

T.C. İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**EPIBRASSİNOLİD'İN GSK3 VE P53 SİNYAL
MEKANİZMALARI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

UTKU ÖZBEY

1409241002

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Programı: Moleküler Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans Programı

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA

AĞUSTOS 2016

T.C. İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

EPİBRASSİNOLİD'İN GSK3 VE P53 SİNYAL MEKANİZMALARI
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

UTKU ÖZBEY

1409241002

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Programı: Moleküler Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans Programı

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA

Diğer Juri Üyeleri: Doç. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN

Yard. Doç. Dr. Devrim Öz ARSLAN

Ağustos 2016

ÖNSÖZ

Eğitim hayatımda tamamlamış olduğum yüksek lisans eğitim programı boyunca ilgi, özveri ve yardımseverliğini sonuna kadar göstermiş olan saygıdeğer danışman hocam Yard. Doç. Dr. Pınar OBAKAN-YERLİKAYA'ya sonsuz teşekkürü bir borç bilirim. Aynı şekilde bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım saygıdeğer hocalarım Doç. Dr. Ajda ÇOKER-GÜRKAN, Doç. Dr. Elif Damla ARISAN ve Prof. Dr. Narçın PALAVAN-ÜNSAL'a çok teşekkür ederim.

Laboratuvarında bir çalışma arkadaşından öte bir yoldaş olan yaptığım her çalışmada hem psikolojik hem de bilgi açasından hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen sevgili dostlarım Ayça Ece NEZİR, Remzi Okan AKAR, Kaan ADACAN ve Zeynep Begüm DURDU'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Laboratuvar çalışmalarında özverisini hiç bir şekilde sakınmayan, öğrenciden ziyade bir çalışma ortağı olan Melissa KARA'ya gönülden teşekkür ediyorum.

Bir arkadaştan çok birer kardeş olan, yakınlıklarını gönülden hissettiğim sevgili arkadaşlarım Tefik ÇETİNKAYA, Bahadır ÜNAL ve Alican ÇETİNKAYA'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Son olarak her türlü maddi ve manevi desteklerinden, evde yaşattıkları güzel aile ortamından ve hiçbir zaman eksilmeyen sevgilerinden dolayı annem Mukadder ÖZBEY ve babam şeref ÖZBEY'e sonsuz teşekkür ederim.

Ağustos 2016

Utku ÖZBEY

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMALAR	v
TABLO LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ	x
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kolorektal Kanseri; Tanı, Epidemiyoloji ve Tedavi	4
2.1.1. Kolorektal Kanseri Risk Faktörleri	4
2.1.2. Kolorektal Kanseri Tanı ve Tedavisi	5
2.1.3. Kolorektal Kanseri Evreleri ve Tedavi Seçenekleri	6
2.2. Brassinosteroidler	8
2.2.1. Epibrassinolid; Kökeni ve Kullanım Alanları	9
2.3. EBR'nin Bitki Hücrelerinde ve Memeli Kanseri Hücrelerinde Etkilediği Hücreyel Yolaklar	11
2.4. Apoptoz	12
2.4.1 Apoptozun Moleküler Mekanizması	13
2.4.2. Apoptoz Tipleri	17
2.4.2. p53	19
2.4.3. GSK3 β	21

2.4.4. MAPK Yolağı, FoxO3a, SAPK/JNK ve Apoptotik Hedefleri	23
2.5. Endoplazmik Retikulum Stresi.....	25
2.6. Model organizma olarak <i>Caenorhabditis elegans</i>	28
2.6.1. <i>C. elegans</i> Yaşam Döngüsü	30
2.5.1. Alzheimer Hastalığı Modeli Olarak <i>C. elegans</i>	32
3. MATERYAL METOD	36
3.1. Hücre Kültürü.....	36
3.2. Doza ve Zamana Bağlı Hücre Canlılık Testi (MTT).....	36
3.3. Zamana Bağlı Hücre Sayısının Tripan Mavisini Boyaması ile Gösterilmesi.....	37
3.4. Akış Sitometrisi ile Hücre döngüsü Analizi.....	37
3.5. İmmunoblotlama	38
3.8. <i>C. elegans</i> Kültürü.....	39
3.9. <i>C. elegans</i> Canlılığının Gözlemlenmesi	41
3.10. <i>C. elegans</i> suşlarının Fertilite Durumlarının Gözlemlenmesi	42
3.11. <i>C. elegans</i> Yaşam Sürelerinin Hesaplanması.....	42
3.11. İstatistiksel Analiz	43
4. SONUÇLAR	44
4.1. MTT ve Tripan Boyaması ile Hücre Canlılığı'nın Değişiminin Gösterilmesi	44
4. 2. Akış Sitometrisi ile Hücre Döngüsü Aşamalarının Hücrelerdeki p53 Durumundan Bağımsız Olarak Değişiminin Gösterilmesi.....	46
4.3. EBR Uygulamasının p53 ile Bağlantılı Apoptotik Yolakların ve Apoptoz Belirteçi Olan Proteinlerin Anlatım Seviyelerine Olan Etkisi	48
4.4. EBR uygulamasının GSK3 β ve İlişkili Olduğu Hücre Sağkalım Yolaklarındaki Protein Seviyelerinin Gösterilmesi.....	50
4.5. EBR uygulamasının Hücresel Stres ile İlişkili Yolaklar ile Bağlantısının Gösterilmesi.....	53

4.6. EBR ile Tetiklenen Endoplazmik Retikulum Stresinin p53 Durumu Farklı Hücre Hatlarında Gösterilmesi	55
4.7. EBR'nin Farklı <i>C. elegans</i> Suşlarında İlaç Toksisitesinin Belirlenmesi	57
4.8. EBR'nin GSK3 β ve Alzheimer Hastalığı Modeli <i>C. elegans</i> Suşlarında Fertilite Durumlarının İncelenmesi	60
4.9. EBR'nin Farklı <i>C. elegans</i> Suşlarının Yaşam Sürelerine Olan Etkisinin Gösterilmesi.....	62
5. TARTIŞMA	64
7. EKLER.....	88
7.1 KULLANILAN CİHAZLAR.....	88
7.2. HÜCRE KÜLTÜRÜ DONANIMLARI.....	89
7.3. KİMYASAL MADDELER.....	90
7.4 Kullanılan Antikorlar	92
8. ÖZGEÇMİŞ	94

KISALTMALAR

AD:	Alzheimer Hastalığı
AIF:	Apoptosis-inducing factor
APC:	Adenomatosis poliposis koli
APP:	Amiloid öncü proteini
ASK1:	Apoptosis signal-regulating kinase 1
ATCC:	American Tissue Culture Collection
ATF4/ATF6:	Activating transcription factor 4/ activating transcription factor 6
Aβ42:	amiloid- β 42
BACE1:	β -APP kırma enzimi 1
BAK1:	Brassinosteroid insensitive 1-associated receptor kinase 1
Bax:	Bcl-2 Associated X Protein
Bcl-2:	B-cell Lenfoma-2
BIN2:	Brassinosteroid-insensitive 2
Bim:	Bcl-2 Interacting Protein
BiP:	Binding immunoglobulin protein
BRI1:	Protein brassinosteroid insensitive 1
BSA:	Sığır Serum Albümini
BSK1:	Brassinosteroid Signaling Kinase 1
BSU1:	BRI1 Supressor 1
BZR/ BZR2:	Brassinazole-Resistant 1 ve Brassinazole-Resistant 2
C/EBP:	CCAAT-enhancer-binding protein
CaCl₂:	Kalsiyum Klorür
CDG1:	Constitutive Differential Growth 1
CDK5:	Sikline bağlı kinaz 5

CGC:	Caenorhabditis Genetics Center
CHOP:	C/EBP homologous protein
DISC:	The death-inducing signaling complex
DMSO:	Dimetil sülfoksit
DNA:	Deoksiribonükleik asit
EBR:	24-epibrassinolid
EDTA:	Ethylenediaminetetraacetic acid
eIF2α:	Eukaryotic translation initiation factor 2 α
ER:	Endoplazmik Retikulum
FAD:	Familial Alzheimer Disease
FAP:	Familyal adenomatöz polipozis
FBS:	Fetal Sığır Serumu
FLICE:	FADD-like interleukin-1 β converting enzyme
FLIP:	FLICE-like inhibitory protein
FoxO3a:	Forkhead box O3a
FuDR:	5- fluoro-2-2deoxyuridine
GSK3:	Glikojen Sentaz Kinaz 3
HNPCC:	Hereditör nonpolipozis kolon kanser
HRP:	Horse Raddish Peroxidase
IKK:	I κ B kinaz
IRE1α:	Inositol-requiring enzyme 1
IκB:	Inhibitor κ B
JNK:	Janus kinaz
KH₂PO₄:	Potassium dihydrogen phosphate
KPO₄:	Potasyum Fosfat
LB:	Luria-Bertani Besiyeri
LiCl:	Lityum Klorür
LRP5/6:	Lipoprotein receptor-related protein
MAPK:	Mitojenle aktifleştirilmiş protein kinaz
MDM-2:	Mouse double minute 2

MgSO₄:	Magnezyum Sülfat
mTOR:	Mammalian target of rapamycin
MTT:	3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
Na₂HPO₄:	Disodyum hidrojen fosfat
NaCl:	Sodyum Klorür
NaOH:	Sodyum hidroksit
NF-κB:	Nuclear Factor κB
NGM:	Nematod Büyütme Besiyeri
p70s6k:	Ribosomal protein S6 kinase beta-1
PARP:	Poly ADP riboz polimeraz
PBS:	Fosfat tamponlu tuz
PDK-1:	Protein Kinaz-1
PERK:	Protein kinase RNA-like ER kinase
PI:	Propidyum iyodür
PI3K:	Fosfoinositol 3 kinaz
PP2A:	Protein fosfatase 2
PUMA:	p53 upregulated modulator of apoptosis
PVDF:	Polivinil florid
RFA:	Radiofrequency ablation
ROS:	Reaktif Oksijen Türevleri
SAPK/JNK:	Stress-activated protein kinases/ Jun amino-terminal kinases
SDS-PAGE:	Sodyumdodesil sülfat-Poliakrilamid jel elektroforezi
SEER:	Surveillance, Epidemiology, and End Program
Ser:	Serin
TBS:	Tris Tamponlu Tuz
TCF/LEF:	T-cell factor/lymphoid enhancer factor
Thr:	Treonin
TNF:	Tümör Necroz Faktör
TP53:	Tümör Proteini 53
TRAF2:	TNF receptor-associated factor 2

Tyr: Tirozin
unc-54: Uncoordinated 54
UPR: Katlanmamış Protein Cevabı
UV: Mor ötesi
XBP-1: X-box protein-1



TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Deneylerde kullanılacak olan <i>C. elegans</i> suşlarının özellikleri	40
Tablo 2. Kullanılan Cihazlar	88
Tablo 3. Hücre kültürü donanımları	89
Tablo 4. Kullanılan kimyalların listesi	90
Tablo 5. Kullanılan antikorlar	92



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2. 1. Kolorektal kanserin ilerlemede geçirdiği evreler.....	6
Şekil 2. 2. BRI1 ve BAK1 brassinosteroid reseptörlerinin proteomik yapıları	9
Şekil 2. 3. 24-epibrassinolid moleküler yapısı.....	10
Şekil 2. 4. Bitkilerde brassinosteroid reseptörleri ve etkiledikleri yollar.....	12
Şekil 2. 5. Memeli hücrelerinde görevli kaspaz proteinleri.....	14
Şekil 2. 6. Bcl-2 protein ailesi üyeleri ve BH bölgeleri bulundurma durumları.....	16
Şekil 2. 7. İçsel ve reseptör bağımlı apoptotik yollar.....	18
Şekil 2. 8. p53'ün aktivitesinin kontrolü MDM-2 aracılığı ile sağlanır.	20
Şekil 2. 9. Wnt sinyal yolağının aktifleşmesi ve β -catenin'in nukleusa göçü.....	22
Şekil 2. 10. p38 MAPK ve etkilediği yollar.....	24
Şekil 2. 11. ER stress durumunda UPR oluşturan proteinler ve yolları.....	26
Şekil 2. 12. Memeli hücrelerindeki ER stres yolları ve hedef proteinleri.....	27
Şekil 2. 13. A) <i>C. elegans</i> model organizmasının anatomik yapısı ve B) ergin <i>C. elegans</i> 'in mikroskopik görüntüsü	29
Şekil 2. 14. <i>C. elegans</i> embriyogenez aşaması	30
Şekil 2. 15. <i>C. elegans</i> yaşam döngüsü.....	31
Şekil 2. 16. Hücrelerde GSK3 β aktivitesinin kontrol edilmesi ve sonucunda Tau Aşırı Fosforlanmasının Kontrolü	34
Şekil 4. 1. Doza bağımlı EBR uygulamasının p53 durumları farklı kolon kanseri hücre hatlarında bağımlı hücre canlılığı üzerine etkisinin gösterilmesi. (A) HT-29, (B) HCT-116 hücre hatlarında 0, 10, 15, 20, 30, 50 μ M, HT-29 p53 ^{+/+} (C) hücre hattında 0, 10, 20, 30, 50 μ M dozlarındaki bağımlı hücre canlılıkları ölçülmüştür. *** p< 0.001, *p<0.05.	45
Şekil 4. 2. Zamana bağımlı EBR uygulamasının hücre sağkalımı üzerine etkisinin tripan mavisi boyaması ile gösterilmesi. (A) HCT-116, (B) HT-29 ve (C) HT-	

- 29 p53^{+/+} hücre hatlarından MTT ile belirlenen 30 µM EBR uygulaması yapılmış, uygulamadan sonraki her gün tripan mavisi ile boyama yapıldıktan sonra ölü hücrelerin sayısı hesaba katılmaksızın canlı hücre sayısı belirlenmiştir. * p<0,05..... 46
- Şekil 4. 3.** Akış sitometrisi vasıtasıyla hücre döngüsünün değişiminin gösterilmesi. (A) HCT-116, (B) HT-29, (C) HT-29 p53^{+/+} hücre hatlarında 30 µM EBR uygulamasından sonraki 48 saat sonunda fikse edilen hücrelere PI boyaması gerçekleştirilmiş, hücreler akış sitometrisinde FL2 filtresinde okutulmuş ve incelenmiştir..... 47
- Şekil 4. 4.** HCT-116, HT-29 ve HT-29 p53^{+/+} (Sırasıyla A,B,C) hücre hatlarında yapılan immünoiblottama vasıtasıyla p53 ve p53'ün anlatımını düzenlediği proteinlerin anlatım seviyelerinin gösterilmesi. MDM-2, Puma, Bim, Bax, p53 ve fosfo-p53 (Ser 15) protein anlatımlarının seviyeleri gösterilmiş, sonuçların doğrulanması amacıyla hücrelerde anlatımının değişmesi öngörülmemen β-tubulin kullanılmıştır ve en az 2 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir..... 49
- Şekil 4. 5.** Belirtilen hücre hatlarında GSK3β ve GSK3β ile ilişkili proteinlerin (Akt, β-kateinin) anlatım ve aktivasyon durumlarının belirlenmesi bunların apoptotik kondüsyonu belirten proteinlerin (Kaspaz 3 ve PARP) ekspresyon ve düzenlenme durumlarının western blot ile gösterilmesi. p-Akt (ser473), p-Akt (Thr308), Akt, p-GSK3β (ser9), GSK3β, β-katenin, Pro-Kaspaz 3, Aktif-Kaspaz 3 ve PARP proteinlerinin anlatım seviyeleri gösterilmiş, sonuçların doğrulanması amacıyla hücrelerde anlatımının değişmesi öngörülmemen β-Aktin kullanılmıştır ve sonuçlar en az 2 kere tekrarlanmıştır..... 52
- Şekil 4. 6.** Yukarıdaki hücre hatlarında GSK3β'nin bağlantılı olduğu MAPK, FoxO3a, SAPK/JNK ve p70s6k proteinlerinin anlatım ve aktivasyon durumlarının western blot ile gösterilmesi. p38, p-p38 (Thr180/Tyr182), FoxO3a, p-FoxO3a (Ser253), p-FoxO3a (Ser318/Ser321), SAPK/JNK, p-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185), p70S6K, p-p70S6K (Thr389) proteinlerinin anlatımları gösterilmiş, sonuçların doğrulanması amacıyla hücrelerde

anlatımının değişmesi öngörölmeven β -Aktin kullanılmış ve her sonuç en az 2 kez tekrarlanmıştır.....	54
şekil 4. 7. HCT-116, HT-29 ve HT-29 p53 ^{+/+} (Sırasıyla A,B,C) hücre hatlarında yapılan immünoblotlama ile endoplazmik retikulum stresi ile bağlantılı proteinlerin anlatım seviyelerinin gösterilmesi. Kalretikulin, Kalneksin, BiP, PDI, Ire1 α , ATF6, PERK, ATF4, CHOP, p-elf2 α (Ser51) proteinlerinin anlatım seviyeleri incelenmiş, sonuçların doğrulanması amacıyla hücrelerde anlatımunun değişmesi öngörölmeven β -aktin kullanılmıştır ve her sonuç en az 2 kere tekrarlanmıştır.....	56
şekil 4. 8. (A) N2, (B) CL2120 ve (C) WM104 suşlarına artan dozlarda EBR ve LiCl uygulaması soncunda ölen <i>C. elegans</i> verilerinin alınması.....	58
şekil 4. 9. N2 ve CL2120 suşlarında LiCl ve EBR uygulamasıyla birlikte ölüm ışımalarının tespit edilmesi. (eksitasyon/emisyon: 340 nm/430 nm)	59
şekil 4. 10. <i>C. elegans</i> suşlarında yapılan yumurta sayımlarına göre CL2120 (A), CL2122 (B), RB814 (C) <i>C. elegans</i> suşlarında farklı EBR konsantrasyonlarındaki (10, 20, 30 μ M) <i>C. elegans</i> suşlarının yumurtlama miktarları. Her kondisyon için 2 L4 larva kullanılmış olup 72 saat sonrasında aşırı bakteri üremesi sebebiyle yumurta sayımı mümkün olmamıştır. İlk 48 saatlik veriler şekildeki gibidir. **** p< 0.0001.	61
şekil 4. 11. EBR ve pozitif kontrol olan LiCl'ün GSK3 β ve A β durumlarına göre farklılık gösteren <i>C. elegans</i> suşlarının yaşam sürelerine olan etkisi	63
şekil 5. 1. EBR kolon kanseri hücrelerinde apoptozu tetiklerken sağkalımı baskılamaktadır. AD modeli <i>C. elegans</i> larda ise GSK3 β aracılığı ile sağkalımı tetiklemektedir.....	71

ÖZET

Kolon kanseri, kanser nedeni ile ölüm oranlarında akciğer kanserinden sonra gelen yaygın bir kanser türüdür. Kolon kanserinin tedavisinde kullanılan geleneksel yöntemlerin başarıları tartışılırken, bu yöntemlerin yan etkileri hastanın yaşam kalitesini düşürmektedir. Bu sebeple yapılan çalışmalarda kolon kanseri tanı ve tedavisine yönelik yeni yöntem ve ilaçların geliştirilmesi için çalışmalar yürütülmektedir. Bu çalışmalarda günümüzde özellikle hedefe yönelik, yan etkileri az, doğallığı yüksek yeni kemoterapötik ajanların üzerine olan çalışmalar önem arz etmektedir. Bitkilerden elde edilen brassinosteroid ailesi steroid yapıdaki bitkisel hormonlardan 24-epibrassinolid (EBR), steroid yapısı sebebiyle doğal kemoterapötik ilaçlardan biri olma potansiyeli taşımaktadır. Gerçekleştirilen *in vitro* çalışmalarda EBR'nin prostat ve kolon kanserinde etkilediği hücresel sinyaller araştırılmış ve EBR'nin apoptotik hücre ölümünü tetiklediği gösterilmiştir.

Yapılan çalışmalar kolon kanserinin oluşmasının başlıca sebeplerinin başında büyüme sinyali hedeflerinde ve tümör baskılayıcı bir protein olan p53'te gerçekleşen mutasyonların varlığı tespit edilmiştir. Bu noktadan yola çıkarak bu çalışmada EBR'nin p53 anlatımı bakımından farklı kolon kanseri hücrelerinde (HCT-116 (doğal tip), HT-29 (p53 mutant) ve HT-29 p53^{+/+}) hücre canlılığının EBR uygulamasıyla değişimi incelenmiştir. Bulgular EBR'nin hücre canlılığını p53 anlatımı farklı hücre hatlarında azalttığı sonucu ortaya çıkmıştır. Hücre canlılığının azalmasının sebebinin apoptotik hücre ölümü olup olmadığı incelendiğinde ise p53 anlatımı farketmeksizin hücre hatlarının tamamında EBR ile apoptozun tetiklendiği, p53'ün hedef proteinlerinin ifadelerinde artış tespit edilmiştir. PI3K, Wnt ve MAPK sinyallerinden etkilenen GSK3 β proteininin büyüme sinyalinin p53 anlatımından bağımsız şekilde kesildiği sonucu ortaya koyulmuştur. Ayrıca, GSK3 β 'nin p38 MAPK proteini ile aktivitesinin düzenlenebileceği düşünülmektedir. Bu sonuçlar ışığında EBR'nin hücrelerde oluşturabileceği stres koşullarının p53 anlatımı farklı hücre hatlarında endoplazmik retikulum (ER) stresine yol açtığı ortaya çıkartılmıştır.

EBR uygulaması ile elde GSK3 β proteininde Ser9 fosforilasyonu ile aktivite kaybı tespit edilmiş ve bunun Alzheimer hastalığı (AD) tedavisinde kullanılan ilaçlardan lityum klorür ile aynı etkiyi yarattığı görüşü ortaya çıkmıştır. Bu sebeple

Caenorhabditis elegans model organizmasında yapılan çalışmalarda, AD modellerinde ve GSK3 β mutant suşlarda EBR'nin LiCl'e göre daha düşük toksisiteye sahip olduğu, AD modellerinde ise doğal tip *C. elegans* suşuna göre yaşam süresini daha fazla arttırdığı sonucu ortaya çıkartılmıştır. Elde edilen bulguların ışığında EBR'nin kolon kanserinde potansiyel kemoterapotik ajan olabileceğini ve ek olarak ve AD'de tedavi amaçlı ilaç olma potansiyeli olduğu belirlenmiştir.



ABSTRACT

Colorectal cancer is the most common cancer after lung cancer causing death in worldwide. Success of traditional therapies of colorectal cancer is being investigated and severe side effects influence patient life quality. Therefore recent studies are focused on the development of new methods and drugs for diagnosis and therapy of colon cancer. These studies are motivated to find targeted, natural new drug candidates with fewer side effects. 24-epibrassinolid (EBR), synthesized from plants, is one of the brassinosteroid family members of plant hormones. Its chemotherapeutic potential has been investigated due to the mammalian steroid-derived structure. EBR treatment affected cellular signaling pathways were investigated in *in vitro* colon and prostate cancer cells and its apoptotic potential has been revealed.

Major causes in the development of colon cancer have been investigated and mutations in the growth signal targets and tumor suppressor protein of p53 were found. Therefore, in this study we investigated EBR treatment effect on cell viability in different colon cancer cell lines with various p53 status: HCT-116 (p53 wild-type), HT-29 (p53 mutant), HT-29 p53^{+/+}. As a result, we demonstrated that EBR treatment decreased cell viability in all colon cancer cell lines regardless of p53 expression. While the cause cell viability decrease was examined, we observed that apoptotic was induced following EBR treatment in a p53 independent way. We also demonstrated that p53 target protein expressions were upregulated. Beside, this study also showed that GSK3 β signaling is inhibited via PI3K, Wnt and MAPK pathways p53 independently. Furthermore, activity of GSK3 β was regulated by p38 MAPK protein. In the light of these data, we concluded that stress conditions activated after EBR treatment in different cell lines with various p53 expression status, were because of Endoplasmic Reticulum (ER) stress induction.

In this study, we found that EBR treatment-caused Ser9 phosphorylation is associated with the inhibition of GSK3 β and this effect of EBR was found similar to lithium chloride (LiCl) used in Alzheimer's Disease (AD) therapy. To model this effect, *Caenorhabditis elegans* model organism was used. We obtained that EBR exerted fewer toxic effect than LiCl in AD models and GSK3 β mutant strains and

EBR treated AD models had longer life span than wild-type *C. elegans* organisms. All these data indicated that EBR has a potential chemotherapeutic effect against colon cancer and a drug candidate for AD.



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kolon kanseri Türkiye'de ve Dünya'da öldürücülüğü akciğer kanserinden sonra 2. sırada yer alan kanser türlerinden biridir [1]. Kolon kanserinin tedavisi söz konusu olduğunda cerrahi yöntemler ve geleneksel kemoterapotik ilaçların yanında hedefe yönelik ve yan etkileri düşük ilaçların geliştirilmesi önem kazanmaktadır. Kolon kanserinin oluşmasının sebepleri arasında büyüme faktörleri reseptörlerinin hedef proteinleri ve tümör baskılayıcı proteinlerden *TP53* geninde gerçekleşen mutasyonlar yer almaktadır [2]. Tespit edilen mutasyonlara yönelik yeni ilaçların bulunması ve geliştirilmesi üzerine çalışmalar devam etmektedir.

p53 hücrelerde tümör baskılayıcı protein olarak işlev yapmaktadır ve hücrelerde hasarlı DNA onarımı, hücresel strese cevap oluşturmak ve hücrelerin apoptotik ölüme sürüklemek gibi işlevleri bulunmaktadır [3]. p53 proteininin de gerçekleşen mutasyon durumlarında hücrelerde işlevlerini yerine getiremez hale gelmekte ayrıca kanser gelişimini tetikleyebilmektedir. Bu çalışmada p53 anlatımı durumu farklı kolon kanseri hücrelerinde, potansiyel etkileri araştırılan EBR (24-epibrassinolid) adı verilen bitkisel steroid türevli hormonun etkileri araştırılmıştır.

İlk defa Malikova ve arkadaşları [4] tarafından kanser önleyici bir ajan olarak tanımlanan EBR, bitki büyüme düzenleyicileri olan brassinosteroid ailesinin bir üyesidir. Bitkilerde başlıca etkileri arasında nükleik asit ve protein sentezinin aktive edilmesi, enzim aktivitesinin düzenlenmesi, büyümenin teşvik edilmesi, meyvelerin büyüklerinin artırılması, stres ve hastalık gibi istenmeyen çevresel faktörlere karşı bağışıklık oluşturulması gelmektedir [5]. Bitkilerde heterodimer bir reseptör olarak bulunan ve hücre membranında lokalize olmuş brassinosteroid reseptörü, brassinosteroid bağlanmasını ardışık serin/treonin domenlerinden fosforile olarak aktif hale geçmektedir. Bu mekanizma ile çeşitli transkripsiyon faktörleri

tetiklenmekte, hücre bölünmesi ve büyümesi gibi brassinosteroid cevap genlerinin anlatımlarını sağlamaktadır [6]. Bu vasıta ile bitkilerdeki GSK3 β benzeri protein olan BIN2'yi baskılayacak şekilde işlev görmektedir [7]. Memelilerde bulunan steroid türevli hormonlara yapısal olarak benzerliği, bu molekülün etkilerinin araştırılmasını doğurmuştur. İnsanlarda steroid yapıdaki hormonların (östrojen ve androjenler) fazla anlatımlarının meme ve prostat kanseri gelişiminden sorumlu olduğu bilinmektedir. Bitki ve hayvan steroidlerinin bu ortak noktasından yola çıkarak EBR, ilk defa kanser hücrelerine Malikova ve arkadaşları [4] tarafından denenmiş ve çeşitli kanser hücre hatlarında hücre canlılığında azalmaya neden olduğu özellikle hormonlara bağımlı kanser türlerinde etkin olmakla beraber hormonlardan bağımsız gelişen kanser türlerinde de etkili olduğu belirlenmiştir [8]. Aynı şekilde farklı genetik karakteristikleri bulunan prostat kanseri hücrelerinde de etkileri modellenmiştir [9]. Bu çalışmada ise amaç, EBR'nin p53 anlatımı bakımından farklı kolon kanseri hücrelerindeki etkileri ve bu etkilerin hangi moleküler mekanizmalar aracılığıyla gerçekleştiğini göstermektedir. Aynı zamanda, EBR'nin apoptotik parametreleri ne şekilde değiştirdiği, p53 ile alakalı hücre sinyalleri üzerindeki etkileri irdelenmiştir. Bununla birlikte p53 proteininden bağımsız olarak apoptotik parametreler ve hücre sağkalımı ile ilgili hücre sinyallerinin taranması da gerçekleştirilmiştir. EBR'nin Wnt sinyal yolağının etken proteinlerinden olan ve hücrelerdeki glikojen metabolizmasından sorumlu GSK3 β proteini üzerine olan etkisi gözlemlenmiştir.

Endoplazmik retikulum (ER) hücrelerde protein sentezi ve proteinlerin doğru katlanmalarını düzenleyen bir organel olarak karşımıza çıkmaktadır [10]. Bu organelde proteinlerin katlanma aşamalarının kesintiye uğraması ve katlanmamış proteinlerin miktarının aşırı artması durumunda hücrelerde katlanmamış protein cevabı (UPR) oluşmasına sebep olmaktadır. Bu durumun oluşmasına ise ER stres adı verilmektedir. UPR hücrelerde apoptotik mekanizmanın indüklenmesine sebep olan etmenlerden biridir. Bu bilgiler ışığında kolon kanseri hücre hatlarında EBR'nin ER stresi tetiklediği ayrıca gösterilmiştir.

EBR'nin GSK3 β üzerindeki etkisi, bu ajanın çeşitli nörodejeneratif hastalıklar adına kullanılabilirliğini sorgulamamıza neden olmuştur. Bilindiği üzere özellikle Alzheimer Hastalığı gelişiminde GSK3 β proteini Ser9 fosforilasyonunun artması nöral hücrelerin ölümü ile ilişkilendirilmiştir [11]. Bu noktadan yola çıkarak EBR'nin potansiyel anti-nörodejeneratif etkisi de bu çalışmada incelenmiştir. Alzheimer Hastalığı (AD), Dünya'da 65 yaş üstü kişilerde her 1000 kişiden 15'inde görülen ve sinir sistemine hasar veren bir hastalık olarak karşımıza çıkmaktadır [12]. AD tedavisi söz konusu olduğunda kullanılan ilaçlar sadece belirtilerini azaltabilmekte ve hastalığın ilerlemesini yavaşlatabilmektedir. Fakat etkin bir ajan halen klinikte kullanılmamaktadır. EBR'nin GSK3 β üzerindeki etkisinin bu özelliğinin AD modelleri üzerinde denemesi bu çalışmada literatürde ilk defa gerçekleştirilmiştir. *Caenorhabditis elegans* model organizması hücrel sinyal yollarının keşfedilmesinde ilk kullanılan model organizmalardan biridir ve deneylerimizde EBR'nin etkisinin aydınlatılması amacıyla da kullanılmıştır. 302 sinir sistemi hücresi bulunan *C. elegans* model organizması, AD gibi sinir sistemini etkileyen ve hücrel sinyallerdeki bozukluklar ile ortaya çıkan hastalıkların tedavisi amacıyla gerçekleştirilen deneylerde günümüzde de kullanılmaktadır. Bu çalışmada, AD için model olabilecek *C. elegans* farklı suşlarında, EBR uygulamasının yaşam sürelerini ne şekilde etkilediği, yumurtlama miktarlarını ne şekilde değiştirdiği ve toksik etkisinin modellenmesi araştırılmıştır. Tüm bu araştırmalar klinikte GSK3 β engelleyici molekül olarak kullanılan ve LiCl ile karşılaştırmalı olarak gerçekleştirilecektir.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasındaki amaçlar;

- 1) Brassinosteroid ailesi üyesi olan EBR'nin p53 anlatımı açısından farklı kolon kanseri hücre hatlarında programlanmış hücre ölümünü tetikleyip tetiklemediğinin gösterimi, bu duruma yol açan hücrel sinyallerin neler olduğunun belirlenmesi.
- 2) EBR'nin kontrol suşlara kıyasla, AD modeli *C. elegans* model organizmasında ne şekilde etkilediğinin belirlenmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kolorektal Kanseri; Tanı, Epidemiyoloji ve Tedavi

Kolon kanseri kalın bağırsağın kolon veya rektum kısmından başlayan kansere denilir. Türkiye Birleşik Veri Tabanı verilerine göre kolorektal kanser Türkiye'de hem kadınlarda hem de erkeklerde rastlanma sıklığı açısından 3. sırada yer almaktadır. Benzer şekilde SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Program) verileri incelendiğinde 2016 yılı içerisinde ABD'de görülme sıklığı açısından 4. sırada bulunmasına rağmen öldürücülük sırasında solunum yolu kanserlerinden sonra 2. sırada olduğu gözlemlenmektedir.

2.1.1. Kolorektal Kanserin Risk Faktörleri

Kolorektal kanserin risk faktörleri arasında yaş, genetik yatkınlık, kolonda oluşan poliplerin malign tümör hale gelme riski, uygun olmayan diyet ve sigara kullanımı yer almaktadır. Yaş faktörü olarak kolon kanseri vakalarının %90'ından fazlası 50 yaş üzerinde gözlemlenmektedir [13]. Aynı zamanda genetik yatkınlık açısından HNPCC (Hereditör nonpolipozis kolon kanseri) vakaları *HNPCC* geninde gerçekleşen mutasyon sonucunda kolorektal kanser meydana gelmektedir [14]. Bununla birlikte FAP (Familiyal adenomatöz polipozis) hastalığında *APC* genindeki mutasyon sebebiyle poliplerden kaynaklanan kolon kanseri durumu oluşur [15]. Crohn hastalığı gibi kolonda gerçekleşen enfeksiyona bağlı hastalıklarda da kolon kanseri görülme olasılığı artış göstermektedir [16]. Ancak günlük yaşama bakıldığında aşırı hayvansal yağlarla yapılan beslenmenin yanısıra iyonlarca ve liflerle desteklenmeyen gıda tüketimi kolorektal kanser riskini arttırmaktadır.

2.1.2. Kolorektal Kanserin Tanı ve Tedavisi

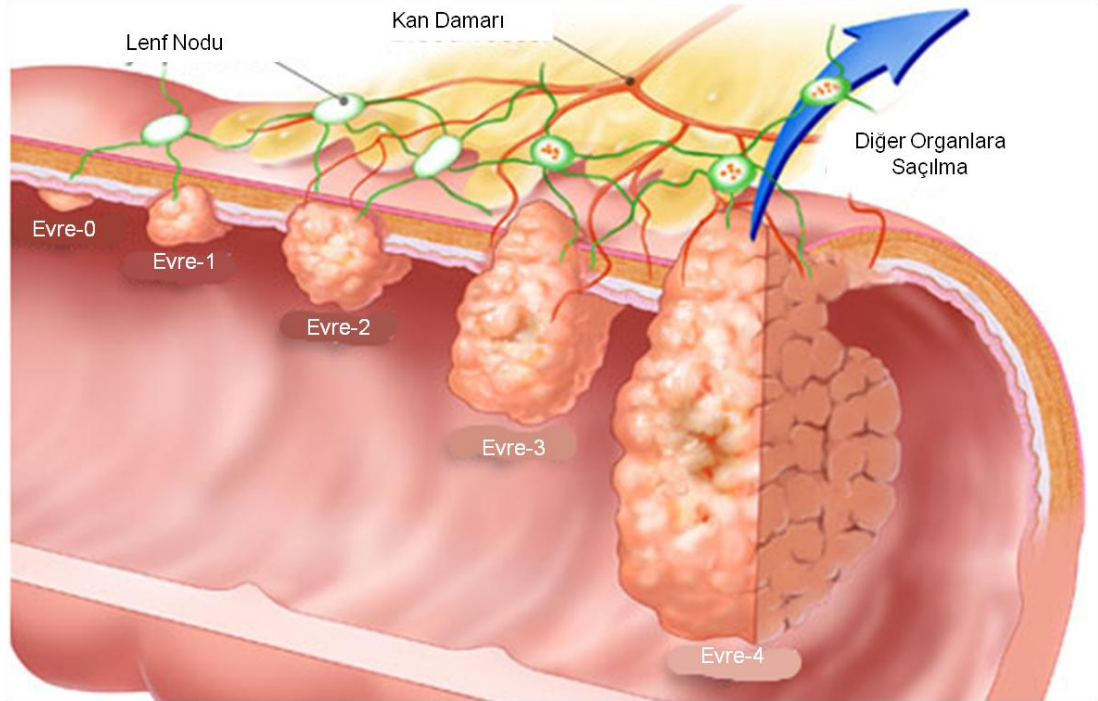
Kolorektal kanserin tanısının konmasında en yaygın ve kesin yöntem kolonoskopidir. Tüm kolonun rektumdan başlayarak kamera ile taranması, varsa poliplerin alınarak incelenmesi esasına dayanır. Bununla birlikte araştırılmakta olan tanı yöntemleri açısından bakıldığında bilgisayarlı tomografi ile tüm kolonun taranması çalışmaları ve dışkıdan yapılabilecek genetik testler araştırılmaya devam etmektedir. Bu yeni geliştirilen tetkik yöntemlerinden ön plana çıkan testlerden biri FOBT (Dışkıda Gizli Kan Testi) olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu yöntem hem kolondaki poliplerin hem de kolon kanserinin kanaması ve dışkıya kan karıştırması tespitine dayanır. Dışkıya uygulanan hemoglobine bağlanan antikorların veya hemoglobini tespit eden kimyasalların incelenmesine dayanır. Kan tespit edilmesi durumunda daha kesin tanı yöntemlerine başvurulabilir. 50 ila 80 yaş arası bireylere 1-2 yıldır düzenli olarak yapılan FOBT sayesinde kolon kanserinden kaynaklanan ölümlerin engellenmesi %15'ten %33'e kadar çıkmıştır [17]. Genetik testlerden FIT-DNA testi olarak Cologuard adı verilen test ile dışkıdaki kanın tespiti ve bu kanda tespit edilebilecek 3 farklı kolon kanserine özgün genin 9 farklı biyoişaretleyicinin saptanması amacıyla kullanılmaktadır. Bu bağlamda bu test vasıtasıyla hiçbir şekilde kolon kanseri semptomlarını göstermeyen hastalara teşhis konulması sağlanmış, kolonoskopi tavsiye edilerek esas teşhisin konulmasının erken gerçekleşmesi sağlanmıştır [18].

Tüm bunlarla birlikte kullanılan başlıca yöntemler sigmoidoskopi adı verilen kalın bağırsağın rektum, anüs, sigmoidal kısmının, kısaca son kısmının, endoskopik bir cihaz vasıtasıyla kontrol edilmesi esasına dayanır. Yapılan araştırmalarda 55 ile 64 yaşları arasında yapılan tek bir sigmoidoskopi, kolorektal kanserin yayılma ve öldürme oranlarını düşürmektedir [19]. Bununla birlikte tüm kolonun taranması esasına dayalı görsel kolonoskopide endoskopik kamera ve esnek bir hortumla kolona girilmesi ve bütün kolonun doktorun rahat görmesi amacıyla hava verilerek kolonun genişletilmesi ve poliplerin taranması şeklinde yapılır. Bununla birlikte gerekli durumlarda kolonoskopi ile poliplerden örnek (biyopsi) alınması mümkündür. Yapılan işlem sırasında hastaya çeşitli sakinleştiriciler verilmesi

gerekebilmektedir. Risk grubundaki insanların 10 yılda bir kolonoskopi yaptırmaları kolon kanseriden kaynaklanan ölümleri %60-70 oranında azalttığı tespit edilmiştir [20]. Bu yöntemin yanısıra özel bir bilgisayarlı tomografi aracılığıyla kolona hava basılarak kolon yolunun açılması ve vücut dışından görüntülemenin gerçekleştirilmesi şeklinde bir kolonoskopi yöntemi de geliştirilmiştir ancak normal kolonoskopi yöntemine göre ne kadar avantaj sağlayacağı henüz belirlenmemiştir.

2.1.3. Kolorektal Kanser Evreleri ve Tedavi Seçenekleri

Kolorektal kanser tanısı konulduğunda hastalığın ilerlemesinin belirli evreleri bulunmaktadır. Bunlar evre 0-4 şeklinde sıralanır. Bunlar; evre-0 kanser sadece kolon duvarındadır, evre-1 kolon duvarının iç kısmındadır, evre-2 kolon duvarının derinlerine kadar ilerlemiştir ancak lenf nodüllerine ulaşmamıştır, evre-3 kanser lenf nodüllerine de yayılmıştır ancak vücudun diğer bölgelerine yayılmamıştır, evre-4 kanser bedenin diğer bölgelerine de yayılım göstermiştir, şeklindedir [21] (Şekil 2.1.).



Şekil 2. 1. Kolorektal kanserin ilerlemesinde geçirdiği evreler [22].

Kolorektal kanserin tedavi yöntemleri incelendiğinde cerrahi yöntemler ön plana çıkmaktadır. Cerrahi yöntemlerde gelişen teknolojilerle birlikte laparoskopik kolon ameliyatları yapılarak poliplerin alınabilmesi sağlanmaktadır [23]. Bununla birlikte rektumda oluşan kolon kanseri türlerinde kolostomi adı verilen yöntemle uygulanabilmektedir [24]. Ancak bir çok hastada kolostomiye ek olarak öncesinde radyasyon ve kemoterapi verilmesi gerekmektedir. Bazı hastalarda da kolorektal kanserin karaciğer ve akciğerlere yayılması durumlarında buralardaki kanserleri tedavi etmek amacıyla RFA (Radiofrequency ablation) veya dondurarak kesme yöntemi kullanılmaktadır [25-26]. Bu yöntemlerde dokunun sağlam olan kısmının hasar görmesi büyük oranda engellenebilmektedir ancak bu yöntemlerde geride bir miktar tümörlü doku kalma olasılığı da bulunmaktadır.

Kolorektal kanserin tedavisinde kullanılan yöntemlerden biri de radyoterapidir. Kolorektal kanserde çeşitli şekillerde uygulanabilen radyoterapi, kanserli bölgeye X-ışınlarının verilmesi, cerrahi operasyon sırasında kanserli bölgeye tek ve yüksek doz radyasyon verilmesi, karaciğere radyoaktif tohumların enjekte edilmesi şeklinde verilebilmektedir. Ancak radyoterapinin çeşitli cilt problemleri, rektum kanaması, mide bulanması, yorgunluk hatta kısırlık gibi yan etkileri gözlemlenebilmektedir [27].

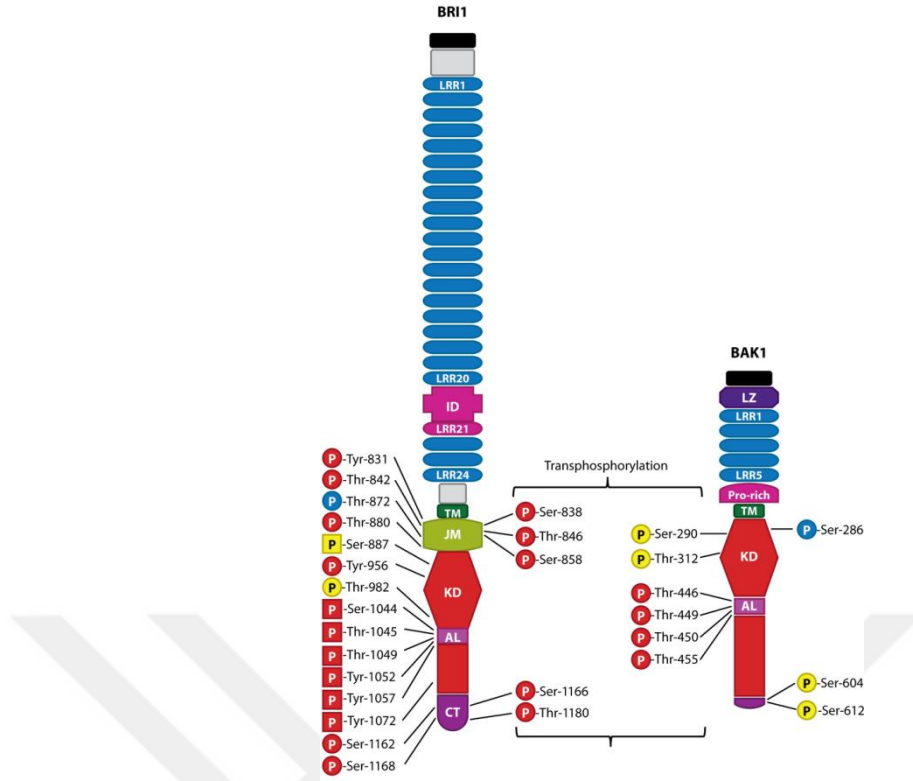
Bununla birlikte kemoterapi, kanser önleyici ilaçların hastaya ağız veya damar yolu ile verilmesi ile gerçekleştirilen tedavi şeklidir. Cerrahi ve radyoterapi destekli olarak verilebilmektedir. Cerrahi öncesi verilen kemoterapiye neoadjuvant, cerrahi müdahale sonrasında verilen kemoterapiye adjuvant adı verilir. Kemoterapide kullanılan ilaçlar genel olarak kanser hücrelerinin çoğalmasını engelleyecek şekilde geliştirilmişlerdir. Hedefleri kanser hücrelerinin DNA'larına hasar vermek ve yeni doku önleyiciler olarak karşımıza çıkmaktadırlar [28]. Bunlarla birlikte hedefe yönelik kemoterapotikler çıkmaya ve klinikte kullanılmaya başlanmıştır. Bu bağlamda hücre içerisindeki sadece tek bir proteini hedefleyen ilaçlar esas

kemoterapinin yanında hastalara verilmeye başlanmıştır. Bu hedefe yönelik tedavilerde özellikle kolorektal kanserlerde en fazla rastlanan Ras proteini mutasyonuna yönelik ilaçlar kullanılmaktadır. Bunlar Epitelyal Büyüme Faktörü (EGF) engelleyici ilaçlar olarak karşımıza çıkmaktadır [29]. Ayrıca tümörlerin aç kalmalarını sağlamak amacıyla damar oluşumunu engelleyen, anti-anjiyogenik ilaçlar da kullanılmaktadır [30]. Ancak yine bu durumlarda kanserin tedavisinde esas olarak kullanılan bu ilaçların yan etkileri arasında kusma, mide bulantısı, ishal ve nöropati oluşabilmektedir. Bunların yanında kemoterapiler çoğunlukla dolaşım sistemindeki lenfositlerin azalmasına, bu sebeple enfeksiyon riskinin artmasına yol açmaktadır.

Bu bağlamda Türkiye'de ve Dünya'da kolorektal kanserin önem verilmesi gereken kanser türlerinden biri olduğu ortaya çıkmış; kolorektal kanserin tanı ve tedavisinde yeni yöntem ve ilaçların oluşturulması için araştırma-geliştirme çalışmalarının yapılması gerekliliği ortaya çıkmıştır. Özellikle kemoterapotik ilaçlar açısından daha başarılı ve yan etkileri daha az ilaçların ortaya çıkarılması gerekmektedir.

2.2. Brassinosteroidler

Brassinosteroidler bitkilerde steroid kökenli hormonlardan olup bitki büyüme ve gelişme düzenleyicileri olarak görev yapmaktadırlar. Brassinosteroidler ilk olarak *Brassica napus* yani kanola bitkisinin polen özütünde keşfedilmiş, hücre büyümesinin düzenlenmesinde rol aldığı gösterilmiştir [31]. Daha sonra yüksek bitkilerde, bitkinin canlı ve büyüyen tüm dokularında sentezlendiği tespit edilmiştir. Bu aşamada bitkilerde yaklaşık 70 farklı brassinosteroid bulunduğu kayıtlara geçirilmiştir [32]. İzolasyonu oldukça zor olan brassinosteroidler aynı zamanda bitkilerde çok düşük konsantrasyonlarda bulunurlar. Yaklaşık olarak 230 kg bitki poleninden sadece 10 mg kadar brassinosteroid izole edilebilmektedir.



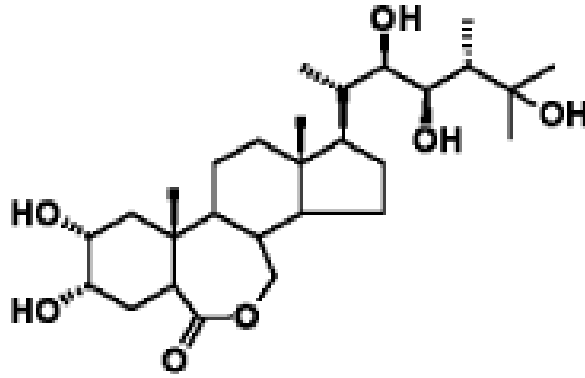
Şekil 2. 2. BRI1 ve BAK1 brassinosteroid reseptörlerinin proteomik yapıları [33].

Bu bitki büyüme düzenleyicileri, memelilerdeki tirozin-kinaz reseptörlerine benzer BRI1 ve BAK1 gibi reseptörlerin çalıştırılmasında brassinosteroidlerin görev aldığı gösterilmiştir [34] (Şekil 2.2.). Bununla birlikte brassinosteroidlerin steroid yapıda olmaları ve memeli hücrelerindeki etkileri bilinen steroid yapıdaki östrojenler ve androjenler ile benzer işleve sahip oldukları düşünülmektedir [35]. Bu anlamda 24-epibrassinolid adı verilen brassinosteroid ailesi üyesi bitki hormonunun memeli hücrelerindeki etkisi tam olarak bilinmemektedir ve araştırmalar devam etmektedir.

2.2.1. Epibrassinolid; Kökeni ve Kullanım Alanları

24-epibrassinolid (EBR) brassinosteroid ailesi üyelerinden biri olup yapılan daha önceki araştırmalarda çeşitli kanser türlerinde tedavi odaklı kemoterapötik ilaç özelliği gösterme potansiyeli olan bitkisel hormondur [36] (Şekil 2.3.). EBR genellikle brassinosteroidlerin izole edildiği bitkilerden olan *Brassica* bitki ailesi üyesi bitkilerinden izole edilmektedir.

EBR bitkilerde yaratılan oksidatif stres ve tuz stresi koşullarında belirli dozlarda bitkiyi stres koşullarından koruma işlevi gördüğü daha önceki çalışmalarda tespit edilmiştir [37-38]. Bununla birlikte nöronal hücrelerde çok düşük dozlarının antioksidan etkisi sayesinde hücreleri oksidatif stresten uzaklaştırdığı ve bu sayede hücrelerin apoptotik hücre ölümünden etkilenmelerinin engellediği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [39]. Benzer bir çalışmada *Lycopersicon esculentum* yani domates bitkisinde gerçekleştirilen tuz stresinde önden kısa süreli EBR uygulaması sonucunda bitkilerde gerçekleşen stres sonucu oluşan durumların azaldığı kaydedilmiştir [40].

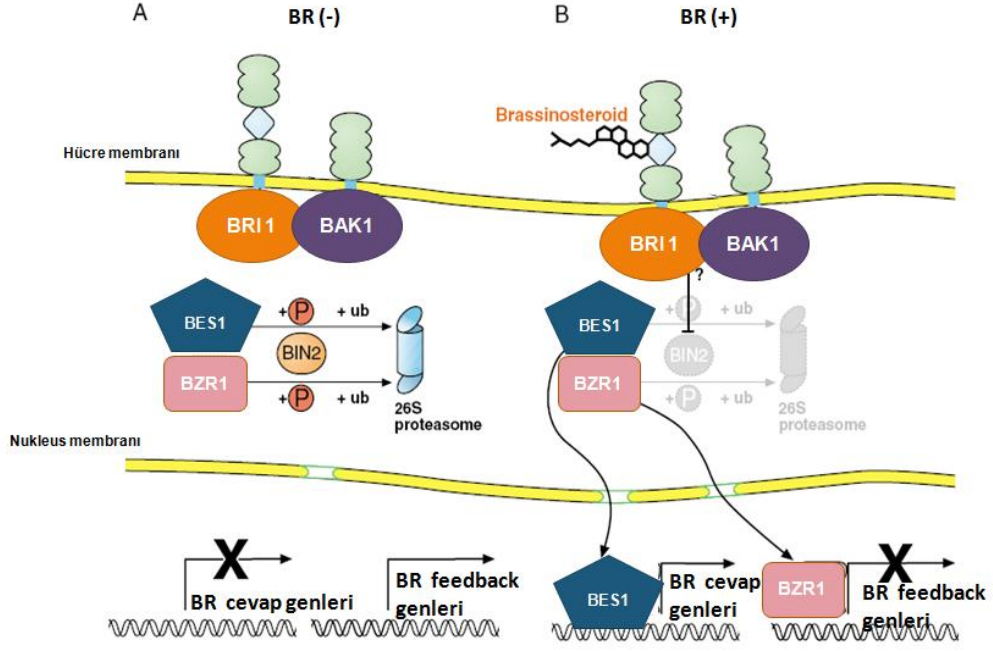


Şekil 2. 3. 24-epibrassinolid moleküler yapısı [41].

Daha önce yapılan çalışmalarda EBR'ın östrojen reseptörüne bağlı yollarla bağlantılı olacak şekilde meme kanseri hücrelerinde hücre ölümünü tetiklediği ve hücre döngüsünü durdurduğu gösterilmiştir [42]. Bununla birlikte prostat kanseri hücre hatlarında poliamin metabolizmasına bağlı olarak önemli apoptotik düzenleyici proteinlerden biri olan p53'ten bağımsız apoptozu prostat kanseri hücre hatlarında tetiklediği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [9]. Yapılan diğer bir çalışmada ise EBR'ın kolon kanseri hücre hatlarında MAPK yolları ve poliamin metabolizmasının düzenlenmesinin sağlanmasıyla apoptotik hücre ölümünü tetiklediği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [43].

2.3. EBR'nin Bitki Hücrelerinde ve Memeli Kanser Hücrelerinde Etkilediği Hücresel Yolaklar

EBR bitki hücrelerinde diğer brassinosteroidler ile benzer şekilde bitkilerdeki brassinosteroid reseptörlerinin aktifleştirilmesinde rol oynamaktadırlar. Bu durum bitkilerdeki stres durumunda hücrelerdeki brassinosteroid reseptörlerine bağlanarak hücrelerdeki stres durumundan daha az etkilenmelerinin sağlamaktadır [44-45]. EBR bitkilerde incelendiğinde BRI1 ve BAK1 reseptörlerinden, BRI1 reseptörüne bağlanarak bu reseptör ile BAK1 reseptörünün birlikte otofosforlanmasını sağlamaktadır. BRI1'in EBR ile etkileşime geçmesi sonucu hücre içinde Brassinosteroid Sinyali Kinazı 1 (BSK1) ve Temel Dönüşümsel Büyütme 1 (CDG1) proteinlerinin hücre içerisinde aktifleşmesine yol açmaktadır. Bu aktifleşme sonucunda dimerize olan bu iki protein hücrelerdeki BRI1 Susturucu 1 (BSU1) proteininin fosforlanmasına yol açmaktadır [46]. BSU1 burada bitkilerdeki GSK3 benzeri kinaz Brassinosteroidten etkilenen 2 (GSK3-like BIN2) proteininin defosforlanması sonucunda aktivitesinin durmasına yol açmaktadır [33]. EBR seviyesinin düşmesi durumunda hücrelerdeki BZR1 ve BZR2 adı verilen proteinlerin BIN2 tarafından fosforlanması sağlanır. Bu fosforlanma sonucunda 14-3-3 proteini tarafından işaretlenerek bu iki proteinin DNA bağlanma işlevi durdurulur ve transkripsiyon yapması engellenir [47]. EBR'ın fazla olması durumunda BIN2 proteini BSU1 tarafından proteozomal yıkımla inaktif hale getirilir ve PP2A proteini aracılığıyla BZR1 ve BZR2 proteinlerinin defosforlanma durumuna geçmesine sebep olur. Bu durumda hedefi olan proteinlerin transkripsiyonunu sağlamak üzere nukleusa göçmeleri sağlanır [48] (Şekil 2.4.).



Şekil 2. 4. Bitkilerde brassinosteroid reseptörleri ve etkiledikleri yollar[33].

Bitkilerdeki tirozin kinaz reseptörleri ile ilişkisi açısından irdelendiğinde EBR memeli hücrelerinde benzer işlevlere sahip tirozin kinaz inhibitörleriyle iletişime geçebileceği öngörülmektedir [49]. Bu bağlamda EBR'ın bitkilerde GSK3 benzeri protein BIN2'nin inhibisyonunun sağlanmasında yarattığı reseptör ligand ilişkisi açısından bakıldığında memeli hücrelerindeki tirozin kinaz reseptörleri ile zıt etkili olarak çalışarak memelilerdeki GSK3 β proteininin hücre çoğalmasını artırıcı etkisinin giderilmesinde etkili olacağı düşünülmektedir [50].

Bununla birlikte daha önce yapılan çalışmalarda hücrelerde EBR'nin ER stresine bağlı programlanmış hücre ölümünün tetiklenmesinde görev alan proteinlerden kalretikulinin seviyesinin düşürülerek stres cevabının artışına neden olarak apoptotik hücre ölümüne yol açtığı prostat kanseri hücre hatlarında gösterilmiştir [51].

2.4. Apoptoz

Özellikle karmaşık canlılarda hücrelerin belirli mekanizmaların kontrolü altında bölündükleri bilinmektedir. Bununla birlikte bazı mekanizmalar vasıtasıyla

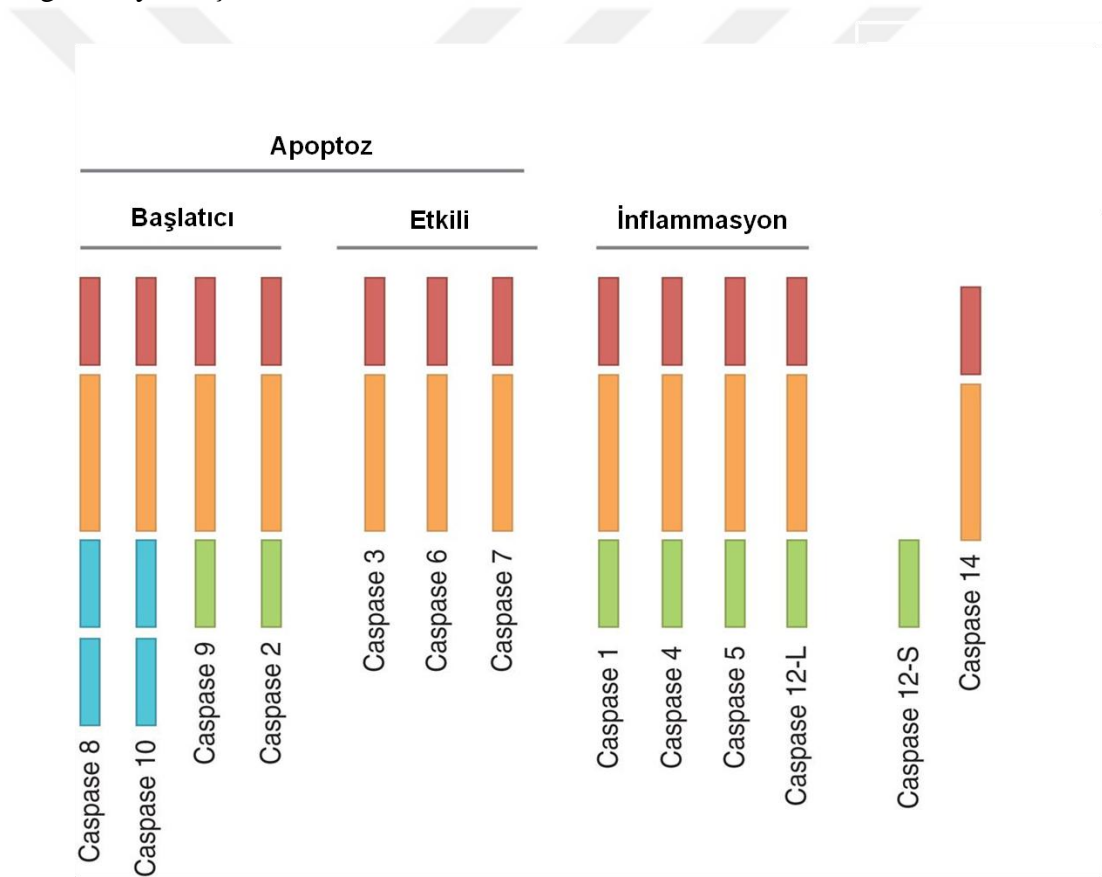
hücrelerin hayatlarına son verildiği öğrenilmiştir. Bu duruma önceden programlanmış hücre ölümü dense de şimdilerde eski Yunanca'da yaprak dökümü anlamına gelen apoptoz kelimesi kullanılmaktadır [52]. Apoptoz normal hücrelerde bağışıklık sistemi hücreleri tarafından, mutasyon geçirmiş kromozomların çiftlenmesi durumunda, hormonlar aracılığıyla ve normal embriyonik gelişimde rastlanan bir durum olarak karşımıza çıkmaktadır [53]. Bu durumların yanısıra DNA hasarına yol açan UV radyasyonu, iyonize radyasyon, oksidatif stres, replikasyon hataları ve genotoksinler de apoptozu tetikleyen etmenler arasındadır [54-55].

2.4.1 Apoptozun Moleküler Mekanizması

Hücrelerde apoptozun gerçekleştirilmesinde görevli proteinlerin görev aldığı farklı yollar çalışmaktadır. Bunlardan kaspazlara bağlı olan, kaspazlardan bağımsız ve mitokondrial etkileşim ile gerçekleşen apoptoz şekilleri tespit edilmiştir. Kaspaz genel sistein proteazlara verilen bir isim olarak karşımıza çıkmakta olup farklı kaspazlar farklı faktörler tarafından uyarılarak apoptozu tetiklemektedirler. Örneğin; TNF- α kaspaz-8 in kesilmesini sağlayarak kaspaz kaskadını başlatmaktadır [56]. Mitokondri üzerindeki Bcl-2 proteininin aktifleşmesiyle birlikte Bcl-2 ailesi proteinlerinden olan Bax, Bim, PUMA gibi apoptozu teşvik eden proteinlerin aktifleşmesini ve böylece mitokondriden sitokrom c salınımının gerçekleşmesi ve kaspaz-9'un kesilmesi ve kaspaz kaskadının başlaması şeklinde bir hücre ölüm yolağının açılması sağlanabilmektedir. Aynı zamanda UV veya X-ışınları sebebiyle oluşan reaktif oksijen türevlerinin artması da mitokondri membranının düzenini bozarak bu durumu sağlayabilmektedir [57]. Bu durumların yanısıra UV'nin direkt olarak mitokondriyi etkilemesi ve sonucunda AIF (Apoptoz Tetikleyici Faktör) proteini vasıtasıyla veya endoplazmik retikulum vasıtasıyla oluşturulan DNA hasarının onarılmasını engellenmesi PARP-1 (Poly ADP riboz polimeraz) proteininin anlatımının artması ve kesilmesi sonucunda bu proteinin görevi olan DNA hasarının onarılmasının engellenmeyecek şekilde kesilmesinin gerçekleşmesi ve kaspazlardan bağımsız apoptozun tetiklenmesini sağlamaktadır [58].

2.4.1.1. Kaspazlar

Apoptoz sinyallerinden oluşan mekanizmada görevli proteinlerin genleri ilk kez *C. elegans* model organizmasında belirlenmiştir. Bu canlının gelişimi sırasında 1090 somatik hücrelerinden 131'i apoptoz aracılığıyla ölmektedir [59]. Apoptozu sağlayan proteinler CED proteinleri olup bu proteinlerin memelilerdeki homologları kaspaz adımları alan sistein proteazlardır [60]. Sistein proteazlar hücrelerde kesilmemiş formları ile sentezlenirler. Kaspazların homodimerizasyonu, proteolitik yıkım ya da başka proteinlerle etkileşime geçerek kesilimleri gerçekleşmekte ve aktifleşmektedirler [61]. Memelilerde kaspazların 14 izoformu bulunmaktadır ve başlatıcı kaspazlar, etkili kaspazlar ve inflammatuar kaspazlar olmak üzere 3 farklı gruba ayrılmışlardır.



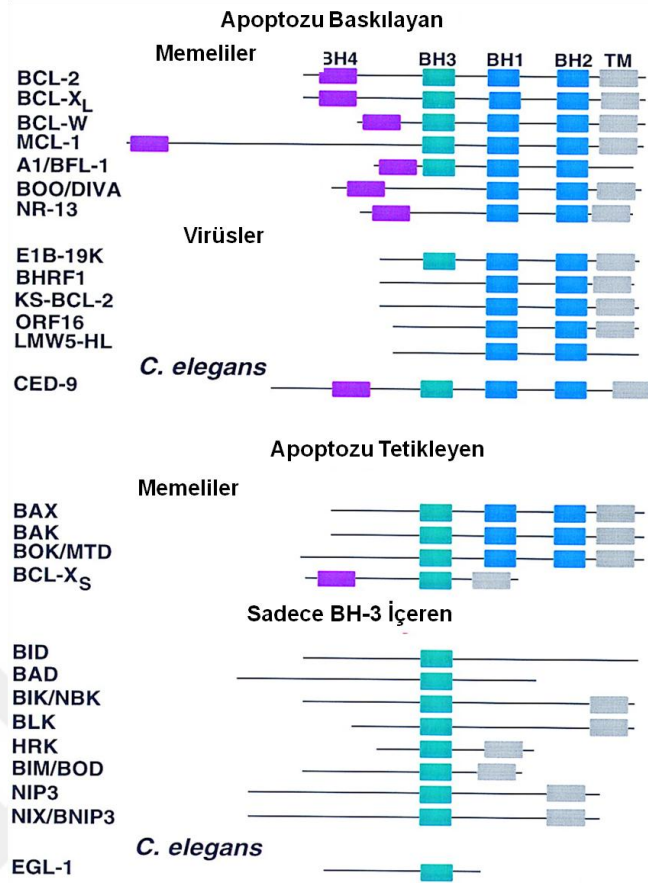
Şekil 2. 5. Memeli hücrelerinde görevli kaspaz proteinleri [62].

Başlatıcı kaspazlar kaspaz-2, 8, 9, 10 olmak üzere 4 tanedir (Şekil 2.5.). Kaspazlar mitokondri veya hücre zarındaki reseptörlerden gelen hücre ölümü sinyalleri ile

aktifleşerek etkili kaspazları kesmesini ve aktifleştirmesini sağlayarak apoptotik sinyalin çalışmasını sağlarlar [62]. Cellat kaspazlar olarak da adlandırılan etkili kaspazlar kaspaz-3, 6 ve 7'nin kaspaz kaskadının sonucunu oluşturduğu (Şekil 2.5.), esas olarak kaskadın sonunda kaspaz-3'ün esas işlevi gördüğü, bu işlevlerinin apoptozda gerekli kromatin farklılaşması, DNA parçalanması, çekirdeğin çökmesi gibi durumlarını sağladığı, esas işlev olarak DNA onarımını engellemek için PARP kesilimini gerçekleştirdiği, Lamin A proteinlerinin kesilimini gerçekleştirerek hücre morfolojisini bozduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [63].

2.4.1.2. *Bcl-2 Ailesi*

Apoptozun tetiklenmesi iki farklı şekilde, mitokondri kaynaklı veya hücre membranındaki ölüm reseptörleri aracılığıyla olabilmektedir. Bu bağlamda ölüm sinyalinin kaynağı hangisi olursa olsun hücre ölümü sinyali Bcl-2 ailesi proteinleri ile düzenlenmektedir. İlk olarak Burkitt lenfomasında sağkalımı tetikleyen protein olarak keşfedilen Bcl-2 proteinini de kapsayan Bcl-2 ailesi proteinleri iki ana gruba ayrılmaktadır; apoptozu tetikleyenler ve apoptozu baskılayanlar [64]. Bcl-2 ailesi üyesi proteinlerinde 4 farklı homoloji bölgesi bulunmaktadır. Bunlar BH1, BH2, BH3 ve BH4 olarak isimlendirilmektedir. Bu bölgelerden BH1, BH2 ve BH3 bölgelerini barındıran Bax, Bak gibi proteinler ve sadece BH3 bulunduran Bim, Bid, Bad gibi proteinler apoptozu tetikleyen Bcl-2 ailesi proteinlerindedir. Ayrıca BH4 bölgesini içeren Bcl-2, Bcl-x_L, Mcl-1 gibi proteinler ise apoptozu baskılayan Bcl-2 ailesi proteinleridir [65-66] (Şekil 2.6.).



Şekil 2. 6. Bcl-2 protein ailesi üyeleri ve BH bölgeleri bulundurma durumları [67].

Bcl-2 ailesi proteinlerinden apoptozu teşvik edenler mitokondrinin dış membranında bulunarak burada mitokondri membran geçirgenliğini değiştirerek mitokondriden sitokrom c, AIF gibi moleküllerin salınımını tetikleyerek apoptozu teşvik ettikleri bilinmektedir [68]. Apoptozu teşvik eden Bcl-2 protein ailesi üyeleri bu durumu mitokondri membranı üzerinde iyon kanalları oluşturabilme yetenekleriyle oluşturabildikleri gösterilmiştir [69]. Apoptozu baskılayan Bcl-2 ailesi proteinleri ise bu iyon kanallarının açılmasını zıt yönde etkileyerek işlevlerini gerçekleştirmektedirler.

2.4.2. Apoptoz Tipleri

Hücrelerde şimdiye kadar tespit edilmiş iki ana apoptoz yoluğu bulunmaktadır. Bunlar dışsal-reseptör bağımlı yolak ve içsel yolak olarak adlandırılmaktadır. Ancak bu iki yolak hücre içerisinde çapraz etkileşim ile hücre ölümüne yol açabildiğı gösterilmiştir [70].

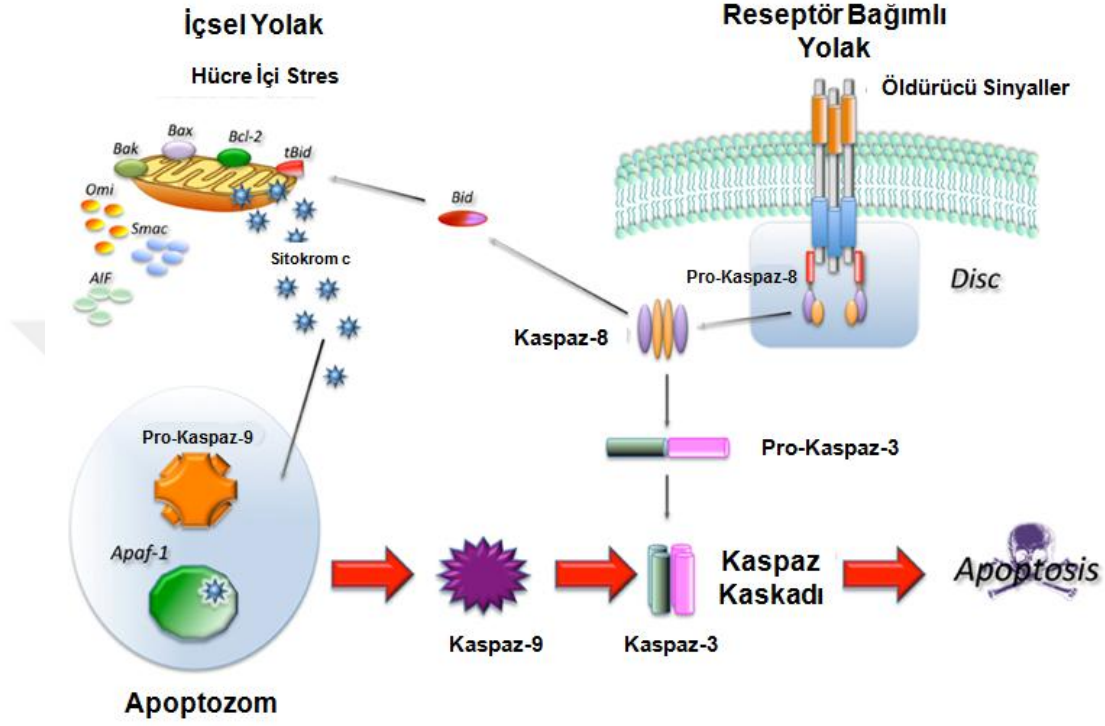
2.4.2.1 Reseptör Bağımlı Apoptotik Yolak

Hücrelerde TNF- α gibi ölüm reseptörlerinin düzenlenmesi ve sonucunda kaspaz-8'in kesilmesi ile sonuçlanan, sonucunda kaspaz kaskadının başlatılması şeklinde yürüyen yolak reseptör bağımlı yolak olarak adlandırılmaktadır [71]. Reseptör bağımlı yolak ile tetiklenen apoptoz iki şekilde gerçekleşmektedir. Bunlardan ilki; ölüm reseptörleriyle aktifleşen kaspaz-8'in etkili kaspazları aktifleştirmesi şeklinde gerçekleşir. İkincisi ise; yine ölüm reseptörleri aracılığıyla aktifleşen kaspaz-8, Bcl-2 ailesi üyelerinden Bid'in kesilimine ve sonuç olarak mitokondriyel apoptotik yoluğu aktifleştirmesine sebep olmaktadır [72] (Şekil 2.7.). Reseptör bağımlı yolakta ölüm reseptörlerinin ligandlarıyla bağlanmasının ardından kaspaz-8 ve kaspaz-10 ile etkileşime geçerek ölümü tetikleyen sinyal kompleksinin (DISC) oluşması sağlanmalıdır. Hücre içinde bu kompleksin oluşmasını engelleyen kaspaz-8 homologu olan FLICE (FADD-benzeri interlökin-1 β çevren enzim) inhibitör proteini (FLIP) [31] ise hücrede apoptozu baskılayıcı görev üstlenmektedir [73].

2.4.2.2. İçsel Apoptotik Yolak

Mitokondri membranının geçirgenliğinin bozulması sonucunda hücrelerde bir ölüm sinyali oluşmaktadır. Bu durum içsel apoptotik yolak olarak adlandırılmaktadır. Mitokondri membranı geçirgenliğinin bozulması sonucunda sitoplazmaya sitokrom c, AIF, DIABLO, bir DNAaz olan endonukleaz G gibi proteinlerin salınımı gerçekleşmektedir [74]. Salınımı gerçekleşen sitokrom c aktif olmayan halde bulunan Apaf-1 molekülüne bağlanarak apoptozom kompleksini oluşturmaktadır. Apoptozom kompleksi kaspaz-9 kesilmesine sebep olarak etkileyici kaspazların kesilmelerini tetikler [75] (Şekil 2.7.). Sonuç olarak kaspaz-9 vasıtasıyla kesilimi

gerçekleşen etkili kaspazlardan kaspaz-3 hücrenin apoptozu gerçekleştirmesini sağlar.



Şekil 2. 7. İçsel ve reseptör bağımlı apoptotik yollar [76].

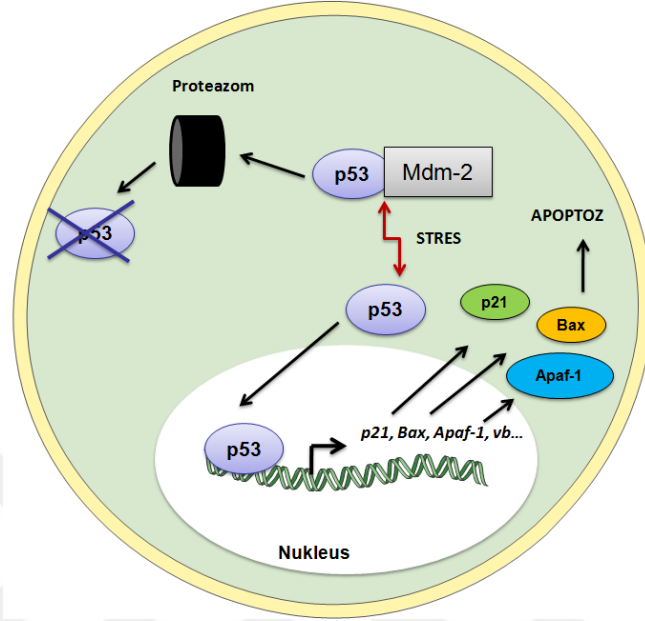
Hücrelerde bu yolların çalışmasında etkili proteinlerden biri olan p53, DNA hasarı, hipoksi ve aşırı onkogen anlatımı durumlarında hücrenin apoptoza gönderilmesinde görev alan tümör baskılayıcı bir protein olma özelliğindedir [77]. p53 hücrelerde belirtilen koşulların sonucunda hücrelerin içsel apoptotik yolağın aktifleştirilip aktifleştirilmemesinde hücrenin karar vermesini sağlayan kilit protein olarak karşımıza çıkmaktadır [78].

2.4.2. p53

p53 hücrelerde genomun gardiyanı olarak adlandırılan aslen tümör baskılayıcı protein olarak *TP53* geninden üretilen, hücrelerde stres ve DNA hasarı durumlarında hücreyi apoptoza sürükleyen bir protein olarak karşımıza çıkmaktadır [79]. p53'ün hücrelerdeki apoptozu tetikleme işlevini gerçekleştirmesi apoptozu tetikleyen proteinlerin anlatım seviyelerini düzenleyerek gerçekleşir. Bu durum mitokondri membran geçirgenliğini düzenleyen proteinlerin anlatım seviyelerini değiştirmesi aracılığıyla apoptozun tetiklenmesi şeklinde gerçekleşmektedir [80-81]. Kanser oluşumuna sebep olan p53 mutasyonlarının %80'i p53'ün DNA'ya bağlanma bölgesinde gerçekleşmektedir [82]. Bu bağlamda p53'ün anlatımını düzenlediği proteinler mitokondri membranının geçirgenliğini düzenleyen Bax, PUMA, Bim gibi Bcl-2 ailesi proteinleri olup Bcl-2 ve bu ailenin üyelerinin büyük bir kısmının anlatımının düzenlenmesinde p53 görev almaktadır [83-84].

p53 metabolizması hücrelerde MDM-2 adı verilen bir protein vasıtasıyla sağlanmaktadır. MDM-2 hücre sitoplazmasında p53 ile doğrudan bağlantı kurarak diğer proteinler ile kurduğu iletişim sonucu p53 proteininin aktivitesini düzenlemekle görevli proteindir [85]. p53'ün hücrelerdeki apoptotik işlevinin düzenlenmesinde görevli proteinlerin esas hedefi bu sebeple MDM-2 proteini olmakta olup MDM-2'nin aktivitesinin değiştirilmesi vasıtasıyla hücrelerde p53'ün aktivitesi düzenlenmektedir. Ayrıca p53'ün aktivitesinin düzenlenmesi MDM-2'yi p53 ile direkt bağlantı kurarak ubiquitin aracılı proteozomal bozunması yolu ile gerçekleştirebilmektedir [86-87] (Şekil 2.8.). Benzer şekilde, p53'ün aktivitesi translasyon sonrası düzenlenme mekanizmalarından fosforlanma vasıtasıyla düzenlenmektedir. Bu düzenlenme işleminde p53'ün düzenlenmesinde en fazla işleve sahip olan fosforlanma bölgesi Ser15 olarak karşımıza çıkmaktadır. Ser15 fosforlanma bölgesi p53'ün DNA hasarı durumunda yanıt olarak oluşturulan aktivasyon bölgesi olarak karşımıza çıkmaktadır [88-89]. Aynı zamanda metabolik stres ve glukoz eksikliği durumlarında da p53'ün Ser15 üzerinden fosforlanma geçirdiği bilinmektedir [90]. Ancak bu durum p53'ün aktivitesini sağlamakla birlikte

MDM-2 ile p53 arasındaki ilişkide Ser15 fosforlanması durumunda MDM-2'nun p53'ü proteozomal yıkımında aktif rol oynayan fosforlanma bölgesi olduğu da belirtilmiştir [91] [92].



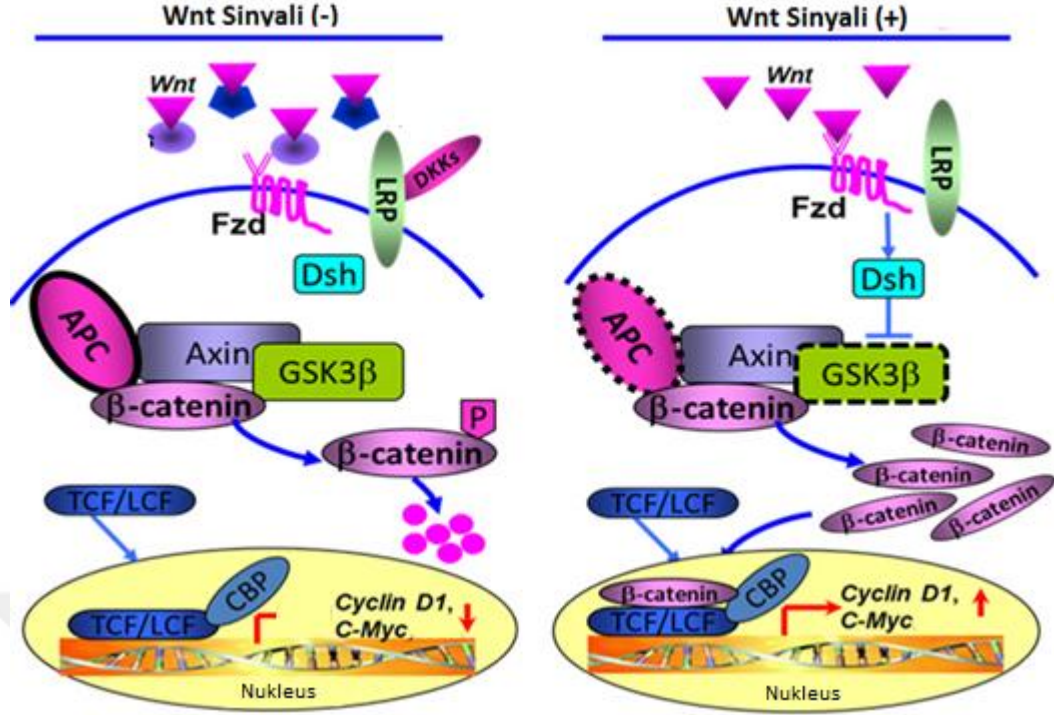
Şekil 2. 8. p53'ün aktivitesinin kontrolü MDM-2 aracılığı ile sağlanır.

p53 proteininin aktivitesinin düzenlenmesinde görevli diğer bir molekül olarak GSK3 β proteini karşımıza çıkmaktadır. GSK3 β proteini ile p53'ün direkt olarak bağlantıya geçerek, p53'ün transkripsiyonel aktivitesinde farklılık gerçekleştirdiği tespit edilmiştir [93]. Bununla birlikte yapılan çalışmalarda GSK3 β 'nin MDM-2 proteinin fosforlanmasını tetikleyerek p53 proteini havuzunu düzenlediği de tespit edilmiştir [94]. Ancak hücrelerde glikojen metabolizmasının düzenlenmesinde görevli protein olan GSK3 β proteini aynı zamanda bazı kanser türlerinde Wnt yolağı ile olan etkileşimi sebebiyle hücrelerde çoğalmayı tetikleyici etki gösterebilmekte, kanser hücrelerindeki önemli apoptoz yollarından bağımsız bir şekilde hücrelerin bölünme durumlarını agresif bir hale getirebilmektedir [95].

2.4.3. GSK3 β

Hücrelerde glikojen metabolizmasının düzenlenmesinde görev alan, hem bitki hücrelerinde hem de memeli hücrelerinde analogları bulunan, hücrel metabolik stres durumunda hücre sağkalımı ile alakalı proteinler tarafından aktivitesi düzenlenen, memelilerdeki formu 47 kDa olan proteindir. Memeli hücrelerinde esas olarak Wnt yolağı ile etkinliğini gösteren GSK3 β bu yolak vasıtasıyla hücrede büyümeyi teşvik etme ve sağkalım durumlarının düzenlenmesinde görevli protein olarak karşımıza çıkmaktadır [96]. GSK3 β bu aktivitesi vasıtasıyla Wnt yolağındaki GSK3 β 'nın da içerisinde yer aldığı protein kompleksinin ayrılmasını sağlayan reseptörler vasıtasıyla β -katenin proteininin nukleusa göçmesi sağlanarak hücrelerdeki sağkalım yolağının çalışması sağlanmaktadır [97].

Wnt proteinini ligand olarak tanıyan frizzled (kıvrılmış) ve LRP5/6 (lipoprotein reseptörü ilişkili protein 5/6) G-proteini ile ilişkili reseptörleri, Wnt proteini yokluğunda APC, Aksin, CK1 ve GSK3 β 'dan oluşan protein kompleksinin birbirlerinden ayrılmalarını sağlayamamaktadırlar. Bu durum β -katenin proteininin fosforlanmasına yol açmaktadır. Fosforlanan β -katenin ubikuitin aracılı proteozomal yıkım ile işlevini yerine getiremez hale getirilmektedir. Ancak Wnt proteininin bu reseptörlere bağlanması sonucunda frizzled reseptörüne bağlanan dishevelled (karmakarışık) proteini vasıtasıyla bahsedilen kompleksteki proteinler birbirlerinden ayrılmakta, bu kompleksteki proteinlerden Aksin proteini LRP5/6 reseptörüne bağlanarak kompleksin işlevini kaybetmesine ve GSK3 β aracılığıyla gerçekleşen β -kateninin fosforlanmasının engellenmesine sebep olmaktadır [98]. Bu durumda β -katenin nukleusa geçerek TCF/LEF (T-cell factor/lymphoid enhancer factor) ile birlikte hedef genlerinin anlatımını sağlar. Hücrelerde hedef genleri inflamasyon oluşturan genler olduğu bilinmektedir [99] (Şekil 2.9.).



Şekil 2. 9. Wnt sinyal yolağının aktifleşmesi ve β -catenin'in nukleusa göçü [100].

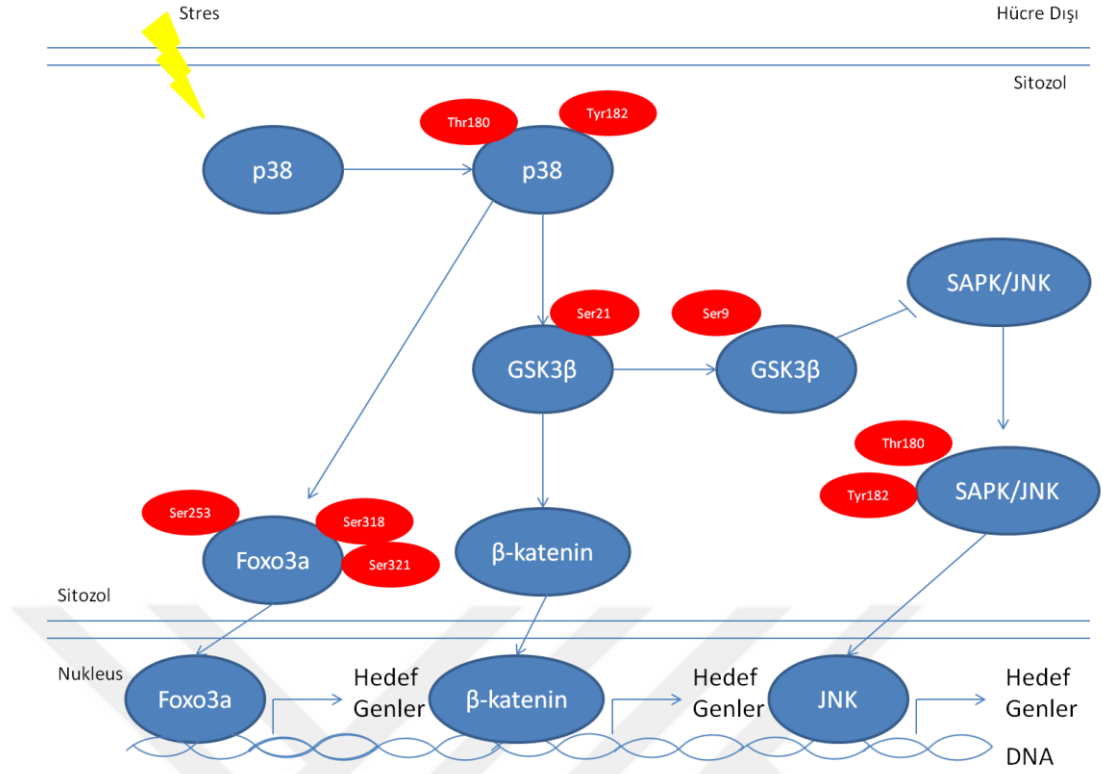
GSK3 β 'nin düzenlenmesinde görevli başlıca protein olarak öncelikle insülin reseptörü tarafından aktivitesi kontrol edilen PI3K (Fosfoinositol 3 kinaz) ve PI3K vasıtasıyla aktifleştirilen Protein Kinaz B diğer bilinen adıyla Akt proteini GSK3 β 'nin inhibisyonunu sağlayarak glikojen sentezini yavaşlatır. Bu duruma aynı zamanda PDK-1 (Protein Kinaz-1) proteini de sebep olmaktadır. Böylece hücrede kullanıma hazır glikozların miktarı artarak hücreye fazladan enerji sağlar [101]. Ancak kanser hücrelerinde GSK3 β inhibisyonu hücrelerdeki stres seviyesinin artışına sebep olarak hücrelerin sağkalım yollarının çalışmasının durdurulmasına yol açmaktadır [102]. Bununla birlikte GSK3 β aktivitesi tau adı verilen ve mikrotübül sabitlenmesinden sorumlu olan proteinin aşırı fosforlanmasına sebep olmaktadır [103]. Aşırı fosforlanan tau proteini amiloid- β proteininin düzgün şekilde iskelet yapısı kurmasını sağlayamadığından bu proteinin birikmesine sebep olarak sinir hücrelerinde toksik etki yapmasının sonucunda AD oluşmasına sebep olmaktadır [104].

2.4.4. MAPK Yolağı, FoxO3a, SAPK/JNK ve Apoptotik Hedefleri

MAPK'lar, yani mitojen ile aktifleşen protein kinazları hücrelerde hücre dışından gelen sinyalleri hücre içerisinde etkilerinin gerçekleştirilmesinde görev alan, hücrelerde bu bağlamda farklı MAPK yolları kullanılarak gen anlatımları, mitoz, metabolizma, hücre hareketleri, sağ kalım, apoptoz ve farklılaşma süreçlerinin düzenlenmesini sağlamaktadırlar [105].

p38 ilişkili MAPK sinyal yolağı hücrelerde stres ile düzenlenen MAPK olarak kayda geçmektedir. p38'in aktifleşmesini sağlayan etkenlerden UV radyasyonu, hipoksi koşulları, oksidatif stres gibi durumlardan etkilenebilmektedir [106]. p38'in etkilediği proteinler göz önüne alındığında FoxO3a proteininin fosforlanmanın azalmasına yol açarak FoxO3a proteininin nukleusa göçmesini sağlamakta, bu durumda FoxO3a'nın transkripsiyonel aktivitesini tetikleyerek hücrelerde apoptozu teşvik etmektedir [107]. FoxO3a p38 MAPK, Akt yolağına alternatif olarak hücrelerde GSK3β'nın inhibe olmasına ve hücre çoğalma sinyalinin kesilmesine sebep olabilmektedir [108]. FoxO3a proteininin diğer bir transkripsiyon aktivitesini düzenleyen protein olarak 14-3-3 proteinlerinden 14-3-3z karşımıza çıkmaktadır [109]. 14-3-3z FoxO3a proteinine nukleusta bağlanarak sitoplazmaya tekrar göçmesini sağlamakta ve bu cevabın geri çekilmesinde görev almaktadır.

Bir diğer MAPK sinyal yolağı oyuncusu olan SAPK/JNK yani stres ile ilişkili protein kinazları/c-jun N-terminal kinazı hücrelerde farklı MAPK yollarından etkilenebilmektedir. SAPK/JNK sinyal kaskadı onkogenlerin anlatımını arttırdığı ve böylece sağkalım sinyali tetiklenmektedir [110]. Bu bağlamda SAPK/JNK proteininin aktivitesinin azalması kanser hücrelerinde hayatta kalım sinyalinin kesilmesine ve apoptozun teşvik edilmesi anlamına gelmektedir. Bununla birlikte yapılan çalışmalarda GSK3β'nın SAPK/JNK fosforlanmasını azaltarak hücrelerde sağkalım sinyalini kestiği aynı zamanda EBR'ın farklı hücre hatlarında SAPK/JNK fosforlanmasını azaltarak hücre sağkalım yollarının etkinliğini azalttığı belirlenmiştir [111] (Şekil 2.10.).



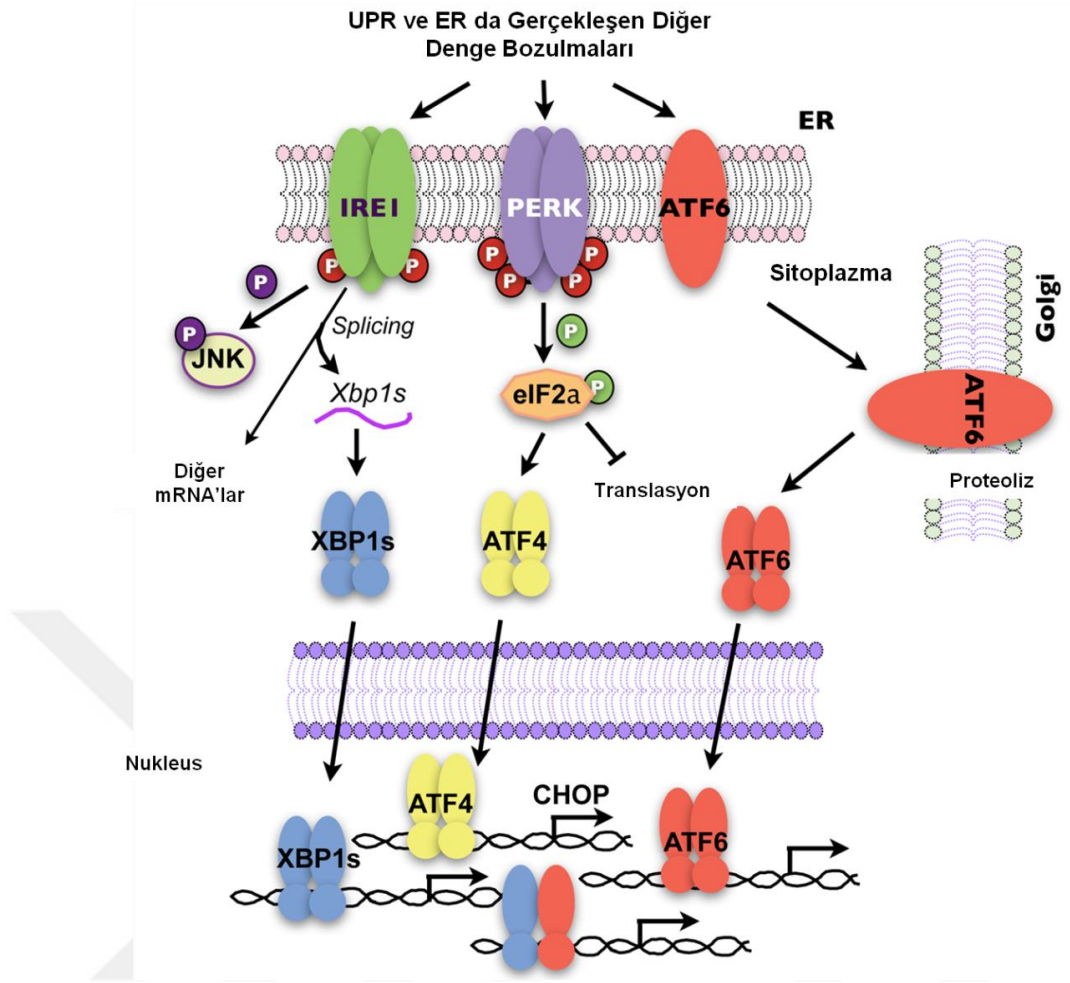
Şekil 2. 10. p38 MAPK ve etkilediği yolaklar.

p38 MAPK proteini fosforlanması vasıtasıyla düzenlenen p70S6K proteini hücrelerde mTOR kompleksi düzenlenmesi sağlanan bir protein olarak karşımıza çıkmakta olup hücrelerde translyasyon mekanizmasının düzenlenmesine görevli bir protein olarak karşımıza çıkmaktadır [112]. Hücrelerde p38 MAPK fosforlanması ile GSK3β fosforlanmasının düzenlenmesinin yanında hücrelerdeki p70S6K proteininin de fosforilasyon seviyesini düşürerek hücrelerde protein anlatımının azalmasına yol açmakta ve hücrelerdeki ER stres durumunun oluştuğunun habercisi olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [113].

2.5. Endoplazmik Retikulum Stresi

Hücrelerde protein anlatımının ve katlanmasının düzenlenmesinde görevli olan organel olarak karşımıza ER çıkmaktadır. Hücrenin ihtiyaç duyduğu protein anlatımı seviyesi normal durumların üstüne çıktığında, hücrelerdeki ER'da bulunan protein katlayıcı proteinler yani şaperonlar yetersiz kalmaktadır. Bu durumda hücrelerde UPR oluşmaktadır. Bununla birlikte katlanmamış protein cevabının hücrede yarattığı stres durumuna endoplazmik stres adı verilmektedir [114].

ER stres sonucunda oluşan UPR hücrelerde 3 farklı ER reseptör proteini görev almaktadır. Bunlar; inositol gerekliliği proteini-1 α (IRE1 α), protein kinaz RNA benzeri ER kinazı (PERK) ve aktifleşen transkripsiyon faktörü-6 (ATF6) olarak karşımıza çıkmaktadır [115]. Bu proteinleri ER şaperonların immünoglobine bağlanan protein (BiP) inhibe etmektedir. ER stres durumunda BiP'in şaperon işlevini yerine getirmek için bu proteinlerden ayrılması UPR'ın oluşumunu tetiklemektedir [116]. Bu aşamada PERK ve IRE1 α proteinleri otofosforlanma geçirerek dimerize olur ve hedeflerinin tetkilenmesini sağlamaktadır. ATF6 ise bu durumda ER membranından Golgi aparatına taşınır ve modifikasyon geçirir. Modifikasyon geçiren ATF6 nükleusa göç gerçekleştirerek hedef proteinlerinin anlatımını gerçekleştirir [117-118] (Şekil 2.11.).

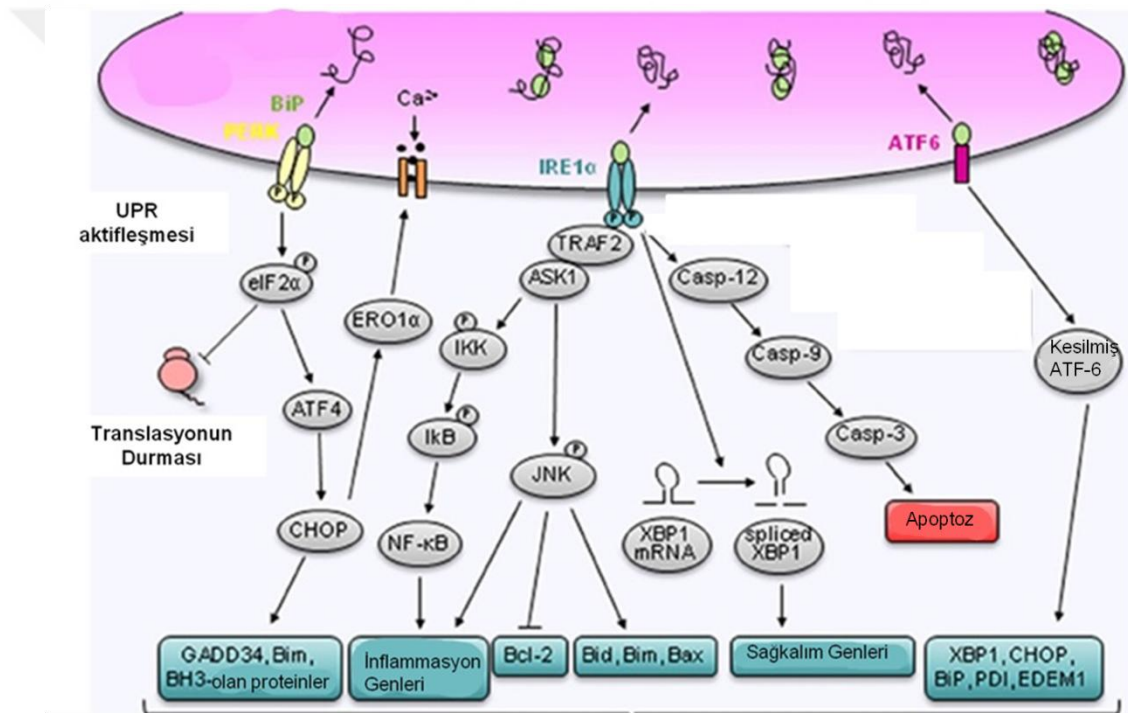


Şekil 2. 11. ER stress durumunda UPR oluşturan proteinler ve yolları [119].

UPR'ı oluşturan proteinlerden IRE1 α , RNAaz aktivitesi sayesinde X-box protein-1 (XBP-1) proteininin RNA'sının kesilmesini sağlayarak işlevli XBP-1 proteinini oluşturulması sağlanır. Bu vasıtayla hücrelerde XBP-1'in transkripsiyon görevi açılarak hücrelerde stresin önüne geçecek proteinlerin anlatımını arttıracak şekilde işlev görmesini sağlar [120]. Bununla birlikte IRE1 α TNF reseptörü bağlantılı faktör (TRAF2) ve apoptoz sinyali düzenleyici kinaz-1 (ASK1) kompleksi aracılığıyla Janus Kinaz (JNK) proteininin fosforlanmasını sağlar. JNK bu aşamada apoptozu teşvik eden proteinlerin anlatımlarını artırırken apoptozu baskılayan proteinlerin anlatımlarını azaltır. Aynı zamanda TRAF2 ve ASK1 kompleksi aracılığıyla aktive olan IKK (I κ B kinaz) ile NF- κ B sinyalini aktifleştirerek hücrelerde yangı durumunun oluşmasını teşvik etmektedir [121]. IRE1 α aynı zamanda ER strese bağlı kaspaz

kaskadının ilk aşaması olan kaspaz-12'nin aktifleşmesinde rol oynamaktadır [122] (Şekil 2.12.).

UPR'in oluşturulmasındaki diğer protein olan PERK; geçirdiği otofosforlanmasından sonra ökaryotik başlatma faktörü 2α'nın (eIF2α) fosforlanmasını sağlayarak translasyonunun durmasını tetiklemektedir [123]. Bununla birlikte ATF4 proteininin nükleusa göçmesini sağlayarak CHOP proteininin anlatımının artmasını sağlamaktadır [124]. CHOP proteini anlatımı olduğunda nükleusa FOXO3a proteini aracılığı ile sağlanmaktadır. Bu koşullar sağlandığında CHOP proteini hücrelerde PUMA, Bim gibi apoptozu teşvik eden, normalde p53 proteini ile anlatımı sağlanan proteinlerin anlatımını tetiklemektedir [124].



Şekil 2. 12. Memeli hücrelerindeki ER stres yolları ve hedef proteinleri [125].

Bunlarla birlikte ATF6; ER stres oluşması durumunda Golgi aparatına vesikül aktarımı ile geçerek burada bölge-1 ve bölge-2 proteazları vasıtasıyla modifikasyona uğrattılır. Sonucunda modifiye olan ATF6 nükleusa geçerek hedef proteinlerinin anlatılmalarını sağlar. ATF6'nın hedef genleri ER şaperonlarıdır [126]. Bu aşamada ATF6'nın göçüyle birlikte BiP proteininin yanısıra ER membranına bağlı kalneksin

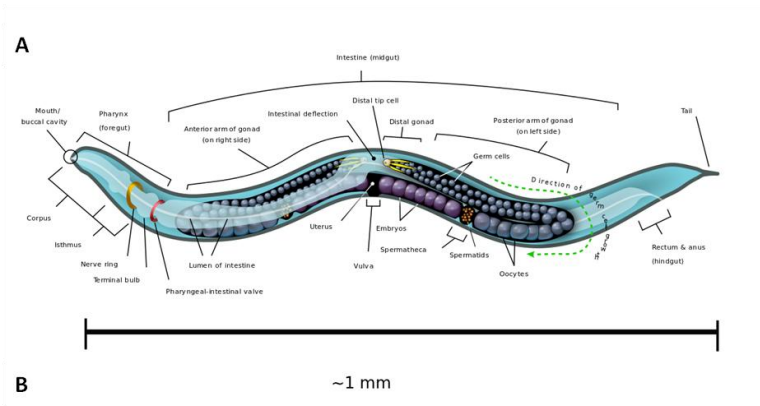
ve ER lümeninde serbest şekilde işlevini gören kalretikulin gibi şaperonların anlatımlarının da düzenlenmesinde görev almaktadır. Bu aşamada kalneksin ve kalretikulin aynı zamanda hücredeki kalsiyum metabolizmasının da düzenlenmesinde görev almaktadır. Bu görevin yanında kalneksin ve kalretikulin proteinlerin doğru katlanıp katlanmamalarının kalite kontrolünde de görev almaktadırlar [127-128] (Şekil 2.12.).

2.6. Model organizma olarak *Caenorhabditis elegans*

C. elegans kendi başına yaşayabilen yani parazit olmayan nematod sınıfındaki bir organizmadır. İlk olarak anatomisinin ve davranışlarının iyi bilinmesi sebebiyle 1965 yılında Sydney Brenner tarafından model organizma olarak gösterilmiştir. Bu buluş "Doğa'nın Bilime Armağanı" adıyla yayınlanması sonucunda 2002 yılında Sydney Brenner'a nobel ödülü kazandırmıştır [129].

C. elegans genomu az miktarda ve kısa intronlarıyla birlikte içerdiği 100 milyon baz çifti ve 20.000 gen içermekle birlikte insan genomunun %3'ü, *Escherichia coli* prokaryotik organizma genomunun 20 katı büyüklüğündedir [130]. Biyoinformatik analizler sonucu *C. elegans* genomunun memeli genomu gen ve gen ürünleri ile %40 homoloji gösterdiği, özellikle insan hastalık genleri ile %65 oranında benzerliği bulunduğu bilinmektedir [131]. 6 çift homolog kromozomu bulunup bunlardan 5 tanesi otozomal kromozomlarını 1 tanesi ise cinsiyet kromozomlarını belirtmektedir. Nematod hermafrodit ve erkek birey olmak üzere iki farklı cinsiyete sahip olabilmektedir. Hermafrodit bireyler XX genotipine sahip olup sperm ve yumurtanın her ikisini de üretebilmekte, kendi kendini dölemekle birlikte homozigot bireyler oluşturup genetik olarak identik döllere meydana getirebilirken erkek birey tarafından da kemotaksis yönlendirmeleri ile döllenmektedirler. XO genotipine sahip erkek bireyler yalnızca sperm üretebilme kapasitesine sahiptirler ve bir hermafrodit birey ile çiftleşebilirler. Hermafrodit bireyler ile erkek bireyler arasındaki L4 aşamasında belirginleşen fizyolojik farklardan biri de hermafroditlerdeki kuyruk yapısının sivri

uçla sonlanması, erkek bireylerdeki kuyruk yapısının ergin bireylerde küreksi bir hal almasıdır [132].



Şekil 2. 13. A) *C. elegans* model organizmasının anatomik yapısı [133] ve B) ergin *C. elegans* model organizmasının mikroskopik görüntüsü [134]

C. elegans'lar üzerinde genetik, toksikolojik ve hastalık modellemeleri üzerine deneyler yapılabilmektedir. Bu aşamada model organizma olarak mutant bireylerin oluşturulması ve farklı suşların elde edilmesi sağlanmıştır [135]. *C. elegans* model organizmasını özellikle diğer model organizmalardan ayıran tarafı davranışlarının bilinmesi ve sinir sisteminin memeli model organizmalarıyla kıyaslanabilecek şekilde gelişmiş olmasıdır (Şekil 2.13.). *C. elegans* model organizmasının sinir sistemi toplamda 302 nörondan oluşmaktadır. Bu nöronlar 118 farklı hücre ile sinaps oluşturmaktadır. Bu aşamada nöronlar organizmadaki neredeyse tüm hücrelerle sinaps kurmakta ayrıca bu sinapsların durumu diğer hayvanlar ile benzer şekilde gerçekleşmektedir. Bu bağlamda bir *C. elegans* model organizmasının sinir

sisteminin yaptığı bağlantılar yaklaşık 5000 kimyasal sinaps, 2000 nöromuskular bağlantı ve 600 ara bağlantıdan oluşmaktadır [136].

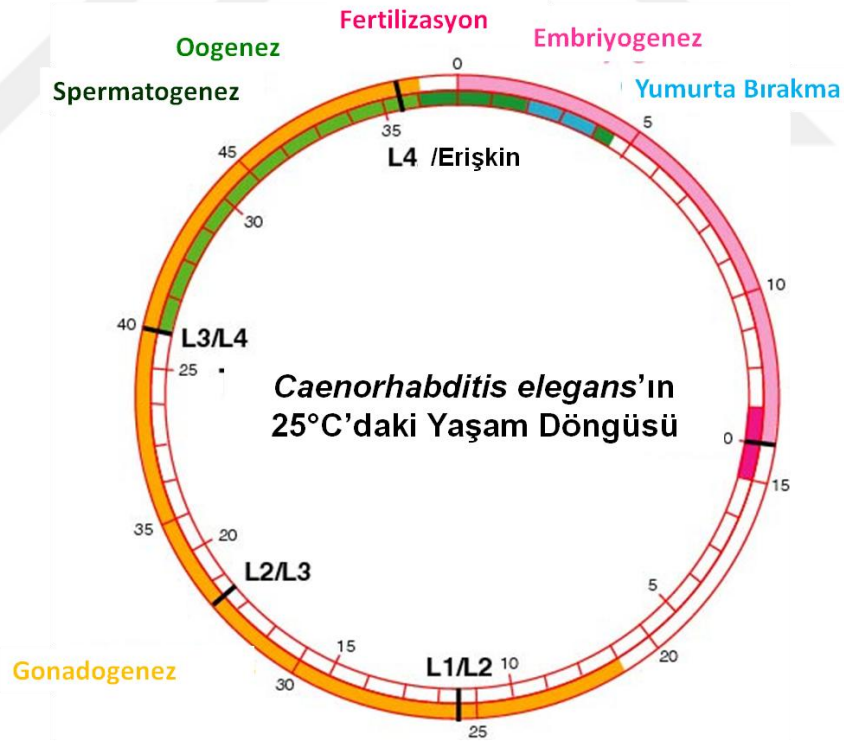
2.6.1. *C. elegans* Yaşam Döngüsü

C. elegans kısa yaşam döngüsü ve gelişimsel evrelerinin tanımlanmış olması ile model organizma olarak kullanılmış, ideal gelişim sıcaklığı olan 22°C de 2.5, 20°C'de 3.5 günde yaşam döngüsünü tamamlarken, 8°C'nin altında gelişimleri durduğu ve 27°C'nin üzerinde üreme yeteneklerini kaybettiği bilinmektedir [137]. Embriyonik dönem öncesi gelişimin başlaması hermafrodit cinsiyete sahip bireyin sperm kesesinde ürettiği spermler ile kendi kendini döllemesi ya da bir erkek birey ile dölleme sonucu hermafrodit bireyin uterusundaki vulval açıklığında biriktirilir. *C. elegans* embriyogenezi proliferasyon, organogenez ve morfogenez aşamalarını içermektedir. Embriyogenezde hücre çoğalması sırasında tek hücrenin ilk bölünme geçirmesi dölleme olmadan yaklaşık 40 dakika sonrasında, yumurtadan çıkma öncesine kadar 558 hücre içeren aşamaya kadar gelmektedir [138].



Şekil 2. 14. *C. elegans* embriyogenez aşaması [139].

Proliferasyon aşamasını takiben bölünen hücrelerin gasturlasyonunun başlaması ve hücrelerin organ sistemlerinin oluşturmaları için göçü proliferasyon sonrası hücre büyümelerinin olması ve 30 hücreli aşamaya ulaşılması ile başlamaktadır (Şekil 2.14.). Hipodermis ve sinir sistemi hücrelerini oluşturan ektoderm, kas ve farinks yapısını içeren mezoderm ile üreme ve sindirim sistemini meydana getiren endoderm olmak üzere temel tabakalanma meydana gelmektedir. Organogenezin meydana gelmesi ile nematodun temel vücut yapılanmasının gerçekleşmesi tamamlanmış olmaktadır. *C. elegans* embriyoları çamaşır suyu gibi çevresel stres faktörlerine dayanıklı yapıya sahip olduklarından senkronizasyon ya da bakteriyel kontaminantlar için yapılan uygulamalarda yalnızca embriyolar yaşamsal faaliyetlerini devam ettirmektedirler [140]. Yumurtadan çıkan bireyler ideal koşullar altında yaşam döngüsü boyunca 3-4 günde tamamlanan 4 gelişim basamağının (L1, L2, L3, L4) ilki olan L1 aşamasında olmaktadır (Şekil 2.15.).



Şekil 2. 15. *C. elegans* yaşam döngüsü [141].

Nematod yaşam döngüsü boyunca L4 aşamasında kadar gelişimini tamamlayabilirken, ideal olmayan çevre faktörlerinde maruz kalması durumunda alternatif gelişim yolağını terci etmektedir. Besinsel yoksunluk ve redüklenme, yüksek sıcaklık stresi, aşırı popülasyon yoğunluğu gibi uygun olmayan çevre koşulları oluştuğunda L1/L2 (L2d) ya da L3 (L3d) larval aşamalarında dauer formuna girmektedirler [142].

Dauer formundaki larvalar gözlemsel olarak diğer larvalardan daha küçük boyutta, hareket düzeyleri sabit, gelişimsel olarak tutulma aşamasında olup doku büyümeleri yavaşlatılmış durumdadır. Nematodlar bu aşamada stres faktörlerine karşı normal larvalara göre stres dirençleri yüksek oranda artmış ve daha uzun yaşama kapasitesine sahip olup, yaşamlarını aylarca sürdürebildikleri bu forma yaşlanmayan gelişim formu adı verilmiştir. Ergin bireyler ideal koşullar altında 2-3 hafta yaşamaktadır. *C. elegans* uzun süreli saklanmak istendiğinde -80°C'de saklanabilmektedir.

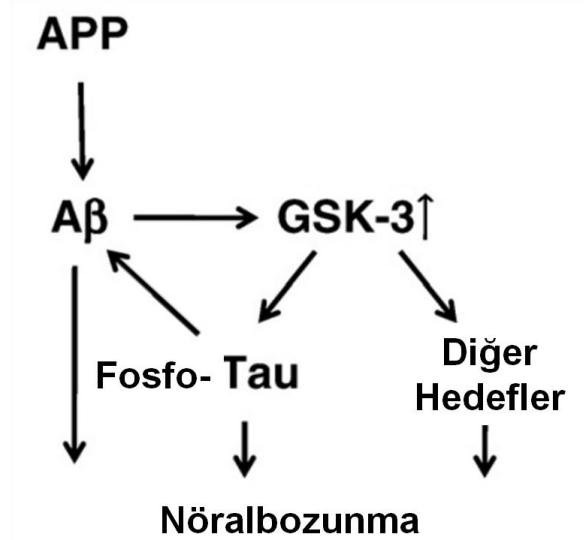
2.5.1. Alzheimer Hastalığı Modeli Olarak *C. elegans*

Memeli organizmalarda ilaç denemeleri yapılmadan önce daha basit organizmalarda deneylerin gerçekleştirilmesi daha hızlı cevapların alınmasında önemli bir aşama olarak göze çarpmaktadır. Bazı hastalıkların hangi genetik etkileşimlerin ve mutasyonların sonucunda oluştuğunun bulunmasında *C. elegans* model organizmasında gerçekleştirilen deneyler ile bulunmuştur. Bu aşamada *C. elegans* model organizma olarak hem hızlı veri alınması hem de maliyetinin düşük olması açısından avantaj sağlamaktadır [143]. Bu aşamada tedavi süreçleri için araştırmalar halen Tip 2 diyabet [144], depresyon [145] AD [146] gibi hastalıklarda devam etmektedir. Adı geçen hastalıkların genetik belirteçlerinin *C. elegans*'ta homologlarının gösterilmesinin ardından bu organizma kullanılmaya başlanmıştır.

AD beyin hücrelerinde birincil olarak amiloid- β 42 (A β 42) plaklarının oluşması ve sonucunda hücre ölümünün gerçekleşmesi durumunda oluşan hastalığa verilen isimdir. Birçok model organizmada bu durumun sebepleri araştırılmıştır. A β ,

transmembran amiloid öncü proteinin (APP) proteolitik olarak kırılması ile meydana gelen peptid ailesine mensuptur. β - ve γ - sekretaz dahil çeşitli enzimatik sindirim APP'yi kırar ve A β proteinin farklı tipleri meydana gelir. Sekretaz aktivitesinin çoğu β -APP kırma enzimi 1 geni (BACE1) tarafından kodlanan integral membran protein aspartil proteazdan kökenlenir [147].

Bu araştırmada kullanılan model organizmalardan biri *C. elegans*'tır. Bu aşamada amiloid- β anlatımı arttırılan *C. elegans* transgenik suşlarında AD olan bireylerdeki sinir hücrelerine benzer şekilde aşırı reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve stres ile alakalı proteinlerin anlatım seviyelerinde artış olduğu gözlemlenmiştir [148]. Yapılan çalışmalarda ayrıca hastalık gelişiminde bir diğer mekanizmasının tau adı verilen proteinin aşırı fosforlanması gösterilmiştir. Tau proteinin hiperfosforile halde patolojik birikimi nörofibriller yumaklar halinde hücre içinde birikime ve apoptotik hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir [149]. Bu hiperfosforlanma da GSK3 β fonksiyonel olarak gösterilmiş ve inhibitörleri potansiyel AD tedavisi için önerilmiştir [150]. GSK3 β *in vitro*'da ve nörobozunma hücre kültürü modellerinde hem primer, hem de ikincil fosforlanma bölgelerinde Tau'nun hiperfosforlanmasını uyardığı gösterilmiştir [151]. Bu da GSK3'ün nörofibrillerin oluşmasına dahil olan önemli bir Tau kinazı olduğunu gösterir. Buna uygun olarak, GSK3 β transgenik farede, tau hiperfosforlanması ve nörodejenerasyonu görülmüştür [99] ve kronik lityum uygulaması (GSK3 inhibitörü) GSK3 β 'ın ve Tau'nun aşırı anlatımı olan çift transgenik farelerde Tau hiperfosforlanmasını ve nörofibril oluşumunu engeller. Nöronların A β 'ye maruz kalması PI3K yolağının inhibisyonu üzerinden GSK3 β aktivitesini artırır ve GSK3 β anlatımı veya aktivitesinin azaltılması A β kaynaklı nörodejenerasyonu önlediği gösterilmiştir [152] (Şekil 2.16.). GSK3 aktivitesinin artması, bu senaryoda hastalığın birincil nedeni olmasa da, artan GSK3 aktivitesi AD'nin amiloid kaskadı hipotezi doğrultusunda, hem FAD (Ailesel AD) hem de sporadik olgularda A β üretimini arttırıp devamında Tau hiperfosforlanması ve nöronal bozunmaya neden olarak etkilediği belirlenmiştir [103].



Şekil 2. 16. Hücrelerde GSK3β aktivitesinin kontrol edilmesi ve sonucunda Tau Aşırı Fosforlanmasının Kontrolü [153].

AD gelişiminde rolü olan bu iki mekanizmanın modelleri *C. elegans* suşları arasında yer almaktadır. Örnek olarak, CL2120 suşunda Aβ plaklarının beden duvarında birikmesi sonucunda *C. elegans* suşlarının felç olmalarına sebep olduğu gösterilmiştir [154]. Bununla birlikte, WM104 suşunda, tau proteininin aşırı fosforlanmış olmasında etkili proteinlerden biri olan GSK3β'nin mutant olarak bulunmaktadır [155] (Tablo 1). AD modeli olan Aβ anlatımı yüksek ve GSK3β anlatımı olmayan *C. elegans* suşlarında yapılan deneylerde 25°C'de bekletilen bu suşların felç oldukları yapılan deneylerde gösterilmiştir [156]. Bununla birlikte verilen bilgilerde brassinosteroid ailesine ait EBR'nin hücrelerde potansiyel GSK3β'nin aktivitesinin arttırıcı olduğu ve hücrelerde sitotoksik etki yapabileceği belirtilmişti [33]. Ancak aynı şekilde EBR'nin düşük dozlarının hücrelerde apoptozu engelleyecek şekilde de etki gösterebileceği de literatürde bulunmaktadır [39]. Bu noktadan yola çıkarak EBR'nin potansiyel GSK3β inhibitörü olabileceği ve bu durumda AD karşı kullanılacak aday ilaçlardan biri olabileceği araştırılmaktadır.

Tüm bu bilgiler ışığında bu çalışmada birincil amaç, öncelikle EBR'nin p53 bakımından farklı kanser hücreleri üzerinde etkisinin hem apoptotik parametreler, hem sağkalım yolları hem de stres yolları bakımından incelenmesidir. Buradan elde edilen çıktılar doğrultusunda hem kanser hücrelerinin sağkalımı için önem arz eden, enerji metabolizmasında görev alan, hem de nörodejeneratif hastalıkların meydana gelmesinde fonksiyonel rolleri gösterilen GSK3 β proteini üzerinde durulmuş ve etkileri *in vivo* da farklı *C. elegans* suşlarında irdelenmiştir. Bu kısım ise çalışmanın ikinci basamağını oluşturmaktadır. Elde edilen bulgular EBR'nin enerji metabolizması yüksek *in vitro* kanser modellerinde çeşitli sağkalım ve stres yollarını etkileyerek apoptotik etki gösterebileceğini, aynı zamanda *in vivo* da GSK3 β inhibisyonu vasıtasıyla nörodejeneratif hastalıklarda irdelenmesi gereken bir ajan olduğunu ortaya koymuştur. Çalışmanın ilerleyen dönemlerinde EBR'nin neden olduğu GSK3 β inhibisyonunun nöral sağkalım ile ilgili yollara nasıl etki ettiği modelleneyecektir.

3. MATERYAL METOD

3.1. Hücre Kültürü

HCT-116 (CCL-247), HT-29 (HTB-p53 DNA bağlanma bölgesindeki mutant) kolon kanseri hücre hatları American Tissue Culture Collection'dan (ATCC) alınmıştır. HT-29 hücre hattında p53 transfeksiyonu işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem konsantrasyonu 1µg/ml olan p53 plazmidinden 1:3 plazmid:lipofektamin (Thermo, LTX) oranında hazırlanarak tranfeksiyon gerçekleştirilmiştir. Bu işlem için antibiyotik ve FBS içermeyen 100 µl McCoy's Medium içerisinde optimizasyon için 1:1, 1:3 ve 1:6 plazmid:lipofektamin oranlarında plazmid ve tranfeksiyon ajanı karışımları hazırlanmıştır. Bu karışımlar 900 µl besiyeri bulunduran 1×10^5 hücre olarak ekilen hücrelerin üzerine damla damla eklenecek şekilde bırakılmıştır. 48 saat boyunca inkübatörde bekletilen hücrelere neomisin uygulaması yapılmıştır. Neomisin vasıtasıyla hücrelerden plazmid alamayan hücrelerin seçimle ölmeleri sağlanmış, sağ kalan hücrelerin oluşturduğu koloniler alınarak yetiştirilmiştir. Yetiştirilen bu hücreler stabil hücre hattı olarak kabul edilmiş ve sıvı azotta saklanmıştır. Elde edilen HT-29 p53+/+ hücre hattı, çalışmada kullanılan diğer hücre hatları ile aynı koşullarda yaşatılmıştır. Hücreler McCoy's Medium içerisinde %10 Fetal Sığır Serum (FBS), 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin konularak hazırlanan besiyeri içerisinde %5 CO₂, 37°C'deki inkübatörde yetiştirilmiştir.

3.2. Doza ve Zamana Bağlı Hücre Canlılık Testi (MTT)

HCT-116 ve HT-29 hücreleri 96 kuyucuklu hücre kültürü petrisine 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekim gerçekleştirildikten sonra hücreler bir gece bekletilir. Daha sonra hücrelerin üzerine 0-50 µM EBR uygulanır ve 24 saat bekletilir. 24 saat sonra hücrelerin besiyerine 10 µl 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-

difeniltetrazolium bromid (MTT) tuzu eklenir. 4 saat içerisinde sadece canlı hücreler hidrojenaz enzimi vasıtasıyla mitokondrilerinde metabolize ettiği MTT tuzunu formazan kristallerine dönüştürür. Formazan kristallerinin DMSO'da çözünmesiyle hücre canlılığı seviyesi 490-655nm dalga boyunda absorban ölçümü yapılarak hücre canlılığı hesaplanır. Elde edilen veriler Graphpad programı kullanılarak istatistiksel analizleri gerçekleştirilir.

3.3. Zamana Bağlı Hücre Sayısının Tripin Mavisi Boyaması ile Gösterilmesi

HCT-116 ve HT-29 hücreleri hayvan doku kültürü laboratuvarında 6 kuyucuklu hücre petrilere 5×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekimleri gerçekleştirilir. Ekilen hücrelerin petri yüzeyine yapışmaları için 24 saat beklendikten sonra hücrelere MTT sonucunda ortaya çıkan %50 hücre canlılığı alınan dozunda EBR uygulaması yapılır. Hücreler 4 gün boyunca her gün ilacın uygulandığı saatte Tripsin/EDTA kullanılarak kaldırılır ve hücreler tripan mavisi ile karıştırılarak hemositometre vasıtasıyla sayım yapılır. Tripin mavisi ile ölü hücreler boyandığından sadece canlı hücrelerin sayımları gerçekleştirilir ve sonucunda elde edilen veriler kaydedilir. Kaydedilen veriler GraphPad programı kullanılarak istatistiksel analizleri gerçekleştirilir.

3.4. Akış Sitometrisi ile Hücre döngüsü Analizi

HCT-116, HT-29 ve HT-29 p53^{+/+} hücre hatlarından hücre kültüründe 6 kuyucuklu hücre petrilere 5×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekimleri gerçekleştirilen hücrelere 24 saat sonunda belirlenen EBR dozunda ilaç uygulaması gerçekleştirilir. 24 saat sonunda hücreler tripsin uygulamasıyla kaldırılıp 500g de santrifüj yapıldıktan sonra PBS ile yıkama yapılır. Yıkamadan sonra %70'lik etanol çözeltisi eklenir ve +4°C'de en az 30 dakika hücrelere fiksasyon uygulaması yapılır. Fiksasyon uygulamasından sonra 1x PBS ile yıkanan pellet 850 g de çöktürülür ve ribonükleaz eklenir. Ardından propidium iodid (PI) boyası eklenir ve 30 dakika karanlıkta inkübe edilir. Ardından akış sitometrisi cihazında FL-2 filtresinde okuması gerçekleştirilen örneklerde hücre fazlarındaki değişimler analiz edilir.

3.5. İmmunoblotlama

Hücre kültüründe 100mm'lik hücre kültürü petrilere ekilen HCT-116, HT-29 ve HT-29 p53^{+/+} hücreleri 2x10⁶ hücre/petri olacak şekilde ekimleri gerçekleştirilir. Bir gece yapışması için beklenen hücrelerin üzerlerine belirlenen dozda (30 µM) EBR uygulanır. Kontrol grubu olarak ilaç uygulanmamış hücreler kullanılacak şekilde ilaç uygulamasından 0-72 saat geçtikten sonra protein izolasyonu yapılır. Bu işlemde hücrelerin hücre kazıyıcısı ile kazınmasından sonra santrifüjlenen hücrelerin pelleti üzerine %10 proteinaz inhibitörü ihtiva eden memeli lizis tamponu eklenmesi sonucunda hücre lizatından proteinler sıvı faza ayrılması işlemine dayanır. Elde edilen protein ekstraktının protein konsantrasyonu belirlenmesi Bradford yöntemiyle gerçekleştirilir. Bu işlemde protein miktarının standardize edilebilmesi için konsantrasyonu bilinen BSA (sığır albümin serumu) kullanılır. BSA'dan eşit konsantrasyon artışı sağlayacak şekilde 96 kuyucuklu hücre kültürü petrilere eklendikten sonra her örnekten birinin haciminde petriye eklenir. Örneklerin üzerine 200 µl Bradford solüsyonu eklenir ve 595 nm de absorbans ölçümü yapılır. Absorbans ölçümlerine göre Microsoft Excel programı kullanılarak BSA konsantrasyonuna göre oluşturulan standart grafiğine göre örneklerin konsantrasyonu hesaplanır. Belirlenen konsantrasyonlara göre her bir örnekten 20 µg olacak şekilde proteinler laemli solüsyonu içerisinde çözülerek 95°C'de 5 dakika kaynatılarak denatüre hale getirilirler. Bu durumda konsantrasyonu bilinen ve üçüncül yapısı olmayan proteinlerin sadece elektroforez yöntemi ile birbirlerinden ayrılmaları gerekmektedir. Bu işlem için SDS-PAGE (Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi) yöntemi kullanılır. Bu yöntemde proteinler SDS-PAGE %12 akrilamid olacak şekilde Bio-Rad jel sisteminde dökülür ve Bio-Rad elektroforez sisteminde yürütülür. Bio-Rad Transblot transfer sisteminde PVDF (Polivinil florid 45mm) membrana aktarılır. TBS-Tween20 solüsyonu içerisinde çözülen %5'lik yağsız süt tozu içerisinde bloklama yapılan membranlara bir gece 1:1000 birincil antikor uygulaması yapıldıktan sonra bir gece 1:3000 ikincil HRP (horse radish peroksidaz) bağlı birincil antikora özel ikincil antikor uygulaması yapılır. Hidrojen peroksit içeren kemilüminesans madde ile muamele edilen membrandaki ışımalar Bio-Rad

ChemiDoc jel-membran görüntüleme sisteminde ışımalar görüntülenerek sonuçlar elde edilir.

3.8. *C. elegans* Kültürü

C. elegans suşlarından N2 (doğal tip), CL2120 ($A\beta_{1-42}$ anlatımı yüksek), CL2122 (CL2120 kontrol suşu) ve WM104 (GSK3 β mutant) suşları University of Minnesota, Collage of Biological Sciences, Caenorhabditis Genetics Center (CGC)'dan alınmıştır. Litresinde 17g agar, 3g NaCl, 2,5g pepton bulunan 1mM CaCl₂, 1mM MgSO₄, 25mM KPO₄, 5 μ g/ml kolesterol ve 500 μ g/ml Ampisilin ile hazırlanan Nematod Büyütme Besiyeri (NGM) üzerinde yetiştirilmişlerdir. *C. elegans* suşlarının beslenebilmeleri için gereken bakteriler University of Minnesota, Collage of Biological Sciences, *Caenorhabditis* Genetics Center (CGC)'dan alınmıştır. Alınan *E. coli* OP50 suşuna *mock* pc3.1 vektörü ampisilin direnci sağlaması ve seçilim sağlaması amacıyla tranforme edilmiştir. Transformasyon için kompotent *E. coli* OP50'ler doğal tip *E. coli* OP50 suşu LB besiyerinde OD600 0.4 olacak şekilde çoğaltıldıktan sonra 4000rpmde 7 dakika santrifüj yapılarak çöktürülür ve üst faz atılır. Daha sonra üzerine soğuk 12.5 ml 0.1M MgCl₂ eklendikten sonra 30 dakika bekletilir ve 4000rpmde 7 dakika santrifüj yapılır ve üst faz atılır. Ardından 10 ml soğuk 0.1M CaCl₂ eklendikten sonra da 30 dakika bekletilerek 4000rpmde 7 dakika santrifüje atılır ve üst faz atılır. CaCl₂ aşaması bir kez daha tekrarlandıktan hücrelerin üzerine 850 μ l 0.1M CaCl₂ ve 150 μ l %100 gliserol eklenir ve -80'e kaldırılır. Daha sonra pc3.1 vektörü kompotent hücrelerle son konsantrasyon 1000 μ g/ml olacak şekilde LB besiyeri içerisinde karıştırılır ve 2 saat boyunca inkübatörde bekletilir. Daha sonra kompotentler 500 μ g/ml son konsantrasyon olacak şekilde hazırlanan ampisilinli LB agar petrilere yayma preperat halinde ekilirler. Oluşan kolonilerden ampisilin dirençli *E. coli* OP50 bakterileri 500 μ g/ml konsantrasyondaki ampisilinli LB besiyerine alınarak sıvı kültürde saklanırlar. 500 μ g/ml ampisilin içeren 300 ml LB besiyerinde çoğaltılan *E. coli* OP50'ler çöktürüldükten sonra 5.85g NaCl, 1g K₂HPO₄ ve 6g KH₂PO₄ bulunan S-basal, 1M potasyum sitrat (pH 6), 1.86 g disodyum EDTA, 0.69 g FeSO₄.7H₂O, 0.2 g MnCl₂.4H₂O, 0.29 g ZnSO₄.7H₂O,

0.025 g CuSO₄.5H₂O içeren iz metal solüsyonu ve 1M CaCl₂ eklenerek hazırlanan S-basal tamamlanmış solüsyonu ile çözündürülen OP50'ler 100mg/ml stok konsantrasyonda olacak şekilde mikrofüj tüplerine aktarılmıştır. NGM petrilerinin üzerine bu stoktan 1:1000 dilüsyon yapılacak şekilde aktarılmış ve 1 gece petride bakterilerin çoğalması sağlandıktan sonra petriyer UV crosslinker kullanılarak UV sterilizasyonuna uğratılmıştır. Bu NGM'lere *C. elegans* suşları aktarılarak deneyler için yetiştirilmişlerdir. Bakteri eklenen NGM petriyeri 4°C'de en fazla 1 hafta bekletilebilirler.

Tablo 1. Deneylerde kullanılacak olan *C. elegans* suşlarının özellikleri

<i>C. elegans</i> suşu	Özellikleri	Biyolojik fonksiyonları
doğal tip (N2)	Hermafrodit bireyler	GSK3 ve CDK5 ifadesi doğal tip
WM104 (unc-101(sy216) gsk-3(nr2047)/hln1 [unc-54(h1040)] I)	GSK3 mutant, hermafrodit bireyler, paralizasyon, ölü yumurta üretimi.	GSK3 fonksiyonel değil
RB814 (<i>cdk-5(ok626)</i>)	Cdk5 mutant, hermafrodit bireyler.	Cdk5 fonksiyonel değil, ok626 alleli 1,6 kb delesyon içermektedir. CDK5 start kodonu fonksiyonel değil.
GMC101 (<i>dvls100 [unc-54p::A-beta-1-42::unc-54 3'-UTR + mtl-2p::GFP]. mtl-2p::GFP</i>)	L4 veya genç bireylerin yaşama ortamının 20°C den 25°C' çıkarılması paralizasyon neden oluyor. Hermafrodit bireyler.	GFP anlatımı gastrointestinal hücrelerinde sürekli ve Kas hücrelerinde myosin anlatımından sorumlu unc54 kontrolünde insan A- <i>beta</i> -1-42 peptidi birikimi duvarı kas hücrelerinde gösterilmesi
CL2120 <i>dvls14(pCL12(unc-54:hu-Aβ 1-42) + mtl-2:gfp)</i>	Hermafrodit bireyler.	GFP anlatımı gastrointestinal hücrelerinde sürekli ve GFP tüm gelişim evresinde belirlenebilir düzeyde. Aβ ₃₋₄₂ peptidi ifadesi mevcut ve beta-fibrilleri birikimi mevcut. Yüksek sıcaklıklar A-beta toksisitesi görülür
CL2122 (<i>dvls15(mtl-2:gfp)</i>)	Fenotip olarak doğal tipe benzer, hermafrodit bireyler.	Transgenik kontrol suşu, (GMC101, CL2120 için)

C. elegans suşları bakterili NGM petriyerine yerleştirildikten sonra 20°C'de soğutmali inkübatörde bekletilirler. *C. elegans* suşlarına yüksek sıcaklık üreme hızlarını

yükseltmekte ve metabolizmalarını değiştirmekte, düşük sıcaklık ise üremelerine ket vurmaktadır. Bu sebeple en uygun sıcaklık olarak 20°C'de yetiştirilmekte olan *C. elegans* suşlarında 3 gün sonrasında NGM'lerdeki bakteriler sıcaklığa bağlı yoğunlaştıklarından ve *C. elegans* suşları aşırı ürediğinden yaşama alanı bulamadıklarından 3 günde bir alt kültür alınması gerekmektedir.

3.9. *C. elegans* Canlılığının Gözlemlenmesi

E. coli OP50 içeren NGM'lerde yetiştirilen *C. elegans* suşları hipoklorit uygulamasıyla senkronizasyon işleminden geğirilirler. Burada amaç *C. elegans* suşlarından sadece yumurtaları bırakmaktır. Bu aşamada iğeriği litrede 3g KH₂PO₄, 6g Na₂HPO₄, 5g NaCl, 1mM MgSO₄ içeren M9 solüsyonu ile kaldırılırlar. M9 da yumurta ve diğer fazladaki *C. elegans* suşları karışık şekilde bulunurlar. 2200g'de 20°C'de 2' santrifüj edilen *C. elegans* suşlarından kalan M9 solüsyonu dikkatlice uzaklaştırılır. Pellet halindeki *C. elegans* suşlarının üzerine 2 ml evlerde kullanılan çamaşır suyu (hipoklorit), 0,5 ml 10M NaOH ve 7,5 ml dH₂O içeren hipoklorit solüsyonu eklenir. Hipoklorit solüsyonu *C. elegans* yumurtalarının yüzeyi kitin tabakasıyla kaplı olduğundan yumurtalara zarar vermeyecek ancak larva ve yetişkin durumdaki *C. elegans* suşlarının tamamının çözünmesine yol açacaktır. Bu çözünmeyi sağlayabilmek için her dakika 5 saniye vorteks yapılacak şekilde *C. elegans* suşları yukarı aşağı yapılacak şekilde 5 dakika boyunca karıştırılırlar. Diseksiyon mikroskobu altında çözünmenin sağlandığı gözlenene kadar bu devam edilmelidir ancak 5 dakikadan daha uzun sürmemelidir. Ardından reaksiyonu durdurmak için 1:1 oranında M9 solüsyonu eklendikten sonra 2200g'de 2' santrifüj edilen yumurtalar ortamdaki hipokloritin uzaklaştırılması için seri santrifüj-M9 eklenmesi şeklinde 3 kez yıkama geręekleřtirilir. Bu aşamada yumurtaları kaybetmemek önemlidir. Üst faza kolayca karışabilmektedirler. Yıkamalar bittikten sonra son üst faz atıldıktan sonra son kez M9 solüsyonu eklenir ve 1 gece oda sıcaklığında larvaların yumurtalardan çıkması için sallayıcıda bırakılırlar. Yumurtadan çıkan L1 fazındaki larvalardan 10 µl lamın üzerine konularak sayım yapılır. Her kondüsyonda 15 larva olacak şekilde dilüsyon oranı hesaplanır. Yapılan

hesaplama son hacim 60 µl olacak şekilde; larvalar, 1:1000 oranında 100mg/ml konsantrasyondaki ampisilin dirençli *E. coli* OP50 ve uygun ilaç kondüsyonu eklenir. İlk ekim sonunda hayvanlar el hataları sonucunda eşit ekilemeyeceğinden ilk hayvan sayıları sayım yapılarak kaydedilir. *C. elegans* suşlarının ölü bireyleri tespit edilinceye kadar petrilere kontrol edilir. Ölü bireyler UV ışığı altında "ölüm ışması" adı verilen ışmayı verdiklerinden bu ışmanın tespiti vasıtasıyla ölü bireylerin sayısı kaydedilir [157].

3.10. *C. elegans* suşlarının Fertilite Durumlarının Gözlemlenmesi

C. elegans suşlarının yumurtlama seviyelerinin değişiminin gözlemlenmesi amacıyla bir önceki aşamada belirtilen senkronizasyon işlemi yapıldıktan ve L1 larvalar elde edildikten sonra larvalar bakterili NGM besiyerlerine alınır ve burada L4 fazındaki larvalar haline gelene kadar bekletilirler (yaklaşık 3 gün).

Bu aşamada içerisinde 120 µM FUdR (5- fluoro-2-2deoxyuridine) bulunan NGM 6 kuyucuklu hücre petrilere hazırlanır. FUdR'un stok çözelti konsantrasyonu 40 mM'dır. L4'ler petrilere yerleştirilmeden önce uygun ilaç konsantrasyonu sağlanmış petrilere ilaçlar bakterilerle birlikte steril kondüsyonlarda petrilere eklenir. İlaçlar eklendikten sonra solucan-tutucu (ucu kıvrık platin çubuk) kullanılarak *C. elegans* suşları FUdR ve ilaçları bulunduran NGM petrilere her kondüsyona 2 tane L4 gelecek şekilde yerleştirilirler. İlk ekimden sonra takip eden 3 gün boyunca her gün petrilere yumurta sayıları kaydedilir.

3.11. *C. elegans* Yaşam Sürelerinin Hesaplanması

NGM petrilere farklı fazlarda bulunan *C. elegans* suşları solucan taşıma çubuğu vasıtasıyla sadece ergin bireyler seçilecek şekilde yeni NGM petrilere aktarılırlar. Aktarılan ergin bireyler bir gün geçtikten sonra bu yeni petriden uzaklaştırılarak bir gece içerisinde bıraktıkları yumurtaların çıkması beklenilir. Bakterisiz petriye ergin birey konulması neslinin devamını stres durumunda arttıracak şekilde bir davranış gösterdiklerinden yumurtlama miktarını arttıracaktır. Bu aşamada elde edilen

yumurtalardan çıkan larvalar yaklaşık 3 gün boyunca L4 fazına gelene kadar beklenir. Elde edilen L4 fazındaki larvalar önceden belirlenmiş konsanstrasyonlarda ilaç eklenmiş 12 kuyucuklu NGM petrilere her kuyuya 10 hayvan gelecek şekilde solucan aktarma çubuğu vasıtasıyla aktarılırlar. İlaç uygulanan bu NGM petrilere hazırlanırken NGM'e 120 µM FuDR eklenir. Bu şekilde ortamda yaşayan ergin bireylerin oluşturdukları yumurtaların deneyin devamını sağlayacak olan *C. elegans* suşları ile karışmasını engellemektir. Bu aşamada her kuyuda eşit sayıda solucan olması önemlidir. Bu aşamadan sonra *C. elegans* suşları her hafta 2 gün haftanın aynı günlerinde olacak şekilde son *C. elegans* ölene kadar sayılır. Yapılan her bir sayımda aşırı bakteri üremesini engellemek için yeni 12 kuyucuklu NGM petrilere aktarılırlar.

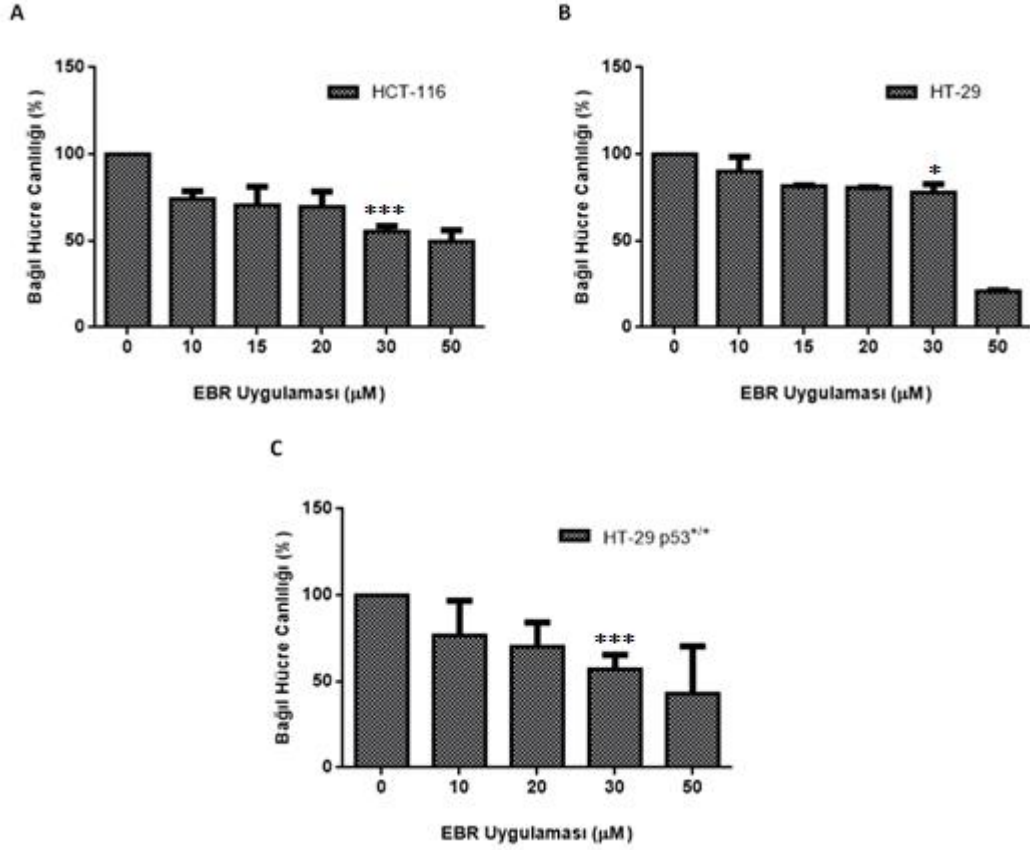
3.11. İstatistiksel Analiz

Elde edilen immüno-blotlama sonuçları "Image J" [158] piksel analizi programı kullanılarak kontrole göre oran alınarak anlatım miktarının kaç kat değiştiği hesaplanmıştır. Akış sitometrisi sonuçları "BD Accuri C6" programı ile analizi yapılarak hücre döngüsündeki fazlarda ne kadar hücre olduğu yüzde oranı olarak hesaplanmıştır. Yapılan *C. elegans* yaşam süresi deneyleri Kaplan-Meier istatistiksel yöntemi kullanılarak "GraphPad Prism" programı kullanılarak grafiğe dökülmüştür. MTT testi, sağkalım grafiği için elde edilen veriler ile *C. elegans* farklı suşlarına EBR'nin sağkalım, fertilité ve ölüm deneylerinin istatistiksel verileri en az üç deney tekrarının ortalamasıdır. Veriler "Graph Pad Prism 6" [159] istatistik programı ile analiz edilmiştir. Grupların karşılaştırılmasında 2 way ANOVA testi kullanılmış ve Bonferroni doğrulama yöntemiyle anlamlı değişimler için p değeri < 0.05 olarak belirlenmiştir.

4. SONUÇLAR

4.1. MTT ve Tripan Boyaması ile Hücre Canlılığı'nın Değişiminin Gösterilmesi

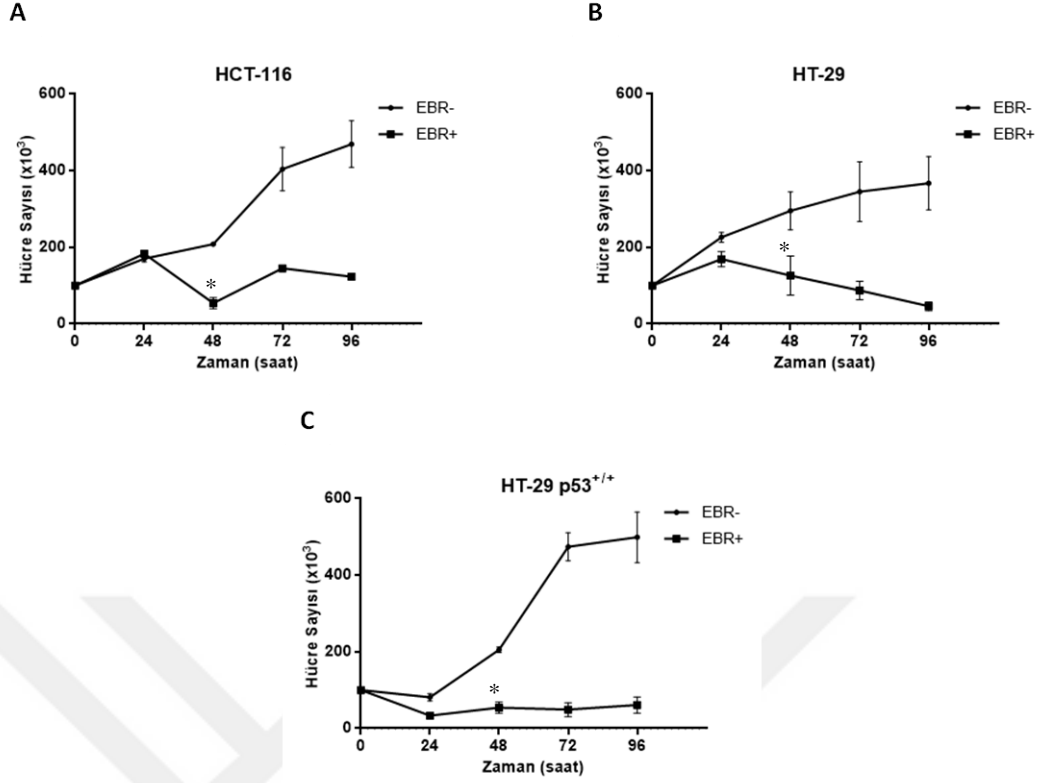
HCT-116, HT-29 ve HT-29 p53^{+/+} hücre hatlarında gerçekleştirilen doza bağlı EBR uygulamasının MTT analizi sonucunda EBR'nin bağlı hücre canlılığı üzerine etkisi sonucunda kolon kanseri hücre hatlarında %50 canlılık gösteren dozunun belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu durumda yapılan deneyde kullanılan tüm hücre hatlarında dozun artışına bağlı olarak bağlı hücre canlılığında azalma tespit edilmiştir (Şekil 4.1.) . Belirlenen hücre hatlarında MTT deneyi ile tespit edilen %50 canlılık elde edilen dozda (30 µM) EBR uygulaması gerçekleştirilen hücrelerde 24, 48, 72 ve 96. saatlerde tripan mavisi boyaması ile canlı ve ölü hücrelerin tespiti gerçekleştirilmiştir. Hemositometre ile yapılan sayımlardan elde edilen sonuçlara göre, 30 µM EBR uygulamasının HCT-116 ve HT-29 hücre hatlarında ilk 24 saatte herhangi bir etkisinin olmadığı ancak 48. saatten itibaren HT-29 hücre hattında canlı hücre sayısında zamanla azalma gözlemlenmiş olup bu hücre hattında EBR'in sitotoksik etkisinin olduğu tespit edilmiştir (p<0.05). Bununla birlikte HCT-116 hücre hattında EBR uygulaması ile birlikte 48. saatte hücre sayısında ani şekilde düşme olduğu tespit edilmiş olup 72. saatten itibaren EBR'in hücrelere olan etkisinin sitostatik olduğu tespit edilmiştir (p<0.05). Bu sonuçların yanısıra HT-29 p53^{+/+} hücre hattında 24. saatten itibaren EBR uygulamasının bu hücre hattında sitostatik etkisinin olduğu gösterilmiştir.



Şekil 4. 1. Doza bağı EBR uygulamasının p53 durumları farklı kolon kanseri hücre hatlarında bağı hücre canlılığı üzerine etkisinin gösterilmesi. (A) HT-29, (B) HCT-116 hücre hatlarında 0, 10, 15, 20, 30, 50 µM, HT-29 p53^{+/+}(C) hücre hattında 0, 10, 20, 30, 50 µM dozlarında 24 saat EBR uygulaması sonucu bağı hücre canlılıkları ölçülmüştür.

***** p < 0.001, *p < 0.05.**

Bu azalma özellikle HCT-116 ve HT-29 p53^{+/+} hücre hatlarında 30 µM EBR dozunda %50 canlılık gösterdiği (p<0.001), bağı hücre canlılığının %50 ye düştüğünü göstermektedir. Bununla birlikte HT-29 hücre hattında 30 µM EBR uygulaması sonucunda bağı hücre canlılığında %50'nin üzerinde bir hücre canlılığına sahip olduğu gözlemlenmiştir (p<0.05) (Şekil 4.1.).

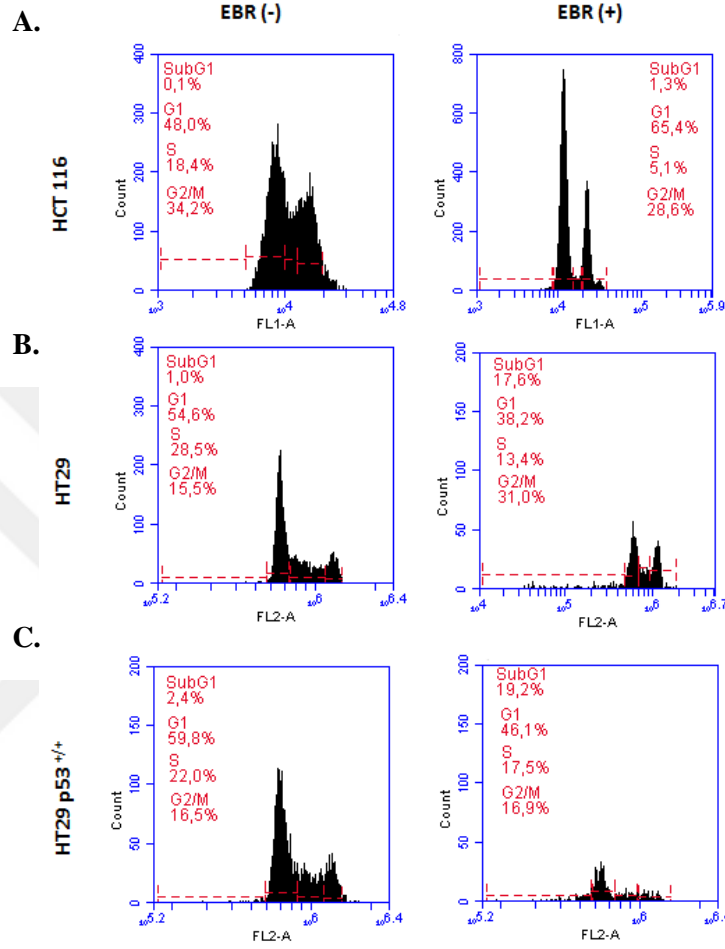


Şekil 4. 2. Zamana bağlı EBR uygulamasının hücre sağkalımı üzerine etkisinin tripan mavisi boyaması ile gösterilmesi. (A) HCT-116, (B) HT-29 ve (C) HT-29 p53^{+/+} hücre hatlarından MTT ile belirlenen 30 μM EBR uygulaması yapılmış, uygulamadan sonraki her gün tripan mavisi ile boyama yapıldıktan sonra ölü hücrelerin sayısı hesaba katılmaksızın canlı hücre sayısı belirlenmiştir. * p<0,05.

4. 2. Akış Sitometrisi ile Hücre Döngüsü Aşamalarının Hücrelerdeki p53 Durumundan Bağımsız Olarak Değişiminin Gösterilmesi

p53 proteini anlatımı bakımından farklı hücre hatlarında PI boyaması ile hücre döngüsü analizi gerçekleştirilmiş olup EBR uygulamasının bu hücre hatlarındaki hücre döngüsünü ne şekilde değiştirdiği gösterilmiştir. Elde edilen akış sitometrisi sonuçlarına göre hücrelerdeki p53 durumu değişken olmasına karşın hücrelerdeki SubG1 popülasyonunda EBR uygulamasıyla birlikte artış olduğu gözlemlenmiştir. Hücrelerdeki SubG1 popülasyonundaki artış hücrelerdeki DNA içeriği olan hücre agregatlarının miktarını gösterdiğinden hücrelerin apoptotik cevap verme

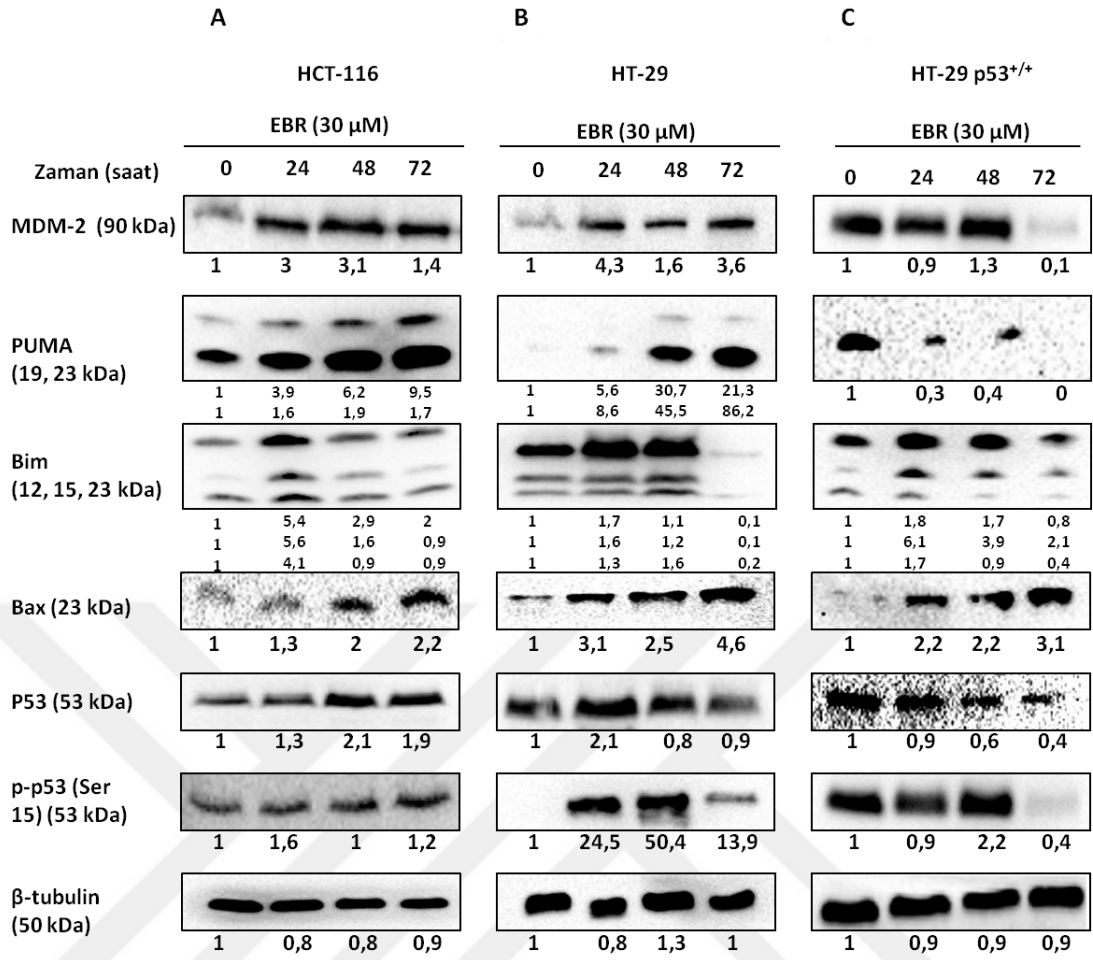
durumlarını göstermektedir. Bu bilginin ışığında EBR uygulamasının tüm hücre hatlarında p53 kondüsyonundan bağımsız bir şekilde apoptozu tetiklediği gösterilmiştir.



Şekil 4. 3. Akış sitometrisi vasıtasıyla hücre döngüsünün değişiminin gösterilmesi. (A) HCT-116, (B) HT-29, (C) HT-29 p53^{+/+} hücre hatlarında 30 µM EBR uygulamasından sonraki 48 saat sonunda fikse edilen hücrelere PI boyaması gerçekleştirilmiş, hücreler akış sitometrisinde FL2 filtresinde okutulmuş olarak incelenmiştir.

4.3. EBR Uygulamasının p53 ile Bağlantılı Apoptotik Yolakların ve Apoptoz Belirteci Olan Proteinlerin Anlatım Seviyelerine Olan Etkisi

Akış sitometrisi sonucunda elde edilen veriler ışığında hücrelerin apoptotik cevabı p53 ve bağlantılı yollardan gerçekleştirip gerçekleştirmediği araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar HCT-116 ve HT-29 hücre hatlarında p53 proteininin anlatım seviyesinin düzenlenmesinde görev alan MDM-2 proteininin seviyesinin EBR uygulamasıyla birlikte 24. saatten itibaren artış gösterdiği belirlenmiştir. HT-29 p53^{+/+} hücre hattında ise p53 seviyesi kontrolde halihazırda aşırı anlatımı gerçekleştirdiğinden yüksek vaziyette gözlemlenmekte ve p53 seviyesinin EBR uygulamasıyla birlikte düşmesiyle birlikte MDM-2 anlatımının da düştüğü gözlemlenmektedir. Bununla birlikte MDM-2 ile p53'ün bağlantı gösterdiği p53 domenindeki Ser15 fosforlanması EBR uygulamasıyla birlikte artış gösterdiği p53'ün işlevsellik durumlarına göre hücre hatlarından HCT-116'da zamanla fosforlanmasının azaldığı, HT-29 ve HT-29 p53^{+/+} hücre hatlarında 72 saat sonunda fosforlanmanın azalma gösterdiği gözlemlenmiştir. Tüm bunların ışığında p53'ün anlatımını düzenlediği apoptozu tetikleyen proteinlerin anlatım seviyeleri incelendiğinde p53 mutant olan HT-29 hücre hattında dahil olmak üzere tüm hücre hatlarında p53 anlatımı azalsa veya işlevini yitirse dahi 72 saat boyunca proteininin anlatım seviyesi artmaya devam etmektedir. Puma proteininin anlatım seviyesi HCT-116 ve HT-29 hücre hatlarında 72 saat boyunca artmakta, HT-29 p53^{+/+} hücre hattında ise p53 anlatımı seviyesi ile birlikte azalmaktadır. Bim proteininin anlatımı ise HCT-116 ve HT-29 p53^{+/+} hücre hatlarında 24. saatte artış gösterirken, HT-29 hücre hattında 72. saatte azalma olduğu gösterilmiştir. Ancak Bax proteininin anlatım seviyesi her koşulda artmaya devam etmektedir. Bu durum hücrelerde EBR ile tetiklenen apoptozun farklı mekanizmalar ile düzenlendiği sonucunu ortaya çıkartmaktadır.



Şekil 4. 4. HCT-116, HT-29 ve HT-29 p53^{+/+} (Sırasıyla A,B,C) hücre hatlarında yapılan immünoblotlama vasıtasıyla p53 ve p53'ün anladığını düzenlediği proteinlerin anlatım seviyelerinin gösterilmesi. MDM-2, Puma, Bim, Bax, p53 ve fosfo-p53 (Ser 15) protein anlatımlarının seviyeleri gösterilmiş, sonuçların doğrulanması amacıyla hücrelerde anlatımının değişmesi öngörülmeden β-tubulin kullanılmıştır ve en az 2 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

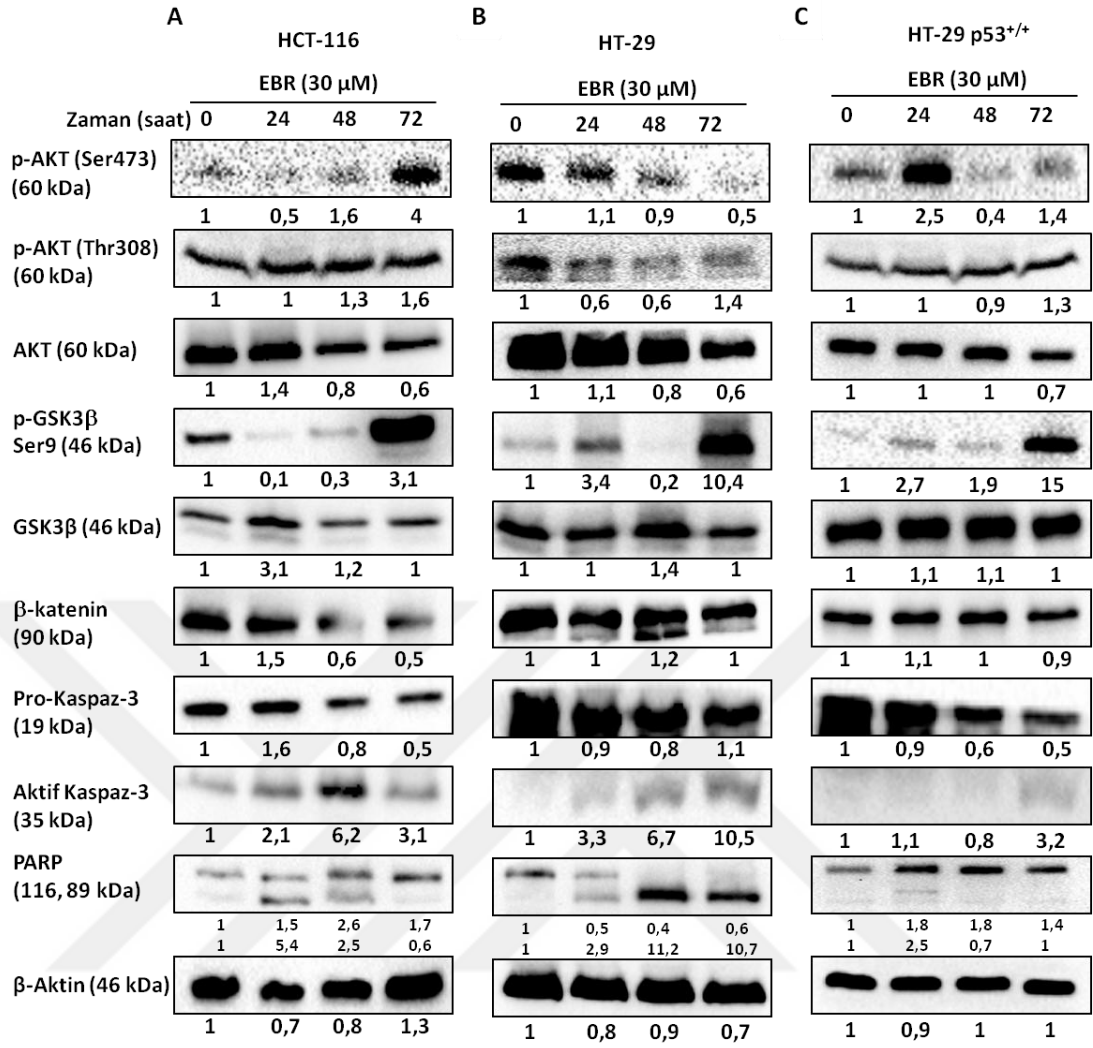
4.4. EBR uygulamasının GSK3 β ve İlişkili Olduğu Hücre Sağkalım Yolaklarındaki Protein Seviyelerinin Gösterilmesi

GSK3 β hücrelerde glikojen metabolizmasında görevli bir protein olup hücrelerdeki sağkalım yolaklarının kontrolünde ve bununla bağlantılı olarak programlı hücre ölümü yolaklarının çalıştırılmasında görevli bir protein olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu bağlamda GSK3 β hücrelerde AKT (Protein Kinaz B) aracılığıyla fosforlanması, GSK3 β 'nin inhibisyonu ve sonucunda hücre sağkalım yolaklarının çalıştırılmasındaki aracı molekül olan β -katenin'in proteozomal degradasyonunu sağlayarak hedef genlerin anlatımını engeller.

Yapılan çalışmada Akt proteininin Ser473 ve Thr308 fosforlanma bölgelerinden fosforlanmasının p53 anlatımı farklı kolon kanseri hücre hatlarında zamana bağlı EBR uygulaması sonucunda gerçekleştirilen immüno blotlamaların ışığında HCT-116 ve HT-29 p53^{+/+} hücre hatlarında hücre sağkalımını uyaracak şekilde artış gösterdiği, bu artışı HCT-116 hücre hattının 72 saat sonunda HT-29 p53^{+/+} hücre hattının 24 saat sonunda gösterdiği gözlemlenmektedir. Bununla birlikte HT-29 hücre hattında zamana bağlı şekilde AKT fosforlanmasında azalma gözlemlenmektedir. Bu bağlamda GSK3 β 'nin Ser9 fosforlanma seviyesi incelendiğinde tüm hücre hatlarında zamana bağlı olarak 48 saat sonunda fosforlanmanın azaldığı, 72 saat sonunda kontrol grubundan daha yüksek bir seviyeye çıktığı gözlemlenmektedir. Bu bağlamda 72 saat sonrası GSK3 β fosforlanmasının AKT yolağından bağımsız bir mekanizmayla kontrol edildiği sonucu ortaya çıkmaktadır.

GSK3 β proteinin degradasyonunu kontrol ettiği β -katenin proteinin seviyesine bakıldığında HCT-116 hücre hattında 48 saat ve sonrasında seviyesinde azalma olduğu, HT-29 hücre hattında 24 saat sonrasında azalma gerçekleştiği, HT-29 p53^{+/+} hücre hattındaki β -katenin seviyesinin etkilenmediği gözlemlenmektedir. Hücrelerdeki GSK3 β fosforlanmasındaki değişim ile kontrol edilen β -katenin seviyesi p53 anlatımı farklılığı ile değişiklik kazanmıştır.

Hücre sağkalım yolları ile GSK3 β ilişkisinin durumu, p53 anlatımının farklılığı ile değişkenlik gösterirken, apoptotik işaretçilerden kaspaz-3 ve PARP proteininin aktiflik durumları gözlemlendiğinde p53 doğal tip olan HCT-116 hücre hattında 24 saat sonunda PARP kesiliminin gerçekleştiği ancak bu durumun 72 saat sonrasında azaldığı sonucu ortaya çıkmaktadır. Bununla birlikte HT-29 hücre hattında 72 saat geçmesine karşın PARP kesiliminin gerçekleşmediği, HT-29 p53^{+/+} hücre hattında PARP kesiliminin sadece 24. saatte gerçekleştiği gösterilmiştir. Bununla birlikte kaspaz-3'ün aktifleşmesi incelendiğinde HCT-116 hücre hattında kaspaz kesiliminin 48. saatte üst seviyelerde olduğu, HT-29 ve HT-29 p53^{+/+} hücre hatlarında zamanla artan kaspaz-3 kesiliminin gerçekleştiği gözlemlenmektedir. Bu sonuçlar PARP kesiliminin HCT-116 ve HT-29 p53^{+/+} hücre hatlarında GSK3 β fosforlanması ile bağlantılı olarak gerçekleştiğini ancak HT-29 hücre hattında GSK3 β fosforlanmasının apoptotik cevabı geri çekmediği sonucuna varılabilir. Bu duruma karşın kaspaz-3 kesiliminin HT-29 ve HT-29 p53^{+/+} hücre hatlarında GSK3 β ile bağımsız olarak gerçekleştiği gözlemlenmiş olup HCT-116 hücre hattında 48. saatte farklı bir yolağın apoptotik mekanizmanın kesilime yol açtığı sonucu ortaya çıkarılmıştır.



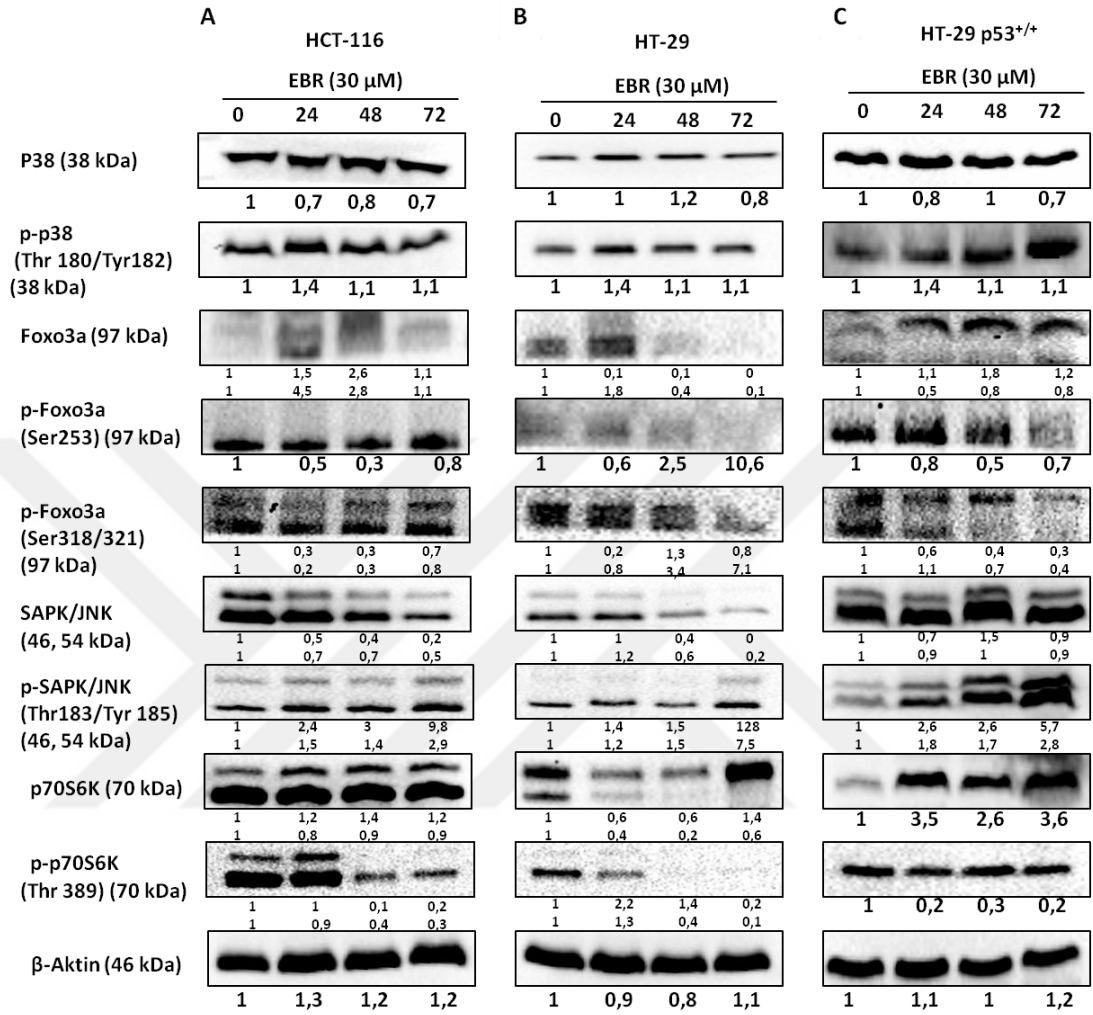
Şekil 4. 5. Belirtilen hücre hatlarında GSK3β ve GSK3β ile ilişkili proteinlerin (Akt, β-kateinin) anlatım ve aktivasyon durumlarının belirlenmesi bunların apoptotik kondüsyonu belirten proteinlerin (Kaspaz 3 ve PARP) ekspresyon ve düzenlenme durumlarının western blot ile gösterilmesi. p-Akt (ser473), p-Akt (Thr308), Akt, p-GSK3β (ser9), GSK3β, β-katenin, Pro-Kaspaz 3, Aktif-Kaspaz 3 ve PARP proteinlerinin anlatım seviyeleri gösterilmiş, sonuçların doğrulanması amacıyla hücrelerde anlatımının değişmesi öngörülmeden β-Aktin kullanılmıştır ve sonuçlar en az 2 kere tekrarlanmıştır.

4.5. EBR uygulamasının Hücresel Stres ile İlişkili Yolaklar ile Bağlantısının Gösterilmesi

p53 anlatımı bakımından farklı kolon kanseri hücre hatlarında hücresel stres durumunda fosforlanma seviyesi artan p38 MAPK proteininin anlatım seviyesi ve Thr180/Tyr182 aminoasitlerinden fosforlanması incelendiğinde HCT-116 ve HT-29 hücre hatlarında fosforlanma seviyelerinde değişiklik gözlemlenmemiştir. Bununla birlikte HT-29 p53^{+/+} hücre hattında hücreler p53 seviyesinin artışı ile bağlantılı olarak p38'in fosforlanma seviyesinde zamana bağlı artış gerçekleştiği gözlemlenmektedir. Hücresel stres durumunda fosforlanması sağlanarak hücrenin apoptotik cevap vermesini sağlayan SAPK/JNK proteininin fosforlanma durumu incelendiğinde HCT-116 ve HT-29 hücre hatlarında SAPK/JNK anlatım seviyesi düşmesine rağmen fosforlanmış formları sabit kalmaktadır. Bu bağlamda hücrelerdeki fosforlanmış olan SAPK/JNK seviyesi yüksek kalmakta, EBR uygulamasıyla birlikte zamanla fosforlanma değişmediğinden EBR'ın hücresel stresi uyardığı gözlemlenmektedir. Bunlarla birlikte hücresel stres ile bağlantılı olarak Akt proteini aracılığıyla Thr389 üzerinden fosforlanmasıyla translyasyon mekanizmasının kontrolünü sağlayan p70s6k proteininin fosforlanma durumu gözlemlenmiştir. Bu bağlamda HCT-116 ve HT-29 hücre hatlarında p70S6K proteininin anlatım seviyesine kıyasla fosforlanma seviyesinde zamana bağlı azalma gözlemlenmiş olup hücrelerde protein translyasyonunun durdurulması özellikle 48. saatte gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Ancak HT-29 p53^{+/+} hücre hattında fosforlanma seviyesindeki azalma sadece 24. saatte gerçekleşmiş olup bu durumun Akt fosforlanmasıyla bağlantılı olabileceği gözlemlenmiştir.

Tüm bunlarla birlikte hücresel stresin oluşması durumunda hücrede apoptotik cevabı oluşturan nukleer transkripsiyon faktörlerinden FoxO3a'nın fosforlanma durumu incelenmiştir. Bu durumda fosforlanmış formu nukleusa göçmeyen, ubikuitin aracılı yıkıma uğrayan ve sonucunda tümör oluşumuna sebep olan FoxO3a proteininin HCT-116 hücre hattında Ser253 fosforlanmasının 48. saatte azaldığı, HT-29 ve HT-29 p53^{+/+} hücre hatlarında 48. saatten itibaren her iki fosforlanma bölgesinde azalma

meydana geldiği ve 72. saatte azalmaya devam ettiği gözlemlenmektedir. Bu bağlamda EBR uygulaması hücrelerde FoxO3a bağlantılı apoptozu 48. saatten itibaren tetiklediği düşünülebilir.



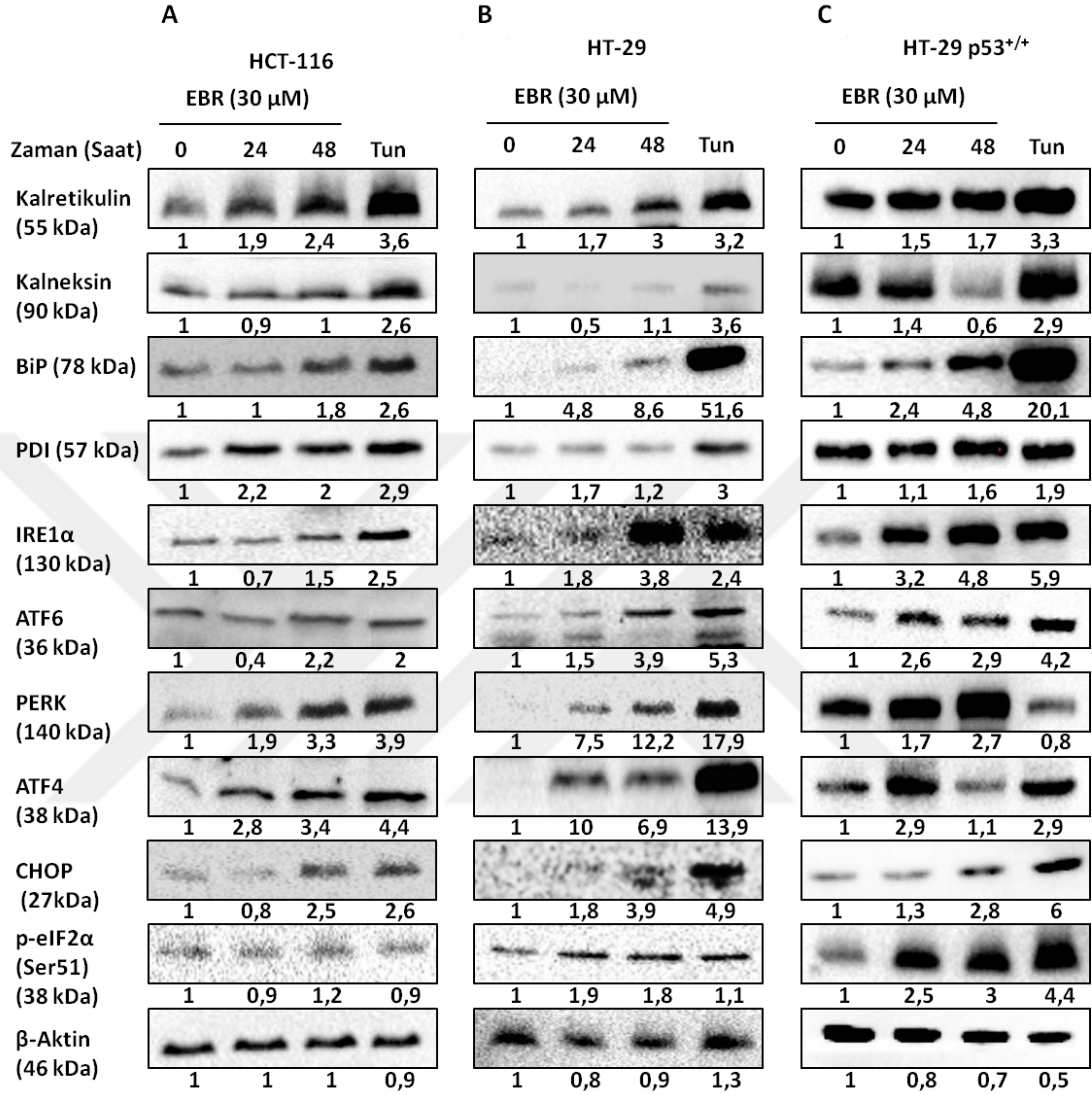
Şekil 4. 6. Yukarıdaki hücre hatlarında GSK3β'nin bağlantılı olduğu MAPK, FoxO3a, SAPK/JNK ve p70s6k proteinlerinin anlatım ve aktivasyon durumlarının western blot ile gösterilmesi. p38, p-p38 (Thr180/Tyr182), FoxO3a, p-FoxO3a (Ser253), p-FoxO3a (Ser318/Ser321), SAPK/JNK, p-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185), p70S6K, p-p70S6K (Thr389) proteinlerinin anlatımları gösterilmiş, sonuçların doğrulanması amacıyla hücrelerde anlatımının değişmesi öngörülmeden β-Aktin kullanılmış ve her sonuç en az 2 kez tekrarlanmıştır.

4.6. EBR ile Tetiklenen Endoplazmik Retikulum Stresinin p53 Durumu Farklı Hücre Hatlarında Gösterilmesi

EBR uygulamasıyla birlikte hücrelerde gerçekleşen hücresel stresin ER stres olarak ortaya çıktığı ve programlanmış hücre ölümünü ER stres aracılığıyla tetiklediği p53 anlatımı bakımından farklı hücrelerde incelenmiştir. Bu bağlamda ER lümenindeki ve hücredeki kalsiyum iyon dengesini kontrol eden ve şaperon protein işlevi gören iki protein olan kalretikulin ve kalneksin proteinlerinin anlatım seviyeleri incelendiğinde bütün hücre hatlarında kalretikulinin zamana bağlı olarak artış gösterdiği, en yüksek anlatım seviyesine 48. saatte ulaştığı gösterilmiştir. Kalneksin proteini incelendiğinde HCT-116 ve HT-29 hücre hatlarında zamana bağlı artış gözlemlenmesine karşın HT-29 p53^{+/+} hücre hattında 48 saat sonrasında kalneksin anlatım seviyesinde azalma gözlemlenmiştir. Bununla birlikte BiP şaperon proteinindeki artış ER lümeninde katlanmamış proteinlerin EBR uygulamasıyla birlikte arttığını, bu durumun tüm hücre hatlarında benzer şekilde gözlemlendiği ve bu durumun p53 anlatım durumundan bağımsız gerçekleştiği gösterilmiştir.

Bu bağlamda ER stres sonucunda hücresel cevapları oluşturan ER membran proteinlerinden IRE1 α , PERK ve ATF6 protein anlatım seviyelerine bakıldığında IRE1 α , HCT-116 ve HT-29 hücre hatlarında 48 saat sonrasında, HT-29 p53^{+/+} hücre hattında 24 saat sonrasında artış gösterdiği gözlemlenmiştir. BiP proteini artışıyla birlikte heterodimer oluşturacak IRE1 α seviyesinin de arttığı gösterilmiştir. Aynı zamanda PERK proteini anlatım seviyesi HCT-116 ve HT-29 hücre hatlarında zamanla artış göstermekte olup HT-29 p53^{+/+} hücre hattında ekspresyon seviyesi p53 artışıyla artmasına karşın EBR uygulamasıyla birlikte 24. saatten itibaren artış göstermektedir. Bunlarla birlikte ER proteinlerinin anlatımlarını sağlayan ATF6 proteininin anlatım seviyesi HCT-116 hücre hattında sabit kalmasıyla birlikte HT-29 ve HT-29 p53^{+/+} hücre hatlarında EBR uygulamasıyla birlikte artış gerçekleştiği gösterilmiştir. Anlatım seviyeleri artış gösteren ER membran proteinlerinin UPR durumunda tetiklediği yolların durumları incelendiğinde IRE1 α ile tetiklenen SAPK/JNK aracılığı ile gerçekleşen apoptozun tetiklendiği giriş kısmında

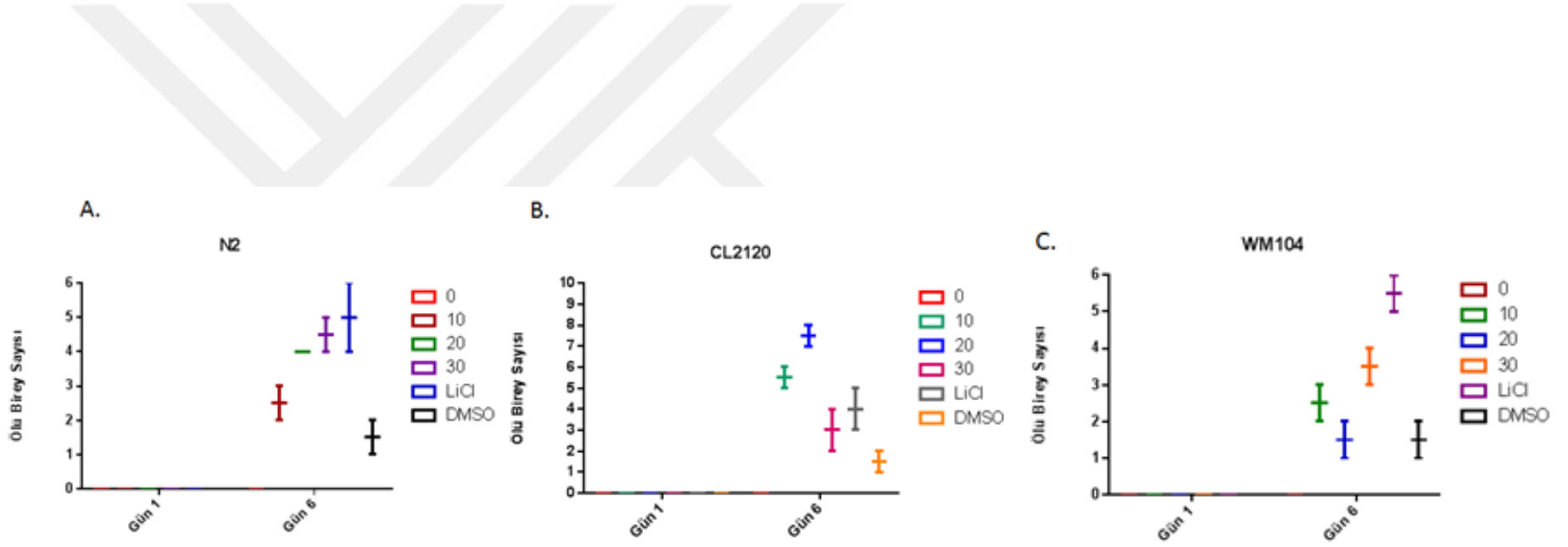
belirtilmiştir. Bununla birlikte PERK artışı ile bağlantılı olarak sırayla fosforlanmış eIF2 α , ATF4 ve CHOP proteinlerinin aktifleştiği ve p53'ten bağımsız apoptotik yolların çalıştırıldığı gösterilmiştir.



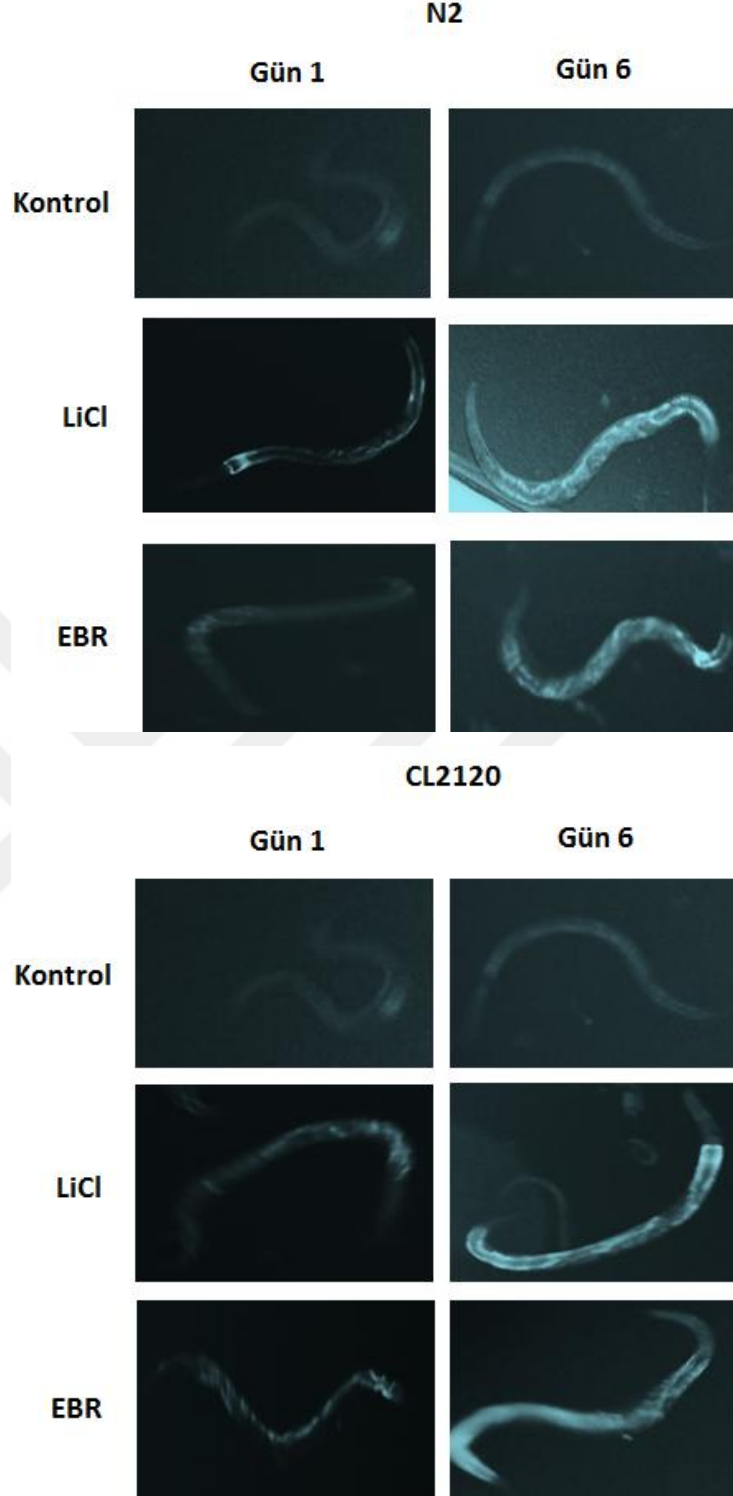
Şekil 4. 7. HCT-116, HT-29 ve HT-29 p53^{+/+} (Sırasıyla A,B,C) hücre hatlarında yapılan immünoblotlama ile endoplazmik retikulum stresi ile bağlantılı proteinlerin anlatım seviyelerinin gösterilmesi. Kalretikulin, Kalneksin, BiP, PDI, Ire1 α , ATF6, PERK, ATF4, CHOP, p-elf2 α (Ser51) proteinlerinin anlatım seviyeleri incelenmiş, sonuçların doğrulanması amacıyla hücrelerde anlatımının değişmesi öngörülmeven β -aktin kullanılmıştır ve her sonuç en az 2 kere tekrarlanmıştır.

4.7. EBR'nin Farklı *C. elegans* Suşlarında İlaç Toksisitesinin Belirlenmesi

Amiloid- β ve GSK3 β anlatım durumları açısından farklı *C. elegans* suşları artan dozlarda EBR ve pozitif kontrol olarak LiCl uygulamasına tabi tutulmuştur [160]. ölümlerin hangi günlerde gerçekleştiği ve hangi sayıda gerçekleştiği not edilmiştir. Ölü *C. elegans* "ölüm ışması" adı verilen, ölü *C. elegans* organizmalarında gözlemlenen ve UV ışık altında ölü *C. elegans* organizmalarının tespitini sağlayan yöntemle tespit edilmişlerdir. Elde edilen verilere göre her üç *C. elegans* suşunda EBR uygulaması sonucunda ilk 5 gün ölüm gözlemlenmemektedir (Şekil 4.8.). 6 gün sonrasında elde edilen verilere göre artan EBR dozlarına göre ölü sayısı N2 (doğal tip) ($p < 0.0001$) ve WM104 (GSK3 β mutant) ($p < 0.001$) suşlarında ölü sayılarında artış gözlemlenmiştir. Artan sayıların yanında LiCl ile karşılaştırıldığında ölü sayıları daha düşük sayılarda tespit edilmiştir. CL2120 (A β_{3-42} anlatımı olan) suşunda ise düşük EBR dozlarında (10, 20 μM) daha fazla ölüm gözlemlenirken artan dozla (30 μM) birlikte daha düşük ölü sayısı tespit edilmiştir ($p < 0.05$). CL2120 suşunda 30 μM EBR dozunda elde edilen ölü sayısı LiCl uygulanmış CL2120'lerden daha düşük sayıda oldukları tespit edilmiştir. Elde edilen veriler *C. elegans* suşlarında tespit edilen "ölüm ışması" ile kontrol edilmiştir (Şekil 4.9.).



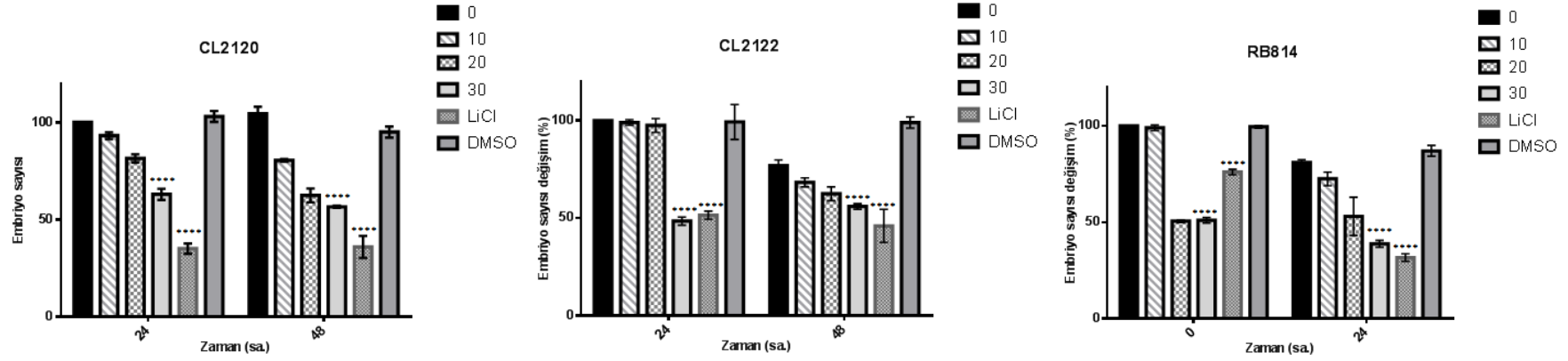
Şekil 4. 8. (A) N2 (Doğal tip), (B) CL2120 (Aβ3-42 anlatımı olan) ve (C) WM104 (GSK3β mutant) suşlarına artan dozlarda EBR ve LiCl uygulaması sonucunda ölen *C. elegans* verilerinin alınması.



Şekil 4. 9. N2 (Doğal Tip) ve CL2120 (A β 3-42 anlatımı olan) suşlarında LiCl ve EBR uygulamasıyla birlikte ölüm ışımalarının tespit edilmesi. (eksitasyon/emisyon: 340 nm/430 nm)

4.8. EBR'nin GSK3 β ve Alzheimer Hastalığı Modeli *C. elegans* Suşlarında Fertilite Durumlarının İncelenmesi

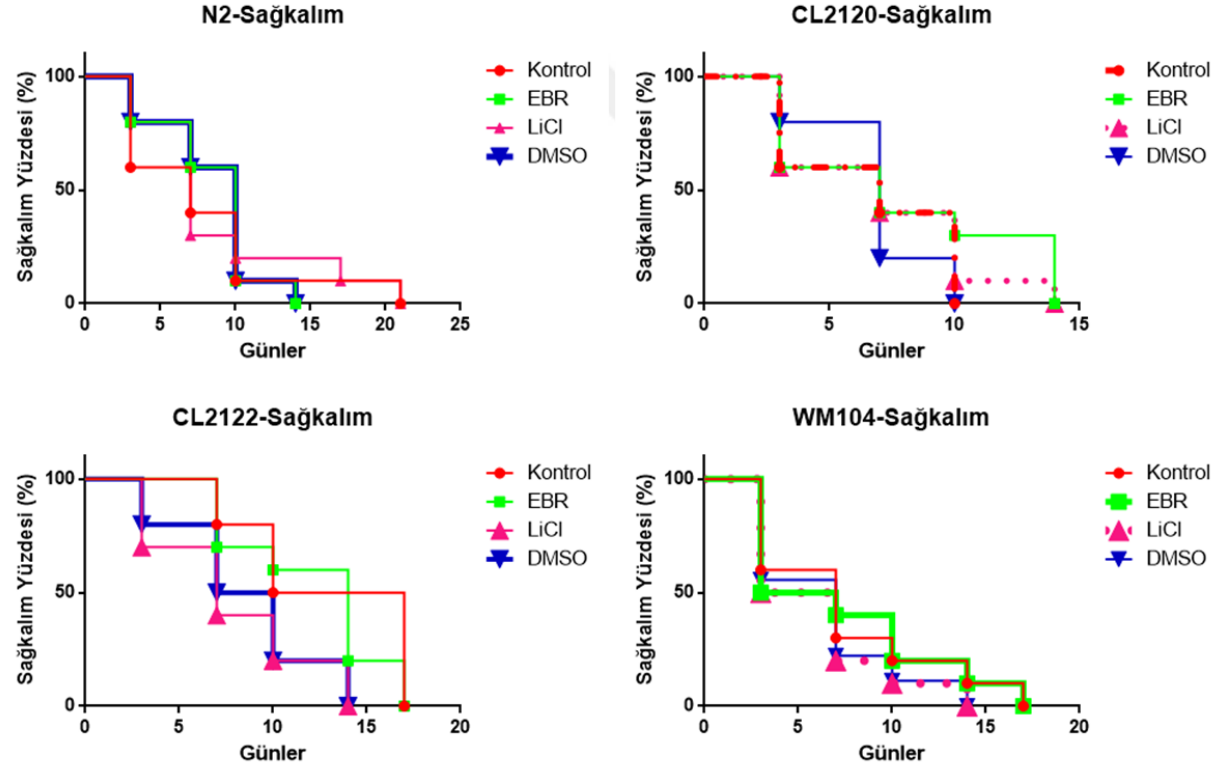
C. elegans suşlarında yapılan fertilite deneyi *C. elegans* suşlarının davranış durumlarına göre verdikleri tepkiyi değiştirmekte, dış etkenlere bağlı olarak yumurtlama seviyelerini değiştirebilmektedirler. Bu değişimler incelendiğinde literatürde GSK3 β inhibitörü olan ve EBR'in bu etkisi için pozitif kontrol olarak seçilmiş olan LiCl'in fertiliteye ket vurduğu tespit edilmiştir. Bu durum literatürdeki verilerle GSK3 β mutantlarıyla yapılan deneylerle uyusmaktadır [160]. Bu değişimlerde EBR uygulamasının *C. elegans* suşlarında gösterdiği fertilite sonuçlarına göre *C. elegans* suşlarında doz artışıyla birlikte zaman içerisinde EBR uygulaması sonucunda yumurta oluşturma miktarlarında azalma gerçekleştiği gözlemlenmektedir (Şekil 4.10.) ($p < 0.0001$). Bu bilginin yanısıra EBR uygulamasından fertilite seviyesinde etkilenen suşlardan CDK5 mutant olan RB814 ve A β_{3-42} anlatımı olan CL2120 *C. elegans* suşlarının EBR'dan daha fazla etkilendiği, kontrol suşundaki yumurtlama seviyesi bağıl olarak kontrole göre daha az düştüğü gözlemlenmiştir ($p < 0.0001$).



Şekil 4. 10. *C. elegans* suşlarında yapılan yumurta sayımlarına göre CL2120 (A β 3-42 anlatımı var) (A), CL2122 (CL2120 için kontrol suşu) (B), RB814 (CDK5 mutant) (C) *C. elegans* suşlarında farklı EBR konsantrasyonlarındaki (10, 20, 30 μ M) *C. elegans* suşlarının yumurtlama miktarları. Her kondisyon için 2 L4 larva kullanılmış olup 72 saat sonrasında aşırı bakteri üremesi sebebiyle yumurta sayısı mümkün olmamıştır. İlk 48 saatlik veriler şekildeki gibidir. **** p< 0.0001.

4.9. EBR'nin Farklı *C. elegans* Suşlarının Yaşam Sürelerine Olan Etkisinin Gösterilmesi

Farklı *C. elegans* suşlarında gerçekleştirilmiş olan sağkalım deneyinde *C. elegans* suşlarına uygulanan 30 μ M EBR, 10 μ M LiCl ve EBR ile aynı miktarda uygulanmış çözücü olan DMSO'nun N2, CL2120, CL2122 ve WM104 suşlarının ölüm zamanları kaydedilmiştir. Deney sonucunda son *C. elegans* öldüğünde elde edilen sonuçlara göre EBR doğal tip *C. elegans* suşunda toksik gelerek yaşam sürelerini kısalttığı sonucu ortaya çıkmaktadır. Ancak amiloid- β anlatımı yüksek AD modeli CL2120 *C. elegans* suşunda bu durum tam tersine dönmekte olduğu, EBR'in yaşam süresinin kontrol ve çözücüye göre daha fazla olduğu saptanmıştır. Bununla beraber GSK3 β mutant olan WM104 *C. elegans* suşunda EBR'in kontrol grubu ile hemen hemen aynı yaşam süresine sahip olduğu sonucu ortaya çıkmıştır. Bu bağlamda GSK3 β inhibitörü olan LiCl'ün sonuçları incelendiğinde EBR ile benzer sonuçlar verdiği, hatta GSK3 β mutant olan suşta EBR'a göre daha toksik gelerek yaşam süresini kısalttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.11.).



Şekil 4. 11. EBR ve pozitif kontrol olan LiCl'in GSK3 β ve A β durumlarına göre farklılık gösteren N2 (Doğal tip), CL2120 (A β 3-42 anlatımı olan), CL2122 (CL2120 için kontrol suşu) ve WM104 (GSK3 β mutant) *C. elegans* suşlarının yaşam sürelerine olan etkisi

5. TARTIŞMA

Kolon kanseri gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde sıklıkla görülen kanser tiplerinden biridir ve coğrafi bölgelere, çevresel koşullara göre farklılık göstermektedir. Yağ bakımından zengin ve lif oranı düşük diyet de kanser gelişimini tetikleyen etkenlerdendir. Bu yüzden endüstrileşmiş ülkelerde kolon kanseri oranı gelişmekte olan ülkelere göre daha fazladır [161]. Bununla birlikte, kolon kanseri gelişim süreci genetik faktörlerle de tetiklenmektedir. Kolon kanseri teşhisi konulan hastaların % 30-35'inde kalıtımın rol oynadığı düşünülmektedir [162]. Kanser tedavilerini daha etkin ve sonuç alıcı hale getirmek için yapılan çok sayıda çalışma olmasına ve her geçen gün yeni tedavi yöntemleri geliştirilmesine rağmen, kansere bağlı ölümler hala ilk sıralarda gelmektedir. Ayrıca mevcut tedavi yöntemlerinde, yan etkiler, belirli bir süre sonra tedavinin etkisiz hale gelmesi ya da tedaviye direnç gibi sebeplerden dolayı alternatif tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi veya yeni biyolojik, kimyasal, farmakolojik, genetik, hedefe yönelik veya daha farklı ajanların geliştirilmesi çalışmalarının daha hızlı şekilde sürdürülmesini gerektirmektedir.

EBR, bitkilerde büyümeyi teşvik eden, memelilerdeki steroid hormonlara yapısal benzerlik gösteren brassinosteroid ailesi üyesidir. Bitkilerde rolleri ve sinyal mekanizması uzun yıllardır bilinmekle beraber, insan hücrelerine etkisi ilk defa 2008 yılında Malikova ve ark. tarafından incelenmiştir. Bu çalışma EBR'nin çeşitli kanser hücrelerinde hücre canlılığına ket vurucu etkisini ortaya koymuştur. Bu çalışmayı takiben, EBR'nin meme, prostat gibi farklı kanser türleri üzerindeki apoptotik etkisi araştırılmış ve EBR'nin hücre döngüsüne etki ederek apoptotik hücre ölümünü indüklediği gösterilmiştir [4-8-9-42-43]. EBR'nin neden olduğu apoptozun moleküler temellerinin anlaşılabilmesi için hücre içi proteomik değişimler SILAC (stable-isotope labelled aminoacid in cell culture) yöntemi laboratuvarımızca belirlenmiştir. Kütle spektrometrisine dayalı proteomik bir yaklaşım olan SILAC

metodu ile radyoaktif işaretleme olmaksızın proteinlerin anlatımları ve modifikasyonları belirlenebilmektedir. Yapılan çalışma sonucu EBR uygulamasına maruz kalan hücrelerde hücre sağkalımı, apoptoz, endoplazmik retikulum (ER) stresi ve ubiquitinlenme ile ilgili pek çok proteinin anlamlı bir şekilde ilaç uygulanmamış kontrol hücrelere göre değiştiği laboratuvarımızca gösterilmiştir [51].

Bu bilgiler doğrultusunda bu çalışmada EBR'nin alternatif kanser terapötiklerinden biri olup olamayacağı araştırılmıştır. İlk olarak yapılan MTT testi ile, p53 durumu açısından doğal tip (HCT-116), DNA bağlanma bölgesinde mutasyon olan p53 taşıyan (HT-29) ve mutant p53 taşıyan hücre hattına doğal tip p53 transfeksiyonu yapılmış ve sabit hücre hattı oluşturulmuş (HT-29 p53^{+/+}) hücre hatları kullanılarak farklı konsantrasyonlarda EBR uygulamasının bağıl hücre canlılığı üzerine etkisi incelenmiştir. Bu bağlamda p53 kondüsyonu farklı olmasına karşın ortak olarak 30 µM EBR dozunda %50'ye en yakın hücre canlılığı değerleri alınmıştır. Bu durum benzer şekilde prostat kanseri hücre hatlarında benzer şekilde 25 µM dozunda elde edildiği daha önce yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [9]. Bu durumda %50 hücre canlılığı alınan dozda yapılan sağkalım analizine göre hücre hatlarında farklı direnç durumları oluşmasına karşın tüm hücre hatlarında EBR'ın 30 µM'lık dozunda sitostatik etki yaptığı, HT-29 hücre hattında p53 durumundan dolayı ilk 24 saatte direnç gözlenmesine karşın bu direncin 48. saatten sonra kırıldığı gözlemlenmiştir. Bu durumlar ışığında EBR'ın hücre hatlarında p53 durumu ne olursa olsun hücre büyümesini engelleyici etki yaptığı gösterilmiştir. Daha önce prostat p53 anlatımları bakımından farklı prostat kanseri hücre hatlarında yapılan araştırma da bu durumun benzer şekilde olduğu ortaya çıkartılmıştır [9].

Literatürde yer alan bilgilere göre EBR ile yapılan çalışmalarda östrojen reseptörü anlatımlarına göre farklı meme kanseri hücre hatlarında EBR'ın hücre döngüsünü durdurabildiği ve apoptotik ölümü tetikleyebildiği gösterilmiştir [42]. Bu çalışmaya bağlı olarak, PI boyaması sonucunda subG1 populasyonundaki artış olduğu, bu durumun p53 durumu farklı hücre hatları söz konusu olduğunda her hücre hattında

SubG1'nın arttığı gösterilmiştir. p53 doğal tip ve HT-29 p53^{+/+} hücre hatlarında EBR ile birlikte gelen apoptotik hücre topluluğu daha az HT-29 hücre hattında daha fazla olmuştur. Sağkalım ve bağıl hücre canlılığı testlerinde HT-29 daha yüksek direnç göstermesine karşın apoptotik hücre popülasyonu açısından HT-29 hücre hattında daha fazla apoptotik hücre gözlemlenmesi EBR'ın p53'ten bağımsız yollarında apoptozu tetikleyebileceği durumunu ortaya çıkartmıştır. Literatürde p53 ile bağlantılı olacak şekilde ER stres durumunda hücre döngüsünün durduğu, hücre döngüsünün p53'ten bağımsız şekilde etkilenmesinin GSK3 β aktivitesiyle ilişkili olabileceği sonuçları bulunmuştur [163-164].

Hücrelerdeki p53 anlatımı durumu farklı olmasına karşın her 3 hücre hattının da apoptozun görüldüğü tespit edilmiştir. p53 metabolizması incelenecek olduğunda stres durumunda p53'ün aktivitesini düzenleyen MDM-2'nun anlatımının artması p53'ün ubiquitine bağlı proteozomal yıkılmayla etkisinin azalmasına sebep olacağı tespit edilmiştir [165]. Bu bağlamda öncelikle p53 kondisyonları ve p53 ile ilişkili yollar 3 farklı hücre hattında tarandığında p53 kondisyonları değişse bile içsel apoptotik yolağı tetikleyen Bax proteininin anlatım seviyesinin her 3 hücre hattında da zamana bağıl şekilde artış olduğu gösterilmiş, HT-29 hücre hattında p53 mutant olmasına karşın PUMA proteininde zamana bağıl artış olduğu gösterilmiştir. PUMA proteininin p53 anlatım durumu farklı dahi olsa ER stres veya farklı transkripsiyon faktörleriyle anlatımının sağlanabileceği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [166]. p53'ün Ser15'ten fosforlanmış olması durumu her 3 hücre hattında da gerçekleştiği gösterilmiştir. p53'ün Ser15 fosforlanması hücrede stres cevabı olarak oluşturulmaktadır ve MDM-2 vasıtasıyla fosforlanmış p53 proteininin dengede tutulması sağlanmaktadır [167]. Bu sonuçlar ışığında EBR'ın p53 ile ilişkili yollardan da hücreleri apoptoza teşvik ettiği, p53'ün işlevsel olmadığı durumlarda da apoptozu teşvik eden proteinlerin anlatımını arttırdığı gösterilmiştir. Bu durumun p53 anlatım durumları farklı erkek eşey hücresi kanserlerinde sisplatin adlı kemoterapötik ile tetiklenebildiği belirlenmiştir [168].

Yapılan araştırmalarda GSK3 β 'nin hücresel apoptozu içsel yoldan tetikleyebileceği, bu duruma GSK3 β 'nin fosforilasyonunu tetikleyen hücresel stres etmenlerinin sebep olabileceği, bu durumun p53'ten bağımsız Şekilde gerçekleştirebileceği sonucu ortaya konmuştur [169]. Bu durum açısından GSK3 β 'nin fosforlanma durumu incelendiğinde EBR'ın aktif bir Şekilde ilk 48 saat içerisinde fosforlanmasının azaltılarak tüm hücre hatlarında bu proteininin sağkalım işlevinin sonlandırıldığı gösterilmiştir. Bununla birlikte 72 saat sonunda bu işlevine daha yüksek fosforlanma ile ulaştığı gösterilmiştir. Bu bağlamda GSK3 β 'nin etkilediği ve etkilendiği yolaklar incelendiğinde AKT tarafından değiştirilen fosforlanma durumunun [170] AKT fosforlanma durumuyla uyuşmadığı, bu kısımda farklı yolakların görev alabileceği düşüncesi oluşmuştur ve bu yolağın p38 MAPK olabileceği üzerinde durulmaktadır [108]. Bu bağlamda esas olarak GSK3 β 'nin etkilediği protein olan β -kateninin ubikuitine bağlı proteozomal bozunması sonucu olarak β -katenin seviyelerinde düşüş gerçekleştiği gösterilmiştir. Bu bağlamda sağkalım yolağının kapatılmasıyla birlikte apoptotik belirteç olarak gösterilebilecek kaspaz-3 ve PARP kesilim durumları incelendiğinde HCT-116 ve HT-29 p53^{+/+} hücre hatlarında ortak olarak 24. saatte hücreler apoptotik cevap vermiş olmakta olup 24 saat sonrasında bu cevabın kaybolduğu gözlemlenmektedir. Bu durumun karşıtı olarak HT-29 hücre hattında bu cevabın geri çekilmediği bu durumun p53'n mutant olması diğer hücre hatlarında p53'n apoptoz ve sağkalımda denge görevi görürken EBR ile tetiklenen stres durumunu tersine dönüştürecek Şekilde tepki vermesine sebep olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu durum MDM-2 artışına karşın artmakta olan doğal tip p53 anlatımının artışı, p53 anlatımı arttırılan HT-29 hücre hattında p53'n anlatımının düşüşü de bu durumu desteklemektedir. Aynı Şekilde literatürde doğal tip p53'n de aşırı anlatımı gerçekleştiği durumlarda hücre sağkalımını tetiklediği sonucu ortaya çıkartılmıştır [171].

Yapılan araştırmada hücrelerde EBR'ın sağkalımı engellediği, bunu da GSK3 β proteininin fosforlanmasını değiştirerek gerçekleştiği bulunmuştu. Bu duruma hangi proteinlerin sebep olduğu araştırıldığında AKT proteini dışında bir proteininin bu

durumu etkilediği öngörölmüş bu konuda daha önce yapılan çalışmalarda EBR'in aynı zamanda MAPK yolağı üzerinde sağkalım üzerinde engelleyici özelliğı olduğı tespit edilmiştir [111]. Bu bağlamda MAPK yolağına ait stres ile bağlantılı p38 proteini incelendiğinde GSK3β'nın inhibe olduğı zamanlarda p38'in de fosforlanmış olduğı tespit edilmiştir. p38'in diğeri bir işlevinin de forkhead yolağı proteinlerinden FoxO3a proteininin de fosforlanmasını engelleyerek nükleusa göçünü sağlayarak hücreleri apoptoza teşvik etmek olduğundan bu durumun gerçekleşip gerçekleşmediğı incelendiğinde FoxO3a proteininin fosforlanmasının azaldığı tespit edilmiştir. Bu durum doksorubisin adı verilen ilaç vasıtasıyla meme kanseri hücre hatlarında gerçekleştiğı bulunmuştur [107]. SAPK/JNK proteininin β-katenin proteininin etkinliğinin azaltılmasıyla birlikte etkinliğinin azaldığı yapılan araştırmalarla gösterilmiştir [172]. Bu çalışmaların ışığında GSK3β'nın etkisinde hücre sağkalımını düzenleyen SAPK/JNK proteinlerinin fosforlanmasının da GSK3β'nın inhibe olmasıyla birlikte azaldığı tespit edilmiş, hücre sağkalımına ket vurma durumunun buradan da desteklendiğı gösterilmiştir. Tüm bunların yanında hücredeki translasyonel mekanizmada görevli p70S6K proteininin ER stres koşulları durumunda protein anlatım mekanizmasının durdurulması gerektiğı durumlarda fosforlanması engellenerek protein anlatımı durulması sağlanmış, bu durum her 3 hücre hattında ortak olarak gerçekleştiğı gösterilmiştir.

Bu bağlamda taranan ER stres ile alakalı proteinlerin anlatım durumları 48 saatlik zaman diliminde incelendiğinde EBR'in 3 hücre hattında da kalretikulin, PDI ve BiP şaperonlarının anlatım seviyelerinin arttığı, bu durumun aşırı protein anlatımı durumu oluşumundan kaynaklandığı, bu durumu sağlayan ve ER şaperonlarının anlatımını arttıran ATF6 proteininin de anlatımının arttığı, bu bağlamda ER membranındaki ER stres ile aktifleşen reseptör proteinlerden PERK proteininin de anlatım seviyelerinin EBR uygulamasıyla birlikte arttığı, bu proteinlerin işlevlerini yerine getirmeleri durumunda UPR oluşturacak ve hücrede apoptozun tetiklenmesini sağlayacak ATF4, CHOP gibi proteinlerin de anlatım seviyelerinde artış olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar EBR ile yapılan önceki çalışmalarla bağlantılı olacak

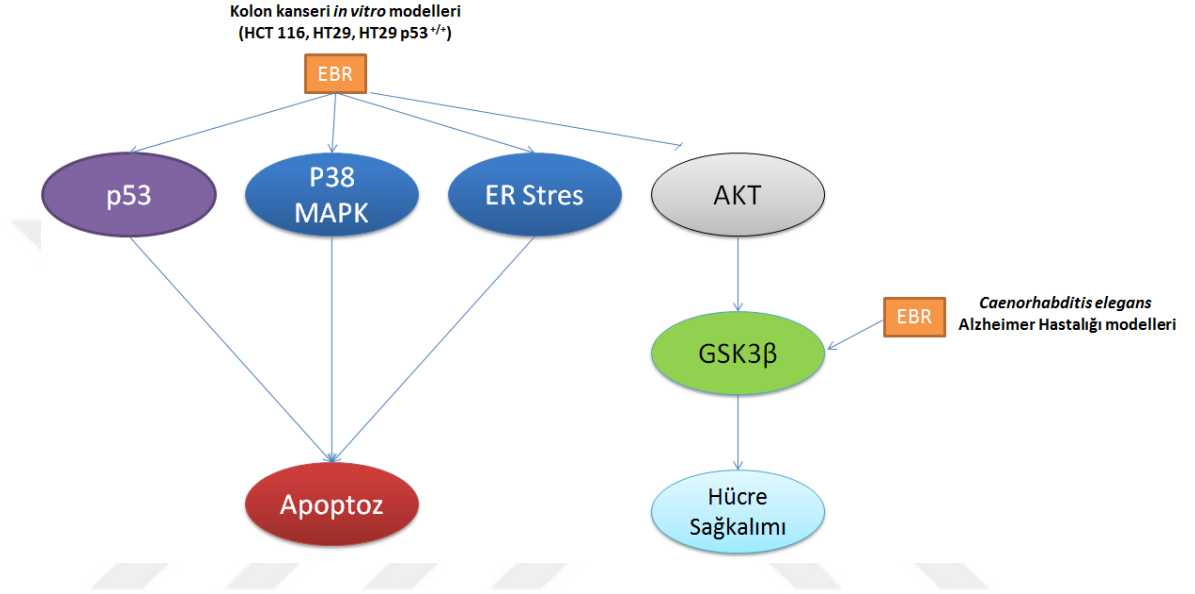
şekildedir. *Arabidopsis thaliana* ile yapılan deneylerde brassinosteroidlerin bitkisel ER stres yolaklarını aktifleştirdiği tespit edilmiş [173], bununla birlikte prostat kanseri hücre hatlarında kalretikulin anlatımı seviyesini etkileyerek UPR oluşumuna sebep olduğu tespit edilmiştir [51]. Bu bağlamda PERK ile ilk aktifleşen ve fosfor bağlanan eIF2 α proteininin fosforlanmasının artması bu yolağın çalıştığını göstermektedir. Tüm bunlarla birlikte yapılan başka bir çalışmada gösterildiği üzere CHOP proteini hücrede BH3 domaini bulunan apoptozu tetikleyen proteinlerin anlatım seviyelerini arttıran bir transkripsiyon faktörü görevi üstlenmektedir. Bu durumun oluşması için CHOP proteininin FoxO3a ile birlikte nükleusa göçmesi gerektiği belirtilmiştir [124]. Bu durumu EBR'ın da oluşturduğu p38 aracılığıyla FoxO3a'nın fosforlanmasını engelleyerek nükleusa göçünü sağladığı, ER stresi tetiklemesi sonucunda da CHOP anlatımını arttırması ve apoptotik proteinlerden özellikle Bax proteininin anlatımının p53'ten tamamen bağımsız bir şekilde artmasının sebebinin bu olduğu sonucu ortaya çıkarılmıştır.

Tüm bu sonuçların ışığında GSK3 β proteininin 72 saatlik zaman diliminde aşırı fosforlanmasının gerçekleşmesi, GSK3 β 'nin aktivitesinin tekrar azalma göstermesi ve bu mekanizmayla tedavi edilen bir hastalık olan AD'ye EBR'nin alternatif bir ilaç olabileceği düşüncesini oluşturmuştur [174-175]. AD, beyin belirli bölgelerinde (korteks ve hippokampus) hücre yitimi ile karakterize nörodejeneratif bir süreçtir. Daha önceki çalışmalarda ile diğer nörodejeneratif hastalıklardaki hücre ölümünde apoptozun rolü olabileceği gösterilmiştir [145]. Ayrıca, AD gibi nörodejeneratif hastalıklarda apoptozun aktive olmasıyla artmış hücre kayıpları (nöron) gerçekleşmektedir [129]. Genetik ve epidemiyolojik çalışmalarda, AD'de yukarı Wnt ve insulin sinyal yolu ara maddelerinin değişiklikleri nedeniyle GSK3'ün deregüle olduğu görülmektedir. Wnt sinyalinin ko-reseptörü olan düşük yoğunlukta lipoprotein reseptörü ile ilişkili protein (LRP6), apolipoprotein E4-e4 negatif bireylerde geç başlangıçlı AD için bir risk gen olarak tespit edilmiştir; bu da AD patolojisinde anormal Wnt sinyalinin neden olduğu belirlenmiştir.

Daha önce literatürde brassinosteroidlerin *C. elegans* model organizmasında irdelendiğine dair bir veriye rastlanılmamıştır. Bu noktadan ve EBR'nin GSK3 β üzerindeki *in vitro* da elde edilen etkisinden yola çıkarak bu çalışmada öncelikle ilaç uygulaması sonucunda EBR'in toksik etkisi ölü sayımları yapılarak gerçekleştirilmiştir. 6 günün sonunda yüksek EBR dozunda daha az ölü tespit edilen suş AD modeli CL2120 suşu olduğu ortaya çıkmış, EBR'in CL2120 suşunda daha az toksik etki gösterdiği belirlenmiştir. EBR AD modeli *C. elegans* suşlarını daha az toksik olarak etkilediği belirlenmiştir. Bu bağlamda AD modeli ve GSK3 β işlevini yitirmiş *C. elegans* suşlarında yapılan sağkalım analizlerinde EBR uygulamasıyla birlikte AD modeli *C. elegans* suşlarında yaşam süresinin artış gösterdiği belirlenmiştir. Bu anlamda LiCl ile yapılan yaşam süresi tayinlerinde doğal tip *C. elegans* suşunun yaşam süresinin arttığı tespit edilmiştir [160]. Bu durum yapılan deneyde de gösterilmiş, EBR'in özellikle A β anlatımı yüksek CL2120 suşunun yaşam süresini LiCl ile benzer şekilde fazladan arttırması AD üzerine EBR'in etkili olabileceği düşünülmüştür. Daha önce LiCl ile yapılan çalışmada doğal tip *C. elegans* suşunda yapılan çalışmada LiCl'nin yumurtlama miktarını azalttığı tespit edilmiştir [160]. Burada yapılan yumurtlama miktarlarında yapılan analizlerde ise doza bağlı EBR uygulamasıyla birlikte *C. elegans* suşlarından AD modellerinde yumurtlama seviyesinin LiCl'e göre daha az azaldığı, bu durumun EBR'in *C. elegans* suşlarından özellikle AD modeli suşlarına LiCl'den daha az toksik etki yaptığını göstermektedir.

Tüm bu bilgilerin ışığında, EBR'nin kanser hücrelerinde apoptozu tetiklediği bunu hücre sağkalım yollarının durdurulması ve bununla birlikte ER stresin tetiklenmesi vasıtasıyla apoptotik proteinlerin anlatımlarını arttırarak yaptığı belirlenmiştir (Şekil 5.1.). EBR'nin kanser hücrelerindeki apoptotik etkisinin *in vivo* etkilerinin *C. elegans* veya fare modellerinde saptanması gelecek çalışmaları oluşturacaktır. Bununla birlikte uzun süreli EBR uygulamasında GSK3 β 'nin tekrar fosforlanmış olması AD durumunda alternatif tedavi olabilecek ilaçlardan olabileceği *C. elegans* model organizmalarında bu çalışma ile ilk defa gösterilmiştir Şekil 5.1.). AD

terapisinde özellikle GSK3 β fosforilasyonun Ser9 domeninden sağlanması hücre içerisinde birçok kinaz molekülü tarafından sağlandığı bilinmektedir [176]. Bu doğrultuda, EBR'nin *C. elegans* model organizmasında hangi yollar üzerinde etkili olarak AD tedavisinde kullanabileceği modellenenektir. Ayrıca, fosforlanma sağlayan diğer kinaz molekülü inhibitörleri ile kombine uygulamalarda etkili terapi için denemelerin gerçekleştirilmesi planlanmaktadır.



Şekil 5. 1. EBR kolon kanseri hücrelerinde apoptozu tetiklerken sağkalımı baskılamaktadır. AD modeli *C. elegans*larda ise GSK3 β aracılığı ile sağkalımı tetiklemektedir.

6. REFERANSLAR

1. Bretthauer, M., *Colorectal cancer screening*. Journal of internal medicine, 2011. **270**(2): p. 87-98.
2. Conlin, A., et al., *The prognostic significance of K-ras, p53, and APC mutations in colorectal carcinoma*. Gut, 2005. **54**(9): p. 1283-1286.
3. Zilfou, J.T. and S.W. Lowe, *Tumor suppressive functions of p53*. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2009. **1**(5): p. a001883.
4. Malikova, J., et al., *Anticancer and antiproliferative activity of natural brassinosteroids*. Phytochemistry, 2008. **69**(2): p. 418-26.
5. Rao, S.S.R., et al., *Brassinosteroids-A new class of phytohormones*. CURRENT SCIENCE-BANGALORE-, 2002. **82**(10): p. 1239-1245.
6. Sun, Y., et al., *Integration of brassinosteroid signal transduction with the transcription network for plant growth regulation in Arabidopsis*. Developmental cell, 2010. **19**(5): p. 765-777.
7. Zhang, D., et al., *Transcription factors involved in brassinosteroid repressed gene expression and their regulation by BIN2 kinase*. Plant signaling & behavior, 2014. **9**(3): p. 59-70.
8. Obakan, P., et al., *Activation of polyamine catabolic enzymes involved in diverse responses against epibrassinolide-induced apoptosis in LNCaP and DU145 prostate cancer cell lines*. Amino Acids, 2014. **46**(3): p. 553-564.
9. Obakan, P., et al., *Epibrassinolide-induced apoptosis regardless of p53 expression via activating polyamine catabolic machinery, a common target for androgen sensitive and insensitive prostate cancer cells*. Prostate, 2014. **74**(16): p. 1622-33.
10. Voeltz, G.K., M.M. Rolls, and T.A. Rapoport, *Structural organization of the endoplasmic reticulum*. EMBO reports, 2002. **3**(10): p. 944-950.
11. Giese, K.P., *GSK-3: A key player in neurodegeneration and memory*. IUBMB life, 2009. **61**(5): p. 516-521.
12. Ferri, C.P., et al., *Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study*. The lancet, 2006. **366**(9503): p. 2112-2117.

13. Force, U.S.P.S.T., *Screening for colorectal cancer: Us preventive services task force recommendation statement*. JAMA, 2016. **315**(23): p. 2564-2575.
14. Kastrinos, F., et al., *Risk of pancreatic cancer in families with Lynch syndrome*. Jama, 2009. **302**(16): p. 1790-5.
15. Sieber, O.M., et al., *Whole-gene APC deletions cause classical familial adenomatous polyposis, but not attenuated polyposis or "multiple" colorectal adenomas*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(5): p. 2954-8.
16. Freeman, H.J., *Colorectal cancer risk in Crohn's disease*. World journal of gastroenterology, 2008. **14**(12): p. 1810.
17. Burch, J.A., et al., *Diagnostic accuracy of faecal occult blood tests used in screening for colorectal cancer: a systematic review*. J Med Screen, 2007. **14**(3): p. 132-7.
18. Imperiale, T.F., et al., *Fecal DNA versus fecal occult blood for colorectal-cancer screening in an average-risk population*. N Engl J Med, 2004. **351**(26): p. 2704-14.
19. Atkin, W.S., et al., *Once-only flexible sigmoidoscopy screening in prevention of colorectal cancer: a multicentre randomised controlled trial*. Lancet, 2010. **375**(9726): p. 1624-33.
20. Ransohoff, D.F., *How Much Does Colonoscopy Reduce Colon Cancer Mortality?* Annals of Internal Medicine, 2009. **150**(1): p. 50-52.
21. Brenner, H., M. Kloor, and C.P. Pox, *Colorectal cancer*. The Lancet, 2014. **383**(9927): p. 1490-1502.
22. *Size of the bowel cancer tumour, its position and whether it has spread*. Available from: <https://www.bowelcanceraustralia.org/bowel-cancer-staging>.
23. Kahn moui, K., et al., *Laparoscopic surgery for colon cancer: a systematic review*. Canadian journal of surgery, 2007. **50**(1): p. 48.
24. Pachler, J. and P. Wille-Jørgensen, *Quality of life after rectal resection for cancer, with or without permanent colostomy*. The Cochrane Library, 2005.
25. Cirocchi, R., et al., *Radiofrequency ablation in the treatment of liver metastases from colorectal cancer*. The Cochrane Library, 2012.

26. Bang, H.J., et al., *Percutaneous cryoablation of metastatic lesions from colorectal cancer: Efficacy and feasibility with survival and cost-effectiveness observations*. ISRN minimally invasive surgery, 2012. **2012**.
27. Mirnezami, R., et al., *Intraoperative radiotherapy in colorectal cancer: systematic review and meta-analysis of techniques, long-term outcomes, and complications*. Surgical oncology, 2013. **22**(1): p. 22-35.
28. Gustavsson, B., et al., *A review of the evolution of systemic chemotherapy in the management of colorectal cancer*. Clinical colorectal cancer, 2015. **14**(1): p. 1-10.
29. Graham, J., M. Muhsin, and P. Kirkpatrick, *Fresh from the pipeline: Cetuximab*. Nature Reviews Drug Discovery, 2004. **3**(7).
30. Keating, G.M., *Bevacizumab: a review of its use in advanced cancer*. Drugs, 2014. **74**(16): p. 1891-1925.
31. Grove, M.D., et al., *Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from Brassica napus pollen*. 1979.
32. Bajguz, A., *Metabolism of brassinosteroids in plants*. Plant Physiol Biochem, 2007. **45**(2): p. 95-107.
33. Kim, T.W. and Z.Y. Wang, *Brassinosteroid signal transduction from receptor kinases to transcription factors*. Annu Rev Plant Biol, 2010. **61**: p. 681-704.
34. Gruszka, D., *The brassinosteroid signaling pathway-new key players and interconnections with other signaling networks crucial for plant development and stress tolerance*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(5): p. 8740-74.
35. Steigerova, J., et al., *Mechanisms of natural brassinosteroid-induced apoptosis of prostate cancer cells*. Food Chem Toxicol, 2012. **50**(11): p. 4068-76.
36. Wang, L., et al., *Heterotrimeric G protein alpha subunit is involved in rice brassinosteroid response*. Cell Res, 2006. **16**(12): p. 916-22.

37. Sharma, I., P.K. Pati, and R. Bhardwaj, *Effect of 24-epibrassinolide on oxidative stress markers induced by nickel-ion in Raphanus sativus L.* Acta Physiologiae Plantarum, 2011. **33**(5): p. 1723-1735.
38. Karlidag, H., E. Yildirim, and M. Turan, *Role of 24-epibrassinolide in mitigating the adverse effects of salt stress on stomatal conductance, membrane permeability, and leaf water content, ionic composition in salt stressed strawberry (Fragaria×ananassa).* Scientia Horticulturae, 2011. **130**(1): p. 133-140.
39. Carange, J., et al., *24-Epibrassinolide, a Phytosterol from the Brassinosteroid Family, Protects Dopaminergic Cells against MPP-Induced Oxidative Stress and Apoptosis.* J Toxicol, 2011. **2011**: p. 392859.
40. Yilmaz Gökdoğan, E. and B. BÜRÜN, *Development of Seedling and Germination of Tomato (Lycopersicon esculentum Mill.) Seeds Pre-applied 24-Epibrassinolide Under NaCl Stress Conditions.* Afyon Kocatepe University Journal of Sciences and Engineering, 2015. **15**(3): p. 18-27.
41. Zullo, M.A.T. and G. Adam, *Brassinosteroid phytohormones: structure, bioactivity and applications.* Brazilian Journal of Plant Physiology, 2002. **14**(3): p. 143-181.
42. Steigerova, J., et al., *Brassinosteroids cause cell cycle arrest and apoptosis of human breast cancer cells.* Chem Biol Interact, 2010. **188**(3): p. 487-96.
43. Coskun, D., et al., *Epibrassinolide alters PI3K/MAPK signaling axis via activating Foxo3a-induced mitochondria-mediated apoptosis in colon cancer cells.* Exp Cell Res, 2015. **338**(1): p. 10-21.
44. Singh, I. and M. Shono, *Physiological and Molecular Effects of 24-Epibrassinolide, a Brassinosteroid on Thermotolerance of Tomato.* Plant Growth Regulation, 2005. **47**(2): p. 111-119.
45. Sun, S., et al., *Foliar Application of 24-Epibrassinolide Improved Salt Stress Tolerance of Perennial Ryegrass.* HortScience, 2015. **50**(10): p. 1518-1523.

46. Kim, T.W., et al., *The CDG1 kinase mediates brassinosteroid signal transduction from BRI1 receptor kinase to BSU1 phosphatase and GSK3-like kinase BIN2*. Mol Cell, 2011. **43**(4): p. 561-71.
47. Peng, P., et al., *Regulation of the Arabidopsis GSK3-like Kinase BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 2 through Proteasome-Mediated Protein Degradation*. Molecular Plant, 2008. **1**(2): p. 338-346.
48. Yu, X., et al., *A brassinosteroid transcriptional network revealed by genome-wide identification of BES1 target genes in Arabidopsis thaliana*. Plant J, 2011. **65**(4): p. 634-46.
49. Ehsan, H., et al., *Interaction of Arabidopsis BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 1 receptor kinase with a homolog of mammalian TGF- β receptor interacting protein*. The Plant Journal, 2005. **43**(2): p. 251-261.
50. Anna Bafico, P.a.S.A.A., MD., *Signaling Pathways of Tyrosine Kinase Receptors*, in *Holland-Frei Cancer Medicine. 6th edition.*, M. Donald W Kufe, Raphael E Pollock, MD, PhD, Ralph R Weichselbaum, MD, Robert C Bast, Jr, MD, Ted S Gansler, MD, MBA, James F Holland, MD, ScD (hc), and Emil Frei, III, MD., Editor. 2003.
51. Obakan, P., et al., *SILAC-Based Mass Spectrometry Analysis Reveals That Epibrassinolide Induces Apoptosis via Activating Endoplasmic Reticulum Stress in Prostate Cancer Cells*. PLoS One, 2015. **10**(9): p. e0135788.
52. Alberts, B., et al., *Programmed cell death (apoptosis)*. 2002.
53. Reed, J.C. and K.J. Tomaselli, *Drug discovery opportunities from apoptosis research*. Current opinion in biotechnology, 2000. **11**(6): p. 586-592.
54. Nagata, S., *Apoptosis by death factor*. cell, 1997. **88**(3): p. 355-365.
55. Norbury, C.J. and B. Zivotovsky, *DNA damage-induced apoptosis*. Oncogene, 2004. **23**(16): p. 2797-2808.
56. Wang, L., F. Du, and X. Wang, *TNF- α Induces Two Distinct Caspase-8 Activation Pathways*. Cell, 2008. **133**(4): p. 693-703.

57. Hongmei, Z., *Extrinsic and intrinsic apoptosis signal pathway review*. 2012: INTECH Open Access Publisher.
58. Kang, Y.-H., et al., *Caspase-Independent Cell Death by Arsenic Trioxide in Human Cervical Cancer Cells Reactive Oxygen Species-Mediated Poly (ADP-ribose) Polymerase-1 Activation Signals Apoptosis-Inducing Factor Release from Mitochondria*. *Cancer research*, 2004. **64**(24): p. 8960-8967.
59. Horvitz, H.R., *Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans**. *Cancer research*, 1999. **59**(7 Supplement): p. 1701s-1706s.
60. Miura, M., et al., *Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 β -converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3**. *Cell*, 1993. **75**(4): p. 653-660.
61. Thornberry, N.A., et al., *A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 β processing in monocytes*. *Nature*, 1992. **356**(6372): p. 768-774.
62. McIlwain, D.R., T. Berger, and T.W. Mak, *Caspase functions in cell death and disease*. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2013. **5**(4): p. a008656.
63. Slee, E.A., C. Adrain, and S.J. Martin, *Executioner caspase-3,-6, and-7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis*. *Journal of biological Chemistry*, 2001. **276**(10): p. 7320-7326.
64. Strasser, A., *The role of BH3-only proteins in the immune system*. *Nature Reviews Immunology*, 2005. **5**(3): p. 189-200.
65. Kelekar, A. and C.B. Thompson, *Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis*. *Trends in cell biology*, 1998. **8**(8): p. 324-330.
66. Reed, J.C., *Bcl-2 family proteins*, in *Apoptosis and Cancer Chemotherapy*. 1999, Springer. p. 99-116.
67. Gross, A., J.M. McDonnell, and S.J. Korsmeyer, *BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis*. *Genes & development*, 1999. **13**(15): p. 1899-1911.

68. Martinou, J.-C. and R.J. Youle, *Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics*. *Developmental cell*, 2011. **21**(1): p. 92-101.
69. Schlesinger, P.H., et al., *Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997. **94**(21): p. 11357-11362.
70. Igney, F.H. and P.H. Krammer, *Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis*. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(4): p. 277-88.
71. Walczak, H. and P.H. Krammer, *The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems*. *Experimental cell research*, 2000. **256**(1): p. 58-66.
72. Tait, S.W. and D.R. Green, *Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond*. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2010. **11**(9): p. 621-632.
73. Walczak, H. and T.L. Haas, *Biochemical analysis of the native TRAIL death-inducing signaling complex*. *Apoptosis and Cancer: Methods and Protocols*, 2008: p. 221-239.
74. Wang, X., *The expanding role of mitochondria in apoptosis*. *Genes & development*, 2001. **15**(22): p. 2922-2933.
75. Würstle, M.L., M.A. Laussmann, and M. Rehm, *The central role of initiator caspase-9 in apoptosis signal transduction and the regulation of its activation and activity on the apoptosome*. *Experimental cell research*, 2012. **318**(11): p. 1213-1220.
76. Favalaro, B., et al., *Role of apoptosis in disease*. *Aging (Albany NY)*, 2012. **4**(5): p. 330-349.
77. Fridman, J.S. and S.W. Lowe, *Control of apoptosis by p53*. *Oncogene*, 2003. **22**(56): p. 9030-40.
78. Benchimol, S., *p53-dependent pathways of apoptosis*. *Cell death and differentiation*, 2001. **8**(11): p. 1049-1051.

79. Surget, S., M.P. Khoury, and J.-C. Bourdon, *Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: a clinical perspective*. *Onco Targets Ther*, 2014. **7**: p. 57-68.
80. Vousden, K.H. and C. Prives, *Blinded by the light: the growing complexity of p53*. *Cell*, 2009. **137**(3): p. 413-431.
81. Brady, C.A. and L.D. Attardi, *p53 at a glance*. *J Cell Sci*, 2010. **123**(15): p. 2527-2532.
82. Olivier, M., M. Hollstein, and P. Hainaut, *TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use*. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2010. **2**(1): p. a001008.
83. Broz, D.K., et al., *Global genomic profiling reveals an extensive p53-regulated autophagy program contributing to key p53 responses*. *Genes & development*, 2013. **27**(9): p. 1016-1031.
84. Nikulenkov, F., et al., *Insights into p53 transcriptional function via genome-wide chromatin occupancy and gene expression analysis*. *Cell Death & Differentiation*, 2012. **19**(12): p. 1992-2002.
85. Momand, J., et al., *The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation*. *Cell*, 1992. **69**(7): p. 1237-1245.
86. Haupt, Y., et al., *Mdm2 promotes the rapid degradation of p53*. *Nature*, 1997. **387**(6630): p. 296-299.
87. Kubbutat, M.H., S.N. Jones, and K.H. Vousden, *Regulation of p53 stability by Mdm2*. *Nature*, 1997. **387**(6630): p. 299-303.
88. Meek, D.W., *Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response?* *Nature Reviews Cancer*, 2009. **9**(10): p. 714-723.
89. Meek, D.W. and C.W. Anderson, *Posttranslational modification of p53: cooperative integrators of function*. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2009. **1**(6): p. a000950.
90. Jones, R.G., et al., *AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint*. *Molecular cell*, 2005. **18**(3): p. 283-293.

91. Teufel, D.P., M. Bycroft, and A.R. Fersht, *Regulation by phosphorylation of the relative affinities of the N-terminal transactivation domains of p53 for p300 domains and Mdm2*. *Oncogene*, 2009. **28**(20): p. 2112-2118.
92. Polley, S., et al., *Differential recognition of phosphorylated transactivation domains of p53 by different p300 domains*. *Journal of molecular biology*, 2008. **376**(1): p. 8-12.
93. Proctor, C.J. and D.A. Gray, *GSK3 and p53-is there a link in Alzheimer's disease?* *Molecular Neurodegeneration*, 2010. **5**(1): p. 1.
94. Kulikov, R., K.A. Boehme, and C. Blattner, *Glycogen synthase kinase 3-dependent phosphorylation of Mdm2 regulates p53 abundance*. *Molecular and cellular biology*, 2005. **25**(16): p. 7170-7180.
95. Ma, C., et al., *GSK3beta mediates the carcinogenic effect of HPV16 in cervical cancer*. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 16555.
96. Wu, D. and W. Pan, *GSK3: a multifaceted kinase in Wnt signaling*. *Trends in biochemical sciences*, 2010. **35**(3): p. 161-168.
97. Jacobs, K.M., et al., *GSK-3beta: A Bifunctional Role in Cell Death Pathways*. *Int J Cell Biol*, 2012. **2012**: p. 930710.
98. MacDonald, B.T. and X. He, *Frizzled and LRP5/6 receptors for Wnt/ β -catenin signaling*. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2012. **4**(12): p. a007880.
99. Cadigan, K.M. and M.L. Waterman, *TCF/LEFs and Wnt signaling in the nucleus*. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2012. **4**(11): p. a007906.
100. *Diagram of the canonical Wnt pathway in the presence and absence of Wnt*.
101. Cohen, P., *The Croonian Lecture 1998. Identification of a protein kinase cascade of major importance in insulin signal transduction*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 1999. **354**(1382): p. 485-495.
102. McCubrey, J.A., et al., *GSK-3 as potential target for therapeutic intervention in cancer*. 2014.

103. Hooper, C., R. Killick, and S. Lovestone, *The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease*. Journal of neurochemistry, 2008. **104**(6): p. 1433-1439.
104. Bloom, G.S., *Amyloid- β and tau: the trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis*. JAMA neurology, 2014. **71**(4): p. 505-508.
105. Cargnello, M. and P.P. Roux, *Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2011. **75**(1): p. 50-83.
106. Cuadrado, A. and A.R. Nebreda, *Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling*. Biochemical Journal, 2010. **429**(3): p. 403-417.
107. Ho, K.-K., et al., *Phosphorylation of FOXO3a on Ser-7 by p38 promotes its nuclear localization in response to doxorubicin*. Journal of Biological Chemistry, 2012. **287**(2): p. 1545-1555.
108. Thornton, T.M., et al., *Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3 β inactivation*. Science, 2008. **320**(5876): p. 667-670.
109. Tzivion, G., M. Dobson, and G. Ramakrishnan, *FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(11): p. 1938-45.
110. Wagner, E.F. and Á.R. Nebreda, *Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development*. Nature Reviews Cancer, 2009. **9**(8): p. 537-549.
111. Coskun, D., et al., *Epibrassinolide alters PI3K/MAPK signaling axis via activating Foxo3a-induced mitochondria-mediated apoptosis in colon cancer cells*. Experimental cell research, 2015. **338**(1): p. 10-21.
112. Chung, J., et al., *PDGF-and insulin-dependent pp70S6k activation mediated by phosphatidylinositol-3-OH kinase*. 1994.
113. Choi, C.-H., et al., *Proteasome inhibition-induced p38 MAPK/ERK signaling regulates autophagy and apoptosis through the dual phosphorylation of glycogen synthase kinase 3 β* . Biochemical and biophysical research communications, 2012. **418**(4): p. 759-764.

114. Sano, R. and J.C. Reed, *ER stress-induced cell death mechanisms*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1833**(12): p. 3460-70.
115. Bernales, S., F.R. Papa, and P. Walter, *Intracellular signaling by the unfolded protein response*. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2006. **22**: p. 487-508.
116. Lee, A.S., *The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress*. *Methods*, 2005. **35**(4): p. 373-381.
117. Gardner, B.M. and P. Walter, *Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response*. *Science*, 2011. **333**(6051): p. 1891-1894.
118. Oakes, S.A. and F.R. Papa, *The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology*. *Annu Rev Pathol*, 2015. **10**: p. 173-94.
119. *ER stress (UPR pathway) Simple review*. Available from: <http://visnu528.blogspot.com.tr/2013/08/er-stress-simple-review.html>.
120. Kober, L., C. Zehe, and J. Bode, *Development of a novel ER stress based selection system for the isolation of highly productive clones*. *Biotechnology and bioengineering*, 2012. **109**(10): p. 2599-2611.
121. Urano, F., et al., *Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1*. *Science*, 2000. **287**(5453): p. 664-666.
122. Yoneda, T., et al., *Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress*. *Journal of Biological Chemistry*, 2001. **276**(17): p. 13935-13940.
123. Rajesh, K., et al., *Phosphorylation of the translation initiation factor eIF2 α at serine 51 determines the cell fate decisions of Akt in response to oxidative stress*. *Cell death & disease*, 2015. **6**(1): p. e1591.
124. Ghosh, A.P., et al., *CHOP potentially co-operates with FOXO3a in neuronal cells to regulate PUMA and BIM expression in response to ER stress*. *PLoS One*, 2012. **7**(6): p. e39586.

125. Deldicque, L., *Endoplasmic reticulum stress in human skeletal muscle: any contribution to sarcopenia?* Front Physiol, 2013. **4**: p. 236.
126. Smith, M.H., H.L. Ploegh, and J.S. Weissman, *Road to ruin: targeting proteins for degradation in the endoplasmic reticulum.* Science, 2011. **334**(6059): p. 1086-90.
127. Leach, M.R. and D.B. Williams, *Calnexin and calreticulin, molecular chaperones of the endoplasmic reticulum,* in *Calreticulin.* 2003, Springer. p. 49-62.
128. Boden, G., et al., *Infusion of glucose and lipids at physiological rates causes acute endoplasmic reticulum stress in rat liver.* Obesity (Silver Spring), 2011. **19**(7): p. 1366-73.
129. Brenner, S., *Nobel lecture: nature's gift to science.* Bioscience reports, 2003. **23**(5): p. 225-237.
130. *Genome Sequence of the Nematode C. elegans: A Platform for Investigating Biology.* Science, 1998. **282**(5396): p. 2012-2018.
131. Leung, M.C., et al., *Caenorhabditis elegans: an emerging model in biomedical and environmental toxicology.* Toxicological sciences, 2008. **106**(1): p. 5-28.
132. Herman, R., *Introduction to sex determination.* WormBook, 2005.
133. http://web.science.uu.nl/developmentalbiology/boxem/elegans_intro.html. Available from: http://web.science.uu.nl/developmentalbiology/boxem/elegans_intro.html.
134. *A lateral (left side) anatomical diagram of an adult-stage nematode hermaphrodite Caenorhabditis elegans (C. elegans) with emphasis on the digestive and reproductive systems.*
135. Brenner, S., *The genetics of Caenorhabditis elegans.* Genetics, 1974. **77**(1): p. 71-94.
136. White, J.G., et al., *The structure of the nervous system of the nematode Caenorhabditis elegans.* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1986. **314**(1165): p. 1-340.

137. Corsi, A.K., *A biochemist's guide to C. elegans*. Analytical biochemistry, 2006. **359**(1): p. 1.
138. Gilbert, S.F., *Early Development of the Nematode Caenorhabditis elegans*. 2000.
139. Wormclassroom. *C. elegans Cell Lineage*. Available from: <http://wormclassroom.org/c-elegans-cell-lineage>.
140. Stein, K.K. and A. Golden, *The C. elegans eggshell*. WormBook, 2015: p. 1-35.
141. pages, M.B.s.t. *The C. elegans Lifecycle*. Available from: http://xyala2.bio.ed.ac.uk/teaching/tutorials/Caenorhabditis/caenorhabditis_lifecycle.shtml.
142. Fielenbach, N. and A. Antebi, *C. elegans dauer formation and the molecular basis of plasticity*. Genes & development, 2008. **22**(16): p. 2149-2165.
143. Kaletta, T. and M.O. Hengartner, *Finding function in novel targets: C. elegans as a model organism*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(5): p. 387-98.
144. Massey, H.C., Jr., et al., *The fork head transcription factor FKTF-1b from Strongyloides stercoralis restores DAF-16 developmental function to mutant Caenorhabditis elegans*. Int J Parasitol, 2006. **36**(3): p. 347-52.
145. Nuttley, W.M., K.P. Atkinson-Leadbetter, and D. Van Der Kooy, *Serotonin mediates food-odor associative learning in the nematode Caenorhabditiselegans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(19): p. 12449-54.
146. Levitan, D., et al., *Assessment of normal and mutant human presenilin function in Caenorhabditis elegans*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996. **93**(25): p. 14940-14944.
147. Zetterberg, H., et al., *Elevated cerebrospinal fluid BACE1 activity in incipient Alzheimer disease*. Archives of neurology, 2008. **65**(8): p. 1102-1107.
148. Wu, Y. and Y. Luo, *Transgenic C. elegans as a model in Alzheimer's research*. Current Alzheimer Research, 2005. **2**(1): p. 37-45.

149. Brion, J.-P., et al. *Neurofibrillary tangles and tau phosphorylation*. in *Biochemical Society Symposia*. 2001. Portland Press Limited.
150. Medina, M. and J. Avila, *Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease*. *Current pharmaceutical design*, 2010. **16**(25): p. 2790-2798.
151. Hernandez, F., J.J. Lucas, and J. Avila, *GSK3 and tau: two convergence points in Alzheimer's disease*. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2013. **33**(s1): p. S141-S144.
152. Takashima, A., et al., *Exposure of rat hippocampal neurons to amyloid β peptide (25–35) induces the inactivation of phosphatidylinositol-3 kinase and the activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 β* . *Neuroscience letters*, 1996. **203**(1): p. 33-36.
153. Wenya, W., *Inhibition of Tau Phosphorylation as a Potential Strategy in Treatment of Parkinson's Disease*. 2011: INTECH Open Access Publisher.
154. Link, C.D., *Expression of human beta-amyloid peptide in transgenic Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1995. **92**(20): p. 9368-9372.
155. Kraemer, B.C., et al., *Neurodegeneration and defective neurotransmission in a Caenorhabditis elegans model of tauopathy*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(17): p. 9980-5.
156. Dostal, V. and C.D. Link, *Assaying beta-amyloid toxicity using a transgenic C. elegans model*. *J Vis Exp*, 2010(44).
157. Gems, D. and C. Coburn, *The mysterious case of the C. elegans gut granule: death fluorescence, anthranilic acid and the kynurenine pathway*. *Frontiers in genetics*, 2013. **4**: p. 151.
158. Schneider, C.A., W.S. Rasband, and K.W. Eliceiri, *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis*. *Nat Meth*, 2012. **9**(7): p. 671-675.
159. Motulsky, H., *Analyzing data with GraphPad prism*. 1999: GraphPad Software Incorporated.

160. McColl, G., et al., *Pharmacogenetic analysis of lithium-induced delayed aging in Caenorhabditis elegans*. J Biol Chem, 2008. **283**(1): p. 350-7.
161. Hagggar, F.A. and R.P. Boushey, *Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors*. Clinics in colon and rectal surgery, 2009. **22**(04): p. 191-197.
162. Win, A.K., et al., *Risk prediction models for colorectal cancer: a review*. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 2012. **21**(3): p. 398-410.
163. Mlynarczyk, C. and R. Fåhraeus, *Endoplasmic reticulum stress sensitizes cells to DNA damage-induced apoptosis through p53-dependent suppression of p21CDKN1A*. Nature communications, 2014. **5**.
164. Yang, K., et al., *Glycogen synthase kinase 3 has a limited role in cell cycle regulation of cyclin D1 levels*. BMC cell biology, 2006. **7**(1): p. 1.
165. Yu, H., et al., *LIF negatively regulates tumour-suppressor p53 through Stat3/ID1/MDM2 in colorectal cancers*. Nature communications, 2014. **5**.
166. Yu, J. and L. Zhang, *PUMA, a potent killer with or without p53*. Oncogene, 2008. **27**: p. S71-S83.
167. Melnikova, V.O., et al., *Mutant p53 is constitutively phosphorylated at Serine 15 in UV-induced mouse skin tumors: involvement of ERK1/2 MAP kinase*. Oncogene, 2003. **22**(38): p. 5958-5966.
168. Burger, H., et al., *Expression of p53, Bcl-2 and Bax in cisplatin-induced apoptosis in testicular germ cell tumour cell lines*. British journal of cancer, 1998. **77**(10): p. 1562.
169. Beurel, E. and R.S. Jope, *The paradoxical pro-and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways*. Progress in neurobiology, 2006. **79**(4): p. 173-189.
170. Moule, S.K., et al., *Regulation of protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 by insulin and β -adrenergic agonists in rat epididymal fat cells activation of protein kinase B by wortmannin-sensitive and-insensitive mechanisms*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(12): p. 7713-7719.

171. Kim, E., A. Giese, and W. Deppert, *Wild-type p53 in cancer cells: when a guardian turns into a blackguard*. *Biochemical pharmacology*, 2009. **77**(1): p. 11-20.
172. Salshor, S. and J. Woodgett, *The links between axin and carcinogenesis*. *Journal of clinical pathology*, 2005. **58**(3): p. 225-236.
173. Che, P., et al., *Signaling from the endoplasmic reticulum activates brassinosteroid signaling and promotes acclimation to stress in Arabidopsis*. *Sci. Signal.*, 2010. **3**(141): p. ra69-ra69.
174. Ly, P.T., et al., *Inhibition of GSK3 β -mediated BACE1 expression reduces Alzheimer-associated phenotypes*. *The Journal of clinical investigation*, 2013. **123**(1): p. 224-235.
175. Muñoz-Montaño, J.R., et al., *Lithium inhibits Alzheimer's disease-like tau protein phosphorylation in neurons*. *FEBS letters*, 1997. **411**(2-3): p. 183-188.
176. Medina, M. and F. Wandosell, *Deconstructing GSK-3: the fine regulation of its activity*. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2011. **2011**.

7. EKLER

7.1 KULLANILAN CİHAZLAR

Kullanılan cihazlar Tablo 2' de verilmiştir.

Tablo 2. Kullanılan Cihazlar

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA
Buzdolabı (No frost)	4263TMB	Arçelik
Derin Dondurucu	2041D	Arçelik
Distile Su Cihazı	TANKPE030	Millipore Direct q-
Dondurucu (-80°C)	Ultra Low Temperature Freezer, U725 Innova	New Brunswick Scientific
Dry heat sterilizer	FN120	Nüve
Elektroforez Aletleri		BioRad
Facs Flow Cihazı	AC6531180147	BD ACCUR1 C6
Fluoresan Mikroskopu	Model: 1X71	Olympus
Güç Kaynağı	PowerPac/Basic	BioRad
Hassas Tartı	LE6202S	Sartorius
İnkübatör	Heracell 150	Thermo
Inverted Mikroskop	Model: XDS-1B	SOIF
Laminar Flow	Model: 12469,2000	HeraSafe
Laminar Flow	LN090	Nüve
Manyetik Karıştırıcı	SB162	Stuart/ProLab
Mikropipet (0,5µl-10µl)	EH52836	Thermo
Mikropipet (200µl-1000µl)	T27274	Thermo
Mikropipet (20µl-200µl)	EH46925	Thermo
Diseksiyon Mikroskopu		Ivyman System
Otoklav	OTO32	Nüve
pH Metre	N315	SEM/Mettler Toledo
Santrifüj	5417R	Eppendorf
Santrifüj(Büyük)	5810R	Eppendorf

Soğutmalı Etüv	ES120	Nüve
Spektrofotometre	Ultraspec 2100 pro	Biosciences
Spin mini spin plus	22331 Hamburg	Eppendorf
Stereo Mikroskop	Discovery.V12	Zeiss
Transfer Cihazı	10016505C	BioRad
UV - Crosslinker	CL1000	UVP
Vorteks	SA8	Stuart/ProLab
Yatay elektroforez sistemi	Gel XL ultra v-2	BioRad

7.2. HÜCRE KÜLTÜRÜ DONANIMLARI

Hücre kültüründe kullanılan donanımlar Tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 3. Hücre kültürü donanımları

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
6 kuyucuklu petri	92006	TPP
12 kuyucuklu petri	92012	TPP
96 kuyucuklu petri	92096	TPP
75cm ² hücre büyütme kapları	90076	TPP
25cm ² hücre büyütme kapları	90026	TPP
100mm hücre büyütme kapları	93100	TPP
60mm hücre büyütme kapları	93060	TPP
Steril pipetler (5ml)	94005	TPP
Steril pipetler (10ml)	94010	TPP
Şırınga filtreleri (0.22 µm)	99722	TPP
Enjektör set	21G Yeşil uç iğneli	ASTRAJE
Tripsin-EDTA	25200-056	Gibco
Penisilin/Streptomisin	15140-122	Gibco
Fetal Bovine Serum	10500-064	Gibco
McCoy's Medium	P04-05500	PAN Biotech
Hemositometre		Neubauer
Pipet uçları		CAPP
HCT-116	CCL-247	ATCC
HT-29	HTB-38	ATCC

7.3. KİMYASAL MADDELER

Çalışma kapsamında kullanılan kimyasal maddeler Tablo 4’de gösterilmiştir.

Tablo 4. Kullanılan kimyalların listesi

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
2-merkaptetanol	S4805940 517	MERCK
Agaroz	A9539	SIGMA-ALDRICH
Akrilamid / Bis-Akrilamid 30% çözelti	A9099	SIGMA-ALDRICH
Amonyum persülfat	A2941	Applichem
Ampisilin	P06-07100	PAN Biotech
Asetik Asid	27225	SIGMA-ALDRICH
Bakır [122] sülfat	02791	Merck
Coomassie Blue Belirteci	A3480	Applichem
Çinko sülfat	08883	Merck
Disodyum EDTA	2937	Applichem
Disodyum fosfat	A4229	Applichem
DMSO	K46505343 517	MERCK
DMSO	D2650	SIGMA-ALDRICH
Etanol	CAS 64-17-5	ALKO MED
Fetal Bovine Serum (FBS)	P290310	Pan Biotech
Floksuridin	F0503	SIGMA-ALDRICH
Glisin	3570	CALBIOCHEM
Hidrojen peroksit	K39218400838	MERCK
Hidroklorik Asit	K43804717 239	MERCK
Hipoklorit (Çamaşır Suyu)		ACE
İzopropanol	K44518295 321	MERCK
Kalsiyum klorür	02382	Merck
Kolesterol	C8667	SIGMA-ALDRICH
Kristal Viyole	FN1048735	MERCK

Laemli Tamponu	S3401-1V	SIGMA
Luminol	A2185	Applchem
Magnezyum Sülfat	05886	Merck
Manganaz [122] Klorit	2087	Applchem
Metanol	24229	SIGMA-ALDRICH
MTT Solüsyonu	M2128-5G	SIGMA-ALDRICH
Page Ruller Plus Prestained Protein Ladder	26619	Fermentas
p-Coumaric Asid	C9008-1G	SIGMA-ALDRICH
Phosphate buffered saline	BE17-51-5F	LONZA
Propidyum iyodür	P4170-100MG	SIGMA-ALDRICH
Ponceau kırmızı Belirteci	A1405	Applchem
Potasyum dihidrojen fosfat	A2946	Applchem
Potasyum Sitrata	89306	Fluka
Protein İzolasyonu Tamponu	78501	Thermo
Saf Etanol	32221	SIGMA-ALDRICH
SDS	UN1888	Applchem
Sığır Serum Albumin	A2153-10G	SIGMA-ALDRICH
Sodyum Klorür	A2941	Applchem
Super Block T20	37536	Thermo
TEMED	A1148,0100	Applchem
Tris Baz	648310	CALBIOCHEM
Tris-HCl	648317	CALBIOCHEM
Tween 20	S6740684 348	MERCK
Yağsız Süt Tozu	SC-2325	Santa Cruz Biotechnology

7.4 Kullanılan Antikorlar

Çalışma kapsamında kullanılan antikorlar Tablo 5’de gösterilmiştir.

Tablo 5. Kullanılan antikorlar

ADI	KATALOG NO	FİRMA ADI
MDM-2	C-18	Santa-Cruz Biotech
Puma	4976	Cell Signaling Technology
Bim	2933	CST
Bax	610982	BD Biosciences
p53	554293	BD Biosciences
Fosfo-p53 (Ser15)	9284	Cell Signaling Technology
Fosfo-Akt (Ser473)	4060	Cell Signaling Technology
Fosfo-Akt (Thr 308)	9275	Cell Signaling Technology
Akt (Pan)	4691	Cell Signaling Technology
Fosfo-GSK3 β (Ser9)	9336	Cell Signaling Technology
GSK3 β	610202	BD Biosciences
β -katenin	610153	BD Biosciences
Kaspaz-3	9662	Cell Signaling Technology
Aktif Kaspaz-3	9661	Cell Signaling Technology
PARP	9542	Cell Signaling Technology
p38 MAPK	612169	BD Biosciences
p-p38 MAPK (Thr 180/Tyr182)	612280	BD Biosciences
FoxO3a	12829	Cell Signaling Technology
Fosfo-FoxO3a (Ser253)	13129	Cell Signaling Technology
Fosfo-FoxO3a (Ser318/321)	9465	Cell Signaling Technology
SAPK/JNK	610627	BD Biosciences
p-SAPK/JNK (Thr183/Tyr 185)	612541	BD Biosciences
p70s6k	611261	BD Biosciences
Fosfo-p70s6k (Thr389)	9234	Cell Signaling Technology

Kalretikulin	12238	Cell Signaling Technology
Kalneksin	2679	Cell Signaling Technology
BiP	3177	Cell Signaling Technology
PDI	3501	Cell Signaling Technology
IRE1 α	3294	Cell Signaling Technology
ATF-6	H-280	Santa-Cruz Biotech
PERK	5683	Cell Signaling Technology
ATF-4	C-20	Santa-Cruz Biotech
CHOP	2895	Cell Signaling Technology
Fosfo-eIF2 α (Ser15)	3398	Cell Signaling Technology
β -aktin	12620	Cell Signaling Technology
β -tubulin	5346	Cell Signaling Technology

8. ÖZGEÇMİŞ

1. Adı Soyadı: Utku ÖZBEY

İletişim Bilgileri:

Adres: Latilokum Sokak. Sedef Sitesi, A Blok Nu:48/8 34381 Mecidiyeköy-İstanbul

Telefon: 0 538 941 11 42

e-posta: utkuozbey@gmail.com

2. Doğum Tarihi: 28.03.1992

3. Ünvanı: Yüksek Lisans Öğrencisi

4. Öğrenim Durumu:

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	İstanbul Kültür Üniversitesi	2014
Yüksek Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	İstanbul Kültür Üniversitesi	2014-

5. Yayınlar

5.1. Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler (SCI & SSCI & Arts and Humanities)

1. Coker-Gurkan A, Arisan ED, Obakan P, Akalin K, Ozbey U, Palavan-Unsal N. Purvalanol induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis and autophagy in a time-dependent manner in HCT116 colon cancer cells. *Oncol Rep.* 2015;33(6):2761-70.

5.2. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında

(Proceedings) basılan bildiriler

1. Utku Özbey*, Deniz Coskun, Pinar Obakan, Ajda Coker-Gurkan, Elif Damla Arisan, Narcin Palavan Unsal, " Epibrassinolide induces p53-independent apoptosis in colon cancer cell lines" EACR-Sponsored 3rd Anticancer Agent Development Congress, PP124, Sayfa: 181, Mayıs 18- 19, 2015 İzmir, Türkiye (Poster Sunum: Utku Özbey)
2. U. Ozbey, P. Obakan, E. D. Arisan, A. Coker-Gurkan, N. Palavan-Unsal, " EBR promotes p53 independent apoptosis in colon carcinoma cell lines", 40th FEBS Congress, The Biochemical Basis of Life, P11-028, Sayfa:227, 4-9 Temmuz 2015, Berlin, Almanya.

6. Ulusal & Uluslararası Projeler

- "Epibrassinolid ve(ya) roskovitin'in potansiyel GSK3b inhibitörü olarak Caenorhabditis elegans modelinde moleküler hedeflerinin terapötik açıdan incelenmesi" (COST Action BM1408 (GENIE), 2015-2018, Bursiyer)
- "Epibrassinolidle Tetiklenen Hücre Ölümünün Endoplazmik Retikulum Stresi İle İlişkisinin Kolon Kanseri Hücre Hatlarında Araştırılması" (3001-TÜBİTAK Başlangıç Ar-Ge Projeleri Destekleme Programı, 113Z845, 2014-2016, Bursiyer)
- " Purvalanol'ün neden olduğu apoptotik hücre ölümünün otofaji ve endoplazmik retikulum stresi ile ilişkisinin HCT-116 kolon kanseri hücrelerinde araştırılması" (2209-a Üniversite Öğrencileri Yurt İçi Araştırma Projeleri Destek Programı, 2012, Eşyürütücü)

7. Bilimsel ve Mesleki Kuruluslara Üyelikler

- 2015: Moleküler Kanser Arastırma Derneği (MOKAD)

8. Katıldığı Uluslararası Bilimsel Etkinlikler:

1. 40th FEBS Congress, The Biochemical Basis of Life, 4-9 Temmuz 2015, Berlin, Almanya.
2. EACR-Sponsored 3rd Anticancer Agent Development Congress, PP124, Sayfa: 181, Mayıs 18- 19, 2015 İzmir, Türkiye
3. International Congress on Polyamines: Clinical and Biological Perspectives, September 2-7, 2012, Istanbul- TURKEY.

