



**İSTANBUL
ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

***VİSCUM ALBUM* EKSTRESİNİN
C6 SIÇAN GLİOMA HÜCRELERİNDE STRES
PROTEİNLERİNİN ANLATIMI ÜZERİNE ETKİSİ**

Evren ÖNAY UÇAR
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman
Prof.Dr. Nazlı ARDA

Kasım, 2009

İSTANBUL



**İSTANBUL
ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

***VİSCUM ALBUM* EKSTRESİNİN
C6 SIÇAN GLİOMA HÜCRELERİNDE STRES
PROTEİNLERİNİN ANLATIMI ÜZERİNE ETKİSİ**

Evren ÖNAY UÇAR
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman
Prof.Dr. Nazlı ARDA

Kasım, 2009

İSTANBUL

*Çok erken kaybettiğim sevgili ablam Eylem
ve eniştem Burhan Salcan anısına....*

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin T-746/13092005 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Bu çalışma 9/11/2009 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof.Dr. Nazlı ARDA (Danışman)
İstanbul Üniversitesi

Prof.Dr. Avni KURU
İstanbul Üniversitesi

Prof. Dr. Dilek KAZAN
Marmara Üniversitesi

Prof. Dr. A. Süha YALÇIN
Marmara Üniversitesi

Prof. Dr. Ayşegül TOPAL SARIKAYA
İstanbul Üniversitesi

ÖNSÖZ

Hayat tıpkı coşkun bir nehir gibi hızla akıp gidiyor ve bu arada farkında olmadan yıllar da geçiyor. Çok uzun zamandır tamamlamak için üzerinde çalıştığım, çaba harcadığım Doktora tezim sonunda bitti. Hayatımdaki en önemli dönemleri bu tez devam ederken yaşadım, kaybettiklerim ve kazandıklarım hep bu süreçte gerçekleşti. Ve hayat bir yandan devam ederken, bu Doktora tezi de büyüdü, gelişti, şekillendi ve son olarak elinizdeki hale geldi. Akademik yolun ne kadar zorlu bir yol olduğunu da, iyi ve kötü türlü deneyimler yaşayarak yine bu süreçte öğrendim. Ve şu anda biliyorum ki her ne kadar bu tez bitmiş olarak sizin elinizde olsa da, benim için hiç bitmeyecek. Çünkü çalışmak, öğrenmek ve denemek istediğim şeylerin sadece çok küçük bir kısmını bu tez kapsamında yapabildim. Daha yolumun çok uzun olduğunun farkındayım. En büyük dileğim ise yaptığım bu çalışmanın insanlığa küçük de olsa bir katkısı olması ve fayda sağlamasıdır.

Her zaman güler yüzlü ve pozitif olmasıyla örnek aldığım, sadece çalışmalarım sırasında değil her konuda bana yardımcı olarak deneyimleriyle yol gösteren, sorularımı asla yanıtız bırakmayan ve bu çalışmanın sonlandırılmasında desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili danışmanım **Prof. Dr. Nazlı ARDA**'ya tüm kalbimle teşekkür ederim. Çalışmamın son aşamasında laboratuvarlarını açarak her türlü desteği veren ve bana yeni bir vizyon kazandıran **Prof. Dr. Alastair AITKEN**'e çok teşekkür ederim. Bu tezin gelişmesinde ve şekillenmesinde değerli fikir ve katkılarıyla bana yol gösteren hocalarım **Prof.Dr.Avni KURU** ve **Prof.Dr.Dilek KAZAN**'a teşekkürü borç bilirim. Ayrıca tezimin hemen hemen tüm aşamalarını yürüttüğüm Bölümümüzün başta Bölüm Başkanı Prof.Dr.Güler TEMİZKAN olmak üzere, tüm Öğretim Üyelerine teşekkür ederim. Ve son olarak bu tezin her aşamasında bana yardımcı olan, akşam geç saatlere kadar çalışırken bana eşlik eden ve manevi desteklerini her zaman hissettiğim tüm dostlarıma, özellikle Araş.Gör.Murat PEKMEZ ve Araş.Gör.Özlem EROL-DAYI'ya çok teşekkür ederim.

Beni bugünlere getiren, tüm hayatım boyunca bana her konuda destek olan ve ilgisini bir an olsun eksiltmeyen **Anne** ve **Babama** varlıklarıyla bana huzur verdikleri için teşekkür ederim. Bu tez süresince her zaman yanımda olan, onlardan çaldığım ve çalışmalarım için harcadığım tüm zamanlar için büyük anlayış gösteren ve beni her konuda sonuna kadar destekleyen Eşim **Ali UÇAR**'a ve Oğlum **Mehmet Alp UÇAR**'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ.....	viii
SEMBOL LİSTESİ.....	ix
ÖZET.....	xii
SUMMARY.....	xiv
1.GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	8
2.1. <i>Viscum album</i>	8
2.2. C6 SIÇAN GLİOMA HÜCRELERİ.....	14
2.3. STRES (ISI ŞOKU) PROTEİNLERİ.....	17
2.3.1. Stres Proteini Aileleri.....	21
HSP100 Ailesi.....	21
HSP90 Ailesi	21
HSP70 Ailesi.....	21
HSP60 Ailesi.....	24
HSP40 Ailesi.....	24
Küçük ısı şoku proteinleri (“Small Heat Shock Protein”, sHSP) Ailesi...	25
2.4. ISI ŞOKU GENLERİNİN TRANSKRİPSİYONU.....	28
2.5. ISI ŞOKU PROTEİNLERİNİN HASTALIKLARDAKI ROLÜ	32
2.6. 14-3-3 PROTEİNİ.....	36

3. MALZEME ve YÖNTEM.....	38
3.1. BİTKİSEL MATERYAL.....	38
3.2. BİTKİ EKSTRESİNİN HAZIRLANMASI.....	39
3.3. C6 SIÇAN GLİOMA HÜCRELERİNİN KÜLTÜRLEME KOŞULLARI.....	39
3.4. HÜCRELERİN ÇOĞALMA EĞRİSİNİN OLUŞTURULMASI.....	40
3.5. SİTOTOKSİSİTE ANALİZİ.....	41
3.6. HSP'LERİN YÜKSEK SICAKLIK UYGULAMALARI İLE İNDÜKSİYONU.....	42
3.7. SUDA ÇÖZÜNEBİLEN HÜCRESEL PROTEİNLERİN İZOLASYONU.....	43
3.7.1. Denatüre Jel Elektforezi (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektforezi / SDS-PAGE) ve Western Blot Analizleri İçin Hazırlanan Protein Ekstresi.....	43
3.7.2. İki Boyutlu Elektforez (2-DE) İçin Hazırlanan Protein Ekstresi.....	44
3.8. PROTEİN KONSANTRASYONUNUN BELİRLENMESİ.....	44
3.9. ELEKTROFORETİK ANALİZLER.....	45
3.9.1. Denatüre Jel Elektforezi (SDS-PAGE).....	45
3.9.2. İki Boyutlu Jel Elektforezi (2-DE)	46
3.10. BOYAMA YÖNTEMLERİ.....	48
3.10.1. Coomassie Boyama.....	49
3.10.2. Gümüş Boyama.....	49
3.11. DENSİTOMETRİK ANALİZLER.....	51
3.12. İMMÜNOLOJİK ANALİZLER.....	51
3.13. KÜTLE SPEKTROMETRİSİ ANALİZLERİ.....	52
3.13.1. Proteinlerin Tripsinle Kesimi.....	52
3.13.2. MALDI-TOF MS Analizi ve Proteinlerin Tanımlanması.....	53

3.14. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....	53
4. BULGULAR.....	54
4.1. C6 SIÇAN GLİOMA HÜCRELERİNİN ÇOĞALMA EĞRİSİ.....	54
4.2. SİTOTOKSİSİTE ANALİZİ.....	55
4.3. HÜCRESEL EKSTRELERİN PROTEİN KONSANTRASYONLARI....	56
4.4. ELEKTROFORETİK VE İMMÜNOLOJİK ANALİZLER.....	57
4.4.1. Denatüre Jel Elektroforezi ve Western Blot.....	57
Stres Proteinleri (Hsp).....	58
14-3-3 Proteinleri.....	60
4.4.2. İki Boyutlu Elektroforez.....	61
4.5. KÜTLE SPEKTROMETRİSİ ANALİZLERİ.....	64
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	73
6. KAYNAKLAR.....	83
ÖZGEÇMİŞ.....	106

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1.	Beyin tümörlerinin ortaya çıktığı bölgeler ve tümör tipleri.....	14
Şekil 2.2.	Şaperon aktivitesi gösteren Hsp'lerin işlevlerini özetleyen şema.....	19
Şekil 2.3.	İnsana ait Hsc70 ve Hsp70'in moleküler yapısı.	22
Şekil 2.4.	Hsc70 ile olgunlaşmamış peptid zincirleri ve katlanmamış proteinler arasındaki etkileşimler.....	23
Şekil 2.5.	Yirmidört altbirimden oluşan sHsp'nin üç boyutlu yapısı.....	25
Şekil 2.6.	HSF aktivasyonu ve dolayısıyla hsp transkripsiyonunu aktive eden hücre içi ve hücre dışı etkenler.....	29
Şekil 2.7.	Stresle indüklenen Hsp'lerin artışında rol oynayan olası mekanizma.....	31
Şekil 2.8.	Malignansi, hücrel stres, tümör gelişimi ve apoptoz inhibisyonunda Hsp27'nin rolü.....	35
Şekil 3.1.	(a) Ihlamur ağacı üzerindeki <i>V. album</i> kümelerine ait fotoğraf, (b) <i>V. album</i> bitkisinin yakın plan görüntüsü.....	38
Şekil 3.2.	Başlangıç hücre sayısı 1×10^5 hücre/ml olan 2 günlük C6 glioma hücrelerinin faz kontrast invert mikroskop altındaki görüntüsü.....	40
Şekil 4.1.	Başlangıç derişimi 5×10^4 hücre/ml ve 1×10^5 hücre/ml olan C6 glioma hücrelerine ait çoğalma eğrisi.....	54
Şekil 4.2.	Farklı derişimlerde uygulanan ekstrenin C6 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi.....	55
Şekil 4.3.	Sığır serum albumin (BSA) standartları (10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 µg/ml) ile çizilen standart grafik.....	56
Şekil 4.4.	Hücrel ekstrelerin suda çözünebilen protein profilleri. SDS-PAGE ile ayrıştırılan ve Coomassie mavisini ile boyanan jellerden birine ait görüntü.....	57
Şekil 4.5.	a) Kontrol ve deney gruplarına ait Hsp27 anlatımlarının Western blot analizi, b) Analiz sonuçlarının grafik şeklinde gösterimi.....	59
Şekil 4.6.	a) Kontrol ve deney gruplarına ait Hsp70 anlatımlarının Western blot analizi, b) Analiz sonuçlarının grafik şeklinde gösterimi.....	59
Şekil 4.7.	14-3-3 izoformlarının (14-3-3 β, 14-3-3 ε, 14-3-3 γ, 14-3-3 η, 14-3-3 ζ) Western analizi.....	60

- Şekil 4.8.** 14-3-3 izoformlarının istatistiksel analizi a) 14-3-3 β , b)14-3-3 ϵ , c) 14-3-3 γ , d)14-3-3 η , e)14-3-3 ζ 61
- Şekil 4.9.** Gümüş boyama yöntemine göre boyanan 2-D jeller. a) Kontrol: 37°C sıcaklıkta tutulan kontrol grubu hücrelere ait protein ekstresi, b) VE: *Viscum* ekstresi uygulanmış, c) Isı şoku: Yüksek sıcaklık (42°C) ile strese sokulmuş, d) VE+Isı şoku: *Viscum* ekstresi ve yüksek sıcaklık (42°C) uygulanmış hücrelere ait protein ekstreleri..... 62
- Şekil 4.10.** Instant Blue ile boyanan 2-D jeller. a) Kontrol: 37°C sıcaklıkta tutulan kontrol grubu hücrelere ait protein ekstresi, b) VE: *Viscum* ekstresi uygulanmış, c) Isı şoku: Yüksek sıcaklık (42°C) ile strese sokulmuş, d) VE+Isı şoku: *Viscum* ekstresi ve yüksek sıcaklık (42°C) uygulanmış hücrelere ait protein ekstreleri..... 63
- Şekil 4.11.** Instant Blue ile boyanan 2-D jellerde molekül ağırlığı 60-80 kDa arasında olan proteinlerin yakın plan görüntüsü. a) Kontrol: 37°C sıcaklıkta tutulan kontrol grubu hücrelere ait protein ekstresi, b) VE: *Viscum* ekstresi uygulanmış, c) Isı şoku: Yüksek sıcaklık (42°C) ile strese sokulmuş, d) VE+Isı şoku: *Viscum* ekstresi ve yüksek sıcaklık (42°C) uygulanmış hücrelere ait protein ekstreleri..... 64
- Şekil 4.12.** Instant Blue ile boyanan 2-D jellerde molekül ağırlığı 23-30 kDa arasında olan proteinlerin yakın plan görüntüsü. a) Kontrol: 37°C sıcaklıkta tutulan kontrol grubu hücrelere ait protein ekstresi, b) VE: *Viscum* ekstresi uygulanmış, c) Isı şoku: Yüksek sıcaklık (42°C) ile strese sokulmuş, d) VE+Isı şoku: *Viscum* ekstresi ve yüksek sıcaklık (42°C) uygulanmış hücrelere ait protein ekstreleri..... 64
- Şekil 4.13.** Kütle spektrometrisi ile tanımlanmak üzere seçilen protein spotları..... 65
- Şekil 4.14.** 3 numaralı spota ait spektrum, Mascot veritabanı taraması ve dizi eşleşme sonuçları. a) Örneğin peptid kütle parmakizi spektrumu (MALDI-TOF MS), b) Mascot veritabanı tarama sonuçları (Mowse skoru ve olası proteinler), c) Olası proteinle dizi eşleşme sonuçları..... 67
- Şekil 4.15.** 5 numaralı spota ait spektrum, Mascot veritabanı taraması ve dizi eşleşme sonuçları. a) Örneğin peptid kütle parmakizi spektrumu (MALDI-TOF MS), b) Mascot veritabanı tarama sonuçları (Mowse skoru ve olası proteinler), c) Olası proteinle dizi eşleşme sonuçları..... 68
- Şekil 4.16.** 6 numaralı spota ait spektrum, Mascot veritabanı taraması ve dizi eşleşme sonuçları. a) Örneğin peptid kütle parmakizi spektrumu (MALDI-TOF MS), b) Mascot veritabanı tarama sonuçları (Mowse skoru ve olası proteinler), c) Olası proteinle dizi eşleşme sonuçları..... 69

Şekil 4.17. 8 numaralı spota ait spektrum, Mascot veritabanı taraması ve dizi eşleşme sonuçları. a) Örneğin peptid kütle parmakizi spektrumu (MALDI-TOF MS), b) Mascot veritabanı tarama sonuçları (Mowse skoru ve olası proteinler), c) Olası proteinle dizi eşleşme sonuçları..... 70

Şekil 4.18. 9 numaralı spota ait spektrum, Mascot veritabanı taraması ve dizi eşleşme sonuçları. a) Örneğin peptid kütle parmakizi spektrumu (MALDI-TOF MS), b) Mascot veritabanı tarama sonuçları (Mowse skoru ve olası proteinler), c) Olası proteinle dizi eşleşme sonuçları..... 71

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1:	Hsp aileleri ve fonksiyonları.....	2
Tablo 2.1.	<i>Viscum album</i> bitkisinden izole edilmiş maddeler.....	11
Tablo 2.2.	<i>V. album</i> bitkisinin kanıtlanmış biyolojik aktiviteleri.....	13
Tablo 2.3.	HSP aileleri, proteinleri, hücre içindeki konumları ve fonksiyonları...	20
Tablo 2.4:	Hsp anlatımını indükleyen koşullar.....	28
Tablo 3.1.	SDS-PAGE için hazırlanan çözeltiler.....	45
Tablo 3.2.	SDS-PAGE'de kullanılan jelin hazırlanması.....	46
Tablo 3.3.	2-DE kiti bileşenleri ve içerikleri.....	47
Tablo 3.4.	Örneklerin izoelektrik odaklama koşulları.....	48
Tablo 3.5	Gümüş boyama yöntemi için gerekli çözeltiler.....	50
Tablo 3.6.	İmmünojenik analizlerde kullanılan primer ve sekonder antikorlar, kaynakları, elde edildikleri organizmalar ve dilüsyonları.....	51
Tablo 4.1.	Hücrel ekstrelelere ait protein konsantrasyonları.....	56
Tablo 4.2:	MASCOT peptid kütle parmakizi tarama sonuçları.....	72

SEMBOL LİSTESİ

2-DE	: İki Boyutlu Jel Elektroforezi (“2-Dimensional Gel Electrophoresis”)
α BC	: α -B-kristalin
ACN	: Asetonitril
AcOH	: Asetik asit
ANOVA	: Varyans analizi (“analysis of variance”)
Apaf-1	: Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (“Apoptotic protease activating factor-1”)
APS	: Amonyum persülfat
ATP	: Adenozin trifosfat
bFGF	: Fibroblast büyüme faktörü (“Basic fibroblast growth factor”)
BSA	: Sığır serum albumini (“Bovine Serum Albumin”)
CDDP	: “Cisplatin”
CHAPS	: 3-[(3-kolamidopropil) dimetilamino]-1-propan sulfonat
CHCA	: α -siyano-4-hidroksisinnamik asit
CJD	: Creutzfeldt–Jakob hastalığı
dATP	: Deoksiadenozin trifosfat
DMEM/F12 HAM	: “Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium / Nutrient Mixture F-12 HAM”
DMSO	: Dimetilsülfoksit
Dox	: “Doxorubicine”
DTT	: Ditiotreitol
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
EGF	: Epidermal büyüme faktörü (“Epidermal Growth Factor”)
EGFR	: Epidermal büyüme faktörü reseptörü (“Epidermal Growth Factor Receptor”)
EtOH	: Etanol
FBS	: Fetal sığır serumu (“Fetal Bovine Serum”)
Grp78	: Glukoz-düzenleyici protein 78 (“Glucose Regulated Protein 78”, BiP)
GSH	: Glutasyon

H ₃ PO ₄	: Fosforik asit
Hap	: Hsc70-aksesuar proteini (“Hsc70-accessory protein”)
HCl	: Hidroklorik asit
Hip	: Hsc70-etkileşimli protein (“Hsp70-interacting protein”)
HO-1	: Hem oksijenaz
Hop	: Hsc70-düzenleyici protein (“Hsp70-organizing protein”)
HRPO	: Yaban turpu peroksidazı
Hsc	: Isı şoku kognatı (akrabası) (“Heat shock cognate”)
HSE	: Isı şoku elementi (“Heat shock element”)
HSF	: Isı şoku transkripsiyon faktörü (“Heat shock factor”)
Hsp	: Isı şoku proteini (“Heat shock protein”)
IC ₅₀	: Canlı hücre sayısını %50 düşüren ekstre konsantrasyonu
IL-1	: İnterlökin
Isı şoku	: Yüksek sıcaklık (42°C) ile strese sokulan grup
Kontrol	: 37°C sıcaklıkta tutulan kontrol grubu
MALDI-TOF MS	: Matriks destekli lazer dezorpsiyon/iyonizasyon-uçuş süresi kütle spektrometrisi (“Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry”)
MAPK	: Mitojen tarafından aktive edilen protein kinaz (“Mitogen-Activated Protein Kinase”)
MeOH	: Metanol
ML I	: Lektin I (Viscumin)
ML II	: Lektin II
ML III	: Lektin III
ML IV	: Lektin IV (ViscalbCBA)
mtHsp75	: Mitokondriyal ısı şoku proteini (“mitochondrial 75-kDa heat shock protein”)
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazolyum)
NF-κB	: Nükleer faktör kappa B (“Nuclear Factor kappa B”)
NH ₄ HCO ₃	: Amonyum bikarbonat
PBS	: “Dulbecco’s Phosphate Buffered Saline”
PDTC	: Pirolidin ditiyokarbamat

Phen	: 1,10-fenantrolin
pI	: İzoelektrik nokta
PKC	: Protein kinaz C
PMSF	: Fenilmetilsülfonil florür
PVDF	: Polivinilidin diflorür
ROS	: Reaktif oksijen türleri (“Reactive Oxygen Species”)
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	: Denatüre Jel Elektforezi (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektforezi)
TFA	: Trifloroasetik asit
TNF	: Tümör nekroz faktörü (“Tumor Necrosis Factor”)
VE	: <i>Viscum</i> ekstresi uygulanmış grup
VE+Isı şoku	: <i>Viscum</i> ekstresi ve yüksek sıcaklık (42°C) uygulaması yapılan grup
VT 1-PS	: Viskotoksin 1-PS
VT A1	: Viskotoksin A1
VT A2	: Viskotoksin A2
VT A3	: Viskotoksin A3
VT B	: Viskotoksin B

ÖZET

Viscum album EKSTRESİNİN C6 SIÇAN GLİOMA HÜCRELERİNDE STRES PROTEİNLERİNİN ANLATIMI ÜZERİNE ETKİSİ

Pek çok kanser türünde olduğu gibi, beyin tümörlerinde de bazı stres proteinlerinin anlatımında artış olduğu bilinmektedir. Özellikle Hsp27 ve Hsp70'deki bu artış, kanser hücrelerini tedaviye daha dirençli hale getirmektedir. Son yıllarda 14-3-3 proteininin bazı formlarının da çeşitli kanser türlerinde benzer bir etki gösterdiği bulunmuş ve bu nedenle 14-3-3 proteinleri de stres proteini olarak kabul edilmişlerdir. Stres proteinlerinin anlatımının baskılanması tedavi sürecine olumlu katkı sağladığından, bu tip proteinler yeni ilaç geliştirme çalışmalarında hedef haline gelmiştir.

Bazı antioksidanların Hsp anlatımını baskıladığı bilinmektedir. Bu bağlamda, kanser tedavisinde destekleyici olarak kullanılan *Viscum album* bitkisinin de benzer bir etki gösterme potansiyeli bulunmaktadır. Bu yarı parazit bitkinin, ıhlamur ağacı üzerinden toplanmış alttürü (*V. album* ssp. *album*) metanolde çözünen antioksidanlar açısından oldukça zengindir.

Bu çalışmanın ana hedefi, *V. album* ssp. *album* metanol ekstresinin, beyin tümörleri modeli olarak kullanılan C6 sıçan glioma hücrelerindeki stres proteinlerinin anlatımı üzerine etkisini belirlemek ve bu bitkinin kanser tedavisinde kullanımına ilişkin moleküler deliller elde etmektir. Çalışmada öncelikle, beyin tümörlerinde anlatımı artan Hsp27, Hsp70 ve 14-3-3 stres proteinleri araştırılmıştır.

Çalışmanın ilk aşamasında, metanol ekstresinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi incelenmiştir. Sitotoksikite analizlerinin sonuçlarına göre, hücreler üzerinde herhangi bir toksik ya da proliferatif etki göstermeyen ekstre konsantrasyonunun 100 µg/ml olduğu bulunmuş ve çalışmanın her aşamasında hücrelere, bu dozda ekstre uygulanmıştır. Ekstre uygulamasının çözünebilir protein profilini nasıl etkilediği 1- ve 2-boyutlu elektroforez (1- ve 2-DE) teknikleriyle ortaya konulmuştur. Tek boyutlu jellerde ayrıştırılmış proteinler, Western blot tekniği ile membrana aktararak, Hsp27, Hsp70 ve 14-3-3 proteinlerine özgü antikorlarla işleme sokulmuştur. Bu analiz sonuçlarına göre, *Viscum album* ekstresi yüksek sıcaklıkla indüklenen 14-3-3 ε, γ ve η formlarının anlatımını etkilememekte, Hsp27 ile 14-3-3 β ve ζ formlarının anlatımlarını indirgemekte ve Hsp70 anlatımını indüklemektedir.

2-DE ile ayrıştırılan proteinler, gümüş nitrata boyanarak jel görüntüleme sistemi aracılığıyla karşılaştırılmıştır. Değişik örneklerde bazı farklılıklar gösteren yaklaşık 700 spot belirlenmiştir. Çalışmalar hedef stres proteinlerine odaklanılarak sürdürülmüştür. MALDI-TOF MS analizi ile uyumlu boya ile boyanmış 2-D jellerden kesilen toplam 20 spottan 13 tanesi MASCOT veri tabanında eşleştirilmiştir. Bu 13 proteine ait peptid kütle parmakizi spektrumları, Mowse skorları ve olası dizi eşleşme sonuçları birlikte değerlendirildiğinde, ısı şoku ile indüklenen 5 proteinin sıçanlardaki Hsp70'lerle eşleştiği gözlenmiştir. Bu proteinler Grp75 prekürsörü, Hsp72-ps1 (Hsp70), Hsc70, Hsc71 ve mitokondriyel Grp75'tir. Kalitatif veriler sHSP ailesinin bir üyesi olan

beta-kristalin A1'in de indüklendiğine işaret etse de, bu protein için elde edilen Mowse skoru oldukça düşüktür.

Sonuç olarak, *Viscum album* metanol ekstresinin, beyin tümörlerinde anlatımı belirgin şekilde artan stres proteinlerinden özellikle Hsp27, 14-3-3 β ve 14-3-3 ζ 'yı baskılamak amacıyla kullanılabilme potansiyeli olduğu anlaşılmıştır. Bununla birlikte Hsp70 indüksiyonu dikkate alınmalıdır.

Bu çalışmada elde edilen veriler, *Viscum album* metanol ekstresinin kimyasal içeriği ve etkiye mekanizmasına ilişkin yeni araştırmaların önünü açmıştır.

SUMMARY

EFFECT OF *Viscum album* EXTRACT ON THE EXPRESSION OF STRESS PROTEINS IN C6 RAT GLIOMA CELLS

It is known that expression of some stress proteins are elevated in brain tumors, as in many cancer types. Especially, the increase in the expression of Hsp27 and Hsp70 make the cancer cells more resistant to the treatment. In recent years, it has been found that some forms of 14-3-3 protein have also similar effect on various cancer types and therefore, 14-3-3 proteins are approved as stress proteins. This type of proteins become targets in new drug development studies since suppressing the expression of stress proteins supports the treatment process.

It is known that some antioxidants suppress Hsp expression. In this sense, *Viscum album* that is used as a supplement in cancer treatment, might have a potential of showing a similar effect. The subspecies of this semiparasitic plant, which was collected from lime trees (*V. album* ssp. *album*) is very rich regard to methanol soluble antioxidants.

The main purpose of this study is to determine the effect of the methanolic extract of *V. album* ssp. *album* on the C6 rat glioma cells, which are used as a model of brain tumors and to achieve some molecular evidences related to the usage of this plant in cancer treatment. Primarily, Hsp27, Hsp70 and 14-3-3 proteins, those expression levels are elevated in brain tumors were investigated in this study.

In the first stage of the study, the effect of methanolic extract on the cell survival was examined. According to the results of cytotoxicity analysis, the concentration that show neither a cytotoxic nor a proliferative effect on the cells was found as 100 µg/ml and this dose of extract was applied to the cells on every stage of the study. The effect of the extract application on the soluble protein profile was exhibited by using 1- and 2-dimensional electrophoresis (1- and 2-DE) techniques. The proteins separated on 1-D gels were transferred to membrane using Western blotting technique and were reacted with the antibodies that are specific to the Hsp27, Hsp70 and 14-3-3 proteins. According to the results of this analyses, *Viscum album* extract does not effect the expression levels of 14-3-3 ε, γ, and η forms that are induced by high temperature; reduces the expression levels of Hsp27 and 14-3-3 β and ζ forms, and induces the expression level of Hsp 70.

The proteins separated with 2-DE, were stained with silver nitrate and compared by using gel documentation system. Nearly 700 spots were detected in different samples, with slight dissimilarities. Studies were carried on by focusing target stress proteins. Only the thirteen spots of total 20 spots cut from 2-D gels, stained by dyes compatible with MALDI-TOF MS analysis, were matched in MASCOT database. By the overall assessment of the results of the peptide mass fingerprint spectra, Mowse scores and probable sequence matches belonging to these 13 proteins, 5 proteins induced by heat shock corresponded to Hsp70s in rats. These proteins are, precursor of Grp75, Hsp72-ps1 (Hsp70), Hsc70, Hsc71 and mitochondrial Grp75. Qualitative data

showed that beta-kristallin A1, a member of sHSP family, was also induced, but the Mowse score of this protein was quite low.

In conclusion, it seems that methanolic extract of *Viscum album* might have a potential in using to suppress Hsp27, 14-3-3 β and 14-3-3 ζ stress proteins, those expression levels are highly elevated in brain tumors. However, Hsp70 induction should be considered.

Data obtained in this study, will lead to new studies on the chemical composition and action mechanism of *Viscum album* methanol extract.

1. GİRİŞ

Dünya üzerinde yaşayan tüm canlılar strese maruz kalırlar. Stres (ısı şoku, oksidatif/iskemik stres, ağır metaller, radyasyon ve çevresel kirleticiler, bazı metabolik ürünler, amino asit analogları vb.) hücrelerde birçok molekülü hasara uğratarken, bazı proteinlerin anlatımlarını indükler. Bu proteinler **stres proteinleri** ya da **ısı şoku proteinleri** (“heat shock protein”, Hsp) olarak adlandırılır ve başta proteinler olmak üzere, çeşitli moleküllerde meydana gelebilecek hasarları önleyici bir savunma mekanizması oluştururlar. Hsp’ler sitoplazmik ağın en büyük bileşenlerinden biridir. Birbirleriyle, diğer proteinlerle ve sitoplazmik ağın tüm bileşenleri ile kovalent olmayan bağlar kurarak dinamik kompleksler oluştururlar (Papp ve diğ., 2003). Bu proteinler, kararlı yapıda olmayan proteinlere ya da denatüre olacak proteinlere geri dönüşümlü bir şekilde bağlanarak iş görürler. Hücrede indüklenebilir formların yanı sıra, normal şartlar altında da bulunan ve **ısı şoku kognatları (akrabaları)** (“heat shock cognate”, Hsc) olarak adlandırılan formlar da mevcuttur. Bazı Hsp’ler özel organellerde konumlanmıştır ve çok sayıda kopyaları vardır. Birçoğu, fonksiyonel olarak hücresel şaperon aktivitesi gösterir. Şaperonlar, proteinlerin fonksiyonel olarak aktif üç boyutlu yapılarını kazanmalarına ve hücrenin çeşitli kompartmanları arasında taşınmalarına yardımcı olan, işe yaramayan veya gerek kalmayan proteinleri ise yıkılmaları için proteazomlara yönlendiren proteinlerdir (Alberts ve diğ., 2002).

Hsp’ler molekül ağırlıklarına, yapılarına ve fonksiyonlarına göre farklı ailelere ayrılmışlardır (Tablo 1.1).

Tablo 1.1. Hsp aileleri ve fonksiyonları*

Aile	En önemli fonksiyonları	Kaynaklar
HSP100	Protein birliklerini önleyici, ısıya dayanıklılık	Benjamin ve McMillan, 1998
HSP90	Sinyal transdüksiyonu, yanlış katlanmış proteinlerin düzeltilmesi	Pratt ve Toft, 2003
HSP70	Protein katlanması ve zarlardan taşınma	Papp ve diğ., 2003
HSP60	Protein katlanması (ökaryotik sitoplazmada Sınırlı substrat)	Papp ve diğ., 2003
HSP40	Protein katlanması, Hsp70'e eşlik (ko-şaperon)	Benjamin ve McMillan, 1998
sHSP	Yanlış katlanmış proteinlerin düzeltilmesi, ısıya dayanıklılık, gözde yapısal protein	Imura ve diğ., 1999

* Aile adındaki sayısal değerler ~ molekül ağırlığını (kDa) göstermektedir.

Hsp'lerin hücre çevriminde ve çeşitli hastalıkların (özellikle kanser ve nörodejeneratif hastalıkların) gelişiminde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Çeşitli kimyasal ajanların ve sitotoksik ilaçların, organizmalardaki bazı Hsp'lerin sentezini indüklediği bilinmektedir. Bunlar arasında oksidasyon ajanları, enerji metabolizmasını etkileyen ilaçlar, sülfidril bileşikler, kelatör ilaçlar, amino asit analogları, transkripsiyon ve translasyon inhibitörleri, steroid hormonlar, teratojenler, etanol vb. sayılabilir. Glukoz azlığının da benzer bir etki gösterdiği bildirilmektedir (Kiang ve Tsokos, 1998; Lord-Fontaine ve Averill-Bates, 2002).

Günümüzde kanserli hücrelerle yapılan çalışmalarda çeşitli stres proteinlerinin anlatımlarında farklılıklar olduğu saptanmış ve bu proteinlerin hem teşhiste hem de tedavinin izlenmesinde "biyomarker" olarak kullanılabilecekleri bildirilmiştir (Oesterreich ve diğ., 1993; Kai ve diğ., 2003; Capello ve diğ., 2003a; Ryu ve diğ., 2003). Yapılan çalışmalarda kolon kanserinde Hsp105'in (Kai ve diğ., 2003), hepatoselüler karsinomada Hsp70'in (Takashima ve diğ., 2003) kolorektal karsinogenezde Hsp60'ın (Capello ve diğ., 2003a), gastrik kanserde Hsp27'nin anlatımının arttığı belirlenmiştir (Ryu ve diğ., 2003).

İnsan meme kanseri hücre hatlarında, sHsp'lerden biri olan Hsp27'nin ilaç direnci ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Hsp27'nin anlatımındaki artışın, bu hücrelerde kemoterapik bir ajan olarak kullanılan Doksorubisin (Dox)'e karşı direnci 3 kat artırdığı gözlenmiştir (Oesterreich ve diğ., 1993). İnsan meme kanseri hücrelerinde yapılan diğer bir

çalışmada, Hsp70'in anti-kanser ilaç direnciyle ilişkili olduğu bulunmuştur. Tümörogenik meme kanseri hücrelerinin hayatta kalması için Hsp70 anlatımının artması gerektiği ve tümöre-özel ölüm programının ancak Hsp70'in azalmasıyla birlikte devreye girdiği belirlenmiştir (Nylandsted ve diğ., 2000).

İnsan ovaryum tümör hücre hattında, özellikle Hsp27'nin hücrelerin "cisplatin"(CDDP) direnci ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu ilacın uzun süre kullanımı kanser hücrelerinin direnç geliştirmesine neden olmaktadır. Bu tip dirençli hücrelerde yapılan analizler Hsp27 ve Hsp70'in anlatımının arttığını, dolayısıyla bu Hsp'lerin CDDP direnç mekanizmasında önemli olduklarını ortaya koymuştur (Yamamoto ve diğ., 2001). Ayrıca indüklenebilir Hsp70'in kanser hücrelerinin gama radyasyonuna karşı direncinde de etkili olduğu saptanmıştır (Lee ve diğ., 2001).

Hsp27 anlatımdaki artışın ksenobiyotiklere karşı hücrede bir koruma mekanizması olarak iş gördüğü de öne sürülmektedir (Katsuki ve diğ., 2004). Ayrıca, Hsp'lerin beyin, kalp ve diğer organları iskemik zararlardan belirgin bir şekilde koruduğu bildirilmektedir (Benjamin ve Mc Millan, 1998; Snoeckx ve diğ., 2001).

Bu bilgiler ışığında, kanser hücrelerinin kemoterapik veya radyoterapik direncini artıran Hsp'lerin anlatımlarını azaltmak, tedaviye ilişkin stratejiler geliştiren araştırmacıların hedefi haline gelmiştir. Bu yaklaşımla yürütülen çalışmalardan birinde, ısı stresine maruz bırakılan HL-60 hücre hattında, antioksidanlar [pirolidin ditiyokarbamat (PDTC) ve 1,10-fenantrolin (Phen)] varlığında Hsp27 ve Hsp72'nin indüksiyonunun azaldığı saptanmıştır (Gorman ve diğ., 1999). Diğer bir çalışmada bir bitki flavonoidi olan kersetinin, prostat kanseri hücrelerinde ısıyla indüklenen Hsp70 anlatımını baskıladığı gösterilmiştir (Kagaya ve diğ., 2000; Asea ve diğ., 2001; Jones ve diğ., 2004).

Jeremias ve diğ. (2004) tarafından glioblastoma multiform hücreleri üzerinde yapılan başka bir çalışmada, antioksidan etkisi bilinen, aynı zamanda yeni bir potansiyel terapötik olarak kanser hücrelerine uygulanan betulinik asitin, sitotoksik etki gösteren ilaçlardan (CDDP, Dox vb.) daha etkili olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla çeşitli antioksidanların kanser tedavisinde destekleyici olarak kullanılma potansiyelleri bulunmaktadır ve bunların bir kısmı Hsp anlatımını baskılayarak etki göstermektedir.

Kanserle ve nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili olarak anlatımı artan diğer bir protein grubu da 14-3-3 proteinleridir. 14-3-3 proteininin beyinde 5 farklı izoformu ($\beta, \epsilon, \gamma, \eta$ ve ζ), T hücreleri ve epitel hücrelerinde ise 2 izoformu (τ ve σ) bulunmaktadır. 14-3-3 protein ailesi fizyolojik ve patolojik koşullar altında farklı hücresel cevapların düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. 14-3-3 izoformlarının Creutzfeldt–Jakob hastalığı (CJD) (Mackie ve Aitken, 2005), Alzheimer (Layfield ve diğ., 1996) ve Parkinson (Ostrerova ve diğ., 1999) gibi nörodejeneratif hastalıklarla ilişkileri olduğu ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca 14-3-3 ζ izoformunun mide, ağız ve akciğer kanserinde aşırı anlatım yaptığı ve tümör gelişiminde direnç sağladığı bilinmektedir (Jang ve diğ., 2004; Matta ve diğ., 2007; Li ve diğ., 2008). Akciğer kanseri hücrelerinde yapılan diğer bir çalışmada, özellikle 14-3-3 ζ izoformunun aşırı anlatım yapmasının radyoterapinin etkinliğini azalttığı, bu proteinlerin baskılandığı durumlarda ise terapi etkinliğinin arttığı ortaya konulmuştur (Qi ve Martinez, 2003). Benzer bir çalışmada aynı izoformun anlatımındaki azalmanın, akciğer kanserinde kemoterapik bir ajan olarak kullanılan CDDP'nin etkinliğini artırdığı gösterilmiştir (Fan ve diğ., 2007). *Drosophila* hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada, ısı stresi sonrasında 14-3-3 ζ proteinlerinin anlatımlarının arttığı ve apositokrom c ile proteinin etkileşimde olduğu bilinen bu proteinin yokluğunda, sitozolde yüksek miktarda apositokrom c agregatlarının oluştuğu gösterilmiştir. Bu çalışma neticesinde 14-3-3 proteinleri de stres proteini olarak kabul görmüştür (Yano ve diğ., 2006).

Günümüzde sentetik ilaçların yanı sıra, çok sayıda doğal ürün, destekleyici (tamamlayıcı) olarak kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Bu tip doğal droglardan biri de *Viscum album* (ökseotu) (“mistletoe”) dur. Ülkemizde ve dünyada hemen hemen her bölgede, ağaçların ve çalıların üzerinde yarı parazit olarak yaşayan *Viscum album* bitkisi çok eski tarihlerden beri halk arasında çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Bu bitkinin antiepileptik, antikanserojen, antiseptik, antispazmodik, diüretik, emetik, kanamayı durdurucu, sindirim kolaylaştırıcı, tansiyon düşürücü, vazodilatör etkileri, (Baytop, 1999) uzun süredir bilinmekte ve kanser, kalp yetmezliği, astım, arterioskleroz, histeri, epilepsi, spazm ve ülser gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Duke, 1987). Bitkinin antidiyabetik (Gray ve Flatt, 1999), antioksidan (Önay-Uçar ve diğ., 2006), apoptozu indüklemeye (Büssing and Schietzel, 1999), antiviral (Karagöz ve diğ., 2003), doğal öldürücü (“Natural Killer”, NK) (Hamprecht ve diğ.,

1987) ve antitümör aktivitelerinin (Jurin ve diğ., 1993) yanı sıra, UV ışınlarına karşı DNA'yı koruma (Kovacs ve diğ., 1991), inflamatuvar ve immünstimulan özellikleri (Timoshenko ve Gabius, 1993) çeşitli çalışmalarla ortaya konulmuştur. Bitkinin ticari olarak hazırlanmış çeşitli ekstreleri, özellikle doğal ilaç kullanımının yasal olduğu İsviçre ve Almanya'da tamamlayıcı tıbbın ayrılmaz bir parçasıdır (Ernst ve diğ., 2003; Kienle ve diğ., 2009). Bu ekstrelerden bazıları Iscador[®], Helixor[®], Plenesol[®], Vysorel[®] ve Eurixor[®] isimleri ile satılmakta ve pek çoğu bilimsel araştırmalarda yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Kunze ve diğ., 1997; Molassiotis ve diğ., 2006; Bar-Sela ve diğ., 2006; Grossarth-Maticek ve Ziegler, 2007). *Viscum album*'un içeriğinde bulunan lektinler, tioninler (viskotoksinler), alkaloidler, polisakkaritler, flavonoller ve mumlar biyoaktiviteleri bakımından araştırılmıştır (Franz ve diğ., 1981; Stein ve diğ., 1999b; Büssing ve diğ., 1998; Büssing ve Schietzel, 1999; Jordan ve Wagner, 1986).

Viscum album'un antikanser aktivitesi ile ilgili çalışmalar ya ekstrenin farklı kanser hücre hatları üzerine uygulanması ya da doğrudan kanser hastalarına enjekte edilmesi yoluyla yürütülmektedir (Knöpfl-Sidler ve diğ., 2005; Pyrme ve diğ., 2007; Kienle ve diğ., 2009). Ovaryum ve meme kanserli hastalar üzerinde yapılan klinik çalışmalar, farklı konakçı ağaçlar üzerinde yaşayan *Viscum album* bitkilerinden hazırlanmış ticari ekstrelerin tedavide etkili olduğunu ortaya koymuştur (Kienle ve diğ., 2009).

Hem çocuklar hem de yetişkinler arasında ölüme yol açan kanser türlerinden biri de beyin tümörleridir. Merkezi sinir sistemi tümörlerinin en büyük grubunu, glial hücrelerden gelişen ve genel olarak **glioma** olarak adlandırılan beyin tümörleri oluşturur. Gliomaların en malignant tipi, **glioblastoma multiform** olarak adlandırılır [4. derece/Dünya Sağlık Örgütü(WHO)]. Primer beyin tümörü tiplerinden biri olan glioma, yüksek derecede damarlanma gösteren ve çok nadir iyileşebilen bir tümör tipidir (Zhang ve diğ., 2003). Glioblastomaların; cerrahi müdahale, radyoterapi ve kemoterapi ile tedavi edilmeleri zordur ve tedavi sonrasında da yaşam süresinin 5 yıldan fazla olduğu görülmemiştir (Oghaki ve Kleihues, 2005).

Kanser araştırmalarında, özellikle beyin tümörlerindeki temel moleküler mekanizmaların aydınlatılmasına ilişkin çalışmalarda tercih edilen modellerden biri de C6 sıçan glioma hücreleridir (Ozar, 2000; Altıok ve diğ., 2006). Pekçok doğal ve

sentetik ilacın bu hücreler üzerindeki etkisi araştırılmış (Barba ve diğ., 1999; Ozar, 2000; Altıok ve diğ., 2006), ancak *Viscum* ekstrelerinin etkisini inceleyen hiçbir çalışmaya rastlanmamıştır.

Beyin tümörleri ile stres proteinleri arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmak amacıyla da bugüne kadar birçok çalışma yapılmıştır (Graner ve Bigger, 2005; Graner ve diğ., 2007). Farklı birçok glioblastoma tiplerinde, Hsp27 anlatımının, malignant olmayan beyin dokularına göre daha fazla olduğu görülmüş ve Hsp27 düzeyinin, glial tümörün malignansi derecesi ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur (Zhang ve diğ., 2003). C6 hücrelerindeki Hsp proteinleri ile ilgili bir çalışmada, ısı stresiyle özellikle hem oksijenaz (HO-1) ve Hsp70'in anlatımının arttığı gösterilmiştir (Zhang ve diğ., 2001). C6'larda Hsp anlatımını baskılayan doğal ya da sentetik bir ilaç adayı bugüne kadar hiç tanımlanmamıştır.

Bu çalışmanın amacı, antitümör aktivitesi çeşitli *in vivo* ve *in vitro* tekniklerle ortaya konulmuş olan *Viscum album* ekstresinin, C6 sıçan glioma hücreleri üzerindeki etkisini Hsp anlatımıyla ilişkili olarak araştırmaktır. Çalışma kapsamında farklı konsantrasyonlarda ekstre uygulanmış C6 glioma hücrelerinde, anlatımı değişecek Hsp'lerin belirlenmesine yönelik proteomik analizler gerçekleştirilecektir.

Çalışmanın ilk aşamasında *Viscum album* ekstresinin, C6 glioma hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazolyum)] analizi ile belirlenecektir. Bu amaçla besiyerinde ekstre içermeyen, çeşitli konsantrasyonlarda ekstre içeren ve ekstrenin hazırlandığı çözücüyü (dimetil sülfoksit, DMSO) içeren gruplar oluşturulacaktır. Deneylerde sitotoksosite analizleriyle belirlenen, toksik olmayan ekstre konsantrasyonu kullanılacaktır. C6 glioma hücrelerindeki stres proteinleri ısı stresi ile indüklenecektir. Ekstre uygulamasıyla değişim gösteren Hsp27, Hsp70 ve 14-3-3 proteininin anlatımları çeşitli moleküler yöntemler kullanılarak belirlenecektir. Hücrelerin çözünebilir proteinleri 1- ve 2-boyutlu jel elektroforezi ile ayrıştırılacak, protein profillerindeki farklılıklar jel görüntüleme ve kütle spektrometrisi (MALDI-TOF MS: "Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry", Matriks destekli lazer dezorpsiyon/iyonizasyon-uçuş süresi kütle spektrometrisi) yöntemleriyle araştırılacaktır. Anlatım düzeyinde değişim saptanan

proteinler biyoinformatik analizlerle değerlendirilecektir. İlgilenilen proteinler “Western Blotlama” tekniği ile spesifik antikorlarla işaretleterek densitometrik analizlerle miktar karşılaştırmaları yapılacaktır.

Viscum album uygulamasının C6 hücre hattında Hsp’lerin anlatımını nasıl etkilediği önemlidir. Hsp’lerin anlatımlarındaki değişim *Viscum album* ekstresinin antikanser aktivitesi ve bu aktivitenin mekanizması ile ilgili ipuçları verebilir. Hsp anlatımlarının azalmasını sağlayan ekstre hücrelerin apoptoza gitmesini ya da ilaç direncinin azalmasını sağlayabilir. Ekstre C6 glioma hücreleri üzerinde etkili olursa, beyin tümörü tedavisine yeni bir yaklaşım getirebilir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. *Viscum album*

Viscum album L. (ökseotu) ormanlık alanlarda çeşitli ağaçların ve çalıların üzerinde yarı parazit olarak yaşayan odunsu bir bitkidir. Dallar üzerinde kümeler oluşturur. Her mevsim yeşil olan bu bitki dioik ve entemogamdır. Meyveleri yaklaşık 1 cm çapında, küre veya armut şeklinde, etli, beyazımsı, şeffaf ve tek tohumludur. Hava şartlarına bağlı olarak değişik zamanlarda çiçek açabilir (Ergun ve diğ., 1994). Bitkinin emeçleri konakçı ağacın ksilemine kadar ulaşır. Konakçıdan su ve mineralleri alırken, fotosentez yaparak kendi karbohidratlarını üretir.

Avrupa'da "European mistletoe", Türkiye'de "ökseotu" olarak isimlendirilen *Viscum album* L. bitkisinin üç alt türü bulunmaktadır (Becker, 1986; Ergun ve diğ., 1994):

1. Çoğunlukla yaprak döken dioik ağaçlar üzerinde yaşayan *Viscum album* L. ssp. *album* [*Viscum album* L. var. *platyspermum* R.Keller]
2. Abies türleri üzerinde yaşayan *Viscum album* L. ssp. *abietis* (Wiesb.) Abromeit [*Viscum laxum* Boiss. et Reuter var. *abietis* (Wiesb.) Hayek]
3. Çoğunlukla Pinus türleri üzerinde yaşayan *Viscum album* L. ssp. *austriacum* (Wiesb.) Vollmann [*Viscum austriacum* Wiesb.; *Viscum laxum* Boiss. et Reuter var. *pini* (Wiesb.) Hayek; *Viscum album* L ssp. *laxum* Fiex]

Viscum türleri uzun yıllar Loranthaceae ailesinin üyeleri arasında sayılmış, ancak sonraları Viscaceae ailesinde yer almaları gerektiği anlaşılmıştır (Franz ve diğ., 1981; Becker, 1986). Bu bitki Kuzey Avrupa'dan, Kuzeybatı Afrika'ya, Avrupa'dan Doğu'ya, Güneybatı ve Orta Asya'dan Japonya'ya kadar geniş bir alanda yaşamaktadır (Hegi, 1981). Türkiye'de de çok geniş bir dağılım göstermekte ve bütün bölgelerde yetişmektedir (Miller, 1982; Ergun ve diğ., 1994).

Bitkinin, tüm dünyada en genel olarak bilinen adı “mistletoe”dur. Ayrıca "Korean mistletoe", "Californian mistletoe" olarak adlandırılan türler de rapor edilmiştir (Khwaja ve diğ., 1980). “Mistletoe” kelimesi, her derde deva anlamına gelen bir Keltik kelimesinden türetilmiştir. Türkçede kullanılan “ökseotu” ismi ise, eski zamanlarda bu bitkinin meyvelerindeki yapışkan maddeden (vissin) yapılan ve kuş tuzağı olarak kullanılan ökseden gelmektedir (Baytop, 1999). Tohumlar, etli ve yumuşak ökseotu meyvelerini yiyen kuşların dışkılarıyla ağaç dalları üzerine düşerek yapışmakta ve ortamdaki ürik asit sayesinde çimlenip gelişmektedir (Becker, 1986).

Ökseotu bitkisi insanlık tarihi kadar eski bir geçmişe sahiptir. MS 500 yılına kadar Kuzey Avrupa’da yaşayan bazı soylu ve aydınlardan seçilen Druidler’in özellikle meşe ağacını infekte eden ökseotlarına karşı büyük bir saygı duydukları bilinmektedir (Schor, 2006). Ökseotlarına verilen bu önem, tarihsel gelişim içinde bir Hıristiyan geleneği olan, Noel’de kapı girişlerine ökseotu asma şekline dönüşmüştür. Çok eski çağlardan itibaren birçok tıp bilgini tarafından kullanıldığı bildirilen ökseotu, 20. yüzyılın başlarında, İsviçreli tıp doktoru Rudolf Steiner’in geliştirdiği alternatif (antroposofikal) tıp uygulamalarında da geniş yer bulmuştur (Franz, 1985). Alışılmamış yöntemlerin kullanıldığı bu tedavi sisteminde, Steiner hazırladığı ökseotu ekstralarını hastalarına enjekte etmiştir. Steiner’in ökseotunun bilimsel araştırmalarda kullanılmasına öncülük ettiği kabul edilmektedir (Schor, 2006).

V. album bitkisi çok eski tarihlerden beri halk arasında çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Bu bitkinin antiepileptik, antikanserojen, antiseptik, antispazmodik, diüretik, emetik, kanamayı durdurucu, sindirim kolaylaştırıcı, tansiyon düşürücü, vazodilatör etkileri (Baytop, 1999) uzun süredir bilinmekte ve özellikle yaprakları kanser, kalp yetmezliği, astım, arterioskleroz, histeri, epilepsi, spazm ve ülser gibi hastalıkların tedavisinde şifalı ot olarak kullanılmaktadır (Duke, 1987). Ayrıca Almanya, Avusturya ve İsviçre’deki çeşitli firmalar tarafından hazırlanan çeşitli ticari ekstralar tamamlayıcı tıpta tedavi amacıyla kullanılmak üzere tüm dünyaya satılmaktadır. Bu ticari ürünlerin bir kısmı pek çok araştırmaya konu olmuş ve aktiviteleri bilim çevrelerince de desteklenmiştir (Kunze ve diğ., 1997; Maier ve Fiebig, 2002; Molassiotis ve diğ., 2006; Bar-Sela ve diğ., 2006; Grossarth-Maticek ve Ziegler, 2007; Pyrme ve diğ., 2007). Ekstrenin hazırlanma şekli ve bitkinin üzerinde yaşadığı

konakçı ağacın türüne göre bu ticari ekstrelerin kimyasal içerik açısından farklılık gösterdiği vurgulanmaktadır (Büssing ve diğ., 1998; Kienle ve diğ., 2009). Bilimsel çalışmalara konu olan, özel işlemlerden geçirilerek hazırlanmış, uluslararası patentli en tanınmış *Viscum album* ekstreleri Iscador[®], Helixor[®], Plenesol[®], Isorel[®], Vysorel[®] ve Eurixor[®] dur (Kunze ve diğ., 1997).

Viscum türlerinden bugüne dek izole edilmiş kimyasal maddeler toplu şekilde Tablo 2.1'de verilmiştir.

Tablo 2.1. *Viscum album* bitkisinden izole edilmiş maddeler

Kimyasal Bileşenler	Kaynaklar
Alkaloitler	Khwaja ve diğ., 1980-1986; Park ve diğ., 1999
Tiramin	Baytop, 1999
Aminoasitler ve türevleri	
Arjinin	Franz, 1985; Duke, 1987
Asparagin	Duke, 1987
Prolin	Franz, 1985
β-Fenilalanin	Duke, 1987
Hidroksilizin	Duke, 1987
Histamin	Duke, 1987
1-Kinürenin	Duke, 1987
Sisteik asit	Duke, 1987
γ-Aminobütirik asit	Duke, 1987
Fenilpropanlar ve glikozitleri	
Fenilpropan	Wagner ve Bladt, 1996; Deliorman ve diğ., 2000b
Kalopanaksin D	Deliorman ve diğ., 1999
Koniferin	Deliorman ve diğ., 1999
Siringin	Duke, 1987; Deliorman ve diğ., 1999- 2000a
Flavonoitler	Wagner ve Bladt, 1996; Deliorman ve diğ., 2000b
Kersetin	Duke, 1987; Deliorman ve diğ., 2000b
Kersetin-3-ramnoz	Duke, 1987
Kersetin-3-arabinoz	Duke, 1987
Lignanlar	Wagner, 1996; Deliorman ve diğ., 2000b
Organik asitler	
Kaffeik asit	Duke, 1987; Wagner ve Bladt, 1996
Klorojenik asit	Wagner ve Bladt, 1996
Miristik asit	Duke, 1987
p-Kumarik asit	Wagner ve Bladt, 1996
Protokateşik asit	Wagner ve Bladt, 1996
Sinapik asit	Duke, 1987; Wagner ve Bladt, 1996
Şikimik asit	Wagner ve Bladt, 1996
Vanillik asit	Wagner ve Bladt, 1996
Proteinler	Peumans ve diğ., 1996; Siegle ve diğ., 2001; Park ve diğ., 1999-2001; Frantz ve diğ., 2000; Lutter ve diğ., 2001
Lektinler	
Viskotoksinler (Tiyoninler)	Büssing ve diğ., 1998-99a; Park ve diğ., 1999; Stein ve diğ., 1999b
Rezinler	Baytop, 1999
Şekerler ve türevleri	
Glukoz, arabinoz, ramnoz	Arda ve diğ., 2003; Duke, 1987
Sukroz	Baillon, 1988
Polisakkaritler	Kuttan ve diğ., 1988; Leneweit ve diğ., 2000; Stein ve diğ., 1999c
Seril alkol	Arda ve diğ., 2003; Duke, 1987
Mannitol	Arda ve diğ., 2003; Duke, 1987
İnositol	Arda ve diğ., 2003; Duke, 1987
Viscumitol (di- <i>O</i> -metil-inositol)	Richter, 1992
1-D-1- <i>O</i> -metil-muko-inositol	Richter ve diğ., 1990
Terpenler ve glikozitleri	
Monoterpen glikozitler	Deliorman ve diğ., 2001a
Triterpenler	
Lupeol	Duke, 1987
Oleonolik asit	Duke, 1987
β-Amirin	Duke, 1987
Vitaminler	
C vitamini	Duke, 1987
α- ve β-karoten	Duke, 1987

V. album türlerinden izole edilmiş ve üzerinde en çok çalışılmış molekül gruplarından biri proteinlerdir. Bitki, sitotoksik etkisi olan 4 tip lektin (glikoprotein) içermektedir: Lektin I (ML I, Viscumin), Lektin II (ML II), Lektin III (ML III) ve Lektin IV (ML IV, ViscalbcBA) (Franz, 1981; Peumans ve diğ., 1996). Avrupa’da satılan ticari ekstrelerin her birinin farklı tipte ve farklı konsantrasyonda lektin içerdiği bilinmektedir. Kanser tedavisinde yardımcı olarak kullanılan bu preparatlar uzun zamandır kanser hastaları üzerinde farklı şekillerde denenmektedir. Özellikle lektinler üzerinde yapılan çalışmalar bu proteinlerin sitotoksik, apoptozu indükleyici ve antianjiyojenik etkilerini ortaya koymuştur (Siegle ve diğ., 2001; Billyy ve Stoika, 2003). Yapılan bir çalışmada, lektin uygulaması yapılan farelerde tümör hücrelerinin %21 oranında azaldığı gösterilmiştir (Pryme ve diğ., 2007). Akciğer tümör hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada, oral yoldan alınan ya da deri altına enjekte edilen ML-1’in tümör metastazını azalttığı ortaya konulmuştur (Kubasova ve diğ., 1998).

Siegle ve diğ. (2001) insan akciğer kanser hattı A549 üzerinde yaptıkları çalışmada, saflaştırılmış lektinler ile standart kanser ilaçlarını (Dox, CDDP ve taksol) birarada kullanmışlar ve bu kombinasyonun hücreler üzerinde daha toksik etki gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Bu uygulama, *V. album* bitkisinin destekleyici tedavide kullanımına yeni bir bakış açısı getirmiştir.

Bitkinin içerdiği diğer bir protein grubu viskotoksinlerin (tiyoninler) ise 5 farklı tipi vardır. Viskotoksin A1 (VT A1), viskotoksin A2 (VT A2), viskotoksin A3 (VT A3), viskotoksin B (VT B) ve viskotoksin 1-PS (VT 1-PS) olarak adlandırılan bu moleküller, sistince zengin, 45-47 amino asitten oluşan ve 3-4 disülfid bağı taşıyan, ~5000 Da molekül ağırlığına sahip polipeptidlerdir. β -Tiyonin ailesinden olan viskotoksinler, lektinlerden çok daha az (~10 kat) sitotoksik olmalarının yanı sıra, sıcaklık ve proteaz etkisiyle bozunmaya karşı da daha dirençlidirler (Jung ve diğ., 1990; Florack ve Stiekema, 1994; Büssing ve diğ., 1998).

Viscum türlerinin kimyasal içeriği, *in vitro* / *in vivo* biyolojik aktiviteleri ve klinik kullanımı konusunda çok sayıda bilimsel çalışma bulunmaktadır. Bugüne kadar bitkinin çeşitli ekstreleri ve bileşenleri ile yapılmış aktivite çalışmaları Tablo 2.2’de özetlenmiştir.

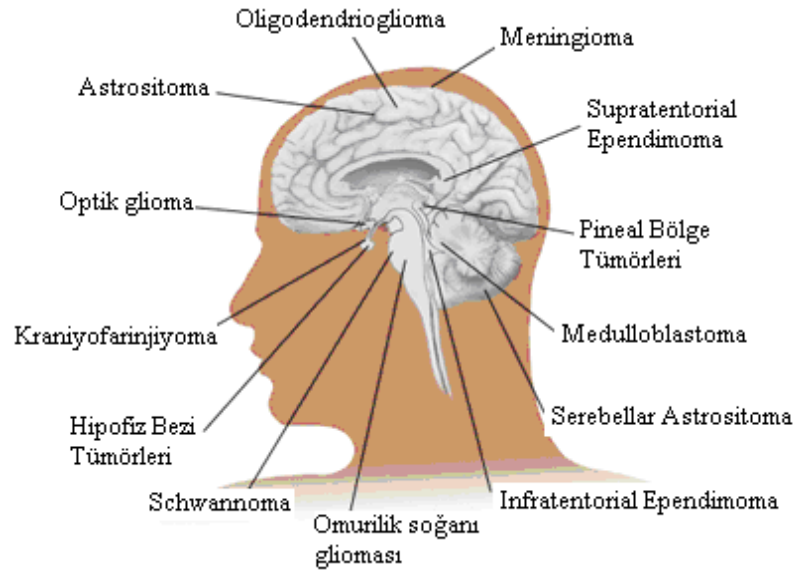
Tablo 2.2. *V. album* bitkisinin kanıtlanmış biyolojik aktiviteleri

Ekstre/bileşen	Aktivite	Kaynaklar
ABNOBAviscum® Alkaloit Iscador® Isorel® Helixor® Lektin Su ekstresi Viskotoksin	Antikanser	Knöpfl-Sidler ve diğ., 2005 Khwaja ve diğ., 1980-1986 Kuttan ve Kuttan, 1992-1993;Knöpfl-Sidler ve diğ., 2005, van Huyen ve diğ.,2002 Ulrich ve Mechelke,1980;Jurin ve diğ.,1993;Zarkovic ve diğ.,2001 Ulrich ve Mechelke, 1980 Jung ve diğ,1990;Park ve diğ, 2001; Siegle ve diğ, 2001 Karkabounas ve diğ., 2000; Mengs ve diğ., 2000 Jung ve diğ., 1990
Butanol, etanol, eter ve petrol eteri ekstreleri	Antimikobakteriyel	Deliorman ve diğ., 2001b
MeOH ekstresi	Antioksidan	Önay-Uçar ve diğ., 2006
EtOH ekstresi Iscador®	Antiviral	Karagöz ve diğ., 2003 Stoss ve diğ., 1999
ABNOBAviscum Iscador® Helixor® Lektin	Apoptoz indükleyici	Büssing ve Scheitzel, 1999 Büssing ve Scheitzel, 1999; van Huyen ve diğ, 2002 Büssing ve Scheitzel, 1999 Büssing ve Scheitzel, 1999; Billyy ve Stoika, 2003
Helixor® Iscador® Polisakkarit	Doğal öldürücü hücreleri indükleyici	Hülßen ve diğ, 1989 Mueller ve diğ., 1989-1990; Hamprechth ve diğ., 1987 Mueller ve diğ., 1990
Su ekstresi	İltihap giderici (inflamator)	Stoss ve diğ., 1999
Eurixor® Helixor® Iscador® Isorel® Lektin Plenosol® Polisakkaritler Su ekstresi Viskotoksin Vysorel®	İmmunmodülatör	Kunze ve diğ., 1997 Kunze ve diğ., 1997 Kovacs ve diğ,1991;Kunze ve diğ.,1997; Büssing, 2006 Jurin ve diğ., 1993 Jung ve diğ., 1990 Kunze ve diğ., 1997 Stein ve diğ., 1999c Başaran ve diğ., 1997 Jung ve diğ., 1990; Stein ve diğ., 1999b Kunze ve diğ., 1997
Helixor® Iscador®	İmmünstimülan	Stein ve diğ., 1999a Kuttan ve Kuttan, 1992
Su ekstresi	İnsülin salgılatıcı	Gray ve Flatt, 1999
Iscador®	Kemoterapi ve radyasyonun zararlı etkisini azaltıcı	Kuttan ve Kuttan, 1993
Helixor® Iscador® Lektinler Su ekstresi	Sitotoksik	Doser ve diğ., 1989 Jung ve diğ,1990; Khwaja ve diğ.,1986; Kuttan ve Kuttan,1992; Kovacs ve diğ, 1991 Doser ve diğ.,1989; Park ve diğ,1999; Peumans ve diğ., 1996; Frantz ve diğ., 2000 Park ve diğ, 1999

® işaretli olanlar ticari ekstrelerdir.

2.2. C6 SIÇAN GLİOMA HÜCRELERİ

Beyin tümörleri, hem çocuklar hem de yetişkinler arasında ölüme neden olan kanser türlerinden biridir. Farklı tipte birçok beyin tümörü vardır. Bunlar genellikle tümörü oluşturan hücre tipi ya da tümörün meydana geldiği beyin bölgesine göre sınıflandırılmaktadır. Bu sınıflandırmalara göre, en genel beyin tümörleri Şekil 2.1’de görülmektedir.



Şekil 2.1. Beyin tümörlerinin ortaya çıktığı bölgeler ve tümör tipleri
(UAB Health System, <http://www.health.uab.edu/14043>, Ziyaret tarihi: 25 Şubat 2009)

Primer beyin tümörleri vücudun diğer bölgelerinden metastaz yoluyla değil, beyin hücrelerinden kökenlenirler; fakat kendileri merkezi sinir sistemi dışında da yayılım gösterebilir, metastaz yapabilirler (Ozar, 2000). Primer beyin tümörleri iyi huylu (benign) ya da kötü huylu (malignant) olabilirler. İyi huylu beyin tümörleri (örneğin meningiomalar, akustik neuromalar, hipofiz bezi tümörleri) genellikle yavaş bir şekilde büyürler ve beyinde buldukları bölgeye bağlı olarak operasyonla alınabilirler. Glioblastoma ve anaplastik astrositomalar gibi kötü huylu beyin tümörleri ise beyin dokusu üzerinde yayılarak çok hızlı bir şekilde büyürler ve cerrahi müdahale ile tamamen alınmaları mümkün olmayabilir (Oghaki ve Kleihues, 2005; Brandes ve diğ., 2008; Gottardo ve Gajjar, 2008).

Merkezi sinir sistemi tümörlerinin en büyük grubunu, glial hücrelerden gelişen ve genel olarak **glioma** olarak adlandırılan beyin tümörleri oluşturur. Gliomalar, astrositlerden kaynaklanan astroglial neoplazmları (astrozitoma), oligodendrio-gliositlerden gelişen oligodendriogliomaları, ependim hücrelerinden gelişen ependimomaları kapsar. Histolojik olarak malignite bulguları göstermeyen bir glial tümör, lokalizasyonuna bağlı olarak klinik açıdan malign bir tümör gibi davranabilir (Ozar, 2000). Dünya sağlık örgütünün (WHO) 1993 yılında yaptığı sınıflandırmaya göre gliomalar, nöroepiteliyal tümörlerin, astrositik tümörler grubunda yer almaktadır (Kleihues ve diğ., 1993).

Gliomaların en malignant tipi, **glioblastoma multiform** olarak adlandırılır [4. derece/Dünya Sağlık Örgütü(WHO)]. Primer beyin tümörü tiplerinden biri olan glioblastoma multiform, yüksek derecede damarlanma gösteren ve çok nadir iyileşebilen bir tümör tipidir (Zhang ve diğ., 2003) Glioblastoma serebrumda, özellikle beynin frontal ve temporal loblarında sıklıkla, serebellum veya beyin kökünde ise nadiren ortaya çıkar. Glioblastomaların cerrahi işlemler, radyoterapi ve kemoterapi ile tedavi edilmeleri zordur ve tedavi sonrasında yaşam süresinin 5 yıldan fazla olduğu görülmemiştir (Oghaki ve Kleihues, 2005; Brandes ve diğ., 2008). Glioblastomalar üzerinde yapılan moleküler analizler, p53 geninde mutasyon olduğunu ve epidermal büyüme faktörü reseptörü (“Epidermal Growth Factor Receptor”, EGFR) geninin kopya sayısının arttığını ortaya koymuştur. Bu analizler sonucunda araştırmacılar genetik açıdan farklı glioblastoma setleri tanımlamıştır (Sehgal, 1998). Son zamanlarda kullanılan “DNA mikroarray” gibi ileri teknolojiler insan gliomalarının moleküler profili hakkında daha fazla bilgi sağlamıştır. Bu çalışmalar glioblastomalarda anlatımı artan birçok gen ailesinin; hücre adezyonu, hareketi ve anjiyogenezi ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (Sallinen ve diğ., 2000).

Glial hücrelerin, nöronları çeşitli streslere (iskemi, travma, nörotoksin vb) karşı korudukları bilinmektedir. Hasarlı beyin bölgelerinde, bazik fibroblast büyüme faktörü (“Basic fibroblast growth factor”, bFGF) ve epidermal büyüme faktörü (“Epidermal Growth Factor”, EGF) gibi büyüme faktörlerinin sentezlenip, aktif glial hücreler tarafından salındıkları ve bu şekilde nörokoruyucu etki gösterdikleri bildirilmektedir (Kubota ve diğ., 2001).

Beyin tümörleri için model olarak kullanılan C6 glioma hücre hattı, transplental olarak N-nitrozometilüre uygulanmış sıçanlardan elde edilmiştir, fakat sıçanın hangi ırktan geldiği kesin olarak belgelenmemiştir. Bu hücreler ilk defa Benda ve diğ. (1971) tarafından kullanılmıştır. Bu hücre hattı, astrosit kökenli bir beyin tümörü hücre hattıdır ve serum içeren ortamlarda astrosit-oligodendrosit fenotip karışımını ortaya koyar (Coyle, 1995). C6 glioma hücrelerinin, model olarak kullanılmasının temelinde astrositlerin beyin dokusunda en çok bulunan glial hücreler olması ve merkezi sinir sisteminin hasarlara karşı cevabını oluşturması yatmaktadır (Altıok, 2006). Çalışılması en çok tercih edilen model hücre hattı olmasının nedenlerinden biri de insan glioma tümörlerine benzerliğidir (Ozar, 2000).

Beyin tümörleri ile stres proteinleri arasında bir ilişki olduğu ilk kez Kato ve diğ. (1995) tarafından öne sürülmüş ve bu konuda bugüne kadar birçok araştırma yapılmıştır. Zhang ve diğ. (2003), normal insan glioma hücre hattı (U87MG), düşük seviyede EGFR anlatımı yapan glioma hücre hattı ve çok yüksek seviyede EGFR anlatımı yapan glioma hücre hattı üzerinde yaptıkları çalışmada, hücrelerin özellikle 5 protein (Hsp27 proteinleri, MVP, TTG, sistatin B ve MMP2) açısından farklılık gösterdiğini saptamışlardır. Bu çalışmada Hsp27 anlatımının, glial tümörün malignasi derecesi ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur. Çünkü, Hsp27 anlatımı malignant olmayan beyin dokularında genellikle düşük seviyede olmasına rağmen, birçok glioblastoma tipinde belirgin şekilde yüksektir (Zhang ve diğ., 2003).

C6 glioma hücreleri üzerinde yapılan diğer bir çalışmada, endoplazmik retikulumda (ER) moleküler şaperon olarak iş gören glukoz-düzenleyici proteinin ("Glucose Regulated Protein 78", Grp78), kurşun (Pb) tolerans mekanizmasında iş gördüğü kanıtlanmıştır. Kurşunun Grp78'in anlatımını artırdığı, artan Grp78'in ise Pb kelatörü olarak iş gördüğü ve böylece Grp78'in, hücreyi kurşuna karşı astroglial toleransta görev aldığı ortaya konulmuştur (Quian ve diğ., 2000)

Glioblastoma multiform hücreleri üzerinde yapılan *in vitro* bir çalışmada, hücrelere uygulanan betulinik asit (antioksidan) ve seramid'in, sitotoksik etki gösteren antikanser ilaçlarından (CDDP, Dox vb.) daha etkili olduğu gösterilmiştir (Jeremias ve diğ., 2004).

2.3. STRES (ISI ŞOKU) PROTEİNLERİ

Stres (ısı şoku, oksidatif/iskemik stres, ağır metaller, radyasyon ve çevresel kirlenmeler, bazı metabolik ürünler, amino asit analogları vb.) hücrelerde birçok molekülü hasara uğrattırırken, bazı proteinlerin anlatımlarının artmasına neden olur. Başta proteinler olmak üzere çeşitli moleküllerin hasara uğramasını önleyen bu proteinler **stres proteinleri** ya da **ısı şoku proteinleri** (“heat shock protein”, Hsp) olarak adlandırılır (Papp ve diğ., 2003).

Stres proteinleri, 1962 yılında *Drosophila melanogaster* larvalarının tükrük bezi hücrelerinde, sıcaklığa bağlı olarak pufların arttığını gören Ritossa tarafından saptanmıştır (Ritossa, 1962). Tissieres ve diğ. (1974) yılında bu tip proteinleri **ısı şoku proteini** (“Heat Shock Protein”, Hsp) olarak adlandırmışlardır. Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalar ısı şoku proteinlerinin tüm türlerde var olduğunu ortaya koymuştur.

1996 yılında yapılan uluslararası bir toplantıda (“Cold Spring Harbor Meeting on Molecular Chaperones and the Heat Shock Response”, ABD) ısı şoku genleri ile ilgili tüm proteinlerin Hsp’ler olarak adlandırılmasına karar verilmiştir. Molekül ağırlıkları 10-170 kDa arasında değişen bu protein aileleri büyük harfli kısaltma ile (örneğin, sHSP veya HSP70 şeklinde), bu ailelere ait proteinler ilk harfi büyük, diğerleri küçük (örneğin, Hsp27 veya Hsp70 şeklinde), genleri ise tümüyle küçük harflerle (örneğin, hsp27 veya hsp70 şeklinde) gösterilirler. Asıl ismin önündeki harf “küçük”ün kısaltması (“small”, s), ardındaki rakamlar ise yaklaşık molekül ağırlığını ifade etmektedir (Snoeckx ve diğ., 2001).

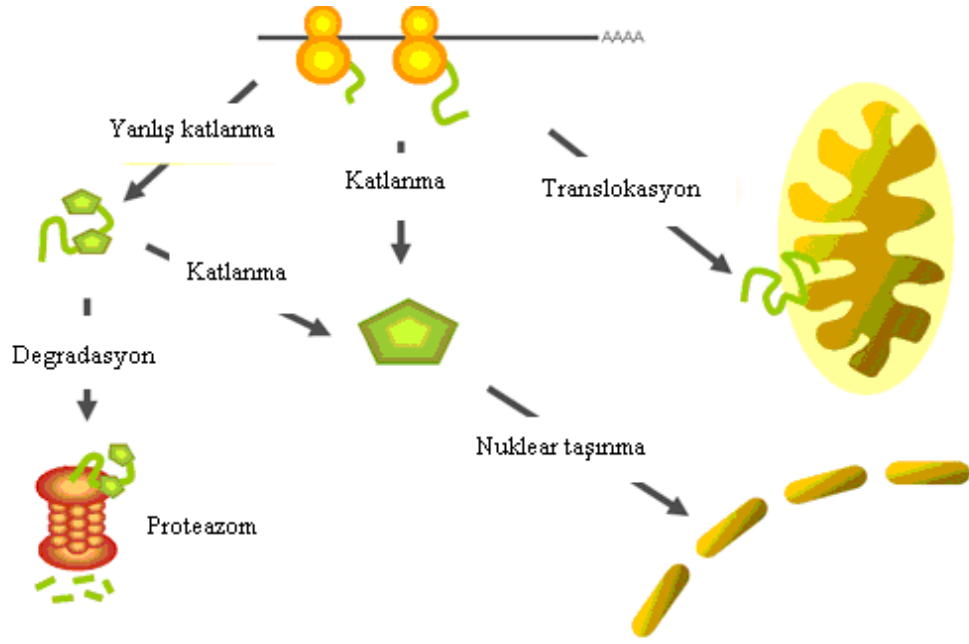
Sıcaklığın artışı veya diğer stres faktörlerinin etkisiyle hsp genleri etkili bir şekilde anlatım yaparlar. İndüklenebilen bu genlerde intron yoktur. Bu nedenle fizyolojik stres sırasında; stres proteinleri sadece birkaç dakika içinde, toplam hücre içi proteinlerinin %15-25’ine ulaşabilirler (Benjamin ve McMillan, 1998).

Hsp’ler sitoplazmik ağın en büyük bileşenlerinden biridir. Birbirleriyle, diğer proteinlerle ve sitoplazmik ağın tüm bileşenleri ile kovalent olmayan bağlar kurarak dinamik kompleksler oluştururlar (Papp ve diğ., 2003). Bu proteinler, kararlı yapıda

olmayan proteinlere ya da denatüre hale gelecek proteinlere geri dönüşümlü olarak bağlanarak iş görürler. Stres proteinlerinin çoğu hücrede normal şartlar altında da bulunurlar (“heat shock cognate”, Hsc), bazıları ise spesifik bir strese cevap olarak indüklenirler. Çok sayıda kopyaları bulunan bu proteinlerin organellerde konumlanmış tipleri de vardır (Alberts ve diğ., 2002).

Hsp’ler hem hücre içinde hem de hücre dışında fonksiyon gösterirler. Normalde Hsp’ler hücre içerisinde bulunurlar, ancak hücreler öldüğünde (nekroz ya da apoptoz ile) hücre dışına salınırlar. Hücre dışındaki Hsp’lerin hastalık veya enfeksiyona karşı bağışıklık sistemini indükleyici etkileri vardır (Pockley, 2001; Prohaszka ve Füst, 2004).

Birçok Hsp, fonksiyonel olarak hücrenel şaperon aktivitesi gösterir. Şaperonlar, proteinlerin fonksiyonel olarak aktif üç boyutlu yapılarını kazanmalarında (katlanma) ve hücrenin çeşitli kompartmanları arasında taşınmalarında (translokasyon, nüklear taşınma) yardımcı olurlar ve görevi biten proteinleri yıkılmaları için proteazomlara yönlendirirler (Alberts ve diğ., 2002) (Şekil 2.2). Ayrıca protein sekresyonuna katkıda bulunur ve ısı şokunda proteinlerin agregasyonunu engellerler. Hücre içinde, proteinlerin katlanması ve proteolitik degradasyon arasında bir denge vardır ve bu sistemde anahtar rolü şaperonlar oynar (Ellis, 1987). Şaperonlar tek başlarına değil; homomerik, heteromerik kompleksler (Hsp60 şaperon sistemi gibi) ya da dinamik şaperon toplulukları oluşturarak (sitoplazmadaki ya da ER’deki Hsp90 taşıyan foldozom gibi) iş görürler (Myung ve diğ., 2003). Isı şoku proteinleri, güçlü hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimleri ile çift kutuplu sarmal stabilitelerinden dolayı kolay kolay denatüre olmazlar. Bu nedenle denatüre koşullarda bile kendi yapılarını koruyarak, diğer proteinlerin katlanmalarına yardımcı olurlar.



Şekil 2.2. Şaperon aktivitesi gösteren Hsp'lerin işlevlerini özetleyen şema (<http://biomolecule.snu.ac.kr/research.html>, Ziyaret tarihi: 19 Şubat 2009)

Nükleik asit ve amino asit dizileri yüksek derecede benzerlik göstermesine rağmen, prokaryot ve ökaryotlardaki Hsp'lerin nomenklatürü ve sınıflandırması farklıdır (Snoeckx ve diğ., 2001). Evrimsel olarak korunmuş Hsp'ler yaklaşık molekül ağırlıkları, yapıları ve fonksiyonlarına göre farklı aileler içinde sınıflandırılmıştır (Benjamin ve McMillan, 1998; Snoeckx ve diğ., 2001). Tablo 2.3'te HSP aileleri, proteinleri, bu proteinlerin hücre içindeki konumları ve fonksiyonları özetlenmiştir.

Tablo 2.3. HSP aileleri, proteinleri, hücre içindeki konumları ve fonksiyonları

Aile/Stres proteinleri	Lokalizasyonu	Fonksiyonu	Kaynaklar
HSP100			
Hsp110 (insan)	Nükleolus/sitoplazma	Isıya dayanıklılık, protein katlanması	Snoeckx ve diğ., 2001
Apg-1 (fare)	Sitozol	Protein katlanması	Snoeckx ve diğ., 2001
Hsp105	Sitozol	Isıya dayanıklılık, iskemik dayanıklılık	Kai ve diğ., 2003
Osp94 (Hsp94)	Renal medulla	Ozmotik stres veya ısı ile indüksiyon	Benjamin ve McMillan, 1998
Grp170	Endoplazmik retikulum	Konstitütif anlatım	Snoeckx ve diğ., 2001
HSP90			
Hsp90 α (Hsp86)	Sitoplazma/nükleus	Aporeseptör (Steroid reseptöre bağlanır)	Snoeckx ve diğ., 2001
Hsp90 β (Hsp84)	Sitoplazma/nükleus	Aporeseptör (Steroid reseptöre bağlanır)	Snoeckx ve diğ., 2001
Grp94	Endoplazmik retikulum	Kalsiyum bağlayıcı şaperon	Koyasu ve diğ., 1986
HSP70			
Hsc70	Sitoplazma, peroksizom, nükleus	Protein katlanması	Benjamin ve McMillan, 1998
Hsp70 (indüklenebilir form)	Sitoplazma/nükleus	Protein katlanması	Snoeckx ve diğ., 2001
mtHsp75	Mitokondri	Protein katlanması	Snoeckx ve diğ., 2001
Grp78(BiP)	Endoplazmik retikulum	Translokasyon ve protein katlanması	Snoeckx ve diğ., 2001
Mortalin	Sitoplazma/nüklear membran	Protein katlanması	Snoeckx ve diğ., 2001
HSP60			
Hsp60	Mitokondri	Protein taşınması/katlanması	Snoeckx ve diğ., 2001
Grp 58	Endoplazmik retikulum	Protein katlanması	Snoeckx ve diğ., 2001
TRiC (CCT)	Sitoplazma	Protein katlanması	Snoeckx ve diğ., 2001
HSP40			
Hsp47	Endoplazmik retikulum	Kollajen sentezinin kontrolü	Snoeckx ve diğ., 2001
Hsp40 (Hdj-1)	Sitoplazma/nükleus	Protein katlanması, Hsp72 koşaperonu	Snoeckx ve diğ., 2001
sHSP			
Hem oksijenaz (HO-1, HO-2, Hsp32)	Sitoplazma	Hipoksi, HIF-1 transkripsiyon faktörü	Snoeckx ve diğ., 2001
Hsp27	Sitoplazma/nükleus	Aktin dinamikleri	Calderwood ve diğ., 2007
α A-Kristalin ve α B-Kristalin	Sitoplazma/nükleus	Gözde yapısal protein, hücre iskeletinin kararlılığı	Snoeckx ve diğ., 2001
p20	Sitoplazma/nükleus	Vazorelaksasyon	Snoeckx ve diğ., 2001
Hsp10	Sitoplazma	Hsp60 kofaktörü	Snoeckx ve diğ., 2001
Hsp20-30kDa	Mitokondri	Z bantlarının korunması	Dalle-Donne ve diğ., 2001
Ubikitinler	Sitozol, nükleus	26S proteazomlar vasıtasıyla anormal proteinlerin yıkımı	Snoeckx ve diğ., 2001
Ubikitin			

2.3.1. Stres Proteini Aileleri

HSP100 Ailesi

Bu ailede yer alan proteinler fizyolojik koşullar altında moleküler şaperonlar olarak iş görürler, suda çözünmeyen protein agregatlarının sitozolde çözünmelerini sağlarlar ve proteinlerin yeniden düzenlenmesinde görev alırlar (Benjamin ve McMillan, 1998). Bu ailenin üyelerinden Hsp105, Hsp70 ile kompleks oluşturarak şaperon aktivitesi gösterir (Kai ve diğ., 2003). Hsp105'in, stres koşulları altında, nöral hücreleri apoptoza karşı koruduğu da bilinmektedir (Hatayama ve diğ., 2001). Ayrıca birçok kanser tipinde normal hücrelere göre Hsp105'in aşırı anlatım yaptığı gösterilmiştir (Kai ve diğ., 2003).

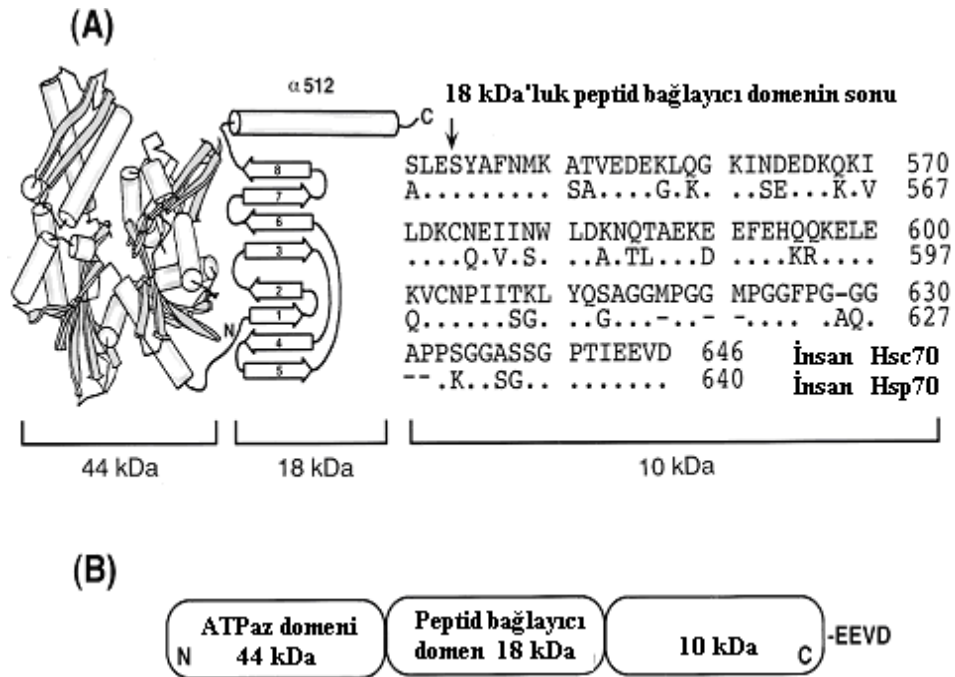
HSP90 Ailesi

Hücredeki toplam proteinin %1-2'sini oluşturan Hsp90 ökaryotik hücrelerde en fazla bulunan proteinlerden biridir (So ve diğ., 2007). Hücrede sadece sitoplazma ve endoplazmik retikulumda bulunan bu proteinler, diğer proteinlere bağlanarak onların aktivasyonunu ve katlanmasını düzenler, yeniden katlanan peptidlerin kümeleşmesini önlerler. HSP90 ailesinin sitoplazmada yer alan üyeleri Hsp90 α ve Hsp90 β 'dir. Endoplazmik retikulumda en fazla bulunan ısı şoku proteini ise Grp94'tür. Steroid reseptörlere, protein kinazlara, ara filamantlere, mikrotübüllere ve aktin mikrofilamentlerine bağlanır (Koyasu ve diğ., 1986). Hsp90 şaperonu çok sayıda hücrel kinaz, transkripsiyon faktörleri ve diğer hücrel proteinlerle kompleksler oluşturarak iş görmektedir (Benjamin ve McMillan, 1998).

HSP70 Ailesi

Bu proteinler stres altında proteinleri korur, katlanmamış proteinlerin kümeleşmesini önler, katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinler arasındaki dengeyi sağlarlar. Hsp70'ler proteinlerin sitoplazma, nükleus, endoplazmik retikulum ve mitokondride taşınmasında görev alırlar. Sitozoldeki Hsp70 (Hsc70), olgunlaşmamış polipeptidlere daha ribozomdan ayrılmadan bağlanır. Hsp70, aynı zamanda ısı şoku faktörü ("Heat shock factor", HSF)'nin aktivitelerini düzenleyerek ısı şoku proteinlerinin transkripsiyonunu da kontrol eder (Benjamin ve McMillan, 1998).

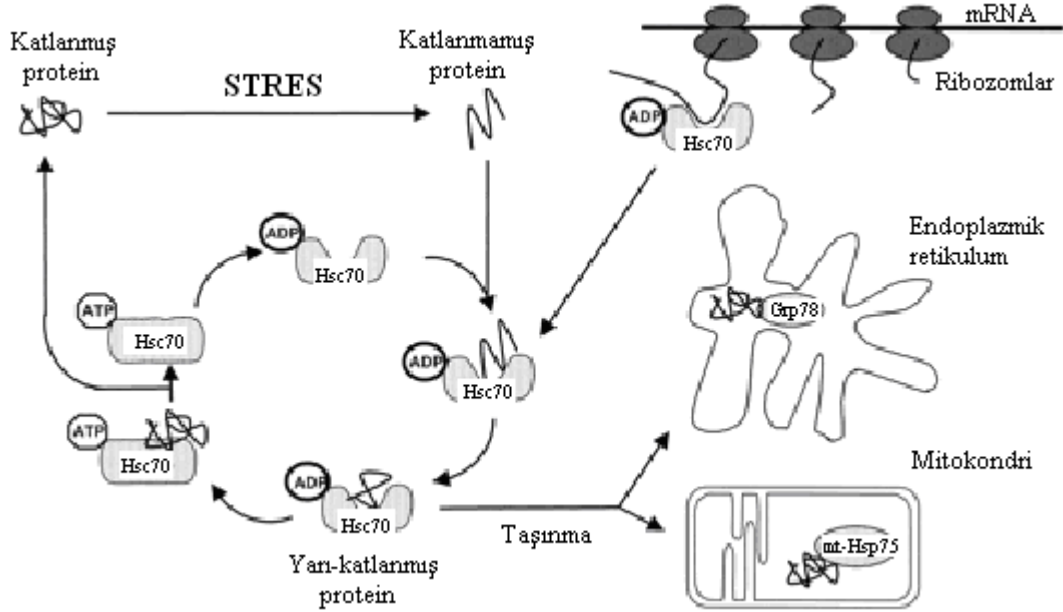
Hsp70 ailesinin tüm üyeleri; yüksek derecede korunmuş 44 kDa'luk bir N-terminal ATPaz domeni, hidrofobik peptidleri bağlayan 18 kDa'luk değişken bir bölgeyi ve yüksek derecede korunmuş 10 kDa'luk C-terminal domeni içerirler. İnsana ait Hsc70 ve Hsp70'in karşılaştırıldığı Şekil 2.3'te, N-terminalde yer alan ve 1–386. amino asitleri içeren 44 kDa'luk fragment, 384–543. amino asitlerin içinde bulunduğu 4 adet çift antiparalel β -katlanması ve tek α -sarmalden oluşan 18 kDa'luk fragment, C-terminalde ise Hsc70 için 542–646. amino asitler, Hsp70 için 542–640. amino asitler ile yüksek derecede korunmuş EEVD terminal dizisi bulunan 10 kDa'luk fragment görülmektedir. Hsc70 ve Hsp70 arasındaki homoloji %80'den fazladır (Kiang ve Tsokos, 1998).



Şekil 2.3. İnsana ait Hsc70 ve Hsp70'in moleküler yapısı. (A) Hsc70 ve Hsp70 proteinlerini oluşturan domenlerin 3 boyutlu yapıları ve amino asit dizileri. (B) Hsp70 N-terminalde 44 kDa'luk ATPaz domeni, 18 kDa'luk peptid bağlayıcı domen; C-terminalde ise 10 kDa'luk fragment ile yüksek derecede korunmuş EEVD terminal dizini içermektedir.

Hsp70'in, ATPaz aktivitesi diğer protein zincirlerinin bağlanması ve ayrılması için gereklidir (Sadis ve Hightower, 1992). Normal koşullar altında Hsp70 şaperonu sitozolde bulunur ve katlanmamış peptidlere bağlanarak, bu peptidlerin hücre içinde bulunmaları gereken bölgeye ulaşmaya kadar katlanmalarını engeller. Hsp70'in hücre iskeleti proteinleri (Sanchez ve diğ., 1994), hücre yüzey glikoproteinleri, kalmodulin ve doymuş yağ asitleri ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Hughes ve August, 1982). Hsp70

endoplazmik retikulum ve mitokondri membranında translokasyonda görev alır, yanlış katlanmış proteinleri lizozomlara ya da peroksizomlara yönlendirir (Şekil 2.4)



Şekil 2.4. Hsc70 ile olgunlaşmamış peptid zincirleri ve katlanmamış proteinler arasındaki etkileşimler.

İnsanlarda HSP70 multigen ailesinin 4 üyesi vardır: Hsp70, Hsc70, Grp78 (“glucose-regulated protein 78”, BiP) ve mtHsp75 (“mitochondrial 75-kDa heat shock protein”). Hsp70 ve Hsc70 hem sitozolde hem de nükleusta bulunur ve katlanmamış proteinlerin bir araya gelmesini engeller. Şaperonlar olarak iş gören Grp78 endoplazmik retikulumda, mtHsp75 ise mitokondrilerde bulunur (Myung ve diğ., 2003).

Isı şoku sırasında, Hsc70 ve Hsp70’ler nükleusa hareket ederler. Translokasyon 60 dakika içinde gerçekleşir ve yaklaşık 3 saat sonra sonlanır, bu süreçte maksimum protein düzeyine ulaşılır (Snoeckx ve diğ., 2001). Hsp72 ısı ile indüklenen bir Hsp70 tipidir. Hsc70 ise hücrede sürekli olarak sentezlenir ve ısı ile çok az indüklenir (Kagaya ve diğ., 2000).

Endoplazmik retikulumda bulunan Grp78 de stresle indüklenen bir moleküler şaperondur. Memeli hücrelerinde, Grp78 geçici olarak bağlandığı proteinlerin katlanmalarını ve taşınmalarını sağlar (Litte ve diğ., 1994; Laitusis ve diğ., 1999).

HSP60 Ailesi

Ondört alt birimden meydana gelen ve hem mitokondri hem de sitoplazmada bulunan Hsp60, hücrenin stresten korunması ve proteinlerin katlanması için Hsp70 ile birlikte iş gören bir şaperondur. Yanlış katlanmış polipeptidlere bağlanarak, onların doğru şekilde katlanmalarına yardımcı olur (Nollen ve diğ., 1999).

Birçok memeli hücresinde Hsp60'ın sürekli anlatımı yapılmaktadır (So ve diğ., 2007). Bu proteinlerin anlatımları Hsp10 tarafından düzenlenir (Frydman ve Hartl, 1996). Yapılan çalışmalar, prostat kanserinin erken ve ileri aşamalarında Hsp10 ve Hsp60 anlatımının arttığını göstermiştir (Cornford ve diğ., 2000; Capello ve diğ., 2003b).

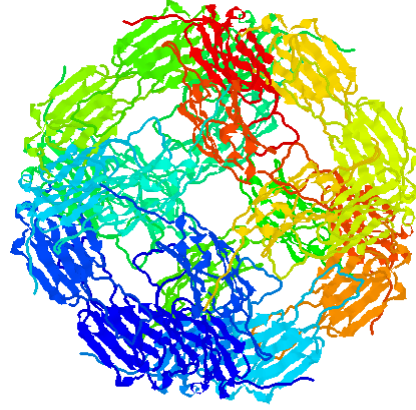
Şaperoninler, şaperonlardan sonra proteinlerin doğru bir şekilde bir araya gelmelerini sağlayan Hsp'lerdir. Ökaryotlarda 2 şaperonin grubu vardır. Birinci grup Hsp60 ve Hsp10'dan oluşur ve mitokondride bulunur. İkinci grupta bulunan TCP1 ise aktin ve tubulin katlanmasında iş görür ve sitozolde yer alır (Rommelaere ve diğ., 1993; Snoeckx ve diğ., 2001).

HSP40 Ailesi

Hsp40'lar katlanmamış proteinlere bağlanarak onları Hsc70'le birleştirirler. ATP hidrolizi sonucunda yeniden katlanan protein Hsc70'ten ayrılır. Hsp40, Hsc70-etkileşimli protein ("Hsp70-interacting protein", Hip), Hsc70-düzenleyici protein ("Hsp70-organizing protein", Hop) veya Hsc70-aksesuar proteini ("Hsc70-accessory protein", Hap) ile yer değiştirebilir ve Hsc70-katlanmamış protein kompleksinde farklı etkileşimlere sebep olabilir. Hip'le birleşmesi kompleksin hücre içinde hareketine neden olurken, Hop'a bağlanması Hsp90'ı bağlamasına, Hap'a bağlanması ise Hsc70-katlanmamış protein kompleksinin ayrılmasına neden olur (Snoeckx ve diğ., 2001; Hohfeld ve diğ., 1995).

Küçük ısı şoku proteinleri (“Small Heat Shock Protein”, sHSP) Ailesi

Aktin polimerizasyonunun inhibitörü olarak keşfedilen bu proteinler futbol topu görünümündedir (Benjamin ve McMillan, 1998; Kim ve diğ., 1998a) (Şekil 2.5). Memelilerdeki sHsp başlangıçta tek bir protein (Hsp25, Hsp27 veya Hsp28 olarak da bilinir) olarak tanımlanmış olmasına rağmen, yapılan çalışmalar gözde yapısal protein olarak iş gören α -B-kristalinin (α BC) de sHSP ailesinin bir üyesi olduğunu ortaya koymuştur (Klemenz ve diğ., 1991).



Şekil 2.5. Yirmidört altbirimden oluşan sHsp'nin üç boyutlu yapısı

sHsp'ler molekül ağırlığı 12-43 kDa olan monomerler halinde bulunurlar. Evrimsel olarak yüksek derecede korunmuş ve yaklaşık 100 amino asitten oluşan bu proteinler, C-terminal α -kristalin domeni ve N-terminal WD/EPF domeni ile tanımlanmaktadır (Nakamoto ve Vigh, 2007).

sHSP'ler reproduktif dokular, deri, kas ve kan hücreleri gibi birçok dokuda sürekli olarak üretilirler (Ciocca ve diğ., 1983). Hücrede sitoplazma, endoplazmik retikulum ve nükleusta bulunurlar. Isı stresine maruz kalan hücrelerde belirgin artış gösterirler. sHsp'lerin şaperon, apoptozu inhibe etme, hücre gelişimini düzenleme, ısı toleransı ve hücre farklılaşması gibi işlevleri vardır (Wang ve diğ., 2004a). Hsp27, nüklear faktör kappa B (“Nuclear Factor kappa B”, NF- κ B) (transkripsiyon faktörü olarak iş gören bir protein kompleksi) yollarının aktivasyonunu artırır, bu yollar hücre büyümesi, enfeksiyon ve strese karşı cevap gibi pek çok önemli süreci kontrol eder. sHsp'ler sinyal iletiminde de rol oynarlar. Hsp27 apoptotik sinyal yollarıyla ilişkilidir. Mitokondri membranının dış kısmı ile etkileşime girer ve sitokrom C/Apaf-1/dATP (sitokrom C/

apoptotik proteaz aktive edici faktör-1/deoksiadenozin trifosfat) kompleksinin aktivasyonunu engeller. Bu nedenle prokaspaz-9'un (apoptoz, nekroz ve iltihaplanmada rolleri olan sistein proteazları ailesinden bir protein) aktivasyonunu da inhibe eder. Fosforile Hsp27 ise, Daxx apoptotik proteinini inhibe eder (So ve diğ., 2007).

Hsp27 ve α BC oligomerik yapıda proteinler olup, fosforilasyonla değişime uğrarlar (Lavoie ve diğ., 1993). Hsp27'nin oligomerizasyonu dinamik bir işlemdir. Oligomerizasyon hücrenin fizyolojisine, Hsp27'nin fosforilasyon statüsüne ve strese maruz kalıp kalmamaya bağlıdır. Hsp27, strese (ısı şoku, arsenit, ozmotik ve oksidatif stres), sitokinler veya agonistlerine (mitojenler, serum, interlökin-1, tümör nekroz faktörü, trombin, histamin ve forbol ester) karşı cevap olarak fosforillenir. Hsp27'nin fosforile olması çoklu sinyal transdüksiyon metabolik yolunda görülür. Isı şoku vasıtasıyla Hsp27 fosforilasyonu ser-82, ser-15 ve ser-78'de meydana gelir, fosforile olan bu bölgelerin tümü kinaz tanıma bölgesinin sonunda yer almaktadır (Landry ve diğ., 1992; Rouse ve diğ., 1994). Hsp27 fosforilasyonu mikrofilament organizasyonu ve dolayısıyla mikrofilament bağımlı olayların değişimi ile ilişkilidir. Endotel hücrelerindeki Hsp27 fosforilasyonu, hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesine yol açan sinyal transdüksiyonunu ve hücre şeklindeki değişimleri işaret etmektedir (Li ve diğ., 1996).

Hsp27 pekçok hücre tipinde, özellikle kas hücrelerinde görülür. Hücre büyümesi ve farklılaşmasının değişik aşamalarında fazla miktarda üretilmesi, Hsp27'nin doku farklılaşmasında önemli bir görevi olduğunu düşündürmektedir. Fosforillenmiş Hsp27 türleri ile hücre hasarı (özellikle kas ve sinir) ve kanser arasında bir bağlantı olduğu gözlemlenmiştir. Anlatım düzeyinin, hücre çoğalması, metastaz ve kemoterapiye direnç ile ters orantılı olduğu öne sürülmektedir. Hastaların serumunda yüksek düzeyde Hsp27 bulunması nedeniyle meme kanserinde potansiyel bir tanı belirtecidir (So ve diğ., 2007).

Hsp27'nin hidroksiüre tarafından (Eskenazi ve diğ., 1998), Hsp25'in ise bazı antikanser ilaçlar tarafından indüklendiği (Bielka ve diğ., 1994) gösterilmiştir. Tümör hücrelerinde, hsp27'nin aşırı anlatımının Dox direnci ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Oesterreich ve diğ., 1993). Hsp27 anlatımı ısı ve kimyasallara direnç özelliği ile ilişkili olmasına rağmen, radyoterapiye dirençle ilişkili olmadığı belirlenmiştir (Fortin ve diğ., 2000).

Hsp27 hücre iskeleti proteinlerinin stabilizasyonunda iş görür. Hücreiçi reaktif oksijen türlerini (“Reactive Oxygen Species”, ROS) ortadan kaldırarak ve glutasyon düzeyini yükselterek oksidatif strese karşı koruyucu etki gösterir (Myung ve diğ., 2003; Acarin ve diğ., 2002). Hsp27 anlatımındaki artışın hücreiçi glutasyon konsantrasyonunu artırdığı ve böylece hücreiçi ROS’ları azalttığı kanıtlanmıştır (Mehlen ve diğ., 1996a). Bu olay glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesinde ve redüklenmiş glutasyon (GSH) düzeyinde artışa yol açabilir (Preville ve diğ., 1999).

Glial hücrelerde hasar sonucu indüklenen Hsp27, Hsp32 ve Hsp47 anlatımının, koruyucu etki gösterdiği ve hücrelerin hasara yol açan koşullara adaptasyonunda iş gördüğü belirtilmektedir (Horwich, 2002). Lipid peroksidasyonuna sebep olan ROS’lar, lipidçe zengin beyinde yüksek mitokondriyal aktiviteye bağlı olarak birikir, nöron ve glial hücreler ise özel şaperonlarını kullanarak kendilerini ROS’lardan korurlar (Myung ve diğ., 2003; Mehlen ve diğ., 1996b). Nöronlarda, fazla miktarda şaperon ekspresyonu olması, nörolojik semptomların ve proteinopatilerin ortaya çıkması ile ilişkilidir (Macario ve Macario, 2007). sHsp’ler merkezi sinir sisteminde, özellikle glial hücrelerde yerleşim göstermektedir. Astrosit ve oligodendrositlerde görülen Hsp27 ve α BC birikimi, Alexander hastalığı, Creutzfeldt-Jakobs hastalığı, multipl skleroz, Alzheimer gibi çeşitli nörolojik hastalıklarla ilişkilidir (Stegevediğ., 1999 Rijk ve Bloemendal, 2000; Macario ve Macario, 2007).

Hsp27’nin aktive olması için fosforilasyon gereklidir (Landry ve diğ., 1991). Yapılan çalışmalar, bu olayın interlökin (IL-1) veya tümör nekroz faktörü (“Tumor Necrosis Factor”, TNF) tarafından aktive edildiğini göstermiştir (Guesdon ve diğ., 1993; Mehlen ve diğ., 1995). Transfekte hücrelerde, Hsp27’nin anlatımı artırılmakta, böylece hem oksidatif strese karşı hem de TNF-aracılı sitotoksositeye karşı koruma sağlanmaktadır (Mehlen ve diğ., 1995). Isı stresi ile Hsp27’nin fosforile olduğu, defosforilasyonunun ise ATP tüketimi sonrasında gerçekleştiği saptanmıştır (Loktionova ve diğ., 1996).

Bu proteinlerin şaperon fonksiyonları mitokondrilerin stabilizasyonu, oksidatif stres derecelerindeki redüksiyon (artan GSH üretimine bağlı olarak), hücreiçi enerji düzeylerinin stabilizasyonu, doğru protein katlanması ve hücre iskeletinin kararlılığı için gereklidir (Liang ve Macrea, 1997). Hsp27 indüksiyonunun inhibisyonu, hücrenin

apoptotik ajanlara maruz kalmasını takiben sitokrom C'nin salınmasını sağlar ve kaspaz aktivasyonu gerçekleşir (Samali ve diğ., 2001).

Bazı Hsp'lerin anlatımı (Hsp27 ve Hsp70 gibi) çevresel ve fizyolojik stresle artmaktadır (Gorman ve diğ., 1999). Isı şoku sonucu Hsp anlatımının geçici artışı, termotolerans ile ilişkilidir ve bu durum hücrenin; ısı şoku, oksidatif stres, çeşitli antikanser ilaçlar ve nitrik oksit gibi öldürücü derecedeki toksik durumlara karşı dirençli olmasını sağlar (Samali ve Cotter, 1996). Stresle indüklenebilen bazı Hsp'lerin (özellikle Hsp27 ve Hsp70) hücreleri apoptoza (Jaatella, 1999) ve nekroza karşı korudukları bilinmektedir (Kabakov ve Gabai, 1995; Mehlen ve diğ., 1995). Bu proteinlerin, farklı aşamalarda kaspazlara engel olarak apoptozu inhibe ettikleri gösterilmiştir (Bruey ve diğ., 2000a; Concannon ve diğ., 2003). Hücrenin nekrozdaki nasıl korunduğuna dair mekanizma ise henüz tam olarak bilinmemektedir. Hsp27 ve Hsp70'in antiapoptotik etkileri mitokondriden sitokrom C salınımı, apoptozom oluşumu ve kaspaz aktivasyonu ile ilişkilendirilerek açıklanmaktadır (Bruey ve diğ., 2000b; Concannon ve diğ., 2003; Samali ve diğ., 2001).

2.4. ISI ŞOKU GENLERİNİN TRANSKRİPSİYONU

Hücrede Hsp anlatımını indükleyen fizyolojik, patolojik ve çevresel etkenler Tablo 2.4'te özetlenmiştir (Kiang ve Tsokos, 1998).

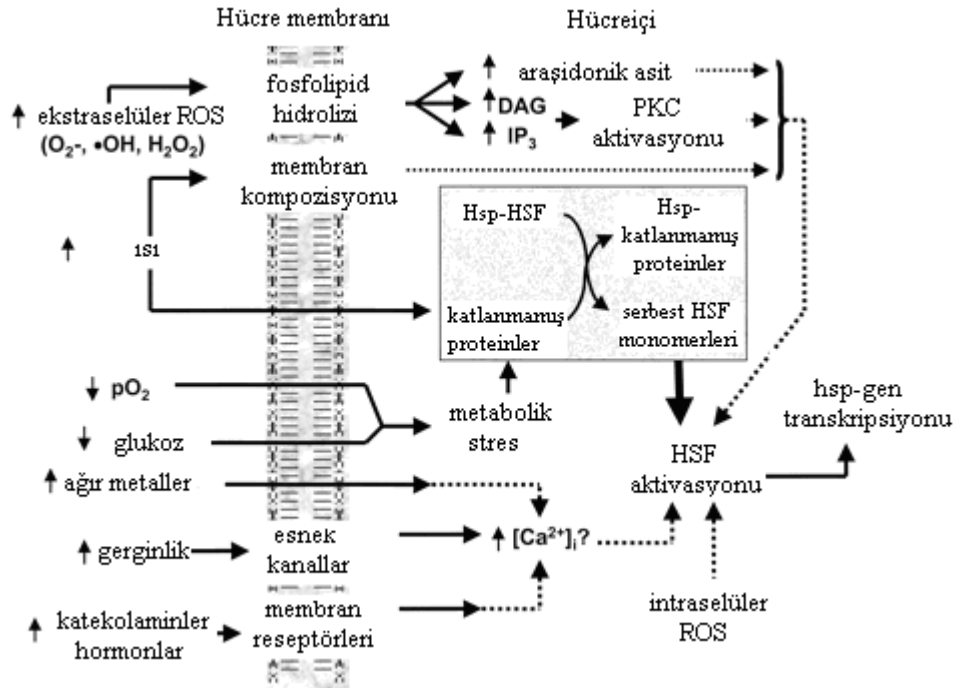
Tablo2.4: Hsp anlatımını indükleyen koşullar

Fizyolojik	Patolojik	Çevresel
Hücre bölünme döngüsü	Viral enfeksiyonlar	Isı şoku
Büyüme faktörleri	Bakteriyal enfeksiyonlar	Ağır metaller
Hücre farklılaşması	Parazitik enfeksiyonlar	Metabolik inhibitörler
Doku gelişimi	Ateş	Amino asit analogları
Hormonal baskılama	İnflamasyon	Etanol
	İskemi	Antibiyotikler
	Hipertrofi	Radyasyon
	Oksidan hasarı	
	Malignansi	
	Otoimmünite	

Hsp genlerinin transkripsiyonu, ısı şoku transkripsiyon faktörleri ("Heat shock factor", HSF) ile hsp genlerinin promotor bölgelerinde bulunan ısı şoku elementlerinin ("Heat

shock element", HSE) etkileşimi aracılığıyla sağlanır. HSF'ler normal koşullar altında sitoplazmada inaktif monomerler halinde bulunurken, sadece stres altındayken DNA'ya bağlanırlar (Morimoto, 1993). HSF stres koşulları altında, DNA'ya bağlanabilmek için üç fosfatlı forma dönüştürülür ve sitoplazmadan nükleusa geçer. Nükleustaki HSF, DNA'daki hsp genlerinin promotör bölgelerine bağlanır. Böylece hsp geninin transkripsiyonunu sağlayarak, Hsp sentezini artırır (Santoro, 2000; Powers ve Workman, 2007).

Birçok faktör HSF aktivasyonuna sebep olabilir (Tablo 2.5, Şekil 2.6). HSF aktivasyonundaki en önemli olay, serbest Hsp molekülleri (Hsp70 gibi) ile stres sonucu ortaya çıkan katlanmamış proteinlerin ve HSF'lerin bağlanmaları arasındaki dengedir. Katlanmamış proteinlerin varlığındaki herhangi bir artış, bu dengeyi Hsp-katlanmamış protein yönünde değiştirir, böylece serbest HSF monomerleri salınır (Snoeckx ve diğ., 2001).



Şekil 2.6. HSF aktivasyonu ve dolayısıyla hsp transkripsiyonunu aktive eden hücre içi ve hücre dışı etkenler. (Kesikli çizgiler tam olarak bilinmeyen transdüksiyon metabolik yolunu göstermektedir)

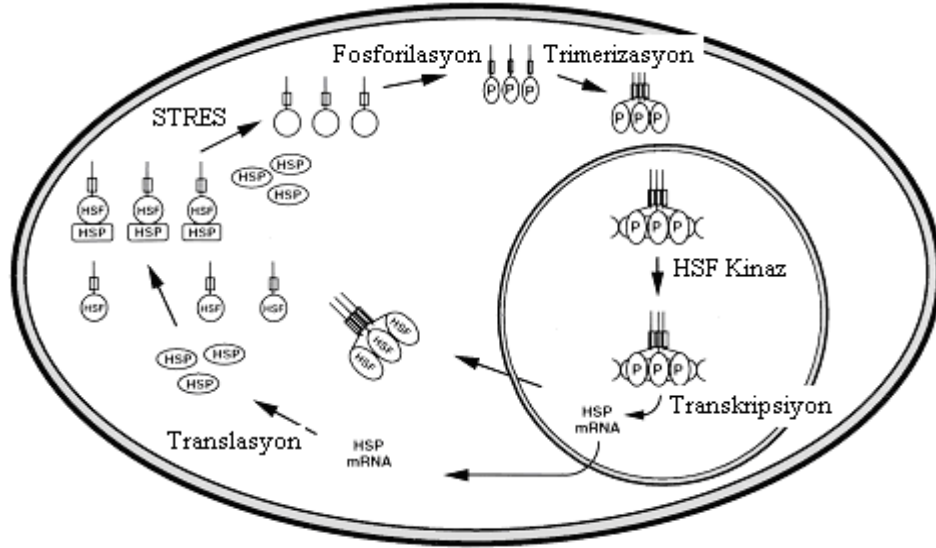
Herbimisin-A, benzokinoid ansamisin antibiyotiği ve tirozin kinaz inhibitörü gibi moleküller Hsp70'in sentezini engeller ve letal ısı stresine karşı direnci artırırken, diğer genlerin (hsp90, hsp60, hsp27 ve grp78 gibi) transkripsiyonunu etkilemez (Morris ve diğ., 1996).

Bugüne kadar 4 farklı HSF saptanmıştır: HSF1, HSF2, HSF3 ve HSF4. HSF1, HSF2 ve HSF4 insanlarda bulunurken, HSF3 sadece tavuklarda bulunmaktadır (Snoeckx ve diğ., 2001). HSF'ler hücrenin gelişimi, büyümesi ve adaptasyonu sırasında indüklenir ve Hsp'lerin sentezlerini düzenlerler. HSF1 hücre strese maruz kaldığında aktive olur ve hsp genlerinin anlatımlarını düzenler, HSF2 hücre farklılaşması ve gelişiminde görev alır, HSF4'ün ise Hsp anlatımının negatif düzenleyicisi olduğu düşünülmektedir (Wu, 1995; Snoeckx ve diğ., 2001).

HSF1 molekül ağırlığı 75 kDa olan, hücrede sürekli anlatımı yapılan, sitozol ve nükleusta konumlanmış, yaklaşık 200 kDa'luk bir kompleksin içinde inaktif monomerler halinde bağlı bulunan bir proteindir (Baler ve diğ., 1993). Dinlenme halinde Hsp70 ve Hsp90'a bağlı olarak bulunan HSF1 monomerlerinin hem DNA-bağlama aktivitesi hem de transkripsiyon aktivitesi negatif kontrol ile baskılanmaktadır (Wu, 1995). HSF1, sadece kinazların aktivasyonu ile serbest kalmaktadır. Fizyolojik stres altında, HSF1, mitojen tarafından aktive edilen protein kinaz ("Mitogen-Activated Protein Kinase", MAPK) ailesinin üyeleri (ERK1, JNK/SAPK ve p38 protein kinaz) tarafından hiperfosforile hale getirilir (Kim ve diğ., 1997). Aktive olan HSF1 sitozolden nükleusa doğru hareket eder ve yaklaşık 700 kDa'luk bir homotrimer oluşturarak DNA'ya bağlanır (Wu, 1995). HSF1-DNA bağlanması, hsp genlerinin upstream promotör bölgelerinde bulunan HSE'lerin varlığı ile yakından ilişkilidir. Bağlanma gerçekleştiğinde bu genlerden yeni mRNA sentezi başlar. Transkripsiyon sonrasında Hsp mRNA'sı nükleustan sitozole geçer ve burada sentez tamamlanır, işi biten HSF de sitozole döner.

Hastalık koşullarında, HSF1 indükleyicilerinin (okside LDL, ROS) hsp gen ekspresyonunu artırarak protein hasarını azalttığı düşünülmektedir. Yüksek sıcaklık ve iskemi gibi fizyolojik stres durumunda, HSF'ler Hsp'lerden ayrılırlar. Protein kinaz C (PKC) veya diğer serin/treonin kinazlar tarafından fosforillenen HSF monomerleri

homotrimerler oluştururlar. Bu trimerler nükleusa gider, hsp genlerinin promotör bölgelerinde bulunan HSE'lere bağlanır (Kiang ve Tsokos, 1998) ve HSF'ler kinazlar tarafından tekrar fosforillendikten sonra transkripsiyon başlar. Yeni sentezlenen Hsp'ler, Hsp sentezini durdurmak için HSF'lere bağlanırlar (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Stresle indüklenen Hsp'lerin artışında rol oynayan olası mekanizma

Hücre kültüründe yapılan çalışmalar; hipoksi, etanol ve sodyum arsenit uygulamalarının hücre içindeki HSF1-DNA bağlanmasını ve Hsp70 seviyesini artırdığını göstermektedir. Yüksek sıcaklık, HSF1 ve Hsp90 arasındaki bağlantıyı zayıflatır, çünkü stres sonucunda denatüre olan proteinler Hsp90'a bağlanmak için HSF'lerle yarışır (Zou ve diğ.,1998). Hücre içinde indüklenbilir Hsp'lerin artması, otomatik düzenleyici bir mekanizma ile HSF1'in aktivasyonunu baskılar (Mosser ve diğ., 1993). Yapılan bir çalışmada serin/treonin kinazın bloke olmasının, HSF1'in fosforilasyonunu ve hsp70 geninin transkripsiyonunu engellediği gösterilmiştir (Xia ve Voellmy, 1997).

Hsp genlerinin anlatımlarını HSF'lerle etkileşime girerek engelleyen kimyasallar da (benzilidin laktam, triepksid triptolid v.b.) bulunmaktadır (Powers ve Workman, 2007).

2.5. ISI ŞOKU PROTEİNLERİNİN HASTALIKLARDAKİ ROLÜ

Isı şoku proteinlerinin birçok hastalıkla özellikle kanserle ilişkili olduğu bilinmektedir. İnsan kanserlerinde, posttranslasyonel modifikasyonlar (örneğin, Hsp'lerin fosforilasyonu) sıklıkla görülmektedir ve özel bazı malignansilerle ilişkilidir (Sarto ve diğ., 2000). Son zamanlarda yapılan araştırmalar ısı şoku proteinlerinin, hücrenin hayatta kalması ve patojenik hastalıkların kontrolü üzerindeki rolüne odaklanmıştır.

Hücre dışındaki Hsp'ler hastalık veya enfeksiyona karşı bağışıklık sistemini uyarmak için çok güçlü tehlike sinyalleri gönderirler. Ayrıca bu proteinler pek çok patolojik ajanın konakta immün cevap oluşturmasında rol oynayan antijenlerdir. Stres proteinlerine karşı gelişen immün cevaplar, çapraz reaksiyonlar vasıtasıyla hücrenin kendisine karşı da (anti-self) reaksiyon geliştirmesine neden olabilmektedir. Sağlıklı bireylerin, enfeksiyon veya herhangi bir şekilde strese maruz kalmış hücrelerinden arınmak için, kendi stres proteinlerine karşı immün cevap verebilme yeteneklerinden yararlanabildikleri ileri sürülmektedir. İşte bu yeteneklerin düzenlenmesindeki bozukluklar bazı otoimmün hastalıklara yol açabilir (Laad ve diğ., 1999; Clark ve Muchowski, 2000). Yapılan bir çalışmada, Hsp'lerin beyin, kalp ve diğer organları iskemik zararlardan belirgin bir şekilde koruduğu (Benjamin ve McMillan, 1998; Snoeckx ve diğ., 2001; Gaitanaki ve diğ., 2003), yiyeceklerin içinde bulunan ksenobiyotiklere karşı hücrede bir koruma mekanizması olarak Hsp27'inin anlatımının arttığı (Katsuki ve diğ., 2004) ve indüklenebilir Hsp70'in kanser hücrelerinin gama radyasyonuna karşı direncinde etkili olduğu saptanmıştır (Lee ve diğ., 2001).

Hücre içindeki oksidatif hasara karşı savunmada görev alan Hsp70 ve Hsp27'ler sitoplazmik antioksidanlar olarak iş görürler (Papp ve diğ., 2003). Hsp27'nin glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, glutatyon redüktaz ve glutatyon transferaz aktivitelerini artırarak, düşen glutatyon düzeyini yükselttiği belirlenmiştir (Arrigo, 1998; Preville ve diğ., 1999). Hsp70'in ise dolaylı antioksidan etki gösterdiği saptanmıştır (McDuffee ve diğ., 1997).

Endotelial disfonksiyon, diyabet, Alzheimer ve Parkinson gibi bazı hastalıklarda redoks homeostazında çeşitli aksamalar olur (Sayre ve diğ., 2001). Okside proteinlerin miktarı

artar, bunun sonucunda konformasyonel hasarla başa çıkabilmek için daha yüksek miktarda şaperona ihtiyaç duyulduğundan, şaperon indüksiyonu gerçekleşir. Bununla birlikte şaperon-indüksiyonlu mekanizmalar kronik stres karşısında yetersiz kalır ve hasarlı proteinler birikmeye başlar. Tüm bu değişimler, yaşlanan organizmanın şaperon-indükleme kapasitesinin birbirine bağlı artışı sonucunda ortaya çıkar (Hall ve diğ., 2001). Buna karşılık, antioksidan sistemlerdeki (örneğin, Cu-Zn SOD anlatımındaki gibi) ve Hsp miktarındaki artış yaşam süresinin uzamasına sebep olur (Papp ve diğ., 2003).

Kalp yetmezliğinde Hsp70 anlatımının artması, hücrelerin hasar görmesini önler. Deneysel bir iskemi olgusunda, transgenik farelerde Hsp70 artışının, hasarı büyük oranda giderdiği gösterilmiştir (Landry, 2000).

Günümüzde kanserli hücreler ile yapılan çalışmalarda çeşitli stres proteinlerinin anlatımlarında farklılıklar olduğu saptanmış ve bu proteinlerin hem teşhiste hem de tedavinin izlenmesinde “biomarker” (biyobelirteç) olarak kullanılabilecekleri bildirilmiştir (Oesterreich ve diğ., 1993; Kai ve diğ., 2003; Capello ve diğ., 2003a; Ryu ve diğ., 2003).

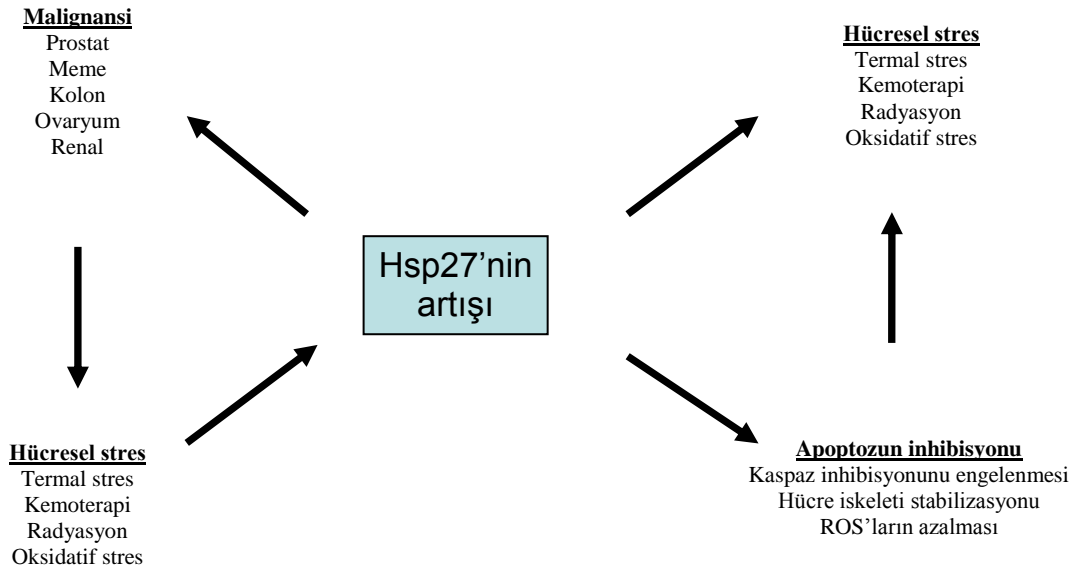
Çoğu kanser türünde Hsp’lerin üretimi artmaktadır. Hsp’ler tümör hücrelerinin proliferasyonu, farklılaşması, invazyonu, metastazı, ölümü ve immün sistem tarafından tanınması ile ilişkilidir (Ciocca and Calderwood, 2005). Artan Hsp70 anlatımının, hücreleri enerji kaybı sonucunda ortaya çıkan nekrozdan koruduğu bildirilmiştir (Kabakov ve Gabai, 1995).

Kanser hastası bireylerin hücrelerinde Hsp-peptit kompleksleri oluşur. Bu anormal peptitlerin hasta hücreler içerisinde bulunuşu, kanserden kansere ve bireyden bireye farklılık gösterir. Bu yüzden anormal peptitlerin çok düşük düzeydeki oluşumu dahi kanser düşüncesini akla getirmelidir (Laad ve diğ., 1999). Ayrıca Hsp’ler bazı kanser tiplerinde hücre farklılaşma derecesinin de göstergesidir. Meme kanseri 300 hasta üzerinde yapılan bir çalışmada, Hsp27’nin lokalizasyonunun daha saldırgan tümörlerle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Thor ve diğ., 1991). Meme kanserinde Hsp27 ve Hsp70 düzeyindeki artış, kanser hücrelerinin kemoterapiye karşı olan direncinin göstergesidir

(Ciocca and Calderwood, 2005). Özellikle bazı kanser tedavilerinde azalan Hsp anlatımı tedavinin etkili olduğunu işaret etmektedir.

Stresle indüklenen bir protein olan Hsp70'in, TNF- α ve TNF- β tarafından indüklenen apoptotik hücre ölümünde baskılayıcı etki gösterdiği bilinmektedir (Jaattela ve Wissing, 1993). Prostat kanserli hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada, hasta bireylerdeki Hsp70 anlatımının kontrol gruplarına göre fazla olduğu ortaya konulmuştur (Abe ve diğ., 2004). Jones ve diğ. (2004) tarafından yapılan bir çalışmada, bir bitki flavonoidi olan kersetinin, prostat kanseri hücrelerinde Hsp70 anlatımını baskıladığı gösterilmiştir. İnsan prostat dokuları kullanılarak yapılan son immünohistokimyasal çalışmalar, prostat kanseri saldırganlığı, progresyonu ve hormona cevap vermeyen fenotip gelişimi ile Hsp27 arasında ilişki olduğunu göstermiştir (So ve diğ., 2007). Temelde Hsp27 ve Hsp70, hücrel stres sırasında en fazla indüklenen şaperonlardır. Hücre onarılrken ve ATP seviyesi artarken, ATP-bağımlı şaperonlar (Hsp70 ve Hsp60) yeniden katlanmada, proteinlerin degradasyonunda ve/veya taşınmasında iş görürler (So ve diğ., 2007). Hsp27 ve Hsp70 malignant hücrelerde bol miktarda bulunur ve kemoterapi direncinde iş görür (Jaattela, 1999). Prostat (Cornford ve diğ., 2000), meme (Conroy ve diğ., 1998), ovaryum kanseri (Arts ve diğ., 1999) ve gastrik tümörlerde (Kapranos ve diğ., 2002) yüksek düzeyde Hsp27 saptanmıştır. Hsp27 anlatımı hormon veya kemoterapiye cevap olarak indüklenmekte ve terapi uygulamalarının indüklediği apoptozu baskılamaktadır (Vargas-Roig ve diğ., 1998; Rocchi ve diğ., 2004). Ayrıca, yüksek düzeydeki Hsp70'in çeşitli insan kanser hücrelerinin hayatta kalması için önkoşul olduğu görülmüş ve tümör hücrelerinde Hsp70'in azalmasının hücre ölümü ile sonuçlandığı ortaya konulmuştur (Nylansted ve diğ., 2000).

Hsp'lerin ilaç direnci ("multidrug resistance") (Ciocca ve diğ. 1993) ve apoptozla ilişkili tümörögenезin artışı ile bağlantılı oldukları, farklı tümör modellerinde ortaya konulmuştur (Bruey ve diğ., 2000b). Hsp27'nin koruyucu etkisi, moleküler şaperon rolü sonucunda veya kaspaz aktivasyonundaki direkt etkisiyle, oksidatif stresin modülasyonu ve hücre iskeletinin düzenlenmesiyle ortaya çıkmaktadır (Concannon ve diğ., 2003). Hsp27'nin malignansi, hücrel stres, tümör gelişimi ve apoptoz inhibisyonundaki rolleri Şekil 2.8'de özetlenmiştir.



Şekil 2.8. Malignansi, hücresel stres, tümör gelişimi ve apoptoz inhibisyonunda Hsp27'nin rolü.

İnsan ovaryum tümör hücre hattında Hsp27'nin CDDP direnci ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. CDDP platin içeren bir bileşiktir ve potansiyel bir anti-kanser ajanıdır. Çeşitli malignan tümörlerin (testis, baş ve boyun, özofagus, akciğer, ovaryum ve idrar torbası kanserleri) tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Uzun süreli uygulamaları sınırlandırılmıştır, çünkü CDDP uygulamaları sonunda dirençli hücreler gelişmekte ve bunlar da malignan hale gelmektedir. Western analizleri bu tip hücrelerde Hsp27 ve Hsp70'in anlatımının arttığını göstermiştir. Sonuçlar bu HSP'lerin CDDP direnç mekanizmasında önemli olduklarını ortaya koymuştur (Yamamoto ve diğ., 2001).

Hsp27 birçok beyin tümöründe de saptanmıştır, anlatımı ile tümörün malignansi derecesi arasında bir korelasyon vardır (Hitotsumatsu ve diğ., 1996; Khalid ve diğ., 1995). Transforme hücrelerdeki Hsp27 anlatımı, termodirenç ve ilaç direnci ile bağlantılıdır (Landry ve diğ., 1989; Huot ve diğ., 1991; Richards ve diğ., 1996) ve tümörlerin anlatımını yaptığı MDR1, Hsp27'nin birlikte anlatımına bağlıdır (Schneider ve diğ., 1998). Ayrıca, düşük pH değerlerine adapte olmuş memeli hücre hatlarında Hsp27 düzeyleri artmıştır (Wachsberger ve diğ., 1997). Hsp27'nin ilaç direnci ile ilişkili olduğu insan meme kanseri hücre hatlarında da gösterilmiştir. Hsp27'nin anlatımındaki

artışın, bu hücrelerde Dox'a karşı (kemoterapik bir ajan) direnci 3 kat artırdığı görülmüş (Oesterreich ve diğ., 1993), ayrıca gastrik kanserde Hsp27'nin anlatımının arttığı saptanmıştır (Ryu ve diğ., 2003). Yapılan bir çalışma Hsp70'in aşırı anlatımının, tümörogenik meme kanseri hücrelerinin hayatta kalması için gerekli olduğunu göstermiştir. Hsp70'in azalması tümöre-özel ölüm programını (apoptozu) aktive etmektedir (Nylandsted ve diğ., 2000).

α B-kristalin düzeyindeki artış ile Alzheimer ve multipl skleroz gibi nörodejeneratif hastalıklar arasında ilişki olduğu bilinmektedir (Nakamoto ve Vigh, 2007). α B-kristalin genindeki mutasyonlar, desmin bağlantılı kardiyomiyopati ve kataraktogenez ile bağlantılıdır. Kataraktın patagonezi zara bağlanan α -kristalinin artışı ile ilişkilidir (Cobb ve Petrash, 2000; Cobb ve Petrash, 2002).

2.6. 14-3-3 PROTEİNİ

14-3-3 proteinleri ilk kez sığır beyin homojenatının 14. fraksiyonunun 3.3 pozisyonundan izole edilmiştir (Moore ve Perez, 1967). Molekül ağırlığı 28 kDa olan 14-3-3 proteinleri evrimsel olarak yüksek derecede korunmuş moleküllerdir. Ökaryotik hücrelerde sürekli olarak anlatımları yapılan 14-3-3 proteinlerinin β , γ , η , ζ , τ , ϵ ve σ olarak isimlendirilen 7 izoformu vardır (Aitken ve diğ., 1992). Bu izoformlardan beş tanesi (β , γ , η , ζ ve ϵ) memeli beyinde, diğer iki tanesi (τ ve σ) ise T hücreleri ve epitel hücrelerinde bulunmaktadır (Aitken, 2006). 14-3-3 proteinleri hücre sinyallerinde, hücre çevriminin düzenlenmesinde, hücre içi trafikte, hücre iskeleti yapısının korunmasında ve transkripsiyonda iş görürler. 14-3-3 proteinleri ile etkileşimde olduğu bilinen 200'den fazla protein vardır ve bu listeye hergün yenileri eklenmektedir (Pozuelo ve diğ., 2004). 14-3-3 izoformlarının Creutzfeldt-Jakob hastalığı (CJD) (Mackie ve Aitken, 2005), Alzheimer (Layfield ve diğ., 1996), Parkinson (Ostrerova ve diğ., 1999) gibi nörodejeneratif hastalıklarla ilişkileri olduğu bilinmektedir. 14-3-3 proteinlerinin sinir hasarı, patojenler, hipoksi ve metabolik stres gibi iç ve dış strese karşı yanıt olarak indüklendiği bilinmektedir (Bae ve diğ., 2003). 14-3-3 proteinlerine ait bu özellikler moleküler şaperonlarla ilişkili görünmektedir (Aitken, 2006).

Yano ve diğ. (2006) *Drosophila* hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmada, ısı stresi ile bu hücrelerdeki 14-3-3 proteinlerinin anlatımlarının arttığını ve bu işlemin HSF'ler tarafından meydana getirildiği göstermişlerdir. Bu çalışmada sitokrom C'nin mitokondriyal prekürsörü olan apositokrom C ile 14-3-3 ζ proteinin etkileşimde olduğu; 14-3-3 ζ proteinin bloke olduğu durumda sitozolde yüksek miktarda apositokrom C agregatlarının oluştuğu gösterilmiştir. Bu çalışma 14-3-3 ζ formunun moleküler şaperon olarak iş gördüğüne dair önemli bir kanıttır (Yano, 2006). 14-3-3 proteinlerinin diğer izoformlarının anlatımlarının da HSF'ler tarafından düzenlendiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Wang ve diğ., 2003; Wang ve diğ., 2004b).

14-3-3 protein ailesi fizyolojik ve patolojik koşullar altında farklı hücrel cevapların düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Özellikle 14-3-3 ζ izoformunun tümör gelişiminde direnç sağladığı bilinmektedir. 14-3-3 ζ birçok kanser tipinde, özellikle ağız, akciğer ve mide kanserinde, aşırı anlatım yapmaktadır (Jang ve diğ., 2004; Matta ve diğ., 2007; Li ve diğ., 2008). Yapılan bir çalışma bu izoformun potansiyel bir moleküler marker olarak, antikanser terapilerin geliştirilmesinde kullanılabileceğini ortaya koymuştur (Li ve diğ., 2008). Akciğer kanseri hücrelerinde yapılan bir çalışmada, özellikle 14-3-3 ζ izoformunun aşırı anlatım yapmasının radyoterapinin etkinliğini azalttığı, bu proteinlerin baskılandığı durumlarda ise terapi etkinliğinin arttığı ortaya konulmuştur (Qi ve Martinez, 2003). Benzer bir çalışmada aynı izoformun ekspresyonunun azalmasının, akciğer kanserinde kemoterapik bir ajan olarak kullanılan CDDP'nin etkinliğini artırdığı gösterilmiştir (Fan ve diğ., 2007).

3.MALZEME VE YÖNTEM

3.1. BİTKİSEL MATERYAL

Bu çalışmada, çeşitli konakçılar üzerinde yaşayan ökseotu (*Viscum album* L. ssp. *album*) (Loranthaceae, Viscaceae) bitkileriyle daha önce gerçekleştirdiğimiz araştırmalarda (Önay, 2002; Önay-Uçar, 2006) belirlediğimiz antioksidan aktivitesi en yüksek bitkiler kullanıldı. İstanbul-Bentler bölgesinde bulunan bir ıhlamur ağacı (*Tilia argentea* Desf. Ex DC) üzerinden Eylül 2006'da toplanan bitkilerin (ISTF No: 37486) yaprakları ayrılarak önce musluk suyu, daha sonra distile su ile iyice yıkandı. Taze yapraklar küçük porsiyonlar halinde (10-20 g), alüminyum folyo ile paketleni, sıvı azotta (-196°C) şok dondurma işlemi uygulandı ve kullanılıncaya dek derin dondurucuda (-70°C) saklandı. Konakçı ağaç ve üzerindeki *V. album* kümelerine ait fotoğraflar Şekil 3.1'de görülmektedir.



Şekil 3.1: (a) Ihlamur ağacı üzerindeki *V. album* kümelerine ait fotoğraf, (b) *V. album* bitkisinin yakın plan görüntüsü

3.2. BİTKİ EKSTRESİNİN HAZIRLANMASI

Derin dondurucuda (-70°C) saklanan taze ökseotu yaprakları (20 g) oda sıcaklığında çözüldükten sonra, bistüri yardımıyla küçük parçalara bölündü ve metanol (MeOH) (%99.9) (160 ml) içeren ağzı kapalı bir balonda, 150 devir/dakika hızda çalkalama yapan bir çalkalayıcıda (Certomat® H, Braun) 1 gün bekletildi. Bu süre sonunda bitki kalıntıları süzülerek uzaklaştırıldı. Süzüntü bir balona alındı ve MeOH, vakumlu buharlaştırıcıda (Rotary Evaporator RE 100) kuruluğa kadar uçuruldu. Elde edilen ekstre, 40 mg/ml derişimde olacak şekilde dimetilsülfoksit (DMSO)(%99.9) içinde çözüldürüldü ve filtreden (Millipore filtre, 0.22 µm) geçirilerek steril edildikten sonra, sitotoksik analizlerde kullanıldı.

3.3. C6 SIÇAN GLİOMA HÜCRELERİNİN KÜLTÜRLEME KOŞULLARI

Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları'ndan sağlanan C6 sıçan glioma hücrelerine ait altkültürlerin yapılmasında sırasıyla şu işlemler uygulandı (Freshney, 2000). Steril bir ortamda, 25 cm²'lik kültür kabı içindeki besiyeri (8 ml) uzaklaştırıldı. Tripsini inhibe eden serum artıklarını ortamdan uzaklaştırmak amacıyla, 5 ml (0.2 ml/cm²) PBS ("Dulbecco's Phosphate Buffered Saline", pH 7.2), hücrelerin bulunduğu yüzeyin karşısından dikkatlice kültür kabına aktarıldı ve hücreler yıkandıktan sonra PBS döküldü. Kültür kabı içine, yine hücrelerin bulunduğu yüzeyin karşısından, 1 ml Tripsin/EDTA [% 0.2 tripsin, % 0.04 EDTA (etilendiamintetraasetik asit)] eklendikten sonra enzim solüsyonunun tüm hücre yüzeyini kaplaması sağlandı ve kültür kabı 37°C'lık etüve kaldırıldı. Hücreler bir film şeklinde kültür kabından ayrılınca kadar (yaklaşık 1 dakika) etüve (37°C) tutulduktan sonra 5 ml (0.2 ml/cm²) besiyeri [streptomisin (100 U/ml), penisilin (100 µg/ml), amfoterisin B (0.25 µg/ml), % 10 fetal sığır serumu (FBS) içeren ve pH'sı 7.4 olan DMEM/F12 HAM ("Dulbecco's Modified Eagle's Medium / Nutrient Mixture F-12 HAM")] eklenip pipet yardımıyla tüm hücreler birbirlerinden ve tutundukları yüzeyden ayrılarak süspansiyon haline getirildi. Yeni bir kültür kabında altkültürleme yapılmadan önce hücreler bir hemositometre yardımıyla sayıldı ve rutin bir altkültür için gerekli olan sayıda (1x10⁵ hücre/ml) hücre alınarak yeni kültür kabına aktarıldı. Hücreler % 5 CO₂ sağlayan etüve (Heraeus D-6450, Hanau), 37°C'da üretildi ve 3 günde bir altkültürleri yapıldı. Başlangıç hücre sayısı 1x10⁵ hücre/ml olan 2 günlük C6

hücrelerinin mikroskoptaki (OLYMPUS CK2, Digital kamera apartmanlı faz kontrast invert mikroskop; Motic Image Plus Programı) görüntüsü Şekil 3.2’de görülmektedir.



Şekil 3.2. Başlangıç hücre sayısı 1×10^5 hücre/ml olan 2 günlük C6 glioma hücrelerinin faz kontrast invert mikroskop altındaki görüntüsü

3.4. HÜCRELERİN ÇOĞALMA EĞRİSİNİN OLUŞTURULMASI

C6 glioma hücrelerinin jenerasyon süresini hesaplayabilmek ve çoğalma eğrisini çizmek amacıyla, başlangıç sayıları 5×10^4 ve 1×10^5 hücre/ml olan kültürlerden 10 gün boyunca her gün, kültürün başlatıldığı saatte sayım yapıldı. Hücreler 1:1 (v/v) tripan mavisini (% 0.5, PBS içinde hazırlandı) ile boyandı ve hemositometrede sayılarak canlı hücre sayısı belirlendi (Fershney, 2000). Absise zaman (gün), ordinata hücre sayıları yerleştirilerek çizilen yarı logaritmik çoğalma eğrisi yardımıyla hücrelerin lag, log ve durağan evreleri belirlendi. Ölçümler 3 tekrarlı olarak yapıldı ve veriler GraphPad Prism 4.0 programı kullanılarak, tek-yönlü ANOVA testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi. Elde edilen çoğalma eğrileri kullanılarak jenerasyon sayısı ve süreleri aşağıdaki formüllere göre hesaplandı (Moat, 1979):

$$n = (\log N_2 - \log N_1) / \log 2$$

$$St = (T_2 - T_1) / n$$

n : jenerasyon sayısı

N₂: logaritmik bölünme sonundaki hücre sayısı

N₁: logaritmik bölünme başlangıcındaki hücre sayısı

St : jenerasyon süresi

T₂: logaritmik bölünmenin bitiş zamanı

T₁: logaritmik bölünmenin başlangıç zamanı

3.5. SİTOTOKSİSİTE ANALİZİ

Sitotoksiste analizleri Mosmann (1983) tarafından önerilen yöntem izlenerek gerçekleştirildi. Bu yöntemde, kültürdeki canlı hücrelerin mitokondriyal dehidrogenaz enziminin aktivitesi ile tetrazolium halkasının koparılması sonucu MTT molekülünün suda çözünmeyen formazan kristallerine dönüşmesi sağlanır ve bu kristaller DMSO'da çözündürüldükten sonra 540 nm'de absorbands ölçümü yapılır. Hazırlanan ekstrenin C6 sıçan glioma hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini saptamak amacıyla, hücreler yetiştirildikleri besiyerinin bileşimi farklı 3 gruba ayrıldı:

1. Farklı derişimlerde ekstre içeren besiyerinde yetişenler : **Deney grubu**
2. DMSO içeren besiyerinde yetişenler : **Kontrol 1**
3. Ekstre veya DMSO içermeyen besiyerinde yetişenler : **Kontrol 2**

DMSO içinde çözündürülerek hazırlanan bitki ekstresi, DMEM:F12 HAM besiyeri ile 1:4 oranında sulandırıldı ve hazırlanan bu stoklardan 5, 10, 25, 75, 100, 250, 500 ve 750 µg/ml derişimlerinde bitki ekstresi içeren besiyerleri hazırlandı. Deney grubu hücrelerine uygulanan farklı derişimlerdeki ekstre DMSO içerdiğinden, DMSO'nun C6 glioma hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi de incelendi. Bu amaçla, Kontrol 1 grubu hücreler, ekstre uygulanan örneğin içinde bulunan DMSO ile aynı oranlarda DMSO içeren besiyerlerinde yetiştirildi. Ekstre ve DMSO içermeyen besiyerinde yetiştirilen

hücreler Kontrol 2 grubunu oluşturdu. Daha sonra her bir gruba aşağıdaki işlemler uygulandı.

96 kuyucuklu kültür kaplarının kuyucuklarına, 1×10^5 hücre/ml içeren hücre süspansiyonundan 200 μ l konularak; % 90'dan fazla bağıl nem ve % 5 CO₂ sağlayan 37 °C'lık etüvde inkübe edildi. Kültür kabına tutunmuş olan hücrelerin üzerindeki besiyeri 24. saatin sonunda uzaklaştırıldı. Deney grubu hücrelerin üzerine farklı derişimlerde ekstre içeren besiyerlerinden, Kontrol 1 grubuna DMSO içeren besiyerlerinden, Kontrol 2 grubuna ise sadece DMEM:F12 HAM besiyerinden 200'er μ l uygulanarak 48 saat etüvde (37°C, %5 CO₂) tutuldu. Bu süre sonunda hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırılarak, 30 μ l MTT stok çözeltisinden (5mg/ml, PBS içinde hazırlandı) eklendi ve 4 saat etüvde bekletildi. Formazan kristallerinin çözünmesi için 150 μ l DMSO eklenip, çözelti homojen hale gelinceye kadar kültür kabı 37°C'da çalkalandı (150 devir/dakika, Certomat® H, Braun). Oluşan renkli ürünün 540 nm dalga boyundaki absorbansı ölçüldü ve sonuçlar aşağıda verilen formül yardımıyla değerlendirildi.

$$\% \text{ Canlılık} = \frac{\text{Deney grubu hücrelerinin absorbansı}}{\text{Kontrol 2 grubu hücrelerinin absorbansı}} \times 100$$

Deneyler 12 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

3.6. HSP'LERİN YÜKSEK SICAKLIK UYGULAMALARI İLE İNDÜKSİYONU

Literatür verilerine göre, hücrelerdeki stres proteinlerinin anlatımını en fazla indükleyen sıcaklık uygulamasının 42°C'da 1 saat bekletme olduğu ve bunu 6 saatlik bir dinlenme periyodunun takip etmesi gerektiği bilinmektedir (Zhang ve diğ., 2001). Bu çalışmada da C6 sıçan glioma hücrelerindeki ısı şoku proteinleri, hücrelerin 42°C'da 1 saat bekletilmesinin ardından 6 saatlik bir dinlenme periyodu uygulanarak indüklendi.

Deneyleerde 75 cm²'lik kültür kabında üretilen ve başlangıç sayıları 1x10⁵ hücre/ml olan 3 günlük hücreler kullanıldı. Hsp indüksiyonunu ve ekstrenin bu indüksiyon üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla 4 farklı hücre grubu oluşturuldu:

Kısa gösterim

Kontrol grubu : Ekstre içermeyen ve ısı şoku uygulanmayan grup	= Kontrol
Deney grubu 1 : Ekstre içeren ve ısı şoku uygulanmayan grup	= VE
Deney grubu 2 : Ekstre içermeyen ve ısı şoku (42°C) uygulanan grup	= Isı şoku
Deney grubu 3 : Ekstre içeren ve ısı şoku (42°C) uygulanan grup	= VE + Isı şoku

Kontrol grubu hücreler (Kontrol) normal inkübasyon koşulunda (37°C) tutuldu. Ekstreler deney grupları oluşturulduktan 1 gün sonra besiyerine eklendi. Isı şoku uygulamaları ise deneyin 3. günü 42°C'da 1 saat tutularak gerçekleştirildi. Isı şoku uygulaması yapılan gruplar, 37°C'da 6 saat dinlendirildi. Bu inkübasyonu takiben, hücrelerin üzerindeki besiyerleri uzaklaştırıldı; sonra sırasıyla PBS ile yıkama ve Tripsin/EDTA (% 0.2 tripsin, % 0.04 EDTA) uygulaması yapıldı. Hücreler tutundukları yüzeyden ayrılınca, 5 ml besiyeri (DMEM/F12 HAM) eklenip pipet yardımıyla tüm hücreler birbirlerinden ve tutundukları yüzeyden ayrılarak süspansiyon haline getirildi. Bu süspansiyondaki hücreler bir tüpe alınarak santifjleme (3000xg, 5 dakika, 25°C) (Janetzki T5) ile ktrld. ktrme işlemi tamamlandıktan sonra süpernatant (besiyeri) uzaklaştılp, hücreler (pellet) soğuk PBS içinde yeniden süspansiyon edildi ve aynı koşullarda tekrar santrifüjlendi. Besiyeri kalıntılarını tamamen uzaklaştırmak amacıyla, soğuk PBS ile yıkama işlemi 2 kez tekrarlandı ve hücreler kullanılacakları zamana kadar -70°C'da saklandı.

3.7. SUDA ÇÖZÜNEBİLEN HÜCRESEL PROTEİNLERİN İZOLASYONU

3.7.1. Denatüre Jel Elektroforezi (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi / SDS-PAGE) ve Western Blot Analizleri İçin Hazırlanan Protein Ekstresi

Her bir kültür kabından elde edilen hücreler (~1,7x10⁷ hücre/ml), 2 ml soğuk (4°C) parçalama tamponu [% 0.04 EDTA (etilendiamintetra asetik asit), %1 Triton X-100, 1 mM PMSF (fenilmetilslfonil florür) ve 0.02 M Tris-HCl (pH 6.8)] ile, 5 kez tekrarlanan periyotlarda 20 saniye ultrasonik su banyosu (Ultraclear Industrial,

Ultrasonic Water Bath), 20 saniye buz banyosu içinde tutularak parçalandı. Homojenat 4°C’da 15000xg hızda (Eppendorf Centrifuge 5810 R), 20 dakika santrifüj edildi. Üst sıvıda bulunan suda çözünebilen proteinler, SDS-PAGE ve Western Blot analizlerinde kullanılmak üzere –70°C’da saklandı (Zhang ve diğ., 2001).

3.7.2. İki Boyutlu Elektroforez (2-DE) İçin Hazırlanan Protein Ekstresi

İki mililitre hücre süspansiyonunun ($1,7 \times 10^7$ hücre/ml) çöktürülmesiyle elde edilen $\sim 3,4 \times 10^7$ hücre, 3 ml lizis tamponu [9 M üre, %4 CHAPS (3-[(3-kolamidopropil) dimetilamino]-1-propan sulfonat), % 0.5 amfolit (pH 3-10), 50 mM DTT (ditiotritol) ve 40 mM Tris (pH 7.4)] ile işleme sokuldu ve 5 kez tekrarlanan periyotlarda 20 saniye ultrasonik su banyosu (Ultraclear Industrial, Ultrasonic Water Bath), 20 saniye buz banyosu içinde tutularak parçalandı. Homojenat 4°C’da 15000xg hızda, 20 dakika santrifüj edildi (Eppendorf Centrifuge 5810 R). Üst sıvıda yer alan suda çözünebilen proteinler 2-DE analizlerinde kullanılmak üzere –70°C’da saklandı (Walker, 2002).

3.8. PROTEİN KONSANTRASYONUNUN BELİRLENMESİ

Hazırlanan protein ekstralarının konsantrasyonlarının belirlenmesinde Bradford yöntemi kullanıldı (Bradford, 1976). Asidik boya (Bradford belirteci), 25 mg Coomassie brilliant blue G-250’nin, 12.5 ml %95 etanolde (EtOH) çözüldürülüp, 25 ml % 85 fosforik asit (H_3PO_4) eklendikten sonra, 250 ml’ye tamamlanıp Whatman No.1 filtreden geçirilmesiyle hazırlandı ve kullanılmadan önce 5 kez sulandırıldı.

5 ml belirteç üzerine 0.1 ml örnek (1x, 10x ve 100x sulandırımında hazırlanmış protein ekstresi) hızla eklenip vorteks ile karıştırıldı. Standart olarak 0.1-1.5 mg/ml konsantrasyonda hazırlanmış sığır serum albumini (“Bovine Serum Albumin”, BSA çözeltileri, kör örnek olarak protein ekstresinin hazırlandığı tampon, kör standart olarak saf su kullanıldı. Karışımlar 15 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra, 595 nm’de köre karşı absorbans ölçümü yapıldı. Standartların protein çözeltilerinin konsantrasyonları ile absorbans değerleri kullanılarak standart grafik hazırlandı. Örneklerin protein konsantrasyonu bu grafikte elde edilen doğru denklemi yardımıyla hesaplandı.

3.9. ELEKTROFORETİK ANALİZLER

3.9.1. Denatüre Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)

Suda çözünebilen hücresel proteinlerin denatüre jel elektrofrez (SDS-PAGE) ile ayrıştırılmasında Walker (2002) tarafından önerilen yöntem kullanıldı. İşlem sırasında kullanılan çözeltiler Tablo 3.1’de, jellerin hazırlanması sırasında kullanılan çözelti oranları ve işlem sırası Tablo 3.2’de verildi. Önce jelin 1. kısmı (ayırma jeli) döküldü ve hava ile teması engellemek üzere jel yüzeyi 1 ml distile su ile kapatıldı. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra (yaklaşık 1 saat) yüzeydeki su uzaklaştırıldı ve jelin 2. kısmı (yükleme jeli) dökülüp tarak yerleştirildi. Polimerizasyon sonunda (yaklaşık 30 dakika) jel kaseti elektrofrez aletine (Mini-PROTEAN 3 Cell, BIO-RAD) yerleştirildi ve örnekler 1:1 oranında örnek yüklemeye tamponu ile karıştırılıp 5 dakika kaynatıldıktan sonra, her bir cepte 20 µg protein olacak şekilde uygulandı.

Tablo 3.1. SDS-PAGE için hazırlanan çözeltiler

Çözeltiler	Bileşenleri
Stok akrilamid çözeltisi	Akrilamid.....30 g Bis.....0.8 g Distile su ile 100 ml’ye tamamlandı
1.875 M Tris-HCl tamponu (pH 8.8)	Trizma-Baz.....45.43 g 3 N HCl ile pH 8.8’e ayarlandı Distile su ile 200 ml’ye tamamlandı
0.6 M Tris-HCl tamponu (pH 6.8)	Trizma-Baz.....14.54 g 3 N HCl ile pH 6.8’e ayarlandı Distile su ile 200 ml’ye tamamlandı
%10 Sodyum dodesil sülfat (SDS)	SDS.....10 g Distile su ile 100 ml’ye tamamlandı
%10 Amonyum persülfat (APS) (polimerizasyon başlatıcı, taze hazırlanır)	APS.....0.1 g Distile su ile 1 ml’ye tamamlandı
1 x Yürütme tamponu (25 mM Tris, 192 mM glisin, %0.1 SDS, pH 8.3)	Tris.....3.03 g Glisin.....14.4 g SDS.....1 g Distile su ile 1 litreye tamamlandı
Örnek yüklemeye tamponu	0.6 M Tris-HCl (pH 6.8).....5 ml SDS.....0.5 g Sukroz.....5 g β-Merkaptoetanol.....0.25 ml Bromofenol mavisi (% 0.5 stok).5 ml Distile su ile 50 ml’ye tamamlandı

Tablo 3.2. SDS-PAGE'de kullanılan jelin hazırlanması

Solüsyonlar	Ayırma jeli (%10 Akrilamid)	Yükleme Jeli (% 5 Akrilamid)
Stok akrilamid solüsyonu	13.3 ml	1.35 ml
1.875 M Tris-HCl tamponu (pH 8.8)	8.0 ml	-
0.6 M Tris-HCl tamponu (pH 6.8)	-	1.0 ml
%10 SDS	0.4 ml	0.1 ml
Su	18.1 ml	7.5 ml
%10 Amonyum persülfat (APS)	0.2 ml	0.05 ml
Karışımın havası alındı		
TEMED	14 µl	14 µl
Jel kasetine döküldü		

Elektroforez işlemi sabit voltajda (200 V) gerçekleştirildi. Bromfenol mavisine ait bant jelin alt kenarına ulaşana dek (~40 dakika) ayırım sürdürüldü. İşlem sonunda akım kesilerek jel kaset arasından çıkarıldı ve bantlar iki farklı yöntemle (Coomassie parlak mavisi veya gümüş nitrat ile boyama) görünür hale getirildi.

3.9.2. İki Boyutlu Jel Elektrofrez (“2-Dimensional Gel Electrophoresis”, 2-DE)

Bu çalışma iki farklı alet kullanılarak gerçekleştirildi. Birinci boyut, yani izoelektrik odaklama için PROTEAN IEF Cell (BIO-RAD) ve Ettan IPGphor II (Amersham Biosciences), ikinci boyut için ise PROTEAN II XL (BIO-RAD) jel elektroforez aleti kullanıldı.

Proteinleri izoelektrik noktalarına (pI) göre ayırmak amacıyla izoelektrik odaklama şeritleri (ReadyStrip IPG Strip, pH 4-7, 17 cm ve Immobiline™ DryStrip, pH 4-7, 13 cm) ve 2 boyutlu elektroforez kiti (ReadyPrep™ 2-D Starter Kit, BIO-RAD, 163-2105) kullanıldı. Kit içerisinde bulunan bileşenler ve içerikleri Tablo 3.3'te verildi.

Tablo 3.3. 2-DE kiti bileşenleri ve içerikleri

Kit bileşenleri	İçerikleri
Rehidrasyon/Örnek Tamponu ("ReadyPrep Rehydration/Sample Buffer")	8 M Üre % 2 CHAPS 50 mM DTT % 2 (w/v) Bio-Lyte [®] 3/10 amfolit Bromofenol mavisi (eser miktarda)
Dengeleme Tamponu I ("Equilibration Buffer I")	6 M Üre % 2 SDS (sodyum dodesil sülfat) 0.375 M Tris-HCl (pH 8.8) % 20 Gliserol %2 (w/v) DTT
Dengeleme Tamponu II ("Equilibration Buffer II")	6 M Üre % 2 SDS 0.375 M Tris-HCl (pH 8.8) % 20 Gliserol % 2.5 (w/v) İyodoasetamid
Kapatma çözeltisi	% 0.5 Agaroz 25 mM Tris 192 mM Glisin % 0.1 SDS Bromofenol mavisi (eser miktarda)

Örnek hacmi şerit başına 1 mg/ml protein uygulanacak şekilde hesaplanarak kit içindeki Rehidrasyon/Örnek Tamponu ile karıştırıldı. Bu karışımdan 17 cm'lik şerit için 300 µl, 13 cm'lik şerit için 200 µl alınıp tek kullanımlık rehidrasyon/dengeleme tepsisinin oluğu içine, kenarlardan 1'er cm boşluk bırakarak ve kabarcık oluşturmadan konuldu. Şerit arada hava kabarcığı oluşturmayacak şekilde bu karışımın üzerine yerleştirildi. İçinde protein olan bu karışımın şeride geçmesi için 1 saat beklendikten sonra, şeridin içinde bulunduğu kuyucuğa 3 ml mineral yağ eklendi. Bu tepsi rehidrasyon işlemi tamamlanana kadar (~12 saat) oda sıcaklığında bekletildi. Bu süre sonunda izoelektrik odaklama işlemine geçildi. İzoelektrik odaklama şeridinin üzerindeki mineral yağ 10 saniye süzöldükten sonra, şerit PROTEAN IEF (ya da Ettan IPGphor II) odaklama tepsisine aktarıldı ve üzerine tekrar 3 ml taze mineral yağ konuldu. Tepsi, alete yerleştirilerek, izoelektrik odaklama işlemi programlandı. Programa göre odaklama işlemi 20°C'da tamamlandı (Tablo 3.4).

Tablo 3.4. Örneklerin izoelektrik odaklama koşulları (50 μ A/şerit, 20°C)

Basamaklar	13 cm'lik şerit		17 cm'lik şerit	
	Voltaj (V)	Süre / voltaj modu	Voltaj (V)	Süre / voltaj modu
1.Basamak	250 V	20 dakika/lineer	500 V	1 saat
2. Basamak	10.000 V	2.5 saat/lineer	1000 V	1 saat/gradyent
3.Basamak	10.000 V	40.000 V-saat / hızlı	8000 V	2.5 saat/gradyent
4.Basamak	-	-	8000 V	2 saat

İşlem tamamlandıktan sonra şerit temiz ve kuru bir rehidrasyon/dengeleme tepsisine alındı ve denatüre jel elektroforezi (2.boyut) yapılarına kadar -70°C'da saklandı.

İzoelektrik noktalarına göre ayrılmış proteinlerin molekül ağırlıklarına göre ayrılacağı ikinci boyuta (SDS-PAGE) geçmeden önce, izoelektrik odaklama şeridi 2 boyutlu jel elektroforez kiti içinde bulunan dengeleme tamponları ile işleme sokuldu. Bu amaçla oda sıcaklığına getirilen şeridin üzerine, kit içinde bulunan Dengeleme Tamponu I'den 4 ml konuldu ve çalkalayıcı yardımıyla yavaşça (30 devir/dakika) 10 dakika karıştırıldı. Şerit üzerindeki Dengeleme Tamponu I dökülüp yerine, 4 ml Dengeleme Tamponu II konuldu ve yine çalkalayıcıda yavaşça (30 devir/dakika) karıştırıldı. Dengeleme Tamponu II uzaklaştırıldıktan sonra şerit bir ölçü kabı içindeki 1x Yürütme Tamponu'na (bkz. Tablo 3.1) batırılıp çıkarıldı ve 2. ayırım işlemi için jel kaseti üzerine yerleştirildi. Şeriti jele yapıştırmak için kasetin üst kısmına pastör pipeti kullanılarak kapatma çözeltisi hava kabarcığı oluşturmayacak şekilde döküldü. Agarozun polimerize olması için 5 dakika beklendikten sonra, tankın içine 1xYürütme Tamponu (bkz. Tablo 3.1) doldurulup elektroforez işlemine başlandı. Elektroforez işlemi 30 dakika 16 mA/jel, ~5 saat 24 mA/jel akım geçecek şekilde gerçekleştirildi. Bromfenol mavisine ait bant jelin alt kenarına ulaşana dek (~5.5 saat) ayırım sürdürüldü. İşlem sonunda akım kesilerek jel kaset arasından çıkarıldı, şeridin asidik ucuna karşılık gelen alt köşesi kesilerek işaretlendi ve Bölüm 3.10'daki yöntemlere göre boyandı.

3.10. BOYAMA YÖNTEMLERİ

Elektroforez sonunda jelde ayrılmış proteinler iki farklı boyama yöntemi ile görünür hale getirildi.

3.10.1. Coomassie Boyama

Bu yöntemde boyama işlemi iki farklı şekilde yapıldı. Birinci yöntemde, proteinlerin kütle spektrometrik analizleri için uygun, InstantBlue (Expedeon) boyası kullanıldı. Proteinlerin çok kısa bir sürede görünür hale geldiği bu yöntemde, jel plastik bir kaba alınıp, üzerine boya konulduktan sonra 1 saat, 50 devir/dakika hızda, oda sıcaklığında çalkalanarak bekletildi. İşlem tamamlanınca jel distile su içine alındı.

Hassasiyeti 0.3-1 µg protein/bant olan ikinci yöntem ise Asubell (1989)'e göre gerçekleştirildi. Jel, alkole ve aside dayanıklı plastik bir kaptaki boyama çözeltisi [50:10:40 hacim oranlarındaki MeOH:AcOH (Asetik asit):H₂O karışımı içinde hazırlanmış, % 0.05 (w/v) Coomassie parlak mavisi ("Coomassie brilliant blue" R-250)] içinde 2 saat, 37°C'da çalkalandı. Daha sonra fazla boyayı uzaklaştırma ("destaining") çözeltisi [5:7:88 hacim oranlarında hazırlanmış MeOH:AcOH:H₂O karışımı] içinde 12 saat süreyle, 50 devir/dakika hızda çalkalayarak bekletildi. Bu çözelti jelin alt zemini boyadan tamamen arınmaya kadar, sık sık değiştirildi ve yıkama işlemi tekrarlandı. Jelde oluşan spotlar ya da bantlar densitometrede (GS-800) analiz edildi (bkz. Bölüm 3.11).

3.10.2. Gümüş Boyama

İlk defa Heukeshuven ve Dernick (1985) tarafından kullanılan ve daha sonra Klose ve Kobalz (1995) tarafından geliştirilen, 2-boyutlu elektroforez jellerinin boyanmasında kullanılan bu yöntem için gerekli çözeltiler Tablo 3.5'te verildi:

Tablo 3.5. Gümüş boyama yöntemi için gerekli çözeltiler

Çözeltiler	Bileşenleri
A. Fiksatif çözeltisi	% 50 (v/v) Etanol % 10 (v/v) Asetik asit Ultrasaf su ile 1 litreye tamamlandı
B. Hassaslaştırma çözeltisi	0.5 M Sodyum asetat % 0.2 (w/v) Sodyum tiyosülfat (5 sulu) % 30 (v/v) Etanol % 0.5 (v/v) glutardialdehit Ultrasaf su ile 1 litreye tamamlandı
C. Boyama çözeltisi	% 0.1 (w/v) Gümüş nitrat % 0.01 (v/v) Formaldehit Ultrasaf su ile 1 litreye tamamlandı
D. İnkübasyon çözeltisi	% 2.5 (w/v) Sodyum karbonat Ultrasaf su ile 1 litreye tamamlandı
E. Görüntü oluşturma çözeltisi	% 2.5 (w/v) Sodyum karbonat % 0.01 (v/v) Formaldehit % 0.05 (w/v) Sodyum bikarbonat % 0.02 (w/v) Thimerosal Ultrasaf su ile 1 litreye tamamlandı
F. Durdurma çözeltisi	0.05 M EDTA Ultrasaf su ile 50 ml'ye tamamlandı

Plastik bir kap içerisinde bulunan jel, sürekli çalkalanarak (50 devir/dakika, Heidolph Unimax 1010) ve sırasıyla şu çözeltiler kullanılarak boyandı. Jel, 500 ml A çözeltisi içinde en az 2 saat (ya da tüm gece) fikse edildi. Fiksatif dökülüp 2 saat 500 ml B çözeltisi içinde bekletildikten sonra, 3 kez 20'şer dakika ultra saf su ile yıkandı. Jel daha sonra 500 ml C çözeltisi içinde 45 dakika tutuldu. C çözeltisi döküldükten sonra, jel 20 saniye ultra saf su ile yıkandı ve 1 dakika D çözeltisi içerisinde bekletildi. Son olarak protein spotları belirinceye kadar E çözeltisi içinde (5-20 dakika) tutulan jel, reaksiyonu durdurmak amacıyla F çözeltisi ile işleme sokuldu. Jelde oluşan spotlar densitometrede analiz edildi (bkz. 3.11).

3.11. DENSİTOMETRİK ANALİZLER

Boyanan jeller önce densitometrede (GS-800 Calibrated Densitometer, BIO-RAD), “Quantity One® SW” yazılımı kullanılarak görüntülendi ve spotlar “PDQest™ Advanced 2-D Gel Analysis Software” programı kullanılarak karşılaştırıldı.

3.12. İMMÜNOLOJİK ANALİZLER

Bu analizlerde, Bölüm 3.6’daki yönteme göre elde edilen hücrelerden, Bölüm 3.7’deki yönteme göre elde edilen protein ekstratları kullanıldı. %10 poliakrilamid içeren SDS-PAGE (Walker, 2002) ile ayrılan proteinler, elektroblot yöntemi ile polivinilidinden diflorür (PVDF) membrana aktarıldı. Membran % 5 (w/v) süt tozu (% 0.05 Tween-20 içeren PBS içinde hazırlandı) ile bloke edildikten sonra, bloklama solüsyonu içinde uygun oranlarda hazırlanan primer antikorla (Tablo 3.6) oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.

Tablo 3.6. İmmünojenik analizlerde kullanılan primer ve sekonder antikorlar, kaynakları, elde edildikleri organizmalar ve dilüsyonları

Antikor	Mono/Poliklonal	Firma-Kaynak	Elde edilen organizma	Dilüsyon
Hsp70 (Hsp72) *	Monoklonal	Stressgen	Fare	1:1000
Hsp27 *	Monoklonal	Stressgen	Fare	1:500
Keçi anti-fare IgG (Fab), HRPO işaretli	Poliklonal	Stressgen	Keçi	1:5000
14-3-3 β *	Poliklonal	Edinburg Üniversitesi	Tavşan	1:2000
14-3-3 ε *	Poliklonal	Edinburg Üniversitesi	Tavşan	1:2000
14-3-3 γ *	Poliklonal	Edinburg Üniversitesi	Tavşan	1:3000
14-3-3 η *	Poliklonal	Edinburg Üniversitesi	Tavşan	1:2000
14-3-3 ζ *	Poliklonal	Edinburg Üniversitesi	Tavşan	1:2000
Keçi IgG	Poliklonal	Edinburg Üniversitesi	Tavşan	1:3000

* işareti primer antikorları göstermektedir. Diğer antikorlar sekonder antikorlardır.

Membran, yıkama solüsyonu (% 0.05 Tween-20 içeren PBS) 15 dakika aralıklarla değiştirilerek 1 saat yıkandıktan sonra, bloklama solüsyonu içinde hazırlanan sekonder antikor ile [Hsp'ler için keçi anti-fare IgG (Fab), HRPO (yaban turpu peroksidazı) ile işaretli konjuge antikor (Stressgen), 1:5000; 14-3-3 proteinleri için keçi IgG, HRPO ile işaretli antikor (Edinburgh Üniversitesi, Prof.Dr. Alastair Aitken), 1:3000] oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Membran yıkama solüsyonu ile tekrar yıkandıktan sonra, spesifik protein bantları "ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham)" kullanılarak röntgen filmi (Hyperfilm) üzerine yansıtıldı.

3.13. KÜTLE SPEKTROMETRİSİ ANALİZLERİ

3.13.1. Proteinlerin Tripsinle Kesimi

İki boyutlu elektroforez (2-DE) ile izoelektrik noktalarına ve molekül ağırlıklarına göre ayrımları yapılan proteinler, kütle spektroskopisi (MALDI-TOF MS) ile tanımlanmak üzere, jelden kesilerek küçük tüplere alındı. Proteinlerin jelden geri kazanılmasında Learmonth ve Aitken (2005) tarafından önerilen yöntem kullanıldı. Bu yöntemde kesilen jel parçası üzerine ortamdaki SDS'i uzaklaştırmak için 100 µl 200 mM amonyum bikarbonat [NH₄HCO₃, %50 asetonitril (ACN) içinde hazırlandı] konuldu ve 30 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 30 saniye, 13000 devir/dakika santrifüj yapıldı. Üst sıvı pipetle alınıp, jel parçası üzerine tekrar 100 µl 200 mM NH₄HCO₃ konuldu ve 30 dakika daha oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 1 dakika, 13000 devir/dakika santrifüj edildi. Üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra, jel parçası üzerine tamamen kaplayacak şekilde %100 asetonitril eklendi ve jelin opak hale gelmesi beklendi. Yaklaşık 5 dakika sonra fazla asetonitril tüpten pipet yardımıyla alındı ve jel parçası oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kuru jel üzerine 25 µl tripsin (10 ng/µL tripsin 50 mM NH₄HCO₃ içinde hazırlandı) (Sigma-Proteomics grade) eklendi, jelin rehidre olması için +4°C'da 30 dakika bekletildi ve daha sonra 32°C'da, 16 saat kesim için bırakıldı.

3.13.2. MALDI-TOF MS Analizi ve Proteinlerin Tanımlanması

Tripsinle küçük peptidlere ayrılan proteinler 10 dakika sonikasyona maruz bırakıldıktan sonra 0.5 µl örnek, 0.5 µl α-siyano-4-hidroksisinnamik asit (CHCA)[10 mg/ml CHCA; %40 H₂O, %10 trifloroasetik asit (TFA), %50 ACN içinde hazırlandı] matriks solüsyonu ile birlikte altın tabakaya yüklendi. Analizler MALDI-TOF MS (“Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry”, Matriks destekli lazer dezorpsiyon/iyonizasyon-uçuş süresi kütle spektrometrisi) (Voyager DE-STR mass spectrometer, Applied Biosystems, California, USA) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Peptid kütle aralığı 800-3500 Da olarak ayarlandı. Tripsin otoliz pikleri kullanılarak cihazın kalibrasyonu yapıldı. Kütle spektrometrisinden elde edilen peptid kütleleri PS1 yazılımı (Applied Biosystems) kullanılarak Mascot veya SwissProt veritabanındaki (<http://us.expasy.org/>) bilgilerle eşleştirildi. Protein eşleşmesinde sadece kütle ağırlığı değil, aynı zamanda peptidlerine ayrılan proteinin yaklaşık molekül ağırlığı ve izoelektrik noktası da dikkate alındı. Taramalarda modifikasyon olarak karbamidometilasyon değerlendirildi. Peptid kütle toleransı ve fragment kütle toleransı 50 ppm ve ± 0.1 Da olarak ayarlandı. Peptid karışımının hangi protein olabileceğine dair elde edilen verilerde, sadece istatistiksel olarak önemli skorlar değerlendirildi.

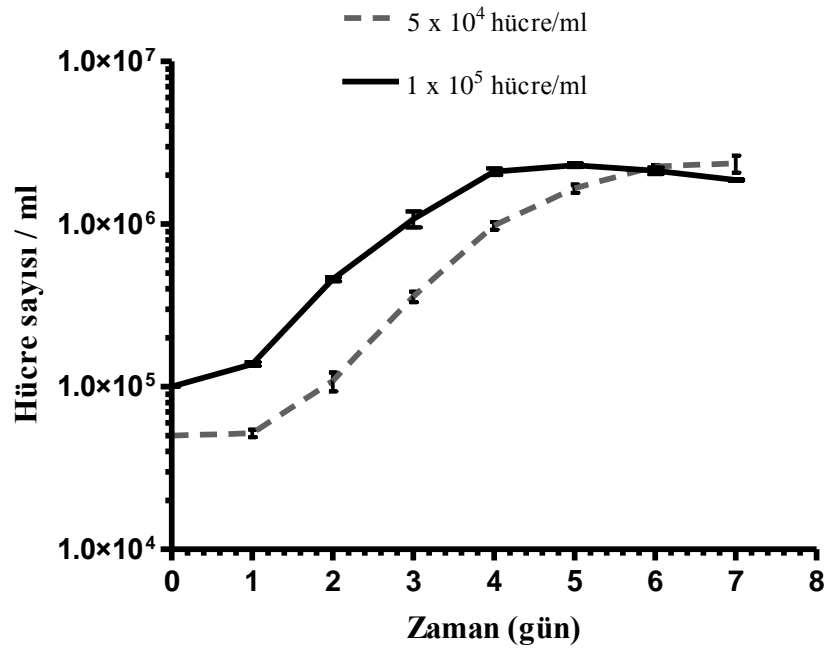
3.14. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Sitotoksik aktivite analizlerine ait tüm sayısal veriler istatistiksel olarak değerlendirildi. Aritmetik ortalamalar (X) ve standart sapmalar (SD) hesaplandı. Gruplar arasındaki farkların anlamlı olup olmadığını belirlemek için ANOVA (tek yönlü varyans analizi; one-way ANOVA) testi yapıldı. Anlamlılık sınırı olarak $P < 0.05$ olarak kabul edildi. Bu istatistiksel işlemler GraphPad Prism 4.0 paket programı ile gerçekleştirildi.

4. BULGULAR

4.1. C6 GLİOMA HÜCRELERİNİN ÇOĞALMA EĞRİSİ

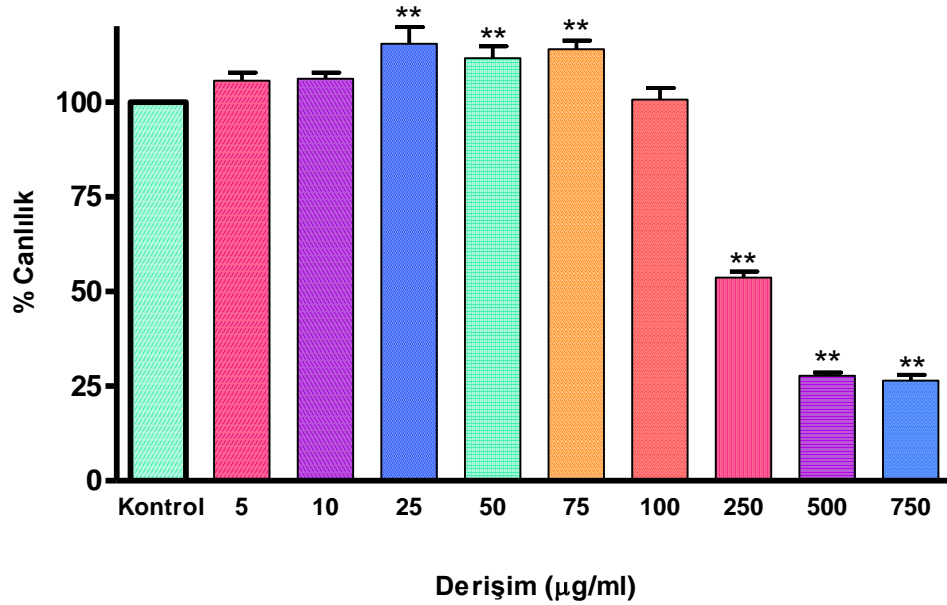
Farklı sayılarda (5×10^4 hücre/ml ve 1×10^5 hücre/ml) başlatılmış C6 glioma hücrelerine ait çoğalma eğrileri Şekil 4.1'de görülmektedir. Başlangıç derişimi 5×10^4 hücre/ml olan hücrelerden elde edilen grafikte, hücrelerin logaritmik faza 1. gün girdikleri, 6. gün ise durağan faza geçtikleri saptandı. Başlangıç derişimi 1×10^5 hücre/ml olan hücrelerden elde edilen grafikte ise, hücrelerin logaritmik faza yine 1. gün girdikleri, durağan faza ise 4. gün geçtikleri saptandı. Elde edilen grafiklerden C6 glioma hücrelerinin jenerasyon süresinin yaklaşık 22 saat olduğu belirlendi. Bu sonuç diğer literatür bilgileriyle de uyum göstermektedir (Barba ve diğ.,1999).



Şekil 4.1. Başlangıç derişimi 5×10^4 hücre/ml ve 1×10^5 hücre/ml olan C6 glioma hücrelerine ait çoğalma eğrisi (Eğrilerin üzerindeki dikey çubuklar standart sapma değerlerini göstermektedir)

4.2. SİTOTOKSİSİTE ANALİZİ

Viscum album ekstresinin C6 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla, 24 saatlik kültürlerle farklı derişimlerde ekstre içeren besiyerleri uygulandı. Ekstre hazırlanırken kullanılan DMSO'nun hücre canlılığına etkisini belirlemek amacıyla yapılan kontrol deneylerine (Kontrol 1) göre, yalnızca % 1.875 DMSO'nun (750 µg/ml konsantrasyondaki ekstrenin içerdiği DMSO) hücre canlılığını % 4.5 oranında inhibe ettiği, bu dozun altındaki değerlerde uygulanan DMSO'nun hücre canlılığı üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı saptandı. Toksik etki gösteren DMSO değeri, ekstre uygulanan örneklerin % canlılık değerlerine eklenerek DMSO'dan kaynaklanan sitotoksik etki bertaraf edildi. Ekstre uygulanmış hücrelerde canlılık testi (MTT analizi) sonucu elde edilen veriler Şekil 4.2'de verildi. Tüm deneyler 12 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Değerlendirmelerde ekstre veya DMSO içermeyen besiyerinde üretilen grup (Kontrol 2), % 100 canlı kabul edildi. Grup içindeki tekrarlar arasındaki tutarlılık tek-yönlü ANOVA testi ile belirlendi.



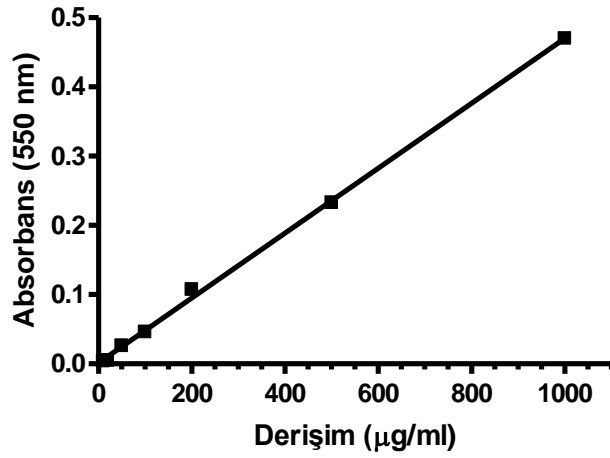
Şekil 4.2. Farklı konsantrasyonda uygulanan ekstrenin C6 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi. ($R^2=0.962$, ** $P < 0.01$)

Yapılan analizler sonucunda, canlı hücre sayısını %50 düşüren ekstre konsantrasyonunun 270 µg/ml ($IC_{50}=270$ µg/ml) olduğu belirlendi. C6 glioma hücrelerine 25 µg/ml, 50 µg/ml ve 75 µg/ml derişimlerinde uygulanan ekstrelerin, proliferatif etki gösterdiği

saptandı. Hücreler üzerinde herhangi bir toksik ya da proliferatif etki göstermeyen ekstre dozunun ise 100 µg/ml olduğu belirlendi ve daha sonraki tüm analizlerde hücrelere, bu dozda ekstre uygulaması yapıldı.

4.3. HÜCRESEL EKSTRELERİN PROTEİN KONSANTRASYONLARI

Hazırlanan tüm hücre ekstralarının protein miktarlarını belirlemek amacıyla Bradford yöntemi kullanıldı (Bradford, 1976). Ekstrelerin içindeki protein miktarları Şekil 4.3'te verilen standart grafik yardımıyla saptandı.



Şekil 4.3. Sığır serum albumin (BSA) standartları (10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 µg/ml) ile çizilen standart grafik ($R^2 = 0.9989$)

Çalışmanın değişik evrelerinde elde edilen hücresel ekstralara ait protein konsantrasyonlarının bir örneği Tablo 4.1'de verildi.

Tablo 4.1. Hücresel ekstralara ait protein konsantrasyonları

Grup	Protein konsantrasyonu (mg/ml)
Kontrol	6.697
VE (Deney grubu 1)	5.854
Isı şoku (Deney grubu 2)	6.774
VE + Isı şoku (Deney grubu 3)	5.445

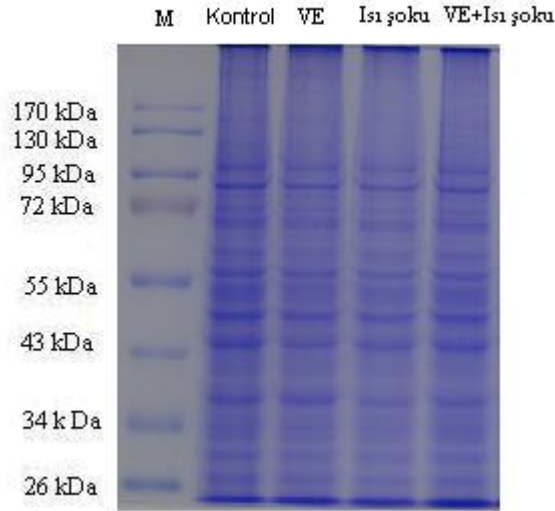
Kontrol: 37°C sıcaklıkta tutulan kontrol grubu, VE: *Viscum* ekstresi uygulanmış, Isı şoku: Yüksek sıcaklık (42°C) ile strese sokulmuş, VE+Isı şoku: *Viscum* ekstresi ve yüksek sıcaklık (42°C) uygulanmış hücrelere ait protein ekstraları

4.4. ELEKTROFORETİK VE İMMÜNOLOJİK ANALİZLER

4.4.1. Denatüre Jel Elektroforezi ve Western Blot

Bölüm 3.6’da belirtilen 4 farklı hücre grubundan (Kontrol, VE, Isı şoku ve VE+Isı şoku) elde edilen suda çözünebilen proteinler, her bir cepte 20 µg protein olacak şekilde jellere yüklendi. Jellerden biri Coomassie boya ile boyanırken, diğer jellerdeki proteinler Bölüm 3.12’de anlatılan yönteme göre PVDF membranlara aktarıldı ve membranlar incelenen herbir protein grubuna özgü antikorlarla (bkz Tablo 3.6) ayrı ayrı işleme sokuldu. Spesifik protein bantları, “ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham)” kullanılarak röntgen filmi (Hyperfilm) üzerine yansıtıldı.

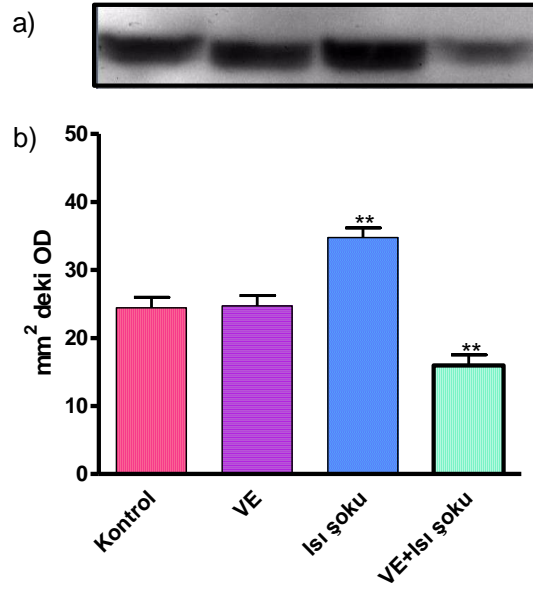
SDS-PAGE ile analizi sonucunda elde edilen bant profilleri Şekil 4.4’te verildi. Jeldeki bantların molekül ağırlıkları, molekül ağırlığı bilinen standart proteinler (Prestained Protein Ladder, Fermentas) yardımıyla belirlendi.



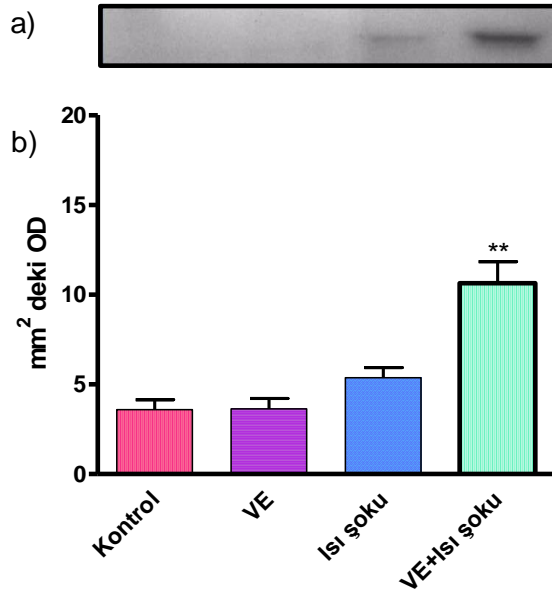
Şekil 4.4. Hücresel ekstrelerin suda çözünebilen protein profilleri. SDS-PAGE ile ayrıştırılan ve Coomassie mavisi ile boyanan jellerden birine ait görüntü. [M: Marker protein karışımı, Kontrol: 37°C sıcaklıkta tutulan kontrol grubu hücrelere ait protein ekstresi, VE: *Viscum* ekstresi uygulanmış, Isı şoku: Yüksek sıcaklık (42°C) ile strese sokulmuş, VE+Isı şoku: *Viscum* ekstresi ve yüksek sıcaklık (42°C) uygulanmış hücrelere ait protein ekstreleri]

Stres Proteinleri (Hsp)

Kontrol ve deney grubu hücreleriyle yürütülen immünolojik analizler sonucunda elde edilen Hsp27 bulguları Şekil 4.5'te ve Hsp70 bulguları Şekil 4.6'da verildi. Şekil 4.5'e göre, yüksek sıcaklık (42°C) uygulaması yapılan hücrelerde (Isı şoku) hem Hsp27 hem de Hsp70 anlatımlarının belirgin bir şekilde arttığı saptandı. *Viscum* ekstresi uygulanan hücrelerde (VE), Hsp27 anlatımında kontrole göre herhangi bir değişim olmadığı, ısı şoku uygulaması yapılan grupta (Isı şoku) Hsp27 anlatımının % 40 oranında arttığı, ekstre uygulaması yapılan ve yüksek sıcaklıkla (42°C) strese sokulan hücrelerde (VE+Isı şoku) ise bu proteinlerin anlatımlarının sadece yüksek sıcaklık uygulaması yapılan hücrelere (Isı şoku) göre yaklaşık %50 oranında azaldığı saptandı. Hsp70'e ilişkin bulgular ise bu indüklenebilir formun Kontrol ve VE grubunda çok düşük düzeyde ortaya çıktığını, buna karşın Isı şoku ve VE+Isı şoku gruplarında Hsp70'in anlatımının arttığını ortaya koydu. Bu artışın kontrole göre, Isı şoku grubunda ~1.5, VE+Isı şoku grubunda ~3 kat olduğu bulundu. Buna göre VE uygulamasının ısı şoku ile strese sokulan hücrelerdeki Hsp70 indüksiyonunu artırdığı görüldü.



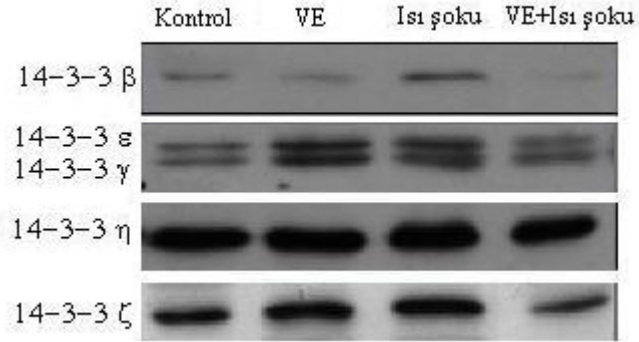
Şekil 4.5. a) Kontrol ve deney gruplarına ait Hsp27 anlatımlarının Western blot analizi, b) Analiz sonuçlarının grafik şeklinde gösterimi (Grup içindeki tekrarlar arasındaki tutarlılık tek-yönlü ANOVA testi ile belirlendi. Deneyler 7 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. ** P<0.01) [Kontrol: 37°C sıcaklıkta tutulan kontrol grubu hücelere ait protein ekstresi, VE: *Viscum* ekstresi uygulanmış, Isı şoku: Yüksek sıcaklık (42°C) ile strese sokulmuş, VE+Isı şoku: *Viscum* ekstresi ve yüksek sıcaklık (42°C) uygulanmış hücelere ait protein ekstrere]



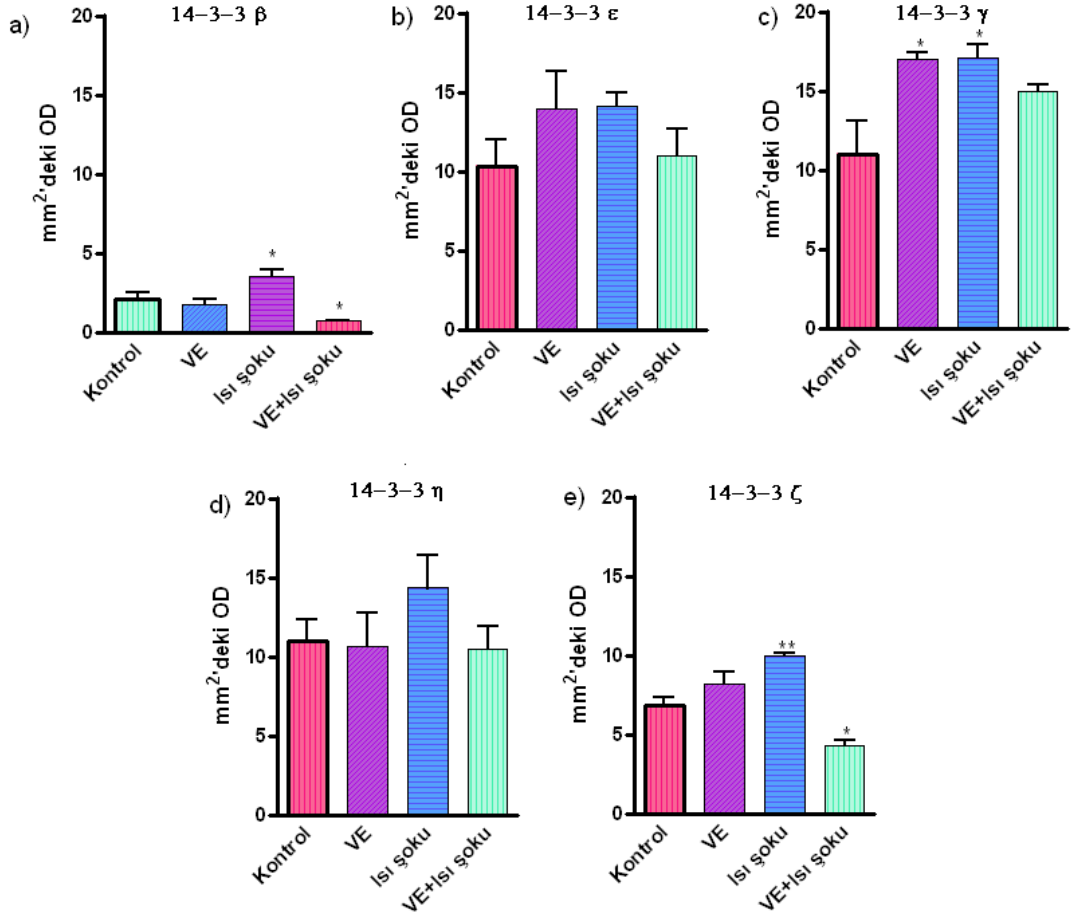
Şekil 4.6. a) Kontrol ve deney gruplarına ait Hsp70 anlatımlarının Western blot analizi, b) Analiz sonuçlarının grafik şeklinde gösterimi (Grup içindeki tekrarlar arasındaki tutarlılık tek-yönlü ANOVA testi ile belirlendi. Deneyler 7 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. ** P<0.01) [Kontrol: 37°C sıcaklıkta tutulan kontrol grubu hücelere ait protein ekstresi, VE: *Viscum* ekstresi uygulanmış, Isı şoku: Yüksek sıcaklık (42°C) ile strese sokulmuş, VE+Isı şoku: *Viscum* ekstresi ve yüksek sıcaklık (42°C) uygulanmış hücelere ait protein ekstrere]

14-3-3 Proteinleri

14-3-3 proteininin izoformları ile yapılan immünolojik analizlerin sonuçları Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de görülmektedir. 14-3-3 β izoformunun, kontrol ve VE gruplarında aynı seviyede olduğu, Isı şoku grubunda indüklendiği, VE+Isı şoku grubunda ise anlatımının azaldığı görüldü. 14-3-3 ϵ ve 14-3-3 γ izoformlarının kontrol ve VE+Isı şoku gruplarında aynı seviyede olduğu, VE ve Isı şoku gruplarında anlatımlarının arttığı belirlendi. 14-3-3 η izoformuna ait veriler karşılaştırıldığında kontrol, VE ve VE+Isı şoku gruplarında anlatımın aynı seviyede olduğu, Isı şoku grubunda ise anlatımın arttığı görüldü. Son olarak 14-3-3 ζ izoformunun, sadece VE grubunda değişmediği, Isı şoku grubunda ~% 40 oranında arttığı, VE+Isı şoku grubunda ise baskılandığı saptandı (Şekil 4.8).



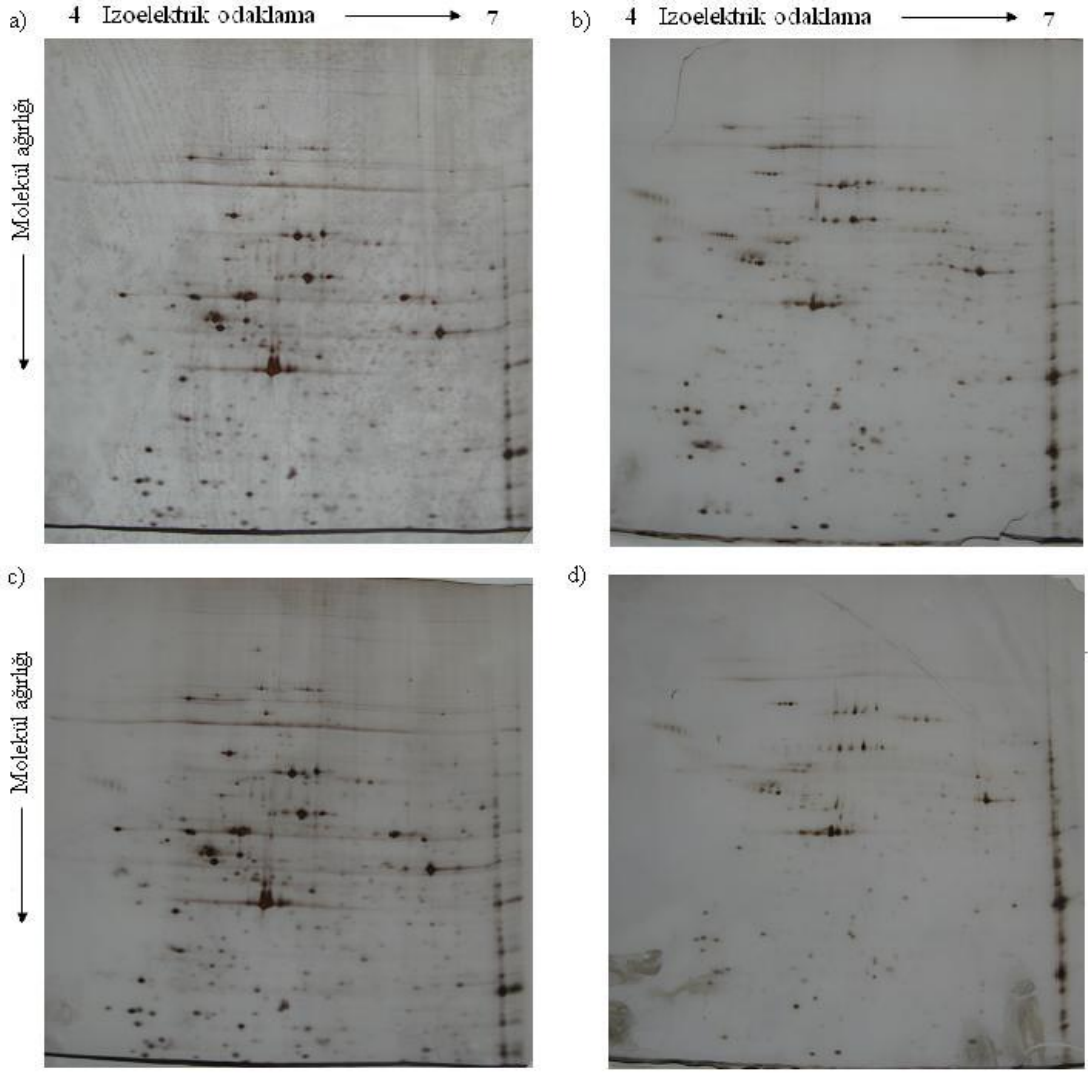
Şekil 4.7. 14-3-3 izoformlarının (14-3-3 β , 14-3-3 ϵ , 14-3-3 γ , 14-3-3 η ve 14-3-3 ζ) Western analizi. [Kontrol: 37°C sıcaklıkta tutulan kontrol grubu hücrelere ait protein ekstresi, VE: *Viscum* ekstresi uygulanmış, Isı şoku: Yüksek sıcaklık (42°C) ile strese sokulmuş, VE+Isı şoku: *Viscum* ekstresi ve yüksek sıcaklık (42°C) uygulanmış hücrelere ait protein ekstreleri]



Şekil 4.8. 14-3-3 izoformlarının istatistiksel analizi a) 14-3-3 β, b) 14-3-3 ε, c) 14-3-3 γ, d) 14-3-3 η, e) 14-3-3 ζ (Grup içindeki tekrarlar arasındaki tutarlılık tek-yönlü ANOVA testi ile belirlendi. Deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. * P<0.05, ** P<0.01) [Kontrol: 37°C sıcaklıkta tutulan kontrol grubu hücrelere ait protein ekstresi, VE: *Viscum* ekstresi uygulanmış, Isı şoku: Yüksek sıcaklık (42°C) ile strese sokulmuş, VE+Isı şoku: *Viscum* ekstresi ve yüksek sıcaklık (42°C) uygulanmış hücrelere ait protein ekstratları]

4.4.2. İki Boyutlu Jel Elektroforezi

Isı şoku ve 14-3-3 proteinleri Western blot analizleriyle incelenen 4 hücre grubundaki (Kontrol, VE, Isı şoku, VE+Isı şoku) suda çözünebilir proteinler iki boyutlu elektroferezle ayrıştırılarak, gümüş boyama yapıldıktan sonra genel protein profillerindeki farklılıklar araştırıldı. Proteinler önce izoelektrik noktalarına göre (pH 4-7) odaklandı, daha sonra ikinci boyutta molekül ağırlıklarına göre ayrıldı. Gümüş boyama yöntemine göre boyanan jellerden elde edilen spotlar PDQest™ Advanced 2-D Gel Analysis Software programı kullanılarak karşılaştırıldı (Şekil 4.9).

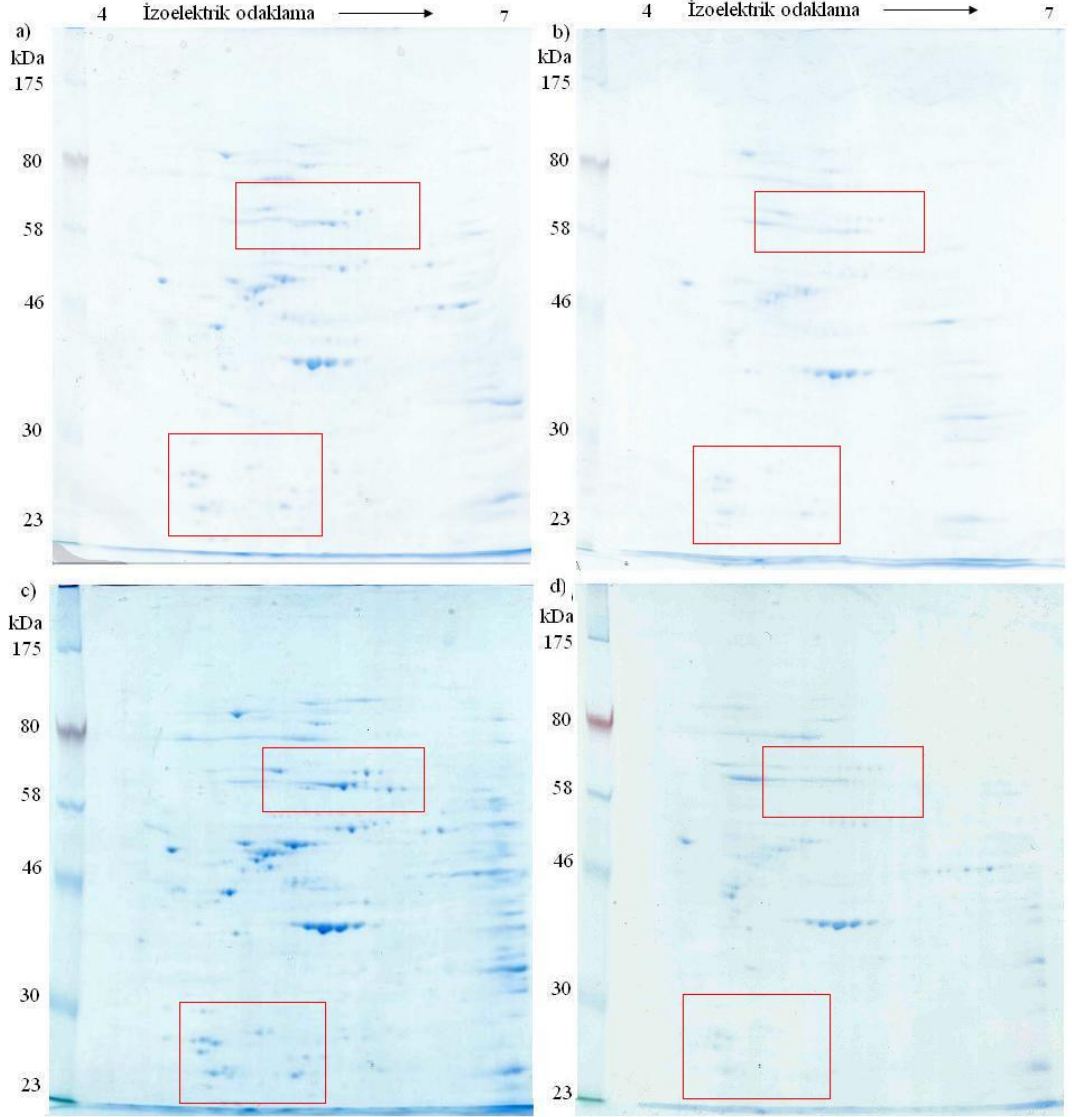


Şekil 4.9. Gümüş boyama yöntemine göre boyanan 2-D jeller. a) Kontrol: 37°C sıcaklıkta tutulan kontrol grubu hücrelere ait protein ekstresi, b) VE: *Viscum* ekstresi uygulanmış, c) Isı şoku: Yüksek sıcaklık (42°C) ile strese sokulmuş, d) VE+Isı şoku: *Viscum* ekstresi ve yüksek sıcaklık (42°C) uygulanmış hücrelere ait protein ekstreleri.

Yapılan analizlerde kontrol grubu örneklere ait jelde 728 spot, VE grubuna ait jelde 763 spot, Isı şoku grubuna ait jelde 776 spot ve VE+Isı şoku grubuna ait jelde ise 658 spot saptandı. Kontrol grubu ile diğer grupların spotları karşılaştırıldığında, ekstre uygulaması yapılan grupta farklılık gösteren 35 spot, ısı şoku uygulaması yapılan grupta farklılık gösteren 48 spot ve hem ısı şoku hem de ekstre uygulaması yapılan grupta ise farklılık gösteren 130 spot belirlendi.

Aynı örneklerin (Kontrol, VE, Isı şoku ve VE+Isı şoku grupları) izoelektrik noktalarına göre (pH 4-7) odaklanıp, daha sonra molekül ağırlıklarına göre ayrıldıktan sonra kütle

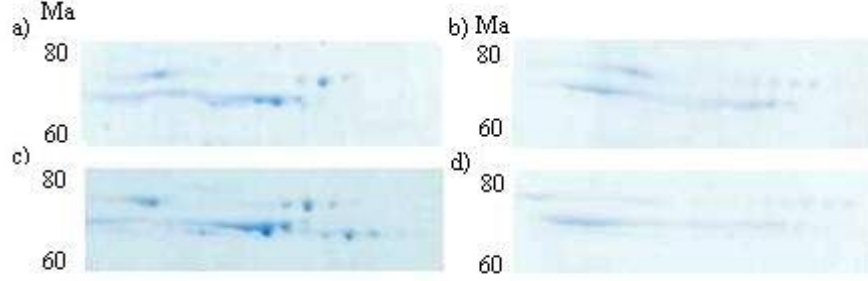
spektrometrisi ile uyumlu Instant blue ile boyandığı jellere ait görüntüler Şekil 4.10'da verildi.



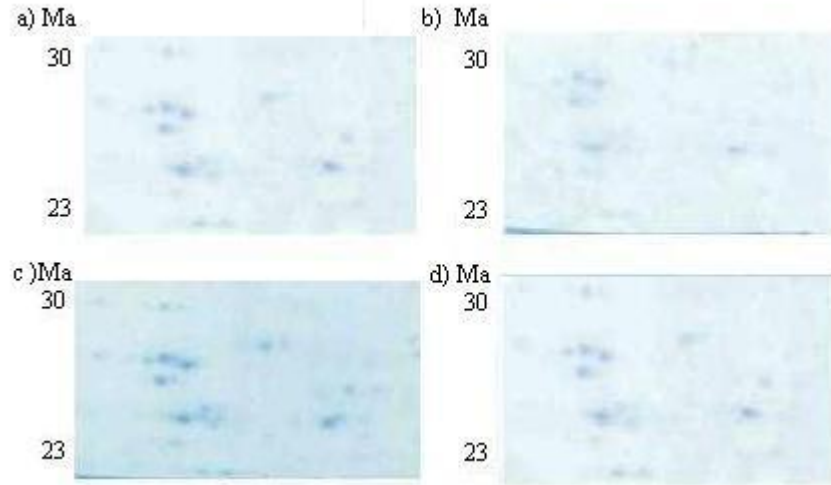
Şekil 4.10. Instant Blue ile boyanan 2-D jeller. a) Kontrol: 37°C sıcaklıkta tutulan kontrol grubu hürelere ait protein ekstresi, b) VE: *Viscum* ekstresi uygulanmış, c) Isı şoku: Yüksek sıcaklık (42°C) ile strese sokulmuş, d) VE+Isı şoku: *Viscum* ekstresi ve yüksek sıcaklık (42°C) uygulanmış hürelere ait protein ekstrereleeri.

Bu jellerde gözlenen spot sayısı boyanın duyarlılık sınırı nedeniyle, gümüş boyama yöntemine göre boyanmış 2-D jellere göre daha azdı. Bu jel fotoğraflarında çerçeve içine alınmış bölgeler büyütülerek yakından incelendiğinde (Şekil 4.11 ve Şekil 4.12),

yüksek sıcaklık uygulamasının özellikle molekül ağırlığı 60-80 kDa aralığında olan proteinlerde anlatım artışına sebep olduğu görüldü.



Şekil 4.11. Instant Blue ile boyanan 2-D jellerde molekül ağırlığı 60-80 kDa arasında olan proteinlerin yakın plan görüntüsü . a) Kontrol: 37°C sıcaklıkta tutulan kontrol grubu hücrelere ait protein ekstresi, b) VE: *Viscum* ekstresi uygulanmış, c) Isı şoku: Yüksek sıcaklık (42°C) ile strese sokulmuş, d) VE+Isı şoku: *Viscum* ekstresi ve yüksek sıcaklık (42°C) uygulanmış hücrelere ait protein ekstreleri.

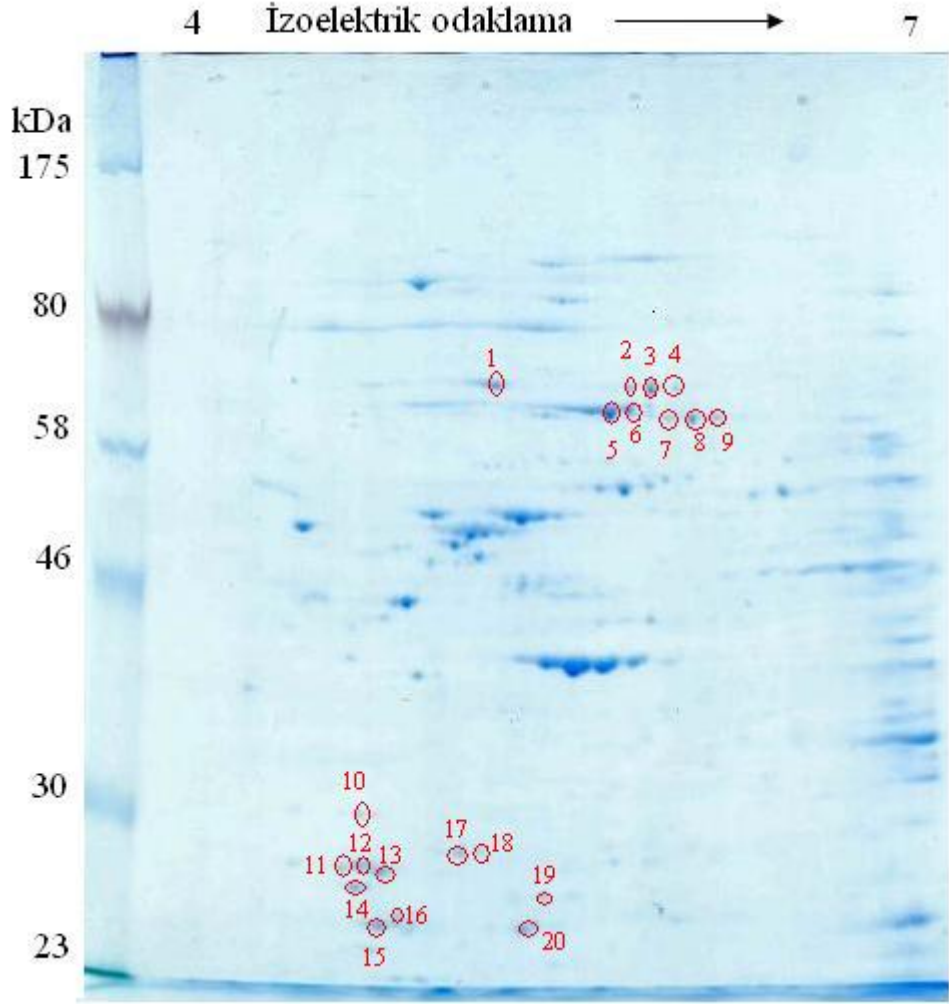


Şekil 4.12. Instant Blue ile boyanan 2-D jellerde molekül ağırlığı 23-30 kDa arasında olan proteinlerin yakın plan görüntüsü . a) Kontrol: 37°C sıcaklıkta tutulan kontrol grubu hücrelere ait protein ekstresi, b) VE: *Viscum* ekstresi uygulanmış, c) Isı şoku: Yüksek sıcaklık (42°C) ile strese sokulmuş, d) VE+Isı şoku: *Viscum* ekstresi ve yüksek sıcaklık (42°C) uygulanmış hücrelere ait protein ekstreleri.

4.5. KÜTLE SPEKTROMETRİSİ ANALİZLERİ

Kontrol, VE, Isı şoku ve VE+Isı şoku gruplarına ait proteinler iki boyutlu elektroforezle ayrılmış ve Instant blue ile boyanmış jellerde (Şekil 4.10) kütle spektrometrisi ile tanımlanmak üzere, farklı deney gruplarında anlatım düzeylerindeki değişimleri Western analizleri ile saptanan, Hsp70, Hsp27 ve 14-3-3 proteini olma olasılığı yüksek

protein spotları işaretlendi ve bu bölgelerdeki jel parçaları kesilip, ayrı ayrı tüplere konuldu. Bu spotların tamamının görüldüğü örnek bir jel fotoğrafı Şekil 4.13'te verildi.

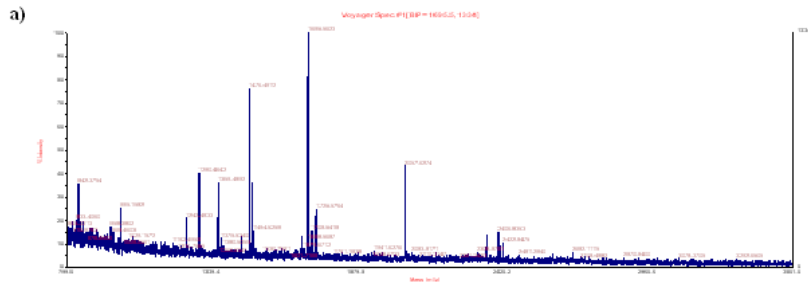


Şekil 4.13. Kütle spektrometrisi ile tanımlanmak üzere seçilen protein spotları

2-D jellerde 60-80 kDa arasındaki protein anlatımları karşılaştırıldığında, yüksek sıcaklık uygulaması yapılan grupta molekül ağırlığı yaklaşık 70 kDa olan özellikle 5 proteinin (3., 5., 6., 8. ve 9. protein spotları) ekspresyonlarının arttığı anlaşıldı (Şekil 4.11). Molekül ağırlığı 23-30 kDa arasında olan protein spotları için ise anlamlı bir fark gözlenmedi (Şekil 4.12).

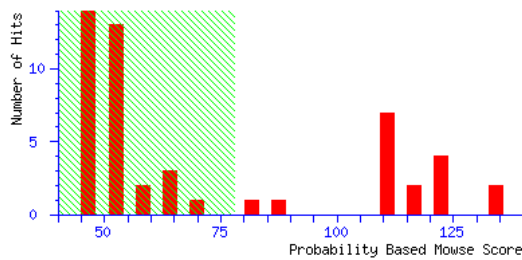
Seçilen her bir protein (Şekil 4.13) tripsinle kesildikten sonra, bu proteine ait peptid piklerini elde etmek üzere MALDI-TOF MS analizleri yapıldı. Kütle spektrometrisinden elde edilen peptid kütleleri, PS1 yazılımı (Applied Biosystems)

kullanılarak Mascot (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html) veya SwissProt veri tabanındaki (<http://us.expasy.org/>) bilgilerle eşleştirildi. Taramalarda modifikasyon olarak karbamidometilasyon değerlendirildi. Peptid kütle toleransı ve fragment kütle toleransı 50 ppm ve ± 0.1 Da olarak ayarlandı. Bu spotların içinde stres proteini (Hsp veya Hsc) oldukları istatistiksel olarak belirlenen herbir örneğe ait (3, 5, 6, 8 ve 9 numaralı spotlar) MALDI-TOF MS verileri (peptid kütle parmakizi spektrumları), Mascot veritabanı tarama sonuçları (Mowse skoru ve olası proteinler) ve peptidlerin olası proteinle dizi eşleşme sonuçları Şekil 4.14, Şekil 4.15, Şekil 4.16, Şekil 4.17 ve Şekil 4.18'de verildi.



b) **Probability Based Mowse Score**

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 78 are significant ($p < 0.05$).



Index

Accession	Mass	Score	Description
1. Q3UVN1_MOUSE	64152	134	12 days embryo embryonic body between diaphragm region and neck cDNA
2. I56581	73984	133	dnaK-type molecular chaperone grp75 precursor - rat
3. A48127	73701	123	dnaK-type molecular chaperone precursor, mitochondrial - mouse
4. Q3TW93_MOUSE	73731	123	Osteoclast-like cell cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone
5. BAA01862	73768	123	MUSP66 NID: - Mus musculus
6. AAB62091	73970	122	CGU92313 NID: - Cricetulus griseus
7. GRP75_RAT	74083	119	Stress-70 protein, mitochondrial precursor (75 kDa glucose-regulated
8. Q3V015_MOUSE	73716	115	11 days pregnant adult female ovary and uterus cDNA, RIKEN full-leng
9. B48127	73920	113	dnaK-type molecular chaperone precursor, mitochondrial - human
10. Q3ZCHO_BOVIN	73981	113	Heat shock 70kDa protein 9B (Mortalin-2).- Bos taurus (Bovine).

c) Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Number of mass values searched: 76

Number of mass values matched: 19

Sequence Coverage: 31%

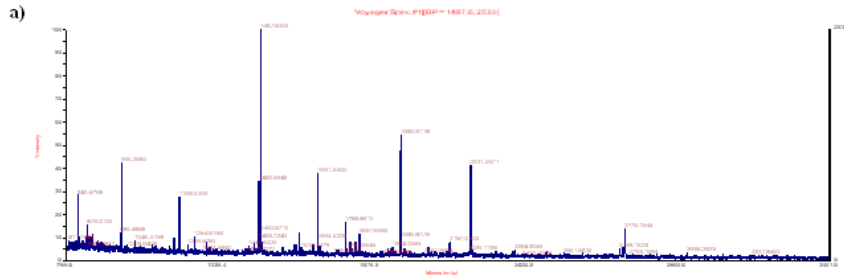
Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1 MISASRAAAA RLVGTTASRS PAAARHQDGV NGLSHEAFRF VSRRDYASEA
51 IKGAVVGIDL GTTNSCVAVM EGKQAKVLEN ABGARTTPSV VAFTPDGERL
101 VGMPAKRQAV TNPNTFYAT KRLIGRRYDD PEVQKDKIV PFKIVRASNG
151 DAWVEAHGKL YSPSQIGAFV LMKMKETAEN YLGHATAKNAV ITVPAYFNDS
201 QRQATKDAGQ ISGLNVLVRI NEPTAAALAY GLDKSEDKVI AVYDLGGGTF
251 DISILEIQKG VFEVKSTNGD TFLGGEDFDQ ALLRHIVKEF KRETGVDLTK
301 DNMALQVRVE AAEKAKCELS SSVQTDINLP YLTMDASGPK HLNMKLTRAQ
351 FEQIVTDLIK RTIAPCQKAM QDAEVSKSIDI GEVILVGGMT RMPKVQQTIVQ
401 DLFGRAPSKA VNPDEAVAIG AAIQGGVLAG DVIDVLLLDV TPLSLGIETL
451 GGVFTKLINR NTIPIPKKSQ VFSTAADGQT QVEIKVCQGE REMAGDNKLL
501 GQFTLLIGIPP APRGVPQIEV TFDIDANGIV HVSADKDKGTG REQQIVIQSS
551 GGLSKDDIEN MVKNAEKYAE EDRRKKERVE AVNMAEGIIH DTEIKMEEFK
601 DQLPADECNK LKEEISKMRE LLARKDSETG ENIRQAASSL QQASLKLIFEM

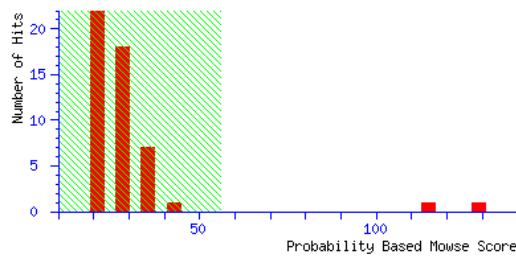
```

Şekil 4.14. 3 numaralı spota ait spektrum, Mascot veritabanı taraması ve dizi eşleşme sonuçları. a) Örneğin peptid kütle parmakizi spektrumu (MALDI-TOF MS), b) Mascot veritabanı tarama sonuçları (Mowse skoru ve olası proteinler), c) Olası proteinle dizi eşleşme sonuçları (Eşleşen peptidler kırmızı renkle işaretlenmiştir)



b) **Probability Based Mowse Score**

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 56 are significant ($p < 0.05$).



Index

Accession	Mass	Score	Description
1. JC4853	70827	129	dnaK-type molecular chaperone hsc73 - mouse
2. S31716	70884	117	dnaK-type molecular chaperone hsp72-ps1 - rat
3. S41415	70505	39	dnaK-type molecular chaperone Hsp70.3 - rat
4. I54542	70142	38	dnaK-type molecular chaperone HSP70 - rat
5. AAA17441	70120	38	RATHSP70A NID: - Rattus norvegicus
6. CAA53140	69935	38	RNHS70F NID: - Rattus norvegicus
7. CAA52328	70043	38	RNHSP70 NID: - Rattus norvegicus
8. Q6TXF7_RAT	40856	36	LRRGT00042.- Rattus norvegicus (Rat).
9. Q32P36_RAT	70505	36	Heat shock 70kD protein 1-like.- Rattus norvegicus (Rat).
10. 1CRRA	17528	34	heat shock substrate binding domain of hsc-70 substrate binding domain

c) Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
 Number of mass values searched: 115
 Number of mass values matched: 21
 Sequence Coverage: 36%

Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1 MSKGPVAVGID LGITYSCVGV FQHGKVEIIA NDQGNRTTPS YVAFTDTERL
51 IGDAAKNQVA MNPTNTVFDA KRLIGRRFDD AVVQSDMKHW PFMVVDAGR
101 PKVQVEYKGE TKSFYPEEVS SMVLTKMKEI AEAYLGKTVT NAVVTVPAYF
151 NDSQRQAAD AGTIAGLNVL RIINEPTAAA IAYGLDKKVR AERNVLIFDL
201 GGGTFDVSIL TTEDGIFEVK STAGDTHLGG EDFDNRMVNH FIAEFKRKHK
251 KDISENKRAV RRLTACERA KRTLSSSTQA SIEIDSLYEG IDFYTSITRA
301 RPEELNADLF RGTLDPVEKA LRDALDKSQ IHDIVLVGGS TRIPKIQLL
351 QDFFNGKELN KSINPDEAVA YGAAVQAAIL SGDKSENVQD LLLLDVTPLS
401 LGIEIAGGVM TVLIKRNTII PTKQTQFTTT YSDNQPGVLI QVYEGGERAMT
451 KDNLLGKFE LTGIPPAPRG VPQIEVTFDI DANGILNVA VDKSTGKENK
501 ITITNDKGRLL SKBDIERMVQ EAEKYKAED KQRDKVSSKN SLESYAFNMK
551 ATVEDEKLQG KINDEDKQKI LDKCNEIISW LDKNQTAKE EFERQQKELE
601 KVCNPIITKL YQSAGMPGG MPGGFPGGGA PPSGGASSGP TIEEVD

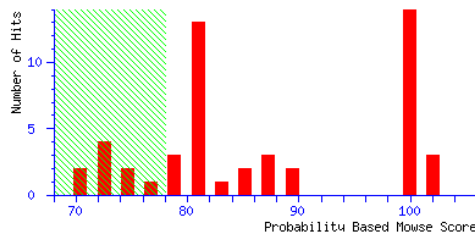
```

Şekil 4.15. 5 numaralı spota ait spektrum, Mascot veritabanı taraması ve dizi eşleşme sonuçları. a) Örneğin peptid kütle parmakizi spektrumu (MALDI-TOF MS), b) Mascot veritabanı tarama sonuçları (Mowse skoru ve olası proteinler), c) Olası proteinle dizi eşleşme sonuçları (Eşleşen peptidler kırmızı renkle işaretlenmiştir)



b) **Probability Based Mowse Score**

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
Protein scores greater than 78 are significant ($p < 0.05$).



Index

	Accession	Mass	Score	Description
20.	1NGA	41639	88	Heat-shock cognate 70kd protein (44kd atpase n-terminal Fragment) (EC 3.6.1.3)
21.	1NGB	41681	88	Heat-shock cognate 70kd protein (44kd atpase n-terminal Fragment) (EC 3.6.1.3)
22.	Q3TH56_MOUSE	71056	88	13 days embryo liver cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:I920018I17
23.	Q53HF2_HUMAN	53580	84	Heat shock 70kDa protein 8 isoform 2 variant (Fragment).- Homo sapiens (Human).
24.	BAB18615	53598	84	AB034951 NID: - Homo sapiens
25.	Q3ULM1_MOUSE	68245	83	Morula whole body morula cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:I0C004
26.	1QQMA	41340	82	d199s mutant of bovine 70 kilodalton heat shock protein hsc70 atpase fragment n
27.	Q3TQ13_MOUSE	71055	81	ES cells cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:C330035P08 product:hea
28.	Q6NZD0_MOUSE	71056	81	Heat shock protein 8.- Mus musculus (Mouse).
29.	A27077	71082	80	dnaK-type molecular chaperone - human
30.	A45935	71021	80	dnaK-type molecular chaperone hsc70 - mouse

- c) Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)
Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
Number of mass values searched: 74
Number of mass values matched: 14
Sequence Coverage: 25%

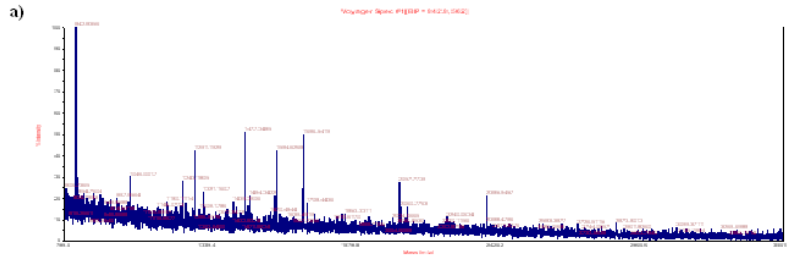
Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1 MSKGPVAVGID LGITYSCVGV FQHGKVEIIA NDQGNRTTPS YVAFDTERL
51 IGDAARNQVA MNPTNTVFDA KRLIGRRFDD AVVQSDMKHW PFMVVNDAGR
101 PKVQVEYKGE TKSFYPEEVS SMVLTKMKEI AEAYLGKTVT NAVVTVPAYF
151 NDSQRQATKD AGTIAGLNVL RIINEPTAAA IAYGLDKKVG AERNVLIFDL
201 GGGTFDVSIL TIEDGIFEVK STAGDTHLGG EDFDNRMVNH FIAEFKRKHK
251 KDISENKRAV RRLRTACERA KRTLSSSTQA SIEIDSLYEG IDFYTSITRA
301 RFBELNADLF RGILDPVEKA LRDAKLDKSQ IHDIVLVGGS TRIPKIQKLL
351 QDFFNGKELN KSINPDEAVA YGAAVQAAIL SGDKSENVQD LLLLDVTPLS
401 LGIETAGGVM TVLIKRNITI PTKQTILTI YSDNQPGLI QVVEGERAMT
451 KDNLLGKFE LTGIPPAPRG VPQIEVFDI DANGILNSA VDKSTGKENK
501 ITITNDKGRL SKEDIERMVQ EAEKYKAEDE KQRDKVSSKN SLESYAFNMK
551 ATVEDEKLQG KINDEDKQKI LDKCNEIISW LDKNQTAEKE EFEHQQKELE
601 KVCNPIITKL YQSAGMPGG MFGGFPGGA PPSGGASSGP TIEEVD

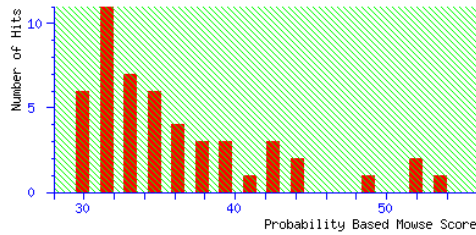
```

Şekil 4.16. 6 numaralı spota ait spektrum, Mascot veritabanı taraması ve dizi eşleşme sonuçları. a) Örneğin peptid kütle parmakizi spektrumu (MALDI-TOF MS), b) Mascot veritabanı tarama sonuçları (Mowse skoru ve olası proteinler), c) Olası proteinle dizi eşleşme sonuçları (Eşleşen peptidler kırmızı renkle işaretlenmiştir)



b) **Probability Based Mowse Score**

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
Protein scores greater than 57 are significant ($p < 0.05$).



Index

Accession	Mass	Score	Description
1. HSP7C_CRIGR	70989	54	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Cricetulus griseus GN=HSPA8 PE=2 SV=1
2. HSP7C_MOUSE	71055	52	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Mus musculus GN=Hspa8 PE=1 SV=1
3. HSP7C_RAT	71055	52	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Rattus norvegicus GN=Hspa8 PE=1 SV=1
4. HIP1_MOUSE	116100	48	Huntingtin-interacting protein 1 OS=Mus musculus GN=Hip1 PE=1 SV=2
5. BIN1_RAT	64721	44	Myc box-dependent-interacting protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Bin1 PE=1
6. GRP75_RAT	74097	44	Stress-70 protein, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hspa9 PE=1 SV=3
7. SYCP1_MOUSE	116518	43	Synaptonemal complex protein 1 OS=Mus musculus GN=Sycp1 PE=1 SV=1
8. VP26A_MOUSE	38204	42	Vacuolar protein sorting-associated protein 26A OS=Mus musculus GN=Vps26a
9. VP26A_RAT	38205	42	Vacuolar protein sorting-associated protein 26A OS=Rattus norvegicus GN=Vp
10. TTC16_MOUSE	87746	41	Tetratricopeptide repeat protein 16 OS=Mus musculus GN=Ttc16 PE=2 SV=1

c) Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)
Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
Number of mass values searched: 106
Number of mass values matched: 14
Sequence Coverage: 21%

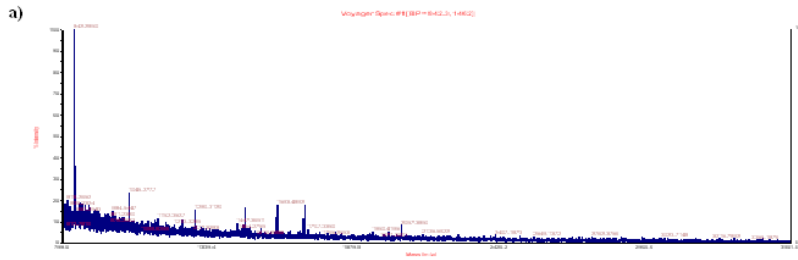
Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1 MSKGPVAVGID LGITYSCVGV FQHGKVEIIA NDQGNRITPS YVAFDTERL
51 IGDAARNQVA MNFTNTVFDA KRLIGRRFDD AVVQSDMKHW PFMVVNDAGR
101 PKVQVEYKGE TKSFYPEEVS SMVLTKMKEI ABAYLGKTVT NAVVTVPAYF
151 NDSQRQATKD AGTIAGLNLV RIINEPTAAA IAYGLDKKVG AERNVLIFFDL
201 GGGTFDVSIL TIEDGIFEVK STAGDTHLGG EDFDNRMVNH FIAEFKRKHK
251 KDISENKRAV RRLRTACERA KRLSSSTQA SIEIDSLYEG IDFYTSITRA
301 RFEBLNADLF RGTLDPVEKA LRDAKLDSQ IHDIVLVGGS TRIPKIQKLL
351 QDFFNGKELN KSINPDEAVA YGAAVQAAIL SGDKSENVQD LLLLDVTPLS
401 LGIETAGGVM TVLIEKRNTI PIKQIQIFTI YSDNQPGVLI QVVEGERAMT
451 KDNLLGKFE LTGIPPAPRG VPQIEVTFDI DANGLNVSA VDKSTGKKNK
501 ITITNDKGRL SKEDIERMVQ EAEKYKAEDE KQRDKVSSKN SLESYAFNMK
551 ATVEDEKLQG KINDEDKQKI LDKCNEIISW LDKNQTAEKE EFEHQQKELE
601 KVCNPIITKL YQSAGGMFPG MPGGFPGGGA PPSGGASSGP TIEEVD

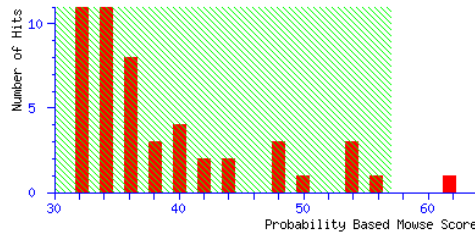
```

Şekil 4.17. 8 numaralı spota ait spektrum, Mascot veritabanı taraması ve dizi eşleşme sonuçları. a) Örneğin peptid kütle parmakizi spektrumu (MALDI-TOF MS), b) Mascot veritabanı tarama sonuçları (Mowse skoru ve olası proteinler), c) Olası proteinle dizi eşleşme sonuçları (Eşleşen peptidler kırmızı renkle işaretlenmiştir)



b) **Probability Based Mowse Score**

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 57 are significant ($p < 0.05$).



Index

Accession	Mass	Score	Description
11. GNN_MOUSE	152438	43	Tetratricopeptide repeat protein GNN OS=Mus musculus GN=Gnn PE=1 SV=1
12. PSMD6_MOUSE	45792	42	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6 OS=Mus musculus GN=Psmd6 PE=2 SV=3
13. CBS_RAT	62157	42	Cystathionine beta-synthase OS=Rattus norvegicus GN=Cbs PE=1 SV=3
14. FUT10_MOUSE	56241	41	Alpha-(1,3)-fucosyltransferase 10 OS=Mus musculus GN=Fut10 PE=2 SV=1
15. GAS8_RAT	56392	40	Growth arrest-specific protein 8 OS=Rattus norvegicus GN=Gas8 PE=2 SV=1
16. GRP75_CRIGR	73970	40	Stress-70 protein, mitochondrial OS=Cricetulus griseus GN=HSPA9 PE=2 SV=1
17. GRP75_RAT	74097	39	Stress-70 protein, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hspa9 PE=1 SV=3
18. GSHB_MOUSE	52442	38	Glutathione synthetase OS=Mus musculus GN=Gss PE=2 SV=1
19. TM186_MOUSE	24958	38	Transmembrane protein 186 OS=Mus musculus GN=Imem186 PE=2 SV=2
20. VPS53_MOUSE	95218	38	Vacuolar protein sorting-associated protein 53 homolog OS=Mus musculus GN=Vps5

c) Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)
 Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
 Number of mass values searched: 78
 Number of mass values matched: 10
 Sequence Coverage: 17%

Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1 MISASRAAAA RLVGTTASRS PAARHQDQGW NGLSHEVFRF VSRRDYASEA
51 IKGAVVGIDL GTTNSCVAVM EGKQAKVLEN AEGARTTPSV VAFTPDGERL
101 VGMPAKRQAV TNPNTFYAT KRLIGRRYDD FEVQKDRNV PFKIVRASNG
151 DAWVEAHGKL YSPSQIGAFV LMKMKETAEN YLGHAKNAV ITVPAYFNDS
201 QRQATKDAGQ ISGLNVLRVI NEPTAALAY GLDKSEKVI AVYDLGGGTF
251 DISILEIQKG VFEVKSTNGD TFLGGEDFDQ ALLRHHIVKEF KRETGVDLTK
301 DNMALQVRRE AAEKAKCELS SSVQTDINLP YLTMDASGPK HLNMKLTRAQ
351 FEQIVTDLIK RTIAPCQKAM QDREVSKSDI GEVILVGGMT RMFKVQQTVQ
401 DLFGRAPSKA VNPDEAVAIG AAIQGGVLAG DVIDVLLLDV TPLSLGIETL
451 GGVFTKLINR NITIPTKKSQ VFSTAADGQT QVEIKVCQGE REMAGDNLLL
501 QQFTLIGIPP APRGVPQIEV TFDIDANGIV HVSAKDKGTG REQQIVIQSS
551 GGLSKDDIEN MVKNAEKYAE EDRRKKERVE AVNMAEGIIH DTETKMEEFK
601 DQLPADECNK LKEBISKMRE LLARKDSETG ENIRQAASSL QQASIKLKFEM
651 AYKKNASERE GSGSSSTGEQ KEDQKEEKQ

```

Şekil 4.18. 9 numaralı spota ait spektrum, Mascot veritabanı taraması ve dizi eşleşme sonuçları. a) Örneğin peptid kütle parmakizi spektrumu (MALDI-TOF MS), b) Mascot veritabanı tarama sonuçları (Mowse skoru ve olası proteinler), c) Olası proteinle dizi eşleşme sonuçları (Eşleşen peptidler kırmızı renkle işaretlenmiştir)

Protein eşleşmesinde sadece peptid kütle parmakizi sonuçları değil, aynı zamanda peptidlerine ayrılan proteinin yaklaşık molekül ağırlığı ve izoelektrik noktası da dikkate alındı. Peptid karışımının hangi protein olabileceğine dair elde edilen verilerde, sadece istatistiksel olarak önemli skorlar değerlendirildi. Kesilen 20 protein spotundan sadece 13 tanesi MASCOT veri tabanında yapılan taramalarda belirlenebildi. Diğer 7 protein için elde edilen piklerle eşleşen, doğru molekül ağırlığı ve izoelektrik noktasına sahip olası proteinler saptanamadı. Mascot analizleri yapılan 13 spottan 5 tanesi (3, 5, 6, 8 ve 9 numaralı protein spotları) özellikle sıçanlardaki Hsp70'lerle yüksek derecede eşleşme gösterdi. Peptid kütle spektrumları değerlendirilen tüm örnekler için sonuçlar Tablo 4.2'de verildi.

Tablo 4.2: MASCOT peptid kütle parmakizi tarama sonuçları*

Protein spotu	Giriş adı	Protein adı	Molekül ağırlığı (Da)	pI	Peptid sayısı	Dizi benzerliği yüzdesi/skor
1	DNAK_MANSM	Hsp 70 (<i>E.coli</i>)	68468	4,74	159	%22 /30
3	I56581	Moleküler şaperon Grp75 prekürsörü	73984	5.87	112	%31 /133
5	S31716	Moleküler şaperon Hsp72-ps1	70884	5.43	115	%36 /117
6	A45935	Moleküler şaperon Hsc70	71021	5.37	78	%25 /80
8	HSP7C_RAT	Hsc71	71055	5.37	128	%21 /52
9	GRP75_RAT	Mitokondriyal Grp75	74097	5.97	73	%17 /39
12	TPM4_RAT	Tropomiyozin alfa-4 zinciri	28549	4.66	42	%29 /35
13	CRBA1_MOUSE	Beta-kristalin A1	23843	5.96	116	%26 /24
15	SLD5_RAT	DNA replikasyon kompleksi GINS protein	25159	5.1	102	%29 / 22
16	Q6TXH1_RAT	LRRGT00028.	25320	5.05	133	%29 /26
17	FRIH_FELCA	Ferritin ağır zinciri	21392	5.53	155	%52 /52
19	GDIR1_RAT	Rho GDP-ayırıcı inhibitor 1	23450	5.12	79	%30 /48
20	STX7_RAT	Sintaksin-7	28965	5.12	66	%17 /16

* Sıçanlardaki Hsp70 ailesiyle yüksek benzerlik gösteren proteinler gri alanda gösterilmiştir

Daha önce yüksek sıcaklıkla indüklendiği Western blot analizleriyle belirlenmiş olan Hsp72 (Hsp70)'ye ait bulgu, 2-D jel elektroforezi ve MALDI-TOF MS bulgularıyla doğrulandı. Bunun da ötesinde MS sonuçları, Grp75 prekürsörü, Hsc70, Hsc71 ve Grp75'in de anlatımlarında artışlar olduğunu ortaya koydu.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde kanserli hücrelerle yapılan pek çok çalışma sonucunda, anlatım düzeylerinde farklılıklar olan stres proteinlerinin, hem teşhiste hem de tedavinin izlenmesinde “biyomarker” olarak kullanılacakları bildirilmiştir (Oesterreich ve diğ., 1993; Kai ve diğ., 2003; Capello ve diğ., 2003; Ryu ve diğ., 2003).

Özellikle Hsp70’in aşırı anlatımının meme kanserinde, endometriyal serviks kanserinde ve hepatoselüler karsinomda zayıf prognoz ve tedaviye direnç ile ilişkili olduğu saptanmıştır (Chuma ve diğ., 2003; Sarto ve diğ., 2000; Takashima ve diğ., 2003). Bu proteinlerin anlatımının meme kanserinde başarısız tedavinin göstergesi olduğu ortaya konulmuştur (Ciocca ve diğ., 1993). İndüklenebilir Hsp72’nin aşırı anlatımının radyasyonun kanser hücreleri üzerindeki öldürücü etkisini ortadan kaldırdığı gösterilmiştir (Lee ve diğ., 2001).

Hsp27’nin aşırı anlatımı ise, hepatoselüler karsinomda zayıf prognoz ile ilişkili olup, histolojik derecelendirmede önem taşımaktadır (Sarto ve diğ., 2000). Cornford ve diğ. (2000), prostat kanserinde Hsp27 anlatımının arttığını saptamışlardır. Bu nedenle araştırmacılar, özellikle prostat kanserli hastalarda Hsp27 hedefli yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesi gerektiğini ve böylece saldırgan malignant fenotipin tedavi edilebileceğini vurgulamışlardır. Hsp27 anlatımındaki artış, meme kanseri gibi başka kanser hücrelerini de tedaviye dirençli hale getirmektedir (Calderwood, 2007; Calderwood ve Ciocca, 2008). Yapılan çalışmalar, Hsp27 anlatımının kanser hücrelerinin CDDP (Oesterreich ve diğ., 1993), Dox (Garrido ve diğ., 1996), vinkristin (Verrill ve diğ., 2006) ve paklitaksel (Rocchi ve diğ., 2004) gibi antikanser ilaçlara karşı direncini artırdığını göstermiştir. Testis ve kolorektal kanser hücrelerindeki CDDP ve Dox direncinin, Hsp27’nin aşırı anlatımı ile geliştiği bilinmektedir (Yamamoto ve diğ., 2001). Hsp27’nin metastaz oluşumunda arttığı proteomik analizlerle de ortaya konulmuştur. Hepatokarsinomlarda yapılan bir çalışmada, tüm metastatik dokularda (metastatik olmayan dokularla karşılaştırıldığında) Hsp27’nin aşırı anlatım yaptığı

görülmüştür (Song ve diğ., 2006). Benzer sonuçlar gastrik kanserde de elde edilmiştir (Cehn ve diğ., 2004).

Hücrede anlatımları artan Hsp'lerin, kanser hücrelerini terapiye dirençli hale getirdiğini ortaya koyan başka çalışmalar da vardır (Oesterreich ve diğ., 1993; Nylandsted ve diğ., 2000; Yamamoto ve diğ., 2001). Örneğin, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde Hsp70 ve Hsp27 aşırı miktarlarda sentezlenmekte ve bu durum hücrelerin Dox, aktinomisin D ve amfoterisin gibi uygulamalara karşı hücrenin direnç kazanmasını sağlamaktadır (Ciocca ve diğ., 1982; Shen ve diğ., 1987; Rice ve Hahn, 1987; Hahn ve Li, 1990). Hsp'lerin yanı sıra çoklu ilaç direnci proteinlerinin anlatımlarının artması, birçok kanser türünde kemoterapi ajanlarına karşı direnç gelişmesine yol açmaktadır (Gottesman ve Pastan, 1988). Tang ve diğ. (2005), prostat kanseri hücre hatlarında ısı şoku uygulaması ve radyoterapi sonrasında, Hsp ve HSF'lerin (ısı şoku faktörlerinin) anlatımlarını incelemişler ve bu proteinlerdeki artışın, tedavinin etkinliğini düşürdüğünü ortaya koymuşlardır.

Hsp'ler ve tedavi etkinliği arasındaki bu ilişki nedeniyle, kanser tedavisinde artık Hsp'lerin baskılanması da stratejik hedefler arasındadır. Antisens oligonükleotid uygulamaları bu proteinleri baskılayarak tümör hücrelerinin apoptoza gitmesini sağlamıştır (Jones ve diğ., 2004). Hsp27'nin anlatımını azaltmaya yönelik çalışmalardan birinde kullanılan antisens teknolojisiyle, HeLa hücrelerindeki Hsp27 anlatımı %40 oranında azaltılmış ve bu hücrelerin apoptotik indükleyicilere duyarlı hale gelmesi sağlanmıştır (Paul ve diğ., 2002). Benzer bir yaklaşımla Hsp27 indüksiyonunun baskılanması, prostat kanseri hücrelerinin tümör oluşturma potansiyelini azaltmakta ve hücrelerin paklitaksel gibi antikanser ilaçlara duyarlılığını artırmaktadır (Rocchi ve diğ., 2004). Kanser hücrelerinde Hsp anlatımı veya fonksiyonu hedeflenerek tedavide yeni bir strateji ortaya konulabilirse ve bu strateji başarılı olursa, özellikle Hsp anlatımlarının arttığı bilinen kanser hücrelerinin yok edilebileceği öne sürülmektedir (Tang ve diğ., 2005).

Hsp anlatımının arttığı bilinen kanser türlerinden biri de beyin tümörleridir. Genelde glioma olarak adlandırılan beyin tümörlerinin, cerrahi müdahale, radyoterapi ve kemoterapi ile tedavi edilmeleri oldukça zordur ve hastalar tedavi edilse bile yaşam

süreleri en fazla 5 yıl uzatılabilmektedir (Oghaki ve Kleihues, 2005; Brandes ve diğ., 2008; Gottardo ve Gajjar, 2008).

Yetişkin kanser hastalarının yaklaşık % 2'sinde bulunan beyin tümörlerinin büyük bir kısmını (% 80-85) malignant gliomalar oluşturmaktadır (Catt ve diğ., 2008). Amerikan Kanseri Topluluğu ("American Cancer Society", ACS) ABD'de her yıl 20.000'den fazla insanın beyin tümörleri nedeniyle öldüğünü bildirmektedir. Bu tümörlerin tedavisinde radyoterapi, çeşitli sitotoksik ilaçlarla kemoterapi, anti-angiyojenik terapi ve moleküler terapiler kullanılmaktadır (Brandes ve diğ., 2008 ; Kreisl, 2009). Fakat gliomalar, radyoterapi ve kemoterapiye yüksek direnç gösterdikleri için tedavi sonrasında da ölümcül olan tümör tiplerindedir. Kemoterapik ilaçların hücre ölümünü gerçekleştirememesinin en önemli sebebi, kan-beyin bariyerini geçememeleridir (Kreisl, 2009). Beyin tümörü tedavisinde bu engeli aşmak amacıyla, ilacın istenilen bölgeye yönlendirilmesini sağlayan Rickham-rezervuarı gibi kateterler kullanılmakta ve ilaçlar (doksorubisin, vinkristin vb.) bu kateterlerden uygulanmaktadır (Jeremias ve diğ., 2004).

Yapılan bir çalışmada glioblastoma hücrelerindeki Hsp27 anlatımının, sağlıklı beyin dokularına göre daha fazla olduğu gösterilmiş ve anlatımdaki bu artışın, glial tümörün malignansi derecesi ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur (Zhang ve diğ., 2003; Sherman ve Multhoff, 2007). Diğer bir çalışmada, 52 glioblastoma multiformlu (IV. derece), 13 anaplastik astrositomalı (III.derece), 10 astrositomalı (II. derece) hastaya ait ve 10 normal bireyden alınan beyin dokusunun proteinleri karşılaştırılmış, sonuçta bir grup proteinin farklı şekilde anlatım yaparak tümörün histolojik derecelendirilmesinde etkili olduğu görülmüştür. Yapılan çalışmada 65 hastanın 37'sinde Hsp27'nin, 48'inde Grp78 ve prohibit (şaperon protein)'in arttığı belirlenmiştir. Hsp27, Grp78 ve prohibitin tümörün derecesini yansıttığı ortaya konulmuştur (Iwadate ve diğ., 2004).

Diğer taraftan, çeşitli nörodejeneratif hastalıklarla ilişkileri olduğu (Mackie ve Aitken, 2005; Layfield ve diğ., 1996; Ostrerova ve diğ., 1999) ve sinir hasarı, patojenler, hipoksi ve metabolik stres gibi iç ve dış strese karşı yanıt olarak indüklendiği (Bae ve diğ., 2003) bilinen 14-3-3 proteinlerinin de kanserle ilişkili olabileceği öngörülmektedir. Nitekim 14-3-3 ζ izoformunun mide, ağız ve akciğer kanserinde aşırı anlatım yaptığı ve

tümör gelişiminde direnç sağladığı belirlenmiştir (Jang ve diğ., 2004; Matta ve diğ., 2007; Li ve diğ., 2008). Gliomalarda, 14-3-3 β izoformunun anlatımının arttığı gösterilmiştir (Liang ve diğ., 2009). Akciğer kanseri hücrelerinde yapılan çalışmalarda, özellikle 14-3-3 ζ izoformunun aşırı anlatım yapmasının radyoterapinin ve kemoterapik bir ajan olarak kullanılan CDDP'nin etkinliğini azalttığı ortaya konulmuştur (Qi ve Martinez, 2003; Fan ve diğ., 2007). *Drosophila* hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada, yüksek sıcaklık uygulamasının bu hücrelerdeki 14-3-3 proteinlerinin anlatımlarını artırdığı ve bu işlemde HSF'lerin rol oynadığı ortaya konulmuştur (Yano, 2006). Bu çalışmalarda özellikle 14-3-3 ζ formunun moleküler şaperon aktivitesine dikkat çekilmektedir.

Buraya kadar özetlenen literatür bilgilerinin ışığında, kanser hücrelerinin kemoterapik veya radyoterapik direncini artıran Hsp'lerin ve 14-3-3 proteininin anlatımını azaltacak yeni ilaçların keşfiyle tedavide başarının artırılacağı anlaşılmaktadır.

Kanser tedavisinde tıbbi bitkilerin kullanımı uzun bir geçmişe sahiptir. Şu anda kullanılan antikanser ajanlarının %60'tan fazlası bitkiler, su organizmaları ve mikroorganizmalar gibi doğal kaynaklardan elde edilmektedir (Cragg ve Newman, 2006). Bitkisel bir drog olarak geniş kullanım alanı bulunan *Viscum album*'un kanser tedavisinde kullanılma potansiyeli oldukça yüksektir. Bitkinin antikanser aktivitesi ile ilgili çalışmalar ya ekstrenin farklı kanser hücre hatları üzerine uygulanması ya da doğrudan kanser hastalarına enjekte edilmesi yoluyla yürülmektedir (Knöpfel-Sidler ve diğ., 2005; Kienle ve diğ., 2009). Ovaryum ve meme kanserli hastalar üzerinde yapılan klinik çalışmalar, farklı konakçı ağaçlar üzerinde yaşayan *Viscum album* bitkilerinden hazırlanmış ticari ekstrelerin tedavide etkili olduğunu ortaya koymuştur (Kienle ve diğ., 2009). Yapılan literatür taramalarında, *Viscum album* ekstrelerinin glioma hücreleri üzerindeki etkisini inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ayrıca stres proteinlerinin anlatımını nasıl etkilediği bugüne kadar hiç araştırılmamıştır.

Bu çalışmanın ana hedefi, çeşitli ekstrelerinin antitümör aktivitesi *in vivo* ve *in vitro* tekniklerle ortaya konulmuş tıbbi bir bitki olan *Viscum album*'dan hazırlanan metanol ekstresinin, C6 sıçan glioma hücre modelinde Hsp27, Hsp70 ve 14-3-3 protein

anlatımlarını etkileyip etkilemediğini ortaya koyarak beyin tümörlerinin tedavisinde kullanılma potansiyeline ilişkin moleküler veriler elde etmiştir.

Bir ilaç ya da başka herhangi bir maddenin hücre üzerindeki etkisini araştırırken, uygulamanın hangi hücre konsantrasyonunda ve hangi zamanda yapılacağını belirlemek üzere, o hücrenin logaritmik faz ya da durağan faza girdiği zaman aralığı (saat/gün) ve jenerasyon süresi bilinmelidir. Bu nedenle başlangıç hücre sayıları farklı olan deney grupları oluşturulup, hücrelerin jenerasyon süresi belirlenmektedir (Freshney, 2000). C6 glioma hücrelerinin jenerasyon süresini hesaplayabilmek ve çoğalma eğrisini çizebilmek amacıyla oluşturulan gruplara göre, başlangıç derişimi 5×10^4 hücre/ml olan hücrelerin logaritmik faza 1. gün, durağan faza ise 6. gün geçtikleri, başlangıç derişimi 1×10^5 hücre/ml olan hücrelerin ise logaritmik faza yine 1. gün girdikleri, durağan faza ise 4. gün geçtikleri saptanmıştır (bkz. Şekil 4.1). Elde edilen grafiklerden C6 glioma hücrelerinin jenerasyon süresinin yaklaşık 22 saat olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç diğer literatür bilgileriyle de uyum göstermektedir (Barba ve diğ.,1999).

Çalışmanın ikinci aşamasında daha önceki araştırmalarımızda en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiş olan (Önay, 2002; Önay-Uçar ve diğ., 2006) ıhlamur ağacı üzerinde yetişen *Viscum album* bitkilerinden hazırlanmış metanol ekstresinin, C6 sıçan glioma hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi MTT [“3-(4,5-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazolium”)] analizi ile değerlendirilmiştir. Yapılan analizler sonucunda, canlı hücre sayısını %50 düşüren ekstre konsantrasyonun 270 µg/ml ($IC_{50}=270$ µg/ml) olduğu belirlenmiştir. C6 glioma hücrelerine 25 µg/ml, 50 µg/ml ve 75 µg/ml derişimlerinde uygulanan ekstrelerin, proliferatif etki gösterdiği saptanmıştır. Hücreler üzerinde herhangi bir toksik ya da proliferatif etki göstermeyen ekstre dozunun 100 µg/ml olduğu belirlenmiş ve daha sonraki bütün analizlerde hücrelere, bu dozda ekstre uygulaması yapılmıştır. Anlatım düzeyleri araştırılacak olan Hsp27, Hsp70 ve 14-3-3 proteinleri ısı şoku ile indüklenmiş ve *Viscum album* ekstresinin bu indüksiyon üzerindeki etkisi çeşitli proteomik tekniklerle incelenmiştir.

İmmünolojik analiz sonuçları (Western blot verileri) değerlendirildiğinde, ısı şoku ($42^{\circ}C$ 'da 1 saat inkübasyon) uygulamasının hücredeki Hsp27 ve Hsp70 anlatımını

belirgin şekilde artırdığı görülmüştür (bkz. Şekil 4.5 ve Şekil 4.6). Kontrol grubu hücreler ile *Viscum* ekstresi uygulanan hücrelerde (VE) ise, Hsp27 anlatımının hemen hemen aynı ve diğer gruplara göre daha düşük olduğu gözlenmiştir. Isı şoku uygulaması Hsp27 anlatımını % 40 oranında artırmış, ekstre uygulaması yapıldıktan sonra ısı şoku uygulanan hücrelerde (VE+Isı şoku) ise anlatımının azaldığı saptanmıştır. Hsp70, Kontrol ve VE gruplarında çok düşük düzeyde belirlenmiş, ancak ısı şoku uygulaması ile indüklenmiştir. Ekstre uygulandıktan sonra ısı şoku uygulanan gruptaki indüksiyon ise çok daha (~%100) yüksektir. Zhang ve diğ. (2001) tarafından yapılan bir çalışmada da benzer bir sonuç elde edilmiş, C6 hücrelerinde Hsp70 anlatımının yüksek sıcaklıkla benzer oranlarda arttığı belirlenmiştir.

Yapılan bazı çalışmalarda, çeşitli antioksidanların Hsp anlatımındaki artışı önleyebildiği bulunmuştur. Isı şoku uygulanan HL-60 hücre hattına, antioksidanlar [pirolidin ditiyokarbamat (PDTC) ve 1,10-fenantrolin (Phen)] uygulandığında Hsp27 ve Hsp72'nin indüksiyonunun azaldığı saptanmıştır (Gorman ve diğ., 1999). Yapılan çalışmalar antioksidan aktiviteye sahip bir bitki flavonoidi olan kersetinin, prostat kanseri hücrelerinde ısıyla indüklenen Hsp70 anlatımını baskıladığını ortaya koymuştur (Kagaya ve diğ., 2000; Asea ve diğ., 2001; Jones ve diğ., 2004). Bu bulgular antioksidan aktiviteye sahip başka maddelerin de Hsp indüksiyonunu baskılama potansiyeli olabileceğini işaret etmektedir.

Dolayısıyla yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiş olan (Önay, 2002; Önay-Uçar, 2006; Simona ve diğ., 2008) *V. album* bitkisinden elde edilen metanol ekstresinin ısı şoku ile indüklenen Hsp27 anlatımını %50 oranında azaltması beklenen bir sonuçtur (bkz. Şekil 4.5). Ancak ekstre Hsp70 üzerinde tam tersi bir etki ortaya koymuştur. Bu farklılığın metanol ekstresindeki değişik bileşenlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Mevsimsel olarak değişen oranda flavonoid, özellikle kersetin ve kamferol içerdiği bilinen (Wollenweber ve diğ., 2000; Duke, 1987) bu bitki, henüz tanımlanmamış bir mekanizmayla Hsp anlatımını indükleyen başka madde(ler) içeriyor olabilir.

Diğer taraftan, nörodejeneratif hastalıklar ve çeşitli kanser tiplerinde rolü olan 14-3-3 proteinlerinin anlatım düzeylerine ilişkin analizler, Isı şoku ve VE+Isı şoku gruplarında,

bazı izoform anlatımlarının kontrole göre belirgin farklılıklar ortaya koyduğunu göstermiştir. *Viscum* uygulaması sadece γ izoformunda indüksiyona yol açarken, ısı şoku β , γ ve ζ izoformlarını indüklemiştir. β ve ζ izoformlarındaki bu indüksiyon, *Viscum album* ekstresi tarafından baskılanmıştır (Şekil 4.8). *Viscum* ekstresi ile işlem gördükten sonra ısı şoku uygulanan hücrelerde β ve ζ izoformlarının ekspresyon düzeyleri kontrol gruplarının da altına düşmüştür (Şekil 4.8 a ve e). Bu etki oldukça anlamlıdır. Çünkü özellikle 14-3-3 ζ izoformu mide, ağız ve akciğer kanserinde aşırı anlatım yapmakta ve tümör gelişiminde direnç sağlamaktadır (Jang ve diğ., 2004; Matta ve diğ., 2007; Li ve diğ., 2008). Ayrıca akciğer kanseri hücrelerinde yapılan çalışmalar, 14-3-3 ζ izoformunun aşırı anlatım yapmasının radyoterapinin ve kemoterapinin etkinliğini azalttığını ortaya koymuştur (Qi ve Martinez, 2003; Fan ve diğ., 2007). Bununla birlikte son dönemde 14-3-3 β izoformunun anlatımının gliomalarda arttığı gösterilmiştir (Liang ve diğ., 2009). Dolayısıyla 14-3-3 β ve ζ izoformlarının etkin bir şekilde baskılanması, kanser tedavisinde yeni bir açılım getirebilir.

Antioksidan etki gösteren maddelerin Hsp anlatımını nasıl etkilediğine dair birçok çalışma bulunmaktadır. Örneğin, bir bitki flavonoidi olan ve aynı zamanda antioksidan aktivitesi bilinen kersetin önemli bir Hsp inhibitörüdür (Peng ve diğ., 2000). Kersetinin, prostat kanseri hücrelerinde Hsp70 anlatımını baskıladığı gösterilmiştir (Jones ve diğ., 2004). Diğer bir çalışmada kersetinin HeLa hücrelerinde ısı stresi ile indüklenen Hsp27 ve Hsp70'in anlatımını baskıladığı ortaya konulmuştur (Jakubowicz-Gil ve diğ., 2002). Bu maddenin ısı şoku faktörünün (HSF), ısı şoku elementine (HSE) bağlanmasını engelleyerek Hsp anlatımını azalttığı bilinmektedir (Kagaya ve diğ., 2000; Hosokawa ve diğ., 1990; Hosokawa ve diğ., 1992; Asea ve diğ., 2001). Nagai ve diğ. (1995) tarafından yapılan bir çalışmada kersetinin HSF trimerlerinin oluşumunu engelleyerek ısı şoku cevabını inhibe ettiği gösterilmiştir. Hücrelere kersetin uygulanması hücreiçi HSF1 düzeyinin, özellikle konstitütif olarak üretilen fosforile formlarının azalmasını sağlamakta (Nagai ve diğ., 1995) ve DNA'ya bağlanmasını (Debes ve diğ., 2003; Dechsupa ve diğ., 2007) engellemektedir. Kersetin sadece HSF1 aktivasyonunu değil, aynı zamanda birçok protein kinazın aktivitesini de inhibe etmektedir (Powers ve Workman, 2007). Gorman ve diğ. (1999) tarafından yapılan çalışmada HL-60 hücre hattına ısı şoku uygulaması yaparak stres proteinleri indüklenmiş ve bu hücrelere antioksidan uygulanarak Hsp27 ve Hsp72'nin belirgin bir şekilde azaldığı gösterilmiştir.

Perez-Garcia ve diğ. (2001) tarafından yapılan çalışma sonucunda antioksidan aktivite gösteren bitki ekstralarının Hsp72 anlatımını azalttığı ortaya konulmuştur. Zanini ve diğ. (2007) tarafından nöroblastoma hücreleri ve Edwing sarkoma hücreleri üzerinde yapılan çalışmada, ısı şoku sonucu indüklenen stres proteinlerinin hücrenin Dox direncini artırdığı, fakat kersetin uygulaması sonucu bu proteinlerin anlatımlarının azaldığı ve hücrelerin ilaca daha duyarlı hale geldiği gösterilmiştir.

Buna karşın doğal bir triterpen olan kelastrolün HSF1'i aktifleştirerek Hsp70 sentezini artırdığı bilinmektedir (Westerheide ve diğ., 2004). Steroid yapıda olmayan bazı anti-inflamatuvar (aspirin, indometasin ve sodyum salisilat gibi) ilaçların da HSF1 trimerizasyonunu uyararak, hsp genlerini indükleyici olarak rol oynadıkları bilinmektedir (Lee ve diğ., 1995). Bu çalışmada *V. album* ekstresindeki bir bileşen benzer bir mekanizmayla Hsp70 indüksiyonuna yol açmış olabilir.

Morris ve diğ. (1996) tarafından yapılan bir çalışmada herbimisin-A, benzokinoid ansamisin antibiyotiği ve tirozin kinaz inhibitörü gibi moleküllerin Hsp70'in sentezini engellediği, fakat hücrenin letal ısı stresine karşı direncini sağlamak amacıyla transkripsiyonunu artırdığı hsp90, hsp60, hsp27 ve grp78 gibi diğer genleri etkilediği gösterilmiştir. Dolayısıyla mekanizması henüz tam olarak bilinmemekle birlikte ekstredeki bileşen(ler) Hsp27'nin baskılanmasına neden olurken, aynı anda Hsp70 indüksiyonuna yol açmış olabilir.

Bu çalışmada elde edilen veriler, farklı Hsp'lerin, aynı ekstreya karşı farklı cevap verilebileceğini, dolayısıyla birden fazla düzenlenme mekanizmasının var olabileceğini ortaya koymuştur.

Stres proteinleri hücrede canlılık ve ölüm yollarında düzenleyici rolleri olan proteinlerdir. Stresle indüklenebilen bazı Hsp'lerin (özellikle Hsp27 ve Hsp70) hücreleri apoptoza ve nekroza karşı korudukları gösterilmiştir (Quigney ve diğ., 2003). Yapılan çalışmalarda, hsp27 geninin aşırı anlatımının ölümcül ısı şokuna karşı, hücreye geçici direnç kazandırdığı ve aktin filamentinin kararlılığını artırdığını gösterilmiştir (Landry ve diğ., 1989; Lavoie ve diğ., 1993; Dalle-Donne ve diğ., 2001). Hsp27, termotolerans olarak adlandırılan bu stres yanıtında mitokondrileri sabitliyor olabilir

(Quigney ve diğ., 2003). Hücrede Hsp anlatımının artması apoptozun baskılanması ile de ilişkilidir (Mehlen ve diğ., 1996b). Pulmoner endotel hücrelerinde Hsp70'in aşırı anlatımının, endotoksinleri indüklediği ve apoptozu azalttığı gösterilmiştir (Wong ve diğ., 1996). Bu baskılama prokaspaz-3'ün aktif kaspaz-3'e dönüşümünün durdurulması ile sağlanmaktadır (Mosser ve diğ., 1997). Proapoptotik sinyaller (Fas gibi), HSF1 hiperfosforilasyonu olmadığı için ısı şoku sırasında HSF1-DNA bağlanmasını azaltmaktadır (Snoeckx ve diğ., 2001). Bu proteinlerin, farklı aşamalarda kaspazlara engel olarak apoptozu inhibe ettikleri gösterilmiştir (Quigney ve diğ. 2003; Bruey ve diğ., 2000a). Nekrozdan hücrenin nasıl korunduğuna dair mekanizma henüz tam olarak bilinmemekle birlikte, Hsp27'nin hücrel redoks olayında rol oynadığı (Mehlen ve diğ., 1995) ve ATP azalmasının bir sonucu olarak ortaya çıkan hücrel hasarın önlenmesinde iş gördüğü saptanmıştır (Kabakov ve Gabai, 1995). Hsp27 ve Hsp70'in antiapoptotik etkileri mitokondriden sitokrom C salınımı, apoptozom oluşumu ve kaspaz aktivasyonu ile ilişkilendirilerek açıklanmaktadır (Bruey ve diğ., 2000a; Concannon ve diğ., 2001). Bu nedenle *Viscum* ekstresinin Hsp27 anlatımını baskılayıcı etkisi, C6 hücrelerinde apoptoz indüksiyonuna yol açabilir.

Yapılan proteomik analizlerde hem molekül ağırlıklarına hem de izoelektrik noktalarına göre Hsp27, Hsp70 ve 14-3-3 proteini olma olasılığı yüksek Kontrol, VE, Isı şoku ve VE+Isı şoku grubu hücrelerin suda çözünebilen proteinleri iki boyutlu elektroforezle ayrıştırılarak incelendiğinde, özellikle molekül ağırlığı 65-80 kDa arasında olan proteinlerin anlatımlarının ısı stresi uygulaması ile belirgin şekilde arttığı belirlenmiştir. Bu proteinlerin peptid kütle piklerini elde etmek üzere MALDI-TOF MS analizleri yapıldıktan sonra, gerçekleştirilen veritabanı taramalarında Hsp70 olma olasılığı yüksek 5 tanesi Mowse skoru, molekül ağırlığı ve izoelektrik noktalarına göre belirlenmiştir. Western blot analizleri sonucunda ısı şoku ile indüklendiği belirlenen Hsp70'in, 2-D elektroforez bulguları ve MALDI-TOF MS verileri de bu indüksiyonu doğrulamıştır. Isı şoku Hsp70'in yanı sıra Grp75 prekürsörü, Hsc70, Hsc71 ve Grp75 anlatımlarını da artırmıştır. Bu sonuçlar hücrelerin stres yanıtında bu proteinlerin de rolünün olabileceğini göstermektedir.

Tez kapsamında yapılan bu çalışma sonucunda, antioksidan etkisi bilinen *Viscum album* metanol ekstresinin, beyin tümörlerinde anlatımları belirgin bir şekilde artan özellikle

Hsp27, 14-3-3 β ve 14-3-3 ζ proteinlerini baskılamak amacıyla kullanılabileceği ortaya konulmuştur. Ancak Hsp70 indüksiyonu da gözardı edilmemelidir. *V. album* ekstresinin zıt yöndeki bu etkilerinin, içeriğindeki farklı kimyasal bileşenlerden ileri geldiği düşünülmektedir. Hsp anlatımlarının azalmasına yol açan ekstre, hücrelerin apoptoza gitmesini ya da ilaç direncinin azalmasını sağlayabilir. Buna karşın bazı maddeler, HSF1 üzerinden Hsp70 indüksiyonuna yol açmaktadır. Bu tip maddelerin ekstrede bulunup bulunmadığı mutlaka araştırılmalıdır. Ekstrenin C6 glioma hücrelerinin bazı stres proteinlerini baskılayıcı etkisinin olması, beyin tümörü tedavisine yeni bir yaklaşım getirebilir. Özellikle kanser hücrelerinde Hsp ve 14-3-3 protein anlatımlarının azalması, kemoterapinin tedavi edici etkisini artırabilir veya hastalara daha düşük dozda kemoterapi ajanlarının verilmesini sağlayarak, uygulanan ilaçların yan etkilerinin azaltabilir.

KAYNAKLAR

- ABE, M., MANOLA, J. B., OH, W. K., PARSLow, D. L., GEORGE, D. J., AUSTIN, C. L., KANTOFF, P. W., 2004, Plasma levels of heat shock protein 70 in patients with prostate cancer: a potential biomarker for prostate cancer. *Clin. Prostate Cancer*, 3(1): 49-53.
- ACARIN, L., PARIS, J., GONZALEZ, B., CASTELLANO, B., 2002, Glial Expression of Small Heat Shock Proteins Following an Excitotoxic Lesion in the Immature Rat Brain. *Glia*, 38: 1-14.
- AITKEN, A., 2006, 14-3-3 proteins: A historic overview. *Seminars in Cancer Biology*, 16: 162-172.
- AITKEN, A., COLLINGE, D.B., VAN HEUSDEN, B.P., ISOBE, T., ROSEBOOM, P.H., ROSENFELD, G., SOLL, J., 1992, 14-3-3 proteins: a highly conserved widespread family of eukaryotic proteins. *Trends Biochem. Sci.* 17, 498-501.
- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P., 2002, *Molecular Biology of the Cell*, Fourth Edition, Garland Science, New York, 0-8153-4072-9.
- ALTIOK, N., ERSOZ, M., KARPUZ, V., KOYUTURK, M., 2006, Ginkgo biloba extract regulates differentially the cell death induced by hydrogen peroxide and simvastatin. *Neurotoxicology*, 27(2):158-63.
- ARDA, N., ÖNAY, E., KOZ, Ö., KIRMIZIGÜL, S., 2003, Monosaccharides and polyols from mistletoes (*Viscum album* L.) growing on two different host species. *Biologia*, 58(6): 1037-1041.
- ARRIGO, A.P., 1998, Small stress proteins: chaperones that act as regulators of intracellular redox state and programmed cell death. *Biol Chem*, 379: 19-26.
- ARTS, H.J., HOLLEMA, H., LEMSTRA, W., WILLEMSE, P.H., DE VRIES, E.G., KAMPINGA, H.H., VAN DER ZEE, A.G., 1999, Heat-shock-protein-27 (hsp27) expression in ovarian carcinoma: relation in response to chemotherapy and prognosis. *Int. J. Cancer*, 84(3): 234-238.
- ASEA, A., ARA, G., TEICHER, B.A., STEVENSON, M.A., CALDERWOOD, S.K., 2001, Effects of the flavonoid drug quercetin on the response of human prostate tumors to hyperthermia in vivo. *Int J Hyperthermia* 17: 347-356.

- AUSUBEL, F.M., BRENT, R., KINGSTON, R.E., MOORE, D.D., SEIDMAN, J.G., SMITH, J.A., STRUHL, K., 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, USA.
- BAE, S., XIAO, Y., LI, G., CASIANO, C.A., ZHANG, L., 2003, Effect of maternal chronic hypoxic exposure during gestation on apoptosis in fetal rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: 983-990.
- BAILLON, F., 1988, Seasonal Variatian of Respiration, Phloem-Transport and Carbohydrate Content in European Mistletoe. *Plant Physiol. Biochem.*, 26 (1): 85-91.
- BALER, R., DAHL, G., VOELLMY, R., 1993, Activation of human heat shock genes is accompanied by oligomerization, modification, and rapid translocation of heat shock transcription factor HSF1. *Mol Cell Biol* 13: 2486-2496.
- BARBA, I., CABAN, M.E., ARU, C., 1999, The Relationship between Nuclear Magnetic Resonance-Visible Lipids, Lipid Droplets, and Cell Proliferation in Cultured C6 Cells. *Cancer Research*, 59: 1861–1868.
- BAR-SELA, G., GERSHONY, A., HAIM, N., 2006, Mistletoe (*Viscum album*) preparations: an optional drug for cancer patients? *Harefuah*, 145(1) :42-46.
- BAŞARAN, A.A., CERİTOĞLU, I., ÜNDEĞER, U., BAŞARAN, N., 1997, Immunomodulatory Activities of Some Turkish Medicinal Plants. *Phytotherapy Research*, 11: 609-611.
- BAYTOP, T., 1999, *Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi*, 2.baskı, Nobel Tıp Kitap Evleri, 975-420-021-1.
- BECKER, H., 1986, Botany of European Mistletoe (*Viscum album* L.). *Oncology*, 43 (1): 2-7.
- BENDA, P., SOMEDA, K., MESSER, J., SWEET, W.H., 1971, Morphological and immunochemical studies of rat glial tumors and clonal strains propagated in culture. *J Neurosurg.*, 34(3):310-323.
- BENJAMIN, I.J. & McMILLAN, D.R., 1998, Stress (heat shock) proteins molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*, 83:117-132.
- BIELKA, H., HOINKIS, G., OESTERREICH, S., STAHL, J., BENNDORF, R., 1994, Induction of the small stress protein, hsp25, in ehrlich ascites carcinoma cells by anticancer drugs. *FEBS Letters*, 343: 165-167.
- BILYY, R.O. & STOIKA, R.S., 2003, Lectinocytochemical detection of apoptotic murine leukemia L1210 cells. *Cytometry Part A*, 56A: 89–95.

- BRADFORD, M.M., 1976, A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem.* 72: 248-54.
- BRANDES, A.A., TOSONI, A., FRANCESCH, E., RENI, M., GATTA, G., VECHT, C., 2008, Glioblastoma in adults. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 67: 139–152
- BRUEY, J.M., DUCASSE, C., BONNIAUD, P., RAVAGNAN, L., SUSIN, S.A., DIAZ-LATOUD, C., GURBUXANI, S., ARRIGO, A.P., KROEMER, G., SOLARY, E., GARRIDO, C., 2000a, Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nature Cell Biology*, 2: 645-652.
- BRUEY, J.M., PAUL, C., FROMENTIN, A., HILPERT, S., ARRIGO, A.P., SOLARY, E., GARRIDO, C., 2000b, Differential regulation of HSP27 oligomerization in tumor cells grown *in vitro* and *in vivo*. *Oncogene*, 19(42): 4855-4863.
- BÜSSING, A. & SCHIETZEL, M., 1999, Apoptosis-Inducing Properties of *Viscum album* L. Extracts from Different Host Trees, Correlate with Their Content of Toxic Mistletoe Lectins. *Anticancer Research*, 19: 23-28.
- BÜSSING, A., SCHALLER, G., PFÜLLER, U., 1998, Generation of Reactive Oxygen Intermediates (ROI) by the Thionins from *Viscum album* L. *Anticancer Research*, 18: 4291-4296.
- BÜSSING, A., STEIN, G.M., PFÜLLER, U., SCHIETZEL, M., 1999a, Differential Binding of Toxic Lectins from *Viscum album* L., ML I and ML III, to Human Lymphocytes. *Anticancer Research*, 19: 5095-5100.
- BÜSSING, A., 2006, Immune modulation using mistletoe (*Viscum album* L.) extracts Iscador. *Arzneimittelforschung*, 56(6A):508-515.
- CALDERWOOD, S.K. & CIOCCA, D.R., 2008, Heat shock proteins: Stress proteins with Janus-like properties in cancer. *Int. J. Hyperthermia*, 24(1):31-39.
- CALDERWOOD, S.K., SHERMAN, M.Y., CIOCCA, D.R., 2007, *Heat Shock Proteins in Cancer*, Springer-Verlag, New York, 1402064004.
- CAPELLO, F., BELLAFFIORE, M., PALMA, A., DAVID, S., MARCIANO, V., BARTOLOTTA, T., SCIUME, C., MODICA, G., FARINA, F., ZUMMO, G., BUCCHIERI, F., 2003a, 60Kda chaperonin (HSP60) is over-expressed during colorectal karsinogenesis, *Eur J Histochem*, 47(2): 105-110.
- CAPPELLO, F., RAPPÀ, F., DAVID, S., ANZALONE, R., ZUMMO, G., 2003b, Immunohistochemical evaluation of PCNA, p53, HSP60, HSP10 and MUC-2 presence and expression in prostate carcinogenesis. *Anticancer Res*, 23(2B): 1325-1331.

- CATT, S., CHALMERS, A., FALLOWFIELD, L., 2008, Psychosocial and supportive-care needs in high-grade glioma. *Lancet Oncol.*, 9: 84-91.
- CHEN, J., KAHNE, T., ROCKEN, C., GOTZE, T., YU, J., SUNG, J.J., CHEN, M., HU, P., MALFERTHEINER, P., EBERT, M.P., 2004, Proteome analysis of gastric cancer metastasis by two-dimensional gel electrophoresis and matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry for identification of metastasis-related proteins. *J Proteome Res.*, 3, 1009–1016.
- CHUMA, M., SAKAMOTO, M., YAMAZAKI, K., OHTA, T., OHKI, M., ASAKA, M., HIROHASHI, S., 2003, Expression profiling in multistage hepatocarcinogenesis: identification of HSP70 as a molecular marker of early hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 37(1):198-207.
- CIOCCA, D.R. & CALDERWOOD, S.K., 2005, Heat shock proteins in cancer: Diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress & Chaperones*, 10 (2): 86-103.
- CIOCCA, D.R., ADAMS, D.J., BJERCKE, R.J., EDWARDS, D.P., MCGUIRE, W.L., 1982, Immunohistochemical detection of an estrogen-regulated protein by monoclonal antibodies. *Cancer Res.*, 42: 4256–4258.
- CIOCCA, D.R., ADAMS, D.J., EDWARDS, D.P., BJERCKE, R.J., MCGUIRE, W.L., 1983, Distribution of an estrogen-regulated protein with a molecular weight of 24,000 in normal and malignang human tissues and cells. *Cancer Research*, 3: 1204-1210.
- CIOCCA, D.R., OESTERREICH, S., CHAMNESS, G.C., MCGUIRE, W.L., FUQUA, S.A., 1993, Biological and clinical implications of heat shock protein 27,000 (Hsp27): a review. *J. Natl. Cancer Inst.*, 85(19): 1558-1570.
- CLARK, J.I. & MUCHOWSKI, P.J., 2000, Small heat shock proteins and their potential role human disease. *Curr Opin Biol*, 10 (1): 52-59.
- COBB, B.A. & PETRASH, J.M., 2002, α -Crystallin chaperonelike activity and membrane binding in age-related cataracts. *Biochemistry*, 41: 483–490.
- COBB, B.A. & PETRASH, J.M., 2000, Characterization of alpha-crystallin-plasma membrane binding. *J. Biol. Chem.*, 275:6664–6672.
- CONCANNON, C.G., GORMAN, A.M., SAMALI, A., 2003, On the role of Hsp27 in regulating apoptosis. *Apoptosis*, 8(1): 61-70.
- CONROY, S.E., SASIENI, P.D., AMIN, V., WANG, D.Y., SMITH, P., FENTIMAN, I. S., LATCHMAN, D.S., 1998, Antibodies to heat-shock protein 27 are associated with improved survival in patients with breast cancer. *Br. J. Cancer*, 77(11): 1875-1879.

- CORNFORD, P.A., DODSON, A.R., PARSONS, K.F., DESMOND, A.D., WOOLFENDEN, A., FORDHAM, M., NEOPTOLEMOS, J.P., KE, Y., FOSTER, C.S., 2000, Heat shock protein expression independently predicts clinical outcome in prostate cancer. *Cancer Res.*, 60(24): 7099-7105.
- COYLE, D.E., 1995, Adaptation of C6 glioma cells to serum-free conditions leads to the expression of a mixed astrocyte-oligodendrocyte phenotype and increased production of neurite-promoting activity. *Journal of Neuroscience Research*, 41(3): 374-385.
- CRAGG, G.M. & NEWMAN, D.J., 2006, *Plants as a source of anti-cancer agents. Ethnopharmacology. Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*, developed under the Auspices of the UNESCO 2006 [[http:// www.eolss.net](http://www.eolss.net)]. Oxford, UK, Eolss Publishers.
- DALLE-DONNE, I., ROSSI, R., MILZANI, A., SIMPLICIO, P., COLOMBO, R., 2001, The actin cytoskeleton response to oxidants: from small heat shock protein phosphorylation to changes in the redox state of actin itself. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(12): 1624-1632.
- DEBES, A., OERDING, M., WILLERS, R., GOBEL, U., WESSALOWSKI, R., 2003, Sensitization of human Ewing's tumor cells to chemotherapy and heat treatment by the bioflavonoid quercetin. *Anticancer Res.*, 23: 3359-3366.
- DECHSUPA, S., KOTHAN, S., VERGOTE, J., LEGER, G., MARTINEAU, A., BERANGER, S., KOSANLAVIT, R., MORETTI, J.L., MANKHETKORN, S., 2007, Quercetin, Siamois 1 and Siamois 2 induce apoptosis in human breast cancer MDA-MB-435 cells xenograft *in vivo*. *Cancer Biol. Ther.*, 6(1): 56-61.
- DELIÖRMAN, D. & ERGUN, F., 2000a, High Performance Liquid Chromatographic Determination of Syringin in *Viscum album* L. ssp. *album* Samples Collected from Different Host Plants. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, 23(19): 3033-3042.
- DELIÖRMAN, D., ÇALIŞ, İ., ERGUN, F., 2001a, A New Acyclic Monoterpene Glucoside from *Viscum album* ssp. *album*. *Fitoterapia*, 72: 101-105.
- DELIÖRMAN, D., ÇALIŞ, İ., ERGUN, F., DOĞAN, B. S. U., BUHARALIOĞLU, C. K., KANZIK, I., 2000b, Studies on the Vascular Effects of the Fractions and Phenolic Compounds Isolated from *Viscum album* ssp. *album*. *Journal of Ethnopharmacology*, 72: 323-329.
- DELIÖRMAN, D., ÇALIŞ, İ., ERGUN, F., TAMER U., 1999, The Comparative Studies on Phenylpropanoid Glycosides of *Viscum album* Subspecies by High Performance Liquid Chromatography. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, 22(20): 3101-3114.
- DELIÖRMAN, D., ERGUN, F., ŞENER, B., PALITTAPONGARNPIM, P., 2001b, Evaluation of Antimycobacterial Activity of *Viscum album* Subspecies. *Pharmaceutical Biology*, 39 (5): 381-383.

- DOSER, C., DOSER, M., HÜLSEN, H., MECHELKE, F., 1989, Influence of Carbohydrates on the Cytotoxicity of an Aqueous Mistletoe Drug and of Purified Mistletoe Lectins Tested on Human T-Leukemia Cells. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, 39 (I): 647-651.
- DUKE, J.A., 1987. *CRC Handbook of Medicinal Herbs*. 5th Ed., CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
- ELLIS, J., 1987, Proteins as molecular chaperones. *Nature*, 328(6129): 378-379.
- ERGUN, F., DELİORMAN, D., ŞENER, B., 1994, *Viscum album* L. (Ökseotu) (Loranthaceae) Bitkisinin Morfolojik Özellikleri ve Türkiye'deki Yayılışı Hakkında Bazı Araştırmalar. *OT Sistematik Botanik Dergisi*, 1 (2): 47-62.
- ERNST, E., SCHMIDT, K., STEUER-VOGT, M.K., 2003, Mistletoe for cancer? A Systematic Review of Randomised Clinical Trials. *Int. J. Cancer*, 107: 262-267.
- ESKENAZI, A.E., POWERS, J., PINKAS, J., OESTERREICH, S., FUQUA, S.A.W., FRANTZ, K.N., 1998, Induction of heat shock protein 27 by hydroxyurea and its relationship to experimental metastasis. *Clin. Exp. Metastasis*, 16: 283-290.
- FAN, T., LI, R., TODD, N.W., QIU, Q., FANG, H.B., WANG, H., SHEN, J., ZHAO, R.Y., CARAWAY, N.P., KATZ, R.L., STASS, S.A., JIANG, F., 2007, Up-regulation of 14-3-3 ζ in Lung Cancer and Its Implication as Prognostic and Therapeutic Target. *Cancer Research* 67(16): 7901-7906.
- FLORACK, D.E.A. & STIEKEMA, W.J., 1994, Thionins: Properties, Possible Biological Roles and Mechanisms of Actions. *Plant Mol. Biol.*, 26: 25-37.
- FORTIN, A., RAYBAUD-DIOGÈNE, H., TÊTU, B., HUOT, J., LANDRY, J., DESCHENES, R., 2000, Overexpression of the 27 kDa heat shock protein is associated with thermoresistance and chemoresistance but not with radioresistance. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, 46(5): 1259-1266.
- FRANTZ, M., JUNG, M.L., RIBEREAU-GAYON, G., ANTON, R., 2000, Modulation of Mistletoe (*Viscum album* L.) Lectins Cytotoxicity by Carbohydrates and Serum Glycoproteins. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, 50 (1): 471-478.
- FRANZ, H., 1985, Inhaltsstoffe der Mistel (*Viscum album* L.) als potentielle Arzneimittel. *Pharmazie*, 40: 97-104.
- FRANZ, H., ZISKA, P., KINDT, A., 1981, Isolation and Properties of Three Lectins from Mistletoe (*Viscum album* L.). *Biochem. J.*, 195: 481-484.
- FRESHNEY, R. I. 2000. *Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Techniqu*, Fourth edition, Wiley-Liss Press.

- FRYDMAN, J. & HARTL, F.U., 1996, Principles of chaperone-assisted protein folding: differences between *in vitro* and *in vivo* mechanisms. *Science*, 272(5267): 1497-1502.
- GAITANAKI, C., KONSTANTINA, S., CHRYSA, S., BEIS, I., 2003, Oxidative stress stimulates multiple MAPK signalling pathways and phosphorylation of the small HSP27 in the perfused amphibian heart. *The Journal of Experimental Biology*, 206: 2759-2769
- GARRIDO, C., MEHLEN, P., FROMENTIN, A., HAMMANN, A., ASSEM, M., ARRIGO, A.P., CHAUFFERT, B., 1996. Inconstant association between 27-kDa heat-shock protein (Hsp27) content and doxorubicin resistance in human colon cancer cells. The doxorubicin-protecting effect of Hsp27. *Eur J Biochem*, 237: 653–659.
- GORMAN, A.M., HEAVEY, B., CREAGH, E., COTTER, T.G., SAMALI, A., 1999, Antioxidant-mediated inhibition of the heat shock response leads to apoptosis. *FEBS Letters*, 445: 98-102.
- GOTTARDO, N.G. & GAJJAR, A., 2008, Chemotherapy for Malignant Brain Tumors of Childhood. *Journal of Child Neurology*, 23(10): 1149-1159.
- GOTTESMAN, M.M. & PASTAN, I., 1988, The multidrug transporter, a double-edged sword. *J. Biol. Chem.*, 263: 12163–12166.
- GRANER, M.W. & BIGGER, D.D., 2005, Chaperone proteins and brain tumors: Potential targets and possible therapeutics. *Neuro-Oncology*, 7: 260–277.
- GRANER, M.W., CUMMING, R.I., BIGNER, D.D., 2007, The Heat Shock Response and Chaperones/Heat Shock Proteins in Brain Tumors: Surface Expression, Release, and Possible Immune Consequences. *The Journal of Neuroscience*, 27(42): 11214–11227.
- GRAY, A.M. & FLATT, P.R., 1999, Insulin-Secreting Activity of the Traditional Antidiabetic Plant *Viscum album* (Mistletoe). *Journal of Endocrinology*, 160: 409-414.
- GROSSARTH-MATICEK, R. & ZIEGLER, R., 2007, Prospective controlled cohort studies on long-term therapy of ovarian cancer patients with mistletoe (*Viscum album* L.) extracts iscador. *Arzneimittelforschung*, 57(10):665-78.
- GUESDON, F., FRESHNEY, N., WALLER, J.R., RAWLINSON, L., SAKLATVALA, J., 1993, Interleukin 1 and Tumor Necrosis Factor Stimulate Two Novel Protein Kinases That Phosphorylate the Heat Shock Protein hsp27 and β -Casein. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(6): 4236-4243.
- HAHN, G.M. & LI, G.C., 1990, Thermotolerance, thermoresistance, and thermosensitization. *Stress Proteins in Biology and Medicine*, Cold Spring Harbor Lab, USA.

- HALL, D.M., SATTTLER, G.L., SATTTLER, C.A., ZHANG, H.J., OBERLEY, L.W., PÍTOT, H.C., KREGEL, K.C., 2001, Aging Lowers Steady-State Antioxidant Enzyme and Stress Protein Expression in Primary Hepatocytes *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 56: 259-267.
- HAMPRECHT, K., HANDGRETINGER, R., VOETSCH, W., ANDERER, A., 1987, Mediation of Human NK-Activity by Components in Extracts of *Viscum album*. *Int. J. Immunopharmac.*, 9 (2): 199-209.
- HATAYAMA, T., YAMAGISHI, N., MINOBE, E., SAKAI, K., 2001, Role of hsp105 in protection against stress-induced apoptosis in neuronal PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 288: 528-534.
- HE, H., CHEN, C., XIE, Y., ASEA, A., CALDERWOOD, S.K., 2000, Hsp70 and heat shock factor 1 cooperate to repress Ras-induced transcriptional activation of the c-fos gene. *Cell Stress and Chaperones*, 5(5): 406-411.
- HEGI, G., 1981, *Illustrierte Flora von Mitteleuropa III*, 309-321, Parey, Berlin.
- HEUKESHOVEN, J. & DERNICK, R., 1985, Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis*, 6, 103–112.
- HITOTSUMATSU, T., IWAKI, T., FUKUI, M., TATEISHI, J., 1996, Distinctive immunohistochemical profiles of small heat shock proteins (heat shock protein 27 and alpha beta-crystallin) in human brain tumors. *Cancer Research*, 77: 352-361.
- HOHFELD, J., MINAMI, Y., HARTL, F., 1995, Hip, a novel cochaperone involved in the eukaryotic Hsc70/Hsp40 reaction cycle. *Cell*, 83: 589-598.
- HORWICH, A.L., 2002, Protein aggregation in disease: a role for folding intermediates forming specific multimeric interactions. *J. Clin. Invest.*, 110, 1221–1232.
- HOSOKAWA, N., HIRAYOSHI, K., KUDO, H., TAKECHI, H., AOIKE, A., KAWAI, K., NAGATA, K., 1992, Inhibition of the activation of heat shock factor *in vivo* and *in vitro* by flavonoids. *Mol. Cell. Biol.*, 12:3490-3498.
- HOSOKAWA, N., HIRAYOSHI, K., NAKAI, A., HOSOKAWA, Y., MARUI, N., YOSHIDA, M., SAKAI, T., NISHINO, H., AOIKE, A., KAWAI, K., NAGATA, K., 1990, Flavonoids inhibit the expression of heat shock proteins. *Cell Struct. Fund.*, 15: 393–401.
- HUGHES, E.N. & AUGUST, J.T., 1982, Co-precipitation of heat shock proteins with a cell surface glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 79: 2305-2309.
- HUOT, J., ROY, G., LAMBERT, H., CHRETIEN, P., LANDRY, J., 1991, Increased Survival after Treatments with Anticancer Agents of Chinese Hamster Cells Expressing the Human Mr 27,000 Heat Shock Protein. *Cancer Research*, 51: 5245-5252.

- HÜLSEN, H., KRON, R., MECHELKE, F., 1989, Influence of *Viscum album* Preparations on the Natural Killer Cell- Mediated Cytotoxicity of Peripheral Blood. *Naturwissenschaften*, 76: 530-531.
- IMURA, T., SHIMOHAMA, S., SATO, M., NISHIKAWA, H., MADONO, K., AKAIKE, A., KIMURA, J., 1999, Differential Expression of Small Heat Shock Proteins in ReactiveAstrocytes after Focal Ischemia: Possible Role of β -Adrenergic Receptor. *The Journal of Neuroscience*, 19(22): 9768–9779.
- IWADATE, Y., SAKAIDA, T., HIWASA, T., NAGAI, Y., ISHIKURA, H., TAKIGUCHI, M., YAMAURA, A., 2004, Molecular Classification and Survival Prediction in Human Gliomas Based on Proteome Analysis. *Cancer Research*, 64: 2496–2501.
- JAATTELA, M. & WISSING, D., 1993, Heat-shock proteins protect cells from monocyte cytotoxicity: possible mechanism of self-protection. *J. Exp. Med.*, 177(1): 231-236.
- JAATTELA, M., 1999, Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Exp. Cell Res.*, 248(1): 30-43.
- JAKUBOWICZ-GIL, J., RZYMOWSKA; J., GAWRON, A., 2002, Quercetin, Apoptosis, Heat Shock. *Biochemical Pharmacology*, 64: 1591-1595.
- JANG, J.S.J., CHO, H.Y., LEE, Y.J., HA, W.S., KIM, H.W., 2004, The Differential Proteome Profile of Stomach Cancer: Identification of the Biomarker Candidates. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, 14(10): 491-499.
- JEREMIAS, I., STEINER, H.H., BENNER, A., DEBATIN, K.M., HEROLD-MENDE, C., 2004, Cell death induction by betulinic acid, ceramide and TRAIL in primary glioblastoma multiforme cells. *Acta Neurochir (Wien)*, 146: 721–729.
- JONES, E.L., ZHAU, M.J., STEVENSON, M.A., CALDERWOOD, S.K., 2004, The 70 kilodalton heat shock protein is an inhibitor of apoptosis in prostate cancer. *Int J Hyperthermia*, 20(8):835-49.
- JORDAN, E. & WAGNER, H., 1986, Structure and Properties of Polysaccharides from *Viscum album* (L.). *Oncology*, 43 (suppl.1): 8-15.
- JUNG, M.L., BAUDINO, S., GAYON, R.G., BECK, J.P., 1990, Characterization of Cytotoxic Proteins from Mistletoe (*Viscum album* L.). *Cancer Letters*, 51: 103-108.
- JURIN, M., ZARKOVIC, N., HRZENJAK, M., ILIC, Z., 1993, Antitumorous and Immunomodulatory Effects of the *Viscum album* L. Preparation Isorel. *Oncology*, 50: 393-398.

- KABAKOV, A.E. & GABAI, V.L., 1995, Heat shock-induced accumulation of 70-kDa stress protein (HSP70) can protect ATP-depleted tumor cells from necrosis. *Experimental Cell Research*, 217: 15-21.
- KAGAYA, A., OKADA, A., JITSUIKI, H., TAWARA, Y., INAGAKI, M., TAKEBAYASHI, M., SAEKI, T., NISHIDA, A., NAKATA, Y., YAMAWAKI, S., 2000, Effect of Heat Stress on Serotonin-2A Receptor-Mediated Intracellular Calcium Mobilization in Rat C6 Glioma Cells. *J Neural Transm.*, 107: 919-929.
- KAI, M., NAKATSURA, T., EGAMI, H., SENJU, S., NISHIMURA, Y. OGAWA, M., 2003, Heat shock protein 105 is overexpressed in a variety of human tumors. *Oncol Rep*, 10(6): 1777-1782.
- KAPRANOS, N., KOMINEA, A., KONSTANTINOPOULOS, P. A., SAVVA, S., ARTELARIS, S., VANDOROS, G., SOTIROPOULOU-BONIKOU, G., PAPAVALASSILOU, A.G., 2002, Expression of the 27-kDa heat shock protein (HSP27) in gastric carcinomas and adjacent normal, metaplastic, and dysplastic gastric mucosa, and its prognostic significance. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 128(8): 426-432.
- KARAGÖZ, A., ÖNAY, E., ARDA, N., KURU, A., 2003, Antiviral Potency of Mistletoe (*Viscum album* ssp. *album*) Extracts Against Human Parainfluenza Virus Type 2 in Vero Cells. *Phytother. Res.* 17, 560-562.
- KARKABOUNAS, S., ASSIMAKOPOULOS, D., MALAMAS, M., SKALTSOUNIS, A. L., LEONCE, S., ZELOVITIS, J., STEFANOPOULOS, D., EVANGELOU, A., 2000, Antiproliferative and Anticarcinogenic Effects of an Aqueous Preparation of *Abies alba* and *Viscum album* se *abies*, on a L-1210 Malignant Cell Line and Tumor-Bearing Wistar Rats. *Anticancer Research*, 20: 4391-4396.
- KATO, H., KOGURE, K., LIU, X.H., ARAKI, T., KATO, K., ITOYAMA, Y., 1995, Immunohistochemical localization of the low molecular weight stress protein HSP27 following focal cerebral ischemia in the rat. *Brain Research*, 679(1):1-7.
- KATSUKI, K., FUJIMOTO, M., ZHANG, X.Y., IZU, H., TAKAKI, E., TANIZAWA, Y., INOUE, S., NAKAI, A., 2004, Feeding induces expression of heat shock proteins that reduce oxidative stress, *FEBS Letters*, 571: 187-191.
- KHALID, H., TSUTSUMI, K., YAMASHITA, H., KISHIKAWA, M., YASUNAGA, A., SHIBATA, S., 1995, Expression of the small heat shock protein (hsp) 27 in human astrocytomas correlates with histologic grades and tumor growth fractions. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 15(2): 257-268.
- KHWAJA, T.A., DIAS, C.B., PENTECOST, S., 1986, Recent Studies on the Anticancer Activities of Mistletoe (*Viscum album*) and Its Alkaloids. *Oncology*, 43 (1): 42-50.

- KHWAJA, T.A., VARVEN, J.C., PENTECOST, S., PANDE, H., 1980, Isolation of Biologically Active Alkaloids from Korean Mistletoe *Viscum album, coloratum*. *Experientia*, 36: 599-600.
- KIANG, J.G. & TSOKOS, G.C., 1998, Heat Shock Protein 70 kDa: Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology. *Pharmacol. Ther.*, 80(2): 183–201.
- KIENLE, G.S., GLOCKMANN, A., SCHINK, M., KIENE, H., 2009, *Viscum album* L. extracts in breast and gynaecological cancers: a systematic review of clinical and preclinical research. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* :28-79.
- KIM, J., NUEDA, A., MENG, Y.H., DYNAN, W.S., MIVECHI, N.F., 1997, Analysis of the phosphorylation of human heat shock transcription factor-1 by MAP kinase family members. *J Cell Biochem.*, 67: 43–54.
- KIM, K.K., KIM, R., KIM, S.H., 1998a, Crystal structure of a small heat-shock protein. *Nature*, 394: 595-599.
- KLEIHUES, P., BURGER, P.C., SCHEITHAUER, B.W., 1993, The New WHO Classification of Brain Tumours. *Brain Pathology*, 3(3): 255-268.
- KLEMENZ, R., FRÖHLI, E., AOYAMA, A., HOFFMANN, S., SIMPSON, R.J., MORITZ, R.L., SCHÄFER, R., 1991, Alpha B crystallin accumulation is a specific response to Ha-ras and v-mos oncogene expression in mouse NIH 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol.*, 11(2): 803-12.
- KLOSE, J. & KOBALZ, U., 1995, Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis*, 16, 1034–1059.
- KNÖPFL-SIDLER, F., VIVIANI, A., RIST, L., HENSEL, A., 2005, Human cancer cells exhibit *in vitro* individual receptiveness towards different Mistletoe extracts *Pharmazie*, 60(6): 448-454.
- KOVACS, E., HAJTO, T., HOSTANSKA, K., 1991, Improvement of DNA Repair in Lymphocytes of Breast Cancer Patients Treated with *Viscum album* Extract (Iscador). *Eur. J. Cancer*, 27 (12): 1672-1676.
- KOYASU, S., NISHIDA, T., KADOWAKI, T., MATSUZAKI, F., IIDA, K., HARADA, F., KASUGA, M., SAKAI, H., YAHARA, I., 1986, Two mammalian heat shock proteins, HSP90 and HSP100 are actin-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83: 8054-8055.
- KREISL, T.N., 2009, Chemotherapy for Malignant Gliomas. *Semin. Radiat. Oncol.*, 19: 150-54.

- KUBASOVA, T., PFÜLLER, U., BOJTOR, I., KÖTELES, G.J., 1998, Modulation of immune response by mistletoe lectin 1 as detected on tumour model in vivo. In: *Effects of antinutrients on the nutritional value of legume diets*. COST 98. EC Publication, Luxembourg.
- KUBOTA, H., NISHIZAKI, T., HARADA, K., HARADA, K., OGA, A., ITO, H., SUZUKI, M., SASAKI, K., 2001, Identification of recurrent chromosomal rearrangements and the unique relationship between low-level amplification and translocation in glioblastoma. *Genes Chromosomes and Cancer* , 31(2): 125-133.
- KUNZE, E., SCHULZ, H., AHRENS, H., GABIUS, H.J., 1997, Lack of an Antitumoral Effect of Immunomodulatory Galactoside-Specific Mistletoe Lectin on N-Methyl-N-Nitrosourea-Induced Urinary Bladder Carcinogenesis in Rats. *Exp. Toxic Pathol.*, 49: 167-180.
- KUTTAN, G. & KUTTAN, R., 1992, Immunological Mechanism of Action of the Tumor Reducing Peptide from Mistletoe Extract (NSC 635089) Cellular Proliferation. *Cancer Letters*, 66: 123-130.
- KUTTAN, G. & KUTTAN, R., 1993, Reduction of Leukopenia in Mice by (*Viscum album*) Administration During Radiation and Chemotherapy. *Tumori*, 79: 74-76.
- KUTTAN, G., VASUDEVAN, D.M., KUTTAN, R., 1988, Isolation and Identification of a Tumour Reducing Component from Mistletoe Extract (Iscaador). *Cancer Letters*, 41: 307-314.
- LAAD, A.D., THOMAS, M.L., FAKIH, A.R., CHIPLUNKAR, S.V., 1999, Human gamma delta T cells recognize heat shock protein-60 on oral tumor cells. *Int J Cancer*, 80 (5): 709-714.
- LAITUSIS, A.L., BROSTROM, M.A., BROSTROM, C.O., 1999, The Dynamic Role of GRP78/BiP in the Coordination of mRNA Translation with Protein Processing. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(1): 486-493.
- LANDRY, J., 2000, Protein Interactions and Molecular Chaperones. Erişim adresi: <http://www.tulane.edu/~biochem/med/hsp.htm>, Erişim Tarihi: 09.01.2009.
- LANDRY, J., CHRÉTIEN, P., LAMBERT, H., HICKEY, E., WEBER, L.A., 1989, Heat shock resistance conferred by expression of the human HSP27 gene in rodent cells. *J. Cell. Biol.*, 109: 7-15.
- LANDRY, J., CHRETIEN, P., LASZLO, A., LAMBERT, H., 1991, Phosphorylation of HSP27 during development and decay of thermotolerance in Chinese hamster cells. *J. Cell. Physiol.*, 147: 93-101.

- LANDRY, J., LAMBERT, H., ZHOU, M., LAVOIE, J.N., HICKEY, E., WEBER, L.A., ANDERSON, C.W., 1992, Human HSP27 is phosphorylated at serines 78 and 82 by heat shock and mitogen-activated kinases that recognize the same amino acid motif as S6 kinase II. *J Biol Chem.*, 267: 794–803.
- LAVOIE, J.N., GINGRAS-BRETON, G., TANGUAY, R.M., LANDRY, J., 1993, Induction of Chinese hamster HSP27 gene expression in mouse cells confers resistance to heat shock. *J Biol. Chem.*, 268: 3420-3429.
- LAYFIELD, R., FERGUSSON, J., AITKEN, A., LOWE, J., LANDON, M., MAYER, J., 1996, Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease brains contain 14-3-3 proteins. *Neurosci Lett*, 209: 57–60.
- LEARMONTH, M. & AITKEN, A., 2005, Protein Identification by In-Gel Digestion and Mass Spectrometric Analysis. *The Proteomics Protocols Handbook*. Humana Press, USA, 1-59259-890-0.
- LEE, B.S., CHEN, J., ANGELIDIS, C., JURIVICH, D.A., MORIMOTO, R.I., 1995, Pharmacological modulation of heat shock factor 1 by antiinflammatory drugs results in protection against stressinduced cellular damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 7207–7211.
- LEE, S.J., CHOI, S.A., LEE, K.H., CHUNG, H.Y., KIM, T.H., CHO, C.K., LEE, Y.S., 2001, Role of inducible heat shock protein in radiation- induced cell death, *Cell Stres & Chaperones*, 6(3): 273-281.
- LENEWEIT, G., FRÖSE, D., ROESNER, K. G., KOEHLER, R., SCHEFFLER, A., 2000, Shear Degredation and Deformation of Polysaccharides in Thin Liquid Film Flow on a Rotating Disk. *Polymer Degradation and Stability*, 70: 283-297.
- LI, S., PIOTROWICZ, R.S., LEVIN, E.G., SHYY, Y.J., CHIEN, S., 1996, Fluid shear stress induces the phosphorylation of small heat shock proteins in vascular endothelial cells. *AJP - Cell Physiology*, 271(3C): 994-1000.
- LI, Z., ZHAO, J., DU, Y., PARK, H.Y., SUN, S.Y., BERNAL-MÍZRACHI, L., AITKEN, A., KHURI, F.R., FU, H., 2008, Down-regulation of 14-3-3 ζ suppresses anchorage-independent growth of lung cancer cells through anoikis activation. *PNAS*, 105(1): 162–167.
- LIANG, P. & MACRAE, T.H., 1997, Molecular chaperones and the cytoskeleton. *Journal of Cell Science*, 110: 1431-1440.
- LIANG, S., SHEN, G., LIU, Q., XU, Y., ZHOU, L., XIAO, S. XU, Z., GONG, F., YOU, C., WEI, Y., 2009, Isoform-specific expression and characterization of 14-3-3 proteins in human glioma tissues discovered by stable isotope labeling with amino acids in cell culture-based proteomic analysis. *Proteomics Clin. Appl*, 3: 743–753.

- LITTLE, E., RAMAKRISHNAN, M., ROY, B., GAZIT, G., LEE, A.S., 1994, The glucose-regulated proteins (GRP78 and GRP94): functions, gene regulation, and applications. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.*, 4(1): 1-18.
- LOKTIONOVA, S.A., ILYINSKAYA, O.P., GABAI, V.L., KABAKOV, A.E., 1996, Distinct effects of heat shock and ATP depletion on distribution and isoform patterns of human Hsp27 in endothelial cells. *FEBS Letters*, 392: 100-104.
- LORD-FONTAINE, S. & AVERILL-BATES, D.A., 2002, Heat shock inactivates cellular antioxidant defenses against hydrogen peroxide: protection by glucose. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(8): 752-765.
- LUTTER, P., MEYER, H.E., LANGER, M., WITTHOHN, K., DORMEYER, W., SICKMANN, A., BLÜGGEL, M., 2001, Investigation of Charge Variants of rViscumin by Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry. *Electrophoresis*, 22: 2888-2897.
- MACARIO, A.J.L. & MACARIO, E.C., 2002, Chaperonopathies and chaperonotherapy. *FEBS Letters*, 581: 3681–3688.
- MACKIE, S. & AITKEN, A., 2005, Novel brain 14-3-3 interacting proteins involved in neurodegenerative disease. *FEBS J*, 272: 4202–4210.
- MAIER, G. & FIEBIG, H.H., 2002, Absence of tumor growth stimulation in a panel of 16 human tumor cell lines by mistletoe extracts *in vitro*. *Anticancer Drugs*, 13:373-379.
- MATTA, A., BAHADUR, S., DUGGAL, R., GUPTA, S.D., RALHAN, R., 2007, Over-expression of 14-3-3 zeta is an early event in oral cancer. *BMC Cancer*, 7: 169.
- MCDUFFEE, A.T., SENISTERRA, G., HUNTLEY, S., LEPOCK, J.R., SEKHAR, K.R., MEREDITH, M.J., BORRELLI, M.J., MORROW, J.D., FREEMAN, M.L., 1997, Proteins containing non-native disulfide bonds generated by oxidative stress can act as signals for the induction of the heat shock response. *J Cell Physiol.*, 171(2):143-51.
- MEHLEN, P., KRETZ-REMY, C., PRÉVILLE, X., ARRIGO, A.P., 1996a, Human hsp27, Drosophila hsp27 and human α B-crystallin expression-mediated increase in glutathione is essential for the protective activity of these proteins against TNF α -induced cell death. *The EMBO Journal*, 15(11): 2695-2706.
- MEHLEN, P., PREVILLE, X., CHAREYRON, P., BRIOLAY, J., KLEMENZ, R., ARRIGO, A.P., 1995, Constitutive expression of human hsp27, Drosophila hsp27, or human α B-crystallin confers resistance to TNF- and oxidative stress-induced cytotoxicity in stably transfected murine L929 fibroblasts. *Immunology*, 154: 363-374.

- MEHLEN, P., SCHULZE-OSTHOFF, K., ARRIGO, A.P., 1996b, Small stress proteins as novel regulators of apoptosis: heat shock protein 2 blocks Fas/APO-1- and staurosporine-induced cell death. *J. Biol. Chem.*, 271: 16510-16514.
- MENGS, U., SCHWARZ, T., BULITTA, M., WEBER, K., 2000, Antitumoral Effects of an Intravesically Applied Aqueous Mistletoe Extract on Urinary Bladder Carcinoma MB49 in Mice. *Anticancer Research*, 20: 3565-3568.
- MILLER, A.G., 1982, *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Davis, P.H. Ed., University of Edinburg, Vol.7:547.
- MOAT, A.G., 1979, *Microbial Physiology*, John Wiley and Sons, New York, 0-471-07258-3.
- MOLASSIOTIS, A., SCOTT, J.A., KEARNEY, N., PUD, D., MAGRI, M., SELVEKEROVA, S., BRUYNS, I., FERNADEZ-ORTEGA, P., PANTELI, V., MARGULIES, A., GUDMUNSDOTTIR, G., MILOVICS, L., OZDEN, G., PLATIN, N., PATIRAKI, E., 2006, Complementary and alternative medicine use in breast cancer patients in Europe. *Support Care Cancer*, 14(3):260-267.
- MOORE, B.W. & PEREZ, V.J., 1967, FD Carlson. ed. *Physiological and Biochemical Aspects of Nervous Integration*. Prentice-Hall, Inc, *The Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA*. pp.343-359.
- MORIMOTO, R.I., 1993, Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science*, 259: 1409-1410.
- MORRIS, S.D., CUMMING, D.V.E., LATCHMAN, D.S., YELLON, D.M., 1996, Specific induction of the 70-kD heat stress proteins by the tyrosine kinase inhibitor herbimycin-A protects rat neonatal cardiomyocytes. *J. Clin. Invest.*, 97: 706-712.
- MOSMANN, T. 1983, Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival Application to Proliferation and Cytotoxicity Assay. *J Immunol Meth*, 65: 55.
- MOSSER, D.D., CARON, A.W., BOURGET, L., DENISE-LAROSE, C., MASSIE, B., 1997, Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.*, 17: 5317-5327.
- MOSSER, D.D., DUCHAINE, J., MASSIE, B., 1993, The DNA-binding activity of the human heat shock transcription factor is regulated *in vivo* by hsp70. *Mol. Cell. Biol.*, 13: 5427-5438.
- MUELLER, E.A. & ANDERER, F.A., 1990, Synergistic Action of a Plant Rhamnogalacturonan Enhancing Antitumor Cytotoxicity of Human Natural Killer and Lymphokine-Activated Killer Cells: Chemical Specificity of Target Cell Recognition. *Cancer Research*, 50: 3646-3651.

- MUELLER, E.A., HAMPRECHT K., ANDERER, F.A., 1989, Biochemical Characterization of a Component in Extracts of *Viscum album* Enhancing Human NK Cytotoxicity. *Immunopharmacology*, 17: 11-18.
- MYUNG, J.K., KRAPPENBAUER, K., WEITZDOERFER, R., PEYRL, A., FOUNTOULAKIS, M., LUBECA, G., 2003, Expressional pattern of chaperones in neuronal, glial, amnion, mesothelial, and bronchial epithelial cell lines. *Molecular Genetics and Metabolism*, 80: 444-450.
- NAGAI, N., NAKAI, A., NAGATA K., 1995, Quercetin Suppresses Heat Shock Response by Down-Regulation of HSF1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 208(3): 1099-1105.
- NAKAMOTO, H. & VÍGH, L., 2007, The small heat shock proteins and their clients. *Cell. Mol. Life Sci.*, 64: 294-306.
- NOLLEN, E.A., BRUNSTING, J.F., ROELOFSEN, H., WEBER, L.A., KAMPINGA, H.H., 1999, *In vivo* chaperone activity of heat shock protein 70 and thermotolerance. *Mol. Cell. Biol.*, 19 (3): 2069-2079.
- NYLANDSTED, J., BRAND, K., JÄÄTTELÄ, M., 2000, Heat shock protein 70 is required for the survival of cancer cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 926:122-125.
- OESTERREICH, S., WENG, C.N., QIU, M., HILSENBECK, SG, OSBORNE CK, FUQUA S.A., 1993, The small heat shock protein hsp27 is correlated with growth and drug resistance in human breast cancer cell lines, *Cancer Research*, 53(19): 4443-4448.
- OHGAKI, H. & KLEIHUES P., 2005, Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol*, 109: 93-108.
- OSTREROVA, N., PETRUCCELLI, L., FARRER, M., MEHTA, N., CHOI, P., HARDY, J., WOLOZIN, B., 1999, Alpha-synuclein shares physical and functional homology with 14-3-3 proteins. *J. Neurosci.*, 19:5782-5791.
- OZAR, E., 2000, Deneysel C6 rat glioma modelinde progesteron ve ibuprofen'in damarlanma paterni üzerine etkileri, Uzmanlık Tezi, T.C. Sağlık Bakanlığı, Bakırköy Ruh ve Sinir Hastalıkları Hastanesi, I.Nöroşirürji Kliniği.
- ÖNAY, E., 2002, Farklı Konakçı Ağaçlar Üzerinde Yaşayan Ökseotu (*Viscum album*) Bitkisinde Biyokimyasal Analizler, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- ÖNAY-UÇAR, E., KARAGÖZ, A., ARDA, N., 2006, Antioxidant Activity of *Viscum album* L. ssp. *album*. *Fitoterapia*, 77: 556-560.
- PAPP, E., NARDAI, G., SÖTI, C., CSERMELY, P., 2003, Molecular chaperons, stress proteins and redox homeostasis, *Biofactors*, 17: 249-257.

- PARK, J.H., HYUN, C.K., SHIN, H.K., 1999, Cytotoxic Effects of the Components in Heat-Treated Mistletoe (*Viscum album*). *Cancer Letters*, 139: 207-213.
- PARK, W.B., LYU, S.Y., KIM, J.H., CHOI, S.H., CHUNG, H.K., AHN, S.H., HONG, S.Y., YOON, T.J., CHOI, M.J., 2001, Inhibition of Tumor Growth and Metastasis by Korean Mistletoe Lectin is Associated with Apoptosis and Antiangiogenesis. *Cancer Biother. & Radiopharm.*, 16 (5): 439-447.
- PAUL, C., MANERO, F., GONIN, S., KRETZ-REMY, C., VIROT, S., ARRIGO, A.P., 2002, Hsp27 as a negativeregulator of cytochrome C release. *Mol Cell Biol.*, 22: 816-834.
- PENG, J., JONES, G.L., WATSON, K., 2000, Stress proteins as biomarkers of oxidative stress: effects of antioxidant supplements. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(11):1598-1606.
- PÉREZ-GARCÍA, F., MARÍN, E., ADZET, T., CAÑIGUERAL, S., 2001, Activity of plant extracts on the respiratory burst and the stress protein synthesis. *Phytomedicine*, 8(1): 31-38.
- PEUMANS, W.J., VERHAERT, P., PFÜLLER, U., DAMME, J.M.V., 1996, Isolation and Partial Characterization of a Small Chitin-Binding Lectin from Mistletoe (*Viscum album*). *FEBS Letters*, 396: 261-265.
- POCKLEY, A.G., 2001, Heat shock proteins in health and disease:Therapeutic agents? Erişim adresi: <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk>, Erişim Tarihi: 21.09.2009.
- POWERS, M.V. & WORKMAN, P., 2007, Inhibitors of the heat shock response: Biology and pharmacology. *FEBS Letters*, 581: 3758-3769.
- POZUELO-RUBIO, M., GERAGHTY, K.M., WONG, B.H., WOOD, N.T., CAMPBELL, D.G., MORRICE, N., MACKINTOSH, C., 2004, 14-3-3-affinity purification of over 200 human phosphoproteins reveals new links to regulation of cellular metabolism, proliferation, and trafficking. *Biochem J.*, 379: 395-408.
- PRATT, W.B. & TOFT, D.O., 2003, Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery, *Experimental Biology and Medicine*, 111-133.
- PRÉVILLE, X., SALVEMINI, F., GIRAUD, S., CHAUFOUR, S., PAUL, C., STEPIEN, G., URSINI, M.V., ARRIGO, A.P., 1999, Mammalian small stress proteins protect against oxidative stress through their ability to increase glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and by maintaining optimal cellular detoxifying machinery. *Experimental Cell Research*, 247(1): 61-78.
- PROHÁSZKA, Z. & FÜST, G., 2004, Immunological aspects of heat-shock proteins-the optimum stress of life. *Mol Immunol.*, 41(1): 29-44.

- PRYME, I.F., DALE, T.M., TILREM, P., 2007, Oral mistletoe lectins: A case for their use in cancer therapy. *Cancer Therapy*, 5: 287-300.
- QI, W. & MARTINEZ, J.D., 2003, Reduction of 14-3-3 Proteins Correlates with Increased Sensitivity to Killing of Human Lung Cancer Cells by Ionizing Radiation. *Radiation Research*, 160(2): 217-223.
- QUIGNEY, D.J., GORMAN, A.M., SAMALI, A., 2003, Heat shock protects PC12 cells against MPP⁺ toxicity, *Brain Research*, 993(1-2): 133-139.
- QUIAN, Y., HARRIS, E.D., ZHENG, Y., CASTIGLIONI, E.T., 2000, Lead targets GRP78, a molecular chaperone, in C6 rat glioma cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 163: 260-266.
- RICE, G.C. & HAHN, G.M., 1987, Modulation of adriamycin transport by hyperthermia as measured by fluorescence-activated cell sorting. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 20: 183-187.
- RICHARDS, E.H., HICKEY, E., WEBER, L., MASTERS, J.R.W., 1996, Effect of Overexpression of the Small Heat Shock Protein HSP27 on the Heat and Drug Sensitivities of Human Testis Tumor Cells. *Cancer Research*, 56: 2446-2451.
- RICHTER, A., 1992, Viscumitol, a Dimethyl-Ether of Muco-Inositol from *Viscum album*. *Phytochemistry*, 31(11): 3925-3927.
- RICHTER, A., THONKE, B., POPP, M., 1990, 1D-1-O-Methyl-Muco-Inositol in *Viscum album* and Members of the Rhizophoraceae. *Phytochemistry*, 29 (6): 1785-1786.
- RIJK, A.F. & BLOEMENDAL, H., 2000, Alpha-B-Crystallin in Neuropathology, *Ophthalmologica*, 214 (1): 7-12.
- RITOSSA, F., 1962, A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*, 18: 571-573.
- ROCCHI, P., SO, A., KOJIMA, S., SIGNAEVSKY, M., BERARDI, E., FAZLI, L., HURTADO-COLL, A., YAMANAKA, K., GLEAVE, M., 2004, Heat shock protein 27 increases after androgen ablation and plays a cytoprotective role in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res.*, 64(18): 6595-6602.
- ROMMELAERE, H., VAN-TROYS, M., GAO, Y., MELKI, R., COWAN, N.J., VANDEKERCKHOVE, J., AMPE, C., 1993, Eukaryotic cytosolic chaperonin contains t-complex polypeptide-1 and seven related subunits. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 11975-11979.
- ROUSE, J., COHEN, P., TRIGON, S., MORANGE, M., ALONSO-LLAMAZARES, A., ZAMANILLO, D., HUNT, T., NEBREDA, A.R., 1994, A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell*, 78: 1027-1037.

- RYU, J.W., KIM, H.J., LEE, Y.S., MYONG, N.H., HWANG, C.H., LEE, G.S., YOM, H.C., 2003, The proteomics approach to find biomarkers in gastric cancer, *J Korean Med Sci*, 18(4): 505-509.
- SADIS, S. & HIGHTOWER, L.E., 1992, Unfolded proteins stimulate nucleolar chaperone Hsc70 ATPase by accelerating ADP/ATP exchange. *Biochemistry*, 31: 9406-9412.
- SALLINEN, S.L., SALLINEN P.K., HAAPASALO, H.K., HELIN, H.J., HELEN, P.T., SCHRAML, P., KALLIONIEMI, O.P., KONONEN, J., 2000, Identification of differentially expressed genes in human gliomas by DNA microarray and tissue chip techniques. *Cancer Res.*, 60:6617–6622.
- SAMALI, A. & COTTER, T.G., 1996, Heat shock proteins increase resistance to apoptosis. *Exp. Cell Res.*, 223: 163–170.
- SAMALI, A., ROBERTSON, J.D., PETERSON, E., MANERO, F., ZEIJL, L.V., PAUL, C., COTGREAVE, I.A., ARRIGO, A.P., ORRENIUS, S., 2001, Hsp27 protects mitochondria of thermotolerant cells against apoptotic stimuli. *Cell Stress and Chaperones*, 6(1): 49-58.
- SANCHEZ, C., PADILLA, R., PACIUCCI, R., ZABALA, J.C., AVILA, J., 1994, Binding of heat-shock protein 70 (hsp70) to tubulin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 310: 428-432.
- SANTORO, M.G., 2000, Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochem. Pharmacol.*, 59: 55–63.
- SARTO, C., BINZ, P.A., MOCARELLI, P., 2000, Heat shock proteins in human cancer *Electrophoresis*, 21(6):1218–1226.
- SAYRE, L.M., SMITH, M.A., PERRY, G., 2001, Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. *Curr Med Chem.*, 8(7):721-38.
- SCHNEIDER, J., JIMENEZ, E., MARENBACH, K., MARX, D., MEDEN, H., 1998, Co-expression of the MDR1 gene and HSP27 in human ovarian cancer. *Anticancer Research*, 18: 2967-2972.
- SCHOR, J., 2006, *Culture Wars, Mistletoe, Kissing and Cancer* [online], Denver Naturopathic Clinic, <http://www.denvernaturopathic.com/news/mistletoe.html>, [Ziyaret tarihi: 2 Ocak 2009].
- SEHGAL, A., 1998, Molecular changes during the genesis of human gliomas. *Semin Surg Oncol.*, 14:3–12.
- SHEN, J., HUGHES, C., CHAO, C., CAI, J., BARTELS, C., GESSNER, T., SUBJECK, J., 1987, Coinduction of glucose-regulated proteins and doxorubicin resistance in Chinese hamster cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 3278–3282.

- SHERMAN, M. & MULTHOFF, G., 2007, Heat Shock Proteins in Cancer. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1113:192-201.
- SIEGLE, I., FRITZ, P., MCCLELLAN, M., GUTZEIT, S., MÜRDTER, T., 2001, Combined Cytotoxic Action of *Viscum album* Agglutinin-1 and Anticancer Agents Against Human A549 Lung Cancer Cells. *Anticancer Research*, 21: 2687-2692.
- SIMONA, V., RUGINA, D., SOCACIU, C., 2008, Antioxidant activities of *Viscum album*'s leaves from various host trees. *Bulletin UASVM, Agriculture*, 65(1): 327-332.
- SNOECKX, L.H.E.H., CORNELUSSEN, R.N., VAN NIEUWENHOVEN, F.A., RENEMAN, R.S., VAN DER VUSSE, G.J., 2001, Heat Shock Proteins and Cardiovascular Pathophysiology. *Physiological Reviews*, 81(4): 1461-1497.
- SO, A., HADASCHIK, B., SOWERY, R., GLEAVE, M., 2007, The Role of Stress Proteins in Prostate Cancer. *Current Genomics*, 8: 252-261.
- SONG, H.Y., LIU, Y.K., FENG, J.T., CUI, J.F., DAI, Z., ZHANG, L.J., FENG, J.X., SHEN, H.L., TANG, Z.Y., 2006, Proteomic analysis on metastasis-associated proteins of human hepatocellular carcinoma tissues. *J Cancer Res Clin Oncol.*, 132: 92-98.
- SONNA, L.A., GAFFIN, S.L., PRATT, R.E., CULLIVAN, M.L., ANGEL, K.C., LILLY, C.M., 2002, Molecular biology of thermoregulation selected contribution: Effect of acute heat shock on gene expression by human peripheral blood mononuclear cells. *J. Appl. Physiol*, 92: 2208-2220.
- STEGE, G.J.J., RENKAWEK, K. , OVERKAMP, P.S.G., VERSCHUURE, P., VAN RIJK, A.F., REIJNEN-AALBERS, A., BOELENS, W.C., BOMSAN, G.J.C.G.M., DE JONG, W.W., 1999, The Molecular Chaperone α B-crystallin Enhances Amyloid β Neurotoxicity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 262(1): 152-156
- STEIN, G. M., EDLUND, U., PFÜLLER, U., BÜSSING, A., SCHIETZEL, M., 1999c, Influence of Polysaccharides from *Viscum album* L. on Human Lymphocytes, Monocytes and Granulocytes *in vitro*. *Anticancer Research*, 19: 3907-3914.
- STEIN, G. M., PFÜLLER, U., SCHIETZEL, M., 1999a,. Viscotoxin-Free Aqueous Extracts from European Mistletoe (*Viscum album* L.) Stimulate Activity of Human Granulocytes. *Anticancer Research*, 19: 2925-2928.
- STEIN, G. M., SCHALLER G., U., PFÜLLER, U., SCHIETZEL, M., BÜSSING, A., 1999b, Thionins from *Viscum album* L: Influence of the Viscotoxins on the Activation of Granulocytes. *Anticancer Research*, 19: 1037-1042.

- STOSS, M., van WELY, M., MUSIELSKY, H., GORTER, R. W., 1999, Study on Local Inflammatory Reactions and Other Parameters During Subcutaneous Mistletoe Application in HIV-Positive Patients and HIV-Negative Subjects Over a Period of 18 Weeks. *Arzneim.-Forsch./ Drug Res.*, 49 (1): 366-373.
- TAKASHIMA, M., KURAMITSU, Y., YOKOYAMA, Y., IIZUKA, N., TODA, T., SAKAIDA, I., OKITA, K., OKA, M., NAKAMURA, N., 2003, Proteomic profiling of heat shock protein 70 family members as biomarkers for hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Proteomics*, 3(12): 2487-2493.
- TANG, D., KHALEQUE, A., JONES, E.L., THERIAULT, J.R., LI, C., WONG, W.H., STEVENSON, M.A., CALDERWOOD, S.K., 2005, Expression of heat shock proteins and heat shock protein messenger ribonucleic acid in human prostate carcinoma *in vitro* and in tumors *in vivo*. *Cell Stress & Chaperones*, 10 (1): 46–58.
- THOR, A., BENZ, C., MOORE, D., GOLDMAN, E., EDGERTON, S., LANDRY, J., SCHWARTZ, L., MAYALL, B., HICKEY, E., WEBER, L.A., 1991, Stress response protein (srp-27) determination in primary human breast carcinomas: clinical, histologic, and prognostic correlations. *J Natl Cancer Inst.*, 83(3):154-5.
- TIMOSHENKO, A. V. & GABIUS, H-J., 1993, Efficient Induction of Superoxide Release from Human Neutrophils by the Galactoside-Specific Lectin from *Viscum album*. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 374: 237-243.
- TISSIERES, A., MITCHELL, H.K., TRACY, U.M., 1974, Protein synthesis in salivary glands of drosophila melanogaster: Relation to chromosome puffs. *J Molecular Biology*, 84 (3): 389- 398,1974.
- ULRICH, V. W. & MECHELKE, F., 1980, Reaktion der *In Vitro*-Kulturen von Menschlichen Fibroblasten, HeLa-Zellen und von Murinen L-Zellen bei Applikation eines Präparats aus *Viscum album* L. *Arzneim.-Forsch./ Drug Res.*, 30 (II): 1722-1725.
- VAN HUYEN, J.P.D., BAYRY, DELIGNAT, S., GASTON, A.T., MICHEL, O., BRUNEVALL, P., KAZATCHKINE, M.D., NICOLETTI, A., KAVERI, S.V., 2002, Induction of apoptosis of endothelial cells by *Viscum album*: a role for anti-tumoral properties of mistletoe lectins. *Mol Med.*, 8(10): 600–606.
- VARGAS-ROIG, L. M., GAGO, F. E., TELLO, O., AZNAR, J. C., CIOCCA, D. R., 1998, Heat shock protein expression and drug resistance in breast cancer patients treated with induction chemotherapy. *Int. J. Cancer*, 79(5): 468-475.
- VERRILLS, N.M., LIEM, N.L., LIAW, T.Y., HOOD, B.D., LOCK, R.B., KAVALLARIS, M., 2006, Proteomic analysis reveals a novel role for the actin cytoskeleton in vincristine resistant childhood leukemia—an *in vivo* study. *Proteomics*, 6, 1681–1694.

- WACHSBERGER, P.R., LANDRY, J., STORCK, C., DAVIS, K., O'HARA, M.D., OWEN, C.S., LEEPER, D.B., COSS, R.A., 1997, Mammalian cells adapted to growth at pH 6.7 have elevated HSP27 levels and are resistant to cisplatin. *Int. J. Hyperthermia*, 13(3): 251-255.
- WAGNER, H. & BLADT, S., 1996, *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*, Second Edition, Germany, 3-540-58676-8.
- WALKER, J.M., 2002, *The Protein Protocols Handbook*, Second edition, Humana Pres.
- WANG, X., GRAMMATIKAKIS, N., SIGANOU, A., CALDERWOOD, S.K., 2003, Regulation of Molecular Chaperone Gene Transcription Involves the Serine Phosphorylation, 14-3-3 epsilon Binding and Cytoplasmic Sequestration of Heat Shock Factor 1. *Mol. Cell Biol.*, 23(17): 6013-6026.
- WANG, W., VINOCUR, B., SHOSEYOV, O., ALTMAN A., 2004a, Role of plant heat shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *TRENDS in Plant Science*, 9 (5): 2 44-252.
- WANG, X., GRAMMATIKAKIS, N., SIGANOU, A., STEVENSON, M.A., CALDERWOOD, S.K., 2004b, Interaction Between Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase 1, 14-3-3 epsilon and Heat Shock Factor 1 During Stress. *J. Biol. Chem.*, 279(47): 49460-49469.
- WESTERHEIDE, S.D., BOSMAN, J.D., MBADUGHA, B.N., KAWAHARA, T.L., MATSUMOTO, G., KIM, S., GU, W., DEVLIN, J.P., SILVERMAN, R.B., MORIMOTO, R.I., 2004, Celastrols as inducers of the heatshock response and cytoprotection. *J. Biol. Chem.*, 279: 56053–56060.
- WOLLENWEBER, E., WIELAND, A., HAAS, K., 2000, Epicuticular Waxes and Flavonol Aglycones of the European Mistletoe, *Viscum album* L. *Z. Naturforsch.* 55(5-6): 314-317.
- WONG, H.R., MANNIX, R., RUSNAK, J.M., BOOTA, A., ZAR, H., WATKINS, S.C., LAZO, J.S., PITT, B.R., 1996, The heat-shock response attenuates lipopolysaccharide-mediated apoptosis in cultured sheep pulmonary artery endothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 15: 745-751.
- WU, C., 1995, Heat shock transcription factors: structure and regulation. *AnnRev Cell Dev Biol.*, 11:441– 469.
- XIA, W. & VOELLMY, R., 1997, Hyperphosphorylation of heat shock transcription factor 1 is correlated with transcriptional competence and slow dissociation of active trimers. *J Biol Chem*, 272: 4094-4102.
- YAMAMOTO, K., OKAMOTO, A., ISONISHI, S., OCHIAI, K., OHTAKE, Y., 2001, Heat shock protein 27 was up-regulated in cisplatin resistant human ovarian tumor cell line and associated with the cisplatin resistance. *Cancer Lett.* 168(2):173-81.

- YANO, M., NAKAMUTA, N., WU, X., OKUMURA, Y., KIDO, H., 2006, A Novel Function of 14-3-3 Protein: 14-3-3 ζ Is a Heat-Shock-related Molecular Chaperone That Dissolves Thermal-aggregated Protein. *Molecular Biology of the Cell*, 17: 4769–4779.
- ZANINI, C., GIRIBALDI, G., MANDILI, G., CARTA, F., CRESCENZIO, N., BISARO, B., DORIA, A., FOGLIA, L., di MONTEZEMOLO, L.C., TIMEUS, F., TURRINI, F., 2007, Inhibition of heat shock proteins (HSP) expression by quercetin and differential doxorubicin sensitization in neuroblastoma and Ewing's sarcoma cell lines. *Journal of Neurochemistry*, 103: 1344–1354.
- ZARCOVIC, N., VUKOVIC, T., LONCARIC, I., MILETIC, M., ZARKOVIC, K., BOROVIC, S., CIPAK, A., SABOLOVIC, S., KONITZER, M., MANG, S., 2001, An Overview on Anticancer Activities of the *Viscum album* Extract Isorel[®]. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 16 (1): 55-62.
- ZHANG, W.L., TSUNEISHI, S., NAKAMURA, H., 2001, Induction of heat shock proteins and its effects on glial differentiation in rat C6 glioblastoma cells. *Kobe J Med. Sci.*, 47: 77-95.
- ZHANG, R., TREMBLAY, T.L., MCDERMID, A., THIBAUT, P., STANIMIROVIC, D., 2003, Identification of Differentially Expressed Proteins in Human Glioblastoma Cell Lines and Tumors. *Glia*, 42:194–208.
- ZOU, J., GUO, Y., GUETTOUCHE, T., SMITH, D.F., VOELLMY, R., 1998, Repression of heat shock transcription factor HSF1 by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. *Cell*, 94: 471-480.

ÖZGEÇMİŞ

21.06.1978 tarihinde İstanbul'da doğdum. 1994 yılında Şişli Teknik Lisesi'nin Bilgisayar Bölümü'nden mezun oldum. 1995 yılında girdiğim İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nden 1999 yılında mezun oldum. Aynı yıl İ.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji Programı'nda Yüksek Lisans yapmaya başladım. Yüksek Lisans tezimi 2002 yılında tamamladıktan sonra, aynı yıl Doktora programına dahil oldum. Aralık 2000 tarihinden itibaren İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım.

YAYINLAR

- Önay-Uçar, E., Karagöz, A., Arda, N. (2006) Antioxidant Activity of *Viscum album* L. ssp. *album*. *Fitoterapia* 77: 556–560
- Karagöz, A., Onay, E., Arda, N., Kuru, A. (2003) Antiviral Potency of Mistletoe (*Viscum album* ssp. *album*) Extracts Against Human Parainfluenza Virus Type 2 in Vero Cells. *Phytotherapy Research* 17, 560-562.
- Arda, N., Önay, E., Koz, Ö., Kırmızıgül, S. (2003) Monosaccharides and Polyols from Mistletoes (*Viscum album* L.) Growing on Two Different Host Species. *Biologia* 58(6), 1037-1041.