

TC. İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SW480 VE DLD-1 KOLON KANSERİ HÜCRE HATLARINDA
EPIBRASSİNOLİDE İLE TETİKLENEN APOPTOZUN MOLEKÜLER
HEDEFLERİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Esin GÜVENİR

1209411002

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Programı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Narçin PALAVAN ÜNSAL

NİSAN 2015

TC. İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SW480 VE DLD-1 KOLON KANSERİ HÜCRE HATLARINDA
EPIBRASSİNOLİDE İLE TETİKLENEN APOPTOZUN MOLEKÜLER
HEDEFLERİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Esin GÜVENİR

1209411002

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 27.03.2015

Tezin Savunulduğu Tarih: 14.05.2015

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Narçin PALAVAN ÜNSAL

Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Şehnaz BOLKENT

Doç. Dr. Elif Damla ARISAN

NİSAN 2015

ÖNSÖZ

İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde yapmış olduğum yüksek lisans tezimin planlanması ve gerçekleştirilmesinde bilgi ve tecrübesiyle yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım, çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Narçın PALAVAN ÜNSAL başta olmak üzere, tez çalışmamın planlanması ve yürütülmesinde emeği geçen çok değerli hocam sayın Doç. Dr. Elif Damla ARISAN' a, laboratuvar çalışmalarımı sürdürdüğüm süre içinde gerek bilimsel anlamda gerekse laboratuvar imkanları açısından yardım ve desteklerini esirgemeyerek bana katkı sağlayan çok değerli hocalarım Doç. Dr. Ajda Çoker GÜRKAN' a ve Yrd. Doç. Dr. Pınar OBAKAN' a ve bütün bölüm hocalarıma, bu çalışmayı yürütürken deneysel aşamaları planlar ve yürütürken bilgi ve deneyimlerini paylaşan arkadaşlarım Biyolog Deniz COŞKUN' a, Biyolog Özge BERRAK' a, Çağrı GÜMÜŞKAPTAN' a ve Onur IRMAK' a, bu çalışmanın yürütülmesinde emeği geçen ve yardımlarını esirgemeyen lisans öğrencilerinden sayın Gülnihal BOZDAĞ, Didem BARAN, Kaan ADAMAN ve tüm İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK LABORATUVARI AİLESİNE, bu sürecin devam etmesi konusunda anlayış gösteren Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü' ndeki tüm öğretim üyelerine, iyi kötü her anlamda yanımda olan ve benden desteklerini esirgemeyen aileme, çalışmalarım boyunca sabırla yanımda olan Önder ÇELİK' e en içten saygılarımı ve sevgilerimi sunar ve teşekkürü bir borç bilirim.

27/03/2015

Esin GÜVENİR

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
KISALTMALAR.....	v
TABLO LİSTESİ.....	viii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
SEMBOL LİSTESİ.....	xi
ÖZET	xii
SUMMARY	xiii
1.GİRİŞ	14
2.GENEL BİLGİLER	18
2.1 Kanser	18
2.2 Kolon Kanseri	18
2.2.1 Kolon’ da Anormal Büyüme	20
2.2.2 Kolon Kanserinin Başlaması ve Yayılması	20
2.2.3 Kolon Kanseri Epidemiyolojisi	21
2.2.4 Kolon Kanseri Etiyolojisi	22
2.2.5 Kolorektal Kanserinin Moleküler Biyolojisi	25
2.3 Apoptoz.....	27
2.3.1 Kaspazlar	29
2.3.2 Apoptozun Moleküler Mekanizması	29
2.3.2.1 Ekstrinsik Yolak: Hücre Yüzey Reseptörleri Aracılığı ile Tetiklenen Apoptoz.....	30
2.3.2.2 Mitokondri/Sitokrom C Aracılı İntrensik yolak	31
2.4 Hücre Sağkalım Sinyal Yolakları.....	34
2.4.1 Protein Kinazlar ve Sinyal İletimindeki Rollerini	34

2.4.2 MAPK Yolağı.....	35
2.4.2 PI3K/ AKT Yolağı.....	38
2.5. Brassinosteroidler	39
2.5.1. Brassinosteroidlerin Çeşitleri.....	40
2.5.2 Brassinosteroidlerin Biyosentezi	40
3.1 KULLANILAN MALZEMELER.....	44
3.1.1 Kullanılan Cihazlar	44
3.1.2 Hücre Kültürü Donanımları.....	44
3.1.3 Kullanılan Kimyasallar.....	44
3.1.4 Kullanılan Tamponlar	44
3.2 YÖNTEMLER	45
3.2.1 Hücre Kültürü	45
3.2.2 Hücre Canlılığının Belirlenmesi	46
3.2.3 Hücre Sağkalım Tayini.....	47
3.2.4 Soft-Agar Koloni Oluşum Testi.....	47
3.2.5 Metastatik Etkinin Belirlenmesinde Kullanılan Parametreler	48
3.2.6 Apoptotik Hücre Ölüminün Belirlenmesi.....	49
3.2.7 Total Protein İzolasyonu	50
3.2.8 Bradford Protein Miktar Tayini	50
3.2.9 İmmunoblotlama Yöntemi.....	51
3.2.9 İstatiksel Analiz	52
4. BULGULAR	53
4.1 Epibrassinolid' in SW480 ve DLD-1 Kolon Kanseri Hücre Hatlarında Hücre Canlılığına Etkisi.....	53
4.2 Epibrassinolid' in SW480 ve DLD-1 Kolon Kanseri Hücre Hatlarında Hücre Sağkalımına Etkisi.....	55
4.3 Epibrassinolid' in SW480 ve DLD-1 Kolon Kanseri Hücre Hatlarında Metastaz Üzerindeki Etkisi.....	56
4.4 Epibrassinolid' in Mitokondriden Türevlenen Apoptotik Yolak Üzerine Etkisinin Modellenmesi.....	60
4.4.1 Epibrassinolid' in SW480 ve DLD-1 Kolon Kanseri Hücrelerinde Hücre Ölümlü Üzerine Etkisinin Belirlenmesi.....	60
4.4.2 Epibrassinolid' in SW480 ve DLD-1 Kolon Kanseri Hücrelerinde DNA Kırıkları Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi	61

4.4.3 Epibrassinolid' in SW480 ve DLD-1 Kolon Kanseri Hücrelerinde Mitokondri Membran Potansiyeli ve Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi.....	62
4.5 Epibrassinolid' in SW480 ve DLD-1 Kolon Kanseri Hücre Hatlarında Apoptoz Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi.....	65
4.6 Epibrassinolid' in SW480 ve DLD-1 Kolon Kanseri Hücre Hatlarında Hücre Sağkalım Yolakları Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi	68
5. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	73
6. REFERANSLAR	87
EKLER	93
ÖZGEÇMİŞ.....	96

KISALTMALAR

AAPC:	<i>Attenuated Adenomatous Polyposis Coli</i>
AO:	Acridine Orange (3-N,3-N,6-N,6-N-Tetramethylacridine-3,6-diamine)
APC:	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
APS:	Amonyum Persulfat
AR:	Androjen Reseptör
Bcl-2:	B-hücre Lenfoma 2
BR:	Brassinolid
BSA:	Sığır Serum Albumin
CDK:	Sikline Bağımlı Kinaz
CTL:	Sitotoksik T Lenfositler
DAPI:	4',6-diamidino-2-phenylindole
DCC:	Kolorektal Kanserlerde Silinen Bölge
Dioc ₆ :	3,3'-diheksiloksakarbosiyenin iyodür
DMSO:	Dimetilsülfoksit
EBR:	Epibrassinolid
EDTA:	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
ER:	Östrojen Reseptör
ER- α :	Östrojen Reseptör α
ER- β :	Östrojen Reseptör β
ERK:	Ekstrasellüler Sinyal-Düzenleyen Kinaz

FAK:	Fokal Adhezyon Kinaz
FAP:	Ailesel Adenomatous Polyposis
FCS:	Fetal Sığır Serumumu
GDP:	Guanizin difosfat
Grb2 :	Büyüme Faktörü Reseptörüne Bağlanan Protein 2
GTP:	Guanozin Trifosfat
HNPCC:	Kalitsal Nonpolipozis Kolorektal Kanser
IAP:	Apoptoz Protein İnhibitörü
ICE:	İnterlökin-1-Beta Dönüştürücü Enzim
JAK:	Janus Kinaz Ailesi
JNK:	c-Jun NH2- Terminal Kinaz
Kaspaz:	Sistein Aspartat Spesifik Proteaz
kDa:	Kilo Dalton
KU:	Kolitis Ülseroza
KR:	Kolorektal
K-Ras:	Kirstein Rat Sarkoma
KRK:	Kolorektal Karsinom
MAPK:	Mitojenin-Aktive Ettiği Protein Kinaz
MAPKK:	MAP kinaz kinaz
MAPKKK:	MAP kinaz kinaz kinaz
MMP:	Mitokondri Membran Potansiyeli
MMR:	Yanlış Eşleşmeyi Onaran Genler
MSI:	Mikrosatellit Kararsızlığı
MTT:	Metiltiazol Difeniltetrazolyum Bromür

NHR:	Nükleer Hormon Reseptör
P53:	Tümör Protein 53
PARP:	Poli ADP Riboz Polimeraz
PBS:	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PDK:	PIP ₃ Bağımlı Kinazlar
PDK1:	Pirüvat Dehidrogenaz Lipoamid Kinaz İzozim 1
PDK2:	Pirüvat Dehidrogenaz Kinaz İzozim 2
PI:	Propidyum İyodür
PI3K:	Fosfotidilinositol 3- Kinaz
PIP ₃ :	Fosfotidilinositol 3,4,5- Trifosfat
PKB:	Protein Kinaz B
PTEN:	Tümör Baskılayıcı Protein Olan Fosfataz ve Tensin homolog
PVDF:	Poliviniliden Florür
RPTK:	Reseptör Protein Tirozin Kinaz
RTK:	Reseptör Tirozin Kinazlar
SDS:	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE:	Sodyum Dodesil Sülfat- Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi
Sos:	Son of Sevenless
TEMED:	Tetrametiletildiamin
TNF:	Tümör Nekroz Faktörü
XIAP:	X Kromozomu Bağlantılı Apoptoz İnhibitörü

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. Kolorektal karsinom gelişiminde rol oynayan risk faktörleri [28]	23
Tablo 2.2. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri [49].....	32
Tablo4.1. EBR' nin SW480 ve DLD-1 kolon kanseri hücrelerindeki yara kapanmasına ait sayısal değerler.....	61
Tablo 1. Kullanılan cihazların listesi	91
Tablo 2. Hücre Kültürü Donanımları.....	92
Tablo 3. Kullanılan Kimyasalların Listesi	92
Tablo 4. %12' lik SDS-PAGE Jel İçeriği.....	93

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2. 1. Kolon anatomisi [23].....	19
Şekil 2. 2. Kolon kanseri gelişimi [26]	21
Şekil 2. 3. GLOBOCAN 2012 verilerine göre kolon kanserinin dünya çapında görülme sıklığı (Dünya sağlık örgütü, GLOBOCAN 2012 kanser istatistikleri)	22
Şekil 2. 4. Normal kolon epitelinden kolon kanserine dönüşüm sürecinde çok sayıda genetik mutasyonun birikimi [2]	26
Şekil 2. 5. Apoptoz sırasında meydana gelen morfolojik değişikliklerin elektron mikroskop görüntüsü	29
Şekil 2. 6. Ekstrinsik ve intrinsik apoptoz yolları [29].....	30
Şekil 2. 7. Bcl-2 ailesi üyelerinin domain yapısı [52]	32
Şekil 2. 8. MAPK sinyal patogenezi [56]	37
Şekil 2. 9. PI3K/AKT sinyal yolağının şematize edilmesi [58]	39
Şekil 2. 10. Brassinosteroidlerin Biyosentez Mekanizması [62].....	41
Şekil 4. 1. EBR' nin SW480 ve DLD-1 kolon kanseri hücre hatlarında konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığına etkisi	53
Şekil 4. 2. EBR' nin SW480 ve DLD-1 kolon kanseri hücre hatlarında zamana bağlı olarak hücre canlılığına etkisi.....	54
Şekil 4. 3. EBR' nin SW480 ve DLD-1 kolon kanseri hücre hatlarında hücre sağkalımına etkisi	55
Şekil 4. 4. Hücrelerin yüzeye yapışmasının engellendiği ortamda hücrelerin büyüebilme yeteneğinin ölçülmesi	56
Şekil 4. 5. EBR' nin SW480 ve DLD-1 Kolon Kanseri Hücre Hatlarının Metastazı Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi.....	57
Şekil 4. 6. EBR' nin SW480 ve DLD-1 kolon kanseri hücrelerinde lateral hücre hareketi üzerindeki etkilerinin belirlenmesi. A: SW480 hücrelerinde EBR' nin yara kapanmasına ait ışık mikroskobu görüntüleri	58

Şekil 4. 7. EBR tarafından tetiklenen hücre ölümünün SW480 ve DLD-1 kolon kanseri hücrelerinde belirlenmesi.....	61
Şekil 4. 8. EBR tarafından tetiklenen DNA kırıklarının SW480 ve DLD-1 kolon kanseri hücrelerinde belirlenmesi.....	62
Şekil 4. 9. EBR' nin SW480 ve DLD-1 kolon kanseri hücrelerinde mitokondri membran potansiyeli ve hücre canlılığı üzerindeki etkisinin belirlenmesi.....	64
Şekil 4. 10. EBR uygulaması sonucundaki apoptotik değişimlerin SW480 ve DLD-1 kolon kanseri hücre hatlarında incelenmesi	66
Şekil 4. 11. Apoptotik hücre ölüm yolağının tetiklenmesinde önemli bir rolü olan pro- ve anti- apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinde EBR uygulaması sonucundaki değişimlerinin incelenmesi.....	68
Şekil 4. 12. EBR' nin MAPK sinyal yolağı üzerine etkilerinin immunoblotlama yöntemi ile zamana bağlı olarak SW480 ve DLD-1 kolon kanseri hücre hatlarında incelenmesi.....	70
Şekil 4. 13. EBR' nin PI3K/AKT hücre sağkalım sinyal yolağı üzerine etkisinin immunoblotlama yöntemi ile zamana bağlı olarak SW480 ve DLD-1 kolon kanseri hücre hatlarında incelenmesi.	72
Şekil 5. 1. EBR' nin SW480 hücrelerinde potansiyel etki mekanizması.	84
Şekil 5. 2. EBR' nin DLD-1 hücrelerinde potansiyel etki mekanizması.	85

SEMBOL LİSTESİ

mm	:	Milimetre
ml	:	Mililitre
μ l	:	Mikrolitre
μ g	:	Mikrogram
μ mol	:	Mikromol
ng	:	Nanogram
%	:	Yüzde
μ M	:	Mikromolar
mM	:	Milimolar
mg	:	Miligram
g	:	Gram
nm	:	Nanometre
$^{\circ}$ C	:	Santigrat derece
M	:	Molar
kDa	:	Kilo dalton
n	:	Örnek sayısı
cm^3	:	Santimetre küp
dk	:	Dakika
sn	:	Saniye

ÖZET

Kanser, hücre büyümesi ve farklılaşması ile ilgili mekanizmaların kontrol edilmesi gibi biyolojik olayları etkileyen mutasyonların birikmesi sonucunda meydana gelmektedir. Tümör hücreleri sınırsız çoğalabilme ve apoptozdan kaçma gibi birçok özellik kazanırlar. Brassinosteroidler (BR) düşük moleküler ağırlığa sahip steroid kökenli içeriklerdir. BR bitki büyümesini ve gelişimini düzenler ve hayvan steroid hormonlarının yapısına benzerlik gösterirler. Çeşitli ilaçlarla hücre bölünmesinin durdurulması, apoptozun uyarılması gibi önemli yaklaşımlar kanserin tedavisinde potansiyel ilaç olarak kullanılabilceğini düşündürmektedir. Epibrassinolid (EBR), BR ailesinin bir üyesidir. Çeşitli hücre hatlarında EBR ile yapılan çalışmalarda, EBR' nin mitokondriyal membran potansiyelini arttırdığı, hücre içi antikor seviyesini azalttığı, hücre döngü mekanizması ile etkileşimde bulunarak büyümeyi engellediği ve hücre ölümü olan apoptozu uyardığı gösterilmiştir. Bu çalışmada SW480 (ER- β pozitif, Arg²⁷³His' te p53 mutant) ve DLD-1 (ER- β negatif, Ser²⁴¹Phe' te p53 mutant) kolon kanseri hücre hatlarında EBR' nin antikanser ve antiproliferatif etkileri incelenmeye çalışılmıştır. Bu nedenle öncelikle hücrelerde EBR' nin programlı hücre ölümü olan apoptoz üzerinde etkileri incelenmiştir. Daha sonraki aşamalarda EBR' nin tetiklediği apoptozun MAPK ve PI3K/AKT hücre sağkalım yolları ile ilişkisi moleküler düzeyde incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, SW480 ve DLD-1 hücre hatlarında EBR' nin hücre sağkalımı üzerinde farklı şekilde cevap oluşturduğunu göstermektedir. EBR' nin SW480 hücrelerinde PI3K ve AKT ifadesini engelleyerek PI3K/AKT hücre sağkalım sinyal yolağını inhibe ettiği, SAPK/JNK ve p38 aktivasyonu sağlayıp ERK1/2 ifadesini engelleyerek MAPK hücre sağkalım yolağını inhibe ederek hücre çoğalmasını baskıladığı ve kaspaz bağımlı apoptozu uyardığı belirlenmiştir. Fakat DLD-1 hücrelerinin MAPK ve PI3K/AKT hücre sağkalım sinyal yollarının aktive olduğu ve buna bağlı olarak hücre çoğalmasını inhibe edemediği ve EBR' ye karşı direnç gösterdiği belirlenmiştir.

SUMMARY

Cancer occurs due to the accumulation of mutations that affect the biological events such as cell growth and differentiation. Tumor cells gain unlimited ability to proliferate as well as escape from apoptosis. Brassinosteroids (BR) have low molecular weight and they are steroid based molecules. BR leads to regulate the plant growth and development and they have similarity to animal steroid hormones. Some approaches suggest to use some drugs that can prevent the cell division and induce apoptosis. These strategies can be promising in order to cope with cancer. Epibrassinolid (EBR) is a member of BR family. It has been shown that EBR increased the mitochondrial membrane potential, decreased the intracellular antibody levels, prevented the cell growth and induce apoptosis via interacting with cell cycle mechanism. In this study, the anticancer effects of EBR were examined in SW480 (ER- β positive, Arg²⁷³His p53 mutant) and DLD-1 (ER- β negative, Ser²⁴¹Phe p53 mutant) colon cancer cell lines. Therefore, particularly, the impacts of EBR on apoptosis mechanism (known as programmed cell death) have been studied. Later on, the relationship between the apoptosis and the MAPK and PI3K/AKT survival pathways was examined. According to the results, EBR had different effects on cell survival in SW480 and DLD-1 cell lines. EBR inhibited the cell proliferation of SW480 cells via preventing PI3K and AKT expressions and PI3K/AKT cell survival signaling pathway. Furthermore, cell proliferation was inhibited by EBR by preventing MAPK cell survival pathway, ERK1/2 expression as well as activating the SAPK/JNK and p38 pathways. Besides, EBR induced the caspase dependent apoptosis in SW480 cells. On the other hand, EBR could not inhibit the cell proliferation DLD-1 cells due to the activation of MAPK and PI3K/AKT cell survival pathways. It has been indicated in this research that DLD-1 cells showed resistance to EBR.

1.GİRİŞ

Kolorektal kanser, dünyada görülen kanserler arasında üçüncü sırada yer almaktadır. Kolorektal kanserlerin kalıtsal formlarında bireyler mutant genleri ile doğarlar ve bu mutasyonlara germ-line mutasyon adı verilmektedir. Ailesel adenomatöz polipozis (FAP) ve kalıtsal nonpolipozis kolorektal kanser (HNPCC), en çok bilinen kalıtsal kolorektal kanser tiplerindedir. Bazen genlerde oluşan mutasyon, çevresel faktörlerin etkisiyle doğumdan sonra gelişmektedir ve bu mutasyonlara somatik mutasyon adı verilmektedir bu mutasyonların sonucunda sporadik olarak tanımlanan kanserler ortaya çıkmaktadır. Kolorektal kanserlerin çoğunluğu, somatik mutasyonlar sonucu gelişen adenokarsinomlardan kaynaklanmaktadır. FAP, HNPCC gibi kalıtsal kolorektal kanserli kişiler bir allellerinde genetik mutasyonla (first hit) doğduklarından, daha sonraki zamanlarda diğer normal allelde somatik mutasyonun (second hit) gelişmesi, tümör gelişimini başlatmak için yeterli olmaktadır ve bu nedenle bu kişilerde adeno-karsinom dizisi daha kısa sürede tamamlanmaktadır [1]. Proto-onkogenlerin aktivasyonu, tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ve yanlış eşleşmeyi onaran genler (MMR) gibi DNA onarımıyla ilgili genlerdeki bozukluklar kolorektal kanser gelişiminde rol oynayan genetik değişikliklerdir. Bununla birlikte tek bir gende meydana gelen mutasyonlardan herhangi birinin ortaya çıkması, kanser oluşumu için tek başına yeterli değildir. Kanser gelişimi için, birden fazla gende ve çok sayıda mutasyonun zaman içerisinde birikmesi gerekmektedir [2]. Kolorektal kanserlerde *K-ras*, *N-ras*, *H-ras* gibi Ras onkogeninde [3] ve Adenomatous Polyposis Coli (APC) gibi tümör baskılayıcı genlerde [4] mutasyon görülmektedir. Kanser hücreleri zamanla mutasyonların birikmesi sonucunda sınırsız bölünebilme, apoptozdan kaçma, metastaz gibi özellikler kazanırlar [5]. Yapılan çalışmalarda büyüme faktörleri ve büyüme reseptörleri, transkripsiyon faktörleri, mitojenik aktivite gibi önemli hücresel sinyal iletim basamaklarında oluşan bozuklukların kanser oluşumunda ve ilerlemesinde önemli bir role sahip olduğu görülmüştür [6].

Programlı hücre ölümü ya da apoptoz çok hücreli canlılarda normal gelişim sırasında gerçekleşen olaydır. Tümörlü bir hücre, pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin dengesinin bozulması, kaspaz aktivitesini azalması ve ölüm reseptör sinyallerinin bozulması sonucunda apoptoz oluşumunu inhibe etmektedir [7].

Hücrenin sağkalımını ve büyümenin kontrolü gibi biyolojik olaylar üzerinde etkisi olan mutasyonların birikimi karsinogenezin temelini oluşturmaktadır. Protoonkogenler ve tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen mutasyonlar farklı mekanizmalar ile tümör oluşumuna yol açarlar. Kanser hücrelerinde, sinyal iletim yollarını ve sinyal proteinlerini hedef alan onkogenik mutasyonlar görülmektedir. Sinyal iletiminde meydana gelen değişiklikler çoğalma ve sağkalım kontrolünün kaybına sebep olur. Onkogenik sinyal iletiminin tümör gelişimi ve invazyon/metastaz sürecinde önemli bir etkisinin olduğu bilinmektedir [8].

Protein kinazlar, sinyal iletiminde protein fosforilasyonunda/aktivasyonunda görev alırlar, reseptör tirozin kinazlar ve sitoplazmik tirozin kinazlar olmak üzere iki ana gruba ayrılırlar [9]. Reseptör tirozin kinazlar (RTK), membranda yerleşik olarak bulunurlar ve bu reseptörler büyüme faktörleri ile bağlandıklarında aktifleşirler ve sitoplazmadaki hedef proteinlerle etkileşime girerek sinyal iletimini gerçekleştirirler. Karsinogenez sürecinde sürekli ve kontrolsüz RTK aktivitesi görülmektedir. Src, Ab1, fokal adhezyon kinaz (FAK) ve Janus kinaz ailesi (JAK) gibi proteinler sitoplazmik protein kinazlara örnek olarak verilebilir [10]. Protein kinazlar dinlenme halindeki hücrelerde sitoplazmada inaktif halde bulunurlar. Büyüme faktörleri veya sitokinler tarafından uyarıldıklarında aktif hale gelerek sitoplazmadaki veya nükleustaki hedeflerine yönelirler. Sitoplazmik tirozin kinazların sürekli aktivasyonu ve onkojenik sinyal iletimi, transformasyon, tümör büyümesi, motilite ve invazyon artışı ile anjiyogenez gibi hücresel olaylarını hızlandırmaktadır [11].

MAPK sinyal yolağı gen ifadesini, mitoz bölünmeyi, hücre çoğalmasını, hücre hareketini, metabolizmasını ve programlı hücre ölümünü düzenlemektedir [12]. Bu sinyal iletim yolu Ras aktivasyonu ile başlar ve sırasıyla Raf (MAPKKK), MEK

(MAPKK) ve Erk (MAPK) kaskadı ile ilerler. Hücrenin uyarılması ile guanizin difosfat (GDP)' nin yerine guanozin trifosfat (GTP) bağlanarak Ras-GTP konformasyonuna dönüşerek aktif hale gelir [13, 14]. Aktif hale gelen Ras hücrenin kontrolsüz bir şekilde uyarılmasından sorumludur ve Raf kinazlara yüksek afinite ile bağlanır ve Raf kinazların hücre membranına yerleşmesini ve aktivasyonunu sağlar. Onkogenik Ras, fosfotidilinositol-3 kinaz (PI3K) yolağının güçlü bir aktivatörüdür ve PI3K yolağını aktive ederek apoptozu baskılar [15]. MAPK sinyal yolağının çalışmasının engellenerek hücre çoğalmasının baskılanması ve apoptozun uyarılarak hücre ölümünün gerçekleşmesi, yapılan çalışmalarda kullanılan kemoterapik yaklaşımlardandır.

PI3K/AKT sinyal yolağı büyüme ve yaşama sinyallerinin iletiminden sorumludur [16]. Reseptörün uyarılmasından sonra PI3K, hücre membranında inositol fosfolipidlerdeki inositol halkasındaki 3'-OH grubunu fosforile ederek ikinci mesaj olan PIP₃ bağımlı kinazlar (PDK) ve protein kinaz B (PKB)' nin aktivasyonundan sorumlu fosfotidilinositol trifosfat (PIP₃)' ı üretmektedir [10]. PKB, *Akt1* ve *Akt2* genleri tarafından kodlanan bir proteindir. Sitokinler ve büyüme faktörleri PI3K ve PKB yolunu aktive ederek hücreler için yaşama sinyallerini oluşturur. Akt bu fosfolipidlerle etkileşimde bulunarak iç membrana translokasyonuna sebep olmaktadır [17]. PI3K' nin sentezinin artması, PTEN' in işlev kaybı veya PKB' nin aşırı sentezlenmesi gibi meydana gelen değişikliklerin karsinogenez ile ilgili olduğu düşünülmektedir [17]. PI3K/AKT sinyal yolağının inhibe edilerek, hücre sağkalımının azaltılması ve hücre ölümünün uyarılması son zamanlarda yapılan çalışmalarda kullanılan kemoterapötik yaklaşımlardandır.

Bitkilerde büyüme ve gelişmeyi düzenleyen brassinosteroidler (BR) düşük moleküler ağırlığa sahip steroid içerikleridir ve hayvan steroid hormonlarla (östrojen ve androjen gibi) yapısal benzerlik gösterirler [18]. Kanser hücreleri ile yapılan çalışmalarda BR ailesinin üyesi olan Epibrassinolid (EBR)' in mitokondri membran potansiyelini arttırdığı, hücre içi antikor seviyesini azalttığı, G0/G1 fazındaki hücre sayısını arttırdığı, S fazındaki hücre oranını azalttığı ve apoptozu uyardığı saptanmıştır [18].

Daha önce yapılan çalışmalarda MDA-MB-468 ve MCF-7 gibi meme kanseri hücrelerindeki EBR' nin hücre canlılığı, hücre çoğalması ve hücre döngüsü üzerindeki etkileri incelenmiş olup, EBR' nin doza bağlı olarak hücre döngüsünün G1 fazında tutulu kalmasına sebep olduğu ve hücre büyümesini engellediği belirlenmiştir [19]. Daha önce yapılan çalışmalarda BR ailesi üyesi EBR' nin antikanser etkisi, meme ve prostat kanseri gibi hücre hatlarında incelenmiştir; antiproliferatif aktivitede uygulanması için mikromolar konsantrasyonlarda olumlu sonuçlar elde edildiği gösterilmiştir, fakat hala EBR' nin hücre ölümü üzerindeki moleküler mekanizması tam olarak bilinmemektedir [18, 19]. EBR' nin meme kanseri ve prostat kanseri üzerinde etkileri ile ilgili çalışma bulunmasına rağmen EBR' nin kolon kanseri hücreleri üzerindeki etkileri ile ilgili çok fazla bir araştırma bulunmamaktadır.

Yapılan araştırmalarda insan steroid hormonlarından östrojenin kolon kanserine karşı koruyucu etkisinin olduğu gösterilmiştir. Östrojen reseptör β (ER β) kolorektal epitelde ifade edilen öncü dominant östrojen reseptörüdür ve koruyucu etkisiyle ilişkili olduğu düşünülmektedir [19]. Hücre hatları seçilirken hem EBR' nin steroid hormonlarla yapısal benzerlik göstermesi, hem de ER β ' nin kolon kanserine karşı koruyucu etkisi göz önünde bulundurulmuştur. Bu çalışmada SW480 (ER- β pozitif, Arg²⁷³His' te p53 mutant) ve DLD-1(ER- β negatif, Ser²⁴¹Phe' te p53 mutant) kolon kanseri hücre hattında EBR' nin antikanser ve antiproliferatif etkileri incelenmiştir. Bu araştırmanın ilk aşamasında EBR' nin kolon kanseri hücre hatlarında hücre canlılığı ve hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri belirlenmiştir. EBR' nin her iki hücre hattında da hücre çoğalmasını engellediği görüldükten sonra, ikinci aşamada EBR' nin hücre hatlarında programlı hücre ölümü üzerindeki etkilerinin açıklığa kavuşturulması planlanmıştır. Üçüncü aşamada ise EBR' nin farklı kaspazlar aracılığı ile tetiklediği apoptozun MAPK ve PI3K/AKT hücre sağkalım yolları ile ilişkisinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 Kanser

Kanser, hücrenin büyümesi ve farklılaşması ile bu mekanizmaların kontrol edilmesi gibi birçok biyolojik olayları etkileyen mutasyonların birikmesi temeline dayanmaktadır. Kontrolsüz bölünmeler geçiren bir hücrenin meydana getirdiği primer tümör hücreleri birçok fenotipik özellikler kazanmaktadır. Bu değişimler tümör hücrelerine kontrolsüz ve sınırsız çoğalma yeteneği kazandırmaktadır. Ayrıca kendi çevrelerinden bağımsız olarak yaşamlarını devam ettirebilen bu hücreler, başka dokulara yayılabilme olarak adlandırdığımız metastaz özelliklerinden dolayı organizmanın diğer doku ve organlarının işlevlerini etkilemektedirler [5].

Genetik anormallikler sonucu oluşan hücrelerin kazandığı kontrolsüz ve sınırsız çoğalma ve metastaz gibi özellikler hücre çoğalması/ ölümü dengesini bozduğu için dokunun homeostatik dengesi de bozulmaktadır. Hücre döngüsü, apoptoz, DNA onarımı gibi anahtar rol oynayan mekanizmalardan sorumlu olan genlerde ve protoonkogen/ tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen mutasyonların, malign fenotipin oluşumuna katkıda bulunduğu saptanmıştır [20].

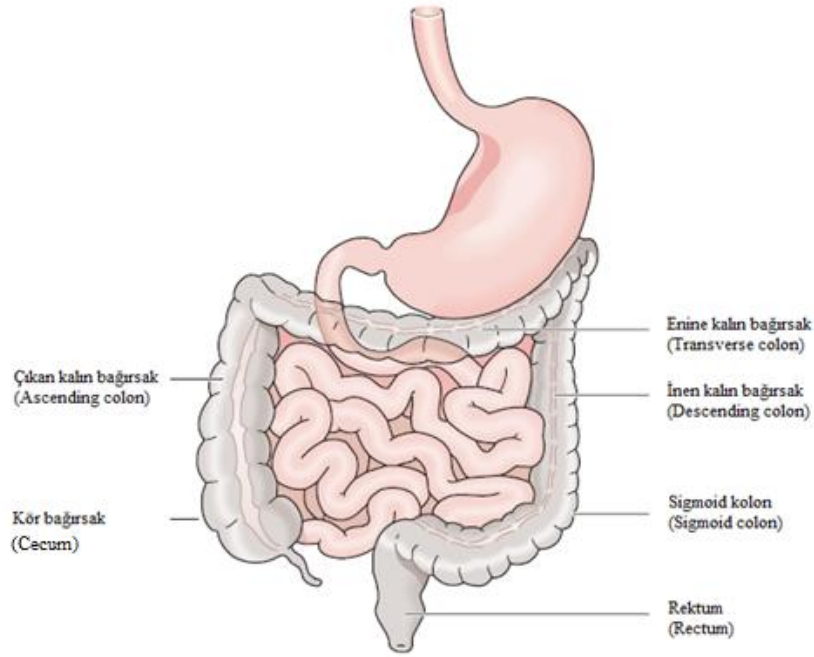
Tüm bunlara ek olarak büyüme faktörleri ve reseptörleri, transkripsiyon faktörleri, mitojenik aktivite gibi önemli hücresel sinyal iletim basamaklarında oluşan bozuklukların kanser oluşumunda ve ilerlemesinde kilit rollere sahip olduğu saptanmıştır [6].

2.2 Kolon Kanseri

Kolon kanseri, abdomenin sağ üst kadranda yer alan kör bağırsak ile başlayan ve rektum ile bağlantılı abdomenin tüm kısımları ile devam eden gastrointestinal bir

hastalıktır. Kolon yaklaşık olarak 1,5 metre uzunluğundadır ve dört kısma ayrılmaktadır [21] (Şekil 2.1).

- İlk bölme çıkan kalın bağırsak olarak adlandırılmaktadır. Bu bölme kolona eklenen ince bağırsaktaki küçük bir kese ile başlar ve abdomenin sağ tarafına kadar devam etmektedir. Kör bağırsak apandisin kolona eklendiği bölgede yer almaktadır.
- İkinci bölme enine kalın bağırsak olarak adlandırılmaktadır çünkü bu bölüm üst abdomende vücudun sağından soluna kadar devam etmektedir.
- Üçüncü bölme inen kalın bağırsak olarak adlandırılmaktadır ve sol tarafta aşağıya doğru devam etmektedir.
- Dördüncü ve son bölüm 'S' veya 'sigmoid' şeklinden dolayı sigmoid kolon olarak bilinmektedir [22].



Şekil 2. 1. Kolon anatomisi. Kolon, kör bağırsak ve kalın bağırsak, enine kalın bağırsak, inen kalın bağırsak ve sigmoid kolon olmak üzere 4' e ayrılır. Rektum, çoğunlukla kolonun dış kısmında oluşur [23].

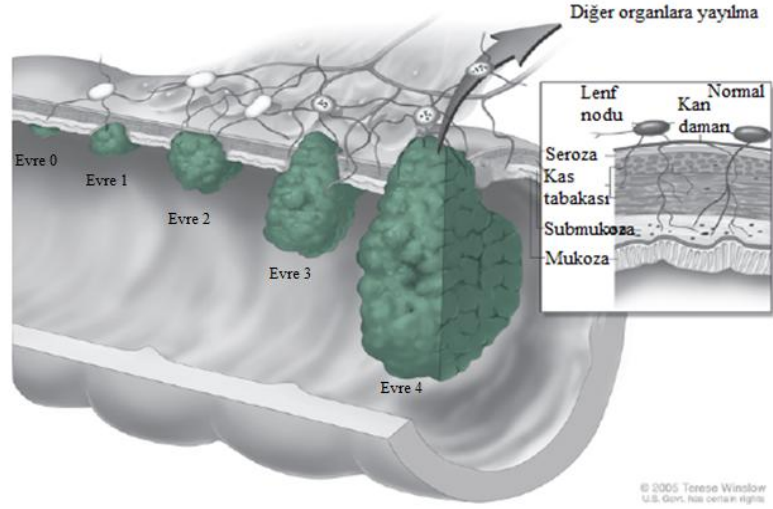
2.2.1 Kolon' da Anormal Büyüme

Çoğu kolon kanseri genellikle uzun yıllar süresince yavaş bir şekilde gelişmektedir. Kanser gelişmeden önce, çoğunlukla doku veya tümörün büyümesi kolon veya rektumun iç duvarında kanser olmayan polip ile başlar [24]. Tümör anormal bir dokudur ve benign ya da malignant olabilir. Bazı polipler kansere dönüşebilir fakat hepsi dönüşmez, kansere dönüşüp dönüşmemesi polibin tipine bağlıdır [25].

- 1) Adenomatöz polip (adenoma): Kansere dönüşebilen poliplerdir, bu nedenle kanserleşme öncesi durum olarak adlandırılmaktadır.
- 2) Hiperplastik polip ve inflamatuvar polip: Genelde kanserleşme öncesi durum olarak değerlendirilmemektedir. Fakat bazı araştırmacılar hiperplastik poliplerin kanserleşme öncesinde olabileceğini veya adenoma ve özellikle kalın bağırsaktaki polip büyüdüğü zaman kanser gelişmesi için bir risk oluşturabileceğini düşünmektedirler [22].

2.2.2 Kolon Kanserinin Başlaması ve Yayılması

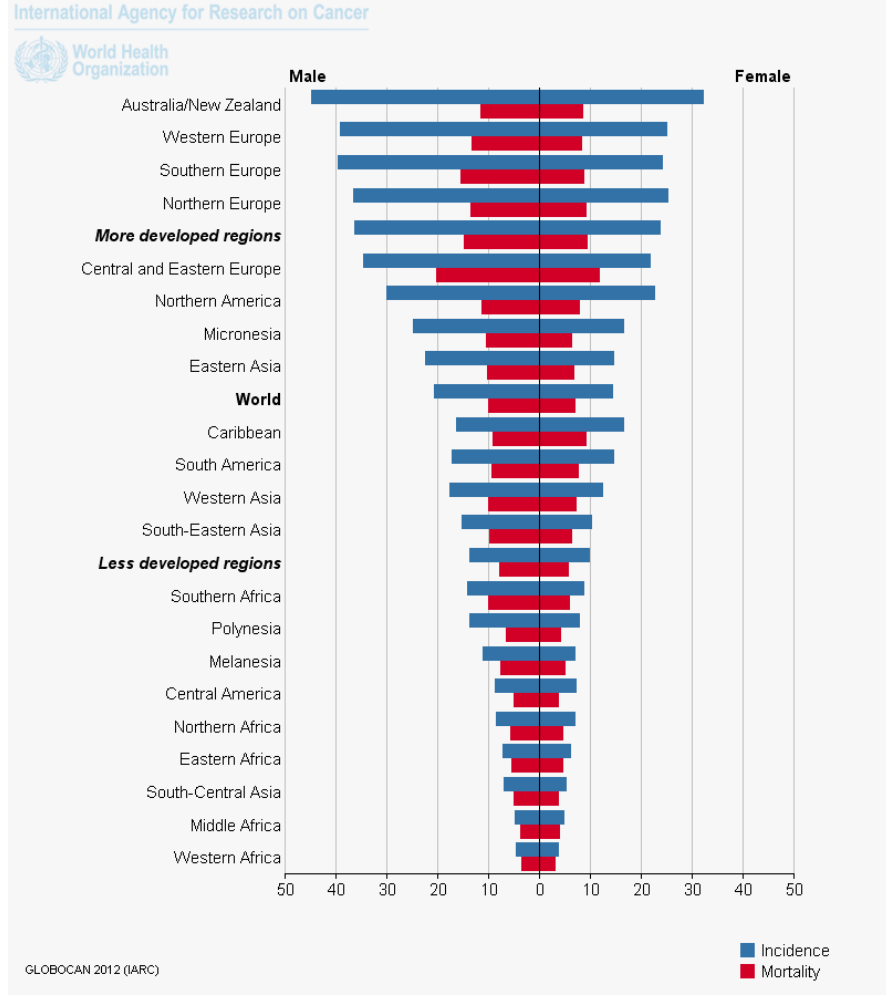
Polip içinde kanser oluşması durumunda, kolon veya rektum duvarının içinde büyümeye başlayabilmektedir. Kolon duvarındaki kanser hücreleri kan damarlarına veya lenf damarlarına genişleyebilmektedir. Lenf damarları ince kanallarla atıkları ve sıvıları taşımaktadır. Kanser hücresi kan veya lenf damarlarına sızdığında en yakın lenf nodlarına veya vücudun farklı kısımlarına taşınabilmekte ve bu yayılma metastaz olarak bilinmektedir. Kolon kanserinin 5 evresi bulunmaktadır. Evre 0 normal hücrelerin kolon mukozasında birikmeye başladığı evredir. Evre 1 kolon duvarının mukozasından submukozaya sızdığı evredir. Evre 2 de üç farklı durum bulunmaktadır. Evre IIA olarak adlandırılan evrede kanser kolon duvarından serosa tabakasına yayılmaktadır. Evre IIB de serosa tabakasına sızarak, fakat yakınlardaki organlara atlayamamaktadır. Evre IIC de kanser yakınlardaki organlara sızmaktadır. Evre III te kanser kolon duvarının mukozasından submukozaya gidebilmektedir ve bir veya üç lenf noduna veya dokuların yakınındaki lenf nodlarına yayılabilmektedir. Evre IV te kan damarları ve lenf nodları ile akciğer, karaciğer veya ovaryum gibi vücudun çeşitli organlarına atlayabilmektedir [26] (Şekil 2. 2).



Şekil 2. 2. Kolon kanseri gelişimi [26].

2.2.3 Kolon Kanseri Epidemiyolojisi

GLOBOCAN 2012 verilerine göre kolon kanseri erkeklerde (746.000 vakanın toplamın %10' unda) üçüncü sırada ve kadınlarda (614.000 vaka, toplamın % 9.2' si) ise ikinci sırada olarak dünya çapında görülmektedir. Türkiye'de ise Sağlık Bakanlığı'nın 2007-2008 yıllarında on iki ildeki kanser kayıt merkezi verilerine göre, KKK (kolorektal karsinom) görülme sıklığı açısından tüm kanserler içinde % 7,8 ile kadınlarda üçüncü ve % 7,5 ile erkeklerde dördüncü sırada yer almaktadır (2). Bu hastalığın hemen hemen %55' i farklı bölgelerde gelişmektedir. En fazla Avustralya' da erkek ve kadınlarda sırasıyla 100.000 de 44.2 ve 32.2 oranında, en düşük de Batı Afrika' da 100.000' de 4.5 ve 3.8 oranında görülmektedir.



Şekil 2. 3. GLOBOCAN 2012 verilerine göre kolon kanserinin dünya çapında görülme sıklığı (Dünya sağlık örgütü, GLOBOCAN 2012 kanser istatistikleri).

2.2.4 Kolon Kanseri Etiyolojisi

Kolorektal kanser gelişiminde rol oynadığı düşünülen çok sayıda risk faktörü tanımlanmıştır [27] (Tablo 2.1).

Tablo 2. 1. Kolorektal karsinom gelişiminde rol oynayan risk faktörleri [28].
KR: Kolorektal, KRK: Kolorektal karsinom, FAP: Familial adenomatöz polipozis, HNPCC: Kalıtsal nonpolipozis kolorektal kanser

Risk Faktörü	Açıklamalar
Yaş	>50
Diyet	Yağdan zengin, posadan fakir
Kişisel Öykü	KR adenom (senkron yada metakron) KRK
Aile Öyküsü	Polipozis sendromları (FAP, Gardner, Turcot, Muir- Torre, Peutz-Jeghers, familial juvenil polipozis) HNPCC KRK' li birinci dereceden akrabalar
İnflamatuvar barsak hastalıkları	Ülseratif kolit (UK) Crohn hastalığı

2.2.4.1 Yaş

Yaş, kolorektal kanser için önemli risk faktörlerinden biridir, insidans 50 yaşından sonra belirgin bir şekilde artmaya başlamaktadır. Kolorektal kanser olgularının %90' ı 50 yaşından sonra görülmektedir. Kolorektal kanser olgularının %52' sine 40 yaşın altındaki kişilerde rastlanmaktadır. Bu nedenle ortalama risk grubuna giren asemptomatik kişilerde tarama testlerinin 50 yaşından sonra başlatılması yararlı olacaktır [29].

Kolorektal kanser olgularında, insidans ile cinsiyet arasında pek fazla belirgin bir farklılık görülmemiştir, ancak kolorektal kanser insidansının erkeklerde yaş ilerledikçe biraz daha arttığı belirlenmiştir.

2.2.4.2 Kolorektal Adenom ve Karsinom Varlığı

Kolorektal kanserin % 90'dan fazlası daha önce gelişmiş olan adenomlardan kaynaklanmaktadır, ancak nadiren non-adenomatöz mukozadan gelişebilir [30]. Bu oluşum sürecine 'adenom karsinom sekansı' denilmektedir. Normal bir kolon

mukozasından adenom oluşumu, adenomdan da displazi, *in situ* ve invaziv kanser gelişiminin yaklaşık olarak 10 yıl sürdüğü gösterilmiştir. Kolorektal kanserlerin FAP (ailesel adenomatöz polipozis) ve HNPCC (kalıtsal nonpolipozis kolorektal kanser) gibi kalıtsal formlarında ise bireyler mutant genlerle doğdukları için adenom oluşumu ve karsinoma dönüşüm sürecinin bu bireylerde daha hızlı olduğu görülmüştür. Kalıtsal ve çevresel mutajenlerin etkisiyle genlerde art arda ortaya çıkan mutasyonlar kolon mukozasında bir takım değişikliklere neden olmaktadır. Bu değişiklikler; polip oluşumu, displastik değişiklikler, *in situ* karsinom ve invaziv karsinom gelişimidir ve bu değişikliklerin daha sonra metastaz ile sonlandığı saptanmıştır [31].

Kolorektal kanser tanısı konan hastalarda, kolonda aynı anda ikinci bir kanserin bulunması (senkron kolon kanseri) ya da daha sonra ikinci bir kanser gelişme (metakron kolon kanseri) olasılığının, normal popülasyona göre yaklaşık 3 kat arttığı ve ortalama %5 civarında olduğu araştırmalarla saptanmıştır [32].

2.2.4.3 Kalıtsal Risk Faktörler

Günümüzde kolorektal kanserlerin genetik bozukluklar yani mutasyonlar sonucunda geliştiği kabul edilmektedir. Kolorektal kanserlerin kalıtsal formlarında bireyler mutant genleri ile doğmaktadırlar ve bu mutasyonlara germ-line mutasyon adı verilmektedir. FAP ve HNPCC, en çok bilinen kalıtsal kolorektal kanser tiplerindedir. Bazen de genlerde oluşan mutasyon, çevresel faktörlerin etkisiyle doğumdan sonra gelişmektedir ve bu mutasyonlara somatik mutasyon adı verilmektedir ve somatik mutasyonların sonucunda sporadik olarak tanımlanan kanserler ortaya çıkmaktadır. Kolorektal kanserlerin çoğunluğu, somatik mutasyonlar sonucu gelişen adenokarsinomlardan kaynaklanmaktadır. FAP, HNPCC gibi kalıtsal kolorektal kanserli kişilerin bir allellerinde genetik mutasyonla (first hit) doğduklarından, daha sonraki zamanlarda diğer normal allelde somatik mutasyonun (second hit) gelişmesi, tümör gelişimini başlatmak için yeterli olmaktadır ve bu nedenle bu kişilerde adeno-karsinom sekansı daha kısa sürede tamamlanmaktadır [1].

2.2.4.4 Ailesel Kolorektal Kanseri Varlığı

Ailesel kolorektal kanseri, kolorektal kanser gelişiminde ikinci sıklıkta görülmektedir ve kolorektal kanserlerin %25-30' unu oluşturmaktadırlar. Ailesel kolorektal kanserin, sporadik olgularda olduğu gibi, somatik mutasyonlara bağlı olarak geliştiği görülmüştür. Ailesinde kolorektal kanser bulunmayan bir kişide, kolorektal kanser gelişme olasılığı %6 iken, birinci dereceden akrabalarından (anne, baba, kardeş) en az birinde kolorektal kanser bulunan kişilerde %12, ikiden fazla birinci derece akrabasında kanser görülen kişilerde kanser görülme olasılığı %35' tir [1] .

2.2.4.5 Çevre ve Diyetle İlişkili Faktörler

Diyet ve çevresel faktörler de kolorektal kanser gelişiminde rol oynamaktadır. Hayvansal yağ ve kırmızı et bakımından zengin, yüksek kalorili besinlerle beslenen toplumlarda kolorektal kanser gelişimi daha sık olarak görülmektedir. Aynı şekilde gıdalarda doymuş ya da çoklu doymamış yağların fazla olması da kolorektal kanser gelişimini arttırmaktadır. Oleik asit yönünden zengin diyet (zeytinyağı, balık yağı vb.) ile beslenen kişilerde kanser oluşumunda artma görülmemiştir. Bol posa bırakan bitkisel liflerin tüketilmesi, kanserojen maddelerin kolon mukozasına temas süresini kısaltarak, aynı zamanda dışkı hacmini arttırarak zararlı maddelerin seyrelmesine yol açarak kolon mukozasına olumsuz etkisini azalttığı bilinmektedir. Kalsiyum, selenyum, A, C, E vitamini ve karotenoidlerin kullanımının kolorektal kanser gelişim riskini azalttığı belirlenmiştir [33].

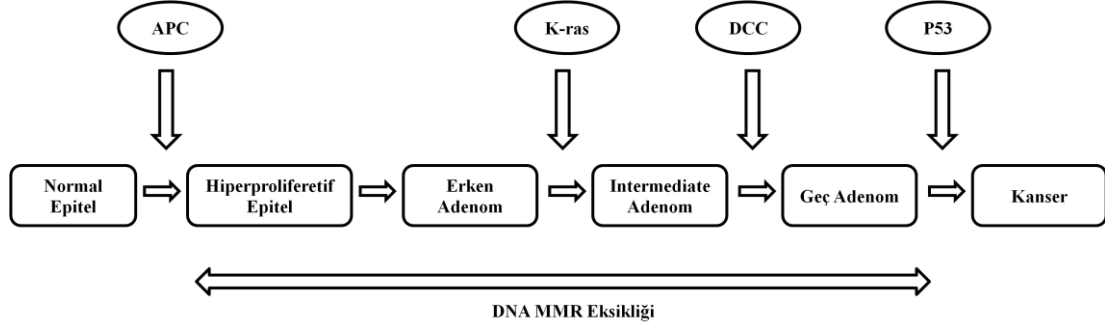
2.2.4.6 İnflamatuvar Barsak Hastalıkları

Uzun zaman boyunca inflamatuvar barsak hastalığına sahip kişilerlerde, kolorektal kanser gelişme riskinin arttığı görülmüştür. Bu durum özellikle kolitis ülseroza (KU) için geçerlidir. Kronik enflamasyonun, kolon mukozasını kanserleşmeye eğilimli hale getirdiği araştırmalarla belirlenmiştir [27].

2.2.5 Kolorektal Kanserin Moleküler Biyolojisi

Kolorektal kanser gelişiminde rol oynayan genetik değişiklikler yani mutasyonlar, proto-onkogenlerin aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonundaki bozukluklar olmak üzere incelenebilir. Tek bir gende yukarıda değinilen mutasyonlardan herhangi birinin ortaya çıkması, kanser oluşumu için tek başına

yeterli olmamaktadır. Kanser gelişimi için, birden fazla gende, çok sayıda mutasyonun zaman içerisinde birikmesi gereklidir (Şekil 2. 4) .



Şekil 2. 4. Normal kolon epitelinden kolon kanserine dönüşüm sürecinde çok sayıda genetik mutasyonun birikimi (borovac ve arkadaşları, 2003). APC: Adenomatous Polyposis Coli, K-ras: Kirstein Rat Sarkoma , DCC: Kolorektal kanserlerde silinen bölge, p53: Tümör proteini 53.

1. Proto- Onkogenler

Proto-onkogenler hücrede uyarının iletiminde ve hücre büyümesinin kontrolünde rol oynayan genlerdendir ve normalde inaktiftirler. Bu genlerin uygun olmayan aktivasyonları, hücre yüzeyinden nükleusa gelecek mesajların anormal bir şekilde iletilmesine, anormal hücre proliferasyonuna ve sonuç olarak da tümör oluşumuna yol açmaktadır. Proto-onkogenler mutasyona uğradığında onkogen adını almaktadır. Onkogenler dominant olarak fonksiyon göstermektedirler [8].

Ras Geni: üzerinde en çok çalışılan onkogendir. İnsanda hücre içi uyarı iletisini düzenleyen üç ras geni (*K-ras*, *N-ras*, *H-ras*) bulunmaktadır [3].

K-ras Geni: 12. Kromozomun kısa kolunda yer almaktadır. Allellerden birindeki mutasyon, bu genin etkili olması için yeterli olmaktadır. *K-ras* geni mutasyona uğradığında, hücre içinde GTP (guanozin trifosfat) hidrolizinin yapılamadığı, G proteinin devamlı olarak aktif formunda kaldığı, bunun sonucunda da kontrolsüz hücre bölünmesine yol açtığı düşünülmektedir [34].

2. Tümör Baskılayıcı Genler

Mutasyona uğradığı zaman kolorektal kanser gelişiminde rol oynayan belli başlı tümör baskılayıcı genler: *APC*, *DCC* (Kolorektal Kanserde Silinen Bölge) ve *p53*' tür. Tümör baskılayıcı genler resesif karakterde olduğundan her iki allelde de mutasyon olduğu zaman tümör oluşumu başlayabilmektedir.

APC Geni: Bu gende yer alan hasar, ilk kez FAP' lı hastalarda tanımlanmıştır. FAP, kolorektal kanserlerin yaklaşık olarak %1' ini oluşturmaktadır ancak, mutant APC geni sporadik kolorektal kanserlerin %80' inde görülmektedir. Bu gende ortaya çıkan mutasyonlar daha hafif seyirli olan AAPC (Attenuated Adenomatous Polyposis Coli) varyantına yol açmaktadır. Genin orta bölümlerinde görülen mutasyonlarda daha ağır seyirli olan klasik FAP formları ortaya çıkmaktadır. AAPC olarak adlandırılan tipte, klasik FAP olgularına oranla daha az miktarda polip bulunmaktadır [4].

DCC Geni: 18. Kromozomun kısa kolunda (18q21) lokalize olmuş bir diğer tümör baskılayıcı gendir. Malign dejenerasyon için her iki allelde de mutasyon gerçekleşmesi gerekmektedir. Mutant DCC, kolorektal kanserinin % 70' inde görülmektedir ve prognozu olumsuz yönde etkilemektedir [2].

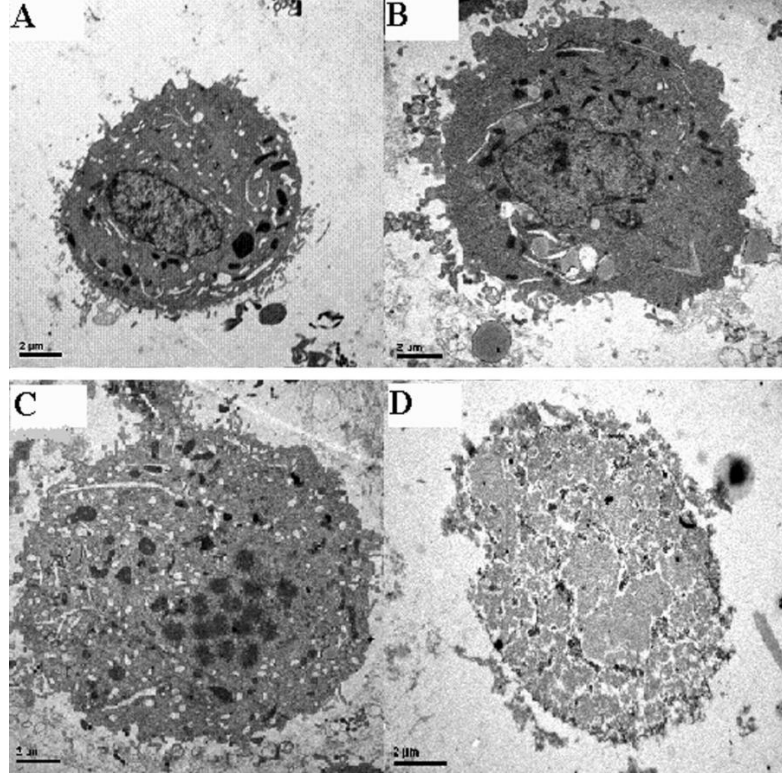
P53 Geni: 17. Kromozomun uzun kolunda yer almaktadır. Onarımı mümkün olmayan genetik değişikliklere maruz kalan hücrelerde programlanmış hücre ölümlerinden biri olan apoptozu başlatmakta önemli bir role sahiptir. Mutasyona uğradığında, bu fonksiyonunu yerine getirememektedir ve insanda çeşitli tipte tümörlerin gelişimine yol açmaktadır. Bu gene ait mutasyon kolorektal kanserin %75' inde görülmektedir. Kolorektal adenomlarda nadiren görüldüğünden, bu gendeki mutasyonun adenom- karsinom sekansının geç dönemlerinde ortaya çıktığı düşünülmektedir [35].

2.3 Apoptoz

Apoptoz ya da programlı hücre ölümü çok hücreli canlılarda normal gelişim sırasında gerçekleşen hücresel bir olaydır. Hücreler çeşitli uyarılara yanıt olarak

ölürler ve bunu programlı bir yol izleyerek yaparlar. Bir diğer hücre ölüm şekli olan nekrozda hücreler kontrollü olmayarak lizize uğrar ve buna bağlı olarak gelişen inflamatuvar yanıtlar ve önemli problemler ortaya çıkmaktadır. Apoptozda ise hücreler kendi ölümleri için aktif rol üstlenmektedir yani hücrel intihar gerçekleştirmektedirler [36].

Apoptozda giden hücrelerde biyokimyasal ve morfolojik olarak değişiklikler meydana gelmektedir. Apoptozun erken dönemlerinde, normal hücrel fonksiyonlar için gerekli olan, hücre iskeleti yapısal proteinleri ve DNA tamirinde görevli nükleer proteinlerin parçalanmasından sorumlu bir protein ailesi olan kaspazlar aktive olmaktadır. Kaspazlar, DNaz gibi nükleusta DNA' yı parçalayan yıkıcı enzimleri aktive etmektedirler. Gerçekleşen bu biyokimyasal değişikliklerin sonucunda hücre sitoplazmasının büzülmesi, aktin filament yapısının bozulması, nükleer laminlerin bozulması, kromatin ve nükleer yapısal proteinlerin parçalanması ve apoptotik hücrelerin nükleuslarının at nalı şeklinde bir yapıya dönüşmesi gibi çeşitli morfolojik değişiklikler meydana gelmektedir. Büzölmeye devam eden hücreler makrofajlar tarafından kolayca fagosite edilebilmeleri için kendilerini paketlerler ve buna bağlı olarak plazma membranında makrofaj yanıtını tetiklemek için membranda bazı değişiklikler meydana gelmektedir. Fosfotidil-serinin hücrenin iç yüzünden dış yüzüne translokasyonu buna örnek olarak verilebilir. Membrandaki değişiklikler çoğunlukla membranda kabartılar şeklinde gerçekleşmektedir ve apoptotik sürecin sonunda apoptotik cisimcik adı verilen küçük vesiköler yapılar görölmektedir [36] (Şekil 2. 5).



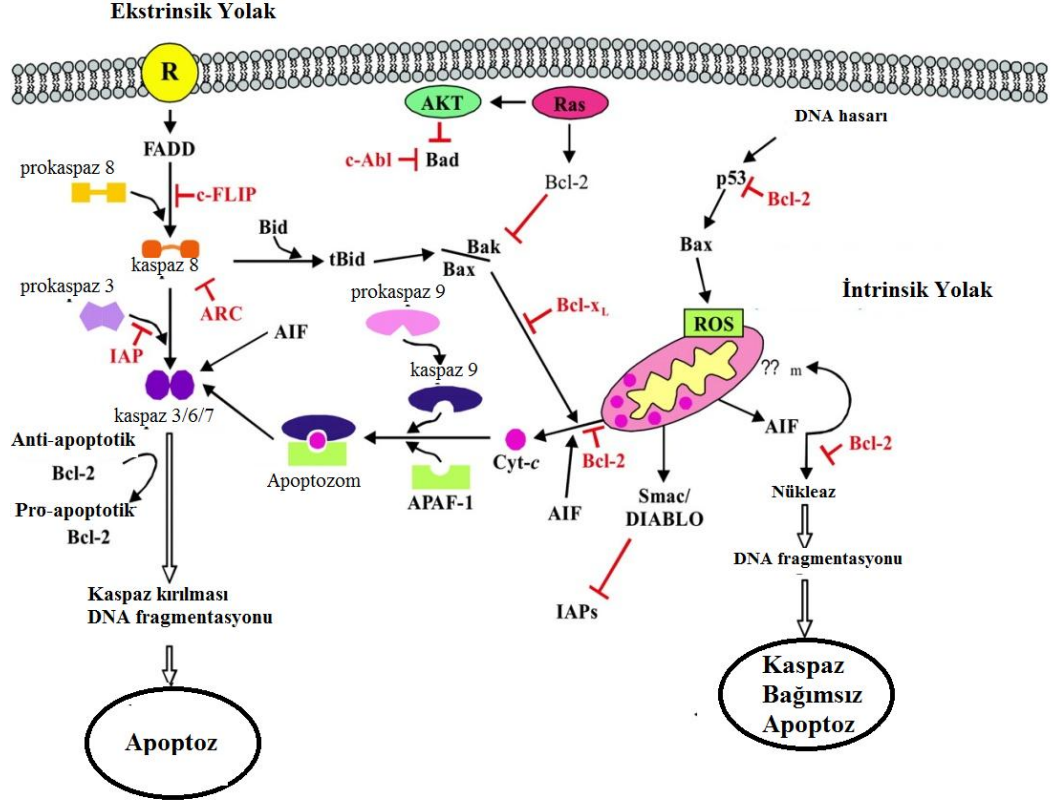
Şekil 2. 5. Apoptoz sırasında meydana gelen morfolojik değişikliklerin elektron mikroskop görüntüsü. A) Normal hücre, B) Hücre membranının büzülmesi, C) kromatinin yoğunlaşması ve nükleer fragmentasyon D) Nekroz [37].

2.3.1 Kaspazlar

Kaspazlar (Sistein Aspartat Spesifik Proteazlar) apoptotik hücre ölümü esnasında önemli rol oynayan sistein-proteaz grubu enzimlerdir [38]. İnaktif protein olarak sentezlenen bu enzimler çeşitli yollarla aktive edildikten sonra, hücresel hedeflerindeki tetrapeptid motifleri tanır ve substratı bir aspartat rezidüsünün karboksil tarafından ayırır. Hücre ölümü sırasında meydana gelen pek çok hücresel ve morfolojik değişimler bu enzimlerin rol oynadığı birtakım basamaklar sonucunda meydana gelmektedirler [39].

2.3.2 Apoptozun Moleküler Mekanizması

Apoptozun mekanizması oldukça karışıktır ve moleküler olayların enerji bağımlı kaskadını içermektedir. Araştırmalar iki ana apoptotik yolağın olduğunu göstermiştir: ekstrinsik (ölüm reseptörü aracılı yolak) ve intrinsik yolak (mitokondri aracılı yolak). Bu iki yolak birbiri ile ilişkilidir ve bir yolak diğer yolağı etkileyebilmektedir [7] (Şekil 2. 6).



Şekil 2. 6. Ekstrinsik ve intrinsik apoptoz yolları [29].

2.3.2.1 Ekstrinsik Yolak: Hücre Yüzey Reseptörleri Aracılığı ile Tetiklenen Apoptoz

Ekstrinsik sinyal yolağı transmembran reseptör aracılı bağlantılarla apoptozu başlatır. Bunlar Fas ligand gibi bir ölüm faktörü veya tümör nekroz faktörü (TNF) gibi ölüm reseptörlerini içermektedir [40]. Fas ligandının Fas reseptörüne bağlanması Fas aracılı ölüm domaini (FADD) adaptör proteinin bağlanmasına yol açar ve TNF ligandının TNF reseptörüne bağlanması FADD ve RIP' in toplanması ile TNFR1 aracılı ölüm domaini (TRADD) adaptör proteinin bağlanmasına yol açar [41, 42]. FADD ölüm efektör domaini ile dimerizasyon oluşturur ve bunun sonucunda prokaspaz 8' i aktive eden sinyaller meydana gelir [43] (Şekil 2. 6).

Kaspaz 8 aktive olduğunda apoptozu tetikler çünkü reseptör ile apoptotik proteazlar arasındaki ilk bağlantıdır ve bir anahtar niteliğindedir. Aktive olan kaspaz 8, diğer kaspazları (kaspaz 3, 6, 7) kırar ve aktive eder. Sonuç olarak enzim kaskadı spesifik hedef proteinini kırar ve apoptoz meydana gelir. Ölüm reseptör aracılı apoptoz

FADD ve kaspaz 8' e bağlanarak onları inaktif hale getiren c-FLIP adı verilen protein tarafından engellenebilir [44].

2.3.2.2 Mitokondri/Sitokrom C Aracılı İntrensik yolak

Apoptozun intrinsik yolağı, DNA hasarı ve oksidatif stres gibi hücre içinden gelen uyarılar tarafından tetiklenmektedir. Bu uyarılar sonucunda iç mitokondri membranında değişiklikler meydana gelmektedir. Bu değişiklikler, mitokondri transmembran potansiyelinin kaybı ve iki ana pro-apoptotik proteinin intermembran boşluğundan sitozole salınmasına sebep olmaktadır [45]. Smac/DIABLO, mitokondriden serbestlenen bir regülatördür ve apoptoz inhibitör proteinleri (IAP)' lar tarafından meydana getirilen inhibisyonu elimine etmekte görev alırlar. Bu proteinler kaspaz bağımlı mitokondriyal yolağı aktive etmektedirler. Smac/DIABLO, aktive olan kaspaz 9 ile X kromozomu bağlantılı apoptoz inhibitörü (XIAP)' ye bağlanmak için rekabete girer. Her iki molekül de XIAP ye bağlanan benzer tetrapeptid domaini içerir. Böylece kaspaz aktivitesi kaspaz kaskadını oluşturmak üzere devam eder, sitokrom C bağlanır ve APAF-1 ve prokaspaz 9' u aktive etmektedirler [46].

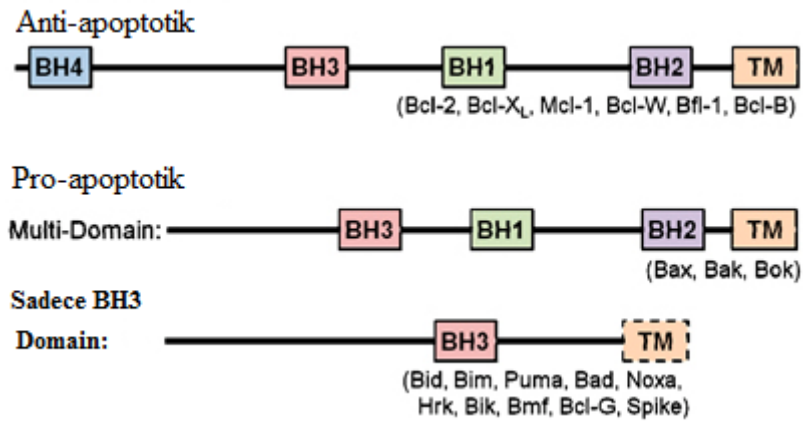
Apoptotik mitokondriyal olayların düzenlenmesi ve kontrolü Bcl-2 ailesi üyeleri tarafından gerçekleştirilmektedir [47]. Tümör baskılayıcı protein p53 Bcl-2 ailesi üyelerinin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır [48]. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri mitokondri membranı geçirgenliğini kontrol etmektedirler.

Şimdiye kadar, Bcl-2 ailesinin yaklaşık 25 üyesi olduğu bulunmuştur (Tablo 2. 2). *BCL2* geni tarafından kodlanmaktadır ve adı β -hücre lenfoma 2 (β -cell lymphoma 2)' den türevlenmektedir. B-hücre lenfomanın t(14;18) kromosomal lokasyonunda bulunmaktadır [49].

Tablo 2. 2. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri [50].

Anti-apoptotik üyeler	Pro-apoptotik üyeler	BH3-only pro-apoptotik üyeler
Bcl-2	Bax	Bid
Bcl-X _L	Bak	Bad
Bcl-w	Bok	Bim
Mcl-1	Bcl-G	Bik
Bcl2l10	Bcl-rambo	Bmf
Bfl-1	Bfk	Noxa
Bcl2l12		Puma

Bcl-2 üyeleri dış mitokondri membranında bulunmaktadır. İyon kanallarının oluşumu içinde veya porların oluşturulması ile membran geçirgenliğinden sorumlu olduğu durumlarda dimer halinde bulunmaktadır [51]. Bcl-2 üyeleri en az bir Bcl-2 homoloji (BH) domaini içerir. BH domainleri sayesinde protein-protein ilişkisini gerçekleştirirler. Fonksiyonlarına ve Bcl-2 homolojilerine göre üç gruba ayrılmaktadırlar. İlk grup, 4 BH domain içeren ve hücreyi apoptotik sinyalden koruyan anti-apoptotik proteinlerdir. Bcl-2 proteinlerinin anti-apoptotik üyeleri apoptozu inhibe etmektedir. Bu proteinlere Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-w, A1/Bfl-1 ve Bcl-B/Bcl2L10 örnek olarak verilebilir [52] (Şekil 7).



Şekil 2. 7. Bcl-2 ailesi üyelerinin domain yapısı [52].

İkinci grup, pro-apoptotik moleküllerden oluşan grup içinde sadece BH3 bölgesini içeren proteinler olarak isimlendirilen gruptur. Bu grup içinde Bid, Bim, Puma, Noxa, Bad, Bmf, Hrk ve bik yer almaktadır. Sadece BH3 bölgesini içeren proteinleri

pro-apoptotik moleküllerin aktivitesini ya indükler (BH3 only aktivatörleri) ya da anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerine bağlanarak inhibe eder [52] (Şekil 2. 7).

Üçüncü grup ise pro-apoptotik proteinlerden oluşmaktadır ve 4 tane BH domaini içermektedirler. Bax, Bak ve Bok/mtd bunlara örnek olarak verilebilir. Mitokondri dışı membran üzerinde bir araya gelen Bcl-2 ailesinden Bax ve Bak molekülleri, oligomerize olarak membran üzerinde bir kanal oluşturur. Altı ya da sekiz molekülün oligomerizasyonu, Bax ve Bak proteinlerinin şekilsel değişikliği sonrası insersiyonundan sonra meydana gelir [52] (Şekil 2. 7). Apoptozun Fas yolu için mitokondriyal hasar BH3 only proteinlerinden olan Bid' in kaspaz 8 kırılması ile birlikte gerçekleşir ve bu da apoptozun intrinsik ve ekstrinsik yolağının birbiri ile etkileşim halinde olduğunu göstermektedir [7] (Şekil 2. 6). Bad, Bcl-xL veya Bcl-2 ile heterodimerize olur. Bcl-2 ve Bcl-xL mitokondriden sitokrom C nin salınmasını engeller. Yapılan araştırmalar Bcl-2 ve Bcl-xL' in kaspaz proteazların aktivasyonunu kontrol ederek apoptotik ölümü engellediğini göstermektedir [53] (Şekil 2. 6). Mitokondri içinde bulunan sitokrom C ve prokaspaz 9'un salınımını sağlar. Sitoplazmaya serbestlenen sitokrom C ve prokaspaz 9 apoptozom adı verilen komplekste birikir ve aynı zamanda dATP de bir kofaktör protein olan ve prokaspaz 9 aktivasyonu için gerekli olan Apaf-1'e bağlanır. Sitokrom C nin Apaf-1' e bağlanmasıyla halkasal bir kompleks oluşur. Bu halkasal kompleks içerisinde prokaspaz 9'un APAF-1' e bağlanmasını sağlayan CARD adı verilen bir domain bulunur. Kaspaz 9 intrinsik yolağın başlatıcı kaspazıdır. Kaspaz 9 aktivasyonundan sonra kaspaz 3, 6 ve 7 aktive olur (Şekil 2. 6).

Puma, Bcl-2 ailesinin üyesidir ve pro-apoptozda rol almaktadır ve p53 aracılı apoptozda önemli rol oynamaktadır. *In vitro* da yapılan çalışmalar Puma' nın aşırı ifadesinin Bax ekspresyonunun artması, Bax konformasyonel değişikliği, mitokondriye translokasyonu, sitokrom C salınması ve mitokondriyal membran potansiyelindeki azalma ile beraber gerçekleştiğini göstermiştir [54].

2.4 Hücre Sağkalım Sinyal Yolakları

Karsinogenezin temelini, hücrenin yaşaması ve büyümenin kontrolü gibi biyolojik olayları etkileyen mutasyonların birikimi oluşturmaktadır. Kanserin gelişim sürecinde tümör hücreleri birçok fenotipik özellik kazanarak hızlı ve sınırsız çoğalma, özgün mikroçevreden bağımsız olarak yaşamını devam ettirme ve metastaz gibi özelliklere sahip olurlar. Protoonkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin seri mutasyonları farklı mekanizmalar ile tümör oluşumuna yol açarlar [5].

Kanser hücrelerinde sinyal iletim yollarını ve sinyal proteinlerini hedef alan onkogenik mutasyonlar sıklıkla görülmektedir. Sinyal iletiminde meydana gelen değişiklikler çoğalma ve/veya yaşama işlevlerinin kontrolünün kaybına yol açar. Bu nedenle onkogenik sinyal iletimi tümör gelişimi ile invazyon/metastaz sürecinde önemli bir role sahiptir [5].

2.4.1 Protein Kinazlar ve Sinyal İletimindeki Roller

Protein kinazlar, sinyal iletimi sırasında protein fosforilasyonunda/aktivasyonunda görev alırlar ve membran yerleşimli olanlar ve sitoplazmik tirozin kinazlar olmak üzere iki ana gruba ayrılırlar. Katalitik özelliklerine göre (fosforilasyona uğrayan aminoasit türü) tirozin ve serin/treonin kinazlar olarak da sınıflandırılmaktadırlar [9].

RTK, membranda yerleşim gösteren proteinlerdir. RTK' lar sitoplazmik kısımlarında aktivasyondan sorumlu olan bölge yani tirozin kinaz bölgesi içerirler. Dinlenme halinde olan hücrelerde RTK' nın inaktif ve aktif konformasyonları arasında bir denge bulunur. Bu reseptörler büyüme faktörleri ile bağlandıktan sonra aktifleşirler ve sitoplazmadaki hedef proteinleri ile etkileşime girerek sinyal iletimini gerçekleştirirler. RTK aktivasyonu reseptörün kendi kendini fosforile etmesi ile başlar ve fosforlanan bu bölgelere çeşitli adaptör proteinler bağlanarak uyarının hücre içine iletilmesini sağlar. RTK aktivasyonunun sonlandırılmasında fosfataz grubu proteinler görev almaktadır. Karsinogenez sürecinde sürekli ve kontrolsüz RTK aktivitesi bulunmaktadır [10].

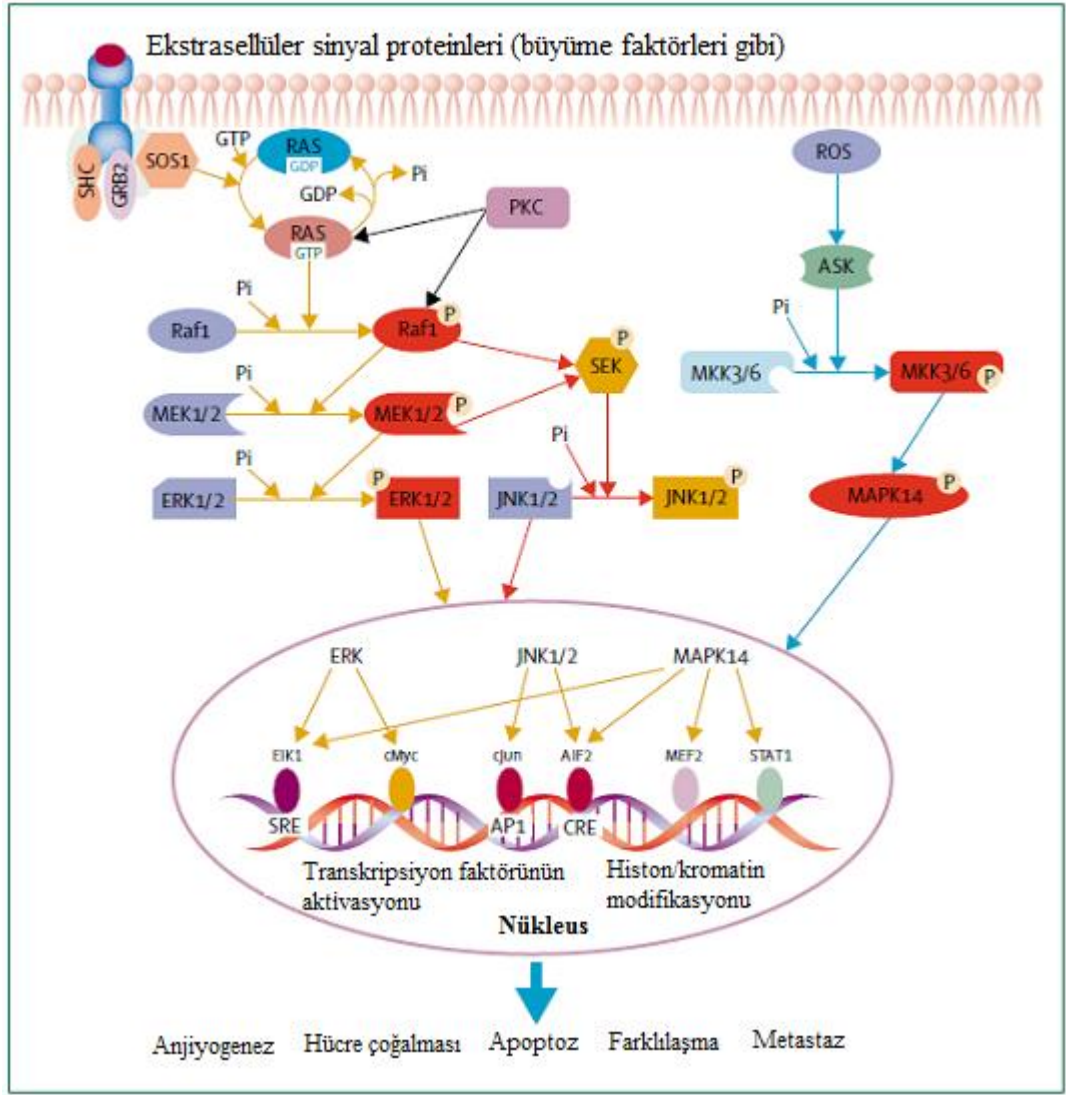
Sitoplazmik protein kinazlara örnek olarak Src, Ab1, fokal adezyon kinaz (FAK) ve Janus Kinaz Ailesi (JAK) proteinler, örnek olarak verilebilir [10]. Dinlenme halindeki hücrelerde sitoplazmada inaktif haldedirler. Büyüme faktörleri veya sitokinler ile uyarıldıklarında aktif hale gelerek sitoplazmadaki veya nükleustaki hedeflerine yönelirler. Sitoplazmik tirozin kinazların sürekli aktivasyonu ve onkogenik sinyal iletimi, transformasyon, tümör büyümesi, motilite ve invazyon artışı ile anjiyogenez gibi hücreyel olayları hızlandırmaktadır [11]. Src tirozin kinaz proteinin c-ucunda meydana gelen kısalma, proteinin inaktif hale gelmesini engelleyerek onkogenik potansiyel kazandırır [55].

2.4.2 MAPK Yolağı

Mitojen aktive protein kinaz (MAPK) sinyal yolağı gen ekspresyonunu, mitozu, hücre çoğalmasını, hareketini, metabolizmasını ve programlı hücre ölümü apoptozu düzenlemektedir [12]. MAPK' lar ekstrasellüler sinyal-düzenleyen kinaz (ERK), c-Jun NH2- terminal kinaz (JNK) ve p38-MAPK olmak üzere 3 aile üyesinden oluşmaktadırlar. ERK' lar büyüme sinyaline cevap olarak MAPK ları aktive etmektedirler. JNK' lar ve p38-MAPK hücreyel ve osmolarite ve metabolizma, DNA hasarı, oksidatif stres gibi çevresel streslere cevap olarak aktive olmaktadır [12]. MAPKlar serin/treonin kinaz ailesidir. MAP kinaz yolu reseptör aracılı sinyalin hücre içine iletiminden sorumlu bir kinaz kaskadı olarak görev yapmaktadır. Kaskad sistemi hem sistemin amplifikasyonu hem de sinyal süresi, şiddeti ve kinetiği gibi düzenleyici etkileşimler açısından önem taşır. MAPK' lar nükleusa girebildiklerinden dolayı plazma membran üzerinde aktive olan RAS ve gen ifadesi arasında sitoplazmik bağlantı sağlamaktadır. Sinyal iletimi G-protein aktivasyonu (Ras aktivasyonu) ile başlar ve MAPKKK' nın (MAP kinaz kinaz kinaz) aktivasyonundan sonra sırasıyla MAPKK (MAP kinaz kinaz) ve MAPK (MAP kinaz) aktive olur. MAPK lar uyarılmaları ile beraber özel substratlarını serin ve treonin rezidülerinden fosforillenir. Bazı fosforilasyon olayları substratı olumlu veya olumsuz bir şekilde düzenlemekte ve bu yüzden bütün kaskadları aktive etmektedir. Böylelikle MAPK' lar fosforilasyon ile birçok transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini etkileyebilirler [12] (Şekil 2. 8).

2.4.2.1 Ras/Raf/MEK/ERK Sinyal İletim Yolu ve Kanser İlişkisi:

Hormonlar, büyüme faktörleri ve tümör promotör maddeler bu sinyal yolunu kullanır. Bu sinyal iletim yolu Ras aktivasyonu ile başlar ve sırasıyla Raf (MAPKKK), MEK(MAPKK) ve Erk (MAPK) proteinleri ile kaskat ilerler. Ras ve Raf protoonkogenlerdendir. Ras proteinlerinin aktif hale gelmesi için translasyon sonrası modifikasyondan (farnesilasyon) sonra membrana yerleşmesi gerekir. Dinlenme halinde RAS-GDP bağlı halde bulunur ve inaktiftir. Hücrenin uyarılması ile GDP' nin yerine GTP bağlanarak Ras-GTP konformasyonuna dönüşerek aktif hale gelir. Ras aktivasyonu tersinir bir süreçtir ve bu aktivasyonda Son of Sevenless (SOS) ve büyüme faktörü reseptörüne bağlanan protein 2 (Grb2) adaptör proteinleri rol oynamaktadır. Bu yolağın efektör molekülleri, SOS üzerinde negatif düzenleyici olarak rol oynar ve Ras aktivasyonunu sonlandırırlar [13, 14]. Aktive olan Ras Raf kinazlara yüksek afinite ile bağlanır ve Raf kinazların hücre membranına yerleşmesini ve aktivasyonunu sağlar.



Şekil 2. 8. MAPK sinyal patogenezi [56].

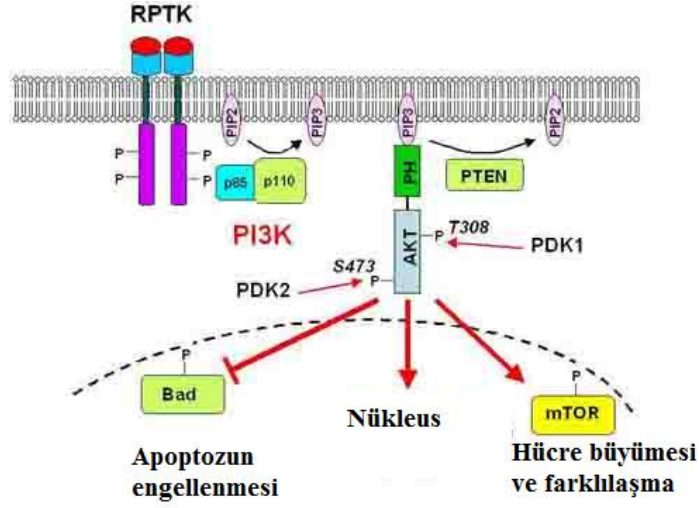
İnsan tümörlerinin %30' unda Ras/Raf/MEK/ERK yolağının aşırı aktivasyonu görülmektedir [13]. Bu oran tümörlerdeki Ras mutasyonu sıklığı ile uyumludur. Mutant Ras proteinleri, aktif RAS-GTP formunda kalır ve bu yüzden hücrenin kontrolsüz bir şekilde uyarılmasından sorumludur.

Normal koşullarda EGF ve PDGF gibi büyüme faktörlerinin fosfoinositid-3 kinaz (PI3K) yolağının uyarılmasında Ras' ın etkinliği minimum düzeydedir. Bununla birlikte, onkogenik Ras, PI3K yolağının güçlü bir aktivatörüdür ve PI3K yolağını aktive ederek apoptozu baskılar [15].

2.4.2 PI3K/ AKT Yolağı

PI3K ailesi, büyüme ve yaşama sinyallerinin iletiminden sorumlu proteinlerdir [16]. Reseptörün uyarılmasından sonra PI3K, hücre membranında inositol fosfolipidlerdeki inositol halkasındaki 3'-OH grubunu fosforile ederek ikinci mesaj olan fosfotidilinositol trifosfat (PIP₃)' ı üretmektedir. PIP₃, PIP₃ bağımlı kinazlar (PDK) ve protein kinaz B (PKB)' nin aktivasyonundan sorumludur [10]. PKB, *Akt1* ve *Akt2* genleri tarafından kodlanan bir proteindir. Sitokinler ve büyüme faktörleri PI3K ve PKB yolunu aktive ederek hücreler için yaşama sinyallerini oluşturur. Akt bu fosfolipidlerle etkileşimde bulunarak iç membrana translokasyonuna sebep olmaktadır [17] (Şekil 2. 9). Tümör baskılayıcı proteinlerden PTEN, PIP₃ oluşumunu inhibe ederek negatif düzenleyici olarak görev yapar [57]. Karsinogenezde etkili olan PI3K sinyal yolağındaki değişiklikler řu şekilde sıralanabilir: PI3K' nin sentezi artabilir, PTEN tümör baskılayıcı proteini mutasyon ile fonksiyon kaybına uğrayabilir, PKB sentezi kanser hücrelerinde artabilir, PTEN' in işlev kaybı veya PKB' nin aşırı sentezlenmesi mTOR aktivasyonunun sürekliliğine yol açabilir.

Son yıllardaki çalışmalar, PI3K/Akt sinyal yolağındaki görevli proteinlerde kanser hücrelerinde sıklıkla değişiklikler olduğunu göstermektedir. Bu yolak sadece tümör gelişiminde değil kanser uygulamaları için tümöre potansiyel cevap olarak da önemli bir role sahiptir. Yeni kemoterapötik ilaçların çoğu PI3K/Akt sinyal yolağı ile ilişkili hedeflere özgü olarak tasarlanmaktadır. Bu yüzden, PI3K/Akt sinyal yolağını iyi anlamının pek çok kanser tipinin tedavi edilmesinde önemli bir role sahip olabileceği düşünölmektedir [17].



Şekil 2. 9. PI3K/AKT sinyal yolağının şematize edilmesi [58]. RPTK: Reseptör protein tirozin kinaz, PI3K: Fosfotidilinositol-3 Kinaz, PTEN: Fosfataz ve tensin homoloğu, AKT/PKB: Protein Kinaz B, PDK1: Pirüvat dehidrogenaz lipoamid kinaz izozim 1, PDK2: Pirüvat dehidrogenaz kinaz izozim 2, Bad: Bcl-2 aracılı ölüm promotor, mTOR: rapamisinin memeli hedefi

2.5. Brassinosteroidler

Yakın bir zamana kadar, bitki büyüme ve gelişimini düzenleyen hormonlar olarak oksinler, gibberellinler, sitokininler, absisik asit ve etilen hormonları bilinmekteydi. Fakat son yıllarda bitki hormonlarının altıncı grubu olarak brassinosteroidi de göz önüne almayı gerektiren kanıtlar ortaya konmuştur. Steroidlerin büyüme ve fizyolojik aşamaların kontrolünü içeren sinyal molekülleri için gerekli olduğu bilinmektedir. Bitkilerden izole edilen steroidal maddeler olan brassinosteroidler (BR'ler), bitki büyümesini ve gelişimini düzenler ve hayvan steroidal hormonlarla yapısal benzerlik gösterirler [18]. BR'ler bitkilerde gen ekspresyonunun düzenlenmesi, hücre bölünmesi ve uzaması, çimlenme, vejetatif ve reproduktif gelişim, damar farklılaşması, kök büyümesi, programlı hücre ölümü ve homeostaz içeren gelişimsel ve fizyolojik aşamaların kontrolünü sağlar. Hücresel seviyede, BR'ler uzama ve fizyonu uyarır, protein ve nükleik asit sentezini aktive eder, fotosentetik kapasiteyi artırır, hücre duvarının özelliklerini ve hücre permeabilitesini değiştirir [59].

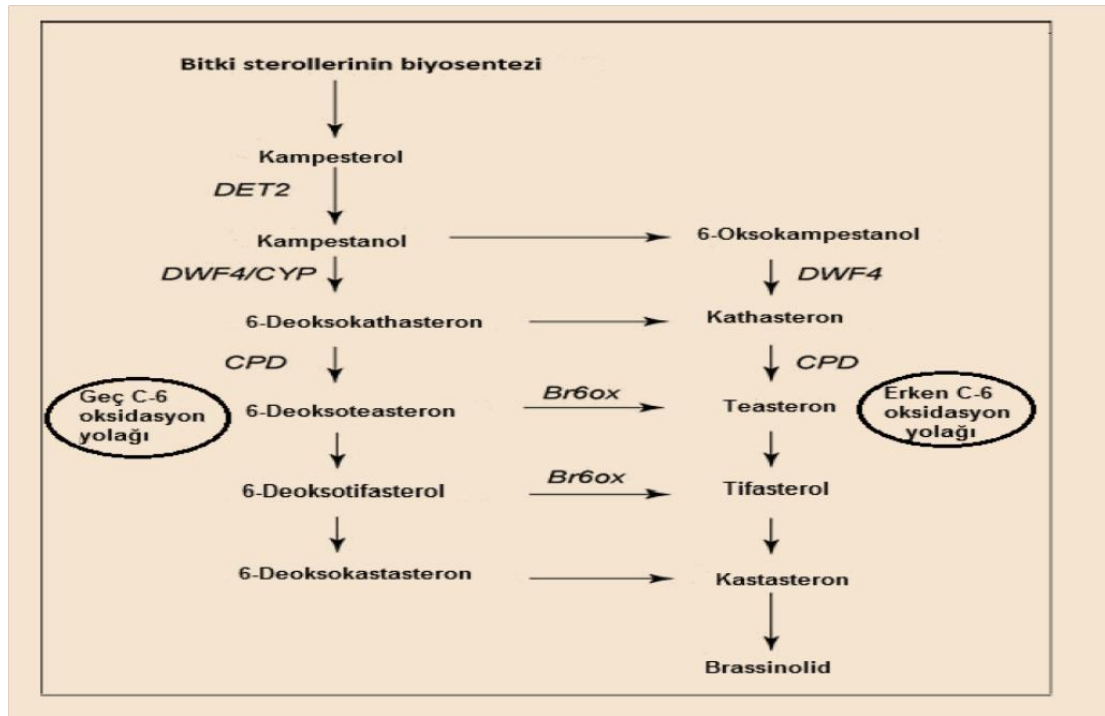
2.5.1. Brassinosteroidlerin Çeşitleri

Grove ve ark. (1979), ilk kez kolzadan brassinolidi [(22R, 23R, 24S)-2 α , 3 α , 22,23 tetrahidroksi-24-metil- β -homo-7-oksa-5 α -kolestan-6-on)] izole etmeyi başarmışlardır. BR' ler kolestanın hidroksile edilmiş türevleridir ve BR' lerin yapısal varyasyonları, C17 yan zincirinin yanı sıra A ve B halkası üzerine farklı grupların gelmesi ile elde edilir. Farklı BR' ler, yan zincir uzunluğuna (yan zincirdeki C sayılarına) göre, C27, C28 ve C29 BR' leri olarak sınıflandırılmaktadır [60]. C27, C28 ve C29 steroidlerini içeren BR' ler, benzer yan zincir yapılarına sahiptir ve genel olarak 5 α -kolestan iskeletini taşımaktadır. C27 BR' leri, C24 pozisyonunda alkil grubu içermemektedir ve kolesterolden üretilmektedir. C28 BR' leri, C24 pozisyonunda bir metilen, α -metil veya β - metil gruplarına sahiptir ve 24-metilenekolesterol, kampesterol ya da 24-epikampesterolden türevlenebilmektedir. C29 BR' leri, C24'de etil veya α -etil grubuna sahiptir ve isofukosterol veya sitosterolden türevlenmektedir. Ayrıca, C24' de bir metilen ve C25' de ilave bir metil grubu içeren C29 BR' leri, 25-metil-24-metilenekolesterolden türevlenmektedir. C28 BR' lerin ara bileşikleri, bitkilerde en yaygın bulunan formlardır. Doğadaki BR' lere ardışık sayısal numaralandırma yapılmıştır. BR1, brassinolidi ifade etmekte ve diğerleri BR2, BR3, BR4...BRn olarak devam etmektedir. Bununla birlikte tüm BR' ler, daima biyolojik olarak aktif değildir. Brassinolid (BL), 24-epibrassinolid (24-epiBL) ve 28-homobrassinolid (28-homoBL) fizyolojik çalışmalarda yaygın olarak kullanılan biyolojik aktif brassinosteroidlerdir. Biyolojik olarak en aktif BR olan BL, C28 BR' leri içersinde yer almaktadır [61].

2.5.2 Brassinosteroidlerin Biyosentezi

BR biyosentezi ve biyosentezinden sorumlu genler, ilk olarak *Arabidopsis* (tere), pirinç ve domateste tanımlanmıştır. BR' ler kampesterol, sitosterol ve kolesterolden sentezlenirler. Kampesterol ve sitosterol hücre membranında fazla bulunurken, kolesterol oldukça az miktarda bulunur. BR' in en aktif formu olan brassinolid, kampesterolden birçok yol ile sentezlenir. Basamak basamak yapılan metabolik çalışmalar, kampesterolden kastasterona erken ve geç C-6 oksidasyon yolağı olmak üzere 2 bağlantılı paralel yolak olduğunu göstermiştir (Şekil 2. 10). Son basamaklarda, kastasteron B halkasının laktanizasyonu ile brassinolide dönüştürülür. BR biyosentezindeki oksidasyon basamakları sitokrom P450 monooksijenaz

enzimleri tarafından sentezlenir. C-22, C-23 hidroksilasyon ve C-6 oksidasyon reaksiyonları BR biyosentezinde anahtar regülatör basamaklardır [62]. Karmaşık olan BR metabolik yolları; dehidrojenasyon, demetilasyon, epimerizasyon, esterifikasyon, glikozilasyon, hidroksilasyon ve sülfonasyon gibi metabolik süreçleri gerektirmektedir [60]. Bitkilerde organa özel regülasyonda, BR biyosentez genlerinin ekspresyonuna bakıldığında *BR6ox* ve *DWF4* genlerinin ekspresyonunun maksimum olarak sürgün uçlarında ve sonrasında da meyvede olması, bu organlardaki endojen BR seviyeleri ile de uyuşmasına bağlı olarak, BR'lerin genç ve gelişmekte olan organlarda oldukça aktif olarak sentez edildiğini ortaya koymaktadır [4, 10]. BR biyosentezinin subsellüler lokalizasyonu henüz tam olarak tanımlanmamıştır.



Şekil 2. 10. Brassinosteroidlerin Biyosentez Mekanizması [62].

2.5.3 Epibrassinolid (EBR)

BR ler düşük moleküler ağırlığa sahip steroid içerikleridir ve bitkilerde büyümeyi ve gelişimi düzenledikleri bilinmektedir. BR' ler, BR türevli antikanser ilaçların üretilebilmesi için antikanser ve antiproliferatif yaklaşım için çeşitli sistemlerde denenmiştir. Doğal BR' ler olan EBR' nin kültüre edilmiş hibridoma fare hücreleri üzerine etkisi incelenmiştir. EBR' nin tipik etkileri olarak şunlar belirlenmiştir:

- I. Mitokondriyal membran potansiyelini arttırmaktadır.
- II. Hücre içi antikor seviyesini azaltmaktadır.

III. Hücrelerin G0/G1 fazında tutulu kalmasını sağlamaktadır .

IV. S fazındaki hücre oranını azaltmaktadır [63].

Daha önce yapılan çalışmalarda BR ailesi üyesi EBR' nin antikanser etkisi, meme ve prostat kanseri gibi hücre hatlarında incelenmiştir. Antiproliferatif aktivitede uygulanması için mikromolar konsantrasyonlarda olumlu sonuçlar elde edildiği gösterilmiştir, fakat hala EBR' nin hücre ölümü üzerindeki moleküler mekanizması tam olarak bilinmemektedir [18, 19].

BR' ler ve insan steroidleri arasında benzerlik bulunmaktadır. İnsan steroid reseptörleriyle BR' ler etkileşimleri reporter assay ve yarışmalı bağlanma deneyleriyle (competition binding assay) ile belirlenmeye çalışılmıştır. Reporter assay EBR' nin östrojen reseptör- α (ER- α)' ya zayıf bir antagonist etkisi olduğunu göstermektedir, cholestanon ve BR4848 gibi sentetik BR' ler ER- α , östrojen reseptör α (ER- α) ve androjen reseptör (AR) üzerinde agonistik etkisi olduğunu göstermektedir. Yarışmalı bağlanma deneyi ile de ER- α ve ER- β ' ya bağlanması incelenmiştir ve EBR' nin ER- α ve ER- β ' ya zayıf bağlanma gösterdiği anlaşılmıştır. Bu sonuçlar EBR, 28-homoCS ve BR4848' in östrojen reseptörlerine bağlanmadığını göstermektedir [19]. Yapılan başka bir araştırmada BR uygulamasından sonra MCF-7 hücrelerinde immuno floresan belirleme yöntemiyle ER- α ve ER- β lokalizasyonlarının değişimleri incelenmiştir. İlaç uygulanmamış MCF-7 hücrelerinde ER- α ' nın nükleusta daha fazla, 28-homoCS ve EBR uygulanan MCF-7 hücrelerinde ER- α ' nın ise sitoplazmada bulunduğu gösterilmiştir. ER- α ' ya zıt olarak, ER- β ilaç uygulanmamış MCF-7 hücrelerinde sitoplazmada predominant olarak bulunur. ER- β 28-homoCS uygulamasından sonra nükleusta yeniden bulunabildiği, EBR uygulanan hücrelerde nükleusun periferinde daha fazla saptandığı belirtilmiştir. Bu değişimler BR uygulamasını ardışık ER' nin ifadesinin azalmasıyla birlikte gerçekleşmektedir. Yapılan çalışmalar BR' nin hücre döngüsü mekanizması etkileşimiyle büyümeyi engellemede potansiyel bir ilaç olduğunu göstermektedir [19].

Yapılan araştırmalarda östrojenin kolon kanserine karşı koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir. Östrojen reseptör β (ER- β) kolorektal epitelde ifade edilen öncü

dominant östrojen reseptördür ve koruyucu etkisiyle ilişkili olduğu düşünülmektedir [19].

Hormon duyarlı ve duyarsız meme kanseri (MCF-7/MDA-MB-468) ve prostat kanseri hücre hatlarında (LNCaP/DU145) daha önce yapılan bir çalışmada EBR' nin canlılık, proliferasyon ve hücre döngüsü üzerindeki etkisi incelenmiştir. BR' nin sitotoksik etkisinin BR-nükleer reseptör etkileşimi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir [19]. BR' nin kanser hücrelerinde doza bağlı olarak hücre büyümesini engellediği görülmüştür. Flow sitometri sonuçlarına göre BR' nin MDA-MB-468, LNCaP ve MCF-7 hücre hatlarında hücre döngüsünün G1 fazında tutulu kalmasına sebep olduğu ve MDA-MB-468, LNCaP ve az miktarda Du145 hücre hatlarında apoptozu uyardığı görülmüştür. Bu sonuçlar ışığında doğal BRlerin mikromolar konsantrasyonlarda hücre büyümesini engellediğini göstermektedir [19].

Yapılan başka bir araştırmada EBR uygulamalarının MCF-7 hücre hatlarında anti-apoptotik Bcl-2 ve Bcl-xL proteinlerinin ekspresyonunu uyardığı görülmüştür [18]. p53 ve MDM-2 protein seviyeleri BR uygulamasından az miktarda etkilendiği gösterilmiştir. MDA-MB-468 meme kanseri hücre hatlarında 24 saatlik BR uygulamasından sonra kaspaz-3' ün fragmentlere ayrıldığı görülmüştür. MDA-MB-468 meme kanseri hücre hatlarındaki BR uygulamasının G1 fazında tutulu kalmayla, subG1 fraksiyonunun artmasıyla sonuçlandığı ve apoptotik cisimciklerin oluşmasına öncülük ettiği görülmüştür [18].

Bu araştırmada ise SW480 ve DLD-1 kolon kanseri hücre hatlarında EBR' nin antikanser ve antiproliferatif etkilerinin incelenmesi hedeflenmiştir. Bu nedenle hücre hatlarındaki EBR' nin etkileri 3 aşamada incelenmiştir: hücre canlılığı ve hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri, programlı hücre ölümü apoptoz üzerindeki etkileri ve EBR' nin farklı kaspazlar aracılığı ile tetiklediği apoptozun MAPK ve PI3K/AKT hücre sağkalım yolları ile ilişkisi. EBR' nin hücre hatlarında hücre ölümü ve hücre sağkalımı üzerindeki etkilerinin açıklığa kavuşturulması planlanmıştır.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1 KULLANILAN MALZEMELER

3.1.1 Kullanılan Cihazlar

Kullanılan cihazlar ekler bölümünde Tablo 1' de sunulmuştur.

3.1.2 Hücre Kültürü Donanımları

Hücre kültüründe kullanılan donanımlar ekler bölümünde Tablo 2' de sunulmuştur.

3.1.3 Kullanılan Kimyasallar

Çalışma kapsamında kullanılan kimyasallar ekler bölümünde Tablo 3' de sunulmuştur.

3.1.4 Kullanılan Tamponlar

3.1.4.1 10X TBS Hazırlanışı

86,6 gr NaCl, 12,11 gr Tris- Baz karışımı pH: 8' e ayarlandıktan sonra distile su ile 1000 ml' e tamamlanır. Hazırlanan 10X TBS kullanılmak için 1X TBS' e dönüştürülür.

3.1.4.2 1X TBS-Tween Hazırlanışı

1X TBS içine 500 µl Tween 20 konularak hazırlanır.

3.1.4.3 Yürütme Tamponunun Hazırlanışı

30,3 gr Tris-Baz, 114 gr Glisin ve 10 gr SDS tartılarak 1000 ml distile su içinde çözülür. Hazırlanan 10X Yürütme Tamponu, jel yürütme esnasında kullanılmak üzere 1X' e dönüştürülür.

3.1.4.4 Transfer Tamponunun Hazırlanışı

200 ml 10X yürütme tamponunun üzerine 100 ml metanol konularak distile su ile 1000 ml' e tamamlanır.

3.1.4.5 Yürütme Jelinin Hazırlanması

Proteinler ağırlıklarına göre ayrılmaları için %12' lik SDS poliakrilamid jelde yürütülürler. Jel içeriği Ekler Bölümünde Tablo 4' te sunulmuştur.

3.1.4.6 Hücre Dondurma Medyasının Hazırlanması

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

3.2 YÖNTEMLER

3.2.1 Hücre Kültürü

SW480 ve DLD-1 kolon kanseri hücre hatları American Type Culture Collection' dan temin edilmiştir. SW480 kolon kanseri hücreleri Alpha MEM Eagle besiyerinde % 10 ısı ile inaktive olmuş fetal sığır serumu (FCS) ve 10 U/ml penisilin/streptomisin antibiyotik katkısı ile, DLD-1 kolon kanseri hücreleri McCoy's 5A besiyerinde % 10 ısı ile inaktive olmuş fetal sığır serumu (FCS) ve 10 U/ml penisilin/streptomisin antibiyotik katkısı ile ve %5 CO₂ içeren 37°C inkubatörlerde büyütülmüştür. Hazırlanan besiyeri 0,22 µM por çapına sahip hücre kültürü ile

uyumlu filtrelerden geçirilerek steril hale getirilip, 50 ml' lik falkon tüplerinde +4°C de saklanmıştır.

Hücreler 75 cm² lik petri kaplarında yetiştirilmiştir. Protein izolasyonu için 100 ve 60 mm' lik, DNA izolasyonu için 75cm² lik petri kaplarına, floresan mikroskobu ve florometre çalışmaları için 12 kuyucuklu petrilere hücre ekimleri gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin gece boyunca petri kaplarına yapışmaları beklendikten sonra gerekli ilaç uygulamaları belirlenen sürelerde uygulanmış ve 37°C' de %5 CO₂ içeren etüvde bekletilmiştir. Hücre ekimi ya da petri kabındaki hücre sayılarının artması sonucunda hücre pasajlanması işlemi için ortamdan besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 75 cm² lik petri kaplarında 2 ml fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkanıp 2 ml tripsin-EDTA (etilen daimin tetra asetik asit) (%0,25) ile CO₂ içeren etüvde 3 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda hücrelerin zarar görmesinin engellenmesi için petri kabına 2 ml McCoy2s 5A veya Alpha MEM Eagle besiyeri eklenerek tripsinin aktivitesi durdurulmuş hücreler santrifüj tüpüne alınmıştır. 2000 rpm' de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atılmış, hücrelerin üzerine 1 ml 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, 1 ml' deki hücre sayısının bulunabilmesi amacı ile 10⁴ ile çarpılmıştır. 1,5x10⁴ hücre, 75 cm²' lik petri kaplarına ekilerek hücrelerin pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.2 Hücre Canlılığının Belirlenmesi

MTT belirteci, canlı hücrelerde hidrojenaz enzimi ile indirgendiğinde çözünemeyen mor formazan tuzu oluşturması sonucu kolorimetrik yöntemle hücre canlılığına bakılmıştır. SW480 ve DLD-1 kolon kanseri hücreleri 96 kuyucuklu petrinin her kuyucuğunda 1X10⁴ hücre olacak şekilde ekim yapılmış ve 24 saat boyunca hücrelerin petriye yapışması için beklenmiştir. EBR uygulaması doza bağlı olarak

(10-50 μM) 24 saat boyunca uygulanmıştır. Her kuyucuğa 10 μl MTT her kuyucuğa eklenmiş ve 4 saat boyunca etüvde bekletilmiştir. Bu süre sonunda MTT ayırıcı eklenmiş besiyeri hücrelerden çekilmiş ve her kuyucuğa 100 μl DMSO eklenmiştir ve karanlıkta 5 dakika bekletilmiştir. Mikroplaka okuyucuda, ikili dalga boyunda 570 nm ve 655 nm' de absorbans ölçümü ile okutulmuştur.

3.2.3 Hücre Sağkalım Tayini

EBR' nin hücreler üzerindeki sitostatik etkisi değerlendirilmiştir. 6 kuyucuklu petrinin her kuyucuğunda 5×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır ve hücreler yapışması için 37°C ' de bir gece inkübe edildikten sonra hücrelere 30 μM EBR 24, 48, 72 ve 96 saat boyunca uygulanmıştır. Hücreler tripsin ile toplanarak 2000 rpm' de 5 dakika boyunca santrifüj yardımıyla çöktürülmüştür. Hücre pelleti 50 μl besiyeri ve 50 μl 0.4 % (w/v) Tripan Mavisı boyası ile karıştırıldıktan sonra bu karışımdan 10 μl çekilerek Neubauer hemositometre ile sayım yapılmıştır.

3.2.4 Soft-Agar Koloni Oluşum Testi

Hücrelerin yüzeye yapışmasının engellendiği ortamda hücrelerin büyüyebilme yeteneğinin ölçülmesi amacı ile soft-agar koloni oluşum testi yapılmıştır. Önceden hazırlanmış ve otoklavlanmış %0,5' lik agaroz çözeltisi donmaması için 37° lik etüvde bekletilmiştir. Hücreler ekilmeden önce 6 kuyucuklu petrilere daha önceden hazırlanmış ve filtre ile süzülerek steril hale getirilmiş %20 FCS içeren 2X' lik medya ile 1:1 oranında %0,5' lik agaroz ile kaplanmıştır ve agarın donması için 30 dakika laminar flowun içinde bekletilmiştir. SW480 ve DLD-1 kolon kanseri hücreleri 6 kuyucuklu petrinin her kuyucuğunda $2,5 \times 10^3$ hücre olacak şekilde 1:1 oranında olacak şekilde 333 μl 2X medya, 333 μl %0,3 agaroz ve 333 μl hücreler karıştırılıp, %0,5 agaroz ile kaplanan petrilere ekilmiştir. Hücreler 30 μM EBR ve 30 μM DMSO ile 15 gün muamele edilmiştir ve %5 CO_2 içeren 37°C inkubatörlerde büyütülmüştür. Hücreleri beslemek için üst medya 2 günde 1 yeni 1X medya ile değiştirilmiştir. Oluşan kolonileri gözlemleyebilmek için 0,5 ml %0,005' lik kristal viyole ile 20 dakika bekletilmiştir. Soft agarda hücrelerin oluşturduğu koloniler ışık mikroskobu ve floresan mikroskobunda 100X büyütme ile incelenmiştir.

3.2.5 Metastatik Etkinin Belirlenmesinde Kullanılan Parametreler

3.2.5.1 Koloni Oluşum Testi

EBR' nin hücrelerdeki metastatik etkisini ve hücreler tek başına bırakıldığında nasıl davrandıklarını belirlemek için koloni oluşum testi yapılmıştır. 6 kuyucuklu petrinin her kuyucuğunda 4×10^3 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır ve hücreler yapışması için 37°C ' de bir gece inkübe edildikten sonra hücrelere $30 \mu\text{M}$ EBR 24, 48, 72 ve 96 saat boyunca uygulandıktan sonra ilaçlı medya çekilip atılarak ilaçsız medya ile değiştirildikten sonra hücrelerin büyümesi incelenmiştir. 14 gün sonunda hücreler metanol asetik asit (3:1) ile 5 dakika muamele edilerek fikse edilmiştir. Hücreler $0,5 \text{ ml } \%0,5$ ' lik kristal viyole ile 20 dakika muamele edildikten sonra yıkanmıştır ve morfolojik görüntüler trans UV ile çekilmiştir.

3.2.5.2 Anti-metastatik Etkinin Belirlenmesinde Kullanılacak Parametreler: Yara İyileşme Analizi

EBR' nin SW480 ve DLD-1 kolon kanseri hücrelerinde lateral hücre hareketi üzerindeki etkileri yara iyileşme analizi ile tespit edilmesi amaçlanmıştır. Ekimden önce 6 kuyucuklu petri kaplarının alt yüzeyleri birbirine paralel 15 adet çizgi ve bu çizgilere dik birbirine paralel 3 çizgi çizilerek hazırlanan çıkartma kağıtlar ile kaplanmıştır. 6 kuyucuklu petrinin her kuyucuğunda 5×10^5 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır ve hücreler yapışması için 37°C ' de bir gece inkübe edilmiştir. Ekimden 24 saat sonra birbirine paralel uzanan 3 çizgi hizasındaki hücreler $200 \mu\text{l}$ ' lik steril pipet ucu ile kazınarak yara oluşturulmuştur. Birbirine paralel uzanan 15 çizgi ile yara çizgilerinin kesiştiği noktalardaki yara genişlikleri, invert mikroskopta mikrometrik oküler ile ölçülerek bunlar 0. saat değerleri (W_0) olarak kaydedilmiştir, ölçümün hemen ardından petrilere kontrol ve ilaçlı medya eklenmiştir. Her gün aynı saatte ölçüm yapılmıştır ve bu işleme 72 saat devam edilmiştir. Aşağıdaki formülle motilite indeksi (MoI) (migrasyon indeksi) hesaplanarak ölçüm sonuçları değerlendirilmiştir.

$$\text{MoI} = 1 - (W_t/W_0)$$

3.2.6 Apoptotik Hücre Ölümünün Belirlenmesi

3.2.6.1 Propidyum iyodür (PI) Boyama

6 kuyucuklu petrinin her kuyucuğunda 5×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Hücrelerin yapışması için 37°C ' de bir gece inkübe edilmiştir. Yapışan hücelere $30 \mu\text{M}$ EBR 24 ve 48 saat boyunca uygulanmıştır. Her bir kuyucuğa $2 \mu\text{g/ml}$ PI (anastok: 50 mg/ml) uygulanarak 15 dakika etüvde inkübe edildikten sonra yeşil filtrede ölü hücelere bakılmıştır.

3.2.6.2 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) Boyama

6 kuyucuklu petrinin her kuyucuğunda 5×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Hücrelerin yapışması için 37°C ' de bir gece inkübe edilmiştir. Yapışan hücelere $30 \mu\text{M}$ EBR 24 ve 48 saat boyunca uygulanmıştır. Her bir kuyucuğa $1 \mu\text{l/ml}$ DAPI uygulanarak 30 dakika etüvde inkübe edildikten sonra mavi filtrede DNA kırıklarına bakılmıştır.

3.2.6.3 3,3'-diheksilkarboksisiyanin iyodür (DiOC₆)

6 kuyucuklu petrinin her kuyucuğunda 5×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Hücrelerin yapışması için 37°C ' de bir gece inkübe edilmiştir. Yapışan hücelere $30 \mu\text{M}$ EBR 24 ve 48 saat boyunca uygulanmıştır. Her bir kuyucuğa $1 \mu\text{l/ml}$ DiOC₆ uygulanarak 15 dakika etüvde inkübe edildikten sonra aqua mavi filtrede canlı hücelere bakılmıştır.

3.2.6.4 Mitokondri Membran Potansiyelinin Belirlenmesi

EBR uygulaması sonucunda hücrelerdeki mitokondriyal membran potansiyelindeki kayıpların ölçülmesi hedeflenmiştir. SW480 ve DLD-1 kolon kanseri hücre hatları 6 kuyucuklu petrilere her kuyucuğunda 1×10^5 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Hücrelerin yapışması için 37°C ' de bir gece inkübe edilmiştir. Yapışan hücreler 48 saat boyunca $30 \mu\text{M}$ EBR ile muamele edilmiştir. Kuyucuklarda bulunan medyalar uzaklaştırılmıştır ve her bir kuyucuğa $1 \mu\text{l/ml}$ DiOC₆ uygulanarak 15 dakika etüvde

inkübe edilerek hücreler Dioc₆ floresan proba boyanmıştır. İnkübasyon süresi sonucunda floresan boyalı medya ortamdan uzaklaştırılmıştır. Ardından hücreler 500 µl 1xPBS ile yıkanmıştır ve hücrelerin yapıştıkları yüzeyden kalkması için her kuyucuğa 300 µl tripsin-EDTA (etilen daimin tetra asetik asit) (%0,25) ile CO₂ içeren etüvde 3 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda hücrelerin zarar görmesinin engellenmesi için petri kabına 300 µ medya eklenerek hücreler santrifüj tüpüne alınmıştır. 2000 rpm' de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atılmış, hücrelerin üzerine 200 µl 1xPBS eklenerek pipetaj yapılmıştır. Hücreler mitokondriyal membran potansiyel (MMP) kaybını ölçmek için özel olan 96 kuyucuklu petrinin kuyucuklarına 50 µl olarak 4 tekrarlı olacak şekilde konulmuştur. Hücrelerdeki Mitokondriyal membran potansiyel (MMP) kaybı Fluoraskan Ascent microplate fluorometer (Thermo Labsystems, Beverly, MA, USA) (eksitasyon/emisyon=485 nm/538 nm) ile ölçülmüştür.

3.2.7 Total Protein İzolasyonu

100 mm' lik petrilere 1,5x10⁵ hücre ekilmiştir. Hücrelerin yapışması için 37°C' de bir gece inkübe edilmiştir. Yapışan hücrelere 30 µM EBR 12, 24 ve 48 saat hücrelere uygulanmıştır. Hücreler 1XPBS ile toplanarak 2 dakika 13200 rpm' de çöktürülmüştür. Bu işlem petrideki bütün hücreler toplanana kadar tekrarlanmıştır. Santrifüjle çöktürülen hücrelere lizis tamponu eklenmiştir. Örnekler 20 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda 20 dakika 13200 rpm de +4 °C' de santrifüj yapılmıştır. Üst faz yeni Ependorf tüpüne alınarak miktar tayini yapılmıştır.

3.2.8 Bradford Protein Miktar Tayini

Protein içeriğinin belirlenmesi için Bradford yöntemi kullanılmıştır. Konsantrasyonu 1,5 µg/ µl olan BSA (sığır serum albumin) kullanılarak önce standart eğri oluşturulmuştur. Bu eğri hazırlanırken; 1,5 µg/ µl, 3 µg/ µl, 4,5 µg/ µl, 6 µg/ µl BSA' nın üzerine Bradford çözeltisi eklenerek 595 nm dalga boyunda absorbanları ölçülmüş, elde edilen proteinlerden 1 µg/ µl alınarak aynı dalga boylarında

absorbansları belirlenmiştir. Standartların absorbans/ konsantrasyon grafiği elde edildikten sonra, bu grafiğin eğim eşitliği kullanılarak absorbans değerleri bilinen örneklerin konsantrasyonları belirlenmiştir.

3.2.9 İmmunoblotlama Yöntemi

3.2.9.1 Proteinlerin Hazırlanması ve SDS-PAGE' de Yürütülmesi

İmmunoblotlama yöntemi için laemmlı tamponu (4x) ve 30 µg protein örnekleri 1:4 oranında karıştırılarak 95°C' de 5 dakika tutulmuştur. Tablo5' te verilen miktarlara göre %4 yükleme ve % 12' lik ayırma SDS PAGE hazırlanarak, proteinler bu jel sistemine yüklenmişlerdir. Jel sisteminde ilk kuyucuk daima protein belirteç ile birlikte 100V' da 2 saat yürütme tamponunda yürütülmüştür.

3.2.9.2 Membrana Transfer ve Bloklama

SDS-PAGE sonrası, yükleme jeli kesilerek ortamdan uzaklaştırılmıştır. Ayırma jeli boyutunda kesilen poliviniliden florid (PVDF) membranlar jellerin altına konduktan sonra, membranlar jellerin her iki tarafında transfer tamponunda ıslatılmış filtre kağıtları yerleştirilmiştir. Membran ve filtre kağıtları kasetlere yerleştirilerek 6 dakika 25 voltta 25 mili amperde transfer işlemi gerçekleştirilmiştir. Transfer işlemi sonrası membranlar, 2 saat oda sıcaklığına, %5' lik yağsız süt tozu(%0,1 Tween 20 içeren 1XTBS) içerisinde bekletilerek bloklama yapılmıştır.

3.2.9.3 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. Birincil antikorlar %5' lik yağsız süt tozu (%0,1 Tween20 içeren 1xTBS) içinde aşağıda belirtilen dilüsyonlarda uygulanmıştır.

Beta Aktin, PARP, kesilmiş PARP, kaspaz 9, kaspaz 3, kaspaz 7, kaspaz 8, Puma, Bak, Bax, Bid, Bad, Bim, Bcl-xL, Mcl-1, Src, c-Raf, ERK1/2, p38, p-p38

(T180/Y182), SAPK/JNK, p-SAPK/JNK, c-Jun, p-PTEN, PI3K, AKT, p-AKT(T308) her bir antikor super block T-20 çözeltisi ile (Pierce) 1:500- 1:1000 aralığında çalışılmıştır. HRP-konjuge sekonder antikorlar 1:5000 aralığında çalışılmıştır.

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

3.2.9.4 Blotların Görüntülenmesi

Membranlar kemiluminisans tamponu ile bekletildikten sonra, röntgen kasetleri içerisine streç filmle sarılarak yerleştirilmiştir. Membranların üzerine röntgen filmleri yerleştirilerek elde edilen kemiluminisansın filmi yakması sağlanmıştır. Geliştirici ve sabitleyici çözeltileri ile istenilen görüntü elde edilinceye kadar yıkanarak, en son filmler suda yıkanarak kurumaya bırakılmıştır.

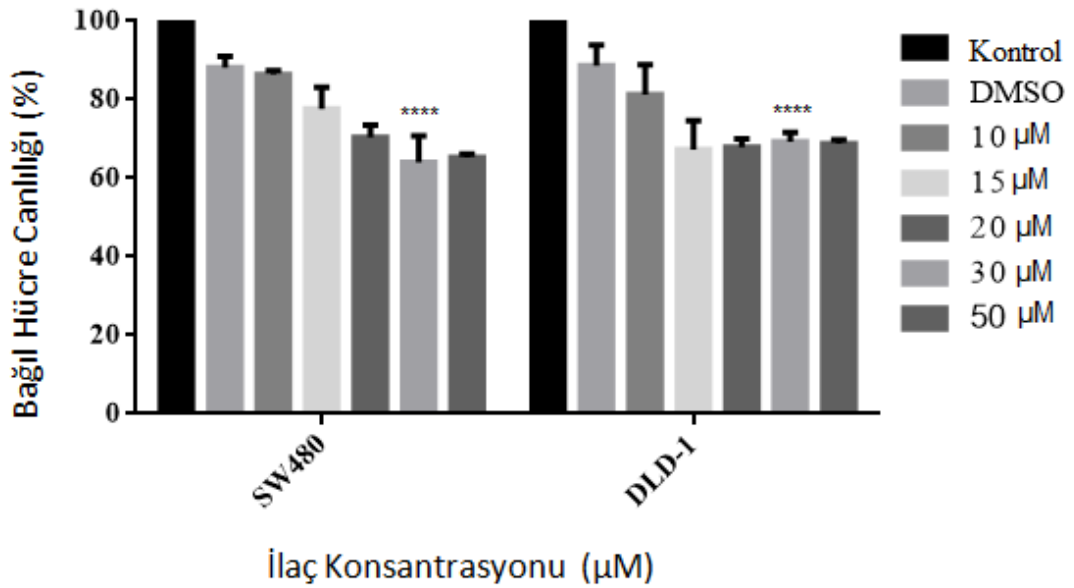
3.2.9 İstatiksel Analiz

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.

4. BULGULAR

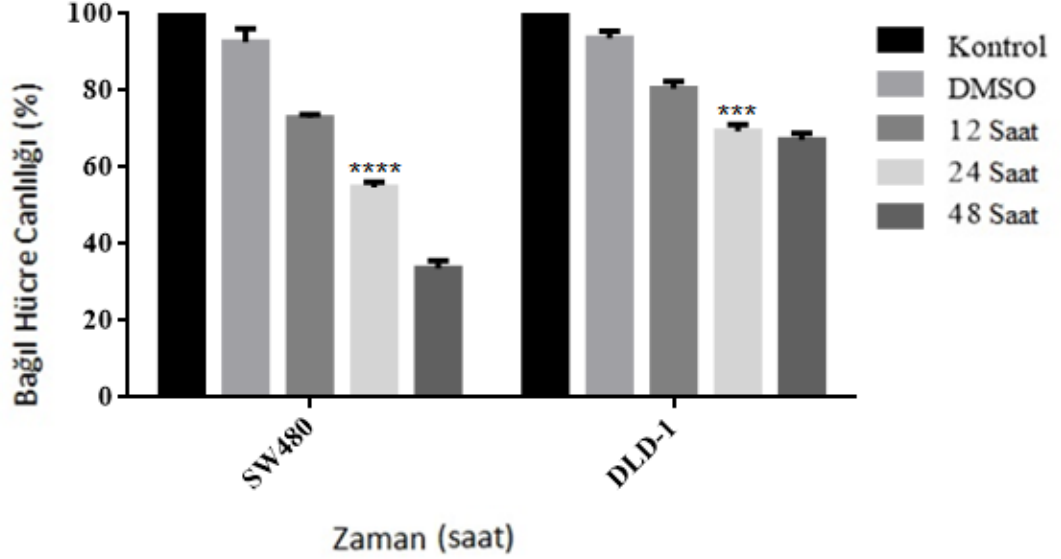
4.1 Epibrassinolid' in SW480 ve DLD-1 Kolon Kanseri Hücre Hatlarında Hücre Canlılığına Etkisi

Farklı konsantrasyonlarda (10-50 μ M) EBR ile muamele edilmeleri sonucunda SW480 ve DLD-1 kolon kanseri hücre hatlarında EBR' nin hücre canlılığı üzerine etkisini belirleyebilmek için MTT hücre canlılığı testi uygulanmıştır (Şekil 4. 1). EBR uygulaması sonucunda SW480 ve DLD-1 hücre hatlarında hücre canlılığının sırasıyla en fazla %64 ve %69 oranında azalmasına sebep olduğu görülmüştür. SW480 ve DLD-1 hücre hatlarında kullanılacak uygun EBR dozu 30 μ M olarak belirlenmiştir.



Şekil 4. 1. EBR' nin SW480 ve DLD-1 kolon kanseri hücre hatlarında konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığına etkisi. SW480 ve DLD-1 kolon kanseri hücreleri 96 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğunda 1×10^4 hücre olacak şekilde 3' er tekrarlı olacak şekilde ekilmiştir. MTT testi 3 defa tekrarlanıp sonuçların ortalaması alınmıştır. **** $p < 0.0001$.

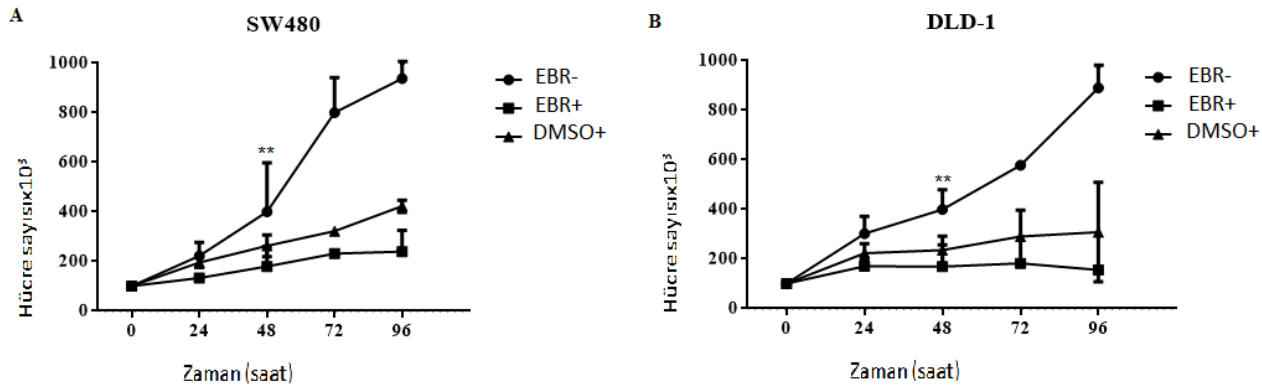
SW480 ve DLD-1 kolon kanseri hücre hatlarında 30 µM EBR'nin zamana bağlı olarak hücre canlılığı üzerindeki etkisini belirleyebilmek için geç zamanlı MTT hücre canlılığı testi uygulanmıştır. Hücre canlılığındaki azalmanın EBR' nin kendisinden mi yoksa içinde çözündüğü DMSO' dan mı kaynaklandığını anlayabilmek için hücreler 30 µl DMSO ile muamele edilmiştir. 30 µl DMSO uygulanmasının nedeni, kullanılan EBR dozunun total hacmi 1 ml olan DMSO EBR karışımında 30 µM EBR konsantrasyonunun 30 µl DMSO içermesidir, yani kullanılan ilaç dozunun aynı olması için 30 µl DMSO ve 30 µM EBR uygulanması uygun görülmüştür. DMSO uygulaması sonucunda SW480 hücrelerinde %92.70 ve DLD-1 hücrelerinde %93.69 hücre canlılığı görülmüştür. Buna dayanarak DMSO' nun her iki hücre hattında hücre canlılığı üzerinde kayda değer bir etkisinin olmadığı görülmüştür. EBR zamana bağlı olarak (12 saat, 24 saat, 48 saat) SW480 ve DLD-1 hücrelerinde canlılığın azalmasına sebep olduğu görülmüştür (Şekil 4. 2). Bundan sonraki yapılacak deneylerde, EBR uygulaması sonucunda SW480 ve DLD-1 hücre hatlarında sırasıyla %35,7 ve %67 oranında hücre canlılığında azalma görülen 48 saatlik EBR uygulamasına karar verilmiştir.



Şekil 4. 2. EBR' nin SW480 ve DLD-1 kolon kanseri hücre hatlarında zamana bağlı olarak hücre canlılığına etkisi. SW480 ve DLD-1 kolon kanseri hücreleri 96 kuyucuklu petrinin her kuyucuğunda 1×10^4 hücre olacak 2' şer tekrarlı olacak şekilde ekilmiştir ve 24 saat sonunda farklı zamanlarda (12-48 saat) uygulanan EBR nin hücrelerin zamana bağlı olarak canlılığa olan etkisi araştırılmıştır. MTT testi 3 defa tekrarlanıp sonuçların ortalaması alınmıştır. ***p<0.001; ****p<0.0001.

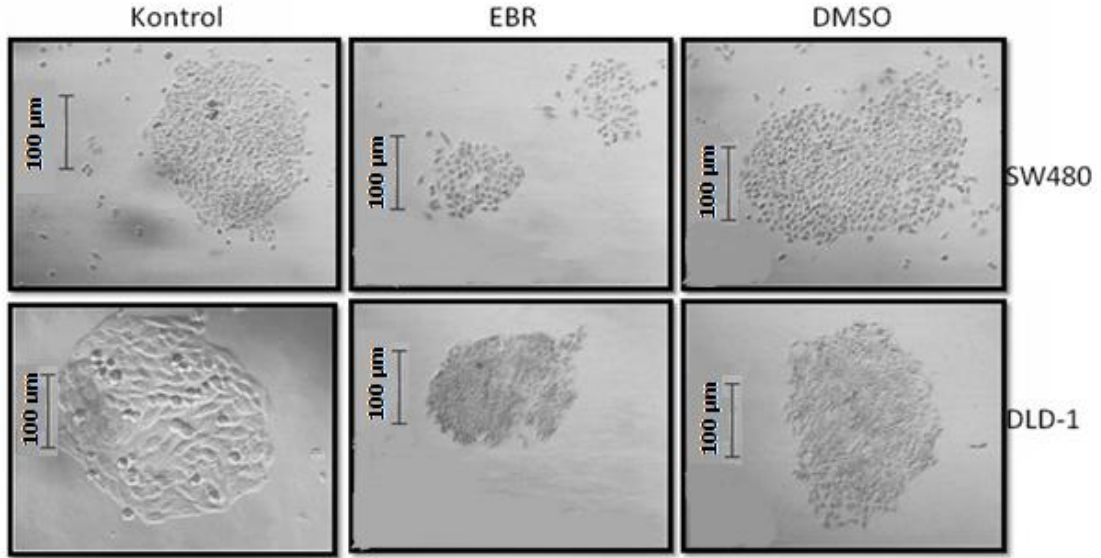
4.2 Epibrassinolid' in SW480 ve DLD-1 Kolon Kanseri Hücre Hatlarında Hücre Sağkalımına Etkisi

SW480 ve DLD-1 hücrelerinde 30 µM EBR' nin zamana bağlı olarak hücre sağkalım üzerindeki etkisini belirleyebilmek için hücre sağkalım testi yapılmıştır. Hücre sağkalımındaki azalmanın EBR' nin kendisinden mi yoksa içinde çözüldüğü DMSO' dan mı kaynaklandığını anlayabilmek için yani hücrelere 30 µl DMSO uygulanmıştır. SW480 ve DLD-1 kontrol gruplarında zamana bağlı olarak hücre sayısının arttığı görülmüştür. 30 µl DMSO uygulanan hücrelere oranla 30 µM EBR uygulanan hücrelerde zamana bağlı olarak hücre sayısında kayda değer oranda azalma olduğu görülmüştür (Şekil 4. 3). Sonuç olarak EBR' nin SW480 ve DLD-1 hücrelerinin sağkalımında sitostatik bir etkisi olduğu görülmüştür.



Şekil 4. 3. EBR' nin SW480 ve DLD-1 kolon kanseri hücre hatlarında hücre sağkalımına etkisi. SW480 ve DLD-1 kolon kanseri hücre hatları 100×10^3 hücre/kuyu 6 kuyucuklu petrilere 2' şer tekrarlı olacak şekilde ekildi ve 30 µM EBR ile 24 saat, 48 saat, 72 saat ve 96 saat zamana bağlı olarak muamele edildi. Hücreler %0,4 (w/v) tripan mavisi (50 µl) ve 1xPBS (50 µl) 1:1 oranında eklendi. Hücreler Neubauer hemositometre ile sayıldı. Hücre sağkalım testi 3 kez tekrarlanıp ortalaması alınmıştır. ** $p \leq 0.01$.

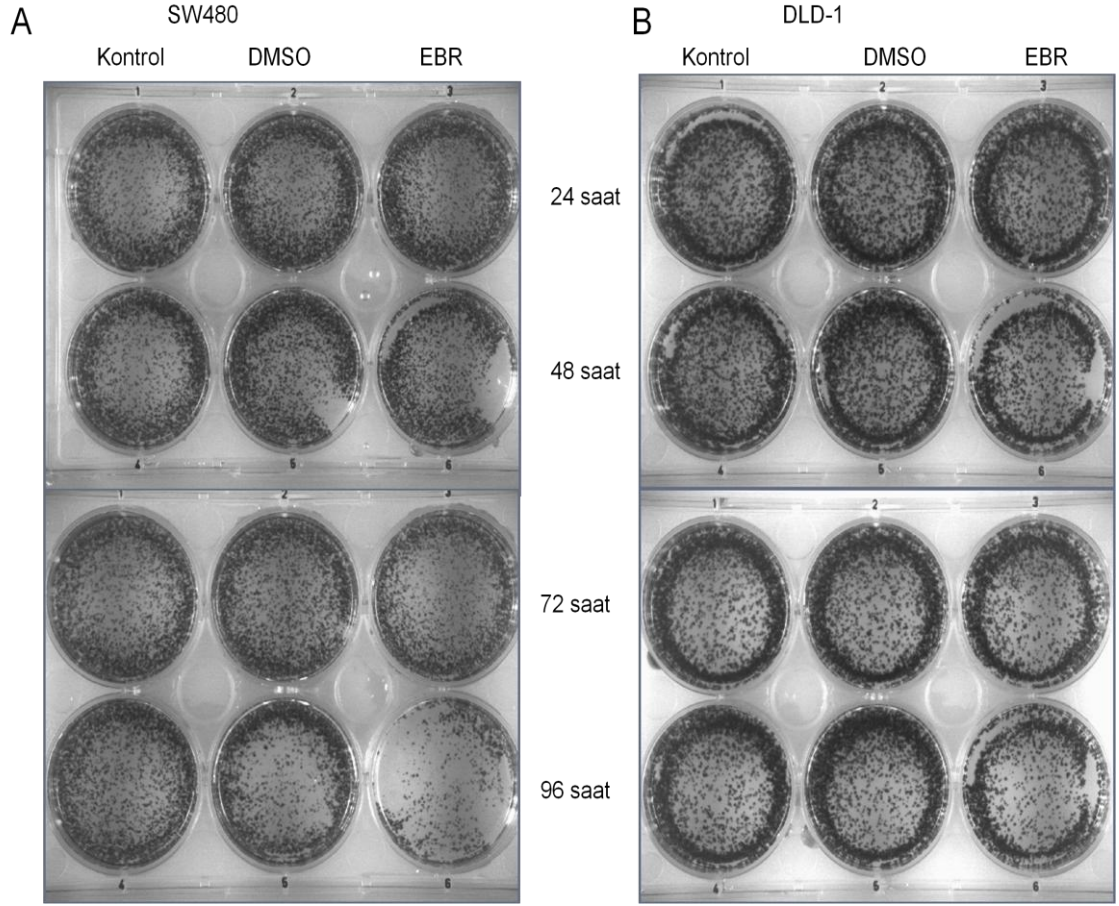
Hücrelerin yüzeye yapışmasının engellendiği ortamda hücrelerin büyüebilme yeteneğinin ölçülmesi amacı ile soft-agar koloni oluşum testi yapılmıştır. Her iki hücrenin, hiçbir ilaç uygulanmamış kontrol gruplarında hücre büyümesine paralel olarak koloni oluşumu gözlemlenmiştir. 30 µM DMSO uygulanan hücrelerde, kontrol gruplarına benzer şekilde DMSO' nun hücre büyümesini ve koloni oluşumunu engellemediği görülmüştür. 30 µM EBR uygulamasının SW480 kolon kanseri hücrelerinde yüzeye bağımsız olarak koloni oluşumunu ve büyümesini engellediği belirgin bir şekilde görülürken, DLD-1 kolon kanseri hücrelerinde koloni oluşumu ve büyümesini engellediği belirgin bir şekilde görülmemiştir (Şekil 4. 4).



Şekil 4. 4. Hücrelerin yüzeye yapışmasının engellendiği ortamda hücrelerin büyüebilme yeteneğinin ölçülmesi. $2,5 \times 10^3$ SW480 ve DLD-1 kolon kanseri hücreleri/ 6 kuyucuk olacak şekilde %0,5 agaroz ile kaplanan petrilere ekildi. $30 \mu\text{M}$ EBR ve $30 \mu\text{M}$ DMSO ile 15 gün muamele edildi. Oluşan kolonileri gözlemleyebilmek için %0,005' lik kristal viyole ile 20 dakika bekletildi. Soft agar da hücrelerin oluşturduğu koloniler ışık mikroskobu ve floresan mikroskobunda 100X büyütme ile incelendi.

4.3 Epibrassinolid' in SW480 ve DLD-1 Kolon Kanseri Hücre Hatlarında Metastaz Üzerindeki Etkisi

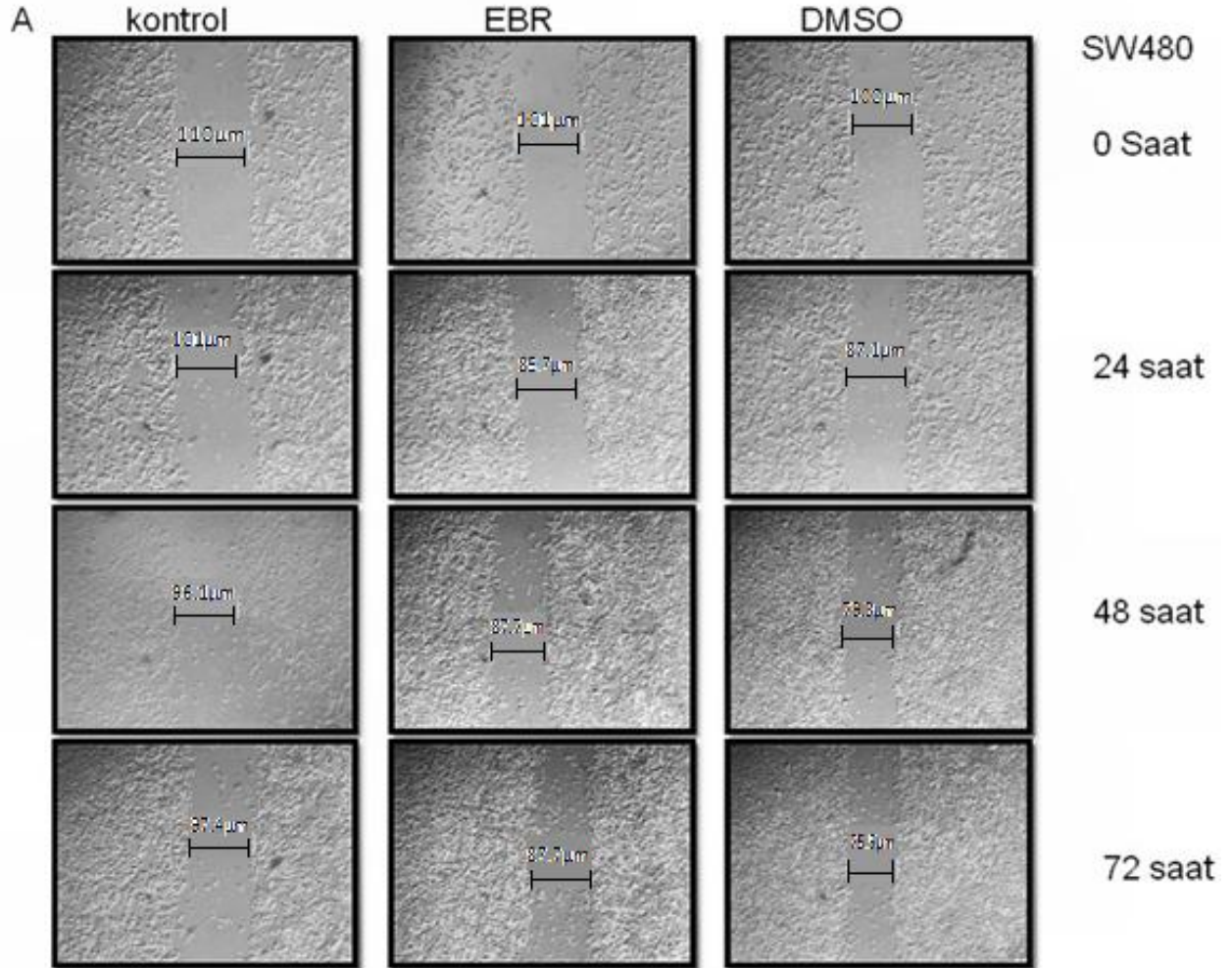
EBR' nin hücrelerdeki metastatik etkisini ve hücreler tek başına bırakıldığında nasıl davrandıklarını belirlemek için koloni oluşum testi yapılmıştır. $30 \mu\text{l}$ DMSO uygulanan SW480 ve DLD-1 kolon kanseri hücre hatları hiçbir ilaç uygulanmamış SW480 ve DLD-1 kolon kanseri hücre hatlarının kontrol gruplarına oranla hücre çoğalmasında değişiklik gözlemlenmemiştir. EBR uygulanan SW480 kolon kanseri hücre hatlarında EBR uygulanmamış hücre hatlarına oranla hücre proliferasyonunda zamana bağlı olarak azalma görülmüştür. EBR uygulanan DLD-1 kolon kanseri hücre hatlarında EBR uygulanmamış hücre hatlarına oranla hücre proliferasyonunda zamana bağlı olarak azalma görülmüştür ve SW480 kolon kanserindeki hücre proliferasyonundaki azalma ile karşılaştırıldığında DLD-1 kolon kanseri hücre hatlarının çoğalmasındaki azalmanın daha az olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4. 5).



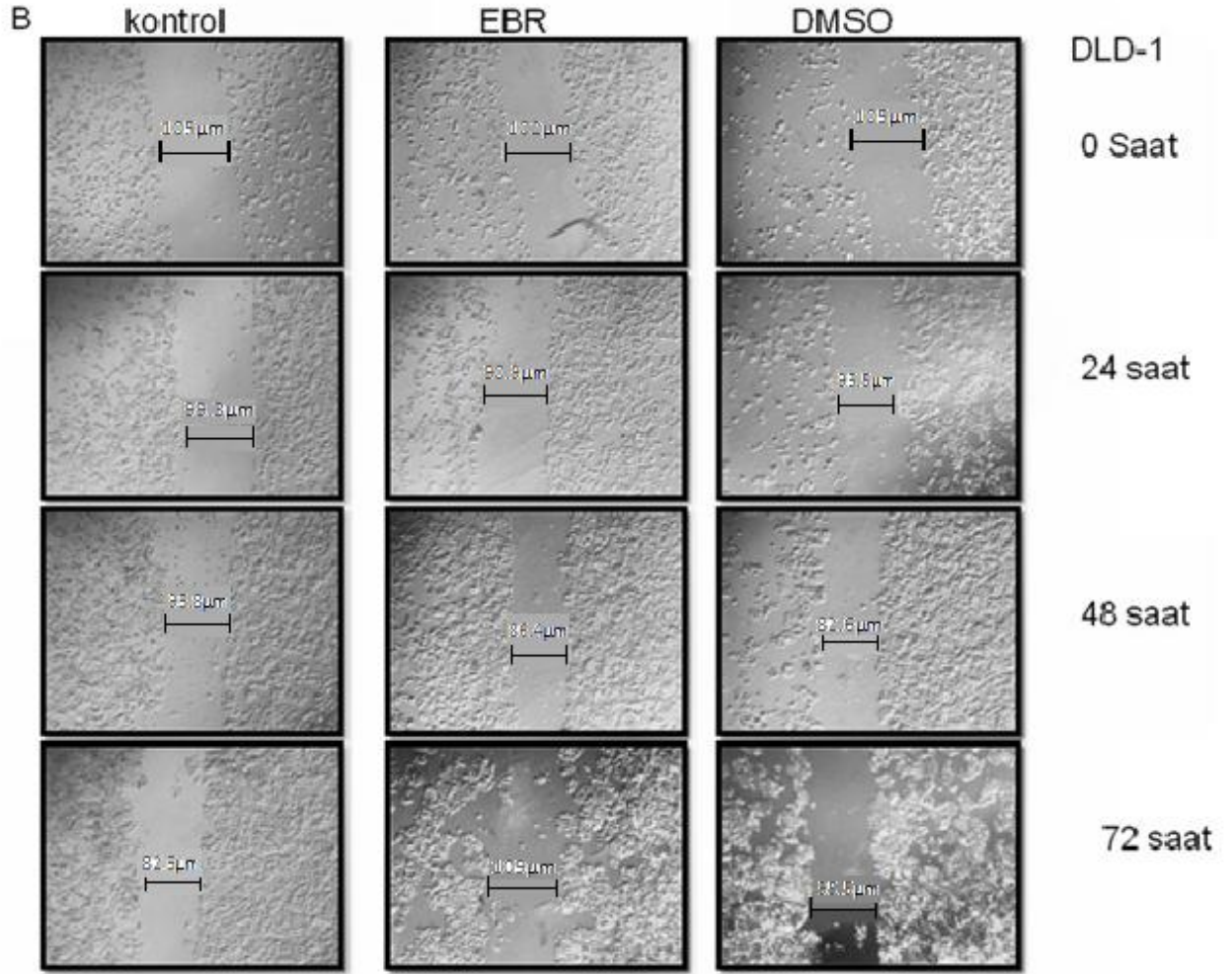
Şekil 4. 5. EBR' nin SW480 ve DLD-1 Kolon Kanseri Hücre Hatlarının Metastazı Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi. SW480 ve DLD-1 kolon kanseri hücreleri 4×10^3 hücre/kuyucuk olacak şekilde 6 kuyucuklu petrilere ekildi. Hücreler 30 μ M EBR ile 24, 48, 72 ve 96 saat muamele edildikten sonra ilaçsız medyum ile değiştirilerek hücrelerin büyümesi incelendi. 14 gün sonunda hücreler metanol asetik asit (3:1) ile 5 dakika muamele edilerek fikse edildi. Hücreler %0,5 'lik kristal viyole ile 20 dakika muamele edildikten sonra yıkandı ve görüntüler trans UV ile çekildi.

EBR' nin SW480 ve DLD-1 kolon kanseri hücrelerinde lateral hücre hareketi üzerindeki etkileri yara iyileşme analizi ile tespit edilmeye çalışılmıştır (Şekil 4. 6). SW480 kolon kanseri hücre hatlarının kontrol gruplarında açılan yara genişliğinin zamana bağlı olarak yavaş yavaş kapandığı saptanmıştır. DMSO uygulanmış SW480 hücrelerinde açılan yara genişliğinin kontrole benzer şekilde zamana bağlı olarak yavaş yavaş kapandığı saptanmıştır. 72 saat sonunda yara genişliğindeki artış zaman geçtikçe hücre proliferasyonunun fazla olmasından dolayı hücrelerin yapıştıkları yüzeyden kalkmasından kaynaklanıyor olabileceği düşünülmüştür. Kontrol ve DMSO grubundaki azalmaya zıt olarak, EBR uygulanan SW480 hücrelerinde açılan yara genişliğinin zamanla kapanmadığı saptanmıştır (A). DLD-1 kolon kanseri

hücre hatlarının kontrol gruplarında açılan yara genişliğinin zamana bağlı olarak yavaş yavaş kapandığı belirlenmiştir. DMSO uygulanmış DLD-1 hücrelerinde ise açılan yara genişliğinin kontrol gruplarındaki gibi zamana bağlı olarak yavaş yavaş kapandığı belirlenmiştir. 72 saat sonunda yara genişliğindeki artış zaman geçtikçe hücre proliferasyonu arttığı için hücrelerin yapıştıkları yüzeyden kalkmasından kaynaklı olduğu düşünülmüştür. EBR uygulaması sonucunda DLD-1 hücrelerinde açılan yara genişliğinin kapanma miktarı incelendiğinde, 72 saat sonunda açılan yara genişliğinin kapanmadığı görülmüştür (B). Elde edilen sonuçlar incelendiğinde EBR uygulaması sonucunda hücre hatlarında açılan yara genişliklerinin kapanma oranlarının farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Açılan yara genişliğinin kapanmasında DLD-1 hücrelerinde anlamlı bir değişiklik görülmediği belirlenmiştir. (Şekil 4. 6).



Şekil 4. 6. EBR' nin SW480 ve DLD-1 kolon kanseri hücrelerinde lateral hücre hareketi üzerindeki etkilerinin belirlenmesi. A: SW480 hücrelerinde EBR' nin yara kapanmasına ait ışık mikroskobu görüntüleri.



Şekil 4. 6. EBR' nin SW480 ve DLD-1 kolon kanseri hücrelerinde lateral hücre hareketi üzerindeki etkilerinin belirlenmesi. SW480 ve DLD-1 kolon kanseri hücreleri alt yüzeyleri birbirine paralel 15 adet çizgi ve bu çizgilere dik birbirine paralel 3 çizgi çizilerek hazırlanan çıkartma kağıtlar ile kaplanan 6 kuyucuklu petri kaplarına her kuyucuğunda 5×10^4 hücre olacak şekilde ekildi ve 37°C ' de bir gece inkübe edildi. 24 saat sonunda birbirine paralel uzanan 3 çizgi hizasındaki hücreler $200 \mu\text{l}$ ' lik steril pipet ucu ile kazınarak yara oluşturuldu. 0. saat, 24. saat, 48. saat ve 72. saat sonunda birbirine paralel uzanan 15 çizgi ile yara çizgilerinin kesiştiği noktalardaki yara genişlikleri ışık mikroskopunda 40X büyütme ile incelendi. B: DLD-1 hücrelerine ait yara kapanmasının ışık mikroskobu görüntüleri.

Tablo 4. 1. EBR' nin SW480 ve DLD-1 kolon kanseri hücrelerindeki yara kapanmasına ait sayısal değerler.

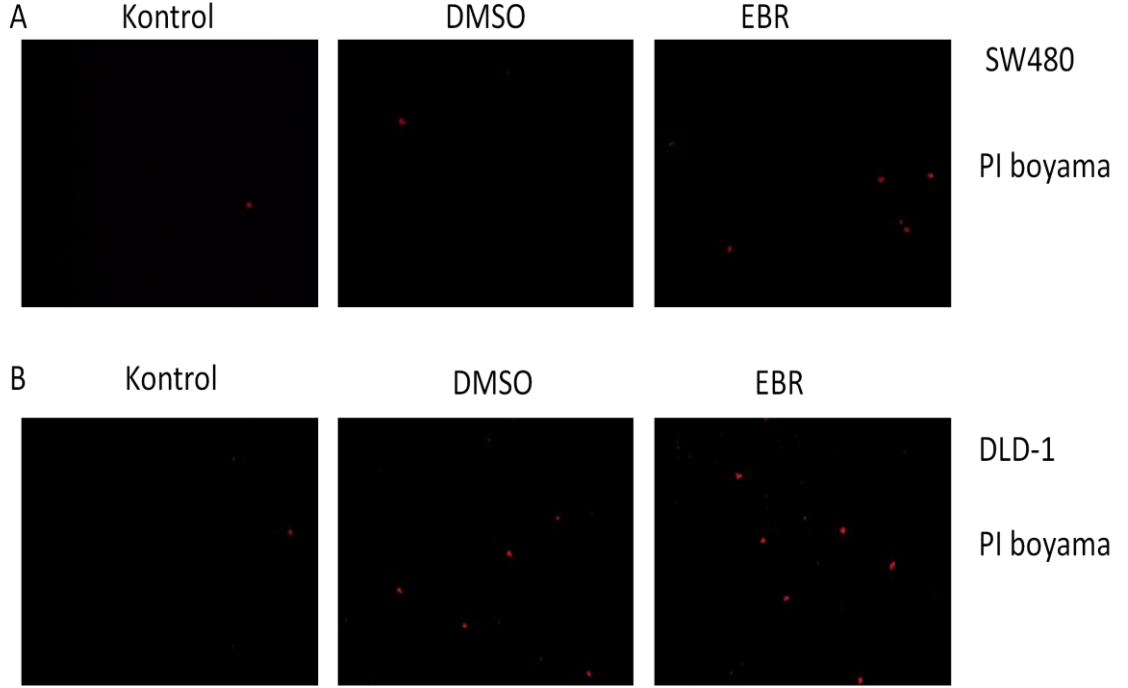
	Yara Kapanması (μm)					
	SW480			DLD-1		
	Kontrol	EBR	DMSO	Kontrol	EBR	DMSO
0 Saat	115.3	105	98.9	105.75	98.63	105
24 Saat	101.2	89.2	85.56	93.975	93.46	91.8
48 Saat	103.05	87.3	79.3	94.6	84.8	82.25
72 Saat	103.8	83.2	78.4	83	94.9	106

4.4 Epibrassinolid' in Mitokondriden Türevlenen Apoptotik Yolak Üzerine Etkisinin Modellenmesi

4.4.1 Epibrassinolid' in SW480 ve DLD-1 Kolon Kanseri Hücrelerinde Hücre Ölümü Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

SW480 ve DLD-1 kolon kanseri hücre hatlarına EBR uygulaması sonrasında hücre ölümü üzerine etkisini gösterebilmek için PI floresan boyası kullanılmıştır (Şekil 4. 7). Hücre membranı PI' a geçirgen değildir; ancak hücre ölümü gerçekleştiğinde hücre içine girebilir, hücre canlılığı ile PI boyama yoğunluğu ters orantılıdır.

SW480 hücrelerinde kontrol gruplarında ölü hücre sayısının az miktarda görülmüştür. DMSO uygulanmış SW480 hücrelerinde ölü hücre sayısının kontrole benzer şekilde az olduğu görülmüştür (A). SW480 hücrelerinde EBR uygulanması ile beraber hücre ölümünün arttığı görülmüştür. DLD-1 hücrelerinin kontrol gruplarında ölü hücre sayısının SW480 hücrelerinde olduğu gibi az olduğu görülmüştür. DMSO uygulanmış DLD-1 hücrelerinde ölü hücre sayısının kontrole ve DMSO uygulanmış SW480 hücrelerine oranla daha fazla olduğu görülmüştür (B). DLD-1 hücrelerinde de EBR uygulaması ile beraber ölü hücre sayısında artış görülmüştür ve bu ölü hücre sayısındaki artışın EBR uygulanmış SW480 hücrelerindeki artıştan daha fazla olduğu görülmüştür (Şekil 4. 7).

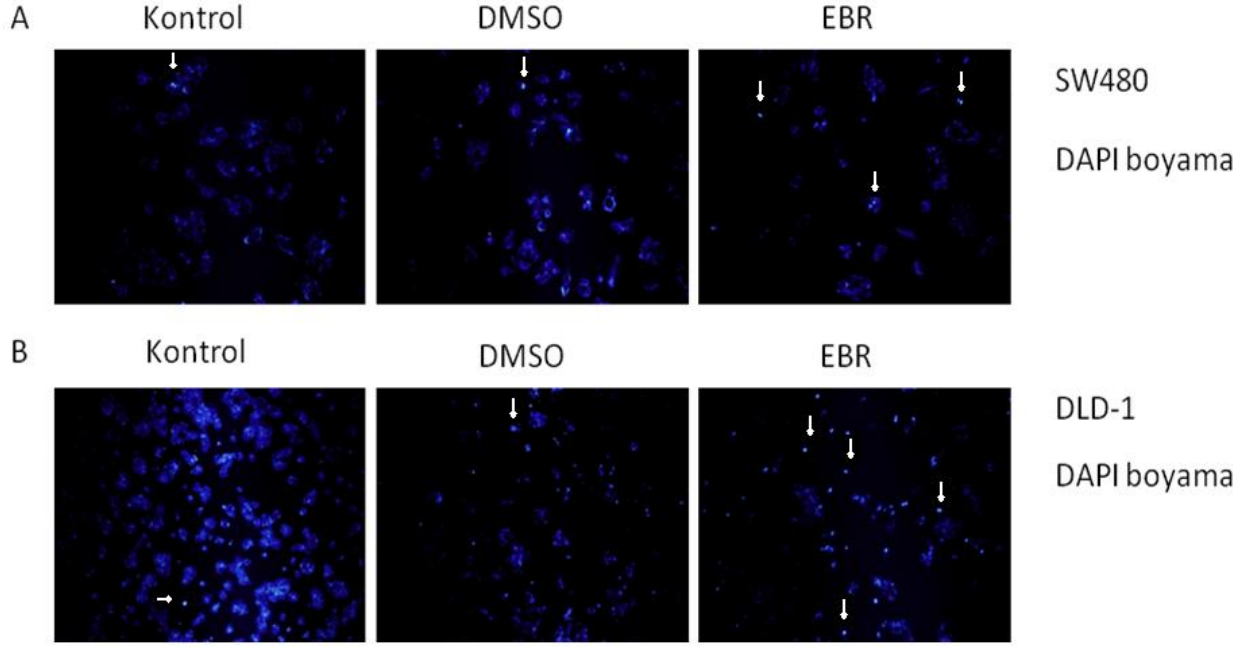


Şekil 4. 7. EBR tarafından tetiklenen hücre ölümünün SW480 ve DLD-1 kolon kanseri hücrelerinde belirlenmesi. $2,5 \times 10^2$ SW480 ve DLD-1 kolon kanseri hücreleri 96 kuyucuklu petrilere ekildi. 48 saat 30 uM EBR ile muamele edildi. Hücreler PI ile 30 dakika bekletildi. Hücreler floresan mikroskobunda 10x büyütme ve 40x büyütme ile incelendi. A: SW480 hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüleri. B: DLD-1 hücrelerine ait floresan mikroskobu görüntüleri.

4.4.2 Epibrassinolid' in SW480 ve DLD-1 Kolon Kanseri Hücrelerinde DNA Kırıkları Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

EBR' nin SW480 ve DLD-1 kolon kanseri hücrelerinde apoptoz sonucu oluşan DNA kırıklarının gözlenmesi için hücreler DAPI floresan boya ile boyanarak floresan mikroskobunda incelenmiştir (Şekil 4. 8). DAPI çift zincirli DNA' ya bağlanarak mavi renk floresan ışımaya sebep olmaktadır. Apoptoz sonucunda oluşan DNA kırıklarının gözlemlenmesine yardımcı olduğu bilinmektedir.

SW480 ve DLD-1 kolon kanseri hücrelerinin kontrol gruplarında DNA kırığı görülmemiştir. DMSO uygulanan SW480 ve DLD-1 kolon kanseri hücrelerinde kontrol gruplarına oranla biraz daha fazla miktarda DNA kırığı görülmüştür. SW480 ve DLD-1 kolon kanseri hücrelerinde EBR uygulaması ile birlikte oluşan DNA kırığı sayısının arttığı görülmüştür. DLD-1 hücrelerinde EBR uygulaması ile birlikte daha fazla miktarda DNA kırığı görülmüştür (B).



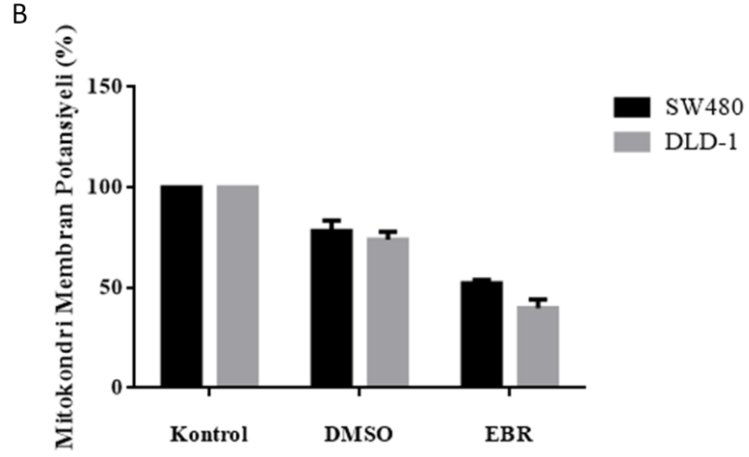
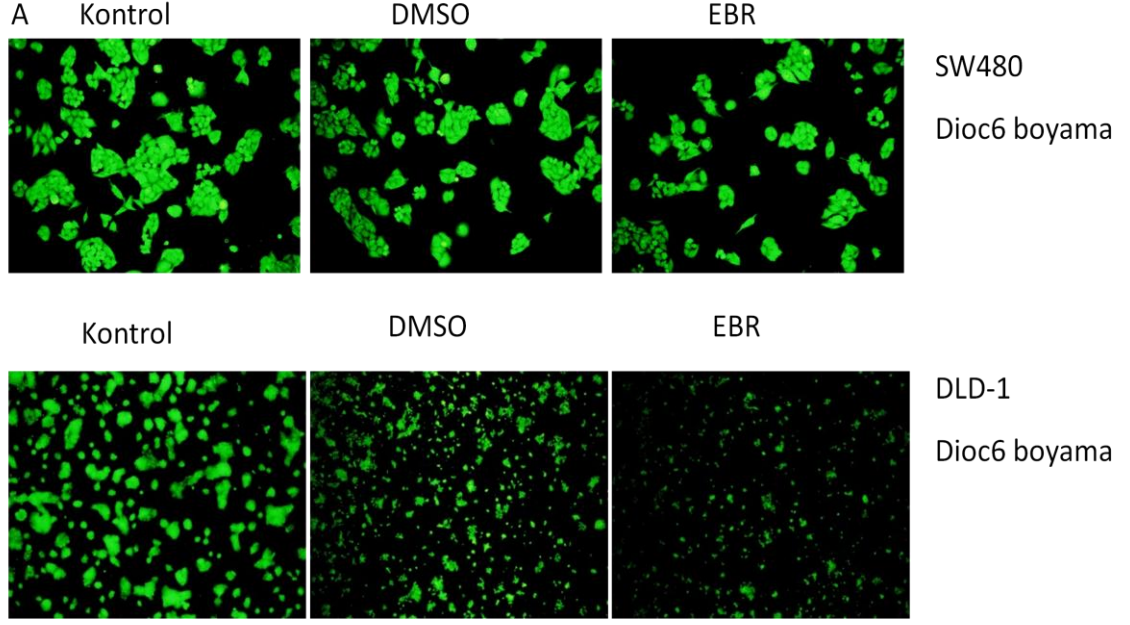
Şekil 4. 8. EBR tarafından tetiklenen DNA kırıklarının SW480 ve DLD-1 kolon kanseri hücrelerinde belirlenmesi. $2,5 \times 10^2$ SW480 ve DLD-1 kolon kanseri hücreleri 96 kuyucuklu petrilere ekildi. Hücreler 48 saat 30 μ M EBR ile muamele edildi. Hücreler DAPI ile 10 dakika bekletildi. Hücreler floresan mikroskopunda 10x10 büyütme ve 40x büyütme ile incelendi.

4.4.3 Epibrassinolid' in SW480 ve DLD-1 Kolon Kanseri Hücrelerinde Mitokondri Membran Potansiyeli ve Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

SW480 ve DLD-1 hücrelerine uygulanan EBR' nin, apoptoza bağlı olarak mitokondri transmembran potansiyeline etkisi, mitokondriye özgü bir boya olan DiOC_6 ile belirlenmiştir ve MMP kaybı Fluoraskan Ascent fluorometer ile ölçülmüştür (Şekil 4. 9). DiOC_6 , canlı hücrelerin mitokondri membranına bağlanır; fakat apoptozun indüklendiği ve buna bağlı olarak mitokondri membran potansiyelini kaybeden hücrelerin mitokondri membranına bağlanamayan bir floresan boyadır.

SW480 hücrelerinin kontrol grubunda hücrelerin canlılığını sürdürebildiği görülmüştür. DMSO uygulanan SW480 hücrelerinde kontrole oranla hücre canlılığında azalmanın olduğu bulunmuştur. EBR uygulanan SW480 hücrelerinde 48 saat sonunda hücre canlılığında belirgin bir azalma görülmüştür. DLD-1 hücreleri de DMSO ve EBR uygulamaları sonucunda SW480 hücrelerindeki hücre canlılığındaki

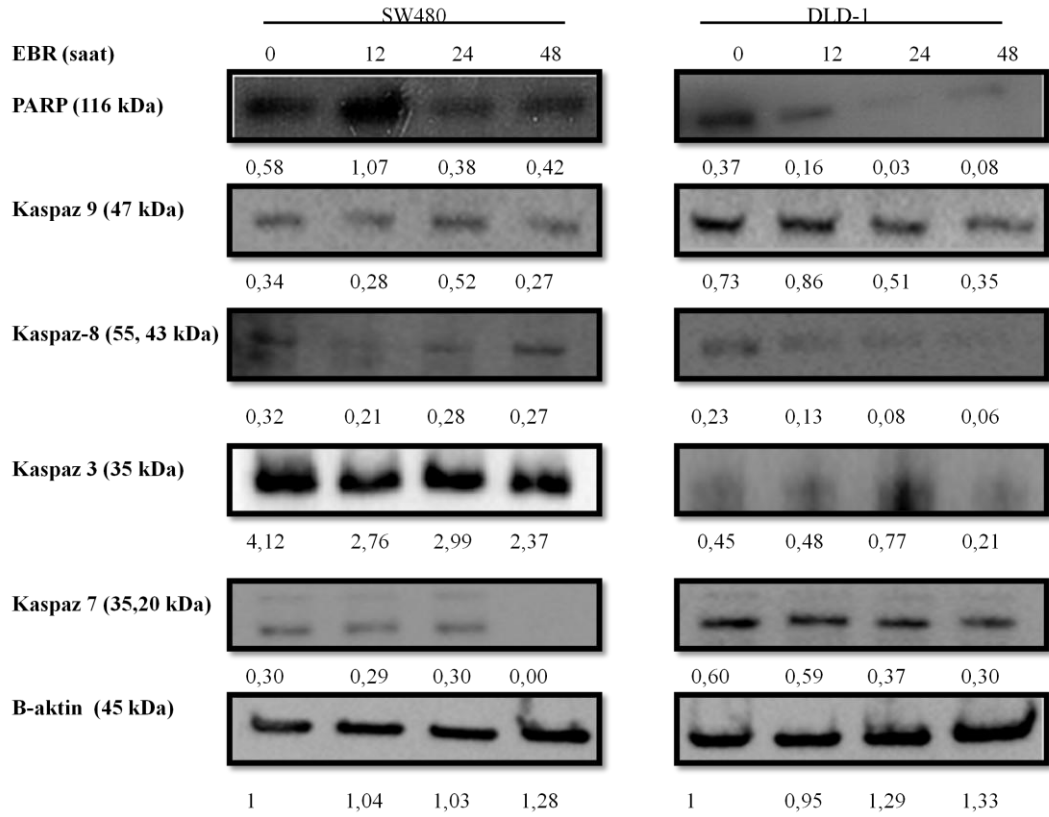
azalmaya benzer şekilde bir azalma meydana geldiği görülmüştür (A). Fluometrede ölçülen absorbans değerlerine göre çizilen grafiğe bakıldığında, EBR uygulaması sonucunda mitokondriyal membran potansiyeli SW480 ve DLD-1 hücrelerinde sırasıyla %52 ve %39 olarak saptanmıştır. DMSO uygulanan SW480 ve DLD-1 hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyeli sırasıyla %78 ve %73 olarak belirlenmiştir (B).



Şekil 4. 9. EBR' nin SW480 ve DLD-1 kolon kanseri hücrelerinde mitokondri membran potansiyeli ve hücre canlılığı üzerindeki etkisinin belirlenmesi. A) $2,5 \times 10^2$ SW480 ve DLD-1 kolon kanseri hücreleri 96 kuyucuklu petrilere ekildi. Hücreler 48 saat 30 μ M EBR ile muamele edildi. Hücreler DiOC6 ile 15 dakika bekletildi. Hücreler floresan mikroskopunda 10x büyütme ve 40x büyütme ile incelendi. B) 1×10^5 SW480 ve DLD-1 kolon kanseri hücreleri 6 kuyucuklu petrilere ekildi. Yapışan hücreler 48 saat 30 μ M EBR ile muamele edildi. Hücreler DiOC6 ile 15 dakika inkübe edilerek hücreler floresan proba boyandı. Floresan proba boyanan hücreler toplanarak MMP kaybını ölçmek için özel olan 96 kuyucuklu petrinin kuyucuklarına 50 μ l olarak 4 tekrarlı olacak şekilde konulmuştur. Hücrelerdeki MMP kaybı Fluoraskan Ascent fluorometer (Thermo Labsystems, Beverly, MA, USA) (eksitasyon/emisyon=485 nm/538 nm) ile ölçülmüştür.

4.5 Epibrassinolid' in SW480 ve DLD-1 Kolon Kanseri Hücre Hatlarında Apoptoz Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

EBR' nin neden olduğu apoptotik ölümün görsel olarak belirlenmesinin ardından, EBR' nin tetiklediği apoptotik hücre ölümü yolağı ile ilişkili proteinler üzerindeki etkisini incelemek için apoptotik yolda görev alan proteinler immunblotlama yöntemi ile belirlenmiştir. Şekil 4. 10' de görüldüğü gibi zamana bağlı EBR uygulaması sonucunda SW480 hücrelerinde apoptoz belirteci olan PARP ifadesinde azalma görülürken PARP ifadesindeki azalmanın DLD-1 hücrelerinde daha fazla oranda olduğu belirlenmiştir. Zamana bağlı EBR uygulaması sonucunda SW480 ve DLD-1 hücrelerinde mitokondriyal apoptotik yolağın aktive olması için gerekli olan başlatıcı kaspaz- 9 ifadesinde azalma saptanmıştır, ekstrinsik yolağın başlatıcı olan kaspaz- 8 ifadesinde, zamana bağlı EBR uygulaması sonucunda SW480 hücrelerinde 12 saate kadar belirgin bir şekilde azalma ve 12 saatten sonra anlamlı bir değişiklik görülmezken, DLD-1 hücrelerinde zamana bağlı olarak azalma görülmüş ve 48 saat sonunda kaspaz 8 ifadesinin yok olduğu bulunmuştur. Cellat kaspaz olarak bilinen kaspaz- 3 ifadesinde zamana bağlı EBR uygulaması sonucunda SW480 hücrelerinde zamana bağlı olarak kaspaz- 3 ifadesinin azaldığı, DLD- hücrelerinde ise 24 saate kadar kaspaz- 3 ifadesinin arttığı ve 48 saatlik uygulama sonucunda kaspaz- 3 ifadesinde azalma tespit edilmiştir. Bir diğer cellat kaspazlardan olan kaspaz- 7 ifadesinde SW480 hücrelerinde 24 saate kadar pek fazla bir değişiklik belirlenmemiştir, 48 saat sonucunda ise kaspaz- 7 ifadesininin yok olduğu, DLD-1 hücrelerinde de zamana bağlı olarak kaspaz- 7 ifadesinde azalma saptanmıştır.

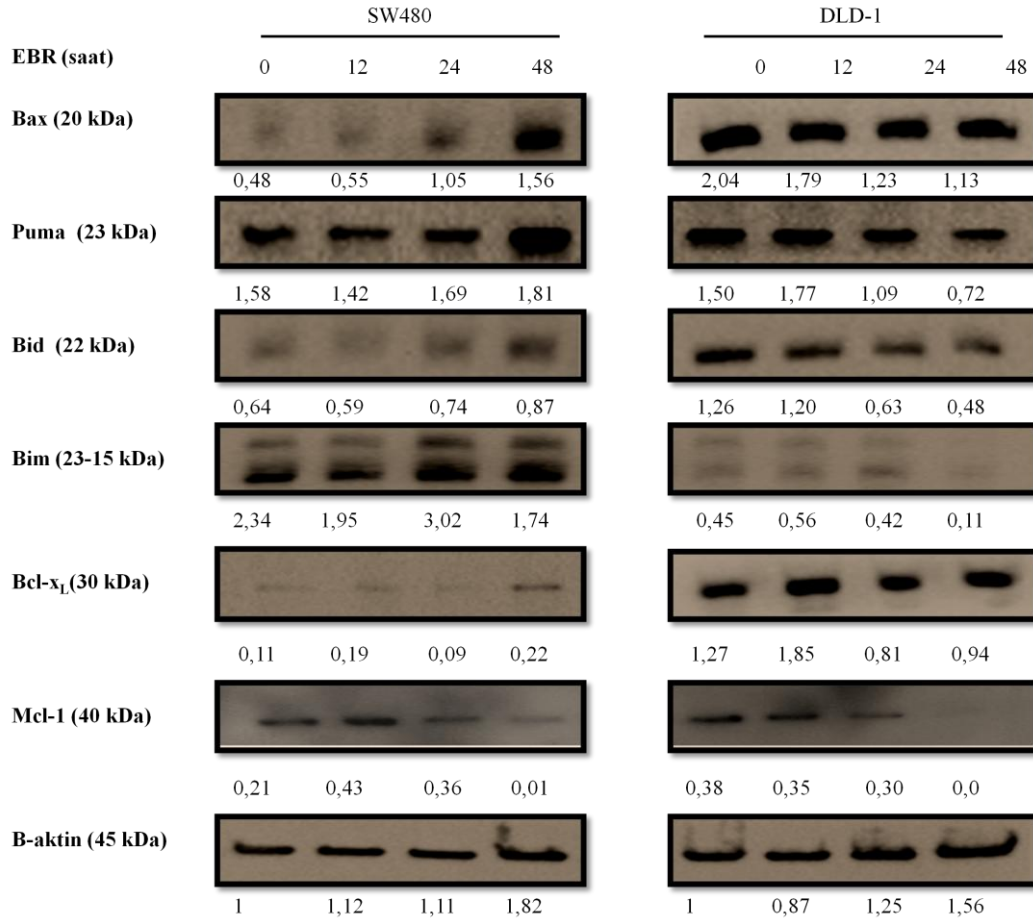


Şekil 4. 10. EBR uygulaması sonucundaki apoptotik değişimlerin SW480 ve DLD-1 kolon kanseri hücre hatlarında incelenmesi. 100 mm petrilere 1×10^6 SW480 hücreleri ekim yapıldıktan sonra 24 saat süreyle hücrelerin yapışması için inkübatörde bekletildi. Daha sonra hücrelere 30 μ M EBR (12-48 saat) uygulaması yapıldı. Belirtilen saatler geçtikten sonra yapılan protein izolasyonları sonucu elde edilen protein ekstraktları %12' lik SDS-PAGE jel elektroforezi sisteminde yürütüldü. PVDF membrana aktarılan proteinler blokaj solüsyonu (%5 süt tozu+ TBS-Tween) içerisinde çözülen (1:1000) birincil antikör içerisinde bir gece bekletildi. İkincil antikora alınan membran ikincil antikör içerisinde de bir gece daha bekletildikten sonra kemilüminesans solüsyonu ile muamele edilerek oluşan ışımaya chemidoc görüntüleme cihazı ile görüntülendi. Bant yoğunlukları her hücre hattı için kontrol, 12 saat, 24 saat ve 48 saatteki protein ifadeleri, kontrol, 12 saat, 24 saat ve 48 saatteki β -Aktin ifadesine oranlanarak ImageJ programı ile hesaplandı.

Apoptotik hücre ölüm yolağının tetiklenmesinde önemli bir rolü olan pro- ve anti- apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinde EBR uygulaması sonucundaki değişimler incelenmiştir. Şekil 4. 11' de gösterildiği gibi pro-apoptotik Bcl-2 ailesine ait olan Bax proteininin, zamana bağlı olarak EBR uygulanması sonucu SW480 hücre hattında ifadesi artarken, DLD-1 hücre hattında ise anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyesi olan Bid proteini ise SW480 hücre hattında EBR uygulaması sonucunda anlamlı bir değişiklik gözlenmezken, DLD-1 hücre hattında ise ifadesinin azaldığı gözlenmiştir. EBR ilaç uygulaması sonucunda pro-apoptotik protein olan Puma'nın anlatımı incelendiğinde SW480 hücrelerinde

ifadesinin arttığı, DLD-1 hücrelerinde ise ifadesinin azaldığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda EBR ilaç uygulaması sonucunda pro-apoptotik protein olan Bim' in üç ana formunun (BimEL, BimL, BimS) SW480 hücre hattında 24 saat EBR uygulaması ile beraber ifadesinin arttığı saptanırken, DLD-1 hücrelerinde ise anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 4. 11).

Anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyesi olan Bcl-xL ve Mcl-1 proteinlerinin zamana bağlı olarak EBR uygulaması sonucunda anlatım düzeylerindeki değişiklikler incelendiğinde, SW480 ve DLD-1 hücrelerinde BclxL ifadesinde anlamlı bir değişiklik belirlenmemiştir. Mcl-1 proteinin ifadesi incelendiğinde ise SW480 hücre hattında 12 saat EBR uygulaması ile birlikte anlatım seviyesinin azalmaya başladığı saptanmıştır. DLD-1 hücre hattında ise 48 saat EBR uygulaması sonucunda Mcl-1 ifadesinin azaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 4. 11).

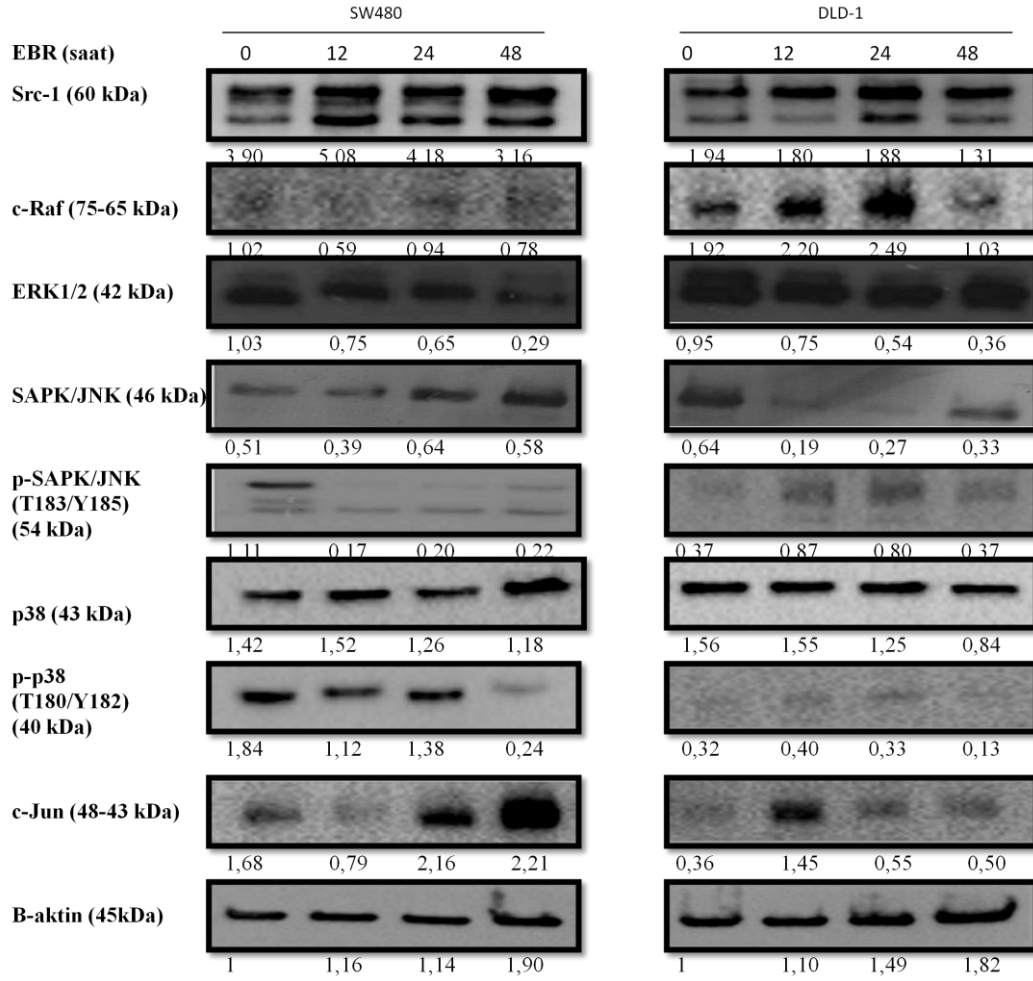


Şekil 4. 11. Apoptotik hücre ölüm yolağının tetiklenmesinde önemli bir rolü olan pro- ve anti- apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinde EBR uygulaması sonucundaki değişimlerinin incelenmesi. 100 mm petrilere 1×10^6 SW480 hücreleri ekim yapıldıktan sonra 24 saat süreyle hücrelerin yapışması için inkübatörde bekletildi. Daha sonra hücrelere $30 \mu\text{M}$ EBR (12-48 saat) uygulaması yapıldı. Belirtilen saatler geçtikten sonra yapılan protein izolasyonları sonucu elde edilen protein ekstraktları %12' lik SDS-PAGE jel elektroforezi sisteminde yürütüldü. PVDF membrana aktarılan proteinler bloklayıcı solüsyonu (%5 süt tozu+ TBS-Tween) içerisinde çözölen (1:1000) birincil antikor içerisinde bir gece bekletildi. İkincil antikora alınan membran ikincil antikor içerisinde de bir gece daha bekletildikten sonra kemilüminesans solüsyonu ile muamele edilerek oluşan ışımaya chemidoc görüntüleme cihazı ile görüntüldü. Bant yoğunlukları her hücre hattı için kontrol, 12 saat, 24 saat ve 48 saatteki protein ifadeleri, kontrol, 12 saat, 24 saat ve 48 saatteki β -aktin ifadesine oranlanarak ImageJ programı ile hesaplandı.

4.6 Epibrassinolid' in SW480 ve DLD-1 Kolon Kanseri Hücre Hatlarında Hücre Sağkalım Yolakları Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

EBR'nin hücre sağkalım yolağı olan MAPK sinyal yolağı üzerindeki etkilerinin incelenmesi için bu yolak ile ilişkili proteinlere immunblotlama ile bakılmıştır (Şekil 4. 12). Src kinaz ailesi GTP-bağlayıcı protein olan Ras ile birlikte MEK/ERK sinyal

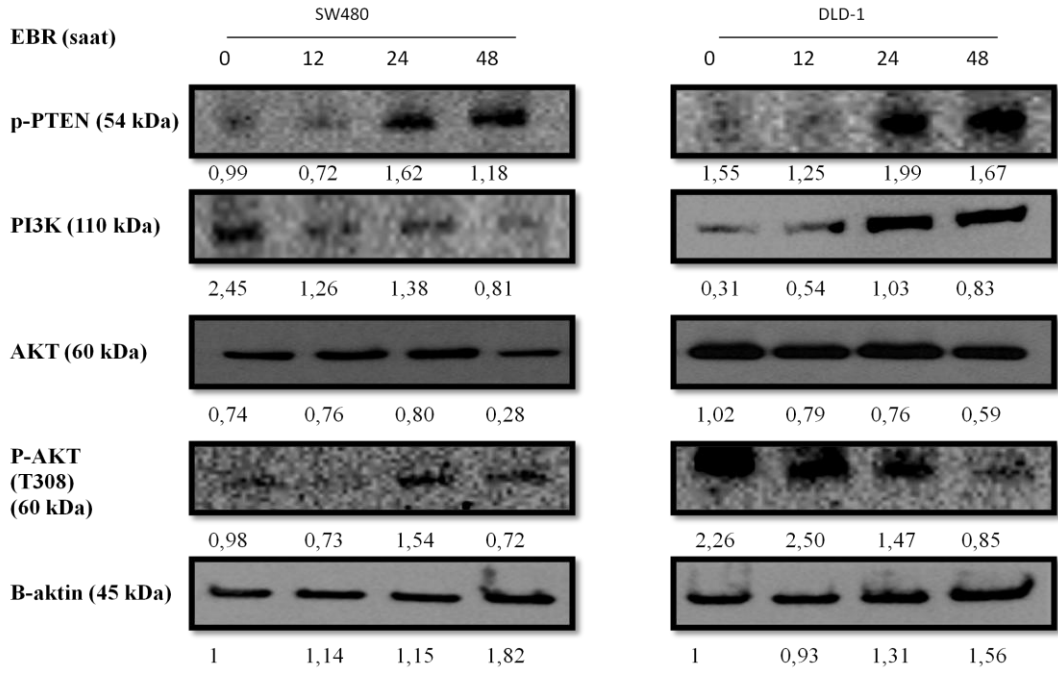
yolağının aktivasyonunda rol alan Raf ailesinin fosforilasyonunda görevlidir. SW480 hücrelerinde Src-1 ifadesinde kontrole oranla zamana bağlı olarak artma görülürken, DLD-1 hücrelerinde ise 24 saatte artma saptanmıştır. Reseptör tirozin kinazlar ve G-protein bağlı reseptörler Ras'ı daha sonra Raf-MEK-MAPK yolağını uyararak aktive etmektedir [64]. SW480 hücre hattında c-Raf ifadesinde artma görülürken, DLD-1 hücrelerinde EBR uygulaması sonucunda c-Raf protein ifadesinde 24 saate kadar artma görülürken 48 saatte protein ifadesinde azalma saptanmıştır. MEK1/2 aracılığıyla aktivasyonu sağlanan ERK1/2 proteinlerinin ifadesinde EBR uygulamasından sonra SW480 ve DLD-1 hücrelerinde zamana bağlı olarak kontrole oranla azalma görülmektedir. Strese sebep olan uyarılar tarafından aktive edilen SAPK/JNK proteininin ifadesinde SW480 ve DLD-1 hücre hatlarında 12 saatten itibaren kontrole oranla artma belirlenmiştir. SW480 hücrelerinde 12 saatten itibaren kontrole oranla fosforile olduğu görülürken, DLD-1 hücrelerinde SAPK/JNK proteinin 12 saatten itibaren defosforile olduğu saptandı. p38 MAPK aktivasyonunun anti kanser ajanların kanser hücrelerini ölüme götürmeleri için gereklidir [65]. p38 proteininin ifadesi EBR uygulamasından sonra SW480 hücrelerinde 12 saatte kontrole oranla artma görülürken 24 saatte azalma ve 48 saatte tekrar artma görülmüştür. DLD-1 hücrelerinde ise p38 ifadesinin 12 saatten sonra zamana bağlı olarak azaldığı görülmüştür. p38 proteinin SW480 hücrelerinde 12 saatte defosforile olduğu, 24 saatte fosforile olduğu ve 48 saat sonunda defosforile olduğu görülürken, DLD-1 hücrelerinde 12 saatten sonra 48 saatte defosforile olduğu görülmüştür. c-Jun transkripsiyonel aktivitesi SAPK/JNK aracılığıyla Ser63 ve Ser73' te fosforilasyon ile düzenlenir. SW480 hücrelerinde 12 saatten sonra zamana bağlı olarak c-Jun proteinin ifadesinde artma görülürken, DLD-1 hücrelerinde ise 12 saatte kontrole oranla artma görülmüş 12 saate oranla 24 ve 48 saatte azalma görülmüştür (Şekil 4. 12).



Şekil 4. 12. EBR' nin MAPK sinyal yolağı üzerine etkilerinin immunoblotlama yöntemi ile zamana bağı olarak SW480 ve DLD-1 kolon kanseri hücre hatlarında incelenmesi. 100 mm petrilere 1×10^6 SW480 hücreleri ekim yapıldıktan sonra 24 saat süreyle hücrelerin yapışması için inkübatörde bekletildi. Daha sonra hücrelere 30 μ M EBR (12-48 saat) uygulaması yapıldı. Belirtilen saatler geçtikten sonra yapılan protein izolasyonları sonucu elde edilen protein ekstraktları %12' lik SDS-PAGE jel elektroforezi sisteminde yürütüldü. PVDF membrana aktarılan proteinler blokama solüsyonu (%5 süt tozu+ TBS-Tween) içerisinde çözölen (1:1000) birincil antikor içerisinde bir gece bekletildi. İkincil antikora alınan membran ikincil antikor içerisinde de bir gece daha bekletildikten sonra kemilüminesans solüsyonu ile muamele edilerek oluşun ışma chemidoc görüntöleme cihazı ile görüntüledi. Bant yoğunlukları her hücre hattı için kontrol, 12 saat, 24 saat ve 48 saatteki protein ifadeleri, kontrol, 12 saat, 24 saat ve 48 saatteki β -aktin ifadesine oranlanarak ImageJ programı ile hesaplandı.

EBR'nin bir diğere hücre sağkalım yolağı olan PI3K/AKT sinyal yolağı üzerindeki etkilerinin incelenmesi için bu yolak ile ilişkili proteinler immunoblotlama yöntemi ile belirlendi (Şekil 4. 13). PTEN fosfolipid ve fosforile olmuş peptidler karşısında aktif olan bir fosfatazdır ve serin, treonin ve tirozin rezidülerini defosforile etme

kapasitesine sahip olarak hücre sağkalımı ve apoptozun inhibisyonu için önemli bir yolak olan AKT/PI3K yolağının negatif regülatörüdür. Tümör hücrelerinin sağkalımında PI3K aktivitesini inhibe eden PTEN fosforile olduğunda aktivitesini kaybetmektedir [66]. PI3K/AKT sinyal yolağının negatif düzenleyicisi olan PTEN proteinin fosforile hali olan p-PTEN proteininin EBR' nin zamana bağlı uygulaması ile SW480 ve DLD-1 hücre hattında fosforile olduğu görülmüştür. EBR uygulaması sonucunda SW480 hücre hattında PI3K p110 proteinin ifadesinde zamana bağlı olarak azalma görülürken, DLD-1 hücre hattında PI3K ifadesinin zamana bağlı olarak arttığı görülmüştür. PI3K' in alt hedeflerinden biri olan ve hücrelerin apoptoza gitmesinin engellenmesini sağlayan AKT/PKB proteinin ifadesinde SW480 hücrelerinde özellikle 24 saatlik EBR uygulamasından sonra azalma görülürken, DLD-1 hücrelerinde anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. PDK1 ve mTORC2, AKT proteinini T308ve S473 bölgelerinde fosforile ederek AKT proteinini aktive eder [67, 68]. SW480 hücrelerinde EBR uygulanmasının ardından AKT proteinin zamana bağlı olarak fosforile olarak aktif hale geldiği, DLD-1 hücrelerinde defosforile olduğu görülmüştür (Şekil 4. 13).



Şekil 4. 13. EBR' nin PI3K/AKT hücre sağkalım sinyal yolağı üzerine etkisinin immunoblotlama yöntemi ile zamana bağlı olarak SW480 ve DLD-1 kolon kanseri hücre hatlarında incelenmesi. 100 mm petrilere 1×10^6 SW480 hücreleri ekim yapıldıktan sonra 24 saat süreyle hücrelerin yapışması için inkübatörde bekletildi. Daha sonra hücrelere 30 μ M EBR (12-48 saat) uygulaması yapıldı. Belirtilen saatler geçtikten sonra yapılan protein izolasyonları sonucu elde edilen protein ekstraktları %12' lik SDS-PAGE jel elektroforezi sisteminde yürütüldü. PVDF membrana aktarılan proteinler bloklama solüsyonu (%5 süt tozu+ TBS-Tween) içerisinde çözölen (1:1000) birincil antikor içerisinde bir gece bekletildi. İkincil antikora alınan membran ikincil antikor içerisinde de bir gece daha bekletildikten sonra kemilüminesans solüsyonu ile muamele edilerek oluşan ışımaya chemidoc görüntüleme cihazı ile görüntülendi. Bant yoğunlukları her hücre hattı için kontrol, 12 saat, 24 saat ve 48 saatteki protein ifadeleri, kontrol, 12 saat, 24 saat ve 48 saatteki β -aktin ifadesine oranlanarak ImageJ programı ile hesaplandı.

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Kolon kanseri, dünyada görülen kanserler arasında üçüncü sırada yer almaktadır. Yaş, diyet ve genetik faktörler gibi etkenler kolorektal kanserlerin gelişme sürecini etkileyen faktörler arasında bulunmaktadır [29, 31, 33]. Hücre sağkalım mekanizmalarının baskılanması, hücre ölüm sinyal mekanizmalarının aktifleştirilmesi gibi moleküler mekanizmalar kemoterapotik stratejiler arasında yer almaktadır. Kanser tedavisinde kullanılabilir potansiyel kemoterapotik ajanların hücre içi moleküler mekanizmalarının açıklığa kavuşturulması büyük bir önem taşımaktadır.

BRler düşük moleküler ağırlığa sahip steroid içerikleridir ve bitkilerde büyümeyi ve gelişimi düzenlerler. BR, hayvan steroidal laktonlarla yapısal benzerlik gösterir [63]. Son zamanlardaki araştırmalarda BR'lerin antikanser ve antiproliferatif özellikleri çeşitli hayvan sistemlerinde incelenmiştir. BR'lerin ileride kanser çalışmaları için potansiyel bir ilaç olması beklenmektedir. Doğal BR'ler olan EBR'nin kültüre edilmiş hibridoma fare hücreleri üzerine etkisi araştırılmıştır. EBR'nin tipik etkileri incelendiğinde, mitokondriyal membran potansiyelini arttırdığı, hücre içi antikor seviyesini azalttığı, G0/G1 fazındaki hücre sayısını arttırdığı, S fazındaki hücre oranını azalttığı belirlenmiştir [63].

Genistein (4,5,7-trihydroxyisoflavone), bir fitoöstrojendir yani bitkilerde östrojen benzeri kimyasal yapıya sahiptir ve östrojen reseptörünün düzenlenmesinde seçici olduğu düşünülmektedir [69]. Bu nedenle hormonal terapide alternatif olarak kullanılmaktadır [70]. Wang ve arkadaşları (1996) MCF-7 meme kanseri hücrelerinde genisteinin hücre büyümesi üzerine etkisini araştırmışlardır ve genisteinin etkisinin konsantrasyona bağlı olarak değiştiğini saptamışlardır. Genistenin etkisinin düşük konsantrasyonlarda östrojen reseptörüne bağlı olarak

gerçekleştiği, yüksek konsantrasyonlarda ise östrojen reseptörüne bağımsız olarak gerçekleştiğini bulmuşlardır [71]. Kuiper ve arkadaşlarının (1997) yaptıkları bir araştırmada ise, genisteinin ER- β reseptörüne bağlanma afinitesinin ER- α reseptörüne bağlanma afinitesinden fazla olduğunu bulmuşlardır [72]. BR' ler ve insan steroidleri arasında benzerlik bulunduğu ve EBR' nin ER- β ' ya bağlanabildiği yapılan çalışmalarda bulunmuştur [19]. Steigerova ve arkadaşlarının (2010) yaptıkları bir araştırmada EBR' nin steroid kökenli bir ajan olması nedeni ile, EBR' nin apoptotik etkisinin, çoğalmaları hücre içi steroid reseptörleri ile tetiklenen MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, ER anlatımı olmayan MDA-MB-231 hücrelerine oranla daha fazla olduğunu saptamışlardır. EBR' nin steroid reseptörlerini bloke ederek transkripsiyon faktörü gibi davranmalarına ket vurabileceği kanısına varmışlardır [18]. Bu bilgiler doğrultusunda EBR ve genisteinin memelilerdeki steroid hormonlarla benzerlik gösterdiği sonucuna varılabilir. EBR' nin kanser hücreleri üzerindeki etkilerinin belirlenmesi ile ilgili yeterli sayıda araştırma bulunmamaktadır. Bu nedenle bu araştırmada elde edilen veriler daha önce genistein ile yapılan çalışmalar ile karşılaştırılmıştır.

Bu bilgilerden yola çıkarak bu araştırmada SW480 ve DLD-1 hücre hatlarında EBR' nin antikanser ve antiproliferatif etkilerinin incelenmesi hedeflenmiştir. Bu araştırmada öncelikle EBR' nin hücre canlılığına etkisi araştırılmıştır. Şekil 4. 1' de artan EBR konsantrasyonları ile birlikte SW480 ve DLD-1 hücre hatlarında hücre canlılığında azalma saptanmıştır (****P<0.0001). Şekil 4. 2' de EBR' nin hücre canlılığı üzerindeki etkisi 30 μ M EBR konsantrasyonu için anlamlı bulunmuştur (****P<0.0001). Zamana bağlı EBR uygulaması sonucunda, ER- β pozitif SW480 hücrelerinde 48 saat sonunda %35.7, ER- β negatif DLD-1 hücrelerinde %67 oranında bağıl hücre canlılığında azalma olduğu saptanmıştır. Wang ve arkadaşlarının (2014) yaptığı bir çalışmada ise EBR uygulanan SW480 hücrelerindeki benzer şekilde yukarıda ifade edildiği gibi EBR ile mekanizma açısından benzerlik gösterebileceği düşünülen genisteinin, SW480 kolon kanseri hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılığında azalmaya sebep olduğu saptanmıştır [73]. Yu ve arkadaşları (2004) genisteinin 15 ile 120 μ M' a kadar artan konsantrasyonlarını uygulayarak yaptıkları MTT testi sonucunda HT-29 kolon kanseri hücrelerinde genisteinin doza bağlı olarak hücre canlılığında azalmaya sebep

olduğu belirlenmiştir [74]. Şekil 4. 3' de gösterildiği gibi SW480 ve DLD-1 hücre hatlarında EBR' nin kontrole oranla zamana bağlı olarak hücre çoğalmasını engellediği bulunmuştur. Steigerova ve arkadaşlarının (2010) yaptığı bir çalışmada EBR uygulaması östrojene duyarlı MCF-7 ve östrojene duyarsız MDA-MB-468 meme kanseri hücre hatlarında hücre canlılığında azalmayı sonuçlandırmıştır [18]. Zhu ve arkadaşlarının (2002) yaptığı bir diğer çalışmada genisteinin Caco-2, SW620 ve HT-29 kolon kanseri hücrelerinde büyümeyi baskıladığı gösterilmiştir [75]. Elde edilen veriler literatür ile uyumlu olarak EBR' nin SW480 ve DLD-1 kolon kanseri hücre hatlarında doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılığını azalttığı ve hücre büyümesini engellediği ortaya konmuştur.

EBR' nin hücrelerde metastatik etkisi koloni oluşum testi ve yara iyileşme analiz testi yöntemi ile araştırılmıştır. Şekil 4. 4' te hücrelerin yüzeye yapışmasının engellendiği ortamda EBR' nin hücrelerin büyüme yeteneği üzerindeki etkileri incelenmiş ve SW480 hücrelerinde DLD-1 hücrelerine göre daha fazla oranda koloni oluşumu ve hücre büyümesini engellediği saptanmıştır. Singh ve arkadaşlarının (2006) yaptığı bir diğer çalışmada isoflavon türevi olan genisteinin, 20 µM ve daha fazla konsantrasyonda genistein uygulamaları sonucunda 253J B-V mesane kanseri hücrelerinde SW480 ve DLD-1 hücrelerinde olduğu gibi koloni oluşumunu engellediği belirlenmiştir [76]. Elde edilen veriler literatür ile karşılaştırıldığında EBR' nin SW480 ve DLD-1 hücrelerinde koloni oluşumuna ket vurarak hücre büyümesini baskıladığı sonucuna ortaya çıkmaktadır. Şekil 4. 5' te EBR' nin zamana bağlı olarak SW480 ve DLD-1 hücre hatlarında metastaz üzerine etkileri gösterilmiştir ve Şekil 4. 4' tekine paralel bir şekilde hücre proliferasyonundaki azalmanın SW480 hücrelerinde DLD-1 hücrelerine oranla daha fazla olduğu bulunmuştur. Şekil 4. 6' da EBR' nin lateral hücre hareketi üzerindeki etkileri incelenmiş ve SW480 hücrelerinde açılan yaranın belli bir oranda kapandığı, DLD-1 hücrelerinde ise açılan yaranın kapanma miktarı ile ilgili anlamlı bir sonuç tespit edilememiştir. Wang ve arkadaşlarının (2014) genisteinin hücre invazyonu üzerindeki etkisini incelemek için yaptıkları bir çalışmada, HepG2, Huh-7 ve HA22T hepatosellüler kanser hücre hatlarında 40 µM genistein uygulamasının hücre invazyonunu engellediğini bulmuşlardır [77]. MTT testi, hücre sağkalım testi, soft agar koloni oluşum testi ve koloni oluşum testi elde edilen tüm verilere bakıldığında

EBR' nin SW480 ve DLD-1 hücrelerinde koloni oluşumunu ve hücre invazyonunu önleyerek ve zamana bağlı olarak hücre sağkalımını engellediği ortaya çıkmaktadır.

Bu araştırmada EBR' nin mitokondriden türevlenen apoptotik yolak üzerine etkisinin araştırılması için, EBR uygulanan ve uygulanmayan hücreler PI ve DAPI gibi floresan boyalar ile muamele edilmiş ve floresan mikroskobunda incelenmiştir. Yapılan çalışmalarda canlı hücrelerin membranının PI' a geçirgen olmadığı fakat canlılığını kaybetmiş hücrelerin membran geçirgenliği arttığı için ölü hücreler PI ile boyanırken canlı hücreler bu boyayı hücre içine almadığı saptanmıştır. Bu nedenle de PI' nin apoptotik hücre ölümünün doğrulanması için kullanılan nükleer bir boya olduğu bilinmektedir [78]. Şekil 4. 7' de EBR' nin tetiklediği hücre ölümünün 48 saatte, DLD-1 hücrelerinde SW480 hücrelerine oranla daha fazla olduğu görülmektedir. Elde edilen PI boyama ile elde edilen floresan görüntülerine göre EBR' nin her iki hücre hattında da hücre ölümünü uyardığı saptanmıştır. DAPI, çift zincirli DNA' ya bağlanarak mavi renk floresan ışımaya sebep olan ve apoptoz sonucunda oluşan DNA kırıklarının gözlemlenmesi için kullanılan bir floresan boyadır. Şekil 4. 8' de EBR' nin apoptoz sonucunda oluşan DNA kırıklarının üzerine etkisi araştırıldığında 48 saatte DLD-1 hücrelerinde SW480 hücrelerine oranla daha fazla miktarda DNA kırığı oluşmasına sebep olduğu tespit edilmiştir. Nakamura ve arkadaşlarının (2009) yaptığı bir çalışmada genistein ve I3C (indol-3-karbinol) kombinasyonu uygulamasının ardından DAPI ile boyandıktan sonra floresans mikroskobu görüntüleri incelendiğinde genistein ve I3C kombinasyonunun HT-29 kolon kanseri hücrelerinde apoptoza giden bir hücrenin karakteristik özelliği olan nükleer fragmentasyon ve kromatin kondensasyonuna neden olduğu bulunmuştur [79]. Elde edilen DAPI floresan boyama görüntülerine bakıldığında EBR' nin genisteine benzer şekilde SW480 ve DLD-1 hücrelerinde apoptoz belirteci olarak kabul edilen DNA kırıklarının oluşmasına neden olarak hücrelerde apoptozu uyardığı sonucu ortaya çıkmaktadır.

EBR' nin hücre canlılığında azalmaya neden olduğu belirlendikten sonra, bu araştırmanın ikinci aşamasında hücre canlılığındaki azalma ve apoptotik mekanizmanın aktivasyonu arasındaki ilişki araştırılmıştır. Şekil 4. 9' da EBR' nin

tetiklediği mitokondri membran potansiyelindeki bozulma, canlı hücrelerin mitokondri membranına bağlanan DIOC6 floresan boyama ile floresan mikroskopunda araştırılmıştır. 48 saat sonucunda EBR' nin SW480 hücrelerinde DLD-1 hücrelerine oranla hücre canlılığında daha fazla miktarda azalmaya sebep olduğu tespit edilmiştir. Obakan ve arkadaşlarının (2014) yaptığı bir araştırmada EBR'nin PC3 prostat kanseri hücrelerinde hücre canlılığında azalmaya yol açtığı bulunmuştur [80]. B' de EBR uygulaması sonucunda mitokondri membran potansiyelinin SW480 hücrelerinde DLD-1 hücrelerine oranla daha fazla olduğu saptanmıştır. Bhardwaj ve arkadaşlarının (2012) yaptığı bir araştırmada doğal BR' ler olan EBR' nin kültüre edilmiş hibridoma fare hücreleri üzerindeki etkileri incelenmiş ve EBR' nin mitokondriyal membran potansiyelini arttırdığı bulunmuştur [63]. MMP testi ve DIOC₆ floresan boyama görüntüsü verilerine bakıldığında SW480 ve DLD-1 hücrelerinde EBR' nin 48 saat sonunda mitokondri membran potansiyelinin artmasına sebep olarak hücre canlılığında azalmaya sebep olduğu sonucuna varılabilir.

Mitokondri membran potansiyelinin kaybı, mitokondri çift zarı arasında bulunan sitokrom C' nin sitoplazmaya salınımını sağlamaktadır. Sitoplazmaya salınan sitokrom C apoptozun mitokondriyal yolağını aktif hale getirmektedir ve apoptotik yolağın aktifleşmesi ile kaspaz aktivasyonu tetiklenmektedir [81]. şekil 4. 10' de EBR' nin SW480 hücrelerinde kaspaz bağımlı ve mitokondri bağımlı intrinsik yolağı uyararak apoptozu tetiklediği belirlenmiştir. EBR uygulamasının SW480 ve DLD-1 hücrelerinde apoptoz belirteci olan PARP' ın ifadesinde azalmaya neden olduğu, özellikle DLD-1 hücrelerinde 24 ve 48 saatlerde ifadesinin yok olduğu gözlemlenmiştir. Başlatıcı kaspaz 9' un ifadesinin SW480 hücrelerinde 24 saate kadar arttığı görülürken, DLD-1 hücrelerinde ise 12 saate kadar arttığı daha sonra azaldığı saptanmıştır. Ekstrinsik yolak için başlatıcı özelliğe sahip olan kaspaz 8 ifadesinin, SW480 hücrelerinde 12 saate kadar belirgin bir şekilde azaldığı ve 12 saatten sonra kaspaz 8 anlatımının çok az oranda arttığı gözlemlenmiştir. DLD-1 hücrelerinde ise kaspaz 8 ifadesinin zamana bağlı olarak azaldığı ve 48 saat sonunda kaspaz 8 ifadesinin yok olduğu saptanmıştır. EBR uygulaması ile kaspaz 3 ifadesinin SW480 hücrelerinde zamana bağlı olarak azaldığı, DLD-1 hücrelerinde ise 24 saate kadar kaspaz 3 ifadesinin arttığı ve 48 saat sonunda kaspaz 3 ifadesinin azaldığı

gözlemlenmiştir. EBR' nin apoptozu uyarılmasında diğler efektör kaspazların da etkili olabileceği düşünülerek bir diğler efektör kaspaz olan kaspaz 7' nin ifadesi incelendiğinde, SW480 hücrelerinde 48 saate kadar bir değişiklik belirlenmemekle birlikte 48 saat sonunda kaspaz 7 ifadesinin kaybolduğu belirlenmiştir. DLD-1 hücrelerinde ise kaspaz- 7 ifadesinin EBR uygulaması sonucunda zamana bağlı olarak azaldığı saptanmıştır. EBR' nin SW480 hücrelerinde apoptozu uyarılmasına benzer şekilde, Steigerova ve arkadaşlarının (2010) yaptığı bir çalışmada MDA-MB-468 meme kanseri hücre hatlarında EBR' nin kaspaz 3 aktivitesini uyardığı gösterilmiştir [18]. Nakamura ve arkadaşlarının (2009) yaptığı bir araştırmada, genistein uygulanan HT-29 kolon kanseri hücrelerinde, PARP kırılmasını uyararak kaspaz 3, kaspaz 8, kaspaz 9 gibi kaspazları aktive ettiği immunbotlama yöntemi ile gösterilerek, HT-29 hücrelerinde kaspaz-bağımlı apoptozu uyararak hücre ölümüne sebep olduğu gösterilmiştir [79]. Bu araştırmada elde edilen veriler literatür ile karşılaştırıldığında, EBR' ye karşı verilen cevabın farklı olması SW480 hücrelerinde kaspaz 3 aktivasyonu gerçekleşirken, DLD-1 hücrelerinde kaspaz 7 aktivasyonunun gerçekleşmesinden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

Apoptozun düzenlenmesinde Bcl-2 ailesi üyeleri önemli bir role sahiptir ve bu düzenlenmede pro- ve anti- apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri arasındaki denge önemli bir role sahiptir. EBR' nin apoptotik yolaktaki etkilerinin tam olarak ortaya çıkarılması için pro- ve anti- apoptotik protein ifadelerindeki değişimler araştırılmıştır. Şekil 4. 11' de EBR uygulaması sonucunda Bax, Puma, Bid ve Bim proteinlerinin , SW480 hücrelerinde ifadelerinin arttığı, DLD-1 hücrelerinde ise SW480 hücrelerinin aksine bu proteinlerin ifadesinin azaldığı bulunmuştur. Anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyesi olan Mcl-1 proteininin ifadesinin her iki hücre hattında da EBR uygulaması sonucunda zamana bağlı olarak azaldığı ve 48 saat sonucunda Mcl-1 ifadesinin SW480 hücrelerinde neredeyse tamamen kesilirken DLD-1 hücrelerinde ise tamamen kaybolduğu gözlemlenmiştir. Obakan ve arkadaşlarının (2014) yaptığı bir çalışmada 24 saatlik EBR uygulamasından sonra PC3 prostat kanseri hücrelerinde Puma, Bak, Bim ve Bax gibi Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik üyelerinin ifadesinin arttığı, anti-apoptotik üyelerinden olan Mcl-1' in ifadesinin ise azaldığı gösterilmiştir [80]. Steigerova ve arkadaşlarının (2010) yaptığı bir diğler araştırmada EBR' nin MCF-7 hücre hatlarında anti-apoptotik Bcl-2 ve Bcl-xL proteinlerinin ekspresyonunu

uyardığı saptanmıştır [18]. Yu ve arkadaşlarının (2004) [74] yaptığı bir başka araştırmada da HT-29 kolon kanseri hücre hatlarında elde edilen immunblotlama verilerine göre genisteinin 60 µM ve 120 µM artan doza bağlı olarak Bax proteinin ifadesinin artmasına sebep olduğu bulunmuştur. Elde edilen veriler literatür ile karşılaştırıldığında SW480 hücrelerinde EBR' nin Bax, Puma ve Bim gibi Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik üyelerinin ifadesini arttırarak ve Bcl-2 ailesinin Mcl-1 gibi anti-apoptotik üyesinin ifadesini azaltarak Bcl-2 ailesi üyelerinin ifadesini düzenlediği sonucuna varılabilir. Immunblotlama verilerine göre SW480 hücrelerindeki Bcl-2 ailesi üyelerinin ifadelerindeki değişikliklere zıt olarak, DLD-1 hücrelerinde Puma, Bax, Bim ve Bid gibi pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinin ifadesinin azaldığı düşünülmektedir. SW480 ve DLD-1 hücrelerinde EBR' ye karşı farklı şekilde cevap verilmesinin sebebinin, Puma, Bax, Bim ve Bid gibi pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinin ifadelerindeki farklılıktan dolayı kaynaklanabileceği kanısına varılmıştır.

Araştırmanın bir sonraki aşamasında EBR' nin hücre sağkalım yollarında görev alan proteinlerle ilişkisi incelenmiştir. MAPK sinyal yolağı ERK ailesi, JNK ailesi ve p38-MAPK ailesinden oluşmaktadır ve memeli hücrelerinde sinyal iletim kaskatı oluşturarak gen ekspresyonu, hücre çoğalması, farklılaşma ve apoptozun düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir [12]. Bu çalışmada EBR' nin MAPK sinyal yolağı ile ilgili proteinlerin ifadesi üzerindeki etkileri incelendiğinde; Src-1 proteinin ifadesinin, SW480 hücrelerinde kontrole oranla zamana bağlı olarak arttığı, DLD-1 hücrelerinde ise 24 saate kadar arttığı ve 24 saatten sonra azaldığı gözlemlenmiştir. EBR uygulaması sonucunda Ras proteinin fosforile ederek aktif hale getirdiği transkripsiyon faktörü olan c-Raf protein ifadesinin, SW480 hücre hattında arttığı, DLD-1 hücrelerinde ise c-Raf protein ifadesinde 24 saate kadar artma gözlemlenirken, 48 saatte azaldığı saptanmıştır. ERK1/2 proteinlerinin ifadesinde EBR uygulamasından sonra SW480 ve DLD-1 hücrelerinde zamana bağlı olarak kontrole oranla azaldığı gözlemlenmiştir. EBR uygulaması sonucunda SAPK/JNK proteininin ifadesinin, SW480 ve DLD-1 hücrelerinde 12 saatten itibaren kontrole oranla arttığı belirlenmiştir. EBR uygulaması ile SAPK/JNK proteininin SW480 hücrelerinde defosforile olduğu, DLD-1 hücrelerinde ise 12 saatten itibaren fosforile olduğu saptanmıştır. p38 proteininin ifadesine bakıldığında, SW480 hücrelerinde 12

saatte kontrole oranla artma görülürken, 24 saatte azalma ve 48 saatte tekrar artış olduğu, DLD-1 hücrelerinde ise 12 saatten sonra zamana bağlı olarak azaldığı belirlenmiştir. SW480 hücrelerinde 12 saatten sonra zamana bağlı olarak MAPK ailesinin etkileşimde olduğu bir diğer transkripsiyon faktörü olan c-Jun proteinin ifadesinde artma görülürken, DLD-1 hücrelerinde ise 12 saatte kontrole oranla artış, 24 ve 48 saatte anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir (Şekil 4. 12). Banerjee ve arkadaşlarının (2008) genistein ile yaptıkları bir araştırmada, EBR' nin SW480 hücrelerinde MAPK yolağını inaktive ederek hücre ölümünün uyarılmasına benzer olarak, genisteinin PC3 prostat kanseri hücrelerinde ERK1/2 aktivasyonunu uyararak hücre ölümünü uyarabileceği, p38 MAPK' ın defosforilasyonunu sağlayarak MAPK yolağının inaktivasyonunu sağladığı gösterilmiştir [82]. Kim ve arkadaşları (2009) genisteinin MAPK ve AKT üzerindeki etkisini araştırdıklarında, 24 saatlik genistein uygulamasının ardından HeLa serviks kanseri hücrelerinde AKT' ın defosforile olduğu ve ERK1/2 protein ifadesinin azaldığı, p38 MAPK fosforile olduğu ve JNK protein ifadesinin arttığı bulunmuştur [83]. Bu araştırmada elde edilen verilerle EBR' nin SW480 hücrelerinde Src-1 aktivasyonunu sağlayarak MAPK sinyal yolağını aktive ettiği sonucuna varılabilir. MAPK sinyal yolağında etkin Ras proteinin aktivasyonu ile Raf proteinin aktif hale geldiği, fakat ERK1/2 inaktivasyonunu sağlayarak hücre çoğalmasını engellediği ve apoptotik hücre ölümünü uyardığı ortaya çıkmaktadır. Buna ilave olarak fosforlanarak aktif hale gelen JNK, apoptozda merkezi role sahip olan c-Jun proteinin 48 saatte aktivasyonunu sağladığı saptanmıştır ve stres durumunda aktive olarak hücre ölümünü uyarayan p38 aktivasyonunun gerçekleştiği belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre EBR' nin SW480 hücrelerinde MAPK sinyal yolağını hücre sağkalımı ile ilgili proteinlerinin çalışmasını engelleyerek hücre ölümü apoptozu uyardığı sonucuna varılabilir. DLD-1 hücrelerinde ise EBR' nin Src-1 aktivasyonu ile MAPK sinyal yolağını aktive ettiği belirlenmiştir. Ras proteinin aktivasyonu ile Raf proteini aktif hale gelmesine rağmen, ERK1/2 inaktivasyonunu sağlayarak hücre çoğalmasını engelleyerek apoptotik hücre ölümünü uyardığı saptanmıştır. SW480 hücrelerindeki zıt olarak pro-apoptotik süreçte önemli olan SAPK/JNK ifadesinin azaldığı belirlenmiştir. EBR uygulaması sonucunda SAPK/JNK ifadesindeki azalmaya bağlı olarak c-Jun proteinin ifadesinin zamanla azaldığı belirlenmiştir. Hücrenin stres koşullarında aktive olarak hücre ölümünü uyarayan p38 MAPK' ın ifadesinin azaldığı belirlenmiştir. Sonuç olarak DLD-1 hücrelerinden elde edilen veriler incelendiğinde

EBR' nin DLD-1 hücrelerinde ERK1/2 inaktivasyonu ile hücre çoğalmasını azalttığı ve MAPK sinyal yolağının apoptozu indüklemeye etkili olmadığı ortaya çıkmaktadır.

AKT sinyal yolağı, hücre sağkalımı ile apoptoz arasındaki dengenin düzenlenmesi açısından önemlidir. AKT aktivitesinin azalması ile, hücre çoğalmasının engellenmesi ve apoptozun uyarılması son zamanlarda kullanılan stratejilerdendir. Cantley ve arkadaşlarının (2002) yaptığı bir çalışmada PI3K/AKT sinyal yolağının kolon kanser oluşumunun düzenlenmesinde önemli bir rolü olduğu gösterilmiştir [57]. PTEN hücre büyümesi ve farklılaşmada önemli bir rol oynamaktadır. Sansal ve arkadaşlarının (2004) yaptığı bir çalışmada PTEN proteininin kaybının, çoğu kanser türlerinde PI3K yolağının aşırı ifade olmasına sebep olduğu bulunmuştur [84]. PTEN proteini, PI3K/AKT sinyal yolağının negatif regülatörü olarak bilinmektedir ve serin, treonin ve tirozin rezidülerini defosforile etme özelliğinden dolayı hücre sağ kalımı ve apoptozun inhibisyonu için önemli bir proteindir [66]. Aynı zamanda PTEN, Akt kinazı, fosfatidilinositol defosforilasyonu ile indirekt olarak inaktive etmektedir [66]. Bu çalışmada EBR' nin hücre sağkalım yollarından PI3K/AKT ile ilişkili olan proteinlerin ifadelerindeki etkileri de incelenmiştir. PI3K/AKT sinyal yolağının negatif düzenleyicisi olan PTEN proteininin fosforile hali olan p-PTEN proteininin fosforile olarak EBR' nin zamana bağlı uygulaması ile SW480 ve DLD-1 hücre hatlarında aktif hale geldiği gözlemlenmiştir. EBR uygulaması sonucunda SW480 hücre hattında PI3K ve AKT proteininin ifadesinde özellikle 48 saatte azaldığı belirlenmiştir; fakat DLD-1 hücrelerinde PTEN proteininin fosforile olmasına ve AKT proteininin ifadesinin azalmasına rağmen, PI3K proteininin ifadesinin arttığı gözlemlenmiştir. SW480 hücre hattında AKT proteininin 24 ve 48 saatte fosforile olduğu görülürken; DLD-1 hücrelerinde 12 ve 24 saatte fosforile olduğu belirlenmiştir. SW480 ve DLD-1 hücrelerinde AKT proteininin fosforile olarak aktif hale gelmesinden dolayı hücre sağkalım sinyallerini önleyemediği ve böylelikle apoptoz sinyallerini uyaramadığı saptanmıştır (Şekil 4. 13). Banerjee ve arkadaşlarının (2008) genistein ile yaptıkları çalışmada, PC3 prostat kanseri hücrelerinde de AKT aktivasyonunu önleyerek hücre sağkalım sinyallerinin engellenmesine ve böylelikle apoptoz sinyallerinin uyarılmasına yol açtığı gösterilmiştir [82]. Tanaka ve arkadaşlarının (2003) yaptığı bir diğer çalışmada genistein uygulanmış prostat kanseri hücrelerinde p38 aktivasyonu ve AKT inaktivasyonu ile apoptozu uyardığı gösterilmiştir [85]. Bu verilerle uyumlu olarak

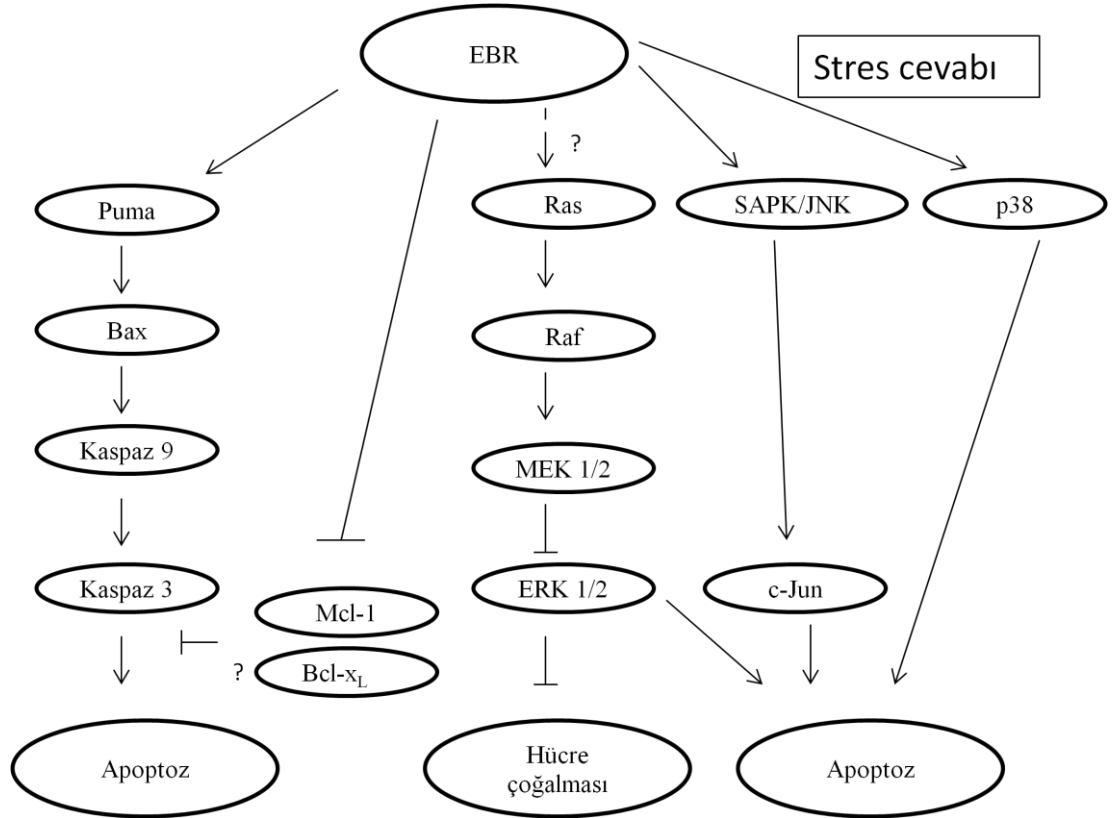
elde edilen bulgular incelendiğinde EBR' nin SW480 hücrelerinde p-PTEN ifadesini arttırarak PTEN proteininin aktivitesini kaybettiği sonucuna varılabilir. PI3K/AKT sinyal yolağının negatif regülatörü olarak bilinen PTEN ifadesinin artması, AKT proteinin fosforile olarak aktif hale gelmesinden dolayı hücre proliferasyonunu baskılayamadığı ortaya çıkmaktadır. EBR' nin DLD-1 hücrelerinde p-PTEN ifadesini arttırarak PTEN proteininin aktif hale getirmesine rağmen, PI3K ifadesini arttırdığı ve AKT ifadesinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı, AKT proteinin fosforile olarak aktif hale geldiği saptanmıştır. Bu nedenle SW480 ve DLD-1 hücrelerinde PI3K/AKT sinyal yolağının aktif olduğu için EBR' nin hücre sağkalımını engelleyemediği sonucuna varılabilir.

Bu araştırmanın ilk aşamasında EBR' nin SW480 ve DLD-1 hücre hatlarında hücre canlılığı ve hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri incelenmeye çalışılmıştır. EBR' nin her iki hücre hattında da hücre çoğalmasını engellediği belirlendikten sonra, ikinci aşamada EBR' nin SW480 ve DLD-1 hücre hatlarında hücre ölümü apoptoz ile olan ilişkisi açıklığa kavuşturulmaya çalışılmıştır. Hücrelerde farklı kaspazlar aracılığıyla apoptozun gerçekleşebiliyor olabileceği bulunduktan sonra, bu çalışmanın üçüncü aşamasını oluşturan EBR' nin tetiklediği apoptozun MAPK ve PI3K/AKT hücre sağkalım yolları ile ilişkisi anlaşılmaya çalışılmıştır. EBR' nin hücre canlılığı üzerindeki etkisini belirlemek için yapılan MTT testine göre EBR' nin SW480 ve DLD-1 hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılığını azalttığı görülmüştür. Mitokondri membran potansiyelini belirlemek için kullanılan DİOC₆ boyasının floresan mikroskopu görüntülerine ve flouremetre sonuçlarına bakıldığında EBR' nin 48 saatte SW480 ve DLD-1 hücre hatlarında hücre canlılığını azalttığı belirlenmiştir. EBR' nin SW480 ve DLD-1 hücrelerinde koloni oluşum ve hücre çoğalması üzerindeki etkilerini belirlemek amacı ile yapılan soft agar koloni oluşum testi ve koloni oluşum testi gibi testlerin verilerine göre EBR' nin SW480 ve DLD-1 hücrelerinde koloni oluşumunu engelleyerek hücre çoğalmasını baskıladığı belirlenmiştir. EBR' nin her iki hücre hattında hücre çoğalması ve hücre canlılığı üzerinde aynı etkiye sahip olmamasından dolayı, DLD-1 hücre hattının SW480 hücre hattına oranla EBR' ye karşı daha dirençli olduğu gözlemlenmektedir. PI floresan boyama görüntüleri incelendiğinde her iki hücre hattında da EBR' nin hücre ölümünü etkilediği saptanmıştır. Hücre ölüm çeşitlerinden apoptozun belirteci olarak

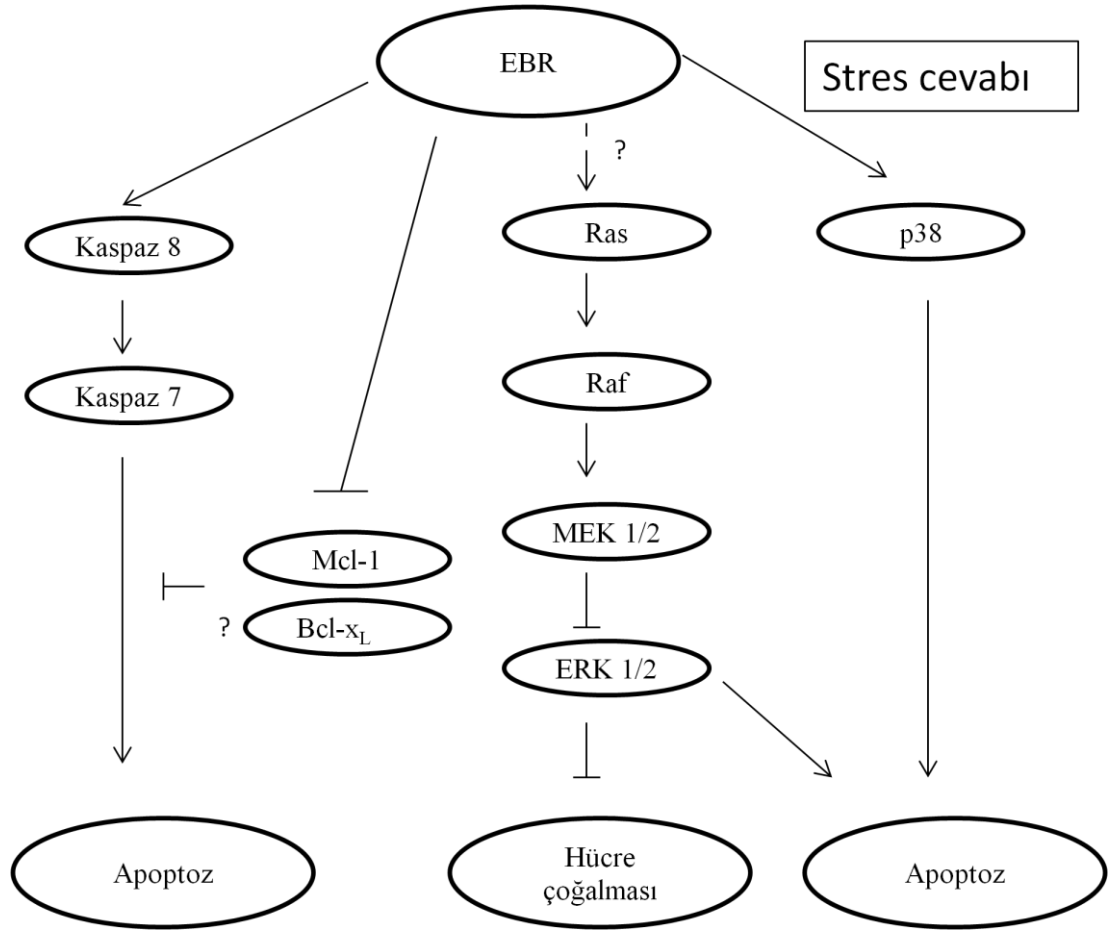
bilinen DAPI floresan boyama görüntüleri incelendiğinde EBR' nin her iki hücre hattında da DNA kırıklarının görülmesi, bu iki hücre hattındaki EBR' nin tetiklediği hücre ölümünün apoptoz olabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle EBR' nin apoptoz üzerindeki etkileri incelendiğinde EBR' nin SW480 hücrelerinde kaspaz 3 aktivasyonu gerçekleştirirken DLD-1 hücrelerinde kaspaz 7 aktivasyonunun meydana gelmesi gibi farklı kaspazları aktive ederek hücre ölümünü tetiklediği sonucuna varılabilir. DLD-1 hücrelerinin EBR' ye karşı direnç göstermesi Puma, Bax, Bim gibi Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik ifadelerinin azalmasından dolayı hücre ölümünü uyaramadığı için daha fazla oranda hücre canlılığını sürdürebileceğinden kaynaklanması olasıdır. EBR' nin tetiklediği hücre ölümü apoptozun MAPK hücre sağkalım yolağı ile ilişkisi incelendiğinde, her iki hücre hattında Src-1 aktivasyonu ile MAPK sinyal yolağının aktive edildiği, fakat farklı MAPK ailesi üyelerini aktive ettiği için hücrelerin EBR' ye karşı farklı şekilde cevap verdiği belirlenmiştir. Her iki hücre hattında hücre çoğalması için önemli olan ERK1/2 proteinini inaktive ederek hücre çoğalmasını baskılayabileceği düşünülmüştür. Buna karşın EBR uygulaması sonunda SW480 hücrelerinde pro-apoptotik süreçte önemli SAPK/JNK aktivasyonunu sağladığı ve buna bağlı olarak apoptozda merkezi role sahip olabileceği düşünülen c-Jun proteinini uyardığı belirlenmiştir. p38 aktivasyonunu sağlayarak apoptozu uyarabileceği sonucuna varılmıştır. DLD-1 hücrelerinde ise EBR uygulaması sonucunda SAPK/JNK protein ifadesinin azaldığı ve buna bağlı olarak c-Jun proteinin ifadesinin azaldığı belirlenmiştir. Aynı zamanda EBR uygulaması sonucunda DLD-1 hücrelerinde p38 ifadesinin azaldığı belirlenmiştir. DLD-1 hücrelerinde EBR hücre çoğalmasını engelleyebilirken, SAPK/JNK ve p38 proteinlerinin inaktif olmasından dolayı apoptozu uyaramadığı sonucuna varılabilir. EBR' nin tetiklediği apoptozun kolon kanser oluşumunda önemli rolü olan PI3K/AKT sinyal yolağı ile olan ilişkisi incelendiğinde, SW480 ve DLD-1 hücrelerinde PTEN proteinin fosforile olarak aktif hale geldiği belirlenmiştir. PI3K/AKT sinyal yolağında görevli AKT proteinin fosforile olarak aktif hale gelmesinden dolayı hücre proliferasyonunu baskılayamadığı sonucuna varılabilir.

Özetle EBR' nin SW480 ve DLD-1 hücre hatlarında farklı yolları etkileyerek hücre ölümünü tetiklediği sonucuna varılabilir. Bu projede EBR' nin SW480 hücrelerinde MAPK üyelerinden biri olan ERK1/2 inhibe ederek hücre çoğalmasına

ket vurduğu saptanmıştır. Kaspaz 9 aktivasyonunu sağlayarak kaspaz-bağımlı apoptozu uyarabileceği ve MAPK üyelerinden JNK ve p38 aktivasyonunu teşvik ederek hücre ölümünü tetikleyebileceği sonucuna varılabilir. DLD-1 hücrelerinde ise MAPK üyelerinden ERK1/2 inhibisyonunu sağlayarak hücre proliferasyonunu durdurabileceği ortaya konmuştur. MAPK üyelerinden JNK ve p38 proteinlerinin ifadelerinin azaldığı için hücre ölümünü uyaramayacağı sonucuna varılmıştır. SW480 ve DLD-1 hücre hatlarında PI3K/AKT hücre sağkalım yolağının aktif olmasından dolayı hücre büyümesinin engellenmesinde PI3K/AKT sinyal yolağının etkisi olmadığı belirlenmiştir. DLD-1 hücrelerinin EBR' ye karşı SW480 hücrelerine göre daha dirençli olması hücrelerin ilaca karşı farklı duyarlılık göstermesinden ve MAPK hücre sağkalım yollarının aktivasyonlarındaki farklılıktan kaynaklanıyor olabileceği sonucuna varılabilir.



Şekil 5. 1. EBR' nin SW480 hücrelerinde potansiyel etki mekanizması.



Şekil 5. 2. EBR' nin DLD-1 hücrelerinde potansiyel etki mekanizması.

Bu çalışmanın devamında EBR' ye karşı verilen cevabın SW480 ve DLD-1 hücre hatlarındaki farklılığın nedenleri araştırılabilir. Steigerova ve arkadaşlarının (2010) yaptığı bir çalışmada östrojen reseptör pozitif MCF-7 ve östrojen reseptör negatif MDA-MB-468 meme kanseri hücre hatlarında östrojen reseptörlerinin EBR' ye karşı farklı cevap oluşturmada etkisi olduğu gösterilmiştir [18]. BR' lerin steroid kökenli olduğu ve insan steroidleri ile benzerlik gösterdiği bilinmektedir. Malikova ve arkadaşlarının (2008) yaptıkları bir araştırmada östrojenin kolon kanserine karşı koruyucu etkisi olduğu ve östrojen reseptör β (ER- β)' nin kolorektal epitelde eksprese edilen öncü dominant östrojen reseptör olması ve bunun koruyucu etkisiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir [19]. Bu bilgilere dayanarak insan steroid reseptörlerinden olan ER' nin SW480 (ER- β pozitif) ve DLD-1 (ER- β negatif) hücrelerinde EBR' ye karşı verilen cevaptaki farklılıkta etkisinin olabileceği düşünülmektedir. Gelecekteki çalışmalarda EBR' nin ER reseptörlerine bağlanma afinitesinin incelenmesi mekanizmayı aydınlatıcı olacaktır. Bu iki hücre hattındaki EBR' ye karşı verilen cevabın farklılığında ER reseptörlerinin etkisi incelenerek

EBR' nin moleküler etki mekanizması açıklanmaya çalışılabilir. Obakan ve arkadaşlarının (2014) yaptığı bir çalışmada AR (+) LNCaP ve AR (-) DU145 prostat kanseri hücre hatlarında EBR' nin mitokondri aracılı apoptozu uyardığı ve EBR' nin bu iki hücre hattındaki apoptotik etkisinin AR ifade durumları ile ilişkili olmadan farklılık gösterdiği bulunmuştur [86]. Androjende olduğu gibi östrojende de EBR' nin steroid hormon ifade durumlarına bağımsız olarak etki gösterebileceğinden dolayı SW480 ve DLD-1 hücrelerinde EBR' nin hücre ölümünü tetiklemede etki mekanizmasının anlaşılabilmesi için, terapotik stratejilerde kullanılan ve kanser oluşum süresinde etkisi bilinen diğer sinyal yolları ile ilişkisinin araştırılmasının açıklayıcı olacağı düşünülmektedir. Böylelikle potansiyel ilaç olan EBR' nin hücre ölümü üzerindeki moleküler mekanizması açıklığa kavuşmuş olacaktır.

6. REFERANSLAR

1. O'Brien BL, DiPalma JA: Molecular biology and colorectal cancer: genetic alterations, inherited syndromes, and applications to colon cancer screening. *Digestive diseases* 1995, 13(3):182-189.
2. Borovac N: [Carcinoma of the anus, rectum and colon]. *Medicinski arhiv* 2003, 57(1 Suppl 2):87-89.
3. Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, Verlaan-de Vries M, van Boom JH, van der Eb AJ, Vogelstein B: Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 1987, 327(6120):293-297.
4. Goss KH, Groden J: Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2000, 18(9):1967-1979.
5. Hanahan D, Weinberg RA: The hallmarks of cancer. *Cell* 2000, 100(1):57-70.
6. Sanovic R, Krammer B, Grumboeck S, Verwanger T: Time-resolved gene expression profiling of human squamous cell carcinoma cells during the apoptosis process induced by photodynamic treatment with hypericin. *International journal of oncology* 2009, 35(4):921-939.
7. Igney FH, Krammer PH: Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature reviews Cancer* 2002, 2(4):277-288.
8. Imura J, Tomita S, Ueda Y, Fujimori T: [Significance of genetic diagnosis with oncogen and suppressor gene]. *Nihon rinsho Japanese journal of clinical medicine* 1999, 57 Suppl:667-670.
9. Pawson T: Regulation and targets of receptor tyrosine kinases. *European journal of cancer* 2002, 38 Suppl 5:S3-10.
10. Blume-Jensen P, Hunter T: Oncogenic kinase signalling. *Nature* 2001, 411(6835):355-365.
11. Jones RJ, Brunton VG, Frame MC: Adhesion-linked kinases in cancer; emphasis on src, focal adhesion kinase and PI 3-kinase. *European journal of cancer* 2000, 36(13 Spec No):1595-1606.
12. Wada T, Penninger JM: Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene* 2004, 23(16):2838-2849.
13. Kolch W: Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *The Biochemical journal* 2000, 351 Pt 2:289-305.
14. Lee JT, Jr., McCubrey JA: The Raf/MEK/ERK signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in leukemia. *Leukemia* 2002, 16(4):486-507.
15. Blalock WL, Navolanic PM, Steelman LS, Shelton JG, Moye PW, Lee JT, Franklin RA, Mirza A, McMahon M, White MK et al: Requirement for the PI3K/Akt pathway in MEK1-mediated growth and prevention of apoptosis: identification of an Achilles heel in leukemia. *Leukemia* 2003, 17(6):1058-1067.

16. Chang F, Lee JT, Navolanic PM, Steelman LS, Shelton JG, Blalock WL, Franklin RA, McCubrey JA: Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia* 2003, 17(3):590-603.
17. Fresno Vara JA, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, Gonzalez-Baron M: PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer treatment reviews* 2004, 30(2):193-204.
18. Steigerova J, Oklestkova J, Levkova M, Rarova L, Kolar Z, Strnad M: Brassinosteroids cause cell cycle arrest and apoptosis of human breast cancer cells. *Chemico-biological interactions* 2010, 188(3):487-496.
19. Malikova J, Swaczynova J, Kolar Z, Strnad M: Anticancer and antiproliferative activity of natural brassinosteroids. *Phytochemistry* 2008, 69(2):418-426.
20. Rohrbeck A, Borlak J: Cancer genomics identifies regulatory gene networks associated with the transition from dysplasia to advanced lung adenocarcinomas induced by c-Raf-1. *PloS one* 2009, 4(10):e7315.
21. Yeatman TJ, Chambers AF: Osteopontin and colon cancer progression. *Clinical & experimental metastasis* 2003, 20(1):85-90.
22. Yeatman TJ, Cher ML, Mao W, Wloch M, Tedesco T: Identification of genetic alterations associated with the process of human experimental colon cancer liver metastasis in the nude mouse. *Clinical & experimental metastasis* 1996, 14(3):246-252.
23. Irving MH, Catchpole B: ABC of colorectal diseases. Anatomy and physiology of the colon, rectum, and anus. *Bmj* 1992, 304(6834):1106-1108.
24. Terashima M: [Lower G.I./colon and rectum cancer]. *Gan to kagaku ryoho Cancer & chemotherapy* 2010, 37(11):2066.
25. Bond JH: Polyp guideline: diagnosis, treatment, and surveillance for patients with colorectal polyps. Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. *The American journal of gastroenterology* 2000, 95(11):3053-3063.
26. Ponz de Leon M, Benatti P, Di Gregorio C, Fante R, Rossi G, Losi L, Pedroni M, Percesepe A, Roncucci L: Staging and survival of colorectal cancer: are we making progress? The 14-year experience of a Specialized cancer Registry. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* 2000, 32(4):312-317.
27. Hagggar FA, Boushey RP: Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clinics in colon and rectal surgery* 2009, 22(4):191-197.
28. Messina CR, Lane DS, Anderson JC: Perceptions of risk factors for colorectal cancer and colorectal cancer risk-related behaviors among current, ex-, and nonsmokers. *Journal of cancer education : the official journal of the American Association for Cancer Education* 2013, 28(3):444-453.
29. Remillard CV, Yuan JX: Activation of K⁺ channels: an essential pathway in programmed cell death. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2004, 286(1):L49-67.
30. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL: Genetic alterations during colorectal-tumor development. *The New England journal of medicine* 1988, 319(9):525-532.

31. Itzkowitz SH: Molecular biology of dysplasia and cancer in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology clinics of North America* 2006, 35(3):553-571.
32. Winawer SJ, Shike M: Dietary factors in colorectal cancer and their possible effects on earlier stages of hyperproliferation and adenoma formation. *Journal of the National Cancer Institute* 1992, 84(2):74-75.
33. Aune D, Chan DS, Lau R, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E, Norat T: Dietary fibre, whole grains, and risk of colorectal cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *Bmj* 2011, 343:d6617.
34. Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE: Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 2002, 418(6901):934.
35. Kikuchi-Yanoshita R, Konishi M, Ito S, Seki M, Tanaka K, Maeda Y, Iino H, Fukayama M, Koike M, Mori T et al: Genetic changes of both p53 alleles associated with the conversion from colorectal adenoma to early carcinoma in familial adenomatous polyposis and non-familial adenomatous polyposis patients. *Cancer research* 1992, 52(14):3965-3971.
36. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychlinsky A: Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *The Journal of cell biology* 2007, 176(2):231-241.
37. Hu R, Ma S, Li H, Ke X, Wang G, Wei D, Wang W: Effect of magnetic fluid hyperthermia on lung cancer nodules in a murine model. *Oncology letters* 2011, 2(6):1161-1164.
38. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J: Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996, 87(2):171.
39. Gloeckler Ries LA, Reichman ME, Lewis DR, Hankey BF, Edwards BK: Cancer survival and incidence from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) program. *The oncologist* 2003, 8(6):541-552.
40. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ: The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001, 104(4):487-501.
41. Hsu H, Xiong J, Goeddel DV: The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 1995, 81(4):495-504.
42. Wajant H: The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* 2002, 296(5573):1635-1636.
43. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME: Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *The EMBO journal* 1995, 14(22):5579-5588.
44. Kataoka T, Schroter M, Hahne M, Schneider P, Irmeler M, Thome M, Froelich CJ, Tschopp J: FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation. *Journal of immunology* 1998, 161(8):3936-3942.
45. Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G, Vandenabeele P: Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 2004, 23(16):2861-2874.

46. Hill MM, Adrain C, Duriez PJ, Creagh EM, Martin SJ: Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *The EMBO journal* 2004, 23(10):2134-2145.
47. Cory S, Adams JM: The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature reviews Cancer* 2002, 2(9):647-656.
48. Schuler M, Green DR: Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochemical Society transactions* 2001, 29(Pt 6):684-688.
49. Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM: Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 1984, 226(4678):1097-1099.
50. Mayer B, Oberbauer R: Mitochondrial regulation of apoptosis. *News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society* 2003, 18:89-94.
51. Minn AJ, Velez P, Schendel SL, Liang H, Muchmore SW, Fesik SW, Fill M, Thompson CB: Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* 1997, 385(6614):353-357.
52. Yip KW, Reed JC: Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene* 2008, 27(50):6398-6406.
53. Newmeyer DD, Bossy-Wetzel E, Kluck RM, Wolf BB, Beere HM, Green DR: Bcl-xL does not inhibit the function of Apaf-1. *Cell death and differentiation* 2000, 7(4):402-407.
54. Liu FT, Newland AC, Jia L: Bax conformational change is a crucial step for PUMA-mediated apoptosis in human leukemia. *Biochemical and biophysical research communications* 2003, 310(3):956-962.
55. Frame MC: Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour. *Biochimica et biophysica acta* 2002, 1602(2):114-130.
56. Fang JY, Richardson BC: The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *The lancet oncology* 2005, 6(5):322-327.
57. Cantley LC, Neel BG: New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999, 96(8):4240-4245.
58. Meier F, Schitteck B, Busch S, Garbe C, Smalley K, Satyamoorthy K, Li G, Herlyn M: The RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT signaling pathways present molecular targets for the effective treatment of advanced melanoma. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 2005, 10:2986-3001.
59. Clouse SD, Sasse JM: BRASSINOSTEROIDS: Essential Regulators of Plant Growth and Development. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* 1998, 49:427-451.
60. Kubicka S, Greil R, Andre T, Bennouna J, Sastre J, Van Cutsem E, von Moos R, Osterlund P, Reyes-Rivera I, Muller T et al: Bevacizumab plus chemotherapy continued beyond first progression in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with bevacizumab plus chemotherapy: ML18147 study KRAS subgroup findings. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2013, 24(9):2342-2349.
61. Fujioka S, Yokota T: Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Annual review of plant biology* 2003, 54:137-164.

62. Divi UK, Krishna P: Brassinosteroid: a biotechnological target for enhancing crop yield and stress tolerance. *New biotechnology* 2009, 26(3-4):131-136.
63. Bhardwaj R, Kandoria A, Marwah R, Vaidya P, Singh B, Dhiman P, Sharma A: Prevalence of rheumatic fever and rheumatic heart disease in rural population of Himachal--a population based study. *The Journal of the Association of Physicians of India* 2012, 60:13-14.
64. Avruch J, Zhang XF, Kyriakis JM: Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway. *Trends in biochemical sciences* 1994, 19(7):279-283.
65. Olson JM, Hallahan AR: p38 MAP kinase: a convergence point in cancer therapy. *Trends in molecular medicine* 2004, 10(3):125-129.
66. Bader AG, Kang S, Zhao L, Vogt PK: Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nature reviews Cancer* 2005, 5(12):921-929.
67. Vivanco I, Sawyers CL: The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nature reviews Cancer* 2002, 2(7):489-501.
68. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM: Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 2005, 307(5712):1098-1101.
69. Cappelletti V, Miodini P, Di Fronzo G, Daidone MG: Modulation of estrogen receptor-beta isoforms by phytoestrogens in breast cancer cells. *International journal of oncology* 2006, 28(5):1185-1191.
70. Upmalis DH, Lobo R, Bradley L, Warren M, Cone FL, Lamia CA: Vasomotor symptom relief by soy isoflavone extract tablets in postmenopausal women: a multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Menopause* 2000, 7(4):236-242.
71. Wang TT, Sathyamoorthy N, Phang JM: Molecular effects of genistein on estrogen receptor mediated pathways. *Carcinogenesis* 1996, 17(2):271-275.
72. Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA: Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 1997, 138(3):863-870.
73. Fan YZ, Li GH, Wang YH, Ren QY, Shi HJ: [Effects of genistein on colon cancer cells in vitro and in vivo and its mechanism of action]. *Zhonghua zhong liu za zhi [Chinese journal of oncology]* 2010, 32(1):4-9.
74. Yu Z, Li W, Liu F: Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by genistein in colon cancer HT-29 cells. *Cancer letters* 2004, 215(2):159-166.
75. Zhu Q, Meisinger J, Van Thiel DH, Zhang Y, Mobarhan S: Effects of soybean extract on morphology and survival of Caco-2, SW620, and HT-29 cells. *Nutrition and cancer* 2002, 42(1):131-140.
76. Singh AV, Franke AA, Blackburn GL, Zhou JR: Soy phytochemicals prevent orthotopic growth and metastasis of bladder cancer in mice by alterations of cancer cell proliferation and apoptosis and tumor angiogenesis. *Cancer research* 2006, 66(3):1851-1858.
77. Wang SD, Chen BC, Kao ST, Liu CJ, Yeh CC: Genistein inhibits tumor invasion by suppressing multiple signal transduction pathways in human hepatocellular carcinoma cells. *BMC complementary and alternative medicine* 2014, 14:26.
78. Riccardi C, Nicoletti I: Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature protocols* 2006, 1(3):1458-1461.

79. Nakamura Y, Yogosawa S, Izutani Y, Watanabe H, Otsuji E, Sakai T: A combination of indol-3-carbinol and genistein synergistically induces apoptosis in human colon cancer HT-29 cells by inhibiting Akt phosphorylation and progression of autophagy. *Molecular cancer* 2009, 8:100.
80. Obakan P, Arisan ED, Coker-Gurkan A, Palavan-Unsal N: Epibrassinolide-induced apoptosis regardless of p53 expression via activating polyamine catabolic machinery, a common target for androgen sensitive and insensitive prostate cancer cells. *The Prostate* 2014.
81. Olson M, Kornbluth S: Mitochondria in apoptosis and human disease. *Current molecular medicine* 2001, 1(1):91-122.
82. Banerjee S, Li Y, Wang Z, Sarkar FH: Multi-targeted therapy of cancer by genistein. *Cancer letters* 2008, 269(2):226-242.
83. Kim SH, Kim SH, Kim YB, Jeon YT, Lee SC, Song YS: Genistein inhibits cell growth by modulating various mitogen-activated protein kinases and AKT in cervical cancer cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2009, 1171:495-500.
84. Sansal I, Sellers WR: The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2004, 22(14):2954-2963.
85. Tanaka Y, Gavrielides MV, Mitsuuchi Y, Fujii T, Kazanietz MG: Protein kinase C promotes apoptosis in LNCaP prostate cancer cells through activation of p38 MAPK and inhibition of the Akt survival pathway. *The Journal of biological chemistry* 2003, 278(36):33753-33762.
86. Obakan P, Arisan ED, Calcabrini A, Agostinelli E, Bolkent S, Palavan-Unsal N: 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):553-564.

EKLER

Tablo 1. Kullanılan cihazların listesi

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
Buzdolabı (No frost)	4263TMB	Arçelik
Cooling-Heating Thermosta	CH-100	BIOSAN
Çeker Ocak		KARAÇELİK
Derin Dondurucu	2041D	Arçelik
Distile Su Cihazı	D56412	TKA-Pacific
Dondurucu (-80°C)	Ultra Low Temperature Freezer, U725 innova	New Brunswick Scientific
Elektroforez Aletleri		BioRad
Floresan Mikroskopu	1X71	Olympus
FLUOROMETRE- LUMİNOMETRE		ELİPS Accent
Güç Kaynağı	PowerPac/Basic	BioRad
Hassas Tartı	LE6202S	Sartorius
Isıtıcı	FN 300	Safety Thermostat
Inverted Mikroskop	XDS-1B	SOIF
İnkübatör	EN025	Nüve
Kar makinası	AF 80	scatsman
Kuru ısı sterilizatörü	FN120	Nüve
Laminar Flow	12469, 2000	HeraSafe
Manyetik Karıştırıcı	SB162	Stuart/ProLab
Mikrodalga fırın	MD595	ARÇELİK
Mikroplaka Okuyucu	Model 680	BIO RAD
Mikropipet(0,5 µl- 10 µl)	EH52836	Thermo
Mikropipet (2µl-20µl)	CJ17240	Thermo
Mikropipet (20µl-200µl)	EH46925	Thermo
Mikropipet (200µl-1000µl)	T27274	Thermo
Otoklav (Kirli)	OT 4060	nüve
Otoklav (Temiz)	OTO32	Nüve
pH Metre	N315	SEM/Mettler Toledo
Santrifüj	5417R	Eppendorf
Sıvı Azot Tankı	ARPEGE 40	AIR LIQUIDE
Spektrofotometre	Ultraspec 2100 pro	Biosciences
Spin mini spin plus	SN0708	LabNet
SU BANYOSU	ST402	nüve
Transfer Sistem	Trans-Blot®-TurboTM	BIO RAD
UV-Translminatör	GelDOC	BioRad
Vorteks	SA8	Stuart/ProLab

Yatay elektroforez sistemi	Gel XL ultra V-2	BioRad
----------------------------	------------------	--------

Tablo 2. Hücre Kültürü Donanımları

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
6 kuyucuklu petri	92006	TPP
96 kuyucuklu petri	92096	TPP
75 cm ² hücre büyütme kapları	90076	TPP
25 cm ² hücre büyütme kapları	90026	TPP
100 mm hücre büyütme kapları	93100	TPP
60 mm hücre büyütme kapları	93060	TPP
Steril pipetler (5ml)	94005	TPP
Steril pipetler (10ml)	94010	TPP
Şırınga filtreleri (0.22 µm)	99722	TPP
Enjektör seti	B25107	Set Inject
Tripsin-EDTA	P10-0231	Pan Biotech
Penisilin/Streptomisin	P06-07100	Pan Biotech
Fetal Bovine Serum	1092-P290310	Pan Biotech
McCoy's Medium	P04-05500	Pan Biotech
Alpha MEM Eagle Medium	P04-21060	Pan Biotech
SW480 hücreleri	CCL-228	ATCC
DLD-1 hücreleri	CCL-221	ATCC

Tablo 3. Kullanılan Kimyasalların Listesi

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
1 kb Marker	SM1163	Fermantas
2- Butanol	8U010083	Applichem
3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT Tetrazolyum Tuzu)	M2003-1G	Sigma
6X Yükleme Tamponu	R0631	Fermantas
β-merkaptetanol	S4805940517	Merck
Agaroz	A2114,1000	Applichem
Akrimalid/ Bis-Akrilamid %30 çözelti	A3699	SIGMA-ALDRICH
Amonyum Asetat	1,110115,1000	Merck
Amonyum Persülfat	A3678	SIGMA
Asetik Asit	10K37230062	Merck
Coomassie Blue Belirteci	500-0006	BioRad

Dimetilsülfoksit (DMSO)	D-5879	SIGMA
Dioc ₆ Boya	2129966	Fluka
Epibrassinolid		
Etanol	A3452,1000	SIGMA-ALDRICH
Etanol (Saf)	32221	Rieel-de Haen
Ethidium Bromide	46067	Fluka
Etilendiamintetraasetik asit (EDTA)	A3452,1000	SIGMA-ALDRICH
Fenol Kloroform	A2279,0250	Applichem
Fetal Bovine Serum (FBS)	1092-P290310	Pan Biotech
Glisin	8B003408	Applichem
Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)	K39218400 838	Merck
İzopropanol	24137	Rieel-de Haen
Laemmler tamponu	S3401-1VL	Sigma
Metanol	24229	SIGMA-ALDRICH
Page Ruler Prestained Protein Ladder	SM0671	Fermantas
Propidium Iodide	A2261,0025	Applichem
Protein İzolasyonu Tamponu	K0301	Fermantas
Sığır serum albumin (BSA)	500-0007	BioRad
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	A3452,1000	Applichem
Sodyum klorür	BCBH3643V	SIGMA-ALDRICH
TEMED	A1148,0100	Applichem
Tris Baz	A2264,1000	Applichem
Tris-HCL	A3452,1000	Applichem
Tween 20	S4927784 802	Merck
Yağsız Süt Tozu	Food Club	Amerika

Tablo 4. %12' lik SDS-PAGE Jel İçeriği

	Ayırma Jeli (Alt Jel)	Yükleme Jeli (Üst Jel)
Distile su	3,4 ml	3,025 ml
Tris-Hcl	2,5 ml(1,5 M pH: 8.8)	1,125 ml (0,5 M pH: 6.8)
%10 SDS	0,1 ml	0,05 ml
Akrilamid/ Bis-Akrilamid	4ml	0,67 ml
Amonyum Persülfat (APS)	0,05 ml	0,025 ml
TEMED	0,025 ml	0,005 ml
TOPLAM	10,005 ml	5,05 ml

ÖZGEÇMİŞ



1. **Adı Soyadı:** Esin GÜVENİR
2. **Doğum Tarihi:** 29.04.1990
3. **Unvanı:** Araştırma Görevlisi
4. **Öğrenim Durumu:**

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	İstanbul Kültür Üniversitesi	2012
Y. Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı	İstanbul Kültür Üniversitesi	2012-...

5. Akademik Ünvanlar:

Görev Ünvanı	Görev Yeri	Yıl
Arş. Gör.	Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi	2014-...

6. Yönetilen Yüksek Lisans ve Doktora Tezleri

6.1 Yüksek Lisans Tezleri

6.2 Doktora Tezleri

7. Yayınlar:

7.1. Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

Ajda Çoker-Gürkan, Elif Damla Arisan, Pınar Obakan, Esin Güvenir, Narçin Palavan Ünsal, Inhibition of autophagy by 3-MA potentiates purvalanol-induced apoptosis in Bax deficient HCT 116 colon cancer cells, Experimental Cell Research, 2014 (DOI: 10.1016/j.yexcr.2014.07.022, Araştırma Makalesi Baskıda)

7.2. Uluslar arası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceeding) basılan bildiriler

1- Onur EROGLU, Mustafa YILDIZ, Ali MUHAMMEDOGLU, Gonca KAVSUT, Esin GUVENIR, Bihter MURATOGLU, Esra N. SOGUT, ASSOCIATION OF DNA METHYLATION OF P16^{INK4A} (CDKN2A) AND MGMT GENES AND HISTOPATHOLOGICAL FEATURES OF BREAST CANCER, 3rd International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, 10-12 September 2014, Izmir Institute of Technology, Izmir/ Turkey

2- Onur EROGLU, Esin GUVENIR, THE CORRELATION BETWEEN LYMPH NODE METASTASIS AND METHYLATION IN BREAST CANCER, 3rd International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, 10-12 September 2014, Izmir Institute of Technology, Izmir/ Turkey

3- Demirer M.R. and Guvenir E., Capturing Sub-similarities Among Proteins (CSAP): A mathematical review on Blaschke Products Using BIO3D, 6th BioNanoTox Conference, Nov. 17-18 2011, Little Rock, US

7.3. Yazılan Uluslar arası kitaplar veya kitaplarda bölümler.

7.4. Ulusal hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

7.5. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan bildiri kitabında basılan bildiriler

7.6 Diğer Yayınlar

8. Ulusal & Uluslararası Projeler

8.1. Ulusal Projeler:

- N1,N11-Dietilnorspermin (Denspm)' in Hct116 Ve Sw480 Kolon Kanseri Hücrelerinde Otofaji Üzerine Etkisinin Poliamin Metabolizması Açısından Araştırılması, TÜBİTAK Araştırma Projesi, Bursiyer, Şubat 2013- Ocak 2014

9. İdari Görevler

10. Bilimsel Kuruluşlara Üyelikleri

Moleküler Biyoloji Derneği

11.Ödüller

12. Etkinlikler

Katıldığı Uluslararası Bilimsel Etkinlikler:

Nanotechnology&Tissue Engineering: Current Challenges and Future Propects, 20-21 Aralık 2013, Istanbul Turkey

International Congress on Polyamines Biological and Clinical Perspectives
September 2-7, 2012, Istanbul Turkey

Katıldığı Ulusal Bilimsel Etkinlikler:

MOBİGEN-DNA OKULU: Oksidatif Stres, DNA hasarı, DNA Onarımı ve Hastalıklar, Prof. Dr. Miral Dizdaroğlu, 16-18 Nisan 2013, İstanbul Türkiye

Boğaziçi Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik HaftasonuV, Dinleyici, 10-11 Nisan 2010, İstanbul Türkiye

İTÜ 3. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kongresi, Dinleyici, 17-20 Ağustos 2009

Orta Doğu Teknik Üniversitesi, I.Ulusal Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar Sempozyumu, Dinleyici, 20 Aralık 2008

Organizasyonda görev Aldığı Bilimsel Etkinlikler

Istanbul Kultur University, HARVARD-MIT Joing meeting on Nanotechnology and Tissue Engineering: Current Challenges and Future Prospects, December 2013

MOBİGEN-DNA OKULU: Oksidatif Stres, DNA hasarı, DNA Onarımı ve Hastalıklar, 16-18 Nisan 2013

Istanbul Kultur University, International Congress on Polyamines Biological and Clinical Perspectives, September 2-7, 2012

İstanbul Kültür Üniversitesi, Evrim Sergisi, görevli Öğrenci, 2012

İstanbul Kültür Üniversitesi, Darwin 200 yaşında etkinlikleri, görevli Öğrenci, 2009

