

T.C. İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**EPİBRASSİNOLİDİN KOLON KANSERİNE KARŞI ANTI-TÜMÖRAL ETKİSİNİN
SCID FARE KSENOGRAFT MODELİNDE GÖSTERİMİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kaan ADACAN
1102060022

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA

MAYIS 2019

T.C. İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**EPİBRASSİNOLİDİN KOLON KANSERİNE KARŞI ANTI-TÜMÖRAL ETKİSİNİN
SCID FARE KSENOGRAFT MODELİNDE GÖSTERİMİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kaan ADACAN

1102060022

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 14.06.2019

Tezin Savunulduğu Tarih: 22.05.2019

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA

Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Elif Damla ARISAN

Dr. Öğrt. Üyesi Ayşe KARATUĞ (İstanbul Üniv.)

MAYIS 2019

ÖNSÖZ

Her zaman örnek aldığım, engin bilgi ve tecrübeleri ile her zaman yol gösteren, yardımlarını benden hiç esirgemeyen bana çalışma imkânı sunmuş olan saygıdeğer tez danışmanım sayın Doç. Dr. Pınar OBAKAN-YERLİKAYA'ya sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim ve laboratuvarında çalıştığım süre boyunca bilgi ve deneyimleriyle eğitim hayatıma olan yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen çok değerli öğretmenlerim sayın Prof. Dr. Narçın PALAVAN ÜNSAL, sayın Prof. Dr. Damla ARISAN'a, sayın Prof. Dr. Ajda ÇOKER-GÜRKAN'a,

Araş. Gör. Özge Berrak'a, Araş. Gör. Pelin Özfiliz'e ve Araş. Gör. Burcu Ayhan Şahin'e her şey için teşekkür ederim.

Labaratuvarında bulunduğum tez çalışmalarımı gerçekleştirdiğim süre boyunca ihtiyaç duyduğum yardımlarını banden esirgemeyen Resul İsmail Kaya, Mert Meşeli, Özlem Sönmez'e teşekkür ederim.

Yükseklisans eğitimim süresince bilgilerini ve yardımlarını her zaman hissettiğim Okan Akar, ve Utku Özbey'e teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında deneyimlerimde ikinci bir göz olan, aynı ortamı paylaşmaktan mutluluk duyduğum, desteğini her zaman hissettiren çok kıymetli Esra Nebilere'e teşekkür ederim.

Beni akademik olarak ilerlemeye teşvik eden, maddi ve manevi olarak hep yanımda olan yardımlarını her zaman hissettiğim Ülkü Özgümüş ve Salih Ersin Özgümüş'e teşekkür ederim.

Benim için her türlü fedakarlıkta bulunup sonsuz destek veren, sabır gösterip çözümler üretmeye çalışan ve bugünlere gelmem için çok emek veren sevgili annem Ülker Harman'a teşekkür ederim.

Bu tez TÜBİTAK 1002 Projesi (Proje no: 117Z727, 2018-2019) tarafından desteklenmiştir. TÜBİTAK'a bu proje kapsamında fon sağlamış olduğu için teşekkür ederiz.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
KISALTMALAR.....	vii
SEMBOL VE BİRİM LİSTESİ.....	xi
ŞEKİL LİSTESİ	xii
TABLO LİSTESİ.....	xv
ÖZET	xvi
ABSTRACT	xvii
1 GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2 GENEL BİLGİLER	4
2.1 Kolorektal Kanser Epidemiyolojisi	4
2.1.1 Kolorektal Kanser Risk Faktörleri.....	5
2.1.2 Kolorektal Kanserde Tanı ve Tedavi Stratejileri.....	5
2.2 Brassinosteroidler	8
2.2.1 Epibrassinolid.....	9
2.2.2 Epibrassinolid'in Bitki Hücrelerindeki Moleküler Mekanizması	11
2.3 PI3K/Akt/mTOR yolağı.....	12
2.4 Adenozin 5' monofosfat-aktive edilmemiş protein kinaz (AMPK) sinyal yolağı	14
2.5 OTOFAJİ.....	15
2.5.1 Mikrotofaji	16
2.5.2 Şaperon Aracılı Otofaji	17
2.5.3 Makrotofaji.....	17
2.6 ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ.....	19
2.7 APOPTOTİK Hücre Ölümü.....	21
2.7.1 Kaspazlar.....	22
2.7.2 BCL-2 Ailesi	23

2.7.3	İçsel Apoptoz Yolağı	24
2.7.4	Reseptör Aracılı Apoptoz Yolağı	25
2.8	Hücre döngüsü.....	26
2.9	Epitel Mezenkimal Dönüşüm.....	28
2.10	Poliamin Metabolizması	30
3	MATERYAL VE YÖNTEM.....	32
3.1	Materyaller	32
3.2	Yöntemler.....	32
3.2.1	Kullanılan Hücre ve Özellikler.....	32
3.2.2	Hücre kültürü.....	32
3.2.3	Epibrassinolidin Hazırlanması ve Ugulanması	34
3.2.4	MTT Hücre Canlılık Testi.....	34
3.2.5	Yara İyileşmesi Deneyi.....	34
3.2.6	DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol) Boyaması	35
3.2.7	DİOC6 (3',3-Dihexiloksakarbosiyanin İyodür) Boyaması	35
3.2.8	Akridin turuncusu (AO) Boyaması.....	35
3.2.9	Monodansylcadaverine (MDC) Boyaması.....	36
3.2.10	Asılı damla Modeli	36
3.2.11	Sferoid Hücre Kültürü	36
3.2.12	Sferoid Hücre Modelinde ve Asılı Damla Hücre Modelinde Floresan Boyama 37	
3.2.13	Koloni oluşumunun kristal viyole ile gösterilmesi.....	37
3.2.14	Plazmit Çoğaltılması ve İzole Edilmesi.....	37
3.2.15	Agaroz Jel Elektroforezi	38
3.2.16	Total Protein İzolasyonu	38
3.2.17	Fosfatlanmış Proteinlerin İzolasyonu	38

3.2.18	Protein Miktar Tayini.....	39
3.2.19	İmmunoblotlama Tekniği ve Protein Düzeylerinin Belirlenmesi	39
3.2.20	İmmünofloresan Tekniği ile Protein Düzeylerinin Belirlenmesi	40
3.2.21	HPLC İle Poliamin Seviyelerinin Belirlenmesi	40
3.2.22	Agar Arası Hücre Modeli.....	41
3.2.23	3 Boyutlu Hücre Kültürü.....	42
3.2.24	Ksenograft SCID Fare Modeli	42
3.2.25	Tümörlerden Protein İzolasyonu	43
3.2.26	İnsan Embriyonik Antijen ELİZA Deneyi.....	43
3.2.27	İmmünohistokimya Deneyi.....	44
4	sonuçlar.....	46
4.1	Epibrassinolid uygulaması DLD-1 ve SW480 kolon kanser hücrelerinde hücre canlılığını azaltıcı yönde etki etmiştir.....	46
4.2	Epibrassinolid akt/mTOR/Ulk-1 yolağına etki ederek hücrenin enerji metabolizmasında ve otofaji yolağında değişikliklere sebep olmaktadır	47
4.3	Epibrassinolid İle Tektiklenen AMPK, Beclin-1 ve SQSTM1/P62 seviyelerindeki değişim otofajik cevap oluşumunda kilit rol oynamaktadır.....	48
4.4	EBR uygulaması Monodansylcadaverine ve Akridin turuncusu boyamalarında artışa sebep olmuştur.....	50
4.5	Epibrassinolid uygulaması sonrası hem SW480 hemde DLD-1 poliamin havuzları azalmıştır.....	51
4.6	Epibrassinolid uygulaması Asili Damla modelinde hücre topluluklarının çaplarını küçültmüştür.....	53
4.7	Epibrassinolid uygulaması Epitel Mezenkimal Dönüşüme etki etmemiş fakat yara iyileşmesini azaltmıştır.....	56
4.8	SW480 hücreleri SCID farelere inokülasyon öncesi GFP pozitif hale getirilmiştir	58

4.9	Epibrassinolid uygulaması sonrasında tümör büyüklükleri sabit kalırken, kontrole oranla ciddi miktarda küçülme gözlemlenmiştir.....	59
4.10	Epibrassinolid uygulaması SCID farelerde ağırlık değişimine sebep olmamıştır.....	60
4.11	CEA konsantrasyonlarında epibrassinolid uygulaması ile beraber azalma tespit edilmiştir.	61
4.12	Yüksek dozda uygulanan epibrassinolid hem ki67 hemde Cyt18 işaretlemelerinde azalmaya sebep olmuştur	62
4.13	Epibrassinolid uygulaması sonrasında tümör örneklerinde Endoplazmik Retikulum stresi tespit edilmemiştir.	64
4.14	Epibrassinolid uygulaması sonrasında tümör örneklerindeki etki sitostatik olarak tespit edilmiştir.	65
5	TARTIŞMA.....	67
6	kaynakça.....	86
7	EKLER	99
7.1	Kullanılan Çözeltiler.....	99
7.1.1	Hücre Dondurma Medyası Hazırlanışı (10 ml için)	99
7.1.2	Hücre Lizis Tamponunun (CLB) Hazırlanışı (10 ml için).....	99
7.1.3	5X Laemmli Tamponunun Hazırlanışı (10 ml için)	99
7.1.4	Bradford Çözeltilisinin Hazırlanışı (250 ml için).....	99
7.1.5	Tris-Baz Çözeltilisinin (1,5 Molar) Hazırlanışı (pH 8,8).....	100
7.1.6	Tris-Baz Çözeltilisinin (0.5 Molar) Hazırlanışı (pH 6,8).....	100
7.1.7	%10 (w/v) Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Çözeltilisinin Hazırlanışı (100 ml için) 100	
7.1.8	%30 (v/v) Akrilamid/Bis-Akrilamid Çözeltilisinin Hazırlanışı (100 ml için) 100	

7.1.9	%10 (w/v) Amonyum Persulfat (APS) Çözeltisinin Hazırlanışı (10 ml için) 100	
7.1.10	10X Yürütme Tamponun Hazırlanışı (pH 8,3)	101
7.1.11	10X Transfer Tamponunun Hazırlanışı (pH 8,3)	101
7.1.12	%12 (v/v) Poliakrilamid Jel Hazırlanışı.....	101
7.1.13	10X Tris Tampon (TBS) Çözeltisinin Hazırlanışı (pH 7,6).....	102
7.1.14	%5 (w/v) Süt Çözeltisinin Hazırlanışı (50 ml için)	102
7.1.15	Tris-Baz Çözeltisinin (1 Molar) Hazırlanışı (pH 8,5)	102
7.1.16	50x TAE Çözeltisinin Hazırlanışı (1L için) (pH 8,6).....	102
7.1.17	Kumarik Asit Çözeltisinin Hazırlanışı (10 ml için).....	102
7.1.18	Luminol Çözeltisinin Hazırlanışı (10 ml için)	102
7.1.19	10X Fosfat Tampon Çözeltisinin (PBS) Hazırlanışı (pH 7,4)	103
7.1.20	0,1 M Fosfat Tuz Tamponu (PBS)	103
7.1.21	% 10 luk Nötral formalin	103
7.1.22	10x 10mM Sitrat Tamponu (pH 6).....	104
7.1.23	1N HCl.....	104
7.1.24	10x 50mM Tris tampon (pH 7.8)	104
7.1.25	Gliserin jel.....	104
7.2	Kullanılan Cihazlar	105
7.3	Hücre Kültürü Donanımları	107
7.4	Kimyasal Maddeler.....	108
7.5	Kullanılan Antikorlar	110
8	Özgeçmiş.....	113

KISALTMALAR

AIF: Apoptoz başlatıcı faktör

Akt/PKB: Protein kinaz B

AMP: Adenozin monofosfat

AMPK: AMP-aktive protein kinaz

Apaf-1: Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1

APS: Amonyum persülfat

ASK1: Apoptoz sinyalini düzenleyici faktör 1

ATCC: American Tissue Culture Collection

ATF4/ATF6: Aktive edici transkripsiyon faktörü 4/ aktive edici transkripsiyon faktörü 6

ATG: Otofaji ilişkili protein

ATP: Adenozin trifosfat

Bad: Bcl2-ilişkili hücre ölüm agonisti

Bak: Bcl2-antagonist protein

Bax: Bcl2-ilişkili X proteini

Bcl-2: B-hücre lenfoma-2

Bcl-xL: Bcl-2 benzeri protein-1

Beclin-1: Bcl-2 etkileşimli protein

BH: Bcl-2 homoloji

Bid: BH3-etkileşim bölgesi ölüm antagonisti

Bik: Bcl-2 etkileşimli ölüm proteini

Bim: Bcl-2 benzeri protein-11

BIN2: Brassinosteroid-insensitive 2

BRI1 : Brassinosteroid insensitive 1

BAK1 : BRI1-ilişkili reseptör kinaz 1

BSA: Sığır serum albumin

BSK1: Brassinosteroid Signaling Kinase 1

BSU1: BRI1 Supressor 1

BZR/ BZR2: Brassinazole-Resistant 1 ve Brassinazole-Resistant 2
CAK: CDK aktifleştirici kinaz
CDK: Sikline bağımlı kinaz
CDKi: Sikline bağımlı kinaz inhibitörü
CHOP : CCAAT/-arttırıcı bağlanma protein homologu olan protein
GAPDH : Gliseraldehit 3-fosfat-dehidrogenaz
CLB: Hücre özütleme tamponu
DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol
DiOC₆: 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide
DISC: Ölüm indükleyici sinyal kompleksi
DISC: Ölüm indükleyici sinyal kompleksi
DMSO : Dimetil Sülfoksit
DNA: Deoksiribo nükleik asit
EBR : Epibrassinolide
EDTA: Etilen diamin tetra asetik asit
eIF2 α : Ökaryotik translasyon başlatıcı faktör 2 α
eIF4E : Ökaryotik translasyon başlatıcı faktör 4E
ER: Endoplazmik retikulum
FADD: Fas-ilişkili ölüm bölgesi
FBS: Fetal sığır serumu
FIP200: Fokal adezyon kinaz etkileşimli 200 kDa protein
FoxO : Forkhead box O
GTP: Guanozin trifosfat
IRE1 α : Inositol gerektiren enzim 1
LC3: Mikrotübül ilişkili protein-hafif zincir 3
MAPK: Mitojenle aktifleştirilmiş protein kinaz
Mcl-1: Uyarılmış miyeloid lösemi hücresi farklılaşma proteini
MDC: Monodansylcadaverine
AO: Akridin turuncusu
MEM : Minimum Essential Medium
mTOR: Memeli rapamisin hedefi

mTORC1/2: mTOR kompleks 1/2
MTT: 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
p70s6k: Ribosomal protein S6 kinase beta-1
PARP: Poli-ADP riboz polimeraz
PBS: Fosfat tamponlu tuz
PDK1 : Fosfoinositid bağımlı kinaz
PE: Fosfatidiletanolamin
PERK: Protein kinaz RNA-benzeri ER kinaz
PI: Propidyum iyodür
PI3K: Fosfatidilinositol-3-kinaz
PS: Fosfatidilserin
PUT: Putresin
PVDF: Poliviniliden florid
Raptor: mTOR-ilişkili düzenleyici protein
Rheb: Beyinde zenginleştirilmiş Ras-homolog
ROS: Reaktif oksijen türevi
SAPK/JNK : Stres ile aktive olan protein kinaz/Jun amino-terminal kinaz
SDS: Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE: SDS poliakrilamid jel elektroforezi
Ser: Serin
SPD: Spermidin
SPM: Spermin
TBS: Tris tamponlu tuz
TBS-T: TBS-Tween
TEMED: Tetrametiletildiamin
Thr: Treonin
TNF- α : Tümör nekroz faktörü
TNFR: Tümör nekroz faktörü reseptörü
TRAIL: TNF ilişkili apoptoz indükleyici ligand
Tsc1/2: Tuberoskleroz kompleks 1/2
Tyr : Tirozin

ULK-1: Unc51 benzeri kinaz-1

UPR: Katlanmamış Protein Cevabı

UV : Ultraviyole

MTT : 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide

XBP-1: X-box protein-1



SEMBOL VE BİRİM LİSTESİ

%: Yüzde

°C: Santigrat derece

µg: Mikrogram

µl: Mikrolitre

µM: Mikromolar

g: Santrifüj kuvveti

gr: Gram

kDa: Kilodalton

L: Litre

M: Molar

mA: Miliamper

ml: Mililitre

mm: Milimetre

nm: Nanometre

pH: Hidrojen kuvveti

rpm: Dakikadaki dönüş sayısı

sa: Saat

V: Volt

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2. 1. Erkeklerde ve Kadınlarda En Sık Görülen 10 Kanserin Yaşa Göre Standardize Edilmiş Şekli [4] (Dünya Standart Nüfusu, 100.000 Kişide).....	4
Şekil 2. 2. Kolon kanserin ilerlemede geçirdiği evreler [27].....	7
Şekil 2. 3. BRI1 ve BAK1 proteinlerinin moleküler yapısı [39].....	9
Şekil 2. 4. 24-Epibrassinolid'in yapısı [43].....	10
Şekil 2. 5. Brassinosteroidlerin bitki hücrelerindeki moleküler mekanizması [45].12
Şekil 2. 6. PI3K/Akt/mTOR yolağının moleküler gösterimi [50].14
Şekil 2. 7. Adenozin 5' monofosfat-aktive edilmemiş protein kinazın etki ettiği yollar [54].....	15
Şekil 2. 8. Otofajinin 3 farklı tipe ait moleküler gösterimi [58].....	16
Şekil 2. 9. Makrootofajinin moleküler mekanizması [66].18
Şekil 2. 10. Endoplazmik retikulum stresi kaynaklı gelişen katlanmamış protein cevabı moleküler mekanizması [73].20
Şekil 2. 11. Apoptozun moleküler mekanizması [76].....	21
Şekil 2. 12. Kaspazların moleküler yapısının gösterimi [80].....	23
Şekil 2. 13. Bcl-2 ailesi proteinlerinin moleküler yapıları ve sahip olduğu domenleri [82].24
Şekil 2. 14. Hücre döngüsünün genel hatlarıyla gösterimi [96].27
Şekil 2. 15. Epitel Mezenkimal dönüşüm yolağının moleküler mekanizması [101].29
Şekil 2. 16. Poliamin metabolizmasının moleküler mekanizması [105].....	31
Şekil 4. 1. SW480 ve DLD-1 kolon kanseri hücrelerinin MTT tenkniği ile hüce canlılığının EBR uygulamasını takiben gösterilmiştir.	46
Şekil 4. 2. SW480 ve DLD-1 kolon kanser hücrelerinden EBR uygulaması sonrasında elde edilen proteinlerden akt/mTOR üyelerinin protein anlatımları gösterilmiştir.	47
Şekil 4. 3. SW480 ve DLD-1 kolon kanser hücrelerinden EBR uygulamasını takiben elde edilen proteinlerden otofaji alakalı proteinlerin anlatım seviyeleri belirlenmiştir.	49

Şekil 4. 4. SW480 ve DLD-1 kolon kanser hücreleri 48 saat EBR uygulamasını takiben MDC ve AO boya tutulumları belirlenmiştir. Hücre açlığı pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.....	50
Şekil 4. 5. SW480 ve DLD-1 kolon kanser hücrelerinde EBR uygulaması ile LC3A/B ve SQSTM1/p62 antikorları ile gerçekleştirilen işaretlemenin gösterilmesi. Beta-Aktin pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.	51
Şekil 4. 6. SW480 ve DLD-1 kolon kanser hücre hatlarında EBR uygulamasını takiben poliamin havuzunun gösterilmesi (A) ve poliamin metabolizmasında önem arz eden protein anlatımlarının belirlenmesi (B).....	52
Şekil 4. 7. SW480 ve DLD-1 hücre hatlarında EBR ve SPD uygulamalarını takiben LC3A/B protein anlatımının tespit edilmesi (A) ve Otofajideki değişikliklerin acirdine orange boyamasını takiben akış sitometrisi de doğrulanması (B).	53
Şekil 4. 8. SW480 kolon kanseri hücre hattında farklı zamanlarda EBR uygulamasını takiben sferoid kültürlerin agar üzerinde ve sallanan damla modelinde oluşturulması (A) ve sallanan damla modelinde oluşturulan sferoidlerin DiOC ₆ /DAPI ile boyanması(B). 21 gün EBR uygulamasını takiben agar üzerinde oluşturulmuş sferoid kültürlerin çapındaki değişikliğin belirlenmesi ve DiOC ₆ /DAPI ile boyanması (C). Farklı konsantrasyonlarda oluşan agarda oluşturulmuş sferoid sw480 kültürlerinin 21 gün EBR uygulamasını takiben alt ve üst agarlardaki değişikliğin gösterilmesi (D).	55
Şekil 4. 9. SW40 hücrelerinin EBR uygulamasını takiben Epitel mezenkimal dönüşüm yolağında etkin proteinlerin anlatımının belirlenmesi (A) ve yara iyileşmesi modelinde oluşturulan yarıkların kapatılması (B).	56
Şekil 4. 10. SW480 hücrelerinde EBR ve EBRnin taşıyıcısı olan DMSO uygulamasını takiben elde edilen koloni oluşumlarının gösterilmesi (A). 3 boyutlu SW480 hücre kültürü ile elde edilen sferoid yapıların EBR uygulamasını takiben kontrol e kıyaslanarak gösterilmesi (B).	57
Şekil 4. 11. mEGFP-C1 plazmitinin konsantrasyonunun ve saflığının gösterilmesi (A) ve agaroz jel de belirlenmesi (B). mEGFP-C1 proteinin SW480 hücrelerinde stabil hale getirilmesi (C) ve protein izolasyonu ile doğrulanması (D).....	58

Şekil 4. 12. Elde edilen tümörlerin EBR ve DMSO uygulamasını takiben yapılmış ölçümlerinin hacimsel olarak gösterilmesi (A), yarıçap olarak gösterilmesi (B) ve görsel olarak sunulması (C).....	60
Şekil 4. 13. SW480 ile modellenmiş SCID farelerin EBR ve DMSO uygulamasını takiben yapılmış ölçümlerinin gösterilmesi (A). Modellenme işlemi yapılmamış farelerin EBR ve DMSO uygulamasını takiben yapılmış ölçümlerinin gösterilmesi (B). SW480 ile modellenmiş farelerin görsel olarak sunulması (C).....	61
Şekil 4. 14 Elizaanalysis.com aracılığı ile elde edilmiş CEA ELİZA kiti standartlarının logaritmik grafik ile doğruluğunun hesaplanması (A). Elde edilen CEA konsantrasyonlarının karşılaştırılması olarak gösterilmesi (B).	62
Şekil 4. 15. Tümörlerden alınan kesitlerin Ki67 ve sitokeratin18 antikoları ile işaretlenmesi(A) ve grafik olarak gösterilmesi (B).	63
Şekil 4. 16. Tümörlerden elde edilen proteinlerde EBR uygulamasına bağlı olarak mTOR,Otofaji ve Endoplazmik retikulum stress cevabı yollarındaki protein anlatımlarının belirlenmesi.....	65
Şekil 4. 17. Tümörlerden izole edilmiş proteinlerin EBR uygulamasına bağlı olarak Apoptoz yolağındaki proteinlerin anlatımındaki değişikliğin gösterilmesi (A) ve hücre döngüsü yolağındaki önem arz eden protein anlatımlarındaki değişikliğin belirlenmesi (B).....	66

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Kullanılan Cihazlar	105
Tablo 2 Hücre Kültürü Donanımları.....	107
Tablo 3. Kullanılan Kimyasalların Listesi	108
Tablo 4. Kullanılan anitkorlar.	110

ÖZET

Kolon kanseri, kanserden ölümlerde akciğer kanserinden sonra yer alan yaygın bir kanser türüdür. Kolon kanserinin dünyada artan görülme sıklığına bağlı olarak yeni tedavi stratejilerine ve moleküler mekanizmaların aydınlatılmasına gerek duyulmaktadır. Epibrassinolid (EBR), bitki büyüme düzenleyicilerinden brassinosteroidlerin (BR) bir üyesi olup polihidroksisteroid yapıdadır. EBR'nin omurgalılarda bulunan steroid hormonlara da yapısal olarak benzerlik gösterdiği bilinmektedir. EBR'nin apoptotik hücre ölümünü tetiklediği farklı kanser hücre hatlarında laboratuvarımız tarafından çeşitli çalışmalarda belirlenmiştir. Ayrıca, çalışmalarımız EBR'nin normal epitel hücrelerine etki etmediğini göstererek, klinikte kullanılabilirliği açısından önemli bilgiler elde edilmiştir. EBR'nin neden olduğu apoptozun moleküler temelleri SILAC (stable-isotope labelled aminoacid in cell culture) yöntemi ile belirlenmiştir. Hücre sağkalımı, apoptoz ve endoplazmik retikulum (ER) stresi ile ilgili pek çok proteinin anlamlı bir şekilde değiştiği laboratuvarımızda gerçekleştirilen deneyler ile gösterilmiştir.

Bu noktadan hareketle tez kapsamında EBR'nin potansiyel anti-tümöral etki mekanizması kolon kanseri hücrelerinde *in vitro* ve *in vivo* denemeler ile aydınlatılmak istenmiştir. Bu amaçla SW480 ve DLD-1 hücre hatları kullanılmış, SW480 hücreleri ise SCID (severe combined immunodeficiency) farelere subkutan olarak matrijel içerisinde verilerek kolon kanseri modeli oluşturulmuştur. *In vitro* deneylerde EBR'nin sferoid büyümesini engelleyici etkisi tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra, tümör oluşumunu takiben günlük EBR uygulamaları ile tümör çapı ve hacminin doz uygulamasına bağlı olarak tümör büyümesine ket vurucu etkisi tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra bu etkinin tümörü oluşturan hücrelerde apoptotik hücre ölümünün tetiklenmesinden daha ziyade hücre döngüsüne ket vurarak tetiklediği gösterilmiştir. Bu çalışma ile EBR'nin kolon kanserine karşı *in vivo* modelde olası anti-tümöral ve sistemik etkisi literatürde ilk defa modellenmiştir.

ABSTRACT

Colon cancer is the second leading cause of cancer related deaths after lung cancer. Due to the increasing incidence of colon cancer in the world, new treatment strategies and molecular mechanisms need to be clarified. Epibrassinolide (EBR) is a member of brassinosteroids (BR) from plant growth regulators and has a polyhydroxysteroid structure. EBR is also known to be structurally similar to steroid hormones found in vertebrates. Various studies have been conducted by our laboratory in different cancer cell lines in which EBR induces apoptotic cell death. In addition, our studies showed that EBR does not affect normal epithelial cells and important information was obtained in terms of its usefulness in the clinic. The molecular basis of the EBR-induced apoptosis was determined by SILAC (stable-isotope-labeled amino acid in cell culture) method. According to study results, EBR altered cell death and survival decision mechanism through effecting endoplasmic reticulum (ER stress).

From this point of view, the scope of the thesis was to elucidate the potential anti-tumor action of EBR with *in vitro* and *in vivo* experiments using colon cancer cells. For this purpose, SW480 and DLD-1 cell lines were used, and SW480 cells were administered subcutaneously in SCID (severe combined immunodeficiency) mice and colon cancer model was generated. *In vitro* experiments have shown that EBR inhibits spheroid growth. In addition, daily EBR administration following tumor formation induced tumor growth and tumor volume decrease in a dose-dependent manner. In addition, this effect of EBR was due to cell cycle inhibition rather than apoptotic cell death induction in tumor-forming cells. This study, therefore, was the first of the literature showing the possible anti-tumoral and systemic effects of EBR in *in vivo* colon cancer model.

1 GİRİŞ VE AMAÇ

Kolon kanseri gastrointestinal sistemde meydana gelen kanserden ölümlerde dünyada ikinci sırada bulunan yaygın bir kanser tipidir. Dünya sağlık örgütü (WHO)'nün 2018 tahmini verilerine göre yaygın kanser türlerine bakıldığında kolon kanseri 1.80 milyon vakada rastlanmıştır ve ölümlerle sonuçlanan kanser vakaları arasında 862 bin ile dünyada ikinci sırada yer almaktadır. [1]. Risk faktörlerine bakıldığında başlıca mutasyonlar ve bunu takiben hareketsizlik, genetik faktörler, sigara kullanımı gibi birçok farklı sebeple ortaya çıkabilir. Kadınlara kıyasla kolon kanser tipleri erkek bireylerde daha fazla görüldüğü tespit edilmiştir. Risk faktörlerine ek olarak çevresel faktörler de kolon kanserinin gelişmesinde yaş ile beraber önemli rol oynamaktadır. Çeşitli coğrafi bölge ve etnik gruplar incelendiğinde kolon kanseri görülme sıklığında önemli değişimler gerçekleşmektedir [2]. Amerikan Kanser Topluluğu (American Cancer Society) 2017 yılı istatistiklerine göre yılın ilk 4 ayında 95500 kişiye kolon kanseri teşhisi konmuştur. 50200 den fazla kişinin kolon kanserine bağlı hayatlarını kaybettiği de veriler dahilindedir [3]. Türkiye'de ise Türkiye Halk Sağlığı merkezinin 2017 verilerine göre erkeklerde kadınlara kıyas ile 2 kat daha fazla kolon kanser teşhisi mevcuttur. Bu durum uygulanmakta olan farklı tedavi stratejilerinin yetersizliğini ifade eder niteliktedir [4]. Bu veriler yeni terapötik ajanların ve de kombin tedavilerin geliştirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır.

Brassinosteroidler (BR), bitkilerde büyüme hormonu benzeri yapılarıdır. Başlıca etkileri arasında hormone dengesinin sağlanması ve korunması, enzim aktivitelerinin düzenlenmesi, protein sentezinin düzenlenmesi ve nükleik asitlerin sentezinin sağlanması gibi birçok farklı örnek bulunmaktadır. Bitki hücrelerinin membranlarında lokalize olan ve heteroligomerize reseptör halinde aktif olarak bulunur [5]. Brassinosteroid reseptör ilişkisi kurulmasını takiben RLCK, BSK ve CDG1 aktivasyonu ile ardışık seri fosforlanmalar ile sinyal itimini sağlamaktadır[6]. Sonucunda birçok farklı transkripsiyon faktörü aktive olmakta ve cevap genlerin çalışmasını sağlamaktadır.

Brassinosteroidler sahip oldukları steroid yapılarından ve işlevlerinden ötürü prostat hücrelerinde ki androjen ve meme hücrelerinde ki östrojen'e benzedikleri düşünülmektedir. Bir BR türevi olan 24-epibrassinolid (EBR) çeşitli kanser hücrelerinde poliamin metabolizmasını, endoplazmik retikulum stresini ve bu yollara bağlı apoptoz sinyal yolağını çalıştırmış ve hücrelerin programlanmış hücre ölümüne gitmelerini sağlamıştır [7-10]. Yapılan çalışmalar EBR'nin gelişen kanser tiplerinde de hücre döngüsü ve apoptoz yolağında etkin kaspaz aileleri, Bcl-2 aile proteinleri gibi birçok farklı protein ailesini etkilediği ortaya konmuştur [11]. Aynı zamanda farklı p53 profiline sahip kolon kanser hücrelerinde endoplazmik retikulum stresini takiben gerçekleşen katlanmamış protein cevabı (UPR) ile apoptotik hücre ölümüne gittiği belirlenmiştir. Aynı zamanda UPR aktivasyonu ile ubiquitinlenen protein miktarında artış olduğu ortaya konmuştur [8, 12].

Otofaji hücrelerde biriken ve enerji geri dönüşümü için kullanılacak olan genel hücre içeriğinin kargolar halinde otofagozomlarla çevrilerek lizozom organeli ile füzyon gerçekleştirilmesi sonucu ile enerjinin geri kazanımını sağlayan bir işlemdir. Bu işlem sırasında otofagozom ve lizozom füzyonunu takiben ortaya otolizozom çıkmaktadır[13]. Otofaji sinyali genellikle kanser hücrelerinin uygulanan strese karşı oluşturduğu erken hayatta kalım cevabını ifade etmektedir. Fakat yapılan çalışmalar uzun süreli stres varlığında hücrelerin programlanmış hücre ölümü olarak bilinen apoptoz yolağını destekleyecek şekilde otofaji sinyali ile öldüğünü göstermiştir [14]. Otofaji sinyali hücre açlığına veya stres cevabına karşı gelişen ve stress faktörleri sayesinde ortaya çıkmış hasarlı protein, organel, lipid yapılar ve birçok benzeri yapının ortadan kaldırılması ile enerjinin geri dönüştürülmesini hedeflemektedir. Otofajinin başlatılması genellikle mTOR proteinin inhibe olmasını takiben Ulk-1 proteinin serin 555 den fosforlanması ile başlar. Fosforlanma işlemi sonrasında Beclin-1 Bcl-2 proteinleri arasındaki homodimerizasyon bozularak otofagozom membranının nükleasyonu başlamaktadır. Ulk-1 proteinine gerçekleştirilen bu fosfat transferini AMPK adı verilen ve hücrede açlık sensörü olarak görev yapan bir protein tarafından gerçekleştirildiği bilinmektedir. [15] Bu noktada Ulk-1 proteininden bağımsız olarak Beclin-1 Bcl-2 proteinleri arasında ki heterodimerizasyonu JNK proteininin bozduğu da bilinmektedir. JNK aynı zamanda

endoplazmik stresine bağlı olarak aktifleşerek hücre ölümünü tetikleyen bir proteindir. EBRnin uzun süreli stress kondüsyonunu takiben JNK protein anlatımını arttırması endoplazmik retikulum stresini takiben Ulk-1 proteininden bağımsız otofaji aktivasyonu ile hücre ölümünün gerçekleşebileceğini ifade etmektedir [16].

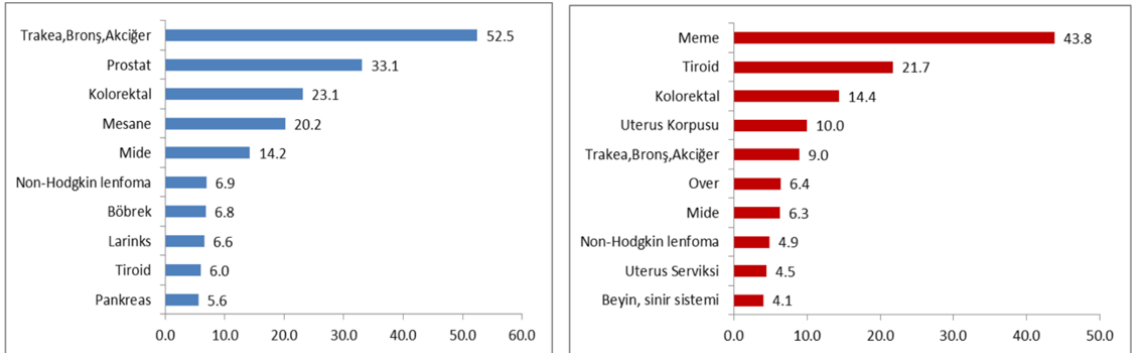
WO 2005023073 A1 patent no'lu alışma EBR'nin toksik olmayan bir kimyasal yapıya sahip olduğunu ve farelerde kullanılabileceğini ifade etmektedir. Sıçanlarda yapılan EBR alışması 36 hafta boyunca içme sularına eklenen EBR ile birlikte sıçanlarda kanda kolesterolü taşımakta olan lipoprotein (LDL) değerlerini %10 ile %25 arasında düşürdüğü tespit edilmiştir [17]. SW480 kolon kanser hücrelerinin immun sistemi baskılanmış farelerde tümör oluşturabilme özelliğine sahip olduğu bilinmekte olup patentte belirtilen letal dozları aşmadan EBR kullanımının mümkün olduğu düşünölmektedir.

Bu bilgiler doğrultusunda bu tez çalışmasının amacı *in vitro* alışmalarda kolon kanser hücrelerinde endoplazmik retikulum stresine bağlı apoptoz yolağını çalıştıran fakat epitel hücrelerinde apoptotik bir etki gözlemlenmeyen EBR ilacının *in vivo* alışma ile etkisinin doza bağlı olarak doğrulanması, EBR'nin ilk kez *in vivo* deneyleerde incelenecek olmasına bağlı olarak oluşturulan SW480 ksenograft fare modellerinin EBR arasındaki ilişkinin aydınlatılması ve elde edilen verilerin gelecekte ki faz çalışmalarına öncü veri olarak kullanılması amaçlanmaktadır.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 KOLOREKTAL KANSER EPİDEMİYOLOJİSİ

Kolon kanseri, kanserden ölüm nedenleri arasında üçüncü sırada yer alan dünya genelinde büyük oranlarda her yıl artan sayıda yeni tanının bulunduğu önemli bir sağlık problemidir. Global surveillance of trends in cancer survival 2000-14 (CONCORD-3), verileri dünya üzerinde kanser türlerinin %75'ini gösteren ve sık rastlanılan kanserlerden her biri için 2000–2014 yılları arasında hastalıkları tespit edilen bireylerden elde edilmiştir. CONCORD-3 çalışmasında, kolon kanserine 65 ülkede 4.198.637 yetişkin de rastlanılmıştır ve sağ kalımın özellikle Orta ve Güney Amerika'da, Asya'da ve Avrupa'da geniş ölçüde değiştiği belirtilmiştir [18]. Ayrıca Türkiye Birleşik Veri Tabanı (TÜİK) verilerine göre de kolon kanseri hem kadınlarda hem de erkeklerde üçüncü sırada yer almaktadır. Erkeklerde yüz binde 23,1 ve kadınlarda ise yüz binde 14,4 sıklığında görülmektedir (Şekil 2.1). World Health Organization (WHO) 2018'de tahmini verilerine göre ölümün önde gelen nedenleri incelendiğinde en yaygın kanserlere bakıldığında kolon kanseri için dünya çapında 1,8 milyon vaka tespit edilmiştir ve ölümlere neden olan kanserler sıralamasında kolon kanseri 862 000 ölüm ile ikinci sırada yer almaktadır (4).



Şekil 2. 1. Erkeklerde ve Kadınlarda En Sık Görülen 10 Kanserinin Yaşa Göre Standardize Edilmiş Şekli [4] (Dünya Standart Nüfusu, 100.000 Kişide)

2.1.1 Kolorektal Kanser Risk Faktörleri

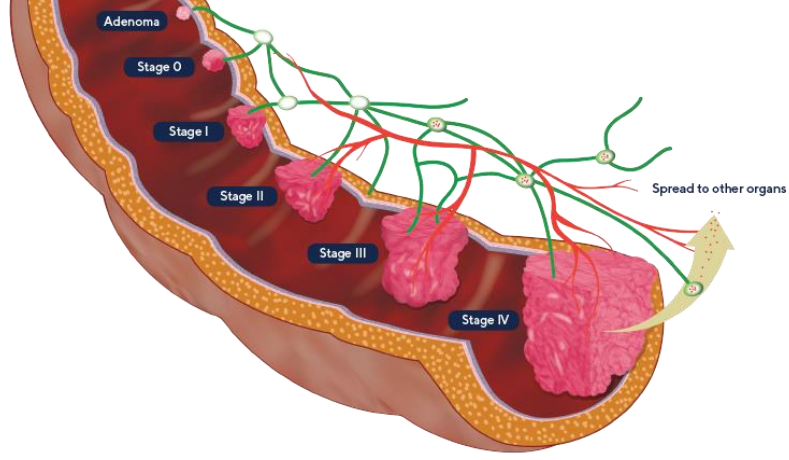
Kolon kanseri ile ilgili dünya üzerinde çeşitli popülasyonlarından elde edilen epidemiyolojik bulgulara göre kolon kanserine rastlanma sıklığı ülkelere ve topluluklara göre farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir. Kolon kanseri üzerinde etkisi olduğu düşünülen faktörler ise yaş, diyet, çevresel faktörler, vücut kitle indeksi (kg / m² olarak BMI), kolon kanseri aile öyküsü, sağlık davranışı ile ilgili (beslenme, sigara, alkol ve diğer) faktörler ve inflamatuvar bağırsak hastalıklarıdır. Yapılan analizlerde aşırı kilolu olan obez erkeklerde kolon kanseri riskinde artış olduğu tespit edilmiştir ve erkeklerde kadınlara oranla daha yüksek bir ilişki olduğunu kadınlarla erkekler arasındaki abdominal yağlanma oranlarının farklılığının kolon kanser riskini etkilediği düşünülmektedir [19]. Kolon kanseri için kalıtsal olmayan etkenler arasında yer alan yaş faktörü en önemli risk faktörüdür. Bakıldığında 40 yaş itibari ile kolon kanseri riski artmaya başlamaktadır ve 50 yaş üzeri risk hızlı bir artış göstermektedir. Özellikle kolon kanseri vakalarının %90'ının 50 yaşından sonra geliştiği tespit edilmiştir [20]. Genetik risk faktörleri incelendiğinde ise genetik mutasyonlara bağlı olarak gelişen kolon kanseri üzerinde; p53 geninde de meydana gelen mutasyonlar kolon kanseri hücrelerine büyük bir oranda çoğalma, hücre döngüsü ve apoptozun kontrolünün ortadan kalkması gibi sonuçlar meydana getirmiştir. HNPCC (Hereditör nonpolipozis kolon kanser) hastalarında FAP hastalığında ve APC genindeki mutasyon sebebiyle kolon kanseri gelişmektedir [21]. Ailede kolon kanseri öyküsünün bulunması önemli bir risk faktörüdür ve özellikle birinci dereceden akraba birlikteliğine bağlı olarak ortaya çıkan sonuçlar yüksek oranda pozitif bir ilişki göstermektedir. Kolon kanseri risk faktörleri içerisinde istatistiksel olarak anlamlı derecede en yüksek oranda risk faktörleri ise birinci derece akrabalarında hem kolon kanseri öyküsü bulunan hem de inflamatuvar bağırsak hastalığı bulunan vakalar da belirlenmiştir [22].

2.1.2 Kolorektal Kanserde Tanı ve Tedavi Stratejileri

Kolon kanserlerinin %80'inden daha yüksek bir oranı kolon poliplerinden gelişmektedir ve kolonda polip ya da erken evrede kanserin belirlenmesinde tarama testleri kullanılması ile uygun tedavi yöntemleri belirlenerek hastalar normal yaşamlarını sürdürebilmektedir. Ayrıca erken teşhis için geniş tarama programları son derece önemlidir. Kolon kanser

taraması ve erken tanısı için belirlenen en doğru yöntem kolonoskopi olarak belirlenmiştir. Kolonoskopi lezyonun doğrudan tesbit edilmesi ve biyopsi alınmasına yardımcı olan invaziv bir yöntemdir. Kolonoskopi Amerika Birleşik Devletleri, Almanya, Polonya ve İtalya gibi ülkelerde ilk sırada tercih tanı ve tarama testi olarak kabul edilmiştir [23]. Ayrıca tarama ve erken tanıda en sık tercih edilenler sigmoidoskopi, kolonoskopi ve görüntüleme yöntemleri olduğu belirlenmiştir. Kolon kanseri tanı ve tarama yöntemleri arasında yer alan sigmoidoskopi ise kısaca kalın bağırsağın son kısmının endoskopik bir cihaz vasıtasıyla kontrol edilerek tanı konulmasına yardımcı olmaktadır. Kolon kanserinde erken tanı için kullanılan bir diğer yöntem dışkıda gizli kan testi (faecal occult blood testing, FOBT) olarak bilinmektedir. FOBT uzun zamandır kolorektal kanser tarama programlarında kullanılmaktadır ve sensitivite %12,9-%79.4, spesifitesi %86.7-%97.7 oranları arasında gösterilmiştir [24]. Ayrıca diğer tanı testlerine göre kolonoskopi ile karşılaştırıldığında daha ucuz bir test olarak bilinmesine karşın güvenilirliği ve hassasiyeti daha düşük olduğu görülmüştür [25]. Kolon kanseri tanı testleri olarak fekal immünokimyasal test (FIT) ve dışkı DNA testi (sDNA) de kullanılmaktadır. FIT testi yanlış pozitiflik ya da negatiflik sonuçlar verebilmektedir ve sDNA testi ise oldukça pahalı olması nedeniyle çok tercih edilmeyen tanı yöntemleridir [26].

Kanser tanısı koyulduktan sonra yapılması gereken en önemli adım evresinin belirlenmesidir. Hastalığın evresi tespit edilerek kanserin vücuttaki durumu, ilerlemesi ve hangi evrede olduğu bulunabilmektedir. Kolon kanseri evreleri I-IV arasında evrelendirilir ve tedavi yöntemleri de vakanın evresine göre belirlenmektedir. Bu evrelerden I. kanser kalın bağırsağın yüzeyini döşeyen hücreler(mukoza) yoluyla büyüme göstermiştir, II. kanser kalın bağırsak duvarı içerisine veya duvar boyunca büyüme göstermiştir, III. kanser yakındaki lenf düğümlerine yayılmıştır, IV. kanser diğer organlar ve uzak bölgelere yayılmaya başlamıştır [2].



Şekil 2. 2. Kolon kanserin ilerlemesinde geçirdiği evreler [27].

Kolon kanseri tedavi yöntemleri incelendiğinde üç ana tedavi seçeneği bulunmaktadır. Bu tedavi yöntemleri cerrahi müdahale, radyasyon ve kemoterapi tedavisidir. Kolon kanserinde erken evrede cerrahi müdahale tercih edilmektedir [28]. Kolon kanserinin erken evrede tanımlandığında yerel ve tamamen polip içerisinde bulunduğu kolonoskopi yöntemi ile kanser tamamen çıkarılabilmektedir. Ancak büyük poliplerin çıkarılması için ise endoskopik mukoza rezeksiyonu ile kalın bağırsağın iç yüzeyini döşeyen hücrelerin bir bölümünün alınması ile gerçekleştirilir. Cerrahi müdahalelerden kolonoskopi yapılmasına karşın çıkarılamayan polipler laparoskopik cerrahiyle çıkarılabilmektedir. Kolon kanserinin ileri evrelerinde ise karaciğer ve akciğerlere yayılması durumlarında tedavi amacıyla RFA (Radiofrequency ablation) veya dondurarak kesme adı verilen teknik kullanılarak cerrahi müdahale gerçekleştirilebilmektedir [29, 30]. Kolon kanseri tedavi yöntemlerinin bir diğeri ise radyoterapidir. Kolon kanserinin lokal ileri evre vakalarında ameliyat öncesi ve sonrası cerrahi ile birlikte radyoterapi tedavisi kullanılmaktadır. Özellikle tekrar eden kanser vakalarında cerrahi müdahale ile birlikte uygulanan radyoterapi ve kemoterapi birlikte uygulanarak kombine terapi yapılabilmektedir. Kullanılan radyoterapi teknikleri ise; preoperatif radyoterapi, kısa süreli radyoterapi ve uzun süreli radyoterapidir [31, 32].

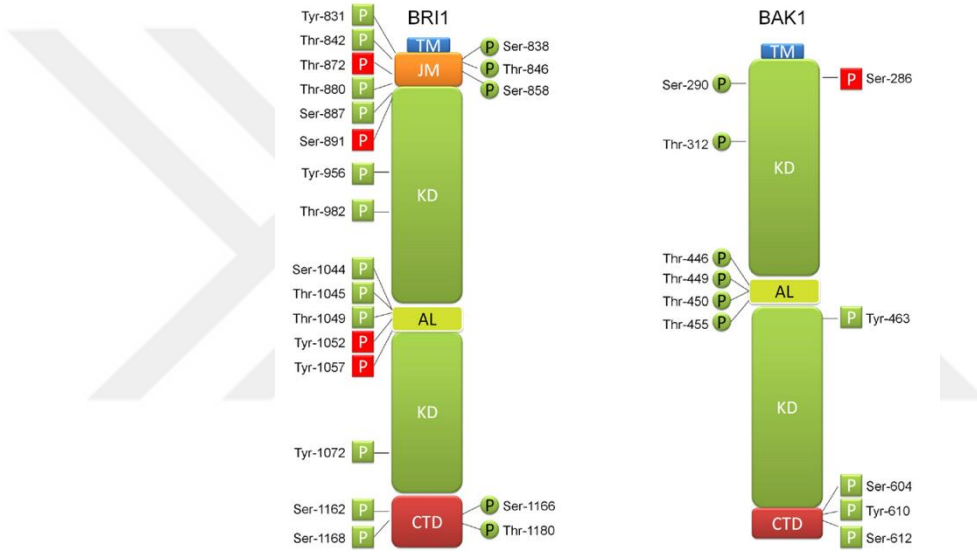
Kolon kanseri tedavi yöntemleri arasında yer alan kemoterapi özellikle invazif tümörlerde ve lenf düğümü yayılımına bağlı olarak kolon kanseri evrelerinden II ve III. evrelerde

standart olarak uygulanan tedavi yaklaşımıdır. Kemoterapi özellikle cerrahi müdahaleler ve radyoterapi ile birlikte uygulanabilmektedir. Kemoterapi eğer cerrahi müdahale öncesi verilir ise uygulanan bu tedavi şekli neoadjuvant olarak isimlendirilirken, cerrahi müdahale sonrasında verilen kemoterapi ise adjuvant olarak tanımlanmıştır. Kolon kanserinde kemoterapi, sıklıkla ameliyattan sonra ya da kanserin tekrarlaması riski taşıyan vakalarda kanser sebebiyle ölümün azaltılmasına amacıyla kullanılmaktadır [33, 34].

2.2 BRASSINOSTEROİDLER

Brassinosteroidler (BR) polyhydroxysteroidler olarak bilinen bir gruba dahildir ve bitkilerde bulunurlar. 1970 yıllarında Mitchell et al. tarafından keşif edilen bu bileşikler kök uzamasında ve hücre bölünmesinde işlevsel olarak nitelendirilmiş ve *Brassica napus* da gösterilmiştir. İlk olarak 1979 yılında *Brassica napus* dan biyolojik aktif bir molekül olarak izole edilmiştir. 23 kg *Brassica napus* poleninden sadece 10mg BR elde edilmiştir. Büyüme teşvik edici özelliği ile bilinen bu bitki hormonları 60 farklı çeşidinin olduğu bitki steroid ailesine dahildir. [35]. Toplamda 70 den fazla bileşik bitkilerden izole edilmiştir. Fakat bunlardan sadece 42 tanesi brassinostreoid metabolit ve konjugat olarak bilinmektedir. Bitkilerde BR'lerin elde edilmesinde çeşitli metabolik işlemler mevcuttur. Bunlar; dehidrojenasyon, epimerleme, esterifikasyon, glikosilasyon, hidroksilasyon ve sülfonasyon olarak bilinmektedir [36]. Brassinosteroid metabolizması 2 farklı ana kategoride incelenebilir. Bunlar; steroidal iskelette yapısal değişimler ve yan zincirde ki yapısal değişimler. BR ler steroid hormonların bitki benzer olarak kabul edilirler. Gerçirdikleri yapısal değişiklikler ile çeşitli bileşiklere dönüşerek işlevsel olarak farklılaşırlar. BR yolağında yer aldığı bilinen genlerden biri *Arabidopsis thaliana* da karakterize edilmiştir. CYP72B1 olarak bilinen bu gen sitokrom p450 monooksijenaz transkripsiyonunu sağlamaktadır. [37]. Biyoaktif BR'lerin hidroksilasyon katelizlemesi ile karakterize edilmiştir. BRler birçok farklı yolak ile metabolize edilirler. BRlerin dağılımı bitki türleri arasında farklılık göstermektedir. Bu sebeple *in vivo* bir ölçüm yapmak zordur. Bu sebeple *in vivo* ortamdaki BR dağılımı ve metabolizması hakkında kısıtlı bilgi elde edilebilmiştir. Ekzojen BR'leri radyo işaretleme tekniği ile işaretleyerek

kullanılmış ve BR ların metabolizması bu şekilde anlaşılmaya çalışılmıştır. BR'ler yapısal olarak hayvanlardaki androjen, östrojen ve kortikoidlere çok benzemektedir. Yeşil alglerde ve vasküler bitkilerde gelişme ve büyüme adına büyük önem arz ederler. [38]. BR'lerin varlığında bitki hücrelerinde bulunan belirli reseptörler çalışmakta ve sinyal iletimini sağlamaktadır. BAK1 ve BRI1 gibi reseptörlerin BR varlığında aktive olduğu bilinmekte ve bu aktivasyonun BR bağımlı ve BR bağımsız olarak gerçekleştiği gösterilmektedir [39].

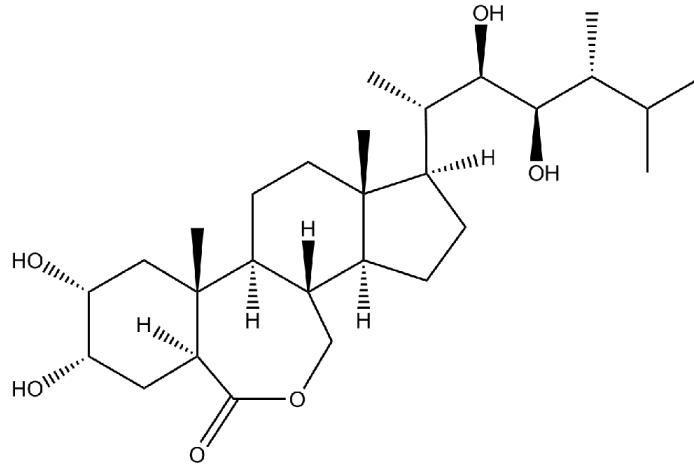


Şekil 2. 3. BRI1 ve BAK1 proteinlerinin moleküler yapısı [39]

2.2.1 Epibrassinolid

EBR bilinen en efektif BR'lerden biridir. Uzun süredir bitkilerdeki etkileri araştırılan EBR nin kanser hücreleri üzerindeki etkileride ayrıca belirlenmektedir. Birçok farklı kanser türünde farklı yolları çalıştırdığı bilinen EBR' nin moleküler mekanizması günümüzde de aydınlatılmaya devam edilmektedir. EBR *Brassica* bitki ailesi türlerinden izole edilen steroid yapıya sahip bir bitki hormonu olarak karakterize edilir. Kanser hücrelerinde kemoterapötik ilaç benzeri etki gösterdiği günümüzde belirlenmeye devam etmektedir. Bitkilerde yüksek dozlarda kullanılmakta ve tuz stresi, Bakır stresi, oksidatif stress, civa stresi gibi birçok farklı stres türüne karşı cevap oluşturulmasını sağlamaktadır. Bitkilerde yapılan çalışmalarda civa stresi sebebi ile yaşamsal süreci korumak için gerekli olan elementlerin hücreye alınmadığı belirlenmiştir. EBR uygulaması ile beraber lipid

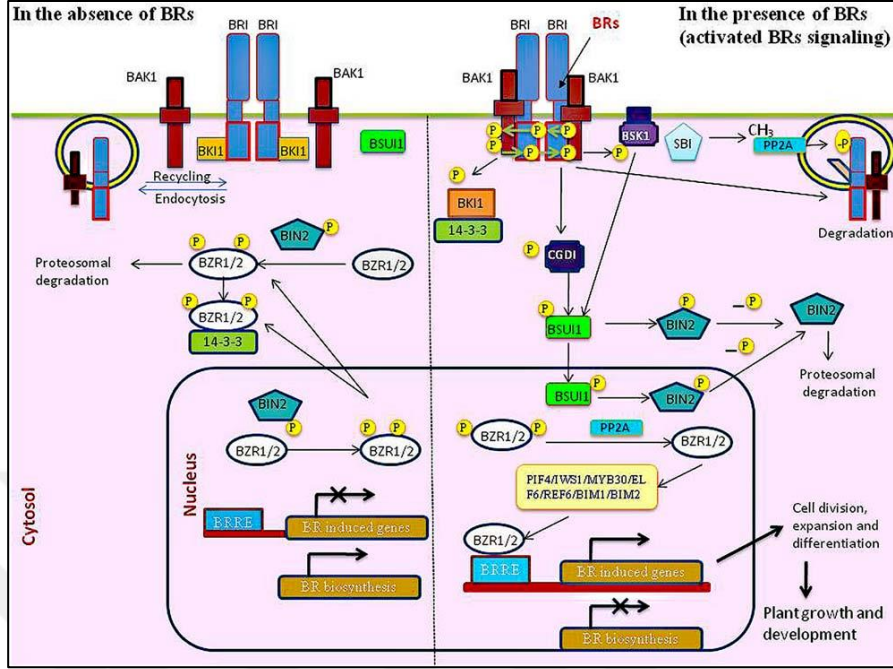
peroksidasyonu düşmüş, antioksidan metabolizması artmış ve reaktif oksijen türevlerinin üretimine kısıtlama getirilmiştir. EBR uygulaması sayesinde osmolite miktarında artış olmuş ve yaprak pigment sisteminde artış gözlemlenmiştir. [40].Nohut olarak bilinmekte olan *Cicer arietinum* ile yapılan bu deneyler ışığında EBR nin antioksidan metabolizmasını arttırdığı ve bitkiyi civa stresinden kurtararak büyüme performansında artış sağladığı gösterilmiştir. Birçok farklı kanser tipinde normal hücreleri etkilemeden kanser hücrelerinde apoptotik cevabı oluşturduğu belirlenmiştir. Prostat kanser hücrelerinde poliamin katabolik etkisini kullanarak p53 protein anlatımından bağımsız olarak apoptozu başlattığı gösterilmiştir. [41] Aynı zamanda yapılan SILAC çalışması ile prostat kanserinde ER stresine bağımlı olarak apoptozu aktive ettiği kanserinde gösterilmiştir. [42]Kolon kanser hücrelerinde ER stresine bağlı olarak apoptozu aktive eden EBR aynı zamanda p53 ve nükleer steroid hormon reseptörlerinden bağımsız olarak apoptoz mekanizmasında sinyal iletimini sağlamıştır [8]. EBR'nin kolon kanser hücrelerinde PI3K ve MAPK yollarını aktifleştirerek FoxO3a bağımlı mitokondriyal strese bağlı apoptozu gerçekleştirdiği gösterilmiştir [9]. Hormon bağımlı ve hormon bağımsız meme kanser hücrelerinde ise hücre bölünmesini durdurarak apoptozun aktive olmasını sağladığı belirlenmiştir. Prostat kanserinde ekinin androjen benzerliği ile alakalı olduğu düşünülürken meme kanserinde östrojen ile alakalı olduğu düşünülmektedir [11].



Şekil 2. 4. 24-Epibrassinolid'in yapısı [43]

2.2.2 Epibrassinolid'in Bitki Hücrelerindeki Moleküler Mekanizması

Epibrassinolid'in bitkilerde etki ettiği yolak brassinosteroid etki yolağı olarak belirlenmiştir. BR plazma membranının ekstraselüler bölgesinde bulunan lösün zengin tekrar reseptörlerine benzeyen kinaz (LRR-RLK) BRI1 ve 2 homologu BRL1 ve BRL3 tarafından algılanır. BRI'lerin iskelet yapısında 25 ve 24 ünite LRR mevcuttur. Diğer bir BRI1 homologu olan BRL2 vasküler gelişimden görevlidir [44]. Fakat korunmuş olan arjinin588 ve glisin690 bölgelerine sahip olsa da BR'lere bağlanamamaktadır. Ortamda BR yokken BRI1 homodimer şeklinde inaktif olarak bulunmaktadır. BRI1 kinaz inhibitör (BKI1) ile interaksiyon kurarak inhibe olan BRI1 homodimeri ayrıca siktoplazmik kinaz domeninden otomatik inhibe edilme fonksiyonunda gerçekleştirebilir. BIN2 ve GSK3/shaggy-like kinaz BES1/BZR2 ailesi transkripsiyon faktörlerini fosforlayarak DNA ya bağlanma miktarını azaltarak, 14-3-3 tarafında sitoplazmada tutulmasını sağlayarak veya protein degradasyon sistemine yönlendirerek inhibe eder [38]. BR aktivasyonu sağlandığında ise BRI1 yardımcı reseptörü olan BAK1 ile heteroligomerize olur. Bu reseptör aynı zamanda SERK3 olarak bilinir. Bu durum BRI1 in otofosforlanmasına sebep olur. BRI1 ve BAK1 eşleşmesini sağlayarak 14-3-3 proteinini tutar ve BR yolağını engelleyecek negatif fonksiyonlarını sonlandırır. Aktif olan bu heteroligomerik reseptörler RLCK, BSK ve CDG1 aktifasyonunu sağlayarak fosforlanma kaskatını başlatır. Bu durum BSU1 in fosforlanmasına sebep olur. BSU1-CDG1 veya BSUI-BSK1 komplekslerinden biri GSK3 benzeri kinaz BIN2 ye sinyal iletimini sağlar. Ardından BSU1 BIN2 'yi de fosforlayarak BZR1 ve BZR2 (BES1) üzerindeki inhibe edici özelliğini kaybetmesini sağlar [45]. PP2A protein ise BZR1 ve BZR2 yi defosforlayarak 14-3-3 proteininden ayrılmasını sağlar. Bu sayede 14-3-3 tarafından sitoplazmada tutulan transkripsiyon faktörü nukleusa transloke olarak hedef genlerin kontrolünü sağlar [38]. Bitkilerdeki bu reseptörler irdelendiğinde etkinin hayvanlarda bulunan tirozin kinaz reseptörleri ile ilişkilendirilmesi mümkündür. EBR hayvan hücrelerinde benzer şekilde yollara etki etmektedir.

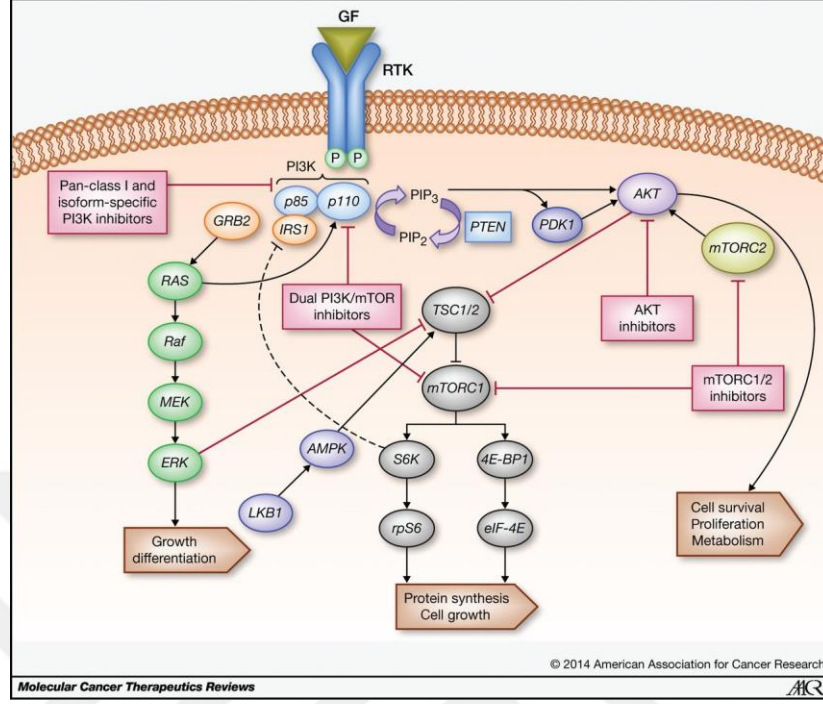


Şekil 2. 5. Brassinosteroidlerin bitki hücrelerindeki moleküler mekanizması [45].

2.3 PI3K/AKT/MTOR YOLAĞI

Bu yolak Reseptör tirozin kinaz (RTK) 'lara büyüme sinyali bağlanması sonrasında aktif olur. Reseptörün aktifleşmesi sonrasında PI3K class I olarak bilinen p85 ve p110 alt ünitelerinden oluşan kompleks PIP2 yi PIP3 e çevirerek yolağın devamlılığını sağlar. Alternatif olarak GRB2 aktifleşmesi MAPK yolağı olarak bilinen ve sırası ile SOS, RAS, RAF, MEK ve ERK proteinlerinin fosfatlanması ile devam ederek sonuçta hücre büyümesi ve farklılaşması sinyalini başlatan bir başka yolağın da devamlılığını sağlar [46]. PIP3 sinyalinin devamlılığının engellenmesi için PTEN protein PIP3 ü PIP2 ye çevirerek sinyalin durdurulmasını sağlar. PIP2 den PIP3 elde edilmesi sonrasında PDK1 serin241 den fosfatlanır ve kaskat devam eder. P-PDK1 proteini AKT proteinini treonin308 amino asitinden fosfatlayarak aktifleşmesini sağlar. [47]Fosfatlanma kaskatı olarak devam eden bu yolakta AKT protein mTORC2 tarafından doğrudan da serin473 den fosfatlanarak aktifleştirilebilir. Bu fosfatlanma işlemi geri besleme mekanizması olarak çalışmaktadır. Akt proteini hücrenin sağ kalımını sağlayan bir proteindir. Diğer adı Protein Kinaz B (PKB) olarak bilinen Akt, IKK α proteinin treonin23 den fosforlanması ve CREB proteinin serin133 den fosforlanması ile hayatta kalımı sağlayan genlerin

çalışmasını sağlar [48]. Aynı zamanda MDM-2 proteinini serin166 ve serin186 amino asitlerinden fosforlayarak p53 tarafından kontrol edilen apoptoz yolağının inhibe edilmesini sağlar. MLK3'ü serin647 den, ASK1'i ise serin83 den fosforlayarak SAPK yolağının inhibe edilmesini sağlar. Kaspaz9 u serin196 dan fosforlayarak kaspaz bağımlı apoptoz yolağına ket vurur. Aynı zamanda FoxO1'i treonin24, serin256 ve serin319 dan, FoxO3'ü treonin32, serin253 ve serin315 den ve FoxO4'ü treonin28, serin193 ve serin258 den fosforlayarak hücre ölüm genlerinin baskılanmasını sağlar. Akt protein önemli bir metabolic sensör olan AMPK proteinini α -alt ünitesinde ki serin487 den fosforlayarak inhibe eder. Aynı zamanda BCL-2 ailesi proteinlerinin ekspresyonunu kontrol ederek hücre canlılığının korunmasını sağlarken BAD gibi apoptozu teşvik eden protein baskılanmasını sağlar. Aynı zamanda hücre bölünmesinin durdurulmasına etki eden p27 proteinini baskılayarak hücre bölünmesinin devamlılığını kontrol eder. Fosfatlanan Akt TSC1/2 proteinini baskılayarak mTORC1'in baskılanmasının önüne geçer. mTORC1 protein kompleksi mTOR ve Raptor proteinlerini içinde barındıran bir komplekstir. mTOR protein translasyonun kontrolünü ve hücre metabolizmasında etkili proteinlerin ekspresyonlarının düzenlenmesinde rol oynayan anahtar bir proteindir. mTOR proteinin serin2448 amino asitinden fosfatlanması durumu mTORC1'in aktif konumda olduğunu ifade ederken serin2481 amino asitinden fosfatlanması proteinin mTORC2 bağımlı çalıştığı anlamına gelir. Bu değişim mTORC1'in baskıladığı ULK-1 proteinin serin555 den fosfatlanarak otofaji sinyalini başlatmasını önlemek için kullanılır. ULK-1 proteini işlevsiz kılınmak için serin757 amino asitinden fosfatlanmalıdır. Ayrıca mTORC1 proteini P70S6K treonin389 dan fosforlayarak S6 ve eIF4B proteinlerinin regülasyonunu sağlayarak protein sentezini pozitif yönde kontrol eder [49]. Aynı zamanda 4E-BP1 proteinin regülasyonunu sağlayarak eIF4E proteinine bağlı olarak translasyonun kontrolünü sağlar. Hücre enerji metabolizmasında ki denge değişimine göre translasyonun inhibe edilmesini kontrol eder. mTOR protein birçok farklı yolağın kontrolünü sağlamaktadır. Translasyonun yan sıra Lipin-1 proteinine bağlı lipid biyosentezini ve gliserolipid metabolizmasının kontrolünü sağlarken, Grb10 poteline bağlı lipoliziz ve CLIP-170 proteinine bağlı mikrotübül organizasyonu gibi birçok farklı yolağın kontrolünü sağlar [50].

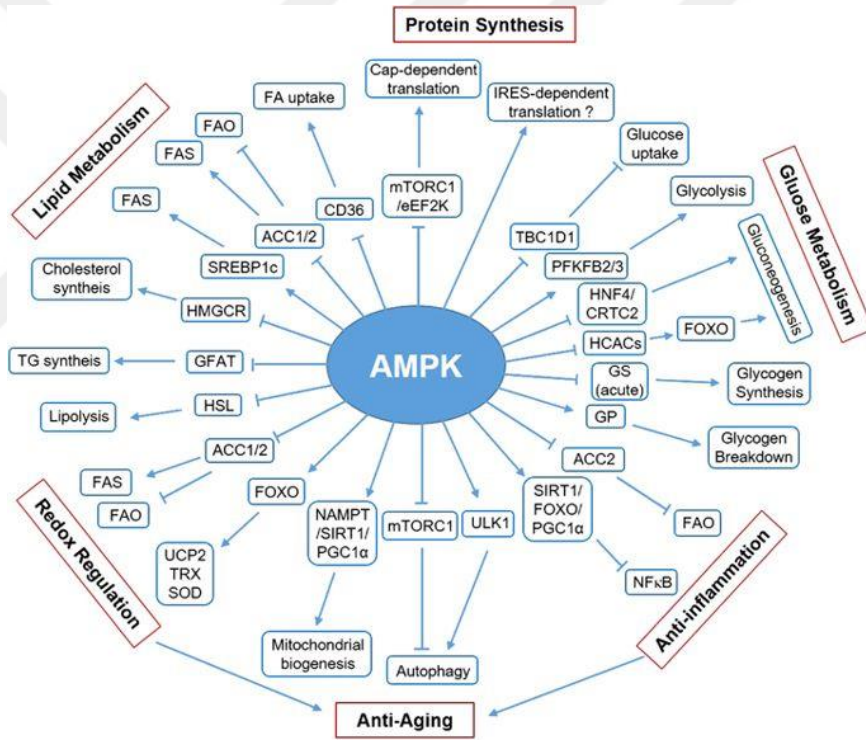


Şekil 2. 6. PI3K/Akt/mTOR yolğunın moleküler gösterimi [50].

2.4 ADENNOZİN 5'MONOFOSFAT-AKTİVE EDİLMEMİŞ PROTEİN KİNAZ (AMPK) SİNYAL YOLAĞI

Adennozin 5'monofosfat-aktive edilmemiş protein kinaz (AMPK) proteini metabolik bir sensör olup hücre metabolizmasını kontrol eder. AMP konsantrasyonunun ATP konsantrasyonundan daha fazla olması durumunda hücre açlığını ifade eden bir durum oluşmaktadır. AMPK protein heterotrimerik bir komplekstir. Bir adet katalitik α -alt ünitesi, 2 adet regülatör β - ve δ -alt ünitelerini barındırır. Memelilerde, AMPK α - ve β -alt üniteleri 2 farklı izoformda bulunurken gamma-alt ünitesi 3 farklı izoformda bulunur. Bu izoformlar 12 farklı potansiyele sahip kombinasyonun oluşmasını sağlar. AMPK proteini treonin172 amino asitinin α -alt ünitesinde fosforlanması veya AMP ya da ADP nin δ -alt ünitesine bağlanması ile aktifleşir. ATP yarışıl olarak δ -alt ünitesine bağlandığı için AMPK proteinin AMP/ATP veya ADP/ATP oranları arasında bir sensör görevi görmesine olanak sağlar [51, 52]. AMPK α -alt ünitesinin treonin 172 den fosforlanması en az 3 kinaz ve 3 fosfataz tarafından kontrol edilir. Bunlar Karaciğer kinaz B1 (LKB1) olarak bilinir. LKB1, STRAD (ste20-related adaptor) ve MO25 (mouse protein 25)

proteinleri ile beraber heterotrimerik yapıda bulunur. Geri kalanlar ise CaMKK2, TAK1, PP2A, PP2C ve PPM1E olarak bilinir. AMPK proteinin aktifleşmesi durumunda hücre metabolizmasındaki anabolizmayı ifade eden yolların baskılanması ve gerekli ise katabolizmayı ifade edecek olan yolların aktifleşmesi sağlanır. p-AMPK treonin172 otofaji başlatıcı protein olarakta bilinen ve açlık durumunda fosfatlanan Ulk-1 proteinini serin555 amino asitinden fosfatlar ve otofajiyi başlatır. Ayrıca mTORC1 in baskılanmasını sağlayarak cap-bağımlı translasyonun sonlanmasını sağlar. AMPK protein aynı zamanda Asetil koa karboksilaz (ACC)'ın serin79 amino asitinden fosforlanarak lipid metabolizmasının inhibe edilmesini kontrol eder [53].

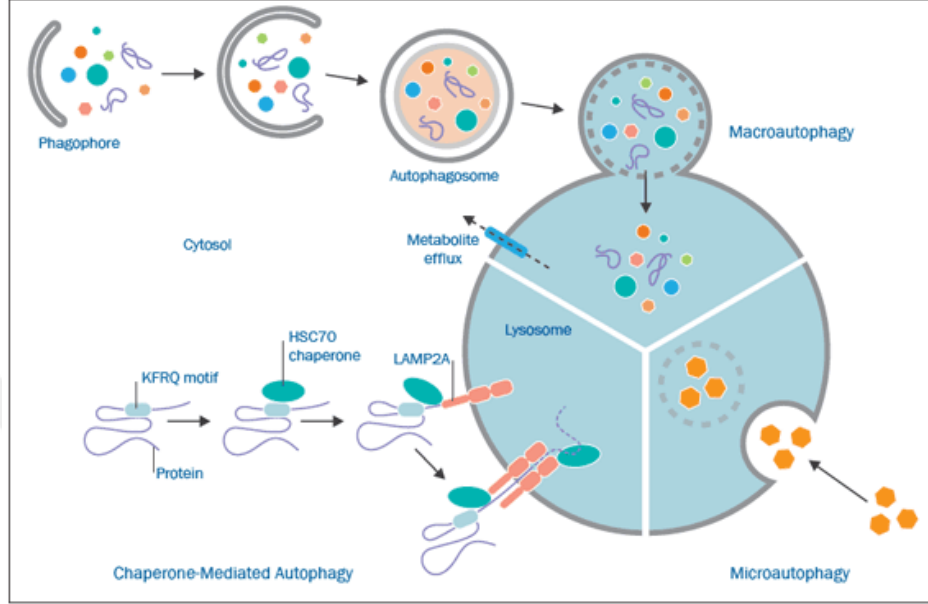


Şekil 2. 7. Adenozin 5' monofosfat-aktive edilmemiş protein kinazın etki ettiği yollar [54].

2.5 OTOFAJI

Otofaji türler arası korunmuş bir katabolik işlemdir. Birçok stress kondüsyonu altında hücrelerin hayatta kalmak amacı ile besin ve enerji dengesini korumak amaçlı gerçekleştirdiği bir işlemdir. Hücre içeriğinin lizozomlara taşınarak parçalanması ve bu yolla enerjinin geri dönüştürülmesini hedefler [55]. Otofaji 3 farklı tipte araştırılmaktadır. Makrotofaji, mikrotofaji ve şaperon-aracılı otofaji. Otofaji teriminin direkt kullanımı

genellikle makrotofajiyi ifade etmektedir [56]. Otofaji her ne kadar enerjinin geri kazanımını amaçlayan bir yolak olarak bilirse de aynı zamanda tip 2 programlanmış hücre ölüm yolağı olarak da kabul görmektedir [57].



Şekil 2. 8. Otofajinin 3 farklı tipe ait moleküler gösterimi [58].

2.5.1 Mikrotofaji

Mikrotofaji çözünebilir yada partikül seviyesinde bulunan hücresel yapıların doğrudan lizozomun içerisine alınma işlemidir. Hücresel içeriklerin doğrudan invaginasyon, çıkıntı şeklinde ve parçalara ayırarak lizozom içerisine alınması ile sonlanmaktadır. Makrotofajide olduğu gibi mikrotofaji de mTOR yolağı tarafından kontrol edilmekte ve nitrojen açlığına bağlı olarak aktiveleştirilmektedir [59, 60]. Genellikle organel boyutlarının korunması, membran kompozisyonun sabit kalması gibi durumda kullanılan mikrotofaji hayatta kalma ve besin kıtlığı gibi durumlarda genellikle kullanılmaz. Vakuoler taşıyıcı şaperon (VTC) kompleksinin mikrotofaji için gerekliliği 2007 yılında uttenwiler et al. tarafından gösterilmiştir. Bu kompleks ER, vakuoller ve hücre periferinde bulunmaktadır. VTC kompleksinde ki delesyonlar mikrotofajik yolağın bloklanması ile sonuçlanır [61].

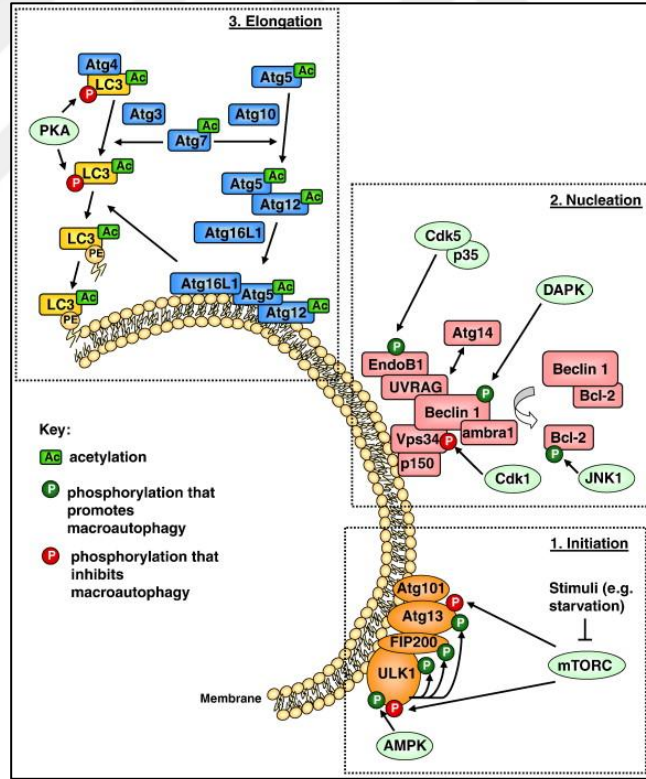
2.5.2 Şaperon Aracılı Otofaji

Şaperon aracılı otofaji (CMA) gelişmiş ökaryotlarda görülmektedir. Bu sistemin karakteristik özelliği sebebiyle sadece çözünebilir proteinler degrade edilebilirken organeller degrade edilememektedir. Hsc70 e bağlı olarak çalışan bu sistem Hsp70 ile 80% homolojiye sahiptir [62]. Sitoplazmik substratlarda bulunan KFERQ peptid sekansına bağlı olarak makrotofajiden daha selektif bir degradasyon sistemidir. CMA oksidatif stres, besin açlığı ve yanlış regüle edilmiş enerjinin dengelenmesi adına çalışır. CMA'nın mikrotofaji ve makrotofajiden ayırt edici özelliği, kargoyu doğrudan lizozom lümenine teslim ederek selektif bir degradasyon sağlamasıdır. Herhangi bir vesikül oluşumuna veya membran füzyonuna ihtiyaç duymaz [63]. Substrat olarak kabul edilen ve degrade edilecek kargo çözünebilir sitozolik proteinlerden oluşur ve KFERQ amino asit sekansına sahiptirler. Bu motif sitoplazmada bulunan proteinlerin 30% unda mevcut olup sitozolik şaperon olarak bilinirler. Hsc70 tarafından hedef alınan substratlar lizozomal membranda bulunan lizozomal membrane proteini (LAMP) 2a ya teslim edilir. Sitoplazmada KFERQ peptid sekansını bulduran protein taşınmadan önce 3 boyutlu yapıları bozularak birincil protein yapılarına indirgenmeleri gerekmektedir [62].

2.5.3 Makrotofaji

Makrotofaji spesifik bir organel olan otofagozom tarafından kontrol edilmektedir. Otofagozom selektif olmayan bir degradasyon sistemini kontrol eder. Sitoplazma içeriğinin otofagozom membranı tarafından çevrelenmesi ve lizozom ile birleşerek degrade edilmesi ile ifade edilir. Otofajinin başlatılması Otofaji ilişkili protein (ATG) lerin fagofor oluşum bölgelerindeki spesifik hücre içi bölgelere getirilmeleri ve izolasyon membranının nukleasyonu ile başlar [55]. Stres durumu veya açlık olduğunda AMPK tarafından serin555 amino asitinden fosforlanan Ulk-1 proteini FIP200 ve ATG13 ile beraber Beclin-1 ve Vps34 (PI3K classIII) ü aktive eder. Ayrıca JNK Beclin-1 Bcl2 heterodimerizasyonunu bozarak Beclin-1'i aktif hale getirebilir. Beclin-1 ve Vps34 ün aktif hale gelmesi için vps15 (p150) ve beclin-1 ile ortak çalışması gerekmektedir. Daha sonra ise BIF-1, UVRAG ve Atg14 gibi proteinlerle ortak hareket ederek otofagozom membranının oluşması adına ilk adımlar atılmaya başlanır [64]. Atg12 proteini E1 olan Atg7, E2 olan Atg10 ile çeşitli reaksiyonlar sonrasında E3 olan Atg12-Atg5-Atg16

kompleksini oluşturur. Eş zamanlı olarak LC3 proteini Atg4 tarafından LC3-I e daha sonra E1 olan Atg7 ile kesilir ve E2 olan ATG3 ile kesilen bölgeye lipid yapıda bulunan fosfatidiletanolamin (PE) yerleştirilerek LC3-II-PE elde edilir [57]. Oluşan bu iki protein yapıları bir araya getirilerek fagofor için ilk adımlar atılmış olur. LC3-II hem iç hemde dışta olacak şekilde çift katlı membran yapısı oluşturulur. Nukleasyonun devamı sonrasında otofagozom oluşmuş ve kargo içeriği otofagozomun içerisine hapsedilmiş durumdadır. İçeri alınacak kargo küçük bir protein olan ubiquitin veya makrotofaji markırı olarak kabul edilen SQSTM1/p62 tarafından işaretli halde bulunur. Otofagozom oluşumu sonrasında lizozom ile füzyon gerçekleştirilir ve kargo ile beraber SQSTM1/p62 proteini de degrade edilmiş olur. Füzyon sonrası ortaya çıkan yapıya otolizozom adı verilir. Otolizozom yapısı içerisinde degrade edilmiş organeller, proteinler ve hücrenin yok etmek istediği içerikler yer almaktadır [65].

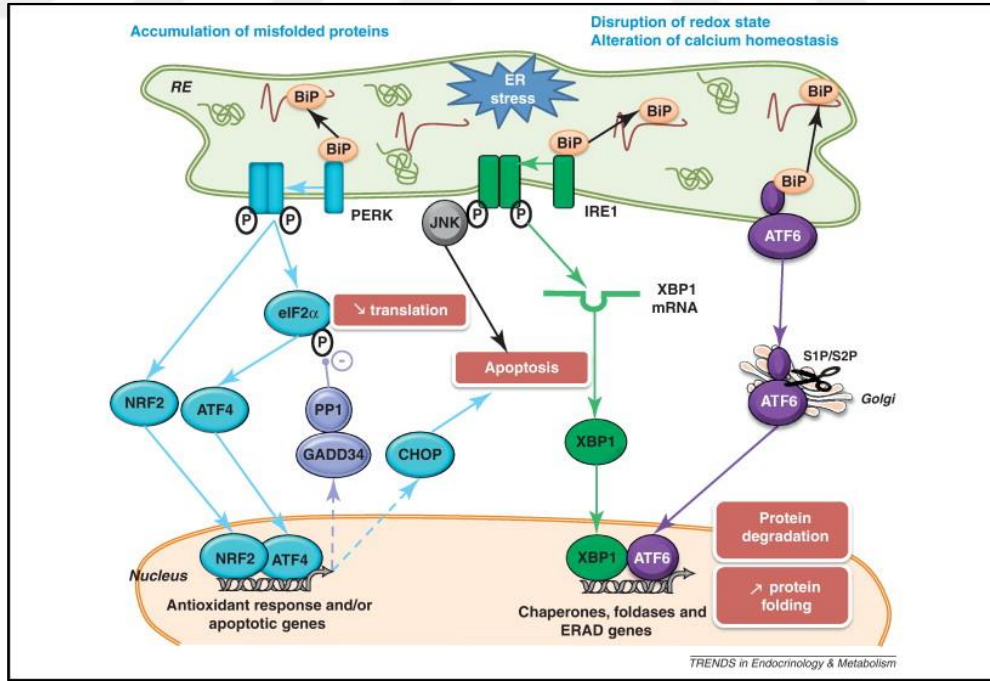


Şekil 2. 9. Makrotofajinin moleküler mekanizması [66].

2.6 ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ

Endoplazmik retikulum hücre içi bir organel olup hücrel homeostazı korumak adına birçok önemi rol oynamaktadır. Proteinlerin olgunlaştırılması, hedef noktalara taşınım ve Ca^{+2} homeostazının korunması gibi birçok farklı role sahiptir. Bu fonksiyonların korunması veya bozulma durumunda cevap oluşturulması adına hücreler adaptif bir cevap geliştirirler. Bu cevap katlanmamış veya yanlış katlanmış protein cevabı (UPR) olarak bilinir. Bu cevap 3 ana yolağın çalıştırılarak strese karşı cevap üretilmesini hedefler. Bu yolları kontrol eden proteinlerin tamamı normalde ER membranında Lümen ve sitoplazmaya Bakacak şekilde konumlanmış ER lümenine Bakan bölgelerinde Grp78/BiP proteinine bağlı şekilde durmaktadırlar [67]. Lümeninde katlanamamış ya yanlış katlanmış proteinler BiP proteini tarafından işaretlenir. Bu işaretlenme BiP-PERK, BiP-IRE1 α ve BiP-ATF6 protein-protein interaksiyonlarının bozulmasına sebep olarak UPR'nin aktifleştirilmesini sağlar. Bunlar, inositol-gerekisini duyan protein 1 α (IRE1 α), protein kinaz RNA (PKR)-benzeri ER kinaz (PERK) ve aktive edici transkripsiyon faktör 6 (ATF6) olarak bilinir [68]. ER stresi oluşmasını takiben, IRE1 α otofosforlanması bir transkripsiyon faktörü olan XBP1'in alternatif kesilimine ve translasyonuna sebep olur. Bu durum şaperon proteinlerin ekspres olmasını sağlar ve ER-bağlantılı protein degradasyonu (ERAD) yolağını harekete geçirir. IRE1 α selektif olarak mRNA degradasyonunu sağlar ve ER de biriken protein miktarının azaltılmasını sağlar. Aynı zamanda Apototik sinyal kinaz 1 (ASK1) aktivasyonu ile yolağın devamında bulunan Jun-N terminal kinaz (JNK) ve p38-MAPK aktivasyonuna sebep olarak apoptozu başlatıcı yönde etki yapabilir. JNK protein Bim ve Bcl-2 proteinleri ile kurduğu interaksiyonlar sonucunda inhibe veya aktive de edilebilir [69]. Buna bağlı olarak p38-MAPK'da fosforlanmaya bağlı aktivasyon ile CHOP proteinini aktive eder ve apoptoz yönünde değişikliklere sebep olur. Bim ve DR5 proteinlerinde artış ve Bcl-2 proteininde ki azalma bu duruma eşlik eder. PERK proteini otofosforlanması ve aktive edilmesi ER stresi ile gerçekleşir [70]. Ökaryotik başlatıcı faktör 2 α (eIF2 α) 'nın serin51den fosforlanması ile devam eden bu yolak proteinin stabilize olarak translasyon aktifivesinde azalmaya sebep olur ve ER da ki protein yüklenmesini azaltır. Bununla birlikte, PERK tarafından gerçekleştirilen eIF2 α serin51 fosforlanması aynı zamanda selektif olarak ATF4 aktivasyonuna sebep olmaktadır. PERK aynı zamanda doğrudan nükleer eritroit 2 p45-

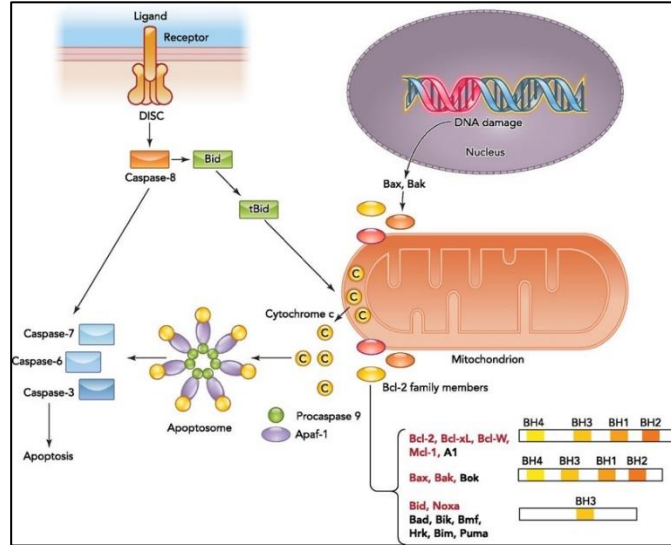
ilişkili faktör 2 (NRF2) fosforlanmasına ve aktive edilmesine NRF2 ve KEAP1 kompleksini bozarak sebep olur. NRF2 ve ATF4 antioksidan genlerinin ekspresyonuna sebep olarak artış göstermekte olan reaktif oksijen türevlerine (ROS) karşı artış gösteren oksidasyon/redüksiyon reaksiyonlarına sebep olur. PERK/ATF4 aynı zamanda C/EBP homolog protein (CHOP) seviyelerini arttırarak öncü apoptoz cevaplara sebep olabilir. UPR'ın 3. bir dalı olan ATF6 proteini 2 farklı kesim bölgesine sahiptir. Bu bölgeler SP1 ve SP2 olarak bilinir [71]. Aktifleşmesini takiben Golgi organelinde bu iki farklı bölgeden proteazlar ile kesilir. Kesilmiş ATF6 şaperonları kodlayan birçok farklı gen bölgesinin ekspresyonunu regüle eder. Bunlar, ERAD ilişkili olanlar ve XBP1 ilişkili olanlar olarak bilinir. Oluşan ER stresine bağlı olarak bu 3 önemli yolak aynı zamanda veya farklı zamanlarda stresin boyutuna göre aktifleşebilir. ER stresi kaynaklı gelişen UPR iki farklı fazda incelenebilir. Bunlardan birincisi hücre canlılığının korunması ve ER homeostazının geri getirilmesi ile karakterize edilirken diğeri geri döndürülemeyen ER stresine bağlı öncü inflamatuvar cevaplar ile hücre ölümünün başlatılması ile karakterize edilir [67, 72].



Şekil 2. 10. Endoplazmik retikulum stresi kaynaklı gelişen katlanmamış protein cevabı moleküler mekanizması [73].

2.7 APOPTOTİK HÜCRE ÖLÜMÜ

Apoptoz tip 1 programlanmış hücre ölümü olarak da bilinen ve hücre ölümünü kontrol eden bir işlemdir. Bu işlem metazoalardan beri korunmuş ve günümüz insanının sahip olduğu bir işlemdir. Omurgalılarda doğru şekilde gelişim ve kanser oluşumunun önlenmesi için apoptoz önem arz etmektedir. Birçok farklı korunmuş yolağı etkileyerek gerçekleşen bu sistemde anahtar rol oynayan çeşitli proteinler mevcuttur. Nekrozun yanısıra apoptoz aktif bir işlem olduğu için enerji gerektirmektedir. Apoptoz içsel veya reseptör aracılı yoldan olmak üzere iki farklı yoldan aktive edilebilir. İçsel yolak mitokondri membranında bulunan porların genişlemesi ile mitokondri içeriğinin sitoplazmaya dağılarak apoptozom kompleksi oluşması ile karakterize edilirken reseptör aracılı yoldan hücre yüzeyinde bulunan ölüm reseptörlerine sinyal iletimi ile karakterize edilir. Sistein-aspartik proteaz (kaspaz) aktivasyonu ile hücresel yapıların degrade edilmesi ve hücrenin ölüme hazırlanması ve çevre dokularda minimum stres ortamının korunması sağlanır. İçsel yoldan ki sinyalin regülasyonu, Bcl-2 ailesi proteinleri tarafından sağlanır. Bu aile hem öncü apoptoz hem de anti apoptoz proteinlerine sahiptir. Bu iki farklı işleve sahip proteinler arasında sağlanan denge hücrenin yaşamı ve ölümü arasındaki kararın verilmesinde büyük rol oynar [74] [72, 75]

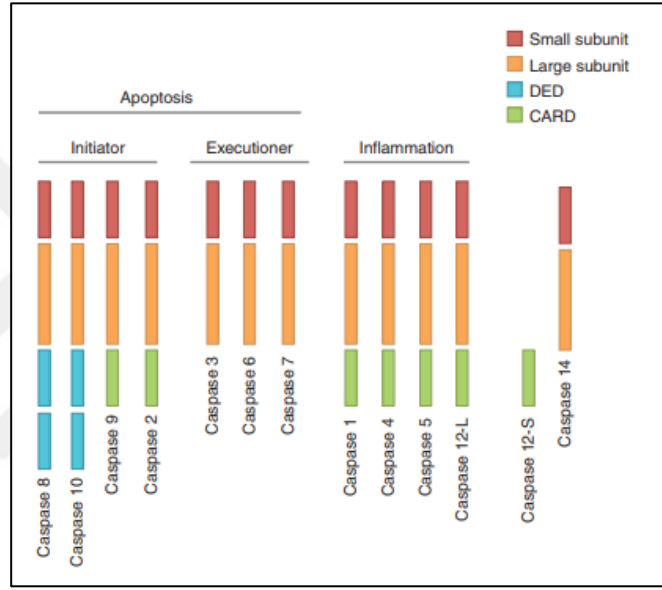


Şekil 2. 11. Apoptozun moleküler mekanizması [76].

2.7.1 Kaspazlar

Apoptozun ana efektörleri olan kaspaz ailesi, proteolitik enzimler olup sistein bölgelerini katalitik bölge olarak kullanır ve hedef proteinlerin aspartik asit bölgelerinin yanından spesifik kesim yaparlar. Apoptozda görev alan kaspazların yanı sıra inflamasyonda görev alan farklı kaspaz grupları da mevcuttur ve öncü sitokin aktivatörleri olarak görev yaparlar. Apoptotik kaspazlar 2 farklı grupta incelenebilir. Bu gruplar başlatıcı kaspazlar ve sonlandırıcı kaspazlar olarak ikiye ayrılır. Başlatıcı kaspazlar spesifik ölüm yollarında ilk aktif edilen proteinler olarak bilinirler ve iki aşamalı kaskat aktivasyonunda ikinci adım olan sonlandırıcı kaspazları aktive ederler. Düzenlenmesinde bozukluk olan kaspaz aktiviteleri hücreler için ölümcüldürler. Bu sebeple hücre kaspaz proteinlerini öncü formlarında bulundurur ve kesilmedikçe aktif edilemezler. İçsel apoptoz yolağında rol alan başlatıcı kaspazlar 9 ve 2 belirlenirken hücre aracılı apoptoz yolağında 8 ve 10'un etkin olduğu belirlenmiştir. İçsel yolda mitokondriyel membran potansiyalinin bozulmasını takiben oluşan apoptozom kompleksi kaspaz 9'un kesilerek aktive olmasını sağlamaktadır. Apoptoz proteaz aktive edici faktör 1 (Apaf-1) kaspaz 9'u apoptozom kompleksine N-terminal kaspaz aktivasyon çağırıcı domen (CARD) yardımı ile çağırır [77]. Kaspaz 9 sitozol de monomerik konsantrasyonlarda bulunurken 3 boyutlu Kristal yapısına Bakıldığında kaspaz 9'un aslında dimer yapıda aktif olduğu öğrenilmiştir. Bu dimer yapıda sadece bir adet aktif domen bulunmaktadır. Kaspaz 9 içsel apoptoz yolda en yaygın ve bilinen olmasına karşın kaspaz 2'nin apoptotik cevaba bağlı DNA hasarı için gerekli olduğu ispatlanmıştır. Kaspaz 2'nin aktivasyonu CARD proteininden çok daha ağır ve kompleks yapıda proteinlerle interaksiyonu sonrası olduğu bilinmekte ve bu aktivasyon Apaf-1 proteininden bağımsız gerçekleşmektedir. Hücre aracılı apoptoz yolağında görev alan kaspaz 8 ve kaspaz 10 istenmeyen hücrelerde immune sistem tarafından aktif edilerek hücrelerin programlanmış hücre ölümüne gitmelerini sağlarlar. Bu yolağın başlangıcı tümör nekroz faktör reseptör tip 1 süper ailesinden olan transmembran ölüm reseptörlerinden FAS (CD95) ligasyonu ile karakterizedir. Ligasyonun olması durumunda Fas reseptörü hücre yüzeyinde mikroagregatlar oluşturur [78]. Bu durum FADD (Fas ilişkili ölüm domenine sahip protein)'in reseptörün hücre için bölgesine çağrılmasını takip eder. FADD kaspaz 8'i homofilik interaksiyon bölgesi olan N-terminal ölüm efektör domen (DEDs) vasıtası ile çağırır. Bu bölge ölüm başlatıcı sinyal

kompleks (DISC)'inde bulunur ve bu kompleks kaspaz 8'i aktif eder. Kaspaz 8 kesildikten sonra dimerize yapıya gelerek aktifleşir. Kaspaz 10, kaspaz 8 ile aynı yolakta insanlarda başlatıcı kaspaz görevi görür. Bazı durumlarda fonksiyonel olarak kaspaz 8'in yerine geçer. Sonlandırıcı kaspazlardan olan kaspaz 3 ve kaspaz 7 sitozolde inaktif ve dimer yapıda bulunurlar. Kısıtlı proteolizis ile aktifleşen bu proteinler domenler arası linker bölgesinden kesilirler. Bu kesilim işlemleri başlatıcı kaspazlar tarafından gerçekleştirilir [79].

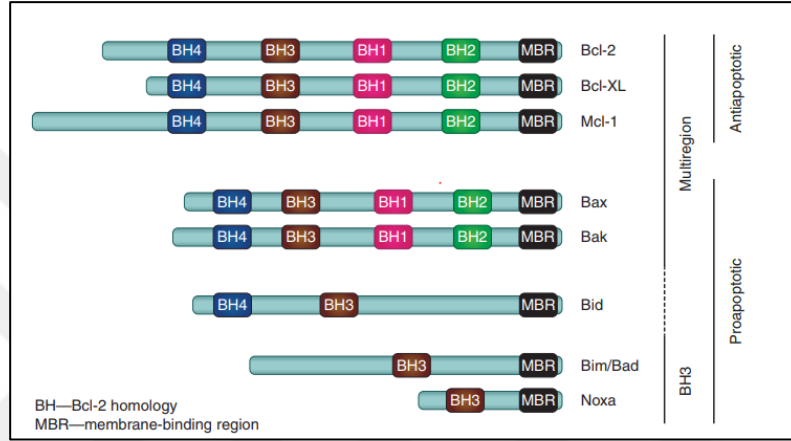


Şekil 2. 12. Kaspazların moleküler yapısının gösterimi [80].

2.7.2 BCL-2 Ailesi

Apoptoz günümüzde en çok çalışılan hücre ölüm şekli olarak bilinmektedir. İnsan gelişiminde ve homeostazın sağlanmasında anahtar bir role sahiptir. İçsel yolağın anahtar regülatörleri görevini gören Bcl-2 ailesi proteinlerinin her üyesi Bcl-2 homoloji (BH) domeni içermektedir [81]. Apoptoz, BH3 domeni içeren öncü apoptoz proteinleri tarafından başlatılır. Bcl-2-etkileşim hücre ölümü düzenleyicisi (BİM), BH3-etkileşim ölüm agonist domeni (BİD), P53-anlatımı artmış apoptoz başlatıcısı (PUMA) gibi birçok potansiyel farklı protein öncü-apoptoz por oluşum proteinleri Bcl-2 ilişkili X protein (BAX) ve BCL-2 antagonist/katil (BAK) ile interaksiyon kurarak aktifleştirilmelerini sağlarlar [82]. Mitokondriyel yüzeyde bulunan Bak ve Bax allosterik olarak yapılarında değişime uğrarlar ve oligomerize olarak mitokondri membranında büyük porların

oluşturulmasını sağlarlar. Bütün antiapoptotik proteinler ve bunlarla birlikte bax, Bak ve bid proteinleri birden fazla BH bölgelerine sahiptirler. Birçok Bcl-2 ailesine dahil proteinlerde membrane bağlanma bölgesi (MBR) de bulunmaktadır. BH3 domenleri anti apoptotik proteinlerin bağlanma bölgesini oluştururken BH1, BH2 ve BH3 bölgeleri beraber hidrofobik girinti oluşumunu sağlamaktadır. BH4 bölgesi ise inositole bağlanılarak ER’de kalsiyum pompalarının kontrolünün gerçekleştirilmesini sağlar [83].



Şekil 2. 13. Bcl-2 ailesi proteinlerinin moleküler yapıları ve sahip olduğu domenleri [82].

2.7.3 İçsel Apoptoz Yolağı

Mitokondri hücre canlılığının sensörü olarak kabul gören bir organeldir. Bu organel de oluşan ve geri döndürülemez değişimler içsel apoptoz yolağı adında bir yolağın başlatılmasına sebep olur. Memelilerde Bax ve Bak adında iki farklı öncü apoptoz protein bu spesifik yolağın aktivasyonundan sorumludur. Sağlıklı hücrelerde Bak serbestçe mitokondri membranında lokalize olurken Bax sitoplazmada serbest şekilde bulunur. Apoptotik sinyal iletildiğinde bu iki protein mitokondri membranına yapışarak oligomeric membran porlarını oluşturur. Bu oluşan porlar öncü apoptotik faktörlerin mitokondri den sitoplazmaya hareketine müsaade eder. Anti apoptotik Bcl-2 ailesi proteinlerinin Bak ve Bax’a bağlanarak heterodimer yapı oluşturması Bak ve Bax ın inaktif olmasını sağlar [83]. Bu durumda mitokondri membrane geçirgenliğinde herhangi bir problem yaşanmaz. BH-3 ailesi proteinleri doğrudan Bax ve Bak oligomerizasyonuna veya dolaylı olarak anti apoptotik Bcl-2 ailesi proteinlerine bağlanarak bu proteinlerin nötralize edilmesini sağlarlar [84]. Mitokondriden sitoplazmaya sızan sitokrom-c, Smac ve endonükleaz G bilinen apoptotik proteinlerdir. Sitoplazmada sitokrom-c Apaf-1 ile interaksyon kurarak

apoptozom oluşumunu sağlar. Apaf-1 apoptozom kompleksi içerisinde öncü kaspaz 9'a N-terminal kaspaz çağırma domeninden bağlanır. Apoptozoma bağlanan öncü kaspaz 9'un katalitik aktivitesinde 2000 kat artış sağlanır [85]. Aktive olan kaspaz 9 apoptozom içerisinde prokaspazlarla oligomerik şekilde durur. Aktif edilen kaspaz 9 öncü kaspaz 3 zimojenlerini keserek hücre ölüm kaskatını arttırıcı yönde etkinlik sağlar. Aynı zamanda kaspaz 9 kendini keserek apoptozom kompleksinden ayrılır. Ayrılması durumunda inaktif hale gelen kaspaz 9 bu işlemi apoptozom aktivitesini sınırlamak için otomatik olarak gerçekleştirir. Kaspaz 3 iki farklı şekilde apoptotik aktiviteyi arttırır. Diğer efektör kaspazları keserek sinyalin artmasını sağlar. Aynı zamanda BH-3 domen e sahip Bid proteinini keser. Kesilen Bid geri besleme mekanizması ile daha fazla Bax ve Bak aktivasyonuna sebep olur. Bu durum daha fazla sitokrom-c ve Smac salınımını takiben daha fazla kaspaz 9 aktivasyonuna sebep olur [86].

2.7.4 Reseptör Aracılı Apoptoz Yolağı

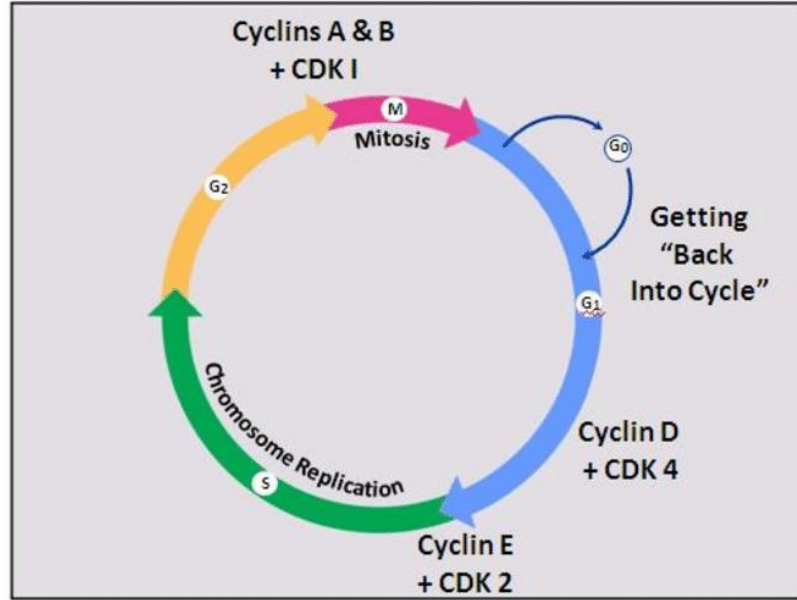
Hücreler ölüm reseptörü olarak bilinen ve hücre dış yüzeyinde yer alan reseptörler sentezlerler. Bu reseptörler apoptotik hücre ölümünü başlatırlar. Liganda sahip diğer hücreler veya serbest ligand molekülleri bu reseptörlere bağlanarak aktifleşmelerini sağlarlar. Çok iyi karakterize edilmiş olan Fas, tumor nekroz faktör reseptör ailesi üyelerindedir. Fas tip 1 membran protein olup 3 sistein zengin domen içerir. Fas'ın sitoplazmik domeni yaklaşık 80 ölüm domeni barındırır. Bu bölgeler bütün ölüm reseptörleri tarafından paylaşılır. Fas ligandı trimerik yapıda olan ve sitotoksik T lenfositlerinin membranlarında lokalize olan bir proteindir. Fas ve ligandı birleştiği anda hücre içerisinde reseptör aracılı apoptoz yolağı aktif edilir. Aktive edilen Fas, Fas trimerlerinin stabilize edilmesi veya konformasyonlarının değiştirilmesi ile sinyal iletimini başlatır [87]. Aktive olan Fas bir adaptor protein olan FADD'a bağlanarak DISC kompleksini oluşturur. DISC öncü kaspaz 8'e ölüm efektör domeninden bağlanır. Öncü kaspaz 8 proteini normal koşullarda monomerik yapıda bulunur ve aktif edilmesini takiben DISC kompleksi içinde dimerize hale gelerek katalitik aktivite sahibi olur. Bu dimerler komşu dimer yapıları keser ve serbestleştirir. Bu sayede heterotetramerik aktif kaspaz 8 yapısı oluşur [88]. Aktif kaspaz 8 kaspaz kaskatını başlatarak diğer efektör kaspazları aktif eder. Aynı zamanda BH-3 domenine sahip Bid proteinini keserek içsel

apoptoz yolağının başlatılmasında sağlar. Fas reseptörü daima hücre yüzeyinde bulunurken asıl soru istenmeyen ölüm reseptör aktivasyonlarından nasıl kaçınıldığıdır. Hücreler kaspaz ilişkili protein olan cFLIP'i eksprese ederler. Bu protein katalitik aktivitesi olmayan öncü kaspaz 8 benzeri bir proteindir. Yüksek ekspresyon seviyesine sahip olduğunda cFLIP öncü kaspaz 8 monomerlerine bağlanarak hücre ölüm yolağını tetiklemeden bir enzim oluşturur [89] [90].

2.8 HÜCRE DÖNGÜSÜ

Hücre siklusu birçok farklı olay ile kontrol edilir ve sonucunda bir ana hücre 2 kardeş hücreye bölünür. Bu embriyo ve tümör hücrelerinde kendini sürekli tekrar eden bir işlemdir. Bölünme sonrasında iki hücrede de birbirinin kopyası DNA bulunmaktadır. Kromozomların doğru şekilde bölünmesi işlemi ile sonuçlanması gereken bu sistem farklı kontrol noktaları ile doğrulanır. Bir hasar durumunda onarıma yönlendirilir veya bölünmemesi sağlanır [91]. 4 farklı alanda incelenen bölünme işlemi ara kontrol noktaları ile desteklenir. G1 (GAP1), S (sentez), G2 (GAP2), M (mitoz) olarak belirlenen bu 4 faz kontrol noktalarında barındırır. Bölünme işleminin devamı için moleküler sinyallerin yardımı ile kontrol ve devamlılık sağlanır. Bu işlemleri kontrol eden Siklin bağımlı protein kinaz (CDK)lar Siklinlerle eşleşerek yolağın devamlılığını sağlar. G1 de beklerken CDK aktivitesi düşüktür. Bölünme sinyali bulunmazken yani hücre büyüme aşamasındayken Siklinlerin mRNA sentezi inhibe edilmiş durumdadır ve hazır bulunan Siklinler degrade edilir. Bölünme sinyalinin iletimi ile birlikte hücrede Siklin protein seviyelerine artış başlar. Bununla beraber Siklin degradasyonu da inhibe edilir ve CDK aktivitesinde artış görülür. Bu belirtiler 4 faz boyunca devamlılık gösterir. Bu yolağın durdurulması p27 Kip1, p21 Cip1, p21, Wee1, Chk1 ve Chk2 gibi birçok farklı protein ile sağlanmaktadır. Kromozomda bir hasarın tespit edilmesi veya kontrol noktalarından birinde engel olması durumunda bu proteinler Siklin-CDK bağlantılarını inhibe ederek yolağı durdurur [92]. G1 fazında bölünme sinyalini takiben retinoblastoma (Rb) proteinin fosforlanması sağlanır. CDK4/5 ve Siklin D eşleşmesi sonrası Rb fosforlanır. Bunu takiben CDK2 ve Siklin E eşleşmesi ile ikinci bir fosforlanma daha geçiren Rb E2F ve DP-1 proteinlerinden ayrılır. E2F ve DP-1 in serbestleşmesi diğer Siklin ve bölünmenin devamlılığını sağlayacak olan proteinlerin anlatımının artmasına sebep olarak yolağın

devamlılığını sağlar. Sentez fazında ise CDK7 ve Siklin H eşleşmesi CDK2 ve Siklin A eşleşmesini sağlar. G2 fazında ise CDK2 ve Siklin A eşleşmesini tabiken CDK1 ve Siklin B eşleşmesi gerçekleşir. M fazında girerken CDK1 ve Siklin A eşleşmesi devam eder. Bu eşleşme sinyalleri de Cdc25A protein tarafından kontrol edilir. Bütün Siklinler übikitinlenerek degrade edilebilir. Bu sayede hücre duracağı fazı belirleyebilir [93]. 3. Adet kontrol noktası ile kontrol edilen bölünme işleminin doğru şekilde tamamlandığından emin olunmalıdır. İlk kontrol noktası G1 fazının içinde olup besin, bölünme faktörleri ve DNA hasar kontrolünü gerçekleştirir. 2. kontrol noktası ise G2 fazında bulunmaktadır. Hücre boyutunu ve DNA replikasyonunun kontrolünü sağlamaktadır. 3. kontrol noktası ise M fazında bulunmakta ve kromozomların iç içliklerine doğru şekilde bağlanmasını kontrol eder [94]. G0 fazı olarak bilinen ve hücrenin replikasyona bağımlı hücre bölünmesi durumunda bulunmadığı bir faz daha bilinmektedir. Dinlenme fazı olarak bilinir ve hücreler bu fazda ne bölünürler ne de bölünme için herhangi bir hazırlıkta bulunurlar. Durgun fazda bulunan hücreler CDK ve Siklin aktivitesi göstermezler [95]. Bölünmeyen bu hücelere örnek olarak hematopoietik, kas, bağırsak ve epitel kök hücreleri gösterilebilir.

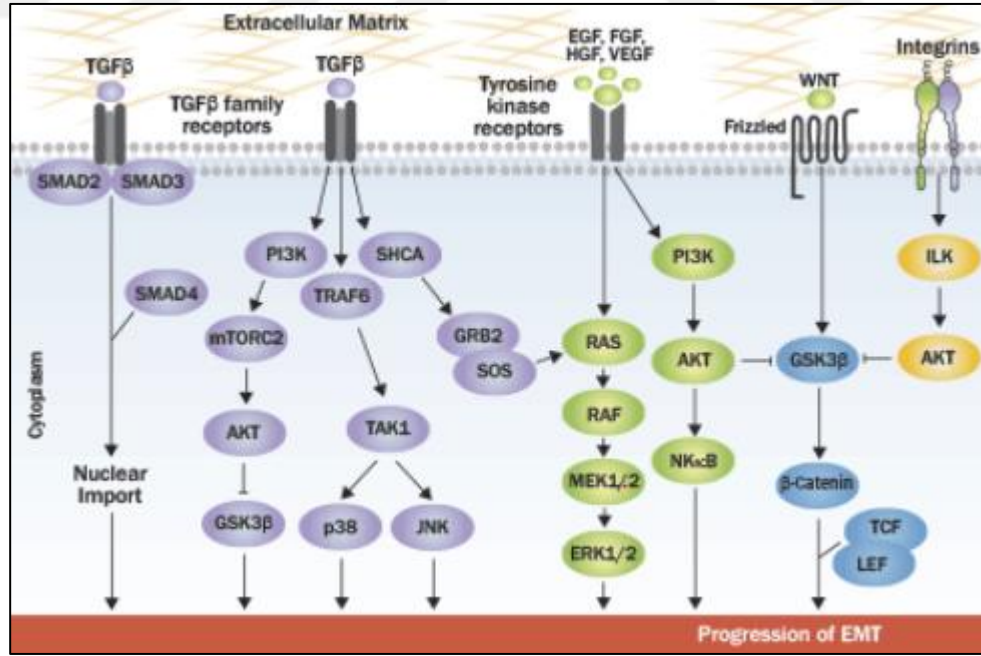


Şekil 2. 14. Hücre döngüsünün genel hatlarıyla gösterimi [96].

2.9 EPİTEL MEZENKİMAL DÖNÜŞÜM

Hücrelerin epitelten mezenkimal hücre tipine dönüşmesi durumu EMT adı verilen ve çok sayıda yolağı kapsayan sıkı şekilde düzenlenen bir olaydır. Epitel ve mezenkimal hücreler memelilerde 2 ana hücre tipidir. Epitel hücreler 5 ana özellik ile karakterize edilir; hücreler arası kohezif interaksiyonlar, apikal ve lateral domenler arasında sıkı bağlantı oluşumu, apikal, lateral ve bazal olmak üzere 3 farklı membran domeni bulundurmamak, çeşitli organellerde ve hücre iskeleti yapılarında polarize olmuş apikobazal dağılımlar ve son olarak lokal çevreye bağlı kalarak hareketten yoksun hücre tipi. Mezenkimal hücrelerin sahip olduğu bilinen özellikleri ise; hücreler arası iletişim olmaması veya çok az olması, apikal ve lateral membran bölgelerinin belirgin olmaması, çeşitli organellerde ve hücre iskeleti yapılarında polarize olmuş apikobazal dağılımlar bulunmaması, invazif düzeyde hücre hareketinin bulunması. EMT sağlayan birçok yolağın kontrolü EMT ana gen ailesi tarafından gerçekleştirilir. Bu aileye ait genler transkripsiyon faktörleri olan Snail, Twist, Zeb ve E47'yi içerir. Kanser içerikli yapılan çalışmalarda EMT ve EMT benzeri olaylar tespit edilmiştir. 5 ana yolakta incelenen bu olaylar; tirozin kinaz reseptörleri, integrinler, Wnt, NF-kappaB ve TGF- β olarak bilinmektedir. Bu yolaklar Akt ve SMAD yolaklarında sinyal iletimine sebep olmaktadır. Yukarıda karakterize özellikleri belirtilmiş olan epitel ve mezenkimal tiplerde moleküler işaretlerde ayrıca tespit edilmiştir [34]. Bu işaretler Epitel hücre tipleri için; E-cadherin, MUC1, Cytokeratin, Laminin-1, Desmoplakin, ZO-1 ve Syndecan olarak bilinir. Mezenkimal hücre tipleri için ise; Vimentin, Fibronectin, N-cadherin, FSP-1, α SMA, Twist, Snail, Slug, FOXC2 ve ZEB2 olarak bilinir. TGF-B sinyal iletimi başlaması ile beraber SMAD2/3 aktive olarak SMAD4 aktivasyonunu takiben nükleer taşınım ile EMT genlerinin transkripsiyonunu sağlar [97]. Ayrıca TGF- β 'nin aktive olması PI3K, TRAF6 ve SHCA'nın aktivasyonuna sebep olur. PI3K mTORC2 aktivasyonu ike Akt'm aktive edilmesini sağlar. Aktive edilen Akt GSK3 β 'yi inhibe ederek EMT aktivasyonunu sağlar. TRAF6 ise TAK1 aktivasyonu ile JNK ve p38 i aktive ederek EMT yolağının aktive olmasını sağlar. SHCA ise GRB2-SOS aktivasyonu ile Tirozin kinaz reseptörü bağımlı yolakta bulunan Ras aktivasyonuna sebep olur. Tirozin kinaz reseptörüne büyüme faktörü bağlanması durumunda Ras aktivasyonu gerçekleşir. Ras proteini kaskat içerisinde bulunan Raf'ı aktive eder. Raf MEK1/2 yi aktive ederken MEK1/2 ise ERK1/2 yi aktive ederek EMT yolağının aktive edilmesi

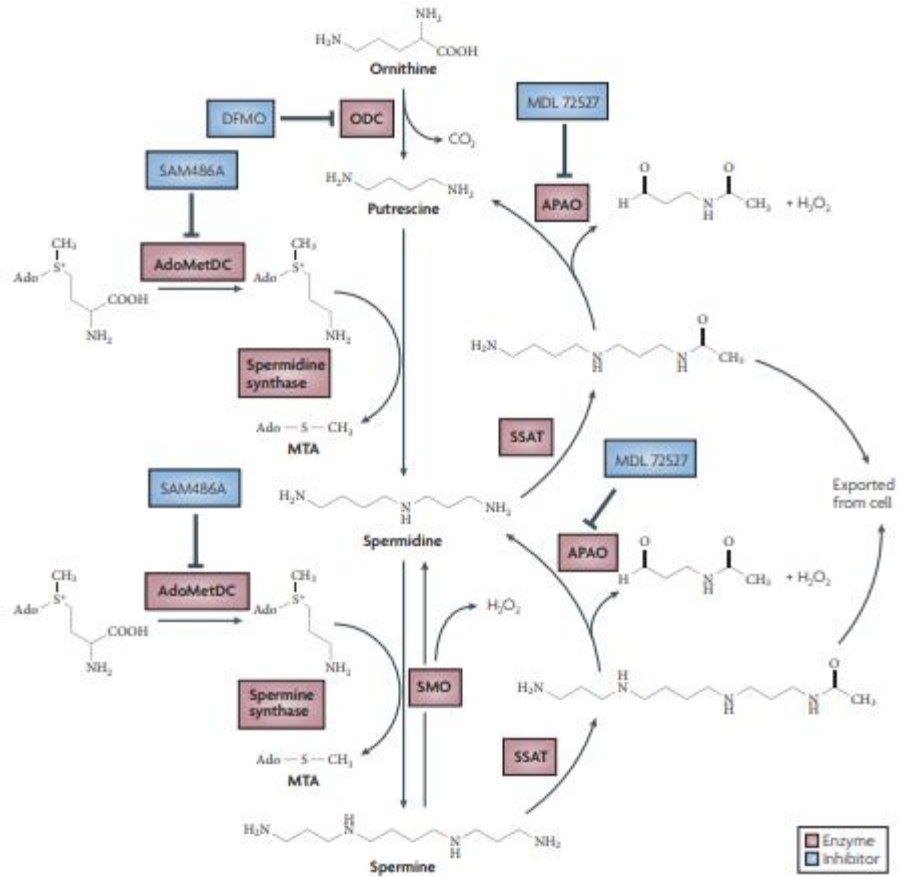
sağlanır [98]. Tirozin kinaz reseptörü aracılı olarak aktive olan diğer bir yolak ise PI3K yolağıdır. Bu yolakta Akt aktivasyonu sağlanır. Akt'ın aktive olması NF kappaB yide aktive eder. Bu durumda EMT yolağının aktivasyonu sağlanırken Akt'ın GSK3β'yi inhibe etmesi Wnt yolağı tarafından aktive edilen GSK3β'nin da kapanması ile sonuçlanır [99]. Bu durumda β-catenin düzenlenmesi sağlanamaz ve TCF-LEF ile birlikte β-catenin EMT yolağının aktifleştirilmesini sağlar. İntegrin yolağı ise ILK aktivasyonuna bağlı olarak Akt aktivasyonu sağlayarak gene WNT yolağına bağlanır. Bu sayede EMT yolağının aktivasyonu sağlanır. Bunlardan bağımsız olarak JAK/STAT yolağı olarak bilinen EMT yi doğrudan aktive edebilen bir yolak daha mevcuttur. Bu yolakta JAK1/2 aktivasyonuna bağlı STAT3 fosforlanması ile STAT3 ün nükleer taşınımı gerçekleşir [100]. EMT yolağı aktive edildiğinde moleküler hedefler olan Slug, Snail, N-cadherin, E-cadherin, TWIST ve Vimentin protein anlatımlarında değişiklikler gerçekleşir. Bu değişimler matris metalloproteinazlarda artışa sebep olur. Bu sayede hücre mikroçevresinde bulunan yapıların parçalanarak hücrenin invazif/metastazik özelliği yükseltgenir.



Şekil 2. 15. Epitel Mezenkimal dönüşüm yolağının moleküler mekanizması [101].

2.10 POLİAMİN METABOLİZMASI

Poliaminlerin birçok farklı hücrel faaliyetlerde rol oynadığı düşünülmektedir. Nükleik asitler ve kromatin yapısının korunması, iyon kanalları ve protein sentezi bunlardan bazılarıdır. Poliaminler aynı zamanda transglutaminaz reaksiyonları için substrat olarak kullanılırlar. Bununla beraber önemli bir translasyonel düzenleyici olan hypuz'un sentezi için de önem arz ederler. Poliamin biyosentezi putresin üretimi ile başlar. Ornitin dekarboksilaz (ODC), Ornitini putresine çevirerek bu sentezi sağlar. ODCnin işlevi antizyme (AZ) ile inhibe edilir. AZ'nin aktivitesini de antizyme inhibitörü (AZI) düzenler. ODC protein anlatımı sıkı bir şekilde düzenlenmektedir. Homodimer yapıda aktif olan ODC, AZ'nin karboksilik bölgesine bağlanarak ODCyi 26S proteozoma yönlendirilmesi ile degrade edilir. ODC benzeri bir protein olan S-adenosylmethionine decarboxylase (AdoMetDC) da poliamin biyosentezinin düzenlenmesine rol alır [102]. ODC den farklı olarak 26S proteozomda degrade edilmeden önce ubiquitin proteinleri tarafından işaretlenir. Biyosentez yolağının kontrolünü sağlayan belirli proteinler mevcuttur. Bunlar Spermidin sentaz, Spermin sentaz, SSAT, PAO ve SMO gibi proteinlerdir. Spermidin sentaz, AdoMetDC ve putresini kullanarak spermidin üretimini sağlamak ve yan ürün olarak 5-deoxy-6-methylthioadenosine (MTA) elde etmektedir [103]. Spermin ve spermidine sentezi için amonopropyl bölgesine ihtiyaç duyulur. Bu bölge decarboxylated S-adenosylmethionine tarafından elde edilir. Spermin poliamini prokaryotlarda spermin sentaz homologu bulunmadığı için sadece ökaryot hücrelerde bulunmaktadır. Poliamin katabolizması 2 aşamalı gerçekleşmekte ve spermin/spermidine N-asetiltransferaz (SSAT) ve peroxizomal FAD-bağımlı enzim N-asetilpoliamin oksidaz (PAO) tarafından düzenlenmektedir. SSAT asetil-coenzim Ada ki asetil grubunu spermin veya spermidine e aktararak N-asetilspermin veya N-asetilspermidin in oluşumu sağlar. PAO ise asetillenmiş poliaminleri asetil gruplarından keserek spermin veya spermidinin tekrar eldesini sağlamaktadır. Bu işlemle beraber 3-aseto-aminopropanal ve H₂O₂ ortaya çıkmaktadır. Spermin oksidaz (SMO) ise FAD-bağımlı bir enzim olup spermin I oksidize ederek spermidine elde edilmesini sağlar bu işlemde de ortaya 3-aminopropanal ve H₂O₂ çıkmaktadır [104].



Şekil 2. 16. Poliamin metabolizmasının moleküler mekanizması [105].

3 MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 MATERYALLER

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasal sarflar, cihazlar, yazılımlar, hücre kültürü donanımları, antikorlar, kitler ekler bölümünde yer almaktadır.

3.2 YÖNTEMLER

3.2.1 Kullanılan Hücre ve Özellikler

SW480 (ATCC CCL-228) kolon kanser hücresi olup 50 yaşında erkek bireyden elde edilmiştir. Epitel yapıda ve aderent olan SW480 hücresi hipotriploit kromozom yapısına sahiptir. 12. Kodon da ras mutasyonuna sahiptir. CEA antijen ekspresyonuna sahip olan hücreler immun sistemi baskılanmış fare tiplerinde tümör oluşturabilme yeteneğinde sahiptirler. P53 geninde 2 farklı mutasyona sahip olan hücreler(G->A kodon 273 Arg->His, C->T kodon 309 Pro->Ser) yüksek düzeyde p53 protein ekspresyonuna sahiptirler ve GM-CSF üretimi yapabildikleri belirlenmiştir.

DLD-1 (ATCC CCL-221) kolon kanser hücresidir. Erkek bireyden elde edilen hücreler epitel formda ve adarenttir. Pseudodiploit krozm yapısına sahip olan hücreler p53 geninde bir adet mutasyon bulundurmaktadırlar(C->T, Ser->Phe 241). CEA antijen anlatımı bulunan hücreler immun sistemi baskılanmış farelerde tümör oluşturabilirler. Yapılan DNA profillemeye çalışmaları HCT-15(ATCC CCL-225), HCT-8(ATCC CCL-244) ve HRT-18G(ATCC CCL-11663) hücre tipleri ile aynı DNA profiline sahip olduğunu göstermiştir.

3.2.2 Hücre kültürü

Kolon kanser hücreleri olan SW480 (ATCC CCL-228) ve DLD-1 (ATCC CCL-221) %5 CO₂ içeren nemli 37 °C'lik etüvde SW480 hücreleri MEM (Minimum Essential Medium), DLD-1 hücreleri McCoy 5A besiyerinde %10 fetal sığır serumu (FBS) ve 10 U/ml

Penisilin/Streptomisin ile büyütülmüştür. Hücre sayısında artış meydana gelmesi ile pasajlama işlemi için ortamdaki besiyeri uzaklaştırılmıştır ve içerisinde hücrelerin bulunduğu 75 cm²'lik petri kapları 2 ml fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkanmıştır. Daha sonra 75 cm²'lik petri kaplarına 2 ml tripsin-EDTA (etilen diamin tetraasetik asit) ile 5% CO₂ içeren 37 °C'lik etüvde 5 dakika bekletilmiştir. Hücrelerin bu süre boyunca zarar görmesinin engellenmesi için hücrelerin üzerine MEM ve McCoy 5A besiyeri eklenerek tripsinin inaktif hale gelmesi sağlanmıştır ve hücreler yıkama yapılarak 15 ml'lik falkon tüpe alınmış ve 500 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atıldıktan sonra hücrelerin üzerine 1 ml MEM/McCoy 5A besiyeri eklenerek pipetaj yapılmış ve homojen bir hücre süspansiyonu elde edilmiştir. Neubauer hemositometresinin kanalına hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak hemositometrede bulunan 25 karede içerisindeki hücre sayısı sayılmış ve 10⁴ ile çarpılarak 1 ml'deki hücre miktarı hesaplanmıştır. 75 cm²'lik petri kaplarına 8x10⁵ hücre ekilerek pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir.

In vivo deneylerde kullanılmak üzere GFP protein anlatımına sahip stabil SW480 hücreleri elde edildi. SW480 (ATCC CCL-228) kolon kanser hücresi 6 kuyucuklu petriye 2x10⁵ hücre olacak biçimde ekilerek morfoloji almaları için 37°C'lik CO₂ etüvde bir gün boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra hücrelere 1:3 oranında 1µg mEGFP-C1 plazmiti (Addgene 54759) ve 3 µl FuGENE® HD Transfection Reagent (Cat# E2311) eklenerek 72 saatlik inkübasyon gerçekleştirilmiştir. 72 saat sonrasında petrideki besiyeri çekilip atılarak plazmide uygun antibiyotik Neomycin içeren medya petriye konularak hücre yoğunluğu ve sitotoksositeye bakılmıştır. 250 µg/ml Neomycin ile başlanılıp 2 gün ara ile doz 500 µg/ml, 750 µg/ml 850 µg/ml ve 1000 µg/ml uygulanmıştır. 1000 µg/ml Neomycin SW480 hücreleri için selektif doz olarak belirlenmiştir. Stabil koloniler seçilerek yeni 96lık petrilere aktarılmış ve büyütülmüştür. Bölünen hücreler T25'lik petriye aktarılarak büyümeleri sağlanmıştır. Protein izolasyonu ve floresan mikroskopu görüntüleri ile mEGFP-C1 plazmitinin pozitif olduğu ispatlanmış ve bu hücreler *in vivo* deneylerde kullanılmıştır.

3.2.3 Epibrassinolidin Hazırlanması ve Ugulanması

EBR 10mg (CAS 78821-43-9) olacak şekilde APOLLO dan satın alınmıştır. 5mM stok konsantrasyonda olacak şekilde DMSO taşıyıcısı ile hazırlanmıştır. SW480 ve DLD-1 *in vitro* çalışmalarda 30 uM final konsantrasyonda kullanılmıştır. 12, 24, 48, 96, 1 hafta ve 21 güne kadar *in vitro* uygulamalar gerçekleştirilmiştir. *In vivo* çalışmalarda ise 240 ug/kg, 480 ug/kg ve 720 ug/kg olacak şekilde DMSO çözücüsü ile hazırlanmış ve 200 ul final hacime serum fizyolojik ile tamamlanarak 500 ul şırıngalarda hazır halde uygulanmıştır. *In vivo* çalışmalarda enjeksiyonlar 15 gün boyunca her gün tekrarlanmıştır. Enjeksiyonlar SCID farelerin periton bölgesinin içerisine gerçekleştirilmiştir.

3.2.4 MTT Hücre Canlılık Testi

Kolon kanser hücreleri olan SW480 (ATCC CCL-228) ve DLD-1 (ATCC CCL-221) 96 kuyucuklu petrinin her kuyucuğuna 1×10^4 hücre olacak biçimde ekim yapılarak hücreler morfoloji almaları için bir gece boyunca 37°C 'lik CO_2 etüvde inkübe edilmiştir. Daha sonra hücreler üzerine 30 μM EBR uygulanarak hücreler 12, 24 ve 48 saat süre ile 37°C etüvde bekletilmiş ve inkübasyon sonunda hücrelerin üzerindeki besiyerine 10 μl 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT) ajanı eklenerek 4 saat boyunca 37°C ' etüvde tutulmuştur. 4 saat içerisinde sadece canlı hücreler hidrogenaz enzimi ile mitokondrilerinde metabolize ettiği MTT ajanının formazan kristallerine dönüştürmüştür. Üstte kalan besiyeri dikkatlice çekilip atılmıştır. Her kuyucuğa 100 μl DMSO eklenilerek karanlıkta 5 dakika bekletilir. Formazan kristallerinin DMSO'da çözünmesiyle hücre canlılığı seviyesi Mikroplaka ELİSA okuyucuda 570 nm ve 655 nm'de iki dalga boyunda absorbans ölçümü yapılmıştır.

3.2.5 Yara İyileşmesi Deneyi

Kolon kanser hücreleri olan SW480 (ATCC CCL-228) ve DLD-1 (ATCC CCL-221) 35mm² petriye 5×10^4 hücre olacak şekilde ekilmiştir ve bir gece boyunca morfoloji almaları için inkübe edilmiştir. Petri tabanı ertesi gün 1000 μl 'lik pipet ucu ile hücreler olduğu yerde kalacak şekilde çizilmiştir ve oluşan yarıkların boyutu mikroskop yardımı ile ölçülmüştür. 30 μM EBR uygulanan örnekler 12, 24 ve 48 saat boyunca 37°C 'lik CO_2

etüvde inkübe edilmiştir. Petri tabanında oluşturulan yarıklar inkübasyon sonrası tekrardan mikroskopta gözlemlenmiştir. Ölçüm sonrası fikse edilen hücreler kristal viyole ile boyanmış ve mikroskopta bir kez daha gözlemlenerek sonuç doğrulanmıştır.

3.2.6 DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol) Boyaması

Kolon kanser hücreleri olan SW480 (ATCC CCL-228) ve DLD-1 (ATCC CCL-221) 6 kuyucuklu petriye 1×10^4 hücre olacak şekilde ekilmiştir ve yapışması için bir gece boyunca 37 °C'lik CO₂ etüvde inkübe edilmiştir. Morfoloji alan hücrelere 30 µM EBR uygulanmıştır. İnkübasyon sonrası hücrelerin medyası 5 mg/ml DAPI içeren medya ile değiştirilmiş ve 10 dakika bekletilmiştir. DNA'ya bağlanan boya floresan mikroskobunda eksitasyonu 350 nm ve emisyon 420 nm'de mavi olarak görüntülenmiştir.

3.2.7 DiOC6 (3',3-Diheksiloksakarbosiyanin İyodür) Boyaması

Kolon kanser hücreleri olan SW480 (ATCC CCL-228) ve DLD-1 (ATCC CCL-221), 6 kuyucuklu petriye 1×10^4 hücre olacak şekilde ekilmiş ve yapışması için bir gece boyunca 37°C' lik CO₂ etüvde inkübe edilmiştir. Morfoloji alan hücrelere 30 µM EBR uygulanmıştır. İnkübasyon sonrasında hücrelerin medyası 400 nM DiOC₆ içeren medya ile değiştirilip 15 dakika boyunca bekletilmiştir. Sağlıklı mitokondri membranını boyayarak canlı hücrelerin seçimi sağlanmıştır. Sağlıklı mitokondri membranına sahip hücreler 15 dakika sonunda floresan mikroskobunda eksitasyonu 488 nm, emisyon 525 nm'de yeşil olarak görüntülenmiştir.

3.2.8 Akridin turuncusu (AO) Boyaması

Kolon kanser hücreleri olan SW480 (ATCC CCL-228) ve DLD-1 (ATCC CCL-221), 6 kuyucuklu petriye 1×10^4 hücre olacak şekilde ekilmiş ve yapışması için bir gece boyunca 37 °C' lik CO₂ etüvde inkübe edilmiştir. Morfoloji alan hücrelere 30 µM EBR uygulanmıştır. İnkübasyon sonrasında hücrelerin medyası 2 mg/ml Akridin turuncusu içeren medya ile değiştirilmiştir. Akridin turuncusu hücre zarından geçebilen dsDNA ya bağlandığında yeşil floresan ışımaya (520 nm) verirken, ssDNA, RNA veya asitik kompartmanları boyadığında ise turuncu floresan ışımaya (650 nm) sağlamaktadır. 10dk boyama sonrasında medya değiştirilmiş ve hücreler floresan mikroskobunda gözlemlenmiştir. Akış sitometrisi tekniği ile bakılmak üzere AO ile boyanan hücreler

tripsinize edilmiştir. 15ml falkonlara toplanan hücreler 1:1 oranda taze besiyeri ile muamele edilip 500g de 5dk santrifülf edilmiştir. Süpernatant atılır ve hücreler 500ul 1x steril PBS ile nazikçe pipetaj yapılması sonrasında akış sitometrisi da okutulmuştur. Okutma işlemi belirlenen sağlıklı populasyon içerisinde her kondüsyondan 10 bin ‘er hücre olunca tamamlanır ve analiz edilir. Kolon kanser hücreleri pozitif kontrol olarak 2 saat boyunca FBS içermeyen besiyerinde bekletilmiş ve aç hücre modeli oluşturulmuştur.

3.2.9 Monodansylcadaverine (MDC) Boyaması

Kolon kanser hücreleri olan SW480 (ATCC CCL-228) ve DLD-1 (ATCC CCL-221), 6 kuyucuklu petriye 1×10^4 hücre olacak şekilde ekilmiş ve yapışması için bir gece boyunca 37 °C’ lik CO₂ etüvde inkübe edilmiştir. Morfoloji alan hücrelere 30 µM EBR uygulanmıştır. İnkübasyon sonrasında hücrelerin medyası 0,05 mM MDC içeren medya ile değiştirmiştir. MDC spesifik olarak lizozomal enzimler, asit fosfataz ve cathepsin D bulunduran bölgelerde birikirler. MDC içeren medya 10dk sonra değiştirilip floresan mikroskopunda gözlemlenmiştir. Kolon kanser hücreleri pozitif kontrol olarak 2 saat boyunca FBS içermeyen besiyerinde bekletilmiş ve aç hücre modeli oluşturulmuştur.

3.2.10 Asılı damla Modeli

SW480 (ATCC CCL-228) ve DLD-1 (ATCC CCL-221) hücreleri 60mm² petrilerin kapaklarına 20ul besiyeri içerisinde 1×10^4 hücre olacak şekilde damla damla bırakılır. EBR uygulaması için, 1×10^4 hücre 30 uM EBR içeren besiyerinde 20 ul final hacimde hazırlanarak 60mm² petri kapağına damla damla bırakılır. Petrilerin içerisine 1ml PBS eklenir ve kapat dikkatlice üzerine kapatılır. Petri ve hücreler hareket ettirilmeden gece boyu 37C 5% CO₂ içeren inkübatörlerde bekletilirler. En az 20 tekrarlı olacak şekilde yapılan deney istenilen süre inkübasyonu sonrasında mikroskopta kapak çevrilmeden ve damla modeli bozulmadan görüntülenir.

3.2.11 Sferoid Hücre Kültürü

96lık koni yapılı petri tiplerine 1% agaroz jel dökülerek donması beklenir. SW480 (ATCC CCL-228) ve DLD-1 (ATCC CCL-221) hücreleri 1×10^4 olacak şekilde 30uM EBR içerikli ve içeriksiz olarak agarlara temas etmeden 50 ul final hacimde petriye ekilir. Ekim sırasında kullanılan kuyuların çevresinde bulunan kuyulara buharlaşmasını önlemek amacı

ile 1x PBS ile eklenir. 37C ve 5% CO₂ içeren inkübatörde gece boyu inkübe edilir ve ertesi gün oluşan sferoid yapı incelenir. Deney planına göre istenilen sürede inkübasyon gerçekleştirilir ve mikroskopta görüntüleme yapılır.

3.2.12 Sferoid Hücre Modelinde ve Asılı Damla Hücre Modelinde Floresan

Boyama

Boyanması istenilen boyalar 2x konsantrasyonlarında sferoid hücre modeli için 50ul final hacimde, sallanan hücre modeli için ise 20ul final hacimde hazırlanmıştır. Sferoid hücre modelinde besiyerine temas etmeden petrilere dikkatlice eklenir ve boyaya göre farklılık gösteren inkübasyon süresi sonrasında floresan mikroskobunda görüntülenir. Asılı damla modelinde ise damla yapısını bozmadan damlanın yanına yavaşça boya eklenir ve boyalara göre farklılık gösteren sürede inkübasyon gerçekleştirilir. İnkübasyon sonrasında floresan mikroskobunda görüntüleme yapılır.

3.2.13 Koloni oluşumunun kristal viyole ile gösterilmesi

Kolon kanser hücreleri olan SW480 (ATCC CCL-228) ve DLD-1 (ATCC CCL-221), 6 kuyucuklu petriye 1×10^4 hücre olacak şekilde ekilmiş ve yapışması için bir gece boyunca 37 °C' lik CO₂ etüvde inkübe edilmiştir. Morfolji alan hücrelere 30 µM EBR uygulanmıştır. 12, 24 ve 48 saatlik ilaç uygulaması sonunda hücrelerin normal medya ile değişimi yapılmıştır. DMSO ilişkili deney için 30 µM EBR ile aynı hacimde DMSO uygulanan hücrelerin besiyeri 12, 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonunda uzaklaştırılmıştır. Kuyucuklardaki medya 10-14 gün sonunda uzaklaştırılarak 1xPBS ile yıkanmış ve 3 ml %100 metanol, 1 ml asetik asit ile 5 dakika inkübe edilmiştir. Fiksasyon sonucunda hücreler Kristal viyole ile boyanmış ve görüntülenmiştir.

3.2.14 Plazmit Çoğaltılması ve İzole Edilmesi

Kanamycin antibiyotiği 50 mg/ml stok konsantrasyonunda hazırlanmıştır. LB agar ve LB broth besi yerlerinde final konsantrasyonu 50 µg/mL olacak şekilde kullanılmıştır.

Addgene den hazır alınan mEGFP-C1 plazmiti Kanamycin LB agar a çizme tekniği ile ekilmiş ve 37 °C de bir gece inkübe edilmiştir. Ertesi gün uydu koloni oluşumu olmayan ve tek başına duran 10 koloni seçilerek Kanamycin bulunduran 3ml LB brotlara

aktarılmıştır. Gece boyu 37 °C de inkübasyon devam etmiştir. Ertesi gün LB brothlardan 2ml ZYMO plazmit izolasyon kit (Cat# D4019) i ile izole edilip %1.2 lik agaroz jelde görüntülenmiştir. Doğrulanmış mEGFP-C1 plazmiti stabil hücre eldesi için yüksek hacimlerde ZYMO plazmit izolasyon kiti ile izole edilmiştir. Elde edilen plazmitlerin saflık ve konsantrasyonu tayini Implen Nanofotometre NP80(CA10770-492) gerçekleştirilerek kullanılmıştır.

3.2.15 Agaroz Jel Elektroforezi

İstenilen yüzde hacimde olacak şekilde tartılan agaroz küçük jeller için 25ml, büyük jeller için 50ml hacimde dökülmüştür. Agaroz jel dökülmeden önce ethidium bromür eklenmiştir. Jel donduktan sonra 1x TAE içeren agaroz jel tankına aktarılmış ve yükleme boyası ile karıştırılan örnekler jele yüklenmiştir. 70 V ta 1 saat yürütülen örnekler Bio-Rad ChemiDoc XRS ile görüntülenmiştir.

3.2.16 Total Protein İzolasyonu

Kolon kanser hücreleri olan SW480 (ATCC CCL-228) ve DLD-1 (ATCC CCL-221), 100 nm'lik petrilere $1,5 \times 10^5$ hücre olacak biçimde ekim yapılmış ve yapışması için 37°C'lik CO₂ lik etüvde bir gün boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra hücreler 30 µM EBR uygulanarak 12, 24 ve 48 saat boyunca etüvde tutulmuştur ve sonrasında hücreler 1xPBS çözültisi kullanılarak kazıma yöntemi ile petriden toplanmış ve 2 dakika süre ile 13200 rpm'de santrifüj işlemi ile çöktürülmüştür. Bu işlem petrideki tüm hücreler toplanıp çöktürülüne kadar tekrarlanmaktadır. Santrifüj ile çöktürülen hücrelere lizis tamponu ilave edilmiştir. Örnekler, 20 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edilmiş ve sonrasında 20 dakika da 16000 g'de +4°C' de santrifüj edilmiştir. Üst faz yeni ependorf tüpüne alınarak -80°C' de saklanılır.

3.2.17 Fosfatlanmış Proteinlerin İzolasyonu

Kolon kanser hücreleri olan SW480 (ATCC CCL-228) ve DLD-1 (ATCC CCL-221), 100 nm'lik petrilere $1,5 \times 10^5$ hücre olacak biçimde ekim yapılmış ve yapışması için 37°C'lik CO₂ etüvde bir gün boyunca inkübe edilmiştir. Morfoloji almış olan hücrelere 30 µM EBR uygulanarak 12, 24 ve 48 saat süre ile etüvde tutulmuştur ve hücreler sonrasında 1xTBS çözültisi kullanılarak kazıma yöntemi ile petriden toplanarak 2 dakika boyunca 13200

rpm'de santrifüj işlemi ile çöktürülmüştür. Bu işlem petrideki tüm hücreler toplanıp çöktürülüne kadar tekrarlanmaktadır. Santrifüj ile çöktürülen hücrelere 1x fosfostop eklenmiş ve lizis tamponuda ilave edilmiştir. Örnekler 20 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Daha sonra 20 dakika da 16000 rpm'de +4°C' de santrifüj edilmiş ve üst faz yeni ependorf tüpüne alınarak -80°C' de saklanmıştır.

3.2.18 Protein Miktar Tayini

Bradford yöntemi kullanılarak protein miktarı belirlenmiştir ve 96 kuyucuklu petri kullanılarak konsantrasyonu 1,5 µg/ml olan Bovine Serum Albumin (BSA), artan miktarlarda kullanılarak önce standart bir eğri oluşturulmuştur. 96 kuyucuklu petri kullanılmaya devam edilerek her örnekten 1 µl konulmuş ve üzerine de 200 µl Bradford solüsyonu ilave edilmiş karanlıkta 5 dakika süre ile bekletilmiştir. Örnekler 595 nm dalga boyunda mikropłaka okuyucuda okutulmuştur. Oluşan absorbans değerleri kullanılarak protein konsantrasyon değerleri elde edilmiştir.

3.2.19 İmmunoblotlama Tekniği ve Protein Düzeylerinin Belirlenmesi

İmmunoblotlama tekniği için, konsantrasyonu hesaplanan proteinlerin Laemmli (5X) yükleme tamponu ve 40 µg protein örnekleri 1:5 oranıda karıştırılarak 95°C'de 5 dakika bekletilerek hazırlanan proteinler %10, %12 veya %15'lik akrilamid /bisakrilamid jelle belirlenen konsantrasyonlarda yüklenerek yürütme tamponu olan tankta 85V 'ta yürütülmüştür. Proteinler yürütüldükten sonra transfere alınmadan önce polvinilden florid (PVDF) membranların kullanılacak hale gemesi için metanol ile aktifleştirilmiştir. Jeldeki proteinler, transferi gerçekleştiren makine ile 2,5 mA'de hücre kDa' una bağlı olarak değişen değerlerde PVDF membrana transfer edilmiştir. Transfer işlemi sonrası membranlar, 1 saat oda sıcaklığında %5'lik yağsız süt tozu (%0,1 Tween 20 içeren 1xTBS) içerisinde çalkalayıcıda bekletilmiştir. Sütte bekleyen membranlar 1:1000 olarak hazırlanan primer antikorunda bir gün boyunca +4 °C' de bekletilmiştir. 1:1000 olarak hazırlanan primer antikor işaretlemesinden sonra membran ikinci antikora alınmadan önce 5 dakika olarak üç kez 1xTBS-T çözeltisi ile yıkanmıştır. Daha sonra membran 1:3000 hazırlanan ikincil antikor ile bir gün boyunca +4°C' de inkübe edilir. Membran TBS-Tween çözeltisi ile 5dk boyunca iki kez ve TBS çözeltisi ile 5dk boyunca bir kez

muamele edilmiştir. Ekte yer alan tabloda belirtilen değerlerde hazırlanmış kemilüminesans çözeltisi ile 2 dk boyunca membranlar muamele edilmiştir. Chemidoc-MP ile 2dk boyunca 30 farklı görüntü kaydedilmiştir.

3.2.20 İmmüno Floresan Tekniği ile Protein Düzeylerinin Belirlenmesi

Kolon kanser hücreleri olan SW480 (ATCC CCL-228) ve DLD-1 (ATCC CCL-221), poly-d-lizin kaplı lamellerin üzerine 1×10^4 hücre olacak şekilde ekimler gerçekleştirilmiştir. 30 μ M EBR uygulaması sonrası medium atılmıştır ve 3 kez 1x PBS ile yıkama gerçekleştirilmiştir. Daha sonra -20 de bekletilmiş 1ml metanol eklenilir ve 10dk boyunca 37°C'lik CO₂ etüvde inkübe edilmiştir. Metanol uzaklaştırılması sonrasında lameller kurumaya bırakılmıştır ve 3 kere 1x PBS ile yıkama gerçekleştirilmiştir. Daha sonra 1ml Triton X-100 solusyonu eklenilir ve 15dk boyunca 37°C'lik CO₂ etüvde inkübasyon sonrasında 3 kere 1x PBS ile yıkama gerçekleştirilmiştir. %0.5 BSA içeren PBS solüsyonu (PBB) ile 3 kez yıkama gerçekleştirildikten sonra 1ml %2 BSA içeren PBS solüsyonu (BLOCK) ile oda sıcaklığında karıştırıcıda (10-15 rpm) 45-60dk inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan Primer lamellerin üzerini kaplayacak şekilde yerleştirilerek kuyunun üzeri gergin bir şekilde ıslak filtre kağıdı/peçete ile kapatılarak folyo ile kaplanmıştır ve +4°C'de karıştırıcıda (10-15 rpm) gece boyu inkübe edilmiştir. Ertesi gün 3 kere 500ul PBB solüsyonu ile lamellerin yıkaması gerçekleştirilerek hazırlanmış olan sekondere DAPI eklenerek kuyularının içine konulmuştur ve kuyunun üzeri gergin bir şekilde ıslak filtrekağıdı/peçete ile kapatılarak folyo ile kaplanmıştır. +4 derecedeki karıştırıcıda (10-15 rpm) 60dk inkübe edilmiştir. Sonrasında 3 kere 500ul PBB solüsyonu ile yıkama gerçekleştirilerek lamaların üzerine bir damla 1x PBS damlatılır ve lameller hücreler altta kalacak şekilde kapatılmıştır. Lameller çekim işlemi sonrası yukarı Bakıcağ şeklinde kuyuya aktarılmıştır ve içerisine 1ml PBS eklenerek üzerine gergin bir şekilde ıslak filtre kağıdı koyularak folyo sarılıp +4 derecede kullanım ihtiyacına kadar saklanılabilmektedir.

3.2.21 HPLC İle Poliamin Seviyelerinin Belirlenmesi

Hücre kültüründe 100mm² petrilere 1.5×10^5 SW480 ve DLD-1 hücreleri ekilmiş ve morfoloji almasını takiben 12, 24 ve 48 saat 30 μ M EBR uygulaması gerçekleştirilmiştir.

İnkübasyon sonrası hücreler kazıyıcı ile petriden kaldırılmış ve 15ml lik falkonlara aktarıldılar. 16000g de 5dk santrifül edilmesiin takiben süpernatant atılır ve hücre pelletinin üzerine 1ml steril PBS içerisinde çözündürülmüş 100 µl trikoloro asetik asit (TCA) ile homojenize edilmiştir. Hücrelerde bulunan monomeric bileşikler polimer maddeler santrifül ile çöktürülerek elde edilir. 23000g de 20dk yapılan santrifüj sonrasında supernatant yeni bir falkona aktarılır. Çözelti pHı 2M NaOH ile yükseltgenerek 10ul Benzil klorür ile muamele edilir. Bu sayede poliaminlere benzil halkası bağlanması sağlanmıştır. Doymuş 5Mlık NaCl tuz çözeltisi ile muamele edilerek serbest monomerlerin ve artıkların çökmesi sağlanır. Dietil eter içerisinde poliaminler çözündürülür ve oluşan faz ayrımı sayesinde poliaminler ayrılır. Örnekler konsantratöre koyularak uçurma işlemi gerçekleştirilir. Bu işlemde ortamda bulunan dietil eter uçar ve mikrofüj tüplerine aktarılmış olan poliaminler tüpleri tiplerine çöker. Kristal forma gelmiş olan poliaminler %60 lık methanol ile çözündürülür ve Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) sistemi kullanılarak poliaminler tespit edilir. Her poliamin için öncesinde yürütülen standartlar sayesinde putresin, spermin ve spermidine için dakikalar deney öncesinde belirlenir. Bu sayede sonuçların doğruluğu sağlanır. Elde edilen sonuçlar oluşturulan standart grafiğinin formülüne göre konsantrasyonlara çevrilerek hesaplanır. Aynı miktarda hücreden elde edilen protein miktarları Bradford tekniği ile belirlenir ve hücrelerdeki protein başına düşen poliamin miktarı cinsinden poliamin seviyeleri tespit edilir.

3.2.22 Agar Arası Hücre Modeli

%1 ve %0.6' lık agarlar hazırlanır ve otoklavlanır. Alt agarda kullanılmak üzere 2x besiyeri hazırlanır. 1% lik agar donmayacak şekilde soğutulur. Önceden hazırlanıp ısıtılmış 2x besiyeri ile 1:1 oranda karıştırılır ve 6 kuyucuklu petrilere her kuyuda 1.5ml karışımdan koyulur ve hareket ettirmeden donması beklenir. Üst agar için SW480 hücreleri kaldırılır ve her kuyuda 5 bin hücre olacak şekilde 1:1 oranda %0.6 lik agar ile karıştırılarak alt agarın üzerine 1.5ml üst agar eklenir. EBR uygulaması yapılacak kondüsyonlarda 5 bin hücre 750ul 30 µM EBR bulunan medya da çözülerek 750µl %0.6 lık agar ile karıştırılır. Agarın sıcak olması hücreleri öldüreceğinden uygun sıcaklığa kadar soğutulması beklenmeli ve üst agar koyulmasından sonra 30dk boyunca oda

ısısında donması için beklenmelidir. Donma işlemi gerçekleştikten sonra 37C de %5 CO2 inkübatöründe bekletilir. Deney sonlandıktan sonra agarlar ayrıştırılarak tripan mavisi ile boyanır ve mikroskopta görüntülenir.

3.2.23 3 Boyutlu Hücre Kültürü

BD Matrigel Matrix (356234) kullanımı ile gerçekleştirilen 3 boyutlu hücre kültürü için 96 kuyucuklu petriler kullanılmıştır. 50µl matrijel içerisinde 5 bin adet SW480 kolon kanser hücresi olan 50µl MEM ile 1:1 oranında karıştırılmış ve her kondüsyondan 4 tekrarlı olacak şekilde 96 kuyucuklu petri kuyularına yerleştirilmiştir. EBR uygulaması gerçekleştirilen kuyulara 50µl hücre karışımı içerisinde 100ul total hacimde 30µM EBR olacak şekilde EBR koyulmuş ve 1:1 oranda matrijel ile karıştırılarak final konsantrasyon sabit olacak şekilde deney gerçekleştirilmiştir. Çevre boş kuyulara buharlaşmayı önlemek amacı ile 1x streil PBS koyulmuştur. Her gün mikroskop ile takip edilen kuyucuklarda sferoid oluşturan hücre popülasyonları belirlenmiş ve her gün sferoid boyutları kontrol edilmiştir. 7. Günün sonunda sferoidler kontrol grubunda birbirleri ile interaksiyona girdikleri ve deney doğruluğunu etkileyeceği boyuta geldiği için deney sonlandırılmıştır.

3.2.24 Ksenograft SCID Fare Modeli

Deneyler ACU-HADYEK tarafından alınan etik kurul onayı ile ACIBADEM UNIVERSİTESİ MEHMET ALİ AYDINLAR KAMPUSUN de gerçekleştirilmiştir. Deneyde severe combined immunodeficiency (SCID) fareler kullanılmıştır. 7×10^6 SW480 kolon kanser hücresi 200 ul matrijel ile farelerin sağ arka bacak önü boşluk bölgelerine inokülasyon gerçekleştirilmiştir. 40 gün süren beklemenin ardından farelerde SW480 tümör boyutları gözle görülür hale gelmiştir.

Gruplara ayrılan farelerin tumor boyutları elektronik kaliper yardımı ile 5 gün arayla ölçülmüştür.

Fare ağırlıkları 5 gün ara ile hassas terazi üzerinde her gün uygulanan EBR enjeksiyonu öncesi tartılmış ve ağırlıkları not edilmiştir.

Fareler sakrifiye edilmeden önce izofloran ile anestezi uygulanmış ve farelerin jugular damarından 500µl kan alınarak serum elde edilmek üzere muhafaza edilmiştir. Fareler daha sonrasında sakrifiye edilerek tümörleri çıkartılmış ve resimleri çekilmiştir.

3.2.25 Tümörlerden Protein İzolasyonu

Tümörlerden gerçekleştirilen protein izolasyonunda T-PER Tissue Protein Extraction Reagent (78510) kullanılmıştır. Tümörlerden bistüri ile alınan parçalar folyo üzerinde küçük kesitler haline getirilmiş ve darası alınmış 2ml hacime sahip mikrofij tüplerinde tartılarak 1gr:20ml T-PER oranı korunarak dounce homojenleştiricisi kullanılarak buz üzerinde homojenize hale getirilmiştir. T-PER kullanılmadan önce 10ml içerisine 1 tablet cOmplete, EDTA-free proteaz inhibitör kokteyli (11836170001) eklenmiştir. Fosforlanmış proteinlerin eldesi için ise işlem bu noktaya kadar tekrarlanmış ve 10ml T-PER içerisine 1 tablet proteaz inhibitörünü takiben 1 tablet PhosSTOP (4906845001) tablet eklenmiştir. Homojenizasyon işlemi tamamlandıktan sonra 10000g de 5dk santrifül edilmiş ve supernatant protein içeriği ayrı bir 1.5ml lik mikrofij tüpüne aktarılarak -80 de depolanmıştır.

3.2.26 İnsan Embriyonik Antijen ELİZA Deneyi

Deneyde Abcam Human CEA ELISA Kit (ab99992) isimli kit kullanılmıştır. Farelerden elde edilen kan örnekleri 30 dk oda sıcaklığında bekletilmiş ve kanın pıhtılaşması sağlanmıştır. Daha sonrasında örnekler 10dk boyunca 2000g de santrifül edilmiştir. Bu sayede Kan ve serum arasında görünür fark elde edilerek serum yeni bir 1.5ml lik mikrofij tüpüne aktarılmıştır. Her bir örnek 2 tekrarlı olacak şekilde 50 şer mikrolitre serum örneği yeni 0.5ml lik PCR tüplerine ayrılmış ve kitin temin ettiği Assay Diluent A ile 100µl final hacime tamamlanmıştır. Kitin temin ettiği recombinant insan CEA standartları belirtilen şekilde seri dilüsyon tekniği ile hazırlanıp en az iki görnek olacak şekilde dilüe edilmiştir. Örnekler kuyucuklara eklenmiş ve gece boyu +4C de düşük hızda sallanan inkübatörde inkübe edilmiştir. Ertesi gün 4 kere 300µl 1x yıkama solüsyonu ile yıkamalar gerçekleştirilmiş ve 100 mikrolitre 1x biotin işaretli CEA antikor her kuyuya eklenmiş ve 1 saat oda sıcaklığında düşük hızda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında aynı yıkamalar tekrar gerçekleştirilmiştir. Yıkamalar sonrasında 100µl 1x Streptavidin solüsyonu ile 45dk düşük hızda inkübe edilen örnekler bir sefer daha yıkanmıştır. Ardından TMB tek aşamalı substrat solüsyonu eklenerek karanlıkta düşük hızda 30dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında 50µl stop solüsyonu eklenmiş ve 450nm de

okutulmuştur. Çıkan sonuçlar elisakit.com firmasına ait elisaanalysis.com da analiz edilmiş ve değerler anlamlandırılmıştır.

3.2.27 İmmünohistokimya Deneyi

Tümörlerden alınan kesitler %10 tamponlanmış formalin çözeltilisinde 4 °C de 16 saat bekletilmiştir. 1 hafta boyunca gün aşırı %70 etanol ile yıkanan örnekler 1 hafta sonrasında doku takibine tabi tutulmuştur. Doku takibinde örnekler %70 etanol de 10dk, %80 etanol ile 20dk daha sonra %90 etanol de 20dk, %96 etanol de 15dk, %100 etanol de 15dk, %100 etanol de 15dk bekletildikten sonra ksilol de 2 kere 5er dk bekletilip 42-44 paraffin e aktarılarak 44 °C soğuk suda kısa süre bekletilir ve oda ısısında çalışılana kadar bekletilmiştir. Ertesi gün 58 parafine aktarılır tümör örnekeri 2 saat 58 °C de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında 58 parafinin içerisine gömülen dokular sertleşmesi için 1 hafta oda ısısında bekletilir. Kesit alma işleminde mikrotoma yerleştirilen paraffin bloklar 4 mikrometre kalınlığında kesitler alınarak üzerinde bir miktar su bulunan poly-L-lizin kaplı hazır lamlar üzerine alınır ve 37 °C deki ısıtma tablasında yapışması için beklenir yapışan kesitlerde düşme olmaması için bir gece 37 °C deki etüvde inkübe edilir. Lamlar şale içerisine alınır ve 2 kere ksilol de 5dk bekletilir. Daha sonra %100 etanol de 2 kere 5dk, %95 etanolde 2 kere 5dk, %70 etanolde 2 kere 5dk bekletilir ve dH₂O ya alınarak deparafinizasyon işlemi gerçekleştirilir ve ardından 5dk bekletilmiştir. Antijen iyileştirme tekniği için lamlar ısıya dayanıklı özel bir kaba alınır ve kabın içerisi 10mM sitrat tampon ile doldurularak 15dk mikrodalga da kaynatılır. Daha sonra 50mM tris +%0,01 tween20 den oluşan yıkama tamponu ile lamlar 10dk boyunca yıkanır. Yıkama sonrasında metanol de hazırlanmış %1.5 H₂O₂ ile 15dk muamele edilir. Noves HistoStain Plus kit içeriğinde bulunan bloklama solüsyonu ile 10dk muamele edilen lamlar 1:100 dilüsyon ile hazırlanmış Ki67 ve 1:200 dilüsyon ile hazırlanmış sitokeratin18 ile kaplanarak üzerlerine lam boyutunda parafilm kesilerek kapatılır. Kapatılan lamlar 4 °C de gece boyu bekletilerek primer antikör bağlanması sağlanır. Ertesi gün yıkama tamponuna alınan lamlar 15dk boyunca yıkanır ve üzerlerine kit içeriğinde bulunan sekonder antikör eklenerek 30dk beklenir. İnkübasyon sonrası 10dk daha yıkama tamponunda bekletilen lamlar kit içeriğinde bulunan Streptavidin peroksidaz ile 10dk muamele edilir. Sonrasında tekrar yıkama tamponuna alınan lamlar 10dk daha

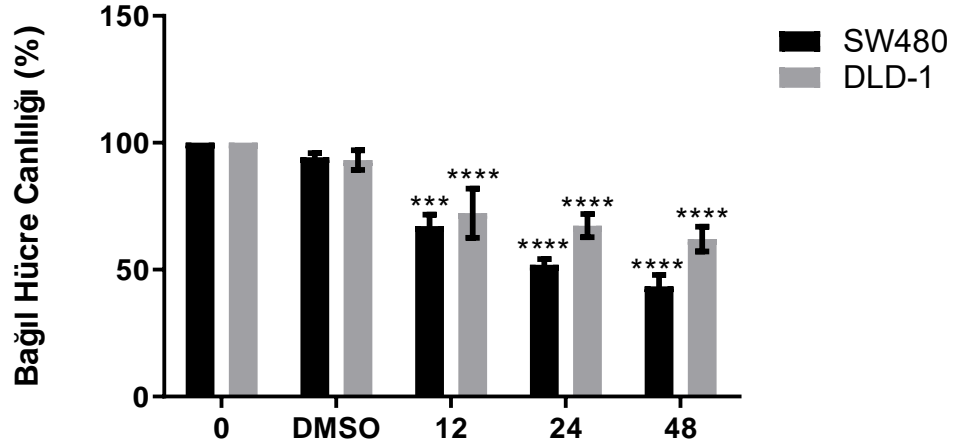
bekletilerek dH₂O ya aktarılır. AEC kiti ile muamele edilen lamlar reaksiyon için zaman tutularak bekletilir. Reaksiyon süresi hesaplanarak bütün örneklere aynı süre boyunca AEC uygulanır ve reaksiyonlar H₂O ile sonlandırılır. Sonlandırılmayı takiben lamların üzeri GVA ile kaplanarak lamel ile kapatılır.



4 SONUÇLAR

4.1 EPİBRASSİNOLİD UYGULAMASI DLD-1 VE SW480 KOLON KANSER HÜCRELERİNDE HÜCRE CANLILIĞINI AZALTICI YÖNDE ETKİ ETMİŞTİR

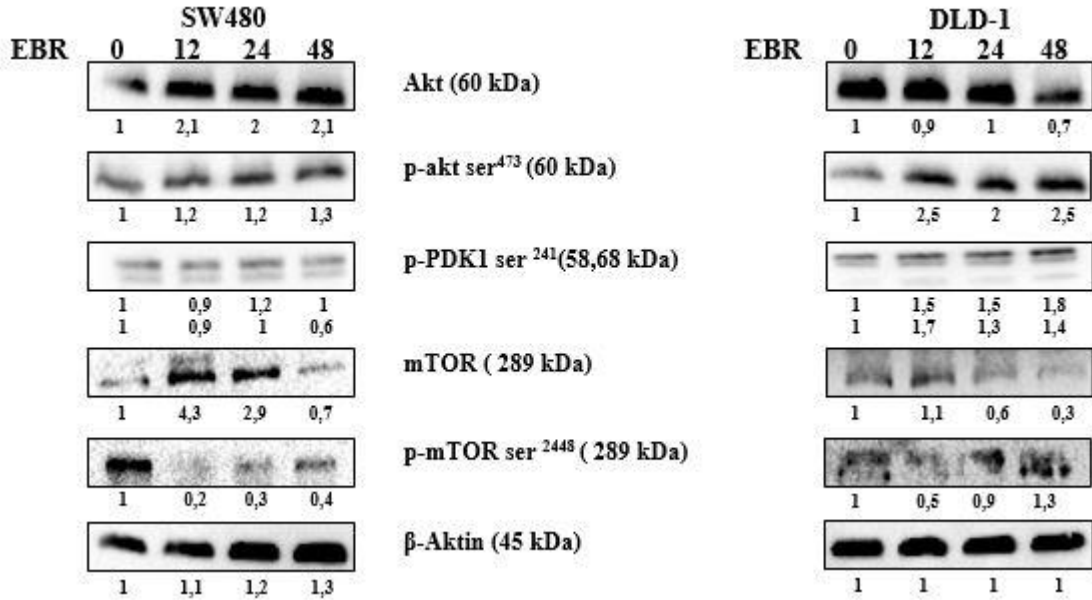
Epibrassinolid(EBR)'in hücre canlılığı üzerindeki etkisinin belirlenmesi için 30 μ M konsantrasyonda zamana bağlı MTT deneyi yapılmıştır. SW480 ve DLD-1 kolon kanseri hücre hatlarında hücre canlılığı azalma göstermiştir. DLD-1 kanser hücreleri 48 saat sonrasında %65 hücre canlılığı gösterirken, SW480 hücreleri %50'nin altına düşmüştür (**** $P \leq 0.0001$, *** $P \leq 0.001$) (Şekil 4.1). Hücre canlılığında ki bu azalma EBR'nin endoplazmik retikulum stresine bağlı apoptoz yolağını indüklemesi ile gerçekleştirildiği daha önce ki çalışmalarımızda gösterilmiştir. [8]



Şekil 4. 1. SW480 ve DLD-1 kolon kanseri hücrelerinin MTT tekniği ile hücre canlılığının EBR uygulamasını takiben gösterilmiştir (**** $P \leq 0.0001$, *** $P \leq 0.001$).

4.2 EPİBRASSİNOLİD AKT/MTOR/ULK-1 YOLAĞINA ETKİ EDEREK HÜCRENİN ENERJİ METABOLİZMASINDA VE OTOFAJİ YOLAĞINDA DEĞİŞİKLİKLERE SEBEP OLMAKTADIR

Otofajik yolaktaki çeşitli değişikliklere bağlı farklı ölüm çeşitlerinde olabileceği düşünülerek çeşitli protein seviyeleri immunoblotlama ile gösterilmiştir. Akt/mTOR yolağına Bakıldığında, Akt protein seviyelerinde değişiklik gözlemlenmezken serin473 amino asitinden fosfatlanmış Akt her iki hücre hattı için 48 saat EBR uygulaması sonucunda artış göstermiştir. Serin241 amino asitinden fosfatlanmış PDK-1 protein seviyeleride iki hücre hattı için de korunmuştur. mTOR proteini translasyon ve otofaji arasındaki dengeyi koruyan ve enerji ihtiyacına göre bu iki yolak arasındaki yönelimi sağlayan proteindir. mTOR proteini EBR uygulaması ile ilk 24 saatte artış göstermiş fakat 48 saatte kontrole kıyasla daha da azalmıştır. Bu noktada serin2448 amino asitinden fosfatlanmış mTOR proteini translasyonun devamını işaret etmektedir. 12 saatlik EBR uygulaması sonrasında azalmış olan fosfatlanmış mTOR 48 saat sonrasında artış göstermiştir (Şekil 4.2).

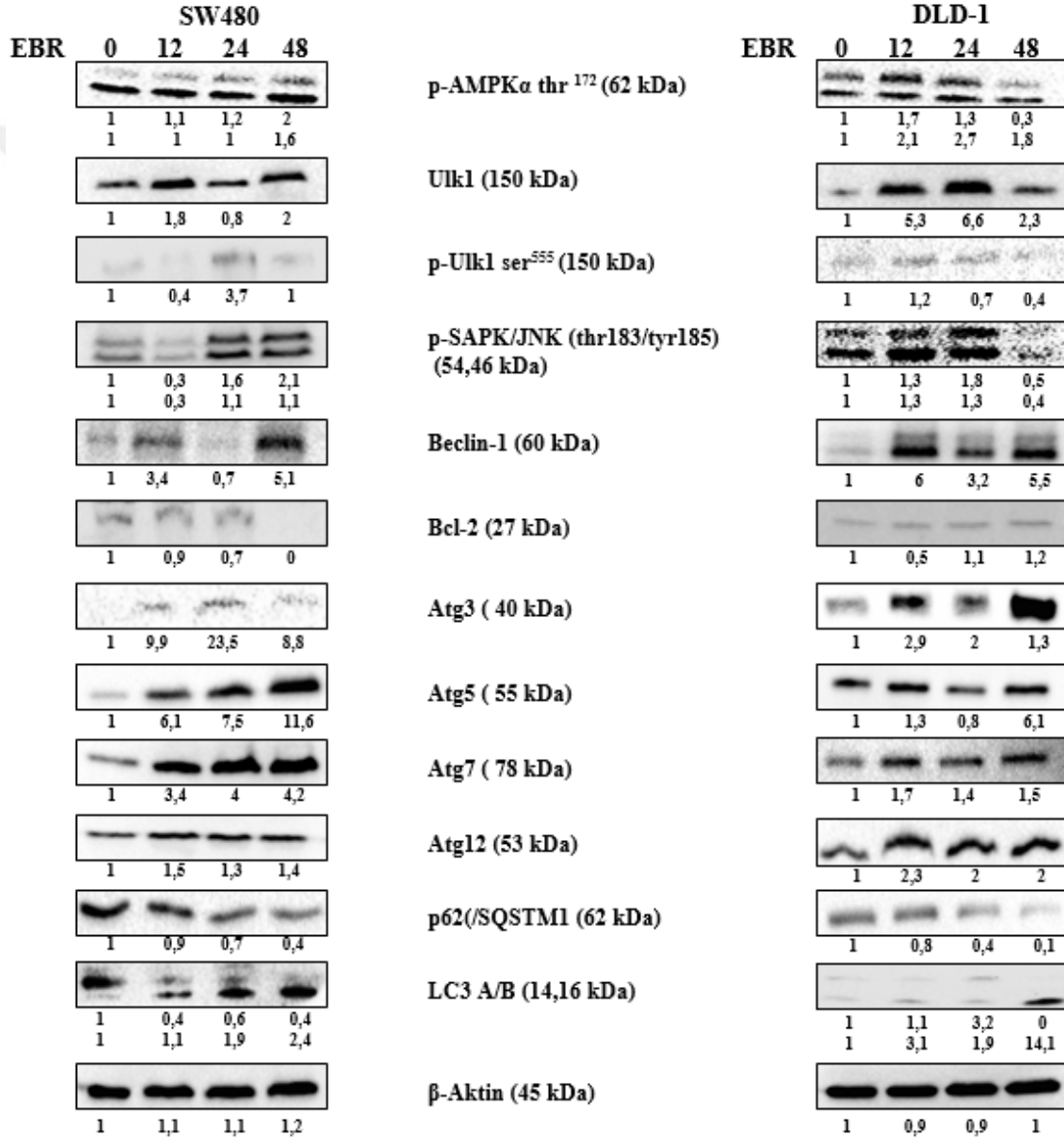


Şekil 4. 2. SW480 ve DLD-1 kolon kanser hücrelerinden EBR uygulaması sonrasında elde edilen proteinlerden akt/mTOR üyelerinin protein anlatımları gösterilmiştir.

4.3 EPİBRASSİNOLİD İLE TEKTİKLENEN AMPK, BECLİN-1 VE SQSTM1/P62 SEVİYELERİNDEKİ DEĞİŞİM OTOFAJİK CEVAP OLUŞUMUNDA KİLİT ROL OYNAMAKTADIR.

Fosfatlanması durumunda aktif olan ve AMP/ATP dengesindeki bozulmalar sonucu hücre enerji ihtiyacını dengelemek için otofaji sinyalini iletecek olan AMPK proteini mTOR'un baskıladığı Ulk-1 otofaji başlatıcı proteinini fosfatlayarak sinyalin başlatılmasını sağlar. 48 saatlik uygulama sonrasında SW480 hücrelerinde AMPK protein seviyesinde artış gözlemlenirken DLD-1 hücrelerinde azalma gözlemlenmiştir. Buna bağlı olarak Ulk-1 protein seviyeleri değişmiş ve DLD-1 hücrelerinde 48 saatte diğer uygulama saatlerine oranla azalma gözlemlenirken SW480 hücrelerinde artış gözlemlenmiştir. Serin555 amino asitinden fosfatlanmış Ulk-1 proteini aktif yapıyı ifade etmektedir. Bu protein seviyesindeki değişiklik otofaji başlangıç sinyalini ifade etmektedir. DLD-1 hücrelerinde ilk artış 12 saatte gözlemlenirken SW480 hücrelerinde 48 saatte belirgin bir değişim gözlemlenmiştir. pSAPK/JNK treonin183/tirozin185 proteini aktif yapıyı ifade etmektedir. SW480 hücrelerinde zamana bağlı olarak artmışken, DLD-1 hücrelerinde 12 ve 24 saatte artarken 48 saatte azalma gözlemlenmiştir. Beclin-1 ve Bcl-2 proteinleri otofajik membran nukleasyonun başlayacağı sinyalin ilk adımıdır. Heterodimerize şekilde bulunan bu iki proteinin birbirlerinden ayrılması durumunda sinyal iletmeye başlanır. Beclin-1 proteini seviyelerindeki artış bu ayrılmayı veya aşırı anlatımı sebebiyle heterodimerizasyonun gerçekleşmemesi durumuna bağlı sinyal iletimini ifade edebilir. Beclin-1 protein seviyelerindeki artış 12 saat ve 48 saatlik EBR uygulaması sonrasında açıkça gösterilmiştir. Bcl-2 protein anlatımı ise SW480 hücrelerinde 48 saatlik uygulama sonrası azalırken, DLD-1 hücrelerinde bir değişim gözlemlenmemiştir. Otofaji sinyalinin iletimi sonrasında ATG proteinleri arasında bir dizi interaksiyon sonrası ATG5-12-16L1 kompleksi oluşur ve diğer ATG proteinleri yardımıyla LC3 sırasıyla LC3-I ve LC3-II'ye kesilerek otofagozom membran oluşumu başlar. Atg3 protein ekspresyonu SW480 hücrelerinde 48 saat uygulama sonrasında azalmıştır. Fakat DLD-1 hücrelerinde bu durumun tam tersi gerçekleşmiş ve Atg3 protein ekspresyonu artış göstermiştir. Atg5 protein ekspresyonu 48 saatlik EBR uygulaması sonrasında SW480 hücrelerinde artış gösterirken DLD-1 hücrelerinde korunmuştur. Her iki hücre hattında Atg7 protein seviyeleri zamana bağlı artış gösterirken Atg12 protein ekspresyonunda herhangi bir

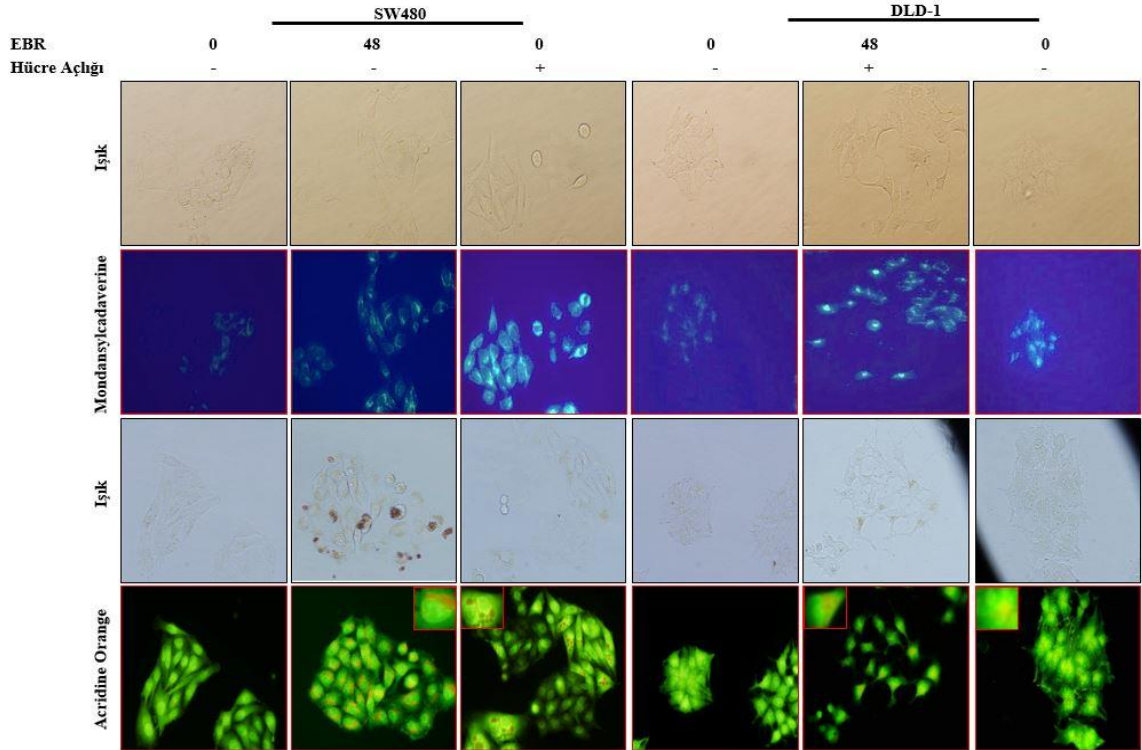
değişiklik gözlemlenmemiştir. SQSTM1/p62 proteini otofagozom ile degrade edilecek kargoyu işaretler ve otofaji sinyali sonlanırken kargo ile degrade olarak yok olur. Her iki hücre hattında da ekspresyon seviyeleri zamana bağlı olarak azalmıştır. Otofagozom membran nukleasyonu için gerekli olan LC3 proteinin ise LC3-I izoformu azalırken LC3-II izoformunun arttığı her iki hücre hattı içinde zamana bağlı olarak gösterilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4. 3. SW480 ve DLD-1 kolon kanser hücrelerinden EBR uygulamasını takiben elde edilen proteinlerden otofaji alakalı proteinlerin anlatım seviyeleri belirlenmiştir.

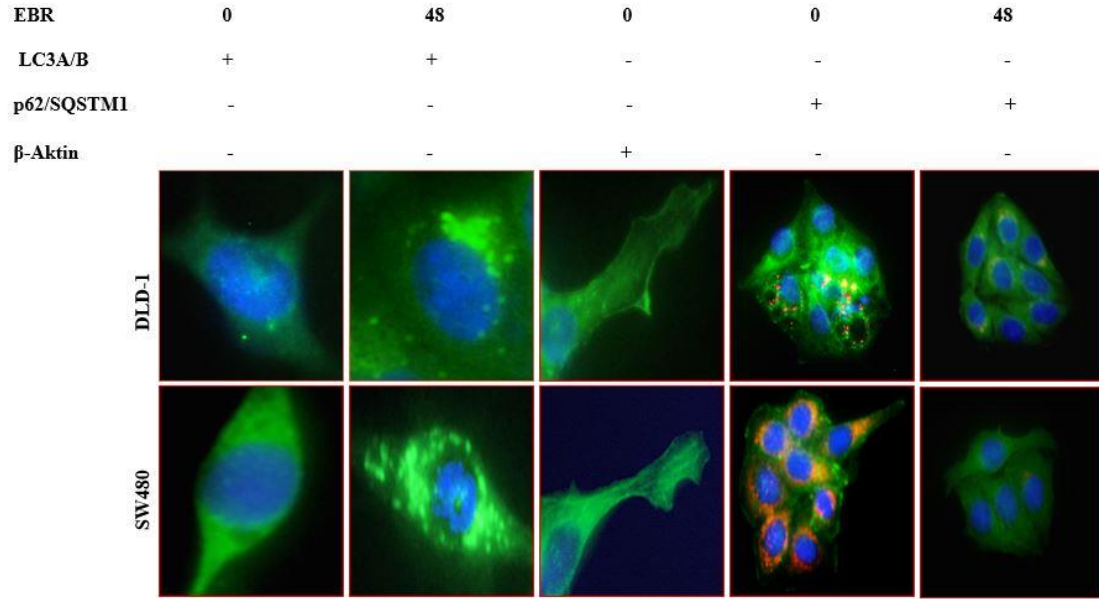
4.4 EBR UYGULAMASI MONODANSYLCADAVERİNE VE AKRIDİN TURUNCUSU BOYAMALARINDA ARTIŞA SEBEP OLMUŞTUR.

Otofajik cevabın gösterilmesi için Monodansylcadaverine ve Akridin turuncusu boyalamaları gerçekleştirilmiş ve bu boyamalarda EBR uygulaması ile beraber artış tespit edilmiş immunofloresan analizleri ile bu sonuçlardaki artış doğrulanmıştır. Otofajik vesiküllerin tespitinde kullanılan bir boya olan monodansylcadaverine 48 saatlik EBR uygulamasını takiben kullanılmış ve uygulaması sonrasındaki artış pozitif kontrol olarak kullanılan aç bırakılmış hücrelerle kıyaslanmış ve iki hücre hattı içinde EBR uygulaması sonrasında artış gösterilmiştir. Akridin turuncusu boyaması sonrasında turuncu olarak belirlenen asidik vesiküller 48 saat EBR uygulaması sonrasında iki hücre hattı içinde artış göstermiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4. 4. SW480 ve DLD-1 kolon kanser hücreleri 48 saat EBR uygulamasını takiben MDC ve AO boya tutulumları belirlenmiştir. Hücre açlığı pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

İmmunofloresan uygulamasında iki hücre hattı içinde 48 saat EBR uygulaması seçilmiştir. LC3A/B ve p62/SQSTM1 antikorumları ile yapılan deneyde LC3A/B işaretlemelerinde artış gözlemlenirken p62/SQSTM1 işaretlemelerinde azalma gözlemlenmiştir (Şekil 4.5).

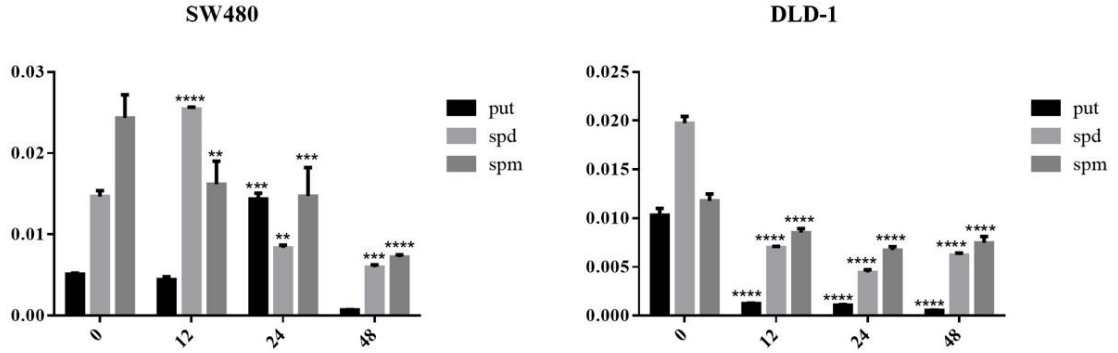


Şekil 4. 5. SW480 ve DLD-1 kolon kanser hücrelerinde EBR uygulaması ile LC3A/B ve SQSTM1/p62 antikorumları ile gerçekleştirilen işaretlemenin gösterilmesi. Beta-Aktin pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

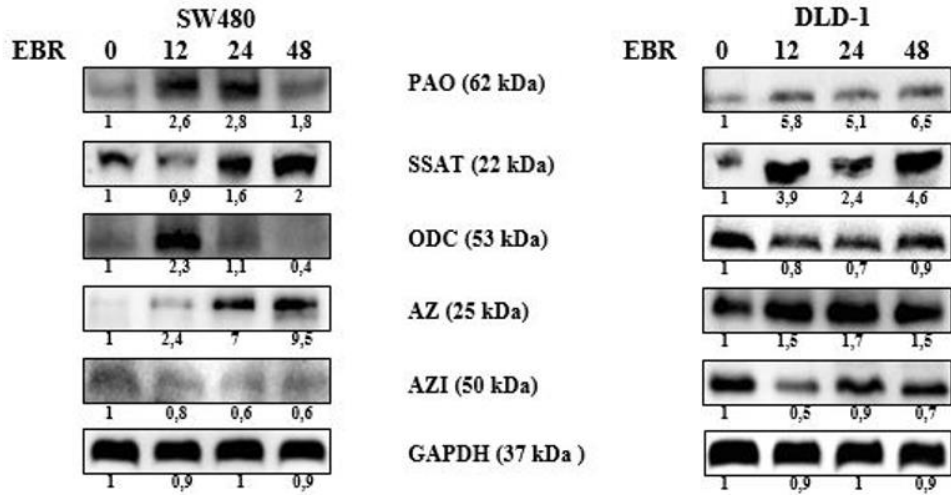
4.5 EPİBRASSİNOLİD UYGULAMASI SONRASI HEM SW480 HEMDE DLD-1 POLİAMİN HAVUZLARI AZALMIŞTIR.

Poliamin seviyelerine bakıldığında iki hücre hattı için de poliamin havuzlarında zamana bağlı EBR uygulaması sonrasında azalma belirlenmiştir (**** $P \leq 0.0001$, *** $P \leq 0.001$, ** $P \leq 0.01$) (Şekil 4.6A). DLD-1 hücre hattında yolakta ki protein ifadelerinde belirgin bir değişiklik görülmezken SW480 hücre hattında 12 saatlik uygulama sonrasında ifadeleri artan ODC ve PAO, 48 saatlik uygulama sonrasında azalmıştır. SSAT ve AZ protein seviyeleri ise zamana bağlı artış göstermiştir (Şekil 4.6B).

A.



B.

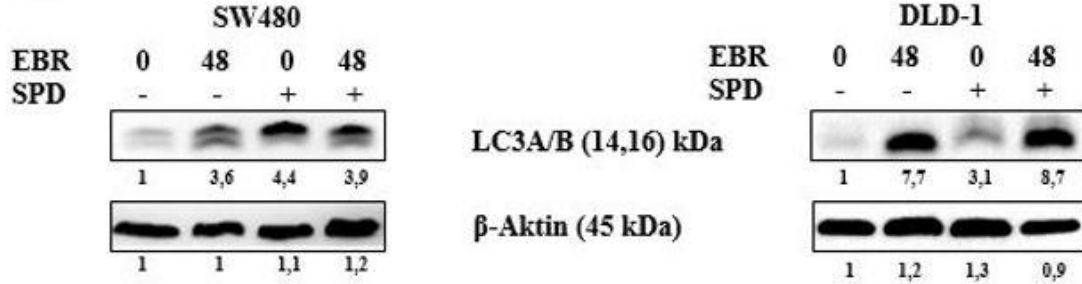


Şekil 4. 6. SW480 ve DLD-1 kolon kanser hücre hatlarında EBR uygulamasını takiben poliamin havuzunun gösterilmesi (A) ve poliamin metabolizmasında önem arz eden protein anlatımlarının belirlenmesi (B) (**** $P \leq 0.0001$, *** $P \leq 0.001$, ** $P \leq 0.01$).

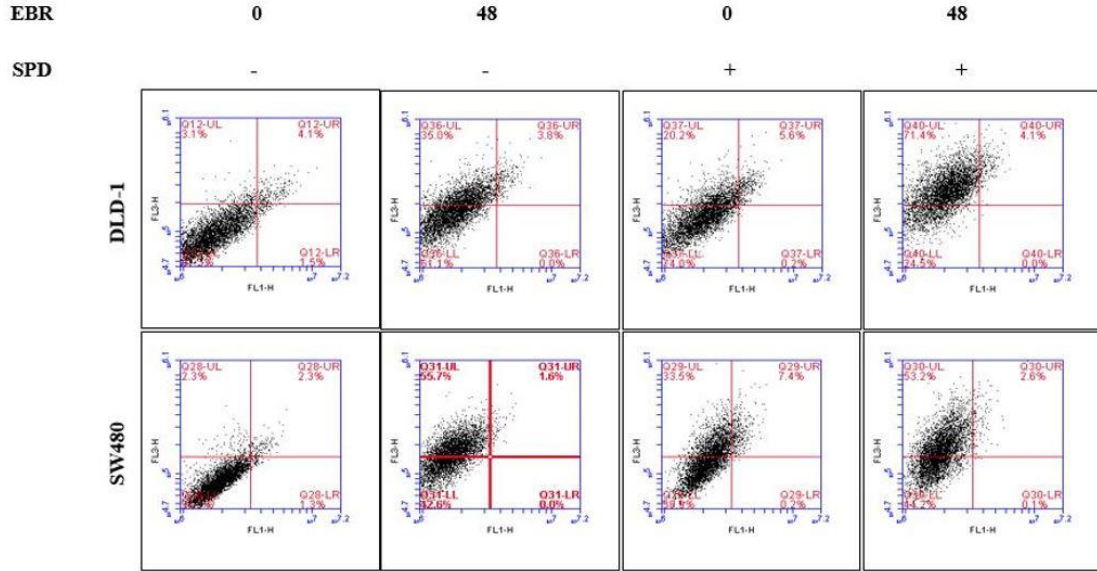
SPD ve SPD&EBR uygulaması ile hücredeki otofajik cevap LC3 antikor ve Akridin turuncusu akış sitometrisi ile gösterilmiştir. SW480 hücrelerinde LC3 protein seviyesi EBR ve spd uygulaması ile artarken EBR&SPD uygulaması sonrası sadece SPD uygulamasına kıyasla azalma tespit edilmiştir (Şekil 4.7A). AO boyama sonucunda ise EBR uygulaması %57.3 asidik boyama ortaya koyarken, SPD uygulaması %40.9 ortaya koymuştur. Beraber uygulamada ise %55.8 asidik boyama elde edilmiştir. SW480 hücrelerinde beraber yapılan uygulama antogonistik etki gösterirken, DLD-1 hücrelerinde etki sinerjistik olarak gösterilmiştir. EBR uygulaması sonrasında AO asidik boyama

%38.8 iken SPD uygulaması sonrasında %5.8'lik boyama sinerjestik etki göstererek beraber uygulama sonrasında %75.6'lık bir asidik boyama ortaya koymuştur (Şekil 4.7B).

A.



B.

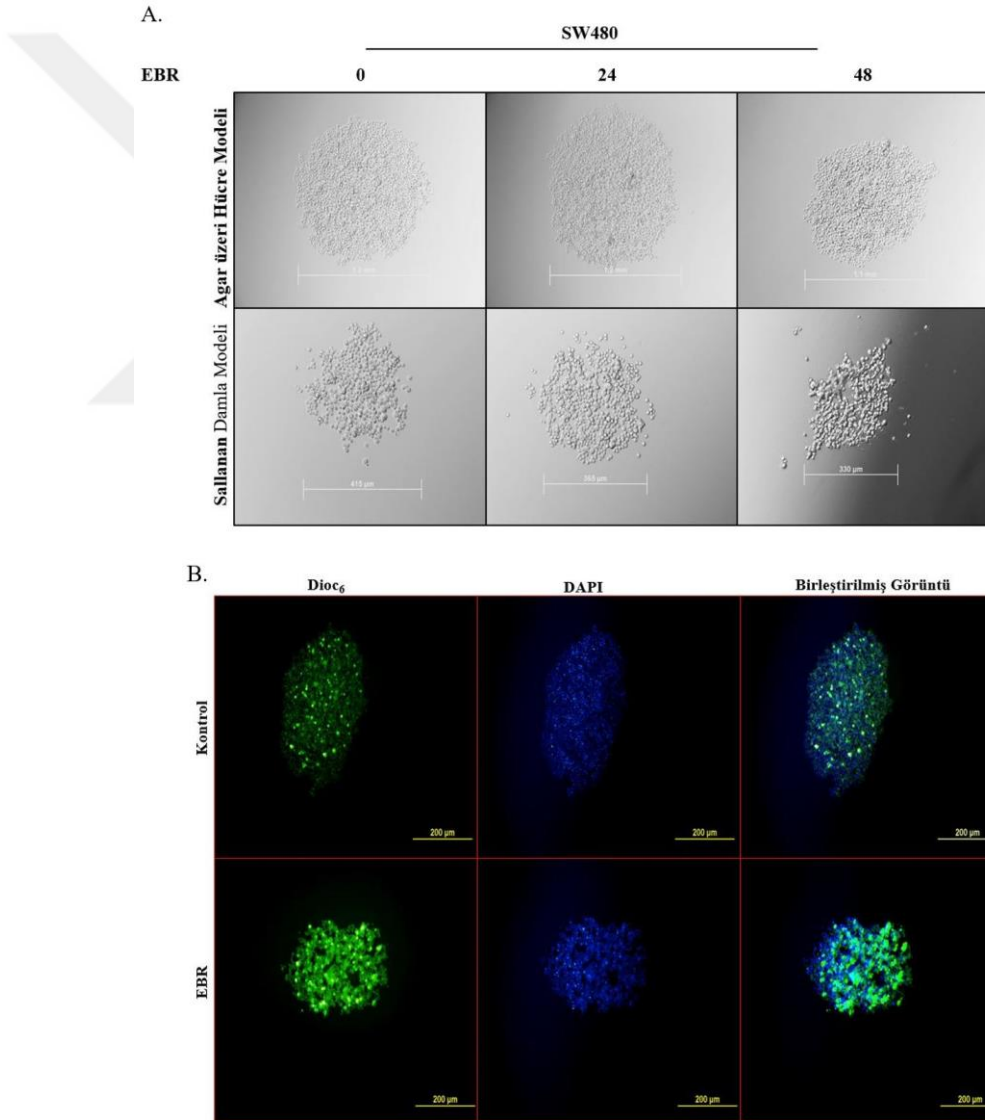


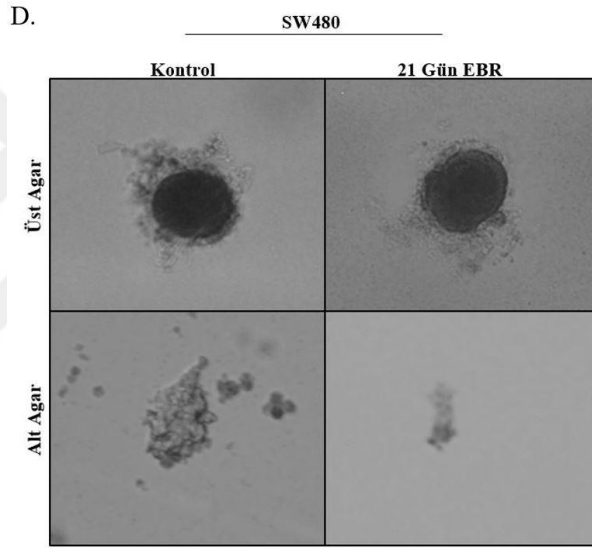
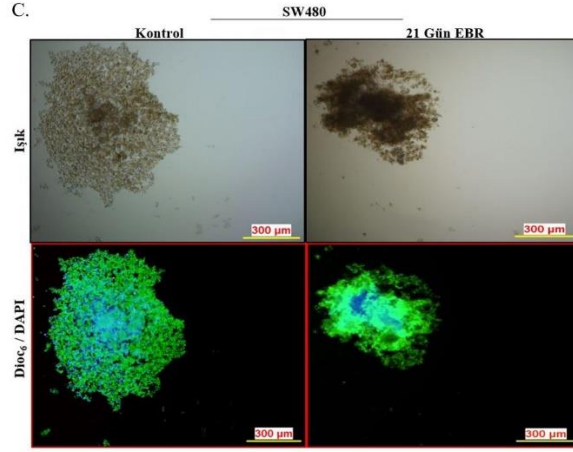
Şekil 4. 7. SW480 ve DLD-1 hücre hatlarında EBR ve SPD uygulamalarını takiben LC3A/B protein anlatımının tespit edilmesi (A) ve Otofajideki değişikliklerin acirdine orange boyamasını takiben akış sitometrisi de doğrulanması (B).

4.6 EPİBRASSİNOLİD UYGULAMASI ASILI DAMLA MODELİNDE HÜCRE TOPLULUKLARININ ÇAPLARINI KÜÇÜLTMÜŞTÜR.

SW480 hücrelerinde agar üzerinde sferoid oluşturma deneyi ve asılı damla deneyi gerçekleştirilmiş 48 saat sonrasında oluşan sferoid hücre popülasyonlarının çapında azalma gözlemlenmiştir (Şekil 4.8A). Hücreler bu deneyler sırasında DiOC₆ ve DAPI

boyaları ile boyanarak sferoid topluluktaki küçülme 48 saat EBR uygulaması sonrasında gösterilmiştir (Şekil 4.8B). Farklı konsantrasyonlarda ve FBS içeriklerine sahip besiyerleri ile oluşturulan agarlar arasında hareket gösterilmiş ve 21 günlük EBR içerikli besiyeri inkübasyonu sonrasında üst agardaki sferoid hücre popülasyonunda bir değişim olmazken alt agarda oluşabilen hücre popülasyonunda azalma gözlemlenmiştir (Şekil 4.8C). Agar üzerinde oluşturulan sferoid hücre toplulukları 21 günlük EBR uygulaması sonrasında DiOC₆ ve DAPI ile boyanmış ve sferoid yapının çapındaki değişiklik gösterilmiştir (Şekil 4.8D).

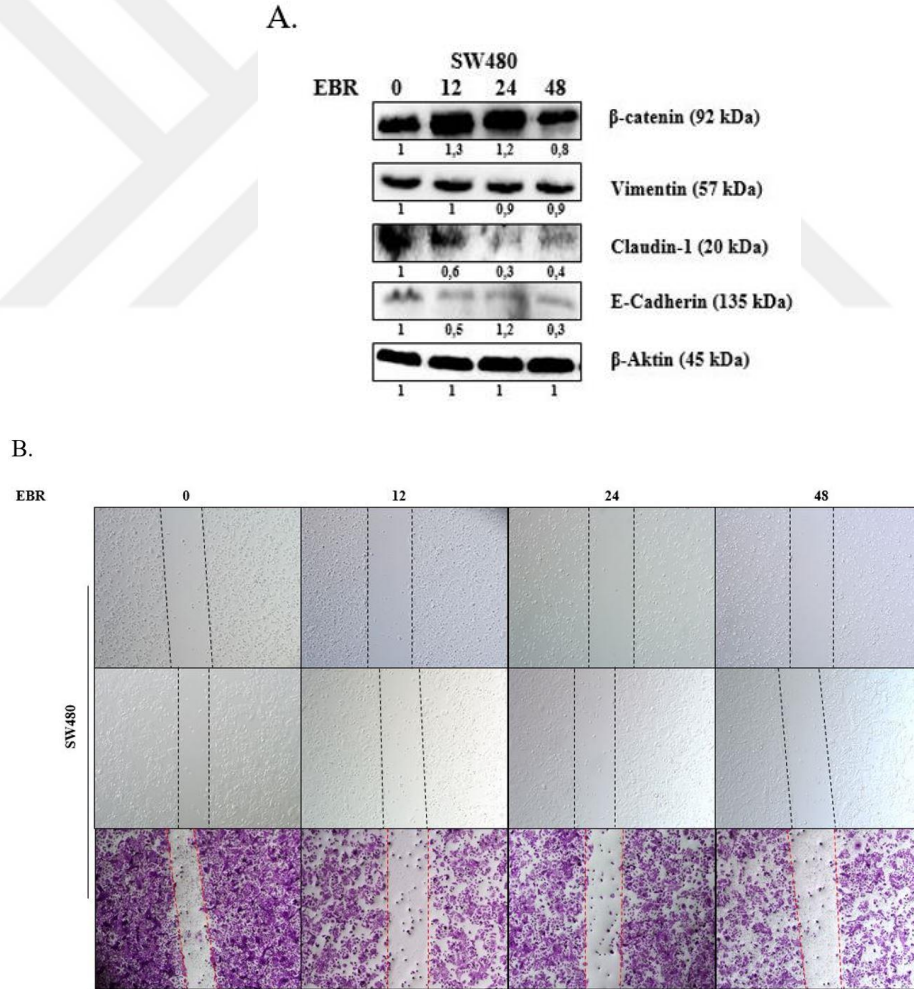




Şekil 4. 8. SW480 kolon kanseri hücre hattında farklı zamanlarda EBR uygulamasını takiben sferoid kültürlerin agar üzerinde ve sallanan damla modelinde oluşturulması (A) ve sallanan damla modelinde oluşturulan sferoidlerin DiOC₆/DAPI ile boyanması(B). 21 gün EBR uygulamasını takiben agar üzerinde oluşturulmuş sferoid kültürlerin çapındaki değişikliğin belirlenmesi ve DiOC₆/DAPI ile boyanması (C). Farklı konsantrasyonlarda oluşan agarda oluşturulmuş sferoid sw480 kültürlerinin 21 gün EBR uygulamasını takiben alt ve üst agarlardaki değişikliğin gösterilmesi (D).

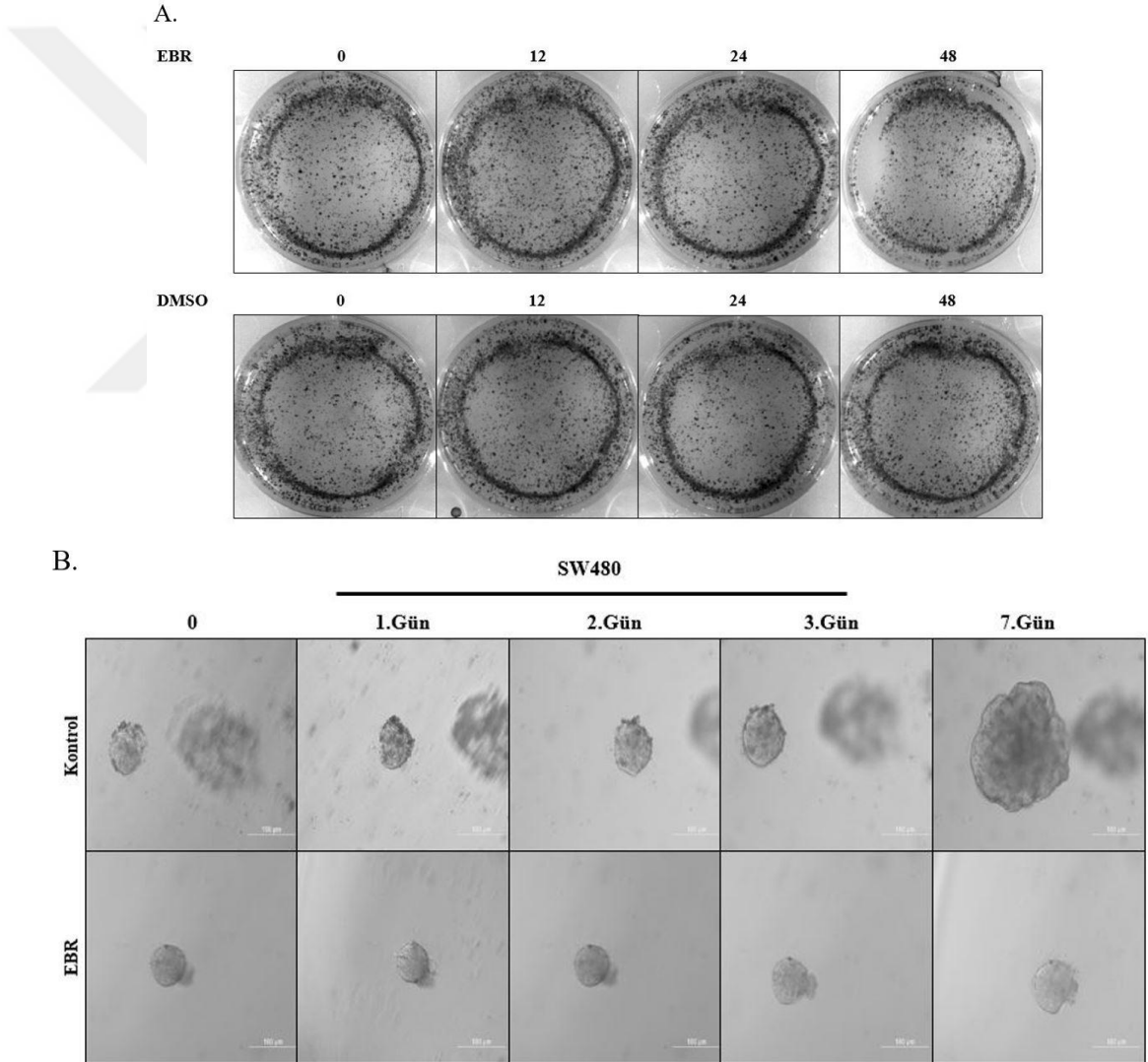
4.7 EPİBRASSİNOLİD UYGULAMASI EPİTEL MEZENKİMAL DÖNÜŞÜME ETKİ ETMEMİŞ FAKAT YARA İYİLEŞMESİNİ AZALTMIŞTIR.

Epitel mezenkimal hücre değişim yolağındaki proteinlerin seviyeleri incelenmiş ve SW480 hücrelerinde β -katenin, vimentin ve E-kadherin protein seviyelerinde değişim gözlemlenmezken Claudin-1 protein ifadesinde zamana bağlı azalma tespit edilmiştir. Snail, Slug ve N-Cadherin protein seviyeleri SW480 hücre hattında bazal anlatımı bulunmadığı için gösterilememiştir (Şekil 4.9A). Yara iyileşmesi deneyinde 3 farklı sürede EBR uygulaması gerçekleştirilmiş ve kontrole kıyasla iyileşme gözlemlenmemiştir (Şekil 4.10A).



Şekil 4. 9. SW40 hücrelerinin EBR uygulamasını takiben Epitel mezenkimal dönüşüm yolağında etkin proteinlerin anlatımının belirlenmesi (A) ve yara iyileşmesi modelinde oluşturulan yarıkların kapatılması (B).

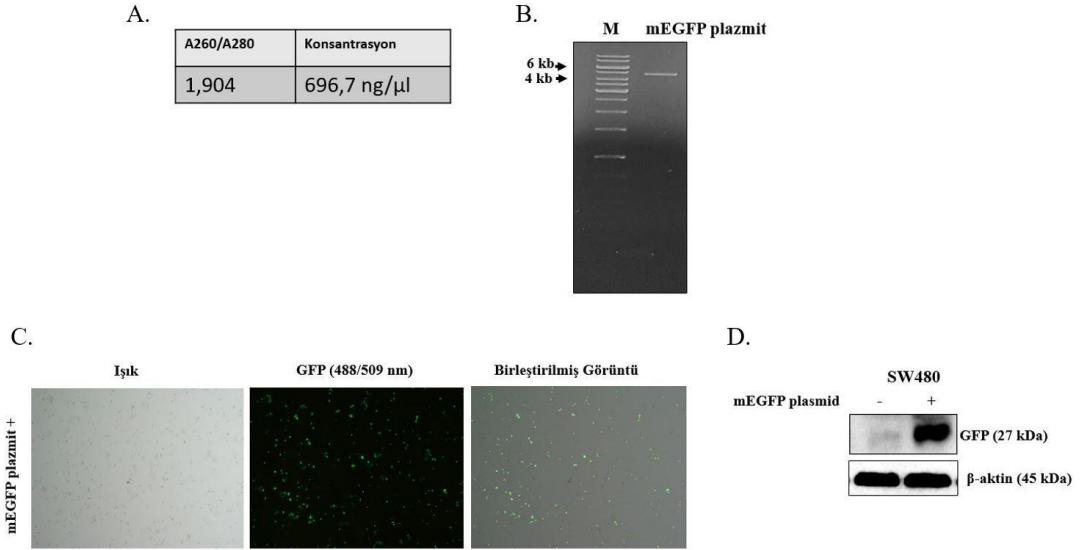
Koloni oluşumu deneyi gerçekleştirilmiş, zamana bağlı EBR uygulaması sonrasında gelişen koloni miktarında azalma gözlemlenirken, ilacın çözücüsü olan DMSO uygulaması sonrasında oluşan koloni miktarında bir değişiklik olmamıştır (Şekil 4.10A). 3 boyutlu hücre kültürü matrijel kullanılarak gerçekleştirilmiş oluşan sferoid hücre toplulukları seçilmiş ve 7 gün boyunca EBR uygulaması ile birlikte takip edilmiştir. 7 günlük uygulama sonrasında kontrol grubundaki sferoid hücre topluluğunun çapı artmaya devam ederken EBR uygulanmış hücre topluluğunda anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir (Şekil 4.10B).



Şekil 4. 10. SW480 hücrelerinde EBR ve EBRnin taşıyıcısı olan DMSO uygulamasını takiben elde edilen koloni oluşumlarının gösterilmesi (A). 3 boyutlu SW480 hücre kültürü ile elde edilen sferoid yapıların EBR uygulamasını takiben kontrol e kıyaslanarak gösterilmesi (B).

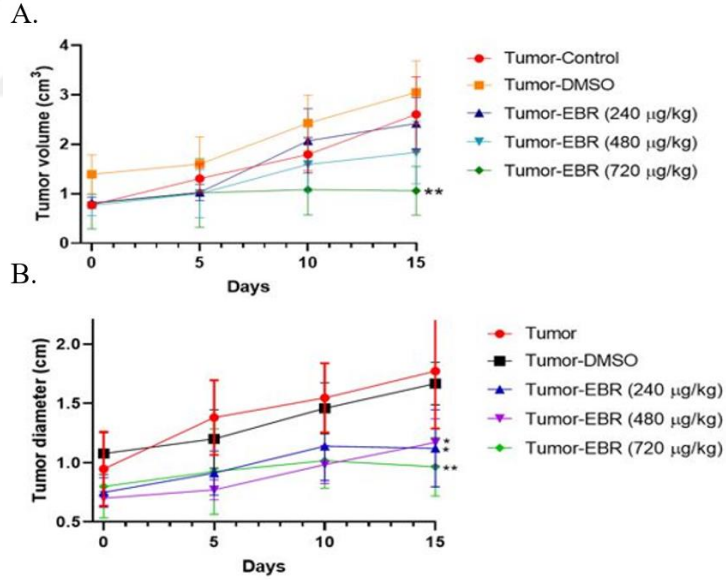
4.8 SW480 HÜCRELERİ SCID FARELERE İNOKÜLASYON ÖNCESİ GFP POZİTİF HALE GETİRİLMİŞTİR

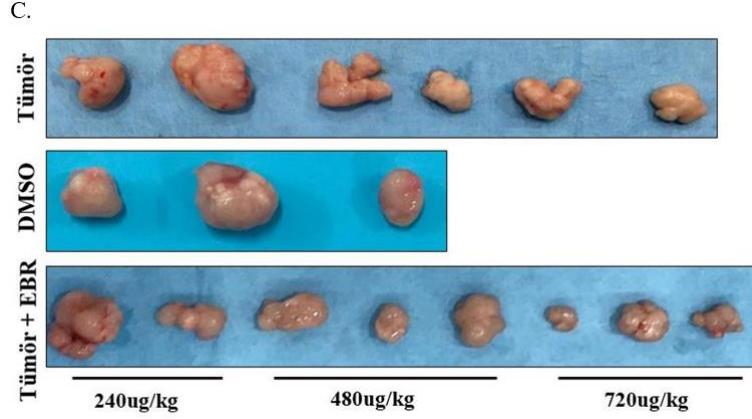
Yapılan bu deneyler ışığında SW480 hücreleri *in vivo* deneyleri için seçilmiştir. SW480 hücreleri mEGFP plasmidi ile transfekte edilerek SCID farelerde ksenograft modeli oluşturulmak üzere deneye başlanmıştır. mEGFP plasmiti çoğaltılmış ve izole edilmiştir. Nanodrop ile konsantrasyonu 696,7 ng/μl olarak belirlenmiştir. İzole edilen plazmitin saflığı ise 1,904 olarak ölçülmüştür (Şekil 4.11A). Plazmit %1.2'lik agaroz jelde görüntülenmiş ve boyutuna göre jelde doğrulama yapılmıştır (Şekil 4.11B). FuGene HD kullanılarak 1:3 oranında transfeksiyon gerçekleştirilmiş ve neomisin antibiyotiği kullanılarak sabit kültür elde edilmiştir. Elde edilen hücreler floresan mikroskobu ile gösterilmiştir (Şekil 4.11C). Doğrulama için bu hücrelerden protein izolasyonu gerçekleştirilip immunoblotlama tekniği ile GFP antikor seviyesine bakılmıştır. İmmunoblotlama sonucunda transfeksiyon yapılan ve yapılmayan gruplar gösterilmiştir. mEGFP plasmidi ile transfekte edilmiş hücrelerde ki GFP antikor seviyesi sonucunda artış gösterilmiştir (Şekil 4.11D).



4.9 EPİBRASSİNOLİD UYGULAMASI SONRASINDA TÜMÖR BÜYÜKLÜKLERİ SABİT KALIRKEN, KONTROLE ORANLA CİDDİ MİKTARDA KÜÇÜLME GÖZLEMLENMİŞTİR

Deneyler sonucunda elde edilen tümörlerin en boy oranları ve hacim sonuçları grafik halinde gösterilmiştir. 720µg/kg EBR uygulanmış tümörlerde anlamlı hacimsel değişiklik olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.12A). Tümör çaplarına bakıldığında ise 240µg/kg, 480µg/kg ve 720µg/kg EBR uygulaması sonrasında anlamlı değişiklikler tespit edilmiş ve grafikte gösterilmiştir (Şekil 4.12B) (** P ≤ 0.01, * P ≤ 0.05). Tümör görsellerinin karşılaştırmalı gösteriminde kontrol tümör boyutlarının DMSO uygulanmış tümör boyutlarından farkı belirgin şekilde gözlemlenmezken EBR uygulamaları sonrasında elde edilen tümör boyutlarında ki farklılık belirgin şekilde gösterilmiştir (Şekil 4.12C).

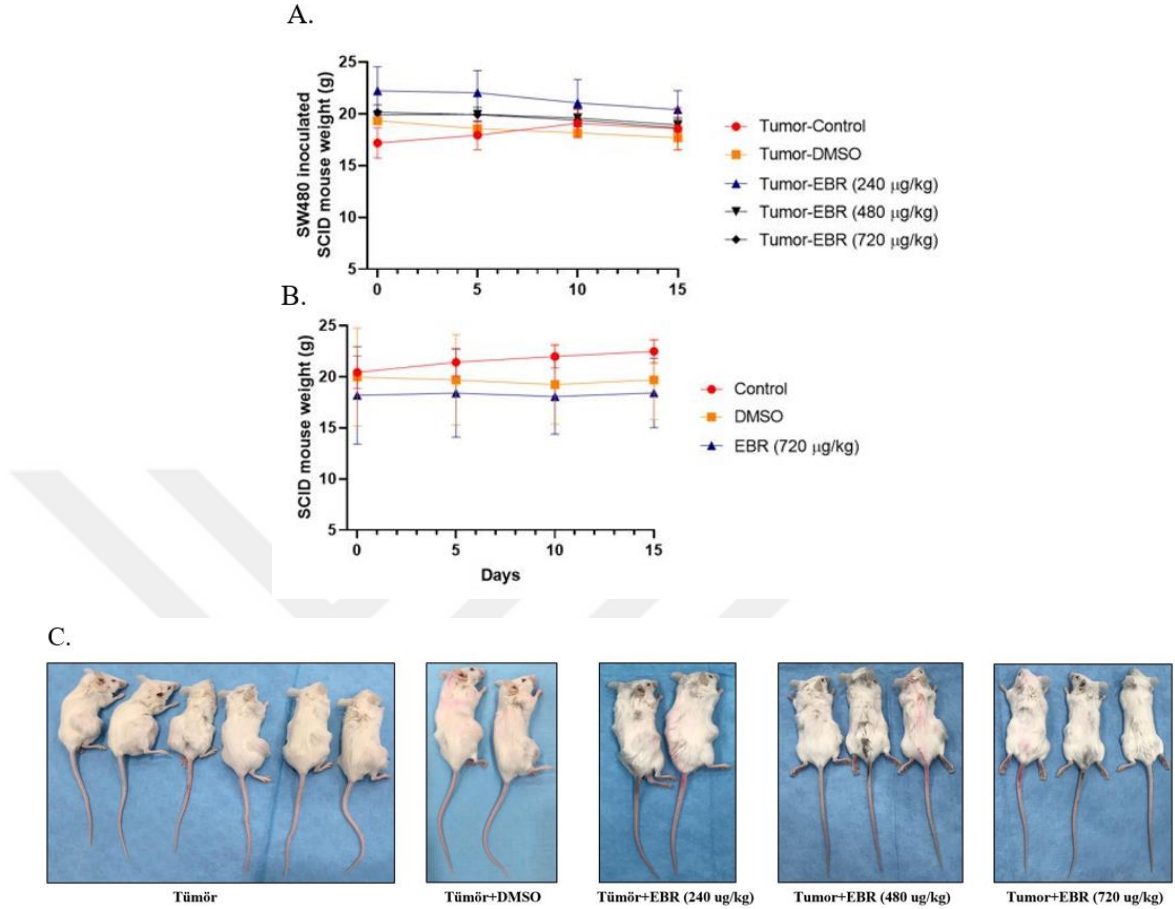




Şekil 4. 12. Elde edilen tümörlerin EBR ve DMSO uygulamasını takiben yapılmış ölçümlerinin hacimsel olarak gösterilmesi (A), yarıçap olarak gösterilmesi (B) ve görsel olarak sunulması (C) (** $P \leq 0.01$, * $P \leq 0.05$).

4.10 EPİBRASSİNOLİD UYGULAMASI SCID FARELERDE AĞIRLIK DEĞİŞİMİNE SEBEP OLMAMIŞTIR.

Fare ağırlıklarındaki değişiklikler grafiklerle ve görsel olarak ortaya konmuştur. SW480 enjekte edilmiştir farelerde kontrol grubunda ağırlık 2-3g arası artış gösterirken diğer kondüsyonlarda değişiklik saptanmamıştır (Şekil 4.13A). Tumor oluşturulması hedeflenmemiş olan farelerde ise kontrol grubundaki farelerde ağırlık artışı gözlemlenirken DMSO ve 720 μ g/kg EBR uygulanmış farelerde ağırlık değişimi saptanmamıştır (Şekil 4.13B). Ksenograft modeli oluşturulmuş farelerin resimleri karşılaştırmalı olarak verilmiştir (Şekil 4.13C).



Şekil 4. 13. SW480 ile modellenmiş SCID farelerin EBR ve DMSO uygulamasını takiben yapılmış ölçümlerinin gösterilmesi (A). Modellenme işlemi yapılmamış farelerin EBR ve DMSO uygulamasını takiben yapılmış ölçümlerinin gösterilmesi (B). SW480 ile modellenmiş farelerin görsel olarak sunulması (C).

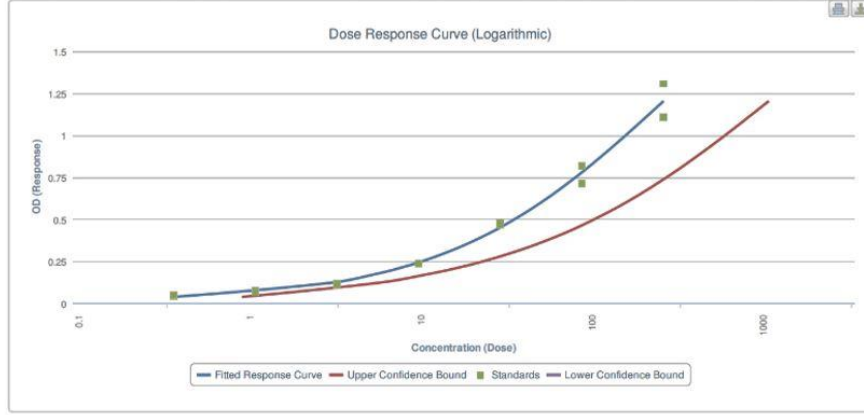
4.11 CEA KONSANTRASYONLARINDA EPİBRASSİNOLİD UYGULAMASI İLE BERABER AZALMA TESPİT EDİLMİŞTİR.

ELİZA tekniği ile fare serumlarındaki CEA konsantrasyonları belirlenmiş ve gösterilmiştir. ELİZA tekniğinde uygulanan standartın doğruluğu %98.8 olarak belirlenmiş ve grafikte gösterilmiştir (Şekil 4.14A). ELİZA tekniğinde elde edilen verilere göre tumor modeli geliştirilmemiş farelerin serumlarında CEA konsantrasyonu belirlenmezken tümör kontrol grubunda ortalama 590ng/ml, DMSO uygulanmış tümör grubunda ortalama 410ng/ml, 240ug/kg EBR uygulanmış tümör grubunda ortalama 190ng/ml, 480ug/kg EBR uygulanmış tümör grubunda ortalama 160ng/ml ve 720ug/kg

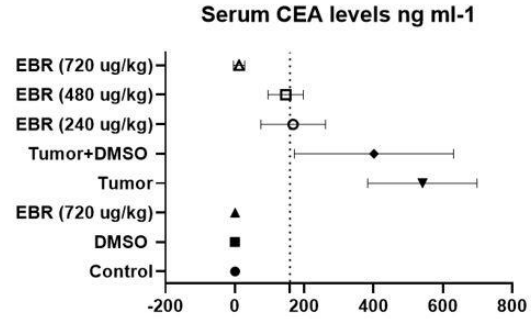
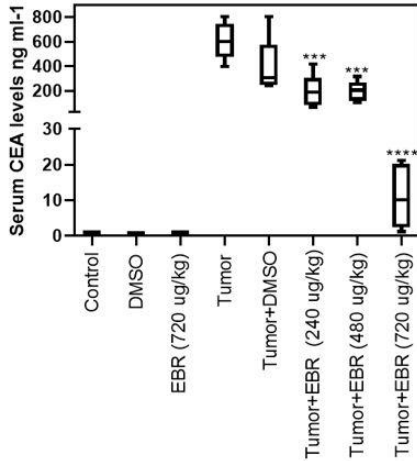
EBR uygulanmış tümör grubunda ise ortalama 12ng/ml CEA konsantrasyonları tespit edilmiştir (Şekil 4.14B) (**** P ≤ 0.0001, *** P ≤ 0.001).

A.

R² value: 0.9879138



B.

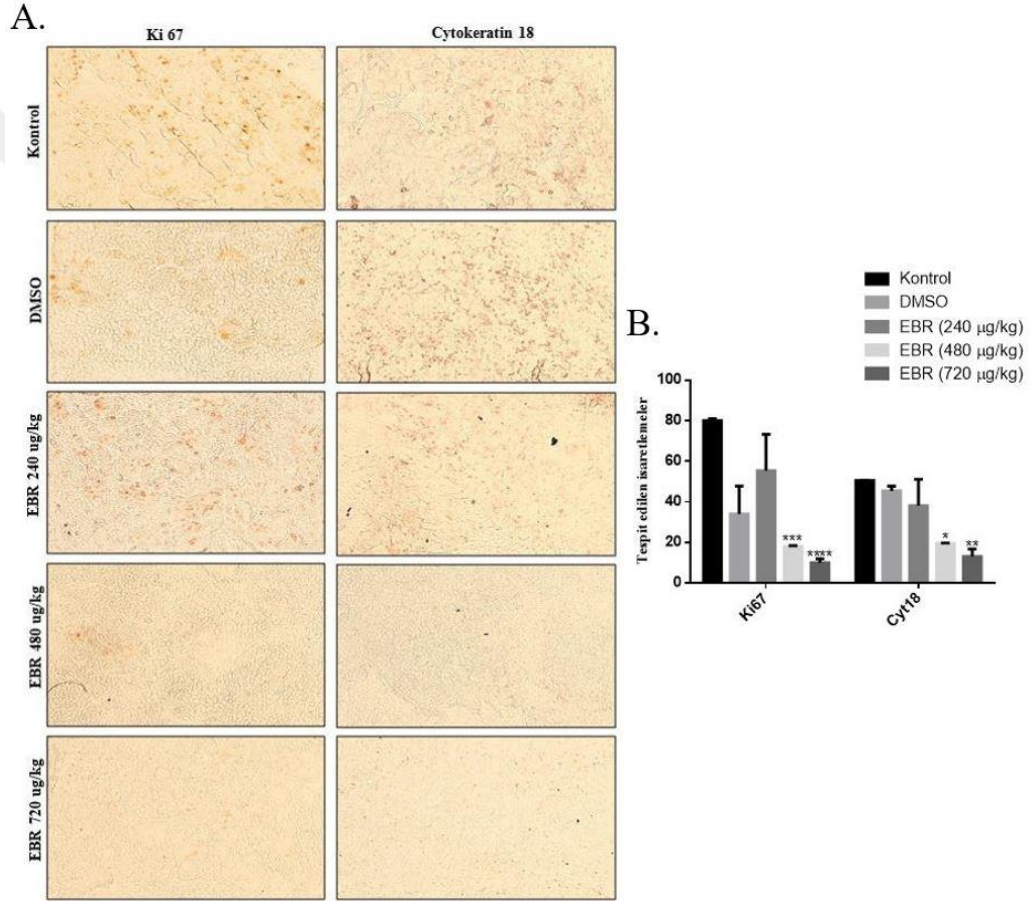


Şekil 4. 14 Elizaanalysis.com aracılığı ile elde edilmiş CEA ELİZA kiti standartlarının logaritmik grafik ile doğruluğunun hesaplanması (A). Elde edilen CEA konsantrasyonlarının karşılaştırılmalı olarak gösterilmesi (B) (**** P ≤ 0.0001, *** P ≤ 0.001).

4.12 YÜKSEK DOZDA UYGULANAN EPİBRASSİNOLİD HEM Kİ67 HEMDE CYT18 İŞARETLEMELERİNDE AZALMAYA SEBEP OLMUŞTUR

Gerçekleştirilen immünohistokimya deneyinde tümörlerden alınan kesitler sitokeratin18 ve Ki67 antikorları ile işaretlenmiştir. Ki67 antikoruna bölünmekte olan hücreleri işaretlerken sitokeratin18 epitel köküne sahip kanser hücrelerinde, epitel hücre benzeri

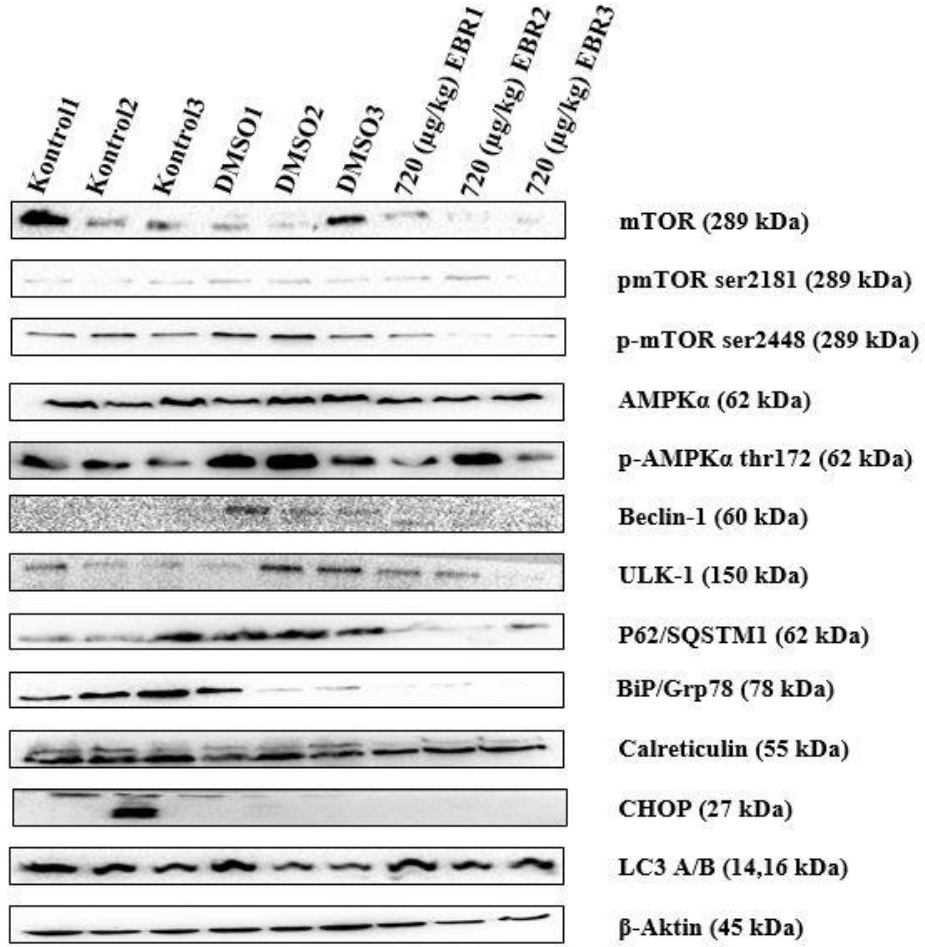
farklılaşmalarda ve hücre hareketine sahip kanser hücrelerinde markır olarak kullanılmaktadır. Kontrol tümörlerde pozitif şekilde işaretlenen Ki67 ve cyt18 240 µg/kg EBR uygulaması ile artış göstermiştir. DMSO uygulaması ile beraber ki67 işaretlenme miktarı düşerken, cyt18 işaretlenme miktarı azalmıştır. 480 µg/kg ve 720 µg/kg EBR uygulamalarını takiben hem Ki67 hemde cyt18 işaretlemeleri yüksek oranda azalma göstermiştir (Şekil 4.15A). Tespit edilen sonuçlar grafik halinde gösterilmiştir (**** P ≤ 0.0001, *** P ≤ 0.001, ** P ≤ 0.01, * P ≤ 0.05) (Şekil 4.15B).



Şekil 4. 15. Tümörlerden alınan kesitlerin Ki67 ve sitokeratin18 antikorları ile işaretlenmesi(A) ve grafik olarak gösterilmesi (B) (**** P ≤ 0.0001, *** P ≤ 0.001, ** P ≤ 0.01, * P ≤ 0.05).

4.13 EPİBRASSİNOLİD UYGULAMASI SONRASINDA TÜMÖR ÖRNEKLERİNDE ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ TESPİT EDİLMEMİŞTİR.

Immunoblotlama tekniği ile çeşitli proteinlerin seviyeleri gösterilmiş ve 3 birey kontrol, 3 birey DMSO, 3 birey 720µg/kg EBR grupları belirlenmiş ve sonuçları gösterilmiştir. Önce ki deneylerde 720µg/kg efektif doz olarak belirlenmiştir. mTOR protein seviyelerinde EBR uygulaması ile azalma tespit edilmiştir. p-mTOR serin2181 de 720µg/kg EBR 2. birey hariç sabit kalırken 2. bireyde protein anlatımında artış görülmüştür p-mTOR serin2448 ise EBR uygulanmış 3 bireyde de protein ifadesinde azalma görülmüştür. AMPK protein anlatımında sabit kalırken p-AMPK treonin172 protein ifadesinde kontrole kıyasla EBR uygulanmış 2. birey de artış görülürken diğer 2 birey de azalma belirlenmiştir. Beclin-1 protein seviyelerinde ise artış gösterilmiştir. Ulk-1 protein anlatımında bireysel değişikliğe bağlı olarak EBR uygulanmış 2 farede yüksek anlatım mevcutken 1 farede anlatım az olarak belirlenmiştir. SQSTM1/p62 protein anlatımında azalma tespit edilmiştir. Kalretikulin protein seviyelerinde değişiklik gözlemlenmezken BiP/Grp78 protein anlatımında azalma gösterilmiştir. CHOP anlatımında BiP/Grp78 ile eş zamanlı azalma gösterilmiştir. LC3 proteini ise sabit kalmıştır (Şekil 4.16).

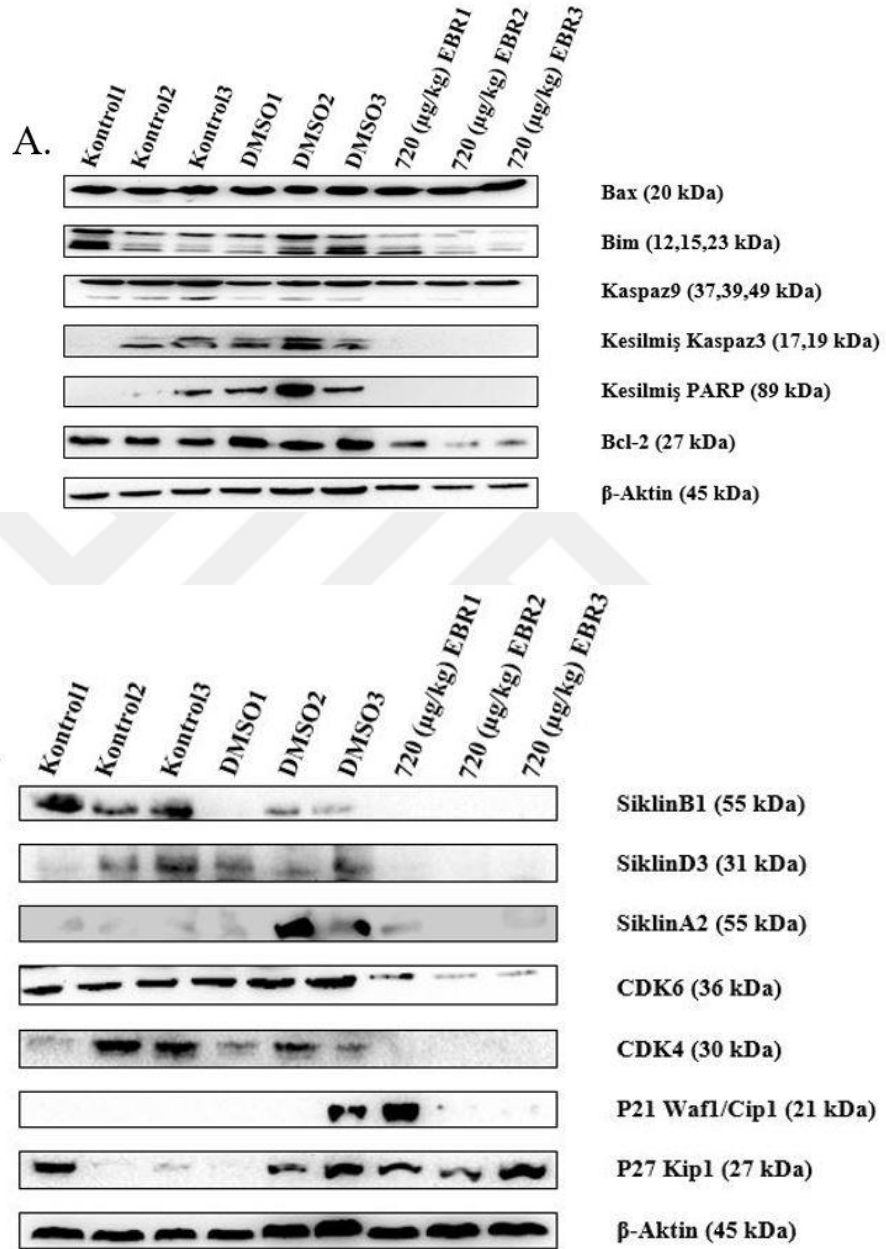


Şekil 4. 16. Tümörlerden elde edilen proteinlerde EBR uygulamasına bağlı olarak mTOR, Otofaji ve Endoplazmik retikulum stres cevabı yollarındaki protein anlatımlarının belirlenmesi.

4.14 EPİBRASSİNOLİD UYGULAMASI SONRASINDA TUMÖR ÖRNEKLERİNDEKİ ETKİ SİTOSTATİK OLARAK TESPİT EDİLMİŞTİR.

Apoptoz yolağında Bax protein anlatımında değişim gözlemlenmezken, Bim protein anlatımında azalma gerçekleşmiştir. Bcl-2 sonucunda ise azalma tespit edilmiştir. Kaspaz 9 proteininde kesilme miktarı EBR uygulaması ile azalmıştır. Kesilmiş PARP ve Kaspaz 3 protein anlatımlarında da azalma gösterilmiştir (Şekil 4.17A). Hücre siklusu yolağında ise CDK6, SiklinB1, SiklinA2, CDK4 ve SiklinD3 protein anlatımlarında EBR uygulamasını takiben azalma tespit edilmiştir. p21 protein anlatımında 1 EBR ve 1 DMSO

uygulanmış farelerde belirgin artış tespit edilmiştir. p27 protein seviyesinde ise EBR uygulamasını takiben artış ortaya konmuştur (Şekil 4.17B).



Şekil 4. 17. Tümörlerden izole edilmiş proteinlerin EBR uygulamasına bağlı olarak Apoptoz yolağındaki proteinlerin anlatımındaki değişikliğin gösterilmesi (A) ve hücre döngüsü yolağındaki önem arz eden protein anlatımlarındaki değişikliğin belirlenmesi (B).

5 TARTIŞMA

Tezde araştırılmış olan kolon kanseri dünya genelinde ölümlerle sonuçlandığı bilinen ve sıralamada ikinci sırada yer alan bir kanser tipidir [1]. Kolon kanseri birçok farklı faktör sebebi ile gelişmektedir. Bunlar içerisinde yaş, diyet, çevresel etkenler, vücut kitle endeksi, genetik mutasyonlar, beslenme ve inflamatuvar bağırsak hastalıklarıdır. Analizler aşırı kilolu olan obez erkeklerde kolon kanserinin görülme riskinde artış olduğu belirlenmiştir. Kadınlar ve erkekler arasında abdominal yağlanma oranlarının farklılığı sebebi ile kolon kanser görülme tehlikesini etkilediği düşünülmektedir [19]. Günümüzde birçok çalışma ile ışık tutulmaya çalışılan kolon kanserinde gerçekleştirilmekte olan tedavi stratejileri birçok yan etki ve kanser hücrelerinin tedaviye karşı direnç oluşturması ile sonlanmaktadır. Bu sebeple kolon kanserinde alternatif tedavilere ihtiyaç duyulmakta ve yeni tedavi seçenekleri ile hızlı şekilde desteklenmesi gerekmektedir.

EBR bitkilerde büyüme hormonu görevi alan ve steroid yapıda bulunan bir BR üyesidir. EBRnin yapısından ötürü memelilerdeki moleküler mekanizmasının steroid yapılı hormonlarla ilişkilendirilebileceği düşünülmektedir. Bitki hücrelerinde moleküler mekanizması uzun yıllar önce aydınlatılmış olmasına rağmen kanser hücrelerindeki moleküler etkisi üzerine olan çalışmalar ilk olarak 2008 yılında Malikova ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir [106]. Ortaya çıkarılan veriler ışığında EBRnin farklı kanser hücrelerinde hücrelerin yaşamsal faktörlerini etkileyerek hücre ölümüne sebep olduğu ortaya konmuştur. Bu çalışmanın öncülüğünde yapılan araştırmalar, EBRnin prostat kanseri, meme kanseri ve kolon kanserinde hücre döngüsünü, poliamin metabolizmasını ve ER stress yolağını etkileyerek apoptoz aracılı hücre ölümüne sebep olduğu ortaya konmuştur [8, 9, 11, 41]. EBRnin moleküler hedeflerinin anlaşılabilmesi için proteomik analiz stable-isotope labelled aminoacid in cell culture (SILAC) tekniği Obakan ve arkadaşları tarafından belirlenmiştir. SILAC tekniği sayesinde ortaya çıkarılan ve ER stressi yolağında şaperon görevi olan calreticulin proteininin anlatımının azalması ER stressi kaynaklı apoptoz gerçekleştiği laboratuvarımızca gösterilmiştir. [8, 42]

Bu bilgiler doğrultusunda EBR'nin SW480 ve DLD-1 hücre hatlarında düzenlediği yollar araştırılmış ve çalışmalar *in vivo* deneyler ile desteklenmiştir. DLD-1 ve SW480 kolon kanser hücrelerinin canlılık seviyeleri MTT tekniği ile belirlenmiştir. Mitokondri işlevsel olan hücrelerin tetrazolium tuzlarını redükte ederek formazan kristallerine çevirmesi durumu izlenmiş ve çevirilen kristallerin yarattığı renk farklılığı ile canlılık testi ortaya konmuştur. Mitokondri redüksiyon işlemine elverişli olan hücreler arası canlılık farklı hesaplanarak gösterilmiştir. Bağlı hücre canlılığı SW480 hücrelerinde zamana bağlı azalmış ve 48 saatte %50'nin altına düşmüştür. DLD-1 hücrelerinde de zamana bağlı azalırken 48 saatte %60 hücre canlılığı ile SW480 hücrelerine kıyasla daha dirençli bir profil sergilemiştir (Şekil 4.1). Bu durum daha önce farklı p53 profiline sahip HT29 ve HCT116 kolon kanser hücre hatlarında da benzer sonuçlar elde edildiği gösterilmiştir [9]. Bu sebeple ölüm miktarları arasındaki farklar iki hücre hattında ki spesifik p53 mutasyon farklılıkları ile açıklanabilir.

AKT/mTOR hücrenin sağ kalımı ve bölünmesi gibi faktörleri kontrol etmektedir. Reseptörlerden gelen ilk sinyal PI3K in PIP2 yi PIP3 çevirmesi ile devam eder. PDK1 fosforlanmasını takiben akt fosforlanır. p-PDK1 serin241 protein seviyeleri sw480 hücre hattında değişmezken DLD-1 hücre hattında 48 saate artış göstermiştir. mTORC2 tarafından serin473 aminoasiti fosforlanırken p-PDK1 serin241 tarafından treonin308 fosforlanmaktadır. Akt sw480 hücrelerinde EBR ile beraber artarken DLD-1 hücrelerinde azalmıştır. Bu durum SW480 hücrelerinin EBR in etkisine karşı hayatta kalma istediğini ifade ederken DLD-1 hücrelerinde 48 saat EBR uygulamasını takiben apoptoza karşı cevap geliştirememeye olabilir. p-Akt serin473 protein seviyeleri 48 saat EBR uygulaması sonrasında iki hücre hattında da artış göstermiştir. Bu durum mTORC2 yapısının hala bütünlüğünü koruduğu ve geri besleme mekanizması ile Akt ı fosforlayarak strese karşı cevap oluşturmaya çalışmasını ifade etmektedir [107] mTOR proteini farklı proteinlerle interaksyona girerek kompleks 1 ve kompleks 2 yapılarını oluşturur. SW480 hücre hattında ilk cevap olarak 12 saatte artış göstermiştir. Fakat p-mTOR serin2448 aynı saat sürecinde azalmıştır. Bu durum mTOR proteinin etkinliğini koruyamadığını 12 saate mTORC1 yapısının bütünlüğünü kaybederek hücre enerji metabolizmasında ki değişiklikleri koruyabilmek adına otofaji yolağını çalıştırdığını gösteriyor olabilir [108].

48 saatte ise SW480 hücrelerinde p-mTOR serin2448 artmaya başlamış ve mTORC1 kompleksi hücre içi homeostazı korumak adına çalışmaya başlayarak önceki çalışmalarda gösterilen ER stresine bağlı apoptotik cevaba yanıt oluşturmaya çalışmış olabilir. DLD-1 hücrelerinde 48 saatlik süreçte SW480 hücreleri ile aynı cevap oluşmuştur. Bu cevap 48 saatte iki hücre hattında da artış göstererek p-Akt serin473 ilişkili olarak gerçekleşmiştir göstermiştir (Şekil 4.2) [109].

Hücre enerji metabolizmasının kontrolünü sağladığı bilinen ve LKB1 tarafından fosforlanarak aktive olan p-AMPK treonin172 proteini sw480 hücre hattında zamana bağlı olarak artış gösterirken DLD-1 hücre hattında 48 saatlik uygulama sonrasında azalmıştır. p-AMPK treonin172 protein seviyelerindeki değişim hücrenin enerji metabolizmasında yaşadığı tükenmeye bağlı olarak artmış ve enerji geri kazanımı için otofaji yolağını aktifleştirmiş olabilir [110]. Ulk-1 protein seviyeleri SW480 hücre hattında ilaca ilk devap olarak 12 saatte artmıştır. DLD-1 hücre hattında da aynı şekilde 12 saatte artış gözlemlenirken sw480 hücre hattında 48 saatte gene bir artış belirlenmiştir. Fakat aynı artış DLD-1 hücre hattında 24 saatte gerçekleşmiştir. Bunun sebebi SW480 hücrelerinin 24 saatte enerji metabolizmasını koruyacak miktarda geri dönüşüm yapabilirken DLD-1 hücrelerinin 24 saatte hayatta kalabilmek adına otofaji sinyalini devam ettirmesi olabilir. P-Ulk-1 serin555 Ulk-1 proteinin AMPK tarafından aktifleştirilmiş formudur. Bu protein seviyesindeki artış otofaji yolağında başlangıç olarak değerlendirilir. SW480 hücrelerinde Ulk-1 protein seviyelerindeki değişimin aksine p-Ulk-1 serin555 24 saatlik EBR uygulaması sonrasında artış göstermiştir [111]. Bu durum ilk otofajik sinyalin Ulk-1 proteininden bağımsız gerçekleşmiş olabileceğini ortaya koymaktadır. p-SAPK/JNK treonin183/tirozin185 proteininde SW480 hücrelerindeki zamana bağlı artış Beclin-1 Bcl-2 proteinleri arasındaki heterodimerizasyonu bozarak otofajik sinyalin iletilmesini arttırıcı yönde etki yapmaktadır [112]. DLD-1 hücrelerinde ise p-AMPK treonin 172'nin zamana bağlı azalması ile ATP ihtiyacına olan gereksinimin azalması ilişkilendirilebilir buna bağlı olarak otofajik sinyale olan ihtiyaçta azalabileceğinden p-SAPK/JNK'ın azalması otofajik sinyalin ihtiyacına bağlı olarak değerlendirilebilir. Bununla beraber JNK proteininin birçok farklı yolla çapraz şekilde konuştuğu bilinmektedir [113]. Özellikle DLD-1 hücrelerinde 24 saatte ki artış önceki

çalışmalarda elde edilen apoptoz verilerine Bakıldığında JNK'in apoptoz yolağıyla olan ilişkisi ile açıklanabilir [8]. Beclin-1 proteinindeki 12 ve 48 saatlik EBR uygulaması sonrasındaki artış Ulk-1 proteininden bağımsız makrotofajik yolakta aktivasyon olduğunu ifade eder. DLD-1 hücrelerinde ise 12 ve 24 saatlik EBR uygulamasından sonra p-Ulk-1 serin555 protein seviyelerinde artış gözlemlenmiştir. Bu durum 12 saatte otofaji yolağının başlangıç sinyali ileilmeye başlandığını ifade eder. Bununla birlikte Beclin-1 protein anlatımı 12 saatte 24 saate ve 48 saatte artış göstermiş ve otofajik sinyalin devamlılığı 3 belirli zaman içinde sürdürülmüştür. Beclin-1 proteini normal koşullarda Bcl-2 proteini ile heterodimerize şekilde bulunur. Bu sayede istenmeyen bir otofajik aktivasyondan kaçınılır. Otofaji sinyalinin iletimi için JNK proteinin Beclin-1 ve Bcl-2 proteinleri arasındaki bağa son vermesi veya Beclin-1 protein ifadesinin artış göstermesi gerekmektedir [114, 115]. Bu durumda SW480 hücre hattı için 12 ve 48 saatte Beclin-1 ifadesi artış gösterirken 48 saatlik EBR uygulaması sonrasında Bcl-2 ifadesi azalmıştır. Bu durum 48 saatlik uygulama sonrasında SW480 hücrelerinin apoptotik sinyale olan cevabının ortadan kaybolması ile otofajik sinyale karşı olan direnç de ortadan kalkmıştır. DLD-1 hücre hattında ise Bcl-2 protein anlatımında zamana bağlı bir değişim gözlemlenmemiştir. Bu durumda otofaji sinyalinin iletimi EBR uygulaması ile anlatımı artış göstermiş olan Beclin-1 proteini ile gerçekleşmiştir. Markotofaji yolağında ATG proteinleri önem arz etmektedir. Bir seri interaksiyon sonrasında protein kompleksleri oluşmakta ve vesikül nükleasyonu sağlanmaktadır. Atg12 proteini ile başlayan sistem Atg7 proteini sayesinde Atg5-12-16 kompleksinin oluşması ile son bulur. SW480 hücrelerinde Atg12 proteini sabit kalırken reaksiyonu sağlayacak olan Atg7 proteini artmış ve bununla beraber Atg5 proteini de EBR uygulaması ile zamana bağlı olarak artış göstermiştir. Bu durum otofajinin gerçekleşmesi için membran nükleasyonun arttığı anlamına gelmektedir. DLD-1 hücrelerinde ise Atg12 EBR uygulaması ile zamana bağlı olarak artarken Atg5 ve Atg7 proteinleri Beclin-1 proteini ile uyumlu şekilde 12 ve 48 saatlik EBR uygulamaları ile artmıştır. Bu durum zamana bağlı otofajik sinyalin şiddetinin 12 ve 48 saatlerinde artış gösterdiğini ortaya koymaktadır. Membran nükleasyonun gözlemlenmesi için LC3 proteinin 2 kere kesilerek sonunda fosfotidiletanolamin eklenmesi ile sonuçlanır. Bu reaksiyon Atg3 proteini tarafından katalizlenir. SW480 hücrelerinde Atg3 proteini EBR uygulaması ile beraber bütün zaman

noktalarında artış göstermiştir. Bu durum LC3-I proteinin Atg7 proteinin yardımı ile Atg3 proteini ile interaksiyon kurduğunu ve LC3-II proteinin oluştuğunu göstermektedir [116]. DLD-1 hücrelerinde ise Atg3 protein anlatımı diğer otofajik protein anlatımları ile beraber pozitif yönde korelasyon göstermiş ve 12,48 EBR uygulaması saatlerinde artmıştır. LC3 proteini ise iki hücre hattı içinde 48 saat sonrasında tamamen kesilime uğrayarak otofajinin maksimum kapasitede çalıştığını göstermiştir. SQSTM1/p62 proteini otofaji yolağının sonlandığını ifade etmek için markır olarak kullanılan bir proteindir. Lizozomda degrade edilecek kargoya bağlanan bu protein otofagozom ve lizozom füzyonu ile ortaya otolizozomun çıktığını ifade eder. İki hücre hattında da SQSTM1/p62 proteini zamana bağlı olarak azalmaktadır (Şekil 4.3)[117]. Bu durum 48 saat EBR uygulaması sonrasında efektif bir şekilde otofajinin sonlandığını ifade eder. Bu noktada daha önce 48 saatte ER stresi bağımlı apoptoz ile öldüğü bilinen hücrelerin otofaji mekanizmasını tam kapasite çalıştırmaya devam etmesine rağmen hayatta kalmamasını günümüzde halen aydınlatılamamış olan otofajik hücre ölümü ile ilişkilendirebiliriz. [118] Ayrıca 12 saatteki otofajik cevabın kolon kanser hücrelerinin EBR uygulamasına erken süreçte hayatta kalım için verdiği cevap olması durumu da göz ardı edilemez [119]. Bu durumda EBR'ye ilk 12 saatlik süreçte otofaji mekanizması ile direnç gösteren DLD-1 ve SW480 kolon kanser hücre hatları 48 saatlik uygulama sonrasında otofaji mekanizmasını apoptoz ile aynı amaçla kullanarak programlanmış hücre ölümü tip2 olarak bilinen otofajik hücre ölümü ile apoptotik hücre ölümünü desteklemektedir [120].

Hücrelerde oluşan 48 saat sonrasında otofajik cevabın aydınlatılması adına MDC ve AO boyamaları gerçekleştirilmiştir. Boyama teknikleri hücre açıklığı sağlanarak enerji metabolizması bozulmuş kondüsyonlarla desteklenmiş ve pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. MDC boyaması lipid yapılar içerisinde birikir. ER lümeni gibi yapılarda birikmezken bilindiği üzere Lizozom, otolizozom ve otofagozom gibi yapılar içerisinde birikerek otofajik sinyalin görüntülenmesi için kullanılır [121]. AO boyaması ise sitoplazmik içeriği yeşil boyarken asidik vesikülleri turuncu olarak işaretler. Bu iki boyama ile hem birbirlerini hemde immunoblotlama sonuçlarını doğrulaması amacı ile yapılmıştır [122]. Resimlerde görüldüğü üzere EBR uygulaması ile MDC boya birikiminde artış gösterilmiştir. Bu birikimin kontrol gruplarında olmadığı açıkça

gösterilmekte olup pozitif kontrolde ise ciddi boya akümülyasyonu görülmektedir. AO boyaması ile iki hücre hattı içinde aynı sonuç ortaya konmuştur (Şekil 4.4).. SW480 hücrelerinde ki turuncu boya birikimi DLD-1 hücrelerine kıyasla daha fazla olarak belirlenmiştir. İki boya da asidik kompartmanları işaretlemektedir. Bu durumda 48 saat EBR uygulamasını takiben SW480 hücrelerinde oluşan asidik kompartmanların DLD-1 hücrelerinde oluşan asidik kompartmanlardan sayıca ve boyutça daha fazla olduğu anlaşılmıştır.

Otofaji sinyalinin doğrulanmasının devamı için otofajide markır olarak kabul edilen SQSTM1/p62 ve LC3 antikorları ile immünifloresan yapılmıştır. Bu teknik ile hücrelerde bulunan proteinler antikorlar ile işaretlenmiş ve floresan özelliği olan sekonder antikorlar ile işaretleme tamamlanmıştır. Pozitif kontrol için β -Aktin işaretlemesi gösterilmiştir. İşaretlenen LC3 proteini iki hücre hattı için de 48 saatlik EBR uygulaması ile artış göstermiştir. Proteinlerin lokalizasyonu için DAPI boyası kullanılmıştır. DAPI boyası nükleus u işaretlemek amacı ile kullanılırken apoptoza bağı DNA kırılmalarını da açık mavi şekilde işaretlemiştir. Görüntülerde nükleus içerisinde görülen açık mavi görüntüler EBR nin 48 saatte ki apoptotik etkisini de göstermiştir. SQSTM1/p62 antikoru ile yapılan işaretleme sonrasında iki hücre hattında da azalma tespit edilmiştir (Şekil 4.5).. Bu durum otofajinin 48 saatte sonlanmaya devam ettiğini ifade etmektedir [123].

Hücrenin sağ kalımı ve yaşam süresinin ilişkilendirilmesi için poliamin seviyelerine bakılmıştır. Poliaminler birçok konuda hücre homeostazının korunumu için görev yapmaktadır. Nukleozom yapılarında asetilasyon ve deasetilasyonlara sebep olarak genlerin anlatımlarını kontrol ederler. Bunun haricinde spermidin'in hücre canlılığının korunması ve mTOR bağımsız otofaji ile hücre enerji metabolizmasının geri kazanımı gibi birçok farklı yolda işlevsel olarak bulunmaktadır [124]. Poliamin havuzlarının miktarları HPLC ve benzoilasyon tekniği ile ortaya konmuştur. SW480 hücreleri ilk 12 saatte spermidin seviyelerini arttırmış ve hayatta kalmaya çalışmıştır. Fakat 48 saatlik EBR uygulaması sonrasında poliamin havuzu nerdeyse tükenmiştir. DLD-1 hücrelerinde ise poliamin havuzu zamana bağı olarak doğrudan azalmıştır (Şekil 4.6A). Poliamin havuzunda ki değişiliği anlamak için immunoblotlama tekniği ile yolda önem arz eden

proteinler gösterilmiştir. SW480 hücre hattında ilk 12 saat EBR uygulaması sonrasında strese cevap olarak ODC artmıştır. Bu durum putresin eldesini sağlamaktadır. SSAT nin azalması ve PAO nun artması poliaminlerin N1-asetil formlarının poliaminlere geri dönüşmesi ve havuzun korunmasını amaçlamaktadır. Fakat 48 saat sonrasında SSAT artmış ve PAO azalmıştır. Bu durum N1-asetil formlarında artışa ve bu artışa bağlı hücre dışına atılmalarına sebep olarak poliamin havuzunda tükenme ile sonuçlanmıştır [125]. AZ proteini ODC proteinini inhibe ederken AZI ise AZ proteinini inhibe etmektedir. Bu durumda 48 saatte ODC protein anlatımı azalmış ve hücrenin polyamin bağımlı sağ kalım hedefi ortadan kalkmıştır. DLD-1 hücrelerinde ise ilk 12 saatlik EBR uygulamasını takiben SSAT artmaya başlamış PAO da buna bağlı olarak artmıştır. AZ protein anlatımının 48 saatte artmasına rağmen ODC protein anlatımında azalma meydana gelmemiştir. Bu durumda ise SSAT artmaya devam etmiş ve N1-asetil formlarına dönüşümü sağlayarak polyaminlerin hücre dışına atılması sağlanmıştır (Şekil 4.6B). [126]. Daha önce prostat kanserinde yapılan çalışmalarda SAT1 siRNA uygulaması ile baskılanan SSAT protein seviyeleri EBR uygulamasının ortaya koyduğu apoptotik hücre ölümünü azaltmıştır. Bu durum SSAT varlığında poliaminlerin N1-asetil formlara dönüştürülerek hücre dışına atılması kaynaklı olabilir. EBR uygulaması ile poliamin havuzlarının tükenmesi daha önce prostat kanser hücrelerinde gösterilmiştir. Oluşan etki kolon kanser hücrelerinde elde edilen etki ile benzerdir [127].

Dışarıdan 10mM konsantrasyonda SPD verilen SW480 ve DLD-1 kolon kanser hücre hatları 48 saat EBR uygulamasını takiben protein izolasyonu ve AO boyamasına tabi tutulmuştur. LC3 protein anlatımı SW480 hücrelerinde 48 saat ile artmış spermidin uygulaması ile kontrole kıyas ile artmaya devam etmiş fakat EBR ve spermidin beraber uygulandığı süreçte etki EBR uygulamasına benzer şekilde kalmıştır. Bunun sebebi dışarıdan verilen spermidin'in EBR varlığında N1-asetil forma dönüştürülerek dışarı atılmış veya putresine dönüştürülmüş olması olabilir [128]. DLD-1 hücre hattında ise 48 saatlik EBR uygulaması ile LC3 proteinin anlatımında artış olurken spermidin uygulaması ile kontrole kıyasla gerçekleşen bu artış EBR ile kıyaslandığında çok az olarak belirlenmiştir (Şekil 4.7A). EBR ve spermidinin beraber uygulanması sonucunda etki snerjestik olmuş ve LC3 protein anlatımında diğer bütün kondüsyonlara kıyas ile artış

gerçekleşmiştir. Otofaji yolağında ki etkinin doğrulanması amacı ile AO boyaması yapılmış ve akış sitometrisinde okutulan hücreler gösterilmiştir. SW480 hücrelerinde %4,6 lık populasyon turuncu işaretlenirken 48 saatlik EBR uygulaması sonucunda %57.3 lük populasyon turuncu işaretlenmiştir. SPD uygulaması ile %40.9 lik populasyonda turuncu işaretlenme mevcutken EBR ve spermidin beraber uygulandığı zaman bu populasyon sadece EBR ye kıyas ile %55.8 ye gerilemektedir. Bu durumda sonuçlar LC3 protein seviyeleri ile örtüşmekte ve dışarıdan verilen spermidin in EBR varlığı etkisi gözlemlenmemektedir. DLD-1 hücrelerinde ise kontrol de %7.2 lik populasyonda turuncu işaretlenme mevcutken EBR uygulaması ile birlikte %38.8 lik populasyon turuncu işaretlenmiştir. Spermidin uygulamasını takiben %25.8 populasyonda turuncu işaretlenme belirlenmiştir. EBR ve spermidin beraber uygulandığında LC3 protein anlatımında ki sinerjestik etki burada da görülmüş ve %75.6 lık populasyonda turuncu işaretlenme olmuştur (Şekil 4.7B). Bu durumda dışarıdan verilen spermidin SW480 hücrelerinde otofajik sinyali arttırmazken DLD-1 hücrelerinde arttırmıştır. SW480 hücrelerindeki SSAT anlatımı sayesinde dışarıdan verilen SPD asetillenmiş olabilir. DLD-1 hücrelerinde ise yüksek PAO anlatımı sayesinde asetillenen SPD kullanılmak üzere dönüştürülmüş olabilir [129]. SPD uygulamasının EBR ye benzer şekilde U2OS osteosarkom hücrelerinde EP300 asetiltransferaz'ı inhibe ederek otofajiyi indüklediği gösterilmiştir [130].

Asılı damla tekniği ile oluşturulmuş sferoid yapıların çapları EBR uygulamasını takiben küçülmüştür. Bu teknik mikrobiyolojide kullanılmaya başlanmış ve hücresel yapıların 2 boyutlu görüntüsünden arındırılarak hareket ve hücre çevresi incelemeleri için kullanımını desteklemiştir [131]. Bu noktada SW480 hücreleri ileri ki *in vivo* deneyleri için seçilmiş ve deneyler SW480 hücre hattı ile devam ettirilmiştir. Günümüzde çoklukla uygulanan Asılı damla modelinin verdiği sonucun doğrulanması amacı ile koni yüzeyli agar üstü hücre modeli deneyi de yapılmış ve sonuçlar karşılaştırılmalı olarak incelenmiştir. SW480 hücreleri asılı damla modelinde 416 μm çapında sferoid bir yapı oluşturmuştur. 24 saatlik EBR uygulamasını takiben bu çap 365 μm ve 48 saatlik EBR uygulaması ile birlikte 330 μm 'ye kadar düşerek sferoid yapıda dağılıma gözlemlenmiştir (Şekil 4.8A). SW480 hücrelerinin asılı damla modelinde yer çekiminin kullanılması ile

oluşturduğu sferoid yapı agar üstü modeli ile kıyaslandığında agar üstü modeli daha düzgün oluşmuş sferoid yapıya sahiptir. Hücre hücre interaksiyonları da daha belirgin şekilde gözlemlenen agar üzeri sferoid hücre modelinde 1.2 mm olarak ölçülen kontrol sferoid hücre çapı 24 saatlik EBR uygulamasını takiben sabit kalmıştır. 48 saatlik EBR uygulaması ile 1.1 mm çapa gerileyen sferoid yapıda bireysel hücrelerin morfolojisinde de değişiklikler tespit edilmiştir (Şekil 4.8A). Aradaki bu farklılık uygulanan EBR konsantrasyonunun 3 boyutu taklit eden bu sistemde 2 boyutlu hücre kültürüne kıyasla ilaca farklı cevaplar verebileceği düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda DLD-1, HCT116 ve Caco-2 gibi farklı kolon kanser hücre hatlarının 3 boyutlu hücre kültürü sonuçları 2 boyutlu hücre kültürü sonuçları ile kıyaslandığında birçok farklı yolağa ait protein seviyelerine değişim olduğu ortaya konmuştur [132]. Öte yandan sferoid kültürlerde EBR nin etkisinin sitotoksik mi sitostatik mi olduğu ayrıca araştırılmalıdır. Sferoid hücreler DiOC₆ ve DAPI ile boyanmış ve hücre canlılık değerleri gözlemlenmiştir. DiOC₆ mitokondri membran potansiyeli bozulmamış olan hücreleri boyayarak hücre canlılığını mitokondri organeli üzerinden göstermektedir. DAPI ise genetik materyali işaretlemektedir. Açık mavi olan bölgelerde ise DNA kırıklarını ortaya koymaktadır (Şekil 4.8B). DNA kırıkları hücrelerin apoptoz sebebi ile DNA'yı onaramayarak öldüğünü göstermektedir [133]. Bu durum hem morfolojik hemde floresan işaretlerle bakıldığında EBR uygulaması ile beraber SW480 sferoidlerinin hem yapısında hemde sferoid içeriğini oluşturan hücrelerde bozulma ve apoptoz sebepli ölüm olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.8C). Akciğer kanser hücrelerinde yapılan çalışmada teroxirone uygulamasını takiben sferoidlere yapılan DAPI boyaması sonrasında apoptotik etki arttıkça DAPI boyamasında ortaya çıkan açık mavi parlamalar gösterilmiştir [134].

Agar arası hücre tekniği ile hücrelerin hareket kapasitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Alt agarda FBS miktarı yüksek olan ve agar konsantrasyonu düşük olan bir kompozisyon bulunurken üst agarda normal besiyeri ve hücreler ile birlikte daha yüksek konsantrasyonda agar mevcuttur. Bu durumda üst agarda oluşan sferoid yapılar hücre açlığı veya bölünmeye olan isteği takiben alt agara hareket edeceklerdir. Agarlar arası konsantrasyon farklı epitel hücre geçişini zorlaştıracak şekilde ayarlanmıştır. Bu sebeple sadece hareket edebilme yeteneğine sahip hücreler alt agara geçebilmektedir [135]. 21

günlük EBR uygulaması *in vivo* ortamda yapılacak deneylere ön sonuç oluşturmayı amaçlamaktadır. 21 günlük EBR içerikli besiyeri bekleyişi sonrasında EBR nin bulunduğu alt agarda sferoid yapı oluşmazken üst agarda oluşan sferoid yapıların boyutlarında değişim gözlemlenmemiştir (Şekil 4.8C). Resimde gösterilen yapılar alt agar ve üst agarın birbirinden ayrılmasını takiben canlı hücrelerin tespiti için tripan mavisi ile boyanmış ve canlı hücreler tespit edilerek deney sonucunun canlı hücrelerden elde edildiği doğrulanmıştır [136]. Bu durum sferoid yapılarda EBR'nin etkisinin hareketi engelleyici fakat sitostatik olduğunu düşündürmektedir. Daha belirgin sonuçlar ortaya koyduğu gösterilen agar üzerinde sferoid yapı deneyi 21 günlük olarak tekrar edilmiş ve DiOC₆/DAPI ile boyanarak kıyaslanmıştır. 21 gün sonrasında sferoid yapısının çapı EBR uygulamasını takiben azalmıştır. Yapılan çalışmalarda U2OS, NIH-3T3, HeLa, PA317, C2C12, SH-SY6Y, A549 ve 293T hücreleri ile oluşturulan sferoidlerin yarıçaplarının cisplatin dozuna bağımlı olarak küçüldüğü veya büyümeyi durdurduğu gösterilmiştir [137]. Başka bir çalışmada SW480, HT29 ve HCT116 sferoid kültürlerinin artan dozlarda bitki türevli ursolik asit uygulaması sonrasında küçüldüğünü ve yüksek dozlarda yok olduğunu ortaya koymuştur. Aynı zamanda SW480 sferoid kültürlerinin Resveratrol ve Capsaicin uygulamasını takiben küçüldüğünde gösterilmiştir [138]. EBR'nin SW480 kolon kanser hücrelerindeki etkisi ile benzerlik göstermektedir.

Hücre hareketinin izlenmesinin önemi oluşan sferoid yapılarda gösterilmiştir. Hücre hareketi için önemli olan ve kanser hücrelerinin endokrin sistemde hareketini kontrol eden epitel-mekanzkimal hücre dönüşüm yolağı protein üyeleri gösterilmiştir. Slug, Snail ve N-kadherin bazal protein anlatımı metastatik olmayan SW480 hücrelerinde bulunmadığından immunoblotlama tenknığı ile bakılmamıştır. β -katenin, vimentin ve claudin-1 protein anlatımları 48 saatlik EBR uygulaması sonrası azalırken E-kadherin sabit kalmıştır (Şekil 4.9A)[139]. Bu sonuçların desteklenmesi için yara iyileşmesi deneyi gerçekleştirilmiştir. Yapılan deneyde 12, 24 ve 48 saatlik EBR uygulamalarını takiben yara iyileşmesi gözlemlenmiştir. Sonuçlarda gösterilen yara iyileşmesinin net şekilde ifade edilebilmesi için deney sonunda hücreler fikse edilmiş ve kristal viyole ile boyanmıştır. Yapılan boyama sonrasında deney başında birbirine eş 4 farklı çizimin farklı zaman süreçlerinde kapanma seviyeleri net şekilde gösterilmiştir. 48 saatlik EBR

uygulamasının olası SW480 hücre hareketini ortadan kaldırdığı tespit edilmiştir (Şekil 4.9A). Bu deney sonucu ile öncesinde yapılan hücre hareketi deneyleri desteklenmiş ve EBR nin etkisi ortaya konmuştur. Ginkgo biloba ekstratı olan EGb 761 ile kolon kanser hücreleri ile yapılan çalışmalar sonucunda SW480 ve SW620 hücre hareketini ve invazyonunu önlediği yara iyileşmesi deneyi ile ortaya konmuştur [140]. EGb 761 uygulaması ile ortaya çıkan etki EBR uygulaması ile elde edilen sonuçlar ile pozitif korelasyon göstermektedir.

Koloni oluşumu deneyi gerçekleştirilmiş ve EBR uygulamasını takiben hücrelerin besiyeri normal medium ile değiştirilerek koloni oluşumu gözlemlenene dek beklenmiştir. *In vivo* deneylerde EBR nin çözücüsü olarak kullanılmaya devam edilecek olan DMSO nun etkisi de bu deney ile gösterilmiştir. DMSO uygulamasında herhangi bir koloni oluşumu engellenmezken 48 saatlik EBR uygulamasını takiben oluşan koloni miktarı azalmıştır (Şekil 4.10A). Yapılan bir çalışmada Sylibin ve Regorafenib ilaçlarının kombin kullanımı ile Akt sinyalinin baskılayarak koloni oluşumunda azalmaya sebep olmuştur [141]. EBR'nin taşıyıcısı olan DMSO dan bağımsız şekilde bu etkiyi ortaya koyduğu gözlemlenmiştir.

3 boyutlu hücre kültürü deneyi *in vivo* çalışma öncesi ortaya konan son deney sonucu olup SW480 *in vivo* modeli oluşumu için en önemli adımdır. SW480 hücreleri matrijel içerisine alınarak ekim gerçekleştirilmiş ve birçok 3 boyutlu kültür yapısı 7 gün boyunca takip edilmiştir. Deney 7 gün sonrasında yapısal farklılığın aşırı bozulması sebebi ile sonlandırılmıştır. Eşit boyutta seçilen iki 3 boyutlu hücre kültürü takip edilerek kültür çapındaki değişiklikler takip edilmiştir. EBR uygulamasında 7 günün sonucunda 3 boyutlu hücre kültüründe herhangi bir büyüme gözlemlenmemiştir. Kontrole bakıldığında ise oluşan 3 boyutlu hücre yapısında 7 günün sonunda kapsüllenmeye kadar gidildiği ortadadır (Şekil 4.10B). SW480, Caco-2, DLD-1, HT-29, LoVo ve Colo206F gibi hücrelerde 3 boyutlu kültürlerdeki Akt ve MAPK sinyal yollarında değişiklikler olduğu belirlenmiştir [142]. Bu sonuçlar ışığında EBR uygulamasının 3 boyutlu hücre kültürü ve 3 boyutlu hücre kültürünü taklit eden deneylerde etkinin 2 boyutlu hücre kültürü sonuçları aksine sitotoksik değil sitostatik olduğu ortaya konmuştur.

In vivo deneylerinde hücrelerin olası hareketini organlarda tespit edebilmek amacı ile hücreler mEGFP plazmiti ile transfekte edilecek neomisin kullanımını takiben stabil hücre hattı elde edilmiş ve bu hücreler büyütülerek SCID farelerde modellenmek üzere kullanılmıştır(Şekil 4.11A-B). Immunoblotlama tekniği ile GFP protein seviyelerine bakılmıştır. Elde edilen stabil hücre hattı normal SW480 hücreleri ile kıyaslanmış ve jelde ki protein seviyesi farklılığı ortaya konmuştur (Şekil 4.11D). Ayrıca hücreler floresan mikroskopunda görüntülenmiş ve GFP protein ekspresyonu doğrulanmıştır(Şekil 4.11C). Olası bir metastazı görüntülemek amacı ile gerçekleştirilen bu deneyler daha önce akciğer, prostat, deri, pankreas, beyin ve meme gibi bir çok farklı tumor oluşumunda kullanılarak çeşitli görüntüleme yöntemleri ile gösterilmiştir [143].

7×10^6 hücre matrijel içerisinde SCID farelerin yan boşluklarına subkutan olarak enjekte edilmiştir. İstenilen tümör oluşumunu takiben 15 gün boyunca belirlenen dozlar intraperitoneal enjeksiyon ile verilmiş 15 günün sonrasında fareler kurban edilerek organları ve kanları alınmıştır. Deneyde 3 farklı doz da belirlenmiş EBR enjeksiyonları gerçekleştirilmiştir. Tümör büyüklükleri kıyaslandığında $720 \mu\text{g}/\text{kg}$ EBR uygulaması ön deneylerde elde edilen sitostatik sonucu elde etmiş ve tümör hacminde değişiklik sağlanmazken $240 \mu\text{g}/\text{kg}$ ve $480 \mu\text{g}/\text{kg}$ EBR uygulaması ile tümör hacim artışı durdurulamamıştır (Şekil 4.12A). Tümör çapında değişikliğe bakıldığında EBR uygulamaları kontrol ve DMSO'ya kıyaslandığında belirgin etki gözlemlenirken $720 \mu\text{g}/\text{kg}$ EBR uygulaması sitostatik etkinin gözlemlendiği doz olarak belirlenmiştir (Şekil 4.12B). Elde edilen veriler görsel olarak paylaşılmış ve bireysel farklılıklara rağmen $720 \mu\text{g}/\text{kg}$ in etkin doz olduğu ortaya konmuştur (Şekil 4.12C). Patentlerde gösterilen damar içi, periton içi ve deri altı gibi farklı şekillerde enjeksiyonun mümkün olmasına rağmen $1000 \text{mg}/\text{kg}$ farelerde, $2000 \text{mg}/\text{kg}$ ise sıçanlarda letal olarak belirlenmiştir. Kullanılan dozlar letal dozlar ile karşılaştırıldığında $240 \mu\text{g}/\text{kg}$ ve $480 \mu\text{g}/\text{kg}$ EBR uygulamalarının yetersiz kalmasının sebebi etkin doz sınırının altına kalmaları olabilir [17].

SCID fare ağırlık değerleri grafikler halinde sunulmuştur. SW480 hücre inokülasyonu gerçekleştirilmiş olan farelerde Kontrol bireylerde fare ağırlığı tümör ağırlığı ile birlikte artmaya devam ederken EBR uygulanan bireylerde ağırlık sabit kalmıştır. Bu durum tümör hacminde ki farklılığın bireylerin ağırlığının düşmesine rağmen toplam ağırlığın sabit kalması ile açıklanabilir. DMSO uygulanan bireylerde ise ağırlıkta düşüş gözlemlenmiştir (Şekil 4.13A). Bu sebebi DMSO nun farelerde doğrudan yarattığı bir etki olabileceken bireysel farklılıktan da kaynaklanabileceği düşünülmektedir. SW480 inokülasyonu yapılmamış SCID farelerde birey ağırlıklarları incelenmiştir. Kontrol farelerinde ağırlık yaşamsal fonksiyonlarla beraber artmaya devam etmiştir. DMSO ve EBR uygulanan bireylerde ise ağırlık sabit kalmıştır (Şekil 4.13B). Bu durum EBR'nin çözücüsü olan DMSO nun yarattığı etkinin EBR dede görülmesi durumu ile ilişkili olabilir. Ayrıca farelerin kilo almaması birseysel farklılıklarla ve tüketilen besin durumu ve her gün gerçekleşen enjenksiyona bağlı stres ile açıklanabilir. Deneyde kullanılan ve SW480 inokülasyonu ile modellenmiş olan SCID farelerin resimleri görsel şekilde sunulmuş ve oluşturulan SW480 tümör boyut ve şekilleri resimlerde gösterilmiştir (Şekil 4.13C). Yapılan çalışmalar ksenograft modeli oluşturulmuş farelerin ilaç uygulamalarını takiben 15 gün içerisinde ölmesi durumunda kullanılan bir formül elde edilmiştir. Bu formül ksenograft model ağırlıklarının %20'sini ilaç uygulamasına takiben kaybetmesine bağlıdır [144]. EBR'nin SW480 ksenograft modellerinde ilaç aracılı toksisitesi gözlemlenmemiştir.

SCID farelerden elde edilen kan örneklerinden serum ayrıştırılmaları yapılmış ve serumlarda bulunan CEA kolon kanser seviyeleri ELİZA testi ile ölçülmüştür. Yapılan seri dilüsyon sonuçları logaritmik grafik ile çizildiğinde %98.791382'lik doğruluk payına sahiptir (Şekil 4.14A). Bu sebeple elde edilen sonuçların doğruluğu ispatlanmış olarak kabul edilmektedir. Serum seviyelerinde ki CEA ng/ml miktarlarına Bakıldığında SW480 inokülasyonu olmayan kontrol, DMSO ve EBR kondüsyonlarında CEA tespiti yapılamamıştır. Grafikte ki sonuçlara Bakıldığında kontrol de 590ng/ml ortalama ile başlayan CEA seviyesi EBR konsantrasyonuna bağlı olarak azalmıştır. 720µg/kg EBR uygulaması ile neredeyse bazal sınıra çekilen CEA konsantrasyonu 720µg/kg EBR uygulamasının efektif doz olduğunu göstermekte ve tümör ilerleyişini durdurduğunu ispat

etmektedir (Şekil 4.14B). Yapılan çalışmalarda LoVo, HCT116, HCT-15, HT-29, Caco-2, SW480, Colo205, HCT-6, LS180, Ls174T ve SK-CO-1 gibi bir çok farklı kolon kanser hücre hattı kullanılmış ve bu hücreler CEA gen bölgesini hedef olan shRNA ile modellenmiştir. Ortaya çıkan sonuçlar CEA ve TBRI interaksiyonuna bağlı TGF- β yolunun düzenlendiği düşündürmektedir [145]. Yapılan bir diğer çalışmada CEA anlatımındaki artış kolon kanser hücrelerinde karaciğer metastazını ortaya koymakta ve CEA ve CEACAM1 aşırı anlatımı olması durumunda anoikis kullanımını ile baskılamayı amaçlamaktadır [146]. EBR uygulaması ile elde edilen verilerde EBR'nin serumda olan CEA anlatımını oluşturulan ksenograft modellerde azalttığını ortaya koymakta ve bu azalmanın SW480 tümörlerinin sahip olduğu agresif profilin baskılanmasına sebep olduğu düşünülmektedir.

İmmünohistokimya sonucunda elde edilen veriler 480 $\mu\text{g}/\text{kg}$ EBR ve 720 $\mu\text{g}/\text{kg}$ EBR uygulamalarını takiben hem Ki67 hem de cyt18 işaretlemelerinde azalma gözlemlenmiş (Şekil 4.15A) ve grafik olarak sunulmuştur (Şekil 4.15B). Bu durum uygulanan dozların tümör ilerleyişine ket vurması ve tümörün hücre döngüsünü G0 a alarak durdurması ile alakalı olabilir. Ki67 bölünmekte olan hücrelerin işaretlenmesini sağlarken cyt18 epitel kökenli hücrelerin hücre hareketi veya hücre farklılaşmasını göstermektedir. Yapılan çalışmalar brassinosteroidlerin meme kanseri hücrelerinde hüce döngüsü tutulumuna sebep olduğunu ortaya koymuştur [11]. Bu durumda EBR uygulaması ile birlikte kolon kanser tümör kesitlerine Ki67 ve cyt18 işaretlemelerinin azalması brassinosteroidlerin hücre tutulumuna olan etkisinin SW480 kolon kanser tümörlerinde de devam ettiğini göstermektedir. SW480 tümörlerinin 480 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ve 720 $\mu\text{g}/\text{kg}$ EBR uygulamasının yarattığı strese cevap oluşturamadığı düşündürmektedir. DMSO uygulaması ile beraber Ki67 işaretlemesinde azalma görülürken cyt18 işaretlemesinde ise artış görülmesi hücrelerin strese karşı verdiği hareket ve farklılaşma cevabı olabilir. Buna bağlı olarak 240 $\mu\text{g}/\text{kg}$ EBR uygulamasını takiben her iki işaretlemelerde de belirlenen artış, uygulanan EBR dozunun düşük olması sebebi ile SW480 tümörlerinin sağ kalım cevabını oluşturabileceği düşünülmüş ve hücre hareketi, hücre bölünmesi ve hücre farklılaşması gibi farklı cevapların ortaya çıkmasına bağlı olarak işaretlemelerde artış görüldüğü düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda EMT yolunun aktif kullanımını kanser ve kanser

kök hücrelerin hayatta kalımı için önem arz etmektedir [147]. Yapılan bir başka çalışmada kolon kanserinin 5-FU kemoterapi uygulamasından c-Yes/YAP yolağını ile farklılaşarak nasıl hayatta kaldığını göstermektedir [148]. 480µg/kg ve 720µg/kg EBR uygulamaları ile hem Ki67 hem de cyt18 azalmakta bu duruma bağlı olarak farklılaşma veya invazyon gibi cevapların ortaya çıkmadığı düşünülmektedir.

Immunoblotlama sonuçlarında tümör oluşumu gözlemlenmiş olan 3 kontrol, 3 DMSO ve etkin doz olarak belirlenmiş 720µg/kg EBR uygulaması gerçekleştirilmiş 3 farede elde edilen proteinler kullanılmıştır. İlk olarak mTOR proteinine bakılmış ve bireysel farklılıklar olmasına karşın EBR uygulaması ile azalma olduğu tespit edilmiştir. Fosforlanmış mTOR seviyelerine de bakılmıştır. p-mTOR ser2481 mTORC2 yapısının bütünlüğünü koruduğunu gösterirken p-mTOR ser2448 mTORC1 yapısının bütünlüğünün korunduğunu ifade eder. Yapılan çalışmalar kolon da oluşan tümörün bulunduğu bölgeye göre farklı seviyelerde p-mTOR anlatımına sahip olduğunu ortaya koymuştur. Bölge fark etmeksizin anlatım seviyelerinin minimum %72.3 olması p-mTOR seviyesinin kolon kanserinde önem arz ettiğini ifade etmektedir [149]. Bireysel farklılıklar sebebi ile EBR uygulamasına bağlı olarak sadece 2. bireyde artış gösteren protein seviyesi 3. bireyde belirgin şekilde azalmıştır. p-mTOR serin2448 e bakıldığında, bireysel farklılıklara rağmen 3 EBR uygulanmış tümörde de azalma tespit edilmiştir. Bu durum tümörlerin enerji metabolizmasında yaşadığı sorunu ifade etmektedir. AMPKα seviyeleri sabit kalırken p-AMPKα treonin172 protein seviyelerinde 1. Ve 3. bireyde azalma gözlemlenirken 2. bireyde artış gözlemlenmiştir. Bu durum tümörde artan enerji ihtiyacının bireysel olarak farklılığı ile alakalı olabilir. Daha önce yapılan çalışmalarda p-AMPK'nın IV. seviye kolon kanserlerinde prognostik özelliğe sahip olabileceği ve bevacizumab ve kemoterapi uygulaması ile beraber tedavi seçeneği olarak sunulmaktadır [150]. Bir başka çalışma da kolon kanserlerinde AMPK aktivasyonunun enerji metabolizmasını dengelemek amacı ile yapılması ile beraber strese karşı hücre bölünmesinin durdurulmasıyla ilişkili olabileceğini ortaya koyarken genel hayatta kalım ile AMPK aktivasyonu arasında bir ilişkinin henüz bulunamadığını ifade etmektedir [151].

Beclin-1 protein seviyelerine bakıldığında DMSO hariç sadece 1. ve 3. EBR uygulanmış bireyde tespit edilebilmiştir. Bu durum hücre hatlarında oluşan otofajik cevap ile alakalı olarak değişkenlik gösterebilir. Ulk-1 protein seviyelerine Bakıldığında ise 1. ve 2. bireyde artan Ulk-1 protein seviyesi 3. Bireyde azalmıştır. Ulk-1 proteininin anlatımı otofaji ile doğrudan alakalı olabileceken mTOR bağımsız otofajininde gerçekleşebileceği bilinmektedir. SQSTM1/p62 proteini otofajinin sonlanmasını ifade eden markır proteinlerden biridir. Bu durumda SQSTM1/p62 proteni EBR uygulaması ile her 3 bireyde de azalırken 3. bireyde otofajik sonlanma diğer 2 bireye kıyasla daha azdır. Bu durum Ulk-1 protein anlatımı ile benzerlik göstermekte ve Ulk-1 protein seviyesinin azaldığı 3. Birey de SQSTM/p62 nin efektif şekilde azalamamış olması otofajik sinyalin Ulk-1 bağımlı şekilde iletiliyor olması ile açıklanabilir. Yapılan çalışmalarda AMPK'nın fosforlanmasını takiben gerçekleşen Ulk-1 serin555 fosforlanması ile başlatılan otofaji bir çok farklı hücre tipi ve yolakta etkindir. Kanser hücrelerinin dışında yapılan çalışmalarda resveratrol fare pluripotent kök hücrelerde farklılaşmanın önlenmesinde rol oynadığını mTOR un baskılanarak protein translasyonuna ket vurduğu gösterilmiştir [152]. Ayrıca yapılan bir başka çalışmada HT-29 ve HCT116 kolon kanser hücrelerinde ökaryotik uzama faktörü 2 kinaz (EEF2K)'ın susturulması ile AMPK-ULK1 bağımlı otofajinin gözlemlendiğini ifade etmektedir [153]. Bu çalışmalar ışığında EBR nin EEF2K üzerinde baskılayıcı bir etkisi olabileceği düşünülmektedir. EBR nin kolon kanser hücrelerinde ER stresine bağımlı apoptotik bir etki ortaya koyduğu önceki çalışmalarımızda gösterilmiştir [8]. Bu durumda ortamda ER stres oluşması ile Grp78/Bip protein ekspresyonunda artış beklenmektedir. Fakat herhangi bir artış gözlemlenmeksizin protein anlatımında azalma tespit edilmiştir. Şaperon proteinlerden kalretikulün de azalma tespit edilmesine karşın CHOP protein seviyelerinde artış görülmemektedir. LC3 protein ekspresyonuna Bakıldığında anlatımın sabit kaldığı sadece EBR uygulanan 2. bireyde azaldığı görülmektedir. Yapılan çalışmalar kolon kanserlerinde yüksek Bip/Grp78 anlatımı malignitesi artmış tümör yapısına, CHOP anlatımının bulunması ise tümör aşamasında artışı ifade etmekte olduğunu ortaya koymuştur [154]. EBR uygulaması ile tümör örneklerinde BiP/Grp78 ve CHOP anlatımlarında azalma tümör ilerleminin durdurulduğunu ifade etmektedir.

Elde edilen sonuçlar ışığında EBR uygulaması ile herhangi stres faktöründe artış tespit edilememiştir. Apoptotik sonuçlar ele alındığında Bax proteini sabit kalmış Bim proteini ise azalmıştır. Kaspaz 9 proteinindeki kesilim ve kesilmiş kaspaz 3 protein seviyesindeki artış ta bu kondüsyonlarda apoptotik ölümün gerçekleştiğini ifade etmektedir. Kesilmiş PARP sonucuna Bakıldığında ise protein anlatımının 3. kontrol bireyinde ve 3 farklı DMSO bireylerinde bulunduğu ve tümör boyutunun oluşturduğu yanıtıcı bir cevap olduğu düşünülmektedir (Şekil 4.17A). Bcl-2 protein seviyelerine bakıldığında ER stres ve apoptotik sonuçlara rağmen kontrol ve DMSO bireylerinde protein anlatımı sabit karılırken stres koşulu görülmeyen 720µg/kg EBR uygulanmış farelerde anlatımda azalma tespit edilmiştir (Şekil 4.17A). Yapılan çalışmalar kaspaz aktivitelerinin klinik bulgularda doku içerisinde belirlenen apoptozun çevre hücrelerin ihtiyacı olan büyüme faktörlerini sağladığı ve kaspaz 3 anlatımı yüksek olan vakalarda kolon kanseri dahil birçok farklı kanser tipinde yaşam süresini düşürdüğü ortaya konmuştur. Yüksek kaspaz 3 aktivitesine sahip olan tümörlerde farklılaşma ve yüksek tümör yarıçapı karakterize olmaktadır [155]. EBR'nin oluşturduğu etki yüksek yarıçapa sahip olan kontrol ve DMSO hücrelerindeki kaspaz 3 ve kaspaz 9 kesilimini azaltmış ve 720µg/kg EBR uygulaması ile beraber sitotoksik olmayan bir etki ortaya koymuştur.

EBR uygulaması ile elde edilemeyen strese bağımlı herhangi bir etki sebebi ile yapılan ön çalışmalarda elde edilen sonuçlara bakıldığında etkinin sitostatik olma ihtimali düşünülmüş ve hücre döngüsünde görevli olan Siklin, CDK ve inhibitörlere bakılmıştır. Elde edilen sonuçlarda Siklin B1, Siklin D3 ve Siklin A2 de EBR uygulaması ile azalma tespit edilmiştir (Şekil 4.17B). Siklin D/E ler G1 fazını, Siklin A lar S fazını ve Siklin B ler G2 fazında aktifleşen Siklinlerdir. Yapılan araştırmalar kolon kanser hücrelerinde, hücre döngüsünde görevli Siklin ve CDK ların belirlenmesini sağlamıştır. Aynı zamanda hücre döngüsü inhibitörlerinin p53 mutasyonlarına göre anlatım seviyelerini göstermiştir [156].3 Siklinin de ekspresyonun bulunmaması 720µg/kg EBR uygulanan bireylerin tümörlerin G0 fazında sıkışmış ve hücre döngüsünün EBR tarafından durdurulmuş olduğu düşünülmektedir. CDKlara Bakıldığında CDK6 ve CDK4 protein ekspresyon seviyelerinde de azalma tespit edilmiştir. Normal koşullarda azalma beklenmeyen CDKlar, p27 proteini tarafından Siklin degradasyonu sağlanırken Sikline bağlı olan

cdkların da Siklinlerle beraber degrade edilebildiği bilinmektedir [157]. p27 ve p21 protein anlatımlarına bakıldığında EBR uygulanan 1. bireyde p21 protein ifadesinde artış görülmüştür (Şekil 4.17B). p27 protein seviyesindeki artış tamamen Siklin D3 ile ters olarak elde edilmiştir (Şekil 4.17B). 1. kontrol bireyinde Siklin D3 ün bulunmayışın sebebi elde edilen veri ışığında 1. bireyde tespit edilen p27 protein anlatımı ile açıklanabilmektedir. Aynı şekilde 720µg/kg EBR uygulanmış bireylerde p27 protein seviyesinde ki artış hücre döngüsündeki tutulmayı açıklanabilir kılmaktadır. Yapılan araştırmalarda EBR nin MCF-7 ve MDA-MB-468 meme kanseri hücre hatlarında Siklin D1, Siklin E, Siklin B1, CDK2 ve CDK4 anlatımlarını azaltırken p21 ve p27 anlatımlarını arttırıcı yönde etki ettiği gösterilmiştir [11]. Steigerova, J. ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği başka bir çalışmada EBR nin prostat kanser hücreleri olan LNCaP ve DU-145 hücrelerindeki hücre döngüsü proteinlerinin anlatımlarına bakılmıştır. Prostat kanser hücrelerinde Siklin D1, Siklin E, CDK4 ve CDK6 anlatımlarını azaltmıştır. Bununla beraber hücre döngüsünün devamlılığı için fosforlanması gereken pRB anlatımında da azalma meydana gelmiştir [158]. Yapılan başka bir çalışmada metformin'in gırtlak skuamöz hücreli kanserinde EBR gibi G0/G1 hücre döngüsü tutulumuna sebep olduğu, bu yolağında Siklin D1 seviyelerinde ki azalmayı takiben p21 ve p27 proteinleri ile kontrol ettiği gösterilmiştir [159]. Elde edilen *in vivo* immunoblotlama sonuçlarına bakıldığında prostat ve meme kanseri hücrelerinde elde edilen sonuçlara benzer profiller görülmüş ve daha önce prostat ve meme kanseri hücrelerinde *in vitro* sonuçların benzerleri SW480 kolon kanser hücresi ile oluşturulmuş ksenograft tümörlerinde de görülmüştür. 720µg/kg EBR uygulamasının hücre döngüsünde tutulumuna sebep olduğu ortaya konmuştur.

Bitkiden elde edilen steroid türevli antikanser etkisi olduğu düşünülen ilaçlara bakıldığında; Pomiferin *Maclura pomifera* dan izole edilmekte ve histon de asetilaz inhibitörü olarak kullanılmaktadır [160]. Sulforafan ise HCT116 kolon kanser hücrelerinde epigenetik düzenleme sağlayarak hTERT anlatımının azalmasına sebep olmaktadır ve mir-21 anlatımı ile beraber RKO kolon kanser hücrelerinde HDAC anlatımını azaltmaktadır [161]. Timokuinon ise *Nigella sativa* bitkisinden izole edilmekte ve LoVo kolon kanser hücrelerinde prostaglandin E2 üzerinden COX-2 anlatımını baskılayarak *in vivo* ve *in vitro* da migrasyonun önüne geçmektedir [162].

Bitkiden elde edilen antikanser etkiye sahip bu ilaçların etkinliği EBR ile kıyaslandığında ortaya konan sonuçlar yetersiz kalmakta ve EBR'nin moleküler mekanizması göz önünde bulundurulduğunda *in vivo* çalışmalarda sitotoksik etkinin gösterilmesi için daha yüksek dozda EBR kullanılmasının tutarlı olacağı düşünülmektedir.

Sonuç olarak yapılan deneyler ışığında EBR'nin 2 boyutlu hücre kültüründe sitotoksik cevaplar sağlarken *in vivo* ve 3 boyutlu hücre kültürü çalışmalarında etkinin sitostatik olduğu gösterilmiştir. Bu durumda uygulanan 720µg/kg EBR konsantrasyonunun SW480 hücreleri ile modellenmiş ksenograft tümörlerinde hücre döngüsü proteinlerin anlatımlarında değişikliklere sebep olarak sitostatik bir etki ortaya koymuştur. Gelecekte yapılacak çalışmalara EBR'nin 720µg/kg konsantrasyonlarda nano taşıyıcılar ile hedefe yönelik tedavi uygulanıp EBR'nin etkinliğinin sitotoksik seviyelere çıkartılabilmesi hedeflenmektedir. Ayrıca EBR'nin adjuvant terapilerde kullanılması hedeflenmektedir.

6 KAYNAKÇA

1. Organization., W.H., *A report about cancer*. (2018, February).
2. Brenner, H., M. Kloor, and C.P. Pox, *Colorectal cancer*. *Lancet*, 2014. **383**(9927): p. 1490-1502.
3. Siegel, R.L., et al., *Colorectal cancer statistics, 2017*. *CA Cancer J Clin*, 2017. **67**(3): p. 177-193.
4. Tabanı, T.B.V., *Türkiye Kanser Rastlanma Sıklığı*. 2015.
5. Zhu, J.Y., J. Sae-Seaw, and Z.Y. Wang, *Brassinosteroid signalling*. *Development*, 2013. **140**(8): p. 1615-20.
6. Xu, P., et al., *A brassinosteroid-signaling kinase interacts with multiple receptor-like kinases in Arabidopsis*. *Mol Plant*, 2014. **7**(2): p. 441-4.
7. Obakan, P., et al., *Activation of polyamine catabolic enzymes involved in diverse responses against epibrassinolide-induced apoptosis in LNCaP and DU145 prostate cancer cell lines*. *Amino Acids*, 2014. **46**(3): p. 553-64.
8. Obakan-Yerlikaya, P., et al., *Calreticulin is a fine tuning molecule in epibrassinolide-induced apoptosis through activating endoplasmic reticulum stress in colon cancer cells*. *Mol Carcinog*, 2017. **56**(6): p. 1603-1619.
9. Coskun, D., et al., *Epibrassinolide alters PI3K/MAPK signaling axis via activating Foxo3a-induced mitochondria-mediated apoptosis in colon cancer cells*. *Exp Cell Res*, 2015. **338**(1): p. 10-21.
10. Fariduddin, Q., et al., *24-Epibrassinolide regulates photosynthesis, antioxidant enzyme activities and proline content of Cucumis sativus under salt and/or copper stress*. *Environ Monit Assess*, 2013. **185**(9): p. 7845-56.
11. Steigerova, J., et al., *Brassinosteroids cause cell cycle arrest and apoptosis of human breast cancer cells*. *Chem Biol Interact*, 2010. **188**(3): p. 487-96.
12. Rodrigues, N.R., et al., *p53 mutations in colorectal cancers*.

13. Yu, L., Y. Chen, and S.A. Tooze, *Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms*. *Autophagy*, 2018. **14**(2): p. 207-215.
14. Heymann, D., *Autophagy: A protective mechanism in response to stress and inflammation*. *Curr Opin Investig Drugs*, 2006. **7**(5): p. 443-50.
15. Shteingauz, A., et al., *AMPK-dependent autophagy upregulation serves as a survival mechanism in response to Tumor Treating Fields (TTFields)*. *Cell Death Dis*, 2018. **9**(11): p. 1074.
16. Vegliante, R. and M.R. Ciriolo, *Autophagy and Autophagic Cell Death: Uncovering New Mechanisms Whereby Dehydroepiandrosterone Promotes Beneficial Effects on Human Health*. *Vitam Horm*, 2018. **108**: p. 273-307.
17. 24-EPIBRASSINOLIDE, W.M.U.O., *PCT/US2005/022780*. 02.03.2006.
18. Allemani, C., et al., *Global surveillance of trends in cancer survival 2000-14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries*. *Lancet*, 2018. **391**(10125): p. 1023-1075.
19. Ning, Y., L. Wang, and E.L. Giovannucci, *A quantitative analysis of body mass index and colorectal cancer: findings from 56 observational studies*. *Obes Rev*, 2010. **11**(1): p. 19-30.
20. Imperiale, T.F., et al., *Prevalence of Advanced, Precancerous Colorectal Neoplasms in Black and White Populations: A Systematic Review and Meta-analysis*. *Gastroenterology*, 2018. **155**(6): p. 1776-1786 e1.
21. Kastrinos, F., et al., *Risk of pancreatic cancer in families with Lynch syndrome*. *JAMA*, 2009. **302**(16): p. 1790-5.
22. Butterworth, A.S., J.P. Higgins, and P. Pharoah, *Relative and absolute risk of colorectal cancer for individuals with a family history: a meta-analysis*. *Eur J Cancer*, 2006. **42**(2): p. 216-27.
23. Issa, I.A. and M. Nouredine, *Colorectal cancer screening: An updated review of the available options*. *World J Gastroenterol*, 2017. **23**(28): p. 5086-5096.
24. Lieberman, D.A., *Clinical practice. Screening for colorectal cancer*. *N Engl J Med*, 2009. **361**(12): p. 1179-87.

25. Sung, J.J., et al., *Screening for colorectal cancer in Chinese: comparison of fecal occult blood test, flexible sigmoidoscopy, and colonoscopy*. *Gastroenterology*, 2003. **124**(3): p. 608-14.
26. Levin, B., et al., *Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps, 2008: a joint guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology*. *Gastroenterology*, 2008. **134**(5): p. 1570-95.
27. rhythmbio, *Colorectal cancer stages*.
28. Kahnamoui, K., et al., *Laparoscopic surgery for colon cancer: a systematic review*. *Can J Surg*, 2007. **50**(1): p. 48-57.
29. Van Cutsem, E., et al., *Towards a pan-European consensus on the treatment of patients with colorectal liver metastases*. *Eur J Cancer*, 2006. **42**(14): p. 2212-21.
30. Basse, L., et al., *Functional recovery after open versus laparoscopic colonic resection: a randomized, blinded study*. *Ann Surg*, 2005. **241**(3): p. 416-23.
31. Martling, A., et al., *The Stockholm II trial on preoperative radiotherapy in rectal carcinoma: long-term follow-up of a population-based study*. *Cancer*, 2001. **92**(4): p. 896-902.
32. Folkesson, J., et al., *Swedish Rectal Cancer Trial: long lasting benefits from radiotherapy on survival and local recurrence rate*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(24): p. 5644-50.
33. Evans, J., U. Patel, and G. Brown, *Rectal cancer: primary staging and assessment after chemoradiotherapy*. *Semin Radiat Oncol*, 2011. **21**(3): p. 169-77.
34. Kannarkatt, J., et al., *Adjuvant Chemotherapy for Stage II Colon Cancer: A Clinical Dilemma*. *J Oncol Pract*, 2017. **13**(4): p. 233-241.
35. Krishna, P., *Brassinosteroid-Mediated Stress Responses*. *J Plant Growth Regul*, 2003. **22**(4): p. 289-297.
36. Bajguz, A. and A. Tretyn, *The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants*. *Phytochemistry*, 2003. **62**(7): p. 1027-46.
37. Bajguz, A., *Metabolism of brassinosteroids in plants*. *Plant Physiol Biochem*, 2007. **45**(2): p. 95-107.

38. Zhou, Y., et al., *Brassinosteroids play a critical role in the regulation of pesticide metabolism in crop plants*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 9018.
39. Gruszka, D., *The brassinosteroid signaling pathway-new key players and interconnections with other signaling networks crucial for plant development and stress tolerance*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(5): p. 8740-74.
40. Ahmad, P., et al., *Modification of Osmolytes and Antioxidant Enzymes by 24-Epibrassinolide in Chickpea Seedlings Under Mercury (Hg) Toxicity*.
41. Obakan, P., et al., *Epibrassinolide-induced apoptosis regardless of p53 expression via activating polyamine catabolic machinery, a common target for androgen sensitive and insensitive prostate cancer cells*. Prostate, 2014. **74**(16): p. 1622-33.
42. Obakan, P., et al., *SILAC-Based Mass Spectrometry Analysis Reveals That Epibrassinolide Induces Apoptosis via Activating Endoplasmic Reticulum Stress in Prostate Cancer Cells*. PLoS One, 2015. **10**(9): p. e0135788.
43. phytotechlab, *24-Epibrassinolide*.
44. Bedini, A., et al., *Unraveling the Initial Plant Hormone Signaling, Metabolic Mechanisms and Plant Defense Triggering the Endomycorrhizal Symbiosis Behavior*.
45. Saini, S., I. Sharma, and P.K. Pati, *Versatile roles of brassinosteroid in plants in the context of its homeostasis, signaling and crosstalks*. Front Plant Sci, 2015. **6**: p. 950.
46. Zhang, W. and H.T. Liu, *MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells*. Cell Res, 2002. **12**(1): p. 9-18.
47. Carnero, A. and J.M. Paramio, *The PTEN/PI3K/AKT Pathway in vivo, Cancer Mouse Models*. Front Oncol, 2014. **4**: p. 252.
48. Jung, H.J. and Y. Suh, *Regulation of IGF -1 signaling by microRNAs*. Front Genet, 2014. **5**: p. 472.
49. Copp, J., G. Manning, and T. Hunter, *TORC-specific phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR): phospho-Ser2481 is a marker for intact mTOR signaling complex 2*. Cancer Res, 2009. **69**(5): p. 1821-7.
50. Dienstmann, R., et al., *Picking the point of inhibition: a comparative review of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors*. Mol Cancer Ther, 2014. **13**(5): p. 1021-31.

51. Hardie, D.G., *AMPK--sensing energy while talking to other signaling pathways*. Cell Metab, 2014. **20**(6): p. 939-52.
52. Gowans, G.J. and D.G. Hardie, *AMPK: a cellular energy sensor primarily regulated by AMP*. Biochem Soc Trans, 2014. **42**(1): p. 71-5.
53. Rattan, R., et al., *5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside inhibits cancer cell proliferation in vitro and in vivo via AMP-activated protein kinase*. J Biol Chem, 2005. **280**(47): p. 39582-93.
54. Jeon, S.M., *Regulation and function of AMPK in physiology and diseases*. Exp Mol Med, 2016. **48**(7): p. e245.
55. Dikic, I. and Z. Elazar, *Mechanism and medical implications of mammalian autophagy*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2018. **19**(6): p. 349-364.
56. Liu, Y. and B. Levine, *Autosis and autophagic cell death: the dark side of autophagy*. Cell Death Differ, 2015. **22**(3): p. 367-76.
57. Mizushima, N., *Autophagy: process and function*. Genes Dev, 2007. **21**(22): p. 2861-73.
58. Novusbio, *chaperone mediated autophagy*.
59. Hayat, M.A., *Chapter 1 - Overview of Autophagy*. 2017.
60. Hayat, M.A.
61. Li, W.W., J. Li, and J.K. Bao, *Microautophagy: lesser-known self-eating*. Cell Mol Life Sci, 2012. **69**(7): p. 1125-36.
62. Kaushik, S. and A.M. Cuervo, *Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world*. Trends Cell Biol, 2012. **22**(8): p. 407-17.
63. Cuervo, A.M. and E. Wong, *Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging*.
64. Hansen, M., D.C. Rubinsztein, and D.W. Walker, *Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2018. **19**(9): p. 579-593.
65. Cicchini, M., V. Karantza, and B. Xia, *Molecular pathways: autophagy in cancer--a matter of timing and context*. Clin Cancer Res, 2015. **21**(3): p. 498-504.

66. Wong, A.S., Z.H. Cheung, and N.Y. Ip, *Molecular machinery of macroautophagy and its deregulation in diseases*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1812**(11): p. 1490-7.
67. Xu, C., B. Bailly-Maitre, and J.C. Reed, *Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions*. J Clin Invest, 2005. **115**(10): p. 2656-64.
68. Meyerovich, K., et al., *Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in pancreatic islet inflammation*. J Mol Endocrinol, 2016. **57**(1): p. R1-R17.
69. Sano, R. and J.C. Reed, *ER stress-induced cell death mechanisms*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1833**(12): p. 3460-3470.
70. Oyadomari, S. and M. Mori, *Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress*. Cell Death Differ, 2004. **11**(4): p. 381-9.
71. Zeeshan, H.M., et al., *Endoplasmic Reticulum Stress and Associated ROS*. Int J Mol Sci, 2016. **17**(3): p. 327.
72. Wong, R.S.Y., *Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment*.
73. Flamment, M., et al., *New insights into ER stress-induced insulin resistance*. Trends Endocrinol Metab, 2012. **23**(8): p. 381-90.
74. O'Brien, M.A. and R. Kirby, *Apoptosis: a review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease*.
75. Schneider, P. and J. Tschopp, *Apoptosis induced by death receptors*.
76. Sendoel, A. and M.O. Hengartner, *Apoptotic cell death under hypoxia*. Physiology (Bethesda), 2014. **29**(3): p. 168-76.
77. McIlwain, D.R., T. Berger, and T.W. Mak, *Caspase functions in cell death and disease*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015. **7**(4).
78. Boatright, K.M. and G.S. Salvesen, *Mechanisms of caspase activation*. Curr Opin Cell Biol, 2003. **15**(6): p. 725-31.
79. Tummers, B. and D.R. Green, *Caspase-8: regulating life and death*. Immunol Rev, 2017. **277**(1): p. 76-89.
80. McIlwain, D.R., T. Berger, and T.W. Mak, *Caspase functions in cell death and disease*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(4): p. a008656.

81. Singh, R., A. Letai, and K. Sarosiek, *Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019. **20**(3): p. 175-193.
82. Shamas-Din, A., et al., *Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(4): p. a008714.
83. Warren, C.F.A., M.W. Wong-Brown, and N.A. Bowden, *BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer*. Cell Death Dis, 2019. **10**(3): p. 177.
84. Elmore, S., *Apoptosis: a review of programmed cell death*. Toxicol Pathol, 2007. **35**(4): p. 495-516.
85. Herr, I. and K.M. Debatin, *Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy*. Blood, 2001. **98**(9): p. 2603-14.
86. Hu, Q., et al., *Molecular determinants of caspase-9 activation by the Apaf-1 apoptosome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(46): p. 16254-61.
87. Caulfield, A.J. and W.W. Lathem, *Disruption of fas-fas ligand signaling, apoptosis, and innate immunity by bacterial pathogens*. PLoS Pathog, 2014. **10**(8): p. e1004252.
88. Zhou, X., et al., *Virus Infection and Death Receptor-Mediated Apoptosis*. Viruses, 2017. **9**(11).
89. Lavrik, I.N., *Systems biology of death receptor networks: live and let die*. Cell Death Dis, 2014. **5**: p. e1259.
90. Sayers, T.J., *Targeting the extrinsic apoptosis signaling pathway for cancer therapy*. Cancer Immunol Immunother, 2011. **60**(8): p. 1173-80.
91. Tyson, J.J. and B. Novak, *Regulation of the eukaryotic cell cycle: molecular antagonism, hysteresis, and irreversible transitions*. J Theor Biol, 2001. **210**(2): p. 249-63.
92. Coqueret, O., *New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment?* Trends Cell Biol, 2003. **13**(2): p. 65-70.
93. Abbastabar, M., et al., *Multiple functions of p27 in cell cycle, apoptosis, epigenetic modification and transcriptional regulation for the control of cell growth: A double-edged sword protein*. DNA Repair (Amst), 2018. **69**: p. 63-72.

94. Barnum, K.J. and M.J. O'Connell, *Cell cycle regulation by checkpoints*. Methods Mol Biol, 2014. **1170**: p. 29-40.
95. Oki, T., et al., *A novel cell-cycle-indicator, mVenus-p27K⁻, identifies quiescent cells and visualizes G₀-G₁ transition*.
96. Hunt, T., *Getting in and out of mitosis*. Rambam Maimonides Med J, 2011. **2**(3): p. e0051.
97. Gonzalez, D.M. and D. Medici, *Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition*. Sci Signal, 2014. **7**(344): p. re8.
98. Tripathi, K. and M. Garg, *Mechanistic regulation of epithelial-to-mesenchymal transition through RAS signaling pathway and therapeutic implications in human cancer*. J Cell Commun Signal, 2018. **12**(3): p. 513-527.
99. Doble, B.W. and J.R. Woodgett, *Role of glycogen synthase kinase-3 in cell fate and epithelial-mesenchymal transitions*. Cells Tissues Organs, 2007. **185**(1-3): p. 73-84.
100. Wendt, M.K., et al., *STAT3 and epithelial-mesenchymal transitions in carcinomas*. JAKSTAT, 2014. **3**(1): p. e28975.
101. Novusbio, *EMT & Stemness*.
102. Thomas, T. and T.J. Thomas, *Polyamine metabolism and cancer*. J Cell Mol Med, 2003. **7**(2): p. 113-26.
103. Pegg, A.E., *Mammalian polyamine metabolism and function*. IUBMB Life, 2009. **61**(9): p. 880-94.
104. Casero, R.A., T. Murray Stewart, and A.E. Pegg, *Polyamine metabolism and cancer: treatments, challenges and opportunities*. Nat Rev Cancer, 2018. **18**(11): p. 681-695.
105. Casero, R.A. and L.J. Marton, *Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases*. Nat Rev Drug Discov, 2007. **6**(5): p. 373-90.
106. Malíková, J., et al., *Anticancer and antiproliferative activity of natural brassinosteroids*. Phytochemistry, 2008. **69**(2): p. 418-26.
107. Yang, G., et al., *A Positive Feedback Loop between Akt and mTORC2 via SIN1 Phosphorylation*. Cell Rep, 2015. **12**(6): p. 937-43.

108. Choi, S.I., et al., *Melatonin induces autophagy via an mTOR-dependent pathway and enhances clearance of mutant-TGFBIp*. J Pineal Res, 2013. **54**(4): p. 361-72.
109. Chiang, G.G. and R.T. Abraham, *Phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR) at Ser-2448 is mediated by p70S6 kinase*. J Biol Chem, 2005. **280**(27): p. 25485-90.
110. Willows, R., et al., *Phosphorylation of AMPK by upstream kinases is required for activity in mammalian cells*. Biochem J, 2017. **474**(17): p. 3059-3073.
111. Hardie, D.G., *AMPK and autophagy get connected*. EMBO J, 2011. **30**(4): p. 634-5.
112. Dai, J.P., et al., *Drug screening for autophagy inhibitors based on the dissociation of Beclin1-Bcl2 complex using BiFC technique and mechanism of eugenol on anti-influenza A virus activity*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e61026.
113. Shen, Y.H., et al., *Cross-talk between JNK/SAPK and ERK/MAPK pathways: sustained activation of JNK blocks ERK activation by mitogenic factors*. J Biol Chem, 2003. **278**(29): p. 26715-21.
114. Pattingre, S., et al., *Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy*. Cell, 2005. **122**(6): p. 927-39.
115. Russell, R.C., et al., *ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase*. Nat Cell Biol, 2013. **15**(7): p. 741-50.
116. Cao, Q.-H., et al.
117. Li, J., et al., *Inhibition of autophagy augments 5-fluorouracil chemotherapy in human colon cancer in vitro and in vivo model*. Eur J Cancer, 2010. **46**(10): p. 1900-9.
118. Puissant, A., et al., *Resveratrol promotes autophagic cell death in chronic myelogenous leukemia cells via JNK-mediated p62/SQSTM1 expression and AMPK activation*. Cancer Res, 2010. **70**(3): p. 1042-52.
119. Ogata, M., et al., *Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(24): p. 9220-31.
120. Tsai, S.C., et al., *Bufalin increases sensitivity to AKT/mTOR-induced autophagic cell death in SK-HEP-1 human hepatocellular carcinoma cells*. Int J Oncol, 2012. **41**(4): p. 1431-42.

121. Ellington, A.A., M. Berhow, and K.W. Singletary, *Induction of macroautophagy in human colon cancer cells by soybean B-group triterpenoid saponins*. *Carcinogenesis*, 2005. **26**(1): p. 159-67.
122. Thomé, M.P., et al., *Ratiometric analysis of Acridine Orange staining in the study of acidic organelles and autophagy*. *J Cell Sci*, 2016. **129**(24): p. 4622-4632.
123. Itakura, E. and N. Mizushima, *p62 Targeting to the autophagosome formation site requires self-oligomerization but not LC3 binding*. *J Cell Biol*, 2011. **192**(1): p. 17-27.
124. Minois, N., D. Carmona-Gutierrez, and F. Madeo, *Polyamines in aging and disease*. *Aging (Albany NY)*, 2011. **3**(8): p. 716-32.
125. Uemura, T., et al., *Polyamine transport is mediated by both endocytic and solute carrier transport mechanisms in the gastrointestinal tract*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2010. **299**(2): p. G517-22.
126. Casero, R.A. and A.E. Pegg.
127. Obakan, P., et al., *Activation of polyamine catabolic enzymes involved in diverse responses against epibrassinolide-induced apoptosis in LNCaP and DU145 prostate cancer cell lines*.
128. Matsui, I., H. Pösö, and A.E. Pegg, *Conversion of exogenous spermidine into putrescine after administration to rats*. *Biochim Biophys Acta*, 1982. **719**(2): p. 199-207.
129. Casero, R.A. and A.E. Pegg, *Spermidine/spermine N1-acetyltransferase--the turning point in polyamine metabolism*. *FASEB J*, 1993. **7**(8): p. 653-61.
130. Pietrocola, F., et al., *Spermidine induces autophagy by inhibiting the acetyltransferase EP300*. *Cell Death Differ*, 2015. **22**(3): p. 509-16.
131. Cui, X., Y. Hartanto, and H. Zhang, *Advances in multicellular spheroids formation*. *J R Soc Interface*, 2017. **14**(127).
132. Riedl, A., et al., *Comparison of cancer cells in 2D vs 3D culture reveals differences in AKT-mTOR-S6K signaling and drug responses*. *J Cell Sci*, 2017. **130**(1): p. 203-218.

133. Mirza, M.B., et al., *Induction of apoptosis and cell cycle arrest by ethyl acetate fraction of Phoenix dactylifera L. (Ajwa dates) in prostate cancer cells.* J Ethnopharmacol, 2018. **218**: p. 35-44.
134. Ni, Y.L., et al., *Teroxirone motivates apoptotic death in tumorspheres of human lung cancer cells.* Chem Biol Interact, 2018. **291**: p. 137-143.
135. Sato-Dahlman, M., et al., *CD133-targeted oncolytic adenovirus demonstrates anti-tumor effect in colorectal cancer.* Oncotarget, 2017. **8**(44): p. 76044-76056.
136. Zanoni, M., et al., *3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained.*
137. Baek, N., et al., *Real-time monitoring of cisplatin cytotoxicity on three-dimensional spheroid tumor cells.* Drug Des Devel Ther, 2016. **10**: p. 2155-65.
138. Wang, W., et al., *Ursolic acid inhibits the growth of colon cancer-initiating cells by targeting STAT3.* Anticancer Res, 2013. **33**(10): p. 4279-84.
139. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition.* J Clin Invest, 2009. **119**(6): p. 1420-8.
140. Liu, T., et al., *Ginkgo biloba extract EGb 761-induced upregulation of LincRNA-p21 inhibits colorectal cancer metastasis by associating with EZH2.* Oncotarget, 2017. **8**(53): p. 91614-91627.
141. Belli, V., et al., *Regorafenib in combination with silybin as a novel potential strategy for the treatment of metastatic colorectal cancer.* Oncotarget, 2017. **8**(40): p. 68305-68316.
142. Edmondson, R., et al., *Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors.* Assay Drug Dev Technol, 2014. **12**(4): p. 207-18.
143. Hoffman, R., *Green fluorescent protein imaging of tumour growth, metastasis, and angiogenesis in mouse models.* Lancet Oncol, 2002. **3**(9): p. 546-56.
144. Jung, J., *Human tumor xenograft models for preclinical assessment of anticancer drug development.* Toxicol Res, 2014. **30**(1): p. 1-5.
145. Li, Y., et al., *Carcinoembryonic antigen interacts with TGF- β receptor and inhibits TGF- β signaling in colorectal cancers.* Cancer Res, 2010. **70**(20): p. 8159-68.

146. Samara, R.N., L.M. Laguinge, and J.M. Jessup, *Carcinoembryonic antigen inhibits anoikis in colorectal carcinoma cells by interfering with TRAIL-R2 (DR5) signaling*. *Cancer Res*, 2007. **67**(10): p. 4774-82.
147. Tiwari, N., et al., *EMT as the ultimate survival mechanism of cancer cells*. *Semin Cancer Biol*, 2012. **22**(3): p. 194-207.
148. Touil, Y., et al., *Colon cancer cells escape 5FU chemotherapy-induced cell death by entering stemness and quiescence associated with the c-Yes/YAP axis*. *Clin Cancer Res*, 2014. **20**(4): p. 837-46.
149. Melling, N., et al., *Expression of phospho-mTOR kinase is abundant in colorectal cancer and associated with left-sided tumor localization*. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015. **8**(6): p. 7009-15.
150. Zulato, E., et al., *Prognostic significance of AMPK activation in advanced stage colorectal cancer treated with chemotherapy plus bevacizumab*. *Br J Cancer*, 2014. **111**(1): p. 25-32.
151. Li, W., et al., *Targeting AMPK for cancer prevention and treatment*. *Oncotarget*, 2015. **6**(10): p. 7365-78.
152. Suvorova, I.I. and V.A. Pospelov, *AMPK/Ulk1-dependent autophagy as a key mTOR regulator in the context of cell pluripotency*. *Cell Death Dis*, 2019. **10**(4): p. 260.
153. Xie, C.M., et al., *Silencing of EEF2K (eukaryotic elongation factor-2 kinase) reveals AMPK-ULK1-dependent autophagy in colon cancer cells*. *Autophagy*, 2014. **10**(9): p. 1495-508.
154. Wang, M. and R.J. Kaufman, *The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development*.
155. Hu, Q., et al., *Elevated cleaved caspase-3 is associated with shortened overall survival in several cancer types*. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014. **7**(8): p. 5057-70.
156. Tominaga, O., et al., *Expressions of cell cycle regulators in human colorectal cancer cell lines*. *Jpn J Cancer Res*, 1997. **88**(9): p. 855-60.
157. Ray, A., et al., *p27Kip1 inhibits cyclin D-cyclin-dependent kinase 4 by two independent modes*. *Mol Cell Biol*, 2009. **29**(4): p. 986-99.

158. Steigerová, J., et al., *Mechanisms of natural brassinosteroid-induced apoptosis of prostate cancer cells*. Food Chem Toxicol, 2012. **50**(11): p. 4068-76.
159. Cai, X., et al., *Metformin Induced AMPK Activation, G0/G1 Phase Cell Cycle Arrest and the Inhibition of Growth of Esophageal Squamous Cell Carcinomas In Vitro and In Vivo*. PLoS One, 2015. **10**(7): p. e0133349.
160. Son, I.H., et al., *Pomiferin, histone deacetylase inhibitor isolated from the fruits of Maclura pomifera*. Bioorg Med Chem Lett, 2007. **17**(17): p. 4753-5.
161. Martin, S.L., R. Kala, and T.O. Tollefsbol, *Mechanisms for the Inhibition of Colon Cancer Cells by Sulforaphane through Epigenetic Modulation of MicroRNA-21 and Human Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) Down-regulation*. Curr Cancer Drug Targets, 2018. **18**(1): p. 97-106.
162. Hsu, H.H., et al., *Thymoquinone suppresses migration of LoVo human colon cancer cells by reducing prostaglandin E2 induced COX-2 activation*. World J Gastroenterol, 2017. **23**(7): p. 1171-1179.

7 EKLER

7.1 KULLANILAN ÇÖZELTİLER

7.1.1 Hücre Dondurma Medyası Hazırlanışı (10 ml için)

Fetal sığır serumu (FBS) 9 ml

Dimetil sülfoksit (DMSO, (CH₃)₂SO) 1 ml

DMSO kullanılarak hücre kültürüne uygun hazırlanan medya 0,22 mm'lik filtre kullanılarak süzülür ve -20°C'de muhafaza edilir.

7.1.2 Hücre Lizis Tamponunun (CLB) Hazırlanışı (10 ml için)

M-PERTM Mammalian Protein Extraction Reagent 10 ml

Roche® PhosSTOP fosfataz inhibitör kokteyli 1 tablet

Roche® proteaz inhibitör kokteyli 1 tablet

+4°C'de muhafaza edilir.

7.1.3 5X Laemmlı Tamponunun Hazırlanışı (10 ml için)

1,5 M Tris-Cl çözeltisi (pH 6,8) 2,0 ml

Bromofenol mavisi (%1(ağırlık/hacim)) 0,5 ml

Gliserol 5,0 ml

β-merkaptoetanol 2,5 ml

Sodyum dodesil sülfat (SDS, NaC₁₂H₂₅SO₄) 2,0 gr

-20°C'de muhafaza edilir.

7.1.4 Bradford Çözeltisinin Hazırlanışı (250 ml için)

Coomassie mavisi (C₄₇H₅₀N₃O₇S₂) 25,0 mg

%95 (hacim/hacim) etanol (C₂H₅OH) 12,5 ml

%85 (hacim/hacim) asetik asit (CH₃COOH)25,0 ml

Distile su (dH₂O) 212,5 ml

+4°C'de muhafaza edilir.

7.1.5 Tris-Baz Çözeltisinin (1,5 Molar) Hazırlanışı (pH 8,8)

Tris-baz (C₄H₁₁NO₃) 90,8 gr

Distile su (dH₂O) 500 ml

Tris-baz 800 ml suyun içinde belirtilen miktarda çözülerek pH 8,8'e ayarlanır. Daha sonra çözelti hacmi 1 L'ye tamamlanır.

7.1.6 Tris-Baz Çözeltisinin (0.5 Molar) Hazırlanışı (pH 6,8)

Tris-baz (C₄H₁₁NO₃) 30,25 gr

Distile su (dH₂O) 500 ml

Tris-baz 800 ml suyun içinde çözülerek pH 6,8'e ayarlanır. Daha sonra çözelti hacmi 1 L'ye tamamlanır.

7.1.7 %10 (w/v) Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Çözeltisinin Hazırlanışı (100 ml için)

Sodyum dodesil sülfat (SDS, NaC₁₂H₂₅SO₄) 10,0 gr

Distile su (dH₂O) 100 ml

Oda sıcaklığında muhafaza edilir.

7.1.8 %30 (v/v) Akrilamid/Bis-Akrilamid Çözeltisinin Hazırlanışı (100 ml için)

Akrilamid (C₃H₅NO) 29,2 gr

Bis-Akrilamid (C₇H₁₀N₂O₂) 0,8 gr

Distile su (dH₂O) 100 ml

+4°C'de muhafaza edilir.

7.1.9 %10 (w/v) Amonyum Persülfat (APS) Çözeltisinin Hazırlanışı (10 ml için)

Amonyum persülfat ((NH₄)₂S₂O₈) 1,0 gr

Distile su (dH₂O) 10 ml

-20°C'de muhafaza edilir.

7.1.10 10X Yürütme Tamponunun Hazırlanışı (pH 8,3)

Tris-baz (C₄H₁₁NO₃) 30,3 gr

Glisin (C₂H₅NO₂) 144,0 gr

Sodyum dodesil sülfat (SDS, NaC₁₂H₂₅SO₄) 10,0 gr

Distile su (dH₂O) 1000 ml

Tris-baz ve glisin 800 ml distile su içinde çözülerek pH 8,3'e ayarlanır. SDS eklenir ve çözelti hacmi 1 L'ye tamamlanarak oda sıcaklığında muhafaza edilir.

7.1.11 10X Transfer Tamponunun Hazırlanışı (pH 8,3)

Tris-baz (C₄H₁₁NO₃) 30,3 gr

Glisin (C₂H₅NO₂) 144,0 gr

Distile su (dH₂O) 1000 ml

Kimyasallar 800 ml distile suyun içinde çözülerek pH 8,3'e ayarlanır. Daha sonra çözelti hacmi 1 L'ye tamamlanır ve oda sıcaklığında muhafaza edilir.

7.1.12 %12 (v/v) Poliakrilamid Jel Hazırlanışı

	ALT JEL	ÜST JEL
Distile su (dH ₂ O)	3,4 ml	3,075 ml
Tris-Baz çözeltisi	2,5 ml (1,5 M, pH 8,8)	1,125 ml (0,5 M, pH 6,8)
%10 (ağırlık/hacim) SDS	0,1 ml	0,05 ml
%30 (hacim/hacim) Akrilamid/Bis-akrilamid	4,0 ml	0,67 ml
%10 (ağırlık/hacim) APS	0,05 ml	0,025 ml
Tetrametiletildiamin (TEMED)	0,005 ml	0,005 ml

7.1.13 10X Tris Tampon (TBS) Çözeltisinin Hazırlanışı (pH 7,6)

Tris-baz ($C_4H_{11}NO_3$) 12,11 gr

Sodyum klorür ($NaCl$) 86,6 gr

Distile su (dH_2O) 1000 ml

Kimyasallar 800 ml suyun içinde çözülerek pH 7,6'ya ayarlanır. Daha sonra çözelti hacmi 1 L'ye tamamlanır ve TBS-Tween çözeltisi için 1X TBS içerisine 1:1000 (hacim/hacim) oranında Tween eklenilerek çözelti oda sıcaklığında muhafaza edilir.

7.1.14 %5 (w/v) Süt Çözeltisinin Hazırlanışı (50 ml için)

Yağsız süt tozu 2,5 gr

1X TBS-T çözeltisi 50 ml

-20°C'de muhafaza edilir.

7.1.15 Tris-Baz Çözeltisinin (1 Molar) Hazırlanışı (pH 8,5)

Tris-baz ($C_4H_{11}NO_3$) 60,5 gr

Distile su (dH_2O) 500 ml

Oda sıcaklığında muhafaza edilir.

7.1.16 50x TAE Çözeltisinin Hazırlanışı (1L için) (pH 8,6)

EDTA disodium tuzu 18.61 gr

Tris baz 242g

Asetik asit 57.1 ml

İyonize edilmiş distile su (DDH_2O)

7.1.17 Kumarik Asit Çözeltisinin Hazırlanışı (10 ml için)

P-Kumarik asit ($C_9H_8O_3$) 0,15 gr

Dimetilsülfoksit (DMSO, $(CH_3)_2SO$) 10 ml

+4°C'de muhafaza edilir.

7.1.18 Luminol Çözeltisinin Hazırlanışı (10 ml için)

Luminol ($C_8H_7N_3O_2$) 0,44 gr

Dimetilsülfoksit (DMSO, $(CH_3)_2SO$) 10 ml

-20°C'de muhafaza edilir.

Kemiluminesans Çözeltisinin hazırlanışı

Kemiluminesans A Çözeltisi	
Distile su (dH ₂ O)	9,0 ml
1 M Tris-baz çözeltisi, pH 8,5	1,0 ml
Kumarik asit çözeltisi	45,0 µl
Luminol çözeltisi	100,0 µl
Kemiluminesans B Çözeltisi	
Distile su (dH ₂ O)	9,0 ml
1 M Tris-baz çözeltisi, pH 8,5	1,0 ml
Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)	6,0 µl

A ve B çözeltileri hazırlandıktan sonra karıştırılır ve karanlık koşullarda kullanılır.

7.1.19 10X Fosfat Tampon Çözeltisinin (PBS) Hazırlanışı (pH 7,4)

Sodyum klorür (NaCl) 80,0 gr

Potasyum klorür (KCl) 2,0 gr

Disodyum hidrojen fosfat (Na₂HPO₄) 14,4 gr

Mono potasyum fosfat (KH₂PO₄) 2,4 gr

Distile su (dH₂O) 1000 ml

7.1.20 0,1 M Fosfat Tuz Tamponu (PBS)

NaH₂PO₄H₂O 2.6 g

Na₂HPO₄2H₂O 15.46 g

NaCl 8.41 g

Distile su 1000 ml

7.1.21 %10 luk Nötral formalin

%37 Formaldehid 100 ml

Na₂HPO₄ 6.5 g

NaH₂PO₄ 3.5 g

Distile su 900 ml

7.1.22 10x 10mM Sitrata Tamponu (pH 6)

Sodyum sitrat 29.4 g

Sitrik asit 21 g

Distile su 1000ml

7.1.23 1N HCl

%37 HCl 82.2ml

Distile su 1000ml

7.1.24 10x 50mM Tris tampon (pH 7.8)

Tris baz 15.1g

1N HCl 50ml

Tris HCl de çözülür, pH ayarlanır ve 250ml e ddH₂O ile tamamlanır.

7.1.25 Gliserin jel

Gelatin 1 g

Gliserin 7 ml

Distile su 6 ml

7.2 KULLANILAN CIHAZLAR

Kullanılan cihazlar Tablo 1 de verilmiştir.

Tablo 1. Kullanılan Cihazlar

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
Dondurucu (-80°C)	Ultra Low Temperature Freezer	Arctiko
Derin dondurucu	2041D	Arçelik
Buzdolabı (No frost)	4263TMB	Arçelik
Distile su cihazı	TANKPE030	Millipore q-5UV
Mikrotom		
UV-Translüminatör Transluminatör	GelDOC	BioRad
Laminar Flow	Model: 12469,2000	HeraSafe
Laminar flow	LN090	Nüve
Otoklav cihazı	OT40L	Nüve
Soğutmalı etüv	ES120	Nüve
Mikropipet (0,5-10 µl)	EH52836	Thermo Scientific
Mikropipet (20-200 µl)	EH46925	Thermo Scientific
Mikropipet (200-1000 µl)	T27274	Thermo Scientific
Floresan mikroskopu	1X71	Olympus
İnverted mikroskop	XDS-1B	SOIF
Optik mikroskop	701	Ivymen
Stereo mikroskop	V12	Zeiss
Kuru ısıtıcı blok	FN120	Nüve
Akış sitometri cihazı	AC6531180147	BD Biosciences
HPLC cihazı	120	Agilent Technologies
Kuru ısıtıcı blok	FN120	Nüve

İnkübatör	51026280	Thermo Scientific
Hassas tartı	LE6202S	Sartorius
pH metre	N315	BIO Technologies
Elektroforez sistemi	1658004	Bio-Rad
Transfer cihazı	10016505C	Bio-Rad
Rotasyon cihazı	SRT9D	Stuart Equipment
Vorteks	SA8	Stuart Equipment
Spektrofotometre	2100	Amershan Biosciences
Sıvı azot tankı	Arpege 40	Air Liquide
Santrifüj cihazı	5417R	Eppendorf
Santrifüj cihazı (Büyük)	5810R	Eppendorf
Karıştırıcı İnkübatörü	Escella E25	New Brunswick
Santrifüj cihazı	22331	Eppendorf

7.3 HÜCRE KÜLTÜRÜ DONANIMLARI

Hücre kültüründe kullanılan donanımlar Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2 Hücre Kültürü Donanımları

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
6 kuyucuklu petri	92006	TPP
12 kuyucuklu petri	92012	TPP
96 kuyucuklu petri	92096	TPP
75cm ² hücre büyütme kapları	90076	TPP
25cm ² hücre büyütme kapları	90026	TPP
100mm hücre büyütme kapları	93100	TPP
60mm hücre büyütme kapları	93060	TPP
Steril pipetler (5ml)	94005	TPP
Steril pipetler (10ml)	94010	TPP
Şırınga filtreleri (0.22 µm)	99722	TPP
Enjektör set	21G	ASTRAJE CT
Tripsin-EDTA	25200-056	Gibco
Penisilin/Streptomisin	15140-122	Gibco
Fetal Bovine Serum	10500-064	Gibco
McCoy 5A		
MEM		
500mikrolitre Şırınga	70570	AYSET
Hemositometre	640110	Marienfeld-Superior
Laminar flow	12469 2000	Thermo Scientific
Laminar flow	LN090	Nüve
Kriovial tüp	V7634	Thermo Scientific

Pipet uçları (1000 µl)	4130135	CAPP
Pipet uçları (200 µl)	5130070	CAPP
Pipet uçları (10 µl)	5030010	CAPP

7.4 KİMYASAL MADDELER

Çalışma kapsamında kullanılan kimyasal maddeler Tablo 3’de gösterilmiştir.

Tablo 3. Kullanılan Kimyasalların Listesi

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
Etanol	CAS 64-17-5	ALKO MED
Saf Etanol	32221	SIGMA-ALDRICH
Metanol	24229	SIGMA-ALDRICH
İzopropanol	K44518295 321	MERCK
2-merkaptotanol	S4805940 517	MERCK
Akrilamid / Bis-Akrilamid 30% çözelti	A9099	SIGMA-ALDRICH
Amonyum persülfat	A2941	Applichem
Coomassie Blue Belirteci	A3480	Applichem
DMSO	K46505343 517	MERCK
DMSO	D2650	SIGMA-ALDRICH
EDTA	A2937	Applichem
DiOC ₆ Boya	2129966	Fluka
DAPI Boya		
PI Boya	P4170-100MG	SIGMA-ALDRICH
Fetal Bovine Serum (FBS)	P290310	Pan Biotech
Laemli Tamponu	S3401-1V	SIGMA
p-Coumaric Asid	C9008-1G	SIGMA-ALDRICH
Luminol	A2185	Applichem
MTT Solüsyonu	M2128-5G	SIGMA-ALDRICH

Phosphate buffered saline (PBS)	BE17-51-5F	LONZA
Sığır Serum Albumin (BSA)	A2153-10G	SIGMA-ALDRICH
SDS (Sodyum dedosil sülfat)	UN1888	Appllichem
Protein İzolasyonu Tamponu	78501	Thermo
Page Ruller Plus Prestained Protein Ladder	26619	Fermentas
Agaroz	A9539	SIGMA-ALDRICH
Tris Baz	648310	CALBIOCHEM
Asetik Asid	27225	SIGMA-ALDRICH
Tris-HCl	648317	CALBIOCHEM
Sodyum Klorür	A2941	Appllichem
Tween 20	S6740684 348	MERCK
TEMED	A1148,0100	Appllichem
Yağsız Süt Tozu	SC-2325	Santa Cruz Biotechnology
Glisin	3570	CALBIOCHEM
H ₂ O ₂ Hidrojen peroksi	K39218400838	MERCK
Rnase Free Water	42480093	QIAGEN
Super Block T20 Blocking Buffer	37536	Thermo
Ponceau kırmızı Belirteci	A1405	Appllichem
Hidroklorik Asit	K43804717 239	MERCK
Kristal Viyole	FN1048735	MERCK
Paraffin 42-44	8002-74-2	MERCK
Sodyum fosfat dibazik	STBG8375	SIGMA-ALDRICH
Sodyum fosfat monobazik	BCBS7605V	SIGMA-ALDRICH

%0.9 İZOTONİK		
Histostain Kit		
AEC	001122	ThermoFisher
FuGene HD	E2311	Promega
MDC		
Akridin turuncusu		
GVA MOUNT	308225	Invitrogen

7.5 KULLANILAN ANTIKORLAR

Kullanılan antikolar Tablo 4’de verilmiştir.

Tablo 4. Kullanılan antikolar.

ADI	KATALOG NO	FİRMA ADI
Bim	2933	Cell Signaling Technology
Bax	610982	BD Biosciences
Kaspaz9	9505	Cell Signaling Technology
SiklinB1	4138	Cell Signaling Technology
SiklinD3	2936	Cell Signaling Technology
SiklinA2	4656	Cell Signaling Technology
CDK6	13331	Cell Signaling Technology
CDK4	12790	Cell Signaling Technology
P21 Waf1/Cip1	2947	Cell Signaling Technology
P27 Kip1	3686	Cell Signaling Technology
mTOR	2983	Cell Signaling Technology
Fosfo-mTOR(Ser2448)	2971	Cell Signaling Technology
Fosfo-mTOR(Ser2481)	2974	Cell Signaling Technology
Fosfo-Akt (Ser473)	4060	Cell Signaling Technology
Fosfo-PDK1(Ser241)	3438	Cell Signaling Technology
Akt (Pan)	4691	Cell Signaling Technology
LC3A/B	12741	Cell Signaling Technology

SQSTM1/p62	39749	Cell Signaling Technology
β -catenin	8480	Cell Signaling Technology
Vimentin	5741	Cell Signaling Technology
Kesilmiş Kaspaz-3	9661	Cell Signaling Technology
Kesilmiş PARP	5625	Cell Signaling Technology
Claudin-1	13255	Cell Signaling Technology
E-cadherin	3195	Cell Signaling Technology
N-cadherin	13116	Cell Signaling Technology
Slug	9585	Cell Signaling Technology
Snail	3879	Cell Signaling Technology
SAPK/JNK	610627	BD Biosciences
p-SAPK/JNK (Thr183/Tyr 185)	612541	BD Biosciences
p70s6k	611261	BD Biosciences
Fosfo-p70s6k (Thr389)	9234	Cell Signaling Technology
Calreticulin	12238	Cell Signaling Technology
p-AMPK(Thr172)	2535	Cell Signaling Technology
Grp78/BiP	3177	Cell Signaling Technology
Ulk-1	6439	Cell Signaling Technology
AMPK α	5832	Cell Signaling Technology
Fosfo-Ulk-1(Ser555)	5869	Cell Signaling Technology
Beclin-1	3495	Cell Signaling Technology
Bcl-2	15071	Cell Signaling Technology
Atg3	3415	Cell Signaling Technology
Atg5	12994	Cell Signaling Technology
Atg7	8558	Cell Signaling Technology
Atg12	4180	Cell Signaling Technology
PAO		
SSAT	61586	Cell Signaling Technology
ODC	sc-398116	Santa Cruz BioTechnology

AZ		
AZI		
GFP	2955	Cell Signaling Technology
CHOP	2895	Cell Signaling Technology
Fosfo-eIF2 α (Ser15)	3398	Cell Signaling Technology
β -aktin	12620	Cell Signaling Technology
GAPDH	8884	Cell Signaling Technology
SQSTM1	ab56416	Abcam
β -aktin 488	8844	Cell Signaling Technology
Ki67	14-5698-82	ThermoFisher Scientific
Cytokeratin18	MA5-15458	ThermoFisher Scientific

8 ÖZGEÇMİŞ



1. Adı Soyadı: Kaan ADACAN

İletişim Bilgileri:

Adres: İstanbul Kültür Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, MOBİGEN 34156 Bakırköy-İstanbul

Telefon: 0534 577 59 57

E-posta: kaanadacan@gmail.com

2. Doğum Tarihi: 3.11.1992

3. Ünvanı: Yüksek Lisans Öğrencisi

4. Öğrenim Durumu:

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	İstanbul Kültür Üniversitesi	2011-2016
Y. Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	İstanbul Kültür Üniversitesi	2016-2019

5. Yayınlar

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

1. Kaan Adacan, Pınar OBakan-Yerlikaya, Elif Damla Arısan, Ajda Çoker-Gürkan, Resul İsmail Kaya, Narçın Palavan-Unsal. "Lack of Atg5 expression does not impair epibrassinolide-induced autophagy in MEF cells, endoplasmic reticulum stress as a

- candidate regulator”. 2019 (Araştırma makalesi, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, gönderildi)
2. Obakan-Yerlikaya P, Arisan ED, Coker-Gurkan A, Kaan Adacan Utku Ozbey Berna Somuncu Didem Baran Narcin Palavan-Unsal. Calreticulin is a fine tuning molecule in epibrassinolide-induced apoptosis through activating endoplasmic reticulum stress in colon cancer cells. *Molecular Carcinogenesis*. 2017 Jan 23. doi: 10.1002/mc.22616. (Araştırma makalesi)

6. Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

1. Pınar OBakan-Yerlikaya, Kaan Adacan, Elif Damla Arisan, Ajda Çoker-Gürkan and Narçın Palavan-Ünsal. “Epibrassinolide Treatment Caused Autophagy or Apoptosis Decision in a Time-Dependent Manner through ER Stress in Colon Cancer Cells” *Nutrients Proceedings*, 2017, 1(10), 986; doi:10.3390/proceedings1100986
2. Adacan, K, Yerlikaya, PO, Arisan, ED, Gurkan, AC, Unsal, NP. Endoplasmic reticulum stress is activated after epibrassinolide treatment leading autophagy in wild type and Atg5-/- mouse embryonic fibroblasts: a survival mechanism in nonmalignant cells. *FEBS JOURNAL*, Volume: 284 Pages: 369 Supplement: 1 Special Issue: SI Meeting Abstract: P.4.3.B008, EP 2017
3. Nebiler, E, Adacan, K, Arisan, ED, Gurkan, AC, Yerlikaya, PO, Unsal, NP. Orlistat is a fatty acid synthase (FASN) inhibitor caused the modulation of AMPK and lipogenesis signaling axis in PC3 prostate cancer cells but not in PNT1A prostate epithelial cells. *FEBS JOURNAL*, Volume: 284 Pages: 369 Supplement: 1 Special Issue: SI Meeting Abstract: P.4.3.B008, EP 2017
4. Kaan Adacan, Pinar OBakan Yerlikaya, Elif Damla Arisan, Ajda Coker-Gurkan, Narcin Palavan-Unsal. Epibrassinolide controls poliamin levels to induce autophagy in Mouse Embryonic Fibroblasts, 4th International Conference on Poliamins: Biochemical, Physiological and Clinical Perspectives, September 4-9, 2016, Rome-Italy

5. Kaan Adacan*, Pinar OBakan, Elif Damla Arisan, Ajda Coker-Gurkan, Narcin Palavan-Unsal. EBR induced autophagy in colon carcinoma cell lines. 41st FEBS Congress, September 03-08, 2016. Kusadası, Turkey
6. K. Adacan, P. OBakan, E. D. Arisan, A. Coker-Gurkan, N. Palavan-Unsal, “EBR induced autophagy in colon carcinoma cell lines”, 40th FEBS Congress, The Biochemical Basis of Life, P09-015, p:110, 4-9 July, 2015, Berlin, Germany.
7. Pinar OBakan, Kaan Adacan, Elif Damla Arisan, Ajda Coker-Gurkan, Narcin Palavan-Unsal. “Poliamin metabolism is involved in EBR induced autophagy in DLD-1 and SW480 colon carcinoma cell lines” Gordon Research Seminar: “Role of Poliamins in Biology and Disease”, June 13-14, 2015, Waterville Valley, NH, USA.

7. Ulusal ve Uluslararası Projeler

- Epibrassinolidin Kolon Kanserine Karşı Anti-Tümöral Etkisinin SCID Fare Ksenograft Modelinde Gösterimi (*TÜBİTAK1002, Proje no: 117Z727, 2018-2019, Bursiyer*)
- Epibrassinolid ve(ya) roskovitin’in potansiyel GSK3b inhibitörü olarak Caenorhabditis elegans modelinde moleküler hedeflerinin terapötik açıdan incelenmesi (*COST Action BM1408 (GENIE), Proje no: 115Z037, 2015-2018, Bursiyer*)
- “Epibrassinolidle Tetiklenen Hücre Ölümünün Endoplazmik Retikulum Stresi İle İlişkisinin Kolon Kanseri Hücre Hatlarında Araştırılması” (*3001-TÜBİTAK Başlangıç Ar-Ge Projeleri Destekleme Programı, 113Z845, 2014-2016, Lisans öğrencisi gönüllü çalışan*)

8. Ödüller ve Sertifikalar

SERTİFİKALAR

Haziran 2014, Uluslararası geçerliliği bulunan Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası

9. Katıldığı Bilimsel Kongre/Seminer/Sempozyum ve Bilimsel Toplantılar

- Tüp Bebek Uygulamalarında Etik ve Hukuki Yaklaşımlar Çalıştayı, Katılımcı, 2017
- II. Kök Hücre Temelli Tedavilerde Güncel Yaklaşımlar Çalıştayı, Katılımcı, 2016

- “Kök Hücre Temelli Tedavilerde Güncel Yaklaşımlar”, 18 Aralık 2015, İstanbul Kültür Üniversitesi, İstanbul-Türkiye (Katılımcı)
- Nanotechnology and Tissue Engineering: Current Challenges and Future Prospects, Bilimsel Toplantı MOBİGEN, Harvard Üniversitesi ve Massachusetts Institute of Technology (MIT) İşbirliği, 20-21 Aralık 2013, İstanbul-Türkiye (Katılımcı)
- 2nd Meeting on Nanotechnology and Tissue Engineering: Current Challenges and Future Prospects, 19-20 Aralık 2014, İstanbul-Türkiye (Katılımcı)
- DNA Hasarı, Onarımı ve Hastalıklarla İlişkisi, MOBİGEN DNA OKULU, 16-18 Nisan 2013, (Katılımcı)
- 42 FEBS, 2017
- 4th International Conference on Polyamines: Biochemical, Physiological and Clinical Perspectives, September 4-9, 2016, Rome-Italy
- 41st FEBS Congress, September 03-08, 2016. Kusadası, Turkey
- 40th FEBS Congress, The Biochemical Basis of Life, 2015, Berlin, Germany.

SAYI: HDK-2017/14
KONU: ACU-HADYEK 2017/13 sayılı başvurunuz

23.03.2017

Sn. Yrd. Doç. Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA

ACU-HADYEK 2017/13 sayılı "**Epibrassinolidin kolon kanserine karşı anti-tümöral etkisinin SCID (Severe Combined Immunodeficiency) fare ksenograft modelinde gösterimi**" isimli projeniz Acıbadem Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun **20.03.2017** tarihli **33.** toplantısında incelenmiş ve etik olarak uygun bulunmuştur.

ACU-HADYEK 2017/13 sayılı karar ektedir.



Prof. Dr. Güldal SÜYEN

Acıbadem Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı



ACIBADEM ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
KARAR FORMU

BAŞVURU TARİHİ: 20.03.2017	KARAR TARİHİ: 20.03.2017																																								
BAŞVURU SAYISI: 2017/13	KARAR SAYISI: 2017/13																																								
<p>İstanbul Kültür Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi'nden Yrd. Doç. Dr. Pınar Obakan Yerlikaya'nın yürütücüsü olduğu "Epibrassinolidin kolon kanserine karşı anti-tümöral etkisinin SCID (Severe Combined Immunodeficiency) fare ksenograft modelinde gösterimi " isimli proje başvurusu Acıbadem Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun "20.03.2017" tarih ve "33" sayılı toplantısında görüşülmüş ve etik açıdan</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Uygun <input type="checkbox"/> Düzeltilmesi Gerekir <input type="checkbox"/> Koşullu Olarak Uygun <input type="checkbox"/> Uygun Değil</p> <p>olarak değerlendirilmiştir.</p>																																									
<table border="1"><thead><tr><th>Kurul Üyesi</th><th>İmza</th><th>Karara Katılıyorum</th><th>Karara Katılmıyorum</th></tr></thead><tbody><tr><td>Prof. Dr. Güldal Süyen (Başkan)</td><td></td><td>(X)</td><td>()</td></tr><tr><td>Prof. Dr. Serap Arbak (Başkan Vekili)</td><td></td><td>(X)</td><td>()</td></tr><tr><td>Prof. Dr. İsmail Hakkı Ulus</td><td></td><td>(X)</td><td>()</td></tr><tr><td>Prof. Dr. Alp Bayramoğlu</td><td></td><td>()</td><td>()</td></tr><tr><td>Prof. Dr. Yeşim Işıl Ülman</td><td></td><td>(X)</td><td>()</td></tr><tr><td>Yrd. Doç. Dr. Devrim Öz Arslan</td><td></td><td>(X)</td><td>()</td></tr><tr><td>Yrd. Doç. Dr. Figen Demir</td><td></td><td>()</td><td>()</td></tr><tr><td>Sabiha Turgut Genç</td><td></td><td>()</td><td>()</td></tr><tr><td>Vet. Hek. Samed Özer (Sekreter)</td><td></td><td>()</td><td>()</td></tr></tbody></table>	Kurul Üyesi	İmza	Karara Katılıyorum	Karara Katılmıyorum	Prof. Dr. Güldal Süyen (Başkan)		(X)	()	Prof. Dr. Serap Arbak (Başkan Vekili)		(X)	()	Prof. Dr. İsmail Hakkı Ulus		(X)	()	Prof. Dr. Alp Bayramoğlu		()	()	Prof. Dr. Yeşim Işıl Ülman		(X)	()	Yrd. Doç. Dr. Devrim Öz Arslan		(X)	()	Yrd. Doç. Dr. Figen Demir		()	()	Sabiha Turgut Genç		()	()	Vet. Hek. Samed Özer (Sekreter)		()	()	
Kurul Üyesi	İmza	Karara Katılıyorum	Karara Katılmıyorum																																						
Prof. Dr. Güldal Süyen (Başkan)		(X)	()																																						
Prof. Dr. Serap Arbak (Başkan Vekili)		(X)	()																																						
Prof. Dr. İsmail Hakkı Ulus		(X)	()																																						
Prof. Dr. Alp Bayramoğlu		()	()																																						
Prof. Dr. Yeşim Işıl Ülman		(X)	()																																						
Yrd. Doç. Dr. Devrim Öz Arslan		(X)	()																																						
Yrd. Doç. Dr. Figen Demir		()	()																																						
Sabiha Turgut Genç		()	()																																						
Vet. Hek. Samed Özer (Sekreter)		()	()																																						