



T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**YENİ NESİL HSP90 İNHİBİTÖRÜ OLAN MPC-3100 İLE
EGCG'NİN İNSAN KOLON KANSERİ HÜCRE HATLARINDA
SİNERJİK ANTİ KANSER ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Esra KİŞİOĞLU

Danışman: Doç. Dr. Aykut ÖZGÜR

TOKAT-2023

ETİK SÖZLEŞME

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Doç. Dr. Aykut ÖZGÜR danışmanlığında hazırlamış olduğum “Yeni Nesil Hsp90 İnhibitörü Olan MPC-3100 İle EGCG’nin İnsan Kolon Kanseri Hücre Hatlarında Sinerjik Anti Kanser Etkilerinin İncelenmesi” adlı Yüksek Lisans tezinin bilimsel etik değerlere ve kurallara uygun, özgün bir çalışma olduğunu, aksinin tespit edilmesi halinde her türlü yasal yaptırımını kabul edeceğimi beyan ederim.

.../.../...

Esra Kışioğlu

JÜRİ KABUL VE ONAY

Esra Kişioğlu tarafından hazırlanan “**Yeni Nesil Hsp90 İnhibitörü Olan MPC-3100 İle EGCG’nin İnsan Kolon Kanseri Hücre Hatlarında Sinerjik Anti Kanser Etkilerinin İncelenmesi**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 08.12.2023 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği ile Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri (Unvanı, Adı Soyadı)

İmzası

Üye (Başkan) : Prof. Dr. İsa GÖKÇE

Üye : Doç. Dr. Aykut ÖZGÜR

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Mehmet KUZUCU

ONAY

.../.../..

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince bana destek olan, yol gösteren, hedeflerime ulaşmam konusunda bana olan desteğini her zaman hissettiğim, sahip olduğu akademik bilgi ve tecrübelerinden her daim faydalandığım kıymetli danışman hocam Doç. Dr. Aykut ÖZGÜR’e sonsuz saygı ve minnetlerimi sunarım.

Eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, hayatım boyunca aldığım her karara saygı duyup arkamda olan, bana destek sağlayan, beni bugünlere getiren canım babam İzzettin KİŞİOĞLU ve canım annem Birsal KİŞİOĞLU’na sonsuz sevgi ve minnetlerimi sunarım.

Bu tezi kıymetli babama ve anneme ithaf ediyorum...

Esra Kişioğlu

ARALIK 2023

ÖZET

YENİ NESİL HSP90 İNHİBİTÖRÜ OLAN MPC-3100 İLE EGCG’NİN İNSAN KOLON KANSERİ HÜCRE HATLARINDA SİNERJİK ANTİ KANSER ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Kişioğlu, Esra
Yüksek Lisans, Biyoloji Ana Bilim Dalı
Tez Danışmanı: Doç. Dr. Aykut ÖZGÜR
Aralık 2023, xiii+76 sayfa

Kanser önde gelen ölüm nedenlerinden biridir. Kolorektal kanser, ülkemizde görülen kanser türü arasında üçüncü sırada yer almakta ve sıklığı giderek artmaktadır. Günümüzde kanserin tedavisi için kullanılan kemoterapi ve radyoterapi gibi yöntemler kısıtlı etkinliğe sahip olmasıyla beraber bir çok yan etkiye de sebep olmaktadır. Klinik, epidemiyolojik ve deneysel araştırmalar yoluyla kanser tedavisi için alternatif, tamamlayıcı ve kombinasyon ilaç ve tedavilerin keşfedilmesinin önemi vurgulanmaktadır. Kolorektal kanser en sık teşhis edilen kanser türlerinden biridir. Kansere karşı yeni ilaç ve tedavilerin geliştirilmesine rağmen, insan kolon kanseri en yaygın kanser türlerinden biridir ve metastazı hala yüksek oranda bir morbidittir. Bu tez çalışmasında, HT-29 (kolorektal adenokarsinoma) insan kanser hücrelerine, yeni terapötik yaklaşımlar geliştirmek amacıyla ilaç tasarımı için önemli bir hedef olan HSP90 inhibitörü MPC-3100 ile yeşil çayda en bol bulunan bir kateşin olan EGCG kombinasyonlarının kolorektal kanser üzerindeki sinerjistik etkileri araştırılmış ve in-vitro deneyler ile değerlendirilmiştir. Etken maddelerin, HT-29 (kolon) kanser hücre hatlarına karşı antiproliferatif aktiviteleri XTT testleriyle incelendi. Tüm bu sonuçlara göre, kolorektal kanser tedavisi için yeni bir alternatif yol olarak görülüp, hedefe spesifik kanser tedavisinde umut veren bir yaklaşım olmakla birlikte, kullanılacak olan doğal bileşikle tedavi olacak insanlar üzerindeki sitotoksik etkiyi azaltarak daha az zararlı tedavi yolları geliştirilmesinde yeni bir bakış kazandıracağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kolorektal Kanser, MPC-3100, EGCG, HT-29 Hücre Hattı, Hsp 90

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE SYNERGIC ANTI-CANCER EFFECTS OF EGCG ON HUMAN COLON CANCER CELL LINES WITH MPC-3100, A NEW GENERATION HSP90 INHIBITOR

Kisioglu, Esra

Master's Thesis, Department of Biology

Thesis Advisor: Assoc. Prof. Dr. Aykut ÖZGÜR

December 2023, xiii+76 pages

Cancer is one of the leading causes of death. Colorectal cancer is the third most common type of cancer seen in our country and its incidence is increasing. Today, methods such as chemotherapy and radiotherapy used for the treatment of cancer have limited effectiveness and cause many side effects. Emphasizes the importance of discovering alternative, complementary and combination drugs and therapies for cancer treatment through clinical, epidemiological and experimental research. Colorectal cancer is one of the most commonly diagnosed cancer types. Despite the development of new drugs and treatments against cancer, human colon cancer is one of the most common types of cancer and its metastasis is still highly morbid. In this thesis study, the synergistic effects of combinations of HSP90 inhibitor MPC-3100, an important target for drug design to develop new therapeutic approaches to HT-29 (colorectal adenocarcinoma) human cancer cells, and EGCG, the most abundant catechin in green tea, on colorectal cancer, were investigated and evaluated by in-vitro experiments. The antiproliferative activities of the active substances against HT-29 (colon) cancer cell lines were examined by XTT tests. According to all these results, it is considered as a new alternative way for the treatment of colorectal cancer and is a promising approach in the treatment of target-specific cancer, and it is thought that it will provide a new perspective in the development of less harmful treatment methods by reducing the cytotoxic effect on the people who will be treated with the natural compound to be used.

Keywords: Colorectal Cancer, MPC-3100, EGCG, HT-29 Cell Line, Hsp 90

İÇİNDEKİLER

ETİK SÖZLEŞME	ii
JÜRİ KABUL VE ONAY	iii
ÖNSÖZ	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİL LİSTESİ	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. ISI ŞOK PROTEİNLERİ VE HSP90	3
2.1.1. Isı Şok Proteinleri	3
2.1.2. HSP90 ve Fonksiyon Düzenlemeleri	5
2.1.3. HSP90 Ko-şaperonlar ve Ko-şaperon Döngüsü	8
2.1.4. HSP90 Client Proteinler	9
2.1.5. HSP90 ve Kanser	11
2.1.5.1. Kanser Gelişiminde HSP90 Rolü	11
2.1.5.2. Kanser Tedavisinde HSP90 Rolü	14
2.1.6. Hsp90 İnhibitörleri ve Klinik Çalışmalar	14
2.1.6.1. NTD İnhibitörleri	19
2.1.6.2. CTD İnhibitörleri	22
2.1.7. MPC-3100	23
2.2. (-)-EPİGALLOKATEŞİN-3-GALLAT (EGCG)	24
2.3. KOLON KANSERİ	25
2.3.1. Kolon Kanserinin Başlaması ve Yayılması	26
2.3.2. Kolon Kanserinin Epidemiyolojisi	27
2.3.3. Kolon Kanserinin Mortalitesi	28
2.3.4. Kolon Kanseri Etiyolojisi	28
2.3.5. Kolon Kanserinin Gelişiminde Rol Alan Moleküllü Mekanizmalar	29
2.3.6. Kolon Kanserinde Rol Alan Genler	31
2.3.6.1. Onkogenler	31
2.3.6.2. Tümör Süpresör Genler	32
2.4. APOPTOZ	33
2.4.1. Kolon Kanseri ve Apoptoz	35
3.1. MATERYALLER	38
3.1.1. Kullanılan Malzemeler	38
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	39
3.2. YÖNTEMLER	39
3.2.1. Hücre Kültürü	39
3.2.1.1. Kullanılan Hücre Hattı	39
3.2.1.2. HT-29 Hücreleri İçin Hücre Kültürü Koşulları	40
3.2.1.3. HT-29 Hücrelerinin Pasajlanması ve Hücre Sayımı	41
3.2.1.4. HT-29 Hücre Hattından Stok Alma ve Dondurma	42
3.2.1.5. Stoktaki HT-29 Hücrelerinin Çözülmesi	43
3.2.1.6. Hücrelerin Medium Değişimi	43
3.2.2. Etken Maddelerin Hazırlanması	43

3.2.3. XTT Testi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi.....	43
3.2.4. Hücre Kültüründen RNA İzolasyonu.....	46
3.2.5. ELISA Analizi.....	48
4. BULGULAR	49
4.2. RT-PCR BULGULARI	55
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	58
KAYNAKÇA	63
ÖZGEÇMİŞ.....	78

SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler

µl	Mikro litre
dH ₂ O	Distile su
dk	Dakika
kD	Kilo Dalton
ml	Mililitre
°C	Celcius
rpm	Dakikadaki devir sayısı
µM	Mikro molar

Açıklama

Kısaltmalar

(-)-EGCG	(-)-Epigallocatechin-3-gallate
ATCC	Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
ATP	Adenozin trifosfat
Bcl-2	B-hücreli lenfoma 2
CO ₂	Karbondioksit
CTD	C-terminal domain
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribo nükleik asit
dPBS	Dulbecco'nun fosfat tamponlu salini
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
FBS	Fetal sıgır serumu
HSF1	Isı şok transkripsiyon faktörü
Hsp90	Isı şoku proteini 90
HT-29	İnsan kolon adenokarsinoma hücre hattı
IC ₅₀	Yarı maksimum inhibitör konsantrasyon
MD	Middle domain
NTD	N-terminal domain
RIPA	Radyoimmünopresipitasyon lizis tamponu

Açıklama

RNA	Ribonükleik asid
RNaz	Ribonükleaz
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Enstitüsü Medyası
TRAP1	TNF reseptör-bağımlı protein 1
XTT	2h-tetrazolyum-5-karboksanilid

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1. HSP90 Aile Yapısı (Hoter vd., 2018)	9
Şekil 2. HSP90'nın ATPaz döngüsü	11
Şekil 3. MPC-3100'ın kimyasal yapısı	23
Şekil 4. Epigallokateşin-3-Gallat (EGCG) kimyasal yapısı.....	25
Şekil 5. HT-29 (kolorektal adenokarsinoma) insan kanser hücre hattı	40
Şekil 6. Flow kabindeki hücre kültürü çalışmaları.....	41
Şekil 7. CO ₂ inkübatörde inkübe olan hücreler	42
Şekil 8. Flow kabinde XTT test çalışmaları	45
Şekil 9. HT-29 hücrelerine XTT testi (24-48 saat) uygulama sonrası görüntüsü	46
Şekil 10. EGCG'nin 24 saat sonunda HT-29 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi	50
Şekil 11. MPC-3100'nın 24 saat sonra HT-29 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi	50
Şekil 12. MPC-3100+EGCG'nin 24 saat sonra HT-29 hücre hattı üzerine etkisi	51
Şekil 13. EGCG'nin 48. saat sonunda HT-29 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi	52
Şekil 14. MPC-3100'nın 48 saat sonra HT-29 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi	53
Şekil 15. MPC-3100+EGCG'nin 48 saat sonra HT-29 hücre hattı üzerine etkisi	54
Şekil 16. Etken maddelerin HT-29 hücrelerinde apoptoz ve proliferasyona etkisi	55
Şekil 17. HT-29 hücrelerinde Bax, Bcl-2 ve CAS-3'ün protein miktarı ifadeleri	56

TABLO LİSTESİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 1. Klinik Araştırmaları Devam Eden Önemli Hsp90 İnhibitörleri ve Moleküler Yapıları	15

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnsanlarda kansere yol açan değişiklikler, çevresel ve genetik faktörlerin birleşiminden kaynaklanmaktadır. Epidemiyolojik çalışmalara göre, kanser insidansı çevreden (kirlilik, kimyasallar, virüsler vb.) ve yaşam tarzından (antioksidan ajanların, vitaminlerin, lifli ve yağlı gıdaların varlığı veya yokluğu) etkilenir (Champe PC vd.; Heim S vd., 1989).

Kötü huylu tümörlerden ölümler, yalnızca kalp yetmezliğinden ölümlerden sonra ikinci sıradadır. Kolorektal kanser meme, prostat ve akciğer kanserinden sonra en sık görülen dördüncü kanserdir ve hem erkeklerde hem de kadınlarda tüm kanserlerin yaklaşık %15'ini oluşturur. Ortalama olarak, her yıl dünya çapında bir milyon yeni vaka teşhis edilmektedir. Kolon kanserinden 500.000 ölüm temsil edilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü kayıtlarına göre, her yıl yaklaşık 800.000 yeni vaka teşhis edilmektedir (Friedman SL vd., 2003)

Yeni kanser ilaçlarının ve tedavilerinin geliştirilmesine rağmen, insan kolon kanseri, kanserin en yaygın formlarından biridir ve metastazı hala yüksek oranda bir morbidite. Son senelerde, Hsp protein ailesinin karsinogenezdeki rolü anlaşılmış ve Hsp90'ın epigenetik yollarda da önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Bu yüzden, hedefe spesifik, yeni nesil kanser çalışmalarında önemli bir biyomolekül haline gelmiştir.

HSP90, olağan sağlıklı hücrelerde, hücresel sinyal iletimi, protein katlanması ve stabilizasyonu ve intraselüler transportta rol almaktadır. Bu proteinlerin stabil olmasından, katlanmalarından ve protein agregasyonunun önlenmesinden sorumlu şaperon protein HSP90'dır. Bundan dolayı Hsp90'nın aktivitesinin inhibasyonu, kanserli hücreler için önemli bir tedavi stratejisi olarak kabul edilmiştir.

HSP90, kolon kanseri de dahil olmak üzere birçok kanser için cazip bir terapötik hedefi temsil eder. Monoterapinin sınırlı klinik etkinliği olmasına rağmen, klinik öncesi ve erken faz klinik çalışmalar, HSP90 inhibitörleri kullanıldığında antitümör aktivitenin arttığını göstermektedir. EGCG ise çaydaki ana biyoaktif bileşenlerden biridir. Epidemiyolojik araştırmalar ve hayvan ve hücre deneyleri, EGCG'nin birçok tümör türü üzerinde önleyici ve tedavi edici bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Bu tez kapsamında, yeni terapötik yaklaşımlar geliştirmek amacıyla ilaç tasarımı için önemli bir hedef olan HSP90 inhibitörü MPC-3100 ile yeşil çayda en bol bulunan bir kateşin olan EGCG kombine ederek kolorektal kanser üzerinde nasıl bir etki sağladığı araştırılmıştır. İn vitro koşullarda modellenerek incelenmiştir. Bu amaç doğrultusunda, kolorektal kanser tedavisi için alternatif yollar geliştirmek, kullanılacak olan doğal bileşikle tedavi olan insanlar üzerindeki sitotoksik etkiyi azaltarak daha az zararlı tedavi yolları geliştirilmesi amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Isı Şok Proteinleri ve HSP90

2.1.1. Isı Şok Proteinleri

Şaperonlar veya ısı şoku proteinleri (heat-shock proteinler; Hsp), ilk olarak 1962'de biliniyor. Bu protein grubu, yüksek sıcaklıklara (42-46°C) maruz kaldığında artan üretimleriyle bilinir (Aufricht, 2005, s.707-713). Stres hücrelerinin hayatta kalması yardımcı olan bir grup protein olan Şaperonlar veya Hsp'ler, sadece termal faktörlerden etkilenmekle kalmaz, aynı zamanda etanol, arsenik, enfeksiyon, inflamasyon, toksinler, hipoksi, dehidratasyon, kanser ve birçok faktör HSP'de artışa sebep olabilir. Bu nedenle, bu proteinlere "stres proteinleri" denir ve vücuttaki stres durumlarına tepkinin bir parçası olarak kabul edilirler (Petrof vd., 2004, s.45-50). HSP'ler, moleküler ağırlıklarına göre ayrılan bir protein grubudur. HSP10, HSP27, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90, HSP110 gibi farklı türleri vardır (Bukau ve Horwich, 1998, s.351-366).

Hücre koruyucu özellikleri şaperon özelliği sayesinde gerçekleşmektedir. Bu özelliklerini sıklıkla hücre içinde proteinlere bağlanarak veya proteinlerin katlanmasını sağlayarak gösterirler (Nylandsted vd., 2000, s.122-125). HSP veya stres proteinleri dahil olmak üzere şaperonlar, hücre protein homeostazının düzenlenmesinde kritik bir rol oynayan yüksek ölçüde korunmuş proteinlerdir (Roodveldt vd., 2017). Bol miktarda bulunurlar, hücre iskeletinin tüm elemanları ile bir kompleks oluşturarak diğer proteinler ile etkileşime girerler (Soti vd., 2002).

Şaperoların başlıca işlevi, ortaya çıkan polipeptitleri uygun konformasyona ulaşmaları için katlamak, hafif denatüre / zarar görmüş proteinleri yeniden katlamak, proteinlerin bir araya gelmesini önlemek ve ciddi şekilde hasar görmüş proteinleri yıkılmaya yönlendirmektir. Şaperonlar proteinleri ubiquitin proteazom sistemine ulaştırmak üzere proteinlerin indirgenmesine yardımcı olurlar (Maiti vd., 2014). Bu nedenle, A β ve tau gibi yanlış katlanmış proteinlerin neden olduğu toksisiteye karşı ilk savunma hattı olarak işlev görürler (Wilhelmus vd., 2007).

Bununla birlikte proinflamatuvar sitokinlerin üretimini indüklemek ve dendritik hücre olgunlaşmasını teşvik etmek için sitokinler olarak işlev gördükleri ileri sürülmüştür (Romi vd., 2011). HSP90 ve HSP70'in, v-Src, Raf1, Akt ve steroid reseptörleri dahil

olmak üzere bir dizi sinyal molekülüyle ilişkili olduğu gözlemlenmiştir (Nollen vd., 2002). HSP'lerin apoptoz kaskadını inhibe edebildikleri de bildirilmiştir (Turturici vd., 2011).

Sinir sisteminde, moleküler şaperonların ekspresyonlarının, serebral iskemi, nörodejeneratif hastalıklar, epilepsi ve travma dahil olmak üzere çeşitli patolojik durumlarda artabildiği bildirilmiştir. Şaperonların, glia ve endotel hücreleri dahil olmak üzere birçok hücre tipinde eksprese edildiği bilinmektedir. Ayrıca hem fizyolojik salgılama mekanizmalarıyla hem de nekrotik hücre ölümü sırasında salınan hücre dışı proteinler olarak da mevcut olabildikleri gözlenmiştir. Hücre dışı ortamda bulunan moleküler şaperonlar, nöronlar gibi strese duyarlı alıcı hücrelere bağlanmanın bir sonucu olarak stres direncini artırabilirler. Ayrıca hücre içi peptidleri immün hücrelere taşıyarak inflamatuvar hücrelere tehlike sinyali verebilir ve immün takibe yardımcı olabilirler (Tutar vd., 2010, Turturici vd., 2011).

Moleküler şaperonlar ve ko-şaperonlar, ribozom bağlama şaperonları, ısı şok proteini 40 (HSP40), HSP70, HSP60, HSP90, HSP100, prefoldinler, küçük HSP ve tetratrikopeptid-alanı içeren ko-şaperonlar dahil olmak üzere farklı ailelere ayrılmıştır (Chiti vd., 2017). Nukleus, sitoplazma, ER ve mitokondri gibi subselüler alanlarda lokalizedirler (Maiti vd., 2014).

Küçük HSP'ler, doğal olmayan proteinlere bağlanarak protein birikimini önleyen ve yeniden katlanmayı veya protein yıkımını kolaylaştıran şaperonlardır (Reis vd., 2017). HSP40, HSP70-ATP hidrolizini düzenler. HSP70, translasyon sırasında proteinlerin katlanmasını sağlar. HSP70 ve HSP90 hücrede birçok örtüşen rol üstlenirken, HSP90 bağlanacağı protein açısından daha fazla seçicilik gösterir. HSP90, protein parçalanması, protein katlanması, protein agregasyonunun önlenmesi ve protein modifikasyonu dahil olmak üzere bu işlevleri yerine getirmek için ATP'ye ihtiyaç duyar (Shelton vd., 2017). 40 kD veya daha az moleküler ağırlığa sahip olan küçük HSP'ler, bu ATP bağlama bölgesinden yoksundur ve yeniden katlanma işlevinde yardımcı olurlar (Wilhelmus vd., 2007).

HSP100, metazoonlarda (örn., Maya) protein parçalanmasında önemli bir role sahiptir, ancak metazoonlar, sitozol ve nukleusta HSP100'den yoksundurlar. HSP60 şaperonları, sitozolde ve ökaryotların mitokondrilerinde bulunur, ancak bakteri ve arkeada daha yüksek oranda protein ile etkileşime giriyor gibi görünmektedir (Reis vd., 2017).

Şaperonların aksine, yardımcı şaperonlar, diğer proteinlere bağlanan ve konformasyonel değişiklikler meydana getiren veya alternatif olarak taşıyıcı proteinler olarak görev yapan proteinler olarak tanımlanabilir. Varsayılan yardımcı şaperonların örnekleri, apolipoprotein E (APOE), heparan sülfat proteoglikanlar (HSPG) ve C1q gibi tamamlayıcı faktörlerdir. Şaperonların aksine, primer olarak hücre dışı bir işleve sahiptirler (Wilhelmus vd., 2007).

Protein kalite kontrolünün devamlılığını sağlamak için şaperonlar doğası gereği, yeni oluşan proteinlerin çoğu ile etkileşime girer. Bu nedenle, APP, gama sekretaz kompleksinin üyeleri, MAPT ve ayrıca bir dizi nöroinflamatuvar bileşen, üretim anlarından itibaren şaperonlarla temas halindedir (Koren vd., 2009). Farklı ko-şaperonlar ve diğer ortak çalışan proteinler ile etkileşime girerek veya kinazların, hormon reseptörlerinin, transkripsiyon faktörlerinin ve antionkojenik proteinlerin ekspresyonunu indükleyerek zararlı hücresel strese karşı koruma sağlamaktadırlar (Maiti vd., 2014).

Patojenik koşullar altında, anormal proteinler şaperon ağı ile etkileşime girerler. “Müşteri-Client” olarak bilinen bu anormal proteinler AH’de tau, PH’nda α -sinüklein ve Lösince zengin tekrar kinaz 2 (LRRK2), ALS’de SOD-1, TDP-43 ve FUS, HH’da huntingtin gibi polyQ proteinleri dahil olmak üzere sayısız nörolojik bozukluğun patogeneğinde büyük rollere sahiptirler (Carman vd., 2013).

2.1.2. HSP90 ve Fonksiyon Düzenlemeleri

Ana protein bağlayıcı ısı şok proteini HSP90’dır. Ribozomda sentezlenen polipeptid zinciri ribozomun ufak yapısından dolayı ribozomun içinde katlanamayabilir. Ancak ribozomdan çıktıktan sonra katlanabilirler. HSP’ler polipeptid dizisinin hidrofobik kısmına bağlanarak proteinlerin katlanmasını sağlarlar (Mayer ve Bukau, 2005, s.670-684). Bu bağlanma 3 şekilde gerçekleşebilir (Pratt vd., 2004, s.857-872).

- 1) Tersiyer yapısını kaybetmiş proteinlerin HSP90 ile bağlanması şeklinde
- 2) Isı şoku ve stres sonrası çözülen proteinlerin hidrofobik kısımlarının HSP ile birleşerek
- 3) Ribozomda mRNA translasyonu sonrası ribozomdan çıkan polipeptid dizinin çökmemesi için prematür bağlanarak gerçekleştirir.

HSP90 bu etkilerini büyük bir kompleks oluşturarak gerçekleştirirler. Buna şaperon makinesi denir. Bu komplekse ko-şaperon denilen farklı proteinler katılır (Mayer ve Bukau, 2005, s.670-684). HSP70 ve HSP90 görevini yerine getirdikten sonra proteinlerden intrinsik ATP'az bölgeleri ile aktif olarak ayrılır (Bukau vd., 1998, s.351-366). Önce bağlanma işlemi, daha sonra katlanma işlemi gerçekleşir. Özellikle HSP60 olmak üzere bazı şaperoninler katlanmada sorumludurlar (Spiess vd., 2004, s.598-604). Bu şaperoninler polipeptid dizeleri üzerinde büyük katlanma kompartmanları oluştururlar ve bu sayede proteinler ATP kullanılarak tersiyer yapılarını kazanırlar (Young vd., 2004, s.781-791).

HSP'lerin bu görevleri dışında hücre içinde metabolizma kontrolu gibi önemli görevleri de vardır. Bunlardan bazıları birçok düzenleyici proteine bağlanarak bu proteinlerin stabilizasyonunu ve tersiyer yapısını sağlamaktır. Bununla beraber mitoz bölünmenin ve hücre siklusunun devamı, apoptozisin engellenmesinde önemli rolleri vardır. Bu etkilerini de yukarda anlatıldığı gibi diğer proteinlerle etkileşerek gerçekleştirirler (Pratt vd., 2004, s.857-872).

HSP'ler bu olumlu ve koruyucu etkilerini hücrelerin maligniteye doğru bir yönelmesi durumunda da devam ettirdikleri ve tümör hücrelerinde yüksek ekspresyonları olduğu gösterilmiştir. Bu tümör hücrelerinin büyümesini sağlayıp, apoptozise gitmelerini engelledikleri belirtilmiştir. (Ciocca vd., 2005, s.86-103)

Bakterilerden memelilere kadar büyük oranda korunmuş bir moleküler şaperon olan HSP90, toplam proteinlerin yüzde 1-2'sini oluşturan prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde bol bulunan proteinlerden biridir. Ökaryotlarda hücre sağkalımı için esastırlar. Memeli hücrelerinde iki HSP90 alt tipi vardır: HSP90 α (HSP90AA1) ve HSP90 β (HSP90AB1). Her ikisi de sitozolde konumlanmışlardır. HSP90 α stres koşullarına duyarlıdır (Ou vd., 2014).

HSP90 α ve HSP90 β izoformları, yaklaşık 500 milyon yıl önce gen duplikasyonunun sonucudur. Ökaryotlarda farklı hücresel fonksiyonları gerçekleştirmek için alternatif HSP90 izoformlarının gerektiği düşünülmektedir. HSP90'ın iki farklı sitozolik formu olan HSP90 α ve HSP90 β , %93 amino asit sekans homolojisine sahip olmasına rağmen, farklı fonksiyonlara sahiptir (Zuehlke vd., 2015). HSP90 α , büyümenin indüklenmesi, hücre döngüsünün düzenlemesi, strese bağlı hücrenin korunması ve kanser metastazı ile ilişkiliyken; HSP90 β erken embriyonik gelişimi, germ hücre olgunlaşması, hücre iskeleti

stabilizasyonu, hücre döngüsü, sinyal iletimi ve uzun süreli hücre adaptasyonu ile ilişkilidir (Shelton vd., 2017).

HSP90 şaperon mekanizmaları, ökaryotik hücrelerde hem fizyolojik hem de stres koşullarında protein homeostazının kilit bir düzenleyicisidir (Schopf vd., 2017). HSP90, client proteinlerinin aktivasyonunun sağlanmasında, olgunlaşmasında, stabilizasyonunda ve yapısal bütünlüğünün sağlanmasında görev yapan ATP-bağımlı bir şaperondur. HSP90, client proteinleri arasında protein kinazlar, hücre döngüsü düzenleyici proteinleri, hücre yüzeyi reseptörleri ve transkripsiyon faktörleri yer alır (Smith vd., 2015). Bu nedenle HSP90 proteinleri temel hücresel süreçlerde, apoptoz, hücre döngüsü kontrolü, hücre canlılığı, protein katlanması ve bozunması ve sinyal iletimi gibi düzenleyici yollarda görev alırlar. Ek olarak, antijen sunan hücrelerin ve dendritik hücrelerin aktivasyonu ile bağışıklığı düzenleyebilir. HSP90'ın aşırı ekspresyonu, çeşitli kanser türleri, viral enfeksiyon, inflamasyon ve nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok patolojik durumla bağlantılı olarak birçok hastalığın patogenezinde potansiyel bir rolünün olduğunu göstermiştir (Hoter vd., 2018).

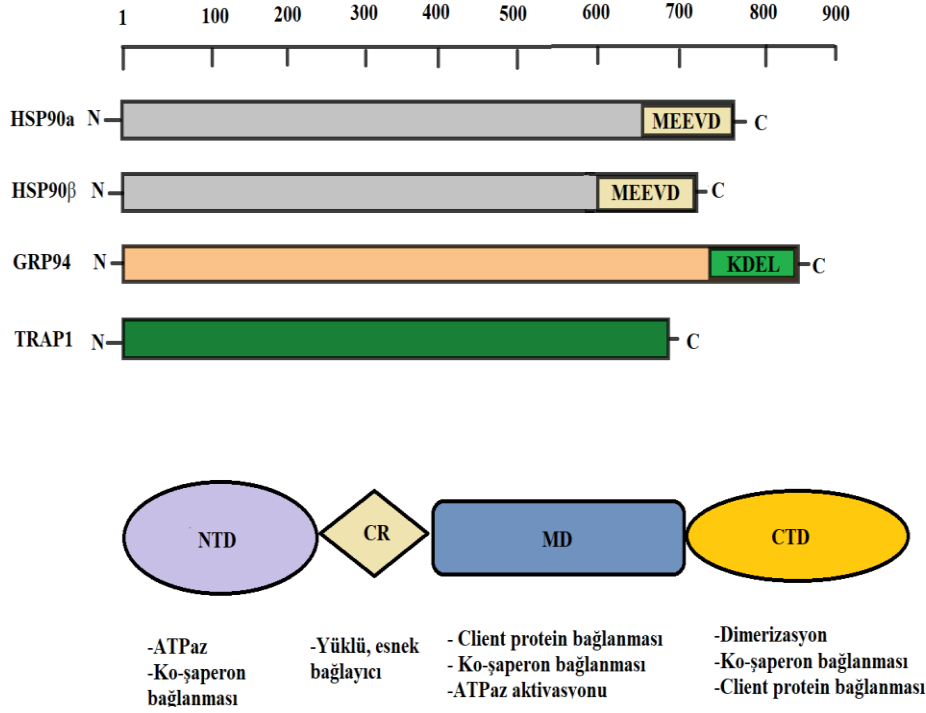
Yüksek ökaryotlarda, HSP90 homologları, mitokondri, kloroplast ve endoplazmik retikulumda da bulunur (Schopf vd., 2017). İnsanlarda, iyi bilinen sitoplazmik HSP90 α ve HSP90 β ve ayrıca sırasıyla ER'da ve mitokondride lokalize olan Grp94 ve TRAP1 dahil olmak üzere birkaç HSP90 izoformu vardır (Zuehlke vd., 2015). Grp94, ER protein kalite kontrolüne ve kalsiyum depolamasına katkıda bulunur. Grp94 moleküler şaperon aktivitesi, salgı ve membran proteinlerinin doğrudan katlanmasını içerir ve yanlış katlanmış proteinlerin yıkımı için hedeflenmesine yardımcı olur. TRAP-1, ağırlıklı olarak mitokondriyal matriks içinde ve membranlar arası boşlukta bulunan bir HSP90 izoformudur. TRAP-1'in işlevleri tam olarak anlaşılamamıştır. TRAP-1'in en geniş şekilde bildirilen fonksiyonu, mitokondriyal geçirgenliği sağlamak için geçici olarak gözeneklerin açılmasını önleyen siklofilin D ile etkileşime girerek ve henüz bilinmeyen mekanizmalarla reaktif oksijen radikallerini azaltarak hücresel koruma sağlamasıdır (Reis vd., 2017).

2.1.3. HSP90 Ko-şaperonlar ve Ko-şaperon Döngüsü

HSP90 bir homodimer olarak işlev görür ve dimerizasyon işlevleri için esastır. Bir HSP90 monomeri yüksek oranda korunan üç bölgeden oluşur: ATP'ye bağlanmaya öncülük eden amino terminal bölgesi (NTD); ATP hidrolizi ve HSP90'ın clientlerine girmesi için önemli olan orta bölge (MD); ve HSP90 dimerizasyonundan mesul olan C-terminal bölgesi (CTD) (Schopf vd., 2017).

MD ve CTD'deki rezidüler client proteinlerin birçoğu ile etkileşime girmektedir. Bu üç bölge tüm HSP90 proteinlerinde korunmasına rağmen, iki ana özellik ökaryotik ve bakteriyel HSP90'ı birbirinden ayırır. Birincisi, bakteriyel HSP90 ve mitokondriyal HSP90 (TRAP1)'da bulunmayan, ER HSP90 (Grp94)'da olduğu gibi sitozolik ökaryotik HSP90'da da bulunan, NTD ve MD'yi birbirine bağlayan uzun, esnek, yüklü bir bağlayıcının bulunmasıdır.

Bu yüklü bağlayıcının HSP90 konformasyonel değişikliklerinin ve ko-şaperon bağlanmasının bir modülatörü olarak işlev gördüğü ileri sürülmüştür. İkincisi, ökaryotik hücrelerin sitozolik HSP90 proteinlerinde HOP, PP5, CHIP, Tpr2, Sgt1 ve Tom70 gibi TPR bölgelerini içeren birçok ko-şaperonun bağlanmasına izin veren Met- Glu-Glu-Val-Asp (MEEVD) motifini içeren bir C-terminal uzantısıdır. Bu motif, bakteri ve ökaryotik organellerde HSP90 TPR ko-şaperonlarının homologlarının bulunmaması ile tutarlı olarak bakteriyel HSP90, Grp94 ve TRAP1'de bulunmamaktadır (Genest vd., 2019) (Şekil 1).



Şekil 1. HSP90 Aile Yapısı (Hoter vd., 2018)

2.1.4. HSP90 Client Proteinler

HSP90'nın tam aktif moleküler şaperon aktivitesi gösterebilmelerine yardımcı olan HOP, Cdc37, Aha1, immünofilinler (FKBP51 and FKBP52), peptidil-prolil izomerazlar ve siklofilin Cy40, HSP70, p23 gibi ko-şaperon, client / ortak proteinler ve multimerik protein kompleksleri ile birlikte işlev gösterir (Maiti vd., 2014, Wang vd., 2014).

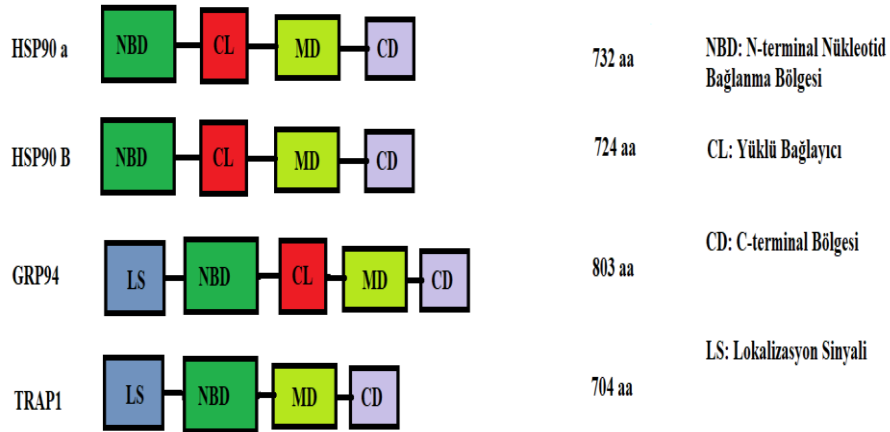
HSP90 düzenleyici protein aktivitesi, HSP90 şaperon proteininin client proteini tanıması ile başlar. Client protein genellikle bir amiloidojenik protein olup, doğal olarak açılmamış bir protein ve kimyasal veya ısı uygulaması ile yapılandırılmamış bir polipeptit gibi kümelenmeye yatkın bir proteindir.

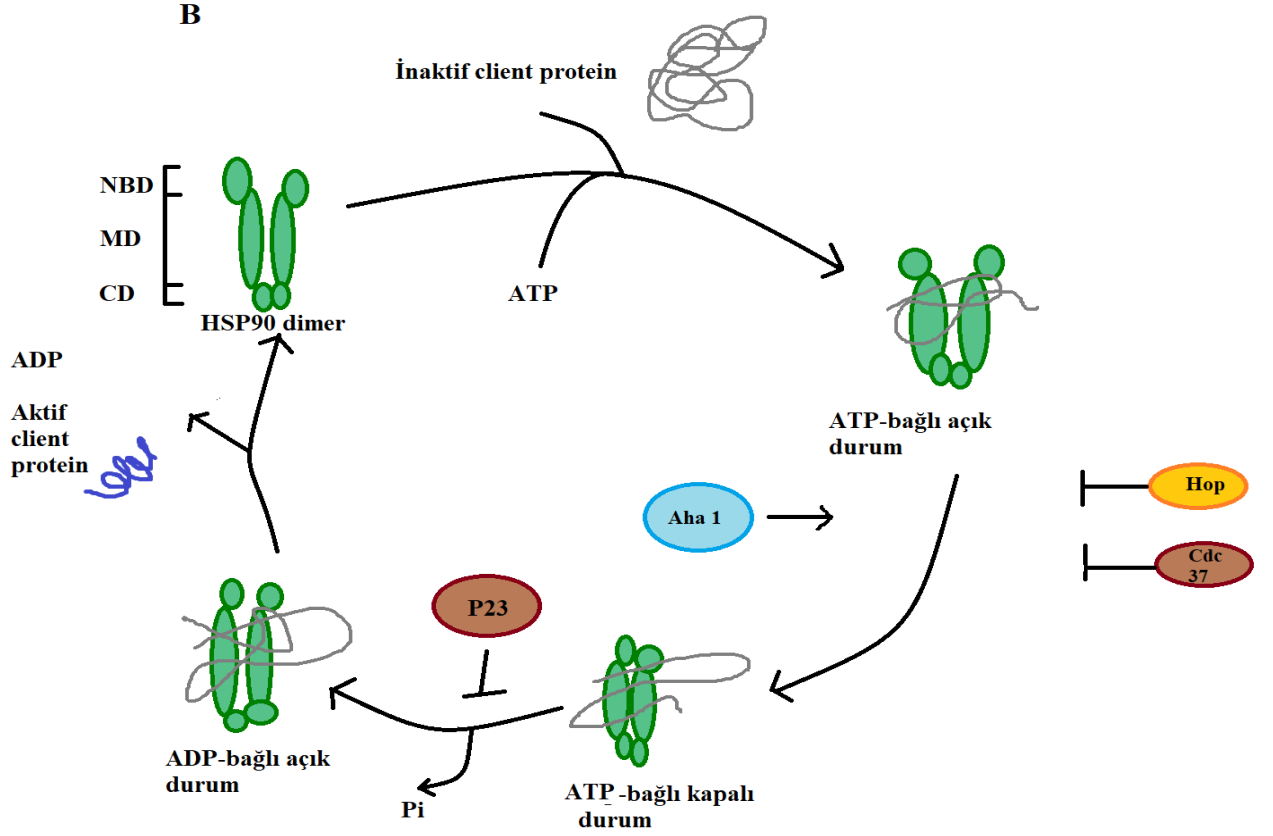
HSP90 dimeri, client proteine 1:1 sitokiyometri ile bağlanır, böylece protein birikmesini veya agregasyonunu önler. Client proteinleri, ATP'den bağımsız bir şekilde veya bazı client proteinleri için ATP'ye bağımlı döngüler ile serbest bırakılabilir. Serbest bırakıldıktan sonra, client proteinin yapılandırılmamış bölgeleri kendiliğinden doğal konformasyonuna yeniden katlanır. Eğer client proteinin yapılandırılmamış bölgeleri

doğal konformasyona katlanamazsa, yeniden katlanma koşulları uygun olana kadar HSP90 tarafından client proteinleri tekrar tekrar bağlanma ve serbest bırakma döngülerine girebilir (Genest vd., 2019).

HSP90 proteininin, katlama ve indirgeme dengesini düzenlemesine dair tam mekanizması net değildir. Anormal veya yanlış katlanmış client proteinlerinin açığa çıkan hidrofobik amino asitleri, agregasyonu önlemek için HSP40 ve HSP70'e bağlanır. Daha sonra HSP70 / 40, client proteininin HOP tarafından desteklenen HSP90'a bağlanmasına neden olur. Ko-şaperon p23, proteini yeniden katlamak için HSP90 ve protein kompleksine bağlanır. Katlanmış olan protein, HSP90 ve ko-şaperon p23 kompleksinden ayrılır. Bir sonraki protein katlama döngüsüne katılabilecek HSP90 ve ko-şaperon p23 yeniden üretilir (Wang vd., 2014).

A





Şekil 2. HSP90'nın ATPaz döngüsü

2.1.5. HSP90 ve Kanser

2.1.5.1. Kanser Gelişiminde HSP90 Rolü

Tümör hücreleri, normal hücrelerin yapı ve şekil değiştirmesiyle oluşur. Bu hücrelerde apoptozisin engellenmesi, sürekli büyüme sinyalleri, büyüme ve bölünmedeki inhibisyonun ortadan kalkması, sürekli anjiyogenezis ve metastaz gibi değişiklikler mevcuttur (Sherman vd., 2007, s.192-201). Malignite gelişiminde ilk önemli değişim otonomik sinyal oluşturabilmedir ve bunu büyük oranda HSP90 gerçekleştirir (Hanahan vd., 2000, s.57-70).

HSP90 hücrelerin büyümesinde görevli birçok faktörün stabilizatörüdür. Bu faktörler; reseptörler, protein kinazlar ve transkripsiyon faktörleridir (Neckers vd., 2003, s.419-424). Sürekli büyümenin olacağı için proteinlerin HSP90 tarafından devamlı kararlı halde tutulması gerekmektedir (Neckers vd., 2003, s.419-424). Proto-onkogen HER2'nin, tümörjenez için gerekli olan sinyal iletimi için gerekli olan HSP90'a bağımlı bir proteinin öncüsü olduğu düşünülmektedir. HER2, HSP90 tarafından aktive edilir ve kararlı hale getirilir. Bununla beraber sinyal iletiminin devamı için gerekli bazı alt kademe proteinler vardır. Bunlar; Akt, c-Src ve B-raf'tır. Bu proteinlerin de HSP90'a ihtiyaçları vardır.

Daha öncede anlatıldığı gibi HSP'ler polipeptidler üzerinde kompartmanlar oluşturur ve şaperon kompleksi buraya bağlanır. Bu kompleksin ana bileşeni HSP90'dır. Bu kompleks heterojen bir yapıya sahiptir. Bu heterojeniteye neden olan diğer proteinler: hop proteini, p23 proteini, HSP70 ve HSP40'tır. Hop destek proteini iken P23 eklenecek substratın belirlenmesini sağlar (Pratt vd., 2004, s.857-872).

İnhibitörler yardımıyla HSP90'nın inaktive edilmesi proteinlerin kararlı yapılarının bozulmasına, mitoz döngüsünün G1 fazında durmasına, apoptozisin aktive olmasına ve sürekli sinyal iletiminin azalmasına neden olur (Neckers vd., 2003, s.419-424). Bu da bize tümör hücrelerinin sınırsız büyümelerinde HSP90'nın ne kadar önemli olduğunu gösterir. Tümör hücrelerindeki HSP üretiminin artışı her tümör çeşidi ve her hastada gerçekleşmeyebilir (Ciocca vd., 2005, s.86-103).

Kanserlerde onkojenik proteinlere bağlanmak için oluşturulan şaperon kompleksinin etkisi HSP90'nın miktar ve yapısı değiştirilerek arttırılabilir (Neckers vd., 2003, s.419-424). Bununla birlikte Geldanamisin, Ansamycin gibi ilaçlar bu şaperon kompleksinin ATPaz bölümünü hedef alır ve kanser hücrelerine karşı etkili olurlar. Kanser hücresi dışındaki normal hücrelerde bu etki yoktur. Bu da HSP90'nın kanserli hücrelerde farklı bir yapıda olduğunu gösterir (Kamal vd., 2003, s.407-410).

HSP90 tümörlü hücrelerin sürekli büyümesi dışında çeşitliliği ve mutasyonları da etkilemektedir. Mutasyona uğrayan proteinler HSP90 tarafından stabilize edilir ve daha dirençli hücrelerin ortaya çıkmasına neden olur (Nimmanapalli vd., 2001, s.1799-1804). Tümör gelişimi sırasında DNA tamir mekanizmaları, hücre siklusunun kontrol basamakları inaktive edilir. Bu olaylar sonucunda mutasyona uğramış proteinler ve tümöral hücreler oluşur. HSP90 da bu mutasyona uğramış proteinlere bağlanarak bunların

kararlı şekilde kalmasına neden olurlar ve bu proteinlerin korunmasını sağlarlar (Van Gent vd., 2001, s.196-206). HSP90 füzyon proteinlerin de (Bcr-Abl) şaperonluğunu yapar (Rahmani vd., 2005, s.1166-1176).

HSP90'nın ısı şoku ve stres gibi durumlarda seviyesi artmaktadır. Bununla birlikte HSP90 proteinlerinin çalışması için ATP gerekmektedir (Peng vd., 2005, s.131). Mevcut çevrenin glukozu düşük ve hipoksik olması HSP90'nın fonksiyonunu inhibe eder.

HSP seviyeleri birçok organizmada uzun yaşam ile ilişkilidir. Bu etkilerini de HSF-1 ile aktive olup artarak yaparlar (Hsu vd., 2003, s.1142-1145). Hücreler sonsuza kadar bölünmezler. Bölünme safhasındaki belli noktalar kontrol bölgeleridir. Bu kontrol mekanizması ile belli bir sayıda bölünürler. Kromozomların uçlarındaki telomerler belli bir uzunluğa indiğinde hücreler artık bölünemez (Campisi vd., 2005, s.513-522). Ancak telomeraz enzimlerinin üretiminin artması hücrelerin bu kritik durumu aşip sınırsız bölünmeye neden olabilirler. HSP90'da bu telomerazların stabilizasyonunu sağlar. Tümöral gelişimde anjiyogenezin de rolü vardır. Tümöral hücrelerde anjiyogenezis artmıştır. HSP90'nın ekspresyonunun artması da anjiyogenezi arttırmaktadır (Pfosser vd., 2005, s.728-736). İleri evre kanserlerde HSP ekspresyonunun yüksek olduğu hastalarda tümörün uzak dokulara metastaz yaptığı, dokudaki invazyon derinliğinin arttığı gösterilmiştir fakat mekanizması tam olarak bilinmemektedir. (Hoang vd., 2000, s.857-864) Bazı çalışmalarda invazyona neden olan MMP-2'nin HSP90 tarafından stabilize edildiği gösterilmiştir (Eustace vd., 2014, s.1096-1098).

Normal hücrelerde HSP transkripsiyonu tümör baskılayıcı p53 ve p63 tarafından kontrol altındadır. Bu kontrol sayesinde aşırı ekspresyonu engellenir (Taira vd., 1999). Ancak kanserler de genel olarak p53 mutasyonu gerçekleşir ve mutasyon sonrası p53 inhibisyonu hücrelerin HSP90 transkripsiyonundaki baskıyı kaldırıp HSP90 ekspresyonunu arttırır. Malignite gelişmesinde yalnız p53 mutasyonun rolü yoktur. Bunun yanında c-myc ve PTEN mutasyonlarının da malignite gelişmesinde etkisi vardır. C-myc ve PTEN'nin de bu etkisini HSP90 ekspresyonun arttırarak gerçekleştirir (Teng vd., 2004).

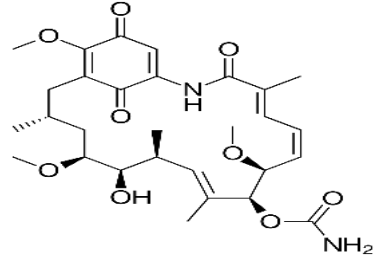
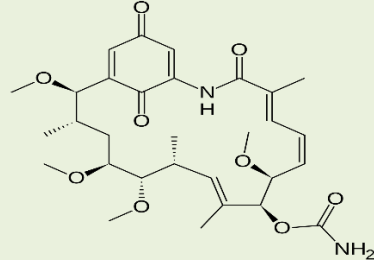
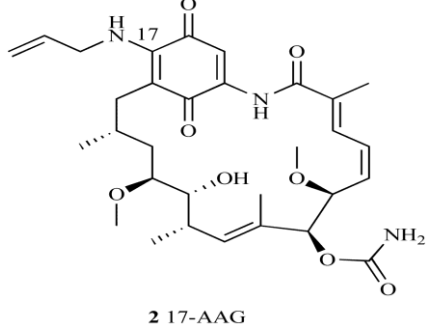
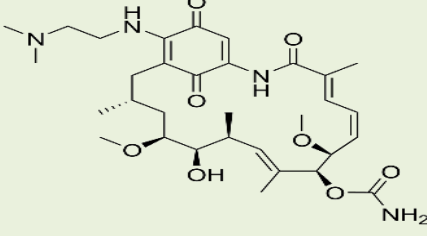
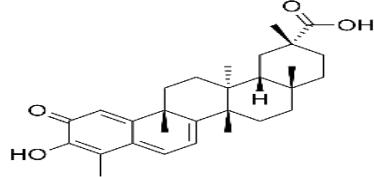
2.1.5.2. Kanser Tedavisinde HSP90 Rolü

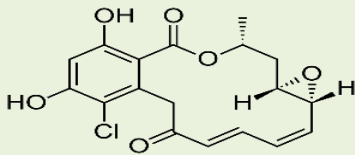
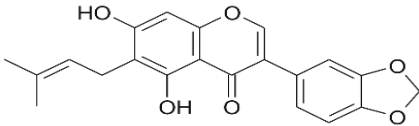
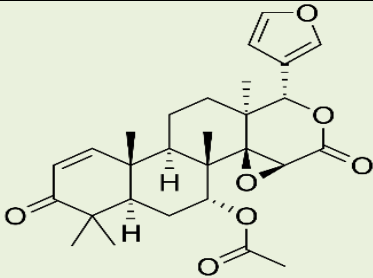
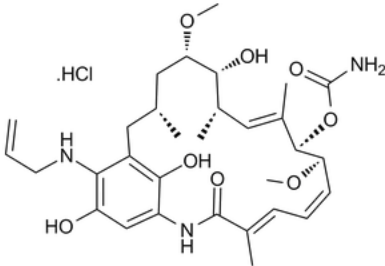
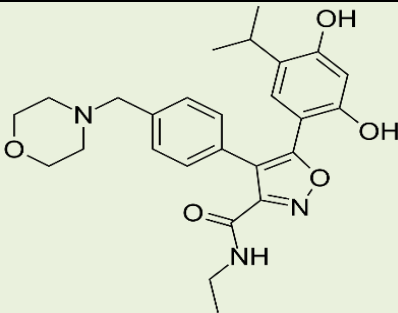
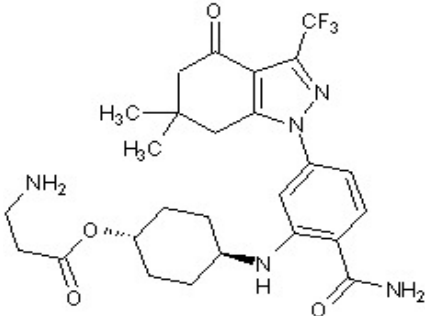
HSP90'ın özellikle de son dönemde bloke edilerek kanser tedavisinde kullanılmaya başlandığı bilinmektedir. HSP90'ın ATPaz bölgesi hedeflenir ve bu etkisi ortaya çıkartılır (Workman vd., 2004, s.48-49). Malign hücrelerde HSP inhibisyonundan sonra, otonom büyümenin sebebi olan tümöral hücrelerinin korunmasında görevli proteinlerin yıkımı gerçekleşmektedir. Bu bağlamda HSP'ler aşı oluşturulması amacı ile kullanılabilir (Manjili vd., 2013, s.4055-4057; Srivastava vd., 2002, s.395).

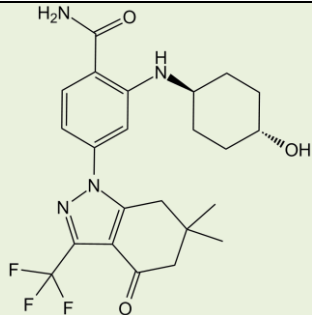
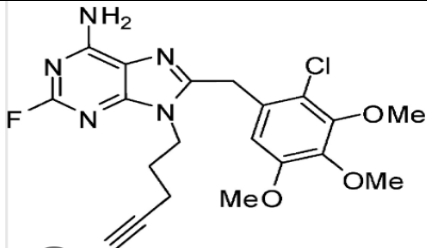
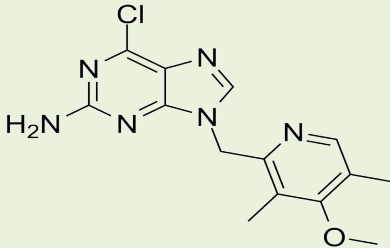
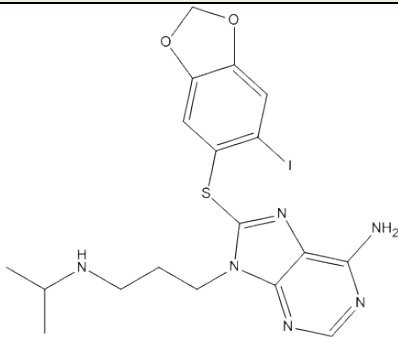
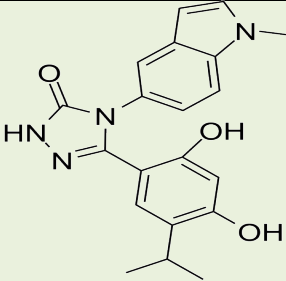
2.1.6. Hsp90 İnhibitörleri ve Klinik Çalışmalar

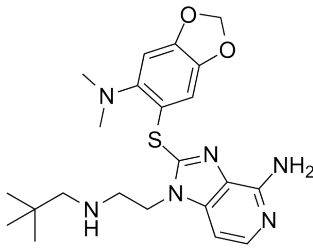
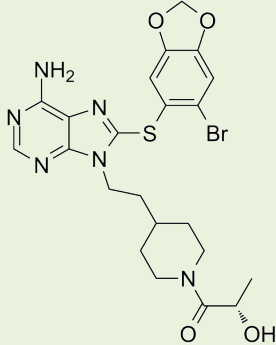
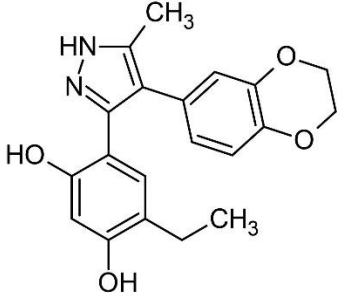
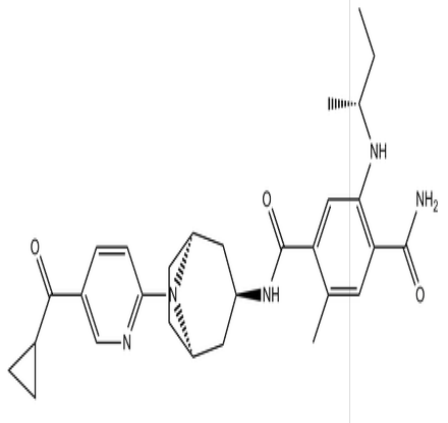
Hsp90 proteini, her yerde eksprese edilen ve iyi korunmuş bir 90 kD moleküler şaperondur ve yapısı stabiliteyi ve reseptör proteinlerini korur, böylece hücrel stres tepkilerini düzenler. Hsp90 ifade düzeyi, stres koşulları altında, örnek ısı şoku veya anormal pH gibi durumlarda artar. Kanserli hücrelerde, normal hücrelere göre iki ila 10 kat daha fazla eksprese edilir. Hsp90 ile alakalı proteinler, büyümeyi teşvik eden proteinleri ve habis transformasyonu destekleyen kinazları içerir. Hsp inhibisyonu birkaç kanser proteinini inhibe edebilir. Bu nedenle, Hsp90 önemli bir terapötik hedef olarak kabul edilir. (Fukuyo Y vd., 2010). Bundan dolayı Hsp90'ın aktivitesinin inhibe olması tedavi stratejisi olarak önemli bir yere sahiptir. Bir çok Hsp90 inhibitörü farklı kanser hücrelerinde ve kanser hastaları üzerinde klinik çalışmaları hala devam etmektedir.

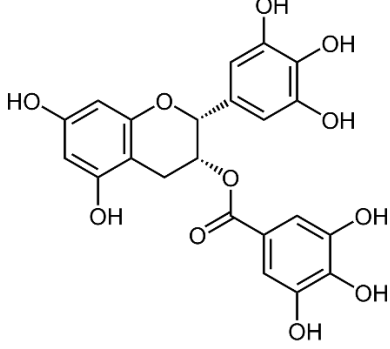
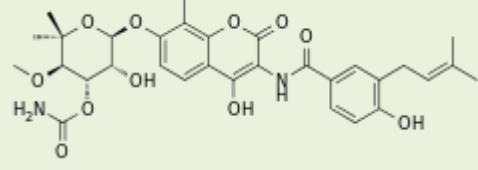
Tablo 1. Klinik Araştırmaları Devam Eden Önemli Hsp90 İnhibitörleri ve Moleküler Yapıları

HSP90 İNHİBİTÖRÜ	MOLEKÜL YAPISI
Geldanamycin	
Herbimycin	
17-AAG	
17-DMAG	
Calestrol	

Radicicol	
Derrubone	
Gedunin	
IPI-504	
AUY922	
SNX-5422	

SNX-2112	
PU24FCI	
BIIB021 (CNF2024)	
PU-H71	
STA-9090	

Debio 0932	
MPC-3100	
CCT018159	
XL-888	

(-)-EGCG	
Novobiocin	

HSP90, protein katlanması ve stabilizasyonunda rol alan bir şaperon proteini olarak görev yapar. Bu sebeple, kanser hücrelerinde HSP90 aktivitesinin inhibisyonu önemli bir terapötik stratejidir. Spesifik olarak kanser hücrelerinde, HSP90'ın (NTD inhibitörleri) ATP hidroliz mekanizmasını inhibe etmek için ATP ile rekabet eden moleküllerin ve HSP90 dimerizasyonunu (CTD inhibitörleri) inhibe etmek için CTD'yi hedefleyen moleküllerin tasarımı önemli hale gelmiştir. Son yıllarda prelinik ve klinik tedavi modaliteleri, klinik çalışmalarda değerlendirilmiştir (Ozgur A vd., 2016, Ozgur A vd., 2014). Hsp90 için geliştirilen inhibitörler iki gruba ayrılabilir: CTD ve NTD.

Hsp90'ın CTD, Hsp90 refakatçi işlevinde önemli roller oynar. CTD, ikincil bir nükleotid bağlama bölgesi içerir (Marcu MG vd., 2000, Garnier C vd., 2002).

N-terminal inhibitörleri, ATPaz aktivitesini ortadan kaldırmak için ATP bağlanma bölgelerine rekabetçi bir şekilde bağlanırken, C-terminal inhibitörleri, TPR motifleri içeren ko-şaperonların aktivitelerini bozarak, anormal şaperon fonksiyonuna neden olur. C-terminus inhibitörleri, yeni kanser kemoterapötiklerinin geliştirilmesi için ortaya çıkan adaylardır (Wandinger SK vd., 2008, Yun BG vd., 2004, Zhao J vd., 2014).

2.1.6.1. NTD İnhibitörleri

Geldanamisin (GM), 1970 yılında *Streptomyces hygroscopicus*'tan tanımlanan ilk benzokinon ansamisin antibiyotiktir (DeBoer vd., 1970). HSP90, ökaryotik hücrelerin

sitozolünde en bol bulunan şaperon proteinlerinden biridir. Yeni sentezlenen proteinlerin kararlı konformasyonlar (olgunlaşma) yapmasına veya nihai konumlarına yer değiştirmelerine yardımcı olur (Becker vd., 1994; Hartl vd., 1996). Ancak, geldanamisin klinik kullanımda değerlendirilmesi, çok düşük solubilité ve in vivo çalışmalarda hepatotoksik özelliklerinin belirlenmesi nedeniyle engellenmiştir. Bu nedenle yeni nesil geldanamisin türevleri (17-AAG, 17-DMAG, IPI-50) geliştirilmiş ve kanser hastalarında klinik denemeleri yapılmaya devam etmektedir (Fukuyo vd., 2010; Gorska vd., 2012; Neckers, 2006). Geldanamisin, çok çeşitli kanserlerde HSP90 şaperon kompleksi tarafından kinaz katlanmasını inhibe ederek güçlü bir anti-kanser aktivitesi sergilemiştir (Whitesell vd., 1994). Ancak GM , metabolik kararsızlığı ve dozla sınırlı hepatotoksitesitesi nedeniyle bir antikanser ilacı olmayı başaramamıştır (Supko vd., 1995). Isı şoku proteini 90'a bağlanan ve Atp'ye bağımlı şaperon fonksiyonlarını inhibe eden bir GM türevi olan 17-Alkilamino-17-demetoksigeldanamisin (17-AAG) ilk olarak 1998'de rapor edilmiştir (Schulte vd., 1998). Hsp90, kanser hücrelerinde onkogenik protein kinazların (Her-2, Akt, Raf-1, HIF-1 α , Bcr-Abl, Src, MAK ve mutant p53) aktivitesini modüle ettiği için kanser tedavisinde önemli bir hedeftir (Whitesell vd., 2005; Schopf vd., 2017; S.C. Bishop vd., 2007). Çok çeşitli insan kanserleri için klinik deneylere giren ilk geldanamisin türevidir (Zolghadr vd., 2017). 17-AAG, prelinik ve klinik araştırmalarda tek bir ajan olarak veya çeşitli kanser türleri için diğer antikanser ajanlarla kombinasyon/nanokombinasyon halinde geniş çapta araştırılmıştır. Bu kanserlerde 17-AAG, Hsp90 müşteri proteinleri olan sinyal yollarında bulunan proteinlerle etkileşimler yoluyla antikanser etkiler gösterir (Talaie vd., 2019).

Geldanamycin ve 17-AAG'nin sebep olduğu kötü etkilerden dolayı, geldanamycin türevi yeni nesil bir bileşik olan 17-DMAG (17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin) üretilmiştir. 17-DMAG'ın bir faz I denemesi, akut miyeloid lösemi (kısmi yanıt), kastrasyona dirençli prostat kanseri (tam yanıt), melanom (kısmi yanıt), böbrek kanseri ve kondrosarkom (stabil hastalık) dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde klinik yararlılığını doğrulamıştır (Beckman vd., 1990).

Geldanamisin ve 17-AAG'nin bir türevi olan retaspimisin veya IPI-504 suda oldukça çözünür ve genellikle iyi tolere edilir. Faz I/II denemelerinde retaspimisin, NSCLC ve gastrointestinal stromal tümörde aktivite göstermiştir (Hanson vd., 2009).

BIIB021 (CNF2024) Conforma Therapeutic Company aracılığıyla geliştirilen, Hsp90'ın oral olarak aktif ve tamamen sentetik bir inhibitörüdür. Klinik öncesi veriler ayrıca çeşitli katı tümörlerde ve hematolojik malignitelerde güçlü antikanser aktiviteyi göstermiştir (Zhang H vd., 2010; Suzuki vd., 2015). İlerlemiş katı tümörleri olan hastalarda gerçekleştirilen bir faz I klinik çalışmasında, BIIB021 güvenlik profili gösterildi ve bir faz II çalışması, refrakter gastrointestinal stromal tümör hastalarında objektif yanıtları belgeledi (Saif vd., 2014; Dickson vd., 2013).

MPC-3100, Myriad Pharmaceuticals tarafından üretilmiştir. Sentetik, oral yoldan biyolojik olarak temin edilebilen, Hsp90 inhibitörüdür. MPC-3100, onkogenik Her-2 proteininin bir inhibitörü olarak görev yapar ve meme, multipl miyelom ve gastrointestinal kanserlerde araştırılmaktadır. Hematolojik ve katı tümörleri olan hastalarda bir Faz I klinik çalışması başlatılmıştır (Ozgur vd., 2016). Yapılan klinik öncesi çalışmalarda MPC-3100, bir çok tümör hücrelerine karşı antitümör etki ve protein modülasyonu göstermiştir.

Debio-0932 (CUDC-305), küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, lenfoma, katı tümörler ve böbrek kanserindeki antikanser aktivitelerini anlamak için hem in vitro hem de klinik çalışmalarda oral olarak uygulanan ve ikinci nesil sentetik bir Hsp90 inhibitörüdür. Debio-0932, Hsp90 ATPaz aktivitesini seçici olarak bloke ederek onkogenik müşteri proteinlerinin uygun şekilde katlanmasını engeller. Debio-0932, yüksek tümör seçiciliği, oral biyoyararlanım ve kan-beyin bariyeri penetrasyonu ile birlikte antikanser aktivite gösterir (Stenderup vd., 2014; Isambert vd., 2015; Jhaveri vd., 2012). Bu nedenle iyi bir ilaç adayı olarak seçilip, faz çalışmaları devam etmektedir.

PU-H71 (Zelavespib), pürin bazlı bir Hsp90 inhibitörüdür. Memorial Sloan Kettering Kanser Merkezi tarafından üretilmiştir. Katı tümörlü veya lenfomalı hastalarda iki faz I klinik çalışması devam etmektedir ve PU-H71 şimdi yeni bir ilaç olarak dikkat çekmektedir. En umut verici Hsp90 inhibitörü olarak kabul edilen PU-H71, PU-3'ün bir türevidir ve Hsp90'ın ATP bağlayıcı bölgelerine özgüllüğün yanı sıra yüksek çözünürlüğe

sahip olacak şekilde tasarlanmıştır. Hsp90, rolünü atp'nin bağlanması ve hidrolizi ile düzenlenen karmaşık bir döngü yoluyla oynar ve PU-H71, ATP bağlanmasını bloke ederek Hsp90 aktivitesini inhibe eder (Liv vd., 2016).

STA-9090 (Ganetespib), Synta Pharmaceuticals firması üretilen, küçük güçlü bir Hsp90 inhibitörüdür. Hsp90'nın N-terminalindeki ATP bağlanma alanına bağlanarak, Hsp90 müşteri protein bozulmasını indükleyerek kuvvetli bir Hsp90 inhibitörü görevi üstlenir. Şu anda, meme ve akciğer kanserleri de dahil olmak üzere insan kanseri tedavisi için STA-9090'ın birçok Faz I–III klinik denemesi devam etmektedir (Proia vd., 2011; Garcia-Carbonero vd., 2013).

AUY922, oldukça güçlü, adenosin trifosfat rekabetçi, jeldanamisin olmayan bir HSP90 inhibitörüdür. Çoğu NSCLC hücre dizisinde *in vitro* ve çeşitlitümör ksenogreftlerinde *in vivo* büyümeyi güçlü bir şekilde inhibe eder (Felip vd., 2018).

SNX-5422 (PF-04929113), Hsp90'ın güçlü ve oldukça seçici bir küçük molekülü inhibitörü olan PF-04928473'ün (SNX-2112) suda çözünür ve oral olarak biyo yararlı bir ön ilacıdır . PF-04928473, Hsp90 ailesi üyelerinin (Hsp90 α , Hsp90 β , Grp94 ve Trap-1) N-terminal ATP cebine rekabetçi bir şekilde bağlanır ve *in vitro* ve *in vivo* olarak çeşitli kanserlere karşı oldukça etkilidir (Rajan vd., 2011).

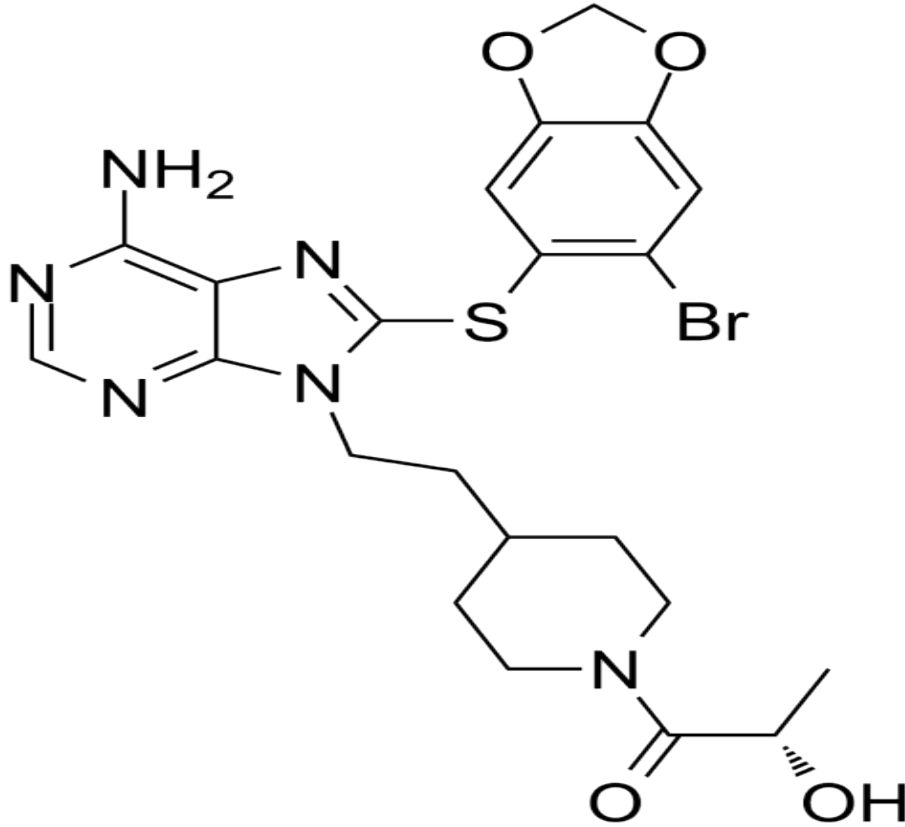
2.1.6.2. CTD İnhibitörleri

(-)-EGCG, yeşil çayın önemli bir bileşeni olan (-)-Epigallocatechin-3-gallate'in (EGCG), çeşitli sinyal yollarının indüklenmesi yoluyla belirli insan kanserleri üzerinde inhibitör etkiler gösterdiği gösterilmiştir (S. Gupta vd., 2004; C. Chen vd., 2003, P. McLoughlin vd., 2004). EGCG, onkojenik protein stabilizasyonunu ve katlanmasını inhibe eder ve Hsp90 CTD'ye doğrudan bağlanarak protein katlanma işlemi sırasında Hsp90'ın dimerleşmesini önler (Ozgur vd., 2016; Ozgur vd., 2014). EGCG'nin adrenal, mesane, meme, servikal, kolorektal, özofagus, mide, karaciğer, akciğer, cilt, oral, yumurtalık, pankreas, prostat kanseri de dahil olmak üzere bir çok kanser hücreleri üzerinde *in vitro* kanser önleyici etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Gan RY vd., 2018). EGCG'nin hücre tabanlı ve hayvan temelli klinik çalışmaları hala devam etmektedir.

Novobiocin, *Streptomyces* bakterisinden izole edilen bir antibiyotiktir ve şaperon, Hsp90 zayıf bir inhibitörüdür (Marcu vd., 2000). Novobiocin ve coumermycin gibi kumarin ilaçları, DNA topoizomerazlarını farklı mekanizmalarla inhibe edebilir. Novobiocin, ATP bağlanma bölgesini bloke ederek bakteriyel giraz B'yi ve memeli topoizomeraz II'yi inhibe eder (Gormley vd., 1996). Novobiocin türevleri, bu şaperonun işlevini inhibe ederek antikanser ajanlar olarak ümit vaat etmektedir (Burlison vd., 2006; Burlison vd., 2008; Donnelly vd., 2008).

2.1.7. MPC-3100

MPC-3100, Myriad Pharmaceuticals şirketi tarafından geliştirilmiş bir pürin türevi HSP90 NTD inhibitörüdür. Bu inhibitör, büyük bir afinite'yle beraber HSP90 NTD'ye bağlanmaktadır. İnhibitör, Her-2 onkojenik proteinindeki inhibisyonu sağlamakta ve gastrointestinal sistem ve multiple myelom kanserlerin tedavisi üzerindeki çalışmalarda denenmektedir. Bu doğrultuda ise solid tümör hastaları üzerindeki klinik phase-1 çalışmaları başlatılmıştır (Ozgur vd., 2016).

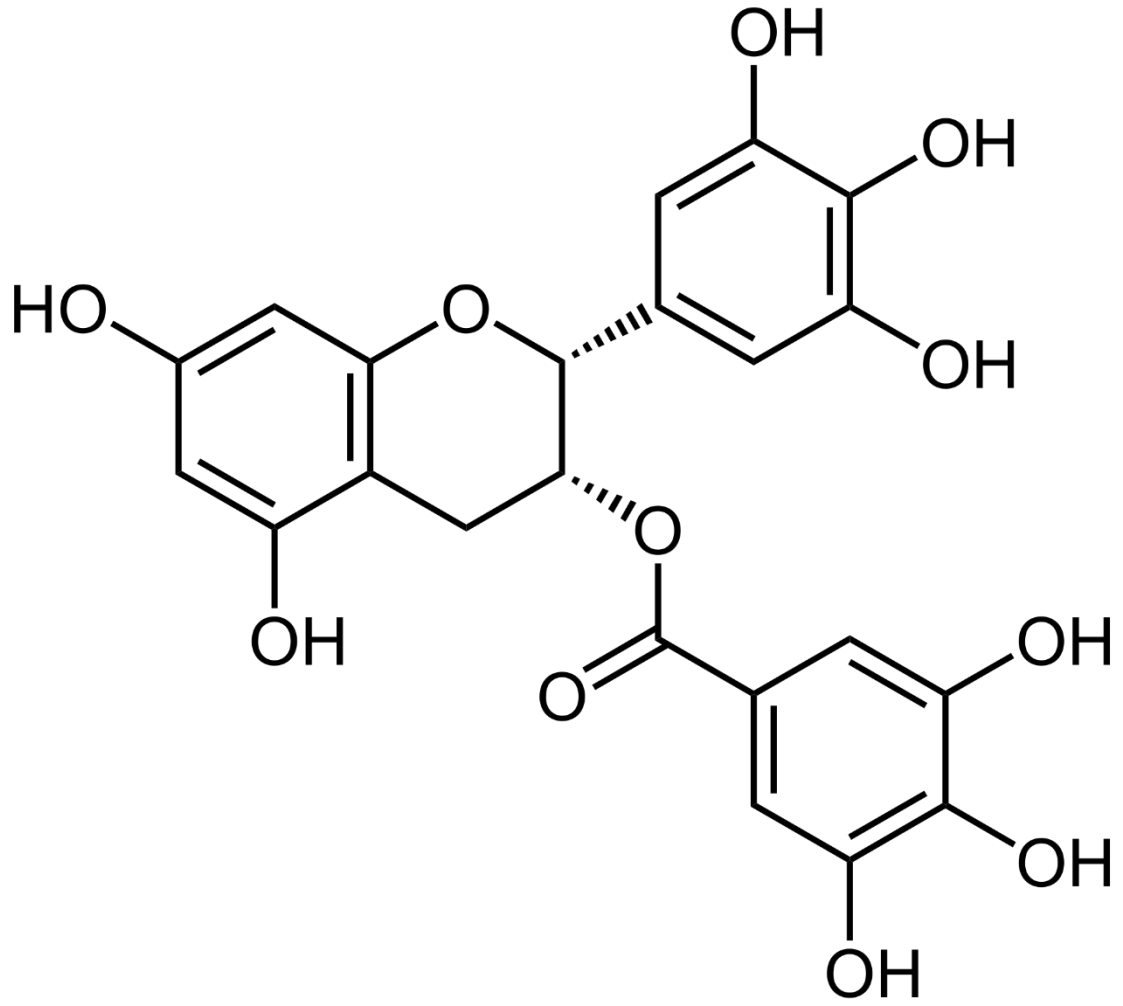


Şekil 3. MPC-3100'ın kimyasal yapısı

2.2. (-)-Epigallocateşin-3-Gallat (EGCG)

Beyaz ve yeşil çayda bol miktarda bulunan EGCG, sade antioksidanlardan biridir. Yapılan araştırmalara bakıldığında (Pace vd., 2013; Granja vd., 2017), EGCG'nin kolorektal kanser de dahil olmak üzere kanser türü üzerinde etkili kemopreventif özelliklere rastlanmıştır.

Polifenollerin bu kemopreventif etkisinin, EGCG'nin kanser hücresi proliferasyonunu inhibe etme, apoptozu indüklemeye ve normal/sağlıklı hücrelere zarar vermeden hücre döngüsü durmasına neden olma kabiliyetinden kaynaklandığına inanılmaktadır (Pace vd., 2013). EGCG'nin anti-kanser özellikleri kısmen, aşırı serbest radikaller nedeniyle hücresel yapıların hasar görmesini önleyen serbest radikal temizleme özelliklerine atfedilir (Farhan vd., 2016). Çalışmalar, EGCG'nin kanser gelişiminde yer alan tüm süreçleri engelleyebileceğini göstermiştir. Ayrıca EGCG'nin antioksidan ve anti-inflamatuar özellikleri kemoterapinin yan etkilerine karşı koruma sağlar (Granja vd., 2017). Yıllar geçtikçe çay tüketimi aynı kalmış ve sağlığa birçok faydası olduğu kanıtlanmıştır. Aynı iddialar doğrudan çayın polifenol içeriği, daha spesifik olarak EGCG ile ilgilidir. Bu nedenle EGCG araştırması büyük önem taşımaktadır. Bu bileşik, kanser, kardiyovasküler hastalık ve nörodejeneratif hastalıklar dahil olmak üzere birçok hastalığın önlenmesinde ve tedavisinde faydalı görünmektedir (Granja vd., 2017). EGCG'nin nanoenkapsülasyonunun kullanımı, ilaç çözünürlüğünü, kararlılığını ve biyoyararlanımını artırabilir, ilaç dolaşım süresini artırabilir, daha yüksek bir hedef serbestliği seviyesi gösterebilir, toksisiteyi azaltabilir, ilacın biyolojik çevre ile erken etkileşimini önleyebilir ve hücre içi penetrasyonu iyileştirebilir (Peer vd., 2007).



Şekil 4. Epigallokateşin-3-Gallat (EGCG) kimyasal yapısı

2.3. Kolon Kanseri

Kolon kanseri, abdomenin sağ üst kadranda bulunan, kör bağırsak ile başlayıp rektum ile son bulan, kolon dokusundaki hücrelerin kontrolsüz bölünmesi ile karakterize olan ve abdomenin tüm kısımlarını etkileyebilen gastrointestinal bir hastalıktır (Yeatman vd., 2003).

Kolon kanseri tipi çoğunlukla adenokarsinomadır. Bu kanserdeki hücre tipi çoğunlukla salgı dokusu hücrelerinden şekillenmektedir. Kolon kanserinde adenokarsinoma dışında epitelial doku hücrelerinde meydana gelen karsinoma ve lenfositlerde meydana gelen lenfoma tümör hücre tipleri de görülmektedir (Terashima vd., 2010). Kalıtsal ve kalıtsal olmayan iki tür kolon kanseri vardır. Kalıtsal kolon kanseri; Ailesel kolon polipozisi

(Familial adenomatous polyposis-FAP) ve kalıtsal kolorektal kanser (HNPCC). FAP'lı hastalarda 5. kromozomdaki APC (Adenomatous Polyposis Coli) geninde mutasyonların meydana geldiği bilinmektedir. Kolon kanserinin FAP ve HNPCC olmak üzere iki tür de otozomal dominant bir şekilde kalıtılır. Ancak çoğu durumda miras alınmamaktadır ve çevresel faktörlerin neden olduğu somatik mutasyonlardan kaynaklandığı bilinmektedir. (Aran vd., 2016).

Sporadik kolorektal tümörlerde ya APC geninde inaktivasyon ya da WNT sinyal yolunda, Axin ve β -katenin moleküllerinde aktive edici mutasyonlar sıkça gözlenir. Çalışmalar, WNT sinyal yolunun kolorektal kanserin başlangıcında önemli bir rol oynadığını göstermiştir. (Sancho vd., 2004).

Erken dönem kolon kanseri genellikle belirti göstermemektedir. Kolon kanseri hastalarında klinik tablo tümörün bulunduğu yere, büyüklüğüne ve metastazın başlamış olmasına bağlıdır. Genel olarak semptomları halsizlik, iştahsızlık, karın ağrısı, istemsiz kilo kaybı, bulantı, kusma, yorgunluk, nefes darlığı, abdominal distensi, kronik bağırsak alışkanlıklarının değişmesi ve bağırsak hareketlerindeki değişiklikler olarak bilinmektedir (Cross vd., 2019).

Kolon kanseri, çevresel etkenler, alkol ve tütün tüketimi, yaş, fiziksel hareketsizlik, alışkanlık haline getirilen sağlıksız beslenme, az meyve ve sebze alımı, genetik ve hormonal değişiklikler gibi çeşitli risk faktörlerinin bir araya gelmesiyle oluşabilen bir hastalıktır. Bu nedenle, kolon kanseri multifaktöriyel bir hastalıktır. (Fang vd., 2012).

Kolon kanserinin beslenme ile ilişkisi oldukça önemlidir. Yüksek yağ ve düşük fibrilli yapılar içeren gıdalarla beslenen toplumlarda kolon kanseri daha sık görülmektedir (Arab vd., 2003). Diyetlerde aşırı bir şekilde alınan kırmızı et ve işlenmiş et tüketimi ile azami miktarda tüketilen meyve ve sebzeler, kolon kanseri risk faktörleri arasında sayılmaktadır (Fang vd., 2012).

2.3.1. Kolon Kanserinin Başlaması ve Yayılması

Kolon kanseri genellikle yıllarca sürece kadar yavaş bir şekilde gelişmektedir. Kolon kanseri; kolonun iç duvarında kanser olmayan polip ile başlayıp doku veya tümörün büyümesi şeklinde ilerlemektedir (Terashima vd., 2010). Bazı polipler kansere dönüşebilirken bazıları herhangi bir hastalığa neden olmamaktadır. Bu durum tamamen polibin tipine bağlı olarak değişmektedir (Bond vd., 2000). Hiperplastik polip ve

adenomatöz polip olmak üzere iki tip polip bulunmaktadır. Hiperplastik polip kanserleşme öncesi durum olarak bilinmektedir. Kalın bağırsaktaki hiperplastik poliplerin kanser gelişmesi için bir risk oluşturabileceği düşünülmemektedir. Adenomatöz polip (adenoma) ise kansere dönüşebilen poliplerdir (Terashima vd., 2010). Kolonun iç duvarında gelişen poliplerde tümör oluşması durumunda, kolon veya rektum duvarının mukoza katmanında büyümeye başlamaktadır. Tümörü oluşturan hücreler, kolon duvarında bulunan kan damarları ve lenf damarlarına kadar gelişip tümörün türüne bağlı olarak yakın dokulara yayılabilmektedir. Kana veya lenf sıvısına karışan kanser hücreleri en yakın lenf nodüllerine veya kolona yakın/uzak mesafelerde bulunan vücudun farklı kısımlarına taşınabilmektedir (Ponz vd., 2000).

Kolon kanseri prognozunda 5 evre görülmektedir. Evre 0; sağlıklı hücrelerin kolon duvarının mukoza katmanında birikmeye başladığı evredir. Evre 1; kolon duvarının mukozasında biriken normal hücrelerin mukoza katmanının hemen altında bulunan submukoza katmanına sıçradığı evredir. Evre 2; bu evrede üç farklı durum bulunmaktadır. Evre IIA ikinci evrenin ilk aşaması olan bu evrede kanser kolon duvarının en dışında bulunan serosa katmanına yayılmaktadır. Evre IIB' de serosa katmanına iyice yayılan hücreler kolonun yakınlarında bulunan organlara sıçramaya başlamaktadır. Evre IIC'de kanser yakınlardaki organlara yayılmaktadır. Evre 3; önceki evrelerde kolon duvarının mukozasına yayılan ve submukozaya sıçrayıp oradan da yayılmaya başlayan kanser hücreleri bu evrede kolonda bulunan birkaç lenf nodülüne veya kolonun yakınında bulunan lenf nodüllerine yayılabilmektedir. Evre 4; son evredir. Bu evrede kanser hücreleri, yüksek metastaz göstermektedir. Kan damarları ve lenf nodülleri ile akciğer, karaciğer veya ovaryum gibi kolona yakın veya uzak vücudun çeşitli organlarına metastaz yaparak sıçrayabilmektedir (Ponz vd., 2000).

2.3.2. Kolon Kanserinin Epidemiyolojisi

Kolorektal kanserin prevalansında görülen hızın, Dünya çapında eşit şekilde yaygınlık göstermediği bilinmektedir. Kolorektal kanser insidans oranının batı kültürü olan gelişmiş ülkelerde daha yoğun olduğu bilinmektedir (Boyle vd., 2000). Gelişmiş ülkeler tüm vakalarının %63'lük dilimini oluşturmaktadır (Janout vd., 2001). İnsidans açısından ise insidansın en yüksek ve en düşük olduğu ülkeler arasında vaka sayılarında 10 kat fark var (Forman vd., 2002). 2019 yılında kolon kanserinin Dünya genelindeki total

vakalarının 101.420 kişi olduğu bilinmektedir (Siegel vd., 2019). Kolon kanseri insidansında son 10 yıl boyunca yükseliş görüldüğü ve önümüzdeki yıllarda da çoğalmaya devam edeceği tahmin edilmektedir (Arnold vd., 2017). Türkiye’de 12 ilde yapılan bir çalışmaya göre KKK (kolorektal karsinom) prevalansının tüm kanser türleri içinde kadınlarda % 7,8 oranında olduğu ve üçüncü ölüm nedeni olduğu belirtilmektedir. Erkeklerde ise % 7,5 oranında olduğu ve ölüm nedeni olarak dördüncü sırada yer aldığı bilinmektedir (Borovac vd., 2003).

2.3.3. Kolon Kanserinin Mortalitesi

Dünyada en çok görülen tümörlerden bir tanesi olan kolorektal kanser kadınlarda ve erkeklerde mortalitesi oldukça yüksek bir hastalıktır. Kanser kaynaklı ölümlerin en önde gelenleri arasında kolon kanseri yer almaktadır (Arber vd., 2005).

Kolorektal kanser, Türkiye’de en sık görülen üçüncü kanser ve dünya çapında en yaygın dördüncü kansere bağılı ölümdür (Ergenoglu vd., 1999).

2021 yılında Dünya genelinde kolon kanseri tanısı konulan 101.420 vakanın olduğu bilinmekte ve bunlardan 51.010’unun ölümle sonuçlandığı tahmin edilmektedir (Siegel vd., 2021).

2.3.4. Kolon Kanseri Etiyolojisi

Diğer kanserlerde olduğu gibi kolon kanserinin etiyolojisi tam olarak anlaşılamamıştır. Bununla birlikte, kolorektal kanserin gelişiminde birkaç faktörün rol oynadığı bilinmektedir. Kolon kanseri gelişiminde hem genetik hem de çevresel birçok risk faktörü bulunmaktadır (Baykan vd., 2010).

Kanser etiyolojisini anlamak ve farklı kanser türlerinin gelişiminde yer alan risk faktörlerini kesin olarak tanımlamak, erken teşhis ve hastalığın ilerlemesi için kritik öneme sahiptir. Kolon kanseri etiyolojisini etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Bu faktörler; diyetle bağılı faktörler, yaşam tarzı ile ilgili faktörler (sigara kullanımı, alkol tüketimi vs) ve kalıtsal faktörlerdir (Stigliano vd., 2014).

Diyete Bağılı Faktörler: Diyetin, kolorektal kanser etiyolojisinde bugüne kadar tanımlanan en büyük dışsal faktörlerden biri olduğu bilinmektedir. Gıda

alışkanlıklarındaki değişiklikler ile kolorektal kanserlerin %68'inin önlenebileceği tahmin edilmektedir (Labianca vd., 2010). Diyetle ilgili en yaygın faktörlerin folat ve kalsiyum eksiklikleri (Cole vd., 2007), artan hayvansal yağ alımı ve et tüketimi, azalan meyve ve sebze tüketimi olduğu bilinmektedir (Key vd., 2011). Alınan gıdalarda emilmeyen bitkisel liflerden fakir içeriğe karşılık zengin karbohidrat içeriğinin kolorektal kanserde risk oluşturduğu bilinmektedir. Düşük lif içeriği ve düşük dışkı hacmi, dışkının bağırsakta kalma süresini artırır. Bağırsak florasında değişikliklere neden olduğu için kolon kanserine karşı da etkili olduğu düşünülmektedir.

Potansiyel olarak toksik karbonhidrat oksidasyon ürünleri, dışkıda yüksek konsantrasyonlarda bulunur çünkü bakteriler tarafından sindirildikten sonra bu ürünler oluşur. Dışkının uzun süre bağırsaklarda kalmasıyla kolon mukozası daha uzun süre bunlara maruz kalmakta ve kolonun yapısına zarar vermektedir (Song vd., 2015). Aşırı hayvansal yağ alımı ile kolonik polip riski arasındaki ilişki iyi bilinmektedir. Yüksek yağ tüketimi, karaciğer tarafından kolesterol ve safra asitlerinin üretimini artırır. Bu asitler bağırsak bakterileri tarafından potansiyel kanserojenlere dönüştürülebilir (Davenport vd., 2018).

Diyetlerde düşük meyve ve sebze tüketiminin kolorektal kansere yakalanma riskini arttırdığı bilinmektedir (Key vd., 2011, Song vd., 2015). A, C ve E vitaminleri gibi koruyucu vitaminlerin az tüketilmesi de kolon kanseri patogeneğinde önemli rol oynar. Güçlü antioksidan özelliklere sahip olan A, C ve E gibi vitaminlerin kemoprotektan olarak kullanılabileceği bilinmektedir. Antioksidanlar, reaksiyonlar sırasında oluşan serbest radikalleri inhibe ederek DNA'yı oksidatif hasardan koruyabilirler. Bu vitaminlerin az alınması ya da alınmamasının kolon kanseri etiyolojisinde önemli olduğu düşünülmektedir (Ergenoglu vd., 1999). Yüksek miktarda kırmızı ve işlenmiş et tüketimi kolorektal kanserde risk faktörü sayılan diğer bir beslenme alışkanlığıdır (Cole vd., 2007).

2.3.5. Kolon Kanserinin Gelişiminde Rol Alan Moleküllü Mekanizmalar

Kolon kanserleri, genetik ve epigenetik değişikliklerin neden olduğu normal kolon epitel hücrelerinin invaziv denokarsinom yani istilacı kanser hücrelerine dönüşmesiyle ortaya çıkar. (Al-Sohaily vd., 2012).

Kolonik epitel hücrelerinin neoplazik sürece girmesine neden olan genetik değişiklikler iki mekanizma ile açıklanmaktadır. Biri DNA yanlış eşleşme onarım mekanizmasının aktivite kaybı ve diploidinin artışı ile ilişkili bir değişikliktir (Microsatellite instability-MSI). Diğeri, allel kayıpları ve anoploidi ile karakterize edilen kromozomal instabilitedir (genomic instability) (Boland vd., 2010).

Mikrosatelit instabilite replikasyon gerçekleşirken DNA yapısının korunmasını sağlayan MMR (Miss-match Repair) genlerindeki değişiklikler sonucu oluşmaktadır. Öte yandan, genomik instabilite, tümör baskılayıcı genlerde ve onkogenlerde tümörigenez için yeterli sayıda değişikliği kademeli olarak tetikleyerek adenom ve karsinom oluşumunda önemli bir rol oynar (Grady vd., 2008).

Fearon ve Vogelstein kolorektal kanser başlaması ve ilerlemesinde rol oynayan moleküler mekanizmaları bu şekilde tanımlamaktadır (Fearon vd., 1990).

- 1) Kolorektal tümörler; tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu veya onkogenlerin aktivasyonu ile oluşmaktadır.
- 2) Benign tümör oluşumu için az sayıda gen mutasyona uğramalıdır ancak malign bir tümörün oluşması için en az dört veya beş genin mutasyona uğraması gerekir. Sıklıkla mutasyonun gerçekleştiği onkogen ve tümör baskılayıcı genler belirlenmiştir. Bu genler, onkogenler rasK ve B-raf'ı inaktive eden mutasyonlar, WNT sinyal yolunun bileşenleri olan APC'yi inaktive eden ve β -katenin'i stabilize eden mutasyonlar ve tümör baskılayıcı gen p53'ü inaktive eden mutasyonlardır. Ayrıca TGF- β sinyal yolağında tümör baskılayıcı proteinlerdeki mutasyonlar olarak tanımlanırlar (Cooper vd., 2006).
- 3) Herhangi bir mutasyona uğramış tümör baskılayıcı gen, heterozigot bir ortamda bile fenotipik etkilerini gösterme eğilimindedir. Bu model, özellikle otozomal baskın özellikteki FAP ve polipozisle birlikte olmayan HNPCC gibi genetik yatkınlıkla sonuçlanan iki bozukluğun özelliklerini aydınlatmak için özellikle önemlidir. (Fearon ve Vogelstein 1990). Hücre proliferasyonu, apoptoz, hücre farklılaşması, anjiyogenez, ölümsüzleşme, invazyon, genomik ve epigenomik instabilite gibi karsinogenezdeki anahtar olayları düzenleyen genlerdeki mutasyonlar, kolorektal kanserin patogeneğinde rol oynar. (Cooper vd., 2006).

2.3.6. Kolon Kanserinde Rol Alan Genler

Kolorektal kanser başlaması ve ilerlemesinde rol alan genetik değişiklikler, protoonkogenlerin aktivasyonu ve aşırı ekspresyonu ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ya da az ekspre edilmesi şeklinde açıklanmaktadır. Herhangi bir kanser türünün başlaması ve ilerlemesi için birden fazla gende çok sayıda mutasyonun meydana gelmesi ve zaman içerisinde birikmesi gerekmektedir (Borovac vd., 2003).

2.3.6.1. Onkogenler

Protoonkogenler, hücre büyümesinin kontrolünde ve hücrede uyarının iletiminde rol oynayan genlerdir ve normalde inaktiftirler. Sağlıklı hücrelerde hücre proliferasyonu kontrollü bir şekilde gerçekleşmektedir. Bu dengeyi koordine eden protoonkogenlerde mutasyon meydana geldiğinde anormal bir şekilde kontrolsüz hücre çoğalmalarına neden olan onkogenler oluşmaktadır. Onkogenler, bir veya birden fazla mutasyonun meydana geldiği genlerdir. Meydana gelen mutasyonlarla bu genlerin proteinleri aşırı bir şekilde ekspre edilir (Fışkın vd., 2002). Onkogenlerin uygun olmayan aşırı aktiviteleri, hücre yüzeyinden çekirdeğe iletilen mesajların anormal bir şekilde iletilmesini sağlar. Böylece hücre proliferasyonunun anormal olarak hızlı ve kontrolsüz olmasına neden olurlar. Sonuç olarak da bu genlerin aşırı aktivitesi tümör oluşumuna yol açar (Imura vd., 2000). Onkogenler büyüme faktörlerini, büyüme faktörü reseptörlerini ve transkripsiyon faktörlerinin üretimini arttırarak apoptozu baskılayıp kansere neden olmaktadır (Croce vd., 2008). İnsanlarda görülen kolorektal kanserlerde RAS protoonkogen mutasyonları en sık görülen genetik değişikliklerdendir (Saxena vd., 2008).

RAS Geni Ailesi: RAS (rat sarcoma) gen grubuyla ilgili çalışmalar 1960'lı yılların başlarında farelerde, lösemiye neden olan bir virusun tanımlanmasıyla başlamıştır. RAS protoonkogenleri, onkogen gen grubu içerisinde izole edilen ilk genlerdir (Saxena vd., 2008).

GTPaz RAS ailesinin her bir üyesi, proteinin N- ve C-terminallerinde korunan yaklaşık 190 amino asit kalıntısına sahiptir (Adjei vd., 2001). Proteinin C terminali, RAS proteinleri arasında değişiklik gösterir. C terminaline bitişik, yaklaşık 25 amino asitlik bir

değişken bölgedir. Bu bölge, RAS ailesi üyelerinin çeşitli işlevleri yerine getirmesini sağlayan en önemli kısımdır (Karnoub vd., 2008).

K-Ras (Kirsten Rat Sarkoma) geni, RAS gen ailesinin bir üyesidir ve viral onkogen homologudur. (Monticone vd., 2008). K-Ras geni, 12. kromozomun 12p12.1 bölgesinde bulunur ve toplamda altı ekzondan oluşur. K-Ras proteininin boyutu 21 kDa'dır ve 189 amino asitten oluşan bir küçük GTPazdır. K-Ras, hücrenin sitoplazmik bölgesinde bulunan bir protein olarak lokalize olur (Wicki vd., 2010).

İnsan kanserlerinde RAS protoonkogeni mutasyonları, kolorektal kanserlerde en yaygın görülen genetik değişiklikler arasındadır (Saxena vd., 2008). RAS genindeki mutasyonlar, yumurtalık, mide, yemek borusu, meme ve prostat dahil olmak üzere birçok kanser türünde nadir olarak görülür (Almoguera vd., 2000). Pankreas adenokarsinomlarının tamamında ve kolon kanserlerinin %50'sinde RAS mutasyonları görüldüğü bilinmektedir (Sameer vd., 2009). RAS proteini, özellikle embriyonik dönemde aktif bir rol oynar. Ancak, yetişkin bir insanda da hücre proliferasyonu yüksek olan dokularda aktif olarak bulunur (Karnoub vd., 2008).

Tümör hücrelerinde, RAS gen ailesinde bazı "hot spot" bölgelerinin nokta mutasyonlara yatkın olduğu bilinir. En sık rastlanan RAS mutasyonları, 12. kodonda glisin amino asidinin valin ile yer değiştirmesi, 13. kodonda glisin amino asidinin sistein ile yer değiştirmesi ve 61. kodonda glutamin amino asidinin lösin, arginin veya lizin ile değiştirilmesi şeklinde gerçekleşir. Bu mutasyonlar, ekzon 12, 13 ve 61'deki "hot spot" kodonlarda spesifik amino asit değişikliklerine yol açar. Bu durum, GTPaz aktivitesinin kaybıyla sonuçlanır. (Karnoub vd., 2008).

2.3.6.2. Tümör Süpresör Genler

Antionkogen ya da tümör baskılayıcı genler olarak da bilinen tümör süpresör genler, hücre proliferasyonunu inhibe eden bir grup genlerdir. Tümör süpresör genlerin allellerinde görülen işlev kaybı, hücrenin kontrolsüz olarak bölünmesine ve tümör büyümesine neden olmaktadır (Pazarbaşı vd., 2003). Tümör süpresör genlere örnek olarak; apoptozis mekanizmasında etkili olan antiapoptotik proteinler, hücre siklusu kontrol proteinleri,

DNA hasar tamiri proteinleri verilebilir. Tümör süpressör genlerin en iyi bilineni ve kanserle ilgili en çok çalışılanı p53 genidir (Kopnin vd., 2000).

Zamanla biriken mutasyonlar sonucu kolorektal kanserlerin gelişiminde rol oynadığı bilinen belli başlı tümör baskılayıcı genler; p53 (Kikuchi vd., 2002), APC (Goss vd., 2000), DCC'dir (Kolorektal Kanserde Silinen Bölge) (Borovac vd., 2003).

2.4. Apoptoz

Apoptoz, organizmadaki işlevselini tamamlamış veya hasarlı hücrelerin çevre hücrelere zarar vermeden ortadan kaldırılmasını sağlayan, genetik olarak kontrol edilen ve programlanan bir hücre ölümüdür. Yunancada ağaçların yapraklarının dökmesi anlamına gelen apoptozis terimi, ilk kez 1972'de kullanılmış ve organizmanın homeostazisi için gerekli bir mekanizma olarak değerlendirilmiştir. Tüm hücreler doğar, çoğalır, farklılaşır ve ölür. Bütün bu olaylar doğal bir düzen içinde ilerler. Doku homeostazı, yani düzenin oluşması ve bozulması, apoptoz ve proliferasyon arasında sağlıklı bir dengenin sağlanmasına bağlıdır. Apoptozis süreci boyunca hücre zarı sağlamdır. Bu nedenle inflamasyona neden olmaz. Apoptoz, işlevsiz hücreleri ortadan kaldırmak için pro-apoptotik ve anti-apoptotik moleküllerin karşıt etkileşimleri tarafından kontrol edilen programlanmış bir hücre ölümüdür. İlgili araştırma alanlarında hala pek çok muamma olsa da, apoptozun çok hücreli organizmalara koordineli bir şekilde avantajlar sağladığı, bu sayede organizmaların homeostazı koruduğu ve yaşam döngüsüne ince ayar yaptığı iyi bir şekilde belgelenmiştir (King vd., 1998). Apoptoz, insan ve embriyonik gelişimde fizyolojik olarak gerçekleşir. Fetal el ve ayak parmakları arasındaki doku kaybı, embriyonik gelişimde apoptozun en önemli örneğidir. Yine menstrüel siklusta endometriyal parçalanma apoptoz yoluyla gerçekleşir. Apoptozun mitokondriyal yolunun aktivasyonuna, DNA hasarı, yanlış katlanmış proteinler ve radyasyon ve ilaç kullanımıyla ilişkili viral enfeksiyonlar aracılık eder (Celepli vd., 2020). Bir hücrenin apoptoz veya nekroz geçirip geçirmeyeceği, uyarının tipine ve/veya uyarının derecesine göre belirlenir. Sıcaklık, radyasyon, hipoksi ve sitotoksik antikanser ilaçlar gibi çeşitli toksik uyarılar düşük dozlarda apoptozu indükleyebilirken, aynı uyarılar yüksek dozlarda nekrozu indükleyebilir. Kısacası, apoptoz, kaspazlar adı verilen bir grup sistein proteazın

aktivasyonunu ve ilk uyarılara bağılı olarak hücrelerde karmaşık ve koordineli bir olaylar dizisini içeren büyük ölçüde enerjiye bağımlı bir süreçtir (Paweletz N vd., 2001).

Apoptoz iki şekilde başlatılır: mitokondriyal (içsel) veya dışsal (eksojen). İçsel apoptotik yollar, hücre içi strese yanıt olarak aktive edilir. Ekstrinsik apoptotik yol, ölüm ligandlarının plazma zarı üzerindeki ilgili ölüm reseptörlerine bağlanmasıyla aktive edilir. Mitokondriyal ve dışsal sinyal yolları, çeşitli hücrel uyarılara yanıt olarak indüklenir, ancak her iki sinyal yolu da sonuçta kaspaz-3 aktivasyonu ile sonuçlanır (Matsuura vd., 2016).

Ekstrinsik ölüm reseptörü yolu, bir ölüm ligandının bir ölüm reseptörüne bağlandığında başlar. Fas (CD95) adı verilen ilgili bir protein, ligandlarından biri olan Fas ligandı (FasL) ile etkileşime girerek bu yolu etkinleştirir. Diğer bir önemli ölüm reseptörü ise tip 1 TNF reseptörü (TNFR1) olarak bilinir ve TNF ligandı ile etkileşime geçerek ekstrinsik ölüm reseptörü yolunu tetikleyebilir (Hengartner vd., 2001). Kaspaz 8 gibi sistein proteazlarını ve TNF reseptörü ile ilişkili ölüm alanı (TRADD) ve Fas ile ilişkili ölüm alanı (FADD) gibi adaptör proteinlerini içeren ölüm reseptörleri, hücre içinde ölüm sinyallerini ileten özel alanlara sahiptir (Schneider vd., 2000). Ölüm ligandları ölüm reseptörlerine bağlandığında, adaptör protein için bir bağlanma bölgesi oluşur. Bu bağlanma bölgesi, ölüm reseptörü, ölüm ligandı ve adaptör proteininden oluşan bir kompleksin oluşmasına yol açar. Bu kompleks, ölüme neden olan sinyal kompleksi (DISC) olarak adlandırılır. DISC, ölüm sinyalini ileten kritik bir yapıdır (O'Brien vd., 2008). DISC, daha sonra procaspase-8'in alımını ve aktivasyonunu başlatır. Bu enzimin aktif formu kaspaz-8'dir, diğer akış aşağı veya yürütme kaspazlarını parçalayarak apoptozu başlatan bir başlatıcı kaspazdır. Kaspaz-8, hücre içi ölüm sinyalini ileten bir anahtar oyuncudur ve apoptoz sürecinin başlangıcını sağlar. (Karp vd., 2009).

İçsel yol, hücre içinde başlatılan bir sinyal yoludur. İçsel uyarıcılara örnek olarak geri dönüşümsüz genetik hasar, hipoksi, yüksek sitozolik kalsiyum konsantrasyonları ve yoğun oksidatif stres gibi faktörler gösterilebilir. Bu iç uyarılar, mitokondriyal sinyalleşmenin içsel yolunu tetikleyerek hücre içinde apoptoz sürecini başlatır (Karp vd., 2009). Bağımsız olarak uyarılmış olan bu yol, mitokondriyal geçirgenliğin artmasına ve sitokrom-c gibi pro-apoptotik moleküllerin sitoplazmaya salınmasını artırır. Bu durum,

apoptoz sürecinin bir sonucudur. (Danial vd., 2004). Bu yol, foliküler non-Hodgkin lenfoma gibi bir kanser türünde kromozom 18 ile 14'ün translokasyonuna bağlı olarak meydana gelen kromozomal kırılma noktasından sonra BCL2 genine ait bir protein tarafından düzenlenen Bcl-2 ailesi tarafından yakından kontrol edilen bir yol olarak bilinir (Tsujimoto vd., 1984). Bcl-2 proteinlerinin iki temel gruptan oluştuğu bilinmektedir. Bunlar, proapoptotik proteinler ve anti-apoptotik proteinlerdir. Proapoptotik proteinler arasında Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim ve Hrk bulunurken, anti-apoptotik proteinler arasında Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1 ve Mcl-1 yer almaktadır (Reed vd., 1997). Anti-apoptotik proteinler, apoptozu düzenlemek için sitokrom-c'nin mitokondriyal salınımını engelleyerek etki gösterir. Öte yandan, pro-apoptotik proteinler ise bu salınımı teşvik ederek apoptozu başlatır. Bu nedenle, apoptozun başlatılıp başlatılmayacağı, mutlak protein miktarıyla değil, pro- ve anti-apoptotik proteinler arasındaki dengeyle belirlenir (Reed vd., 1997). Mitokondriyal transmembran boşluktan sitoplazmaya salınan diğer apoptotik faktörler arasında apoptozu indükleyen faktör (AIF), mitokondriyal türevli sekonder kaspaz aktivatörü (Smac), Düşük pI'li (DIABLO) IAP Bağlayıcı protein ve Omi/yüksek sıcaklık gereksinim proteini (HtrA2) bulunur (Kroemer vd., 2007). Sitokrom c'nin sitoplazmik salınımı, apoptozom adı verilen bir kompleksin oluşumu yoluyla kaspaz 3'ün aktive edilmesini sağlar. Bu kompleks, sitokrom c, Apaf-1 ve kaspaz 9'dan oluşur (Kroemer vd., 2007). Bununla birlikte, Smac/DIABLO veya Omi/HtrA2 gibi apoptoz proteinleri, IAP'lerin (İnhibitör Apoptozis Proteinleri) inhibitörlerine bağlanarak kaspaz aktivasyonunu destekler. Bu bağlanma, IAP'lerin kaspaz-3 veya -9 ile etkileşimini bozar (Kroemer vd., 2007; LaCasse vd., 2008).

2.4.1. Kolon Kanseri ve Apoptoz

Kanser, vücudumuzda bulunan hücrelerin bir kanser kök hücresi aracılığıyla aşırı ve zamansız çoğalmalarıyla gerçekleşen çok basamaklı bir süreçtir. Oluşumu, gelişimi ve sonuçları hastadan hastaya değişen karmaşık bir hastalıktır. Kanser, hücrelerin aşırı büyüyen ve kontrolden çıkan, bağışıklık sistemi kontrolünden kaçan, uzak dokuları istila eden ve metastaz oluşturan metabolik ve davranışsal değişikliklere uğradığı çok adımlı bir süreçtir. Kanser hücreleri; kendi bölünme sinyallerini üretimi, bölünmede dur sinyallerine karşı duyarsızlık, doku invazyonu ve metastaz, sınırsız bölünme potansiyeli, anjiyogenezin sürdürülmesi, apoptozdan kaçış gibi özellikleri vardır. Kolon kanseri,

gastrointestinal sistemin en yaygın kanserlerinden biridir. Kolorektal kanser, hem erkeklerde hem de kadınlarda tüm kanserlerin yaklaşık yarısını oluşturur (Jemal A vd., 2009). Karsinogenez ve kemorez direncine katkıda bulunan apoptotik hücre ölümüne direnç, kolorektal kanserin önemli bir özelliğidir (Hanahan vd., 2011). Kanser hücrelerinde apoptoz ve apoptotik bozuklukların düzenlenmesinde yer alan mekanizmaların daha iyi anlaşılmasıyla, bu hücrel programın kanser tedavisinde kullanım için yeni fırsatlar sunabileceğine inanılmaktadır (Fulda S vd., 2015). Bundan dolayı, tümör hücrelerinde apoptozun indüksiyonu, kolon kanseri tedavisi için potansiyel bir mekanizmadır.

Tümör büyümesi yalnızca proliferasyon hızına değil, ayrıca apoptoz hızına da bağlıdır. Örnek olarak, Bcl-2 ekspresyonu, normal kolonik epitelyumun kriptleri boyunca yukarı doğru azalır ve en yüksek ekspresyon tabanda ve minimum miktarlar kript ucundadır (Hockenbery DM vd., 1991). Bu, kriptlerin tabanında hücre bölünmesine izin vermek için programlanmış ölümü önleme ihtiyacını gösterir, ancak kolonik kript boyunca hücre olgunlaştıkça ve yaşlandıkça apoptoz uyarılır. Bağırsak hücrelerinin bir saldırı ile karşılaştıklarında programlanmış hücre ölümüne maruz kalamaması, habis dönüşüm eğiliminin önemli bir göstergesidir (Huerta, S vd., 2006).

Kolon kanserinde apoptoz daha önce gözden geçirilmiştir. Bununla birlikte, apoptoz alanında son birkaç yıldaki keşifler ve kolon karsinogenezinin moleküler yönleri, bu önemli tümörjenez mekanizmasını yeniden gözden geçirmeyi zorunlu kılmaktadır. Bu yeni içgörüler, gelecekteki araştırmalar için kanser hücrelerinin kemoterapötik direncinde ve bağışıklık sisteminden kaçmada belirli hedefleri ima ediyor (Huerta, S vd., 2006).

Apoptozun kolon kanserindeki rolü, adenom öyküsü olan hastalarda normal mukozada bile belirgindir. Örneğin, rezeke edilmiş adenomları olan hastalardan takip kolonoskopisi sırasında alınan mukozal biyopsi örnekleri, adenom öyküsü olmayan hastaların mukozasına kıyasla azalmış apoptoz gösterir. Bu, adenom öyküsü olan hastaların görünüşte normal mukozasında malignite eğilimi olduğunu düşündürür (Anti M vd., 2001).

Kanserde en sık görülen mutant gen olan tümör baskılayıcı p53, apoptozun düzenlenmesinde ve vücudun kansere karşı korunmasında çok önemli bir rol oynar. p53 proteini, DNA hasarını takiben post-translasyonel modifikasyonlar tarafından aktive

edilen ve stabilize edilen bir transkripsiyonel faktördür (Cadwell vd., 2001). Genellikle p53, işlevini, esas olarak hücre döngüsü durması ve apoptozun düzenlenmesinde yer alan hedef genlerin işlem yapması yoluyla yürütür (Chipuk vd., 2004; Samuel vd., 2002). DNA hafifçe hasar gördüğünde, p53'ün aktivasyonu, DNA onarımının ilerlemesine izin vermek için p21'i hedefleyerek G1 fazı hücre döngüsünün durmasına ve ardından sikline bağımlı kinazların inhibisyonuna neden olur. Bununla birlikte, DNA hasarı ciddiye ve başarılı bir şekilde onarılamazsa, p53, mitokondriyal dış zar geçirgenliği, sitokrom c salınımı ve kaspaz aktivasyonu için gerekli olan Bax'ı hedefleyerek apoptozu tetikler (Attardi vd., 2004). Ek olarak, anti-apoptotik protein Bcl-2 de vahşi tip p53 tarafından baskılanır ve p53 tarafından aşağı regülasyonu apoptozu teşvik eder (Hemann vd., 2006).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. MATERYALLER

3.1.1. Kullanılan Malzemeler

- RPMI 1640 besiyeri (BI- Biological Industries)
- Fötal Sığır Albümin (FBS) (Dr. Zeydanlı Hayat Bilimleri Tic. Ltd. Şti.)
- Penisilin-Streptomycin (BI- Biological Industries)
- Santrifüj tüp 15ml (ISO lab)
- HT-29 (ATCC)
- Filtreli 25 cm²-75 cm² Hücre Kültürü Şişeleri (SPL Life)
- Filtresiz 75 cm² Hücre Kültürü Şişeleri (SPL Life)
- Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) (BI- Biological Industries)
- Trypsin-EDTA (BI- Biological Industries)
- Cryo Tüp (Corning Incorporated)
- Dimetil sülfoksit (DMSO) (AppliChem Panreac)
- Thoma Lamı (Tiefe Depth Profondeur)
- 96 Kuyucuklu Mikroplak (SPL Life)
- XTT Kit (BI- Biological Industries)
- MPC-3100 (AdooQ Bioscience)
- EGCG (AdooQ Bioscience)
- RIPA Buffer (SERVA)
- 5ml'lik Steril Enjektör (Beybi)
- Santrifüj tüp 2 ml (Lab Solute)
- RNA İzolasyon Kiti (Favorgen Biotech Corp)
- Mikropipet Uçları (Biofil)

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

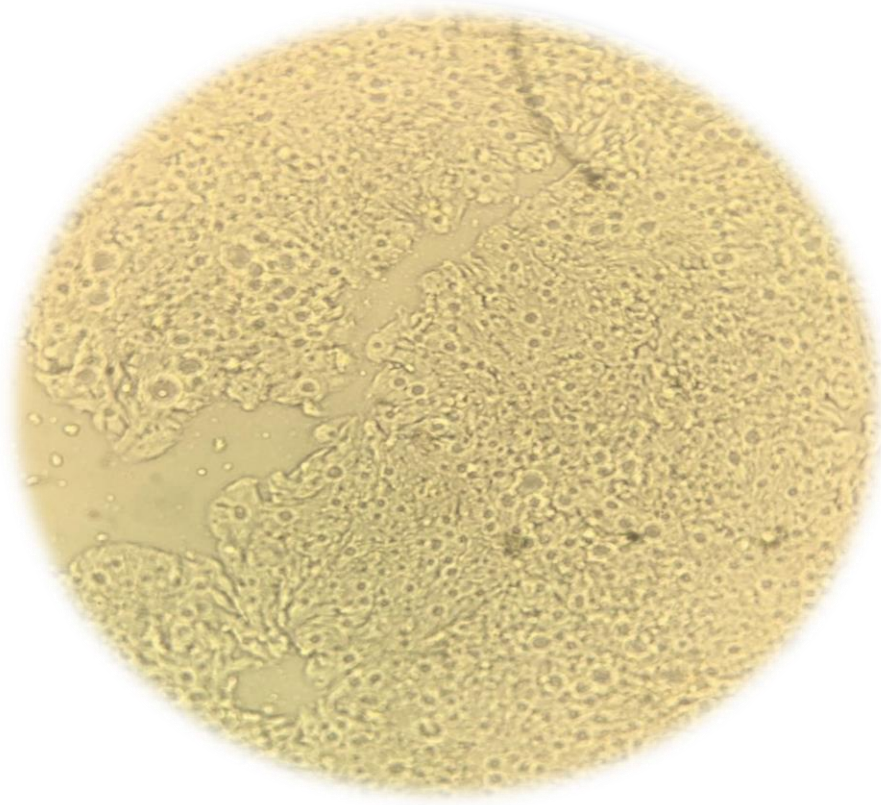
- Ultrasonik Banyo (Çalışkan Lab.)
- Santrifüj (Hermle Z 306)
- Vorteks (Boeco Germany V-1 Plus)
- CO₂'li İnkübatör (Çalışkan Lab.)
- Ayarlanabilir Mikro Otomatik Pipet (Eppendorf)
- Elektrikli Otomatik Pipet (Gilson)
- -20°C Buzdolabı (Arçelik)
- Flow Kabin (Biobase BSC-1300IIA2-x)
- Inverted Mikroskop (Olympus Ckx53)
- Masa Üstü Bilgisayar (Hp)
- Otoklav (HMC HV-50L)
- -80°C Buzdolabı (Haier Bio-medical ultra low temperature)
- Buzdolabı (Arçelik)
- Mikropłaka Okuyucu (Infinite® 200 PRO)
- Mikrosantrifüj (Himac CT15E)
- -20°C Buzdolabı (Arçelik)

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. Hücre Kültürü

3.2.1.1. Kullanılan Hücre Hattı

Bu tez çalışmasında HT-29 (kolorektal adenokarsinoma) insan kanser hücre hattı, okulumuz tarafından daha önce ATCC'den satın alınmış olup, hücre kültürü laboratuvarında bulunan stoklardan kullanılmıştır.



Şekil 5. HT-29 (kolorektal adenokarsinoma) insan kanser hücre hattı

3.2.1.2. HT-29 Hücreleri İçin Hücre Kültürü Koşulları

Hücreler % 10 Fetal Bovine Serum (FBS), % 1 penisilin– streptomisin antibiyotik, % 90 1 L-Glutaminli Roswell Park Memorial Institute Media (RPMI 1640) besiyeri ortamında 37°C sıcaklık, %5 karbondioksit (CO₂) ve %95 nemli ortam içeren CO₂ inkübatörü içerisinde ve 25-75 cm² lik hücre kültürü flasklarında büyütülmüştür. Hücreler inverted mikroskop ile düzenli olarak takip edilmiştir.



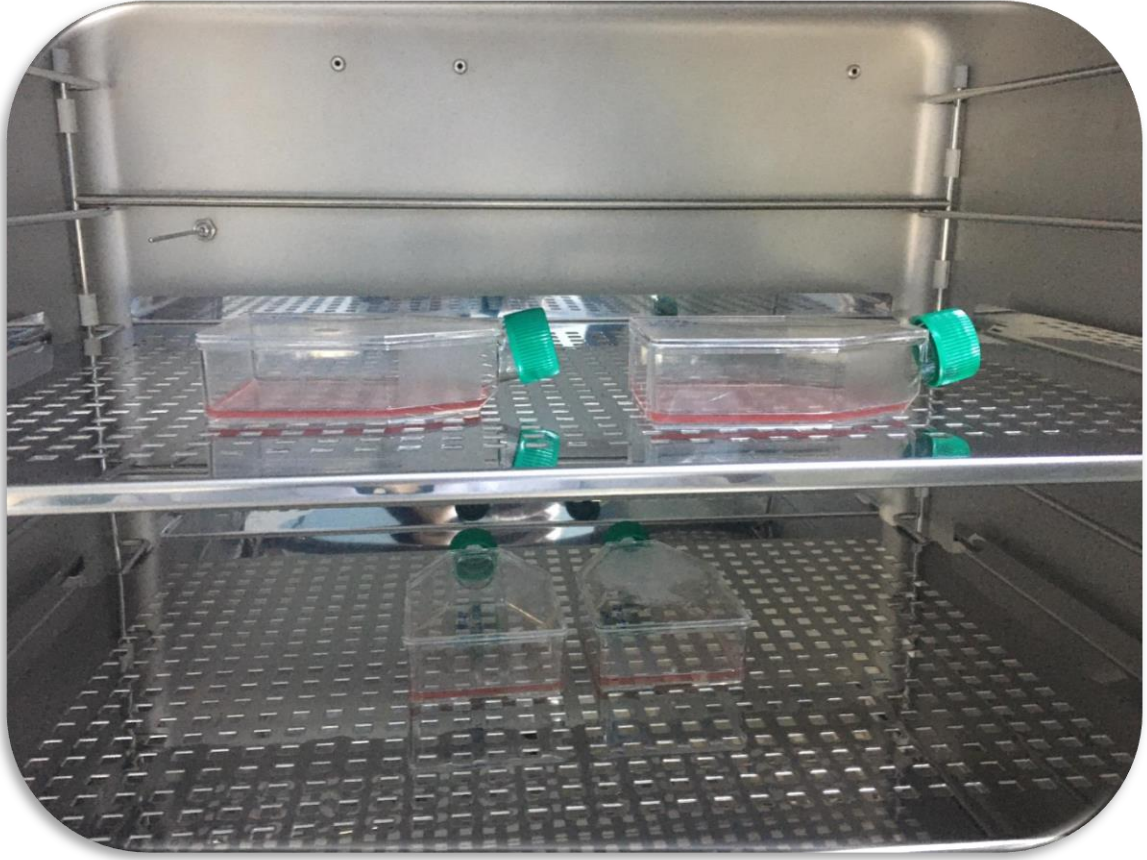
Şekil 6. Flow kabindeki hücre kültürü çalışmaları

3.2.1.3. HT-29 Hücrelerinin Pasajlanması ve Hücre Sayımı

HT-29 hücreleri, hücre kültür flasklarında yaklaşık %80 oranında yoğunluğa ulaştığında hücre kültürü laboratuvarında tripsinizasyon adı verilen yöntem ile pasajlanmıştır. Pasajlamak için önce hücre kültürü flasklarındaki medium uzaklaştırılmıştır. Tripsin-EDTA çözeltisinin etkili olabilmesi için hücreler soğuk dPBS ile yıkanmıştır ve 5-6 ml kadar Tripsin-EDTA çözeltisi ile hücreler muamele edilerek 5 dk CO₂ inkübatörde bekletilmiştir. Ardından inverted mikroskobu aracılığıyla hücrelerin yüzeydeki durumu gözlemlenmiş, hücrelerin yüzeyden kalkıp kalmadığına bakılmıştır. Hücrelerin yüzeyden kalkması durumunda, hücre flasklarına Tripsin-EDTA çözeltisi hacminin en az iki katı kadar serumlu besiyeri ile inhibe edilir. Hücreler pipetlenerek tek hücre süspansiyonu haline getirilir ve bir falkon tüpe aktarılır. Hücre süspansiyonu 1200 rpm’de 5dk santrifüjlenir ve süpernatant uzaklaştırılır. Hücreler 1 ml besiyerinde sulandırılır ve sayılır. Hücre kültür flasklarına ekimler yapılır.

3.2.1.4. HT-29 Hücre Hattından Stok Alma ve Dondurma

Hücre kültürü flasklarındaki medium uzaklaştırılmıştır. Tripsin-EDTA çözeltisinin etkili olabilmesi için hücreler soğuk dPBS ile yıkanmıştır ve 5-6 ml kadar Tripsin-EDTA çözeltisi ile hücreler muamele edilerek 5 dk CO₂ inkübatörde bekletilmiştir. Ardından inverted mikroskobu aracılığıyla hücrelerin yüzeydeki durumu gözlemlenmiş, hücrelerin yüzeyden kalkıp kalmadığına bakılmıştır. Hücrelerin yüzeyden kalkması durumunda, hücre flasklarına Tripsin-EDTA çözeltisi hacminin en az iki katı kadar serumlu besiyeri ile inhibe edilir. Hücreler pipetlenerek tek hücre süspansiyonu haline geririlir ve bir falkon tüpe aktarılır. Hücre süspansiyonu 1200 rpm’de 5dk santrifüjlenir ve süpernatant uzaklaştırılır. Falkon tüpü kuru buz içine yerleştirilmiş ve işlemin devamı orada gerçekleştirilmiştir. Falkon tüpünde kalan hücrelere %10 DMSO ve %90 FBS olarak hazırlanan karışımdan 1 ml ekleyip pipetaj yapılmıştır. Daha sonra hücreler, kriyovial tüplere aktarılmıştır. Stoklar – 80°C’ye alınarak saklanmıştır.



Şekil 7. CO₂ inkübatörde inkübe olan hücreler

3.2.1.5. Stoktaki HT-29 Hücrelerinin Çözülmesi

-80°C’den alınan kriyovialler, aseptik şartlarda 37°C su banyosunda çözdürülmüştür. Stoktaki hücrelerin tamamı 30 ml RPMI-1640 mediumu içeren falkon tüpe aktarılmıştır. 1200 rpm’de 5dk santrifüjden sonra süpernatantlar uzaklaştırılmıştır. Hücreler % 10 Fetal Bovine Serum (FBS), % 1 penisilin– streptomisin antibiyotik, % 90 ı L-Glutaminli Roswell Park Memorial Institute Media (RPMI 1640) besiyeri içeren 75cm²’lik filtreli flasklara yerleştirilmiştir. 37°C’de %5 CO₂ içeren CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir.

3.2.1.6. Hücrelerin Medium Değişimi

Hücre kültürü flasklarındaki medium uzaklaştırılmıştır. Bir miktar dPBS ile hücreler birkaç sefer pipetaj yapılarak kontrollü bir şekilde yıkama yapılmıştır. Hücre kültürü flaskındaki dPBS uzaklaştırılarak, medium karışımından ekleme yapılarak medium değişimi gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. Etken Maddelerin Hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan MPC-3100 ((2S)-1-[4-[2- [6-amino-8-[(6-bromo-1,3- benzodio xol-5 -yl)thio]-9H- purin-9-yl] etil]-1 - piperidinil] -2-hidroksi-1- propanon) (AdooQ Bi oscience, 958025-66-6, >98%, 10 mg) ve EGCG (Epigallocateşin Gallat) (AdooQ Bio science, 989-51-5, >%98, 250 mg) ticari olarak temin edilmiştir. Stok solüsyon olan MP C-3100 500 µl’de ve EGCG ise 1200 µl DMSO içerisinde çözülerek hazırlanmıştır ve d aha sonra -20°C’de saklanmıştır. DMSO ile yapılan çözme işleminin sonunda EGCG 0,4 545 µM, MPC-3100 0,0364 µM olarak stok solüsyonları hazır hale gelmiştir. Hücre kült ürü deneylerinde kullanılan etken maddelerin farklı konsantrasyonları hücrelerin büyüm esi için kullanılan medyum ile seyreltilerek elde edilmiştir.

3.2.3. XTT Testi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi

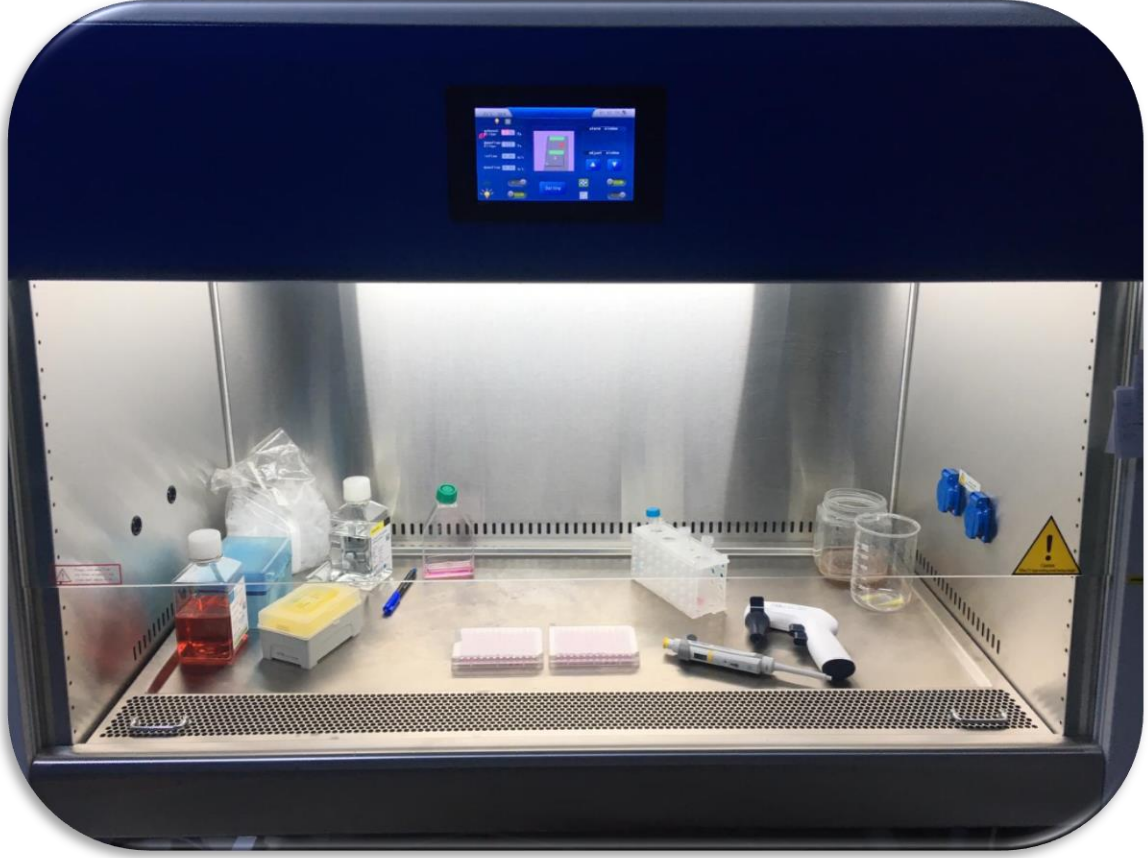
XTT canlılık testi, proliferasyonu ve hücre canlılığını ölçen bir tür sitotoksiste testidir. Bu prosedürün amacı, hücre canlılığını ve hücre proliferasyonunu belirlemek için hücrelerdeki mitokondriyal dehidrojenaz kapasitesini kullanmaktır (Kocaoğlu 2014). XTT test yöntemi, sarı XXT ((2,3-Bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-

5- karboksianilit tuzu)) tetrazolyum tuzunun (XTT) metabolik olarak aktif hücreler tarafından turuncu bir formazan boyasına ayrılmasına dayanır. Bu dönüşüm sadece canlı hücrelerde gerçekleşir. Formazan boyaları sulu çözeltilerde çözünür ve doğrudan bir spektrofotometre ile ölçülebilir. Bu şekilde ortamdaki canlı hücre miktarı belirlenebilir (Scudiero vd., 1988; Roehm vd., 1991).

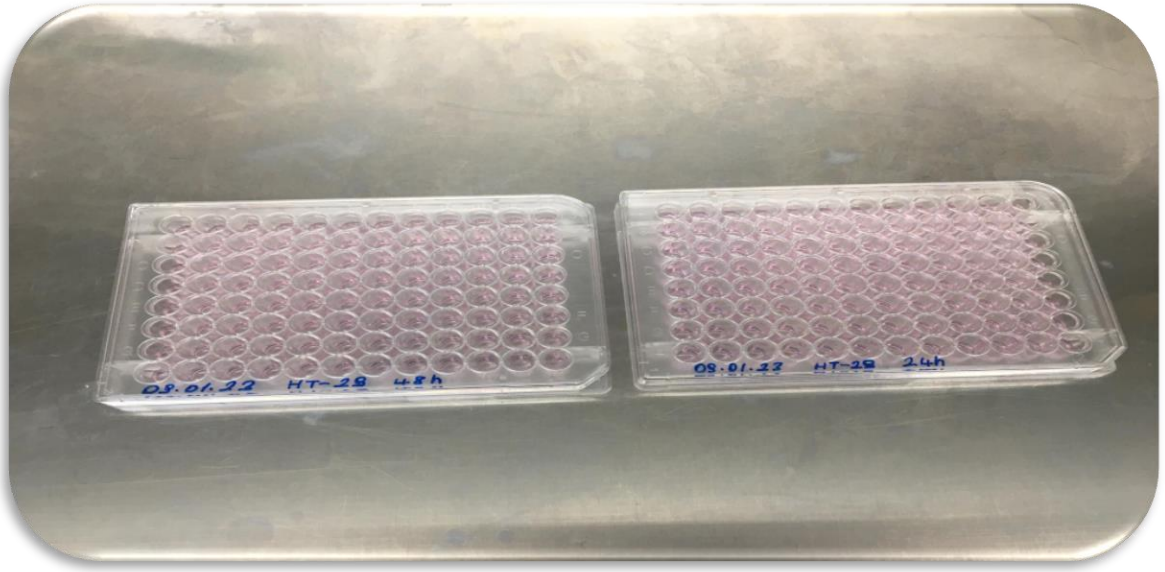
XTT Testi Protokolü;

- 1) 75cm²'lik filtreli flasklara ekilen hücrelerin %80 doluluğa ulaşması beklenmiştir.
- 2) Flasklar %80'lik doluluğa ulaştığında tripsinizasyon işlemi yapılarak pasajlanmıştır.
- 3) Thoma lamında yapılan sayma işleminden sonra 2 adet 96 kuyucuklu paletlere 5000hücre/kuyucuk olacak şekilde ekim yapılmıştır.
- 4) 200 µM EGCG ve 100 µM MPC-3100 ve 200 µM EGCG+100 µM MPC-3100 konsantrasyonları hazırlanmıştır.
- 5) Paletler, 37 °C ve %5 CO₂ ortamlı inkübatörde 24 saat inkübe edilmiştir.
- 6) İnkübe edildikten sonra her bir paletin ilk sıra kuyucuklardaki medyumları uzaklaştırılmıştır.
- 7) İlk dört sıraya EGCG, sonraki dört sıraya MPC-3100, son dört sıraya ise EGCG+MPC-3100 hazırlanan konsantrasyonlardan 200 µL şeklinde her bir kuyucuğa ilave edilmiştir.
- 8) Paletler ilk sıradan son sıraya kadar sırayla %50 oranla seyreltme işlemi yapılmıştır. Son sıra kontrol grubu olarak belirlendiği için etken madde konulmamıştır.
- 9) Bir inkübatörde, birinci palet 24 saat boyunca, ikinci palet ise 48 saat boyunca %5 oranında CO₂ ve 37 °C sıcaklıkta inkübe edildi.
- 10) Her kuyucuğa 50 µL XTT solüsyonu eklendi, aktive edildi ve 4 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında, 450nm dalga boyunda mikropipetle okuyucu kullanılarak absorbans değerleri ölçüldü.
- 11) Hücre canlılığı yüzdesi, aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı:
% hücre canlılığı = (1 - Absorbans (muamele grubu) / Absorbans (kontrol grubu))
x 100

Hücre canlılığı, formül ve oluşturulan büyüme eğrisi kullanılarak hesaplandı. IC50 değerleri, büyüme eğrisi denklemi kullanılarak hesaplandı.



Şekil 8. Flow kabinde XTT test çalışmaları



Şekil 9. HT-29 hücrelerine XTT testi (24-48 saat) uygulama sonrası görüntüsü

XTT Solüsyonlarının Hazırlanması;

XTT reaktif solüsyonunu ve aktivasyon solüsyonunu kullanımdan hemen önce 37°C'lik bir banyoda çözündürülmüştür. Berrak solüsyonlar elde edilene kadar hafifçe sallanmıştır. Bir plaka (96 kuyucuk) için yeterli bir reaksiyon solüsyonu hazırlamak için 5 ml XTT reaktifine 0,1 ml aktivasyon solüsyonu eklenmiştir.

3.2.4. Hücre Kültüründen RNA İzolasyonu

MPC-3100 50 μ M, EGCG 100 μ M, MPC-3100 50 μ M+EGCG 100 μ M olacak şekilde ayrı ayrı medyumlu karışımlar içeren total hacim 5 ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Hücre kültür flasklarında yaklaşık %80 oranında yoğunluğa ulaştığında, flasktaki medyumlar uzaklaştırılarak hazırlanmış olan karışımlar ayrı ayrı flasklara eklenerek 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra tripsinize edilen hücrelerden RNA izolasyonu ticari kit kullanılarak kit prosedürüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

RNA İzolasyon Protokolü;

- 1) Tripsinize edilen hücrelerden süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücre topağına 350µl FARB tamponu ve e 3,5 µl β-Mercaptoetanol eklenmiştir. Hücreleri tamamen yeniden askıya almak için 1 dakika boyunca kuvvetlice vortekslenmiştir.
- 2) Bir toplama tüpüne bir filtre kolonu yerleştirilip ve numune karışımını filtre kolonuna aktarılmıştır. 2 dakika boyunca tam hızda (~ 18.000 xg) santrifüjlenmiştir.
- 3) Berraklaştırılmış süpernatantı toplama tüpünden yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılıp, süpernatantın hacmini ölçülmüştür.
- 4) 1 hacim %70 RNaz içermeyen etanol eklenip, vorteksleyerek iyice karıştırılmıştır.
- 5) Bir FARB mini kolonunu toplama tüpüne yerleştirilip, etanol eklenmiş numune karışımını (herhangi bir çökelti dahil) FARB mini kolona aktarılmıştır. 1 dakika boyunca tam hızda santrifüjlenip, akış atılır ve FARB mini kolonunu toplama tüpüne geri konulmuştur.
- 6) FARB mini kolona 500 µl yıkama tamponu 1 eklenip, 1 dakika tam hızda santrifüjlenmiştir. Akışı atıp, FARB mini kolonunu toplama tüpüne geri konulmuştur.
- 7) FARB mini kolona 750 µl Yıkama Tamponu 2 ekleyip, 1 dakika tam hızda santrifüjlenmiştir. Akışı atıp, FARB mini kolonunu toplama tüpüne geri konulmuştur.
- 8) Bir yıkama daha için bir önceki adımı tekrarlanmıştır.
- 9) FARB mini kolonunu kurutmak için FARB mini kolonunu 3 dakika daha tam hızda santrifüjlenmiştir.
- 10) FARB mini kolonunu bir Elüsyon Tüpüne (sağlanan 1,5 ml mikrosantrifüj tüpü) yerleştirilmiştir.
- 11) FARB mini kolonunun membran merkezine 70 µl RNaz içermeyen dH₂O eklenmiştir. FARB mini kolon 1 dakika bekletilmiştir.
- 12) RNA'yı ayırtmak için FARB mini kolonunu 1 dakika boyunca tam hızda santrifüjlenmiştir.
- 13) Aynı protokol diğer 2 flaska da uygulanarak, RNA'lar -80°C'de saklanmıştır.

RNA izolasyonu kit protokolüne uygun bir şekilde gerçekleştirildikten sonra, RT-PCR yardımıyla Bcl-2, Cas-3, Bax genlerine ait mRNA ekspresyon düzeyleri analiz edildi.

3.2.5. ELISA Analizi

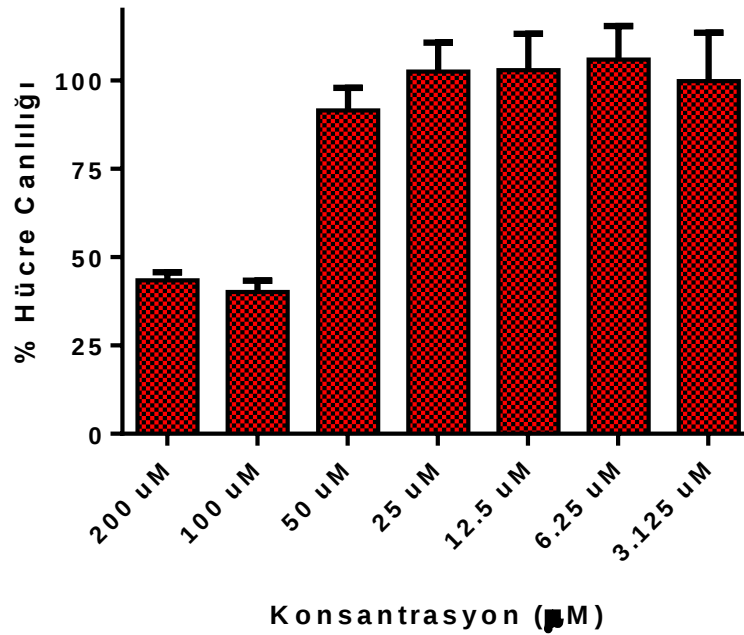
Hücre kültür flasklarında yaklaşık %80 oranında yoğunluğa ulaştığında, MPC-3100 50 µM, EGCG 100 µM, MPC-3100 50 µM+EGCG 100 µM olacak şekilde üç flastaki hücrelere ayrı ayrı hazırlanan etken madde yüklemesi yapılarak 48 saat inkübe edilmiştir. Ardından tripsinize edilen hücrelerden süpernatant uzaklaştırılmıştır. Falkonlardaki her bir hücre kümesine 500 µl liziz tamponu (RIPA) eklenilmiştir ve 5 ml'lik enjektör yardımı ile 10-15 defa al-ver yaparak homojen hale getirilmiştir. Tüm bu işlemler kuru buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. Hücreler santrifüj tüplerine alınarak, 4°C'de 5 dk boyunca tam hızda santrifüjlenmiştir. Supernatant steril tüplere alınarak -20°C'de saklanmıştır. Ardından pro-apoptotik anti-apoptotik proteinlerinin ekspresyonunu ölçmek için ELISA yöntemi kullanıldı. Proteintech ELISA kiti kullanılarak belirlendi ve prosedür, kitin talimatlarına tam olarak uyularak gerçekleştirildi. ELISA okuyucu ile 450 nm'de OD kaydedildi. Son olarak standart eğri ve OD değerine göre protein konsantrasyonu miktarı okundu.

4. BULGULAR

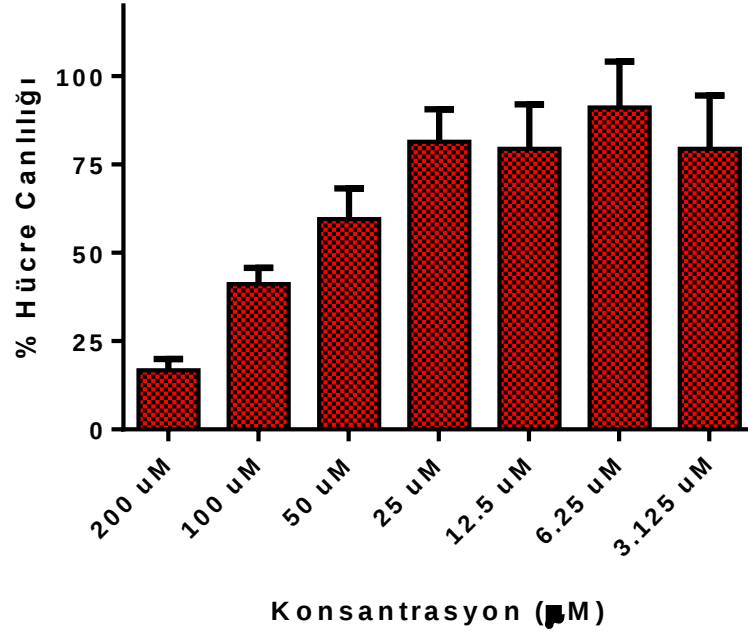
4.1. XTT Test Bulguları

HT-29 hücreleri, 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekildi. Daha önceki çalışmalara dayanarak, EGCG'nin 200 μ M-3,125 μ M aralığında, MPC-3100'ün ise 50 μ M-0,28125 μ M aralığında 7 farklı doz uygulanarak hücre canlılığı üzerindeki etkisi incelendi. Ayrıca, EGCG ile MPC-3100'ün kombinasyonunun da 250 μ M-3,40625 μ M arasında değişen farklı dozlarda hücre canlılığına etkisi 24 ve 48 saatte değerlendirildi. XTT analizi kullanılarak, kontrol ve doz gruplarının absorbans değerleri (OD), mikropłaka okuyucusunda 450 nm dalga boyunda ölçülen renk değişimi sayesinde belirlendi.

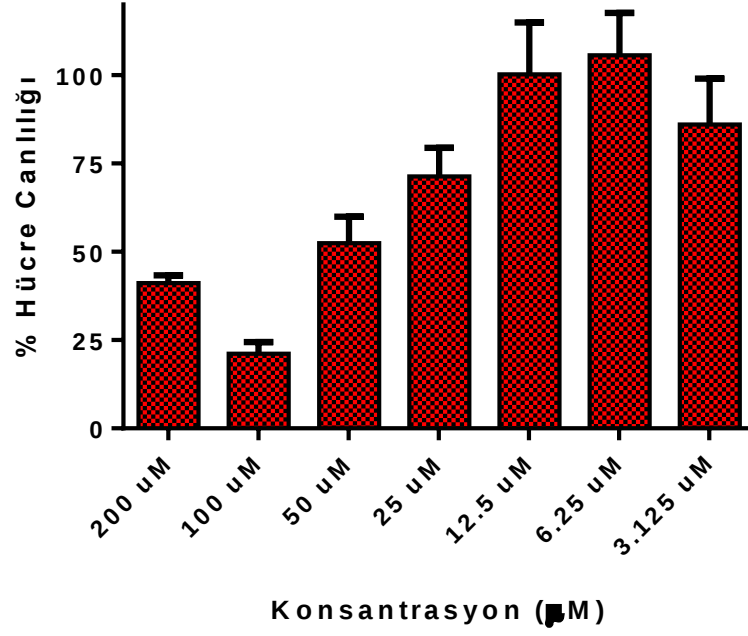
EGCG, MPC-3100 ve birlikte kombinasyonu için 24. saatin sonunda doza bağılı olarak hücre canlılığındaki değişimler Şekil 8., Şekil 9., Şekil 10.'da gösterilmiştir. Bu verilere göre 24 saat sonunda IC50 değerleri sırasıyla 71,34 μ M, 14,48 μ M ve 62,06 μ M olarak hesaplanmıştır.



Şekil 10. EGCG'nin 24 saat sonunda HT-29 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi

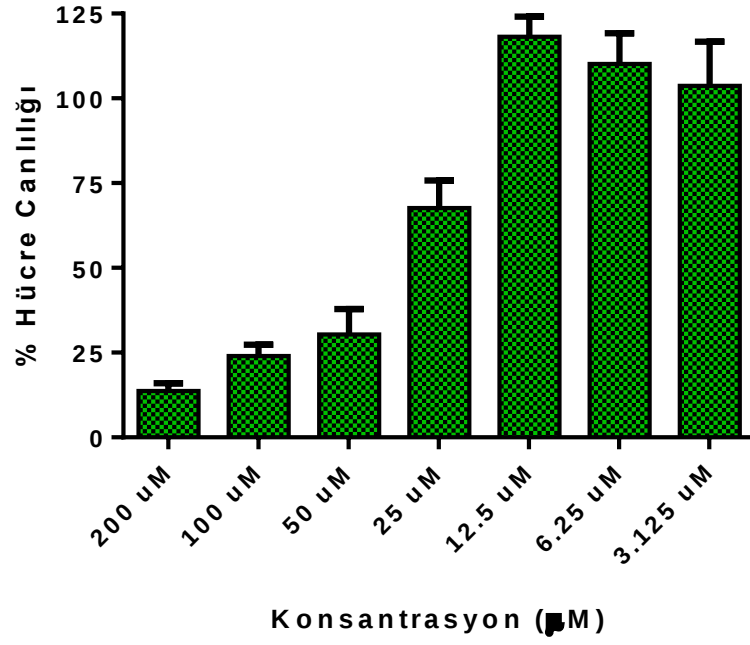


Şekil 11. MPC-3100'nin 24 saat sonra HT-29 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi

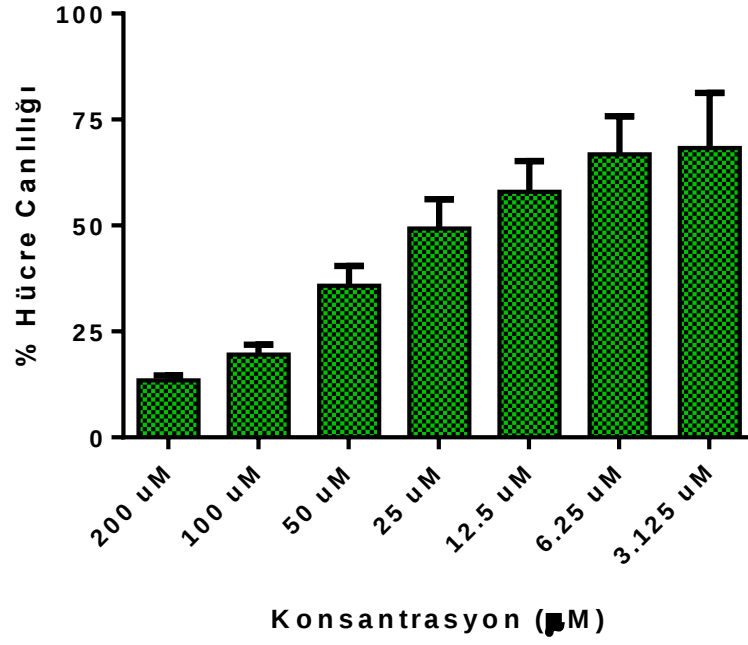


Şekil 12. MPC-3100+EGCG'nin 24 saat sonra HT-29 hücre hattı üzerine etkisi

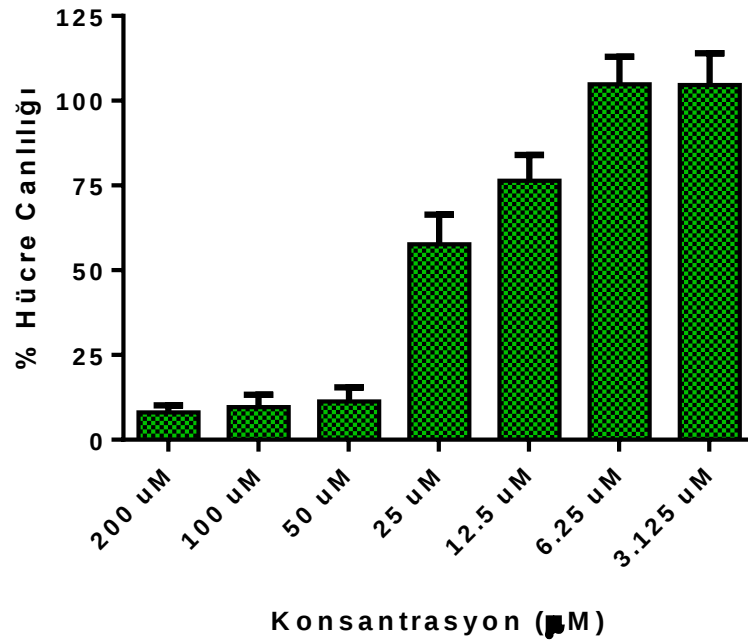
EGCG, MPC-3100 ve birlikte kombinasyonu için 48. saatin sonunda doza bağlı olarak hücre canlılığı üzerine etkisi Şekil 11., Şekil 12. Ve Şekil 13.'de gösterilmiştir. 48. saatin sonunda yapılan bu ölçümlerde IC₅₀ değerleri sırasıyla 17,38 µM, 90,71 µM, 10,18 µM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 13. EGCG'nin 48. saat sonunda HT-29 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi



Şekil 14. MPC-3100'nin 48 saat sonra HT-29 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi



Şekil 15. MPC-3100+EGCG'nin 48 saat sonra HT-29 hücre hattı üzerine etkisi

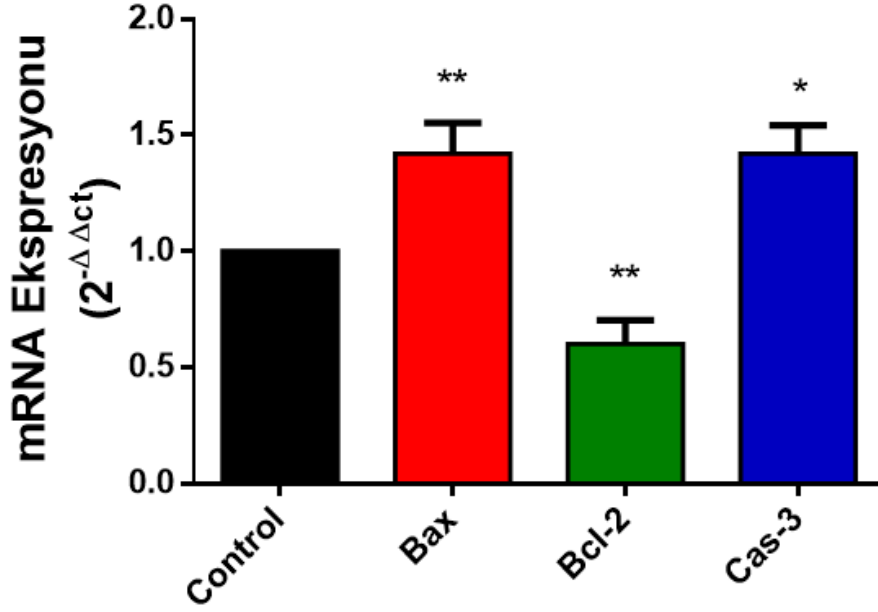
Elde edilen veriler doğrultusunda XTT deney sonuçlarında konsantrasyonun artmasına paralel olarak hücre proliferasyonunda anlamlı bir azalma olduğu belirlenmiştir. Sonuçlar incelendiğinde MPC-3100, EGCG ve birlikte elde edilen kombinasyonu, 48 saat uygulama süresi, 24 saat uygulama süresine göre daha efektif bir şekilde hücre proliferasyonunu inhibe ettiği belirlendi.

24'üncü saatte EGCG HT-29 KRK hücre canlılığını %50 altına düşürdüğü dozlar 200 μ M, 100 μ M iken, 48. saatte ise bu dozlar 200 μ M, 100 μ M, 50 μ M olarak belirlenmiştir.

24'üncü saatte MPC-3100'ın HT-29 hücrelerinin canlılığını %50'nin altına düşürdüğü doz sırasıyla, 50 μ M, 25 μ M olmakla birlikte 48'inci saatte bu dozlar 50 μ M, 25 μ M, 12,5 μ M ve 6,25 μ M olarak belirlendi.

Ayrıca EGCG ve MPC-3100'ın birlikte kombinasyonu 24'üncü saatte hücre canlılığını %50'nin altına düşürdüğü dozlar 250 μ M, 125 μ M iken bu oran ve dozlar 48'inci saatte %20'ye inmiştir. Hücre canlılığını %20'nin altına düşürdüğü doz sırasıyla, 250 μ M, 125 μ M ve 62,5 μ M olarak ölçülmüştür. Bu durum EGCG ve MPC-3100'ın birlikte kombinasyonu hücre proliferasyonunu büyük oranda inhibe ederek, 48.'ci saatte sinerjik bir etki oluşturmuştur.

4.2. RT-PCR Bulguları



Şekil 16. Etken maddelerin HT-29 hücrelerinde apoptoz ve proliferasyona etkisi

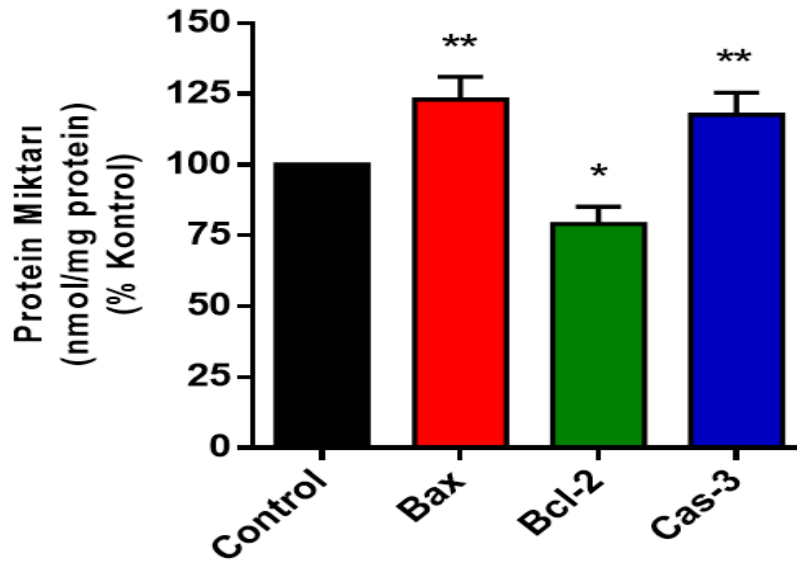
HT-29 hücre hattında kontrole göre BAX, BCL-2, CAS-3 genlerinin mRNA düzeyindeki ekspresyon değişimleri Real-Time PCR ile araştırılmıştır. RT-PCR ile tespit edilen mRNA ekspresyon değişimi ile elde edilen verilerin analizinde $\Delta\Delta CT$ metodu kullanılmıştır.

Apoptozla ilişkili genler arasında yer alan anti-apoptotik BCL-2 (B hücre lösemi/lenfoma 2 apoptoz düzenleyici) ve pro-apoptotik BAX (BCL-2 ilişkili X, apoptoz düzenleyici), apoptozun baskılanmasında doğrudan veya dolaylı olarak etki ederek önemli roller üstlenebilir.

Etken maddelerin HT-29 hücrelerinde (Bax, Cas-3) ve proliferasyona (Bcl-2) etkisi, analizi gerçekleştirilen genlere ait her bir grubun mRNA ekspresyon düzeylerinin 48 saat sonra kontrol grubu ile kıyaslanması sonucu belirlendi. HT-29 hücrelerine belirtilen dozda uygulanması durumunda Cas-3 ve proapoptotik Bax gen ekspresyonlarının kontrol grubuna göre istatistiki olarak anlamlı düzeyde uyarıldığı

görüldü. Bcl-2'nin mRNA ekspresyon seviyesinin kontrol grubuna göre istatistiki düzeyde azalarak, farklılık gösterdiği belirlendi.

4.3. ELISA Analizi Bulguları



Şekil 17. HT-29 hücrelerinde Bax, Bcl-2 ve CAS-3'ün protein miktarı ifadeleri

Apoptoz, aktif bir hücre yıkımı sürecidir ve iyonlaştırıcı radyasyon ve kanser kemoterapi ilaçları gibi çeşitli ajanlara yanıt olarak ortaya çıkan önemli bir hücre ölümü türüdür.

Bax, Bcl-2 kanser hücrelerinde apoptoz sürecinde rol alan proteinlerdir. Bu proteinler, hücrelerin normal yaşam döngünde önemli rol oynarlar. Bax, apoptozu tetikleyen bir protein olup, hücreyi stresli koşullar altında sinyal vererek hücrenin ölüm sürecini başlatır. Bax proteininin aktif olması, mitokondrinin (hücrenin enerji zar ürettiği organellerinden biri) dışını delerek, mitokondriyal sitokrom c proteininin serbest kalmasına ve hücrede apoptotik çalışmasının başlamasına neden olur. Böylece, Bax, hücrelerin sağlığı için, programlanmış ölüm işlemlerini başlatmasına yardımcı olur.

Diğer yandan, Bcl-2, hücrenin apoptozun engellenmesinde rol oynayan bir protein ailesidir. Bcl-2, hücrelerin ölüm sinyallerini bloke ederek, hücrelerin programlanmış

ölümünden kaçınmasına yardımcı olur. Kansere hücreleri, normal değerlere kıyasla daha yüksek değerler Bcl-2 proteinine sahip olabilirler. Bu, kanser oluşumunu apoptozu önleyerek daha uzun süre yaşamasına ve çoğalmasına yardımcı olabilir.

Bax ve Bcl-2 arasındaki denge, hücrelerin sağlıklı bir şekilde programlanmış ölümü veya kanserli hücreleri aşırı çoğalması arasındaki farkı belirler.

CAS-3 ise, apoptozun son dönemleri aktif olan bir enzimdir ve hücre içindeki bazı proteinleri keserek apoptozu tetikler. CAS-3, hücre zarının çökmesine, çekirdek DNA'sının parçalanmasına ve hücrelerin parçalanmasına neden olur. Bu nedenle, CAS-3 apoptozunu başlatan en önemli enzimlerden biridir.

Etken maddeler tarafından apoptozun indüksiyon mekanizmasını anlamak için bu çalışmada Bax, Bcl-2, Cas-3 ekspresyon seviyeleri incelenmiştir (*Şekil 14.*). HT-29 hücrelerinin etken maddelerle işlenmesi ile pro-apoptotik Bax ve Cas-3 ifadesinin seviyesi belirgin bir şekilde artma ile sonuçlanmıştır. Tersine, anti-apoptotik Bcl-2 proteini ifade seviyesi, önemli ölçüde azalmıştır. Sonuçlar, etken maddelerin mitokondriyal yol boyunca apoptozu indükleyebileceğini göstermektedir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kemoterapi, kanser tedavisinde kullanılan en önemli yöntem olsa da ilaçların maliyeti oldukça yüksektir. Bu nedenle, ülke ekonomilerinde önemli bir sağlık harcaması gideridir ve sağlık harcamalarının önemli bir bölümü oluşturur. Bu durumdan dolayı yerli kanser ilaç geliştirme çalışmaları, ülkelerin sağlık politikaları için öncelikli bir durumdur. Türkiye'de kanserle mücadelede yerli ilaç geliştirme çabaları, sağlık politikalarının merkezinde yer almakla birlikte son yıllarda yerli kanser ilaç geliştirmelerine büyük önem veren ülkelerden biridir.

Yüksek lisans tez çalışmamda, hedefe yönelik kanser tedavisi için, HT-29 (kolorektal adenokarsinoma) insan kanser hücrelerine, yeni terapötik yaklaşımlar geliştirmek amacıyla ilaç tasarımı için önemli bir hedef olan HSP90 inhibitörü MPC-3100 ile yeşil çayda en bol bulunan bir kateşin olan EGCG kombinasyonlarının kolorektal kanser üzerindeki sinerjistik etkileri araştırılmış ve in-vitro deneyler ile belirlenmiştir.

Literatürde, klinik çalışmalarda Hsp90 inhibitörleri üzerine yapılan fazla sayıda çalışmalar mevcuttur. Yapılan çalışmalarda, ilk geliştirilen geldanamisin bazlı Hsp90 inhibitörleri, güçlü anti-kanser özelliklere sahip olmalarına rağmen klinik çalışmalarda ciddi yan etkilere neden olmuştur. Bu nedenle, daha az toksik ve daha iyi tolere edilen yeni nesil Hsp90 inhibitörlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Yeni nesil Hsp90 inhibitörlerinin geliştirilmesi, daha spesifik ve etkili bir kanser tedavisi sağlama amacını taşımaktadır. Bu inhibitörler, Hsp90 proteinini hedef alarak kanser hücrelerinin büyümesini ve yayılmasını durdurmayı hedeflerken, normal hücreler üzerinde minimal etkilere sahip olmaları hedeflenmektedir. Böylece, tedaviye bağlı yan etkilerin azaltılması ve tedaviye uyumun artırılması amaçlanmaktadır.

Yeni nesil Hsp90 inhibitörlerinden biride MPC-3100'dır. Yapılan ilk preklinik çalışmalar, MPC-3100'in ciddi antitümör aktivitesi gösterdiğini ortaya koymuştur. Ayrıca, MPC-3100'in diğer HSP90 inhibitörlerine kıyasla daha az yan etki oluşturduğu gösterilmiştir. MPC-3100 ile ilgili yapılan diğer çalışmalar, MPC-3100'in farelerdeki, tümörlerdeki büyümeyi engelleyebildiğini, kanser hücrelerinde apoptoz (programlı hücre ölümü) indüklediğini ve kemoterapiye dirençli kanser hücrelerinde bile etkili olduğunu

göstermiştir. Bu nedenle çalışmamızda Hsp90 inhibitörü olan MPC-3100'ı kullanmayı tercih ettik.

Yapılan diğer çalışmalarda; MPC-3100, erlotinib veya sorafenib gibi diğer ajanlarla kombinasyon halinde kullanıldığında, her iki ajanın tek başına gösterdiğinden daha güçlü bir anti-tümör etkinlik göstermektedir. Bu nedenle, MPC-3100, tek başına geniş bir etkinliğe sahip olmasının yanı sıra, diğer hedefli tedavilerle bir araya getirilebilecek potansiyele sahip olduğu görülmüştür (Baichwal vd., 2011).

MPC-3100 adlı bir bileşiğin anti-tümör etkinliği, EGFR inhibisyonuna duyarlı bir akciğer kanseri (A549) ksenograft modelinde erlotinib ile karşılaştırıldı. MPC-3100, 21 gün boyunca günde 150 veya 200 mg/kg dozlarında uygulandı. Bu dozlarla tedavi edilen gruplarda tümör büyümesi %88 oranında inhibe edildi veya %16 oranında tümör gerilemesi gözlemlendi. MPC-3100'nin tümör büyümesi inhibisyonu, 5-fluorourasil (5-FU) ile karşılaştırıldığında daha olumlu sonuçlar göstermektedir. Ayrıca, MPC-3100 çeşitli kanser hücre tiplerine karşı aktif olduğu gibi, çoklu dozlama programlarına tabi tutulan ksenograft modellerinde de etkili olmuştur. Yapılan karşılaştırmalara göre, MPC-3100'ün anti-tümör aktivitesi, 5-FU ve erlotinib'e kıyasla daha olumlu sonuçlar vermektedir (Baichwal vd., 2010).

Yeşil çayda ise doğal olarak bulunan bir polifenol bileşik olan EGCG, kanser üzerine yapılan birçok çalışmada incelenen bir bileşiktir. Bu çalışmalar, EGCG'nin kanser hücreleri üzerinde çeşitli antitümör etkileri olduğunu ve kanser tedavisinde potansiyel bir rol oynayabileceğini göstermektedir. EGCG'nin antioksidan, anti-inflamatuar, tümör büyümesini engelleme, metastazı önleme, apoptozu uyarıcı ve anjiyogenezin engellenmesi gibi etkileri kanser çalışmalarında hala araştırılmaktadır.

Yapılan bir çalışmada, EGCG'nin kolon kanseri hücrelerinin büyümesini ve metastazını inhibe ettiği ve hücre döngüsünü durdurarak apoptozu tetiklediği gösterilmiştir. Ayrıca, EGCG'nin kolon kanseri hücrelerinde anti-enflamatuar etkiler göstererek, inflamasyonun kanser gelişimine katkıda bulunan faktörlerin inhibisyonunu sağladığı bulunmuştur.

Başka bir araştırmada ise, EGCG'nin kolon kanseri hücrelerinde DNA hasarını onardığı ve antioksidan etkileriyle hücrenin oksidatif stresle mücadelesine yardımcı

olduğu gösterilmiştir. Bu da EGCG'nin kolon kanseri gelişimini önlemede etkili olabileceğini düşündürmektedir. EGCG'nin kolon kanserine karşı koruyucu etkilerini destekleyen epidemiyolojik çalışmalar da bulunmaktadır. Örneğin, yeşil çay tüketimi ile kolon kanseri insidansı arasında ters bir ilişki olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Bu nedenle çalışmamızda MPC-3100 ve EGCG'yi kombine ederek in-vitro deneyler ile sinerjistik etkilerini değerlendirdik.

MPC-3100 ve EGCG ile yapılan kanser çalışmalarında her iki bileşik de kanser tedavisiyle ilgili potansiyel etkileri nedeniyle araştırılmıştır, ancak MPC-3100 ve EGCG'nin kanserle ilgili etkileri üzerindeki çalışmalar bağımsız olarak yürütülmüştür. Kansere, yeni terapötik yaklaşımlar geliştirmek amacıyla, MPC-3100 ve EGCG'yi hem tek başlarına hem de birlikte insan kolon kanseri hücre hattında (HT-29) sinerjik anti kanser etkilerini inceledik.

Bu tez çalışmasında, etken maddelerin ve kombine uygulamalarının değişen dozlarda HT-29 kolon kanseri hücrelerine uygulanıp zamana ve doza bağlı olarak hücre canlılığının tespiti ve hücrelerin %50'sinin yaşadığı dozu bulmak için XTT hücre proliferasyon testi kullanılmıştır. Kanser hücrelerinin gen profilini değerlendirmek için mRNA ekspresyon analizi ve protein miktarını tespit etmek için Elisa testi yapılmıştır.

Çalışmamızda etken maddelerin ve kombine uygulamalarının değişen dozlarda HT-29 hücrelerine uygulanmış olup zamana ve doza bağlı hücre canlılığının tespiti amaçlanmıştır. Bu çalışmada, EGCG; 200 μ M, 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 12,5 μ M, 6,25 μ M, 3,125 μ M, MPC-3100; 50 μ M, 25 μ M, 12,5 μ M, 6,25 μ M, 3,125 μ M, 1,5625 μ M, 0,28125 μ M, EGCG+MPC-3100; 250 μ M, 125 μ M, 62,5 μ M, 31,25 μ M, 15,625 μ M, 7,8125 μ M, 3,40625 μ M konsantrasyonları hücrelere uygulanmış 24 ve 48 saat inkübe edilmiştir. Kontrol grubuna hücreli besiyeri içerisinde etken maddeler olmaksızın uygulanmıştır.

EGCG, MPC-3100 ve birlikte kombinasyonu verilere göre 24 saat sonunda IC50 değerleri sırasıyla 71,34 μ M, 14,48 μ M ve 62,06 μ M olarak hesaplanmıştır. EGCG, MPC-3100 ve birlikte kombinasyonu için 48. saatin sonunda yapılan bu ölçümlerde IC50 değerleri sırasıyla 17,38 μ M, 90,71 μ M, 10,18 μ M olarak hesaplanmıştır. Elde edilen veriler doğrultusunda XTT deney sonuçlarında konsantrasyonun artmasına paralel olarak hücre proliferasyonunda anlamlı bir azalma olduğu belirlenmiştir. Sonuçlar

incelendiğinde MPC-3100, EGCG ve birlikte elde edilen kombinasyonu, 48 saat uygulama süresi, 24 saat uygulama süresine göre daha efektif bir şekilde hücre proliferasyonunu inhibe ettiği belirlendi.

24. saatte EGCG, HT-29 KRK hücre canlılığını %50 altına düşürdüğü dozlar 200 μ M, 100 μ M iken, 48. saatte ise bu dozlar 200 μ M, 100 μ M, 50 μ M olarak belirlenmiştir.

24. saatte MPC-3100'ın HT-29 hücrelerinin canlılığını %50'nin altına düşürdüğü doz sırasıyla, 50 μ M, 25 μ M olmakla birlikte 48'inci saatte bu dozlar 50 μ M, 25 μ M, 12,5 μ M ve 6,25 μ M olarak belirlendi.

Ayrıca EGCG ve MPC-3100'ın birlikte kombinasyonu 24. saatte hücre canlılığını %50'nin altına düşürdüğü dozlar 250 μ M, 125 μ M iken bu oran ve dozlar 48. saatte %20'ye inmiştir. Hücre canlılığını %20'nin altına düşürdüğü doz sırasıyla, 250 μ M, 125 μ M ve 62,5 μ M olarak ölçülmüştür. Bu durum EGCG ve MPC-3100'ın birlikte kombinasyonu hücre proliferasyonunu büyük oranda inhibe ederek, 48. saatte sinerjik bir etki oluşturmuştur.

HT-29 hücre hattında, kontrole göre genlerin mRNA düzeyindeki ekspresyon değişimleri Real-Time PCR yöntemi ile çalışılmıştır. Genlere ait her bir grubun mRNA ekspresyon düzeylerinin 48 saat sonra kontrol grubu ile kıyaslanması sonucu belirlendi. Real time PCR ile Bcl-2 ve Bax genlerinin ekspresyonlarında kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edildi. HT-29 hücrelerine belirtilen dozda uygulanması durumunda Cas-3 ve proapoptotik Bax gen ekspresyonlarının kontrol grubuna göre istatistiki olarak anlamlı düzeyde uyarıldığı görüldü. Bcl-2'nin mRNA ekspresyon seviyesinin kontrol grubuna göre istatistiki düzeyde azalarak, farklılık gösterdiği belirlendi.

Etkin maddeler tarafından apoptozun indüksiyon mekanizmasını anlamak için bu çalışmada Bax, Bcl-2, Cas-3 protein ekspresyon seviyeleri Elisa testi ile incelenmiştir (*Şekil 14.*). HT-29 hücrelerinin etken maddelerle işlenmesi ile pro-apoptotik Bax ve Cas-3 ifadesinin seviyesi belirgin bir şekilde artma ile sonuçlanmıştır. Tersine, anti-apoptotik Bcl-2 proteini ifade seviyesi, önemli ölçüde azalmıştır. Sonuçlar, etken maddelerin mitokondriyal yol boyunca apoptozu indükleyebileceğini göstermektedir.

Bu çalışmalar ışığında, Hsp90 inhibitörü olan MPC-3100, EGCG ve kombinasyonu, kolon kanserine yönelik ilaç geliştirme çalışmalarında iyi bir aday ilaç maddeleri olabileceğini düşünmekteyiz. Bu kombinasyon çalışmasının kolon kanseri

üzerindeki etkilerini tam olarak aydınlatmak için, diğ er olası hücre ölüm mekanizmalarını araştırmak ve kombinasyon tedavisinin moleküler mekanizmalarını belirlemek faydalı olacaktır. Ayrıca bu yüksek lisans tezi, gelecekte yapılacak bilimsel projeler ve araştırmalar için önemli bir temel oluşturacaktır.

KAYNAKÇA

- Adjei AA: Blocking Oncogenic Ras Signaling for Cancer Therapy. J. Natl. Cancer Inst.,93:(10):62-74, 2001.
- Al-Sohaily S, Biankin A, Leong R, Kohonen-Corish M, Warusavitarne J: Molecular pathways in colorectal cancer. Journal of gastroenterology and hepatology,27(9):23-31,2012.
- Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. Cell,53:549-54,2000.
- Aran V, Victorino AP, Thuler LC, Ferreira CG: Colorectal cancer: epidemiology, disease mechanisms and interventions to reduce onset and mortality. Clinical colorectal cancer, 15:195-203,2016.
- Arber N, Levin B: Chemoprevention of colorectal cancer: ready for routine use,ed. Tumor Prevention and Genetics III. Springer.p. 213-230,2005.
- Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F: Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. Gut, 66:683-691,2017.
- Aufricht C. Heat-shock protein 70: molecular supertool? Pediatric Nephrology. 2005;20 (6):707-13.
- Baykan A, Zorluoğlu A, Geçim E, Terzi C: Kolon ve Rektum Kanseri. İstanbul: Türk Kolon ve Rektum Cerrahisi Derneği; 2010.
- Boland CR, Goel A: Microsatellite instability in colorectal cancer. Gastroenterology. 138(6):73-87,2010.
- Bond JH: Polyp guideline: diagnosis, treatment, and surveillance for patients with colorectal polyps. Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. The American journal of gastroenterology 95(11):3053-3063,2000.
- Borovac N: Carcinoma of the anus, rectum and colon. Medicinski arhiv 57:(2):87-89,2003.
- Boyle P, Langman JS: ABC of colorectal cancer: Epidemiology, BMJ, 321(7264): 805-808,2000.

- Bukau B, Horwich AL. The MD70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*. 1998;92 (3):351-66.
- Bukau, B., Horwich, A.L. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*. 1998, 92(3): 351-366.
- Campisi J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell*. 2005;120 (4):513-22.
- Carman, A., S. Kishinevsky, J. Koren, 3rd, W. Lou ve G. Chiosis) "Chaperone- dependent Neurodegeneration: A Molecular Perspective on Therapeutic Intervention." *J Alzheimers Dis Parkinsonism* 2013(Suppl 10), 2013.
- Chiti, F. ve C. M. Dobson. "Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade." *Annu Rev Biochem* 2017, 86: 27-68.
- Ciocca DR, Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell stress & chaperones*. 2005;10 (2):86-103.
- Cole BF, Baron JA, Sandler RS: Folic acid for the prevention of colorectal adenomas. A randomized clinical trial. *JAMA*, 109:297-235,2007.
- Cooper GM, Hausman RE: *Hücre: Moleküler Yaklaşım*. İzmir Tıp Kitabevi.s.73,2006.
- Croce CM: Oncogenes and cancer. *The New England Journal Of Medicine*, 358(5):502-511,2008.
- Cross AJ, Wooldrage K, Robbins EC, Pack K, Brown JP, Hamilton W, Thompson MR, Flashman KG, Halligan S, Thomas-Gibson S: Whole-colon investigation vs. flexible sigmoidoscopy for suspected colorectal cancer based on presenting symptoms and signs: a multicentre cohort study, *British journal of cancer*, 120:154,2019.
- Davenport JR, Su T, Zhao Z: Modifiable lifestyle factors associated with risk of sessile serrated polyps,
- Ergenoglu OM: 1,2 Dimetilhidrazin ile Kolorektal Kanser Olusturulan Sıçanlarda Selenyum, Vitamin E ve Levamizolün Etkileri. Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, Adana, 1999.
- Eustace BK, Jay DG. Extracellular roles for the molecular chaperone, hsp90. *Cell cycle*. 2014;3 (9):1096-8.

- Fang JY, Li Z, Li Q, Huang WS, Kang L, Wang JP: Resveratrol affects protein kinase C activity and promotes apoptosis in human colon carcinoma cells, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13:6017-6022,2012.
- Farhan, M., Khan, H. Y., Oves M., Al-Harrasi, A., Rehmani, N., Arif, H., Hadi, S. M., Ahmad, A. Cancer therapy by catechins involves redox cycling of copper ions and generation of reactive oxygenspecies, *Toxins*, vol. 2016, 8, 2.
- Fearon ER, Vogelstein BA: Genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61(5):59-67,1990.
- Fışkın K: Genetik Kavramlar. Altıncı baskıdan çeviri. Öner, C. P. 635-651,2002.
- Forman D, Bray F, Brewster DH, Gombe Mbalawa C, Kohler B, Pineros M, Steliarova-Foucher E, Swaminathan R: World Health Organization. Cancer Incidence in Five Continents, 2002.
- Genest, O., S. Wickner ve S. M. Doyle. "Hsp90 and Hsp70 chaperones: Collaborators in protein remodeling." *J Biol Chem* 2019, 294(6): 2109-2120.
- Goss KH, Groden J: Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 18(9):1967-1979, 2000.
- Grady WM, Carethers JM: Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology*, 135(4):79-99,2008.
- Granja, A., Frias, I., Neves, A. R., Pinheiro, M., Reis, S., Therapeutic Potential of Epigallocatechin Gallate Nanodelivery Systems, *BioMed Research International*. 2017.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A., The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57– 70, 2000.
- Hoang AT, Huang J, Rudra-Ganguly N, Zheng J, Powell WC, Rabindran SK, et al. A novel association between the human heat shock transcription factor 1 (HSF1) and prostate adenocarcinoma. *The American journal of pathology*. 2000;156 (3):857-64.
- Hoter, A., M. E. El-Sabban ve H. Y. Naim. "The HSP90 Family: Structure, Regulation, Function, and Implications in Health and Disease." *Int J Mol Sci*, 2018, 19(9).
- Hsu A-L, Murphy CT, Kenyon C. Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. *Science*. 2003;300 (5622):1142-5.

- Imura J, Tomita S, Ueda Y, Fujimori T: Significance of genetic diagnosis with oncogen and suppressor gene. *Journal of clinical medicine*, 57:667-670,2000.
- Janout V, Kollarova H: Epidemiology of colorectal cancer, *Biomed Pap Med Fac Univ Palacku Olomouc Czech Repub*, 145:5-10,2001.
- Kamal A, Thao L, Sensintaffar J, Zhang L, Boehm MF, Fritz LC, et al. A high- affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature*. 2003;425 (6956):407-10.
- Karnoub AE, Weinberg RA: Ras oncogenes: split personalities. *Molecular Cell Biology*,9: 517-531,2008.
- Key TJ: Fruit and vegetables and cancer risk. *Br J Cancer*, 104:6-11,2011.
- Kikuchi-Yanoshita R, Konishi M, Ito S, Seki M, Tanaka K, Maeda Y, Iino H, Fukayama M, Koike M, Mori T: Genetic changes of both p53 alleles associated with the conversion from colorectal adenoma to early carcinoma in familial adenomatous polyposis and non-familial adenomatous polyposis patients. *Cancer research*, 52(14):3965-3971,2002.
- Kopnin BP: Targets of oncogenes and tumor suppressors: Key for understanding basic mechanisms of carcinogenesis. *Biochemistry*, 65(1):2-27,2000
- Koren, J., 3rd, U. K. Jinwal, D. C. Lee, J. R. Jones, C. L. Shults, A. G. Johnson, L. J. Anderson ve C. A. Dickey. "Chaperone signalling complexes in Alzheimer's disease." *J Cell Mol Med* 2009, 13(4): 619-630
- Labianca R, Beretta GD, Kildani B, Milesi L, Merlin F, Mosconi S: Colon cancer. *Crit Oncol Hematologi*, 74:106-133,2010.
- Maiti, P., J. Manna, S. Veleri ve S. Frautschy. "Molecular chaperone dysfunction in neurodegenerative diseases and effects of curcumin." *Biomed Res Int* 2014: 495091.
- Manjili MH, Wang X-Y, Chen X, Martin T, Repasky EA, Henderson R, et al. HSP110-HER2/neu chaperone complex vaccine induces protective immunity against spontaneous mammary tumors in HER-2/neu transgenic mice. *The Journal of Immunology*. 2003;171 (8):4054-61.
- Mayer, M. P. ve B. Bukau. "Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism." *Cell Mol Life Sci* 2005, 62(6): 670-684.

- Monticone M, Biollo E, Maffei M, Donadini A, Romeo F, Storlazzi CT, Giaretti W, Castagnola P: Gene expression deregulation by KRAS G12D and G12V in a BRAF V600E context. *Mol Cancer*, 7: 92-98,2008.
- Neckers L, Ivy SP. Heat shock protein 90. *Current opinion in oncology*. 2003;15 (6):419-24.
- Nimmanapalli R, O'Bryan E, Bhalla K. Geldanamycin and its analogue 17- allylamino-17-demethoxygeldanamycin lowers Bcr-Abl levels and induces apoptosis and differentiation of Bcr-Abl-positive human leukemic blasts. *Cancer research*. 2001;61 (5):1799-804.
- Nylandsted J, Brand K, Jäättelä M. Heat shock protein 70 is required for the survival of cancer cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2000;926 (1):122-5.
- Ou, J. R., M. S. Tan, A. M. Xie, J. T. Yu ve L. Tan. "Heat shock protein 90 in Alzheimer's disease." *Biomed Res Int*, 2014: 796869.
- Ozgur, A., Tutar, Y. Heat Shock Protein 90 Inhibition in Cancer Drug Discovery From Chemistry to Futural Clinical Applications. *Anticancer Agents Med Chem*. 2016, 16(3): 280-290.
- Ozgur A, Tutar Y. Heat Shock Protein 90 Inhibitors in Oncology. *Curr Proteomics* 2014; 11: 2-16.
- Pace, R. C. C. D., Liu, X., Sun, M., Nie, S., Zhang, J., Cai, Q., ... Wang, S., Anticancer activities of (-)-epigallocatechin-3-gallate encapsulated nanoliposomes in MCF7 breast cancer cells. *Journal of Liposome Research*, 23(3), 187–196, 2013.
- Pazarbaşı A: Kanser genetiği. Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Adana, 2003.
- Peer, D., Karp, J. M., Hong, S., Farokhzad, O.C., Margalit, R., Langer, R., Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat. Nanotechnol*. 2007, 2, 751–760.
- Petrof EO, Ciano MJ, Chang EB. Role and regulation of intestinal epithelial heat shock proteins in health and disease. *Chinese journal of digestive diseases*. 2004;5 (2):45-50.
- Pfotter A, Thalgott M, Büttner K, Brouet A, Feron O, Boekstegers P, et al. Liposomal Hsp90 cDNA induces neovascularization via nitric oxide in chronic ischemia. *Cardiovascular research*. 2005;65 (3):728-36.

- Ponz de Leon M, Benatti P, Di Gregorio C, Fante R, Rossi G, Losi L, Pedroni M, Percesepe A, Roncucci L: Staging and survival of colorectal cancer: are we making progress? The 14-year experience of a Specialized cancer Registry. Digestive and liver disease: official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver 32(4):312-317,2000.
- Pratt WB, Galigniana MD, Harrell JM, DeFranco DB. Role of hsp90 and the hsp90-binding immunophilins in signalling protein movement. Cellular signalling. 2004;16 (8):857-72.
- Rahmani M, et al. Cotreatment with suberanoylanilide hydroxamic acid and 17allylamino 17-demethoxygeldanamycin synergistically induces apoptosis in Bcr–AblC cells sensitive and resistant to STI571 (imatinib mesylate) in association with downregulation of Bcr–Abl, abrogation of signal transducer and activator of transcription 5 activity, and Bax conformational change. Mol Pharmacol 2005; 67: 1166–1176.
- Reis, S. D., B. R. Pinho ve J. M. A. Oliveira. "Modulation of Molecular Chaperones in Huntington's Disease and Other Polyglutamine Disorders." Mol Neurobiol, 2017, 54(8): 5829-5854.
- Romi, F., G. Helgeland ve N. E. Gilhus. "Heat-shock proteins in clinical neurology." Eur Neurol, 2011, 66(2): 65-69.
- Roodveldt, C., T. F. Outeiro ve J. E. A. Braun. "Editorial: Molecular Chaperones and Neurodegeneration." Front Neurosci, 2017, 11: 565.
- Sameer AS, Chowdhri NA, Abdullah S, Shah ZA, Siddiqi MA. Mutation pattern of K-ras gene in colorectal cancer patients of Kashmir: a report. Indian J Cancer, 46:219-25,2009
- Sancho E, Batlle E, Clevers H: Signaling pathways in intestinal development and cancer, Annu. Cell Dev. Biol., 20:695-723,2004.
- Saxena N, Lahiri SS, Hambarde S, Tripathi RP: RAS: Target for Cancer Therapy. Cancer Investigation, 26: 948-955,2008.
- Schopf, F. H., M. M. Biebl ve J. Buchner. "The HSP90 chaperone machinery." Nat Rev Mol Cell Biol, 2017, 18(6): 345-360.

- Schubbert S, Shannon K, Bollag G: Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Cancer*,7:295-308,2007.
- Shelton, L. B., J. Koren, 3rd ve L. J. Blair . "Imbalances in the Hsp90 Chaperone Machinery: Implications for Tauopathies." *Front Neurosci*, 2017, 11: 724.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A: Cancer statistics, 2021, CA: A cancer journal for clinicians, 69:7-34,2021.
- Smith, H. L., W. Li ve M. E. Cheetham. "Molecular chaperones and neuronal proteostasis." *Semin Cell Dev Biol*, 2015 40: 142-152.
- Song M, Garrett WS, Chan AT: Nutrients, foods, and colorectal cancer prevention. *Gastroenterology*, 148:1244-1260,2015.
- Soti, C. ve P. Csermely. "Chaperones and aging: role in neurodegeneration and in other civilizational diseases." *Neurochem Int*, 2002, 41(6): 383-389.
- Spiess C, Meyer AS, Reissmann S, Frydman J. Mechanism of the eukaryotic chaperonin: protein folding in the chamber of secrets. *Trends in cell biology*. 2004;14 (11):598-604.
- Srivastava P. Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses. *Annual review of immunology*. 2002;20 (1):395-425.
- Stigliano V, Sanchez-Mete L, Martayan A, Anti M. Early-onset colorectal cancer: a sporadic or inherited disease? *World J Gastroenterol*,20:12420-12430,2014.
- Taira T, Sawai M, Ikeda M, Tamai K, Iguchi-Ariga SM, Ariga H. Cell cycle- dependent switch of up-and down-regulation of human hsp70 gene expression by interaction between c-Myc and CBF/NF-Y. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274 (34):24270-9.
- Teng S-C, Chen Y-Y, Su Y-N, Chou P-C, Chiang Y-C, Tseng S-F, et al. Direct activation of HSP90A transcription by c-Myc contributes to c-Myc-induced transformation. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279 (15):14649-55.
- Terashima M: Lower G.I./colon and rectum cancer. *Gan to kagaku ryoho Cancer & chemotherapy* 37(11):2066,2010.
- Turturici, G., G. Sconzo ve F. Geraci. "Hsp70 and its molecular role in nervous system diseases." *Biochem Res Int*, 2011: 61812.

- Tutar, L. ve Y. Tutar. "Heat shock proteins; an overview." *Curr Pharm Biotechnol*, 2010, 11(2): 216-222.
- Wang, H., M. S. Tan, R. C. Lu, J. T. Yu ve L. Tan. "Heat shock proteins at the crossroads between cancer and Alzheimer's disease." *Biomed Res Int*, 2014: 239164.
- Wicki A, Herrmann R, Christofori G: Kras in metastatic colorectal cancer. *Swiss Med Wkly* 140: 31-12,2010.
- Wilhelmus, M. M., R. M. de Waal ve M. M. Verbeek. "Heat shock proteins and amateur chaperones in amyloid-Beta accumulation and clearance in Alzheimer's disease." *Mol Neurobiol*, 2007, 35(3): 203-216.
- Workman P. Altered states: selectively drugging the Hsp90 cancer chaperone. *Trends in molecular medicine*. 2004;10 (2):47-51.
- Yeaman TJ, Chambers AF: Osteopontin and colon cancer progression. *Clinical & experimental metastasis*, 20(1):85-90,2003.
- Young JC, Agashe VR, Siegers K, Hartl FU. Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2004;5 (10):781-91.
- Zuehlke, A. D., K. Beebe, L. Neckers ve T. Prince. "Regulation and function of the human HSP90AA1 gene." *Gene*, 2015, 570(1): 8-16.
- Bresailer RS. Malignant and premalignant lesions of the colon. In *Current Diagnosis and Treatment in Gastroenterology*. Eds:Friedman SL, McQuaid KR,Grendell JH.McGraw Hill, New York,2003,pp:407-435.
- Champe PC, Harvey RA. *Biochemistry*. Çev: Tokullugil A, Dirican M, Ulukaya E. *Biyokimya*.2.baskı.
- Heim S, Mitelman F. *Cancer Cytogenetics*. 2nd ed, NewYork: Alan R Liss Inc 1989:265-282
- Fukuyo Y, Hunt CR, Horikoshi N.Geldanamisin and its anti-cancer activities.*Cancer Lett*. 2010 Apr 1;290(1):24-35
- Marcu MG, Chadli A, Bouhouche I, Catelli M, Neckers LM, Isı şoku proteini 90 antagonisti novobiosin, şaperon J. Biol'ün karboksil ucunda daha önce tanınmayan bir ATP bağlama alanı ile etkileşime giriyor . *Kimya* 275 (2000) 37181–37186.

- Garnier C, Lafitte D, Tsvetkov PO, Barbier P, Leclerc-Devin J, Millot JM, Briand C, Makarov AA, Catelli MG, Peyrot V, Binding of ATP to heat shock protein 90: bir ATP-binding için kanıt C-terminal alanındaki site , *J. Biol. Kimya* 277 (2002) 12208–12214.
- Wandinger SK, Richter K, Buchner J. Hsp90 refakatçi makinesi. *J Biol Chem.* 2008; 283 :18473–18477. doi: 10.1074/jbc.R800007200.
- Yun BG, Huang W, Leach N, Hartson SD, Matts RL. Novobiocin, Hsp90'ın farklı bir konformasyonunu indükler ve Hsp90-koşaperon-müşteri etkileşimlerini değiştirir. *Biyokimya.* 2004; 43 :8217–8229. doi: 10.1021/bi0497998.
- Zhao J, Zhao H, Salon JA, Brown D, Brandes E, Bazzill J, Grogan PT, Subramanian C, Vielhauer G, Cohen MS, Blagg BS. Hsp90 C-Terminal inhibitörleri olarak novobiyosin ve bifenil amidler içeren triazol. *Medchemcomm.* 2014; 5 :1317–1323. doi: 10.1039/C4MD00102H.
- Chen, C., Shen, G., Hebbar, V., Hu, R., Owuor, ED ve Kong, ANT (2003). HT-29 insan kolon adenokarsinom hücrelerinde epigallocatechin-3-gallat kaynaklı stres sinyalleri. *Karsinogenez* , 24 (8), 1369-1378.
- Gupta, S., Hastak, K., Afaq, F., Ahmad, N., & Mukhtar, H. (2004). Kaspazların, nükleer faktör kappaB'nin epigallocatechin-3-gallat aracılı inhibisyonunda ve apoptozun indüklenmesinde temel rolü. *Onkogen* , 23 (14), 2507-2522.
- McLoughlin, P., Roengvoraphoj, M., Gissel, C., Hescheler, J., Certa, U., & Sachinidis, A. (2004). HT 29 kolon karsinomu sferoidlerinde epigallocatechin-3 gallate'e transkripsiyonel yanıtlar. *Genlerden hücrelere* , 9 (7), 661-669.
- Gan RY, Li HB, Sui ZQ, Corke H. Absorption, metabolism, anti-cancer effect and molecular targets of epigallocatechin gallate (EGCG): An updated review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2018 Apr 13;58(6):924-941. doi: 10.1080/10408398.2016.1231168. Epub 2017 Jun 2. PMID: 27645804.
- Gormley, NA, Orphanides, G., Meyer, A., Cullis, PM ve Maxwell, A. (1996). Kumarin antibiyotiklerinin DNA giraz B proteininin fragmanları ile etkileşimi. *Biyokimya* , 35 (15), 5083-5092.
- Marcu, MG, Schulte, TW ve Neckers, L. (2000). Novobiocin ve ilgili kumarinler ve ısı şok proteini 90'a bağlı sinyal proteinlerinin tükenmesi. *Ulusal Kanser Enstitüsü Dergisi* , 92 (3), 242-248.

- Burlison, JA, Neckers, L., Smith, AB, Maxwell, A. ve Blagg, BS (2006). Novobiocin: hsp90'ın seçici inhibisyonu için bir DNA giraz inhibitörünün yeniden tasarlanması. *American Chemical Society Dergisi* , 128 (48), 15529-15536.
- Burlison, JA, Avila, C., Vielhauer, G., Lubbers, DJ, Holzbeierlein, J., & Blagg, BS (2008). Birkaç kanser hücre hattına karşı anti-proliferatif aktivite gösteren novobiyosin analoglarının geliştirilmesi. *Organik kimya Dergisi* , 73 (6), 2130-2137.
- Donnelly, AC, Mays, JR, Burlison, JA, Nelson, JT, Vielhauer, G., Holzbeierlein, J., & Blagg, BS (2008). Antiproliferatif aktivite sergileyen novobiyosin yapı iskelesinin kumarin halkası türevlerinin tasarımı, sentezi ve değerlendirilmesi. *Organik kimya Dergisi* , 73 (22), 8901-8920.
- DeBoer, C., Meulman, P. A., Wnuk, R. J., & Peterson, D. H. (1970). Geldanamycin, a new antibiotic. *The Journal of antibiotics*, 23(9), 442-447.
- Supko, JG, Hickman, RL, Grever, MR ve Malspeis, L. (1995). Bir antitümör ajanı olarak geldanamisin prelinik farmakolojik değerlendirmesi. *Kanser kemoterapisi ve farmakolojisi* , 36 (4), 305-315.
- Becker, J. ve Craig, EA (1994). Moleküler şaperonlar olarak ısı şoku proteinleri. *Avrupa Biyokimya Dergisi* , 219 (1-2), 11-23.
- Hartl, FU (1996). Hücre protein katlanmasında moleküler şaperonlar. *Doğa* , 381 (6583), 571-580.
- Whitesell, L., Mimnaugh, EG, De Costa, B., Myers, CE ve Neckers, LM (1994). Isı şoku proteini HSP90-pp60v-src heteroprotein kompleksi oluşumunun benzokinon anamsisinler tarafından engellenmesi: onkojenik dönüşümde stres proteinlerinin temel rolü. *Ulusal Bilimler Akademisi Tutanakları* , 91 (18), 8324-8328.
- Fukuyo, Y., Hunt, C.R., Horikoshi, N., 2010. Geldanamycin and its anti-cancer activities. *Cancer Lett.* 290(1): 24-35.
- Gorska, M., Popowska, U., Sielicka-Dudzin, A., Kuban-Jankowska, A., Sawczuk, W., Knap, N., Cicero, G., Wozniak, F., 2012. Geldanamycin and its derivatives as Hsp90 inhibitors. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 17: 2269-2277.
- Neckers, L., 2006. Chaperoning oncogenes: Hsp90 as a target of geldanamycin. *Handb Exp Pharmacol.* 172: 259-277.

- Schulte, T. W., & Neckers, L. M. (1998). The benzoquinone ansamycin 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin binds to HSP90 and shares important biologic activities with geldanamycin. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 42(4), 273-279.
- Whitesell, L. ve Lindquist, SL (2005). HSP90 ve kanserin refakatçiliği. *Nature Review Cancer* , 5 (10), 761-772.
- Schopf, FH, Biebl, MM ve Buchner, J. (2017). HSP90 refakatçi makinesi. *Nature incelemeleri Moleküler hücre biyolojisi* , 18 (6), 345-360.
- S.C. Bishop, J.A. Burlison, B.S. Blagg Curr (2007). Cancer Drug Targets, p. 369.
- Zolghadr , AR ve Boroomand, S. (2017). Su / oktanol arayüzünde HSP90 inhibitörlerinin kendiliğinden montajı: Bir moleküler dinamik simülasyon çalışması . *Kimyasal Fizik Mektupları* , **669** , 130 – 136
- Talaei, S., Mellatyar, H., Asadi, A., Akbarzadeh, A., Sheervalilou, R., & Zarghami, N. (2019). Spotlight on 17-AAG as an Hsp90 inhibitor for molecular targeted cancer treatment. *Chemical Biology & Drug Design*, 93(5), 760-786.
- Beckman, JS, Beckman, TW, Chen, J., Marshall, PA ve Freeman, BA (1990). Peroksinitrit tarafından görünür hidroksil radikal üretimi: nitrik oksit ve süperoksitten kaynaklanan endotel hasarı için çıkarımlar. *Ulusal Bilimler Akademisi Tutanakları* , 87 (4), 1620-1624.
- Hanson, BE ve Vesole, DH (2009). Retaspimisın hidroklorür (IPI-504): antikanser ajanı olarak yeni bir ısı şoku proteini inhibitörü. *Araştırma ilaçları hakkında uzman görüşü* , 18 (9), 1375-1383.
- Suzuki, M., Takeda, T., Nakagawa, H., Iwata, S., Watanabe, T., Siddiquey, MN, ... & Kimura, H. (2015). Isı şoku proteini 90 inhibitörü BIIB021, T ve doğal öldürücü hücreli lenfomaların büyümesini baskılar. *Mikrobiyolojide Sınırlar* , 6 , 280.
- Zhang H, Neely L, Lundgren K, Yang YC, Lough R, Timple N and Burrows F: BIIB021, a synthetic Hsp90 inhibitor, has broad application against tumors with acquired multidrug resistance. *Int J Cancer*. 126:1226–1234. 2010.
- Saif, M. W., Takimoto, C., Mita, M., Banerji, U., Lamanna, N., Castro, J., ... & Von Hoff, D. (2014). A Phase 1, Dose-Escalation, Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Study of BIIB021 Administered Orally in Patients with Advanced Solid TumorsPhase I Study of BIIB021. *Clinical Cancer Research*, 20(2), 445-455.

- Dickson, M. A., Okuno, S. H., Keohan, M. L., Maki, R. G., D'adamo, D. R., Akhurst, T. J., ... & Schwartz, G. K. (2013). Phase II study of the HSP90-inhibitor BIIB021 in gastrointestinal stromal tumors. *Annals of oncology*, 24(1), 252-257.
- Stenderup, K., Rosada, C., Gavillet, B., Vuagniaux, G., & Dam, TN (2014). Yeni bir oral Hsp90 inhibitörü olan Debio 0932, bir ksenograft transplantasyon modelinde sedef hastalığını hafifletir. *Açta dermato-venereolojik* , 94 (6).
- Isambert, N., Delord, JP, Soria, JC, Hollebecque, A., Gomez-Roca, C., Purcea, D., ... & Fumoleau, P. (2015). Debio0932, ikinci nesil bir oral ısı şoku proteini (HSP) inhibitörü, ilerlemiş kanserli hastalarda—sabit doz uzatma fazına sahip insanda ilk doz artırma çalışmasının sonuçları. *Onkoloji Yıllıkları* , 26 (5), 1005-1011.
- Jhaveri, K., Taldone, T., Modi, S., & Chiosis, G. (2012). Advances in the clinical development of heat shock protein 90 (Hsp90) inhibitors in cancers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1823(3), 742-755.
- Li, H. K., Matsumoto, Y., Furusawa, Y., & Kamada, T. (2016). PU-H71, a novel Hsp90 inhibitor, as a potential cancer-specific sensitizer to carbon-ion beam therapy. *Journal of radiation research*, 57(5), 572-575.
- Garcia-Carbonero, R., Carnero, A., & Paz-Ares, L. (2013). Inhibition of HSP90 molecular chaperones: moving into the clinic. *The Lancet Oncology*, 14(9), e358-e369.
- Proia, D. A., Foley, K. P., Korbut, T., Sang, J., Smith, D., Bates, R. C., ... & Blackman, R. K. (2011). Multifaceted intervention by the Hsp90 inhibitor ganetespib (STA-9090) in cancer cells with activated JAK/STAT signaling. *PLoS One*, 6(4), e18552.
- Felip, E., Barlesi, F., Besse, B., Chu, Q., Gandhi, L., Kim, S. W., ... & Garon, E. B. (2018). Phase 2 Study of the HSP-90 Inhibitor AUY922 in previously treated and molecularly defined patients with advanced non-small cell lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 13(4), 576-584.
- Rajan, A., Kelly, RJ, Trepel, JB, Kim, YS, Alarcon, SV, Kummar, S., ... & Giaccone, G. (2011). Dirençli Solid Tümör Maligniteleri ve Lenfomaları Olan Hastalarda Oral Olarak Biyoyararlı bir Isı Şoku Protein 90 İnhibitörü olan PF-04929113'ün (SNX-5422) Faz I Çalışması Solid Tümörler ve Lenfomalarda PF-04929113'ün Faz I Çalışması. *Klinik Kanser Araştırması* , 17 (21), 6831-6839.

- Matsuura, K., Canfield, K., Feng, W. ve Kurokawa, M. (2016). "Metabolic Regulation of Apoptosis in Cancer." *International Review of Cell and Molecular Biology*, 327, 43-87.
- King, K. L., & Cidlowski, J. A. (1998). Cell cycle regulation and apoptosis. *Annual review of physiology*, 60, 601.
- Hengartner, M. O. (2001). Apoptosis: corralling the corpses. *Cell*, 104(3), 325-328.
- Schneider, P., & Tschopp, J. (2000). Apoptosis induced by death receptors. *Pharmacotherapy library*, 31, 281-286.
- O'Brien, M. A., & Kirby, R. (2008). Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease. *Journal of veterinary emergency and critical care*, 18(6), 572-585.
- Karp, G. (2009). *Cell and molecular biology: concepts and experiments*. John Wiley & Sons.
- Danial, N. N., & Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell*, 116(2), 205-219.
- Tsujimoto, Y., Finger, L. R., Yunis, J., Nowell, P. C., & Croce, C. M. (1984). Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t (14; 18) chromosome translocation. *Science*, 226(4678), 1097-1099.
- Reed, J. C. (1997, October). Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies. In *Seminars in hematology* (Vol. 34, No. 4 Suppl 5, pp. 9-19).
- Kroemer, G., Galluzzi, L., & Brenner, C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological reviews*, 87(1), 99-163.
- LaCasse, E. C., Mahoney, D. J., Cheung, H. H., Plenchette, S., Baird, S., & Korneluk, R. G. (2008). IAP-targeted therapies for cancer. *Oncogene*, 27(48), 6252-6275.
- Celepli, S., ve ark.. (2020). "Apoptoz ve Apoptotik Yolların Gözden Geçirilmesi."
- Fulda S. Targeting apoptosis for anticancer therapy. *Semin Cancer Biol.*, 2015, 31:84-88.
- Paweletz N. Walther Flemming: pioneer of mitosis research. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:72–5, 2001.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009; 59: 225-49. doi: 10.3322/caac.20006.

- Hanahan, D., Weinberg Robert A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144 (5), 646–674.
- Hockenbery DM, Zutter M, Hickey W, et al. BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:6961–5.
- Huerta, S., Goulet, E. J., & Livingston, E. H. (2006). Colon cancer and apoptosis. *The American Journal of Surgery*, 191(4), 517-526.
- Anti M, Armuzzi A, Morini S, et al. Severe imbalance of cell proliferation and apoptosis in the left colon and in the rectosigmoid tract in subjects with a history of large adenomas. *Gut* 2001;48:238–46.
- Cadwell, C., & Zambetti, G. P. (2001). The effects of wild-type p53 tumor suppressor activity and mutant p53 gain-of-function on cell growth. *Gene*, 277(1-2), 15-30.
- Chipuk, J. E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N. M., Newmeyer, D. D., Schuler, M., & Green, D. R. (2004). Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science*, 303(5660), 1010-1014.
- Samuel, T., Weber, H. O., & Funk, J. O. (2002). Linking DNA damage to cell cycle checkpoints. *Cell cycle*, 1(3), 161-167.
- Attardi, L. D., & DePinho, R. A. (2004). Conquering the complexity of p53. *Nature genetics*, 36(1), 7-8.
- Hemann, MT ve Lowe, SW (2006). p53-BCL-2 bağlantısı. *Hücre ölümü ve farklılaşması* , 13 (8), 1256.
- Kocaoğlu, E. (2014). Kinik asidin sitotoksik / genotoksik ve antigenotoksik etkilerinin sağlıklı akciğer epitel hücre hatlarında belirlenmesi. Yüksek lisans tezi, BUÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Biyoloji Bölümü.
- Scudiero, D.A., Shoemaker, R.H., Paull, K.D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T.H., Currens, M.J., Seniff, D., Boyd, M.R. (1988). Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines. *Cancer Res*, 48,4827-4833.
- Baichwal, V. R., Brown, B., Wettstein, D., Papac, D. I., Mather, G. G., & Carlson, R. O. (2011). Antitumor activity of MPC-3100, a synthetic Hsp90 inhibitor, in

combination with erlotinib and sorafenib. *Cancer Research*, 71(8_Supplement), 2628-2628.

Baichwal, VR, Yu, MK, Wettstein, D., Dowd, BF, Rushton, K., Zavitz, K., ... & Carlson, RO (2010). Hayvan modellerinde sentetik, oral olarak biyolojik olarak temin edilebilen bir Hsp90 inhibitörü olan MPC-3100'ün antitümör aktivitesi. *Kanser Araştırması* , 70 (8_Ek), 2635-2635.