



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KAFEİK ASİT FENETİL ESTER (CAPE)'İN
FARKLI KOLOREKTAL KANSER HÜCRE
HATLARI ÜZERİNDEKİ APOPTOTİK
ETKİLERİ VE SURVİVİN
EKSPRESYONUNDAKİ DEĞİŞİMLER**

Ceren SARI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Figen CELEP EYÜPOĞLU

TRABZON-2016



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KAFEİK ASİT FENETİL ESTER (CAPE)'İN
FARKLI KOLOREKTAL KANSER HÜCRE
HATLARI ÜZERİNDEKİ APOPTOTİK
ETKİLERİ VE SURVİVİN
EKSPRESYONUNDAKİ DEĞİŞİMLER**

Ceren SARI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Figen CELEP EYÜPOĞLU

TRABZON-2016

ONAY

Bu Tez Yüksek Lisans Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur

Prof. Dr. Ersan KALAY

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı

.....

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Ceren SARI'nın hazırladığı “KAFFEİK ASİT FENETİL ESTER (CAPE)'İN FARKLI KOLOREKTAL KANSER HÜCRE HATLARI ÜZERİNDEKİ APOPTOTİK ETKİLERİ VE SURVİVİN EKSPRESYONUNDAKİ DEĞİŞİMLER” başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Prof. Dr. Figen CELEP EYÜPOĞLU

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Figen CELEP EYÜPOĞLU

Prof. Dr. Ersan KALAY

Prof. Dr. Ali İrfan GÜZEL

Tarih:08/06/2016

Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/.../.... tarih ve ... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....

Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışması ve yazımı aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

08/06/2016

Ceren SARI

İthaf

Yüksek Lisans tezimi; her koşulda güvenebildiğim, sığınabildiğim, beni desteklemekten asla vazgeçmeyeceklerini bildiğim aileme ve bu dünyadan ayrıldığı günden itibaren eksikliğini hissettiğim anneanneme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasını değerli fikirleriyle ve tecrübeleriyle destekleyen Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Ersan KALAY'a, çalışmamın oluşturulması süresince tecrübelerinden faydalandığım Prof. Dr. Figen CELEP EYÜPOĞLU'na, çalışmamı sürdürdüğüm müddetçe desteklerini gördüğüm Yrd. Doç. Dr. Tuba DİNÇER ve Yrd. Doç. Dr. Bayram TORAMAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmaları ve yazımı süresince her an yardımına koşan çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. Burcu YÜCEL, Arş. Gör. Ceren SÜMER, Arş. Gör. Gülden YORGANCIOĞLU BUDAK, Arş. Gör. Derya KAYA, Arş. Gör. Asiye Büşra BOZ, Arş. Gör. İdris ER ve Arş. Gör. İhsan NALKIRAN'a, sevgili arkadaşlarım Pelin KÜÇÜK, Adem YILDIRIM ve Banu ÖZTÜRK'e en içten teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca şefkat ve desteklerini esirgemeyen Fatmagül YENİSEY ve Tülay KÖSEAHMET'e teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmada kullanılan hücre hatlarını temin etmemize yardımcı olan Duisburg Essen Üniversitesi Radyasyon Biyolojisi Enstitüsü'ne, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Araştırma Geliştirme Merkezi'ne ve Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'na teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmayı 115S628 kodlu proje ile destekleyen TÜBİTAK Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu (SBAG)'na teşekkür ederim.

Son olarak aldığım tüm kararları destekleyen ve edindiğim tüm tecrübelerde yanımda olan, maddi ve manevi varlıklarını her zaman hissettiren, fedakarlık ve anlayışlarının karşılığını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim çok değerli aileme sonsuz minnet ve şükranlarımı sunarım.

Arş. Gör. Ceren SARI

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ONAY	ii
BEYAN	iii
İthaf	iv
TEŞEKKÜR	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	xi
KISALTMA, SİMGE ve FORMÜLLER DİZİNİ	xii
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	4
4.1. Kanser	4
4.1.1. Kolorektal Kanser	4
4.1.1.1. İnsidans ve Epidemiyoloji	4
4.1.1.2. Etiyoloji	5
4.2. Apoptoz İnhibitör Protein Ailesi (IAP)	5
4.2.1. Survivin	6
4.2.1.1. Survivinin Yapısı ve Fonksiyonu	6
4.2.1.2. Survivinin Apoptozdaki Rolü	8
4.2.1.3. Survivinin Hücre Bölünmesindeki Rolü	8
4.2.1.4. Survivinin Kanserdeki Seçici Ekspresyonu ve Moleküler Tanıdaki Rolü	9
4.3. 5-Fluorourasil (5-FU)	12
4.4. Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE)	12
4.5. Water Soluble Tetrazolium Salts (WST-1) Testi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi	13
4.6. Annexin V / 7AAD İşaretleme Yöntemi ile Apoptoz Tayini	13
4.7. Aktif Kaspaz-3 Ölçümü ile Apoptoz Tayini	14
4.8. Akridin Oranj/Etidyum Bromür Boyama Yöntemi ile Apoptoz Tayini	14
4.9. Western Blot Yöntemi ile Protein Ekspresyonlarının Belirlenmesi	14
4.10. Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR) Yöntemi ile Gen Ekspresyonlarındaki Değişimin mRNA Düzeyinde İncelenmesi	15
5. GEREÇ ve YÖNTEM	16

5.1. Gereç	16
5.1.1. Hücre Hatları	16
5.1.2. Kimyasallar	16
5.1.3. Protein Markırlar	17
5.1.4. Antikorlar	17
5.1.4.1. Primer Antikorlar	17
5.1.4.2. Sekonder Antikorlar	17
5.1.5. Primerler	18
5.1.6. Kitler	18
5.1.7. Cihazlar	18
5.1.8. Sarf Malzemeler	19
5.1.9. Solüsyon, Tampon ve Besiyerleri	20
5.1.9.1. Hücre Kültürü Besiyerleri	20
5.1.9.2. Muamele Solüsyonları	20
5.1.9.3. Hücre Canlılık Analizi Solüsyonları	21
5.1.9.4. Akridin Oranj/Ethidyum Bromür Boyama Solüsyonları	21
5.1.9.5. Western Blot Solüsyonları	21
5.2. Yöntem	25
5.2.1. Hücrelerin Kültüre Edilmesi	25
5.2.2. Hücrelerin İkilenme Zamanının (Doubling Time) Belirlenmesi	26
5.2.2.1. Tripan Mavisini ile Hücre Sayımı	26
5.2.2.2. İkilenme Zamanının Belirlenmesi	26
5.2.3. Hücrelerin CAPE ve 5-FU ile Muamele Edilmesi	26
5.2.4. Water Soluble Tetrazolium Salts (WST-1) Hücre Canlılık Testi	27
5.2.5. Annexin V/7AAD Apoptoz Testi	27
5.2.6. Aktif Kaspaz-3 Apoptoz Testi	28
5.2.7. Akridin Oranj/Etidyum Bromür Boyaması ile Apoptoz Tayini	28
5.2.8. RNA İzolasyonu ve Reverse Transkriptaz PCR	29
5.2.9. Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR)	30
5.2.10. Western Blot Yöntemi	31
5.2.10.1. Hücrelerden Protein İzolasyonu	31
5.2.10.2. SDS-PAGE Jellerinin Hazırlanması	32
5.2.10.3. SDS-PAGE Jellerinin Elektroforezi	33
5.2.10.4. Islak Blotlama	33

5.2.11. İstatistiksel Analizler	34
6. BULGULAR	35
6.1. Hücrelerin Morfolojik ve Fenotipik Özellikleri	35
6.2. Hücre Kültürü	35
6.3. Canlılık Analizleri	37
6.3.1. 5-FU'nun Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi	37
6.3.2. CAPE'in Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi	38
6.3.3. 5-FU ve CAPE Birlikteğinin Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi	39
6.4. Apoptotik Analizler	40
6.4.1. CAPE Aracılı Apoptoza Bağlı Hücre Morfolojisindeki Değışimlerin Akridin Oranj/Etidyum Bromür Boyama Tekniğı ile Gösterilmesi	40
6.4.2. CAPE Aracılı Apoptozun Flow Sitometri Yöntemi ile Gösterilmesi	42
6.4.2.1. Annexin V / 7- AAD Testi ile Sağlıklı ve Apoptotik Hücre Popülasyonunun Belirlenmesi	42
6.4.2.2. Aktif Kaspaz-3 Testi ile Kaspaz-3 Aktivasyonundaki Değışimlerin Belirlenmesi	45
6.5. Protein Analizleri	51
6.6. Gen Ekspresyonu Analizleri	54
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	56
8. SONUÇ ve ÖNERİLER	63
9. KAYNAKLAR	66
10. ÖZGEÇMİŞ	75

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1. Survivin proteininin yapısı ve fonksiyonu	7
Şekil 2. Survivin pre-mRNA'sı tarafından üretilen gen füzyonları	7
Şekil 3. Survivin'in Apoptoz ve Hücre Bölünmesindeki Rolü	11
Şekil 4. Çalışmada kullanılmış olan hücre hatlarının büyüme eğrileri	36
Şekil 5. Hücre hatlarında 5-FU muamelesinin doza bağlı değişimi	37
Şekil 6. Hücre hatlarında CAPE muamelesinin doza bağlı değişimi	38
Şekil 7. Hücre hatlarında 5-FU, CAPE, CAPE/5-FU muamelesinin hücre canlılığı üzerine etkisi	39
Şekil 8. Kullanılan hücre hatlarında CAPE muamelesinin 72. Saatinde Akridin Oranj/Etidyum Bromür boyaması ile elde edilen floresan mikroskobu görüntüleri	41
Şekil 9. DLD-1 hücrelerinde 72 saatte gerçekleşen CAPE aracılı hücrel apoptoz oranlarının belirlenmesi	42
Şekil 10. HCT-116 hücrelerinde 72 saatte gerçekleşen CAPE aracılı hücrel apoptoz oranlarının belirlenmesi	43
Şekil 11. RKO hücrelerinde 72 saatte gerçekleşen CAPE aracılı hücrel apoptoz oranlarının belirlenmesi	43
Şekil 12. WiDR hücrelerinde 72 saatte gerçekleşen CAPE aracılı hücrel apoptoz oranlarının belirlenmesi	44
Şekil 13. CCD 841-CoN hücrelerinde 72 saatte gerçekleşen CAPE aracılı hücrel apoptoz oranlarının belirlenmesi	44
Şekil 14. Kullanılan hücre hatlarında CAPE muamelesi ile gerçekleşen apoptotik hücre yüzdelerinde gerçekleşen değişimler	45
Şekil 15. DLD-1 hücrelerinde 72 saatte gerçekleşen CAPE aracılı kaspaz-3 aktivitesinin belirlenmesi	46
Şekil 16. HCT-116 hücrelerinde 72 saatte gerçekleşen CAPE aracılı kaspaz-3 aktivitesinin belirlenmesi	47
Şekil 17. RKO hücrelerinde 72 saatte gerçekleşen CAPE aracılı kaspaz-3 aktivitesinin belirlenmesi	48
Şekil 18. WiDR hücrelerinde 72 saatte gerçekleşen CAPE aracılı kaspaz-3 aktivitesinin belirlenmesi	49
Şekil 19. CCD 841-CoN hücrelerinde 72 saatte gerçekleşen CAPE aracılı	

kaspaz-3 aktivitesinin belirlenmesi	50
Şekil 20. Kullanılan hücre hatlarında CAPE muamelesi ile gerçekleşen aktifleşmiş kaspaz-3 değişimleri	51
Şekil 21. Kullanılan hücre hatlarında CAPE muamelesinin survivin ve p53-Ser46 protein ekspresyonları üzerine etkisi	52
Şekil 22. Kullanılan hücre hatlarında CAPE muamelesinin p53-Ser15 protein ekspresyonu üzerine etkisi	52
Şekil 23. Kullanılan hücre hatlarında CAPE muamelesi ile gerçekleşen survivin protein seviyesindeki değişimler	53
Şekil 24. Kullanılan hücre hatlarında CAPE muamelesi ile gerçekleşen p53-Ser46 protein seviyesindeki değişimler	53
Şekil 25. Kullanılan hücre hatlarında CAPE muamelesi ile gerçekleşen p53-Ser15 protein seviyesindeki değişimler	54
Şekil 26. Kullanılan hücre hatlarında CAPE muamelesi ile survivin mRNA seviyesinde gerçekleşen değişimler	55
Şekil 27. Kullanılan kanser hücre hatlarındaki survivin ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması	55

TABLULAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa No
Tablo 1. Memelilerde apoptoz inhibitör protein ailesi üyeleri	6
Tablo 2. Tezde Kullanılan Hücre Hatlarına Ait Bilgiler	16
Tablo 3. Primer Listesi	18
Tablo 4. Genomik DNA Eliminasyon Reaksiyonu Bileşenleri	30
Tablo 5. Reverse Transkriptaz Reaksiyonu Bileşenleri	30
Tablo 6. SYBR Green Reaksiyon Kurulumu	31
Tablo 7. Döngü Koşulları	31
Tablo 8. Ayırma Jeli İçeriği	32
Tablo 9. Yükleme jeli içeriği	33

KISALTMA, SİMGE ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

5-FU	: 5-Fluorourasil
7-AAD	: 7-amino-actinomycin D
AIF	: Apoptoz İndükleyici Faktör
APS	: Amonyum Persülfat
ATCC	: Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
BIRC5	: Baculoviral IAP Repeat Containing 5
BSA	: Bovin Serum Albumin
CAPE	: Kafeik Asit Fenetil Ester
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonukleik asit
DTT	: Dithiothreitol
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
FBS	: Fetal bovin serum
HCl	: Hidroklorik Asit
IAP	: Apoptoz İnhibitör Proteinleri
ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
NFκB	: Nuklear Faktör Kappa B
PBS	: Fosfat tampon solusyonu
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PE	: Fikoeritrin
Pen-Strep	: Penisilin-Streptomisin
RNA	: Ribonükleik Asit
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
TBST	: Tris buffered saline Tween
WST-1	: Water Soluble Tetrazolium Salts

1. ÖZET

Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE)'in Farklı Kolorektal Kanser Hücre Hatları Üzerindeki Apoptotik Etkileri ve Survivin Ekspresyonundaki Değişimler

Günümüzde yaygın kanser türlerinden biri olan kolorektal kanserde, kemoterapötiklere karşı gelişen direnç ve kemoterapötiklerin sağlıklı hücreler için toksik olması bu kanserlerin tedavisinde karşılaşılan en önemli sorunların başında gelmektedir. Tezin amacı; kafeik asit fenetil ester (CAPE)'in, farklı kolorektal kanser hücre hatları üzerindeki apoptotik etkilerinin ve bir anti apoptotik protein olan survivin ekspresyonu üzerindeki etkilerinin incelenmesidir. Bu bağlamda; farklı kolorektal kanser hücre hatları ve normal kolorektal hücre hattı kullanılarak, CAPE'in hücreler üzerindeki anti tümöral etkileri araştırıldı. Bu amaçla, CAPE ile bir kemoterapötik ajan olan 5-Fluorourasil (5-FU), hücrelere ayrı ayrı ve birlikte muamele edilerek oluşturdukları etki hücre canlılık analizleri yapılarak incelendi. CAPE'in canlılığı doza bağlı olarak RKO, HCT-116 ve DLD-1 hücre hatlarında anlamlı oranlarda azalttığı gösterildi. Bununla birlikte; CAPE ve 5-FU'nun birlikte kullanılmasının, tek başlarına kullanılmalara kıyasla hücre canlılıkları üzerinde anlamlı bir fark oluşturmadıkları gözlemlendi. CAPE muamelesinin hücre morfolojisi üzerinde oluşturduğu apoptoza özgü değişimler akridin oranj/etidyum bromür boyama tekniği kullanılarak tespit edildi. Flow sitometri çalışmaları ile CAPE muamelesinin; RKO, HCT-116 ve DLD-1 hücre hatlarında apoptotik hücre yüzdesini ve kaspaz-3 aktivasyonunu artırdığı gözlemlendi. Ayrıca bütün hücre hatlarında CAPE muamelesinin, survivin ekspresyonu ve p53 proteininin Ser-46 ve Ser-15 rezidüleri üzerinden fosforilasyonuna etkisi western blot yöntemiyle incelendi ve her hücre hattında farklı sonuçlar elde edildi. Survivin mRNA düzeyindeki ekspresyon analizleri kantitatif real time PCR (qRT-PCR) ile araştırıldığında, CAPE'in yalnızca DLD-1 ve RKO hücre hatlarında ekspresyonu anlamlı derecede azalttığı gözlemlendi.

Anahtar Sözcükler: Antikarsinojenik ajan, apoptoz, apoptoz inhibitör proteinleri, flow sitometri, ilaç direnci

2. SUMMARY

Apoptotic Effects of Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) on Different Colorectal Cancer Cell Lines and Alterations in the Expression of Survivin

Colorectal cancer is one of the most common cancer type. The resistance to chemotherapeutics which are used in the treatment of colorectal cancer constitutes an obstacle for the treatment of the disease. These chemotherapeutics also have toxic effects on healthy cells. In this thesis, it was aimed to investigate the apoptotic effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on different colorectal cancer cell lines and the alterations in the expression of anti apoptotic protein survivin. In this connection, it was analyzed the anti tumoral effects of CAPE on different colorectal cancer cell lines and healthy colorectal cancer line. Cell lines were treated with CAPE, a chemotherapeutic agent 5-fluorourasil (5-FU) and CAPE in combination with 5-FU. Their effects on different cell lines were investigated by cell viability tests. It was demonstrated that CAPE decreased cell viability of RKO, HCT-116 and DLD-1 cancer cell lines in a dose dependent manner. Morphological differences of cells after CAPE treatment were observed by acridine orange/ethidium bromide staining method. Apoptotic cell percentage and active caspase-3 alterations of the cells were observed by flow cytometric analysis. According to these analysis, CAPE increased apoptotic cell percentage and active caspase-3 level in RKO, HCT-116 and DLD-1 cell lines. The alterations of survivin, phospho p53-Ser46 and phospho p53-Ser15 protein levels were analyzed by western blot method. It was observed that CAPE caused different effects in survivin, phospho p53-Ser46 and phospho p53-Ser15 protein levels on different cell lines. The alterations of mRNA expression levels of survivin in different cell lines were analyzed by quantitative real time PCR method. It was shown that mRNA expression of survivin decreased in DLD-1 and RKO cell lines after CAPE treatment.

Key words: Anticarcinogenic agents, apoptosis, apoptosis inhibitor proteins, flow cytometry, drug resistance

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Kolorektal kanser, genetik ve çevresel pek çok faktöre bağılı olarak gelişebilen ve günümüzde en sık teşhis edilen kanser türlerinden biridir. Pek çok kanser türünde olduğu gibi kolorektal kanserde de etkin tedavi hala mümkün olmamaktadır. Cerrahi müdahale ve kemoterapi ile hastalığın agresif progresyonunun belirli bir ölçüde baskılanması sağlansa da, bu tedaviler hastanın yaşam kalitesini düşürmekte, ayrıca ilerleyen yıllarda hastalığın nüksetmesi kaçınılmaz olmakta ve neredeyse tüm hastalarda bu tedavilere karşı direnç gelişmektedir. Kolorektal kanserde relaps ve metastaz oranının yüksek oluşu ve tedavide kullanılan 5-FU gibi kemoterapötiklere karşı gelişen direnç, hastalığın tedavi edilmesinde engel oluşturmaktadır.

Etkili bir kanser tedavisinde, seçici olarak kanser hücrelerini hedefleyecek ve kanser hücrelerinin kemoterapiye hassasiyetlerini artıracak bir ajana ihtiyaç duyulmaktadır (1-3). Dolayısıyla sağlıklı hücrelere zarar vermeden kanser hücrelerini öldürebilecek bir ajan kullanılarak, kanserde direnç ile ilişkilendirilmiş proteinleri hedeflemek alternatif tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi açısından önemli olacaktır. CAPE'in tümör hücrelerinde seçici olarak, kontrolsüz ve klonal çoğalmanın baskılanması, hücre ölümünün indüklenmesi gibi pek çok anti tümöral etkisi yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (4, 5). Bu bulgular CAPE'in alternatif bir ajan olarak kanser tedavisinde kullanılabileceği fikrini uyandırmıştır.

Bu noktadan yola çıkılarak gerçekleştirilen çalışmamızda, kolorektal kanser hücre hatlarının hem CAPE ile hem de CAPE'in tedavide sıklıkla kullanılan bir kemoterapötik ajan olan 5-FU ile birlikte muamelesiyle (CAPE/5-FU) hücreler üzerinde oluşturacağı anti tümöral etkilerin incelenmesi ve survivin ekspresyonu üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda öncelikle; 5-FU'nun, CAPE'in ve CAPE/5-FU'nun hücre canlılığı üzerine etkileri incelenmiştir. CAPE muamelesinin ardından, hücrelerde oluşan morfolojik değişimler mikroskopik olarak analiz edilmiştir. Flow sitometrik çalışmalar ile apoptotik hücre popülasyonları belirlenmiş ve aktif kaspaz-3 değişimleri incelenmiştir. CAPE muamelesinin survivin ekspresyonu ve p53 proteininin Ser-46 ve Ser-15 rezidüleri üzerinden fosforilasyonuna etkisi incelenmiştir. Ayrıca CAPE muamelesi sonrası survivin gen ekspresyonu seviyesindeki değişimler analiz edilmiştir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Kanser

Kanser, büyüme ve farklılaşmayı sağlayan hücresel mekanizmalardaki kontrol kaybı sonucu vücut hücrelerin kontrolsüz çoğalmaları ile karakterize olan hastalıklar grubudur. Meydana gelen mutasyonlar sonucu, hücre döngüsü kontrol mekanizmalarına yakalanmayan hasarlı hücreler, apoptotik mekanizmalar ile ölmeyerek bölünmeye devam ederler ve tümöral kitleleri oluştururlar (6).

İçerisinde pek çok risk faktörü barındıran ve hücresel mekanizmalarda fonksiyonel anlamda hasarlar görülmesine neden olan kanser, kompleks bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Kanseri gelişimi, pek çok farklı dokuya ait vücut hücrelerinde görülebilmektedir. Somatik mutasyonlar kanser gelişimindeki en önemli faktörlerden biridir. Farklı hücresel süreçler, meydana gelen bu mutasyonlardan etkilenmektedir. Bu nedenle kanserli hücrelerde, hücresel sistem genel anlamda zarar görmektedir (7).

4.1.1 Kolorektal Kanser

Kolorektal kanser, ailesel veya spontan olarak gelişebilen kalın bağırsak ve rektumun adenokarsinom türü kanseridir. Kolorektal kanser hücreleri, kolon mukozasında bulunan epitel hücrelerden köken alır. Mukozal yüzeyde gerçekleşen apoptotik mekanizmalar ile ölen bu hücreler besinlerle alınan kimyasallar, bakteriler ve bunların ürettiği kimyasal faktörler gibi etkenler sonucu kanserleşmektedir (8).

4.1.1.1. İnsidans ve Epidemiyoloji

Günümüz verilerine göre her yıl yaklaşık 1 000 000 kişiye kolorektal kanser tanısı koyulmakla beraber; tanı koyulan hastaların yaklaşık %50 mortalite göstermesi, kolorektal kanseri kadınlarda ve erkeklerde en çok tanı koyulan üçüncü kanser türü ve en çok ölüme sebebiyet veren dördüncü kanser türü yapmaktadır (9, 10).

Kolorektal kanserin yıllık insidansı ortalama olarak 27.44/100 000'dür. Bu oran kadınlarda 29.8 iken erkeklerde 25.49 olarak gözlenmektedir. Etnik köken ve ırk göz önüne alınarak yapılan istatistiklerde ise kolorektal kanser insidansı beyaz ırkta 42.4/100 000, siyah ırkta 52.3/100 000'dür. En yüksek insidanslar Kuzey Amerika, Avustralya, Yeni Zelanda, Kuzey ve Batı Avrupa'da iken, Asya ve Afrika'da düşük oranlar görülmektedir (11). Genellikle ileri yaşlarda ortaya çıkan kolorektal kanserde;

tanı koyulduktan sonra hastaların yaklaşık 5 yıl sağ kalım olasılığı, hastaların yaşına ve hastalığın evresine göre değişiklik göstermekle birlikte ortalama %65.3 oranındadır.

4.1.1.2 Etiyoloji

Kolorektal kanser etiyolojik açıdan incelendiğinde, moleküler değişikliklerden çevresel faktörlere kadar uzanan çok sayıda risk faktörü içeren bir hastalık olarak tanımlanmaktadır (12). Kolorektal kanserdeki bilinen risk faktörlerinin başlıcaları; bağırsak polipleri, ileri yaş, beslenme ve egzersiz alışkanlıkları, sigara ve alkol tüketimidir. Aile içerisinde kolorektal kanser tanısı koyulmuş akrabalar varsa, yeni tanı için risk artmaktadır. Bu nedenle kolorektal kanserde aile hikayesi önemlidir. Ayrıca moleküler düzeyde kompleks germinal ya da somatik mutasyonların bu hastalıktaki rolü yadsınamayacak düzeydedir (13).

4.2. Apoptoz İnhibitör Protein Ailesi (IAP)

Apoptoz İnhibitör Protein Ailesi üyeleri, 70 amino asitlik Baculovirüs IAP tekrarı (BIR) içeren ve yapısında bu tekrarları bir ile üç kopya arasında bulunduran proteinleri oluşturmaktadır. IAP ailesi üyelerinin sahip olduğu BIR domaini sayısı değişken olmakla birlikte bu domain bahsedilen bütün proteinlerin amino terminalinde bulunmaktadır. İlk kez 1993 yılında, viral enfeksiyon sırasında konağın ölüm yanıtına engel olabilmeleri ile Baculovirüs genomunda tanımlanmışlardır (14, 15).

Memelilerde sekiz farklı apoptoz inhibitör proteini bulunmakta ve bu proteinler hücre ölümü, immunité, inflamasyon, hücre döngüsü ve migrasyon gibi farklı süreçlerde rol almaktadır. (Tablo 1).

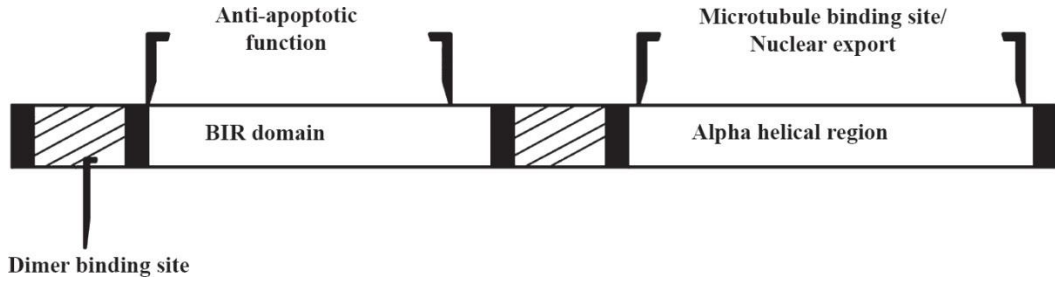
Tablo 1. Memelilerde apoptoz inhibitör protein ailesi üyeleri

Protein	İsim	Eksprese Edildiği Doku/Yapı
XIAP/ILP-1/MIHA/BIRC4	XIAP	Birçok insan dokusu
c-IAP1/hIAP1/MIHB/BIRC2	Hücrel IAP 1	Birçok insan dokusu, Yetişkinlerde timüs, testis ve overde yüksek eksprese
c-IAP2/hIAP2/MIHC/BIRC3	Hücrel IAP 2	Birçok insan dokusu, Yetişkinlerde dalak ve timusta yüksek eksprese
ILP2/BIRC8/TS-IAP	IAP benzeri protein-2	Yetişkin testisleri
ML-IAP/Livin/KIAP/BIRC7	Melanoma IAP	Fetal karaciğer ve böbrekler, yetişkin testis ve timusu
NAIP/BIRC1	Nöral Apoptoz İnhibitör Protein	Yetişkin karaciğeri, plasenta ve merkezi sinir sistemi
Survivin/TIAP/BIRC5	Survivin	Fetal karaciğer, böbrek, akciğer ve gastrointestinal sistemi; tümörler
BRUCE/BIRC6/Apollon	BIR tekrarı içeren ubiquitin konjuge enzim sistem	Golgi kompleksi ve veziküller

4.2.1. Survivin

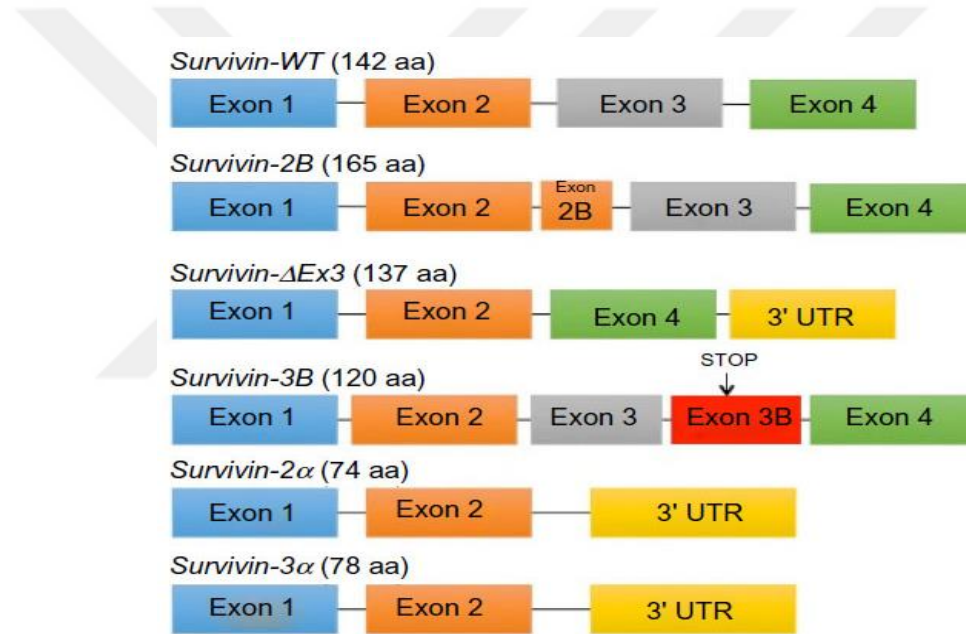
4.2.1.1. Survivin'in Yapısı ve Fonksiyonu

Survivin, ilk olarak 1997 yılında apoptoz inhibitör proteinleri (IAP) ailesinin bir üyesi olarak tanımlanmıştır. *BIRC5* (*Baculoviral IAP Repeat Containing 5*) geninin ekspresyonu sonucunda üretilen survivin, 17. Kromozomun q25 bölgesinde lokalizedir. Yetişkin dokularda ekspresyon profili çok düşük olsa da fetal gelişim ve tümöral oluşum prosesinde ekspresyonu yüksek olarak gözlenen Survivin, 142 amino asitlik ve 16.5 kDa ağırlığında bir proteindir (16). Apoptoz inhibitör protein ailesi üyelerinin en küçüğü olan survivinin bütün izoformları, anti apoptotik fonksiyonları bakımından önemli olduğu düşünülen BIR domaini ve tübülünle etkileşen alfa heliks bölgesi içermektedir (Şekil 1).



Şekil 1. Survivin proteininin yapısı ve fonksiyonu (17) (Jaiswal'dan)

Survivin gen lokusu tarafından kodlanan 6 adet izoform bulunmaktadır (Şekil 2). Bu izoformların, malign hücrelerde normal hücelere kıyasla daha yüksek oranlarda eksprese edildiği gösterilmiştir (18).



Şekil 2. Survivin pre-mRNA'sı tarafından üretilen gen füzyonları (18) (Khan'dan)

Hücre proliferasyonu ve hücre ölümü arasındaki dengeyi düzenleyen survivinin; apoptotik yolağın önemli bir mekanizması olan kromatin kondenzasyonu ve DNA fragmentasyonunda proteolitik rol oynayan, aktivasyonu ile ölüm sürecini başlatan kaspaz-3'e bağlanarak apoptozu inhibe ettiği bilinmektedir (19).

Survivin ayrıca hücre döngüsünün G2-M fazı geçişinde rol alan kromozom taşıyıcı protein kompleksinin bir bileşenidir. Kromozom-mikrotübül bağlanma hatalarının onarılması, iğ ipliği oluşumunu düzenleyen kontrol noktasının aktivasyonu

ve sitokineзде kontraktıl halka oluşumunda görev alarak hücre döngüsünün sürdürülmesini sağlamaktadır (20).

4.2.1.2. Survivinın Apoptozdaki Rolü

Programlanmış hücre ölümü olarak bilinen apoptoz mekanizması, vücuttaki hasarlı ya da sağlıklı hücrelerin sistemden elimine edilmesi ve bu sayede hücrel homeostazının sağlanması açısından önemli bir fizyolojik süreçtir. Bu süreç, hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine ligandların bağlanması ile aktive edilen ölüm reseptörleri yolu ve mitokondriden apoptoz uyarıcı faktör Sitokrom C'nin salınması ile gerçekleşen mitokondriyal yol olarak adlandırılan iki farklı mekanizma ile oluşturulmaktadır. Apoptoz süreci, sistein proteaz ailesi üyelerinden olan kaspazların aktive edilerek diğer kaspazları ve hücrel proteinleri yıkması ile gerçekleşir. Bahsedilen her iki apoptotik mekanizma da, başlatıcı ve sonlandırıcı kaspazlar gibi pek çok sayıda kaspaz proteinleri tarafından yürütülmektedir (21).

Survivinın apoptotik yollardaki hedef kaspazlar olan kaspaz-3, kaspaz-7 ve kaspaz-9 üzerinde inhibe edici etkisi olduğu çalışmalarla gösteriliyor olmasına rağmen, bu etkinin direk veya dolaylı olup olmadığı hala tartışma konusudur (22). Survivinın ayrıca kaspaz bağımsız apoptoz olarak bilinen Apoptoz İndükleyici Faktörler (AIF)'in, sitoplazmadan nükleusa translokasyonu ile gerçekleşen hücre ölüm mekanizmasının inhibisyonunda da etkili olduğu bilinmektedir (23).

4.2.1.3. Survivinın Hücre Bölünmesindeki Rolü

Hücre bölünmesi süreci hücrel gelişim için son derece önemlidir ve bu süreçte yaşanan fonksiyonel bozukluklar malignan tümörigeneze sebebiyet vermektedir (24). Deneysel çalışmalar hücre bölünmesi süreci boyunca survivin ekspresyonunun G2/M fazında arttığını göstermektedir. Sitokinez regülatörleri olan Borealin, Aurora B ve INCENP proteinleri ile etkileşerek kromozom taşıyıcı protein kompleksinin önemli bir elemanı haline gelen survivin, hücre bölünmesinde kromozomların düzgün şekilde ayrılması ve sitokinez sürecinde aktif rol oynar (25).

Survivin, hücre bölünmesi boyunca kromozomların farklı bölgelerinde lokalize olmaktadır. Mitoz boyunca mitotik iğde yerleşik gözlenen survivin, tübülın proteinleri ile etkileşerek mitoz bölünmenin regülasyonunda önemli bir rol oynamaktadır (26).

G2 fazında sentromerde lokalize olan survivin, profaz ve metafazda sentromerin iç kısmına difüze olmaktadır. Anafazda ise sentromerlerle etkileşemeyen survivin tekrar mitotik iğde lokalize olmaktadır. Sitokinez sürecinde ise orta cisimciklerde gözlenmektedir (27).

Kromozom ve mikrotübüller arasındaki bağlanma hatalarının onarılmasında, iğ ipliği oluşumu regülasyonunda görevli kontrol noktalarının aktivasyonunda ve sitokinezde gerçekleşen kontraktıl halka oluşumunda görev alan survivin, hücre döngüsünün etkili bir şekilde sürdürülmesini sağlamaktadır (28).

4.2.1.4. Survivinın Kanserdeki Seçici Ekspresyonu ve Moleküler Tanıdaki Rolü

Hücreyel homeostaziyi sağlayan ve fizyolojik olarak gerçekleşen hücre ölümlerinin baskılanması, kanserleşmenin en önemli göstergelerinden biri olarak kabul edilmektedir (29). Bu nedenle, apoptoz inhibitör protein ailesi üyelerinin artmış ekspresyonları pek çok kanser türünde gözlenmektedir ve bu proteinlerin yüksek ekspresyonları malignansilerde apoptotik uyarıya karşı gelişen direnç ile karakterizedir (30-32).

Survivin, farklılaşmış erişkin dokularda düşük seviyede eksprese edilirken, embriyonik ve fetal dokularda yüksek seviyede eksprese edilmektedir. Pek çok kanser türünde survivin ekspresyonu yüksek olarak gözlenmektedir. Bu gibi nedenlerle survivin, kanserin diagnostik ve prognostik markırlarından biri olabilecek potansiyele sahiptir (33). Daha önce yapılmış klinik çalışmalarda incelenen farklı kanser türlerine ait hasta biyopsilerinde yüksek oranlarda survivin pozitif değerler gözlenmiştir (34, 35).

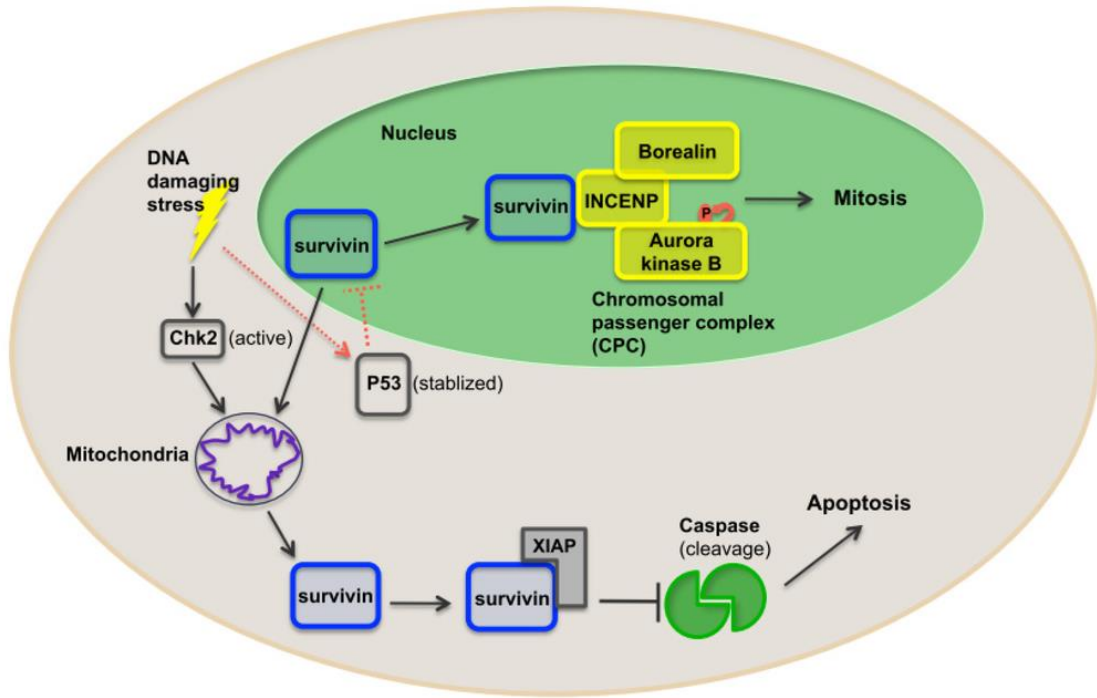
Survivinın artmış ekspresyonu kolorektal kanser hücrelerinde apoptotik indeksin düşük, proliferatif indeksin yüksek oluşuyla ilişkilendirilmiş ve bu şekilde tümörigenezin desteklendiği bildirilmiştir (36-38). Survivin ekspresyonu gözlenen hastalarda; hastalığın ilerlemesinin olumsuz sinyalleri olarak artmış nüks hızı, metastaz ve tedaviye artmış direnç ile bağlantılı olarak kısalan yaşam süresi gösterilmektedir. Artmış survivin ekspresyonunun kolorektal kanserde radyoterapi ve kemoterapiye direnç, lenf nodu ve karaciğer metastazları, hastalarda relaps oranında artış ve sağ kalım süresinin kısalmasıyla da ilişkilendirildiği çalışmalarda mevcuttur (39-42).

Bir tümör supresör gen ürünü olan p53 proteini; hücre döngüsünün kontrolünde, DNA tamirinde ve apoptozun regülasyonunda rol oynamaktadır (43). Normal

koşullarda MDM2 adlı protein p53'e bağlanarak, nükleustan sitozole taşınmasını engeller ve ubikülin ligaz aktivitesi ile p53'e ubikülin ekleyerek proteozomlarda yıkılmasına aracılık eder. p53 proteini pek çok protein kinaz tarafından farklı rezidülerinden fosforillenmesine göre farklı fonksiyonlar göstermektedir. DNA hasarı durumunda; p53, Ser15 ve Ser20 rezidülerinden fosforillenir, negatif regülatörü MDM2 ile arasındaki etkileşimler bozulur ve p53 stabil hale gelerek hücrede birikir. Diğer taraftan ser46 rezidüsünden fosforillendiğinde, apoptoz ile ilişkili genlerin transkripsiyonlarını uyaran transkripsiyon faktörü olarak rol oynar ve apoptozu indükler (44-46).

Yüksek oranda gözlenen survivin ekspresyonu ve yabancı p53'ün işlevsel olarak çalışmıyor olmasının tümörigenezle bağdaştırılması, survivinin fonksiyonel olarak p53 ile ilişkilendirilmesi ihtimalini düşündürmektedir (47). p53'ün hedeflediği ve down regülasyonundan sorumlu olduğu proteinlerden biri de survivindir. p53'ün, survivin ekspresyonunu transkripsiyonel aşamada baskıladığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (48). Öte yandan, survivin de p53 ekspresyonunu regüle edebilmektedir. Akciğer kanseri hücrelerinde survivinin yüksek ekspresyonunun, p53'ün dahil olduğu apoptotik mekanizmayı baskıladığı gösterilmiştir (49). Bunlara ilave olarak; survivin, MDM2 aracılı p53 yıkılım mekanizmasının regülasyonunda da rol oynamaktadır. Survivinin regüle ettiği MDM2 yıkılımının inhibisyonu, p53 proteininin degradasyonunu artırmaktadır. Böylece, survivinin yüksek ekspresyonu p53 protein seviyesinin düşmesine sebep olmaktadır (50).

Survivinin kanserdeki rolü yalnızca apoptoz ile bağdaştırılmakla kalmaz, mitotik süreçteki rolünün de kanserin moleküler temelinde etkili olduğu bilinmektedir. Survivinin mitoz bölünme regülasyonunda sahip olduğu misyonlar nedeniyle, yüksek ekspresyonu durumunda hücre bölünmesi devam ederken gerçekleştirilecek iş defektlerine ve yanlış eşleşmiş kinetokorların bölünme sürecine devam etmesiyle kanserleşmenin oluşumuna neden olabileceği düşünülmektedir (28, 51, 52).



Şekil 3. Survivin'in Apoptoz ve Hücre Bölünmesindeki Rolü (33) (Mobahat'tan)

Survivin'in karsinogenezdeki rolünün yanı sıra anjiyogenezde de önemli bir etkiye sahip olabileceği tartışılmaktadır. Bunun nedeni, anjiyogenezin proliferatif fazındaki endotel hücrelerde görülen güçlü survivin ekspresyonudur (53).

Apoptotik mekanizmalarda meydana gelen fonksiyonel bozukluklar, kemoterapi ve radyoterapiye direnç gibi hayati konularda survivin önemli bir rol oynamaktadır ve bu durum survivin'in tanıda kullanılabilecek önemli bir belirteç ve tedavide potansiyel ilaç hedefi olarak hizmet edebileceğini göstermektedir (32, 54-56).

Survivin'in yüksek düzeyde gözlenen ekspresyonunun ilişkilendirildiği durumlardan biri de kemoterapötiklere karşı gelişen ilaç direnci mekanizmasıdır. Pek çok kemoterapötik ilaca karşı gelişen direnç, tedavinin verimini oldukça düşürmektedir. Bahsedilen bu direncin üstesinden gelebilmek, tedavi şansını artırarak hastanın yaşam kalitesini de yükseltecektir. Survivin gibi kanserde direnç ile ilişkilendirilmiş proteinleri hedeflemek, alternatif tedavi yaklaşımları geliştirilmesini sağlayacaktır. Bu amaçla yapılan çalışmalarda antisens RNA, ribozim, siRNA ve shRNA gibi in vitro metotlarla survivin ekspresyonu baskılanan hücrelerin model organizmalara verildiğinde sistemik bir toksisite oluşturmadığı gözlenmiş ve survivini hedeflemenin etkili bir yaklaşım olacağı kanısına varılmıştır (57, 58).

4.3. 5-Fluorourasil (5-FU)

Bir urasil analogu olan 5-FU, kolorektal kanser tedavisinde öncelikli olarak kullanılan kemoterapötik ajanlardan biridir. Timidilat sentaza bağlanarak nükleotid biyosentezini baskılar ve DNA sentezine etki eder. Böylece, hücrelerin proliferasyonunu engelleyerek apoptoza gitmelerine aracılık eder (59, 60). 5-FU, kanser tedavilerinde sıklıkla kullanılan bir kemoterapötik ilaç olsa da ciddi yan etkilere sahiptir. Kullanım dozu arttıkça, kanser hücrelerinin yanı sıra sağlıklı hücelere verdiği zarar da artmaktadır. Özellikle kemik iliği ve gastrointestinal kanalda bu etki ciddi oranlarda gözlenmektedir (61).

Günümüzde kolorektal kanser tedavisinde sıklıkla kullanılmakta olan 5-FU'ya karşı direnç gelişmekte ve tedavi süreci son derece zorlaşmaktadır. Gerek kolorektal kanserli hastaların gerekse DLD-1 gibi çeşitli kolorektal kanser hücre hatlarının 5-FU'ya karşı direnç gösterdiği çeşitli çalışmalarca gösterilmiştir (62-65). Oluşan bu direnç mekanizmasını aşarak tedaviyi etkin hale getirecek unsurların arayışı sürmektedir.

4.4. Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE)

CAPE, arıların çeşitli bitkilerden topladığı özütleri reçinemi bir madde haline getirerek ürettiği doğal bir bileşik olan Propolis'in önemli bir bileşenidir (66).

CAPE son derece güçlü bir antioksidan olup kanser çalışmalarında kullanmak için ideal bir ajandır. Son yıllarda, özellikle CAPE'in anti proliferatif etki mekanizmasını aydınlatmaya yönelik çalışmalar, kanserde etkili bir tedavi yöntemi geliştirilmesi açısından umut vaat etmektedir. CAPE'in pek çok kanserde yüksek ekspresyon gösterdiği bilinen ve proliferasyonun indüklenmesi ile karakterize NFkB'yi inhibe ettiğini gösterilmiştir (67). Ayrıca CAPE'in kanser hücrelerine seçici apoptotik, anti klonal ve anti proliferatif etkilerini inceleyen çalışmalar mevcuttur (5, 68, 69). CAPE, sağlıklı hücrelerin kanser hücrelerine dönüşümünü inhibe etmektedir ve kanser hücreleri sağlıklı hücelere kıyasla CAPE muamelesine daha duyarlıdır. Bu durum, CAPE'in kanser hücreleri üzerinde seçici sitotoksik etkiye sahip olduğunu ve sağlıklı hücrelerin bu durumdan kanser hücreleri kadar etkilenmediğini göstermektedir (70, 71). Yapılan araştırmalar CAPE'in kanser hücreleri üzerindeki etkisinin sitotoksik olmak yerine; apoptozun indüklenmesi ile beraber fizyolojik olarak gerçekleştiğini göstermektedir.

(72, 73). Fakat CAPE'in seçici apoptotik etkisinin moleküler mekanizması henüz tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir.

CAPE'in, kanser hücrelerinde kemoterapi ve radyoterapiye karşı hassasiyet oluşturarak, tedavinin etkinliğini artırdığı ve bununla beraber sağlıklı hücelere zarar vermeden, kanser hücreleri üzerinde seçici anti tümöral etkiler gösterdiği de literatürde yer almaktadır (74-76). CAPE'in sağlıklı hücelere zarar vermeden kanser hücrelerinde seçici olarak apoptozu indüklemesi, kemoterapi ve radyoterapinin sağlıklı hücrelerde oluşturduğu zararlı etkiler göz önüne alındığında oldukça dikkat çekici bir özelliktir.

4.5. Water Soluble Tetrazolium Salts (WST-1) Testi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi

WST-1, metabolik aktivitenin ölçümüne dayalı hücre proliferasyon testlerinin başlıcalarından biridir. Hücre canlılığı, mitokondriyal aktivite ve sitotoksosite gibi özelliklerin incelendiği WST-1 testi, turuncu renkli tetrazolyum tuzlarının canlı hücrelerde mitokondriyal redüktaz enzimi ile sarı renge dönüşmesi ve bu renk değişiminin spektrofotometrik olarak 440 nm dalga boyunda ölçülmesi ile analiz edilmektedir (77).

4.6. Annexin V / 7AAD İşaretleme Yöntemi ile Apoptoz Tayini

Flow sitometri kullanılarak hücre canlılığının ölçülmesi, canlı hücrelerin sitozolik yüzünde bulunan fosfatidilserin gruplarının, apoptotik hücrelerde hücre zarının dış yüzüne transloke olması ve floresan bağlı Annexin V'in bu gruplara seçici olarak bağlanması prensibine dayanmaktadır. Hücre zarında gerçekleşen geçirgenlik fonksiyonlarının kaybı ise 7-aminoactinomycin D (7AAD) kullanılarak ölçülmektedir. Bu yöntem ile hücrelerin apoptotik aşamaları tespit edilebilmektedir. Erken apoptotik aşamadaki hücrelerde, 7AAD hücre membranı tarafından dışarı atılırken, geç apoptotik aşamada ve ölü hücrelerde membran bütünlüğünün bozulmasıyla 7AAD hücre içine girebilmektedir. Canlı hücreler Annexin V ve 7AAD negatif iken; erken apoptoz aşamasındaki hücreler Annexin V pozitif ve 7AAD negatif, geç apoptoz aşamasındaki hücreler ise Annexin V pozitif 7AAD pozitif sonuç vermektedir. Annexin V negatif ve 7AAD pozitif sonuç veren hücreler, nekrotik hücreler olarak değerlendirilmektedir (78). Bu nedenle apoptotik aşamaları ayırabilmek için, Annexin V'in yanı sıra ikincil boya olarak 7AAD gibi bir boyanın kullanılması gerekmektedir.

4.7. Aktif Kaspaz-3 Ölçümü ile Apoptoz Tayini

Flow sitometri kullanılarak analizi yapılan apoptotik ölçümlerden biri de aktifleşmiş kaspaz-3 değişimlerine dayanmaktadır. Kaspaz-3, kaspaz ailesinin diğer üyeleri gibi normal şartlarda inaktif pro-enzim formundayken, apoptotik sürecin başlamasıyla aktifleştirilen bir proteazdır. Aktifleşen kaspaz-3, apoptotik yolakta görevli diğer kaspazları da aktifleştirmekte ve apoptoz sürecinde anahtar sayılabilecek bir rol oynamaktadır (79). Bu nedenle apoptozun erken evrelerinde olan hücreleri tespit etmek için kaspaz-3 aktivasyonlarının incelenmesi, tercih edilmesi gereken yöntemlerden biridir. Bu yöntemde aktifleşmiş kaspaz-3, Fikoeritrin (PE) konjuge antikorlar ile işaretlenerek flow sitometride analiz edilmektedir (80).

Aktif kaspaz-3'ü tanıyan spesifik antikorlar kullanılarak flow sitometride yapılmakta olan bu analizler, ilgilenilen hücrenin apoptotik sürecinde gerçekleşen Kaspaz-3 aktivasyonu hakkında bilgi edinmeyi sağlamaktadır.

4.8. Akridin Oranj/Etidyum Bromür Boyama Yöntemi ile Apoptoz Tayini

Apoptozu tespit etmede kullanılan yöntemlerden biri de, farklı dalga boylarında ışığa veren ve floresan ışık mikroskobu ile görüntülenen, akridin oranj ve etidyum bromür boya ile gerçekleştirilen yöntemdir. Akridin oranj ve etidyum bromür canlı ve ölü hücreleri ayırt etmede kullanılan iki farklı boyadır. Akridin oranj, canlı ve ölü hücrelerin içine girerek hücre çekirdeklerinin yeşil renkte boyanmasını sağlar. Etidyum bromür ise apoptotik süreci geçirmekte olan ve sitoplazmik membran integritesini kaybeden hücrelerin içine girerek çekirdeklerinin turuncu renkte boyanmasını sağlar. Sonuç olarak canlı hücrelerin çekirdekleri yeşil renkte, apoptoz aşamasındaki hücrelerin çekirdekleri ise turuncu renkte görülmektedir (81).

4.9. Western Blot Yöntemi ile Protein Ekspresyonlarının Belirlenmesi

Western blot yöntemi, protein ekspresyonunun belirlenmesi için kullanılan temel yöntemlerden biridir. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) yürütülen örneklerin, özel seçilmiş bir membrana aktarılması ve proteinlere spesifik antikorlarla işaretlendikten sonra spektrofotometrik ölçümlerle protein absorbansının tespit edilmesi şeklinde işlemektedir. İşlem sonunda elde edilen bant profili, örneklerdeki ilgilenilen proteinin miktarını ve ilaç muamelesi çalışmalarında bu proteinin miktarındaki değişimi belirlemeyi sağlar (82).

4.10. Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR) Yöntemi ile Gen Ekspresyonlarındaki Değişimin mRNA Düzeyinde İncelenmesi

Real Time PCR yöntemi, PCR ürünlerinin amplifikasyonunun monitörize edildiği ve kullanılan floresan işaretli probalar ya da boyalar aracılığıyla, amplifiye olan DNA'nın gerçek zamanlı olarak takip edilebildiği bir yöntemdir. Amplifiye edilen DNA miktarı, çeşitli sayısal değerlere dönüştürülerek analiz edilir. Bu şekilde mRNA düzeyi belirlenmiş olur (83).

Çift zincirli DNA'nın bu şekilde çoğaltılmasında en çok kullanılan yöntemlerden biri "SYBR Green" yöntemidir. SYBR Green DNA zincirlerinin arasında girdiğinde ışığa veren bir floresan boyadır. Çift zincirli DNA'ya bağlanır ve bu nedenle çoğalan DNA'daki artışla doğru orantılı olarak Real Time PCR cihazında okunan floresanın miktarı da eş zamanlı şekilde artar. Gerçekleşen bu artış, gerçek zamanlı olarak takip edilebilmektedir (84)

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Gereç

5.1.1. Hücre Hatları

Çalışmada kullanılan hücre hatları Tablo 2’de gösterildiği gibidir.

Tablo 2. Tezde Kullanılan Hücre Hatlarına Ait Bilgiler

Hücre Hattı	ATCC Kodu	Temin Edildiği Yer
HCT-116	ATCC® CCL-247™	Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
RKO	ATCC® CRL-2577™	Duisburg Essen Üniversitesi Radyasyon Biyolojisi Enstitüsü
DLD-1	ATCC® CCL-221™	Gülhane Askeri Tıp Akademisi Araştırma Geliştirme Merkezi
WiDR	ATCC® CCL-218™	Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
CCD 841-CoN	ATCC® CRL-1790™	Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

5.1.2. Kimyasallar

5-Fluorourasil	Koçak, 1919428
%40 Akrilamid/Bisakrilamid	Biorad,161-0146
Amonyum Persülfat	Sigma Aldrich, A9164
Beta Merkaptol Etanol	Merck, 8.05740.0250
Bovine Serum Albumin (BSA)	Amresco, 0332
Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE)	Sigma Aldrich, C8221
Complete Mini Protease Inhibitor	Roche, 04693159001
Dithiothreitol (DTT – C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂)	Thermo Scientific, R0861
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Sigma Aldrich, 472301
Dulbecco’s Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Gibco, 14190094
Etanol (C ₂ H ₅ OH)	Mey, Türkiye
Fenilmetilsülfonil florür (PMSF)	Sigma Aldrich, 1741932998611
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco, 16000-036
Hidroklorik Asit (HCl)	Merck, 1.00314.2500

L-Glutamin	Biological Industries, 752353
McCoy's 5A (Modified) Medium	Gibco, 26600-023
Mem Eagle with Earle's BSS, with L-glutamine	Lonza, BE12-611F
Metanol	Merck, 1.06009.2500
Penisilin/Streptomisin (Pen/Strep)	Gibco, 15140-122
Potasyum Dihidrojen Fosfat (KH ₂ PO ₄)	Sigma, NIST200B
RPMI 1640, HEPES	Gibco, 52400-025
Sodyum Dodesil Sülfat	Merck, 822050
Sodyum Phosphate Dibasic (H ₂ NaO ₄ P)	Sigma Aldrich, S7907
Sodyum Florür (NaF)	Sigma Aldrich, S7920
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Merck, 1.064.621.000
Sodyum Klorür (NaCl)	Merck, 1.06404.1000
Sodyum Orthovanadate (Na ₃ VO ₄)	Sigma Aldrich, S6508
Tripan Mavisi	Sigma Aldrich, T8154
Tripsin-EDTA	Biological Industries, 741152
Tris-Baz (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Sigma Aldrich, T1503
Tween 20	J.T.Baker, 7374

5.1.3. Protein Markırlar

Prism Protein Ladder	Abcam, ab115832
----------------------	-----------------

5.1.4. Antikorlar

5.1.4.1. Primer Antikorlar

Anti Survivin Rabbit Monoclonal	Abcam, ab76424
Anti-p53 (phospho S15) Rabbit Polyclonal	Abcam, ab1431
Anti-p53 (phospho S46) Rabbit Monoclonal	Abcam, ab76242
Anti-GAPDH Mouse Monoclonal	Abcam, ab125247

5.1.4.2. Sekonder Antikorlar

Anti-Mouse-HRP	Bio-Rad, 170-5047
Anti-Rabbit-HRP	Bio-Rad, 170-5045

5.1.5. Primerler

Çalışmada kullanılan primerler Tablo 3'te gösterildiği gibidir.

Tablo 3. Primer Listesi

Primer Adı	Primer Dizisi (5'-3')
Survivin Forward Primer	agccctttctcaaggaccac
Survivin Reverse Primer	ctctatggggctcgtcatctgg
β -Actin Forward Primer	ctggcaccacaccttctacaatg
β -Actin Reverse Primer	cctggtagatgggcacagtgtg

5.1.6. Kitleler

WST-1 Cell Proliferation Reagent Kit	Abcam, ab155902
PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I	BD Biosciences, 559763
PE Active Caspase-3 Apoptosis Kit	BD Biosciences, 550914
RNeasy Mini Kit	QIAGEN, 74104
QuantiTect Reverse Transcription Kit	QIAGEN, 205311
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	QIAGEN, 204143

5.1.7. Cihazlar

Buzdolabı (+4°C)	Arçelik, Türkiye
Buz Makinesi	Scottman, İngiltere
Chemiluminesans Görüntüleme Sistemi	BIORAD, ABD
Derin dondurucu (-20°C)	Bosch, Türkiye
Derin Dondurucu (-86°C)	Thermo, ABD
Dikey Elektroforez ve İmmüno blot Sistemi	BIORAD- ABD
Distile Su Cihazı	GFL 2004, Almanya
Elisa Plate Reader	Eppendorf, Almanya
Etüv (37°C)	Memmert, Almanya
BD Accuri C6 Plus	BD Biosciences, Kanada
Hassas terazi	Ahaus, ABD
Invert mikroskop	Nikon, Japonya
Lamin air flow hood	Heraeus, Almanya

Light Cycler 480 Instrument II	Roche, Almanya
Manyetik Karıştırıcı	IKA, ABD
Mikrosantrifüj	Thermo I EC, ABD
Otoklav	Tutnauer 3150 ELV, İtalya
Otomatik pipet seti	Gilson, ABD
pH metre	Hanna, Portekiz
Pipet aid	Drummond Scientific, ABD
Soğutmalı yüksek devirli santrifüj	Eppendorf 5804, Almanya
Su banyosu	Memmert, Almanya
Termocycler	GeneAmp 9700, ABI, ABD
Termomikser	Eppendorf, Almanya
Vorteks	Labinco L-46, Hollanda
Yüksek Devirli Santrifüj	Eppendorf 5810, Almanya

5.1.8. Sarf Malzemeler

Enjektör (5 ve 10 ml)	Ayset, Türkiye
Falkon Tüpler (15 ve 50 ml)	Greiner, Almanya
Kültür Flaskları (25 cm ² T25 ve 75 cm ² T75)	Greiner, Almanya
Eppendorf Tüpler (1.5 ml)	Greiner, Almanya
Pastör Pipetleri	Isolab, Almanya
Pipet Uçları (10, 200, 1000 µl)	Axygene, Almanya
Plate (6 ve 96 kuyucuklu)	Greiner, Almanya
Serolojik Pipetler (5, 10 ve 25 ml)	Greiner, Almanya
Thoma Lamı	Marienfild, Almanya
qPCR Plate (96 kuyucuklu)	Bioplastic, Hollanda

5.1.9. Solüsyon, Tampon ve Besiyerleri

5.1.9.1. Hücre Kültürü Besiyerleri

50 ml %10 FBS %1 Pen-Strep İçeren RPMI 1640 Besiyer

Hazırlanışı:

45.5 ml RPMI 1640 besiyeri içerisine 5 ml FBS ve 0.5 ml pen-strep eklenerek hazırlandı ve +4°C'de muhafaza edildi.

50 ml %10 FBS %1 Pen-Strep İçeren Mem Eagle with Earle's BSS Besiyer

Hazırlanışı:

45.5 ml Mem Eagle with Earle's BSS (EMEM) besiyeri içerisine 5 ml FBS ve 0.5 ml pen-strep eklenerek hazırlandı ve +4°C'de muhafaza edildi.

50 ml %10 FBS %1 Pen-Strep İçeren McCoy's 5A (Modified) Besiyer

Hazırlanışı:

45.5 ml McCoy's 5A (Modified) besiyeri içerisine 5 ml FBS ve 0.5 ml pen-strep eklenerek hazırlandı ve +4°C'de muhafaza edildi.

5.1.9.2. Muamele Solüsyonları

CAPE Solüsyonu (Stok)

Hazırlanışı:

Ticari olarak satın alınan 1 gr CAPE ürününden (Mw: 284.31) 0.1 gr tartılarak 10 ml DMSO içerisinde çözüldü. (10mg/ml). Alikotlanarak -20°C'de muhafaza edildi.

5-Fluorourasil Solüsyonu (Stok)

Hazırlanışı:

Ticari olarak satın alınan 5-Fluorourasil kullanıldı. Oda sıcaklığında ve karanlıkta muhafaza edildi.

5.1.9.3. Hücre Canlılık Analizi Solüsyonları

WST-1 Solüsyonu

Hazırlanışı:

Abcam firması tarafından temin edilen kullanıma hazır solüsyon kullanıldı ve alikotlanarak -20°C’de muhafaza edildi.

5.1.9.4. Akridin Oranj/Ethidyum Bromür Boyama Solüsyonları

Akridin Oranj Solüsyonu (Stok)

Hazırlanışı:

5 mg Akridin Oranj, 1 ml PBS içerisinde çözülerek stok solüsyon hazırlandı.

Etidyum Bromür Solüsyonu (Stok)

Hazırlanışı:

3 mg Etidyum Bromür, 1 ml PBS içerisinde çözülerek stok solüsyon hazırlandı.

Akridin Oranj/Etidyum Bromür Çalışma Solüsyonu

Hazırlanışı:

Akridin Oranj ve Etidyum Bromür stok solüsyonlarından 1'er µl alınarak, 1 ml PBS içerisine eklendi ve çalışma solüsyonu hazırlandı. Oda sıcaklığında ve karanlıkta muhafaza edildi.

5.1.9.5. Western Blot Solüsyonları

Ayırma Jel Tamponu (1.5 M, Tris-HCl pH 8.8)

Hazırlanışı:

36.33 g Tris (Tris-baz Mw:121.14 g/mol) 180 ml deiyonize su içerisinde çözülerek, HCl ile pH 8.8'e ayarlandı ve toplam hacim deiyonize su ile 200 ml'ye tamamlanarak oda sıcaklığında muhafaza edildi.

Yükleme Jel Tamponu (0.5 M, Tris-HCl pH 6.8)

Hazırlanışı:

6.057 g Tris (Tris-baz Mw:121.14 g/mol) 90 ml deiyonize su içerisinde çözülerek, HCl ile pH 6.8'e ayarlandı ve toplam hacim deiyonize su ile 100 ml'ye tamamlanarak oda sıcaklığında muhafaza edildi.

%10 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)

Hazırlanışı:

10 g SDS ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_4\text{Na}$, Mw:288.372 g/mol) 100 ml deiyonize suda çözülerek oda sıcaklığında muhafaza edildi.

Tris Glisin Tamponu (10X)

Hazırlanışı:

30.3 g Tris (Tris-baz Mw:121.14 g/mol) ve 144 g glisin (Mw:75.07 g/mol), 1 litre deiyonize suda çözülerek oda sıcaklığında muhafaza edildi.

SDS-PAGE Yürütme Tamponu (1X)

Hazırlanışı:

10X Tris Glisin tamponu 1X olacak şekilde seyreltildi ve 10 ml %10'luk SDS ilave edilerek son hacim 1 litreye tamamlandı.

SDS-PAGE Transfer Tamponu (10X)

Hazırlanışı:

10X Tris Glisin tamponu 1X olacak şekilde seyreltildi ve 200 ml metanol ilave edilerek son hacim 1 litreye tamamlandı.

Amonyum Persülfat (%10 APS)

Hazırlanışı:

100 mg APS (Mw: 228.18 g/mol), 1 ml deiyonize suda çözülerek +4°C'de muhafaza edildi.

SDS-PAGE Yükleme Tamponu

Hazırlanışı:

Toplam hacim 10 ml olacak şekilde 0.25 M Tris-Cl pH 6.8, %10 SDS, %50 Gliserol, %0.01 Bromofenolblue hazırlandı ve -20°C'de muhafaza edildi. Kullanımdan önce son konsantrasyonu 0.5 M olmak üzere DTT eklendi.

%40 Akrilamid/Bisakrilamid

Hazırlanışı:

Biorad tarafından temin edilen kullanıma hazır solüsyon kullanıldı ve +4°C'de muhafaza edildi.

Phosphate Buffer Saline (PBS), 10X Stok, pH:7.4

Hazırlanışı:

80 g 1.37 M NaCl (Mw: 58.44 g/mol), 2 g 2.7 mM KCL (Mw: 74.56 g/mol), 11 g 4.3 mM Na₂HPO₄ (Mw:141.96 g/mol), 2 g 1.4 mM KH₂PO₄ (Mw:136.09 g/mol) 1 litre distile su içerisinde hazırlanarak pH:1N HCl ile 7.4'e ayarlandı.

PBS, %0.05 Tween 20

Hazırlanışı:

10X PBS stoğundan 10 ml ve %20'lik Tween 20 solüsyonundan 250 µl alınarak son hacim deiyonize su ile 100 ml'e tamamlandı ve oda sıcaklığında muhafaza edildi.

%20 Triton-X 100

Hazırlanışı:

10 ml Triton-X 100 deterjanının üzerine 40 ml deiyonize su eklenerek son hacim 50 ml'e tamamlandı. Triton-X 100'ün tamamının çözülebilmesi için çözelti bir müddet ısıtıldı ve ardından +4°C'de muhafaza edildi.

RIPA Hücre Patlatma Tamponu (10X Stok)

Hazırlanışı:

Son konsantrasyonları, 150 mM Sodyum Klorür, 1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH:8.0, %1 Triton-X 100, %0.5 Sodyum deoksikolat ve %0.1 SDS olacak şekilde solüsyonlar ilave edildi ve son hacim 50 ml'e tamamlandı.

RIPA Hücre Patlatma Tamponu (1X)

Hazırlanışı:

Son konsantrasyonları 1X RIPA, 1X PI, 1X NaPPi, 10X NaVan, 5X NaF ve 20X PMSF olacak şekilde solüsyonlar ilave edildi ve deiyonize su ile son hacim 1 ml'e tamamlandı.

Proteaz İnhibitör Kokteyli

Hazırlanışı:

1 adet Complete Mini Tablet (Roche), 1 ml çift distile su içinde çözüldü ve -20°C'de muhafaza edildi.

Fosfataz İnhibitörleri

20X Sodyum Pyrophosphate (NaPPi - 100mM)

Hazırlanışı:

4.44 g NaPPi, 100 ml çift distile suda çözüldü ve +4°C'de muhafaza edildi.

100X Sodyum Orthovanadate (NaVan – 200mM)

Hazırlanışı:

3.68 g Na₃VO₄ 90 ml çift distile su içerisinde çözüldü. 1 N NaOH kullanılarak pH 10.0'a ayarlandı ve sarı renkli solüsyon renksiz olana kadar kaynatıldı. Oda sıcaklığına gelene kadar beklendikten sonra pH tekrar ölçülerek 10.0'a ayarlandı ve hacim 100 ml'e tamamlandı. Alikotlanarak -20°C'de muhafaza edildi.

50X Sodyum Florür (NaF – 1mM)

Hazırlanışı:

4.2 g NaF, 100 ml çift distile su içerisinde çözüldü ve alikotlanarak -20°C'de muhafaza edildi.

100X PMSF (100mM)

Hazırlanışı:

0.174 g PMSF, 10 ml etil alkol içerisinde sulandırıldı ve alikotlanarak -20°C'de muhafaza edildi.

5.2. Yöntem

5.2.1. Hücrelerin Kültüre Edilmesi

HCT-116 hücreleri ve RKO hücreleri %10 FBS (Fetal Bovin Serum) ve %1 penisilin-streptomisin içeren McCoy's 5A besiyeri ile 37°C'de %5 CO₂ içeren etüvde kültüre edildi.

DLD-1 hücreleri %10 FBS (Fetal Bovin Serum) ve %1 penisilin-streptomisin içeren RPMI 1640 besiyeri ile 37°C'de %5 CO₂ içeren etüvde kültüre edildi.

WiDR hücreleri ve CCD 841-CoN hücreleri %10 FBS (Fetal Bovin Serum) ve %1 penisilin-streptomisin içeren MEM Eagle with Earle's BSS (EMEM) besiyeri ile 37°C'de %5 CO₂ içeren etüvde kültüre edildi.

Hücreler her gün kontrol edilerek, flask yoğunluğu mikroskopik olarak gözlemlendi. Flaskta yoğunlaşma görülmeye başladığında pasajlama işlemleri gerçekleştirildi. Pasajlama işlemi, flask yüzeyine tutunan hücrelerin üzerindeki süpernatant dökülerek flask 5ml PBS ile yıkandı. 1ml Tripsin-EDTA solusyonu hücreler üzerine eklenerek 37°C'de 2-3 dakika (dk) inkübe edildi. İnvirt mikroskopta kontrol edilerek flask yüzeyinden ayrıldığı tespit edilen hücrelere, tripsinizasyonu durdurmak için 5ml %10 FBS içeren besiyeri ilave edildi. Flasklardan toplanan hücreler 15 ml falkon tüplere alınarak 1200 rpm'de 5 dk santrifüjle çöktürüldü ve besiyeri ile tekrar süspanse edilerek yeni flasklara aktarıldı. Pasajlama işlemi tamamlanan hücreler, 37°C %5 CO₂ içeren etüvde yerleştirildi.

5.2.2. Hücrelerin İkilenme Zamanının (Doubling Time) Belirlenmesi

Çalışmamızda kullanılmakta olan hücrelerin sayılarını iki katına çıkardıkları sürenin tespit edilerek hücrelerin büyüme karakteristiklerinin belirlenmesi, ilaç muamelesi sonrasında hücrelerin kültürde ne kadar süre ile tutulması gerektiği ve canlılık deneylerine başlarken, çalışılması gereken uygun hücre sayısının belirlenmesi gibi çalışmada temel sayılabilecek pek çok etken açısından önemlidir. Bu nedenle çalışmada öncelikle hücrelerin sayısını iki katına çıkardığı zaman tespit edildi.

5.2.2.1. Tripan Mavisi ile Hücre Sayımı

Hücrelerin ikilenme zamanlarının belirlenmesi için öncelikle hücreler tripan mavisi ile boyanarak sayıldı. Hücre süspansiyonundan 10 µl alındı ve temiz bir endorf tüp içinde 10 µl Tripan mavisi ile karıştırıldı. Boyanan hücreler Thoma Lamına yayılarak invert mikroskopta sayım yapıldı. Mikroskopta parlak görünen hücreler canlı; mavi boya almış olan hücreler ise ölü hücre olarak değerlendirildi.

Canlı hücre sayısı; “(Hücre sayısı/2) x dilüsyon faktörü x 10⁴ x süspansiyon hacmi” formülü ile hesaplandı.

5.2.2.2. İkilenme Zamanının Belirlenmesi

Kullanılan hücreler, ayrı ayrı sayılarak belirtilen formül ile canlı hücre sayısı hesaplandı. Her hücre hattından yaklaşık olarak 1x10⁶ hücre alınarak, T75 flasklara ekildi. Hücrelerin flaska ekildiği an, 0. Saat olarak kabul edildi.

24. saatte flasklardaki hücreler Tripsin-EDTA ile tripsinize edildi ve tekrar sayıldı. Flasktaki toplam hücre sayısı belirlendikten sonra, tripsinize edilmiş bütün hücreler tekrar aynı flaska ekildi. Bu işlem 48 ve 72. saatlerde de devam etti. Bütün sayımların sonucu not edildi ve hücre sayıları ile sayıldıkları saatler kullanılarak çizilen büyüme eğrisi aracılığıyla hücrelerin ikilenme zamanı tespit edildi.

5.2.3. Hücrelerin CAPE ve 5-FU ile Muamele Edilmesi

Çalışmada kullanılan hücreler, deneylerin dizaynına uygun olarak 6 ve 96 kuyucuklu pleytlere ekildi. Hücrelerin tamamı flask yüzeyine tutunan tipte hücreler olduğundan, hücreler pleytlere ekildikten sonra 37°C %5 CO₂ içeren etüvde bir gece (yaklaşık 18 saat) inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında flask yüzeyine tutulumları mikroskopik olarak kontrol edilen hücrelerin besiyerleri tamamen çekildi ve

kontrol grubu hücrelerine CAPE ve 5-FU içermeyen besiyerleri eklendi. Muameleli hücrelere ise belirli aralıktaki dozlarda (5 µM – 100 µM) CAPE ve belirli aralıktaki dozlarda (2,5 µM – 40 µM) 5-FU içeren besiyerleri eklenerek 72 saat inkübasyona bırakıldı. Kullanılan CAPE ve 5-FU dozları; “ $M1 \times V1 = M2 \times V2$ ” formülü kullanılarak hesaplandı.

5.2.4. Water Soluble Tetrazolium Salts (WST-1) Hücre Canlılık Testi

CAPE muamelesiz, belirli miktarlarda CAPE ile muamele edilen, 5-FU muamelesiz ve belirli miktarlarda 5-FU ile muamele edilen hücreler her kuyucukta yaklaşık 8000 hücre olacak şekilde sayılarak, 96 kuyucuklu pleytlere ekildi ve 72 saatlik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun 68. Saatinde WST-1 boyası ilave edildi ve 4 saat daha inkübe edildi. 72 saat tamamlandığında, kültüre eklenmiş olan tetrazolium tuzlarının yalnızca canlı hücrelerde, mitokondriyal redüktaz enzimi ile sarı renge dönüşmesi ve bu renk değişiminin spektrofotometrik olarak 440 nm dalga boyunda ölçülmesi ile hücrelerin canlılık oranı belirlendi. CAPE ve 5-FU için hücre popülasyonunun yaklaşık olarak yarısını öldüren değer tespit edildi. Daha sonra, bu etkin dozlardaki CAPE, 5-FU ve CAPE/5-FU hücrelere muamele edilerek WST-1 yöntemi tekrarlandı.

5.2.5. Annexin V/7AAD Apoptoz Testi

Apoptoz testine başlamadan önce, hücreler tripsinize edilerek flasklardan kaldırıldı ve 72 saat sonunda yaklaşık olarak 1×10^6 hücre sayısına ulaşacak şekilde ikilenme zamanları göz önüne alınarak 6 kuyucuklu pleytlere ekildi. Hücrelerin flaska tutunmasının gerçekleşmesi için hücreler bir gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda, WST-1 testi ile belirlenen etkin doz değeri göz önüne alınarak CAPE muamelesi gerçekleştirildi. Muamele edilen her hücre hattı için kontrol grubu olarak muamelesiz hücreler de çalışmaya dahil edildi. İlaç muamelesinden 72 saat sonra apoptoz testine geçildi.

Apoptotik ve ölü hücrelerin tespiti için PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I kullanıldı. Hücreler Tripsin-EDTA ile tripsinize edilerek 6 kuyucuklu pleytlerden alındı ve 2 kez soğuk PBS ile yıkandı. Bütün yıkamalar 1200 rpm’de 5 dk olacak şekilde gerçekleşen santrifüj işlemi ile yapıldı. Yıkamaların ardından hücreler, 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde 1X Annexin Binding Buffer ile süspanse edildi. Birincisi kontrol tüpü,

ikincisi 5µl Annexin V, üçüncüsü 5µl 7AAD, dördüncüsü 5µl Annexin V ve 5µl 7AAD içeren tüpler olmak üzere, her kuyucuk için 4 deney tüpü hazırlandı ve tüplere 100 µl hücre süspansiyonu eklenerek düşük hızda 4-5 saniye (sn) vortekslendi. Tüpler oda sıcaklığında ve karanlıkta 15 dk inkübe edildikten sonra flow sitometri cihazında hücreler analiz edildi.

5.2.6. Aktif Kaspaz-3 Apoptoz Testi

Ticari olarak satın alınan PE Active Caspase 3 Apoptosis Kit (BD Bioscience) protokolüne uygun olarak muamelesiz ve etkin dozlardaki CAPE ile muamele edilen hücrelerde flow sitometrik analiz gerçekleştirildi. Öncelikle 72 saat sonunda yaklaşık olarak 1×10^6 hücre sayısına ulaşacak şekilde 6 kuyucuklu pleytlere ekilen muameleli ve muamelesiz hücreler tripsinize edilerek pleytlerden kaldırıldı. 2 kez soğuk PBS ile yıkandı. Yıkamalar, 1200 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj işlemi ile gerçekleştirildi. Daha sonra hücreler, 1×10^6 hücre/0.5 ml solüsyon olacak şekilde kit içeriğinde bulunan Cytotfix/Cytoperm solüsyonu ile süspansiyon edildi. 20 dk buz üzerinde inkübasyon gerçekleştirildi. İnkübasyon süresi sonunda 1200 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj edilen hücreler, kit içeriğinde bulunan ve 10X'den 1X'e seyreltilmiş Perm/Wash solüsyonu ile 1×10^6 hücre/0.5 ml solüsyon olacak şekilde yıkandı. Yıkama işlemleri, 1200 rpm'de 5 dk olacak şekilde gerçekleşen santrifüj işlemi yapıldı. Hücreler, 100µl Perm/Wash solüsyonu ile tekrar süspansiyon edilerek ependorf tüplere alındı. Kit içeriğinde bulunan Rabbit Anti- Active Caspase-3 antikordan her bir ependorf tüpüne 20 µl eklendi ve 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücreler 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. 1 ml Perm/Wash solüsyonu ile süspansiyon edilerek tekrar aynı santrifüj işleminden gerçekleştirildi. Hücreler son olarak 0.5 ml Perm/Wash solüsyonu ile süspansiyon edilerek flow sitometride analiz edildi.

5.2.7. Akridin Oranj/Etidyum Bromür Boyaması ile Apoptoz Tayini

6 kuyucuklu pleytlere ekilen muameleli ve muamelesiz hücreler, muamelenin ardından geçen 72 saat sonunda tripsinize edilerek pleytlerden kaldırıldı. 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edilen hücreler, 1 ml PBS ile süspansiyon edildi. Alkolle temizlenmiş lamaların üzerinde 10 µl Akridin Oranj/Etidyum Bromür boya çözeltisi ve 10 µl hücre süspansiyonu karıştırılarak floresan mikroskopta analiz edildi.

5.2.8. RNA İzolasyonu ve Reverse Transkriptaz PCR

Hücrelerden RNA izolasyonu, QIAGEN RNeasy Mini Kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. Daha önce 6 kuyucuklu pleytlere ekilmiş ve muameleli/muamelesiz olarak gruplandırılmış yaklaşık 1×10^6 sayıdaki hücreler, Tripsin-EDTA ile pleyt yüzeyinden kaldırılarak 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası hücreler PBS ile yıkanarak aynı koşullarda tekrar santrifüj edildi. Hücrelerin üzerindeki süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı. Kit protokolüne uygun olarak, her bir hücre pelletinin üzerine, kit içeriğindeki RLT solüsyonundan 350 µl eklenerek hücreler süspansiyon edildi ve ependorf tüplere alındı. RLT solüsyonu kullanılmadan önce, kit önerisi doğrultusunda içerisine toplam hacmin %1'i kadar beta merkaptan etanol eklendi. RLT solüsyonu ile süspansiyon edilen hücrelere, 350 µl etanol eklendi ve ince şırıngalı enjektör ile 8-10 kez al-ver yapılarak homojenize edildi. Ardından toplam hacmi 700 µl olan hücre süspansiyonu, toplama tüpüne yerleşik olan kolonlara aktarıldı ve 8000 g'de 15 sn santrifüj edildi. Santrifüjün ardından toplama tüpünde biriken sıvı döküldü ve her bir kolondan 700 µl RW1 solüsyonu geçirildi. Kolonlar, 8000 g'de 15 sn santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı dökülerek her bir kolondan 500 µl RPE solüsyonu geçirildi. Kolonlar 8000 g'de 15 sn santrifüj edildi ve toplama tüplerindeki sıvı dökülerek 500 µl RPE solüsyonu her bir kolondan tekrar geçirildi. Kolonlar 8000 g'de 2 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpleri ve içerdikleri sıvı atılarak kolonlar temiz toplama tüplerine alındı. Kolondan herhangi bir solüsyon geçirilmeden, 14000 rpm'de 1 dk santrifüj gerçekleştirildi. Daha sonra kolonlar, temiz ependorf tüplerinin üzerine alınarak, kolonlardan 40 µl RNase-free water geçirildi. Yaklaşık 2-3 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 8000g'de 1 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası kolonlar atılarak, RNA'nın içinde bulunduğu ependorf tüpler -20°C'de muhafaza edildi.

Hücrelerden izole edilen RNA'dan cDNA sentezi "QuantiTect Reverse Transcription Kit" ile gerçekleştirildi. Kit protokolü takip edilerek gerçekleştirilen bu işlemlerde kullanılan bileşenler ve miktarları Tablo 4'te belirtilmektedir.

Tablo 4. Genomik DNA Eliminasyon Reaksiyonu Bileşenleri

Bileşen	Hacim/Reaksiyon	Son Konsantrasyon
gDNA Wipeout Buffer, 7X	2 µl	1X
Kalıp RNA	Değişken (1µg'a kadar)	
RNase-free water	*Değişken	
Toplam Hacim	14 µl	–

*gDNA Wipeout Buffer sabit miktarda kullanılırken, RNase-free water miktarı son hacmin 14 µl olması gerektiği göz önüne alınarak kalıp RNA'ya göre belirlendi.

Tabloda belirtilen karışım hazırlanarak 42°C'de 2 dk inkübe edildikten sonra buza alındı.

Reverse Transkriptaz reaksiyonu için gerekli bileşenler Tablo 5'te belirtildiği gibi hazırlandı.

Tablo 5. Reverse Transkriptaz Reaksiyonu Bileşenleri

Bileşen	Hacim/Reaksiyon	Son Konsantrasyon
Reverse Transkriptaz	1 µl	
RT Buffer, 5X	4 µl	1X
RT Primer Mix	1 µl	
*Kalıp RNA	14 µl	
Toplam Hacim	20 µl	–

*Kalıp RNA için, Tablo 4'te belirtildiği şekilde hazırlanan ve 42°C'de 2 dk inkübe edilen örneğin tamamı (14 µl) kullanıldı.

Belirtilen şekilde hazırlanan 20 µl'lik karışım, 42°C'de 15 dk, 95°C'de 3 dk olmak üzere tek bir PCR döngüsü şeklinde gerçekleştirildi. PCR döngüsü tamamlandıktan sonra -20°C'de muhafaza edildi.

5.2.9. Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR)

Real Time PCR, QIAGEN QuantiTect SYBR Green PCR kit protokolüne uygun şekilde Roche Light Cycler 480 II cihazında gerçekleştirildi. Reverse Transkriptaz yöntemi ile elde edilmiş cDNA örnekleri, survivin ve normalizasyonda kullanılan

housekeeping gen β -Actin için temin edilmiş primerler ve kit içeriğindeki malzemelerin kullanıldığı reaksiyon dizaynı Tablo 6’da belirtilmiştir.

Tablo 6. SYBR Green Reaksiyon Kurulumu

Bileşen	Hacim/Reaksiyon
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	10 μ l
Primer 1	0.5 μ l
Primer 2	0.5 μ l
RNase-free water	6 μ l
Kalıp cDNA	3 μ l

Tablo 6’da belirtilen reaksiyon kurulduktan sonra 96 kuyucuklu pleyte dublikeytler halinde dağıtıldı ve Roche Light Cycler 480 II cihazına uygun olarak Tablo 7’de belirtilen döngü uygulandı.

Tablo 7. Döngü Koşulları

Adım	Zaman	Sıcaklık
İlk denatürasyon	15 dk	95°C
Denatürasyon	15 sn	94°C
Bağlanma	30 sn	60°C
Uzatma	30 sn	72°C
Döngü Sayısı	40	

5.2.10. Western Blot Yöntemi

5.2.10.1.Hücrelerden Protein İzolasyonu

6 kuyucuklu pleytlere ekilen muameleli ve muamelesiz hücreler, 72 saatlik inkübasyonun ardından buza alınarak +4°C’de soğutulmuş PBS ile yıkandı. Yıkamanın ardından hücrelerin üzerine, proteaz ve fosfataz inhibitörlerinin eklendiği, %1 Triton X-100 içeren 250 μ l RIPA patlatma tamponu eklenerek 30 dk buz üzerinde orbital çalkalayıcıda sallandı. Hücre lizatları, hücre kazıyıcı kullanılarak pleytlerden alındı ve ependorf tüplere aktararak +4°C’de 13.000 g’de 15 dk santrifüj edildi. Süpernatant temiz bir ependorf tüpe aktarıldı ve analiz edilmek üzere -20°C’de muhafaza edildi.

5.2.10.2. SDS-PAGE Jellerinin Hazırlanması

SDS-PAGE Jel Elektroforez Camlarının Hazırlanması

Camlar distile su ile yıkandıktan sonra %70'lik etil alkol ile temizlendi. Temizlenen camlar jel standına yerleştirildi.

Ayrırma Jelinin Hazırlanması

Survivin 16 kDa ve p53 53 kDa moleküler ağırlığında oldukları için, her iki proteinin de aynı jelde görüntülenebilmesi açısından ayırma jeli %12.5 olarak belirlendi. Uzun ve kısa camlar birleştirilerek jel hazırlama standına yerleştirildi. SDS-PAGE jeli için kullanılması gereken ajanlar Tablo 8'de belirtildiği şekilde hazırlandı. Ayırma jeli hazırlanarak, yükleme jeline de yer ayırmak için, kısa camın yaklaşık 1 cm altına kadar döküldü. Ayırma jeli döküldükten sonra, ayırma jelinin hava ile temasının engellenmesi için jelin üst kısmına izopropanol ilave edildi.

Tablo 8. Ayırma Jeli İçeriği

Malzemeler	%12.5
ddH ₂ O	2.17 ml
Acrylamid (%40 acrylamid mix)	1.25 ml
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	1.25 ml
% 10 SDS	0.05 ml
% 10 APS	0.05 ml
TEMED	5 µl
Toplam	4.775 ml

Yükleme Jelinin Hazırlanması

Ayrırma jeli polimerleştikten sonra, jelin üzerindeki izopropanol dikkatlice uzaklaştırıldı. Tablo 9'da belirtildiği gibi hazırlanan yükleme jeli, camlar arasında kalan 1 cm'lik boşluğa aktarıldı ve 10 kuyucuklu tarak camlar arasına yerleştirildi. Polimerizasyon için 45-60 dakika beklendi.

Tablo 9. Yükleme jeli içeriği

Malzemeler	%4
ddH ₂ O	3.14 ml
Acrylamid (%40 acrylamid mix)	0.5 ml
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	1.25 ml
%10 SDS	0.05 ml
%10 APS	0.05 ml
TEMED	3 µl
Toplam	4.993 ml

5.2.10.3. SDS-PAGE Jellerinin Elektrofrezisi

Örneklerin Yüklenmesi ve Yürütülmesi

Örneklerin üzerine yükleme tamponu (5x), son konsantrasyonu 1x olacak şekilde eklendi ve 95°C’de 7 dakika kaynatıldı. Kuyucuklara protein marköründe 5 µl olmak üzere örneklerden 20-30 µl yüklendi. Jel ilk önce 75 Volt’da 15 dakika sonra 105 Volt’da yaklaşık 90-105 dakika yürütüldü.

5.2.10.4. Islak Blotlama

Örneklerin yüklenerek yürütülmüş olduğu SDS PAGE jelinin membrana transfer edilmesi için öncelikle camlar spatula yardımı ile birbirinden dikkatlice ayrıldı ve blotlama öncesinde dengelenmesi için transfer tamponuna alındı. Bu sırada, jelle aynı büyüklükte kesilen nitroselüloz membran, transfer tamponuna alınarak dengelendi. Blotlama kasetinin siyah (anot) yüzüne önceden transfer tamponunda ıslatılmış bir adet sünger yatak ve iki adet ince 3 MM Whatman kağıdı yerleştirildi. Kağıdın üstüne önceden dengelenmiş jel hava kabarcığı kalmayacak şekilde yerleştirildi. Jelin üstüne dengelenmiş membran dikkatlice yerleştirildi. Membranın üstüne iki adet ince 3MM Whatman kağıdı ve ıslatılmış sünger yerleştirilerek sandviç oluşturuldu. Blotlama kaseti transfer tamponu içeren tanka, anot siyah tarafta ve katot kırmızı tarafta olacak şekilde yerleştirildi. Transfer +4 °C’de 100 Voltta bir saat yapıldı. Transfer esnasında tank magnetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Transfer sonrasında membran kasetten çıkarılarak PBS ile yıkandıktan sonra blotlama tamponu eklenerek bir saat oda sıcaklığında veya gece boyu +4°C’de orbital karıştırıcıda inkübasyona bırakıldı.

Bloklama solüsyon tipleri, primer antikor dilüsyonları ve inkübasyon süresi, antikorun ürün kataloğunda yer alan öneriler doğrultusunda hazırlandı. Survivin antikoru 1/2500 olacak şekilde %2.5 BSA ve %2.5 yağsız süt tozu içeren, p53 phospho S15 antikoru 1/250 olacak şekilde %5 lik BSA içeren ve p53 phospho S46 antikoru 1/1000 olacak şekilde %2.5 BSA ve %2.5 yağsız süt tozu içeren bloklama solüsyonunda seyreltildi. Birincil antikor inkübasyonundan sonra membran üç kez, yaklaşık beş dakika boyunca, %0.5 lik Tween 20 içeren TBST ile (TBST) ile çalkalanarak yıkandı. Daha sonra membran bloklama solüsyonu içerisinde, Anti-Survivin ve Anti-p53 primer antikorları için 1/7500 oranında seyreltilmiş HRP konjuge anti tavşan ikincil antikor solüsyonu ile orbital karıştırıcıda yavaş hızda çalkalanarak bir saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu inkübasyonun ardından membran tekrar üç kez yaklaşık beş dakika orta hızda TBST içerisinde yıkandı. Yıkamaların ardından membran pens ile kenarından tutularak temiz bir kaba aktarıldı. Işımayı saptamak için 0.5 ml ECL solüsyonu (BioRad ECL bileşenleri 1:1 oranında karıştırıldı) ile yaklaşık bir dakika muamele edildi. BioRad Chemidoc Görüntüleme Cihazı yardımı ile membran görüntülenerek analiz edildi.

5.2.11. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler, GraphPad Prism programı kullanılarak, aynı hücre gruplarının kendi içinde farklı konsantrasyonlardaki CAPE ile muamele edilmesiyle elde edilen verilerin karşılaştırmaları için *One Way ANOVA* testi; aynı konsantrasyonlardaki CAPE ile muamele edilen farklı hücre gruplarının karşılaştırılması için *Student's t Test* kullanıldı. *p* değeri 0.05'ten küçük olan istatistikler anlamlı; 0.05'ten büyük olanlar ise anlamsız olarak değerlendirildi.

6. BULGULAR

Bu çalışmada, kolorektal kanser hücre hatlarının hem CAPE ile hem de CAPE'in tedavide sıklıkla kullanılan bir kemoterapötik ajan olan 5-FU ile birlikte muamelesiyle (CAPE/5-FU), CAPE'in survivin ekspresyonu üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlandı. CAPE'in survivin ekspresyonu üzerindeki etkisinin incelendiği bu çalışmada, aynı zamanda farklı kolorektal kanser hücre hatlarında pro-apoptotik bir protein olan p53'ün ekspresyonundaki değişim de incelendi. Kullanılan hücreler kontrol grubu ve muameleli grup şeklinde ayrılarak, muamele edilen ajanların etkin doz değerleri 72 saatlik süre dahilinde WST-1 canlılık testiyle belirlendi. Belirlenen dozdaki CAPE'in hücreler üzerindeki apoptotik etkisi Annexin V/7AAD testi ile incelendi, apoptotik yolda etkili olan kaspaz-3 aktivitesi üzerinde gerçekleşen etkisi ise Aktif Kaspaz-3 testi ile tespit edildi. Hücreler üzerindeki apoptotik etkinin morfolojik olarak incelenmesi, Akridin Oranj/Etidyum Bromür boyaması ile mikroskopik olarak gerçekleştirildi. CAPE'in, survivin ekspresyonu üzerindeki etkisini mRNA düzeyinde incelemek için Real-Time PCR ve protein düzeyinde incelemek için Western Blot yöntemleri kullanıldı.

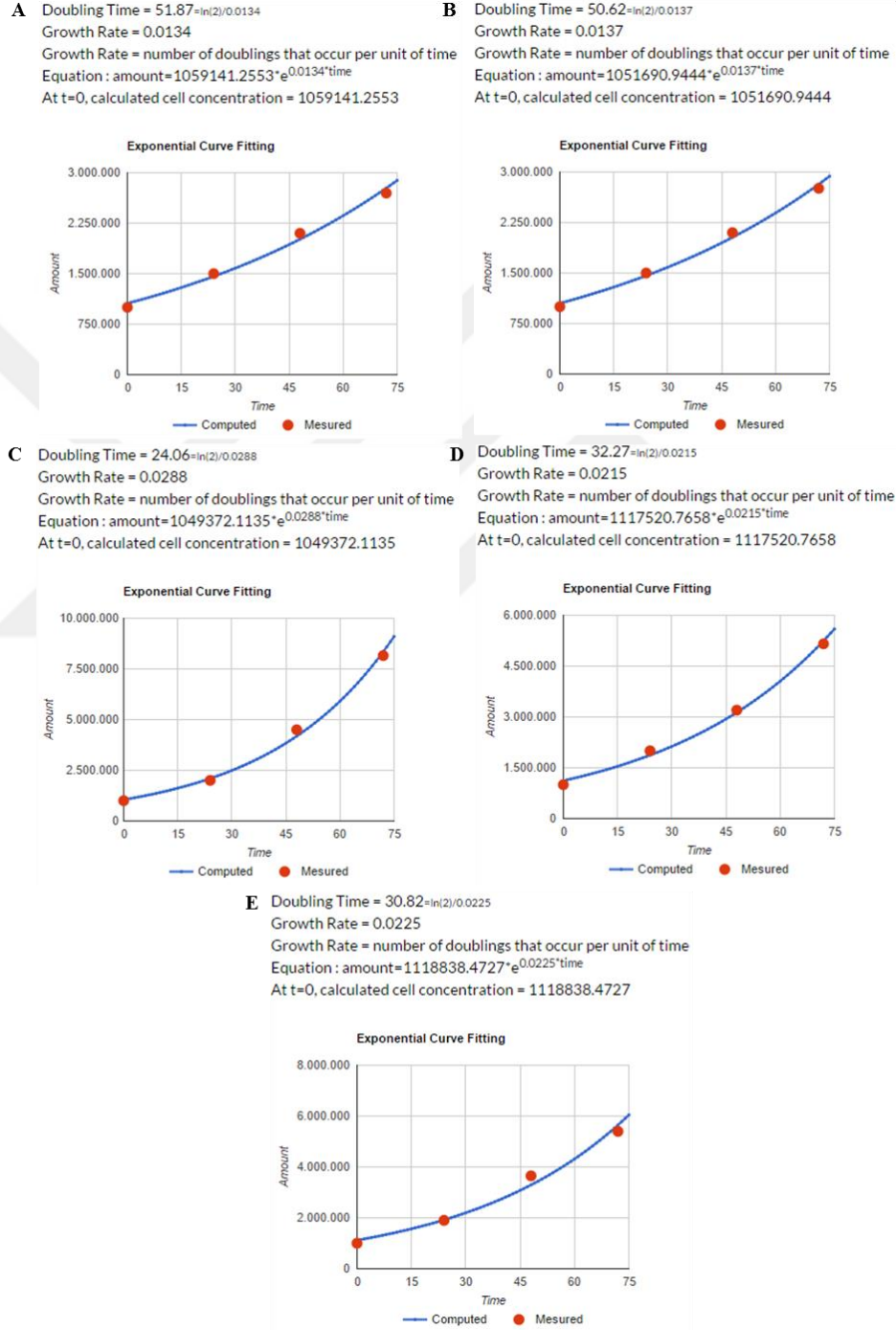
6.1. Hücrelerin Morfolojik ve Fenotipik Özellikleri

Çalışmada; kolorektal kanser özelliği taşıyan WiDR, DLD-1, HCT-116, RKO hücre hatları ile kontrol olarak kullanılan normal kolorektal hücre hattı CCD 841-CoN olmak üzere 5 farklı hücre hattı kullanıldı. Ticari sağlayıcısı tarafından verilen bilgilere göre hücrelerin tamamı epitel kökenlidir ve flask yüzeyine tutunan tiptedir. HCT-116 ve RKO hücre hatlarının p53 yabancıl tip olduğu belirtilmektedir. WiDR hücre hattının; p53'ün 273. kodonunu etkileyen arg>his dönüşümü taşıdığı ve DLD-1 hücre hattının; p53'ün 241. kodonunu etkileyen ser>phe dönüşümü taşıdığı üretici firma tarafından onaylanmıştır. Bahsedilen bu değişimlerin patolojik olduğu bilinmektedir (85, 86).

6.2. Hücre Kültürü

Çalışmada kullanılan ve kolorektal kanser özelliği taşıyan WiDR, DLD-1, HCT-116, RKO hücre hatları ile kontrol olarak kullanılan normal kolorektal hücre hattı CCD 841-CoN, T75 flasklarda ATCC tarafından önerilen besiyerleri ile kültüre edildi. Hücrelerin durumu her gün mikroskopik olarak kontrol edildi. Flask yüzeyinde yoğunlaşmanın yaklaşık %70 düzeyine ulaştığı durumlarda hücreler yıkanıp tripsinize

edilerek flasklardan alındı ve yeni flasklara ekilerek pasaj işlemleri gerçekleştirildi. Çalışmaya, hücrelerin büyüme karakteristiklerini belirlemek için sayılarını ikiye çıkardıkları zamanın tespiti ile başlandı. Hücrelerin ikilenme zamanını hesaplanması için 72 saat içinde 4 kez hücre sayımı yapılarak büyüme eğrileri çizildi (Şekil 4).



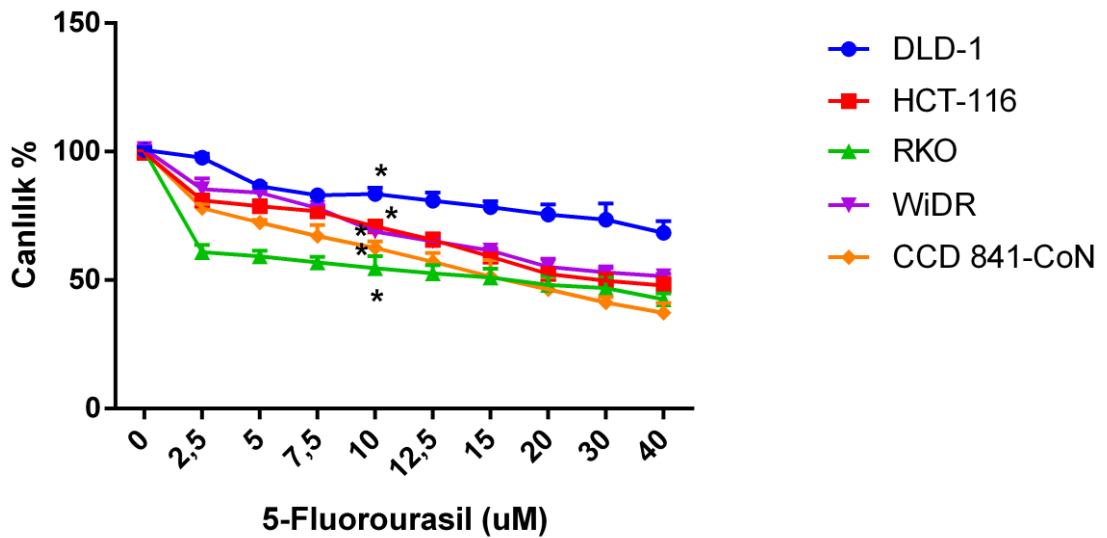
Şekil 4. Çalışmada kullanılmış olan hücre hatlarının büyüme eğrileri A) CCD 841-CoN, B) WiDR, C) DLD-1, D) HCT-116, E) RKO

6.3. Canlılık Analizleri

6.3.1. 5-FU'nun Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi

DLD-1, HCT-116, RKO, WiDR ve CCD 841-CoN hücre hatları hücrelerine 2,5 μ M ve 40 μ M arasında değişen dozlarda 5-FU muamelesi yapılarak, muamelenin 72. saatinde WST-1 testi gerçekleştirildi. WST-1 testinin sonuçlarına göre, 5-FU muamelesinin doza bağlı olarak canlılığı düşürdüğü gözlemlendi (Şekil 5).

Çalışmada kullanılan en düşük doz olan 2,5 μ M 5-FU dozunda DLD-1, HCT-116, RKO, WiDR ve CCD 841-CoN hücrelerinin gösterdiği canlılık değerleri sırasıyla %97, %81, %60, %85 ve %78 olarak belirlendi. Çalışmada kullanılan en yüksek doz olan 40 μ M dozunda ise, 5-FU'ya dirençli olduğu bilinen DLD-1 hücrelerinde tespit edilen canlılık değeri %70 iken; HCT-116, RKO, WiDR ve CCD 841-CoN hücrelerinde bu değerler sırasıyla %47, %42, %51 ve %37 olarak tespit edildi. 5-FU'nun tüm hücre hatlarında eşit olarak kullanılacak dozu belirlenirken, çalışmanın devamında CAPE ile birlikte muamelesi gerçekleştirilerek yapılacak deneyler göz önünde bulunduruldu. Kullanılan hücrelerin, 5-FU'ya gösterdiği hassasiyet farkı da dikkate alınarak 10 μ M dozu seçildi. DLD-1, HCT-116, RKO, WiDR ve CCD 841-CoN hücrelerinin 10 μ M dozunda tespit edilen canlılık değerleri %83, %70, %54, %68 ve %62 şeklinde gözlemlendi.

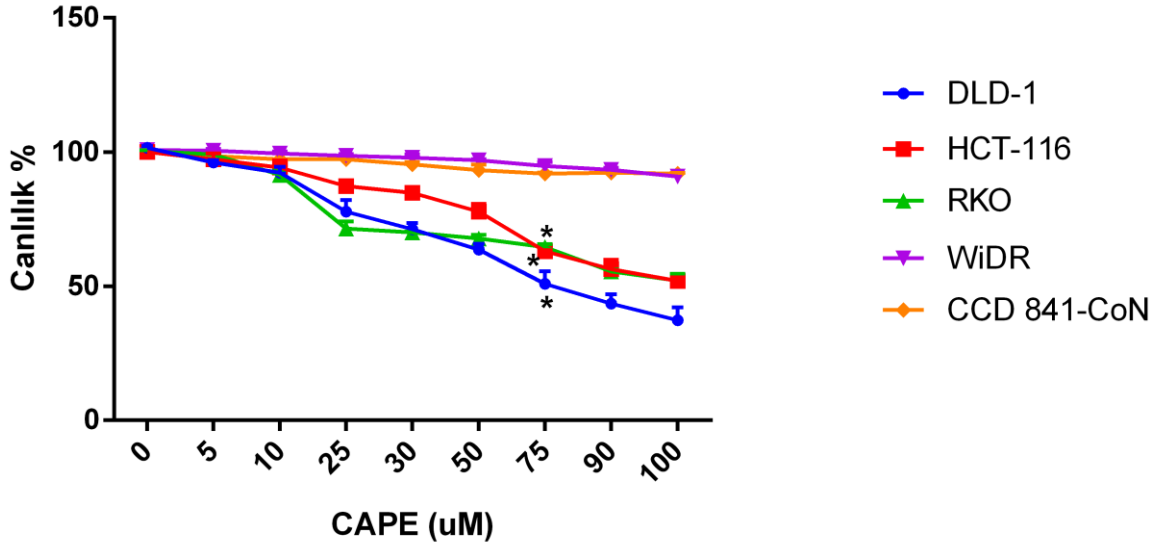


Şekil 5. Hücre hatlarında 5-FU muamelesinin doza bağlı değişimi, * p<0.05

6.3.2. CAPE'in Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi

DLD-1, HCT-116, RKO, WiDR ve CCD 841-CoN hücre hatları hücrelerine 5 µM ve 100 µM arasında değişen dozlarda CAPE muamelesi yapılarak, muamelenin 72. saatinde WST-1 testi gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlara göre, CAPE muamelesinin doza bağlı olarak canlılığı düşürdüğü gözlemlendi (Şekil 6).

Çalışmada kullanılan en düşük doz olan 5 µM dozunda DLD-1, HCT-116, RKO, WiDR ve CCD 841-CoN hücrelerinde tespit edilen canlılık değerleri sırasıyla, %96, %97, %99, %100 ve %98 olarak gözlemlendi. Çalışmada kullanılan en yüksek doz olan 100 µM dozunda ise bu değerler sırasıyla %37, %51, %52, %90 ve %92 şeklinde tespit edildi. Elde edilen bu sonuçlara göre CAPE'in tüm hücre hatlarında eşit olarak kullanılacak dozu belirlenirken, çalışmanın devamında 5-FU ile birlikte muamelesi gerçekleştirilerek yapılacak deneyler göz önünde bulunduruldu. Kullanılan hücrelerin CAPE muamelesine gösterdiği hassasiyet farkı da dikkate alınarak 75 µM dozu seçildi. Çalışmada kullanılan DLD-1, HCT-116, RKO, WiDR ve CCD 841-CoN hücrelerinin 75 µM dozunda tespit edilen canlılık değerleri %50, %63, %64, %94 ve %92 şeklinde sıralandı.

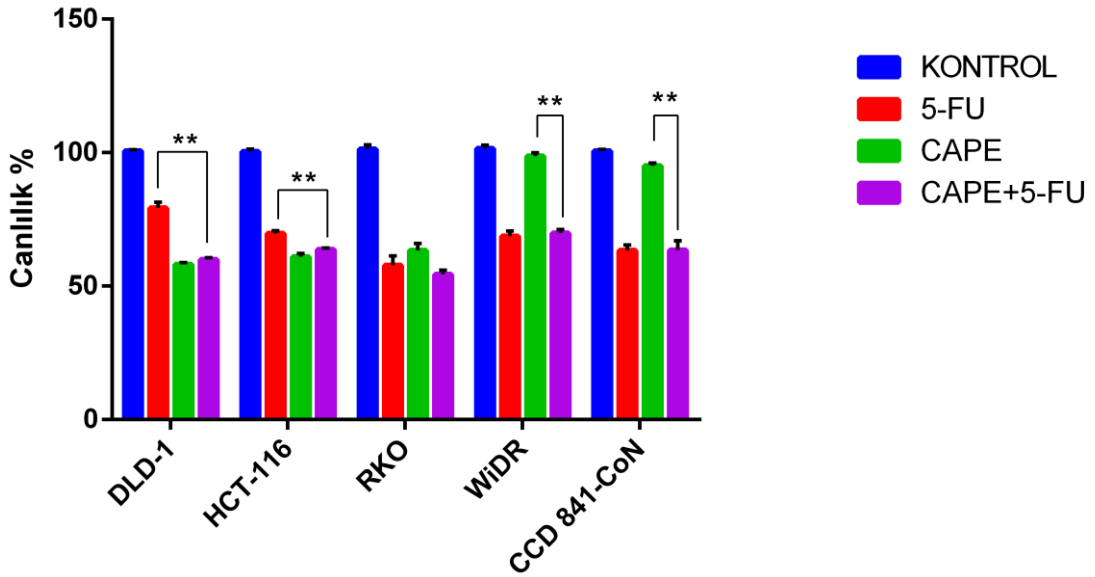


Şekil 6. Hücre hatlarında CAPE muamelesinin doza bağlı değişimi, *p<0.05

6.3.3. 5-FU ve CAPE Birlikteliğinin Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi

Farklı 5-FU ve CAPE dozları kullanılarak yapılan canlılık analizlerinin ardından DLD-1, HCT-116, RKO, WiDR ve CCD 841-CoN hücrelerine daha önce belirlenen 10 µM 5-FU ve 75 µM CAPE dozlarının birlikte muamelesi gerçekleştirildi ve muamelenin 72. saatinde WST-1 testi uygulandı.

Elde edilen sonuçlara göre DLD-1, HCT-116, RKO, WiDR ve CCD 841-CoN hücrelerinde tespit edilen canlılık değerleri sırasıyla, %59, %63, %54, %69, %63 olarak belirlendi (Şekil 7).



Şekil 7. Hücre hatlarında 5-FU, CAPE, CAPE/5-FU muamelesinin hücre canlılığı üzerine etkisi, **p<0.01

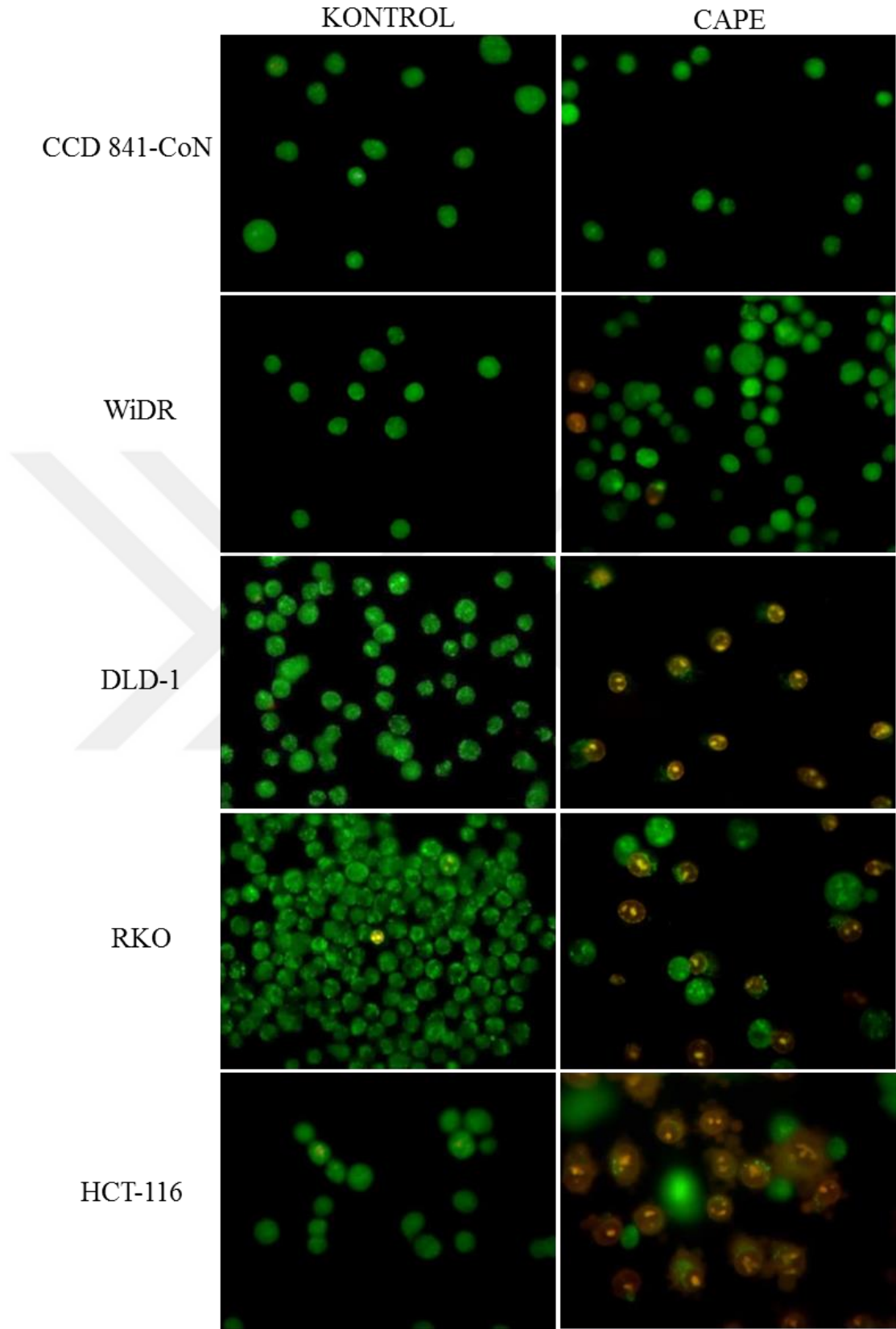
CAPE ve 5-FU'nun birlikte kullanılarak gerçekleştirildiği çalışmalarda, DLD-1 ve HCT-116 hücrelerinden elde edilen sonuçlar 5-FU muamelesine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı sonuç verirken, RKO hücrelerinde 5-FU ya da CAPE muamelesine göre istatistiksel olarak anlamlı herhangi değişiklik saptanmadı. WiDR ve CCD 841-CoN hücrelerinde ise CAPE muamelesi sonuçlarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edildi. Buna rağmen, WiDR ve CCD 841-CoN hücrelerinin yalnızca CAPE'in muamele edilmesi ile elde edilen sonuçlarının istatistiksel olarak anlamlı olmaması ve CAPE/5-FU kombinasyonunun bu hücrelerde neredeyse 5-FU'nun tekil

etkisi kadar etki göstermiş olması; DLD-1, HCT-116 ve RKO hücrelerinin ise CAPE/5-FU kullanıldığında, yalnızca CAPE'in muamele edildiği duruma kıyasla anlamlı değişiklikler göstermemiş olması neticesinde, çalışmanın ilerleyen kısımlarında 5-FU'nun deneylere dahil edilmemesine karar verildi.

6.4. Apoptotik Analizler

6.4.1. CAPE Aracılı Apoptoza Bağlı Hücre Morfolojisindeki Değişimlerin Akridin Oranj/Etidyum Bromür Boyama Tekniği ile Gösterilmesi

Çalışmada kullanılan DLD-1, HCT-116, RKO, WiDR ve CCD 841-CoN hücreleri, belirlenmiş olan CAPE dozu ile 72 saat muamele edilerek floresan mikroskopta morfolojik olarak analiz edildi. Kontrol grubu olarak, muameleli hücrelerin yanı sıra muamelesiz hücreler de çalışmaya dahil edildi. Mikroskopik analizlerde; yeşil renkte görülen hücreler sağlıklı, turuncu renkte görülen hücreler ise apoptotik olarak değerlendirildi. Analiz sonuçlarına göre DLD-1, HCT-116 ve RKO hücreleri CAPE muamelesinin ardından apoptotik hücre morfolojisi gösterirken, WiDR ve CCD 841-CoN hücrelerinde bu değişim gözlenmedi (Şekil 8).



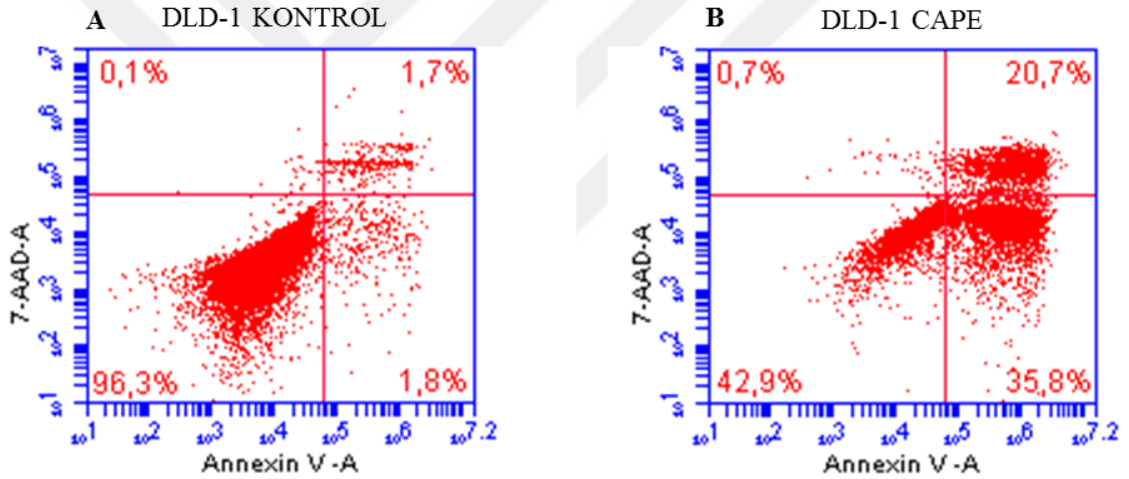
Şekil 8. Kullanılan hücre hatlarında CAPE muamelesinin 72. saatinde Akridin Oranj/Etidyum Bromür boyaması ile elde edilen floresan mikroskobu görüntüleri

6.4.2. CAPE Aracılı Apoptozun Flow Sitometri Yöntemi ile Gösterilmesi

6.4.2.1. Annexin V / 7- AAD Testi ile Sağlıklı ve Apoptotik Hücre Popülasyonunun Belirlenmesi

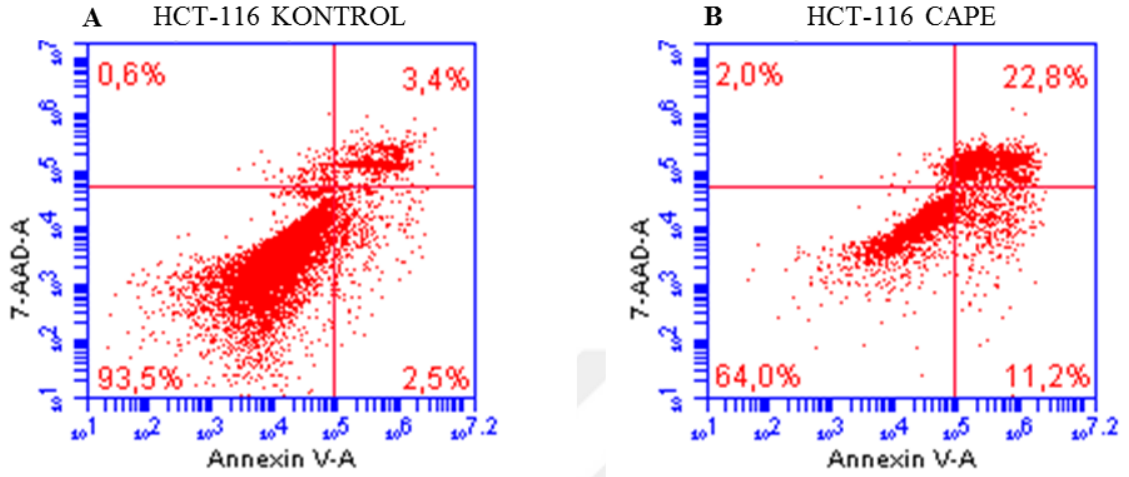
Annexin V-PI testi ile ilk olarak DLD-1, HCT-116, RKO, WiDR ve CCD 841-CoN hücrelerinin 72 saatlik kültürü sonucundaki bazal apoptotik hücre oranı belirlendi. CAPE muamelesi ile apoptotik ve ölü hücre oranının doza bağlı olarak arttığı tespit edildi.

DLD-1 hücrelerinde 72. saatte yapılan ölçümlere göre muamelesiz kontrol grubunda %3.6 olan apoptotik ve ölü hücre oranı, CAPE muamelesi gerçekleştirilmiş hücrelerde %57.2 olarak belirlendi (Şekil 9).



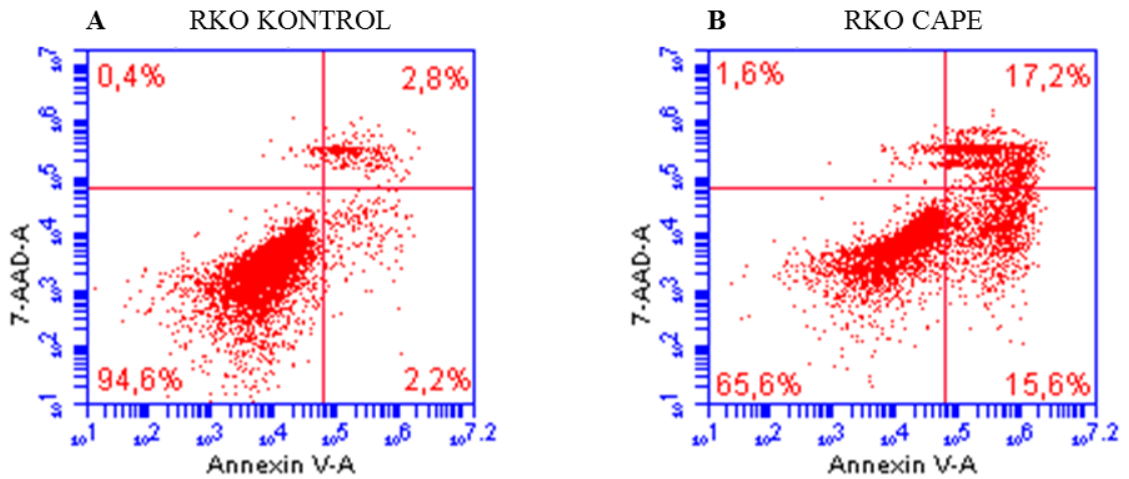
Şekil 9. DLD-1 hücrelerinde 72 saatte gerçekleşen CAPE aracılı hücresel apoptoz oranlarının belirlenmesi, A) Kontrol, B) CAPE

HCT-116 hücrelerinde 72. saatte yapılan ölçümlere göre muamelesiz kontrol grubunda %6.5 olan apoptotik ve ölü hücre oranı, CAPE muamelesi gerçekleştirilmiş hücrelerde %36 olarak belirlendi (Şekil 10).



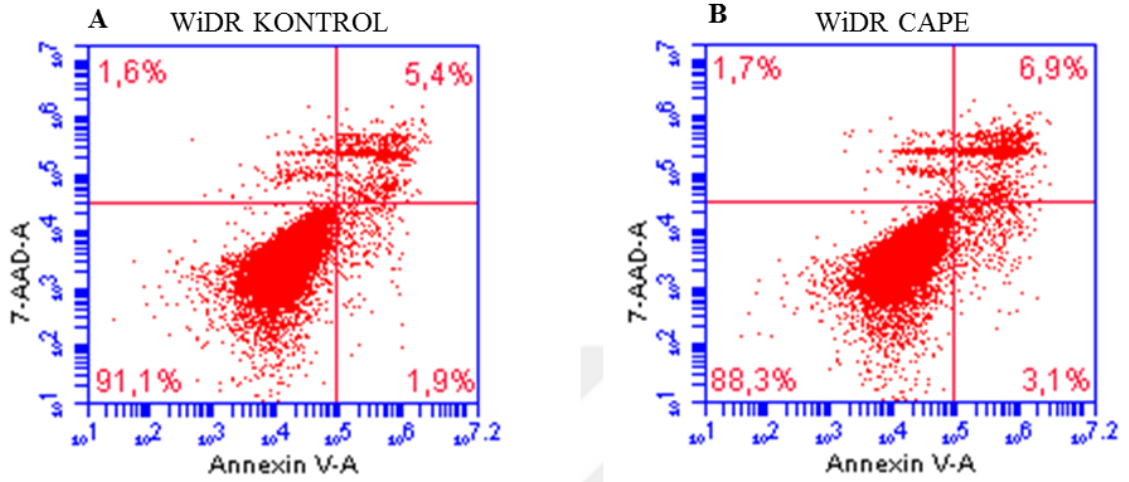
Şekil 10. HCT-116 hücrelerinde 72 saatte gerçekleşen CAPE aracılı hüresel apoptoz oranlarının belirlenmesi, A) Kontrol, B) CAPE

RKO hücrelerinde 72. saatte yapılan ölçümlere göre muamelesiz kontrol grubunda %5.4 olan apoptotik ve ölü hücre oranı, CAPE muamelesi gerçekleştirilmiş hücrelerde %34.4 olarak belirlendi (Şekil 11).



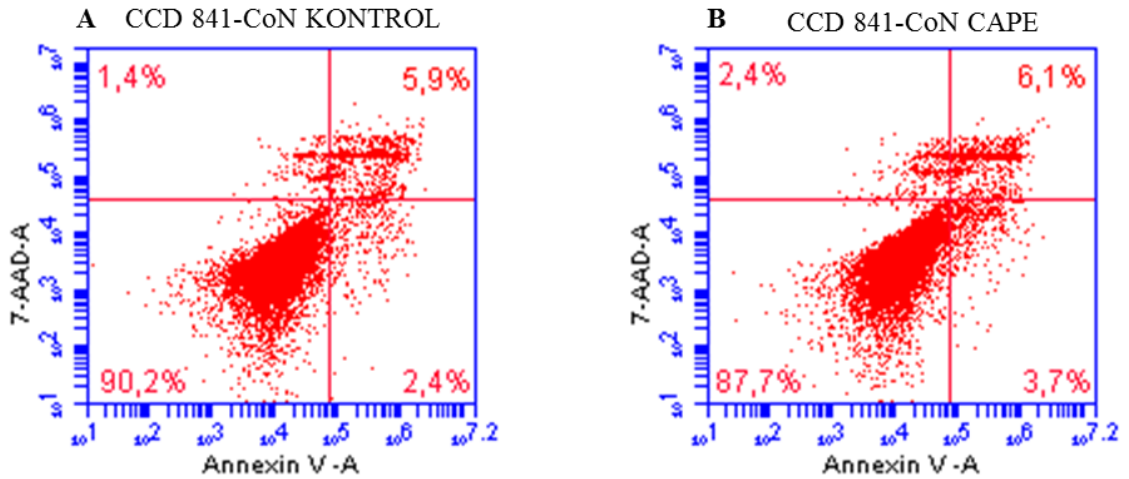
Şekil 11. RKO hücrelerinde 72 saatte gerçekleşen CAPE aracılı hüresel apoptoz oranlarının belirlenmesi, A) Kontrol, B) CAPE

WiDR hücrelerinde 72. saatte yapılan ölçümlere göre muamelesiz kontrol grubunda %8.9 olan apoptotik ve ölü hücre oranı, CAPE muamelesi gerçekleştirilmiş hücrelerde %11.7 olarak belirlendi (Şekil 12).



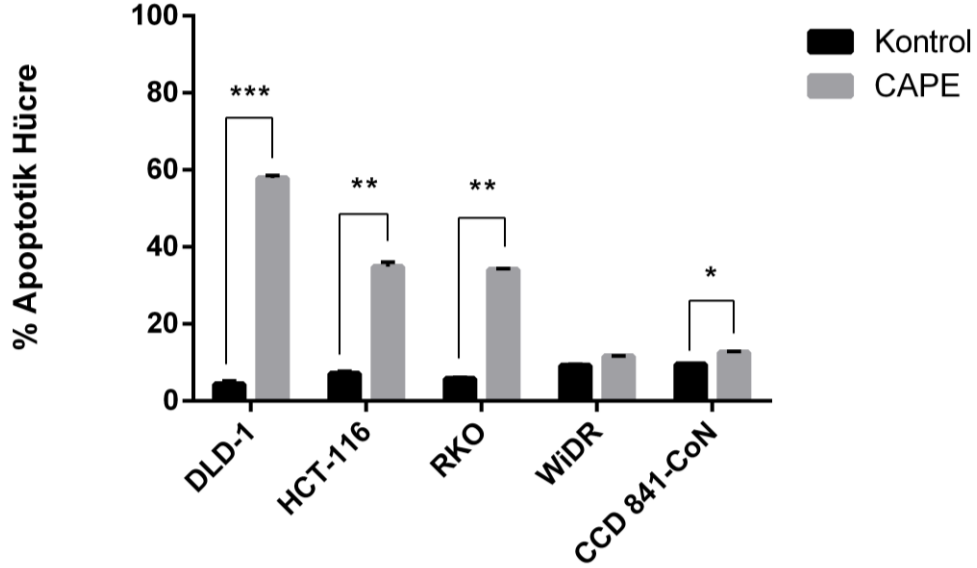
Şekil 12. WiDR hücrelerinde 72 saatte gerçekleşen CAPE aracılı hücresel apoptoz oranlarının belirlenmesi, A) Kontrol, B) CAPE

CCD 841-CoN hücrelerinde 72. saatte yapılan ölçümlere göre muamelesiz kontrol grubunda %9.7 olan apoptotik ve ölü hücre oranı, CAPE muamelesi gerçekleştirilmiş hücrelerde %12.2 olarak belirlendi (Şekil 13).



Şekil 13. CCD 841-CoN hücrelerinde 72 saatte gerçekleşen CAPE aracılı hücresel apoptoz oranlarının belirlenmesi, A) Kontrol, B) CAPE

Tüm hücre hatlarının CAPE muamelesi sonrası gösterdikleri sağlıklı ve apoptotik hücre oranlarındaki değişimler incelendi. DLD-1, HCT-116, RKO ve CCD 841-CoN hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edildi (Şekil 14).

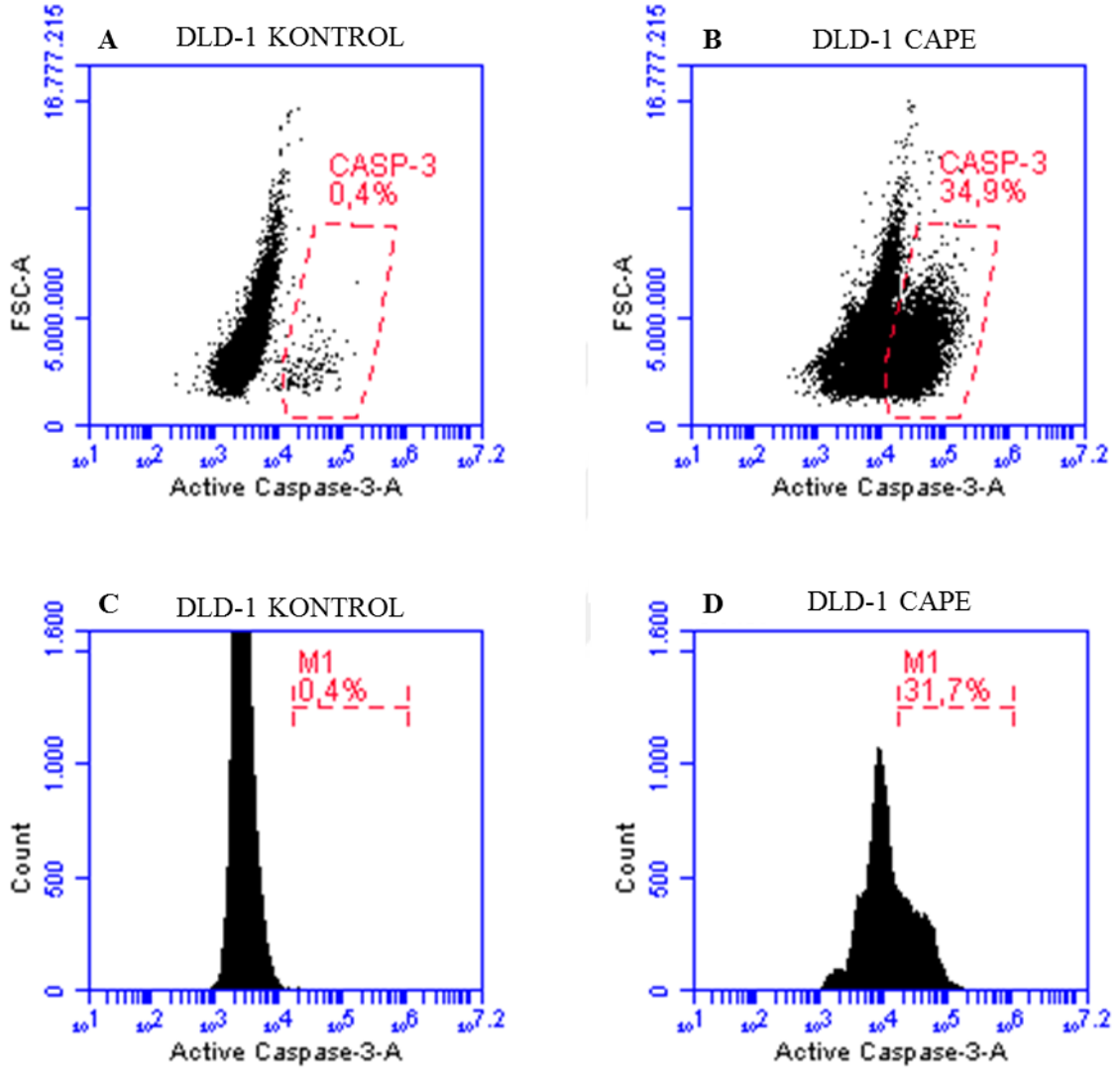


Şekil 14. Kullanılan hücre hatlarında CAPE muamelesi ile gerçekleşen apoptotik hücre yüzdelerinde gerçekleşen değişimler, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

6.4.2.2. Aktif Kaspaz-3 Testi ile Kaspaz-3 Aktivasyonundaki Değişimlerin Belirlenmesi

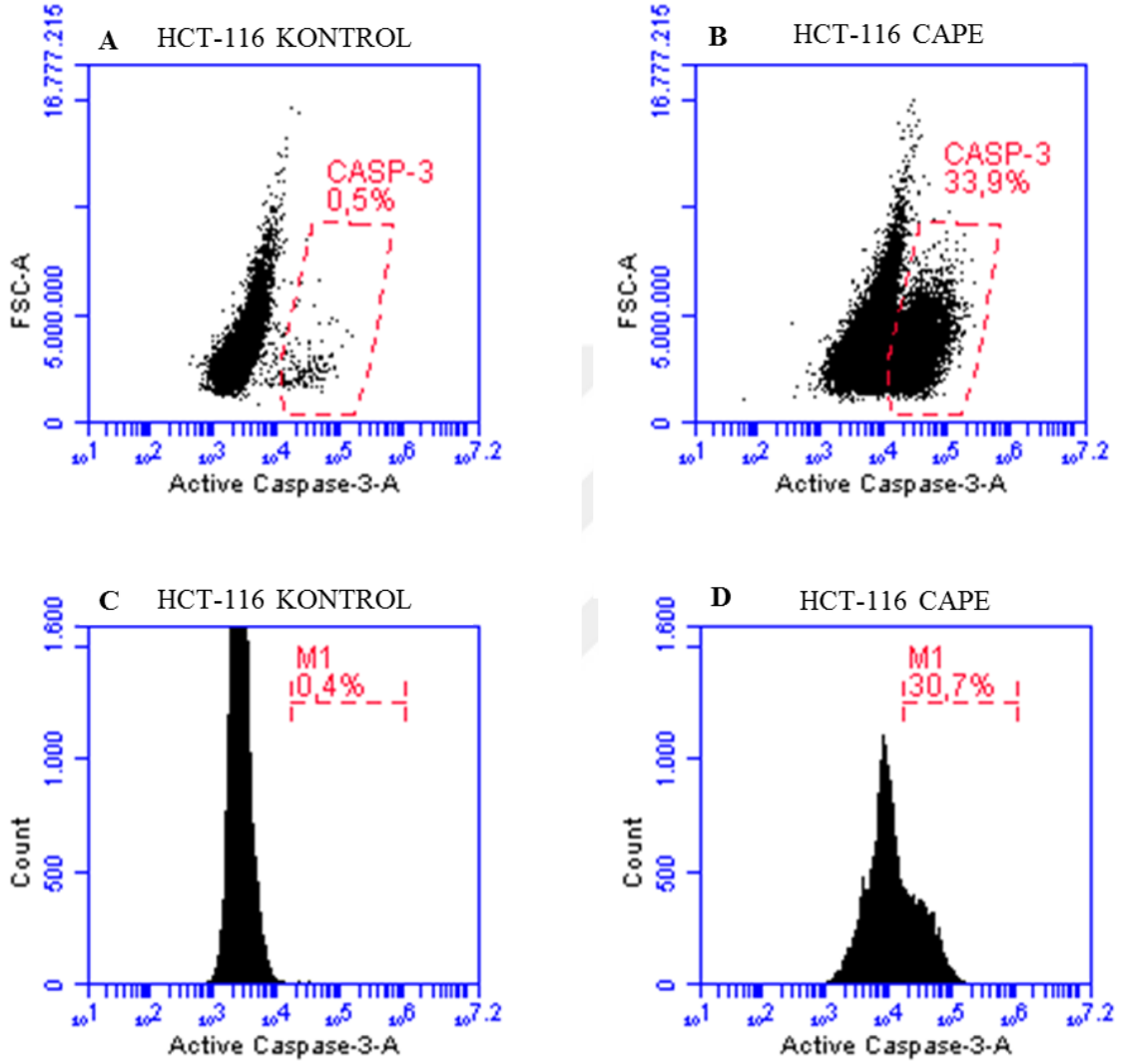
DLD-1, HCT-116, RKO, WiDR ve CCD 841-CoN hücreleri muamelesiz ve CAPE muamelesi gerçekleştirilmiş şekilde gruplandırıldı ve 72 saat boyunca kültüre edildi. 72 saat sonunda uygulanan Aktif Kaspaz-3 testi ile hücre gruplarındaki kaspaz-3 aktivitesi ölçüldü. Muamelesiz hücrelerden elde edilen veriler, bazal kaspaz aktivitesi olarak kabul edildi. CAPE muamelesi içeren hücre gruplarında, kaspaz-3 aktivitesinde artış gözlemlendi. Kaspaz-3 aktivitesinde gözlenen bu artış, hücre hatları arasında farklılık gösterdi.

DLD-1 hücrelerinde 72. saatte yapılan ölçümlere göre muamelesiz kontrol grubu hücrelerinin kaspaz-3 aktivitesi %0.4 olarak ölçülürken, CAPE muamelesi gerçekleştirilen hücrelerde bu oran %31.7 olarak belirlendi (Şekil 15).



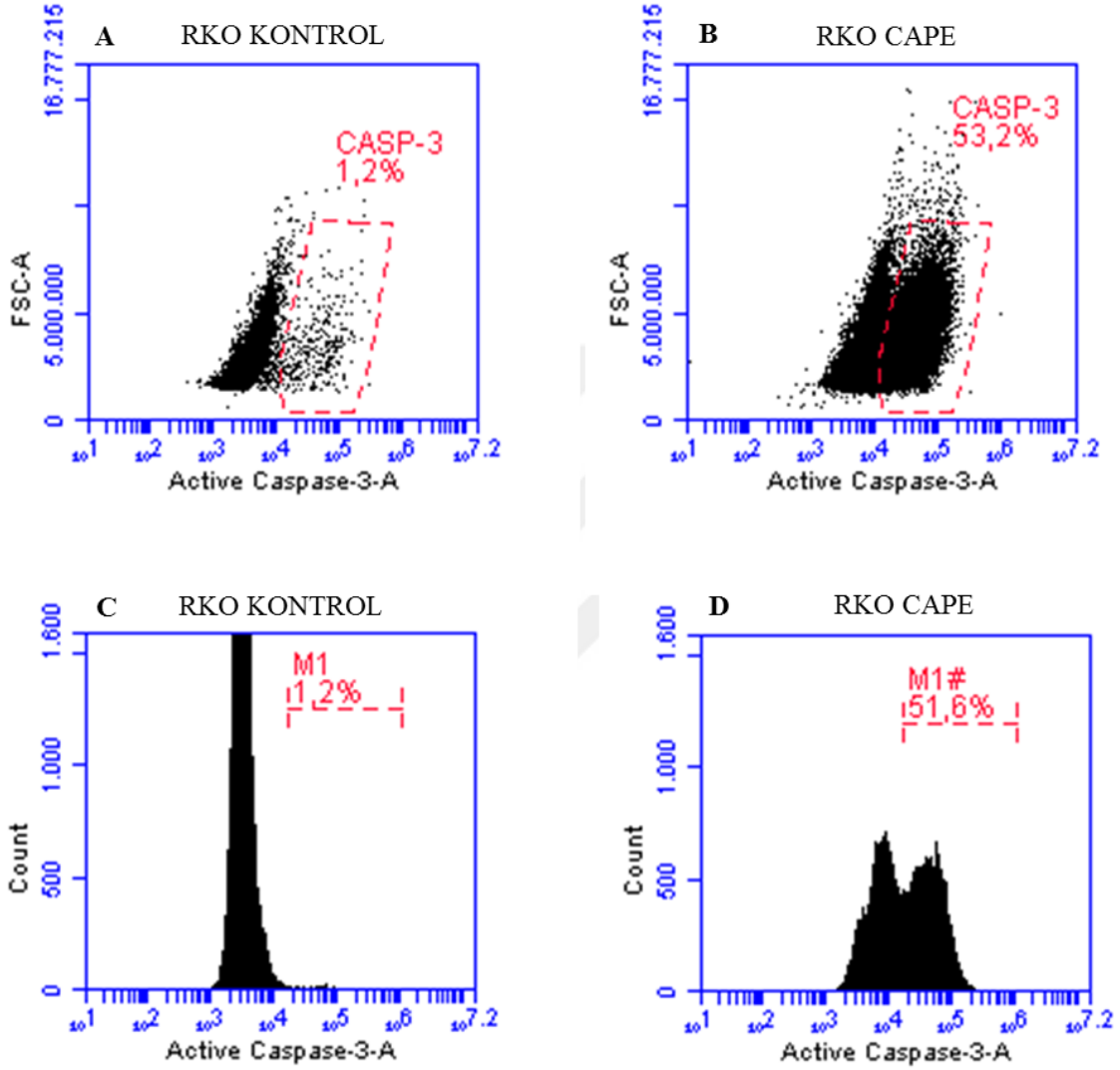
Şekil 15. DLD-1 hücrelerinde 72 saatte gerçekleşen CAPE aracılı kaspaz-3 aktivitesinin belirlenmesi, A) Kontrol grubu hücrelerinde popülasyon dağılımı, B) CAPE içeren hücre grubunda popülasyon dağılımı, C) Kontrol grubu hücrelerinde kaspaz-3 aktivitesi, D) CAPE içeren hücre grubunda kaspaz-3 aktivitesi

HCT-116 hücrelerinde 72. saatte yapılan ölçümlere göre muamelesiz kontrol grubu hücrelerinin kaspaz-3 aktivitesi %0.4 olarak ölçülürken, CAPE muamelesi gerçekleştirilen hücrelerde bu oran %30.7 olarak belirlendi (Şekil 16).



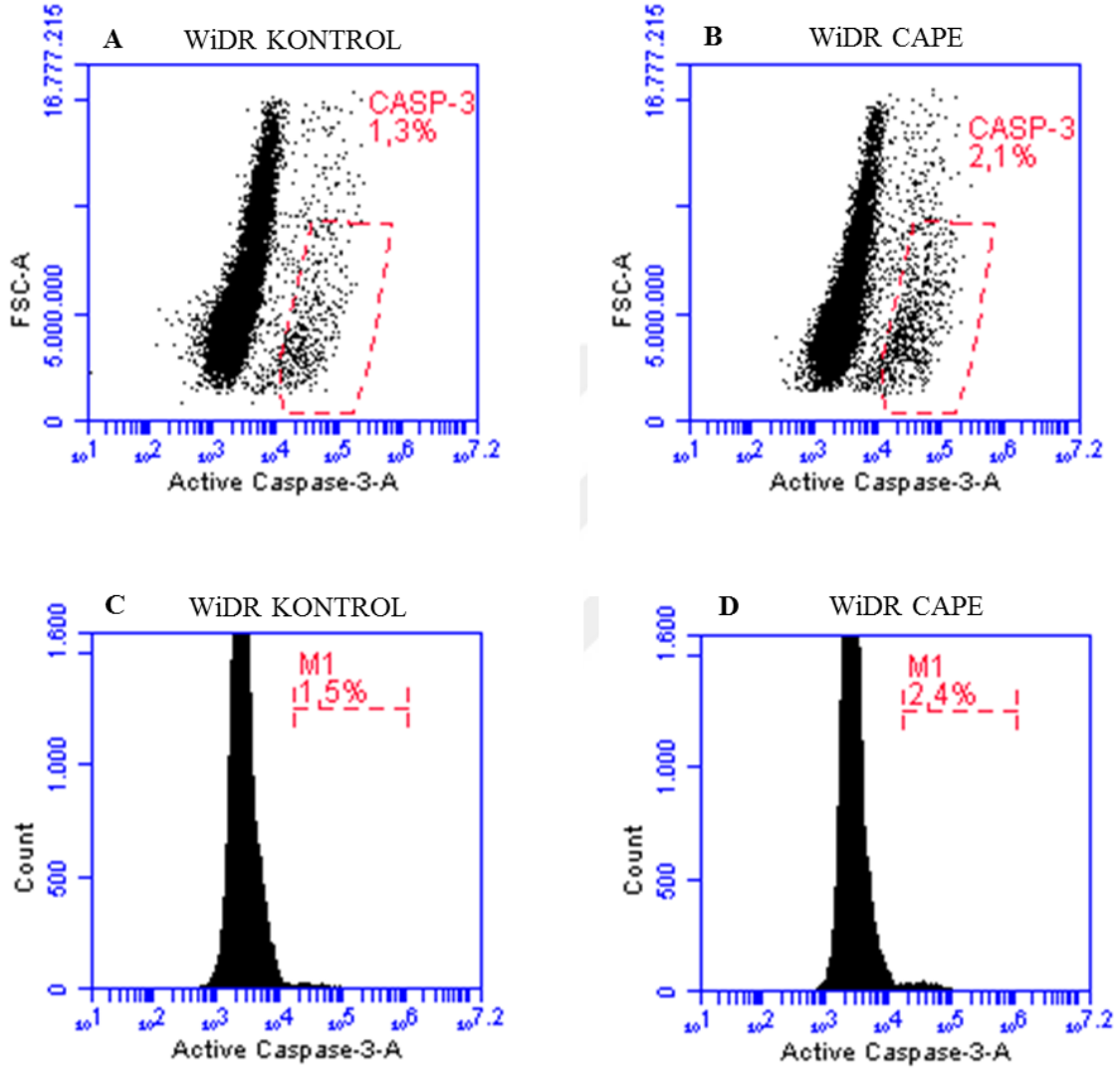
Şekil 16. HCT-116 hücrelerinde 72 saatte gerçekleşen CAPE aracılı kaspaz-3 aktivitesinin belirlenmesi, A) Kontrol grubu hücrelerinde popülasyon dağılımı, B) CAPE içeren hücre grubunda popülasyon dağılımı, C) Kontrol grubu hücrelerinde kaspaz-3 aktivitesi, D) CAPE içeren hücre grubunda kaspaz-3 aktivitesi

RKO hücrelerinde 72. saatte yapılan ölçümlere göre muamelesiz kontrol grubu hücrelerinin kaspaz-3 aktivitesi %1.2 olarak ölçülürken, CAPE muamelesi gerçekleştirilen hücrelerde bu oran %51.6 olarak belirlendi (Şekil 17).



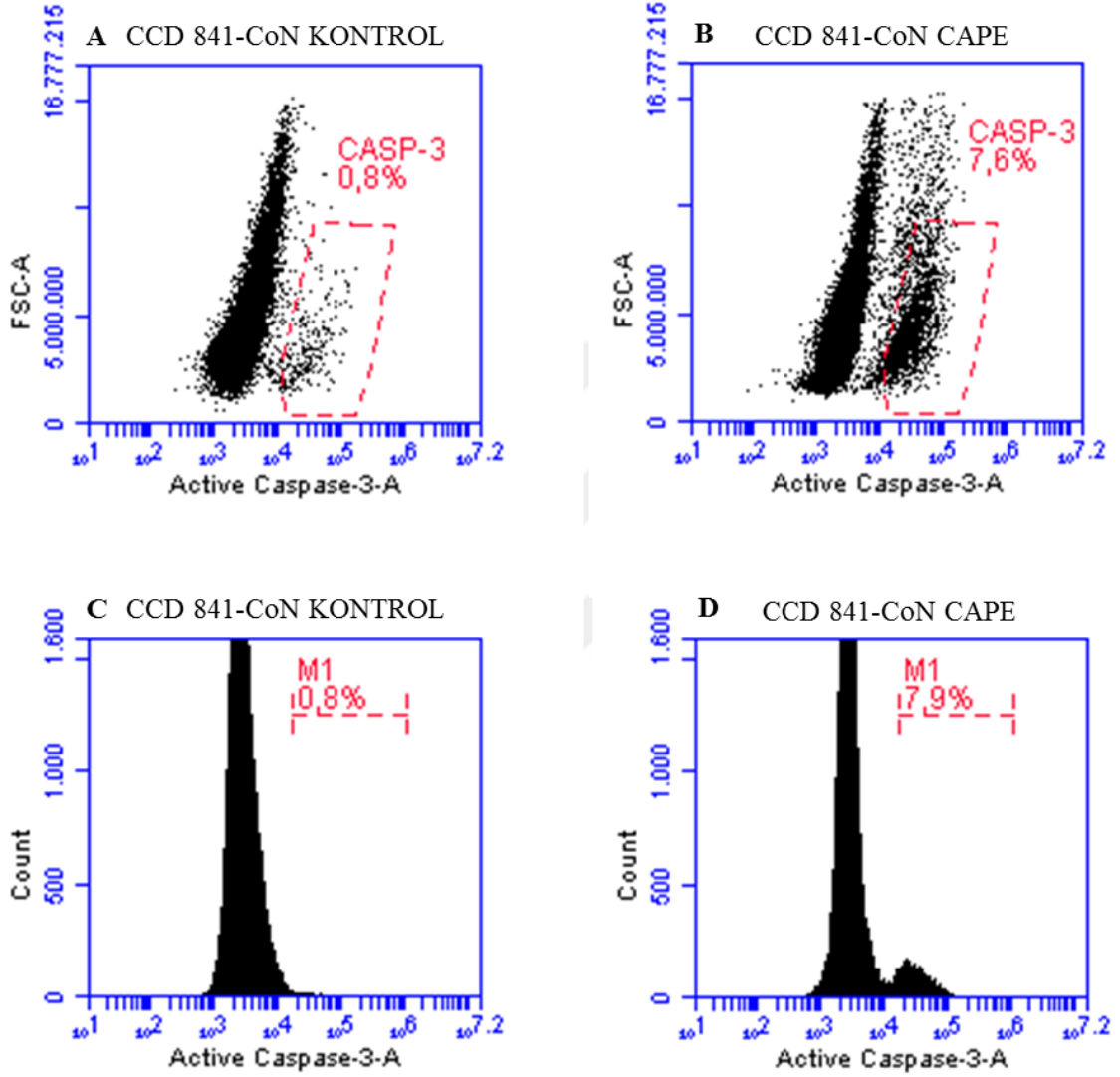
Şekil 17. RKO hücrelerinde 72 saatte gerçekleşen CAPE aracılı kaspaz-3 aktivitesinin belirlenmesi, A) Kontrol grubu hücrelerinde popülasyon dağılımı, B) CAPE içeren hücre grubunda popülasyon dağılımı, C) Kontrol grubu hücrelerinde kaspaz-3 aktivitesi, D) CAPE içeren hücre grubunda kaspaz-3 aktivitesi

WiDR hücrelerinde 72. saatte yapılan ölçümlere göre muamelesiz kontrol grubu hücrelerinin kaspaz-3 aktivitesi %1.5 olarak ölçülürken, CAPE muamelesi gerçekleştirilen hücrelerde bu oran %2.4 olarak belirlendi (Şekil 18).



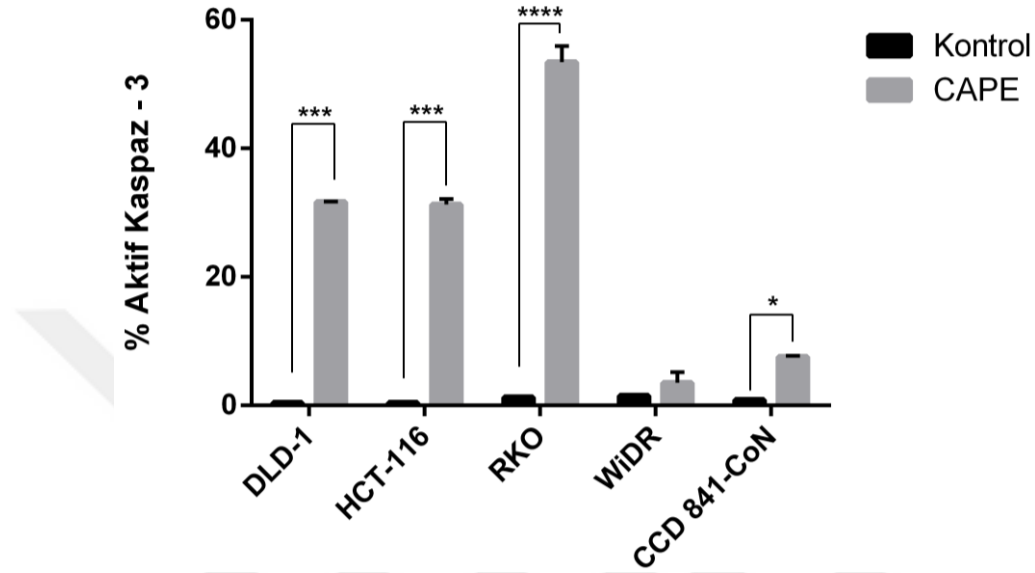
Şekil 18. WiDR hücrelerinde 72 saatte gerçekleşen CAPE aracılı kaspaz-3 aktivitesinin belirlenmesi, A) Kontrol grubu hücrelerinde popülasyon dağılımı, B) CAPE içeren hücre grubunda popülasyon dağılımı, C) Kontrol grubu hücrelerinde kaspaz-3 aktivitesi, D) CAPE içeren hücre grubunda kaspaz-3 aktivitesi

CCD 841-CoN hücrelerinde 72. saatte yapılan ölçümlere göre muamelesiz kontrol grubu hücrelerinin kaspaz-3 aktivitesi %0.8 olarak ölçülürken, CAPE muamelesi gerçekleştirilen hücrelerde bu oran %7.9 olarak belirlendi (Şekil 19).



Şekil 19. CCD 841-CoN hücrelerinde 72 saatte gerçekleşen CAPE aracılı kaspaz-3 aktivitesinin belirlenmesi, A) Kontrol grubu hücrelerinde popülasyon dağılımı, B) CAPE içeren hücre grubunda popülasyon dağılımı, C) Kontrol grubu hücrelerinde kaspaz-3 aktivitesi, D) CAPE içeren hücre grubunda kaspaz-3 aktivitesi

Tüm hücre hatlarının CAPE muamelesi sonrası gösterdikleri aktif kaspaz-3 seviyesindeki değişimler incelendi. DLD-1, HCT-116, RKO ve CCD 841-CoN hücrelerinde, CAPE muamelesi sonrası kaspaz-3 aktivasyonunun arttığına dair istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edildi (Şekil 20).



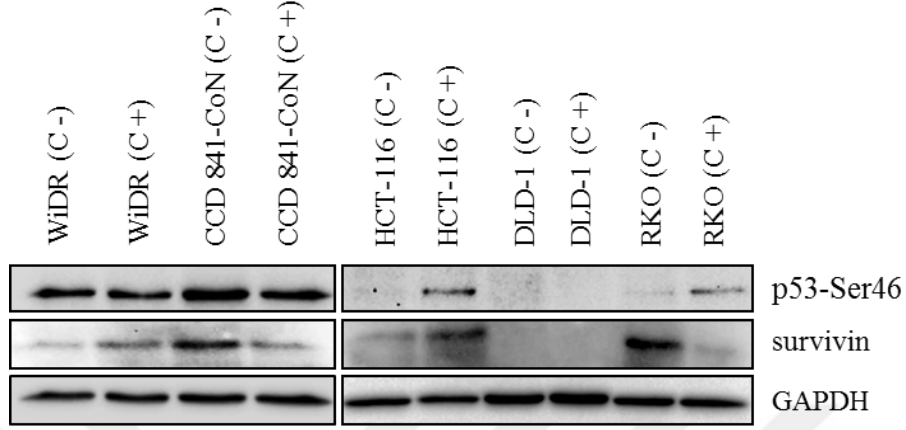
Şekil 20. Kullanılan hücre hatlarında CAPE muamelesi ile gerçekleşen aktifleşmiş kaspaz-3 değişimleri, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

6.5. Protein Analizleri

HCT-116, DLD-1, RKO, WiDR ve CCD 841-CON hücreleri muamelesiz ve CAPE muameleli olarak gruplandırılarak 72 saatlik hücre kültürü sürecinin ardından protein izolasyonları gerçekleştirildi. İzole edilen protein ekstratları kullanılarak Western Blot yöntemi gerçekleştirildi. Image Lab programı kullanılarak görüntülenen ve normalize edilen survivin, p53-Ser15 ve p53-Ser46 protein ekspresyonlarındaki değişimler incelendi.

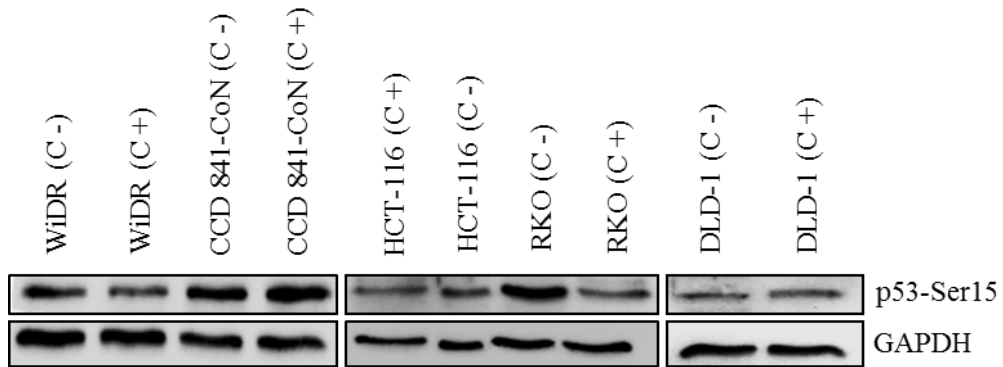
WiDR hücrelerinde CAPE muamelesinin ardından survivin protein seviyesinde artış gözlenirken, p53-Ser46 protein seviyesinde bir değişiklik söz konusu olmadı. CCD 841-CoN hücrelerinde CAPE muamelesinin ardından survivin proteini seviyesinde azalış gerçekleşirken, p53-Ser46 proteini seviyesinde bir değişiklik gözlenmedi. HCT-116 hücrelerinde survivin ve p53-Ser46 protein seviyelerinde artış gözlendi. DLD-1 hücrelerinde survivin ve p53-Ser46 proteinleri tespit edilemedi. RKO hücrelerinde ise

survivin protein seviyesinde azalış, p53-Ser46 protein seviyesinde artış gözlemlendi. (Şekil 21).



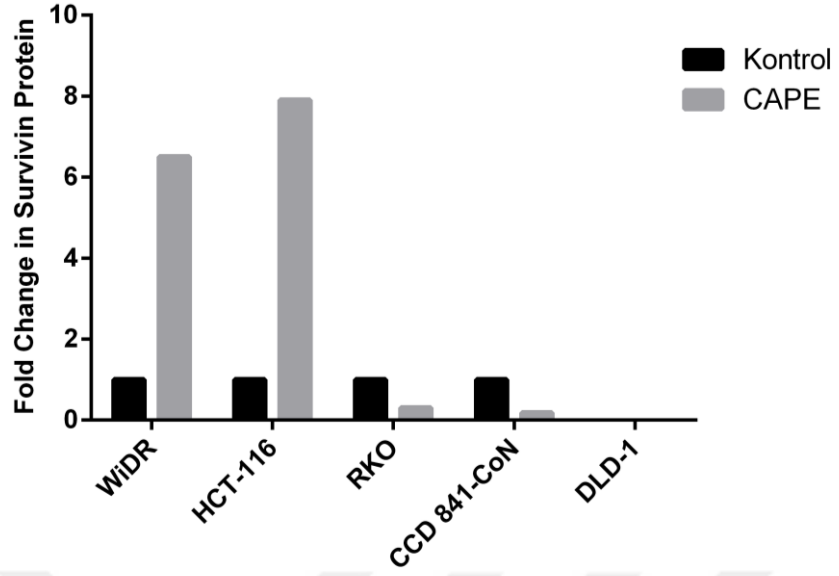
Şekil 21. Kullanılan hücre hatlarında CAPE muamelesinin survivin ve p53-Ser46 protein ekspresyonları üzerine etkisi

WiDR hücrelerinde CAPE muamelesinin ardından p53-Ser15 protein seviyesinde azalış, CCD 841-CoN hücrelerinde ise artış gözlemlendi. HCT-116 ve DLD-1 hücrelerinde CAPE muamelesinin ardından p53-Ser15 protein seviyelerinde artış gözlenirken, RKO hücrelerinde ise azalış gerçekleşti (Şekil 22).

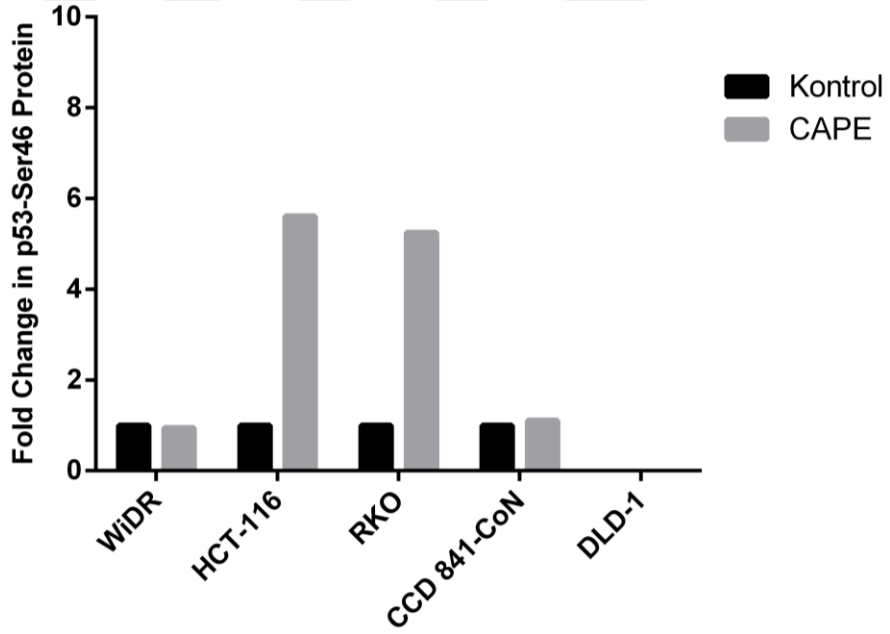


Şekil 22. Kullanılan hücre hatlarında CAPE muamelesinin p53-Ser15 protein ekspresyonu üzerine etkisi

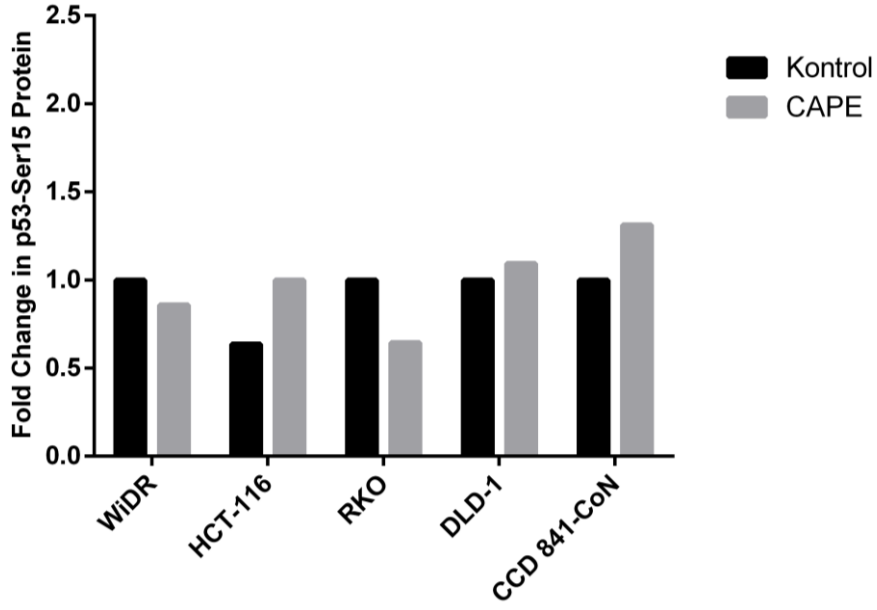
Kullanılan tüm hücre hatlarında survivin, p53-Ser15 ve p53-Ser46 protein seviyelerinde gerçekleşen değişimler Şekil 23, Şekil 24 ve Şekil 25'te grafikler halinde gösterilmiştir.



Şekil 23. Kullanılan hücre hatlarında CAPE muamelesi ile gerçekleşen survivin protein seviyesindeki değişimler



Şekil 24. Kullanılan hücre hatlarında CAPE muamelesi ile gerçekleşen p53-Ser46 protein seviyesindeki değişimler

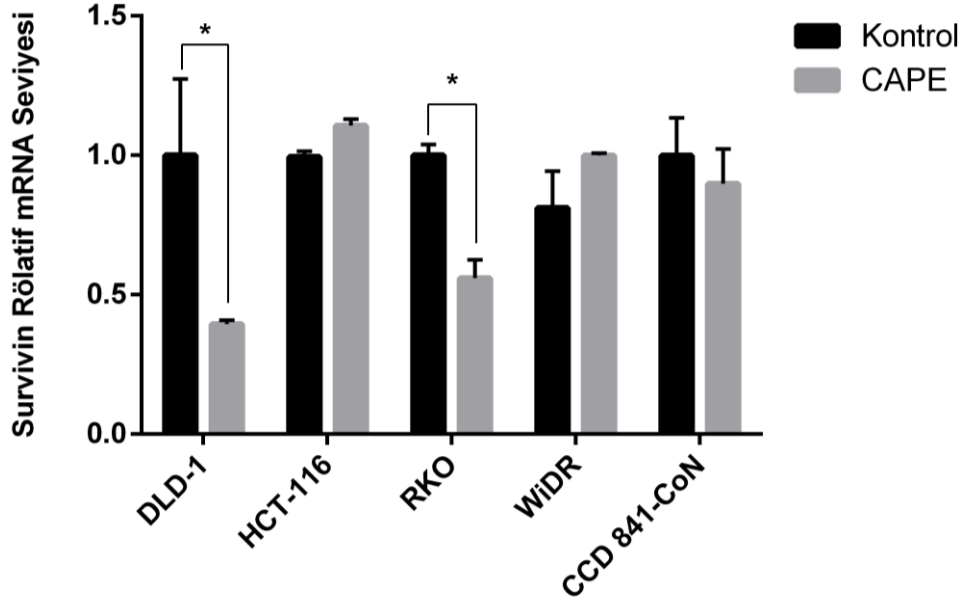


Şekil 25. Kullanılan hücre hatlarında CAPE muamelesi ile gerçekleşen p53-Ser15 protein seviyesindeki değişimler

6.6. Gen Ekspresyonu Analizleri

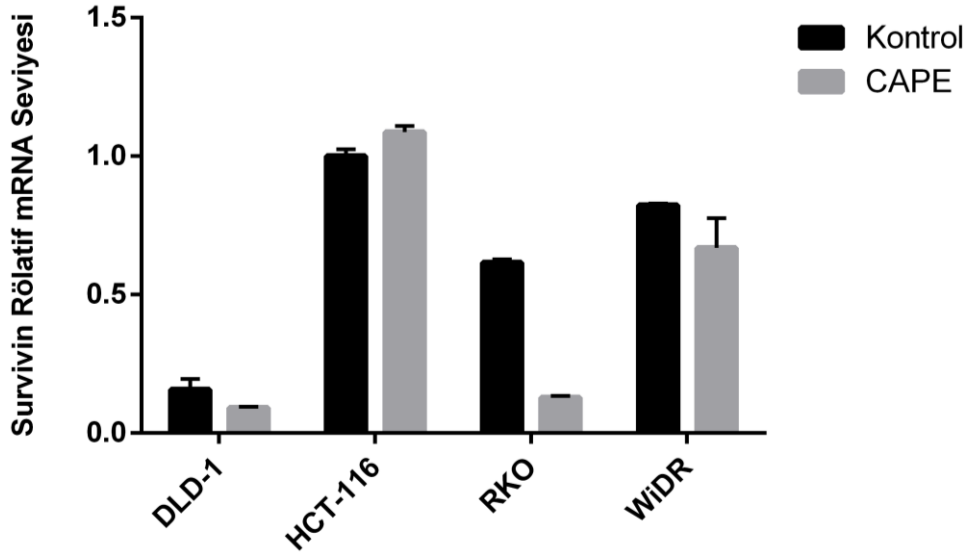
CAPE ile muamele edilen hücre grupları ve kontrol olarak kullanılan muamelesiz hücre gruplarının, 72 saatlik hücre kültürü sürecinin ardından RNA izolasyonları yapılarak, RNA'dan cDNA sentezi gerçekleştirildi. cDNA sentezinin ardından SYBR Green kullanılarak gerçekleştirilen Real-Time PCR işleminde, hücrelerde survivinin mRNA düzeyindeki değişimleri incelendi.

Yapılan analizler sonucunda survivinin mRNA düzeyinde DLD-1 ve RKO hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gözlenirken; WiDR, HCT-116 ve CCD 841-CoN hücrelerinde ise istatistiksel olarak anlamlı değişimler gerçekleşmedi (Şekil 26).



Şekil 26. Kullanılan hücre hatlarında CAPE muamelesi ile survivin mRNA seviyesinde gerçekleşen değişimler (Her bir hücre grubunun kendi içerisindeki kontrolü referans alınarak hazırlanmıştır.) *p<0.05

Kanser hücre hatlarının survivin ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması için, hücre hatlarından biri referans olarak seçildi ve ekspresyon seviyeleri analiz edildi (Şekil 27).



Şekil 27. Kullanılan kanser hücre hatlarındaki survivin ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması (HCT-116 hücre hattı referans alınarak hazırlanmıştır.)

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çağımızın en yaygın hastalıklarından biri olan kanserde agresif progresyon, tedaviye direnç, relaps ve metastaz oranlarının yüksek oluşu en büyük sorunlardan biri haline gelmiştir. Klinik uygulamalarda kullanılan kemoterapötiklere karşı gelişmekte olan direnç, tedavide ciddi bir engel oluşturmakta ve bu durum mortalite riskini artırmaktadır (1, 3, 4).

Son zamanlarda, kanser oluşumu ve gelişiminin moleküler mekanizmasını aydınlatmaya yönelik önemli sayılacak bilimsel çalışmalar, apoptotik süreçte rol alan hücre elemanlarına dikkat çekmektedir. Bunlar arasında en dikkat çekici olanlardan biri ise, apoptoz inhibitör protein ailesi proteinlerinden olan survivindir. Kolorektal kanser de dahil olmak üzere pek çok kanserli hücrede ekspresyonu yüksek bulunan, kanserde direnç ile ilişkilendirilmiş survivin gibi proteinlerin hedeflenmesi, alternatif tedavi yöntemleri açısından önemlidir (33). Bu gibi proteinleri hedeflerken seçilecek ajanların aynı zamanda, sağlıklı hücreler için toksik olmayacak ve seçici olarak kanser hücrelerini hedefleyecek özellikte olması gerekmektedir. Bu bulgular doğrultusunda; çalışmamızda, tümör hücrelerinde seçici olarak işlev gören, hücre ölümünün indüklenmesi gibi pek çok anti tümöral etkisi yapılan çalışmalarla belirlenen CAPE'in, anti apoptotik bir protein olan survivin üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır (75, 76).

Çalışmamızda, metabolik aktivitenin ölçümüne dayalı hücre proliferasyon testi WST-1 ile gerçekleştirilen analizlerde, tedavide alternatif bir ajan olabileceğini düşündüğümüz CAPE'in yanı sıra, klinikte sıklıkla kullanılan kemoterapötiklerden biri olan 5-FU da kullanılmış ve CAPE ile karşılaştırmalı etkisi incelenmiştir. Çalışmada kullanılmış hücre hatlarından DLD-1'in 5-FU dirençli hücre hattı olduğunun belirtildiği literatür bilgileri dikkate alınarak, dirençli olan bu hücre hattında 5-FU'nun yanı sıra CAPE muamelesinin gerçekleştirdiği etkiler incelenmiş ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. DLD-1 hücre hattında elde edilen sonuçlar, literatürde bahsedilen 5-FU direnci ile örtüşmektedir (65). Ayrıca çalışmada kullanılan ve 5-FU dirençli olmayan hücre hatlarında gerçekleşen 5-FU ve CAPE'in etkileri incelenerek, elde edilen sonuçlar üzerinden çalışma devam ettirilmiştir. Bu sonuçlara göre gerçekleştirilmiş olan 5-FU muamelesinde, kullanılması için seçilen 10 µM dozu tüm hücre hatlarında anlamlı

sonuçlar verirken 5-FU'ya dirençli olduğu bilinen DLD-1 hücre hattında canlılık oranları diğer hücre hatlarına kıyasla daha yüksek gözlenmiştir.

CAPE muamelesi DLD-1 ve HCT-116 hücrelerinde 5-FU muamelesine kıyasla daha düşük canlılık değerleri verirken RKO hücrelerinde bu değer daha yüksek olarak gözlenmiştir. Çalışmanın devamında kullanılması için seçilen 75 μ M CAPE dozu, DLD-1, HCT-116 ve RKO hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar verirken, WiDR hücreleri ve kontrol olarak kullanılan normal kolorektal hücre grubu CCD 841-CoN üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkiye sahip değildir. Literatürde, CAPE'in HCT-116 hücrelerinde proliferasyonunu anlamlı düzeyde baskıladığı ve hücrelerin canlılığını düşürdüğü gösterilen çalışmalar mevcuttur. (87, 88). Çalışmamızda CAPE'in, DLD-1 ve RKO hücreleri üzerinde de benzer etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca CAPE'in kontrol olarak kullanılan normal kolorektal hücreler üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkiye sahip olmayışı, uygun dozlarda kullanıldığı sürece kanser hücrelerine seçici toksisite göstereceği düşüncemizi destekler niteliktedir. Literatürde CAPE kullanılarak yapılan çalışmalarda da, CAPE'in sağlıklı hücreler üzerinde sitotoksik etkisi olmadığı gösterilmiştir (89).

Bu verilerin yanı sıra, 10 μ M 5-FU ve 75 μ M CAPE dozlarının birlikte kullanılması ile gerçekleştirilen canlılık analizlerine bakıldığında, yalnızca CAPE kullanılarak elde edilen sonuçlara kıyasla DLD-1, HCT-116 ve RKO hücre hatlarında istatistiksel olarak anlamlı değişimler gözlenmemiştir. WiDR hücre hattı ve CCD 841-CoN hücre hattı ise istatistiksel olarak anlamlı değişiklikler göstermiştir. Fakat bu hücreler CAPE muamelesi ile son derece yüksek canlılık değerleri verdiği için, elde edilen bu sonucun 5-FU'nun toksik etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir. CAPE ve 5-FU'nun sinerjik etkisinin, tekil olarak kullanıldıkları zaman oluşturdukları etki ile benzer olduğu tespit edilerek, 5-FU dirençli olan DLD-1 hücre hattında da ilacın direnç mekanizmasının aşılmasında CAPE'in etkisiz kaldığı grlmştir. CAPE ve 5-FU birlikteliği; kullanılan hücre hatlarında beklenen değişikliği gerçekleştiremediği için, çalışmanın ilerleyen kısımlarında yalnızca CAPE muameleleri ile incelemeler yapılmıştır.

Akridin Oranj/Etidyum Bromür boyama tekniği ile hücreler morfolojik olarak incelendiğinde, CAPE muamelesinin DLD-1, HCT-116 ve RKO hücrelerinde, hücre

morfolojisini değiştirdiği ve hücreslerin apoptotik sürecini başlattığı gösterilmiştir. CAPE muamelesi gerçekleştirilmeyen hücresler sağlıklı hücre morfolojisi gösterirken, CAPE muamelesi ile hücreslerin morfolojisinin apoptotik hücre morfolojisine dönüşmesi, CAPE-aracılı apoptozun gerçekleştiğini gösterir niteliktedir. Öte yandan, canlılık analizlerinde yüksek canlılık oranları gösteren WiDR hücresleri ve kontrol olarak kullanılan normal kolorektal hücre hattı olan CCD 841-CoN hücresleri ise morfolojik olarak belirgin değişiklikler sergilememiştir.

Morfolojik incelemelerin ardından apoptotik ve ölü hücreslerin yüzdesel oranlarının tespit edilmesi için gerçekleştirilen flow sitometri çalışmalarında, WST-1 canlılık analizi sonuçları ile uyumlu veriler elde edilmiştir. DLD-1, HCT-116 ve RKO hücreslerinde apoptotik evredeki hücreslerin yüzdesi yüksek oranlarda gözlenirken, WiDR ve CCD 841-CoN hücreslerinde bu oranlar düşük düzeyde kalmıştır. WST-1 canlılık analizlerinde yüksek yüzdesel canlılık verilerine sahip WiDR ve CCD 841-CoN hücre hatlarında, flow sitometri çalışmalarında elde edilen düşük yüzdesel apoptotik sonuçlar birbiri ile tutarlı haldedir. Ayrıca, DLD-1, HCT-116 ve RKO hücre hatlarında gözlenmekte olan apoptotik hücreslere ait yüksek yüzdesel değerler, canlılık testlerinde elde edilmiş düşük yüzdesel canlılık verileri ile uyumludur. Öte yandan literatürde gösterilmiş olan, CAPE muamelesi gerçekleştirilmiş HCT-116 hücreslerinin flow sitometri yöntemi kullanılarak apoptotik olarak incelenmesi ile elde edilen sonuçlar, çalışmamızda elde edilen sonuçlar ile örtüşmektedir (87, 88).

Çalışmamızın devamında, önemli bir apoptotik belirteç olan aktif kaspaz-3 düzeyi incelenmiştir. Apoptotik sürecin yürütülmesinde rol alan kaspaz-3, CAPE kullanılarak gerçekleştirilmiş pek çok farklı kanser türüne ait hücre hatları üzerinde çalışılmış ve CAPE aracılı apoptozdaki aktivasyonu gösterilmiştir (90-92). Flow sitometri yöntemi kullanılarak gerçekleştirdiğimiz aktifleşmiş kaspaz-3 ölçümlerinde; DLD-1, HCT-116 ve RKO hücre hatlarında, CAPE muamelesi sonrasında kaspaz-3 aktivitesinin oluştuğu gösterilerek, bu hücreslerde gerçekleşen CAPE aracılı apoptotik sürece dair yeni veriler elde edilmiştir. Gerçekleştirilen CAPE muamelesine rağmen, yüzdesel apoptotik hücre oranı düşük düzeyde olan ve yüksek canlılık oranlarına sahip WiDR ve CCD 841-CoN hücreslerinde kaspaz-3 aktivitesi de düşük düzeylerde gözlenmiştir.

CAPE'in tüm bu flow sitometrik çalışmalarda, önemli bir apoptotik belirteç olan kaspaz-3 etkinliğini ve apoptotik hücre sayısını artırması çalışmanın devamı açısından önemlidir. Kullanılan üç hücre hattında apoptotik süreci başlattığı gözlenen CAPE'in, normal kolorektal hücre hattında bu etkiyi göstermemiş olması da önemli bir bulgudur.

Çalışmamızın ilerleyen kısımlarında gerçekleştirdiğimiz protein düzeyindeki incelemeler ile CAPE muamelesi sonrası survivin, p53-Ser46 ve p53-Ser15 proteinleri düzeyinde gerçekleşen değişimler belirlenmiştir.

p53'ün, survivinin down regülasyonundan sorumlu olduğu ve survivinin anti apoptotik aktivitesini antagonize ederek apoptozu indüklediğine dair çalışmalar bulunmaktadır (48). p53'ün mutant hale geçtiği kanser hücrelerinde ise bu etki kaybolmakta ve p53 tarafından regüle edilemeyen survivin, hücreler üzerinde etkinliğini artırarak hücrelerin proliferasyon sürecinin yürütülmesine katkıda bulunmaktadır (47, 49). p53 proteini pek çok farklı rezidü üzerinden fosforillenerek, farklı hücresel süreçlere dahil olmaktadır. Ser46 rezidüsünden fosforillenen p53 proteini, hücrelerin apoptoza girmesini indüklerken, DNA hasarı oluşması durumunda Ser15 rezidüsünden fosforillenme gerçekleşmektedir (44-46). Çalışmamızda, Ser46 ve Ser15 rezidülerinden fosforile edilen p53 proteini ile survivin protein düzeyindeki değişiklikler incelenmiş ve kullanılan hücre hatları protein düzeyinde farklı sonuçlar vermiştir.

Normal kolorektal hücre hattı CCD 841-CoN hücrelerinde, kontrol grubunda az miktarda gözlenen survivin protein seviyesi CAPE muamelesi gerçekleştirilen hücrelerde daha da azalmaktadır. Fosforilasyonu, apoptotik sürecin başlaması ile ilişkilendirilen p53-Ser46 protein miktarında herhangi bir değişim olmamakla birlikte, p53-Ser15 düzeyinde bir miktar artış gözlenmiştir. CAPE'in bu sağlıklı hücreler üzerinde anlamlı bir sitotoksik etkisi olmadığı, çalışmamızın ilk aşamalarında gerçekleştirilen canlılık analizleri, apoptotik hücre yüzdeleri ve kaspaz-3 aktivasyonu analizi ile gösterilmiştir. Protein analizlerinden elde edilen sonuçlara göre; CAPE, survivin ekspresyonu üzerinde baskılayıcı bir etkiye sahip olsa da apoptotik süreç ile ilişkili p53-Ser46 protein düzeyinde farklılık görülmemiş olması, etkili bir apoptotik sürecin gerçekleşmediğini düşündürmektedir. Hücrelerde DNA hasarı oluşumundan sonra fosforile olan p53-Ser15 proteininde az miktarda bir artış görülmesi ise, CAPE'in DNA hasarı ile ilişkilendirilebilecek bir duruma sebebiyet vermesi ihtimalini akıllara

getirmektedir. Literatürde daha önce yapılmış bir çalışmada, CAPE'in bakır iyonları varlığında DNA hasarı oluşturduğu gösterilmiştir (93). Başka bir çalışmada ise, survivin ekspresyonu baskılanan hücrelerde DNA tamir mekanizmasının daha etkili şekilde çalıştığı gösterilmiştir (94). Bunun yanı sıra, CAPE ile benzer etkiler gösteren kafeik asit ile yapılan bazı çalışmalarda, kafeik asitin DNA hasarına karşı koruyucu etki oluşturduğuna dair veriler mevcuttur (95, 96). Tüm bu literatür bilgisi ve çalışmamızın ilk kısımlarındaki sonuçlar dikkate alındığında, normal kolorektal hücrelerde CAPE'in anlamlı bir apoptotik etkiye sahip olmadığı fakat survivini baskılayarak DNA hasarı sonrasında tamir mekanizmasında görev alan proteinlerin etkisinin artmasına neden olabileceği düşünülmektedir. CAPE'in bu hücrelerde DNA hasarı oluşturma ihtimali ya da hücreleri DNA hasarına karşı koruma ihtimali hakkında daha net yorumlar yapabilmek için, DNA hasarını belirleyecek farklı yöntemlerin uygulanmasına ihtiyaç vardır. Ayrıca DNA tamir mekanizmasında gerçekleşen değişimleri daha iyi gözlemleyebilmek için, bu mekanizmada rol alan farklı proteinlerin incelenmesi ve fosforile p53 düzeylerinin yanı sıra total p53 seviyesindeki değişimlere de bakılması gerekmektedir.

Yabanıl tip p53 karakteristiği gösteren RKO hücre hattında, CAPE muamelesinin ardından survivin protein seviyesi azalırken, p53-Ser46 protein seviyesi artmış, p53-Ser15 protein seviyesinde ise azalış gözlenmiştir. Bu durumda; CAPE'in, RKO hücre hattında survivin protein seviyesini baskılayıp p53-Ser46 protein seviyesini artırarak apoptotik süreci sağlıyor olduğu düşünülmüştür. RKO hücre hattında gözlenen CAPE aracılı apoptozda, literatürde bahsedilmekte olan p53 ve survivin arasındaki negatif regülasyon ilişkisinin korunduğu düşünülmektedir (48).

Yabanıl tip p53 karakteristiği gösteren bir diğer hücre hattı HCT-116'da ise survivin, p53-Ser46 ve p53-Ser15 protein seviyelerinin tamamında artış gözlenmiştir. CAPE, HCT-116 hücreleri üzerinde apoptotik etki gösteriyor olmasına rağmen; CAPE muamelesinin ardından anti apoptotik özellikte bir protein olan survivin ekspresyonunda görülen artış ilgi çekicidir. Survivin'in rol aldığı hücresel yollarda pek çok proteinle etkileşiyor olduğu bilinmektedir (97-99). HCT-116 hücrelerinde görülen survivin protein miktarındaki artışın, bu yollardaki upstream ya da downstream hedef olarak görev yapan moleküllerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Survivin'in yanı sıra p53-Ser15 ve p53-Ser46 protein seviyelerinde görülen artışlar, p53 ve survivin

proteinleri arasında oluşması muhtemel etkileşim kaybını düşündürmektedir. Uzun süreli kültürlerinde kanser hücreleri ile benzer özellikler göstermeye başlayan mezenkimal kök hücrelerde yapılmış bir çalışma ile, p53 ve survivin arasındaki bu etkileşim kaybı gösterilmiştir (100). HCT-116 hücrelerinde elde edilen sonuçlara göre; CAPE, survivin üzerinde baskılayıcı bir etki sağlayamamış olsa da, p53-Ser46 ve p53-Ser15 protein seviyelerinde gözlenen artış, hücrelerin apoptotik sürecinin işleyişine işaret olabilecek bir değişimdir.

WiDR hücrelerinin yüksek canlılık ve düşük kaspaz-3 aktivitesi gösterilmiş ve çalışmada kullanılan diğer üç hücre hattına kıyasla CAPE muamelesi sonrasında bu hücre hattına ait etkili bir apoptotik süreç gözlenmemiştir. Mutant tip p53 karakteristiği gösteren WiDR hücre hattında bu verilerle örtüşür şekilde survivin protein seviyesi artmış, p53-Ser15 protein miktarı azalmış ve p53-Ser46 protein miktarında bir değişim gözlenmemiştir. CAPE bu hücre hattında survivin üzerinde baskılayıcı bir etki sağlayamamıştır ve fosforile p53 seviyelerinde de artış gözlenmediği için, bu hücrelerin apoptotik sürecinde p53'ün etkin şekilde rol almadığı düşünülmüştür.

p53 mutant tipte olan bir diğer hücre hattı DLD-1'de, hem kontrol hem de CAPE muamelesi gerçekleştirilmiş hücre gruplarında survivin ve p53-Ser46 protein seviyelerinde herhangi bir bant gözlenmemiş, yalnızca p53-Ser15 proteini seviyesinde bir miktar artış meydana gelmiştir. p53-Ser46 proteininin tespit edilememiş olması, CAPE'in DLD-1 hücre hattında p53 proteininin Ser46 rezidüsü üzerinden fosforillenme mekanizmasında etkisi olmadığını, proteinin farklı bir rezidüden fosforillenebileceğini düşündürmüştür. DLD-1 hücrelerinde survivin proteininin tespit edilememiş olması ise ilgi çekici bir sonuç olmuştur.

Bu sonucu daha iyi anlayabilmek ve CAPE'in survivin gen ekspresyonu düzeyinde ne gibi değişimlere sebep olduğunu tespit etmek için gerçekleştirilen Real Time PCR analizinde, DLD-1 ve RKO hücre hatlarında CAPE'in survivin ekspresyonu üzerindeki baskılayıcı etkisi istatistiksel olarak gösterilmiştir. Bunun yanı sıra HCT-116 ve WiDR hücre hatlarında, survivin ekspresyonunda grafiksel artışlar görüle bile, bu değişim istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değildir. Normal kolorektal hücre hattı olan CCD 841-CoN hücre hattında ise, grafiksel olarak bir azalış görülmüştür fakat bu da istatistiksel olarak anlamlı sayılan bir sonuç olmamıştır. CAPE'in survivin gen

ekspresyonu düzeyinde gerçekleştirdiği değişimleri anlamak için yapılmış olan Real Time PCR çalışmasında elde edilen veriler, Western Blot protein analizi sonuçları ile örtüşmektedir. Çalışmamızda kullanılan kanser hücre hatlarındaki bazal survivin ekspresyonu miktarlarına bakıldığında ise; HCT-116, RKO ve WiDR hücre hatlarına kıyasla DLD-1 hücre hattındaki survivin ekspresyonlarının çok daha az olduğu belirlenmiştir. Western blot protein analizinde, DLD-1 hücre hattındaki survivin proteini miktarının tespit edilemiyor olması, bu hücre hattındaki survivin ekspresyonunun diğer hücre hatlarına kıyasla çok daha az olması ile açıklanabilecek bir durumdur.



8. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Farklı kolorektal kanser hücre hatlarında ve sağlıklı kolorektal hücrelerde CAPE ve CAPE ile 5-FU'nun birlikte muamele edilmesiyle oluşan anti proliferatif etkilerin incelenmesi ve survivin ekspresyonlarındaki değişimin araştırılması amaçlanan bu çalışma kapsamında, ilk aşamada hücreler üzerindeki 5-FU, CAPE, CAPE ve 5-FU birlikteliğinin etkileri incelenerek, CAPE'in 5-FU ile birlikte kullanıldığında ilacın etkinliği artırmadığı fakat HCT-116, DLD-1 ve RKO hücre hatlarında doza bağlı olarak hücre canlılığını azalttığı gösterilmiştir. WiDR hücre hattı ve CCD 841-CoN sağlıklı kolorektal hücre hattında ise istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç gözlenmemiştir. 5-FU ile birlikte kullanıldığında ilacın etkinliğinde değişiklik sağlamayan CAPE; kolorektal kanser tedavisinde kullanılmakta olan farklı bir kemoterapötik ilaç ile birlikte kullanılarak, elde edilen sonuçlar hücrelerde tekil olarak oluşturdukları sonuçlar ile kıyaslanırsa, CAPE etkinliği hakkında daha net bir fikre ulaşılabileceği düşünülmektedir.
2. CAPE muamelesi yapılan hücrelerin morfolojik değişimleri incelenmiş ve canlılık oranları azalan HCT-116, DLD-1 ve RKO hücrelerinin morfolojik olarak apoptotik hücre morfolojisi sergilemiş oldukları gösterilmiştir. WiDR hücreleri ve CCD 841-CoN hücreleri ise sağlıklı hücre morfolojilerini korumuşlardır.
3. CAPE muamelesi sonrası hücre popülasyonundaki apoptotik hücrelerin oranı tespit edilerek; HCT-116, DLD-1 ve RKO hücrelerinde CAPE aracılı apoptozun gerçekleştiği gösterilmiştir. WiDR hücreleri ve sağlıklı kolorektal hücreler olan CCD 841-CON hücreleri ise düşük oranlarda apoptotik hücre profilini sergileyerek, hücre canlılıklarını korumuşlardır.
4. Önemli bir apoptotik belirteç olan kaspaz-3 aktivasyonu analiz edilerek, CAPE aracılı apoptoz mekanizması hakkındaki veriler kuvvetlendirilmiştir. HCT-116, DLD-1 ve RKO hücre hatlarında yüksek oranlarda kaspaz-3 aktivasyonu görülürken, CCD 841-CoN hücreleri ve WiDR hücrelerinde bu duruma rastlanmamıştır.
5. Çalışmanın ilerleyen kısmında protein analizleri gerçekleştirilerek survivin, p53-Ser46 ve p53-Ser15 protein seviyelerine bakılmıştır. CAPE muamelesi sonrası survivin ekspresyonlarının baskılanmasını beklediğimiz kanser hücre hatlarından yalnızca RKO hücre hattında bu etki gözlenmiş, HCT-116 ve WiDR hücre hattında

ise survivin protein miktarlarında artış gerçekleşmiştir. Sağlıklı kolorektal hücrelerde görülen az miktarda ölüm ile orantılı olarak survivin protein miktarı da azalmıştır. DLD-1 hücre hattında ise survivin proteini tespit edilememiştir. Alınan sonuçlar; CAPE'in apoptotik etkisini yalnızca RKO hücre hattında survivini etkileyerek gösterebildiğini düşündürmektedir. Kullanılan diğer kanser hücre hatlarında survivinde beklenen inhibisyonlar gerçekleşmemiştir. Bu mekanizmanın daha iyi anlaşılabilmesi için, survivinin apoptotik süreçte etkileşim halinde olduğu bilinen Smac/DIABLO ve XIAP gibi proteinlerin ve bu proteinlerin etkileşmekte olduğu diğer proteinlerin, CAPE muamelesi sonrası protein düzeyinde meydana gelen değişimleri incelenmelidir.

6. Apoptoz çalışmalarında sıklıkla kullanılan fosforile p53-Ser46 proteini ile fosforile p53-Ser15 protein miktarlarına bakıldığında, yabancıl tip p53 ve mutant p53'e sahip hücre hatlarının her birinin farklı sonuçlar oluşturduğu gözlenmiştir. Bu durumun hücrelerin sahip olduğu mutasyon profillerinin farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. p53 seviyesindeki değişimlerin daha iyi anlaşılabilmesi için, fosforile p53 protein seviyelerinin yanı sıra total p53 protein seviyesinin de incelenmesi gerektiği düşünülmektedir.
7. Son olarak CAPE muamelesinin ardından survivinin mRNA düzeyinde gerçekleşen değişimler incelenmiştir ve elde edilen sonuçlar, protein analizinden elde edilen sonuçlarla örtüşmektedir. DLD-1 hücre hattında survivinin protein düzeyinde tespit edilememiş olması, kullanılan diğer hücre hatları ve DLD-1 hücre hattı arasındaki survivin ekspresyonlarının karşılaştırılması ihtiyacını hissettirmiştir. Yapılan analiz, DLD-1 hücre hattında diğer hücre hatlarına kıyasla survivin ekspresyonunun son derece düşük olduğunu göstermiştir.
8. CAPE'in kullanılan hücre hatlarında canlılığı istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaltıyor olması ve kaspaz-3 gibi apoptotik belirteçlerin CAPE muamelesi sonrasında aktifleşmesi; buna rağmen sağlıklı hücrelerde bu durumun gözlenmemesi, CAPE aracılı apoptozun kanser hücrelerine seçici toksisite sağlıyor olduğu fikrini güçlendirici niteliktedir. CAPE'in hücre hatlarında survivin ekspresyonlarını farklı şekilde etkiliyor olması ise, hücrelerin farklı mutasyon profili taşımalarının yanı sıra, survivin ile etkileşen başka proteinlerin rollerine de

deđinilmesi gerektiđini dűşündürmektedir. alıřmalar bu yűnde geniřletilirse, CAPE'in anti proliferatif mekanizması hakkında literatűre katkı sađlayabilecek daha net veriler elde edilecektir.



9. KAYNAKLAR

1. Disibio G, French SW (2008). Metastatic patterns of cancers: results from a large autopsy study. *Arch Pathol Lab Med* 132: 931-939.
2. Hermanek Sr. P, Hermanek Jr. P, Hohenberger W, Klimpfinger M, Köckerling F, Papadopoulos T (2003). The pathological assessment of mesorectal excision: implications for further treatment and quality management. *International Journal of Colorectal Disease* 18: 335-341.
3. Hess KR, Varadhachary GR, Taylor SH, Wei W, Raber MN, Lenzi R, Abbruzzese JL (2006). Metastatic patterns in adenocarcinoma. *Cancer* 106: 1624-1633.
4. Weiss L, Grundmann E, Torhorst J, Hartveit F, Moberg I, Eder M, Fenoglio-Preiser CM, Napier J, Horne CH, Lopez MJ, et al. (1986). Haematogenous metastatic patterns in colonic carcinoma: an analysis of 1541 necropsies. *J Pathol* 150: 195-203.
5. Zheng ZS, Xue GZ, Grunberger D, Prystowsky JH (1995). Caffeic acid phenethyl ester inhibits proliferation of human keratinocytes and interferes with the EGF regulation of ornithine decarboxylase. *Oncol Res* 7: 445-452.
6. Greaves M, Maley CC (2012). Clonal evolution in cancer. *Nature* 481: 306-313.
7. Bertram JS (2000). The molecular biology of cancer. *Molecular Aspects of Medicine* 21: 167-223.
8. Ph Q (1998). The pathologist, the surgeon and colorectal cancer: get it right because it matters. *Prog Pathol* 4: 201-213.
9. DeSantis CE, Lin CC, Mariotto AB, Siegel RL, Stein KD, Kramer JL, Alteri R, Robbins AS, Jemal A (2014). Cancer Treatment and Survivorship Statistics, 2014. *Ca-a Cancer Journal for Clinicians* 64: 252-271.
10. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005). Global cancer statistics, 2002. *Ca-a Cancer Journal for Clinicians* 55: 74-108.
11. Hagggar FA, Boushey RP (2009). Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clin Colon Rectal Surg* 22: 191-197.
12. Campos FG, Logullo Waitzberg AG, Kiss DR, Waitzberg DL, Habr-Gama A, Gama-Rodrigues J (2005). Diet and colorectal cancer: current evidence for etiology and prevention. *Nutr Hosp* 20: 18-25.
13. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA (1999). Cancer statistics, 1999. *CA*

- Cancer J Clin 49: 8-31, 31.
14. de Almagro MC, Vucic D (2012). The inhibitor of apoptosis (IAP) proteins are critical regulators of signaling pathways and targets for anti-cancer therapy. *Exp Oncol* 34: 200-211.
 15. Altieri DC (2015). Survivin - The inconvenient IAP. *Semin Cell Dev Biol* 39: 91-96.
 16. Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC (1997). X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 388: 300-304.
 17. Jaiswal PK, Goel A, Mittal RD (2015). Survivin: A molecular biomarker in cancer. *Indian J Med Res* 141: 389-397.
 18. Khan S, Ferguson Bennit H, Asuncion Valenzuela MM, Turay D, Diaz Osterman CJ, Moyron RB, Esebanmen GE, Ashok A, Wall NR (2015). Localization and upregulation of survivin in cancer health disparities: a clinical perspective. *Biologics* 9: 57-67.
 19. Hernandez JM, Farma JM, Coppola D, Hakam A, Fulp WJ, Chen DT, Siegel EM, Yeatman TJ, Shibata D (2011). Expression of the antiapoptotic protein survivin in colon cancer. *Clin Colorectal Cancer* 10: 188-193.
 20. Carmena M, Wheelock M, Funabiki H, Earnshaw WC (2012). The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 789-803.
 21. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257.
 22. Chen X, Duan N, Zhang C, Zhang W (2016). Survivin and Tumorigenesis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies. *J Cancer* 7: 314-323.
 23. Croci DO, Cogno IS, Vittar NB, Salvatierra E, Trajtenberg F, Podhajcer OL, Osinaga E, Rabinovich GA, Rivarola VA (2008). Silencing survivin gene expression promotes apoptosis of human breast cancer cells through a caspase-independent pathway. *J Cell Biochem* 105: 381-390.
 24. Chen Z, Sui J, Zhang F, Zhang C (2015). Cullin family proteins and tumorigenesis: genetic association and molecular mechanisms. *J Cancer* 6: 233-242.
 25. Zhao J, Tenev T, Martins LM, Downward J, Lemoine NR (2000). The ubiquitin-

- proteasome pathway regulates survivin degradation in a cell cycle-dependent manner. *J Cell Sci* 113 Pt 23: 4363-4371.
26. Mita AC, Mita MM, Nawrocki ST, Giles FJ (2008). Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics. *Clin Cancer Res* 14: 5000-5005.
 27. Dai D, Liang Y, Xie Z, Fu J, Zhang Y, Zhang Z (2012). Survivin deficiency induces apoptosis and cell cycle arrest in HepG2 hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Rep* 27: 621-627.
 28. Altieri DC (2003). Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene* 22: 8581-8589.
 29. Hanahan D, Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.
 30. Tamm I, Richter S, Scholz F, Schmelz K, Oltersdorf D, Karawajew L, Schoch C, Haferlach T, Ludwig WD, Wuchter C (2004). XIAP expression correlates with monocytic differentiation in adult de novo AML: impact on prognosis. *Hematol J* 5: 489-495.
 31. Tamm I, Kornblau SM, Segall H, Krajewski S, Welsh K, Kitada S, Scudiero DA, Tudor G, Qui YH, Monks A, Andreeff M, Reed JC (2000). Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias. *Clin Cancer Res* 6: 1796-1803.
 32. Nachmias B, Ashhab Y, Ben-Yehuda D (2004). The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): an emerging therapeutic target in cancer. *Semin Cancer Biol* 14: 231-243.
 33. Mobahat M, Narendran A, Riabowol K (2014). Survivin as a Preferential Target for Cancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences* 15: 2494.
 34. Huang Y, Chen X, Chen N, Nie L, Xu M, Zhou Q (2011). Expression and prognostic significance of survivin splice variants in diffusely infiltrating astrocytoma. *J Clin Pathol* 64: 953-959.
 35. Vegran F, Boidot R, Bonnetain F, Cadouot M, Chevrier S, Lizard-Nacol S (2011). Apoptosis gene signature of Survivin and its splice variant expression in breast carcinoma. *Endocr Relat Cancer* 18: 783-792.
 36. Chen WC, Liu Q, Fu JX, Kang SY (2004). Expression of survivin and its significance in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 10: 2886-2889.

37. Jiang ZM, Yao HR, Zhan J, Xie DR, Li HG (2004). [Expression and significance of survivin in colon cancer]. *Ai Zheng* 23: 1414-1417.
38. Yao HB, Wu AG, Huang ZH (2004). [Expression of survivin and its clinical significance in colorectal carcinoma]. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 24: 1412-1415.
39. Chu XY, Chen LB, Wang JH, Su QS, Yang JR, Lin Y, Xue LJ, Liu XB, Mo XB (2012). Overexpression of survivin is correlated with increased invasion and metastasis of colorectal cancer. *Journal of Surgical Oncology* 105: 520-528.
40. Fang YJ, Lu ZH, Wang GQ, Pan ZZ, Zhou ZW, Yun JP, Zhang MF, Wan DS (2009). Elevated expressions of MMP7, TROP2, and survivin are associated with survival, disease recurrence, and liver metastasis of colon cancer. *Int J Colorectal Dis* 24: 875-884.
41. Kim K, Chie EK, Wu HG, Kim SG, Lee SH, Kang GH, Hyun CL, Ha SW (2011). High survivin expression as a predictor of poor response to preoperative chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer. *International Journal of Colorectal Disease* 26: 1019-1023.
42. Lee YY, Yu CP, Lin CK, Nieh S, Hsu KF, Chiang H, Jin JS (2009). Expression of survivin and cortactin in colorectal adenocarcinoma: association with clinicopathological parameters. *Dis Markers* 26: 9-18.
43. Harris CC (1996). Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *J Natl Cancer Inst* 88: 1442-1455.
44. Muller PA, Vousden KH (2014). Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. *Cancer Cell* 25: 304-317.
45. Ozaki T, Nakagawara A (2011). Role of p53 in Cell Death and Human Cancers. *Cancers (Basel)* 3: 994-1013.
46. Zilfou JT, Lowe SW (2009). Tumor suppressive functions of p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1: a001883.
47. Lai YJ, Lin CI, Wang CL, Chao JI (2014). Expression of survivin and p53 modulates honokiol-induced apoptosis in colorectal cancer cells. *J Cell Biochem* 115: 1888-1899.
48. Hoffman WH, Biade S, Zilfou JT, Chen J, Murphy M (2002). Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *J Biol Chem* 277:

- 3247-3257.
49. Mirza A, McGuirk M, Hockenberry TN, Wu Q, Ashar H, Black S, Wen SF, Wang L, Kirschmeier P, Bishop WR, Nielsen LL, Pickett CB, Liu S (2002). Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene* 21: 2613-2622.
 50. Wang Z, Fukuda S, Pelus LM (2004). Survivin regulates the p53 tumor suppressor gene family. *Oncogene* 23: 8146-8153.
 51. Ambrosini G, Adida C, Sirugo G, Altieri DC (1998). Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting. *J Biol Chem* 273: 11177-11182.
 52. Sun C, Cai M, Gunasekera AH, Meadows RP, Wang H, Chen J, Zhang H, Wu W, Xu N, Ng SC, Fesik SW (1999). NMR structure and mutagenesis of the inhibitor-of-apoptosis protein XIAP. *Nature* 401: 818-822.
 53. Tran J, Rak J, Sheehan C, Saibil SD, LaCasse E, Korneluk RG, Kerbel RS (1999). Marked induction of the IAP family antiapoptotic proteins survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 264: 781-788.
 54. Altieri DC (2003). Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nat Rev Cancer* 3: 46-54.
 55. Kato J, Kuwabara Y, Mitani M, Shinoda N, Sato A, Toyama T, Mitsui A, Nishiwaki T, Moriyama S, Kudo J, Fujii Y (2001). Expression of survivin in esophageal cancer: correlation with the prognosis and response to chemotherapy. *Int J Cancer* 95: 92-95.
 56. Schimmer AD (2004). Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res* 64: 7183-7190.
 57. Fukuda S, Pelus LM (2006). Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. *Mol Cancer Ther* 5: 1087-1098.
 58. Singh N, Krishnakumar S, Kanwar RK, Cheung CH, Kanwar JR (2015). Clinical aspects for survivin: a crucial molecule for targeting drug-resistant cancers. *Drug Discov Today* 20: 578-587.
 59. Dallas NA, Xia L, Fan F, Gray MJ, Gaur P, van Buren G, 2nd, Samuel S, Kim MP, Lim SJ, Ellis LM (2009). Chemoresistant colorectal cancer cells, the cancer

- stem cell phenotype, and increased sensitivity to insulin-like growth factor-I receptor inhibition. *Cancer Res* 69: 1951-1957.
60. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG (2003). 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 3: 330-338.
 61. Delval L, Klastersky J (2002). Optic neuropathy in cancer patients. Report of a case possibly related to 5 fluorouracil toxicity and review of the literature. *J Neurooncol* 60: 165-169.
 62. Gorlick R, Bertino JR (1999). Drug resistance in colon cancer. *Semin Oncol* 26: 606-611.
 63. Subbarayan PR, Lee K, Ardalan B (2010). Arsenic trioxide suppresses thymidylate synthase in 5-FU-resistant colorectal cancer cell line HT29 In Vitro re-sensitizing cells to 5-FU. *Anticancer Res* 30: 1157-1162.
 64. Karasawa H, Miura K, Fujibuchi W, Ishida K, Kaneko N, Kinouchi M, Okabe M, Ando T, Murata Y, Sasaki H, Takami K, Yamamura A, Shibata C, Sasaki I (2009). Down-regulation of cIAP2 enhances 5-FU sensitivity through the apoptotic pathway in human colon cancer cells. *Cancer Sci* 100: 903-913.
 65. Inaba M, Naoe Y, Mitsuhashi J (1998). Mechanisms for 5-fluorouracil resistance in human colon cancer DLD-1 cells. *Biol Pharm Bull* 21: 569-573.
 66. Russo A, Longo R, Vanella A (2002). Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia* 73 Suppl 1: S21-29.
 67. Natarajan K, Singh S, Burke TR, Jr., Grunberger D, Aggarwal BB (1996). Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 9090-9095.
 68. Fesen MR, Pommier Y, Leteurtre F, Hiroguchi S, Yung J, Kohn KW (1994). Inhibition of HIV-1 integrase by flavones, caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and related compounds. *Biochem Pharmacol* 48: 595-608.
 69. Murtaza G, Karim S, Akram MR, Khan SA, Azhar S, Mumtaz A, Bin Asad MH (2014). Caffeic acid phenethyl ester and therapeutic potentials. *Biomed Res Int* 2014: 145342.
 70. Chen MF, Wu CT, Chen YJ, Keng PC, Chen WC (2004). Cell killing and radiosensitization by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in lung cancer cells. *J Radiat Res* 45: 253-260.

71. Lee YT, Don MJ, Hung PS, Shen YC, Lo YS, Chang KW, Chen CF, Ho LK (2005). Cytotoxicity of phenolic acid phenethyl esters on oral cancer cells. *Cancer Lett* 223: 19-25.
72. Avcı ÇB, Gündüz C, Baran Y, Şahin F, Yılmaz S, Dogan ZO, Saydam G (2011). Caffeic acid phenethyl ester triggers apoptosis through induction of loss of mitochondrial membrane potential in CCRF-CEM cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 137: 41-47.
73. Chen MJ, Chang WH, Lin CC, Liu CY, Wang TE, Chu CH, Shih SC, Chen YJ (2008). Caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis of human pancreatic cancer cells involving caspase and mitochondrial dysfunction. *Pancreatology* 8: 566-576.
74. Cavaliere V, Papademetrio DL, Lombardo T, Costantino SN, Blanco GA, Alvarez EM (2014). Caffeic acid phenylethyl ester and MG132, two novel nonconventional chemotherapeutic agents, induce apoptosis of human leukemic cells by disrupting mitochondrial function. *Target Oncol* 9: 25-42.
75. Lee YY, Kao CL, Tsai PH, Tsai TH, Chiou SH, Wu WF, Ku HH, Wong TT (2008). Caffeic acid phenethyl ester preferentially enhanced radiosensitizing and increased oxidative stress in medulloblastoma cell line. *Childs Nerv Syst* 24: 987-994.
76. Su ZZ, Lin J, Prewett M, Goldstein NI, Fisher PB (1995). Apoptosis mediates the selective toxicity of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) toward oncogene-transformed rat embryo fibroblast cells. *Anticancer Res* 15: 1841-1848.
77. Nissen E, Pauli G, Vollenbroich D (1997). WST-1 assay--a simple colorimetric method for virus titration. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 33: 28-29.
78. Hérault O, Colombat P, Domenech J, Degenne M, Bremond J-L, Sensebe LUC, Bernard M-C, Binet C (1999). A rapid single-laser flow cytometric method for discrimination of early apoptotic cells in a heterogeneous cell population. *British Journal of Haematology* 104: 530-537.
79. Boatright KM, Salvesen GS (2003). Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 15: 725-731.
80. Belloc F, Belaud-Rotureau MA, Lavignolle V, Bascans E, Braz-Pereira E, Durrieu F, Lacombe F (2000). Flow cytometry detection of caspase 3 activation in preapoptotic leukemic cells. *Cytometry* 40: 151-160.

81. Ribble D, Goldstein NB, Norris DA, Shellman YG (2005). A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. *BMC Biotechnol* 5: 12.
82. Kurien BT, Scofield RH (2006). Western blotting. *Methods* 38: 283-293.
83. Bustin SA, Mueller R (2005). Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin Sci (Lond)* 109: 365-379.
84. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn* 5: 209-219.
85. Kim HW, Lee HM, Hwang SH, Ahn SG, Lee KA, Jeong J (2014). Patterns and Biologic Features of p53 Mutation Types in Korean Breast Cancer Patients. *J Breast Cancer* 17: 1-7.
86. Skaug V, Ryberg D, Kure EH, Arab MO, Stangeland L, Myking AO, Haugen A (2000). p53 mutations in defined structural and functional domains are related to poor clinical outcome in non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 6: 1031-1037.
87. Wang D, Xiang DB, He YJ, Li ZP, Wu XH, Mou JH, Xiao HL, Zhang QH (2005). Effect of caffeic acid phenethyl ester on proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells in vitro. *World J Gastroenterol* 11: 4008-4012.
88. Xiang D, Wang D, He Y, Xie J, Zhong Z, Li Z, Xie J (2006). Caffeic acid phenethyl ester induces growth arrest and apoptosis of colon cancer cells via the beta-catenin/T-cell factor signaling. *Anticancer Drugs* 17: 753-762.
89. Cavaliere V, Papademetrio DL, Lorenzetti M, Valva P, Preciado MV, Gargallo P, Larripa I, Monreal MB, Pardo ML, Hajos SE, Blanco GA, Alvarez EM (2009). Caffeic Acid Phenylethyl Ester and MG-132 Have Apoptotic and Antiproliferative Effects on Leukemic Cells But Not on Normal Mononuclear Cells. *Transl Oncol* 2: 46-58.
90. Motawi TK, Abdelazim SA, Darwish HA, Elbaz EM, Shouman SA (2016). Modulation of Tamoxifen Cytotoxicity by Caffeic Acid Phenethyl Ester in MCF-7 Breast Cancer Cells. *Oxid Med Cell Longev* 2016: 3017108.
91. Jin UH, Song KH, Motomura M, Suzuki I, Gu YH, Kang YJ, Moon TC, Kim CH (2008). Caffeic acid phenethyl ester induces mitochondria-mediated apoptosis in human myeloid leukemia U937 cells. *Mol Cell Biochem* 310: 43-48.
92. Hung MW, Shiao MS, Tsai LC, Chang GG, Chang TC (2003). Apoptotic effect of

- caffeic acid phenethyl ester and its ester and amide analogues in human cervical cancer ME180 cells. *Anticancer Res* 23: 4773-4780.
93. Wang T, Chen LX, Long Y, Wu WM, Wang R (2008). DNA damage induced by caffeic acid phenyl ester in the presence of Cu(II) ions: potential mechanism of its anticancer properties. *Cancer Lett* 263: 77-88.
 94. Reichert S, Rodel C, Mirsch J, Harter PN, Tomicic MT, Mittelbronn M, Kaina B, Rodel F (2011). Survivin inhibition and DNA double-strand break repair: a molecular mechanism to overcome radioresistance in glioblastoma. *Radiother Oncol* 101: 51-58.
 95. Neradil J, Veselska R, Slanina J (2003). UVC-protective effect of caffeic acid on normal and transformed human skin cells in vitro. *Folia Biol (Praha)* 49: 197-202.
 96. Li Y, Chen LJ, Jiang F, Yang Y, Wang XX, Zhang Z, Li Z, Li L (2015). Caffeic acid improves cell viability and protects against DNA damage: involvement of reactive oxygen species and extracellular signal-regulated kinase. *Braz J Med Biol Res* 48: 502-508.
 97. McNeish IA, Lopes R, Bell SJ, McKay TR, Fernandez M, Lockley M, Wheatley SP, Lemoine NR (2005). Survivin interacts with Smac/DIABLO in ovarian carcinoma cells but is redundant in Smac-mediated apoptosis. *Experimental Cell Research* 302: 69-82.
 98. Niu TK, Cheng Y, Ren X, Yang JM (2010). Interaction of Beclin 1 with survivin regulates sensitivity of human glioma cells to TRAIL-induced apoptosis. *FEBS Lett* 584: 3519-3524.
 99. Shi Z, Liang YJ, Chen ZS, Wang XH, Ding Y, Chen LM, Fu LW (2007). Overexpression of Survivin and XIAP in MDR cancer cells unrelated to P-glycoprotein. *Oncol Rep* 17: 969-976.
 100. He L, Zhao F, Zheng Y, Wan Y, Song J (2016). Loss of interactions between p53 and survivin gene in mesenchymal stem cells after spontaneous transformation in vitro. *Int J Biochem Cell Biol* 75: 74-84.

10. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, Adı : SARI, Ceren
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 04/05/1989, Kars
Medeni hali : Bekar
Telefon : 0462 377 7957
E-Posta : cerensari@ktu.edu.tr
Yazışma adresi : KTÜ SABE Tıbbi Biyoloji AD 61080 TRABZON

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	: KTÜ SABE Tıbbi Biyoloji AD	2016
Lisans	: Fatih Üniversitesi	2006
Lise	: Özel Gülbaharhatun Lisesi	2002

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre (Yıl)
1. Araştırma görevlisi	KTÜ SABE Tıbbi Biyoloji AD	2015-

YABANCI DİL

İngilizce (YDS: 72.5)