

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

**HCT 116 ve HT 29 KOLON KARSİNOMA HÜCRELERİNDE
EPIBRASSİNOLİD TARAFINDAN TETİKLENEN APOPTOTİK SÜREÇTE
POLİAMİNLERİN ROLÜ**

YÜKSEK LİSANS

TEZİ

Deniz COŞKUN

(1109411001)

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Narçin PALAVAN-ÜNSAL

OCAK 2014

ÖNSÖZ

Tez çalışmalarım ve lisans eğitimim boyunca engin tecrübelerinden ve deneyimlerinden yararlandığım, her konuda desteğini benden esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Narçın PALAVAN ÜNSAL'a teşekkürlerimi sunarım.

Tüm lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca akademik alanda sahip oldukları tüm bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan ve yanımda olan değerli hocalarım Doç. Dr. Elif Damla ARSAN, Doç. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN ve Yrd. Doç. Dr. Pınar OBAKAN'a

Hem akademik, hem de özel hayatımda bana destek olan Araş. Gör. Pelin ÖZFİLİZ, Özge BERRAK, Ceylan CAMBAZOĞLU, Gülşen TAŞKINAY ve İrem KESKİNÇELİK'e

Tezim ve tüm hayatım boyunca desteklerini yanımda hissettiğim sevgili annem Aydan COŞKUN, babam A.Murat COŞKUN, kardeşim Hakan COŞKUN'a

Hayatıma girdiği andan beri beni her konuda destekleyen, zor zamanlarımda yanımda olan Emir ÇELİK'e

Bu çalışma boyunca benden yardımlarını esirgemeyen tüm çalışma arkadaşlarıma, bu çalışmamın uygulama kısmında 1002 Hızlı Destek Programı 212T168 nolu proje ile beni destekleyen TÜBİTAK'a ve İstanbul Kültür Üniversitesi'ne teşekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ.....	vii
SEMBOL LİSTESİ.....	viii
ÖZET.....	xi
SUMMARY.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1.KOLON KANSERİ.....	5
2.1.1. Kolon Kanseri Epidemiyolojisi.....	5
2.1.2. Kolon Kanseri Etiyolojisi.....	5
2.1.3. Kolon Kanseri Oluşumunun Moleküler Mekanizması.....	6
<i>2.1.3.1. Ailesel adenomatöz polip (APC) geni.....</i>	<i>6</i>
<i>2.1.3.2. K-Ras.....</i>	<i>7</i>
<i>2.1.3.3. p53.....</i>	<i>8</i>
2.1.4. Kolon Kanserinde Tümör Yayılımı ve Evreleme.....	8
2.2. POLİAMİNLER.....	10
2.2.1. Poliamin Metabolizması.....	11
2.3. APOPTOZ.....	14
2.3.1. Apoptoz Tipleri.....	16
<i>2.3.1.1. İç (İntrinsik) Yolak.....</i>	<i>16</i>
<i>2.3.1.2. Dış (ekstrinsik) Yolak.....</i>	<i>18</i>
2.4. HÜCRE SAĞ KALIM SİNYAL YOLAKLARI.....	19
2.4.1. MAPK Yolağı.....	19

2.4.2. PI3K/AKT	20
2.4.3. ForkHead Yolağı	21
2.5. BRASSİNOSTEROİDLER	22
2.5.1. Brassinosteroidlerin Biyosentez Mekanizması	23
2.5.2 Brassinosteroidlerin Hücresel İşlevleri ve Türevleri	24
2.5.2.1. Epibrassinolid	26
3. MALZEME VE YÖNTEM	28
3.1. KULLANILAN MALZEMELER	28
3.1.1. Kullanılan Cihazlar	28
3.1.2. Hücre Kültürü Donanımları	28
3.1.3. Kullanılan Kimyasallar	28
3.1.4. Kullanılan Tamponlar	28
3.1.4.1. 10X TBS Hazırlanışı	28
3.1.4.2. 1X TBS-Tween Hazırlanışı	28
3.1.4.3. Yürütme tamponunun Hazırlanışı	28
3.1.4.4. Transfer Tamponunun Hazırlanışı	28
3.1.4.5. Yürütme Jelinin Hazırlanması	29
3.1.4.6. Hücre Dondurma Medyasının Hazırlanması	29
3.2. YÖNTEMLER	29
3.2.1. Hücre Kültürü	29
3.2.2. Hücre Canlılığının Belirlenmesi	30
3.2.3. Hücre Sağkalm Tayini	30
3.2.4. 3,3' Diheksiloksakarbosiyenin İyodür (DiOC ₆) Boyama	30
3.2.5. Propidyum iyodür (PI) boyama	31
3.2.6. 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) Boyama	31
3.2.8. DNA Kırıklarının Gösterimi	31

3.2.9. Total Protein İzolasyonu	32
3.2.10. Bradford Protein Miktar Tayini	32
3.2.11. İmmunoblotlama Yöntemi	32
3.2.11.1. <i>Proteinlerin Hazırlanması ve SDS-PAGE’de Yürütülmesi</i>	32
3.2.11.2. <i>Membrana Transfer ve bloklama</i>	32
3.2.11.3. <i>Primer ve Sekonder Antikor İşaretlemeleri</i>	33
3.2.11.4. <i>Bantların Görüntülenmesi</i>	33
3.2.12. Poliamin Miktarlarının Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Tayini	34
3.2.13. SİRNA YÖNTEMİ İLE GEN SUSTURULMASI	35
3.2.13.1. <i>siRNA Transfeksiyonu</i>	35
3.2.13.2. <i>p53 Plazmid Transfeksiyonu</i>	35
3.2.14. İstatiksel Analiz	35
4. BULGULAR	36
4.1. EPİBRASSİNOLİD’İN HCT 116 VE HT 29 KOLON KANSERİ HÜCRE HATLARINDA HÜCRE CANLILIĞINA ETKİSİ	36
4.2. EPİBRASSİNOLİD’İN HCT 116 VE HT 29 HÜCRE HATLARINDA APOPTOTİK ETKİSİ	37
4.3. EPİBRASSİNOLİD’İN POLİAMİN METABOLİK ENZİMLERİNE VE ROS ÜRETİMİNE ETKİSİ	43
4.4. EPİBRASSİNOLİD’İN HÜCRE SAĞKALIM YOLAKLARI ÜZERİNE ETKİLERİ	47
4.5. HCT 116 VE HT 29 HÜCRE HATLARINDA EPİBRASSİNOLİDLE TETİKLENEN APOPTOZDA P53’ÜN ROLÜ	50
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	54
REFERANSLAR	63
EKLER	72

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2. 1 Wnt/ β -katenin yolağında APC mutasyonu (46).....	7
Şekil 2. 2 Kolon kanseri gelişimine sebep olan mutasyonlar (52).	8
Şekil 2. 3 Kolon kanserinde sınıflandırmaların şematik görünümü (55).	10
Şekil 2. 4 Poliaminlerin kimyasal yapısı.	11
Şekil 2.5 Poliamin metabolizması (59).	11
Şekil 2. 6 ODC'nin, ornitin dekarboksilaz antizim ve antizim inhibitörü ile düzenlenmesi (64).	12
Şekil 2.7 Sperminin SMO veya PAO enzimleri ile spermidine dönüşümü (70).....	13
Şekil 2.8 Bcl-2 ailesi üyeleri (88).....	16
Şekil 2.9 Apoptotik iç yolak mekanizması (93).	17
Şekil 2.10 Apoptozun iç ve dış yolağının moleküler mekanizması (98).	18
Şekil 2.11 Ras/Raf/MEK/ERK Sinyal iletimi.	19
Şekil 2.12 PI3K/AKT yolağı (102).	21
Şekil 2.13 FOXO transkripsiyon faktörü ailesinin normal ve kanser hücrelerindeki moleküler mekanizması (112).	22
Şekil 2.14 Brassinosteroidlerin biyosentezi.	23
Şekil 2.15 : Bitki hücrelerinde brassinolid sinyal mekanizması (120).....	25
Şekil 2.16 Doğal brassinosteroidlerin kimyasal yapısı (20).....	26
Şekil 4. 1 HCT 116 ve HT 29 hücrelerinde doza bağlı EBR uygulamasının hücre canlılığına etkisi. * $p < 0,01$; **** $p < 0,00001$	36
Şekil 4. 2. HCT 116 ve HT 29 hücrelerinde zamana bağlı EBR uygulamasının hücre canlılığına etkisi. * $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$	37
Şekil 4. 3. EBR uygulanan hücrelerde zamana bağlı olarak hücre büyümesinin incelenmesi.	37
Şekil 4. 4. HCT 116 ve HT 29 hücre hatlarında 30 μ M EBR uygulaması sonucu hücre ölümü ve mitokondri membran potansiyelindeki değişim PI ve DiOC6 boyama ile gösterilmiştir. ..	39
Şekil 4. 5. HCT 116 ve HT 29 hücrelerinde EBR ile teiklenen DNA kondensasyonunun gösterilmesi.	39
Şekil 4. 6. Apoptotik hücrelerde DNA kırıklarının gösterilmesi.	40
Şekil 4. 7. EBR ile tetiklenen apoptotik yolakta PARP kesiliminin belirlenmesi	40

Şekil 4. 8. EBR uygulanmış hücrelerde zamana bağlı olarak kaspaz aktivasyonunun gösterilmesi. ****p<0,00001	41
Şekil 4. 9. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin EBR uygulaması sonucu anlatımlarındaki değişikliklerinin gösterilmesi	43
Şekil 4. 10. EBR uygulaması sonucunda PA biyosentez ve katabolizmasındaki enzimlerin anlatım seviyelerindeki değişikliklerin gösterilmesi	44
Şekil 4. 11. EBR uygulanmış HCT 116 ve HT 29 kolon kanseri hücrelerinde poliamin içeriğinin gösterilmesi. *p <0,01; **p<0,001; *p<0,0001	44
Şekil 4. 12. HT 29 kolon kanseri hücrelerinde SSAT ve PAO siRNA oranı optimizasyonu. .	45
Şekil 4. 13. HCT 116 ve HT 29 kolon kanseri hücrelerinde SSAT ve PAO siRNA uygulamasının hücre canlılığına etkisi.	45
Şekil 4. 14. SSAT ve PAO siRNA uygulanmış hücrelerde PARP kesiminin gösterilmesi.	46
Şekil 4. 15. HCT 116 ve HT 29 hücre hattında MDL 72, 527 uygulaması sonucu hücre canlılığındaki değişimlerin saptanması ve apoptotik cevabın incelenmesi. *** p< 0,001	47
Şekil 4. 16. EBR uygulamasının MAPK ailesi proteinlerinin anlatımındaki etkileri.	48
Şekil 4. 17. EBR uygulamasının MAPK ailesi proteinlerinin anlatımındaki etkileri.	49
Şekil 4. 18. EBR uygulanan hücrelerde PI3K/AKT sinyal yolağının ve FOXO3a transkripsiyon faktörünün anlatımındaki değişikliklerin gösterilmesi.	50
Şekil 4. 19. HCT 116 hücre hattında p53 siRNA uygulaması sonucu EBR'nin etkisinin gösterilmesi. *** p< 0,001	51
Şekil 4. 20. HT 29 hücre hattında p53 overekspresyon sonucu EBR etkisinin gösterilmesi. ** p< 0,01	51
Şekil 4. 21. p53 siRNA uygulanmış HCT 116 ve p53 overeksprese edilmiş HT 29 hücre hatlarında EBR'nin PARP kesimi üzerindeki etkisi.	52
Şekil 4. 22. HCT 116 p53 -/- hücre hatlarında EBR'nin zamana bağlı olarak hücre canlılığına ve sağkalımına etkisinin gösterilmesi. *** p< 0,001	53

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. Kolon kanserinde evreleme sistemi (54).....	9
---	---

SEMBOL LİSTESİ

5-FU:	5-Fluorurasil
AdoMet:	S-Adenozilmetionin
AIF:	Apoptoz indükleyici faktör
AP-1:	Aktivatör protein-1
Apaf-1:	Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1
APS:	Amonyum persülfat
AR:	Androjen reseptörü
AZI:	Antizim inhibitörü
BAK1:	BRI1-uyumlu reseptör kinaz
Bcl-2:	B-hücre lenfoma 2
BENSpm:	Bis(etil)norspermin
BES1:	BRI baskılayıcı 1
BH:	Bcl-2 homoloji bölgeleri
BR:	Brassinosteroid
BRI1:	Brassinosteroid duyarlı 1
BSA:	Sığır serum albumin
BZR1:	Brassinazol-direnci 1
CDK:	Sikline bağımlı kinaz
CHENSpm:	Sikloheptilmetil-diazaundekan
CO₂:	Karbondioksit
DENSpm:	Ditetil(nor)spermin
DAPI:	4',6-diamidino-2-fenilindol
dcAdoMet:	Dekarboksile AdoMet
DFMO:	Difluorometilornitin
DiOC₆:	3, 3'-diheksiloksakarbosianin iyodür
DMSO:	Dimetilsulfoksit
ER:	Östrojen reseptörü
ERK:	Ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz
EBR:	Epibrassinolid
EDTA:	Etilen diamin tetra asetik asit
FAP:	Ailesel adenomatöz polip

FOXO:	ForkHead/Winged Helix Box Class O
GDP:	Guanin difosfat
GSK3β:	Glikojen sentaz kinaz 3 β
GTP:	Guanin trifosfat
H₂O₂:	Hidrojen peroksit
HNPCC:	Hereditör non-polipozis kolon kanseri sendromu
HPLC:	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
IAP:	Apoptoz inhibitörü protein
JNK:	c -Jun NH ₂ terminal kinaz
kDa:	KiloDalton
K-Ras:	Kirstein rat sarcoma
MAPK:	Mitojenle aktive edilmiş protein kinaz
MAPKK:	MAP kinaz kinaz
MAPKKK:	MAP kinaz kinaz kinaz
MDL 72,527:	N1, N4-bis (butadenil)-1,4-diaminobutan
MTT:	Metiltiazol difeniltetrazolyum bromür
NSAID:	Steroid kökenli olmayan anti-inflamatuar ajan
OAZ:	ODC antizim
ODC:	Ornitin dekarboksilaz
ORF:	Açık okuma alanı
PA:	PA
PAO:	PA oksidaz
PARP:	Poli ADP riboz polimeraz
PBS:	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PDK:	PIP ₃ bağımlı kinaz
PI:	Propidyum iyodür
PI3K:	Fosfatidilinositol-3 fosfat
PIP₃	Fosfatidilinozitol trifosfat
PLP:	Piridoksal fosfat
PTEN:	Tümör baskılayıcı protein olan fosfataz ve tensin homolog
Put:	Putresin
PVDF:	Poliviniliden florid
ROS:	Reaktif oksijen türleri

qRT-PCR:	Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
SAMDC:	S-Adenozilmetionin dekarboksilaz
SDS:	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE:	SDS- Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SMO:	Spermin oksidaz
Spd:	Spermidin
Spm:	Spermin
SSAT:	Spermidin, spermin asetil transferaz
TBS:	Tris tamponlu tuz çözeltisi
TCA:	Trikloroasetik asit
TEMED:	Tetrametletilendiamin
TNF:	Tümör nekrozis faktör
TRAIL:	TNF ile ilişkisi apoptoz indükleyici ligand reseptör
$\Delta\psi_m$:	Mitokondri membran potansiyeli

ÖZET

Kolon kanseri gastrointestinal sistemde meydana gelen, kanserden ölümlerde akciğer kanserinden sonra gelen yaygın bir kanser türüdür. Kötü beslenme, hareketsiz yaşam tarzı ve sigara kullanımı gibi farklı çevresel etkenlerle tetiklenebilir. Risk faktörü olarak bunların yanı sıra genetik etmenler de rol oynamaktadır. Kolon kanserinin popülasyondaki yüksek insidansına bağlı olarak yeni tedavi stratejilerine ve moleküler mekanizmaların aydınlatılmasına gerek duyulmaktadır. Kolon mukozasının epitel hücrelerindeki genetik değişikliklere bağlı olarak artan hücre proliferasyonu pek çok hücreyel aktiviteye bağlıdır, bunların arasında hücrenin metabolik regülasyonunda işlevsel olan amin türevleri olan poliaminlerin (PA) önemli rollere sahiptirler.

PA'lar (putresin, spermidin, spermin) DNA'nın stabilizasyonu ve hücre bölünmesindeki önemli rolleri ile bilinmektedirler. Daha önceki çalışmalara dayanarak, PA biyosentez enzimi ornitin dekarboksilazın aşırı anlatımının kanseri bir onkogen olan c-myc ile birlikte çalışarak tetiklediği gösterilmiştir. PA biyosentezinin artmasına karşılık aynı zamanda kanser hücrelerinde katabolik yolda meydana gelen sorunlarla PA'ların hücre dışına atılmadıkları ve hücrelerin sürekli olarak hücre döngüsünde kalarak kanser oluşumunun tetiklendiği belirlenmiştir. Son yıllarda antikanser strateji olarak hücre içi PA katabolizmasının aktive edilmesi üzerine çalışılmaya başlanmış ve çeşitli kemoterapötik ajanların bunu sağlayabildiği gösterilmiştir. Hücreyel PA'ların üretimine ket vurmak, PA katabolizmasının aktive olması ile mümkündür. PA katabolik enzimlerinden spermidin-spermin asetil transferaz (SSAT) hücre içi PA'ları asetilleyerek bir önceki formlarına dönüşümlerini sağlar ya da hücreden atılabilmesi için oksidasyon işlemini gerçekleştirecek olan PA oksidaz (PAO) enzimi için substrat haline dönüştürür ve bu durumda hücrede fazla PA birikimi önlenmiş olur. Yapılan çalışmalar PA katabolizmasını aktive ederek hücreyel PA düzeylerinde azalma sağlayan kemoterapötiklerin aynı zamanda hücrelerde apoptozu teşvik ettiğini de göstermiştir.

Antikanser tedavi stratejilerinde gözlemlenen en önemli problemlerden biri tümör hücrelerinde ilaçlara karşı geliştirilen direnç mekanizmasıdır ve bununla ilgili olarak birçok etken bulunmaktadır. İlaçlara karşı direnç mekanizmalarının gelişmesinde pek çok etken bulunmaktadır. Hücre sağkalım sinyalinin ilaçlarla kesilememesi veya sinyal yollarındaki proteinlerin aşırı anlatımları direnç mekanizmasına örnek verilebilir. Hücre sağkalımında

görevli protein ailelerinden biri olan MAPK ailesi üyeleri, AP-1, c-Myc gibi transkripsiyon faktörleri aracılığı ile hücre bölünmesini tetiklemektedir. Bir diğer hücre sağkalım yolağı ise fosfotidilinositol-3 fosfat/ protein kinaz B (PI3K/AKT) tarafından yönetilmektedir. Bu yolakta farklı olarak normal şartlarda apoptotik hücre ölümünü tetikleyen ForkHead/Winged Helix Box Class O (FOXO) transkripsiyon faktörü ailesi inhibe edilmekte ve hücre bölünmesinde görevli hedef genlerin transkripsiyonu gerçekleşmektedir.

Epibrassinolid (EBR), bir bitki büyüme maddesi olan brassinosteroidlerin (BR) bir üyesi olup, bitkilerde büyümeyi teşvik etmektedir. EBR omurgalılarda bulunan ve büyümeyi teşvik eden steroid hormonlara benzerlik gösteren doğal bir polihidroksi steroiddir. Bitkilerde büyüme üzerine olan etkisi birçok çalışmada gösterilmekle beraber memeli hücreleri üzerine etkisi son yıllarda ele alınmaya başlanmıştır. 2008 Malikova ve ark. tarafından EBR'nin çeşitli kanser hücre hatlarında çoğalmayı önleyici etkisinin varlığı ve hücre döngüsüne etki ederek apoptoz mekanizmasını başlattığı öne sürülmüştür.

Bu araştırma kapsamında EBR'nin farklı genomik özelliklere sahip HCT 116 ve HT 29 hücrelerinde mitokondri ve kaspazlara bağımlı apoptozu tetiklediği, bu süreçte farklı Bcl-2 ailesi üyeleri EBR'ye karşı cevap oluşturduğu gösterilmiştir. Ayrıca EBR'nin tetiklediği apoptozun PA katabolizması ile ilişkili olduğu her iki kolon kanseri hücre hattında da belirlenmiştir. Ayrıca, EBR'nin, tümör hücrelerinde sağkalımı tetikleyen PI3K/AKT yolağını indirgeyerek, FOXO3a transkripsiyon faktörü aracılı ve Bim aktivitesi ile apoptozun tetiklendiği belirlenmiştir. Aynı zamanda MAPK yolağının da aktif olduğu ve PA metabolizmasında görevli ornitin dekarboksilaz (ODC) enziminin transkripsiyon faktörü c-Myc'in de indirgendiği gösterilmiştir. Son olarak EBR ile tetiklenen apoptozun p53-bağımsız gerçekleştiği belirlenmiştir.

SUMMARY

Colon cancer at the gastrointestinal track system is the second most commonly death cause of cancer after the lung cancer. Malnutrition such as a high fat, alcohol or red meat intake, obesity, smoking, lack of physical exercise are major risk factors of colorectal cancer . Because of the high incidence of colon cancer in world population, it is necessary to develop new therapeutic strategies and to reveal the molecular mechanisms. Cell proliferation is increasing depending on the genetic modification in epithelial cells of colon mucosa and it is related with cellular activities such as amine derivative polyamines.

Polyamines (putrescine, spermidine, spermine) have important roles at DNA stabilization and cell division. Earlier studies have shown that over expression of the biosynthetic enzyme ornithine decarboxylase trigger the carcinogenesis, in collaboration with oncogene c-Myc. While polyamine biosynthesis is increasing in cancer cells, they cannot exclude from the cell because of the problems occurring at polyamine catabolic pathway and they stay within the cell and induce carcinogenesis. In recent years researchers trying to activate the intracellular polyamine catabolic pathway as an anticancer strategy and they showed that some chemotherapeutic agents can provide this. It is possible to inhibit the cellular polyamine production by activating their catabolism. One of the polyamine catabolic pathway enzyme spermidine-spermine acetyl transferase (SSAT) supply interconversion by acetylating polyamines and provide acetylated substrates to an other catabolic enzyme, polyamine oxidase (PAO), which is going to realize the oxidation procedure and exclude them from the cell; therefore inhibit the polyamine accumulation. Recent studies revealed that chemotherapeutics causing decrease in polyamine levels, by activating the polyamine catabolism, could also trigger apoptosis.

One of the problems of the anticancer theprapy strategies is acquired drug resistance mechanisms in tumor cells. There are several factors leading to resistance against drugs.

The disabilities of drug to inhibit cell survival signaling or overexpressions of survival factors could be stated as examples of acquired resistance. MAPK protein family is one of the major signalling pathways inducing cell survival and proliferation through transcription factors, like AP-1 or c-Myc. The other main survival pathway is driven by PI3K/AKT. This pathway transmits the cell proliferation signal by inhibiting FOXO transcription factor family members

which have role in the activation of apoptotic cell death. There are also additional transcription factors initiating the target gene expressions which play role in cell division.

Epibrassinolide (EBR), a member of plant growth regulator family stimulate the plant growth. EBRs are natural polyhydroxy steroids present in all vertebrates and they are similar to steroid hormones that stimulate cell growth. Several studies revealed their growth effects in plants, but their roles in mammalian cells are unclear yet. The EBRs inhibitory effects on proliferation in different cancer cell lines established by Malikova et al. (2008). They also revealed that EBR induce apoptosis by effecting cell cycle.

In this study, it has been determined that EBR triggered mitochondria-mediated and caspase-dependent apoptosis by modulating Bcl-2 family members in HCT 116 and HT 29 colon cancer cells with different genetic characteristics. EBR-induced apoptosis was found related with polyamine catabolism in each cell line. In addition, EBR treatment was able to inhibit PI3K/AKT signalling pathway and induce FOXO3a-mediated and Bim-activated apoptosis. In the same time, it has been also found that MAPK pathway was activated in response to EBR and its downstream target, c-Myc, the transcription factor responsible for polyamine metabolic enzyme transcription ornithine decarboxylase (ODC) was downregulated. Finally, our data suggested that EBR-induced apoptosis was p53-independent.

1. GİRİŞ

Kolon kanseri en sık görülen kanser türlerinden birisi olup, ülkemizde metastatik kolon kanseri vakaları yüksek mortalite oranlarına sahiptir. 2012 yılı kanser vakaları istatistiklerine göre, kolon kanseri kadın ve erkeklerde en sık görülen kanser türlerinden üçüncüsüdür (1). Bu nedenle tedaviye yönelik olarak, yeni terapötik hedeflerin ortaya konması ve etkileşimde oldukları moleküler yolların aydınlatılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Hücrelerin metabolik düzenlenmesinde işlevsel rolleri olan amin türevleri PA'lar [putresin (Put), spermidin (Spd), spermin (Spm)], birçok kanser türünde artan biyosentezleri ile kanser tetikleyicisi olarak gösterilmişlerdir (2). DNA'nın stabilizasyonu, hücre devrinin kontrolü ve hücre bölünmesi gibi önemli hücre olaylarında görev alan PA'ların kanser belirteci olma potansiyeli taşıdıkları ortaya konulmuştur (3). PA biyosentez enzimi olan ODC, bir proto-onkogen olan c-myc ile birlikte çalışarak normal hücrelerin transformasyonunda rol oynamakta ve kanserli hücrelerde PA biyosentezini artırmaktadır (4). Aynı zamanda kanser hücrelerinde biyosentez aktivitesinin artması ile birlikte katabolik enzimlerin aktivitesinde azalma ve üretilen PA'ların hücre içinde yıkılımı ya da hücre dışına atılımının engellendiği tespit edilmiştir. Normal koşullar altında PA biyosentezi ve katabolizması hücre homeostasisini sağlamaktadır. Fazla PA üretimi katabolik aktivite ile engellenerek dengede tutulmaktadır, aksi durum hücrelerin sürekli olarak hücre devrinde kalmalarını tetiklemektedir. PA biyosentezine ket vuran maddeler, PA düzeylerinin azalmasına neden oldukları gibi aynı zamanda kanser hücrelerinde apoptotik mekanizmayı da tetiklemektedir. Son yıllarda PA'ları hedef alan antikanser stratejileri arasında katabolik yolda görev alan enzimlerin aktivitelerinin artırılması yer almaktadır (5-9). PA katabolizması 3 farklı enzimle kontrol edilmektedir. SSAT, PA'ları asetilleyerek, PA oksidaz (PAO), asetile PA'ları oksitleyerek, spermin oksidaz (SMO) ise Spm'yi doğrudan oksitleyerek bir önceki formlarına dönüştürmekte ya da hücre dışına atılmalarını sağlayarak etkili olmaktadır. Katabolik yoldaki enzimlerin aktivasyonları sırasında hücre için yüksek derecede toksisite meydana getiren hidrojen peroksit ve aldehit türevleri gibi yan ürünler açığa çıkmaktadır. Hidrojen peroksitin reaktif oksijen türlerinin yüksek PA katabolizma düzeyleri ile uyumluluk gösteren

DNA-hasarlı değişimlerde önemli rol oynadığı bilinmektedir (10,11). Hücre içinde artan katabolik aktiviteyle birlikte azalan PA miktarının hücrelerde bölünmeye ket vurduğu ve açığa çıkan hidrojen peroksit gibi toksik ajanlarla apoptozun teşvik edildiği gösterilmiştir (12). Son yıllarda PA katabolik enzimlerinden SMO'nun hidrojen peroksit üretiminde önemli rol oynadığı öne sürülmüştür (13,14). PA katabolik enzimlerinin aktivasyonunu hedef alan ajanlar arasında klinikte kullanılan platin türevli ilaçların ya da PA analoglarının bulunduğu gözlemlenmiştir (15). Kanserli dokular sağlıklı dokulara oranla daha fazla miktarda PA içermekte ve bu nedenle PA biyosentezi inhibitörleri, tümör büyümesini ve metastazı engelleme açısından kayda değer bir potansiyele sahiptir. Bu nedenle, son yıllarda çeşitli kanser tiplerinde PA metabolizmasının terapötik bir hedef olabilirliği araştırılmaya başlanmıştır. Özellikle prostat kanserinin ilerlemesi ile ilgili ilişkilendirilen PA'lar, insan vücudunda en fazla prostat bezinde bulunmaktadır (16).

Geliştirilen kemoterapötik ajanlarda rastlanan en büyük sorun hücrelerin ilaca cevapsızlık ya da direnç mekanizması geliştirmeleridir. Bu bağlamda artan ölüm oranları da bulguyu destekler niteliktedir. Hücre içindeki moleküler hedefleri iyi belirlenmiş yeni ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır. İlk defa Malikova ve ark. (17) tarafından anti-kanser olarak tanımlanan Epibrassinolid (EBR) bu ajanlara bir örnektir. EBR, bitki büyüme düzenleyicileri olan brassinosteroid ailesinin bir üyesidir. Brassinosteroidlerin bitki metabolizmalarındaki rolleri halen araştırılmaktadır. Başlıca etkileri arasında hormonal dengenin sağlanması, nükleik asit ve protein sentezinin aktive edilmesi, enzim aktivitesinin düzenlenmesi, büyümenin indüklenmesi, meyvelerin büyüklerinin ve sayısının artırılması, stres ve hastalık gibi istenmeyen çevresel faktörlere karşı bağışıklık oluşturulması bulunmaktadır (18). Doğal brassinosteroidlerin bitkilere dışardan uygulanmasının antioksidan etki yarattığı, süperoksit dismutaz, katalaz gibi antioksidan enzimleri artırdığı ortaya konulmuştur (19). Bitkilerde heterodimer bir reseptör olarak bulunan ve hücre membranında yerleşmiş olmuş brassinosteroid reseptörü, brassinosteroid bağlanmasını ardışık serin/treonin domeinlerinden fosforile olarak aktif hale geçmektedir. Bu mekanizma ile çeşitli transkripsiyon faktörleri aktive olmakta, hücre bölünmesi ve büyümesi gibi brassinosteroid cevap genlerinin anlatımlarının tetiklenmesini sağlamaktadır (20). Steroid yapıdaki brassinosteroidler hayvanlarda bulunan steroid türevli hormonlara yapısal olarak benzemektedir. İnsanlarda steroid yapıdaki hormonlar embriyonik gelişim ve sekonder eşey karakterlerinin gelişiminden sorumludur. Bitki ve hayvan steroidlerinin bu ortak noktasından yola çıkarak EBR, ilk defa

kanser hücrelerine Malikova ve ark. (17) tarafından araştırılmış ve çeşitli kanser hücre hatlarında hücre canlılığında azalmaya neden olduğu özellikle hormonlara bağımlı kanser türlerinde etkin olmakla beraber hormonlardan bağımsız gelişen kanser türlerinde de etkili olduğu belirlenmiştir (18,21). EBR'nin steroid olma özelliği ve kanserli hücrelerdeki steroid hormon reseptörlerinin kendilerine özgü ligandlar dışında başka steroidleri de bağlayabilme özelliklerinden yola çıkarak hücre ölümünde sitoplazmada lokalize olan steroid reseptörlerin etkisi olup olmadığı bilinmemektedir. Bu nedenle EBR'nin kanser hücrelerindeki etkisinin moleküler mekanizması halen araştırılmaktadır.

Ökaryotik hücrelerde bölünme sinyali hücre membranında ya da sitoplazmada yerleşmiş pek çok reseptör ile algılanmaktadır. Normal şartlarda hücre bölünmesi sıkı bir şekilde denetlenirken, kanserli hücrelerde hücre bölünme sinyali sürekli olarak algılanmakta ya da ligand bağımsız olarak da sinyal iletimi gerçekleşmektedir (22). Antikanser tedavi stratejilerinde yaşanan önemli problemlerden biri, kullanılan ilaçlara karşı hücre bölünme sinyalinin devam etmesidir. Yani diğer bir deyişle tümör hücreleri bu ilaçlara karşı sağkalım sinyal yollarını aktif tutarak direnç meydana getirmektedirler. Tümör hücrelerinde sıklıkla aktif olarak gözlemlenen sağkalım yollarından bir tanesi MAPK ailesi proteinleri tarafından düzenlenmektedir (23). MAPK yolağında görev alan proteinler sinyali bir kaskad halinde bir proteinden diğer proteine fosforlanma yolu ile aktarır son olarak hücre bölünmesinde görevli genlerin transkripsiyonundan sorumlu transkripsiyon faktörlerini aktive etmektedirler. Bu faktörlere örnek olarak c-Jun ve c-Fos proteinlerinin dimerleşmesi ile meydana gelen AP-1, ya da c-Myc örnek verilebilir (24). Sağkalım sinyalini nukleusa iletebilen bir diğer sinyal yolağı PI3K/AKT'dir. Bu sinyal yolağı, tümör baskılayıcı protein olan fosfataz ve tensin homolog (PTEN) adı verilen protein ile düzenlenmektedir (25-27). PTEN fosforlanması PI3K/AKT yolağını indirgemektedir. Aktif PI3K/AKT yolağında taşınan büyüme sinyalinin iletilmesinde FOXO transkripsiyon faktörü ailesinin fosforlanma yolu ile inhibe edilmesi önem taşımaktadır. FOXO ailesi aktif durumda iken apoptozu indükleyecek Bim, kaspaz 9 gibi proteinlerin transkripsiyonunu başlattığı için PI3K/AKT ile inhibe edilmesi hücre sağkalımı için önem taşımaktadır (28).

Bu bilgiler ışığında bu çalışmanın esas amacı, steroid reseptörleri anlatımına (androgen reseptörü ve estrogen reseptörü β) sahip HCT 116 (p53 wt) ve HT 29 (p53 mt) kolon kanseri hücrelerinde EBR'nin apoptotik potansiyelinin ve PA katabolik yolağındaki önemli enzimlere

etkisinin ortaya konulması, aynı zamanda hücre sağkalım mekanizmalarının nasıl etkilendiğinin ortaya koyulmasıdır. Böylece yeni bir kemoterapötik ajan adayı olan EBR'nin kolon kanseri hücrelerinde hangi moleküler mekanizmaları hedef aldığı ve tedavide kullanılabilirliği ortağa çıkarılmış olacaktır. EBR ile tetiklenen apoptotik sürecin yanı sıra aynı zamanda PA biyosentez ve katabolizma enzimleri ile ilişkisi ve sağkalım moleküllerine etkisi bu araştırma ile literatürde ilk kez ortaya konacaktır. EBR ile tetiklenen apoptotik süreçte tüm bu moleküler yollarla ilişkinin daha önce bilinmemesi ve ilk kez bu tez ile ortaya konulacak olması, EBR'nin moleküler düzeyde etki mekanizmasının aydınlatılmasına katkı sağlayacaktır. Bu çalışmanın, EBR'nin kolon kanseri hücrelerinde hangi moleküler mekanizmaları hedef aldığı ve tedavide kullanılabilirliği hakkında birçok ön veriyi ortaya koyacağı düşünülmüştür.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.KOLON KANSERİ

2.1.1. Kolon Kanseri Epidemiyolojisi

Kolon kanseri görülme sıklığı dünyada erkeklerde akciğer, kadınlarda meme kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır (29). Kolon kanseri, Batı Avrupa, Kuzey Amerika, Yeni Zelanda ve Avustralya gibi gelişmiş ülkelerde yüksek oranda görülürken, Hindistan, Güney Amerika ve Ortadoğu ülkelerinde düşük oranda görülmektedir (30,31). Ülkemizde ise, 1999 yılı Sağlık Bakanlığı verilerine göre tüm kanser tipleri arasında erkeklerde dördüncü kadınlarda ise ikinci sırada yer almaktadır (1). Kolon kanserinin görülme sıklığı aynı ülkede diyet ve çevresel faktörlere bağlı olarak, yöre ve topluluklara göre farklılık göstermektedir. Düşük risk taşıyan bölgelerden yüksek riskli bölgelere göç edilmesi kolon kanseri görülme riskini artırmaktadır (32).

Kolon kanserlerinde ilerleyen yaşla beraber, genel olarak 40 yaşından sonra, kansere yakalanma riski artmaktadır. Yapılan araştırmalar sonucu kolon kanserlerinin %90'dan fazlası 50 yaş sonrası gelişmeye başladığından kontrol programlarının başlatma yaşı bu orana göre belirlenmiştir (33).

2.1.2. Kolon Kanseri Etiyolojisi

Kolon kanseri gelişimini çevresel, diyet, yaş, adenom ve karsinom öyküsü, aile öyküsü gibi pek çok faktör etkilemektedir (33). Diyet ile alınan yağlarla birlikte kolonda artan safra asitleri ve serbest yağ asitleri kolon mukozasında hasara yol açarak epitel hücrelerinin çoğalmasını teşvik etmektedir. Aynı zamanda kırmızı et tüketimi fazla olan ülkelerde de kolon kanseri görülme riskinin arttığı düşünülmektedir (34,35). Asya, Afrika gibi kolon kanserinin az görüldüğü bölgelerden Amerika Birleşik Devletleri gibi sık görülen bölgelere göç ile

birlikte kolon kanserinin görülme oranının artması çevresel faktörlerinde kolon kanseri oluşumunda rol oynadığını göstermektedir (36).

Kolon kanseri oluşumunda genetik faktörler ve aile öyküsü de önemli rol oynamaktadır. ailesel adenomatöz polip (FAP) ve herediter non-polipozis kolon kanseri sendromu (HNPCC) kalıtımla geçen otozomal dominant kanser tipleridir. FAP, ailesel adenomatöz polip (APC) tümör süpresör genindeki mutasyon bu kanser tipinin oluşmasında etkilidir (37). HNPCC, Lynch I ve Lynch II sendromu olarak ikiye ayrılmaktadır. Lynch I sendromu, otozomal dominant, erken yaşta başlayan ve sıklıkla birden çok kolon tümörü ile birlikte görülmektedir. Lynch II sendromu ise Lynch I sendromuna benzerlik gösterir ve rahim, meme, mide gibi kolon dışı tümörler ile beraber görülmektedir. HNPCC için Amsterdam kriterleri olarak bilinen “International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Carcinoma” (ICG-HNPCC) kriterler belirlenmiştir (38,39). Bu kriterlere göre;

- Ailede kolon kanseri tanısı koyulmuş en az 3 kişi bulunması ve üç aile üyesinden birisi, diğer ikisinin 1.derece akrabası olması
- Kolon kanserinin en az iki nesilde ortaya çıkması
- Kolon kanseri olan aile üyelerinden en az birinin 50 yaşından önce kolon kanseri gelişiminin gözlenmesi
- Kanser tanısının patolojik olarak doğrulanması gerekmektedir.

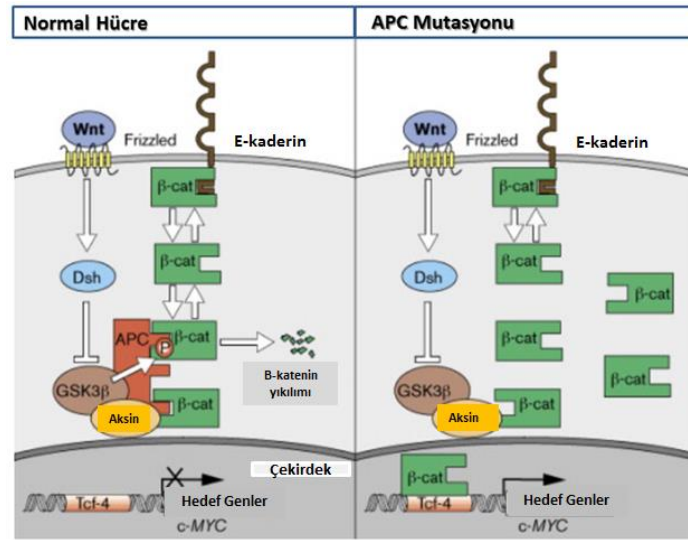
2.1.3. Kolon Kanseri Oluşumunun Moleküler Mekanizması

2.1.3.1. Ailesel adenomatöz polip (APC) geni

Kolon kanseri oluşumunda genetik değişimler önemli bir rol oynamaktadır. Ortaya çıkan kolon kanserlerinin çoğunda genlerde somatik mutasyon görülmektedir. Kolon tümör hücrelerinin çoğalmasında APC negatif düzenleyicidir. Kolon kanserlerinin % 60'ında APC geninde somatik mutasyon görülmektedir. APC geninin mutasyona uğrayarak inaktivasyonu FAP'ta gözlemlenmektedir (40).

APC geni 5. Kromozomun uzun kolunda (5q21-22) bulunmakta ve birçok biyomolekül ile etkileşimde bulunabilen çok domainli APC proteinini kodlamaktadır (41). APC proteini kolon epitel hücrelerinin bazolateral membranında bulunmaktadır. APC mutasyonlarının büyük bir kısmı proteinin belirli bölgelerinin kodlanmaması sonucu oluşmaktadır ve bu mutasyonlar

hücre büyüme ve çoğalmasını düzenleyen mekanizmalarda değişime yol açmaktadır (42). Wnt/ β -katenin sinyal yolağı hücre çoğalmasında önemli rol oynayan sinyal yolaklarından biridir. Wnt/ β -katenin yolağında hücre çoğalma sinyali gelmediğinde APC proteini Axin ve glikojen sentaz kinaz 3 β (GSK3 β) proteinlerine bağlanarak yıkıcı bir moleküller birliğı oluşturmaktadır. Bu yapı, β -katenin proteinine ubikuitin molekülünün bağlanmasını ve sonuç olarak proteozomal yıkımını sağlamaktadır. Böylece, β -katenin nukleusa geçerek transkripsiyonu başlatma aktivitesini gösteremez (Şekil 2.1) (43). APC geninde meydana gelen mutasyonlar sonucu, β -katenin yıkımı sağlanamadığından, sitoplazmada biriken β -katenin nukleusa geçerek çoğalmayı başlatıcı hedef genlerin transkripsiyonunu başlatmaktadır (Şekil 2.1) (44,45).



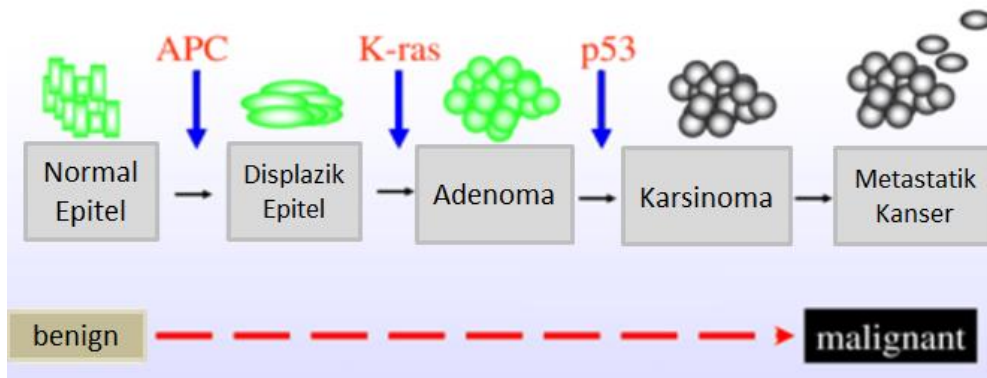
Şekil 2. 1. Wnt/ β -katenin yolağında APC mutasyonu (46).

2.1.3.2. K-Ras

Kirstein rat sarcoma (K-Ras), Ras protein ailesine ait ve kolon kanserlerinde mutasyonu sıklıkla rastlanan bir proto-onkogendir. K-Ras mutasyonu kolon kanserlerinde %37- 41 oranında bulunmaktadır. Ras ailesi, büyüme faktörü reseptörlerine gelen mitojenik sinyallerin iletiminde rol oynamakta ve böylece hücre döngüsü ve çoğalması ile genlerin anlatımı sağlanmaktadır. Ras proteinlerinin aktivitesi guanin trifosfat (GTP)-bağımlı olarak gerçekleşmektedir (47,48). Eğer Ras guanin difosfat (GDP)- bağımlı durumda ise inaktif haldedir. *Ras* genleri mutasyonu sonucu Ras proteinleri GTP'ye bağlı kalarak sürekli aktif duruma geçmekte ve böylece hücrelerde kontrolsüz büyüme sinyali alınmaktadır. *K-Ras* mutasyonları *APC* gen mutasyonu ile birlikte meydana gelmesi ileri kolon kanseri oluşumuyla ilişkilendirilmiştir (Şekil 2.2) (49).

2.1.3.3. p53

Tumor protein-53 (p53), hücre döngüsünü düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. Hücre döngüsünde DNA hasarı oluştuğunda hücre siklusunu durdurarak DNA onarım mekanizmasını başlatmakta ya da apoptozu tetiklemektedir (50). Bu nedenle p53 mutasyonları kolon kanseri dahil olmak üzere akciğer, meme, prostat gibi pek çok kanser tipinin oluşmasıyla ilişkili gösterilmiştir (Şekil 2.2). Kolon kanserinde p53 geninin bir alleli delesyona uğrarken diğer allelde nokta mutasyonu bulunmaktadır. p53 geninin delesyonu kolon kanserlerinin % 75'inde görülmesine rağmen adenom kanserlerinden nadir gözlenmektedir (51).



Şekil 2. 2. Kolon kanseri gelişimine sebep olan mutasyonlar (52).

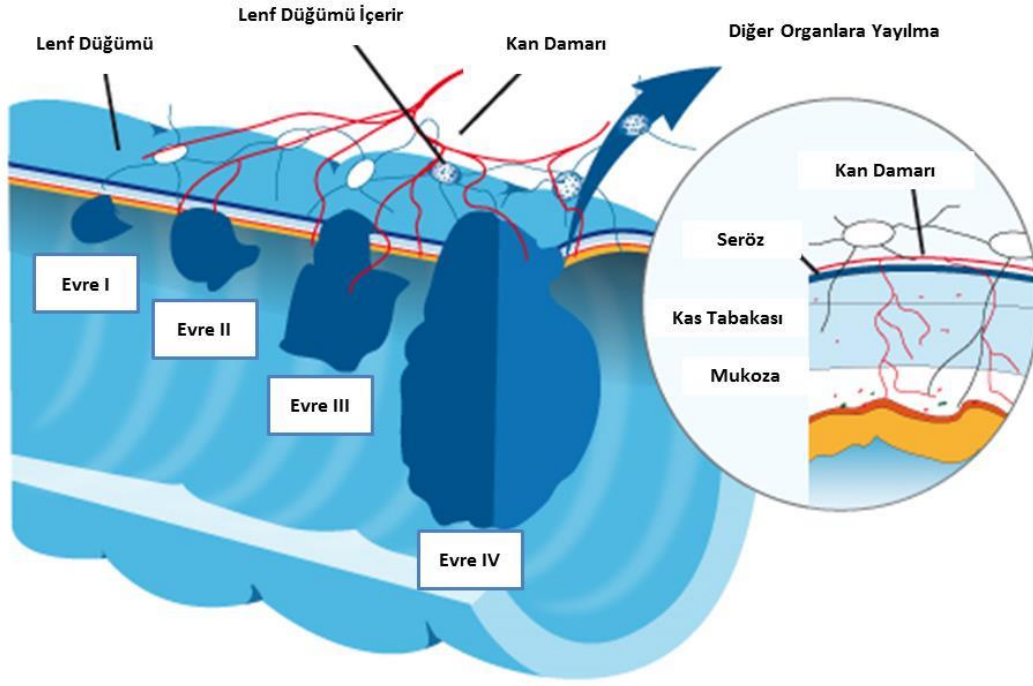
2.1.4. Kolon Kanserinde Tümör Yayılımı ve Evreleme

Kolon kanserleri genellikle intramukozal epitel lezyonlarla başlamakta ve tümör gelişimi ile beraber submukozaya inerek invaziv kanser haline dönüşmektedir. Bu aşamadan sonra lokal yayılımla beraber tümör bağırsak katları boyunca ilerleyerek serozaya doğru ilerlemekte ve tümör komşu organlara tutunmaktadır. Kolon kanseri lenf düğümleri aracılığı ile lenfatik yayılım göstermekte ve farklılaşmış habis tümörlerde bu yayılıma sıkça rastlanmaktadır. Kolon kanseri metastazları genellikle karaciğer ve akciğerde sıklıkla rastlanmakla beraber implantasyon diğer bir yayılım türüdür. Bu yolla kanser hücresi bağırsak içinden periton boşluğuna metastaz yapabilmektedir. Tümör yayılımı teşhis ve derecelendirme açısından önemli bir yere sahiptir. Bu yüzden kolon kanserinde Dukes tarafından oluşturulan evreleme sistemi ve TNM sistemi (T: Tümör invazyonu, N: Lenf nodu tutulumu, M: Metastaz) en sık kullanılan evreleme sistemleridir (Tablo 2.1) (Şekil 2.3)(53,54).

Tablo 2.1.Kolon kanserinde evreleme sistemi (54)

Evre	TNM	Dukes Sınıflandırması	Tümör İnvazyon Derecesi	5 Yıl Hayatta Kalım
0	T0, N0, M0		Gözle görünür tümör yok	
I	T1, N0, M0	A	Tümör mükölaris mukoza ve submukozaya sınırlı	%97
I	T2, N0, M0			%90
II	T3, N0, M0	B1, B2	Tümör mükölaris propriaya sınırlı	%78
II	T4, N0, M0			%63
III	T1-4, N1, M0	C1, C2	Serozaya ulaşmış, komşu organ tutulumu olabilir	%56-65
III	T1-4, N2, M0			%26-37
IV	T1-4, N1-2, M1	D	Uzak metastaz var	%1

T0: İnsitu karsinom	N0: Lenf nodu tutulumu yok
T1: Submukoza invazyonu	N1: 1-3 lenf nodu tutulumu
T2: Muskularis propriaya invazyon	N2: >4 lenf nodu tutulumu
T3: Seroza İnvazyonu	M0: uzak metastaz yok
T4: Komşu organ invazyonu	M1: uzak metastaz var

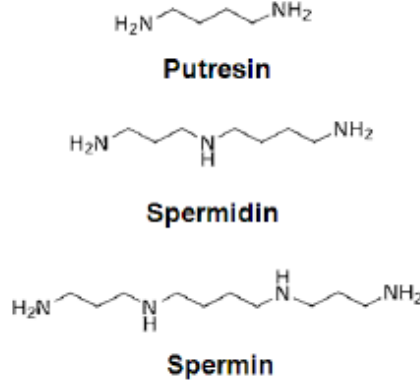


Şekil 2. 3. Kolon kanserinde sınıflandırmaların şematik görünümü (55).

2.2. POLİAMİNLER

PA'lar prokaryotik ve ökaryotik canlılarda bulunan polikasyonik moleküllerdir ve hücre içinde birçok hücre fonksiyonunun gerçekleşmesinden sorumludurlar. Hücre içinde görevleri tanımlanmış PA'lar; diamin putresin (Put), triamin olan spermidin (Spd) ve tetramin olan spermin (Spm)'dir (Şekil 2.4). PA'ların kimyasal yapıları bir amino grup (H_2N-) ile başlar ve bu grubu metilen zinciri ($-CH_2-$) takip eder. Metilen grubuna ikinci bir amino grubu ($-NH-$) gelmekte ve molekül başka bir amino grubu ($-NH_2-$) ile sona ermektedir (56,57)

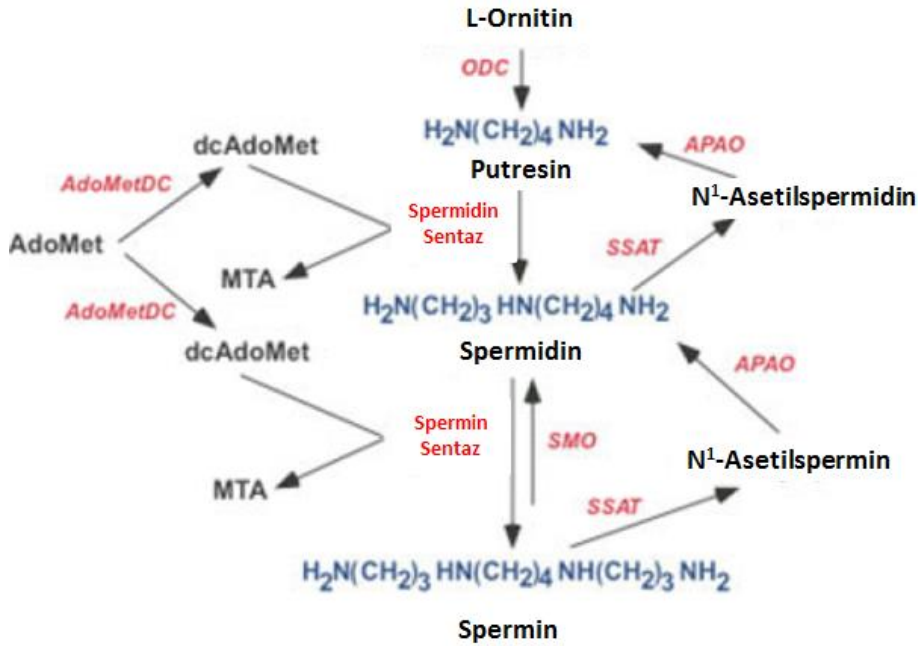
Memeli hücrelerinde, PA'lar hücre içi pek çok önemli olaylarda görev alırlar. PA'ların pozitif yüklü olmaları nedeniyle hücre içinde negatif yüklü moleküllere ve nükleik asitlere bağlanma özelliği göstermektedirler. Aynı zamanda PA'lar hücre bölünmesi, protein-DNA etkileşimi, hücre döngüsü, DNA-RNA stabilizasyonu, sinyal iletimi, reseptör-ligand interaksyonu, membran stabilizasyonu ve apoptoz gibi önemli hücresel olaylarda görev almaktadırlar (58).



Şekil 2. 4. Poliaminlerin kimyasal yapısı.

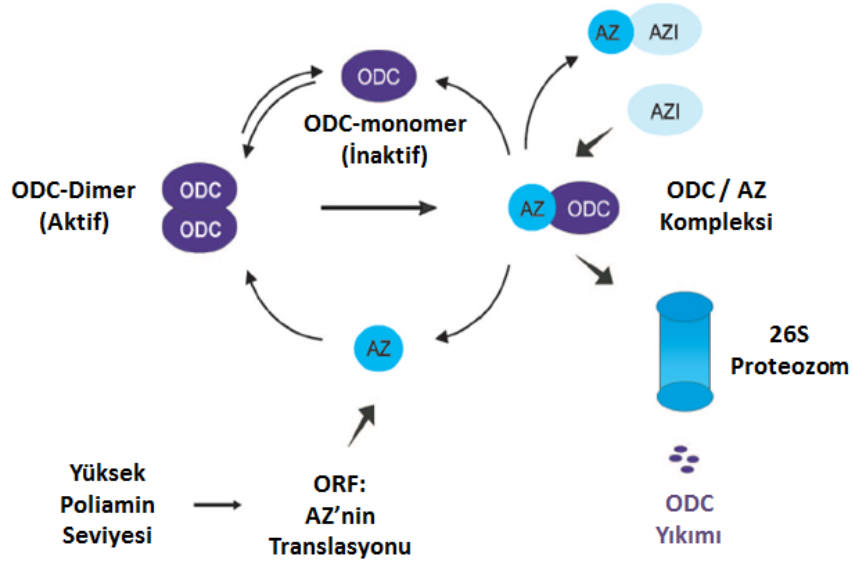
2.2.1. Poliamin Metabolizması

PA biyosentezi ve katabolizması hücre homeostasının sağlanması açısından çok önemlidir. Bu yüzden hücre içinde ihtiyaca göre PA'lar sentezlenir, birbirlerine dönüştürülür ya da yıkılırlar. PA biyosentezinde ilk adım ornitin amino asidinden Put sentezidir. Ornitin hücre içinde üre siklusunda bulunan önemli bir bileşiktir ve PA biyosentezinde ornitin dekarboksilaz (ODC) yardımı ile Put' a dönüşür . ODC piridoksal fosfat (PLP)- bağımlı amino asit dekarboksilazdır ve iki aktif bölgesi ile homodimer halde aktivite göstermektedir. ODC monomerinde NH₂-terminal domaini ve COOH- domaini olmak iki domain bulunmaktadır. Ökaryotik ODC genellikle L-ornitine yüksek afinite göstermektedir. Bu yüzden hücre içinde PA biyosentezinin kontrol noktasını oluşturmaktadır (59) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Poliamin metabolizması (59).

Hücre içinde PA seviyesi arttığında ODC aktivitesi azalmakta ya da hücre içi PA seviyesi azaldığında artmaktadır (60). Hücre içinde ODC aktivitesi OAZ (ODC antizim) ve AZI (Antizim inhibitörü) tarafından düzenlenmektedir. OAZ, ODC enziminin mRNA'sında açık okuma alanı 1 (open reading frame 1, ORF1) ve ORF2 fizyonu arasında bir çerçeve kayması ile translasyonu gerçekleşmektedir ve yüksek PA seviyesinde transkripsiyonu meydana gelmektedir. Artan PA seviyesi sonucu oluşan OAZ direk ODC'ye bağlanır ve ODC'nin 26S proteozom tarafından yıkımı sağlanır. ODC'nin 26S proteozom tarafından yıkılması için ubiquitinlenme gerekmemektedir. OAZ aktivasyonu ise hücre içinde AZI tarafından düzenlenmektedir. AZI, AZ'ye yüksek bağlanma afinitesi gösterir ve AZ-ODC kompleksinde AZ'ye bağlanarak ODC'nin serbest kalmasını sağlamakta ve 26S proteozomda yıkımı engellenmiş olmaktadır (Şekil 2.6) (60-63).

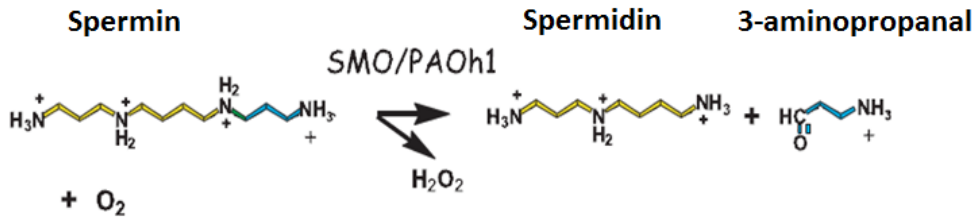


Şekil 2. 6. ODC'nin, ornitin dekarboksilaz antizim ve antizim inhibitörü ile düzenlenmesi (64).

Hücre içinde PA biyosentezinde ikinci önemli enzim, S-adenozil metiyonin dekarboksilaz (SAMDC)'dir. SAMDC, adenzil metiyonin (AdoMet) molekülünü dekarboksilleyerek karboksile AdoMet (dcAdoMet) formunu oluşturmaktadır. dcAdomet bir aminopropil vericisidir. PA biyosentezinde dcAdoMet, aminopropil grubunun transferini katalizleyen Spd sentaz ve Spm sentaz için substrat oluşturmaktadır. Gerçekleşen reaksiyon sonucunda dcAdoMet aminopropil kaybederek Spd ve Spm'ye dönüşmektedir (Şekil 2.5) (63,65).

PA katabolizması, iki önemli enzim; asetiltransferaz enzimi olan SSAT ve oksidasyon enzimi olan PAO ile düzenlenmektedir. Katabolizmanın ilk basamağında SSAT enzimi, asetil

koenzim A'dan gelen asetil grubunun transferi ile N1-asetilspermidin ve N1-asetilsperminin oluşumunu katalizlemekte ve böylece asetile PA'lar oluşmaktadır (Şekil 2.5). Oluşan asetile PA'lar katabolizmanın ikinci basamağında yer alan PAO için substrat oluşturmaktadırlar. PAO, asetile Spm i oksitleyerek Spd' ye ya da asetile Spd'yi oksitleyerek Put' a dönüşümünü katalizlemektedir (Şekil 2.5) (13,66). Asetile PA'ların katalizlenmesi sonucu N-asetil-3-aminopropanol ve H₂O₂ açığa çıkmaktadır. PA katabolizmasında görev alan diğer bir enzim ise spermin oksidaz (SMO)'dur (67). SMO, Spm'nin Spd'ye oksitlenmesini katalizler fakat Spd'nin oksitlenmesi üzerinde bir etkisi yoktur (Şekil 2.7) (68,69).



Şekil 2.7. Sperminin SMO veya PAO enzimleri ile spermidine dönüşümü (70).

PA'ların hücre büyümesi ve çoğalması üzerindeki etkileri göz önünde bulundurarak PA'lar üzerinde antikanser stratejileri geliştirilmiştir. Araştırmacılar PA biyosentezindeki anahtar enzimlerden ODC'nin aktivitesinin durdurulması üzerine çeşitli inhibitörler geliştirmişlerdir. Yapılan çalışmalarda ODC aktivitesinin durdurulması sonucu hücrede PA seviyesinin azaldığı, hücre iskelet yapısının bozulduğu, DNA replikasyonu, transkripsiyonu ve translasyonu gibi önemli hücresel olayların gerçekleşmesini önlediği gösterilmiştir. Bu inhibitörlerden en fazla araştırılanı L-alfa-diflurometilornitin (DFMO)'dur (71). DFMO, ODC'yi geri dönüşümsüz olarak inhibe etmektedir. Ancak, DFMO'nun anti-kanser aktivitesi klinik olarak ümit verici olarak değerlendirilse de kanserli hücreler dışında normal hücre ve dokulara toksik etki yarattığı saptanmıştır. Son dönemlerde yapılan çalışmalarda ise düşük dozda kullanılan DFMO'nun PA seviyesini azalttığı ve normal hücreler üstündeki toksik etkilerinin azaldığı görülmüştür ve DFMO ile çeşitli anti-kanser ilaçların kombine tedavisi ümit vaad etmektedir. PA metabolizması üzerindeki diğer bir araştırma alanı ise PA analoglarıdır. DENSp_m, BENSp_m ve CHENSp_m gibi PA analoglarının kanser hücrelerinde sitotoksik etkilerinin olduğu gösterilmiştir (71). PA analogları, PA biyosentezini engelleyip katabolizma enzimlerini uyararak hücresel doğal PA miktarının azaltılmasını hedef alan ajanlardır. Bu ajanların aynı zamanda PA katabolik enzimlerin aktivitelerini arttırarak hücre

içi PA seviyelerini azalttıkları bilinmektedir. PA analogları ile meme, melanoma ve akciğer kanserlerinde SSAT transkripsiyonunun arttığı gösterilmiştir (72-74). SSAT anlatımı ve aktivitesinin artışı PA analogları dışında çeşitli kemoterapötik ajanlarla da tetiklenmektedir. Bu ajanlar arasında sulindac gibi NSAID'ler, 5-fluorurasil (5-FU), platin türevli kemoterapötikler bulunmaktadır. SSAT anlatımı ve aktivitesindeki artışın hücre büyümesi ile ters orantılı olduğu ve apoptotik hücre ölümünü tetiklediği gösterilmiştir. Chen ve ark. (75) SK-MEL-28 melanoma hücreleri ile yaptıkları araştırmada PA analogları uygulamasını takiben SSAT anlatımının artmasının, programlı hücre ölümü apoptozun düzenlenmesi için gerekli olduğunu göstermişlerdir. PA katabolizmasını hedef alan PA analogları dışında kalan çeşitli kemoterapötik ajanların, hedef aldıkları moleküler mekanizma dışında, PA katabolizmasını da devreye sokarak, etkilerinin artmasına neden olduklarını bilinmektedir. Özellikle kanser terapisinde klasik kemoterapötik ajanlarla, PA metabolizmasını hedef alan ajanların kombine edilmesi umut verici sonuçları ortaya çıkarmaktadır. Bununla birlikte kullanılan PA analoglarda ya da kemoterapötik ajanlarda karşılaşılan problem normal hücrelerde meydana getirdikleri toksisitedir (56,76).

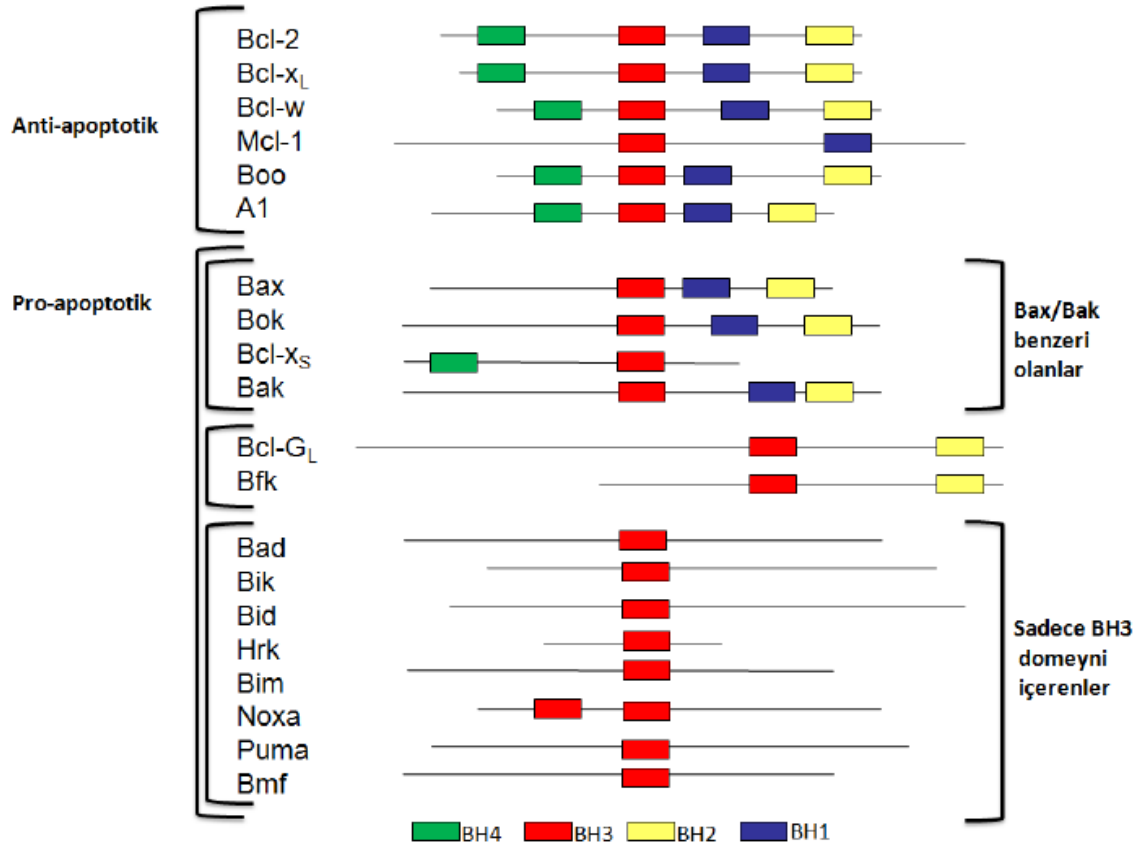
2.3. APOPTOZ

Apoptoz, fizyolojik ve patolojik olarak istenmeyen, hasar görmüş ya da neoplastik hücrelerde gerçekleşen programlı hücre ölümüdür. Doku homeostası, apoptoz ve hücre çoğalması arasındaki denge ile sağlanmakta ve bu dengenin bozulması sonucu kanser başta olmak üzere pek çok hastalığın ortaya çıkışı meydana gelmektedir (77,78). Apoptotik hücre ölümü sırasında hücre küçülmekte, kromatin kondenzasyonu ve hücre apoptotik cisimciklere ayrılmakta ve bu apoptotik cisimcikler komşu hücreler tarafından fagositoz ile ortada kaldırılmaktadır (79,80).

Apoptotik hücre ölümü sırasında pek çok protein ailesi görev almaktadır. Bu protein ailelerinden bir tanesi kaspazlar olarak bilinen sistein proteazlardır ve apoptozun başlamasında ve son evresinde görev almaktadır. Hücrede inaktif kaspazlar pro-kaspaz şeklinde bulunmakta ve bu pro-kaspazlar proteolitik yıkım sonucu pro- bölgesi uzaklaşarak aktif hale dönüşmektedir. Kaspazların 14 isoformu bulunmakta ve 3 grupta incelenmektedir; başlatıcı kaspazlar (kaspaz-2, 8, 9,10), etkili kaspazlar (kaspaz-3, 6, 9) ve inflamatuvar

kaspazlar (81). Başlatıcı kaspazlar hücreye iç (mitokondri) ya da dış (hücre zarı) yolaktan gelen sinyaller doğrultusunda ölüm sinyallerin başlatılmasından ve etkili kaspazların aktivasyonundan sorumludurlar. Başlatıcı kaspazlar, etkili kaspazları inaktif halde bulunmasını sağlayan amino asit dizilerini keserek aktif hale getirmektedir. Etkili kaspazlar aktif hale geldiklerinde hücre iskeleti proteinleri, ADP riboz polimeraz (PARP), laminler gibi hedef proteinlerin kesimini gerçekleştirmektedirler (82).

Apoptotik hücre ölümünde görev alan diğer bir protein ailesi ise Bcl-2 (B-hücre lenfoma 2) ailesidir. Hücreye dış ya da iç kaynaklı gelen ölüm sinyali genellikle Bcl-2 ailesi tarafından düzenlenmektedir (83). Bcl-2 ailesi, pro-apoptotik ve anti-apoptotik olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Pro-apoptotik Bcl-2 ailesi proteinleri apoptozu indüklerken anti-apoptotik proteinler apoptozu baskılamaktadır. Bu iki farklı etkiye sahip olan proteinlerin işlevleri yapılarında bulunan Bcl-2 homolog bölgeleri (BH) tarafından düzenlenmektedir. Bu proteinlerin yapılarında BH1, BH2, BH3 ve BH4 olmak üzere 4 tane BH bölgesi bulunmaktadır ve Bcl-2 ailesi proteinleri BH1, BH2 ve BH3 bölgeleri ile diğer Bcl-2 ailesi proteinlerinin BH3 bölgelerine bağlanarak iletişim kurmaktadır. Pro-apoptotik protein ailesi taşıdıkları BH yapılarına göre ikiye ayrılır; BH1, BH2, BH3 bölgelerini taşıyanlar (Bak, Bax) ve sadece BH3 bölgesini taşıyanlar (Bid, Bad, Bim). Anti-apoptotik Bcl-2 ailesi proteinleri ise sadece BH4 bölgesi taşırlar (Bcl-2, Mcl-1, Bcl-X_L, Bcl-w) (Şekil 2.8). Bcl-2 ailesindeki pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin arasındaki denge hücre sağkalımı ve ölümü arasındaki dengeyi oluşturmaktadır (84,85). Anti-apoptotik proteinlerin protein ifadeleri fazla olduğunda apoptoz baskılanırken pro-apoptotik proteinlerin ifadelerinin fazla olması hücreyi apoptoza teşvik etmektedir (86,87).



Şekil 2.8. Bcl-2 ailesi üyeleri (88).

Bcl-2 aile proteinleri mitokondri membranının dış zarında lokalize olmaktadır. Mitokondriyel apoptotik başlatıcı sinyal sitokrom c, apoptoz indükleyici faktör (AIF) gibi moleküllerin salınımı, mitokondri membran potansiyelinin bozulması ile gerçekleşmektedir. Mitokondri membranına yerleşmiş olan Bcl-2 ailesi üyelerinden pro-apoptotik proteinler por oluşturarak mitokondri membran potansiyelinin bozulmasına etki etmektedirler. Anti-apoptotik proteinler ise bu porların açılmasına engel olmaktadır (89).

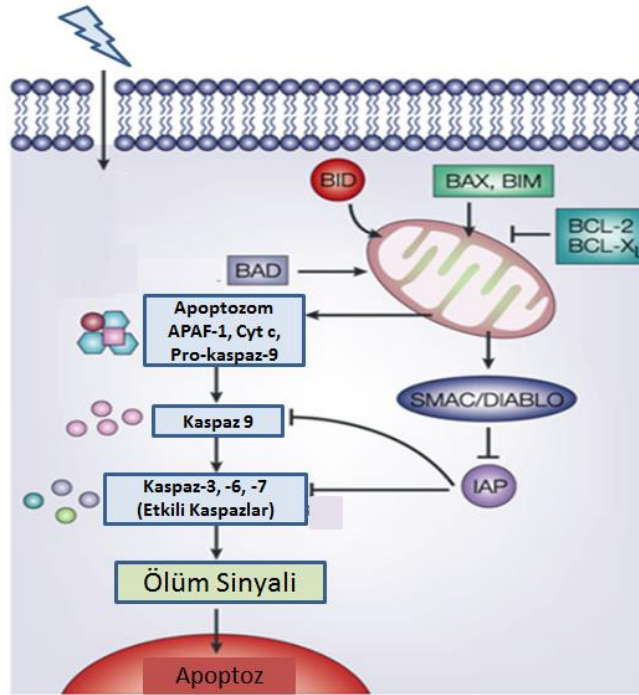
2.3.1. Apoptoz Tipleri

Apoptotik sinyal alınması hücrede iki yoldan meydana gelir. bunlardan birincisi mitokondri aracılı olan iç yolak diğeri ise hücre membranı aracılı dış yolaktır.

2.3.1.1. İç (İntrinsik) Yolak

Mitokondri hücreye enerji kaynağı olmanın yanı sıra hücreye gelen apoptotik ölüm sinyalinin başlamasında da önemli bir görev oynamaktadır. Mitokondrinin çift katlı membran yapısının

bozulması apoptozu başlatmaktadır. Mitokondri dış zar potansiyelinin bozulması pro-apoptotik ve anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri arasındaki denge ile sağlanmaktadır. Normal koşullarda pro-apoptotik proteinler inaktif durumdadır. Hücre içine gelen ölüm sinyali ile birlikte anti-apoptotik proteinler inaktif hale gelerek mitokondri membranında lokalize olmuş pro-apoptotik Bax, Bad, Bim gibi proteinler dış zarda meydana getirdikleri por yapısı ile mitokondri membran bütünlüğü bozarak sitokrom c, apoptoz indikleyici faktör (AIF) ve ikincil mitokondri türevli kaspaz/direkt apoptoz inhibitörü bağlayıcı protein (Smac/DIABLO) gibi faktörlerin sitoplazmaya salınmasını sağlamaktadır (90). AIF, sitoplazmaya çıktıktan sonra doğrudan nükleusa gider ve burada endonükleaz G'yi aktive ederek DNA fragmentasyonuna neden olmaktadır. Smac/DIABLO ise apoptoz inhibitör (AIP) bağlanarak kaspaz 9'un inaktive olmasını engellemektedir. Mitokondriden salınan sitokrom c ise inaktif monomer halinde bulunan apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (Apaf-1) a bağlanmakta ve daha sonra kaspaz 9'a bağlanarak apoptozom denilen kompleksi oluşturmaktadır. Apoptozom pro-kaspaz 9 ile etkileşime girerek pro- kısmın yıkımını sağlamakta ve caspas 9 aktif hale gelmektedir. Aktif hale gelen başatıcı kaspaz 9 diğer etkili kaspazların proteolitik yıkımını sağlayarak onların aktif hale gelmesini sağlamaktadır. Sonuçta kromatin kondensasyonu bozulmakta, DNA fragmentleri meydana gelmekte ve hücre apoptozu gitmektedir (Şekil 2.9) (91,92).

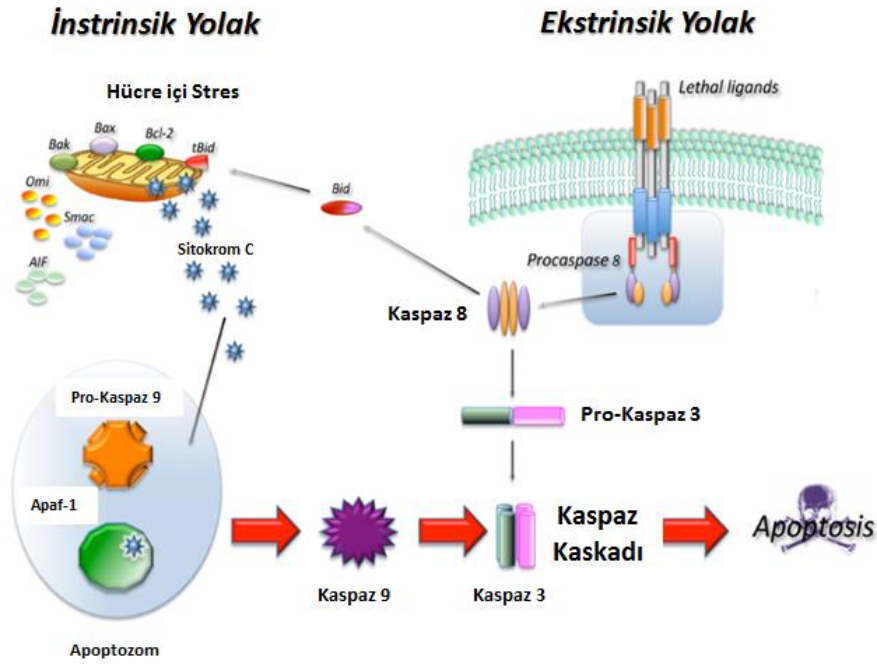


Şekil 2.9. Apoptotik iç yolak mekanizması (93).

2.3.1.2. Dış (ekstrinsik) Yolak

Apoptoz mitokondri dışında tümör nekroz faktörü (TNF), Fas reseptörü, ölüm reseptörü 3 (DR3) ve TNF ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand reseptör (TRAIL) reseptörleri tarafından indüklenmektedir (94). Bu ölüm reseptörleri ile tetiklenen apoptotik süreç iki şekilde gerçekleşmektedir.

Ölüm reseptörleri hücre membranında transmembran halde bulunurlar ve hücre içi kısımları prokaspaz-8 ile etkileşime girerek, prokaspaz-8 in pro kısmını kesmekte ve aktif kaspaz-8'e dönüştürmektedirler. Aktif hale gelen kaspaz-8 etkili kaspazlar kaspaz-3, 6, 9'un aktifleşmesini sağlamakta ve hücre içinde makromoleküller parçalanarak hücre ölümüne gitmektedir. Diğer ikinci yol ise reseptörler tarafından aktif hale gelen kaspaz-8 pro-apoptotik bir protein olan Bid ile etkileşime girmektedir. Kaspaz-8 Bid'in proteolitik kesilimine yol açarak mitokondriye yönelmesine sebep olmaktadır. Bid diğer pro-apoptotik proteinler gibi mitokondride sitokrom c, SMAC gibi proteinlerin salınımını sağlamakta ve böylece apoptotik hücre ölümü meydana gelmiş olmaktadır (95-97).



Şekil 2.10. Apoptozun iç ve dış yolağının moleküler mekanizması (98).

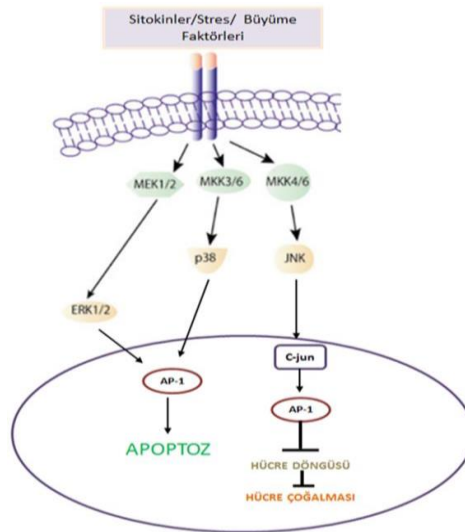
2.4. HÜCRE SAĞ KALIM SİNYAL YOLAKLARI

2.4.1. MAPK Yolağı

Mitojen-aktive edici protein kinazlar (MAPK), memeli hücrelerinde sinyal iletim kaskadı oluşturarak embriyogenez, çoğalma, farklılaşma ve apoptozun düzenlenmesinde görev almaktadır. MAPK ailesi; p38 MAPK ailesi, ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz (ERK) ailesi ve c-Jun NH₂ terminal kinaz (JNK) ailesi olmak üzere 3' e ayrılmaktadır (99)(Şekil 2.11).

MAPK yolu, hücreye reseptör aracılığı ile gelen sinyalin Ras proteinini aktive etmesi ile başlamakta, MAPKKK'nın (MAP kinaz kinaz kinaz, Raf) aktivasyonu sonrasında sırasıyla MAPKK (MAP kinaz kinaz, MEK) ve MAPK (MAP kinaz, ERK) aktivitesiyle sinyal kaskadı oluşturarak, bölünme sinyali nükleusa taşınmakta ve nükleustaki transkripsiyon faktörlerini fosforile ederek hücresel cevabın oluşmasını sağlamaktadır (100).

MAPK yolağında Ras ve Raf protoonkogen sınıfından proteinlerdir. Normal şartlarda hücrede Ras inaktif (Ras-GDP) halde bulunmaktadır. Hücreye gelen sinyal ile GDP yerine GTP bağlanır ve Ras aktif (Ras-GTP) haline gelir, aktive olan Ras proteini Raf kinazlara yüksek afinite ile bağlanmakta ve sinyal kaskadının oluşumunu başlatmaktadır (101). Kanser hücrelerinin çoğunda Ras/Raf/MEK/ERK yolunun aşırı aktivasyonu görülür. Bu aşırı aktivite Ras proteininin mutasyonu sonucu meydana gelmektedir. Kanser hücrelerinde Ras mutasyonu sonucu Ras aktif formunda (Ras-GTP) kalır ve hücrenin sürekli uyarılmasına sebep olmakta ve böylece hücre büyümesi kontrolsüz bir biçimde devam etmektedir.

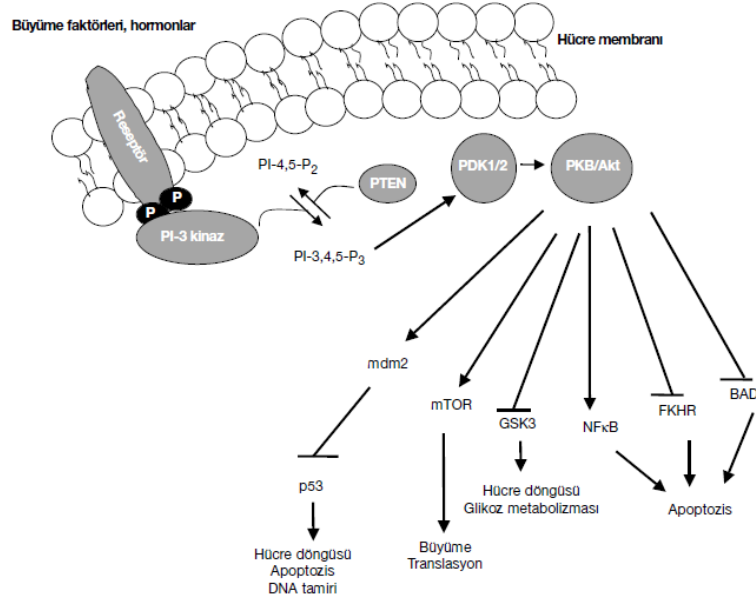


Şekil 2.11. Ras/Raf/MEK/ERK sinyal iletimi.

MAPK ailesi üyesi olan p38 MAPK sinyal yolağı ise hücrel streste hücre döngüsünün durdurulmasında ve apoptozda görev almaktadır. Hücrenin stres koşullarında p38 MAPK aktive olarak p53 proteinin hücre içinde artmasını sağlayarak aktivasyonunu gerçekleştirmekte ve böylece hücre döngüsüne dolaylı ya da dolaysız etki etmiş olmaktadır. MAPK ailesinin diğer üyesi olan JNK ise hücre çoğalmasında, farklılaşması ve apoptozun regülasyonunda görev almaktadır. Fosforlanmış JNK nükleusta lokalize olmakta ve c-jun proteinini aktive etmektedir. Fosforlanarak aktive olan AP-1 transkripsiyon faktörünü oluşturmaktadır. AP-1 transkripsiyon faktörü c-jun:c-jun homodimeri ya da c-jun:c-fos heterodimeri şeklinde oluşmakta ve TNF- α ve Bak gibi pro-apoptotik proteinlerin transkripsiyonunu gerçekleştirmektedir. Ayrıca p53, c-myc gibi transkripsiyon faktörlerinin fosforlanmasına neden olmaktadır (22,102).

2.4.2. PI3K/AKT

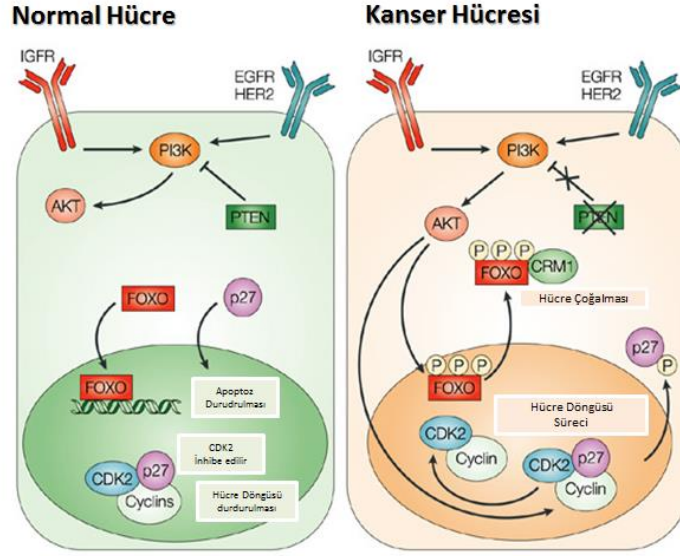
PI3K protein ailesi hücrede büyüme sinyallerinin iletiminden sorumludur (103). Hücreye gelen sinyal ile reseptörün uyarılmasıyla PI3K, hücre membranında inositol fosfolipidlerin fosforilasyonunu katalizlemekte ve fosfotidilinositol trifosfat (PIP₃) oluşturmaktadır. PIP₃, PIP₃ bağımlı kinaz (PDK) ve AKT aktivasyonundan sorumludur. Aktive olan PDK, AKT'yi fosforile ederek aktif hale getirmektedir (101,104,105). Aktif AKT hücre döngüsü, glikoz metabolizması, büyüme, apoptozun baskılanması gibi hücre sağkalım ve büyümesi üzerindeki mekanizmaları arasında denge sağlamaktadır. Hücrede sitokinler ve büyüme faktörleri PI3K/AKT yolağını aktif hale getirerek hücre için büyüme sinyalleri oluşturmaktadır. Aynı zamanda bu yolak üzerinde tümör baskılayıcı proteinlerden PTEN, PIP₃ oluşumunu engelleyerek negatif düzenleyici bir rol oynamaktadır (Şekil 2.12) (106,107). Kanser hücrelerinde AKT aktivasyonu hücre döngüsü üzerindeki etkilerinden dolayı büyük önem taşımaktadır. AKT, hücre döngüsünde G1 fazında görev alan siklin D ve siklin bağımlı kinaz 4/6 (CDK4/6) kompleksi üzerinde uyarıcı bir etki yapmakta ve aynı zamanda hücre döngüsünde inhibitör proteini olan p21'in yıkımını sağlayan proteini yıkmaktadır. AKT'nin kanser hücreleri üzerindeki diğer bir etkisi ise hücre sağkalımını apoptozu baskılayarak sağlamaktadır. AKT, pro-apoptotik bir protein olan Bad ile kaspaz 9 üzerinde baskılayıcı etki göstermekte ve NF κ B yolu ile anti-apoptotik rol oynamaktadır (Şekil 2.11) (108).



Şekil 2.12. PI3K/AKT yolu (102).

2.4.3. ForkHead Yolağı

Forkhead protein ailesi FOXO1a, FOXO2a ve FOXO4a proteinlerinden oluşmaktadır. Bu proteinlerin her biri bir transkripsiyon faktörüdür. Hücreye çoğalma sinyali gelmediğinde nükleusta lokalize olmaktadır. Hücre büyüme reseptörleri kaynaklı büyüme sinyali aldığı zaman, PI3K/PKB ve AKT sinyal yolağının aktive olması durumunda FOXO proteinleri serin/treonin residülerinden fosforlanmakta ve böylece FOXO proteinlerinin DNA'ya bağlanma afinitesi düşmektedir, ancak bu fosforlanma FOXO'ların 14-3-3 proteinine bağlanma afinitesini arttırmakta ve 14-3-3-FOXO kompleksi oluşturmaktadır (109). Oluşan bu kompleks nükleustan sitoplazmaya geçmekte ve böylece FOXO'nun transkripsiyon başlatma kapasitesi indirgenmiş olmaktadır (Şekil 2.13). FOXO protein hücre siklusunu yöneten sikline bağlı kinaz (CDK) ve siklinlerin doğal inhibitörü p27^{Kip1} ve pro-apoptotik Bim önemli proteinlerin transkripsiyonunu başlattığı için son derece önemlidir (110) (Şekil 2.13). Hücrelerde FOXO proteinin ailesinin inaktivasyonu kanser gelişimini başlatan faktörlerden birisidir. Aynı zamanda FOXO anlatımındaki azalma, kemoterapötik ajanlara karşı kanser hücrelerinde geliştirilen ilaca cevapsızlık mekanizmasında da pro-apoptotik proteinlerin anlatımını azaltacağı için ayrıca büyük önem taşımaktadır (111).



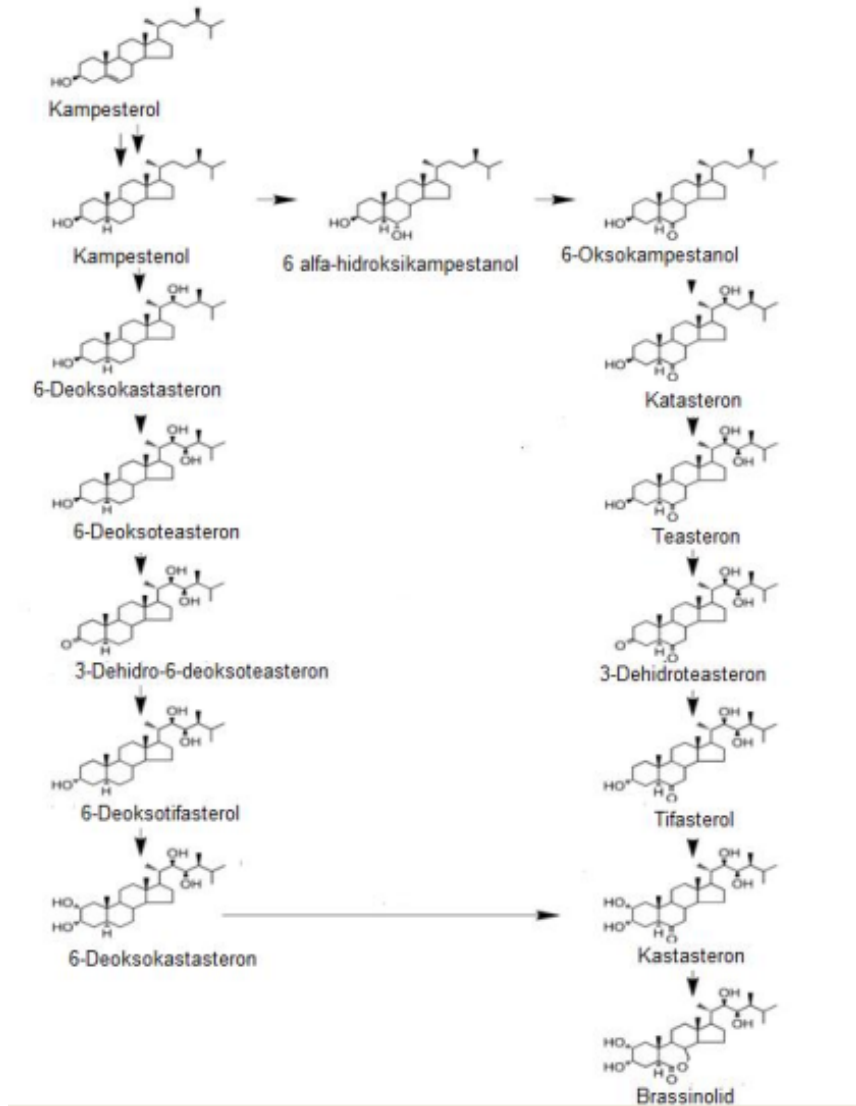
Şekil 2.13. FOXO transkripsiyon faktörü ailesinin normal ve kanser hücrelerindeki moleküler mekanizması (112).

2.5. BRASSİNOSTEROİDLER

BR'ler, ilk defa 1970 yılında Mitchell ve arkadaşları tarafından *Brassica napus* (şalgam) polenlerinden izole edilmiş ve steroid yapılı ilk bitki bileşeni olarak tanımlanmıştır. BR'ler omurgalı ve böceklerde bulunan, steroid hormona benzerlik gösteren doğal polihidroksi steroidlerdir. Doğal BR'ler bir 5α -kolestan iskeleti ve birbirine bitişik A, B, C, D halkaları ile 17. karbona bağlı alkil zincirinden oluşur ve bu yapısı klasik bir steroid kimyasal yapısına benzerlik gösterir (17,113). BR'ler gen anlatımının düzenlenmesi, hücre bölünmesi, çimlenme, iletim dokusunun farklılaşması, kök büyümesi, bitki homeostası gibi pek çok fizyolojik süreçte görev alır. Yapılan çalışmalarda dış kaynaklı olarak alınan BR'lerin bitkilerde abiyotik ve biyolojik stres koşullarına dayanıklılığı arttırdığı gösterilmiştir (114). Tohum verimini azaltan streslerden birisi olan tuzluluk stresiyle ilgili tuza dirençli ve dirençsiz arpa bitkilerinde EBR uygulaması sonucu fotosentetik kapasite artırılmış ve bitkilerin tuzluluk stresi altında daha iyi fotosentez yaptıkları gözlenmiştir (115). Tuzluluk stresinin yanı sıra metal stresine karşı da BR'lerin etkisi gösterilmiştir. BR'lerin en yaygın olarak görüleni 24-epibrassinolid ve 28-homobrassinolide'in ağır metal stresine karşı etkili olduğu gösterilmiştir (116,117). Aynı zamanda bitkilerde BR'ler virüs, bakteri ve mantar gibi biyotik stres oluşturan patojenlere karşı savunmada görev almaktadır. Bitkiler dışında yapılan çalışmalarda ise böceklerde hücre bölünmesi ile ilgili olaylardaki etkileri de ortaya konmuştur (17).

2.5.1. Brassinosteroidlerin Biyosentez Mekanizması

BR'ler, bir karbon iskeleti ve buna bağlı 4 halkadan oluşan polihidroksi steroidal lakton ve ketondur. Doğal olarak bulunan ve tanımlanmış kırktan fazla brassinostreoid bulunmaktadır. A ve B halkaları ve yan zincirlerindeki farklı bileşenler ile yapı olarak kimyasal farklılık göstermektedir. Bu yapısal farklılıklar biyosentez sırasında oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları sırasında gerçekleşmektedir. Bitki sterollerini BR'lerin öncü maddesi olarak kullanmakta ve bu öncü maddelerden biyosentez için en çok kampesterol (24- α -metil kolesterol) kullanılmaktadır. Brassinolide oluşumu sırasıyla, kampesterol, teasteron, tifasterol, kastasteron ve brassinolid şeklinde gelişmektedir (Şekil 2.14). Doğada en çok bulunan brassinosteroidler, brassinolid ve C28 steroidlerdir (17,113).

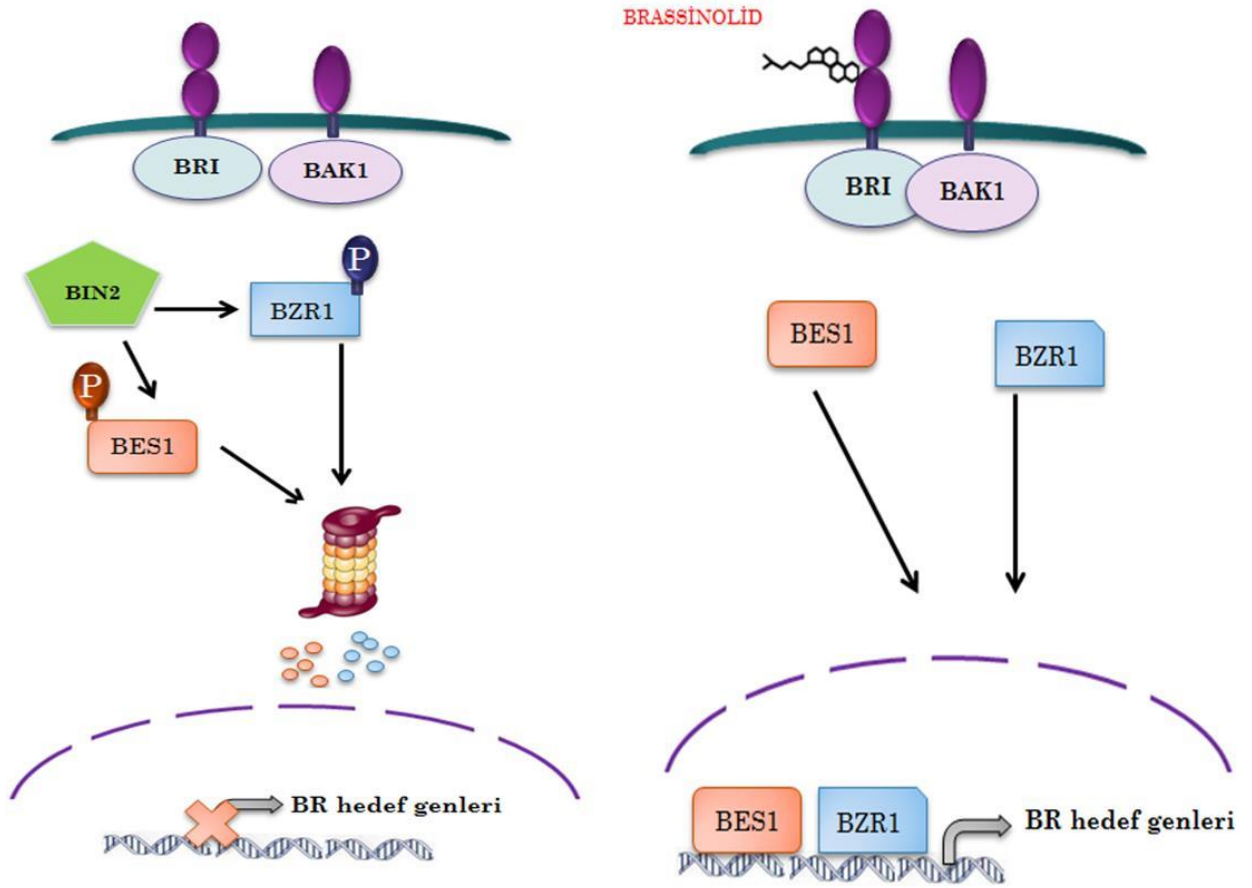


Şekil 2.14. Brassinosteroidlerin biyosentezi.

2.5.2 Brassinosteroidlerin Hücresel İşlevleri ve Türevleri

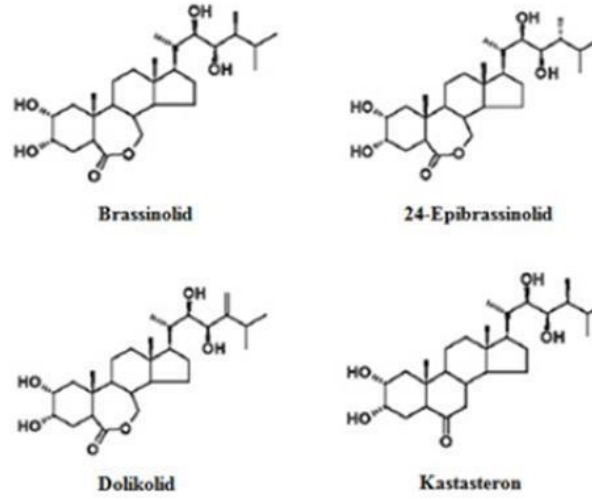
BR'lerin hücre duvarı mekaniği, hücre zar geçirgenliği, nükleik asitlerin ve protein sentezini aktive etme, gen ekspresyonunun düzenlenmesi gibi pek çok olayda rol oynadığı gösterilmiştir (118). Hayvan hücrelerinde steroid hormonlar gen anlatımının düzenlenmesinde etkilidirler. Steroid hormonlar sitoplazmada bulunan reseptörlere bağlanmakta ve sinyal nükleusa taşınmaktadır. Taşınan sinyalle beraber hormona bağlı gen anlatımı başlamakta ya da baskılanmaktadır. *Arabidopsis thaliana* bitkisi üzerinde yapılan çalışmalarda, hayvan hücrelerindeki steroidlere benzer olarak BR sinyalinin transkripsiyonel değişikliklere sebep olarak bitkide fizyolojik cevapların oluştuğu saptanmıştır (119).

BR sinyal mekanizmasında, reseptöre-benzer kinaz olan brassinosteroid insensitive 1 (BRI1) geni önemli bir rol oynamaktadır. BRI1 proteini hayvanlarda bulunan serin/treonin kinaz aktivitesine benzer bir aktivite göstermektedir. BR sinyal iletiminde ikinci önemli protein BRI1 uyumlu reseptör kinaz (BAK1) proteindir. BAK1, BRI1 ile heterodimer oluşturarak BR sinyalini hücre içine taşımada görev yapmaktadır. Oluşturulan heterodimerizasyondan sonra her iki reseptörde fosforilasyon meydana gelir ve kinaz aktivitesi gerçekleşir. BR'nin reseptörlere bağlanarak oluşturduğu sinyale brassinazol-direnci-1 (BZR1) ve BRI baskılayıcı 1 (BES1) proteinleri cevap göstermektedir. BR sinyal yolağında diğer bir önemli protein, BR sinyalinde negatif düzenleyici olarak görev yapan brassinosteroid insensitive 2 (BIN2)'dir. BIN2, BZR1 ve BES1'i defosforile etmektedir. Defosforile olan bu iki protein BR sinyal mekanizmasında görevli olan ya da BR sinyali sonucu oluşan cevap genlerinin aktivasyonunu ya da baskılanmasını sağlamaktadır. BR yokluğunda ise BIN2, BZR1 ve BES1'i fosforlayarak yıkımına sebep olmaktadır (17,19,114,120).



Şekil 2.15. : Bitki hücrelerinde brassinolid sinyal mekanizması (120).

BR'ler şimdiye kadar toplam olarak 58 bitki türünden izole edilmiş ve 65 adet BR ve 5 adet BR konjugatı tanımlanmıştır (21). BR'ler doğal ve sentetik olarak ikiye ayrılmaktadırlar; doğal BR'ler yağ asitleri ve şekere konjuge durumda bulunurken BR analogları ise doğal BR'ler ile yapısal benzerlik göstermektedirler (Şekil 2.15) .



Şekil 2.16. Doğal brassinosteroidlerin kimyasal yapısı (20).

2.5.2.1. Epibrassinolid

Epibrassinolid (EBR) doğal bir brassinosteroiddir ve biyotik strese cevap, hücre bölünmesi, büyüme gibi önemli hücresel olaylarda rol oynamaktadır ve EBR'nin bitkilerde strese karşı cevap oluşturma, tuzluluk, büyüme ve fotosentezdeki önemli etkileri yapılan araştırmalarla gösterilmiştir (20). Son yıllarda yapılan çalışmalarda EBR'nin bitki hücreleri dışında hayvan hücrelerindeki etkileri araştırılmaya başlanmıştır (18).

Yapılan çalışmalarla BR'lerin kanser üzerindeki etkileri araştırılmış ve farklı hücre hatları üzerinde; MCF-7 meme kanseri, K563 kronik miyeloid lösemi, HeLa serviks kanseri, CEM T-lenfoblastik lösemi gibi birçok hücre hattında EBR uygulaması sonucu hücre canlılığının azalma olduğu, BR'lerin anjiyogenezi engellediği, hücre döngüsüne etki ettiği ve apoptozu tetiklediği görülmüştür. Aynı zamanda brassinosteroidler, Alzheimer, Huntington, steroidlerle tetiklenen osteoporoz ve katarakt, androjen duyarsızlığı, astım ve gibi pek çok hastalığın tedavisi için önerilmişlerdir (20).

BR'lerin apoptozu nasıl tetiklediği bilinmemektedir, ancak EBR'nin memeli hücrelerindeki steroid yapısına benzerliğinden dolayı EBR-steroid hormon reseptör ilişkisi incelenmiştir. Yapılan çalışmalar doğrultusunda EBR'nin hormon reseptör anlatımı bulunan hücrelerde daha iyi cevap vermesi EBR ile tetiklenen apoptozda steroid hormon reseptörlerinin rolü olabileceği ileri sürülmüştür. Östrojene bağımlı gelişen MCF-7 meme kanseri hücrelerine

EBR uygulandığında hücre döngüsünü düzenleyen CDK'lara ve siklinlere etki ettiği ve hücre döngüsünü G1 fazında durudurduğu saptanmıştır. Aynı zamanda bu hücre hattında EBR'nin östrojen reseptörü (ER) üzerindeki etkisi araştırıldığında, EBR uygulanan hücrelerde ER'nin sitoplazmada aldığı ve nükleusa göç etmediği gösterilmiştir (18). Yapılan tüm bu araştırmalar sonucunda EBR'nin meme kanseri için kemoterapotik bir ajan olabileceği düşünölmektedir (21). Ancak, EBR'nin kolon kanseri hücre hattında apoptotik ölümünün tetiklenmesindeki etkisi ise bilinmemektedir.

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 kimyasal maddeler Ekler bölümünde Tablo 3’te sunulmuştur.

3.1.4. Kullanılan Tamponlar

3.1.4.1.10X TBS Hazırlanışı

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

3.1.4.2. 1X TBS-Tween Hazırlanışı

1X TBS içine 500µl Tween 20 konularak hazırlanır.

3.1.4.3. Yürütme tamponunun Hazırlanışı

30,3gr Tris-baz, 114 gr Glisin ve 10 gr SDS tartılarak 1000ml distile su içinde çözünür. Hazırlanan 10X yürütme tamponu hazırlanır. Jel yürütmesi sırasında kullanılmak için 1X’e dönüştürülür.

3.1.4.4. Transfer Tamponunun Hazırlanışı

200 ml 10X yürütme tamponunun üzerine 100ml metanol konularak distile su ile 1000ml’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 tankının içinde saklanabilir.

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. Hücre Kültürü

HCT 116, HT 29, HCT 116 p53 anlatımı bulunmayan (p53 -/-) kolon kanseri hücre hatları American Type Tissue Culture Collection' dan temin edilmiştir. Hücreler McCoy's 5A (besiyerinde % 10 sığır fetusu serumu ve 10 U/ml penisilin/streptomisin antibiyotik katkısı ile % 5 CO₂ içeren 37°C'de inkübatörde üretilmiştir. Hazırlanan besiyeri 0,22 µM por çapındaki hücre kültürü ile uyumlu filtrelerden geçirilerek steril hale getirilip, 50 ml'lik falkon tüplerde +4°C'de saklanmıştır.

Hücreler 75 cm² lik petri kaplarında yetiştirilmiştir. Protein izolasyonu için 100 ve 60 mm'lik, PA izolasyonu için 60 mm'lik petri kaplarına, RNA izolasyonu için 6 kuyulu petri kaplarına, floresan mikroskopu ve florometre çalışmaları için 12 kuyulu petrilere hücre ekimleri gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin gece boyunca petri kaplarına yapışmaları beklendikten sonra gerekli ilaç ve/veya inhibitör uygulamaları belirlenen sürelerde uygulanmış ve 37 °C 'de % 5 CO₂ içeren etüvde bekletilmiştir.

Hücre ekimi ya da petri kabındaki hücrelerin sayılarının artması sonucu 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 diamin tetra asetik asit) (% 0,25) ile CO₂ içeren etüvde 2 dakika bekletilmişlerdir. Bu süre sonunda hücrelerin zarar görmesinin engellenmesi için petri kabına 2 ml McCoy's 5A besiyeri eklenerek tripsinin aktivitesi durdurulmuş hücreler santrifüj tüpüne alınmıştır. 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj

işleminde sonra süpernatant atılmış, hücrelerin üzerine 1ml taze besiyeri eklenmiştir. İyice pipetaj yapıp homojen bir hale gelen hücre süspansiyonu hücre sayımına hazırlanmış bulunmaktadır.

Hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak Neubauer hemositometresinin kanalına aktarılmış ve üzeri lamel ile kapatılmıştır. Hemositometrede 25 karede sayılan hücre sayısı, 1ml'deki hücre sayısının bulunabilmesi için 10^4 ile çarpılmıştır. $1,5 \times 10^6$ hücre, 75 cm²'lik petri kaplarına ekilerek hücrelerin pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. Hücre Canlılığının Belirlenmesi

MTT ayırıcı, canlı hücrelerde mor renkli formazon tuzu oluşturması sonucu kolorimetrik yöntemle hücre canlılığına bakılmıştır. HCT 116 kolon kanseri hücreleri 96 kuyucuklu petrinin her kuyucuğunda 1×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmış ve 24 saat boyunca hücrelerin yapışması için beklenmiştir. EBR uygulaması doza bağlı olarak (10-50 µM) 24 saat boyunca uygulanmıştır. Her kuyucuğa 10µl MTT ayırıcı eklenmiş ve hücreler 4 saat boyunca etüvde bekletilmiştir. Daha sonra MTT ayırıcı eklenmiş besiyeri hücrelerden çekilmiş ve her kuyucuğa 100µl 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'in hücreler üzerindeki sitostatik etkisi değerlendirilmiştir. 12 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 30µM EBR, 24, 48,72 ve 96 saat boyunca uygulanmıştır. Hücreler tripsin ile toplanarak 2000 rpm' de 5 dakika boyunca santrifüj yardımıyla çöktürülmüştür. Hücre pelleti 50µl besiyeri ve 50µl Tripan mavisi boyası ile karıştırılarak hemositometre ile sayım yapılmıştır.

3.2.4. 3,3' Diheksiloksakarbosiyenin İyodür (DiOC₆) Boyama

12 kuyucuklu petrinin her kuyucuğunda 5×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Yapışan hücrelere 30µM EBR 24 ve 48 saat boyunca uygulanmıştır. Her bir kuyucuğa 1nM DiOC₆

(ana stok: 4mM) 30 dakika boyunca uygulanarak fluoresan mikroskobunda mavi filtre ile canlı hücrelere bakılmıştır.

3.2.5. Propidyum iyodür (PI) boyama

12 kuyucuklu petrinin her kuyucuğunda 5×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Yapışan hücrelere 30 μ M EBR, 24 ve 48 saat boyunca uygulanmıştır. Her bir kuyucuğa 2 μ g/ml PI (ana stok: 50mg/ml) uygulanarak 15 dakika etüvde inkübe edildikten sonra yeşil filtrede ölçü hücrelere bakılmıştır.

3.2.6. 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) Boyama

12 kuyucuklu petrinin her kuyucuğunda 5×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapıldıktan sonra yapışan hücrelere 30 μ M EBR 24 ve 48 saat boyunca uygulanmıştır. Her bir kuyucuğa 1 μ l/ml DAPI boyası 30 dakika uygulanmıştır.

3.2.8. DNA Kırıklarının Gösterimi

6 kuyucuklu petrilere her bir deney grubu için 5×10^5 hücre ekilmiştir. Petri kaplarına yapışması için bir gece beklenen hücrelere 30 μ M EBR 24,48 ve 72 saat boyunca uygulanmıştır. Hücrelere kontrol amaçlı olarak 500 μ M hidrojen peroksid uygulaması yapılarak 6 saat bekletilmiştir. İlaç uygulamasından sonra hücreler toplanarak 2 dakika 13200 rpmde santrifüj yardımıyla çöktürülmüştür. Çöken hücrelere 500 μ l lizis tamponu uygulanmış ve 40 dakika boyunca buzda bekletilmiştir. Bu süre sonunda örnekler 15 dakika 13200 santrifüj yapılmış ve üst faz yeni bir ependorfa alınmıştır. Üst faza proteinaz K ve RNaz (100 μ g/ml) eklenerek 37°C de 1 saat bekletilmiştir. Bir saatin sonunda Fenol/Kloroform/izomil (25:24:1) ile bir kez karıştırılarak üst faz tekrar yeni bir ependorfa alınmıştır. Alınan hacmin 1/10 u kadar 3M amonyum asetat ve 2 volüm %100 etanol konularak bir gece -20 derecede bekletilmiştir. Ertesi gün örnekler 15 dakika 13200 rpm de santrifüj edilmiştir. Elde edilen DNA üzerine 500 μ l %70 etanol eklenerek 2 dakika 13200 rpm de santrifüj edildikten sonra DNA pelleti kurutulmuş, üzerine 25-30 μ l TE konulmuştur. elde edilen örnekler %2'lik agaroz gelde yürütülerek UV translüminatör de görüntülenmiştir.

3.2.9. Total Protein İzolasyonu

100 mm'lik petrilere $1,5 \times 10^5$ hücre ekilmiştir. Yapışan hücrelere 30 μM EBR 12, 24 ve 48 saat hücrelere uygulanmıştır. Hücreler 1X PBS ile toplanarak 2 dakika 13200 rpm'de çöktürülmüştür. Bu işlem etrideki bütün hücreler toplanana kadar tekrarlanmıştır. Santrifüjle çöktürülen hücrelere lizis tamponu eklenmiştir. Örnekler 20 dakika oda sıcaklığında çalkalıyıcıda inkübe edildikten sonra 20 dakika 13200 rpm de $+4^\circ\text{C}$ de santrifüj yapılmıştır. Üst faz yeni Ependorf tüpüne alınarak miktar tayini yapılmıştır.

3.2.10. Bradford Protein Miktar Tayini

Protein içeriğinin belirlenmesi için Bradford yöntemi kullanılmıştır (121). Konsantrasyonu 1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ olan BSA (sığır serum albumin) kullanılarak önce standart eğri oluşturulmuştur. Bu eğri şu şekilde hazırlanmıştır: 1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 4,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 7,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA'nın üzerine Bradford çözeltisi eklenerek 595 nm dalga boyunda absorbansları ölçülmüş, elde edilen proteinlerden 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ alınarak aynı dalga boylarında absorbansları belirlenmiştir. Standartların absorbans/konsantrasyon grafiği elde edildikten sonra, bu grafiğin eğim eşitliliği kullanılarak absorbans değerleri bilinen örneklerin konsantrasyonları belirlenmiştir.

3.2.11. İmmunoblotlama Yöntemi

3.2.12.1. Proteinlerin Hazırlanması ve SDS-PAGE'de Yürütülmesi

İmmunoblotlama yöntemi için Laemmli tamponu (4X) ve 30 μg protein örnekleri 1:3 oranında karıştırılarak 95°C 'de 5 dakika tutulmuştur. %4 yükleme ve %12'lik ayırma SDS-PAGE hazırlanarak, proteinler bu jel sistemine yüklenmişlerdir. Jel sisteminde ilk kuyuda daima protein belirteç ile birlikte 100 V'de 2 saat yürütme tamponunda yürütülmüştür.

3.2.11.2. Membrana Transfer ve bloklama

SDS-PAGE sonrası, yükleme jeli kesilerek ortamdan uzaklaştırılmıştır. Ayırma jeli boyutunda kesilen poliviniliden florid (PVDF) membranlar jellerin altına konduktan sonra, membran ve jellerin her iki tarafına transfer tamponunda ıslatılmış filtre kağıtları yerleştirilmiştir. Jel, membran ve filtre kağıtları kasetlere yerleştirilerek 1,5 saat boyunca 350 miliamperde transfer işlemi gerçekleştirilmiştir. Transfer işlemi sonrası membranlar, 2 saat oda sıcaklığında, %5'lik yağsız süt tozu (%0.1 Tween 20 içeren 1X TBS) içerisinde bekletilerek bloklama işlemi yapılmıştır.

3.2.11.3. 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 1X TBS) içinde aşağıda belirlenen dilasyonlarda uygulanmışlardır:

Beta-aktin , PARP,kesilmiş kaspaz 9, kaspaz 3, kesilmiş kaspaz 3, kaspaz 7, kaspaz 8, Puma , Bak, Bid, Bax, Bim, Mcl-1, Bcl-xL, ODC, AZI, Prof. Chaim Kahana'nın (Weizmann Enstitüsü) hediyesi), SSAT, PAO, Src, c-Raf, p-c-Raf, ERK1/2, p38, p-p38, SAPK/JNK, p-SAPK/JNK, c-Jun, c-Fos, c-Myc, p-PTEN, PI3K p85, AKT, FoxO3a p-FoxO3a (Ser318/321) (CST, poliklonal anti tavşan). Her bir antikor super block T-20 çözeltisi ile (Pierce) 1:500-1:1000 aralığında çalışılmıştır. HRP-konjuge sekonder antikorlar 1:5000 aralığında çalışılmıştır (CST). siRNA için SSAT (Santa Cruz sc-61617), PAO (santa Cruz sc-44540), p53 (Santa Cruz sc-29435), p53 plazmidi için; pcDNA-Flag-p53 vektörü (Addgene plasmid #10838)) kullanılmıştır.

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

3.2.11.4. Bantların 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 film çözeltileri ile istenilen görüntü elde edilinceye kadar yıkanarak, en son aşamada filmler soğuk suda yıkanarak kurumaya bırakılmışlardır.

3.2.12. Poliamin Miktarlarının Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Tayini

1×10^6 sayıda hücre 60 mm'lik petri kaplarına ekilerek, bir gece boyunca 37 °C'de %5'lik CO₂'li etüvde tutulmuşlardır. Hücrelere daha sonra 30 µM EBR uygulanmıştır. PA içeriklerinin belirlenebilmesi için öncelikle hücreler 1X PBS ile yıkanmış, daha sonra kazıyıcı yardımı ile kazınarak kaldırılmış ve santrifüj tüplerinde toplanmışlardır. Tüpler daha sonra 13200 rpm'de bir dakika boyunca çöktürülmüş ve benzoilasyon işlemine geçilmiştir.

500 µl trikloroasetik asit (TCA) hücre lizatının üzerine eklenerek cam tüplere alınmış ve daha sonra üzerine 1ml sodyum hidroksit eklenmiştir. 10 ml %50 benzoil klorür eklenmesinin ardından tüpler 1 dakika boyunca karıştırılmıştır. 20 dakika oda sıcaklığında inkübasyon sonrası tüpler tekrar 1 dakika boyunca karıştırılmıştır. Örneklerin üzerine 1 ml 5M sodyum klorür eklendikten sonra, her tüpe 2 ml dietiler eklenip vortekslenmiştir. Aşağıda kalan tabaka yeni mikrofüj tüplerine alınmış ve daha sonra bu tabakanın üzerine saf su eklenerek tüpler karıştırılmıştır. Tüpler daha sonra 13200 rpm'de 2 dakika santrifüj edilip, kloroform içeren kısım yeni bir tüpe alınıp evaporatör yardımı ile cam tüplerde uçurma gerçekleştirilmiştir. Örneklerin üzerine 500 µl metil alkol eklenmiş ve elde edilen PA ekstraktı -20°C'de saklanmıştır.

PA analizleri yüksek basınçlı sıvı kromatografi cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Mobil faz olarak % 60'lık metanol kullanılmıştır. İnternal standart olarak diaminoaktan kullanılmıştır. Kromatografiden çıkacak sonuçların analiz edilmesinden önce PA standartları hazırlanarak cihazda okutulmuştur. Hazırlanan PA standartları aşağıdaki şekildedir:

- 1 mM Put: 8 mg Put hidroklorid (50 ml saf su ile)
- 1mM Spd: 12,7 mg Spd hidroklorid (50 ml saf su ile)
- 1 mM Spm: 17,4 mg Spm tetrahidroklorid (50 ml saf su ile)

Her analiz öncelikle hazırlanan standart örnekler enjekte edilerek başlanmıştır. Buna göre sırasıyla Put 6. dakikada, Spd 13. dakikada, Spm ise 23. dakikada HPLC kolonundan çıkarak ultraviyole ışık altında tespit edilmiştir. Örneklerin enjeksiyon hacmi 50 µl olacak şekilde ayarlanmıştır. Elde edilen PA değerleri protein bazında ifade edilmiştir. Her analiz en az üç kere tekrarlanmıştır.

3.2.13. siRNA Yöntemi ile Gen Susturulması

2×10^4 HCT 116 ve HT 29 hücresi 6 kuyucuklu petri kaplarına ekilerek bir gece petri kabına yapışmaları beklendikten sonra hücrelere SSAT siRNA, PAO siRNA ve p53 transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. siRNA uygulamaları 48 saat süre ile gerçekleştirildikten sonra gen susturulması immunoblotlama yöntemleri ile kontrol edilmiştir. Bu işlemler için total protein elde edilmiştir.

3.2.13.1. siRNA Transfeksiyonu

SSAT siRNA 1,25 µg/µl, transfeksiyon ajanı ise 2:3 oranında, PAO siRNA yine 1,25 µg/µl, transfeksiyon ajanı ise 2:3 oranında ve bunun yanı sıra p53 siRNA 1,25 µg/µl, transfeksiyon ajanı da 2:3 oranında uygulanmıştır. Ayrıca hücrelere negatif kontrol olarak negatif siRNA transfeksiyonu da 1,25 µg/µl konsantrasyonda yapılmış, transfeksiyon ajanı 2:3 olarak uygulanmıştır. siRNA uygulamaları üretici firmaların önerdiği protokollere bağlı kalınarak gerçekleştirilmiştir. Kısaca fetal sığır serumu içermeyen besiyerinde hazırlanıp, 15 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra, hücrelerin üzerinde bulunan besiyerine damla damla eklenip petri kabı dikkatli bir şekilde çalkalanmıştır. siRNA uygulamasından 5 saat sonra 2x McCoy's besiyeri eklenir ve 24 saat beklenir. 24 saat sonra siRNA'lı besiyeri değiştirilir ve normal besiyeri ile 24 saat beklendikten sonra 30 µM EBR 48 saat boyunca uygulanmıştır.

3.2.13.2. p53 Plazmid Transfeksiyonu

p53 plazmidi 2 µg/µl, transfeksiyon ajanı ise 1:6 oranındadır. Hücrelere plazmid uygulaması fetal sığır serumu içermeyen besiyerinde hazırlanıp, 15 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra, hücrelerin üzerinde bulunan besiyerine damla damla eklenmiştir ve petri kabı dikkatli bir şekilde çalkalanmıştır. Plazmid uygulamasından 24 saat sonra besiyeri değiştirilmiş ve birgün boyunca bekletilmiştir. Daha sonra besiyeri 30 µM EBR içeren besiyeri ile değiştirilerek 48 saat beklenmiştir. .

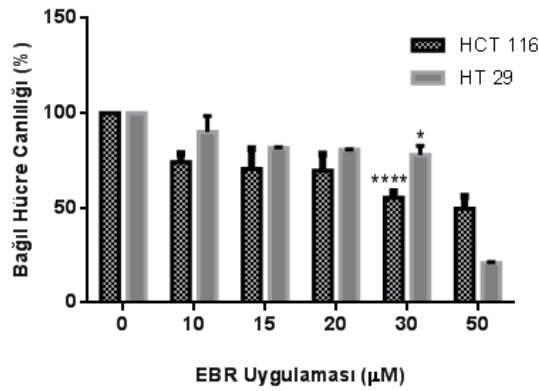
3.2.14. İstatiksel Analiz

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

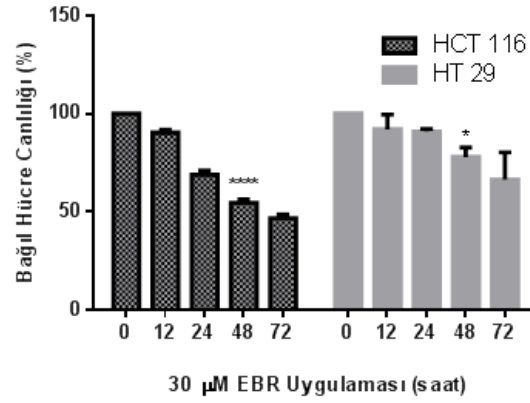
4.1. EPİBRASSİNOLİD'İN HCT 116 ve HT 29 KOLON KANSERİ HÜCRE HATLARINDA HÜCRE CANLILIĞINA ETKİSİ

HCT 116 ve HT 29 kolon kanseri hücrelerine artan konsantrasyonlarda (10-50 μ M) 24 saat boyunca EBR uygulanmıştır. EBR'in artan dozlarıyla beraber HCT 116 ve HT 29 hücre canlılığının azaldığı ve 30 μ M EBR uygulamasının hücre canlılığının % 50' oranında azalmasına neden olduğu saptanmıştır. Seçilen 30 μ M EBR deneyler süresince kullanılmıştır (Şekil 4.1).



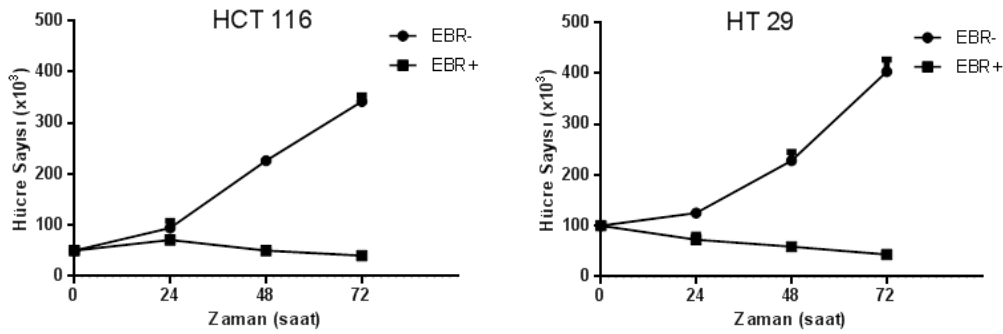
Şekil 4. 1. HCT 116 ve HT 29 hücrelerinde doza bağlı EBR uygulamasının hücre canlılığına etkisi. * $p < 0,01$; **** $p < 0,00001$.

MTT testi sonucunda seçilen 30 μ M EBR dozunun zamana bağlı olarak (0,5-48 saat) hücre canlılığı üzerindeki etkisi araştırılmıştır. 30 μ M EBR 48 saat boyunca uygulandığında HCT 116 hücrelerinde % 52,4, HT 29 hücrelerinin % 34 oranında hücre canlılığı kaybı görülmektedir (Şekil 4.2).



Şekil 4. 2. HCT 116 ve HT 29 hücrelerinde zamana bağlı EBR uygulamasının hücre canlılığına etkisi. * $p<0,01$; **** $p<0,0001$.

Yapılan MTT deneyleri sonucu seçilen 30 μ M EBR'in zamana bağlı olarak hücre büyümesi üzerindeki etkilerini belirleyebilmek amacıyla hücre sağkalım analizi uygulanmıştır. Hücreler tripan mavisi boya ile boyanarak ışık mikroskobu yardımıyla sayılmış ve hücre sayıları kontrol hücreleriyle karşılaştırılmıştır. 30 μ M EBR uygulamasında HCT 116 hücrelerinde ilk 24 saatte hücre büyümesinin durduğu 48 saatle beraber hücre ölümünün başladığı belirlenmiştir. HT 29 kolon kanseri hücre hattında ise uygulanan 30 μ M EBR 24 saatle beraber hücre ölümüne sebep olduğu, HCT 116 hücre hattıyla karşılaştırıldığında ölüm oranının daha düşük olduğu saptanmıştır (Şekil 4.3).



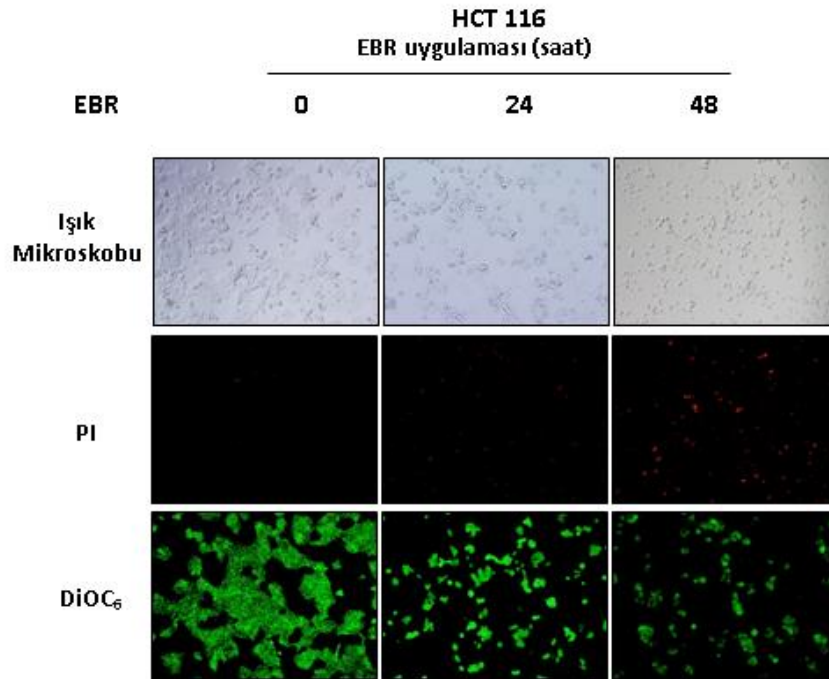
Şekil 4. 3. EBR uygulanan hücrelerde zamana bağlı olarak hücre büyümesinin incelenmesi.

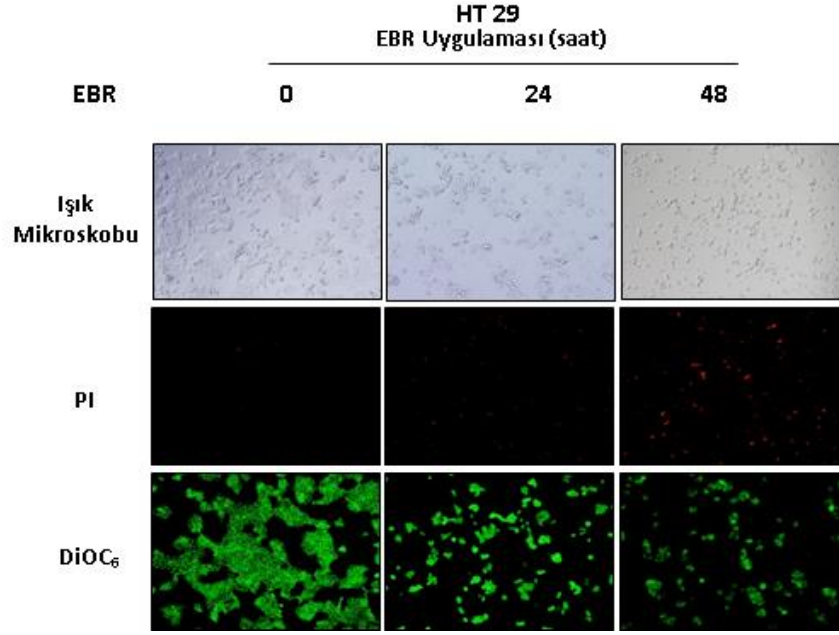
4.2. EPİBRASSİNOLİD'İN HCT 116 ve HT 29 HÜCRE HATLARINDA APOPTOTİK ETKİSİ

EBR uygulanan hücrelerde apoptotik ölümün tetiklenip tetiklenmediğini belirlemek amacıyla ölü hücrelerin boyanmasını sağlayan PI boyaması yapılmıştır. Canlı hücrelerin zarından geçiş yapamayan propidyum iyodür ölü hücrelerin zar morfolojisi değişmesiyle hücre içine girerek ölü hücrelerin gözlenmesini sağlamaktadır. Hücredeki mitokondriyal apoptotik hücre

ölümünü göstermek amacıyla DiOC₆ boyama yapılmıştır. Hücre içindeki nuklear kondensasyonu göstermek için ise ilaç uygulanmış hücrelerde DAPI boyama gerçekleştirilmiştir.

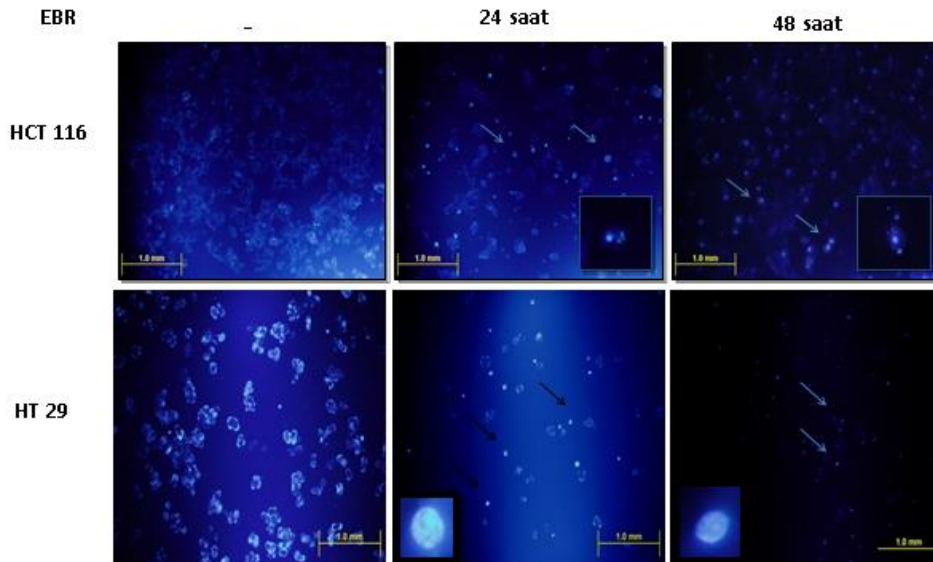
30 µM EBR uygulanan HCT 116 ve HT 29 hücrelerinde 24 saatte hücre ölümünün meydana geldiği ve 48 saatin sonunda hücre ölümünde belirgin bir artış olduğu PI boyama ile belirlenmiştir. DiOC₆ boyama ile 30 µM EBR'in mitokondriyel membran potansiyeli üzerindeki etkisi incelendiğinde, her iki hücre hattında 48 saatlik EBR uygulamasının 24 saatte göre daha fazla hücre canlılığında azalmaya neden olduğu görülmektedir (Şekil 4.4).



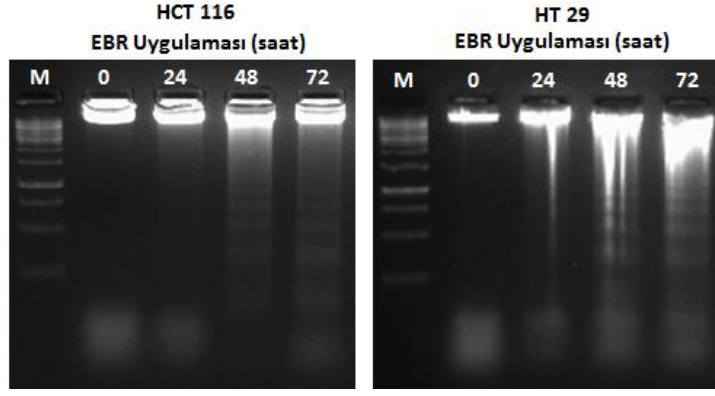


Şekil 4. 4. HCT 116 ve HT 29 hücre hatlarında 30 μ M EBR uygulaması sonucu hücre ölümü ve mitokondri membran potansiyelindeki değişim PI ve DiOC₆ boyama ile gösterilmiştir.

HCT 116 ve HT 29 kolon kanseri hücrelerinde 48 saat EBR uygulaması ile oluşan DNA kırıkları DAPI boyama ile belirlenmiştir. HCT 116 kolon kanseri hücre hattı HT 29 hücre hattına göre EBR uygulaması sonucunda 48 saatte DNA kırıklarının 24 saate göre daha fazla artış gösterdiği görülmüştür. EBR ile tetiklenen apoptotik hücre ölümünü göstermek amacıyla DNA fragmentleri belirlenmiştir (Şekil 4.5- Şekil 4.6).

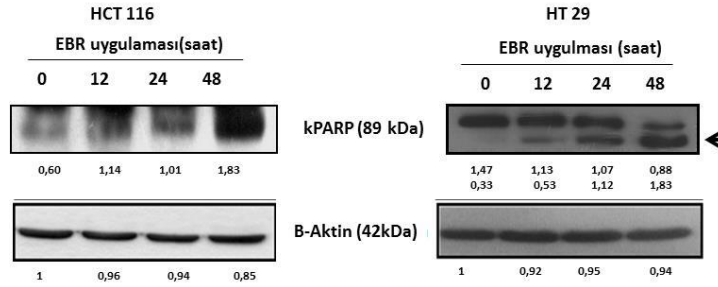


Şekil 4. 5. HCT 116 ve HT 29 hücrelerinde EBR ile tetiklenen DNA kondensasyonunun gösterilmesi.



Şekil 4. 6. Apoptotik hücrelerde DNA kırıklarının gösterilmesi.

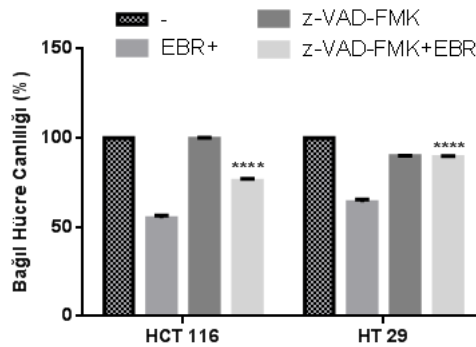
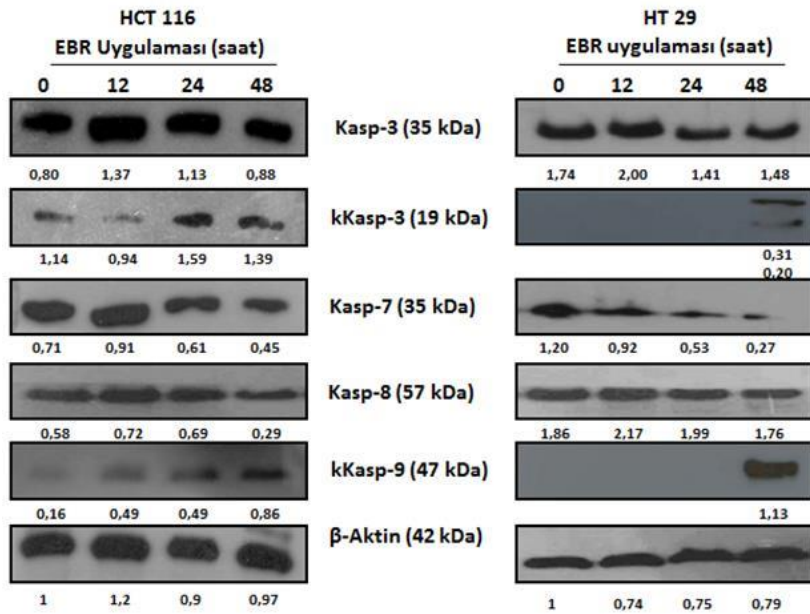
HCT 116 ve HT 29 kolon kanseri üzerindeki steroid bir hormon olan EBR tarafında tetiklenen apoptotik hücre ölüm yolağının modellenmesi amacıyla apoptotik yolda önemli bir rol oynayan Bcl-2 ve kaspaz ailesi üyeleri incelenmiştir. Şekil 4.7’de gösterildiği gibi her iki kolon kanseri hücre hattında EBR uygulaması yapılmamış kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında apoptotik hücre ölümünün gerçekleşmesinde bir belirteç olan PARP kesimi araştırılmıştır. Farklı zamanlarda EBR uygulaması yapılan HCT 116 hücrelerinde kontrol ile karşılaştırıldığında özellikle 48 saatte PARP kesiminin (89 kDa) 12 ve 24 saate göre daha da arttığı görülmektedir. HT 29 hücre hattında ise 12 saatlik EBR uygulamasıyla PARP kesiminin başladığı ve artan zamanla beraber özellikle 48 saatte PARP kesiliminin arttığı görülmüştür.



Şekil 4. 7. EBR ile tetiklenen apoptotik yolda PARP kesiliminin belirlenmesi

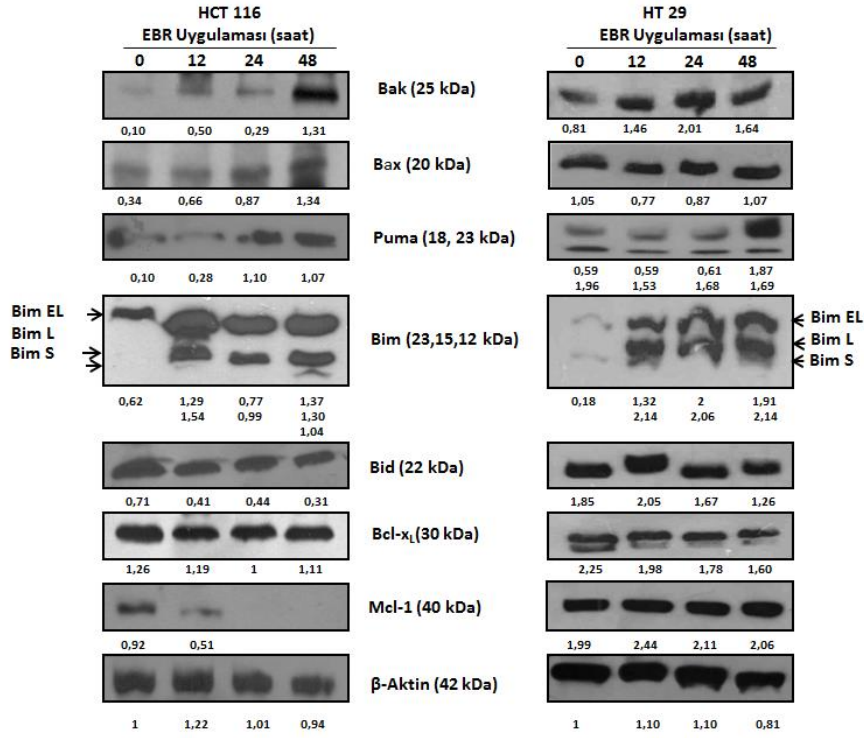
Bu verilere ilave olarak EBR uygulanmış kolon kanseri hücrelerinde apoptotik yoldaki kaspaz ailesi anlatımları da araştırılmıştır. Kaspaz ailesi üyesi olan başlatıcı kaspaz 9 ve etkili kaspazlar, kaspaz 3 ve 7, hücre içindeki kalsiyum seviyesinin artmasıyla aktifleşerek hücre iskeletinin yıkılmasını sağlamaktadır. Zamana bağlı olarak uygulanan EBR ile, HCT 116 ve HT 29 hücre hatlarında 24 saat sonunda kaspaz-3 anlatımı azalmıştır. HCT 116 hücre hattında EBR, kaspaz 3 kesilimi ise 24 saatte itibaren artarken HT 29 hücre hattında özellikle 48 saatte

kaspaz 3 kesilimi için belirleyici olarak bulunmuştur. Diğer etkili bir kaspaz olan kaspaz 7, her iki hücre hattında da zamana bağlı olarak azalmıştır. Ekstrinsik yolda önemli bir kaspaz olan kaspaz 8 ise zamana bağlı olarak EBR uygulaması sonucu HCT 116 hücrelerinde 48 saatte kontrole oranla azalma görülürken HT 29 hücre hattında ise bir değişiklik belirlenmemiştir. Kaspaz ailesinin diğer bir üyesi olan kaspaz 9'un HCT 116 hücre hattında, EBR uygulamasından 12 saat sonra aktive olmaya başladığı, HT 29 hücre hattında ise EBR'in 48 saatte kaspaz 9 kesilimine yol açtığı saptanmıştır (Şekil 4.8). Kaspaz bağımlı apoptoz aynı zamanda kaspaz inhibitörü z-VAD-FMK varlığında da incelenmiştir. Öncül Z-VAD-FMK (1 saat) ardından EBR uygulaması, sadece EBR ile tetiklenen apoptotik ölümü engellemiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4. 8. EBR uygulanmış hücrelerde zamana bağlı olarak kaspaz aktivasyonunun gösterilmesi. ****p<0,00001

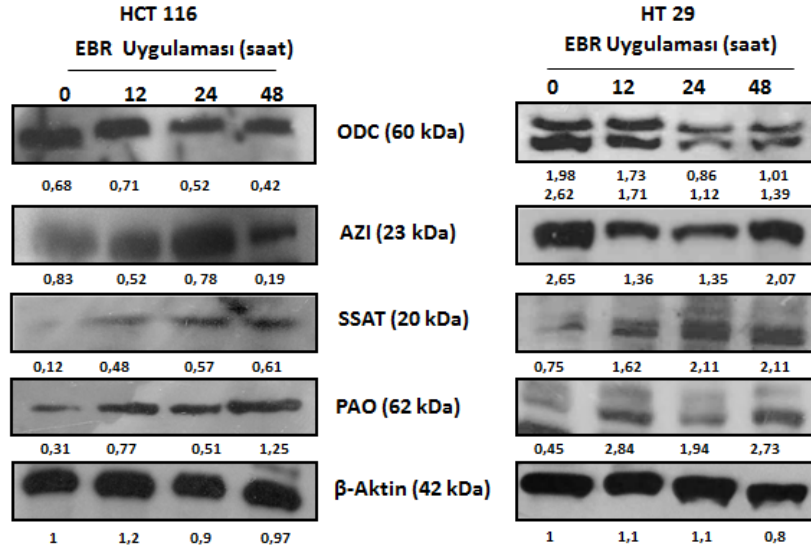
Apoptotik hücre ölüm yolağının tetiklenmesinde önemli bir rolü olan pro- ve anti- apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinde EBR uygulaması sonucundaki değişimleri. Şekil 4.9' da gösterildiği gibi pro-apoptotik Bcl-2 ailesine ait olan ve işlevsel olarak benzerlik gösteren Bak ve Bax proteinleri, EBR uygulamasından sonra; HCT 116 hücre hattında ilaç uygulaması yapılmamış kontrol hücrelerinde bazal seviyesi az olan Bak proteininin anlatımının arttığı görülmektedir. HT 29 hücre hattında ise 12 saatlik EBR uygulamasından sonra Bak anlatımının arttığı görülmektedir. Zamana bağlı olarak EBR uygulanması sonucu HCT 116 hücre hattında Bax ifadesi artarken, HT 29 hücre hattında ise anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyesi olan Bid proteini ise HCT 116 hücre hattında EBR uygulaması sonucu kesilirken, HT 29 hücre hattında ise bir değişiklik gözlenmemiştir. Aynı zamanda her iki hücre hattında EBR ilaç uygulaması sonucunda pro-apoptotik Puma'nın anlatımının zamana bağlı olarak arttığı tespit edilmiştir. Bir diğer pro-apoptotik protein olan Bim'in üç ana izoformunun (BimEL, BimL, BimS) HCT 116 hücre hattında 48 saat, HT 29 hücre hattında ise 12 saat EBR uygulaması ile beraber kontrol hücrelerine göre anlatımlarının arttığı görülmektedir (Şekil 4.9). Anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyesi olan Bcl-xL ve Mcl-1 proteinlerinin zaman bağlı olarak EBR uygulaması sonucunda anlatım düzeylerindeki değişiklikler incelendiğinde, HCT 116 ve HT 29 hücre hatlarında Bcl-xL ifadesinde anlamlı bir değişiklik olmadığı, Mcl-1 anlatımında ise HCT 116 hücre hattında 12 saat ilaç uygulaması ile birlikte anlatım seviyesinin azalmaya başladığı ve 24 saatten sonra yıkıldığı Şekil 4.9'da görülmektedir. HT 29 hücre hattında ise Mcl-1 anlatımında bir değişiklik belirlenmemiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4. 9. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin EBR uygulaması sonucu anlatımlarındaki değişikliklerinin gösterilmesi

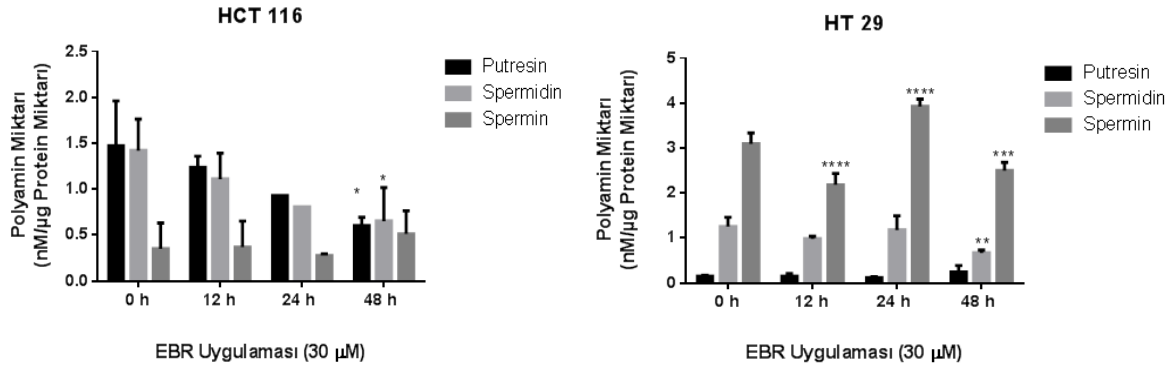
4.3. EPİBRASSİNOLİD'İN POLİAMİN METABOLİK ENZİMLERİNE ve ROS ÜRETİMİNE ETKİSİ

HCT 116 kolon kanseri hücrelerinde EBR uygulamasıyla birlikte PA metabolizmasındaki değişimler araştırılmıştır. Şekil 4.12'de görüldüğü gibi PA biyosentezinde rol oynayan ODC enzimi ve ODC enzimi regülatörü AZI'nın anlatımları HCT 116 ve HT 29 hücre hatlarında EBR uygulamasıyla beraber azalmıştır. PA katabolizmasında önemli rolleri olan SSAT ve PAO enzimlerinin ise EBR uygulanmamış kontrol hücrelerinde bazal seviyelerinin çok az olduğu, ilaç uygulamasıyla birlikte her iki hücre hattında da 12. saatten itibaren anlatım düzeylerinin arttığı saptanmıştır (Şekil 4.10).



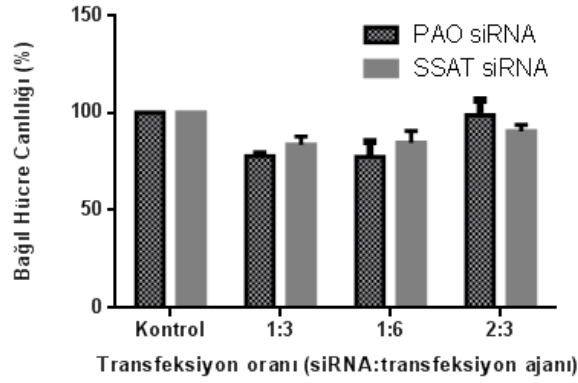
Şekil 4. 10. EBR uygulaması sonucunda PA biyosentez ve katabolizmasındaki enzimlerin anlatım seviyelerindeki değişikliklerin gösterilmesi

Azalan ODC ve artan katabolik proteinler sonucu hücre içi PA düzeyleri farklı zaman dilimlerinde (12, 24, 48 saat) EBR uygulanan HCT 116 kolon kanseri hücrelerinde incelenmiştir (Şekil 4.11).



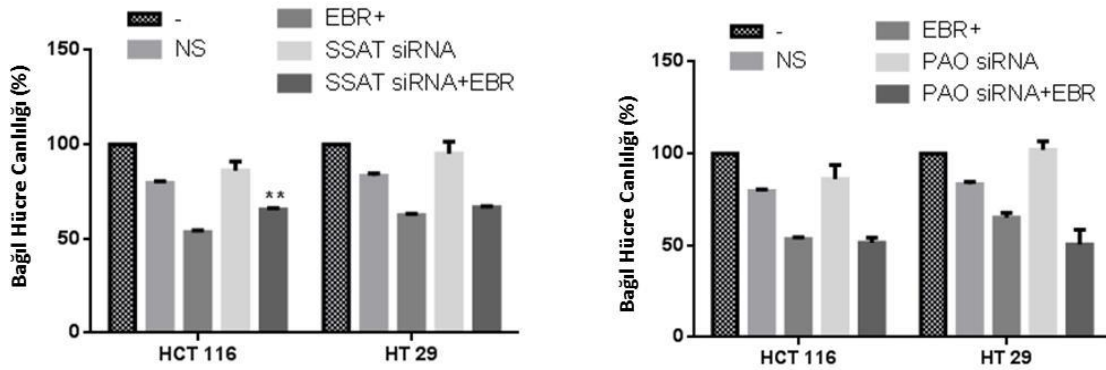
Şekil 4. 11. EBR uygulanmış HCT 116 ve HT 29 kolon kanseri hücrelerinde poliamin içeriğinin gösterilmesi. *p < 0,01; **p < 0,001; ****p < 0,0001.

EBR'nin tetiklediği apoptozun PA katabolizması ile olan ilişkisinin daha iyi anlaşılması için katabolik yolda önemli rol oynayan SSAT ve PAO enzimlerine özgü siRNA'lar uygulanmış ve apoptotik mekanizma incelenmiştir. Uygulanan siRNA miktarlarının optimize edilmesi adına farklı konsantrasyonlarda siRNA uygulamaları yapılmış ve hücre hatları için toksik olmayan siRNA:transfeksiyon ajanı oranı belirlenmiştir (Şekil 4.12). MTT testi ile yapılan optimizasyona göre 2:3 oranı belirlenmiştir.



Şekil 4. 12. HT 29 kolon kanseri hücrelerinde SSAT ve PAO siRNA oranı optimizasyonu.

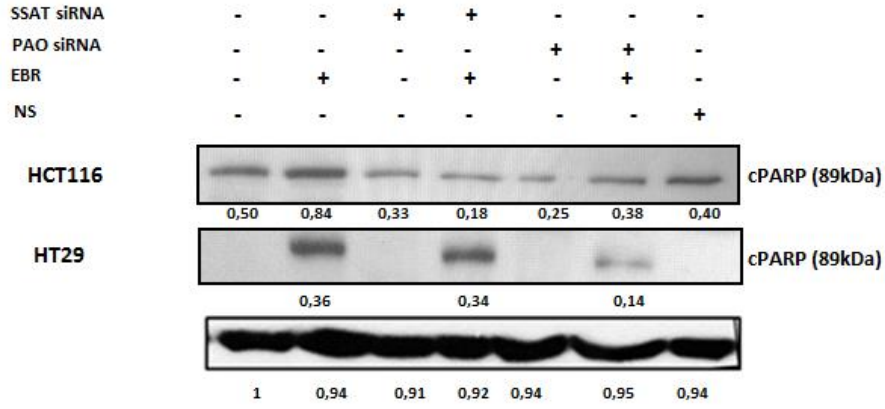
Belirlenen oranlarda SSAT ve PAO siRNA HCT 116 ve HT 29 kolon kanseri hücrelerine uygulanmış ve bu hücrelerde EBR uygulaması sonucunda hücre canlılığındaki etkileri incelenmiştir. Her iki hücre hattında da 30 μ M EBR uygulaması hücre canlılığında %50 oranında azalmaya sebep olmuştur. Uygulanan siRNA konsantrasyonları her iki hücre hattında hücre canlılığında anlamlı bir azalışa yol açmazken, sadece EBR uygulanmış örneklerle oranla, 48 saat EBR+siRNA uygulanmış her iki hücre hattında da PAO siRNA uygulaması EBR'nin neden olduğu hücre canlılığı kaybını engellememiştir. Bununla birlikte SSAT siRNA uygulanan hücrelerde EBR'nin canlılığa ket vurucu etkisine HCT 116 hücre hatlarında engellendiği, HT 29 hücre hattında ise bir değişikliğe neden olmadığı saptanmıştır (Şekil 4.13).



Şekil 4. 13. HCT 116 ve HT 29 kolon kanseri hücrelerinde SSAT ve PAO siRNA uygulamasının hücre canlılığına etkisi.

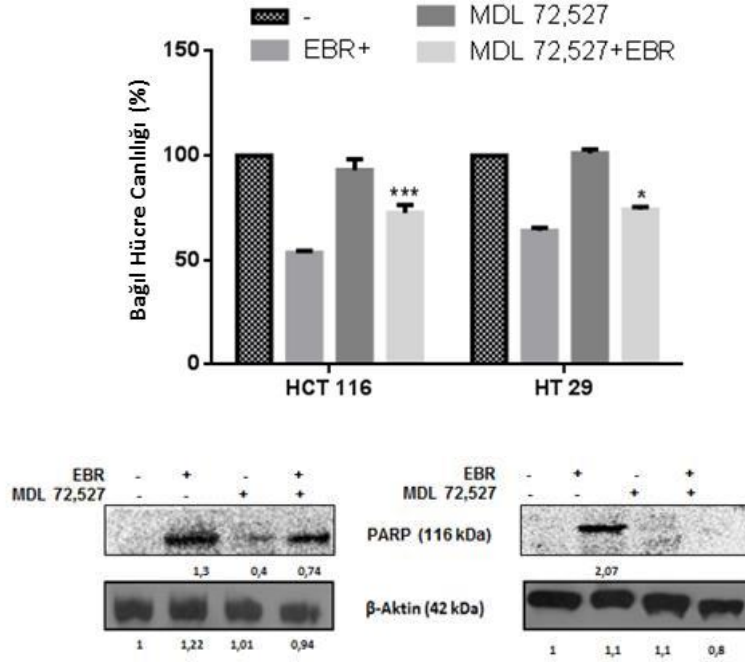
PA katabolizması üzerinde önemli etkileri olan SSAT ve PAO enzimlerinin siRNA ile susturulması sonucu hücredeki apoptotik etkinin saptanabilmesi için western blot yöntemi ile PARP kesimi araştırılmıştır (Şekil 4.14). HCT 116 hücre hattında 48 saatlik EBR uygulaması

PARP kesimini arttırırken SSAT ve PAO siRNA uygulamasıyla PARP kesimi azalmıştır. HT 29 hücre hattında ise özellikle PAO siRNA uygulanan hücrelerde EBR uygulaması sonucu PARP kesimindeki azalmanın çok fazla olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4. 14. SSAT ve PAO siRNA uygulanan hücrelerde PARP kesiminin gösterilmesi.

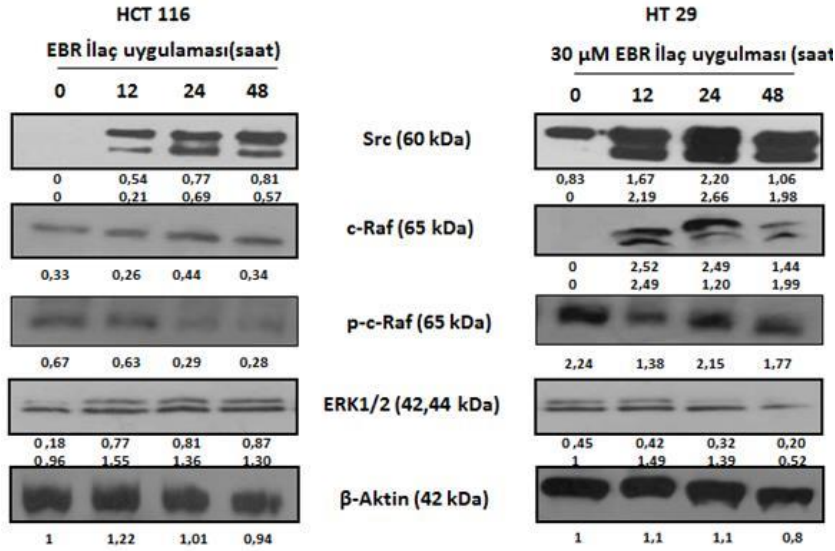
Kolon kanseri hücre hatlarında EBR'nin tetiklediği apoptozun PA katabozması ile etkileşimini daha iyi ortaya koyabilmek için PAO ve SMO inhibitörü olan MDL-72,527 varlığında hücre canlılığı kaybı incelenmiş ve sadece EBR uygulaması ile meydana gelen hücre canlılığı kaybı ile karşılaştırılmıştır. HCT 116 ve HT 29 hücrelerinde 2 saat öncül MDL-72,527 uygulaması sonrasında EBR uygulandığında, sadece EBR ile tetiklenen hücre canlılığı kaybı engellenmiştir (Şekil 4.15). Aynı zamanda PA katabolizmasının MDL 72,527 ile inhibe edilmesi EBR ile tetiklenen PARP kesilimini her iki hücre hattında da azaltmıştır (Şekil 4.15).



Şekil 4. 15. HCT 116 ve HT 29 hücre hattında MDL 72, 527 uygulaması sonucu hücre canlılığındaki değişimlerin saptanması ve apoptotik cevabın incelenmesi. *** p< 0,001

4.4. EPİBRASSİNOLİD'İN HÜCRE SAĞKALIM YOLAKLARI ÜZERİNE ETKİLERİ

HCT 116 ve HT 29 kolon kanseri hücre hatlarında EBR uygulaması sonucunda öncelikle MAPK sinyal iletim mekanizmasında işlevsel proteinlerin anlatımlarındaki değişimler incelenmiştir. Sinyal iletiminde rol oynayan Src her iki hücre hattında EBR uygulaması ile beraber artış göstermiştir. MAPK yolağında sinyal iletiminde önemli bir protein olan c-Raf'ın anlatımında EBR uygulamasıyla HCT 116 hücre hattında anlamlı bir değişikliğe neden olmazken, HT 29 hücre hattında c-Raf anlatımı artmıştır. Fosforlanmış c-Raf anlatım ise HCT 116 hücrelerinde 24 saatten itibaren azalmıştır. Bununla birlikte HT 29 hücre hattında ise 12 saatlik EBR uygulaması, ilaç uygulanmamış kontrol hücreleri ile kıyaslandığında c-Raf fosforlanması azalırken 24 ve 48 saat EBR uygulaması ile değişim gözlemlenmemiştir. EBR uygulamasının MAPK sinyal kaskadında görevli bir diğer protein olan ERK1/2 üzerindeki etkisi incelendiğinde ise HCT 116 hücre hattında zamana bağlı ERK1/2 artışı gözlemlenirken, HT 29 hücre hattında zamana bağlı olarak ERK anlatımında azalma belirlenmiştir (Şekil 4.16).

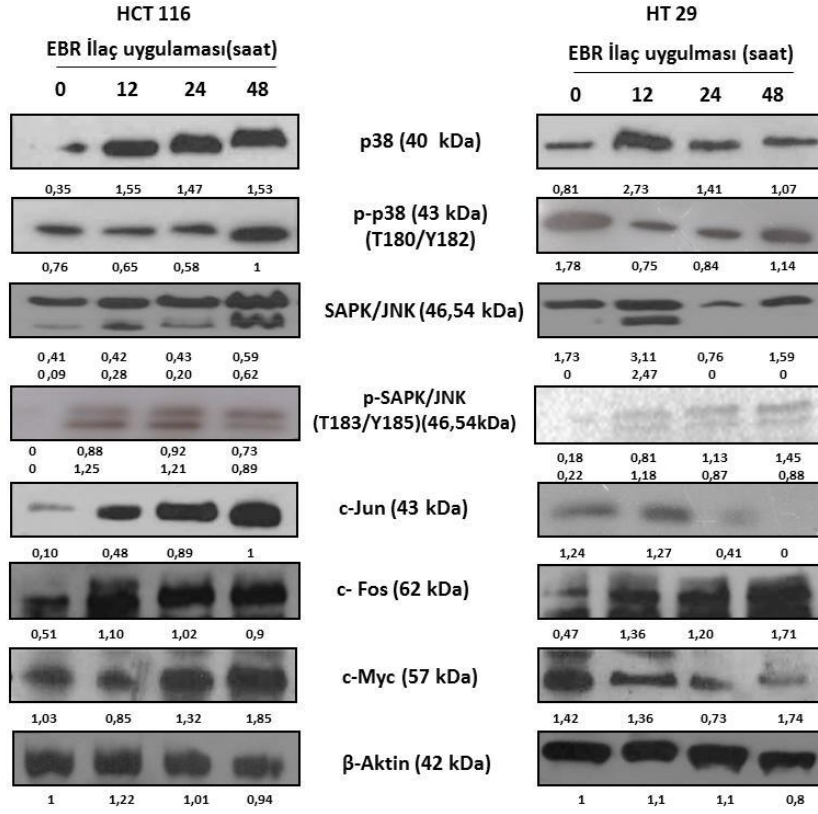


Şekil 4. 16. EBR uygulamasının MAPK ailesi proteinlerinin anlatımındaki etkileri.

MAPK ailesinin üyesi olan p38 proteini anlatımı HCT 116 hücrelerinde zamana bağlı olarak artış gösterirken, HT 29 hücre hattında ise 12 saatlik EBR uygulamasıyla beraber kayda değer bir artış belirlenmemiştir. HCT 116 hücre hattında p38 proteininin fosforlanmış aktif formu araştırıldığında özellikle 48 saatte anlatımında bir artış gözlemlenmiş, bununla birlikte HT 29 hücre hattında EBR'nin zıt bir etki yaparak p38'in fosforlanmasını indirdiği belirlenmiştir (Şekil 4.17).

MAPK ailesinin diğer bir üyesi SAPK/JNK'nın, HCT 116 hücrelerinde normal ve fosforlanmış formu zamana bağlı olarak artış göstermiştir. HT 29 hücre hattında ise SAPK'nın anlatımının 24 saatte azaldığı JNK'nın ise sadece 24 saatte artış gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.17).

MAPK kaskadı ile aktive olan bir transkripsiyon faktörü olan AP-1'i oluşturan c-Jun ve c-Fos proteinlerinin EBR ile anlatımlarındaki değişiklikleri incelediğimizde ise; c-Jun anlatımının HCT 116 kolon kanseri hücrelerinde ilaç uygulanmamış kontrol hücrelerine göre zamana bağlı olarak artış gösterdiği, HT 29 hücre hattında ise 12 saatlik EBR uygulamasının ardından azaldığı ve 48 saatte tamamen yok olduğu gözlemlenmiştir. c-Fos proteinin anlatımı ise HCT 116 ve HT 29 hücre hatlarının her ikisinde zamana bağlı EBR uygulamasıyla artış göstermiştir (Şekil 4.17). AP-1 transkripsiyon faktörünün hedefi olan c-Myc anlatımı incelendiğinde ise HCT 116 hücre hattında 24 ve 48 saatlik EBR uygulamasıyla bir artış olduğu, fakat HT 29 hücre hattında ise 12 saat EBR uygulamasıyla azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.17).

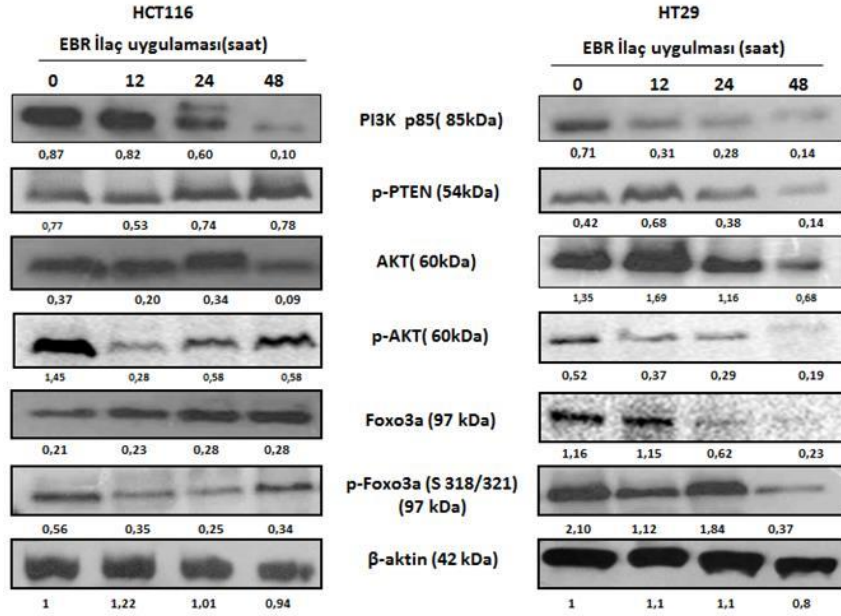


Şekil 4. 17. EBR uygulamasının MAPK ailesi proteinlerinin anlatımındaki etkileri.

PI3K/AKT sinyal yolağı aktivasyonu kanser hücrelerinin önemli sağkalım mekanizmalarından biridir. EBR uygulamasının bu yolakta PI3K'in p85 düzenleyici ünitesinin üzerindeki etkisi araştırıldığında, HCT 116 kolon kanseri hücrelerinde özellikle 48 saatte kayda değer bir azalma görülürken HT 29 hücre hattında ise 12 saatlik EBR uygulamasıyla beraber azalmaya başladığı ve zamana bağlı olarak azalmanın devam ettiği belirlenmiştir (Şekil 4.18). Bu yolak üzerinde tümör baskılayıcı olarak görev yapan PTEN proteininin fosforlanarak inaktif olması HCT 116 hücre hattında zamana bağlı olarak artarken, HT 29 hücre hattında ise EBR'nin zıt etki yaparak PTEN fosforlanmasını özellikle 48 saatte azalttığı saptanmıştır (Şekil 4.18).

PI3K aktivasyonunun alt basamağında yer alan AKT proteininin anlatımı ise EBR uygulanan her iki hücre hattında da 48 saatte azaldığı, bu azalışın HT 29 hücre hattında daha belirgin olduğu ortaya konmuştur. AKT proteinin fosforlanmış formu araştırıldığında ise HCT 116 hücre hattında zamana bağlı EBR uygulaması ile fosforile AKT proteininin azaldığı, HT 29 hücre hattında da özellikle 48 saatte anlamlı bir şekilde azaldığı görülmüştür.

Hücre sağkalımını düzenleyen FOXO3a transkripsiyon faktörünün EBR uygulaması sonucu anlatımındaki değişiklikler araştırıldığında ise, HCT 116 hücre hattında zamana bağlı olarak EBR uygulaması ile FOXO3a anlatımının arttığı, fosforlanmış formunda ise zamana bağlı azalış olduğu saptanmıştır. HT 29 kolon kanseri hücre hattında ise FOXO3a transkripsiyon faktörünün 24 saat EBR uygulaması sonucu anlatımının azalmaya başladığı 48 saatte hemen hemen yok olduğu görülmüştür. HT 29 hücre hattında FOXO3a'nın fosforlanmış formunun ise 48 saatte anlamlı bir biçimde azaldığı görülmüştür (Şekil 4.18).



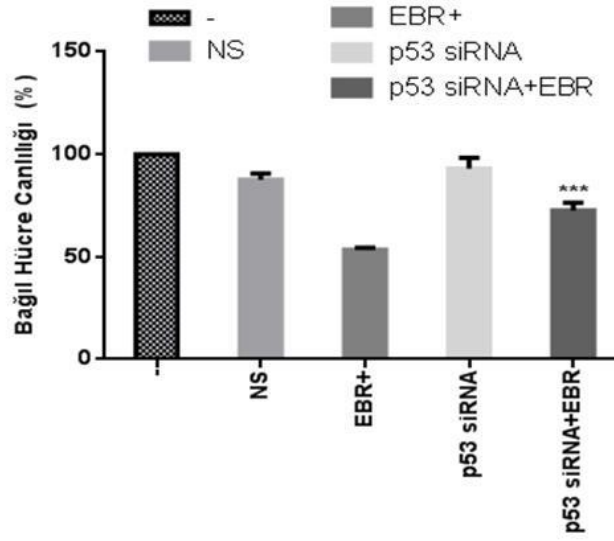
Şekil 4. 18. EBR uygulanan hücrelerde PI3K/AKT sinyal yolağının ve FOXO3a transkripsiyon faktörünün anlatımındaki değişikliklerin gösterilmesi.

4.5. HCT 116 ve HT 29 HÜCRE HATLARINDA EPİBRASSİNOLİDLE TETİKLENEN APOPTOZDA p53'ÜN ROLÜ

p53 proteini hücre döngüsünün düzenlenmesi, hücrelerin apoptoza yönlendirilmesinde kanser hücrelerinde önemli bir rol oynamaktadır. HCT 116 ve HT 29 hücre hatları arasındaki farklılıklardan bir tanesi de HT 29 hücre hattında p53 proteinin 273. kodonundaki arjininin mutasyona uğrayarak histidine (R273H) dönüşmüş olmasıdır. Bu nedenle EBR ile tetiklenen hücre ölümünde, p53'ün nasıl bir rol oynadığı bu araştırmada aydınlatılmaya çalışılmıştır.

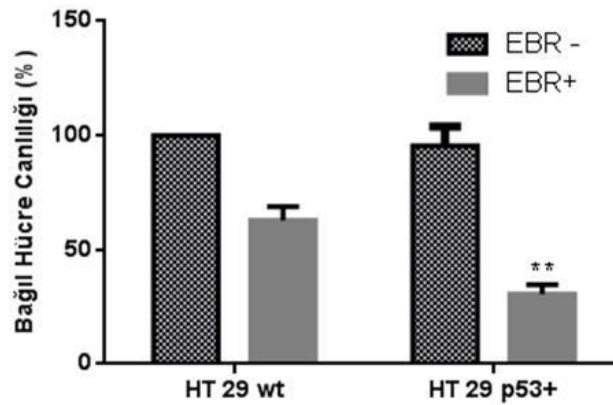
p53 proteini açısından yabancı tipte olan olan HCT 116 hücre hattı p53'e özgü siRNA kullanılarak susturulmuştur ve EBR'nin etkilerine bakılmıştır. Diğer taraftan p53 mutant olan HT 29 hücre hattına ise plazmid aktarımı yolu ile yabancı tipte p53 anlatımı yaptırılarak p53'ün EBR ile tetiklenen apoptozdaki olası rolleri araştırılmıştır. p53 siRNA ile beraber EBR

uygulanan HCT 116 hücre hattında hücre canlılığı kaybının engellendiği şekil 4.19 açıkça görülmektedir.



Şekil 4. 19. HCT 116 hücre hattında p53 siRNA uygulaması sonucu EBR'nin etkisinin gösterilmesi. *** p< 0,001

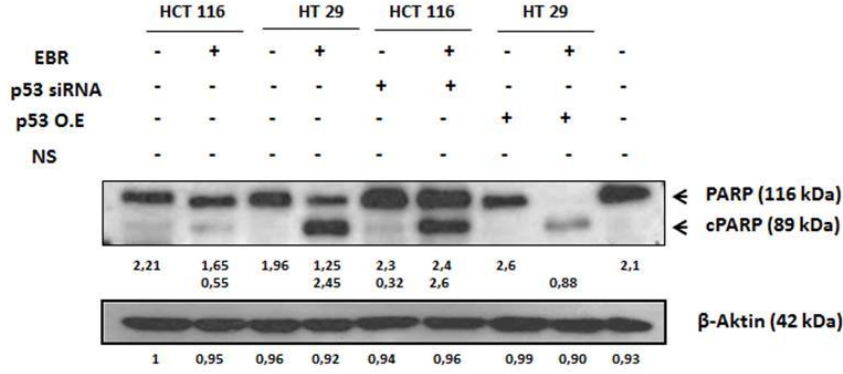
Bununla birlikte p53 proteini mutant olan HT 29 hücre hattında ise p53 anlatımının arttığı ve EBR'nin 48 saat boyunca hücrelerde meydana getirdiği hücre canlılığı kaybına etkisinin arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.20).



Şekil 4. 20. HT 29 hücre hattında p53 overekspresyon sonucu EBR etkisinin gösterilmesi. ** p< 0,01

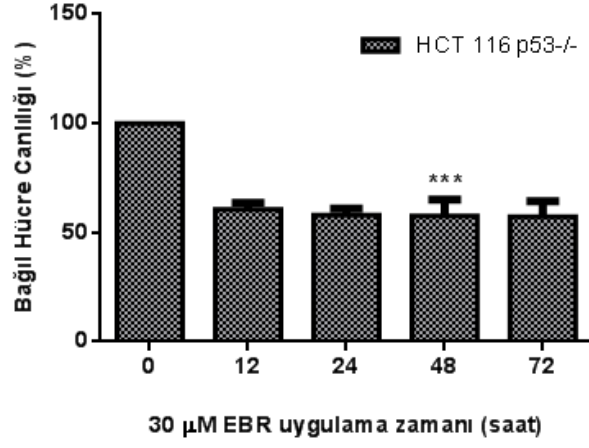
HCT 116 hücre hattında p53 proteinin susturulması ve HT 29 hücre hattında ise overekspresyonunun yapılması sonucunda EBR uygulamasının apoptotik yolaktaki etkisinin belirlenmesi için PARP kesilimi incelenmiştir. HCT 116 hücre hattında sadece p53 siRNA uygulaması PARP kesimine sebep olmazken p53 siRNA ve EBR uygulaması PARP

kesilimine sebep olmuş ve bu etkinin sadece EBR uygulamasına göre arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.21). HT 29 hücre hattında ise p53 anlatımının artırıldığı hücrelerde EBR uygulaması ile birlikte sadece EBR ile tetiklenen PARP kesiliminin değişmediği gözlenmektedir (Şekil 4.21).



Şekil 4. 21. p53 siRNA uygulanmış HCT 116 ve p53 overeksprese edilmiş HT 29 hücre hatlarında EBR'nin PARP kesimi üzerindeki etkisi.

EBR'nin p53 üzerindeki etkisinin daha iyi anlaşılması amacıyla HCT 116 p53 ^{-/-} hücrelerde EBR'nin zamana bağlı olarak hücre canlılığına etkisi araştırılmıştır. Zamana bağlı olarak EBR uygulandığında 12 saatten itibaren hücre canlılığının % 60 oranına azaldığı ve artan zaman göre hücre canlılığındaki bu azalmanın değişmediği tespit edilmiştir. Hücre sağkalım analiziyle de HCT 116 p53 ^{-/-} hücrelerde EBR'nin hücre büyümesini durdurduğu ve sitostatik etki yarattığı görülmüştür (Şekil 4.22).



Şekil 4. 22. HCT 116 p53 -/- hücre hatlarında EBR'nin zamana bağlı olarak hücre canlılığına ve sağkalımına etkisinin gösterilmesi. *** p< 0,001

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kolon kanserleri batı ülkelerinde en sık görülen kanser tiplerinden biridir ve coğrafi bölgelere, çevresel koşullara göre farklılık göstermektedir. Yağ bakımından zengin ve lif oranı düşük diyet de kanser gelişimini tetikleyen etkenlerdendir. Bu nedenle endüstrileşmiş ülkelerde kolon kanseri oranı gelişmekte olan ülkelere göre daha fazladır (122). Bununla birlikte, kolon kanseri gelişim süreci genetik faktörlerle de tetiklenmektedir. Kolon kanseri teşhisi konulan hastaların % 30-35'inde kalıtımın rol oynadığı düşünülmektedir (123).

Kolon kanseri tedavi stratejileri genellikle hücrelerinin çoğalmasına neden olan hücre sağkalım mekanizmalarının baskılanması, hücre ölümünü tetikleyen hücre ölüm sinyal mekanizmalarının aktifleştirilmesi gibi moleküler mekanizmaları hedef almaktadır. Bu nedenle çeşitli kemoterapötik ajanların hücre içi moleküler mekanizmalarının belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Karşılaşılan en büyük güçlüklerden biri kanser hücreleri tarafından geliştirilen ilaçlara direnç mekanizması ve ilaçların bireylerde meydana getirdiği istenmeyen yan etkilerdir. Bu kapsamda, hem başlangıç evresinde hem de agresif tümörlerin ortadan kaldırılmasında kullanılabilecek ayrıca bireye yan etkisi aza indirgenmiş kemoterapötik ajanların geliştirilmesi için çalışılmaktadır.

Son yıllarda kanser hücrelerinde, normal dokulara göre artan metabolizmaları ile dikkat çeken PA'ların terapötik bir hedef olabilecekleri üzerinde durulmaktadır (71). Ökaryotik canlılarda yaygın olarak bulunan bu alifatik katyon ailesi üyeleri (Put, Spd ve Spm) hücre büyümesi, çoğalması ve farklılaşması gibi önemli olaylarda rol almaktadırlar (124). Kanserli dokuların sağlıklı dokulara oranla daha fazla miktarda PA içerdikleri, aynı zamanda PA metabolizma enzimi olan ODC'nin de fazla anlatımını gerçekleştirdikleri birçok çalışma ile ortaya konulmuştur (4,125). Bu nedenle PA biyosentezi inhibitörü DFMO çeşitli kanser türlerinde *in vitro* ortamlarda denenmiş ve umut vaat eden sonuçlar alınmıştır (126). Bununla birlikte *in vivo* denemelerde yüksek toksisite problemleri ile karşılaşılmış ve sadece çocukluk çağı kanserlerinde etkisi çeşitli faz denemelerinden geçebilmiştir (127). PA biyosentez inhibitörü

DFMO'nun sınırlı bir kapasite ile sadece belirli kanser türlerine etki ettiğinin gösterilmesi (128,129) ve aynı zamanda biyosentez yolağının kesilmesinin kanser hücrelerine dışardan PA alınımını etkilemediği, diyet ya da bakteriyal flora kökenli PA'ların kanser hücrelerine alınabildiği PA'lar ile ilgili yeni stratejilerin geliştirilmesini tetiklemiştir (130). Son dönemde yapılan çalışmalar çeşitli ajanlarla PA katabolizmasının tetiklenmesi ve hücre içi PA seviyelerinin azaltılması yönündedir (131). PA katabolizma enzimlerinin tetiklenmesiyle hücrede PA seviyelerinde azalış meydana geldiği gibi, SSAT tarafından asetillenmiş PA'ların PAO ile oksidasyonları ya da Spm'nin SMO ile doğrudan oksidasyonu sırasında toksik maddelerin açığa çıkması da tetiklenmektedir (132). Açığa çıkan H₂O₂ ve aldehitlerin kanser hücrelerinde apoptotik ölümü tetiklediğine ilişkin birçok çalışma bulunmaktadır (133).

PA katabolik enzimlerinin aktivasyonunu hedef alan ajanlar arasında DENSpm gibi PA analogları gösterilmiştir. Hürelere DENSpm uygulanması sonucu PA homeostazının bozulmasıyla katabolik yolak enzimlerinden SSAT'nin arttığı gözlemlenmiştir (134). SSAT'nin, DNA kırıkları meydana getiren platin türevli kemoterapötik ajanlardan oksaliplatin ve sisplatin tarafından en fazla tetiklenen genlerden biri olduğu tespit edilmiştir (135). Babbar ve Gerner (136) sulindak sülfonun kolon kanser hücresi olan Caco-2 hücre hattında SSAT aktivitesinin 4 kat artırdığını tespit etmişlerdir. Yapılan çalışmalar sonucu SSAT'nin kolon kanserinde kemoterapötik ajanlara karşı verilen cevap mekanizmasında önemli bir biyobelirteç olduğu gösterilmiştir (137). Bununla birlikte PA katabolizmasını tetikleyen ajanlar yüksek yan etkilere sahip ve PKa'ya spesifik ajanları oluşturmamaktadırlar. Bu kapsamda özellikle androjen bağımlı ve bağımsız hücreleri içeren heterojen tümörler için PA'ları da hedef alarak hücreleri apoptotik ölüme götüreceği aynı zamanda normal dokulara zarar vermeyen ajanların keşfine ve moleküler mekanizmalarının aydınlatılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

EBR, bitkilerde büyüme ve farklılaşmayı teşvik eden ve memelilerdeki steroid hormonlara benzerlik gösteren brassinosteroid ailesi üyesidir. Bitkilerde iyi tanımlanmış rolleri ve sinyal mekanizması haricinde memelilerdeki etkisi ilk kez 2008 yılında Malikova ve ark. (17) tarafından saptanmıştır. Bu çalışmada EBR'nin çeşitli kanser hücrelerinde hücre canlılığına olan etkilerini ortaya konmuştur. Bu çalışmayı takiben, 2010 yılında Steigerova ve ark. (18) EBR'nin meme kanseri üzerinde etkisini araştırmış ve EBR'nin hücre döngüsüne etki ederek hücre çoğalmasına etki ettiğini ve apoptoz mekanizmasını aktive ettiğini öne sürmüşlerdir.

Steigerova ve ark. (18) aynı zamanda 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 ve EBR'nin steroid reseptörlerini bloke ederek bir transkripsiyon faktörü gibi davranmalarına ket vurabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bununla birlikte Obakan ve ark. 2013 yılında EBR'nin hem steroid reseptörü AR anlatımı yapan LNCaP, hem de yapmayan DU145 hücre hatlarında apoptotik etkisini göstermişler ve PA katabolizmasının EBR için önemli bir moleküler hedef olduğunu ortaya koymuşlardır (3)

Bu noktadan yola çıkarak bu çalışmada amaç, çoğalmaları birincil olarak steroid reseptörleri ile tetiklenmeyen HC T116 ve HT 29 hücre hatlarında EBR'nin potansiyel apoptotik etkisinin PA metabolizması ile ilişkili olarak aydınlatılması ve aynı zamanda EBR'nin hücre sağkalım mekanizmalarındaki etkisini belirlemektir. Bununla birlikte seçilen hücre hatlarından HCT 116 ve HT 29 hücre hatlarında bazal seviyesi az olmakla beraber, androgen reseptörü ve estrogen reseptörü β anlatımı olduğu bilinmektedir (138) . Fakat HT 29 hücre hattında p53 proteini mutasyona (R273H) uğramıştır (138).

Bu çalışmada elde edilen bulgulara göre, EBR, her iki hücre hattında doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılığına etki ederek azalmaya sebep olmuştur. HCT 116 hücrelerinde 48 saat süre ile 30 μ M EBR uygulamasının ardından % 50 oranında canlılık görülürken, HT 29 hücre hattında ise bu oran % 66 olarak saptanmıştır. EBR uygulaması aynı zamanda HCT 116 ve HT 29 hücre hatlarında zamana bağlı olarak hücre sağkalımına da etki etmektedir. HCT 116 hücrelerinde 24 saat EBR uygulaması hücre büyümesini durdururken 48 ve 72 saatte sitotoksik etki yaratmış ve hücre çoğalmasını negatif yönde etkilediği belirlenmiştir. HT 29 hücre hattında ise EBR uygulaması 24 saatten itibaren sitotoksik bir etki yaratarak hücre çoğalmasına ket vurmaktadır (Şekil 4.1-3). EBR uygulaması sonucu görülen hücre canlılığındaki azalmanın apoptotik mekanizmanın aktivasyonu ile ilgili olup olmadığı da bu araştırmada ele alınmıştır. EBR ile tetiklenen hücre canlılığı kaybının apoptotik hücre ölümünden dolayı kaynaklanıp kaynaklanmadığını belirlemek amacıyla önce 24 ve 48 saatlerde mitokondri membran potansiyelindeki ($\Delta\psi_m$) bozulma floresan mikroskobu ile belirlenmiştir (Şekil 4.4). $\Delta\psi_m$ kaybı, mitokondri çift zarı arasında bulunan, elektron transport zinciri üyesi olan sitorom c'nin sitoplazmaya salınımını sağlamaktadır. Mitokondriyel yolağın aktive olması ile sitoplazmaya salınan sitokrom c, kaspaz aktivasyonunun tetiklenmesine

neden olmaktadır (82). EBR uygulanmış HCT 116 ve HT 29 hücre hattında başlatıcı ve etkili kaspazların aktivasyonuna neden olarak kaspazların hedefi olan PARP'ın kesimine neden olduğu gözlemlenmiştir. EBR'nin kaspaz bağımlı ve mitokondri bağımlı intrinsik yolak ile apoptozu tetiklediği tespit edilmiştir (Şekil 4.7). Aynı zamanda HCT 116 ve HT 29 hücre hatlarında DNA kırıklarına neden olduğu hem DAPI boyama ile floresan mikroskopunda, hem de agaroz jelde DNA kırıklarının gözlemlenmesi ile belirlenmiştir. Her iki hücre hattında steroid anlatımının bulunması EBR'nin etkisini arttırmış olabileceği düşünülmüştür. Benzer şekilde Steigerova ve ark. (18) EBR'nin meme kanseri hücrelerinde kaspaz-bağımlı apoptozu tetikleyici etkisini göstermişler aynı zamanda, ER anlatımı bulunan MCF-7 hücrelerinde daha etkili olduğu da ileri sürülmüştür. Aynı şekilde Obakan ve ark. Da (3) AR anlatımı yapan LNCaP hücrelerinde EBR'nin, AR anlatımı bulunmayan DU145 hücrelerine göre apoptozu tetiklemede daha etkili olduğunu ama buna rağmen her iki hücre hattında da etkin bir şekilde apoptotik hücre ölümü saptamışlardır. EBR'nin yanı sıra brassinosteroid türevlerinden homokastasteronda aynı şekilde MCF-7 hücrelerinde apoptozu tetiklemede etkili olmuştur. Benzer şekilde, bu çalışmada da prostat kanseri hücre hatlarından AR (+) LNCaP hücre hattında EBR, apoptozu tetiklemekte daha etkili olduğu ortaya koyulmuştur (17).

Bu verilere ek olarak, 48 saat EBR uygulamasının HCT 116 hücre hattında kaspaz-8 kesilimine neden olması fakat, HT 29 hücre hattında aynı etkinin görülmemiş olması HCT 116 hücrelerinde EBR'nin ekstrinsik apoptotik yolağı da aktive ettiği ve buna bağlı olarak bu hücrelerde daha fazla apoptotik etki görülmesini açıklamaktadır (Şekil 4.8). Literatürde EBR'nin kolon kanserlerinde etkisi bilinmemekle beraber, steroid hormon ekspresyonu bulunmayan yapılan diğer çalışmalarda DU145 prostat ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde ekstrinsik yolağın aktive olduğu (3) görülmüştür (18). Bu sonuçlardan yola çıkarak EBR'nin HCT 116 hücrelerinde her iki yolağında aktive edildiği ilk kez gösterilmiş olmaktadır.

EBR'nin apoptotik yolaktaki etkilerini açık bir şekilde ortaya koyabilmek için pro- ve anti-apoptotik protein düzeylerindeki değişimler incelenmiştir. Apoptozun indüklenmesinde anahtar rol oynayan Bcl-2 ailesi üyeleri Bax ve Bak proteinlerinin anlatımlarının 48 saatlik EBR uygulaması sonucu HCT 116 hücre hattında arttığı belirlenmiştir, HT 29 hücre hattında ise Bak anlatımı artarken Bax anlatımında bir değişiklik gözlenmemiştir. Diğer pro-apoptotik proteinler Puma, Bim anlatımı her iki hücre hattında da artış göstermiştir. Apoptotik ölümün

baskılanmasında rol oynayan anti-apoptotik proteinlerin EBR uygulaması sonucu anlatımlarındaki değişiklikler incelendiğinde; HCT 116 hücre hattında Mcl-1 proteinin 48 saatte yıkıldığı ancak HT 29 hücre hattında değişmediği, Bcl-x_L proteinin anlatımında ise sadece HT 29 hücre hattında azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.9). Bu sonuçlar ile beraber EBR'nin farklı kolon kanseri hücrelerinde Bcl-2 ailesi üyelerinin anlatımları üzerine farklı etkiler gösterdiği saptanmıştır. Benzer şekilde Obakan ve ark. (3) ile Steigerova ve ark. da (18) EBR'nin farklı hücrelerde farklı Bcl-2 ailesinin rol oynadıklarını göstermişlerdir.

PA'lar hücre çoğalmasında, DNA, RNA sentezinde önemli rol oynamaktadırlar . Hücrelerde aşırı sentezlenmeleri hücre büyümesine tetikleyerek kanser gelişimine neden olmaktadır. Bu nedenle hücre içi PA seviyelerinin azaltılmasına yönelik antikanser stratejiler son yıllarda önem kazanmıştır. Yapılan çalışmalarda cisplatin, doksorubisin gibi kemoterapötik ajanların hücre içi PA düzeyi, PA katabolizmasını aktive ederek azalttıkları gösterilmiştir. Aynı zamanda hücre içi PA seviyesi hücre sinyal mekanizmaları içinde kritik rol oynamaktadır. Bu nedenle geliştirilen kanser tedavilerinde PA katabolik yolağının aktive edilerek hücre büyümesinin engellenmesi yeni bir terapötik strateji olarak görülmektedir (139-142).

Bu araştırmada EBR'nin apoptotik etkisinin PA metabolizması ile olan ilişkisi de HCT 116 ve HT 29 hücre hatlarında incelenmiştir. Elde edilen bulgular, HCT 116 hücre hattında 48 saat EBR uygulanmasının hücre içi Put, Spd ve Spm seviyelerinin azalttığı, HT 29 hücre hattında ise Spd ve Spm seviyelerini azaltırken Put seviyesinde artışa neden olduğunu ortaya koymuştur. PA'ların hücre içindeki düzeylerindeki bu değişimleri anlamak amacıyla EBR uygulaması sonrası PA metabolizmasında rol oynayan proteinlerin anlatımlarındaki değişimler araştırılmıştır. PA biyosentezinde yer alan ODC enziminin HCT 116 ve HT 29 hücre hatlarında EBR uygulamasıyla zamana bağlı olarak anlatımının azaldığı görülmüştür. ODC'nin düzenlenmesinde kritik rol oynayan AZI anlatımında 48 saat EBR uygulamasıyla azalma olduğu belirlenmiştir. Ancak, HT 29 hücre hattında AZI protein düzeyi 12 saatten sonra azalırken 48. saatte tekrar artış göstermektedir (Şekil 4.10). Put seviyelerinin bu hücre hattında azalması bu bulgu ile ilişkilendirilmiştir. AZI'nın aynı zamanda hücre dışından içeri PA taşınmasında AZ OAZ ile birlikte taşındığı düşünöldüğünde, EBR uygulaması ile birlikte PA'ların farklı cevapları, ODC düzenlenmesi ve PA taşınması ile ilgili olabileceğini göstermektedir. Benzer bulgu Obakan ve ark. (3) tarafından DU145 hücre hattında da elde

edilmiştir. Bu araştımcılar., EBR'nin farklı prostat kanseri hücrelerinde PA biyosentezinde ve seviyelerinde farklı etkiler yarattığını göstermişlerdir.

Hücre içi PA düzeyindeki bu değişiklikler PA katabolizmasında görev alan enzimlerin protein anlatımının artması ile de ilgilidir. EBR uygulaması HCT 116 ve HT 29 hücre hatlarında SSAT anlatımının artmasına neden olmuştur. PAO anlatımı ise HCT 116 hücrelerinde zamana bağlı olarak artış gösterirken HT 29 hücre hattında özellikle 48 saatte artış göstermiştir ve böylece hücre içi PA seviyesinde azalış meydana gelmiştir (Şekil 4.11). Başka kemoterapötik ajanların da SSAT' anlatımını uyardığı kolon kanseri hücre hatlarında saptanmıştır (137). PAO anlatımındaki artış ise daha önce Deveureux ve ark. (143) tarafından akciğer tümör hücre hatlarında gözlemlenmiştir. PAO ve SMO gibi PA oksidazların katalizledikleri reaksiyonlar sonucu H₂O₂ ve aldehitler gibi toksik yan ürünlerin açığa çıktığı bilinmektedir (144). Bu ajanlar hücre içinde ROS oluşumunu ve apoptozu tetiklemektedirler. CDK inhibitörleri gibi kemoterapötik ilaçların CaCo-2 ve HCT 1116 kolon kanseri hücre hatlarında SSAT ve PAO'yu indükleyerek ROS oluşumunu tetikledikleri bilinmektedir (145,146).

EBR'nin PA katabolik yolağındaki etkilerini daha iyi anlamak amacıyla SSAT ve PAO enzimlerini anlatımı susturulmuş ve EBR'nin hücre canlılığı ve apoptoz üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Uygulanan siRNA konsatrasyonları her iki hücre hattında hücre canlılığında anlamlı bir azalışa neden olmazken, PAO siRNA uygulaması, EBR'nin neden olduğu hücre canlılığı kaybını engellemiştir. Bununla birlikte SSAT siRNA uygulanan HCT 116 hücre hatlarında EBR'nin hücre canlılığı kaybına olan etkisinin engellendiği, HT 29 hücre hattında ise bir değişikliğe neden olmadığı belirlenmiştir. EBR'nin PA katabolizması ile etkileşimini saptayabilmek amacıyla PARP kesilimi araştırılmış her iki hücre hattı için de SSAT ve PAO siRNA uygulamasıyla PARP kesiminin azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.13-14). Bu bulgular PA katabolizmasının EBR ile tetiklenen apoptozda rol oynadığının bir göstergesidir. EBR'nin PA katabolizmasına bağlı olarak apoptozu tetiklediği benzer şekilde LNCaP prostat kanseri ile yapılan araştırmalarda gösterilmiştir. LNCaP hücrelerinde SSAT ve PAO susturulmasının EBR'nin etkisini indirgediği saptanmıştır (3).

Araştırmanın bir sonraki aşamasında EBR'nin hücre sağkalım yolaklarında görev alan proteinlerle olan ilişkisi incelenmiştir. Mitojen-aktive edici protein kinazlar (MAPK), p38 MAPK ailesi, ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz (ERK) ailesi ve c-Jun NH₂ termial kinaz

(JNK) ailesi olma üzere 3' e ayrılmakta ve memeli hücrelerinde sinyal iletim kaskadı oluşturarak çoğalma, farklılaşma ve apoptozun düzenlenmesinde görev almaktadırlar. EBR'nin MAPK yolağı üzerindeki etkileri araştırıldığında, HCT 116 hücre hattında p38, SAPK/JNK ve ERK1/2 anlatımlarının yanı sıra c-Raf, c-Myc, c-Fos gibi MAPK ailesinin etkileşimde olduğu transkripsiyon faktörlerinin anlatımları da zamana bağlı EBR uygulaması ile artmaktadır. Ancak HT 29 hücre hattında 12 saat EBR uygulamasını takiben bu proteinlerin anlatımları azalmaktadır (Şekil 4.16-17). Benzer olarak, meme kanserinde tamoksifen ya da tiroid karsinoma hücrelerinde resveratrol gibi farklı kemoterapötik ilaçların MAPK aktivasyonu ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir (147). EBR'nin iki hücre hattı için MAPK yolağında farklı etkiler oluşturması hücrelerde HCT 116 hücrelerinin yabancı tip p53 anlatımı yapmasından, HT 29 hücrelerinde ise p53 anlatımının inaktif olmasından kaynaklanabilmektedir. Ras/C-raf/MAPK sinyal kaskadı p53'ün transkripsiyonel aktivitesi sonucu aktive etmesi olasıdır. Bunun yanı sıra MAPK sinyal yolağı aynı zamanda stres ile de tetiklenerek AP-1, c-Myc gibi transkripsiyon faktörlerinin anlatımının sağlanmasına ve bunlara bağlı olarak çeşitli tümör baskılayıcı proteinlerin anlatımlarına yol açmaktadırlar (147).

Bu araştırma kapsamında ayrıca EBR uygulamasının hücre sağkalım sinyal yollarından PI3K/AKT ve hedef proteinlerinden biri olan FOXO3a transkripsiyon faktörünün anlatımındaki değişiklikler de incelenmiştir. Her iki kolon kanseri hücre hattında da EBR uygulamasıyla beraber PI3K p85, fosforlanmış AKT'nin anlatımlarında azalma gözlemlenmiştir. Tümör hücrelerinin sağkalımında PI3K aktivitesini inhibe eden PTEN ise fosforlandığında aktivitesini kaybetmektedir (148). Normal hücrelerde ise PTEN kontrolsüz çoğalma sinyali alan hücrenin sağkalımını engellemek için Bcl-2 ailesi üyelerinden pro-apoptotik Bad, kaspaz ailesinden kaspaz-9 gibi proteinleri aktive ederek hücrelerin apoptozu gitmesini sağlamaktadır (149). Fosforlanmış PTEN ise PI3K'i inhibe ederek hücre sağkalım yolağını indirgemektedir. Fosforlanmış PTEN anlatımı HCT 116 hücrelerinde zamana bağlı EBR uygulaması ile artarken, HT 29 hücre hattında 12 saat EBR uygulamasıyla artan pPTEN anlatımı zamana bağlı olarak azalmaktadır (Şekil 4.18).

AKT fosforlanması apoptotik cevabın oluşmasında görevli bir başka protein olan FOXO3a'nın nukleusa göçünü inhibe etmektedir. FOXO3a, Bim, Puma gibi pro-apoptotik proteinlerin anlatımını düzenleyen bir transkripsiyon faktörü olması nedeni ile, araştırma

kapsamında EBR uygulaması sonrası FOXO3a'nın anlatımındaki değişimler belirlenmiştir. HCT 116 hücre hattında zamana bağlı EBR uygulaması ile FOXO3a anlatımının arttığı, fosforlanmış formunda ise zamana bağlı azalış olduğu tespit edilmiştir. HT 29 hücre hattında ise EBR'nin, FOXO3a anlatımını 24 saat uygulama sonrasında azaltmaya başladığını, 48 saatte neredeyse tamamıyla yok olduğu, fosforlanmış formunun ise 48 saatte anlamlı bir biçimde azaldığı görülmüştür. PI3K/AKT yolağından sinyal gelmediği durumunda FOXO3a fosforlanmamakta ve böylece transkripsiyon faktörü olarak nukleusa göç etmekte ve hedef genlerinden biri olan pro-apoptotik Bim proteininin transkripsiyonunu başlatmaktadır. Eğer sinyal doğrultusunda fosforlanırsa nukleusa göç etmemekte ve apoptozda fonksiyonel olmamaktadır. Bu noktadan yola çıkarak HCT 116 hücre hattında azalan PI3K sinyali ile FOXO3a anlatımı artmış, fosforlanmış formu ise azalmış yani nukleusta tutulumu gerçekteşmeyerek nukleusa Bim proteininin anlatımını arttırmıştır. Bununla beraber HT 29 hücre hattında ise yine fosforlanmış FOXO3a anlatımı azalmaktadır. Bu sonuçlardan yola çıkarak EBR uygulaması sonucu her iki hücre hattında artan Bim izoformları defosforilasyonla aktif hale geçen FOXO3a düzeyi ile ilişkilidir sonucuna varılabilir. Benzer şekilde sisplatin, selenyum gibi pek çok kemoterapötik ajanın kolon kanseri hücrelerinde apoptozu Bim üzerinden düzenlediği bilinmektedir (150).

Hücre büyümesinin düzenlenmesinde önemli role sahip olan ve genellikle kanser hücrelerinde mutasyona uğrayarak hücrelerde onkogenik etki gösteren p53 proteini üzerinde EBR'nin etkisinin anlaşılması için yabancı tipteki HCT 116 hücrelerinde p53, p53'e özgü siRNA ile susturulmuş ve mutant olan HT 29 hücrelerinde ise p53 plazmidi aktarımı yolu ile arttırılarak incelenmiştir. 48 saat EBR uygulaması ile gözlemlenen hücre canlılığı kaybı ve PARP kesiliminin HCT 116 hücrelerinde p53 susturulduğunda engellendiği, HT 29 hücre hattında ise p53 varlığında EBR etkisinin arttığı bulunmuştur (Şekil 4.21). Bu sonuçlardan yola çıkarak, HCT 116 ve HT 29 hücre hatlarında EBR'nin p53'ten bağımsız bir şekilde apoptozu tetiklediği çıkarılabilir.

Bulara ek olarak HCT 116 p53 -/- hücrelerde EBR etkisi araştırılmıştır. Zamana bağlı olarak EBR uygulanan hücrelerde 12 saatten itibaren beraber hücre canlılığının azaldığı ve bu azalmanın zamanla değişmediği görülmüş ve sağkalım analizi ile EBR'nin HCT 116 p53 -/- hücre büyümesi üzerinde sitostatik etki yarattığı saptanmıştır (Şekil 4.22). Daha önce EBR'nin p53 üzerindeki etkisi prostat kanser hücre hattı LNCaP ve DU145 hücrelerinde

araştırılmıştır. Bu çalışma doğrultusunda yabancı tip olan LNCaP hücresinde EBR uygulaması p53 seviyesini artırıp p53 düzenleyicisi Mdm2 protein seviyesinde azalış gözlemiş, mutant olan DU145 hücre hattında ise bir değişikliğe sebep olmadığı gösterilmiştir (3). Yapılan bu araştırmalar doğrultusunda EBR'nin p53' den bağımsız olarak apoptozu tetiklediği saptanmıştır. Benzer şekilde rapamisin, brefeldin, 5-FU gibi kemoterapötik ajanların p53 bağımsız olarak farklı kanser hücrelerinde apoptozu tetikledikleri bilinmektedir (151,152).

Sonuç olarak, bu araştırma kapsamında elde edilen bulgulara göre: EBR, HCT 116 ve HT 29 hücrelerinde apoptozu tetiklemektedir. Literatürde ilk defa EBR ile tetiklenen mitokondri ve kaspaz bağımlı apoptoz kolon kanseri hücre hatlarında detaylı bir şekilde aydınlatılmıştır. Aynı zamanda her iki hücre hattında da farklı Bcl-2 ailesi üyeleri EBR'ye karşı cevap oluşturmuştur. Ayrıca, EBR'nin PA biyosentez ve katabolizması ile ilişkili olarak kolon kanseri hücre hatlarında apoptozu tetiklediği literatürde ilk defa gösterilmiştir. HCT 116 ve HT 29 hücrelerinde yapılan SSAT ve PAO gen susturma yöntemi ve katabolik enzimlere özgü inhibitörler ile aktivite engellenmesi durumlarında, EBR ile tetiklenen hücre canlılığı kaybı, apoptoz ve ROS üretimindeki artışın gözlemlenmediği saptanmıştır. Bu sonuçlar EBR'nin kolon kanseri hücrelerinde PA metabolizması ile ilişkili olarak apoptotik cevabın oluştuğunu göstermektedir. Ayrıca, literatürde ilk kez EBR'nin hücre sağkalım sinyal yolları ile etkileşiminde araştırılmış, MAPK yolağının aktif olduğu ve PA metabolizmasında görevli ODC'nin transkripsiyon faktörü olan c-Myc'in EBR uygulaması ile indirgeniği gösterilmiştir. Tümör hücrelerinde sağkalımı tetikleyen PI3K/AKT gibi proteinlerin anlatımlarının ise kolon kanseri hücrelerinde EBR ile azaldığı ve FOXO3a transkripsiyon faktörü etkinliğinde Bim pro-apoptotik proteininin her üç izoformunun EBR uygulaması ile arttığı tespit edilmiştir. Son olarak hem p53'e özgü siRNA ve p53 plazmid aktarımı yolları ile sırasıyla HCT 116 ve HT 29 hücrelerinde EBR ile p53 etkileşimi araştırıldığında ve EBR'nin p53 e bağımsız olarak kolon kanseri hücrelerinde apoptozu tetiklediği belirlenmiştir.

Elde edilen tüm bu bilgiler, EBR ile ilgili mevcut literatürü doğruladığı gibi, aynı zamanda apoptotik mekanizmanın aydınlatılması ve PA metabolizması, hücre sağkalım yolları ve p53 ile olan ilişkisi bakımından bir ilk olma niteliği taşımaktadır. Ayrıca bu araştırmaya gelecekte yapılacak olan çalışmalar için EBR'nin terapötik etkinliği açısından bir temel oluşturma niteliği taşımaktadır.

REFERANSLAR

1. Siegel, R., Ma, J., Zou, Z. and Jemal, A. (2014) Cancer Statistics, 2014. *CA: a cancer journal for clinicians*.
2. Tabor, C.W. and Tabor, H. (1984) Polyamines. *Annual review of biochemistry*, **53**, 749-790.
3. Obakan, P., Arisan, E.D., Calcabrini, A., Agostinelli, E., Bolkent, S. and Palavan-Unsal, N. (2013) Activation of polyamine catabolic enzymes involved in diverse responses against epibrassinolide-induced apoptosis in LNCaP and DU145 prostate cancer cell lines. *Amino acids*.
4. Young, L., Salomon, R., Au, W., Allan, C., Russell, P. and Dong, Q. (2006) Ornithine decarboxylase (ODC) expression pattern in human prostate tissues and ODC transgenic mice. *J Histochem Cytochem*, **54**, 223-229.
5. Mitchell, M.F., Tortolero-Luna, G., Lee, J.J., Hittelman, W.K., Lotan, R., Wharton, J.T., Hong, W.K. and Nishioka, K. (1997) Polyamine measurements in the uterine cervix. *J Cell Biochem Suppl*, **28-29**, 125-132.
6. Yasumoto, K. (1993) [Ornithine decarboxylase (ODC) activity in the mucosa of human remnant stomach, and the clinical significance on tumor promotion]. *Nihon Geka Gakkai zasshi*, **94**, 1000-1007.
7. Sjöholm, A. and Berggren, P.O. (1993) [Polyamines in health and disease]. *Lakartidningen*, **90**, 1651-1654.
8. Tanaka, T., Kojima, T., Hara, A., Sawada, H. and Mori, H. (1993) Chemoprevention of oral carcinogenesis by DL-alpha-difluoromethylornithine, an ornithine decarboxylase inhibitor: dose-dependent reduction in 4-nitroquinoline 1-oxide-induced tongue neoplasms in rats. *Cancer research*, **53**, 772-776.
9. Cipolla, B., Guille, F., Moulinoux, J.P., Quemener, V., Staerman, F., Corbel, L. and Lobel, B. (1993) Polyamines and prostatic carcinoma: clinical and therapeutic implications. *European urology*, **24**, 124-131.
10. Krishnan, K., Campbell, S., Abdel-Rahman, F., Whaley, S. and Stone, W.L. (2003) Cancer chemoprevention drug targets. *Current drug targets*, **4**, 45-54.
11. Mirsalis, J.C. (1987) Genotoxicity, toxicity, and carcinogenicity of the antihistamine methapyrilene. *Mutation research*, **185**, 309-317.
12. Seiler, N. (1995) Polyamine oxidase, properties and functions. *Progress in brain research*, **106**, 333-344.
13. Pledge, A., Huang, Y., Hacker, A., Zhang, Z., Woster, P.M., Davidson, N.E. and Casero, R.A., Jr. (2005) Spermine oxidase SMO(PAOh1), Not N1-acetylpolyamine oxidase PAO, is the primary source of cytotoxic H₂O₂ in polyamine analogue-treated human breast cancer cell lines. *The Journal of biological chemistry*, **280**, 39843-39851.
14. Xu, H., Chaturvedi, R., Cheng, Y., Bussiere, F.I., Asim, M., Yao, M.D., Potosky, D., Meltzer, S.J., Rhee, J.G., Kim, S.S. *et al.* (2004) Spermine oxidation induced by *Helicobacter pylori* results in apoptosis and DNA damage: implications for gastric carcinogenesis. *Cancer research*, **64**, 8521-8525.
15. McCloskey, D.E., Yang, J., Woster, P.M., Davidson, N.E. and Casero, R.A., Jr. (1996) Polyamine analogue induction of programmed cell death in human lung tumor cells. *Clin Cancer Res*, **2**, 441-446.
16. Luk, G.D. and Casero, R.A., Jr. (1987) Polyamines in normal and cancer cells. *Advances in enzyme regulation*, **26**, 91-105.

17. Malikova, J., Swaczynova, J., Kolar, Z. and Strnad, M. (2008) Anticancer and antiproliferative activity of natural brassinosteroids. *Phytochemistry*, **69**, 418-426.
18. Steigerova, J., Oklestkova, J., Levkova, M., Rarova, L., Kolar, Z. and Strnad, M. (2010) Brassinosteroids cause cell cycle arrest and apoptosis of human breast cancer cells. *Chemico-biological interactions*, **188**, 487-496.
19. Decombel, L., Tirry, L. and Smagghe, G. (2005) Action of 24-epibrassinolide on a cell line of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *Archives of insect biochemistry and physiology*, **58**, 145-156.
20. Carange, J., Longpre, F., Daoust, B. and Martinoli, M.G. (2011) 24-Epibrassinolide, a Phytosterol from the Brassinosteroid Family, Protects Dopaminergic Cells against MPP-Induced Oxidative Stress and Apoptosis. *Journal of toxicology*, **2011**, 392859.
21. Steigerova, J., Rarova, L., Oklestkova, J., Krizova, K., Levkova, M., Svachova, M., Kolar, Z. and Strnad, M. (2012) Mechanisms of natural brassinosteroid-induced apoptosis of prostate cancer cells. *Food Chem Toxicol*, **50**, 4068-4076.
22. Staal, S.P. (1987) Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **84**, 5034-5037.
23. Blanc, A., Pandey, N.R. and Srivastava, A.K. (2004) Distinct roles of Ca²⁺, calmodulin, and protein kinase C in H₂O₂-induced activation of ERK1/2, p38 MAPK, and protein kinase B signaling in vascular smooth muscle cells. *Antioxidants & redox signaling*, **6**, 353-366.
24. Cosse, J.P., Ronvaux, M., Ninane, N., Raes, M.J. and Michiels, C. (2009) Hypoxia-induced decrease in p53 protein level and increase in c-jun DNA binding activity results in cancer cell resistance to etoposide. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, **11**, 976-986.
25. Greggio, E. and Singleton, A. (2007) Kinase signaling pathways as potential targets in the treatment of Parkinson's disease. *Expert review of proteomics*, **4**, 783-792.
26. Yang, L., Dan, H.C., Sun, M., Liu, Q., Sun, X.M., Feldman, R.I., Hamilton, A.D., Polokoff, M., Nicosia, S.V., Herlyn, M. *et al.* (2004) Akt/protein kinase B signaling inhibitor-2, a selective small molecule inhibitor of Akt signaling with antitumor activity in cancer cells overexpressing Akt. *Cancer research*, **64**, 4394-4399.
27. Majumder, P.K., Febbo, P.G., Bikoff, R., Berger, R., Xue, Q., McMahon, L.M., Manola, J., Brugarolas, J., McDonnell, T.J., Golub, T.R. *et al.* (2004) mTOR inhibition reverses Akt-dependent prostate intraepithelial neoplasia through regulation of apoptotic and HIF-1-dependent pathways. *Nature medicine*, **10**, 594-601.
28. Huang, H. and Tindall, D.J. (2006) FOXO factors: a matter of life and death. *Future oncology (London, England)*, **2**, 83-89.
29. Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J. and Thun, M.J. (2007) Cancer statistics, 2007. *CA: a cancer journal for clinicians*, **57**, 43-66.
30. Hagggar, F.A. and Boushey, R.P. (2009) Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clinics in colon and rectal surgery*, **22**, 191-197.
31. Parkin, D.M., Pisani, P. and Ferlay, J. (1999) Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*, **49**, 33-64, 31.
32. Wannasuntad, S., May, S. and Mock, J. (2003) The absence of cancer prevention for the Thai population in the U.S. *Asian American and Pacific Islander journal of health*, **10**, 108-113.
33. Norat, T., Bingham, S., Ferrari, P., Slimani, N., Jenab, M., Mazuir, M., Overvad, K., Olsen, A., Tjonneland, A., Clavel, F. *et al.* (2005) Meat, fish, and colorectal cancer

- risk: the European Prospective Investigation into cancer and nutrition. *Journal of the National Cancer Institute*, **97**, 906-916.
34. Lewis, R., Flynn, A., Dean, M.E., Melville, A., Eastwood, A. and Booth, A. (2004) Management of colorectal cancers. *Quality & safety in health care*, **13**, 400-404.
 35. Bird, R.P., Yao, K., Lasko, C.M. and Good, C.K. (1996) Inability of low- or high-fat diet to modulate late stages of colon carcinogenesis in Sprague-Dawley rats. *Cancer research*, **56**, 2896-2899.
 36. Vanamala, J., Tarver, C.C. and Murano, P.S. (2008) Obesity-enhanced colon cancer: functional food compounds and their mechanisms of action. *Current cancer drug targets*, **8**, 611-633.
 37. Rustgi, A.K. (2007) The genetics of hereditary colon cancer. *Genes & development*, **21**, 2525-2538.
 38. Rodriguez-Bigas, M.A., Vasen, H.F., O'Malley, L., Rosenblatt, M.J., Farrell, C., Weber, T.K. and Petrelli, N.J. (1998) Health, life, and disability insurance and hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *American journal of human genetics*, **62**, 736-737.
 39. Lagerstedt Robinson, K., Liu, T., Vandrovcova, J., Halvarsson, B., Clendenning, M., Frebourg, T., Papadopoulos, N., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Peltomaki, P. *et al.* (2007) Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) diagnostics. *Journal of the National Cancer Institute*, **99**, 291-299.
 40. Fodde, R. (2002) The APC gene in colorectal cancer. *European journal of cancer*, **38**, 867-871.
 41. Bodmer, W.F., Bailey, C.J., Bodmer, J., Bussey, H.J., Ellis, A., Gorman, P., Lucibello, F.C., Murday, V.A., Rider, S.H., Scambler, P. *et al.* (1987) Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature*, **328**, 614-616.
 42. Midgley, R. and Kerr, D. (1999) Colorectal cancer. *Lancet*, **353**, 391-399.
 43. James, R.G., Davidson, K.C., Bosch, K.A., Biechele, T.L., Robin, N.C., Taylor, R.J., Major, M.B., Camp, N.D., Fowler, K., Martins, T.J. *et al.* (2012) WIKI4, a novel inhibitor of tankyrase and Wnt/ss-catenin signaling. *PloS one*, **7**, e50457.
 44. Kikuchi, A. (1999) Roles of Axin in the Wnt signalling pathway. *Cellular signalling*, **11**, 777-788.
 45. Willert, K. and Jones, K.A. (2006) Wnt signaling: is the party in the nucleus? *Genes & development*, **20**, 1394-1404.
 46. Trani, D., Datta, K., Doiron, K., Kallakury, B. and Fornace, A.J., Jr. (2012) Enhanced intestinal tumor multiplicity and grade in vivo after HZE exposure: mouse models for space radiation risk estimates. *Radiation and environmental biophysics*, **49**, 389-396.
 47. Bokoch, G.M. and Der, C.J. (1993) Emerging concepts in the Ras superfamily of GTP-binding proteins. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **7**, 750-759.
 48. Arber, N., Shapira, I., Ratan, J., Stern, B., Hibshoosh, H., Moshkowitz, M., Gammon, M., Fabian, I. and Halpern, Z. (2000) Activation of c-K-ras mutations in human gastrointestinal tumors. *Gastroenterology*, **118**, 1045-1050.
 49. Barry, E.L., Baron, J.A., Grau, M.V., Wallace, K. and Haile, R.W. (2006) K-ras mutations in incident sporadic colorectal adenomas. *Cancer*, **106**, 1036-1040.
 50. Linsalata, M., Notarnicola, M., Caruso, M.G., Di Leo, A., Guerra, V. and Russo, F. (2004) Polyamine biosynthesis in relation to K-ras and p-53 mutations in colorectal carcinoma. *Scandinavian journal of gastroenterology*, **39**, 470-477.
 51. Astrin, S.M. (1991) Are there molecular targets for therapy of colon cancer? *Oncology (Williston Park, N.Y)*, **5**, 127-132; disc 132, 135, 139.

52. Smith, G., Carey, F.A., Beattie, J., Wilkie, M.J., Lightfoot, T.J., Coxhead, J., Garner, R.C., Steele, R.J. and Wolf, C.R. (2002) Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53--alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 9433-9438.
53. Bodmer, W.F., Cottrell, S., Frischauf, A.M., Kerr, I.B., Murday, V.A., Rowan, A.J., Smith, M.F., Solomon, E., Thomas, H. and Varesco, L. (1989) Genetic analysis of colorectal cancer. *Princess Takamatsu symposia*, **20**, 49-59.
54. Song, W., He, Y.L., Cai, S.R., Zhang, C.H., Chen, C.Q., Peng, J.J. and Zhan, W.H. (2009) [Clinical features of colorectal mucinous adenocarcinoma]. *Zhonghua wei chang wai ke za zhi = Chinese journal of gastrointestinal surgery*, **12**, 487-490.
55. <http://www.cio-koeln-bonn.de/en/patients/diagnosis-cancer/colorectal-cancer/how-is-my-colorectal-cancer-treatment-organised/>.
56. Casero, R.A. and Pegg, A.E. (2009) Polyamine catabolism and disease. *The Biochemical journal*, **421**, 323-338.
57. Casero, R.A., Jr. and Woster, P.M. (2009) Recent advances in the development of polyamine analogues as antitumor agents. *Journal of medicinal chemistry*, **52**, 4551-4573.
58. Wallace, H.M., Duthie, J., Evans, D.M., Lamond, S., Nicoll, K.M. and Heys, S.D. (2000) Alterations in polyamine catabolic enzymes in human breast cancer tissue. *Clin Cancer Res*, **6**, 3657-3661.
59. Rial, N.S., Meyskens, F.L. and Gerner, E.W. (2009) Polyamines as mediators of APC-dependent intestinal carcinogenesis and cancer chemoprevention. *Essays in biochemistry*, **46**, 111-124.
60. Pegg, A.E. (2012) Toxicity of polyamines and their metabolic products. *Chemical research in toxicology*, **26**, 1782-1800.
61. Durantoni, B., Holl, V., Schneider, Y., Carnesecchi, S., Gosse, F., Raul, F. and Seiler, N. (2003) Polyamine metabolism in primary human colon adenocarcinoma cells (SW480) and their lymph node metastatic derivatives (SW620). *Amino acids*, **24**, 63-72.
62. Farriol, M., Segovia-Silvestre, T., Castellanos, J.M., Venereo, Y. and Orta, X. (2001) Role of putrescine in cell proliferation in a colon carcinoma cell line. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif)*, **17**, 934-938.
63. D'Agostino, L., Pignata, S., Daniele, B., D'Adamo, G., Ferraro, C., Silvestro, G., Tagliaferri, P., Contegiacomo, A., Gentile, R., Tritto, G. *et al.* (1990) Polyamine uptake by human colon carcinoma cell line CaCo-2. *Digestion*, **46 Suppl 2**, 352-359.
64. Pegg, A.E. (2006) Regulation of ornithine decarboxylase. *The Journal of biological chemistry*, **281**, 14529-14532.
65. Zhang, W., Ramdas, L., Shen, W., Song, S.W., Hu, L. and Hamilton, S.R. (2003) Apoptotic response to 5-fluorouracil treatment is mediated by reduced polyamines, non-autocrine Fas ligand and induced tumor necrosis factor receptor 2. *Cancer biology & therapy*, **2**, 572-578.
66. Wang, Y. and Casero, R.A., Jr. (2006) Mammalian polyamine catabolism: a therapeutic target, a pathological problem, or both? *Journal of biochemistry*, **139**, 17-25.
67. Amendola, R., Bellini, A., Cervelli, M., Degan, P., Marcocci, L., Martini, F. and Mariottini, P. (2005) Direct oxidative DNA damage, apoptosis and radio sensitivity by spermine oxidase activities in mouse neuroblastoma cells. *Biochimica et biophysica acta*, **1755**, 15-24.

68. Stanic, I., Facchini, A., Borzi, R.M., Stefanelli, C. and Flamigni, F. (2009) The polyamine analogue N1,N11-diethylnorspermine can induce chondrocyte apoptosis independently of its ability to alter metabolism and levels of natural polyamines. *Journal of cellular physiology*, **219**, 109-116.
69. Bianchi, M., Polticelli, F., Ascenzi, P., Botta, M., Federico, R., Mariottini, P. and Cona, A. (2006) Inhibition of polyamine and spermine oxidases by polyamine analogues. *The FEBS journal*, **273**, 1115-1123.
70. Fellenberg, C., Ziegler, J., Handrick, V. and Vogt, T. (2012) Polyamine Homeostasis in Wild Type and Phenolamide Deficient Arabidopsis thaliana Stamens. *Frontiers in plant science*, **3**, 180.
71. Senanayake, M.D., Amunugama, H., Boncher, T.D., Casero, R.A. and Woster, P.M. (2009) Design of polyamine-based therapeutic agents: new targets and new directions. *Essays Biochem*, **46**, 77-94.
72. Vujcic, S., Halmekyto, M., Diegelman, P., Gan, G., Kramer, D.L., Janne, J. and Porter, C.W. (2000) Effects of conditional overexpression of spermidine/spermine N1-acetyltransferase on polyamine pool dynamics, cell growth, and sensitivity to polyamine analogs. *J Biol Chem*, **275**, 38319-38328.
73. Fogel-Petrovic, M., Shappell, N.W., Bergeron, R.J. and Porter, C.W. (1993) Polyamine and polyamine analog regulation of spermidine/spermine N1-acetyltransferase in MALME-3M human melanoma cells. *J Biol Chem*, **268**, 19118-19125.
74. Xiao, L. and Casero, R.A., Jr. (1996) Differential transcription of the human spermidine/spermine N1-acetyltransferase (SSAT) gene in human lung carcinoma cells. *Biochem J*, **313** (Pt 2), 691-696.
75. Chen, Y., Kramer, D.L., Jell, J., Vujcic, S. and Porter, C.W. (2003) Small interfering RNA suppression of polyamine analog-induced spermidine/spermine n1-acetyltransferase. *Mol Pharmacol*, **64**, 1153-1159.
76. Boncher, T., Bi, X., Varghese, S., Casero, R.A., Jr. and Woster, P.M. (2007) Polyamine-based analogues as biochemical probes and potential therapeutics. *Biochemical Society transactions*, **35**, 356-363.
77. Payne, C.M., Bernstein, H., Bernstein, C. and Garewal, H. (1995) Role of apoptosis in biology and pathology: resistance to apoptosis in colon carcinogenesis. *Ultrastructural pathology*, **19**, 221-248.
78. Barr, P.J. and Tomei, L.D. (1994) Apoptosis and its role in human disease. *Bio/technology (Nature Publishing Company)*, **12**, 487-493.
79. Kerr, J.F., Wyllie, A.H. and Currie, A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, **26**, 239-257.
80. Mevorach, D. (2003) [Apoptosis: death is part of life]. *Harefuah*, **142**, 832-833, 878.
81. Howley, B. and Fearnhead, H.O. (2008) Caspases as therapeutic targets. *Journal of cellular and molecular medicine*, **12**, 1502-1516.
82. Olson, M. and Kornbluth, S. (2001) Mitochondria in apoptosis and human disease. *Current molecular medicine*, **1**, 91-122.
83. Schultz, D.R. and Harrington, W.J., Jr. (2003) Apoptosis: programmed cell death at a molecular level. *Seminars in arthritis and rheumatism*, **32**, 345-369.
84. Chao, D.T. and Korsmeyer, S.J. (1998) BCL-2 family: regulators of cell death. *Annual review of immunology*, **16**, 395-419.
85. Tsujimoto, Y. and Shimizu, S. (2000) Bcl-2 family: life-or-death switch. *FEBS letters*, **466**, 6-10.

86. Michels, J., Johnson, P.W. and Packham, G. (2005) Mcl-1. *The international journal of biochemistry & cell biology*, **37**, 267-271.
87. Halestrap, A.P., Doran, E., Gillespie, J.P. and O'Toole, A. (2000) Mitochondria and cell death. *Biochemical Society transactions*, **28**, 170-177.
88. Wallace, H.M., Fraser, A.V. and Hughes, A. (2003) A perspective of polyamine metabolism. *The Biochemical journal*, **376**, 1-14.
89. Chinnaiyan, A.M. (1999) The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, **1**, 5-15.
90. Kuwana, T. and Newmeyer, D.D. (2003) Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Current opinion in cell biology*, **15**, 691-699.
91. Schuler, M. and Green, D.R. (2001) Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochemical Society transactions*, **29**, 684-688.
92. Adrain, C., Creagh, E.M. and Martin, S.J. (2001) Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2. *The EMBO journal*, **20**, 6627-6636.
93. Igney, F.H. and Krammer, P.H. (2002) Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature reviews*, **2**, 277-288.
94. Kim, B.M. and Hong, S.H. Sequential caspase-2 and caspase-8 activation is essential for saikosaponin a-induced apoptosis of human colon carcinoma cell lines. *Apoptosis*, **16**, 184-197.
95. Ahmed, K., Matsuya, Y., Nemoto, H., Zaidi, S.F., Sugiyama, T., Yoshihisa, Y., Shimizu, T. and Kondo, T. (2009) Mechanism of apoptosis induced by a newly synthesized derivative of macrosphelides with a thiazole side chain. *Chemico-biological interactions*, **177**, 218-226.
96. Huerta, S., Heinzerling, J.H., Anguiano-Hernandez, Y.M., Huerta-Yepez, S., Lin, J., Chen, D., Bonavida, B. and Livingston, E.H. (2007) Modification of gene products involved in resistance to apoptosis in metastatic colon cancer cells: roles of Fas, Apaf-1, NFkappaB, IAPs, Smac/DIABLO, and AIF. *The Journal of surgical research*, **142**, 184-194.
97. Lee, E.J., Park, H.G. and Kang, H.S. (2003) Sodium salicylate induces apoptosis in HCT116 colorectal cancer cells through activation of p38MAPK. *International journal of oncology*, **23**, 503-508.
98. Ryu, H., Lee, J., Impey, S., Ratan, R.R. and Ferrante, R.J. (2005) Antioxidants modulate mitochondrial PKA and increase CREB binding to D-loop DNA of the mitochondrial genome in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 13915-13920.
99. Bragado, P., Armesilla, A., Silva, A. and Porras, A. (2007) Apoptosis by cisplatin requires p53 mediated p38alpha MAPK activation through ROS generation. *Apoptosis*, **12**, 1733-1742.
100. Wu, H., Li, H. and Guo, J. (2008) Spry2-mediated inhibition of the Ras/ERK pathway through interaction with Src kinase following cerebral ischemia. *Brain Inj*, **22**, 275-281.
101. Kolch, W. (2000) Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *The Biochemical journal*, **351 Pt 2**, 289-305.
102. Blume-Jensen, P. and Hunter, T. (2001) Oncogenic kinase signalling. *Nature*, **411**, 355-365.
103. Amente, S., Zhang, J., Lavadera, M.L., Lania, L., Avvedimento, E.V. and Majello, B. Myc and PI3K/AKT signaling cooperatively repress FOXO3a-dependent PUMA and GADD45a gene expression. *Nucleic acids research*, **39**, 9498-9507.

104. Ma, R., Xiong, N., Huang, C., Tang, Q., Hu, B., Xiang, J. and Li, G. (2009) Erythropoietin protects PC12 cells from beta-amyloid(25-35)-induced apoptosis via PI3K/Akt signaling pathway. *Neuropharmacology*, **56**, 1027-1034.
105. Zou, C.Y., Smith, K.D., Zhu, Q.S., Liu, J., McCutcheon, I.E., Slopis, J.M., Meric-Bernstam, F., Peng, Z., Bornmann, W.G., Mills, G.B. *et al.* (2009) Dual targeting of AKT and mammalian target of rapamycin: a potential therapeutic approach for malignant peripheral nerve sheath tumor. *Molecular cancer therapeutics*, **8**, 1157-1168.
106. Bouali, S., Chretien, A.S., Ramacci, C., Rouyer, M., Becuwe, P. and Merlin, J.L. (2009) PTEN expression controls cellular response to cetuximab by mediating PI3K/AKT and RAS/RAF/MAPK downstream signaling in KRAS wild-type, hormone refractory prostate cancer cells. *Oncology reports*, **21**, 731-735.
107. Roux, P. (1999) [PTEN: a tumor suppressor with original properties]. *Bulletin du cancer*, **86**, 522-525.
108. Blanco-Aparicio, C., Renner, O., Leal, J.F. and Carnero, A. (2007) PTEN, more than the AKT pathway. *Carcinogenesis*, **28**, 1379-1386.
109. Reagan-Shaw, S. and Ahmad, N. (2007) The role of Forkhead-box Class O (FoxO) transcription factors in cancer: a target for the management of cancer. *Toxicology and applied pharmacology*, **224**, 360-368.
110. Potente, M., Fisslthaler, B., Busse, R. and Fleming, I. (2003) 11,12-Epoxyeicosatrienoic acid-induced inhibition of FOXO factors promotes endothelial proliferation by down-regulating p27Kip1. *The Journal of biological chemistry*, **278**, 29619-29625.
111. Naimi, M., Gautier, N., Chaussade, C., Valverde, A.M., Accili, D. and Van Obberghen, E. (2007) Nuclear forkhead box O1 controls and integrates key signaling pathways in hepatocytes. *Endocrinology*, **148**, 2424-2434.
112. Herzog, S., Reth, M. and Jumaa, H. (2009) Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, **9**, 195-205.
113. Slavikova, B., Kohout, L., Budesinsky, M., Swaczynova, J. and Kasal, A. (2008) Brassinosteroids: synthesis and activity of some fluoro analogues. *Journal of medicinal chemistry*, **51**, 3979-3984.
114. Wang, L., Xu, Y.Y., Li, J., Powell, R.A., Xu, Z.H. and Chong, K. (2007) Transgenic rice plants ectopically expressing AtBAK1 are semi-dwarfed and hypersensitive to 24-epibrassinolide. *Journal of plant physiology*, **164**, 655-664.
115. Dhaubhadel, S., Chaudhary, S., Dobinson, K.F. and Krishna, P. (1999) Treatment with 24-epibrassinolide, a brassinosteroid, increases the basic thermotolerance of Brassica napus and tomato seedlings. *Plant molecular biology*, **40**, 333-342.
116. Voigt, B., Porzel, A., Naumann, H., Horhold-Schubert, C. and Adam, G. (1993) Hydroxylation of the native brassinosteroids 24-epicastasterone and 24-epibrassinolide by the fungus Cunninghamella echinulata. *Steroids*, **58**, 320-323.
117. Sirhindi, G., Kumar, S., Bhardwaj, R. and Kumar, M. (2009) Effects of 24-epibrassinolide and 28-homobrassinolide on the growth and antioxidant enzyme activities in the seedlings of Brassica juncea L. *Physiol Mol Biol Plants*, **15**, 335-341.
118. Sala, C. and Sala, F. (1985) Effect of brassinosteroid on cell division and enlargement in cultured carrot (*Daucus carota* L.) cells. *Plant cell reports*, **4**, 144-147.
119. Arteca, J.M. and Arteca, R.N. (2001) Brassinosteroid-induced exaggerated growth in hydroponically grown Arabidopsis plants. *Physiologia plantarum*, **112**, 104-112.
120. Back, T.G., Janzen, L., Nakajima, S.K. and Pharis, R.P. (1999) Synthesis and Biological Activity of 25-Methoxy-, 25-Fluoro-, and 25-Azabrassinolide and 25-

- Fluorocasterone: Surprising Effects of Heteroatom Substituents at C-25. *The Journal of organic chemistry*, **64**, 5494-5498.
121. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, **72**, 248-254.
 122. Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J. and Thun, M.J. (2009) Cancer statistics, 2009. *CA: a cancer journal for clinicians*, **59**, 225-249.
 123. Lansdorp-Vogelaar, I., Kuntz, K.M., Knudsen, A.B., van Ballegooijen, M., Zauber, A.G. and Jemal, A. (2010) Contribution of screening and survival differences to racial disparities in colorectal cancer rates. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **21**, 728-736.
 124. Igarashi, K. (1993) Role of polyamines in cell proliferation and differentiation. *Seikagaku*, **65**, 86-104.
 125. McCann, P.P. and Pegg, A.E. (1992) Ornithine decarboxylase as an enzyme target for therapy. *Pharmacol Ther*, **54**, 195-215.
 126. Laukaitis, C.M. and Gerner, E.W. (2011) DFMO: targeted risk reduction therapy for colorectal neoplasia. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, **25**, 495-506.
 127. Bachmann, A.S. (2004) The role of polyamines in human cancer: prospects for drug combination therapies. *Hawaii Med J*, **63**, 371-374.
 128. Raj, K.P., Zell, J.A., Rock, C.L., McLaren, C.E., Zoumas-Morse, C., Gerner, E.W. and Meyskens, F.L. (2013) Role of dietary polyamines in a phase III clinical trial of difluoromethylornithine (DFMO) and sulindac for prevention of sporadic colorectal adenomas. *Br J Cancer*, **108**, 512-518.
 129. Kreul, S.M., Havighurst, T., Kim, K., Mendonca, E.A., Wood, G.S., Snow, S., Borich, A., Verma, A. and Bailey, H.H. (2012) A phase III skin cancer chemoprevention study of DFMO: long-term follow-up of skin cancer events and toxicity. *Cancer Prev Res (Phila)*, **5**, 1368-1374.
 130. Farriol, M., Segovia-Silvestre, T., Venereo, Y. and Orta, X. (2000) Polyamines in the gastrointestinal tract. *Nutr Hosp*, **15**, 85-91.
 131. Nowotarski, S.L., Woster, P.M. and Casero, R.A. (2013) Polyamines and cancer: implications for chemotherapy and chemoprevention. *Expert Rev Mol Med*, **15**, e3.
 132. Alarcon, R.A. (2012) Anticancer system created by acrolein and hydroxyl radical generated in enzymatic oxidation of spermine and other biochemical reactions. *Med Hypotheses*, **79**, 522-530.
 133. Agostinelli, E., Arancia, G., Vedova, L.D., Belli, F., Marra, M., Salvi, M. and Toninello, A. (2004) The biological functions of polyamine oxidation products by amine oxidases: perspectives of clinical applications. *Amino Acids*, **27**, 347-358.
 134. Hahm, H.A., Ettinger, D.S., Bowling, K., Hoker, B., Chen, T.L., Zabelina, Y. and Casero, R.A., Jr. (2002) Phase I study of N(1),N(11)-diethylnorspermine in patients with non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, **8**, 684-690.
 135. Hector, S., Tummala, R., Kisiel, N.D., Diegelman, P., Vujcic, S., Clark, K., Fakhri, M., Kramer, D.L., Porter, C.W. and Pendyala, L. (2008) Polyamine catabolism in colorectal cancer cells following treatment with oxaliplatin, 5-fluorouracil and N1, N11 diethylnorspermine. *Cancer Chemother Pharmacol*, **62**, 517-527.
 136. Babbar, N., Gerner, E.W. and Casero, R.A., Jr. (2006) Induction of spermidine/spermine N1-acetyltransferase (SSAT) by aspirin in Caco-2 colon cancer cells. *Biochem J*, **394**, 317-324.
 137. Allen, W.L., McLean, E.G., Boyer, J., McCulla, A., Wilson, P.M., Coyle, V., Longley, D.B., Casero, R.A., Jr. and Johnston, P.G. (2007) The role of spermidine/spermine

- N1-acetyltransferase in determining response to chemotherapeutic agents in colorectal cancer cells. *Mol Cancer Ther*, **6**, 128-137.
138. Alford, T.C., Do, H.M., Geelhoed, G.W., Tsangaris, N.T. and Lippman, M.E. (1979) Steroid hormone receptors in human colon cancers. *Cancer*, **43**, 980-984.
 139. Agostinelli, E., Condello, M., Molinari, A., Tempera, G., Viceconte, N. and Arancia, G. (2009) Cytotoxicity of spermine oxidation products to multidrug resistant melanoma M14 ADR2 cells: sensitization by the MDL 72527 lysosomotropic compound. *International journal of oncology*, **35**, 485-498.
 140. Averill-Bates, D.A., Cherif, A., Agostinelli, E., Tanel, A. and Fortier, G. (2005) Antitumoral effect of native and immobilized bovine serum amine oxidase in a mouse melanoma model. *Biochemical pharmacology*, **69**, 1693-1704.
 141. Lord-Fontaine, S., Agostinelli, E., Przybytkowski, E. and Averill-Bates, D.A. (2001) Amine oxidase, spermine, and hyperthermia induce cytotoxicity in P-glycoprotein overexpressing multidrug resistant Chinese hamster ovary cells. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, **79**, 165-175.
 142. Mondovi, B., Riccio, P. and Agostinelli, E. (1988) The biological functions of amine oxidases and their reaction products: an overview. *Advances in experimental medicine and biology*, **250**, 147-161.
 143. Devereux, W., Wang, Y., Stewart, T.M., Hacker, A., Smith, R., Frydman, B., Valasinas, A.L., Reddy, V.K., Marton, L.J., Ward, T.D. *et al.* (2003) Induction of the PAOh1/SMO polyamine oxidase by polyamine analogues in human lung carcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol*, **52**, 383-390.
 144. Thomas, T. and Thomas, T.J. (2001) Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell Mol Life Sci*, **58**, 244-258.
 145. Arisan, E.D., Coker, A. and Palavan-Unsal, N. (2012) Polyamine depletion enhances the roscovitine-induced apoptosis through the activation of mitochondria in HCT116 colon carcinoma cells. *Amino Acids*, **42**, 655-665.
 146. Coker, A., Arisan, E.D. and Palavan-Unsal, N. (2012) Silencing of the polyamine catabolic key enzyme SSAT prevents CDK inhibitor-induced apoptosis in Caco-2 colon cancer cells. *Mol Med Rep*, **5**, 1037-1042.
 147. Rabenoelina, F., Semlali, A., Duchesne, M.J., Freiss, G., Pons, M. and Badia, E. (2002) Effect of prolonged hydroxytamoxifen treatment of MCF-7 cells on mitogen activated kinase cascade. *International journal of cancer*, **98**, 698-706.
 148. Bader, A.G., Kang, S., Zhao, L. and Vogt, P.K. (2005) Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nature reviews*, **5**, 921-929.
 149. Dudek, H., Datta, S.R., Franke, T.F., Birnbaum, M.J., Yao, R., Cooper, G.M., Segal, R.A., Kaplan, D.R. and Greenberg, M.E. (1997) Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science (New York, N.Y)*, **275**, 661-665.
 150. Fernandez de Mattos, S., Villalonga, P., Clardy, J. and Lam, E.W. (2008) FOXO3a mediates the cytotoxic effects of cisplatin in colon cancer cells. *Molecular cancer therapeutics*, **7**, 3237-3246.
 151. Wallen, E., Sellers, R.G. and Peehl, D.M. (2000) Brefeldin A induces p53-independent apoptosis in primary cultures of human prostatic cancer cells. *The Journal of urology*, **164**, 836-841.
 152. Ahn, C., Hwang, M., Ramsamooj, P., Lee, S. and Jung, M. (1997) Rapamycin-induced apoptosis is p53-independent in human prostate carcinoma PC-3 cells. *International journal of oncology*, **11**, 1115-1118.

EKLER

Tablo 1.Kullanılan cihazların listesi

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
UV-Transluminatör	GelDOC	BioRad
Santrifüj	5417R	Eppendorf
Spin mini spin plus	SN0708	LabNet
Yatay elektroforez sistemi	Gel XL ultra V-2	BioRad
Hassas Tartı	LE6202S	Sartorius
Mikropipet (0,5µl-10µl)	EH52836	Thermo
Mikropipet (20µl-200µl)	EH46925	Thermo
Mikropipet (200µl-1000µl)	T27274	Thermo
Otoklav	OTO32	Nüve
Manyetik Karıştırıcı	SB162	Stuart/ProLab
Distile Su Cihazı	D56412	TKA-Pacific
pH Metre	N315	SEM/Mettler Toledo
Derin Dondurucu	2041D	Arçelik
Buzdolabı (No frost)	4263TMB	Arçelik
Vorteks	SA8	Stuart/ProLab
Dry heat sterilizer	FN120	Nüve
Spektrofotometre	Ultraspec 2100 pro	Biosciences
Güç Kaynağı	PowerPac/Basic	BioRad
Laminar Flow	Model: 12469,2000	HeraSafe
Inverted Mikroskop	Model: XDS-1B	SOIF
İnkübatör	EN 025	Nüve
Florasan Mikroskobu	Model: 1X71	Olympus
Dondurucu (-80°C)	Ultra Low Temperature Freezer, U725 innova	New Brunswick Scientific
Elektroforez Aletleri		BioRad

Tablo 2. Hücre kültürü donanımları

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
12 kuyucuklu petri	92012	TPP
6 kuyucuklu petri	92006	TPP
96 kuyucuklu petri	92096	TPP
75cm ² hücre büyütme kapları	90076	TPP
25cm ² hücre büyütme kapları	90026	TPP
100mm hücre büyütme kapları	93100	TPP
60mm hücre büyütme kapları	93060	TPP
Steril pipetler (5ml)	94005	TPP
Steril pipetler (10ml)	94010	TPP
Şırınga filtreleri (0.22 µm)	99722	TPP
Enjektör seti	B25107	-
Tripsin-EDTA	P10-0231	Pan Biotech
Penisilin/Streptomisin	P06-07100	Pan Biotech
Fetal Bovine Serum		Pan Biotech
McCoy's Medium	P04-05500	Pan Biotech
HCT 116 hücreleri	CCL-247	ATCC

Tablo 3. Kullanılan kimyasalların listesi

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
Etanol	A3452,1000	SIGMA-ALDRICH
Saf Etanol	32221	Rieel-de Haen
Metanol	24229	SIGMA-ALDRICH
İzopropanol	24137	Rieel-de Haen
2-merkaptoetanol	S4805940517	Merck
Akrilamid / Bis-Akrilamid 30% çözelti	A3699	SIGMA-ALDRICH
Amonyum persülfat	A3678	SIGMA
Coomassie Blue Belirteci	500-0006	BioRad
DMSO	D5879	SIGMA
EDTA	A3452,1000	SIGMA-ALDRICH
DiOC6 Boya	2129966	Fluka
Fetal Bovine Serum (FBS)	P290310	Pan Biotech
Laemli Tamponu	S3401-1V	SIGMA
p-Coumaric Asid		
Luminol		
MTT Solüsyonu	M2003-1G	SIGMA
Phosphate buffered saline (PBS)		Pan Biotech
Propidium Iodide	A2261,0025	Applichem
Sığır Serum Albumin (PSA)	500-0007	BioRad
SDS (Sodyum dedosil sülfat)	A3452,1000	Applichem
Protein İzolasyonu Tamponu	K0301	Fermentas
Page Ruller Prestained Protein Ladder	SM0671	Fermentas
Agaroz	A2114,1000	Applichem
Tris Baz	A2264,1000	Applichem
Asetik Asid	K37230062	MERCK
Ethidium Bromide	46067	Fluka

Tris-HCl	A3452,1000	Applichem
1 kb Marker	SM1163	Fermentas
6X yükleme Tamponu	R0631	Fermentas
Amonyum Asetat	1,110115,1000	MERCK
Fenol Kloroform	A2279,0250	Applichem
Epibrassinolid		
Sodyum Klorür		
Tween 20	S4927784 802	MERCK
TEMED	A1148,0100	Applichem
Yağsız Süt Tozu	Food club	Amerika
Glisin		
H ₂ O ₂ Hidrojen peroksi	K39218400838	MERCK

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

	Alt Jel	Üst Jel
Distile su	3,4 ml	3,075 ml
Tris-HCl	2,5ml (1,5M,pH: 8,8)	1,125ml (0,5M, pH: 6,8)
%10 SDS	0,1 ml	0,05ml
Akrilamid/Bis-Akrilamid	4 ml	0,67 ml
Amonyum Persulfat (APS)	0,05 ml	0,025ml
TEMED	0,005ml	0,005ml
TOPLAM	10,005 ml	5,05ml

ÖZGEÇMİŞ

1. Adı Soyadı: Deniz Coşkun
2. Doğum Tarihi: 07/09/1989
3. Unvanı:
4. Öğrenim Durumu:



Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	İstanbul Kültür Üniversitesi	2011
Y. Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	İstanbul Kültür Üniversitesi	2011-

5. Akademik Unvanlar:
6. Yönetilen Yüksek Lisans ve Doktora Tezleri

6.1. Yüksek Lisans Tezleri

“HCT 116 ve Ht 29 kolon karsinoma hücrelerinde Epibrassinolid tarafından tetiklenen apoptotik süreçte poliaminlerin rolü”

6.2. Doktora Tezleri

7. Yayınlar

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

7.2. Uluslararası diğer hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

7.3. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (*Proceedings*) basılan bildiriler

Deniz Coskun, Pınar Obakan, Elif Damla Arısan, Ajda Çoker-Gürkan, Narçın Palavan-Ünsal. Epibrassinolide Induced Apoptotic Cell Death in HCT116 and HT29 Colon Carcinoma cells. First International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, 23-24 November 2012, İstanbul-TURKEY (Poster sunum : Deniz Coşkun)

Deniz Coşkun, Pınar Obakan, Elif Damla Arısan, Ajda Çoker-Gürkan, Narçın Palavan-Ünsal. The Potential Role of Polyamines in EBR-Induced Apoptotic Cell Death in HCT116 Colon Carcinoma Cells. International Congress on Polyamines: Biological and Clinical Perspectives, 2-7 September 2012, İstanbul-TURKEY (Poster sunum : Deniz Coşkun)

Deniz Coskun, Ajda Çoker-Gürkan, Elif Damla Arısan, Serdar Arısan, Nurettin Cem Sönmez , Narçın Palavan-Ünsal. The Association Between Interleukin-1 Beta (-511C>T) and IL-1 Receptor Antagonist VNTR Gene Polymorphisms in Urolithiasis. International Graduate Student Immunology Conference at Harvard University, 27-28 April 2012, Boston, USA (Poster sunum : Deniz Coşkun)

Ajda Çoker, Serdar Arısan, **Deniz Coşkun**, Abdülmecit Yavuz, Elif Damla Arısan, N. Cem Sönmez, Narçın Palavan Ünsal. Investigation of Fetuin-A SNP in urinary stone disease patients 4th International Congress of Molecular Medicine, June 27th-30th, 2011 İstanbul-TURKEY (Poster sunum : Deniz Coşkun)

7.4. Yazılan uluslararası kitaplar veya kitaplarda bölümler

7.5. Ulusal hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

7.6. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

7.7. Diğer yayınlar

Deniz Coskun, Pınar Obakan, Elif Damla Arısan, Ajda Çoker-Gürkan, Narçın Palavan-Ünsal. The Potential Role of Polyamines in Epibrassinolide-Induced Apoptotic Cell Death in Colon Carcinoma Cells. Gordon Research Conferances: Polyamines, Regulation and Role of Polyamine in Biology and Diseases, June 16-21, 2013, Waterville Valley, NH, USA (Poster sunum: Narçın Palavan Ünsal)

7.8. Uluslararası atıflar

8. Ulusal & Uluslararası Projeler

Kolon Karsinoma Hücrelerinde Epibrassinolid Tarafından Tetiklenen Apoptotik Süreçte Poliaminlerin Rolü (TUBİTAK, Hızlı Destek Projesi, 212T168, 2013-2014)

9. İdari Görevler

10. Bilimsel ve Mesleki Kuruluşlara Üyelikler

- MOKAD
- Moleküler Biyoloji Derneği

11. Ödüller ve Burslar

TUBİTAK, Hızlı Destek Projesi, 212T168, 2013-2014 Bursiyer

Katıldığı Uluslararası Bilimsel Etkinlikler:

- International Congress on Polyamines: Clinical and Biological Perspectives, September 2-7, 2012, Istanbul Turkey
- First International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, 23-24 November 2012, İstanbul-TURKEY
- International Graduate Student Immunology Conference at Harvard University, 27-28 April 2012, Boston, USA
- 4th International Congress of Molecular Medicine, June 27th-30th, 2011 Istanbul-TURKEY
- LGC Standart Cell Culture Seminar. October 2010, İstanbul-TURKEY
- International-attended ITU IV. National Molecular Biology and Genetics Student Congress August 27-31 2010, İstanbul-TURKEY
- Yeditepe Üniversitesi Uluslararası Katılımlı Biyoteknoloji Kongresi Mayıs 2010, İstanbul, Türkiye
- International VI. IUGEN Molecular Biology and Genetics Student Winter School, 06-08 March

Organizasyonunda Görev Aldığı Bilimsel Etkinlikler:

- Istanbul Kultur University, HARVARD-MIT Joint meeting on Nanotechnology and Tissue Engineering: Current Challenges and Future Prospects, Aralık 2013
- DNA Hasarı, Onarımı ve Hastalıklarla İlişkisi, 16-18 Nisan 2013
- Polyamines: Biological and Clinical Perspectives, 2-7 Eylül 2012
- MOBİGEN DNA OKULU Genomik Uygulamalar Sertifika Programı, 24-26 Eylül 2008