

**LÖSEMİ VE KOLON KANSERİ HÜCRELERİNDE
YENİ BİR PROTEOZOM İNHİBİTÖRÜ OLAN
MLN9708 'in ANTİNEOPLASTİK ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Bio. Selin Engür

Yüksek Lisans Tezi

**LÖSEMİ VE KOLON KANSERİ
HÜCRELERİNDE YENİ BİR PROTEOZOM
İNHİBİTÖRÜ OLAN MLN9708 'in
ANTİNEOPLASTİK ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Bio. Selin Engür

Yüksek Lisans Tezi

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmakoloji Anabilim Dalı

Eskişehir, Haziran 2013

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Miriş DİKMEN

Bu tez çalışması, Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Proje No. 1207S120).

Jüri ve Enstitü Onayı

Selin Engür'ün “Lösemi ve kolon kanseri hücrelerinde yeni bir proteozom inhibitörü olan MLN9708 ‘in antineoplastik etkilerinin araştırılması” başlıklı, Farmakoloji Anabilim Dalı’ndaki Yüksek Lisans tezi, 27.06.2013 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	Doç. Dr. Miriş DİKMEN Anadolu Üniversitesi
Üye	Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK Anadolu Üniversitesi
Üye	Prof. Dr. Kevser Erol Eskişehir Osmangazi Üniversitesi

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 30.05.2013 tarih ve 19/4 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı ve soyadı : Selin Engür
Doğum tarihi ve yer : 1988, ESKİŞEHİR
Uyruğu : T.C.
Medeni durumu : Bekar
İletişim Adresi : Vişnelik Mah. Çolpan Sk. Selin Apt. No:48/13
Telefon : +90 (222) 335 05 80 / 3746
e-Posta : sengur@anadolu.edu.tr

Eğitim Durumu

İlköğretim : Melahat Ünügür İlköğretim Okulu, 1999
Ortaokul : Melahat Ünügür İlköğretim Okulu, 2002
Lise : Fatih Anadolu Lisesi, 2006
Lisans :Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 2010
Yabancı Dil : İngilizce

Mesleki Deneyim

Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar: Moleküler Kanser Araştırma Derneği (MOKAD)

Yayınlar

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler

1. Hilmi Ozden, Sahin Kabay, Gokhan Bayramoglu, M Cengiz Ustuner, Nilgun Ozturk, Hakan Senturk, Bilge Ozkal, **Selin Engur**, Derya Ustuner, H Veysi Gunes. “The Protective Effect Of Hypericum Perforatum in experimental Renal Ischemia/Reperfusion Injury in The Rats”, The 17th Congress of the International Federation of Associations of Anatomists (IFAA), Wednesday, August 19, 2009, South Africa.
2. Dikmen M.,Demirtaş B.,**Engür S.** Cytotoxic effect of angiogenesis inhibitor Fumagillin on C6 glioma cells. 2nd International Congress on Neurobiology, Psychopharmacology and Treatment Guidance, Thessaloniki Greece, pp 173-174, November 24-27, 2011

3. **S. Engür**, M. Dikmen. Cytotoxic and apoptotic effects of MLN9708, a new proteasome inhibitor, in human colon cancer Caco2 cell line. **1st International Congress on Controversies in Personalized Oncology (CONPO) Breast, Colon, Lung and Melanoma, Barcelona, Spain, March 7-10, 2013.**
4. M. Dikmen, **S. Engür**, B. Demirtaş, Z. Cantürk, Y. Öztürk. The cytotoxic effects of Griseofulvin on colon adenocarcinoma cell line (Caco-2) using MTT assay and Xcelligence technology. **1st International Congress on Controversies in Personalized Oncology (CONPO) Breast, Colon, Lung and Melanoma, Barcelona, Spain, March 7-10, 2013.**

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler

1. Hakan ŞENTÜRK, Gökhan BAYRAMOĞLU, Mediha CANBEK, Güngör KANBAK, **Selin ENGÜR**, Kazım KARTKAYA, Ayşegül BAYRAMOĞLU. “Trinitrobenzen Sülfonik Asit (TNBS) ile Meydana Getirilmiş Deneysel Kolit Nedenli Oksidatif Stres Hasarına Karşı Gallik Asit’in Koruyucu Rolünün Belirlenmesi”, 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, 21-25 Haziran 2010, Pamukkale Üniversitesi, Denizli, Türkiye.
2. Gökhan BAYRAMOĞLU, Ayşegül BAYRAOĞLU, **Selin ENGÜR**, Hakan ŞENTÜRK, Nilgün ÖZTÜRK. “Karaciğer İskemi/Reperfüzyon Hasarına Karşı Hypericum Perforatum’un Olası Koruyucu Etkileri”, 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, 21-25 Haziran 2010, Pamukkale Üniversitesi, Denizli, Türkiye
3. Miriş Dikmen, **Selin Engür**, Buket Demirtaş, Yusuf Öztürk. “Antidepresan Bir İlaç Olan Essitalopram’ın MCF7 İnsan Meme Kanseri Hücrelerinde Antikanserojenik Etkileri” Türk Farmakoloji Derneği 21. Ulusal Farmakoloji Kongresi,p74,Eskişehir, Türkiye 19-22 Ekim, 2011

Bilimsel Etkinlikler

Katılan kurslar ve eğitim programları

1. 19. Ulusal Biyoloji Kongresi (23-27 Haziran 2008), TRABZON
2. 1. Ulusal Biyoteknoloji Öğrenci Kongresi (08-10 Mayıs 2009), İSTANBUL
3. 20. Ulusal Biyoloji Kongresi (21-25 Haziran 2010), DENİZLİ
4. 2nd International Congress on Neurobiology, Psychopharmacology and Treatment Guidance (24-27 November 2011), Thessaloniki GREECE
5. Türk Farmakoloji Derneği 21. Ulusal Farmakoloji Kongresi (19-22 Ekim 2011),ESKİŞEHİR
6. DNA ve RNA Tabanlı Moleküler Yöntemler Çalıştayı (25-26 Nisan 2012), EDİRNE
7. 1. Öngörüşel ve Bireye Özgü Tedavinin Günümüz Modern Tıp ve Eczacılık Pratiğinde Uygulamaları Sertifika Programı (P4) (13-16 Eylül 2012), ESKİŞEHİR
8. **1st International Congress on Controversies in Personalized Oncology (CONPO)**
Breast, Colon, Lung and Melanoma, Barcelona, Spain, March 7-10, 2013

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimimin her aşamasında yardımlarını esirgmeden bana her daim yol gösteren, tezimin doğru bir şekilde yönlendirilmesinde ve sonuçlanmasında deneyimlerinden ve bilgisinden sonsuz yararlandığım, hayata dair fikirlerine her zaman önem verdiğim ve vereceğim değerli hocam Sayın Doç. Dr. Miriş DİKMEN'e

Farmakoloji'yi bana öğreten ve lisansüstü eğitimim boyunca bana her konuda destek olan Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK'e ve Farmakoloji Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Süleyman AYDIN, Yard. Doç. Dr. Özgür Devrim CAN'a, Yard. Doç. Dr. Rana ARSLAN'a, Yard. Doç. Dr. Nurcan Bektaş TÜRKMEN'e ve Yard. Doç. Dr. Ümide DEMİR ÖZKAY'a;

Laboratuvar çalışmalarım, tezimin yönlendirilmesinde ve hayatımın önemli aşamalarında bana destek olan sevgili hocam Farmasötik Mikrobiyoloji ABD Öğretim Görevlisi Zerrin KAHRAMAN CANTÜRK'e;

4 yıllık hiç ayrı geçmeyen lisans eğitimimiz sonrasında daha beraber çok zamanımız var diyerek yüksek lisans hayatına atıldığım, birlikte ağlayıp birlikte güldüğüm ve her zaman yanımda olan dostum Biyolog Buket DEMİRTAŞ'a

Tez çalışmamı yapmış olduğu finansal destek için Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na,

Yükseklisans eğitimim boyunca birlikte olduğumuz bana hiçbir konuda yardımlarını esirgemeyen başta aynı odayı paylaştığım sevgili arkadaşlarım Umut İrfan ÜÇEL, Şafak ULUSOY, Elif KAYA ve Ar. Gör. Ayça ÇAKMAK'a ve Analitik Kimya ekibinden, Emre ÖZDEMİRHAN, Murat KOZANLI ve Sema KOYUTÜRK'e

Eğitim hayatım boyunca benden desteklerini esirgemeyen, her koşulda yanımda ve arkamda olup bana sonsuz sevgilerini veren babam Turhan ENGÜR, annem Yasemin ENGÜR ve kardeşim Simay ENGÜR'e

Sonsuz teşekkür ederim...

Selin ENGÜR

Haziran, 2013

LÖSEMİ VE KOLON KANSERİ HÜCRELERİNDE YENİ BİR PROTEOZOM İNİHİTÖRÜ OLAN MLN9708 'in ANTİNEOPLASTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Proteazom inhibisyonu etkili bir antikanser tedavi yöntemi olarak son yıllarda giderek önem kazanmaktadır. Bortezomib, birçok kanser hücre hattına karşı yüksek etki gücüne sahiptir. Özellikle multiple myeloma da spesifik etkinlik göstermesiyle birlikte, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, mantle hücreli lenfoma ve pankreas kanserinde de etkili bulunmuştur. MLN9708, seçiciliği ve etkisi bakımından Bortezomib benzeri olup, yeni geliştirilen ikinci jenerasyon bir proteazom inhibitörüdür ve faz 1 çalışmaları halen devam etmektedir. MLN9708'in etkileri, solid tümörler ve hematolojik malignansiler de, prelinik olarak araştırılmaya başlanmıştır. Çalışmalarda, MLN9708'in sulu çözeltilerde ya da plazmada hızlı hidrolize olarak biyolojik aktif formu olan MLN2238'e dönüştüğü gösterilmiştir.

Bu tez çalışmasında; MLN2238 ve Bortezomib'in antineoplastik etkileri, K562 insan kronik myeloid lösemi ve Caco2 insan kolorektal adenokarsinom hücre hatlarında araştırılmıştır. MLN2238 ve Bortezomib'in K562 ve Caco2 hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkileri 24 ve 48. saatte WST-1 yöntemi ile belirlenmiştir. Apoptotik etkiler ise, Annexin V-PI, kaspaz-3 aktivasyonu ve mitokondrial membran depolarizasyon (JC-1) yöntemleri ile akış sitometri cihazında analiz edilmiştir. Proteozom inhibitörlerinin etki yolağı üzerinde hücre inhibisyonunda ve apoptozunda önemli rol oynayan; NF-kB ve c-myc mRNA ekspresyon düzeyleri ise Real Time-PCR yöntemi ile değerlendirilmiştir.

Çalışmanın sonucunda, zamana ve konsantrasyona bağımlı olarak MLN2238 ve Bortezomib'in, K562 ve Caco2 hücreleri üzerinde önemli derecede antiproliferatif etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. MLN2238 ve Bortezomib'in AnnexinV-PI yöntemi ile analiz edilen apoptotik etkileri K562 ve Caco2 hücrelerinde özellikle 24. saatte etkili bulunmuştur. MLN2238 ve Bortezomib'in Kaspaz-3 aktivasyonunu ve mitokondrial depolarizasyonunu arttırarak her iki hücre tipini de apoptoza götürdüğü belirlenmiştir. NF-kB mRNA ekspresyonu K562 ve Caco2 hücrelerinde, MLN2238 ve Bortezomib konsantrasyonlarında 24. saatte azalmıştır. C-myc mRNA ekspresyonu K562 hücrelerinde her iki inkübasyon zamanında azalırken, Caco2 hücrelerinde ise sadece 24. saatte azalma göstermiştir.

Bu çalışmada MLN2238'in, hem K652 hemde Caco2 hücrelerinde önemli apoptotik etkisinin bulunması, lösemi ve kolon kanser kemoterapisinde önemli antikanserojenik potansiyele sahip olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: proteozom inhibitörü, MLN9708, Caco2, K562, apoptoz

INVESTIGATION OF ANTINEOPLASTIC EFFECTS OF NEW PROTEASOME INHIBITOR MLN9708 IN LEUKEMIA AND COLON CANCER CELLS

ABSTRACT

Inhibition of the proteasome has emerged as a clinically effective anti-cancer therapeutic approach in recent years. Bortezomib showed extremely high potency against a wide range of cancer cell lines. Bortezomib specifically shows a high efficiency in multiple myeloma, non-small lung cancer, mantle cell lymphomas, and pancreatic cancer. MLN9708, selectivity and potency were similar to that of bortezomib, is currently being investigated in phase I studies. It has an improved second generation new proteasome inhibitor and shows superior antitumor activity in both solid tumor and hematologic malignancy. Preclinical studies show that MLN9708 immediately hydrolyzed to MLN2238, the biologically active form, when it is exposed to aqueous solutions or plasma.

In this study, we investigated antineoplastic effects of MLN2238 and Bortezomib on K562 human myelogenous leukemia cells and Caco2 human colon cancer cells. Antiproliferative effects of MLN2238 and Bortezomib were determined by the 4-[3-(4-Iodo-phenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5tetrazolio]-1,3-benzene disulphonate (WST-1) assay. Apoptosis was determined by increased Annexin V-PI binding capacity and mitochondrial membrane potential (JC-1) and caspase-3 activity were analyzed using flow cytometry. NF- κ B and c-myc get involved in the impact pathway of proteasome inhibition and play an important role in cell inhibition and apoptosis. NF- κ B and c-myc mRNA expression levels were determined by Real Time-PCR method.

We found that MLN2238 and Bortezomib had significant time- and concentration-dependent antiproliferative effects on K562 and Caco2 cells. It was determined that MLN2238 and Bortezomib induced apoptosis at 24 hours. Also they evaluated apoptosis for increase mitochondria depolarization and caspase-3 activation in both cell lines. MLN2238 and Bortezomib downregulated NF- κ B mRNA expression at 24 hours both in K562 and Caco2 cell lines. Concentrations of MLN2238 and Bortezomib decreased mRNA expression of c-myc on K562 cell line at both 24 and 48 incubation time, but they downregulated c-myc mRNA expression on Caco2 cells only at 24 hour.

As a result of our study, MLN2238 has important antiproliferative and apoptotic effects on K562 and Caco2 cells. It shows that MLN2238 might be potential agent for leukemia and colon cancer chemotherapy.

Key Words: proteasome inhibitor, MLN9708, Caco2, K562, apoptosis

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZGEÇMİŞ	i
ÖNSÖZ	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	xvii
GİRİŞ ve AMAÇ	1
KAYNAK BİLGİSİ	2
KANSER	2
Lösemi	2
<i>Kronik miyeloid lösemi</i>	3
<i>K562 hücre hattı</i>	5
Kolon Kanseri	5
<i>NF-kB ve kolorektal kanserler</i>	7
<i>Caco2 hücre hattı</i>	7
APOPTOZİS	7
Kaspazlar	9
Apoptozun Moleküler Mekanizmaları	10
<i>Dış yolak (Ölüm Reseptörleri Yolağı)</i>	10
<i>İç yolak (Mitokondriyal Yolak)</i>	11
Apoptoz Modülatörleri	13
<i>Nükleer transkripsiyon faktörü NF-kB</i>	13
Ubikülin/Proteozom Sistemi	15
<i>26S proteozom</i>	16
<i>Proteozom inhibisyonu</i>	16
<i>Bortezomib</i>	17
<i>MLN9708</i>	18
GEREÇLER	20
Kullanılan Kimyasal Maddeler ve İlaçlar	20

Kullanılan Cihazlar	21
YÖNTEMLER	22
Deneylerde Kullanılan Hücreler	22
<i>Kronik myeloid lösemi hücre hattı (K562)</i>	22
<i>İnsan kolon adenokarsinom hücre hattı (Caco2)</i>	22
Kullanılan Araç ve Gereçlerin Hazırlanması	22
<i>Kullanılan malzemelerin steril edilmesi</i>	22
<i>Kullanılan ilaçların hazırlanması</i>	22
<i>Bortezomib</i>	22
<i>MLN2238</i>	22
Hücre Kültürü Çalışmaları	
<i>Caco2 ve K562 hücrelerinin kültür ortamında çoğaltılması ve deneylere hazırlık</i>	23
<i>Hücre sayımları</i>	23
<i>WST-1 yöntemi ile sitotoksitenin belirlenmesi</i>	23
<i>Metodun uygulanması</i>	24
Akış Sitometri Cihazında Yapılan Deneyler	25
<i>Akış sitometride Annexin V-PI yöntemi ile apoptotik etkinin belirlenmesi</i>	25
<i>Metodun uygulanması</i>	25
<i>Akış sitometride Kaspaz-3 aktivasyonu ile apoptotik etkinin belirlenmesi</i>	26
<i>Metodun uygulanması</i>	26
<i>Akış sitometride JC-1 boyama yöntemi ile hücrelerin mitokondrial membran bütünlüğünün belirlenmesi</i>	27
<i>Metodun uygulanması</i>	27
Real Time (Gerçek Zamanlı)- PCR	
(Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Yöntemi ile	
NF-kB ve c-myc mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi	28
<i>Metodun Uygulanması</i>	29
<i>Total RNA izolasyonu</i>	29
<i>cDNA sentezi</i>	29

<i>RT-PCR (Real time PCR) İle mRNA Ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi</i>	30
BULGULAR ve TARTIŞMA	31
MLN2238 ve Bortezomib'in K562 ve Caco2 Hücrelerinde Sitotoksik Etkilerinin WST-1 Yöntemi ile Değerlendirilmesi	31
MLN2238 ve Bortezomib'in K562 ve Caco2 Hücrelerinde Apoptotik Etkilerinin Akış Sitometri Yöntemi ile Değerlendirilmesi	36
<i>Akış sitometride AnnexinV-PI yöntemi ile apoptotik etkinin Değerlendirilmesi</i>	36
<i>Akış sitometride Kaspaz-3 aktivasyonu ile apoptotik etkinin Değerlendirilmesi</i>	46
<i>Akış sitometride JC-1 boyama yöntemi ile hücrelerin mitokondrial membran bütünlüğünün değerlendirilmesi</i>	56
Real time PCR ile mRNA Ekspresyonunun Değerlendirilmesi	66
SONUÇ ve ÖNERİLER	81
KAYNAKLAR	82

TABLÖLAR DİZİNİ

TABLO NO ve ADI	SAYFA
Tablo 1 Apoptozda Rol Oynayan Kaspazlar	9
Tablo 2 26S proteozom inhibitörlerinin hedefleri ve klinik durumları	17
Tablo 3 MLN2238'in K562 Hücre Hattı Üzerinde WST-1 Testi Sonuçlarına Göre % İnhibisyon Değerleri	32
Tablo 4 Bortezomib'in K562 Hücre Hattı Üzerinde WST-1 Testi Sonuçlarına Göre Yüzde İnhibisyon Değerlerinin Gösterilmesi	33
Tablo 5 MLN2238'in Caco2 Hücre Hattı Üzerinde WST-1 Testi Sonuçlarına Göre Yüzde İnhibisyon Değerlerinin Gösterilmesi	34
Tablo 6 MLN2238'in Caco2 Hücre Hattı Üzerinde WST-1 Testi Sonuçlarına Göre Yüzde İnhibisyon Değerlerinin Gösterilmesi	35
Tablo 7 K562 Hücre Hattı Üzerinde MLN2238 ve Bortezomib'in 24. ve 48. Saatlerdeki Akış Sitometri Annexin V-PI Apoptoz Sonuçları	40
Tablo 8 Caco2 Hücre Hattı Üzerinde MLN2238 ve Bortezomib'in 24 ve 48 Saatlik Akış Sitometride Annexin V-PI Apoptoz Sonuçları	45
Tablo 9 K562 Hücre Hattı Üzerinde MLN2238 ve Bortezomib'in 24 ve 48 saatlik Akış Sitometride Kaspaz- 3 Aktivasyonu Sonuçları	50
Tablo 10 Caco2 Hücre Hattı Üzerinde MLN2238 ve Bortezomib'in 24 ve 48 saatlik Akış Sitometride Kaspaz- 3 Aktivasyonu Sonuçları	55
Tablo 11 K562 Hücre Hattı Üzerinde MLN2238 ve Bortezomib'in 24 ve 48 saatlik Akış Sitometride Mitokondrial Depolarizasyon (JC-1) sonuçları	60

Tablo 12	Caco2 Hücre Hattı Üzerinde MLN2238 ve Bortezomib'in 24 ve 48 saatlik Akış Sitometride Mitokondrial Depolarizasyon (JC-1) sonuçları	65
Tablo 13	MLN2238 ve Bortezomib Uygulanan K562 Hücreleri İçin Örnek Ve Referans Genlerin RT-PCR Sonunda Elde Edilen Eşik Değerleri(CP)	68
Tablo 14	MLN2238 ve Bortezomib Uygulanan Caco2 Hücreleri İçin Örnek Ve Referans Genlerin RT-PCR Sonunda Elde Edilen Eşik Değerleri(CP)	70
Tablo 15	MLN2238 ve Bortezomib Konsantrasyonları ile İnkübe Edilmiş K562 Hücrelerinde RT-PCR Sonucunda Hesaplanan NF-kB ve c-myc Genine Ait Hedef/Referans Oranları	72
Tablo16	MLN2238 ve Bortezomib Konsantrasyonları ile İnkübe Edilmiş Caco2 Hücrelerinde RT-PCR Sonucunda Hesaplanan NF-kB ve c-myc Genine Ait Hedef/Referans Oranları	74

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL NO ve ADI	SAYFA
Şekil 1 Philadelphia Kromozomunun Oluşması	4
Şekil 2 Apoptoz Sırasında Hücrede Meydana Gelen Morfolojik Değişimler	8
Şekil 3 Şematik Gösterimle Dış Yolak	11
Şekil 4 Şematik Gösterimle İç Yolak	12
Şekil 5 Hem İçsel (Mitokondriyal) Hemde Dışsal Apoptotik Yolağın Şematik Olarak Gösterilmesi	13
Şekil 6 26S Proteozom Kompleksi Tarafından Düzenlenen Nf-kB'nin Fonksiyonları	14
Şekil 7 Ubikütin-Proteozom Yolu ve 26S Proteozomun Bileşenleri	16
Şekil 8 Bortezomib'in Kimyasal Formülü	18
Şekil 9 MLN9708'in MLN2238'e Hidrolize Olması	19
Şekil 10 Bortezomib ve MLN2238'in Bağlanma Bölgelerinin Gösterilmesi ve 26S Proteozom	19
Şekil 11 WST-1 Tetrazolyum Tuzunun Formazan Tuzuna Dönüşümü	24
Şekil 12 TaqMan Yöntemi	28
Şekil 13 MLN2238 Konsantrasyonlarının, K562 Hücre Hattında WST-1 Yöntemine Göre Hesaplanan 24. ve 48. Saatlerdeki % Canlılık Değerleri ve İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	31
Şekil 14 Bortezomib Konsantrasyonlarının, K562 Hücre Hattında WST-1 Yöntemine Göre Hesaplanan 24. ve 48. Saatlerdeki % Canlılık Değerleri ve İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	32
Şekil 15 MLN2238 Konsantrasyonlarının, Caco2 Hücre Hattında WST-1 Yöntemine Göre Hesaplanan 24. ve 48. Saatlerdeki % Canlılık Değerleri ve İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	33

Şekil 16	Bortezomib Konsantrasyonlarının, Caco2 Hücre Hattında WST-1 Yöntemine Göre Hesaplanan 24. ve 48. Saatlerdeki % Canlılık Değerleri ve İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	35
Şekil 17	MLN2238 Konsantrasyonlarının (1, 5, 10 Ve 20 µM) K562 Hücreleri Üzerindeki, 24. Saatteki Apoptotik Etkisi	36
Şekil 18	MLN2238 Konsantrasyonlarının (1, 5, 10 ve 20 µM) K562 Hücreleri Üzerindeki, 48. Saatteki Apoptotik Etkisi	37
Şekil 19	Bortezomib Konsantrasyonlarının (1, 5, 10 ve 20 µM) K562 Hücreleri Üzerindeki, 24. Saatteki Apoptotik Etkisi	38
Şekil 20	Bortezomib Konsantrasyonlarının (1, 5, 10 ve 20 µM) K562 Hücreleri Üzerindeki, 48. Saatteki Apoptotik Etkisi	39
Şekil 21	MLN2238 Konsantrasyonlarının (1, 5, 10 ve 20 µM) Caco2 Hücreleri Üzerindeki, 24. Saatteki Apoptotik Etkisi	41
Şekil 22	MLN2238 Konsantrasyonlarının (1, 5, 10 ve 20 µM) Caco2 Hücreleri Üzerindeki, 48 Saatlilik Apoptotik Etkisi	42
Şekil 23	Bortezomib Konsantrasyonlarının (1, 5, 10 ve 20 µM) Caco2 Hücreleri Üzerindeki, 24. Saatteki Apoptotik Etkisi	43
Şekil 24	Bortezomib Konsantrasyonlarının (1, 5, 10 ve 20 µM) Caco2 Hücreleri Üzerindeki, 48. Saatteki Apoptotik Etkisi	44
Şekil 25	MLN2238 Konsantrasyonlarının (1, 5, 10 ve 20 µM) K562 hücreleri Üzerindeki, 24. Saatteki Kaspaz-3 Aktivasyonu Etkisi	46
Şekil 26	MLN2238 Konsantrasyonlarının (1, 5, 10 ve 20 µM) K562 hücreleri Üzerindeki, 48. Saatteki Kaspaz-3 Aktivasyonu Etkisi	47
Şekil 27	Bortezomib Konsantrasyonlarının (1, 5, 10 ve 20 µM) K562 hücreleri Üzerindeki, 24. Saatteki Kaspaz-3 Aktivasyonu Etkisi	48
Şekil 28	Bortezomib Konsantrasyonlarının (1, 5, 10 ve 20 µM) K562 hücreleri Üzerindeki, 48. Saatteki Kaspaz-3 Aktivasyonu Etkisi	49
Şekil 29	MLN2238 Konsantrasyonlarının (1, 5, 10 ve 20 µM) Caco2 hücreleri Üzerindeki, 24. Saatteki Kaspaz-3 Aktivasyonu Etkisi	51

Şekil 30	MLN2238 Konsantrasyonlarının (1, 5, 10 ve 20 µM) Caco2 hücreleri Üzerindeki, 48. Saatteki Kaspaz-3 Aktivasyonu Etkisi	52
Şekil 31	Bortezomib Konsantrasyonlarının (1, 5, 10 ve 20 µM) Caco2 hücreleri Üzerindeki, 24. Saatteki Kaspaz-3 Aktivasyonu Etkisi	53
Şekil 32	Bortezomib Konsantrasyonlarının (1, 5, 10 ve 20 µM) Caco2 hücreleri Üzerindeki, 48. Saatteki Kaspaz-3 Aktivasyonu Etkisi	54
Şekil 33	MLN2238 Konsantrasyonlarının (1, 5, 10 ve 20 µM) K562 Hücreleri Üzerindeki, 24. Saatteki Mitokondrial Memran Bütünlüğüne Etkisi	56
Şekil 34	MLN2238 Konsantrasyonlarının (1, 5, 10 ve 20 µM) K562 Hücreleri Üzerindeki, 48. Saatteki Mitokondrial Memran Bütünlüğüne Etkisi	57
Şekil 35	Bortezomib Konsantrasyonlarının (1, 5, 10 ve 20 µM) K562 Hücreleri Üzerindeki, 24. Saatteki Mitokondrial Memran Bütünlüğüne Etkisi	58
Şekil 36	Bortezomib Konsantrasyonlarının (1, 5, 10 ve 20 µM) K562 Hücreleri Üzerindeki, 48. Saatteki Mitokondrial Memran Bütünlüğüne Etkisi	59
Şekil 37	MLN2238 Konsantrasyonlarının (1, 5, 10 ve 20 µM) Caco2 Hücreleri Üzerindeki, 24. Saatteki Mitokondrial Memran Bütünlüğüne Etkisi	61
Şekil 38	MLN2238 Konsantrasyonlarının (1, 5, 10 ve 20 µM) Caco2 Hücreleri Üzerindeki, 48. Saatteki Mitokondrial Memran Bütünlüğüne Etkisi	62
Şekil 39	Bortezomib Konsantrasyonlarının (1, 5, 10 ve 20 µM) Caco2 Hücreleri Üzerindeki, 24. Saatteki Mitokondrial Memran Bütünlüğüne Etkisi	63
Şekil 40	Bortezomib Konsantrasyonlarının (1, 5, 10 ve 20 µM) Caco2 Hücreleri Üzerindeki, 48. Saatteki Mitokondrial Memran Bütünlüğüne Etkisi	64
Şekil 41	MLN2238 (M) ve Bortezomib (B) konsantrasyonları ile (1, 5, 10 ve 20 µM) 24 Saat İnkübe Edilen K562 Hücrelerinde Nf-kB ve GAPDH Genlerinin Amplifikasyon Eğrisi	66

Şekil 42	MLN2238 (M) ve Bortezomib (B) konsantrasyonları ile (1, 5, 10 ve 20 µM) 48 Saat İnkübe Edilen K562 Hücrelerinde Nf-kB ve GAPDH Genlerinin Amplifikasyon Eğrisi	66
Şekil 43	MLN2238 (M) ve Bortezomib (B) konsantrasyonları ile (1, 5, 10 ve 20 µM) 24 Saat İnkübe Edilen K562 Hücrelerinde C-myc ve GAPDH Genlerinin Amplifikasyon Eğrisi	67
Şekil 44	MLN2238 (M) ve Bortezomib (B) konsantrasyonları İle (1, 5, 10 ve 20 µM) 48 Saat İnkübe Edilen K562 Hücrelerinde C-myc ve GAPDH Genlerinin Amplifikasyon Eğrisi	67
Şekil 45	MLN2238 (M) ve Bortezomib (B) Konsantrasyonları ile (1, 5, 10 ve 20 µM) 24 Saat İnkübe Edilen Caco2 Hücrelerinde Nf-kB ve GAPDH Genlerinin Amplifikasyon Eğrisi	68
Şekil 46	MLN2238 (M) ve Bortezomib (B) Konsantrasyonları İle (1, 5, 10 ve 20 µM) 48 Saat İnkübe Edilen Caco2 Hücrelerinde Nf-kB ve GAPDH Genlerinin Amplifikasyon Eğrisi	69
Şekil 47	MLN2238 (M) ve Bortezomib (B) Konsantrasyonları İle (1, 5, 10 ve 20 µM) 24 Saat İnkübe Edilen Caco2 Hücrelerinde C-myc ve GAPDH Genlerinin Amplifikasyon Eğrisi	69
Şekil 48	MLN2238 (M) ve Bortezomib (B) Konsantrasyonları ile (1, 5, 10 ve 20 µM) 48 Saat İnkübe Edilen Caco2 Hücrelerinde C-myc ve GAPDH Genlerinin Amplifikasyon Eğrisi	70
Şekil 49	MLN2238 ve Bortezomib Konsantrasyonları İle 24 Saat İnkübe Edilmiş K562 Hücrelerinde NF-kB Genine Ait Hedef/Referans Oranları	71
Şekil 50	MLN2238 ve Bortezomib Konsantrasyonları ile 48 Saat İnkübe Edilmiş K562 Hücrelerinde NF-kB Genine Ait Hedef/Referans Oranları	71
Şekil 51	MLN2238 ve Bortezomib Konsantrasyonları ile 24 Saat İnkübe Edilmiş K562 Hücrelerinde c-myc Genine Ait Hedef/Referans Oranları	71
Şekil 52	MLN2238 ve Bortezomib Konsantrasyonları ile 48 Saat İnkübe Edilmiş K562 Hücrelerinde c-myc Genine Ait Hedef/Referans Oranları	72

Şekil 53	MLN2238 ve Bortezomib Konsantrasyonları ile 24 Saat İnkübe Edilmiş Caco2 Hücrelerinde NF-kB Genine Ait Hedef/Referans Oranları	73
Şekil 54	MLN2238 ve Bortezomib Konsantrasyonları ile 48 Saat İnkübe Edilmiş Caco2 Hücrelerinde NF-kB Genine Ait Hedef/Referans Oranları	73
Şekil 55	MLN2238 ve Bortezomib Konsantrasyonları ile 24 Saat İnkübe Edilmiş Caco2 Hücrelerinde c-myc Genine Ait Hedef/Referans Oranları	73
Şekil 56	MLN2238 ve Bortezomib Konsantrasyonları İle 48 Saat İnkübe Edilmiş Caco2 Hücrelerinde c-myc Genine Ait Hedef/Referans Oranları	74

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

ANOVA	: Varyans Analizi (Analysis of Variance)
cDNA	: Komplementer deoksiribonükleik asit
DMSO	: Dimetilsülfoksit
FADD	: Fas İlişkili Ölüm Domaini
FBS	: Fötal Sığır Serumu
FDA	: Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration)
GAPDH	: glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase
kDa	: Kilo dalton
KML	: Kronik miyeloid lösemi
KRK	: Kolorektal kanser
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
NF-kB	: Nükleer transkripsiyon faktörü
PBS	: Fosfat tuz tampon çözeltisi (Phosphate Buffer Saline)
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
pH	: Hidrojen konsantrasyonunun eksi logaritması
SPSS Sciences)	: Sosyal bilimler için istatistik programı (Statistical Package for Social
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
VEGF	: Vasküler endotel büyüme faktörü

GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser, hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalması veya anormal hücrelerin apoptoza uğrayamaması olarak tanımlanmaktadır. Kanser karmaşık bir mekanizma olmasını, kanser hücrelerinin sürekli, kontrolsüz çoğalması, verilen ilaçlara direnç kazanması ve metastaz yaparak tüm vücuda yayılabilme özelliğine sahip olması oluşturmaktadır ve bu durumlar tedaviyi zorlaştırmaktadır. Bu yüzden günümüzde halen kanser tedavisinde yeni yollar aranmaktadır. Bu bağlamda Proteozom inhibisyonu, klinikte etkili bir antikanser tedavi yaklaşımı olarak son on yıl içinde ortaya çıkmıştır (Almond and Cohen, 2002; Dick and Fleming, 2010).

Antitümör etki için 26S proteozom kompleksi hedef alınarak birçok proteozom inhibitörü geliştirilmiş ve test edilmiştir. Bu proteozom inhibitörleri, farklı tümör tiplerinde apoptoza harekete geçirerek antitümör fonksiyonu göstermiştir. Dahası bu proteozom inhibitörlerinin anjiyogenezi, hücre hücre adezyonunu ve migrasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir. Klinikte birçok proteozom inhibitörü için multipl myeloma ve katı tümörlerin tedavisi için çalışmalar bulunmaktadır (Frankland-Searby ve Bhaumik, 2012).

Proteozom inhibitörleri kendilerine özgü bir etki mekanizmasına sahiptirler. Bortezomib (Velcade, PS-341) bu gruptan klinik araştırma dönemine erişebilen ve FDA tarafından onaylanan ilk ilaç olma özelliğine sahiptir (Richardson ve ark., 2007)

Bortezomib şu an klinikte multiple myeloma ve mantle hücreli lenfoma tedavisinde kullanılmaktadır (Frankland-Searby ve Bhaumik, 2012).

Bortezomib'in myelom gibi hemopoetik kökenli kanserlerin tedavisinde kullanılmış olmasına rağmen, büyüyen temel ve klinik çalışmalar, bortezomib'in birçok çeşit solid tümörü (kolon, akciğer, meme ve prostat kanserleri gibi) tedavi etmede başarılı olduğunu göstermiştir (Ling ve ark., 2010; Fujita ve ark., 2007; Cardoso ve ark., 2006).

MLN9708 insan tümörlerinin geniş bir aralığını tedavi etmek için geliştirilen ikinci nesil proteozom inhibitörüdür (Kupperman ve ark., 2010)

MLN9708 şu an klinikte lenfomalı ve solid tümörlü hastalarda faz I aşamasındadır. Ayrıca MLN9708'in multiple myeloma için klinik faz I/II çalışmaları devam etmektedir (Crawford ve Walker, 2011).

Biz de bu çalışmada, yeni bir proteozom inhibitörü olan MLN9708'i, FDA onaylı bir ilaç olan Bortezomib ile karşılaştırarak hem hematolojik malignansilerde, hem de solid tümörlerde etkilerini belirlemeyi amaçladık. İnsan K562 lösemi hücre hattı ve Caco2 insan kolorektal hücre hattı üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkilerini, proteozom inhibitörlerinin etki yolağı üzerinde anahtar rol oynayan NF- κ B ve c-myc ekspresyon düzeylerini belirledik.

KAYNAK BİLGİSİ

KANSER

Kanserin gelişmesine neden olan temel değişiklik kanser hücrelerinin sürekli, kontrolsüz çoğalmasdır. Kanser hücreleri, hücrenin normal davranışlarını kontrol eden sinyallere doğru tepkiyi göstermek yerine kontrolsüz biçimde çoğalmayı ve bölünmeyi sürdürerek, normal doku ve organları da istila eder ve sonunda tüm vücuda yayılır. Kanser hücrelerinin ortak özelliği olan çoğalmayı denetleyen mekanizmaların ortadan kalkması, çok hücreli sistemlerde biriken anomalilerin sonucudur. Kanser hücrelerini normal hücreden ayıran birçok davranış da bu özelliği yansıtır.

Kanser vücutta yer alan herhangi bir hücrenin anormal çoğalması sonucu ortaya çıkabildiğinden, gerek davranış, gerekse tedaviye cevap yönünden önemli ölçüde değişiklik gösteren yüzden fazla değişik kanser türü mevcuttur. Kanser patolojisinde en önemli konu benign (iyi huylu) ve malign (kötü huylu) tümörleri birbirinden ayırabilmektir. Hücrelerin anormal çoğalması sonucunda ortaya çıkan tümör benign ya da malign olabilir. Deride görülen basit siğiller gibi benign tümörler çevredeki dokuya ya da vücudun uzak bölgelerine yayılmadan oluştukları yerde kalırlar. Buna karşılık malign tümörler hem çevredeki normal dokuya, hem de kan ya da lenfatik sistem aracılığıyla vücudun diğer bölgelerine yayılır (metastaz). Aslında sadece malign tümörler kanser olarak tanımlanır. Kanseri tehlikeli yapan, bunların yayılma ve metastaz yapma özellikleridir. Benign tümörler genellikle ameliyat ile çıkartılabildiği halde, malign tümörlerin vücudun uzak bölgelerine yayılması hastalığın tedavisini güçleştirir.

Gerek malign, gerekse benign tümörler türedikleri hücreye göre sınıflandırılır. Kanselerin çoğu üç ana grupta toplanabilir: karsinomlar, sarkomlar ve lösemi veya lenfomalar. İnsan kanserlerinin yaklaşık %90'ını oluşturan karsinomlar epitel hücrelerinden kaynaklanan tümörlerdir. İnsanda az görülen sarkomlar, kas, kemik, kırıkda ve fibröz doku gibi bağ dokusunda gelişen solid tümörlerdir. İnsan kanserlerinin yaklaşık %7'sini oluşturan lösemi ve lenfomalar ise sırasıyla kan ya da immün sistem hücrelerinden gelişir. Tümörler ayrıca geliştikleri organa ve ilgili hücrenin türüne göre de sınıflandırılır (Cooper ve Hausman, 2006).

Lösemi

Lösemi, akyuvar (lökosit=beyaz küre) dediğimiz kemik iliğinde yapılan kan hücrelerinin kontrolsüz çoğalması sonucu oluşan bir kanser türüdür. (Klein ve ark., 1976)

Hücre tipine göre lösemiler 'miyeloid' ve 'lenfositik' olarak ikiye ayrılmaktadır. Miyeloid ve lenfositik lösemilerin her biri 'akut' veya 'kronik' olarak ilerlemektedir. Bu özelliklerine göre lösemiler dört gruba ayrılmaktadır (Cantürk, 2006).

1. Akut Lenfositik (Lenfoblastik) Lösemi (ALL)
2. Akut Miyeloid Lösemi (AML)
3. Kronik Lenfositik Lösemi (KLL)
4. Kronik Miyeloid Lösemi (KML)

Normal lenfoid hücre topluluğu, immüoglobulin ve T hücre reseptörü genlerinin farklı ve klonal yeniden yapılanma sürecini geçirerek, B ve T hücrelerine proliferasyon (çoğalma) olma ve farklılaşma sürecini tamamlar. Bu sürecin herhangi bir safhasında meydana gelen somatik genetik değişiklikler proliferasyonun bozulmasına, klonal olarak hücre popülasyonunda artışa ve ALL' ye neden olmaktadır. ALL' lerin yaklaşık % 75' inde kromozomal translokasyonlar mevcuttur.

Akut myeloid lösemi (AML) fenotipik olduğu kadar, genotipik olarak da heterojenite gösteren kompleks bir hastalıktır. 100' den fazla sitogenetik sapma (aberrasyon) ve çeşitli genlerdeki mutasyonlar bu hastalıkta tanımlanmıştır.

KLL'de lösemi hücresi fonksiyon göstermeyen çok sayıda lenfosit oluşturur. Bu hücreler kemik iliği ve lenf nodlarındaki normal hücrelerin yerini alır. Lenfositlerin görevini yerine getirmesine müdahale eder ve bu nedenle hastanın immün cevabı zayıflar. Ayrıca kemik iliğinde oluşan çok sayıda lösemi hücresi nötrofil ve trombosit sayılarının düşmesine de neden olmaktadır (Cantürk, 2006).

Kronik miyeloid lösemi

KML (kronik miyeloid lösemi), gelişmesinin başlangıcında olan (primitif) tüm bir canlıyı oluşturabilme yeteneğine sahip olan (pluripotent) kök hücrenin klonal bir hastalığıdır (Haznedaroglu ve Koca, 2005).

KML terimi bugüne kadar; kronik granülositik lösemi, kronik miyelojen lösemi ve kronik miyelositik lösemi olarak da isimlendirilmiştir. KML araştırmalarında en önemli olay, Nowell ve Hungerford tarafından 1960 yılında *Philadelphia kromozomu* (Ph kromozomu)'nun bulunması olmuştur. İlik hücrelerinde G grubu kromozomda (9. kromozom) uzun kolun büyük parçasının koparak kaybolduğunu tanımlamış, ancak kopan parçaya ne olduğunu anlayamamışlardır (Nowell ve Hungerford, 2007)

Rowley 1973 yılında yaptığı bir çalışmada giemsa boyama yaparak, kromozom bantlama yöntemi ile 9. kromozomdaki kopan parçanın kaybolmadığını 22. kromozomun uzun koluna transloke olduğunu belirtmiştir. 1980'li yıllarda bu translokasyon sonucunda, 210 kd'luk bir onkoprotein üretildiği tespit edilmiştir. (Rowley, 1973)

Bu onkoprotein hücresel çoğalmayı olumsuz yönde etkileyen proteinleri fosforile etmektedir. Özellikle de miyeloid hücre dizisi boyunca, farklılaşan hücrelerin farklılaşma mekanizmasını etkileyip hücrelerin çoğalmasına ve KML hücre klonlarının artmasına neden olmaktadır. Bu proteinler hücrenin bir takım özelliklerini değiştirip hücrenin apoptozunu inhibe etmektedir (Sessions, 2007; Nowell, 2002)

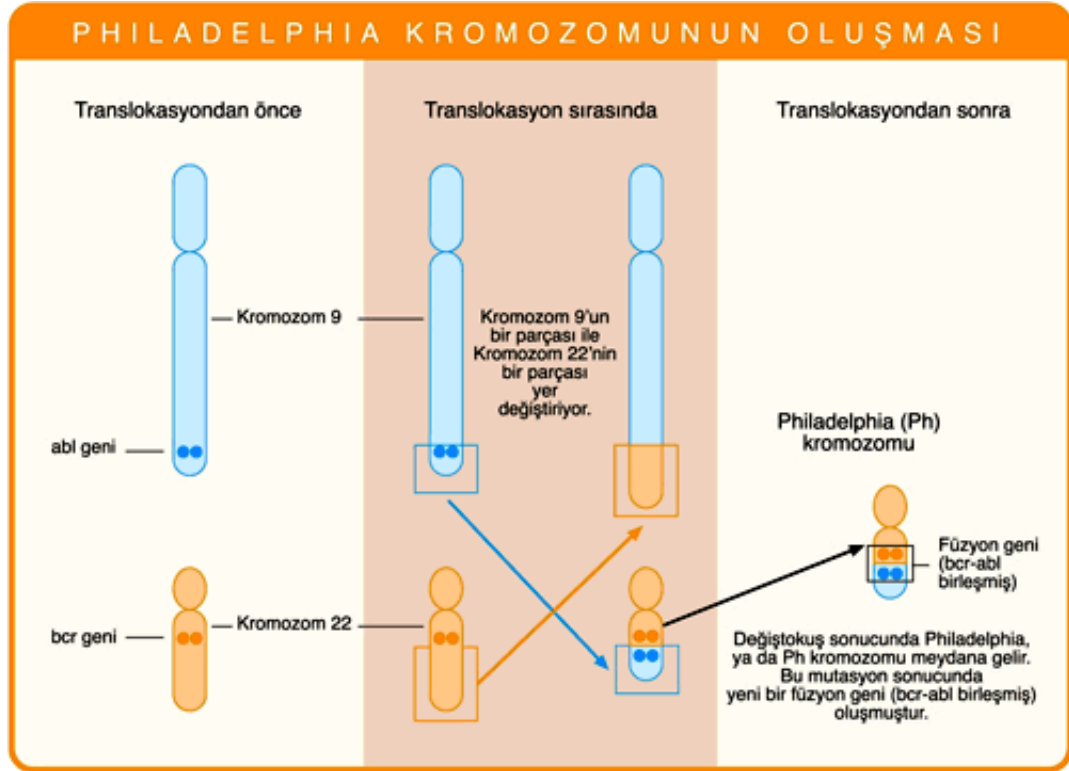
KML'nin insidansı yaşla beraber belirgin olarak artmaktadır, hastaların % 30' u 60 yaş üstündedir. (Baran ve Gündüz, 2007).

Hastalık erkeklerde kadınlara kıyasla (1,5/1) daha fazla görülme eğilimindedir. KML, çocukluk yaş grubunda da görülebilmekle beraber, bu vakalar KML hastalarının sadece % 10' unu ve tüm çocukluk yaş grubu lösemilerinin % 3' ünü oluşturmaktadır.

KML pluripotent (bir canlıyı oluşturabilme yeteneğine sahip) kemik hücrelerinden köken alır. Yavaş ilerleyen bu hastalığın klinikte iki aşaması vardır: kronik faz ve blast krizi (akut faz). KML'nin kronik fazı çok az belirti gösterir ve yıllarca sürebilir. Ancak sonunda bütün hastalar, blast krizi adı verilen ve yaşamı tehdit eden akut faza girerler (Druker, 2002).

Kemik iliğinde aşırı miyeloid hiperplazi (bir organ veya dokunun hücre sayısındaki artış nedeniyle büyümesi), çevre kanında olgun miyeloid hücrelerden oluşan yüksek lökosit sayısı (bazofili ile birlikte) ve dalağın büyümesi (splenomegali) ile karakterizedir. Akut lösemide var olan patolojik çizelgenin aksine, lösemi hücreleri farklılaşma yeteneklerini kaybetmemişlerdir (Haznedaroglu ve Koca, 2005).

Ph kromozom 9 üzerinde ki abl onkogeninin normal lokusundan 22. kromozoma translokasyonu sonucunda aktivasyonu lösemilerin %95'inde görülen KML'de yaygın bir olaydır. Bu translokasyon, abl ile 22. kromozomdaki bcr genlerini birleştirerek bcr/abl onkogeninin oluşmasına neden olur. Onkogen tarafından sentezlenen Bcr/abl birleşik proteinin de Abl'nin birinci ekzonunun yerini Bcr'a özgü aminoasit dizileri almıştır. Bcr/Abl proteini, sürekli aktif durumda kalan bir trozin kinazdır ve hücre içi sinyal yollarını aktifleştirerek lösemi gelişmesine neden olur (Druker, 2002).



Şekil 1. Philadelphia Kromozomunun Oluşması (http-1)

Miyeloid lösemi hücreleri, normal hücrelere göre, daha yavaş proliferasyon ve büyüme hızına sahiptir. Lösemi hücreleri olgunlaşmadıkları sürece bölünmezler. Olgunlaşma ve proliferasyon birbirlerine bağlı olaylardır (Cantürk, 2006; Singhal ve ark., 1999).

K562 hücre hattı

K562 hücre hattı, ilk kez 1975 yılında Lozzio ve arkadaşları tarafından, KML hastalarının terminal blastik kriz evresinde, plevral sıvılarında izole edilerek hazırlanmış bir lösemik hücre hattıdır. Oksidatif stres, glutasyon sistemi ve anti-kanser tedavilerinin geliştirilmesi ile ilgili çalışmalarda sıklıkla tercih edilen bir hücre hattıdır (Koeffler ve Gold, 1980; Lozzio ve Lozzio, 1975; Assaf ve ark., 2003).

Giemsa ile hazırlanmış preparatlarda K562 hücreleri farklılaşmamış blast hücreleri olarak tanımlanır ve yaklaşık 20 mikron çapındadır. Basofilik sitoplazmaları granül içermez ve iki ya da daha fazla parçalı nükleusları vardır. K562 hücreleri granülosit ve monositler gibi sitokimyasal maddeler ile pozitif boyanmazlar (Nakajima ve ark., 1993; Şencan, 2006).

Kültür medyumunda süspansiyon olarak büyüyen K562 hücrelerinin iki kat artma süreleri ortalama 12 saattir (Singhal ve ark., 1999).

K562 hücrelerinde, normal kromozom sayısının yaklaşık 1,5 katı kromozom bulunur. KML için spesifik bir belirteç olan Ph kromozomu K562 hücrelerinde pozitifdir. Buna bağlı olarak bu hücre serisinde abl/bcr füzyon geni ekspresyonu nedeniyle apoptoza karşı direnç vardır (Anand ve ark., 1995; Saydam ve Aydın, 2003; Şencan, 2006).

K562 hücre hattı standart hücre büyüme koşulları altında düşük oranda hemoglobin sentezler. Ancak K562 hücre hattı; hemin, sitozin arabinozid, bütirik asit ve 5-azasitidin gibi çeşitli bileşenlerle tedavi edildiğinde eritroid farklılaşma gerçekleşmektedir. Böylece, K562 hücre hattı embriyonik ve fetal globin genlerinin ifadelerinin düzenlenmesinde moleküler çalışmaların yanı sıra anti tümör ilaçların geliştirilmesinde önemli bir model oluşturmaktadır (Osti ve ark., 1997).

Kolon Kanseri

Kolon kanseri, kolon ve rektumu kaplayan epitel tabakasından köken alan yaygın bir kanser türüdür (Jemal ve ark., 2008).

Dünya genelinde her sene 1 milyondan fazla yeni kolorektal kanser (KRK) durumu teşhis edilmektedir. KRK dünyada en sık görülen üçüncü kanserdir (Terzic ve ark., 2010).

KRK özellikle sanayi ülkelerinde yaygın olarak görülen ve kanser ölümlerinde ikinci en büyük sebebi oluşturan kanser türüdür (Magrını ve Von, 2002; Terzic ve ark., 2010; Langdon, 2004).

Kolon ve rektum kanserleri (kolorektal kanserler) batı ülkelerinde ki en yaygın kanser tiplerindedir ve birleşik devletlerde, her yıl, yaklaşık 140,000 vaka rapor edilmektedir (toplam kanser olgularının yaklaşık %10'u). Kolon kanserlerinin çoğu (diğer kanser tipleri gibi) kalıtılan hastalık değildir, yani ebeveynlerden çocuklarına direkt olarak aktarılamaz. Bununla birlikte, kolon kanserinin iki kalıtsal formu tanımlanmıştır. Her iki sendromda da, kansere yatkınlık geninin kalıtılması kanser gelişme olasılığını artırmaktadır. Kolon kanserinin kalıtsal formlarından biri (ailesel adenomatoz polipozis) oldukça nadirdir, toplam kolon

kanseri olgularının %1'inden daha azdır. Kolon kanserinin ikinci kalıtsal formu (kalıtsal polipsiz kolorektal kanser veya HNPCC) daha yaygındır ve bütün kolon kanseri olgularının %15'ini oluşturmaktadır (Cooper ve Hausman, 2006).

Primer kolorektal kanserlerin %95'ini adenokarsinomlar oluşturur. Kolon kanserlerinin yaklaşık %30'u rektumda % 25'i sigmoidde %5-10'u inen kolonda %10-15'i transvers kolonda, çıkan kolon-çekumda da %25'i yerleşir. Yapılan bir çalışmada KRK yaklaşık %45'inin rektumda %22'sinin de sigmoid kolonda görüldüğü bildirilmiştir (Küpelioglu, 2004).

Kolorektal kanserin erken safhaları genellikle semptomatik değildir. Bununla birlikte kolorektal kanserin erken safhalarında tarama yapılarak saptanabilmesi önemlidir. Bu hastalık ilerleyen dönemde, rektal kanama, gaitada kan, bağırsak doğasının değişmesi, alt abdomende kramplara sebep olmaktadır. Kolorektal kansere yakalanma riski yaşa bağlı olarak artmaktadır. Teşhis edilmiş vakaların % 90'dan fazlası 50 yaş ve üzeridir. Aynı zamanda bazı kalıtsal genetik mutasyonlar (ailesel adenomatoz polipozis-FAP) ve kalıtsal polipozis olmayan kolorektal kanser- HNPCC), bireysel ya da ailesel kolorektal kanser ve/ veya polip öyküsü ya da kronik inflamatuvar bağırsak hastalıkları geçmişi hastalıkla ilişkili risk faktörleri arasındadır. Ayrıca obezite, hareketsizlik, sigara ve alkol tüketimi, aşırı kırmızı et tüketimi, sebze ve meyve tüketimindeki yetersizlik kolorektal kanser riskini artıran faktörler arasındadır (American Cancer Society, 2008).

KRK durumlarının büyük bir oranı kalıtilabilir genetik değişikliklerden daha çok çevresel sebeplerle ilgilidir. Risk faktörleri çevresel ve besin kaynaklı mutajenleri, özel bağırsak kommensalleri ve patojenleri, ve tümör gelişiminden önce gelen kronik bağırsak inflamasyonunu içermektedir Bir kaç onkogenin aktivasyonunu ve iki ya da daha fazla tümör baskılayıcı geninin kaybını içeren genetik bozukluklar kanser gelişimi için yeterlidir (Terzic ve ark., 2010; Jasperson ve ark., 2010).

Kolorektal tümörlerde KRK'ye yol açan iki temel genetik yolak belirlenmiştir: Birinci yolak, sporadik KRK'lerin % 60-70'inde görülür, Adenomatous Polyposis Coli (APC) tümör-suppressor genindeki inaktive edici, K-ras onkogenindeki aktive edici ve p53 tümör-suppressor genindeki inaktive edici mutasyonları içerir.

İkinci yolak, sporadik KRK'lerin geri kalan % 15-20'sinde görülür, hatalı yanlış eşleşme tamir sistemini içerir. Bu tamir sisteminin kaybı genomik instabiliteye ve tümör-suppressor genlerinde (Bax gibi) fonksiyon kaybına ve onkogenlerde fonksiyon kazanılmasına (β -catenin'de olduğu gibi) yol açan yüksek sayıda mutasyonların birikmesine sebep olur (Das ve ark., 2007).

Kolit bağımlı kanser (Colitis-Associated Cancer (CAC)) ateşli bağırsak hastalığı (Inflammatory Bowel Disease (IBD)) ile ilgilidir. Tedavisi zor ve ölüm oranı yüksektir. Noninflamatuvar KRK ve CAC benzer kanser gelişim evrelerini içermektedir. IBD-bağımlı kanserin bir inflamasyon-displazi (dysplasia)-karsinoma sırasında gerçekleştiği düşünülmektedir. İnflamasyon kolon epitelindeki değişiklikler kaskadını, bu da epitel hücrelerinin apoptotik ve regeneratif aktivitelerini indüklemektedir (Terzic ve ark., 2010).

NO ve nitrik oksit sentazlar, NF-kB, ROT ve RNT'ler, COXs, pro- ve anti-inflamatuvar sitokinler, metallere; antioksidan enzimler, peroksizom proliferatörü ile aktive edilen reseptör ligandları, kinazlar, büyüme faktörleri ve tümör engelleyici proteinler, p53 ve retinoblastoma (pRb)'nin hepsi kronik inflamasyon ve kanserin önlenmesi ve tedavisinde potansiyel hedeflerdir (Hofseth, 2008).

NF-kB ve kolorektal kanserler

Transkripsiyon faktörü NF-kB bir dimerdir; altbirimlerin her kombinasyonu farklı genlerin düzenlenmesinde yer alır. 5 alt birimi bulunur: p105/p50, p100/p52, RelA (p65), c-Rel ve RelB. Bunlar sitoplazmada öncü olarak veya özel inhibitörler, KB inhibitor proteinleri (Ikb), ile inaktif halde bulunurlar (Terzic ve ark., 2010).

Tümör gelişimine yardımcı olan sitokinlerin çoğu NF-KB transkripsiyon faktörleri aracılığıyla aktif hale getirilir veya öncü kanser hücrelerde ve immün/inflamatuvar hücrelerinde NF-kB sinyalleşmesini aktif hale getirir. NF-kB'nin kolorektal ve kolitis-bağımlı tümörögenizde belirgin bir rolü vardır. Kolorektal ve kolitis-bağımlı tümörlerin % 50'sinden fazlasında tipik olmayan NF-kB aktivasyonu belirlenmiştir. NF-kB'nin aktivasyonu, hücre proliferasyonu ve angiogenez ile, hücre ölümünün engellenmesiyle, ve hücre invazyonu ve metastazının promot edilmesiyle tümörögenizi destekleyebilir. NF-kB'nin antiapoptotik aktivitesi diğer genler paralelinde Bcl2, Bcl-xL, ve cFLIP'in aktivasyonu yoluyla düzenlenir. NF-kB'leri aktive edilmiş kanser hücreleri kemoterapötiklere ve iyonize radyasyona karşı dirençlidir. NF-kB aktivitelerinin önlenmesi bu ajanlara karşı hücre duyarlılığını oldukça artırır (Terzic ve ark., 2010).

Caco2 hücre hattı

Caco2 (insan kolon kanseri) hücre hattı; 72 yaşında, Kafkas, kolorektal adenokarsinom hastalığına sahip erkek bir hastanın epitelial kolon dokusundan alınarak kültüre edilmiştir. Adhere hücre özelliğine sahip bir hücre hattıdır (<http://2>).

Caco2 hücre hattı, kaynağı insan kolonu olan bir adenokarsinomdur. Hücreler epitelyal morfolojiye sahiptir.

APOPTOZİS

Çok hücreli organizmalarda, hücre çoğalması ve hücre ölümü arasında daima bir denge vardır. Bu denge organizmanın gelişimi ve doku homeostazisinin sağlanması açısından büyük önem taşır. Bu dengenin bozulması embriyogenez sürecinde hatalara yol açar, ayrıca dejeneratif hastalıkların ve kanserin gelişiminde rol oynar (Danial ve Korsmeyer, 2004).

Apoptozis terimi, bilimsel olarak ilk defa İskoçyalı araştırmacılar Kerr, Wyllie ve Currie tarafından 1972 yılında kullanılmış ve canlı dokulardaki hücre azalmalarından sorumlu olan, yapısal olarak özgün bir hücre ölüm tipi olarak tanımlanmıştır (Kerr ve ark., 1972).

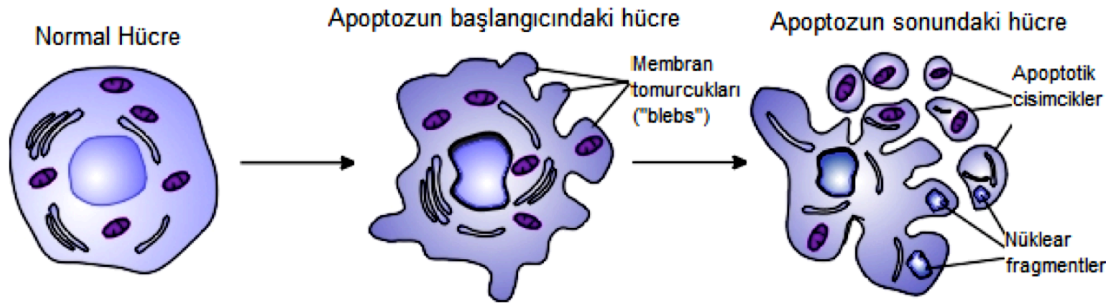
Apoptoz hücre-içi ve hücre-dışı pek çok sinyal tarafından iki temel yolak üzerinden aktive edilen ve pek çok protein tarafından regüle edilen, kontrollü ve programlı bir hücre ölüm sürecidir (Raff, 1998)

Yaşam süresince dokulardaki hücre sayısı apoptoz sayesinde dengede tutulur. Apoptoz genetik olarak düzenlenen, enerjiye (ATP'ye) bağımlılık gösteren fizyolojik hücre ölümüdür. (Danial ve Korsmeyer, 2004).

Apoptozun tetiklenmesi için; sinyal moleküllerini, reseptörleri, enzimleri ve genleri düzenleyen proteinleri içeren bir seri molekülün işbirliği gereklidir (Fan ve ark., 2005).

Organizmada meydana gelebilecek yetersiz apoptoz kanser ve otoimmün hastalıklara, artan apoptoz ise akut ve dejeneratif birçok hastalığa yol açabilmektedir. Dolayısıyla apoptoz mekanizmasının kusursuz işlemesi organizmanın sağlıklı yaşamı açısından son derece önemlidir (Pınarbaşı, 2007).

Apoptoza giden bir hücrede çeşitli morfolojik ve biyokimyasal değişimler meydana gelir. İlk önce, apoptoza giden hücrenin bulunduğu yüzeyle arasındaki adezyon ortadan kalkar ve hücre yuvarlaklaşır. Aynı zamanda apoptotik hücrenin komşu hücrelerle olan teması da ortadan kalkar. Apoptoza giden hücrenin hacminde azalma olur ve hücre büzülmesi meydana gelir. Kromatin nüklear membrana yaklaşır ve yoğunlaşır. DNA, nükleozomlar arası bölgelerinden kesilerek 180-200 baz çifti büyüklüğündeki internükleozomal fragmentlere ayrılır. Hücre membranında kabarcık şeklinde girintili-çıkıntılı yapıların ("bleb") oluşmasıyla, membran tomurcuklanması ("membran blebbing") meydana gelir. Son olarak apoptotik hücre; apoptotik cisimcik ("apoptotic body") adı verilen, membranla çevrili, içinde sitoplazmayı, hücresel organelleri ve nükleus fragmentlerini içeren küçük parçalara ayrılır (**Şekil 2**). (Willingham, 1999; Saraste ve Pulkki, 2000). Apoptotik cisimcikler, makrofajlar ve dendritik hücreler gibi aktif fagositler ve çevrelerindeki hücreler tarafından ortadan kaldırılır. Apoptoz sırasında hücre, membranındaki fosfolipid asimetrisini kaybeder. Normalde hücre membranının sitozolik tarafında bulunan fosfatidilserin (PS), apoptoz sırasında membranın hücre dışına bakan tarafına geçer. Apoptotik cisimciklerin fagositler tarafından tanınmasında bu fosfatidilserin translokasyonu önemli rol oynar (Savill ve Fadok, 2000; Erwig ve Henson, 2008).



Şekil 2. Apoptoz Sırasında Hücrede Meydana Gelen Morfolojik Değişimler (http-3)

Kaspazlar

Kaspazlar gerek ölüm reseptörleri yolu, gerekse mitokondriyal apoptozda rol alan proteazlardır (Kaufmann ve Hengartner, 2001).

Kaspazlar, apoptozis de rol oynayan Sistein Aspartat Spesifik Proteaz (Cystein Aspartat Spesifik Protease) olarak tanımlanan bir protein ailesidir. Bu proteaz ailesinin üyeleri, aktif bölgelerinde sistein rezidülerine (aminoasit) sahip olmakla birlikte substrat proteinlerindeki kesim bölgesi genelde aspartik asitten sonra gelen kısımdır. Kaspazlar, hedef hücrede apoptozu gerçekleştiren sistein proteaz grubundan olup, ilk sentezlendiklerinde inaktif pro-kaspaz veya zymojen (inaktif proteolitik enzim) olarak bulunurlar. Kaspazların inaktif formu olan zymojen yapısı (pro-kaspaz), apoptozun indüklenmesinden sonra aktif kaspaz formuna dönüşür (Cooper ve Hausman, 2006).

Tüm kaspazlar aminoasit sekansları, yapıları ve substratları yönünden benzerlik göstermektedir. Kaspazlar amino ucu domaini (prodomain), büyük alt-birim ve küçük alt-birim olmak üzere üç önemli domain bulundurur. Aktif merkez, büyük alt-birimde yer almaktadır. Aktivasyon bu domainler arasında peptit bağlarının kırılması ve daha sonra büyük ve küçük alt-birimler birleşerek heterodimer, heterodimerler de birleşerek iki aktif merkez içeren bir tetramerik yapı oluşmasıyla meydana gelir (Nicholson, 1999; Yerlikaya ve Dokudur, 2010).

Kaspazlar apoptozun şekillenmesinde görev alan 40 tan fazla proteazın aktifleşmesini sağlar. Kaspaz ailesinin bazı üyeleri (Kaspaz 2, 8, 9, 10) başlatıcı kaspazlar olarak bilinirken, bazıları da (3, 6, 7) efektör kaspazlar (hedef kaspazlar) olarak bilinir. Başlatıcı kaspazlar apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara iletirler (Cooper ve Hausman, 2006).

Efektör kaspazlar hücre çekirdeğinde, sitoplazmada ve hücre iskeletinde bulunan birçok yapısal ve işlevsel proteinleri parçalayan proteazlardır. Apoptozisde rol alan kaspazlar **Tablo 1**'de görülmektedirler. (Cohen, 1997; Yerlikaya ve Dokudur, 2010)

Tablo 1. Apoptozda Rol Oynayan Kaspazlar (Yerlikaya ve Dokudur, 2010)

Enzim	Protein Ağırlığı (kDa)	Aktivasyon Sonrası Oluşan Altbirimler
Başlatıcı Kaspazlar		
Kaspaz-2	51	19/22
Kaspaz-8	55	18/11
Kaspaz-9	45	17/10
Kaspaz-10	55	17/12
Kaspaz-12	50	20/10
Efektör Kaspazlar		
Kaspaz-3	32	17/12
Kaspaz-6	34	18/11
Kaspaz-7	35	20/12

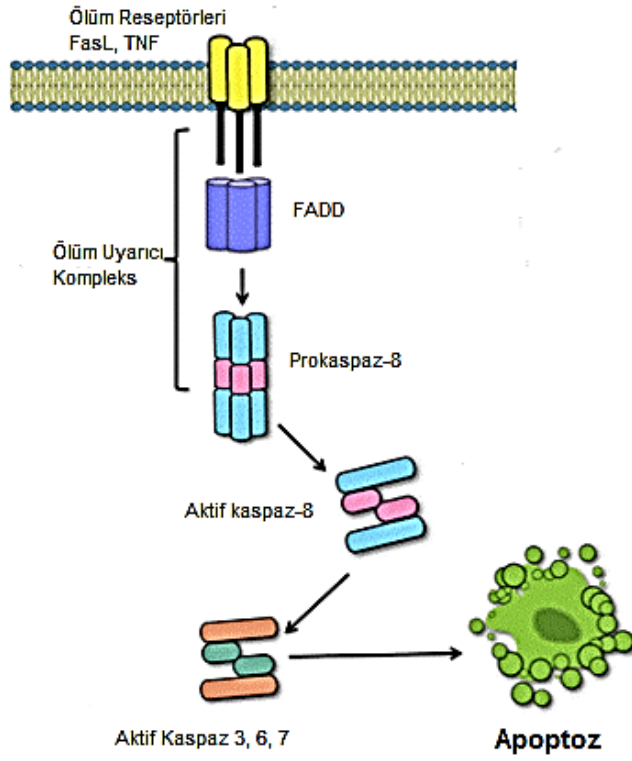
Apoptozun Moleküler Mekanizmaları

Dış yolak (Ölüm Reseptörleri Yolağı)

Dış yolak, “ölüm reseptörleri” adı verilen hücre yüzey reseptörlerine spesifik ölüm ligandlarının (“death ligand”) bağlanması sonucu aktifleşir. Ölüm reseptörleri, Tümör Nekroz Faktör / Sinir Büyüme Faktörü (“Tumor Necrosis Factor / Nerve Growth Factor”, TNF / NGF) reseptör süper ailesine ait olan hücre yüzey sitokin reseptörleridirler. Bilinen 6 tane ölüm reseptörü vardır. Bunlar Fas (CD95 veya Apo1), TNF-R1 (p55 veya CD120a), ölüm reseptörü 3 (“death receptor 3”, DR3 veya Apo3), ölüm reseptörü 4 (“death receptor 4”, DR4 veya TRAIL-R1), ölüm reseptörü 5 (“death receptor 5”, DR5 veya TRAIL-R2) ve ölüm reseptörü 6 (“death receptor 6”, DR6)’dır (Guicciardi ve Gores, 2009).

Bu ölüm reseptörlerine bağlanan ligandlar, TNF süper gen ailesine ait tamamlayıcı sitokinlerdir. Fas ligandı (FasL), Fas reseptörüne; TNF ve lenfotoksin α , TNF-R1 reseptörüne; Apo3 ligandı, DR3 reseptörüne; TRAIL’ler ise DR4 ve DR5 reseptörlerine bağlanır (Ashkenazi ve Dixit, 1998; Guicciardi ve Gores, 2009).

Apoptozun dış yolak ile indüklenmesi sürecinde; ligand bağlanması sonucu aktifleşen ölüm reseptörü, bir adaptör protein olan “Fas ilişkili ölüm domeni”ni (“Fas-Associated Death Domain”, FADD) kendisine bağlar. FADD; biri “ölüm domeni” (“death domain”, DD), diğeri ise “ölüm etkili domen” (“death effector domain”, DED) olmak üzere 2 tane protein etkileşim bölgesinden oluşmaktadır. FADD, kendisinde ve ölüm reseptöründe bulunan ölüm domenleri arasındaki etkileşimler sonucu ölüm reseptörüne bağlanır. FADD, ölüm reseptörüne Fas-sinyal yolağında olduğu gibi doğrudan da bağlanabilir, TNF-R1 - sinyal yolağında olduğu gibi bir diğere adaptör olan TNF Reseptör İlişkili Ölüm Domeni (“TNF Receptor-Associated Death Domain”, TRADD) aracılığıyla da bağlanabilir (Thorburn, 2004). FADD’ın prokaspaz-8’e bağlanması ise DED aracılığıyla olur. FADD, kendisinde ve prokaspaz-8’de bulunan DED’ler arasındaki etkileşimler sonucu prokaspaz-8’e bağlanır. FADD’ın ölüm reseptörüne ve prokaspaz-8’e bağlanması sonucu, reseptörde “ölüm uyarıcı kompleks” (“Death Inducing Complex”, DISC) adı verilen bir kompleks oluşur (Thorburn, 2004). DISC’teki prokaspaz-8, otokatalizle aktifleşir ve aktif kaspaz-8’e dönüşür. Aktif kaspaz-8 de, kaspaz-3 ve -7 gibi sonlandırıcı kaspazları aktifleştirir. Aktifleşen bu kaspazlar da hücre sel substratları yıkararak, apoptotik hücrede görülen morfolojik ve biyokimyasal değişimleri meydana getirirler. (Oktay, 2011)



Şekil 3. Şematik Gösterimle Dış Yolak (Cooper, 2012)

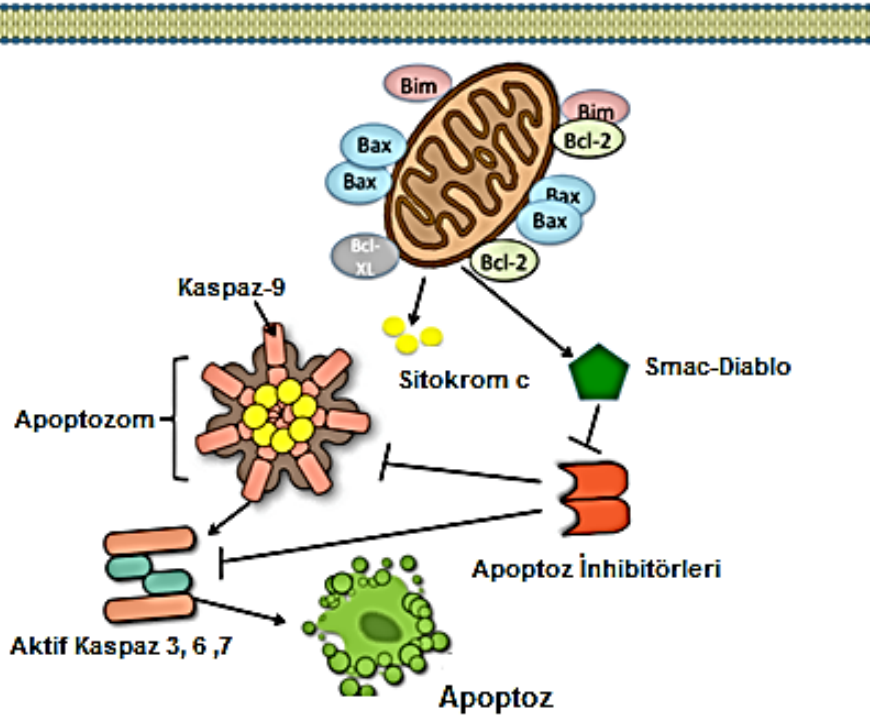
İç yolak (Mitokondriyal Yolak)

Apoptoz indüksiyonunda geçerli bir diğer yolak, mitokondrinin anahtar rol oynadığı iç yolak, kısaca mitokondriyal yolaktır. DNA hasarı, büyüme faktörlerinin ve hormonların yokluğu, radyasyon, toksinler, hipoksi, hipertermi, serbest radikaller ve viral enfeksiyonlar mitokondriyal yoldan apoptozu indükleyen tetikleyicilerdir ve bu tetikleyiciler reseptör-aracılı değildirler (Elmore, 2007).

Mitokondriyal apoptotik yolağın işleyişi, Bcl-2 protein ailesinin üyeleri tarafından düzenlenir (Cory ve Adams, 2002).

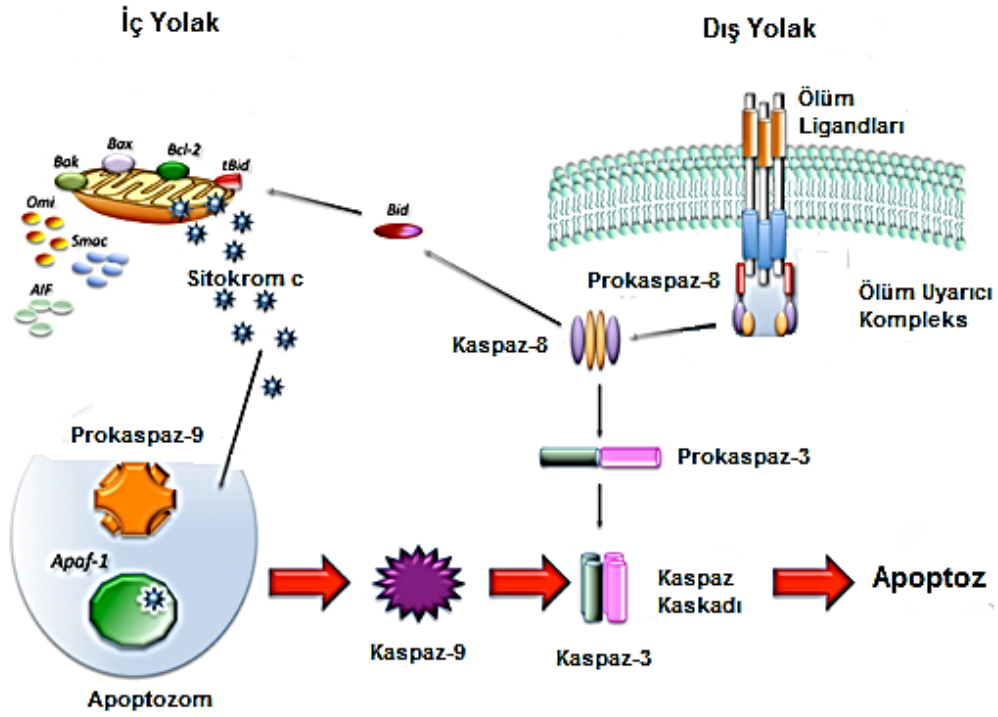
Bcl-2 protein ailesinin pro-apoptotik üyeleri olan Bax ve Bak, mitokondriyi etkileyerek içsel apoptotik yolağı düzenlerler. Canlı hücrelerde, Bax ve Bak monomer olarak bulunurlar. Bir ölüm sinyali alındığında, normalde sitozolde bulunan Bax mitokondriye gider, mitokondrinin dış membranına entegre olur ve orada oligomerleşir. Normalde mitokondride bulunan inaktif Bak da oligomerize olur ve aktifleşir. Tüm bunların sonucunda mitokondrinin dış membran geçirgenliğinde değişiklikler meydana gelir. Mitokondrinin membranlar arası bölgesindeki apoptojenik proteinler dışarı salınır (Campello ve Scorrano, 2009).

Mitokondriyal apoptotik yolda en temel iki olay, mitokondrinin membran geçirgenliğinin bozulması ve apoptojenik proteinlerin mitokondriden sitozole salınmasıdır. Mitokondriden sitozole salınan bu pro-apoptotik proteinlerin en önemlileri sitokrom c, Smac/DIABLO (“second mitochondrial activator of caspases/direct IAP binding protein with low pI”), apoptoz indükleyici faktör (“apoptosis inducing factor”, AIF) ve endonükleaz G’dir (Wang, 2001).



Şekil 4. Şematik Gösterimle İç Yolak (Cooper, 2012)

Sitozole salınan sitokrom c, sitozolik bir protein olan APAF-1 (“apoptosis protease-activator factor 1”)’e bağlanır ve böylece APAF-1’de konformasyonel bir değişim meydana gelir. Bu konformasyonel değişim dATP/ATP’nin bağlanmasını kolaylaştırır. Sitokrom c - APAF-1 kompleksine dATP/ATP’nin bağlanması ile “apoptozom” adı verilen bir kompleks oluşur. Prokaspaz-9 molekülleri, apoptozoma bağlanarak aktifleşir ve aktif kaspaz-9’a dönüşürler. Aktif kaspaz-9 enzimi de, kaspaz-3 gibi sonlandırıcı kaspazları aktifleştirir (Şekil 4) (Wang, 2001).



Şekil 5. Hem İçsel (Mitokondriyal) Hem de Dışsal Apoptotik Yolağın Şematik Olarak Gösterilmesi (Favaloro ve ark., 2012)

Apoptoz Modülatörleri

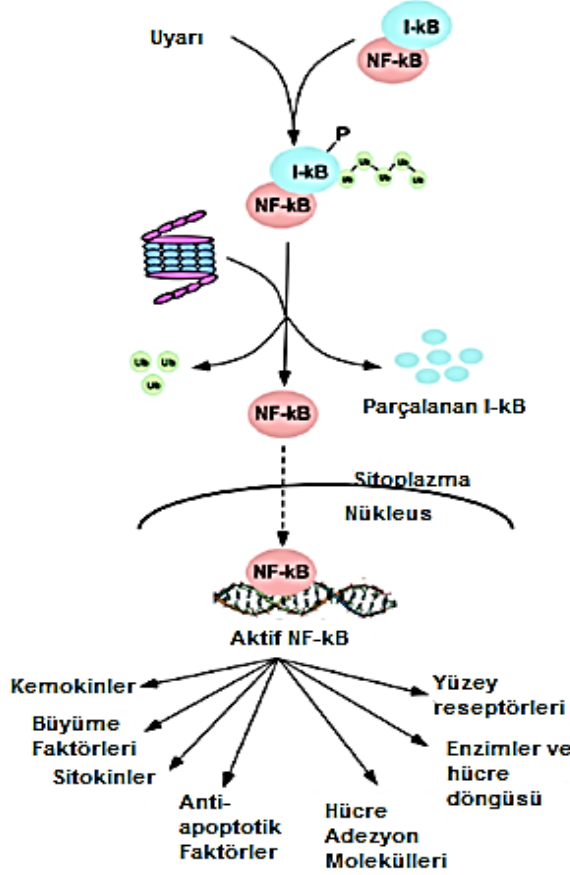
Apoptozis çok sayıda modülatör tarafından düzenlenir. Bunlar arasında; kalsiyum iyonları, seramid ve benzeri moleküller, c-myc gibi onkogenler, tümör baskılayıcı p53 proteini ve mitokondri organeli bulunmaktadır. Apoptotik süreç boyunca hücre içine sürekli kalsiyum girişi olur. Kalsiyum iyonları endonükleaz aktivasyonunda, gen regülasyonunda, proteazların aktivasyonunda ve hücre iskeleti organizasyonunda rol almakla birlikte apoptozisin gerçekleşmesi için önemli bir iyonudur (Cooper, 2006)

Nükleer transkripsiyon faktörü NF- κ B

NF- κ B (Nükleer faktör kappa B), sitokinler, kemokinler, büyüme faktörleri, hücre-adezyon molekülleri ve yüzey reseptörleri benzeri molekülleri kodlayan genlerin düzenlenmesinde görevli bir transkripsiyon faktörüdür. Dolayısıyla bağışıklık yanıtına, enflamasyona ve apoptoza etkin olarak katılır (Shishodia ve Aggarwal, 2002).

NF- κ B bir heterodimerdir ve 50 kDa'lık ve 65 kDa'lık 5 alt birimden meydana gelir. p105/p50, p100/p52, RelA (p65), c-Rel ve RelB. Bunlar sitoplazmada öncü (precursor) olarak veya özel inhibitörler, KB inhibitor proteinleri (IKB) ile inaktif halde bulunurlar (Terzic ve ark., 2010).

NF-kB'nin etkinleşmesinin en az 3 basamağı direkt ubiquitinlenmeyi gerektirir: İnhibitör kB'nin (İKB) yıkımı, NF-kB'nin öncüllerinin yıkımı ve TAK1'in (TGF-beta ile etkinleşen kinaz 1) etkinleşmesi (Skaug ve ark., 2009).



Şekil 6. 26S Proteozom Kompleksi Tarafından Düzenlenen NF-kb'nin Fonksiyonları (Frankland-Searby ve Bhaumik, 2012)

NF-kB alt birimlerinin etkinliği proteozom aracılığıyla düzenlenir ve çalışmak için proteolize ihtiyaç duyar. NF-kB'nin etkinliği, İKB ile engellenir ve uyarılmayan hücrelerde inaktif halde kalmasını sağlar. NF-kB ile düzenlenen gen ürünleri proapoptotik ve anti-apoptotik olarak ikiye ayrılabilir. Proapoptotik ürünler arasında p53, Fas, TNF, Kaspaz 1, TRAIL, c-Myc ve Fas ligand gibi moleküller yer alırken antiapoptotik olanlar arasında siklin D1, COX-2 (siklooksijenaz-2), Bcl-2, TRAF-1 (TRAIL ile ilişkili faktör 1) ve 2, Survivin ve MnSOD (mangan süperoksit dismutaz) yer alır. (Shishodia ve Aggarwal, 2002; Spataro ve ark., 1998; Deshaies, 1995)

NF-kB muhtemelen doku orijininin ziyade ölüm uyarısının durumu ile belirlenen anti ve proapoptotik fonksiyonların her ikisini de gösterir. Uygun fizyolojik durumlarda, NF-kB'nin aktivasyonu bir sürü kompleks proteinin aktivasyonu yoluyla apoptotik uyarıya dirence neden olur.

Bununla beraber, belirli uyarılara tepki olarak NF-kB aktivasyonu apoptozun indüklenmesine yol açabilir. Bu kaspaz-1 gibi kaspazlar, interferon-düzenleyicili faktör-1, c-myc, ve p53 gibi bazı proapoptotik proteinlerin aktivasyonu ile açıklanabilir. (Ghobrial ve ark., 2005)

Tümör gelişimine yardımcı olan sitokin (cytokine)'lerin çoğu NF-kB transkripsiyon faktörleri aracılığıyla aktif hale getirilir veya öncü kanser (prealignant) hücrelerde ve immün/inflamatuvar hücrelerinde NF-kB sinyalleşmesini aktif hale getirir. NF-kB'nin kolorektal ve kolitis-bağımlı tümörögenizde belirgin bir rolü vardır. Kolorektal ve kolitis-bağımlı tümörlerin % 50'sinden fazlasında tipik olmayan NF-kB aktivasyonu belirlenmiştir (Terzic ve ark., 2010).

Ayrıca, Hodgkin lenfomada, B hücreli lenfomada ve T hücreli lenfomada NF-kB'nin sürekli ekspresyonu gösterilmiştir (Jeay ve ark., 2002).

Ubikütün/Proteozom Sistemi

Bu sistem geniş bir proteinaz kompleksinden oluşmakta olup, hücre büyümesi ve apoptozu düzenlemeden sorumludur. Protein yıkımı oldukça koordineli bir işlem olup ubikütün moleküllerine bağlanarak proteinin tanınmasını ve 26S proteozomu ile sindirilmesini içerir (Ghobrial ve ark., 2005).

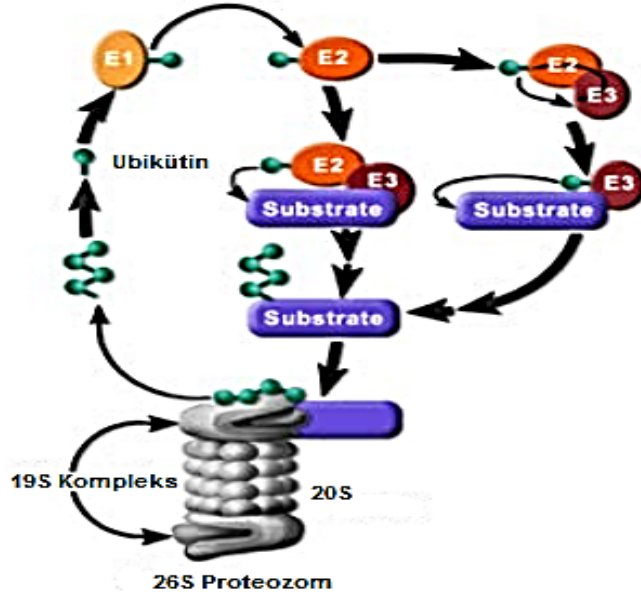
Ciechanover ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda ubikütün molekülünü keşfetmiş ve protein yıkımında rolünü belirlemişlerdir (Mani ve Gelmann, 2005).

Ökaryotik hücrelerde seçici protein yıkımı, genellikle yıkılacak olan proteine ubikütün moleküllerinden oluşan bir zincir eklenip 26S proteozoma yönlendirilerek burada peptidlere kadar yıkılması ile meydana gelir (Hershko ve Ciechanover, 1998; Yerlikaya, 2004).

Ubikütün molekülü anormal bir hücrenin malign hücreye dönüşümüyle ilgili hücre içi sinyaller, hücre proliferasyonu, bağışıklık yanıtı ve transkripsiyonun düzenlenmesi gibi birçok moleküler homeostatik mekanizmaya katılır. Ubikütün, 76 aminoasitlik küçük bir peptid olup hedef substratlara E1 (ubikütün aktifleştirici enzim), E2 (ubikütün konjuge edici enzimler) ve E3 (ubikütün ligaz) denen 3 enzimin sırasıyla etkinleşmesi ile bağlanan ve onları proteozom adlı hücre içi organelde hedef gösteren bir moleküldür (Spataro ve ark., 1998).

Proteinlerin katlanması ya da protein komplekslerinin oluşumu endoplazmik retikulumda organelde gerçekleşir. Yanlış katlanan proteinler endoplazmik retikulum şaperonlarını içeren bir sistem tarafından tanınır, çoklu ubikütünlerle işaretlenir (poliubikütünlenme) ve 26S proteozom aracılığıyla yıkılır (Yewdell, 2001; Rudd ve ark., 2002).

Yeni sentezlenen proteinlerin yaklaşık üçte biri sentezlendiği dakikada proteozomlar tarafından yıkılır (Yewdell, 2001).



Şekil 7. Ubikütün-Proteozom Yolu ve 26S Proteozomun Bileşenleri (E1: Ubikütün aktive edici enzim, E2: Ubikütün konjuge edici enzim, E3: Ubikütün ligaz) (http-4)

26S Proteozom

26S proteozom, çoğunlukla Ubikütün ile işaretlenmiş proteinlerin yıkıldığı, tüm hayat formlarında bulunan ve yaklaşık 64 alt birimden oluşan büyük bir proteazdır. 26S proteozom, sitoplazma ve çekirdekte bulunan multikatalitik bir proteazdır. Görevleri arasında, hücre içindeki birçok kısa ve uzun ömürlü proteinlerin miktarlarını kontrol etmenin yanı sıra hatalı katlanmış-anormal proteinlerin yıkımı, hücre döngüsü proteinleri olan siklinlerin, transkripsiyon faktörlerinin işlenmesi ve yıkımı, hücre döngüsünün durdurulması, immün-cevap ve apoptozis bulunmaktadır. 26S proteozomda yıkılan proteinlerin bazıları; p53, c-Myc (onkoprotein), IκB (NFκB inhibitörü), β-catenin, Bax, tBid, siklinlerdir. 26S proteozom, bir adet 20S proteozom ve iki adet 19S düzenleyici kompleksi içerir ve 2.5 MDa ağırlığındadır (Kalejta ve Shenk, 2003).

Proteozom inhibisyonu

Proteozom inhibisyonu, klinikte etkili bir antikanser tedavi yaklaşımı olarak son on yıl içinde ortaya çıkmıştır. Bu durum öncelikle hematolojik malignansiler için geçerlidir (Dick ve Fleming, 2010).

Proteozom inhibitörleri, proteozomların fonksiyonlarını inhibe eder, protein yapımını güçleştirir ve çoklu sinyal iletimini engellerler. Sinyal iletimi kesilince kanserli hücreler ölür ve tümörün büyümesi baskılanır (Karp, 1999).

Son zamanlarda yapılan bir çalışmada; kanser hastalarının sağlıklı bireyler ile karşılaştırıldığında, plazmalarında 20S proteozom miktarının 1000-kat kadar yükseldiğini göstermiştir. Bu çalışmalar, proteozom inhibitörlerinin spesifik olarak çoğalabilen hücrelerde apoptoza neden olduklarını; dolayısıyla, diğer anti-kanser ilaçlara göre avantajlı durumda olduklarını ve kanser tedavisinde daha etkili olabileceklerini göstermektedir (Dutaud ve ark., 2002)

Antitümör etkiler için 26S proteozom kompleksi hedef alınarak birçok proteozom inhibitörü geliştirilmiş ve test edilmiştir. Bu proteozom inhibitörleri, farklı tümör tiplerinde apoptozu harekete geçirerek antitümör fonksiyonu göstermiştir. Dahası bu proteozom inhibitörlerinin anjiyogenezi, hücre hücre adezyonunu ve migrasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir. Klinikte birçok proteozom inhibitörü için multipl myeloma ve katı tümörlerin tedavisi için çalışmalar bulunmaktadır. Proteozom inhibitörlerinden olan Bortezomib şu an klinikte multiple myeloma ve mantle hücreli lenfoma tedavisinde kullanılmaktadır.

Tablo 2. 26S proteozom inhibitörlerinin hedefleri ve klinik durumları (Frankland-Searby ve Bhaumik, 2012)

26S proteozom inhibitörleri	26S proteozom hedefi	Klinik Durumu
Bortezomib	Kimotripsin benzeri aktivite	MM ve MCL için onaylı
Carfilzomib	Kimotripsin benzeri aktivite	MM'de faz III, AML ALL ve CLL'de faz I, solid tümörlerde faz Ib/II
ONX0912	Kimotripsin benzeri aktivite	Solid tümörlerde faz I
NPI-0052	Kimotripsin benzeri, tripsin benzeri ve kaspaz benzeri aktiviteler	MM, solid tümör, refrakter lenfoma ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde faz I
CEP-18770	Kimotripsin benzeri aktivite	MM'de faz I/II
MLN9708	Kimotripsin benzeri aktivite	MM'de faz I/II Hematolojik olmayan malignansilerde ve lenfomada faz I

MM: multiple myeloma, **MCL:** mantle hücreli lenfoma, **AML:** Akut Miyeloid Lösemi **ALL:** . Akut Lenfositik Lösemi **CLL:** Kronik Lenfositik Lösemi.

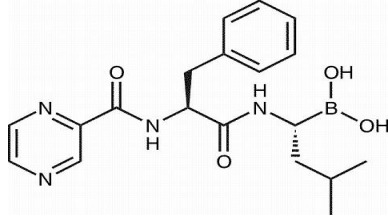
Bortezomib

Bortezomib, diğer isimleriyle Velcade, PS-341, birçok kanser hücre hattına karşı yüksek etki gücüne sahiptir. Özellikle multiple myeloma da spesifik etkinlik göstermesiyle birlikte, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, mantle hücreli lenfoma ve pankreas kanserinde de etkili bulunmuştur (Scagliotti, 2006; Aghajanian ve ark., 2002; Richardson ve ark., 2003; Kumar ve ark., 2011; Papandreou ve Logothetis, 2004).

Bortezomib FDA onayı alan ilk proteozom inhibitörü olma özelliğine sahiptir (Ma ve ark., 2003; Mitsiades ve ark., 2003).

İlk olarak FDA bortezomib’i 2003 yılında multiple myelomun 3. basamak tedavisi için (önceden en az iki tedavi görmüş) onaylamıştır (Kane ve ark., 2006).

Daha sonra ise FDA 2008 yılında ilk basamak tedavi için onay vermiştir. Ayrıca Bortezomib’in mantle hücreli lenfoma tedavisine de 2006 yılında onay gelmiştir (Kane ve ark., 2007)



Şekil 8. Bortezomib’in Kimyasal Formülü

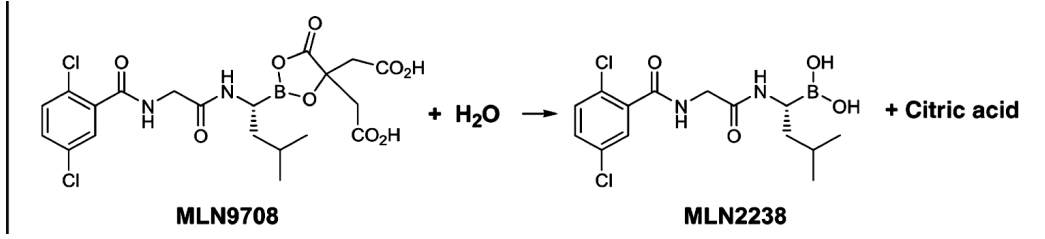
Kanser hücrelerini öldürmesine rağmen bortezomib’in hücresel mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir. Ancak bortezomib’in hücreleri öldürme etkinliği için birçok mekanizmanın sorumlu olduğu düşünülmüştür. Bunlar, hücre adezyonunun bozulması, sitokin bağımlı yaşam yollarının kesilmesi (NF-kB gibi), anjiyogenezin inhibe olması, endoplazmik retikulum stresinin aktivasyonu, pro-apoptotik genlerin upregülasyonu ya da anti-apoptotik genlerin down-regülasyonudur (Yew ve ark., 2005; Brüning ve ark., 2011).

Proteozom inhibitörü Bortezomib’in İmatinib’e duyarlı ve dirençli KML hücre dizilerinde apoptozi arttırdığı, G2/M fazı hücre siklusu duraklamasını tetiklediği ve çoğalmayı inhibe ettiği gösterilmiştir. Bununla beraber imatinib ile eş zamanlı kombine olarak verildiğinde büyümenin inhibisyonunda karşıt bir etkileşim ortaya çıkmaktadır, bu nedenden dolayı ardışık verildiklerinde aditif etki ortaya çıkmaktadır (Melo ve Chuah, 2008)

MLN9708

MLN9708 insan tümörlerinin geniş bir aralığını tedavi etmek için geliştirilen ikinci nesil proteozom inhibitörüdür (Kupperman ve ark., 2010).

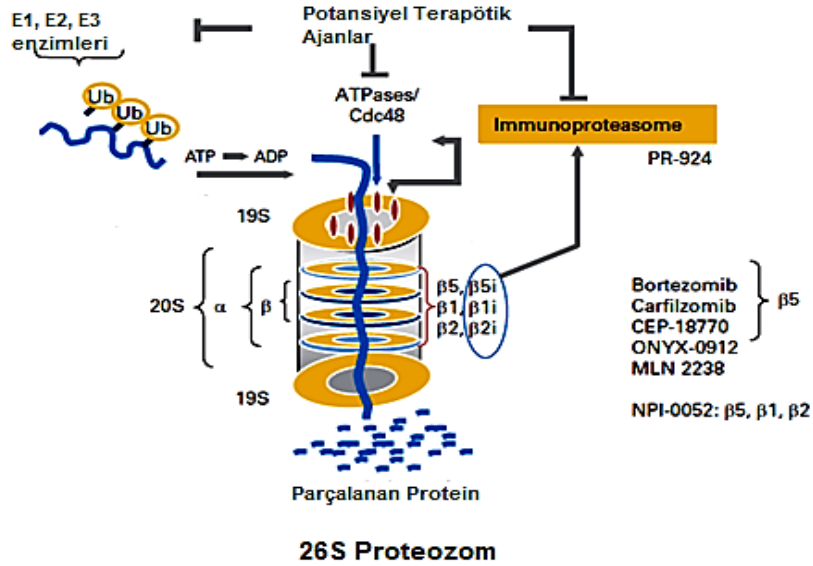
MLN9708 bor içeren küçük bir peptid inhibitör molekülüdür. Bortezomib’in aksine MLN9708 oral olarak biyoyararlanıma sahiptir. Bortezomib’e benzer olarak ise proteozomu kimotripsin benzeri aktiviteyle (β_5) inhibe eder. Bununla birlikte MLN9708’in 20S proteozom ayrışma yarı ömrü Bortezomib’den daha kısadır (6 kat daha hızlıdır) bu yüzden MLN 9708 doku dağılımında Bortezomib’e göre avantajlı olduğu düşünülmektedir. MLN9708 biyolojik olarak inaktiftir ancak plazmada hızlı bir şekilde hidrolize olarak biyolojik aktif formu olan MLN2238’e dönüşür. MLN2238 birçok kanser hücre hattına karşı güçlü antikanser aktivite gösterir (Chauhan ve ark., 2011; Kupperman ve ark., 2010).



Şekil 9. MLN9708'in MLN2238'e Hidrolize Olması (Edmund ve ark., 2011)

Bortezomib 20S proteozomunda β bölgesinin 3 alt ünitesine de bağlanabilmesine rağmen genellikle β_5 alt ünitesine bağlanmaya eğilimlidir ve burayı inhibe eder (Kupperman ve ark., 2010; Adams ve ark., 1998)

MLN2238, 20S proteozomun β_5 altünitesine bağlanarak kültüre edilen kanser hücrelerinde inhibisyon ve güçlü aktivite göstermektedir. Ayrıca yüksek konsantrasyonlarda β_1 ve β_2 alt ünitesine de bağlandığı ve inhibe ettiği bulunmuştur (Marblestone, 2009).



Şekil 10. Bortezomib ve MLN2238'in Bağlanma Bölgelerinin Gösterilmesi ve 26S Proteozom (Anderson, 2012)

MLN9708'in etkileri, solid tümörler ve hematolojik malignansiler de, prelinik olarak araştırılmaya başlanmıştır (Kupperman ve ark., 2010).

Bu bağlamda şu an klinikte lenfomalı ve solid tümürlü hastalarda faz I aşamasındadır. Ayrıca MLN9708'in multiple myeloma için klinik faz I/II çalışmaları devam etmektedir (Crawford ve ark., 2011).

Biz de bu çalışmada, yeni bir proteozom inhibitörü olan MLN9708'i, FDA onaylı bir ilaç olan Bortezomib ile karşılaştırarak hem hematolojik malignansilerde, hem de solid tümörlerde etkilerini belirlemeyi amaçladık. İnsan K562 lösemi hücre hattı ve Caco2 insan kolorektal hücre hattı üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkilerini, proteozom inhibitörlerinin etki yolağı üzerinde anahtar rol oynayan NF-kB ve c-myc ekspresyon düzeylerini belirledik.

GEREÇLER

Kullanılan Kimyasal Maddeler ve İlaçlar

- 0,2 ml'lik PCR tüpü (Greiner bio-one, Amerika).
10, 100, 1000 ve 5000 µl'lik otomatik pipetör (Eppendorf, Kanada),
10, 200, 1000 µl'lik mikropipet ucu (Greiner bio-one, Amerika),
12 kanallı otomatik pipet (Axygen, İngiltere),
15 ve 50 ml'lik santrifüj tüpleri (Isolab, Almanya),
25 cm²-75 cm²'lik hücre kültür flaskı (Greiner bio-one, Amerika)
2ml'lik Ependorf tüp (Greiner bio-one, Amerika),
5 ve 10 ml'lik steril enjektör (Aysel, Türkiye),
5-10 ve 25 ml'lik cam pipet (Isotherm, Türkiye),
6 ve 96 kuyucuklu hücre kültür plakası (TPP, İsviçre),
Annexin V Fitc Apoptosis Detection Kit 100 test, cat no:556547 (BD Biosciences, Amerika)
Bortezomib (BioChemica - A7737, Almanya)
Cedex smart Slide (Roche, Almanya),
Dimetilsülfoksit (DMSO) (Sigma-Aldrich, Almanya),
Fetal Bovine Serum (FBS) (Sigma-Aldrich, Almanya),
Filtre (Sartorius stedim, Almanya);
Kryotüp (2ml) (Greiner bio-one, Amerika),
Lamel (Isolab, Almanya),
L-glutamin (Sigma-Aldrich, Almanya);
MitoScreen (JC-1) Kit Cat no:551302 (BD Biosciences, Amerika)
MLN2238 (20 mg) (Activebiochem, Katalog No:A1226, Amerika)
Parafilm (Pechiney, Fransa),
pH indükator kağıdı (Macherey- Nagel, Almanya)
RPMI-1640 medyum (1X) (HyClone, Thermo Scientific),
Sodyum pirüvat (Biochrom AG, Almanya),
Şarjlı pipetör (Starlab, Almanya),
Tripan mavisi (Roche, Almanya),
Trypsin-EDTA 10X (Pan, Biotch),
WST-1 sitotoksosite kiti (25 ml) Cat no: 11644807001 (Roche, Almanya)

Kullanılan Cihazlar

Cedex (Innovatis),
Derin dondurucu buzdolabı (Altus),
DNA-RNA çalışma kabini HEPA/UV PCR (UVP),
Akış sitometri cihazı (BD. FACS Aria)
Hassas terazi (Ohaus),
İnverted mikroskop (Leica),
Laminar Flow kabin (Heal Force),
Light Cycler 480® (Roche),
MagNA Lyser (Roche),
MagNA Pure Compact (Roche),
Masaüstü soğutmalı santrifüj (Eppendorf),
Mikro santrifüj (Hettich),
Mikroplaka okuyucu (ELİSA) (BioTek),
NanoDrop 2000 Spektrofotometre (Thermo Scientific),
Otoklav (Alp),
Otomatik pipetler (Eppendorf),
PCR Thermal Cycler (Gradient PCR) (Takara),
Steril CO₂ inkübatörü (Thermo Scientific),
Sterilizatör (Nüve)
Su banyosu (Nuve),
Vorteks (Daihan)

YÖNTEMLER

Deneylerde Kullanılan Hücreler

Kronik myeloid lösemi hücre hattı (K562)

Çalışmamızda kullanılan hücreler ATCC (Amerikan Tissue Culture Collection)'den sağlanmıştır. (ATCC kodu: CCL-243)

İnsan kolon adenokarsinom hücre hattı (Caco2)

Çalışmamızda kullanılan hücreler ATCC (Amerikan Tissue Culture Collection)'den sağlanmıştır. (ATCC kodu: HTB-37)

Kullanılan Araç ve Gereçlerin Hazırlanması

Kullanılan malzemelerin steril edilmesi

Çalışmalarda kullanılacak cam ve metal malzemeler alüminyum folyolara sarılı olarak sterilizatörde 180°C'de 2 saat, sıvı solüsyonlar ise otoklavda 121°C, 1.5 atm/Hg'de 20 dakika steril edilmiştir. Kullanılan tüm sıvı kimyasallar selüloz nitrat filtreden geçirilerek steril edilmiştir (Jakoby ve Pastan, 1979).

Kullanılan ilaçların hazırlanması

Bortezomib

Toz halindeki Bortezomib'ten (BioChemica - A7737, Almanya) dimetilsülfoksit (DMSO; Sigma) içinde çözülerek 500 mM konsantrasyonda ana stok hazırlanmıştır. Bu stok solüsyondan, kültür medyumunda çeşitli seyreltme işlemleri yapılarak, 0.01, 0.1, 5, 10, 20, 30 µM Bortezomib konsantrasyonları hazırlanmıştır. En yüksek Bortezomib konsantrasyonunda DMSO oranı % 0.1 oranında olduğu için kontrol grubuna da medyum içinde %0.1 oranında DMSO uygulanmıştır. Bortezomib'den hazırlanan ana stok, aliquatlanarak -20°C'de saklanmıştır. Deneyde kullanılan bortezomib konsantrasyonları da her deney tekrarında taze hazırlanarak kullanılmıştır.

MLN2238

Toz halindeki MLN2238'den (Activebiochem, Amerika) dimetilsülfoksit (DMSO; Sigma) içinde çözülerek 30 mM konsantrasyonda ana stok hazırlanmıştır. Bu stok solüsyondan, kültür medyumunu kullanarak çeşitli seyreltme işlemleri yapılarak 0.01, 0.1, 5, 10, 20, 30 µM MLN2238 konsantrasyonları hazırlanmıştır. En yüksek MLN2238 konsantrasyonunda DMSO oranı % 0.1 oranında olduğu için kontrol grubuna da medyum içinde %0.1 oranında DMSO uygulanmıştır. MLN2238 den hazırlanan ana stok, aliquatlanarak -80°C'de saklanmıştır. Deneyde kullanılan MLN2238 konsantrasyonları da her deney tekrarında taze hazırlanarak kullanılmıştır.

Hücre Kültürü Çalışmaları

Caco2 ve K562 hücrelerinin kültür ortamında çoğaltılması ve deneylere hazırlık

Kolorektal adenokarsinom hücre hattı (Caco2) ve kronik miyeloid lösemi (K562) hücreleri, %10 fetal bovine serum, %1 penisillin/streptomisin, %1 L-glutamin ve %1 amfoterisin içeren RPMI-1640 besiyerinde, % 5 CO₂'li etüvde,%95 bağıl nem'de 37 °C'de süspansiyon kültür ortamında çoğaltıldı. Kültür kabı %70 oranında hücre yoğunluğuna sahip olduğu zaman (yaklaşık 2-3 gün) alt kültürlerle ayrılarak büyümesi sağlandı. Çoğaltılan hücrelerin bir kısmı -80 °C'de stoklanarak çalışmanın sonraki deneyleri için stoklandı.

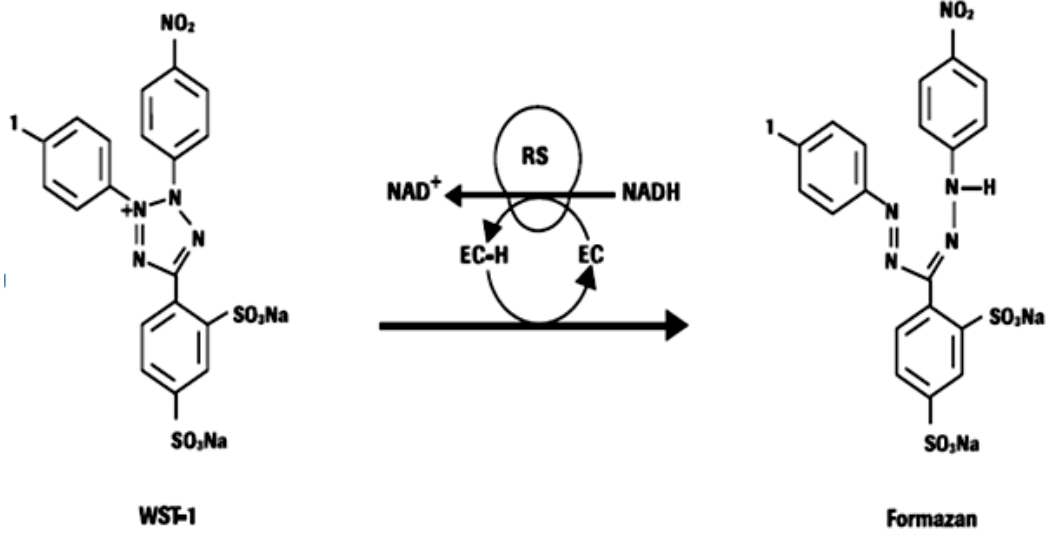
Hücre sayımları

Flasklarda bulunan K562 ve Caco2 hücreleri PBS ile yıkanmıştır. Caco2 hücreleri için kültür kabının büyüklüğüne ve hücrenin yoğunluğuna bağlı olarak, flaska 250-450 µL 1X tripsin konmuş, bir iki dakika inkübatörde bekletilerek hücrelerin yapıştıkları flasktan kalkmaları sağlanmıştır. Tripsinin etkisini nötralize etmek için, kalkan hücrelerin üzerine hemen besiyeri ilave edilerek, besiyeri-hücre karışımı santrifüj tüpüne aktarılmıştır. K562 hücreleri ise non-adhere hücre olma özellikleri nedeniyle flasktan direkt santrifüj tüpüne alınmışlardır. 1200 rpm' de 5 dakika santrifüj sonrasında, pelet üzerine yeni besiyeri eklenmiş ve pipetleme yapılmıştır. WST-1, Annexin-V/PI, Kaspaz-3, Jc-1 ve RT-PCR yöntemleri uygulanmadan önce K562 ve Caco2 hücreleri tripan mavisi solüsyonu ile boyanarak hücre sayıcı cihaz (Cedex-Roche) ile sayılmıştır.

WST-1 yöntemi ile sitotoksitenin belirlenmesi

WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate), bir tetrazolyum tuzu olup, canlı hücrelerin mitokondrilerinde süksinat-dehidrogenaz enzimine spesifik olarak bağlanır ve suda çözünmeyen formazan tuzlarına dönüşür. Bu dönüşüm canlı hücrelerde nikotinamid adenin dinükleotit fosfatın glikolitik üretimine bağlıdır. Bu nedenle oluşan formazan miktarı direkt olarak kültürde metabolik olarak aktif hücreleri (canlı hücreleri) göstermektedir WST-1 yönteminde spektrofotometrik olarak ölçülen absorbans değeri, kültürdeki hücrelerin metabolik aktivitelerini gösterir ve bu değer de yaşayan hücre sayısı ile ilişkilidir. Proliferasyon arttıkça, formazan tuzu oluşumuna bağlı olarak absorbans değeride artış gösterir (Carmicheal ve ark., 1987; Lian ve ark., 2003) (**Şekil 11**).

WST-1 toksik olmayan, suda çözünebilen membran-geçirgen ürünlere metabolize edilir, böylelikle kültürde kolayca diffüze olmaktadır. Bu nedenle WST-1, hücre kültürlerinin canlılığını riske atmaz ve arada çözünme gibi başka bir aşama içermediği için uygulanmaları MTT ile karşılaştırıldığında daha kolaydır (Galluzi ve ark., 2009).



Şekil 11. WST-1 Tetrazolyum Tuzunun Formazan Tuzuna Dönüşümü (RS: Mitokondrial Süksinat- Tetrazolyum Redüktaz Sistemi)

Metodun uygulanması

K562 ve Caco2 hücreleri %10'luk Fetal Bovine Serum ve %1 Penisilin-Streptomisin içeren RPMI-1640 ortamında, 37°C' de %5 CO₂ inkübatöründe kültüre edilmiştir. Hücreler yeterince çoğaldıktan sonra hücre sayımı yapılarak, 96 kuyucuklu plakalara her bir kuyucukta 5.000 hücre olacak şekilde besiyeri ortamında ekilmiştir. Caco2 hücrelerini yapışmaları için 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. K562 hücreleri süspansiyon oldukları için konsantrasyonların verilmesi için 3-4 saat beklenmiştir. DMSO'da çözülerek hazırlanmış olan MLN2238 ve Bortezomib stok solüsyonundan hücre kültür besiyeri içinde gerekli seyreltmeler yapılarak uygun MLN2238 ve Bortezomib konsantrasyonları (0.01, 0.1, 1, 5, 10, 20 ve 30 µM) hazırlanmıştır. Kuyucuklara taze olarak kültür besiyerinde hazırlanan MLN2238 ve Bortezomib konsantrasyonları uygulanmıştır. Kontrol grubundaki hücrelere de %0.1 oranında DMSO içeren besiyeri uygulanmıştır. Daha sonra plakalar 24 ve 48 saatlik inkübasyonlara bırakılmıştır. İnkübasyon süreleri sonunda her bir 96'lık kuyucuktaki hücreler üzerine, WST-1 kit (Katalog no:11644807001, Roche) prosedürü talimatlarına göre 10 µL WST-1 reaktifi ilave edilerek, hücreler 3 saat inkübatörde inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda absorbanslar 420 nm dalga boyunda ELİZA okuyucu cihazında, her bir grupta 7 kuyucuk olacak şekilde okunmuştur. Deneyler bir birinden bağımsız 3 tekrar olarak çalışılmıştır. Renk oluşumuna göre alınan absorbans değerleri, hücre canlılığı ile direkt olarak ilişkilendirilmiştir. Sonuçlar canlılık formülüne göre hesaplanıp % canlılık olarak belirlenmiştir.

$$\% \text{ canlılık} = \frac{\text{Örneğin absorbans değeri}}{\text{Kontrolün absorbans değeri}} \times 100$$

Akış Sitometri Cihazında Yapılan Deneyler

Akış sitometride Annexin V-PI yöntemi ile apoptotik etkinin belirlenmesi

Bu yöntem, sağlıklı hücre zarlarının iç kısmında bulunan fosfatidilserinin apoptotik hücrelerde hücre zarının parçalanması ile birlikte hücrenin dış kısmına çıkması temeline dayanır (Boğa, 2009).

Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde membran lipidlerinden biri olan fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Eğer hücre apoptoza giderse normalde iç yüzde yerleşmiş olan PS molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar. Bu yer değiştirme hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana gelir. AnnexinV, hücrenin dış yüzeyine yerleşen fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olduğu için, floresan bir madde (örn. FITC) ile işaretlenerek apoptotik hücre görünür hale getirilebilir (Gatti ve ark., 1998; Kopman ve ark., 1994; Overbeeke ve ark., 1998; Zhang ve ark., 1997).

Propidyum iyodid (PI) ise, DNA ya da çift sarmallı RNA'ya bağlandığından, membran yapısı bozulmuş geç apoptotik ve nekrotik hücrelerin tespitinde kullanılmaktadır (Boğa, 2009).

FITC ve Annexin V'in hücre yüzeyindeki fosfatidilserine bağlanma oranı akış sitometri ile ölçülebilmektedir. Nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de Annexin V bağlanması görülebildiği için ikinci boya olarak propidyum iyodür eklenmektedir. Annexin V-FITC (green fluorescence) ve non-vital boya olan propidium iodide (red fluorescence) ile aynı zamanda boyanan hücreler, canlı hücreler ([Annexin-V - /PI -]), erken apoptotik hücreler ([AnnexinV+ / PI -]), geç apoptotik hücreler ([Annexin-V+ /PI +]) ve nekrotik hücrelerin ([Annexin-V- /PI +]) birbirinden ayırt edilmesine izin verir (Overbeeke ve ark., 1998; Tesarik ve ark., 1998).

Metodun uygulanması

Bu çalışma için Annexin V Fitc Apoptosis Detection Kit (Katolog no: 556547, BD) protokolü uygulanmıştır. K562 ve Caco2 hücreleri %10'luk Fetal Bovine Serum ve %1 Penisilin-Streptomisin içeren RPMI-1640 ortamında, 37°C' de %5 CO₂ inkübatöründe kültüre edilmiştir. Hücrelerin yeterince çoğalması beklendikten sonra hücre sayımı yapılarak hücreler 6 kuyucuklu plakalara her bir kuyucukta 1×10^5 hücre olacak şekilde besiyeri ortamında ekilmiştir. Caco2 hücrelerini yapışmaları için 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. K562 hücreleri süspansiyon oldukları için konsantrasyonların verilmesi için 3-4 saat beklenmiştir. DMSO'da çözülerek hazırlanmış olan MLN2238 ve Bortezomib stok solüsyonundan hücre kültür besiyeri içinde gerekli seyreltmeler yapılarak WST-1 testinin sonuçlarına göre seçilen uygun MLN2238 ve Bortezomib konsantrasyonları (1, 5, 10 ve 20 μ M) hazırlanmıştır. Kuyucuklara taze olarak kültür besiyerinde hazırlanan MLN2238 ve Bortezomib konsantrasyonları uygulanmıştır. Kontrol grubundaki hücrelere de %0.1 oranında DMSO içeren besiyeri uygulanmıştır. Daha sonra plakalar 24 ve 48 saatlik inkübasyonlara bırakılmıştır. İnkübasyon süreleri sonunda her bir 6'lık kuyucuktaki hücreler kaldırılarak 1200 rpm'de 5 dakika sentrifüj edilmiş ve supernatant uzaklaştırılmıştır.

Hücre peleti 2 ml soğuk PBS 2 kez yıkanmıştır. Son yıkamadan sonra kalan pellet 100 µl PBS ile resuspanse edilerek flow tüpüne aktarılmış, üzerine 5 µl Annexin V ve 3 µl PI ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 20 dakika inkübasyona bırakılan tüplerin inkübasyon sonunda 250 µl “Annexin V bağlama tamponu” eklenerek 30 dakika içinde akış sitometri cihazında okuması yapılmıştır.

Akış sitometride Kaspaz-3 aktivasyonu ile apoptotik etkinin belirlenmesi

Kaspazlar gerek ölüm reseptörleri yolu, gerekse mitokondriyal apoptozda rol alan proteazlardır (Kaufmann ve Hengartner, 2001).

Kaspaz-3, apoptoz mekanizmasının tamamlanma fazında yer alan ve apoptozun sonlandırılmasından sorumlu (sonlandırıcı) kaspazlardan biridir. Kaspaz-3 hem dışsal apoptotik yolak üzerinden hem de içsel (mitokondriyal) apoptotik yolak üzerinden aktive olabilir. Kaspaz-3, kromatin kondensasyonundan, DNA fragmentasyonundan ve hücre iskeletine ait proteinlerin yıkımından sorumludur. Bu nedenle bir hücrede kaspaz-3 enzim aktivitesinin belirlenmesi, o hücrenin apoptoza gittiğinin en önemli kanıtlarından biridir (Slee ve ark., 2001).

Özellikle kaspaz 3, 8 ve 9 apoptozda daha büyük öneme sahiptir; kaspaz-9 mitokondriyal yolakta, kaspaz-8 Fas/CD95 yolağında önemli rol oynarken, kaspaz-3 ise çoklu yolaklar ile aktivitesini göstermektedir.

Kaspaz-3 aktivitesi;

- Western Blot
- İmmünohistokimya
- Akış sitometri
- ELIZA

Yöntemleri kullanılarak belirlenebilmektedir.

Aktif kaspaz-3 apoptoza giden hücrelerin güçlü bir göstergesi olarak ortaya çıkmıştır ve apoptozun varlığına işaret olarak kabul edilir. Apoptozun erken aşamalarında aktif hale gelmesi de önemli bir proteaz olduğunu göstermektedir.

Kit içeriğinde kullanılan solüsyonlar ile (Cytotfix/Cytoperm) hücreler önce geçirgen hale getirilmiş ve daha sonra PE Rabbit Anti-Aktif kaspaz-3 ile boyanarak akış sitometri cihazında analizi yapılmış ve aktif kaspaz-3 yüzdeleri belirlenmiştir.

Metodun uygulanması

Kaspaz-3 aktivasyonunun belirlenmesinde PE Active Caspase-3 Apoptosis Kiti (Katalog NO: 550914, BD) kullanılmıştır. K562 ve Caco2 hücreleri 1×10^5 hücre/ml yoğunluğunda olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. Hücreler MLN2238 ve Bortezomib ile WST-1 ve Annexin V-PI testi sonuçlarına göre belirlenen uygun konsantrasyonlarda (1, 5, 10 ve 20 µM) ve zamanlarda (24 ve 48 saat) inkübasyona tabi bırakılmıştır. İnkübasyon süreleri sonunda her bir 6'lık kuyucuktaki hücreler kaldırılarak 1200 rpm'de 5 dakika sentrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır.

Hücre peleti soğuk PBS ile 2 kez yıkanmıştır. (Birinci yıkamada 1000 µl ve ikinci yıkamada 2000 µl PBS kullanılmıştır). Son yıkamadan sonra tüplerin üzerindeki süpernatant dökülmüş ve pelletin üzerine fiksasyon ve hücrelerin geçirgenliğini sağlamak için, 500 µl cytofix/cytoperm solüsyonu ilave edilerek 20 dk buzun içinde bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda 1200 rpm de 5 dk santrifüj yapılmış ve pellet 2 kez 500 µl “perm wash” ile yıkanmıştır. Son yıkamadan sonra hücre pelleti 50 µl perm wash ile resüspanse edilerek üzerine 10 µl antibody (PE Rabbit Anti kaspaz-3) eklenmiş ve 30 dk oda ısısında inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda her bir tüpe 1000 µl perm wash ilave edilerek santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda pellet 350 µl perm wash ile flow tüpüne aktarılarak akış sitometri cihazında analiz edilmiştir.

Akış sitometride JC-1 boyama yöntemi ile hücrelerin mitokondrial membran bütünlüğünün belirlenmesi

Bazı çalışmalar mitokondriyal geçirgenlik transisyon por açıklığının apoptoza yol açan süreçler için önemli bir kanıt olduğunu göstermiştir (Dispersyn ve ark., 1999)

Apoptozda mitokondriyal bozukluğu içeren iki önemli etken ortaya konmuştur. Bu etkenlerden biri mitokondri zarının geçirgenliğinin değişmesi ve bunu takip eden membran potansiyelinin kaybolması ikincisi de, mitokondrinin iç membran boşluğundan sitozole AIF (Apoptosis inducing factor) ve sitokrom c gibi apoptotik proteinlerin salınmasıdır (Chen ve ark., 2008).

Mitokondriyal membran potansiyelinin belirlenmesi için katyonik voltaj bağımlı bir boya olan JC-1 (5,5', 6,6'- tetrachlo-1,1', 3,3'- tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide) den faydalanılır. Bu boya mitokondriyal membran potansiyeli'nin polarizasyon durumunu gösteren bir boyadır (Iijima, 2006).

Mitokondriyal membran potansiyelinin kaybolması apoptozun bir göstergesidir. JC-1, hücrelerde mitokondriyal membran potansiyelini ölçer. Sağlıklı hücrelerde JC-1 mitokondriyi kırmızıya boyar. Apoptotik hücrelerde ise mitokondriyal membran potansiyeli çöker. JC-1 mitokondrilerin içinde birikemez. Bu hücrelerde JC-1 sitoplazmada yeşil floresan monomerik yapısında kalır (Yao ve ark., 2007).

Metodun uygulanması

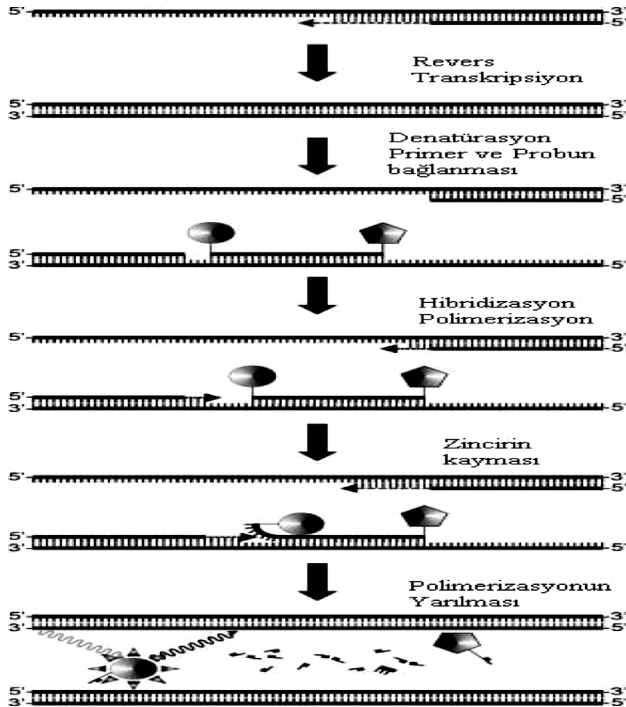
Hücrelerin mitokondriyal membran bütünlüğünün belirlenmesinde akış sitometri mitokondriyal membran potansiyeli belirleme kiti (katolog no: 551302 ,BD) kullanılmıştır. K562 ve Caco2 hücreleri 1×10^5 hücre/ml yoğunluğunda olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. Hücreler MLN2238 ve Bortezomib ile WST-1, Annexin V-PI testlerinin sonuçlarına göre belirlenen uygun konsantrasyonlarda (1, 5, 10 ve 20 µM) ve zamanlarda (24 ve 48 saat) inkübasyona tabi bırakılmıştır. İnkübasyon süreleri sonunda her bir 6'lık kuyucuktaki hücreler kaldırılarak 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Her bir tüpe kit içeriğinde ki bileşenler uygun şekilde karıştırılarak elde edilen çalışma solüsyonu eklenmiş ve 37°C'de 15 dakika etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda hücreler yine kit içinde bulunan 1000 µl Assay solüsyonu ile yıkanmıştır.

Yıkama işleminden sonra, hücreler 250 µl Assay solüsyonu ile süspansiyon edilmiş ve akış sitometri cihazında analize tabi tutulmuştur.

Real Time (Gerçek Zamanlı)- PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Yöntemi ile NF-kB ve c-myc mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), herhangi bir organizmaya ait genomik DNA'daki özgül bölgelerin çoğaltılması için kullanılan bir yöntemdir ve bunun için sadece DNA örnekleri kullanılmaktadır. Ancak, hücrelerden elde edilen RNA'lar, polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılmadıklarından, önce revers transkriptaz ile komplementer DNA'ya (cDNA) çevrilirler. Bu olaya revers transkripsiyon denir (Bustin, 2000).

TaqMan sisteminde 5' ve 3' uçlarından florokrom maddelerle işaretli prob kullanılmaktadır. Prob'un 5' ucunda raportör florokrom, 3' ucunda ise "quencher (baskılayan)" florokrom bulunmaktadır. Şekil 12'de belirtildiği gibi prob, tek zincir haldeki hedef moleküle, primerlerin bağlanma bölgesinin arasında kalan yere bağlanmaktadır. Prob-hedef molekül arasındaki hibridizasyon devam ettiği sürece raportör florokrom molekülünün sinyal oluşturması, 3' uçtaki quencher florokrom tarafından engellenmektedir. Primerlerin hedef nükleik asite bağlanmasından sonra başlatılan primer uzaması prob'un bağlandığı noktaya kadar geldiğinde, sentezin devam edebilmesi için Taq DNA polimeraz enzimi 5'→3' nükleaz aktivitesini kullanarak probu 5' uçtan yıkmaya başlar. Raportör florokrom serbest hale geldiğinde sinyal oluşturmaktadır (Livak ve ark., 1995).



Şekil 12. TaqMan Yöntemi (Bustin, 2000)

Bir Real Time (Gerçek Zamanlı)- PCR(Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Yönteminde;

Niceliksel ölçümde miktarı belirlenmek istenen örnekler, içerdiği cDNA miktarı bilinen standartlarla PCR sonunda karşılaştırılmaktadır. Bu standartların amplifikasyonları, her dokuda aynı düzeyde anlatıma girdiği bilinen genlerle (housekeeping genler) gerçekleştirilir. Housekeeping genler; bir tür veya organizmanın her hücresi için her zaman sabit düzeylerde eksprese olan genlerdir. Bu standart örneklerin eşik değerine (CP) girdikleri döngü PCR cihazı tarafından saptanmaktadır ve miktarı belirlenmek istenen esas örneklerle karşılaştırılmaktadır. Reaksiyon sonunda, standartların eşik değerleri belirlenerek bir eğri oluşturulur. Miktarları bilinmeyen örneklerin bu eğriyi kestiği döngüler belirlenerek miktar sayımı yapılabilmektedir. Göreceli (relative) sayıma göre çalışılacak her iki örnek için farklı karışım hazırlanır. Bu karışımlardan birinde housekeeping genlerine ait primerler bulunurken, diğerinde hedef genin primerleri bulunmaktadır. PZR sonunda hedef genin değeri, referans genin değerine oranlanarak ölçülür ve normalize edilir.

Metodun Uygulanması

Bu yöntemde RNA'dan cDNA sentezi ve kalıp cDNA'dan da NF-kB ve c-myc genlerinin amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Housekeeping gen olarak GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase) kullanılmıştır.

Total RNA izolasyonu

Apoptoz sonuçlarına paralel olarak, MLN2238 ve Bortezomib konsantrasyonları (1, 5, 10 ve 20 μ M) ile Caco2 ve K562 hücrelerinin inkübasyonundan sonra total RNA, izolasyon robotu kullanılarak izole edilmiştir.

MLN2238 ve Bortezomib'in 1, 5, 10, 20 μ M konsantrasyonları ile 24 ve 48 saat inkübe edilen Caco2 ve K562 hücrelerinden total RNA izolasyonu için RNA izolasyon robotu (MagNA Pure Compact) kullanılmıştır. RNA verimi 260 nm ve 280 nm optik dansitede, nanodrop spektrofotometrik ölçüm yapılarak belirlenmiştir. Daha sonra cDNA sentezi için her bir örnekten eşit miktarda RNA (100 ng/örnek) taşınmıştır.

cDNA sentezi

cDNA sentezi için Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis kit (katolog no:05091284001, Roche) prosedürü uygulanmıştır. PCR tüplerine örnek başına 100 ng total RNA, 1 μ l Oligo (dT)18 primeri (2.5 μ M) koyularak toplam hacim 11.4 μ l'ye distile su ile tamamlanmıştır. Tüpler PCR Thermal Cycler'da 10 dakika 65°C'de denature edilmiştir. Tüplerin içeriğine, 4 μ l Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase Reaction Buffer (1X ve 8 mM MgCl₂ içerir), 0.5 μ l RNase inhibitörü (20 U), 2 μ l dNTP karışımı (her biri 10mM), 1 μ l DTT (5mM), 1.1 μ l Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase (10 U) ilave edilerek toplam hacim 20 μ l'ye tamamlanmıştır. Daha sonra tüpler PCR Thermal Cycler'da 55°C'de 30 dk, 85 °C'de 5dk inkübe edilmiştir. Elde edilen cDNA'lar, Light Cycler 480 PCR cihazında amplifikasyon için kullanılmıştır.

RT-PCR (Real time PCR) İle mRNA Ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi

RT-PCR ile Caco2 ve K562 hücre hatları üzerinde 1, 5, 10 ve 20 μ M MLN2238 ve Bortezomib konsantrasyonlarının, NF-kB ve c-myc mRNA ekspresyon düzeylerine olan etkileri araştırılmıştır. RT-PCR yöntemi, cihaza uygun kit ve primerler kullanılarak uygulanmıştır. Elde edilen cDNA'lar, LightCycler 480 RT-PCR cihazında, NF-kB ve c-myc genine spesifik TaqMan'lı primerler ve PCR kit kullanılarak kit protokolüne göre, cihazda optimize edilerek çoğaltılmıştır. House keeping gen olarak GAPDH kullanılmıştır.

Light Cycler PCR 480 uyumlu 96'lık well plate'lere sırasıyla;

H₂O	4 μl
Prob Master	10 μl
Primer (Taqman'lı)	1 μl
(R Primer ve F Primer Karışımı)	
cDNA	5 μl

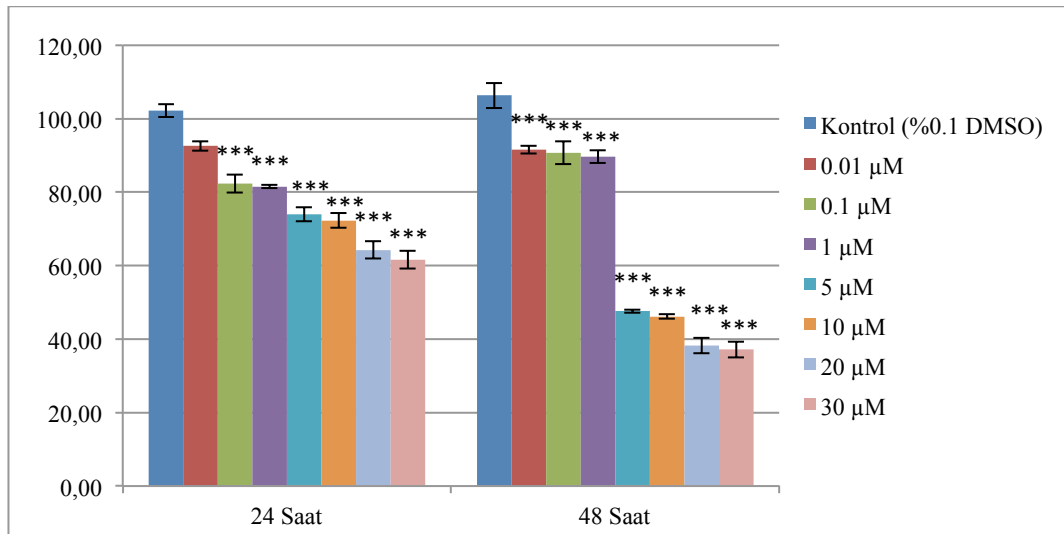
Kimyasalları yüklenmiştir. Hazırlanan bu karışım 96'lık plakaya NF-kB, cmy-c ve GAPDH için ayrı ayrı yüklenmiştir. Yükleme işleminden sonra 96'lık plaka LightCycler 480 RT-PCR cihazına yerleştirilip örneklerin niceliksel ölçüm miktarları belirlenmiştir. Sonuçlar 'Advanced Relative Quantification' programı (Software Release 1.5.0 SP4 version 1.5.0.39) kullanılarak, MLN2238 ve Bortezomib'in NF-kB ve c-myc ekspresyonu üzerindeki etkileri karşılaştırılmıştır.

BULGULAR ve TARTIŞMA

MLN2238 ve Bortezomib'in K562 ve Caco2 Hücrelerinde Sitotoksik Etkilerinin WST-1 Yöntemi ile Değerlendirilmesi

K562 ve Caco2 hücreleri 0.01, 0.1, 1, 5, 10, 20 ve 30 µM MLN2238 ve bortezomib konsantrasyonları ile 24 ve 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Her bir inkübasyon sonunda MLN2238 ve Bortezomib'in K562 ve Caco2 hücreleri üzerinde sitotoksik etkileri, WST-1 yöntemi ile belirlenmiştir. Kontrol ve 0.01, 0.1, 1, 5, 10, 20, 30 µM MLN2238 ve Bortezomib konsantrasyonlarına ait WST-1 sonuçları ELİZA (Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Yöntemi) cihazında 420 nm dalga boyunda okutulmuştur. Daha sonra her bir gruba ait 24 ve 48. saatteki % canlılık değerleri hesaplanmıştır. Renk oluşumuna göre alınan absorbans değerleri, hücre canlılığı ile direkt olarak ilişkilendirilmiştir. Gruplara ait % canlılık değerleri Şekil 13, 14, 15, 16 ve % inhibisyon değerleri Tablo 3, 4, 5 ve 6' da verilmiştir.

MLN2238 konsantrasyonlarının K562 ve Caco2 hücrelerinde, konsantrasyon ve zamana bağlı olarak önemli sitotoksik etkileri belirlenmiştir. WST-1 analizi sonuçlarına göre hesaplanan % canlılık değerlerinin de konsantrasyon ve inkübasyon artışına bağlı olarak önemli derecede azaldığı görülmüştür ($p < 0.001^{***}$).



Şekil 13. MLN2238 Konsantrasyonlarının, K562 Hücre Hattında WST-1 Yöntemine Göre Hesaplanan 24. ve 48. Saatlerdeki % Canlılık Değerleri ve İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi (Ortalama ± Standart Sapma) (n=7)

K562 hücrelerinde 24. saatteki % canlılık değerleri, kontrol grubuna göre 0.01, 0.1, 1, 5, 10, 20 ve 30 µM MLN2238 konsantrasyonlarında sırasıyla % 92.53, 82.24, 81.52, 73.95, 72.27, 64.26 ve 61.59 olarak hesaplanmıştır. İstatistiksel anlamlılık değeri, kontrol grubuna göre 0.1, 1, 5, 10, 20 ve 30 µM MLN2238 konsantrasyonlarında $p < 0.001^{***}$ olarak belirlenmiştir.

K562 hücrelerinde 48 saatlik % canlılık değeri kontrol grubuna göre 0.01, 0.1, 1, 5, 10, 20 ve 30 µM MLN2238 konsantrasyonlarında sırasıyla % 91.52, 90.75, 89.56, 47.60, 46.16, 38.27 ve 37.17 olarak hesaplanmıştır. İstatistiksel anlamlılık değeri, kontrol grubuna göre tüm MLN2238 konsantrasyonlarında $p < 0.001^{***}$ olarak belirlenmiştir.

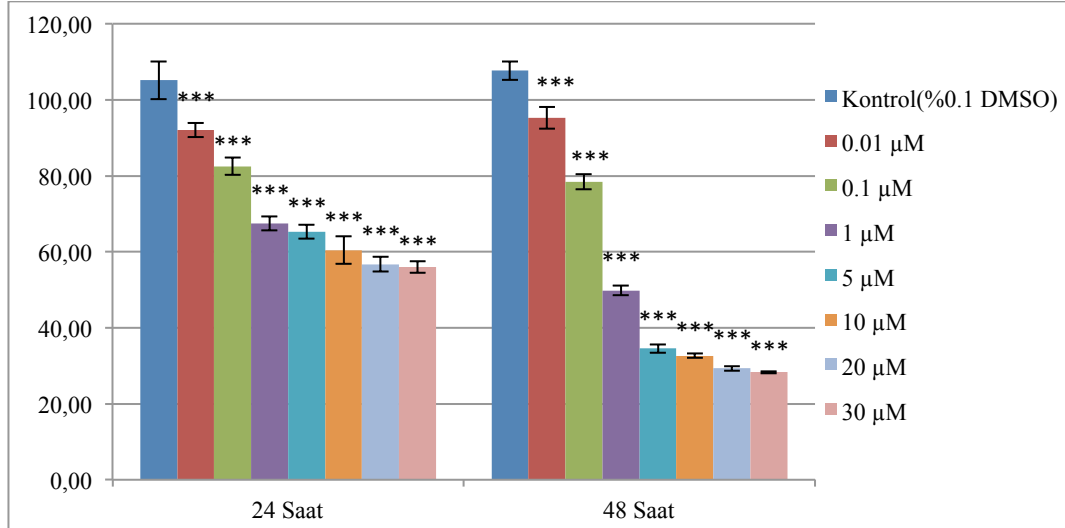
Tablo 3' de K562 hücrelerinde MLN2238 konsantrasyonlarının WST-1 sonuçlarına göre hesaplanan % inhibisyon değerleri verilmiştir.

Tablo 3. MLN2238'in K562 Hücre Hattı Üzerinde WST-1 Testi Sonuçlarına Göre % İnhibisyon Değerleri

MLN2238(μM)	% İnhibisyon Değerleri (Kontrol % inhibisyonu 0'dır)	
	24 saat	48 saat
0.01	7.47	8.48
0.1	17.76	9.25
1	18.48	10.31
5	26.05	52.40
10	27.73	53.84
20	35.74	61.73
30	38.41	62.83

Tablo 3'deki sonuçlara göre; MLN2238, K562 hücre hattı üzerinde kontrole göre, 24. saatte; 0.01 μM ' da %7.47; 0.1 μM ' da %17.76; 1 μM ' da %18.48; 5 μM ' da %26.05; 10 μM ' da %27.73; 20 μM ' da %35.74 ve 30 μM ' da %38.41 oranında hücre proliferasyonunda azalma meydana getirmiştir.

Bu % inhibisyon değerlerinin ise kontrole göre 48. saatte konsantrasyon artışına göre sırasıyla, % 8.48, 9.25, 10.31, 52.40, 53.84, 61.73 ve 62.83 oranında olduğu belirlenmiştir.



Şekil 14. Bortezomib Konsantrasyonlarının, K562 Hücre Hattında WST-1 Yöntemine Göre Hesaplanan 24. ve 48. Saatlerdeki % Canlılık Değerleri ve İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi (Ortalama \pm Standart Sapma) (n=7)

K562 hücrelerinde 24. saatteki % canlılık değeri kontrol grubuna göre 0.01, 0.1, 1, 5, 10, 20 ve 30 μM Bortezomib konsantrasyonların da sırasıyla % 92.01, 82.52, 67.47, 65.28, 60.45, 56.72 ve 56.01 olarak hesaplanmıştır. İstatistiksel anlamlılık değeri, kontrol grubuna göre tüm Bortezomib konsantrasyonlarında $p < 0.001$ olarak belirlenmiştir.

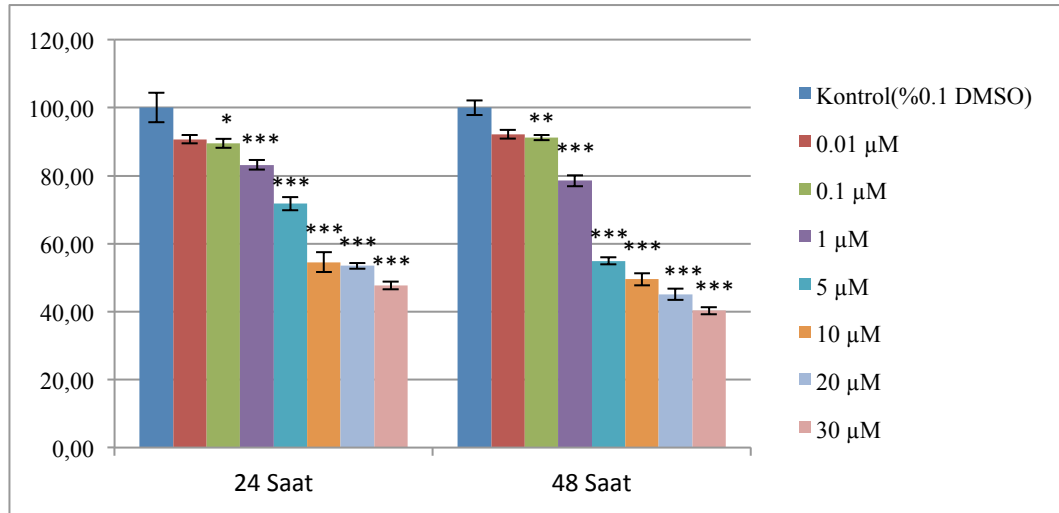
K562 hücrelerinde 48. saatteki % canlılık değeri kontrol grubuna göre 0.01, 0.1, 1, 5, 10, 20 ve 30 μM Bortezomib konsantrasyonların da sırasıyla % 95.24, 78.45, 49.83, 34.53, 32.64, 29.31 ve 28.29 olarak hesaplanmıştır. İstatistiksel anlamlılık değeri, kontrol grubuna göre tüm Bortezomib konsantrasyonlarında $p < 0.001$ *** olarak belirlenmiştir.

Tablo 4' de K562 hücrelerinde Bortezomib konsantrasyonlarının WST-1 sonuçlarına göre hesaplanan % inhibisyon değerleri verilmiştir.

Tablo 4. Bortezomib'in K562 Hücre Hattı Üzerinde WST-1 Testi Sonuçlarına Göre Yüzde İnhibisyon Değerlerinin Gösterilmesi

Bortezomib (μM)	% İnhibisyon Değerleri (Kontrol % inhibisyonu 0'dır)	
	24 saat	48 saat
0.01	7.99	4.76
0.1	17.48	21.55
1	32.53	50.17
5	34.72	65.47
10	39.55	67.36
20	43.28	70.69
30	43.99	71.71

Tablo 4'deki sonuçlara göre; Bortezomib'in K562 hücre hattı üzerinde kontrole göre 24. saatte; 0.01 μM ' da %7.99; 0.1 μM ' da %17.48; 1 μM ' da %32.53; 5 μM ' da %34.72; 10 μM ' da %39.55; 20 μM ' da %43.28 ve 30 μM ' da %43.99 oranında hücre proliferasyonunda azalma meydana getirdiği bulunmuştur. Bu sitotoksik etkinin kontrole göre 48. saatte; 0.01 μM ' da %4.76; 0.1 μM ' da %21.55; 1 μM ' da %50.17; 5 μM ' da %65.47; 10 μM ' da %67.36; 20 μM ' da %70.69 ve 30 μM ' da %71.71 oranında olduğu belirlenmiştir.



Şekil 15. MLN2238 Konsantrasyonlarının, Caco2 Hücre Hattında WST-1 Yöntemine Göre Hesaplanan 24. ve 48. Saatlerdeki % Canlılık Değerleri ve İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi (Ortalama \pm Standart Sapma) (n=7)

Caco2 hücrelerinde 24 saatteki % canlılık değeri kontrol grubuna göre 0.01, 0.1, 1, 5, 10, 20 ve 30 μM MLN2238 konsantrasyonlarında sırasıyla % 90.69, 89.52, 83.18, 71.80, 54.57, 53.50 ve 47.73 olarak hesaplanmıştır. İstatistiksel anlamlılık değeri, kontrol grubuna göre 0,1 μM MLN2238 konsantrasyonunda $p<0,05^*$ ve 1, 5, 10, 20 ve 30 μM MLN2238 konsantrasyonlarında $p<0.001^{***}$ olarak belirlenmiştir.

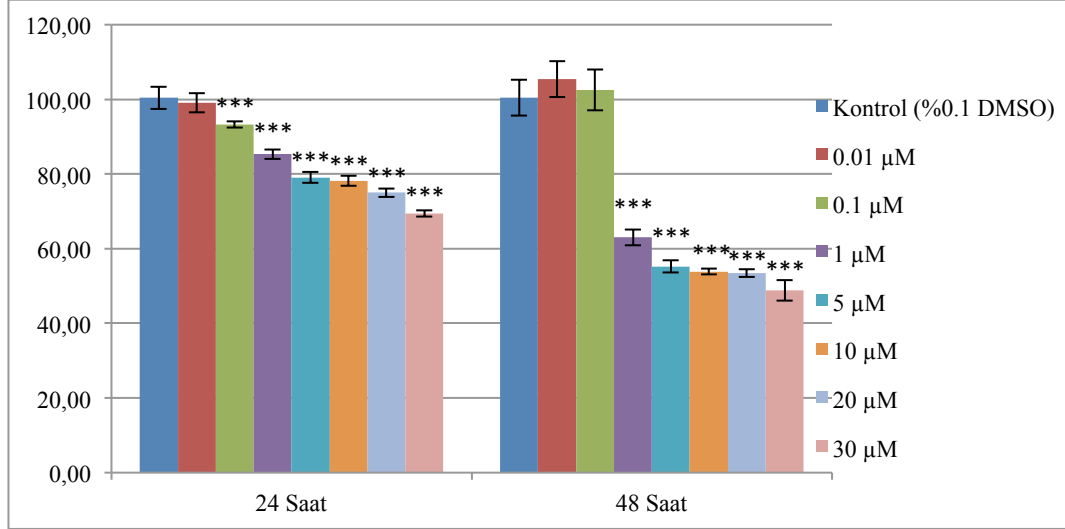
Caco2 hücrelerinde 48 saatteki % canlılık değeri kontrol grubuna göre 0.01, 0.1, 1, 5, 10, 20 ve 30 μM MLN2238 konsantrasyonlarında sırasıyla % 92.16, 91.21, 78.53, 54.89, 49.55, 45.11 ve 40.27 olarak hesaplanmıştır. İstatistiksel anlamlılık değeri, kontrol grubuna göre 0,01 μM MLN2238 konsantrasyonunda $p<0,05^*$, 0,1 μM MLN2238 konsantrasyonunda $p<0,01^{**}$ ve 1, 5, 10, 20 ve 30 μM MLN2238 konsantrasyonlarında $p<0.001^{***}$ olarak belirlenmiştir.

Tablo 5' de Caco2 hücrelerinde MLN2238 konsantrasyonlarının WST-1 sonuçlarına göre hesaplanan % inhibisyon değerleri verilmiştir.

Tablo 5. MLN2238'in Caco2 Hücre Hattı Üzerinde WST-1 Testi Sonuçlarına Göre Yüzde İnhibisyon Değerlerinin Gösterilmesi

MLN2238 (μM)	% İnhibisyon Değerleri (Kontrol % inhibisyonu 0'dır)	
	24 saat	48 saat
0.01	9.31	7.84
0.1	10.48	8.79
1	16.82	21.47
5	38.2	45.11
10	45.43	50.45
20	46.5	54.89
30	52.27	59.73

Tablo 5'deki sonuçlara göre; MLN2238'in Caco2 hücre hattı üzerinde kontrole göre 24. Saatte; 0.01 μM ' da %9.31; 0.1 μM ' da %10.48; 1 μM ' da %16.82; 5 μM ' da %38.20; 10 μM ' da %45.43; 20 μM ' da %46.50 ve 30 μM ' da %52.27 oranında hücre proliferasyonunda azalma meydana getirdiği bulunmuştur. Bu sitotoksik etkinin kontrole göre 48. saatte; 0.01 μM ' da %7.84; 0,1 μM ' da %8.79; 1 μM ' da %21.47; 5 μM ' da %45.11; 10 μM ' da %50.45; 20 μM ' da %54.89 ve 30 μM ' da %59.73 oranında olduğu belirlenmiştir.



Şekil 16. Bortezomib Konsantrasyonlarının, Caco2 Hücre Hattında WST-1 Yöntemine Göre Hesaplanan 24. ve 48. Saatlerdeki % Canlılık Değerleri ve İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi (Ortalama ± Standart Sapma) (n=7)

Caco2 hücrelerinde 24. saatteki % canlılık değeri kontrol grubuna göre 0.01, 0.1, 1, 5, 10, 20 ve 30 µM Bortezomib konsantrasyonlarında sırasıyla % 99.10, 93.31, 85.31, 79.05, 78.23, 74.99 ve 69.45 olarak hesaplanmıştır. İstatistiksel anlamlılık değeri, kontrol grubuna göre 0,1, 1, 5, 10, 20 ve 30 µM Bortezomib konsantrasyonlarında $p < 0.001^{***}$ olarak belirlenmiştir.

Caco2 hücrelerinde 48 saatlik % canlılık değeri kontrol grubuna göre 0.01, 0.1, 1, 5, 10, 20 ve 30 µM Bortezomib konsantrasyonlarında sırasıyla % 105.42, 102.50, 62.99, 55.26, 53.83, 53.45 ve 48.83 olarak hesaplanmıştır. İstatistiksel anlamlılık değeri, kontrol grubuna göre 1, 5, 10, 20 ve 30 µM Bortezomib konsantrasyonlarında $p < 0.001^{***}$ olarak belirlenmiştir.

Tablo 6' da Caco2 hücrelerinde Bortezomib konsantrasyonlarının WST-1 sonuçlarına göre hesaplanan % inhibisyon değerleri verilmiştir.

Tablo 6. MLN2238'in Caco2 Hücre Hattı Üzerinde WST-1 Testi Sonuçlarına Göre Yüzde İnhibisyon Değerlerinin Gösterilmesi

Bortezomib (µM)	% İnhibisyon Değerleri (Kontrol % inhibisyonu 0'dır)	
	24 saat	48 saat
0.01	0,9	0
0.1	6,69	0
1	14,69	37,01
5	20,95	44,74
10	21,77	46,17
20	25,01	46,55
30	30,55	51,17

Tablo 6'daki sonuçlara göre; Bortezomib'in Caco2 hücre hattı üzerinde kontrole göre 24. saatte; 0.01 µM' da %0.9; 0.1 µM' da %6.69; 1 µM' da %14.69; 5 µM' da %20.95; 10 µM' da %21.77; 20 µM' da %25.01 ve 30 µM' da %30.55 oranında hücre proliferasyonunda azalma meydana getirdiği bulunmuştur.

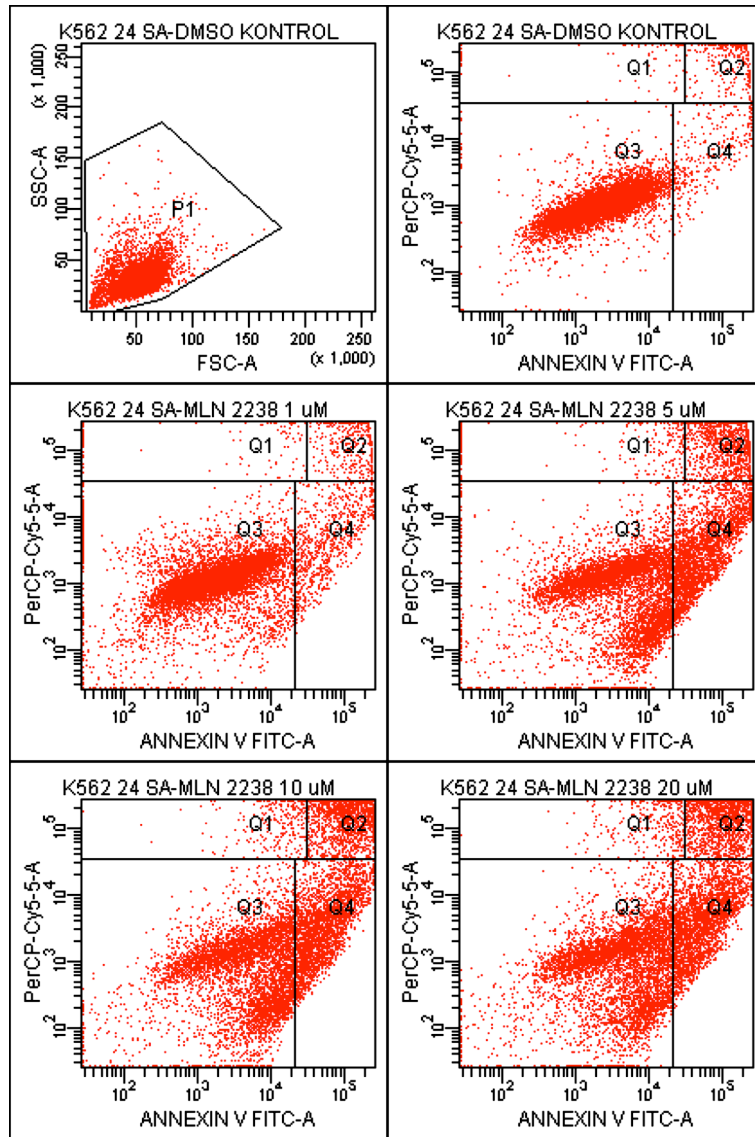
Bu sitotoksik etkinin kontrole göre 48. saatte; 0.01 μM ' da %0; 0.1 μM ' da %0; 1 μM ' da %37.01; 5 μM ' da %44.74; 10 μM ' da %46.17; 20 μM ' da %46.55 ve 30 μM ' da %51.17 oranında olduğu belirlenmiştir.

MLN2238 ve Bortezomib'in K562 ve Caco2 Hücrelerinde Apoptotik Etkilerinin Akış Sitometri Yöntemi ile Değerlendirilmesi

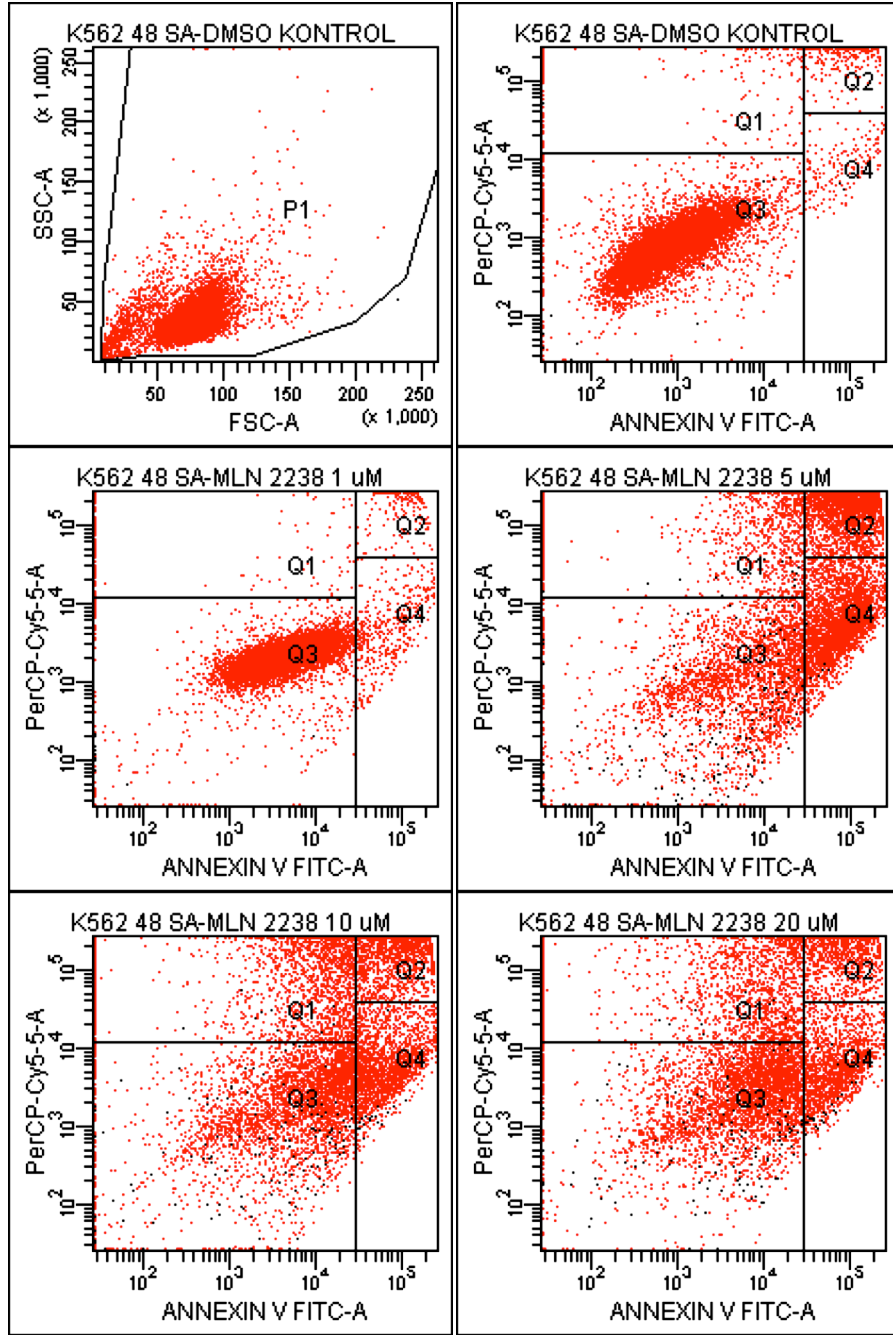
Akış sitometride AnnexinV-PI yöntemi ile apoptotik etkinin değerlendirilmesi

K562 hücreleri üzerindeki MLN2238 ve Bortezomib'in 1, 5, 10 ve 20 μM konsantrasyonlarının 24. ve 48. saatlerdeki, akış sitometri analiz sonuçları **şekil 17, 18, 19, 20'de** ve **Tablo 7'de** verilmiştir.

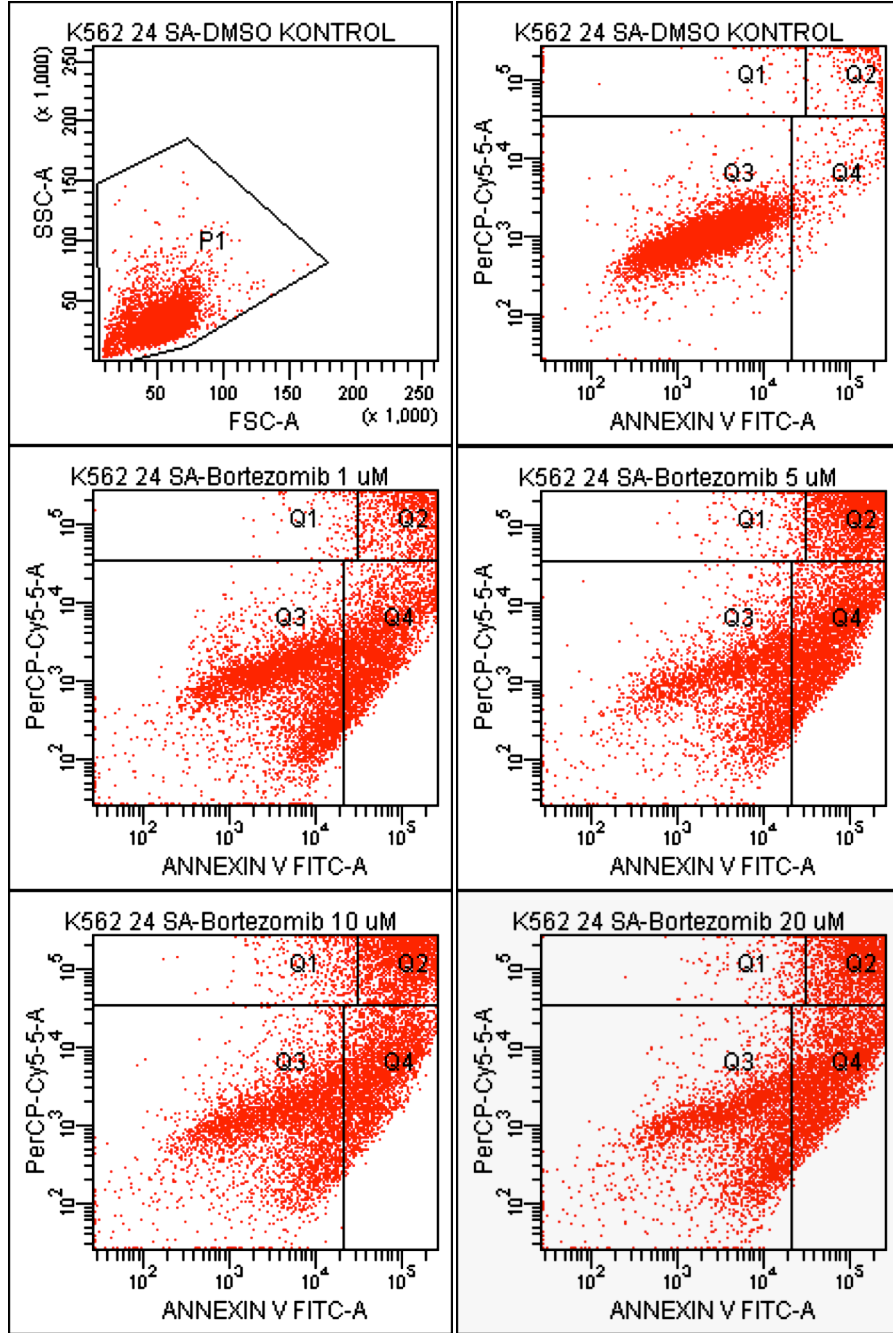
Caco2 hücreleri üzerindeki MLN2238 ve Bortezomib'in 1, 5, 10 ve 20 μM konsantrasyonlarının 24. ve 48. saatlerdeki, akış sitometri analiz sonuçları **şekil 21, 22, 23, 24'de** ve **Tablo 8'de** verilmiştir.



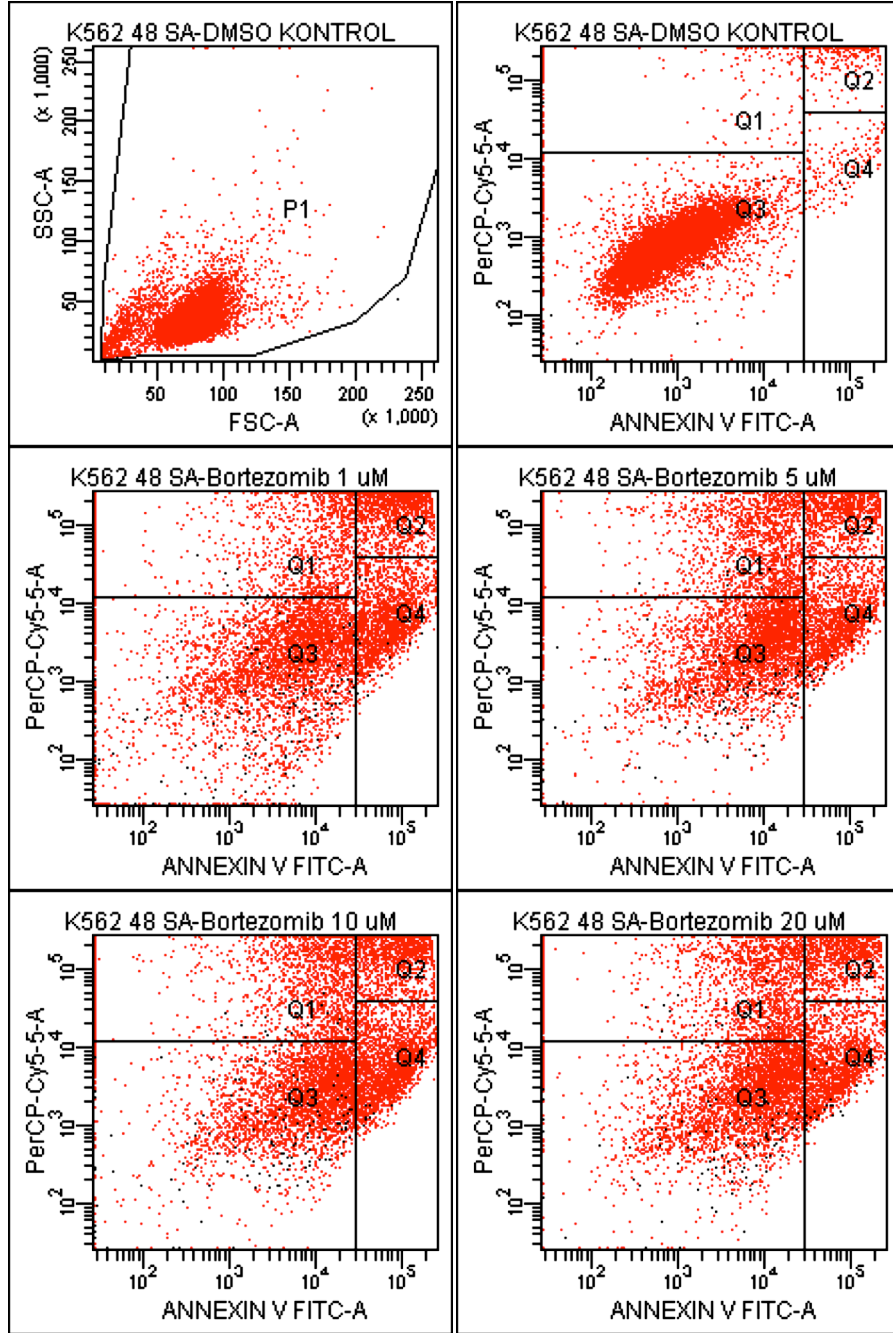
Şekil 17. MLN2238 Konsantrasyonlarının (1, 5, 10 Ve 20 μM) K562 Hücreleri Üzerindeki, 24. Saatteki Apoptotik Etkisi



Şekil 18. MLN2238 Konsantrasyonlarının (1, 5, 10 ve 20 μM) K562 Hücreleri Üzerindeki, 48. Saatteki Apoptotik Etkisi



Şekil 19. Bortezomib Konsantrasyonlarının (1, 5, 10 ve 20 μM) K562 Hücreleri Üzerindeki, 24. Saatteki Apoptotik Etkisi



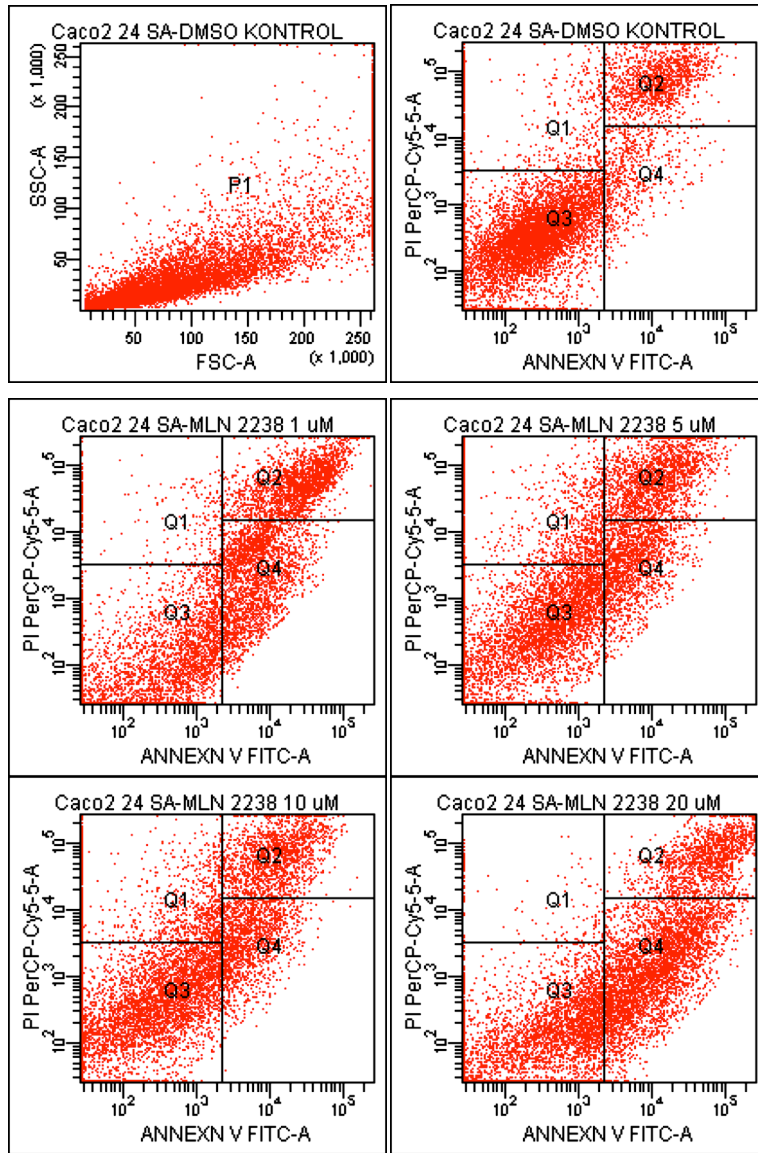
Şekil 20. Bortezomib Konsantrasyonlarının (1, 5, 10 ve 20 μM) K562 Hücreleri Üzerindeki, 48. Saatteki Apoptotik Etkisi

Tablo 7. K562 Hücre Hattı Üzerinde MLN2238 Ve Bortezomib'in 24. ve 48. Saatlerdeki Akış Sitometri Annexin V-PI Apoptoz Sonuçları

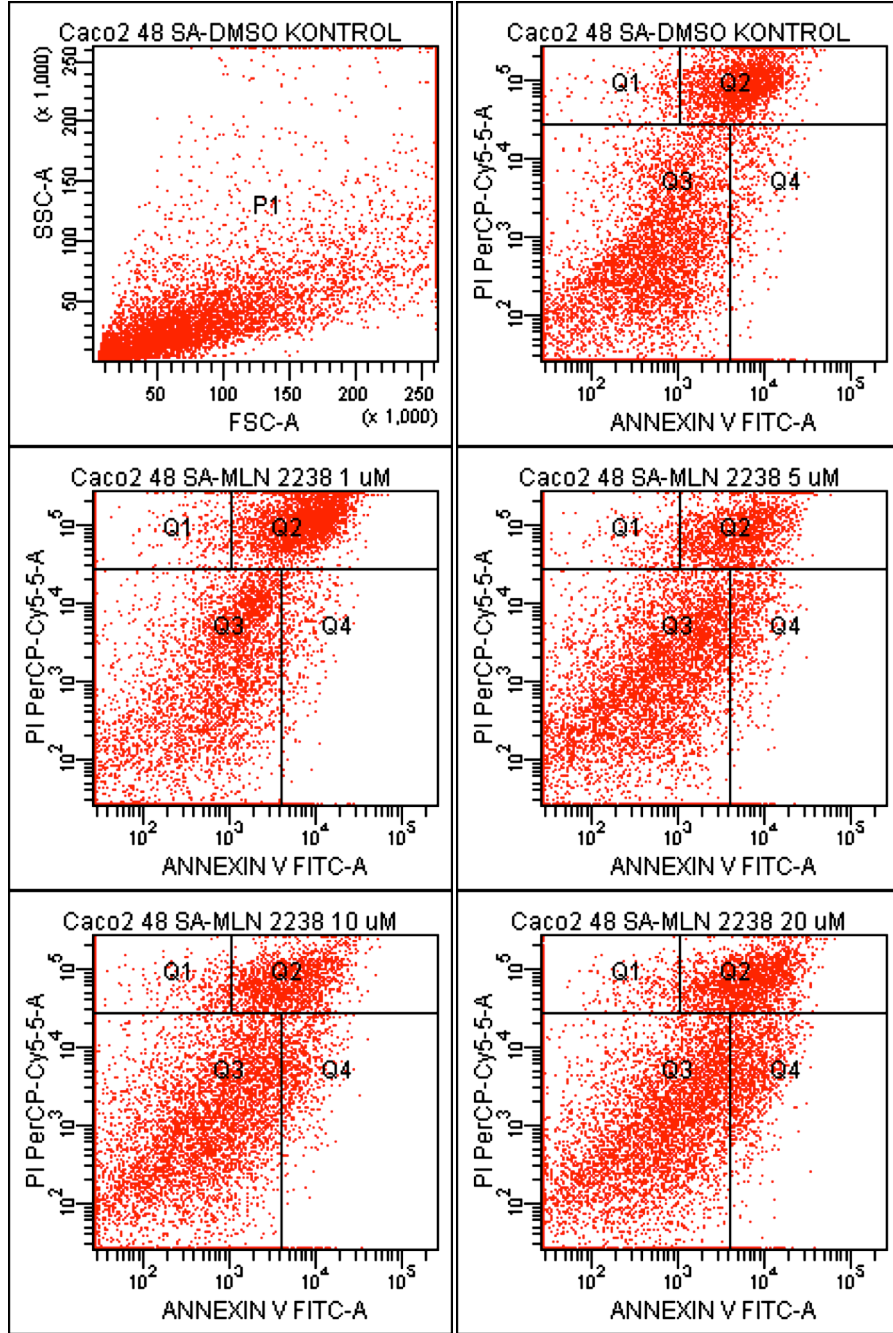
K562 hücrelerine uygulanan Konsantrasyonlar (μM)		24. Saat			
		Canlı hücre % (Q3)	Nekrotik hücre% (Q1)	Erken Apoptotik hücre % (Q4)	Geç Apoptotik hücre % (Q2)
MLN2238	Kontrol (%0.1 DMSO)	93.2	0.8	2.9	3.1
	1	87.1	1.4	7.4	4.1
	5	57.3	3.0	28.6	11.1
	10	53.9	2.6	29.5	14.0
	20	54.0	3.1	27.6	15.2
Bortezomib	Kontrol (%0.1 DMSO)	93.2	0.8	2.9	3.1
	1	54.6	1.2	32.4	11.8
	5	36.6	2.1	37.4	23.9
	10	42.9	3.9	29.7	23.6
	20	37.8	2.3	35.7	24.2
K562 hücrelerine uygulanan Konsantrasyonlar (μM)		48. Saat			
		Canlı hücre % (Q3)	Nekrotik hücre% (Q1)	Erken Apoptotik hücre % (Q4)	Geç Apoptotik hücre % (Q2)
MLN2238	Kontrol (%0.1 DMSO)	92.1	3.6	1.8	2.5
	1	91.2	1.9	4.4	2.5
	5	29.8	11.0	33.2	26.0
	10	39.1	27.1	20.0	13.8
	20	40.8	31.9	16.7	10.7
Bortezomib	Kontrol (%0.1 DMSO)	92.1	3.6	1.8	2.5
	1	43.1	23.4	19.3	14.3
	5	37.7	33.2	17.7	11.3
	10	37.4	25.9	22.7	14.0
	20	39.3	31.7	17.8	11.2

Tablo 7' deki sonuçlara göre, MLN2238'in K562 hücresi üzerinde 24. saatteki erken apoptotik etkisi özellikle 5 μM konsantrasyondan itibaren kontrol grubuna göre artmıştır. 5, 10 ve 20 μM konsantrasyonlarda erken apoptotik değerleri kontrole göre sırasıyla; %28.6, 29.5, 27.6 ve geç apoptotik değerleri ise %11.1, 14.0, 15.2'dir. 48. saatte ise 5, 10 ve 20 μM konsantrasyonlarda erken apoptotik değerleri sırasıyla, %33.2, 20, 16.7 ve geç apoptotik değerleri ise %26, 13.8, 10.7 olarak belirlenmiştir. Nekrotik hücre değerleri 24. saatte konsantrasyonlar arasında önemli farklılık göstermezken, 48. saatte hücre nekrozunun 5 μM konsantrasyondan başlayarak artış gösterdiği belirlenmiştir.

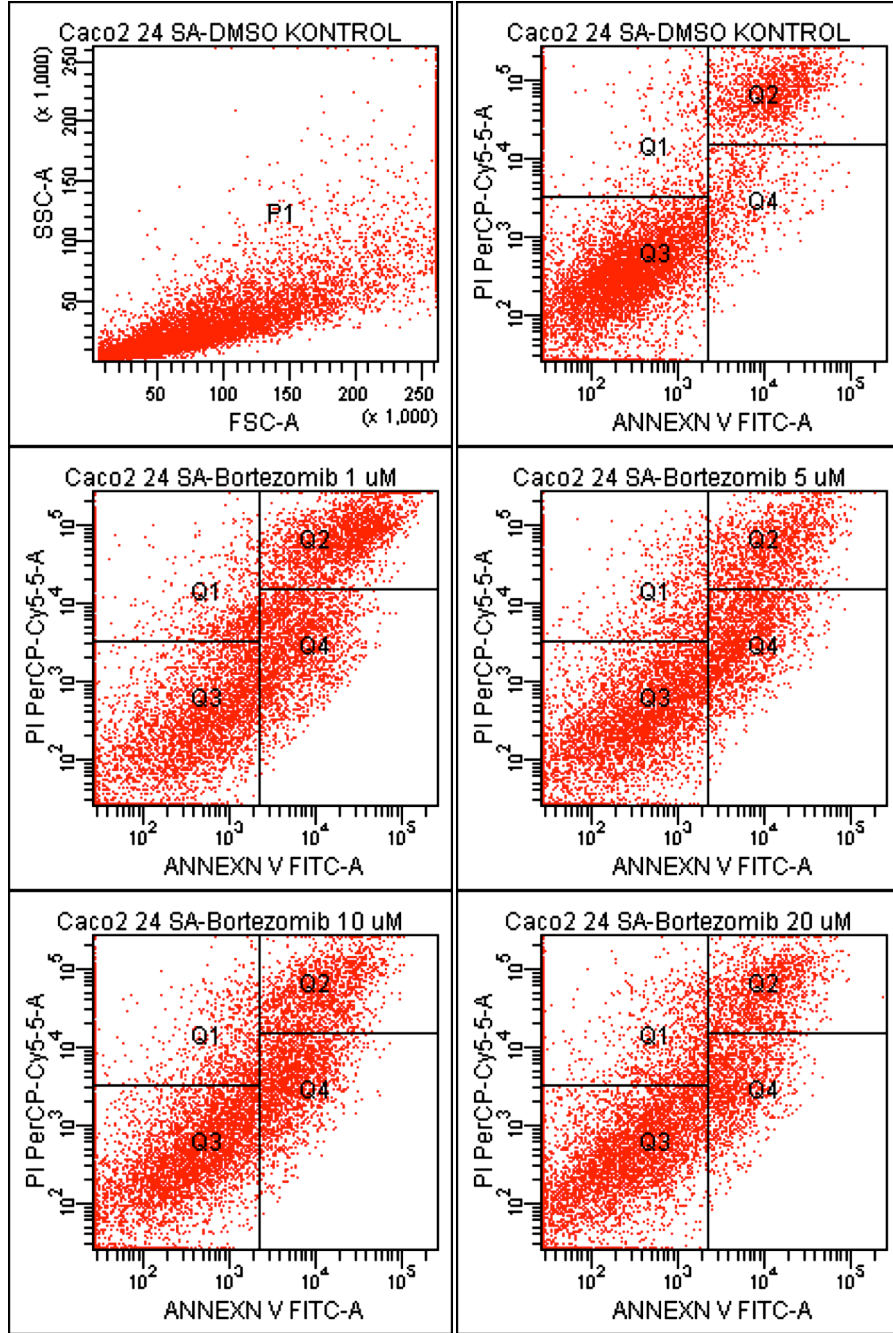
Bortezomib'in K562 hücresi üzerinde 24. saatteki erken apoptotik etkisi 1 μM konsantrasyondan itibaren kontrole göre artış göstermiştir. 1, 5, 10 ve 20 μM konsantrasyonlarda erken apoptotik değerleri kontrole göre sırasıyla; %32.4, 37.4, 29.7, 35.7 ve geç apoptotik değerleri ise %11.8, 23.9, 23.6 ve 24.2 dir. 48. saatte ise 1, 5, 10 ve 20 μM konsantrasyonlarda erken apoptotik değerleri sırasıyla, %19.3, 17.7, 22.7, 17.8 ve geç apoptotik değerleri de %14.3, 11.3, 14.0 ve 11.2 olarak belirlenmiştir. Nekrotik hücre değerleri ise MLN2238' deki gibi 24. saatte konsantrasyonlar arasında önemli farklılık göstermezken, 48. saatte hücre nekrozunun 1 μM konsantrasyondan başlayarak arttığı görülmüştür.



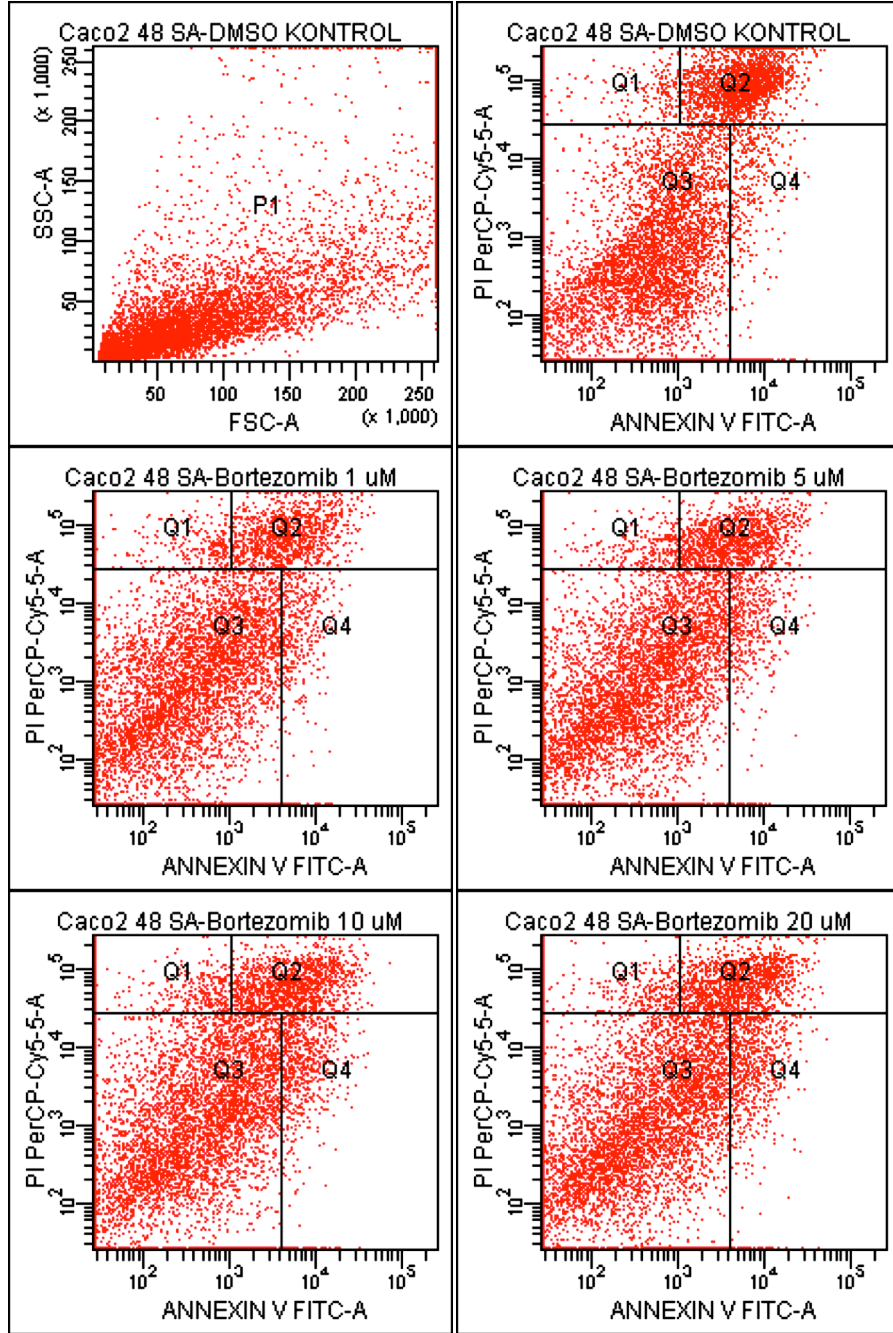
Şekil 21. MLN2238 Konsantrasyonlarının (1, 5, 10 ve 20 μM) Caco2 Hücreleri Üzerindeki, 24. Saatteki Apoptotik Etkisi



Şekil 22. MLN2238 Konsantrasyonlarının (1, 5, 10 ve 20 μ M) Caco2 Hücreleri Üzerindeki, 48 Saatlik Apoptotik Etkisi



Şekil 23. Bortezomib Konsantrasyonlarının (1, 5, 10 ve 20 μ M) Caco2 Hücreleri Üzerindeki, 24. Saatteki Apoptotik Etkisi



Şekil 24. Bortezomib Konsantrasyonlarının (1, 5, 10 ve 20 µM) Caco2 Hücreleri Üzerindeki, 48. Saatteki Apoptotik Etkisi

Tablo 8. Caco2 Hücre Hattı Üzerinde MLN2238 Ve Bortezomib'in 24 ve 48 Saatlik Akış Sitometride Annexin V-PI Apoptoz Sonuçları

Caco2 hücrelerine uygulanan Konsantrasyonlar (μM)		24. Saat			
		Canlı hücre % (Q3)	Nekrotik hücre% (Q1)	Erken Apoptotik hücre % (Q4)	Geç Apoptotik hücre % (Q2)
MLN2238	Kontrol (%0.1 DMSO)	74.6	6.1	6.2	13.1
	1	51.3	2.7	24.3	21.6
	5	52.5	11.8	17.3	18.4
	10	56.5	11.6	15.6	16.4
	20	40.9	1.5	42.5	15.1
Bortezomib	Kontrol (%0.1 DMSO)	74.6	6.1	6.2	13.1
	1	45.5	9.5	21.8	23.2
	5	56.0	9.4	19.5	15.1
	10	54.0	10.2	19.6	16.1
	20	59.4	13.7	14.0	12.9
Caco2 hücrelerine uygulanan Konsantrasyonlar (μM)		48. Saat			
		Canlı hücre % (Q3)	Nekrotik hücre% (Q1)	Erken Apoptotik hücre % (Q4)	Geç Apoptotik hücre % (Q2)
MLN2238	Kontrol (%0.1 DMSO)	68.6	10.2	3.6	17.6
	1	54.9	9.5	4.2	31.4
	5	66.6	10.5	7.0	15.8
	10	65.8	11.1	7.1	15.9
	20	60.7	6.9	12.5	19.8
Bortezomib	Kontrol (%0.1 DMSO)	68.6	10.2	3.6	17.6
	1	72.1	12.2	4.2	11.5
	5	68.0	14.1	5.1	12.8
	10	66.4	12.8	6.7	14.2
	20	65.7	12.5	7.6	14.2

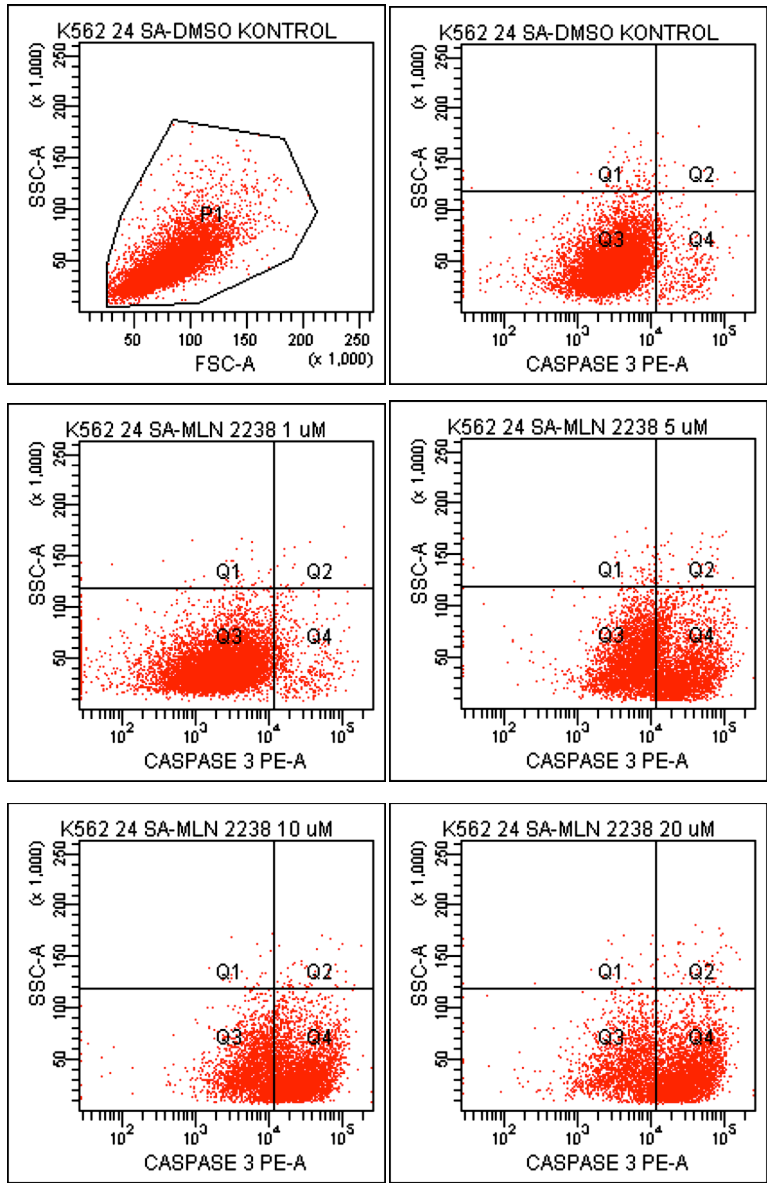
Tablo 8'deki sonuçlara göre, MLN2238'in Caco2 hücresi üzerinde 24. saatteki erken apoptotik etkisi 1 μM konsantrasyondan itibaren önemli düzeyde artış göstermiştir. 1, 5, 10 ve 20 μM konsantrasyonlarda erken apoptotik değerleri sırasıyla; %24.3, 17.3, 15.6, 42.5 ve geç apoptotik değerlerin ise %21.6, 18.4, 16.4 ve 15.1 olduğu analiz edilmiştir. 48. saatte ise erken apoptotik hücre değerlerinde azalma meydana gelmiş olup, bu erken apoptotik değerler 1, 5, 10 ve 20 μM MLN2238 konsantrasyonlarında sırasıyla, %4.2, 7.0, 7.1, 12.5, geç apoptotik değerler de %31.4, 15.8, 15.9, 19.8 olarak belirlenmiştir. Bortezomib'in Caco2 hücresi üzerinde 24. saatteki erken apoptotik etkisi 1 μM konsantrasyondan itibaren artış göstermiştir.

1, 5, 10 ve 20 μM konsantrasyonların erken apoptotik değerleri sırasıyla; %21.8, 19.5, 19.6, 14.0 ve geç apoptotik değerleri de %23.2, 15.1, 16.1 ve 12.9 dur. 48. saatte ise erken apoptotik hücre değerlerinde azalma meydana gelmiş ve 1, 5, 10 ve 20 μM konsantrasyonlarda erken apoptotik değerleri sırasıyla, %4.2, 5.1, 6.7, 7.6; geç apoptotik değerleri de %11.5, 12.8, 14.2, 14.2 olarak belirlenmiştir.

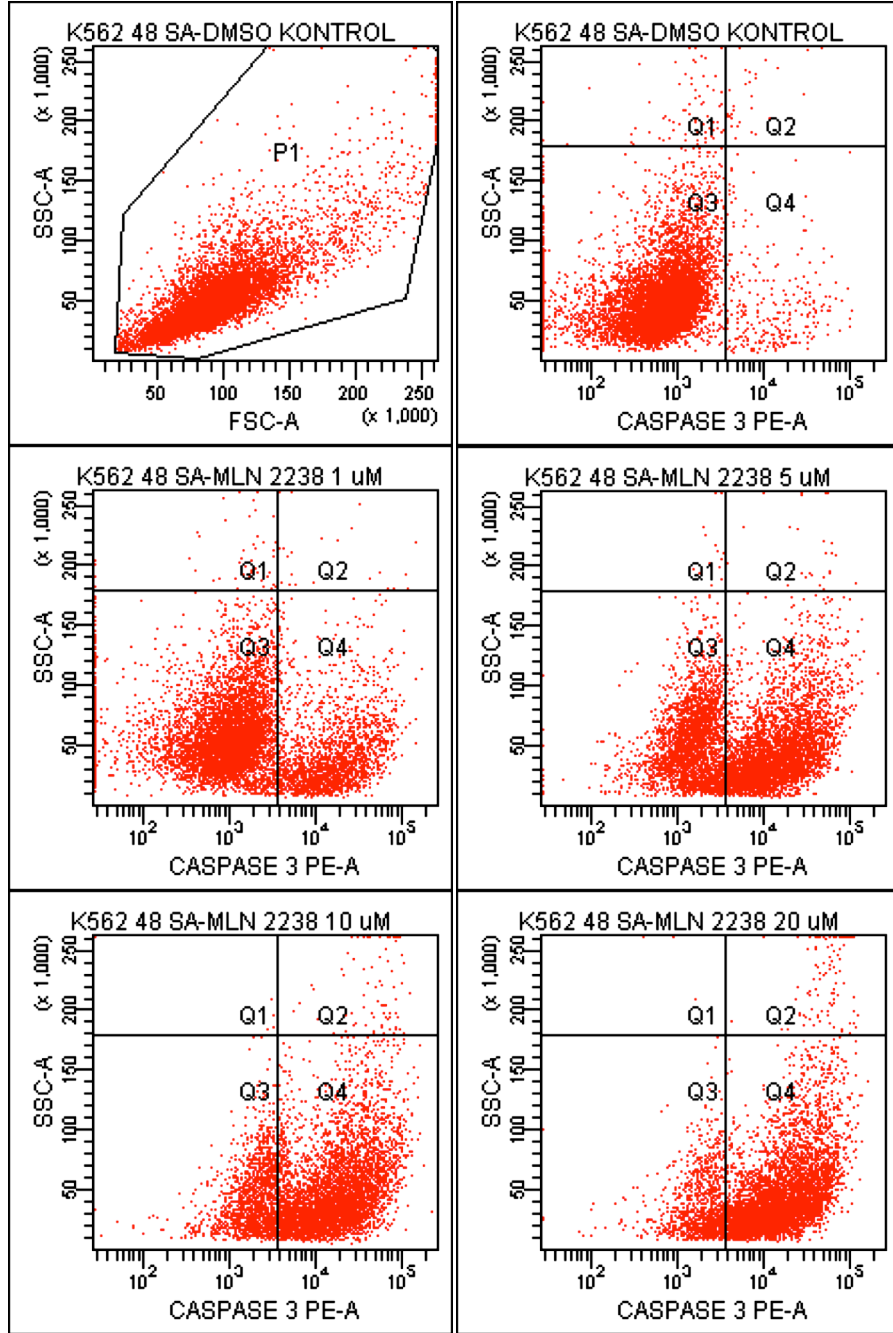
Akış sitometride Kaspaz-3 aktivasyonu ile apoptotik etkinin değerlendirilmesi

K562 hücreleri üzerinde, MLN2238 ve Bortezomib'in 1, 5, 10 ve 20 μM konsantrasyonlarının 24. ve 48. saatlerdeki, akış sitometri analiz sonuçları **Şekil 25, 26, 27, 28** ve **Tablo 9'** da; sonuçları ise şekil 7-8 ve Tablo 4 de vermiştir.

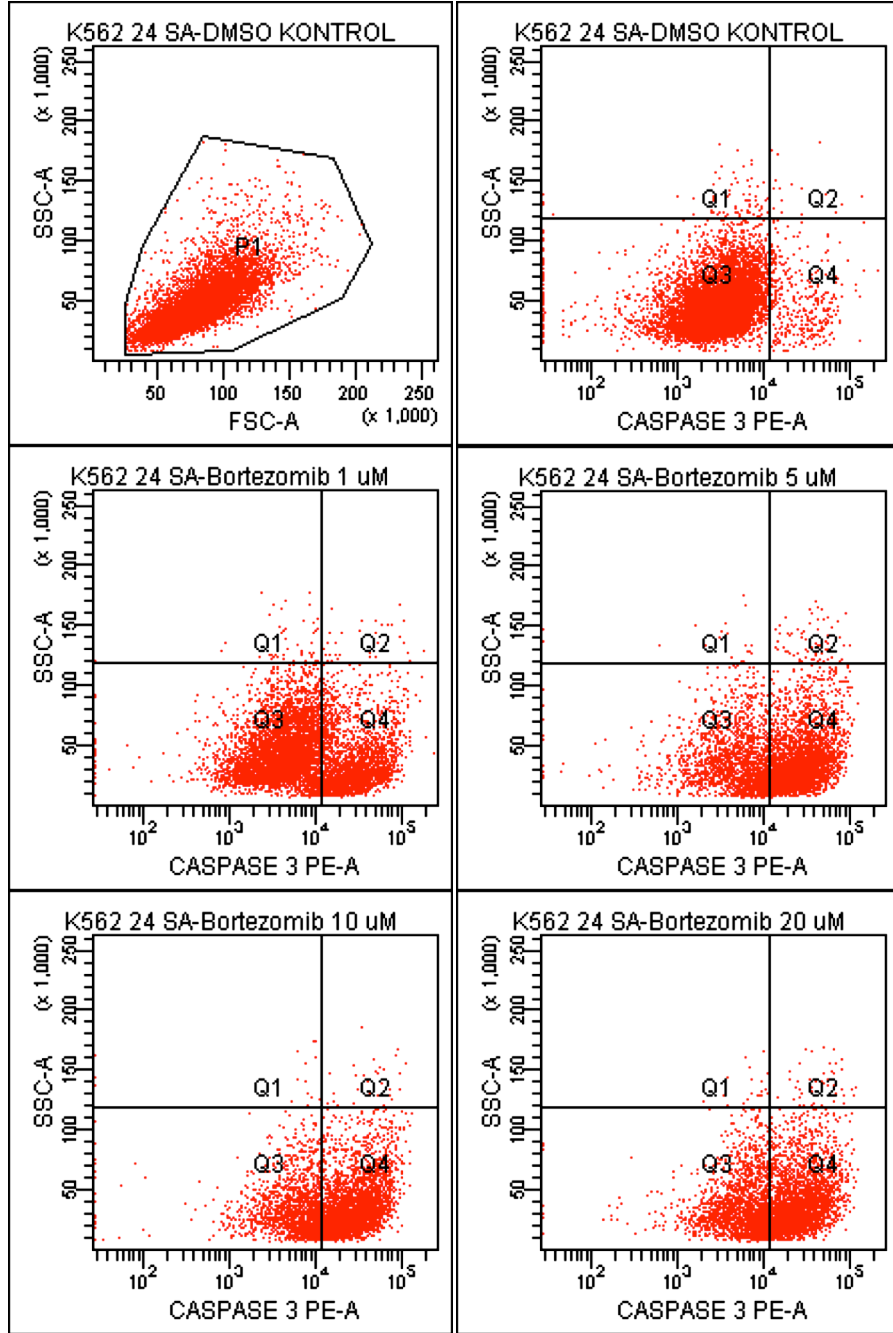
Caco2 hücreleri üzerinde, MLN2238 ve Bortezomib'in 1, 5, 10 ve 20 μM konsantrasyonlarının 24. ve 48. saatlerdeki, akış sitometri analiz sonuçları **Şekil 29, 30, 31, 32** ve **Tablo 10'** da verilmiştir.



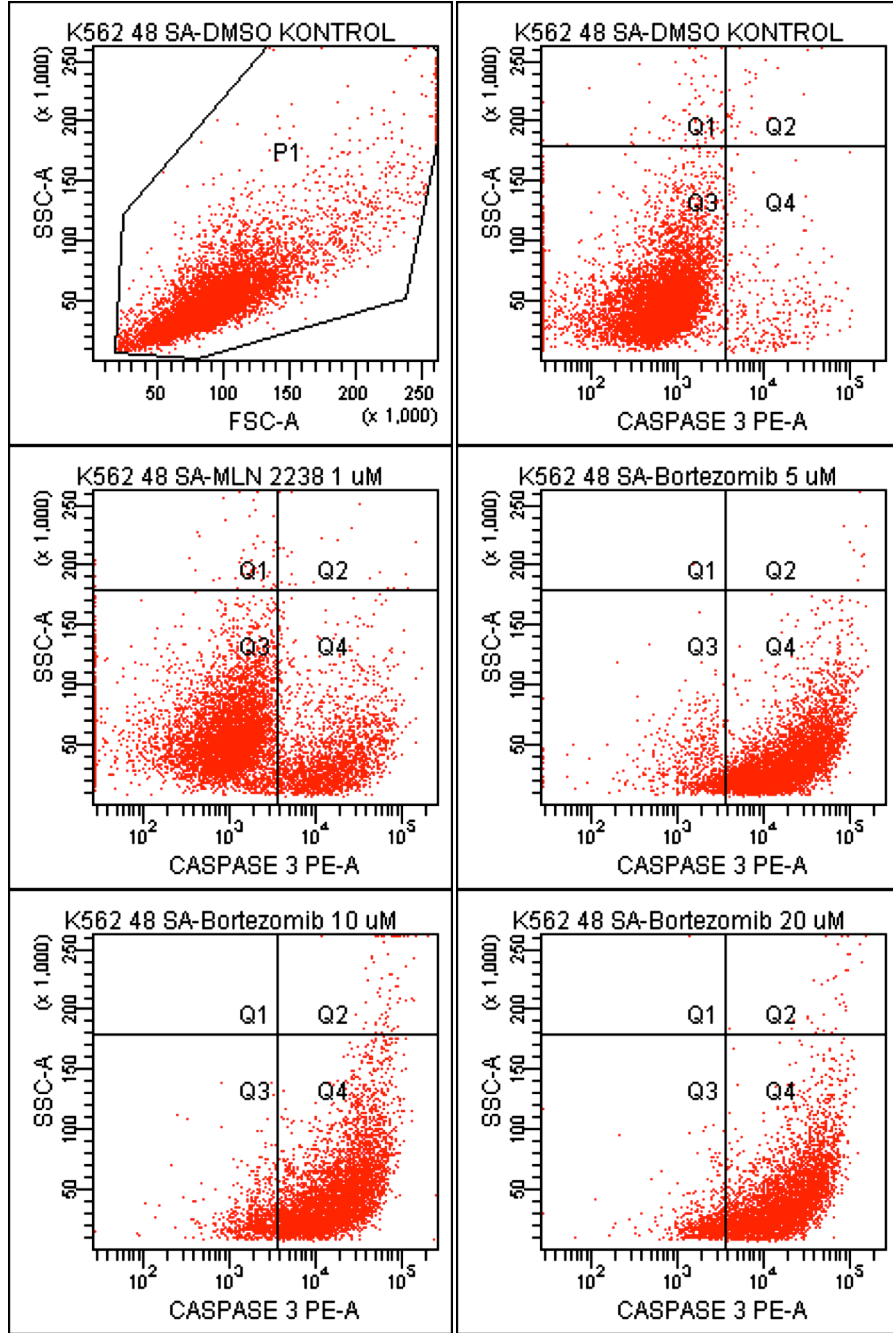
Şekil 25. MLN2238 Konsantrasyonlarının (1, 5, 10 ve 20 μM) K562 hücreleri Üzerindeki, 24. Saatteki Kaspaz-3 Aktivasyonu Etkisi



Şekil 26. MLN2238 Konsantrasyonlarının (1, 5, 10 ve 20 µM) K562 hücreleri Üzerindeki, 48. Saatteki Kaspaz-3 Aktivasyonu Etkisi



Şekil 27. Bortezomib Konsantrasyonlarının (1, 5, 10 ve 20 µM) K562 hücreleri Üzerindeki, 24. Saatteki Kaspaz-3 Aktivasyonu Etkisi



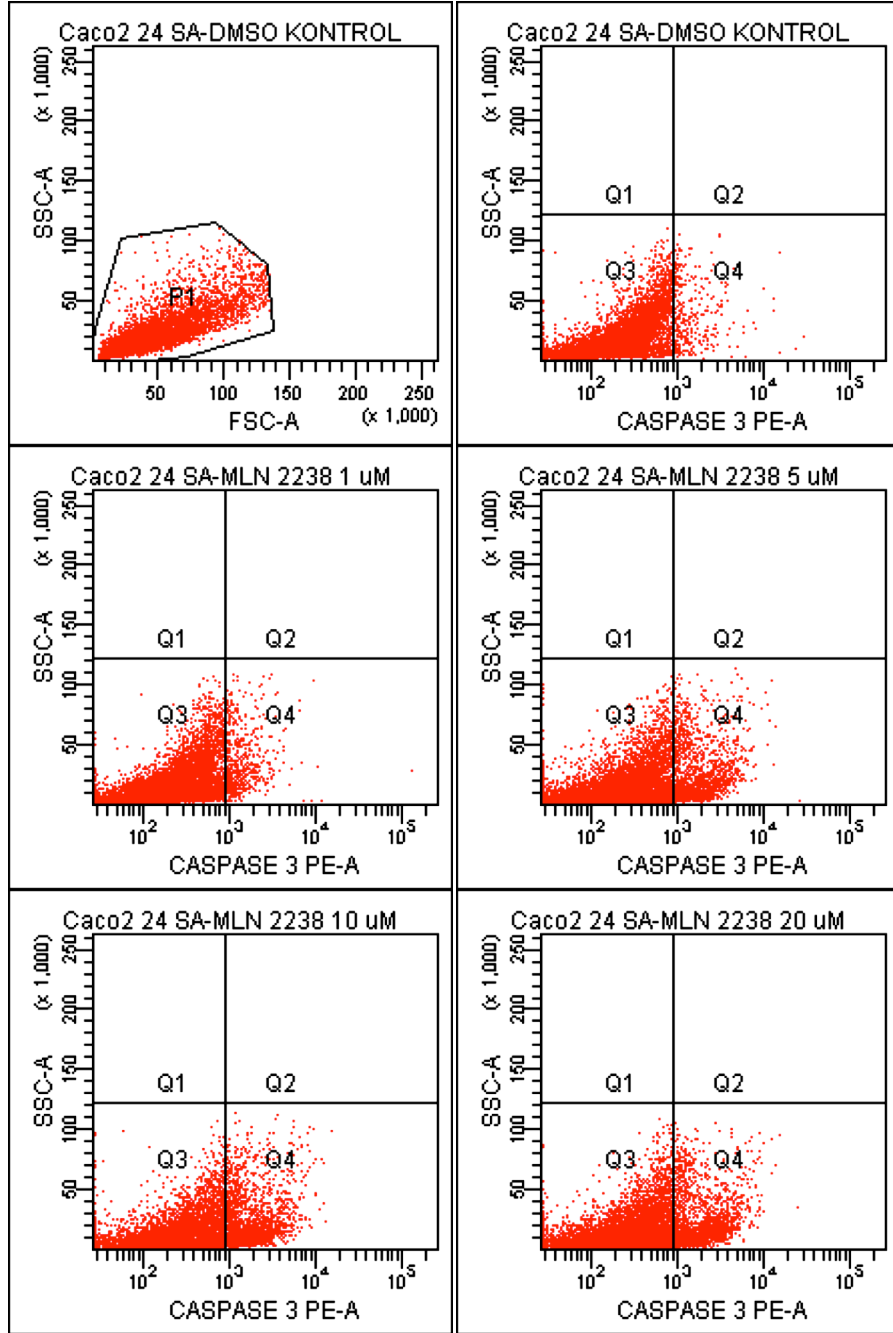
Şekil 28. Bortezomib Konsantrasyonlarının (1, 5, 10 ve 20 μ M) K562 hücreleri Üzerindeki, 48. Saatteki Kaspaz-3 Aktivasyonu Etkisi

Tablo 9. K562 Hücre Hattı Üzerinde MLN2238 ve Bortezomib'in 24 ve 48 saatlik Akış Sitometride Kaspaz- 3 Aktivasyonu Sonuçları

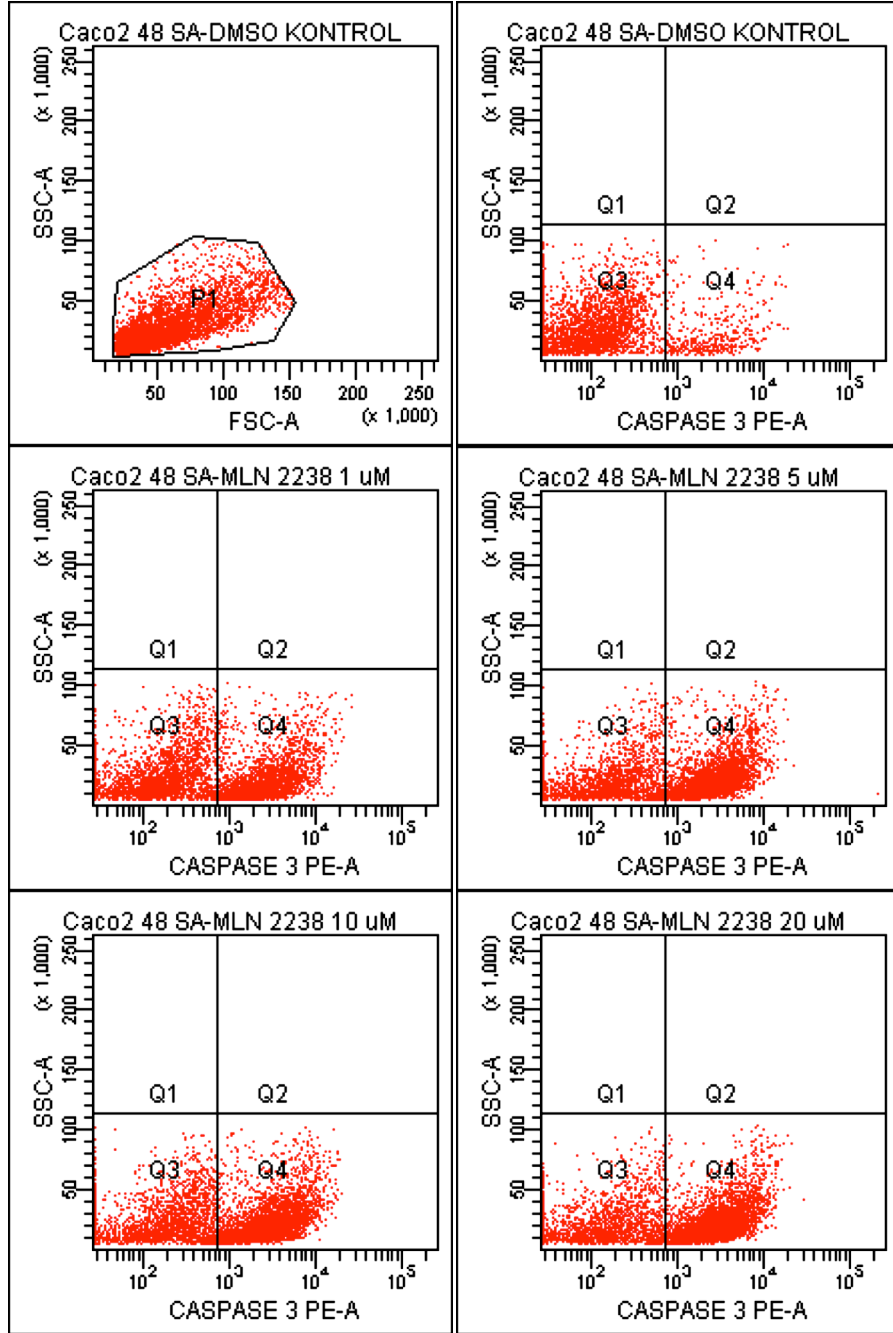
K562 hücrelerine uygulanan Konsantrasyonlar (μM)		24. Saat	
		Canlı hücre % (Q3)	Kaspaz-3 pozitif % (Q4)
MLN2238	Kontrol (%0.1 DMSO)	94.3	4.1
	1	93.9	5.0
	5	61.4	36.3
	10	54.6	44.4
	20	54.1	44.4
Bortezomib	Kontrol (%0.1 DMSO)	94.3	4.1
	1	70.4	28.3
	5	59.5	38.9
	10	60.6	38.4
	20	64.3	34.5
K562 hücrelerine uygulanan Konsantrasyonlar (μM)		48. Saat	
		Canlı hücre % (Q3)	Kaspaz-3 pozitif % (Q4)
MLN2238	Kontrol (%0.1 DMSO)	94.4	3.6
	1	73.0	26.1
	5	47.2	52.3
	10	35.6	63.4
	20	33.9	64.8
Bortezomib	Kontrol (%0.1 DMSO)	94.4	3.6
	1	44.3	55.1
	5	28.9	70.9
	10	31.8	67.3
	20	34.9	64.5

Tablo 9'deki sonuçlara göre, MLN2238'in K562 hücresi üzerinde kaspaz-3 aktivasyonu üzerine etkileri kontrole göre konsantrasyon ve zamana bağlı artmıştır. Özellikle 24. saatte $5\mu\text{M}$ 'dan; 48. saatte ise $1\mu\text{M}$ 'dan itibaren kaspaz-3 aktivasyonun önemli derecede arttığı belirlenmiştir. Bu aktif kaspaz-3 değerlerinin, 24. saatte 5, 10 ve $20\mu\text{M}$ 'da sırasıyla, %36.3, 44.4, 44.4; 48. saatte ise %52.3, 63.4, 64.8 olarak analiz edilmiştir.

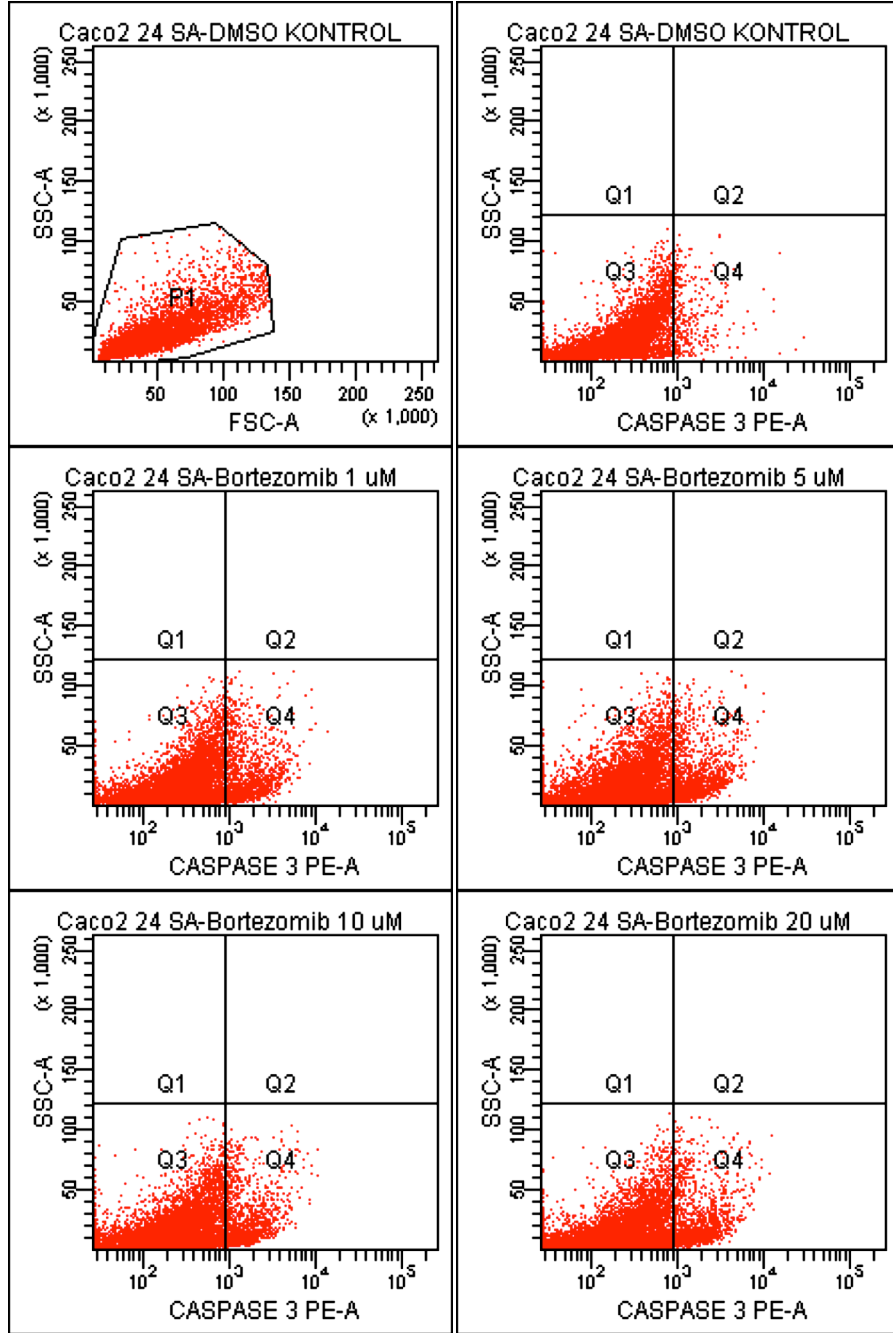
Bortezomib'in K562 hücrelerinde kaspaz-3 aktivasyonu artırıcı etkisi 24. ve 48. saatte tüm bortezomib konsantrasyonlarında görülmüştür. Bu aktif kaspaz-3 değerlerinin 24. saatte 1, 5, 10 ve $20\mu\text{M}$ 'da sırasıyla, %28.3, 38.9, 38.4 ve 34.5; 48. saatte ise %55.1, 70.9, 67.3 ve 64.5 olarak analiz edilmiştir.



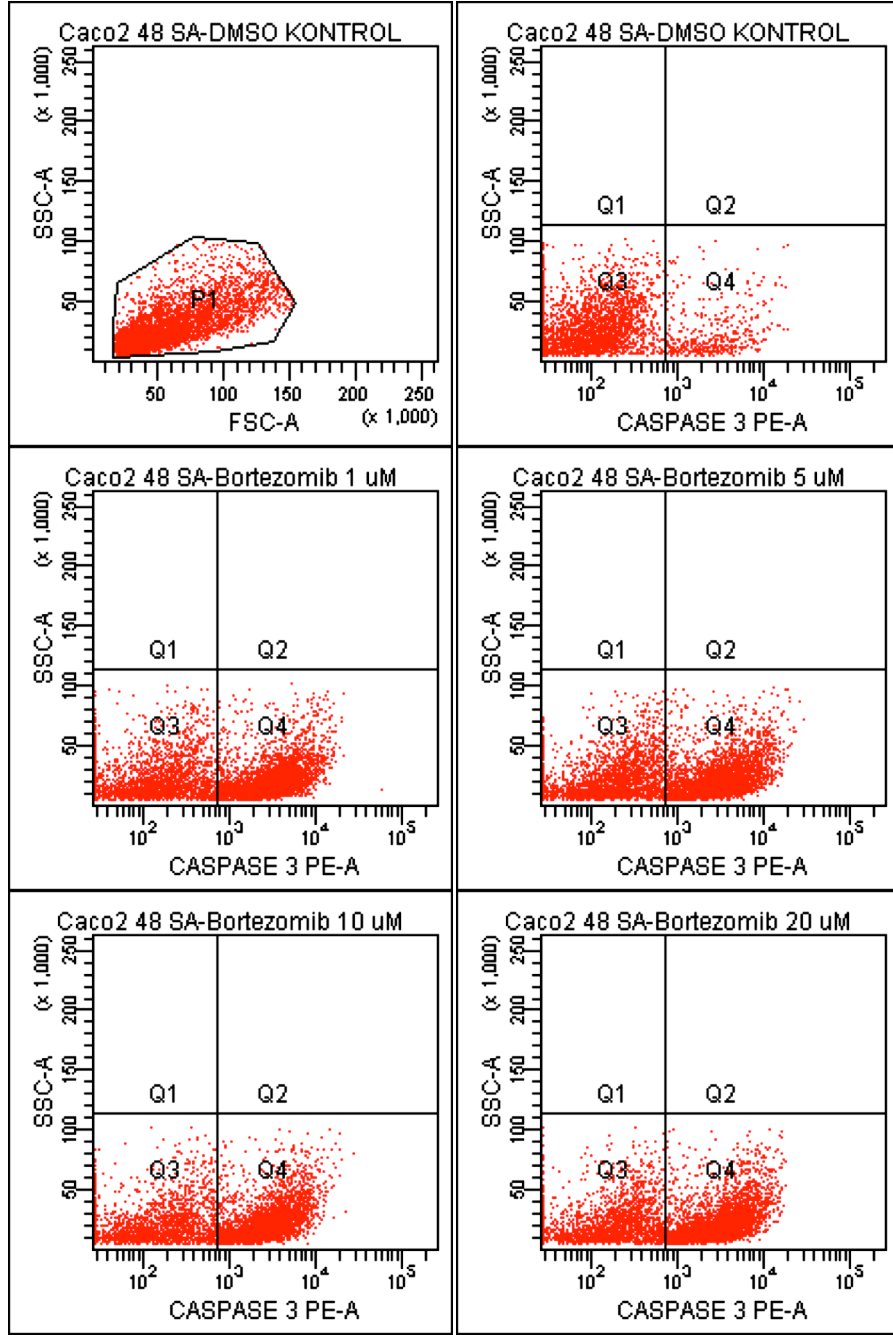
Şekil 29. MLN2238 Konsantrasyonlarının (1, 5, 10 ve 20 μM) Caco2 hücreleri Üzerindeki, 24. Saatteki Kaspaz-3 Aktivasyonu Etkisi



Şekil 30. MLN2238 Konsantrasyonlarının (1, 5, 10 ve 20 μ M) Caco2 hücreleri Üzerindeki, 48. Saatteki Kaspaz-3 Aktivasyonu Etkisi



Şekil 31. Bortezomib Konsantrasyonlarının (1, 5, 10 ve 20 μ M) Caco2 hücreleri Üzerindeki, 24. Saatteki Kaspaz-3 Aktivasyonu Etkisi



Şekil 32. Bortezomib Konsantrasyonlarının (1, 5, 10 ve 20 μ M) Caco2 hücreleri Üzerindeki, 48. Saatteki Kaspaz-3 Aktivasyonu Etkisi

Tablo 10. Caco2 Hücre Hattı Üzerinde MLN2238 ve Bortezomib'in 24 ve 48 saatlik Akış Sitometride Kaspaz- 3 Aktivasyonu Sonuçları

Caco2 hücrelerine uygulanan Konsantrasyonlar (μM)		24. Saat	
		Canlı hücre % (Q3)	Kaspaz-3 pozitif % (Q4)
MLN 2238	Kontrol (%0.1 DMSO)	91.8	5.2
	1	89.7	7.1
	5	76.0	20.9
	10	73.5	24.0
	20	72.4	24.6
Bortezomib	Kontrol (%0.1 DMSO)	91.8	5.2
	1	78.2	16.9
	5	76.9	17.1
	10	79.4	16.0
	20	78.0	18.7
Caco2 hücrelerine uygulanan Konsantrasyonlar (μM)		48. Saat	
		Canlı hücre % (Q3)	Kaspaz-3 pozitif % (Q4)
MLN 2238	Kontrol (%0.1 DMSO)	77.6	7.4
	1 μM	53.4	42.1
	5 μM	46.1	52.1
	10 μM	47.9	50.0
	20 μM	44.9	53.7
Bortezomib	Kontrol (%0.1 DMSO)	77.6	7.4
	1 μM	49.9	48.4
	5 μM	46.4	52.1
	10 μM	47.3	51.6
	20 μM	44.1	55.0

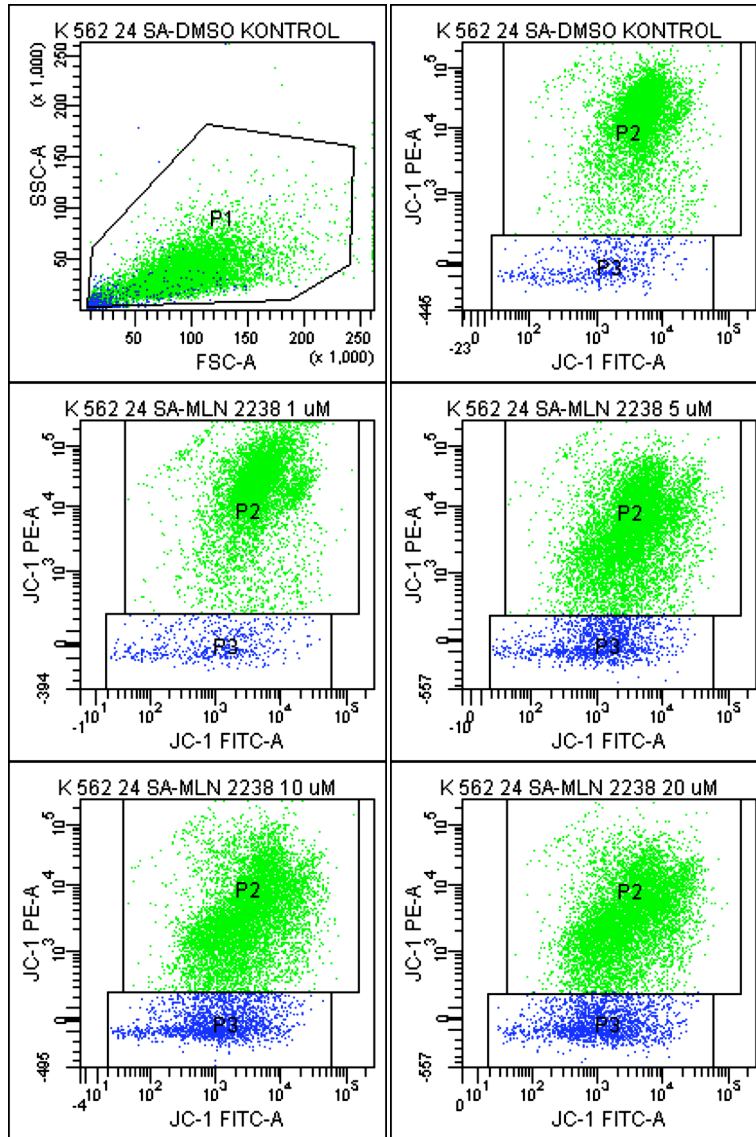
Tablo 10'daki sonuçlara göre, MLN2238'in Caco2 hücresi üzerinde kaspaz-3 aktivasyonu üzerine etkileri kontrole göre konsantrasyon ve zamana bağlı artmıştır. Özellikle 24. saatte 5 μM 'dan; 48. saatte ise 1 μM 'dan itibaren kaspaz-3 aktivasyonun önemli derecede arttığı belirlenmiştir. Bu aktif kaspaz-3 değerlerinin, 24. saatte 5, 10 ve 20 μM 'da sırasıyla, %20.9, 24, 24.6; 48. saatte ise %52.1, 50, 53.7 olarak analiz edilmiştir.

Bortezomib'in Caco2 hücrelerinde kaspaz-3 aktivasyonu artırıcı etkisi 24. ve 48. saatte tüm bortezomib konsantrasyonlarında görülmüştür. Bu aktif kaspaz-3 değerlerinin 24. saatte 1, 5, 10 ve 20 μM 'da sırasıyla, %16.9, 17.1, 16.0 ve 18.7; 48. saatte ise %48.4, 52.1, 51.6 ve 55 olarak analiz edilmiştir.

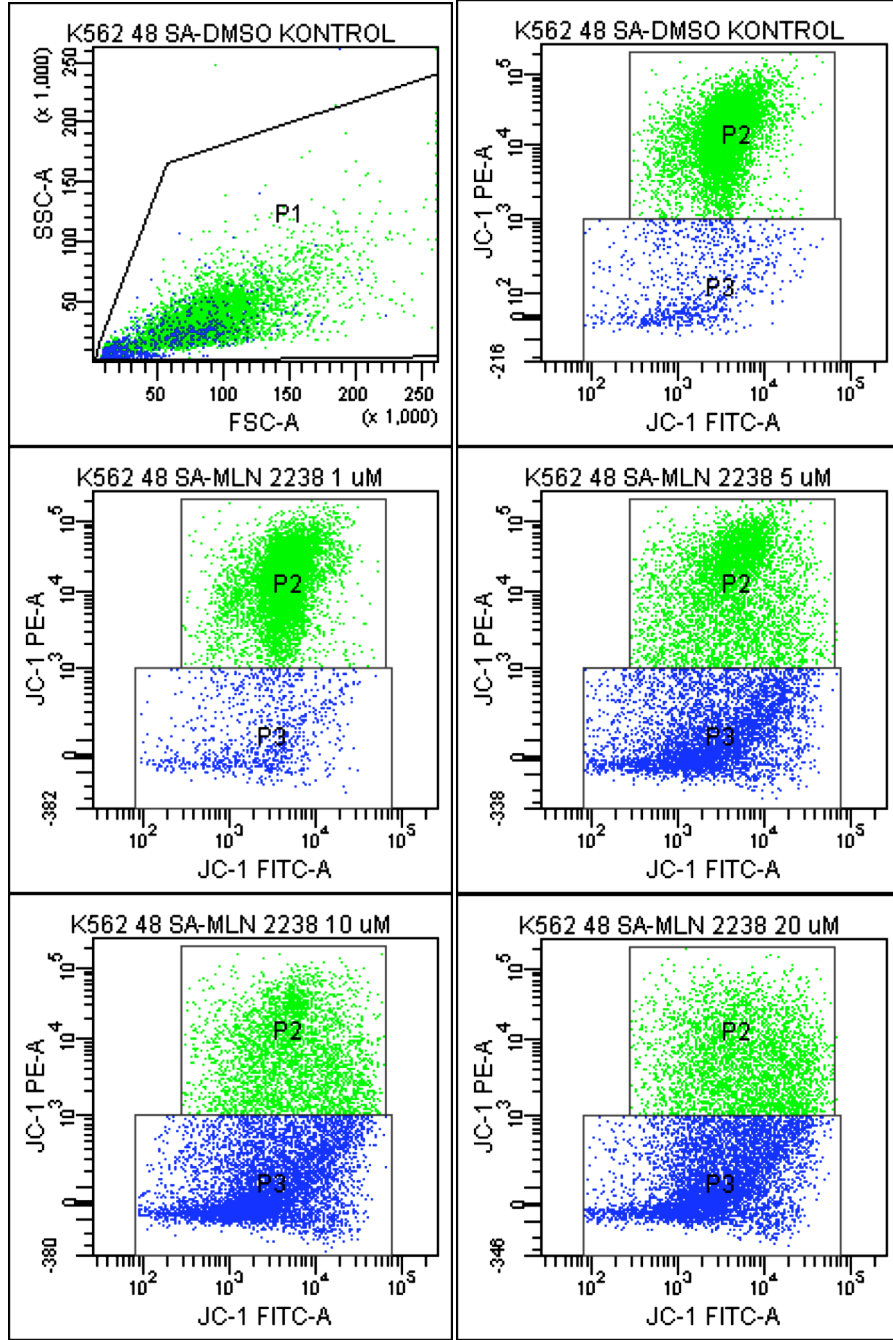
Akış sitometride JC-1 boyama yöntemi ile hücrelerin mitokondrial membran bütünlüğünün değerlendirilmesi

K562 hücreleri üzerinde, MLN2238 ve Bortezomib'in 1, 5, 10 ve 20 μM konsantrasyonlarının 24. ve 48. saatlerdeki, akış sitometri analiz sonuçları **Şekil 33, 34, 35, 36** ve **Tablo 11**'de gösterilmiştir.

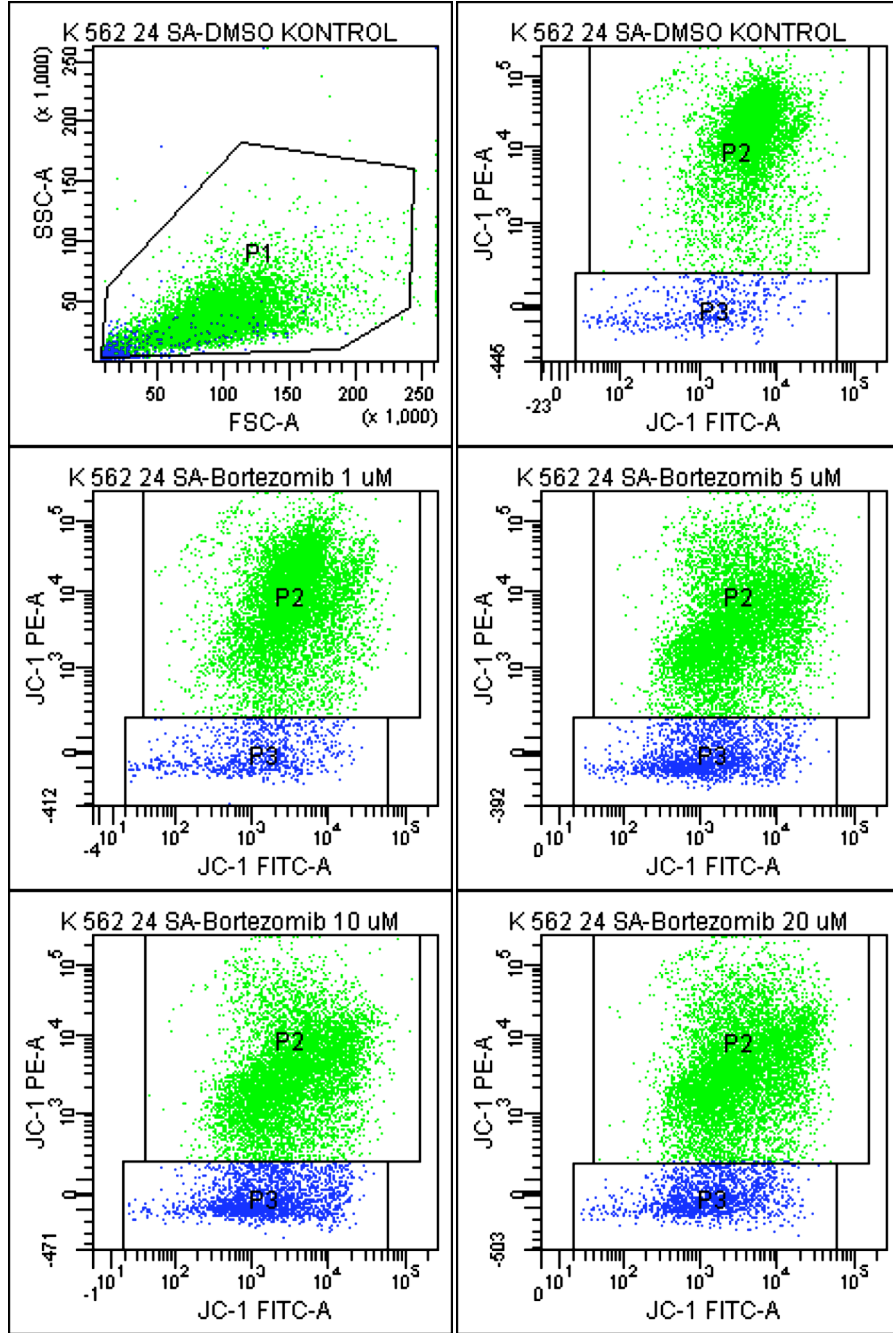
Caco2 hücreleri üzerinde, MLN2238 ve Bortezomib'in 1, 5, 10 ve 20 μM konsantrasyonlarının 24. ve 48. saatlerdeki, akış sitometri analiz sonuçları **Şekil 37, 38, 39, 40** ve **Tablo 12**'de gösterilmiştir.



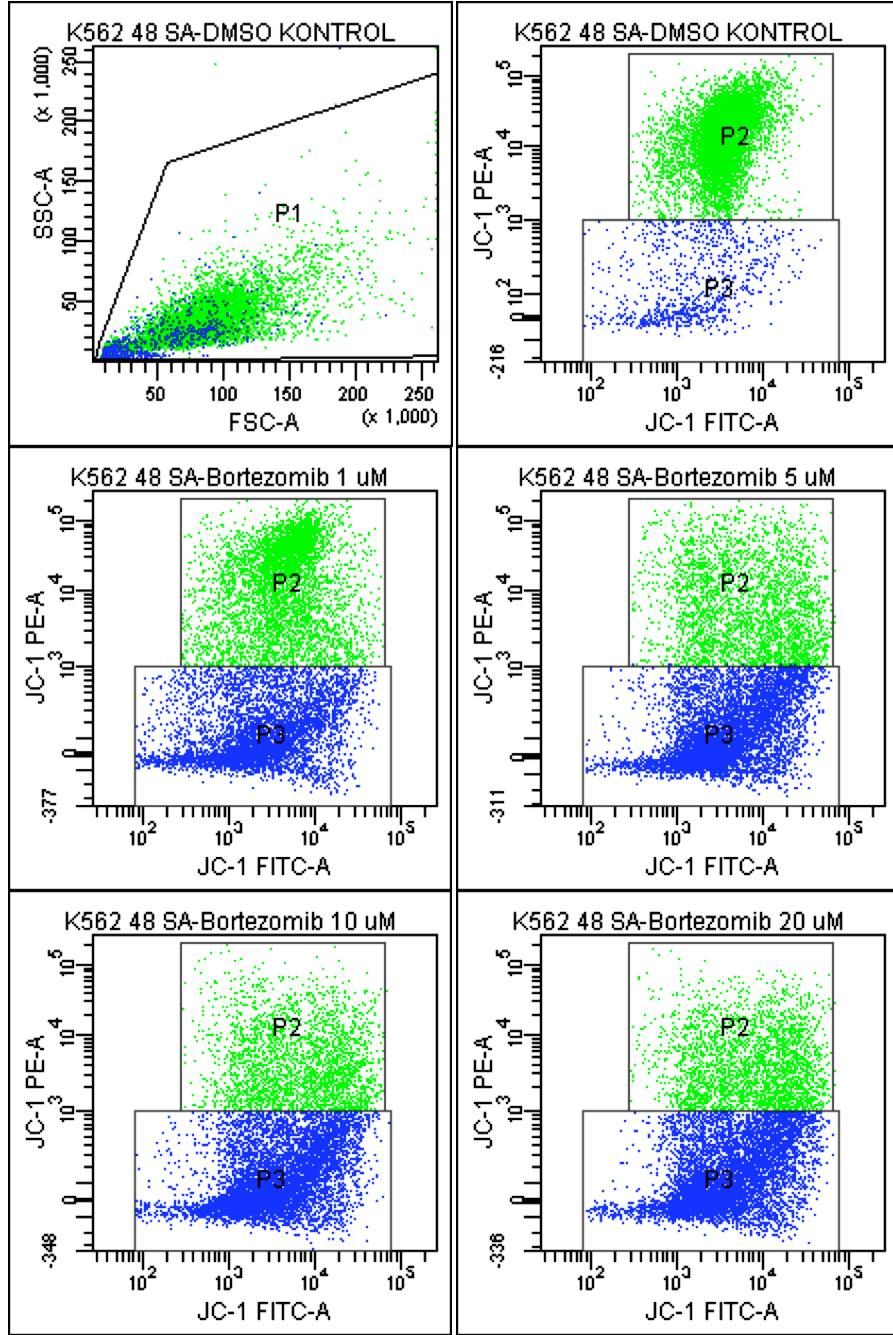
Şekil 33. MLN2238 Konsantrasyonlarının (1, 5, 10 ve 20 μM) K562 Hücreleri Üzerindeki, 24. Saatteki Mitokondrial Membran Bütünlüğüne Etkisi



Şekil 34. MLN2238 Konsantrasyonlarının (1, 5, 10 ve 20 μM) K562 Hücreleri Üzerindeki, 48. Saatteki Mitokondrial Membran Bütünlüğüne Etkisi



Şekil 35. Bortezomib Konsantrasyonlarının (1, 5, 10 ve 20 μ M) K562 Hücreleri Üzerindeki, 24. Saatteki Mitokondrial Memran Bütünlüğüne Etkisi



Şekil 36. Bortezomib Konsantrasyonlarının (1, 5, 10 ve 20 μ M) K562 Hücreleri Üzerindeki, 48. Saatteki Mitokondrial Membran Bütünlüğüne Etkisi

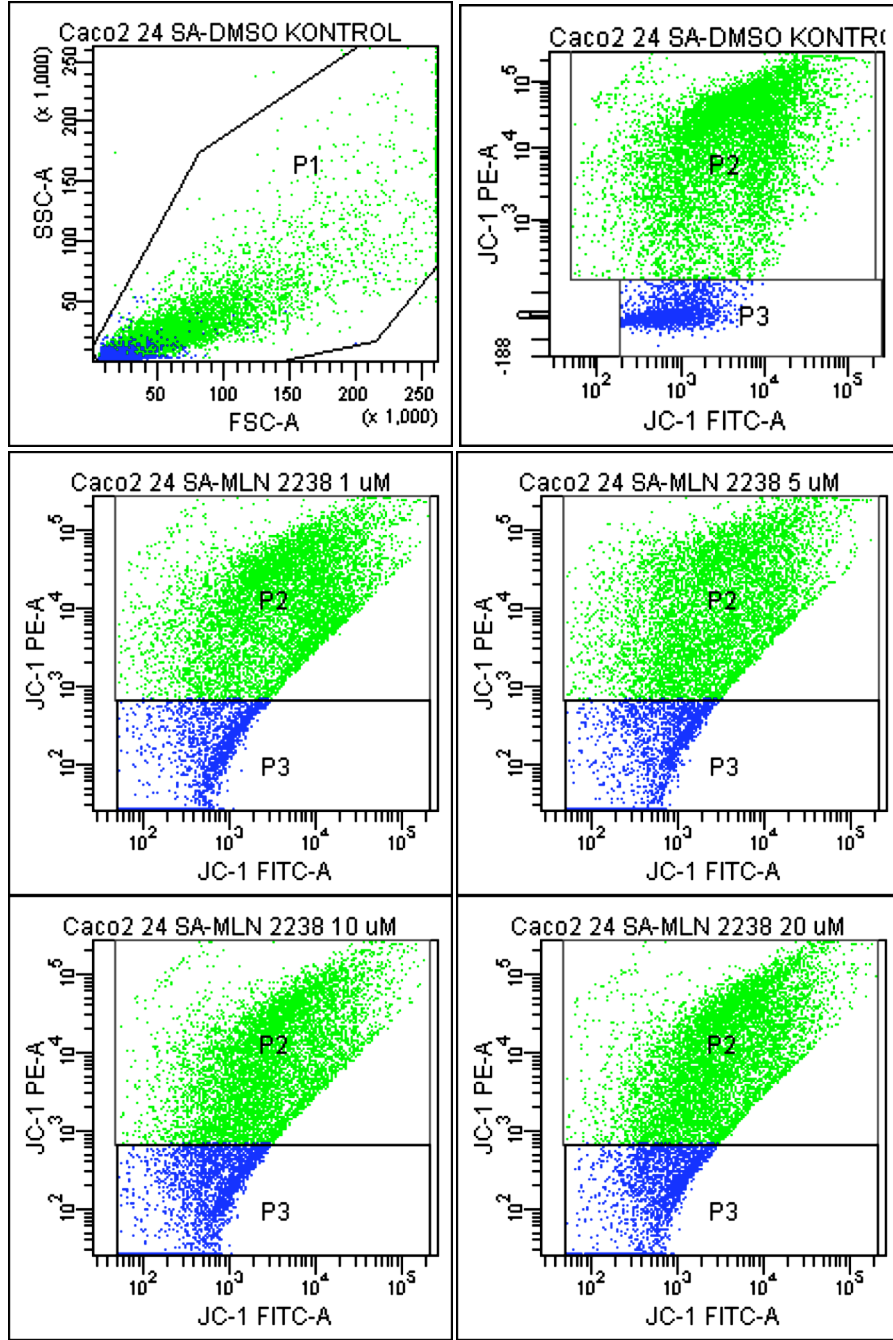
Tablo 11. K562 Hücre Hattı Üzerinde MLN2238 ve Bortezomib'in 24 ve 48 saatlik Akış Sitometride Mitokondrial Depolarizasyon (JC-1) sonuçları

K562 hücrelerine uygulanan Konsantrasyonlar (μM)		24. Saat	
		P2 (Canlı Hücre)	P3 (JC-1 Pozitif)
MLN 2238	Kontrol (%0.1 DMSO)	94.4	5.3
	1	94.8	5.0
	5	85.9	13.9
	10	81.8	18.0
	20	81.3	18.7
Bortezomib	Kontrol (%0.1 DMSO)	94.4	5.3
	1	91.7	8.3
	5	82.3	17.8
	10	79.3	20.8
	20	84.2	16.0
K562 hücrelerine uygulanan Konsantrasyonlar (μM)		48. Saat	
		P2 (Canlı Hücre)	P3 (JC-1 Pozitif)
MLN 2238	Kontrol (%0.1 DMSO)	89.7	8.6
	1	90.0	9.2
	5	50.2	47.3
	10	34.8	63.0
	20	35.1	62.9
Bortezomib	Kontrol (%0.1 DMSO)	89.7	8.6
	1	49.4	48.3
	5	30.2	69.3
	10	25.1	74.6
	20	27.5	72.7

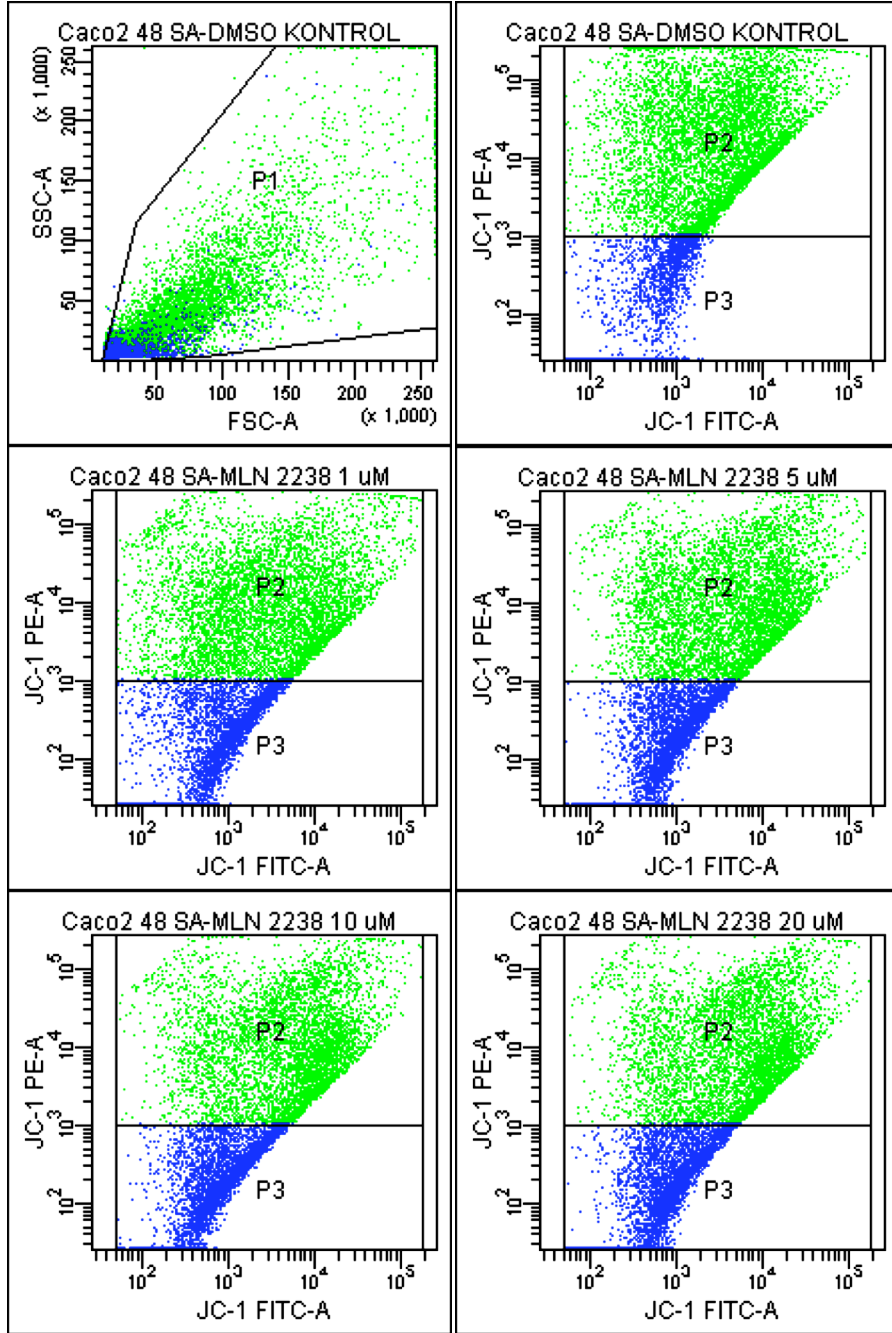
Tablo 11'de K562 hücrelerinde MLN2238 ve Bortezomibin akış sitometri analizine göre mitokondrial membran depolarizasyon (JC-1) sonuçları verilmiştir. Hücrelerin 48. saatte 24. saate göre, hem MLN2238 hem de bortezomib konsantrasyonlarında mitokondrial membran depolarizasyonları önemli düzeyde artmıştır.

24. saatte MLN2238'nin K562 hücrelerinde 5, 10 ve 20 μM 'da mitokondrial depolarizasyon değerleri sırasıyla, %13.9, 18, 18.7; 48. saatte ise %47.3, 63, 62.9 olarak belirlenmiştir.

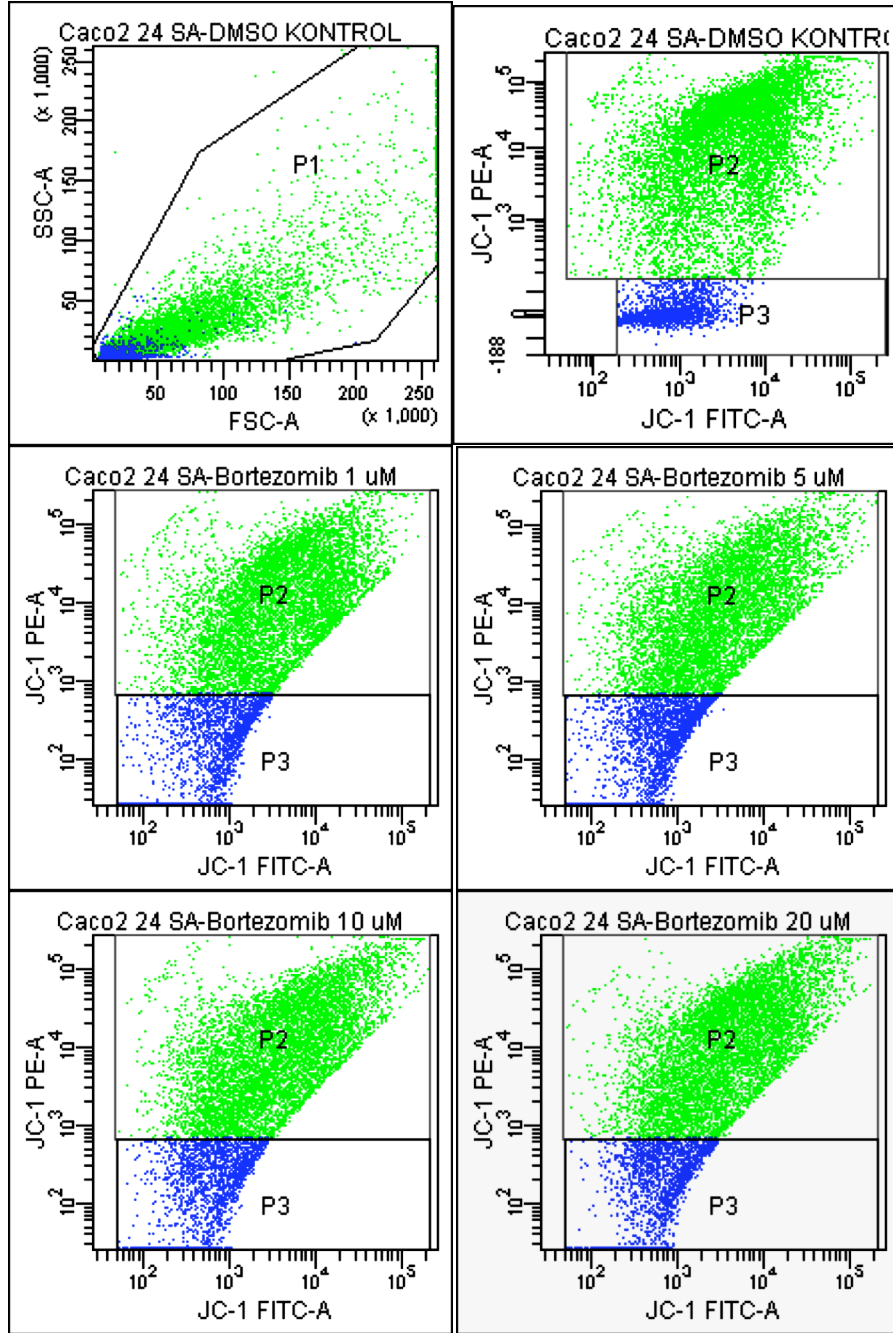
Bortezomib'de ise K562 hücrelerine mitokondrial depolarizasyon değerleri, 48. saatte 1 μM konsantrasyondan başlayarak 24. saate göre artış göstermiştir. 24. saatte 1, 5, 10 ve 20 μM konsantrasyonlarda mitokondrial depolarizasyon değerleri sırasıyla, %8.3, 17.8, 20.8, 16; 48. saatte ise %48.3, 69.3, 74.6 ve 72.7 olarak belirlenmiştir.



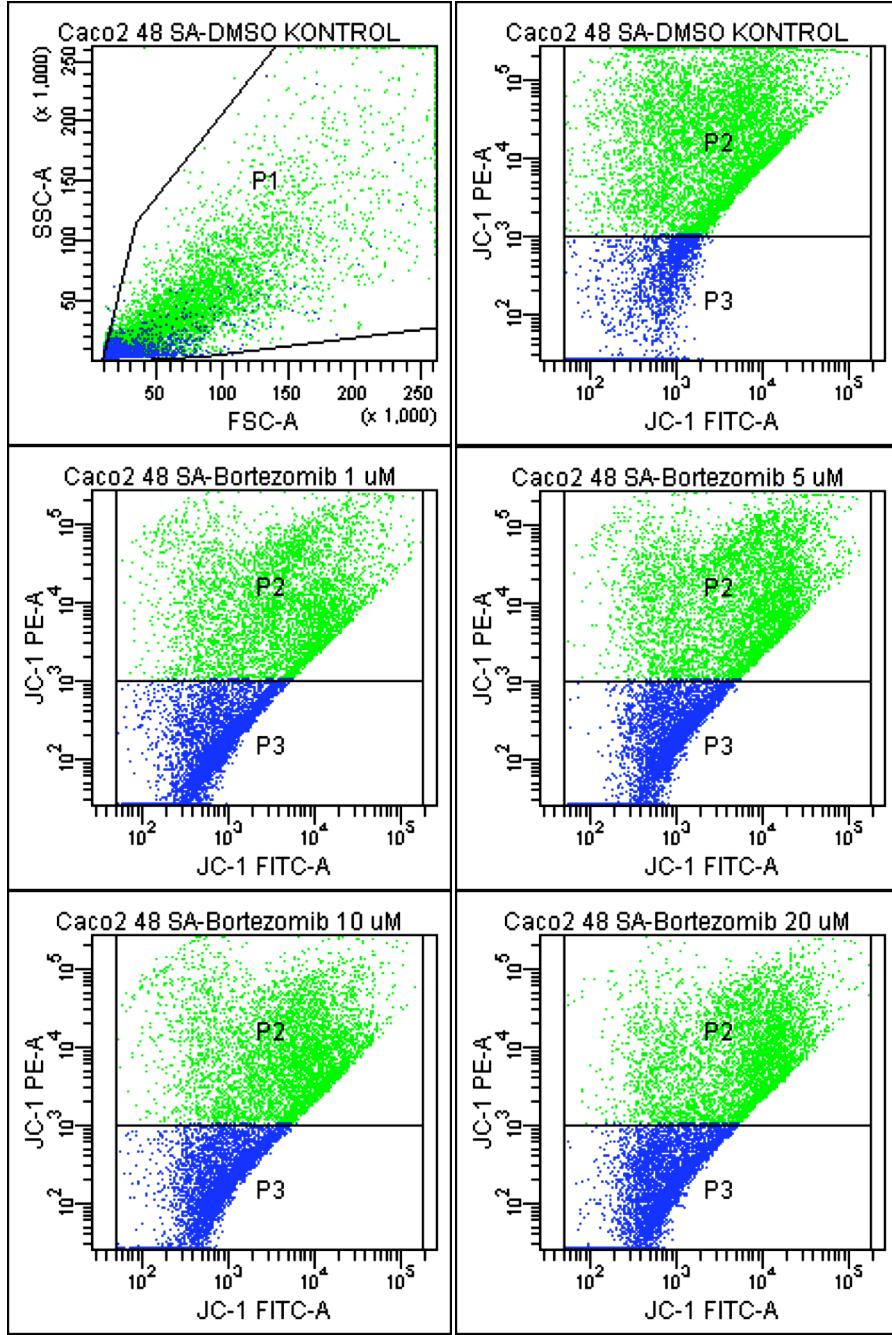
Şekil 37. MLN2238 Konsantrasyonlarının (1, 5, 10 ve 20 μ M) Caco2 Hücreleri Üzerindeki, 24. Saatteki Mitokondrial Memran Bütünlüğüne Etkisi



Şekil 38. MLN2238 Konsantrasyonlarının (1, 5, 10 ve 20 μ M) Caco2 Hücreleri Üzerindeki, 48. Saatteki Mitokondrial Memran Bütünlüğüne Etkisi



Şekil 39. Bortezomib Konsantrasyonlarının (1, 5, 10 ve 20 μ M) Caco2 Hücreleri Üzerindeki, 24. Saatteki Mitokondrial Membran Bütünlüğüne Etkisi



Şekil 40. Bortezomib Konsantrasyonlarının (1, 5, 10 ve 20 μ M) Caco2 Hücreleri Üzerindeki, 48. Saatteki Mitokondrial Membran Bütünlüğüne Etkisi

Tablo 12. Caco2 Hücre Hattı Üzerinde MLN2238 ve Bortezomib'in 24 ve 48 saatlik Akış Sitometride Mitokondrial Depolarizasyon (JC-1) sonuçları

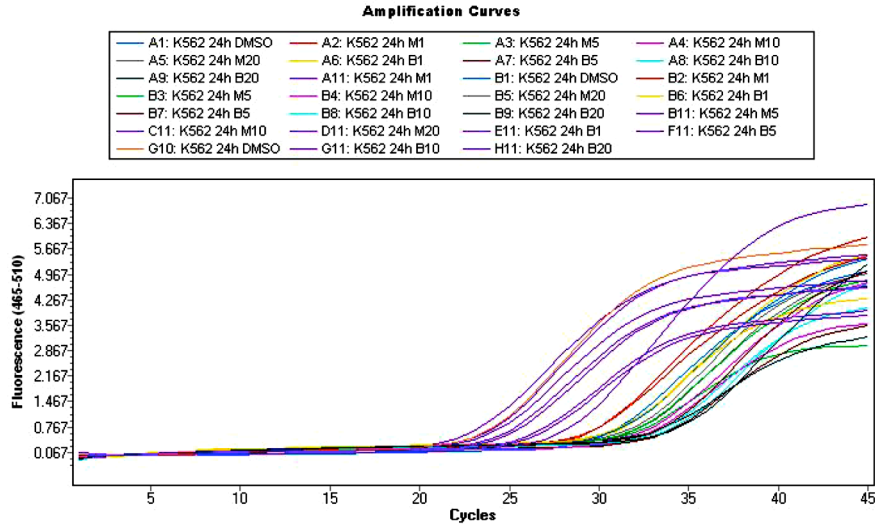
Caco2 hücrelerine uygulanan Konsantrasyonlar (μM)		24. Saat	
		P2 (Canlı Hücre)	P3 (JC-1 Pozitif)
MLN 2238	Kontrol (%0.1 DMSO)	78.1	21.0
	1	77.0	21.5
	5	70.3	21.2
	10	72.6	27.6
	20	76.4	24.0
Bortezomib	Kontrol (%0.1 DMSO)	78.1	21.0
	1	74.6	25.5
	5	72.3	27.8
	10	77.7	22.9
	20	78.6	22.0
Caco2 hücrelerine uygulanan Konsantrasyonlar (μM)		48. Saat	
		P2 (Canlı Hücre)	P3 (JC-1 Pozitif)
MLN 2238	Kontrol (%0.1 DMSO)	70.8	26.4
	1	60.9	38.1
	5	59.9	40.2
	10	56.2	44.0
	20	55.1	45.2
Bortezomib	Kontrol (%0.1 DMSO)	70.8	26.4
	1	48.6	51.5
	5	55.5	44.7
	10	51.8	48.3
	20	48.0	52.3

Tablo 12'deki sonuçlara göre MLN2238'in Caco2 hücresi üzerinde mitokondrial membran depolarizasyon değerleri, 48. saatte 1 μM konsantrasyondan başlayarak 24. saate göre artış göstermiştir. 24. saatte 1, 5, 10 ve 20 μM konsantrasyonlarda mitokondrial depolarizasyon değerleri sırasıyla, %21.5, 21.2, 27.6, 24.0 olup, kontrole göre artış belirlenmemiştir. 48. saatte ise mitokondrial depolarizasyon değerleri sırasıyla, %38.1, 40.2, 44.0 ve 45.2 olarak analiz edilmiş ve bu değerler kontrole göre artış göstermiştir.

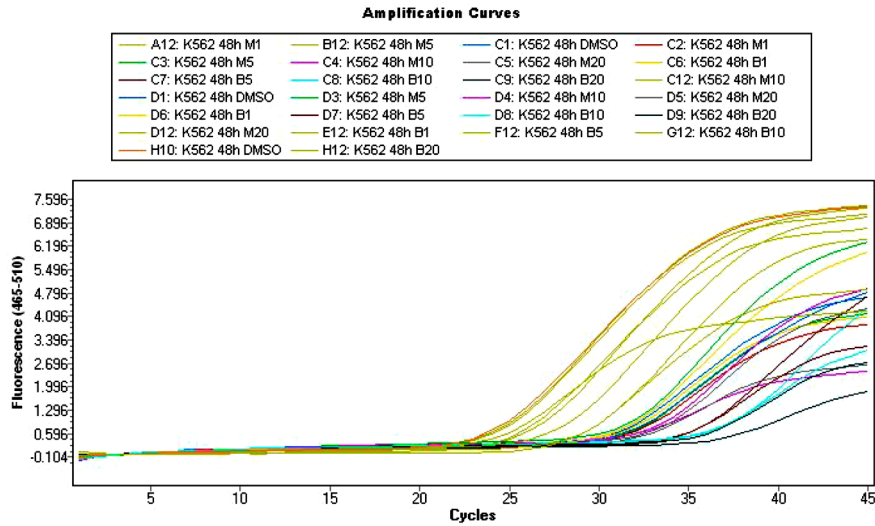
Bortezomib'de ise Caco2 hücresi üzerinde mitokondrial membran bütünlüğünü depolarize ettiği değerler 48. saatte 1 μM konsantrasyondan başlayarak 24. saate göre artış göstermiştir. 24. saatte 1, 5, 10 ve 20 μM konsantrasyonlarda mitokondrial depolarizasyon değerleri sırasıyla, %25.5, 27.8, 22.9, 22.0 olup, kontrole göre artış belirlenmemiştir. 48. saatte ise mitokondrial depolarizasyon değerleri sırasıyla, %51.5, 44.7, 48.3 ve 52.3 olarak analiz edilmiş ve bu değerler kontrole göre artış göstermiştir.

Real Time PCR ile mRNA Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

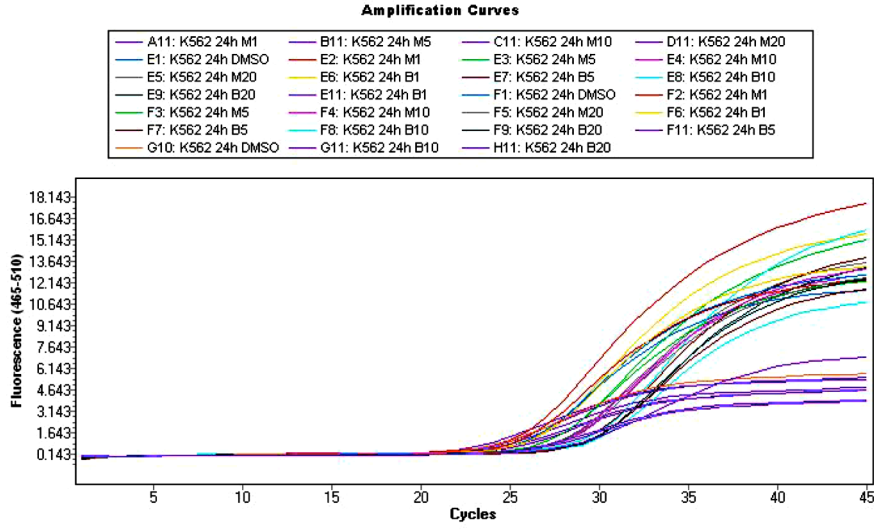
Bu çalışmada diğer çalışmalara paralel olarak MLN2238 ve Bortezomib'in 1, 5, 10 ve 20 μM konsantrasyonları her iki hücre hattına da uygulanmış ve hücreler 24 ve 48 saat inkübe edilerek RNA izolasyonları yapılmıştır. Her bir RNA örneğinin saflığı ve miktarı nanodrop cihazında belirlenmiş ve cDNA sentezi için 100 ng RNA kullanılmıştır. Elde edilen cDNA'ların Light Cycler 480 de PCR analizleri yapılmıştır. K562 (Şekil 41, 42, 43, 44) ve Caco2 (Şekil 45, 46, 47, 48) hücreleri için amplifikasyon aşamasında örnek ve referans genlerin 465-510 nm dalga boyundaki floresan aralığında eşik değerine girdikleri döngüler saptanmıştır.



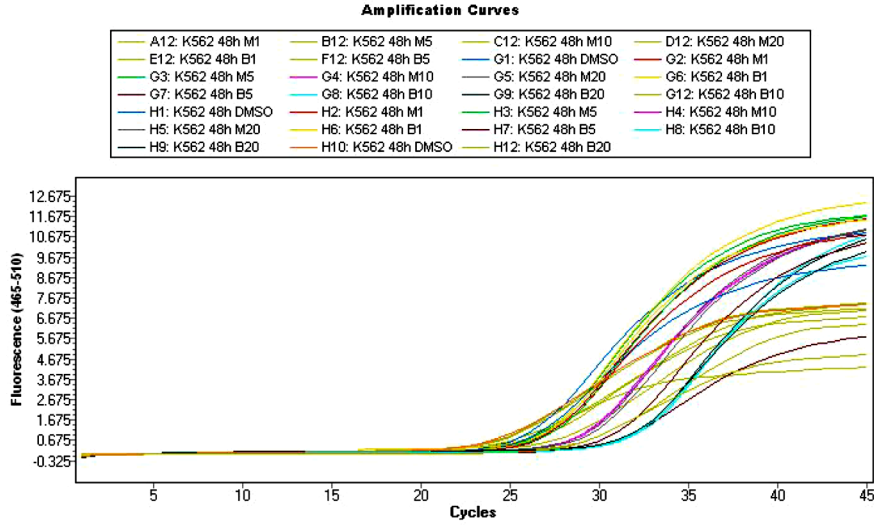
Şekil 41. MLN2238 (M) ve Bortezomib (B) konsantrasyonları ile (1, 5, 10 ve 20 μM) 24 Saat İnkübe Edilen K562 Hücrelerinde NF-kB ve GAPDH Genlerinin Amplifikasyon Eğrisi



Şekil 42. MLN2238 (M) ve Bortezomib (B) konsantrasyonları ile (1, 5, 10 ve 20 μM) 48 Saat İnkübe Edilen K562 Hücrelerinde NF-kB ve GAPDH Genlerinin Amplifikasyon Eğrisi



Şekil 43. MLN2238 (M) ve Bortezomib (B) konsantrasyonları ile (1, 5, 10 ve 20 μ M) 24 Saat İnkübe Edilen K562 Hücrelerinde C-myc ve GAPDH Genlerinin Amplifikasyon Eğrisi

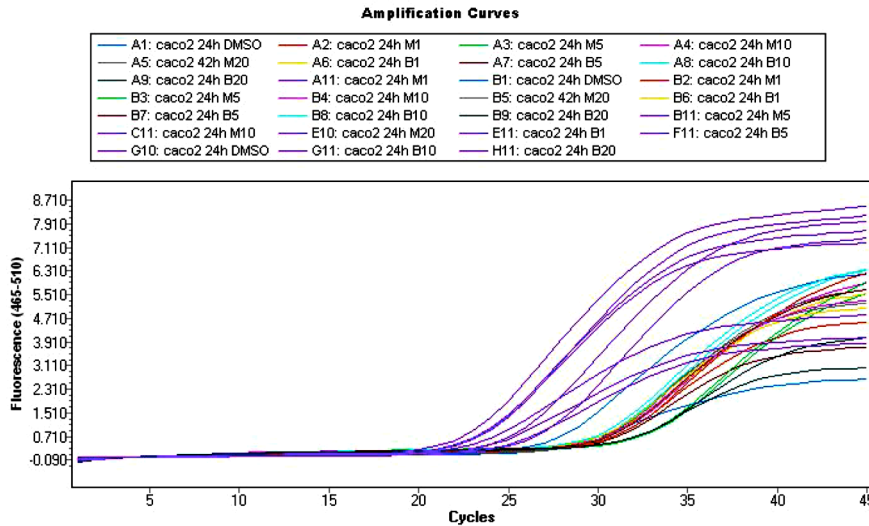


Şekil 44. MLN2238 (M) ve Bortezomib (B) konsantrasyonları ile (1, 5, 10 ve 20 μ M) 48 Saat İnkübe Edilen K562 Hücrelerinde C-myc ve GAPDH Genlerinin Amplifikasyon Eğrisi

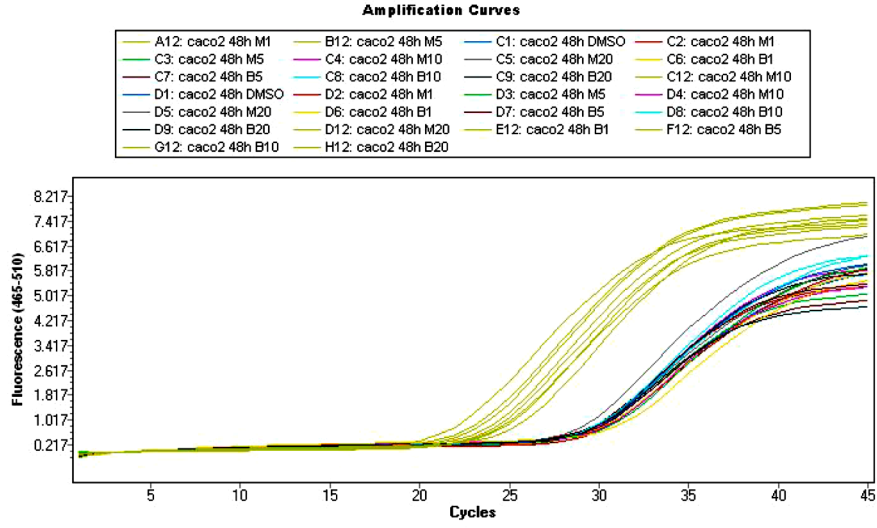
MLN2238 ve Bortezomib uygulanan K562 hücresi üzerinde yapılan RT-PCR analiz sonucunda NF-kB, c-myc ve GAPDH genlerinin ölçülen tam niceliksel eşik değerleri (CP)'nin analizi **Tablo 13**'de verilmiştir.

Tablo 13. MLN2238 ve Bortezomib Uygulanan K562 Hücreleri İçin Örnek Ve Referans Genlerin RT-PCR Sonunda Elde Edilen Eşik Değerleri (CP)

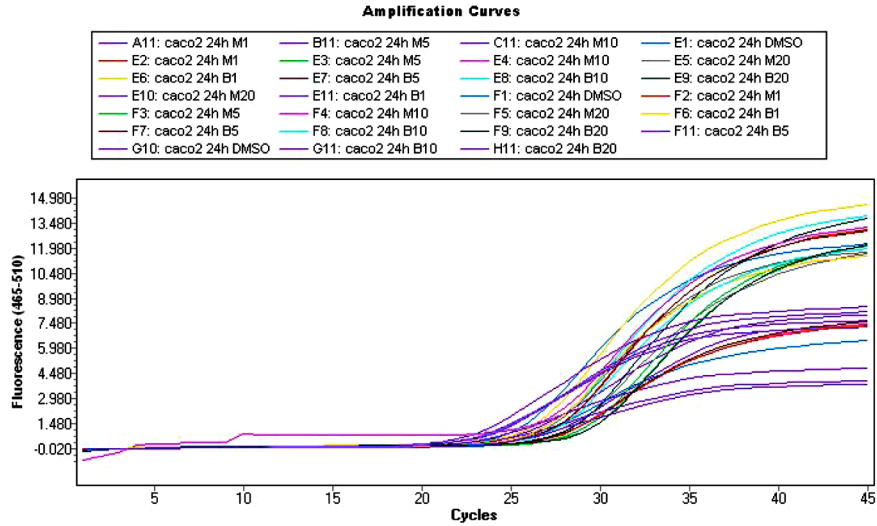
	MLN2238 ve Bortezomib Konsantrasyonları (µM)	CP değeri (NF-kB)	CP değeri (C-myc)	CP değeri (GAPDH)
24 saat	Kontrol (%0.1 DMSO)	30.80	25.92	23.85
	MLN2238-1	29.66	25.62	23.85
	MLN2238-5	31.85	27.37	22.97
	MLN2238-10	32.52	28.21	24.46
	MLN2238-20	32.10	28.13	23.95
	Bortezomib 1	31.21	26.52	23.85
	Bortezomib 5	33.52	29.41	25.94
	Bortezomib 10	33.66	29.75	26.13
	Bortezomib 20	33.94	29.68	28.31
48 saat	Kontrol (%0.1 DMSO)	31.37	25.99	24.25
	MLN2238-1	31.96	27.11	25.58
	MLN2238-5	31.81	27.17	24.67
	MLN2238-10	32.55	29.14	26.44
	MLN2238-20	32.64	29.57	24.67
	Bortezomib 1	31.48	27.05	24.67
	Bortezomib 5	35.05	30.78	28.11
	Bortezomib 10	36.61	32.13	29.53
	Bortezomib 20	36.17	31.94	28.63



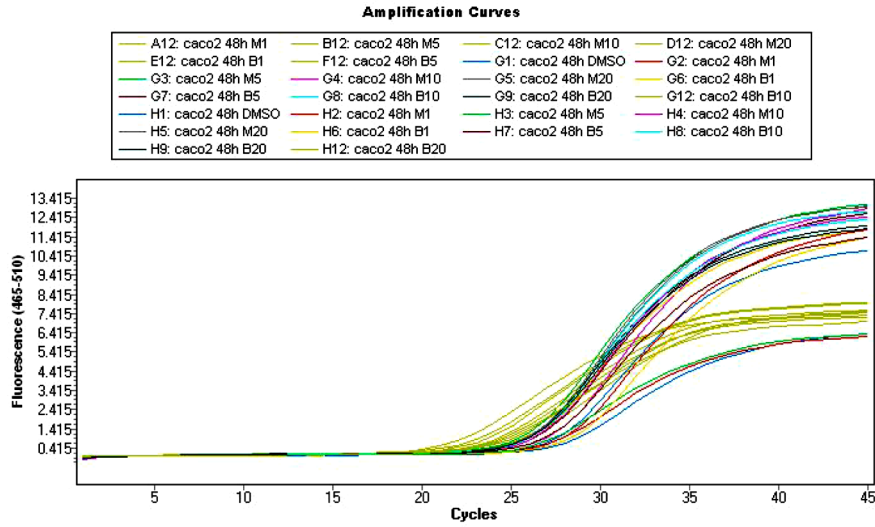
Şekil 45. MLN2238 (M) ve Bortezomib (B) Konsantrasyonları ile (1, 5, 10 ve 20 µM) 24 Saat İnkübe Edilen Caco2 Hücrelerinde NF-kB ve GAPDH Genlerinin Amplifikasyon Eğrisi



Şekil 46. MLN2238 (M) ve Bortezomib (B) Konsantrasyonları ile (1, 5, 10 ve 20 µM) 48 Saat İnkübe Edilen Caco2 Hücrelerinde NF-kB ve GAPDH Genlerinin Amplifikasyon Eğrisi



Şekil 47. MLN2238 (M) ve Bortezomib (B) Konsantrasyonları ile (1, 5, 10 ve 20 µM) 24 Saat İnkübe Edilen Caco2 Hücrelerinde C-myc ve GAPDH Genlerinin Amplifikasyon Eğrisi

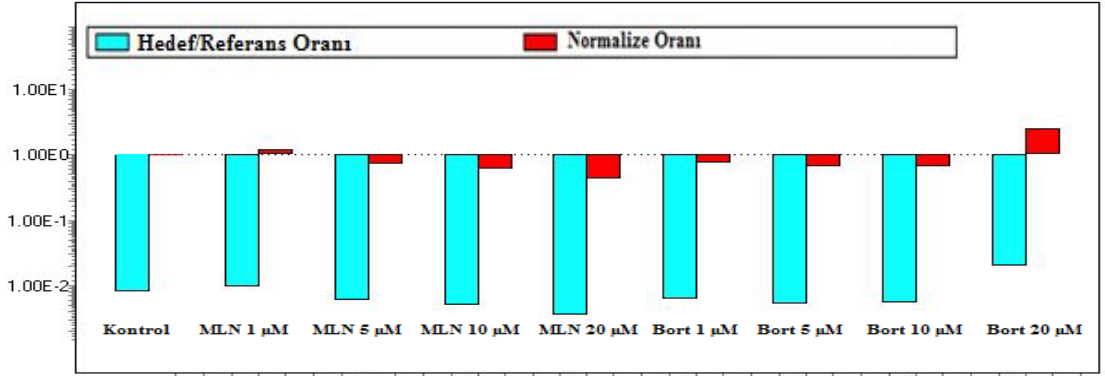


Şekil 48. MLN2238 (M) ve Bortezomib (B) Konsantrasyonları ile (1, 5, 10 ve 20 μM) 48 Saat İnkübe Edilen Caco2 Hücrelerinde C-myc ve GAPDH Genlerinin Amplifikasyon Eğrisi

MLN2238 ve Bortezomib uygulanan Caco2 hücresi üzerinde yapılan RT-PCR analiz sonucunda NF-kB, c-myc ve GAPDH genlerinin ölçülen tam niceliksel eşik değerleri (CP)'nin analizi tablo 14'de verilmiştir.

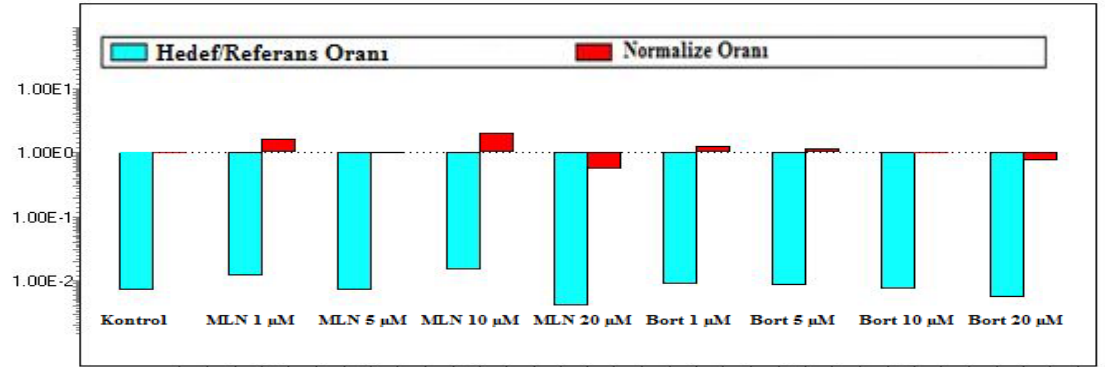
Tablo 14. MLN2238 ve Bortezomib Uygulanan Caco2 Hücreleri İçin Örnek Ve Referans Genlerin RT-PCR Sonunda Elde Edilen Eşik Değerleri (CP)

	MLN2238 ve Bortezomib Konsantrasyonları (μM)	CP değeri (NF-kB)	CP değeri (C-myc)	CP değeri (GAPDH)
24 saat	Kontrol (%0.1 DMSO)	27.76	25.49	22.83
	MLN2238-1	30.89	27.53	25.41
	MLN2238- 5	32.84	29.13	26.94
	MLN2238-10	30.75	27.26	23.95
	MLN2238-20	30.18	27.41	23.41
	Bortezomib 1	30.31	26.39	23.28
	Bortezomib 5	30.56	27.53	23.83
	Bortezomib 10	30.27	27.31	23.34
	Bortezomib 20	31.70	28.90	24.81
48 saat	Kontrol (%0.1 DMSO)	29.59	27.67	21.83
	MLN2238-1	29.60	27.48	21.81
	MLN2238-5	30.14	26.18	23.26
	MLN2238-10	30.01	27.05	24.67
	MLN2238-20	29.27	26.38	22.93
	Bortezomib 1	30.44	27.38	25.37
	Bortezomib 5	29.57	26.84	23.83
	Bortezomib 10	29.74	26.41	23.95
	Bortezomib 20	29.63	26.16	24.21

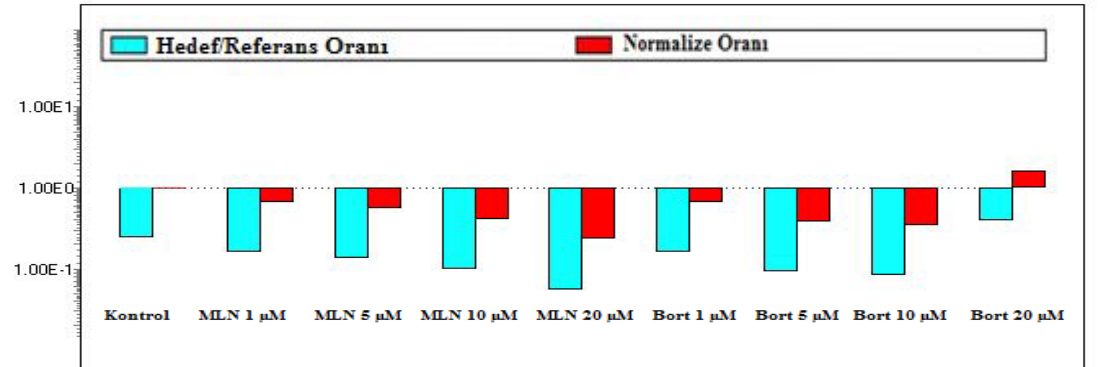


Şekil 49. MLN2238 ve Bortezomib Konsantrasyonları ile 24 Saat İnkübe Edilmiş K562 Hücrelerinde NF-kB Genine Ait Hedef/Referans Oranları

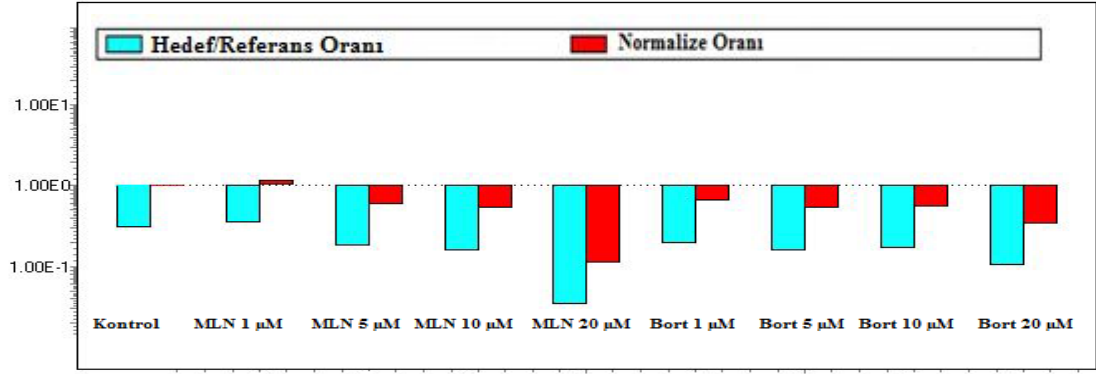
K562 hücrelerinde, 24. saatte kontrole göre MLN2238'in 5, 10, 20 µM, Bortezomib'in de 1, 5, 10 µM konsantrasyonlarında NF-kB mRNA ekspresyonunun konsantrasyon artışına paralel olarak azalmış olduğu belirlendi. 48. saatte ise NF-kB mRNA ekspresyonunda kontrole göre azalma görülmemiştir.



Şekil 50. MLN2238 ve Bortezomib Konsantrasyonları ile 48 Saat İnkübe Edilmiş K562 Hücrelerinde NF-kB Genine Ait Hedef/Referans Oranları



Şekil 51. MLN2238 ve Bortezomib Konsantrasyonları ile 24 Saat İnkübe Edilmiş K562 Hücrelerinde c-myc Genine Ait Hedef/Referans Oranları

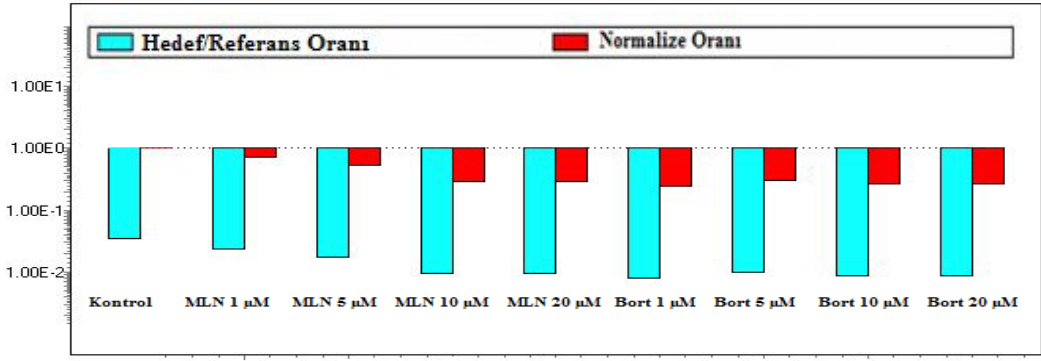


Şekil 52. MLN2238 ve Bortezomib Konsantrasyonları ile 48 Saat İnkübe Edilmiş K562 Hücrelerinde c-myc Genine Ait Hedef/Referans Oranları

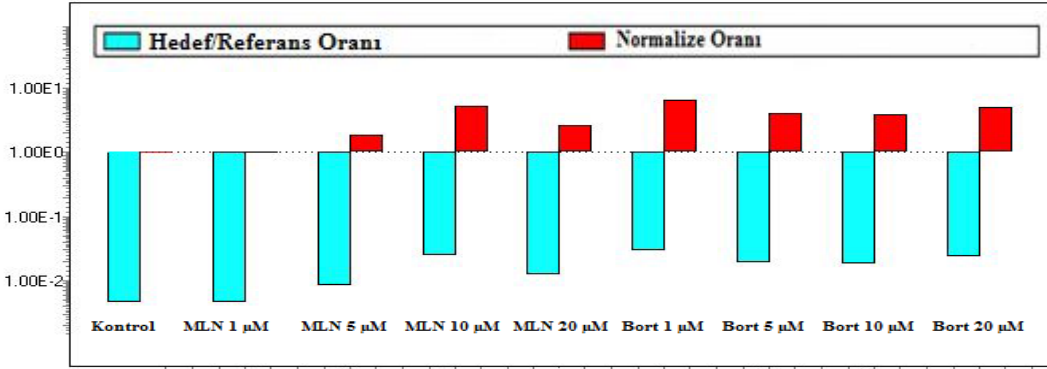
K562 hücrelerinde 24 saatte MLN2238'in 1, 5, 10, 20 μ M ve Bortezomib'in 1, 5 ve 10 μ M konsantrasyonlarında c-myc mRNA ekspresyonu, belirgin bir düzeyde azalma göstermiştir. 48. saatte de MLN2238 ve Bortezomib'in tüm konsantrasyonlarının artışına paralel olarak c-myc mRNA ekspresyonu azalmıştır. En fazla c-myc mRNA ekspresyonunu azaltıcı etki, 48. saatte 20 μ M MLN2238 konsantrasyonunda görülmüştür (Şekil 51, 52 ve Tablo 15).

Tablo 15. MLN2238 ve Bortezomib Konsantrasyonları ile İnkübe Edilmiş K562 Hücrelerinde RT-PCR Sonucunda Hesaplanan NF- κ B ve c-myc Genine Ait Hedef/Referans Oranları

MLN2238 ve Bortezomib Konsantrasyonları (μ M)		Hedef/Referans Oranı (NF κ B)	Normalize Oranı (NF- κ B)	Hedef/Referans Oranı (Cmcy)	Normalize Oranı (Cmcy)
24 saat	Kontrol (%0.1 DMSO)	8.09 E-3	1.000	0.2386	1.000
	MLN2238-1	9.68 E-3	1.196	0.1590	0.6664
	MLN2238-5	5.92 E-3	0.7318	0.1329	0.5569
	MLN2238-10	4.95 E-3	0.6122	9.84E-2	0.4125
	MLN2238-20	3.52 E-3	0.4348	5.53E-2	0.2317
	Bortezomib 1	6.10 E-3	0.7537	0.157E-2	0.6589
	Bortezomib 5	5.24 E-3	0.6472	9.06E-2	0.3798
	Bortezomib 10	5.41E-3	0.6682	8.14E-2	0.3412
48 saat	Kontrol (%0.1 DMSO)	7.17E-3	1.000	0.2990	1.000
	MLN2238-1	1.20E-2	1.673	0.3454	1.155
	MLN2238-5	7.12E-3	0.9943	0.1771	0.5923
	MLN2238-10	1.45E-2	2.020	0.1547	0.5173
	MLN2238-20	3.98E-3	0.5560	3.33E-2	0.1114
	Bortezomib 1	8.89E-3	1.241	0.1920	0.6420
	Bortezomib 5	8.17E-3	1.140	0.1563	0.5228
	Bortezomib 10	7.37E-3	1.029	0.1644	0.5500
Bortezomib 20	5.38E-3	0.7513	0.1011	0.3380	

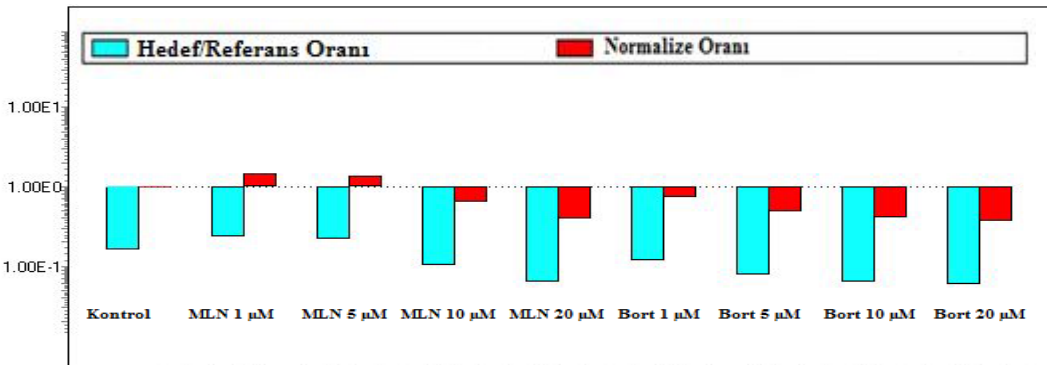


Şekil 53. MLN2238 ve Bortezomib Konsantrasyonları ile 24 Saat İnkübe Edilmiş Caco2 Hücrelerinde NF-kB Genine Ait Hedef/Referans Oranları

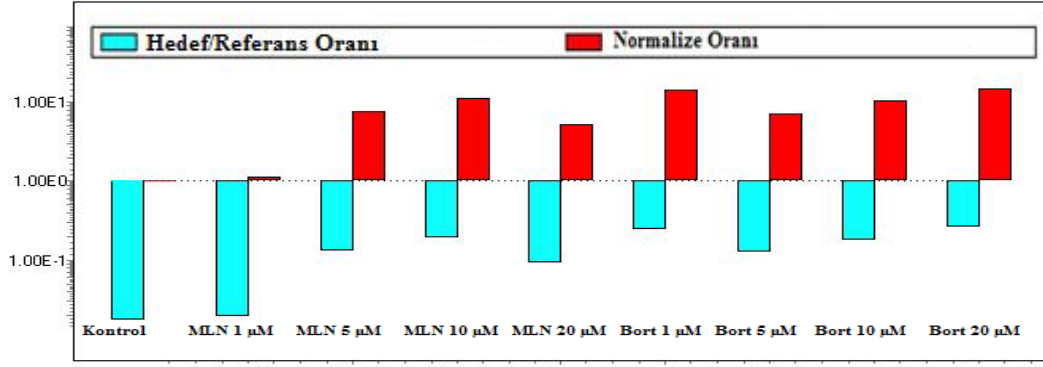


Şekil 54. MLN2238 ve Bortezomib Konsantrasyonları ile 48 Saat İnkübe Edilmiş Caco2 Hücrelerinde NF-kB Genine Ait Hedef/Referans Oranları

Caco2 hücrelerinde 24. saatte 1, 5, 10 ve 20 µM MLN2238 ve Bortezomib konsantrasyonlarında NF-kB mRNA ekspresyonunun önemli düzeyde azaldığı olduğu belirlenmiştir. 48. saatte ise K562 hücre ekspresyon sonuçlarına benzer olarak, Caco2 hücrelerinde NF-kB mRNA ekspresyonda azalma görülmemiştir.



Şekil 55. MLN2238 ve Bortezomib Konsantrasyonları ile 24 Saat İnkübe Edilmiş Caco2 Hücrelerinde c-myc Genine Ait Hedef/Referans Oranları



Şekil 56. MLN2238 ve Bortezomib Konsantrasyonları ile 48 Saat İnkübe Edilmiş Caco2 Hücrelerinde c-myc Genine Ait Hedef/Referans Oranları

RT-PCR sonucunda, Caco2 hücrelerinde 24. saatte MLN2238'in 10 ve 20 µM, Bortezomib'in de 1, 5, 10, 20 µM konsantrasyonlarında c-myc mRNA ekspresyonunun azaldığı analiz edilmiştir. En fazla mRNA ekspresyon azalışının 20 µM MLN2238 ve Bortezomib konsantrasyonlarında olduğu görülmüştür. 48. saatte ise c-myc mRNA ekspresyonunda kontrole göre azalma görülmemiştir.

Tablo16. MLN2238 ve Bortezomib Konsantrasyonları ile İnkübe Edilmiş Caco2 Hücrelerinde RT-PCR Sonucunda Hesaplanan NF-kB ve c-myc Genine Ait Hedef/Referans Oranları

MLN2238 ve Bortezomib Konsantrasyonları (µM)		Hedef/Referans Oranı (NFkB)	Normalize Oranı (NF-kB)	Hedef/Referans Oranı (Cmcy)	Normalize Oranı (Cmcy)
24 saat	Kontrol (%0.1 DMSO)	3.28E-2	1.000	0.1592	1.000
	MLN2238-1	2.25E-2	0.6847	0.2301	1.446
	MLN2238-5	1.67E-2	0.5093	0.2190	1.376
	MLN2238-10	8.98E-3	0.2738	0.1003	0.6301
	MLN2238-20	9.16E-3	0.2793	6.25E-2	0.3927
	Bortezomib-1	7.66E-3	0.2335	0.1158	0.7276
	Bortezomib-5	9.44E-3	0.2879	7.70E-2	0.4835
	Bortezomib-10	8.17E-3	0.2493	6.37e-2	0.4002
	Bortezomib-20	8.40E-3	0.2562	5.87e-2	0.3688
48 saat	Kontrol (%0.1 DMSO)	4.61E-3	1.000	1.75E-2	1.000
	MLN2238-1	4.53E-3	0.9808	1.96E-2	1.121
	MLN2238-5	8.47E-3	1.836	0.1324	7.565
	MLN2238-10	2.48E-2	5.374	0.1931	11.03
	MLN2238-20	1.23E-2	2.670	9.13E-2	5.219
	Bortezomib 1	2.99E-2	6.469	0.2481	14.18
	Bortezomib 5	1.88E-2	4.068	0.1246	7.118
	Bortezomib 10	1.80E-2	3.906	0.1819	10.40
	Bortezomib 20	2.34E-2	5.067	0.2589	14.79

Bu tez çalışmasında, MLN2238 ve Bortezomib konsantrasyonlarının sitotoksik etkileri, WST-1 yöntemi kullanılarak araştırılmış ve WST-1 absorbans sonuçları kullanılarak, kontrol grubuna göre, her bir grubun % hücre canlılık değerleri hesaplanmıştır.

K562 hücreleri üzerinde MLN2238'in konsantrasyon artışına bağlı olarak kontrole göre hücre proliferasyonunun hem 24 hem de 48. saatte önemli düzeyde azalttığı belirlenmiştir. 48. saatte özellikle 5, 10, 20 ve 30 μM konsantrasyonlarda hücre proliferasyonunun %50'nin altına düştüğü görülmektedir. K562 hücrelerinde MLN2238'e paralel olarak Bortezomib'in de 24. ve 48. saatte hücre proliferasyonunu azalttığı belirlenmiştir. 48. saatte 1, 5, 10, 20 ve 30 μM Bortezomib konsantrasyonlarının önemli antiproliferatif etkisi olduğu görülmektedir.

Caco2 hücrelerinde MLN2238'in hem 24 hem de 48 saatlik inkübasyonu sonucunda, konsantrasyon artışına bağlı olarak hücre proliferasyonunda önemli azalmalar görülmüştür. Caco2 hücrelerinde de K562 hücrelerinde olduğu gibi %50'den daha fazla hücre inhibisyonunun 48. saatte 10, 20 ve 30 μM MLN2238 konsantrasyonunda olduğu belirlenmiştir. Bortezomib konsantrasyonlarının da Caco2 hücresi üzerinde önemli antiproliferatif etki gösterdiği belirlenmiş ve en fazla etkinin 48. saatteki 30 μM 'da (%51.17) olduğu görülmüştür.

Proteozom inhibitörleri, proteozomların fonksiyonlarını inhibe eder, protein yapımını güçleştirir ve çoklu sinyal iletimini engellerler. Sinyal iletimi kesilince kanserli hücreler ölür ve tümörün büyümesi baskılanır. Bizim çalışmamızda da MLN2238 ve Bortezomib zaman ve konsantrasyona bağımlı olarak hem K562 hem de Caco2 hücrelerinde önemli antiproliferatif etkiler meydana getirmiştir. MLN2238'in her iki hücre hattında da benzer antiproliferatif etkileri olduğu görülürken, Bortezomib'in K562 hücrelerindeki antiproliferatif etkisinin solid bir tümör olan Caco2 hücreleri üzerinde daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Bizim WST-1 bulgularımıza paralel olarak, multiple myelom hücreleri üzerinde MLN2238'in 6.5, 12.5, 25 ve 50 nmol/L konsantrasyonları kullanılarak yapılan MTT sitotoksikite testi sonuçlarına göre 48. saatte 12.5 nmol/L konsantrasyonda %50'ye yaklaşan, 25 nmol/L'de ise %50'den fazla antiproliferatif etki bulunmuştur (Chauhan ve ark., 2011)

Yan ve arkadaşlarının K562 hücreleri üzerinde yaptıkları bir çalışmada, 48. saatte 32 nM Bortezomib Konsantrasyonunda %50 ve 64 nM konsantrasyonunda ise %80 oranında hücre inhibisyonu olduğu ifade edilmiştir (Yan ve ark., 2007).

Bortezomib'in farklı konsantrasyonları (0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.06 ve 0.1 μM) ile yapılan bir çalışmada Caco2 hücreleri üzerindeki WST-1 sonuçlarına göre IC50 konsantrasyonun 0.03 ila 0.04 $\mu\text{M}/\text{L}$ arasında olduğu vurgulanmıştır (Loeffler-Ragg ve ark., 2009)

Yine Bortezomib'in kolon kanseri hücreleri üzerinde antiproliferatif etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada; 3 farklı insan kolon kanser hücre hattında (HCT116, HT-29 ve Caco2) MTT analizine göre, 48. saatte Bortezomib'in 333 nM konsantrasyonunun Caco2 hücrelerinin proliferasyonunu %60 oranında azalttığı gösterilmiştir (Voutsadakis ve ark., 2010).

DU145 insan prostat kanseri hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada, Bortezomib'in 1, 5, 10, 20 ve 50 µM konsantrasyonlarında MTT yöntemine göre 48. saatte 20 µM'da yaklaşık %40 ve 50 µM konsantrasyonda ise %50 den fazla hücre proliferasyonunda inhibisyon olduğu ifade edilmiştir (Goktas ve ark., 2010)

Ayrıca Chitambar ve Purpi'nin Mantle lenfoma (Granta) hücreleri üzerinde yaptığı bir çalışmada 2, 4, 6 ve 8 nM Bortezomib konsantrasyonlarından, 48. saat MTT sonuçlarına göre sadece 8 nM'de hücre inhibisyonunun %50'den daha fazla olduğu açıklanmıştır (Chitambar ve Purpi, 2010)

Proteozom inhibitörlerinin spesifik olarak çoğalabilen hücrelerde apoptoza neden olduklarını; dolayısıyla, diğer anti-kanser ilaçlara göre avantajlı durumda olduklarını ve kanser tedavisinde daha etkili olabileceklerini göstermektedir (Dutaud ve ark., 2002).

Çalışmamızda K562 ve Caco2 hücrelerinde MLN2238 ve Bortezomib konsantrasyonlarının apoptotik etkileri Annexin V-PI yöntemi ile akış sitometri cihazında analiz edilerek araştırılmıştır.

Annexin V-PI sonuçlarımızda görülen % hücre canlılık değerleri, WST-1 yöntemi ile hesapladığımız % hücre proliferasyon değerleri ile paralellik göstermiştir.

MLN2238'in K562 hücrelerinde erken apoptotik etkilerinin en fazla 24. saatte 10 µM; 48. saatte ise 5 µM'da olduğu belirlenmiştir. Konsantrasyon artışına bağlı olarak, MLN2238'nin en yüksek konsantrasyonu olan 20 µM' da nekrotik hücre oranının 48. saatte 31.9 olduğu hesaplanmıştır. Bu çalışmada MLN2238'nin en önemli erken apoptotik etkilerinin 24. saatte meydana geldiği belirlenmiştir.

K562 hücreleri üzerinde Bortezomib konsantrasyonlarına bakıldığında en yüksek erken apoptotik hücre değerlerinin 24. saatte 5 µM'da; 48. saatte ise 10 µM'da meydana geldiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar, Bortezomibin de erken apoptotik etkisinin en fazla 24. saatte meydana geldiğini, 48. saatte ise bu değerlerin düştüğü ve buna bağlı olarak nekrotik hücre ölümünü arttırdığını göstermektedir.

Caco2 hücrelerinde MLN2238'in erken apoptotik etkisi 24. saatte ve 1 µM'dan itibaren artış göstermiş ve en yüksek erken apoptotik hücre oranı 20 µM konsantrasyonda %42.5 olarak analiz edilmiştir. 48. saatte ise MLN2238 konsantrasyonlarından en fazla erken apoptotik hücre oranı 20 µM'da %12.5 olarak belirlenmiştir. Bu bulgular, Caco2 hücrelerinde MLN2238'nin apoptotik etkisinin daha çok 24. saatte meydana geldiğini açıklamaktadır.

Bortezomib'in Caco2 hücre hattındaki erken apoptotik etkilerinin de 24 saatlik inkübasyon sonunda artmış olduğunu, 48. saatte ise bu etkinin azaldığı ancak nekrotik ve geç apoptotik hücre oranlarında artışın olduğu belirlenmiştir.

Annexin V-PI sonuçlarımıza göre, MLN2238'in apoptotik etkisinin her iki hücre hattında da benzer olduğu görülmektedir. Ancak Bortezomib'in antiproliferatif etkide olduğu gibi apoptotik etkide de K562 hücrelerinde Caco2 hücrelerine göre daha etkili olduğu belirlenmiştir.

Bizim Annexin V-PI bulgularımızla benzer olarak, multiple myelom (MM.1S, H929, OPM1, OPM2) hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada, MLN2238'in IC50 konsantrasyonunun (5 nM) uygulandığı akış sitometri Annexin V-PI analiz sonucuna göre, 24. saatteki erken apoptoz değerlerinin önemli derecede artmış olduğu bildirilmiştir (Chauhan ve ark., 2011).

K562 hücresi ve Bortezomib ile yapılan başka bir çalışmada Bortezomib'in 4, 8, 16, 32 ve 64 nM konsantrasyonlarının, Annexin V-PI yöntemi ile apoptotik etkileri belirlenmiş ve 48. saatte, 32 nM konsantrasyonda apoptotik hücre değeri %30 iken, 64 nM konsantrasyonda %50 olarak bulunmuştur (Yan ve ark., 2007).

Loeffler-Ragg ve arkadaşları tarafından Bortezomib'in Caco2 hücre hattı üzerinde 0.02, 0.03, 0.04 ve 0.05 µM konsantrasyonlarını uyguladıkları bir çalışmada Annexin V-PI yöntemine göre 48. saatteki erken apoptoz değerleri, doza bağımlı olarak artış göstermiş ve 0.04 µM konsantrasyonda %20 iken, 0.05 µM konsantrasyonda %40 olduğu rapor edilmiştir (Loeffler-Ragg ve ark., 2009).

Yine Bortezomib'in, K562 ve HL-60 hücreleri üzerinde ki antineoplastik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada da, 50 ve 100 nM Bortezomib uygulamasının apoptotik etkiler akış sitometri cihazı kullanılarak 4, 8 ve 12. saatlerde analiz edilmiştir. Bortezomib'in 8 ve 12. saatte HL-60 hücrelerinde apoptotik etkileri görülürken, bizim sonucumuza da zıt olarak, K562 hücrelerinde apoptotik etki belirlenmemiştir. Bu durumun apoptozun 12. saatten sonra başladığı ve bu çalışmada 12. saatten sonraki etkilere bakılmadığı için olduğunu düşünmekteyiz (Liu ve ark., 2013).

DU145 insan prostat kanseri hücreleri üzerinde Bortezomib'in 5 µM konsantrasyonunun uygulandığı çalışmada da Annexin V-PI yöntemine göre 48. saatte erken apoptozun %30 değerinde artış gösterdiği rapor edilmiştir (Goktas ve ark., 2010).

Tez çalışmamızda K562 ve Caco2 hücrelerinde MLN2238 ve Bortezomib konsantrasyonlarının kapaz-3 aktivasyonu üzerine etkilerini akış sitometri analiz yöntemi ile araştırdık. Çalışmamızda her iki hücre hattında da MLN2238 ve Bortezomib'in kaspaz-3 aktivasyonunu konsantrasyon ve zamana bağlı olarak önemli oranda arttırmıştır. Kaspaz-3, apoptoz mekanizmasının tamamlanma fazında yer alan ve apoptozun sonlandırılmasından sorumlu (sonlandırıcı) kaspazlardan biridir. Kaspaz-3 hem dışsal apoptotik yolak üzerinden hem de içsel (mitokondriyal) apoptotik yolak üzerinden aktifleşebilir. (Slee ve ark., 2001).

24. saatte MLN2238 5 µM'dan itibaren konsantrasyon artışına bağlı olarak K562 hücrelerinde kaspaz-3 aktivasyonunda önemli artışlar meydana getirirken, Bortezomib'in ise 1 µM'dan itibaren kaspaz-3 aktivasyonunda önemli artışlar görülmüştür. 48. saatte ise her iki ilacında tüm konsantrasyonlarında kaspaz-3 aktivasyonunda artışların önemli düzeyde olduğu belirlenmiştir. Özellikle 5, 10 ve 20 µM MLN2238 ve Bortezomib konsantrasyonlarında kaspaz-3 pozitif hücre oranı sırasıyla, % 52.3, 63.4, 64.8 ve % 70.9, 67.3 ve 64.5 olarak analiz edilmiştir.

24. saatte hem MLN2238 hem de Bortezomibin 5 µM'dan itibaren konsantrasyon artışına bağlı olarak Caco2 hücrelerinde kaspaz-3 aktivasyonunda artış olduğu görülmüştür. 48. saatte ise kaspaz-3 aktivasyonundaki artışların tüm konsantrasyonlarda önemli oranda artmış olduğunu analiz ettik. Özellikle 20 µM MLN2238 ve Bortezomib konsantrasyonlarında kaspaz-3 pozitif oranı sırasıyla % 53.7 ve 55 olarak belirlendi. Bu bulgularımız, proteozom inhibitörü olan iki ilacın da K562 ve Caco2 hücrelerindeki ne kadar önemli apoptotik etki meydana getirdiğinin açıklamasıdır.

Kaspaz-3 aktivasyonu her iki hücre hattında da hem MLN2238 hem de Bortezomib konsantrasyonlarında artış göstermiştir. Özellikle kaspaz-3 aktivasyonunda 24. saate göre 48. saatte daha fazla aktivasyon belirlenmiştir.

MLN9708'in multipl myelom (MM) hücrelerine karşı antineoplastik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, MLN9708'in MM hücrelerinin büyümesini engellediği ve apoptozu indüklediği açıklanmıştır. Ayrıca MLN9708'in MM hücrelerinde tetiklediği apoptoz ile ilişkili olarak kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9'u aktive ettiği bildirilmiştir (Chauhan ve ark., 2011).

HL-60, KG-1, K562 and MOLT-3 hücre hatları üzerinde Bortezomib'in apoptotik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, hücrelere Bortezomib'in 50 ve 100 nM konsantrasyonları verilmiş ve 6. saatte kaspaz-3 aktivasyonun artmış olduğu ifade edilmiştir (Liu ve ark., 2013).

Yine K562 hücreleri üzerinde yapılan başka bir çalışmada Bortezomib'in 32 nM konsantrasyonu ile Western blot yöntemine göre kaspaz-3 aktivasyonu belirlenmiş ve 48. saatte kaspaz-3 aktivasyonun arttığı rapor edilmiştir (Yan ve ark., 2007).

İnsan prostat kanseri (DU145) hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada, Bortezomib'in 5 µM konsantrasyonunda kaspaz-3 geninin mRNA seviyesinin PCR ile analizi sonucunda arttığı belirtilmiştir (Goktas ve ark., 2010).

C.R. Chitambar ve arkadaşlarının Mantle lenfoma (Granta) hücreleri üzerinde yaptığı çalışmada Bortezomib'in 5 ve 6.7 nM konsantrasyonların 24. saatteki kaspaz-3 aktivasyonu enzimatik olarak belirlenmiş ve kontrole göre 5 nM konsantrasyonda kaspaz-3 aktivasyonunun yaklaşık 6 katına çıktığı, 6.7 nM konsantrasyonda ise bu oranın 12 kat olduğu bildirilmiştir (Chitambar ve Purpi, 2010).

Çalışmamızda K562 ve Caco2 hücrelerinde MLN2238 ve Bortezomib konsantrasyonlarının mitokondrial depolarizasyon üzerine etkileri JC-1 yöntemi ile akış sitometri cihazında analiz edilerek belirlenmiştir.

K562 hücrelerinde MLN2238'in mitokondrial depolarizasyon üzerine etkisi, diğer apoptotik sonuçlarımızla benzer olarak, konsantrasyon ve zamana bağlı olarak artış göstermiştir. En yüksek değerler 48. saatte 5, 10 ve 20 µM konsantrasyonda sırasıyla %47.3, 63.0, 62.0 olarak belirlenmiştir. K562 hücrelerinde Bortezomib konsantrasyonlarının mitokondrial depolarizasyonu 48. saatte MLN2238'e göre daha fazla arttırmıştır. 1, 5, 10 ve 20 µM konsantrasyonda değerler sırasıyla; %48.3, 69.3, 74.6, 72.7 olarak analiz edilmiştir.

Caco2 hücrelerinde MLN2238'in ve Bortezomib'in mitokondrial depolarizasyonu özellikle 48. saatte 5, 10 ve 20 µM konsantrasyonda kontrol değerine göre arttırdığı görülmüştür.

Bizim çalışmamıza paralel olarak Mantle lenfoma (Granta) hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada, Bortezomib'in 5 ve 6.7 nM konsantrasyonların 24. saatte akış sitometride yapılan JC-1 analizine göre 6.7 nM'da mitokondrial depolarizasyonun kontrole göre %39 olduğu ifade edilmiştir (Chitambar ve Purpi, 2010).

Bortezomib'in solid tümörler üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, böbrek adenokarsinoma hücreleri kullanılmıştır. Bu hücreler 10 nM Bortezomib konsantrasyonu ile 24 saat inkübe edilmiş ve JC-1 boyası ile boyanarak, akış sitometri cihazında analiz edilmiştir. Kontrole göre bortezomib uygulanan hücrelerde mitokondrial depolarizasyon oranlarında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bizim sonuçlarımızda ise, Caco2 hücrelerinde MLN2238 ve Bortezomib'in mitokondrial depolarizasyonu 48. saatte arttırdığı görülmüştür. Bu bulgumuz solid tümörler üzerinde MLN2238 ve Bortezomib'in apoptotik etkisi olduğu sonucunu desteklemektedir (Shanker ve ark., 2008).

Tez çalışmamızda K562 ve Caco2 hücrelerinin, MLN2238 ve Bortezomib konsantrasyonlarının NF-kB ve c-myc mRNA ekspresyon düzeyleri üzerine etkileri RT-PCR yöntemi ile analiz edilmiştir.

K562 hücrelerinde 24. saatte MLN2238'in 5, 10, 20 µM konsantrasyonlarında doza bağlı olarak artan NF-kB mRNA ekspresyonunun azaldığı belirlenmiştir. Bortezomib'de de 1, 5, 10 µM konsantrasyonlarda NF-kB ekspresyonunda azalma görülmektedir. NF-kB mRNA ekspresyonunun azalması ile birlikte K562 hücrelerinde 24 ve 48. saatte 1, 5, 10 ve 20 µM MLN2238 ve Bortezomib konsantrasyon artışına bağlı olarak c-myc mRNA ekspresyonunun da önemli düzeyde azalmış olduğunu belirledik. Özellikle en fazla c-myc mRNA ekspresyonunu azaltıcı etki, 48. saatte 20 µM MLN2238 konsantrasyonunda görülmüştür.

Caco2 hücrelerinde 24. saatte hem MLN2238 hem de Bortezomib'in tüm konsantrasyonlarında NF-kB mRNA ekspresyonunun azaldığı, ancak bu etkinin 48. saatte devam etmediği görülmüştür. Caco2 hücrelerinde 24. saatte MLN2238'in 10 ve 20 µM, Bortezomib'in ise tüm konsantrasyonlarında c-myc mRNA ekspresyonunun azaldığı belirlenmiş olup en fazla azaltıcı etkinin 20 µM konsantrasyonda olduğu görülmüştür.

Kanser hücrelerinin, normal hücrelere göre proteozom inhibisyonuna daha duyarlı olduğu bildirilmiştir. NF-kB bir transkripsiyon faktörüdür, NF-kB'nin aktifleşmesi hücre canlılığını ve proliferasyonunu sağlar. Hücre sitoplazmasında NF-kB IKB ile beraber bulunur. Hücre uyarı alınca IKB ubikütilenerek fosforlanır. Bunun sonucunda sitoplazmada protein degradasyonundan sorumlu proteozom kompleksleri aktifleşmiş IKB'yi NF-kB'den ayırır. NF-kB serbest kalınca aktif bir transkripsiyon faktörü olarak hücre nükleusuna geçip DNA'ya bağlanarak, DNA'da canlılığı, proliferasyonu ve antiapoptotik ilişkili genlerin ekspresyonunu uyarır. (Frankland-Searby ve Bhaumik, 2012)

Bizde çalışmamızda NF-kB mRNA ekspresyonunun 24. saatte MLN2238 ve Bortezomib konsantrasyonlarının artışına bağlı olarak kontrole göre önemli düzeyde azaldığını belirledik. Bu sonucumuz WST-1 ve apoptoz sonuçlarımıza paralellik göstermektedir. Çalışmamızda proteozom inhibisyonuna bağlı olarak, NF-kB ekspresyonunun azalması hücre canlılığının azaldığı ve apoptozun arttığı bir göstergesidir.

Yapılan literatür taramasında K562 ve Caco2 hücrelerinde Bortezomib ve MLN2238'nin NFkB ve c-myc mRNA ekspresyonlarına RT-PCR ile etkilerinin araştırıldığı çalışmaya rastlanılmamıştır. Ancak başka *in vitro* çalışmada multiple myelom ve prostat hücrelerinde, Bortezomib'in NF-kB'yi inhibe ederek apoptozu indüklediği bildirilmiştir (Goktas ve ark., 2010; Lashinger ve ark., 2005; An ve ark., 2003; Hideshima ve ark., 2002)

Multiple myeloma hücrelerinde proteozom inhibitörleri (Bortezomib ve ikinci nesil proteozom inhibitörleri (MLN9708/2238) NF-kB aktivitesini inhibe ederler (Fuchs, 2013).

Chauhan ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, MM.1S hücreleri, MLN2238'in 12 nmol/L konsantrasyonu ile muamele edildikten sonra 1, 3, 6, 12 ve 24. saatlerdeki NFkB düzeyleri ELİZA yöntemiyle tayin edilmiş ve özellikle 12. ve 24. saatlerde NFkB düzeylerinde önemli azalmalar saptanmıştır (Chauhan ve ark., 2011).

Bortezomib ile yapılan bir çalışmada tedavi sonucunda HCT116 ve HT-29 kolon kanser hücrelerinde, NF-kB inhibisyonu gözlenirken, Caco2 hücresinde bu inhibisyon görülmemiştir (Voutsadakis ve ark., 2010).

Normal bir hücrede c-myc, bir proto-onkogen olarak görev yapan bir transkripsiyon faktörüdür. Bazı hematolojik malignansilerde (Burkit Lenfoma) c-myc'nin onkogene dönüşerek hücreyi sürekli bölünmeye sürüklediği bilinmektedir. Kanserleşmiş hücrelerde c-myc onkogeninin ekspresyonu artmıştır. C-myc ekspresyonunun azalması hücreyi apoptozla götürmektedir. (Thompson, 1998)

Bizim de çalışmamızda da MLN2238 ve Bortezomib konsantrasyonlarında c-myc mRNA ekspresyonunun azalması ve buna bağlı olarak da apoptoz değerlerinin artış göstermesi antikanserojenik etkide önemli bir bulgudur.

Sonuç olarak bu çalışma, MLN2238'in K562 ve Caco2 hücrelerinde apoptotik etkilerin araştırıldığı ilk çalışmadır. Bu nedenle MLN2238 ve Bortezomib'in antineoplastik etkilerinin K562 ve Caco2 hücrelerinde çalışılacak yeni moleküler mekanizmalara ışık tutacağını düşünmekteyiz.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışma yeni bir proteozom inhibitörü olan MLN2238'in etkilerini, FDA onaylı bir proteozom inhibitörü olan Bortezomib ile karşılaştırarak hem K562 hem de Caco2 hücreleri üzerinde ki antineoplastik etkilerinin değerlendirilmesi ve karşılaştırılması amacıyla planlanmıştır. Bu tez çalışması hematolojik bir malignansi olan K562 ve solid bir tümör olan Caco2 hücreleri üzerinde MLN2238'in antineoplastik etkilerinin araştırıldığı ilk çalışma olması nedeniyle özgün bir değer taşımaktadır.

K562 ve Caco2 hücreleri üzerinde MLN2238 ve Bortezomib'in konsantrasyon artışına bağlı olarak kontrole göre hücre proliferasyonunun hem 24 hem de 48. saatte önemli düzeyde azalttığı belirlenmiştir.

Annexin V-PI sonuçlarımıza göre, MLN2238'in apoptotik etkisinin her iki hücre hattında da benzer olduğu görülmektedir. Ancak Bortezomib'in antiproliferatif etkide olduğu gibi apoptotik etkide de K562 hücrelerinde Caco2 hücrelerine göre daha etkili olduğu belirlenmiştir.

Kaspaz-3 aktivasyonu her iki hücre hattında da hem MLN2238 hem de Bortezomib konsantrasyonlarında artış göstermiştir. Özellikle 24. saate göre 48. saatte daha fazla aktivasyon belirlenmiştir.

Mitokondrial depolarizasyon sonuçlarımızda MLN2238 ve Bortezomib'in K562 hücreleri üzerinde hem 24 hemde 48. saatte etkili olduğu, Caco2 hücrelerinde ise etkinin sadece 48 saatte ortaya çıktığı analiz edilmiştir.

NF-kB mRNA ekspresyon düzeylerinde ise her iki hücre hattında da inhibisyonun 24. saatte olduğu gözlenmiştir. MLN2238'in artan konsantrasyonları Bortezomib'e göre NF-kB inhibisyonu açısından her iki hücre hattında da daha etkili bulunmuştur.

C-myc mRNA ekspresyon düzeylerinin K562 hücresi üzerinde MLN2238'in artan konsantrasyonlarında Bortezomib'e göre hem 24 hem de 48. saatte daha fazla inhibisyon etkisinin olduğunu belirlenmiştir. Caco2 hücrelerinde ise c-myc mRNA inhibisyonu 24. saatte her iki madde konsantrasyonunda da inhibisyon gösterdiği analiz edilmiştir.

Sonuç olarak MLN2238'in hem bir lösemi hücresi olan K562 hem de kolon kanser hücresi olan Caco2 üzerinde Bortezomib kadar hatta bazı sonuçlarımızda Bortezomib'den daha fazla apoptotik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca MLN2238'in Bortezomib'e göre solid tümörler üzerinde daha etkili olduğu bulunmuştur. Bu nedenle MLN9707'in antineoplastik etkilerinin daha farklı kanser hücre tiplerinde de araştırılması gerektiğini düşünmekteyiz. MLN9708'in tekli ya da kombine ajanlarla çalışılarak yeni antikanser ilaçların keşfine katkı sağlayacağı kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

- Adams, J., Behnke, M., Chen, S., Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 8, 333-8 (1998).
- Aghajanian, C., Soignet, S., Dizon, D.S., A phase I trial of the novel proteasome inhibitor PS341 in advanced solid tumor malignancies, *Clin. Cancer Res.* 8, 2505–2511 (2002).
- Almond, J.B., Cohen, G.M., The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy, *Leukemia*, 16, 433-43 (2002).
- American Cancer Society, *Cancer Facts & Figures 2008*, Atlanta: American Cancer Society (2008).
- An, J., Sun, Y., Adams, J., Drug interactions between the proteasome inhibitor bortezomib and cytotoxic chemotherapy, tumor necrosis factor (TNF), and TNF-related apoptosis inducing ligand in prostate cancer, *Clin. Cancer Res.*, 9, 4537-4545 (2003).
- Anand, S., Verma, H., Kumar, L., Singh, N., Induction of apoptosis in chronic myelogenous leukemia lymphocytes by hydroxyurea and adriamycin, *Cancer Letter*, 88, 101-105 (1995)
- Anderson, K.C., The 39th David A. Karnofsky Lecture: bench-to-bedside translation of targeted therapies in multiple myeloma, *J. Clin. Oncol.*, 30, 445-452 (2012).
- Ashkenazi, A., Dixit, V.M., Death receptors: signaling and modulation, *Science*, 281, 1305-1308 (1998).
- Assaf, Y.A., Domiano, A.E., Zotta, E., Ibarra C., Kotsias, B.A., CFTR in K562 leukemic cells, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 285(2), 480-488 (2003).
- Baran, Y., Gündüz, U., Kronik myeloid lösemi genetiği, *Türkiye Klinikleri J. Hem. Onc-Special Topics*, 3, 50-55 (2007).
- Boğa, C., Akım sitometri ile apoptozis tayini. Sözer O, Ed. *Klinik ve pratikte akım sitometri*, 1. baskı, Haberal Eğitim Vakfı, 155-158, Ankara, 2009.
- Brüning, A., Vogel, M., Mylonas, I., Friese, K., Burges, A., Bortezomib targets the caspase-like proteasome activity in cervical cancer cells, triggering apoptosis that can be enhanced by Nelfinavir, *Curr. Cancer Drug Targets*, (2011)
- Bustin, S.A., Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays, *Journal of Molecular Endocrinology*, 25, 169–193 (2000).
- Campello, S., Scorrano, L., The mitochondrial pathway: focus on shape changes, Yin, X.M., Dong, Z., *Essentials of Apoptosis: A Guide for Basic and Clinical Research*, Humana Press, USA, 151-175 (2009).
- Cantürk, Z., *Bor Bileşilerinin Lösemi Hücrelerine ve Normal Lenfositlere Olan Etkisinin Hücre Kültüründe ve Transmission(Geçirimli) Elektron Mikroskopunda İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Osmangazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, Türkiye (2006)

- Cardoso, F., Durbecq, V., Laes, J.F., Badran, B., Lagneaux, L., Bex, F., Desmedt, C., Willard-Gallo, K., Ross, J.S., Burny, A., Bortezomib (PS-341, Velcade) increases the efficacy of trastuzumab (Herceptin) in HER-2-positive breast cancer cells in a synergistic manner, *Mol. Cancer Ther.*, 5, 3042-3051 (2006).
- Carmicheal, J., DeGrafit W. G., Gazdar, A.F., Minna, J.D., Mitchell, J.B., Evaluation of tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing, *Cancer Research*, 47, 936-942 (1987).
- Chauhan, D., Tian, Z., Zhou, B., Kuhn, D.J., Orłowski, R.Z., Raje, N.S., Richardson, P.G., Anderson, K.C., In vitro and in vivo selective antitumor activity of a novel orally bioavailable proteasome inhibitor MLN9708 against multiple myeloma cells, *Clin. Cancer Res.*, 17, 5311–5321 (2011).
- Chen, T.K., Ming, J.H., Bing, C.C., Chien, C.C., Che, M.T., Shioh, L.P., Chien, H.L., Denbinobin induces apoptosis in human lung adenocarcinoma cells via Akt inactivation, Bad activation, and mitochondrial dysfunction, *Toxicology Letters*, 177, 48-58 (2008).
- Chitambar, C.R., Purpi, D.P., A novel gallium compound synergistically enhances bortezomib-induced apoptosis in mantle cell lymphoma cells, *Leukemia Research*, 34, 950–953 (2010).
- Cohen, G.M., Caspases: the executioners of apoptosis, *Biochem. J.*, 326, 1-16 (1997).
- Cooper, D.M. The balance between life and death: defining a role for apoptosis in aging, *J. Clin. Exp. Pathol.*, 4 (1), (2012).
- Cooper, M.G., Hausman, R.E., Hücre, Moleküler Yaklaşım, İzmit Tıp Kitap Evi, İzmit, 631-673, 2006.
- Cory, S., Adams, J.M., The Bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch, *Nature Reviews Cancer*, 2, 647-656 (2002).
- Crawford, L.J., Walker, B., Irvine, A.E., Proteasome inhibitors in cancer therapy, J., Danial, N.N., Korsmeyer, S.J., Cell death: critical control points, *Cell*, 116, 205-219 (2004).
- Crawford, L.J., Walker, B., Irvine, A.E., Proteasome inhibitors in cancer therapy, *J. Cell Commun. Signal*, 5, 101–110 (2011).
- Das, D., Arber, N., Jankowski, J.A., Chemoprevention of colorectal cancer, *Digestion*, 76, 51–67 (2007).
- Deshaies, R.J., Make it or break it: the role of ubiquitin-dependent proteolysis in cellular regulation, *Trends in Cell Biology*, 5, 428-434 (1995).
- Dick, L.R., Fleming, P.E., Building on bortezomib: second-generation proteasome inhibitors as anti-cancer therapy, *Drug Discovery Today*, 15, 5-6 (2010).
- Dispersyn, G., Nuydens, R., Connors, R., Borgers, M., Geerts, H., Bcl-2 protects against FCCP-induced apoptosis and mitochondrial membrane potential depolarization in PC12 cells, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1428, 357-371 (1999).

Druker, B.J., Inhibition of the Bcr-Abl tyrosine kinase as a therapeutic strategy for CML, *Oncogene*, 21, 8541-8546 (2002).

Dutaud, D., Aubry, L., Henry, L., Levieux, D., Hendil, K.B., Kuehn, L., Bureau, J.P. and Ouali, A., Development and evaluation of a sandwich ELISA for quantification of the 20S proteasome in human plasma, *J.Immunol. Methods.*, 260, 183-93 (2002).

Elmore, S., Apoptosis: a review of programmed cell death, *Toxicologic Patholog*, 35, 495-516 (2007).

Erwig, L.P., Henson, P.M., Clearance of apoptotic cells by phagocytes, *Cell Death and Differentiation*, 15, 243-250 (2008).

Fan, T.J., Han L.H., Cong R.S., Liang J., Caspase family proteases and apoptosis. *Acta. Biochim. Biophys.*, 37, 719-727 (2005).

Favaloro, B., Allocati, N., Graziano, V., Ilio C. D., Laurenzi V.D., Role of apoptosisin disease, *Aging*, 4 (5), (2012).

Frankland-Searby, S., Bhaumik, R.S., The 26S proteasome complex: An attractive target for cancer therapy, *Biochimica. et Biophysica. Acta.*, 1825, 64–76 (2012).

Fujita, T., Doihara, H., Washio, K., Ino, H., Murakami, M., Naito, M., Shimizu, N., Antitumor effects and drug interactions of the proteasome inhibitor bortezomib (PS341) in gastric cancer cells, *Anticancer Drugs*, 18, 677-686 (2007).

Fuchs, O., Targeting of NF-kappaB signaling pathway, other signaling pathways and epigenetics in therapy of multiple myeloma, *Cardiovascular and Haematological Disorders-Drug Targets*, 13, 16-34 (2013)

Galluzzi, L., Aaronson, S.A., Abrams, J., Alnemri, E.S., Andrews, D.W., Baehrecke, E.H. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes, *Cell Death and Differentiation*, 16 (8), 1093-1107 (2009).

Gatti, R., Belletti, S., Orlandini, G., Bussolati, O., Dall'asta, V., Gazzola, G.C., Comparison of Annexin V and calcein-AM as early vital markers of apoptosis in adherent cells by confocal laser microscopy, *J. Histochem. Cytochem.*, 46, 895–900 (1998).

Ghobrial, I.M., Witzig, T.E., Adjei, A.A., Targeting apoptosis pathways in cancer therapy, *CA Cancer J. Clin.*55: 178-194 (2005).

Goktas, S., Baran, Y., Ural A.U., Yazici, S., Aydur, E., Basal, S., Avcu, F., Pekel, A., Dirican, B., Beyzadeoglu M., Proteasome inhibitor bortezomib increases radiation sensitivity in androgen independent human prostate cancer cells, *Urology*, 75 (4) (2010).

Guicciardi, M.E., Gores, G.J., , The Death Receptor Pathway, YIN, X.M., DONG, Z., *Essentials of Apoptosis: A Guide for Basic and Clinical Research*, Humana Press, 119-150 (2009).

Haznedaroglu, I., Koca, E., Imatinib mesylate and the management of chronic myeoid leukemia (CML), *Turk J. Haematol.*, 22, 161-172 (2005).

- Hershko, A., Ciechanover, A., The ubiquitin system, *Annu. Rev. Biochem.*, 67, 425-79 (1998).
- Hideshima, T., Chauhan, D., Richardson, P., NF-kappa B as a therapeutic target in multiple myeloma, *J. Biol. Chem.*, 277 (2002).
- Hofseth, L.J., Nitric oxide as a target of complementary and alternative medicines to prevent and treat inflammation and cancer, *Cancer Letters*, 268, 10–30 (2008).
- Iijima, T., Mitochondrial membrane potential and ischemic neuronal death, *Neuroscience Research*, 55, 234-243 (2006).
- Jakoby, Y., Pastan, I.H., *Cell culture*, Academic Press, San Diego, Kalifornia, A.B.D. (1979)
- Jaspersen, K.W., Tuohy, T.M., Neklason, D.W., Burt, R.W., Hereditary and familial colon cancer, *Gastroenterology*, 138, 2044–2058 (2010).
- Jeay, S., Sonenshein, G.E., Postel-Vinay, M.C., Growth hormone can act as a cytokine controlling survival and proliferation of immune cells: new insights into signaling pathways, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 188, 1-7 (2002).
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., *Cancer Statistics 2008*, CA. *Cancer J. Clin.*, 58, 71 – 96 (2008).
- Kalejta, R.F., Shenk, T., Proteasome-dependent, ubiquitin-independent degradation of the Rb family of tumor suppressors by the human cytomegalovirus pp 71 protein, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100, 3263-8 (2003).
- Kane, R.C., Farrell, A.T., Sridhara, R., Pazdur, R., United States Food and Drug Administration approval summary: bortezomib for the treatment of progressive multiple myeloma after one prior therapy, *Clin. Cancer Res.*, 12, 2955–2960 (2006).
- Kane, R.C., Dagher, R., Farrell, A., Ko, C.W., Sridhara, R., Justice, R., Pazdur, R., Bortezomib for the treatment of mantle cell lymphoma, *Clin. Cancer Res.*, 13, 5291–5294 (2007).
- Karp, G., *Cell and Molecular Biology Concepts and Experiments*, John Wiley and Sons Inc., New York, 123-231, 1999.
- Kaufmann, S.H., Hengartner, M.O., Programmed cell death: alive and well in the new millennium, *Trends Cell Biol.*, 11 (12), 526-534 (2001).
- Kaufmann, S.H., Hengartner, M.O., Programmed cell death: alive and well in the new millennium, *Trends Cell Biol.*, 11 (12), 526-534 (2001).
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. ve Currie, A.R., Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br. J. Cancer*, 26, 239–257 (1972).
- Klein, E., Ben-Bassat, H., Neumann, H., Ralph, P., Zeuthen, J., Polliack, A., Vánky, F., Properties of the K562 cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukemia, *Int. J. Cancer.*, 18(4), 421-31 (1976).
- Koeffler, H.P., Golde, D.W., Human myeloid leukemia cell lines: a review, *Blood*, 56 (3), 344-350 (1980).

- Kopman, G., Reutelingsperger, C.P., Kuijten, G.A., Keehnen, R.M., Pals, S.T., Van Oers, N.H., Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis, *Blood*, 84, 1415–1420 (1994).
- Koretzky, G.A., The legacy of the Philadelphia chromosome, *The Journal of Clinical Investigation*, 8(117), 2030-2032 (2007).
- Kumar, A., Hozo, I., Wheatley, K., Djulbegovic, B., Thalidomide versus bortezomib-based regimens as first-line therapy for patients with multiple myeloma: a systematic review, *Am. J. Hematol.*, 86, 18–24 (2011).
- Kupperman, E., Lee, E.C., Cao, Y., Bannerman, B., Fitzgerald, M., Berger, A., Yu, J., Yang, Y., Hales, P., Bruzzese, F., Liu, J., Blank, J., Garcia, K., Tsu, C., Dick, L., Fleming, P., Yu, L., Manfredi, M., Rolfe, M., Bolen, J., Evaluation of the proteasome inhibitor MLN9708 in preclinical models of human cancer, *Cancer Res.*, 70, 1970–1980 (2010).
- Küpelioglu, A., Kolorektal kanserde histopatoloji, *Türkiye klinikleri cerrahi kolorektal kanser özel sayısı*, 9 (1), 25-27 (2004).
- Lashinger, L.M., Zhu K., Williams, S.A., Bortezomib abolishes tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance via a p21-dependent mechanism in human bladder and prostate cancer cells, *Cancer Res.*, 65, 4902-4908 (2005).
- Lee, E.C., Fitzgerald, M., Bannerman B., Antitumor Activity of the Investigational Proteasome inhibitor MLN9708 in mouse models of B-cell and plasma cell malignancies, *Clin. Cancer Res*, 17(23) (2011).
- Lian, Z., Niwa, K., Gao, J., Tagami, K., Mori, H, Tamaya, T., Association of cellular apoptosis with anti-tumor effects of the Chinese herbal complex in endocrine-resistant cancer cell line, *Cancer Detection and prevention*, 27: 147-154 (2003).
- Ling, X., Calinski, D., Chanan-Khan, A., Zhou, M., Li, F., Cancer cell sensitivity to bortezomib is associated with survivin expression and p53 status but not cancer cell types, *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 29(8) (2010).
- Liu C.Y., Shiau C.W., Kuo, H.Y., Huang H.P., Chen M.H., Tzeng, C.H., Chen, K., Cancerous inhibitor of protein phosphatase 2A determines bortezomib-induced apoptosis in leukemia cells, *Haematologica*, 98(5) (2013).
- Livak, K.J., Flood, S.J., Marmaro, J., Giusti, W., Deetz, K., Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR methods and applications*, 4, 357–362 (1995).
- Lozzio, C.B., Lozzio B.B., Human chronic myelogenous leukemia cell line with positive Philadelphia chromosome, *Blood*, 45(3), 321-33 (1975).
- Ma, M.H., Yang, H.H., Parker, K., The proteasome inhibitor PS-341 markedly enhances sensitivity of multiple myeloma tumor cells to chemotherapeutic agents, *Clin. Cancer Res.*, 9 1136–1144 (2003).

- Magrini, V., Von, R., Effect of p53 or hMLH1 status on the mechanisms of cytotoxicity of 7-hydroxystaurosporine (UCN-01) or irinotecan (CPT-11) in colorectal cancer cell lines, Dissertation, (2002).
- Mani, A., Gelmann, E.P., The ubiquitin-proteasome pathway and its role in cancer, *J. Clin. Oncol.*, 23, 4776-89 (2005).
- Marblestone, J.G., Ubiquitin Drug DiscoveryDiagnostics 2009:First Annual Conference 13-14 October, Philadelphia PA, USA, (2009).
- Melo, J.V., Chuah, C., Novel agents in CML therapy: tyrosine kinase inhibitors and beyond, *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, 427-435 (2008).
- Mitsiades, N., Mitsiades, C.S., Richardson, P.G., The proteasome inhibitor PS-341 potentiates sensitivity of multiple myeloma cells to conventional chemotherapeutic myeloma after one prior therapy, *Clin. Cancer Res.*, 12, 2955–2960 (2006).
- Nakajima, O., Hashimoto, Y., Iwasaki, S., Enhancement by retinoid of hemin induced differentiation of human leukemia K562 cell line, *FEBS.*,330, 81-84 (1993).
- Nicholson, D.W., Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death, *Cell Death Differ.*, 6, 1028-42 (1999).
- Nowell, P.C., Hungerford, D.A., A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia, *Science*, 142, 1497 (1960).
- Nowell, P.C., Progress with chronic myelogenous leukemia: a personal perspective over four decades, *Annual Reviews*, 53, 1–13 (2002).
- Oktay Z., E Vitamininin Sıçan C6 Glioma Hücreleri Üzerindeki Apoptoz İndükleyici Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye (2011).
- Osti, F., Corradini, F.G., Hanau, S., Matteuzzi, M., Gambari, R., Human leukemia K562 cells: induction to erythroid differentiation by guanine, guanosine and guanine nucleotides, *Haematologica*, 82, 395-401 (1997).
- Overbeeke, R., Steffens-Nakken, H., Vermes, I., Reutelingsperger, C., Hanen, C., Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays, *Apoptosis*, 3, 115 (1998).
- Papandreou , C.N., Logothetis, C.J., Bortezomib as a potential treatment for prostate cancer, *Cancer Res.*, 64, 5036–5043 (2004).
- Philchenkov, A., Caspases: potential targets for regulating cell death, *J. Cell Mol. Med.*, 8, 432-44 (2004).
- Pınarbaşı, E., Apoptozis, *Moleküler Biyoloji*, Nobel Yayınevi, Ankara, 423-68, 2007.
- Proteasome inhibition by lactacystin in primary neuronal cells induces both potentially neuroprotective and pro-apoptotic transcriptional responses: a microarray analysis, *J. Neurochem.*, 94, 943–956 (2005).

Raff, M.C., Cell suicide for beginners, *Nature*, 396, 119-122 (1998).

Ragg, J. L., Mueller, D., Gerner G., Proteomic identification of aldo-keto reductase AKR1B10 induction after treatment of colorectal cancer cells with the proteasome inhibitor bortezomib, *Mol. Cancer Ther.*, 8(7) (2009).

Reed, J.C., Mechanisms of apoptosis, *Am. J. Pathol.*, 157 (5), 1415-1430 (2000).

Richardson, P.G., Barlogie, B., Berenson, J., A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma, *N. Engl. J. Med.*, 348, 2609–2617 (2003).

Richardson, P.G., Mitsiades, C., Schlossman, R., Munshi, N., Anderson, K., New drugs for myeloma, *Oncologist*, 12(6), 664-89 (2007).

Rowley, J.D., A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining, *Nature*, 243, 290-3 (1973).

Rudd, P.M., Merry, A.H., Wormald, M.R., Glycosylation and prion protein, *Current Opinion in Structural Biology*, 12(5), 578-586 (2002).

Saraste, A., Pulkki, K., Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis, *Cardiovascular Research*, 45, 528-537 (2000).

Savill, J., Fadok, V., Corpse clearance defines the meaning of cell death, *Nature*, 407, 784-788 (2000).

Saydam, G., Aydin H.H., Involvement of protein phosphatase 2A in interferon alfa2b induced apoptosis in K562 human CML cells, *Leukemia Research*, 27, 709-717 (2003).

Scagliotti, G., Proteasome inhibitors in lung cancer, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 58, 177–189 (2006).

Sessions, J., PharmD, BcOP, Chronic myeloid leukemia in 2007, *Journal of Managed Care Pharmacy*, 8 (13), 4-7 (2007).

Shanker, A., Brooks A.D., Tristan C.A., Treating metastatic solid tumors with bortezomib and a tumor necrosis factor , Related Apoptosis, Inducing Ligand Receptor Agonist Antibody, *J. Natl. Cancer Inst.*, 100, 649 – 662 (2008).

Shishodia, S., Aggarwal B.B., Nuclear factor-kB activation: a question of life and death, *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 35(1), 28-40 (2002).

Singhal, S., Awasthi, S., Oandya, U., Piper, J., John-Saini, M.K., Cheng, J.Z., Awasthi Y.C., The effect of Curcumin on glutathione-linked enzymes in K562 human leukemia cells, *Toxicology Letters*, 109, 87-95 (1999).

Skaug, B., Jiang, X., Chen, Z.J., The role of ubiquitin in NF-kappaB regulatory pathways. *Annu. Rev. Biochem*, 78, 769-796 (2009).

Slee, E.A., Adrain, C., Martin, S.J., Executioner caspases-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis, *The Journal of Biological Chemistry*, 276 (10), 7320-7326 (2001).

Spataro, V., Norbury, C., Harris, A., The ubiquitin-proteasome pathway in cancer, *British Journal of Cancer*, 77, 448-455 (1998).

- Şencan, S., Warfarin'in Sitotoksik Etkisinin K562 Lösemik Hücre Soyunda Çalışılması, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri, Türkiye (2006).
- Terzic, J., Grivennikov, S., Karin, E., Karin, M., Inflammation and colon cancer, *Gastroenterology*, 138, 2101–2114 (2010).
- Tesarik, J., Greco, E., Cohen-Bacrie, P., Mendoza, C., Germ cell apoptosis in men with complete and incomplete spermiogenesis failure, *Mol. Hum. Reprod.*, 4, 757 (1998).
- Thompson, E.B., The many roles of c-Myc in apoptosis, *Annu. Rev. Physiol.*, 60, 575-600 (1998).
- Voutsadakis, A., Patrikidou, A., Tsapakidis, K., Karagiannaki, A., Hatzidaki, E., Stathakis, N., Papandreou, C., Additive inhibition of colorectal cancer cell lines by aspirin and bortezomib, *Int. J. Colorectal Dis.*, 25, 795–804 (2010).
- Wang, X., The expanding role of mitochondria in apoptosis, *Genes, Development*, 15, 2922-2933 (2001).
- Willingham, M.C., Cytochemical methods for the detection of apoptosis, *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 47 (9), 1101-1109 (1999).
- Yan, C.H., Wang, Y.C., Li, D., Wang, Y., Liu, W., Wu, Y.L. and Chen G.Q., Arsenic trioxide and proteasome inhibitor bortezomib synergistically induce apoptosis in leukemic cells: the role of protein kinase, *Leukemia*, 21, 1488–1495 (2007).
- Yao, G., Ling, L., Luan, J., Ye, D., Zhu, P., Nonylphenol induces apoptosis of Jurkat cells by a caspase-8 dependent mechanism, *International Immunopharmacology*, 7, 444-453 (2007).
- Yerlikaya, A., Cellular functions of the 26S proteasome, *Turk J. Biol.*, 28, 31-38 (2004).
- Yerlikaya, A., Dokudur, H., Protein yıkımının önemi, *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 35 (2), 93-99 (2009).
- Yew, E.H., Cheung, N.S., Choy, M.S., Qi, R.Z., Lee, A.Y., Peng, Z.F., Melendez, A.J., Manikandan, J., Koay, E.S., Chiu, L.L., Ng, W.L., Whiteman, M., Kandiah, J., Halliwell, B., Yewdell, J.W., Not such a dismal science: the economics of protein synthesis, folding, degradation and antigen processing, *Trends Cell Biol.*, 11(7), 294-297 (2001).
- Zhang, G., Gurtu, V., Kain, S.R., Yan, G., Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of Annexin V, *Biotechniques*, 23, 525–531 (1997).

http-1 <http://www.turkkanser.org.tr/kml/nedir.php>

http-2 http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-37.aspx?geo_country=tr).

http-3 <http://www.utm.utoronto.ca/~w3cellan/apoptosis.html>)

http-4 http://www.bb.ustc.edu.cn/ocw/NR/rdonlyres/Biology/7-340Fall-2004/7D4E5F70-D6E2-44B7-BF0B-836ACCD62630/0/chp_ub_p_sys.jpg