

PROTEOZOM İNHİBİTÖRÜ MG-132'NİN KANSER

HÜCRE DİZİLERİNE ETKİSİ

Harun DOKUDUR

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Nisan-2009

PROTEOZOM İNHİBİTÖRÜ MG-132’NİN KANSER
HÜCRE DİZİLERİNE ETKİSİ

Harun DOKUDUR

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

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Azmi YERLİKAYA

Nisan – 2009

KABUL ve ONAY SAYFASI

Harun DOKUDUR'un YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı 'PROTEOZOM İNHİBİTÖRÜ MG-132'NİN KANSER HÜCRE DİZİLERİNE ETKİSİ' başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

...../...../.....

(Sınav tarihi)

Üye: Yrd. Doç. Dr. Azmi YERLİKAYA (Tez Danışmanı)

Üye: Yrd. Doç. Dr. Mustafa YÖNTEM

Üye: Yrd. Doç. Dr. Sait ALTIKAT

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun/...../..... gün ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Atalay KÜÇÜKBURSA
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

PROTEOZOM İNHİBİTÖRÜ MG-132’NİN KANSER HÜCRE DİZİLERİNE ETKİSİ

Harun DOKUDUR

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 2009

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Azmi YERLİKAYA

ÖZET

Bu çalışmada, günümüzde kanser tedavisi için anti-kanser ilaçlarının bir alternatifi olarak kullanılan 26S proteozom inhibitörlerinden MG-132’nin kanser hücre dizileri üzerindeki morfolojik etkileri ve proteozom inhibisyonun neden olduğu eIF2 α fosforilasyonunda Hsp70 proteinin bir rolü olup-olmadığı araştırılmıştır. Çalışmamızda 4T1 meme ve B16F10 melenoma kanser hücrelerine farklı sürelerde %0.1 DMSO (kontrol) veya 50 μ M proteozom inhibitörü MG132 verildiğinde özellikle 8. saatten itibaren kontrol grubu dışındaki hücrelerde apoptozise benzer morfolojik değişimler gözlenmiştir. Hücrelerin küreselleşmesi, büzülüp küçülmesi ve membranda apoptotik veziküllerin oluşması bu tür hücre ölümünün karakteristik özellikleridir. Ayrıca, hücre ölümünü tespit etmek için hücrelere 24 saat süreyle %0.1 DMSO veya 10 μ M MG-132 verilerek tripan mavisi testi ile ölü ve canlı hücreler thoma lamı yardımıyla sayılmıştır. Sağkalım grafiği incelendiğinde hem 4T1 hem de B16F10 hücrelerinde MG-132 muamelesi sonrasında kontrole göre anlamlı bir fark elde edilmiştir ($p < 0.05$). Bu sitotoksik etkinin protein sentezindeki inhibisyondan kaynaklanıp kaynaklanmadığını belirlemek için eIF2 α fosforilasyonunu inceledik. 4T1 meme kanser hücrelerini 6 saat süreyle %0.1 DMSO veya 50 μ M MG-132 ile muamele ettikten sonra hücreler lizis edildi. Daha sonra elde ettiğimiz total proteinlerden SDS-PAGE ve Western-blot metodlarını kullanarak sırasıyla eIF2 α (P) ve total eIF2 α protein seviyelerine baktık. Kontrol gruplarında herhangi bir değişiklik olmazken 50 μ M MG-132 ile muamele edilmiş hücrelerde eIF2 α (P) seviyesinde artış gözlenmiştir. Total eIF2 α protein miktarında ise bir değişiklik olmamıştır. MG132 ile kısa bir süre muamele edilen 4T1 hücrelerinde, proteozom inhibisyonu sonucu Hsp70 protein miktarında da eIF2 α fosforilasyonuna benzer bir şekilde önemli bir artış gözlenmiştir. Bu sonuç, proteozom inhibisyonundan sonra görülen eIF2 α (P)’nundaki yükselmeden Hsp70 proteinin bir rolü olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Apoptozis, 4T1, B16F10, eIF2 α , Kanser, MG-132, Proteozom.

EFFECTS OF PROTEOSOME INHIBITOR MG-132 IN CANCER CELL LINES

Harun DOKUDUR

Department of Biology, M.S.Thesis, 2009

Thesis Supervisor: Assist. Prof. Dr. Azmi YERLİKAYA

SUMMARY

In this work, the effects of MG-132, one of the 26S proteasome inhibitors which are used as alternatives of the anti-cancer drugs nowadays, on morphologic changes of cancer cell lines and the role of Hsp70 on eIF2 α phosphorylation causing inhibition of protein synthesis following proteasome inhibition are investigated. In our work, in 4T1 breast and B16F10 melanoma cancer cells treated in a time-dependent manner with 50 μ M MG-132, morphologic changes commonly observed in apoptotic cells were observed starting from 8 hour; however, such changes were not observed in control group treated with 0.1% DMSO. Cell rounding, shrinkage, apoptotic vesicles in the membrane are characteristic features of this type of cell death. In addition, in order to determine the cell death, after treating with 0.1% DMSO or 10 μ M MG-132, dead and live cells were counted using typan blue exclusion test with the help of a hemacytometer. When the survival graph is examined, significant differences in MG-132 treated 4T1 and B16F10 cells as compared to the control were obtained ($p < 0.05$). In order to determine whether this cytotoxic effect is due to the inhibition of the protein synthesis, we examined eIF2 α phosphorylation. 4T1 breast cancer cells were lysed after treating with 0.1% DMSO or 50 μ M MG132 for 6 hour. Afterwards, we examined the level of eIF2 α (P) and total eIF2 α , respectively from the total protein using SDS-PAGE and Western-blot techniques. No change was observed in control groups; however, the level of eIF2 α (P) was increased in cells treated with 50 μ M MG132. No change was observed in the level of total eIF2 α . In 4T1 cells treated for a brief time with MG132, a significant increase in Hsp70 level in parallel to eIF2 α phosphorylation was observed in response to proteasome inhibition. This result suggests that Hsp70 may play a role in the observed increase in eIF2 α after 26S proteasomal inhibition.

Keywords: Apoptosis, 4T1, B16F10, Cancer, eIF2 α , MG-132, Proteasome.

TEŞEKKÜR

Bu tez alıőmasında tez konusunun belirlenmesinden, uzun süren ve sabır gerektiren deney aşamalarına ve tez alıőmasının hazırlanmasına kadar geçen her süreçte bilgisini, yardımını ve her türlü desteğini esirgemeyen sayın, danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Azmi YERLİKAYA'ya ve üniversite öğrencilik hayatım süresince bilime ve hayata dair tecrübe ve katkılarından dolayı diğer tüm bölüm hocalarıma, manevi desteğini esirgemeyen arkadaşım Serap OBAN'a Őükranlarımı sunarım.

Bugünlere ulaşmama vesile olan, sevgi ve Őefkatlerini her daim yanımda hissettiğim canım aileme Őükranlarımı bir bor bilirim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. PROTEİN YIKIMI	2
2.1. Serin Proteazlar	3
2.2. Lizozomlar	4
2.2.1. Lizozomal degradasyon.....	5
2.2.2. Lizozomal proteazların regülasyonu	8
2.3. Kaspazlar	8
2.3.1. Kaspaz aktivasyonu	9
2.3.2. Apoptozisde kaspazların rolleri.....	10
2.3.3. Apoptozis ve apoptotik hücrelerin karakteristik özellikleri	12
2.4. Meprinler	12
2.5. Ubiquitin Proteozom Yolu.....	13
2.5.1. 26S proteozom.....	14
2.5.2. 20S proteozomun proteolitik aktiviteleri.....	15
2.5.3. 26S proteozom inhibitörleri.....	15
2.5.4. 26S proteozomun hücrel görevleri	16
2.5.5. Ubiquitin-proteozom yolu ve p53 proteini	16
2.5.6. Ubiquitin-proteozom yolu ve protein sentezi	18
2.5.7. Proteozom ve kanser ilişkisi	19
3. MATERYAL VE METOT	21
4. SONUÇLAR	26
5. TARTIŞMA	333
KAYNAKLAR DİZİNİ	366

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Kimotripsinojen zimogen formunun ince bağırsakta olgunlaşması.....	3
2.2. Lizozomlardaki hidrolitik enzimler.....	4
2.3. Lizozomal yıkım yolları.....	5
2.4. Hsp73 proteini aracılığı ile lizozomlara protein hedeflenmesi.....	7
2.5. Kaspaz alt birimlerinden aktif kompleks oluşması.....	10
2.6. Kaspas-8 ve kaspaz-3'ün Fas reseptörü aracılığıyla aktivasyonu.....	11
2.7. Ubiquitin-proteozom yolu.....	14
2.8. Proteozom inhibitörleri MG132 ve PS-341 (Velcade)'in yapısı.....	17
4.1. Proteozom inhibisyonu sonucu 4T1 hücrelerinde görülen morfolojik değişimler.....	27
4.2. Proteozom inhibisyonu sonucu B16F10 hücrelerinde görülen morfolojik değişimler.....	28
4.3. 4T1 ve B16F10 hücrelerindeki morfolojik değişimlerin 40x objektif ile analizi.....	30
4.4. 4T1 ve B16F10 hücrelerinin sağkalım grafiği.....	30
4.5. Proteozom inhibisyonu sonucu eIF2 α fosforilasyonunun Western-blot ile analizi.....	31
4.6. Proteozom inhibisyonu sonucu total eIF2 α 'nın Western-blot ile analizi.....	31
4.7. MG-132 ile proteozomun inhibe edilmesi sonucu Hsp70 miktarındaki yükselmenin Western-blot ile analizi.....	322

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Kaspazların yapısal özellikleri.....	10
3.1. Bio-Rad protein tayin metodunda kullanılan miktarlar.....	22
3.2. Ayırıştırma jeli (Separating Gel) hazırlanışı.....	23
3.3. Yığma jeli (Stacking Gel) hazırlanışı.....	23

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
eIF2 α	Translasyon başlama faktörü.
eIF2B	Translasyon başlama faktörü.
E1	Ubiquitin aktive edici enzim.
E2	Ubiquitin konjugasyon enzim.
E3	Ubiquitin ligaz enzim.
Hsp70	70 kDa moleküler ağırlıklı ısı şok proteini.
p21	Siklin bağımlı kinaz inhibitör.
p27	Siklin bağımlı kinaz inhibitör.
p53	Tümör baskılayıcı protein.
Ub	Ubiquitin proteini.
<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
AdoMetDC	Adenozil Metionin Dekarboksilaz
CAD	Kaspaz Aktiviteli Deoksiribonükleaz
CDK	Siklin Bağımlı Kinaz
DMSO	Dimetil Sülfoksit
ER	Endoplazmik Retikulum
GCN2	Transkripsiyon-2 Pozitif Genel Kontrol
HRI	Hem Regüleli İnhibitör
MEF	Mause Embriyonik Fibroblast
MHC	Major Histocompatibility Kompleks Class I
M6F	Mannoz-6-fosfat
ODC	Ornitin Dekarboksilaz
PERK	PKR Benzeri ER Yerleşik Kinaz
PKR	Çift Zincirli RNA Bağımlı Kinaz
UPR	Yanlış Katlanmış Protein Cevabı

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanserlerin birçoğunda onkogen veya tümör baskılayıcı proteinlerdeki mutasyonlar sıklıkla görülmektedir. Bu gen ürünlerinin birçoğunun ifadesi proteozomal yıkım tarafından kontrol edilmektedir. Kanserlerdeki modifikasyonların birçoğu proteozomun yıkım yolunun işlevini etkilemektedir. Ayrıca bir takım gen ürünleri proteozomal alt birimler ile ve dolayısıyla ubiquitin-proteozom yolu ile etkileşim halinde olabilir. Ubiquitindeki ya da ubiquitinin proteozoma bağlandığı bölgelerdeki mutasyonlar proteinlerin stabilitesini etkileyerek karsinogeneze neden olabilir. Bunlara ilave olarak bazı tümör baskılayıcı genler ya da onkogen ürünleri (E3 ligaz gibi) substratların ubiquitinasyon reaksiyonlarına direkt katılabilir. Kanserle ilişkisi belirlenen birçok protein [tümör baskılayıcı gen APC (β -catenin seviyesini kontrol etmektedir), tümör baskılayıcı gen DCC (Deleted in Colon Cancer), p53 ve Rb] ubiquitin-proteozom yolu tarafından yıkılmaktadır veya ubiquitin-proteozom yolu tarafından yıkılan proteinler ile etkileşmektedir [1].

Yukarıda da belirtildiği üzere proteozom inhibitörlerinin (MG-132, lactacystin, MG115 veya PS-341) spesifik olarak çoğalabilen tümör hücrelerde apoptozisi daha güçlü uyardıkları bilinmektedir; dolayısıyla, diğer anti-kanser ilaçlara göre proteozom inhibitörlerine olan ilgi son zamanlarda daha hızlı artmıştır. Fakat şu ana kadar yapılan diğer bazı çalışmalarda ise, multiple myeloma, non-Hodgkin's lenfoma ve non-small cell akciğer karsinoması tedavisinde proteozom inhibitörlerinin olumlu sonuç vermesine ve birçok kanser ilaçlarına (doxorubicin, melphalan, mitoxantrone ve dexamethasone) karşı oluşan direncin kırılmasına rağmen metastatik melanoma, kolorektal kanser ve kronik lenfositik lösemide beklenen sonuçlar elde edilememiştir [2,3]. Bu çalışmalar ise proteozomun hücrel görevlerinin daha kapsamlı araştırılması gerektiğini ortaya koymaktadır. Bu tezin amacı, proteozom inhibitörü MG-132'nin sitotoksik etkilerini, 4T1 meme ve B16F10 melanoma kanser hücre dizileri üzerinde araştırmaktır. Sitotoksik etkiler inverted mikroskop yardımıyla ve tripan mavisi testi ile belirlenmiştir. Ayrıca, daha önce yapılan bir çalışma proteozom inhibisyonunun protein sentezini COS-7 hücrelerinde eIF2 α fosforilasyonunu artırarak inhibe ettiğini göstermiştir [4]. Bu çalışmanın diğer bir amacı ise proteozom inhibisyonunun protein sentezini diğer hücrelerde inhibe ettiği gibi 4T1 hücrelerinde de eIF2 α fosforilasyonunu sağlayarak protein sentezini inhibe edip etmediğini araştırmaktır.

2. PROTEİN YIKIMI

Biyolojik moleküller devamlı sentezlendikleri gibi yıkıma da uğramaktadırlar. Biyomoleküllerden protein ve RNA'nın sürekli bir şekilde sentezlendiği ve daha sonra yıkıldığı nosyonu son zamanlara kadar pek önemsenmemiştir. Protein ve RNA'nın aksine, DNA mitoz veya mayoz bölünme öncesinde sentezlendikten sonra tekrar sentezlenmemekte veya yıkılmamaktadır. Eğer, protein ve RNA gibi biyomoleküllerin devamlı sentezlenmesi veya bu biyomoleküllerin sırasıyla amino asitlere ve nükleotidlere kadar yıkılması söz konusuysa o zaman her bir ribonükleik asitin ve protein molekülünün sentezini veya yıkımını kontrol eden biyokimyasal mekanizmaların da olması gerekir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, hücre homeostazisinin sağlanmasında protein ve RNA yıkım mekanizmalarının biyosentetik mekanizmalar kadar önemli olduğunu göstermiştir. Enzim/protein seviyelerinin hücre içindeki miktarı protein sentezi yanında protein yıkım hızına da bağlıdır. 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 ve hem de yıkım hızı tarafından belirlenmektedir.

$$[P] = ks/kd$$

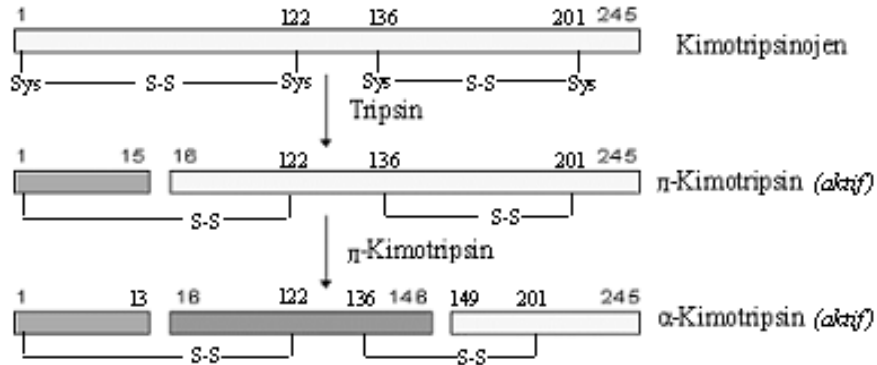
Bu denkleme göre sentez hızını 10 kat arttırdığımızda protein miktarı da 10 kat artar. Aynı şekilde protein yıkım hızını 10 kat azaltırsak protein miktarı benzer şekilde 10 kat artar[5].

Protein yıkımı, hücre içinde ya da dışında işlev gören proteazlar tarafından gerçekleştirilmektedir. Hasarlı, 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 ve hatta birkaç yıl arasında değişir. Hızlı bir şekilde yıkılan proteinler sentez esnasında yanlış amino asitin eklenmesinden dolayı hasarlı (normal üç boyutlu yapısını alamamış) olan veya normal işlevi esnasında bozulan proteinlerdir [6,7]. Genellikle proteinlerin yarı ömürleri N-ucunda bulunan amino asit ile bir korelasyon göstermektedir. Bu olay N-end kuralı olarak bilinir. Örneğin, N-ucunda metionin, serin, alanin, treonin, valin ve glisin amino asitleri bulunan proteinlerin yarı ömürleri 20 saati aşmaktadır. Fenilalanin, lösin, aspartik asit, lizin ve arginin bulunan amino asitler ise 3 dakika veya daha az kısa ömürlü proteinlerdir [8]. Yine yapılarında PEST sekansı (prolin, glutamik asit, serin ve treonin) içeren proteinler diğer proteinlere göre daha hızlı yıkılmaktadırlar [9,10]. Hasarlı proteinler hem bakteriler hem de ökaryotik hücrelerde sitozolik ATP-bağımlı sistemler tarafından yıkılan kısa ömürlü proteinlerdir. Hücre içinde veya dışında işlev gören proteazlardan bazıları şunlardır: Serin proteazlar (tripsin ve kimotripsin), lizozomlarda bulunan

katepsinler, sitozolde bulunan kaspazlar, hücre zarında bulunan veya ekstraselüler sıvıya salgılanan meprinler ve yine hücre içinde bulunan çok büyük yapıda olan ATP-bağımlı proteozom [11].

2.1 Serin Proteazlar

Serin proteaz grubuna tripsin, kimotripsin ve elastaz enzimleri girmektedir. Aktif merkezlerinde enzimatik aktivitesi için elzem olan serin amino asiti içerdikleri için bu şekilde isimlendirilmişlerdir. Bu üç enzim pankreas tarafından sentezlenmekte ve sindirim sistemine (12 parmak bağırsağına) aktif olmayan proenzim (zimogen) olarak salgılanmaktadır (Şekil 2.1). Sindirim sisteminde peptid zincirinin bir kısmı koparılarak aktif enzim formuna dönüştürülürler. Tripsin hücre dışındaki proteinleri bazik amino asitlerin (lizin ve arginin) karbonil grubu (peptid bağına katılan karboksil grubu) tarafından kırmaktadır, kimotripsin ise fenilalanin ve tirozin gibi aromatik amino asitlerin karbonil grubundan sonra proteinleri yıkmaktadır. Elastaz enzimi ise daha az spesifik olup çoğunlukla küçük fakat nötr olan amino asitlerden sonra proteinleri parçalamaktadır. Her üç proteazında moleküler ağırlıkları 25 kDa civarındadır ve aktif merkezlerinde histin, aspartik asit ve serin amino asitleri bulunmaktadır [7].

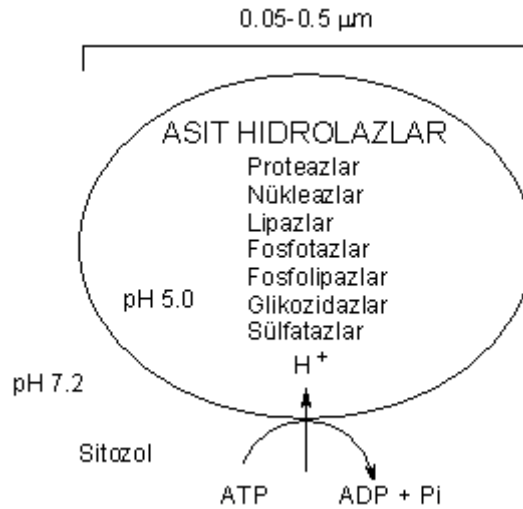


Şekil 2.1 Kimotripsinojen zimogen formunun ince bağırsakta olgunlaşması [7].

Yukarıda bahsedilen proteazlar dışında kan pıhtılaşmasında görev alan thrombin ve pıhtının yıkımını sağlayan plazmin de serin proteaz grubuna girmektedir. Kimotripsin aktif merkezinde peptid bağı hidrolizinde önemli rol oynayan üç amino asit vardır: His₅₇, Ser₁₉₅ ve Asp₁₀₂'dir. His₅₇ sırasıyla hem baz hem de asit gibi davranmaktadır. Ser₁₉₅ peptid bağına atak (saldırmaktadır) etmektedir. Asp₁₀₂ ise His₅₇'yi Ser₁₉₅ ile H-bağı yapması için yönlendirmektedir [7,11].

2.2 Lizozomlar

Lizozomlar hidrolitik enzimler içeren membranla çevrili organeller olup hücre içinde makromoleküllerin sindirilmesi için kullanılmaktadır. Yaklaşık 40 çeşit hidrolitik enzim içermektedirler (proteazlar, nükleazlar, lipazlar, glikozidazlar ve fosfolipazlar). Bütün hepsi asit hidrolaz olarak bilinir çünkü optimum aktivite için asidik bir ortama ihtiyaç duyarlar. Membranda bulunan bir H^+ ATPaz pompası ile sitozolden proton iyonlar (H^+) lizozom lümenine taşınarak, pH 5 civarında tutulur (Şekil 2.2). Lizozom enzimleri sitozole sızarsalar bile çok az tahribat yaparlar çünkü sitozolik pH 7.2'de inaktive olurlar. Lizozom membranındaki proteinlerin çoğuna çok sayıda karbonhidrat grubu eklenmiştir bunun da onları lizozom lümeninde bulunan proteazlardan koruduğu düşünülmektedir [12].

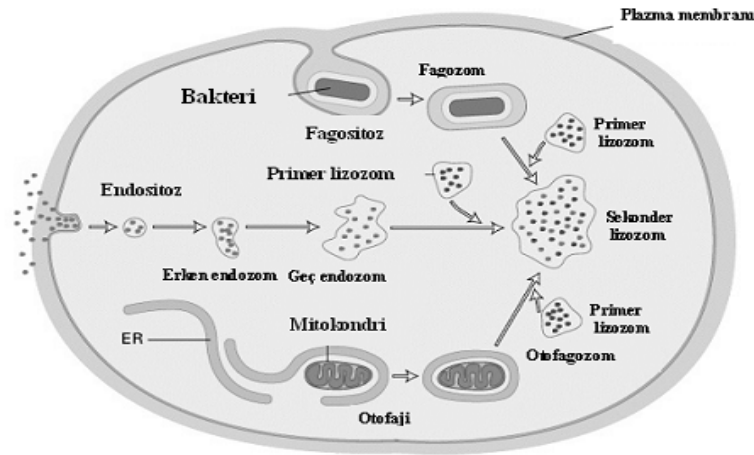


Şekil 2.2 Lizozomlardaki hidrolitik enzimler [12].

Lizozomlar bütün ökaryotik hücrelerde bulunmaktadır. Bitkilerdeki ve mantarlardaki vakuoller çok yönlü lizozomlar gibi işlev görmektedir. Vakuoller hücrelerin yaklaşık %30'luk bir bölümünü kaplamaktadır, bazı hücrelerde bu %90'na varmaktadır. Vakuollerin çok değişik görevleri vardır. Sindirim kompartımanı olmasının yanında ayrıca atık madde deposu, embriyo gelişimi için besin deposu ve hatta bitki yenildiği zaman zararlı maddeler vakuollerden salındığı için predatörlere karşı bir savunma da sağlamaktadır [12].

2.2.1 Lizozomal degradasyon

Lizozomlarda yıkıma uğrayacak maddeler lizozomlara üç farklı yoldan ulaşmaktadır. Bu yollardan biri endositozdur. Hücre dışından maddelerin plazma membranının invajinasyonu ile hücre içine alınmasıyla meydana gelir ve iki çeşit endositoz vardır; pinositoz (sıvıların hücre içine alınması: hücrenin içmesi) ve fagositoz (katı maddelerin hücre içine alınması: hücrenin yemesi). Endositoz ile alınan maddeler önce erken endozom (early endosome) denilen küçük düzensiz veziküller (keseler) içine alınır. Bu veziküller içine alınan bazı moleküller çıkarılır ve tekrar plazma membranına geri gönderilir, diğer maddeler ise geç endozom (late endosome) denilen veziküllere iki vezikülün füzyonu (birleşmesi) sonucu teslim edilir. Geç endozomlarda pH 6 civarındadır. Olgun lizozomlar, geç endozom membranındaki bazı proteinlerin kaybolması ve pH'ın daha da düşmesiyle oluşurlar. Lizozomlarda yıkılacak olan maddeler ikinci bir yol olan otofaji ile de lizozomlara ulaşır (Şekil 2.3) [12].

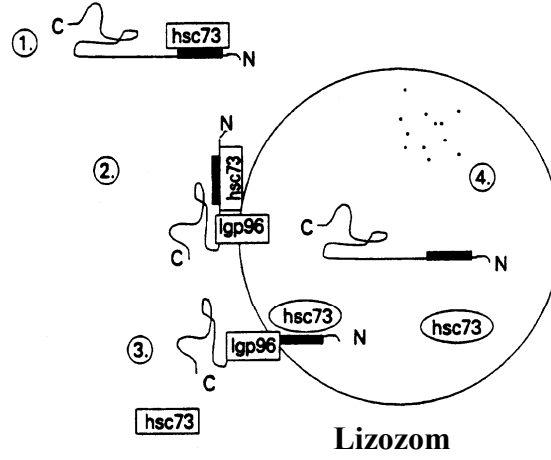


Şekil 2.3 Lizozomal yıkım yolları [12].

Otofaji hücrenin kendisine ait bazı maddelerin veya kısımların elimine edilmesi işlemidir. Karaciğerlerde bir mitokondrinin yaklaşık 10 gün gibi bir ömrü vardır. Bu sürenin sonunda mitokondri lizozom tarafından otofaji ile yok edilmektedir. Bu işlem ER'den elde edilen membran ile organelin etrafının sarılması (otofagozom) ve daha sonra otofagozomun lizozom ile birleşmesiyle sonuçlanır. Lizozomlara ulaşmada kullanılan üçüncü bir yol bazı proteinlerin yüzeyinde bulunan KFERQ sinyal sekansıdır. KFERQ sekansı (K, lizin; F, fenilalanin; E, glutamik asit; R, arginin ve Q ise glutamin amino asitidir) muhtemelen lizozom membranında bulunan spesifik transpörtör proteinler tarafından tanınarak bu tür proteinlerin

lizozom lümenine taşınması ve orada proteazlar tarafından yıkılması sağlanmaktadır.

Lizozom enzimleri ve membran proteinleri granüllü ER'da sentezlendikten sonra golgi aparatı üzerinden lizozomlara gönderilir. Bu proteinleri içeren veziküller trans golgi ağından koptuktan sonra geç endozomlar ile birleşirler. Geç endozomlar da sonradan lizozom organeline dönüşürler. Lizozomal proteinler ve enzimler nasıl diğer proteinlerden ayırt edilmektedirler? Bu proteinler N-bağlı (N-linked) oligosakkaritlere eklenen özgül bir belirteç olan mannoz-6-fosfat grupları (M6P) taşımaktadırlar. Bu gruplar muhtemelen cis golgi ağında eklenmektedir. M6P grupları trans golgide bulunan ve bir transmembran proteini olan M6P reseptör proteinleri tarafından tanınmaktadır. Bu reseptörler lizozomal hidrolaz enzimlerine bağlanarak transport vezikülleri içine paketlenirler. Bu veziküller trans golgiden koparak geç endozomlar ile birleşirler ve içerisindeki enzimleri bu organelin lümenine bırakırlar. M6P reseptörleri pH 7'de lizozomal proteinlere bağlanırlar fakat endozomlardaki düşük pH reseptörlerin bu proteinlerden ayrılmasını sağlar. M6P reseptörleri lizozomal enzimleri bıraktıktan sonra veziküller ile trans golgiye geri getirilerek tekrar kullanılırlar. Ökaryotlardaki lizozomal sistem ile çoğunlukla uzun ömürlü hücre zarı ve hücre dışı proteinler hücre içine alındıktan sonra yıkıma uğramaktadır [12]. Lizozomlarda endositoz ile hücre içine alınan proteinleri yıkan katepsin olarak bilinen yaklaşık 50 hidrollitik proteaz vardır. Ubiquitin-proteozom yolunun aksine lizozomal protein yıkımı özgül değildir. Lizozomal proteazların veziküller içine konulması otodegradasyonu engellemektedir. Lizozom membranlarında yıkım sonrası oluşan amino asitleri sitoplazmaya taşıyan transportörler bulunmaktadır. Lizozomlarda yıkılacak olan proteinler üç önemli yol ile buraya hedeflenmektedir; endositoz (pinositoz ve fagositoz), otofaji ve özgül sinyal sekanslar (KFERQ pentapeptid sekansı) aracılığı ile. Sitolik proteinlerin yaklaşık %30'u bu sekansı içermektedir ve besin yetmezliği durumunda (hücre kültürlerinde serum eksikliğinde) bu proteinler lizozomlara hedeflenmektedir. Bu pentapeptid sekansa heat shock proteinlerden Hsp73 proteinin bağlandığını ve bu protein aracılığı ile lizozomlara yönlendirildiği bilinmektedir (Şekil 2.4) [13]. Bu proteinlere heat shock proteinleri denilmesinin nedeni yüksek ısıda uyarılmalarından dolayıdır. Fakat daha sonra hücrelerde normal şartlarda da sürekli ve yüksek miktarda sentezlendikleri görülmüştür. Hsp proteinleri yeni sentezlenen proteinlerin ER veya mitokondriye gönderilmesinde görev alırlar. Ayrıca stres şartları altında üç boyutlu yapılarını kaybeden proteinlerin katlanmalarına yardımcı olmak veya degradasyon yollarına hedeflenmelerini sağlayarak hücre içinde bu anormal proteinlerin birikmesini engellemede önemli rolleri vardır.



Şekil 2.4 Hsp73 proteini aracılığı ile lizozomlara protein hedeflenmesi [13].

Lizozomal degradasyon çalışmaları NH_4Cl ve leupeptin ilaçları ile inhibe edilmektedir. Bu inhibitörler sayesinde bir proteinin lizozomlar tarafından mı veya başka bir hücre içi proteaz tarafından mı yıkılıp yıkılmadığı kolayca anlaşılmaktadır. Lizozomal hidrolazlar pre-proenzim olarak sentezlenirler, sentez devam ettiği sırada sinyal sekans çıkarılır ve ER'da proenzim katlanmaları olur. Golgide asparagin-bağlı (N-linked) glikozilasyona uğrarlar. Yine golgide N-asetil glukozamiylfosfotransferaz enzimi ve N-asetilglukozamidaz enzimleri ile mannoz-6-fosfat eklenir. Bu işaretlenmiş olan proenzime golgi membranında bulunan M6P reseptörleri bağlanır ve endolizozomal sisteme yönlendirilir. Glikozilasyonun bu enzimleri endozom ve lizozomlarda yıkımdan koruduğu varsayılmaktadır. Lizozomal proteazlar endo ve ekzo peptidazlar olarak iki grupta incelenmektedirler. Endoproteazlar çoğunlukla sistin ve aspartik proteazlardır, ekzoproteazlar ise sistin ve serin proteazlardır [14].

Lizozomlara teslim edilen proteinler önce asidik ortamda denatüre olurlar daha sonra endoproteazlar tarafından yıkılırlar ve son olarak ekzoproteazlara substrat olarak amino asitlere kadar yıkılırlar. Tüm endoproteazların primer yapıları oldukça korunmuş ve benzer sekonder yapıya sahiptirler. Aralarındaki farklar çoğunlukla korunan bölgeler arasında bulunan kısımlara insörsiyon ve delesyonlardan kaynaklanmaktadır. Aktif bölgede bulunan sistin amino asitine ek olarak histidin (His), asparagin (Asn) ve glutamin (Gln) aktif bölgeyi oluşturan ve substrat hidrolizine katılan amino asitlerdir. Bu amino asitler tüm sistin endoproteazlar arasında korunan amino asitlerdir. Sistin proteazlar lizozomlardaki denatürasyona sebep olan ortam şartlarına dayanıklı ve geniş bir pH spektrumuna sahiptirler. Fakat çoğu nötr ve alkali ortamlarda dayanıksızdırlar. Bu da hücreyi bu tür enzimlerden

korumaktadır. Sistin proteazların yarı-ömürleri lizozomlarda birkaç gün ile haftalar arasında değişmektedir. Bazı proteazlar inhibitör proteinler aracılığı ile regüle edilmekte iken lizozomal proteazlarda buna ihtiyaç yoktur. Örneğin, tripsin inhibitörü (MA 6 kDa) tripsini, α_1 -antiproteinaz (MA 53 kDa) ise elastaz enzimini inhibe eden proteinlerdir [14].

2.2.2 Lizozomal proteazların regülasyonu

Yapılan bazı araştırmalar lizozom lümenindeki redoks şartlarının lizozom endoproteazları regüle ettiğine dair bulgular ortaya çıkarmasına rağmen diğer bazı çalışmalarda ise redoks potansiyelinin regülasyonda pek fazla bir rolü olmadığını göstermektedir. Örneğin, *in vitro* deneyler katepsin B ve katepsin L'nin pH 4.5-6.5 arasında dayanıklı olduğunu ve sistin amino asitini thiol (RSH) formunda tutmak için indirgeyici bir ortama ihtiyaç duyulduğu gösterilmiştir. Diğer bazı çalışmalarda redoks potansiyel değişikliğinin katepsin B aktivitesini çok az etkilediği görülmüştür. Lizozom lümen pH'ı lizozom proteazların regülasyonunda en önemli etkenlerdendir. Proteazların asidik bir ortama ihtiyaç duymadıkları, lizozom pH'nın asidik ve nötr pH arasında değiştiği gösterilmiştir. Katepsin D pH 2.8-5.0 arasında, katepsin E pH 3-3.5 arasında, katepsin S pH 5-7.5 ve katepsin B ise pH 5-6.5 gibi nötr bir ortamda aktivite göstermektedir. Bu da tüm lizozomal proteazlar için optimum bir pH sağlandığını göstermektedir [14].

2.3 Kaspazlar

Kaspazlar hasarlı veya fazla olan hücrelerin çevrelerine zarar vermeden ortadan kaldırılmasını sağlayan programlanmış hücre ölümünü (apoptozis) uyaran proteazlardır. Apoptotik hücrede meydana gelen morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler sistin proteazlar olan kaspazlar tarafından gerçekleştirilmektedir. Tüm kaspazlar amino asit sekansları, yapıları ve substratları yönünden benzerlik göstermektedir. Hepsi proenzim olarak sentezlenmektedir (30-50 kDa).

Üç önemli domain içermektedirler;

1. Amino ucu domain-prodomain.
2. Büyük alt birim.
3. Küçük alt birim.

Aktif merkez büyük alt birimde yer almaktadır. Aktivasyon bu domainler arasında peptid bağlarının kırılması ve daha sonra büyük ve küçük alt birimler birleşerek heterodimer, heterodimerler de birleşerek iki aktif merkez içeren tetramerik aktif enzimi oluştururlar (Şekil 2.5). Kaspazlar proteazlar arasında en çok spesifite gösteren enzimlerdir. Kesinlikle aspartik

asitten sonra substratlarını kırmaktadırlar. Aspartik asitin önündeki 4 amino asit (tetrapeptid) kompozisyonu ve bunların üç boyutlu yapısı spesifitede önemli etkiye sahiptir. Memelilerde şimdiye kadar 12 tane tespit edilmiştir.

Apoptozisi uyarmalarına göre kaspazlar iki gruba ayrılırlar;

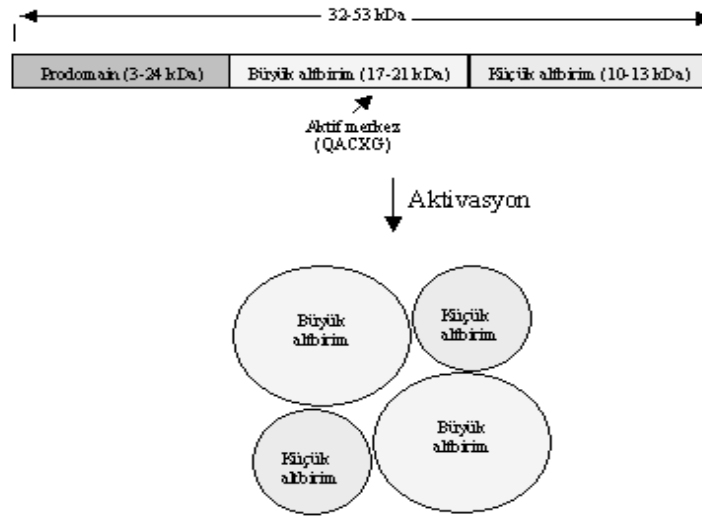
1. Apikal (başlatıcı kaspazlar).
2. Efektör kaspazlar.

Başlatıcı kaspazlar efektör kaspazları aktive eden proteazlardır. Efektör kaspazlar hücre çekirdeğinde (laminler), DNA tamir enzimlerinden PARP, Fodrin, Rb, sitoplazmada (aktin) ve hücre iskeletinde bulunan birçok yapısal ve işlevsel proteinleri parçalayan proteazlardır. Apoptoziste görev alan kaspazlar Çizelge 2.1'de gösterilmektedir [15-18].

Efektör kaspazlar katepsin veya kalpein (Ca^{+2} tarafından aktive edilen hücre hareketinde ve adhezyonda rol alan proteaz) gibi diğer proteazlar tarafından da aktive edilebilmektedir. Kaspaz enzimlerinin aktivasyonuna ve dolayısıyla apoptozis uyarılmasına neden olan dış etkenlerden bazıları UV ışını, gama ışını, radyasyon, ilaçlar ve toksinler sayılabilir [17,19].

2.3.1 Kaspaz aktivasyonu

Kaspazlar çekirdek proteinlerinden lamini yıkarak kromatin kondensasyonuna, hücre iskeletini oluşturan aktin proteinini yıkarak hücre büzülmesi ve sitoplazma kondensasyonuna neden olurlar. Kaspazlar hücrede sürekli sentezlenmekte ve apoptozis uyarısı sonucu aktive edilmektedirler. Kaspazlar farklı uyarılar ile aktive edilmektedirler. Örneğin Şekil 2.6'da gösterilen kaspaz 8 plazma membranında bulunan Fas reseptörünün uyarılması sonucu aktive edilmektedir [16,18].



Şekil 2.5 Kaspaz alt birimlerinden aktif kompleks oluşması [19].

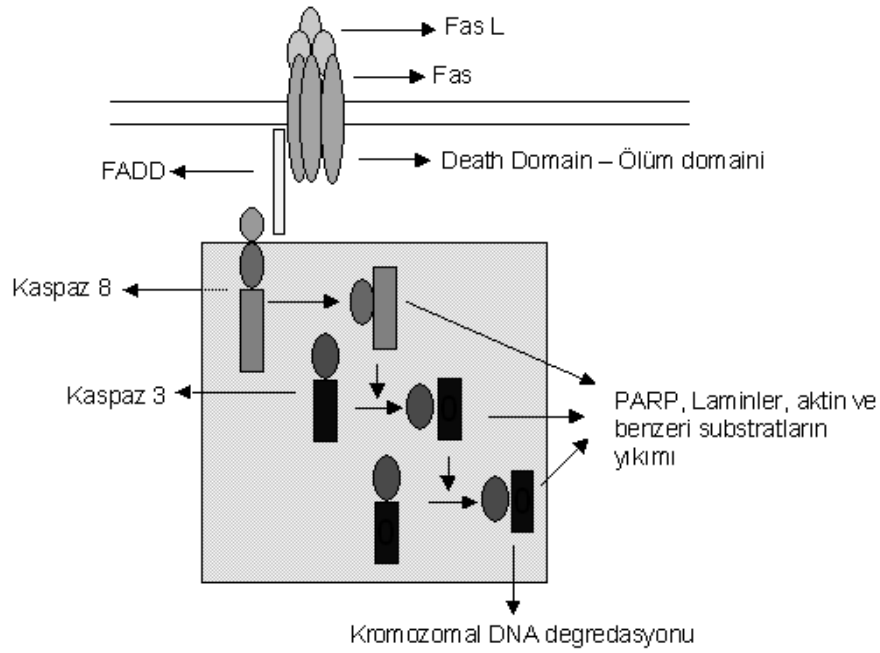
Çizelge 2.1 Kaspazların yapısal özellikleri [17].

Enzim	Moleküler Ağırlık (kDa)	Alt birimler
Başlatıcı Kaspazlar		
Kaspaz-2	51	19/22
Kaspaz-8	55	18/11
Kaspaz-9	45	17/10
Kaspaz-10	55	17/12
Kaspaz-12	50	20/10
Efektör Kaspazlar		
Kaspaz-3	32	17/12
Kaspaz-6	34	18/11
Kaspaz-7	35	20/12

2.3.2 Apoptozisde kaspazların rolleri

Apoptozis yaklaşık olarak 30-60 dakika sürmektedir. Apoptozis, DNA fragmantasyonu, kromatin kondensasyonu, membranla çevrili veziküllerin görüldüğü bir seri olaylar dizisini içermektedir. Apoptozis esnasında kaspazlar tarafından yıkılan yaklaşık 40 substrat tespit edilmiş olup bu substratların yıkımı apoptozisde görülen bu olayları tetiklemektedir. Görevlerinden bir tanesi, hücreyi apoptozisten koruyan proteinleri ortadan

kaldırmak ve inaktive etmektir. Bu proteinlerden bir tanesi I^{CAD} 'dir. Bu protein normalde CAD (kaspaz aktiviteli deoksiribonükleaz) proteinine bağlanarak hücre içinde bu enzimi inaktif durumda tutmaktadır. Apoptotik bir uyarı geldiğinde kaspazlar aktive edilir edilmez bu inhibitörü (I^{CAD}) yıkarak CAD enzimini serbest bırakmaktadır.



Şekil 2.6 Kaspas-8 ve kaspaz-3'ün Fas reseptörü aracılığıyla aktivasyonu [16].

Serbest kalan CAD enzimi nükleozomlar arasındaki DNA'yı kırarak 200 bp uzunluğunda DNA fragmentleri oluşturmaktadır. Bu oluşan DNA fragmentleri agaroz jel elektrofezde DNA merdiveni şeklinde görülmektedir [20].

Kaspazlar ayrıca apoptozisi inhibe eden negatif regülatörleri yıkarak hücre ölümünü tetiklemektedir. En önemli negatif apoptozis inhibitörü Bcl-2'dir. Bcl-2 gibi işlev gören ve benzerlik gösteren diğer bazı apoptozis inhibitörleri Bcl-xL, Bcl-w ve Mcl-1 proteinleridir. Aynı şekilde Bcl-2 proteinine benzerlik gösteren fakat apoptozisi tetikleyen diğer bazı proteinler ise Bax, Bak, Bad ve Bcl-xs proteinleridir. Bcl-xL veya Bcl-2 farede mutasyona uğratıldığında hayvanlar embriyonik safhada veya doğum sonrasında bazı organlarda aşırı hücre ölümü nedeniyle ölmektedir [18].

2.3.3 Apoptozis ve apoptotik hücrelerin karakteristik özellikleri

Apoptozis tanımı ilk defa Kerr ve ark. tarafından ileri sürülmüştür. Apoptozis aktif ve programlanmış bir hücre ölümü olup çeşitli fizyolojik ve patolojik uyarılar ile başlatılabilir veya inhibe edilebilir. Apoptozis normal bir gelişim için hücre bölünmesi kadar önemlidir. Organizmanın ihtiyaç duymadığı fazla hücrelerin eliminasyonunu sağlar. Embriyo gelişimi esnasında parmaklar arasındaki perdenin ve sinir sistemindeki nöronların %50'sinin ortadan kaldırılması apoptozis ile sağlanmaktadır. Tüm çok hücreli organizmalarda apoptozis her gün cereyan etmektedir ve homeostazisin sağlanması için yaklaşık 10 milyar hücre her gün apoptozis ile ölmektedir.

Apoptotik hücrelerin karakteristik özellikleri:

1. Sitoplazma ve çekirdek kondensasyonu.
2. Membran yüzeyinde küçük keseciklerin görülmesi ve hücrenin büzülmesi.
3. Dokularda komşu hücrelerden ayrılması. Hücre kültürlerinde ise petri kabına yapışık olarak büyüyen hücrelerin kabın dibinden sökülerek besi yerinde asılı durması.
4. Hücrenin küçük parçacıklara bölünerek apoptotik veziküller oluşturması.
5. Organeller bu küçük veziküller içinde bozulmadan durmaktadır, dolayısıyla hücre içeriği dışarı salınmamaktadır.
6. Apoptotik veziküller hızla komşu hücreler tarafından fagozite edilmektedir.
7. Membran normalde asimetric yapıdadır. Fakat apoptotik hücreler bu asimetric yapıyı koruyamamaktadır ve özellikle fosfatidilserin molekülleri çift katlı lipid membranın iç yüzeyinden dış yüzeyine transfer olmaktadır.
8. DNA fragmantasyonu (DNA merdiveni). Apoptotik hücrelerin en belirgin biyokimyasal belirteçlerinden bir tanesi kromatinin 200 bp fragmentlere kırılarak agaroz jel elektroforezde merdivenimsi görülmesidir [18,20,21].

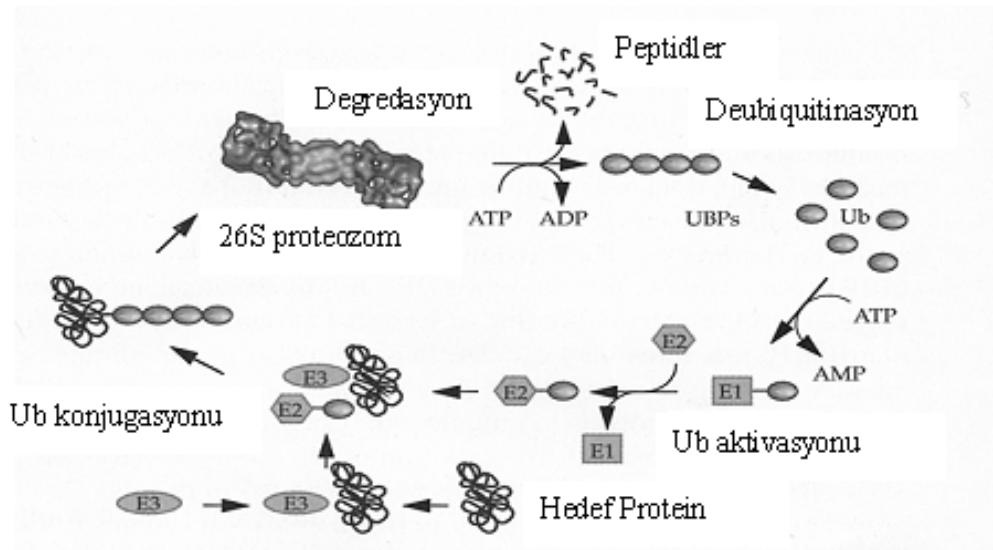
2.4 Meprinler

Hücre zarında bulunan veya ekstraselüler sıvıya salgılanan metaloproteazlardır. Amino asit seviyesinde %50 benzerlik gösteren α ve β alt birimlerinden oluşurlar. Alt birimler birleşerek homo veya heterokompleksler meydana getirilir. Membran formları dimerik (homodimerik B, meprin B) ya da tetramerik (heteromerik $\alpha_2\beta_2$ ya da $\alpha_3\beta_2$ kompleksler, meprin A) şeklindedir. Salgılanan meprin formu ise 10-100 tane α alt biriminin nonkovalent olarak birleşmesi sonucu oluşan, bilinen en büyük proteazlardan biridir. Meprinler böbrek proksimal

tüplerinde ve bağırsak epitel hücrelerinde yüksek miktarda bulunmaktadır. Çok sayıda peptid ve protein parçalamaktadırlar; bunlar arasında gastrin, angiotensin gibi peptidler ve ekstraselüler matriks proteinleri kolajen IV ve fibronektin bulunmaktadır. Meprin alt birimlerinin sentezinin önemli derecede bağırsak yolu enfeksiyonlarında ve kanserli hücrelerde arttığı görülmüş, ve özellikle ekstraselüler matriks proteinlerini yıkımları nedeniyle kanserli hücrelerin metastazında önemli etkileri olduğu bilinmektedir [22].

2.5 Ubiquitin Proteozom Yolu

Ökaryotik hücrelerdeki seçici protein yıkımında proteinler çoğunlukla bir poliubiquitin (76 aminoasitlik bir protein) zinciri ile işaretlendikten sonra 26S proteozom tarafından peptidlere kadar yıkılırlar [6,22-24]. Ubiquitin yıkılacak olan proteinlere bağlanmadan önce ilk olarak ubiquitin aktive edici enzimde (E1) bulunan bir sistin amino asit ile ubiquitin C-ucu arasında bir thioester bağı kurulur. Şekil 2.7’de gösterildiği gibi aktive edilen ubiquitin daha sonra benzer şekilde E1 enziminden ubiquitin konjugasyon enzimindeki (E2) bir sistin amino asidine 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 [25,26]. Son aşamada, hedef proteindeki bir lizin amino asidi ile ubiquitin C-terminusundaki glisin amino asidi arasında bir izopeptid bağı (ubiquitin C-terminusundaki glisin amino asidi ile substrat proteindeki lizin amino asidinin yan grubu arasında oluşan peptid bağı) oluşur. Diğer bir ubiquitin molekülü bu defa ilk bağlanmış olan ubiquitin molekülünün 48. pozisyonunda bulunan lizin amino asidine eklenir. Eklenen her bir ubiquitin molekülünün lizin 48. amino asidine bir ubiquitin molekülü bağlanması ile hedef protein üzerinde bir poliubiquitin zinciri sentezlenir [28]. Fakat nadiren bazı proteinler (örneğin, C-jun ve ornitin dekarboksilaz) ubiquitin ile işaretlenmeden 26S proteozom tarafından yıkılmaktadırlar. Ornitin dekarboksilaz (ODC), istisna olarak 26S proteozoma antizyme aracılığı ile hedeflenmektedir. ODC, Ub ile modifiye edilmemektedir ve Ub (Ubiquitin) ODC yıkımında görev almamaktadır [29].



Şekil 2.7 Ubiquitin-proteozom yolu [27].

Yıkılacak olan proteinler ubiquitine olduktan sonra 26S proteozoma yönlendirilmektedir.

2.5.1 26S proteozom

26S proteozom sitoplazmada ve çekirdekte bulunan multikatalitik bir proteazdır. 26S proteozom tüm hayat formlarında bulunan ve yaklaşık 64 alt birimden oluşan büyük bir proteazdır. Görevleri arasında, misfolded (hatalı katlanmış) ve anormal proteinler, hücre döngüsü proteinlerinden siklinler, transkripsiyon faktörlerinin işlenmesi ve yıkımı, hücre döngüsünün durdurulması, immün-cevap ve apoptozis bulunmaktadır. 26S proteozom, 1 tane 20S proteozom ve 2 tane 19S düzenleyici kompleksten oluşan 2.5 MDa ağırlığında bir proteazdır. Ubiquitin-protein konjugatları daha sonra 26S proteozomun 19S düzenleyici kompleksi tarafından tanınır, hedef protein çözülür, 20S kor kompleksi içine gönderilir ve burada peptidlere kadar yıkılır. 19S düzenleyici kompleksi iki alt kompleksten oluşmaktadır: Base (20S komplekse yakın kompleks) ve Lid (kapak). Base kompleksinde ATPaz aktivitesi içeren 6 protein ve ubiquitin tanıyan S5a proteini bulunmaktadır. ATPaz enzimlerinin substrat proteinlerin üç boyutlu yapılarının çözülmesi ve proteolitik aktiviteleri içeren 20S kompartmanı içine gönderilmesinden sorumlu olduğu sanılıyor. 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. Çoğunlukla ubiquitin hedef proteinde lizin amino asitlerine eklenmesine rağmen nadiren bazı proteinlerde (örneğin, transkripsiyon faktörü MyoD) N-terminusundaki amino asitin NH₂ grubuna eklendiği

görülmüştür. 26S proteozom 2.5 MDa ağırlığında olup 19S düzenleyici kompleks ve 20S kor kompleksin birleşmesi ile oluşmaktadır. 19S kompleks 20S kompleksin her iki ucuna eklenmektedir. Prokaryotik ve ökaryotik 20S kompleksi (700 kDa) α ve β alt birimlerinin oluşturduğu 4 tabaklı silindirik bir yapıdır. Arkeobakter *Thermoplasma acidophilum*'da 14 tane β alt birimi içteki iki tabakayı, 14 α alt birimi ise dıştaki iki tabakayı oluşturmaktadır ($\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ şeklinde dizilmektedir). Ökaryotlarda her bir α ve β alt birimi farklıdır ve $\alpha_{1-7}\beta_{1-7}\beta_{1-7}\alpha_{1-7}$ şeklinde dizilmektedirler [6,23,24,27].

2.5.2 20S proteozomun proteolitik aktiviteleri

20S proteozom kompleksi en az üç farklı proteolitik aktivite göstermektedir:

1. Kimotripsin benzeri aktivite.
2. Tripsin benzeri aktivite.
3. Peptidil glutamil aktivite.

Beta alt birimleri proenzim olarak sentezlenirler ve proteozom olgunlaşması sırasında 75 amino asit kadar olan pro sekans çıkarılır. Yedi beta alt biriminden üçü (β_1 , β_2 ve β_5) enzimatik aktivite göstermekte ve bu alt birimler Gly ve Thr amino asitleri arasında kırılmakta ve enzim bu Thr yan gruplarını substrat peptid bağlarını kırmakta kullandığı için threonin proteazlar olarak bilinir. Peptid bağı hidrolizi ATP ve ubiquitin gerektirmektedir. Aktif bölgedeki her bir Thr amino asiti arasındaki mesafe 28 °A kadardır, bu da proteinlerin yaklaşık 8 amino asitlik peptidlere kadar yıkıldığını göstermektedir [23,27].

2.5.3 26S proteozom inhibitörleri

Proteozom inhibitörleri MG-132 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, NFkB inhibitörü Ikb, poliamin biyosentez enzimleri ODC ve AdoMetDC (Adenozilmetionin dekarboksilaz) gibi çok farklı mekanizmalarda rol alan proteinler vardır. Başlıca proteozom inhibitörleri [24,29-32].

Lactacystin: Lactacystin kovalent olarak Thr amino asidini modifiye ederek geri dönüşümsüz olarak proteozomu inhibe eder ve oldukça spesifiktir.

MG-132: Yüksek konsantrasyonda katepsin B gibi diğer bazı proteazları da inhibe edebilir, geri dönüşümlü inhibisyon yapar (Şekil 2.8).

PSI: Kimotripsin benzeri aktiviteyi inhibe eder.

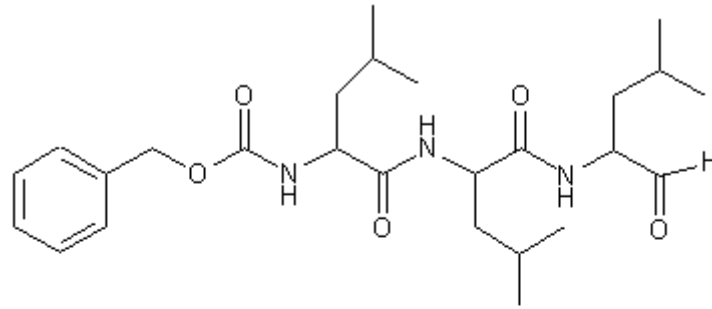
Bortezomib (PS-341) : Dipeptid boronik asit analogu. Birçok tümör çeşidine (multiple miyeloma, Iymphoma, prostat) karşı etkili olduğu görüldüğü için Amerikan Sağlık Bakanlığı tarafından kanser tedavisinde kullanılmak üzere onaylanmıştır. Proteozomun kimotriptik aktivitesini geri dönüşümlü olarak inhibe eder (Şekil 2.8) [3,33].

2.5.4 26S proteozomun hücresel görevleri

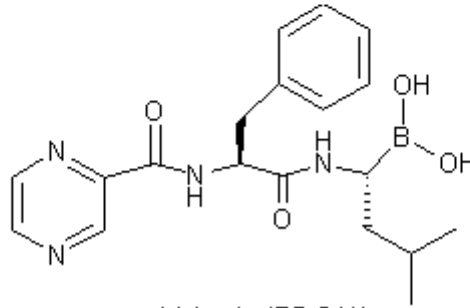
Proteozom, abnormal (hatalı katlanmış) ve normal proteinlerin, kısa ve uzun ömürlü proteinlerin yıkımından sorumlu bir hücre içi proteaz olmasının yanında vücuda giren virüs ve bakterilere ait proteinleri yıkarak oluşan antijenlerin majör histocompatibility kompleks class I tarafından (MHC) hücre yüzeyinde sunumunu sağlayarak T-hücreleri tarafından fagozite edilmesini sağlar. Hücre döngüsü, endositoz, transkripsiyon, organel biyogenezi, spermatogenez, anjiogenez, apoptozis ve protein sentezi gibi birçok hücresel olayda görev alan proteinlerin yıkımını veya işlenmesini sağlayarak bu hücresel mekanizmalara direkt veya indirekt bir şekilde katkıda bulunmaktadır [23,24,26,34].

2.5.5 Ubiquitin-proteozom yolu ve p53 proteini

p53 proteini proapoptotik bir protein olup tümör baskılayıcı protein olarak bilinir. Kaspaz 3, 7, 8 ve 9 enzimlerini aktive ederek apoptozisi uyarır ve kanser oluşumunu engeller. *In vivo* ve *in vitro* modellerde ubiquitin-proteozom yolu tarafından yıkıldığı bilinmektedir. Ayrıca hücre döngüsünün ilerlemesi ve hücre döngüsünün kontrolünde önemli görevlerinin olduğu gösterilmiştir [23,35]. p53'ün stabilizasyonu (yıkımının durması) birçok hücre kültürü modelinde apoptozise neden olmaktadır. 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 proteinin over-ekspresyonu (aşırı ifadesi) ile Rat-1 hücrelerinde apoptozisin uyarılması için yeterli olduğu görülmüştür.



MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-H)



Velcade (PS-341)

Şekil 2.8 Proteozom inhibitörleri MG132 ve PS-341 (Velcade)'in yapısı [33].

Yazarlar, bu hücre ölümüne diğer moleküllerinde katılabileceğini önermelerine rağmen elde ettikleri veriler proteozom inhibisyonu sonucunda p53 proteinin birikmesi ve akabinde hücre döngüsü inhibitörlerinden p21'in transkripsiyonun uyarılmasının apoptozis tetiklenmesinde anahtar bir rol oynadığıdır [35]. Kanserli dokularda p53 geninde yaygın şekilde mutasyonlara rastlanılmaktadır. Kolon kanserinin %70, akciğer kanserinin %50, ve göğüs kanserlerinin % 20'sinde p53'te mutasyonlar tespit edilmektedir [12,36]. p53 proteini aynı zamanda proapoptotik proteinlerden Bax ve Fas proteinlerinin sentezini uyararak ve Bcl-2 gibi antiapoptotik proteinlerin sentezini engelleyerek DNA hasarları durumunda apoptozisi tetikler [37].

Diğer bazı çalışmalarda ise yukarıda anlatılan çalışmanın aksine proteozom inhibitörlerinin p53/p21'den bağımsız bir yol ile apoptozisi tetikleyebileceği gösterilmiştir [38]. Bu karşıt bulgular proteozom inhibisyonun farklı hücrelerde apoptozisi farklı yollardan uyarabileceğini ve proteozom inhibisyonun bu tür yaygın etkilerinin aydınlatılmasının kanserli hücrelerde apoptozis tetiklemek için yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine olanak sağlayacağına işaret etmektedir.

2.5.6 Ubiquitin-proteozom yolu ve protein sentezi

26S proteozomun degradasyon işlevi proteozom inhibitörleri ile kısa süreli olarak inhibe edildiğinde global (küresel) protein sentezi durmaktadır. Protein sentezinin bu inhibisyonu ökaryotik translasyon başlama faktörü eIF2 α 'nın HRI kinaz tarafından fosforilasyonu ile sağlanmaktadır [4]. eIF2, α , β ve γ olarak adlandırılan üç alt birimden oluşmaktadır [39].

Protein sentezinin translasyon başlama safhasında eIF2 α , metionil-tRNA (Met-tRNA_i)'yı 40S ribozom alt ünitesine taşır [39]. Met-tRNA_i, GTP ve eIF2 α molekülleri 40S ribozomal ünitesine bağlanarak 43S pre-başlama kompleksini oluştururlar [40]. 43S başlama öncesi kompleksine 60S ribozom alt ünitesinin bağlanmasıyla GTP hidroiz edilir ve eIF2-GDP molekülü ribozomdan ayrılır [41]. GDP molekülünün GTP'ye dönüşümü eIF2B proteini tarafından sağlanmaktadır. Protein sentezinin global düzenlenmesi esasen eIF2 α alt ünitesinin spesifik olarak Ser51'den fosforilasyonu ile olmaktadır [42]. Fosforile edilmiş [eIF2 α (P)] GDP/GTP değişimini sağlayamaz ve eIF2 α (P)-eIF2B ayrılmaz bir kompleks oluşturur [42,43]. eIF2B, sitoplazmadaki eIF2 moleküllerinin yaklaşık olarak %10-20 kadarını oluşturmaktadır. Bu nedenle eIF2 α 'nın %10'nun fosforilasyonu bile hücredeki tüm mevcut eIF2B'nin bağlanması için yeterlidir. Bu suretle eIF2B'nin GDP/GTP değişimini sağlayan aktivitesi bloke olur ve bu durumda protein sentezinin tamamen inhibe edildiği gözlenmektedir [41,43]. Ökaryotik translasyon başlama faktörünü Ser⁵¹'den spesifik olarak fosforile eden 4 farklı kinaz enzimi belirlenmiştir: PKR, interferon tarafından indüklenebilen ve çift zincirli RNA tarafından aktive edilen bir kinaz olup, stres durumlarında ve viral enfeksiyonda eIF2 α 'yı fosforile etmektedir; PERK, ER'ye yerleşmiş PKR benzeri bir kinaz olup, ER'de yanlış katlanmış proteinlerin birikimi sonucu aktive olur; GCN2, besin tarafından düzenlenen protein kinaz olup, besin eksikliğinde yüksüz tRNA'ya cevaben işlev görür; HRI, hem tarafından regüle edilen protein kinazdır [41,42,44].

Proteozom inhibisyonunun neden olduğu eIF2 α fosforilasyonuna aracılık eden kinazı bulabilmek için her bir muhtemel kinaz geni knock-out olan (çıkarılmış olan) fare embriyonik fibroblast (MEF) hücre hatları kullanılmıştır [4]. Kısa süre önce yayınlanan bu çalışmada hem yabancı tip hem de PERK, PKR ve GCN2 knock-out hücre dizilerinde proteozom inhibisyonunda proteozom inhibitörü kullanılmıştır (50 μ M MG132, 4 saat muamele). Daha sonra eIF2 α fosforilasyonunun yükseldiği görülmüştür. Bu sonuç, proteozom inhibisyonunun neden olduğu eIF2 α fosforilasyonunun PERK, PKR veya GCN2 aracılı olmadığını göstermiştir. Aynı şekilde yabancı tip ve HRI knock-out hücre dizilerini yine proteozom inhibitörü ile muamele

ettiğimizde (50 μ M MG132, 4 saat muamele), yabani tip de yüksek miktarda eIF2 α görülürken, knock-out HRI'da ise çok düşük miktarda eIF2 α görülmüştür. Bu sonuç bize proteozom inhibisyonu sonucu eIF2 α fosforilasyonunun HRI kinaz aracılığı ile olduğunu kanıtlamaktadır [4].

2.5.7 Proteozom ve kanser ilişkisi

Proteozom inhibitörleri farklılaşmış ve bölünmeyen hücrelerin aksine spesifik olarak bölünebilen tümör hücrelerinde apoptozisi uyarmaktadır. Örneğin, bölünebilen insan lösemik HL60 hücreleri bölünemeyen (quiescent) HL60 hücrelerine göre proteozom inhibitörleri *N*-carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-norvalinal (LLnV) ve *N*-carbobenzoxy-L-isoleucyl-L- γ -*t*-butyl-L-glutamyl-L-alanyl-L-leucinal (PSI) tarafından apoptozise daha duyarlı oldukları gösterilmiştir [45]. Lactasistin (doğal proteozom inhibitörü) ve LLnV ağız squamous-cell carcinoma hücrelerinde p27^{Kip1}(Cdk inhibitörü) akümüasyonunu sağlayarak apoptozisi tetiklemelerine rağmen normal ağız epitel hücrelerinde ve gingival epitel hücrelerinde apoptozisi etkilememektedirler [46]. Aynı şekilde bölünmeyen kontak inhibisyonlu (quiescent) hücrelerde proteozom inhibitörü PSI ile apoptozisi uyarmak için aktif bölünen primer endotel hücrelerde kullanılan dozun en az 340-kat daha fazlasını kullanmak gerekmektedir [47].

Son zamanlarda yapılan bir diğer çalışma, sağlıklı bireyler ile karşılaştırıldığında birçok kanser hastalarının (acute myeloid leukemia, AML, Hodging's disease, chronic myeloproliferatif syndrome ve solid tümör hastaları) plazmalarında 20S proteozom miktarının 1000-kat kadar yükseldiğini göstermiştir [48]. 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 inhibitörlerinin *in vitro* ve *in vivo* modellerde geniş spektrumlu aktivite göstermelerinden dolayı, son zamanlarda kanser tedavisinde önemli bir hedef molekül olarak proteozoma olan ilgi dramatik bir şekilde artmıştır. Proteozom inhibitörlerinden MG132 proteozomdan başka serin ve sistin proteazları da inhibe etmektedir. Daha spesifik olan lactacystin geri dönüşümsüz bir şekilde proteozomda bulunan birkaç proteolitik aktiviteyi aynı anda inhibe etmektedir. PS-341 (Bortezomib), proteozomda bulunan yalnızca chymotrypsin-benzeri proteolitik aktiviteyi engellemesi nedeniyle daha spesifiktir ve plazmadan atılımı 15 dakika içinde gerçekleştiğinden daha az toksik etki göstermektedir [49].

Hücre kültürlerinde, PS-341'in birçok solid ve hematolojik malignant tümör hücrelerinde (myeloma, lenfoma, akciğer, ovaryum, pankreas, prostat, baş ve boyun kanserlerinde) apoptozisi uyardığı bilinmektedir. Hangi mekanizma aracılığı ile apoptozisi uyardığı bilinmemesine rağmen proteozom tarafından yıkılan p53, p21, p27 ve proapoptotik

proteinlerin akümüasyonu aracılığı ile olduğu tahmin edilmektedir [3]. PS-341 klinik denemelerde kanser tedavisinde kullanılan ilk proteozom inhibitörüdür. Faz I solid ve hematoloji malignant tümörlerde (özellikle multiple myeloma ve lenfomalar) umut verici bulgular elde edilmiştir ve PS-341 üzerinde detaylı çalışmaların yapılması ve ileriki çalışmalarda diğer anti-kanser ilaçlar ile beraber (kombine) denemesi tavsiye edilmiştir [50,51]. Halen, PS-341 diğer birçok kemoterapi ilaçları ile kombine edilerek apoptozis ve anti-tümör aktivitesinin artırılması hedeflenmekte; bu tip çalışmalar birçok enstitü veya üniversitede planlanmakta veya devam etmektedir.

Şu ana kadar yapılan diğer bazı çalışmalarda ise, multiple myeloma, non-Hodgkin's lenfoma ve non-small cell akciğer karsinoma tedavisinde proteozom inhibitörlerinin olumlu sonuç vermesine ve birçok kanser ilaçlarına (doxorubicin, melphalan, mitoxantrone ve dexamethasone) karşı oluşan direncin kırılmasına rağmen metastatik melanoma, kolorektal kanser ve kronik lenfositik lösemide başarılı sonuçlar elde edilememiştir [2,3]. *In vitro* deneylerde, meme kanser hücrelerinde anti-tümör ilaçlarından cyclophosphamide ve cisplatin karşı oluşan direncin de kaldırılmasında etkisi olmamıştır [52]. Şu anda klinik uygulamaları başlamasına rağmen, metastatik melanoma hastalarında 1.5 mg/m² doz verilerek 21 günlük bir tedavi döneminin ilk iki haftasında her hafta 2 doz i.v. enjeksiyonla yapılan tedavide, PS-341'in tek başına melanoma tedavisinde etkili olmadığı sonucuna varılmıştır [2]. Bu bulgular, özellikle metastatik melanoma ve meme kanserlerine karşı daha etkili tedavilerin elde edilmesi için proteozom inhibitörlerinin etkilerinin ve hücrel görevlerinin daha detaylı aydınlatılması gerektiğini ortaya koymaktadır.

3. MATERYAL VE METOT

Materyal:

4T1 meme kanser hücreleri, B16F10 melanoma hücreleri ve Dimethyl sülfoksit (DMSO) Yrd. Doç. Dr. Nuray Erin (Akdeniz Üniversitesi, Tıp fakültesi) tarafından gönderilmiştir. eIF2 α Ser51 (P) ve total eIF2 α proteinlerini tanıyan antikolar Prof. Dr. Scott R. Kimbal (Penn State Üniversitesi Hershey Medical College) tarafından gönderilmiştir. ECL Western blotting ve Bio-Rad protein assay kitleri Amersham Pharmaceuticals'dan temin edilmiştir. Hsp70 antikor, RPMI-1640 besiyeri, Fetal bovine serum (FBS), tripsin, Penicillin/Streptomisin, MG132, Bio-Max X-ray filmleri ve SDS-PAGE jel elektroforez için kullanılan kimyasallar Sigma-Aldrich Inc.'dan, PVDF membranı Millipore firmasından temin edilmiştir.

Besiyeri Hazırlanışı:

10.4 gr RPMI-1640 850 ml dH₂O'da çözüldükten sonra 1N HCl ile pH 4'e ayarlandı. Bu aşamadan sonra steril 20 ml NaHCO₃ (stok %7.5) ve 22.5 ml glukoz (%20'lik stokdan), 4 ml HEPES solüsyonu (2.5 M stokdan) ve 1 ml sodyum pirüvat solüsyonu (stok 1M) konulduktan sonra pH 7.1'e 1N NaOH ile ayarlandı. 10 ml Pen/Strep antibiyotik karışımı eklendikten sonra besiyeri hacmi 1L'ye tamamlandı. 1L kapasiteli disposable Millipore filtrasyon sistemi (por çapı 0.22 μ m) ile Laminer Flow kabini içinde filtre edildi. Filtre edilen besiyerinin 900 ml'sine 100 ml FBS konuldu. 4°C'de muhafaza edildi.

Hücre Kültürleri:

4T1 ve B16F10 hücreleri 37°C'de %5 CO₂'lik ortam sağlayan HF90 inkübatöründe çoğaltıldılar. Stok kültürler 25 cm² steril Corning Flasklarda ve deney kültürleri ise 35 mm x 10 mm steril petri kaplarında çoğaltıldılar. Hücre pasajı çoğunlukla ~%70 yoğunlukta yapıldı. Hücreler 1 ml %0.25'lik tripsin ile yıkandıktan sonra 2ml %0,25 tripsin flasklara (PBS de hazırlandı) konuldu ve 4T1'ler ~3 dk, B16F10'lar ise ~30 saniye tripsin ile muamele edildi. Tripsin, vakum pompasına bağlı pastör pipeti ile aspire edildikten sonra hücreler 1/10 oranında yeni besi yeri ile seyreltilerek flasklara ekildi. Hücre pasajı her 3 günde bir periyodik olarak yapıldı.

Tripan Mavisi Testi:

24 saat muamelenin sonunda petrilere endorflara aktarılan 10 μ M ve %0.1 DMSO'lu hücre kültürleri 2700 rpm'de 2 dk süreyle santrifüje edildi. Her petriye 500 μ l

tripsin ilave edildi ve 2 dk süreyle bekletildi. Tripsin mikropipet ile çekilip ependorf dibindeki pellet ile karıştırılıp ependorflar tekrar 2700 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda, ependorflardaki süpernatantlar atılıp pelletler üzerine 500'er µl PBS ilave edildi ve biraz pipetleme yapıldıktan sonra başka bir ependorfa bu ependorfdan 20 µl ilave edildi ve bunun üzerine de 20 µl tripan mavisi ilave edilip karışım 2 dk süreyle bekletildi. Bu karışımdan 20 µl alıp thoma laminının her iki kısmında hemositometrik ölçüm yapıldı. Ölü hücreler tripan mavisi boyaıyla boyanırken, canlı hücreler ise boyanmamıştır. % Sağ kalımın formülü ise aşağıdaki gibidir.

$$\% \text{Sağ kalım} = \frac{\text{Canlı hücre sayısı/ml}}{\text{Toplam hücre sayısı/ml}} \times 100$$

Hücre Lizisi:

Petri kabındaki hücreler belirtilen inhibitörler ile muamele edildikten sonra 1 ml PBS ile yıkandı. Hücreler daha sonra 200 µl lizis solüsyonu (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA ve %0.5 Triton-X 100, pH 7.4) ile 30 dk buzda inkübe edildikten sonra 15 saniye Kontes Pellet Pestle ile karıştırılarak komple homogenizasyon sağlandı. 12.000 rpm'de 15 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant -80°C'ye konuldu.

Protein Tayini:

Protein miktar tayini için Bio-Rad Protein Assay metodu kullanıldı [53]. Bio-Rad protein standardına (28 mg) 20 ml steril dH₂O eklenerek 1.4 µg/µl solüsyon elde edilir ve alikotlanarak -20°C'de muhafaza edilir. Standart tüpleri Çizelge 3.1'de görüldüğü gibi hazırlanır. Numune tüpüne ise 4 µl protein hücre homogenatı + 796 µl dH₂O ve 0.2 ml Bio-Rad boyası karıştırılarak hazırlanır. Tüpler karıştırılır ve 5 dk oda ısısında bekletildikten sonra OD₅₉₅ deney körüne karşı UV Spektrofotometrede okunur. Numunelerdeki protein miktarı aynı şekilde absorbans değerleri okunduktan sonra çizilen standart grafiği yardımıyla hesaplandı. Standart grafiğinin doğrusallığını gösteren r² değeri minimum 0.98 olarak elde edilmiştir.

Çizelge 3.1 Bio-Rad protein tayin metodunda kullanılan miktarlar.

Solüsyon	Standart (µl)	Tampon (µl)	dH ₂ O (µl)	Bio-Rad Dye (ml)
Deney Körü	-	4	796	0.2
Standart 1	0.7	4	795.3	0.2
Standart 2.5	1.8	4	794.2	0.2
Standart 5	3.6	4	792.4	0.2
Standart 10	7.1	4	788.9	0.2

SDS-PAGE:

Poliakrilamid jel elektroforez için mini elektroforez tankı kullanıldı. %0.1 SDS içeren %12'lik poliakrilamid jelde 25 veya 30 µg protein 100V veya (150V) elektrik akımı uygulanarak ayrıştırıldı [54].

Çizelge 3.2 Ayrıştırma jeli (Separating Gel) hazırlanışı.

Stok Solüsyon	%10	%12
dH ₂ O	3.65 ml	3.15 ml
1 M Tris-HCl pH 8.8.	3.75 ml	3.75 ml
%40 Akrilamid	2.50 ml	3.00 ml
%10 SDS	100 µl	100 µl
%10 Amonyum persülfat	100 µl	100 µl
TEMED	6 µl	6 µl

Ayrıştırma jeli Çizelge 3.2'deki gibi hazırlanıp iyice karıştırıldıktan sonra hemen 1 ml'lik pipet ile cam plaklar arasına dökülür. Ve üzerine 1 ml 2-propanol pipet ile konulur (hızlı polimerize olması için). Jel katılaştıktan sonra 2-propanol dökülür ve stacking jel (yığıma jeli, %3.75) hazırlanır (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3 Yığıma jeli (Stacking Gel) hazırlanışı.

dH ₂ O	2.329 ml
1 M Tris-HCl pH 6.8.	375 µl
%40 Akrilamid	281 µl
%10 SDS	30 µl
%10 Amonyum persülfat	30 µl
TEMED	5 µl

Stacking jeli ayrıştırma jeli üzerine dökülür ve tarak yerleştirilir. Spacer ve tarak (8 kuyulu) ebatları 1 mm kuyulara maksimum 45 µl numune yüklenebilir. Numuneler > 90°C'de 5 dk denatüre edilir ve denatürasyondan sonra buharlaşan sıvının ependorfun dibine çökmesi için kısa bir süre (10 saniye kadar) 12.000 rpm'de santrifüj edilir. Daha sonra numuneler hemen kuyulara yüklenir. 100V'da yaklaşık 2 saat 10 dk akıtılır, mA ve WATTS maksimuma ayarlanır. Jel çıkarıldıktan sonra Western-blot için 15 dk transfer solüsyonuna konulur.

Western Blotting:

Western-blot için Amersham firmasının protokolü takip edildi. PVDF membranı 8 x 9 cm ebatlarında, filtre kağıdı (2 tane) ise 11 x 9 cm ebatlarında kesilir. PVDF membranı 15 saniye metanol ile aktive edilir ve 2 dk dH₂O'da bekletildikten sonra 5 dk'da transfer solüsyonuna konulur. PVDF membranı iki sünger ve 2 filtre kağıdı arasında jelin üzerine kapatılır. 70V'da 3 üç saat transfer edilir. Transferden sonra membran çıkarılır ve metanol ile yıkanır ve filtre kağıdı üzerine konularak 15 dk kurutulur (proteinlerin daha iyi membrana bağlanması için). Membran 15 dk sonunda tekrar metanol ile 15 saniye aktive edilir ve iyice dH₂O ile yıkanır. %5'lik blocking solüsyonunda (1.5 g 30 ml TBS-T'de hazırlanır) bir gece 4°C'de bekletilir. Sabahleyin, membran TBS-T ile üç defa yıkanır (1. yıkama 15 dk., 2. yıkama 5 dk., ve 3. yıkama 5 dk.). Primer antikor eIF2 α (Ser51 P) 1:4000 seyreltilir (15 ml hazırlanır; 3.75 μ l 15 ml TBS-T solüsyonuna konulur). Total eIF2 α antikoruna ise 1:500 seyreltilir. Fare monoklonal Hsp70 antikoruna ise 1:5000 seyreltilmiştir. Primer antikor ile 1 saat inkübasyondan sonra membran üç defa aynı şekilde yıkanır ve sekonder antikor konulur (anti-rabbit veya anti-mouse, 1: 5000 seyreltilir: 3 μ l antikor 15 ml TBS-T solüsyonunda) 1 saat inkübe edilir ve tekrar membran TBS-T ile yıkanır. Membran üzerine HRP substratı pipetlenir ve 2 dk bekletilir. Substrat Reaktif1 4 ml ve Reaktif2 4 ml karıştırılarak hazırlanır. Membran plastik streç ile sarılır. İki mukavva kağıdı arasında membranın üzerine Kodak Bio-Max film (18 cm x 24 cm) konularak kemilüminesans filme yansıtılır (2 dk). Film makas ile karanlık odada ortadan kesilerek yarısı kullanılır diğer yarısı tekrar kutusuna konulur. Film banyo işlemi: 5 dk developing solüsyonu, 1 dk dH₂O ve 10 dk Fixer'de bekletilir. Son olarak film bol su ile yıkanır ve kurutulur.

Kullanılan Solüsyonlar:

Tripan mavisi

0.4 g tripan mavisi hassas terazide tartılıp son hacim 100 ml olacak şekilde PBS ilave edilir.

2X elektroforez tampon solüsyonu (Running Solution)

12 g Tris Base, 57.6 g Glisin ve 4 g SDS. 2 L'ye tamamlanır. Elektroforez yapılacağı zaman 1:1 dH₂O ile seyreltilir.

1 M Tris-HCl pH 8.8

12.114 gram 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.

1 M Tris-HCl pH 6.8

12.114 gram 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 g akrilamid, 0.52 g bis-akrilamid 50 ml son hacimde çözülür.

%10 Amonyum persülfat

0.1 g amonyum persülfat 1 ml dH₂O'da çözülür. Elektroforez yapılacağı gün hazırlanır.

%10 SDS

4 g SDS 40 ml dH₂O'da çözülür.

Transfer solüsyonu

25 mM Tris base, 192 mM Glisin, %7 Methanol ve %0.07 SDS. Hazırlanışı: 2 L için 28.826 g Glisin, 6.057 g Tris-Base, 1.4 g SDS ve 140 ml Metanol. İyi karıştırılır.

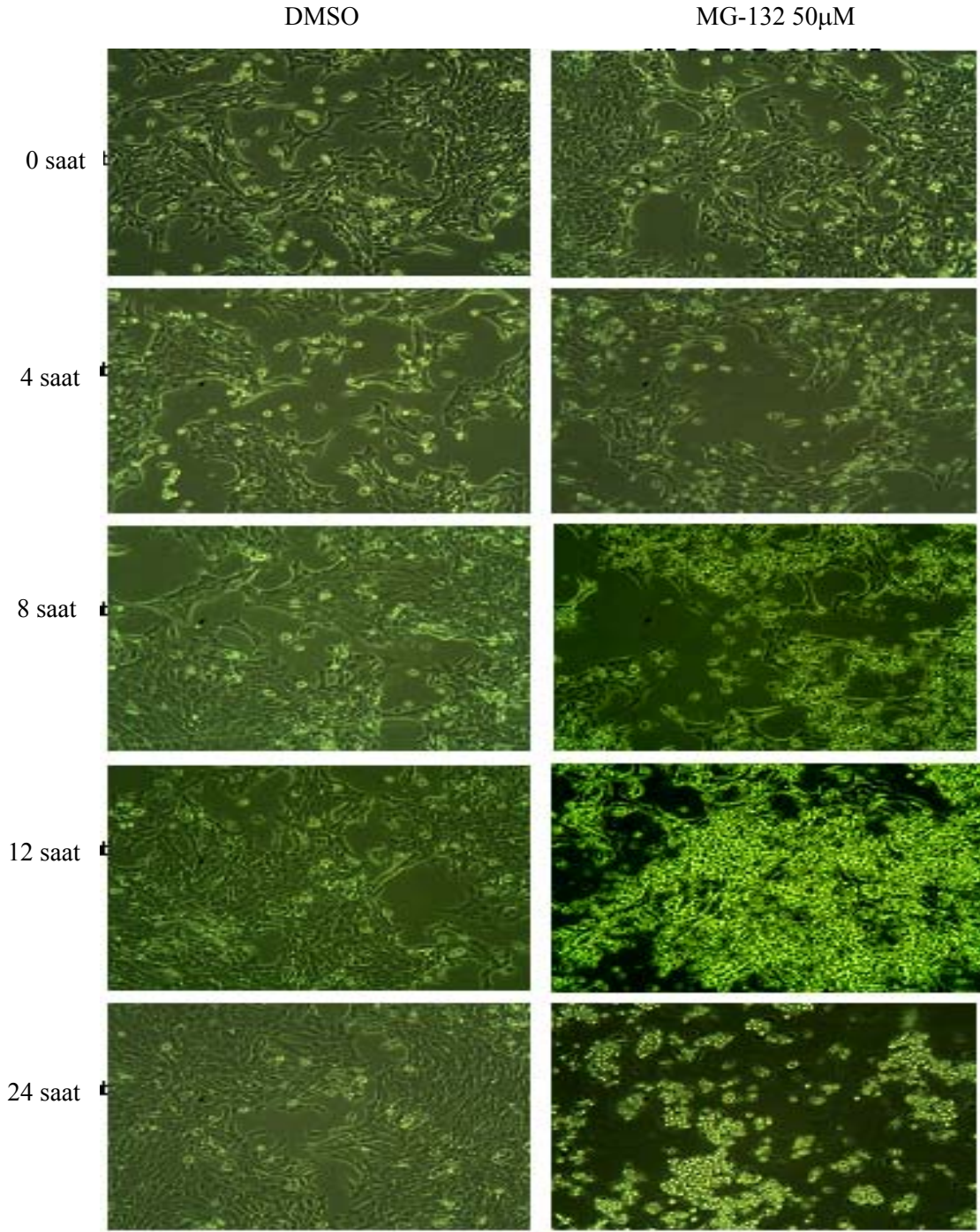
Kullanılan Cihazlar:

- Nüve marka otoklav.
- HANNA marka pH ölçüm cihazı.
- KONTES marka Pellet pestle (manuel homejenizatör).
- LABCONCO marka güç kaynağı.
- BİO-RAD Smart SpecPlus marka spektrofotometre.
- HF 90 marka CO₂ inkübatör.
- Hettich ZENTRIFUGEN marka santrifüj.
- APOLLO Model Western-blot cihazı.
- CONSORT N.V. marka mini elektroforez tankı.
- GYRO-ROCKER STR 9 marka çalkalayıcı.
- SANYO derin dondurucu.
- Motik marka inverting mikroskop.

4. SONUÇLAR

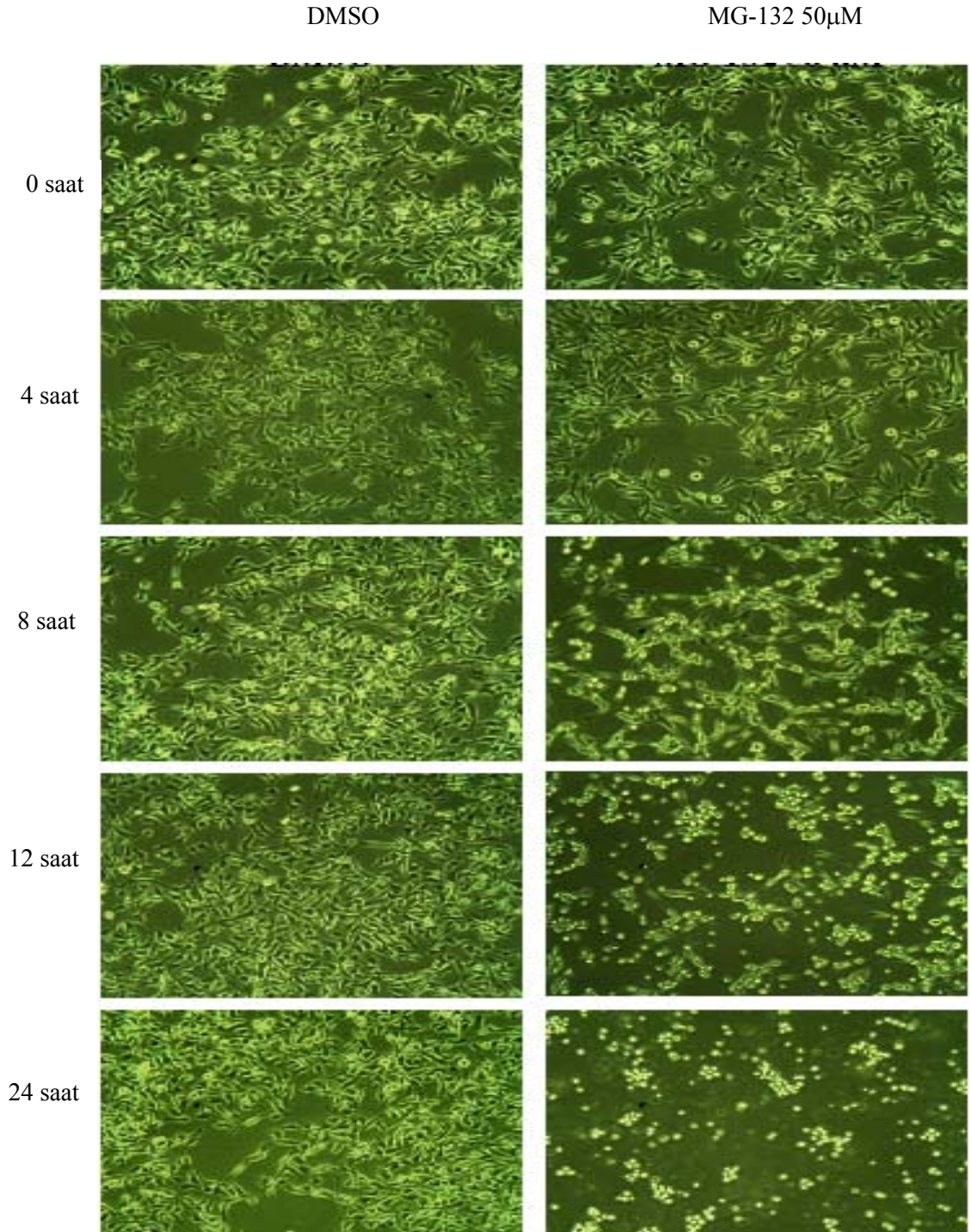
4T1 ve B16F10 hücre kültürleri 35 x 10 mm'lik steril petrilere üretiltiler. Bu hücreler aşağıda belirtilen sürelerde, %0.1 DMSO ve 50 µM konsantrasyonundaki MG-132 proteozom inhibitörü ile muamele edilip, karbondioksit inkübatöründe (37°C, %5 CO₂) inkübe edildiler. Daha sonra aşağıda belirtilen sürelerin sonunda ilgili petrideki hücreler inverted ışık mikroskopunda incelenmeye alındı ve morfolojileri kaydedildi. Şekil 4.1'deki 4T1 hücreleri 10x'lik objektif ile incelendiğinde 0. ve 4. saatlerde kontrol ve 50 µM MG-132 muameleli hücrelerde herhangi bir değişiklik olmadığı gözlemlendi. Bu durumdaki hücrelerin besiyeri ortamı bulunan petri kabının dibine hücre uzantılarıyla yapışık halde olduğu ve hücrelerin belirli bir şeklinin olduğu görülmektedir ve hücrelerin çok büyük bir yüzdesi canlıdır. 8. saatten itibaren 50 µM MG-132 ile muamele edilmiş 4T1 hücrelerinde morfolojik bir değişim gözlenirken kontrol hücrelerinde ise herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Şekil 4.2'deki B16F10 hücreleri aynı şekilde 10x'lik objektifde incelendiğinde 4T1 hücrelerine benzer şekilde 0. ve 4. saatlerde kontrol ve 50 µM MG-132 ile muamele edilmiş hücrelerde herhangi bir değişiklik olmadığı gözlemlendi. Yine 4T1 hücrelerinde olduğu gibi B16F10 hücrelerinde 8. saatten itibaren yalnızca MG-132 muameleli hücrelerde morfolojik bir değişim gözlenmiştir. İlaç uygulanmış B16F10 ve 4T1 hücrelerinde, apoptotik hücrelerde sıklıkla görülen hücre büzülmesi, küçülmesi, küresel bir şekil alması ve petri kabından kalkması gibi morfolojik değişimler gözlenmiştir. Şekil 4.3'deki 4T1 ve B16F10 hücreleri 40x'lik objektifde incelendiğinde 24. saatte %0.1 DMSO'lu hücrelerde herhangi bir değişim gözlenmez iken 10 µM MG-132 ile muamele edilmiş 4T1 ve B16F10 hücrelerinde ise morfolojik değişimler daha detaylı gözlenmiştir. Hücrelerin morfolojik değişimlerinden elde ettiğimiz sonuçlara göre her iki hücre tipi MG-132 proteozom inhibitörüne karşı hassastır ve her iki hücre tipinde hücre ölümü gözlenmektedir.

Morfolojik analizler ile elde edilen sonuçları tripan mavisi testi ile teyit etmek için eşit sayıda 4T1 ve B16F10 hücreleri logaritmik fazda iken %0.1 DMSO ve 10 µM MG-132 proteozom inhibitörü ile 24 saat süreyle inkübe edildiler. Daha sonra hücreler thoma lamı üzerinde inverted ışık mikroskop yardımıyla incelendi. Her grup için ölü ve canlı hücreler thoma lamı yardımıyla sayılarak % sağkalım hesaplandı. % Sağkalım grafiği (Şekil 4.4) incelendiğinde DMSO (%0.1) ile muamele edilen 4T1 hücrelerin %95±2.4'ün canlı olduğu görülmüştür buna karşın 10 µM MG-132 ile muamele edilen hücrelerin %53±6.8'in canlı kaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.4 b).



Şekil 4.1 Proteozom inhibisyonu sonucu 4T1 hücrelerinde görülen morfolojik değişimler.

4T1 hücrelerinin farklı zaman süreleri için %0.1 DMSO ve 50 μ M MG-132 ile muamele edilmesiyle meydana gelen morfolojik değişimler (10x'lik objektif).

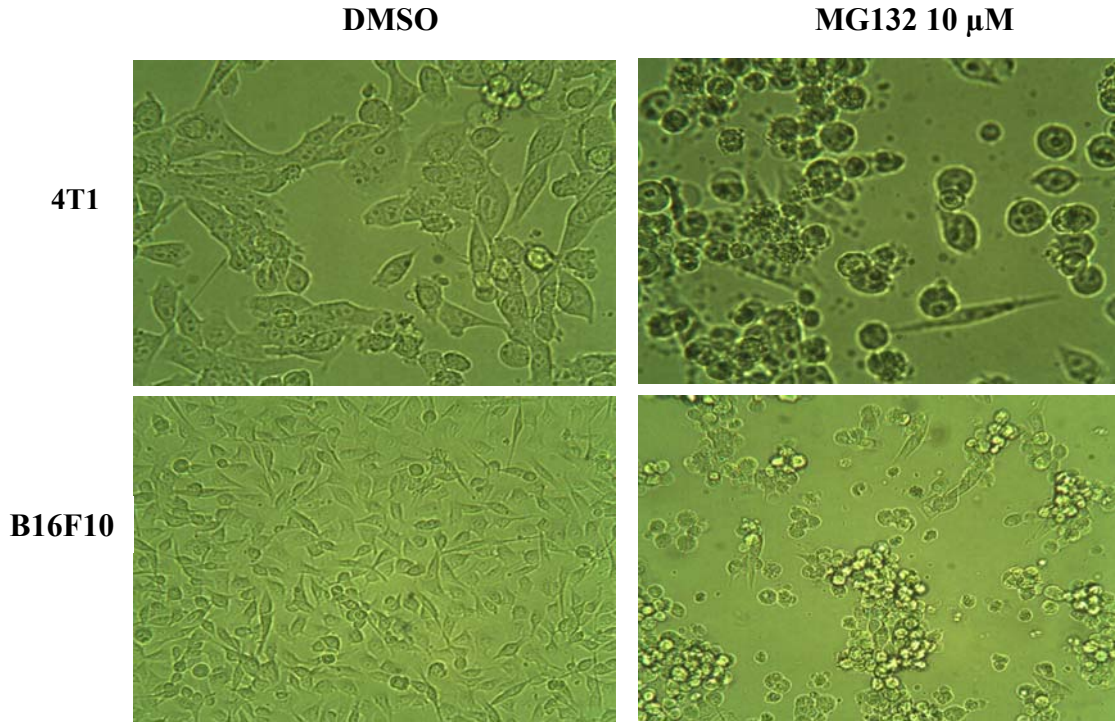


Şekil 4.2 Proteozom inhibisyonu sonucu B16F10 hücrelerinde görülen morfolojik değişimler.

B16F10 hücrelerinin farklı zaman süreleri için %0.1 DMSO ve 50 μ M MG-132 ile muamele edilmesiyle meydana gelen morfolojik değişimler (10x'lik objektif).

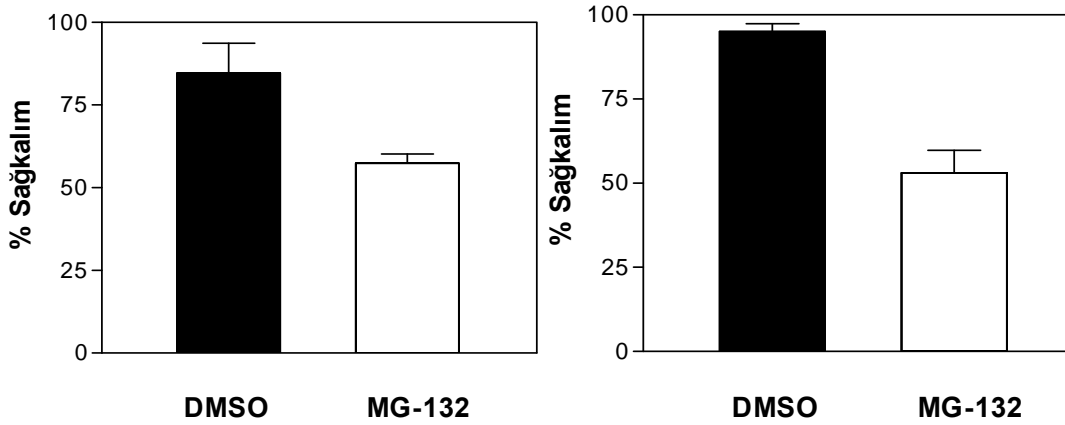
Benzer şekilde B16F10 hücrelerinde canlı kalan hücrelerin oranı kontrolde %84.7±9.05 iken 10 µM MG-132 ile muamele edilen hücrelerde bu oran %57.4±2.8 olarak gözlenmiştir (Şekil 4.4 a). Bu sonuçların GraphPad Prism 3.03 programı ile istatistiki analizi yapıldığında proteozom inhibitörü MG-132'nin her iki kanser hücresinde kontrole göre (%0.1 DMSO) önemli oranda hücre ölümünü tetiklediği görülmüş ($p < 0.05$) ve her iki kanser hücresinin proteozom inhibitörüne karşı hassas olduğu anlaşılmıştır. 4T1 kanser hücrelerindeki sitotoksik etkilerin protein sentezindeki inhibisyondan kaynaklanıp-kaynaklanmadığını belirlemek için eIF2α fosforilasyonunu inceledik. Morfolojilerindeki değişimler ve % sağkalım oranları sebebiyle apoptozise uğradığını düşündüğümüz, 4T1 hücre kültürleri 35 x 10 mm'lik petrielerde üretildikten sonra 50 µM MG-132 ile 6 saat kadar muamele edildiler. Daha sonra SDS-PAGE ve Western-blot metodları kullanılarak global protein sentezini translasyonun başlama aşamasında inhibe eden eIF2α (P) proteinin seviyesine bakıldı.

Yaptığımız deneylerin sonucunda (Şekil 4.5) 50 µM MG-132 ile muamele edilmiş 4T1 hücrelerinde eIF2α (P) protein miktarları yüksek çıkarken kontrol hücrelerinde ise çok düşük miktarlarda çıkmıştır. Bu da bize 6 saat gibi kısa süreli ilaç muamelesinin global protein sentezini translasyon aşamasında inhibe ettiğini göstermektedir. Aynı deney bu sefer total eIF2α için yapıldığında (Şekil 4.6), hem 50 µM MG-132 ile muamele edilmiş 4T1 hücrelerinde hem de %0.1 DMSO ile muamele edilmiş 4T1 hücrelerinde total eIF2α protein miktarının yaklaşık olarak aynı olduğu ve değişmediği görülmektedir. 50 µM MG-132 ile muamele edilmiş 4T1 hücrelerinde eIF2α (P)/total eIF2α oranının yaklaşık olarak 3 kat arttığı görülmüştür. eIF2α fosforilasyonunda, Hsp70 proteinin bir rolü olup-olmadığını tespit etmek için önce Western-blot ile proteozom inhibisyonundan sonra Hsp70 proteinin benzer şekilde uyarılıp-uyarılmadığını inceledik. Şekil 4.7'deki sonuçlara göre, %0.1 konsantrasyonundaki DMSO ile 6 saat süreyle muamele edilmiş 4T1 hücrelerinde Hsp70 miktarı düşükken, yine aynı sürede 50 µM MG-132 ile muamele edilmiş 4T1 hücrelerinde ise Hsp70 miktarının önemli oranda arttığı görülmektedir. Bu sonuçlara göre 4T1 kanser hücrelerinde MG-132 ile oluşturulan hücre stres sonucu, eIF2α fosforilasyonuna benzer bir şekilde anti-apoptotik Hsp70 protein miktarında da artma olduğu görülmektedir. Hsp70, antiapoptotik bir protein olup HRI kinaz'ın aktivasyonu için ve eIF2α'nın fosforilasyonu için gerekli olduğu retikülosit hücrelerinde gösterilmiştir [63]. Dolayısıyla, elde ettiğimiz bu sonuç, Hsp70 proteinin eIF2α fosforilasyonunda bir rolü olacağını ima etmektedir ve ileriki çalışmalarda Hsp70'in bu fosforilasyondaki rolünün araştırılması gerekmektedir.



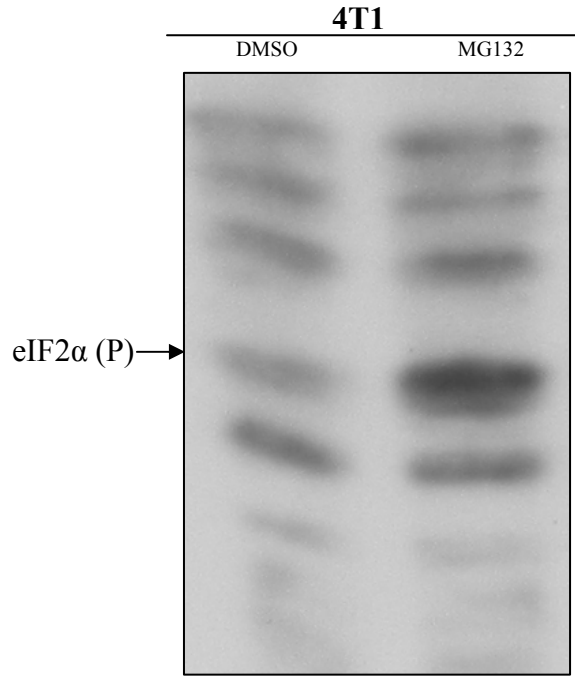
Şekil 4.3 4T1 ve B16F10 hücrelerindeki morfolojik değişimlerin 40x objektif ile analizi.

24 saat süreyle %0.1 DMSO ve 10 µM MG-132 ile muamele edilmesiyle hücrelerde meydana gelen morfolojik değişimler (40x'lik objektif).



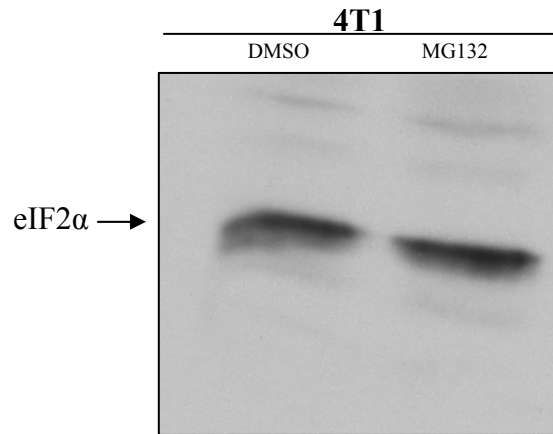
Şekil 4.4 4T1 ve B16F10 hücrelerinin sağkalım grafiği.

- MG132'nin B16F10 hücrelerindeki sitotoksik etkisinin tripan mavisi testi ile tayini.
- 4T1 hücrelerinde MG132'nin sitotoksik etkisinin tripan mavisi testi ile tayini.



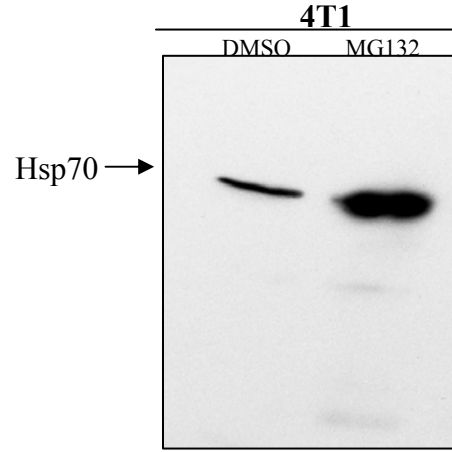
Şekil 4.5 Proteozom inhibisyonu sonucu eIF2 α fosforilasyonunun Western-blot ile analizi.

4T1 hücrelerinin 6 saat süreyle %0.1 DMSO ve 50 μ M MG-132 ile muamelesi sonucunda hücrelerde görülen eIF2 α (P) seviyelerinin Western-blot metodu ile analizi.



Şekil 4.6 Proteozom inhibisyonu sonucu total eIF2 α 'nın Western-blot ile analizi.

4T1 hücrelerinde 6 saat süreyle %0.1 DMSO ve 50 μ M MG-132 ile muamelesi sonucunda hücrelerde görülen total eIF2 α seviyelerinin Western-blot metodu ile analizi.



Şekil 4.7 MG-132 ile proteozomun inhibe edilmesi sonucu Hsp70 miktarındaki yükselmenin Western-blot ile analizi.

4T1 hücrelerinin 6 saat süreyle %0.1 DMSO ve 50 μ M MG-132 ile muamelesi sonucunda görülen Hsp70 proteinindeki artış.

5. TARTIŞMA

Kerr ve Ark. yayınladıkları bir makalede iki tip hücre ölümünden bahsetmişlerdir; genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümü apoptozis ve programlı olmayan ve yaralanmalar sonucu meydana gelen nekrozis [55,56]. Clarke ve Ark. ise, doğal gelişimsel hücre ölümü ve toksin uygulaması sonrası oluşan hücre ölümünü apoptozis olarak tanımlamış ve bu tip hücre ölümünün, hücre küçülmesi, kromatin yoğunlaşması, çekirdek içinde bulunan DNA'nın fragmentlere ayrılması ve apoptotik cisimciklerin oluşumu gibi özellikleriyle ayırt edildiğini söylemiştir [56,57].

Üzerinde çalıştığımız 4T1 ve B16F10 kanser hücrelerini proteozom inhibitörü MG-132 ile muamele ettiğimizde hücrelerin petri kabının dibinden kalktığını ve besiyeri ortamında yüzer bir hal aldığını, küreselleştiğini, küçülüp büzüldüğünü, komşu hücrelerden ayrıldığını, membran zarında küçük veziküllerin oluştuğunu ve üzerine düşen ışığı daha çok yansıttığını gözlemledik. Benzer morfolojik değişiklikler Zhang ve Ark. (2005) tarafından HeLa hücrelerinin 0.1 μM 4DPG ile muamele edilmesi ile kaydedilmiştir ve bu hücrelerin apoptozise uğradıkları görülmüştür [58]. Yine benzer sonuçlar, spesifik proteozom inhibitörleri LLnV ve PSI ile muamele edilmiş HL60 hücrelerinde ilaç ilavesinden yaklaşık olarak 3-4 saat sonra hücrelerin bir kısmında apoptozis gözlenmiş ve morfolojik olarak da hücre membranında keseler ve hücre küçülmesi gözlenmiştir. Uzun süreli ilaç muamelesi sonucunda ise apoptozisin önemli belirteçlerinden olan DNA fragmentasyonu gözlenmiştir [45].

Proteozom inhibitörü MG-132'nin sitotoksik ve anti-proliferasyon etkileri tripan mavisini ile yaptığımız % sağkalım deneyleri ile doğrulanmıştır. Bu çalışmalar sonucunda, hem 4T1 hücrelerinde hem de B16F10 hücrelerinde, ilaç muamelesi sonucunda kontrol gruplarına göre anlamlı bir fark elde edilmiştir ($p < 0.05$). Yapılan diğer bazı enteresan çalışmalarda ise, bazı tümör hücrelerinde (DHL4 lenfoma ve akciğer kanser hücresi H460) proteozom inhibitörleri ile apoptozis uyarılması için çok yüksek konsantrasyon kullanılması gerekmektedir (dirençli hücrelerdir); bazılarında ise proteozom inhibitörler apoptozis uyarılmasına tamamen engel olmaktadır (timüs hücreleri ve sempatetik nöronlar) [35,59,60]. Bu sebeple, elde ettiğimiz bu bulgular proteozom inhibitörlerinin tek başına veya kombine olarak başka inhibitörler ile kullanıldığında meme ve melanoma kanserlerinde etkili olma olasılığının yüksek olduğunu göstermektedir.

Agresive malignant neoplazmaların en belirgin özelliklerinden bir tanesi protein sentezindeki artıştan kaynaklanan hızlı proliferasyondur [61]. Giriş bölümünde de belirtildiği gibi protein sentezinin global kontrolü eIF2 α alt ünitesinin spesifik olarak Ser51'den

fosforilasyonu ile olmaktadır [42]. Fosforile edilmiş [eIF2 α (P)] GDP/GTP değişimini sağlayamaz ve eIF2 α (P)-eIF2B ayrılmaz bir kompleks oluşturur [42,43] ve bu mekanizma aracılığı ile protein sentezi komple durmaktadır. Yine, Schewe ve Aguirre-Ghiso (2009), multiple miyeloma (MM) hücreleri ile yaptıkları çalışmada eIF2 α 'yı hiperfosforile durumda tutan tedavi stratejilerin proteozom inhibitörü PS-341'in apoptotik etkisini arttıracığını ve PS-341 ile tedavi edilen multiple miyeloma hastalarında yaygın olarak görülen tümörün nüksetme problemini azaltacağını önermişlerdir [62]. Bu sebeple, 4T1 ve B16F10 hücrelerinde gözlemediğimiz proteozom inhibitörü MG-132'nin sitotoksik etkilerinin kısmen eIF2 α fosforilasyonu aracılı protein sentezindeki durmadan kaynaklanıp kaynaklanmadığını belirlemek için her iki hücrede proteozom inhibisyonundan sonra Western-blot yöntemi ile eIF2 α fosforilasyonunu inceledik. Sonuçlar bölümünde kapsamlı bir şekilde anlatıldığı gibi 4T1 hücre dizisinde önemli oranda eIF2 α fosforilasyonunda bir yükselme görülmüştür. Benzer sonuçlar daha önce Yerlikaya ve Ark (2008). tarafından da rapor edilmiştir. Bu çalışmada ise, 26S proteozom inhibitörü COS-7 hücrelerinde 4 saat gibi kısa süreli muamelesi sonucunda global protein sentezinin eIF2 α fosforilasyonu nedeniyle başlama aşamasında durduğunu gözlemlemişlerdir [4]. Protein sentezindeki bu inhibisyonun nedenini aydınlatmak için yaptıkları deney sonucunda eIF2 α 'yı fosforile eden kinazlar arasında (GCN2, PERK, PKR ve HRI) yalnızca HRI^{-/-} hücrelerinde (HRI knock out) proteozom inhibisyonundan sonra eIF2 α fosforilasyonunun gözlenmediğini rapor etmişlerdir [4]. Bundan dolayı, proteozom inhibitörlerinin sitotoksik ve anti-tümör etkilerinin bir kısmının protein sentezi inhibisyonundan kaynaklandığını düşünüyoruz. Proteozom inhibisyonundan sonra eIF2 α fosforilasyonuna neden olan mekanizmaların aydınlatılması ile yeni kanser tedavi yöntemlerinin gelişmesine yol açacağını düşünüyoruz. Yerlikaya ve Ark. yaptıkları çalışmada eIF2 α fosforilasyonuna, proteozomun inhibisyonundan sonra HRI kinaz enziminin sebep olduğunu bulmuşlardır [4]. HRI kinaz enziminin ise farklı yollardan aktive olduğu bilinmektedir; bunlardan bir tanesi ısı şok proteinleri (Hsp) ile olan muhtemel etkileşimidir. Lu ve Ark. (2001), Hsp70 proteininin stres şartlarında HRI kinaz enziminin katlanması ve aktif forma dönüşmesi için gerekli olduğunu göstermişlerdir [63]. eIF2 α fosforilasyonundaki bu yükselmeye ısı şok proteinlerinden Hsp70 proteininin neden olduğunu varsaydık. Hsp70 proteininin bir rolü olup olmadığını doğrulamak için öncelikle Hsp70 proteininin proteozom inhibisyonundan sonra uyarılıp uyarılmadığını Western-blot yöntem ile inceledik. Şekil 4.7'de görüldüğü gibi 4T1 hücre kültürlerinde Hsp70 miktarında anlamlı bir artış gözlenmiştir. Hsp70 miktarındaki bu önemli artışın HRI kinazı aktive edeceği ve bunun akabinde eIF2 α fosforilasyonunu yükselttiğini tahmin etmekteyiz. Hsp70'in eIF2 α fosforilasyonunda kesin bir rolü olup-olmadığını belirlemek için proteozom

inhibisyonundan sonra gözlemlediğimiz Hsp70 uyarılmasını iki farklı Hsp70 inhibitörü ile (quercetin ve KNK437) inhibe etmeye çalışacağız. Bu deneyler sonucunda eIF2 α fosofrilasyonunda Hsp70'in bir görevi olup-olmadığını doğrulamaya çalışacağız. Eğer olumlu sonuç elde edemezsek çalışmalarımızı HRI kinazı aktive eden diğer mekanizmalara yöneltmeyi hedefliyoruz. Bu mekanizmanın ileride aydınlatılması çok önemli alternatif kanser tedavi yöntemlerinin gelişmesine yol açacağı kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- [1] Pajonk, F. and McBride, W.H., 2001, The proteasome in cancer biology and treatment, *Radiat Res*, 156, 447-59.
- [2] Markovic, S.N., Geyer, S.M., Dawkins, F., Sharfman, W., Albertini, M., Maples, W., Fracasso, P.M., Fitch, T., Lorusso, P., Adjei, A.A. and Erlichman, C., 2005, A phase II study of bortezomib in the treatment of metastatic malignant melanoma, *Cancer*, 103, 2584-9.
- [3] Adams, J., 2004, The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs, *Cancer Cell*, 5, 417-21.
- [4] Yerlikaya, A., Kimball, S.R. and Stanley, B.A., 2008, Phosphorylation of eIF2a in response to 26S proteasome inhibition is mediated by the haem-regulated inhibitor (HRI) kinase, *Biochem J*, 412, 579-588.
- [5] Doherty, F.J. and Mayer, R.J., 1992, *Intracellular protein degradation*, IRL Press, Oxford.
- [6] Yerlikaya, A., 2004, Cellular functions of the 26S proteasome, *Turk J Biol.*, 28, 31-38.
- [7] Voet, D.D. and Voet, J.G., 1995, *Biochemistry*, John Wiley & Sons, Inc., New York.
- [8] Varshavsky, A., 1996, The N-end rule: functions, mysteries, uses, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 12142-9.
- [9] Rechsteiner, M. and Rogers, S.W., 1996, PEST sequences and regulation by proteolysis, *Trends Biochem Sci*, 21, 267-71.
- [10] Rogers, S.W. and Rechsteiner, M.C., 1986, Microinjection studies on selective protein degradation: relationships between stability, structure, and location, *Biomed Biochim Acta*, 45, 1611-8.
- [11] Yerlikaya, A., 2007, Protein sentezi ve yıkımı, In Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M. and Tanyolaç, B. (eds.), *Moleküler biyoloji*, Nobel Yayınevi, Ankara.
- [12] Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J.D., 1994, *Molecular Biology of The Cell*, Garland Publishing, Inc., New York.
- [13] Agarraberes, F.A., Terlecky, S.R. and Dice, J.F., 1997, An intralysosomal hsp70 is required for a selective pathway of lysosomal protein degradation, *J Cell Biol*, 137, 825-34.
- [14] Pillay, C.S., Elliott, E. and Dennison, C., 2002, Endolysosomal proteolysis and its regulation, *Biochem J*, 363, 417-29.
- [15] Cohen, G.M., 1997, Caspases: the executioners of apoptosis, *Biochem J*, 326 (Pt 1), 1-16.
- [16] Nagata, S., 1997, Apoptosis by death factor, *Cell*, 88, 355-65.
- [17] Philchenkov, A., 2004, Caspases: potential targets for regulating cell death, *J Cell Mol Med*, 8, 432-44.
- [18] Reed, J.C., 2000 Mechanisms of apoptosis, *Am J Pathol*, 157, 1415-30.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- [19] Nicholson, D.W., 1999, Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death, *Cell Death Differ*, 6, 1028-42.
- [20] Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. and Nagata, S., 1998, A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD, *Nature*, 391, 43-50.
- [21] Green, D.R., 1998, Apoptotic pathways: the roads to ruin, *Cell*, 94, 695-8.
- [22] Bond, J.S., Matters, G.L., Banerjee, S. and Dusheck, R.E., 2005, Meprin metalloprotease expression and regulation in kidney, intestine, urinary tract infections and cancer, *FEBS Lett*, 579, 3317-22.
- [23] Hershko, A. and Ciechanover, A., 1998, The ubiquitin system, *Annu Rev Biochem.*, 67, 425-79.
- [24] Hilt, W. and Wolf, D.H., 1996, Proteasomes: destruction as a programme, *Trends Biochem Sci.*, 21, 96-102.
- [25] Hershko, A., Ciechanover, A., Heller, H., Haas, A.L. and Rose, I.A., 1980, Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77, 1783-6.
- [26] Jentsch, S., 1992, The ubiquitin-conjugation system, *Annu Rev Genet*, 26, 179-207.
- [27] Voges, D., Zwickl, P. and Baumeister, W., 1999, The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis, *Annu Rev Biochem*, 68, 1015-68.
- [28] Chau, V., Tobias, J.W., Bachmair, A., Marriott, D., Ecker, D.J., Gonda, D.K. and Varshavsky, A., 1989, A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein, *Science*, 243, 1576-83.
- [29] Murakami, Y., Matsufuji, S., Kameji, T., Hayashi, S., Igarashi, K., Tamura, T., Tanaka, K. and Ichihara, A., 1992, Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination, *Nature*, 360, 597-9.
- [30] Pagano, M., 1997, Cell cycle regulation by the ubiquitin pathway, *Faseb J*, 11, 1067-75.
- [31] He, H., Qi, X.M., Grossmann, J. and Distelhorst, C.W., 1998, c-Fos degradation by the proteasome, An early, Bcl-2-regulated step in apoptosis, *J Biol Chem*, 273, 25015-9.
- [32] Yerlikaya, A. and Stanley, B.A., 2004, S-adenosylmethionine decarboxylase degradation by the 26 S proteasome is accelerated by substrate-mediated transamination, *J Biol Chem.*, 279, 12469-78. Epub 2004 Jan 12.
- [33] Burger, A.M. and Seth, A.K., 2004, The ubiquitin-mediated protein degradation pathway in cancer: therapeutic implications, *Eur J Cancer*, 40, 2217-29.
- [34] Hershko, A., 1988, Ubiquitin-mediated protein degradation, *J Biol Chem*, 263, 15237-40.
- [35] Lopes, U.G., Erhardt, P., Yao, R. and Cooper, G.M., 1997, p53-dependent induction of apoptosis by proteasome inhibitors, *J Biol Chem*, 272, 12893-6.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- [36] Kandioler, D., Dekan, G., End, A., Pasching, E., Buchmayer, H., Gnant, M., Langmann, F., Mannhalter, C., Eckersberger, F. and Wolner, E., 1996, Molecular genetic differentiation between primary lung cancers and lung metastases of other tumors, *J Thorac Cardiovasc Surg*, 111, 827-31; discussion 832.
- [37] el-Deiry, W.S., 1998, Regulation of p53 downstream genes, *Semin Cancer Biol*, 8, 345-57.
- [38] Wagenknecht, B., Hermisson, M., Eitel, K. and Weller, M., 1999, Proteasome inhibitors induce p53/p21-independent apoptosis in human glioma cells, *Cell Physiol Biochem*, 9, 117-25.
- [39] Kimball, S.R., 1999, Eukaryotic initiation factor eIF2, *Int J Biochem Cell Biol*, 31, 25-9.
- [40] Satoh, S., Hijikata, M., Handa, H. and Shimotohno, K., 1999, Caspase-mediated cleavage of eukaryotic translation initiation factor subunit 2alpha, *Biochem J*, 342, 65-70.
- [41] Pain, V.M., 1996, Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells, *Eur J Biochem*, 236, 747-71.
- [42] Marissen, W.E., Guo, Y., Thomas, A.A., Matts, R.L. and Lloyd, R.E., 2000, Identification of caspase 3-mediated cleavage and functional alteration of eukaryotic initiation factor 2alpha in apoptosis, *J Biol Chem*, 275, 9314-23.
- [43] Kumar, K.U., Srivastava, S.P. and Kaufman, R.J., 1999, Double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) is negatively regulated by 60S ribosomal subunit protein L18, *Mol Cell Biol*, 19, 1116-25.
- [44] Harding, H.P., Zeng, H., Zhang, Y., Jungries, R., Chung, P., Plesken, H., Sabatini, D.D. and Ron, D., 2001, Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in perk^{-/-} mice reveals a role for translational control in secretory cell survival, *Mol Cell*, 7, 1153-63.
- [45] Drexler, H.C., 1997, Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 855-60.
- [46] Kudo, Y., Takata, T., Ogawa, I., Kaneda, T., Sato, S., Takekoshi, T., Zhao, M., Miyauchi, M. and Nikai, H., 2000, p27Kip1 accumulation by inhibition of proteasome function induces apoptosis in oral squamous cell carcinoma cells, *Clin Cancer Res*, 6, 916-23.
- [47] Drexler, H.C., Risau, W. and Konecny, M.A., 2000, Inhibition of proteasome function induces programmed cell death in proliferating endothelial cells, *Faseb J*, 14, 65-77.
- [48] Dutaud, D., Aubry, L., Henry, L., Levieux, D., Hendil, K.B., Kuehn, L., Bureau, J.P. and Ouali, A., 2002, Development and evaluation of a sandwich ELISA for quantification of the 20S proteasome in human plasma, *J Immunol Methods*, 260, 183-93.
- [49] Voorhees, P.M., Dees, E.C., O'Neil, B. and Orłowski, R.Z., 2003, The proteasome as a target for cancer therapy, *Clin Cancer Res*, 9, 6316-25.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- [50] Aghajanian, C., Soignet, S., Dizon, D.S., Pien, C.S., Adams, J., Elliott, P.J., Sabbatini, P., Miller, V., Hensley, M.L., Pezzulli, S., Canales, C., Daud, A. and Spriggs, D.R., 2002, A phase I trial of the novel proteasome inhibitor PS341 in advanced solid tumor malignancies, *Clin Cancer Res*, 8, 2505-11.
- [51] Orłowski, R.Z., Stinchcombe, T.E., Mitchell, B.S., Shea, T.C., Baldwin, A.S., Stahl, S., Adams, J., Esseltine, D.L., Elliott, P.J., Pien, C.S., Guerciolini, R., Anderson, J.K., Depcik-Smith, N.D., Bhagat, R., Lehman, M.J., Novick, S.C., O'Connor, O.A. and Soignet, S.L., 2002, Phase I trial of the proteasome inhibitor PS-341 in patients with refractory hematologic malignancies, *J Clin Oncol*, 20, 4420-7.
- [52] Teicher, B.A., Ara, G., Herbst, R., Palombella, V.J. and Adams, J., 1999, The proteasome inhibitor PS-341 in cancer therapy, *Clin Cancer Res*, 5, 2638-45.
- [53] 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.
- [54] Laemmli, U.K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature.*, 227, 680-5.
- [55] Kerr, J.F., Wyllie, A.H. and Currie, A.R., 1972, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br J Cancer*, 26, 239-57.
- [56] Edinger, A.L. and Thompson, C.B., 2004, Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy, *Curr Opin Cell Biol*, 16, 663-9.
- [57] Clarke, P.G., 1990, Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms, *Anat Embryol (Berl)*, 181, 195-213.
- [58] Zhang, Q.Y., Jiang, M., Zhao, C.Q., Yu, M., Zhang, H., Ding, Y.J. and Zhai, Y.G., 2005, Apoptosis induced by one new podophyllotoxin glucoside in human carcinoma cells, *Toxicology*, 212, 46-53.
- [59] Chauhan, D., Li, G., Shringarpure, R., Podar, K., Ohtake, Y., Hideshima, T. and Anderson, K.C., 2003, Blockade of Hsp27 overcomes Bortezomib/proteasome inhibitor PS-341 resistance in lymphoma cells, *Cancer Res*, 63, 6174-7.
- [60] Sadoul, R., Fernandez, P.A., Quiquerez, A.L., Martinou, I., Maki, M., Schroter, M., Becherer, J.D., Irmeler, M., Tschopp, J. and Martinou, J.C., 1996, Involvement of the proteasome in the programmed cell death of NGF-deprived sympathetic neurons, *Embo J*, 15, 3845-52.
- [61] Rosenwald, I.B., 2004, The role of translation in neoplastic transformation from a pathologist's point of view, *Oncogene*, 23, 3230-47.
- [62] Schewe, D.M. and Aguirre-Ghiso, J.A., 2009, Inhibition of eIF2 α dephosphorylation maximizes bortezomib efficiency and eliminates quiescent multiple myeloma cells surviving proteasome inhibitor therapy, *Cancer Res*, 69, 1545-52.
- [63] Lu, L., Han, A.P. and Chen, J.J., 2001, Translation initiation control by heme-regulated eukaryotic initiation factor 2 α kinase in erythroid cells under cytoplasmic stresses, *Mol Cell Biol.*, 21, 7971-80.

