

PROTEOZOM İNHİBİSYONUN 4T1 MEME VE  
B16F10 MELANOMA HÜCRELERİNDEKİ  
APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Emrah OKUR

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Aralık - 2010



PROTEOZOM İNHİBİSYONUN 4T1 MEME VE B16F10 MELANOMA  
HÜCRELERİNDEKİ APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Emrah OKUR

Dumlupınar Üniversitesi  
Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliği Uyarınca  
Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman : Doç. Dr. Azmi YERLİKAYA

Aralık - 2010

**KABUL VE ONAY SAYFASI**

Emrah OKUR'un YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "PROTEOZOM İNHİBİSYONUN 4T1 MEME VE B16F10 MELANOMA HÜCRELERİNDEKİ APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI" başlıklı bu çalışma, jürimizce Dumlupınar Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

16 / 12 / 2010

(Sınav Tarihi)

Üye : Doç. Dr. Azmi YERLİKAYA

Üye : Doç. Dr. Metin BÜLBÜL

Üye : Yrd. Doç. Dr. Mustafa YÖNTEM

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ..... / ..... / ..... gün ve ..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Atalay KÜÇÜKBURSA  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## PROTEOZOM İNHİBİSYONUNUN 4T1 MEME VE B16F10 MELANOMA HÜCRELERİNDEKİ APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Emrah OKUR

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 2010

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Azmi YERLİKAYA

### ÖZET

Son zamanlarda anti-kanser çalışmalarında proteozom inhibisyonuna olan ilgi artmıştır. Proteozom inhibisyonunun bazı hücrel fonksiyonları etkilediği ve apoptozisi başlatabileceği ortaya çıkmıştır. Bu tez çalışmasında; proteozom inhibisyonunun 4T1 meme kanseri ve B16F10 melanoma hücreleri üzerinde meydana getirdiği apoptotik etkiler araştırılmıştır. Çalışmamızda, 48 saat süreyle farklı bortezomib konsantrasyonları (10 nM, 100 nM, 500 nM, 1 µM) ile muamele edilen B16F10 hücreleri; apoptoziste sıklıkla görülen hücrelerin petri kabının dibinden kalkması, küreselleşme, küçülüp büzülme, komşu hücrelerden ayrılma ve üzerine düşen ışığı daha çok yansıtma gibi morfolojik değişimlere uğramışlardır. Ayrıca, apoptozisin önemli belirteçlerinden olan DNA fragmentasyonu da gözlenmiştir. 4T1 hücrelerinde B16F10 hücrelerine göre daha yüksek konsantrasyonlarda (100 nM, 500 nM, 1 µM) apoptotik değişimler gözlenmiştir. Yine çalışmamızda; 48 saat süre ile 0.5 µM MG132 ile muamele edilen B16F10 hücrelerinde apoptotik değişimler benzer şekilde meydana gelirken, 0.5 µM MG132 ile 48 saat muamele edilen 4T1 hücrelerinde çok fazla değişim gözlenmemiştir. Ayrıca, 10 µM bortezomib ve 6 saat süreyle muamele edilen B16F10 ve 4T1 hücrelerinde Western blot yöntemiyle p53 proteini miktarı incelendiğinde; yalnız B16F10 hücrelerinde p53 artışı gözlenirken, 4T1 hücrelerinde artış görülmemiştir. Bu sonuçlar; B16F10 hücrelerinin 4T1 hücrelerine göre, proteozom inhibitörlerine karşı daha hassas olduklarını ve bu hassasiyette p53 proteininin önemli rol aldığını göstermektedir. Daha sonra yapılan deneylerde, hem 4T1 hem de B16F10 hücrelerinde kaspaz-3 enzim aktivitesinde önemli artış gözlenmiştir; fakat, bu sonuç Western blot analizleriyle doğrulanamamıştır. Western blot deneyleri proteozom inhibisyonu sonucu kaspaz 3'ün aktive olmadığını göstermiştir. Bu sonuçlar, aktivite deneylerinde görülen kaspaz-3 aktivitesindeki artışın muhtemelen diğer kaspazlardan (örneğin, kaspaz-7) kaynaklanma ihtimali olduğunu göstermektedir. Ayrıca, Western blot analizleri bortezomib ile muamele edilen 4T1 ve B16F10 hücrelerinde ubiquitin-protein konjugatları miktarının arttığını göstermiştir. Elde edilen sonuçlar; proteozom inhibisyonunun apoptozisin uyarılmasında etkili olduğunu ve kanser tedavisinde alternatif olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler :** 4T1, B16F10, bortezomib, MG132, p53, proteozom inhibisyonu, apoptozis

## **AN INVESTIGATION OF THE APOPTOTIC EFFECTS OF PROTEASOME INHIBITION IN 4T1 BREAST AND B16F10 MELANOMA CELLS**

Emrah OKUR

Department of Biology, M.S.Thesis, 2010

Thesis Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Azmi YERLİKAYA

### **SUMMARY**

It has been revealed that proteasome inhibition affects several cellular functions and induces apoptosis. In this thesis study, the apoptotic effects of proteasome inhibition on 4T1 breast cancer and B16F10 melanoma cells has been investigated. In our study, B16F10 cells treated with different bortezomib concentrations (10 nM, 100 nM, 500 nM, 1  $\mu$ M) for 48 hours have showed morphological changes such as detaching from petri dish, rounding, shrinkage, separating from adjacent cells and reflecting more light, which are commonly observed in apoptotic cells. In addition, DNA fragmentation, an important indicator of apoptosis, was observed. In 4T1 cells, apoptotic changes were observed with higher concentrations (100 nM, 500 nM, 1  $\mu$ M) as compared to B16F10 cells. Furthermore, while apoptotic changes were similarly observed in B16F10 cells treated with 0.5  $\mu$ M MG132 for 48 h, no significant changes were observed in 4T1 cells treated with 0.5  $\mu$ M MG132 for 48 h. Also, when p53 protein level was investigated with Western blot in 10  $\mu$ M bortezomib treated B16F10 and 4T1 cells for 6 h, an increase in p53 was observed only in B16F10 cells, but not in 4T1 cells. These results show that B16F10 cells are more sensitive to the proteasome inhibition as compared to 4T1 cells, and in this sensitivity p53 protein plays a significant role. In follow-up experiments, a significant increase in caspase-3 enzyme activity observed in both 4T1 and B16F10 cells; however, this result was not confirmed by Western blot analyzes. Western blot experiments did not show an increase caspase-3 activity in response to proteasome inhibitor. These results show that the increase in caspase-3 activity observed in the activity experiments may thus result from other caspases (e.g., caspase-7). In addition, Western blot analyzes showed that ubiquitin-protein conjugates are increased in bortezomib-treated 4T1 and B16F10 cells. The results obtained indicated that proteasome inhibition is effective in triggering apoptosis and may be used as an alternative in the cancer therapy.

**Keywords :** 4T1, B16F10, bortezomib, MG132, p53, proteasome inhibition, apoptosis

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisansa başladığım ilk günden beri gerek ders döneminde gerekse tez çalışmasının seçilmesinde, yürütülmesinde, sonuçlandırılmasında ve değerlendirilmesinde maddi-manevi hiçbir desteğini, yardımını ve bilgisini esirgemeyen danışman hocam sayın Doç. Dr. Azmi YERLİKAYA'ya teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca yetişmemde ve bugünlere gelmemde emeği olan bütün hocalarıma teşekkür ederim.

Hayatım boyunca benden hiçbir desteklerini esirgemeyen, her zaman yanımda olduklarını hissettiğim, bana mutlu ve huzurlu bir aile ortamı sunan babama, anneme, abilerime ve ablama teşekkürü bir borç bilirim.

Bu tez çalışması; 109S035 numaralı Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) projesi tarafından desteklenmiştir.

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET .....	iv
SUMMARY .....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. KANSER .....	3
2.1. Kanserın Moleküler Temelleri .....	5
2.1.1. Onkogenler .....	5
2.1.2. Tümör baskılayıcı genler .....	6
2.2. Kanser Çalışmalarında Hücre Kültürünün Önemi .....	6
3. PROTEİN YIKIMI .....	7
3.1. Serin Proteazlar .....	9
3.2. Lizozomal Yıkım .....	9
3.3. Kaspazlar .....	10
3.3.1. Kaspaz aktivasyonu .....	11
3.3.2. Kaspazların substratları .....	11
3.4. Meprinler .....	12
3.5. Ubiquitin- Proteozom Yolu .....	12
3.5.1. Ubiquitin konujuge edici sistem .....	13
3.5.2. 26S proteozom .....	14
3.5.3. Ubiquitin-proteozom yolunun mekanizması .....	15
3.5.4. Proteozomun hücreselel aktivitelere .....	17
3.5.5. Proteozom inhibitörleri .....	17
4. APOPTOZİS (PROGRAMLANMIŞ HÜCRE ÖLÜMÜ) .....	23
4.1. Apoptotik Hücrenin Karakteristik Özellikleri .....	25
4.2. Apoptozisin İndüklenmesi .....	27
4.3. Apoptoziste Mitokondrinin Rolü .....	27



## İÇİNDEKİLER (devam)

	<b>Sayfa</b>
4.4. Apoptozisin Düzenlenmesinde Görev Alan Genler .....	28
4.4.1. Bcl-2 ailesi .....	28
4.5. Nükleer Etkiler .....	29
4.6. Apoptozis Görülen Doku ve Hücreler .....	30
4.7. Çok Hücreli Canlıların Gelişimi Esnasında Apoptozis Görülmesi .....	31
4.8. Apoptoziste p53 Proteininin Rolü .....	32
5. PROTEOZOM VE KANSER İLİŞKİSİ .....	33
6. MATERYAL VE METOD .....	34
6.1. Materyal .....	34
6.2. Besiyeri Hazırlanışı .....	34
6.3. Hücre Kültürleri .....	34
6.4. Hücre Ekimi .....	35
6.5. DNA Fragmentasyon Analizi .....	35
6.6. Hücre Lizisi .....	37
6.7. Protein Tayini .....	37
6.8. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) .....	37
6.9. Western Blot Yöntemi .....	39
6.10. Komasi Mavisi ile Jel Boyama İşlemi .....	39
6.11. Stripping Muamelesi .....	39
6.12. Kaspaz Aktivitesi Deneyi .....	41
6.13. Kullanılan Solüsyonlar .....	41
6.14. Kullanılan Cihazlar .....	43
7. SONUÇLAR .....	45
8. TARTIŞMA .....	64
KAYNAKLAR DİZİNİ .....	68

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b><u>Sekil</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
3.1. Ubiquitinasyon ve ubiquitinin görevleri .....	13
3.2. Protein yıkımında görev alan 26S proteozomun yapısı .....	14
3.3. <i>Thermoplasma acidophilum</i> 'da ve ökaryotlarda 20S proteozom yapısı .....	15
3.4. Ubiquitin-proteozom yolunun mekanizması .....	16
3.5. Dipeptidil boronik asit analogu olan proteozom inhibitörü bortezomibin kimyasal yapısı .....	20
3.6. Proteozom inhibitörü MG132'nin kimyasal yapısı .....	21
3.7. Hsp70 inhibitörü quercetin'in kimyasal yapısı .....	21
3.8. Lizozomal inhibitör leupeptin'in kimyasal yapısı .....	22
4.1. Apoptotik hücrede küçük keseciklerin görülmesi .....	25
4.2. İnsan trofoblast hücrelerinde görülen değişimler .....	26
6.1. DNA fragmentasyon analizi .....	36
6.2. Western blot metodu ile protein analizi .....	40
7.1. Proteozom inhibitörü bortezomibin B16F10 hücrelerinde DNA fragmentasyonuna etkileri .....	45
7.2. B16F10 hücrelerinden izole edilen DNA'nın Proteinaz-K ve RNase-A ile muamele edildikten sonra görüntülenmesi .....	46
7.3. B16F10 hücrelerinde 48 saat süre ile uygulanan proteozom inhibitörü bortezomibin farklı konsantrasyonlarının DNA fragmentasyonuna etkileri .....	47
7.4. 48 saat süre ile bortezomibin farklı konsantrasyonları ile muamele edilmiş B16F10 hücrelerinin morfolojileri .....	48
7.5. B16F10 hücrelerinde bortezomibin farklı konsantrasyonlarının DNA fragmentasyonu üzerine etkilerinin Roche Apoptotik DNA Ladder Kit kullanılarak görüntülenmesi .....	49
7.6. B16F10 hücrelerinin farklı inhibitörlerle 48 saat muamele edildikten sonraki morfolojileri .....	50
7.7. B16F10 hücrelerinde farklı inhibitörlerin DNA fragmentasyonuna etkileri .....	51
7.8. B16F10, 4T1 ve 4THMpc hücrelerinin farklı proteozom inhibitörleriyle 48 saat muamelesi sonrası morfolojileri .....	52
7.9. B16F10, 4T1 ve 4THMpc hücrelerinde proteozom inhibitörlerinin DNA fragmentasyonuna etkileri .....	53
7.10. 4T1 ve 4THMpc hücrelerinin farklı bortezomib konsantrasyonları ile 48 saat muamele edildikten sonraki morfolojileri .....	54
7.11. Bortezomibin farklı konsantrasyonlarının 4T1 ve 4THMpc hücreleri üzerindeki etkileri .....	55

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<b><u>Sekil</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
7.12. B16F10, 4T1 ve 4THMpc hücre tiplerinde p53 ve $\beta$ -actin miktarının belirlenmesi .....	56
7.13. B16F10, 4T1 ve 4THMpc hücrelerinde 48 saat süreyle uygulanan 10 nM ve 1 $\mu$ M bortezomib konsantrasyonlarının kaspaz-3 proenzim kırılmasına etkileri .....	58
7.14. B16F10, 4T1 ve 4THMpc hücrelerinde 48 saat süreyle uygulanan 1 $\mu$ M bortezomib kaspaz-3 proenzim kırılmasına etkisi .....	59
7.15. B16F10, 4T1 ve 4THMpc hücrelerinde 48 saat süreyle uygulanan 1 $\mu$ M bortezomib $\beta$ -actin miktarına etkisi .....	60
7.16. 6 saat süreli 10 $\mu$ M bortezomib muamelesinin B16F10, 4T1 ve 4THMpc hücrelerine etkileri .....	61
7.17. Proteozom inhibitörü bortezomib ile 24 saat süreyle muamele edilen B16F10, 4T1 ve 4THMpc morfolojileri .....	62
7.18. 10 nM ve 100 nM bortezomib ile 24 saat muamele edilen B16F10, 4T1 ve 4THMpc hücrelerinde kaspaz-3 proenzim kırılması .....	62
7.19. B16F10, 4T1 ve 4THMpc hücrelerinde 24 saat süreli 10 nM ve 100 nM bortezomib muamelesinin ubiquitin-protein konjugatları miktarına etkileri .....	63
8.1. Bortezomib ve quercetin arasında boronat ester bağı oluşumu .....	65

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b><u>Çizelge</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
3.1. Protein yıkımında görev alan proteazlar .....	9
3.2. Proteozom inhibitörlerinin in vitro koşullarda geniş spektrumlu anti-kanser aktivite gösterdiği kanser türleri .....	18
3.3. Proteozom inhibitörlerinin olası anti-tümör mekanizmaları .....	19
3.4. Proteozom inhibisyonuna karşı oto-düzenleyici mekanizmalar .....	19
4.1. İnsan hastalıklarında apoptozisin rolü .....	24
4.2. Apoptozisin düzenlenmesinde görev alan genler .....	28
4.3. Apoptozisin düzenlenmesinde görev alan Bcl-2 ailesi proteinleri .....	29
4.4. p53'ün apoptozis sırasındaki hedef genleri .....	32
6.1. Bio-Rad Protein Assay metodunda kullanılan numunelerinin hazırlanışı .....	37
6.2. Ayırıştırma jeli (seperating gel) hazırlanışı .....	38
6.3. Yığıma jeli (stacking gel, %3,75) hazırlanışı .....	38
6.4. Kaspaz-3 aktivite deneyinde kullanılacak örneklerin hazırlanması .....	42
7.1. B16F10, 4T1 ve 4THMpc hücrelerinde 48 saat süreyle uygulanan farklı konsantrasyonlardaki bortezomibin kaspaz-3 aktivitesine etkileri .....	58
7.2. 10 nM ve 1 µM bortezomib ile 48 saat muamele edilen B16F10, 4T1 ve 4THMpc hücrelerinin protein miktarları .....	60

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

kDa	Kilo dalton
p21	21 kDa moleküler ağırlığa sahip siklin bağımlı kinaz inhibitörü
p27	27 kDa moleküler ağırlığa sahip siklin bağımlı kinaz inhibitörü
p53	53 kDa moleküler ağırlığa sahip tümör baskılayıcı protein
ICE	İnterleukin-1- $\beta$ -dönüştürücü enzim
Hsp70	Isı şoku proteini 70
Hsp73	Isı şoku proteini 73
PEST	Prolin, glutamik asit, serin ve treonin amino asitleri içeren sekans
NF- $\kappa$ B	Nükleer faktör kappa B
I $\kappa$ B	NF- $\kappa$ B inhibitörü
Ub	Ubiquitin
E1	Ubiquitin aktive edici enzim
E2	Ubiquitin konjuge edici enzim
E3	Ubiquitin ligaz enzimi
DNaz	Doksiribonükleaz
NO	Nitrik oksit
dH <sub>2</sub> O	Distile su
EtBr	Etidyum bromür

### Kısaltmalar

ODC	Ornitin dekarboksilaz
SAMDC	S-adenozilmetiyonin dekarboksilaz
M6P	Mannoz 6 fosfat
PARP	Poly (ADP-riboz) polimeraz
CAD	Kaspazla aktive olan DNaz
ICAD	CAD inhibitörü
cGMP	Halkasal guanozin monofosfat
AIF	Apoptosis indükleyici faktör
FBS	Fetal bovin serum
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
UV	Ultraviyole

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ubiquitin-proteozom sistemi tarafından gerçekleştirilen koordineli intraselüler protein yıkımı, hücre işlemlerin büyük bir kısmının düzenli ilerlemesi için çok önemlidir. Ubiquitin-proteozom yolunun substratları arasında siklinler ve p53 gibi hücre düzenleyici proteinlerin bazıları bulunmaktadır ve bu moleküllerin yıkımının düzenlenmesiyle hücre döngüsünün ilerlemesi ve hücre proliferasyonunun kontrolü arasında bağ kurulmuştur. Bu tür proteinlerin, hücre içi seviyelerinin kontrolüyle, ubiquitin-proteozom yolunun aktivitesi apoptozisle ilişkilendirilebilir. Proteozom inhibitörleri, hücre döngüsünü engelleyerek normal hücrelerin ve kanser hücrelerinin apoptozisini teşvik eder. Apoptozis işlemi ya da diğer adıyla programlanmış hücre ölümü, hem bireysel hücrelerin kaderinde, hem de multiselüler organizmaların normal fonksiyonlarında önemlidir. Apoptozisin uygulanmasının, interleukin-1- $\beta$ -dönüştürücü enzim (ICE) ile ilgili proteazların bir ailesi olan kaspazların aktivitesiyle çoğu zaman yakından ilgili olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, son zamanlarda ubiquitin-proteozom yolunun; apoptoziste etkili olduğu, proteozom tarafından bazı hücre yollarının etkilendiği ve apoptozise yol açıp parçalanmayı başlatabileceği ortaya çıkmıştır [1- 3].

Proteozom inhibitörleri kullanılarak, ubiquitin-proteozom yolunun hedeflenmesi, kanser tedavisi için yeni bir yaklaşım gösterebilir. Proteozom inhibitörleri, spesifik olarak çoğalabilen tümör hücreleri üzerinde apoptozisi daha güçlü uyarmaktadır. Ayrıca, kanser tedavisinde kullanılan diğer yöntemlere göre genellikle kendini kısıtlayan ve daha hafif yan etkileri olan bir yöntemdir. Bu yüzden son zamanlarda diğer anti-kanser ilaçlara göre proteozom inhibitörlerine olan ilgi artmıştır. Klinik olarak proteozom inhibitörleri, multiple miyeloma, non-Hodkin's lenfoma, manto hücreli lenfoma, küçük hücreli olmayan akciğer karsinoması ve prostat kanseri tedavisinde olumlu sonuçlar vermiştir ve birçok kanser ilacına karşı oluşan direnç kırılmıştır. Ancak, metastatik melanoma, kalın bağırsak kanseri (kolorektal kanser) ve kronik lenfositik lösemide beklenen sonuçlar elde edilememiştir [4- 6]. Bu yüzden, ubiquitin-proteozom yolu ve apoptozis mekanizmalarının kanser türleri üzerindeki etkileri üzerine daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

Proapoptotik bir protein olan p53'ün stabilizasyonu, bir çok hücre kültürü modelinde apoptozise neden olmaktadır. Proteozom inhibitörleri ile muamele edilen Rat-1 ve PC12 hücrelerinde tümör baskılayıcı p53 proteininin hızlı bir şekilde biriktiği görülmüştür [7].

Bu tezde, bazı proteozom inhibitörlerinin (bortezomib, MG132); 4T1 meme ve B16F10 melanoma kanser hücreleri üzerindeki proapoptotik ve sitotoksik etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir. Ayrıca proteozom inhibitörlerinin haricinde Hsp70 inhibitörü quercetin ve

lizozomal inhibitör leupeptin kullanılarak ve 4T1 ile B16F10 hücrelerinin yanında 4THMpc hücreleri kullanılarak karşılaştırma yapılmıştır. İnhibitörlerle muamele edilen hücrelerde kaspaz-3 aktivitesinde değişiklik meydana gelip gelmediği belirlenmiştir. Ayrıca, proteozom inhibitörleriyle muamele edilmiş hücrelerden izole edilen proteinlere belirli antikorlar uygulanıp; kaspaz-3, p53 ve ubiquitin-protein konjugatlarının birikip-birikmediği Western blot tekniği ile araştırılmıştır.

## 2. KANSER

Kanser; vücutta oluşan malign (kötü huylu) tümörleri tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Çok hücreli organizmalarda her hücrenin çoğalması, farklılaşması ve sağ kalımı, organizmanın genel gereksinimleri doğrultusunda düzenlenir. Kanser hücrelerinde bu olayları düzenleyen mekanizmalar ortadan kalkar, hücreler kontrolsüz biçimde bölünerek çoğalmaya başlar ve tümör sonunda vücudun diğer bölgelerine yayılarak normal doku ve organların işlevini etkiler. Kanser, hücrenin temel düzenleyici mekanizmalarındaki kusurlardan kaynaklandığı için, özellikle moleküler ve hücresel düzeyde incelenmesi gereken bir hastalıktır. Patoloji uzmanları ve kanser çalışmaları yapan biyologlar malignant neoplazmaların ya da kanserlerin, anormal durumlarını birkaç ayırt edici özellik ile açıklamaktadırlar. Bunların en belirgin özellikleri epitel kökenli olmalarıdır. Yani vücudun iç ve dış yüzeyini saran hücrelerden köken almalarıdır. Bu hücrelere destek olan kan damarları ve bağ dokusu vardır. Malignant neoplazmalar büyüme ve gelişmenin ilk safhalarında normal dokuya benzemektedir. Neoplastik hücreler vücutta herhangi bir gelişme gösterebilen dokularda gelişebilirler. Hızlı veya yavaş büyüyebilmelerine rağmen, büyüme hızları çoğunlukla etrafındaki normal dokuların hızını geçebilmektedir.

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

Kanserin varlığını doğrulayan sitolojik kriterler:

- 1) Kanserli hücrelerin morfolojileri diğer normal hücrelerinkinden farklılık ve değişiklik göstermektedir. Bu hücreler, kendi aralarında da farklılık göstermektedirler. Şekil ve ebat olarak da farklılık gösterirler.
- 2) Kanserli hücrelerin normal hücrelere göre, çekirdekleri büyüktür ve kromatinleri oldukça görünürdür (hiperkromatik). Çekirdek/sitoplazma oranı yüksektir ve çekirdekleri çok belirgin bir çekirdekçiğe sahiptir.
- 3) Mitoz bölünme geçiren kanser hücre popülasyonları, normal hücrelerinkinden daha fazladır. Kanserli hücrelerde 1000 hücrede 20 veya daha fazla mitotik hücre görülürken, bu sayı normal hücrelerde 1'den daha azdır.



- 4) Anormal mitozlar, büyük hücreler, şekli ve ebatı değişiklik gösteren hücreler (pleomorfik) ve çok çekirdekli hücreler malignant hücrelerde normal hücrelere göre daha sık görülmektedir.
- 5) Kanser hücreleri ölümsüzdür (immortal). Yani uygun şartlarda sonsuza dek bölünebilme özelliğine sahiptir. Normal hücrelerdeki gereksiz çoğalmayı önleyen inhibisyon mekanizması kanser hücrelerinde bozulmuştur.
- 6) Malignant tümör hücrelerinde, anormal kromozom düzenlenmeleri görülmektedir. Örnek olarak *Philadelphia Kromozomu* verilebilir. Bu kromozom, 22. kromozomun bir parçasının 9. kromozoma taşınması sonucu ortaya çıkar. Bu durum kronik miyelositik lösemi hastalarında sıklıkla görülmektedir.
- 7) Malignant tümörlerin normal hücrelerden bir diğer farkı kontakt inhibisyonun çalışmamasıdır. Normal hücreler bir petri kabına konulduğunda, hücreler birbirine temas ettiğinde çoğalma durmaktadır. Malignantlarda ise çoğalma devam etmektedir.
- 8) Normalde petri kabında bir hücre üretilirken serum ilave etmek gerekir. Malignant tümörler çok düşük serum konsantrasyonlarında çoğalabilirler. Normal bir hücre böyle bir durumda %10 serum ihtiyacı duyar. Bu konsantrasyon %10'dan %1'e düştüğünde hücre büyümesi azalır. Ancak malignant tümörler konsantrasyon %1'e düşürülse bile çoğalmaya devam ederler.
- 9) Normal hücreler buldukları yere yapışarak çoğalırlar. Kanserli hücreler ise serbest bir şekilde çoğalır ve bu şekilde daha çok metastaz yapabilir.
- 10) Kanserli hücrelerde glikolizis artmaktadır. Kanserleşen hücrenin metabolizması değişmiştir. Genellikle şeker alımını artmış ve anaerobik solunum oranı yükselmiştir. Aerobik solunum arttığından dolayı laktik asit üretimi artmış, oksijen tüketimi ise azalmıştır. Kanser hücrelerinin önemli bir özelliği de oksijenli ortamda bile anaerobik solunum yapabilmeleridir.
- 11) Kanser hücrelerinde glukoneogenez artmıştır. Glukoneogenezde harcanan enerji glikolizdeki enerji üretiminden fazla olduğundan dolayı kanser hücresi normal hücrelerin ürettiği enerjiyi de kullanmak durumundadır.
- 12) Kanserleşen hücrenin antijenik özellikleri değişir.
- 13) Kanserleşen hücrelerin enzimlerinde miktar ve fonksiyon bakımından değişiklikler oluşur.

Tümörler, bir değişiklik nedeniyle anormal çoğalmaya başlayan bir tek hücreden gelişir. Gerçekleşen yeni mutasyonlar giderek daha hızlı çoğalma, invazyon, sağ kalım ve metastaz yeteneğine sahip hücrelerin ortaya çıkmasına olanak verir. Radyasyon ve birçok kimyasal karsinojen DNA hasarı yaratarak, mutasyonlara neden olurlar. Bazı başka karsinojenler ise hücre çoğalmasını uyararak, kanser gelişimine katkıda bulunur. Belirli DNA virüsleri ve retrovirüsler (RNA genomuna sahip virüsler) neoplaziye (tümör büyümesi) neden olabilmektedir. DNA virüsleri konak genomuna DNA'yı doğrudan yerleştirirler. Retrovirüsler ise viral RNA'nın DNA kopyasını üreten reverse transkriptaz enzimine sahiptirler. DNA kopyası daha sonra konak genomuna yerleştirilir.

Kanserlerin büyük çoğunluğu karsinoma (epitel dokusundan kaynaklanan malign tümörler), sarkoma (bağ dokusu hücrelerinden kaynaklanan malign tümörler), lösemi veya lenfoma gruplarından birine girer. Karsinoma; epitel hücrelerinin habisleşmesinden kaynaklanan ve insan kanserlerinin yaklaşık %90'ını içeren kanser grubudur. Sarkoma, nadir olarak görülür ve kas, kemik, iskelet ve lif dokuları gibi bağ dokularında görülen kanser türüdür. Lösemi ve lenfoma, kan yapan hücrelerden ve bağışıklık sistemi hücrelerinden kaynaklanır ve insan kanser vakalarının yaklaşık %8'ini oluşturur. Melanoma, lenfoma, timoma gibi bazı malignant tümörler benign tümörler gibi "oma" son eki alabilir. Bu gibi durumlarda sözcüğün önüne malignant ifadesi getirilir. Tümörler, ayrıca temeldeki doku (örneğin; akciğer ve göğüs karsinomaları) ve tümörü içeren hücrelere göre de sınıflandırılır. Örneğin; fibrosarkomlar fibroblastlardan ve eritroid lösemi de eritrositlerin öncül hücrelerinden kaynaklanır [8, 10- 15].

## **2.1. Kanserın Moleküler Temelleri**

### **2.1.1. Onkogenler:**

Onkogenler, normal hücre büyümesini ve gelişmesini etkileyen genlerdir. Eğer bir onkogen, kendiliğinden gen içindeki bir mutasyon ya da eksternal kontrolün değişmesi sonucu farklılaşır ya da normalden daha fazla ifade edilmeye başlarsa, bu değişiklikler hücrede kontrolsüz büyümeye ve dolayısıyla malignansiye sebep olur. Onkogenlerin büyük bir bölümü hücre büyümesi, çoğalması ve farklılaşmasının kontrolü ile ilişkili proto-onkogen denilen normal genlerin mutasyona uğramış (aktive edilmiş) formlarıdır. Proto-onkogenlerin mutasyona uğraması, proto-onkogen ürünlerinin aşırı sentezlenmesi, promotör bölgelerindeki translokasyonlar sonucu onkogenler oluşabilmektedir. Hücre bölünmesini düzenleyen büyüme faktörleri, sinyal alınımını sağlayan hücre reseptörleri, hücre bölünmesinde görev alan transkripsiyon faktörleri, sinyal iletimini sağlayan proteinler, tirozin kinaz proteinleri (örneğin;

Src), GTP bağlayıcı proteinler (örneğin; Ras) bilinen en önemli proto-onkogen ürünleridir. Onkogenlerin sentezledikleri proteinlere ise onkoprotein adı verilmektedir [9, 10, 11].

### **2.1.2. Tümör baskılayıcı genler:**

Tümör baskılayıcı genler (örneğin; p53 ve retinoblastoma) zarar görmüş DNA'yı tamir ederek veya yaygın hücre hasarı varsa apoptozisi başlatarak tümör büyümesini baskılayan veya önleyen proteinleri kodlamaktadırlar. Tümör baskılayıcı genlerin veya protein ürünlerinin fonksiyonlarında kayıp olması kontrolsüz neoplastik hücre büyümesi ile sonuçlanabilmektedir. Tümör baskılayıcı genler; mutasyonlar (herediter ya da edinsel), normal tümör baskılayıcı gen proteinlerinin viral genlerin kodladığı proteinlere bağlanması (örneğin; HPV proteinleri), heterozigot hücrelerde normal tümör baskılayıcı gen proteininin mutant tümör baskılayıcı gen proteini ile kompleks oluşturması gibi çeşitli mekanizmalarla normal fonksiyonlarını kaybedebilirler [11].

### **2.2. Kanser Çalışmalarında Hücre Kültürünün Önemi**

Tümör hücreleri, bir hücre kültürü içerisinde aşırı bir şekilde bölünür ve çoğalırlar. Yetişkin bir hayvanın dokusundan alınan örnek, laboratuvar şartlarında kültüre alındığında çok yavaş bir gelişme gösterir. Oysa ki embriyo safhasında olan veya yeni doğmuş bir hayvandan alınan doku çok daha hızlı bir şekilde gelişme ve çoğalma eğilimindedir. Dolayısıyla genç canlı bireylerden alınıp geliştirilen hücre kültürlerine kanserojenik ajanlar, örneğin bazı kimyasal maddeler, radyasyonlar ve tümör virüsleri ilave edilerek kanser oluşumu kısa sürede gözlenebilmektedir. Genellikle kültüre alınmış ve kanser etmenleri ile muamele edilmiş olan bu hücreler ana bireye tekrar verildiğinde ilgili dokudaki komşu hücelere oranla çok aşırı bir şekilde bölünmeye başlarlar. Sonuçta canlı organizmada tümör oluşur [10].

### 3. PROTEİN YIKIMI

Bir organizmanın birçok hücrel proteini sürekli olarak yıkılmakta ve yeniden sentezlenmektedir. Proteinlerin yarı ömürleri birkaç dakika, birkaç hafta ya da daha uzun süreler arasında değişiklik göstermektedir ve protein yıkımın farklı hızları hücre regülasyonunun önemli bir kavramıdır. Transkripsiyon faktörleri gibi çabuk yıkılan çoğu protein regülatör molekül olarak işlev görür. Bu proteinlerin hızlı dönüşümü, çevreden gelen uyarılara hızlı cevap verebilmek için gereklidir. Özgül sinyallere cevap olarak çabuk yıkılan diğer proteinler ise, hücre içi enzim aktivitesinin regülasyonu için diğer bir mekanizma oluştururlar. Önemli birçok enzimatik reaksiyonda görev alan enzimler bilinen en kısa yarı ömürlere sahiptirler. Mesela, ornitin dekarboksilaz (ODC), 30 dakika; S-adenozilmetiyonin dekarboksilaz (SAMDC), 48 dakika; RNA polimeraz I, 78 dakika; tirozin aminotransferaz, 120 dakika; serin dehidrataz 240 dakika yarı ömre sahiptir. Normal şartlar altında, bazı önemli metabolik kontrol noktalarında görev alan enzimlerin yıkılarak değişen çevre şartlarına ve metabolik ihtiyaçlara göre aktivitelerinin düzenlenmesi protein yıkım mekanizmaları tarafından gerçekleştirilmektedir. Ayrıca, proteinlerin besin yetersizliği durumunda enerji ve amino asit kaynağı olmasının sağlanması ve transkripsiyonel veya translasyonel hatalardan kaynaklanan hasarlı veya işlevsiz proteinlerin uzaklaştırılması da protein yıkım mekanizmalarının işlevleri arasındadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, hücre homeostazisinin sağlanmasında protein ve RNA yıkım mekanizmalarının biyosentetik mekanizmalar kadar önemli olduğunu göstermiştir [7, 13, 16- 18].

Protein yıkımı, hücre içinde ya da dışında işlev gören proteazlar tarafından gerçekleştirilmektedir (Çizelge 3.1). Hasarlı ve anormal proteinlerin, hücre içinde birikmesini engellemek ve amino asitlerin geri dönüşümü için proteinlerin devamlı yıkılması gerekir. Çeşitli proteinlerin yarı ömürleri yarım dakika ile birkaç saat hatta birkaç yıl arasında değişmektedir. Hızlı bir şekilde yıkılan proteinler sentez esnasında yanlış amino asidin eklenmesinden dolayı hasarlı (normal üç boyutlu yapısını alamamış) olan veya normal işlevi esnasında bozulan proteinlerdir. Genellikle proteinlerin yarı ömürleri N ucunda bulunan amino asit ile bir korelasyon göstermektedir. Bu olay N-end kuralı olarak bilinmektedir. Örneğin; N-ucunda metionin, serin, alanin, treonin, valin ve glisin amino asitleri bulunan proteinlerin yarı ömürleri 20 saati aşmaktadır. Fenil alanin, lösin, aspartik asit, lizin ve arginin bulunan amino asitler ise 3 dakika veya daha az kısa ömürlü proteinlerdir. Yine yapılarında PEST sekansı (prolin, glutamik asit, serin ve treonin) içeren proteinler diğer proteinlere göre daha hızlı yıkılmaktadır. Hasarlı proteinler hem bakteriler hem de ökaryotik hücrelerde sitozolik ATP-bağımlı sistemler tarafından yıkılan kısa ömürlü proteinlerdir [7, 17, 19- 22].

Protein yarı ömrü protein moleküllerinin yarısının yıkıldığı süre olarak kabul edilir ve aşağıdaki denklem yardımıyla hesaplanır:

$$t_{1/2} = \ln 2 / k_d$$

Burada  $t_{1/2}$ , protein yarı ömrü;  $\ln$ , doğal logaritma;  $k_d$  ise yıkım hızı sabitidir.

Hücre içindeki protein/enzim düzeyleri sadece onların sentez hızı ile değil aynı zamanda yıkım hızı ile de kontrol edilir. Proteinlerin hücrelerdeki miktarları yapım ve yıkım hızlarıyla orantılıdır. Dolayısıyla, bir proteinin yıkım hızını kontrol etmek hücre ekonomisi açısından sentez hızını kontrol etmek kadar önemlidir. Sürekli hal denkleminde de görüldüğü gibi enzim/protein miktarı hem sentez hızı hem de yıkım hızı tarafından kontrol edilmektedir.

$$[P] = k_s / k_d$$

Bu denkleme göre sentez hızını 10 kat arttırdığımızda protein miktarı da 10 kat artmaktadır. Aynı şekilde protein yıkım hızını 10 kat azaltırsak protein miktarı 10 kat artacaktır [7, 13, 16, 23].

Proteinlerin yıkımında rol oynayan bir takım hücre içi sinyaller bulunmaktadır. Bilinen protein yıkım sinyalleri aşağıda verilmiştir:

- 1) Moleküler ağırlık arttıkça protein yıkım hızı artar.
- 2) Bir proteinin izoelektrik noktası düştükçe yıkım hızı artar.
- 3) Pirodoksal fosfat,  $NAD^+$  gibi koenzimlerin azalması yıkımı artırır.
- 4) Hidrofobisite arttıkça yıkım hızı artar.
- 5) Proteinlerin yüzey polaritesi (yükü) arttıkça yıkım hızı artar.
- 6) Termal stabilite azaldıkça yıkım hızı artar.
- 7) Oksidasyon tarafından inaktivasyon, yıkım için proteini işaretler.
- 8) Ubiquitin proteininin sentezi protein yıkımı için bir işaretler.
- 9) Yapısında bol miktarda PEST sekansı bulunan proteinler daha hızlı yıkılır.
- 10) Bazı yardımcı proteinler proteinleri yıkıma sevk eder. Örneğin; Antizyme proteini ornitin dekarboksilazı (ODC) yıkıma sevkeder.
- 11) Fosforilasyon miktarı arttıkça çoğunlukla protein yıkım hızı düşer.

**Çizelge 3.1.** Protein yıkımında görev alan proteazlar

Hücre Dışı	Hücre İçi	Membran
Serin Proteazlar	Katepsin (Lizozomlarda)	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kimotripsin</li> <li>• Tripsin</li> <li>• Elastaz</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kaspazlar (Sistin proteaz)</li> <li>• Kalpanlar</li> <li>• ATP bağımlı proteozom</li> </ul>	Meprinler
Pepsin		

### 3.1. Serin Proteazlar

Serin proteaz grubu içerisinde tripsin, kimotripsin ve elastaz enzimleri girmektedir. Aktif merkezlerinde enzimatik aktivitesi için gerekli olan serin amino asiti içermelerinden dolayı bu şekilde isimlendirilmişlerdir. Her üç enzim de pankreas tarafından sentezlenmekte ve sindirim sistemine (12 parmak bağırsağına) aktif olmayan proenzim olarak (zimogen) salgılanmaktadır. Sindirim sisteminde peptit zincirinin bir kısmı koparılarak aktif enzim formuna dönüştürülmektedir. Tripsin enzimi; hücre dışındaki proteinleri bazik amino asitlerin (lizin veya arginin) karbonil grubu (peptit bağına katılan karboksil grubu) tarafından kırmaktadır; kimotripsin ise fenilalanin ve tirozin gibi aromatik amino asitlerin karbonil grubundan sonra proteinleri yıkmaktadır. Elastaz enzimi ise diğerlerine göre daha az spesifiktir ve çoğunlukla küçük fakat nötr olan amino asitlerden sonra proteinleri parçalamaktadır. Bu üç proteazın moleküler ağırlıkları yaklaşık 25 kDa civarındadır ve aktif merkezlerinde histin, aspartik asit ve serin amino asitleri bulunmaktadır. Bu proteazların dışında kan pıhtılaşmasında görev alan thrombin enzimi ve pıhtının yıkımını sağlayan plasmin enzimi de serin proteaz grubuna girmektedir [24].

### 3.2. Lizozomal Yıkım

Ökaryotlardaki lizozomal yıkım sistemi ile çoğunlukla uzun ömürlü hücre zarı ve hücre dışı proteinleri hücre içine alındıktan sonra yıkıma uğramaktadır. Lizozomda katepsin olarak bilinen yaklaşık 50 hidrolitik proteaz vardır ve bunlar endositoz ile hücre içine alınan proteinleri yıkmaktadır. Lizozom membranında bulunan bir H<sup>+</sup> pompası olan ATPaz'ın lümene sitozolden H<sup>+</sup> protonları transferi nedeniyle düşük bir pH'ya sahiptir. Lizozomal proteinlerin tümü bu asidik pH'da işlev görmektedir. İnaktif proenzim olarak sentezlenmekte ve lizozomdaki diğer proteazlar veya asidik pH aracılığı ile aktif forma dönüştürülmektedirler. Yıkılacak olan

proteinler; endositoz (pinositoz ve fagositoz), otofaji veya bazı proteinlerin yüzeyinde bulunan KFERQ özgül sinyal sekansı (LizFenGluArgGln pentapeptit sekansı) ile lizozomlara hedeflenmektedir. Sitozolik proteinlerin yaklaşık %30'unda bu pentapeptit sekansı bulunmaktadır ve besin yetersizliği durumunda (hücre kültürlerinde serum eksikliğinde) lizozoma hedeflenmektedirler. Bu pentapeptit sekansa, önce ısı-şok proteinlerinden Hsp73 proteinin bağlandığı ve bu protein aracılığı ile lizozomlara yönlendirildiği bilinmektedir. Isı-şok proteinleri, stres altında üç boyutlu yapılarını kaybeden proteinlerin katlanmalarına yardımcı olur ayrıca yıkım yollarına hedeflenmelerini sağlayarak hücre içinde bu anormal proteinlerin birikmesinin engellenmesinde görev alır.

Lizozomal yıkım çalışmalarında  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ve leupeptin ilaçları ile inhibe edilmektedirler. Bu inhibitörler sayesinde bir proteinin lizozom tarafından mı veya başka bir hücre içi proteaz tarafından mı yıkıldığı belirlenmektedir. Lizozomal proteazlar da serin proteazlar gibi pre-proenzim olarak sentezlenirler, sentez devam ettiği sırada sinyal sekans çıkarılır ve endoplazmik retikulumda proenzim katlanırlar. Golgide asparagin-bağlı (N-linked) glikolizasyona uğrarlar ve mannoz 6 fosfat (M6P) eklenir. Bu işaretlenmiş olan proenzim golgi membranında bulunan M6P almaçları tarafından bağlanır ve endolizozomal sisteme yönlendirilir. Glikolizasyonun bu enzimleri endozom ve lizozomlarda yıkımdan koruduğu varsayılmaktadır [24, 25].

### 3.3. Kaspazlar

Kaspazlar; interleukin-1 $\beta$  dönüştürücü enzim (ICE) proteaz ailesi olarak bilinen sistin proteazlar ailesinin üyesidir. Hasarlı veya fazla olan hücrelerin çevrelerine zarar vermeden ortadan kaldırılmasını sağlayan programlanmış hücre ölümü apoptozisi uyaran proteazlardır. Bu enzimler hücre içinde aktif olmayan proenzim (zimojen) olarak sentezlenirler ve proteolitik yıkım sonucu büyük ve küçük iki alt birime ayrıldıktan sonra, her bir alt birimden iki tane birleşerek heterotetramerik aktif kompleksi oluşturur. Aktif merkezlerinde sistein içermelerinden dolayı sistein proteazlar grubuna dahil edilmişlerdir ve substrat proteinlerini aspartik asidinden sonra hidroliz ederler. Apoptozisi uyarmalarına göre apikal (başlatıcı) ve efektör kaspazlar olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Kaspaz 2, 8, 9 ve 10 apikal kaspaz grubuna girerler ve bunlar efektör kaspazları (kaspaz 3, 6, 7) aktive eden proteazlardır. Efektör kaspazlar hücre çekirdeğinde, sitoplazmada ve hücre iskeletinde bulunan birçok yapısal ve düzenleyici proteini parçalayan proteazlardır. Efektör kaspazlar katepsin ve kalpan ( $\text{Ca}^{+2}$  tarafından aktive edilen hücre hareketinde ve adhezyonda rol alan proteaz) gibi diğer proteazlar tarafından da aktive edilebilmektedir. Kaspazların aktivasyonu, çeşitli pro-apoptotik ve anti-apoptotik sinyal

iletim yolağı ile düzenlenmektedir. Bunun içinde, Bcl-2 ailesi üyeleri, katalitik olarak inaktif kaspazlar (örneğin; FLIP) ve apoptozis inhibitörleri yer almaktadır. Akt/protein kinaz B (PKB), protein kinaz C (PKC) ve mitojen-aktif protein kinazlar gibi protein kinazlar, sinyal iletiminde merkezi bir role sahiptirler ve kaspaz aktivasyonunu düzenlemektedirler. Kaspaz enzimlerinin aktivasyonuna ve dolayısıyla apoptozis uyarılmasına neden olan dış etkenlerden bazıları UV, gama radyasyon, ilaçlar ve toksinler olarak sayılabilir [2, 7, 24, 26].

### 3.3.1. Kaspaz aktivasyonu:

Başlangıçta inaktif formda sentezlenen kaspazlar kırılarak aktifleşir ve dimerize olurlar. Kaspaz aktivasyonu (dimerizasyonu); hücre yüzey ölüm reseptörlerinin aktivasyonu ya da kaspaz-9 bağlayıcı protein olan apaf-1'in oligomerize olmak üzere indüklenmesiyle gerçekleşmektedir. Apaf-1'in indüksiyonu ise sitokrom c'nin mitokondriden salıverilmesi ile gerçekleşir. Apaf-1'in oligomerizasyonu kaspaz-9 monomerlerinin biraraya getirilmesini sağlar. Böylece aktifleşen kaspaz-9, kaspaz-3'ü aktifleştirir.

Ayrıca mitokondriden apoptozis indükleyici faktörler (AIF) salıverilir. AIF'ler, henüz bilinmeyen bazı nükleazları aktifleştirerek DNA yıkımına yol açarlar ama bunların çekirdekte yol açtığı morfoloji değişikliği apoptoziste tipik olarak görülen tipte değildir. Meydana gelen morfoloji değişikliği, net olarak seçilebilen sınırlardan ziyade düzensiz, sınırlı ve periferik yerleşimli dağınık çekirdek parçaları şeklinde olmaktadır.

Her dokunun eksprese ettiği kaspaz tipi farklı olabilmektedir. Böyle bir durumda farklı dokular için farklı kaspazların aktivasyonu yoluyla apoptozisin gerçekleştiği düşünülebilir. Örneğin, periferik T hücreleri ultraviyole ile indüklenmiş apoptozise gitmek için kaspaz-3'e ve kaspaz-9'a gereksinim duymazlar. Buna karşın, embriyonik stem hücreleri bu durumda her iki kaspaza da gereksinim duyarlar. Hatta hücrelerin değişik farklılaşma derecelerinde değişik kaspazların aktivasyonuna gereksinim duyulabilmektedir. Örneğin, periferik T hücreleri Fas'ın aktivasyonuna yanıt olarak gelişen apoptoziste kaspaz-3'e gereksinim duyarlar ama timositler kaspaz-3 eksikliğinde yine Fas'la indüklenen bir apoptozise gidebilirler [27].

### 3.3.2. Kaspazların substratları:

- **PARP:** Poli (ADP-Riboz) Polimeraz'dır. DNA tamir mekanizmasında rol alan bir enzimdir.
- **DNA-PK:** DNA bağımlı bir protein kinazdır.
- **PRb:** Retinoblastoma geninin ürünüdür. Hücre siklusunun durdurulmasında rol alır.
- **Lamins:** Çekirdek membranında yer alan yapısal proteinlerdir.



- **NuMA:** Nukleus mitotik apparatus protein.
- **Fodrin:** Hücre iskeletinde yer alan yapısal bir proteindir.
- **$\beta$ -Aktin:** Hücre iskeletinde yer alan yapısal bir proteindir.
- **Mdm2:** Tümör baskılayıcı protein olan p53'ün inaktivasyonunu sağlayan bir proteindir.
- **Cyclin A2:** Hücre siklusunda rol alır ve siklusun ilerlemesini sağlar.
- **Presenilin:** Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklarda biriktiği görülen bazı bileşiklerdir.
- **Diğer:** Metabolik aktivitelerden sorumlu bazı kinazlar gibi [27].

### 3.4. Meprinler

Hücre zarında bulunan ya da ekstraselüler (hücre dışı) sıvıya salgılanan metaloproteazlardır.  $\alpha$  ve  $\beta$  alt birimlerinden oluşurlar ve bu alt birimler amino asit seviyesinde %50 benzerlik göstermektedir. Alt birimler birleşerek homo veya heterokompleksler meydana getirmektedir. Membran formları, dimerik (homodimerik B, meprin B) ya da tetramerik ( $\alpha_2\beta_2$  ya da  $\alpha_3\beta_2$  kompleksler, meprin A) şeklindedir. Salgılanan meprin formu 10-100 adet  $\alpha$  alt biriminin nonkovalent olarak birleşmesi sonucu oluşan, bilinen en büyük proteazlardan birisidir. Meprinler, böbrek proksimal tüplerinde ve bağırsak epitel hücrelerinde yüksek miktarda bulunmaktadır. Aralarında gastrin, angiotensin gibi peptitler ve ekstraselüler matriks proteinleri kolajen IV ve fibronektin bulunan çok sayıda peptit ve protein parçalamaktadırlar. Bağırsak yolu enfeksiyonlarında ve kanserli hücrelerde meprin alt birimlerinin sentezinin önemli derecede arttığı görülmüş ve özellikle ekstraselüler matriks proteinlerini yıkmalarından dolayı kanserli hücrelerin metastazında önemli etkilere sahip oldukları bilinmektedir [24].

### 3.5. Ubiquitin- Proteozom Yolu

Programlanmış hücre ölümüne karışan proteazlar arasında en iyi bilinen proteazlar kaspazlar olmasına rağmen son yapılan çalışmalar ubiquitin-proteozom yolunun da apoptozis işleminde önemli bir rol oynadığını ortaya koymuştur [1].

Ubiquitin-proteozom yolu; hatalı katlanmış, hasarlı ve kısa ömürlü proteinlerin yıkımı için önemli bir katabolik yoldur. Proteinlerin amino asitlere kadar yıkılmasının dışında bazı transkripsiyon faktörlerinin (NF- $\kappa$ B) kısmi yıkılmasında (işlenerek olgunlaşmasında) ve aktivasyonundan sorumludur. Proteozom inhibitörleri MG132 ve lactacystin ile yapılan çalışmalar ubiquitin-proteozom yolunun hücre içindeki proteinlerin %80'den fazlasının yıkımından sorumlu olduğunu göstermektedir. Hedef proteinler yıkılmadan önce ubiquitin ile

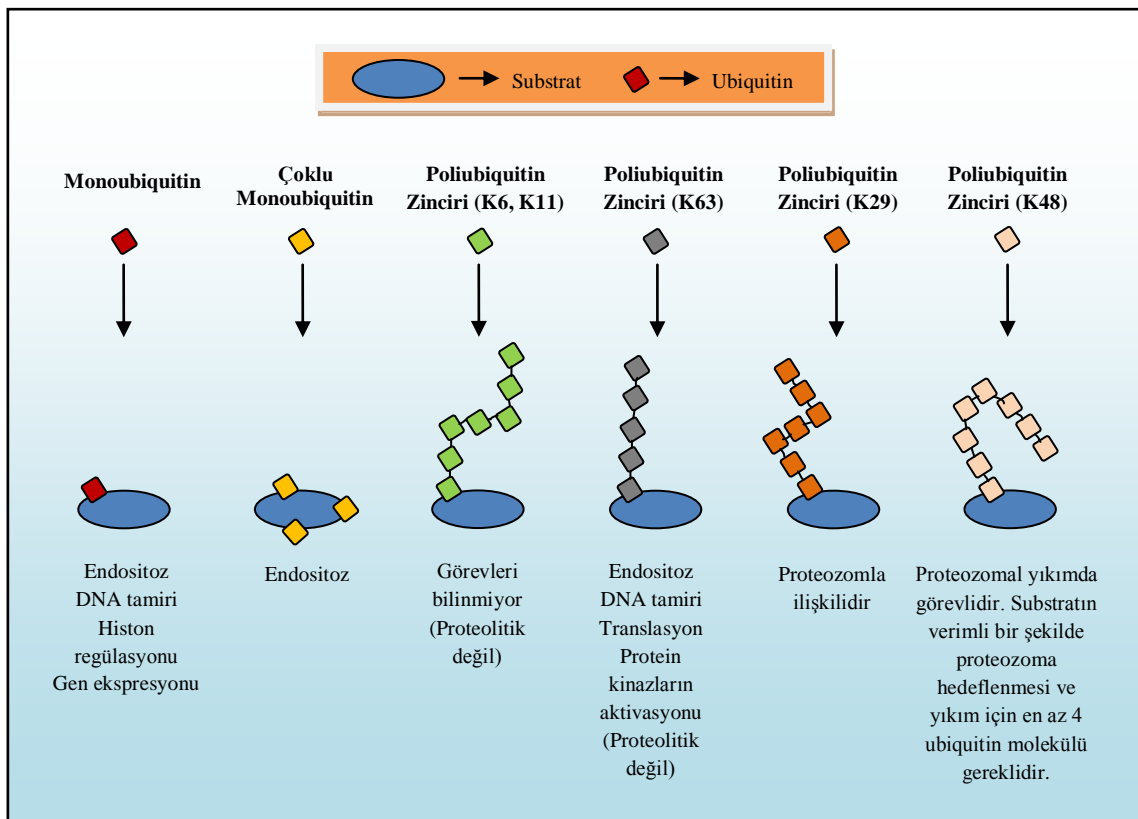
işaretlenirler. Daha sonra hedef protein üzerinde bir poliubiquitin zinciri oluşturulduktan sonra poliubiquitine olmuş protein 26S proteozoma yönlendirilir. 26S proteozomda işaretlenmiş olan hedef protein peptitlere kadar yıkılır [4, 19, 24, 28- 30].

Ubiquitin-proteozom sistemi; ubiquitin konjuge edici sistem ve 26S proteozomdan meydana gelir [1].

### 3.5.1. Ubiquitin konjuge edici sistem:

Ubiquitin; tüm ökaryotik hücrelerde bulunan, yüksek oranda korunmuş, ısıya dayanıklı, 76 amino asit içeren, 8.5 kDa ağırlığa sahip bir polipeptittir. ATP-bağımlı proteolitik yolda görev alır [31].

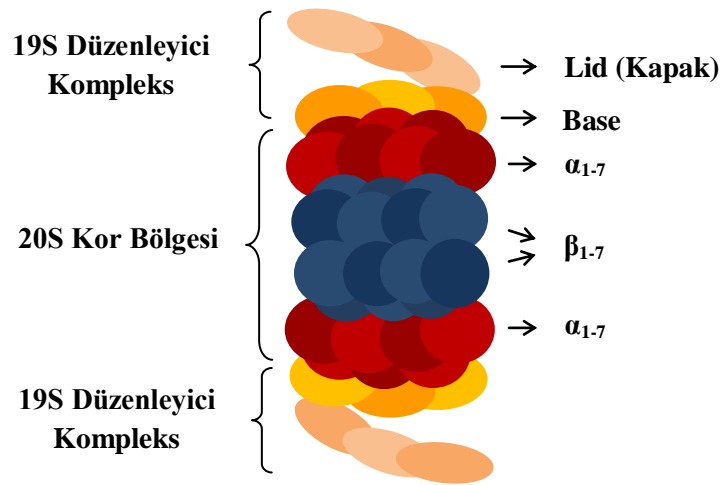
Ubiquitin konjuge edici sistemin koordineli fonksiyonu; ubiquitin aktive edici enzim (E1), ubiquitin konjuge edici enzim (E2) ve ubiquitin ligaz (E3) gibi bazı enzim sınıflarını ve ubiquitin hidrolazları içerir. Bir hedef proteinle birleşmede bu yolun aktivitesi mono ya da poliubiquitinasyona yol açar (Şekil 3.1). Poliubiquitinasyona uğramış proteinler; proteozom tarafından yıkılmak için hedeflenir [1].



Şekil 3.1. Ubiquitinasyon ve ubiquitin görevleri [32, 33, 34'den uyarlanarak tekrar çizilmiştir]

### 3.5.2. 26S proteozom:

Hücrel proteinlerin yıkımında işlev gören proteozom; tüm hayat formlarında bulunan, yaklaşık 64 alt birimin oluşturduğu, 2.5 MDa ağırlığında, silindirik bir yapısı olan ATP-bağımlı multikatalitik aktiviteye sahip bir proteazdır. Hücrenin hem sitoplazmasında hem de çekirdeğinde bulunmaktadır. 19S düzenleyici kompleks ve proteolitik merkez olan 20S kor kompleksi olarak bilinen multikatalitik proteinaz kompleksini içerir (Şekil 3.2). 19S kompleks, 20S kompleksin her iki ucuna eklenmektedir [1, 7, 24, 35].



Şekil 3.2. Protein yıkımında görev alan 26S proteozomun yapısı [7, 35, 36'dan uyarlanarak tekrar çizilmiştir]

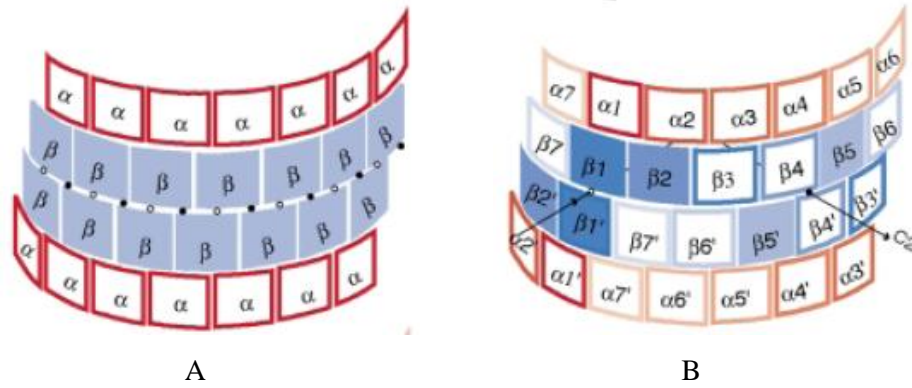
#### 3.5.2.1. 19S düzenleyici kompleks:

Base (20S komplekse yakın kompleks) ve lid (kapak) olmak üzere iki alt kompleksten oluşmaktadır. Base kompleksinde ATPaz aktivitesi içeren 6 tane protein ve ubiquitin tanıyan S5a proteini bulunmaktadır. ATPaz enzimlerinin, substrat proteinlerinin üç boyutlu yapılarının çözülmesi ve proteolitik aktiviteleri içeren 20S kompleks içine gönderilmesinden sorumlu olduğu sanılmaktadır. S5a proteini ise hedef proteinlerdeki ubiquitin zincirlerini tanımaktadır. Protein yıkımı için lid kompleksine de ihtiyaç vardır. Lid sekiz alt birimden oluşmaktadır. İşlevi tam olarak bilinmemesine rağmen ubiquitine olmuş proteinlerin tanınması ve deubiquitinasyondan sorumludur [7].

#### 3.5.2.2. 20S kor kompleksi:

20S kompleksi; 700 kDa ağırlığa sahip olup, hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda bulunmaktadır. Prokaryotik ve ökaryotik 20S kompleksi,  $\alpha$  ve  $\beta$  alt birimlerinin oluşturduğu 4 tabakalı bir silindir yapısıdır. Arkeobakter *Thermoplasma acidophilum*'da 14 tane  $\beta$  alt birimi

içteki iki tabakayı, 14  $\alpha$  alt birimi ise dıştaki iki tabakayı oluşturmaktadır ve  $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$  şeklinde dizilmektedir. Ökaryotlarda her bir  $\alpha$  ve  $\beta$  alt birimi farklıdır ve  $\alpha_{1-7}\beta_{1-7}\beta_{1-7}\alpha_{1-7}$  şeklinde dizilmektedirler (Şekil 3.3). 20S proteozom kompleksi en az üç farklı proteolitik aktivite göstermektedir. Bunlar; tripsin benzeri, kimotripsin benzeri ve post-glutamil peptidil aktivitedir. Beta alt birimleri proenzim olarak sentezlenir ve proteozom olgunlaşması sırasında 75 amino asit kadar olan pro sekans çıkarılır. Yedi beta alt biriminden üçü ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$  ve  $\beta_5$ ) enzimatik aktivite göstermekte ve bu alt birimler glisin (Gly) ve treonin (Thr) amino asitleri arasında kırılmakta ve enzim bu Thr yan gruplarını substrat peptit bağlarını kırmakta kullandığı için treonin proteazlar olarak da bilinir. Aktif bölgedeki her bir Thr amino asiti arasındaki mesafe 28 Å kadardır, bu da proteinlerin yaklaşık 8 amino asitlik peptitlere kadar yıkıldığını göstermektedir [7, 24].



Şekil 3.3. *Thermoplasma acidophilum*'da (A) ve ökaryotlarda (B) 20S proteozom yapısı [37]

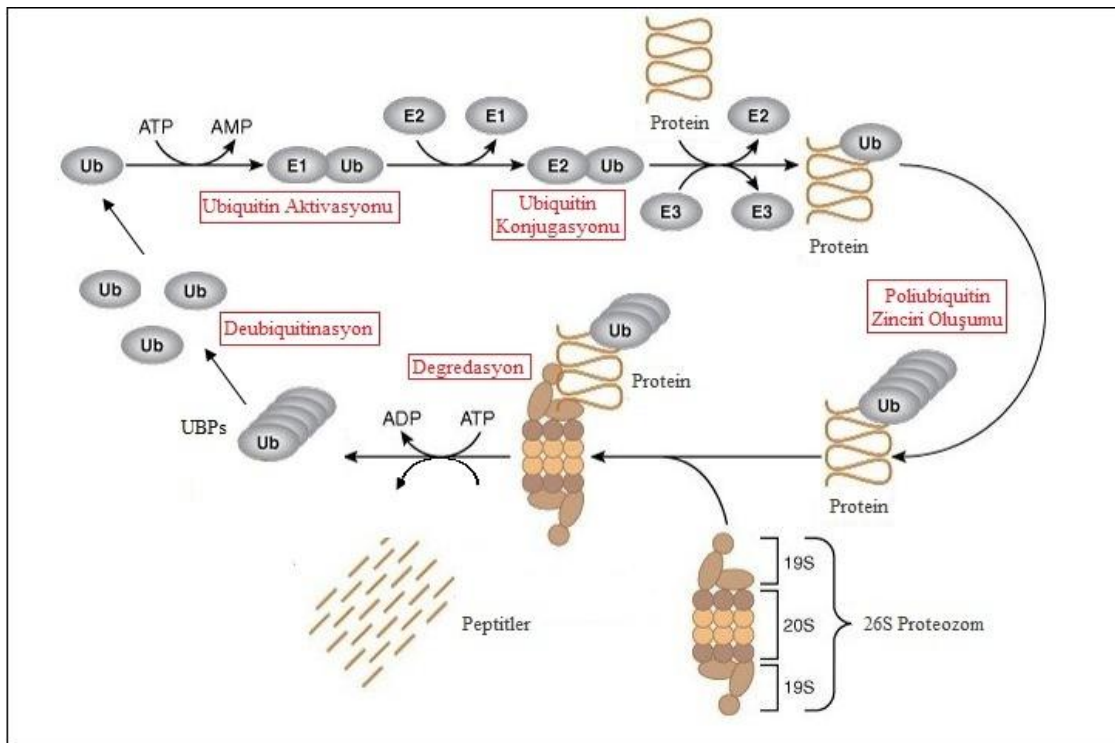
### 3.5.3. Ubiquitin-proteozom yolunun mekanizması:

Ökaryotik hücrelerde seçici protein yıkımı, çoğunlukla proteinler bir poliubiquitin zinciri ile işaretlendikten sonra 26S proteozom tarafından peptitlere kadar yıkılmasıyla gerçekleşir. Fakat nadiren bazı proteinler (örneğin; c-Jun ve ornitin dekarboksilaz -ODC-) ubiquitin ile işaretlenmeden 26S proteozom tarafından yıkılmaktadır.

Ubiquitin yıkılacak olan proteinlere bağlanmadan önce ilk olarak ubiquitin aktive edici enzimde (E1) bulunan bir sistein amino asiti ile ubiquitinin C-ucu arasında bir thioester bağı kurulur. Aktive edilen ubiquitin daha sonra benzer şekilde E1 enziminden ubiquitin konjuge edici enzimdeki (E2) bir sistein amino asitine aktarılır. Bu E2 enzimleri yıkılacak olan proteinlere ubiquitin molekülünü ubiquitin ligaz (E3) enzimi yardımı ile direkt aktarır veya

ubiquitin E3 enzimine aktarıldıktan sonra substrat proteinlere aktarılır. Son aşamada hedef proteindeki bir lizin amino asiti ile ubiquitin C-terminusundaki glisin amino asiti arasında bir izopeptit bağı oluşur. Diğer bir ubiquitin molekülünün 48. pozisyonunda bulunan lizin amino asitine eklenir. Eklenen her bir ubiquitin molekülünün lizin 48 amino asitine bir ubiquitin molekülü bağlanması ile hedef protein üzerinde bir poliubiquitin zinciri sentezlenir. Ubiquitin-protein konjugatları daha sonra 26S proteozomun 19S düzenleyici kompleksi tarafından tanınır, hedef protein çözülür (unfold), 20S kor kompleks içine gönderilir ve burada peptitlere kadar yıkılır. Bu reaksiyon olmadan önce ubiquitin molekülleri seçici olarak 19S düzenleyici kompleksinde bulunan deubiquitinasyon (UBPs) enzimleri tarafından hedef proteinden çıkarılır ve bir sonraki yıkım yolunda kullanılırlar (Şekil 3.4).

Çoğunlukla ubiquitin, hedef proteinlerin lizin amino asitlerine eklenmesine rağmen nadiren bazı proteinlerde (örneğin; transkripsiyon faktörü MyoD) N-terminustaki amino asitin  $\text{NH}_2$  grubuna eklendiği görülmüştür [7, 24].



Şekil 3.4. Ubiquitin-proteozom yolunun mekanizması [38'den alınıp düzenlenmiştir]

### 3.5.4. Proteozomun hücreyel aktivitelere:

- Anormal (hatalı katlanmış, hasarlı) ve normal proteinlerin yıkımında görev almaktadır.
- Kısa ve uzun ömürlü proteinlerin yıkımında görev yapar.
- Bağışıklık sisteminde görev yapmaktadır. Vücuda giren virüs ve bakterilere ait proteinleri yıkarak oluşan antijenlerin major histocompatibility complex class 1 (MHC) tarafından hücre yüzeyinde sunumuna katkı sağlayarak T-hücreleri tarafından fagozite edilmesini sağlar.
- N-ucu kuralına göre substrat yıkımında rol alır.
- Mitoz döngüsü boyunca siklinler, siklin-bağımlı kinazlar ve siklin-bağımlı kinaz inhibitörlerinin zamanında yıkılması ve giriş çıkışlarının düzenlenmesiyle hücre büyümesi için gereklidir.
- Anjiyogenez ile ilgilidir.
- Bazı transkripsiyon faktörlerinin (NF-κB) kısmi yıkılmasında (işlenerek olgulaşmasında) ve aktivasyonundan sorumludur.
- Antijen üretimi ile ilgilidir.
- Endositozda rol alır.
- Organel biyogenezinde rol alır.
- Spermatogenezde rol alır.
- Apoptozis ile ilgilidir [31,39].

### 3.5.5. Proteozom inhibitörleri:

Proteozom inhibitörleri kanser hücre kültürlerinde apoptozisi uyararak anti-tümör aktivite göstermektedirler (Çizelge 3.2). Proteozom inhibitörlerini kanser tedavisinde kullanmak için çalışmalar birçok laboratuarda halen devam etmektedir. Proteozom inhibitörleri MG132 ve lactacystin ile yapılan çalışmalar hücre proteinlerinin %80-90'nın proteozom tarafından yıkıldığını göstermiştir. Bu proteinler arasında siklinler, Cdk inhibitörleri p21, p27 ve p57, tümör baskılayıcı p53, transkripsiyon faktörleri c-Jun ve c-Fos, NF-κB inhibitörü IκB, poliamin biyosentez enzimleri ODC ve AdoMetDC (S-adenozilmetionin dekarboksilaz) gibi çok farklı mekanizmalarda rol alan proteinler vardır. MG132 ile yapılan başka bir çalışma, proteozom

inhibitörlerinin melanoma ve meme kanseri hücrelerine karşı anti-kanser etki gösterebileceklerini ve bundan dolayı daha ileri düzeyde araştırılması gerektiğini önermektedir. [7, 24, 40].

**Çizelge 3.2.** Proteozom inhibitörlerinin in vitro koşullarda geniş spektrumlu anti-kanser aktivite gösterdiği kanser türleri [4]

Solid Tümörler	Hematolojik Maligniteler
• Akciğer kanseri	• Multiple miyeloma
• Kolon kanseri	• Manto hücreli lenfoma
• Mide kanseri	• B hücreli lenfoma
• Karaciğer kanseri	• T hücreli lösemi / lenfoma
• Pankreas kanseri	• NK lösemi / lenfoma
• Tiroid kanseri	• Hodgkin Lenfoma
• Böbrek kanseri	• Burkitt Lenfoma
• Mesane kanseri	• Waldenstrom Makroglobulinemi
• Ovaryum kanseri	• Akut ve kronik miyeloid lösemi
• Meme kanseri	• Kronik lenfositik lösemi
• Serviks (rahim ağzı) kanseri	
• Endometriyal kanser	
• Prostat kanseri	
• Bel ve boyun skuamöz karsinoması	
• Kolanjiyokarsinoma (safra kanallarının adenokarsinoması)	
• Mezotelyoma	
• Nöroblastoma	
• Gliyoblastoma	
• Medulloblastoma	
• Retinoblastoma	
• İnsülinoma	
• Melanoma	
• Rabdomiyosarkoma	
• Ewing Sarkoma	
• Osteosarkoma	
• Granüloza hücreli tümör	

### **3.5.5.1. Proteozom inhibitörleri ile tetiklenen anti-tümör ve oto-protektif mekanizmalar**

Proteozom inhibitörleri bir takım muhtemel anti-tümör mekanizmalarına sahiptir ve proteozom inhibisyonuna karşı bazı oto-düzenleyici mekanizmalar bulunmaktadır. Bunlar Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.4'te ayrıntılı olarak verilmiştir.

**Çizelge 3.3.** Proteozom inhibitörlerinin olası anti-tümör mekanizmaları [4]

<b>Anti-tümör Mekanizmalar</b>	
• Bcl-2 ailesinin pro ve anti-apoptotik üyeleri üzerinde farklı etkiler	• p53, p21 ve p27 birikmesi
• İndüklenebilir NF-κB aktivitesinin inhibisyonu	• XIAP ve survivinlerin down-regülasyonu
• Endoplazmik retikulum stresi ve hatalı katlanmış proteinlerin birikmesi	• Oksidatif stresin indüklenmesi
• Kemik morfogenetik protein sinyalinin aktivasyonu	• Protein translasyonunun inhibisyonu
• FoxO ve FoxMI proteinlerinin baskılanması	• Telomeraz aktivitesinin inhibisyonu
• Epitelyal- mezenşimal dönüşümün inhibisyonu	• PI3 K / Akt sinyalinin down-regülasyonu
• Lenfositlerin sitotoksitesine kanser hücrelerinin immüno-sensitizasyonu	• Ölüm reseptörlerinin up-regülasyonu
• İyonlaştırıcı radyasyona maruz kaldıktan sonra artan genomik instabilite	• Histon asetilasyonu
• p-glikoprotein inhibisyonu ile birçok ilaca karşı oluşan direncin giderilmesi	• E <sub>2</sub> F baskılanması
	• IL-6-aracılı sinyalin inhibisyonu
	• Tubulin stabilizasyonu
	• Mitotoik katastrofun indüklenmesi
	• Anjiyogenez inhibisyonu

**Çizelge 3.4.** Proteozom inhibisyonuna karşı oto-düzenleyici mekanizmalar [4]

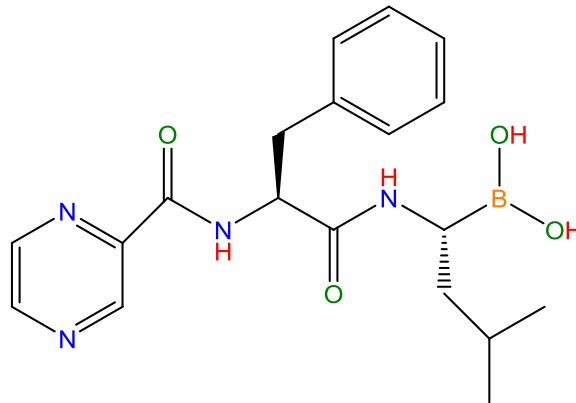
<b>Oto-Düzenleyici Mekanizmalar</b>	
• Konstütif (temel) NF-κB aktivitesinin aktivasyonu	• Makrotofaji indüksiyonu
• Hsp72 ve AKR1B10'un indüksiyonu	• Stat3 fosforilasyonu
• EGFR sinyalinin aktivasyonu	• Akt fosforilasyonu
• Glutasyon sentezinin up-regülasyonu	



Tez çalışmamızda kullandığımız inhibitörler aşağıda verilmiştir:

### **3.5.5.2. Proteozom inhibitörü bortezomib (Velcade, PS341):**

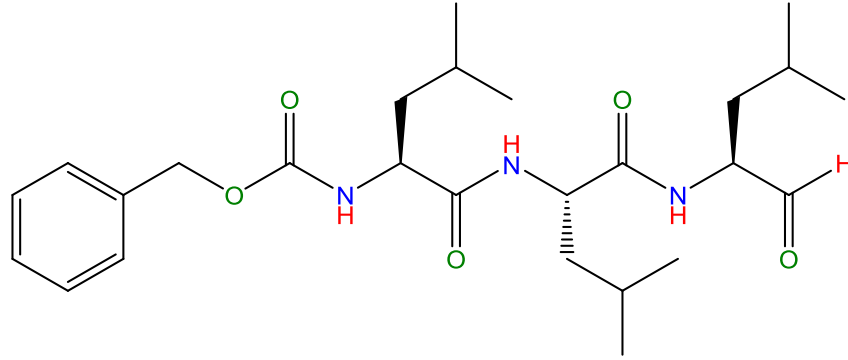
Bortezomib; özel ve seçici hücre geçirgenliğine sahip, küçük bir moleküler ağırlığı olan moleküldür. Proteozomun kimotripsin benzeri aktivite gösteren aktif bölgesine bir kovalent bağla sıkıca bağlanarak, proteozomun geri dönüşümlü olarak inhibisyona uğramasına sebep olur. Kimyasal olarak, lösin ve fenil alaninden türemiş bir dipeptidil boronik asit analogudur (Şekil 3.5). Bortezomibin, birçok in vivo ve in vitro modelde, tümör hücresi proliferasyonunu, adhezyonu, metastazı pek çok açıdan inhibe ettiği gösterilmiştir. Bortezomib, hem sistein hem de serin proteazlardan daha yüksek proteozom seçiciliği göstermektedir. Prostat, lösemi, pankreas, kolon, miyeloma, manto hücreli lenfoma, küçük hücreli olmayan akciğer, yumurtalık, baş ve boyun gibi tümör hücresi tiplerinde anti-kanser aktivitesi gösterdiği görülmüştür [5, 6, 41- 44].



**Şekil 3.5.** Dipeptidil boronik asit analogu olan proteozom inhibitörü bortezomibin kimyasal yapısı [6, 45'ten uyarlanarak ChemBioDraw Ultra 11.0 programı ile tekrar çizilmiştir].

### **3.5.5.3. Proteozom inhibitörü MG132:**

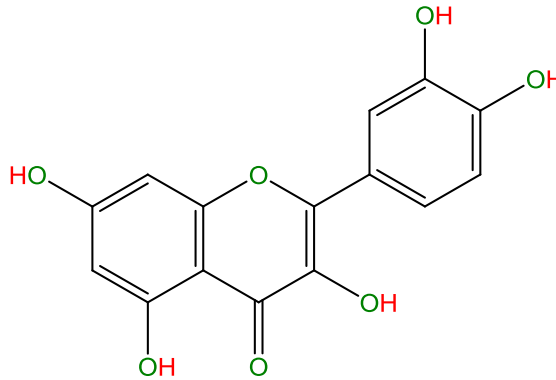
Bir peptit aldehit olan MG132 (carbobenzoxy-Leu-Leu-leucinal); proteozom kompleksinin her üç proteolitik aktivitesini de inhibe etmektedir (Şekil 3.6). MG132'nin reaktif oksijen türlerinin oluşumu ile apoptotik hücre ölümünü uyardığı gösterilmiştir. Ayrıca, yüksek konsantrasyonda katepsin B gibi diğer bazı proteazları da inhibe edebilmektedir. MG132 geri dönüşümlü bir inhibisyon meydana getirmektedir. Yapılan bazı çalışmalarda MG132'nin, HeLa hücrelerinde, Calu-6 akciğer kanser hücrelerinde, insan osteosarkoma MG-63 hücrelerinde, meme kanseri hücrelerinde ve melanoma hücrelerinde anti-kanser etki yapabilecekleri gösterilmiştir [7, 40, 46- 48].



**Şekil 3.6.** Proteozom inhibitörü MG132'nin kimyasal yapısı [49, 50'den uyarlanarak ChemBioDraw Ultra 11.0 programı kullanılarak tekrar çizilmiştir].

#### **3.5.5.4. Hsp70 inhibitörü quercetin:**

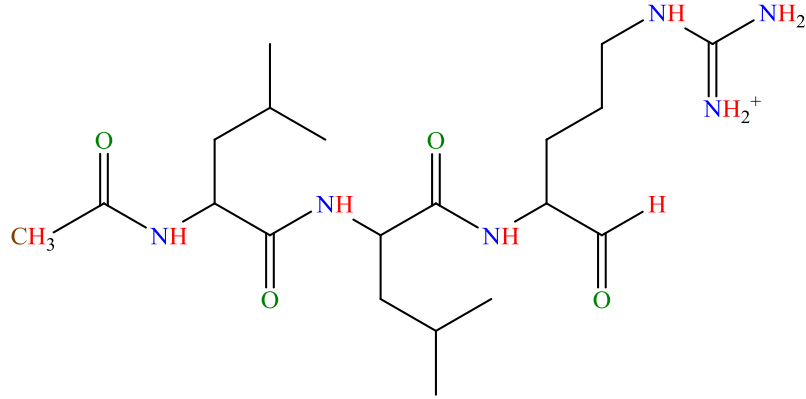
Quercetin (3,3',4',5,7- pentahidroksiflavon); bitkilerde sekonder metabolit olarak yaygın halde bulunan bir flavanoiddir. Flavanoidler; bir heterosiklik piron ya da piron halkası ile bağlı 2 benzen halkasından meydana gelen bir fenil benzo( $\gamma$ )piron-türevi yapı ile karakterize edilir (Şekil 3.7). Quercetin bir glikozit olarak, günlük insan diyetinde bulunan pekçok meyvede, sebze, sert kabuklu meyvelerde, tohumlarda bulunmaktadır. Quercetin, antiproliferatif ve apoptotik etkileri içeren farklı biyolojik aktiviteleri içerdiği görülmüştür. Lösemi, meme, özefagus, kolon, prostat, nazofaringeal, endometriyal ve akciğer gibi çeşitli insan kanserlerinde gelişmeyi inhibe ettiği belirlenmiştir. Quercetin aracılı apoptozis; stres proteinleri, mikrotübüllerin bozulması, NF- $\kappa$ B, Cox-2, p53, survivin, c-jun NH<sub>2</sub>-terminal kinaz, Bcl-2 ailesi proteinler, ısı-şok proteinleri, DNA topoizomeraz II, sitokrom-c salınımı ve kaspazların aktivasyonu gibi faktörlerle ilişkili olabilir [51- 54].



**Şekil 3.7.** Hsp70 inhibitörü quercetin'in kimyasal yapısı [51, 54, 55'ten uyarlanarak ChemBioDraw Ultra 11.0 programı ile tekrar çizilmiştir].

### **3.5.5.5. Lizozomal inhibitör leupeptin:**

Leupeptin (Ac-Leu-Leu-Arginal) bir peptit aldehittir. Katepsin A, katepsin B, tripsin, papain gibi proteazlar üzerinde geri dönüşümlü bir inhibisyon meydana getirmektedir [56, 57, 58].



**Şekil 3.8.** Lizozomal inhibitör leupeptinin kimyasal yapısı [57'den uyarlanarak ChemBioDraw Ultra 11.0 programı ile tekrar çizilmiştir].

#### 4. APOPTOZİS (PROGRAMLANMIŞ HÜCRE ÖLÜMÜ)

Genel olarak canlı organizmalarda iki ana hücre ölüm biçimi vardır. Bunlardan biri nekroz (nekrotik ölüm); hücre yaralanmaları sonucu hücrenin zarar görecak şişip, patlayarak ölmesi, diğeri ise apoptozistir. Hücreler apoptozis sırasında birçok uyararla ölüme giderler ancak bu ölüm programlı, kontrollü ve düzenli bir biçimde gerçekleşir. Bu süreç nekrotik hücre ölüm sürecinden farklıdır. Nekrotik ölümdede hücre kontrolsüz biçimde ölüme gider, hücre parçalanır, enflamasyon görülür. Apoptoziste ise hücre kendi ölümü sırasında aktif rol alır ve kendi ölümünün her aşamasına katkıda bulunur. Bu nedenle apoptozis hücre intiharı olarak da bilinir. Nekrozda patlayan hücrenin içerikleri komşu hücrelere de zarar verirken, apoptoziste çevre hücreler zarar görmez ve ölen hücreden etkilenmezler [59].

Vücudumuzda yaklaşık 210 tip hücre bulunur ve her bir hücrenin yaşam döngüsü; doğum, farklılaşma, işlev görme ve ölüm evrelerinden oluşmaktadır. Yaşam süresi hücre tipine göre değişmektedir. Örneğinin, barsak hücreleri 3-5 günlük bir yaşam süresini takiben ölürlerken, nötrofiller dokuda 4 günlük, derinin epidermal hücreleri 20-25 günlük, eritrositler kanda 120 günlük bir süre sonunda ölmektedirler. Ancak, miyokard kası hücreleri veya nöronlar ömür boyu (50-100 yıl) yaşarlar. Fakat buna rağmen, miyositlerin veya nöronların yaklaşık %10-15'i ömrünün sonuna doğru kaybedilmektedir. Nöronların çok sayıda ölmesi ancak sinapsların tam olarak oluşmadığı dönemden önce olur. Bu dönemde, doğumda aşırı sayıda olan nöronların sayısı uygun sinaptik ağına sağlanabilmesi için azalır. Optimum sayıda nöronun optimum sayıda sinaptik bağlantı içinde olabilmesi için bu nöron kayıpları gereklidir. Bahsedilen bu hücre ölümleri apoptozisle gerçekleşir. Zamanı gelince ölen bu hücreler daha önceden programlanmış bir şekilde ölürlere. Örneğinin; insanda yaklaşık  $5 \times 10^{11}$  kan hücresi programlı hücre ölümüyle her gün elenir. Tüm bu ölümler fizyolojik şartlarda meydana geldiği için bu ölüm şekli fizyolojik hücre ölümü olarak da adlandırılır [27, 59]. Aşırı hücre bölünmesinden dolayı hücrelerdeki artış, fonksiyonel olmayan ve yaşlı olan hücrelerin eliminasyonu ile dengelenmektedir. Bu dengeyi sağlayan işlem apoptotik programdır ve bu programdaki hasarlar hücrelerde patolojik azalışa veya artışa neden olarak hastalıklara yol açmaktadır (Çizelge 4.1). Apoptotik programdaki bozukluğun neden olduğu aşırı hücre artışı kanser ve otoimmün hastalıklara; hücre azalışı ise AIDS ve nörodejeneratif hastalıklara neden olmaktadır. Apoptozisin özellikle embriyonun gelişim ve farklılaşma işleminde vazgeçilmez bir role sahip olduğu bilinmektedir. Bunun yanı sıra bağışıklık sisteminde sitotoksik T lenfositleri tarafından virüs enfeksiyonlu hücrelerin ve otoreaktif B veya T lenfosit hücrelerinin eliminasyonunun apoptozis ile gerçekleştiği gösterilmiştir. Apoptozisin diğere bir fonksiyonu hasarlı DNA'ya sahip hücrelerin yıkımını sağlamasıdır. Bu tip hücreler mutasyon birikimine uğramadan ve bir tümör hücresine

dönüşmeden önce apoptotik program ile öldürülmektedir. Doku homeostazisi için (örneğin; yara iyileşmesi veya barsak hücrelerinin “turnover”ında olduğu gibi) hücreler ortamdan programlı olarak öler kaybolmaktadır [27, 60, 61].

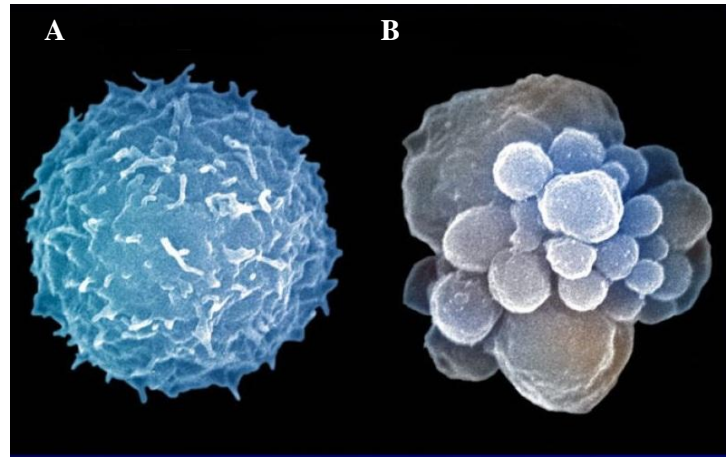
**Çizelge 4.1.** İnsan hastalıklarında apoptozisin rolü [62, 63]

Apoptozisin Artmasıyla İlgili Hastalıklar	Apoptozisin Azalmasıyla İlgili Hastalıklar
1. Nörodejeneratif bozukluklar Alzheimer hastalığı Amyotrofik lateral skleroz Creutzfeld-Jakob hastalığı Huntington hastalığı Parkinson hastalığı Retinitis pigmentosa Spinal muskular atrofi 2. Hematolojik Bozukluklar Aplastik anemi Fanconi anemisi Hodgkin hastalığı Myelodisplastik sendromlar Polycythemia vera 3. Otoimmün Bozukluklar Fulminant hepatit Graft- versus- host hastalığı Hashimoto tiroiditis İnsüline bağımlı diyabet Multiple sklerozis Romatoid artrit Skleroderma Sjögren sendromu 4. İskemik Yaralanma İskemi ve reperfüzyon Böbrek enfarktüsü Miyokardiyal enfarktüs İnme 5. Toksinlere Bağlı Hastalıklar Alkole bağlı hepatit Pulmonar fibrozis Sepsis 6. Bakteriyel ve Viral Enfeksiyon Kazanılmış immün yetersizlik sendromu (AIDS) Ebola virüsü <i>Chlamydia trachomatis</i> <i>Helicobacter pylori</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Shigella flexneri</i> 7. Diğerleri Travmatik spinal kord yaralanması Tümör karşı-atağı (immün ayrıcalık)	1. Kanser hastalığı Blastoma Karsinoma Lösemi Lenfoma Malign gliyoma Sarkoma Seminoma 2. Premalign Hastalıklar Ataxia telangiectasia Paroksimal nokturnal hemoglobinüri Myelodisplastik sendromlar Xeroderma pigmentosum 3. Otoimmün Bozukluklar Otoimmün lemfoproliferatif sendrom (tip I ve II) Sistemik lupus erythematosus 4. Ateroskleroz 5. Metabolik Bozukluklar Niemann-Pick hastalığı Osteoporozis Wilson hastalığı 6. Viral Enfeksiyonlar Adenovirüsler Baculovirüsler Epstein-Barr virüsü Herpesvirüsler Poxvirüsler  <b>Prematür ve Fizyolojik Yaşlanmada Apoptozis</b> Down sendromu Erken yaşlanma (Progeria) Xeroderma pimentosum

#### 4.1. Apoptotik Hücrenin Karakteristik Özellikleri

Bir seri spesifik sinyallere bağlı olarak apoptoze giden hücrelerde biyokimyasal ve morfolojik olarak farklı değişiklikler söz konusudur. Apoptozisin erken dönemlerinde bir protein ailesi olarak bilinen kaspazlar aktive olur. Bu proteinler normal hücre fonksiyonları için gerekli olan, özellikle hücre iskeleti yapısal proteinleri ve DNA tamirinde rol alan nükleer proteinlerin parçalanmasından sorumludur. Aynı zamanda kaspazlar DNazlar gibi çekirdekte DNA'yı parçalayan diğer yıkıcı enzimleri aktive ederler. Bu biyokimyasal değişiklikler sonucunda hücrede bazı morfolojik değişiklikler gözlenir [64]. Bunlar:

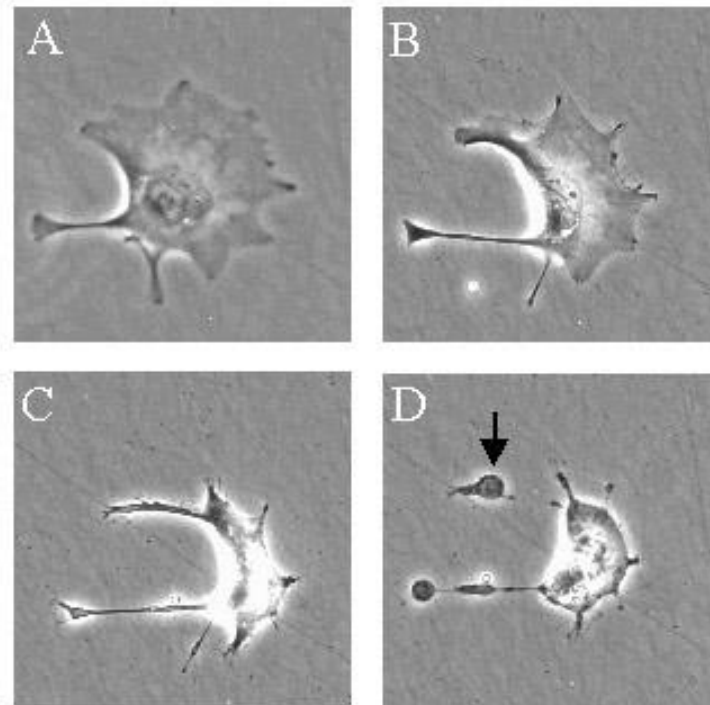
- Sitoplazmik hacimde kayıp meydana gelmesinden dolayı kondensasyon (yoğunlaşma) meydana gelir ve hücre küçülür. Sitoplazmik proteinlerde de kondensasyon görülür.
- Kromatin maddesinin kondensasyonu ile ilişkili olarak çekirdekte küçülme ve kırılma (karyoheksiz) meydana gelir.
- Membran yüzeyinde küçük kesecikler görülür ve hücre büzülür.



**Şekil 4.1.** Apoptotik hücrede küçük keseciklerin görülmesi. **A)** Normal akyuvar, **B)** Apoptotik akyuvar [65]

- Dokularda apoptotik hücreler komşu hücrelerden ayrılır. Hücre kültürlerinde ise petri kabına yapışık olarak büyüyen apoptotik hücreler, kabın dibinden sökülerek besiyerinde asılı dururlar.
- Hücre, küçük parçacıklara bölünerek apoptotik veziküller oluşturur. Organeller bu küçük veziküller içinde bozulmadan durur ve dolayısıyla hücre içeriği dışarı salınmaz.
- Oluşan bu apoptotik veziküller hızla komşu hücreler tarafından fagozite edilirler (Şekil 4.2).

- Membran normalde asimetrik yapıdadır. Fakat apoptotik hücreler bu asimetrik yapıyı koruyamamaktadır ve özellikle fosfolipidlerin molekülleri çift katlı lipid membranın iç yüzeyinden dış yüzeyine transfer olmaktadır. Bu şekilde fosfolipidlerin, apoptotik hücrelerin komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınmasını ve sindirilmesini sağlamaktadır.
- Apoptotik hücrenin en belirgin biyokimyasal belirteçlerinden bir tanesi kromatinin 200 baz çifti fragmentlere kırılarak agaroz jel elektroforezinde merdivenimsi görülmesidir [39, 60, 64, 66, 67].



**Şekil 4.2.** İnsan trofoblast hücrelerinde görülen değişimler. **A)** Lamin ve aktin filamentlerinin kesilmesi sonucu sitoplazma çekmeye ve küçülmeye başlar. **B)** Kromatin ve çekirdekte bulunan yapısal proteinlerin kesilmesi sonucu çekirdekte kondensasyon başlar ve çoğu zaman çekirdek at nalı biçiminde görülür. **C)** Hücre büzölmeye ve küçölmeye devam eder ve makrofajların tanıyabileceği biçimde paketlenir. Bu fagositik hücreler dokudan apoptotik hücreleri ayırt eder ve diğer hücrelere zarar vermeden uzaklaştırılır ve böylece çevre hücreler nekrotik ölümler sırasında görölen sorunlarla karşılaşmazlar. **D)** Apoptotik hücrelerde görölen morfolojik membran değişimlerinden biri de hücre içeriklerini alan ve membranla çevrili veziköller biçiminde apoptotik hücrelerden kopan tomurcuklardır. Bu küçük veziköller apoptotik cisim olarak adlandırılır (şekilde ok ile gösterilmektedir) [59].

## 4.2. Apoptozisin İndüklenmesi

Hücrelerde apoptozisin indüklenebileceği birçok yol bulunmaktadır. Bu uyarıcılardan herhangi birine hücrenin duyarlılığı pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonu (Bcl-2 proteinler veya apoptozis protein inhibitörleri), uyarıcının derecesi ve hücre siklusunun aşaması gibi faktörlere bağlı olarak değişir. Bazı durumlarda apoptotik uyarıcılar, hücre yüzey reseptörlerine ölüm indükleyici ligandların bağlanması gibi ekstrinsik sinyallerden veya sitotoksik T-lenfositlerle apoptozisin induksiyonuyla oluşmaktadır. T-hücreleri hasarlı ya da virüsle enfekte hücreleri tanır ve hasarlı hücreleri neoplastik hücre oluşumundan ya da virüsle enfekte hücrelerle enfeksiyonun yayılmasını önlemek için apoptozisi başlatır. Bazı durumlarda apoptozis hücresel stresi takiben üretilen intrinsik sinyallerle başlatılır. Hücresel stres; radyasyon, kimyasallar ya da viral enfeksiyona maruziyetle oluşabilir. Büyüme faktörünün yoksunluğu ya da oksidatif stresin bir sonucu olarak da hücresel stres meydana gelebilir. Genel olarak intrinsik sinyaller apoptozisi mitokondri aracılığıyla gerçekleştirir [64].

## 4.3. Apoptoziste Mitokondrinin Rolü

Hücre ölümünün kontrol edilmesinde mitokondri önemli bir role sahiptir. Örneğin, Bcl-2 ve Bcl-X<sub>L</sub> gibi Bcl-2 protein ailesinin anti-apoptotik üyeleri, mitokondri membranının dış kısmında yer alırlar ve hücre yaşamını devam ettirmeye yönelik olarak çalışırlar. Bad ve Bax gibi Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik üyelerinin birçoğu, Bcl-2 ve Bcl-X<sub>L</sub> ile ya da mitokondri membranı ile direkt ilişki kurarak mitokondri üzerinden etkilerini gösterirler. Mitokondri apoptozisin gerçekleşmesini sitokrom c salınımıyla sağlar ve pro-kaspaz 9 ile birlikte apaf-1 ve ATP bir kompleks oluşturur. Bu kompleks kaspaz 9'un aktivasyonuna ve kaspaz kaskadının başlamasına yol açar. Mitokondriden sitokrom c'nin salınımını sağlayan faktörler bilinmemektedir. Bax ve diğer Bcl-2 proteinleri por-oluşturucu proteinlerle yapısal benzerlikler gösterdikleri için, Bax proteininin mitokondri dış membranında bir transmembran por oluşturabileceği, böylece membran potansiyel kaybı ve sitokrom c ve AIF (apoptozis indükleyici faktör) salınımına yol açabileceği ileri sürülmektedir. Bcl-2 ve Bcl-X<sub>L</sub>'nin bu por oluşumunu önlemek üzere görev aldıkları düşünülmektedir. Bax veya Bad proteinlerinin Bcl-2 veya Bcl-X<sub>L</sub> ile heterodimerizasyonunun onların koruyucu etkilerini önlediği düşünülmektedir. Aynı zamanda Bax ve Bad gibi bu proteinlerin geniş çapta PT (permeability transition) por oluşumunu ve buna bağlı olarak sitokrom c kaybı ve apoptozisin başlamasını da sağlayabildikleri düşünülmektedir [59, 64].



#### 4.4. Apoptozisin Düzenlenmesinde Görev Alan Genler

Çok sayıda gen apoptozisin düzenlenmesinde görev alır (Çizelge 4.2). Bu genlerin bir bölümü hücre yüzeyinde bir bölümü ise hücre içi sinyal iletim yollarında görev alırlar. Bu genlerden apoptoziste görev alan en önemli gen grubu Bcl-2 ailesidir.

**Çizelge 4.2.** Apoptozisin düzenlenmesinde görev alan genler [59]

• Fas, Trail, TNF (almaç ve ligandlar)	• Kaspazlar (yaklaşık 13 tane), granzim, kalpain
• Bcl-2 ailesi proteinler (yaklaşık 12 tane)	• Kaspaz düzenleyicileri IAP/ Survivin (5 tane), Apaf-1
• Kinazlar RIP3, CAP, AKT, PKA, MapK	• Transkripsiyon faktörleri p53, myc, Nur77
• Mitokondri proteinleri VDAC, ANT, sitokrom c, AIF, SMAC	• Diğerleri FADD, TRADD, DAD1
• Proteazlar	

##### 4.4.1. Bcl-2 ailesi:

Bcl-2 ailesi; hücre kaderini belirlemede önemli rol oynamaktadır. Bcl-2 ailesi birbirine zıt etkileri olan iki gruptan oluşur (Çizelge 4.3). Pro-apoptotik Bcl-2 ailesi proteinleri, apoptozisi indükleyici etkiye sahiptir. Anti-apoptotik Bcl-2 ailesi proteinleri ise apoptozisi baskılayıcı etkiye sahiptir. Pro-apoptotik proteinler, sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salıverilmesini indükler. Anti-apoptotik proteinler ise sitokrom c salıverilmesini baskılar. Bu iki zıt etkili grubun işleyişi, yapılarında bulunan iki bölgeye (hidrofobik cep ve amfipatik  $\alpha$ -heliks) bağlıdır. Yapılarındaki BH1, BH2 ve BH3 bölgeleri hidrofobik cebi oluşturur. Amfipatik  $\alpha$ -heliks, BH3 bölgesinde yer alır. Hidrofobik cep sayesinde bir diğer bcl-2 ailesi üyesinin BH3 bölgesine bağlanırlar. Pro-apoptotik üyeler kendi içinde iki alt gruba ayrılırlar. Bu alt gruplardan biri yapılarında her üç bölgeyi de (BH1, BH2, BH3) içeren üyelerden (örneğin; Bax, Bak), diğeri ise sadece BH3 bölgesini içeren üyelerden (Bid, Bad, Bim) oluşur. Anti-apoptotik üyelerde ayrıca BH4 bölgesi bulunur. Bu bölgenin, apoptozisin diğer hücrel yollarla "pathway" ilişkisini kurduğu düşünülmektedir. Hücrelerin apoptotik uyarıya duyarlılığı pro-apoptotik ve anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin arasındaki dengeye bağlıdır. Anti-apoptotik üyeler, doğal olarak intrinsik sitokrom c'nin salıverilmesini baskılama özelliğine sahiptir. Bu durumda, pro-apoptotik üyelerin anti-apoptotik üyelerle bağlanması halinde bu inhibitör etki ortadan kalkar ve sitokrom c salıverilmesi gerçekleşir. Bu yüzden, pro ve anti-apoptotik

üyelerin dengesi yaşam ile ölüm arasındaki seçeneği belirler. Anti-apoptotik üyelerin aşırı ekspresyonlarının apoptozisi baskıladığı oysa pro-apoptotik üyelerin aşırı ekspresyonunun ise hücreleri öldürdüğü görülmektedir. Apoptozise dayanıklı hücrelerde Bcl-2:Bax heterodimerlerinin baskın olduğu görülmektedir. Bax:Bax hücre ölümüne yatkınlığı gösterir [27, 60, 64].

**Çizelge 4.3.** Apoptozisin düzenlenmesinde görev alan Bcl-2 ailesi proteinleri [27, 59, 60, 68]

Pro-apoptotik Proteinler	Anti-apoptotik Proteinler
Bax	Bcl-2
Bak	Bcl-x <sub>L</sub>
Bok	Bcl-w
Bcl-x <sub>S</sub>	Mcl-1
Bad	Al
Bid	NR-13
Bik	Ced-9
Bim	Boo
Spike	
Noxa	
Puma	

#### 4.5. Nüklear Etkiler

Apoptozisin hücre sel anlamda belirleyicilerinden birisi kromozomal DNA'nın nükleozomal birimler haline parçalanmasıdır. Apoptotik hücrelerin çekirdeklerindeki DNA'nın yıkımı, kaspaz aktivasyonunu takiben birkaç yolla sağlanmaktadır. Kaspazlar için substrat olarak tanımlanan ilk protein poly (ADP-riboz) polimeraz -PARP- enzimidir. PARP, DNA hasarı tamirinde, poly (ADP-riboz) sentezlenmesini katalizleme ve DNA zincir kırıklarına bağlanıp nüklear proteinleri modifiye etme görevini üstlenir. PARP proteininin DNA hasarını onarması, kaspaz-3 ile parçalanmasını takiben önlenir. DNA replikasyonu ve tamiri için gerekli diğer bir nüklear enzim DNA topoizomeraz II'dir. Kaspazlar bu enzimi inaktive ederek, DNA hasar oluşumuna yol açarlar. Çekirdeğin şeklini sağlayan çekirdek içi proteinler laminlerdir. Bu proteinlerin görevleri nüklear membran ve kromatin arasındaki ilişkileri sağlamaktır. Kaspaz-6 proteinleriyle laminlerin yıkımı sonucunda, kromatin kondensasyonu ve apoptotik hücrelerde çoğunlukla gözlenen nüklear fragmentasyon yapıları izlenmektedir. DNA'nın nükleozomal

altbirimler haline fragmente olmasından sorumlu enzim CAD (kaspazla aktive olan DNaz)'dir. Normalde, CAD; inaktif bir kompleks olarak ICAD (CAD inhibitörü, DNA fragmentasyon faktör 45 olarak da bilinir) ile birlikte bulunur. Apoptozis sırasında, ICAD kaspazlarla parçalanır ve CAD serbest kalır. CAD, yüksek spesifik aktiviteli bir DNaz (DNaz I ve DNaz II'den daha yüksek) olduğu için nükleer DNA'nın hızlı fragmentasyonu gerçekleşir. Nitrik oksit (NO) birçok dokuda yer alan vazodilasyon, nöronal fonksiyon, inflamasyon ve immün fonksiyon gibi birçok fizyolojik yolu regüle eden önemli bir sinyal molekülüdür. Nitrik oksitin, apoptozis regülasyonunda rol oynadığı gösterilmiştir. Apoptozisin etkilerinin, NO dozuna ve hücrenin tipine bağlı olarak, hem apoptozisi indükleyebileceği hem de apoptozisten hücreyi koruyabileceği yönünde sonuçlar bulunmaktadır. Nitrik oksitin, lökosit, hepatosit, trofoblast ve endotelial hücreleri içeren birçok hücre tipinde apoptozisi inhibe ettiği gösterilmiştir. Genelde, NO'nin anti-apoptotik etkileri, nitrosilasyon ve kaspaz-3, kaspaz-1 ve kaspaz-8'in içinde bulunduğu birçok kaspazın inaktivasyonu gibi birçok mekanizmayla gerçekleşir. p53 aktivasyonu, ısı-şok proteini 70 (Hsp 70)'in ve Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>'in düzenlenmesi, cGMP-bağlı protein kinazların aktivasyonuna neden olan cGMP sinyal aktivasyonu ve kaspaz aktivitesi baskılanması diğer mekanizmalardır. Apoptozis üzerinde NO etkileri genel olarak cGMP bağımlı ya da bağımsız olarak sınıflandırılır. Nitrik oksit, guanilat siklazın hem grubu aracılığıyla cGMP sinyalini aktive edebilme kabiliyetindedir. cGMP'nin üretimi, cGMP bağlı protein kinazların aktivasyonuna öncülük eder [64].

#### 4.6. Apoptozis Görülen Doku ve Hücreler

Organizmanın bazı dokularında ve hücrelerinde sürekli olarak apoptotik hücreler oluşmaktadır ve bu oluşum ömür boyu devam etmektedir. Böylece ölüm (apoptozis) ve yeniden yapım (mitozis) bu dokularda doku homeostazisini oluşturmak üzere dinamik bir denge halinde süregelmektedir. Normal apoptotik hücre ölümü ve yerine yeni hücre yapımının günde yaklaşık  $1 \times 10^{11}$  hücreyi bulduğu hesaplanmaktadır. Bu hızda bir hücre ölümü ve yeniden yapımı, yetişkin bir insanın vücut ağırlığının her 18-24 ayda bir yeniden yapım ve yıkımı anlamına gelmektedir. Bu doku ve hücrelere örnek olarak verilebilecekler aşağıdadır:

- **İnce barsaklar:** İnce barsaklardaki kriptaların tabanlarında yeni oluşan hücreler, kriptaların uçlarına doğru göç ederler ve 3-4 gün süren bu göçün sonunda ölümler, barsak boşluğuna dökülürler.
- **Göz:** Göz lensleri, embriyonik gelişim esnasında oluşur, apoptotik hücreleri bünyesinde bulundurur.

- **Deri:** Derinin keratinositleri derinin bazal tabakasında oluştuktan (stem hücre bölünmesi) sonra derinin en üst tabakasına doğru (stratum korneum) göç ederler. Bu göç esnasında derinin her tabakasında çeşitli farklılaşma özellikleri gösterip en sonunda derinin organizmayı dış etkenlerden (enfeksiyon ajanları, travmatik zedelenmeler vs.) koruyucu ölü tabakasını oluşturmak üzere ölürlür. Deri keratinositlerinde bu şekilde gerçekleşen apoptozisin özelleşmiş bir apoptozis formu olduğu düşünülmektedir.
- **Timus:** İmmün sistemin çok önemli hücreleri olan T lenfositler timusta olgunlaşırlar. Bu hücrelerin etkisiz olanları veya organizmanın kendi dokularına karşı reaksiyon verme potansiyeli taşıyanları kan dolaşımına girmeden önce apoptozisle ölürlür ve böylece ortamdaki uzaklaştırılırlar.
- **Nöronlar:** Beyinde sinapsların oluşumu esnasında bazı nöronlar apoptozisle ortamdaki uzaklaştırılırlar.
- **Uterus:** Menstruasyon esnasında uterusun iç duvarındaki hücreler ölürlür ve menstruasyon kanıyla uzaklaştırılırlar. Böylece, uterusun iç tabakası (endometrium) apoptozisle dökülür.
- **Diğer:** Hücreler bir virüs ile enfekte olduklarında ya da genetik değişimlerle onarılamayacak şekilde bozulduklarında sıklıkla kendilerini öldürürler. Genetik değişime uğramış hücrenin intihar etmedeki başarısızlığı kansere katkıda bulunur [27, 69].

#### 4.7. Çok Hücreli Canlıların Gelişimi Esnasında Apoptozis Görülmesi

Çok hücreli canlıların normal ve doğru gelişimleri, seçilmiş bazı hücrelerinin apoptozisle ölmesine bağlıdır. Bazı örnekler aşağıda sıralanmıştır:

- 1 mm uzunluğunda transparant bir kurtçuk olan *Caenorhabditis elegans*'ın başlangıçta 1090 olan hücre sayısı tam olarak 131 hücre azalır ve böylece hermafroditik formdan yetişkin forma dönüşür. Ölen hücreler mikroskop altında izlenebilirler. Bu kurtçuk model alınarak yapılan organ gelişimi ve apoptozis çalışmaları 2002 yılında Sydney Brenner, Robert Horwitz ve John Sulston'a Nobel Ödülü kazandırmıştır.
- Kurbağaların metamorfozisi esnasında kuyrukları kaybolur. Böylece yetişkin forma geçerler. Kuyruktaki hücreler apoptozisle ölümler kaybolurlar.
- İnsan embriyosunun el parmakları arasında bulunan perdelerin, buradaki hücrelerin apoptozisle ölmesi sonucu kaybolduğu düşünülmektedir [27].

#### 4.8. Apoptoziste p53 Proteininin Rolü

p53 geni kromozom 17'de yerleşiktir ve 53 kDa moleküler ağırlığa sahip bir protein kodlamaktadır. p53 proteini proapoptotik bir protein olup tümör baskılayıcı protein olarak bilinmektedir. DNA hasarı ve onkogenik transformasyon sonucu aktive olmaktadır. Kaspaz 3, 7, 8 ve 9 enzimlerini aktive ederek apoptozisi uyarır ve kanser oluşumunu engeller. *In vivo* ve *in vitro* koşullarda ubiquitin-proteozom yolu tarafından yıkıldığı bilinmektedir. Çeşitli genlerin ifade düzeylerini kontrol eden bir transkripsiyon faktörü olan p53; hücre döngüsünün normal bir biçimde seyretmesini sağlamaktadır. Eğer hücrede normal olmayan bir durum varsa hücre döngüsü p53 tarafından duraksatılmaktadır. p53 hücrel stres durumunda apoptozisi tetiklemektedir. Strese girmeyen, hasara uğramamış hücrelerde p53 konsantrasyonu belirlenemeyecek kadar azdır ve sitoplazmada tutularak çekirdeğe girişi önlenir. Normal gelişme sırasında gerçekleşen apoptoziste görev almayan p53 tümör baskılayıcı geni çeşitli kanserlerde mutasyona uğramaktadır. Tüm kanserlerin %50'sinden fazlasında p53 mutasyonu görülmektedir (örneğin; kolon kanserlerinin %70'inde, akciğer kanserlerinin %50'sinde ve göğüs kanserlerinin %20'sinde p53 mutasyonu tespit edilmiştir) [7, 59, 70]. Apoptozis sırasında p53 tarafından transkripsiyonu düzenlenen genler Çizelge 4.4'te görülmektedir.

**Çizelge 4.4.** p53'ün apoptozis sırasındaki hedef genleri [59]

• Bcl-2 proteinleri Bax, Puma, Noxa, Bid	• Adaptörler Apaf-1
• Ölüm almaçları DR5, CD95, Fas	• Diğerleri P53AIP1, p53DINP1, Peg3, PERP, FIG1

## 5. PROTEOZOM VE KANSER İLİŞKİSİ

Proteozom inhibitörlerinin, farklılaşmış ve bölünmeyen hücrelerin aksine spesifik olarak bölünebilen tümör hücrelerinde apoptozisi uyardığı bilinmektedir. Örneğin, bölünebilen insan lösemik HL60 hücrelerinin, bölünemeyen (quiescent) HL60 hücrelerine göre proteozom inhibitörleri *N*-carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-norvalinal (LLnV) ve *N*-carbobenzoxy-L-isoleucyl-L- $\gamma$ -*t*-butyl-L-glutamyl-L-alanyl-L-leucinal (PSI) tarafından apoptozise daha duyarlı oldukları gösterilmiştir. Fakat, bölünmeyen kontak inhibisyonlu (quiescent) hücrelerde proteozom inhibitörü PSI ile apoptozis uyarmak için aktif bölünen primer endotel hücrelerde kullanılan dozun en az 340 kat daha fazla kullanılması gerekmektedir. Son zamanlarda yapılan bir diğer çalışma, sağlıklı bireyler ile karşılaştırıldığında birçok kanser hastasının (akut myeloid lösemi, Hodgkin hastalığı, kronik myeloproliferatif sendrom ve solid tümör hastaları) plazmalarında 20S proteozom miktarının 1000 kat kadar yükseldiğini göstermiştir. Bu çalışmalar, proteozom inhibitörlerinin spesifik olarak çoğalabilen hücrelerde apoptozise neden olduklarını; dolayısıyla, diğer anti-kanser ilaçlara göre daha avantajlı durumda olduklarını ve kanser tedavisinde daha etkili olabileceklerini göstermektedir. Proteozom inhibitörleri; *in vitro* ve *in vivo* modellerde geniş spektrumlu aktivite gösterdikleri için, son zamanlarda kanser tedavisinde önemli bir hedef molekül olarak proteozoma olan ilgi önemli derecede artmıştır. Hücre kültürlerinde, bortezomibin birçok katı ve hematolojik malignan tümör hücrelerinde (miyeloma, lenfoma, akciğer, ovaryum, pankreas, prostat, baş ve boyun kanserlerinde) apoptozisi uyardığı bilinmektedir. Apoptozisin proteozom tarafından yıkılan p21, p27, p53 ve proapoptotik proteinlerinin birikmesi aracılığı ile olduğu düşünülmektedir. Klinik denemelerde kanser tedavisinde kullanılan ilk proteozom inhibitörü bortezomibtir. Faz I solid ve hematoloji malignan tümörlerde (özellikle multiple myeloma ve lenfomalar) umut verici bulgular elde edilmiştir. Bu yüzden bortezomib üzerinde detaylı çalışmaların yapılması ve ilerleyen çalışmalarda diğer anti-kanser ilaçlar ile beraber bortezomib kombinasyonlarının denenmesi tavsiye edilmiştir [7].

## 6. MATERYAL VE METOD

### 6.1. Materyal

B16F10 melanoma hücreleri, 4T1 ve 4THMpc meme kanseri hücreleri Doç. Dr. Nuray Erin (Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi) tarafından gönderilmiştir. RPMI 1640 besiyeri, fetal bovine serum (FBS), tripsin, Penicillin/Streptomisin, MG132 ve SDS-PAGE jel elektroforez için kullanılan kimyasallar, Sigma-Aldrich Inc.'dan; Apoptotic DNA Ladder Kit, Roche firmasından; bortezomib (velcade, PS341), Millenium Pharmaceuticals Inc.'dan; PVDF membran Millipore firmasından; ECL Western Blotting ve Bio-Rad protein assay kitleri Amersham Pharmaceceutical'dan; Caspase-3 Colorimetric Activity Assay Kit Chemicon firmasından; Anti-kaspaz-3 antikoru Millipore ve Santa Cruz firmasından temin edilmiştir. Kullanılan diğer tüm kimyasallar Sigma- Aldrich Inc. firmasından satın alınmıştır.

### 6.2. Besiyeri Hazırlanışı

10.4 gr RPMI 1640 besiyeri, yaklaşık 850 ml otoklavlanmış dH<sub>2</sub>O'da çözüldükten sonra pH 4'e 1N HCl ile ayarlanarak tamamen çözünmesi sağlanır. Bu aşamadan sonra 20 ml NaHCO<sub>3</sub> (stok solüsyon %7.5), 22.5 ml glukoz (%20'lik stok solüsyondan), 4 ml HEPES solüsyonu (stok solüsyon 2.5M) ve 1 ml sodyum pirüvat solüsyonu (stok solüsyon 1M) konulduktan sonra 1N NaOH ile pH 7.1'e ayarlanır. 10 ml Penicillin/Streptomisin antibiyotik karışımı eklenir ve besiyeri hacmi 1 L'ye tamamlanır. Hemen 1 L kapasiteli disposable Millipore filtrasyon sistemi (0.22 µm por kapasiteli membran) ile Laminer Flow kabini içinde filtre edilir. Son olarak filtre edilen besiyerinin %90'ına (900 ml) %10 oranında (100 ml) FBS konulur. Besiyeri +4°C'de muhafaza edilir.

### 6.3. Hücre Kültürleri

B16F10, 4T1 ve 4THMpc hücreleri RPMI-1640 besiyerinde, 37°C sıcaklık ve %5 CO<sub>2</sub> sağlayan HF90 inkübatöründe çoğaltıldılar. Stok kültürler 25 cm<sup>2</sup> steril corning flasklarda, deney kültürleri ise 35 mm x 10 mm steril petri kaplarında çoğaltıldılar [71]. Genellikle hücre 70-80 yoğunlukta (logaritmik faz) hücre pasajı işlemi gerçekleştirildi. Pasaj işlemi daima mikrobiyolojik güvenlik kabini içerisinde gerçekleştirildi. Besiyeri aspire edilip hücreler 1 ml %0.25'lik tripsin ile yıkandıktan sonra, 2 ml %0.25'lik tripsin flasklara konuldu ve yaklaşık olarak B16F10 hücreleri 30 saniye, 4T1 ve 4THMpc hücreleri ise 3 dakika muamele edildi. Bu süre zarfında hücrelerin kalkıp kalkmadığını görmek için inverted mikroskopta hücreler izlendi. Vakum pompasına bağlı pastör pipet ile tripsin aspire edildikten sonra hücreler 1/10 oranında yeni besiyeri ile seyreltildi ve yeni flasklara ekildi. Ekilen hücrelerin çoğalıp logaritmik faza

(%70-80 yoğunluğa) gelmesi ortalama olarak 3 günde gerçekleştiği için, pasaj işlemi periyodik olarak 3 günde bir tekrarlandı.

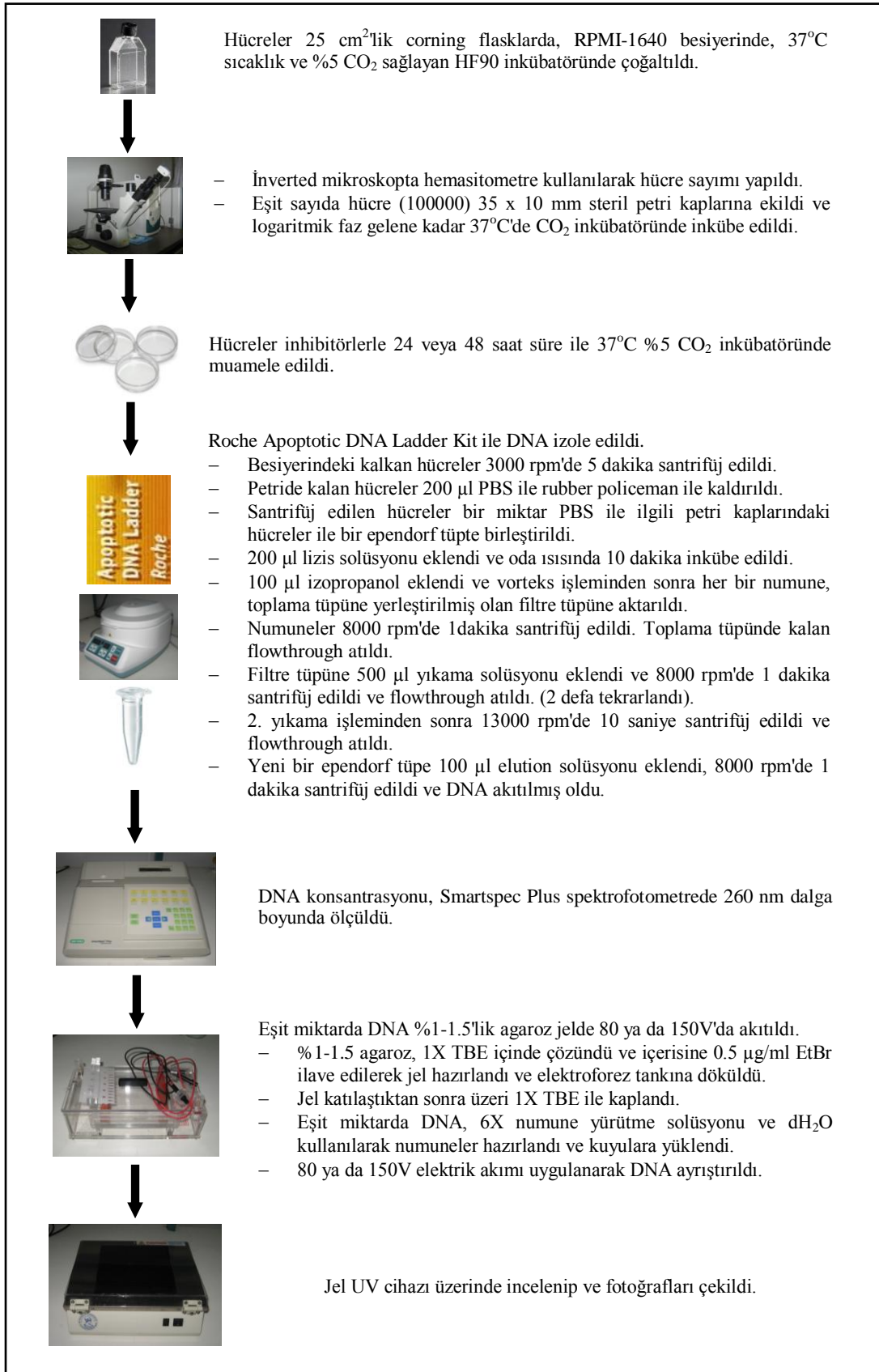
#### **6.4. Hücre Ekimi**

Pasaj işlemi sırasında besiyeri ile 1/10 oranında seyreltilen hücreler, hemositometrede inverted mikroskop altında sayıldı ve  $0.1 \text{ mm}^3$ 'deki hücre sayısı belirlendi. 35 mm x 10 mm'lik bir petride 100000 hücre olacak şekilde hücre ekimi gerçekleştirildi [72].

#### **6.5. DNA Fragmentasyon Analizi**

Ekimi yapılan hücreler, 48 saat sonra logaritmik fazda, bortezomib, MG132, quercetin, leupeptin gibi farklı inhibitörler ile muamele edilmişlerdir. DNA izolasyonu Roche Apoptotic DNA Ladder Kit ile gerçekleştirilmiştir. Hücreler, 48 saat süre ile inhibitörlerle muamele edildikten sonra, besiyerinde kalkmış vaziyetteki hücreler 3000 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Petri kabında kalan hücreler ise 200  $\mu\text{l}$  PBS ile rubber policeman ile kaldırıldı. Santrifüjden sonra çöken hücreler ile petrilere kaldırılan hücreler bir ependorf tüpte birleştirildi. Daha sonra hemen 200  $\mu\text{l}$  lizis solüsyonu eklendi ve oda ısısında 10 dakika inkübe edildi. Bu süre sonunda 100  $\mu\text{l}$  izopropanol eklendi ve vorteks işleminden sonra, her bir numune, toplama tüpüne yerleştirilmiş olan filtre tüpüne aktarıldı. Daha sonra numuneler 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpünde kalan flowthrough atıldı. Filtre tüpüne 500  $\mu\text{l}$  washing buffer eklendi, 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi ve flowthrough atıldı (bu yıkama işlemi ardarda 2 defa gerçekleştirildi). 2. yıkama işleminden sonra 13000 rpm'de 10 saniye santrifüj edildi ve yine flowthrough atıldı. Son olarak filtre tüpü yeni bir toplama kabına yerleştirildi ve DNA 100  $\mu\text{l}$  elution solüsyonu ile akıtıldı. Bu işlemlerden sonra, DNA konsantrasyonu, Smartspec Plus spektrofotometrede 260 nm dalga boyunda belirlendi. Bu işlemlerden sonra %1 veya %1.5 oranında agaroz içeren jel; 1X TBE solüsyonu (TBE solüsyonu 10X olarak hazırlandı ve elektroforez yapılacağı zaman  $\text{dH}_2\text{O}$  ile 1X'e seyreltildi) içinde çözünerek hazırlandı, içerisine 0.5  $\mu\text{g/ml}$  etidyum bromür (EtBr) ilave edildi ve tarağı yerleştirilmiş olan yatay elektroforez tankına döküldü. Jel katılaştıktan sonra üzeri 1X TBE solüsyonu ile kaplandı ve tarak çıkartıldı. Eşit miktarda DNA, 6X numune yürütme solüsyonu ve  $\text{dH}_2\text{O}$  kullanılarak numuneler hazırlandı ve kuyulara yüklendi. 80 ya da 150V elektrik akımı uygulanarak DNA ayrıştırıldı. Jel UV cihazı üzerinde incelendi ve fotoğrafları çekildi (Şekil 6.1).





Şekil 6.1. DNA fragmentasyon analizi

## 6.6. Hücre Lizisi

Petri kabında çoğaltılan hücreler, belirtilen inhibitörler ile muamele edildikten sonra 1 ml PBS ile yıkandı. Hücreler daha sonra 200 µl lizis solüsyonu ile 30 dakika buzda inkübe edildikten sonra 15 saniye Kontes Pellet Pestle ile karıştırılarak tamamen homojenize olması sağlandı. +4°C'de 12000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatant -80°C'ye konuldu.

## 6.7. Protein Tayini

Protein miktarını belirlemek için Bio-Rad Protein Assay metodu kullanıldı [73]. Bio-Rad protein standardına (bovine serum albumin, 28 mg) 20 ml steril dH<sub>2</sub>O eklenerek 1.4 µg/µl solüsyon elde edildi ve alikotlanarak -20°C'de muhafaza edildi. 0.8 ml'de hazırlanan 1- 2.5- 5 ve 10 µg BSA (bovine serum albumin) içeren standart solüsyonu üzerine 0.2 ml Bio-Rad konsantre dye reagent konuldu (Çizelge 6.1). Hazırlanan numuneler 5 dakika oda ısısında bekletildi. Daha sonra standartlar UV spektrofotometrede OD<sub>595</sub> körüne karşı ölçüldü. Numunelerdeki protein miktarlarında aynı şekilde absorbans değerleri okunduktan sonra çizilen standart grafiği sayesinde hesaplandı. Yapılan deneylerde r<sup>2</sup> değeri minimum 0.98 olarak elde edildi.

**Çizelge 6.1.** Bio-Rad Protein Assay metodunda kullanılan numunelerinin hazırlanışı

Solüsyonlar	Standart (µl)	Tampon (µl)	dH <sub>2</sub> O (µl)	Bio-Rad Boyası (ml)
<b>Deney Körü</b>	-	4	796	0.2
<b>Standart 1</b>	0.7	4	795.3	0.2
<b>Standart 2,5</b>	1.8	4	794.2	0.2
<b>Standart 5</b>	3.6	4	792.4	0.2
<b>Standart 10</b>	7.1	4	788.9	0.2
<b>Numune</b>	-	4	796	0.2

## 6.8. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)

SDS-PAGE'de mini elektrofrez kullanıldı. %0.1 SDS içeren %12'lik ayrıştırma jeli hazırlandı (Çizelge 6.2) ve elektrofrezin iki camı arasına döküldü. Ayrıştırma jelinin üzerine yaklaşık 1 ml 2-propanol (izopropanol) koyuldu. Jelin katılaşması için yaklaşık 20 dakika beklendikten sonra 2-propanol döküldü ve jel distile su ile yıkandı. Daha sonra yığma jeli hazırlandı (Çizelge 6.3). Hazırlanan yığma jeli pipet ile ayrıştırma jelinin üzerine pipetlendi.

Elektroforez targağı yerleştirildi ve yığıma jeli katılaşması için bir süre beklendi. Elektroforez tampon solüsyonu (running solution) 2X olarak hazırlandı ve elektroforez yapılacağı zaman 1:1 oranında dH<sub>2</sub>O ile seyreltildi. Numune yükleme solüsyonu 6X olarak hazırlandı. Eşit miktarda protein, 1:6 oranında seyreltilmiş numune yükleme solüsyonu ve dH<sub>2</sub>O kullanılarak numuneler hazırlandı. Hazırlanan numuneler 90°C'de 5 dakika denatüre edildi ve daha sonra 12000 rpm'de 10 saniye santrifüj edildi. Numuneler elektroforez kuyularına yüklendi ve 150 V (veya 100 V) elektrik akımı uygulanarak proteinler ayrıştırıldı. Elektroforez bittikten sonra ayrıştırma jeli cam plaklar arasından çıkarılarak Western blot için 15 dakika transfer solüsyonuna konuldu [74].

**Çizelge 6.2.** Ayrıştırma jeli (seperating gel) hazırlanışı

Stok Solüsyon	%12	%15
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	3.15 ml	2.4 ml
<b>1M Tris-HCl pH 8.8</b>	3.75 ml	3.75 ml
<b>%40 Akrilamid</b>	3.00 ml	3.75 ml
<b>%10 SDS</b>	100 µl	100 µl
<b>%10 Amonyum persülfat</b>	100 µl	100 µl
<b>TEMED</b>	6 µl	6 µl

**Çizelge 6.3.** Yığıma jeli (stacking gel, %3.75) hazırlanışı

Kullanılan Solüsyonlar	Miktar
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	2.329 ml
<b>1M Tris-HCl pH 6.8</b>	375 µl
<b>%40 Akrilamid</b>	281 µl
<b>%10 SDS</b>	30 µl
<b>%10 Amonyum persülfat</b>	30 µl
<b>TEMED</b>	5 µl

## 6. 9. Western Blot Yöntemi

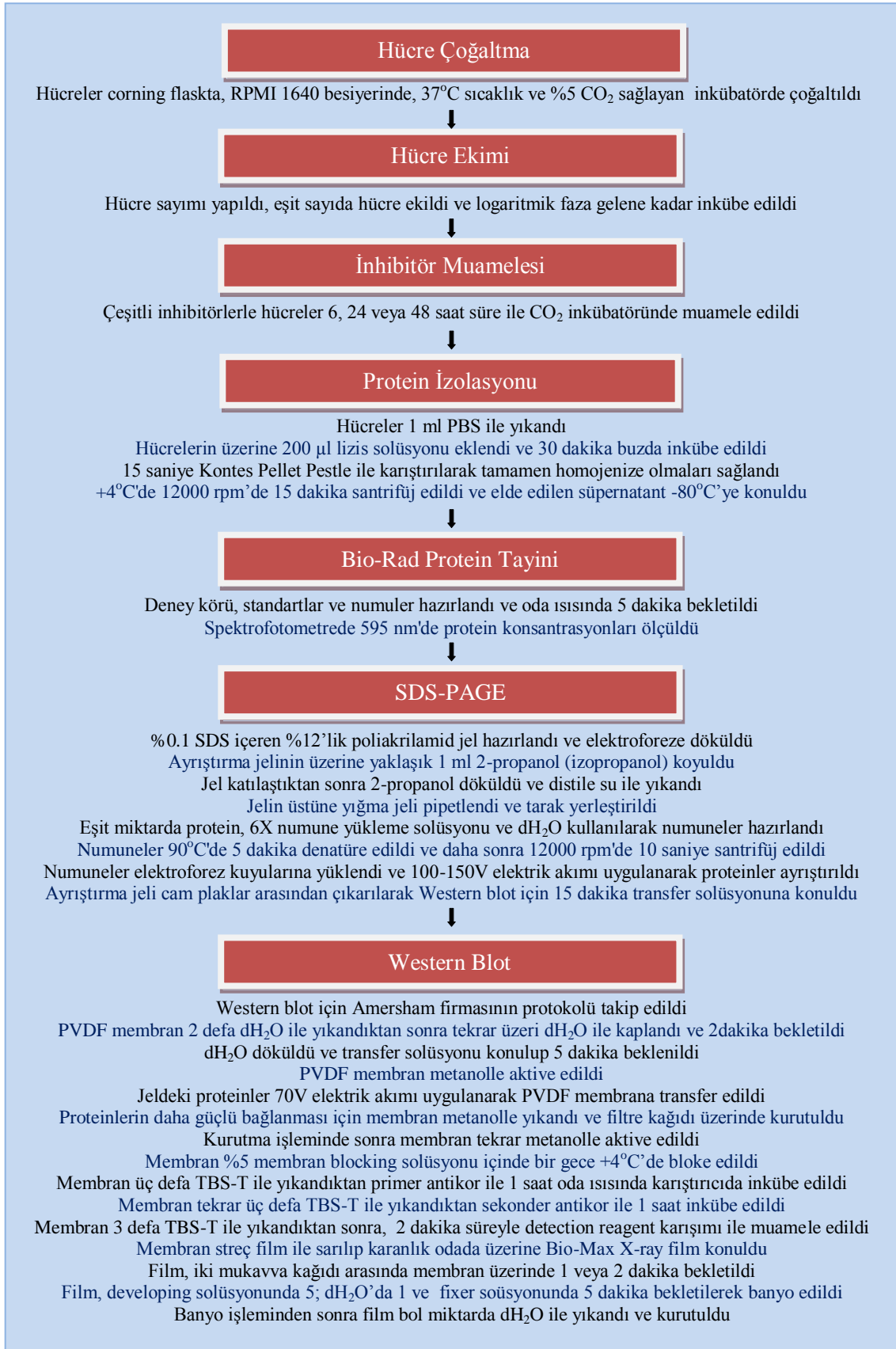
Western blot işlemi için Amersham Firmasının protokolü takip edildi. PVDF membran metanole konulup aktive edildikten sonra 2 defa dH<sub>2</sub>O ile yıkandı ve tekrar dH<sub>2</sub>O ile kaplanıp 2 dakika beklenildi. Bu süre sonunda dH<sub>2</sub>O döküldü ve transfer solüsyonu konulup 5 dakika beklenildi. Jeldeki proteinler metanol ile aktive edilen PVDF membrana 70V'da 2 saat transfer edildikten sonra proteinlerin membrana daha güçlü bağlanması için, membran metanolle yıkandı ve filtre kağıdı üzerinde kuruması için bekletildi. Kurutma işleminden sonra membran tekrar metanolle aktive edildi ve %5 membran blocking solüsyonu ile bir gece +4°C'de bloke edildi. Membran üç defa TBS-T ile yıkandıktan sonra tavşan anti-p53 poliklonal antikoru (1:5000 TBS-T ile seyreltildi) veya fare anti-β-actin monoklonal antikoru (1:3000 TBS-T ile seyreltildi) ile 1 saat oda ısısında karıştırıcıda inkübe edildi. Membran tekrar üç defa TBS-T ile yıkandıktan sonra anti-rabbit veya anti-mouse sekonder antikor ile (1:5000 TBS-T ile seyreltildi) 1 saat inkübe edildi. Üç defa TBS-T ile yıkandıktan sonra, 2 ml detection reagent 1 ve 2 ml detection reagent 2 karışımı hazırlandı ve bu karışım membran üzerine 2 dakika süreyle uygulandı. Membran plastik streç ile sarıldı ve sonra karanlık odada üzerine Bio-Max X-ray film konuldu. Film, iki mukavva kağıdı arasında membran üzerinde 1 veya 2 dakika bekletildikten sonra kendi tasarladığımız 40 cm x 25 cm x 15 cm ebatlarında ve üç bölmeden oluşan (her biri 5 cm genişliğinde) paslanmaz çelikten yapılan bir tank içinde manuel olarak banyo edildi. Developing solüsyonunda 5 dakika, dH<sub>2</sub>O'da 1 dakika ve son olarak fixer solüsyonunda 5 dakika bekletilerek film banyo edildi. Banyo işleminden sonra film bol miktarda dH<sub>2</sub>O ile yıkandı ve kurutuldu (Şekil 6.2) [71, 72].

## 6.10. Komasi Mavisi ile Jel Boyama İşlemi

Jel, yaklaşık 60 dakika boyama solüsyonu ile karıştırıcı üzerinde boyandıktan sonra, yıkama solüsyonunda 1 gece bekletildi ve daha sonra jel bol miktarda dH<sub>2</sub>O ile yıkanarak jelin şeffaflaşması sağlandı.

## 6.11. Stripping Muamelesi

Stripping solüsyonu 50°C'de ısıtıldı. Membran metanolle aktive edilip dH<sub>2</sub>O ve TBS-T ile yıkandıktan sonra stripping solüsyonuna konuldu. Stripping kabı streç filmle sarıldı ve 50°C'de 30 dakika inkübe edildi. Bu süre sonunda stripping solüsyonu boşaltıldı ve membran 3 defa çalkalayıcı üzerinde TBS-T ile yıkandı. Membran %5'lik membran blocking ajan içerisinde +4°C'de bir gece bekletildi.



**Şekil 6.2.** Western blot metodu ile protein analizi [71- 74]

## 6.12. Kaspaz Aktivitesi Deneyi

100000 hücre 35 mm x 10 mm'lik steril petri kaplarına ekildikten 48 saat sonra, logaritmik fazda, hücreler farklı bortezomib konsantrasyonları ile muamele edildi. Proteinlerin izole edilmesinde "Chemicon Caspase-3 Colorimetric Activity Assay Kit" kullanıldı. Hücreler 48 saat ilaç ile muamele edildikten sonra besiyerinde kalkmış durumda bulunan hücreler santrifüj etmek için 15 ml'lik bir tüpe aktarıldı. Steril petri kabında kalan hücreler ise 1 ml PBS yıkandı. PBS + kalan hücreler 15 ml'lik ilgili tüpteki tüpteki diğer hücrelerle birleştirildi ve bu kalkan hücreler oda ısısında 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Daha sonra petri kaplarında kalan tutunmuş haldeki hücrelerin üzerine Chemicon Kaspas-3 Kitindeki 1X hücre lizis solüsyonundan 100 µl ilave edildi 15 ml'lik tüplerde santrifüj edilmiş olan hücreler ile birleştirildi. Hücreler daha sonra 10 dakika buzda bekletilerek homojenize edildi. Homojenize hücreler, 4°C'de 12000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Daha sonra süpernatantlar -84°C'ye konuldu. Protein miktar tayini için, "Bio-Rad Protein Assay" metodu kullanıldı. Kaspaz-3 aktivitesinin ölçülmesine Chemicon Kaspaz-3 kitinin protokolüne göre devam edildi. Protein numuneleri, 1X hücre lizis solüsyonu, 5X tampon solüsyonu, dH<sub>2</sub>O ve kaspaz-3 substratı belirli oranlarda karıştırıldıktan sonra (Çizelge 6.4), tüpler 37°C'de 2 saat inkübe edildi. Daha sonra, direkt trUView Cuvette ile 405 nm'de SmartSpec UV spektrofotometrede okundular.

## 6.13. Kullanılan Solüsyonlar

- **DNA lizis solüsyonu:** 500 µl 1M Tris HCl pH 8.0, 1 ml 1 mM EDTA, 250 µl %0.25 NP40; 100 ml'ye dH<sub>2</sub>O ile tamamlanır.
- **10X TBE:** 54.5 gr Tris-Base, 27.5 gr borik asit, 2.325 gr EDTA; dH<sub>2</sub>O ile 500 ml'ye tamamlanır.
- **1X tripsin:** 5 ml 10X tripsin, 45 ml PBS
- **2X SDS elektroforez tampon solüsyonu:** 12 gr Tris base, 57.6 gr glisin ve 4 gr SDS; 2 L'ye dH<sub>2</sub>O ile tamamlanır. Elektroforez yapılacağı zaman 1:1 oranında dH<sub>2</sub>O ile seyreltilir.
- **Numune yükleme solüsyonu:** %60 Gliserol, 300 mM Tris pH 6.8, 12 mM EDTA, %12 SDS, 864 mM β-mercaptoetanol ve %0.05 bromofenol blue
- **Transfer solüsyonu:** 25 mM Tris base, 192 mM glisin, %7 metanol ve %0.07 SDS (Hazırlanışı: 6.057 gr Tris base, 28.826 gr glisin, 140 ml metanol, 1.4 gr SDS; 2L'ye dH<sub>2</sub>O ile tamamlanır.)

**Çizelge 6.4.** Kaspaz-3 aktivite deneyinde kullanılacak örneklerin hazırlanması

Tüp	Hücre	Protein miktarı (µg/4 µl)	Protein miktarı (µg/µl)	Hacim (20 µg için)	1X Lizis Buffer (µl)	5X Assay Buffer (µl)	dH <sub>2</sub> O (µl)	Kaspaz-3 Substrat (µl)	Toplam Son Hacim (µl)
1	B16 Kon	8,8415	2,21	9,05	176,31	52	7,64	15	260
2	4T1 Kon	10,5178	2,63	7,61	177,75	52	7,64	15	260
3	4THMpc Kon	9,6805	2,42	8,26	177,1	52	7,64	15	260
4	B16 1 µM	1,3135	0,33	60,91	124,45	52	7,64	15	260
5	4T1 1 µM	1,2623	0,32	63,38	121,98	52	7,64	15	260
6	4THMpc 1 µM	0,8632	0,22	92,68	92,68	52	7,64	15	260
7	B16 500 nM	1,0924	0,27	73,23	112,13	52	7,64	15	260
8	4T1 500 nM	1,1472	0,29	69,74	115,62	52	7,64	15	260
9	4THMpc 500 nM	0,9602	0,24	83,32	102,04	52	7,64	15	260
10	4T1 100 nM	1,9972	0,5	40,06	145,3	52	7,64	15	260
11	4THMpc 100 nM	1,407	0,35	56,86	128,5	52	7,64	15	260
12	B16 10 nM	1,3638	0,34	58,66	126,7	52	7,64	15	260
13	4T1 10 nM	7,6859	1,92	10,41	174,95	52	7,64	15	260
14	4THMpc 10 nM	6,2921	1,57	12,71	172,65	52	7,64	15	260
15	Substrat Blank				185,36	52	7,64	15	260
<b>Standart eğri çizimi için pNA standart tüplerinin hazırlanışı</b>									
	<b>pNA standart konsrasyonu</b>	<b>1 mM pNA standart stok solüsyonu (µl)</b>	<b>10 µM pNA standart stok solüsyonu (µl)</b>	<b>1X Lizis Buffer (µl)</b>	<b>5X Assay Buffer (µl)</b>	<b>dH<sub>2</sub>O (µl)</b>	<b>Toplam Son Hacim (µl)</b>		
	5 µM	1,3		185,36	52	21,34	260		
	10 µM	2,6		185,36	52	20,04	260		
	50 µM	13		185,36	52	9,64	260		
	100 µM		2,6	185,36	52	20,04	260		

- **TBS-T:** 8 gr/L NaCl, 20 mM Tris HCl pH 7.6 ve %0.1 tween 20 (Hazırlanışı: 8 gr sodyum klorür, 20 ml Tris HCl pH 7.6, 1 ml tween 20, 980 ml dH<sub>2</sub>O)
- **%5 membran blocking solüsyonu:** 1.5 gr membran blocking agent, 30 ml'ye TBS-T ile tamamlanır.
- **Komasi mavisi boyama solüsyonu:** %0.1 Coomassie brilliant blue R250, %50 metanol ve %10 glasiyel asetik asit
- **Jel yıkama solüsyonu:** %10 Metanol, %7 glasiyel asetik asit (Hazırlanışı: 20 ml metanol, 14 ml glasiyel asetik asit, 200 ml'ye dH<sub>2</sub>O ile tamamlanır.)
- **1M Tris HCl pH 8.8:** 12.114 gr tartılır ve yaklaşık 60 ml de çözüldükten sonra pH 8.8'e 1 N HCl ile ayarlanır. Son hacim 100 ml'ye tamamlanır. +4°C'de muhafaza edilir.
- **1M Tris HCl pH 6.8:** 12.114 gr tartılır ve yaklaşık 60 ml de çözüldükten sonra pH 6.8'e 1 N HCl ile ayarlanır. Son hacim 100 ml'ye tamamlanır. +4°C'de muhafaza edilir.
- **%40 akrilamid:** 19.48 gr akrilamid, 0.52 gr bis-akrilamid, 50 ml son hacimde çözülür.
- **%10 amonyum persülfat:** 0.1 gr amonyum persülfat 1 ml dH<sub>2</sub>O'da çözülür.
- **%10 SDS:** 4 gr SDS, 40 ml dH<sub>2</sub>O'da çözülür.
- **Stripping solüsyonu:** 100 mM 2-merkaptöetanol, %2 SDS, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8

#### 6.14. Kullanılan Cihazlar

- Lamin Air Flow mikrobiyolojik güvenlik kabini
- Motik marka inverted mikroskop
- Motic marka mikroskop kamerası
- GFL 2001/4 model su arıtma cihazı
- HF 90 marka CO<sub>2</sub> inkübatörü
- Nüve BM 402 model su banyosu
- Nüve OT 012 model otoklav
- AND GR 200 model analitik terazi
- Hettich ZENTRIFUGEN UNIVERSAL 32R santrifüj

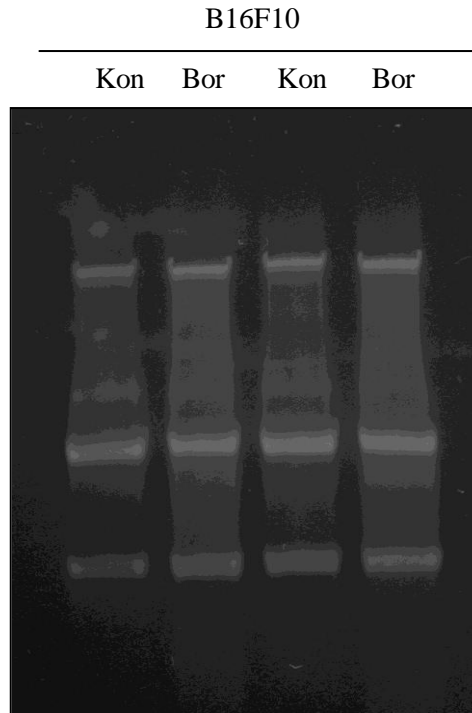


- Hettich ZENTRIFUGEN MİKRO 120 santrifüj
- SANYO marka derin dondurucu
- HANNA marka pH ölçüm cihazı
- KONTES marka Pellet pestle (manuel homejenizatör)
- LABCONCO marka güç kaynağı
- BIO-RAD Smart SpecPlus marka spektrofotometre
- ATTA marka yatay elektroforez tankı
- CONSORT N.V. marka mini elektroforez tankı
- APOLLO Model Western-blot cihazı
- Major science MD 02 EN model dry bath inkübatör
- GYRO-ROCKER STR 9 model çalkalayıcı
- IKA RCT basic model manyetik karıştırıcı
- UNIEQUIP marka UV cihazı
- SPECTROLINE marka UV cihazı

## 7. SONUÇLAR

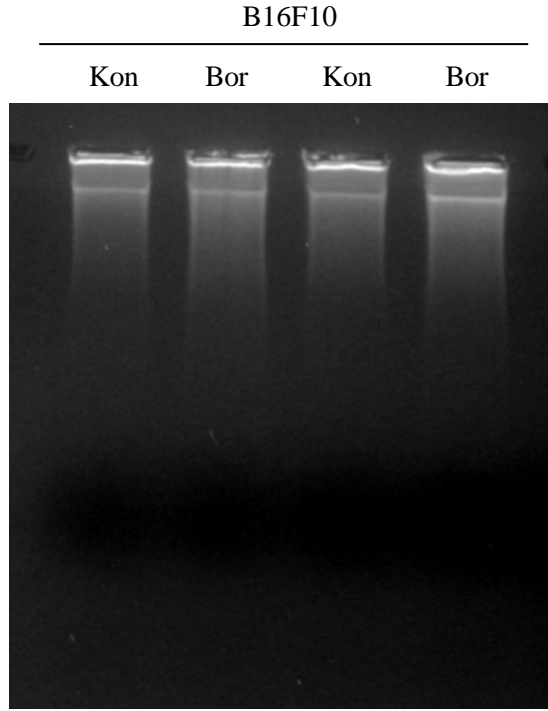
Bu tez çalışmamızdaki hedefimiz; çeşitli proteozom inhibitörlerinin 4T1 meme kanseri (p53 mutant) ve B16F10 melanoma hücreleri üzerindeki apoptotik etkilerinin araştırılmasıdır. Bunun için temel olarak 4T1 meme ve B16F10 melanoma hücreleri ve elde edilen etkileri karşılaştırma imkanı sunmak için 4THMpc (4T1 hücrelerinin kültürlenmesiyle elde edilen daha metastatik meme kanseri hücresi) hücreleri kullanılmıştır. Hücreler 25 cm<sup>2</sup>'lik corning flasklarda çoğaltılıp, her hücre tipinde eşit sayıda hücre 35 mm x 10 mm steril petri kaplarına ekilip, inhibitörlerle muamele edilmiştir.

İlk olarak B16F10 hücrelerinde proteozom inhibitörü bortezomibin etkileri araştırıldı. Eşit sayıda hücre (her petride 100000 hücre) ekildikten sonra hücreler logaritmik faza geldiklerinde 100 nM bortezomib ile 24 saate kadar muamele edildi ve Roche Apoptotik DNA Ladder Kit ile DNA izole edildikten sonra, DNA %1'lik agaroz jel elektroforezinde ayrıştırılıp EtBr ile boyandı ve UV cihazında görüntüldü. Bu işlemler sonucunda 24 saate kadar 100 nM bortezomib muamelesinin B16F10 hücrelerinde DNA fragmentasyonuna yol açmadığı görüldü (Şekil 7.1).



**Şekil 7.1.** Proteozom inhibitörü bortezomibin B16F10 hücrelerinde DNA fragmentasyonuna etkileri. Hücreler, 35 mm x 10 mm petrilere eşit sayıda (100000) ekildikten sonra logaritmik fazdayken 24 saat 100 nM bortezomib ile muamele edilmiştir. Roche Apoptotik DNA Ladder Kit ile DNA izole edildikten sonra, 3 µg DNA, içerisinde 0.5 µg/ml EtBr bulunan %1'lik agaroz jel elektroforezinde ayrıştırılıp en son UV cihazında görüntülenmiştir. Kon, kontrol; bor, bortezomib.

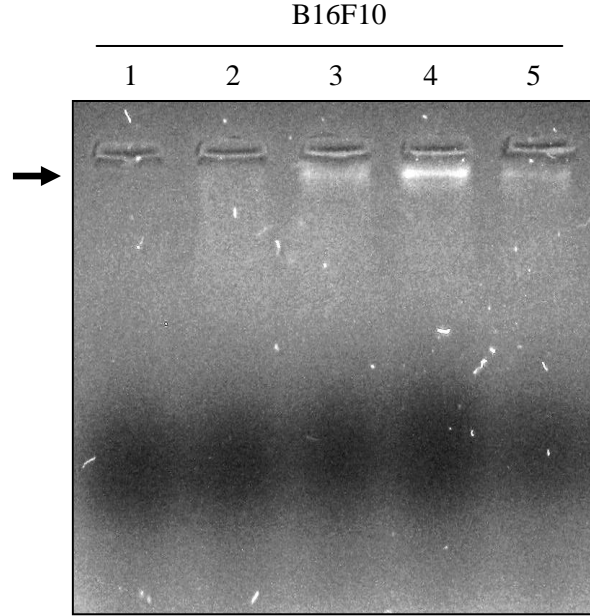
Yaptığımız bu ilk deneyde DNA fragmentasyonu gözlenememesinin sebebi protein ya da RNA kontaminasyonu olabileceği için, daha net bir sonuç elde etmek amacıyla kalan DNA'lar Proteaz-K ve RNase-A ile muamele edildi. Daha sonra 2.5 µg DNA, EtBr içeren %1.5'luk agaroz jel elektroforezinde ayrıştırılıp UV cihazında görüntüledi. Yine bu işlemler sonrasında kontrol ve bortezomib muamelesi arasında herhangi bir fark gözlenmedi (Şekil 7.2).



**Şekil 7.2.** B16F10 hücrelerinden izole edilen DNA'nın Proteinaz-K ve RNase-A ile muamele edildikten sonra görüntülenmesi. B16F10 hücreleri 24 saat süre ile 100 nM bortezomib ile muamele edildikten sonra Roche Apoptotik DNA ladder Kit ile izole edilen DNA'lar Proteinaz-K ve RNase-A ile muamele edilmiştir. Kon, kontrol; bortezomib

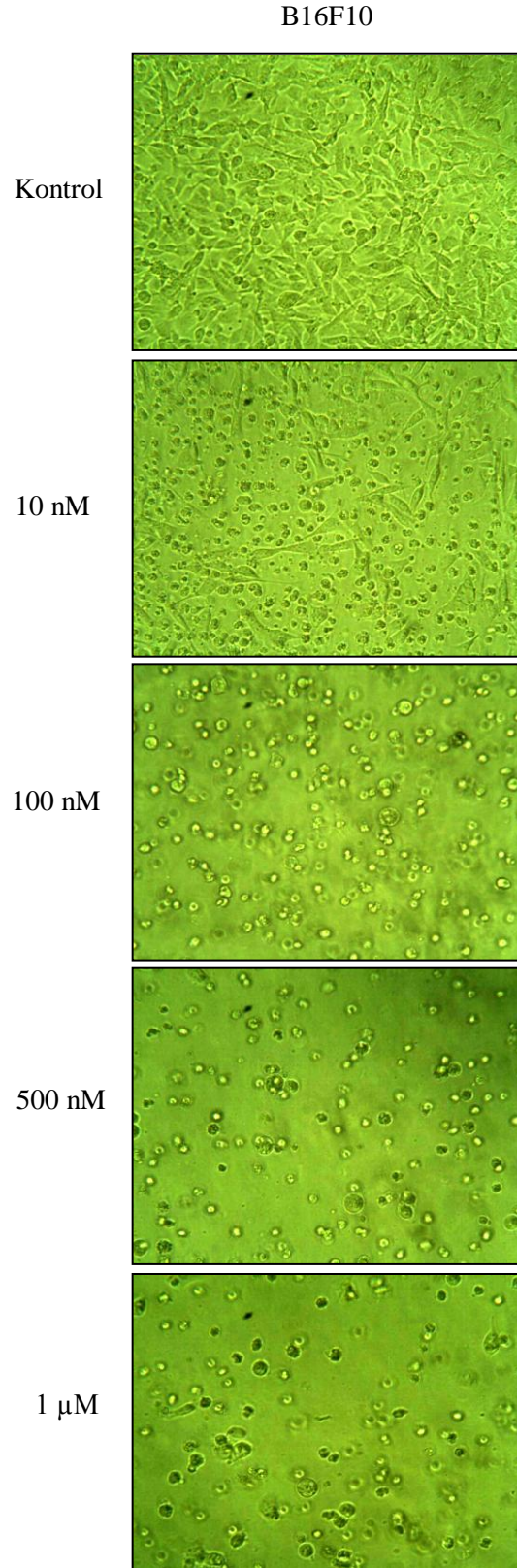
Yapılan bu deneylerde DNA fragmentasyonu elde edilememesi farklı yöntemler denenmesi ihtiyacını doğurmuştur. Çünkü, DNA fragmentasyonunun görülmemesinin çeşitli nedenleri olabilir. Bu yüzden Roche Apoptotik DNA Ladder Kit'in B16F10 hücrelerinde doğru sonuç vermiyor olabileceği düşünülerek DNA izolasyonunda başka bir prosedür uygulanmaya karar verildi. Ayrıca, DNA fragmentasyonunun geç uyarılabileceği düşünülerek daha uzun süreli bortezomib konsantrasyonları uygulanmaya karar verildi. Bunun için, B16F10 hücreleri 48 saat süre ile farklı bortezomib konsantrasyonları (10, 100, 500 nM ve 1 µM) ile muamele edildi, Wei ve Arkadaşları tarafından yayınlanan makaledeki [75] metot uyarlanarak DNA izole edildi ve %1.5'luk agaroz jelde ayrıştırılıp UV cihazında görüntüledi. Sonuç olarak, kontrol grubunda DNA bandı görülmezken, bortezomib konsantrasyonuna bağlı olarak DNA fragmentasyonunda artış gözlemlendi. Bortezomib uygulanan bantlarda yüksek moleküler

ağırlıklı bant gözükmürken, kontrol grubunda bu bandın gözükmemesi; DNA fragmentasyonunu dolayısıyla apoptozisi işaret etmektedir (Şekil 7.3).

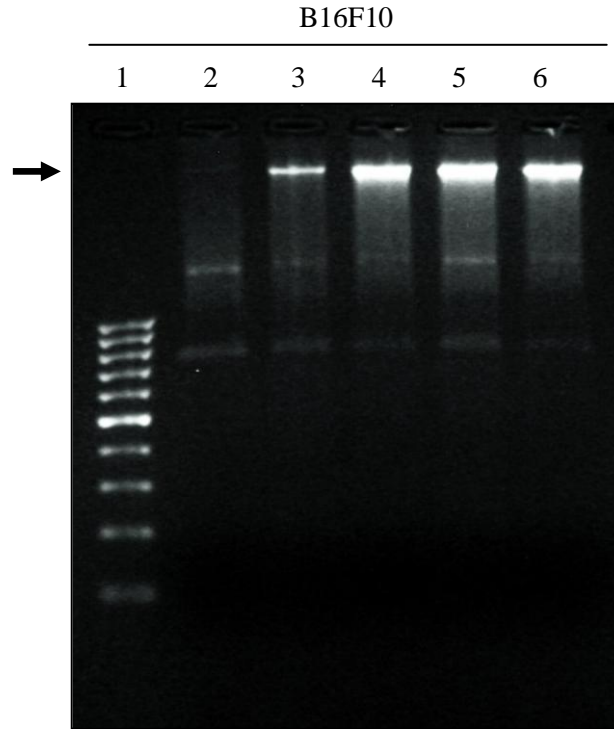


**Şekil 7.3.** B16F10 hücrelerinde 48 saat süre ile uygulanan proteozom inhibitörü bortezomibin farklı konsantrasyonlarının DNA fragmentasyonuna etkileri. Hücreler, petrilere eşit sayıda ekilip logaritmik faza geldikten sonra farklı konsantrasyonlardaki bortezomib ile 48 saat muamele edildikten sonra DNA izole edildi. Daha sonra 2 µg DNA, içerisinde 0.5 µg/ml EtBr bulunan %1.5'lik agaroz jel elektroforezinde ayrıştırıldı ve UV cihazında görüntülendi. Çizgi 1, kontrol; çizgi 2, 10 nM bortezomib; çizgi 3, 100 nM bortezomib; çizgi 4, 500 nM bortezomib; çizgi 5, 1 µM bortezomib; →, yüksek moleküler ağırlıklı bant

Uyguladığımız bu prosedür, B16F10 melanoma hücrelerinde DNA fragmentasyonu analizi ile apoptozisin teşhis edilebileceğini göstermektedir. Ancak bu metot, gerek elde edilen DNA'nın kalitesinin yetersiz olması gerek de bu prosedürü uygulamanın çok zaman alması gibi dezavantajlara sahiptir. Bu yüzden, bu deneyde uygulanan muamele süresi ve farklı bortezomib konsantrasyonlarında deney Roche Apoptik DNA Ladder Kit ile tekrarlandı. B16F10 hücreleri 48 saat süreyle farklı bortezomib konsantrasyonları (10 nM, 100 nM, 500 nM ve 1 µM) ile muamele edildi ve bu süre sonundaki morfolojileri inverted mikroskopta incelenip Motic mikroskop kamerasıyla görüntülendi. Daha sonra Roche Apoptik DNA Ladder Kit ile DNA izole edilip agaroz jel elektroforezinde ayrıştırıldı. Sonuçta; inverted mikroskop ile yapılan morfolojik incelemede, kontrol grubunda herhangi bir değişme olmayıp sağlıklı olduğu gözlenirken, bortezomib ile muamele edilen hücrelerde 10 nM'dan itibaren morfolojik olarak küçülme, petri kabından kalkma ve ışığı daha fazla kırma gözlemlendi (Şekil 7.4). Ayrıştırılan DNA'lar incelendiğinde ise, yine kontrol grubunda bir kırılma gözlenmezken, bortezomib ile muamele edilen hücrelerde net bir şekilde DNA fragmentasyonu görüntülendi (Şekil 7.5).

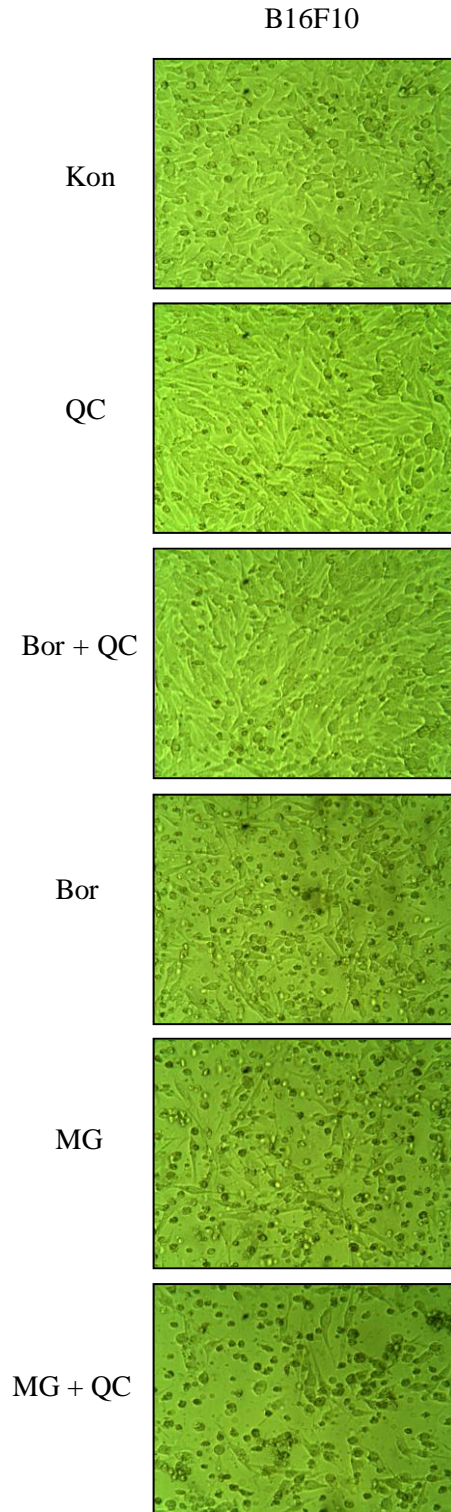


**Şekil 7.4.** 48 saat süre ile bortezomibin farklı konsantrasyonları ile muamele edilmiş B16F10 hücrelerinin morfolojileri. Motik marka mikroskop kamerası ile 20X'de görüntülendi.

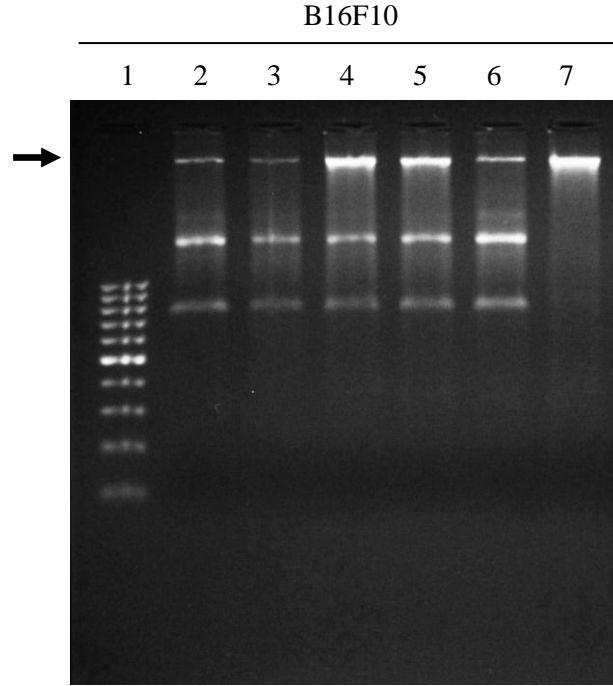


**Şekil 7.5.** B16F10 hücrelerinde bortezomibin farklı konsantrasyonlarının DNA fragmentasyonu üzerine etkilerinin Roche Apoptotik DNA Ladder Kit kullanılarak görüntülenmesi. Eşit sayıda ekimi yapılan hücreler logaritmik faza geldikten sonra bortezomibin farklı konsantrasyonları ile 48 saat muamele edildi. Roche Apoptotik DNA Ladder Kit ile DNA'lar izole edildi. Daha sonra, 0.5 µg DNA, içerisinde 0.5 µg/ml EtBr bulunan %1.5'luk agaroz jel elektroforezinde 2 saat süreyle ayrıştırıldı ve UV cihazında görüntüldü. Çizgi 1, marker (2 µl); çizgi 2, kontrol; çizgi 3, 10 nM bortezomib; çizgi 4, 100 nM bortezomib; çizgi 5, 500 nM bortezomib; çizgi 6, 1 µM bortezomib.

Bir sonraki deneyde proteozom inhibitörleri bortezomib, MG132, Hsp70 inhibitörü quercetin ve bunların kombinasyonlarının B16F10 hücreleri üzerindeki apoptotik etkileri araştırıldı. Eşit miktarda ekilen hücreler logaritmik faza geldikten sonra inhibitörlerle 48 saat muamele edildi ve inverted mikroskopla morfolojileri görüntüldü. Bu süre sonunda Roche Apoptotik DNA Ladder Kit kullanılarak hücrelerden DNA izole edildi ve 0.5 µg DNA, 0.5 µg/ml EtBr içeren %1.5'luk agaroz jel elektroforezinde ayrıştırıldıktan sonra UV cihazında görüntüldü. Sonuç olarak; morfolojik incelemede, bortezomib, MG132 ve MG132 + quercetin muamelelerinde apoptotik hücrelerde görülen morfolojik değişiklikler gözlenirken; kontrol, quercetin ve bortezomib + quercetin muamelelerinde herhangi bir değişiklik gözlenmedi (Şekil 7.6). Agaroz jelde ayrıştırılan DNA'lar incelendiğinde ise, morfolojik analizlerle paralel şekilde, bortezomib, MG132 ve MG132 + quercetin muamelelerinde DNA fragmentasyonu görülürken (Şekil 7.7, çizgi 4, 5, 7, 10, 11, 13); kontrol, quercetin ve bortezomib + quercetin muamelelerinde herhangi bir kırılma gözlenmedi (Şekil 7.7, çizgi 2, 3, 6, 8, 9, 12).



**Şekil 7.6.** B16F10 hücrelerinin farklı inhibitörlerle 48 saat muamele edildikten sonraki morfolojileri. Hücreler, 10nM bortezomib; 0.5 µM MG132; 20 µM quercetin; 10 nM bortezomib + 20 µM quercetin; 0.5 µM MG132 + 20 µM quercetin ile 48 saat muamele edildikten sonra inverted mikroskopta 20X'te görüntülendi. Kon, kontrol; bor, bortezomib; MG, MG132; QC, quercetin

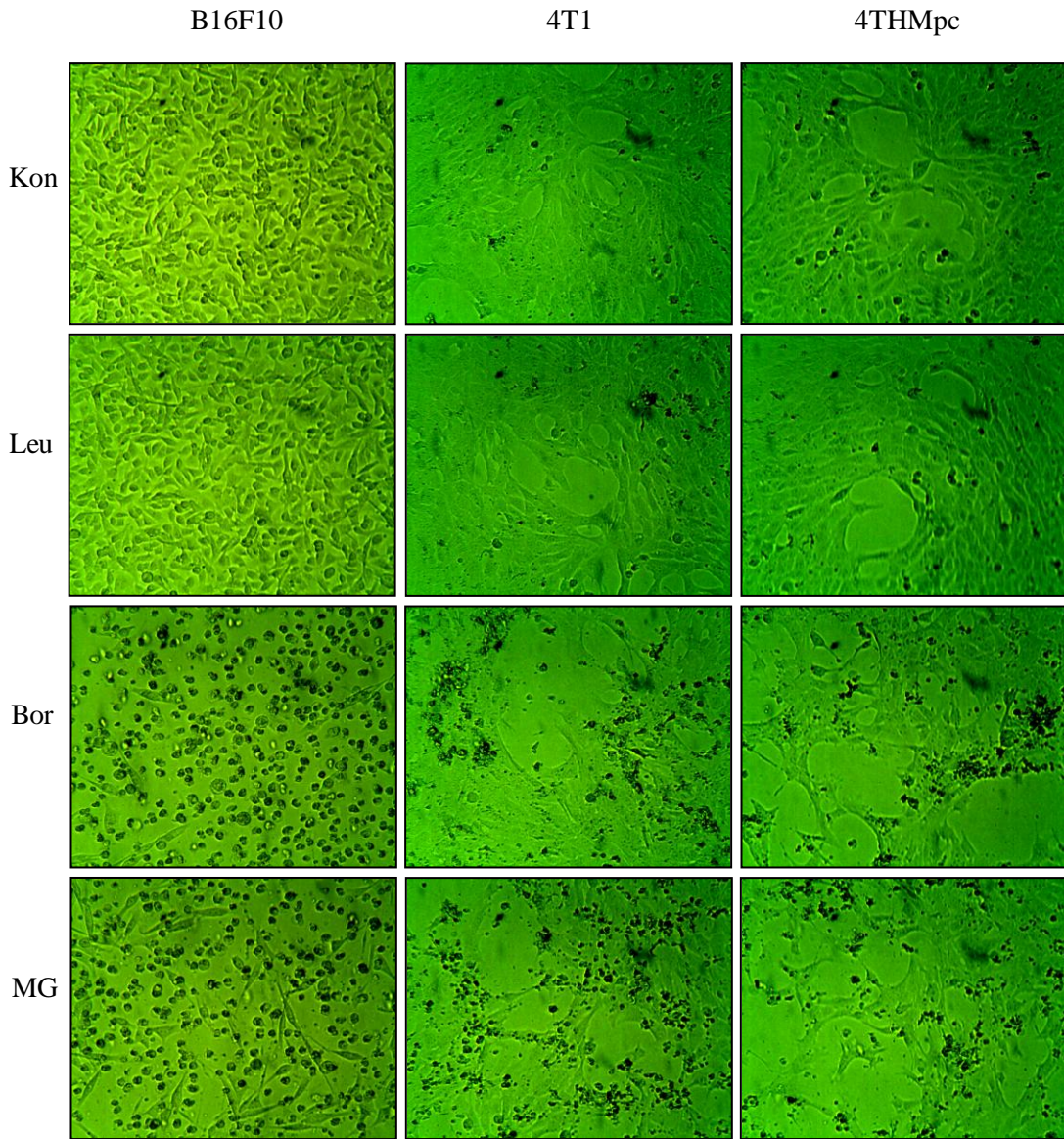


**Şekil 7.7.** B16F10 hücrelerinde farklı inhibitörlerin DNA fragmentasyonuna etkileri. Eşit sayıda ekimi yapılan hücreler logaritmik faza geldikten sonra, 10 nM bortezomib; 0.5  $\mu$ M MG132; 20  $\mu$ M quercetin; 10 nM bortezomib + 20  $\mu$ M quercetin; 0.5  $\mu$ M MG132 + 20  $\mu$ M quercetin ile 48 saat muamele edildi ve Roche Apoptotik DNA Ladder Kit ile izole edildi. İzole edilen 0.5  $\mu$ g DNA, 0.5  $\mu$ g/ml EtBr içeren %1.5'lük agaroz jel elektroforezinde ayrıştırıldı ve UV cihazında görüntülendi. Çizgi 1, marker; çizgi 2, kontrol; çizgi 3, quercetin; çizgi 4, bortezomib; çizgi 5, MG132; çizgi 6, bortezomib + quercetin; çizgi 7, MG132 + quercetin

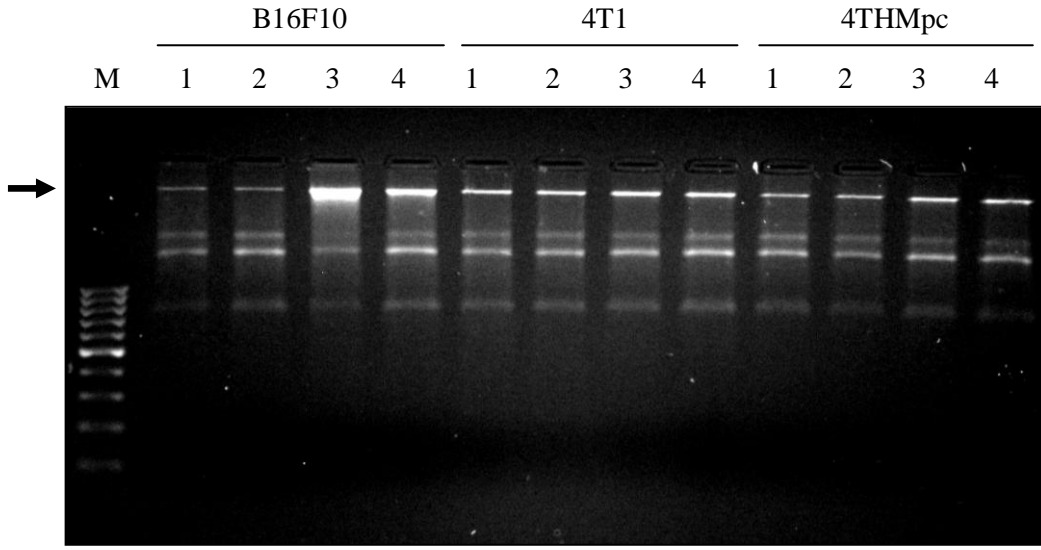
İlerleyen çalışmalarda B16F10 melanoma hücrelerinin yanında; diğer çalışma konumuz olan p53-mutant 4T1 meme kanseri hücreleri ve etkilerin karşılaştırılması amacıyla 4T1 hücrelerinin kültürlenmesiyle elde edilen daha metastatik 4THMpc hücreleri deneylerimizde kullanıldı. Eşit miktarlarda ekimi yapılan her üç hücre tipi de logaritmik faza gelince 48 saat süreyle proteozom inhibitörleri bortezomib, MG132 ve lizozomal inhibitör leupeptin ile muamele edildi. Daha sonra Roche Apoptotik DNA Ladder Kit ile DNA'lar izole edildi ve agaroz jelde ayrıştırıldı. Morfolojik analizler incelendiğinde, 48 saatlik muamele sonucunda, 10 nM bortezomib ve 0.5  $\mu$ M MG132 ile muamele edilen B16F10 hücrelerinde apoptotik hücrelerde görülen morfolojik değişiklikler gözlenirken; 4T1 ve 4THMpc hücre tiplerinin bortezomib ve MG132 muamelesinden çok fazla etkilenmedikleri görüldü. 10  $\mu$ M leupeptin muamelesi ise her üç hücre tipinde de herhangi bir sitotoksik etki meydana getirmedi (Şekil 7.8). DNA analizleri sonucunda, bortezomib ve MG132 ile muamele edilen B16F10 hücrelerinde DNA fragmentasyonu uyarılırken (Şekil 7.9, çizgi 4, 5); leupeptin ile uyarılmadı. 4T1 ve 4THMpc hücrelerinde ise kontrol, bortezomib, MG132 ve leupeptin muameleleri sonrasında



DNA fragmentasyonları arasında fark gözlenmedi (Şekil 7.9, çizgi 6- 13). DNA analiz sonuçları ile morfolojik analizlerin sonuçları paralellik göstermektedir. Bu sonuçlar, 4T1 ve 4THMpc hücrelerinin; B16F10 hücrelerine göre proteozom inhibitörlerine daha dirençli olduğunu ve lizozomal inhibitör leupeptinin her üç hücre tipinde de DNA fragmentasyonunu uyarıcı etkide bulunmadığını göstermektedir.



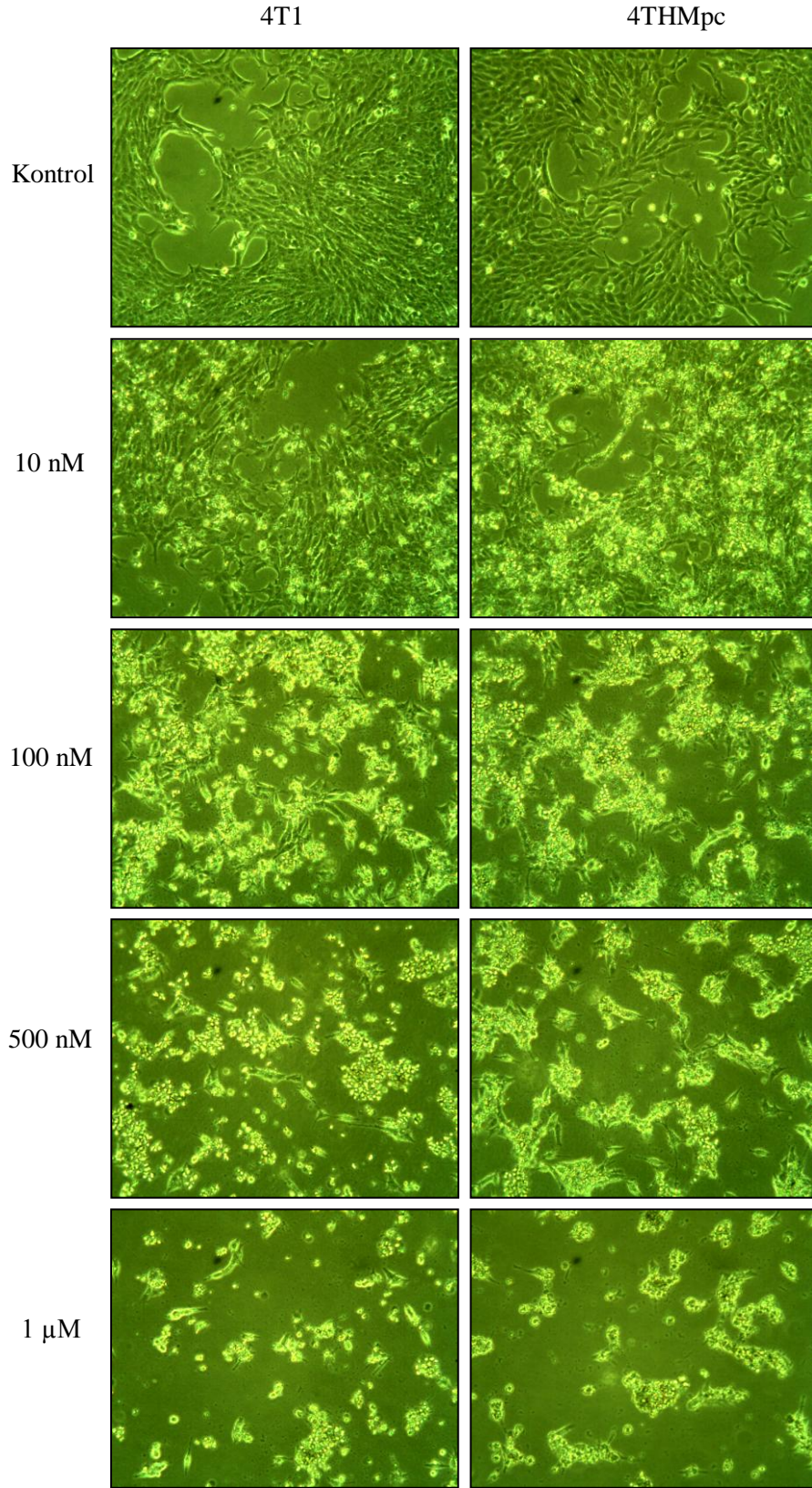
**Şekil 7.8.** B16F10, 4T1 ve 4THMpc hücrelerinin farklı proteozom inhibitörleriyle 48 saat muamelesi sonrası morfolojileri. Hücreler; 10 nM bortezomib, 0.5µM MG132 ve 10 µM leupeptin ile 48 saat muamele edildi ve daha sonra inverted mikroskopta 20X'te morfolojileri görüntülendi. Kon, kontrol; leu, leupeptin; bor, bortezomib; MG, MG132



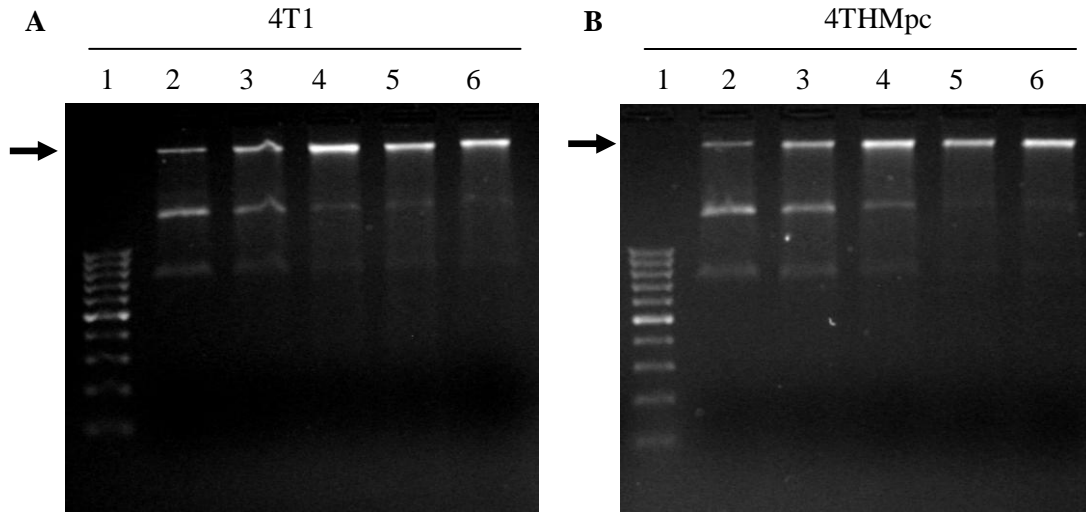
**Şekil 7.9.** B16F10, 4T1 ve 4THMpc hücrelerinde proteozom inhibitörlerinin DNA fragmentasyonuna etkileri. Hücreler, 10 nM bortezomib, 0.5  $\mu$ M MG132 ve 10  $\mu$ M leupeptin ile 48 saat süre ile muamele edildikten sonra Roche Apoptotik DNA Ladder Kit ile DNA izole edildi. 0.5  $\mu$ g DNA; içinde 0.5  $\mu$ g/ml EtBr bulunan %1.5'lük agaroz jel elektroforezinde ayrıştırıldı ve UV cihazında görüntülendi. M, 100 bp marker; çizgi 1, kontrol (DMSO, ilaç çözücüsü); çizgi 2, leupeptin; çizgi 3, bortezomib; çizgi 4, MG132.

B16F10 hücrelerinin tümör baskılayıcı p53-bağımlı apoptozis gösterdikleri bunun yanında 4T1 ve 4THMpc hücrelerinin p53-mutant oldukları bilinmektedir. Son yaptığımız deneyde düşük konsantrasyonlu (10 nM) bortezomib muamelesi ile B16F10 hücrelerinde DNA fragmentasyonu görülürken, 4T1 ve 4THMpc hücrelerinde görülmemiştir. Yine daha önce yaptığımız bir deneyde düşük konsantrasyonlu bortezomib muamelesinin yanında daha yüksek konsantrasyonlu bortezomib muamelelerinin de DNA fragmentasyonunu uyardığı görülmüştür (bkz. Şekil 7.5). Düşük konsantrasyonlu bortezomib muamelesinden etkilenmeyen 4T1 ve 4THMpc hücrelerinin bortezomibin daha yüksek konsantrasyonlarına cevap verip vermeyeceğini belirlemek için bu hücreler eşit sayıda ekim yapıp logaritmik faza geldikten sonra 48 saat süre ile farklı bortezomib konsantrasyonları (10 nM, 100 nM, 500 nM ve 1  $\mu$ M) ile muamele edildi. DNA'ları Roche Apoptotik DNA Ladder Kit ile izole edildi ve agaroz jelde ayrıştırıldı. Her iki hücre tipinde de 100 nM ve daha yüksek bortezomib konsantrasyonlarında, apoptotik hücrelerde görülen morfolojik değişiklikler (Şekil 7.10) ve ayrıştırılan DNA'larda kırılma meydana geldiği gözlemlendi (Şekil 7.11, A, B). Bu sonuçlar, 4T1 ve 4THMpc hücrelerinin B16F10 hücrelerine göre proteozom inhibitörlerine daha dirençli olduğunu göstermektedir ve bu olayda p53 proteininin etkili olduğu bilgisini desteklemektedir.



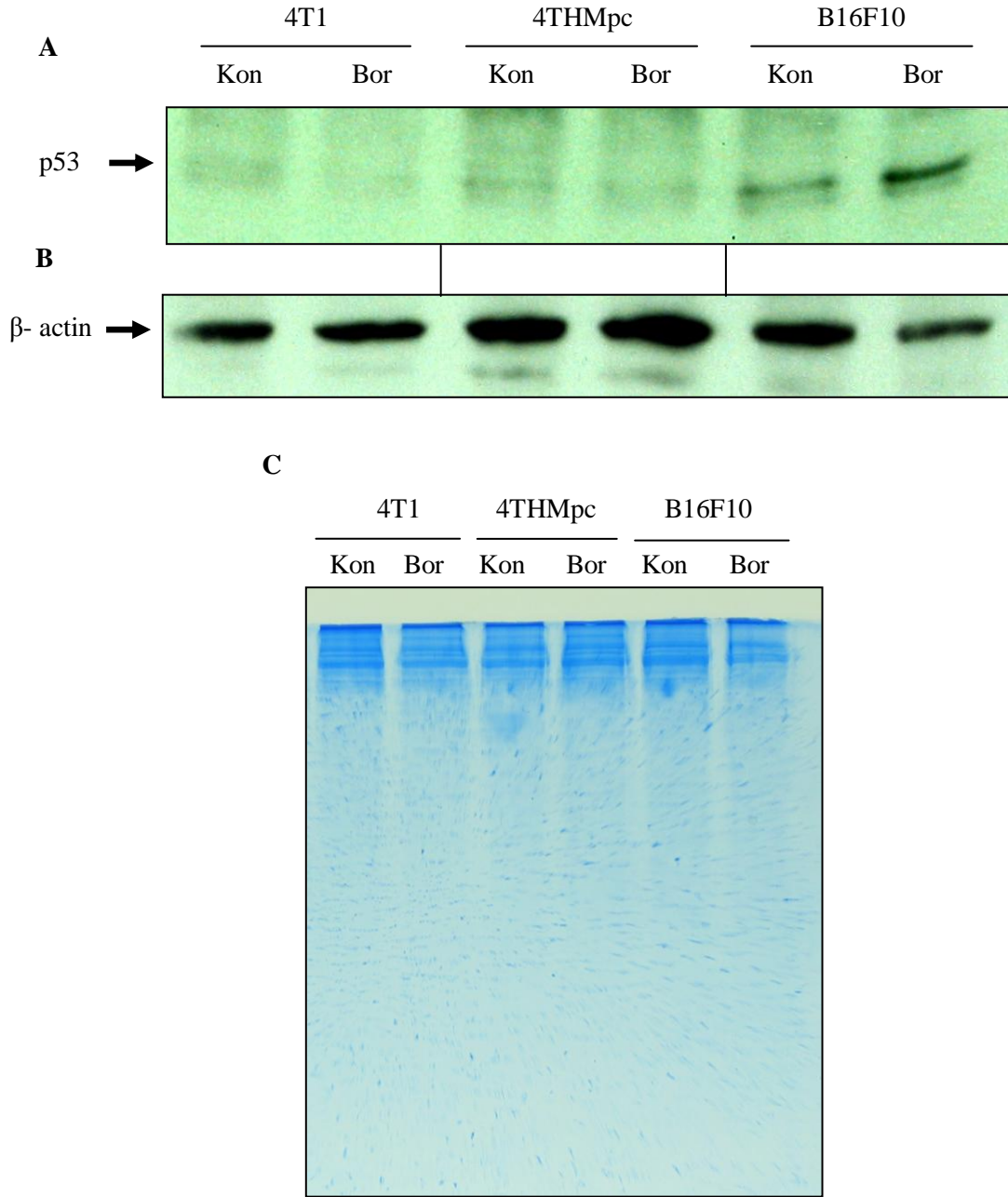


**Şekil 7.10.** 4T1 ve 4THMpc hücrelerinin farklı bortezomib konsantrasyonları ile 48 saat muamele edildikten sonraki morfolojileri.



**Şekil 7.11.** Bortezomibin farklı konsantrasyonlarının 4T1 (A) ve 4THMpc (B) hücreleri üzerindeki etkileri. Eşit sayıda ekilen hücreler logaritmik faza geldikten sonra bortezomibin farklı konsantrasyonları ile 48 saat muamele edildi. Roche Apoptotik DNA Ladder Kit ile DNA'lar izole edildi. Daha sonra, 0.5 mg DNA, içerisinde 0.5 µg/ml EtBr bulunan %1.5 agaroz jel elektroforezinde ayrıştırıldı ve UV cihazında görüntüldü. Çizgi 1, 100 bp marker (2 µl); çizgi 2, kontrol (izotonik NaCl- ilaç çözücüsü); çizgi 3, 10 nM bortezomib; çizgi 4, 100 nM bortezomib; çizgi 5, 500 nM bortezomib; çizgi 6, 1 µM bortezomib.

B16F10 hücrelerinin apoptozisinde p53 proteinin rol aldığı ve 4T1 ile 4THMpc hücrelerinde ise p53-bağımsız apoptozis gerçekleştiği bilgisini teyit etmek için; her üç hücre tipi 10 µM bortezomib ile kısa süreli (6 saat) olarak muamele edildi. Bu süre sonunda proteinler izole edildi ve "Bio-Rad Protein Assay Metodu" ile protein konsantrasyonları belirlendi. Bio-Rad sonucunda  $r^2$  değeri 0.9889 olarak elde edildi. İzole edilen 45 µg total protein %12'lik SDS-PAGE'de ayrıştırıldıktan sonra Western blot ile jeldeki proteinler PVDF membrana transfer edildi. Daha sonra p53 ve  $\beta$ -actin (eşit yükleme yapıp yapılmadığını kontrol etmek için) proteinlerinin miktarlarına bakmak için PVDF membran belirli antikolar ile muamele edildi. Bu işlem sonucunda, PVDF membrandaki görüntüler, film banyo işlemi gerçekleştirilerek Bio-Max filme aktarıldı (Şekil 7.12, A, B). Ayrıca jelden membrana proteinlerin transfer verimliliğini görmek ve eşit miktarda yükleme yapıldığını bir kez daha doğrulamak için Western blot işleminden sonra jel koması mavisi ile boyandı (Şekil 7.12, C). p53 miktarına bakıldığında; B16F10 hücrelerinde 6 saat gibi kısa süreli bir proteozom inhibisyonundan sonra önemli oranda bir p53 birikmesi görülürken, 4T1 ve 4THMpc hücrelerinde herhangi bir p53 birikmesi görülmedi. Sonuçların güvenilirliği;  $\beta$ -actin muamelesi ve jelin koması mavisi ile boyanması ile desteklendi. Bu sonuçlar; p53'ün B16F10 hücrelerinin apoptozisinde rol aldığı; 4T1 ve 4THMpc hücrelerinin ise p53-mutant olup, p53-bağımsız apoptozis gösterdiği bilgisini doğruladı.



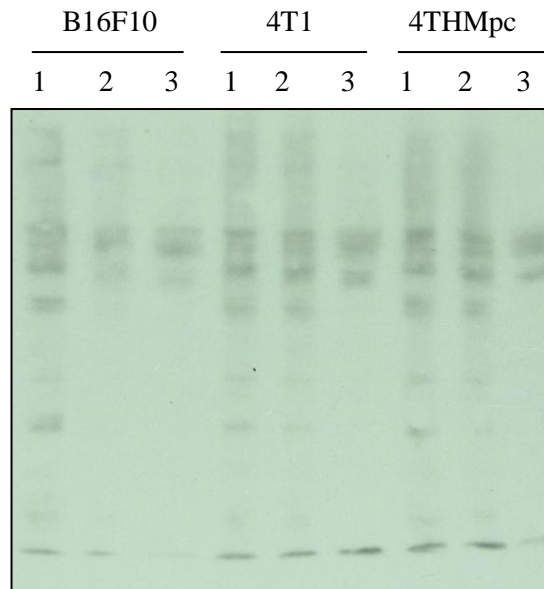
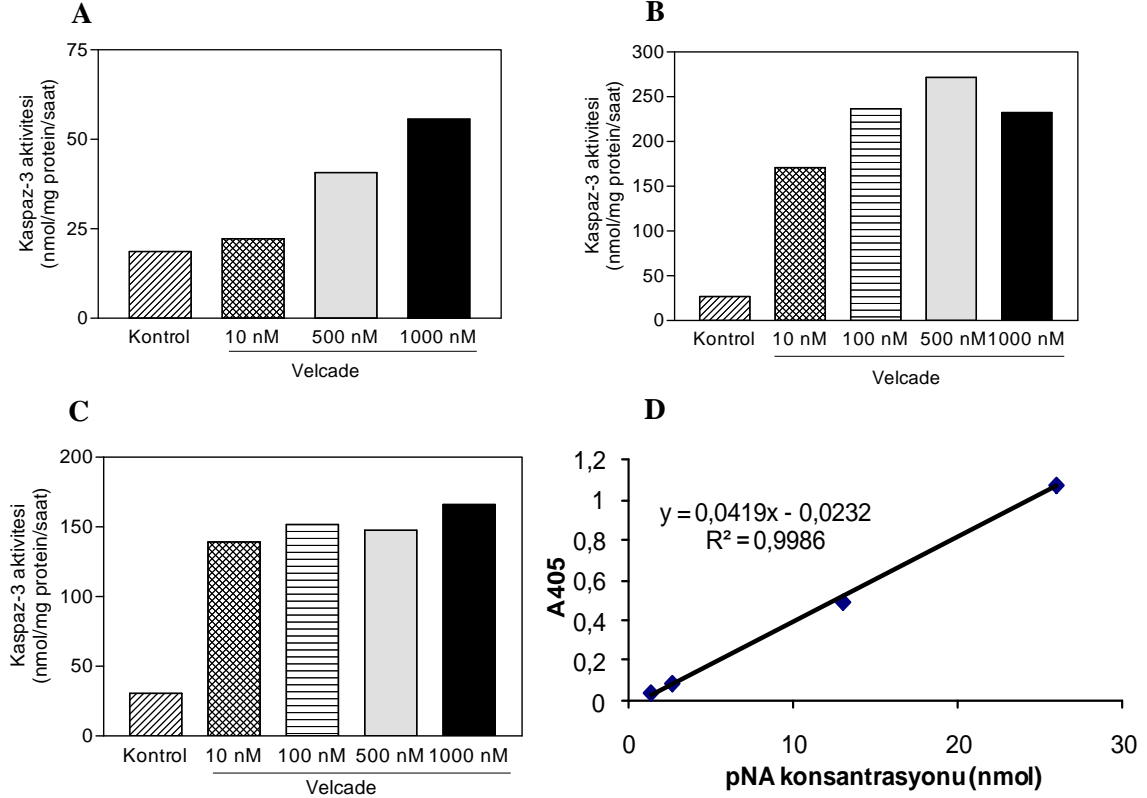
**Şekil 7.12.** A) B16F10, 4T1 ve 4THMpc hücre tiplerinde p53 ve  $\beta$ -actin miktarının belirlenmesi. Eşit miktarda ekilen hücreler logaritmik faza geldikten sonra 10  $\mu$ M bortezomib ile muamele edildi. Proteinler izole edildi ve 45 $\mu$ g total protein %12'lik SDS-PAGE'de ayrıştırılıp Western blot yöntemi ile proteinler PVDF membrana transfer edildi. p53'ü belirlemek için; PVDF membran primer antikor olarak tavşan anti-p53 monoklonal antikor ve sekonder antikor olarak anti-rabbit antikor ile muamele edildi. **B)**  $\beta$ -actin miktarını belirlemek için ise; primer antikor olarak fare anti- $\beta$ -actin antikor ve sekonder antikor olarak anti-mouse antikor kullanıldı. Antikor muamelesinden sonra film banyosu yapılarak, PVDF membrandaki protein görüntüleri Bio-Max filme aktarıldı. **C)** Western blot işleminden sonra eşit yükleme yapıldığı doğrulamak için jel komasi mavisi ile boyandı.

Yaptığımız hücre morfolojisi ve DNA fragmentasyonu analizlerinde; proteozom inhibitörleri bortezomib ve MG132'nin 48 süre ile uygulandığında B16F10 hücrelerinde apoptozisi uyardığı ancak lizozomal inhibitör leupeptinin apoptozisi uyarıcı etki yapmadığı belirlendi. Ayrıca Western blot analizleriyle; 6 saat süreli 10  $\mu$ M bortezomib muamelesi ile B16F10 hücrelerinde p53 ekspresyonu uyarılırken, 4T1 ve 4THMpc hücrelerinde p53 birikimi gözlenmedi. Bundan sonra her üç hücre tipinde de, proteozom inhibitörlerinin uyardığı apoptoziste görev aldığı bilinen kaspaz-3 enziminin aktivasyonunun uyarılıp uyarılmadığına bakılmaya karar verildi.

B16F10, 4T1 ve 4THMpc hücreleri eşit sayıda ekilip logaritmik faza geldikten sonra 48 saat süreyle farklı bortezomib konsantrasyonları ile (10 nM, 100 nM, 500 nM ve 1  $\mu$ M) ile muamele edildi. Daha sonra hücrelerin proteinleri izole edildi ve Bio-Rad Protein Assay Metodu ile protein konsantrasyonları ölçüldü. Chemicon Kaspaz-3 Kitinin protokolüne göre gerekli yüklemeler yapılarak örnekler hazırlandı ve kaspaz-3 aktivite ölçümleri yapıldı. Deney sonucunda B16F10 hücrelerinin kaspaz-3 aktivitelerine bakıldığında; kontrole göre, 10 nM bortezomib muamelesi 1.19 kat; 500 nM bortezomib 2.18 kat ve 1  $\mu$ M bortezomib ise 3 kat artışa neden oldu (B16F10 hücrelerinin 100 nM bortezomib muamelesinde protein miktarı çok düşük olduğu için kaspaz-3 aktivitesi ölçülemedi) (Çizelge 7.1, A). 4T1 hücrelerinin kaspaz-3 aktivitesinde; kontrole göre, 10 nM bortezomib muamelesi 6.3 kat; 100 nM bortezomib 8.8 kat; 500 nM bortezomib 10.1 kat ve 1  $\mu$ M bortezomib ise 8.6 kat artışa neden oldu (Çizelge 7.1, B). 4THMpc hücrelerinin kaspaz-3 aktivitesine bakıldığında ise; kontrole göre, 10 nm bortezomib muamelesi 4.6 kat; 100 nM bortezomib 5 kat; 500 nM bortezomib 4.8 kat ve 1  $\mu$ M bortezomib ise 5.4 kat artışa neden oldu (Çizelge 7.1, C). Oluşan ürün miktarını nmol/mg protein/saat olarak hesaplamak için çizilen standart eğri Çizelge 7.1, D'de görülmektedir.

Elde edilen kaspaz-3 aktivite deneylerinin sonuçlarını doğrulamak için, kaspaz-3 proenzim kırılmaları Western blot metodu ile analiz edildi. İlk olarak eşit sayıda ekimi yapılan B16F10, 4T1 ve 4THMpc hücreleri logaritmik faza gelince 48 saat süre ile 10 nM ve 1  $\mu$ M bortezomib ile muamele edildi ve proteinleri izole edildi. 25  $\mu$ g protein %12'lik SDS-PAGE'de ayrıştırıldı. Proteinler, Western blot ile PVDF membrana aktarıldıktan sonra Millipore marka 1:200 oranında seyreltilmiş poliklonal anti-kaspaz-3 antikoru ile inkübe edilip film banyo işlemi gerçekleştirildi. Bu işlemler sonucunda; hem 32 kDa ağırlığında olan kaspaz-3 proenzimi hem de prokaspaz-3 aktivasyonu sonucu ortaya çıkan p17 kDa ve p12 kDa'lık kırılma ürünleri görülmüdü (Şekil 7.13). Benzer sonuç, membrana aktarılan 60  $\mu$ g protein ve aynı antikorun 1:100 oranında seyreltilmesi ile de elde edildi.

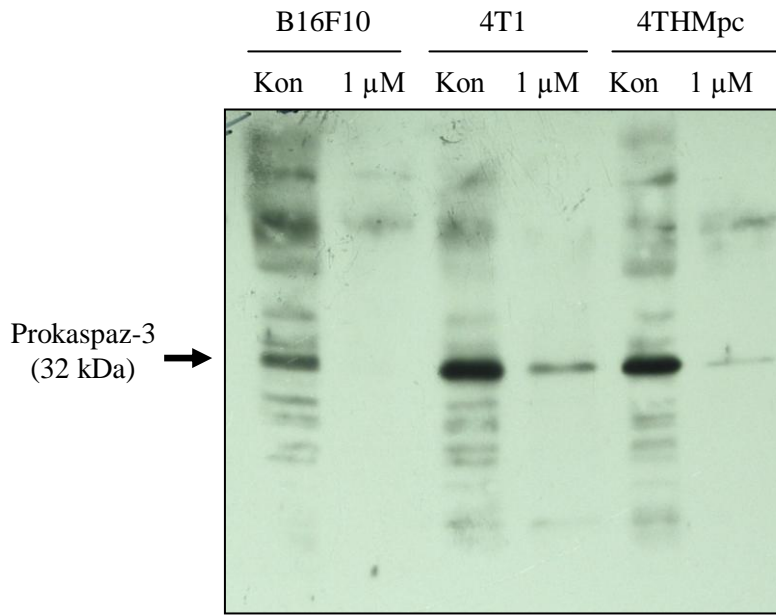
**Çizelge 7.1.** B16F10, 4T1 ve 4THMpc hücrelerinde 48 saat süreyle uygulanan farklı konsantrasyonlardaki bortezomibin kaspaz-3 aktivitesine etkileri



**Şekil 7.13.** B16F10, 4T1 ve 4THMpc hücrelerinde 48 saat süreyle uygulanan 10 nM ve 1 $\mu$ M bortezomib konsantrasyonlarının kaspaz-3 proenzim kırılmasına etkileri. İzole edilen 25  $\mu$ g protein, %12'lik SDS-PAGE'de ayrıştırıldı ve Western blot ile PVDF membrana aktarıldı. Membran; Millipore marka 1:200 oranında seyreltilmiş poliklonal anti-kaspaz-3 ile muamele edilip, film banyo işlemi gerçekleştirildi. 1, kontrol; 2, 10 nM bortezomib; 3, 1  $\mu$ M bortezomib



Bu sonuç üzerine, kullanılan antikorun değiştirilmesine karar verildi. Kalan örnekler üzerinde Santa Cruz Biyoteknoloji Inc. firmasından elde edilen poliklonal anti-kaspaz-3 antikorunu denendi. 48 saat süreyle 1  $\mu$ M bortezomib ile muamele edilen hücrelerden izole edilen 30  $\mu$ g protein %15'lik SDS-PAGE'de ayrıştırılıp PVDF membrana aktarıldıktan sonra, 1:200 oranında seyreltilmiş anti-kaspaz-3 antikorunu ile muamele edildi. Deney sonucunda; kontrol gruplarında prokaspaz-3 bantları net bir şekilde görülürken; bortezomib ile muamele edilen hücrelerde ise hemen hemen hiç bant görülmedi (Şekil 7.14).

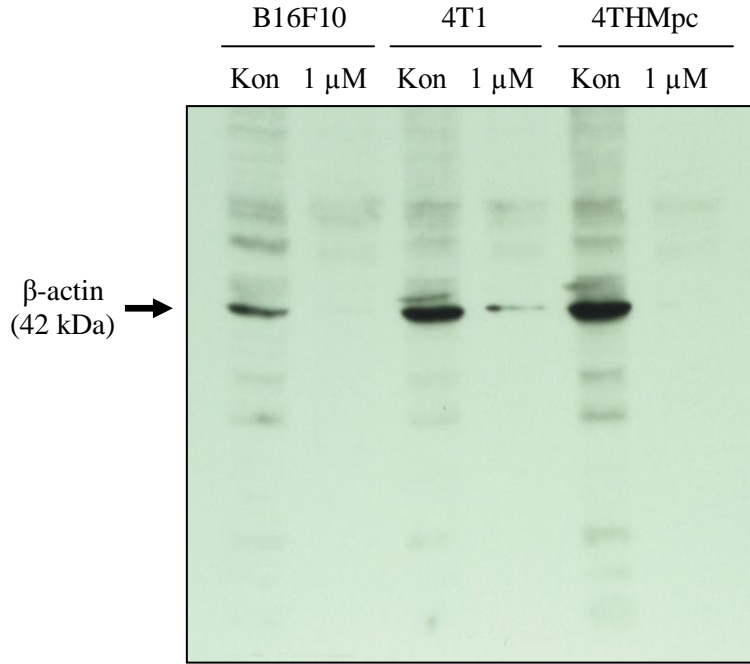


**Şekil 7.14.** B16F10, 4T1 ve 4THMpc hücrelerinde 48 saat süreyle uygulanan 1  $\mu$ M bortezomibin kaspaz-3 proenzim kırılmasına etkisi. İzole edilmiş olan 30  $\mu$ g protein %15'lik SDS-PAGE'de ayrıştırılıp, proteinler Western blot ile PVDF membrana transfer edildi. Santa Cruz marka 1:200 oranında seyreltilmiş anti-kaspaz-3 antikorunu PVDF membrana uygulandı ve film banyo işlemi gerçekleştirildi. Kon, kontrol

Millipore firmasından alınan antikorda olduğu gibi Santa Cruz marka anti-kaspaz-3 antikorunda da kaspaz-3 aktivasyon ürünleri görülmemiştir. İlk olarak, antikorun spesifik olarak proenzim formunu tanıdığı düşünüldü ve proteinlerin eşit miktarda yüklenip yüklenilmediğini belirlemek için  $\beta$ -actin miktarına bakıldı. Ancak beklenilenin aksine, bortezomib ile muamele edilen gruplarda kaspaz-3 miktarında olduğu gibi  $\beta$ -actin miktarında da önemli bir azalma olduğu görüldü. Eğer  $\beta$ -actin miktarları eşit çıksaydı kaspaz-3 miktarındaki azalmanın aktivasyondan dolayı olabileceği düşünülebilirdi ancak  $\beta$ -actin miktarı da önemli ölçüde azaldığı için, kaspaz-3 miktarındaki düşüşün aktivasyonla alakalı olma ihtimalinin düşük olduğu düşünülmektedir.  $\beta$ -actin miktarındaki bu azalma oldukça ilginçtir. Bu olay, yüksek konsantrasyonlu ve uzun süreli proteozom inhibitörü muamelelerin aşırı ve beklenmedik toksik



etkiler gösterebileceğini düşündürmektedir (Şekil 7.15). Ayrıca Bio-Rad protein tayini sonuçları da bortezomib ile muamele edilen hücrelerin protein miktarında önemli ölçüde azalma olduğunu göstermektedir (Çizelge 7.2). Bu sonuç, kaspaz-3 ve  $\beta$ -actin proteinlerindeki azalmanın, protein sentezindeki global azalmadan kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

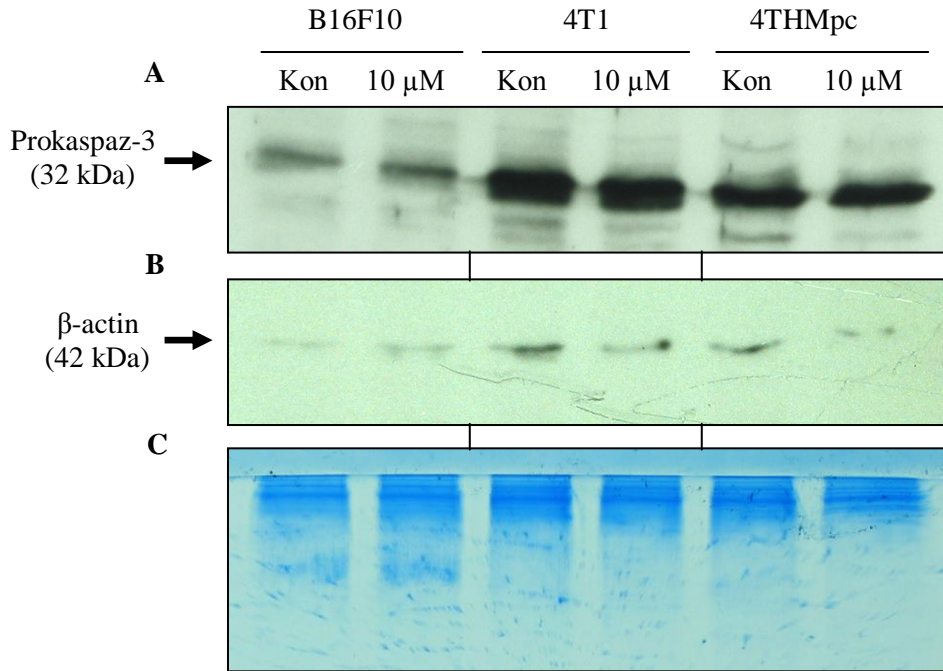


**Şekil 7.15.** B16F10, 4T1 ve 4THMpc hücrelerinde 48 saat süreyle uygulanan 1  $\mu$ M bortezomibin  $\beta$ -actin miktarına etkisi. İzole edilen 30  $\mu$ g protein %12'lik SDS-PAGE'de ayıştırıldı. Western blot ile proteinler PVDF membrana aktarıldı. Membran, Sigma firmasından elde edilen 1:3000 oranında seyreltilmiş anti- $\beta$ -actin ile muamele edildi ve film banyosu gerçekleştirildi.

**Çizelge 7.2.** 10 nM ve 1  $\mu$ M bortezomib ile 48 saat muamele edilen B16F10, 4T1 ve 4THMpc hücrelerinin protein miktarları

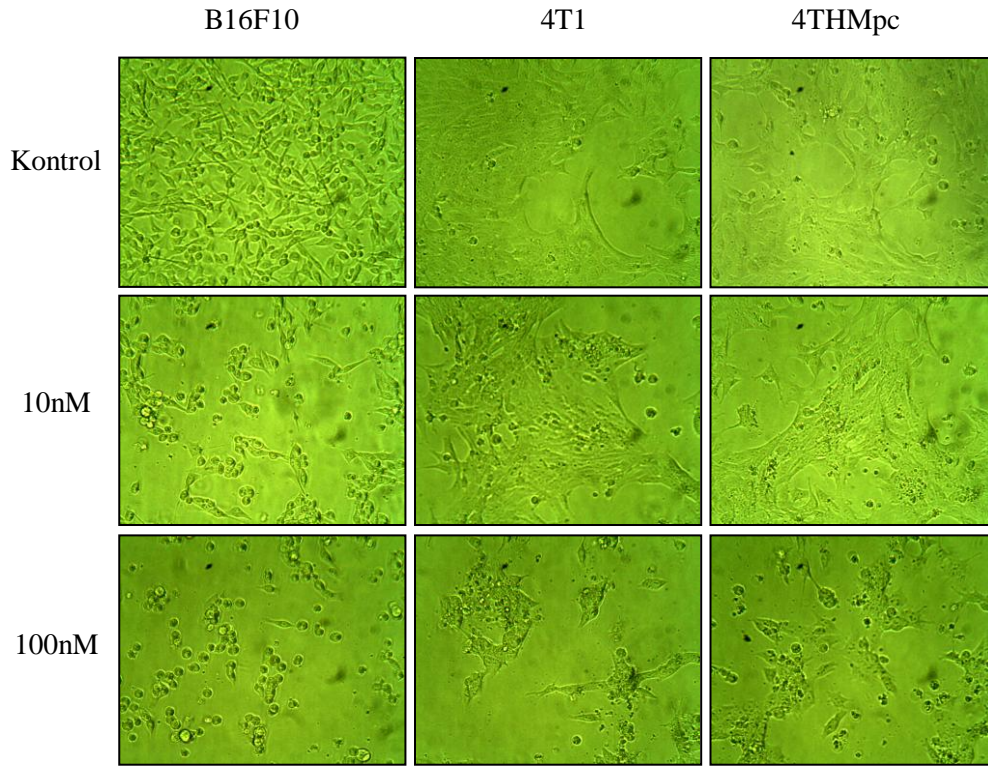
Numune	Protein Miktarı ( $\mu$ g/ $\mu$ l)
<b>B16F10 - Kontrol</b>	3.980
<b>B16F10 - 10 nM</b>	1.800
<b>B16F10 - 1 <math>\mu</math>M</b>	0.995
<b>4T1 - Kontrol</b>	4.410
<b>4T1 - 10 nM</b>	3.930
<b>4T1 - 1 <math>\mu</math>M</b>	1.280
<b>4THMpc - Kontrol</b>	4.060
<b>4THMpc - 10 nM</b>	3.490
<b>4THMpc - 1 <math>\mu</math>M</b>	0.790

Hücrelerde uzun süreli bortezomib muamelesinin aşırı toksik etki yapmasından dolayı proteozom inhibisyonundan sonra kaspaz-3'ün spesifik olarak aktive olup olmadığını belirlemek için B16F10, 4T1 ve 4THMpc hücreleri daha kısa süreli olarak (6 saat) bortezomib ile muamele edildi. Eşit sayıda ekimi yapılan hücreler logaritmik faza geldikten sonra 6 saat süreyle 10  $\mu$ M bortezomib ile muamele edildi. Daha sonra proteinler izole edildi ve 50  $\mu$ g protein %15'lik SDS-PAGE'de ayrıştırıp, Western blot ile PVDF membrana aktarıldı. Membran, anti-kaspaz-3 antikoruna ile muamele edildi ve film banyo işlemi gerçekleştirildi. Sonuçta; 6 saat gibi kısa süreli 10  $\mu$ M bortezomib muamelesinin her üç hücre tipinde de kaspaz-3 aktivasyonu üzerinde önemli bir etki yapmadığı görüldü (Şekil 7.16, A). Daha sonra  $\beta$ -actin miktarını belirlemek için PVDF membran anti- $\beta$ -actin antikoruna ile muamele edildi. 6 saat 10  $\mu$ M bortezomib muamelesi sonucunda her üç hücrede de  $\beta$ -actin miktarında önemli bir azalma olmadığı görüldü (Şekil 7.16, B). Western blot sonrası jel koması mavisi ile boyandı ve 6 saat süreli muamelenin total proteinde bir azalmaya neden olmadığı gözlemlendi (Şekil 7.16, C).

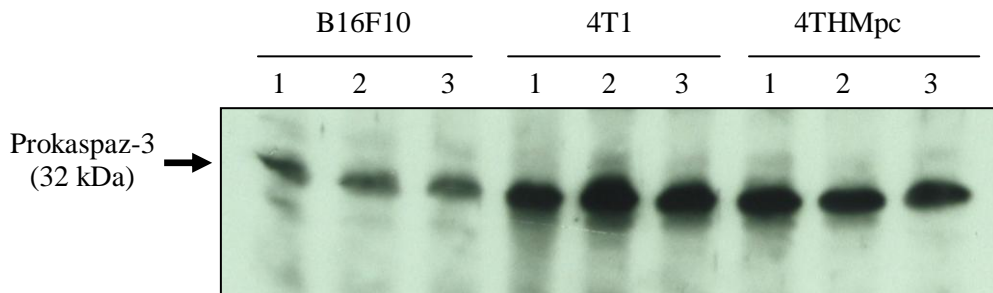


**Şekil 7.16.** 6 saat süreli 10  $\mu$ M bortezomib muamelesinin B16F10, 4T1 ve 4THMpc hücrelerine etkileri. Eşit miktarda ekilen hücreler logaritmik faza geldikten sonra 6 saat süreyle 10  $\mu$ M bortezomib ile muamele edildi ve proteinler izole edildi. **A)** 50  $\mu$ g protein %15'lik SDS-PAGE'de ayrıştırıldıktan sonra, Western blot ile PVDF membrana transfer edildi. Membran, Santa Cruz firmasına ait 1:200 oranında seyreltilmiş anti-kaspaz-3 antikoruyla muamele edildi. **B)** 50  $\mu$ g protein %12'lik SDS-PAGE'de ayrıştırıldıktan sonra, Western blot ile PVDF membrana transfer edildi. Membran, Sigma firmasına ait 1:3000 oranında seyreltilmiş anti- $\beta$ -actin antikoruyla muamele edildi ve film banyosu yapıldı. **C)** Western blot işleminden sonra jel, koması mavisi ile boyandı. Kon, kontrol.

Daha sonraki deneyde; B16F10, 4T1 ve 4THMpc hücreleri ekimi yapıp logaritmik faza geldikten sonra 10 nM ve 100 nM bortezomib ile 24 saat muamele edildi ve inverted mikroskopta morfolojileri görüntülendi (Şekil 7.17). Daha sonra proteinleri izole edildi ve 50 µg protein %15'lik SDS-PAGE'de ayrıştırılıp, Western blot ile proteinler PVDF membrana aktarıldı. Membran, anti-kaspaz-3 antikoruyla muamele edildi. Bu işlemler sonucunda da, prokaspaz-3 proteininin miktarında önemli bir azalma görülmedi (Şekil 7.18). Aynı şekilde β-actin antikoruna muamelesi sonucunda β-actin miktarında da bir azalma görülmedi.

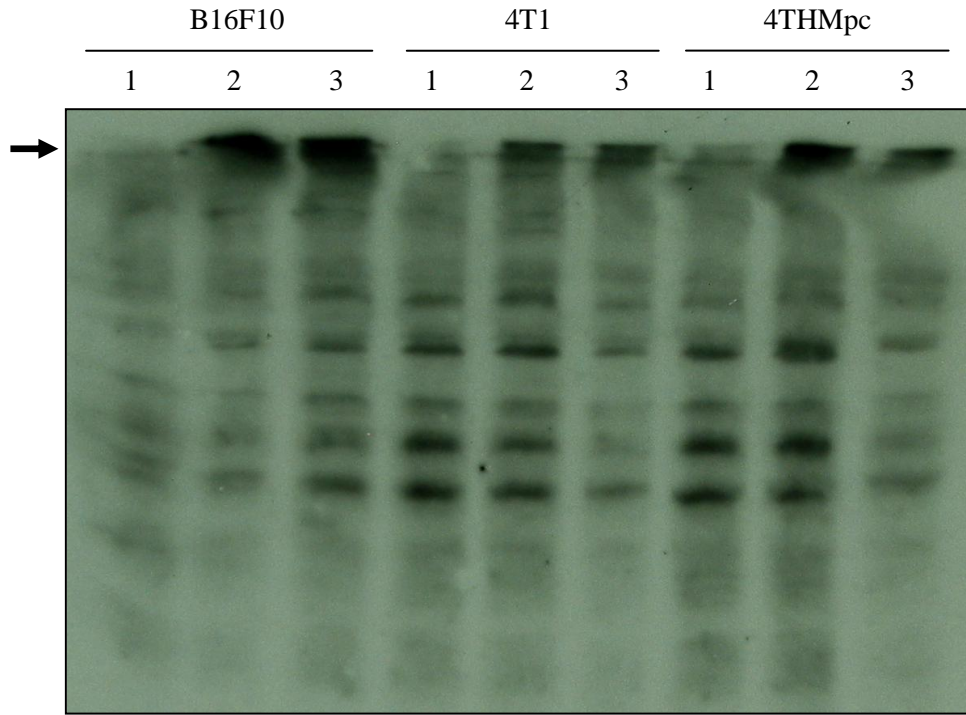


**Şekil 7.17.** Proteozom inhibitörü bortezomib ile 24 saat süreyle muamele edilen B16F10, 4T1 ve 4THMpc morfolojileri. Inverted mikroskopta 20X'te görüntülendi.



**Şekil 7.18.** 10 nM ve 100 nM bortezomib ile 24 saat muamele edilen B16F10, 4T1 ve 4THMpc hücrelerinde kaspaz-3 proenzim kırılması. Ekimi yapılan hücreler logaritmik faza gelince 24 saat 10 nM ve 100 nM bortezomib ile muamele edildi. Daha sonra proteinler izole edildi ve 50 µg protein %15'lik SDS-PAGE'de ayrıştırılıp Western blot ile PVDF membrana aktarıldı. Membran, Santa Cruz firmasına ait 1:200 oranında seyreltilmiş anti-kaspaz-3 ile muamele edildi. 1, kontrol; 2, 10 nM bortezomib; 3, 100 nM bortezomib

Daha sonra proteozom tarafından gerçekleştirilen protein yıkımında önemli rol alan; yıkılacak birçok proteine bağlanarak proteozom tarafından tanınmasını sağlayan ubiquitin proteininin miktarına bakıldı. B16F10, 4T1 ve 4THMpc hücreleri 10 nM ve 100 nM bortezomib ile 24 saat muamele edildikten proteinleri izole edildi ve 30 µg protein %15'lik SDS-PAGE'de ayrıştırıldı. Jeldeki proteinler Western blot ile PVDF membrana transfer edildikten sonra, membran anti-ubiquitin antikoru ile muamele edildi. Sonuçta; B16F10 hücrelerinde hem 10 nM hem de 100 nM bortezomib muamelesi sonrasında ubiquitin-protein konjugatlarında çok belirgin bir artış görülürken; 4T1 ve 4THMpc hücrelerinde B16F10 hücrelerindeki kadar olmasa da ubiquitin-protein konjugatlarında önemli ölçüde artış görüldü (Şekil 7.19).



**Şekil 7.19.** B16F10, 4T1 ve 4THMpc hücrelerinde 24 saat süreli 10 nM ve 100 nM bortezomib muamelesinin ubiquitin miktarına etkileri. Eşit sayıda ekimi yapıp logaritmik faza gelen hücreler, 24 saat 10 nM ve 100 nM bortezomib ile muamele edildi. Daha sonra hücrelerin proteinleri izole edildi ve 30 µg protein %15'lik SDS-PAGE'de ayrıştırılıp, Western blot ile PVDF membrana transfer edildi. Membran, Santa Cruz firmasına ait 1:200 oranında seyreltilmiş anti-ubiquitin antikoru ile muamele edildi ve film banyo işlemi gerçekleştirildi. 1, kontrol; 2, 10 nM bortezomib; 3, 100 nM bortezomib.

## 8. TARTIŞMA

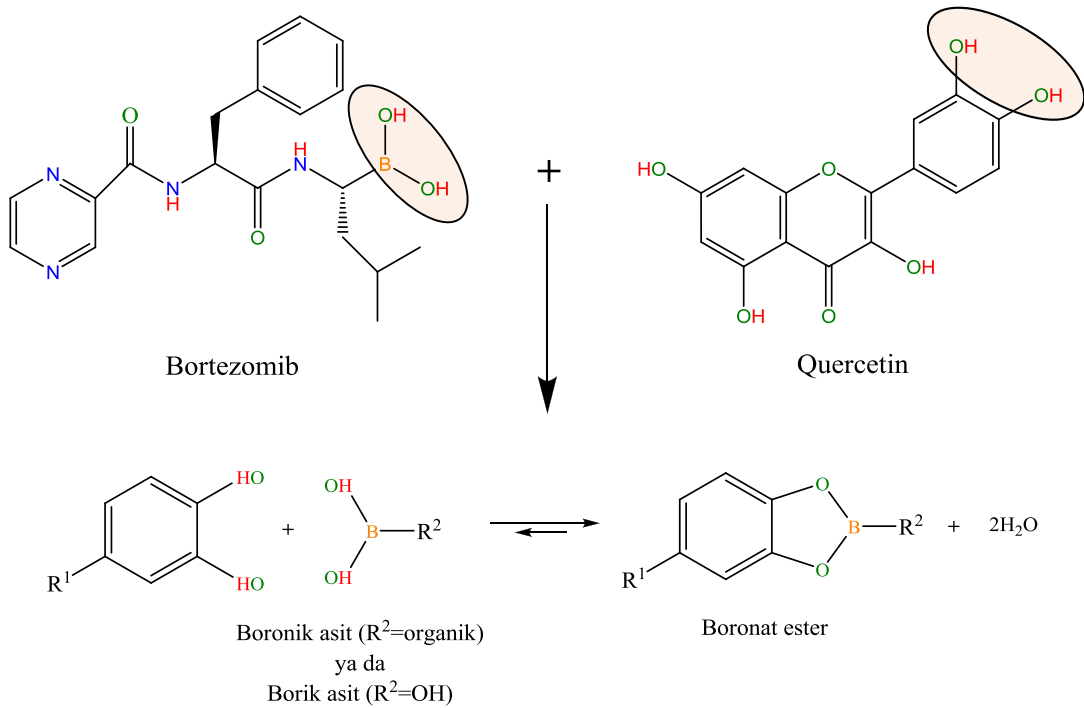
Ubiquitin-proteozom yolu; kanser ve hücre döngüsünün kontrolünde önemli bir rol oynamaktadır. Proteozom inhibitörleri hücre döngüsünü engelleyerek ve apoptozisi tetikleyerek kanser hücrelerinde anti-tümör aktiviteye neden olmaktadır. Proteozom inhibitörleriyle apoptozisin uyarılması; genellikle p27, p53, Bid, Bax gibi proapoptotik proteinlerin birikmesi ve NF- $\kappa$ B işlenmesinin inhibisyonu ile meydana gelmektedir. Yapılan pekçok çalışma bortezomibin çoğunlukla NF- $\kappa$ B aktivasyonunu engelleyerek kanser hücrelerinde apoptozisi uyardığını ve hücre çoğalmasını engellediğini göstermektedir [3, 6]. Daha önce yapılan bazı çalışmalarda; insan osteosarkoma MG-63 hücrelerinde [48], B16F0 ve B16F10 melanoma hücre hatlarında [3], MG132'nin hücreleri genellikle G2-M-fazında etkilediği ve hücrelerde DNA fragmentasyonu, apoptotik cisim gibi apoptotik değişimler meydana getirdiği gösterilmiştir. Proteozom aktivitesini engelleyen lactacystin varlığında çoğalan insan monoblast U937 hücrelerinde yaşayabilirlik azalmış, apoptoziste anlamlı değişiklikler meydana gelmiş ve hücrelerin kromozomal DNA'sında fragmentler ortaya çıkmıştır. Ayrıca başka araştırmacılar, peptit aldehit proteozom inhibitörleri kullanılan U937 hücrelerinde apoptozisin uyarıldığını doğrulamışlardır. Yapılan diğer çalışmalarda, insan T-hücre lösemi MOLT-4 hücrelerinde ve fare lenfotik lösemi L5178Y hücrelerinde, hücreye nüfuz edebilen bir peptit aldehit proteozom inhibitörünün apoptozisi uyardığı gösterilmiştir [2].

Deneylerimizde, B16F10 hücreleri 100 nM bortezomib ile 24 saat muamele edildiğinde herhangi bir DNA fragmentasyonu gözlenmezken; süre arttırıldığında (48 saat süre ile 10 nM-100 nM- 500 nM ve 1  $\mu$ M bortezomib) hücrelerde petri kabının dibinden kalkıp besiyerinde yüzer bir hal alma, küreselleşme, küçülüp büzülme, komşu hücrelerden ayrılma ve üzerine düşen ışığı daha çok yansıtma gibi apoptotik hücrelere ait morfolojik değişimler ve DNA fragmentasyonu gözlemledik. Ayrıca, yüksek konsantrasyonda kısa süreli bortezomib uygulandığında (10  $\mu$ M bortezomib ile 6 saat gibi kısa sürede) yine apoptotik hücrelerde görülen morfolojik değişimleri gözlemledik. Zhang ve Ark. [76] tarafından HeLa hücrelerinin 0.1  $\mu$ M 4DPG ile muamele edilmesi sonucu benzer morfolojik değişiklikler kaydedilmiş ve bu hücrelerin apoptozise uğradıkları görülmüştür.

B16F10 hücreleri; bortezomib, MG132 ve MG132 + quercetin ile muamele edildiğinde; apoptotik hücrelerde görülen morfolojik değişimler ve DNA fragmentasyonu gözlenirken; quercetin ve bortezomib + quercetin muamelelerinde herhangi bir apoptotik değişim gözlenmemiştir. Bu oldukça ilginç bir sonuçtur. Proteozom inhibitörleri bortezomib ve MG132 ayrı ayrı uygulandığında apoptotik etki yaparken; tek başına uygulandığında herhangi bir etki



yapmayan Hsp70 inhibitörü quercetin, MG 132 ile kombine edildiğinde MG132'nin etkisini artırırken bortezomib ile kombine edildiğinde antagonistik bir etki meydana getirip bortezomibin etkisini ortadan kaldırmıştır [77]. Quercetin'in farklı proteozom inhibitörleriyle farklı etkiler göstermesinin, inhibitörlerin yapısal özelliklerinden kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Quercetin ve bortezomibin kimyasal yapısı incelendiğinde quercetin'in bir katekol, bortezomibin ise borik asit analogu olduğu görülmektedir. Katekol ile boronik asit grupları arasında bir boronat kompleksi oluştuğu ve oluşan bu kompleks yüzünden bortezomibin sitotoksik etkilerinin ortadan kalktığı tahmin edilmektedir (Şekil 8.1) [78]. Oluşan bu kompleksin negatif etkilerinden dolayı araştırmacılar anti-kanser ilacı olarak yapısında katekol bulunmayan bir flavon olan flavopiridolü geliştirmişlerdir [79]. Dai ve Ark. yaptıkları bir çalışmada PS-341 ve flavopiridol kombinasyonu ile K562 ve Lama hücreleri muamele edildiğinde hücrelerin güçlü bir şekilde apoptozise uğradıklarını göstermişlerdir [80]. Bu sonuçlara göre; quercetin'in bortezomibten farklı proteozom inhibitörleriyle kombinasyonu ya da bortezomibin yapısına uygun inhibitörlerle kombine edilmesi, B16F10 melanoma hücreleri üzerinde etkili olabilir ve yeni kanser tedavilerinin geliştirilmesine olanak sağlayabilir.



**Şekil 8.1.** Bortezomib ve quercetin arasında boronat ester bağı oluşumu [79'dan uyarlanarak ChemBioDraw Ultra 11.0 programı ile tekrar çizilmiştir]

4T1 ve 4THMpc hücreleri 48 saat süre ile farklı konsantrasyonlardaki bortezomib ile muamele edildiğinde; 10 nM bortezomib muamelesinde herhangi bir etki görülmemişken; 100 nM ve daha yüksek konsantrasyonlarda, apoptotik hücrelerde görülen morfolojik değişiklikler ve ayrıştırılan DNA'larda fragmentasyon meydana geldiği gözlenmiştir. 4T1 ve 4THMpc hücreleri 0.5  $\mu$ M MG132 ile 48 saat muamele edildiklerinde önemli bir sitotoksik etki görülmemiştir. Elde ettiğimiz bu sonuçlar 4T1 ve 4THMpc meme kanseri hücrelerinin B16F10 melanoma hücrelerine göre proteozom inhibitörlerine karşı daha dirençli olduklarını ve ancak daha yüksek konsantrasyonlarda etkilendiklerini göstermektedir.

Proteozom inhibisyonu sonucu apoptozisin uyarılması; hücre ölümünün, ubiquitin-proteozom yolu tarafından yıkılan düzenleyici bir molekülün hücre içi konsantrasyonunun artması sonucu uyarıldığını işaret etmektedir. Apoptozisin böyle bir düzenleyicisi olarak en önemli aday, ubiquitine olduğu ve proteozom tarafından yıkıldığı bilinen p53'tür [2]. B16F10 hücrelerinin apoptozisinde p53 proteinin rol aldığı; 4T1 ve 4THMpc hücrelerinin ise p53-mutant olduğu ve yaptığımız deneyler sonucunda 4T1 ve 4THMpc hücrelerinin B16F10 hücrelerine göre proteozom inhibitörlerine daha dirençli oldukları bilinmektedir. Bu bilgiler ışığında B16F10 hücrelerinin 4T1 ve 4THMpc hücrelerine göre proteozom inhibitörlerine daha hassas olmasında p53'ün rolü olup olmadığını anlamak için hücreler 10  $\mu$ M bortezomib ile 6 saat süreyle muamele edildi ve Western blot analiziyle p53 miktarları belirlendi. Deney sonucunda B1610 hücrelerinde p53 ekspresyonunun arttığı gözlenirken, 4T1 ve 4THMpc hücrelerinde herhangi bir artış gözlenmemiştir. Bu sonuçlar bize B16F10 hücrelerinin proteozom inhibitörlerine daha hassas olmasında p53 proteinin önemli bir rol oynadığını ve proteozom inhibisyonunun 4T1 ve 4THMpc hücrelerinde p53-bağımsız bir şekilde apoptozisi uyardığını açık bir şekilde göstermektedir. Benzer sonuç, Yerlikaya ve Erin'in yayınladığı makalede de gösterilmiştir [72]. Lopes ve Ark. proteozom inhibitörleri ile muamele edilen Rat-1 ve PC12 hücrelerinde tümör baskılayıcı p53 proteinin hızlı bir şekilde akümüle olduğunu göstermişlerdir. Benzer şekilde p53 tarafından uyarılan CDK (siklin bağımlı kinaz) inhibitörü p21 proteini ve Mdm2 proteinlerinin de biriktiğini göstermişlerdir. Bu çalışmada, proteozom inhibitörleri ile uyarılan apoptozisin, dominant-negatif p53 proteini ile bloke edildiğini fakat yabancı tip p53 proteininin aşırı ifade edilmesinin Rat-1 hücrelerinde apoptozisin uyarılması için yeterli olduğu görülmüştür. Yazarlar, bu hücre ölümüne diğer moleküllerin de katılabileceğini önermelerine rağmen elde ettikleri veriler proteozom inhibisyonu sonucunda p53 proteininin birikmesi ve akabinde hücre döngüsü inhibitörlerinden p21'in transkripsiyonun uyarılmasının apoptozis tetiklenmesinde anahtar bir rol oynadığını göstermektedir [7].

Proteozom inhibitörlerinin uyardığı apoptoziste görev aldığı bilinen kaspaz-3 enziminin aktivasyonunun B16F10, 4T1 ve 4THMpc hücrelerinde uyarılıp uyarılmadığı belirlemek için hücreler 48 saat süreyle farklı bortezomib konsantrasyonlarıyla muamele edildi. Aktivite deneyi sonucunda tüm hücre tiplerinde kaspaz-3 aktivasyonunda önemli ölçüde artış meydana geldi. Elde ettiğimiz bu aktivite deneyi sonuçlarını doğrulamak için Western blot analizleri gerçekleştirildi. İlk olarak hücreler 48 saat süreyle farklı bortezomib konsantrasyonlarıyla muamele edildi ve Western blot ile kaspaz-3 miktarına bakıldı. Ancak deney sonucunda hem kaspaz-3 enzimi hem de aktivasyon ürünleri görülmedi. Ayrıca eşit yükleme olup olmadığını kontrol etmek için  $\beta$ -actin miktarına bakıldı ve beklenenin aksine  $\beta$ -actin miktarında azalma tespit edildi. Kaspaz-3 miktarındaki bu azalmanın aktivasyondan değil global protein azalmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu sonuçlar, uzun süreli ve yüksek konsantrasyonlu proteozom inhibitörü muamelelerinin aşırı toksik etki meydana getirebileceğini göstermiştir. Devam eden deneylerde kısa süreli (6 saat ve 24 saat) bortezomib uygulandığında hem kaspaz-3 miktarında hem de  $\beta$ -actin miktarında önemli bir azalma görülmemiştir. Bu şekilde, kaspaz-3 aktivite deneyleriyle kaspaz-3 aktivasyonundaki artış rahatlıkla belirlenirken, bu sonuçlar Western blot tekniğiyle doğrulanamamıştır. Western blot deneylerinde elde edilen sonuçlar, proteozom inhibisyonu sonucu kaspaz 3'ün aktive olmadığını göstermiştir. Bu sonuçlar, aktivite deneylerinde görülen kaspaz-3 aktivitesindeki artışın muhtemelen diğer kaspazlardan (örneğin, kaspaz-7) kaynaklanabileceğini göstermektedir.

Bortezomib ile 24 saat muamele edilen B16F10, 4T1 ve 4THMpc hücrelerinde Western blot tekniği ile yapılan analiz sonucu, B16F10'da daha fazla olmak üzere hücrelerde görülen ubiquitin miktarındaki artış; bu hücrelerin apoptozisinin uyarılmasında proteozom inhibisyonunun önemini bir kez daha ispatlamaktadır.

Bu tez çalışması boyunca yapılan morfolojik analizler, DNA fragmentasyon analizleri, kaspaz-3 aktivite deneyi ve Western blot analizleri sonucu elde edilen sonuçlar, proteozom inhibisyonunun B16F10 melanoma ve 4T1 meme hücrelerinin apoptozisinin uyarılmasındaki önemini net bir şekilde ortaya koymaktadır. Hücresel boyutta elde etmiş olduğumuz sonuçlar, bu kanser dizileri üzerinde ümit vericidir. Ancak bizim elde ettiğimiz sonuçlar hücresel boyutta olduğu için, sonuçların diğer in vitro koşullarda doğrulanması, daha sonra deney hayvanları üzerinde uygun inhibitör konsantrasyonlarının ve sürelerinin belirlenmesi ve en son klinik olarak etkilerinin ispatlanması gerekmektedir. Tüm bunların gerçekleşmesi her ne kadar uzun bir süreç gerektirse de bizim elde etmiş olduğumuz sonuçlar ışığında proteozom inhibitörlerinin melanoma ve meme kanserlerinin tedavisinde anti-kanser ilacı olarak geliştirilebileceğini düşünmekteyiz.



## KAYNAKLAR DİZİNİ

- [1] Orłowski, R. Z., 1999, The Role of The Ubiquitin-Proteasome Pathway in Apoptosis, Cell Death and Differentiation (1999) 6, 303- 313.
- [2] Lopez, U. G., Edhardt, P., Yao, R., Cooper, G., M., 1997, p53-dependent Induction of Apoptosis by Proteasome Inhibitors, The Journal of Biological Chemistry Vol. 272, No.20, Issue of May 16, pp. 12893- 12896.
- [3] Martin, B., Martin, E., Alvarez, M., Castano, J. C., Garcia- Orad, A., 2007 Differential Response of Melanoma B16 Cell Lines in The Control of The Mitotic Arrest Induced by Proteasome Inhibitors, Precilincial Science, POSTER.
- [4] Wu, W. K. K., Cho, C. H., Lee C. W., Wu, K., Fan, D., Yu, J., Sung, J. J. Y., 2010, Proteasome Inhibition: A New Therapeutic Strategy to Cancer Treatment, Cancer Letters 293 (2010), 15- 22.
- [5] Markovic, S. N., Geyer, S. M., Dawkins, F., Sharfman, W., Albertini, M., Maples, W., Fracasso, P. M., Fitch, T., Lorusso, P., Adjei, A. A., Erlichman, C., 2005, A Phase II Study of Bortezomib in The Treatment of Metastatic Malignant Melanoma, Cancer, 103, 2584- 9.
- [6] Adams, J., 2004, The Development of Proteasome Inhibitors as Anticancer Drugs, Cancer Cell, 5, 417- 21.
- [7] Yerlikaya, A., Dokudur, H., 2009, Protein Yıkımının Önemi, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 35 (2), 93- 99.
- [8] Yerlikaya, A., 2009, Kanser Biyolojisi Ders Notları, Dumlupınar Üniversitesi.
- [9] Başaran, N., 1999, Tıbbi Genetik Ders Kitabı, 7. Baskı, Güneş & Nobel Tıp Kitap Evi, 465 s.
- [10] Dilsiz, N., 2004, Moleküler Biyoloji, Palme Yayınları: 279, 220 s.
- [11] Jones, B. G., 2001, Patoloji, (Çev. A. A. Dinçtürk), Güneş Kitabevi, Ankara, 384 s.
- [12] Ruddon, R. W., 2007, Cancer Biology, Oxford University Press, Fourth Edition, 530 p.
- [13] Cooper, G. M., Hausman, R. E., 2006, Hücre: Moleküler Yaklaşım, (Çev. M. Sakızlı, N. Atabey), İzmir Tıp Kitabevi, İzmir, Üçüncü Baskı, 714 s.
- [14] Sadıqov, S., T., 2001, Canlılarda Moleküler Düzenleme Mekanizmaları (Moleküler Biyolojide Özel Konular), Erciyes Üniversitesi Yayınları, No: 127, Kayseri, 249 s.
- [15] Yöntem, M., 2010, Gen Teknolojisi ve Protein Sentezi, Kütahya, Dumlupınar Üniversitesi, 190 s.
- [16] Doherty, F.J. and Mayer, R. J., 1992, Intracellular Protein Degradation, IRL Press, Oxford.
- [17] Voet, D. D., Voet, J. G., 1995, Biochemistry, John Wiley & Sons Inc, New York.
- [18] Yerlikaya, A., Stanley, B. A., 2004, S-adenosylmethionine Decarboxylase Degredation by The 26 S Proteasome is Accelerated by Substrate-mediated Transamination, J Biol Chem, 279, 12469- 78.
- [19] Yerlikaya, A., 2004, Cellular Functions of The 26S Proteasome, Turk J Biol, 28, 31- 38.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- [20] Varshavsky A., 1996, The N-rule: Functions, Mysteries, Uses, Proc Natl Acad Sci, USA, 93, 12142- 9.
- [21] Rechsteiner, M., Rogers, S. W., 1996, PEST Sequences and Regulation by Proteolysis, Trends Biochem Sci, 21, 267- 71.
- [22] Rogers S. W., Rechsteiner, M. C., 1986, Microinjection Studies on Selective Protein Degradation: Relationships Between Stability, Structure, and Location, Biomed Biochim Acta, 45, 1611- 8.
- [23] Keha, E. E., Küfrevioğlu, Ö. İ., 2005, Biyokimya, Aktif Yayınevi, Erzurum, 642 s.
- [24] Yerlikaya, A., 2007, Protein Sentezi ve Yıkımı, In Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M. and Tanyolaç, B. (eds.), Moleküler Biyoloji, Nobel Yayınevi, Ankara.
- [25] Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D., 1994, Molecular Biology of The Cell, Garland Publishing, Inc.
- [26] İncesu, Z., Sivas, H., Ergene, E., Akalın, G., 2007, Kanserde Apoptoza Duyarlılık Mekanizmasında Ras-Sinyal Yolu-İntegrin Etkileşimi, Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi, 030326, 59 s.
- [27] Ulukaya, E., 2003, Apoptozis Ders Notları, Uludağ Üniversitesi, 19 s.
- [28] Hilt, W., Wolf, D. H., 1996, Proteasomes: Destruction as a Programme, Trends Biochem Sci, 21, 96- 102.
- [29] Hershko, A., Ciechanover, A., 1998, The Ubiquitin System, Annu Rev Biochem, 67, 425- 79.
- [30] Jentsch, S., 1992, The Ubiquitin-conjugation System, Annu Rev Genet, 26, 179- 207.
- [31] Güney, Y., Bilgihan, A., 2002, Ubikitin Sistem, T Klin Tıp Bilimleri, 22, 616- 619.
- [32] Haglund, K., Dikic, I., 2005, Ubiquitylation and Cell Signaling, The EMBO Journal, 24, 3353- 3359.
- [33] Product Highlight, 2009, Ubiquitin Chains, SUMO Chains, Affinity Matrices (UIM, SIM), Boston Biochem Biomol.
- [34] Yerlikaya, A., 2009, Protein Sentezi ve Ubikitin-Proteozom Yolu, Dumlupınar Üniversitesi.
- [35] Karp, G., 2005, Cell And Molecular Biology- Concepts And Experiments, Fourth Edition, John Wiley & Sons, Inc, 780 p.
- [36] Hee, N., C., 2010, Metal-based Compounds for Anticancer Research: Proteasome Inhibitors.
- [37] Zwicky, P., Voges, D., Baumeister, W., 1999, The Proteasome: a Macromolecular Assembly Designed for Controlled Proteolysis, Phil. Trans. R. Soc. Lond. B, 354, 1501- 1511.
- [38] Cell Signal, 2007, Ubiquitin/Proteasome Pathway, Cell Signaling Technology, Inc.
- [39] Yerlikaya, A., 2009, Proteoliz Ders Notları, Dumlupınar Üniversitesi.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- [40] Yerlikaya, A., Dokudur, H., Şeker, S., 2009, Proteozom İnhibitörü MG132'nin 4T1 Meme ve B16F10 Melanoma Kanser Hücrelerindeki Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması, Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, Sayı 19, ISSN- 1302- 3055, 15- 22.
- [41] Kuhn, D. J., Zeger, E. L., Orlowski, R. Z., 2006, Proteasome Inhibitors and Modulators of Heat Shock Protein Function, Update On Cancer Therapeutics I, 91- 116.
- [42] Schumacher, L. Y., Vo, D. D., Garban, H. J., Comin-Anduix, B., Owens, S. K., Dissette, V. B., Glaspy, J. A., McBride, W. H., Bonavida, B., Economou, J. S., Ribas, A., 2006, Immunosensitization of Tumor Cells to Dendritic Cell-Activated Immune Responses with the Proteasome Inhibitor Bortezomib (PS- 341, Velcade), The Journal of Immunology, 176, 4757- 4765.
- [43] Queirolo, P., Acquati, M., 2006, Targeted Therapies in Melanoma, Anti-Tumour Treatment, Cancer Treatment Reviews, 32, 524- 531.
- [44] Tang, Z. H., Wu, Y. L., Gao, S. L., Shen, H. W., 2008, Effects of the Proteasome Inhibitor Bortezomib on Gene Expression Profiles of Pancreatic Cancer Cells, Journal of Surgical Research, 145, 111- 123.
- [45] Teicher, B. A., Ara, G., Herbst, R., Palombella, V. J., Adams, J., 1999, The Proteasome Inhibitor PS-341 in Cancer Therapy, Clinical Cancer Research, 5, 2638- 2645.
- [46] Han, Y. H., Park, W. H., 2010, The Effects of MAPK Inhibitors on a Proteasome Inhibitor, MG132- Induced HeLa Cell Death in Relation to Reactive Oxygen Species and Glutathione, Toxicology Letters, 192, 134- 140.
- [47] Han, Y. H., Park, W. H., 2010, Treatment with p38 Inhibitor Partially Prevents Calu-6 Lung Cancer Cell Death by a Proteasome Inhibitor, MG132, Cancer Genetics and Cytogenetics, 199, 81- 88.
- [48] Yan, X. B., Yang, D. S., Gao, X., Feng, J, Shi, Z. L., Ye, Z., 2007, Caspase- 8 Dependent Osteosarcoma Cell Apoptosis Induced by Proteasome Inhibitor MG132, Cell Biology International, 31, 10, 1136- 1143.
- [49] Myung, J., Kim, K. B., Crews, C. M., 2001, The Ubiquitin- Proteasome Pathway and Proteasome Inhibitors, Medicine Research Reviews, 21, 4, 245- 273.
- [50] Lee, D. H., Goldberg, A. L., 1998, Proteasome Inhibitors: Valuable New Tools for Cell Biologists, Trends in Cell Biology, 8, 397- 403.
- [51] Harwood, M., Danielewska-Nikiel, B., Borzelleca, J. F., Flamm, G. W., Williams, G. M., Lines, T. C., 2007, A Critical Review of The Data Related to The Safety of Quercetin and Lack of Evidence of *in vivo* Toxicity, Including Lack of Genotoxic/ Carcinogenic Properties, Food and Chemical Toxicology, 45, 2179- 2205.
- [52] Murakami, A., Ashida, H., Terao, J., Multitargeted Cancer Prevention by Quercetin, 2008, Cancer Letters, 269, 315- 325.
- [53] Woude, H. V. D., Boersma, M. G., Alink, G. M., Vervoort, J., Rietjens, I. M. C. M., 2006, Consequences of Quercetin Methylation for Its Covalent Glutathione and DNA Adduct Formation, Chemico- Biological Interactions, 160, 193- 203.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- [54] Yang, J. H., Hsia, T. C., Kuo, H. M., Chao, P. D. L., Chou, C. C., Wei, Y. H., Chung, J. G., 2006, Inhibition of Lung Cancer Cell Growth by Quercetin Glucuronides Via G2/ M Arrest and Induction of Apoptosis, *Drug Metabolism and Disposition*, 34, 296- 304.
- [55] Chondrogianni, N., Kapeta, S., Chinou, I., Vassilatou, K., Papassideri, I., Gonos, E. S., 2010, Anti-ageing and Rejuvenating Effects of Quercetin, *Experimental Gerontology*, 45, 763- 771.
- [56] Jayashanhar, L., 2007, Cathepsin B: Novel Cysteine Proteases of The Papain Family.
- [57] Schröder, E., Phillips, C., Garman, E., Harlos, K., Crawford, C., 1993, X-Ray Crystallographic Structure of a Papain- Leupeptin Complex, *Federation of European Biochemical Societies*, 315, 1, 38- 42.
- [58] Product Highlight, 2007, Leupeptin, Roche Diagnostics GmbH.
- [59] Pınarbaşı, E., 2007, Apoptozis (Programlı Hücre Ölümü), In Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M. and Tanyolaç, B. (eds.), *Moleküler Biyoloji*, Nobel Yayınevi, Ankara.
- [60] İncesu, Z., Akalın, G., 2004, Bazı Doğal ve Sentetik Bileşiklerin Kansersiz Hücre İçi Protein Aktivasyonuna ve Apoptoz Üzerine Etkileri, *TC. Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi*, 030345, 91 s.
- [61] Lowitz, B. B., Casciato, D. A., 2000, *Medical Oncology & Principles of Cancer Biology*.
- [62] Tomatır, A. G., 2003, Apoptoz: Programlı Hücre Ölümü, *T Klin Tıp Bilimleri*, 23, 499- 508.
- [63] Fadeel, B., Orrenius, S., Zhivotovsky, B., 1999, Apoptosis in Human Disease: A New Skin for the Old Ceremony?, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 266, 699- 717.
- [64] Özten Kandaş, N., 2004, Apoptosis, Programlı Hücre Ölümü, *Ankara Üniversitesi Dikimevi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Dergisi*, 5, 1, 7- 10.
- [65] Palavan Ünsal, N., 2007, *Kanser Biyolojisi*, İstanbul Kültür Üniversitesi.
- [66] Aslan Koşar, P., Özçelik, N., 1998, Apoptozis Üzerine Kanser Tedavisinde Kullanılan Bazı İlaçların Etkisi, *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi*, 5, 4, 179- 182.
- [67] Çalışkan, M., 2000, Apoptosis: Programlanmış Hücre Ölümleri, *Türk J Zool*, 24, Ek Sayı, 31- 35.
- [68] Holcik, M., LaCasse, E. C., MacKenzie, A. E., Korneluk, R. G., 2005, *Apoptosis in Health and Disease, Clinical and Therapeutic Aspects*, Cambridge University Press, 249 p.
- [69] Denizli, A., Gürzumar, A., 1999, Hücre İntiharı, *Popüler Bilim*, 12- 15.
- [70] Klug, W. S., Cummings, M. R., Spencer, C. A., 2009, *Genetik Kavramlar*, (Çev. C. Öner, S. Sümer, R. Öner, A. Ögüş, L. Açıık), Palme Yayıncılık, Sekizinci Baskıdan Çeviri, Ankara, 677 s.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- [71] Yerlikaya, A., Dokudur, H., 2010, Investigation of The eIF2 $\alpha$  Phosphorylation Mechanism in Response to Proteasome Inhibitor in Melanoma and Breast Cancer Cells, *Molecular Biology*, ISSN 0026- 8933, 44, 5, 760- 768.
- [72] Yerlikaya, A., Erin, N., 2008, Differential Sensitivity of Breast Cancer and Melanoma Cells to Proteasome Inhibitor Velcade, *International Journal of Molecular Medicine*, 22, 817- 823.
- [73] Bradford, M. M., 1976, A Rapid and Sensitive Method for The Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing The Principle of Protein-dye Binding, *Anal Biochem.*, 72, 248- 54.
- [74] Laemmli, U. K., 1970, Cleavage of Structural Proteins During The Assembly of The Head of Bacteriophage T4, *Nature.*, 227, 680- 5.
- [75] Wei, Y. Q., Zhao, X., Kariya, Y., Fukata, H., Teshigawara, K., Uchida, A., 1994, Induction of Apoptosis by Quercetin: Involvement of Heat Shock Protein, *Cancer Research*, 54, September 15, 4952- 4957.
- [76] Zhang, Q. Y., Jiang, M., Zhao, C. Q., Yu, M., Zhang, H., Ding, Y. J., Zhai, Y. G., 2005, Apoptosis Induced by One New Podophyllotoxin Glucoside in Human Carcinoma Cells, *Toxicology*, 212, 46- 53.
- [77] Yerlikaya, A., Okur, E., Şeker, S., Erin, N., 2010, Combined Effects of The Proteasome Inhibitor Bortezomib and Hsp70 Inhibitors on The B16F10 Melanoma Cell Line, *Molecular Medicine Reports*, 3, 333- 339.
- [78] Şeker, S., 2010, Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı
- [79] Liu, F. T., Agrawal, S. G., Movasaghi, Z., Wyatt, P. B., Rehman, I. U., Gribben, J. G., Newland, A. C., Jia, L., 2008, Dietary Flavonoids Inhibit The Anticancer Effects of The Proteasome Inhibitor Bortezomib, *Blood*, 112, 3835- 46.
- [80] Dai, Y., Rahman, M., Pei, X. Y., Dent, P., Grant, S., 2004, Bortezomib and Flavopiridol Interact Synergistically to Induce Apoptosis in Chronic Myeloid Leukemia Cells Resistant to Imatinib Mesylate Through Both Bcr/Abl-dependent and -independent Mechanisms, *Blood*, 104, 509- 18.