

**T.C. İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**POTANSİYEL GSK3 İNHİBİTÖRÜ EPİBRASSİNOLİD'İN**  
**SİNİR HÜCRE MODELLERİNDE ETKİLERİNİN**  
**ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**SHAFAG NAHMADOVA**

**1409241009**

**Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik**

**Programı: Moleküler Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans Programı**

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

**TEMMUZ 2016**

T.C. İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

POTANSİYEL GSK3 İNHİBİTÖRÜ EPİBRASSİNOLİD'İN SİNİR  
HÜCRE MODELLERİNDE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SHAFAG NAHMADOVA

1409241009

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: Prof. Dr. Narçin PALAVAN-ÜNSAL

Yrd. Doç. Dr. Fatemeh BAHADORİ

Temmuz 2016

## **ÖNSÖZ**

Tez çalışmalarım sırasında değerli fikirlerinden ve tecrübelerinden yararlandığım, her aşamada yol gösterici olan ve yetişmemde emeği geçen danışman hocam Sayın.Yrd.Doç.Dr Pınar OBAKAN YERLİKAYA' ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezim sırasında, başından sonuna kadar hep yanımda olan, her aşamasında görüşleri ile bana katkıda bulunan, her zaman desteğini hissettiğim Sayın Prof.Dr. Narçın PALAVAN ÜNSAL' a, Sayın Doç.Dr Elif Damla ARISAN' a, Sayın Doç.Dr Ajda ÇOKER GÜRKAN' a,

Tezim süresince bana her anlamda destek olan ve hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan sevgili anneme, babama ve kardeşlerime, bu tezin hazırlanması sırasında her zaman desteklerini hissettiğim sevgili arkadaşlarıma teşekkür ederim. Bu çalışma boyunca yardımlarını esirgemeyen tüm çalışma arkadaşlarıma ve çalışmamın uygulama kısmını destekleyen İstanbul Kültür Üniversitesi' ne teşekkürü borç bilirim.

**Temmuz, 2016**

**Shafag NAHMADOVA**

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	I
İÇİNDEKİLER .....	II
ŞEKİL LİSTESİ.....	VI
TABLO LİSTESİ .....	IX
SEMBOL LİSTESİ.....	X
ÖZET.....	XII
SUMMARY .....	XIII
1.GİRİŞ.....	1
1.1. NÖROBLASTOMA .....	3
1.1.1 Etiyoloji ve risk faktörleri .....	4
1.1.2 Nöroblastoma Tanısı ve Evreleme.....	5
1.1.3 Nöroblastomanın Genetik Altyapısı .....	9
1.2 NÖROBLASTOMA GELİŞİMİNDE MOLEKÜLER MEKANİZMALAR .....	10
1.3 TEDAVİ YAKLAŞIMLARI .....	11
1.3.1 Cerrahi yaklaşım.....	12
1.3.2 Kemoterapi .....	12
1.3.3 İmmunoterapi.....	13
1.4 NÖROBLASTOMA <i>İN VİTRO</i> MODELLERİ .....	14
1.5.GLİKOJENSENTAZKİNAZ3.....	17
1.5.1 GSK3 ve sinyal mekanizması .....	17
1.5.2 GSK3'ün Alzheimer hastalığı ve nöroblastoma gelişimindeki rolü.....	20

1.5.3 GSK3 ve tau fosforlanması.....	23
1.5.4 GSK3 ve nöroblastoma .....	25
1.6. APOPTOZ .....	26
1.6.1 Apoptozun moleküler mekanizması .....	27
1.6.1.1 Kaspazlar .....	27
1.6.1.2. Bcl-2 ailesi .....	28
1.6.2 Apoptoz tipleri.....	29
1.6.2.1 İç (İntrinsik )yolak.....	29
1.7. BRASSİNOSTEROİDLER .....	32
1.7.1 Brassinostereoidlerin yapı ve özellikleri .....	32
1.7.2 Brassinosteroidlerin Biyosentezi.....	33
1.7.3 Brassinosteroidlerin hücrel işlevleri .....	33
1.7.4 Brassinosteroidlerin Türevleri.....	35
1.7.4.1 Epibrassinolid.....	36
1.7.4.2 Epibrassinolid' in kanser hücrelerindeki etkileri .....	37
2. MALZEME VE YÖNTEM.....	40
2.1. KULLANILAN MALZEMELER .....	40
2.1.1. Kullanılan Cihazlar.....	40
2.1.2. Hücre Kültürü Donanımları .....	40
2.1.3. Kullanılan Kimyasallar .....	40
2.1.4. Kullanılan Moleküler Biyoloji Kitleri .....	40
2.2. HÜCRE KÜLTÜRÜ, HÜCRE CANLILIĞI VE SAĞKALIM TAYİNİ .....	43
2.2.1. Hücrelerin Yetiştirilmesi .....	43
2.2.2. Hücrelerin Kaldırılması, Sayımı ve Pasajlanması .....	43
2.2.3. Hücre Canlılığı Tayini .....	44
2.2.4. Hücre Sağkalım Tayini.....	44
2.2.5. Koloni oluşum testi.....	45
2.2.6 Soft Agar koloni oluşum testi.....	45
2.2.7. Hücrelerin Dondurulması ve Çözdürülmesi.....	46

<b>2.3. MİKROSKOBİK YÖNTEMLER .....</b>	<b>46</b>
<b>2.3.1. Işık Mikroskobu .....</b>	<b>46</b>
<b>2.3.2. Floresan Mikroskobu.....</b>	<b>46</b>
2.3.2.1. Propidyum İyodür (PI) Boyama.....	46
2.3.2.2. 3,3'-Diheksiloksakarbosiyanın İyodür (DiOC6) Boyama .....	47
2.3.2.3. 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) Boyama.....	47
2.3.2.4. 2',7'-diklorfloresein-diasetat (DCFH-DA) Boyama .....	47
<b>2.4. İMMUNOBLOTLAMA .....</b>	<b>48</b>
<b>2.4.1. Total Protein İzolasyonu .....</b>	<b>48</b>
<b>2.4.2. Sitoplazmik ve Nükleer Protein İzolasyonu .....</b>	<b>48</b>
<b>2.4.3. Bradford Protein Miktar Tayini.....</b>	<b>49</b>
<b>2.4.4. Proteinlerin SDS-PAGE'de Yürütülmesi .....</b>	<b>50</b>
<b>2.4.5. Membrana Transfer ve bloklama.....</b>	<b>50</b>
<b>2.4.6. Primer ve Sekonder Antikor İşaretlemeleleri .....</b>	<b>50</b>
<b>2.4.7. Bantların Görüntülenmesi .....</b>	<b>50</b>
<b>2.5. AKIM SİTOMETRİSİ.....</b>	<b>51</b>
2.5.1. Hücrelerin Hazırlanması.....	51
2.5.2. Apoptotik Hücre Ölümünün Anneksin V ve Propidyum İyodür Boyaması ile Akım Sitometrisinde Tayini .....	51
2.5.3 Apoptotik Süreçte Artan Hidrojen- Peroksit miktarının ROS oluşumuna etkisinin DCFH-DA Boyaması ile Akım Sitometrisinde Tayini.....	52
2.5.4. Hücre Döngüsünün Akım Sitometrisi Kullanılarak İncelenmesi..	52
<b>2.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....</b>	<b>52</b>
<b>3. BULGULAR.....</b>	<b>53</b>
<b>3.1. EPİBRASSİNOLİD' İN SK-N-AS HÜCRE HATTINDA HÜCRE CANLILIĞINA ETKİSİ .....</b>	<b>53</b>
<b>3.2 EPİBRASSİNOLİD' İN SK-N-AS HÜCRE HATTINDA KOLONİ OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİLERİ.....</b>	<b>55</b>

3.3 EPİBRASSİNOLİD' İN SK-N-AS HÜCRE HATTINDA HÜCRE DÖNGÜSÜ ÜZERİNE ETKİLERİ.....	57
3.4 EPİBRASSİNOLİD' İN SK-N-AS HÜCRE HATTINDA APOPTOTİK ETKİSİ.....	58
3.5 EPİBRASSİNOLİD' İN SK-N-AS HÜCRE HATTINDA KASPAZ AKTİVASYONU ÜZERİNE ETKİSİ .....	63
3.6 EPİBRASSİNOLİD' İN SK-N-AS HÜCRE HATTINDA GSK3B-WNT YOLAĞI PROTEİNLERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ .....	64
3.7 EPİBRASSİNOLİD' İN SK-N-AS HÜCRE HATTINDA ALZHEİMER PROTEİNLERİ ÜZERİNDE ETKİSİ.....	65
3.8 EPİBRASSİNOLİD' İN SK-N-AS HÜCRE HATTINDA TETİKLEDİĞİ APOPTOTİK SÜREÇTE ROS OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİSİ.....	67
3.9 EPİBRASSİNOLİD' İN SK-N-AS HÜCRE HATTINDA N-ASETİL SİSTEİN (NAC) İLE EŞZAMANLI ETKİSİNİN BELİRLENMESİ.....	68
7. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	71
KAYNAKLAR.....	83
EKLER.....	101

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. 1. Nöroblastoma metastatik bölgeleri [20].....	7
Şekil 1. 2.Nöroblastoma tipleri [18].....	7
Şekil 1. 3.Uluslar arası Nöroblastoma Evrelendirme Sistemi [20] .....	9
Şekil 1. 4. Nöroblastoma hücrelerinin morfolojisi (www.atcc.org).....	16
Şekil 1. 5.GSK3β'nın fosforilasyon ve aktivasyonu [62] .....	18
Şekil 1. 6.Wnt yolağında GSK3' ün rolü [67]. .....	19
Şekil 1. 7. GSK3 ve onun Alzheimerda rolü [90]. .....	22
Şekil 1. 8. Apoptoz sırasında meydana gelen morfolojik değişimler [118].....	27
Şekil 1. 9.Apoptozun iç ve dış yolaklarının moleküler mekanizmaları [129] .....	31
Şekil 1. 10.Brassinolidlerin genel yapısı [134] .....	33
Şekil 1. 11.Brassinolid sinyal yolakları. A) brassinolid sinyali olmadığı ve B) olduğu durumda .....	35
Şekil 1. 12.Doğal brassinosteroidlerin kimyasal yapısı [139].....	36
Şekil 3. 1. SK-N-AS hücrelerinde EBR'nin koloni oluşumuna etkisinin incelenmesi. $5 \times 10^3$ ve $7,5 \times 10^3$ hücre/kuyu olacak şekilde SK-N-AS hücreleri petri kaplarına ekilmiş, 24 saat boyunca 1 ve 10µl EBR uygulanmış 14 gün boyunca inkübe edilmiştir. 14 gün sonunda fikse edilip kristal viyole ile boyanmış ve ışık mikroskopunda görüntüleri alınmıştır .....	55
Şekil 3. 2. EBR uygulanmış SK-N-AS hücrelerinde soft agarda koloni oluşumunun incelenmesi. Soft agarda 10 gün boyunca inkübe edilen hücreler, 10 gün sonunda ışık mikroskobu altında incelenmiş ve koloni çapları ölçülmüştür. 56	
Şekil 3. 3. EBR uygulanmış SK-N-AS hücrelerinde soft agarda oluşan kolonilerin çapının belirlenmesi. ....	57



- Şekil 3. 4. EBR uygulanan SKNAS hücrelerinde doza bağlı hücre döngüsü evrelerindeki değişimin akım sitometresi analizi ile araştırılması. A.Hücreler 24 saat boyunca EBR ile inkübe edildikten sonra etanol ile fikse edilip, PI boyaması gerçekleştirilmiştir.B.Hücre döngüsünün farklı fazlarındaki hücre sayısı en az 3 deney tekrarı sonra belirlenmiştir..... 58
- Şekil 3. 5. EBR uygulanan SKNAS hücrelerinde annkesin V-PI boyama sonrası erken ve geç apoptotic hücre popülasyonlarının belirlenmesi. A. Hücreler 24 saat boyunca EBR ile inkübe edildikten sonra Annexin V ve PI boyaması uygulanmış ve BD Bioscience Accuri C6 programı ile analiz edilmiştir. B. Erken apoptotic, geç apoptotic ve nekrotik popülasyon yüzdeleri en az üç deney tekrarı sonrası belirlenmiştir. .... 59
- Şekil 3. 6. EBR ile tetiklenen hücre ölümünün SKNAS hücrelerinde floresan probalar ile belirlenmesi. 1 ve 10 µM EBR SKNAS hücrelerine 24 saat boyunca uygulanmıştır. DiOC6, Propidium iyodür (PI) ve DAPI ile boyanan hücreler floresan mikroskopunda incelenmiştir(400x). .....**Error! Bookmark not defined.**
- Şekil 3. 7. EBR uygulamasının pro- ve anti- apoptotik Bcl-2 ailesi üzerine etkilerinin immunoblotlama yöntemi ile belirlenmesi. Total protein izolasyonunun ardından 30µg protein her bir örnek için %12'lik SDS-PAGE ile ayrıştırıldı. İmmunoblotlama işlemlerinin ardından ilgili proteinlere ait bantlar kemiluminans özelliğine dayanarak belirlenmiştir.Beta aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. .... 63
- Şekil 3. 8. EBR uygulamasının kaspaz kesilimi üzerine etkilerinin immunoblotlama yöntemi ile belirlenmesi. Total protein izolasyonunun ardından 30µg protein her bir örnek için %12'lik SDS-PAGE ile ayrıştırıldı. İmmunoblotlama işlemlerinin ardından ilgili proteinlere ait bantlar kemiluminans özelliğine dayanarak belirlenmiştir.Beta aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. .... 64
- Şekil 3. 9. EBR uygulamasının GSK3/beta-katenin yolağı üzerine etkilerinin immunoblotlama yöntemi ile belirlenmesi. Total ve nüklear-sitoplazmik protein

izolasyonunun ardından 30µg protein her bir örnek için %10-12 SDS-PAGE ile ayrılandırıldı. İmmunoblotlama işlemlerinin ardından ilgili proteinlere ait bantlar kemiluminans özelliğine dayanarak belirlenmiştir. Beta aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.....	65
Şekil 3. 10. EBR uygulamasının Alzheimer hastalığı proteinleri üzerine etkilerinin immunoblotlama yöntemi ile belirlenmesi. Total protein izolasyonunun ardından 30µg protein her bir örnek için %12'lik SDS-PAGE ile ayrılandırıldı. İmmunoblotlama işlemlerinin ardından ilgili proteinlere ait bantlar kemiluminans özelliğine dayanarak belirlenmiştir. Beta aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. ....	66
Şekil 3. 11. EBR uygulamasının SK-N-AS hücre hattında ROS oluşumu üzerine etkisinin belirlenmesi. 24 saat boyunca 1 ve 10 µM EBR uygulanmış hücreler DCFH-DA boya ile boyanmıştır. 15 dakika inkubasyon sonucunda hücreler akım sitometrisinde analiz edilmiştir. ....	67
Şekil 3. 12. NAC uygulamasının EBR ile tetiklenen A. reaktif oksijen türlerinin oluşumuna B. hücre canlılığı kaybına etkisi. **p< 0,01 .....	69
Şekil 3. 13. NAC' ın 10µM EBR uygulanmış SK-N-AS hücrelerinde EBR' nin toksik etkisini geri döndürmesinin belirlenmesi. SK-N-AS hücreleri 24 saat boyunca 10µM EBR ve 5mM NAC uygulaması sonucunda DCFH-DA ajanı ile boyanmış, 15 dakika inkubasyon sonunda örnekler akım sitometrisinde incelenmiştir.....	70

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 1.</b> Uluslararası Nöroblastoma Evrelendirme Sistemi.....	8
<b>Tablo 2.</b> Kullanılan cihazların listesi.....	101
<b>Tablo 3.</b> Hücre kültürü donanımları.....	102
<b>Tablo 4.</b> Kullanılan kimyasalların listesi.....	103
<b>Tablo 5.</b> Kullanılan moleküler biyoloji kitleri.....	104



## SEMBOL LİSTESİ

<b>Ab:</b>	Amiloid beta
<b>APP:</b>	Amiloid öncü protein
<b>APS:</b>	Amonyum persülfat
<b>BACE:</b>	Beta-site amiloid öncü protein kesen enzim
<b>BDNF:</b>	Beyin türevli nörotrofik faktör
<b>BAG1:</b>	Bcl-2 assosiye gen
<b>BAK1:</b>	BRI1-uyumlu reseptör kinaz
<b>Bcl-2:</b>	B-hücre lenfoma 2
<b>BH:</b>	Bcl-2 homoloji bölgeleri
<b>BR:</b>	Brassinosteroid
<b>BRI1:</b>	brassinosteroid duyarlı 1
<b>BSA:</b>	Sığır serum albumin
<b><i>C.elegans:</i></b>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
<b>CDK:</b>	Sikline bağımlı kinaz
<b>CO<sub>2</sub>:</b>	Karbondioksit
<b>Dsh:</b>	Dağınık reseptör
<b>DAPI:</b>	4',6-diamidino-2-fenilindol
<b>DCFH-DA:</b>	2',7'-dichlorflorescein-diasetat
<b>DISC:</b>	Ölüm indükleyici sinyal kompleksi
<b>DiOC6:</b>	3, 3'-diheksiloksakarbosianin iyodür
<b>DMSO:</b>	Dimetilsulfoksit
<b>EBR:</b>	Epibrassinolid
<b>EDTA:</b>	Etilen diamin tetra asetik asit
<b>FADD:</b>	Fas ilişkili ölüm domeni

<b>GSK:</b>	Glikojen sentaz kinaz
<b>Frz:</b>	Kıvrılmış reseptör
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:</b>	Hidrojen peroksit
<b>IGF-1:</b>	İnsulin benzeri büyüme faktörü-1
<b>kDa:</b>	KiloDalton
<b>MYCN:</b>	N-myc proto-onkogen protein
<b>MTT:</b>	Metiltiazoldifeniltetrazolyum bromür
<b>NAC:</b>	N-asetil sistein
<b>PARP:</b>	Poli ADP riboz polimeraz
<b>PBS:</b>	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
<b>PI:</b>	Propidyum iyodür
<b>PI3K:</b>	Fosfotidilinositol-3 fosfat
<b>PS:</b>	Presenilin proteini
<b>ROS:</b>	Reaktif oksijen türleri
<b>SDS:</b>	Sodyum dodesil sülfat
<b>SDS-PAGE:</b>	SDS- Poliakrilamid Jel Elektroforezi
<b>SMAC:</b>	Kaspazların ikincil mitokondri türevi aktivatörü
<b>TBS:</b>	Tris tamponlu tuz çözeltisi
<b>TEMED:</b>	Tetrametletilendiamin
<b>TNF:</b>	Tümör nekroz faktör
<b>TRAIL:</b>	TNF-ilişkili apoptoz indükleyici ligand
<b>Trk:</b>	Tropomiyozin reseptör kinaz

## ÖZET

Epibrassinolid (EBR), bitki büyüme düzenleyicileri olan brassinosteroidlerinin biyolojik olarak aktif bir üyesi olup, son yıllarda tümör oluşturmeyen hücrelere etki etmeksizin, farklı kanser hücrelerinde apoptozu tetikleyen bir madde olarak belirlenmiştir.

Bir serin/treonin protein kinaz olan glikojen sentaz kinaz 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) ilk olarak glikojen metabolizmasının ve insulin sinyal mekanizmasının önemli bir elemanı olarak tanımlanmış olsa da son yıllarda hücre bölünmesi, farklılaşması, adhezyon gibi birçok hücreyel olayı düzenleyen bir molekül olarak gösterilmektedir. GSK3 $\beta$  sinyal mekanizmasında meydana gelen değişimlerin Alzheimer, inflamasyon, tip II diyabet ve kanser gibi birçok toplum sağlığını etkileyen hastalıklarla olan yakın ilişkisi, molekülün üzerindeki ilgiyi arttırmaktadır. GSK3 $\beta$  inhibitörlerinin patolojik bulguları azaltma yönündeki etkileri tanımlanmış olmakla beraber halen etkin bir inhibitör geliştirilememiştir. Örnek olarak, Alzheimer hastalığının patolojik bulgusu olan amiloid  $\beta$  (A $\beta$ ) birikimleri veya nörofibril stabilizasyonunun, GSK3 $\beta$  inhibitörü lityum klorür ile gerilediği bildirilmiştir. Fakat tam anlamıyla iyileşme süreci tetiklenmemiş olup, GSK3 $\beta$  inhibitörleri ile ilgili çalışmalar sürdürülmektedir. Nörodegenerasyonun yanısıra GSK3'ün tumor oluşumunda da önemli bir etken olduğu, hücre sağkalımını bir apoptoz indükleyici protein olan pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyesi Bax proteinin fosforile ederek devre dışı bıraktığı ve bu şekilde hücre sağkalımını tetiklediği bulgular arasındadır. Lösemi, glioma, pankreas ve meme kanseri gibi çeşitli kanser türlerinin gelişimde anahtar bir rol üstlendiği gösterilmiştir.

Bu çalışmada, EBR uygulaması bir nöroblastoma ve aynı zamanda Alzheimer Hastalığı (AH) modeli olan SK-N-AS hücre hattında hücre canlılığında kayba, mitokondri ile ilişkili, kaspaz-bağımlı apoptozun tetiklenmesine neden olmuştur. EBR AH biyobelirteçlerinde anlatım değişikliğine yol açmazken, pGSK3 $\beta$  Ser9 fosforilasyonunu arttırarak,  $\beta$ -katenin nuklear göçne ket vurmıştır. Sonuç olarak EBR bu hücreler üzerinde apoptotik etki göstermiştir.

## SUMMARY

Epibrassinolide (EBR) a biologically active member of the brassinosteroids, plant growth regulator family, has been recently indicated as an apoptotic inducer in various cancer cells without affecting non-tumor cell growth. The effect of EBR on neural cell lines has not been investigated. Our recent findings indicated that EBR has the potential to inhibit GSK3 $\beta$  signaling by Ser9 phosphorylation.

Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) was first identified molecule which acts as a critical mediator of glycogen metabolism and insulin signaling mechanism. It was recently shown to regulate cell division, differentiation and adhesion. The close relation between the dysfunction of GSK3 $\beta$  in diverse diseases such as Alzheimer's disease, inflammation, type II diabetes and cancer, raised the interest on this molecule. GSK3 $\beta$  inhibitors were defined with reducing effects in the pathological symptoms of the mentioned diseases; an effective inhibitor was not developed yet. For instance, the reduction in the buildup of amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) deposits and the formation of neurofibrillary tangles was reported following lithium treatment. However, a full regression was not achieved and is being investigated. Beside neurodegeneration, GSK3 $\beta$  has been shown as an important factor in tumor progression by phosphorylating and inactivating an apoptotic inducer, the pro-apoptotic member of the Bcl-2 family member, Bax. This mechanism has been shown to play role in diverse cancer types including leukemia, glioma, pancreas and breast cancer.

In this study, we aimed to determine the potential effect of EBR in SK-N-AS cell line, which is a good model for neuroblastoma as well as Alzheimer Disease (AD). EBR treatment induced cell viability loss, mitochondria-mediated and caspase-dependent apoptosis in SK-N-AS cells. EBR did not affected on AD biomarkers bur induced pGSK3 $\beta$  phosphorylation by Ser9 and inhibited the translocation of its downstream target  $\beta$ -catenin. Consequently EBR exerted apoptotic effect in these cells.

## 1.GİRİŞ

Kanser, günümüzde artan teşhis ve tedavi yöntemlerine rağmen özellikle gelişmiş ülkeler başta olmak üzere tüm dünyada en önemli sağlık sorunları arasında yer almaktadır. Sık görülmesi ve yüksek oranda ölüme yol açmasından dolayı önemli bir halk sağlığı sorunu olarak değerlendirilen kanser, hastalıklara bağlı ölümler arasında kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırada yer almaktadır.

Dünya Sağlık Örgütü ve Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı' nın yayınlamış olduğu 2014 Dünya Kanser Raporu verilerine göre, 2012' de tüm dünya genelinde tahmini olarak 14 milyon olan kanser vakasının, gelecek 20 yıl içinde oldukça yüksek bir artış göstererek 22 milyona ulaşması beklendiği belirtilmektedir. Kansere bağlı ölümlerde de benzer bir şekilde artış gerçekleşeceği, 2012'de 8,2 milyon olan ölüm oranının da 20 yıl içinde yılda 13 milyona ulaşacağı öngörülmektedir [1]. ABD' de 2013 yılında 1.666.290 yeni kanser teşhisi konulmuş ve bunlardan 580.350'si ölümlerle sonuçlanmıştır [2]. Türkiyede de kanser ile ilişkili istatistik verileri dünya ile paralellik göstermekle birlikte, Türkiye kanser haritası incelendiğinde her yıl yaklaşık yüzelli bin yeni kanser olgusu teşhis edilmektedir.

Kanser oluşumu, gelişimi, ilerlemesi ve sonuçları açısından bir hastadan diğerine göre değişkenlik gösteren karmaşık bir hastalık olmakla birlikte bu heterojenlik hücresel ve moleküler düzeyde de görülmektedir. Kanser, hücrelerin bağımsız (otonom), aşırı ve kontrolsüz çoğalmaları, uzaktaki doku ve organları istila ederek metastazlar oluşturmaları ile karakterize olan metabolik ve davranışsal değişikliklerin olduğu çok basamaklı ve kompleks bir hastalıktır. Genetik, kimyasal ve çevresel koşullar kanserin oluşmasına sebep olabilir [3]. Çok farklı kanser türleri bulunmaktadır. Bunlardan biri



olan beyin kanseri, özellikle çocuklarda kansere bağlı ölümler arasında başta gelen nedenlerden biri olmakla birlikte beyin tümörlerinin çoğu ölümcül olup, ölümcül olmayanları da beyin fonksiyonlarına zarar vermekte ve günlük yaşamı oldukça olumsuz etkilemektedir [4]. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'nın 2008 yılı kanser raporu verilerine göre beyin kanseri vakaları her 100 bin kişinin 238' inde görüldüğü ve sadece 64' ünün hayatta kalabildiği belirtilmiştir. Beyin tümörleri insidansı erkeklerde kadınlardan bir miktar daha yüksektir [4].

Beyin kanserinin diğer kanser türlerine nazaran görülme sıklığı az olmakla birlikte ölüm oranı oldukça yüksek bir kanser türüdür [5]. Beyin tümörleri, bütün kanserlerin yaklaşık %1,4' üne tekabül ederken, kansere bağlı ölümlerde ise %2,44' ünden sorumludur [1]. Beyin tümörleri primer ve sekonder olarak iki ana grupta incelenmekle birlikte primer olanlarda çeşitli alt gruplarda incelenir. Bunlar, nöroepitelyal orijinliler, meningeal tümörler, kranyal ve spinal sinir tümörleri, lenfoma ve hematopoyetik neoplaziler, germ hücreli tümörler ve sellar bölge tümörleridir. Beyin tümörleri bir kaç çeşit olmakla birlikte Dünya Sağlık Örgütü glioblastoma ve nöroblastoma kanserli hücreleri sırasıyla astrosit ve embriyonel beyin tümörü sınıfına dâhil etmektedirler [6].

Embriyonik totipotent ve pluripotent hücreler doku diferansiyonu gösteren hücrelerdir ve doğumdan sonraki ilk yıllarda kaybolmaktadırlar. Bundan dolayı bu tip hücrelerden oluşmuş tümörler de genellikle çocukluk dönemi tümörleridir. Genel olarak malign nitelik taşırlar ve aynı tümörde birden fazla dokuya farklılaşabilirler [7]. Kanser tedavisindeki gelişmelere rağmen beyin kanserinin tedavisi oldukça zordur ve halen tam anlamıyla etkili bir ilacı olmayan tümörler grubuna girmektedir. Beyin kanseri primer (kök hücre) beyin hücrelerinin anormal gelişim göstermesiyle oluşabileceği gibi, metastaz yeteneğine sahip kanserli hücrelerin diğer organlardan kan dolaşımı yoluyla beyine göç etmesi sonucunda da oluşabilir [8].

## 1.1. NÖROBLASTOMA

Nöroblastoma, embriyonik gelişimin dördüncü haftasında ortaya çıkan, adrenal medulla veya sempatik gangliyonlarda normalde bulunan primordial nöral krest hücrelerinden köken alan ve tüm çocukluk çağı kanserlerinin %8-10' unu oluşturan bir tümördür [9]. Nöral tümörlerin oluşumu nöral kreste dönüşen embriyonik ektodermin normal sinyallere cevap vermemesi ve normal gelişimini tamamlayamaması sonucu gerçekleşir. Nöral tüpteki nöroektodermal hücrelerden nöroektodermal tümörler, nöral kreste dönüşen hücrelerden ganglia ve nöroblastom, kemik ve yumuşak dokuyu oluşturan nöroektodermal hücrelerden ise periferik nöroektodermal tümörler oluşmaktadır [10].

Tümörün biyolojik davranışlarındaki değişkenlik nedeniyle, nöroblastoma özellikle 1 yaş altındaki vakalarda spontan regresyon veya benign transformasyon (ganglionöromaya değişim) gösterebilirken, 1 yaş üzerindeki hastalarda daha agresif seyir gösterebilmekte, bu durum hastaların prognozunu belirlemede ve tedavisinde sorunlara yol açmaktadır. Pediatrik kanser tedavisindeki kemoterapi, radyoterapi, kemik iliği transplantasyonu gibi ilerlemelere rağmen yaşama oranı %40' ın altında kalmaktadır [11]. Amerikan Kanser Derneği (American Cancer Society)' nin 2014 verilerine göre Amerika Birleşik Devletleri'ndeki 0-14 yaş arası çocukluk çağı tümörlerinin %7' sinden sorumlu olup her yıl yaklaşık 700 yeni çocuk bu hastalığa yakalanmaktadır [12]. Türkiye Pediatrik Onkoloji Grubu (TPOG)' na ait NBL 2003 protokolünde ve aynı grubun Ekim 2006 verilerine göre, Türkiye'de ortalama tanı konma yaşı 22 aydır ve kız/erkek oranı ise 1:1'dir [13].

SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results Program) 2014 yılındaki raporuna göre nöroblastom için 5 yıllık sağkalım oranı, 1975-1979 yılları arasında %54 iken 1985-2000 yılları arasında %65 ve 2003-2009 yılları arasında da %79 a çıkmıştır. Irk ve cinsiyet arasında genel farklılık çok az olmakla birlikte lokal veya bölgesel hastalığı olan çocuklarda yaşam süresi daha yüksek iken, büyük çocuklar ve uzak metastazlı

hastalar için yaşam süresi azalmaktadır. Bu nedenle bazı gebelik ve doğumsal faktörlerin, ebeveynlerin aldığı ilaçların daha dikkatli incelenip kullanımının daha hassas olması gerekmektedir.

Periferik nöroblastik tümörler sempatik sinir sisteminin embriyojenik neoplazmlarıdır ve sıklıkla adrenal bezlerde görülmekle birlikte boyun, göğüs, karın veya pelvis bölgelerindeki sinirlerde görülebilmektedir. Primer tümörlerin %60' ından fazlası adrenal medulladan veya abdomendeki paraspinall ganglia'lardan kaynaklanabilir [14]. En sık metastaz bölgesel lenf nodları, karaciğer, kemik iliği ve kemiklerdir [15].

### **1.1.1 Etiyoloji ve risk faktörleri**

Etiyolojisi tam olarak bilinmemekle birlikte çevresel etkenlerin nöroblastomada majör rolü gösterilememiştir. Daha çok nöral krest gelişim bozukluğuna bağlı geliştiği düşünülmektedir. Ancak risk faktörleri arasında elektronik, tarım, kimyasal ajan maruziyeti yüksek işlerde çalışanlar, radyasyona maruz kalanlar, annenin yaşı, kullandığı ilaç ve hormonlar, alkol alımı, sigara kullanımı, tekrarlayan sezeryan, bebeğin düşük doğum ağırlığı, prenatal doğum yer almaktadır [16, 17].

Nöroblastoma tanısı konmuş çocuklarda vücut ağırlığında kayıp, terleme, kızarma, iştahsızlık, baş ağrısı, çarpıntı ve hipertansiyon gibi belirtiler görülmektedir. Adrenal medullanın kromofin hücrelerinde, beyin ve sempatik nöronlarda sentezlenen adrenalın, norepinefrin ve dopamin (katekolaminler) yapımındaki artışa bağlı olarak terleme, hızlı ve çabuk öfkelenme, hipertansiyon gelişmektedir. Ayrıca tümörün kemik iliğine metastaz yapması ile anemi gözlenebilmektedir. Sindirim sistemi anormallikleri, fetal alkol sendromu, nörolojik ve gelişimsel anormallikler, otozomal resesif geçişli ürogenital ve kardiyak anomaliler, Beckwith-Wiedemann sendromu ve Turner Sendromu nöroblastoma ile birlikte bildirilen semptomların başında gelmektedir [16]. Klinik bulgu ve semptomlar primer tümörün bulunduğu bölgeye, metastatik duruma veya paraneoplastik sendrom gelişimine bağlı olarak çeşitlilik göstermektedir [17].

Son yıllarda hız kazanan tümör dokusundan yapılan moleküler genetik ve biyolojik analizler, klinik davranışlardaki bu değişkenliğe ışık tutmaya başlamıştır. Nöroblastomada tümör dokusundaki birçok genetik değişikliklerin prognoz üzerine etkisi gösterilmiştir. Örneğin triploidi iyi prognozla ilişkili MYCN onkogen amplifikasyonu, 17q dengesiz fazlalığı, 1p veya 11q allelik kaybı daha agresif tümör özellikleri ve kötü prognozlaişkilidir [18].

Ailevi nöroblastoma olguları diğer herediter kanserlerde olduğu gibi daha erken yaşta tanı almakta ve çoklu primer tümörle ortaya çıkmaktadır. Bu olgularda yapılan geleneksel genetik analizler ile herediter nöroblastomaya predispozisyon lokusunun 16. kromozom kısa kolunda (16p 12-13) olduğu gösterilmiştir. Ancak bulgular birden fazla sorumlu genin olduğunu işaret etmektedir. Bu genlerin tümü periferalsinir sisteminin nor-adrenerjik komponentinin normal gelişiminde temel rol oynayan genlerdir. Nöroblastoma olgularında konjenital anomaliler sık görülmekle birlikte bu olgularda gösterilen yapısal kromozomal değişiklikler çok nadirdir [18]. Genetik değişiklikler, tedaviye yanıt ve prognozun önemli göstergesi olup, tanı sırasında tümörün karakterini belirlemektedir. Dolayısıyla nöroblastoma, tümör hücresinde yapılan genetik ve biyolojik incelemelerin, hastanın en iyi şekilde yönetilmesi için gerekli bilgileri bize sağlayan tek solid tümör modelidir. Yakın gelecekte hedef, bu bilgiyi hastalara uygulanacak daha etkin ve daha az toksik tedavilere çevirmektir.

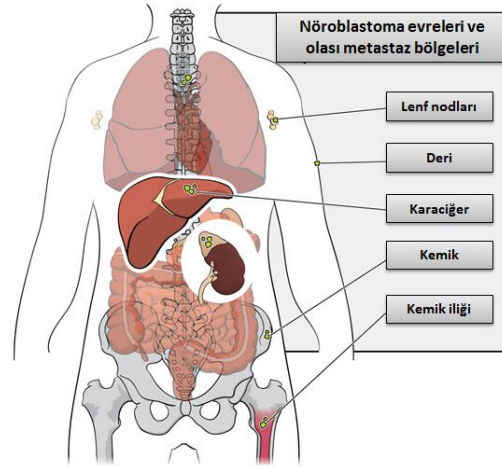
### **1.1.2 Nöroblastoma Tanısı ve Evreleme**

Güncel tedavi yöntemleri, devam eden klinik çalışmalar ve temel bilim araştırmalarına rağmen, nöroblastoma ileri evreleri öngörülemeyen klinik seyriyle karmaşık bir tıbbi sorun olmaya devam etmektedir. Nöral krest kökenli olması nedeniyle, nöroblastomlar adrenal medullada veya sempatik ganglionlar boyunca her yerde oluşabilir. Bu nedenle, hasta görüntüsü ve semptomları genellikle tümörün konumunun klinik yansımalarıdır. İntra abdominal nöroblastomlar ve retroperitonda olanlar ebebeyn tarafından veya rutin

klirik muayene sırasında saptanan asemptomatik kitleler gösterme eğilimindedirler. Pelvik kitleler, nroblastomalar için alışılmamış konum olmasına karşın, mesane ya da rektosigmoid kolonu sıkıştırabilir, üriner retansiyon ve ya kabızlığa neden olabilir. Meme nroblastomaları genellikle meme, göğüs kafesi radyografisinde rastgele kitleler şeklinde bulunur (şekil 1.1).

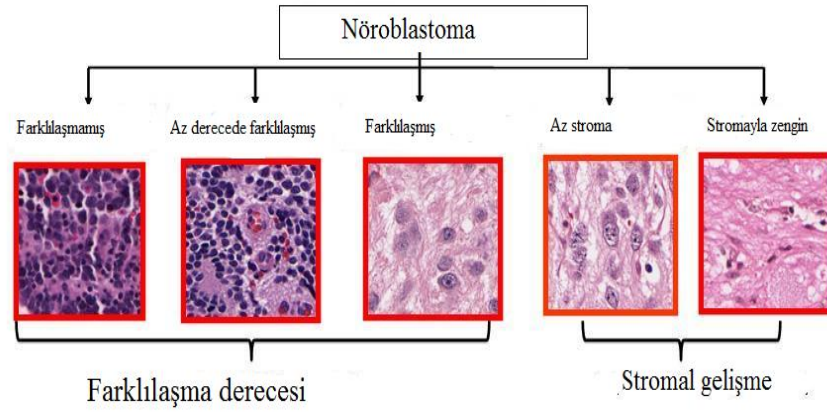
Erken semptomları, tipik olarak genel halsizlik, kilo kaybı ve açıklanamayan ateş gibi spesifik olmayan belirtiler mevcut olduğu zaman görülür. Ancak tümör kendiliğinden kanama yaratır ve bu da anemi kaynaklı halsizlik ile karın ağrısının başlangıcına yol açar [19]. Genel olarak, şiddetli belirtiler tümör kritik bir boyuta ulaşıncaya veya metastaz gelişene kadar meydana gelmez.

Uzayan servikal kitleler ile kliniğe başvuran bebekler ve çocuklar birinci derecede ya da metastatik nöroblastoma sahip olabilir. Kemik metastazı, kemik ağrısı yanısıra aktivite düzeyinde ani farklı değişiklikler görünmektedir. Ayrıca, kafatası tutulumu, göz çevresi morluğu söz konusu olabilir ki, bu da yanlışlıkla travma kaynaklı semptomlarla karıştırılır. Paraspinal tümörler omurga içinden uzanıp omuriliği sıkıştırabilir, böylece motor eksikliği ve ilerleyici felce neden olur. Bebeklerde de ağrısız, mavimsi subkutan nodüller şeklinde ortaya çıkan lezyonlar görülebilir. Bu aşama 4S (evre 4-ileri safha) hastalığının yaygın bir özelliğidir ve spontan tümör gerilemesi için potansiyeli olan olumlu bir prognoza işarettir (şekil 1.1) [19].



**Şekil 1. 1. Nöroblastoma metastatik bölgeleri[20]**

Nöroblastomaların sınıflandırılması tümör içinde hücresel farklılaşma derecesine göre belirlenir. Bol miktarda nöroblastlara sahip zayıf derecede farklılaşmış tümörler nöroblastoma olarak sınıflandırılırken, stroma kısımları artmış olgun ganglion hücreleri ve seyrek nöroblastlarla iyi derecede farklılaşmış iyi huylu tümörler ganglionöromlar olarak tarif edilmiştir [21]. Ganglionöroblastomalar, hem olgunlaşmamış nöroblastomalar hem de farklılaşmış ganglionöromaların özelliklerine sahip kategoridir (Şekil 1.2) [22].



**Şekil 1. 2.Nöroblastoma tipleri[18]**

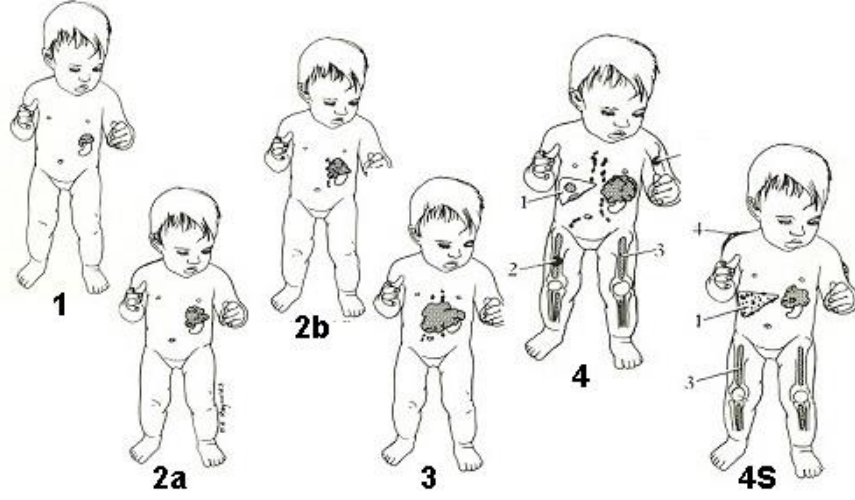
Nöroblastomalar, hiperkromatik nükleuslu, dar sitoplazmalı küçük hücrelerden oluşur. Bunlar sıklıkla ince fibrovasküler septalar ile birlikte gruplar oluşturan tümör hücreleri şeklinde görülür. *In vitro* çalışmalarda N tip nöroblastik hücreler, S tip Schwannian/melanoblastik öncül hücreler ve I tip kök hücre olmak üzere moleküler özellikler ve davranış olarak da farklı olan 3 farklı tip nöroblastoma hücresi bulunmuştur. Nöroblastoma, farklılaşmamış, az farklılaşmış ve farklılaşmış olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır [19].

Uluslararası Nöroblastoma Patoloji Sınıflandırması olarak değiştirilen Shimada sınıflandırması, nöroblastoma davranışı ve prognozunu tahmin etmek ve aydınlatmak için yaygın kullanılmıştır [23]. Bu sınıflandırma sistemi, hastanın yaşına ek olarak, hücrel farklılaşma derecesi, Schwann stroması ve mitotik–karyorektik indeks gibi (MKİ) histolojik özellikleri dikkate alır. Hem tanı anındaki, hem de uygun tedavi protokollerini belirlemek için hastalığın ilerlemesi boyutunu ve aşamasını belgelemek açısından Uluslararası Nöroblastoma Evrelendirme Sistemi genel olarak kabul görmüş yöntemdir (Tablo 1) (Şekil 1.3) [24].

**Tablo 1. Uluslararası Nöroblastoma Evrelendirme Sistemi**

<b>Aşama</b>	<b>Tanımlama</b>
<b>1</b>	Lokalize ve etrafı belirgin tümör; lenf düğümleri metastazı yok
<b>2A</b>	Etrafı belirgin olmayan lokalize tümör; lenf düğümleri metastazı yok
<b>3</b>	Bölgesel lenf düğümü tutulumu var, cerrahi olarak çıkartılması mümkün olmayan tümör
<b>4</b>	Uzak lenf düğümlerine, kemik, kemik iliği, karaciğer, deri ve ya diğer organlara metastaz yapmış primer tümör
<b>4S</b>	Deri, karaciğer ve kemik iliği ile sınırlı (<1 yaş bebeklerle sınırlı) metastatik (1,2A,2B aşamalarında tanımlandığı gibi) primer tümörler

### Uluslararası Nöroblastoma Evrelendirme Sistemi



Şekil 1. 3.Uluslar arası Nöroblastoma Evrelendirme Sistemi[20]

#### 1.1.3 Nöroblastomanın Genetik Altyapısı

Genel olarak tümör oluşumu iki nokta hipotezi ile açıklanmaktadır ve doğuştan bir kromozomdaki alel kaybının nöroblastoma oluşumuna zemin hazırladığı, bununla birlikte aynı genin alelinde meydana gelen nokta mutasyonunun kanser oluşumuna neden olduğu düşünülmektedir [25]. Tümör hücrelerinde gösterilmiş genetik değişiklikler hastalığın patogenezinde ve prognozunda rol oynayabilmekte ve tümörün biyolojisi ve biyokimyası ile ilgili bilgileri sunmaktadır. Nöroblastomada belirlenen sitogenetik sapmalar-kromozom kayıpları, artımları ve DNA indeksi anormalliklerini içerir. Olumsuz prognoz ve zayıf hasta sonuçları ile güçlü şekilde ilişkili tümörlerin %70'inde 1.kromozomun (1 p36 bölgesinin silinmesi) heterozigotluk kaybı oluşur [26, 27].

Nöroblastomada 11q ve 14 q kromozom üzerinde de delesyonlar sık tespit edilmektedir [28]. Bununla birlikte, 1p delesyonu tümör dokusunun %25-35' inde görülürken 11q



delesyonu tümör dokusunun %35' inde saptanmıştır. Ayrıca, 17q kromozom üzerinde allel artımları klinik olarak nöroblastoma için önem arz etmektedir [29]. İleri evre nöroblastomaların yaklaşık üçte ikisi diploid DNA miktarına sahiptir ve genellikle kemoterapiye dirençlidir. Bununla birlikte, hipodiploid DNA miktarının varlığı erken hastalık aşaması ve geliştirilmiş prognoz ile ilişkilidir [30].

## 1.2 NÖROBLASTOMA GELİŞİMİNDE MOLEKÜLER MEKANİZMALAR

**MYCN Amplifikasyonu:** MYCN(N-myc) protoonkogen proteinin fazla anlatımı veya amplifikasyonu tümörigenezle özellikle nöroblastoma ile ilişkilidir. N-myc fetal beyinde en fazla anlatımı bulunur ve normal beyin gelişimi için kritiktir [31]. Nöroblastoma MYCN onkogeni de dahil bazı moleküller ile karakterize edilir ki, bunlar prognozun çeşitli dereceleriyle ilişkilidir; hücre yüzey glikoproteini CD44, tirozin kinaz reseptörleri TrkA ve TrkB, ve onların ilgili ligandları NGF ve BDNF. Bu belirteçlerden MYCN, en önemlisi olup, birincil nöroblastomların %25'inde yükselmiştir ve hastalığın ileri evresi hızlı hastalık metastazı ve kötü klinik sonuçla güçlü ilişkilidir [32]. MYCN amplifikasyonu olan tümörler tipik olarak sağlıklı neovaskülarizasyon ile karakterize edilir. Ayrıca, MYCN amplifikasyonu, kromozom 1p delesyonu ve çoklu ilaca dirençle ilişkili proteinin (MRP) ekspresyonunun artması gibi kötü prognostik göstergelerle ilişkili olmuştur [33]. En önemli prognoz göstergelerinden biridir. MYCN 2. kromozomun kısa kolunda 2p24 bölgesinde yerleşmiş bir gendir. Bu genin amplifikasyonu sitogenetik olarak 2 şekilde gösterilmektedir; **d-mins** (double minutes kromatin cisimcikleri) ekstra küçük kromozom parçalarının olması, **HSR** (homojenboyanan bölgeler) ise aynı kromozom içinde bir bölgenin yinelenmesi şeklinde tanımlanmaktadır. Tümör hücresinde MYCN amplifikasyonu değişik moleküler tekniklerle (southern blot, FISH, kantitatif PCR, immunhistokimya gibi) gösterilebilir. Kopya sayısının 10 ve üzerinde olması prognostik öneme sahiptir. Nöroblastoma olgularında MYCN amplifikasyon sıklığı % 17-25 arasında değişmektedir ve varlığı ileri evre hastalık, hızlı tümör büyümesi, yüksek relaps riski ve kötü

prognozla anlamlı olarak ilişkilidir. Diğer prognostik özelliklerden bağımsız bir risk faktörüdür. ABD’de nöroblastom tanısı almış 2877 hastanın sonuçları bunu çok net ortaya koymaktadır [34].

Yapılan çeşitli çalışmalarda, nöroblastoma hücre hatlarında ve nöroblastoma hastalarında CDK4/CDK6 kinaz aktivitesinde önemli düzeyde artış olduğu gösterilmiştir. SiklinD1 ve CDK 4 gen amplifikasyonunun yanı sıra homozigot CDKN2A delesyonu da rapor edilmiştir [35-37]. SiklinD1, CDK4, CDK6 gen ifadelerinin nöroblastoma vakalarında fazla anlatımlarının olduğunu göstermekle birlikte diğer tümörlerle karşılaştırıldığında da nöroblastomada bu genlerin anlatım düzeylerinin daha yüksek olduğu belirtmişlerdir [38]. Nöroblastomada SiklinD1, CDK4 ve CDK6’ daki genomik anomalilerin belirlenmesi bu pediatrik tümörde hücre döngüsünün G1 aşamasına giriş kontrol noktasında bir bozukluk olduğunu gösterir [38]. Sempatik sisteme ait nöroblastların nasıl nöroblastomlara dönüştüğü tam olarak bilinmemekle birlikte bu malign dönüşümde nöroblastların normal farklılaşmasını uyaran nörotropin reseptör yollarının rol oynadığı düşünülmektedir. Ayrıca, nöroblastoma hücrelerinde hücre farklılaşması ve apoptozla ilişkili genlerin anlatımı arttığında telomeraz aktivitesi düşük bulunurken, hücre döngüsü ile genler ve transkripsiyon faktörlerinin fazla anlatımı, yüksek telomeraz aktivitesi ve kötü prognozla ilişkilidir [39].

### **1.3 TEDAVİ YAKLAŞIMLARI**

Kanser tedavisinde; tümörün organizmada bulunduğu dokuya, tümörün karakterine ve evresine, hastanın fizyolojik durumuna göre çok çeşitli tedavi yöntemleri uygulanmakla birlikte bu tedaviler arasında, radyoterapi, kemoterapi, immünoterapi, monoklonal antikor terapileri, gen terapisi ve cerrahi müdahale gibi yöntemler kullanılmaktadır [40]. Günümüzde nöroblastoma için tedavi seçenekleri cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi

yöntemlerinin birleştirilmesi konusunda uzlaşmıştır. Bu yaklaşım hastalığın evresi ve başvuru sırasında hastanın yaşına bağlı olarak bireysel olarak değiştirilmektedir.

### **1.3.1 Cerrahi yaklaşım**

Cerrahi, nöroblastoma tanı ve tedavisinde çeşitli amaçlar için kullanılmaktadır. Histopatolojik tanı ve genetik incelemeler için yeterli tümör dokusu sağlamak ve hastalığın evresini belirlemeye yardımcı olması bu amaçlara örnek olarak verilebilir. Ayrıca, eğer mümkünse, hastanın hayati organlarına zarar vermeden tümörü çıkartmak için en iyi yoldur. Evre 4S dışında, tümörün en az %90'nını güvenle çıkartmak önem arz etmektedir. Eğer cerrahi sonrası tümör kalıntıları bırakıldıysa kemoterapi sırasında izlenmeli ve kalan tümör ikincil cerrahi ile çıkarılmalıdır. İkincil cerrahi, kemoterapiye yanıtı belirlemek ve ilk operasyon sonrası bırakılan kısmın tamamen alınması için önem arz etmektedir. Nöroblastomada cerrahi komplikasyon oranı %5–25 olarak bildirilmektedir. Komplikasyonlar, en sık tümör prognozu iyi olan çocuklarda ortaya çıktığından cerrahi riskten kaçınmak önemlidir [41].

### **1.3.2 Kemoterapi**

Kemoterapi özellikle orta ve yüksek risk grubundaki hastaların ya da düşük risk grubu olup hayati organların tutulumu nedeniyle cerrahi tedavinin uygulanmadığı olgularda temel tedavidir. Kemoterapi protokolleri hastanın risk grubuna göre belirlenmektedir. Kombine kemoterapi, ileri evre primer, dirençli veya metastatik nöroblastomlu hastalarda başarılı olmuştur. Şu anda en yaygın kullanılan kemoterapik maddeler siklofosamid, ifosfamid, vinkristin, doksorubisin (adriamisin), cisplatin, karboplastin, etoposid (VP-16) ve melfalan'dır.

İleri evre tümörlerde kombine kemoterapi, hastalığı etkili bir şekilde ortadan kaldırmakta başarısız olmuştur; bununla birlikte çoğunlukla ileri evre primer tümörün ölçüsünü azaltırken onun cerrahi olarak çıkarılabilir olmasını sağlar. Daha yoğun

kombinasyon tedavisi ile uzun süreli sağkalım bir gelişme olsa da, toksisite önemli bir sorun olmaya devam etmektedir. Bu nedenle, kemoterapinin zararlı yan etkilerini azaltırken yararlarını toplamak için ilave yardımcı maddeler (adjuvanlar) gerekebilir.

Total vücut irradyasyonu ile kemik iliği tedavi veya kemik iliği nakli (BMT) ardından melfalan ile tedavi yüksek riskli nöroblastomlu hastalar için kısıtlı başarı göstermiştir [41]. Başka bir çalışmada, otolog kemik iliği naklinin yoğun kemoterapi ile karşılaştırıldığında sağkalımı önemli ölçüde artırdığı gösterilmiştir [42]. Matthay ve arkadaşlarının 2006 senesindeki raporu kemoterapiye dirençli nöroblastomalı hastalar için 131 I-MIBG ile miyeloablatif kemoterapinin kombine terapinin etkili olduğunu göstermiştir [43]. Ancak tüm bu bulgular hala olumsuz sonuçları olan girişimlerdir.

### **1.3.3 İmmunoterapi**

Bazı nöroblastoma vakalarında oluşan spontan tümör gerilemesi birçok araştırmacıların ilgisini çekmiş ve tümör düzenlemesi için potansiyel immunolojik mekanizma önerilmiştir. Programlanmış bağışıklık hücrelerinin kanser hücrelerinin üzerindeki antijenlere karşı davranması bilim adamları tarafından mercek altına alınmıştır. Retinoidlerin nöroblastomlar sitotoksik lenfositlere duyarlı hale getirmek için büyük doku uygunluğu sınıf I yolağını düzenlediği gösterilmiştir [44]. Yoğun kemoterapi ile birlikte anti-GD2 immüterapi tekbaşına başarısız ameliyat sonrasında tekrarlayan, yayılan hastalığın kür şansı olarak gösterilmiştir [45]. Dendritik hücreleri hedef alan immüterapi nöroblastomanın *in vivo* modelinde ümitverici tümör azalması yanıtı göstermiştir [46]. Çeşitli kanser türlerinde *in vitro* yapılan araştırmalar Epibrassinolid' in anti- kanserojen etkinliğini ve tedavide rol alabileceğini düşündürmektedir.

#### 1.4 NÖROBLASTOMA *İN VİTRO* MODELLERİ

Başlangıçta nöroblastoma tümörlerinin *in vitro* kültürü, tümör eksplantlarının kolayca özenli aksonların yetiştirildiği plazma-pıhtı kültürlerinde büyüdüğünü bulan Murray ve Stout tarafından teşhis için kısa vadeli araç olarak kullanılmıştır [47]. Nöroblastoma tümörlerinin uzun süreli kültürleri ve bu hücrelerin farklılaşmış özelliklerinin kültürde anlatımı, *in vivo* ve *in vitro* olarak ayırt etmek için nöroblastoma hücrelerinin eğilimini anlamak amacıyla bu kültürlerle çalışan araştırmacıları etkilemiştir [48].

Primer nöroblastoma hücreleri kültürde küçük, yuvarlak veya genellikle uzun nörit-benzeri süreçleri hazırlamasına rağmen nispeten olgunlaşmamış bir görünüme sahip damla şekilli hücrelerdir. Nöroblastoma hücreleri sadece yumuşak substrata yapışan hücre birikimlerinde büyüyebilir. Oluşan hücre hatlarının morfolojik görünüşü nöroblastik, orta derece ve substrata yapışan veya sabit morfolojiye sahip hücrelere göre değişir [49]. Kültürler bu hücre tipleri için homojen ya da heterojen olabilir.

İlave büyüme faktörlerinin yokluğunda serum içermeyen koşullarda nöroblastoma hücre hatlarının uyumuna dair raporlar mevcuttur. Çalışmalarda SK-N-AS hücre hattının IGF-2 anlatımı olduğu için, serumsuz koşullarda uyum sağladığı gösterilmiştir; oysa diğer nöroblastoma hücre hatları serum içermeyen koşullarda büyümek için IGF-2' ye gerek duymaktadır [50]. Nöroblastomaların sitogenetik özellikleri en çok ileri evre tümörlerde bulunmaktadır ve en çok nöroblastoma hücre hattı ileri evre tümörlerden elde edilmiştir.

Nöroblastoma oluşturduğu düşünülen hücreler, embriyonal nöral krestlerin postgangliyon sempatik nöroblastlarıdır. Nöral krest nöral borunun kapanması sırasında ortaya çıkan geçici yapıdır. Nöral krest hücreleri periferel sinir sistemi, böbrek üstü bezinin ilik hücreleri, kalsitonin üreten tiroid hücreleri, pigment hücreleri ve mezoktodermal hücreler de dahil olmak üzere çok çeşitli dokulara farklılaşabilen ve lateral göçü izleyen hücrelerdir. Göçen nöral krest hücrelerinin karşılaştırdığı büyüme ve farklılaşma spesifik peptidlerin, onların gelişim ve köken spesifik farklılaşmasını etkilediği düşünülmektedir [51].

Bazı bulgular nöroblastoma hücre hatlarının, kendi nöral krest hücre öncüleri gibi nöral veya nöroendokrin özelliklerinin bulunduğu gösterilmiştir. Kültürde nöroblastoma hücrelerinin en önemli özelliklerinden biri nöritik süreçlerde spontan veya uyarılmış olgunlaşmadır. Diğer nöronal özellikler ise; nörotransmitter biyosentetik enzimlerin sentezi, nörofilament anlatımı, opioid, muskarinik ve nörotrofin reseptörlerinin ekspresyonu, katekolamin depolama bölgeleri olduğu düşünülen yoğun nukleus granülleri, nöron spesifik enolaz immunoreaktivitesi.

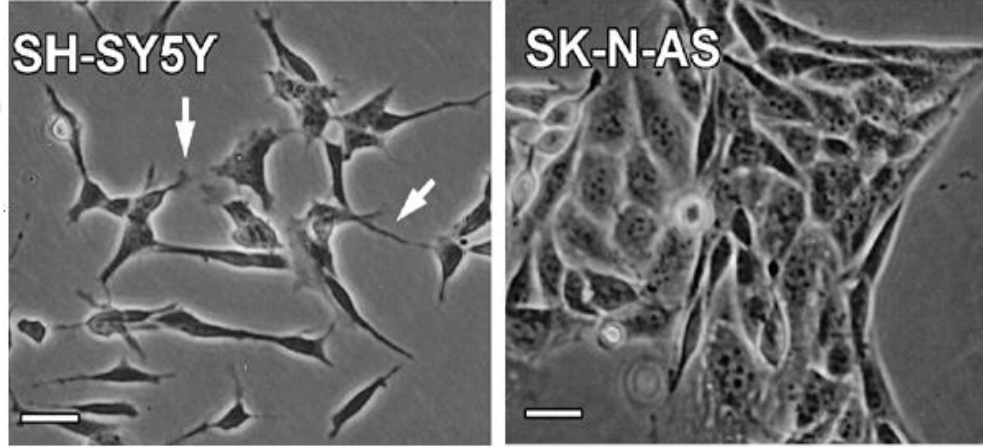
Nöroblastoma hücre hatları, heterojenliğe katkıda bulunan en az 3 morfolojik varyant içerir; nöroblastik (N), sabit veya substrata yapışan (S) ve orta dereceli (I) hücre tipleri [51, 52]. Nöroblastoma hücre hatlarının birçok morfolojik alt tipleri klonlanmıştır ve karakteristik biyokimyasal parametreler ile ayrt edilebilir. Biyolojik yanıt değiştiricilerinin nöroblastoma hücre hatlarında apoptoz veya hücre ölümünü uyarması son zamanlarda takdir edilmektedir.

**SH-SY5Y hücre hattı-** ilk olarak 1970' lerin başlarında sempatik adrenerjik ganglial kökenli nöroblastoma hastasının kemik iliğinden biyopsi ile elde edilen SK-N-SH hücrelerinin üç kez klonlanmış alt tipidir. Bu hücreler nöronların biyokimyasal ve fonksiyonel özelliklerine sahip olduklarından 1980' lerin başından beri bu hücre hattı nöronların modeli olarak kullanılmaktadır. SK-N-SH hücreleri 3 farklı fenotipde hücreleri içerir: nöronal (N tipi), Schwannian (S tipi) ve orta dereceli (I tipi) [53]. SH-SY5Y hücre hattı nispeten homojen nöroblast- benzeri (N tipi) hücre hattıdır. Bu hücre hattı, nöronal belirteç enzim aktivitesi (tirozin ve dopamin  $\beta$ - hidroksilazları) sergiler, norepinefrinin (NA) spesifik alımını ve bir veya daha fazla nörofilament proteinlerinin anlatımını barındırır. Bu hücreler aynı zamanda opioid, muskarinik ve sinir büyüme faktörü reseptörlerinin anlatımını yapar.

Buna ek olarak, SH-SY5Y hücreleri *in vitro* hücre modelinin geliştirilmesi için ön koşul olmakla, kontaminasyon olmadan uzun süre boyunca kültür içinde çoğalma yeteneğine

sahiptir. SH-SY5Y hücreleri olgunlaşmamış neoplastik nöral krest hücrelerinden elde edilmiştir ve kök- hücre özelliklerine sahiptir. SH-SY5Y hücreleri yaygın olarak metabolizma, nöronal farklılaşma analizi de dahil olmak üzere, nörodejeneratif ve nöroadaptif işlemler ile ilişkili, nörotoksisite ve nörolojik koruma gibi deneysel nörolojik çalışmalarda kullanılmıştır (Şekil 1.4).

**SK-N-AS hücre hattı**, 1981 yılında Helson tarafından 6 yaşlı beyaz ırk kökenli hastanın kemik iliğinin metastaz bölgesinden elde edilmiştir. Nöroblast tip hücre hattı olup adherent özelliktedir. Diğer nöroblastoma hücre hatlarında retinoidler nöronal farklılaşma ve hücre büyümesinin durdurulmasını uyarırken, SK-N-AS hücre hattında az etkili olmuştur [54]. SK-N-AS hücre hattında 1p. delesyonu, N-myc' un tek bir kopyası görülmektedir [55]. SK-N-AS hücre hattının IGF-2 ekspresyonu için, serumsuz koşullarda uyum sağladığı bilinmektedir; oysa diğer nöroblastoma hücre hatları serum içermeyen koşullarda büyüme için IGF-2' ye gerek duyar [50].



**Şekil 1. 4. Nöroblastoma hücrelerinin morfolojisi (www.atcc.org).**

## 1.5.GLİKOJENSENTAZKİNAZ3

GSK3, glikojen sentezinde yer alan anahtar enzim glikojen sentazı fosforlayan kinaz olarak 1980 yılında keşfedilmiştir [56]. GSK3 evrimsel olarak korunmuş ve memelilerde GSK3 $\alpha$  ve GSK3 $\beta$  adlı 2 farklı gen tarafından kodlanan 2 izoform içermektedir [57]. GSK3 $\alpha$  ile karşılaştırıldığında, GSK3 $\beta$  proteininin N ucunda 60 amino asit kısmı eksiktir, bu da daha düşük moleküler ağırlıkta olmasına neden olmuştur (46,7kDa). 2 izoform büyük ölçüde benzerdir. En önemlisi de kinaz domaini (ATP bağlanma bölgesi) %97 homoloji göstermektedir.

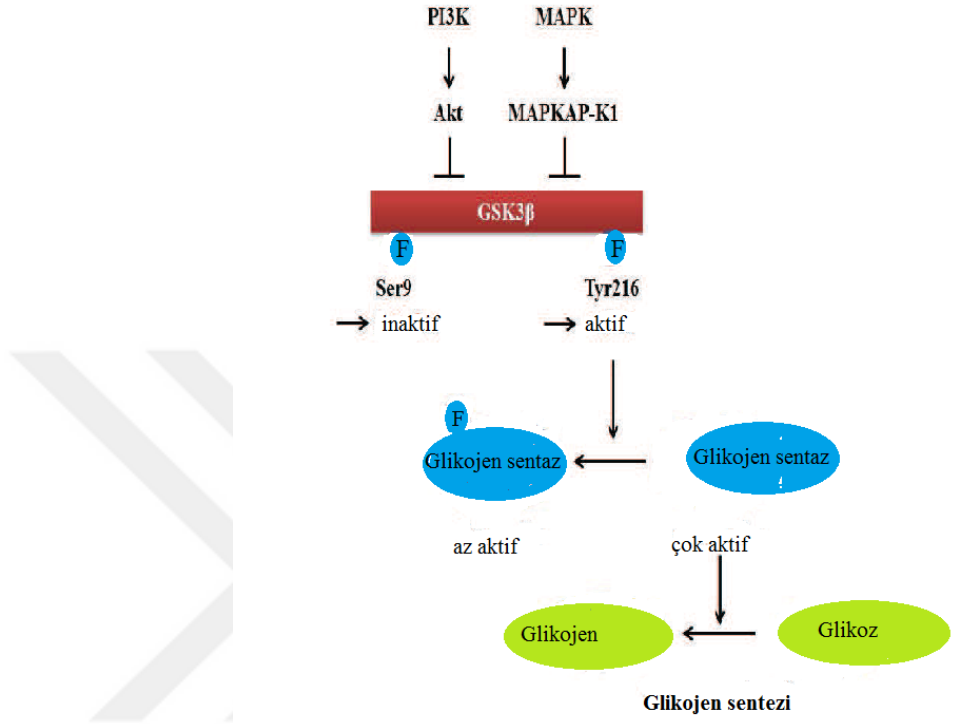
Başlangıçta, GSK3' ün esas işlevinin fosforlanma ve glikojen sentazın inaktivasyonu yoluyla glikojen sentezinin negatif düzenlenmesi olduğu belirtilmiştir. Ancak, sonraki çalışmalar GSK3' ün hücre döngüsünü düzenlenmesi, çoğalma, farklılaşma, apoptoz ve hücre göçü gibi işlevlerini ortaya çıkarmıştır. Gen susturma çalışmalarında gösterildiği üzere, yüksek homolojiye rağmen 2 izoform fonksiyonel olarak önemsiz değildir [58].

### 1.5.1 GSK3 ve sinyal mekanizması

Fare modellerinden elde edilen bulgular GSK3 izoformlarının doku spesifik fizyolojik fonksiyonlar sergilediğini düşündürmektedir. GSK3 $\beta$ ' nın susturulduğu fareler anne karnında ölürken [58], GSK3 $\alpha$  yoksun fareler canlı kalmış ve glikozun yüksek miktarına cevap olarak geliştirilmiş glukoz toleransı ve artan hepatik glikojen deposu ve insülin duyarlılığı göstermiştir [59]. GSK3 $\beta$ , fosforlanması, hücre içi lokalizasyonu ve protein- protein etkileşimleri aracılığı ile düzenlemeyi birden fazla düzeyde etkilemektedir. GSK3 proteininin kendisi çok fazla fosforlanmaya maruz kalır, bu da amino asitin değiştirilmesine bağlı olarak onun aktivitesini etkilemektedir [58]. Tyr216' da GSK3 $\beta$  kinaz domaininin tirozinden fosforlanması onun aktivasyonuna neden olur



[60], ancak N-terminal Ser9 fosforilasyonu onun aktivitesinin inhibisyonuna neden olmaktadır ve GSK3 $\beta$ 'nin işlevinin düzenlenmesinde önemli rol oynar [61] (Şekil 1.5).

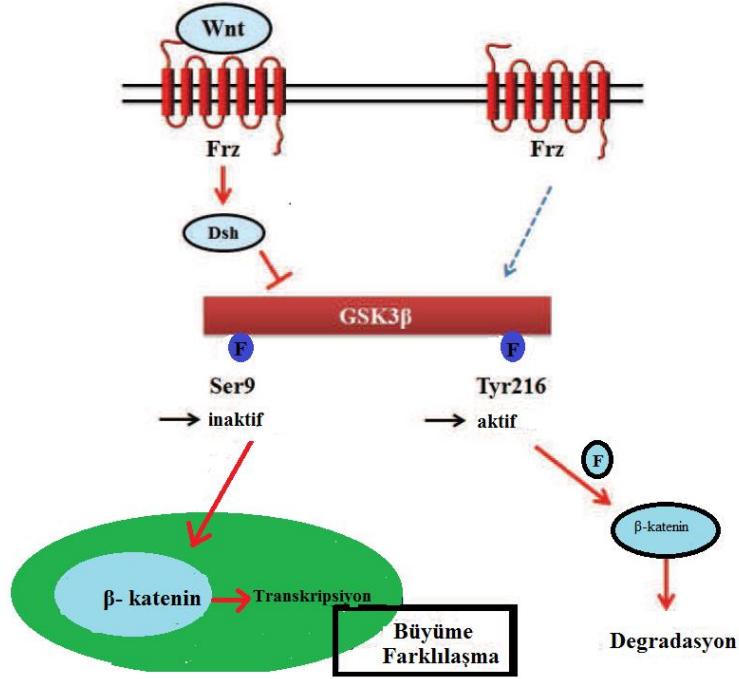


**Şekil 1. 5. GSK3 $\beta$ 'nin fosforilasyon ve aktivasyonu[62]**

GSK3 $\beta$  aynı zamanda kanser oluşumu ve embriyo gelişimi ile ilişkili olan Wnt sinyal yolağını baskılayan protein olarak işlev görmektedir [63][64][65]. Wnt yolağı, sinir sisteminde sinaps oluşumunu, sinir dokusu da dahil olmak üzere birçok dokuda hücre sağkalımı, çoğalma, farklılaşma ve hücre göçünü teşvik etmede temel rol oynamaktadır. Kısaca, Wnt yolağı inhibitörün engellenmesini sağlayarak transkripsiyon faktörünün aktivasyonuna neden olmaktadır. Wnt sinyali mevcut olmadığı zaman GSK3 $\beta$  diğer proteinlerle (örneğin, axin, adenomatous polyposis coli ([APC]) ilişkiye girer ve yolağın önemli bir aracısı olarak işlev görür. Bu durumda, proto- onkoprotein  $\beta$ - katenin, fosforlanır ve degradasyon yoluyla hızlı bir şekilde nukleusa yönlendirilir, böylece,

hücrede önemli bir seviyede birikimi olmaz[66] Aksine, Wnt kendi reseptörüne- Frizzled' e (Frz) bağlandığında Dishevelled (Dsh) hücre membranına geçer. GSK3 $\beta$  Dishevelled aktivasyonu ile inhibe edilir.

Sonuç olarak, GSK3 fosforlanması aracılığıyla ubiquitinasyon- bağımlı proteozomal degradasyondan kaçan  $\beta$ - katenin sitoplazmada birikir.  $\beta$ - katenin sonradan nükleusa geçer ve burada onkoprotein olarak işlev görerek belirli hedef genlerin transkripsiyonunu başlatmak için diğer proteinlerle (örneğin, T- hücre faktörü [Tcf], lenfoid güçlendirici faktörü [Lef]) birleşir. Bu mekanizmada, GSK3 $\beta$  tümör baskılayıcı protein olarak düşünülmektedir (Şekil 1.6).



Şekil 1. 6. Wnt yolağında GSK3' ün rolü[67].

Pek çok GSK3 substratı GSK3-ün oluşması için fosforlanmadan önce öncü-fosforlanma gerektirir. Böylece promotör kinazın hem normal, hem de hastalık durumu

GSK3 aktivitesini kısıtlayabilir. GSK3 aynı zamanda Ser 9/24-de p70 ribosomal S6 kinaz-1 ve mitojenle aktive protein kinaz (MAPK) sinyalinin alt yolak düzenleyicisi olan 90 kDA ribosomal protein S6 tarafından fosforile edilebilir [68]. Düzenleyici serin fosforilasyonuna ek olarak, GSK3 $\alpha$  ve GSK3 $\beta$  aktivitesi 216 veya 279. aminoasitler'de tirozin fosforlanması ile düzenlenebilir.

Fizyolojik şartlarda, GSK3 bu bölgelerde de fosforlanır ve GSK3 aktivitesini artırır. Ancak, GSK3-ün Tyr216/279- dan düzenlenmesi, Ser9/21- den düzenlenmeye göre daha az yaygındır [69][70]. Wnt sinyali kompleks GSK3' ü bir dizi bağlanma ortaklarından ayırarak GSK3 aktivitesini düzenler, bunun sonucu olarak  $\beta$  kateninin degradasyonu ve fosforlanmasını engeller. Wnt yokluğunda,  $\beta$  katenin sinyal havuzu, degradasyon yolu ile düşük seviyelerde muhafaza edilmektedir [71][72][73].  $\beta$  katenin,  $\beta$  transdusin tekrarı içeren protein ( $\beta$ TrCP) tarafından ubiquitinyasyon için hedeflenmiştir ve daha sonra proteazom tarafından parçalanır.  $\beta$  katenin, serin-treonin kinazlar, kasein kinaz1(CK1) kinazlar ve GSK3 $\beta$  tarafından fosforlanır.  $\beta$  katenin fosforlanması, aksin, adenomatöz polipozis koli protein ve diversiyon içeren multiprotein kompleksi oluşturur. Wnt sinyalinin alınması, GSK3 bağlayıcı protein (GBP)/Frat-1-in güçlendirilmesi yoluyla  $\beta$  kateninin bozulmasını engeller, bu da GSK3 $\beta$ ' nın yıkım kompleksinden çıkarır. Stabilize edilmiş  $\beta$  katenin nükleusa geçer ve T hücre faktörü/lenfoid güçlendirici faktör transkripsiyon faktörleri ile birleşir, siklinD1, PPAR $\delta$  gibi Wnt'in hedef genlerinin transkripsiyonuna yol açar. Son zamanlarda, GSK3 $\alpha$ ' nın GSK3 $\beta$  gibi yıkım kompleksi ve Wnt sinyal yolunda işlevi gösterilmiştir; bu da bu enzimin Wnt biyolojisinde GSK3 $\beta$ 'ya eşit olarak önemli olduğunu düşündürmektedir [74][75].

### **1.5.2 GSK3'ün Alzheimer hastalığı ve nöroblastoma gelişimindeki rolü**

GSK3' ün Alzheimer hastalığında merkezi bir rol oynadığını ve onun degradasyonunun hem rastgele, hem de ailesel Alzheimer durumlarında hastalığın patolojik işaretlerinden

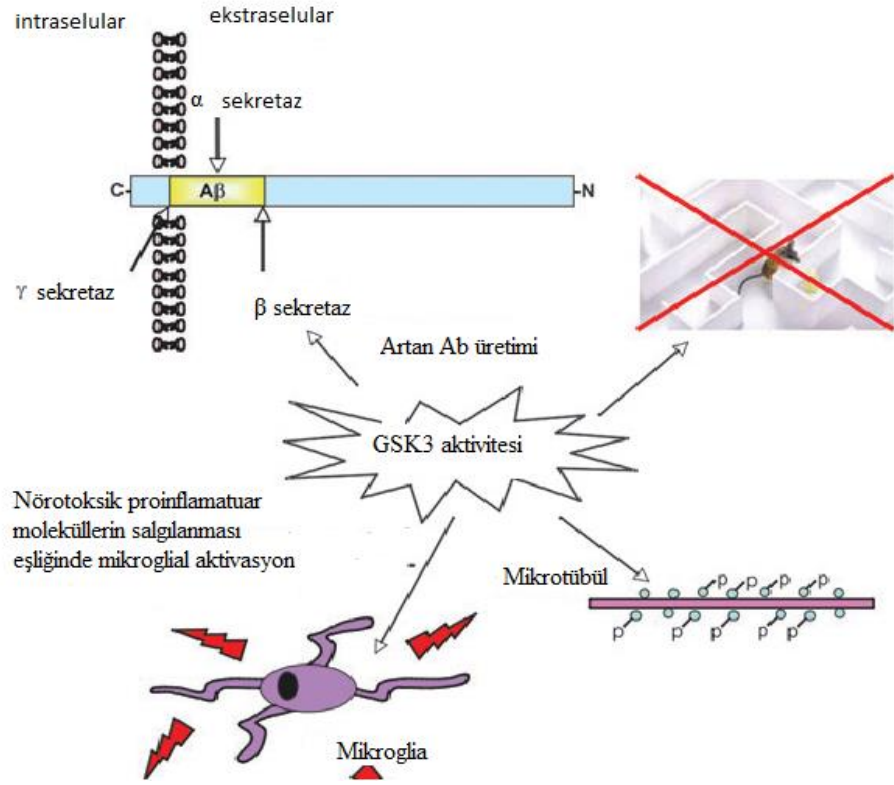
bir çoğunu hesaba katmasına dair kanıtlar, Alzheimer hastalığının GSK3 hipotezini açık ve keskin bir şekilde ifade etmektedir. Elde edilen kanıtlar, GSK3'ün Tau hiperfosforlanması, hafıza bozukluğu, A $\beta$  üretiminin artması ve enflamasyonda rol oynaması gösterilmiştir (Şekil 1.7).

GSK3 ayrıca Alzheimer'da mevcut olan kolinerjik eksiklik ile bağdaşımda olan asetilkolin sentezini azaltır [76]. Ayrıca GSK3 apoptozun önemli mediatörüdür ve böylece Alzheimer hastalığında doğrudan nöral kayba katkıda bulunabilir [77]. Nitekim, eğer GSK3 Alzheimer hastalığı patojenezinde merkez ise, o zaman Alzheimer hastalığında bu enzimin aktivitesinin artışı için kanıt beklenir. Ancak teknik olarak zor olsa da, ölüm sonrası beyin dokusunda enzimatik aktiviteyi ölçmek gibi küçük ihtimaller mevcuttur. Buna rağmen, dolaylı kanıtlar hastalıkta GSK3'ün rolünü desteklemektedir.

GSK3'ün distrofik akson ve nörofibriller ile lokalize olduğu gösterilmiştir [78]. Aktif GSK3 nöronlarda fibril değişiklikleriyle ortaya çıkar [79] ve Tyr216- da GSK3'ün fosforlanması için yapılan immunoblotlama ile Alzheimerda ön korteksde GSK3'ün aktivitesinin artışı kanıtlanır [80]. Alzheimer hastalarının hipokampusu ve Alzheimer'lı beyinden elde edilen dokularda GSK3'ün anlatımının arttığı bulunmuştur [81]; ancak sonraki çalışmalar GSK3'ün enzimsel faaliyetinde artış olmadığını bildirmiştir. GSK3 anlatımı hem Alzheimer durumunda, hem de hafif kognitif bozuklukta sirküle periferik lenfositlerde upregüle edilir [82].

Son zamanlarda GSK3 promotöründeki polimorfizmin geç başlayan Alzheimer hastalığında risk faktörü olduğu bildirilmiştir; bunun da hastalıkta GSK3 anlatımındaki değişikliklere sebep olduğu gösterilmiştir [83]. Bu bulgulara, Alzheimer hastalığında fosforlanma durumunda, GSK3 aktivitesinin artabileceği gösterilmesine rağmen bunun için doğrudan kanıtlar hala sınırlıdır ve bazı çalışmalarda Alzheimer'da GSK3 aktivitesinde değişiklik [84] veya azaltılmış GSK3 aktivitesi bulunmamıştır [85].

Genetik ve epidemiyolojik çalışmalarda, Alzheimerda yukarı Wnt ve insulin sinyal yolu ara maddelerinin değişiklikleri nedeniyle GSK3'ün düzenlenmesinde bozukluklar olduğu görülmektedir. Wnt sinyalinin ko- reseptörü olan düşük yoğunlukta lipoprotein reseptörü ile ilişkili protein (LRP6), apolipoprotein E4-e4 negatif bireylerde [86] geç başlangıçlı Alzheimer için bir risk gen olarak tespit edilmiştir; bu da Alzheimer hastalığının patolojisinde anomal Wnt sinyalinin suçlanmasına neden olmuştur. Buna ek olarak, Alzheimer ile diyabet ve insulin direnci arasında ilişki rapor edilmiştir [87] ve genetik çalışmalar insulin sinyal genlerinin Alzheimer hastalığı için duyarlılığı olan lokusları olduğunu bulunmuştur [88][89].



Şekil 1. 7. GSK3 ve onun Alzheimerda rolü [90].

GSK3' ün birçok alt yolak substratlarının, bellek oluşumu sırasında bağlantıların doğru kurulması için gerekli olan önemli bir işlem olan sinaptik yeniden oluşmaya dahil olduğu bilinmektedir [91].

Wnt veya PI3 kinaz sinyalinin baskılanması, öğrenme ve hafızanın korelasyonunu en iyi karakterize eden uzun vadeli potansiyeli (LTP) bozar [92][93]. GSK3 hem Wnt, hem de insulin yolaklarını negatif düzenler; GSK3 $\beta$  inhibisyonunu vahşi tip farelerde LTP indüksiyonu ile sonuçlanır [94][95]; bu da GSK3 $\beta$ -nın LTP-de Wnt ve insulin etkilerine karşı bileceğini göstermektedir. Bu duruma göre, farelerde GSK3 $\beta$ -nın fazla ekspresyonu LTP indüksiyonunu önler [94] ve konumsal öğrenmede azalmaya neden olur [96]. GSK3 $\beta$  inhibitörlerinin uzun süreli depresyonu (LTD) bloke ettiği gösterilmiştir ve LTD sırasında GSK3 $\beta$  aktivitesinin arttığı görülmüştür [95]. Bu nedenle, GSK3 $\beta$ -nın hafıza oluşumunun indüklenmesi, LTD-nin susturulması ve LTP oluşumuna izin verilmesi için kritik olduğu görünmektedir.

GSK3 aynı zamanda hafızanın evrensel modülatörü olan cAMP duyarlı element bağlama proteinini [97] fosforlar ve inhibe eder. Ayrıca, GSK3 hafıza oluşumu sırasında sinaptik oluşum için gerekli olan işlemleri, aktin ve tubulin birleşmesini [98] teşvik etmektedir. GSK3 LTP ve hafıza oluşumuna neden olan bir kapı görevi gördüğü için önerilmektedir. Alzheimerda GSK3 aktivitesinin artması göz önüne alındığında, bu hastalıkta hafıza kaybı, hastalık ilerledikçe nöronal kaybı takip eden LTP inhibisyonu ile bağdaştırılabilir.

### **1.5.3 GSK3 ve tau fosforlanması**

GSK3  $\beta$  ve GSK3 $\alpha$ , *in vitro*'da ve nörodejenerasyon hücre kültürü modellerinde hem primer, hem de ikincil fosforlanma bölgelerinde Taunun hiperfosforlanmasını uyarır; bu da *in vivo*'da GSK3'ün nörofibrillerin oluşmasına dahil olan önemli bir Tau kinazı olduğunu gösterir. Buna uygun olarak, GSK3 $\beta$  transgenik farede, tau hiperfosforlanması

ve nörodejenerasyonu görülmüştür [99] ve kronik lityum (GSK3 inhibitörü) GSK3 $\beta$ 'ın ve Tau'nun aşırı anlatımı olan çift transgenik farelerde Tau hiperfosforlanmasını ve nörofibril oluşumunu engeller.

İnsulin, insan nöroblastoma hücrelerinde Tau fosforlanmasını geçici olarak artırır, fakat kısa bir süre sonra Tau fosforlanmasını azaltır ki, bu da aktivasyon ve bunu takiben GSK3 inhibisyonu ile ilişkilidir [100]. Wnt sinyalinin negatif regülatörü olan Dickkopf proteini de, GSK3 aktivasyonu yoluyla Tau fosforlanması ve nörodejenerasyonunu teşvik eder [101]; Dickkopf'un anlatımı Alzheimer'da artmıştır. Ayrıca, PS-1 hem GSK3 $\beta$ , hem de Tauya bağlanır, PS-1'in FAD'la ilişkili mutant formları GSK3 $\beta$ ' ya daha etkili şekilde bağlanarak tau fosforlanmasında artışa neden olur [102]. PS-1-in, Tau fosforlanması ve apoptozu engelleyen PI3-kinaz/Akt sinyali üzerinden GSK3'ü inaktive ettiği gösterilmiştir. PS-1 FAD mutasyonları PS-1 bağımlı PI3 kinaz-Akt yolağını inhibe etmektedir, GSK3 aktivitesini kolaylaştırmakla Tau hiperfosforlanmasına neden olmaktadır. Bu GSK3 aktivitesinde ikincil sapmalar aracılığıyla hızlanan hastalık ilerlemesine yol açabilecek FAD mutasyonları aracılığıyla potansiyel mekanizmadır [103].

GSK3 $\beta$ ' nın aksine, GSK3 $\alpha$ ' nın amiloid- öncü proteinin (APP) kesimini düzenleyerek A $\beta$  oluşumunun artmasına neden olduğu gösterilmiştir [104]. Nöronların A $\beta$ 'ye maruz kalması PI3 kinaz yolağının inhibisyonu üzerinden GSK3 $\beta$  aktivitesini artırır ve GSK3  $\beta$  anlatımı veya aktivitesinin azaltılması A $\beta$  kaynaklı nörodejenerasyonu önlediği [105] gösterilmiştir [106]. GSK3 aktivitesinin artması, bu senaryoda hastalığın birincil nedeni olmasa da, artan GSK3 aktivitesi Alzheimer hastalığının amiloid kaskadı hipotezi doğrultusunda, hem FAD hem de sporadik olgularda A $\beta$  üretimini arttırıp devamında Tau hiperfosforlanması ve nöronal dejenerasyona neden olduğu gösterilmiştir [90].

Muhtemelen GSK3 aktivitesinin bastırılması üzerinden etkili olan insulin sinyalinin amiloid prosesi ve APP üzerinde olumlu etki gösterdiği gösterilmiştir. İnsulin A $\beta$ -

proteazı, insulin indirgeyici enzimin (İDE) [107] anlatımını sAPP $\alpha$  salgılanmasını artırır, bu da APP'nin non-amiloidojenik  $\alpha$ -sekretaz aracılı kesilmesi sonucu oluşmaktadır [108]. Alzheimer olan kişilerde, burundan insulinin verilmesi A $\beta$ 40/42 oranını olumlu şekilde değiştirdiği ve kognisyonu iyileştirdiği gösterilmiştir [109].

#### 1.5.4 GSK3 ve nöroblastoma

Glikojen sentaz kinazın 40 üzeri substratının olduğu ve farklılaşma, büyüme, proliferasyon, hareketlilik, hücre döngüsü ilerlemesi ve apoptoz da dahil olmak üzere çeşitli hücresel fonksiyonları düzenlediği bilinmektedir [16]. İnsuline bağımlı olmayan diyabet ile ilişkili olarak, beyinde çok fazla anlatımı vardır ve Alzheimer hastalığı, şizofreni ve bipolar bozukluk gibi nörolojik hastalıklara katkıda bulunur [19]. GSK3 $\beta$ 'nin hücre tipine ve koşullara bağlı olarak tutarsızlık göstererek, hem tümör baskılayıcı, hem de tümör teşvikedici rolü gösterilmiştir. Örneğin, kinazın prostat kanserinde hücre büyümesini teşvik eden andojen reseptörünü inhibe etdiği gösterilmiştir; böylece tümör baskılayıcı olarak davranmıştır [110]. Bunun aksine, GSK3 $\beta$ 'nin kolorektal kanserde yüksek miktarda anlatımı vardır ve pankreatik kanserde nükleer faktor kB (NFkB) aracılı hücre sağkalımına katılarak tümör teşvikedici gibi davranmıştır [111]. GSK3, hücre canlılığının düzenlenmesinde ikili işlevlere sahiptir; ya apoptozu inhibe, ya da aktive etmesi gösterilmiştir [112]. Bu nedenle, bu molekler hedefin aktivasyonu veya inhibisyonunun potansiyel terapötik kazanç olup olmadığını belirlemek için belirli hücre tiplerinde GSK3 $\beta$ 'nin dikkatli bir şekilde incelenmesi şartdır.

Son bulgular nöroblastoma tedavisinde GSK3 $\beta$  inhibisyonunun potansiyel rol oynadığını düşündürmektedir. B65 nöroblastoma hücre hattında, hücre döngüsü durdurulmasının inhibisyonuna karşılık olarak *in vitro*'da hücre çoğalması azalmıştır [112]. GSK3 $\beta$  inhibisyonu nöroblastoma hücrelerinde çoğalmanın azalmasına ve artan

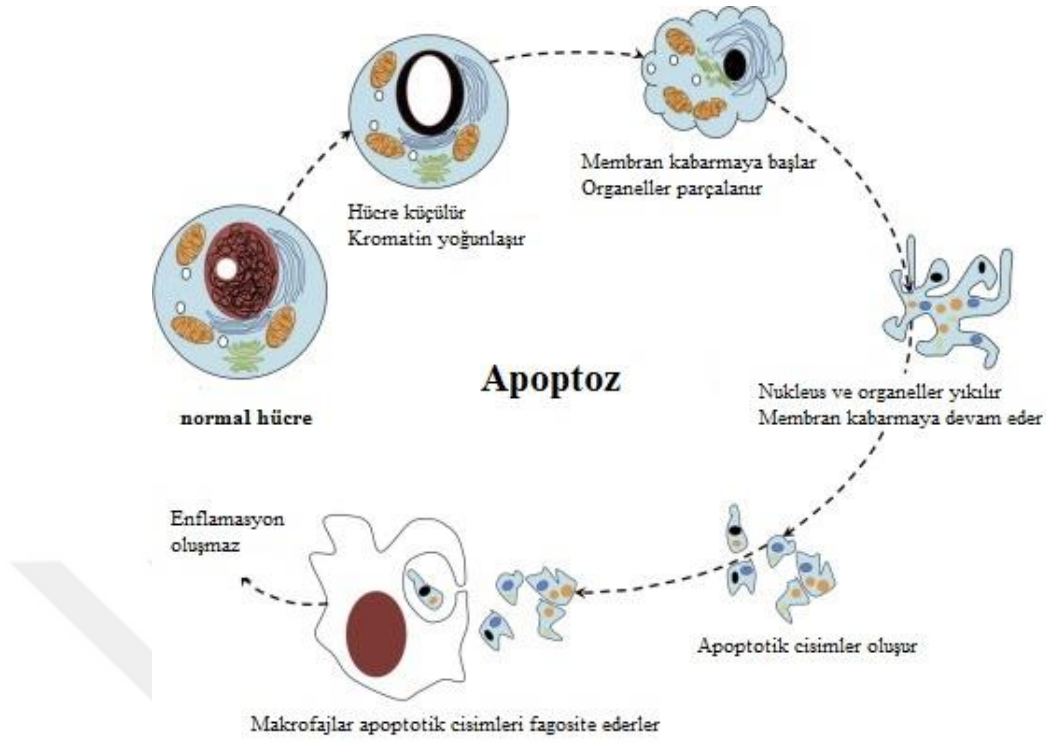


apoptoza neden olmuştur. En önemlisi, *in vivo*'da bu etkiler gecikmiş tümör büyümesine çevrilmiştir [113].

## 1.6. APOPTOZ

1972 senesinde ilk kez Kerr ve ekibi tarafından apoptoz terimi ortaya atılmıştır [114]. Apoptotik hücre ölümünün gerçekleşmesi sırasında bir sıra morfolojik değişiklikler olmaktadır (Şekil 1.8). Hücre büzümekte, kromatin kondensasyonu oluşmakta, plazma membranı bozulmakta, hücre apoptotik cisimciklere ayrılmakta ve bu apoptotik cisimcikler komşu hücreler tarafından fagositoz ile ortadan kaldırılmaktadır [114].

Apoptoz ilk olarak *Caenorhabditis elegans* model organizmasında karakterize edilmiştir. *C.elegans*' ların gelişiminde apoptoz boyunca çeşitli genlerin anlatımı artmış, erişkin bir birey oluşumu sırasında 1090 hücreden 131 hücrenin kaybolduğu ve 959 yaşayan hücre kaldığı ortaya koyulmuştur [115]. Apoptoz vücudun bütünündeki hücre sayısının belirli bir sayıda tutulmasını sağlamakta ve immün sistem faaliyetlerinin gerçekleşmesinde rol oynamaktadır [116]. Apoptotik ölüme meydana gelen aksaklıklar, homeostazın olumsuz yönde bozulmasına; Alzheimer ve Parkinson gibi dejeneratif hastalıklardan AIDS gibi kronik hastalıklara ve hatta immünolojik hastalıklara neden olduğu gösterilmiştir [117].



*Şekil 1. 8. Apoptoz sırasında meydana gelen morfolojik değişimler[118].*

### 1.6.1 Apoptozun moleküler mekanizması

Apoptotik hücre ölümü sırasında birçok protein ailesi görev yapmaktadır. Apoptotik hücre ölümü sırasında meydana gelen değişimler farklı protein aileleri üyeleri tarafından düzenlenmektedir. Bu protein aileleri; Bcl-2 protein ailesi ve kaspazlar olarak bilinen sistein proteazlardır. Ayrıca hücre membranında ölüm reseptörleri bulunmaktadır.

#### 1.6.1.1 Kaspazlar

Apoptotik mekanizmada görevli genler ilk kez *C.elegans*'ta belirlenmiştir. *C.elegans*'ın gelişim sürecinde 1090 somatik hücreden 131'i apoptoz ile ölmektedir. Bu hücre ölümünü yöneten proteinler CED protein ailesi üyeleridir. Ced-3 bir protein sisteazı kodlamaktadır [119]. Ced-3'ün memelilerdeki homologu ise kaspaz protein ailesidir. Kaspaz protein aileleri sistein proteazlardır ve hedef proteinlerde aspartik asitten sonraki

peptid bağı kırıcı enzimlerdir. Kaspazlar, hücre ölümü kontrolü ve inflamasyon üzerindeki etkileri ile bilinmektedirler. Bu zamana kadar 18 tane memeli kaspazı tanımlanmıştır [120]. Memelilerde kaspazlar; başlatıcı kaspazlar (kaspaz-2,8,9,10), etkili kaspazlar (kaspaz-3,6,7) ve inflamatuvar kaspazlar (kaspaz-1,4,5,11,12 ve diğerleri) olarak üç gruba ayrılır. Kaspazlar, inaktif formları olan prokaspazlar olarak sentezlenmektedir. Prokaspazlar; homodimerizasyon, proteolitik yıkım ya da başka proteinlerle etkileşime girerek aktif hale geçmektedir. Proteolitik yıkım sonucu pro-bölgesi enzimden uzaklaştırılır, büyük ve küçük alt ünitelerin etkileşimi ile hücreler aktif hale geçmektedir.

Hücre ölümü sırasında meydana gelen morfolojik değişimler, bu enzimlerin etkileri sayesinde ortaya çıkmaktadır [121]. Başlatıcı kaspazlar, mitokondri yada dış sinyal sonucu meydana gelen apoptotik uyarı sonrası ölüm sinyallerini başlatarak, etkili kaspazların aktivasyonunu sağlamaktadır. Etkili kaspazın aktif hale gelmesi, başlatıcı kaspazın etkili prokaspazı inaktif halde tutan amino asit dizisini kesmesi ile gerçekleşmektedir. Başlatıcı kaspazlar, ölüm efektör domeni (DED; kaspaz-8 ve 10) ve kaspaz-çekilmeyen domen (CARD, kaspaz-2,9,1,11) içermektedir ve dimerizasyon gerçekleştirirler, aktivasyonlarını gerçekleştirmek amacıyla daha büyük kompleks oluştururlar.

#### *1.6.1.2. Bcl-2 ailesi*

Apoptozun gerçekleşmesinde görevli olan diğer protein ailesi B-hücre lenfoma-2 (Bcl-2) ailesidir. Bcl-2 ailesinin yaklaşık 20 üyesi vardır, hepsi en az bir Bcl-2 homoloji domeni içermektedir. Bu domen protein- protein ilişkisine aracılık yapmaktadır. Aile üyelerinin çoğu ya üç ya da dört BH domen paylaşmaktadır. Bcl-2 proteinlerinin bir grubu apoptozu inhibe (anti-apoptotik) etmekte, diğeri ise teşvik etmektedir (pro-apoptotik). Bcl-2 ailesi pro-apoptotik proteinler (Bax, Bak, Bad, Bid, Bik, Bim, Bcl-XL) ve anti-apoptotik proteinlerdir (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Mcl-1). Pro-apoptotik proteinlerin ekspresyonunun artması apoptozun indüklenmesini sağlarken, anti-apoptotik proteinlerin anlatımının artması hücre sağkalımını sağlamaktadır. Mitokondri

dış membranı üzerinde bir araya gelen Bcl-2 ailesinden Bax ve Bak molekülleri oligomerize olur ve membran üzerinde bir kanal oluşturmaktadır. Mitokondri içinde bulunan sitokrom c ve prokaspaz-9' un salınmasını sağlamaktadır [122].

Bid, Bax ve Bak gibi pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri normalde hücrelerde sessiz 'latent' halde bulunurlar. Bu pro-apoptotik üyeler aktive edildiklerinde sitokrom c' nin sitoplazmaya salınmasını sağlarlar. Bid' in kırılmasına, dolayısıyla aktifleşmesine sebep olan etken kaspaz-8'in aktivasyonudur. Aktif kaspaz-8 Bid' i kırar, oluşan Bid fragmanı BH3 bölgesine sahip olduğundan diğer pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri ile etkileşime girerek onların normalde buldukları sitoplazmadan mitokondriye göç etmelerine neden olur. Bu aktivasyon sonucu sitokrom c salınımı gerçekleşmektedir. Bid fragmanı ayrıca Bak düzenlemeli sitokrom c salınımını da aktifleştirmektedir [123].

Pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyesi olan Bad, birçok normal hücrede bulunmaktadır. Bad' in diğer Bcl-2 ailesi üyeleri ile kompleks oluşturması fosforlanma- fosforlanmama mekanizması ile düzenlenmektedir. Normal koşullarda, Bad yaşam faktörlerinin etkisiyle fosforlanmış durumda tutulmaktadır. Fosforlanmış durumda iken anti-apoptotik üyelerle kompleks oluşturmadığından bu anti-apoptotik ajanları etkisizleştirememektedir. Yani, sitokrom c tutucu etkilerini antagonize edememektedir. Defosforile olduğu durumlarda (örn, yaşam faktörlerinin eksikliği gibi bir nedenle) anti-apoptotik üyelerle kompleks oluşturarak anti- apoptotik etkilerini ortadan kaldırmaktadır [124].

## **1.6.2 Apoptoz tipleri**

### *1.6.2.1 İç (İntrinsik) yolak*

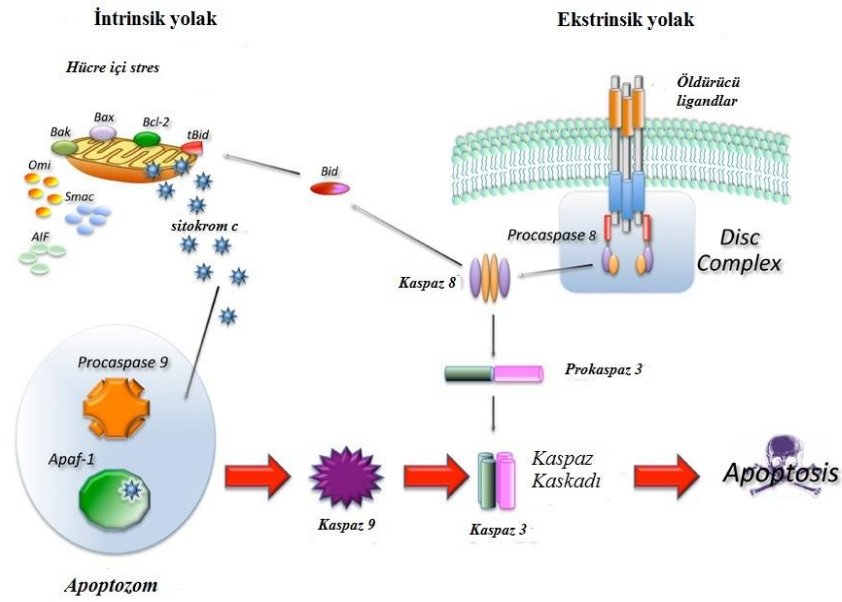
Apoptozun intrinsik yolağının dışarıdan gelen uyarılara (FAS, TNF) duyarlı olmadığı tespit edilmiştir. DNA hasarı ve oksidatif stres gibi hücre içinden gelen uyarı, apoptozun intrinsik yolağını mitokondrinin dış membranına etki eden Bcl-2 ailesi proteinleri aracılığıyla indüklenmektedir [122]. Mitokondrinin çift katlı membran yapısının hasar görmesi apoptozu başlatmaktadır. Mitokondri dış zar potansiyelinin

bozulması pro-apoptotik ve anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri arasındaki denge ile sağlanmaktadır. Normal koşullarda pro-apoptotik proteinler inaktif durumdadır. Hücrede alınan ölüm sinyali sonrasında; anti-apoptotik proteinler inaktif hale gelerek mitokondri membranında lokalize olmuş pro-apoptotik Bax, Bad, Bim gibi proteinlerin anlatımını arttırmaktadır. Bu proteinlerin dış zarda meydana getirdikleri por yapısı ile mitokondri membran bütünlüğünü bozarak, mitokondrinin iki zarı arasında bulunan elektron taşıma zincirinin üyesi olan sitokrom c, apoptoz indükleyici faktör (AIF) ve ikincil mitokondri türevli kaspaz/direkt apoptoz inhibitörü bağlayıcı protein (Smac/DIABLO) gibi faktörlerin sitoplazmaya salınmasını sağlamaktadır [122]. Mitokondriden salınan sitokrom c; inaktif monomer halinde bulunan apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (Apaf-1)'a bağlanır ve daha sonra kaspaz-9'a bağlanarak apoptozom denilen kompleksin oluşumuna sebep olmaktadır. Apoptozom prokaspaz-9 ile etkileşime girerek pro-kısmın yıkımını sağlamakta ve kaspaz-9'u aktif hale getirmektedir. Aktif hale gelen başlatıcı kaspaz-9 diğer etkili kaspazların proteolitik yıkımını sağlayarak onların aktif hale gelmesini sağlamakta ve apoptozu tetiklemektedir [125].

#### **1.6.2.2 Dış(Ekstrinsik ) yolak**

Mitokondri dışında da hücre membranında lokalize olmuş farklı reseptörler tarafından apoptotik ölüm tetiklenebilir. Bu reseptörler; tümör nekroz faktörü (TNF), Fas reseptörü, ölüm reseptörü 3(DR3) ve TNF ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand reseptör (TRAIL) reseptörleridir [126]. Ligand ölüm reseptörlerine bağlandığı zaman yapısal bir değişiklik meydana gelir ve birkaç reseptör bir araya gelir, oligomerizasyon gerçekleşir. Böylelikle hücre dışından gelen moleküllerin bağlanması gerçekleşir ve kaspaz -8'i aktive eden sinyaller yayılmaktadır. Kaspaz-8 ekstrinsik yolakta, başlatıcı kaspaz olarak görev yaparak reseptör ile apoptotik proteazlar arasındaki ilk bağlantıyı sağladıkları bilinmektedir. Aktive olan kaspaz-8, diğer kaspazları (kaspaz-3,6,7) keserek aktive eder. Sonuç olarak enzim kaskadı özgün hedef proteinini kırar ve apoptoz meydana gelmektedir [127].

Kaspaz- 8 aracılı ölümden ikinci yol ise reseptörler tarafından aktif hale gelen kaspaz-8 pro-apoptotik bir protein olan Bid ile etkileşime girmesidir. Kaspaz-8 Bid'in proteolitik kesilimine yol açarak mitokondriye yönelmesine sebep olmaktadır. Bid bu noktada mitokondri iç ve dış yolakları arasında bir köprü görevi görmektedir; diğer pro-apoptotik proteinler gibi mitokondride sitokrom c, SMAC gibi proteinlerin salınımını uyarmakta ve böylece apoptotik hücre ölümü meydana gelmiş olmaktadır. Fas reseptörü, bir sitokin reseptörü olup, TNF reseptör ailesindeki gibi hücre içinde ölüm domaini içerir. Bu domain Fas ilişkili ölüm domaini (FADD) adı verilir. Fas reseptörü FADD ile ilişki kurarak hücre içine ölüm sinyalinin taşınmasını tetiklemektedir [128] (Şekil1.9) [129].



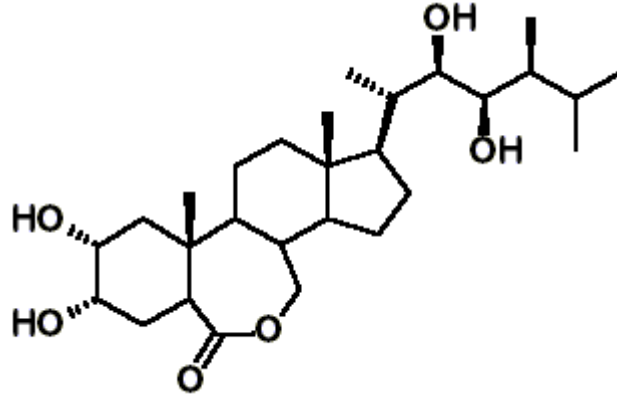
Şekil 1. 9. Apoptozun iç ve dış yolaklarının moleküler mekanizmaları [129]

## 1.7. BRASSİNOSTEROİDLER

Brassinosteroidler (BR) ilk defa 1970 yılında Mitchell ve arkadaşları tarafından *Brassica napus* (şalgam) polenlerinden izole edilmiş ve steroid yapılı ilk bitki bileşeni olarak tanımlanmıştır. BR'ler omurgalı ve böceklerde bulunan, steroid hormona benzerlik gösteren doğal polihidroksi steroidlerdir [130]. Hayvanlarda embriyonik, post-embriyonik gelişim ve organizmanın homeostazının sağlanması gibi rolleri iyi tanımlanmış steroid hormonlara yapısal olarak benzerlik göstermektedir. Bitkilerde ise BR'ler pek çok fizyolojik olayı kontrol etmektedirler [131]. Bitki steroidleri, böcek, hayvan ve insan steroid hormonları ile yapısal benzerlik gösteren 70' ten fazla bileşiği kapsamaktadır.

### 1.7.1 Brassinostereoidlerin yapı ve özellikleri

BR'ler ilk olarak *Brassica* cinsi bitki polenlerinden elde edilmiştir. BR'lerin tanımlanan ilk üyesi brassinolid 40 kg polenden 4 mg kristal halinde izole edilmiş ve steroid yapıdaki ilk bitki bileşeni olarak tanımlanmıştır. Doğal BR'ler bir 5 $\mu$ -kolestan iskeleti ve birbirine bitişik A, B, C, D halkaları ile 17. karbona bağlı alkil zincirinden meydana gelir ve bu yapısı klasik bir steroid kimyasal yapısına benzerlik gösterir (Şekil 1.10). BR'lerin bitki gelişiminde birçok olayın düzenlenmesinde, özellikle tohum çimlenmesinde, kök ve gövde gelişiminde, vasküler farklılaşma ve fertilitede önemli oldukları ortaya konmuştur. BR'lerin dış kaynaklı olarak verildiği bitkilerde abiyotik ve biyolojik stres koşullarına dayanıklılığı artırdığı gösterilmiştir [132]. Tohum verimini azaltan streslerden birisi olan tuzluluk stresiyle alakalı tuza dirençli ve dirençsiz arpa bitkilerinde EBR uygulaması sonucu fotosentetik kapasite arttığı ve bitkilerin tuzluluk stresi altında daha iyi fotosentez yaptıkları gözlemlenmiştir [132]. Tuzluluk stresi dışında metal stresine karşı da BR'lerin etkisi gösterilmiştir. Özellikle *Brassica juncea*'da ve pirinç bitkilerinde yapılan çalışmalar, 24-epibrassinolid ve 28-homobrassinolid'in ağır metal ve pestisid stresine karşı etkili olduğu ortaya konmuştur [133].



*Şekil 1. 10.Brassinolidlerin genel yapısı[134]*

### **1.7.2 Brassinosteroidlerin Biyosentezi**

BR' ler kolestanın hidroksile edilmiş türevleri olup BR' lerin yapısal varyasyonları, C17 yan zincirinin yanı sıra A ve B halkası üzerine farklı grupların gelmesi ile elde edilmektedir. Farklı BR'ler, yan zincir uzunluğuna (yan zincirdeki C sayılarına) göre, C27, C28 ve C29 BR'leri olarak sınıflandırılmaktadır [135]. Bitki sterollerini BR' lerin öncü maddesi olarak kullanılmakta ve bu öncü maddelerden biyosentez için en çok kampesterol (24- $\mu$ -metil kolestrol) kullanılmaktadır. Brassinolid oluşumu sırasıyla, kampesterol, testosteron, tifasterol, kastasteron ve brassinolid şeklinde gelişmektedir. Doğada en çok bulunan brassinosteroidler, brassinolid ve C28 steroidlerdir [131].

### **1.7.3 Brassinosteroidlerin hücresel işlevleri**

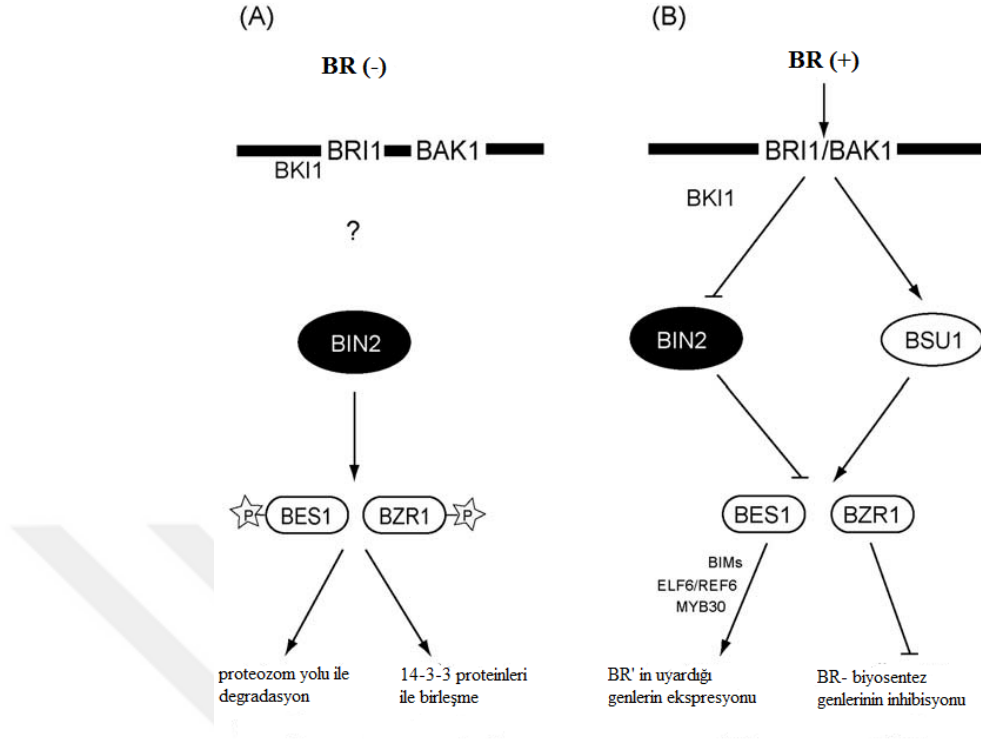
BR' lerin hücre duvarı mekaniği, hücre zarı geçirgenliği, nükleik asitlerin ve protein sentezini aktive etme, gen anlatımının düzenlenmesi gibi pek çok olayda rol oynadığı gösterilmiştir. BR'ler, bitkilerde büyüme ve gelişme üzerinde çeşitli düzenleyici aktivitelere sahiptir [135]. BR' lerin tüm bu hücresel aktiviteleri nasıl düzenlediği hücre içine taşıdığı sinyal yollarının aydınlatılması ile anlaşılmıştır. Hayvanlardaki steroid hormonlar sitoplazmada bulunan reseptörlerine bağlanarak sinyalin nükleusa taşınmasını ve böylece hormona bağımlı gen anlatımının başlatılmasında veya



baskılanmasında görevlidir. BR'lerin bitki gelişimindeki önemli rolünün ortaya çıkarılması, tanımlanması ve BR sinyal iletim yolundaki birçok bileşenin karakterizasyonu, Arabidopsis'de BR-sentezlemeyen (BR-yoksun) ve BR-yanıt vermeyen (BR-) mutantlarla yapılan moleküler genetik çalışmalar ile olmuştur [136].

BR sinyal mekanizmasında, reseptöre-benzer kinaz olan brassinosteroid insensitive 1 (BRI1) geni önemli bir rol oynamaktadır. BRI1 proteini hayvanlarda bulunan serin/treonin kinaz aktivitesine benzer bir aktivite göstermektedir. BRI1, transmembran domeni, N-terminal sinyal peptidi ve 25 adet lösinle zengin tekrar içeren ekstraselüler domen içeren bir moleküldür. BR sinyal iletiminde ikinci önemli protein BRI1 uyumlu reseptör kinaz (BAK1) proteinidir. BAK1, BRI1 ile heterodimer oluşturarak BR sinyalini hücre içine taşımada görev yapmaktadır. Oluşturulan heterodimerizasyondan sonra her iki reseptörde fosforilasyon meydana gelmekte ve kinaz aktivitesi gerçekleşmektedir. Böylece hücre içindeki diğer moleküller için reseptörlerin hücre içi kısımlarında interaksiyon bölgeleri meydana gelmektedir. BR'nin reseptörlere bağlanarak oluşturduğu sinyale brassinazol- direnci 1 (BZR1) ve BR1 basklayıcı 1 (BES1) proteinleri cevap göstermektedir.

BR sinyal yolağında diğer bir önemli protein, BR sinyalinde negatif düzenleyici olarak görev yapan brassinosteroid insensitive 2 (BIN2)'dir. BIN2, BZR1 ve BES1'i defosforile etmektedir [137]. Defosforile olan bu iki protein BR sinyal mekanizmasında görevli olan ya da BR sinyali sonucu meydana gelen cevap genlerinin aktivasyonunu ya da baskılanmasını sağlamaktadır. BR yokluğunda ise BIN2, BZR1 ve BES1'i fosforlayarak yıkımına sebep olmaktadır [137] (Şekil1.11).

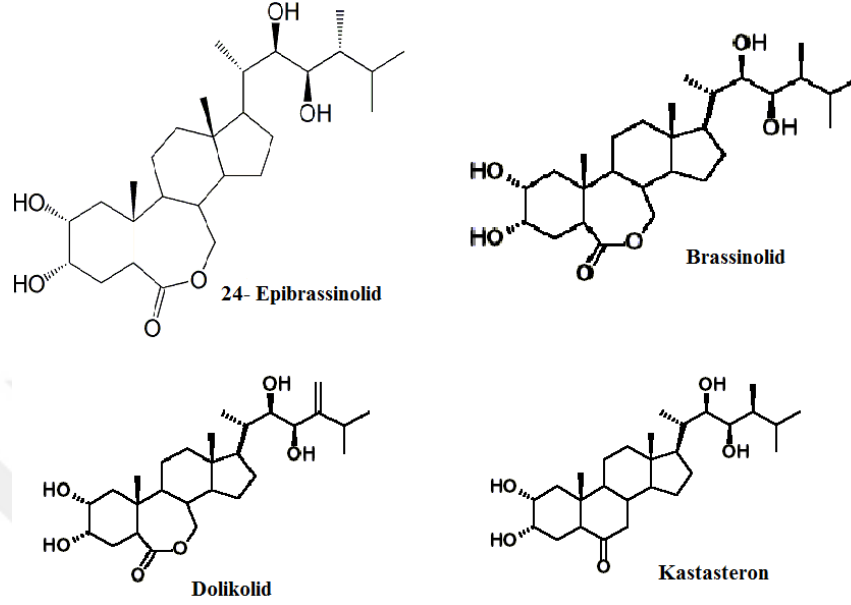


**Şekil 1. 11. Brassinolid sinyali olmadığında ve B) olduğu durumda**

#### 1.7.4 Brassinosteroidlerin Türevleri

BR'lerin şimdiye kadar toplam olarak 58 bitki türünden izole edilmiş olduğu belirtilmektedir ve 65 adet BR ve 5 adet BR konjugatı tanımlanmıştır [138]. Böylelikle bitkiler aleminde yaygın olarak gözlemlendiği söylenebilmektedir. BR'lerin tümü biyolojik olarak aktif değildir. Biyolojik olarak aktif BR'lerden, brassinolid, EBR, homobrassinolid fizyolojik çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Bunların dışında; dolikolid, homodolikolid, kastasteron, dolikosteron, tifasterol BR türevlerine örnek olarak verilmektedir. BR'ler doğal ve sentetik olarak iki grupta sınıflandırılmaktadır. Doğal BR'lerde; 3.karbonda mono-, di-, trioksijen bulunan A halkası, 6-okso-7-oksalakton veya 6-okso rolünü temsil eden B halkası, birbirleri ile bitişik A ve D

halkaları bulunmaktadır. Aynı zamanda, 24.karbonda 22 $\mu$ , 23 $\mu$ -dihidroksillenmiş veya 25.karbonda metillenmiş olarak tanımlanmıştır (Şekil1.12) [130].



Şekil 1. 12.Doğal brassinosteroidlerin kimyasal yapısı[139]

#### 1.7.4.1 Epibrassinolid

24-Epibrassinolid (EBR) doğal BR'ler sınıfına girmekte ve hücre büyümesi, hücre bölünmesi, strese karşı cevap oluşturmak gibi birçok hücre olaylarında görev aldığı gözlemlenmiştir [130]. Tuzluluk stresi ürün verimliliği sınırlayan en ciddi abiyotik stres faktörlerinden biridir. Tuz stresi ozmotik ve iyonik stres aracılığıyla bütün bitki ve yanısıra hücresel düzeylerde bitki fizyolojisini etkiler. Tuzluluk ve nikel stresi büyümeye ve fotosenteze değinen önemli çalışmalar olarak gösterilmiştir. Yapılan araştırmalarda 15 günlük EBR uygulamasının tuzluluk ve nikel stresine karşı *Brassica juncea* bitkisini koruduğu gözlemlenmiştir [140].

Memeli hücre kültürlerinde EBR' nin olası faydalı etkilerinin bulunabilmesi amacıyla fare hücre kültürleri ile çalışmalar yapılmıştır [141]. Bu amaçla fare hibridoma hücre kültürleri hem standart serum eklenmeyen besiyerinde veya %30 dilüe edilerek hücreleri besin stresine sokacak olan besiyerleri olarak hazırlanmıştır. Hücre kültürlerine yarı-devamlı olarak  $10^{-16}$  ile  $10^{-9}$  mol ve  $10^{-1}$  arasında konsantrasyonlarda değişen EBR uygulaması yapılmıştır. Hem standart hem de dilue edilmiş medyada aynı sonuçlar gözlenmiş ve bu sonuçlar: mitokondri membran potansiyeli (MMP) değerinin artması, hücre içi antikor seviyesinin düşmesi, hücrelerin  $G_0/G_1$  fazında fraksiyonunun artması, hücrelerin S fazında fraksiyonunun azalması ile EBR' nin mitokondri performansı, hücre bölünme mekanizmasındaki düzensizlikleri, memeli hücre hatlarında protein sentezini artırma üzerinde etki gösterebiliyor olduğu ortaya konulmuştur [141].

#### ***1.7.4.2 Epibrassinolid' in kanser hücrelerindeki etkileri***

BR'lerin farklı hücre hatlarında hücre döngüsüne etki ettikleri, büyümeyi, anjiyogenezi engelledikleri ve apoptozu tetikledikleri belirlenmiştir. EBR' nin hücre döngüsü ve hücre çoğalması üzerindeki etkisi MCF-7 meme kanseri, A549 akciğer, K563 kronik miyeloid lösemi, RPMI 8226 çoklu miyeloma, CEM T-lenfoblastik lösemi, Hela servikal kanseri gibi hücre hatlarında ve fibroblastlarda gösterilmiş ve doza bağlı olarak bu hücre hatlarında hücre canlılığında azalış olduğu gösterilmiştir [138]. BR'lerin apoptozu hangi yolak aracılığı ile tetiklediği bilinmemekle beraber yapılan çalışmalar sonucu teoriler elde edilmiştir.

EBR' nin memeli hücrelerindeki steroid hormon yapısına benzerliğinden dolayı EBR-steroid hormon reseptör ilişkisi olabileceği düşünülmüş ve incelemesi yapılmıştır. Yaklaşık olarak meme kanserlerinin %70' i östrojen reseptör  $\alpha$  anlatımı yapmaktadırlar. Büyük ölçüde kabul edildiği gibi Estrojen reseptörü (ER) $\alpha$  tümör oluşumu ve gelişimini arttırıcı etki göstermektedirler. Buna rağmen, östrojen reseptörünün normal ve kanser hücrelerinde iki farklı formda bulunduğu bilinmektedir ve bağımsız genlerden eksprese edilmektedirler: Estrojen reseptörü  $\alpha$  (ER- $\alpha$ ) ve Estrojen reseptörü  $\beta$  (ER- $\beta$ ). ER- $\alpha$

meme kanseri tümör agresifliğinde baş düzenleyicidir ve ER- $\beta$ ' ya oranla daha fazla bulunmaktadır [142].

EBR' nin etkisinin hormona bağılı olarak gelişen kanser hücre hatlarında daha etkili olduğu öne sürülmüştür. Bu amaçla yapılan çalışmada östrojene bağımlı olarak gelişen MCF-7 meme kanseri hücre hatlarında EBR' nin hücre döngüsünü G1 fazında inhibe ederek, döngüyü düzenleyen CDK' ların (p21, p27, p53) ve siklinler gibi proteinlerin anlatımını etkileyip, apoptozu indüklediği gösterilmiştir [142]. EBR' nin LNCaP (AR+) hücre hattında hücre döngüsünü G1 fazında bloke ettiğini ve siklin D1, CDK4/6 ve pRb ekspresyon seviyelerini azalttığını ve DU145 (AR-) hücrelerinde G2/M fazında hücre sayısı yüzdesinin arttığı ve siklin A ve siklin B1 seviyelerinin azaldığı gözlemlenmiştir [138].

EBR' nin apoptotik etkisinin daha iyi anlaşılabilmesi p53 geni içermeyen PC3 hücre hatlarının hücresel cevabı üzerinde inceleme yapılmıştır [143]. p53 yabancı tip ve p53 stabil transfekte edilmiş hücrelerde EBR' nin hücre ölümünü mitokondri aracılı ve kaspaza bağılı olarak arttırdığı ortaya konularak EBR ile indüklenmiş hücre ölümünün p53' ten bağımsız olduğunu önermiştir [143].

Literatürdeki bu bilgiler ışığında EBR' nin meme kanseri ve prostat kanseri için kemoterapötik bir ajan olabileceği düşünülmektedir. Ancak, EBR' nin hücre ölümünü hangi mekanizma üzerinden tetiklediği bilinmemektedir. Aynı şekilde, EBR' nin nöroblastoma üzerindeki etkileri bilinmemekte ve bu konu üzerinde daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

Günümüzde biyolojik bileşenlerin kullanımı ve çeşitli hastalıklarda tedavi ajanı olabileceğine yönelik ilginin artması ile birlikte çeşitli meyve ve sebzelerde bulunan fenolik bileşikler ve türevleri ile yapılan çalışmalar artmıştır. Çalışmamızda brassinolid

ailesinin bir türevi olan EBR kullanılmıştır. Çeşitli kanser türlerinde *in vitro* yapılan araştırmalar EBR'nin anti- kanserojen etkinliğini ve tedavide rol alabileceğini düşündürmektedir. Bu çalışmadaki hipotezimiz, Epibrassinolid' in bir beyin tümörü olan nöroblastom hücrelerinde hücre döngüsü ve apoptoz gibi hücrel mekanizmalar üzerinden etki gösterdiği ve ayrıca hücre invazyonunu ve koloni oluşumunu etkileyeceğidir. Beynin belirli bölgelerinde (korteks ve hipokampus) hücre yitimi ile karakterize bir dejeneratif süreç bulunmaktadır. Alzheimer hastalığı ile diğer nörodejeneratif hastalıklardaki hücre ölümüne apoptoz katılıyor olabilir. Ayrıca, Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda apoptozun aktive olmasıyla artmış hücre kayıpları (nöron) gerçekleşmektedir [129]. Bu çalışmada ayrıca EBR' nin Alzheimer durumunda ölüm ve sağkalım yollarından hangisinde etkili olduğuna bakmak istedik.

## **2. MALZEME VE YÖNTEM**

### **2.1. KULLANILAN MALZEMELER**

#### **2.1.1. Kullanılan Cihazlar**

Kullanılan cihazlar Ekler bölümünde Tablo 1’de sunulmuştur.

#### **2.1.2. Hücre Kültürü Donanımları**

Hücre kültüründe kullanılan donanımlar Ekler bölümünde Tablo 2’ de sunulmuştur.

#### **2.1.3. Kullanılan Kimyasallar**

Kullanılan kimyasal maddeler Ekler bölümünde Tablo 3’de sunulmuştur.

#### **2.1.4. Kullanılan Moleküler Biyoloji Kitleri**

Kullanılan moleküler biyoloji kitleri Tablo 4’te sunulmuştur

#### **2.1.5. Kullanılan Tamponlar, Çözeltiler ve İçerikleri**

##### DMEM besiyeri :

DMEM sıvı besiyeri

% 10 sığır fetüsü serumu

% 1 (10 U/ml) penisilin/streptomisin

%1 temel olmayan amino asit

##### Bradford çözeltisi

Coomassie blue belirteci 25 mg

Etanol (%95’lik ) 12,5 ml

Asetik asit (%85’lik) 25 ml

Saf su 212,5 ml

Yükleme Jel Tamponu: 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

Ayırma Jel Tamponu: 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8

% 10 (w/v) APS (amonyum persülfat) 10 ml

1 gr APS 10 ml distile su içerisinde çözdürülerek hazırlanır ve -20°C'de saklanır.

%4'lük yükleme jeli

670 µl %30 Akrlamid:bis-akrlamid çözeltisi

2,5 ml 0,5M Tris-HCl pH:6,8

50µl % 10 SDS

50 µl % 10 APS

10 µl TEMED

3,075 ml saf su

% 12'lik ayırma jeli

4 ml %30 Akrlamid:bis-akrlamid çözeltisi

2.5 ml 1.5M Tris-HCl pH:8.8

100 µl % 10 SDS (sodyum dodesil sülfat)

75µl % 10 APS (amonyum persülfat)

8 µl TEMED (Tetrametletilendiamin)

3.4 ml saf su

TBS (Tris tamponlu tuz çözeltisi) (10X) (1 litre):

12,11 gr Tris bazı

86.6 gr NaCl

pH:8



1X TBS-Tween (1 litre):

100 ml TBS 10X

500 µl Tween 20

10X SDS-PAGE (SDS- Poliakrilamid Jel Elektroforezi) yürütme tamponu (1 litre)

30.3 gr Tris bazı

114 gr glisin

10 gr SDS

Transfer tamponu (1 litre):

100 ml Metanol

200 ml 10X yürütme tamponu

700 ml saf su

%10 (w/v) Amonyum Persülfat (APS) Hazırlanışı

1g APS 10ml distille su içerisinde çözdürülerek hazırlanır ve -20' de saklanır.

Kemiluminisans Tamponu:

A çözeltisi

9 ml saf su

1ml 1M tris-HCl, pH:8,5

45 µl kumarik asit

100 µl luminol

B çözeltisi

9 ml saf su

1ml 1M tris-HCl, pH 8,5

6 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Hazırlandıktan sonra karanlıkta saklanmaktadır.

Hücre Dondurma Medyasının Hazırlanışı

9ml filtre edilmiş Fetal sığır serumu ve 1ml dimetilsülfoksit (DMSO) ile hazırlanan dondurma medyası yardımıyla hücreler uzun süreli olarak sıvı azot tankının içinde saklanmıştır.

## **2.2. HÜCRE KÜLTÜRÜ, HÜCRE CANLILIĞI VE SAĞKALIM TAYİNİ**

### **2.2.1. Hücrelerin Yetiştirilmesi**

Tez kapsamında kullanılan nöroblastoma hücre hattı SK-N-AS, American Type Tissue Culture Collection' dan temin edilmiştir. Bu hücre hattı nöroblast tip hücre hattı olup adheren özelliğindedir. Orijinal olarak beyinde oluşan kemik iliğine metastaz eden hücrelerdir. SK-N-AS hücre hattında 1p. delesyonu, N-myc' un tek bir kopyası görülmektedir. SK-N-AS hücre hattının IGF-2 ekspresyonu için, serumsuz koşullarda uyum sağladığı bilinmektedir. Hücreler DMEM (Dulbecco' Modified Eagle Medium) besiyerinde % 10 sığır fetusu serumu, 10 U/ml penisilin/streptomisin antibiyotik katkısı ve %1 esansiyel olmayan amino asit ile % 5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C'de inkübatörde üretilmiştir. Hazırlanan besiyeri 0,22 µM por çapındaki hücre kültürü ile uyumlu filtrelerden geçirilerek steril hale getirilip, 50 ml'lik falkon tüplerde +4°C'de saklanmıştır.

Hücreler 25 cm<sup>2</sup> lik petri kaplarında yetiştirilmiştir. Protein izolasyonu için 100 ve 60 mm'lik, hücre akım sitometresi (FACS) uygulamaları için 6 kuyulu petri kaplarına, floresan mikroskopu ve florometre çalışmaları için 12 kuyulu petrilere hücre ekimleri gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin gece boyunca petri kaplarına yapışmaları beklendikten sonra gerekli ilaç ve/veya inhibitör uygulamaları belirlenen sürelerde uygulanmış ve 37 °C 'de % 5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde bekletilmiştir.

### **2.2.2. Hücrelerin Kaldırılması, Sayımı ve Pasajlanması**

Hücre ekimi ya da petri kabındaki hücrelerin sayılarının artması sonucu hücre pasajlanması işlemi için ortamdan besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 25 cm<sup>2</sup> lik petri kaplarında 2 ml fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkandıktan sonra 2 ml tripsin-EDTA (etilen diamin tetra asetik asit) (% 0,25) ile CO<sub>2</sub> içeren etüvde 2 dakika bekletilmişlerdir. Bu süre sonunda hücrelerin zarar görmesinin engellenmesi için petri kabına 2 ml DMEM besiyeri eklenerek tripsinin aktivitesi durdurulmuş hücreler

santrifüj tübüne alınmıştır. 2000 rpm’de 5 dakika santrifüj işleminden sonra süpernatant atılmış, hücrelerin üzerine 1ml taze besiyeri eklenmiştir. İyice pipetaj yapıp homojen bir hale gelen hücre süspansiyonu hücre sayımına hazırlanmış bulunmaktadır.

Hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak Neubauer hemositometresinin kanalına aktarılmış ve üzeri lamel ile kapatılmıştır. Hemositometrede 25 karede sayılan hücre sayısı, 1ml’deki hücre sayısının bulunabilmesi için  $10^4$  ile çarpılmıştır.  $1 \times 10^6$  hücre, 25 cm<sup>2</sup>’lik petri kaplarına ekilerek hücrelerin pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir.

### **2.2.3. Hücre Canlılığı Tayini**

EBR’nin zamana veya doza bağlı olarak hücre canlılığına etkisi metiltiazoldifeniltetrazolyum bromür (MTT) testi ile belirlenmiştir. Kısaca  $1 \times 10^4$  hücre/kuyu 96 kuyucuklu petri kaplarında ekilip gece boyunca yapışmaları beklendikten sonra, hücrelere 0-30 µM EBR uygulanmış ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İlaç uygulaması sonucu MTT solüsyonu uygulaması ve sonrasında 4 saat inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Seçilen EBR dozunu takiben, diğer deneyler 24 saatlik periyotlarda gerçekleştirilmiştir. MTT tetrazolium tuzu ile 4 saat bekletilen örneklerde oluşan kesilmiş formazan bileşikler canlı hücrelerin yüzeyinde birikir. Bu bileşiklerin verdiği mor renk 570 nm dalga boyundaki spektrofotometrik okumaya tabi tutulmuş ve ilaç uygulanmamış kontrol örneklere oranlama yapılarak bağıl EBR sitotoksik düzeyi belirlenmiştir.

### **2.2.4. Hücre Sağkalım Tayini**

Hücre sağkalım tayini için hücreler tripsin-EDTA ile kaldırılıp, Neubauer hemositometrede sayıldıktan sonra  $5 \times 10^4$  hücre 6 kuyulu petrilere ekilmiş ve gece boyu hücrelerin petri kaplarına yapışmaları beklenmiştir. 24-48-72 ve 96 saatlik zaman dilimlerinde 1 ve 10 µM EBR uygulanmış ve bu süreler sonunda hücreler yeniden tripsin-EDTA ile kaldırılarak santrifüj ile çöktürülmüşlerdir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücrelerin üzerine 1:1 oranında %0,4’lük tripan mavisi

eklendikten sonra, 10 µl hücre süspansiyonundan alınarak hemositometrede sayılmışlardır. Ölü olan hücreler tripan mavisini absorbe ederken, canlı olanlar şeffaf şekilde görülmüşlerdir. Bu şekilde EBR uygulaması sonucu sağ kalan hücrelerin sayısı belirlenmiştir.

#### **2.2.5. Koloni oluşum testi**

EBR uygulaması sonrasında SK-N-AS hücrelerinde koloni oluşumunun nasıl etkilendiğini belirlemek için, 6 kuyucuklu petrilere kontrol ve doz grupları için 5000-7500 hücre ekimi yapılmış, 24 saat sonra 1 ve 10 µM EBR uygulanmıştır. 14 gün boyunca hücrelerin 2 günde bir besiyeri değiştirmek suretiyle 37°C' de, %5 CO<sub>2</sub>' li ortamda bekletilmiştir. 14 günün sonunda hücreler soğuk metanolle -20°C' de 10 dakika fikse olmaları sağlanmıştır. Fikse olmuş koloniler kristal viole boyası ile 15 dakika boyanmıştır. Boyanmış olan koloniler kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak sayılmış ve değerlendirilmiştir.

#### **2.2.6 Soft Agar koloni oluşum testi**

EBR uygulamasının, SK-N-AS hücrelerinin yumuşak agarda koloni oluşturmasını nasıl etkilediğini belirlemek için ilk önce %5' lik agaroz (0,1g agaroz+20ml 1xPBS) hazırlanıp otoklavda steril edilmiştir. Alt agar için 500 µl %5'lik agaroz ile 500 µl %20 FBS içeren DMEM besiyeri karıştırılmış ve 6 kuyucuklu petriye her kuyuda 1ml olacak şekilde dökülmüştür. Agar donana kadar laminar flow içerisinde bekletilmiştir. %5'lik agar %3'lük agara dilüe edilmiştir. (1200µl %5'lik agaroz+800µl 1xPBS) %3'lük agaroz %20 FBS içeren besiyeri ile karıştırılıp pipetaj yapılmıştır. Üzerine 333µl %10 FBS içeren besiyeri+2500 hücre karışımı eklenip pipetaj yapılmış ve petrilere dökülmüştür. İlaçlı örnekler için bu karışımın üzerine ilaç eklenmiştir. 10 gün boyunca 37°C' de %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda bekletilmiştir. 10 gün sonunda koloniler ışık mikroskopunda incelenmiştir.

### **2.2.7. Hücrelerin Dondurulması ve Çözdürülmesi**

Erken pasaj sayıları olan hücreler yedeklenmek amacıyla aşamalı olarak önce bir gece -80°C buzdolabında, daha sonra uzun süre saklamak için -196 °C sıvı azot tankına alınmışlardır. Bu işlem için hücreler tripsin-EDTA ile muamele edilerek kaldırıldıktan sonra, 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra sayılmış ve yaklaşık  $1 \times 10^6$  hücre dondurucu ortamı oluşturacak %10 dimetil sulfoksit(DMSO) ve %90 FBS içeren dondurma solüsyonu ile karıştırılarak kriyo tüplerde dondurulmuştur.

Gerekli görüldüğünde hücreler sıvı azottan çıkartıldıktan sonra, hızlı bir şekilde çözdürülmüş ve önceden ısıtılarak 37°C'ye getirilmiş besiyerinde 25 cm<sup>2</sup>'lik petri kaplarına alınmışlardır. Hücreler petri kabına yapıştıktan sonra tripsin-EDTA ile kaldırılarak santrifüjleme işlemine tabi tutulmuş ve DMSO uzaklaştırılmıştır.

## **2.3. MİKROSKOBİK YÖNTEMLER**

### **2.3.1. Işık Mikroskobu**

$1 \times 10^4$  hücre 12 kuyulu petri kaplarına ekildikten sonra yapışmaları için bir gece bekletilmiştir. Daha sonra 24 saat süreyle 1 ve 10µM EBR uygulanmıştır. EBR uygulanan ve uygulanmayan kontrol grubu hücrelerin morfolojik görüntüleri floresan ataçmanlı mikroskop ile beyaz ışıkta öncelikle 10x10 daha sonra 40x10 büyütmede belirlenmiştir.

### **2.3.2. Floresan Mikroskobu**

#### *2.3.2.1. Propidyum İyodür (PI) Boyama*

Hücre ölümünün değerlendirilmesi amacıyla Propidyum İyodür boyaması yapılmıştır.  $1 \times 10^4$  SK-N-AS hücresi 6 kuyulu petri kaplarına ekilip bir gece yapışmaları beklendikten sonra, 24 saat boyunca 1 ve 10 µM EBR uygulanmıştır. İnkübasyon süresini takiben ilaçlı besi yeri mikropipet yardımıyla çekilip atıldıktan sonra, hücreler 2mg/ml propidyum iyodür (PI) içeren DMEM besiyeri ile 30 dakika boyunca

bekletilmişlerdir. Bu süre sonunda kuyulardan PI içeren medyum uzaklaştırılıp hücreler PBS ile yıkandıktan sonra, 500 µl PBS eklenerek floresan ataçmanlı mikroskop ile incelenmiştir (Eksitasyon: 536 nm, Emisyon: 617nm). Yeşil filtre ile ölü hücreler kırmızı renkte gözlemlenmiştir.

#### 2.3.2.2. 3,3'-Diheksiloksakarbosiyanın İyodür (DiOC6) Boyama

DiOC6 hücre geçirgenliği olan ve lipofilik bir boyadır. Düşük konsantrasyonda yaşayan hücrelerdeki mitokondri membranını boyayarak yaşayan hücrelerin seçilimini sağlar.  $1 \times 10^4$  sayıda SK-N-AS hücresi 6 kuyulu petri kabına ekildikten sonra, 24 saat süre ile 1 ve 10 µM EBR uygulaması sonunda, EBR'li DMEM besiyeri uzaklaştırılıp 1nM DiOC6 içeren besiyeri eklenmiştir. 15 dakika boyunca DiOC6 ile muamele sonucu hücreler boyayı içeren besiyerinden mikropipet yardımı ile uzaklaştırıldıktan sonra bir kez PBS ile yıkanmış ve kuyulara 500 µl PBS ilave edilmiştir. 488 nm eksitasyon ve 525 nm emisyon dalga boylarında floresan ataçmanlı mikroskop ile incelenmiş ve sağlıklı mitokondri membranına sahip hücreler yeşil olarak gözlemlenmiştir.

#### 2.3.2.3. 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) Boyama

DAPI boyası intakt hücre membranından geçerek bütün canlı veya fikse olmuş hücreleri boyar. SK-N-AS hücrelerinde EBR'nin neden olduğu DNA kondensasyonunu gözlemlmek için DAPI boyama gerçekleştirilmiştir.  $1 \times 10^4$  sayıda SK-N-AS hücresi 6 kuyulu petri kabına ekilip bir gece petri kabına yapışmaları beklendikten sonra, 1 ve 10 µM EBR 24 saat süre ile uygulanmıştır. 24 saat sonunda EBR içeren besiyeri uzaklaştırılıp yerine 1µl/ml DAPI içeren besiyeri eklenmiş ve 10 dakika boyunca 37 °C'de % 5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde bekletilmiştir. Bu süre sonunda DAPI içeren medyum çekilip hücreler PBS ile yıkanmış ve her kuyuya 500 µl PBS eklenmesinin ardından DNA kondensasyonu floresan ataçmanlı mikroskop ile 350 nm eksitasyon ve 470 nm emisyon dalga boylarında incelenmiştir.

#### 2.3.2.4. 2',7'-diklorfloresein-diasetat (DCFH-DA) Boyama

DCFH-DA, EBR uygulanan hücrelerde oluşan ROS üretimini görüntülemek için kullanılmıştır. DCFH-DA, normalde floresan özellikte olmayan fakat hücre içine difüze

olduktan sonra, hücrede bulunan reaktif oksijenlerle okside olarak DCF molekülüne dönüşerek floresan ışığa veren bir moleküldür.  $1 \times 10^4$  sayıda SK-N-AS hücrelerine 6 kuyulu petri kabına ekildikten sonra, 1 ve  $10 \mu\text{M}$  EBR 24 saat süresince uygulanmıştır. Son konsantrasyon  $1 \mu\text{M}$  olacak şekilde  $37^\circ\text{C}$ 'de % 5  $\text{CO}_2$  içeren etüvde 5 dakika bekletilen hücreler inkübasyon süresi sonrası PBS ile iki kez yıkanmışlardır. Daha sonra üzerlerine 500 ml fosfat tamponu eklendikten sonra, DCFH-DA'nin okside formu diklorofloresinin floresan mikroskobunda emisyon 480 nm ve eksitasyon 500 nm dalga boylarında incelenmiştir.

## **2.4. İMMUNOBLOTLAMA**

### **2.4.1. Total Protein İzolasyonu**

SK-N-AS hücreleri  $1 \times 10^6$  hücre/kuyu olacak şekilde 100 mm çaplı petrilere ekilmiş ve uygun miktarda besi ortamı (DMEM besiyerinde % 10 sığır fetüsü serumu, %1 esansiyel olmayan amino asit ve 10 U/ml penisilin/streptomisin antibiyotik katkısı ile) eklenmiştir. Bir gece petri kabına yapışmaları beklendikten sonra hücrelere 24 saat süre ile 1 ve  $10 \mu\text{M}$  EBR uygulanmıştır. EBR uygulamasından sonra besiyeri atılmış, hücreler soğuk 1X PBS ile bir kez yıkanmış ve tekrar 1X PBS eklenmiştir. Bu aşamada kazıyıcı yardımı ile hücreler kaldırılmış ve 1,5 ml'lik santrifüj tüplerine alınmışlardır. Tüpler 1 dakika 13200 rpm' de santrifüj edildikten sonra, süpernatant atılmıştır. Çökeltinin üzerine hücre protein özütleme tamponu, %10 proteaz inhibitörü ilavesi ile eklenmiştir. Oda sıcaklığında 15 dakika kalan örnekler daha sonra  $+4^\circ\text{C}$ 'de 20 dakika boyunca 13200 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar total protein tayini için  $-80^\circ\text{C}$ 'de saklanmıştır.

### **2.4.2. Sitoplazmik ve Nükleer Protein İzolasyonu**

Sitoplazmik ve nükleer protein izolasyonu için ProteoJET sitoplazmik ve nükleer protein izolasyon kiti kullanılmıştır. SK-N-AS hücreleri  $5 \times 10^6$  hücre/kuyu olacak şekilde 100 mm çaplı petrilere ekilmiş ve uygun miktarda besi ortamı eklenmiştir.

Hücreler yapıştıktan sonra 24 saat boyunca 1 ve 10 $\mu$ M EBR uygulanmıştır. İlaç uygulanmasından sonra, Tripsin-EDTA ile eşit miktarda besi yeri eklenmiş ve Tripsin-EDTA' nın aktivitesi durdurulmuştur. 600 g' de 2-5 dakika santrifüj işlemi yapılarak hücreler çöktürülmüştür. 1X PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiş ve 600 g'de 2-5 dakika santrifüj işlemi yapılarak hücreler yeniden çöktürülmüştür. Süpernatant uzaklaştırılmış ve pellet üzerine 50 $\mu$ l CER1 solüsyonu eklenmiştir. 15 saniye vorteks işlemi uygulanarak 10 dakika buzda inkübasyon yapılmıştır. Sonrasında 2,25  $\mu$ l CER2 solüsyonu eklenmiştir. 5 saniye çalkalama işlemi uygulanmış ve 1 dakika buzda inkübasyon yapılmıştır. 5 saniye çalkalama işlemi uygulanarak 16000g' de 5 dakika santrifüj işlemi yapılmış ve hücreler çöktürülmüştür. Elde edilen süpernatantta sitoplazmik protein elde edilmiştir. Süpernatant yeni bir eppendorf' a aktarılmış ve -80' de muhafaza edilmiştir. Pellet üzerine 25 $\mu$ l NER solüsyonu eklenmiş ve 15 saniye vortex işlemi uygulanmıştır. Buzda 40 dakika boyunca 10 dakika aralıklarla 15 saniye vortex işlemi yapılarak inkübasyon yapılmıştır. 16000 g'de 10 dakika santrifüj işlemi yapılarak süpernatant elde edilmiştir. Elde edilen süpernatant nüklear proteindir. Yeni bir santrifüj tüpüne aktarılarak -80°C dondurucuda muhafaza edilmiştir.

### **2.4.3. Bradford Protein Miktar Tayini**

Protein içeriğinin belirlenmesi için Bradford yöntemi kullanılmıştır. Konsantrasyonu 1,5  $\mu$ g/  $\mu$ l olan BSA (sığır serum albumin) artan miktarlarda (1, 2, 3, 4, 5 $\mu$ g) kullanılarak standart eğri oluşturulmuştur. 24 saat boyunca 1 ve 10 $\mu$ M EBR eklenmiş örneklerden 1 $\mu$ l 96 kuyucuklu petriye eklenmiştir. Proteinler üzerine 200  $\mu$ l Bradford solüsyonu eklenerek 5 dakika karanlık ortamda inkübe edilmiştir. Mikroplaka okuyucuda 595 nm' de çıkan absorbans değerleri kullanılmış ve protein konsantrasyon değerleri hesaplanmıştır. Standartların absorbans/konsantrasyon grafiği elde edildikten sonra, bu grafiğin eğim eşitliliği kullanılarak absorbans değerleri bilinen örneklerin konsantrasyonları belirlenmiştir.



#### **2.4.4. Proteinlerin SDS-PAGE’de Yürütülmesi**

İmmunoblotlama yöntemi için Laemmlı tamponu (5X) ve 30 µg protein örnekleri karıştırılarak 95°C’de 5 dakika ısıtıcıda bekletilmiştir. %12’lik ayırma SDS-PAGE hazırlanarak, proteinler bu jel sistemine yüklenmişlerdir. Jel sisteminde ilk kuyuda daima protein belirteç ile birlikte 90 V’de 2 saat yürütme tamponunda yürütülmüştür.

#### **2.4.5. Membrana Transfer ve bloklama**

SDS-PAGE sonrası, yükleme jeli kesilerek ortamdan uzaklaştırılmıştır. Ayırma jeli boyutunda kesilen poliviniliden florid (PVDF) membranlar metanol ile aktif hale getirilmiştir. PVDF membran jellerin altına konduktan sonra, jeldeki proteinler transfer işleminden geçirilmiş 2,5 mA’ de 5 dakika boyunca membrana transfer edilmiştir. Transfer işlemi sonrası membranlar, 2 saat oda sıcaklığında, %5’lik yağsız süt tozu (%0,1 Tween 20 içeren 1X TBS) içerisinde bekletilerek bloklama işlemi yapılmıştır.

#### **2.4.6. Primer ve Sekonder Antikor İşaretlemeleri**

Süt tozu içerisinde alınan membranlar, 1X TBS-Tween ile 5 dakika olmak üzere 3 kez yıkandıktan sonra, primer antikorlarla gece boyu +4°C sıcaklıkta bekletilmişlerdir.

Primer antikorların uygulanmasını takiben membranlar 5 dakika boyunca 3 kez TBS-Tween ile yıkanmıştır. Yıkamanın ardından, membranlar anti-tavşan ve anti-fare ikincil antikorlar (1:3000) ile gece boyu +4°C sıcaklıkta bekletilmiştir. İkincil antikor uygulamasının ardından, 10 dakikalık 2 TBS-Tween ve 10 dakikalık TBS yıkaması sonrasında, örnekler kemilüminisans tampon (A ve B çözeltilerinin 1:1 karışımı) ile 1 dakika muamele edilmiştir.

#### **2.4.7. Bantların Görüntülenmesi**

Membran TBS Tween çözeltisi ile 2 kez ve TBS çözeltisi ile 1 kez yıkandıktan sonra hazırlanmış kemilüminisans solüsyonu ile muamele edilmiştir. Chemidoc MP görüntüleme sistemiyle membranın görüntüsü alınmıştır.

## **2.5. AKIM SİTOMETRİSİ**

### **2.5.1. Hücrelerin Hazırlanması**

$5 \times 10^5$  sayıda SK-N-AS hücresi 6 kuyucuklu hücre petrilere ekilerek, bir gece boyunca  $37^\circ\text{C}$ 'de %5'lik  $\text{CO}_2$ 'li etüvde tutulmuşlardır. Petri kabının dibine yapışan hücelere 1 ve 10  $\mu\text{M}$  EBR uygulaması hücre döngüsünün tayini için 24 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. Hücre membranının dışına çıkararak lokalizasyon değişikliği yapan fosfatilserinlerin tayini için kullanılan anneksin V ve ölü hücrelerin belirlenmesi için kullanılan propidyum iyodür boyaması gerçekleştirilmiştir. Belirtilen zaman diliminde EBR uygulamasını takiben hem yüzen hücreler hem de tripsin-EDTA ile kaldırılan hücreler santrifüj edilip, akım sitometrisi için hücreler hazırlanmaya başlanmıştır.

### **2.5.2. Apoptotik Hücre Ölümünün Anneksin V ve Propidyum İyodür Boyaması ile Akım Sitometrisinde Tayini**

Apoptotik hücre ölümü akım sitometrisinde anneksin V-PI boyama ile tespit edilmiştir. Protokol üretici firmanın talimatlarına göre uygulanmıştır. Santrifüj edilen hücreler 500  $\mu\text{l}$  anneksin V bağlama tamponu içinde karıştırıldıktan sonra, 5  $\mu\text{l}$  annexin V-FITC ve 5  $\mu\text{l}$  PI (50  $\mu\text{g/ml}$ ) ile 10 dakika boyunca karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübe edilmişlerdir. Örnekler daha sonra akım sitometrisinde değerlendirilmişlerdir. Örnek başına 10000 hücre akım sitometrisi tarafından analiz edilmiştir. Anneksin V floresansı absiste, PI floresansı ordinatta olmak üzere hücreler noktalar halinde dörtgen bölümlü grafikte sunulmuştur. Bu dörtgen grafiğin her bir bölmesindeki rakamlar hücre popülasyonunun % değerini temsil etmektedir. Grafiğin her bir bölmesi sırasıyla: alt sol: canlı; alt sağ: erken apoptotik; üst sağ: geç apoptotik; üst sol: nekrotik hücre popülasyonlarını işaret eder. Elde edilen verilerin analizi BD C6 Biosciences programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

### **2.5.3 Apoptotik Süreçte Artan Hidrojen- Peroksit miktarının ROS oluşumuna etkisinin DCFH-DA Boyaması ile Akım Sitometrisinde Tayini**

Epibrassinolid tarafından tetiklenen apoptotik süreçte artan hidrojen-peroksit miktarının ROS oluşumuna etkisi akım sitometrisinde DCFH-DA boyama ile tespit edilmiştir. Protokol üretici firmanın talimatlarına göre uygulanmıştır. Santrifüj edilen hücreler 2 µl/ml DCFH-DA ile 15 dakika boyunca inkübe edilmişlerdir. Örnekler daha sonra akım sitometrisinde değerlendirilmiştir. Örnek başına 10000 hücre akım sitometrisi tarafından analiz edilmiştir. Elde edilen verilerin analizi BD C6 Biosciences programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

### **2.5.4. Hücre Döngüsünün Akım Sitometrisi Kullanılarak İncelenmesi**

Tripsin-EDTA uygulaması sonrası santrifüj edilen hücreler 1 ml %70 etanol ile fikse edilerek, 30 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. 3 dakika boyunca 13200 rpm'de santrifüj edilen hücreler etanolden uzaklaştırılmıştır. Her bir örneğin üzerine 980µl PBS, 10µl PI ve 10µl RNaz A eklenerek 30 dakika boyunca 37 °C'de karanlıkta inkübe edilmişlerdir. Örnek başına 10000 hücre akım sitometrisinde incelenmiştir. PI floresansı sunulan grafikte absiste verilmiştir. Bu grafiğe göre DNA miktarı, hücre devrinin G1, S, G2 ve M evrelerinde değiştiği için, ilk pik 2n sayıda DNA içeren ve hücre devrinin G1 fazındaki hücreleri, plato bölümü DNA sayısı artmaya başlayan S fazındaki hücreleri, 2. pik DNA sayısı 4n'e çıkmış G2 evresindeki hücreleri göstermektedir. G1 fazından önceki evre ise DNA kırıkları bulunduran apoptotik hücrelerin yer aldığı subG1 fazı olarak bilinmektedir. Veri analizi BD C6 Biosciences programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

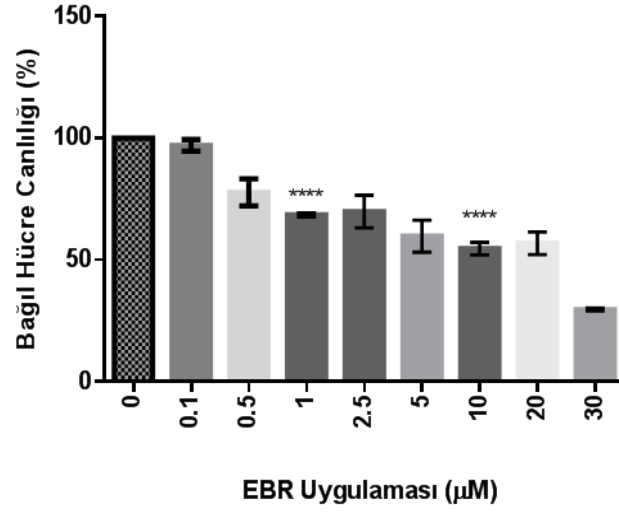
## **2.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZ**

Elde edilen veriler en az üç deney tekrarının ortalamasıdır. Veriler Graph Pad 4.04 istatistik programı ile analiz edilmiştir. Grupların karşılaştırılmasında bağımsız t testi kullanılmış ve anlamlı değişimler için p değeri < 0.05 olarak belirlenmiştir.

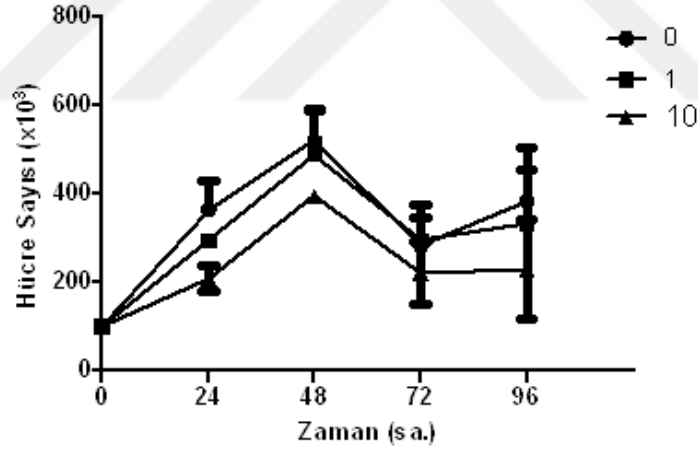
### **3. BULGULAR**

#### **3.1. EPİBRASSİNOLİD' İN SK-N-AS HÜCRE HATTINDA HÜCRE CANLILIĞINA ETKİSİ**

Öncelikle, EBR' nin SK-N-AS hücre canlılığına etkisi MTT testi ile belirlenmiştir. DMEM besiyerinde %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C' lik etüvde büyütülen SK-N-AS hücreleri 10000 hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyucuklu petri kaplarında ekilip gece boyunca yapışmaları beklendikten sonra hücelere 24 saat boyunca 1 ve 10µM EBR uygulamaları yapılmıştır. Şekil 3.1'de görüldüğü üzere, EBR uygulanmış hücrelerin bağıl canlılık yüzdeleri doza bağlı olarak azalmıştır. SK-N-AS hücrelerinde 24 saatlik 1µM EBR uygulaması sonrasında bağıl canlılık yüzdesi % 67,7; 10µM EBR uygulaması sonrasında ise %50,3 olarak görülmüştür. (\*\*\*\*p<0,001). Bunun dışında EBR' nin SK-N-AS hücrelerinin canlılığına etkisi sağkalım testi ile de incelenmiştir. SK-N-AS hücrelerine 24, 48, 72, 96 saat boyunca EBR uygulanmış ve hücre sayısı incelenmiştir. Şekil 3.2'de görüldüğü üzere EBR' nin sitotoksik değil sitostotik etkisi gözlemlenmiştir (Şekil3.2).



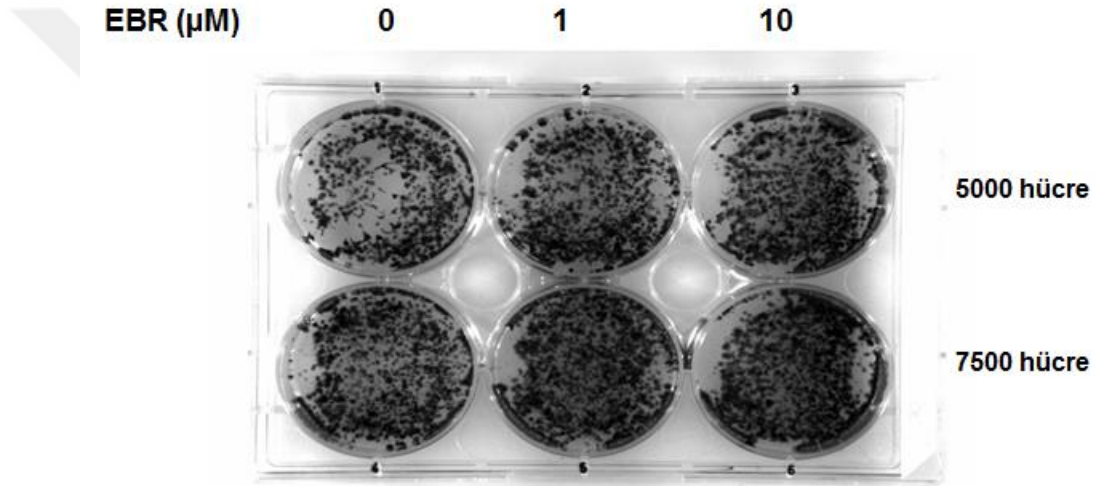
Şekil 3. 1.SK-N-AS hücrelerinde EBR' nin doza bağlı hücre canlılığının MTTyöntemi ile incelenmesi. \*\*\*\*  $p < 0,001$



Şekil 3.2. 1.SK-N-AS hücrelerinde EBR' nin hücre sağkalımı üzerine etkisinin belirlenmesi. Hücelere 24- 96 saat boyunca 1 ve 10µM EBR uygulanmış ve hücreler tripan mavisi ile boyandıktan sonra ışık mikroskobu altına Neubauer hemositometresi yardımı ile sayılmıştır.

### 3.2 EPIBRASSİNOLİD' İN SK-N-AS HÜCRE HATTINDA KOLONİ OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİLERİ

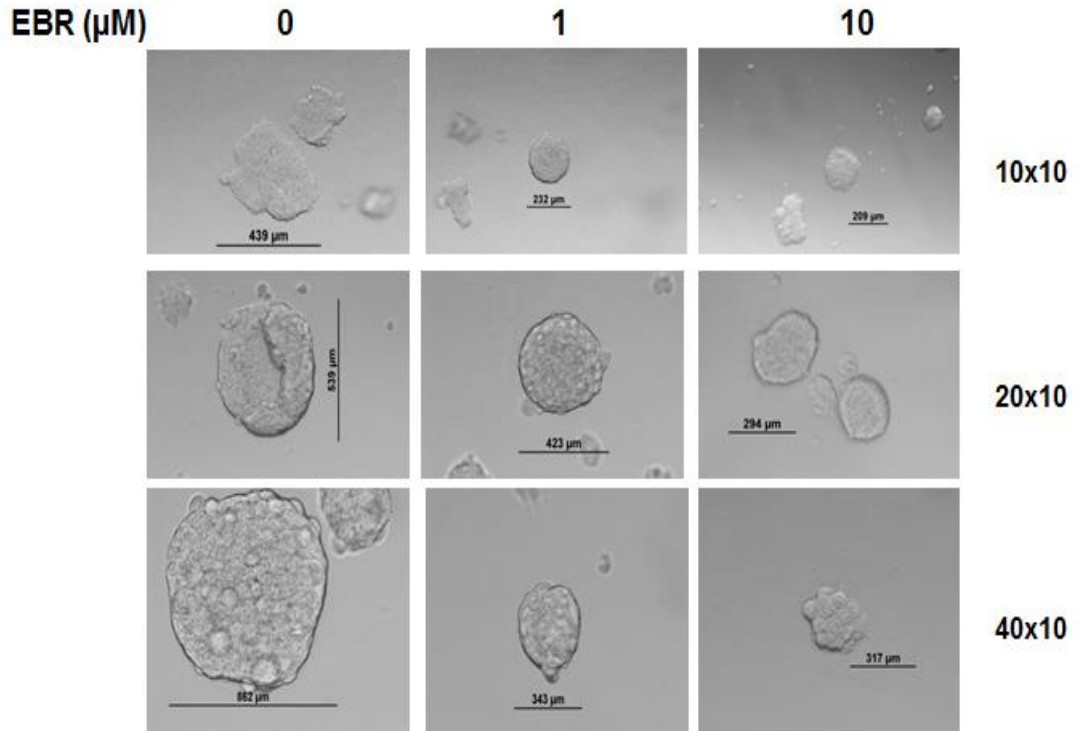
EBR' nin SK-N-AS hücrelerinde koloni oluşumuna etkisini belirlemek amacıyla koloni oluşum testi yapılmıştır. 6 kuyulu petrilere 5000-7500 hücre ekilmiş, 24 saat sonra 1 ve 10 µl EBR uygulanmıştır. 14 günlük inkübasyon sonunda koloniler fikse edilip kristal viyole ile boyanmış, 15 dakika inkübasyondan sonra ışık mikroskopunda incelenmiştir. Şekil 3.3' te görüldüğü üzere, EBR uygulanmış hücrelerde koloni oluşumu doza bağlı olarak azalmıştır.



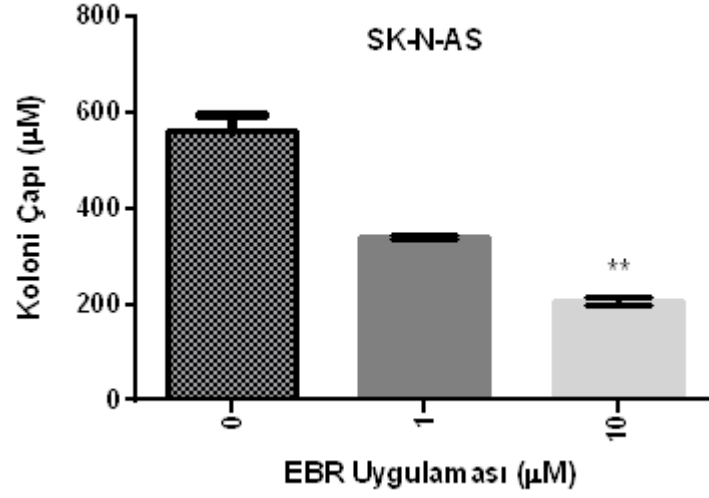
*Şekil 3.3.SK-N-AS hücrelerinde EBR'nin koloni oluşumuna etkisinin incelenmesi.  $5 \times 10^3$  ve  $7,5 \times 10^3$  hücre/kuyu olacak şekilde SK-N-AS hücreleri petri kaplarına ekilmiş, 24 saat boyunca 1 ve 10µl EBR uygulanmış 14 gün boyunca inkübe edilmiştir. 14 gün sonunda fikse edilip kristal viyole ile boyanmış ve ışık mikroskopunda görüntüleri alınmıştır*

Ayrıca, EBR' nin soft agarda büyütülen SK-N-AS hücrelerinde koloni oluşumunu nasıl etkilediğini belirlemek için soft agar koloni oluşum testi yapılmıştır. 6 kuyulu petrilere 10 gün boyunca inkübe edilen hücreler, 10 gün sonunda floresan mikroskopunda incelenmiş ve koloni çapı belirlenmiştir. Şekil 3.4'te görüldüğü üzere EBR uygulanmış hücrelerin oluşturduğu kolonilerin çapı doza bağlı olarak küçülmüştür. Şekil 3.5'te

görüldüğü üzere koloni çapının anlamlı ölçüde küçülmesi 10 $\mu$ M EBR uygulaması sonrasında görülmüştür.



**Şekil 3.4.** EBR uygulanmış SK-N-AS hücrelerinde soft agarda koloni oluşumunun incelenmesi. Soft agarda 10 gün boyunca inkübe edilen hücreler, 10 gün sonunda ışık mikroskobu altında incelenmiş ve koloni çapları ölçülmüştür.



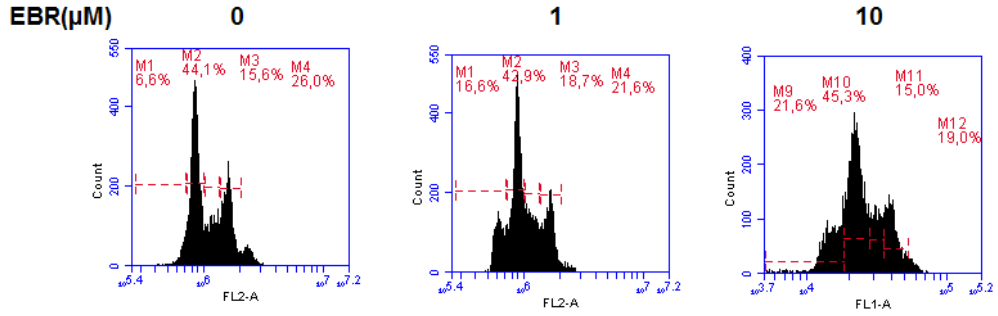
*Şekil 3. 5. EBR uygulanmış SK-N-AS hücrelerinde soft agarda oluşan kolonilerin çapının belirlenmesi. Soft agarda 10 gün boyunca inkübe edilen hücreler, 10 gün sonunda ışık mikroskobu altında incelenmiş ve koloni çapları ölçülmüştür.*

### **3.3 EPİBRASSİNOLİD' İN SK-N-AS HÜCRE HATTINDA HÜCRE DÖNGÜSÜ ÜZERİNE ETKİLERİ**

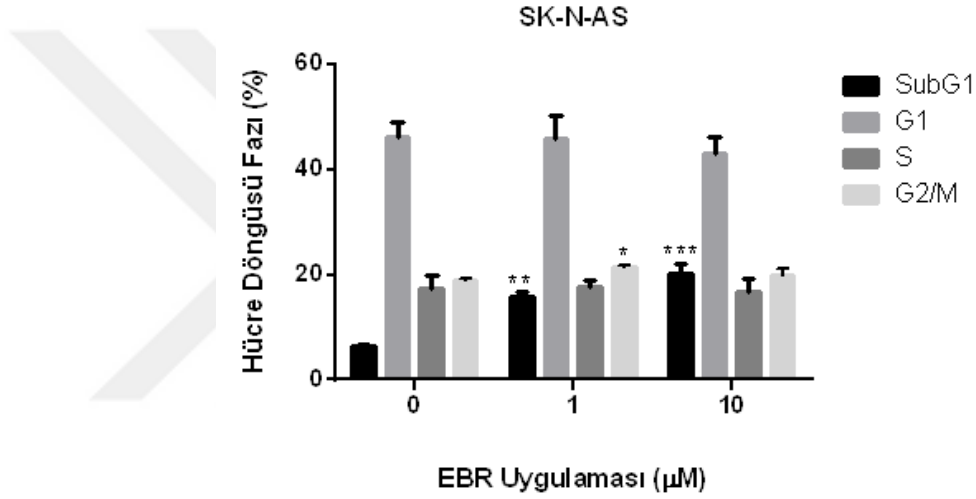
Şekil 3.6'da görüldüğü üzere, SK-N-AS hücrelerinde 24 saat boyunca 1µM'lık EBR uygulaması sonucunda SubG1 fazında %10, 10µM'lık EBR uygulaması sonucunda %15, 3 kat artış görülmektedir. Bu sonuç, SK-N-AS hücrelerinde EBR' nin apoptotik mekanizmayı aktive ettiğini göstermektedir.



A.



B.



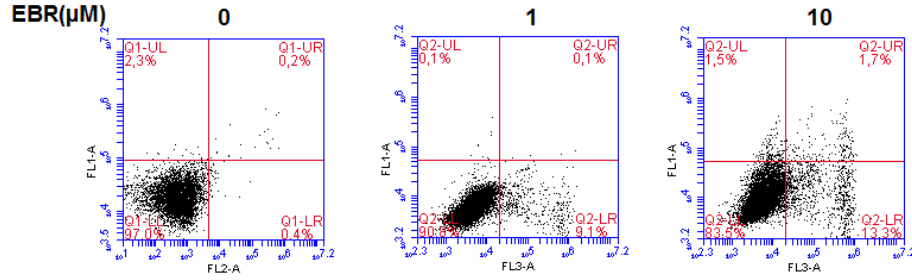
*Şekil 3.6. EBR uygulanan SKNAS hücrelerinde doza bağlı hücre döngüsü evrelerindeki değişimin akım sitometresi analizi ile araştırılması. A. Hücreler 24 saat boyunca EBR ile inkübe edildikten sonra etanol ile fikse edilip, PI boyaması gerçekleştirilmiştir. B. Hücre döngüsünün farklı fazlarındaki hücre sayısı en az 3 deney tekrarı sonra belirlenmiştir.*

### 3.4 EPİBRASSİNOLİD' İN SK-N-AS HÜCRE HATTINDA APOPTOTİK ETKİSİ

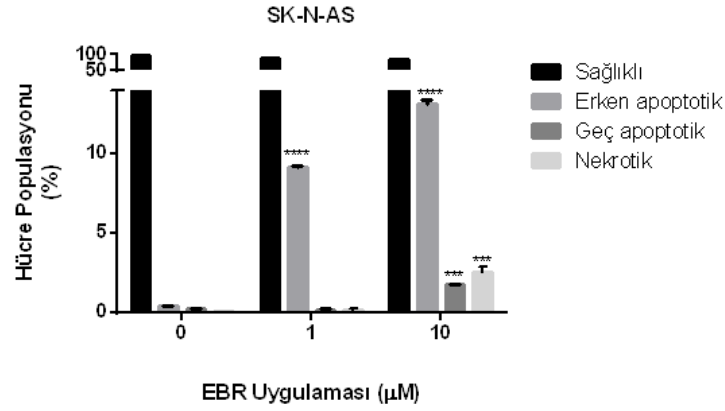
EBR uygulanmış hücrelerde apoptotik ölümün tetiklenip tetiklenmediğini belirlemek amacıyla anneksin V ve PI boyaması yapılmıştır. Şekil 3.7' de görüldüğü üzere, 24 saat boyunca 1  $\mu\text{M}$ ' lık EBR uygulanan hücrelerde erken ve geç apoptotik hücre popülasyonunda kontrol grubuna göre yaklaşık 15 kat, 10  $\mu\text{M}$ ' lık EBR uygulanan

hücrelerde ise erken ve geç apoptotik hücre popülasyonunda EBR uygulanmayan hücelere oranla yaklaşık 25 kat artış olduğu saptanmıştır. Nekrotik popülasyonda ise anlamlı bir değişim her iki dozda bulunmamıştır. Bu sonuç, SK-N-AS hücrelerinde EBR' nin apoptotik mekanizmayı aktive ettiğini göstermektedir.

A.



B.



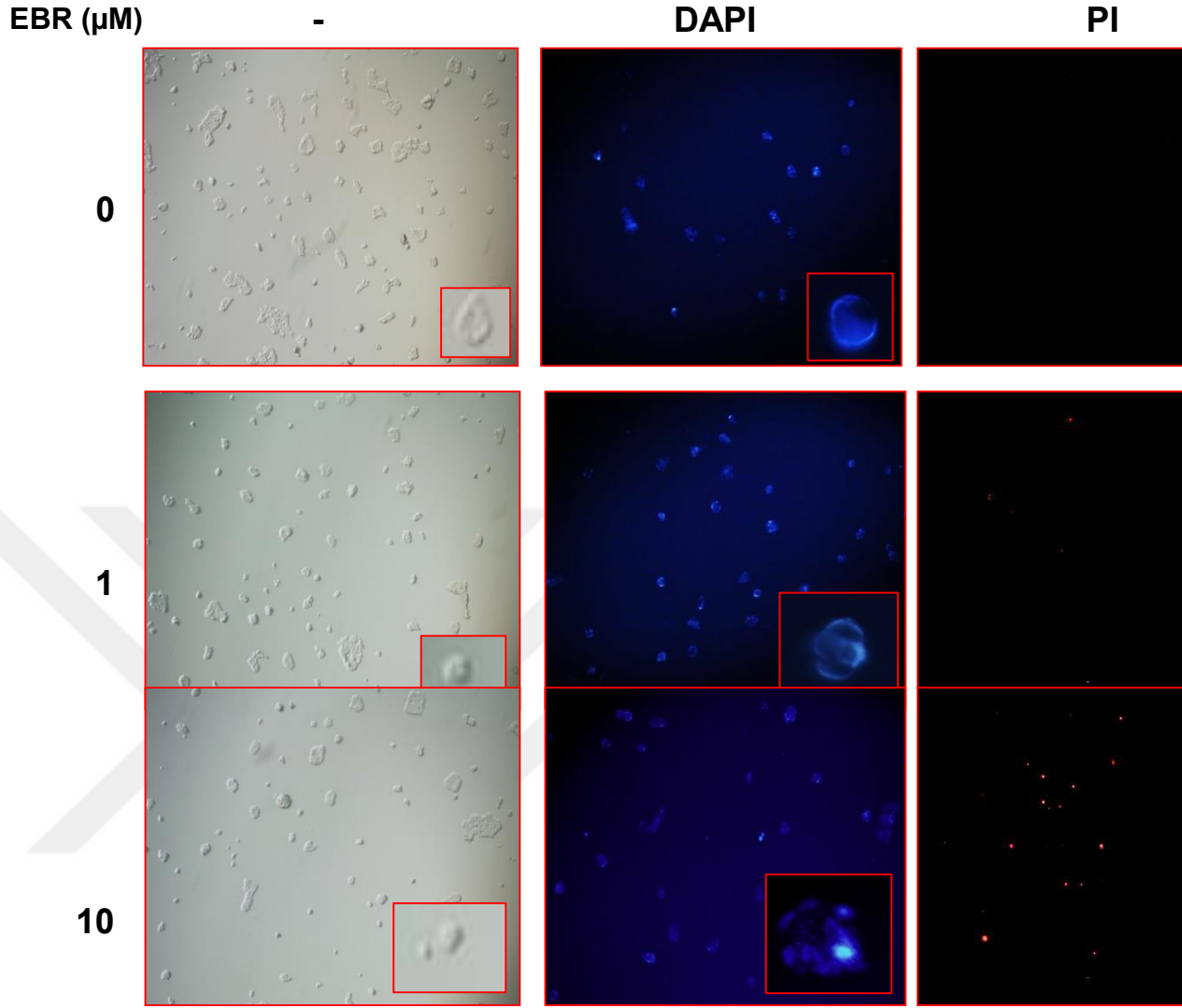
**Şekil 3. 7. EBR uygulanan SKNAS hücrelerinde annexin V-PI boyama sonrası erken ve geç apoptotik hücre popülasyonlarının belirlenmesi. A. Hücreler 24 saat boyunca EBR ile inkübe edildikten sonra Annexin V ve PI boyaması uygulanmış ve BD Bioscience Accuri C6 programı ile analiz edilmiştir. B. Erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik popülasyon yüzdeleri en az üç deney tekrarı sonrası belirlenmiştir.**

EBR' nin SK-N-AS hücrelerinde apoptotik ölümü tetikleyip tetiklemediğini belirlemek amacıyla PI boyaması yapılmıştır. PI canlı hücrelerin membranından geçiş yapamayarak yalnızca ölü hücrelerin boyanmasını sağlamaktadır. Ölü hücrelerin zar morfolojisinin değişmesi sonucu hücre içine girerek ölü hücrelerin gösterilmesini sağlamaktadır. 1 ve 10 µM EBR uygulanan SK-N-AS hücrelerinde 24 saatte hücre ölümünün meydana

geldiği ve 10  $\mu\text{M}$ ' lık EBR uygulaması sonucunda hücre ölümünde belirgin bir artış olduğu PI boyama ile belirlenmiştir. (Şekil3.8).

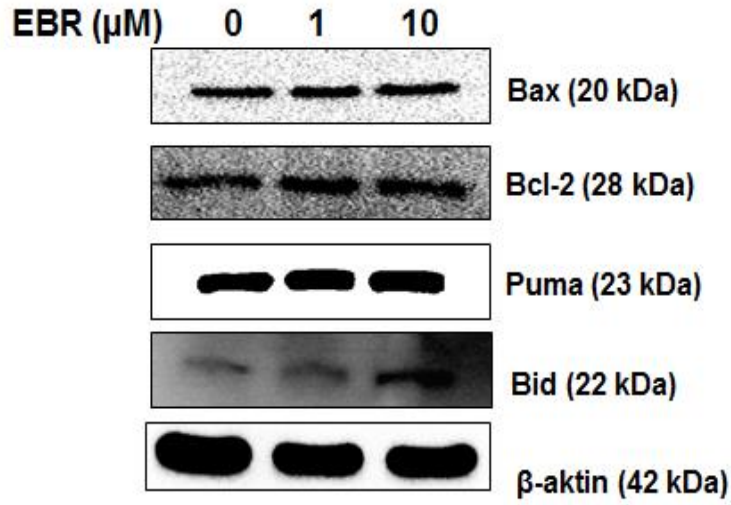
Hücredeki mitokondriyal apoptotik hücre ölümünü göstermek amacıyla DiOC6 boyama yapılmıştır. Apoptotik hücre ölümünde mitokondri membran potansiyeli bozulmaktadır. Bu nedenle apoptotik ölümü gerçekleştirmiş hücrelerde boya hücrede tutulamaz, yalnızca sağlıklı hücreler yeşile boyanabilmektedir. DiOC6 boyama ile 1 ve 10  $\mu\text{M}$  EBR uygulamasının mitokondriyel membran potansiyeli üzerindeki etkisi incelendiğinde, her iki dozun 24 saatlik uygulamasının hücre canlılığında azalmaya neden olduğu görülmektedir. Her iki doz kendi arasında karşılaştırıldığında, 10  $\mu\text{M}$  EBR uygulamasının 1 $\mu\text{M}$  EBR uygulamasına göre hücre canlılığında daha fazla azalmaya neden olmuştur. (Şekil3.8).

Nükleik asit boyası olan DAPI hücre nükleusunu belirgin hale getirerek DNA kırıklarının görünür hale gelmesini sağlamaktadır. EBR ile tetiklenmiş apoptotik hücre ölümünün gösterilmesi amacıyla DNA kırıkları gösterilmiştir. SK-N-AS nöroblastoma hücrelerinde 24 saat 1 ve 10 $\mu\text{M}$  EBR uygulaması ile oluşan DNA kırıkları DAPI boyama ile belirlenmiştir. 10 $\mu\text{M}$  EBR uygulaması sonucunda 24 saatte DNA kırıklarının artış gösterdiği görülmüştür (Şekil3.8).



*Şekil 3. 8. EBR ile tetiklenen hücre ölümünün SKNAS hücrelerinde floresan probalar ile belirlenmesi. 1 ve 10  $\mu\text{M}$  EBR SKNAS hücrelerine 24 saat boyunca uygulanmıştır. DiOC6, Propidium iyodür (PI) ve DAPI ile boyanan hücreler floresan mikroskopunda incelenmiştir(400x).*

Floresan problemlerin yanı sıra olarak apoptotik hücre ölümünün gerçekleştiğini göstermek amacıyla immunoblotlama tekniği kullanılarak apoptotik proteinlerin ilaç uygulamasına bağlı olarak hücre içerisindeki anlatımına bakılmıştır. Apoptotik hücre ölüm yolağının tetiklenmesinde önemli bir rolü olan pro- ve anti- apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinin EBR uygulaması sonucundaki değişimleri incelenmiştir. Şekil 3.9' da görüldüğü üzere SK-N-AS hücrelerinde 10 µM EBR uygulaması sonucunda Bid anlatımının arttığı belirlenmiştir. Bid' in proteolitik kesilimine kaspaz-8 sebep olmaktadır ve Bid' in mitokondriye yönelmesine sebep olmaktadır. Bid hem Bax, hem de Bcl-2' ye bağlanma özelliğine sahiptir ve 10µM EBR uygulaması sonucunda Bax anlatımının da arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.9). Bax sitozolde bulunur ve apoptotik uyarı alınması halinde mitokondri membranına bağlanır ve por oluşumunu indükler. Ayrıca, 24 saat boyunca 1 ve 10 µM EBR uygulanmış SK-N-AS hücrelerinde PUMA proteininin anlatımının arttığı belirlenmiştir (Şekil 3.9). PUMA Bcl-2' ye bağlanarak mitokondriye geçme ve sitokrom c salınımını teşvik ederek apoptozu uyarmaktadır. Anti- apoptotik protein olan Bcl-2 proteininin anlatımının arttığı verilerde görülmektedir. 1 ve 10 µM EBR uygulaması sonucunda Bcl-2 proteininin anlatımında belirgin bir değişim belirlenmemiştir (Şekil3.9). Beta- aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.

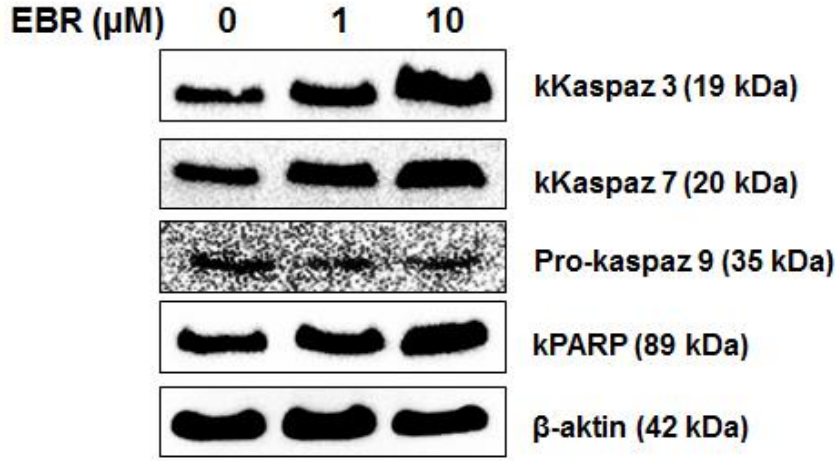


*Şekil 3. 9. EBR uygulamasının pro- ve anti- apoptotik Bcl-2 ailesi üzerine etkilerinin immunoblotlama yöntemi ile belirlenmesi. Total protein izolasyonunun ardından 30 $\mu\text{g}$  protein her bir örnek için %12'lik SDS-PAGE ile ayrıştırıldı. İmmunoblotlama işlemlerinin ardından ilgili proteinlere ait bantlar kemiluminans özelliğine dayanarak belirlenmiştir. Beta aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.*

### 3.5 EPİBRASSİNOLİD' İN SK-N-AS HÜCRE HATTINDA KASPAZ AKTİVASYONU ÜZERİNE ETKİSİ

Bcl-2 protein ailesine ilave olarak EBR uygulanmış nöroblastoma hücrelerinde apoptotik yolaktaki kaspaz ailesi anlatımları da araştırılmıştır. Kaspaz ailesi üyesi olan başlatıcı kaspaz prokaspaz- 9, etkili kaspazlar, kaspaz-3 ve kaspaz-7, hücre içindeki kalsiyum seviyesinin artmasıyla aktifleşerek hücre iskeletinin yıkılmasını sağlamaktadır. Doza bağlı olarak uygulanan EBR ile, 24 saatte SK-N-AS hücre hattında prokaspaz- 9 anlatımı azalmıştır. 1ve 10  $\mu\text{M}$  EBR uygulaması sonucunda SK-N-AS hücrelerinde kesilmiş kaspaz-3 ve kesilmiş kaspaz- 7 anlatımının arttığı gözlemlenmiştir. Etkili kaspazlar, ilgili proteinlerden DNA tamirinde rol alan poli (ADP- riboz) polimeraz – PARP' ı parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar. 24 saat boyunca 1 ve 10  $\mu\text{M}$  EBR uygulanan SK-N-

AS hücrelerinde kesilmiş PARP anlatımının da anlamlı derecede arttığı belirlenmiştir (Şekil 3.10).

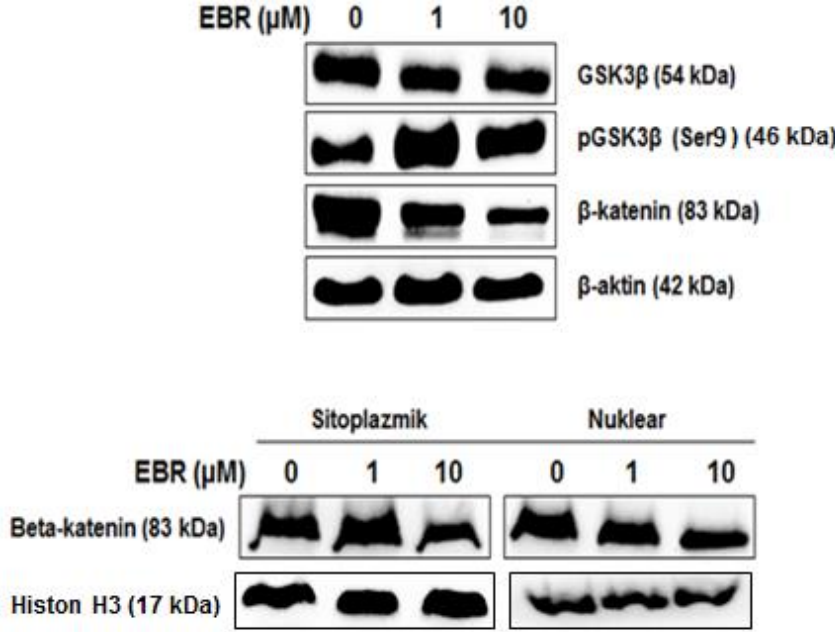


*Şekil 3.10. EBR uygulamasının kaspaz kesilimi üzerine etkilerinin immunoblotlama yöntemi ile belirlenmesi. Total protein izolasyonunun ardından 30µg protein her bir örnek için %12'lik SDS-PAGE ile ayrılandırıldı. İmmunoblotlama işlemlerinin ardından ilgili proteinlere ait bantlar kemiluminans özelliğine dayanarak belirlenmiştir. Beta aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.*

### 3.6 EPİBRASSİNOLİD' İN SK-N-AS HÜCRE HATTINDA GSK3B-WNT YOLAĞI PROTEİNLERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

SK-N-AS hücre hattında GSK3β/Wnt yolağı proteinlerinin incelenmesi yapılmıştır. Şekil 3.11' de görüldüğü üzere, SK-N-AS hücrelerinde 24 saatte GSK3β proteininin anlatımında 1 µM EBR uygulaması sonucunda azalma, 10 µM EBR uygulaması sonucunda ise artış gözlemlenmiştir (Şekil 3.11). Fosforlanan GSK3β proteininin anlatımında 1 ve 10 µM EBR uygulaması sonucunda artış belirlenmiştir. β-katenin GSK3β tarafından fosforlanmaktadır. β-katenin'in fosforlanması multiprotein- yıkım kompleksi oluşturmaktadır. Wnt sinyalinin alınması β-katenin'in bozulması engellenmektedir. Stabilize edilmiş β-katenin nukleusa geçmekte ve transkripsiyon faktörleri ile birleşmektedir. Şekil 3.11'de görüldüğü üzere, 24 saatte 1 ve 10 µM EBR

uygulanan SK-N-AS hücrelerinde  $\beta$ -katenin proteininin anlatımında azalma belirlenmiştir. Nukleustaki  $\beta$ -katenin anlatımı ise artmıştır. Histon H3 yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır (Şekil 3.11).



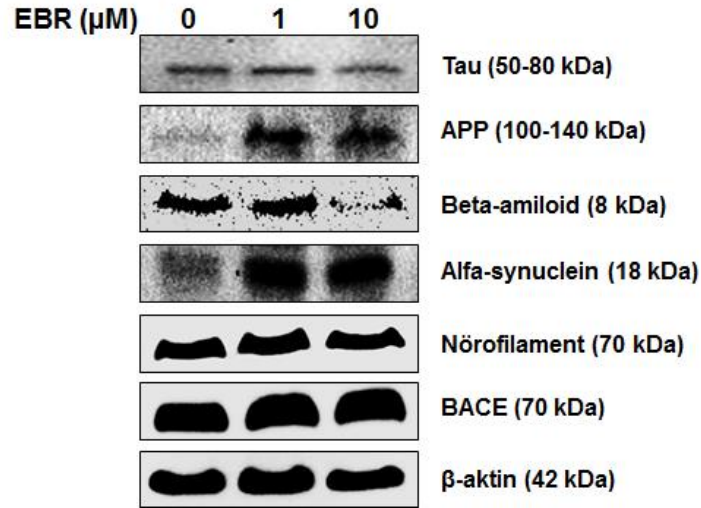
*Şekil 3. 11. EBR uygulamasının GSK3/beta-katenin yolağı üzerine etkilerinin immunoblotlama yöntemi ile belirlenmesi. Total ve nüklear-sitoplazmik protein izolasyonunun ardından 30 $\mu$ g protein her bir örnek için %10-12 SDS-PAGE ile ayrıştırıldı. İmmunoblotlama işlemlerinin ardından ilgili proteinlere ait bantlar kemiluminans özelliğine dayanarak belirlenmiştir. Beta aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.*

### 3.7 EPİBRASSİNOLİD' İN SK-N-AS HÜCRE HATTINDA ALZHEİMER PROTEİNLERİ ÜZERİNDE ETKİSİ

EBR' nin Alzheimer hastalığı ile ilişkili olduğu düşünülen proteinler üzerinde etkisini belirlemek amacıyla 24 saat boyunca 1 ve 10  $\mu$ M EBR uygulanmış SK-N-AS hücrelerinde Alzheimer hastalığı ile ilişkili proteinlerin anlatımı belirlenmiştir. Şekil 3.12'de görüldüğü üzere, 24 saatte Tau ve APP proteininin anlatımında anlamlı



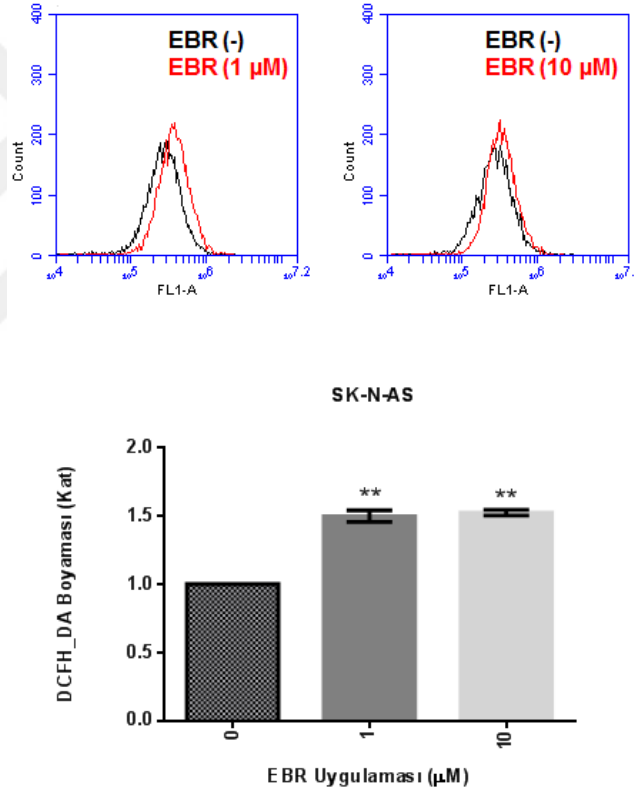
değişiklik gözlemlenmemiştir. 10  $\mu$ M EBR uygulanmış SK-N-AS hücrelerinde APP'nin metabolizma ürünlerinden biri olan  $\beta$ -amiloid proteininin anlatımında azalma belirlenmiştir (Şekil 3.12).  $\mu$ -synuclein ve BACE proteinlerinin anlatımında artış gözlemlendiği halde, nörofilament proteininin anlatımında anlamlı değişiklik belirlenmemiştir (Şekil 3.12).



**Şekil 3.12. EBR uygulamasının Alzheimer hastalığı proteinleri üzerine etkilerinin immunoblotlama yöntemi ile belirlenmesi. Total protein izolasyonunun ardından 30 $\mu$ g protein her bir örnek için %12'lik SDS-PAGE ile ayrıştırıldı. İmmunoblotlama işlemlerinin ardından ilgili proteinlere ait bantlar kemiluminans özelliğine dayanarak belirlenmiştir. Beta aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.**

### 3.8 EPİBRASSİNOLİD' İN SK-N-AS HÜCRE HATTINDA TETİKLEDİĞİ APOPTOTİK SÜREÇTE ROS OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİSİ

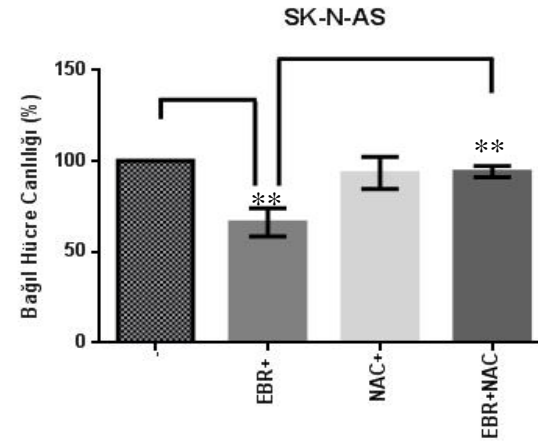
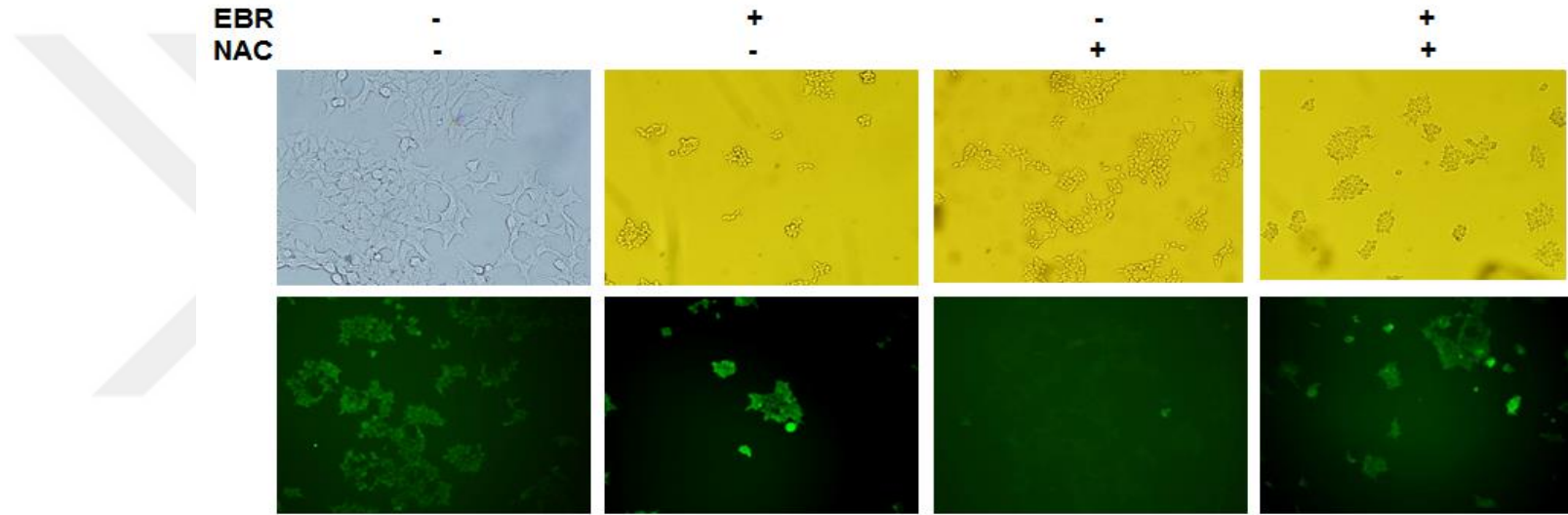
EBR' nin SK-N-AS hücre hattında apoptotik süreçte ROS oluşumuna etkisinin olup olmadığını belirlemek amacıyla 24 saat boyunca 1 ve 10  $\mu\text{M}$  EBR uygulanmış SK-N-AS hücreleri DCFH-DA boyama ile akım sitometrisinde incelenmiştir. Bu, toksik ajanlara maruziyet sonucu hücre içerisinde meydana gelen reaktif oksijen türlerinin DCFH-DA ajanı kullanılarak belirlenmesi amacıyla yapılan bir deneydir. Hücreye difüzyon ettikten sonra DCFH-DA hücresel esterazlar tarafından deasetile edilir, daha sonra ROS ile oksitlenir. Şekil 3.13'te görüldüğü üzere, 1 ve 10  $\mu\text{M}$  EBR uygulanmış SK-N-AS hücrelerinde kontrol hücrelere oranla anlamlı ölçüde ROS artışı gözlemlenmiştir



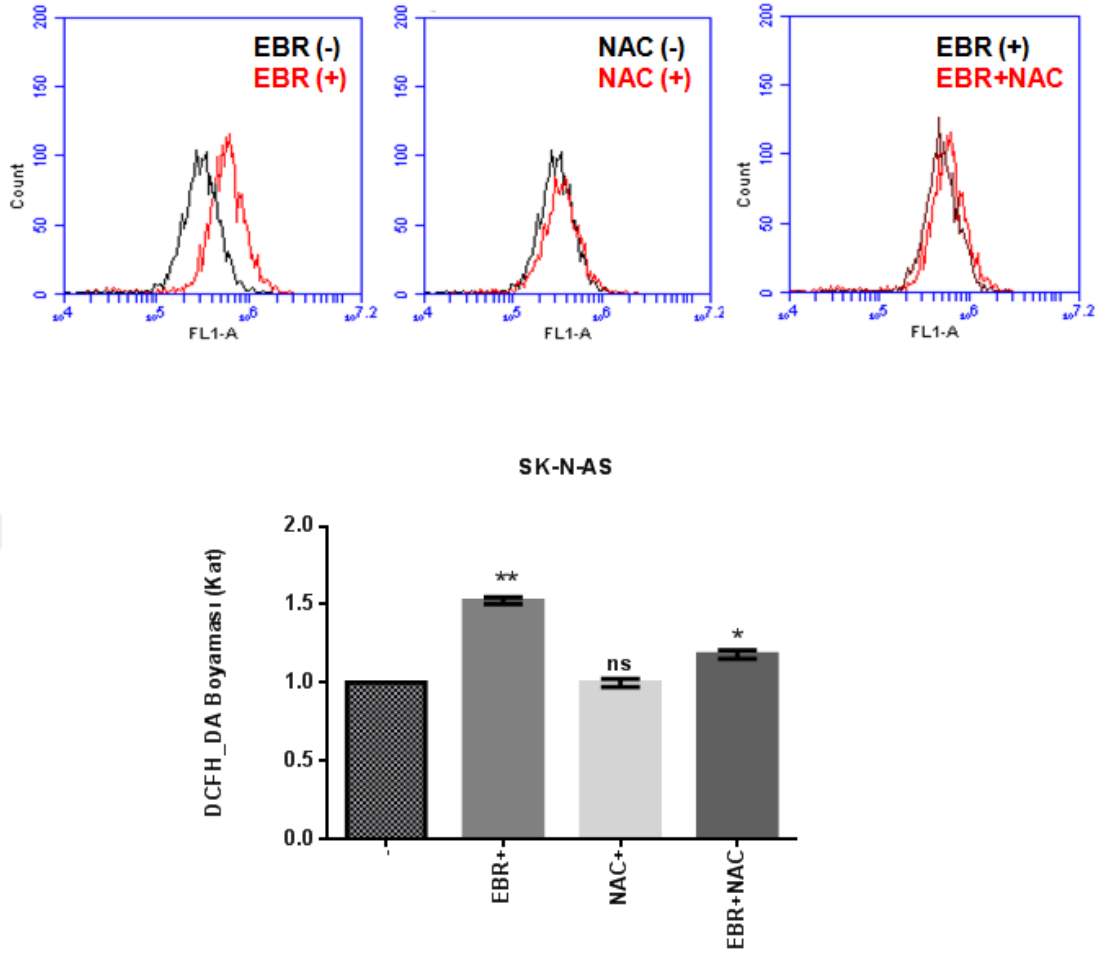
*Şekil 3.13. EBR uygulamasının SK-N-AS hücre hattında ROS oluşumu üzerine etkisinin belirlenmesi. 24 saat boyunca 1 ve 10  $\mu\text{M}$  EBR uygulanmış hücreler DCFH-DA boya ile boyanmıştır. 15 dakika inkubasyon sonucunda hücreler akım sitometrisinde analiz edilmiştir.*

### **3.9 EPIBRASSINOLID' IN SK-N-AS HÜCRE HATTINDA N- ASETİL SİSTEİN (NAC) İLE EŞZAMANLI ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

EBR ile tetiklenen apoptotik süreçte toksik ajanların yıkıcı etkisini önleyen bir ajan olan N-asetil sistein (NAC), SK-N-AS hücrelerine 10 µM EBR ile eş zamanlı olarak 24 saat boyunca uygulanmış ve hücre canlılığındaki değişimler gözlemlenmiştir. Şekil 3.14'de görüldüğü gibi NAC SK-N-AS hücre hattında EBR' nin hücre canlılığına negatif etkisini engellemekte, aynı şekilde EBR' nin toksik etkisini geri döndürmektedir (Şekil 3.15).



Şekil 3. 14. NAC uygulamasının EBR ile tetiklenen A. reaktif oksijen türlerinin oluşumuna B. hücre canlılığı kaybına etkisi. \*\* $p < 0,01$



**Şekil 3. 15.** NAC' ın 10 $\mu$ M EBR uygulanmış SK-N-AS hücrelerinde EBR' nin toksik etkisini geri döndürmesinin belirlenmesi. SK-N-AS hücreleri 24 saat boyunca 10 $\mu$ M EBR ve 5mM NAC uygulaması sonucunda DCFH-DA ajanı ile boyanmış, 15 dakika inkubasyon sonunda örnekler akım sitometrisinde incelenmiştir.

Şekil 3.15'de görüldüğü gibi, tek başına NAC uygulandığında SK-N-AS hücrelerinde kontrole oranla anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir. 10  $\mu$ M EBR ve 5 mM NAC uygulaması sonucunda ise EBR' nin etkisinin anlamlı derecede azaldığı belirlenmiştir.

## 7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser, organizmada hücrelerin çeşitli sebeplerden dolayı kontrolü kaybedip anormal şekilde çoğalmaları ile karakterize olan kompleks bir hastalıktır. Bu kontrolsüz çoğalmaya bağlı olarak tümör oluşumu gerçekleşmektedir. Tümörler normal vücut işleyişini, bulunduğu dokuya bağlı olarak durdurmakta ve bazen ölümle sonuçlanabilecek durumlara yol açmaktadır [144]. Nöral krest hücrelerinden köken alan, biyolojik ve klinik olarak da farklı özellikler gösteren nöroblastoma çocukluk çağının en sık rastlanılan tümörleri arasında yer almakta ve çoğu zamanda ölümle sonuçlanmaktadır. Bu bağlamda 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.

Günümüzde kanser tedavi yöntemlerinin yanı sıra dünyada ve ülkemizde pek çok kanser hastası konvansiyonel tedavilerle birlikte alternatif tedavileri de sıklıkla kullanmaktadır. Alternatif ve tamamlayıcı tedavilerde kullanılan doğal ürünler ile kanser hücrelerinin büyümesi, metastazın engellenmesi, hücre ölümünün indüklenmesi gibi mekanizmalarla bu hastalığın tedavisinin sağlanması amaçlanmaktadır. Son çalışmalar, GSK3 $\beta$  inhibisyonunun nöroblastoma tedavisinde potansiyel rolü olduğunu

düşündürmektedir. GSK3 $\beta$  inhibisyonunun nöroblastoma hücrelerinde çoğalmayı azalttığı ve apoptozu artırdığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir [113]. B65 nöroblastoma hücre hattında, lityum uygulaması ile tetiklenen hücre döngüsü durdurulmasının *in vitro*da hücre çoğalmasını azalttığı gösterilmiştir [112]. GSK3 $\beta$  inhibisyonu nöroblastoma hücrelerinde çoğalmanın azalmasına ve artan apoptozu neden olmuştur. En önemlisi, *in vivo*da bu etkiler gecikmiş tümör büyümesine çevrilmiştir [113].

Alzheimer hastalığı, beynin belirli bölgelerinde (korteks ve hipokampus) hücre yitimi ile karakterize nörodejeneratif bir süreçtir. Daha önceki çalışmalarda ile diğer nörodejeneratif hastalıklardaki hücre ölümünde apoptozun rolü olabileceği gösterilmiştir [145]. Ayrıca, Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda apoptozun aktive olmasıyla artmış hücre kayıpları (nöron) gerçekleşmektedir [129]. Genetik ve epidemiyolojik çalışmalarda, Alzheimerda yukarı Wnt ve insulin sinyal yolu ara maddelerinin değişiklikleri nedeniyle GSK3'ün dereğile olduğu görülmektedir. Wnt sinyalinin ko-reseptörü olan düşük yoğunlukta lipoprotein reseptörü ile ilişkili protein (LRP6), apolipoprotein E4-e4 negatif bireylerde geç başlangıçlı Alzheimer için bir risk gen olarak tespit edilmiştir; bu da Alzheimer hastalığının patolojisinde anormal Wnt sinyalinin neden olduğu belirlenmiştir.

Potansiyel GSK3 inhibitörü EBR, bitki büyüme ve gelişim sürecinde önemli görevi olan brassinosteroidler ailesine ait steroid bir hormondur. Memeli hücrelerinde bölünmeyi inhibe edici etkileri ilk defa 2008 yılında Malikova ve arkadaşları tarafından bulunmuştur [142]. Bu çalışmada EBR' nin farklı kanser hücreleri üzerine olan etkisi incelenmiştir. Bu çalışmanın ardından 2010 senesinde Steigerova ve arkadaşları EBR' nin memeli hücrelerindeki steroid hormon yapısına benzerliğinden dolayı EBR-steroid hormon reseptör ilişkisi olabileceği düşünülmüş ve incelemesi yapılmıştır [142]. Bu amaçla yapılan çalışmada östrojene bağımlı olarak gelişen MCF-7 meme kanseri hücre hattında EBR' nin hücre döngüsünü G1 fazında inhibe ederek, döngüyü düzenleyen

CDK' ların (p21, p27, p53) ve siklinler gibi proteinlerinin anlatımını etkileyip, apoptozu indüklediği gösterilmiştir.

2014 senesinde Obakan ve arkadaşları EBR' nin apoptotik etkisinin daha iyi anlaşılabilmesi için p53 geni içermeyen PC3 hücre hatlarının hücresel cevabı üzerinde inceleme yapmıştır. p53 yabancı tip ve p53 stabil transfekte edilmiş hücrelerde EBR' nin hücre ölümünü hücre ölümünü mitokondri aracılı ve kaspaza bağımlı olarak arttırdığı ortaya konulmuştur, bu sonuçlar da EBR ile indüklenmiş hücre ölümünün p53' ten bağımsız olduğunu önermiştir [143]. Ayrıca, 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 ubikutinlenme ile ilgili pek çok proteinin anlamlı bir şekilde ilaç uygulanmamış kontrol hücrelere göre değiştiği laboratuvarımızca gösterilmiştir [146]. Bu proteinlerden EBR uygulaması sonrası en anlamlı olarak değişen ise ER lümeninde proteinlerin katlanması ve Ca<sup>2+</sup> iyonlarını tamponlama özelliği olan kalretikulin olarak bulunmuştur. Farklı kanser hücrelerinde EBR'nin neden olduğu ER stresi ve katlanmamış protein cevabı üzerine çalışmalar devam etmekte olup, EBR'nin farklı hücre hatlarında akut ve ya kronik ER stresine neden olduğu ortaya koyulmuştur. EBR zamana bağlı bir şekilde apoptotik dozda doğal ve p53 nakavt HCT116 ve HT-29 (p53 mutant) kolon kanseri hücrelerinde GSK3 $\beta$  aktivitesini Ser9 defosforilasyonu nedeni ile arttığı tespit edilmiştir (yayınlanmamış veri). Etki HCT116 doğal ve p53 nakavt hücrelerde 72. saat boyunca EBR uygulanması sonucunda yeniden Ser9'un fosforilasyonu görülmekte olup ve GSK3 ifade düzeyinde azalmaya neden olmaktadır (yayınlanmamış veri).



Yapılan tüm bu araştırmalar sonucunda EBR' nin çeşitli kanser tipleri için kemoterapötik bir ajan olabileceği düşünölmektedir [138, 142]. EBR'nin GSK3 temelli bir moleköler gelişim süreci bulunan nöroblastoma gelişimine etkisi ise literatürde bulunmamaktadır. Tüm bu bilgiler göz önüne alındığında, bu çalışmadaki amaç, EBR uygulamasının SK-N-AS hücre hattı üzerindeki apoptotik potansiyelini, hem apoptotik belirteçlerdeki değişimler göz önünde bulunarak incelemek, hem de seçilen hücre hattı bir Alzheimer hastalığı modeli olarak kullanıldığı için GSK3β/ Wnt yolağı üzerinden Alzheimer üzerindeki etkisini moleköler düzeyde belirlemektedir. Apoptotik süreç aynı zamanda beynin hippokampus ve korteks kısımlarındaki nöronların apoptotik sürecini de temsil ettiği için, EBR'nin iki yönlü olarak etkisi bu çalışmada araştırılmıştır.

Öncelikle, SK-N-AS hücrelerinde 24 saat EBR uygulamasının sonrasında bağıl canlılık yüzdesinin düştüğü gösterilmiştir. Hücre sağkalımının ise özellikle 10 µM EBR uygulaması ise sitostatik etki yarattığı ve bu etkinin 96 saate kadar devam ettiği gösterilmiştir. EBR'nin sitostatik etkileri prostat ve kolon kanseri hücrelerinde 10 ve 20 µM dozlarda gösterilmiştir. Bu hücrelerde 30 µM EBR dozu sitotoksik etki yaratmıştır [147, 148]. SK-N-AS hücrelerinde yüksek dozlara çıkılmamış canlılığı %25 düşüren doz olan 10 µM'da deneyler gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın ilerleyen dönemlerinde yüksek doz EBR'nin etkileri modellenebilir. Çalışma kapsamında ayrıca, EBR'nin SK-N-AS hücreleri koloni oluşumuna etkisine bakılmıştır. Özellikle 10µM EBR uygulanmış hücrelerde koloni çapının anlamlı şekilde azaldığı tespit edilmiştir. Kanser hücrelerinin çoğalmalarının ve tümör oluşturma potansiyellerinin inhibe edilmesi önem arz etmekte birçok kemoterapötik ajan adayı için araştırılmaktadır. EBR, brassinosteroid kökenli homokastasteron ve benzer şekilde bir steroid türevi olan bikalutamidin koloni oluşumuna ket vurduğu çeşitli kanser hücre hatlarında gösterilmiştir [131, 147, 149]. Bu bağlamda, EBR'nin daha önce etkisi bilinmeyen SK-N-AS hücrelerinde koloni formasyonuna ket vurması umut vaad edicidir.

EBR ile tetiklenen hücre canlılığı kaybının apoptotik ölümden kaynaklanıp kaynaklanmadığını anlayabilmek için apoptotik belirteçler araştırılmıştır. Hücrelere, 24 saat süreli EBR uygulaması yapılmış, ışık mikroskobunda inceleme yapılmış ve hücrelerde hücre membranının yapısındaki bozulmalar saptanmıştır. EBR uygulaması ile beraber MMP'deki bozulma floresan mikroskobu ile belirlenmiştir. MMP'deki doza bağlı olarak gözlenen EBR'nin mitokondriyal yolak üzerinden apoptozu aktive ettiği sonucunu göstermiştir. Başka bir apoptoz belirteci olan DNA kırıklarının oluşumu da floresan mikroskobu ile PI boyama sonrası incelenmiştir. Özellikle 10 µM EBR'nin anlamlı bir şekilde SK-N-AS hücre hattında DNA kırıkları oluşumunu sağladığı bulunmuştur. Steroid türevli ya da anti-steroidal kemoterapötiklerin DNA kırığı oluşumuna sebep olduğu pek çok makalede gösterilmiştir [143]. Bununla birlikte EBR'de daha önceki çalışmalarda, prostat, kolon ve meme kanseri hücrelerinde DNA kırığına neden olmuştur [148, 150]. Nöroblastoma modeli hücrelerde de bu fragmentasyonun olması ilacın anti-kanser özelliğini vurgulamaktadır.

EBR'nin yol açtığı apoptotik ölüm aynı zamanda, hücre döngüsü subG1 popülasyonundaki değişim ve fosfotidilserinlerin anneksin V pozitif boyanmasına göre değerlendirilmiştir. EBR'nin SK-N-AS hücre hattında seçilen her iki dozda, kontrol grubuna kıyasla SubG1 fazının yüzdesini anlamlı bir şekilde arttırdığı bulunmuştur. EBR'nin neden olduğu apoptotik süreç ayrıca anneksin V-PI boyama sonrası erken, geç evre apoptotik popülasyonlar ile nekrotik popülasyonların belirlenmesini sağlayan akım sitometrisi metodu ile belirlenmiştir. Erken ve geç evre apoptotik popülasyonun EBR özellikle 10 µM EBR uygulanmış hücrelerde, kontrol hücre grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı (yaklaşık 25 kat) tespit edilmiştir. Bu yöntem ile EBR'nin nöroblastoma hücre hattında apoptotozu tetiklediği desteklenmiştir. Benzer şekilde Steigerova ve ark ile Obakan ve ark farklı kanser hücrelerinde akım sitometrisi ile yaptıkları deneylerde EBR uygulamasının subG1 fazında ve apoptotik popülasyonlarda artışa neden olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca bu etkinin p53 proteininden bağımsız olduğu da vurgulanmıştır [138, 143, 148].

EBR' nin neden olduğu apoptozun SK-N-AS hücrelerinde hangi apoptotik yolak üzerinden ilerlediği araştırılmış, bunun için öncelikle pro- ve anti- apoptotik protein düzeylerindeki değişimler incelenmiştir. SK-N-AS hücrelerinde pro-apoptotik bir protein olan Bax, Bid ve PUMA' nın anlatım seviyelerinin EBR uygulanmamış kontrol hücelere göre arttığı gözlemlenmiştir. Pro-apoptotik proteinlerin yoksunluğu ilaç duyarsızlığı nedenlerinden biridir. Bax ve PUMA sitozol içinde yer alan bir pro-apoptotik proteindir ve apoptozun indüksiyonu ile beraber mitokondriye transloke olmaktadır [151]. Bax ve PUMA ilgili bağlanma bölgeleri vasıtasıyla p53'ün doğrudan transkripsiyon kontrolü altındadırlar. *In vitro* ve *in vivo*' da sitokrom c salınımını ve kaspaz kesilimini arttırdıkları ortaya konulmuştur [152]. Bu açıdan her iki pro-apoptotik proteinin anlatımındaki artış SK-N-AS hücrelerinde EBR'nin apoptotik etkisi için önemli bulunmuştur. Yapılan çalışmalar EBR'nin Bax ve PUMA üzerindeki etkisini kolon, prostat ve meme kanseri hücrelerinde de göstermiştir [142, 147]. Bu bağlamda SK-N-AS hücrelerinde EBR ile tetiklenen Bax anlatım artışının p53 ile ilişkisi ilerleyen deneylerde araştırılması gereken bir noktadır. Bunun yanı sıra, Bid proteini dış apoptotik yolak üzerinden kaspaz 8 aktivasyonu ile indüklenen ve mitokondriyal yolak üzerine etkili bir başka pro-apoptotik proteindir. Literatürdeki çalışmalar EBR'nin dış apoptotik yolak üzerine etkisini göstermemiştir. Bu etki SK-N-AS hücrelerine özgü olup, gelecekte bu yolağın aktivasyonunun aydınlatılması gerekmektedir. Yapılan bu çalışmada ayrıca anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinden Bcl-2 anlatımına bakılmıştır. SK-N-AS hücrelerinde Bcl-2 proteini anlatımında anlamlı bir değişiklik bulunmamıştır. Bu sonuçlara benzer olarak Obakan P. ve arkaşları ile Steigerova ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda, EBR' nin farklı kanser hücre hatlarında Bcl-2 protein ailesi üzerinde etkisi incelenmiştir [143]. Obakan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada PC3 prostat kanseri hücre hattında pro-apoptotik proteinler olan Bax, PUMA, Bak ve Bim anlatımlarının EBR uygulaması ile arttığı, anti-apoptotik proteinler olan Mcl-1 ve Bcl-2 anlatımlarının ise EBR uygulaması ile azaldığı gösterilmiştir [143]. Steigerova ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise MCF-7 meme kanseri hücre hattında zamana bağlı

EBR uygulaması ile anti-apoptotik proteinler olan Bcl-xL ve Bcl-2 anlatımının azaldığı ve Bax ve Bid pro-apoptotik proteinin anlatımının ise azaldığı gösterilmiştir [143]. MDA-MB-438 meme kanseri hücre hattında ise anti-apoptotik proteinler olan Bcl-2 ve Mcl-1 anlatımının değişmediği, Bid pro-apoptotik proteininin kesildiği ve Bax pro-apoptotik proteinin anlatımının ise azaldığı gösterilmiştir.

Bcl-2 ve BCL-X gibi anti-apoptotik genler, erken nöral ontojenide yüksek düzeyde eksprese edilir. Bcl-2 geni kromozom 18q21.3'de lokalizedir. Bcl-2, çoğu nöroblastom hücre hatlarında ve primer tümörde aşırı ifade edilir. Bcl-2 proteini, ganglionöromlarda nadiren rastlanır. Tümör regresyonu apoptoz inhibitör yokluğuna bağlı olabilir. Ayrıca Bcl-2 proteinin yüksek düzeyleri tümörün ilaca direncinde önemli rol oynar [121]. Farelerde yapılan Bcl-2 gen çalışmalarında dalak, lenf düğümü, kemik iliği, timus ve beyin normal dokularında Bcl-2 gen ekspresyonu olduğu ortaya konmuştur [153]. Reed ve arkadaşları nöroblastoma ve nöronal özellikler gösteren tümör hücrelerinde değişik derecelerde Bcl-2 protoonkogen ekspresyonu izlemişler ve Bcl-2' nin aşırı ekspresyonunun apoptozu engelleyerek hücre yaşama sürecini arttırdığı ve bu şekilde hücre ölümü ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir [154]. Ayrıca çok sayıda hücre ölümü mekanizmalı kemoterapötikler ile etkileştiği bulunmuştur. Sonuç olarak yüksek Bcl-2 seviyesi, nöroblastom hücrelerinde tedaviye kötü yanıt ile ilişkilidir. Dolayısıyla hasta yaşam süresini kısaltmaya yol açması beklenmektedir. Castle ve ark (1993) nöroblastom tanılı hastalar üzerinde yaptıkları çalışmada Bcl-2 geni ile kötü histoloji ve evre arasında güçlü ilişki bulmuşlardır [155].

Bu verilerin elde edilmesinin ardından, EBR' nin SK-N-AS hücre hattında kaspaz kesilimi üzerine etkisi gösterilmiştir. Kaspazlar apoptozun başlamasından sorumlu olan enzim grubu ve substratları hücrede bulunan çok sayıda proteinlerdir. Kaspazların aktivasyonu sonucunda hücrede; hücrenin küçülmesi, kromatin kondansasyonu, DNA fragmentasyonu ve sonunda hücrelerin küçük parçalara ayrılması bu hücrelerin komşu

hücreler tarafından sindirilmesi olayları meydana gelir. Apoptozun terminal basamağı olan DNA fragmantasyonu iki temel olayla karşımıza çıkmaktadır. DNA ilk olarak parçalara ayrılmakta ve ardından oligonükleozomal parçaya çevrilmiştir. Çalışmamızda SK-N-AS hücre hattında kaspaz-3, kaspaz-7 ve PARP' ın kesilmiş formunda artış gözlenmiştir. Pro-kaspaz-9 anlatımında ise azalma olduğu gözlemlenmiştir. Literatürde EBR' nin nöroblastoma hücrelerinde etkisi bilinmemekle beraber, steroid hormon eksprese etmeyen kanser hücreleri ile yapılan diğer çalışmalarda DU145 prostat ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde kaspaz-3, -7, -9 ve PARP kesilimi gerçekleştiği ve görülmüştür [138, 142, 148]. Sitokrom c' nin mitokondriden salınımı Apaf-1 ve kaspaz-9 içeren, kaspaz 9'un aktive olduğu kompleksin (apoptozom) oluşumuna neden olmaktadır. Daha sonra kaspaz-9 proteolitik kesim ile aşağı yöndeki kaspaz-3 gibi diğer kaspazları kesip ve aktive etmekte ve nihayetinde hücre ölümü gerçekleşmektedir. Dolayısı ile apoptozun başlamasından sorumlu olan ana enzim grubu kaspazlardır ve substratları hücrede bulunan çok sayıdaki proteinlerdir. Kaspazların aktivasyonu sonucunda hücrede; hücrenin küçülmesi, kromatin kondansasyonu, DNA fragmantasyonu ve sonunda hücrelerin küçük parçalara ayrılması bu hücrelerin komşu hücreler tarafından sindirilmesi olayları meydana gelmektedir [121].

GSK3 $\beta$ ' nin kanser hücre tipine bağımlı olarak hem tümör teşvikedici hem de tümör engelleyici bir rolü olduğu bilinmektedir [156]. Nöroblastoma hücre çoğalması ve farklılaşmasının apoptozun indüklenmesiyle düzenlendiği bilinmektedir. Daha önce Dickey A. ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada GSK3 $\beta$ ' nin inhibisyonunun anti-apoptotik proteinler olan XIAP ve Bcl-2 anlatımını azaltarak apoptozu artırabileceği gösterilmiştir [113]. Bu çalışmada Neuro-2A nöroblastoma hücrelerinde GSK3 $\beta$  inhibisyonunun apoptozun indüklenmesi ve hücre döngüsü durdurulmasıyla hücre canlılığında azalma belirlenmiştir [113]. GSK3 $\beta$ ' nin apoptoz üzerinde çelişkili etkileri bilinmektedir; şöyle ki dış ölüm reseptörü aracılı apoptozu engellerken, mitokondriyal içsel apoptotik yolağı teşvik etmektedir [157, 158]. Petit-Paitel ve arkadaşlarının 2009

senesinde yaptıkları çalışmada fare TSM1 nöron hücrelerinde GSK3 $\beta$  aktivitesinin inhibisyonunun mitokondriyal membran potansiyeli değişiklikleri ve sonrasında kaspaz-9 ve kaspaz-3 aktivasyonunun engellenmesiyle hücre ölümünü önlediği gösterilmiştir [159]. 1998 senesinde Cooper ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise nöronal farklılaşmada kaspaz-3 bağımlı durumda model sistem olarak kullanılan PC12 hücrelerinde GSK3 $\beta$ 'nin aşırı ekspresyonunun spontan apoptozu uyardığı belirtilmiştir [160]. Kotliarova ve arkadaşlarının 2008 yılında yaptıkları çalışmada GSK3 $\beta$ 'nin inhibisyonunun onkojenik transkripsiyon faktörü c-myc' un aktivasyonuna, dolayısıyla Bax, Bim gibi pro-apoptotik faktörlerin ve tümör-nekroz-faktör ilişkili apoptoz uyarıcı ligandın (TRAIL) uyarılmasıyla apoptoz ve sonuç olarak sitotoksositeye neden olduğu belirlenmiştir [161].

Çalışmamızda SK-N-AS hücrelerine EBR uyguladığımızda GSK3 $\beta$  proteininin anlatımında azalma, fosforlanan GSK3 $\beta$  formunda ise artış gözlemlenmiştir. Bunun dışında GSK3 $\beta$ 'nin Wnt/ $\beta$ - katenin yolağı aracılığıyla hücre çoğalmasına da dahil olduğu bilinmektedir. GSK3 $\beta$  inhibisyonu defosforile ve stabil  $\beta$ -katenin' in nukleusa translokasyonuna ve transkripsiyon faktörleri ile etkileşimine, sonucunda hücre çoğalmasından sorumlu genlerin uyarılmasına neden olmaktadır. Rao ve arkadaşlarının 2005 senesinde yaptıkları çalışmada kimyasal bir GSK3 $\beta$  inhibitörü olan Lityum klorür' ün (LiCl)  $\beta$ -katenin aracılı tiroisitlerin çoğalma potansiyelini anlamlı ölçüde arttırdığı gösterilmiştir [162]. Benzer şekilde bir başka GSK3 $\beta$  inhibitörü olan 6-bromoindirubin-3'-oksim (BIO)'in artan  $\beta$ - katenin aktivitesi aracılığıyla memeli kardiyomiyositlerinde çoğalmayı teşvik ettiği gösterilmiştir [163]. Bir başka çalışmada GSK3 $\beta$ 'nin inhibisyonunun  $\beta$ -katenin aracılığıyla farklı hedef genlerin transkripsiyonel aktivasyonuna yol açtığı, bunun sonucunda nörosferlerden farklılaşan nöronların sayısında artışa yol açtığı gösterilmiştir [164]. Çalışmamızda ise SK-N-AS hücrelerine EBR uyguladıktan sonra, özellikle 10  $\mu$ M konsantrasyonda,  $\beta$ -katenin anlatımında anlamlı ölçüde azalma görülmüştür. Benzer şekilde 10  $\mu$ M EBR uyguladığımız doz

grubunda sitoplazmik  $\beta$ -katenin' in anlatımında azalma, nuklear  $\beta$ -katenin anlatımında ise anlamlı değişiklik gözlemlenmemiştir.

GSK3 $\beta$  yüksek düzeyde beyinde eksprese edilmektedir. Son yıllarda yapılan alışmalar GSK3 $\beta$ ' nin beyin önemli işlevlerine dahil olduğunu ve Alzheimer, Parkinson ve Huntington gibi nörolojik hastalıklar ve başka nörodejeneratif bozukluklarla ilişkili olduğunu ortaya çıkarmıştır [165, 166]. Literatürde epilepsi ve bipolar bozuklukların tedavisinde kullanılan valproatın *in vivo* ' da GSK3 enzimini inhibe etdiği gösterilmiştir. Bir başka GSK3 $\beta$  inhibitörü olan himenialdizinin Alzheimer hastalığında GSK3 $\beta$  tarafından hiperfosforlanan bölgelerde mikrotübül bağlanma proteini olan Tau'nun *in vivo* ' da fosforlanma durumu engellemektedir. Alsterpaulon, başka bir GSK3 $\beta$  inhibitörü *in vivo* ' da GSK3' e bağlanmak için ATP ile mücadele ederek, Alzheimer hastalığında GSK3 tarafından fosforillenen bölgelerde Tau'nun fosforlanmasını engellemektedir [167].

Alzheimer hastalığında nöronal apoptozun da önemli bir rol oynadığı ve kaspazların bu patolojik sürece dahil olduğu literatürde gösterilmiştir [168]. Kültüre edilmiş hipokampal nöronlarının A $\beta$  peptidlerine maruz kalması kaspaz-3 aktivasyonu ve apoptozla sonuçlanmıştır [169]. A $\beta$ , amiloid-öncü proteinin (APP) ardışık parçalanmasından oluşmaktadır ve kaspaz-3 APP kesilimine dahil olan baskın kaspaz olarak bilinmektedir [170]. Tau proteini de kaspaz-3 için bir substrat olarak bilinmektedir ve C-ucunda Tau'nun kesilimi, Tau hiperfosforlanmasını ve nörofibril birikimini teşvik etmektedir [171]. Ayrıca,  $\beta$ -kaynaklı kaspaz-3 aktivasyonu Alzheimer modellerinde tau proteininin anormal işlemine neden olmaktadır [172]. APP aynı zamanda *in vivo* ' da kaspaz-6 tarafından da kesile bilmekte ve APP fragmentinin N-ucu, kaspaz-6 bağımlı aksonal dejenerasyonu tetikleyen ölüm reseptörünün aktivasyonu için bir ligand olarak bilinmektedir [173]. Daha önce yapılan çalışmalarda, üçlü transgenik Alzheimer hastalığı fare modelinde anti-apoptotik Bcl-2 geninin kaspaz-9 ve kaspaz-3 aktivasyonunu engellemesiyle içsel apoptotik yolağın bloke edilmesinin

potansiyel faydası gösterilmiştir; bu koşullarda Tau'nun kaspaz kesilimi seviyesi sınırlıdır ve plakların ve düğümlerin oluşumu inhibe edilmiştir, hafıza muhafazası geliştirilmiştir [174, 175]. SK-N-AS nöroblastoma hücrelerine EBR uyguladığımızda Alzheimer ilişkili proteinlerden APP ve  $\alpha$ -synuclein anlatımında artış görülürken, A $\beta$  proteinin anlatımında azalma gözlemlenmiştir. Tau, BACE, Nörofilament proteinin anlatımında anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir.

Çalışmamızın sonraki aşamasında EBR' nin SK-N-AS hücrelerinde apoptotik süreçte reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumuna etkisinin olup olmadığını belirlemek amacıyla kontrol ve doz grubu verileri akım sitometrisinde incelenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre her iki doz grubunda kontrole kıyasla ROS oluşumu anlamlı ölçüde artmıştır. Bu sonuçlar bize EBR uygulanmış SK-N-AS hücrelerinde gerçekleşen ölümün mitokondriyal yolak aracılı apoptozla gerçekleştiğini düşündürmektedir. EBR' nin SK-N-AS hücrelerinde N-asetil sistein (NAC) ile kombine edildiği durumda, ROS oluşumu ve hücre canlılığına etkisi belirlenmiştir. Yalnız EBR uygulamasına kıyasla, EBR ve NAC'ın kombine edildiği durumda SK-N-AS hücrelerinde ROS oluşumu ve hücre canlılığı kaybının engellendiği bulunmuştur. Buradan yola çıkarak EBR'nin ROS oluşumuna neden olan bir ajan olduğu sonucuna varılmıştır. NAC, glutatyon ve ksenobiotiklerin detoksifikasyonunda önemli rol oynayan bir ajandır. Serbest radikal ve reaktif elektrofilleri detoksifiye etme yeteneğine sahiptir. Olivieri ve arkadaşlarının 2001 senesinde yaptıkları çalışmada SHSY5Y nöroblastoma hücre hattında NAC' ın hücreleri oksidatif stres ve sitotoksik-uyarıcı bileşiklerden koruduğunu, aynı zamanda Alzheimer etiyojisi için önemli olan APP işleme/A $\beta$  salınımı ve tau fosforilasyonu gibi metabolik süreçleri etkilemekte olduğu belirtilmiştir [176]. Bizim yaptığımız çalışmada da NAC' ın SK-N-AS hücreleri üzerinde herhangi bir sitotoksik etkisi görülmemekle birlikte, ilaçla birlikte uygulandığında EBR' nin sitotoksik etkisini geri çevirdiği gözlemlenmiştir.



Elde edilen tüm bu bilgiler, kanser hücrelerinde apoptotik süreçlerde EBR'nin rolü ile ilgili mevcut literatürü doğrulamaktadır. Bunun yanı sıra, SK-N-AS hücre hattında EBR uygulaması ile artan anlatım seviyesine sahip Bax ve PUMA'nın p53 ile olan ilişkisi araştırılmalıdır. Ayrıca, Bid anlatımındaki artış SK-N-AS hücrelerinde EBR'nin dış apoptotik yolağı aktive etme potansiyelini göstermekte ve gelecek çalışmalarda üzerinde durulması gereken nokta olarak göze çarpmaktadır. Bu çalışma aynı zamanda bir Alzheimer hastalığı modeli olan nöronal hücre hattında EBR'nin denemesi bakımından bir ilki oluşturmakta olup, GSK3 $\beta$ /Wnt yolağı üzerinde EBR'nin etkisinin araştırılması bakımından bir ilk olma niteliğı taşımaktadır. Son olarak bu araştırma gelecekte yapılacak olan çalışmalar için EBR'nin terapötik etkinliğı açısından ve in vivo denemelerde kullanılabilmesi açısından bir temel oluşturma niteliğı taşımaktadır.

## KAYNAKLAR

1. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2016*. CA Cancer J Clin, 2016. **66**(1): p. 7-30.
2. Siegel, R., D. Naishadham, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2013*. CA Cancer J Clin, 2013. **63**(1): p. 11-30.
3. Merlo, L.M., et al., *Cancer as an evolutionary and ecological process*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(12): p. 924-35.
4. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2005*. CA Cancer J Clin, 2005. **55**(1): p. 10-30.
5. Ferlay, J., et al., *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008*. Int J Cancer, 2010. **127**(12): p. 2893-917.
6. Vescovi, A.L., R. Galli, and B.A. Reynolds, *Brain tumour stem cells*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(6): p. 425-36.
7. Pfister, S.M., et al., *Molecular diagnostics of CNS embryonal tumors*. Acta Neuropathol, 2010. **120**(5): p. 553-66.
8. Singh, S.K., et al., *Identification of a cancer stem cell in human brain tumors*. Cancer Res, 2003. **63**(18): p. 5821-8.
9. Speleman, F., J.R. Park, and T.O. Henderson, *Neuroblastoma: A Tough Nut to Crack*. Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2016. **35**: p. e548-57.
10. van Noesel, M.M., *Neuroblastoma stage 4S: a multifocal stem-cell disease of the developing neural crest*. Lancet Oncol, 2012. **13**(3): p. 229-30.

11. Ross, R.A., et al., *Human neuroblastoma I-type cells are malignant neural crest stem cells*. Cell Growth Differ, 1995. **6**(4): p. 449-56.
12. Khazaei, S., H. Salehiniya, and A. Mohammadian-Hafshejani, *Some Facts about Cancer in the World using Registered Cancer in 2012*. Iran J Public Health, 2015. **44**(11): p. 1559-60.
13. Cheung, R., *Poor treatment outcome of neuroblastoma and other peripheral nerve cell tumors may be related to under usage of radiotherapy and socio-economic disparity: a US SEER data analysis*. Asian Pac J Cancer Prev, 2012. **13**(9): p. 4587-91.
14. Ilias, I. and K. Pacak, *Diagnosis and management of tumors of the adrenal medulla*. Horm Metab Res, 2005. **37**(12): p. 717-21.
15. Sugiura, Y., et al., *Matrix metalloproteinases-2 and -9 are expressed in human neuroblastoma: contribution of stromal cells to their production and correlation with metastasis*. Cancer Res, 1998. **58**(10): p. 2209-16.
16. Haase, G.M., C. Perez, and J.B. Atkinson, *Current aspects of biology, risk assessment, and treatment of neuroblastoma*. Semin Surg Oncol, 1999. **16**(2): p. 91-104.
17. Maris, J.M., *The biologic basis for neuroblastoma heterogeneity and risk stratification*. Curr Opin Pediatr, 2005. **17**(1): p. 7-13.
18. Brodeur, G.M., *Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(3): p. 203-16.
19. Ross, M.E., et al., *Classification of pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling*. Blood, 2003. **102**(8): p. 2951-9.
20. Schleiermacher, G., et al., *Treatment of stage 4s neuroblastoma--report of 10 years' experience of the French Society of Paediatric Oncology (SFOP)*. Br J Cancer, 2003. **89**(3): p. 470-6.

21. Hicks, M.J. and B. Mackay, *Comparison of ultrastructural features among neuroblastic tumors: maturation from neuroblastoma to ganglioneuroma*. *Ultrastruct Pathol*, 1995. **19**(4): p. 311-22.
22. Peuchmaur, M., et al., *Revision of the International Neuroblastoma Pathology Classification: confirmation of favorable and unfavorable prognostic subsets in ganglioneuroblastoma, nodular*. *Cancer*, 2003. **98**(10): p. 2274-81.
23. Shimada, H., et al., *The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system)*. *Cancer*, 1999. **86**(2): p. 364-72.
24. Brodeur, G.M., et al., *Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging and response to treatment*. *Prog Clin Biol Res*, 1994. **385**: p. 363-9.
25. Maris, J.M., *Recent advances in neuroblastoma*. *N Engl J Med*, 2010. **362**(23): p. 2202-11.
26. Brodeur, G.M., et al., *Cytogenetic features of human neuroblastomas and cell lines*. *Cancer Res*, 1981. **41**(11 Pt 1): p. 4678-86.
27. Gilbert, F., et al., *Abnormalities of chromosome 1p in human neuroblastoma tumors and cell lines*. *Cancer Genet Cytogenet*, 1982. **7**(1): p. 33-42.
28. Srivatsan, E.S., K.L. Ying, and R.C. Seeger, *Deletion of chromosome 11 and of 14q sequences in neuroblastoma*. *Genes Chromosomes Cancer*, 1993. **7**(1): p. 32-7.
29. Sawyer, J.R., et al., *Evolution of tumor chromosome abnormalities after therapy in a pediatric astrocytoma*. *Cancer Genet Cytogenet*, 1991. **53**(1): p. 119-23.
30. Look, A.T., et al., *Cellular DNA content as a predictor of response to chemotherapy in infants with unresectable neuroblastoma*. *N Engl J Med*, 1984. **311**(4): p. 231-5.

31. Dassi, E., et al., *Multi-omic profiling of MYCN-amplified neuroblastoma cell-lines*. *Genom Data*, 2015. **6**: p. 285-7.
32. Ribatti, D., *Anti-angiogenesis in neuroblastoma*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2013. **86**(3): p. 212-21.
33. Norris, M.D., et al., *Expression of the gene for multidrug-resistance-associated protein and outcome in patients with neuroblastoma*. *N Engl J Med*, 1996. **334**(4): p. 231-8.
34. Schmidt, M.L., et al., *Favorable prognosis for patients 12 to 18 months of age with stage 4 nonamplified MYCN neuroblastoma: a Children's Cancer Group Study*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(27): p. 6474-80.
35. Easton, J., et al., *Disruption of the cyclin D/cyclin-dependent kinase/INK4/retinoblastoma protein regulatory pathway in human neuroblastoma*. *Cancer Res*, 1998. **58**(12): p. 2624-32.
36. Krasnoselsky, A.L., et al., *Altered expression of cell cycle genes distinguishes aggressive neuroblastoma*. *Oncogene*, 2005. **24**(9): p. 1533-41.
37. Rader, J., et al., *Dual CDK4/CDK6 inhibition induces cell-cycle arrest and senescence in neuroblastoma*. *Clin Cancer Res*, 2013. **19**(22): p. 6173-82.
38. Molenaar, J.J., et al., *Cyclin D1 and CDK4 activity contribute to the undifferentiated phenotype in neuroblastoma*. *Cancer Res*, 2008. **68**(8): p. 2599-609.
39. Weinstein, J.L., H.M. Katzenstein, and S.L. Cohn, *Advances in the diagnosis and treatment of neuroblastoma*. *Oncologist*, 2003. **8**(3): p. 278-92.
40. Barrett, D.M. and R. Bagatell, *The Beginning of the End of Package Deal Therapy for Patients With High-Risk Neuroblastoma?* *J Clin Oncol*, 2016.
41. Applebaum, M.A., et al., *Second malignancies in patients with neuroblastoma: the effects of risk-based therapy*. *Pediatr Blood Cancer*, 2015. **62**(1): p. 128-33.

42. Guo, C., et al., *Allelic deletion at 11q23 is common in MYCN single copy neuroblastomas*. *Oncogene*, 1999. **18**(35): p. 4948-57.
43. Matthay, K.K., et al., *Phase I dose escalation of iodine-131-metaiodobenzylguanidine with myeloablative chemotherapy and autologous stem-cell transplantation in refractory neuroblastoma: a new approaches to Neuroblastoma Therapy Consortium Study*. *J Clin Oncol*, 2006. **24**(3): p. 500-6.
44. Raffaghello, L., et al., *Multiple defects of the antigen-processing machinery components in human neuroblastoma: immunotherapeutic implications*. *Oncogene*, 2005. **24**(29): p. 4634-44.
45. Kushner, B.H., et al., *Neuroblastoma in adolescents and adults: the Memorial Sloan-Kettering experience*. *Med Pediatr Oncol*, 2003. **41**(6): p. 508-15.
46. Redlinger, R.E., Jr., R.B. Mailliard, and E.M. Barksdale, Jr., *Advanced neuroblastoma impairs dendritic cell function in adoptive immunotherapy*. *J Pediatr Surg*, 2003. **38**(6): p. 857-62.
47. Murray, M.R. and A.P. Stout, *Distinctive Characteristics of the Sympathicoblastoma Cultivated in Vitro: A Method for Prompt Diagnosis*. *Am J Pathol*, 1947. **23**(3): p. 429-41.
48. McLaughlin, P.J., I.S. Zagon, and J. Skitzki, *Human neuroblastoma cell growth in tissue culture is regulated by opioid growth factor*. *Int J Oncol*, 1999. **14**(2): p. 373-80.
49. Chen, H., et al., *Anti-tumor effect of rutin on human neuroblastoma cell lines through inducing G2/M cell cycle arrest and promoting apoptosis*. *ScientificWorldJournal*, 2013. **2013**: p. 269165.
50. El-Badry, O.M., et al., *Insulin-like growth factor II-mediated proliferation of human neuroblastoma*. *J Clin Invest*, 1991. **87**(2): p. 648-57.
51. Ciccarone, V., et al., *Phenotypic diversification in human neuroblastoma cells: expression of distinct neural crest lineages*. *Cancer Res*, 1989. **49**(1): p. 219-25.

52. Ross, R.A., et al., *Differentiation-inducing agents stably convert human neuroblastoma I-type cells to neuroblastic (N) or nonneuronal (S) neural crest cells*. *Prog Clin Biol Res*, 1994. **385**: p. 253-9.
53. Joshi, S., et al., *Retinoic acid receptors and tissue-transglutaminase mediate short-term effect of retinoic acid on migration and invasion of neuroblastoma SH-SY5Y cells*. *Oncogene*, 2006. **25**(2): p. 240-7.
54. Gaetano, C., K. Matsumoto, and C.J. Thiele, *Retinoic acid negatively regulates p34cdc2 expression during human neuroblastoma differentiation*. *Cell Growth Differ*, 1991. **2**(10): p. 487-93.
55. Caron, H., et al., *Allelic loss of chromosome 1p36 in neuroblastoma is of preferential maternal origin and correlates with N-myc amplification*. *Nat Genet*, 1993. **4**(2): p. 187-90.
56. Gill, G.N. and L.D. Garren, *A cyclic-3',5'-adenosine monophosphate dependent protein kinase from the adrenal cortex: comparison with a cyclic AMP binding protein*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1970. **39**(3): p. 335-43.
57. Woodgett, J.R., *cDNA cloning and properties of glycogen synthase kinase-3*. *Methods Enzymol*, 1991. **200**: p. 564-77.
58. Hoeflich, K.P., et al., *Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation*. *Nature*, 2000. **406**(6791): p. 86-90.
59. MacAulay, K., et al., *Glycogen synthase kinase 3alpha-specific regulation of murine hepatic glycogen metabolism*. *Cell Metab*, 2007. **6**(4): p. 329-37.
60. Dajani, R., et al., *Crystal structure of glycogen synthase kinase 3 beta: structural basis for phosphate-primed substrate specificity and autoinhibition*. *Cell*, 2001. **105**(6): p. 721-32.
61. Stambolic, V. and J.R. Woodgett, *Mitogen inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta in intact cells via serine 9 phosphorylation*. *Biochem J*, 1994. **303** ( Pt 3): p. 701-4.

62. Mills, C.N., et al., *Emerging roles of glycogen synthase kinase 3 in the treatment of brain tumors*. Front Mol Neurosci, 2011. **4**: p. 47.
63. Cook, D., et al., *Wingless inactivates glycogen synthase kinase-3 via an intracellular signalling pathway which involves a protein kinase C*. EMBO J, 1996. **15**(17): p. 4526-36.
64. Manoukian, A.S. and J.R. Woodgett, *Role of glycogen synthase kinase-3 in cancer: regulation by Wnts and other signaling pathways*. Adv Cancer Res, 2002. **84**: p. 203-29.
65. Fuchs, S.Y., et al., *Oncogenic beta-catenin signaling networks in colorectal cancer*. Cell Cycle, 2005. **4**(11): p. 1522-39.
66. Hagen, T. and A. Vidal-Puig, *Characterisation of the phosphorylation of beta-catenin at the GSK-3 priming site Ser45*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **294**(2): p. 324-8.
67. MacDonald, B.T., K. Tamai, and X. He, *Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases*. Dev Cell, 2009. **17**(1): p. 9-26.
68. Doble, B.W. and J.R. Woodgett, *GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 7): p. 1175-86.
69. Bhat, R.V., et al., *Regulation and localization of tyrosine216 phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta in cellular and animal models of neuronal degeneration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(20): p. 11074-9.
70. Bijur, G.N. and R.S. Jope, *Proapoptotic stimuli induce nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3 beta*. J Biol Chem, 2001. **276**(40): p. 37436-42.
71. Dale, T.C., *Signal transduction by the Wnt family of ligands*. Biochem J, 1998. **329** ( Pt 2): p. 209-23.
72. Huelsken, J. and J. Behrens, *The Wnt signalling pathway*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 21): p. 3977-8.



73. Nusse, R., *Wnt signaling in disease and in development*. Cell Res, 2005. **15**(1): p. 28-32.
74. Asuni, A.A., et al., *GSK3alpha exhibits beta-catenin and tau directed kinase activities that are modulated by Wnt*. Eur J Neurosci, 2006. **24**(12): p. 3387-92.
75. Doble, B.W., et al., *Functional redundancy of GSK-3alpha and GSK-3beta in Wnt/beta-catenin signaling shown by using an allelic series of embryonic stem cell lines*. Dev Cell, 2007. **12**(6): p. 957-71.
76. Hoshi, M., et al., *Regulation of mitochondrial pyruvate dehydrogenase activity by tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta in brain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(7): p. 2719-23.
77. Turenne, G.A. and B.D. Price, *Glycogen synthase kinase3 beta phosphorylates serine 33 of p53 and activates p53's transcriptional activity*. BMC Cell Biol, 2001. **2**: p. 12.
78. Yamaguchi, H., et al., *Preferential labeling of Alzheimer neurofibrillary tangles with antisera for tau protein kinase (TPK) I/glycogen synthase kinase-3 beta and cyclin-dependent kinase 5, a component of TPK II*. Acta Neuropathol, 1996. **92**(3): p. 232-41.
79. Pei, J.J., et al., *Distribution of active glycogen synthase kinase 3beta (GSK-3beta) in brains staged for Alzheimer disease neurofibrillary changes*. J Neuropathol Exp Neurol, 1999. **58**(9): p. 1010-9.
80. Leroy, K., Z. Yilmaz, and J.P. Brion, *Increased level of active GSK-3beta in Alzheimer's disease and accumulation in argyrophilic grains and in neurones at different stages of neurofibrillary degeneration*. Neuropathol Appl Neurobiol, 2007. **33**(1): p. 43-55.
81. Blalock, E.M., et al., *Incipient Alzheimer's disease: microarray correlation analyses reveal major transcriptional and tumor suppressor responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(7): p. 2173-8.

82. Hye, A., et al., *Glycogen synthase kinase-3 is increased in white cells early in Alzheimer's disease*. *Neurosci Lett*, 2005. **373**(1): p. 1-4.
83. Mateo, I., et al., *Association between glycogen synthase kinase-3beta genetic polymorphism and late-onset Alzheimer's disease*. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 2006. **21**(4): p. 228-32.
84. Pei, J.J., et al., *Distribution, levels, and activity of glycogen synthase kinase-3 in the Alzheimer disease brain*. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1997. **56**(1): p. 70-8.
85. Swatton, J.E., et al., *Increased MAP kinase activity in Alzheimer's and Down syndrome but not in schizophrenia human brain*. *Eur J Neurosci*, 2004. **19**(10): p. 2711-9.
86. De Ferrari, G.V., et al., *Common genetic variation within the low-density lipoprotein receptor-related protein 6 and late-onset Alzheimer's disease*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(22): p. 9434-9.
87. Biessels, G.J., L.J. Kappelle, and G. Utrecht Diabetic Encephalopathy Study, *Increased risk of Alzheimer's disease in Type II diabetes: insulin resistance of the brain or insulin-induced amyloid pathology?* *Biochem Soc Trans*, 2005. **33**(Pt 5): p. 1041-4.
88. Hamilton, G., et al., *Candidate gene association study of insulin signaling genes and Alzheimer's disease: evidence for SOS2, PCK1, and PPARgamma as susceptibility loci*. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2007. **144B**(4): p. 508-16.
89. Reiman, E.M., et al., *GAB2 alleles modify Alzheimer's risk in APOE epsilon4 carriers*. *Neuron*, 2007. **54**(5): p. 713-20.
90. Hooper, C., R. Killick, and S. Lovestone, *The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease*. *J Neurochem*, 2008. **104**(6): p. 1433-9.
91. Cole, A.R., et al., *GSK-3 phosphorylation of the Alzheimer epitope within collapsin response mediator proteins regulates axon elongation in primary neurons*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(48): p. 50176-80.

92. Sanna, P.P., et al., *Phosphatidylinositol 3-kinase is required for the expression but not for the induction or the maintenance of long-term potentiation in the hippocampal CA1 region.* J Neurosci, 2002. **22**(9): p. 3359-65.
93. Chen, J., C.S. Park, and S.J. Tang, *Activity-dependent synaptic Wnt release regulates hippocampal long term potentiation.* J Biol Chem, 2006. **281**(17): p. 11910-6.
94. Hooper, C., et al., *Glycogen synthase kinase-3 inhibition is integral to long-term potentiation.* Eur J Neurosci, 2007. **25**(1): p. 81-6.
95. Peineau, S., et al., *LTP inhibits LTD in the hippocampus via regulation of GSK3beta.* Neuron, 2007. **53**(5): p. 703-17.
96. Hernandez, F., et al., *Spatial learning deficit in transgenic mice that conditionally over-express GSK-3beta in the brain but do not form tau filaments.* J Neurochem, 2002. **83**(6): p. 1529-33.
97. Bullock, B.P. and J.F. Habener, *Phosphorylation of the cAMP response element binding protein CREB by cAMP-dependent protein kinase A and glycogen synthase kinase-3 alters DNA-binding affinity, conformation, and increases net charge.* Biochemistry, 1998. **37**(11): p. 3795-809.
98. Koivisto, L., et al., *Glycogen synthase kinase-3 regulates cytoskeleton and translocation of Rac1 in long cellular extensions of human keratinocytes.* Exp Cell Res, 2004. **293**(1): p. 68-80.
99. Lucas, J.J., et al., *Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice.* EMBO J, 2001. **20**(1-2): p. 27-39.
100. Lesort, M., R.S. Jope, and G.V. Johnson, *Insulin transiently increases tau phosphorylation: involvement of glycogen synthase kinase-3beta and Fyn tyrosine kinase.* J Neurochem, 1999. **72**(2): p. 576-84.

101. Caricasole, A., et al., *Induction of Dickkopf-1, a negative modulator of the Wnt pathway, is associated with neuronal degeneration in Alzheimer's brain*. J Neurosci, 2004. **24**(26): p. 6021-7.
102. Takashima, A., et al., *Tau protein kinase I is essential for amyloid beta-protein-induced neurotoxicity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(16): p. 7789-93.
103. Baki, L., et al., *PSI activates PI3K thus inhibiting GSK-3 activity and tau overphosphorylation: effects of FAD mutations*. EMBO J, 2004. **23**(13): p. 2586-96.
104. Sun, X., et al., *Lithium inhibits amyloid secretion in COS7 cells transfected with amyloid precursor protein C100*. Neurosci Lett, 2002. **321**(1-2): p. 61-4.
105. Phiel, C.J., et al., *GSK-3alpha regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides*. Nature, 2003. **423**(6938): p. 435-9.
106. Takashima, A., et al., *Exposure of rat hippocampal neurons to amyloid beta peptide (25-35) induces the inactivation of phosphatidyl inositol-3 kinase and the activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 beta*. Neurosci Lett, 1996. **203**(1): p. 33-6.
107. Zhao, L., et al., *Insulin-degrading enzyme as a downstream target of insulin receptor signaling cascade: implications for Alzheimer's disease intervention*. J Neurosci, 2004. **24**(49): p. 11120-6.
108. Solano, D.C., et al., *Insulin regulates soluble amyloid precursor protein release via phosphatidyl inositol 3 kinase-dependent pathway*. FASEB J, 2000. **14**(7): p. 1015-22.
109. Dhamoon, M.S., J.M. Noble, and S. Craft, *Intranasal insulin improves cognition and modulates beta-amyloid in early AD*. Neurology, 2009. **72**(3): p. 292-3; author reply 293-4.
110. Wang, L., et al., *Suppression of androgen receptor-mediated transactivation and cell growth by the glycogen synthase kinase 3 beta in prostate cells*. J Biol Chem, 2004. **279**(31): p. 32444-52.

111. Ougolkov, A.V., et al., *Glycogen synthase kinase-3beta participates in nuclear factor kappaB-mediated gene transcription and cell survival in pancreatic cancer cells*. *Cancer Res*, 2005. **65**(6): p. 2076-81.
112. Pizarro, J.G., et al., *A molecular study of pathways involved in the inhibition of cell proliferation in neuroblastoma B65 cells by the GSK-3 inhibitors lithium and SB-415286*. *J Cell Mol Med*, 2009. **13**(9B): p. 3906-17.
113. Dickey, A., et al., *GSK-3beta inhibition promotes cell death, apoptosis, and in vivo tumor growth delay in neuroblastoma Neuro-2A cell line*. *J Neurooncol*, 2011. **104**(1): p. 145-53.
114. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. *Br J Cancer*, 1972. **26**(4): p. 239-57.
115. Ellis, H.M. and H.R. Horvitz, *Genetic control of programmed cell death in the nematode C. elegans*. *Cell*, 1986. **44**(6): p. 817-29.
116. Evan, G. and T. Littlewood, *A matter of life and cell death*. *Science*, 1998. **281**(5381): p. 1317-22.
117. Mihara, S., et al., *Effects of thyroid hormones on apoptotic cell death of human lymphocytes*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999. **84**(4): p. 1378-85.
118. Abou-Ghali, M. and J. Stiban, *Regulation of ceramide channel formation and disassembly: Insights on the initiation of apoptosis*. *Saudi J Biol Sci*, 2015. **22**(6): p. 760-72.
119. Metzstein, M.M., G.M. Stanfield, and H.R. Horvitz, *Genetics of programmed cell death in C. elegans: past, present and future*. *Trends Genet*, 1998. **14**(10): p. 410-6.
120. Eckhart, L., et al., *Identification of novel mammalian caspases reveals an important role of gene loss in shaping the human caspase repertoire*. *Mol Biol Evol*, 2008. **25**(5): p. 831-41.

121. Shalini, S., et al., *Old, new and emerging functions of caspases*. Cell Death Differ, 2015. **22**(4): p. 526-39.
122. Schultz, D.R. and W.J. Harrington, Jr., *Apoptosis: programmed cell death at a molecular level*. Semin Arthritis Rheum, 2003. **32**(6): p. 345-69.
123. Wei, M.C., et al., *tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c*. Genes Dev, 2000. **14**(16): p. 2060-71.
124. Shamas-Din, A., et al., *Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(4): p. a008714.
125. Schuler, M. and D.R. Green, *Mechanisms of p53-dependent apoptosis*. Biochem Soc Trans, 2001. **29**(Pt 6): p. 684-8.
126. Lin, C.F., et al., *Sequential caspase-2 and caspase-8 activation upstream of mitochondria during ceramide and etoposide-induced apoptosis*. J Biol Chem, 2004. **279**(39): p. 40755-61.
127. Khosravi-Far, R. and M.D. Esposito, *Death receptor signals to mitochondria*. Cancer Biol Ther, 2004. **3**(11): p. 1051-7.
128. Magnusson, C. and D.L. Vaux, *Signalling by CD95 and TNF receptors: not only life and death*. Immunol Cell Biol, 1999. **77**(1): p. 41-6.
129. Favalaro, B., et al., *Role of apoptosis in disease*. Aging (Albany NY), 2012. **4**(5): p. 330-49.
130. 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.
131. Malikova, J., et al., *Anticancer and antiproliferative activity of natural brassinosteroids*. Phytochemistry, 2008. **69**(2): p. 418-26.

132. Wang, L., et al., *Transgenic rice plants ectopically expressing AtBAK1 are semi-dwarfed and hypersensitive to 24-epibrassinolide*. J Plant Physiol, 2007. **164**(5): p. 655-64.
133. Aval'baev, A.M., M.V. Bezrukova, and F.M. Shakirova, *Effect of brassinosteroids on the hormonal balance in wheat seedlings*. Dokl Biol Sci, 2003. **391**: p. 337-9.
134. Creelman, R.A. and J.E. Mullet, *Oligosaccharins, brassinolides, and jasmonates: nontraditional regulators of plant growth, development, and gene expression*. Plant Cell, 1997. **9**(7): p. 1211-23.
135. Bajguz, A., *Metabolism of brassinosteroids in plants*. Plant Physiol Biochem, 2007. **45**(2): p. 95-107.
136. Divi, U.K., T. Rahman, and P. Krishna, *Brassinosteroid-mediated stress tolerance in Arabidopsis shows interactions with abscisic acid, ethylene and salicylic acid pathways*. BMC Plant Biol, 2010. **10**: p. 151.
137. Divi, U.K. and P. Krishna, *Brassinosteroid: a biotechnological target for enhancing crop yield and stress tolerance*. N Biotechnol, 2009. **26**(3-4): p. 131-6.
138. Steigerova, J., et al., *Mechanisms of natural brassinosteroid-induced apoptosis of prostate cancer cells*. Food Chem Toxicol, 2012. **50**(11): p. 4068-76.
139. Esposito, D., et al., *Hypoglycemic effects of brassinosteroid in diet-induced obese mice*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2012. **303**(5): p. E652-8.
140. Ali, B., et al., *24-Epibrassinolide protects against the stress generated by salinity and nickel in Brassica juncea*. Chemosphere, 2008. **72**(9): p. 1387-92.
141. Franek, F., T. Eckschlager, and L. Kohout, *On steroids, part CDXVI - 24-epibrassinolide at subnanomolar concentrations modulates growth and production characteristics of a mouse hybridoma*. Collection of Czechoslovak Chemical Communications, 2003. **68**(11): p. 2190-2200.

142. 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.
143. 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.
144. Floyd, E. and T.M. McShane, *Development and use of biomarkers in oncology drug development*. Toxicol Pathol, 2004. **32 Suppl 1**: p. 106-15.
145. Witsch, E., M. Sela, and Y. Yarden, *Roles for growth factors in cancer progression*. Physiology (Bethesda), 2010. **25**(2): p. 85-101.
146. 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.
147. 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.
148. 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. 553-64.
149. Bernard, D., et al., *Myc confers androgen-independent prostate cancer cell growth*. J Clin Invest, 2003. **112**(11): p. 1724-31.
150. Suzuki, R., et al., *Genistein potentiates the antitumor effect of 5-Fluorouracil by inducing apoptosis and autophagy in human pancreatic cancer cells*. Anticancer Res, 2014. **34**(9): p. 4685-92.
151. Finucane, D.M., et al., *Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibitable by Bcl-xL*. J Biol Chem, 1999. **274**(4): p. 2225-33.



152. Rosse, T., et al., *Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c*. *Nature*, 1998. **391**(6666): p. 496-9.
153. Zinkel, S., A. Gross, and E. Yang, *BCL2 family in DNA damage and cell cycle control*. *Cell Death Differ*, 2006. **13**(8): p. 1351-9.
154. Reed, J.C., et al., *Differential expression of bcl2 protooncogene in neuroblastoma and other human tumor cell lines of neural origin*. *Cancer Res*, 1991. **51**(24): p. 6529-38.
155. Castle, V.P., et al., *Expression of the apoptosis-suppressing protein bcl-2, in neuroblastoma is associated with unfavorable histology and N-myc amplification*. *Am J Pathol*, 1993. **143**(6): p. 1543-50.
156. Garcia-Gorostiaga, I., et al., *Glycogen synthase kinase-3 beta and tau genes interact in Parkinson's and Alzheimer's diseases*. *Ann Neurol*, 2009. **65**(6): p. 759-61; author reply 761-2.
157. Beurel, E. and R.S. Jope, *The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways*. *Prog Neurobiol*, 2006. **79**(4): p. 173-89.
158. Sun, M., et al., *XIAP associates with GSK3 and inhibits the promotion of intrinsic apoptotic signaling by GSK3*. *Cell Signal*, 2009. **21**(12): p. 1857-65.
159. Petit-Paitel, A., et al., *Involvement of cytosolic and mitochondrial GSK-3beta in mitochondrial dysfunction and neuronal cell death of MPTP/MPP-treated neurons*. *PLoS One*, 2009. **4**(5): p. e5491.
160. Pap, M. and G.M. Cooper, *Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt cell survival pathway*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(32): p. 19929-32.
161. Kotliarova, S., et al., *Glycogen synthase kinase-3 inhibition induces glioma cell death through c-MYC, nuclear factor-kappaB, and glucose regulation*. *Cancer Res*, 2008. **68**(16): p. 6643-51.

162. Rao, A.S., et al., *Lithium stimulates proliferation in cultured thyrocytes by activating Wnt/beta-catenin signalling*. Eur J Endocrinol, 2005. **153**(6): p. 929-38.
163. Tseng, A.S., F.B. Engel, and M.T. Keating, *The GSK-3 inhibitor BIO promotes proliferation in mammalian cardiomyocytes*. Chem Biol, 2006. **13**(9): p. 957-63.
164. Maurer, M.H., et al., *Glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) regulates differentiation and proliferation in neural stem cells from the rat subventricular zone*. J Proteome Res, 2007. **6**(3): p. 1198-208.
165. Grimes, C.A. and R.S. Jope, *The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling*. Prog Neurobiol, 2001. **65**(4): p. 391-426.
166. Jope, R.S. and M.S. Roh, *Glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in psychiatric diseases and therapeutic interventions*. Curr Drug Targets, 2006. **7**(11): p. 1421-34.
167. Martinez, A., et al., *Glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) inhibitors as new promising drugs for diabetes, neurodegeneration, cancer, and inflammation*. Med Res Rev, 2002. **22**(4): p. 373-84.
168. Rohn, T.T., *The role of caspases in Alzheimer's disease; potential novel therapeutic opportunities*. Apoptosis, 2010. **15**(11): p. 1403-9.
169. Gervais, F.G., et al., *Involvement of caspases in proteolytic cleavage of Alzheimer's amyloid-beta precursor protein and amyloidogenic A beta peptide formation*. Cell, 1999. **97**(3): p. 395-406.
170. Shang, Y.C., et al., *Prevention of beta-amyloid degeneration of microglia by erythropoietin depends on Wnt1, the PI 3-K/mTOR pathway, Bad, and Bcl-xL*. Aging (Albany NY), 2012. **4**(3): p. 187-201.
171. Noble, W., et al., *Minocycline reduces the development of abnormal tau species in models of Alzheimer's disease*. FASEB J, 2009. **23**(3): p. 739-50.

172. Banwait, S., et al., *C-terminal cleavage of the amyloid-beta protein precursor at Asp664: a switch associated with Alzheimer's disease*. J Alzheimers Dis, 2008. **13**(1): p. 1-16.
173. Nikolaev, A., et al., *APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases*. Nature, 2009. **457**(7232): p. 981-9.
174. Rohn, T.T., et al., *Lack of pathology in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease after overexpression of the anti-apoptotic protein Bcl-2*. J Neurosci, 2008. **28**(12): p. 3051-9.
175. Corona, C., et al., *New therapeutic targets in Alzheimer's disease: brain deregulation of calcium and zinc*. Cell Death Dis, 2011. **2**: p. e176.
176. Olivieri, G., et al., *N-acetyl-L-cysteine protects SHSY5Y neuroblastoma cells from oxidative stress and cell cytotoxicity: effects on beta-amyloid secretion and tau phosphorylation*. J Neurochem, 2001. **76**(1): p. 224-33.

## EKLER

Tablo 2. Kullanılan cihazların listesi

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
Buzdolabı ( No frost )	4263TMB	Arçelik
Derin Dondurucu	2041D	Arçelik
Dikey akışlı güvenlik kabini	Model:	HeraSafe
Distile Su Cihazı	D56412	TKA-Pacific
Dondurucu (-80°C)	U725 innova	New Brunswick
Elektroforez sistemi	165-8000	Bio-Rad
Elektroforez transfer sistemi	170-4155	Bio-Rad
Floresan ataçmanlı invert	Model: 1X71	Olympus
Fluorometre	Fluoroskan	Thermo Labsystems
Güç Kaynağı	PowerPac/Basic	BioRad
Hassas Tartı	LE6202S	Sartorius
Hemositometre	Z359629	Sigma Aldrich
Santrifüj (Büyük)	5810R	Eppendorf
Invert Mikroskop	XDS-1B	SOIF
İnkübatör	EN 025	Nüve
Spin mini spin	SN0708	LabNet
Kar-buz makinası	AF80	Scotsman
Manyetik Karıştırıcı	SB162	Stuart/ProLab
Masaüstü soğutmalı santrifüj	5417R	Eppendorf
Mikropipet (0,5µl-10µl)	EH52836	Thermo Scientific
Mikropipet (2µl-20µl)	CJ17240	Thermo Scientific
Mikropipet (20µl-200µl)	EH46925	Thermo Scientific
Mikropipet (200µl-1000µl)	T27274	Thermo Scientific
Mikroplaka okuyucu,	680	Bio-Rad
Otoklav	OTO32	Nüve
pH Metre	N315	SEM/Mettler Toledo

<b>PVDF Membran</b>	88518	Thermo Scientific
<b>Sıvı azot tankı ve ikmal tankı</b>	Arpege 40	Air Liquid
<b>Spektrofotometre</b>	Ultraspec 2100	Biosciences
<b>Tartı</b>	LE6202S	Sartorius
<b>Tüp rotasyon aleti</b>	SRT9D	Stuart
<b>Vorteks</b>	SA8	Stuart/ProLab
<b>X-ray Film</b>	34090	Thermo Scientific

**Tablo 3.** Hücre kültürü donanımları.

<b>ADI</b>	<b>ÜRÜN KODU</b>	<b>FİRMA ADI</b>
<b>100 mm petri</b>	93060	TPP
<b>12 kuyucuklu petri</b>	92012	TPP
<b>25cm<sup>2</sup> hücre büyütme kapları</b>	93100	TPP
<b>6 kuyucuklu petri</b>	92006	TPP
<b>60 mm petri</b>	94005	TPP
<b>75cm<sup>2</sup> hücre büyütme kapları</b>	90026	TPP
<b>96 kuyucuklu petri</b>	90076	TPP
<b>SK-N-AS hücre hattı</b>	CRL-2137	ATCC
<b>Fetal Bovine Serum</b>	P291509	Pan Biotech
<b>Kriyovial tüp</b>	V7634	NUNC
<b>Etüv</b>	Heracell 1150	Thermo
<b>Penisilin/Streptomisin</b>	P06-07100	Pan Biotech
<b>DMEM besiyeri</b>	D5546	GIBCO
<b>Steril pipetler (10ml)</b>	94010	TPP
<b>Steril pipetler (5ml)</b>	94005	TPP
<b>Şırınga filtreleri (0.22 µm)</b>	99722	TPP
<b>Tripsin-EDTA</b>	P10-0231	Pan Biotech

**Tablo 4.** Kullanılan kimyasalların listesi.

<b>ADI</b>	<b>ÜRÜN KODU</b>	<b>FİRMA ADI</b>
<b>10X PBS</b>	P04-53500	Pan Biotech
<b>2-merkaptoetanol</b>	S4805940517	Merck
<b>Akrilamid / Bis-Akrilamid 30%</b>	A3699	Sigma Aldrich
<b>Amonyum persülfat</b>	A3678	Sigma Aldrich
<b>Anti-apoptotik Bcl-2 ailesi antikorları</b>	99412	Cell Signaling Technology
<b>Apoptoz antikorları</b>	9915	Cell Signaling Technology
<b>Coomassie Blue Belirteci</b>	500-0006	Bio-Rad
<b>DAPI</b>	D1306	Invitrogen
<b>DCFH-DA</b>	C6827	Invitrogen
<b>DiOC6 Boya</b>	2129966	Fluka
<b>DMSO</b>	D5879	Sigma Aldrich
<b>EDTA</b>	A3452	Sigma Aldrich
<b>Epibrassinolide</b>	E1641	Sigma Aldrich
<b>Etanol</b>	A3452	Sigma Aldrich
<b>Fetal Bovine Serum (FBS)</b>	P290310	Pan Biotech
<b>Hidrojen peroksit</b>	K39218400838	MERCK
<b>Hücre döngüsü antikorları</b>	9932	Cell Signaling Technology
<b>İzopropanol</b>	24137	Rieel-de Haen
<b>Kazpaz antikorları</b>	9929	Cell Signaling Technology
<b>Laemli Tamponu</b>	S3401	Sigma Aldrich
<b>Luminol</b>	A8511	Sigma Aldrich
<b>Metanol</b>	24229	Sigma Aldrich
<b>MTT</b>	M2003	SIGMA
<b>Page Ruller Prestained Protein</b>	SM0671	Fermentas
<b>Pro-apoptotik Bcl-2 ailesi antikorları</b>	9942	Cell Signaling Technology
<b>Propidium Iodide</b>	A2261	Appllichem

<b>Protein İzolasyonu Tamponu</b>	K0301	Fermentas
<b>Saf Etanol</b>	32221	Rieel-de Haen
<b>SDS (Sodyum dedosil sülfat)</b>	A3452	Applichem
<b>Sığır Serum Albumin (BSA)</b>	500-0007	BioRad
<b>Sodyum Klorür</b>	A2942	AppliChem
<b>TEMED</b>	A1148	Applichem
<b>Trikloroasetik asit</b>	T0699	Sigma Aldrich
<b>Tris Baz</b>	A2264	Applichem
<b>Tris-HCl</b>	A3452	Applichem
<b>Tween 20</b>	S4927784 802	MERCK
<b>Yağsız Süt Tozu</b>	9999	Cell Signaling Technology
<b>Yükleme standart antikorları</b>	5142	Cell Signaling Technology

**Tablo 5.** Kullanılan moleküler biyoloji kitleri.

<b>ADI</b>	<b>ÜRÜN KODU</b>	<b>FİRMA ADI</b>
<b>Annexin V-PI kiti</b>	BV-K101-3	MBL International
<b>Sitoplazmik nuklear protein izolasyon kiti</b>	K0311	Fermentas