ve CsA'nın MDA-MB-231 Hücrelerinin Koloni Oluşumuna Etkisi

Farklı konsantrasyonlarda MDA-MB-231 hücrelerine uygulanan OV ve CsA'nın koloni oluşumu üzerindeki etkileri incelendi. OV yüksek konsantrasyonda (10^{-3} M) MDA-MB-231

hücrelerinin koloni oluşumundaki etkisi kontrole göre %23,6 oranındadır. 10^{-5} M OV'un hücrelerin koloni oluşturmasına etkisi kontrole göre %51,6 oranındayken, 10^{-6} M OV'un etkisi %71'dir. 10^{-7} M OV'un koloni oluşumuna etkisi hemen hemen kontrolle aynı orandadır.



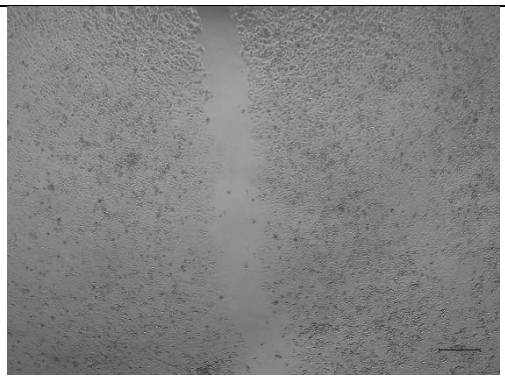
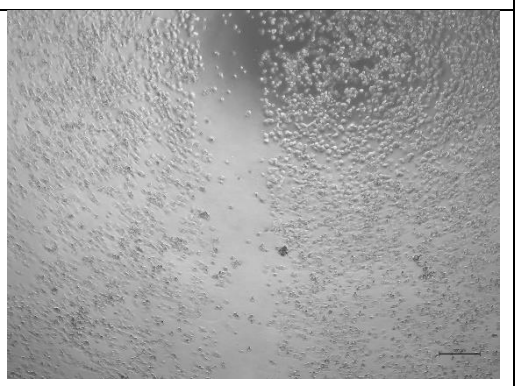
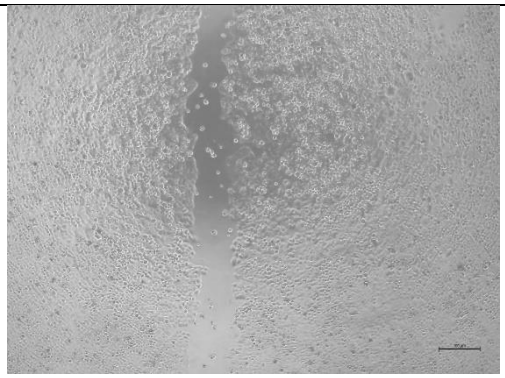
Şekil 15. Farklı konsantrasyonlarda OV ve CsA uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin koloni oluşumu. A. OV uygulanan 12 kuyucuğun fotoğrafı. B. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan OV'a göre kolonilerin sayısının yüzdelik grafiği. C. CsA uygulanan 12 kuyucuğun fotoğrafı. D. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan CsA'ya göre kolonilerin sayısının yüzdelik grafiği.

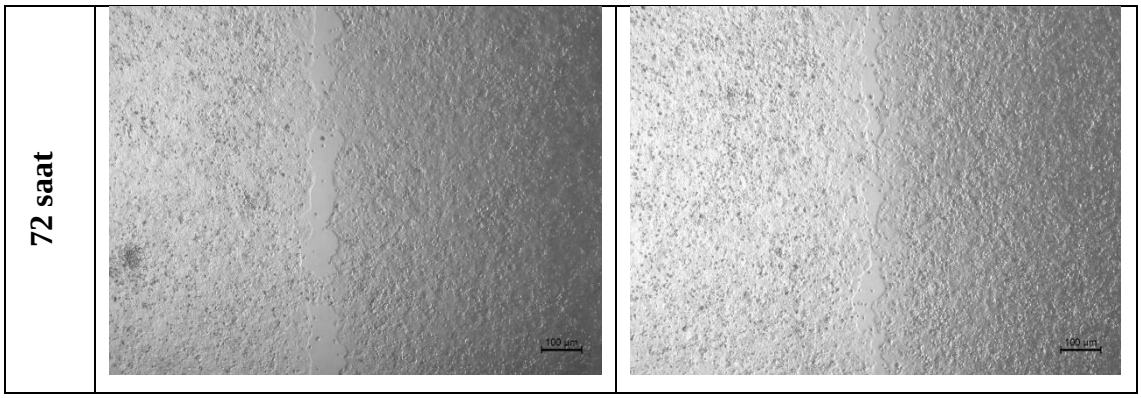
Farklı konsantrasyonlarda CsA uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde koloni oluşumu şekilde görüldüğü gibidir. OV kadar koloni oluşumunu engelleyici bir etkisi olmasa da hücrenin şeklini etkilemiştir. 10^{-4} M CsA uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin koloni oluşumu kontrole göre %65,9 oranındayken 10^{-5} M CsA'nın etkisi %71,9 oranındadır. 10^{-6} M CsA'nın hücrelerin koloni oluşturmasına etkisi %75,7 oranındadır. MDA-MB-231 hücrelerinin koloni oluşumuna 10^{-7} M CsA'nın etkisi kontrole göre %89,9 oranındayken 10^{-8} M CsA'nın koloni oluşumuna etkisi neredeyse kontrol grubu hücreler ile aynı %98,7 oranındadır.

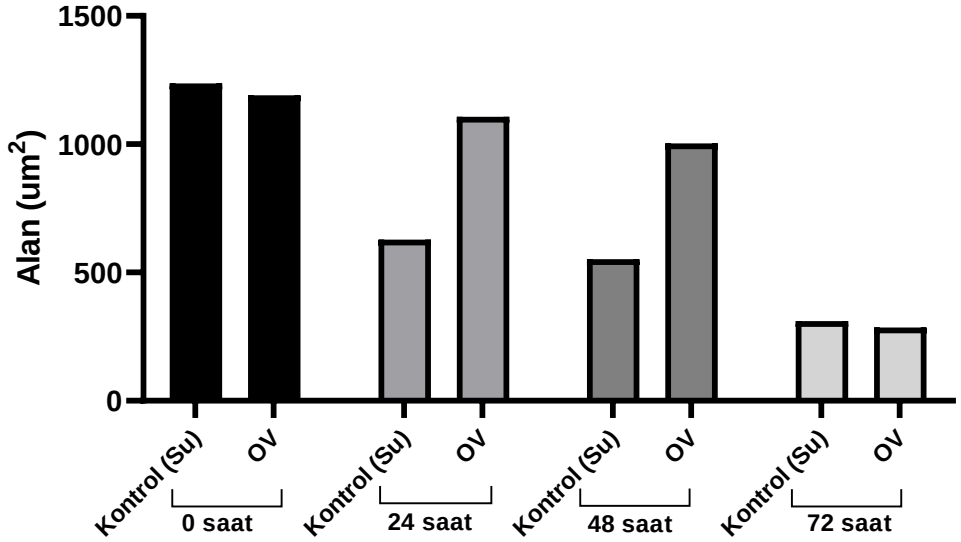
OV ve CsA'nın MDA-MB_231 Hücrelerinin Migrasyonuna Etkisi

MDA-MB-231 hücrelerine OV ve CsA yöntem kısmında da detaylıca açıklandığı şekilde uygulandı ve çizilen hücrelerin fotoğrafları mikroskop altında çekildi. 24 saat, 48 saat ve 72 saat inkübasyon süreleri sonrasında tekrar fotoğrafları aynı bölgelerden çekildi.

Tablo 1. OV 'un MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki migrasyona gösterdiği etkinin resimleri

	Kontrol (su)	**OV**
0 saat		
24 saat		
48 saat		

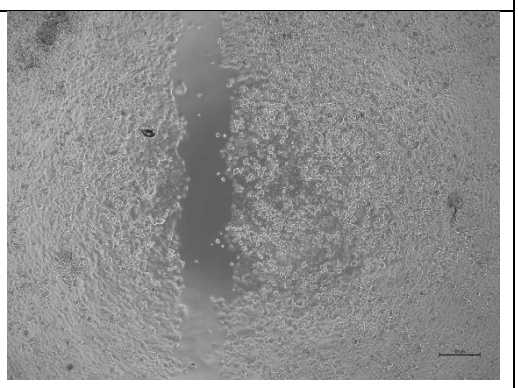
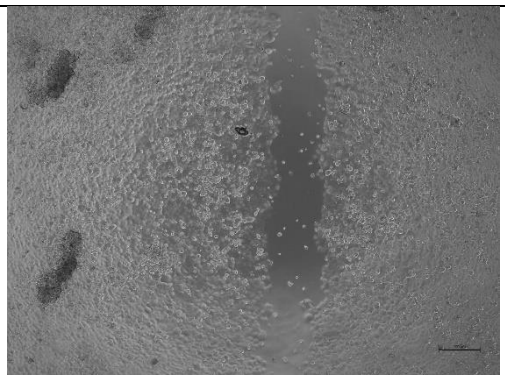
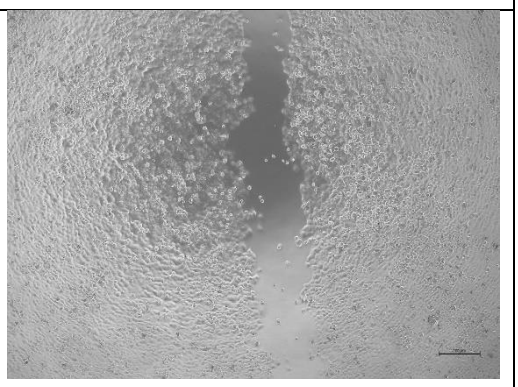
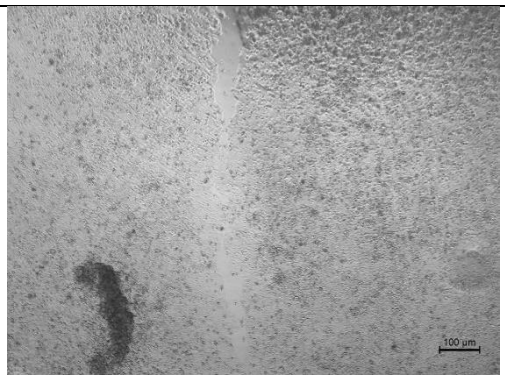
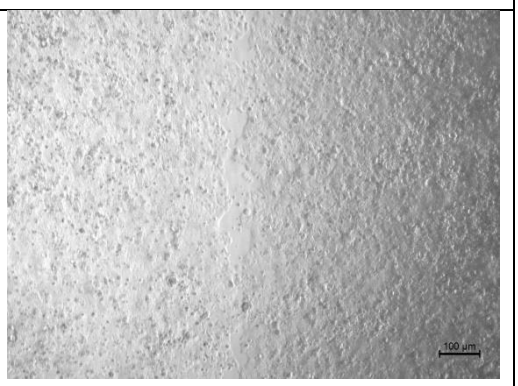


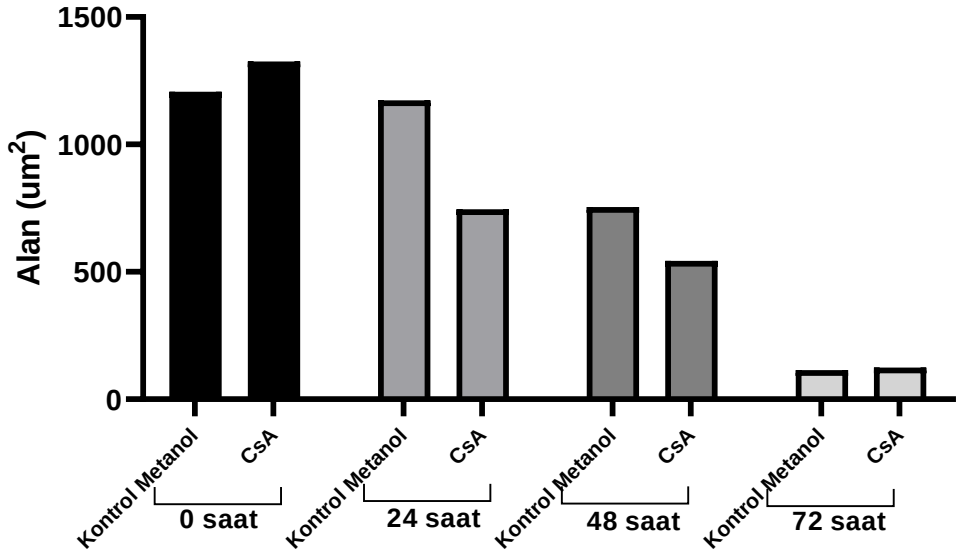


Şekil 16. OV uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin zamana göre kapanma alanlarının grafiği

MDA-MB-231 hücrelerinin OV uygulamasından sonra zamana göre migrasyonlarını sayısal olarak belirlemek için boşluk alanları ölçüldü. 0. saat OV uygulandıktan sonraki boşluk alanını göstermektedir. Başlangıçta kontrol grubundaki ve OV grubundaki hücrelerin arasında kalan boşluk hemen hemen aynı alana sahipken 24 saat sonra resimlerden ve grafiklerden anlaşılacağı üzere kontrol grubunda hücreler arasındaki boşluk hızla kapanmaktadır. Alan giderek küçülmüştür. Ama OV uygulanan gruptaki hücreler arasındaki alan 24 saat sonrasında daha az kapanmıştır. Başlangıca göre 24 saat sonrasında OV hücrelerin ilerlemesini engellemiştir. Başlangıçtan 48 saat sonra hücreler boş alanı biraz daha kapatsalar da kontrole göre kapanan alan daha azdır. Başlangıçtan 72 saat sonrasında kontrol ile OV uygulanan hücre grubu arasında boş alanların ölçümleri aynıdır.

Tablo 2. CsA'nın MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki migrasyona gösterdiği etkinin resimleri

	Kontrol (Metanol)	**CsA**
0 saat		
24 saat		
48 saat		
72 saat		



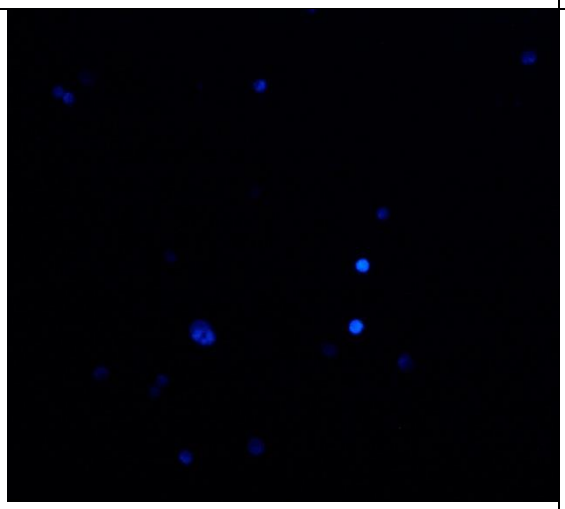
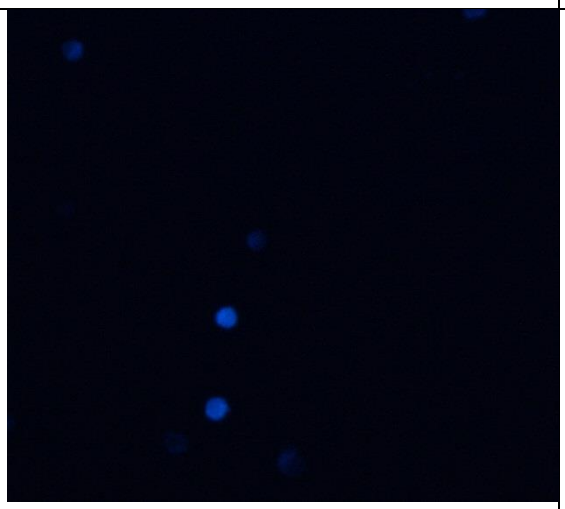
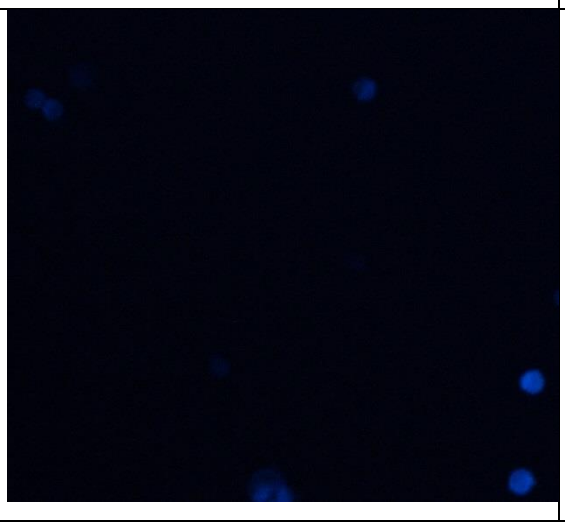
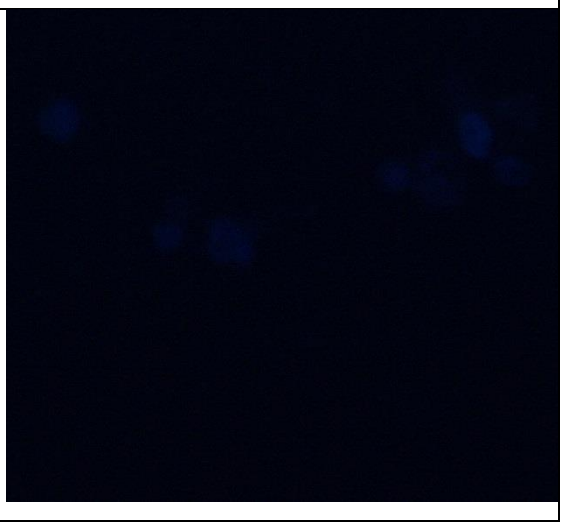
Şekil 17. CsA uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin zamana göre kapanma alanlarının grafiği

MDA-MB-231 hücrelerine CsA uygulandıktan sonra hücrelerin hareketleri görüntülendi ve hücrelerin arasındaki boş alan zamana göre ölçüldü. Buna göre başlangıçtan 24 saat sonrasında CsA uygulanan hücre grubu kontrole göre daha fazla hareket etmiştir. Başlangıçtan 48 saat sonra CsA uygulanan hücreler arasındaki boşluk kontrole göre daha fazla kapanmıştır. 72 saat sonrasında ise hücrelere arası boşluk kontrol ile aynıdır. CsA, MDA-MB-231 hücrelerinin hareketini bu sonuçlara göre engellememiştir.

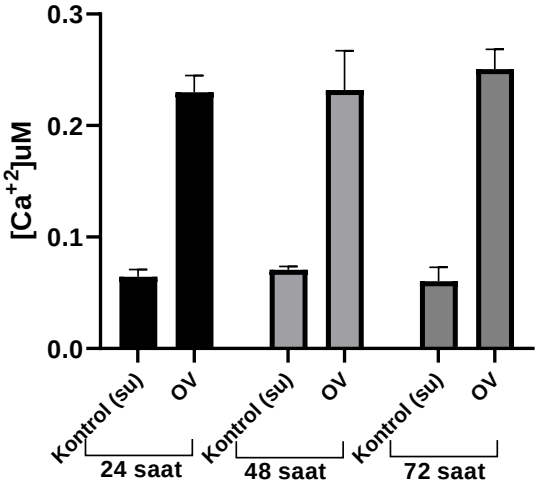
OV'nin MDA-MB-231 Hücrelerinde Hücre İçi $[Ca^{+2}]_i$ Etkisi

MDA-MB-231 hücrelerine OV uygulandıktan 24, 48 ve 72 saat inkübasyon süresi sonrasında hücrelere Indo1ff AM kalsiyum indikatörü yüklendi ve $[Ca^{+2}]_i$ hesaplandı. Indo 1FF AM kalsiyum ile bağlandığı zaman 405 nm dalgaboyunda ışıma vermektedir. Bu bize mavi renk olarak görülür. Eğer kalsiyuma bağlı değilse 485 nm dalgaboyunda ışıma verir ki biz bunu yeşil renk olarak görmekteyiz. Burada yeşil renk olarak hücreler görülmediği için sadece mavi renk yani Indo 1ff'in kalsiyum ile bağlı olduğunu gösteren fotğraflara yer verildi. $[Ca^{+2}]_i$ hesaplanırken yöntem kısmında detaylıca anlatıldığı gibi Indo 1FF'in kalsiyum ile bağlı olmadığı floresan yoğunluğu da hesaplamalara katıldı.

Tablo 3. OV uygulanan MDA-MB-231 Hücrelerinde $[Ca^{+2}]_i$ görüntüleri

	Kontrol (su)	**OV**
24 saat		
48 saat		
72 saat		

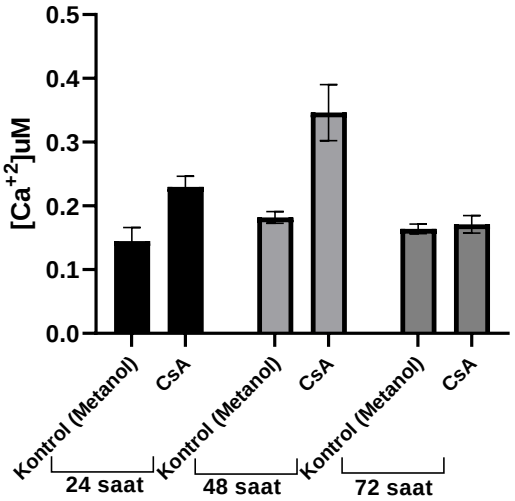
Floresan yoğunlukları hesaplandıktan sonra bu değerler $[Ca^{+2}]_i$ miktarına dönüştürüldü. Şekil deki grafik 24, 48 ve 72 saat inkübasyon süreleri sonrasındaki $[Ca^{+2}]_i$ değişimi göstermektedir.



Şekil 18. OV uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde $[Ca^{+2}]_i$ miktarını 24 saat, 48 saat ve 72 saat inkübasyon sürelerinde gösteren grafik.

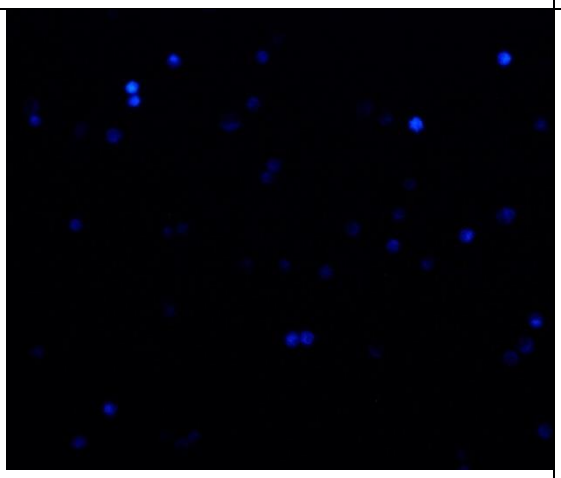
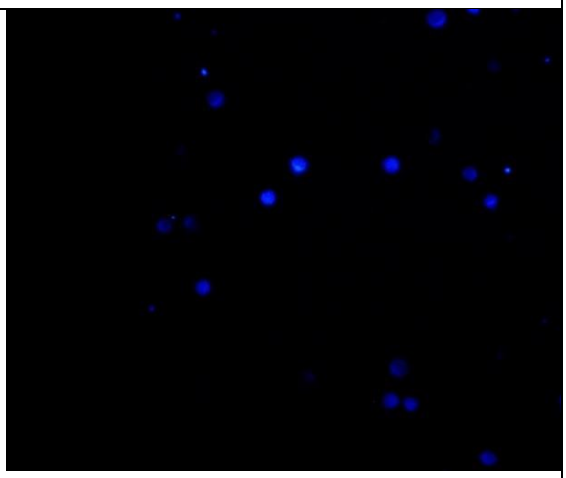
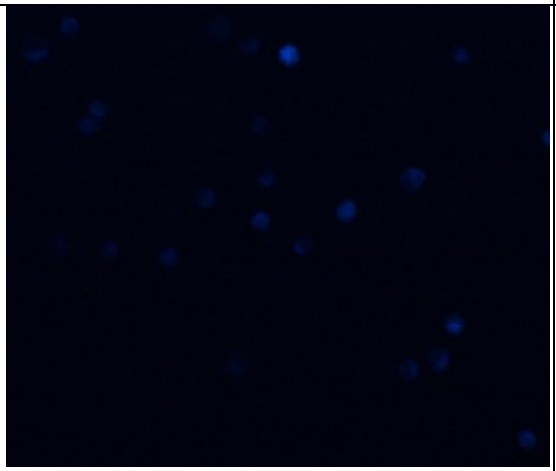
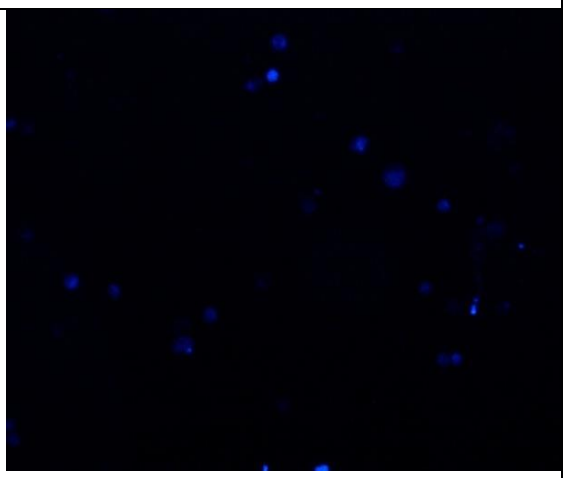
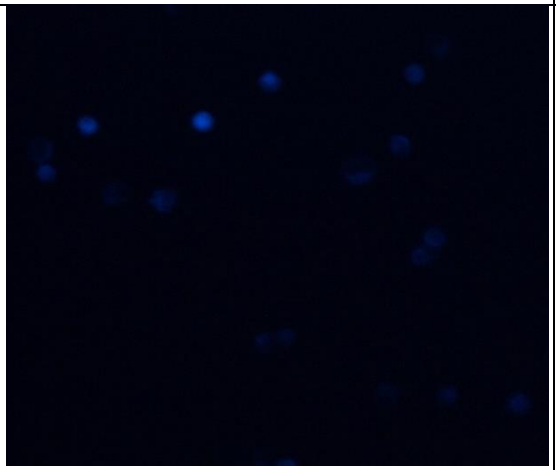
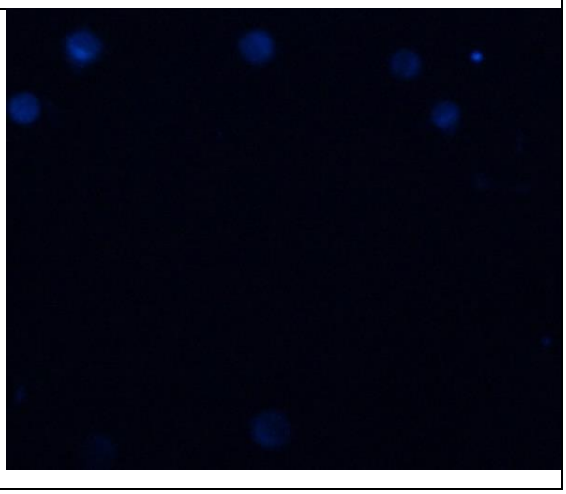
Bu sonuçlara göre OV uygulanan hücrelerdeki $[Ca^{+2}]_i$, kontrol grubu hücrelere göre daha fazladır. Zamana göre OV uygulanan hücrelerdeki $[Ca^{+2}]_i$ anlamlı bir şekilde değişmemektedir. OV hücre içi kalsiyumu tutmaktadır.

CsA'nın MDA-MB-231 Hücrelerinde Hücre İçi $[Ca^{+2}]_i$ Etkisi



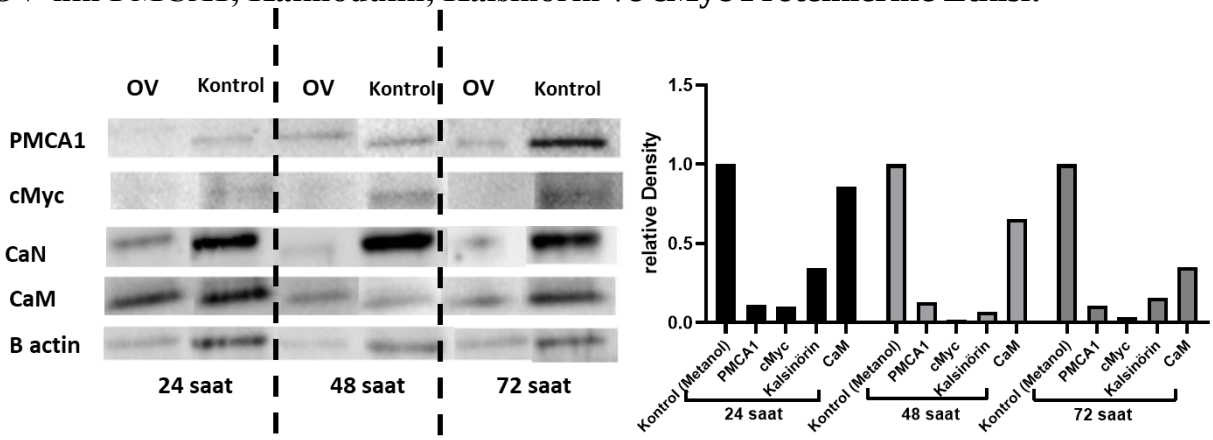
Şekil 19. CsA uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde $[Ca^{+2}]_i$ miktarını 24 saat, 48 saat ve 72 saat inkübasyon sürelerinde gösteren grafik.

Tablo 4. CsA uygulanan MDA-MB-231 Hücrelerinde $[Ca^{+2}]_i$ görüntüleri

	Kontrol (Metanol)	**CsA**
24 saat		
48 saat		
72 saat		

OV gibi CsA da MDA-MB-231 hücrelerine uygulandıktan 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonrasında Indo 1FF AM ile muamele edilerek $[Ca^{+2}]_i$ görüntülendi ve hesaplandı. Kontrol grubuna göre CsA uygulanan hücrelerde $[Ca^{+2}]_i$ daha fazla bulundu. Zamana göre $[Ca^{+2}]_i$ CsA uygulanan hücrelerde anlamlı olarak değişmemektedir.

OV'nin PMCA1, Kalmodulin, Kalsinörin ve cMyc Proteinlerine Etkisi:



Şekil 20. OV'nin PMCA1, Kalmodulin (CaM), Kalsinörin (CaN) ve cMyc Proteinlerine etkisini gösteren grafik ve proteinlerin ekspresyonları.

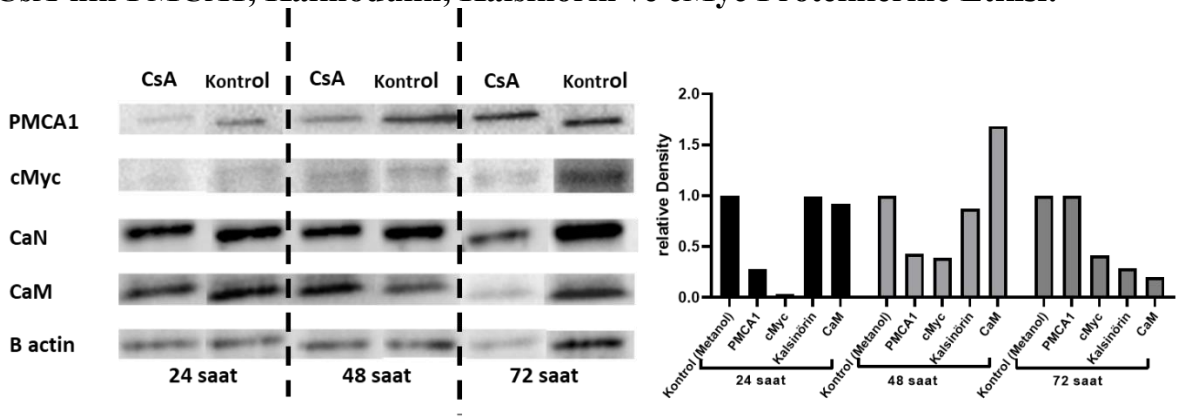
OV, plazma membranı Ca pompasını inhibe etmektedir. 24 saat OV ile inkübe edilen MDA-MB-231 hücrelerinde PMCA1 proteini kontrole göre ekspresyonu çok düşüktür. 48 saat inkübasyon süresinde PMCA1 protein ekspresyonu artmış gibi görünse de 72 saat sonrasında OV, PMCA1 ekspresyonunu kontrole göre baskılamıştır.

OV, CaM (kalmodulin) proteinini 24 saat inkübasyon süresi sonrasında ekspresyonunu artırmaktadır. 48 ve 72 saat sonrasında CaM protein ekspresyonu kontrole göre azalmıştır.

MDA-MB-231 hücreleri OV ile muamele edildikten 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresi sonrasında cMyc proteininin ekspresyonu kontrole göre baskılanmıştır.

Kalsinörin proteininin ekspresyonunu OV, 24 saat sonrasında MDA-MB-231 hücrelerinde artırsa da 48 ve 72 saat sonrasında baskılamıştır.

CsA'nin PMCA1, Kalmodulin, Kalsinörin ve cMyc Proteinlerine Etkisi:



Şekil 21. CsA'nın PMCA1, Kalmodulin, Kalsinörin ve cMyc Proteinlerine etkisini gösteren grafik ve proteinlerin ekspresyonları.

CsA, kalsinörün inhibtörü olmasına rağmen MDA-MB-231 hücrelerinde kontrole göre kalsinörin protein ekspresyonlarında bir değişiklik olmamıştır. Buna karşın diğer proteinler PMCA1, cMyc ve CaM ekpresyonları üzerinde etkisini göstrmiştir.

CsA uygulanan ve 24 saat inkübe edilen MDA-MB-231 hücrelerinde PMCA1 ve cMyc proteinleri eksprese olmamıştır. 72 saat sonrasında ise özellikle PMCA1 proteini kontrole göre aşırı eksprese olurken cMyc proteinleri kontrole göre eksprese olmuştur.

CaM proteinleri CsA uygulanmasından 24 saat sonra ekspresyonu kontrole göre baskılandı 48 saat sonrasında artmış gibi görünse de 72 saat sonrasında ekspresyonu kontrole göre azalmıştır.

TARTIŞMA

Bu çalışmada, PMCA pompası ve direkt etkileşimde olduğu Kalmodulin (CaM) proteini ve CaM sayesinde dolaylı olarak etkileşim içerisinde olduğu düşünülen Kalsinörin (CaN) ve c-Myc yolu açığa çıkarılması amaçlanmıştır. Bu amacı gerçekleştirmek için meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB231 hücreleri ile çalışıldı ve iki tür soru soruldu. Birincisi PMCA bloke edilirse bu proteinler ve kanser hücreleri nasıl etkilenir? İkincisi CaN bloke edilirse bu proteinler ve kanser hücreleri nasıl etkilenir?

Neden PMCA bloke edildi? PMCA birçok yerde açıklandığı gibi hücrenin plazma membranında bulunan ve hücre içerisinde kalsiyum iyonunun birikmesini engellemek amaçlı kalsiyum iyonlarını hücre içerisinden dışarısına ATP kullanarak pompalayan önemli bir proteindir. PMCA'nın bloke olması hücrenin kalsiyum çıkışına kapatmak demektir ki az da olsa kalsiyum Na/Ca^{+2} değiştiricisini kullanarak hücre dışına çıkmaktadır. PMCA kapanmasından dolayı hücrenin içerisinde kalsiyumun genel olarak hücreye neler yaptığını gözlemleyebilineceği düşünüldü. PMCA pompası, plazma zarının toplam proteininin küçük bir bileşenidir (% 0.1'den az) (Brini and Carafoli 2011). PMCA pompasının bir izomeri olan ATP2B1 proteininin MDA MB 231 meme kanseri hücrelerinde eksprese olduğu bilinmektedir (Lee et al. 2002). Bu çalışmada PMCA1 proteinlerinin MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde eksprese olduğunu gösterdik. Ortovanadate uygulanarak PMCA1 bloke edildi. 24, 48 ve 72 saat inkübe edilen OV çalışmamızda da gösterildiği gibi PMCA1 proteinini kontrole göre baskılamıştır. Bu projede ayrıca hücre içi kalsiyum konsantrasyonu hem görüntülendi hem de hesaplandı. OV uygulanmasından 24 saat sonra hücre içi kalsiyum konsantrasyonu 0,07 uM iken OV ile muamele edilen hücrelerde 0,230 uM dır. Hücrelerden kalsiyum çıkışının azaldığı bu hesaplamalar ile de kanıtlanmıştır. Farklı konsantrasyonlarda OV muamele edildikten sonra hücre proliferasyonu OV'nin yüksek konsantrasyonlarında gerilemiştir. Aynı şekilde OV ile muamele olduktan sonra hücreler 10^{-3}M gibi yüksek konsantrasyonda %90'larda apoptoza gitmiştir. OV konsantrasyonu azaldıkça hücrelerin apoptoza gitme oranları azalsa da kontrol ile kıyaslandığında anlamlıdır. Bu sonuçlar Bruce ve ark.'nın da belirttiği gibi PMCA pompası baskılandığı zaman hücrenin apoptoza gittiği verisi ile uyumludur (Bruce 2017). Bu çalışmada ayrıca OV ile muamele olan MDA-MB-231 hücrelerinin göçünün yavaşladığı bulundu. PMCA'nın bloke olmasının hücre göçü üzerindeki etkisi de gösterildi. Peki OV ile PMCA1'in inhibe edilmesi, PMCA pompaları için çok önemli bir protein olan CaM üzerinde nasıl bir etkiye sebep olmuştur? Bilindiği gibi CaM, Ca^{+2} iyonu ile sitoplazmada kompleks bir yapı

oluşturmaktadır. CaM, dört Ca^{+2} iyonu taşıyabilir (Brini and Carafoli 2009). PMCA'nın aktive olması için Ca^{+2}+CaM'nın kompleksinin pompaya bağlanması gerekmektedir (Brini and Carafoli 2011; Déliot and Constantin 2015). OV ile PMCA1 inhibe edildiğinin 24 saat sonrasında CaM proteini kontrole göre down regüle olsa da hemen hemen ekspresyon seviyeleri yakındır. Ama inkübasyon zamanı artıkça CaM ekspresyonuda azalmıştır. Bir yayında Kanser hücreleri, göç oranlarını ve invazyonlarını arttırmak için Ca^{+2}+CaM'ye bağlı sinyal sistemlerini kullanıldığını bildirmiştir (Villalobo and Berchtold 2020). Bizim sonuçlarımız da OV'nin 24 saat sonrasında CaM ekspresyonunun 24 saat sonrası hücrelerin migrasyonlarının da yavaş olduğu, 72 saat sonrasında CaM ekspresyonu baskılandığı zaman hücrelerin migrasyonlarının arttığı görülmüştür. Bu çalışmada MDA-MB-231 hücrelerinde OV uygulanan hücrelerde PMCA1 ile birlikte CaM proteinlerinin ekspresyonlarının da inhibe olduğu gösterilmiştir.

Ca^{+2}+CaM kompleksinin aktive ettiği bir diğer protein CaN'dir. Yüksek kalsiyum mevcudiyetinde, kalmodulin, CaN'e bağlanarak, otoinhibitör alanı aktif bölgeden çıkararak, CaN aktivasyonuna ve ardından hedef proteinlerin defosforilasyonuna yol açar (Brun and Godbout 2016). Meme kanserinde CaN'i zara bağlayarak CaN-NFAT yolağının aktivasyonunu azaltabilen PMCA2 ile etkileşime girebilir. Bununla birlikte, küçük bir peptit ile PMCA2-CaN etkileşiminin spesifik bozulması, NFAT aktivitesini arttırır ve meme kanseri hücre hatlarında hücre canlılığını azaltır, bu da artan apoptoz ve paklitaksele duyarlılıkla sonuçlandığı belirtilmiştir (Brun and Godbout 2016). Bu çalışmada OV uygulanan hücrelerde PMCA1 inhibe olduğu gibi kalsinörünin de inhibe olduğu gösterildi. Bu sonuç, Kalsinörin inhibitörleri ile tedavi, transplant hastalarında gözlemlendiği gibi kanser riskini de artırabildiği yorumunu destelememektedir (Brun and Godbout 2016). OV her ne kadar spesifik bir CaN inhibitörü olmasa da yaptığımız çalışma ile dolaylı yoldan da olsa CaN proteinlerini inhibe ettiğini gösterdik. OV uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin apoptoza gitme oranlarının yüksekliği ve proliferasyonlarındaki azalma CaN inhibe olduğu zaman meme kanseri hücrelerinin çoğalması yavaşlamıştır.

Siklasporin A (CsA), immunspresif olduğu gibi CaN inhibitörü olarak da bilinmektedir. CsA'nın kendisi de doğrudan tümör büyümesinde rol oynar çünkü TGF 41 üretimini artırabilir, Ras'ı aktive edebilir ve PTEN ekspresyonunu baskılayarak AKT'nin aktivasyonunu artırabildiği rapor edilmiştir (Brun and Godbout 2016). Bizim çalışmamızda PMCA pompası ile bağlantılı olduğu için CaN yolağının kanser hücresinin fonksiyonuna, hücre içi Ca^{+2} konsanstrasyonuna ve PMCA ile ortak yolağına etkisi araştırıldı. Bunun için CsA inhibitörü ile MDA-MB-231 hücreleri muamele edildi. Buna göre CsA, 24 saat ve 48 saat CaN proteinini inhibe edemedi.

Ama 72 saat sonrasında kontrole kıyasla CaN proteini CsA uygulamasından sonra inhibe olmuştur. Bu sonucunu hücrelerin apoptozu ve prolifersyonları üzerinde görebiliriz. CaN inhibe olmadığı zaman hücrelerin apoptoza gitme oranları %10 seviyesinde kalmıştır. CsA uygulamasından 72 saat sonra PMCA1 proteini CaN baskılandığında aktive olmuştur. Diğer bir CsA uygulamasının sonucu CaM üzerindeki etkisidir. CsA uygulanmasından 48 saat sonraki veriler kafaları karıştırsa da 24 ve 72 saat sonraki sonuçlara göre CaN ve CaM aynı oranda inhibe olmaktadır. Hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonuna bakıldığı zaman CsA uygulanmasından 72 saat sonrasında PMCA1 proteinin ekpresyonundaki artışın etkisi görülebilir. Hücre içi konsantrasyon kontrolle yaklaşık olarak aynı seviyelerdedir (kontrol $[Ca^{+2}]i$=0,164 uM, CsA $[Ca^{+2}]i$= 0,171 uM). CaN inhibitörleri siklosporin A ve takrolimus gibi immünsüpresanların kronik kullanımı kanser insidansını artırdığı belirtilse de (Mognol et al. 2012) bizim çalışmamızda belirli bir artış görülmedi.

Çalışmamızın özgün noktası meme kanserinde PMCA pompası ile cMyc transkripsiyon faktörü arasındaki ilişkiyi açığa çıkarmış olmasıdır. CaN substratları arasında transkripsiyon faktörleri, hücre döngüsü ve apoptozla ilgili proteinler, sitoskeletal proteinler, iskele proteinleri, membran kanalları ve reseptörler bulunur (Brun and Godbout 2016). CaN, Ca^{+2}+CaM kompleksinin bağlanması ile aktive olmaktadır. CaN aktive olduktan sonra NFAT transkripsiyon faktörünü aktive etmektedir. Peki cMyc bu ilişkinin neresindedir? Bizim çalışmamıza kadar cMyc ile CaN ilişkisi ve cMyc ile Ca^{+2} ilişkisini net bir şekilde açıklayan çalışmalara rastlanmamıştır. cMyc, büyüme, farklılaşma, apoptoz, anjiyogenez, DNA onarımı ve hatta protein sentezi ve ribozom montajı gibi temel metabolik süreçlerin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Bu nedenle, cMyc aktivitesinin deregülasyonunun birçok insan kanserinde kötü huylu dönüşümün merkezi bir özelliği olması şaşırtıcı değildir (Buchholz et al. 2006). cMyc, birçok insan malignitesinde sıklıkla aşırı eksprese edilir ve c-Myc 'nin malign hücre transformasyonundaki önemli rolü iyi bilinmektedir (Nesbit, Tersak, and Prochownik 1999).

cMyc, NFAT ile etkileşime girerek aktifleşmektedir. Ayrıca prostat kanseri zerinde yapılan çalışmalar da Ca^{+2}/CaN sinyal verme aktivitesi baskılandığında cMyc'nin down regüle olduğu belirtilmiştir (Buchholz et al. 2006). Ancak bizim çalışmamızda daha farklı sonuçlar elde edildi. Bizim çalışmamıza göre, OV ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde PMCA1 proteininin inhibe edilmesi ile cMyc'nin inhibe olduğu görülmüştür. İlginç olan nokta, CsA uygulanmasından sonra 24 saat ve 48 saat sonraki protein ifadelerine bakıldığında CaN ve CaM ekspresyonları ile cMyc ekspresyonları ters orantılı bir şekilde değişmektedir. Çünkü CsA uygulandıktan 72 saat sonra CaN ve CaM ekspresyonları azalmaya başladığı zaman cMyc

ekspresyonu artış göstermiştir. OV uygulanan hücrelerde PMCA1 proteinler inhibe olduktan sonra hücrelerin yüksek oranda apoptoza gitmeleri, kanser hücreleri önünde bir engel olan cMyc proteinlerinin baskılanmasından kaynaklı olabileceği sonucuna varılabilir.

SONUÇ

Yaşatmak mı? Öldürmek mi? Ca^{+2}'nın canlı organizmalardaki rolü için açıklanamayan iki sorudur. Ca^{+2}'nin faydalı rolleri saymakla bitmez ama en ufak bir dengenin bozulması ile de acımasız yönünü hemen gösterebilir. Normal hücreler için Ca^{+2}'nin acımasız yönünü görmek istenmeyen bir durum olsa da kanser hücreleri için her şey çok farklıdır. İyi yönlendirilebilecek Ca^{+2} sinyalleri kanser tedavisinde destek hatta temel unsur olabilir. Bunun için öncelikle en derin noktasına kadar hücre içerisinde ve dışında Ca^{+2}'nin rolünü tanımlamak gerekmektedir. Bu proje ile ufakta olsa bazı noktalara ışık tutmaya çalıştık. PMCA ve cMyc'nin meme kanseri hücrelerindeki ilişkisi bu projede gösterildi. İnhibe edilen Ca^{+2} pompası cMyc'nin kanser hücrelerindeki ekspresyonunu down regüle etmektedir. CaM'nin artan ekspresyonu PMCA1 artışına katkı sağlamasa da cMyc'i baskılamıştır. CaN'nin meme kanserinde cMyc üzerinde dolaylı etkisi de gösterildi. CaN artışı ile cMyc inhibe olmaktadır.

Bu proje Ca+2, CaM, CaN, PMCA ve cMyc ilişkisini göstermiş olsa da sadece çok küçük bir bölümüne ışık tutmuştur. İleriki çalışmalarımız için temel ve çok olumlu veriler elde edilmiştir. Bu projeden elde edilen veriler ışığında MDA-MB-231 hücreleri için bu yolak üzerinde terapatik etkiler araştırılacaktır.

KAYNAKLAR

Berchtold, Martin W., and Antonio Villalobo. 2014. “The Many Faces of Calmodulin in Cell Proliferation, Programmed Cell Death, Autophagy, and Cancer.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1843 (2): 398–435. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.10.021.

Boczek, Tomasz, Malwina Lisek, Bozena Ferenc, and Ludmila Zylinska. 2017. “Cross Talk among PMCA, Calcineurin and NFAT Transcription Factors in Control of Calmodulin Gene Expression in Differentiating PC12 Cells.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1860 (4): 502–15. https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2017.01.012.

Brini, Marisa, and Ernesto Carafoli. 2009. “Calcium Pumps in Health and Disease.” *Physiological Reviews*. https://doi.org/10.1152/physrev.00032.2008.

Brini, Marisa, and Ernesto Carafoli.2011. “The Plasma Membrane Ca2+ ATPase and the Plasma Membrane Sodium Calcium Exchanger Cooperate in the Regulation of Cell Calcium.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3 (2): 1–15. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004168.

Bruce, Jason I. E. 2017. “Metabolic Regulation of the PMCA: Role in Cell Death and Survival.” *Cell Calcium*, June. https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.06.001.

Brun, Miranda, and Roseline Godbout. 2016a. “Activation of Calcineurin in Cancer: Many Paths, One Hub.” *Translational Cancer Research* 3 (5): S497–506. https://doi.org/10.21037/9510.

Buchholz, Malte, Alexandra Schatz, Martin Wagner, Patrick Michl, Thomas Linhart, Guido Adler, Thomas M Gress, and Volker Ellenrieder. 2006. “Overexpression of C-Myc in Pancreatic Cancer Caused by Ectopic Activation of NFATc1 and the Ca2+/Calcineurin Signaling Pathway.” *The EMBO Journal* 25 (15): 3714–24. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601246.

Carafoli, E. 1991. “Calcium Pump of the Plasma Membrane.” *Physiological Reviews* 71 (1): 129–53.

Chin, D, and A R Means. 2000. “Calmodulin: A Prototypical Calcium Sensor.” *Trends in Cell Biology* 10 (8): 322–28. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10884684.

Chyan, Chia-Lin, Deli Irene, and Sin-Mao Lin. 2017. “The Recognition of Calmodulin to the Target Sequence of Calcineurin—A Novel Binding Mode.” *Molecules* 22 (10): 1584. https://doi.org/10.3390/molecules22101584.

Curry, Merril C., Nicole A. Luk, Paraic A. Kenny, Sarah J. Roberts-Thomson, and Gregory R. Monteith. 2012. “Distinct Regulation of Cytoplasmic Calcium Signals and Cell Death Pathways by Different Plasma Membrane Calcium ATPase Isoforms in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells.” *The Journal of Biological Chemistry* 287 (34): 28598–608. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.364737.

Dang, Chi V. 2012. “MYC on the Path to Cancer.” *Cell* 149 (1): 22–35. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.003.

Datta, Sandeep Robert, Ann M. Ranger, Michael Z. Lin, James Fitzhugh Sturgill, Yong-Chao Ma, Chris W. Cowan, Pieter Dikkes, Stanley J. Korsmeyer, and Michael E. Greenberg. 2002. “Survival Factor-Mediated BAD Phosphorylation Raises the Mitochondrial Threshold for Apoptosis.” *Developmental Cell* 3 (5): 631–43. https://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00326-X.

Déliot, Nadine, and Bruno Constantin. 2015. “Plasma Membrane Calcium Channels in Cancer: Alterations and Consequences for Cell Proliferation and Migration.” *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. Elsevier. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.06.009.

Eskes, Robert, Solange Desagher, Bruno Antonsson, and Jean-Claude Martinou. 2000. “Bid Induces the Oligomerization and Insertion of Bax into the Outer Mitochondrial Membrane.” *Molecular and Cellular Biology* 20 (3): 929–35. https://doi.org/10.1128/MCB.20.3.929-935.2000.

Gabay, M., Y. Li, and D. W. Felsher. 2014. “MYC Activation Is a Hallmark of Cancer Initiation and Maintenance.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 4 (6): a014241–a014241. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a014241.

Hofland, L J, P M van Koetsveld, and S W Lamberts. 1990. “Percoll Density Gradient Centrifugation of Rat Pituitary Tumor Cells: A Study of Functional Heterogeneity within and between Tumors with Respect to Growth Rates, Prolactin Production and Responsiveness to the Somatostatin Analog SMS 201-995.” *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)* 26 (1): 37–44. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2138476.

James, P., M. Maeda, R. Fischer, A. K. Verma, J. Krebs, J. T. Penniston, and E. Carafoli. 1988. “Identification and Primary Structure of a Calmodulin Binding Domain of the Ca2+ Pump of Human Erythrocytes.” *Journal of Biological Chemistry* 263 (6): 2905–10.

Lee, Won Jae, Sarah J Roberts-Thomson, Nicola A Holman, Fiona J May, Gillian M Lehrbach, and Gregory R Monteith. 2002. “Expression of Plasma Membrane Calcium Pump Isoform MRNAs in Breast Cancer Cell Lines.” *Cellular Signalling* 14 (12): 1015–22. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12359307.

Lin, Charles Y, Jakob Lovén, Peter B Rahl, Ronald M Paranal, Christopher B Burge, James E Bradner, Tong Ihn Lee, and Richard A Young. 2012. “Transcriptional Amplification in Tumor Cells with Elevated C-Myc.” *Cell* 151 (1): 56–67. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.08.026.

Luoto, K. R., A. X. Meng, A. R. Wasylishen, H. Zhao, C. L. Coackley, L. Z. Penn, and R. G. Bristow. 2010. “Tumor Cell Kill by C-MYC Depletion: Role of MYC-Regulated Genes That Control DNA Double-Strand Break Repair.” *Cancer Research* 70 (21): 8748–59. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0944.

Mann, Kris M., Jenna Lynn Ray, Edward S. Moon, Kristin M. Sass, and Mark R. Benson. 2004. “Calcineurin Initiates Smooth Muscle Differentiation in Neural Crest Stem Cells.” *The Journal of Cell Biology* 165 (4): 483–91. https://doi.org/10.1083/jcb.200402105.

Mognol, Giuliana P., Patricia S. De Araujo-Souza, Bruno K. Robbs, Leonardo K. Teixeira, and João P.B. Viola. 2012. "Transcriptional Regulation of the C-Myc Promoter by NFAT1 Involves Negative and Positive NFAT-Responsive Elements." *Cell Cycle* 11 (5): 1014–28. https://doi.org/10.4161/cc.11.5.19518.

Monteith, Gregory R., Felicity M. Davis, and Sarah J. Roberts-Thomson. 2012. "Calcium Channels and Pumps in Cancer: Changes and Consequences." *The Journal of Biological Chemistry* 287 (38): 31666–73. https://doi.org/10.1074/jbc.R112.343061.

Monteith, Gregory R, Yewlan Wanigasekara, and Basil D Roufogalis. 1998. "The Plasma Membrane Calcium Pump, Its Role and Regulation: New Complexities and Possibilities." *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 40 (4): 183–90. https://doi.org/10.1016/S1056-8719(99)00004-0.

Nesbit, Chadd E., Jean M. Tersak, and Edward V. Prochownik. 1999. "MYC Oncogenes and Human Neoplastic Disease." *Oncogene*. Oncogene. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202746.

Orrenius, Sten, Boris Zhivotovsky, and Pierluigi Nicotera. 2003. "Calcium: Regulation of Cell Death: The Calcium–Apoptosis Link." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4 (7): 552–65. https://doi.org/10.1038/nrm1150.

Qu, Bin, Dalia Al-Ansary, Carsten Kummerow, Markus Hoth, and Eva C. Schwarz. 2011. "ORAI-Mediated Calcium Influx in T Cell Proliferation, Apoptosis and Tolerance." *Cell Calcium* 50 (3): 261–69. https://doi.org/10.1016/j.ceca.2011.05.015.

Rumi-Masante, Julie, Farai I. Rusinga, Terrence E. Lester, Tori B. Dunlap, Todd D. Williams, A. Keith Dunker, David D. Weis, and Trevor P. Creamer. 2012. "Structural Basis for Activation of Calcineurin by Calmodulin." *Journal of Molecular Biology* 415 (2): 307–17. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.11.008.

Schwarz, Eva C., Bin Qu, and Markus Hoth. 2013. "Calcium, Cancer and Killing: The Role of Calcium in Killing Cancer Cells by Cytotoxic T Lymphocytes and Natural Killer Cells." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1833 (7): 1603–11.

https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.11.016.

Shibasaki, F, and F McKeon. 1995. “Calcineurin Functions in Ca(2+)-Activated Cell Death in Mammalian Cells.” *The Journal of Cell Biology* 131 (3): 735–43. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7593193.

Singh, Garima, Shiv K. Singh, Alexander König, Kristina Reutlinger, Monica D. Nye, Tillman Adhikary, Martin Eilers, Thomas M. Gress, Martin E. Fernandez-Zapico, and Volker Ellenrieder. 2010. “Sequential Activation of NFAT and C-Myc Transcription Factors Mediates the TGF-β Switch from a Suppressor to a Promoter of Cancer Cell Proliferation.” *Journal of Biological Chemistry* 285 (35): 27241–50. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.100438.

Strehler, E. E., and D. A. Zacharias. 2001. “Role of Alternative Splicing in Generating Isoform Diversity among Plasma Membrane Calcium Pumps.” *Physiological Reviews* 81 (1): 21–50.

Swulius, M T, and M N Waxham. 2008. “Ca(2+)/Calmodulin-Dependent Protein Kinases.” *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* 65 (17): 2637–57. https://doi.org/10.1007/s00018-008-8086-2.

Villalobo, Antonio, and Martin W. Berchtold. 2020. “The Role of Calmodulin in Tumor Cell Migration, Invasiveness, and Metastasis.” *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG. https://doi.org/10.3390/ijms21030765.

Wang, Hong-Gang, Nuzhat Pathan, Iryna M. Ethell, Stanislaw Krajewski, Yu Yamaguchi, Futoshi Shibasaki, Frank McKeon, Tanya Bobo, Thomas F. Franke, and John C. Reed. 1999. “Ca2+-Induced Apoptosis Through Calcineurin Dephosphorylation of BAD.” *Science* 284 (5412): 339–43. https://doi.org/10.1126/science.284.5412.339.

Wang, Shuhuai, Xinmei Kang, Shouqiang Cao, Hui Cheng, Di Wang, and Jingshu Geng. 2012. “Calcineurin/NFATc1 Pathway Contributes to Cell Proliferation in Hepatocellular Carcinoma.” *Digestive Diseases and Sciences* 57 (12): 3184–88. https://doi.org/10.1007/s10620-012-2255-8.

Zha, Jiping, Hisashi Harada, Elizabeth Yang, Jennifer Jockel, and Stanley J Korsmeyer. 1996. “Serine Phosphorylation of Death Agonist BAD in Response to Survival Factor Results in Binding to 14-3-3 Not BCL-XL.” *Cell* 87 (4): 619–28. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81382-3.