

PROTEOZOM İNHİBİTÖRÜ PS-341 VE HSP70
İNHİBİTÖRÜ QUERCETİNİN B16F10 HÜCRE
KÜLTÜRÜNE ETKİLERİ

Semih ŞEKER

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Şubat-2010

**PROTEOZOM İNHİBİTÖRÜ PS-341 VE HSP70 İNHİBİTÖRÜ QUERCETİNİN B16F10
HÜCRE KÜLTÜRÜNE ETKİLERİ**

Semih ŞEKER

Dumlupınar Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoloji Anabilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Azmi YERLİKAYA

Şubat-2010

KABUL ve ONAY SAYFASI

Semih ŞEKER'in YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı 'PROTEOZOM İNHİBİTÖRÜ PS-341 VE HSP70 İNHİBİTÖRÜ QUERCETİNİN B16F10 HÜCRE KÜLTÜRÜNE ETKİLERİ' başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

...../...../.....
(Sınav tarihi)

Üye: Yrd. Doç. Dr. Azmi YERLİKAYA (Tez Danışmanı)

Üye: Yrd. Doç. Dr. Mustafa YÖNTEM

Üye: Yrd. Doç. Dr. Muhittin ARSLANYOLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun/...../..... gün ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Atalay KÜÇÜKBURSA
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

PROTEOZOM İNHİBİTÖRÜ PS-341 VE HSP70 İNHİBİTÖRÜ QUERCETİNİN B16F10 HÜCRE KÜLTÜRÜNE ETKİLERİ

Semih ŞEKER

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 2010

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Azmi YERLİKAYA

ÖZET

Bu çalışmada, günümüzde kanser tedavisinde kullanılan proteozom inhibitörlerinden PS-341'in, Hsp70 inhibitörü quercetin'in ve PS-341 + quercetin kombinasyonlarının B16F10 melenoma kanser hücresi üzerindeki morfolojik ve sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Çalışmamızda, B16F10 melenoma kanser hücreleri farklı konsantrasyonlarda PS-341 (1 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 1 µM ve 10 µM) ve quercetin (100 nM, 1 µM, 10 µM, 50 µM, 100 µM ve 200 µM) ile 24 saat süresince muamele edildiğinde, PS-341 muameleli hücrelerde 10 nM ve üzerindeki konsantrasyonlarda, quercetin muameleli hücrelerde ise 50 µM ve üzeri konsantrasyonlarda Apoptotik anlam içeren morfolojik değişiklikler tespit edilmiştir. Daha sonra MTT testi kullanılarak hücrelerin % sağkalım grafikleri çıkarılarak IC₅₀ değerleri hesaplandı. Bu çalışmaya göre B16F10 hücrelerinde PS-341 IC₅₀ değeri 1.3 nM, quercetin IC₅₀ değeri ise 45 µM olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, PS-341 ve quercetin ortak kombinasyonunun yeni bir kanser tedavisi geliştirmede etkili olup-olmayacağı araştırılmıştır. DMSO (kontrol), 10nM PS-341, 45µM quercetin ve 10 nM PS-341 + 45 µM quercetin konsantrasyonları ile B16F10 hücrelerinin 24 saat muamelesi sonucunda çıkan % sağkalım değerleri kontrol grubu ve diğer gruplar kendi aralarında karşılaştırılmıştır. Ayrıca, DMSO (kontrol), 100 nM PS-341, quercetin (50 µM veya 100 µM), 100 nM PS-341 + 50 µM quercetin ve 100 nM PS-341 + 100 µM quercetin konsantrasyonları ile hücreler 24 saat muamele edilmiştir. Bu sonuçlar ışığında, tek başına uygulanan inhibitörler veya kombine inhibitör grubu kontrol grubuna kıyasla istatistiki olarak farklı olmasına rağmen kombine muamele tek başına uygulanan ilaç gruplarından istatistiki olarak farklı çıkmamıştır. Bu sonuçlar, PS-341 ve quercetin ortak kombinasyonunun kanser tedavisinde ilaçların yalnız kullanımından daha etkili olmayacağını göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: B16F10, PS-341, quercetin, % sağkalım, proteozom, Hsp

EFFECTS OF PROTEASOME INHIBITOR PS-341 AND HSP70 INHIBITOR QUERCETIN IN B16F10 CELL LINE

Semih ŞEKER

Department of Biology, M.S.Thesis, 2010

Thesis Supervisor: Assist. Prof. Azmi YERLİKAYA

SUMMARY

In this study, the morphological and cytotoxic effects of the proteasome inhibitor PS-341, currently being used in cancer treatment, Hsp70 inhibitor quercetin and of PS-341 + quercetin combination were investigated in B16F10 melanoma cancer cell line. In our study, when different concentrations of PS-341 (1 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 1 µM and 10 µM) and quercetin (100 nM, 1 µM, 10 µM, 50 µM, 100 µM and 200 µM) were applied to B16F10 melanoma cancer cells, morphological changes were observed in PS-341-treated cells with 10 nM and higher concentrations and in quercetin-treated cells with 50 µM and higher concentrations. Afterwards, MTT test was used to obtain % viability and then IC₅₀ values were calculated. According to this study, the IC₅₀ value of PS-341 was 1.3 nM and that of quercetin was 45 µM in B16F10 cells. After these studies, PS-341 and quercetin combination was investigated to determine if a potentially novel combination therapy could be developed. Therefore, B16F10 cells were treated with DMSO (control), 10 nM PS-341, 45 µM quercetin and 10 nM PS-341 + 45 µM quercetin concentrations for 24 h and % viability results were compared to control and with each other. In addition, treatment of cells with DMSO (control), 100 nM PS-341, quercetin (50 µM or 100 µM), 100 nM PS-341 + 50 µM quercetin or 100 nM PS-341 + 100 µM quercetin concentrations for 24 h verified the above results. In light of these results, although singly applied inhibitor groups or combined treatment group were statistically different as compared to control, combined treatment was not statistically different than the single agent treatment. These results show that PS-341 and quercetin combination may not be more effective than the single inhibitor treatments.

Key words: B16F10, PS-341, quercetin, % viability, proteasome, Hsp

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasında tez konusunun belirlenmesinden, uzun süren deney aşamalarının bitimine kadar olan süreçte bilgisini, özverisini, sabrını ve her türlü desteğini esirgemeyen ve sürekli yanımda olan sayın danışman hocam Yrd. Doç Dr. Azmi YERLİKAYA'ya, eğitim ve öğrenim hayatım boyunca bilim ve hayat sevgisini bana aşılayan diğer bölüm hocalarıma, bu uzun maratonda birlikte koştuğumuz Harun DOKUDUR, Fatih İLHAN ve Ayşegül GÜNEŞ'e teşekkürü bir borç bilirim.

Bu günlere gelmemi sağlayan, benden maddi manevi hiçbir desteği esirgemeyen, sevgi ve şefkatleriyle daima yanımda olan canım aileme, dedeme ve halama teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR.....	vi
ŞEKİLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. PROTEİN YIKIMI	3
2.1. Serin Proteazlar.....	5
2.2 Lizozomlar	6
2.2.1. Lizozomal Degredasyon.....	7
2.3. Kaspazlar	10
2.3.1. Kaspazların aktivasyonu.....	12
2.3.2. Apoptozis ve apoptoziste kaspazların rolleri.....	12
2.4. Meprinler	15
2.5. Ubiquitin-proteozom yolu.....	16
2.5.1. 26S Proteozom.....	17
2.5.2. 26S Proteozom inhibitörleri.....	19
2.5.2.1. Sentetik inhibitörler.....	19
2.5.2.2. Doğal proteozom inhibitörleri.....	20
3. ISI ŞOKU PROTEİNLERİ	22
3.1. Küçük ısı şoku proteinleri (sHsps).....	22
3.2. Isı şoku proteini 60 (Hsp60)	25
3.3. Isı şoku proteini 70 (Hsp70)	26

İÇİNDEKİLER (devam)

3.3.1. Hsp70 inhibitörleri	27
3.4. Isı şoku proteini 90 (Hsp90)	29
3.4.1. Hsp90 İnhibitörleri	30
3.5. Isı şoku proteini 100 (Hsp100)	31
4. MATERYAL ve METOT	32
4.1. Materyal.....	32
4.2. Besiyeri Hazırlanışı.....	32
4.3. Hücre Kültürleri.....	32
4.4. MTT testi	32
4.5. Kullanılan Solüsyonlar	33
4.6. Kullanılan Cihazlar:	33
5. SONUÇLAR	34
6. TARTIŞMA	43
KAYNAKLAR DİZİNİ	47

ŞEKİLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Lizozomlardaki hidrolitik enzimler.....	6
2.2. Lizozomal yıkım yolları.....	7
2.3. Hsp73 proteini aracılığı ile lizozomlara protein hedeflenmesi	9
2.4. Lizozomal hidrolazların olgunlaşması	9
2.5. İnaktif kaspazın aktivasyonu.....	11
2.6. Kaspaz-8 ve kaspaz-3'ün Fas reseptörü aracılığıyla aktivasyonu.....	14
2.7. Apoptotik sinyaller ile kaspaz zincir aktivasyonu.....	15
2.8. Ubiquitin-proteozom yolu.....	17
2.9. 26S proteozomun yapısı.....	18
2.10. Proteozom inhibitörlerinin kimyasal yapısı	20
3.1. Hsp27 ve Hsp70'in apoptotik proteinler ile ilişkileri.....	24
3.2. Hsp60 inhibisyonu ile mitokondriyel apoptozis oluşumu.....	26
3.3. Hsp70 inhibitörlerinin kimyasal yapısı	28
3.4. Hsp90-bazlı süper şaperon makinesi.....	29
3.5. GA (geldanamycin) ile Hsp90 inhibisyonu.....	31
5.1. PS-341 muamelesi sonrası hücre morfolojilerinde görülen değişiklikler	35
5.2. Quercetin muamelesi sonrası hücre morfolojilerinde görülen değişiklikler	36
5.3. PS-341 muamelesi sonucu meydana gelen büyüme inhibisyonu.....	37
5.4. Quercetin muamelesi sonucu meydana gelen büyüme inhibisyonu.....	37
5.5. B16F10 hücrelerinde 10 nM PS-341, 45 µM quercetin ve kombinasyonu sonrası görülen morfolojik değişiklikler	39
5.6. B16F10 hücrelerinde 10 nM PS-341, 45 µM quercetin ve kombinasyonu sonrası görülen % sağkalım grafiği	40
5.7. PS-341, iki farklı quercetin konsantrasyonu ve kombinasyonları sonrası görülen morfolojik değişiklikler.....	41
5.8. PS-341, iki farklı quercetin konsantrasyonu ve kombinasyonları sonrası görülen % sağkalım grafiği.....	42
6.1. PS-341 ve quercetin arasında boronat ester bağı oluşumu.....	46

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Proteinlerin yarı-ömürlerini belirleyen sinyaller hakkında hipotezler	4
2.2. Lizozomal sistemde bulunan bazı katepsinler.....	8
2.3. Apoptozisde rol oynayan kaspazlar	11

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
E1	Ubiquitin aktive edici enzim.
E2	Ubiquitin konjugasyon enzim.
E3	Ubiquitin ligaz enzim.
Ub	Ubiquitin proteini.
Hsp10	10 kDa moleküler ağırlıklı ısı şoku proteini.
Hsp27	27 kDa moleküler ağırlıklı ısı şoku proteini.
Hsp40	40 kDa moleküler ağırlıklı ısı şoku proteini.
Hsp60	60 kDa moleküler ağırlıklı ısı şoku proteini.
Hsp70	70 kDa moleküler ağırlıklı ısı şoku proteini.
Hsp90	90 kDa moleküler ağırlıklı ısı şoku proteini.
Hsp100	100 kDa moleküler ağırlıklı ısı şoku proteini.

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
DMSO	Dimetil Sülfoksit
M6F	Mannoz-6-fosfat
ODC	Ornitin Dekarboksilaz
NFκB	Nükleer Faktör Kappa B
IκB	İnhibitör Kappa B
CAD	Kaspaz Aktiviteli Deoksiribonükleaz
ER	Endoplazmik Retikulum
GA	Geldanamisin
FBS	Fetal Bovine Serum

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalması veya anormal hücrelerin apoptoza uğrayamaması olarak tanımlanmaktadır. Yapılan araştırmalarda kanser ile proteozom fonksiyonu arasında önemli ilişkiler belirlenmiştir. Proteozom, hücre çoğalması ve apoptozisin önemli bir düzenleyicisidir [1]. Malignant formlar genel olarak onkogenler veya tümör supressör genlerde oluşan genetik mutasyonlar tarafından oluşmaktadır. Bu genlerin birçoğunun ürünlerinin ifadesi proteozomal yıkım tarafından kontrol edilmektedir. Proteozom fonksiyonunda kanserle ilişkili olarak meydana gelen modifikasyonlar yıkım yollarını etkileyebilmektedir. Ayrıca bazı gen ürünleri, proteozomun alt-üniteleri ile ve dolayısıyla ubiquitin-proteozom yolu ile direkt etkileşim halinde olabilir. Ubiquitin ya da proteozom bağlayıcı bölgelerde meydana gelen mutasyonlar, protein dengesini değiştirerek karsinogenezin neden olabilmektedir. Bunlara ilave olarak bazı tümör baskılayıcı genler veya onkogen ürünler (E3 ligaz gibi) substrat ubiquitinasyonuna direkt katılabilmektedir. Kanserle ilişkisi belirlenen birçok tümör supressör gen [APC (β -katenin seviyesini kontrol eder), DCC (Deleted in Colon Cancer), p53 ve Rb] ve onkogenler (Fos, Mos, Myb, Myc) ubiquitin-proteozom yolu tarafından yıkılmaktadır ya da direkt etkileşim halindedir [2]. Proteozom inhibitörlerinin spesifik olarak çoğalabilen tümör hücrelerde apoptozisi daha güçlü uyardıkları bilinmektedir. Bu nedenle proteozom inhibitörlerine olan ilgi diğer anti-kanser ilaçlarına olan ilgiye göre son zamanlarda artmıştır. Fakat şu ana kadar yapılan diğer bazı çalışmalarda ise, multiple myeloma, non-Hodgkin's lenfoma ve küçük hücre dışı akciğer karsinoması tedavisinde proteozom inhibitörlerinin olumlu sonuç vermesine ve birçok kanser ilaçlarına (doxorubicin, melphalan, mitoxantrone ve dexamethasone) karşı oluşan direncin kırılmasına rağmen metastatik melanoma, kolorektal kanser ve kronik lenfositik lösemide beklenen sonuçlar elde edilememiştir [3-5]. Bu çalışmalar ise proteozomun hücresel görevlerinin ve apoptotik mekanizmalar ile ilişkilerinin daha kapsamlı araştırılması gerektiğini ortaya koymaktadır.

Hücrede protein hasarına neden olan stresler, Hsp'lerin (ısı şok proteinleri) ifadesinin artmasına neden olmaktadır. Hsp'lerin başlıca rolü hücreleri Proteotoksiste ve stresin güçlü öldürücü etkisinden korumaktır. Stresin koruyucu Hsp'ler birçok kanser hücresinde aşırı sentezlenmektedir. Hsp'ler ile hücre sağkalımının ve apoptotik yolların birçok anahtar komponenti etkileşim halindedir. Hsp70, Hsp60 ve Hsp27 başlıca moleküler şaperonlardır ve protein katlanması, hücresel kompartmanlar arasında proteinlerin nakledilmesi, aktif protein kompleksi oluşturma ve hatalı katlanmış ya da kısa ömürlü proteinlerin yıkımı için gereklidirler [6]. Hsp70 inhibitörü quercetin antiproliferasyon ve apoptotik etkiler gibi çeşitli biyolojik

aktivitelere sahip olduğu bulunmuştur [7]. Bu tezin amacı proteozom inhibitörü PS-341 ve Hsp70 inhibitörü quercetinin B16F10 melanoma kanser hücre dizilerine etkilerini araştırmaktır.

2. PROTEİN YIKIMI

Protein yıkımı, diğer adıyla proteoliz, hücre içindeki veya dışındaki proteazlar tarafından proteinlerin kısmen veya tamamen yıkılması işlemidir. Protein yıkımı ile:

- Hasarlı, anormal proteinlerin yıkılarak hücre içinde birikmesi engellenir.
- Normal şartlar altında hücre yaşamında önemli görevler üstlenen proteinlerin/enzimlerin metabolik aktiviteleri kontrol edilerek hücrenin değişen çevre şartlarına ve strese cevap vermesi sağlanır.
- Besin yetersizliği durumunda proteinler amino asit yapıtaşlarına kadar parçalanarak hücrenin enerji ve enerji kaynağı karşılanır.

Her hücrede birçok protein sürekli sentezlenmekte ve yıkıma uğramaktadır. Biyomoleküllerden protein ve RNA'nın sürekli bir şekilde sentezlendiği ve yıkıldığı görüşü son zamanlara kadar pek önemsenmemiştir. DNA, protein ve RNA'nın aksine mitoz ve mayoz bölünme öncesinde sentezlendikten sonra tekrar sentezlenmemekte ve yıkılmamaktadır. Eğer, protein ve RNA hücre homeostazisini kontrol etmek için sürekli bir şekilde sentezleniyor ve sırasıyla amino asit ve nükleotid yapıtaşlarına kadar parçalanıyorlar ise o zaman protein ve RNA'nın sentezini ve yıkımını kontrol eden biyokimyasal mekanizmalar olması gerekmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar hücre homeostazisinin sağlanmasında protein ve RNA yıkım mekanizmalarının biyosentez mekanizmaları kadar önemli olduğunu göstermiştir.

Bir hücre içindeki enzim/protein seviyesi sentez hızının yanında yıkım hızı ile de kontrol edilmektedir. Dolayısıyla, bir enzimin/proteinin yıkım hızını kontrol etmek hücre ekonomisi açısından sentez hızını kontrol etmek kadar önemlidir. Aşağıdaki sürekli hal denkleminde de görüldüğü gibi bir enzimin/proteinin hücre içindeki miktarı sentez hızı ve yıkım hızı ile kontrol edilmektedir[5].

$$[P]=ks/kd$$

[P]: protein miktarı, *ks*: Protein sentez hızı, *kd*: Protein yıkım (degradasyon) hızı. Bu denkleme göre bir proteinin sentezini 10 kat arttırsak protein miktarı 10 kat artar. Eğer, protein yıkımını 10 kat azaltırsak benzer şekilde protein miktarı da 10 kat artar [8].

Proteinler, sıfırıncı-dereceden reaksiyon kinetiği ile sentezlenip birinci-dereceden reaksiyonlar ile yıkılmaktadırlar. Sıfırıncı-dereceden reaksiyonlarda, reaksiyon hızı sabittir ve

zamanla değişmez. Ancak reaksiyona giren maddelerden sadece birinin hücre içinde tükenmesi ile reaksiyon tamamen durmaktadır. Proteinler, sentezi için gerekli olan faktörlerden sadece birinin eksikliğinde dahi sentezlenemez. Örneğin, bir proteinin sentezi esnasında gerekli olan sadece tek bir amino asidin eksikliğinde sentez tamamen durur. O ana kadar oluşan polipeptid zinciri protein sentezi tamamlanmadan ribozomdan ayrılır ve protein yıkım mekanizmaları tarafından parçalanır. Bu nedenle bir proteinin sorunsuz sentezlenebilmesi için protein sentez mekanizmasının sürekli olarak elzem faktörlerle beslenmesi gerekmektedir. Birinci-dereceden reaksiyonlarda ise reaksiyon hızı reaksiyona giren maddelerden birinin konsantrasyonuna bağlıdır. Reaksiyona giren madde (reaktant) reaksiyon esnasında tükendikçe, reaktant konsantrasyonu azaldığı gibi konsantrasyon azalmasına bağlı olarak zamanla reaksiyon hızı da azalacaktır[5].

Protein yarı-ömrü protein moleküllerinin yarısının yıkıldığı süre olarak kabul edilir ve aşağıdaki denklem yardımıyla hesaplanır:

$$t_{1/2} = \ln 2 / k_d$$

$t_{1/2}$: Protein yarı ömrü, $\ln$: Doğal logaritma, k_d : Yıkım hız sabiti [8].

Proteinlerin yarı-ömrüleri yarım dakika ile birkaç saat, hatta birkaç yıl arasında değişir. Genellikle hızlı bir şekilde yıkılan proteinler, sentez esnasında yanlış amino asidin eklenmesinden dolayı üç boyutlu yapısını alamamış olan, normal işlevi esnasında bozulan proteinlerdir [5, 9]. Proteinlerin yarı-ömrüleri hücre içindeki birtakım sinyaller ile artabilir veya azalabilir. Protein yarı-ömürünü belirleyen sinyaller hakkındaki hipotezler Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1 Proteinlerin yarı-ömrülerini belirleyen sinyaller hakkında hipotezler.

1. Koenzim azalması (Pyrodoxal-P, NAD⁺): (Grup spesifik proteazlar tarafından Apo enzim yıkımı)
2. Moleküler Kütle: (Moleküler kütle arttıkça yıkım oranı artar)
3. İzoelektrik nokta: (İzoelektrik noktada azaldıkça yıkım oranı artar)
4. Hidrofobisite: (Proteinin hidrofobisitesi arttıkça yıkım oranı artar)
5. Yüzey polaritesi: (Yüzey polaritesi arttıkça yıkım oranı artar)

6. Termal denge: (Termal denge azaldıkça yıkım oranı artar)
7. Fosforilasyon: (İnterconversion durumu üzerine yıkım oranı bağımlılığı)
8.Oksidasyon: (Oksidasyon tarafından inaktivasyon yıkım için enzimi işaretler)
9. Ubiquitinasyon, serbest α-amino grubu, N- ucu kuralı: (Ubiquitinasyon yıkım için proteini işaretler)
10. Sekans-spesifik yıkım sinyalleri PEST hipotezi: (Molekül içi sekanslar hızlı yıkım sinyalleridir)
11. Yardımcı-proteinler: (Spesifik ikinci proteinler, Antizyme yıkım başlatır ve ilerletir)

Genellikle protein yarı ömürlerinin N-ucunda bulunan aminoasit ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Protein yarı-ömürleri ile N-ucu amino asidi arasındaki ilişki N-end kuralı olarak bilinir. Bu kurala göre, N-ucunda metionin, serin, alanin, treonin valin ve glisin aminoasidi bulunan proteinlerin yarı ömürleri 20 saati aşmaktadır. N-ucunda fenilalanin, lösin, aspartik asit, lizin ve arginin bulunan amino asitler ise yarı-ömürleri 3 dakika veya daha kısa olan proteinlerdir [5, 10]. Ayrıca yapılarında PEST sekansı (P: Prolin, E: Glutamik asit, S: Serin, T: Treonin) içeren proteinler diğer proteinlere göre daha hızlı yıkılmaktadır [5, 11-12]. Hücre içinde veya dışında görev alan proteazların bazıları şunlardır: Serin proteazlar, lizozomda bulunan katepsinler, kaspazlar, meprinler ve ubiquitin-proteozom yolu [5, 13].

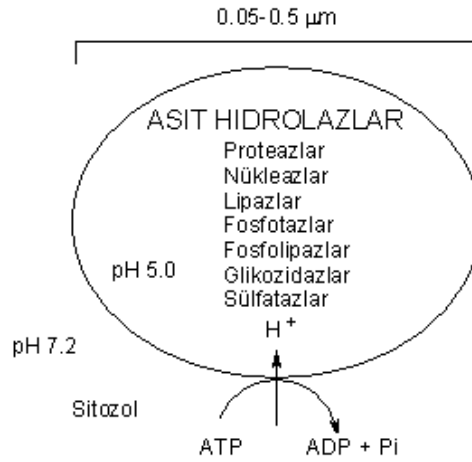
2.1. Serin Proteazlar

Aktif merkezlerinde enzimatik aktivite gösterebilmeleri için zorunlu olarak bulunması gereken serin amino asidi içerdikleri için bu şekilde isimlendirilmişlerdir. Serin proteazlar grubunu tripsin, kimotripsin ve elastaz enzimleri girmektedir. Bu üç enzim pankreas tarafından sentezlenip proenzim şeklinde sindirim sistemine salgılanmaktadır. Sindirim sisteminde sınırlı proteoliz ile peptid zincirinin bir kısmı koparılacak aktif enzim formuna dönüşürler. Her üç proteazında moleküler ağırlıkları 25 kDa civarında olup aktif merkezlerinde histin, aspartik asit ve serin amino asitleri bulunmaktadır. Tripsin, hücre dışındaki proteinleri bazik aminoasitleri (lizin ve arginin) karbonil grubundan (peptid bağına katılan karboksil grubu) kırmaktadır. Kimotripsin, fenilalanin ve tirozin gibi aromatik aminoasitlerin karbonil grubundan sonra proteinleri yıkmaktadır. Kimotripsinin aktif merkezindeki His₃₇, Ser₁₉₅ ve Asp₁₀₂ peptid bağlarının hidrolizinde önemli rol oynamaktadır. His₃₇ sırasıyla hem baz hem de asit gibi

davranmaktadır. Ser₁₉₅ direk olarak peptid bağına saldırılmaktadır. Asp₁₀₂ ise His₃₇'yi Ser₁₉₅ ile hidrojen bağı yapması için yönlendirmektedir. Elastaz enzimi ise daha az spesifik olup çoğunlukla küçük fakat nötr amino asitlerden sonra proteinleri parçalamaktadır. Ayrıca bu üç proteaz dışında kan pıhtılaşmasında görev alan trombin ve pıhtının yıkımını sağlayan plazmin de serin proteazlar grubuna girmektedir [5, 9, 13].

2.2. Lizozomlar

Lizozomlar, hücre içindeki makro moleküllerin sindirilmesi için gerekli olan hidrolitik enzimleri içeren membranla çevrili organellerdir. Lizozomlar içerisinde yaklaşık 40 çeşit hidrolitik enzim bulunmaktadır (proteazlar, nükleazlar, lipazlar, glikozidazlar ve fosfolipazlar). Lizozom içerisindeki hidrolitik enzimler ayrıca asit hidrolazlar olarak da bilinmektedirler. Çünkü enzimatik aktivitelerini gösterebilmeleri için asidik pH'ya ihtiyaç duyarlar. Membranda bulunan bir H⁺ATPaz pompası ile sitozolden proton iyonları (H⁺) lizozom lümenine taşınarak pH 5 civarında tutulur. Lizozomal enzimler, asidik pH'da aktif oldukları için sitozole sızmaları halinde sitozolik pH 7.2'de inaktif hale dönüşüp çok az bir tahribat yaparlar. Lizozom membranındaki proteinlerin çoğuna çok sayıda karbonhidrat grubunun eklenmiş olmasının bu proteinleri lizozom lümeninde bulunan proteazlardan koruduğu düşünülmektedir [5, 14].



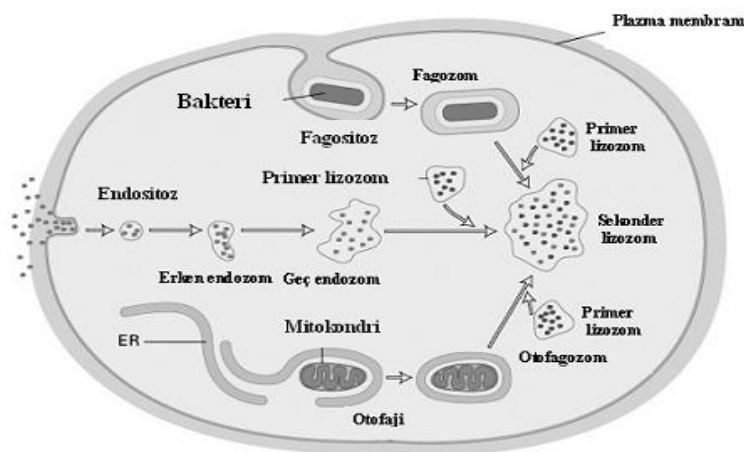
Şekil 2.1 Lizozomlardaki hidrolitik enzimler [14].

Lizozomlar bütün ökaryotik hücrelerde bulunmaktadırlar. Bitkilerdeki ve mantarlardaki vakuoller çok yönlü lizozomlar gibi işlev görmektedir. Vakuoller hücrelerin yaklaşık % 30'luk bir bölümünü kaplamaktadır, bazı hücrelerde bu % 90'na varmaktadır. Vakuollerin çok değişik

görevleri vardır. Sindirim kompartmanı olmasının yanında ayrıca atık madde deposu, embriyo gelişimi için besin deposu ve hatta bitki yenildiği zaman zararlı maddeler vakoullerden salındığı için predatörlere karşı bir savunma mekanizması olarak görev almaktadır [5, 14].

2.2.1. Lizozomal Degredasyon

Lizozomda yıkılacak maddeler, lizozoma endositoz, otofaji veya KFERQ sekansı ile ulaşmaktadır. Endositoz, hücre dışından maddelerin plazma membranının invajinasyonu ile hücre içine alınması ile meydana gelir ve pinositoz (sıvıların hücre içine alınması: hücrenin içmesi) ve fagositoz (katı maddelerin hücre içine alınması: hücrenin yemesi) olmak üzere iki çeşidi vardır. Endositoz ile alınan maddeler önce erken endozom (early endosome) denilen küçük düzensiz veziküller (keseler) içine alınır. Bu veziküller içine alınan bazı moleküller çıkarılır ve tekrar plazma membranına geri gönderilir, diğer maddeler ise geç endozom (late endosome) denilen veziküllere iki vezikülün füzyonu (birleşmesi) sonucu teslim edilir. Geç endozomlarda pH 6 civarındadır. Olgun lizozomlar, geç endozom membranındaki bazı proteinlerin kaybolması ve pH'nın daha da düşmesiyle oluşurlar. Lizozomlarda yıkılacak olan maddeler ikinci bir yol olan otofaji ile de lizozomlara ulaşabilir [5, 14]. Otofaji hücrenin kendisine ait bazı maddelerin veya kısımların elimine edilmesi işlemidir. Karaciğerde bir mitokondrinin yaklaşık 10 gün gibi bir ömrü vardır. Bu sürenin sonunda mitokondri lizozom tarafından otofaji ile yok edilmektedir. Bu işlem ER'den elde edilen membran ile organelin etrafının sarılması (otofagozom) ve daha sonra otofagozomun lizozom ile birleşmesiyle sonuçlanır[5].



Şekil 2.2 Lizozomal yıkım yolları [14].

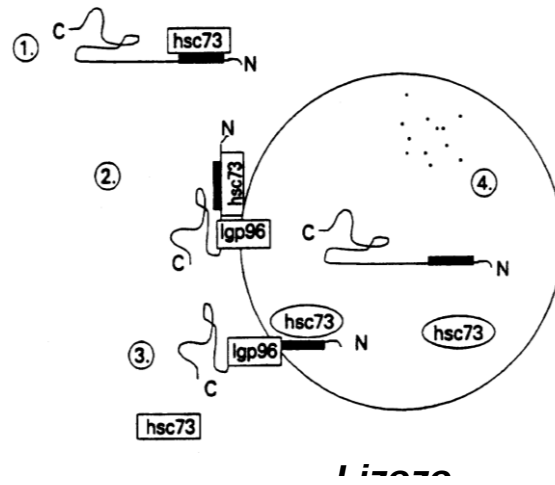
Ökaryotlardaki lizozomal sistem ile çoğunlukla uzun ömürlü hücre zarı ve hücre dışı proteinler hücre içine alındıktan sonra yıkıma uğramaktadır [5, 14]. Lizozomda endositoz ile

hücre içine alınan proteinleri yıkan katepsin olarak bilinen yaklaşık 50 hidrolitik proteaz vardır[5]. Bunlardan bazıları Çizelge 2.2’de verilmiştir.

Çizelge 2.2 Lizozomal sistemde bulunan bazı katepsinler [15]. (M.A.: Moleküler ağırlık).

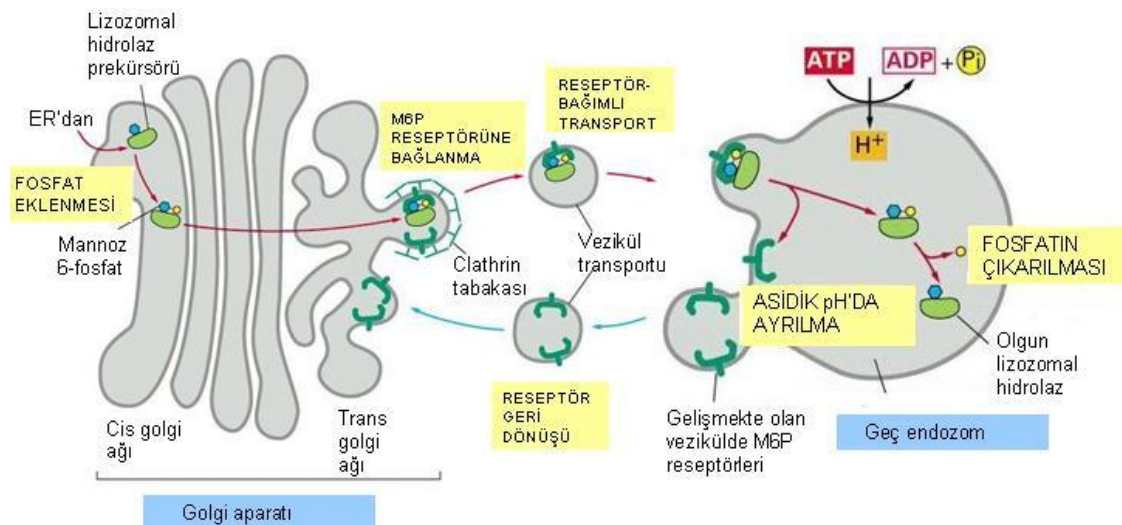
Enzim	Katalitik amino asit	M.A.	Aktif olduğu pH
Katepsin B	Sis	27	5.0-6.5
Katepsin D	Asp	42	2.8-5.0
Katepsin E	Asp	100	3.0-3.5
Katepsin G	Ser	30	7.5
Katepsin H	Sis	28	5.0-6.5
Katepsin L	Sis	29	4.5-6.0
Katepsin N	Sis	34	3.5
Katepsin S	Sis	24	5.0-7.5
Katepsin T	Sis	34	6.9
Katepsin K	Sis	27-29	6.0-6.5

Lizozomlara ulaşmada kullanılan üçüncü bir yol, bazı proteinlerin yüzeyinde bulunan KFERQ sinyal sekansıdır. KFERQ sekansı (K, lizin; F, fenilalanin; E, glutamik asit; R, arginin; Q, glutamin amino asitidir) muhtemelen lizozom membranında bulunan spesifik transportör proteinler tarafından tanınarak bu sekansı taşıyan proteinlerin lizozom lümenine taşınması ve orada proteazlar tarafından yıkılmasını sağlamaktadır. Besin yetersizliği durumunda KFERQ özgül sinyal sekansını içeren proteinler lizozoma yönlendirilmekte ve kısa bir süre için hücrenin amino asit ihtiyacı bu proteinlerden sağlanmaktadır. Sitozolik proteinlerin yaklaşık % 30’u bu sekansı içermektedir ve besin yetersizliği durumunda (hücre kültürlerinde serum eksikliğinde) bu proteinler lizozomlara hedeflenmektedir. Bu pentapeptit sekansa heat shock proteinlerden (ısı şok proteini) Hsp73 proteinin bağlandığını ve bu protein aracılığı ile lizozomlara yönlendirildiği bilinmektedir (Şekil 2.3) [5, 16]. Bölüm 3’de anlatıldığı gibi bu proteinlere ısı şok proteinleri denilmesinin nedeni yüksek ısıda uyarılmalarından dolayıdır. Fakat daha sonra hücrelerde normal şartlarda da sürekli ve yüksek miktarda sentezlendikleri görülmüştür. Hsp proteinleri yeni sentezlenen proteinlerin ER veya mitokondriye gönderilmesinde de görev alırlar. Ayrıca stres şartları altında üç boyutlu yapılarını kaybeden proteinlerin katlanmalarına yardımcı olmak veya degradasyon yollarına hedeflenmelerini sağlayarak hücre içinde bu anormal proteinlerin birikmesini engellemede önemli rolleri vardır.



Şekil 2.3 Hsp73 proteini aracılığı ile lizozomlara protein hedeflenmesi [16].

Lizozomal hidrolazlar pre-proenzim olarak sentezlenirler, sentez devam ettiği sırada sinyal sekansı çıkarılır ve ER'da proenzim katlanmaları olur. Golgide asparagin-bağlı (N-linked) glikozilasyona uğrarlar. Yine golgide N-asetil glukozamiylfosfotransferaz enzimi ve N-asetilglukozamidaz enzimleri ile mannoz-6-fosfat (M6P) eklenir. Bu işaretlenmiş olan proenzim golgi membranında bulunan M6P reseptörleri tarafından bağlanır ve endolizozomal sisteme yönlendirilir. Glikolizasyonun bu enzimleri endozom ve lizozomlarda yıkımdan koruduğu varsayılmaktadır [5, 14].



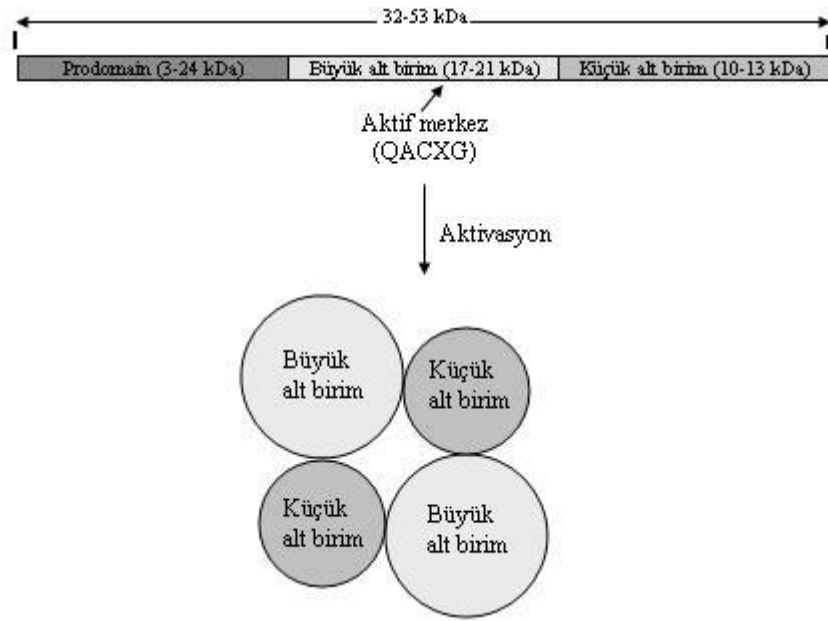
Şekil 2.4 Lizozomal hidrolazların olgunlaşması [14]'den uyarlanmıştır.

Lizozomlara teslim edilen proteinler önce asidik ortamda denatüre olurlar daha sonra endoproteazlar tarafından yıkılırlar ve son olarak ekzoproteazlara substrat olarak amino asitlere kadar yıkılırlar. Tüm endoproteazların primer yapıları oldukça korunmuş ve benzer sekonder yapıya sahiptirler. Aralarındaki farklar çoğunlukla korunan bölgeler arasında bulunan kısımlara insörsiyon ve delesyonlardan kaynaklanmaktadır. Aktif bölgede bulunan sistin amino asidine ek olarak histidin (His), asparagin (Asn) ve glutamin (Gln) aktif bölgeyi oluşturan ve substrat hidrolizine katılan amino asitlerdir. Bu amino asitler tüm sistin endoproteazlar arasında korunan amino asitlerdir. Sistin proteazlar lizozomlardaki denatürasyona sebep olan ortam şartlarına dayanıklı ve geniş bir pH spektrumuna sahiptirler. Fakat çoğu nötr ve alkali ortamlarda dayanıksızdırlar. Bu da hücreyi bu tür enzimlerden korumaktadır. Sistin proteazların yarı-ömürleri lizozomlarda birkaç gün ile haftalar arasında değişmektedir. Bazı proteazlar, inhibitör proteinler aracılığı ile regüle edilmekte iken lizozomal proteazlarda buna ihtiyaç yoktur. Örneğin, tripsin inhibitörü (MA, 6 kDa) tripsini, α_1 -antiproteinaz (MA, 53 kDa) ise elastaz enzimini inhibe eden proteinlerdir. Lizozomal degradasyon çalışmaları NH_4Cl ve leupeptin ilaçları ile inhibe edilmektedir. Bu inhibitörler sayesinde bir proteinin lizozomlar tarafından mı veya başka bir hücre içi proteaz tarafından mı yıkılıp-yıkılmadığı kolayca anlaşılmaktadır [5, 15].

2.3. Kaspazlar

Kaspazlar hasarlı veya fazla olan hücrelerin çevrelerine zarar vermeden ortadan kaldırılmasını sağlayan programlanmış hücre ölümünü (apoptozis) uyaran proteazlardır. Apoptotik hücrede meydana gelen morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler sistin proteazlar olan kaspazlar tarafından gerçekleştirilmektedir. Aktif merkezlerinde sistin amino asidi taşıdıkları ve hedefledikleri proteinleri aspartik asit birimlerinden sonra kestikleri için bu şekilde isimlendirilmişlerdir (C-Asp-ase; C: Sistin aminoasidi simgesi, Asp: Aspartik asit, -ase: kesici enzim eki). Kaspazlar proteazlar arasında en çok spesifisite gösteren enzimlerdir. Kesinlikle aspartik asitten sonra substratlarını kırmaktadırlar. Aspartik asidin önündeki 4 aminoasit (tetrapeptit) kompozisyonu ve bunların üç boyutlu yapısı spesifisitede önemli etkiye sahiptir. Memelilerde şimdiye kadar 12 tane kaspaz tespit edilmiştir. Tüm kaspazlar amino asit sekansları, yapıları ve substratları yönünden benzerlik göstermektedir. Kaspazlar amino ucu domaini (prodomain), büyük alt-birim ve küçük alt-birim olmak üzere üç önemli domain bulundurur. Aktif merkez, büyük alt-birimde yer almaktadır. Aktivasyon bu domainler arasında peptit bağlarının kırılması ve daha sonra büyük ve küçük alt-birimler birleşerek heterodimer, heterodimerler de birleşerek iki aktif merkez içeren bir tetramerik yapı oluşmasıyla meydana

gelir (Şekil 2.5). Apoptozisi uyarmalarına göre kaspazlar apikal (başlatıcı) kaspazlar ve efektör kaspazlar olmak üzere ikiye ayrılırlar. Başlatıcı kaspazlar, efektör kaspazları aktive eden proteazlardır. Efektör kaspazlar hücre çekirdeğinde (laminler), DNA tamir enzimlerinden PARP, fodrin, Rb, sitoplazmada (aktin) ve hücre iskeletinde bulunan birçok yapısal ve işlevsel proteinleri parçalayan proteazlardır. Apoptozisde rol alan kaspazlar Çizelge 2.3’de görülmektedirler [5, 17-20].



Şekil 2.5 İnaktif kaspazın aktivasyonu [5, 21]’den uyarlanmıştır.

Çizelge 2.3 Apoptozisde rol oynayan kaspazlar [5, 19].

Enzim	Proenzim ağırlığı (kDa)	Aktivasyon sonrası oluşan altbirimler
Başlatıcı Kaspazlar		
Kaspaz-2	51	19/22
Kaspaz-8	55	18/11
Kaspaz-9	45	17/10
Kaspaz-10	55	17/12
Kaspaz-12	50	20/10
Efektör Kaspazlar		
Kaspaz-3	32	17/12
Kaspaz-6	34	18/11
Kaspaz-7	35	20/12

2.3.1. Kaspazların aktivasyonu

Kaspaz aktivasyonunda başlıca üç mekanizma vardır:

- a) Başlatıcı bir kaspaz tarafından proteolitik kesim sonucu aktivasyon
- b) Yakın indükleme (induced proximity)
- c) Holoenzim oluşumu

Efektör kaspazın başlatıcı kaspaz tarafından proteolitik kesimi sonucu aktivasyonu oldukça etkin bir mekanizmadır. Yakın indükleme mekanizmasında ise birçok kaspaz-8 molekülü bir araya gelerek birbirlerini çapraz biçimde aktive ederler. Holoenzim olarak aktivasyonda ise sit-c ve ATP-bağımlı Apaf-1 oligomerizasyonu, prokaspaz-9'un bu komplekse katılmasına olanak vererek apoptozomu oluşturur. Kaspaz-9'un bu yolla aktivasyonu proteolitik olarak değil, kompleksin biçim değiştirmesiyle sağlanır. Ayrıca IAP (inhibitor of apoptosis- apoptozis inhibitörleri) ailesi prokaspazlara bağlanıp aktivasyonlarını önleyerek veya aktif kaspazlara bağlanıp aktivite göstermelerini engelleyerek kaspaz aktivasyonunu inaktive eder ve böylelikle apoptozis inhibe edilir [22].

2.3.2. Apoptozis ve apoptoziste kaspazların rolleri

Apoptozis terimi ilk defa Kerr ve arkadaşları tarafından ortaya atılmıştır. Apoptozis veya diğer adıyla programlanmış hücre ölümü, organizmanın hayatı boyunca görülen normal hücrel bir süreçtir. Bölünme ile artan hücre sayısı Apoptozis ile dengelenerek organizmanın hücrel homeostazisi sağlanmış olur. Apoptozis, fizyolojik ve patolojik uyarılar ile aktif veya inhibe edilebilir. Apoptozis organizmanın ihtiyaç duymadığı fazla hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlar. Embriyo gelişimi esnasında parmaklar arasındaki perdenin ve sinir sistemindeki nöronların % 50'sinin ortadan kaldırılması apoptozis ile sağlanmaktadır. Tüm çok hücreli organizmalarda apoptozis her gün cereyan etmektedir ve homeostazisin sağlanması için yaklaşık 10 milyar hücre her gün apoptozis ile ölmektedir. Bir organizmada normal hücrel sürecinin dışında, apoptotik mekanizmaların aktivasyonu veya inhibisyonu çeşitli hastalıkların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Organizmada meydana gelebilecek yetersiz apoptozis kanser ve otoimmün hastalıklara, artan apoptozis ise akut ve dejeneratif birçok hasalağa yol açabilmektedir. Dolayısıyla apoptozis mekanizmasının kusursuz işlemesi organizmanın sağlıklı yaşamı açısından son derece önemlidir [5,22].

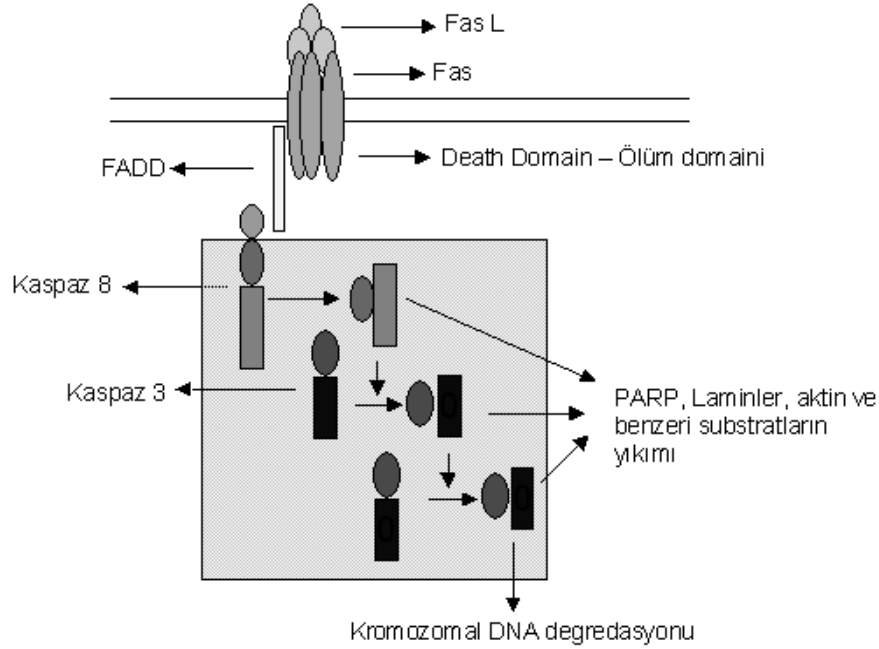
Apoptozise uğrayan hücrelerde karakteristik bir takım özellikler gözlenmektedir. Apoptotik hücrelerde lamin ve aktin filamentlerin kesilmesi sonucu sitoplazma küçülmeye başlar. Benzer şekilde kromatin ve çekirdekte bulunan yapısal proteinlerin kesilmesi sonucu

çekirdekte kondensasyon başlar ve çoğu zaman çekirdek at nalı şeklinde görülür. Apoptotik hücrelerin bir diğer karakteristik özelliği membran yüzeyinde küçük keseciklerin görülmesi ve hücrelerin büzülmesidir. Büzülen hücreler dokularda komşu hücrelerden ayrılmaktadır. Bu durum hücre kültürlerinde ise petri kabına yapışık olarak büyüyen hücrelerin kabın dibinden ayrılarak besi yerinde asılı durması olarak gözlenmektedir. Dokularda komşu hücrelerden ayrılan ve petri kabında ise asılı duran hücreler küçük parçacıklara bölünerek apoptotik vezikülleri oluştururlar. Apoptozise uğrayan hücrelerin organelleri, bu veziküller içerisinde bozulmadan durmakta ve hücre içeriği dışarıya salınmamaktadır. Böylelikle hücre içeriği etrafa yayılmayarak apoptozise uğrayan hücrelerin diğer hücelere zarar vermesi engellenmiş olur. Oluşan apoptotik veziküller hızla komşu hücreler tarafından fagosit edilir. Normal bir hücrede membran asimetrik yapıdadır. Fakat apoptotik hücreler bu asimetrik yapıyı koruyamamakta ve özellikle fosfatidilserin molekülleri çift katlı lipid membranının iç yüzeyinden dış yüzeyine transfer olmaktadır. Apoptotik hücrelerin en belirgin biyokimyasal belirteçlerinden biri DNA fragmentasyonudur (DNA merdiveni). Apoptotik hücre kromatini 200 bp (baz çifti) uzunluğunda fragmentlere ayrılarak agaroz jel elektroforezinde merdivenimsi görülmektedir [5, 20, 22-24].

Apoptozis yaklaşık olarak 30-60 dakika sürmektedir. Apoptozis esnasında kaspazlar tarafından yıkılan yaklaşık 40 substrat tespit edilmiş olup bu substratların yıkımı apoptoziste görülen olayları tetiklemektedir. Kaspazların görevlerinden bir tanesi, hücreyi apoptozisten koruyan proteinleri ortadan kaldırmak ve inaktive etmektir. Bu proteinlerden bir tanesi I^{CAD} 'dir. Bu protein normalde CAD (kaspaz aktiviteli deoksiribonükleaz) proteinine bağlanarak hücre içinde bu enzimi inaktif durumda tutmaktadır. Apoptotik bir uyarı geldiğinde kaspazlar aktive edilir edilmez bu inhibitörü (I^{CAD}) yıkarak CAD enzimini serbest bırakmaktadır. Serbest kalan CAD enzimi nükleozomlar arasındaki DNA'yı kırarak 200 bp uzunluğunda DNA fragmentleri oluşturmaktadır. Bu oluşan DNA fragmentleri agaroz jel elektrofezde DNA merdiveni şeklinde görülmektedir [5, 23].

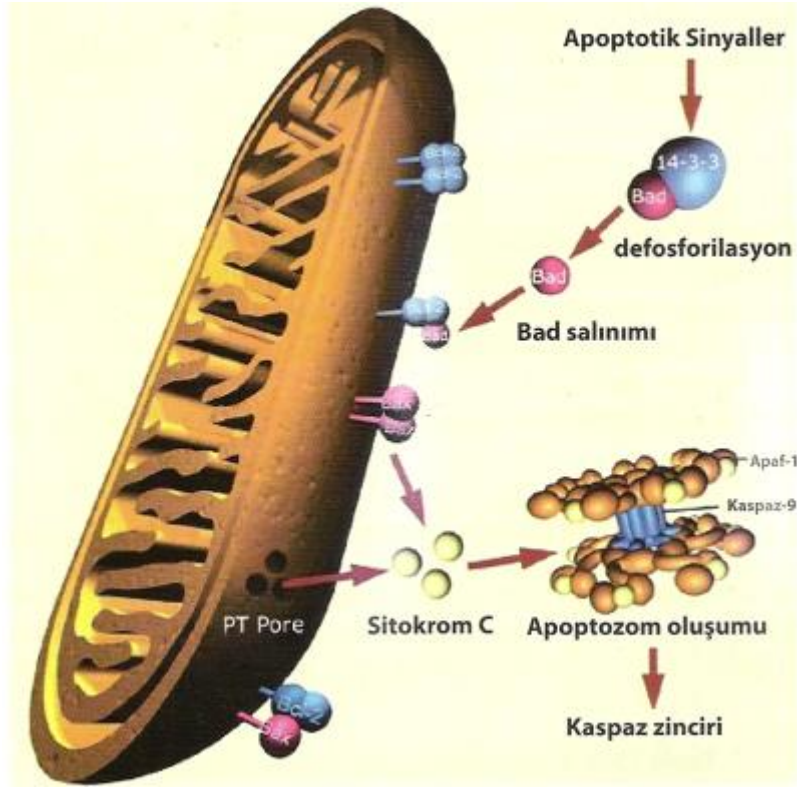
Memeli hücrelerinde iki tane büyük apoptotik yol belirlenmiştir: ölüm almaçı dış yol (extrinsic) ve mitokondriyel iç yol (intrinsic). Dış yol membranda bulunan ölüm almaçlarına ligandlar bağlandığında aktive edilmektedir. Dış yollardan bir tanesi Fas aracılı sinyal iletimidir. Fas trimer bir moleküldür. Fas-L ile birleştiğinde almaç trimerizasyonu tetiklenir ve proteinin iç kısmında yer alan ölüm domainleri (DD) kümeleşmeye başlar. Bu kümeleşme FADD'ın ölüm domainlerinin, almacının DD'leri ile etkileşime girmesini sağlar. FADD ayrıca DED (death effector domain) içerir. Bu domain FAS-FADD kompleksine prokaspaz-8'in bağlanmasını

sağlar. Böylelikle kaspaz-8 aktive olur ve bu da kaspaz-3'ü aktive ederek apoptozisi tetikler (Şekil 2.6) [22].



Şekil 2.6 Kaspaz-8 ve kaspaz-3'ün Fas reseptörü aracılığıyla aktivasyonu [18].

Mitokondri, kaspaz zinciri ve apoptozisin düzenlenmesinde en önemli rolü oynayan organelidir. Mitokondriden sitokrom-c salınması kaspaz-3 ve kaspaz-9'un aktivasyonunu sağlar. Mitokondriyel yol ile apoptozis uyarılması apoptozom oluşumu ile sağlanır. Apoptozom çok proteinli bir yapı olup sitokrom-c, Apaf-1, prokaspaz-9 ve ATP içerir (Şekil 2.7). Mitokondri membranında bulunan antiapoptotik Bcl-2 ailesi proteinleri (Bcl-2 ve Bcl-XL) hücre yaşamını teşvik ederken aynı protein ailesi grubunun üyeleri olan Bax ve Bad hücreleri ölüme sürükler. Bax dış mitokondri membranında por oluşturarak membran potansiyelinin kaybolmasını ve bu porlardan sitokrom-c salınmasını sağlar. Bcl-2 ve Bcl-XL mitokondri membranında por oluşmasını engellemektedir. Bax ya da Bad, Bcl-2 veya Bcl-XL ile heterodimer oluşturmak suretiyle Bcl-2 ve Bcl-XL proteinlerinin koruyucu etkilerini ortadan kaldırılır. Böylelikle mitokondriden salınan sitokrom-c, apaf-1 ve prokaspaz-9 apoptozumu oluşturur ve kaspaz zincirini aktive ederek hücre ölümünü gerçekleştirir [22].



Şekil 2.7 Apoptotik sinyaller ile kaspaz zincir aktivasyonu [22].

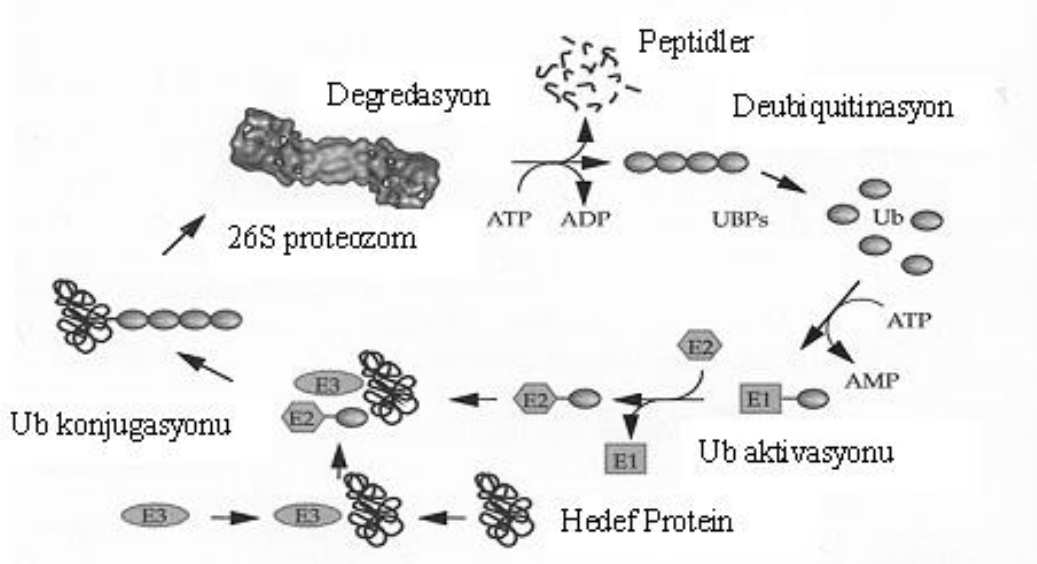
2.4. Meprinler

Hücre zarında bulunan veya ekstraselüler sıvıya salgılanan metaloproteazlardır. Amino asit seviyesinde % 50 benzerlik gösteren α ve β alt birimlerinden oluşurlar. Alt birimler birleşerek homo veya heterokompleksler meydana getirilir. Membran formları dimerik (homodimerik B, meprin B) ya da tetramerik (heteromerik $\alpha_2\beta_2$ ya da $\alpha_3\beta_2$ kompleksler, meprin A) şeklindedir. Salgılanan meprin formu ise 10-100 tane α alt biriminin nonkovalent olarak birleşmesi sonucu oluşan, bilinen en büyük proteazlardan biridir. Meprinler böbrek proksimal tüplerinde ve bağırsak epitel hücrelerinde yüksek miktarda bulunmaktadır. Çok sayıda peptid ve protein parçalamaktadırlar; bunlar arasında gastrin, angiotensin gibi peptidler ve ekstraselüler matriks proteinleri kolajen IV ve fibronektin bulunmaktadır. Meprin alt birimlerinin sentezinin önemli derecede bağırsak yolu enfeksiyonlarında ve kanserli hücrelerde arttığı görülmüştür ve özellikle ekstraselüler matriks proteinlerini yıkmaları nedeniyle kanserli hücrelerin metastazında önemli etkileri olduğu bilinmektedir [25].

2.5. Ubiquitin-proteozom yolu

Protein yıkımında lizozomal enzimlerin görev aldığı uzun süreler önce biliniyordu. Fakat leupeptin, antipain ve kimostatin gibi lizozomal inhibitörlerin keşfinden sonra protein yıkımında başka yollarında olduğu anlaşılmıştır. Çünkü bu inhibitörlerle lizozomu inhibe edilmiş hücrelerde protein yıkımı devam etmekteydi. Ciechanover ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda ubiquitin molekülünü keşfetmiş ve protein yıkımında rolünü belirlemişlerdir [26]. Ökaryotik hücrelerde seçici protein yıkımı genellikle yıkılacak olan proteine ubiquitin moleküllerinden (76 aminoasitlik bir peptid komponenti) oluşan bir zincir eklenip 26S proteozoma yönlendirilerek burada peptidlere kadar yıkılması ile meydana gelir [27-29]. Ubiquitin molekülü hedef proteine E1, E2 ve E3 ubiquitin enzim kompleksi aracılığıyla bağlanır. İlk olarak ubiquitin aktive edici enzimde (E1) bulunan bir sistin kalıntısı ile ubiquitin molekülünün C-ucu arasında bir thioester bağı kurulur. Bu şekilde aktive edilmiş olan ubiquitin molekülü benzer şekilde ubiquitin konjuge edici enzime (E2) aktarılır. E2 enzimleri ubiquitin molekülünü, ubiquitin ligaz enziminin (E3) türüne göre ya direk hedef proteine aktarır veya ilk önce E3 ubiquitin molekülü kendi üstüne alır daha sonra hedef proteine aktarır. Hedef proteindeki bir lizin amino asidi ile ubiquitin C-ucundaki glisin amino asidi arasında bir izopeptid bağı oluşur. Bağlanacak olan diğer bir ubiquitin molekülü ilk bağlanmış olan ubiquitin molekülünün 48. pozisyonunda bulunan lizin amino asidine eklenir. Eklenen her bir ubiquitin molekülünün lizin 48. aminoasidine bir ubiquitin molekülü bağlanması ile hedef protein üzerinde bir poliubiquitin zinciri sentezlenir [5, 30-33]. En az 4 ubiquitin molekülü birbirine bu şekilde bağlanıp bir poliubiquitin zinciri oluştuktan sonra hedef protein 26S proteozoma yönlendirilir. Poliubiquitin zinciri oluşurken ubiquitin molekülleri arasında oluşacak bağlar hedef proteinin geleceği açısından son derece önemlidir. Ubiquitin molekülleri arasında lizin63-glisin76 bağlantısı oluşması DNA tamiri, endositozis gibi proteolitik olmayan sinyal oluşmasına neden olur [26]. Çoğunlukla ubiquitin hedef proteinde lizin amino asitlerine eklenmesine rağmen nadiren bazı proteinlerde (örneğin, transkripsiyon faktörü MyoD) N-terminusundaki amino asidin NH₂ grubuna eklendiği görülmüştür [34]. 26S proteozom 2.5 MDa ağırlığında olup 19S düzenleyici kompleks ve 20S kor kompleksin birleşmesi ile oluşmaktadır. 26S proteozomda genellikle ubiquitin molekülü ile işaretlenmiş proteinler yıkılmaktadır. Fakat nadiren bazı proteinler [örneğin, α -Synuclein (Parkinson hastalığında görülen doğuştan hatalı katlanmış bir protein), tümör baskılayıcı proteinlerin retinoblastoma ailesi (p105, p107, p130), C-jun ve ornitin dekarboksilaz] ubiquitin ile işaretlenmeden 26S proteozom tarafından yıkılmaktadırlar. Ornitin dekarboksilaz (ODC), istisna olarak 26S proteozoma antizyme aracılığı ile hedeflenmektedir. ODC, ubiquitin ile modifiye edilmemektedir ve ubiquitin ODC

yıkımında görev almamaktadır [35-37].

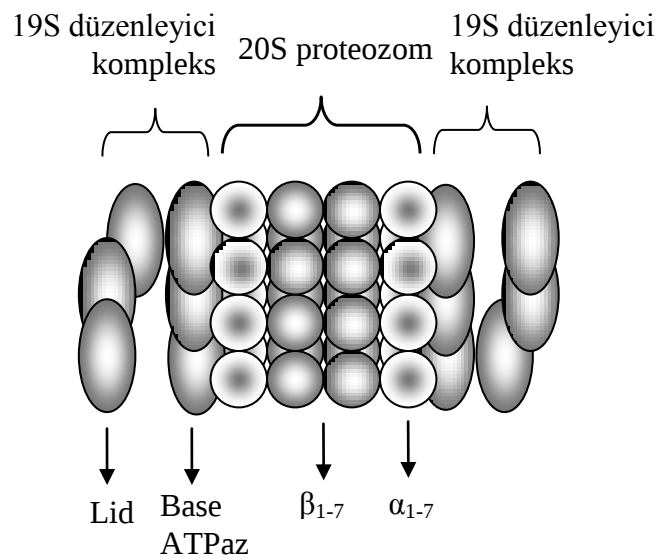


Şekil 2.8 Ubiquitin-proteozom yolu (Ub: Ubiquitin, E1: Ubiquitin aktive edici enzim, E2: Ubiquitin konjuge edici enzim, E3: Ubiquitin ligaz) [38].

2.5.1. 26S Proteozom

26S proteozom, çoğunlukla ubiquitin ile işaretlenmiş proteinlerin yıkıldığı, tüm hayat formlarında bulunan ve yaklaşık 64 alt birimden oluşan büyük bir proteazdır. 26S proteozom, sitoplazma ve çekirdekte bulunan multikatalitik bir proteazdır. Görevleri arasında, hücre içindeki birçok kısa ve uzun ömürlü proteinlerin miktarlarını kontrol etmenin yanı sıra hatalı katlanmış-anormal proteinlerin yıkımı, hücre döngüsü proteinleri olan siklinlerin, transkripsiyon faktörlerinin işlenmesi ve yıkımı, hücre döngüsünün durdurulması, immün-cevap ve apoptozis bulunmaktadır. 26S proteozomda yıkılan proteinlerin bazıları; p53, C-Myc (onkoprotein), IκB (NFκB inhibitörü), β-catenin, Bax, tBid, siklinler, poliamin sentezinde görevli olan ODC ve SAMDC proteinleridir. 26S proteozom, bir adet 20S proteozom ve iki adet 19S düzenleyici kompleksi içerir ve 2.5 MDa ağırlığındadır. Ubiquitin ile işaretlenmiş hedef protein, ilk olarak 19S düzenleyici kompleks tarafından tanınarak proteinin üç boyutlu yapısı çözülür. Buradan 20S kor bölgesine gönderilerek hedef protein peptidlere kadar yıkılır. 19S düzenleyici kompleksi 20S kompleksinin her iki ucunda bulunur. 19S düzenleyici kompleksi iki alt kompleksten oluşmaktadır: Base (20S kompleksine yakın bölge) ve Lid (kapak). Baz kompleksinde ATPaz aktivitesi içeren 6 protein ve ubiquitin tanıyan S5a proteini bulunmaktadır. ATPaz enzimlerinin hedef proteinlerin üç boyutlu yapılarının çözülmesi ve

proteolitik aktiviteleri içeren 20S kompartmanı içine gönderilmesinden sorumlu olduğu sanılmaktadır. 26S proteozomda protein yıkımı için lid kısmının bulunması zorunludur. Lid sekiz alt birimden oluşmaktadır. Görevi tam olarak bilinmese de ubiquitine olmuş proteinlerin tanınması, yıkımdan önce ubiquitin zincir ilerlemesi ve deubiquitinasyondan sorumlu olduğu sanılmaktadır. Prokaryotik ve ökaryotik 20S kompleksi 700 kDa ağırlığında olup α ve β alt birimlerinin oluşturduğu 4 tabaklı silindirik bir yapıdır. Arkeobakter *Thermoplasma acidophilum*'da 14 tane β alt birimi içteki iki tabakayı, 14 α alt birimi ise dıştaki iki tabakayı oluşturmaktadır ($\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ şeklinde dizilmektedir). Ökaryotlarda her bir α ve β alt birimi farklıdır ve $\alpha_{1-7}\beta_{1-7}\beta_{1-7}\alpha_{1-7}$ şeklinde dizilmektedirler. β iç halkaları katalitik yerleri barındırırlar. 20S proteozom kompleksi kimotripsin benzeri, tripsin benzeri ve peptidil glutamil benzeri olmak üzere en az üç farklı proteolitik aktivite göstermektedir. Beta alt birimleri proenzim olarak sentezlenirler ve proteozom olgunlaşması sırasında 75 amino asit kadar olan pro sekans çıkarılır. Yedi beta alt biriminden üçü (β_1 , β_2 ve β_5) enzimatik aktivite göstermekte ve bu alt birimler Gly ve Thr amino asitleri arasında kırılmakta ve enzim bu Thr yan gruplarını substrat peptid bağlarını kırmakta kullandığı için threonin proteazlar olarak da bilinmektedir. Peptid bağı hidrolizi ATP ve ubiquitin gerektirmektedir. Aktif bölgedeki her bir Thr amino asidi arasındaki mesafe 28 Å kadardır, bu da proteinlerin yaklaşık 8 amino asitlik peptidlere kadar yıkıldığını göstermektedir. α -alt-ünitelerinin amino uçları proteolitik kompartmana girişi engeller. Böylece proteozomun içerdeki boşluğuna silindirin her iki ucunda sınırlı porlar aracılığıyla geçiş olur [5, 26-29, 33, 38].



Şekil 2.9 26S proteozomun yapısı [5].

2.5.2. 26S proteozom inhibitörleri

Proteozom inhibitörleri MG-132 ve laktasistin ile yapılan çalışmalar hücre proteinlerinin %80-90'nın proteozom tarafından yıkıldığını göstermiştir. Bu proteinler arasında siklinler, Cdk inhibitörleri p21, p27 ve p57, tümör baskılayıcı p53, transkripsiyon faktörleri c-Jun ve c-Fos, NFκB inhibitörü IκB, poliamin biyosentez enzimleri ODC ve AdoMetDC (adenozilmetionin dekarboksilaz) gibi çok farklı mekanizmalarda rol alan proteinler vardır. Proteozom inhibitörleri sentetik inhibitörler ve doğal inhibitörler olmak üzere iki grupta toplanmışlardır [5, 28-29, 36, 39-41].

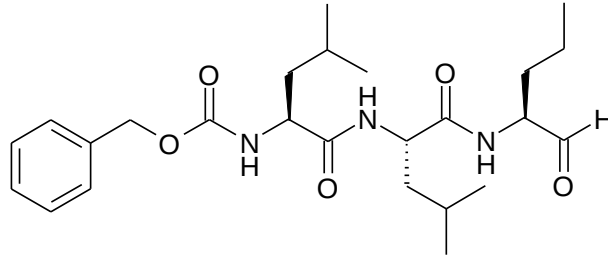
2.5.2.1. Sentetik inhibitörler

Araştırmacılar proteozom aktivitesini inhibe edebilmek için yaptıkları çalışmalarda 20S proteozomun kimotripsin-benzeri aktivitesini seçici olarak inhibe eden MG-115, MG-132 ve PSI inhibitörlerini geliştirmişlerdir. MG-132, katepsin B gibi bazı proteazları da inhibe edebilmektedir. Bu peptid aldehytler, 20S proteozomun güçlü inhibitörleri olarak geniş çapta biyolojik araştırmalarda kullanılmasına rağmen yüksek reaktif aldehyt fonksiyonel grup ortaya çıkarmaları nedeniyle seçici inhibisyon yapamadıklarından tedavi edici ajanlar olarak ya da kompleks sinyal yollarının incelenmesi için moleküler araştırmalarda kullanılmasında büyük bir engel oluşturmaktadır. Bu engelin üstesinden gelebilmek için araştırmacılar reaktif olmayan peptid inhibitörleri geliştirmişlerdir. Reaktif olmayan peptid inhibitörlerine örnek olarak α-ketokarbonil, boronik ester türevleri verilebilir. Ayrıca aldehyt olmayan proteozomu geri dönüşümsüz olarak inhibe eden proteozom inhibitörleri tripeptidler α', β'-epoksiketonlar ve vinly sülfonazlar geliştirilmiştir. Vinly sülfonazlar ilk olarak sistin proteaz inhibitörleri olarak tanımlanmıştır. Daha sonraki yapılan çalışmalarda Peptid vinly sülfonazın proteozomun amino ucu treonininin hidroksil grubunun değişimi ile 20S proteozomu geri dönüşümsüz olarak inhibe ettiği gösterilmiştir. Peptid bazlı inhibitörlerin diğer bir sınıfı boronik asit fonksiyonel grubu kullanmaktadır. Bu sınıfın en iyi karakterize edilmiş inhibitörü dipeptid boronik asit analogu PS-341'dir. Araştırmacılar tarafından yapılan faz II denemelerinde çeşitli hastalıklarda PS-341 muamelesi hızlı ve etkili cevap oluşmasını sağlamıştır [3, 42]. Birçok tümör çeşidine (multiple myeloma, lenfoma, prostat) karşı etkili olduğu görüldüğü için Amerikan Sağlık Bakanlığı tarafından kanser tedavisinde kullanılmak üzere onaylanmıştır. PS-341 proteozomun kimotripsin benzeri aktivitesini geri dönüşümlü olarak inhibe eder. PS-341 muamelesi hücrelerde hücre siklusu ilerlemesini bloke ederek G2-M fazında hücrelerin yığılmasına neden olmuştur. Hücrelerin PS-341 ile uzun süreli muamelesi apoptozise neden olmaktadır. Bundan başka PS-341, in vivo şartlarda proteozom aracılı IκB yıkımını ve NFκB-bağımlı gen

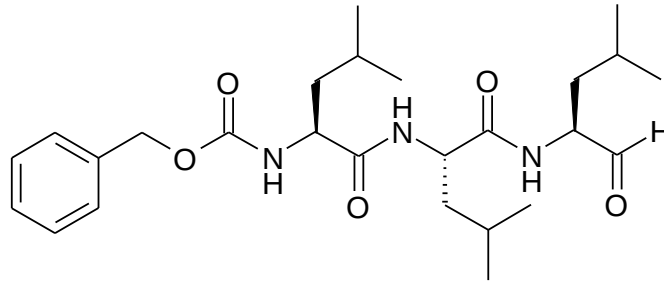
expressyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir [40, 43].

2.5.2.2. Doğal proteozom inhibitörleri

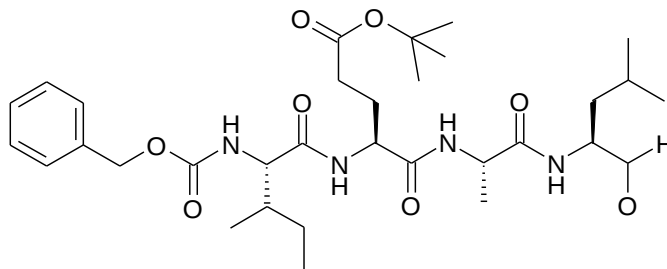
Laktasistin doğal bir *Streptomyces lactacystinaeus* metabolitidir. Laktasistin hücre siklusu ilerlemesini inhibe ettiği belirlenmiştir. Sonraki çalışmalarda Schreiber ve arkadaşları laktasistin 20S proteozomu β -alt-ünitesinin amino-ucu treoninini geri dönüşümsüz olarak inhibe ettiğini göstermişlerdir. Epoxomicin kimliği belirlenmemiş bir actinomycetes ırkında gözlemlenmiştir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda epoxomicin'in spesifik olarak 20S proteozomu hedeflediği gösterilmiştir. Epoxomicin 20S proteozom için son derece spesifiktir [40].



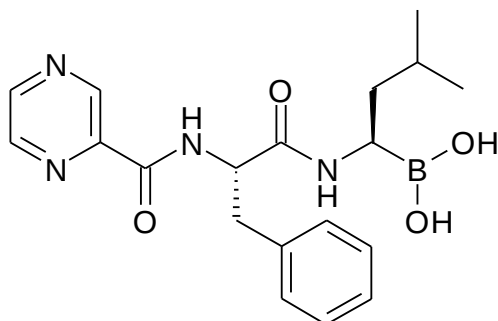
MG115



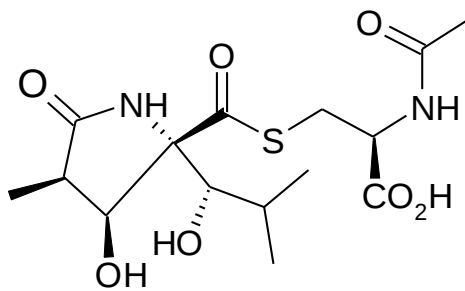
MG132



PSI



Velcade (PS-341)



Lactacystin

Şekil 2.10 Proteozom inhibitörlerinin kimyasal yapısı [5, 40]'den uyarlanarak ISIS/DRAW programında çizilmiştir.

3. ISI ŞOKU PROTEİNLERİ

Stres proteinleri olarak da bilinen ısı şoku proteinleri (heat shock proteins-hsps), ilk olarak yüksek ısıya maruz kalan hücrelerde keşfedilmişlerdir. Daha sonra yapılan çalışmalarda ısı şokunun yanında fiziksel stres, bazı kimyasallar, oksidatif stres ya da diğer protein hasarına yol açan durumlarda da uyarıldıkları belirlenmiştir. Hsp proteinlerinin moleküler ağırlıkları 15 kDa – 110 kDa arasında değişmektedir. Hsp proteinleri normal koşullar altında hücrelerde bulunmaktadır; fakat ısı artışı, kimyasallar ya da diğer stres faktörleri ile karşılaşıldığında hücredeki miktarı artmaktadır. Hsp bir hücrenin strese karşı direncini arttıran proteinlerdir. Proteinlerin stabilitesinde ve denatüre olmuş proteinlerin katlanmalarında gereklidir [44].

Isı şoku proteinleri moleküler ağırlıklarına göre 5 sınıfa ayrılmaktadır. Büyük moleküler ağırlığa sahip Hsp'ler ATP-bağımlı şaperonlardır. Küçük Hsp'ler ise bir ATP-bağımsız modeller olarak tanımlanmaktadır [44-45]. Bunlar:

- Küçük ısı şoku proteinleri (sHsps)
- Isı şoku proteini (Hsp60)
- Isı şoku proteini (Hsp70)
- Isı şoku proteini (Hsp90)
- Isı şoku proteini (Hsp100)

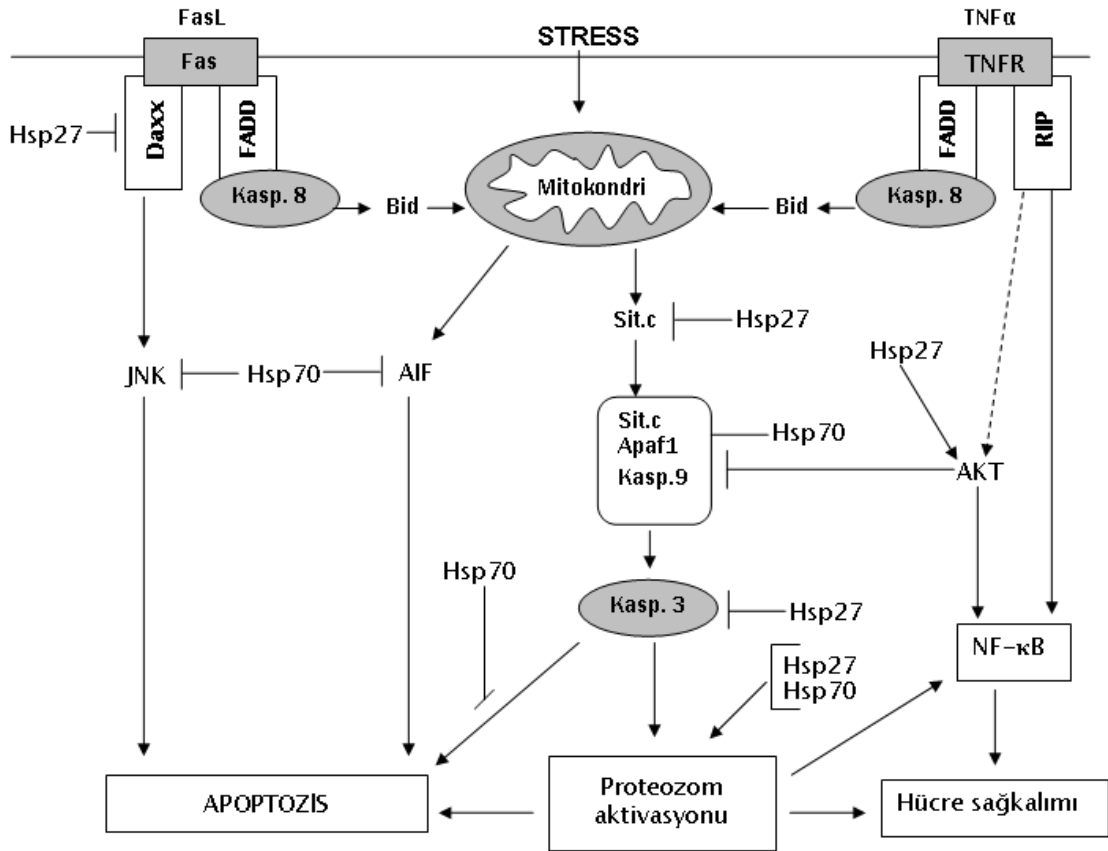
3.1. Küçük ısı şoku proteinleri (sHsps)

Küçük ısı şoku proteinleri, 12-43 kDa ağırlığındaki ısı şok proteinleridir. Stres faktörlerinin yokluğunda en çok hücrelerin ve dokuların sitozolünde bulunur. Fakat Birçok sHsps stres durumları altında ortaya çıkmaktadır. Isı ya da oksidatif stres gibi uyarılarla sHsps sentezi artarak memeli hücrelerinin sağkalımını arttırmaları. sHsps yüksek moleküler ağırlığa sahip Hsp'lerin aksine ATP'den bağımsız biçimde protein kümeleşmesini engelleyen şaperonlardır. Normal fizyolojik durumlar altında sentez seviyeleri hücre büyümesi ve farklılaşması ile ilişkilidir. sHsps'nin sentezinin artması sabit fazlı tümör hücrelerinde, farklılaşma esnasında ve büyümesi durmuş B-lenfositlerde gözlenmiştir [46-48].

Hsp40 şaperon proteinleri Hsp70 ve polipeptidler arasında kompleks oluşumu için gereklidir. Hsp70-Hsp40 şaperon ailesi üyeleri, protein katlanması ve hatalı katlanmış proteinlerin geri kazanılmasında rol oynamaktadır [49-50]. Bütün Hsp40 ailesinde J-domaini bulunur ve Hsp70 ATPase aktivitesinin düzenlenmesinden sorumludur. Hsp40 proteinleri 3 mekanizma ile Hsp70 ve polipeptidler arasında kompleks oluşumunu düzenler. Birincisi, Hsp40 proteinleri polipeptid-bağlayıcı domainlerin (PPDs) nadir bir sınıfını içermektedir. Bu PPDs, hedef proteinleri Hsp70'e bağlar ve dağıtır. İkincisi, Hsp40 proteinleri Hsp70'e bağlı olan ATP'yi ADP forma dönüştürerek Hsp70'in konformasyonu ile Hsp70-protein kompleksini stabilize eder. Üçüncüsü, Hsp40 ailesinin uzmanlaşmış üyeleri aynı hücresel kompartman içinde farklı alanlara yerleşmiştir. Farklı alanlara yerleşmiş Hsp40 proteinleri ile Hsp70'lerin etkileşimi farklı Hsp70-Hsp40 kompleksi oluşturarak bu alanlarda tek hedef proteinlerin bağlanmasına olanak verir [49].

Hsp27'nin hücrede sentezi hormon, kemoterapi ve inhibitörler gibi faktörler ile apoptozisin uyarılmasına cevap olarak artmaktadır. Hsp27 ve Hsp70'in sito-koruyucu aktivitesi için farklı birkaç mekanizmadan söz edilebilir. Birincisi her iki protein çok güçlü şaperonlardır. Başlangıçta, Hsp27 gibi ATP-bağımsız şaperonlar hasarlı proteinlerin birikmesini ve çökmesini engeller. Hücre iyileşmeye başladığı ve ATP seviyeleri zenginleştiği zaman Hsp70 ve Hsp60 gibi ATP-bağımlı şaperonlar proteinlerin yıkılması ya da taşınması ve geri katlanmasında görev alırlar. İkincisi her iki protein apoptozom, kaspaz aktivasyon kompleksi (Hsp27 ve Hsp70), apoptozis uyaran faktör (sadece Hsp70) gibi apoptotik mekanizmaların inhibisyonunda kilit rol oynarlar. Üçüncüsü, her iki protein apoptozis düzenleyici proteinlerin proteozom-aracılı yıkımında görev alırlar. Hsp27 ve Hsp70 malignant hücrelerde bol miktarda ifade edilir. Hsp27 seviyelerinde artış çoğunlukla prostat, meme, ovaryum ve mide tümörlerinde belirlenmiştir. Tümör hücrelerinde bu proteinlerin aşırı sentezi hücrelerin onkojenik gücünü arttırabilir. Bu nedenle Hsp70 ve Hsp27'nin seçici inhibisyonu kanser tedavisinde değerli bir strateji oluşturabilir [45, 51]. Hsp70 ve Hsp27'nin sito-koruyucu etkisi hücreleri apoptozisten mahrum bırakabilme kabiliyeti ile ilişkilidir. Hsp70 ve Hsp27 birkaç farklı apoptotik efektör ile direk etkileşim halindedir (Şekil 3.1). Hsp27 CD95-aracılı apoptotik yol ile etkileşim halindedir. Hsp27'nin fosforile olmuş formu CD95-aracılı ölüm yolunun komponentlerinden biri olan Daxx ile direk etkileşimindedir. Bu nedenle apoptotik mitokondriyel (intrinsic) yoldan farklı olarak apoptotik dış (extrinsic) yol, Hsp27'nin fosforile formu tarafından inhibe edilir. İntrinsic yol da ise apoptozis Hsp27'nin fosforile olmamış formu tarafından inhibe edilir. Ayrıca Hsp27 tarafından oluşturulan antiapoptotik etki serin/treonin kinaz Akt/PKB'nin inhibisyonu ile olabilir. Serin/treonin kinaz Akt/PKB hücre büyüme uyarılmasına cevapta sağkalım sinyali

oluşturan bir proteindir. Akt, Bad ve kaspaz-9 gibi birkaç proapoptotik proteini fosforile ve inhibe eder. Böylelikle Akt fosforilasyonları, NF- κ B (hücreyi sağkalıma teşvik eden transkripsiyon faktörü)-aracılı sağkalım yollarının yükselmesiyle sonuçlanır. Hsp70 ATP tükenmesiyle meydana gelen enerji yoksunluğundan ve stres-uyarılmalı kaspaz-bağımlı apoptozisden hücreleri korumaktadır. Hsp70 kaspaz aktivasyonunu güçlü bir şekilde engelleyebilir. İntrinsic yolun bazı modellerinde Hsp70'in aşırı ifadesi kaspaz-3 aktivasyonunu engellerken mitokondriden sitokrom-c'nin salınmasını engellememektedir. Ayrıca Hsp70'in antiapoptotik etkisi Hsp70 ve AIF arasındaki etkileşim ile ilgilidir. AIF bir kaspaz-bağımsız ölüm efektörüdür. AIF, sitozol aracılığıyla mitokondriden nukleusa hareket etmektedir. Hsp70'in AIF'in mitokondriyel salınımı üzerine etkisi yoktur. Dolayısıyla Hsp70 mitokondriden salındıktan sonra AIF'yi inhibe etmektedir. Ayrıca Hsp70 jun N-terminal kinaz-1'e (JNK1) bağlanır ve inhibe eder. Fakat bu etkileşim apoptozisin engellenmesi için yeterli olmayabilir. Hsp70 pro-apoptotik proteinler p53 ve c-Myc ile birleştiği gösterilmiştir. Son olarak Hsp70 yardımcı-şaperon BAG-1 üzerine bir etkisi ile apoptozisi inhibe edebilir [45].



Şekil 3.1 Hsp27 ve Hsp70'in apoptotik proteinler ile ilişkileri [45]'den uyarlandı.

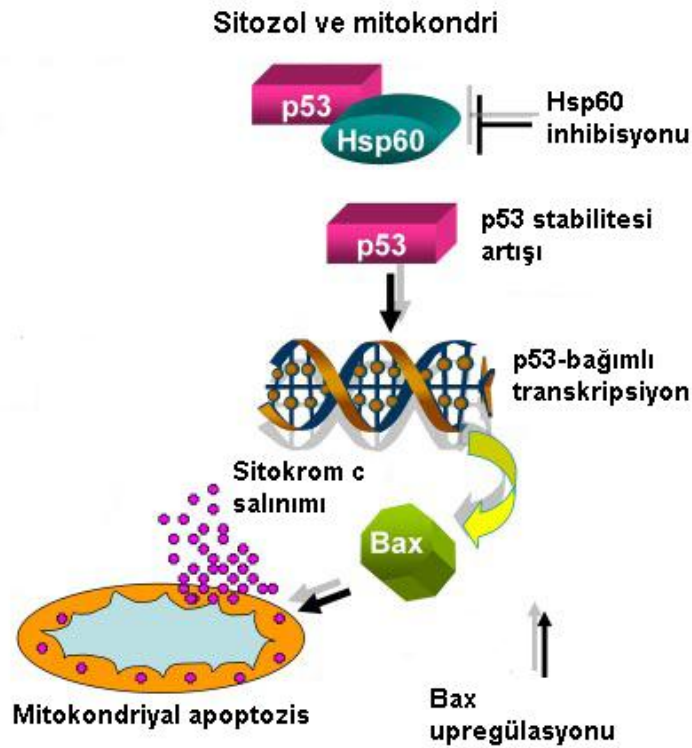
Hsp'lerin ubiquitin/proteozom sistem ile proteinlerin yıkımını kolaylaştırabildiği belirlenmiştir. Hsp27, Hsp70 ve Hsp90 birkaç mekanizma tarafından ubiquitin/proteozom yolu ile proteinlerin yıkımını arttırabilir. BAG-1 ve CHIP, protein katlanmasından yıkımına şaperon sistemin aktivitesini düzenlemede rol almaktadırlar. CHIP (C-terminus of Hsc70-interacting protein) olarak bilinen bir yardımcı-şaperon ubiquitin ligazdır ve Hsp70 ile etkileşim halindedir. Ubiquitine olmuş hatalı katlanmış proteinler şaperon tarafından yakalanır ve proteozomun 19S alt-ünitesi ile birleşir. Ubiquitin-seven domain içeren BAG-1, Hsp70 ve Hsc70 için diğer şaperondur. BAG-1, Hsc70/Hsp70 şaperon sistemi ve 26S proteozom arasında ekstra bir bağ sağlamaktadır. BAG-1, Hsp27 ubiquitin-seven bir domain içerir, 26S proteozomun katalitik aktivitesini artırır ve stres uyarımına cevapta ubiquitine proteinlerin yıkımını artırır. Hsp27 ubiquitin ile direk etkileşim halindedir [45].

Hsp10'un protein katlama mekanizmasının gerekli bir komponenti olduğu tespit edilmiştir. Protein komplekslerinin toplanmasında ve mitokondri içine hücumda Hsp10 gereklidir. Hsp10 bir nükleer gen tarafından şifrelenir, sitoplazmada translate edilir ve mitokondri içine taşınır. Hsp10 normal hücrelerde en çok mitokondri matriksinde yerleşmiştir. Ayrıca diğer hücre içi bölgelerde de bulunmuştur. Kanseri hücrelerinin sitoplazmasında Hsp10'un yüksek seviyeleri rapor edilmiştir. Hsp10, Hsp60/10 protein katlama mekanizmasında başlıca Hsp60'ın partneri olarak bulunmuştur. Hsp60'ın fonksiyonu Hsp10'a bağımlıdır. Hsp10, Substrat bağlaması ve ATPase aktivitesinin düzenlenmesi için Hsp60 proteinine bağlanır. Hsp60/10 kompleksinin polipeptidlerin katlanmasını hızlandırmada sorumlu olduğu düşünülmektedir [52-53].

3.2. Isı şoku proteini 60 (Hsp60)

Hsp60 ailesi ısı şok proteinlerinin büyük bir grubudur. Hsp60 üyeleri sitozolde ve ekstraselüler kompartmanda bulunmalarına rağmen çoğunlukla mitokondri matriksinde lokalleşmişlerdir. Moleküler şaperon olarak Hsp60 olgunlaşmamış proteinlerin katlanmasında ve sitoplazmadan organelle proteinlerin transportunda görev alır. Tipik şaperon fonksiyonuna ek olarak aminoasit transportu, sinyal iletimi, peptid tanınması, immün sistem regülasyonu ve apoptozis gibi çeşitli fonksiyonlarda görev alır [54]. Hsp60 ifadesinin artışı, insan kanserlerinin farklı tiplerinde gözlenmiştir. Hsp60'ın aşırı sentezi in vivo ve in vitro'da metastatik fenotipleri uyarmaktadır [55]. Hsp60'ın aşırı sentezi Adrenal cushing tümörleri, insanda meydana gelen meme, kalın bağırsak, bronşiyal ekzoservikal, ovaryum ve prostat kanseri gibi çeşitli tümör ve kanserlerde rapor edilmiştir [56]. Jurkat T hücrelerinde, Hsp60 ve Hsp10 şaperon proteinleri, kaspaz-3'ün subpopulasyonu ile kompleks halinde mitokondride bulunur. Staurosporin ile

apoptozisin uyarılması üzerine mitokondriyel prokaspaz-3 Hsp60'dan ayrılır ve aktive edilir. Böylelikle her iki protein sitozol içine salınır [53]. Sitozolik Hsp60 ayrıca proapoptotik protein Bax ile kompleks oluşturur. Oksijen yetersizliği durumunda Hsp60 ve bax ayrılır. Bunun üzerine bax, apoptozise katılmak üzere mitokondriye nakledilir [57]. Moleküler şaperon Hsp60'ın küçük müdahale edici RNA (SiRNA) tarafından inhibisyonu ile Hsp60/p53 kompleksinde bozulma meydana gelmektedir. Böylelikle p53 stabilizasyonu, proapoptotik bax ekspresyonunun artması ve bax-bağımlı apoptozis meydana gelmektedir. İn vivo şartlarda Hsp60 insan tümörlerinde normal dokulara göre daha fazla ifade edilmektedir [58].



Şekil 3.2 Hsp60 inhibisyonu ile mitokondriyal apoptozis oluşumu [58].

3.3. Isı şoku proteini 70 (Hsp70)

Hsp70, membranlar arasında protein translokasyonundan apoptozisin düzenlenmesine birçok hücrel sürecin geniş bir alanında yer almaktadır. Hsp70'ler zayıf adenozin trifosfatazlardır (ATPaz) ve ATP-bağımlı moleküler şaperonlardır [45, 59]. Hsp70 ailesi üyeleri polipeptid bağlayıcı olarak hareket ederek hücrel protein metabolizmasını düzenler [49]. Hsp70 apoptotik uyarı, ısı şoku, tümör nekroz faktörü, büyüme faktörü geri çekilmesi, oksidatif stres, kemoterapik ajanlar, seramid ve radyasyondan hücreleri korur. Hsp70, ısı şokunda ya da

seramid uyarılmalı apoptozisde kaspaz-3 ve SAPK/JNK aktivasyonunu engeller [60]. Hsp70'in yukarıda bahsettiğimiz hücreyi koruyucu özelliklerinden dolayı kanser araştırmalarında Hsp70 inhibitörlerine olan ilgi son zamanlarda artmıştır. Hsp70'in bazı önemli fonksiyonlarını aşağıdaki gibi maddeleyebiliriz [45].

1. Hücresel kompartmanlar içine proteinlerin getirilmesi
2. Sitozol, mitokondri ve endoplazmik retikulumda proteinlerin katlanması
3. Stabil olmayan proteinlerin yıkımı
4. Protein komplekslerinin bozulması
5. Düzenleyici proteinlerin kontrolü
6. Hatalı katlanmış proteinlerin geri katlanması
7. Mitokondri içine öncü proteinlerin translokasyonu

3.3.1. Hsp70 inhibitörleri

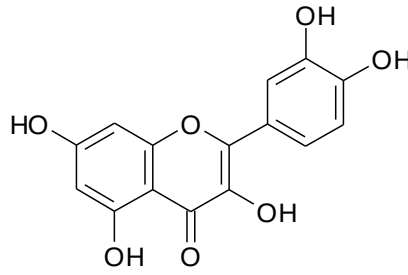
Flavonoidler, doğal olarak meydana gelen polifenolik bileşiklerdir ve güçlü farmakolojik özelliklere sahiptirler. Flavonoidlerin günlük alımı düşük kanser riski ile ilişkilendirilmiştir [61].

Quercetin, özellikle meyve ve sebzelerde bol olan bir flavonoidtir ve güçlü bir antioksidandır. Quercetin'in antiproliferasyon ve apoptotik etkiler gibi çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu bulunmuştur. Son günlerde yapılan çalışmalarda quercetin'in proteozom aktivasyonunu inhibe ederek apoptozisi uyardığı, G₁/S ya da G₂/M fazında hücre siklusunun durmasına sebep olduğu, p21 ifadesini arttırdığı ve Hsp70'i inhibe ettiği bulunmuştur. Quercetin'in lösemi, meme, özefagus, kolon, prostat, nazofarinks, endometrial ve akciğer kanseri gibi çeşitli insan kanserlerinin büyümesini inhibe ettiği rapor edilmiştir. Quercetin Hsp70 inhibisyonu, glikolizisin inhibisyonu, makromolekül ve enzim sentezi, hücre siklusunun durdurulması ve östrojen tipII bağlayıcı bölgesi ile etkileşim gibi çeşitli mekanizmalar ile malignant hücrelerin büyümesini inhibe ettiği belirlenmiştir [62-65].

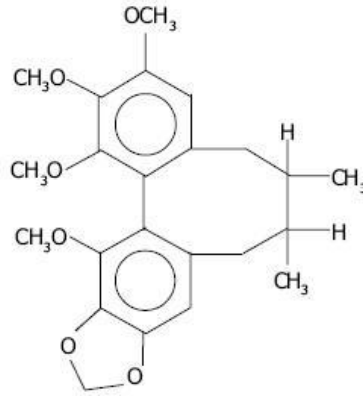
Schisandrin B bir dibenzocyclooctadiene bileşiğidir ve *Schisandra chinensis*'in meyvesinden izole edilmiştir. Çin kliniklerinde viral ve kimyasal hepatitlerin tedavisi için kullanılmaktadır. Yapılan bir araştırmada Schisandrin B'nin insan hepatoma SMMC-7721

hücrelerinde Hsp70'i ve hücrelerin çoğalmasını inhibe ettiği, in vitro da apoptozisi uyardığı belirlenmiştir [66].

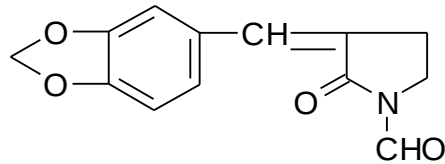
KNK437 (*N*-formyl-3,4-methylenedioxy-benzylidene- γ -butyrolactam) in vitro da ısı şok proteinlerin sentezini inhibe etmektedir. Yapılan bir araştırmada KNK437'nin doz-bağımlı olarak COLO 320DM (insan kolon karsinoması) hücrelerinde Hsp105, Hsp70 ve Hsp40'ın uyarılmasını ve ısı toleransına kazancı inhibe ettiği tespit edilmiştir [67-68].



Quercetin



Schisandrin B

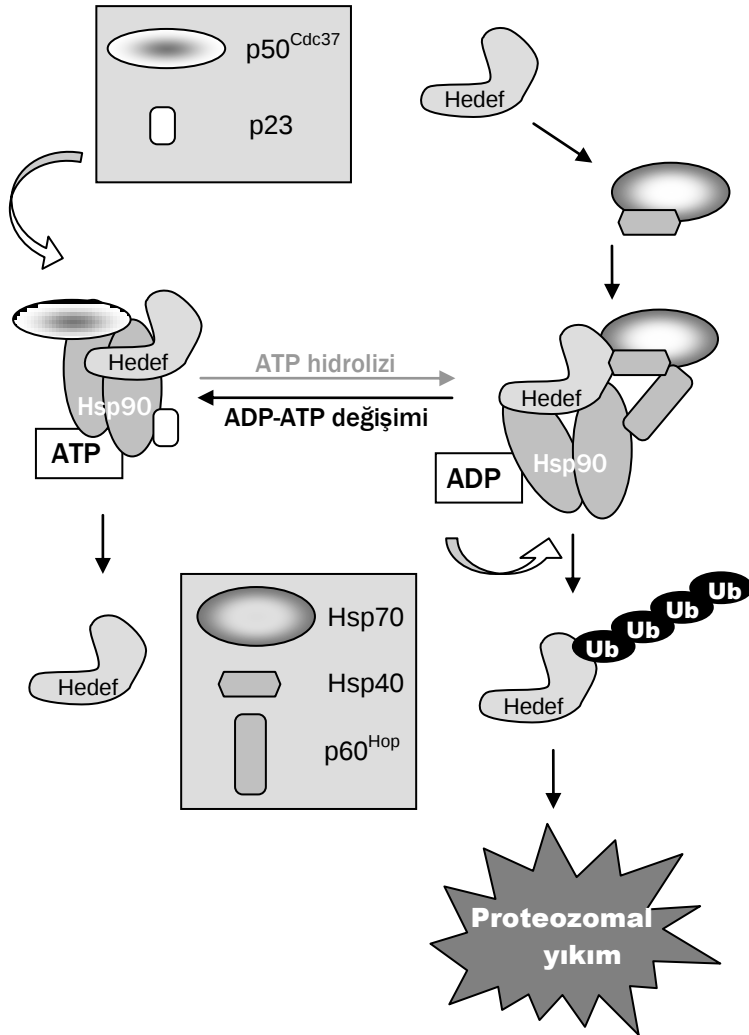


KNK437

Şekil 3.3 Hsp70 inhibitörlerinin kimyasal yapısı, Quercetin [62]'den, KNK437 [67]'den uyarlanarak ISIS/DRAW programında çizilmiştir. Schisandrin B [66]'den alınmıştır.

3.4. Isı şoku proteini 90 (Hsp90)

Hsp90 bir moleküler şaperondur. Gereksiz ya da aşırı sentezlenmiş proteinler tarafından uyarılarak aktive edilmiş sinyal proteinlerin fonksiyonu ve stabilitesi için gereklidir [69]. Hsp90 miktarı çevresel stres esnasında hücrede normal bulunduğu miktardan 2-10 kat daha fazla bulunmaktadır. Hsp90 proteinlerin katlanması, hücresel kompartmanlar arasında translokasyonu, protein kümelerinin baskılanması ve sinyal proteinlerin olgunlaşması için gereklidir. Hsp90 fonksiyonel bir hedef proteinin uygun katlanmasına ya da bazı proteinlerin yıkımına öncülük edebilir. Stres altında hedef protein Hsp90 yoluyla ya yıkıma uğrar ya da tamir işlemi gerçekleşir [70]. Bugüne kadar 100'den fazla Hsp90 hedef protein belirlenmiştir.

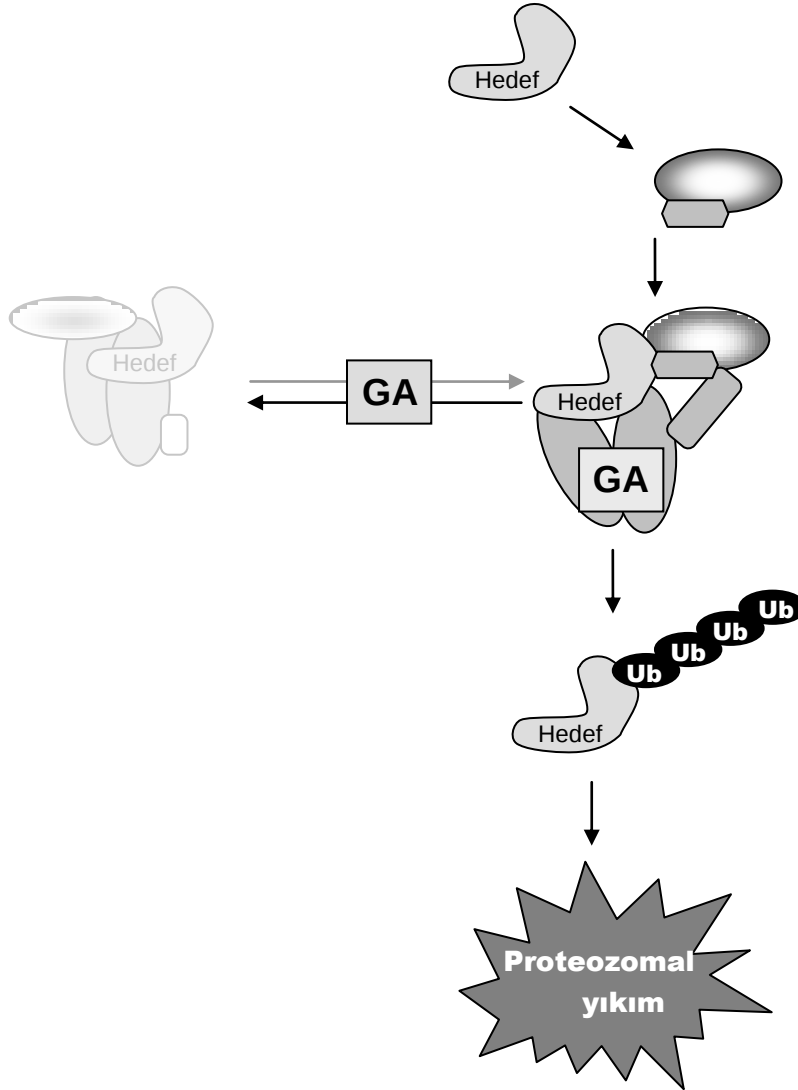


Şekil 3.4 Hsp90-bazlı süper şaperon makinesi [70]'dan uyarlanmıştır.

Şekil 3.4’de Hsp90-aracılı süper-şaperon makinesinin nükleotid-bağımlı siklusu gösterilmiştir. Yeni sentezlenmiş hedef protein ilk olarak bir Hsp70/Hsp40 şaperon kompleksi ile birleşir. Bu topluluk bir Hsp90/Hsp70-bağlayıcı protein olan p60^{Hop} ile Hsp90’a birleşir. Bu noktada Hsp90, ADP- bağlı konformasyondadır. Hsp90’ın bir amino-ucu nükleotid bağlayıcı cebinde ATP ile ADP’nin değişimi sonucu Hsp90 konformasyonu değişir. P60^{Hop} ve Hsp70/Hsp40 serbest kalır. P50cdc37 ve p23 içeren yardımcı şaperonların diğer seti eklenir. Bu ATP bağlı şaperon kompleksi hedef proteinleri katlar ve stabilize eder ve geçici olarak bu durumda tutunurlar. Bu bir uyarıya cevaba ya da liganda bağlanmaya hazırdır. Eğer hedef protein liganda bağlanmaya ya da uyarıya maruz kalmayı başaramazsa yeni şaperon etkileşimleri ile geri dönüşümü (recycled) olacaktır. Eğer ATP-bağımlı adım gerçekleşmezse hedef protein ubiquitinasyona ve proteozomal yıkıma uğrayacaktır. Sonuç olarak Hsp90’ın amino-ucu bağlayıcı cebinde meydana gelen ATP/ADP nükleotid değişimi Hsp90 şaperon mekanizmasını yönlendirerek hedef proteinin geleceğini belirler [70].

3.4.1. Hsp90 İnhibitörleri

GA (Geldanamycin) in vitro deneylerin yanı sıra in vivo deneylerde de v-Src-dönüşmüş kanser hücrelerine karşı anti-tümör aktivite göstermiştir. GA başlangıçta direkt olarak tirozin kinaz inhibisyonu ile anti-tümör aktivitesi gösterdiği düşünülmüştür. Ancak bir in vitro kinaz yöntemi ile GA’nın hiçbir Src ya da onun fosforilasyon aktivitesi inhibisyonu ile direkt olarak etkileşmediği gösterilmiştir. Sonuç olarak GA’nın Hsp90’ı direk hedeflediği belirlenmiştir. Ansamycin, ATP ya da ADP’den daha büyük bir ilgi ile Hsp90-bağlayıcı cepte nükleotidin yerini alan peptid shepherdin gibi N-ucu inhibitörleridir. Böylelikle Hsp90 şaperon siklusunda kısa-sirkülasyon meydana gelir. Hsp90 inhibitörleri nükleotid-bağımlı sikluyu engeller. Promotor alana GA bağlanmış süper-şaperon makinesi topluluğu şaperonun ADP bağlı konformasyonuna benzer ve ubiquitin-proteozomal sisteme hedef proteinin hedeflenmesi ile sonuçlanır ve hedef protein burada yıkılır. Bu şekilde Hsp90 inhibisyonu, Hsp90 hedef proteinlerin yarı-ömrünü düzenli olarak kısaltmaktadır. Hsp90 tümör hücreleri gibi normal hücrelerin fonksiyonu için de gereklidir. Bu nedenle Hsp90 inhibisyonu malignantlık için seçici olamayabilir. Preklinik ve klinik gözlemler Hsp90 inhibitörlerinin in vivo’da belirli dozlarda ve program dahilinde toksisiteye neden olmadan anti-tümör aktivitesi için kullanılabileceğini göstermiştir [70].



Şekil 3.5 GA (geldanamycin) ile Hsp90 inhibisyonu ve hedef proteinin proteozomal yıkıma yönlendirilmesi [70]'den uyarlanmıştır.

3.5. Isı şoku proteini 100 (Hsp100)

Fizyolojik koşullar altında bu protein, moleküler şaperonlar gibi fonksiyon göstererek, proteinlerin yeniden düzenlenmesinde görev alır. Hsp100 protein kümelerini ayırmak için onları eritir. Özellikle Hsp100 ailesi içinde yer alan Hsp104 yeni toplanan proteinleri kurtarma “yeteneğine sahiptir. Ayrıca Hsp100 mayalarda sıcaklık toleransının kazanılmasında da görev alır. Bitkilerde Hsp100 belli bir ısı toleransından sonra kapasitesini yitirir [44].

4. MATERİYAL ve METOT

4.1. Materyal

B16F10 melanoma hücreleri Doç. Dr. Nuray Erin (Akdeniz Üniversitesi, Tıp fakültesi) tarafından gönderilmiştir. RPMI-1640 besiyeri, fetal bovine serum (FBS), tripsin, Penicillin/Streptomisin, MTT ve diğer kimyasallar Sigma-Aldrich Inc.'dan temin edilmiştir.

4.2. Besiyeri Hazırlanışı

10.4 gr RPMI-1640 850 ml dH₂O'da çözündükten sonra 1N HCl ile pH 4'e ayarlanır. Bu aşamadan sonra steril 20 ml NaHCO₃ (stok % 7.5) ve 22.5 ml glukoz (% 20'lik stokdan), 4 ml HEPES solüsyonu (2.5 M stoktan) ve 1 ml sodyum pirüvat solüsyonu (1 M stoktan) konulduktan sonra pH 7.1'e 1 N NaOH ile ayarlanır. 10 ml Pen/Strep antibiyotik karışımı eklendikten sonra besiyeri hacmi 1L'ye tamamlanır. 1L kapasiteli disposable Millipore filtrasyon sistemi (por çapı 0.22 µm) ile Laminer Flow kabini içinde filtre edilir. Filtre edilen besiyerinin 900 ml'sine 100 ml FBS konulur. 4°C'de muhafaza edilir.

4.3. Hücre Kültürleri

B16F10 hücreleri 37°C'de % 5 CO₂'lik ortam sağlayan HF90 inkübatöründe çoğaltıldılar. Stok kültürler 25 cm² steril Corning Flasklarda ve deney kültürleri ise 35 mm x 10 mm steril petri kaplarında çoğaltıldılar. Hücre pasajı çoğunlukla ~% 70 yoğunlukta yapıldı. Hücreler 1 ml % 0.25'lik tripsin ile yıkandıktan sonra 2 ml % 0,25 tripsin flasklara (PBS de hazırlandı) konuldu ve B16F10 hücreleri ~30 saniye tripsin ile muamele edildi. Tripsin, vakum pompasına bağlı pastör pipeti ile aspire edildikten sonra hücreler 1/10 oranında yeni besi yeri ile seyreltilerek flasklara ekildi. Hücre pasajı her 3 günde bir periyodik olarak yapıldı.

4.4. MTT testi

B16F10 hücre kültürleri 35 mm x 10 mm steril kaplarda, 37 °C, % 5 CO₂' de logaritmik faza ulaşana kadar inkübe edildiler. Logaritmik fazdaki hücreler PS-341 ve quercetin'in farklı konsantrasyonları ve kombinasyonları ile muamele edilerek inkübatörde 24 saat muamele edildiler. 24 saatin sonunda besiyerleri tüplere alındı. Tüpler 2700 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatantlar atıldı. Pelletler ise tekrar petrilere eklendi. Her petriye 2 ml 0.5 µg/µl MTT ve % 0.5 FBS içeren besiyeri konuldu. Petrilerin etrafı alüminyum folyo ile sarılarak inkübatörde 4 saat inkübe edildi. 4 saatin sonunda petrilerdeki besiyerleri tüplere alındı ve 2700 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar atıldı pelletler ise tekrar petrilere

eklendi. Her petriye 200 µl % 3 SDS ve 1 ml 40 mM HCl/izopropanol konuldu. Pipetleme ile homojenizasyon gerçekleştirilerek örnekler ependorf tüplerine alındı. Ependorflar 12000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra ependofların süpernatantından 100 µl alınarak 900 µl % 3 SDS 40 mM HCl/izopropanol ile seyreltildi (1/10 seyreltme). Örnekler spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda ölçüldü.

İstatistiki Analizler:

İstatistiki analizler, GraphPad Prism 3.03 programı ile yapılmıştır. Deney sonuçları ortalama $\pm$ SEM olarak sunuldu. Deneylerin istatistiki analizi one-way ANOVA ve Bonferroni çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. $p < 0.05$ 'den küçük değerler önemli kabul edilmiştir.

4.5. Kullanılan Solüsyonlar

MTT

49.750 ml besiyerine 250 µl FBS ilave edildi. 50 ml'de % 0.5 FBS içeren besiyerine 0.025 gr MTT konuldu. MTT çözünene kadar karıştırıldı.

%3 SDS

1.5 g SDS 50 ml dH₂O'da çözülür.

40 mM HCl/İzopropanol

1M stok HCl çözeltisinden 2 ml alınır. Üzerine 48 ml izopropanol ilave edilir.

4.6. Kullanılan Cihazlar:

- HF 90 marka CO₂ inkübatör.
- SANYO derin dondurucu.
- Nüve marka otoklav.
- HANNA marka pH ölçüm cihazı.
- Motik marka inverted mikroskop.
- Motic marka mikroskop kamerası
- Hettich ZENTRIFUGEN marka santrifüj
- GYRO-ROCKER STR 9 marka çalkalayıcı.
- BİO-RAD Smart SpecPlus marka spektrofotometre.

5. SONUÇLAR

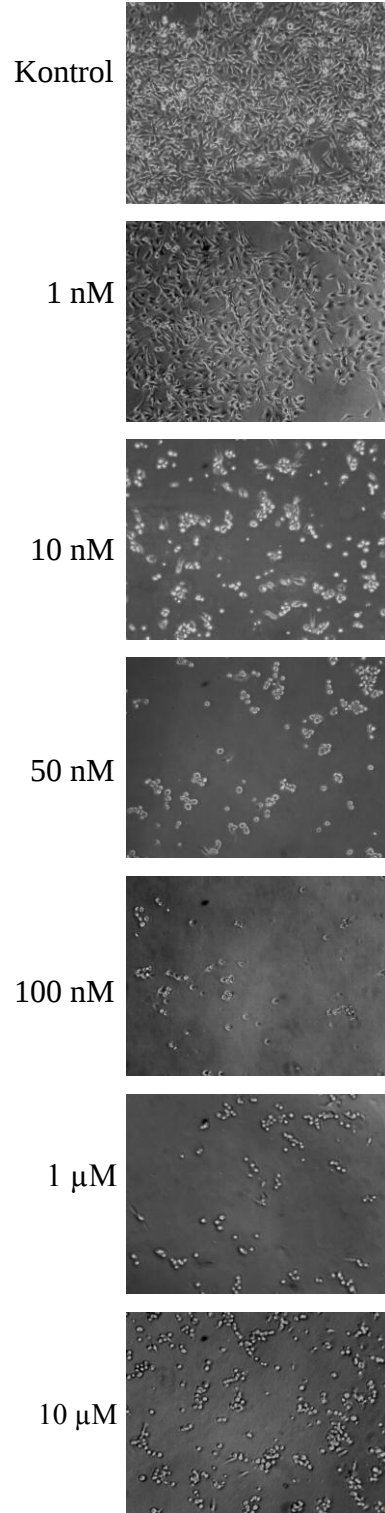
B16F10 hücre kültürleri 35 x 10 mm'lik steril petrilere logaritmik faza gelene kadar çoğaltıldılar. Bu hücrelere aşağıda belirtilen konsantrasyonlarda PS-341 ve quercetin muamelesi yapılarak inkübatörde (37 °C, % 5 CO₂) inkübe edildiler. 24 saat sonunda her petrideki hücrelerin morfolojileri inverted mikroskop yardımıyla incelenip kaydedildi.

Şekil 5.1'deki PS-341'in farklı konsantrasyonları ile muamele edilmiş B16F10 hücreleri 10x'lik objektif ile inverted mikroskopda incelendiğinde, kontrol grubunda hücrelerin petri dibine yapışık, petrinin tamamen hücre ile dolu olduğu görülmektedir. PS-341 1 nM muameleli petride, hücre morfolojisinde ve miktarında kontrol grubu ile arasında bir fark gözlenmemiştir. Fakat, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 1 µM ve 10 µM PS-341 ile muamele edilmiş petrilere hücre miktarı azalmış, apoptotik hücrelerin karakteristik özellikleri olan hücrelerin küçülüp büzülmesi, birbirlerinden ayrılması ve besiyerinde asılı bir vaziyette durması gibi morfolojik değişimler gözlenmiştir.

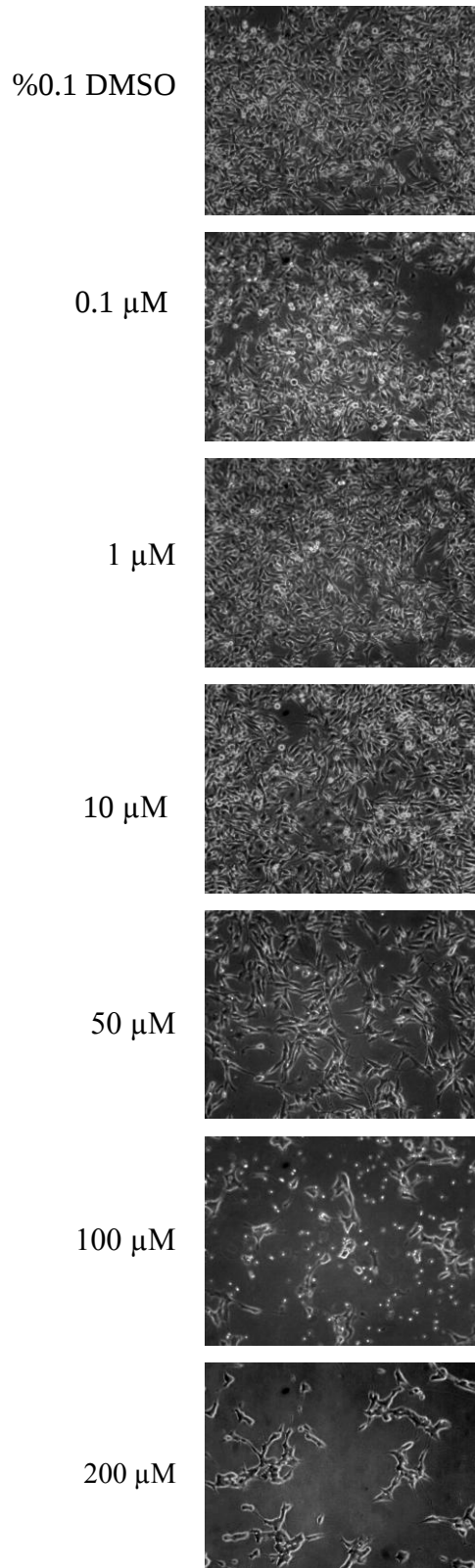
Şekil 5.2'deki quercetin'in farklı konsantrasyonları ile muamele edilmiş B16F10 hücreleri 10x'lik objektif ile mikroskopda incelendiğinde, DMSO (kontrol) grubu petrisi ile 100 nM, 1 µM, 10 µM, quercetin ile muamele edilmiş petrilere arasında hücre miktarı ve morfolojileri arasında fark gözlenmemiştir. Fakat, 50 µM, 100 µM ve 200 µM quercetin ile muamele edilmiş petrilere hücre miktarında azalma, hücrelerin küçülüp büzülmesi ve besi yerinde asılı kalması gözlenmiştir.

Hücrelerin morfolojik değişimlerinden elde ettiğimiz sonuçlara göre B16F10 melanoma kanser hücreleri proteozom inhibitörü PS-341'e ve Hsp70 inhibitörü quercetine karşı hassastırlar.

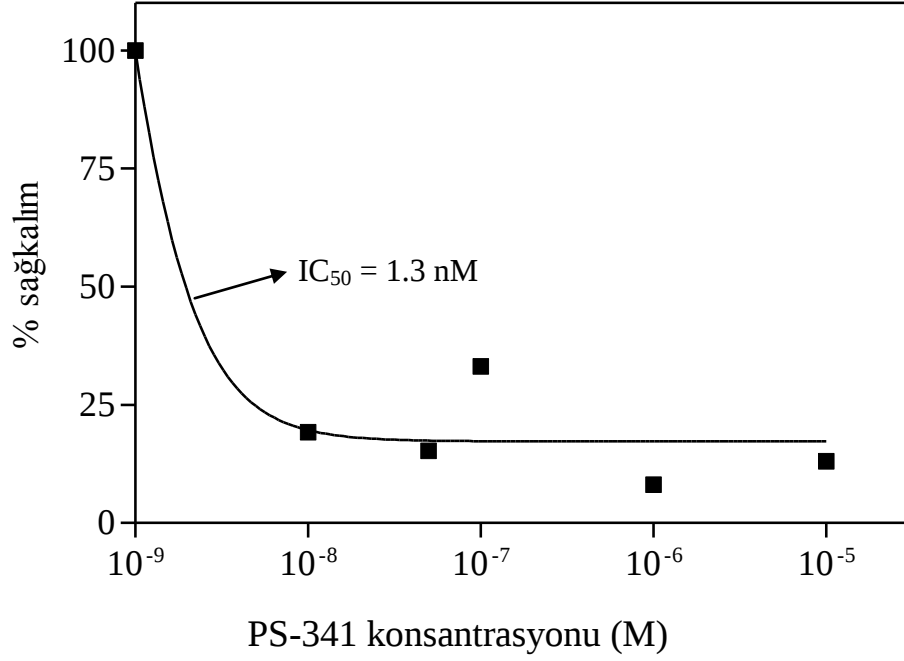
PS-341 ve quercetin'in IC₅₀ değerini hesaplamak için morfolojileri kaydedilmiş petrilere MTT testi uygulandı. MTT testinin sonuçları GraphPad Prism 3.03 programı ile istatistiki analizi yapıldı. Bu istatistiki analize göre PS-341'in IC₅₀ değeri 1.3 nM, quercetin'in IC₅₀ değeri 45 µM olarak tespit edilmiştir. PS-341 ile quercetin IC₅₀ değerleri arasında son derece büyük bir fark tespit edilmiştir (~ 35 x 10³ kat). Bu da, PS-341'in, B16F10 melanoma kanser hücre dizilerinde quercetine göre çok daha güçlü bir şekilde sitotoksik etki yarattığını göstermektedir. IC₅₀ değeri bulunan PS-341 ve quercetin'in muameleli B16F10 hücrelerinin % sağkalım grafikleri çıkarılmıştır (Şekil 5.3 ve Şekil 5.4).



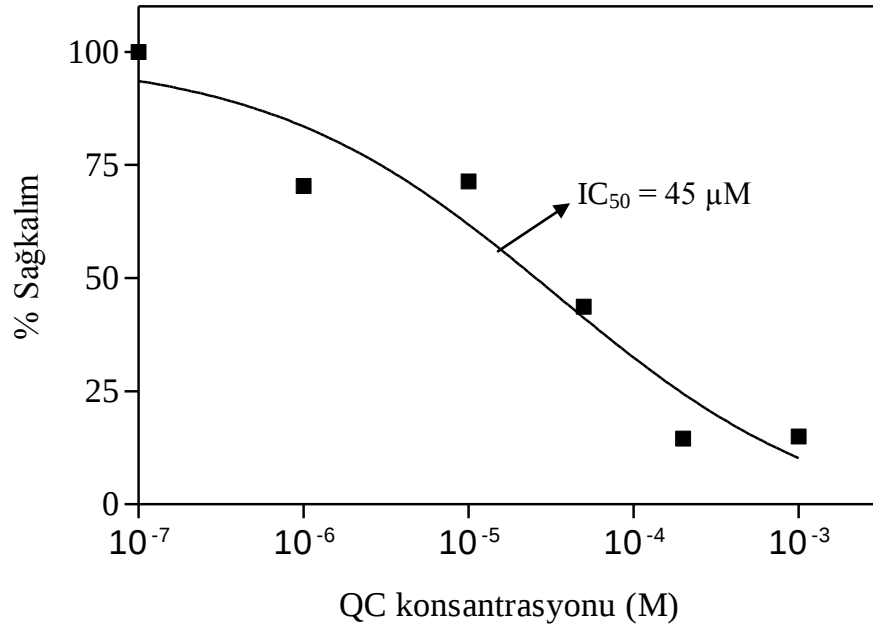
Şekil 5.1 PS-341 muamelesi sonrası hücre morfolojilerinde görülen değişiklikler. B16F10 hücreleri 35 x 10 mm steril petrilerde eşit olarak ekildi. Logaritmik fazdaki hücreler izotonik NaCl solüsyonu, ilaç çözücüsü (kontrol) ve PS-341'in farklı konsantrasyonları (0.001, 0.01, 0,5, 0.1, 1 ve 10 µM) ile 24 saat muamele edildi. 24 saat sonunda hücre morfolojileri 10x'lik objektif ile inverted mikroskopda incelenip kaydedildi.



Şekil 5.2 Quercetin muamelesi sonrası hücre morfolojilerinde görülen değişiklikler. B16F10 hücreleri 35 x 10 mm steril petrilerde eşit olarak ekildi. Logaritmik fazdaki hücreler % 0.1 DMSO (kontrol) ve quercetin farklı konsantrasyonları (0.1, 1, 10, 50, 100 ve 200 μ M) ile 24 saat muamele edildi. 24 saat sonunda hücre morfolojileri inverted mikroskop ile incelendi.



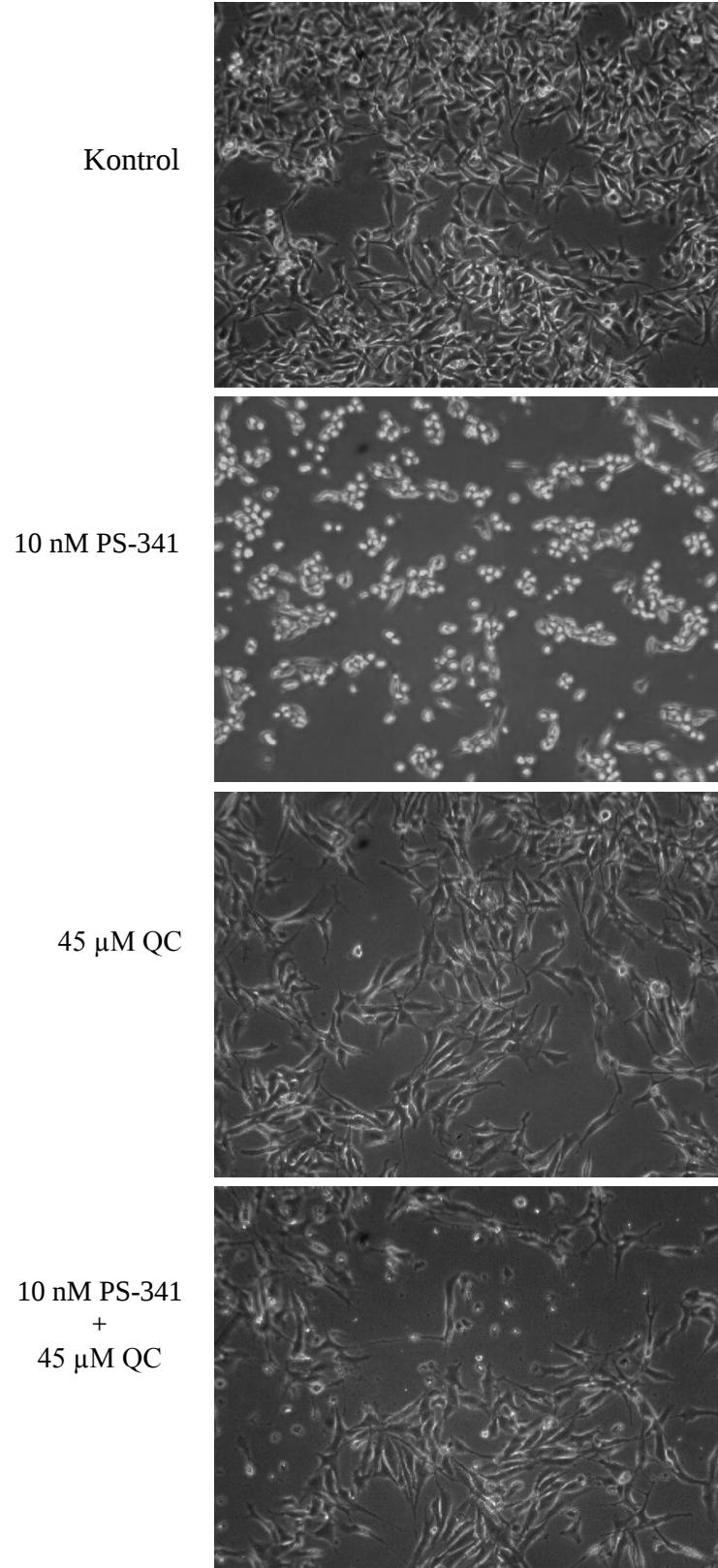
Şekil 5.3 B16F10 hücrelerinde PS-341 muamelesi sonucu meydana gelen büyüme inhibisyonu. Hücreler PS-341'in farklı konsantrasyonları (0.001, 0.01, 0.5, 0.1, 1 ve 10 μ M) ile 24 saat muamele edildi. Hücrelerin IC_{50} değeri ve % sağkalım grafiği MTT yöntemi ile belirlendi.



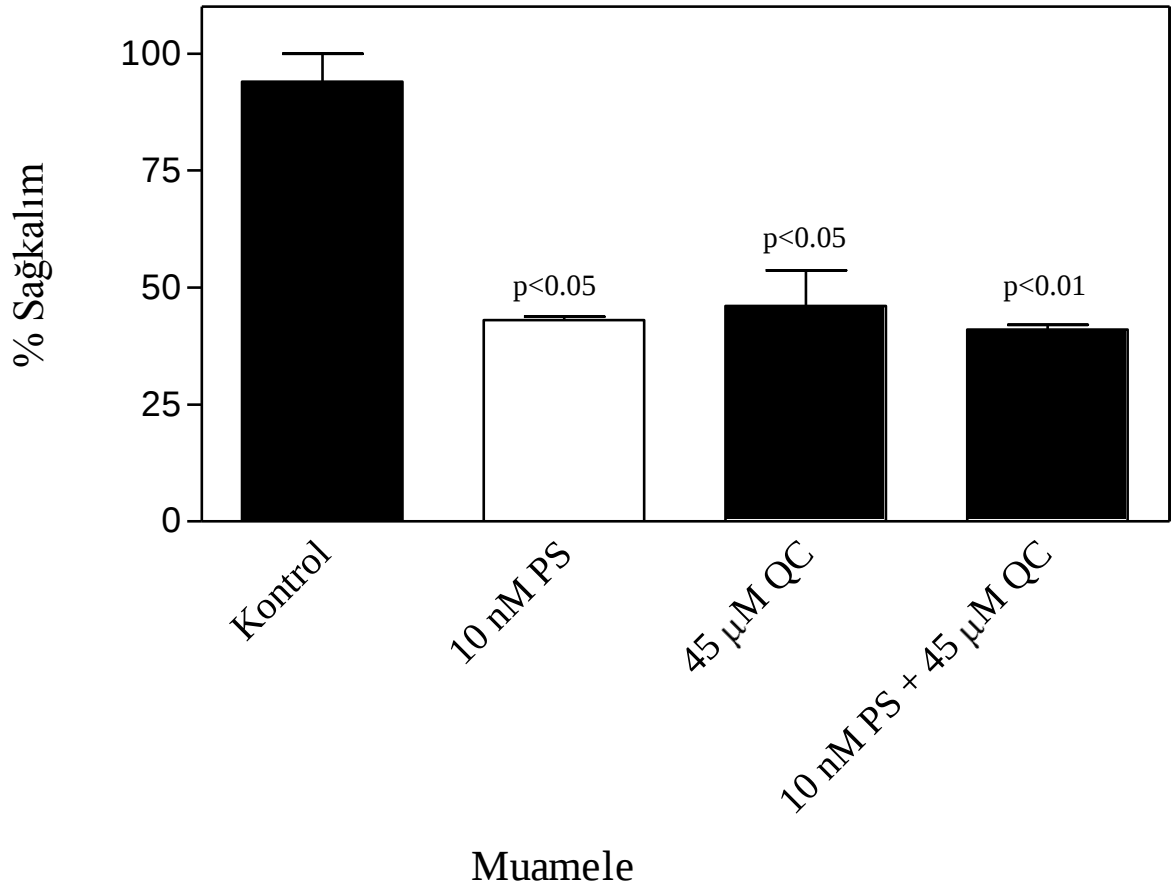
Şekil 5.4 B16F10 hücrelerinde quercetin muamelesi sonucu meydana gelen büyüme inhibisyonu. Hücreler quercetin'in farklı konsantrasyonları (0.1, 1, 10, 50, 100 ve 200 μ M) ile 24 saat muamele edildi. Hücrelerin IC_{50} değeri ve % sağkalım grafiği MTT yöntemi ile belirlendi.

Elde ettiğimiz sonuçlardan yola çıkarak PS-341 ve quercetin ile kombinasyon oluşturmanın B16F10 melanoma hücre dizilerini daha etkili bir şekilde ortadan kaldırdılabileceği varsayımında bulunduk. Bunun için B16F10 hücre kültürleri 35 x 10 mm'lik steril petrilere üretildikten sonra kontrol, 10 nM PS-341, 45 µM quercetin ve 10 nM PS-341 + 45 µM quercetin ile 24 saat süresince muamele edildiler. 24 saat sonunda ilk olarak petrilere hücrelerin morfolojileri inverted mikroskop yardımıyla incelenip kaydedildi (Şekil 5.5). Şekil 5.5 incelendiğinde PS-341'in hücreleri güçlü bir şekilde ortadan kaldırdığı görülmüştür. Quercetin'in ise diğer yaptığımız deney ile benzer şekilde PS-341'e göre daha zayıf bir şekilde hücreleri ortadan kaldırdığı görülmüştür. PS-341 ve quercetin kombinasyonunda ise hücre miktarında azalma gözlenmiştir. Fakat kombinasyonun etkisinin PS-341'in tek başına etkisinden daha zayıf olduğu görülmüştür. Bu sonucu istatistiki açıdan teyit etmek için hücrelere MTT testi uygulanarak sonuçlar GraphPad Prism 3.03 programı ile veri haline getirildi. B16F10 hücrelerinin % sağkalım grafiği incelendiğinde kontrol grubu ile ilaç muameleleri [10 nM PS-341 ($p<0.05$), 45µM quercetin ($p<0.05$), 10 nM PS-341 + 45 µM quercetin ($p<0.001$)] arasındaki fark istatistiki açıdan önemli bulunmuştur. Fakat ilaç muameleleri (10 nM PS-341, 45 µM quercetin, 10 nM PS-341 + 45 µM quercetin) arasında istatistiki açıdan önemli bir fark bulunmamıştır (Şekil 5.6).

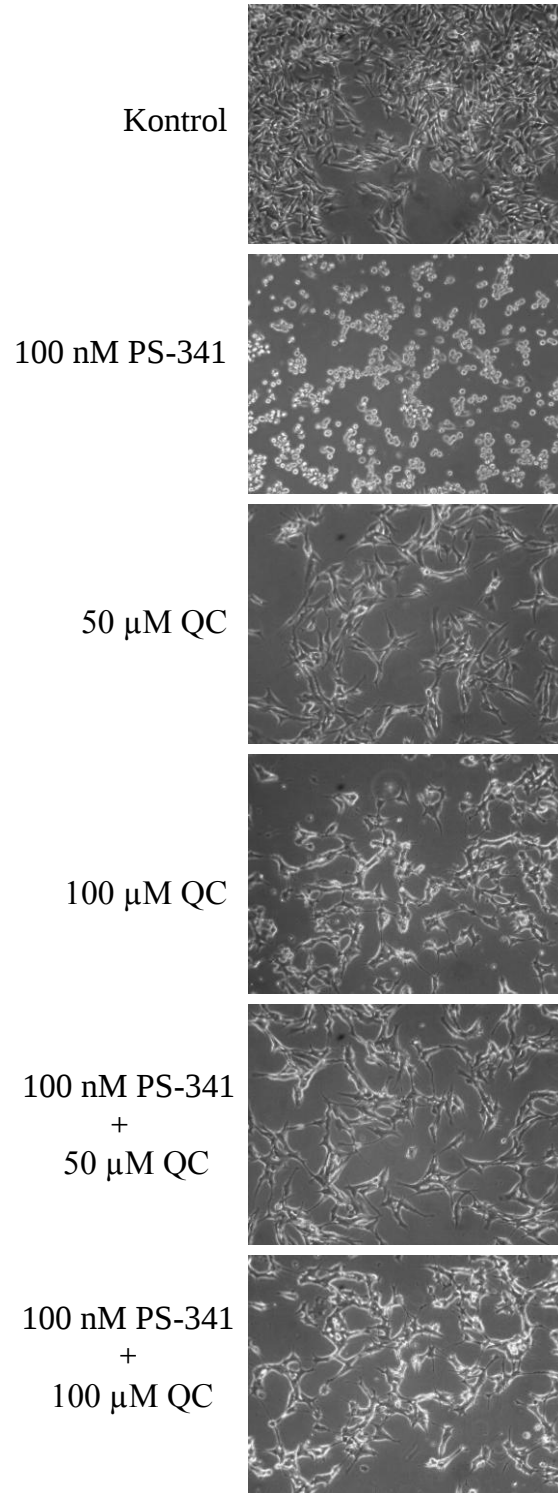
Yaptığımız deneyin sonucunu teyit etmek ve daha yüksek ilaç konsantrasyonlarında hücrelerin morfolojilerini ve % sağkalımını incelemek için diğer bir deneyde B16F10 hücre kültürleri 35 x 10 mm'lik steril petrilere logaritmik faza gelene kadar üretildikten sonra 100 nM PS-341, 50 µM quercetin, 100 nM PS-341 + 50 µM quercetin, 100 µM quercetin, 100 nM PS-341 + 100 µM quercetin ile 24 saat muamele edildiler. 24 saat sonunda ilk olarak petrilere hücrelerin morfolojileri inverted mikroskop yardımıyla incelenip kaydedildi (Şekil 5.7). MTT testi uygulanarak sonuçların GraphPad Prism 3.03 programı ile istatistiki analizi yapıldı. Kontrol grubu ile ilaç muameleleri arasında istatistiki açıdan önemli fark olduğu tespit edilmiştir ($p<0.001$). Fakat, 100 nM PS-341, 50 µM quercetin, 10 nM PS-341 + 50 µM quercetin arasında istatistiki açıdan önemli bir sonuç bulunamayarak yukarıdaki sonuç teyit edilmiştir. Ayrıca 100 µM quercetin ve 10 nM PS-341 + 100 µM quercetin ilaç muameleleri ile diğer ilaç muameleleri arasında istatistiki açıdan önemli bir fark bulunmuştur ($p<0.05$). Yine, 100 µM quercetin ve 10 nM PS-341 + 100 µM quercetin arasında istatistiki açıdan önemli bir fark bulunmamıştır (Şekil 5.8). Bu deneylerden çıkardığımız sonuca göre B16F10 hücre dizileri proteozom inhibitörü PS-341 ve Hsp70 inhibitörü quercetin'e karşı hassastır. Fakat, PS-341 ve quercetin kombinasyonunun B16F10 hücre dizilerinde etkili bir tedavi oluşturmayacağı sonucu tespit edilmiştir.



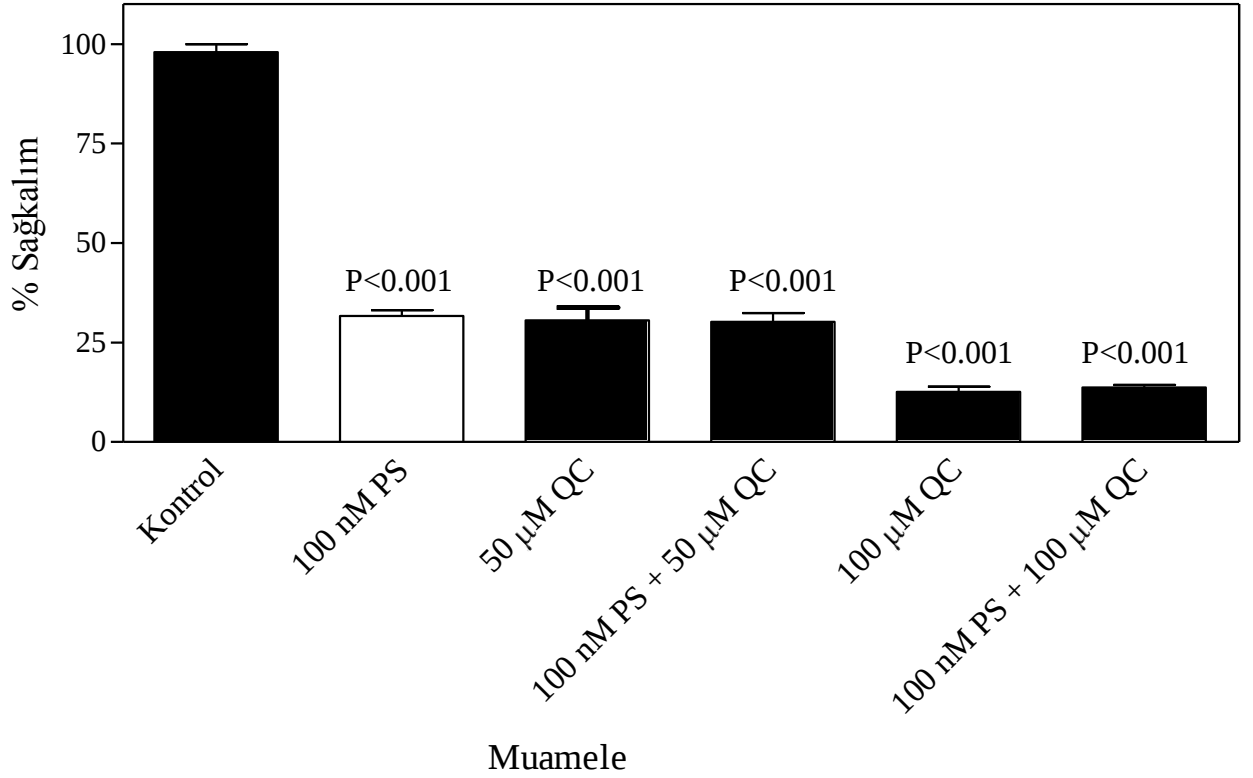
Şekil 5.5 B16F10 hücrelerinde 10 nM PS-341, 45 μ M quercetin ve kombinasyonu sonrası görülen morfolojik değişiklikler.



Şekil 5.6 B16F10 hücrelerinde 10 nM PS-341, 45 µM quercetin ve kombinasyonu sonrası görülen % sağkalım grafiği. Hücreler steril petrilerde logaritmik faza gelene kadar üretildikten sonra 10 nM PS-341, 45 µM quercetin ve 10 nM PS-341 + 45 µM quercetin ile 24 saat muamele edilmiştir. Sonuçlar Materyal ve Metotta belirtilen MTT yöntemiyle belirlenmiştir. Sonuçlar, ortalama $\pm$ SEM olarak sunulmuştur (n = 2) (PS: PS-341, QC: Quercetin).



Şekil 5.7 100 nM PS-341, iki farklı quercetin konsantrasyonu ve kombinasyonları sonrası görülen morfolojik değişiklikler.



Şekil 5.8 100 nM PS-341, iki farklı quercetin konsantrasyonu ve kombinasyonları sonrası görülen % sağkalım grafiği. Hücreler steril petrilerde logaritmik faza gelene kadar üretildikten sonra 100 nM PS-341, 50 µM, 100 µM quercetin, 100 nM PS-341 + 50 µM quercetin, 100 nM PS-341 + 100 µM quercetin ile 24 saat muamele edilmiştir. Sonuçlar Materyal ve Metotta belirtilen MTT yöntemiyle belirlenmiştir. Sonuçlar, ortalama $\pm$ SEM olarak sunulmuştur (n = 2) (PS: PS-341, QC: Quercetin).

6. TARTIŞMA

Clarke ve arkadaşları apoptozisi doğal gelişimsel hücre ölümü ve toksin uygulaması sonrası oluşan hücre ölümü olarak tanımlamışlardır ve bu tip hücre ölümünün, hücre küçülmesi, kromatin yoğunlaşması, çekirdek içinde bulunan DNA'nın fragmentlere ayrılması ve apoptotik cisimciklerin oluşumu gibi özellikleriyle ayırt edildiğini söylemiştir [71-72]. Üzerinde çalıştığımız B16F10 kanser hücreleri proteozom inhibitörü PS-341 ile muamele ettiğimizde hücrelerin petri kabının dibinden kalktığını ve besiyeri ortamında yüzer bir hal aldığını, küreselleştiğini, küçülüp büzüldüğünü, komşu hücrelerden ayrıldığını, membran zarında küçük veziküllerin oluştuğunu ve üzerine düşen ışığı daha çok yansıttığını gözlemledik. Benzer morfolojik değişiklikler Yerlikaya ve ark. (2009) tarafından B16F10 melanoma ve 4T1 meme kanser hücrelerinde tespit edilmiştir [33]. Yine, Zhang ve ark. (2005) tarafından HeLa hücrelerinin 0.1 μ M 4DPG ile muamele edilmesi sonucu benzer morfolojik değişiklikler kaydedilmiştir ve bu hücrelerin apoptozise uğradıkları görülmüştür [73]. Benzer sonuçlar, spesifik proteozom inhibitörleri LLnV ve PSI ile muamele edilmiş HL60 hücrelerinde ilaç ilavesinden yaklaşık olarak 3-4 saat sonra hücrelerin bir kısmında apoptozis gözlenmiş ve morfolojik olarak da hücre membranında keseler ve hücre küçülmesi gözlenmiştir. Uzun süreli ilaç muamelesi sonucunda ise apoptozisin önemli belirteçlerinden olan DNA fragmentasyonu gözlenmiştir [74]. Yapılan diğer bazı çalışmalarda ise, bazı tümör hücrelerinde (DHL4 lenfoma ve akciğer kanser hücresi H460) proteozom inhibitörleri ile apoptozis uyarılması için çok yüksek konsantrasyon kullanılması gerekmektedir; bazılarında ise proteozom inhibitörleri apoptozis uyarılmasına tamamen engel olmaktadır [75-77].

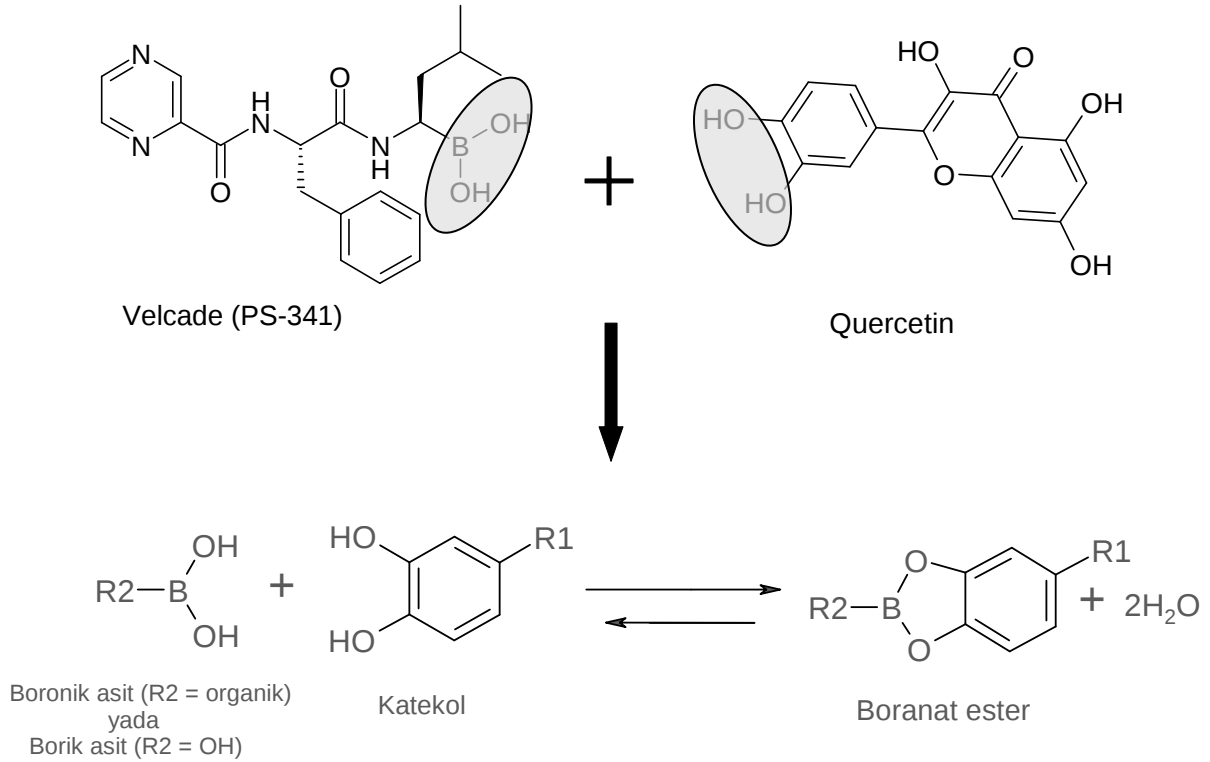
Proteozom inhibitörleri kısmında bahsettiğimiz üzere PS-341 bir boronik asit analogudur. Birçok tümör çeşidine (multiple miyeloma, Lymphoma, prostat) karşı etkili olduğu görüldüğü için Amerikan Sağlık Bakanlığı tarafından kanser tedavisinde kullanılmak üzere onaylanmıştır. PS-341 proteozomun kimotripsin benzeri aktivitesini geri dönüşümlü olarak inhibe eder. PS-341 muamelesi hücrelerde G2-M fazında hücre siklusunun bloke olmasına ve hücrelerin yığılmasına neden olmuştur. Hücrelerin PS-341 ile uzun süreli muamelesi apoptozise neden olmaktadır. Bundan başka PS-341, in vivo şartlarda proteozom aracılı I κ B (NF κ B inhibitörü) yıkımını ve NF κ B (hücre sağkalımını arttıran transkripsiyon faktörü)-bağımlı gen ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir [3, 40, 43]. PS-341'in bu sitotoksik ve proapoptotik etkileri hücre sağkalımında önemli görevler üstlenen Hsp'lerin miktarını arttırmaktadır. Proteozom inhibisyonu sonucu hücrede miktarı artan Hsp70 membranlar arasında protein translokasyonundan apoptozisin düzenlenmesine kadar birçok hücresel süreçte rol almaktadır.

Hsp70'in hücredeki miktarı ısı şoku, tümör nekroz faktörü, büyüme faktörü geri çekilmesi, oksidatif stres, kemoterapik ajanlar, seramid ve radyasyon gibi apoptotik uyarılara cevap olarak artmaktadır. Li ve ark. yaptıkları bir çalışmada Hsp70'in antiapoptotik etkisinin seramid uyarılmalı apoptozisde kaspaz-3 ve SAPK/JNK aktivasyonunu engellemek suretiyle meydana getirdiğini belirtmişlerdir [59-60]. Yerlikaya ve ark. yaptıkları bir çalışmada B16F10 hücrelerinin 10 μ M PS-341 ile 6 saat muamelesi sonrası Hsp70 miktarında yaklaşık % 30'luk bir artış tespit etmişlerdir [78]. Benzer şekilde Combaret ve ark. 10 nM PS-341 ile 48 saat muamele edilen CLB-Sedp, SHEP, CLB-Ga ve IMR32 hücre dizilerinde Hsp70 miktarındaki artışı tespit etmişlerdir [79]. Yine Hsp70 miktarındaki ve bununla beraber Hsp27 ve Hsp90 miktarındaki artışı Mitsiades ve ark. MM1.S hücrelerinin PS-341 muamelesi sonrası 8. saatten itibaren tespit etmişlerdir [80]. PS-341 muamelesi sonrası hücrelerde miktarı artan bu Hsp proteinleri PS-341'in sitotoksik ve proapoptotik etkilerini azaltabileceğini varsaydık. Bu nedenle proteozom inhibitörü PS-341 ile birlikte Hsp inhibitörleri kullanmanın B16F10 hücrelerini daha güçlü bir şekilde ortadan kaldıracabileceğini düşündük. Bu nedenle Hsp70 inhibitörlerinden biri olan quercetin sitotoksik etkilerini araştırdık. Bilindiği üzere quercetin, özellikle meyve ve sebzelerde bol olan bir flavonoidtir ve güçlü bir antioksidandır. Son günlerde yapılan çalışmalarda quercetin proteozom aktivasyonunu inhibe ederek apoptozisi uyardığı, G₁/S ya da G₂/M fazında hücre siklusunun durmasına sebep olduğu, p21 ifadesini artırdığı tespit edilmiştir [62-63].

Yukarıda bahsettiğimiz PS-341 ve quercetin sitotoksik ve apoptotik etkilerinden dolayı bu çalışmamızda proteozom inhibitörü PS-341 ve Hsp70 inhibitörü quercetin ve ikisinin kombinasyonunun B16F10 melanoma kanser hücre dizilerine sitotoksik etkilerini araştırdık. İlk olarak PS-341 ve quercetin farklı konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilmiş B16F10 hücrelerindeki morfolojik değişiklikler inverted mikroskop yardımıyla incelendi. Buna göre Hsp70 inhibitörü quercetin B16F10 hücrelerinde doz-bağımlı olarak antiproliferasiyona neden olmuştur. Benzer morfolojik değişimleri Wei ve ark. K562, Molt-4, raji ve MCAS hücrelerinde tespit etmişlerdir. Wei ve ark. tarafından yapılan deneyde K562, Molt-4, raji ve MCAS tümör hücrelerinin quercetin ile muamelesi sonucu hücrelerde morfolojik değişimler, nükleer kromatin kondensasyonu ve nükleer fragmentasyon gözlemlenmişler, bu sonuçlarla quercetin'in bu hücrelerde apoptozise neden olduğunu tespit etmişlerdir [63]. Bu çalışmada, PS-341'in quercetine göre çok daha düşük konsantrasyonlarda ve daha güçlü bir şekilde hücreleri ortadan kaldırdığı tespit edilmiştir. PS-341 ve quercetin IC₅₀ değerleri hesaplandığında aralarında yaklaşık 35000 katlık bir fark tespit edilmiştir (PS-341 IC₅₀ = 1.3 nM, quercetin IC₅₀ = 45 μ M). 10 nM PS-341 + 45 μ M quercetin kombinasyonu ile 24 saat muamelesi sonucu

beklentimizin aksine enterasan olarak B16F10 hücrelerinin sağkalımında 10 nM PS-341 ve 45 µM quercetin ile 24 muamele arasında istatistiki açıdan bir fark tespit edilmemiştir. Sonucumuzu teyit etmek ve PS-341 ve quercetin yüksek konsantrasyonlarında B16F10 hücrelerinin morfolojilerini belirlemek için yaptığımız deneyde benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçla beklentimizin aksine B16F10 melanoma kanser hücre dizilerinde proteozom inhibitörü PS-341 ile Hsp70 inhibitörü quercetin arasında oluşturulacak kombine bir tedavinin ilaçların tek başına kullanılmasından daha etkili olmayacağını; hatta quercetin PS-341'in etkisini bloke ettiği tespit edilmiştir (morfolojik kriterlere göre). Bu çalışmada, quercetin B16F10 hücrelerinde Hsp70 uyarılmasını bloke edip-etmediği araştırılmamıştır. Fakat, Yerlikaya ve ark. yaptıkları çalışmalarda B16F10 hücrelerinde quercetin Hsp70'i inhibe ettiğini Western blot yöntemi ile belirlemişlerdir (Yerlikaya, A., yayınlanmamış sonuç).

Elde ettiğimiz sonuçlara benzer şekilde Liu ve ark. yaptıkları çalışmada doza bağlı bir biçimde quercetin CLL ve malignant-B hücre dizilerinde PS-341 tarafından uyarılan apoptozisi inhibe ettiğini belirlemişlerdir. Fakat diğer proteozom inhibitörleri lactacystin ve MG-132 ile oluşturulan quercetin kombinasyonunun CLL hücreleri ile muamelesinde quercetin lactacystin ve MG-132 tarafından uyarılan apoptozis üzerine inhibitör etki göstermediğini belirlemişlerdir. Sonuçta quercetin, farklı proteozom inhibitörleri ile farklı etkiler göstermiştir. Bu nedenle quercetin PS-341 üzerine inhibitör etkisinin proteozomal düzeyde olmayabileceğini, ikisinin kimyasal yapısı arasında bir kompleks oluştuğunu belirlemişlerdir. Quercetin ve PS-341'in kimyasal yapısı incelendiğinde quercetin bir katekol ve PS-341 bir borik asit analogudur. 1,2 dihidroksibenzen (katekol) ile boron asitleri arasında bir kompleks oluşmaktadır. PS-341'de bulunan boronik asit ile quercetin katekol grubu arasında oluşan boronat kompleksi tarafından PS-341'in öldürücü etkisini ortadan kaldırabilmektedir (şekil 6.1). Katekol ve boronik asit grupları arasındaki bu kimyasal kompleks oluşumundan dolayı araştırmacılar anti-kanser ilacı olarak yapısında katekol içermeyen sentetik bir flavon olan flavopiridolü geliştirmişlerdir [62]. Dai ve ark. yaptıkları bir çalışmada PS-341 ve flavopiridol kombinasyonu ile K562 ve Lama hücrelerinin muamelesi sonucu hücrelerin güçlü bir şekilde apoptozise uğradıklarını belirlemişlerdir [81].



Şekil 6.1 PS-341 ve quercetin arasında boronat ester bağı oluşumu [62]'den uyarlanmıştır.

PS-341 ile quercetin arasında oluşan kimyasal kompleks PS-341 ve quercetin kombinasyonunun kanser hücre dizilerine uygulanmasını engellemektedir. Bu nedenle PS-341 ile başka Hsp70 inhibitörlerinin (shisandrin B, KNK 437 gibi) B16F10 hücrelerine uygulanmasının alternatif kanser tedavi yöntemlerinin geliştirilmesini sağlayacağı kanaatindeyiz. Bununla beraber quercetin B16F10 hücreleri üzerindeki antiproliferasyon etkisi umut verici düzeydedir. Bu nedenle quercetin farklı proteozom inhibitörleri ile muamelesinin melanoma kanserlerinde etkili olacağı ve alternatif yeni kanser tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine yardımcı olacağı kanaatindeyiz. Ayrıca Hsp27, Hsp60 ve Hsp90 gibi diğer Hsp'lerin inhibitörleri ile PS-341 veya başka proteozom inhibitörleri arasında oluşturulacak bir kombinasyon B16F10 hücre dizileri üzerine daha güçlü bir sitotoksik etki gösterebilir. İn vitro şartlarda olumlu sonuç elde edilen ilaç kombinasyonlarının sitotoksik etkileri tümör oluşturulan hayvan deneyleri üzerinde denenebilir. Hayvan deneyleri sonrası sitotoksik etkisi belirlenen ve verimli sonuçlar alınan ilaç kombinasyonlarının klinik düzeyde kullanılabileceği ve alternatif anti-kanser tedavisi olarak geliştirilebileceği kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- [1] Almond, J.B. and Cohen, G.M., 2002, The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy, *Leukemia*, 16, 433-43.
- [2] Pajonk, F. and McBride, W.H., 2001, The proteasome in cancer biology and treatment, *Radiat Res*, 156, 447-59 .
- [3] Adams, J., 2004, The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs, *Cancer Cell*, 5, 417-21.
- [4] Markovic, S.N., Geyer, S.M., Dawkins, F., Sharfman, W., Albertini, M., Maples, W., Fracasso, P.M., Fitch, T., Lorusso, P., Adjei, A.A. and Erlichman, C., 2005, A phase II study of bortezomib in the treatment of metastatic malignant melanoma, *Cancer*, 103, 2584-9.
- [5] Yerlikaya, A. ve Dokudur, H., 2010, Protein Yıkımının önemi, *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, (Baskıda).
- [6] Mosser, D.D. and Morimoto, R.I., 2004, Molecular chaperones and the stress of oncogenesis, *Oncogene*, 23, 2907-18.
- [7] Choi, J.A., Kim, Y.J., Lee, J.Y., Kang, C.M., Kwon, H.J., Yoo, Y.D., Kim, T.W., Lee, Y.S. and Lee, S.J., 2001, Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells by quercetin, *Int J Oncol*, 19, 837-44.
- [8] Doherty, F.J. and Mayer, R.J., 1992, *Intracellular protein degradation*. Oxford: IRL Press.
- [9] Voet D.D. and Voet, J.G., 1995, *Biochemistry*, 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- [10] Varshavsky, A., 1996, The N-end rule: functions, mysteries, uses, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 12142-9.
- [11] Rogers, S.W. and Rechsteiner, M.C., 1986, Microinjection studies on selective protein degradation: relationships between stability, structure, and location, *Biomed Biochim Acta*, 45, 1611-8.
- [12] Rechsteiner, M. and Rogers, S.W., 1996, PEST sequences and regulation by proteolysis, *Trends Biochem Sci*, 21, 267-71.
- [13] Yerlikaya, A., 2007, Protein sentezi ve yıkımı, in *Moleküler Biyoloji*, Ankara, Nobel Yayınevi, 219-46 s.
- [14] Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J.D., 1994, *Molecular Biology of The Cell*, Garland Publishing, Inc., New York.
- [15] Pillay, C.S., Elliott, E. and Dennison, C., 2002, Endolysosomal proteolysis and its regulation, *Biochem J*, 363, 417-29.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- [16] Agarraberes, F.A., Terlecky, S.R. and Dice, J.F., 1997, An intralysosomal hsp70 is required for a selective pathway of lysosomal protein degradation, *J Cell Biol*, 137, 825-34.
- [17] Cohen, G.M., 1997, Caspases: the executioners of apoptosis, *Biochem J*, 326, 1-16.
- [18] Nagata, S., 1997, Apoptosis by death factor, *Cell*, 88, 355-65.
- [19] Philchenkov, A., 2004, Caspases: potential targets for regulating cell death, *J Cell Mol Med*, 8, 432-44.
- [20] Reed, J.C., 2000, Mechanisms of apoptosis, *Am J Pathol*, 157, 1415-30.
- [21] Nicholson, D.W., 1999, Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death, *Cell Death Differ*, 6, 1028-42.
- [22] Pınarbaşı, E., 2007, Apoptozis, *Moleküler Biyoloji*, Ankara: Nobel Yayınevi, 423-68.
- [23] Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. and Nagata, S., 1998, A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD, *Nature*, 391, 43-50.
- [24] Green, D.R., 1998, Apoptotic pathways: the roads to ruin, *Cell*, 94, 695-8.
- [25] Bond, J.S., Matters, G.L., Banerjee, S. and Dusheck, R.E., 2005, Meprin metalloprotease expression and regulation in kidney, intestine, urinary tract infections and cancer, *FEBS Lett*, 579, 3317-22.
- [26] Mani, A. and Gelmann, E.P., 2005, The ubiquitin-proteasome pathway and its role in cancer, *J Clin Oncol*, 23, 4776-89.
- [27] Hershko, A. and Ciechanover, A., 1998, The ubiquitin system, *Annu Rev Biochem*, 67, 425-79.
- [28] Hilt, W., and Wolf, D.H., 1996, Proteasomes: destruction as a programme, *Trends Biochem Sci*, 21, 96-102.
- [29] Yerlikaya, A., 2004, Cellular functions of the 26S proteasome, *Turk J Biol.*, 28, 31-38.
- [30] Chau, V., Tobias, J.W., Bachmair, A., Marriott, D., Ecker, D.J., Gonda, D.K. and Varshavsky, A., 1989, A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein, *Science*, 243, 1576-83.
- [31] Hershko, A., Ciechanover, A., Heller, H., Haas, A.L. and Rose, I.A., 1980, Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77, 1783-6.
- [32] Jentsch, S., 1992, The ubiquitin-conjugation system, *Annu Rev Genet*, 26, 179-207.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- [33] Yerlikaya, A., Dokudur, H. ve Şeker, S., 2009, Proteozom inhibitörü MG132'nin 4T1 meme ve B16F10 melanoma kanser hücrelerindeki sitotoksik etkileri, Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 19, 15-22.
- [34] Breitschopf, K., Bengal, E., Ziv, T., Admon, A. and Ciechanover, A., 1998, A novel site for ubiquitination: the N-terminal residue, and not internal lysines of MyoD, is essential for conjugation and degradation of the protein, EMBO J, 17, 5964-73..
- [35] Kalejta, R.F. and Shenk, T., 2003, Proteasome-dependent, ubiquitin-independent degradation of the Rb family of tumor suppressors by the human cytomegalovirus pp71 protein, Proc Natl Acad Sci U S A, 100, 3263-8.
- [36] Murakami, Y., Matsufuji, S., Kameji, T., Hayashi, S., Igarashi, K., Tamura, T., Tanaka, K. and Ichihara, A., 1992, Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination, Nature, 360, 597-9.
- [37] Tofaris, G.K., Layfield, R. and Spillantini, M.G., 2001, alpha-synuclein metabolism and aggregation is linked to ubiquitin-independent degradation by the proteasome, FEBS Lett, 509, 22-6.
- [38] Voges, D., Zwickl, P. and Baumeister, W., 1999, The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis, Annu Rev Biochem, 68, 1015-68.
- [39] He, H., Qi, X.M., Grossmann, J. and Distelhorst, C.W., 1998, c-Fos degradation by the proteasome, An early, Bcl-2-regulated step in apoptosis, J Biol Chem, 273, 25015-9.
- [40] Myung, J., Kim, K.B. and Crews, C.M., 2001, The ubiquitin-proteasome pathway and proteasome inhibitors, Med Res Rev, 21, 245-73.
- [41] Pagano, M., 1997, Cell cycle regulation by the ubiquitin pathway, FASEB J, 11, 1067-75.
- [42] Troch, M., Jonak, C., Müllauer, L., Püspök, A., Formanek, M., Hauff, W., Zielinski, C.C., Chot, A., Raderer, M., 2008, A phase II study of bortezomib in patients with MALT lymphoma, Haematologica, 94.
- [43] Burger, A.M. and Seth, A.K., 2004, The ubiquitin-mediated protein degradation pathway in cancer: therapeutic implications, Eur J Cancer, 40, 2217-29.
- [44] Aşkar, T.K., Ergün, N. ve Turunç, V., 2007, Isı şok proteinler ve fizyolojik rolleri, Kafkas Üniv Vet Fak Derg, 13, 109-114.
- [45] Garrido, C., Schmitt, E., Cande, C., Vahsen, N., Parcellier, A. and Kroemer, G., 2003, HSP27 and HSP70: potentially oncogenic apoptosis inhibitors, Cell Cycle, 2, 579-84.
- [46] Fink, A.L., 1999, Chaperone-mediated protein folding, Physiol Rev, 79, 425-49.
- [47] Jakob, U., Gaestel, M., Engel, K. and Buchner, J., 1993, Small heat shock proteins are molecular chaperones, J Biol Chem, 268, 1517-20.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- [48] Mehlen, P., Schulze-Osthoff, K. and Arrigo, A.P., 1996, Small stress proteins as novel regulators of apoptosis. Heat shock protein 27 blocks Fas/APO-1- and staurosporine-induced cell death, *J Biol Chem*, 271, 16510-4.
- [49] Fan, C.Y., Lee, S. and Cyr, D.M., 2003, Mechanisms for regulation of Hsp70 function by Hsp40, *Cell Stress Chaperones*, 8, 309-16.
- [50] Kobayashi, Y., Kume, A., Li, M., Doyu, M., Hata, M., Ohtsuka, K. and Sobue, G., 2000, Chaperones Hsp70 and Hsp40 suppress aggregate formation and apoptosis in cultured neuronal cells expressing truncated androgen receptor protein with expanded polyglutamine tract, *J Biol Chem*, 275, 8772-8.
- [51] So, A., Hadaschik, B., Sowery, R. and Gleave, M., 2007, The role of stress proteins in prostate cancer, *Curr Genomics*, 8, 252-61.
- [52] Czarnecka, A.M., Campanella, C., Zummo, G. and Cappello, F., 2006, Heat shock protein 10 and signal transduction: a capsula eburnea of carcinogenesis?, *Cell Stress Chaperones*, 11, 287-94.
- [53] Samali, A., Cai, J., Zhivotovsky, B., Jones, D.P. and Orrenius, S., 1999, Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of jurkat cells, *EMBO J*, 18, 2040-8.
- [54] Arya, R. and Lakhotia, S.C., 2008, Hsp60D is essential for caspase-mediated induced apoptosis in *Drosophila melanogaster*, *Cell Stress Chaperones*, 13, 509-26.
- [55] Tsai, Y.P., Yang, M.H., Huang, C.H., Chang, S.Y., Chen, P.M., Liu, C.J., Teng, S.C. and Wu, K.J., 2009, Interaction between HSP60 and beta-catenin promotes metastasis, *Carcinogenesis*, 30, 1049-57.
- [56] Hwang, Y.J., Lee, S.P., Kim, S.Y., Choi, Y.H., Kim, M.J., Lee, C.H., Lee, J.Y. and Kim, D.Y., 2009, Expression of heat shock protein 60 kDa is upregulated in cervical cancer, *Yonsei Med J*, 50, 399-406.
- [57] Takayama, S., Reed, J.C. and Homma, S., 2003, Heat-shock proteins as regulators of apoptosis, *Oncogene*, 22, 9041-7.
- [58] Ghosh, J.C., Dohi, T., Kang, B.H. and Altieri, D.C., 2008, Hsp60 regulation of tumor cell apoptosis, *J Biol Chem*, 283, 5188-94.
- [59] Shaner, L. and Morano, K.A., 2007, All in the family: atypical Hsp70 chaperones are conserved modulators of Hsp70 activity, *Cell Stress Chaperones*, 12, 1-8.
- [60] Li, C.Y., Lee, J.S., Ko, Y.G., Kim, J.I. and Seo, J.S., 2000, Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation, *J Biol Chem*, 275, 25665-71.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- [61] Middleton, E., Kandaswami, C. and Theoharides, T.C., 2000, The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer, *Pharmacol Rev*, 52, 673-751.
- [62] Liu, F.T., Agrawal, S.G., Movasaghi, Z., Wyatt, P.B., Rehman, I.U., Gribben, J.G., Newland, A.C. and Jia, L., 2008, Dietary flavonoids inhibit the anticancer effects of the proteasome inhibitor bortezomib, *Blood*, 112, 3835-46.
- [63] Wei, Y.Q., Zhao, X., Kariya, Y., Fukata, H., Teshigawara, K. and Uchida, A., 1994, Induction of apoptosis by quercetin: involvement of heat shock protein, *Cancer Res*, 54, 4952-7.
- [64] Yang, J.H., Hsia, T.C., Kuo, H.M., Chao, P.D., Chou, C.C., Wei, Y.H. and Chung, J.G., 2006, Inhibition of lung cancer cell growth by quercetin glucuronides via G2/M arrest and induction of apoptosis, *Drug Metab Dispos*, 34, 296-304.
- [65] Elia, G. and Santoro, M.G., 1994, Regulation of heat shock protein synthesis by quercetin in human erythroleukaemia cells, *Biochem J*, 300, 201-9.
- [66] Wu, Y.F., Cao, M.F., Gao, Y.P., Chen, F., Wang, T., Zumbika, E.P. and Qian, K.X., 2004, Down-modulation of heat shock protein 70 and up-modulation of Caspase-3 during schisandrin B-induced apoptosis in human hepatoma SMMC-7721 cells, *World J Gastroenterol*, 10, 2944-8.
- [67] Koishi, M., Yokota, S., Mae, T., Nishimura, Y., Kanamori, S., Horii, N., Shibuya, K., Sasai, K. and Hiraoka, M., 2001, The effects of KNK437, a novel inhibitor of heat shock protein synthesis, on the acquisition of thermotolerance in a murine transplantable tumor in vivo, *Clin Cancer Res*, 7, 215-9.
- [68] Yokota, S., Kitahara, M. and Nagata, K., 2000, Benzylidene lactam compound, KNK437, a novel inhibitor of acquisition of thermotolerance and heat shock protein induction in human colon carcinoma cells, *Cancer Res*, 60, 2942-8.
- [69] Neckers, L. and Neckers, K., 2002, Heat-shock protein 90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutic agents, *Expert Opin Emerg Drugs*, 7, 277-88.
- [70] Koga, F., Kihara, K. and Neckers, L., 2009, Inhibition of cancer invasion and metastasis by targeting the molecular chaperone heat-shock protein 90, *Anticancer Res*, 29, 797-807.
- [71] Clarke, P.G., 1990, Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms, *Anat Embryol (Berl)*, 181, 195-213.
- [72] Edinger, A.L. and Thompson, C.B., 2004, Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy, *Curr Opin Cell Biol*, 16, 663-9.
- [73] Zhang, Q.Y., Jiang, M., Zhao, C.Q., Yu, M., Zhang, H., Ding, Y.J. and Zhai, Y.G., 2005, Apoptosis induced by one new podophyllotoxin glucoside in human carcinoma cells, *Toxicology*, 212, 46-53.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- [74] Drexler, H.C., 1997, Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 855-60.
- [75] Chauhan, D., Li, G., Shringarpure, R., Podar, K., Ohtake, Y., Hideshima, T. and Anderson, K.C., 2003, Blockade of Hsp27 overcomes Bortezomib/proteasome inhibitor PS-341 resistance in lymphoma cells, *Cancer Res*, 63, 6174-7.
- [76] Lopes, U.G., Erhardt, P., Yao, R. and Cooper, G.M., 1997, p53-dependent induction of apoptosis by proteasome inhibitors, *J Biol Chem*, 272, 12893-6.
- [77] Sadoul, R., Fernandez, P.A., Quiquerez, A.L., Martinou, I., Maki, M., Schroter, M., Becherer, J.D., Irmeler, M., Tschopp, J. and Martinou, J.C., 1996, Involvement of the proteasome in the programmed cell death of NGF-deprived sympathetic neurons, *Embo J*, 15, 3845-52.
- [78] Yerlikaya, A. and Erin, N., 2008, Differential sensitivity of breast cancer and melanoma cells to proteasome inhibitor Velcade, *Int J Mol Med*, 22, 817-23.
- [79] Combaret, V., Boyault, S., Iacono, I., Brejon, S., Rousseau, R. and Puisieux, A., 2008, Effect of bortezomib on human neuroblastoma: analysis of molecular mechanisms involved in cytotoxicity, *Mol Cancer*, 7, 50.
- [80] Mitsiades, N., Mitsiades, C.S., Poulaki, V., Chauhan, D., Fanourakis, G., Gu, X., Bailey, C., Joseph, M., Libermann, T.A., Treon, S.P., Munshi, N.C., Richardson, P.G., Hideshima, T. and Anderson, C., 2002, Molecular sequelae of proteasome inhibition in human multiple myeloma cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 14374-99.
- [81] Dai, Y., Rahman, M., Pei, X.Y., Dent, P. and Grant, S., 2004, Bortezomib and flavopiridol interact synergistically to induce apoptosis in chronic myeloid leukemia cells resistant to imatinib mesylate through both Bcr/Abl-dependent and -independent mechanisms, *Blood*, 104, 509-18.