CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ * FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GELDANAMYCİN UYGULANMIŞ KOLON KANSERİ HÜCRE DİZİNLERİNDE APOPİTOZİS MEKANİZMASININ ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zeynep KASAR

Anabilim Dalı : Kimya

Programı : Biyokimya

MANİSA 2013

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ * FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GELDANAMYCİN UYGULANMIŞ KOLON KANSERİ HÜCRE DİZİNLERİNDE APOPİTOZİS MEKANİZMASININ ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zeynep KASAR

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 30/07/2013

Tezin Savunulduğu Tarih : 16/09/2013

Tez Danışmanı : Doç.Dr. Funda KOSOVA
Diğer Jüri Üyeleri : Prof.Dr.Zeki ARI
Doç.Dr.Ayşe DİNÇER

MANİSA 2013

İÇİNDEKİLER..……..……..……..III
ŞEKİL LİSTESİ ……..……..……..……..……..IV
ÇİZELGE LİSTESİ ……..……..……..……..……..……V
KISALTMALAR LİSTESİ…….……..……..……..……..VI
TEŞEKKÜR…..……..……..……..……..……..VII
ÖZET…… ..……..……..……..VIII
ABSTRACT……IX
1.GİRİŞ…..……..……..1
2.GENEL BİLGİLER.....……..……..2
2.1.KOLON….....2
2.2.KOLOREKTAL TÜMÖRLER……..…….....……..……..3
2.3.APOPİTOZİS...……..……..……..……..……..……..3
2.3.1.Apopitozisin Safhaları……..……..……..……..……..……..4
2.3.1.1.Sinyal Safhası.....4
2.3.1.2.Hazırlık Safhası.....4
2.3.1.3.Ölüm Safhası.....4
2.4. APOPİTOZİS MEKANİZMASININ MODÜLATÖRLERİ.....6
2.4.1.Bcl-2 Ailesi Proteinler.....6
2.4.2.Sitokrom c.....6
2.4.3.Apaf-1.....7
2.4.4.P53 Geni.....7
2.5. APOPİTOZİS MEKANİZMASININ EFEKTÖRLERİ.....7
2.5.1.Kaspazlar.....7
2.6.APOPİTOZİSİN OLUŞUM YOLLARI……..……..……..8
2.6.1.Mitokondriyal Yol…….....……..……..……..……..8
2.6.2.Ölüm Reseptörleri Yolu.…….....……..……..……..……..9
2.6.3.Endoplazmik Retikulum Aracılıklı Yol.....10
2.7.KOLON KANSERİ VE APOPİTOZİS İLİŞKİSİ.....10
2.8.ISI ŞOK PROTEİNLERİ.....11
2.9.GELDANAMİSİN...……..……..……..……..12
3.GEREÇ VE YÖNTEM…….....……..……..……..……..13
4.BULGULAR……..……..……..……..……..16
5.TARTIŞMA……..……..……..……..……..……..20
6.SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....23
7.KAYNAKLAR……..……..……..……..24

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.Kalın bağırsağın başlıca bölümleri……..……..2
Şekil 2.Apoptotik süreç ve hücrede meydana gelen değişiklikler…….……..6
Şekil 3: İnternal apoptozis mekanizması ……...9
Şekil 4.Ölüm reseptörleri ve mitokondri aracılıklı apopitozis ve hücrede meydana gelen değişiklikler...……10
Şekil 5.Colo 205 kolon kanseri hücre dizinlerinde semikonfluent ve konfluent olmuş hücreler……..16
Şekil 6: Colo 205 Kolon kanseri hücre dizinine 17AAG etkisinin MTT analizi ……..……..17
Şekil 7. TUNEL yöntemine göre hücrelerin görüntüleri……..17
Şekil 8. Colo 205 Kolon kanseri hücre dizinlerine 17-AAG etkisinin TUNEL yöntemine göre apopitosiz analizi……..18
Şekil 9.Colo 205 kolon kanseri hücre dizininde 17AAG tedavisinin RT-PCR analizi ile apopitotik faktörler Bcl–2, Apaf–1, Kaspaz–9 değerleri üzerine etkisi……..…....19
Şekil 10. Colo 205 kolon kanseri hücre dizininde 17AAG tedavisinin RT-PCR analizi ile apopitotik faktör Sitokrom C değerleri üzerine etkisi……..…….19

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 1. Apopitozis mekanizmasının önemli üyeleri ……5

Çizelge 2. COLO 205 kolon kanseri hücre dizinlerinde 17 AAG tedavisi sonrasında RT-PCR analizi ile apopitotik faktörlerin expresyon değerleri…….....…….18

KISALTMALAR LİSTESİ

APAF 1	Apoptotik Proteaz Aktivasyon Faktörü
BCL 2	Anti-apoptotik protein. İlk defa insan 'B-cell lymphoma'larında bulunmuştur.
DMEM	Dulbecco's modifiye Eagle's medyum
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
FADD	Fas bağımlı ölüm domaini
FasL	Fas ligandı
FCS	Fötal sığır serumu
HSP 90	Heat Shock Protein (Isı Şok Proteini)
17 AAG	17-ali amino-17-dimetoksi geldanamisin
Kaspaz 9	Sistein aspartik asit spesifik proteaz 9
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol -2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide
PBS	Fosfat tamponu içeren %0,9 NaCl
RT PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction(Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
TNF	Tümör Nekroz Faktör
TRADD	TNFR-1 bağımlı ölüm domaini
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyltransferase-biotin nick end-labelling

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, 2011-012 numaralı proje olarak Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir.

Yüksek lisans eğitimim süresince yardım ve desteğini esirgemeyen, değerli bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, danışman hocam Sayın Doç.Dr. Funda Kosova'ya,

Tezin deneysel aşamasındaki emeklerinin yanında her konuda yardımcı olan Sayın Prof. Dr. M.İbrahim Tuğlu'ya ve Sayın Doç. Dr. Feyzan Özdal Kurt'a,

Yardımlarından ve katkılarından dolayı Sayın Prof. Dr. Zeki Arı'ya, Sayın Prof. Dr. Şule Gök'e ve arkadaşım Tuba İmren'e,

Bugüne gelinceye kadar her zaman yanımda olan sevgili aileme teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Zeynep KASAR

ÖZET

Kanser; hücrenin çoğalmasını, farklılaşmasını, sağ kalımını denetleyen kritik genlerde meydana gelen değişikliklerden kaynaklanan hastalıktır. Kanser ve apoptosise, hücre popülasyon dinamiğinde karşılıklı olgu olarak sık sık rastlanmaktadır. Kontrolsüz hücre proliferasyonunun yanında azalmış apoptozis kolon kanseri gelişimine katkı sağlamaktadır.

Geldanamisin, anti-kanserojen etki gösteren, benzokinon ansamisin antibiyotiktir. Isı şok proteinleri, ısı stresine yanıt olarak sentezlenen, hücresel homeostaziyi düzenleyen, hücrenin sağ kalımını artıran, moleküler şaperonlardır. HSP–90 hücre koruyucu özelliğinden dolayı programlı hücre ölümünün (apopitozisin) gerçekleşmesini engelleyen ısı şok proteinidir.

Çalışmamızda, geldanamisin deviresi olan 17–AAG'nin, kolon kanseri hücre dizini Colo–205 kültüründe apopitozis üzerine etkilerini araştırmak için, öncelikle MTT yöntemiyle hücrelerin canlılık ve çoğalma özelliklerini, ardından TUNEL yöntemiyle apopitotik hücre oranı belirlemeyi, daha sonra 17-AAG'nin apopitozis sinyal yolu üzerindeki etkisi için, mitokondriyal yolun anahtar proteinleri olan sitokrom-c, bcl–2, kaspaz–9, APAF–1 ekspresyonlarına RT PCR yöntemiyle incelemeyi amaçladık.

17-AAG uygulaması sonrasında MTT analizleri ile hücre çoğalmasının durduğu ölümün gerçekleştiği, RT-PCR gen ekspresyonlarına bakıldığında ise Sitokrom c, Apaf–1, kaspaz 9 proteinlerin ekspresyonu istatistiksel olarak belirgin şekilde artarken ($p<0,05$), Bcl–2 ekspresyonun ise istatistiksel olarak belirgin şekilde azaldığını ($p<0,05$) gördük.

Dolayısıyla, 17AAG uygulaması kolon kanseri tedavisinde katkı sağlayabilecek ajan olarak gözükmektedir. Bu konuyla ilgili daha fazla çalışmalarla da bu bulguların desteklenmesi yararlı olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Apopitozis, Hücre Kültürü, 17-AAG, Sitokrom c, Kaspaz 9, Bcl 2, Apaf–1

ABSTRACT

Cancer is a disease caused from the changes in the critical genes that control cell proliferation, differentiation, survival. Cancer and apoptosis are often seen in the cell population dynamics as mutually case. Uncontrolled cell proliferation and decreased apoptosis contribute to the development of colon cancer.

Geldanamycin is a benzoquinone antibiotic ansamisin that showing the anti-cancer effect. HSPs are molecular chaperones that synthesized in response to heat stress, regulate cellular homeostasis and improve overall survival of the cell. HSP90 is heat shock protein that impeding the realization of programmed cell death in cells due to the its protective nature.

In our study we aimed to examine the effects of 17-AAG, on Colo–205 colon cancer cell line index to investigate culture on apoptosis, primarily the method of MTT viability and growth characteristics of the cells, and then the TUNEL method to identify apoptotic cell ratio. Then the effect of 17-AAG on apoptosis on the signal path, the path key mitochondrial proteins, cytochrome c, bcl–2, caspase–9, apaf–1 expression in RT PCR method were evaluated.

After the implementation of 17-AAG, with MTT analysis, cell proliferation stopped and death occurred. When RT-PCR is analyzed, gene expression in cytochrome c, apaf–1, caspase–9 increased in a statistical manner ($p < 0.05$) and Bcl–2 expression significantly decreased in a remarkable way ($p < 0.05$).

Therefore, 17AAG application seems to be an agent that may contribute to the treatment of colon cancer. More studies on this topic would be useful for supporting these findings.

Keywords: Apoptosis, cell culture,17-AAG, cytochrome c,caspase 9,Bcl 2, Apaf–1

1.GİRİŞ

Kanser; hücrenin çoğalmasını, farklılaşmasını ve sağ kalımını denetleyen kritik genlerde meydana gelen değişikliklerden kaynaklanan bir hastalıktır. Hücrelerin sürekli ve kontrolsüz çoğalması kanserin gelişmesine neden olan temel değişikliktir (Tömekçe 2008). Çeşitli kontrol mekanizmalarının denetiminden kurtulan hücreler çoğalmalarına devam ederek, sıra dışı büyüyen anormal hücre kitlesinin oluşmasına neden olmaktadırlar (Tisdale 2002).

Kanser ve apopitozise, hücre popülasyon dinamiğinde karşılıklı olgu olarak sık sık rastlanmaktadır (Wei ve ark, 2001). Apopitozisin başlaması ve ilerlemesinde önemli görev alan sinyal proteinleri şaperon olarak isimlendirilirler. Isı şok proteinleri, hücresel homeostazın düzenlenmesinde ve hücrenin hayatta kalmasında moleküler şaperon olarak fonksiyon görürler (Sreedhar and Csermely,2004). Bir ısı şok proteini olan HSP–90, apopitozisin kritik kontrol noktalarında farklı proteinlerle etkileşerek düzenleyici rol oynar ve hücre koruyucu özelliğinden dolayı apopitozisi önler (Parcellier ve ark, 2003). HSP90'ın çeşitli ajanlarla inhibisyonu, mitokondri membranında depolarizasyona yol açarak apopitozisin başlatılmasında önemli rol oynayan sitokrom c'nin sitozole salınımına neden olur (Piner 2009). HSP 90 inhibitörlerinden geldanamisin ve türevleri, apopitozisi indükleyici etkiye sahiptirler. Geldanamisin ve türevlerinin, farklı kanser türlerinde apopitozis sinyal mekanizmaları üzerine etkileri incelenmiş fakat kolon kanseri üzerinde az sayıda çalışma yapılmıştır.

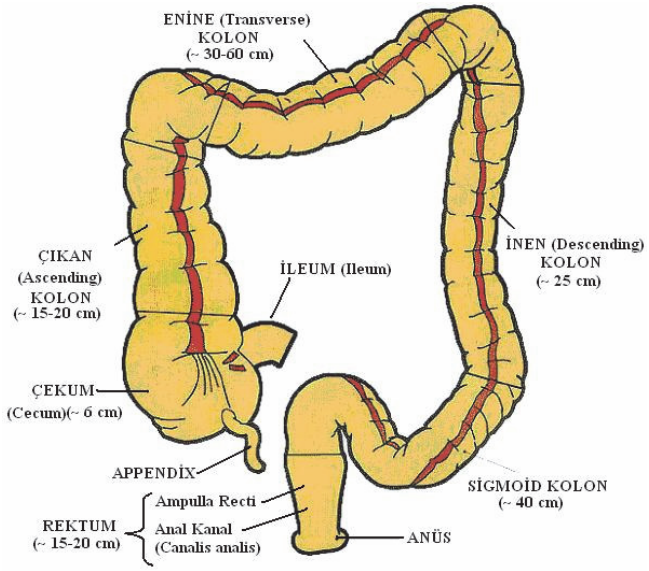
HSP–90 inhibitörlerinin pek çok tümörde mitokondriyal yol aracılıklı apopitozisi indüklediği gösterildiği için, bu çalışmamızda geldanamisin türevlerinden 17 AAG'nin apopitozis sinyal yolu üzerindeki etkisini, mitokondriyal yolun anahtar proteinleri olan sitokrom-c, kaspaz–9, APAF–1, Bcl 2 ekspresyonlarına bakarak incelemeyi amaçladık.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.KOLON

Kalın bağırsak, ileumun bitiminden anüse kadar sindirim kanalının 1/5'ini oluşturur, ortalama 150 cm uzunluğundadır ve çekum, çıkan kolon, transvers kolon, inen kolon, sigmoid kolon ve rektum bölümlerinden oluşur (Pehlivan 2008). Kalın bağırsağın en uzun bölümü kolondur. Kolon yaklaşık beş cm kalınlığında veya çapında kaslı tüp yapısındadır (Durhan 2006). Kolonun ilk parçası çekumdur, boy ve genişliği 6–8 cm olan keseleşmiş bir organdır. Çıkan kolon 15 cm dir, enine kolon (transverse) kalın bağırsağın en uzun parçasıdır (45 cm) bunu takip eden kısım, inen kolondur 25 cm uzunluğundadır. Sigmoid kolon, kalın bağırsağın en dar kısmıdır ve rektuma açılır (Akpınar 2006). Sigmoid kolondan sonraki 8–15 cm lik ekstraperitoneal kolon kısmı ise rektum olarak isimlendirilir (Erden 1991).Kalın bağırsak, karın boşluğunun yanları, üst ve alt kısımlarında bulunur ve ince bağırsakları içine alan bir çerçeve oluşturur (Çiftlikçi 2002).

Kalın bağırsağın başlıca görevi depolama, emilim, taşıma, salgılamadır ve kolondan su, sodyum, klorür, sakkaroz ve laktoz emilir (Pehlivan 2008). Kalın bağırsak, mikroflora metabolizması ile alınan gıdaların yıkılması, su ve elektrolitlerin emilmesi, semisolid maddelerin depolanması, mikrofloral metabolizma ile alınan materyallerin yıkılması ve feçesin rektum ve anüse doğru ilerletilmesiyle görevlidir (Akpınar 2006).



Şekil 1. Kalın bağırsağın başlıca bölümleri

2.2.KOLOREKTAL TÜMÖRLER

Tümör, normal dokuların gelişmesini aşan, onlara uyum göstermeyen ve kendisini oluşturan uyaranın yok olması durumunda bile büyümeye devam eden anormal doku kitlesidir (Durhan 2006). Tümör hücrelerine kanser denebilmesi için malign (habis, kötü huylu) özellik göstermeleri yani kontrolsüz büyümeleri, komşu dokuları istila etme özelliğine sahip olmaları gerekmektedir. Tümörler başka dokulara yayılmıyorlarsa kanseröz değildirler ve bu durumda, benign (iyi huylu) tümör olarak adlandırılırlar.

Polip, kolon veya rektum hattında dokunun büyümesiyle oluşan lezyondur (Durhan 2006). Kolon ve rektum birbirlerine çok yakın olmalarından dolayı bu iki organın kanserleri kolorektal kanser terimi altında birlikte tartışılır (Akpınar 2006). Kolorektal tümörler, histopatolojik olarak hiperplastik polip, adenomatöz polip ve karsinom tip olmak üzere 3'e ayrılırlar. Hiperplastik polipler benign, adenomatöz polipler malignite potansiyeli olan, adenokarsinomlar ise malign tümörlerdir (Türktekin 2009). Hastaların kolonoskopi ile yapılan kontrolleri sırasında, bu polipler bağırsak epitelinde görülmektedir (Türktekin 2009).

Kolon kanseri en çok görülen kanser türleri arasında üçüncü sırada yer alır (Tisdale 2002). Kolon kanserinden ölüm oranı, erkeklerde akciğer ve prostat kanserinden sonra kadınlarda ise meme kanserinden sonra en fazla görülen ölüm oranıdır (Saygılı 1997) Amerika da her yıl 130.000 kişiye kolon kanseri tanısı konmakta, bunlardan 50.000 ine yakını ölümle sonuçlanmaktadır (Türktekin 2009).

2.3.APOPİTOZİS

Gelişmiş organizmalarda gereksinim duyulmayan ve/veya fonksiyonu bozulan hücrelerin çevreye zarar vermeden kontrollü ve programlı ölümüne apopitozis denir (Duranyıldız ve diğerleri,2004). Kerr, Wyllie ve Currie, 1972 yılında yayımladıkları bir makalede o tarihe kadar fazla tanımlanmamış ve nekrozdan farklı morfolojik özellikler taşıyan bir hücre ölüm şeklini tarif etmişler ve bu olayı apoptosis olarak adlandırmışlardır (Kerr ve ark, 1972). Apoptosis sözcüğü Yunanca kökenli bir sözcüktür. Kerr, Wyllie ve Currie, programlı hücre ölümünü tanımlamış ve bu fizyolojik olayı Yunan mitolojisinde sonbahardaki yaprakların dökülmesine benzeterek, apo (ayrı) ve ptozis (düşme) kelimelerini birleştirerek apoptosis olarak isimlendirmişlerdir (Douglas ve ark, 1994).

Apoptozisin genetik düzenlenmesi hakkındaki bilgiler Caenorhabditis elegans ile yapılan ayrıntılı incelemeye dayanmaktadır. 1986'da Robert Horvitz, C.elegans'ta normal embriyogenez ve hücre ölümü için en az 3 genin gerekli olduğunu göstermiştir. Ced-3, Ced-4 ve Ced-9 adı verilen bu genler olmadan apoptoz görülmediği ve gelişme olmadığı gözlemi Dr. Horvitz'e 2002'de Nobel ödülü kazandırmıştır (Çolakoğulları 2007).

Apopitozis, enerji bağımlı, evrimsel süreçte genler tarafından kontrol edilen programlanmış fizyolojik bir süreçtir, belirli fizyolojik ve morfolojik değişimlerle karakterize edilir. Morfolojik değişimler; nükleer kondensasyon, hücre büzülmesi, membran şişmesi gibi değişimleri kapsarken, fizyolojik değişimler; spesifik endonükleazlarla DNA'nın fragmentlerine parçalanması, kaspazların aktivasyonu sonucu proteinlerin sindirilmesini kapsamaktadır (Sreedhar and Csermely, 2004).

Apopitozisin oluşumu, ölüm sinyali, kromatinde sıkışma, hücrede parçalanma, yutulma (fagositoz) şeklinde özetlenebilir. Apoptosis oluşurken meydana gelen değişiklikler şu şekildedir;

1. Hücreler hacim kaybeder ve büzüşür.
2. Hücre yüzeylerinde küresel kabarcıklar oluşur.
3. Fosfotidilserin isimli fosfolipid hücreden dışarı çıkar.
4. Stoplazma yoğunlaşır; mitokondri, sitokrom-C gibi apoptosisi uyaran faktörleri serbestleştirerek bütünlüğünü kaybeder ve parçalanır.
5. Kaspazlar aktive olur.
6. Kromozomal DNA'lar kendi içinde 180- 200 bp'lik internükleozomal fragmanlara ayrılarak parçalanır (Gültekin ve diğerleri, 2008).

Apopitozis, organizmanın normal işleyişi sırasında görülen ve düzenli olarak sürmesi gereken bir tür hücre ölüm şeklidir. Hızlanmış veya yavaşlamış apoptosis hastalık belirtisi olabilir. Apopitosisin gereksiz yere oluştuğu veya hızlandığı hastalıklara, AIDS, nörodejeneratif hastalıklar, insüline bağımlı tip diabet örnek verilebilirken apoptosisin yavaşladığı hastalıklara otoimmün hastalıklar ve kanser örnek verilebilir (Ulukaya 2003).

2.3.1. Apoptozisin Safhaları

Apopitozis, oldukça düzenli bir süreçtir ve temelde kaskad zincirini takip eden başlangıç uyarılarına tepkidir, dolayısıyla, 3 evreye ayrılabilir: (1) başlatma aşaması (ya da sinyal faz), yüzey ölüm reseptörlerinin (özellikle tümör nekroz faktör (TNF) ailesi üyelerinin), mitokondriyal yol veya diğer uyaranlar tarafından apoptosisin başlatılmasını içerir.(2) sinyal iletim fazı (veya hazırlık safhası), burada başlatıcı kaspazlar ve bazı kinazlar / fosfatazların aktivasyonu yer alır; ardından (3) ölüm fazı, efektör kaspaz aktivasyonunu içermektedir (Türktekin 2009).

2.3.1.1. Sinyal safhası

Apopitosisin başlangıç safhasıdır**.** TNF(tümör nekroz faktör) gibi ölüm reseptörlerinin aktivasyonunu içeren başlangıç evresi, mitokondrial yolu veya diğer uyarıcılarla hücre ölümünün başlamasını içerir. Ölüm reseptörlerinin aktive edilmesiyle apopitosisin başlaması için sinyal verilmiş olur.

2.3.1.2. Hazırlık safhası

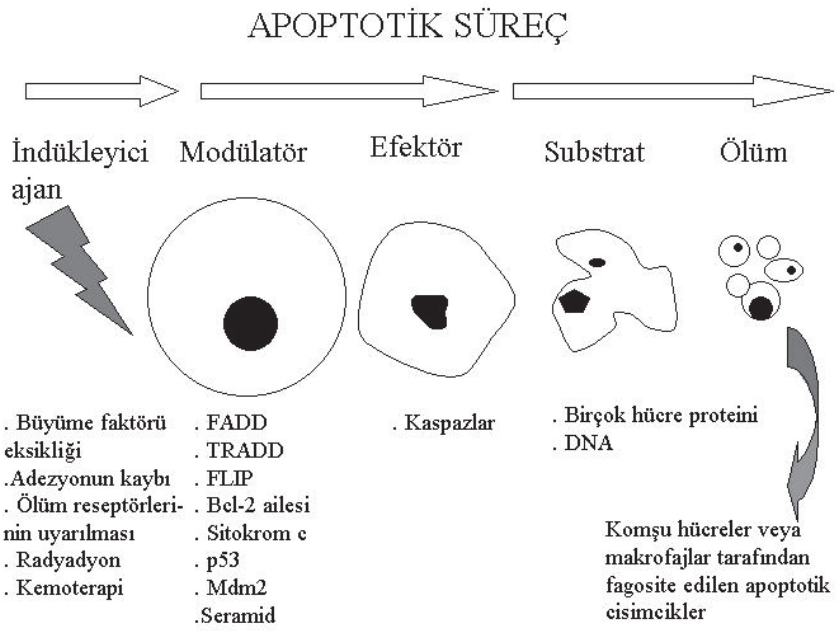
Programlı hücre ölümünün aktive edildiği ve belirli kinazlar /fosfatazın meydana geldiği, sinyalin enerjiye dönüşme evresidir.

2.3.1.3. Ölüm safhası

Etkili kaspazların aktivasyonunu içeren uygulama aşamasıdır (Thornberry and Lazebnik, 1998). En son basamak olan ölüm safhası, apoptozis membran şişmesi ve fosfotidilserinin membrandan dışarı çıkması gibi hücre morfolojisindeki belirgin değişimler ile karakterize edilir (Martin ve ark, 1995).

Çizelge 1. Apopitozis mekanizmasının önemli üyeleri (Sreedhar and Csermely)

A.Sinyal Faz	
Ölüm reseptörleri	
Fizyolojik değişiklikler	ROS, Ca+2, JNK/SAPK aktivasyonu
Proteaz aktivitörleri	granzimler, calpains, katepsinler, proteazom
B. Hazırlık Fazı	
Başlatıcı kaspazlar	Kaspaz-8, 9,10,12
Fizyolojik değişiklikler	Bax, ROS, MMPT, stokrom c, apoptozom
Nükleazlar	AIF, endonükleaz G, PARP
C. Ölüm Fazı	
Efektör kaspazlar	Kaspaz-3, -6, -7
Fizyolojik değişiklikler	membran şişmesi, DNA parçalanması



Şekil 2. Apoptotik süreç ve hücrede meydana gelen değişiklikler (Ulukaya E.)

Apopitozise yol açan nedenler, büyüme faktörü eksikliği, hücre yaşlanması “Senescence”, kanser ilaçları, radyasyon, yüksek doz glukokortikoid, Fas veya TNFR–1 reseptörlerinin aktivasyonu, oksidatif stres gibi nedenlerdir.

2.4.APOPİTOZİS MEKANİZMASININ MODÜLATÖRLERİ

2.4.1.Bcl–2 Ailesi Proteinler

Apopitozis mekanizmasının en önemli modülatörlerinden biri Bcl- 2 ailesi proteinlerdir. Bcl–2 (B-cell leukemia–2) ailesinin adı, Bcl–2 onkogeninden gelmektedir.

Mitokondri aracılıklı programlı hücre ölümünde oldukça önemli olan Bcl-2 ailesi proteinleri apoptosiste tetikleyici (pro-apoptotik) ya da engelleyici (anti-apoptotik) olarak görev alırlar.

Bcl–2 ailesi üyeleri 2 ana grup altında toplanabilir:

1. Anti-apoptotik Bcl–2 Proteinleri: Bcl-2 ile yapısal ve işlevsel olarak yüksek oranda benzerlik gösteren bu proteinlerin hepsi, hücre ölümüne karşıdır. Bu grubun üyeleri Bcl–2, Bcl-x, Bcl-2l2’dir (Tömekçe 2008).

2.Pro-apoptotik Bcl-2 Proteinleri: Bu proteinler, Bcl-2 ile daha az benzerlik gösterirler ve apoptosisi uyarıcı özelliğe sahiptirler. Bax, Bcl-Xs, Bak, Bid, Bad pro- apoptotik üyelerdendir (Tömekçe 2008).

Bu ailenin üyeleri kendi aralarında homo veya hetero-dimerler oluştururlar. Hücrenin yaşayabilirlik durumu bu ailenin proapoptotik ve anti-apoptotik üyelerinin rölatif oranına bağlıdır.

Bu oranın artması ya da azalması apoptozisin inhibisyonu veya aktivasyonu ile sonuçlanır (Ulukaya 2003).

Bcl–2 özellikle mitokondri dış membranında bulunmakta ve iyon transportunu düzenlemektedir (Ulukaya 2003). Bcl–2 onkogeni, apoptosisin inhibe edilmesiyle oluşan karsinogenezde önemli rol oynar (Saleh and Jacks, 1999). Bcl–2, hücreleri apoptosisten koruduğu belirlenen ilk gendir (Duranyıldız ve diğerleri,2004). Bu anti-apoptotik etkisini, mitokondriden sitokrom-c salınmasını ve buna bağlı olarak efektör kaspazların aktivasyonunu önleyerek gösterir (Goldstein ve ark, 2000). Bcl–2 seviyelerindeki azalma hücreleri apoptozise götürürken, artışı hücreleri ölümden korur (Duranyıldız ve diğerleri, 2004). Bcl–2'nin Bax ile olan etkileşiminde Bcl-2'nin oranının yüksek olması hücrenin yaşamını sürdürmesini sağlarken, Bax'ın daha fazla olması durumunda hücre ölüme gitmektedir (Pehlivan 2008).

2.4.2.Sitokrom c

Sitokrom c, mitokondri iç membranında bulunan elektron transport zincirine ait bir proteindir. Bcl 2 ailesine ait proteinler, sitokrom c'nin mitokondri membranından sitozole salınımını denetlerler. Bu salınım, hücre ölüm yolunu aktifleştirir. Son yıllarda anlaşılan önemiyle apoptosis sürecinde merkezi bir konuma oturmuştur. Mitokondri aracılıklı apoptosisin meydana gelmesinde önemli rol oynar. Sitokrom c'nin mitokondriden sitoplâzmaya salıverilmesi apoptosis yoluna girmiş bir hücrede geri dönüşümsüz bir döneme girildiğini işaret eder (Thornberry ve ark, 1998).

Sitokrom c, sitozole salındıktan sonra, sitozolik apoptotik proteaz aktivasyon faktörü–1 (Apaf–1) ve pro-kaspaz–9 ile apoptozom oluşturmak üzere birleşir (Li ve ark, 1997).Prokaspaz–9 bu kompleks içinde etkinleşerek kaspaz–9'a dönüşür ve kaspaz 9, kaspaz 3 ve 7'yi etkinleştirir. Böylece hücre ölümü gerçekleşir (Tömekçe 2008).

2.4.3.Apaf-1

Apaf-1, sitozolik proteaz aktivasyon faktörüdür. Mitokondri aracılıklı apoptosisin meydana gelmesinde görevlidir. Apaf-1, sitokrom-c ve prokaspaz-9 ile birleşerek apoptozom oluşturur. Prokaspaz-9 etkinleşerek kaspaz-9'a dönüşür. Kaspaz-9'un diğer kaspazları aktive etmesiyle apoptosis meydana gelir. Apaf-1'in indüksiyonu sitokrom c'nin mitokondriden salıverilmesi ile gerçekleşir. Sitokrom c, Apaf-1'in aktivatörüdür. Apaf-1'in oligomerizasyonu kaspaz-9 monomerlerinin biraraya getirilmesini sağlar. Böylece aktifleşen kaspaz-9, kaspaz-3'ü aktifleştirir (Ulukaya 2003).

2.4.4.P53 Geni

P53 geni DNA koruyucusu olarak görev yapar ve DNA hasarlarına karşı oluşan hücresel yanıtın önemli bir parçasıdır (Akpınar 2006). P53, bir tümör süpressör gendir. P53, hücrede DNA hasarı oluştuğunda, hasar onarılabilecek düzeyde ise hücre siklusunu G1 fazında durdurur ve hücreye DNA'sını tamir edebilmesi için zaman kazandırır. DNA hasarı tamir edilemeyecek kadar büyükse bu durumda p53 apoptosisi indükler. P53'ün apoptosisi indüklemesi Bcl-2/Bax

oranını değiştirmesi Bax'ın ekspresyonunu artırması yoluyla gerçekleşir (Ulukaya 2003). P53, Baxın miktarını artırarak hücreleri ölüme götürür.

2.5.APOPİTOZİS MEKANİZMASININ EFEKTÖRLERİ

2.5.1.Kaspazlar

Apopitozis gerçekleşirken hücreyi parçalayan yani apoptotik morfolojinin oluşumunu sağlayan etkenler efektörler olarak bilinirler. Kaspazlar, apopitosisin efektörüdürler. Kaspazlar, bir düzineden fazla proteaz içeren, etkin yerlerinde sistein içerdikleri ve substratları konumundaki proteinleri, aspartik asitten sonra kestikleri için bu ismi (caspases = cysteine aspartic acid-specific proteases) almışlardır (Tömekçe 2008). Kaspazlar, sistein proteazlardır ve aspartik asitten sonraki peptid bağını kırarlar (Ulukaya 2003).

Kaspazlar, etkin olmayan öncüller (prokaspazlar) olarak sentezlenir ve proteolitik olarak birbirlerini aktifleştirirler (Tömekçe 2008,Gültekin 2008). Başlatıcı kaspazın etkinleşmesi kendisinden sonraki diğer kaspazların etkinleşmesini ve hücre ölümünü sağlayan bir zincirleme tepkimeyi, kaspaz kaskadını başlatır (Tömekçe 2008). Kaspazlar, başlatıcı, etkileyici, inflamatuvar olmak üzere üç ana grupta sınıflandırılırlar (18).

Kaspazlar üç kategoride incelenirler:

a) Başlatıcı kaspazlar (kaspaz–2,8, 9,10)

b) Etkileyici kaspazlar (kaspaz–3,6, 7)

c) İnflamatuvar kaspazlar (diğerleri) (Gültekin 2008)

Başlatıcı kaspazlar, apopitotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini etkileyici kaspazlara iletirler. Etkileyici kaspazlar ise ilgili proteinleri parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar (Ulukaya 2003). Ölümü gerçekleştiren etkileyici kaspazlardır. Etkileyici kaspazlar, başlatıcı kaspazların akışını aktive ederler.

Apoptotik programın merkezi bileşeni kaspazlardır (Pehlivan 2008). Apoptosisi aktive eden sinyaller tarafından tetiklenip, apoptosisin her üç yolunda da (mitokondriyal, ölüm reseptörleri, endoplazmik retikulum aracılıklı) aktif olarak görev alırlar (Ozawa ve ark 2002,Zhang ve ark 1997).

Mitokondriyal yol, başlatıcı kaspaz-9'un aktivasyonunu içerir. Kaspaz-9, bağlayıcı protein olan Apaf-1'in oligomerize olması, kaspaz-9 monomerlerinin bir araya getirilmesini sağlar. Böylece aktifleşen kaspaz-9 da etkileyici kaspazlar, kaspaz -3,-6,-7'yi aktive eder (Kerr ve ark,1972). Ölüm reseptörleri yolunda ise, TNF'nin indüklediği hücre ölümü, başlatıcı kaspazlar, kaspaz -8 ve -10 un aktivasyonunu içerir. Daha sonra bu kaspazlar, etkileyici kaspazları, kaspaz -3, -6 ve -7 aktive ederler.

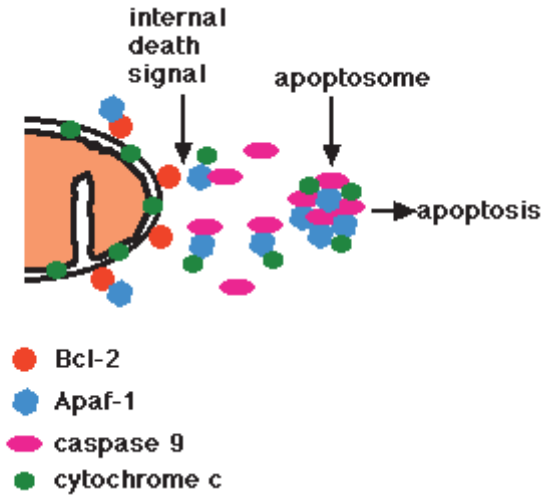
Kaspazlardaki defektler otoimmun hastalıklara, kanser ve bazı nörolojik bozuklukların oluşumuna katkıda bulunabilir(Kidd ve ark 2000,Norberg ve ark 2010).

2.6.APOPİTOZİSİN OLUŞUM YOLLARI

Apopitotik hücre ölümü farklı sinyal ileti mekanizmaları aracılığıyla uyarılabilmektedir. Bu sinyal ileti mekanizmaları: mitokondriyal yol (intrinsik), ölüm reseptörleri (ekstrinsik) yolu ve endoplazmik retikulum aracılıklı yoldur.

2.6.1.Mitokondriyal yol (Instrinsik)

Intraselüler ölüm sinyallerinin proapoptotik moleküllere iletilerek aktivasyonlarının sağlandığı süreçleri içerir (Lanneau ve ark,2008). Sitokrom c, sitosolik apoptotik proteaz aktivasyon faktörü–1 (Apaf–1) ve pro-kaspaz–9 ile apoptozom oluşturmak üzere birleşir (Li ve ark, 1997). Sitokrom c'nin mitokondriden sitozole salıverilmesi hücre ölüm yolunu etkinleştirir. Sitokrom c'nin salıverilmesini takiben, prokaspaz 9 ve Apaf–1 sitozolde bir araya gelerek "apoptozom" olarak adlandırılan bir kompleks oluşturur. Bu kompleks içinde prokaspaz 9 etkinleşerek kaspaz 9'a dönüşür ve kaspaz 9, kaspaz 3 ve 7'yi etkinleştirir. Böylece hücre ölümü gerçekleşir (Tömekçe 2008).



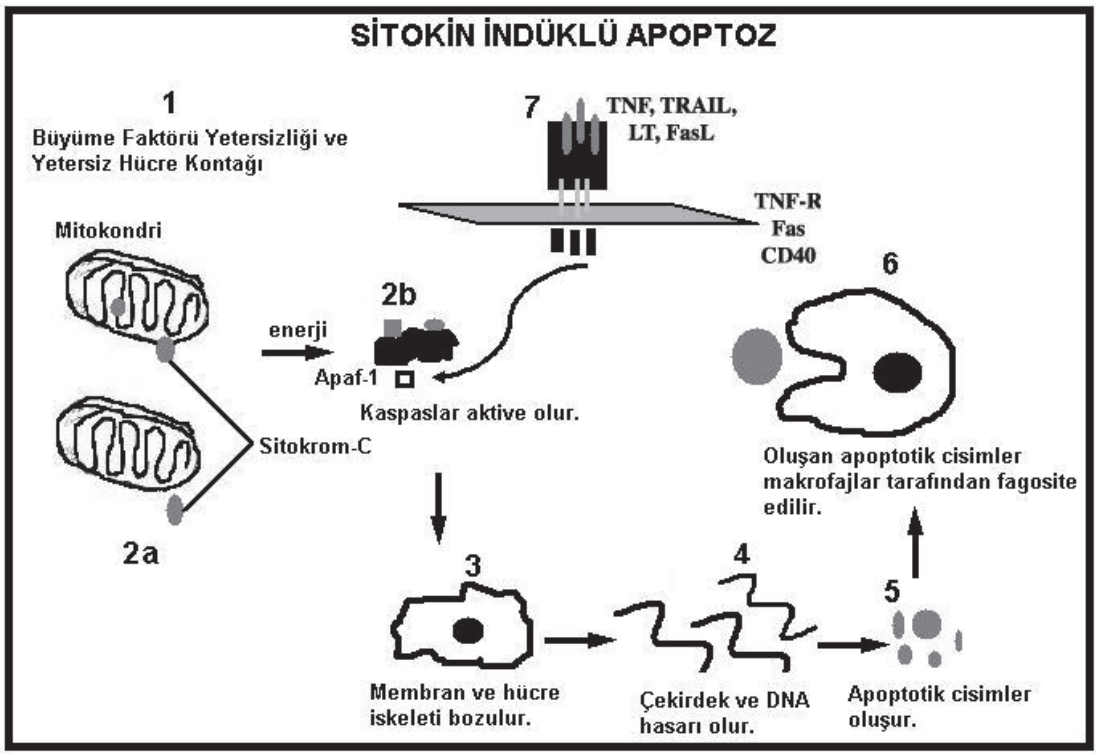
Şekil 3. İnternal apoptozis mekanizması (Tunalı M.)

Mitokondriyal yolun kontrolü, Bcl–2 ailesine ait pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerinin dengesine bağlıdır. Bcl 2 ailesine ait proteinler, sitokrom c'nin mitokondri membranından sitozole salınımını denetlerler. Sitokrom c, mitokondri iç membranında bulunan elektron transport zincirine ait bir proteindir. Son yıllarda anlaşılan önemiyle apoptozis sürecinde merkezi bir konuma oturmuştur. Bu yüzden de sitokrom c'nin mitokondriden sitoplâzmaya salıverilmesi apoptozis yoluna girmiş bir hücrede geri dönüşümsüz bir döneme girildiğini işaret eder (Thornberry and Lazebnik,1998).

2.6.2.Ölüm reseptörleri yolu (Ekstrinsik)

Apoptosisin dış sinyallerle tetiklendiği yoldur. Ölüm reseptörleri olarak bilinen tümör nekroz faktör (TNF) reseptör ailesinin plazma membran proteinlerine bağlanması ile tetiklenir (Luo 1998).Apoptosisin ölüm reseptörleri yolu, TNF ailesi hücre yüzey reseptörlerin kendileriyle

ilişkili apoptosis uyarıcı ligandlar (TRAIL), Fas ligantları ya da bazı malign ve normal hücrelerin kendilerine özgü reseptörleriyle birleşmesiyle gerçekleşir (Çolakoğulları 2007). Ölüm reseptörleri; TNF (Tumour Necrosis Factor) reseptör gen ailesine aittir. Bilinen altı tane ölüm reseptörü (CD95 (APO–1/Fas), TRAIL (TNFRelated Apoptosis-Inducing Ligand)-R1,TRAILR2, TNF-R1, DR3 ve DR6) vardır. Adaptör proteinler, reseptörle gelen sinyal sonucunda kaspazlara bağlanıp onları aktive ederler (Pehlivan 2008).Duyarlı ligandların bağlanmasıyla üç TNFR ya da Fas molekülü kompleks oluşturmak üzere bir araya gelir ve TNFR ve Fas trimerlerinin sitoplazmik bölümleri sırasıyla TRADD ve FADD/Mort-1adlı adaptör proteinlerine bağlanırlar. Reseptörlerin sitoplazmik kısımları, adaptör proteinler ve proteazlar bir "Ölüm İndükleyici Sinyal Kompleksi (DISC)"ni oluştururlar. Proteazların aktivasyonu apoptotik sinyali üretir(Çolakoğulları 2007).DISC, kaspaz–8'in doğrudan aktivasyonuna öncülük eder. Kaspaz–8' de kaspaz–3'ü aktive eder ve apoptozis oluşur (Li ve ark,1997).



Şekil 4.Ölüm reseptörleri ve mitokondri aracılıklı apoptosis ve hücrede meydana gelen değişiklikler (Altunkaynak ve Özbek)

2.6.3. Endoplazmik Retikulum Aracılıklı Yol

Endoplazmik retikulum, protein biyosentezinde ve katlanmasında, hücre içi kalsiyum dengesinin düzenlenmesinde önemli rol oynar. Hücre içi kalsiyum homeostazisinin bozulması ve intraluminal oksitadif çevresinin değişmesi da dahil olmak üzere çeşitli şartlar, ER'un stresini artırabilir ve apoptosise yol açabilir (Sreedhar and Csermely, 2004). Dış uyaranlar, hücre içinde Ca^{+2} artışına neden olabilir bununla birlikte cAMP gibi hücre içi ikincil habercileri aktive edilir. Bu da kaspaz kaskadına sebep olur ve apoptosisi başlatır (Öktem 2001). ER'un stresinin apoptozisin gelişimine etkisinin ne olduğunun tam olarak anlaşılamamasına rağmen, son çalışmalar, ER proteazlarının, kaspaz–7 ve -12 nin apoptosise katıldığını öne sürmektedir (Sreedhar and Csermely,2004).

2.7.KOLON KANSERİ ve APOPİTOZİS İLİŞKİSİ

Çoğu kanser türünde olduğu gibi kolon kanserinin gelişiminde de apoptosis önemli rol oynamaktadır. Kontrolsüz hücre poliferasyonunun yanında azalmış apoptosis de kolon kanseri gelişimine katkı sağlamaktadır. Apoptosisin azalması pek çok faktörle ilişkili olabilmektedir. Kolon kanseri gelişimi de bu faktörlerle ilişkili olduğu bilinen çok basamaklı bir süreçtir (Durhan 2006).

Protoonkogenlerde değişiklikler, tümör baskılayıcı genlerin aktivasyonlarındaki kayıplar, kolon kanseri gelişimine yol açan değişiklikler olarak kabul edilmektedir. Örneğin, bir tümör baskılayıcı gen olan P53 geninde meydana gelen mutasyonların çeşitli kanser türlerine sebep olabildiği gibi kolon kanserine de sebep olabileceği düşünülmektedir. P53 geni bir transkripsiyon aktivitörüdür. Mutasyona uğradığı ya da bulunmadığı zaman hücre apoptosise gidemez ve ömrü uzar (Pehlivan 2008). P53 apoptosis mekanizmasında Bcl 2 ve Bax proteinleri arasındaki oranı ayarlar. Tümör hücreleri anti-apoptotik proteinlerin aşırı yapımıyla ya da pro-apoptotik proteinlerin yapımlarının, azalmasıyla apoptosise dirençli bir nitelik kazanırlar (Solakoğlu 2009). Kolorektal kanserlerde p53 mutasyonunun belirlenmesi hastalığın prognozu açısından önemlidir. p53 mutasyonu taşıyan kolorektal kanser hastaları mutasyon taşımayanlara göre daha kötü bir hastalık seyrine ve kısa hayatta kalma oranına sahiptirler (Akpınar 2006).

Tümör dokusunda apoptotik hücre sayısının yaşayabilir hücrelere oranı belirlenebilmektedir ve bu oran, apoptozisin şiddetini belirtmektedir. Bu, tümörün tipini ve evresini belirlemede, tedaviye vereceği yanıtı önceden tahmin etmede ve prognozu saptamada yardımcı olabilmektedir (Öktem 2001).

Apoptosis mekanizmasının daha iyi anlaşılmasının, kolon kanserinin tedavisinde büyük ölçüde yarar sağlayacağı açık bir gerçektir.

2.8.ISI ŞOK PROTEİNLERİ

Isı şok proteinleri, genel olarak ısı stresine yanıt olarak sentezlenen bununla birlikte farmakolojik ajanlar, oksijen yetmezliği gibi değişik stresler altında da sentezlenen protein türüdürler (Öncel 2012,Akyol 2009). Isı şok proteinleri, hücresel homeostaziyi ve hücrenin sağ

kalımını düzenleyen moleküler şaperonlardır (Sreedhar and Csermely,2004). Hücre metabolizması kontrolünde önemli rol oynarlar. Proteinlerin katlanmasına yardım ederler, deforme proteinlerin atılmasını sağlarlar (Akyol 2009). Isı şok proteinleri, hücre siklusunun kısalması, apoptosisin inhibe edilmesi, mutant genlerin kararlılığının sağlanması ve immun sistemin indüklenmesi gibi mekanizmalarla kanser gelişimini etkilerler (Öncel 2012).

HSP90, hücre döngüsü, büyümesi, canlılığı, apopitosis, anjiyogenezis ve onkojenezis düzenlenmesinde önemli oynayan bir ısı şok proteinidir. HSP90, özellikle hücre yenilenmesi ve gelişiminde ekstraselüler sinyallere cevabın arttırılmasında görev almaktadır (Öncel 2012). Apopitozisin düzenlenmesinde karışık rollere sahip olan HSP90, hücresel koruyucu özelliklerinden dolayı apopitotik yanıtı inhibe etmektedir (Piner 2009). HSP90, farklı apopitotik proteinler ile etkileşerek apopitosisin kritik kontrol noktalarında düzenleyici rol oynar. HSP90, apopitosisin mitokondriyal yolla ilerlemesinde işlev görmektedir. HSP90, Apaf-1'in işlevini negatif yönde etkiler ve Apaf-1'e doğrudan bağlanır, prokaspaz–9 ile oligomerizasyonunu engeller (Pandey ve ark, 2000). Apaf 1, prokaspaz 9 ve sitokrom c ile birleşemezse apoptosis meydana gelemez ve hücre yaşamaya devam eder. HSP90'nın çeşitli ajanlarla inhibisyonu, apoptosisin meydana gelmesini yani hücrenin programlı olarak ölümünü sağlar.

2.9.GELDANAMİSİN

Geldanamisin, tümör hücrelerinde aktivite gösteren antikansorejen bir ilaçtır ve HSP90 inhibitörüdür. HSP90'nın şaperon fonksiyonunu engelleyerek, anti-kanserojen etki gösteren, bir benzokinon ansamisin antibiyotiktir (Supko ve ark,1995). Geldanamisinin kristal yapısının HSP90'nın N terminal kısmına bağlandığı kanıtlanmıştır (Fukuyo ve ark, 2010).Biyokimyasal ve yapısal çalışmalar, geldanamisinin özellikle HSP 90a bağlanarak onun şaperon fonksiyonunu engellediğini kanıtlamıştır (Chen ve ark, 2009).

Geldanamisin deriveleri 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) ve 17-dimethylaminoethylamino–17-demethoxygeldanamycin (17-DMAG), HSP90'nın fonksiyonunu inhibe eden kemoteropatik ilaçlardır (Nakagawa ve ark,2000). Geldanamisin derivelerinden 17-AAG ile ilgili faz 1 klinik çalışmaları 1999 yıllında yapılmış olup yüzlerce yetişkin ve pediatrik onkoloji hastalarında kullanılmıştır (Evan and Littlewood,1998). HSP 90 inhibitörü 17AAG, günümüzde meme ve diğer tümörlerde antikanserojen olarak faz II klinik çalışmalarına girmiştir (Lawen 2003).

Kanser hücreleri, HSP-90'nın yüksek ekspresyonlarıyla ilişkilidir ve farmakolojik etkisine karşı oldukça duyarlıdırlar çünkü çoğu sağ kalım ve büyüme proteini HSP 90'nın şaperon fonksiyonuna bağlıdır (Grem ve ark,2005). HSP–90 inhibitörleri ile onkojenik sinyallerin bloke edilmesi sonucu kolon kanser hücrelerinin metastatik davranışlarının azaltıldığı gösterilmiştir (Shivapurkar ve ark, 2003).

3.GEREÇ ve YÖNTEM

Geldanamisin derivesinin uygulanması

Geldanamisin derivesi olan 17-AAG stok solüsyonda 10 mM olacak şekilde DMSO içinde çözülerek stok solüsyonu hazırlandı. Daha sonra hazırlanan bu stok solüsyondan 1, 0,25, 0,06, 0,015, 0,007 ug/ml farklı dozlarda 17-AAG tedavi amacıyla kanser hücre dizilerine uygulandı.

Hücre Kültürü

Bu çalışmada kullanılan olan kolon karsinoma hücre dizisi Colo 205, DMEM F–12, %10 FCS, %1 L-glutamine ve %1penisilin-streptomycine içeren kültür ortamında 37°C'de ve 5% CO2'li inkübatörde kültüre edildi. Hücrelerin üremesi her 2 günde bir morfolojik olarak faz kontrast ataçmanlı inverted mikroskopta (CK40-F200, Olympus, Japonya) incelendi ve mikrofotografi ile görüntülendi. Konfluent olan hücrelerden pasaj yapılarak hücrelerin çoğaltılması sağlandı. Hücreler daha sonra 96 gözlü platlere 45000 ml/hücre olacak şekilde aktarıldı. Hücreler yüzeye tutunup üremeleri gözlendikten sonra 17-AAG stok solüsyonu 1, 0,25, 0,06, 0,015, 0,007 ug/ml farklı dozlarda hücrelere ilave edildi. 48 saat sonra hücre proliferasyonu ve sitotoksisitesi, kolorimetrik bir test yöntemi olan MTT ile değerlendirildi. Aynı şekilde hazırlanmış hücreler için Apoptotik hücre varlığı TUNEL yöntemi ile gösterildi.

MTT

Bu hücrelerin mitokondriyel fonksiyonları, canlı hücre yoğunluğu kolorimetrik bir test yöntemi olan MTT testi ile belirlendi. Bu test, sarı, suda çözünebilen MTT boyasının aktif mitokondrilerdeki elektron akımı yoluyla mor formazan ürünlerine dönüşmesini ölçmektedir. Hücre kültürünün üretme vasatı boşaltıldı. Buzdolabında muhafaza edilmekte olan MTT stok solüsyonu (50g MTT+ 10ml PBS) hazırlandı. Daha sonra hazırlanan MTT stok solüsyonundan (1ml MTT stok solüsyonu + 9ml üretme vasatı) olacak şekilde MTT çalışma solüsyonu hazırlandı. MTT çalışma solüsyonundan 100µl/kuyucuk miktarda eklendi ve 4 saat inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda MTT solüsyonu boşaltılıp, dimetil sülfoksit (DMSO) eklendi. Daha sonra 570 nm'de, 690 nm referans filtreye karşılık mikroplaka okuyuculu spektrofotometrede ölçüm yapıldı. DMSO eklenmesinin sebebi, oluşan formazan kristallerinin çözülmesini sağlamaktır.

TUNEL

Bu teknik için DeadEnd Colorimetric TUNEL system kiti (G7130, Promega, USA) kullanıldı. Hücreler 15 dakika %4'lük paraformaldehit ile 10 dakika muamele edildikten sonra, 10 dakika 20-µg/ml proteinase K ile inkübe edilerek 3 defa 5'er dakika tampon solüsyonu ile yıkandı. İkinci kez %4'lük paraformaldehit 5 dakika uygulanıp yıkandıktan sonra, tampon solüsyonu ile 5 dakika yıkanan hücreler TdT-enzimi solüsyonu ile 37oC de 1 saat inkübe edildi. 10 dakika %22 NaCl ve % 11 sodyum sitrat içeren solüsyon ile (SSC) uygulanan hücrelere tampon solüsyonu ile yıkama yapıldıktan sonra endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dakika %3'lük H2O2 (TA–015-HP, Lab vision, Fremont, CA) uygulandı. Ardından tampon

solüsyonu ile oda sıcaklığında 10 dakika yıkanan hücreler anti-streptavidin-peroksidaz enzimi ile 30 dakika inkübe edildi. Tampon solüsyonu ile yıkanan hücreler TUNEL reaksiyonunun görünürlüğünü saptamak amacıyla diaminobenzidine (DAB) ile boyandı. Hücreler, 3 defa 5 dk distile su ile yıkandı. Distile su ile yıkama işleminden sonra kapatma solüsyonu (Histomount mounting solution) ile kapanarak mikroskopta incelendi.

RNA İzolasyon Protokolü

Hücreler flasklardan tüplere alındı. Kaldırma işlemi, Tripure isolation reagent ile yapıldı. Flasktaki hücrelere Tripure isolation reagent eklendi ve kazıma işleminden sonra tüplere konuldu. Çalışmada kontrol grubu ve 17 AAG uygulanmış grup olmak üzere iki tür hücre kullanıldı. Tripure reagent etkisiyle hücreler pembe renk aldı. Hücreler sonra 3000 rpmde 30 sn santrifüj edildi.

Daha sonra hücreler alt kısmında beadsler bulunan özel ependorf tüplerine alındı. MAGNA Lyser homojenizatörde 3000 rpm de 30 sn dödürüldü. Böylece tüpteki beadslerin de yardımıyla hücreler homojen görünüm alarak parçalandı.

Homojenizatörden çıkarılan tüpler soğutma bloğuna alındı ve 5 dk bekletildi. Bu işlem, homojenizatördeki hızın etkisiyle ısınan tüplerin soğutulması için yapıldı. Tüpler 5 dk oda ısısında bekletildi. Daha sonra tüplere 200 mikrolitre kloroform eklendi, 5 dk bekletildi ve 12000 rpm de 4 Cde 20 dk santrifüj edildi. Kloroform homojen hale gelen hücrede faz oluşumunu sağlamak için kullanıldı. Bu işlem sonucunda DNA, RNA ve protein kısım olmak üzere 3 faz elde edildi.

1.Faz (sulu faz) ; RNA içerir, renksizdir.

2.Faz ; DNA içerir, beyazdır.

3.Faz (organik faz) ;protein içerir, kırmızıdır**.**

RNA izolasyonu için 500 mikrolitre renksiz olan 1.faz tüplere alındı. Üzerine 500 mikrolitre izopropanol eklendi. İzopropanol RNA yı DNA ve diğer safsızlıklardan arındırmak için kullanıldı, nükleik asitlerin çökmesini sağladı. Oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi. 12000 rpm de 4 Cde 10 dk santrifüj edildi. Oluşan çökelek üzerine 1ml % 75'lik etanol eklendi. 12000 rpm de 4 Cde 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant atıldı. 57 C' de etanol uçuruldu. Kalan çökeleğe 50–100 mikrolitre RNAaz free su eklenerek pipetaj yapıldı. Çökeleğin çözünmesi sağlandı.

DNA Sentezi

RNAaz free su eklendikten sonra hücrelerin absorbansı ölçüldü.

Her örnek için,

9,4 mikrolitre RNA+H2O

2 mikrolitre Random hexamer primer ile toplam 11,4 mikrolitre karışım hazırlandı. Bu karışım küçük tüplere alındı ve pipetaj yapıldı. Daha sonra tüpler thermalcycler a yerleştirildi. 65 ^{o}C'de 10 dk inkübe edildi. RNA'lar denatüre edildi, varsa sekonder yapıları açılmış oldu.

Bu arada mastermix hazırlandı. Mastermix, Reaksiyon Buffer, Protector RNase Inhibitor, Deoxynucleotide Mix, Transkriptör Reverse Transkriptaz enziminden oluşmaktadır.

Her örnek için,

4 mikrolitre reaksiyon buffer

2 mikrolitre DNTP

1 mikrolitre DTT

1,1 mikrolitre enzim

0,5mikrolitre RNAse inhibitör olmak üzere toplam 8,6 mikrolitre mastermix hazırlandı. Hazırlanan mastermix (8,6 mikrolitre) thermalcyclerdan alınan örneklere (11,4 mikrolitre) eklendi ve pipetaj yapıldı. cDNA örneklerinin final hacimleri 20µl e tamamlandı. Sonra, tüpler thermal cycler a yerleştirildi ve aşağıdaki programa göre çalıştırıldı.

55 ^{o}C 'de 30 dk

85 ^{o}C'de 5 dk

Transkriptör Reverse Transkriptaz enzimi RNA'yı çift sarmal yani cDNA haline getirmektedir. 85 ^{o}C'de uygulama yapılmasının sebebi ise bu enzimi denatüre etmek içindir.

Real Time PCR Aşaması

Spesifik primer, elde edilen cDNA'lar ile reaksiyona girerek hedeflenen RNA ekspresyon düzeyini belirlemede kullanıldı. cDNA örneği, final hacmi 10 µl olacak şekilde, reaksiyon karışımı hazırlandı. Bu karışım distile su, primer prob mix, enzimden oluşmaktadır.

Her örnek için,

3,5 µl dH2O

0,5 µl primer prob mix

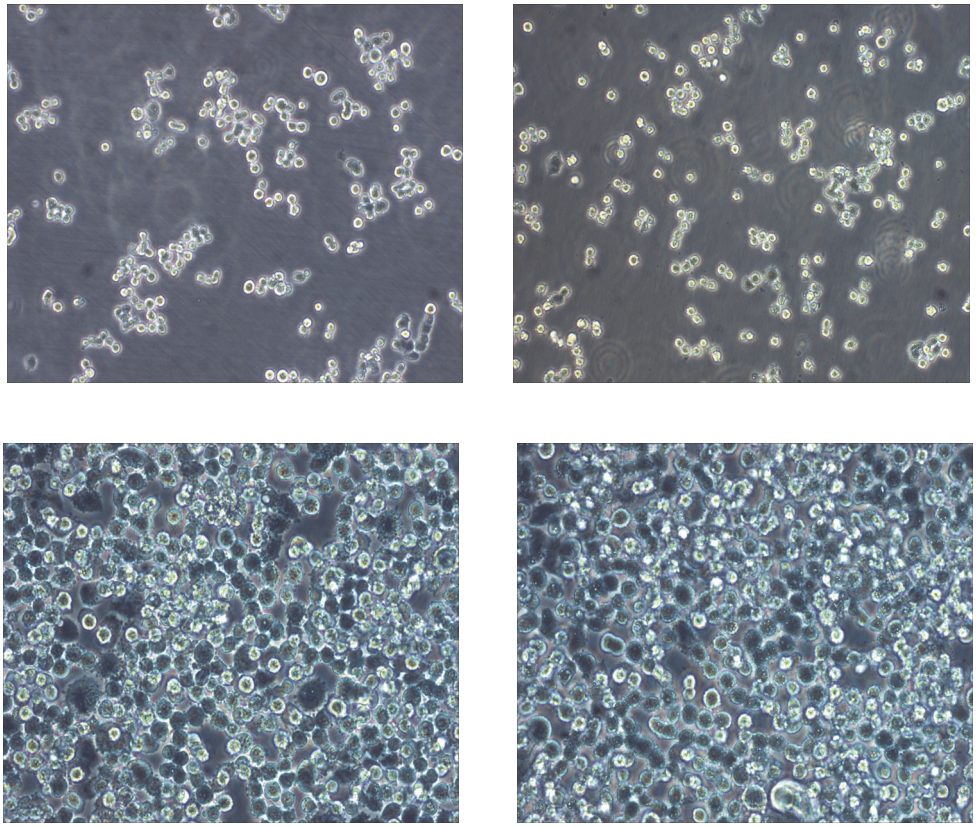
5 µl enzim olmak üzere 9 µl karışım elde edildi. Bu karışıma 1 µl cDNA örneği eklendi ve pipetaj yapıldı. Toplam karışım 10 µl ye tamamlandı. Reaksiyon karışımı, 96 kuyucuklu pleytin her bir kuyucuğuna 10µl olacak şekilde dağıtıldı ve PCR da okumaya verildi. 1 saat sonunda PCR da okuma işlemi gerçekleşti.

İstatiksel Yöntem

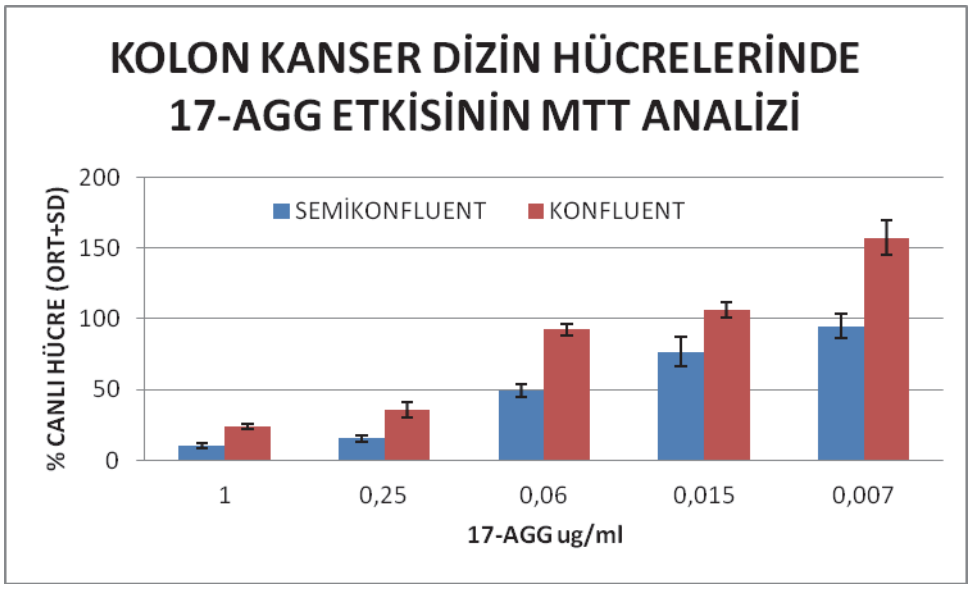
Deneylerden elde edilen verileri değerlendirmede SPSS 15.0 istatistik programı kullanıldı. Gruplar arası farkın anlamlılığı Mann Whitney-U testi ile değerlendirildi. Anlamlılık sınırı $p<0.05$ olarak kabul edildi.

4.BULGULAR

Kolon kanseri hücre hattımız Colo–205 ATCC firmasından getirtildi ve protokole uygun şekilde çözdürülerek flasklara alındı. Pasaj yapılan hücrelerin normal şekilde üredikleri saptandı ve MTT için yönlendirildi. Colo–205, kolon adenokarsinomunu taklit eden bir hücre dizinidir. Bu hücre dizininde hücreler küçük ve yuvarlak olarak gözlendi. Hücrelerin kültür tabağına yapışması geç ve değişik düzeylerde gerçekleşti. Yapışan hücrelerin dikensi çıkıntılar yaptıkları, yuvarlıklarını korudukları ve nadir olarak bipolar hale geçtikleri izlendi.

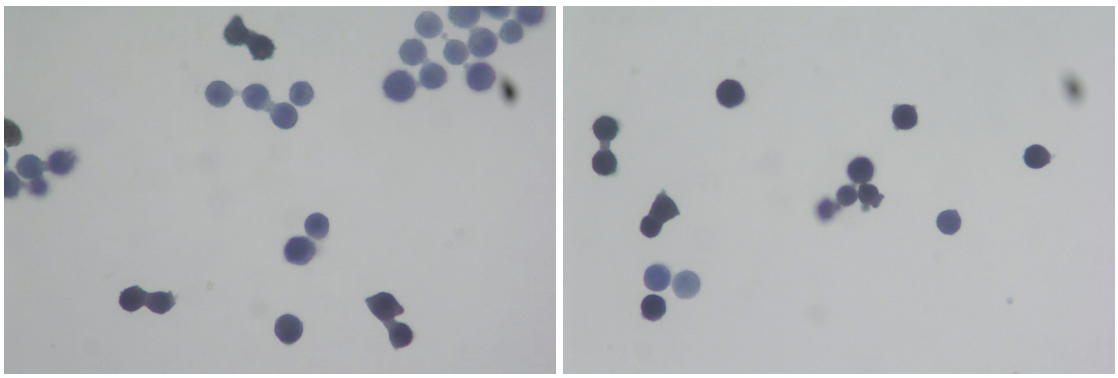


Şekil 5. Colo 205 kolon kanseri hücre dizinlerinde semikonfluent ve konfluent olmuş hücreler.



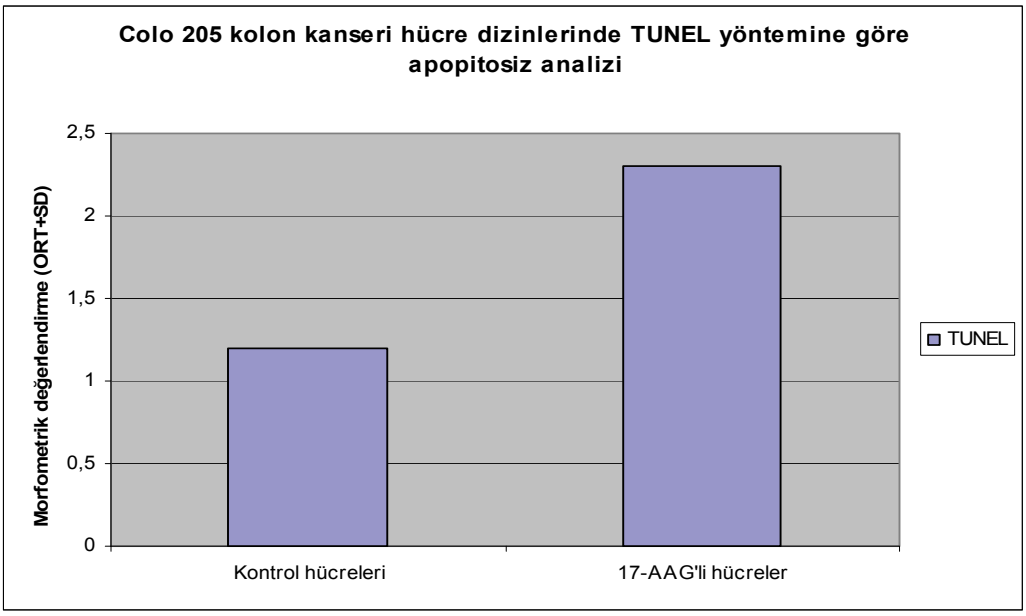
Şekil 6: Colo 205 Kolon kanseri hücre dizinine 17AAG etkisinin MTT analizi

17-AAG uygulaması sonrasında MTT analizi ile hücre çoğalmasının durduğu ve ölümün gerçekleştiği gözlendi. MTT analizinde hücrelerin yarısını öldüren ve çoğalmayı durduran 17-AAG dozunun 0,06 ile 0,25 ug/ml olduğu belirlendi (Şekil 6).



Kontrol hücreleri 17-AAG'li hücreler

Şekil 7. TUNEL yöntemine göre hücrelerin görüntüleri



Şekil 8. Colo 205 Kolon kanseri hücre dizinlerine 17-AAG etkisinin TUNEL yöntemine göre apopitosiz analizi

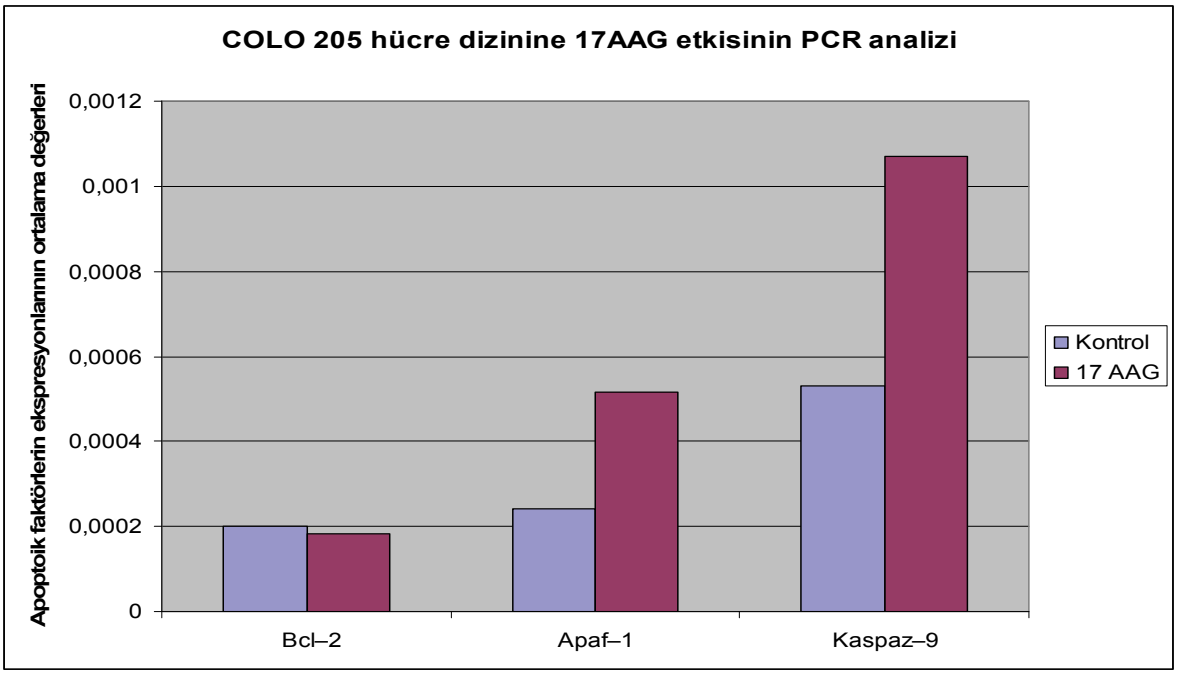
Hücre davranışının morfometrik incelenmesine göre 17-AAG uygulamasının oluşturduğu doz bağımlı toksik etki sonrasında hücrelerin apoptotik yola girdikleri saptandı (Şekil7). Yapılan TUNEL boyamalarında hücrelerin apopitotik oldukları immunohistokimyasal olarak da gözlendi. Hücrelerin toksik etkiye uğradıkları ve bazı hücrelerde kromatin kondensasyonu, bleb ve protrüzyonlar göstererek daha da küçüldükleri gözlendi.

Tablo 1. Colo 205 kolon kanseri hücre dizinlerinde 17-AAG tedavisi sonrasında RT-PCR analizi ile apopitotik faktörlerin expresyon değerleri

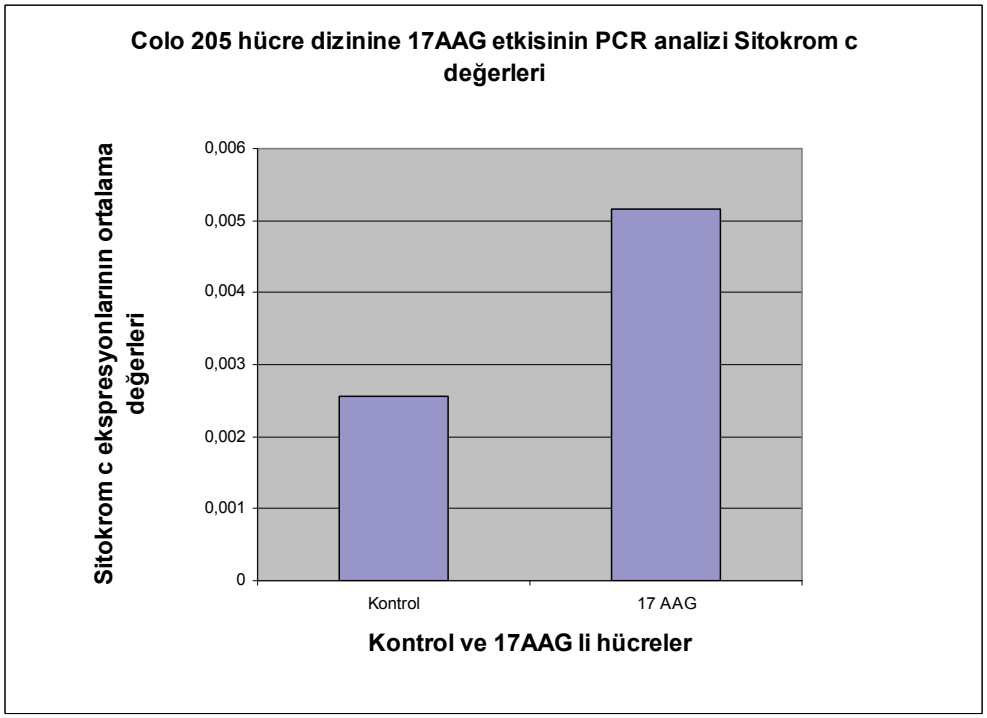
	Sitokrom c	Bcl–2	Apaf–1	Kaspaz–9
Kontrol	0,00255000	0.00020100	0,00024300	0,00053200
17-AAG	0,00517000[a]	0,00018400 [a]	0,00051600 [a]	0,00107000 [a]

[a]**:** Kontrole göre karşılaştırıldığında $p<0.05$

17-AAG ile tedavi dozu uygulanan ve uygulanmayan kolon kanseri hücre hatlarında, apoptozisin oluşumunda etkili olan sinyal proteinlerinin gen ekspresyonlarına RT-PCR analiziyle bakıldı (Tablo 1). Kolon kanseri hücre hattına 17-AAG ile tedavi dozu uygulandıktan sonra Sitokrom c, Apaf–1, kaspaz 9 proteinlerinin ekspresyon değerleri istatistiksel olarak belirgin şekilde artarken ($p<0,05$), Bcl–2 ekspresyon değerinin ise istatistiksel olarak belirgin şekilde azaldığı ($p<0,05$) görüldü (Tablo 1).



Şekil 9. Colo 205 kolon kanseri hücre dizininde 17AAG tedavisinin RT-PCR analizi ile apopitotik faktörler Bcl–2, Apaf–1, Kaspaz–9 değerleri üzerine etkisi



Şekil 10. Colo 205 kolon kanseri hücre dizininde 17AAG tedavisinin RT-PCR analizi ile apopitotik faktör Sitokrom C değeri üzerine etkisi

5.TARTIŞMA

Kolon kanseri, en sık rastlanan malignitelerden biridir, yıllık 1 milyon yeni vaka ve 600,000 den fazla ölüm tahminiyle dünya çapında kansere bağlı ölümlerin 3. sebebidir (He ve ark,2012). Kolon kanseri gelişimi pek çok faktörle ilişkili olduğu bilinen çok basamaklı bir süreçtir (Durhan ve diğerleri,2006). Tümör baskılayıcı genlerin aktivasyonlarındaki kayıplar, aşırı hücre proliferasyonu, azalmış apopitozis kolon kanseri gelişimine yol açan değişiklikler olarak kabul edilmektedir. Bu faktörler içinden apopitozis mekanizmasının bozulmasının, kolon kanseri gelişiminde önemli bir yere sahip olduğu düşünülmektedir.

Apopitozis, hücre-içi ve dışı sinyaller tarafından üç yolak üzerinden aktifleşen, pek çok protein tarafından regüle edilen, kontrollü ve programlı bir hücre ölüm sürecidir (Özkaya 2008). Kerr ve ark, (1972) apopitozisin, potansiyel kanser hücrelerinin ve tümör gelişiminin ortadan kaldırılması ile ilişki olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmamızda kolon kanseri hücre hattı, COLO 205'te apopitozisin indüklenmesiyle bu hücrelerin gelişiminin engellediği gösterildi. Benzer şekilde Watanapokasin ve ark, (2011) kolon hücre hattı COLO 205 üzerinde yaptıkları çalışmada, mitokondri ve ölüm reseptörleri aracılıklı apopitozisin artırılmasının bu hücrelerin gelişimini engellediğini göstermişlerdir. Diğer kolon kanseri hücre hatlarında yapılan çalışmalardan da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Hostein ve ark, (2001) çeşitli kolon kanseri hücre hatlarında (HCT116,HCT15,HT29) yaptıkları çalışma, apopitozisin indüklenmesinin kolon kanseri gelişimini azalttığını göstermektedir.

Çalışmamızda, bir geldanamisin derivesi olan 17-AAG'nin, kolon kanseri hücre hattında antikanser etkisinin araştırılması amaçlandı. 17–AAG'nin, kolon kanseri hücre dizini Colo–205 kültüründe apopitozis üzerine etkilerini araştırmak için, öncelikle MTT yöntemiyle hücrelerin canlılık ve çoğalma özellikleri incelendi, ardından TUNEL yöntemiyle hücrelerin apopitotik yola girdikleri belirlendi. Sonra 17-AAG'nin apopitozis sinyal yolu üzerindeki etkisi, mitokondriyal yolun anahtar proteinleri olan sitokrom-c, bcl–2, kaspaz–9, APAF–1 ekspresyonlarına RT-PCR yöntemiyle bakılarak incelendi. MTT analizinde hücrelerin yarısını öldüren ve çoğalmayı durduran 17-AAG dozunun 0,06 ve 0,25 ug/ml olduğu ve apopitozis göstergesi TUNEL boyamasının 17-AAG uygulaması ile arttığı saptandı.

Isı şok proteinleri, ısı stresine yanıt olarak sentezlenen, hücresel homeostazi ve hücrenin sağ kalımını düzenleyen moleküler şaperonlardır (Öncel 2012, Supko ve ark 1995, Sreedhar and Csermely 2004). Bu proteinler, kanser hücrelerinde çok fazla olup, apopitozisi engellerler ve sinyal proteinlerini anormal stabilize ederek tümör hücelerinin yaşamına katkıda bulunmaktadırlar (Richardson ve ark,2011). Bir ısı şok proteini olan HSP–90, hücresel koruyucu özelliklerinden dolayı apopitotik yanıtı inhibe etmektedir. Mitokondride bulunan HSP- 90, membran geçirgenliğini ve sitokrom c salınımını kontrol eder. HSP90'ın çeşitli ajanlarla inhibisyonu, mitokondri membranında depolarizasyona neden olur ve doz bağımlı sitokrom c salınımı gözlenir. Bu durum HSP90'nın, tümör hücrelerindeki mitokondrilerde şaperon işlevinin

inhibisyonuyla kanser tedavisinde kullanılması açısından önemlidir (Kang ve ark,2007). Hayvan modellerinde ve faz–1 araştırmalarında tedavi edilen hasta plazma örneklerinde Hsp–90 inhibitörü 17-AAG ile yapılan çalışmalar, kolon kanserinde anlamlı apopitotik ve sitostatik etkinliğe sahip olduğunu göstermiştir (Moser ve ark,2009). Kelland ve ark, (1999) 17-AAG'nin Hsp-90'nın şaperon fonksiyonunu engelleyerek, kolon kanser hücre hattı HT29 hücrelerinde apopitozisi indüklediğini göstermişlerdir.

Hsp-90'nın inhibisyonunda geldanamisin ve türevleri önemli bir yere sahiptir. 17AAG, literatüre geçen ilk HSP–90 inhibitörüdür. 17AAG, HSP–90'a bağlanır ve koruyucu özelliğini engelleyerek hücrelerde apopitozis meydana gelmesini sağlar. HSP90'nın fonksiyonunu engellerken onkojenik proteinleri azaltır, tümör hücresi proliferasyonunu engeller ve apopitozisi indükler (Chung ve ark,2003). Bu çalışmamız, 17AAG'nin kolon kanseri hücre hattında apopitozisi indüklediğini göstermektedir. Benzer şekilde Hostein ve ark, (2001) kolon kanseri hücre hatlarında (HCT116,HCT15, HT29) yaptıkları çalışma, 17-AAG'nin HSP-90'a bağlanarak, Raf–1 ve Akt gibi onkojenik proteinlerinin yıkımının sağlanmasıyla hücre döngüsünün durmasına ve apopitozise sebebiyet verdiğini göstermiştir. Clarke ve ark, (2000) kolon kanseri hücre hatlarında yaptıkları çalışma, 17AAG'nin Hsp-90'nın şaperon fonksiyonunu engelleyerek onkojenik proteinlerin yıkımını sağladığını ve sinyal iletimini engellediğini göstermektedir.

Apopitozis, kaspazlar tarafından yürütülen morfolojik değişikliklerle karakterize edilen ve Bcl–2 ailesi proteinler tarafından düzenlenen programlı hücre ölüm biçimidir (Diaz ve Li, 2003). Kanser hücreleri, pro-apoptotik Bcl–2 üyelerinin ekspresyonlarını azaltıp; anti-apoptotik Bcl–2 üyelerinin ekspresyonlarını artırabilirler (Manss ve ark, 2011). Bu protein ailesine ismini veren Bcl–2, anti-apopitotik bir proteindir. Bcl–2, mitokondri membranının dışında yer almasından ve sitokrom-c'yi mitokondrinin içinde tutmasından dolayı onun gardiyanı gibidir. Cohen-Saidon ve ark, (2006) HSP–90 ve Bcl-2'nin birbiriyle ilişkili olduğunu ve bu ilişkinin Bcl-2'nin optimal anti-apoptotik fonksiyonu için gerekli olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmaları, HSP–90 ve Bcl–2 ilişkisinin bozulmasının; Bcl-2'nin sitokrom-c nin mitokondriyal salınımını, kaspaz aktivasyonunu ve hücre ölümünü içeren anti-apoptotik etkisini engellediğini göstermiştir (Cohen-Saidon ve ark,2006). Watson ve ark, (1996) çalışmalarında anti-apoptotik Bcl–2 molekülünün ekspresyon seviyelerinin kolon kanserinin erken safhalarında arttığını belirtmektedirler. Çalışmamızda, kolon kanseri hücre hattına 17 AAG ile tedavi dozu uygulandığında Bcl–2 ekspresyonunun istatistiksel olarak azaldığı tespit edildi. Benzer şekilde başka kanser türlerinde yapılan çalışmalar, 17-AAG tedavisinin hücrelerde Bcl–2 değerinin azalmasına sebep olduğunu ya da tümör gelişimini engellediğini göstermiştir. Flandrin ve ark, (2008) akut myleoit lösemi hücrelerinde otonom büyümenin, Bcl–2 hücrelerde aşırı eksprese olsa bile 17AAG ile kolayca inhibe edildiğini göstermişlerdir. Ferrario ve ark, (2007) 17-AAG ile tedavi edilen meme kanseri hücre hattında Bcl-2 seviyelerinin azaldığını tespit etmiştirler. Nimmanapalli ve ark, (2003) HL–60 promiyelositik lösemi hücre hattında yaptıkları çalışmada, bir Bcl–2 antagonisti ve 17-

AAG'nin birlikte uygulamasının, Bcl-2'nin yüksek seviyeleri yüzünden apoptosise direnç kazanan kanser hücrelerinde antitümör aktivite gösterdiğini kanıtlamıştır.

Sitokrom c, mitokondri iç membranında bulunan elektron transport zincirine ait bir proteindir. Sitokrom c, mitokondriden sitozole salındıktan sonra sitozolik apoptotik proteaz aktivasyon faktörü–1 (Apaf–1)'e bağlanır ve pro-kaspaz–9 ile apoptozom oluşturmak üzere birleşir (Liu ve ark 2013,Li ve ark 1997). HSP-90'nın inhibe edildiği hücrelerde apoptotik hücre ölümü, sitokrom-c'nin mitokondriyal yolla sitozole salınmasıyla gerçekleşir (Margineantu ve ark,2007). Çalışmamızda kolon kanseri hücre hattına 17-AAG ile tedavi dozu uygulandığında Sitokrom-c ekspresyonunun istatistiksel olarak belirgin şekilde arttığı görüldü. Benzer şekilde Hsu ve ark, (2008) COLO 205 hücre hattında, Bcl–2 ekspresyonunu azaltıp; sitokrom-c ve kaspaz–9 ekspresyonlarını artırarak yaptıkları çalışma, bu hücrelerde mitokondri aracılıklı apopitozisin indüklenerek hücre gelişimini engellendiğini göstermiştir. Bir diğer çalışmada, Nimmanapalli ve ark, (2003). HL–60 promiyelositik lösemi hücre hattında 17-AAG'nin sitokrom-c nin mitokondriyal salınımını ve sitozolde birikimini artırdığını böylelikle kaspaz-9'un ve kaspaz-3'ün aktive olmasıyla apoptosisin meydana geldiğini saptamışdırlar.

Apaf–1, sitozolik proteaz aktivasyon faktörüdür. Apaf-1'in indüksiyonu sitokrom c'nin mitokondriden salıverilmesi ile gerçekleşir, sitokrom c, Apaf-1'in aktivatörüdür (Ulukaya,2003). Wright ve ark, (2007) Apaf–1 ve kaspaz-9'un sitokrom-c nin indüklediği apopitozis için gerekli olduğunu tespit etmişlerdir. Apaf-1'in oligomerizasyonu kaspaz–9 monomerlerinin bir araya getirilmesini sağlar. HSP90, Apaf-1'in işlevini negatif yönde etkiler ve Apaf-1'e doğrudan bağlanır, prokaspaz–9 ile oligomerizasyonunu engeller (Pandey ve ark,2000). Bu çalışmamızda, kolon kanseri hücre hattına bir geldanamisin türevi olan 17-AAG ile tedavi dozu uygulandığında Apaf–1 ekspresyonunun istatistiksel olarak belirgin şekilde arttığı tespit edildi. Dias ve ark, (2002) HL–60 hücre hattında yaptıkları çalışmada, 17-AAG'nin HSP-90'nın Apaf–1'e bağlanmasını engellediğini ve apaf–1 değerini artırdığını göstermiştirler.

Kaspazlar, apoptoziste önemli rol oynayan sistein bağımlı aspartat proteaz ailesidir. Sitokrom-c ve apaf–1, ATP varlığında prokaspaz-9'un yıkımını ve aktif kaspaz-9'un oluşumunu kolaylaştırır. Prokaspaz-9'un apoptozoma katılımı, kendisinin aktivasyonuyla kaspaz-9'un oluşumu ve onun da kaspaz–3 gibi hücre yıkımını düzenleyen efektör kaspazları aktive etmesiyle sonuçlanır (Liu ve ark, 2012). Çalışmamızda kolon kanseri hücre hattına 17 AAG ile tedavi dozu uygulandığında kaspaz–9 ekspresyonunun istatistiksel olarak belirgin şekilde arttığı tespit edildi. Başka kanser türlerinde 17-AAG tedavisiyle yapılan çalışmalar, apopitozisin indüklenmesi ve kaspaz–9 ekspresyonun artmasıyla sonuçlanmıştır. Karkoulis ve ark, (2012) mesane kanseri hücrelerinde yaptıkları çalışma sonucunda 17-AAG'nin indüklediği hücre ölümünün, kaspaz–9 ve kaspaz–3 gibi apoptosisin önemli elemanlarının ekspresyonlarını artırdığını belirtmişlerdir. Georgakis ve ark, (2006) lenfoma hücrelerinde yaptıkları çalışmaya

göre, HSP–90 inhibitörü 17-AAG'nin kaspaz-9'un ekspresyonunu artırarak apopitozisi indüklediğini belirtmişlerdir.

6.SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, bu çalışmada 17AAG uygulamasının kolon kanseri hücre hattında çoğalmayı inhibe ettiğini ve apoptotik proteinler olan Sitokrom c, Apaf–1, kaspaz–9 proteinlerinin ekspresyonlarını istatistiksel olarak belirgin şekilde artırırken, anti-apoptotik protein Bcl–2 ekspresyonunu ise istatistiksel olarak belirgin şekilde azaltmakta olduğu görülmektedir. Dolayısıyla, 17AAG uygulaması kolon kanseri tedavisinde katkı sağlayabilecek bir ajan olarak gözükmektedir.

17-AAG, faz–1 ve faz–2 çalışmalarına girmiş bir ilaçtır; faz–3 çalışmalarının daha çok hasta toplulukları üzerinde denenmesi sonucunda bu ilacın kullanımınının artırılarak kanser tedavisinde umut olabileceğini düşünmekteyiz.

7.KAYNAKLAR

1.Akpınar G., Kolon kanserinde apoliprotein e (apo e) gen poliferizminin araştırılması.(Doktora Tezi), Kocaeli Üniversitesi;2006

2.Akyol S.,Over Kanserinde Sıcak Şok Proteinleri (HSP) ve Progesteron Reseptörleri (PR). Bakırköy Tıp Dergisi, 2009;5(3): 83–91

3. Chen X., Kang H.,Zou F. Low concentration of GA activates preconditioning response in HepG2 cells during oxidative stress—roles of Hsp90 and vimentin. Cell Stress Chaperones. 2009;14(4):381–389

4. Chung Y., Troy H., Banerji U., Jackson L.E., Walton M.I., Stubbs M., Griffiths J.R.,Judson I.R., Leach M.O., Workman P., Ronen S.M. Magnetic Resonance Spectroscopic Pharmacodynamic Markers of the Heat Shock Protein 90 Inhibitor 17-Allylamino,17-Demethoxygeldanamycin (17AAG) in Human Colon Cancer Models.Journal of the National Cancer Institute. 2003;95(21):1624–1633

5.Clarke P.A., Hostein I.,Banerji U., Di Stefano F., Maloney A., Walton M., Judson I. and Workman P. Gene expression pro®ling of human colon cancer cells following inhibition of signal transduction by 17-allylamino–17-demethoxygeldanamycin, an inhibitor of the hsp90 molecular chaperone. Oncogene.2000;19: 4125 – 4133

6.Cohen-Saidon C., Carmi I., Keren A., and Razin E. Antiapoptotic function of Bcl-2 in mast cells is dependent on its association with heat shock protein 90. Blood, 2006; 107:1413-1420

7.Çiftlikçi A.Kolorektal kanserlerde tümör belirleyicilerinin incelenmesi.(Yüksek Lisans Tezi) İnönü Üniversitesi;2002

8.Çolakoğulları M.,BCL-2 Proteinin apoptoz yolakları üzerine etkisinin incelenmesi.(Doktora Tezi) Uludağ Üniversitesi,2007

9.Margineantu D.H.,Emerson C.B., Diaz D.,Hockenbery D.M. Hsp90 Inhibition Decreases Mitochondrial Protein Turnover. PLoS ONE 2007;2(10): e1066;[14 screens]. Avaible from: URL: http://www.plosone.org

10.Dias S., Shmelkov S.V., Lam G., and Rafii S. VEGF165 promotes survival of leukemic cells by Hsp90-mediated induction of Bcl-2 expression and apoptosis inhibition. Blood, 2002; 99(7):2532–2540

11.Diaz G.D., Li Q., and Dashwood H.R. Caspase-8 and Apoptosis-inducing Factor Mediate a Cytochrome *c*-independent Pathway of Apoptosis in Human Colon Cancer Cells Induced by the Dietary Phytochemical Chlorophyllin. Cancer Research, 2003;63:1254–1261

12.Douglas R.G., Reid P.B., Thomas G.C. Apoptosis and cancer. Principles and Practice of Oncology, 1994; (1)1–13.

13.Duranyıldız D.,Oğuz H., Çamlıca H.,Yasasever V., Topuz E. Malign Melanomalı Hastalarda Serum BCL-2 düzeyleri. Türk Onkoloji Dergisi, 2004;19: 4,131–133

14.Durhan E., Kolon kanser tanılı olgularda PCR RFLP metodu ile p53 gen mutasyonlarının saptanması. (Yüksek Lisans Tezi) Afyon Kocatepe Üniversitesi;2006

15.Erden E., Kolon kanserlerinde transizyonel mukoza değişikliklerinin morfolojisi ve müsin histokimyası üzerine araştırma.(Tıpta Uzmanlık Tezi) Ankara Üniversitesi;1991

16.Evan, G., Littlewood, T. A matter of life and cell death. Science,1998; 281:1317– 1322.

17.Ferrario A.,Rucker N.,Wong S.,Luna M., and Gome C.Survivin, a Member of the Inhibitor of Apoptosis Family, Is Induced by Photodynamic Therapy and Is a Target for Improving Treatment Response. Cancer Res 2007;67(10):4989–95

18.Flandrin P.,Guyotat D., Duval A.,Cornillon J.,Tavernier E.,Nadal N., Campos L. Significance of heat-shock protein (HSP) 90 expression in acute myeloid leukemia cells. Cell Stress and Chaperones,2008;13: 357–364

19.Fukuyo Y., Hunt C.R., Horikoshi N.Geldanamycin and its anti-cancer activities. Cancer Letters, 2010; 290: 24–35

20.Georgakis GV, Li Y, Younes A.The heat shock protein 90 inhibitor 17-AAG induces cell cycle arrest and apoptosis in mantle cell lymphoma cell lines by depleting cyclin D1, Akt, Bid and activating caspase 9. Br J Haematol. 2006; 135(1):68–71.

21.Goldstein JC, Waterhouse NJ, Juin P, Evan GI, Gren DR. The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. Nat Cell Biol. 2000; 2(3):156–16215.Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide- ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 1972;26: 239–257.

22.Grem J.L.,Morrison G., Guo X.,Agnew E.,Takimoto C.H.,Thomas R.,Szabo E., Grochow L.,Grollman F.,Hamilton M.,Neckers L. And Wilson R.H.Phase I and Pharmacologic Study of 17-(Allylamino) 17Demethoxygeldanamycin in Adult Patients With Solid Tumors. Journal of Clinical Oncology,2005; 23;1885–1893

23.Gültekin N., Karaoğlu K,Küçükateş E. Hücrede apoptoz ve sağkalım mekanizmalarının keşfedilmesi ve yeni potansiyel tedavi stratejileri, Türk Kardiyol Dern Arş, 2008; 36:120-130

24. He X., Dong Y., Wah Wu C., Zhao Z., Simon S.M., Chan F.K.L., Sung J., and Yu J. MicroRNA–218 Inhibits Cell Cycle Progression and Promotes Apoptosis in Colon Cancer by Downregulating BMI1 Polycomb Ring Finger Oncogene. Molecular Medicine,2012; 18: 1491–1498

25.Hostein I., Robertson D., DiStefano F., Workman P., and Clarke P.A. Inhibition of Signal Transduction by the Hsp90 Inhibitor 17-Allylamino–17-demethoxygeldanamycin Results in Cytostasis and Apoptosis. Cancer Research, 2001; 61: 4003–4009

26.Hsu S., Lu J., Kuo C., Yang J., Lin M., Chen G., Su C., Lu H.,and Chung J. Crude Extracts of Solanum lyratum Induced Cytotoxicity and Apoptosis in a Human Colon Adenocarcinoma Cell Line (Colo 205). Anticancer Research,2008; 28: 1045–1054

27.Karkoulis P.K.,Stravopodis D.J.,Margaritis L.H., Voutsinas G.E., 17-Allylamino–17-demethoxygeldanamycin induces downregulation of critical Hsp90 protein clients and results in cell cycle arrest and apoptosis of human urinary bladder cancer cells, BMC Cancer 2010, 10: 481-495

28.Kang B.H., Plescia J., Dohi T., Rosa J., Doxsey S.J., Altieri D.C.,Regulation of tumor cell mitochondrial homeostasis by an organellespecific hsp90 chaperone network. Cell, 2007;131: 57–70.

29.Kelland L.R., Sharp S.Y., Rogers P.M., Myers T.G., Workman P. DT-Diaphorase Expression and Tumor Cell Sensitivity to 17-Allylamino,17-demethoxygeldanamycin, an Inhibitor of Heat Shock Protein 90. Journal of the National Cancer Institute, 1999;91(22):1940–1949

30. Kerr J.F.R., Wyllie A.H. and Currie A.R. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon With Wideranging Implications In Tissue Kinetics. Br. J. Cancer,1972; 26: 239–257

31.Kidd VJ, Lahti JM, Teitz T. Proteolytic regulation of apoptosis, Semin Cell Dev Biol., 2000;(3):191-01.

32.Lanneau, D., Brunet, M., Frisan, E., Solary, E., Fontenay, M., Garrido, C. Heat shock proteins: essential proteins for apopitozis regulation. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2008; 12: 43–61.

33.Lawen, A. Apoptosis—an introduction BioEssays, 2003;25: 888–896.

34.Li, P., Nijhavan, D.I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S.,Wang, X., Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade, Cell, 1997; 91: 79-89.

35.Liu H., Jıang X., Zhang M., Pan Y.,Yu Y., Zhang S., Ma X.,Li Q.,Chen K. Association of CASP9, CASP10 gene polymorphisms and tea drinking with colorectal cancer risk in the Han Chinese population. Journal of Zhejiang University-Science Biomedicine & Biotechnology: 2013;14(1):47–57

36.Liu K., Duanyang Shu D., Song N., Gai Z., Yuan Y., Li J., Li M., Guo S., Peng J., Hong H.The Role of Cytochrome c on Apoptosis Induced by Anagrapha falcifera Multiple Nuclear Polyhedrosis Virus in Insect Spodoptera litura Cells. PLoS ONE 2012;7(8): e40877. [12 screens]. Available from: URL:http://www.plosone.org

37. Luo, X., , Budihardjo I., Zou, H., Slaughter, C.,Wang, X., Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. Cell, 1998; 94: 81–90

38.Manns J., Daubrawa M., Driessen S., Paasch F., Hoffmann N., Loffler A.,Lauber K., Dieterle A., Alers S., Iftner T.,Schulze-Osthoff K., Stork B. and Wesselborg S. Triggering of a novel intrinsic apoptosis pathway by the kinase inhibitor staurosporine: activation of caspase-9 in the absence of Apaf-1. The FASEB Journal.2011;25:3250–3261

39.Martin, S. J., Reutelingsperger, C. P., McGahon, A. J., Rader, J. A., van Schie, R. C., LaFace, D. M., & Green, D. R. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. J Exp Med, 1995; 182:1545– 1556.

40.Moser C., Lang S.A. and Stoeltzing O. Heat-shock Protein 90 (Hsp90) as a Molecular Target for Therapy of Gastrointestinal Cancer. Anticancer Research,2009; 29: 2031–2042

41.Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B. A., & Yuan, J. Capase-12 mediates endoplasmic reticulum specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-h. Nature,2000; 403, 98–103

42.Nimmanapalli R., O'Bryan E., Kuhn D., Yamaguchi H.,Wang H., and Bhalla K.Regulation of 17-AAG–induced apoptosis: role of Bcl-2, Bcl-Xl and Bax downstream of 17-AAG–mediated down-regulation f Akt, Raf-1, and Src kinases,Blood. 2003;102:269–275).

43.Norberg E, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondrial regulation of cell death: processing of apoptosis-inducing factor (AIF), Biochem Biophys Res Commun. 2010, 396(1): 95–100.

44.Ozawa H, Keone RW, Marcilla AE, Dioz PH, Dietrich WD: Thetapeutic stragies targetting caspase inhibition following spinal cord injury in rats, Exp. Neurol, 2002; 177:306–313.

45.Oktem S., Özhan M.H., Özol D.Apoptozisin Önemi, Toraks Dergisi, 2001; 2(1):91-95

46.Öncel M., Isı şok proteinleri ve kanser.Eur J Basic Med Sci,2012;2(1):16-23

47.Özkaya A.B. HCT–116 Kolon Kanser Hücre Hattında Yeşil Çay Etken Maddesi Olan (-)-Epigallokatekin–3-gallatın Apoptoz Üzerine Etkisinin İncelenmesi. (Yüksek Lisans Tezi) Dokuz Eylül Üniversitesi; 2008

48.Pandey, P., Saleh, A., Nakazawa, A., Kumar, S., Srinivasula, S.M.,Kumar, V.,Weichselbaum, R., Nalın, C., Alnemri, E.S., Kufe, D., Kharbanda, S., Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. The EMBO Journal, 2000;19: 4310–4322

49.Parcellier A. ,Gurbuxani, S. Schmitt, E. Solary, E. Garrido, C.,Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003;304: 505–512.

50.Pehlivan S., Kolorektal tümörlerde telomeraz aktivitesi ve apoptozis ile ilişikisi. (Tez) Fırat Üniversitesi,2008

51.Piner P., Lambda-Cyhalothrinin Oreochromis niloticus'da karaciğerde piperonil bütoksit modülarörlüğünde oksidatif stres potansiyelinin belirlenmesi, stres proteinleri ve apoptozis üzerine etkileri. (Tez) Çukurova Üniversitesi,2009

52.Richardson P.G., Mitsiades C.S., Laubach J.P., Lonial S., Chanan-Khan A.A., Anderson KC. Inhibition of heat shock protein 90 (HSP90) as a therapeutic strategy for the treatment of myeloma and other cancers. J Haematol.2011 Feb;152(4):67–79.

53.Saleh H.A.,Jacks H. Correlation of bcl-2 Oncoprotein Immunohistochemical Expressionwith Proliferation Index and Histopathologic Parameters in Colorectal Neoplasia. Pathology Oncology Research,1999; 5: 4

54.Saygılı E.İ. Kolorektal kanserli hastalarda lipid peroksidasyonu ve antioksidan sistemler. (Yüksek Lisans Tezi) İstanbul Üniversitesi; 1997

55.Shivapurkar, N., Reddy, J., Chaudhary, P. M., & Gazdar, A. F. Apoptosis and lung cancer: a review. J Cell Biochem, 2003;88: 885–898.

56.Solakoğlu Z. Apoptoz varlığı ya da yokluğu bir hastalık nedeni. Klinik Gelişim Dergisi,2009;22(3): 20–25.

57.Sreedhar A.S., Csermely P. Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy A comprehensive review. Pharmacology Therapeutics, 2004;101: 227–257.

58.Supko JG, Hickman RL, Grever MR, Malspeis L., Preclinical pharmacologic evaluation of geldanamycin as an antitumor agent. Cancer Chemother Pharmacol, 1995;36.305–315.

59.Thornberry N.A.,Lazebnik Y. Caspases: Enemies Within. Science, 1998;281 (5381):1312–1316

60.Tisdale Mj. Cachexia in cancer patients, Nat. Rev. Cancer, 2002, 2; 862–71.

61.Tömekçe N.B.,Apoptozla ilişkili genler BCL2L12 ve PDCD4'ÜN lösemi hastalarındaki ekspresyon analizi. (Yüksek Lisans Tezi) İstanbul Üniversitesi; 2008

62.Türktekin M. Kolon kanseri hücre hattında apigenin flavonoidinin apoptoz yolaklı gen ifade edilmesine olan etkilerinin araştırılması. (Yüksek Lisans Tezi) Gazi Üniversitesi; 2009

63. Ulukaya E. Apoptozis Ders Notları, Ankara, 2003

64.Watanapokasin R.,Jarinthanan F., Nakamura Y., Sawasjirakij N., Jaratrungtawee A., Suksamrarn S. Effects of α-mangostin on apoptosis induction of human colon cancer. World J Gastroenterol 2011;17(16): 2086–2095

65.Watson A.J., Merritt A.J., Jones L.S., Askew J.N., Anderson E., Becciolini A., Balzi M., Potten C.S., Hickman J.A. Evidence for reciprocity of Bcl–2 and p53 expression in human colorectal adenomas and carcinomas. Br J Cancer. 1996;73: 889–895

66.Wei Q, Kazimierz S, Kadiiska M. Mechanism of arsenic-induced cross tolerance to nickel cytotoxicity, genotoxicit and apoptosis in rat liver epithelial cells. Toxicological Science 2001; 63:189-195.

67. Wright K.M., Smith M.I., Farrag L., and Deshmukh M.Chromatin modification of Apaf-1 restricts the apoptotic pathway in mature neurons, The Journal of Cell Biology, 2007;179, 825–832

68.Zhang Z, Kreps CJ, Guth L: Experimental analysis of progressive necrosis after spinal cord trauma in the: etiological role of the inflammatory responce, Exp. Neurol, 1997, 143: 141–52.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Zeynep KASAR
Doğum Tarihi: 01.01.1986
Doğum Yeri: İzmir

ÖĞRENİM DURUMU

Lisans: Celal Bayar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü
Yüksek Lisans: Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bölümü