



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEZENKİMAL KÖK HÜCRE İLE BİRLİKTE KÜLTÜRE EDİLEN
NÖROBLASTOMA HÜCRELERİNİN X-BAĞIMLI APOPTOTİK PROTEİN
İNİHİTÖRÜNE VERDİĞİ YANITIN İNCELENMESİ**

KEZBAN UÇAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Betül ÇATALGÖL

İSTANBUL-2013

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	4
4.1. Nöroblastoma Tümörleri	4
4.2. Apoptoz	5
4.2.1. Kaspazlar ve ölüm reseptörleri	6
4.2.2. Apoptozda ekstrinsek yolak	
4.2.3. Apoptozda intrinsek yolak	10
4.2.4. XIAP	10
4.3. Hücre Yaşam döngüsü ve Kanser	12
4.4. Embelin	16
4.5. Tümör Nekroz Faktör(TNF)- Aracılı Apoptoz Uyarıcı Ligand (TRAIL)	17
4.5.1. TRAIL	17
4.5.2. Hücrelerde görülen TRAIL direnci	18
4.5.3. Nöroblastomada hücrel tedavilerin rolü	19
4.5.4. AK- MKH' lerin TRAIL' ı kanser hücrelerine taşıması	19
4.6. Sinyal İleti Yolakları NF-KB ve mTOR 'un Rolü	21
5. GEREÇ ve YÖNTEM	23
5.1.1. Kullanılan Gereçler	23
5.1.2. Kullanılan hücre hattı	23
5.1.3. Kullanılan cihazlar	23
5.1.4. Kullanılan kimyasallar	25
5.1.5. Çözeltiler	25
5.2. Yöntemler	26
5.2.1. Hücrelerin çözülmesi	26
5.2.2. Hücrelerin pasajlanmaları ve çoğaltılmaları	26
5.2.3. Hücrelerin sayılması	26
5.2.4. Hücre canlılık testi	27
5.3. pEGFP-TRAIL Plazmidinin <i>E. coli</i> Bakteri Hücrelerine Aktarılarak Çoğaltılması ve İzolasyonu	27

5.4. pEGFP-TRAIL Plazmidinin BamH I ve EcoR I Kesim Enzimleriyle Çift Kesim Yapılarak Doğrulanması	28
5.5. pEGFP-TRAIL Vektörünün AD- MKH' e Elektroporasyon Yapılarak Transfeksiyonu	29
5.6. AD- MKH' lerle Nöroblastoma Hücrelerinin Birlikte Kültüre Edilmesi	29
5.7. Akış Sitometrik Analizler	30
5.7.1. Annexin- V/ PI apoptoz nekroz analizi	30
5.7.2. Hücre yaşam döngüsü analizi	30
5.8. Sinyal İleti Yolakları Analizi	31
6. BULGULAR	32
6.1. Kullanılan Hücre Hatlarının Çoğaltılması	32
6.1.1. pEGFP-TRAIL Plazmidinin çoğaltılması ve doğrulanması	32
6.1.2. WST- 1 canlılık tayini	32
6.2. Embelin Uygulanan SK- N- AS Hücrelerinde IC₅₀ Değeri	32
6.3. WST- 1 canlılık tayini	34
6.4. Akım Sitometri İle Annexin- PI apoptoz nekroz analizi	34
6.5. Akış Sitometrik Hücre Yaşam Döngüsü Regülasyon Analizi	42
6.6. NF- κB Sinyal Yolağı	52
6.7. mTOR Sinyal Yolağı	53
7. TARTIŞMA	
8.KAYNAKLAR	62
9.ETİK KURUL ONAYI	
10.ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR

UV : Mor ötesi

DNA : Deoksiribonükleik asit

CDK : Siklin bağımlı kinaz (cyclin dependent kinase)

MPF : Mitoz başlatıcı faktör (mitosis promoting factor)

CAD : Kaspaz aracılığıyla aktiveşen endonükleaz (caspase-activated endonuclease)

ICAD : CAD inhibitörü (inhibitor CAD)

Apaf-1 : Apoptotic protease activating factor-1

TNF : Tümör nekroz faktörü

TNFr : TNF reseptörü

DD : Ölüm bölgesi (death domain)

TRAIL : TNFr-apoptoz-tetikleyici lingand (TNFr-apoptosis-inducing ligand)

DISC : Ölüm-tetikleyici sinyal kompleksi (death-inducing signaling complex)

FADD : Fas-ilişki ölüm bölgesi (Fas-associated death domain)

DED : Ölüm-efektör bölgesi (death-effector domain)

RIP : Reseptör-etkileşim proteini (reseptor interaction protein)

FLIP : FLICE inhibitör proteini

FBS : Fetal bovine serum

PBS : Phosphate buffered saline

PI : Propidyum iyodür

TBST : Tris buffered saline-Tween 20

Kaspaz : Sistein- aspartik proteaz (cysteine-aspartic proteases)

XIAP :X'e bağılı apoptoz inhibitor protein

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

- Şekil 1.** Apoptoz yolaklarının düzenlenmesi
- Şekil 2.** Hücre yaşam döngüsü
- Şekil 3.** Hücre yaşam döngüsünde kontrol noktaları
- Şekil 4.** TRAIL sinyal ileti yolağı
- Şekil 5.** NF- κ B ve mTOR sinyal ileti yolağı
- Şekil 6.** pEGFP- TRAIL plazmidinin haritası
- Şekil 7.** pEGFP-TRAIL plazmidinin BamH I ve EcoR I kesim enzimleri ile kesimi sonucunda oluşacak bant büyüklüğü
- Şekil 8.** pEGFP-TRAIL plazmidinin BamH I ve EcoR I kesim enzimleri ile kesimi sonucunda oluşan bantların agaroz jel yürütülmeleri sonucundaki görüntüleri
- Şekil 9.** Kontrol SK-N-AS hücreleri Annexin V analizi
- Şekil 10.** Kontrol SK-N-AS hücreleri PI analiz
- Şekil 11.** Kontrol SK-N-AS hücreleri Annexin-PI analizi
- Şekil 12.** Embelin ile indüklenen SK-N-AS hücreleri Annexin V-PI analizi
- Şekil 13.** Yabani tip MKH'lerle kokültüre edilmiş yabani tip SK-N-AS hücrelerinde Annexin V – PI analizi
- Şekil 14.** TRAIL vektörü taşıyan MKH'lerle kokültüre edilmiş yabani tip SK-N-AS hücrelerinde Annexin-PI analizi
- Şekil 15.** Embelin ile indüklenmiş yabani tip SK-N-AS hücreleri ile yabani tip MKH'lerin kokültür sonrası Annexin-PI analizi
- Şekil 16.** TRAIL vektörü taşıyan MKH'ler ve Embelin ile indüklenmiş yabani tip SK-N-AS hücrelerinin kokültür sonrasında Annexin-PI analizi
- Şekil 17.** Kontrol SK-N-AS hücreleri hücre yaşam döngüsü analizi
- Şekil 18.** Embelin ile indüklenen SK-N-AS hücrelerinde hücre yaşam döngüsü analizi
- Şekil 19.** Yabani tip MKH'lerle kokültüre edilmiş yabani tip SK-N-AS hücrelerinde Annexin V – PI analizi
- Şekil 20.** TRAIL vektörü taşıyan MHH'lerle kokültüre edilmiş yabani tip SK-N-AS hücrelerinde Annexin-PI analizi
- Şekil 21.** Embelin ile indüklenmiş yabani tip SK-N-AS hücreleri ile yabani tip MKH'lerin kokültür sonrası Annexin-PI analizi

- Şekil 22.** TRAIL vektörü taşıyan MKH'ler ve Embelin ile indüklenmiş yabancı tip SK-N-AS hücrelerinin kokültür sonrasında Annexin-PI analizi
- Şekil 23.** Kokültür sonucunda SK-N-AS hücrelerinde yapılan Annexin V-PI çalışmalarının grafikte gösterimi
- Şekil 24.** XIAP inhibitörü embelin kullanılmış SK-N-AS hücreleri ile TRAIL transfekte edilmiş ve edilmemiş MKH hücrelerinin kokültür edilmesi sonucu apoptoz oranlarının karşılaştırılması
- Şekil 25.** TRAIL transfekte edilmemiş MKH hücrelerine uygulanan embelinin apoptotik etkisi ile TRAIL transfekte edilmiş MKH hücrelerine uygulanan embelinin apoptotik etkisinin karşılaştırılması
- Şekil 26.** Kokültüre edilmiş hücrelerin G2+M fazına etkisi
- Şekil 27.** Kokültür sonucunda hücre döngüsündeki apoptoz yüzdeleri
- Şekil 28.** I- κ B sinyal ileti yolağı analizi sonuçları
- Şekil 29.** mTOR sinyal yolağı analizi sonuçları

BEYAN FORMU

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

05.06.2013

Kezban UÇAR

TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi : Yüksek Lisans
Anabilim Dalı : Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı
Tez Sahibi : Keaton Hacıoğlu
Tez Başlığı : Mezonükleol Kök Hücre ile Birlikte Kültüre Edilen Nöroblastların
Sınav Yeri : Hücrelerin X-Ray'li Apoptik Protein İnkübasyonu Üzerine Yaptırılması
Sınav Tarihi : Tıp Fak. Biyokimya A.B.D.
2006/2013

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)

Yrd. Doç. Dr. Betül Çabukçal

Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)

Prof. Dr. Meriç K. Özer

Yrd. Doç. Dr. Çevdet NACAR

Kurumu

M.Ü. Biyokimya A.B.D.

M.Ü. Biyokimya A.B.D.

M.Ü. Biyofizik A.B.D.

İmza








Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 15.../07/2013 tarih ve 37 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

V. Prof. Dr. İnci ALİCAN


İTHAF

“Prof.Dr. Yavuz TAGA hocama ve aziz anısına...”

TEŐEKKÜR

Tezin fikrinin oluŐmasında büyük katkı sağlayan ve çalıŐmalarım için en güzel ortamı sunan merhum danışman hocam **Prof. Dr. Yavuz TAGA**' ya,

Deneysel açıdan ufkumu aan tezimde büyük emekleri olan ve çalışmalar konusunda cesaretlendiren değerli hocam **Prof. Dr. Semra KOÇTÜRK**' e,

Akademik hayat konusunda kendisinden birçok Őey öğrendiğim, her türlü sorunumda yardımcı olan danışman hocam **Yrd. Doç. Dr. Betül ÇATALGÖL**' e,

Yüksek lisansım boyunca bilgilerini paylaŐmaktan kaçınmayan, desteklerini hiç esirgemeyen **Prof. Dr. Nesrin KARTAL ÖZER, Prof. Dr. A. Süha YALÇIN, Doç. Dr. Tunç AKKOÇ** ve **Yrd. Doç. Dr. Saime BATIREL** hocalarıma,

ÇalıŐmalarımda bizzat bulunarak hafta sonu veya akŐam demeyip yardımlarını hiç esirgemeyen çok değerli dostlarım **Ahmet CİNGÖZ, Kübra YAMAN, Cenay CİHAN, Ceyda REK, Ergül MUTLU ALTUNDAĞ**' a,

Őenol Yolcu ve Biyokimya Anabilim Dalındaki tüm arkadaŐlarıma,

Bugünlere gelmemde en büyük paya sahip, her türlü imkanı sunarak beni destekleyen canım **Aileme**,

TeŐekkürü bir borç bilir ve en içten Őükranlarımı sunarım.

1.ÖZET

Nöroblastoma, bebeklik ve erken çocukluk çağının en sık görülen solid tümörüdür. Pediatrik kanser tedavisindeki gelişmelere rağmen yaşama oranı %40'ların altında kalmaktadır. Nöroblastoma tümörlerinde yüksek düzeyde tedavi rezistansı çok kötü bir prognoz sergilemekte ve genellikle ölümcül seyretmektedir. Bu nedenle diğer santral sinir sistemi tümörlerinde olduğu gibi nöroblastomada da farklı tedavi yaklaşımları ortaya çıkarılması gerekli görülmüştür. Yapılan çalışmalarda kök hücrelerin tümör hücrelerine doğru bir yönelişi olduğu ve TNF ailesinin bir üyesi olan TRAIL proteinin; kanser hücrelerini apoptoza indüklemesi ve normal hücreleri etkilememesi yönünden avantajları olduğu bilinmektedir. Tümör hücrelerinin kendilerini apoptozdan korumak için kullandıkları XIAP inhibisyonu ile tümör hücrelerinin TRAIL' e duyarlılığı artmaktadır. Bu hücresel yönelişte mezenkimal kök hücrelerin içerisine transfer edilecek olan ve tümör hücrelerini öldürücü etkisini artırmada önemli rol oynayan bir takım genler, antiapoptotik protein inhibitörlerinin kullanılması yeni bir yaklaşım olarak ortaya çıkmaktadır. Bu çalışmamızda, adipoz doku kökenli insan mezenkimal kök hücreleri kullanıldı ve TRAIL vektörü mezenkimal kök hücrelere transfeksiyon solüsyonları ve Amaxa Nucleofactor 4D (Lonza) cihazı ile transfekte edildi. Nöroblastoma tümör hücrelerine XIAP inhibitörü embelin uygulandı. TRAIL transfeksiyonu yapılmış mezenkimal kök hücreleri, SK-N-AS hücreleri ve embelin uygulanmış SK-N-AS hücreleri ile birlikte kültüre edildi. İnkübasyonların ardından nöroblastoma hücrelerinin canlılığı ve hücre döngüsü flow sitometride analiz edildi. SK-N-AS hücrelerinde NF- κ B, mTOR sinyal yolağı analizleri AlphaScreen teknolojisiyle ölçüldü. Çalışmamızın sonucunda genetik olarak TRAIL ekspresyonu artırılmış mezenkimal kök hücrelerin nöroblastoma hücreleri üzerinde apoptoza indükleyerek hücre canlılığını etkilediğini, nöroblastoma hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği ve NF- κ B, mTOR sinyal yollarını etkilediği görülmektedir. Tüm çalışmalar sonucundaki verilerimizin literatürde önemli bir yer tutacağına ve nöroblastomanın tedavisinde klinik açıdan da önem arz edeceğine inanmaktayız.

Anahtar Kelimeler: Embelin, Mezenkimal Kök Hücre, Nöroblastoma, TRAIL, XIAP

2.SUMMARY

The Effect of X-linked Apoptotic Protein inhibitor on the Neuroblastoma Cells co-cultured with Mesenchymal Stem Cells

Neuroblastoma (NB) is the most common solid cancer in childhood. Despite the improvement in Pediatric cancer treatments such as chemotherapy, radiotherapy, and bone marrow transplantation, survival rate is still less than 40%. Higher level of resistance in Neuroblastoma tumors shows a very bad prognosis and generally induces death. Thus, approaches for different treatments have been considered necessary in Neuroblastoma tumors like other central neural system tumors. Recently, the usage of stem cells has brought a new aspect for the effective therapy. The stem cells are present in almost every tissue and are useful vehicle for cancer therapy since they can be loaded with antitumor agents. In this direction, TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is a potent inducer of apoptosis in cancer cells which can be inhibited by X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP). In this study, human mesenchymal stem cells (MSCs) were used. The TRAIL gene vector were transfected to MSCs by Lipofectamine 2000 reagent and Amaxa Nucleofactor 4D. Embelin cultured with SK-N-AS cells for 24 hours. TRAIL transfected mesenchymal stem cells were cultivated with SK-N-AS cells and was induced with embelin. Thereafter cell survival of neuroblastoma cells were determined with flow cytometry analysis. For the evaluation of the NF- κ B, mTOR signaling pathways in SK-N-AS cells, AlphaScreen Technology (Perkin Elmer) has been used. The results showed that genetically modified MSCs secreting TRAIL reduce the cell survival of cancer cells by inducing apoptosis and inhibiting the proliferation. By demonstrated that XIAP inhibition sensitizes neuroblastoma cells for TRAIL-induced apoptosis and the signaling pathways NF- κ B and mTOR play a significant role in this process. Our results may take important place in literature and also in the clinic.

Keywords: Embelin, Mesenchymal Stem Cell, Neuroblastoma, TRAIL, XIAP

3.GİRİŞ ve AMAÇ

Günümüzde kanser gibi pek çok hastalığın nedeninin ; hücre ölümü ya da yaşamı ile ilgili olduğu bilinmektedir. Kontrollü hücre ölümü apoptoz ile hedefe yönelik çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır. Kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi yöntemlerin tek başına yetersiz kaldığı nöroblastoma gibi solid tümörlerde hücresel tedavi ve kombine tedaviler gün gittikçe umut kaynağı olmuştur.

Literatür ışığında Mezenkimal kök hücrelerin ve TRAIL ligandının kanser hücrelerini apoptoza yönlendirdiğini bilmekteyiz. TRAIL geninin adipoz doku mezenkimal kök hücrelerine (AD-MKH) transferi sonucu mezenkimal kök hücrenin taşıdığı TRAIL geninin ifade edilmesiyle apoptozun artacağı düşünülmektedir. Tümör hücrelerinin kendilerini apoptozdan korumak için kullandıkları X'e bağlı apoptozu inhibe eden protein(XIAP) inhibitörü olan embelin, tümör hücrelerinin TRAIL'e duyarlılığını artırmaktadır.

Yapacağımız çalışmada nöroblastoma hücrelerinde XIAP inhibitörü olan embelinin apoptoz etkinliğini ve TRAIL geni aktarılmış adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler ile embelin uygulanan nöroblastoma hücrelerinin birlikte kültüre edilmesi sonucu tümör hücrelerinin apoptozunun artmasını amaçlamaktayız.

Çalışmamızda tüm bu süreçlerde rol alan bazı hücre içi sinyal yollarının etkisini invitro ortamda inceleyerek en etkin tedavi yöntemini bulmayı planlamaktayız.

4.GENEL BİLGİLER

4.1.Nöroblastoma Tümörleri

Nöroblastoma bebeklik ve erken çocukluk çağının; küçük, yuvarlak hücreli tümörlerinden biridir [Yamamoto K,Hayashi Y, Hanada R, 1995]. Adrenal medulla ve sempatik ganglionlarda görülen ilkel nöral krest hücrelerinden orjin alan bir tümördür. İlk bir yıl içinde beyin tümörleri dışında en sık görülen solid tümördür ve tüm çocukluk çağı malignitelerinin %8-10'unu oluşturur [Kushner BH,Cheung NK,1988]. İnsidansı her yıl 7000 canlı doğumda 1 olup bu insidans tüm dünya da benzerdir. Erkek/kız oranı 1/1 olup erkeklerde biraz daha fazla görülmektedir.

Nöroblastoma tümörleri düşük, orta ve yüksek risk olmak üzere üç farklı şekilde sınıflandırılır [Maris JM,Hogarty MD,Bagatell R,Cohn SL,2007]. Yüksek riskli nöroblastomada cerrahi, radyoterapi, kemoterapi ve kemik iliği transplantasyonu gibi pek çok tedavi yöntemleri izlenmesine rağmen, agresif bir süreç ve çoklu ilaç direnciyle ilişkili olarak hastaların %70'i ölmektedir [Van Noesel MM, Versteeg R, 2004].

Nöroblastoma tümörlerinin etyolojisi tam olarak bilinmemektedir, çeşitli genetik ve epigenetik faktörlerle ilişkilidir.İkinci kromozomun kısa kolunda (2p)bulunan bir protoonkogen olan MYCN amplifikasyonu ileri evre hastalık ve kötü sonuçlarla ilişkilidir. Hastalığın düşük evresindeki hastalarda ve bebeklerde MYCN amplifikasyonu varsa bu hastalarda tümör hızlı progresyon gösterir ve prognoz kötüdür [Schwab M, Alitalo K, Klempnauer K-H, et al.,1983, Shimada H, Stram DO, Chatten J, et al.,1995].

Nöroblastoma tümör hücrelerinde B-hücre lenfoma 2(Bcl-2) ve ekstra büyük B-hücre lenfoma (Bcl-XL) gibi bazı antiapoptotik proteinlerin overekspresyonu gözlenmektedir ve bu da tümör hücrelerine, apoptoza karşı yüksek bir direnç kazandırmakta ve anti-tümöral kemoterapi ilaçlarının etkinliğini zayıflatmaktadır [Van Noesel MM, Versteeg R. ,2004].

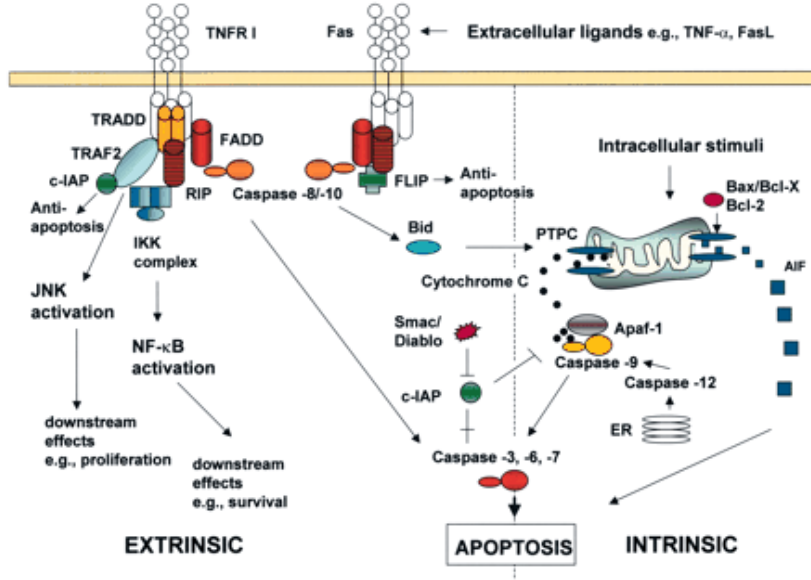
Nöroblastoma tümörleri farklı fenotopik özellikler göstermektedir. Bunlar neuronal (N-tip), stromal (S-tip), intermediate (I-tip) olmak üzere 3'e ayrılır. N-tip hücreler yavaş tutunma gösterip, kümeler halinde çoğalırlar ve nörotik bir süreç izleyerek, nörotransmitterlerin sentezlenmesiyle ilişkili enzimleri eksprese ederler. S-tip hücreler diğerlerinin aksine tabanda yayılarak çoğalırlar ve nörotransmitter sentezinden sorumlu değildirler. I-tip hücreler ise N ve S tipin ortak özelliklerini gösterirler [Ross RA et al.1995].

4.2.Apoptoz

Hücre intiharı olarak ta bilinen apoptoz organizmanın ihtiyaç duymadığı ve organizma için tehlikeli olabilecek hücrelerin ortadan kaldırılmasında homeostazın düzenlenmesinde rol alan programlı bir ölüm sürecidir.

Hücrelerde apoptoz ekstrinsik ve intrinsik olmak üzere temelde iki yolak üzerinden gerçekleşir.. TNF ailesi hücre yüzey reseptörleri ile ilişkili apoptoz uyarıcı ligandlar (TRAIL) ve Fas ligantları bazı malign ve normal hücrelerde kendilerine özgü reseptörlerle birleşerek ölüme neden olurlar [Baud V., Karin M., 2001, Ow Y-L P., Green R.D., Hao Z., Mak T.W.,2008]. İntrensik yolak olarak adlandırılan ikinci yol ise mitokondri katılımlı, Bcl-2 protein ailesi tarafından iletilen ve kontrol edilen bir yoldur [Fennell DA., Cotter FE.,2000, Ricky W. Johnstone, Astrid A. Ruefli, and Scott W.Fennell DA., Cotter FE.,2002]. Her iki yolda da hücrede karakteristik biyokimyasal ve morfolojik değişiklikler meydana gelmektedir. Plazma membranının tomurcuklanması, fosfatidil serin kalıntılarının membranın dış yüzeyine yönelmesi, hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması ve stoplazmik membran parçalanması gibi değişikliklerdir [Dasari VR et al. 2010].

Sitokinler, hormonlar, toksinler, reaktif oksijen türleri, UV, çeşitli fiziksel ajanlar ve büyüme faktörlerinin azalması gibi pek çok etken, Fas ve Tümör Nekroz Faktör (TNF) reseptörlerinin uyarılması apoptozisi başlatabilir [Baud V., Karin M.,2000, Cryns VL, Yuan J,1998].



Şekil 1. Apoptoz yolaklarının düzenlenmesi [Cancer Journal for Clinicians Volume 55; Issue 3, 178-194, 2005]

4.2.1. Kaspazlar ve ölüm reseptörleri

Kaspaz (“caspase”)’lar, zimojen (inaktif prekürsör) olarak sitoplazmada bulunan ve aktif merkezlerinde sistein yer aldığından aspartat- sistein proteazlar olarak adlandırılan bir grup enzimlerdir. İnsanlarda belirlenmiş olan 12 kaspazdan 7’si (kaspaz-2,-3,-4,-5,-6,-7,-8,-9 ve -10) apoptotik süreçte rol oynamaktadır [Vazquez A, Bond EE, Levine AJ, Bond GL.,2008].

Başlatıcı (initiatör) kaspazlar, hücre-içi ya da hücre-dışı sinyalleri proteolitik aktiviteye çevirerek kaspaz kaskadını başlatır. Başlatıcı kaspazlar hücre dışı sinyaller ile aktifleştiginde ekstrinsek yolağı, hücre içi sinyallerle aktifleşen başlatıcı kaspazlar ise intrinsek yolağı uyararak kaspaz kaskadını tetiklerler. Cellat(executioner) kaspazlar hücre içerisinde apoptoz mekanizmasını uyanan spesifik polipeptitleri proteolitik olarak kesen kaspazlardır [Deng Y, Lin Y, Wu X.,2002].

Apoptoz, ölüm reseptörleri adı verilen birbiriyle yapısal olarak akraba olan birkaç reseptör tarafından aktif olarak uyarılır. En iyi bilinen örnekleri TNF α ve Fas reseptörleridir. Bu hücre yüzey reseptörleri, hücre membranında bulunur ve TNFR ailesinin üyesidirler Fas (APO-1, CD95) ölüm reseptörü lenfoid, hepatosit gibi bazı tümör hücrelerinde ve akciğerlerde miyokard da bulunur [Fischer U, Schulze-Osthoff K, 2005].

Ölüm reseptörleri hücre zarı içine tutunmuş, bir ucu hücre dışına, bir ucu hücre içine bakan, hücre içi tarafında prokaspaz 8 in aktiflenmesini sağlayan bir ölüm bölgesi (death domain) bulunan reseptörlerdir. Hücre zarında bulunan kendileri için özgün reseptörlere bağlanan ligandlar reseptörün trimerik (üç bileşenden oluşan) bir yapıya dönüşmesine yol açarlar ve hücre içinde adaptör moleküller adı verilen bir dizi moleküle etkileşerek prokaspaz 8 i iki farklı büyüklükte parçaya böler ve inaktif prokaspaz-8 aktif hale gelir [Da Silva F., Nizet V, 2009]. Başlatıcı kaspaz denen aktif kaspaz 8, inaktif durumdaki proenzimler olan kaspaz 3, kaspaz 6 ve kaspaz 7 nin bir zincir biçiminde aktiflenmesine yol açar. Aktifleşen tüm kaspazlar hücre makromoleküllerini parçalayarak apoptoz morfolojisinin oluşumuna yol açarlar [Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH.,1999]. Aktif kaspaz 8, B-hücre CLL/Lenfoma 2 Bcl-2 ailesi proteinlerinden biri olan BH3-ilişkili domeyn ölüm agonisti(BH3-interacting domain death agonist-Bid) 'ni proteolitik olarak aktifleşmesine yol açar.

Dış Aktif kaspaz 8, Bcl-2 ailesi proteinlerinden biri olan Bid'in de proteolitik olarak aktifleşmesine yol açar. Bid, mitokondriden sitokrom c, bazı başka proteinlerin (SMAC) ve kalsiyumun serbestlemesine yol açar. Böylece ölüm reseptörleri yolu mitokondriyal yolu da aktifleştirir. Mitokondride dış zar potansiyelinin değişmesi Bcl-2 ailesi adı verilen bir protein grubu tarafından düzenlenir. Bu proteinler mitokondri dış zarına oligomerize olurlar. Oluşan oligomerizasyon dış membran permeabilitesini bozar[Cancer Lett.,2001].

Hücrede antiapoptotik aile üyeleri olan Bcl-2, Bcl-x, yine aynı ailenin üyeleri olan Bad, Bim, Bmf, Bid ve BH-3 only proteinleri gibi proapoptotik proteinler tarafından baskılanır. Ailenin proapoptotik üyeleri normal koşullarda inaktif durumdadır, bu

nedenle mitokondriyal zar geçirgenliği Bcl-2 ve benzerlerinin etkisi sayesinde değişmez. Ancak çeşitli uyarılar (büyüme faktörünün uzaklaştırılması Bad'ın, kalsiyum artışı Bim'in, UV ışın Bmf'nin) proapoptotik grubun aktifleşmesine yol açarlar, sonuçta Bcl-2, proapoptotik aile üyeleri tarafından baskılanır, Bcl-2 tarafından inaktif durumda tutulan ve yine aynı aileden olan Bak ve Bax proteinleri etkinleşerek mitokondri dış zarında permeabilite porların oluşumuna, zar potansiyelinin değişimine yol açar. Bu da uygulamacı kaspazların aktivasyonu ve apoptozla sonuçlanır.

Zar geçirgenliğinde artış sonucu mitokondri zarı potansiyelinin bozulması dış zarda hızlı bir şişmeyi izleyerek iki zar arasında bulunan çeşitli proteinlerin hücre sitoplazmasına çıkmasına yol açar. Bu kaçış, ya zarda oluşan permeabilite por aracılığıyla ya da dış zarın patlamasıyla oluşabilir. Temel olarak mitokondrideki solunum zincirinde yer alan bir enzim olan sitokrom c, apoptoz indükleyici faktör (AİF), SMAC ve ENDO G adlı DNaz enzim, sitoplazmaya dağılır.

Sitokrom c, sitoplazmada inaktif monomerler halinde bulunan Apoptotik peptidaz aktive edici faktör 1 (Apoptotic peptidase activating factor 1-APAF-1) molekülüne bağlanarak apoptozom adı verilen yapının oluşumunu sağlar [Ow Y-L P. et al., 2008]. Oluşan apoptozom kompleksi kaspaz 9 u aktifleştirmek üzere keser, kaspaz -9 diğer kaspazları proteolitik bir zincir halinde aktifleştirerek apoptozun gerçekleşmesini sağlar. Cellat kaspazlar (executioner caspases)'in aktivitesi ve/veya aktivasyonu inhibitör apoptoz proteinleri (Inhibitor of Apoptosis Proteins-IAP) denen bir grup protein tarafından baskılanır. IAP'lar kaspaz-3/-7 'nin aktivasyonunu inhibe edebilir ya da apoptozomal kaspaz-9'un aktivasyonunu bloklar [Waterhouse NJ, Ricci JE, Green DR. (2002)., Merino D, et al., 2006].

p53, DNA gardiyanı olarak bilinen, kromozom 17p13.1 üzerinde lokalize olan tümör süpresör bir gendir. p53 sitoplazmada bulunan ve DNA nın ya da hücrenin ağır biçimde hasar görmesi durumunda, DNA da belli genlerin aktivasyonuna, böylece yapımlarının artmasına (Bax, Apaf-1, Fas) belli genlerin de baskılanmasına (Bcl-2, Bcl-X) yol açarak apoptozu tetikleyen bir transkripsiyon faktörüdür. DNA

hasarı, hipoksi ya da onkogenlerin aktivasyonu, sürekli yapılan ama ubiquitinleyici bir protein (mdm2) tarafından belli bir hızda yıkılan p53 ün fosforillenmesine, fosforillenmede ubiquitinlenmenin bozulmasına yol açar. Miktarı artan p53 çekirdeğe geçerek ilgili genlerin ifade edilmelerini değiştirerek hücreyi apoptoza sokar[Beroud C, Soussi T.,1998, Joza N, Susin SA, Dongez E, et al., 2001].

4.2.2.Apoptozda Ekstresek Yolak

Apoptozun dış yolu TNF ailesi hücre yüzey reseptörleri ile ilişkili TRAIL ve Fas ligantları bazı malign ve normal hücrelerde kendilerine özgü reseptörlerle birleşerek ölüme neden olurlar. TNF ailesi reseptörleri (TNF-R1/CD120a, TNF-R2, DR3/Wsl-1/Tramp, DR4/Trail-R2, CAR-1) ve Fas/CD95/APO1 reseptörü belli bir amino asit dizilimi ve homolojiyi paylaşır[Baud V, Karın M., 2001, Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, et al. ,2008].

Bu proteinlerin hücre dışı kısımları ligand bağlanması için önemlidir. Sitoplazmik kısımlarının kıyaslanması bu moleküllerde kısmen korunmuş olan bir ölüm bölgesinin (DD) bulunduğunu gösterir. Bu bölgeler apoptozun başlaması için gerekli olan sitoplazmik sinyal proteinlerinin bağlandığı yerlerdir. Duyarlı ligandların bağlanmasıyla üç TNFR ya da Fas molekülüne kompleks oluşturmak üzere bir araya gelir ve TNFR ve Fas trimerlerinin sitoplazmik bölümleri sırasıyla TRAAD ve FADD adlı adaptör proteinlerine bağlanırlar. Bu adaptör proteinlerden birinin ektopik yapımı apoptozu uyarabilmektedir. Bu proteinlerin hem DD hem de proteazların ölüm oluşturan bölgesine (DED) bağlanan protein etkileme bölgesi vardır. Reseptörlerin sitoplazmik kısımları, adaptör proteinler ve proteazlar bir “Ölümü Baslatan Sinyalleme Kompleksi (DISC)” oluşturur. Proteazların aktivasyonu apoptotik sinyali üretir. Apoptozu başlatma yeteneklerini tasarlayan TNFR ya da Fas mutasyonlarında sitoplazmik ölüm bölümü proteinlerinin bağlanmasının bozulması, bu moleküllerin Fas ve TNFR’e bağlı apoptozda önemli rol oynadıklarının göstergesidir[Baud V, Karın M., 2001]. Normalde, “Ölüm Bölgesi Susturucusu (SODD)” olarak adlandırılan protein ile uyarılmamış reseptörlerin sitoplazmik DD uçları maskelenerek reseptörlerin kendiliğinden sinyal oluşturması önlenir.

Reseptörün uyarılması ile SODD ölüm ucundan ayrılır ve DED içeren adaptörün bağlanmasına izin verir [Porter AG., 1999, Reed JC., 1999, Motzer RJ., et al. 2008].

4.2.3 Apoptozda intrinsek yolak

İntrinsek yolak (mitokondriyal yolak); çeşitli sinyaller tarafından mitokondri dış membranının geçirgenliğinde değişim olması sonucunda kaspaz-9' un aktifleşmesi ile sonuçlanan apoptotik aktivasyon sürecidir. Bu süreçteki en kritik basamak, spesifik polipeptidlerin mitokondrideki membranlar arası alandan sitoplazmaya salınmalarıdır [Goldstein JC, Waterhouse NJ, Juin P, Evan GI, Green DR, 2000]. Membranlar arası bölgeden salınan proteinler arasında en çok, elektron transport sisteminin bir bileşeni olan ve normal koşullarda mitokondri iç membranına zayıf bağlanmış konumda bulunan, sitokrom c ön plana çıkmaktadır. Apoptotik süreçte mitokondriden sitokrom c salınması hızlı, kantitatif bir süreçtir ve kaspaz-9 aktivasyonu üzerinden apoptozun tetiklenmesine neden olur [Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X., 1997]. Sitokrom c sitoplazmaya geçtikten sonra öncelikle adaptör Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) proteinine bağlanır [Eischen CM, Kottke TJ, Martins LM, et al., 1997]. Sonuçta oluşan 700 kDa büyüklüğündeki kompleks, çoklu Apaf-1 ve kaspaz-9 moleküllerini içerir ve “apoptozom” olarak adlandırılır [Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. ,1999]. Bu kompleksin etkisiyle aktifleşen kaspaz-9, kaspaz-3' ü aktifleştirerek intrinsek yolak üzerinden apoptozun tetiklenmesine neden olur.

4.2.4.XIAP

IAP proteinleri, 70-80 amino asitlik tekrar dizileri olan baculoviral IAP repeat (BIR) domainleri ile karakterize edilen sitozolik proteinlerdir,kaspazlara bağlanır ve kaspaz aktivitesini inhibe ederler [Crook N., Clem R., Miller L.,1993]. IAP proteinleri için BIR ve RING domainleri tanımlanmıştır. BIR domaini ; IAP proteinleri yapısında 1-3 arasında değişen tekrarlar olarak yer alır, tüm domainleri apoptozis ile ilişkili değildir, ancak proteinlerin anti-apoptotik özellik gösterebilmesi için gereklidir [Duckett C., Li F.,Wang Y., Tomaselli K., Thompson C., Armatrong R., 1998].

RING domaini proteinin karboksil ucunda yer alır. Özellikle ubiquitinlenmiş hedef proteinlerin degradasyonunun sağlanmasında rol alır [Joazeiro C., Weissman A. 2000]. İnsanlarda 8 farklı IAP proteini tanımlanmıştır .Bunlar ;XIAP (X-linked IAP), c-IAP1, c-IAP2, ML-IAP (melanoma IAP)/ Livin, ILP2 (IAP-like protein 2), NAIP(neuronal apoptosis- inhibitory protein), Bruce / Apollon ve Survivin [Riedi S., Yigong S.,2004].

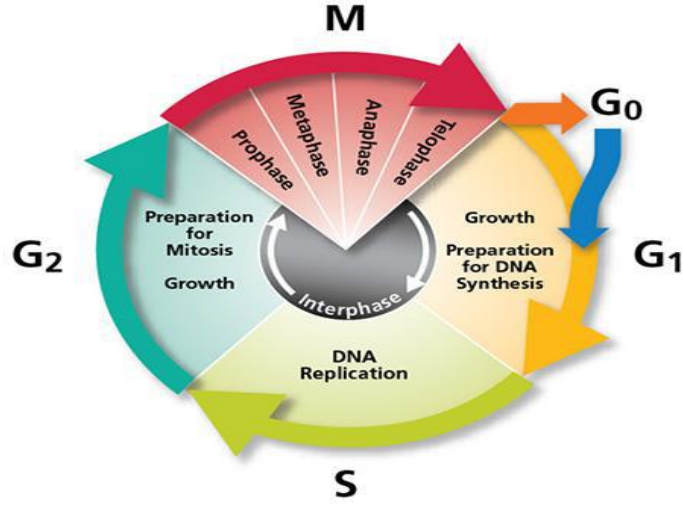
IAP proteinleri kaspaz inhibisyonu dışında , hücre döngüsü regülasyonunda, protein degradasyonunda ve kaspaz bağımsız sinyal kaskadlarında rolü olan proteinle XIAP, en iyi tanımlanmış IAP proteinleridir. Hem ekstrinsik hem de intrinsik yol üzerinden hücreyi apoptoza götürür.BIR1, BIR 2, BIR 3 ve RING olmak üzere 4 major domainden oluşur ve kaspaz inhibisyonunda yer alır [Holcik M., Korneluk R.,2001]. BIR domainleri XIAP proteinlerinin anti-apoptotik aktivite göstermesini ve kaspaz inhibisyonunu sağlaması kaspaz inhibisyonu ve anti-apoptotik aktivite göstermesi için mutlak domainlerdir [Deveraux Q., Takashashi R., Salvesen G., Reed J.,1997]. BIR 2 domaini bunlar arasında en etkili olan domain olarak rapor edilmiştir [Takashashi R., Deveraux Q., Tamm I., Welsh K., Munt N., Salvesen G.,Reed J.,1998]. BIR3 domaini kaspaz-9'un inhibisyonundan tamamen sorumlu iken BIR1 ve BIR 2 domainleri de kaspaz-3 ve -7 ' yi inhibe eder [Riedi S., et al., 2001,Chai J., et al., 2001].

XIAP kaspaz inhibisyonunun yanında hücre siklusu regülasyonu, NF- κ B aracılı aktif sinyal yollarında ve transkripsiyonda da rol alır[Salvesen G., Duckett C., 2002]. Bugüne kadar XIAP seviyeleri patolojik olarak akut ve kronik lösemileri, prostat ve akciğer kanserleri, Hodgkin lenfoma ve birçok tümör tipi ile ilişkilendirilmiştir [Carter B., et al., 2005,Hofmann H., et al., 2002]. B hücre kökenli Hodgkin lenfomalarda da XIAP'nin aşırı ekspresyonu rapor edilmiştir [Kashkar H., 2003]. Tüm bunlarla birlikte XIAP proteinlerinde BIR domainlerini hedef seçecek küçük molekülü antagonistlerle, inhibitör proteinlerin inhibisyonu sağlanarak tümör hücrelerinin apoptozise indüklenmesi sağlanabilirliği ve anti-tümöral bir aktivite oluşturulabileceği rapor edilmiştir. XIAP proteininin kaspazlarla ve Smac proteinlerle bağlanmasında rol alan BIR 3 domaininin aktif bölgesine küçük

moleküllü XIAP inhibitörlerinin bağlanması ile yeni tedavi yaklaşımları ortaya çıkar [Mohr A., et al. ,2010].

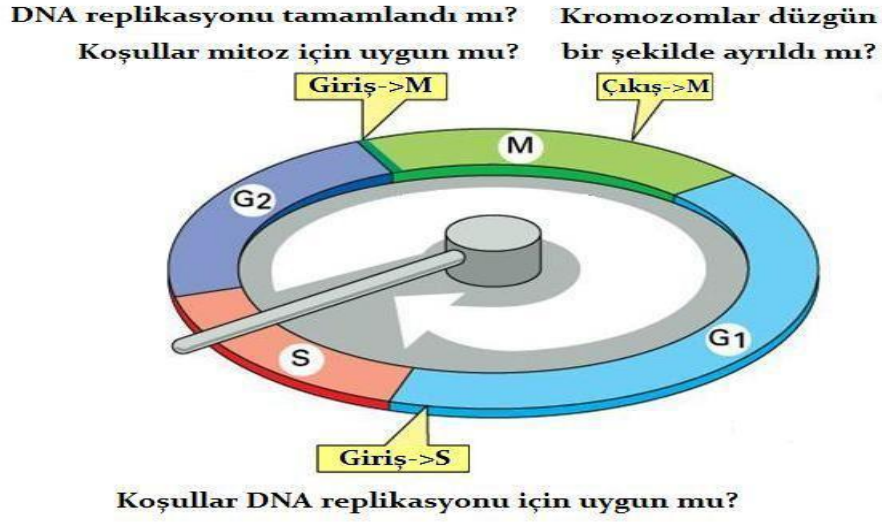
4.3. Hücre Yaşam Döngüsü ve Kanser

Hücrelerin çoğalması, hücre döngüsü (cell cycle) adı verilen birbirini izleyen evrelerin oluşturduğu bir dizi olayların sonucu meydana gelmektedir. Hücreler hücre döngüsü ile ilişkisine göre 3 gruba ayrılır. Deri ve gastrointestinal gibi sürekli bölünen hücreler, miyokard ve nöron gibi hücre döngüsünü terk etmiş ve ileri diferansiyasyon gösteren hücreler. Son olarak normal de bu döngü dışında kalan ancak uyarıların etkisiyle proliferasyon aşamalarına giren kemik iliği kök hücreleri ve karaciğerdir.Sürekli bölünen hücrelerde mitozdan sonra siklus G1-S-G2 (İTERFAZ) ve M (MİTOZ) şeklinde tekrarlanır.Bu süreçte hücre uyarımı ve büyüme meydana gelmekte veya bölünme sinyalleri almadıkları sürece istirahat fazı G0 da durmaktadır [Vermeulen K, Berneman ZN, vanBockstaele DR., 2003]. İnterfaz hücre döngüsünün %90'nını kapsar ve 16-24 saat sürer.Mitoz bölünme ise 1-2 saat sürmektedir. Hücre büyümesi G1 fazında kısıtlayıcı nokta (Rpoint) tarafından koordine edilir ve bu noktada hücre duracak veya hücre siklusunu tamamlayacaktır [Vermeulen K, VanBockstaele DR, Berneman Z N.,2003, Öndağ Cabadak H.,1987]. Kendi çevrelerini kontrol eder, sinyal alır ve büyümeyi indükler. Bu faz DNA sentezi (replikasyonu) için hazırlık yapılır. RNA ve protein sentezi gerçekleşmektedir. DNA sentezi başlamamıştır. S fazında ise DNA sentezlendikten sonra,G2 fazında hücre büyümeye devam eder aynı zamanda RNA sentezi,protein sentezi gerçekleşir ve hücre mitoz hazırlanır. Mitoz; profaz, metefaz, anafaz ve telefozdan oluşmaktadır. Telefozda sitoplazmik bölünme tamamlanır ve aynı genetik materyalli iki yeni hücre meydana gelir [Bellamy COC.,1996, Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell JE, 2000, Vermeulen K., 2003,Öndağ Cabadak H.,1987)].



Şekil 2:Hücre yaşam döngüsü. Hücre yaşam döngüsünün mitoz (M), replikasyona hazırlık (G1), sentez DNA replikasyonu (S), mitoz hazırlık (G2) fazları şekilde gösterilmektedir [Vermeulen K., Bockstaele D., Berneman Z. 2003].

Hücre siklusunda bir faz tamamlanmadan sonraki faza geçilirse genetik materyal tam ve doğru kopyalanmadığı için hücrede hasar meydana gelebilir. Hücre siklusuna G1-S geçişinde,G2-M geçişinde ve metafaz-anafaz geçişinde kontrol noktaları vardır. Bu kontrol noktalarında hücrenin siklusa devam edip etmeyeceği kararı verilir [Vermeulen K., 2003]. G1-S kontrol noktasında hücrenin replikasyon için hazır olup olmadığı, G2-M kontrol noktasında hücrenin mitoz için uygun olup olmadığı, M-G1 kontrol noktasında kromozomların yerleşimi kontrol edilir [Alberts B., et al. 2007]. Radyasyon veya toksinle muamele edilen hücrelerde DNA’da meydana gelen hasara göre hücre siklusunda kontrol noktaları G1 den S fazına veya G2’denmitoz geçişi engeller.DNA’da meydana gelen hasar DNA sentezinide inhibe edebilir.DNA’sı replike olmamış hücrelerde mitoz giriş kinaz komplekslerinin inaktivasyonu ile engellenir.



Şekil 3.Hücre yaşam döngüsünde kontrol noktaları[Vermeulen K., Bockstaele D., Berneman Z. 2003].

Hücre siklusunda iki tip gen grubunun rolü vardır:

Onkogenler (*Her 2, lneu, ras, c myc vb*) ve tümör baskılayıcı genler p53 ve (Retinoblastoma geni). Onkogenler, kanser gelişimini doğrudan ve dolaylı olarak etkileyen gen grubudur. Tümör baskılayıcı genler ise kanser gelişimini baskılar. p53 geni işlevini kaybederse hücre büyümesinin kontrolü ortadan kalkar ve DNA tamiri olmadan hücre siklusu kontrolsüz devam eder. Normal hücrelerde DNA hasarı olduğunda, genomik kararlılığı sağlar ve hücre siklusunu G 'de inhibe eder ve hücreye tamir için zaman kazandırır. Hasar tamir edilemiyorsa hücre apoptozise gider [Verneulen K., et al. 2003].

Hücre döngüsü; siklinler (cyc=cln), siklin bağımlı kinazlar (cdk) ve siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CDI) tarafından kontrol edilir. Bu proteinlerin düzeyleri hücre döngüsünün farklı fazlarında farklılıklar gösterir. Siklinbağımlı kinazlar G1-S-G2 ve mitoz geçisi kontrol etmektedir[Vermelen K., et al. 2008, Verneulen K., et al. 2003]. Memeli hücrelerinin hücre döngüsünde işlevleri bilinen onbir tane siklin

bağımlı kinaz (cdk1-11) ve 16 siklin siklin D (D1,D2 ve D3); siklin E (E1,E2), siklin A (A1,A2) ve B (B1,B2) rol oynamaktadır [Vermelen K., et al. 2008, Verneulen K., et al. 2003, Kearns WG, Liu JM, 2001, Giacinti C, Giordano A 2006]. Hücre döngüsündeki meydana gelen hasalar kansere neden olabilir. Radyasyon v.b. etkenlere maruz kalan hücrelerde hücre siklusunda hatalar görülmektedir. Kanser hücrelerinin karakteristik özelliklerinden biri büyüme uyarımından bağımsız olarak tekrar G1 fazına girmesidir. Rb fosforillenme/defosforillenme oransızlığından G1-S fazları geçişlerindeki değişiklikler hücrelerin çoğalmasını değiştirebilir. İnsan kanserlerinin bazılarında (glioblastoma ve Retino- blastoma) Rb mutasyonları saptanmıştır. Tümör virüsleri HDAC ile Rb'nin bağlanmasını inhibe edebilir. Siklin D' nin fazla eksprese olduğu bazı durumlarda ise E2F aktiflesmesinden sonra Rb inhibisyonunu sağlayan defosforillenme olmadığında S fazına hatalı ilerleme olabilir. Kusurlu G siklin E-cdk2 kompleksi sentriollerin hatalı replikasyonunu uyarmaktadır [Kearns WG, Liu JM., 2001]. Hücrede iki veya daha fazla sentriolün varlığı anafazda hatalı kromozom ayrılmasına neden olur. Bazı insan kanserlerinde sentriollerin fazla dublikasyonu da belirlenmiştir. İnsan kanserlerinde en sık görülen mutant gen p53 'tür. Normal bir hücrede DNA hasarı olduğunda, düzeyi artar ve hücre siklusunu G fazında inhibe ederek DNA onarımı için hücreye zaman kazandırır. Hasar tamir edilemiyorsa hücre apoptoze gider . Hasarlı hücrenin ölümü veya hücre siklusunda kalmasının nasıl sağlandığı tam olarak bilinmemektedir.p53 mutasyonlarında hücreler bölünmeye devam eder. Bu mutasyonlar sonucunda tümör baskılayıcı fonksiyonlarında kayıp olurken diğer yandan onkojenik fonksiyon ortaya çıkabilir [Flatt PM, Pietenpol JA., 2000, Cheng M, Sexl V, Sherr C, Raussel M., Kearns WG, Liu JM., 2001].

p53, p21 ya da p16 gibi tümör baskılayıcı proteinler hücre yaşam döngüsünü duraksatma aktivitesi gösterirken siklinler ve CDK'lar hücreyi bölünmeye yönlendirdiklerinden onkogen olarak adlandırılır [Karp G., 2005, Vazquez A, Bond EE, Levine AJ, Bond GL., 2008]. Çeşitli kanser türlerinde bu tümör baskılayıcı proteinlerin eksikliği, siklin ve CDK'ların ise aşırı ekspresyonu söz konusudur. Kanser karakteristik özelliklerinden en önemlisinin kontrolsüz hücre bölünmesi olduğu düşünüldüğünde protein ekspresyon profilindeki bu değişimin önemi

anlaşılmaktadır [Zhang H.,2007]. Benzer şekilde bir pro-onkogen olan RAS proteini aktifleştğinde siklinD-CDK4 kompleksini aktifleştirerek hücre döngüsünün ilerlemesine neden olur. İnsan tümörlerinin %20-30' unda RAS aktifleşmesi görülmektedir. Kanser oluşum mekanizmasında ardışık mutasyonlar sonucu hücre döngüsünün çıkması görülmektedir. Bu mutasyonlar genellikle DNA tamir enzimlerinde (inaktifleşme), proto-onkogenlerde (aktifleşme-onkogene dönüşüm) ve tümör baskılayıcı genlerde aktifleşme olarak ortaya çıkmaktadır [Maller JL.,1990].

4.4.Embelin

Kanser hücrelerinde,apoptozu ve apoptotik yolları aktifleştirmek için son yıllarda pek çok kemoterapi ilaçları kullanıldığı bilinmektedir.Çoğu kanser ilacı neden oldukları DNA hasarı üzerinden etki göstermektedir ve kanser hücrelerinin DNA tamir mekanizmalarındaki yetersizlikten yararlanarak hücreleri apoptotik sürece sürüklemektedir [Kaufmann SH, Earnshaw WC., 2000].

Molekül ağırlığı 294.39g/mol ve moleküler formu (C₁₇H₂₆O₄) olan Embelin Japon Ardisia bitkisinden türetilen doğal bir üründür.Embelin (2,5-dihydroxy-3-undecyl-1,4-benzoquinone) peptid olmayan,hücelere geçirgen ve küçük molekül ağırlıklı bir XIAP inhibitörüdür [Ahn KS.,2007]. Molekül üzerinde BIR3 domaini ile etkileştiği gösterilmiştir. Bu ajanın hücre büyümesini inhibe ettiği, kaspaz 9' u aktive ettiği ve XIAP aracılı oluşan anti-apoptotik etkiyi yok ederek apoptozisi uyardığı prostat kanseri hücrelerinde ve Jurkat hücre dizisinde gösterilmiştir. Diğer yandan XIAP, birçok kanser türünde ve Hodgkin lenfoma hücrelerinde yüksek düzeyde eksprese olduğu için, hücrelerin apoptozis dirençli olmalarına aracılık eden önemli bir moleküldür. Embelin ve TRAIL' in kombinasyonu pankreatik kanserlerde hücre ölümünü indüklemiştir. Çeşitli kanser türlerinde güçlü bir NF-κB inhibitörü ve güçlü antioksidan etkiye sahiptir. Embelin NF-κB bağımlı genlerde tümör hücrelerinin sağ kalımını, proliferasyonunu, invazyonunu ve anjiyogenezini down regüle etmektedir ve bu yüzden kanser tedavisinde potansiyel olarak yararlı bir ajan olarak kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda insan solid tümörlerde hücre apoptozu ve büyüme inhibisyonu görünmüştür. Mitokondriyal membran potansiyelini azaltarak

apoptozda önemli rol oynar [Jantova SL., 2009]. XIAP antiapoptotik bir protein ve çoğu kanser türlerinde eksprese olmaktadır tümör büyümesi ile ilişkilendirilir. XIAP çoğu kanser hücrelerinin kemoterapi ve radyoterapi direncinde kritik bir rol oynar. Embelin-XIAP ilişkisinin kanser hücrelerindeki etkisi bu yönüyle önem taşımaktadır.

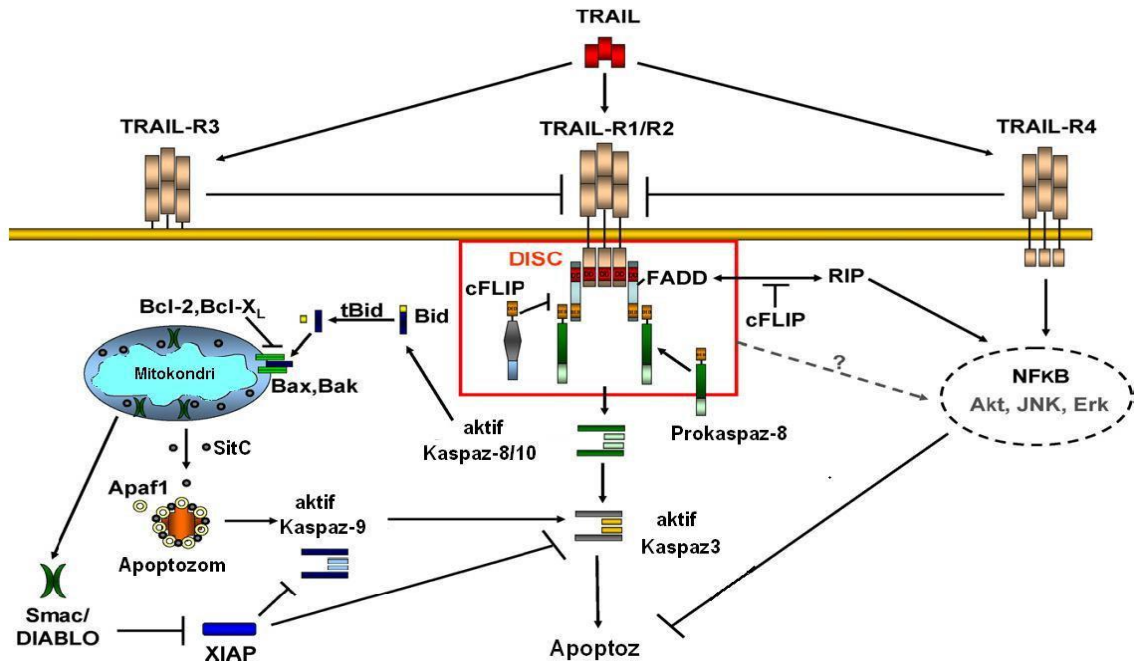
4.5.Tümör Nekroz Faktör (TNF)-Aracılı Apoptoz Uyarıcı Ligand (TRAIL)

4.5.1.TRAIL

TRAIL, 1995 yılında tanımlanmış olan, 32kDa moleküler ağırlığında,281 aminoasit uzunluğunda TNF süper ailesi üyesi bir apoptotik liganttır [Wiley et al., 1995]. TNF-alfa'ya %23, Fas-liganda ise %28 amino asit benzerliği olan bir transmembran proteindir [Nagane, Huang, and Cavenee, 2001]. TRAIL,3.kromozom 3q26 pozisyonunda lokalize olan 5 ekzon ve 4 introndan oluşan bir 20 kb'lık bir genidir. Kısa bir stoplazmik N-terminal ve uzun ekstraselüler bağlanma domaini ile tip 2 transmembran proteindir. TRAIL, Fas-L ve TNF ile yüksek homoloji göstermesine rağmen seçici olarak kanser hücrelerinde apoptozu indüklediğinden ilgi çekici bir proteindir. TRAIL 5 farklı reseptöre bağlanabilmektedir bunlardan ikisi ölüm reseptörü olarakta adlandırılan apoptoz indükleyici reseptör TRAIL-R1(DR4) ve TRAIL-R2(DR5),Apoptoz sinyali göndermede yetersiz kalan Decoy reseptör olarakta adlandırılan TRAIL-R3(DcR1) TRAIL-R4(DcR2) ve Osteoprotegrin (OPG) gibi reseptörlere ilişki kurarak hücrenin apoptoza gitmesini sağlarlar [Griffith TS., et al. 1998].

TRAIL, ölüm reseptörlerine bağlandığında (TR-1/DR4 ve TR-2/DR5), hücrede dış apoptotik yolağın aktivasyonu gerçekleşir (LeBlanc and Ashkenazi, 2003). TRAIL'ın bağlanması ile DR4 ve DR5, ölüm birimi içeren adaptör molekül Fas-Associated Death Domain-containing Adaptor molecule (FADD) aracılığıyla, apoptozu başlatıcı kaspazlar olan kaspaz-8 ve kaspaz-10'u reseptöre çekerek aktive eder. Kaspaz-8 ve kaspaz-10 ise, efektör kaspazları yani kaspaz-3,- 6, ve -7' yi aktive eder. Bazı hücrelerde kaspaz-3' ün TRAIL aracılı aktivasyonu, iç apoptotik yolun da indüklenmesi ile sonuçlanır [Deng Y, Lin Y, Wu X.,2002]. Bu durumda, kaspaz-8 veya kaspaz-10, bir pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyesi olan Bid molekülünü kırarak

aktive eder. Aktive olan Bid molekülü, Bax ve Bak molekülleri ile etkileşime girer ve sonrasında mitokondriden sitokrom c ve Smac/Diablo salınır. Sitokrom c ve Apaf-1, başlatıcı proteaz kaspaz-9' u aktive eder. Kaspaz-9, kaspaz-3,-6, ve-7' nin aktivasyonunu sağlayan diğer bir kaspazdır. Smac/Diablo, Inhibitor of Apoptosis Protein (IAP) moleküllerine bağlanır. Bu bağlanma sayesinde IAP'lerin kaspaz 3'e bağlanması engellenir ve kaspaz 3'ün aktif kalması sağlanır [Ashkenazi A, Dixit VM. 1998].



Şekil 4. TRAIL sinyal ileti yolağı [Falschlehner C, Emmerich CH, Gerlach B, Walczak H., 2007].

4.5.2. Hücrelerde görülen TRAIL direnci

TRAIL ölüm ligandinin normal hücrelerde toksik etki göstermeyip, kanser hücrelerini apoptozu tetiklemesine rağmen bazı malignat tümörlerde TRAIL direnci gözlemlenmiştir. TRAIL' a dirençliliğin nedeni olabilecek iki farklı hipotez geliştirilmiştir. Bu hipotezlere göre, normal hücrelerde ölüm reseptörleri (DR4 ve

DR5) ile rekabete giren yalancı reseptörler (DcR1 ve DcR2) bulunur ve bu reseptörler ölüm reseptörlerine bağlanabilecek TRAIL ligantlarının sayısını düşürerek veya hücre içi anti-apoptotik yolları aktive ederek TRAIL' a dirençlilik sağlar .Bir diğer hipotez ise TRAIL'a dirençli hücrelerde apoptozu inhibe edici moleküllerin sentezinin arttığını savunmaktadır [Pan et al., 1997 a/b, Sheridan et al., 1997, Medema et al., 1997, Irmeler et al., 1997; Hu et al., 1997; Djerbi et al., 2001; Golks et al., 2005].

4.5.3.Nöroblastomada Hücresel Tedavilerin Rolü

Tedavi direncinin ve ölüm oranının bu kadar yüksek olduğu bir hastalıkta, hedefe yönelik tedaviler arasında yer alan hücresel tedavi yaklaşımları uygulanması zorunlu gibi görülmektedir. Hiç şüphesiz ki, hücresel tedaviler arasında ise adını son zamanlarda sıkça duyar olduğumuz kök hücreler ve kök hücre tedavileri önemli bir yeri kapsar. Özellikle mezenkimal stromal/kök hücrelerin kanser terapisinde kullanımı literatürde geniş yer kaplamaktadır. Bu konuda “wild type” (WT) ve “gene-modified” (GM) kemik iliği (BM) kökenli mezenkimal kök hücrelerin anti-tümoral potansiyelleri bir çok çalışmada gösterilmiştir Kök hücre açısından bakıldığında, ilk olarak kemik iliği kökenli olanların yoğun şekilde kullanılmalarına rağmen, yağ dokusu ise mezenkimal projenitörler için önemli bir kaynaktır. Yağ dokusu, mezenkimal kök hücreler açısından bol bulunması ve kolay elde edilip izole edilebilmeleri açısından bir çok avantaja sahiptir[Black LL, 2007; Zuk PA, 2002; Kern S., 2006].

4.5.4.AK-MKH'lerin TRAIL' ı kanser hücresine taşınması

Kök hücreler arasında, hedefe yönelik olarak yapılan çalışmalarda mezenkimal kök hücreler (MKH) baş sırayı almaktadır. Son çalışmalar kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin tümör dokusuna yöneldiğini ve entegre olduğunu göstermektedir. Bu yüzden de immün yanıt ya oluşmaz ya da geç oluşur. Bu da MKH'lerin in vivo kullanımında büyük avantaj sağlamaktadır [Javazon EH.,

BeggsKJ., Flake AW., 2004]. Ayrıca MKH'lerin lökositlere benzer şekilde çeşitli integrinler ve adezyon molekülleri aracılığı ile ekstrasvazyon gösterdikleri düşünülmektedir. Yüzeylerinde eksprese ettikleri “very late antigen 4 (VLA-4)”, endotel hücrelerinde bulunan “vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)” ile ilişkilidir. P-selectin de bu süreçte önemli rol oynamaktadır [Karp G., 2005, Ruster B., Gottig S., Ludwig RJ., 2006]. Tümör hücrelerinden ya da hasarlı dokulardan salınan çeşitli sitokin/kemokin ve büyüme faktörleri, kök hücrelerde bulunan reseptörlere bağlanarak MKH'lerin damar dışına çıkmalarını ve hedefe yönelmelerini sağlamaktadır [Loebinger MR, Eddaoudi A, Davies D, Janes SM.,2009]. Bu hücresele yönelişte MKH'lerin içerisine transfer edilecek olan ve tümör hücrelerini öldürücü etkisini artırmada önemli rol oynayan bir takım genler de tedavide yeni bir yaklaşımdır. Bu hücreler özellikle kanser tedavisinde içlerine yüklenen TRAIL, çeşitli interferonlar ve interleokinler gibi ajanları kanserli bölgeye götürerek tümör hücrelerini apoptoza uğratmaktadırlar. Bu konuda yapılan birçok çalışma umut vericidir.

Araştırmacılar akciğer metastatik kanser modelinde TRAIL yüklenmiş kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin metastatik kanser hücrelerine yönelerek öldürücü etki yapıp yapmadığını incelemişlerdir. TRAIL ile transfekte edilen mezenkimal kök hücreler akciğer (A549), meme (MDAMB231), skuamöz (H357) ve servikal (HeLa) kanser hücrelerinde ko-kültür şartlarında apoptoz ve ölüm meydana getirmişlerdir.

TRAIL eksprese eden mezenkimal kök hücrelerin subkütan “xenograft” deneyleri tümör büyümesini çok önemli oranda azaltmışlardır [0.12 cm³ (0.04-0.21) versus 0.66 cm³ (0.21-1.11); P < 0.001]. Araştırmacılar daha sonra akciğer metastazı oluşturdukları bir fare modelinde TRAIL eksprese eden mezenkimal kök hücreleri sistemik olarak verdiklerinde TRAIL'ın metastatik tümörü tamamiyle temizlediğini (farelerin %38'inde/kontroldeki %0'a göre) göstermişlerdir. Bu TRAIL eksprese eden mezenkimal kök hücreleri kullanarak tümör ve onların metastazlarının tedavisi edilebileceğini gösteren önemli bir çalışmadır [Loebinger MR., et al.,2009].

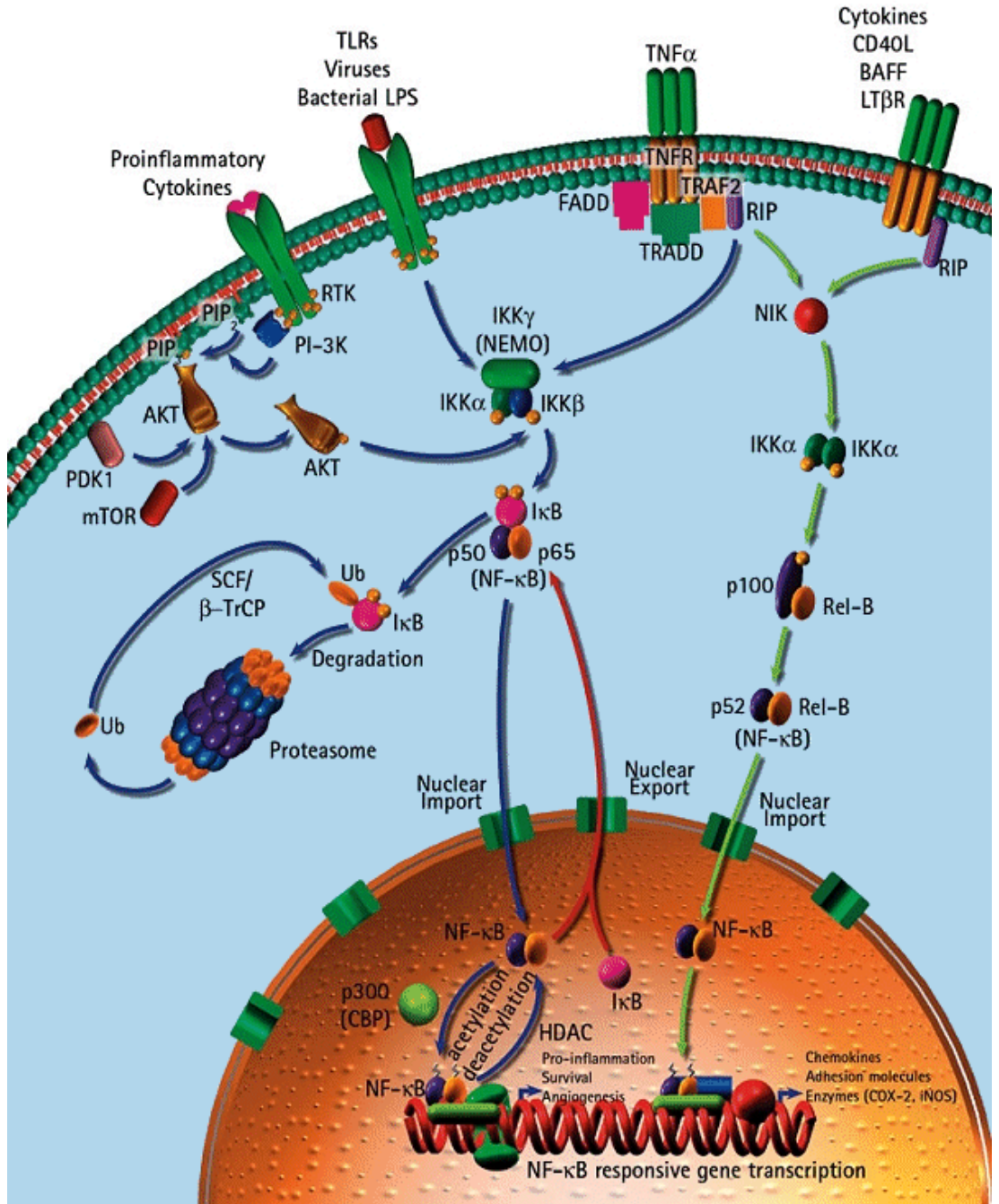
TRAIL potansiyel bir anti-kanser ajanı olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte birçok kanser hücresi primer olarak TRAIL'e rezistans gösterebileceği gibi

başlangıçta hassas olan hücreler de sonradan direnç kazanabilmektedirler. Böyle bir direnç mekanizmasının anlaşılması kanser tedavisinde TRAIL'in kullanılması açısından çok önemlidir. Direnç farklı şekillerde gelişebilir. DR4 ve DR5 reseptörlerinin mutasyonu dirence yol açabilir. Fas ile ilişkili ölüm bölgesi adaptor protein (FADD) ve kaspaz-8 ölüm uyaran sinyali kompleksinin oluşturmak açısından gereklidirler ve bunların herhangi birindeki defekt TRAIL direncine yol açar. c-FLIP'in artan ekspresyonu birçok kanser tipinde dirence yol açabilmektedir. Aynı şekilde Bcl-2, Bcl-XL'in artan ekspresyonu, Bax veya Bak fonksiyonunun kaybı, apoptoz inhibitör proteinlerin (IAP) yüksek ekspresyonu ve ikincil mitokondri kaynaklı kaspaz aktivatörlerinin (Smac/DIABLO) mitokondriden sitoplazmaya az çıkması gibi faktörlerin tümü TRAIL'e karşı oluşan apoptotik direnç mekanizmasında tarif edilmiştir [Zhang L., Fang B.,2005].

4.6. Sinyal İleti Yolakları NF- κ B ve mTOR 'un Rolü

NF- κ B yolağı hücrenin hayatta kalması ve proliferasyonu ile doğrudan ilgili bir sinyal yolağıdır. Hücre canlılığı yüksek olan hücrelerde daha aktiftir. I- κ B (inhibitör- κ B) proteinleri sitoplazmada NF- κ B/Rel transkripsiyon faktörlerine bağlı bulunmaktadır. Bu durumda kompleks inaktif formdadır. I- κ B fosforilasyonunun ardından, I- κ B'nin proteazom aracılı yıkımı ile NF- κ B/Rel kompleksi fosforillenmek ve çekirdeğe gitmek üzere salınarak aktif forma geçmektedir. I- κ B fosforilasyonunu sitokinler, büyüme faktörleri ve kemokinler gibi birçok hücre dışı sinyal molekülleri uyarır. NF- κ B'nin salınmasında I- κ B'nin Ser32/36'dan fosforillenmesi önemlidir. Bu bölgenin fosforilasyonu NF- κ B aktivasyonunun iyi bir belirteçidir [Oeckinghaus A, Hayden M, Ghosh S.,2011].

mTOR, PI3K/AKT'nin aşağı doğru akım yolağında fonksiyon gösteren anahtar bir kinaz olarak tanımlanmıştır ve bu yüzden inhibisyonu, potansiyel olarak önemli terapötik bir hedef olarak belirlenmiştir. mTOR apoptotik hücre ölümünün düzenlenmesinde etkilidir. Apoptotik ölümden önce p53, B-hücreli lenfoma 2 (BCL2), BCL2- antagonistisi (BAD), p21, p27 ve c-myc gibi sinyal iletim hedefleri belirleyicidir. mTOR aktivasyonu hücre ölümünü düzenleyen bu molekülleri inhibe eder [Faivre S, Kroemer G, Raymond E., 2006].



Şekil 5. NF-κB ve mTOR sinyal ileti yolağı [Oeckinghaus A, Hayden M, Ghosh S.,2011].

5. GEREÇLER ve YÖNTEMLER

Çalışmamız “Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu” tarafından değerlendirilmiş, 21.12.2012 tarih ve 22 sayısı ile onaylanmıştır.

5.1. Kullanılan Gereçler

5.1.1. Kullanılan hücre hattı

ATCC'den ticari olarak PCS-500-011 katalog numaralı AK-MKH ile CRL-2266 katalog numaralı SK-N-AS nöroblastoma hücre hattı satın alındı ve kullanıldı. Çalışmalarımızda kullanacağımız SK-N-AS hücreleri nöroblastoma türlerinden S-tip hücrelere örnektir [Gatsinzi T., 2011].

5.1.2. Kullanılan cihazlar

- Akış sitometrisi (Becton Dickinson FACS Calibur)
- EnSpire multimode plate okuyucu (Pelkin Elmer)
- Amaxa Elektroporasyon cihazı (Lonza)
- Janus otomatik pipetleme cihazı (Pelkin Elmer)
- Spektrofotometre (Shimadzu BioSpec Nano)
- Masaüstü soğutmalı tüp ve plate santrifüj (Beckman Coulter Allegra X-15R)
- Masaüstü soğutmalı eppendorf santrifüj (Beckman Coulter Microfuge 22R)
- Laminar Flow (Scanlaf)
- CO2 inkübatör (Sanyo)
- Hücre sayım ve canlılık tayini cihazı (Roche Cassy)
- -152°C derin dondurucu (Sanyo)
- - 80°C derin dondurucu (Sanyo U7386S)

- Floresans Mikroskop (Olympus)
- Faz kontrast Mikroskop (Zeiss)
- İverted Mikroskop (Zeiss)
- İverted Mikroskop (Leica)
- Hassas terazi (Denver)
- pH metre (IKA)
- Etüv (Mettler)
- Buz makinası (Scotsman)
- Plak okuyucu (Molecular Devices)
- Vorteks (IKA)
- Orbital shaker (IKA)
- Su saflaştırma cihazı (Aqua solution)
- Su banyosu (Mettler)
- Pipet takımı (Eppendorf)
- Otoklav (Sanyo)
- Elektroforez sistemi (Bio-Rad)
- Elektroforez sistemi için güç kaynağı (Bio-Rad)
- U.V görüntüleme cihazı (Intas)
- Hücre kültürü odası hava temizleme cihazı (Uvion Air Aura)

5.1.3. Kullanılan kimyasallar

- Embelin (Sigma)
- DMEM Ortam (Biochrom)
- Penisilin/Streptomisin (Biochrom)

- Fetal Bovine Serum(FBS) (Biochrom)
- L-Glutamin (Biochrom)
- PBS (phosphate buffered saline) (Biochrom)
- Tripan mavisi (Biochrome)
- Dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma)
- Tripsin/EDTA çözeltisi (Biochrom)
- Kalsiyum klorür (Sigma)
- Propidyum iyodür (PI) (Alexis)
- Annexin
- V-FITC (BD Pharmingen)
- RNAz (Sigma)
- WST-1 (Roche)
- İzopropil alkol (Merck)
- Annexin V/PI kiti (Becton Dickinson)
- AlphaScreen SureFire I- κ B α (p-Ser32/36) Assay kiti (Pelkin Elmer)
- AlphaScreen SureFire Mtorr (p-Ser/Thr) Assay kiti (Pelkin Elmer)
- High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche)

5.1.4. Çözeltiler

- **Luria Broth Besiyeri:** 10 g toz haldeki LB tartılır, 1000 ml distile suda çözülüp otaklanır.
- **Annexin – V Binding Buffer (AVBB):** 10mM HEPES/NaOH pH 7.4 olacak şekilde ayarlanır. 140mM NaCl ve 2.5mM CaCl₂ eklenir.
- **Propidium Iodide Staining Mixture :** 50 μ g/ml PI stoğundan AVBB ile 10X dilusyonlu karışım hazırlanır.
- **Fosfat Sitrik Asit Tamponu :** 192 ml 0.2 M Na₂HPO₄ ile 8 ml 0.1 M sitrik asit , pH 7.8 olacak şekilde ayarlanır.
- **DNA staining solüsyonu :** 10 ml PBS içerisinde 200 μ g PI ve 2 mg RNAz A hazırlanır.

5.2. Yöntemler

5.2.1. Hücrelerin çözülmesi

Sıvı nitrojende ya da -152 °C'lik dondurucuda bekletilen hücreler gerekli olduğunda çözülerek kullanıldı. Sıvı nitrojen ya da -150°C'den alınan dondurulmuş hücreler hızla 37°C'de çözüldü. Tüp içerisindeki süspansiyon 15ml'lik tüplere aktarıldı ve üzerine 10mL önceden 37°C'ye getirilmiş büyüme ortamı ilave edildi. Tüp 1300 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Pellet besiyerinde süspansiyon edildi ve flasklara ekim yapıldı.

5.2.2. Hücrelerin pasajlanmaları ve çoğaltılmaları

Hücrelerin flask yüzeyini yaklaşık olarak %70-80 kaplamalarının ardından hücrelerin pasajlanarak bir başka flaska aktarılması işlemleri yapıldı. Hücrelerin besiyeri üç dört günde bir yeni besiyeri ile değiştirildi. Hücreler 4-5 pasajda bir dondurularak (%90 FBS, %10 DMSO) önce -80°C'lik derin dondurucuya, bir gecenin ardından da sıvı nitrojende ya da -152°C'ye kaldırıldı.

5.2.3. Hücrelerin sayılması

Hücrelerin bulunduğu flaskın içerisindeki besi ortamı atıldı. Flask steril PBS ile yıkandı. Flasklara; 25cm² flask için 0,5 mL, 75cm² flask için 1 mL önceden 37°C'ye ısıtılmış tripsin/EDTA ilave edildi. Flask inkübatörde 4-5 dakika bekletildi. Flask yüzeyinden ayrılan hücreler 15ml'lik tüplere toplandı. Tüplere 5'er mL FBS içeren büyüme ortamı ilave edildi. Tüpler 1300 rpm de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Pellet istenen miktarda, büyüme ortamı içerisinde süspansiyon edildi. Hazırlanan hücre süspansiyonundan 10µl alındı bir tüpe koyuldu ve 10µl tripan mavisi ile süspansiyon edildikten sonra Thoma lamı ve lamel arasındaki boşluğa, hazırlanan boyalı hücre süspansiyonundan 10µL konuldu. Ters-faz ışık mikroskopunda 10x büyütmede sayım yapıldı. Mavi boyana hücreler ölü, boyayı dışlayan hücreler canlı olarak değerlendirilerek Thoma lamının her biri 16 küçük kare içeren 4 farklı alanı sayılarak ortalaması alındı. Hücre sayısı/ml = Ortalama sayım değeri (64 karenin toplamı/4) x seyreltme faktörü x 10⁴ formülünden bir hücre süspansiyonunun bir mililitresindeki

hücre sayısı belirlendi. Hücre süspansiyonu seyreltilerek istenen konsantrasyonda hücre süspansiyonu elde edilerek ekim yapıldı.

Ayrıca “Cassy otomatize” hücre sayım cihazı ile de sayım yapıldı. 10ml “Cassy tone” sıvısı içerisine 10µl süspansiyon hücre örneğinden koyularak cihaza yerleştirildi cihazda ölü ve canlı oranı okundu.

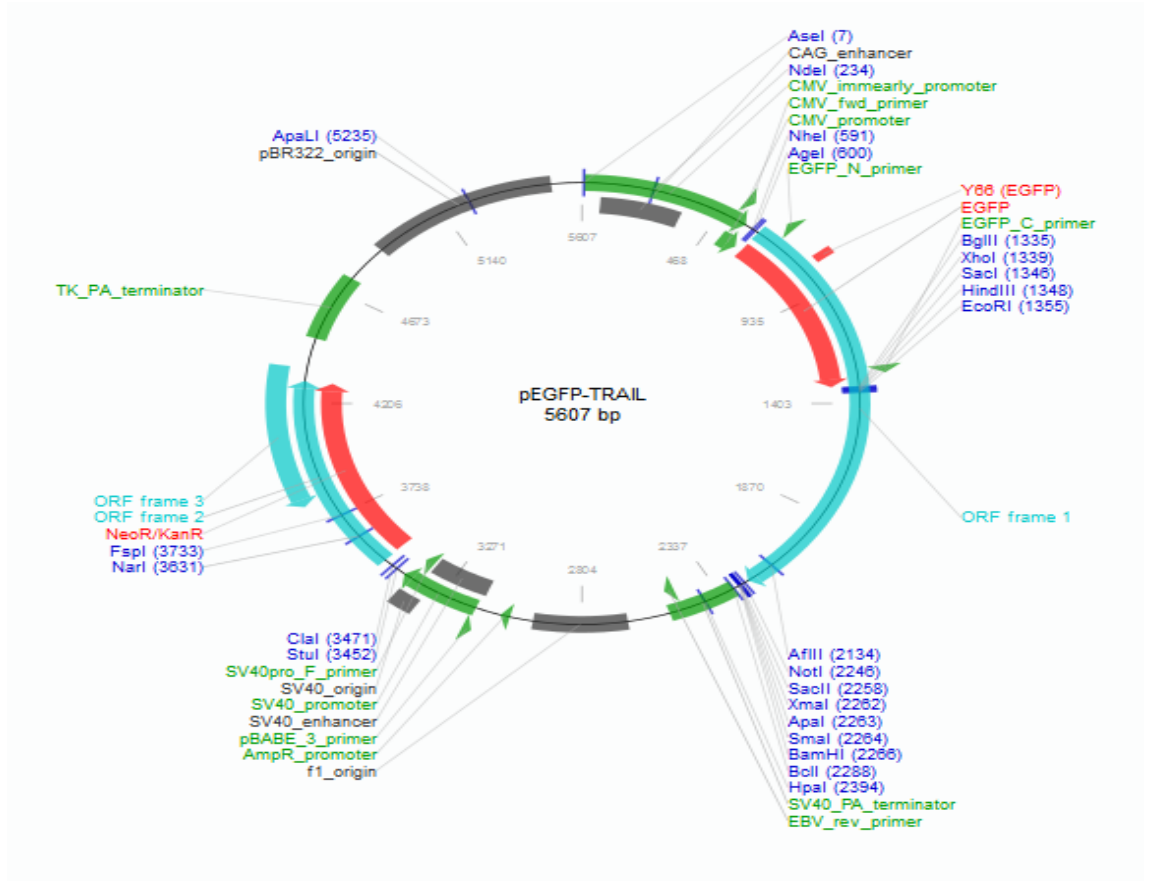
5.2.4. Hücre canlılık testi (WST-1)

96 kuyulu platelere 5x 10⁴ hücre 100 µl medium içerisinde ekildi. 37°C’ de %5’lik CO₂’ de 24 saat inkübe edildi. Bu inkübasyondan 24 saat son hücelere Embelin uygulandı (kuyulardaki son hacim 100µl olarak ayarlandı). Daha platerler 37°C’ de %5’lik CO₂’de 24-48saat inkübe edildi. 24-48 saat geçtikten sonra kuyulara 10µl WST-1 reaktifi eklendi. Takiben 37°Cde %5’lik CO₂’de 4 saat inkübe edildi. 1 dakika çalkalayıcıda çalkalandı ve 420nm-480nm arasında okuma yapıldı. Hesaplama: Embelin uygulanan hücrelerin absorbans değeri, kontrol grubunun absorbans değerine bölündü ve çıkan sonuç 100 ile çarpıldı. (kontrol grubu %100 canlı kabul edildi.)

Yüzde Canlılık = [Örnek ABSortalama / Kontrol ABSortalama] x 100

5.3. pEGFP-TRAIL Plazmidinin *E. coli* bakterisi hücrelerine aktarılarak çoğaltılması ve izolasyonu

pEGFP-TRAIL plazmidini (Plasmid 10953) içeren bakteri kültürü, Addgene firmasından satın alındı. Plazmid, bakteriyal direnç geni olarak Kanamycin, seçici marker olarak da Neomycin antibiyotik direnç genlerini içermektedir. Bakteri kültürü 100 µg/ml Kanamycin içeren LB (Luria Broth) besiyerinde, 37°C’lik inkübatörde gece boyunca çoğaltılmaya bırakıldı. Diğer gün bakterilerin çoğaldığı gözlemlendi ve High Pure Plasmid Isolation Kiti (Roche - Kat. No: 11754777001) ile plazmid izolasyonu gerçekleştirildi.



Şekil 6. pEGFP- TRAIL plazmidinin haritası

5.4. pEGFP-TRAIL Plazmitinin BamH I ve EcoR I kesim enzimleri ile çift kesim yapılarak doğrulanması

İzolasyonu yapılan plazmidin doğrulanması BamH I ve EcoR I (Fermentas) kesim enzim enzimleri kullanılarak, çift kesim yöntemi ile yapıldı. 5 µl plazmid DNA'sı (1 µg'ın üzerinde olacak miktarda), 2 µl Buffer EcoR I, 1 µl EcoR I kesim enzimi, 2 µl BamH I kesim enzimi, 10 µl DNaz/RNaz içermeyen su içeren tüp hazırlandı. Hazırlanan tüp 37 °C'de 1 saatlik inkübasyonun ardından %1'lik agaroz jel elektroforezinde 100 V'ta 40 dakika yürütülerek görüntülendi.

5.5. pEGFP-TRAIL vektörünün Adipoz doku kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelere elektroporasyon yapılarak transfeksiyonu

Adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücrelerine pEGFP-TRAIL plazmidi Amaxa Nucleofector cihazı ile transfekte edilmiştir. Kültür kaplarında büyütülen hücreler, tripsinlenerek kalırıldı. Her kuyucuk için 5x10⁵ hücre, 100 µl Nucleofector solüsyonu içerisinde hazırlandı. İçerisine 2µg plazmid eklenip küvetlere aktarıldı. Küvetler cihaza yerleştirildi ve FF-104 programı ile transfekte edildi. Transfeksiyon sonrası küvetlere besiyeri eklenerek hücreler 24 kuyucuklu plate' lere ekildi.

5.6. Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerle Nöroblastoma Hücrelerinin Birlikte Kültüre Edilmeleri

Embelin uygulanmış ve uygulanmamış olan SK-N-AS hücreleri 6 kuyulu plate'lere kuyucuk başına 1x10⁶ hücre olacak şekilde DMEM besi yeri içerisinde ekildi ve 37 °C, %5 CO₂ içeren nemli ortamda inkübasyona bırakıldı. 24 saatlik inkübasyonun ardından 0,4 µm por çaplı hücre kültürü insertleri (BD-353090) üzerlerine yerleştirildi. İnsertlerin üzerlerine TRAIL vektörü transfeksiyonu yapılmış ve yapılmamış mezenkimal kök hücreler ekildi. Hücreler 24 saat 37 °C, %5 CO₂ içeren nemli ortamda inkübe edildi.

Deney grupları şu şekildedir:

24 Saat
wt-NB
wt-NB+wt-MKH
WtNB+TRAIL-MKH
WtNB+EMBELİN
wtNB-EMBELİN+wt-MKH
wtNB-EMBELİN+TRAIL-MKH

İsmlendirme:

NB: Nöroblastoma (SK-N-AS)

wt-NB: Hiçbir transfeksiyon gerçekleştirilmemiş (wild type) SK-N-AS hücresi

wt-MKH: Hiçbir transfeksiyon gerçekleştirilmemiş (wild type) adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücre.

TRAIL-MKH: TRAIL overekspresyonu yapan plasmid transfekte edilmiş adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücre.

NB-Embelin: Embelin ile indüklenmiş SK-N-AS hücresi.

5.7. Akış Sitometrik Analizler**5.7.1. Annexin-V/PI apoptoz/nekroz analizi**

Yapılan uygulamaların ardından kuyuların içerikleri ayrı ayrı tüplere aktarıldı. Kuyucukların içerisindeki hücreler 0,35' er ml tripsin ile kaldırıldı. Sonra kuyucuklar 1'er ml PBS ile yıkandı ve kendi tüplerine aktarıldı. Bu hücre süspansiyonu oda sıcaklığında 1300 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve hücreler 1 ml PBS ile yıkandı. 1300 rpm'de 5 dakika santrifüjün ardından her bir pellet 1 ml Annexin V binding buffer ile süspansiyon edildi. Tekrar 1300 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant atıldı. Pellet 100 µl Annexin V binding buffer ile süspansiyon edildi ve her tüpe 5 µl Annexin V, 5 µl PI eklendi. Tüpler karanlıkta 15 dakika inkübe edildi. Her bir tüpe 400'er µl PBS ilave edildi ve akış sitometride FL1 ve FL2 filtreleri kullanılarak okuma gerçekleştirildi. Sonuçlar akış sitometrisi cihazında otomatik olarak hesaplandı.

5.7.2. Hücre yaşam döngüsü analizi

Annexin-V apoptoz/nekroz analizinde hücre yaşam döngüsü regülasyonu için ayrılan süspansiyon 1300 rpmde 5 dakika santrifüj edildi. Pelletler 200'er µL PBS çözeltisi ile süspansiyon edildi ve her bir tüp içeriği V-tabanlı 96 kuyucuklu platelerin

kuyucuklarına aktarıldı. Buz üzerinde 30 dakika fiksasyon için beklendi. Plate 1300 rpmde 5 dakika +4°C’ de santrifüj edildi. Süpernatantlar aspire edildi. Plate yavaşça vortekslendi. Her bir kuyucuğa 50’ şer µl PBS ve 100’ er µl etanol ilave edildi. Buz üzerinde 15 dakika beklendi. Plak 1300 rpm de 5 dakika +4°C’ de santrifüj edildi. Süpernatantlar aspire edildi. Plak yavaşça vortekslendi. Her bir kuyucuğa 50’ şer µl RNAz ilave edildi. RNAz aktivitesi için plak 37°C’de 30 dakika inkübe edildi. Plate 1300 rpmde 5 dakika +4°C’de santrifüj edildi. Süpernatantlar aspire edildi. Her bir kuyucuğa 200’er µL PI eklendi. Oda sıcaklığında 15 dakika beklendi. Her bir kuyucuğun içeriği ayrı ayrı tüplere aktarıldı. Her bir tüpün üzerlerine 300’er µL Annexin V ve 1 mL PBS ilave edildi. Akış sitometrede okuma gerçekleştirildi. Sonuçlar cihazın programı tarafından otomatik olarak hesaplandı. Bu veriler kullanılarak istatistiksel analiz yapıldı.

5.8. Sinyal İleti Yolakları Analizi

Nöroblastoma hücrelerinde etkilenen çeşitli sinyal ileti yolaklarının analizleri için AlphaScreen SureFire (Perkin Elmer) kitleri kullanıldı. Bu çalışmada farklı sinyal ileti yolağı incelendi. Bunlar: I-κBα (p-Ser32/36) (Kat. No: TGRIKS500), mTOR (p-S2448)(Kat. No: TGRMTS-L), Kokültür sonunda her grup için ayrı ayrı olmak üzere, 1x10⁷ hücre 1 ml PBS’te süspanse edildi. Bunun içerisinde 10 µl/kuyucuk olacak şekilde alınarak 384 kuyucuklu plate'lere aktarıldı. Üzerlerine 10 µl PBS eklendi ve her kuyucuktaki son hacim 20 µl oldu. 5x lizis tamponundan eklendi her kuyucuğa 5’er µl eklendi. Plate 5-10 dk. 350 rpm’de çalkalandı. Lizattan her bir sinyal yolağı çalışması için 4’er µl alınarak farklı kuyucuklara aktarıldı. Üzerlerine 5 µl “Acceptor” karışımından eklendi ve 2 dk çalkalanarak oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 2 µl “Donor” karışımından eklendi. 2 dk. çalkalanarak oda sıcaklığında 2 saat, karanlıkta inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon bitiminde EnSpire Multimode plate okuyucuda okutuldu.

6. BULGULAR

6.1. Kullanılan Hücre Hattının Çoğaltılması

Çalışmada kullanılan SK-N-AS nöroblastoma kanser hücreleri ile adipoz doku kaynaklı mezankimal kök hücreler yaklaşık %70-80 olarak flask yüzeyini kapladıklarında pasajlama işlemleri gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin bu yoğunluğa ulaşma süreleri kanser hücrelerinde 1-2 gün, kök hücrelerde ise 3-4 gün olarak gözlenmiştir.

6.2. pEGFP-TRAIL Plazmidinin çoğaltılması ve doğrulanması

E. coli bakteri kültürlerinde 100 µg/ml Kanamycin içeren ortamda kontrol grubu olarak ayrılan bakterilerin çoğalmadığı, plazmidi taşıyan bakterilerin ise çoğaldığı gözlemlendi. Çoğaltılıp izole edilen pEGFP-TRAIL (Addgene-10953) plazmidi, izolasyonun ardından BioSpec Nano cihazında ölçülerek konsantrasyonları hesaplandı. İzolasyonlar arasında farklılık olmakla birlikte 1000-5000 ng/µl arasında değerler bulundu. Plazmidin doğruluğu ise BamH I ve EcoR I enzimleri ile çift kesim yöntemiyle analiz edildi. 5607 bp büyüklüğündeki plazmidde bulunan BamH I kesim noktasından (2266 bp) EcoR I kesim noktasına (1355 bp) kadar 4696 bp ve EcoR I kesim noktasından (1355 bp) BamH I kesim noktasına (2266 bp) kadar 911 bp olmak üzere iki bant gözlemlendi.

<Serial Cloner V2.5> -- <18 Ara 2012 Sal 10:13>

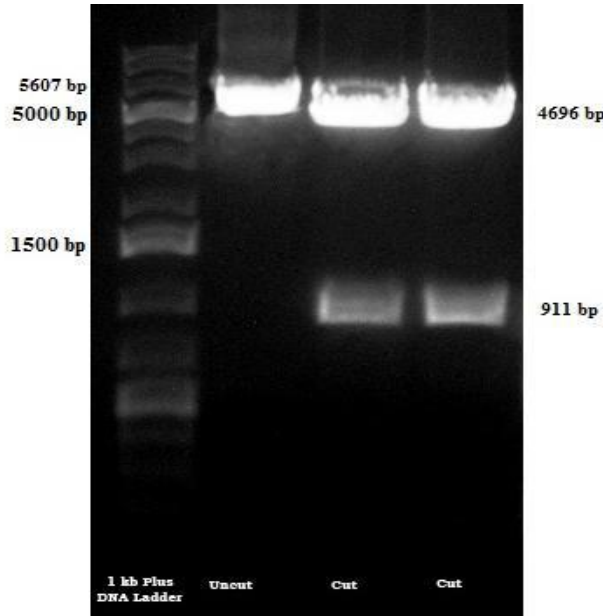
Restriction analysis of Untitled Sequence #1 [Circular]
Incubated with EcoRI + BamHI

2 fragments generated.

1: 4.696 bp - From BamHI[2266] To EcoRI[1355]
2: 911 bp - From EcoRI[1355] To BamHI[2266]



Şekil 7. pEGFP-TRAIL plazmidinin BamH I ve EcoR I kesim enzimleri ile kesimi sonucunda oluşan bant büyüklüğü



Şekil 8. pEGFP-TRAIL plazmidinin BamH I ve EcoR I kesim enzimleri ile kesimi sonucunda oluşan bantların agaroz jelde yürütülmeleri sonucundaki görüntüleri

6.3. Embelin Uygulanan SK-N-AS Hücrelerinde IC50 Değeri

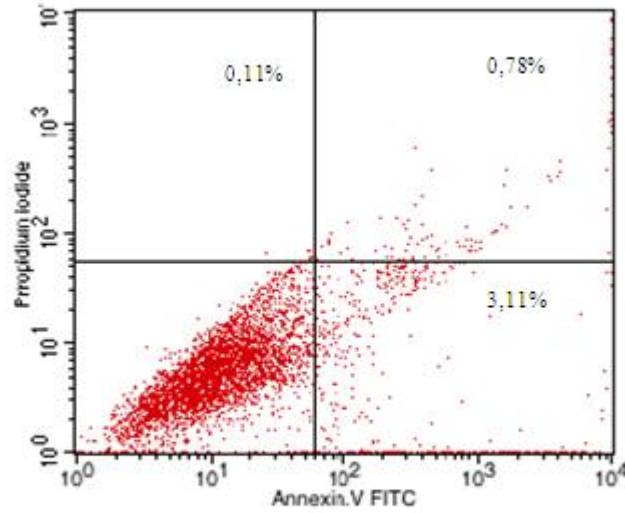
6.3.1.WST-1 canlılık tayini

0, 10, 30, 50, 75,100µM µM Embelin ile 24ve 48 saat inkübe edilen SK-N-AS hücrelerinin canlılık oranları WST-1 canlılık testi ile tayin edildi. Ajanla indüklenmemiş SK-N-AS hücrelerinin WST-1 reaktifiyle inkübe edildikten sonra plak okuyucuda verdiği (Kontrol grubu) absorbans değerleri %100 canlılık değeri olarak kabul edilerek belirtilen konsantrasyonlarda (0, 10, 30, 50, 75,100µM) Embelin uygulanmış diğer hücrelerin canlılık değerleri hesaplandı. Embelin'in SK-N-AS hücreleri üzerindeki canlılık testi sonuçlarına göre, Embelin'in 90µM'dan daha yüksek konsantrasyonlarda hücre ölüm oranı %50'den çok daha yüksek olduğu tespit edildi, 90 µM'dan daha düşük konsantrasyonlarda ise hücre canlılık oranı %50'den daha yüksek çıktı. Bu sonuçlar doğrultusunda IC50 değeri Embelin'in 90µM olarak tespit edildi. Yapılan tüm bu çalışmalar (her bir konsantrasyonda indüklenmiş ve indüklenmemiş hücre grupları için) dokuz kez tekrar edilerek ve ortalamaları alınarak hesaplandı.

6.4.Akış sitometresi ile Annexin V-PI apoptoz/nekroz analizi

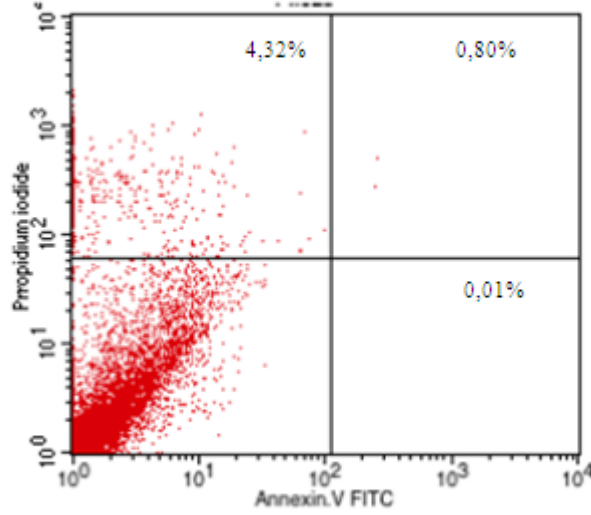
SK-N-AS hücrelerinde WST-1 yöntemi kullanılarak Embelin için belirlenen IC50 değeri, hücrelere uygulanıp 24 saat inkübe edildikten sonra apoptotik/nekrotik hücre ölümünün tipi, Akış Sitometrik Annexin V-PI Apoptoz/Nekroz Analizi ile incelendi. Her bir örnek için akış sitometride 1x10⁶ hücre sayımı gerçekleştirildi. TRAIL ekspresyonu artırılmış adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler, "wild type" olarak adlandırılan TRAIL plazmidi aktarılmamış MKH'ler ve embelin uygulanan nöroblastoma hücrelerindeki apoptoz oranları Annexin-V/PI analizi çalışması ile akış sitometrisi cihazında tayin edildi. Her aşama için 105 hücre sayıldı. Annexin V (-) ve PI (-) hücreler sağlıklı, Annexin V (+) ve PI (-) hücreler erken apoptotik, Annexin V (+) ve PI (+) hücreler geç apoptotik ve son olarak Annexin V (-) ve PI (+) hücreler

nekrotik olarak kabul edilmiştir. Her bir alana düşen hücre yüzdeleri hesaplandıktan sonra ortalama yüzde değerler grafiğe geçirilmiştir. Grafik sütunlarında hem erken apoptotik hem geç apoptotik hücelere ait yüzde değerleri toplanarak “apoptotik” olarak adlandırılmıştır. Annexin V (-) ve PI (-) hüceler sağlıklı, Annexin V (+) ve PI (-) hüceler erken apoptotik, Annexin V (+) ve PI (+) hüceler geç apoptotik ve son olarak Annexin V (-) ve PI (+) hüceler nekrotik olarak kabul edilmiştir. Her bir alana düşen hücre yüzdeleri hesaplandıktan sonra ortalama yüzde değerler grafiğe geçirilmiştir. Grafik sütunlarında hem erken apoptotik hem geç apoptotik hücelere ait yüzde değerleri toplanarak “apoptotik” olarak adlandırılmıştır.



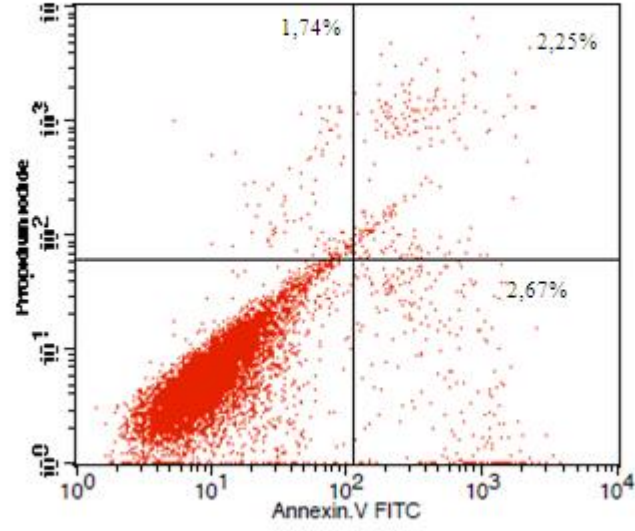
Şekil 9. Kontrol SK-N-AS hüceleri Annexin V analizi

Kontrol hücrelerinde akış sitometrik Annexin V analizlerinde canlı hücre sayısı yüksek çıkmıştır. Sadece Annevin V uygulandığı için Annexin V pozitifliği de düşük miktarda görülmüştür. Bulgular istatistiksel olarak gösterilmiştir.



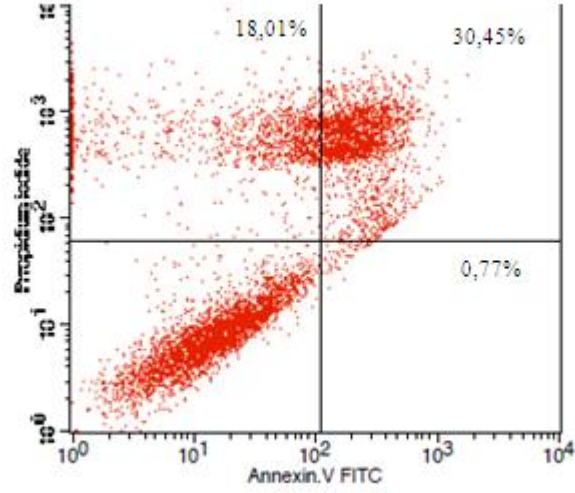
Şekil 10. Kontrol SK-N-AS hücreleri PI analiz

Kontrol hücrelerinde akış sitometrik PI analizlerinde canlı hücre sayısı yüksek çıkmıştır. Sadece PI uygulandığı için PI pozitifliği de düşük miktarda görülmüştür. Bulgular istatistiksel olarak gösterilmiştir.



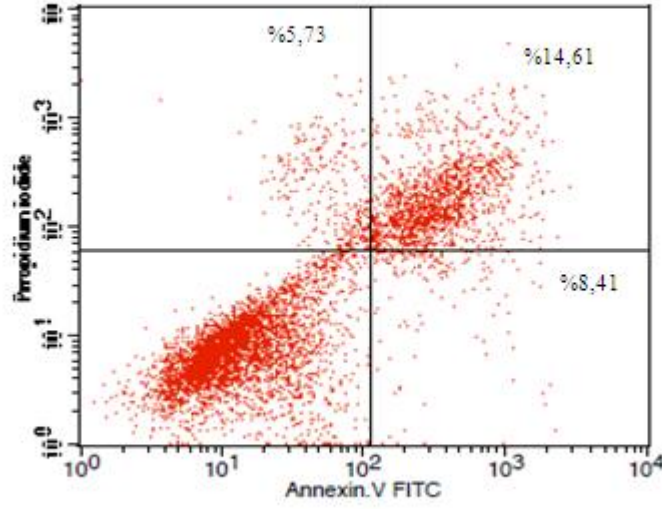
Şekil 11. Kontrol SK-N-AS hücreleri Annexin-PI analizi

Kontrol hücrelerinde akış sitometrik Annexin V-PI analizlerinde canlı hücre sayısı yüksek çıkmıştır. Annexin V ve PI pozitifliği de düşük miktarda görülmüştür. Bulgular istatistiksel olarak gösterilmiştir.



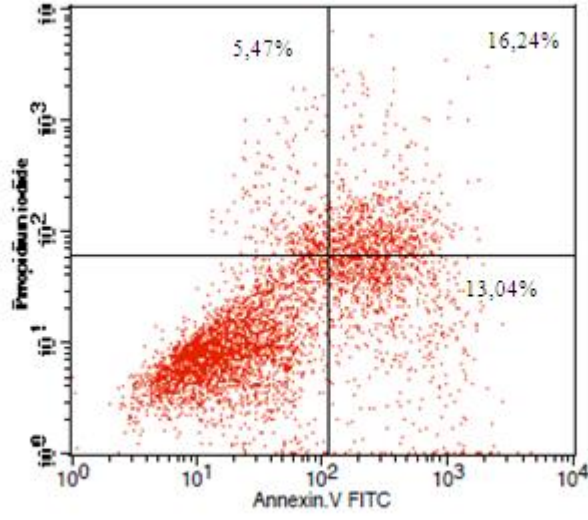
Şekil 12. Embelin ile indüklenen SK-N-AS hücreleri Annexin V-PI analizi

Embelin ile indüklenen hücrelerde akış sitometrik Annexin V-PI analizlerinde canlı hücre popülasyonunun buna oranla apoptotik hücre popülasyonunun varlığı görülmüştür. Bulgular istatistiksel olarak gösterilmiştir.



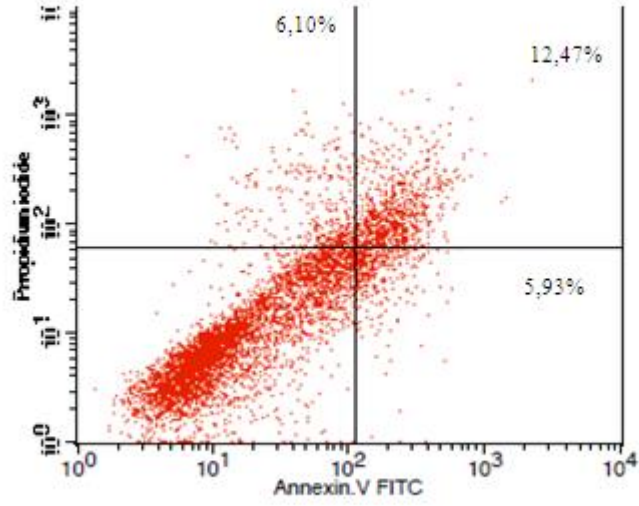
Şekil 13. Yabani tip MKH'lerle kokültüre edilmiş yabani tip SK-N-AS hücrelerinde Annexin V – PI analizi

MKH'lerle (MKH) birlikte kültüre edilmiş yabani tip (NB) nöroblastoma hücrelerinde akış sitometrik Annexin V-PI analizlerinde apoptotik hücre popülasyonunun varlığı görülmüştür. Bulgular istatistiksel olarak gösterilmiştir.



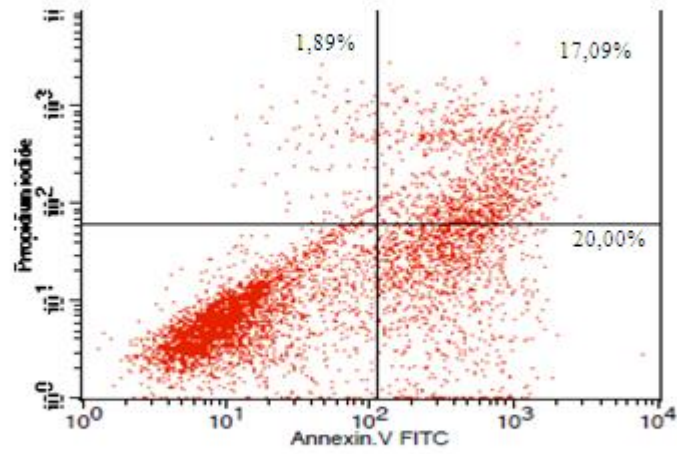
Şekil 14. TRAIL vektörü taşıyan MKH'lerle kokültüre edilmiş yabancı tip SK-N-AS hücrelerinde Annexin-PI analizi

TRAIL vektörü taşıyan MKH'lerle birlikte kültüre edilmiş yabancı tip SK-N-AS hücrelerinde, akış sitometrik Annexin V-PI analizlerinde apoptotik hücre popülasyonunun varlığı görülmüştür. Bulgular istatistiksel olarak gösterilmiştir.



Şekil 15. Embelin ile indüklenmiş yabancı tip SK-N-AS hücreleri ile yabancı tip MKH'lerin kokültür sonrası Annexin-PI analizi

Embelin ile indüklenmiş SK-N-AS hücreleri ile birlikte kültüre edilen yabancı tip MKH'lerin akış sitometrik Annexin V-PI analizlerinde apoptotik hücre popülasyonunun varlığı görülmüştür. Bulgular istatistiksel olarak gösterilmiştir.



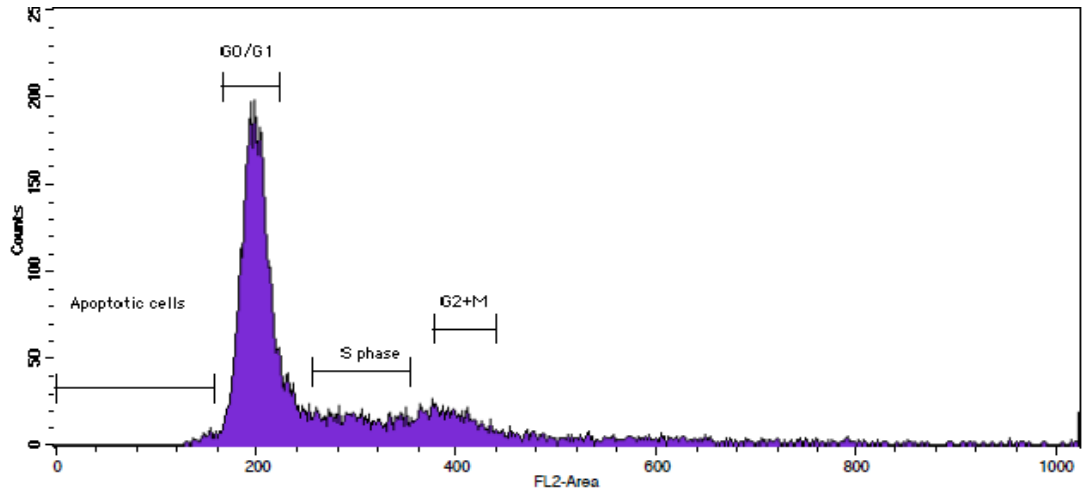
Şekil 16. TRAIL vektörü taşıyan MKH'ler ve Embelin ile indüklenmiş yabancı tip SK-N-AS hücrelerinin kokültür sonrasında Annexin-PI analizi

TRAIL vektörü taşıyan MKH'ler ile birlikte kültüre edilen Embelin ile indüklenmiş yabancı tip SK-N-AS hücrelerinin akış sitometrik Annexin V-PI analizlerinde apoptotik hücre popülasyonunun varlığı görülmüştür. Bulgular istatistiksel olarak gösterilmiştir.

6.5. Akış sitometrik hücre yaşam döngüsü regülasyon analizi

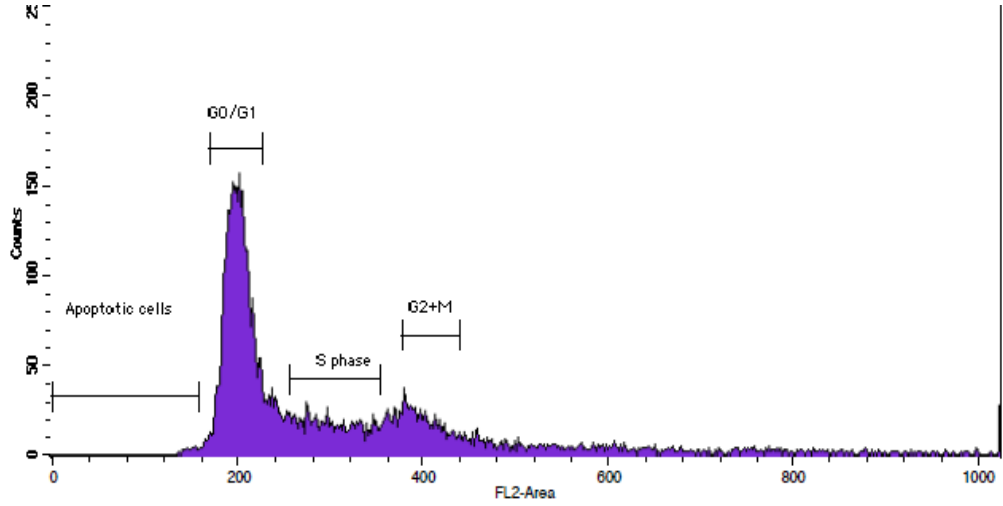
Embelin (90 μ M) 24 saat inkübe edilen SK-N-AS hücrelerinin, hücre yaşam döngüsünde meydana gelen değişim, akış sitometrik hücre yaşam döngüsü analizi ile tayin edilmiştir. Her bir örnek için akış sitometride 1x10⁶ hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Embelin uygulanan nöroblastoma (SK-N-AS) hücrelerin, TRAIL ekspresyonu artırılmış adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler ve “wild type” olarak adlandırılan TRAIL plazmidi aktarılmamış MKH'ler hücreler ile birlikte kültüre edilmes, sonucu değişim,akış sitometrik hücre yaşam döngüsü analizi ile tayin

edilmiştir Her aşama için 105 hücre sayıldı Her bir hücredeki DNA pikleri değerlendirilip G0/G1 ve G2/M belirlenmiştir. Bu pikler arasında kalan bölge S fazı olarak nitelendirilmiştir. G0/G1 pikinden az DNA içeriğine sahip hücreler ise G0/G1 fazı ve apoptotik hücre olarak değerlendirilmiştir. Pik alanlarına düşen hücre sayısının sayılan toplam hücre sayısına oranından her bir faz için hücre yüzdeleri hesaplanmış ve ortalama yüzde değerler grafiğe geçirilmiştir.



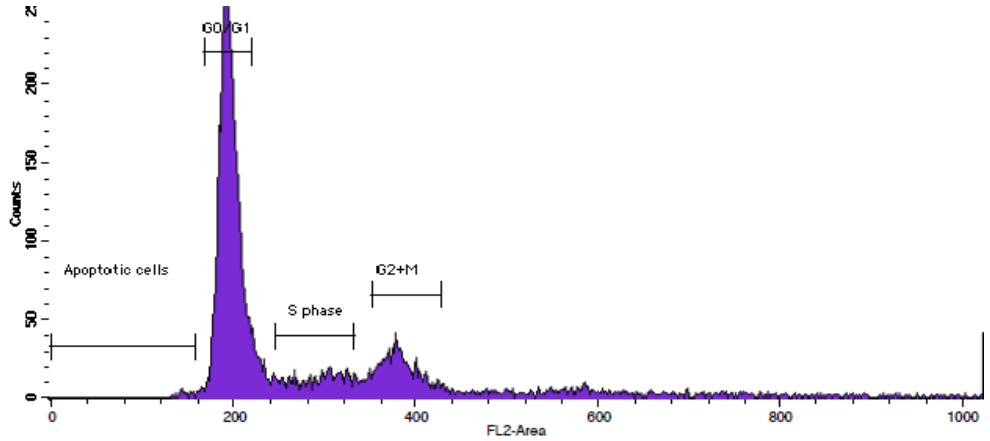
Şekil 17. Kontrol SK-N-AS hücreleri hücre yaşam döngüsü analizi

Kontrol hücrelerinin yaşam döngüsü analizlerine göre yaşam döngüsü fazları belirlenmiş ve bulgular istatistiksel olarak gösterilmiştir.



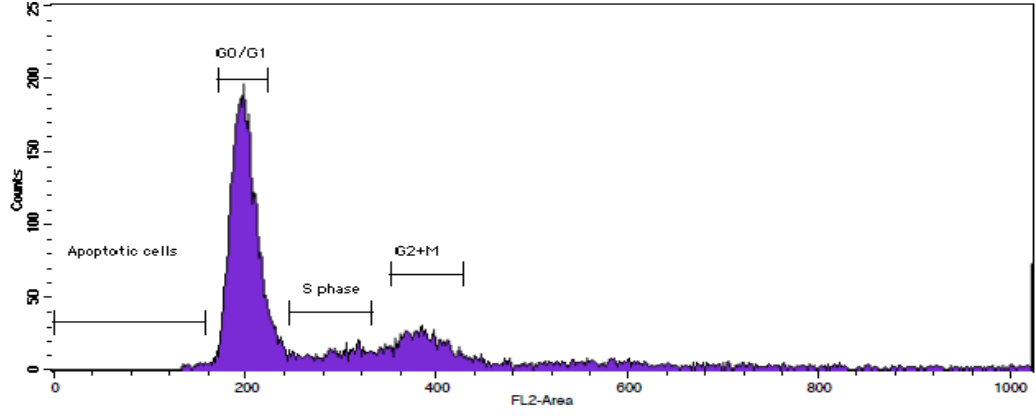
Şekil 18. Embelin ile indüklenen SK-N-AS hücrelerinde hücre yaşam döngüsü analizi

Embelin ile indüklen hücrelerde yaşam döngüsü fazlarındaki değişiklikler tespit edilmiş ve bulgular istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.



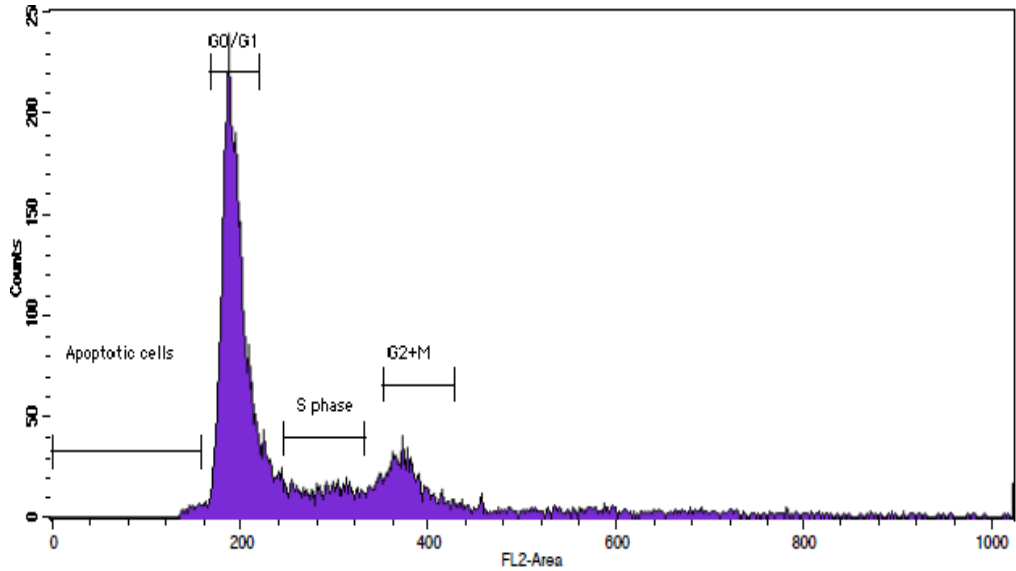
Şekil 19. Yabani tip MKH'lerle kokültüre edilmiş yabani tip SK-N-AS hücrelerinde Annexin V – PI analizi

MKH'lerle birlikte kültüre edilmiş yabani tip SK-N-AS hücrelerinin, hücre yaşam döngüsü fazlarındaki değişiklikler tespit edilmiş ve bulgular grafik olarak gösterilmiştir.



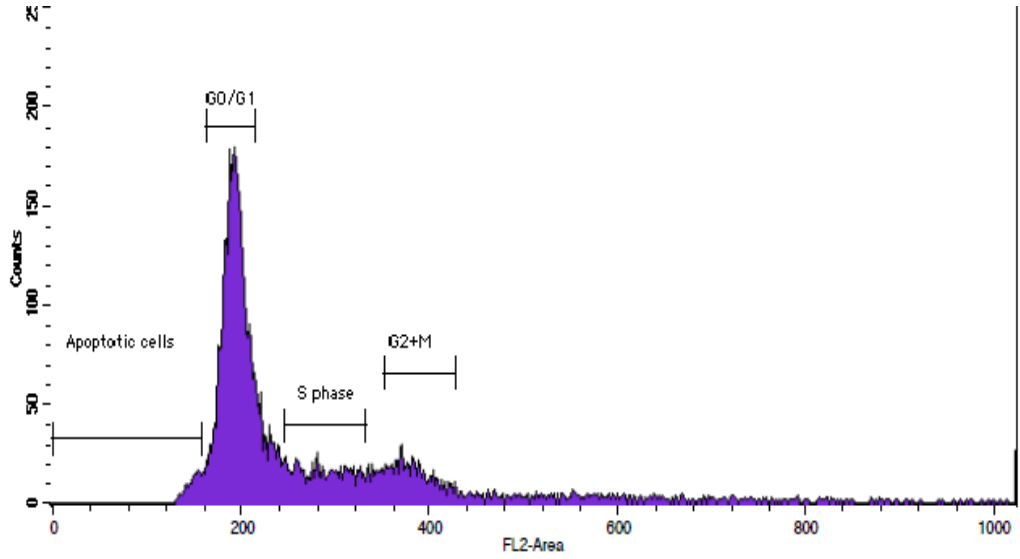
Şekil 20. TRAIL vektörü taşıyan MKH'lerle kokültüre edilmiş yabancı tip SK-N-AS hücrelerinde Annexin-PI analizi

TRAIL vektörü taşıyan MKH'lerle birlikte kültüre edilmiş SK-N-AS hücrelerinin, hücre yaşam döngüsü fazlarındaki değişiklikler tespit edilmiş ve bulgular grafik olarak gösterilmiştir.



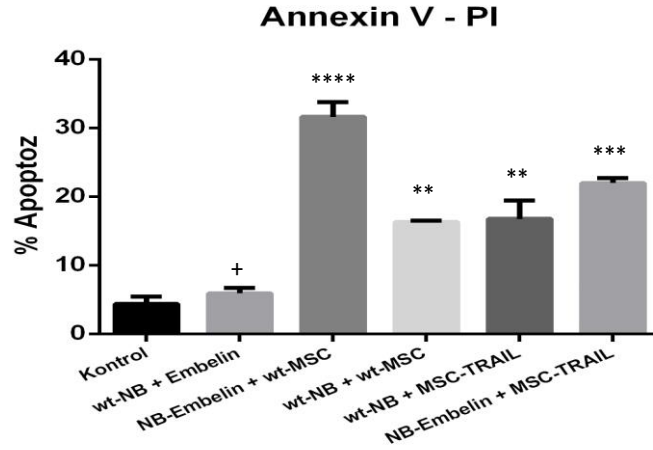
Şekil 21. Embelin ile indüklenmiş yabancı tip SK-N-AS hücreleri ile yabancı tip MKH'lerin kokültür sonrası Annexin-PI analizi

Embelin ile indüklenmiş SK-N-AS hücreleri ile birlikte kültüre edilen yabancı tip MKH'lerin hücre yaşam döngüsü fazlarındaki değişiklikler tespit edilmiş ve bulgular grafik olarak gösterilmiştir.



Şekil 22. TRAIL vektörü taşıyan MKH'ler ve Embelin ile indüklenmiş yabancı tip SK-N-AS hücrelerinin kokültür sonrasında Annexin-PI analizi

TRAIL vektörü taşıyan MKH'ler ile birlikte kültüre edilen Embelin ile indüklenmiş yabancı tip SK-N-AS hücrelerinin hücre yaşam döngüsü fazlarındaki değişiklikler tespit edilmiş ve bulgular grafik olarak gösterilmiştir.



Şekil 23. Kokültür sonucunda SK-N-AS hücrelerinde yapılan Annexin V-PI çalışmalarının grafikte gösterimi

+Anlamli değil NB+Embelin vs Kontrol

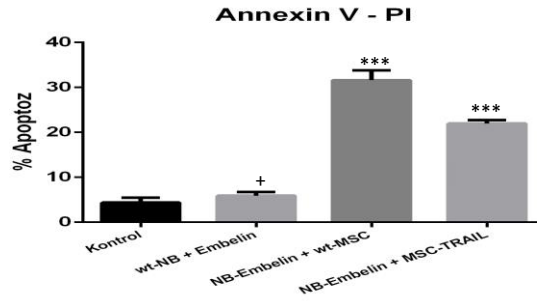
*** $p < 0.001$ NB-Embelin+wt-MSC, NB-Embelin+MSC-TRAIL vs Kontrol

** $p < 0.0012$ wt-NB+wt-MSC vs Kontrol

** $P < 0.0010$ wt-NB+MSC-TRAIL vs Kontrol

SK-N-AS nöroblastoma hücreleri mezenkimal kök hücrelerle indirekt olarak kokültür edilmelerinin ardından; nöroblastoma hücrelerinde akış sitometrisinde Annexin V-PI analiziyle apoptotik hücre tayinleri yapılmıştır. Kontrol grubuna ($4,390 \pm 0,74$) kıyasla kokültür yapılan gruplarda apoptotik hücre miktarının arttı gözlemlenmiştir. Kokültüre edilmeyen sadece Embelin uygulanan nöroblastoma hücrelerinde apoptoz değeri kontrole göre anlamsız çıkmıştır. ($5,900 \pm 0,58$) ($p < 0.8972$). Embelin ile indükleniş SK-N-AS hücreleri mezenkimal kök hücreleri ile birlikte kokültüre edildiğinde ($31,63 \pm 1,53$) ($p < 0,001$) Embelin uygulanmayan SK-N AS hücrelerinin mezenkimal kök hücre ile birlikte kültüre edilen ($16,29 \pm 0,15$) ($p < 0,0012$) gruba göre daha fazla apoptoz gözlemlenmiştir.

TRAIL plazmidi taşıyan ve TRAIL'ı daha fazla eksprese eden mezenkimal kök hücrelerin ($16,77 \pm 1,89$) ($p < 0,001$) TRAIL plazmidi taşımayan mezenkimal kök hücre grubuna ($16,29 \pm 0,15$) ($p < 0,0012$) göre apoptoz düzeyi daha yüksektir. TRAIL plazmidi taşıyan mezenkimal kök hücreler ve Embelin uygulanan Nöroblastoma hücreleri kokültüre edildiğinde ($21,98 \pm 0,53$) ($p < 0,001$) apoptoz oranı TRAIL plazmidi taşıyan mezenkimal kök hücrelerle nöroblastoma hücrelerinin kokültür edilmesine göre apoptoz oranı daha yüksektir. ($16,77 \pm 1,89$) ($p < 0,0010$). Elde edilen veriler anlamlı bulunmuştur.



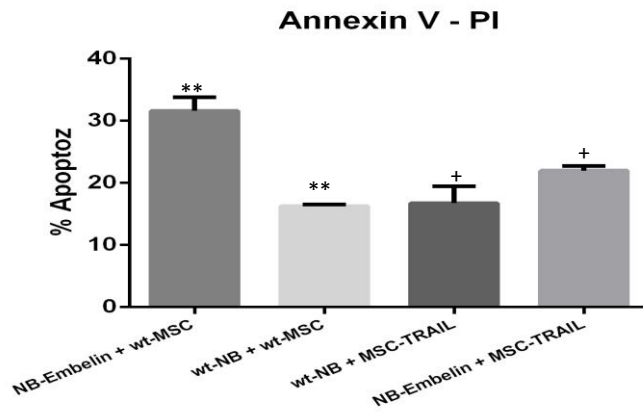
Şekil 24. XIAP inhibitörü Embelin kullanılmış SK-N-AS hücreleri ile TRAIL transfekte edilmiş ve edilmemiş MKH hücrelerinin kokültür edilmesi sonucu apoptoz oranlarının karşılaştırılması.

+Anlamlı değil wt-NB+Embelin vs Kontrol $p < 0.5835$,

*** $p < 0.0001$ NB-Embelin+wt-MSC vs Kontrol

*** $p < 0.0004$ NB-Embelin+TRAIL-MSC vs Kontrol

XIAP inhibitörü Embelin ile indüklenen nöroblastoma hücrelerinde apoptoz oranı ($5,900 \pm 0,58$) ($p < 0,5835$), kontrole göre ($4,390 \pm 0,74$) anlamsız bulunmuştur. TRAIL transfekte edilmiş ($21,98 \pm 0,535$) ($p < 0,0004$) ve edilmemiş mezenkimal kök hücrelerin ($31,63 \pm 1,53$) ($p < 0,0001$), embelin ile indüklenen SK-N-AS hücreleri ile birlikte kokültüre edildiğindeki apoptoz değerleri embelin uygulanmış nöroblastoma hücrelerine (wt-NB+Embelin) ($5,900 \pm 0,58$) ($p < 0,5835$) göre daha anlamlıdır.



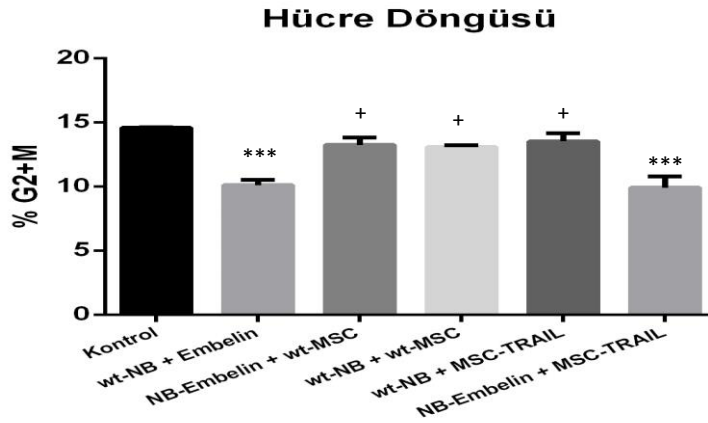
Şekil 25. TRAIL transfekte edilmemiş MKH hücrelerine uygulanan embelinin apoptotik etkisi ile TRAIL transfekte edilmiş MKH hücrelerine uygulanan embelinin apoptotik etkisinin karşılaştırılması.

+Anlamlı değil wt-N+MSC-TRAIL,NB-Embelin+MSC TRAIL vs.Kontrol $p < 0,0825$

** NB-Embelin+wt-MSC,wt-NB+MSC vs Kontrol

Embelin uygulanan nöroblastoma hücrelerinin mezenkimal kök hücre ile kültüre edilmesiyle elde edilen apoptoz yüzdesi ($31,63 \pm 1,53$) ($p < 0,0019$), Embelin uygulanmayan nöroblastoma hücresi ile TRAIL transfekte edilmemiş mezenkimal kök hücrenin birlikte kültürü ($16,29 \pm 0,15$) ($p < 0,0019$) sonucuna göre daha yüksektir.

TRAIL transfekte edilmiş mezenkimal kök hücrelerin embelin uygulanan nöroblastoma hücreleri ile kokültüre edilmesi sonucu elde edilen apoptoz yüzdesi(21.98 ± 0.53) ($p < 0,0825$), TRAIL transfekte edilmiş mezenkimal kök hücrelerin nöroblastomlarla yaptığı kokültür sonucunda elde edilen apoptoz yüzdesinin ($16,77 \pm 1,89$) ($p < 0,0825$) göre yüksektir.



Şekil 26. Kokültüre edilmiş hücrelerin G2+M evresine etkisi

+Anlamli değil NB-Embelin+MSC vs Kontrol

+ Anlamli değil wt-NB+wt-MSC vs Kontrol

+Anlamli değil wt-NB+MSC-TRAIL vs Kontrol

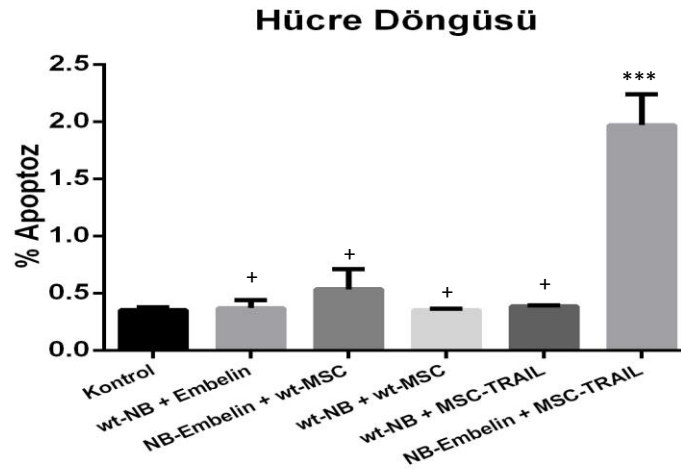
*** $p < 0.0006$ wt-NB+Embelin

*** $p < 0.004$ NB-Embelin +TRAIL MSC

TRAIL vektörü aktarılmış ve aktarılmamış mezenkimal kök hücreler ile embelin uygulanmış ve uygulanmamış nöroblastoma hücreleri kokültüre edildiğinde hücre döngüsü G2+M evresinde kontrole grubuna ($14,57 \pm 0,040$) kıyasla embelin uygulanan gruplarda G2+M evresinin azaldı görülmüştür. Embelin uygulanan

nöroblastoma hücrelerinde($10,11\pm 0,280$) ($p<0,0006$) ve TRAIL vektörü taşıyan mezenkimal kök hücre ile embelin uygulanan nöroblastoma hücresi kokültüre edildiğinde($9,918\pm 0,53$) ($p<0,004$) bulunan derler kontrole göre azlamıştır.

TRAIL transeksiyonu yapılmamış mezenkimal kök hücreler ile embelin uygulanmış nöroblastoma hücreleri kokültüre edildiğine göre kontrole kıyasla anlamlı azalma görülmemiştir($13,25\pm 0,395$). TRAIL transfeksiyonu yapılmış ve yapılmamış mezenkimal kök hücrelerin nöroblastoma hücreleri ile kokültüre edildiğinde elde edilen derler kontrole göre anlamsız bulunmuştur ($13,53\pm 0,450$; $13,10\pm 0,085$).



Şekil 27. Kokültür sonucunda hücre döngüsündeki apoptoz yüzdeleri

+Anlamlı değil NB-Embelin+wt-MSC, wt-NB+wt-MSC,

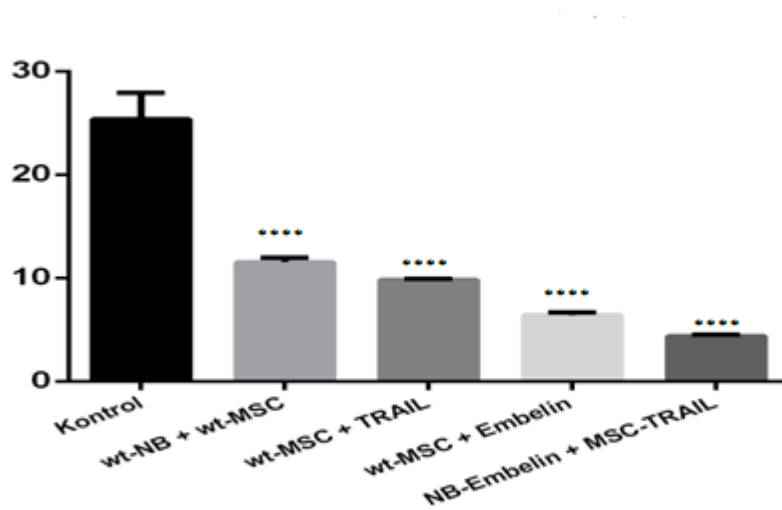
wt-NB +MSC-TRAIL, wt-NB+Embelin vs Kontrol

*** $p<0,004$ NB- Embelin+ MSC- TRAIL vs Kontrol

Kokültür sonrası yapılan hücre döngüsü analizinde apoptoz oranları karşılaştırılmıştır. Kontrole ($0,350\pm 0,020$) kıyasla gruplarda ($0,370\pm 0,050$; $0,350\pm 0,010$; $0,385\pm 0,005$; $0,535\pm 0,125$) apoptotik hücre miktarının değişmediği gözlemlenmektedir. TRAIL vektörü taşıyan mezenkimal kök hücreler ile embelin uygulanan nöroblastoma hücreleri kokültüre edildiğindeki apoptoz miktarı ($1,970\pm 0,190$) ($p<0,004$) kontrole ve diğer gruplara göre artmıştır.

6.6. NF- κ B sinyal yolağı

Kullanılan kit Ser32/36'dan fosforillenerek ortama salınan I- κ B seviyesini ölçmektedir. Bu durumda ortamda bulunan I- κ B miktarı ne kadar yüksekse hücredeki NF- κ B aktivitesi o kadar yüksek olacaktır.



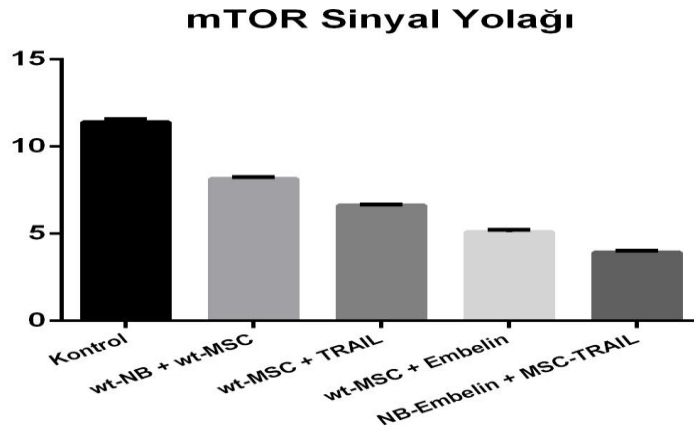
Şekil 28. I- κ B sinyal ileti yolağı analizi sonuçları

***** $p<0,00001$ wt-NB+Embelin,
NB-Embelin+wt-MSC, wt-NB+wt-MSC,
wt-NB+MSC-TRAIL, NB-Embelin+MSC-TRAIL vs Kontrol

NF- κ B yolağı hücrenin hayatta kalması ve proliferasyonu ile doğrudan ilgili bir sinyal yolağıdır. Hücre canlılığı yüksek olan hücrelerde daha aktiftir. Bu durumda embelin ile indüklenen nöroblastoma hücrelerinde, fosforile olmuş I- κ B seviyesi daha yüksek görölmektedir ($11,54 \pm 0,19$) ($p < 0,00001$) ve kontrol grubuna ($25,36 \pm 2,37$) göre anlamlıdır. Yabani tip MKH'lerle koköltüre edilmiş ve XIAP inhibitörü kullanılan nöroblastoma hücrelerinde fosforile olan I- κ B seviyesi daha düşüktür ($6,419 \pm 0,31$) ($p < 0,00001$). TRAIL ekspresyonu artırılmış MKH'lerle koköltüre edilmiş yabani tip nöroblastomalarda bu seviye daha düşmüş, hem TRAIL ekspresyonu artırılmış MKH'ler ve hem de XIAP inhibitörü kullanılan nöroblastoma hücrelerinin koköltürü sonuçlarında ise fosforile olmuş I- κ B seviyesi ($4,375 \pm 0,09$; $6,419 \pm 0,31$) ($p < 0,00001$) diğer gruplara göre en düşük seviyedir. Bu da TRAIL'ın indüklediği apoptozda NF- κ B aktivitesinin düştüğünü göstermektedir. Hücrelerin ölüme gidişiyile bu doğrudan etkilidir.

6.7.mTOR Sinyal yolağı

Kullanılan kit p-S2448'dan fosforillenerek ortama salınan Src tirozin kinazın seviyesini ölçmektedir. Kanser gelişimi sırasında Src tirozin kinazın ekspresyonu ve/veya aktivitesi artmaktadır.



Şekil 29. mTOR sinyal yolağı analizleri sonuçları

***** $p < 0,00001$ wt-NB+Embelin,
NB-Embelin+wt-MSK, wt-NB+wt-MSK,
wt-NB+MSK-TRAIL,
NB-Embelin+MSK-TRAIL vs Kontrol

TRAIL vektörü taşıyan veya taşımayan mezenkimal kök hücreler nöroblastoma hücreleri ile kokültüre edildiğinde kontrole ($11,40 \pm 0,20$) göre fosforilasyon seviyelerinde ($6,61 \pm 0,06$; $8,15 \pm 0,10$) ($p < 0,00001$) azalmalar görülmektedir. TRAIL vektörü taşıyan veya taşımayan mezenkimal kök hücreler embelin ile indüklenen nöroblastoma hücreleri ile kokültüre edildiğinde kontrole ($11,40 \pm 0,20$) göre fosforilasyon seviyelerinde ($3,91 \pm 0,10$; $5,09 \pm 0,11$) ($p < 0,00001$) anlamlı azalmalar görülmektedir. Fosfoinozid-3 kinaz (PI-3K) ailesi, büyüme ve yaşama sinyallerinin iletiminden sorumlu proteinlerdir [Cheng M, Sexl V, Sherr C, Raussel M., 1988]. Reseptörün uyarılmasından sonra PI-3K, hücre membranında inozitol fosfolipidlerin fosforilasyonunu katalizler. Fosfatidilinozitol trifosfat (PIP3), bu yolla oluşan bir lipid mediatördür. PIP3, PIP3 bağımlı kinazlar (PKD) ve protein kinaz B (PKB)'nin aktivasyonundan sorumludur. Protein kinaz B, Akt1 ve Akt2 genleri tarafından kodlanan bir proteindir. Genler, viral v-akt onkogeninin insanda bulunan homologlarıdır. Sitokinler ve büyüme faktörleri PI-3K ve PKB yolunu aktive ederek hücreler için yaşama sinyalleri oluştururlar. Tümör baskılayıcı proteinlerden PTEN ise, PIP3 oluşumunu inhibe ederek negatif düzenleyici rol oynar [Staal SP., 1987, Nicholson KM, Anderson NG., 2002]. Protein kinaz B uyarısı hücre içinde çeşitli proteinlerin aktivitelerini etkilemektedir. Bunlardan biri, "mammalian target of rapamycin (mTOR)" proteindir. Kinaz aktivitesine sahip olan bu proteinin rapamisin tarafından inhibe olduğu gösterilmiştir [Vogt PK., 2001]. S6 kinaz (S6K) aktivasyonu ile S6 ribozomal proteinini aktive ederek, 5'TOP mRNA'ların translasyonunu uyarır. Ökaryotik inisiasyon faktörü 4E ile bağlanan proteini (4E-BP) inaktive ederek, 4E'nin serbest hale gelmesini sağlar. Aktif hale gelen 4E ribozomal proteinlerin translasyonunu uyarır. 5'TOP mRNA'lar, hücredeki RNA miktarının %20'sini oluşturur ve translasyon işleminde etkilidirler. 4E proteini de, bu mesajların translasyonunda etkilidir. Sentezlenen proteinlerin, büyüme faktörleri, onkoproteinler

veya hücre döngüsünün düzenleyici proteinleri olması mTOR'un önemini ortaya koymaktadır. Rapamisin, mTOR sentez artışı görülen tümörlerde antitümör etki gösterdiği bildirilmektedir [Nicholson KM, Anderson NG.,2002, Jefferies HB, Fumagalli S, Dennis PB, et al.,1997, Schmelzle T, Hall MN.,199,Vogt PK.,]. mTOR katabolik ve anabolik metabolizmalar arasında anahtar işlevi olan bir kinazdır [Faivre S, Kroemer G, Raymond E.,2006]. Rapamisin (sirolimus), 1975 yılında Rapa Nui'de toprak mahsullerinden doğal olarak üretilmiştir [Seghal SN, Baker H, Vézina C., 1975]. Kanser gelişimi sürecinde Src tirozin kinazın ekspresyonu ve/veya aktivitesi artmaktadır. Hücrelerde inaktif halde bulunan endojen Src uyarılarla aktif hale geçince, hem kinaz aktivitesi hem de SH domainleri üzerindeki kısıtlayıcı etkenler ortadan kalkar. Aktive olan protein, periferik alandaki adezyon bölgelerine hareket eder. Src'nin katalitik aktivitesi ile tetiklenen sinyal iletimi mekanizması hücre büyümesi, adezyon ve migrasyon gibi fizyolojik işlevleri yürütmektedir. Buna göre, kanser hücrelerinde Src aktivasyonunun kontrolünün ortadan kalkması tümör büyümesini hızlandırabilir ve hücrelerdeki invazyon potansiyelini uyarabilir.

7. TARTIŞMA

Kansere karşı geliştirilen yeni tedavi yaklaşımlarına rağmen çocukluk çağı kanser ölümlerinin yaklaşık %15'inden nöroblastoma tümörleri sorumludur. Biyolojik davranışında değişkenlik sunması nedeniyle, agresif bir yol izlemesinden dolayı prognoz sağaltımı sorunlu olabilmektedir. Nöroblastomada tedavi süreci ameliyat, kemoterapi, radyoterapi gibi farklı yöntemlerin uygulanmasıyla uzun bir dönemi kapsamaktadır. Buna ek olarak nöroblastoma rekürrensleri yüksek düzeyde tedavi rezistansı ve çok kötü bir prognoz sergilemekte ve genellikle ölümcül seyretmektedir. İleri dönem nöroblastoma taşıyıcılarında görülen, agresif bir tedaviye rağmen kötü sonuçlar alınması, yeni tedavi yaklaşımlarını gerekli kılmaktadır. Diğer kanser türlerinde uygulanan gen tedavi yaklaşımları nöroblastoma için de uygulanabilir gözükmemektedir [Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL.,2007]. Gen tedavilerinde yaşanan en büyük zorluklardan birisi, canlı vücudunda vektörü istenilen dokuya taşımaktır. Bu konuda kök hücrelerin, kanser hücrelerine doğru gösterdikleri migrasyon, kök hücreleri kanser hücrelerine karşı taşıyıcı olarak kullanılabilir kılmaktadır [Kabos P, Ehtesham M, Kabosova A, Black KL, Yu JS.,2002].

Bir apoptoz indükleyici ligand olan Tümör Nekroz Faktör İlişkili Apoptoz İndükleyici Ligand “Tumor Necrosis Factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand” (TRAIL), hücre membranındaki reseptörüne bağlandığında FADD gibi ilişkili domeynler üzerinden kaspaz-8 aktivasyonu ile hücrenin apoptoza gitmesine neden olmaktadır. Ayrıca TRAIL normal hücrelerde toksik etki göstermezken kanser hücrelerinde apoptozu uyardığı için de tedavide umut vericidir [Daris VR., et al. 2010]. Apoptozda ekstrinsik ve intrinsik yollar arasındaki etkileşim Bid proteininin kaspaz-8 tarafından aktifleşen tBid aracılığıyla sağlanır. Bid ayrıca diğer hücre yüzey ölüm reseptörleri olan TNF ve TRAIL aracılığıyla da aktifleşebilmektedir. Yapılan çalışmalarda, Bid' proteini “knock out” yapılmış fare hepatositlerinde, TNF veya anti-Fas ile apoptoz indüklenmeye çalışıldığında, bu farelerde apoptozun oluşmadığı gözlemlenmiştir [Luo X. Budihardjo I. Zou H., Slaughter C., and Wang X., 1996].

Bir kemoterapötik ajan olan aktinomisin D'nin (Act D) Bcl-XL anti-apoptotik proteininin sentezini azaltarak Kaposi Sarkoma hücrelerini TRAIL aracılı apoptozise duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir [Curr Opin Pharmacol, 2004]. Yine TRAIL ve Act D'nin birlikte kullanıldığı yaklaşımlarla, TRAIL'a dirençli prostat kanser hücrelerinde Act D'nin XIAP anti-apoptotik molekülünün sentezini azalttığı gösterilmiştir. Bir başka kemoterapötik ajan olan etopozitin, TR-1 ve TR-2 ölüm reseptörlerinin sentezini artırarak meme kanseri hücrelerinde TRAIL aracılı apoptozun etkinliğini önemli derecede artırdığı gösterilmiştir [Curr Opin Pharmacol, 2004]. TRAIL'ın kanser hücrelerindeki etkinliğini artırmak için kemoterapötik ajanların yanında başka yaklaşımların, genel olarak TRAIL ölüm reseptörlerinin ve kaspazların sentezini artırarak, ve IAP ailesi üyesi moleküllerin veya anti-apoptotik c-FLIP molekülünün inhibisyonunu sağlayarak fonksiyon gördüğü gösterilmiştir.

Literatürler ışığında mezenkimal kök hücrelerin her ne kadar kanser hücrelerine göçü ve kanser hücrelerini kontrollü ölüm şekli olan apoptoza yönlendirdiği bilinse de, TRAIL geninin AD-MKH'lere transferi sonucunda mezenkimal kök hücrenin bu göçünden yararlanılarak kanser hücrelerine gitmesi ve taşıdığı TRAIL geninin ifade edilmesiyle apoptozu artırması daha etkin olacaktır. Bizim çalışmamız sonucunda da, mezenkimal kök hücrelerin, hem kontrol grubuna hem de embelin ile indüklenen nöroblastoma kanser hücrelerine göre apoptozu artırdığı görülmüştür. Mezenkimal kök hücrelere TRAIL plazmidi transfekte edilmesiyle birlikte, yabancı tip olarak adlandırdığımız, TRAIL plazmidi transfeksiyonu yapılmamış kök hücrelere göre apoptozu artırdığı tespit edilmiştir. Nöroblastoma da bunların içerisinde olmak üzere bazı kanser türlerinde TRAIL rezistansı da tespit edilmiştir. TRAIL direncinde yalancı reseptörler denilen "Decoy receptor" (DcR)'ler ile ölüm reseptörlerinin oranı etkilidir. TRAIL, DcR1 ve DcR2'ye bağlandığında ileti gerçekleşmeyeceği için DcR'lerin fazla olması TRAIL'a bağlı apoptozu yarışmalı olarak engellemektedir. Ayrıca birçok çalışmada TRAIL direnci ile anti-apoptotik moleküllerin etkileşimi de incelenmiştir. Bu anti apoptotik moleküllerin başında c-FLIP (Cellular FLICE-inhibitory protein) ve IAP (inhibitor of apoptosis protein) gelmektedir. c-FLIP; FADD üzerindeki kaspaz-8 bağlanma bölgesini işgal ederek kaspaz kaskadının aktivasyonunu ve böylece ölüm sinyalini bloklayarak gerçekleştirirken, IAP ise

kaspaz-9/-3 ve kaspaz-7'nin aktivasyonu veya aktivitesini bozarak gerçekleştirir. IAP ailesinin üyeleri arasında; X-linked IAP (XIAP), c-IAP1, c-IAP2 ve Survivin gibi moleküller bulunurlar. Bazı kanser türleriyle yapılan çalışmalarda XIAP'ın seviyesinin yüksek olmasının TRAIL'ın indüklediği apoptozu blokladığı gösterilmiştir. XIAP, down-regüle edildiğinde hücreler TRAIL'a karşı duyarlı hale gelerek apoptoz miktarlarında belirgin artışlar gözlenmiştir. XIAP'ın si-RNA ile susturulduğu glioma hücreleri ve TRAIL geni transfekte edilmiş kordon kanı kök hücrelerinin birlikte ko-kültüre edilmesiyle yapılmış bir çalışmada, XIAP'ın down-regülasyonu kaspaz-3 ve kaspaz-9'un aktivasyonuna yol açarak glioma hücrelerinde apoptozu tetiklemiştir. Apoptoz; mitokondri zar kaybı, Bax ve Bad'ın up-regülasyonu, Akt ve p-Akt moleküllerinin down-regülasyonu ile FACS, TUNEL gibi çeşitli yöntemlerle gösterilmiştir [Dasari VR., et al., 2010].

Yaptığımız çalışmada, Embelin ile nöroblastoma hücrelerinde XIAP'ın inhibe edilmesinin ardından TRAIL ile uyarılan hücrelerin daha fazla apoptoz gittiği görülmektedir. Bu sonuçlar da bize, bizim kullandığımız hücrelerin de XIAP üzerinden TRAIL'a karşı direnç gösterdiğini ifade edebilir. Embelin küçük molekül ağırlıklı spesifik bir XIAP inhibitörüdür, meme kanseri ve diğer solid tümörlerde hücre proliferasyonunu inhibe eder, apoptozu düzenler [Allensworth JL., et al., 2012]. Embelinin meme kanseri hücrelerinde hücre döngüsü G2+M evresini inhibe ettiği ve apoptotik hücre sayısının arttığı gözlemlenmiştir [Yang LI., et al.2012]. Yapılan çalışmalar embelinin hücre proliferasyonu ve apoptozla ilgili siklin D1, c-Myc ve survivini down regüle ettiği gözlenmiştir. Siklin D1 hücre döngüsü G0-G1 fazında önemli rol almaktadır [Nasmyth K., 1996]. Siklin D1 NF-κB kontrolü altında olduğundan düşük siklin D1 embelin tarafından inhibe edilmiş NF-κB göstergesidir. Benzer şekilde survivin ve c-Myc nin inhibisyonunda NF-κB' nin embelin tarafından inhibisyonunun göstergesidir. Yapılan çalışmada embelinin kolon kanserinde c-Myc ekspresyonunu azalttığını, hücre döngüsünü, anjiyogenezi ve apoptozu regüle ettiği görülmüştür [Eisenman RN., 2001, Nesbit CE, Tersak JM, Prochownik EV., 1999, Baudino TA., et al., 2002, Bertl E, Bartsch H, Gerha C., 2006]. Embelin prostat kanseri hücrelerinde kaspaz aktivasyonunu sağlayarak hücre büyümesinin inhibisyonunu ve hücre ölümünü sağlamıştır [Danquah M., 2009]. Anti-

apoptotik proteinlerden olan BCL-2 ailesi proteinleri ise yine TRAIL tarafından indüklenen apoptozu inhibe ederler. Anti-apoptotik proteinler, fosfatidylinositol-3-kinase (PI3K), Akt, Nuclear factor-kappa B (NF- κ B) veya inhibitör kappa B (I κ B) ailesi transkripsiyon faktörleri tarafından kontrol edilir [Mellier G, Huang S, Shenoy K, Pervaiz S., 2010].

TRAIL reseptörlerinden DR4 ve DR5'in NF- κ B sinyal yolu ile ilişkisi bilinmektedir. TRAIL dirençli hücrelerde NF- κ B'nin aktivasyonu sonucunda hücre proliferasyonunda ve sağ kalımında artış gözlenmektedir. Tümör hücrelerinde ölüm reseptörleri sinyallerindeki defekt sonucunda NF- κ B'ye bağlı olarak hücre proliferasyonu, metastazı ve invazyonunda artış gözlenmektedir. Ravi ve arkadaşları NF- κ B'nin tumor hücrelerindeki bu etkisinde NF- κ B-alt ünitelerinden olan "RelA (p65)" ve "c-Rel"nin rol oynadığını önermişlerdir. TRAIL uygulanmasının ardından RelA'da over-ekspresyon, kaspaz-8, DR4 ve DR5 ekspresyonlarında azalma gözlenirken c-IAP1 ve c-IAP2'de artış gözlenmekte ve büyük ölçüde anti-apoptotik bir süreçle sonuçlanmaktadır. Bunun tersine ise TRAIL'ın uygulanmasından sonra c-Rel'in over-ekspresyonu ile de DR4, DR5 ve Bcl-Xs'nin artması; c-IAP1, c-IAP2 ve survivin'in inhibisyonu ve pro-apoptotik sürecin başlaması görülmektedir [Mellier G., et al. 2010].

Sinyal iletimi yollarını ve sinyal proteinlerini hedef alan onkojenik mutasyonlara sık olarak rastlanmaktadır. Sinyal iletiminde meydana gelen değişimler hücrenin çoğalma ve/veya yaşama işlevlerinin kontrolünü ortadan kaldırır. Böylelikle, onkojenik sinyal iletimi tümör gelişimi ile invazyon/metastaz sürecinde etkin rol oynamaktadır. I- κ B (inhibitör- κ B) proteinleri sitoplazmada NF- κ B/Rel transkripsiyon faktörlerine bağlı bulunmaktadır. Bu durumda kompleks inaktif formdadır. I- κ B fosforilasyonunun ardından, I- κ B'nin proteazom aracılı yıkımı ile, NF- κ B/Rel kompleksi fosforillenmek ve çekirdeğe gitmek üzere salınarak aktif forma geçer. I- κ B fosforilasyonunu sitokinler, büyüme faktörleri ve kemokinler gibi birçok hücre dışı sinyal molekülleri uyarmaktadır. NF- κ B'nin salınmasında I- κ B'nin Ser32/36'dan fosforillenmesi önemlidir. Ve bu bölgenin fosforilasyonu NF- κ B aktivasyonunun iyi bir belirteçidir. Yaptığımız sinyal yollarını analizlerinde, I-

κ B'nin hücredeki miktarı, NF- κ B aktivitesi ile ve dolayısıyla hücre canlılığıyla ilgilidir. Bu durumda yabancı tipteki MKH'lerle birlikte kokültüre edilmiş nöroblastoma hücrelerinde, fosforile olmuş I- κ B seviyesi daha yüksek görülmektedir. Hem TRAIL ekspresyonu artırılmış MKH'ler ve hem de XIAP inhibitörü kullanılmış nöroblastoma hücrelerinin kokültürü sonuçlarında ise fosforile olmuş I- κ B seviyesi diğer gruplara göre en düşük seviyedir. Bu da TRAIL'ın indüklediği apoptozda NF- κ B aktivitesinin düştüğünü göstermektedir. Antikanser ajanlar olarak mTOR inhibitörlerinin ortaya çıkışı ana molekülden ziyade rapamisin analogları ile başlamıştır. Güncel olarak bu analoglar temsirolimus, everolimus, ridaforolimus ve deforolimustan oluşmaktadır. mTOR inhibitörlerinin kanserli hastalarda güvenilirlikleri ve etkinlikleri kanıtlanmıştır. mTOR inhibitörleri ile yapılan klinik çalışmalar uzun süreli objektif tümör yanıtı sağlamıştır [Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, et al., 2008, Atkins MB, Hidalgo M, Stadler WM, et al., 2004].

mTOR inhibitörü ilaçların meme, lenfoma, akciğer, mide ve sarkom kanserlerini içine alan çeşitli solid tümörlerde etkinliği gösterilmiştir [Yuan R, Kay A, Berg WJ and Leubwohl D., 2009]. PI3K/ AKT/ mTOR sinyal yolağının düzensizliği birçok kanser tipinin patogenezinde rol oynamaktadır. mTOR öncesi ve sonrası sinyal yollarının her ikisi de insan kanserlerinde yaygın olarak bozulmuştur. mTOR, PI3K/AKT'nin aşağı doğru akım yolağında fonksiyon gösteren anahtar bir kinaz olarak tanımlanmıştır ve bu yüzden inhibisyonu, potansiyel olarak önemli terapötik bir hedef olarak belirlenmiştir. mTOR apoptotik hücre ölümünün düzenlenmesinde etkilidir. Apoptotik ölüme temelde p53, B-hücreli lenfoma 2 (BCL2), BCL2-antagonisti (BAD), p21, p27 ve c-myc gibi sinyal iletim hedefleri belirleyicidir. mTOR aktivasyonu hücre ölümünü düzenleyen bu molekülleri inhibe eder [Favre S, Kroemer G, Raymond E., 2006].

Yine başka çalışmalarda mTOR'un tümör hücre motilitesinde, anjiyogenezinde ve kanser metastazlarının regülasyonunda önemli rol oynadığı gösterilmiştir [Zhang L, Fang B.,2005]. Kanser hücrelerinde, hipoksi anjiyogenezin en güçlü uyarıcısıdır. Hipoksiye hücrel cevapı düzenleyen en önemli proteinler HIF'lerdir. HIFa ve HIFb subünitlerinden oluşur. Hipoksik durumlar HIF'leri aktive eder, bu da

anjyogenez için gerekli çeşitli büyüme faktörlerinin ekspresyonunu uyarır. Bu faktörler arasında VEGF, temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF) ve trombosit büyüme faktörü (PDGF) bulunmaktadır. Besin ve büyüme faktörleri bol miktarda bulunduğu, mTOR aktive olur, bu da protein sentezi, hücre büyümesi ve hücre gelişimine neden olur. p53 geni DNA hasarı ve düşük besin seviyeleri gibi hücrede stresi indükleyen şartlar altında aktive edilen kritik bir tümör baskılayıcı proteini kodlamaktadır. Bu proteinler sıklıkla malignitelerinde eksikliğe veya mutasyona uğramışlardır ve fonksiyonlarını kaybetmeleri kemoterapiye dirençle ilişkilidir. Yakın zamandaki bulgular mTOR sinyalinin p53 tarafından inhibe edildiğini ve p53'deki fonksiyon kaybının mTOR aktivasyonu ile sonuçlandığını göstermektedir [Vazquez A, Bond EE, Levine AJ, Bond GL.,2008]

Çalışmamızdan elde edilen bulgular istatistiksel olarak one way Anova ile değerlendirildiğinde; TRAIL ekspresyonu artırılmış mezenkimal kök hücrelerin, embelin uygulanan nöroblastoma hücreleri üzerinde apoptozu indükleyerek hücre canlılığını etkilediğini ve bu yolla hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini göstermektedir. Diğer bir çalışmada NF- κ B ve mTOR sinyal ileti yolları analiz edilmiştir. Hem sinyal yollarıyla ilgili yapılan çalışmalar, hem de Annexin V-PI tayin yönteminin bulguları; TRAIL ekspresyonu artırılmış mezenkimal kök hücrelerin nöroblastoma hücreleri üzerinde apoptozu indüklediğini desteklemektedir.

8.KAYNAKLAR

- Ahn KS. Embelin an inhibitor of X chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein, blocks nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) signaling pathway leading to suppression of NF-kappaB-regulated antiapoptotic and metastatic gene products. *Mol Pharmacol.* 2007;71(1):209–19.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K and Walter P., *The Cell Cycle And Programmed Cell Death.* In: *Molecular Biology of the Cell.* Garland Science. 2007; 991
- Allensworth JL, Aird KM, Aldrich AJ, Batinic-Haberle I and Devi GR: XIAP inhibition and generation of reactive oxygen species enhances TRAIL sensitivity in inflammatory breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 11: 1518-1527, 2012
- Apo2L/TRAIL. *Curr Opin Pharmacol*, 2004. 4(4): p. 333-9. apoptosis of prostate cancer cells: role of XIAP in resistance.
- Ashkenazi A, Dixit VM. (1998). Death receptors: Signalling and modulation, *Sciences* 281, 1305-1308.
- Atkins MB, Hidalgo M, Stadler WM, et al. Randomized phase II study of multiple dose levels of CCI-779, a novel mammalian target of sirolimus kinase inhibitor, in patients with advanced refractory renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2004;22:909-8.
- Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol*, 11(9):372-7, 2001
- Baudino TA, McKay C, Pendeveille-Samain H, Nilsson JA, Maclean KH, White EL et al. c-Myc is essential for vasculogenesis and angiogenesis during development and tumor progression. *Genes Dev* 2002;16:2530–43.
- Beroud C, Soussi T. P53 gene mutation software and database. *Nucleic Acid Res.* 1998; 26: 200-204.
- Bertl E, Bartsch H, Gerhauer C. Inhibition of angiogenesis and endothelial cell functions are novel sulforaphane-mediated mechanisms in chemoprevention. *Mol Cancer Ther* 2006;5:575–85.
- Black LL, Gaynor J, Gahring D, Adams C, Aron D, Harman S, Gingerich DA, Harman R. (2007). Effect of adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on lameness in dogs with chronic osteoarthritis of the coxofemoral joints: a randomized, double-blinded, multicenter, controlled trial. *Vet Ther.* Winter;8(4):272-84.
- Cancer Journal for Clinicians* Volume 55; Issue 3, 178-194, 2005

- Carter B., Gronda M., Wang Z., Welsh K., Pinilla C., Andreeff M. et al. (2005). Small-molecule XIAP inhibitors depress downstream effector caspases and induce apoptosis of acute myeloid leukemia cells, *Blood*, 105, 4043-4050
- Chai J., Shiozaki E., Srinivasula S., Wu Q., Data P., Alnemri E., Shi Y. (2001) Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP, *Cell*, 104, 769-780
- Cheng M, Sexl V, Sherr C, Raussel M. Assembly of cyclin D-dependent kinase and titration of p27Kip1 regulated by mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1) *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 1091-4.
- Controlling the mitochondrial gatekeeper for effective chemotherapy. *Br J Haematol*, 111(1):52-60, 2000.
- Crook N., Clem R., Miller L. (1993). An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a Zinc finger-like motif. *Journal of Virology*, 62, 2168-2174.
- Crosstalk in NF- κ B signalling pathways Oeckinghaus A, Hayden M, Ghosh S ;2011 *Nature Immunology* 12, 695-708.
- Cryns VL, Yuan J. (1998). The cutting edge: caspases in apoptosis and disease. In *When Cells Die*. Edited by Lockshin RA, Zakeri Z, Tilly JL. New York: Wiley-Liss Inc.; 177-210.
- Da Silva F., Nizet V.: Cell death during sepsis: Integration of disintegration in the inflammatory response to overwhelming infection. *Apoptosis*. 14: 509-521; 2009.
- Danquah M. Micellar delivery of bicalutamide and embelin for treating prostate cancer. *Pharm Res*. 2009;26(9):2081-92. *1588 Med Oncol* (2011) 28:1584-1588.
- Dasari VR, Velpula KK, Kaur K, Fassett D, Klopfenstein JD, Dinh DH, Gujrati M, Rao JS. (2010). Cord blood stem cell-mediated induction of apoptosis in glioma downregulates X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP). *PLoS One*. 28;5(7):e11813. doi: 10.1371/journal.pone.0011813 .
- Dasari VR, Velpula KK, Kaur K, Fassett D, Klopfenstein JD, Dinh DH, Gujrati M, Rao JS. (2010). Cord blood stem cell-mediated induction of apoptosis in glioma downregulates X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP). *PLoS One*. 28;5(7):e11813. doi: 10.1371/journal.pone.0011813
- Deng Y, Lin Y, Wu X. (2002). TRAIL-induced apoptosis requires Bax-dependent mitochondrial release of Smac/DIABLO. *Genes Dev*. 16 (1), 33-45
- Deveraux Q., Takahashi R., Salvesen G., Reed J. (1997). X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases, *Nature*, 388, 300-303
- Duckett C., Li F., Wang Y., Tomaselli K., Thompson C., Armatrong R. (1998). Human IAP like protein regulates programmed cell death downstream of Bcl-X1 and cytochrome c. *Molecular and Cellular Biology*, 18, 608-615

- Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 1999; 68:383–424
- Eischen CM, Kottke TJ, Martins LM, et al. Comparison of apoptosis in wild-type and Fas-resistant cells: chemotherapy-induced apoptosis is not dependent on Fas/Fas ligand interactions. *Blood* 1997; 90(3):935–43.
- Faivre S, Kroemer G, Raymond E. Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Nat Rev* 2006;5:671-8.
- Falschlehner C, Emmerich CH, Gerlach B, Walczak H. TRAIL signalling: decisions between life and death. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39 (7-8):1462-75.
- Fischer U.,Schulze-Osthoff K.: New approaches and therapeutics targeting apoptosis in disease. *Pharmacol Rew* 57: 187-215; 2005.
- Flatt PM, Pietenpol JA. Mechanisms of cell-cycle checkpoints: at the cross roads of carcinogenesis and drug discovery. *Drug Metab Rev* 2000; 32: 283-305.
- Foster I. Cancer: A cell cycle defect. *Radiography* 2008; 14: 144-9.
- Giacinti C, Giordano A. RB and cell cycle progression. *Oncogene* 2006; 25: 5220-7.
- Goldstein JC, Waterhouse NJ, Juin P, Evan GI, Green DR. The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol* 2000; 2(3):156–62.
- Griffith TS, Chin WA, Jackson GC, Lynch, D.H., Kubin, M.Z., (1998). Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells. *J. Immunol.* 161 (6), 2833–2840.
- Hofmann H., Simm A, Hammer A., Silber R., Bartling B.(2002).Expression of Inhibitors of apoptosis(IAP) proteins in non-small cell human lung cancer, *J.Cancer Res. Clin.Oncol.*,128,554-560
- Holcik M., Korneluk R.(2001). XIAP,the guardian angel, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2, 550-556
- JantovaSL. 3-(5-Nitro-2-thienyl)-9-chloro-5-morpholin-4-yl[1,2,4] triazolo [4,3-c] quinazoline induces ROS-mitochondrial mediated death signaling and activation of p38 MAPK in murine L1210 leukemia cells. *Neoplasma.* 2009;56(6):494–9.
- Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. (2004). Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging.
- Jefferies HB, Fumagalli S, Dennis PB, et al. Rapamycin suppresses 5' TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. *EMBO J* 1997; 16:3693-704
- Joazeiro C., Weissman A. (2000).RING finger proteins:mediators of ubiquitin ligase activity, *Cell*,12,549-552
- Joza N, Susin SA, Dongez E, et al. Essential role of the mitochondrial apoptosis inducing factor in programmed cell death. *Nature* 2001; 41: 549-594

- Kabos P, Ehtesham M, Kabosova A, Black KL, Yu JS. (2002). Generation of neural progenitor cells from whole adult bone marrow. *Exp Neurol*, 178:288–293.
- Karp G. *Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments* (4 ed.). Hoboken, NJ: John Wiley and Sons. 2005;598–599.
- Kashkar H., Haefs C., Shin H., Dutoit S., Salvesen G., Krönkr M., Jürgensmeier J.(2003).XIAP-mediated caspase inhibition in Hodgkin’s lymphoma-derived Bcells,*J.Exp.Med*, 198,341-347
- Kaufmann SH, Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res* 2000; 256:42–9.
- Kearns WG, Liu JM. Cell cycle checkpoint genes and aneuploidy: A short review. *Current Genomics* 2001; 2:171-80.
- Kearns WG, Liu JM. Cell cycle checkpoint genes and aneuploidy: A short review. *Current Genomics* 2001; 2: 171-80,
- Kushner BH, Cheung NK. (1988). Neuroblastoma. *Pediatr Ann.* Apr;17(4):269-76, 278-84.
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell JE. *Molecular Cell Biology*. 4 edition: WH Freeman and Co, New York, 2000
- Loebinger MR, Eddaoudi A, Davies D, Janes SM. (2009). Mesenchymal stem cell delivery of TRAIL can eliminate metastatic cancer. *Cancer Res.* 15;69(10):4134-42. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4698
- Luo X, Budihardjo I, Zou H., Slaughter C., and Wang X. Bid, a Bcl2 interacting lymphocyte. *Curr Opin Hematol*, 3(1):35-40, 1996
- Maller JL. MPF and cell cycle control. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res.* 1990;24:323-Review
- Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL. (2007). Neuroblastoma. *Lancet.* 23;369(9579):2106-20.
- Mellier G, Huang S, Shenoy K, Pervaiz S. (2010). TRAILing death in cancer. *Mol Aspects Med.*;31(1):93-112. doi: 10.1016/j.mam
- Merino D, Lalaoui N, Morizot A, Schneider, P., Solary, E., Micheau, O., (2006). Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2. *Mol. Cell Biol.* 26 (19), 7046–7055.
- Mohr A, Albarenque SM, Deedigan L, Yu R, Reidy M, Fulda S, Zwacka RM. (2010). Targeting of XIAP combined with systemic mesenchymal stem cell-mediated delivery of sTRAIL ligand inhibits metastatic growth of pancreatic carcinoma cells. *Stem Cells.*;28(11):2109-20. doi: 10.1002/stem.533.

- Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, et al. RAD001 vs placebo in patients with metastatic renal cell carcinoma after progression on VEGFr-TKI therapy: results from a randomized, double blind, multicenter phase-III study [abstract]. *J Clin Oncol* 2008;26:Abstract LBA5026.
- Nasmyth K. Viewpoint: putting the cell cycle in order. *Science* 1996;274:1643–5.
- Nesbit CE, Tersak JM, Prochownik EV. MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene* 1999;18: 3004–16.
- Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cellular Signalling* 2002;14: 381-95.].
- Ow Y-L P., Green R.D., Hao Z., Mak T.W.: Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* Vol 9 :532-542 July; 2008.
- Öndag Cabadak H. İnsan periferel kan ve fibroblast hücre kültürlerinin sinkronizasyonu ve sinkronize hücre kültürlerinden kromozom analizi ve karyotip hazırlanması. Yüksek Lisans Tezi, Ankara: Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, 1987.
- Porter AG. Protein translocation in apoptosis. *Trends Cell Biol*, 9(10):394-401, 1999.
- Reed JC. Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol*, 17(9):2941-53, 1999.
- Ricky W. Johnstone, Astrid A. Ruefli, and Scott W. Lowe. Apoptosis: A Link between Cancer Genetics and Chemotherapy. *Cell* 2002, Vol. 108, 153–164.
- Riedi S., Renatus M., Schwarzenbacher R., Zhou Q., Sun C., Fesik S., ve ark.(2001). Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP, *Cell*, 104:791-800
- Riedi S., Yigong S.(2004). Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Biol.*, 5, 897-907
- Ross RA, Spengler BA, Domènech C, Porubcin M, Rettig WJ, Biedler JL. (1995). Human neuroblastoma I-type cells are malignant neural crest stem cells. *Cell Growth Differ.*;6(4):449-56.
- Ruster B, Gottig S, Ludwig RJ. (2006). Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood*; 108:3938e44.
- Salvesen G., Duckett C.(2002). IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 401-410
- Schmelzle T, Hall MN. TOR, a central controller of cell growth. *Cell* 2000; 103:253–62. *Sci USA* 1999; 96:4240-5.

- Schwab M, Alitalo K, Klempnauer K-H, et al. Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and neuroblastoma tumor. *Nature* 1983;305:245–8.
- Seghal SN, Baker H, Vézina C. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic II. Fermentation, isolation and characterization. *J Antibiot* 1975; 28:727-2
- Shimada H, Stram DO, Chatten J, et al. Identification of subsets of neuroblastomas by combined histopathologic and N-myc analysis. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:14706.
- Staal SP. Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: Amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 5034-7.
- Takashaski R., Deveraux Q., Tamm I., Welsh K., Munt N., Salvesen G., Reed J.(1998).A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases.*The Journal of Biological Chemistry*,273,7787-7790
- Targeting programmed cell death pathways with experimental therapeutics: opportunities in high-risk neuroblastoma. *Cancer Lett.* 18 *Trends Cell Biol*, 11(9):372-7, 2001
- The cell cycle :a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer Vermeulen K., Bockstaele D., Berneman Z. 2003
- Van Noesel MM, Versteeg R. (2004). Pediatric neuroblastomas: genetic and epigenetic 'danse macabre'. *Gene*. 21;325:1-15.
- Vazquez A, Bond EE, Levine AJ, Bond GL. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2008 Dec.7;(12):979-87
- Vermeulen K, Berneman ZN, vanBockstaele DR. Cell cycle and apoptosis. *Cell Prolif* 2003; 36: 165-75.
- Vogt PK. PI 3-kinase, mTOR, protein synthesis and cancer. *Trends Mol Med* 2001; 7:482-4.
- Waterhouse NJ, Ricci JE, Green DR. (2002). And all of a sudden it's over: mitochondrial outer-membrane permeabilization in apoptosis. *Biochimie* 84 (2–3), 113–121

- Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA. (1995). Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 3 (6), 673–682.
- Yamamoto K, Hayashi Y, Hanada R, et al. Mass screening and age-specific incidence of neuroblastoma in Saitama Prefecture. *Jpn J Clin Oncol* 1995;13:2033–8
- Yang LI, Dalei LI, Shengguang YUAN, Zhenran WANG, Fang TANG, Rongrong NIE, Jun WENG, Lina MA and Bo TANG: Embelin-induced MCF-7 breast cancer cell apoptosis and blockade of MCF-7 cells in the G2/M phase via the mitochondrial pathway:2012
- Yuan R, Kay A, Berg WJ and Lebowitz D. Targeting tumorigenesis: development and use of mTOR inhibitors in cancer therapy. *J Hematol & Oncol* 2009; 2:1-12.
- Zhang H. Molecular signaling and genetic pathways of senescence: Its role in tumorigenesis and aging. *J Cell Physiol.* 2007 Mar;210(3):567-74. Review
- Zhang L, Fang B. (2005). Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer. *Cancer Gene Ther.*;12(3):228-37.
- Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to C. Elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 1997; 90(3):405–13
- Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. An APAF-1-cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 1999; 274(17):11549–56.

9. ETİK KURUL ONAYI



T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

PROJENİN ADI: Mezenkimal Kök Hücre ile Birlikte Kültüre Edilen Nöroblastoma Hücrelerinin X-Bağımlı Apoptotik Protein İnhibitörüne Verdiği Yanıtın İncelenmesi
PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ: Yrd. Doç. Dr. Betül ÇATALGÖL
PROJEDEKİ ARAŞTIRICILAR : Kezban UÇAR
ONAY TARİHİ VE ONAY SAYISI: 21.12.2012-22

Sayın Yrd. Doç. Dr. Betül ÇATALGÖL

165 protokol nolu "Mezenkimal Kök Hücre ile Birlikte Kültüre Edilen Nöroblastoma Hücrelerinin X-Bağımlı Apoptotik Protein İnhibitörüne Verdiği Yanıtın İncelenmesi" isimli projeniz Enstitümüzün Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından incelenmiş ve etik yönden uygunluğuna karar verilmiştir.

F. Arıcıoğlu

Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU
Komisyon Başkanı

Serap Şirvanci

Doç. Dr. Serap ŞİRVANCI
Komisyon Başkan Yardımcısı

Serap Akyüz

Prof. Dr. Serap AKYÜZ

Levent Kabasakal

Doç. Dr. Levent KABASAKAL

Prof. Dr. Aysel PEHLİVAN

Neşe Bahçecik

Doç. Dr. Neşe BAHÇECİK

Doç. Dr. Oğuzhan DEYNELİ

Asım Cingel

Doç. Dr. Asım CİNGEL

Doç. Dr. Pınar AY

Murat Çekin

Yrd. Doç. Dr. Murat ÇEKİN

Zübeyir Sari

Yrd. Doç. Dr. Zübeyir SARI

Yrd. Doç. Dr. Tolga GÜVEN

10.ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Kezban	Soyadı	UÇAR
Doğum Yeri	TRABZON	Doğum Tarihi	01/ 11/ 1988
Uyruğu	T. C	TC Kimlik No	47938804980
E-mail	ucarkezban@gmail.com	Tel	

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü	2009
Lise	Mehmet Akif Ersoy Lisesi	2005

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	İyi	Orta	Orta

TEZ KONTROL ÇİZELGESİ

	Evet	Hayır
Metin A4 (21x29.7 cm) boyutunda 70-100 gr birinci hamur beyaz kâğıda hazırlandı mı?	+	
Her sayfanın solunda 4 cm, sağında 2.5 cm, üstünde ve altında 3 cm boşluk bırakıldı mı?	+	
Çıktılar kaliteli çıktı veren bir bilgisayar kullanılarak, kâğıdın çift yüzüne alındı mı?	+	
Yazı karakteri olarak Times New Roman kullanıldı mı?	+	
Tez başlığı ve ana başlıklar 14 punto, diğer yazılar 12, gerektiğinde 9-10 punto yazıldı mı?	+	
Noktalama işaretlerinden sonra bir karakter ara verildi mi?	+	
Satır aralığı ve paragraf aralığı standartlarına uyuldu mu?	+	
Ana ve ara başlıklar uygun puntoda ve özelliklerde yazıldı mı?	+	
Kısaltma ve simgeler uygun şekilde yapıldı mı?	+	
Şekil, resim ve tablolar listesi uygun şekilde hazırlandı mı?	+	
Varsa, alıntılar uygun şekilde yazıldı mı?	+	
Varsa, dipnotlar uygun şekilde yazıldı mı?		
Sayfa numaralandırmaları uygun şekilde yapıldı mı?	+	
Türkçe özet tezin içeriğini yansıtıyor mu?	+	
Türkçe özeti kelime sayısı açısından uygun uzunlukta mı?	+	
Türkçe özete önerilen şekilde anahtar kelimeler konuldu mu?	+	
İngilizce özete tezin başlığı konuldu mu?	+	
Türkçe ve İngilizce özet birbiri ile uyumlu mu?	+	
İngilizce özeti kelime sayısı açısından uygun uzunlukta mı?	+	
İngilizce özete anahtar kelimeler konuldu mu?	+	
Şekil, resim ve tablolar uygun ölçülerde hazırlandı mı?	+	
Şekil, resim ve tabloların üst, alt başlık ve açıklamaları uygun şekilde yazıldı mı?	+	
Tez dış kapağına 2x2 cm ölçülerinde üniversitenin mavi renkli amblemi yerleştirildi mi?	+	
Kapakta yalnız tez başlığı 14 punto ve koyu renk, diğer yazılar 12 punto ile yazıldı mı?	+	
Kaynaklar metin içinde doğru şekilde kullanıldı mı?	+	
Tez sonunda kaynaklar listesi uygun şekilde yazıldı mı?	+	
Tezde kullanılan bütün kaynaklar elde mevcut mu?	+	
Ekler uygun başlıklarla, tezdeki sunuş sırasına göre, ayrı sayfalardan başlamak üzere verildi mi?	+	
Beyan uygun formatta yazıldı mı?	+	
Özgeçmiş uygun formatta yazıldı mı?	+	
Tez onay formu eklendi mi? (Savunma sınavı sonrasında)	+	
Tez uygun şekilde ciltlendi mi? (Savunma sınavı sonrasında)	+	