

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK ve FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GALLİK ASİTİN APOPTOTİK ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

EBRU TURHANLAR
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2014

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK ve FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GALLİK ASİTİN APOPTOTİK ETKİSİNİN
BELİRLENMESİ

EBRU TURHANLAR
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
YRD. DOÇ. DR. ASUMAN DEMİROĞLU ZERGEROĞLU

GEBZE
2014



**GEBZE YÜKSEK
TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 27/01/2014 tarih ve 2014/06 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 14/02/2014 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Ebru TURHANLAR' ın tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Yrd. Doç. Dr. Asım DEMİROĞLU ZERGEROĞLU

ÜYE

: Yrd. Doç. Dr. Can Murathan ERİSTİ

ÜYE

: Yrd. Doç. Dr. Emel ERGENE

ONAY

GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

..... tarih ve sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

İlk defa 1960 yılında keşfedilen Malignant Mezotelyoma (MM), dünya üzerinde yaygınlığı gittikçe artan, teşhisi zor ve ilaç tedavisine dirençli bir kanser türüdür. Bugüne kadar tedaviye yönelik etkin ajanların yetersizliği bu alandaki çalışmaları hızlandırmaktadır. Bu tez çalışmasında, birçok meyvede bulunan ve bazı kanserlerde anti-proliferatif ve apoptotik olduğu belirtilen gallik asitin (GA) MM hücrelerindeki apoptotik etkisi araştırılmıştır. Öncelikle GA'nın MM hücrelerine etkisi morfolojik olarak incelenmiştir. Ardından, GA'nın apoptotik etkisini belirlemek amacıyla DNA merdivenlenmesi analizi yapılmış ve kaspaz 8 ve 9 moleküllerinin enzimatik aktiviteleri ve protein seviyeleri incelenmiştir. İlaveten GA aracılığıyla düzenlenen apoptozun stresle aktive olan sinyal yollarıyla bağlantısı araştırılmıştır. Son olarak GA'nın p53 ve PARP protein seviyelerine etkisi belirlenmiştir.

Sonuçlarımız doğrultusunda GA, 100 μ M dozda zamana bağlı olarak iç ve dış apoptotik yolağın aktivasyonuna neden olmuştur. Her iki apoptotik yolağın aktivasyonunda JNK yolağının değil p38 yolağının katkısının olduğu tespit edilmiştir. P53 aktivasyonunun GA ile indüklenen hücrelerde p38 yolağı bağlantılı olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Gallik Asit, Apoptoz, Malignant Mezotelyoma, Kaspaz.

SUMMARY

Malignant Mesothelioma (MM), discovered by Wagner and his friends in 1960, is a type of cancer, which has poor diagnosis and resistance to drug therapy. Insufficiency of effective agents in therapy has accelerated research in this field. In this thesis, we investigated, in MM, the apoptotic effects of gallic acid (GA), which is found in many fruits and has been known to have anti-proliferative and apoptotic effects in some cancers. Firstly, the effect of GA on MM cells was investigated morphologically. Then, to determine the apoptotic effects of GA, a DNA fragmentation analysis was performed and the protein levels and enzymatic activities of caspase-8 and caspase-9 were analyzed. In addition, we searched the connection between the GA-coordinated apoptosis and the stress-activated signalling pathways. Finally, we determined the effect of GA on the p53 and PARP protein levels.

According to our results, GA, in 100 μ M dose and time-dependently, caused the activation of both intrinsic and extrinsic apoptotic pathways. We established that p53 signalling pathway but not JNK pathway contributed to the activation of these two apoptotic pathways. We think that the p53 activation in GA-induced cells might be linked with the p38 signalling pathway.

Key Words: Gallic Acid, Apoptosis, Malignant Mesothelioma, Caspase.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince maddi ve manevi yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen ve her konuda desteğini her zaman hissettiğim hocam Sn. Yrd. Doç. Dr. Asuman Demiroğlu Zergeroğlu'na,

İlk tanıdığım andan itibaren hep yanımda olan, varlıklarıyla hayatımı renklendiren dostlarım Ekin Kestevur, Fatma Sağır ve Gülşife Candemir' e,

Tüm tez çalışmam boyunca desteklerini esirgemeyen Emrah Kırdök, Hüseyin Gül, Zeynep Yılmaz, Seda Macit ve Nurettin Ayvalı' ya,

Yardıma her ihtiyaç duyduğumda beni hiç geri çevirmeyen Zeynep Özcan ve Onur Çalışkaner'e,

En mutsuz olduğum anlarda bile beni güldürmeyi başarabilen, dostlukları benim için çok özel olan Şerif Yılmaz, Hamit Ekinci ve Taner Şar'a,

Ayrıca Özge Eltan, Emrah Özçelik, İrem Yalım, Metin Çetin, Pelin Balçık, Görkem Odabaş, Zeynep Girgin, Furkan Alkan, Şeyma Özen, Mehmet Sarıhan, Tuğçe Keskiner, Türkan Çakar, Safa Aydın' a ve tüm MBG ailesine,

Ve her zaman maddi, manevi desteklerini esirgemeyen, bundan sonra da her zaman yanımda olacaklarını bildiğim annem Nurcan Turhanlar, babam Taşkın Turhanlar ve kardeşim Aykut Turhanlar'a teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	2
2. KANSER	4
2.1. Malignant Mezotelyoma	4
2.2. Polifenoller ve Gallik Asit Türevleri	8
2.2.1. Polifenoller	8
2.2.1.1. Flavonoidler	8
2.2.1.2. Lignanlar	10
2.2.1.3. Stilbenler	10
2.2.1.4. Fenolik Asitler	11
2.2.2. Gallik Asit ve Ester Türevleri	12
2.3. Gallik Asitin Kansere Hücreleri Üzerine Etkisi	15
2.4. Hücre Ölümü	18
2.4.1. Apoptoz	22
2.4.1.1. Dışsal (Extrinsic) Yolak	24
2.4.1.2. İçsel (Intrinsic) Yolak	25
2.4.2. Kaspazlar	26
2.4.2.1. Apoptozda Görevli Kaspazlar	28
2.4.2.2. İnflamatuvar Kaspazlar	31
2.4.2.3. Terminal Farklılaşması Gerektiren Kaspazlar	33
2.4.2.4. Tanımlanamamış Fizyolojik Etkileri Olan Kaspazlar	33
2.4.3. p53	34

2.4.4. Poli ADP-Riboz Polimeraz (PARP)	37
2.5. Sinyal Yolakları	40
2.5.1. Mitojen Tarafından Aktive Edilen Protein Kinazlar (MAPKs)	40
2.5.1.1. p38 Sinyal Yolağı	40
2.5.1.2. c-JUN NH ₂ - Terminal Kinazlar (JNK Sinyal Yolağı)	41
3. MATERYAL VE YÖNTEM	43
3.1. Materyal	43
3.1.1. Kimyasal Maddeler	43
3.1.2. Hücre Hatları	43
3.1.3. Cihaz ve Diğer Malzemeler	44
3.1.4. Kullanılan Solüsyonlar	44
3.1.5. Kullanılan Kit ve Antikorlar	47
3.2. Yöntem	48
3.2.1. Hücre Kültürü ve Alt Kültürleme	48
3.2.2. Hücre Stoklanması ve Dondurulmuş Hücrelerin Çöktürülmesi	48
3.2.3. DNA Merdivenlenme (Fragmentasyon) Analizleri	48
3.2.3.1. DNA İzolasyonu	49
3.2.3.2. Agaroz Jel Elektroforezi	49
3.2.4. Kaspaz Aktivite Testleri	49
3.2.4.1. Hücre Lizisi	50
3.2.4.2. Protein Miktarının Belirlenmesi (BCA Yöntemi)	50
3.2.4.3. Kaspaz-8 ve -9 Proteinlerinin Aktivasyonlarının Belirlenmesi	50
3.2.5. Sinyal Yolak İnhibitörleri ve Kaspaz Aktivitelerinin Ölçümü	51
3.2.6. Gallik Asitin Kaspaz 8 ve 9, p53 ve PARP Proteinlerine Etkisinin İncelenmesi	51
3.2.6.1. Proteinlerin Eldesi ve Total Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi	51
3.2.6.2. SDS-PAGE ve Western Blotlama	52
4. SONUÇLAR	53
4.1. Gallik Asitin SPC212 Hücre Morfolojileri Üzerine Etkisinin Konsantrasyon ve Zamana Bağlı Belirlenmesi	53
4.2. Gallik Asitin Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi	54

4.2.1. DNA Fragmentlenmesinin Konsantrasyona ve Zamana Bağlı Belirlenmesi	54
4.2.2. Kaspaz Aktivitelerinin Belirlenmesi	54
4.2.3. Sinyal Yolak İnhibitörleri ve Gallik Asit Etkileşiminin Kaspaz Aktivitesine Etkisinin Belirlenmesi	57
4.2.4. p53 ve PARP Proteinlerinin Aktivitesinin Belirlenmesi	60
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	61
KAYNAKLAR	65
ÖZGEÇMİŞ	74

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u> <u>Kisaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
O ₂	: Oksijen
Ca ²⁺	: Kalsiyum +2 iyonu
NF-κB	: Nükleer faktör kappa B
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksidaz
TNF-α	: Tümör nekroz faktör alfa
IC ₅₀	: Yarı maksimum inhibitör konsantrasyonu
TGF-β	: Transforme edici büyüme faktörü beta
Bcl-2	: B-hücre lenfoma 2
NAD ⁺	: Nikotinamit adenin dinükleotid
ABL	: Abelson mürin lökemisi viral onkogen homologu 1
ADAM17	: ADAM metallopeptidaz domain 17
AIF	: Apoptoz uyarıcı faktör
Akt	: Protein kinaz B
Apaf-1	: Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1
ATP	: Adenozin trifosfat
Bax	: Bcl-2 bağlantılı X proteini
BCR	: Kırılma noktası kümelenme bölgesi proteini
CARD	: Kaspaz tanıma domaini
CASc	: Katalitik kaspaz bölgeleri
COX	: Siklooksijenaz
DED	: Ölüm efektör domaini
DISC	: Ölüm tetikleyici sinyal kompleksi
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ER	: Endoplazmik retikulum
ERK	: Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazlar
FADD	: Fas ilişkili ölüm domaini içeren protein
FasL	: Fas ligand
GA	: Gallik asit
GSH	: Glutatyon

GTPaz	:	Guanozin trifosfat hidrolaz
IAP	:	Apoptotik protein inhibitörü
ICE	:	İnterlökin-1 β -converting enzim
IGF-1R	:	İnsülin benzeri büyüme faktörü reseptörü 1
JNK	:	C-Jun N-terminal kinaz
MAPKs	:	Mitojen tarafından aktive edilen kinazlar
MM	:	Malignant mezotelyoma
MMP	:	Mitokondri membran geçirgenliği
MMP-9	:	Matriks metalloproteinaz 9
MMPs	:	Matriks metalloproteinazlar
PARP	:	Poli ADP-riboz polimeraz
PI3K	:	Fosfatidilinositol-3-kinaz
PS	:	Fosfotidilserin
PUMA	:	P53 tarafından uyarılan apoptoz düzenleyici
PYD	:	Pirin domaini
RIP1	:	Serin-treonin kinaz
RNS	:	Reaktif nitrojen türleri
ROS	:	Reaktif oksijen türleri
SV40	:	Simian virüs 40
TNFR1	:	Tümör nekroz faktör reseptörü tip 1
TRAIL	:	TNF bağımlı apoptoz uyarıcı ligand
UV	:	Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Malignant mezotelyoma kanserine yakalanmış 76 yaşındaki bir erkek hastanın, asbeste maruz kalmasından sonra oluşan plaklar ve plevral yüzey.	5
2.2: Asbest fiberlerinin patojenezi.	6
2.3: Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı.	8
2.4: Flavonoidlerin alt gruplarının kimyasal yapısı.	9
2.5: Lignanların kimyasal yapısı.	10
2.6: Stilbenlerin kimyasal yapısı.	10
2.7: Hidroksisinnamik asitlerin kimyasal yapısı.	11
2.8: Hidroksibenzoik asitlerin kimyasal yapısı.	12
2.9: Gallik asitin kimyasal yapısı.	12
2.10: Nekroz ve apoptoza uğrayan hücrelerin kaderi.	20
2.11: Programlı hücre ölümü çeşitleri.	22
2.12: Hücrelerin, programlı hücre ölümlerinden biri olan apoptoza uğradıklarında geçirdikleri değişimler.	23
2.13: Apoptozun içsel ve dışsal yolağı.	26
2.14: Kaspazların görevlerine göre grupları.	27
2.15: a) Kaspaz-3, b) Kaspaz-6 ve c) Kaspaz-7'nin moleküler yapıları.	29
2.16: Kaspaz-2'nin moleküler yapısı.	29
2.17: a) Kaspaz-8 ve b) Kaspaz-10'nun moleküler yapısı.	30
2.18: Kaspaz-9'un moleküler yapısı.	30
2.19: Kaspaz-1'in moleküler yapısı.	31
2.20: MAPK sinyal yolağının akışı.	42
4.1: Kontrol, 100 µM ve 200 µM konsantrasyonlarda GA uygulanmış SPC212 hücrelerinin a) 24. saatteki ve b) 48. Saatteki mikroskopik görüntüleri.	53
4.2: GA'nın doza ve zamana bağlı olarak spc212 ve Met5A hücrelerinde sebep olduğu DNA fragmentasyonu.	54

4.3:	GA'nın SPC212 hücreleri üzerindeki etkisi. a) Kaspaz-8 ve b) Kaspaz-9 proteini üzerindeki etkisi.	56
4.4:	Kaspaz -8 ve -9 proteinlerinin hücredeki değişimlerinin belirlenmesi. a) 24. ve 48. saatlerde kaspaz kesimleri b) 24. saatte ve 48. saatte kaspaz-9 kesimleri.	57
4.5:	JNK (SP600125), p38 (SB203580) ve EGFR (CL-387,785) inhibitörleri ile GA'nın SPC212 hücre hattındaki kaspaz aktivitesinin değerlendirilmesi. İnhibitörler 10 μ M ve GA 100 μ M olarak uygulanmıştır. a), c) Kaspaz-8, b), d) Kaspaz-9 aktivitelerini göstermektedir.	59
4.6:	p53 ve PARP protein seviyeleri 50 μ M, 100 μ M ve 200 μ M GA uygulanan SPC212 hücrelerinde a) p-p53, p53 ve b) PARP proteini seviyelerindeki değişimleri.	60

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Gallik asitin ester türevleri.	14
2.2: GA'nın bazı kanser hücre hatlarındaki etkileri.	16
2.3: Ölen hücrelerde görülen değişiklikler.	18

1. GİRİŞ

Malignant Mezotelyoma (MM) göğüs zarının mezotelyal hücrelerinden kökenlenip serosal yüzeyler ve inter-lobular çatlaklarda büyümeye devam eden [Motadi et al., 2007] ve ilk kez 1960 yılında asbest ile ilişkilendirilmiş bir kanser türüdür [Wagner et al., 1960]. Asbest temel olarak otomotiv sektöründe fren yapımında, gemi inşaatında ve inşaat sektöründe kullanılır. Asbeste maruz kalındıktan sonra belirtiler ortaya çıkıncaya kadar 15-40 yıl arasında herhangi bir etki görülmez. Fakat hastalık teşhisini takiben hastanın yaşam süresi 5-16 aydır [Sriram and Antony, 2007]. Bu duruma rağmen MM için etkin bir ajan henüz bulunamamıştır.

Gallik Asit (GA) birçok meyve ve sebzenin içeriğinde bulunan doğal bir moleküldür ve gallotanen denilen tanen içeriğinde bulunur [Locatelli et al., 2013], [You et al., 2011]. GA'nın başta anti-kanser olmak üzere pek çok etkisi bulunmaktadır [Mansouri et al., 2013]. Lösemi, prostat, akciğer, mide, kolon, meme, rahim ağzı ve özofagus kanserleri GA'nın en çok çalışıldığı kanser türleri arasındadır [Locatelli et al., 2013].

Hücreler, ölürken geçirdikleri morfolojik değişimlere göre 3 temel kısımda incelenirler. Bunlar; apoptoz, otofaji ve nekrozdur [Takemura et al., 2013]. Programlı hücre ölümü tiplerinden biri olan apoptoz gelişim ve olgunlaşma sırasında, hücre ölümü ve doku homeostazisinin kontrolü ve düzenlenmesinden sorumludur [Loetscher et al., 2001]. Apoptoza giren hücrelerdeki değişimler morfolojik olarak nükleer yoğunlaşma, hücre büzülmesi ve membran kabarcıklanması olarak tanımlanır. Bunların yanında kaspazların aktive olması, DNA'nın 180-200 oligonükleozomal fragmente bölünmesi sonucu DNA fragmentlenmesi fizyolojik değişimler arasındadır [Sreedhar and Csermely, 2004].

Apoptozda temel olarak 2 yolak görev alır. Bunlar reseptör aracılı yolak olarak bilinen dışsal yolak ve mitokondriyel yolak olarak bilinen içsel yolaktır [Takemura et al., 2013]. Dışsal apoptoz yolağı, hücre membranında bulunan ölüm reseptörlerinin aktivasyonu ile başlatılır. TNF- α , TRAIL ya da FasL, bu yolaktaki temel başlatıcı moleküllerdir. İçsel yolak ise ultraviyole ışınları, steroidler, kimyasal ilaçlar ya da büyüme faktörü yoksunluğu gibi etmenler aracılığıyla başlatılır [Sakamaki and Satou, 2009].

Apoptozda rol oynayan temel moleküller kaspazlardır. Kaspazlar sistein proteaz ailesinin üyeleridir. İnsanlarda 11 tane kaspaz bilinmesine rağmen apoptozda görevli kaspazlar; kaspaz-3, -6, -7, -8 ve -9'dur. Kaspaz-8 dışsal yolakta görev alırken, içsel yolak kaspaz-9 tarafından aktive olur. Kaspaz-3, -6 ve -7 her iki yolak içinde ortak moleküldür [Sakamaki and Satou, 2009].

Hücrelerin apoptoza uğramasında birçok molekül rol almaktadır. Bu moleküllerden p53; DNA hasarı, hücresel stres faktörleri, hipoksi, onkojen aktivasyonu, açlık, mitokondriyal ve ribozomal süreçlerde görev alır. Hücrenin içinde bulunduğu koşullara bağlı olarak hücre ölümünü, yaşlılığı, hücre döngüsünün durdurulmasını veya DNA onarımını uyarabilir. p53'ün apoptozda iki ana rolü vardır. Bunlardan ilki apoptoz düzenleyici moleküllerdeki transkripsiyonel aktivasyon, diğeri ise mitokondriyal membran fizyolojisindeki değişikliktir [Stegh, 2012].

Transformasyon, ölüm, yaşam, farklılaşma ve hücre proliferasyonu gibi hücresel olaylarda görev alan MAPKs, hücre içi sinyalleri düzenleyen serin treonin kinazlar ailesinin üyeleridir. Hücre çekirdeğinden bilgi aktarılması konusunda önemli görevleri vardır. MAPKs ailesinin önemli üyelerinden iki tanesi p38 ve JNK sinyal yolaklarıdır. p38 sinyal yolağı hiperosmolarite, ısı şoku, radyasyon gibi birçok stres kaynağı tarafından aktive olabilir. p38'in gen transkripsiyonunun düzenlenmesi, sitokin üretiminin uyarılması, apoptozun uyarılması ve hücre farklılaşması gibi etkilerinin olduğu bilinmektedir [Platanias, 2003]. JNK sinyal yolağı ise TNF- α ve TGF- β gibi pro-inflamatuar sitokinler tarafından aktive edilir. Hücre apoptozu, proliferasyonu ya da farklılaşması JNK sinyal yolağının cevapları arasındadır [Kim and Choi, 2010].

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

MM, üzerinde yoğun çalışmalar yapılmasına rağmen, geç teşhis edilen ve çok etkin tedavi yöntemi olmayan bir kanser türüdür. Hastalığın tedavisi için henüz etkin bir ajan bulunamamıştır. Bir polifenol olan GA, çeşitli kanser türlerinde hücre ölümünü tetikleyici etki gösterir. GA normal hücrelere karşı az sitotoksik etki göstermesi ve kanser hücrelerine karşı gösterdiği toksik etki nedeniyle ilgi çekicidir.

Bu tez çalışmasında, birçok bitkide bulunan ve etkinliği birçok kanser araştırmasında kanıtlanmış GA'nın, MM hücreleri üzerine olan etkisi DNA ve protein seviyesinde araştırılması planlanmıştır. GA uygulanmış olan hücrelerdeki DNA

hasarı araştırıldıktan sonra, kaspaz proteinleri seviyeleri incelenmiştir. Sonrasında kaspaz aktivasyonunda hangi yolların aracı olduğu araştırılmıştır.

Şu ana kadar yapılan çalışmalarda GA'nın MM üzerine etkisiyle ilgili araştırma bulunmamaktadır. Yaptığımız çalışma GA'nın MM hücrelerindeki apoptotik etkisinin incelendiği ilk çalışmadır. Bu tezde GA'nın *in vitro* olarak MM hücrelerindeki apoptotik etkisi ve bu etkiye neden olan aracı moleküllerin katkısının araştırılması hedeflenmiştir.

2. KANSER

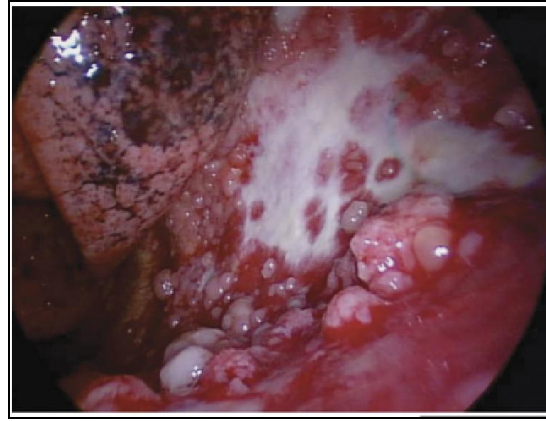
Tümörler saldırganlık seviyelerine göre; komşu dokuları istila etmeden, lokal olarak büyüyen (benign) ve komşu dokuları istila edip, metastaz yapan (malign) tümörler olarak adlandırılırlar. Benign tümörler zararsızdırlar. Fakat bazen hayati öneme sahip organlara baskı yapabilirler. Bu durumda organizma için zarar verici hale gelebilirler. Kanser ilişkili ölümlerin çoğu malign tümörler tarafından gerçekleştirilirler. Kanser ölümlerinin % 90'ı metastaz yapan malign tümörlerden kaynaklanır.

Tümörler kökenlendikleri dokulara göre epitelyal (karsinoma), mezenşimal (sarkoma), hematopoetik ve nöroektodermal olmak üzere 4 temel gruba ayrılırlar. İnsanlarda oluşan tümörlerin büyük kısmı epitelyal kökenlidir. Karsinomalar gastrointestinal sistem (ağız, özofagus, mide ve ince ve kalın bağırsak), deri, süt bezleri, pankreas, akciğer ve karaciğer gibi organlardan kökenlenirler. Sarkomalar tüm kanser tiplerinin % 1'ini oluştururlar ve çeşitli mezenşimal hücre tiplerinden meydana gelirler. Fibroblastlar, adipositler, osteoblastlar ve miyositlerden kökenlenen tümörler mezenşimal tümörlerdir. Kan hücresi kökenli (eritrosit, antikor salgılayan plazma hücreleri ve T ve B lenfositler) hematopoetik tümörleri meydana getirirler. Nöroektodermal tümörler ise merkezi ve periferik sinir sistemi bileşenlerinden türevlenirler. Glioma, glioblastoma, nöroblastoma, schwannoma ve medullablastoma hücrelerinden kökenlenen kanserler nöroektodermal kanserlerdir. Karsinomalar çok sık rastlanan kanser türleri olmasına rağmen, kökenini aldıkları dokuya göre karşılaşılma sıklıkları değişmektedir. Malignant mezotelyoma (MM), çok sık rastlanılmamasına rağmen, gelişimi sırasında sinsice ilerleyen oldukça agresif bir kanser türüdür [Alberts et al., 2006].

2.1. Malignant Mezotelyoma

MM dünya üzerinde yaygınlığı gittikçe artan, teşhisi zor ve ilaç tedavisine dirençli bir kanser türüdür [Sriram et al., 2007], [Zangemeister-Wittke et al., 2005]. Tümör, Şekil 2.1'de [Sriram and Antony, 2007] görüldüğü gibi göğüs zarının mezotelyal hücrelerinden kökenlenir, ardından serosal yüzeyler ve inter-lobular çatlaklarda büyümeye devam eder [Motadi et al., 2007]. İlk kez 1960 yılında Wagner

ve arkadaşları tarafından Güney Afrika’da asbest teması ile ilişkili olarak meydana geldiği bildirilmiştir [Wagner et al., 1960]. Sigara dumanı ise MM oluşumu için ikincil sebeptir [Zitting et al., 2002]. Batı ülkelerinde mesleksel veya çevresel temas sonucu gelişen mezotelyoma; Türkiye, Kıbrıs, Yunanistan, Afganistan, Bulgaristan gibi ülkelerde asbest ile karışmış toprağın (beyaz toprak) ev işlerinde kullanılmasıyla ikincil temas sonucunda gelişmektedir [Web 1, 2014]. Hastaların akciğerlerinde asbest parçalarının gözlenmesi bu durumu onaylamaktadır [Motadi et al., 2007]. Maruz kalındıktan sonra belirtiler ortaya çıkıncaya kadar 15-40 yıl arasında belirti göstermeyen bir periyoda sahiptirler. Yaşam süresi 5-16 aydır ve 1 yıl tedaviden sonra hastaların %75’i hayatlarını kaybederler. Etkili bir tedavisi olamayan MM, kemoterapi ve radyoterapiye karşı dirençlidir. Aynı zamanda teşhisinin de zor olmasından dolayı genellikle hastalığın son aşamalarında teşhis edilebilmektedir. MM hastaların %5’inden daha azında erken teşhis edilir ve ameliyat sonucunda hastalarda iyileşme görülebilmektedir [Sriram and Antony, 2007]. Hastalığın Avrupa’da 2020 yılına kadar her yıl iki kat artacağı tahmin edilmektedir [Zangemeister-Wittke et al., 2005]. Amerika’da ise her yıl yaklaşık 2500 hasta MM’den dolayı hayatını kaybetmektedir [Sriram and Antony, 2007].

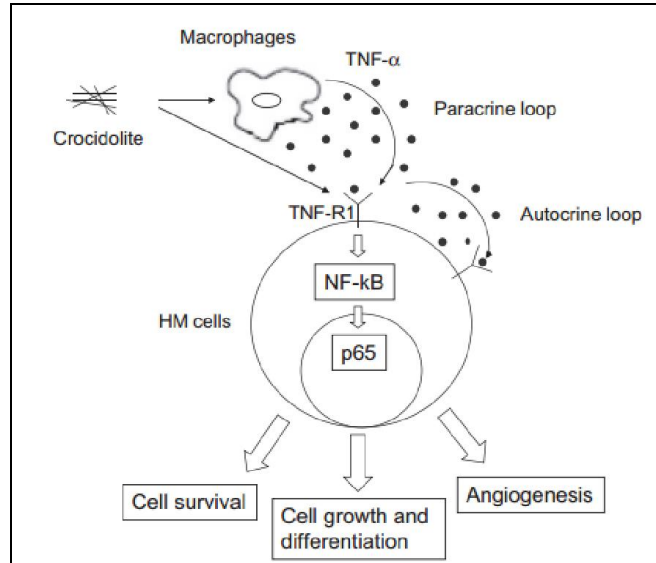


Şekil 2.1: Malignant mezotelyoma kanserine yakalanmış 76 yaşındaki bir erkek hastanın, asbeste maruz kalmasından sonra oluşan plaklar ve plevral yüzey.

Mezotelyomalar dört histolojik kategoriye ayrılabilen bir heterojeniklik gösterirler; epitelioid (%50), sarkamotöz (%15-20), bifazik (% 15-20), desmoplastik (%15-20) [Cagle et al. 1989] Bu baskın öncül alt gruplardan çok daha nadir olarak epitelyal, kıkırdağımsı, kemiğımsi ve damarımı yapılar görülebilir. Epitelioid alt grubu kabarcıklı ve borumsu büyüme şekli ile ayırt edilir. Yeterince farklılaşmamış

şekli ise daha bütünsel büyüme özelliği gösterir. Tümör hücreleri genellikle küboid yapıdadır fakat pulumsu ya da sütunumsu yapılardan iğ şekli yapılara kadar geniş bir aralıkta da olabilir. İyice farklılaşmış tümörlerin yüzeyleri stoplazmik vakuol görünümündedir. Sarkomatöz grubu varyantlarının malignant görünen iğ hücrelerini de içeren birçok çeşidi vardır. Bu hücreler fibröz stroma da küçük demetler halinde çoğalırlar. Bifazik grubunu ise tanımlamak daha kolaydır. Hem epiteloïd hem de sarkomatöz öğelerini içeren karışımdan oluşurlar [Motadi et al., 2007].

Malignant mezotelyomanın temel sebebi olan asbest, hidratlanmış magnezyum silikat mineralleri grubudur ve yaygın olarak gemi inşasında, otomotiv sektöründe fren yapımında ve inşaat sektöründe kullanılır [Sriram and Antony, 2007]. İki temel asbest şekli vardır; serpantin asbest (krizotil) ve amfibol asbest (krokidolit, amosit, antofilit, aktinolit ve tremolit). Krokidolit, ince fiberlere sahip olduğu için Şekil 2.2’de [Zucali et al., 2011] görüldüğü gibi akciğerler içine girebilir ve tekrarlanan bir hasara sebep olabilir, bundan dolayı onkojenik olarak en tehlikeli asbest türüdür [Zucali et al., 2011].



Şekil 2.2: Asbest fiberlerinin patojenezi.

İnsan mezotelyoma hücreleri asbeste maruz kalındıktan sonra poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) aktive olur. İnsan mezotelyal hücrelerinin doğrudan asbeste maruz kalmasını takiben tek iplikçikli DNA’da kırıkların oluşması PARP’ın baskılanmasına sebebiyet verebilir. PARP normalde bir DNA tamir enzimi olmasına rağmen, asbeste maruz kalındığında apoptoz ve hücre ölümünü tetikler. Asbestin sebep olduğu MM

oluşma mekanizması değişik şekillerde olabilir. Asbest fiberleri aracılığıyla plevranın kronik tahrişi, fiberlerin mitotik mekanizma ile karışımının kromozomal zararlara yol açması, mitojen aktive edici protein kinaz sinyal yolağını (MAPK) ve nükleer faktör kB yolağını da içeren hücresel yolların aktive olması ve DNA hasarı sonrasında oksidatif stres oluşumu, malignant mezotelyoma oluşumunda etkilidir [Toumpanakis and Theocharis, 2011].

MM'de etkili olan ve hücre içindeki stres sonucunda hücrelere zarar verebilen reaktif oksijen türleri (ROS), oksijen içeren, kimyasal olarak reaktif moleküllerdir. Oksijen iyonları ve peroksitler ROS moleküllerindendir. ROS'lar normal metabolizma içinde oksijenin yan ürünleri olarak oluşurlar ve hücre sinyalleri ve homeostazinin korunması açısından önemli moleküllerdir. Ancak UV, sıcaklık değişimleri ve radyasyon gibi hücre içinde stres yaratan durumlarda çok yüksek seviyelere ulaşabilirler. Bu durumda hücre ciddi zararlar görebilir [Devasagayam et al., 2004].

Reaktif oksijen türleri asbest fiberleri tarafından oluşturulabilir. Demir molekülü gerektiren süreçte fiber yüzeylerindeki reaksiyon ve mezotelyal hücreler ya da ayrılmış makrofajlar tarafından asbest fiberlerinin fagositozu ROS oluşumunda etkilidir. Asbest fiberleri aynı zamanda reaktif nitrojen türlerini (RNS) de oluşturabilir. Asbeste maruz kalma ile başlatılan inflamatuvar süreçinde hem ROS hem de RNS oluşabilir [Toumpanakis and Theocharis, 2011].

Her ne kadar çalışmaların birçoğu, MM'nin ana sebebinin asbeste maruz kalmak olduğunu gösterse de bazı çalışmalarda Simian 40 virüsü (SV40) ve MM ilişkisi araştırılmıştır. SV40 ile mezotelyoma arasında bir ilişki olduğu belirlenmiş olmasına rağmen, SV40 tek başına mezotelyomaya sebep olmaz. Yapılan çalışmalarda SV40'ın, krosidolit ile birleşmesi sonucunda, hamsterlarda mezotelyamayı teşvik ettiği görülmüştür. Moleküler epidemiyolojik çalışmalarda, SV40'ın asbeste maruz kalan hücrelerde MM riskini arttığı gözlenmiştir. Ancak son dönemde yapılan çalışmalar SV40'ın MM'den sorumlu olmadığını göstermektedir [Sriram and Antony, 2007].

2.2. Polifenoller ve Gallik Asit Türevleri

2.2.1. Polifenoller

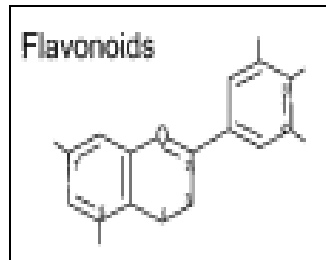
Her molekülde birden fazla fenol grubu taşıyan bileşikler polifenoller olarak adlandırılır. Bitkilerin sekonder metabolitleri olan polifenoller bitkileri zararlı dış etkilere (UV, patojenler vb.) korurken aynı zamanda bitkilerin renklenmelerinden ve tatlarından sorumludurlar. Gün içinde yediğimiz birçok besinde bulunan polifenoller sebze, meyve ve kuru baklagillerin yanında çay, kahve ve şarap gibi birçok içecek içinde de bulunur [Yoon et al., 2013], [Manach et al., 2004].

Son yıllarda polifenoller, hem diyet içinde alınan besinlerde bol miktarda bulunmasından hem de kötü huylu tümör tedavisi, kardiyovasküler hastalıklar ve nörodejeneratif hastalıklara karşı olumlu etkilerinden dolayı araştırmacılar tarafından ilgi görmektedirler [Yoon et al., 2013].

Polifenoller, fenol halkalarına göre dört temel gruba ayrılmışlardır; flavonoidler, lignanlar, stilbenler ve fenolik asitler [Yoon et al., 2013].

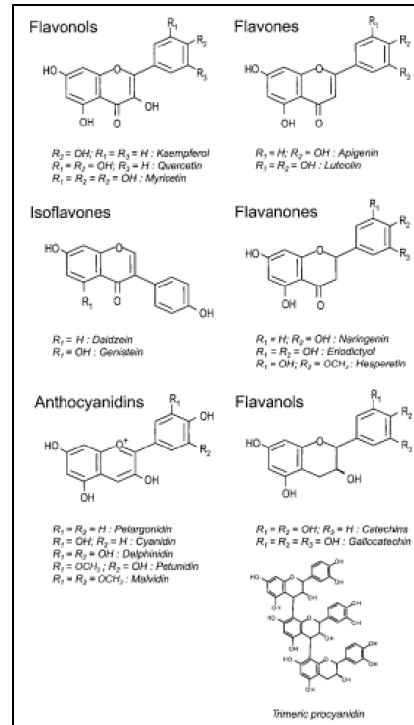
2.2.1.1. Flavonoidler

En büyük polifenol grubunu içeren flavonoidler Şekil 2.3'te [Manach et al., 2013] görüldüğü gibi iki benzen halkasının oksijen içeren bir piren halkasına bağlanmasıyla oluşur. Şekil 2.4'te [Manach et al., 2013] görüldüğü gibi, temel olarak altı gruba ayrılırlar; flavonoller, flavonlar, flavanonlar, izoflavonlar, flavanoller, ve antosiyanidinler.



Şekil 2.3: Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı.

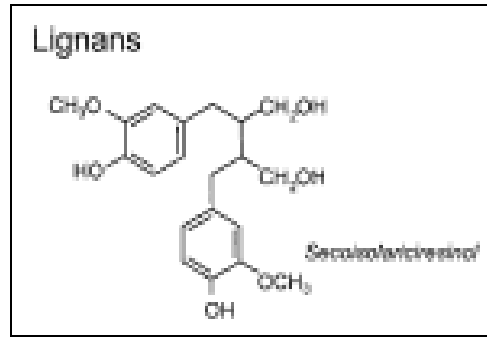
Kersetinin de içinde bulunduğu flavonoller yiyeceklerde en çok bulunan flavonoid türüdür. Soğan, brokoli ve pırasada bol miktarda bulunmaktadır. Flavonollerden daha az yaygın olarak bulunan flavonlar ise en çok maydanoz ve kerevizde bulunur. Nane gibi aromatik bitkiler ve turunçgiller flavononlar açısından zengindir. Baklagillerde özellikle soyada bulunan izoflavonlar 3 ana molekül içerir. Bunlar; genistein, diadzein ve glycitein'dir. Flavanoller hem monomer (kateşin) hem de polimer (proantiosiyantin) olarak bulunabilirler. Kateşin birçok meyvede bulunur. Ayrıca yeşil çay ve çikolata kateşin bakımından zengindir. Kateşinlerin dimer, oligomer ve polimerleri proantiosiyantinleri oluşturur. Üzüm, elma, şeftali gibi yiyeceklerin ve şarap, bira gibi içeceklerin ekşimtrak tatlarından proantiosiyantinler sorumludur. Antosiyanidinler çiçeklerin ve meyvelerin epidermal dokularında bulunan ve bu bitkilere mor, pembe, kırmızı ve mavi rengi veren pigmentlerdir. pH'a göre renkli ya da renksiz farklı kimyasal yapılarda bulunabilirler. Antosiyaninler aglikon formunda (antosiyanidin) değişken yapıdadırlar. Fakat bitki içinde bulunduklarında onların yapılarını bozan; ışıık, pH ve oksidasyon gibi koşullara karşı dirençlidirler. Patlıcan, lahana, fasülye soğan gibi kök sebzelerinde bulunmalarına rağmen, meyvelerde sebzelere göre daha yoğun miktarda görülürler [Manach et al., 2013].



Şekil 2.4: Flavonoidlerin alt gruplarının kimyasal yapısı.

2.2.1.2. Lignanlar

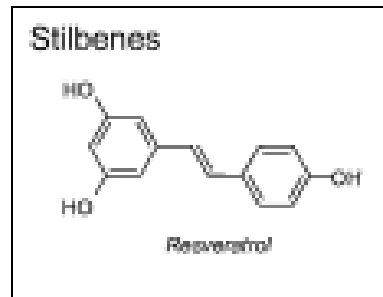
Lignanlar Şekil 2.5'te [Manach et al., 2013] görüldüğü gibi iki fenilpropan biriminden meydana gelirler. Lignanlar keten tohumu gibi yağlı bitkilerde çok fazla miktarda bulunur. Algler, baklagiller (mercimek), tahıllar (tritikle ve buğday), meyveler (armut, yaban eriği) ve bazı sebzeler (sarımsak, havuç, kuşkonmaz) de eser miktarda lignan içerir. Fakat keten tohumu diğer bitkilere oranla yaklaşık 1000 kat daha fazla lignana sahiptir. Lignanlar bağırsak mikroflorasında enterodiol ve enterolakton olarak metabolize edilir [Manach et al., 2013].



Şekil 2.5: Lignanların kimyasal yapısı.

2.2.1.3. Stilbenler

Kimyasal yapısı Şekil 2.6'da [Manach et al., 2013] gösterilen stilbenler insan diyetinde çok az miktardalardır. Bir stilben olan ve antikarsinojik etkileri tıbbi bitkilerle yapılan çalışmalar sonucunda gözlemlenen resveratrol, şarapta çok az miktarda bulunur. Bu durumdan dolayı resveratrol'ün koruyucu etkisi vücuda alınan diğer besinlerden daha fazla değildir [Manach et al., 2013].



Şekil 2.6: Stilbenlerin kimyasal yapısı.

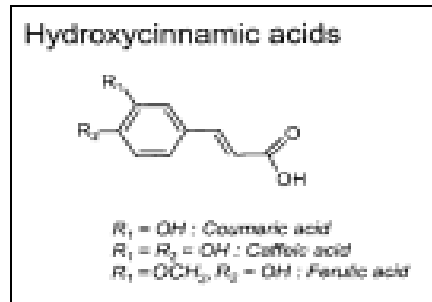
2.2.1.4. Fenolik Asitler

Fenolik asitler temel olarak 2 grupta incelenir; sinamik asit türevleri ve benzoik asit türevleri.

Şekil 2.7’de [Manach et al., 2013] kimyasal yapısı görünen hidroksisinnamik asitler hidroksibenzoik asitlerden daha yaygındırlar ve başlıca *p*-kumarik, kafeik, ferulik ve sinamik asitten meydana gelmektedir. Bu asitler genelde serbest formda çok nadir bulunurlar. Fakat işlenmiş yiyeceklerde (dondurulmuş, sterilize ve fermente edilmiş) serbest form daha yaygındır. Hidroksisinnamikasitler’in bağlı halleri ya glukozillenmiş türevleri ya da kuinik asit, şikimik asit ve tartarik asitin türevleridir. Kafeik asit ve kuinik asitin birleşmiş hali birçok meyvede ve yüksek konsantrasyonlarda kahvede bulunur. Hidroksisinnamik asitlerin yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu meyveler; yaban mersini, kivi, erik, kiraz ve elmadır.

Meyvelerdeki hidroksisinnamik asitlerin büyük bir kısmı kafeik asitlerden oluşur. Kafeik asitler en çok bulunan fenolik asitlerdir ve meyvelerin çoğunda toplam hidroksisinnamik asitlerin %75-100’ünü oluştururlar. Meyvelerin bütün kısımlarında kafeik asit bulunmasına rağmen en yüksek konsantrasyonu olgun meyvelerde dir.

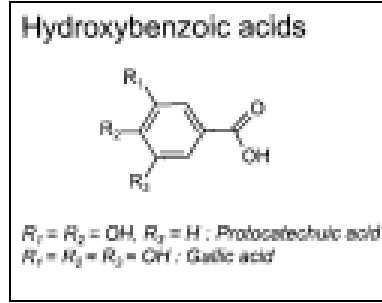
Ferulik asitler tahıl tanelerinde en çok bulunan fenolik asittir. Özellikle tanelerin dış kısımlarında bulunur. Buğdayın proteince zengin dış kısmı ve perikarp bölgesi toplam ferulik asitin %98’ini bulundurur.



Şekil 2.7: Hidroksisinnamik asitlerin kimyasal yapısı.

Şekil 2.8’de [Manach et al., 2013] kimyasal yapıları görünen hidroksibenzoik asitler hidrolizlenebilen tanenler gibi karmaşık yapıların bileşenleridir. Mangoda bulunan gallotanen ve kırmızı meyvelere bulunan elagitanenler hidrolizlenebilen tanenler içindedir. Yenilebilen bitkilerin hidroksibenzoik asit miktarları düşük olmasına rağmen kırmızı meyveler, siyah turp, ve soğanda bu miktar oldukça

yüksektir. Gallik asit (GA) hidroksibenzoik asitler grubunun içinde yer alır [Manach et al., 2013].

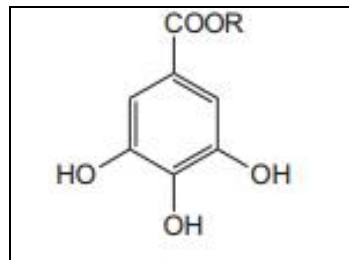


Şekil 2.8: Hidroksibenzoik asitlerin kimyasal yapısı.

2.2.2. Gallik Asit ve Ester Türevleri

Gallik asit (GA; 3,4,5-trihydroxyl-benzoic acid), polihidroksifenolik bileşik olarak, serbest form ya da daha yaygın olarak gallotanen denilen tanen içeriğinde bulunan, insanlarda çok iyi metabolize edilebilen bir moleküldür. GA'ca zengin çok sayıda bitki, meyve bulunmaktadır. Mazı, üzüm, çilek gibi kırmızı meyveler, ananas, muz, limon, güvercin ağacı, elma kabuğu gibi yiyecekler ve çikolata, kırmızı ve beyaz şarap gibi işlenmiş yiyecek ürünleri GA'ca zengindir. Bu yiyecekler vücuda alındığında, GA'nın serbest ya da glukronidleşmiş formunun mikromolar konsantrasyonları insan kan plazmasında gözlenir [Locatelli et al., 2013], [You et al., 2011].

Şekil 2.9'da [Locatelli et al., 2012] kimyasal yapısı gösterilen, moleküler ağırlığı 170,12 g/mol, erime noktası 250 °C ve suda çözünürlüğü 20 °C'de % 1,1 olan GA sarımsı beyaz renkli bir kristaldir [Verma et al., 2013].



Şekil 2.9: Gallik asitin kimyasal yapısı.

GA hidrolizlenebilen tanenlerin asit hidrolizasyonu sonucu elde edilebilir. GA'nın yan grubu çeşitli tepkimeler sonucunda değişerek, farklı farmakolojik özelliklere sahip, GA esterlerini ve onların analoglarını oluşturabilir. GA molekülündeki kimyasal değişimler, çözünürlük ve iyonizasyon seviyesi gibi farmakokinetik ve farmakodinamik özellikleri değiştirebilir. Ester türevleri yan zincirlerindeki karbon atom sayılarına göre kısaltılır. Bu türevler arasındaki temel fark, alifatik zincirdeki karbon atom sayısı olmasına rağmen, moleküllere farklı fizikokimyasal karakterler kazandırır. Yağ içinde çözülebilme anlamına gelen lipofilik, bu fizikokimyasal özelliklerden biridir. GA esterlerinin lipofil değerleri C log P değeri hesaplanarak bulunabilir. C log P değeri ve lipofililik ters orantılıdır. Yani C log P değeri ne kadar yüksekse lipofililik o kadar düşüktür [Locatelli et al., 2013].

GA'nın başta anti-kanser olmak üzere, anti-oksidan, anti-enflamatuar, anti-diyabetik, anti-anjiyogenik, anti-melanogenik [Mansouri et al., 2013], anti-bakteriyel, anti-viral [Liu et al., 2011], anti-alerjik, anti-ülser [Locatelli et al., 2013], anti-mutagenik [Verma et al., 2013] gibi etkileri bulunmaktadır.

GA, tirozinaz aktivitesini ve B16 melanoma hücrelerinin melanin biyosentezini inhibe etmesinden dolayı deri beyazlatıcı ajan olarak görev yapar. Hayvan modellerinde GA'nın oksidatif stresi azalttığı bulunmuştur. Bunun yanında, hepatik dokularda serumdaki katalaz enzimiyle birlikte glutatyon (GSH), GSH peroksidaz, GSH redüktaz ve GSH-S-transferaz seviyelerini artırır. Yağ asitlerinin doyumluğunu inhibe eden GA, damar oluşumunu engeller. Nöron hücrelerinde amiloid- β proteini teşvikli apoptozu önler ve sıçanlarda kimyasallarla indüklenmiş böbrek ve karaciğer hasarını inhibe eder. İnsan lenfositlerini, DNA fragmentlenmesinden ve hidrojen peroksitin indüklediği lipid peroksidasyonundan korur [Chuang et al., 2010].

Ayrıca GA, matriks metalloproteinazlarının (MMPs) anlatımını baskılar, buna bağlı olarak kanserli hücre göçü ve metastaz kuvvetli bir şekilde engellenmiş olur. Bu etkilerin ise hücre iskeleti yeniden düzenlenme yolağı (PI3K, p38 ve Ras) ve metastazla ilgili çoklu proteinlerin baskılanması ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Bunun yanında GA, enflamasyon öncesi sitokin ve kemokinlerin anlatımını baskılar [Yoon et al., 2012].

GA uygulanmış hücrelerde küçük GTPaz'ların Rho ailesi üyelerinden biri olan RhoB ekspresyonu artar. Rho ailesinin üyeleri hücre içinde yaşanan birçok olayda (hücre döngüsü, gen ekspresyonu, aktin düzenlenmesi, apoptoz) önemli

düzenleyicilerdir. Rho ailesi GTPaz'larının (RhoA, RhoB, RhoC) amino asit dizileri % 85 oranında birbirlerine benzemesine rağmen yapılan çalışmalarda her birinin ayrı etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. RhoA gastrik kanser hücre proliferasyonunu arttırırken, RhoC kanser hücre göçü ve yayılımını sağlar. Bunların yanında RhoB gastrik kanser hücrelerinde proliferasyonu, hücre göçünü ve yayılımı baskılar.

Bunların yanında GA çok iyi bir serbest radikal uzaklaştırıcısıdır. Antioksidan özelliğinden dolayı yiyecek, kozmetik ve farmasötik alanlarında da kullanılan GA, farmakolojik dozlarda memelilerde zehirli değildir. LD50 dozu sıçanlarda hesaplanmış ve bu değer kütlece 5 g/kg olarak bulunmuştur [Mansouri et al., 2012].

Tablo 2.1'de [Locatelli et al., 2012] gösterilen GA'nın ester türevleri (özellikle alkil esterler) farmakolojik özellikler açısından incelenmiştir. Birçok incelemede GA'nın ester türevlerinin, GA'dan daha kuvvetli etkilere sahip olduğu belirlenmiştir. Örneğin özellikle yan zincirinde sekiz ya da daha çok karbon atomuna sahip sentetik GA türevleri anti-viral, anti-fungal ve antioksidan özellikler açısından incelenmiş ve GA'ya göre daha etkili olduğu görülmüştür. Bu etkiler alkil ester türevlerinin amfipatik özellikleriyle de doğrudan ilişki halindedir. Molekülün hem hidrofilik hem de hidrofobik grupları üzerinde taşıması hücre membranı afinitesini ve geçirgenliğini arttırarak aktiviteye katkıda bulunur [Locatelli et al., 2012].

Tablo 2.1: Gallik asitin ester türevleri.

Kısaltma	Gallatlar	-R	C log P
GA	Gallik Asit	-H	0,89
G1	Metil	-CH ₃	0,92
G2	Etil	-(CH ₂)-CH ₃	1,27
G3	Propil	-(CH ₂) ₂ -CH ₃	1,73
G4	Bütil	-(CH ₂) ₃ -CH ₃	2,13
G5	Pentil	-(CH ₂) ₄ -CH ₃	2,53
G6	Hekzil	-(CH ₂) ₅ -CH ₃	2,92
G7	Heptil	-(CH ₂) ₆ -CH ₃	2,32
G8	Oktil	-(CH ₂) ₇ -CH ₃	3,72
G10	Desil	-(CH ₂) ₉ -CH ₃	4,51
G10	Undesil	-(CH ₂) ₁₀ -CH ₃	4,90
G12	Dodesil	-(CH ₂) ₁₁ -CH ₃	5,30
G14	Tetradesil	-(CH ₂) ₁₃ -CH ₃	6,09
G16	Hekzadesil	-(CH ₂) ₁₅ -CH ₃	6,89
G18	Oktadesil	-(CH ₂) ₁₇ -CH ₃	7,68

2.3. Gallik Asitin Kanser Hücreleri Üzerine Etkisi

In vitro ve *in vivo* uygulamalarda alkil gallatların birçok tümör hücre hattına karşı aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Propil gallat bileşenlerin hücre membranından geçerek stoplazmaya girmesine yardımcı olan hidrofobik alkil ester grubu içermektedir. Propil gallatın DNA'yı oksitlemesiyle meydana gelen hasarın ROS üretimiyle bağlantılı olduğu belirtilmiştir. Propil gallat stoplazmik bir esterase tarafından GA'ya dönüştürülürken DNA hasarı ve buna bağlı olarak apoptozun indüklenmesinden sorumlu olan H₂O₂, O₂ ve semikinon reaktif türlerinin ortaya çıktığı gösterilmiştir [Locatelli et al., 2012]. Yapılan çalışmalarda GA'nın; lösemi, prostat kanseri, akciğer kanseri, mide, kolon, meme, rahim ağzı ve özofagus kanserleri [You et al., 2011], melonoma kanseri [Locatelli et al., 2012], ağız içi tümörleri [Kaur et al., 2009] ve beyin tümörleri üzerinde [Lu et al., 2010] olumlu etkileri olduğu gözlenmiştir. Ayrıca Tablo 2.2'de [Locatelli et al., 2012] bazı kanser türlerinde GA'nın yaptığı etkiler gösterilmiştir. Çeşitli hücre hatlarında farklı moleküler düzeyde çok çeşitli etkiler gösteren GA, kansere karşı olan etkisinden dolayı terapötik uygulamalar için çok önemli bir biyomoleküldür [Verma et al., 2013]. GA hem mükemmel bir serbest radikal uzaklaştırıcı, hem de çok sayıda tümör hücre hattında programlanmış hücre ölümünü ve farklılaşmayı uyarıcı olarak tanımlanabilir. GA kanser gelişimi ve malignant transformasyonunu engellemede önemli rol oynar [Madlener et al., 2007]. Bu özellikten dolayı da GA'nın, vitaminlere katkı olarak kullanılması ya da ilave besinler ile vücuda alınması kanser riskini azaltmak açısından büyük bir önem taşımaktadır [Verma et al., 2013].

GA'nın anti-kanser özelliği üzerinde en çok durulan özelliklerinden biri olmasına rağmen, metal iyonları varlığında, konsantrasyona bağımlı olarak gösterdiği pro-oksidan özellik de önem taşımaktadır. GA'nın gösterdiği bu özellikten dolayı, kanser hücre hatlarında apoptoz indükleyici olarak etki gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca GA'nın kimyasallar tarafından meydana getirilen karsinogenezden koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir [Verma et al., 2013].

Tablo 2.2: GA'nın bazı kanser türlerindeki etkileri.

Kanserli hücre hattı	Hücre tipi	Gallik asidin etkisi	Referanslar
KATO III	Mide kanseri	Apoptoz	Yoshioka et al. (2000)
COLO 205	Kolon adenokarsinom	Apoptoz	Yoshioka et al. (2000)
3T3L1	Adiposit	Apoptoz	Hsu et al. (2007)
DU145	Prostat karsinoma	Apoptoz	Kaur et al. (2009)
22Rv1	Prostat karsinoma	Apoptoz	Kaur et al. (2009)
Calu-6	Akciğer kanseri	Apoptoz	You and Park (2010)
A459	Akciğer kanseri	Apoptoz	You and Park (2010)
HeLa	Rahim ağzı kanseri	Apoptoz	You et al. (2010)
U87	Glioma hücreleri	Anti-anjiyogenik	Lu et al. (2010)
U251n	Glioma hücreleri	Anti-anjiyogenik	Lu et al. (2010)
HL-60	Lösemi	Antiproliferatif	Madlener et al. (2007)
HT-29	Kolon kanseri hücreleri	Apoptoz	Bernhaus et al. (2009)

GA'nın insan promiyelositik lösemi HL-60 hücrelerinde apoptozu indüklediği ve hücre proliferasyonunu, yaklaşık 300 μM konsantrasyonda IC_{50} değerine ulaşarak inhibe ettiği görülmüştür. GA'nın etkisi karboksil grubunun metil, etil ve propil grupları tarafından baskılanmasıyla azaltılabilir. Karboksil grubuna lauril gruplarının eklenmesi ise GA'nın etkisini artırır. Bu durumda IC_{50} değerine yaklaşık 33 μM konsantrasyonunda ulaşılır [Locatelli et al., 2013]. GA ve onun türevleri lösemi hücrelerinde Ca^{2+} bağımlı apoptozu uyurabilmektedir. GA'nın, HL-60 lösemi hücrelerinde apoptoz sırasında superoxide dismutase enzimini inhibe ettiği gösterilmiştir [Madlener et al., 2007].

GA uygulanmış hücrelerde görülen apoptozun oksidatif stres sonucunda oluşan ROS, mitokondriyel fonksiyon bozukluğu ve intraselüler Ca^{2+} seviyesindeki artış ile alakalı olduğu görülmüştür [You et al., 2011]. GA'nın intraselüler Ca^{2+} seviyesinde değişikliğe yol açtığı ve bu etkinin ikincil ROS üretimiyle ve apoptozis indüksiyonuyla bağlantılı olduğu belirtilmiştir. İntraselüler Ca^{2+} seviyesindeki artışın sebep olduğu kaspaz 3 aktivasyonu mitokondriyal geçirgenlikte değişime, bu durum da sitokrom c'nin mitokondriyal porlardan stoplazmaya geçişine sebep olmaktadır [Locatelli et al., 2013].

Bunun yanında GA, kanser hücrelerine karşı seçici bir sitotoksikite gösterirken, normal hücrelere karşı çok düşük düzeyde bir sitotoksikite gösterir. GA normal fibroblast ve endotel hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstermemektedir. Bunların yanında, GA normal insan lenfositlerinde antiapoptotik etki gösterir ve antiapoptotik mekanizmasına etki ederek RINm5F beta hücrelerini glukolipotoksisteye karşı korur [You et al., 2010].

GA'nın insan lökemi hücre hattı (HK-63) ve HOS-1 hücre hattı üzerinde sitotoksik etkileri olduğu belirlenmiştir. GA; HSC-2 ve HL-60 hücrelerinde de

normal hücelere oranla daha yüksek DNA fragmentlenmesine ve sitotoksiteye neden olmuştur. GA'nın sitotoksitesinin hücre tipinden bağımsız olarak ROS üretimiyle bağlantılı olduğu, intraselüler Ca^{2+} ve ROS üretiminin, GA tarafından uyarılan apoptozun erken sinyal yolaklarının modülasyonunda önemli rol aldığı gösterilmiştir. Farklı hücre hatlarında apoptoza yol açan sinyal yolaklarını hedef alan ve çeşitli farmakolojik inhibitörler kullanılarak yapılan çalışmalar sonucunda; GA tarafından farklı hücre hatlarında başlatılan ölüm sinyalleri farklılık gösterse de genel başlatıcıların ROS ve Ca^{2+} olduğu gösterilmiştir [Locatelli et al., 2013].

K562 ve HL-60 lökemi hücre hatlarında yapılan çalışmalarda GA'nın kaspaz 3 ve 8 ifadelenmesini indüklediği, Bcl-2/Bax oranında artışa sebep olduğu, BCR/ABL kinazın tirozin fosforilasyonunun inhibisyonunda görev aldığı ve COX-2 seviyelerini düşürdüğü belirlenmiştir. GA, HL-60 hücrelerinde hem COX-1 hem de COX-2 aktivitelerini inhibe edebilmektedir. COX-2 ifadelenmesindeki artış, hücre bölünmesini uyardığı ve apoptozu inhibe ettiği için kanser gelişiminde rol oynamaktadır. COX-2 ifadelenmesinin GA tarafından inhibisyonu bu açıdan önem taşımaktadır [Locatelli et al., 2013].

GA tümör gelişiminin farklı safhalarında etki gösterebilir. Örneğin; 12-O-tetradecanolyphorbol-13-asetatın başlattığı deri kanserine bağlı olarak gelişen ornitin dekarboksilaz cevabını azaltmada etki göstermektedir. Gallik asit aynı zamanda tumor angiyoenezinin baskılanmasında da görev almaktadır. Mürin mesane kanser modeli (MB-49) üzerinde yapılan çalışmada GA kanser hücrelerinin yayılması üzerinde inhibisyon etkisi göstermiştir ve MMP-9'un da bu sürece dahil olduğu düşünülmektedir. Tümörler üzerindeki etkisinin dışında, GA aktivatör protein-1'in transkripsiyonel aktivitesini inhibe ederek atheroskleroza önlemek amaçlı da kullanılabilir. U87 ve U251 insan glioma hücre hatlarında yapılan çalışmada, GA'nın; glioma hücrelerinin canlılığını, çoğalmasını ve yayılma kapasitesini azaltıcı yönde etki gösterdiği ve normal fare beyin endotelial hücrelerinde ise tüp formasyonunu engellediği belirlenmiştir. Gallik asit aynı zamanda ADAM17 ifadelenmesini baskılamaktadır ve bu baskılanma PI3K/Akt ve Ras/MAPK sinyal yolaklarının inaktivasyonu aracılığıyla gerçekleşen invazyonun inhibisyonu ile ilişkili olabilir [Lu et al., 2010].

2.4. Hücre Ölümü

Çok hücreli organizmalar yaşamlarını sürdürebilmek için özelleşmiş dokulara ayrılmışlardır. Dokuları oluşturan hücreler gelişmek ve çoğalmak için hem çevrelerindeki komşu hücrelerle hem de bütün organizmayla bir düzen içinde olmalıdır. Bu karmaşık ve bütünleşmiş kontrol sisteminin hücre seviyesinde bozulması doku homeostazisinin bozulmasına yol açar. Homeostazinin bozulması hücrelerin normalden çok daha fazla çoğalmasına sebep olabilir. Bu durum insanlarda birçok hastalığın temelini oluşturur. Aynı şekilde hücrelerin erken zamanlarda ölümü de metabolizma için hastalık yapıcı etmendir. [Jacobson M., McCarthy., 2002]

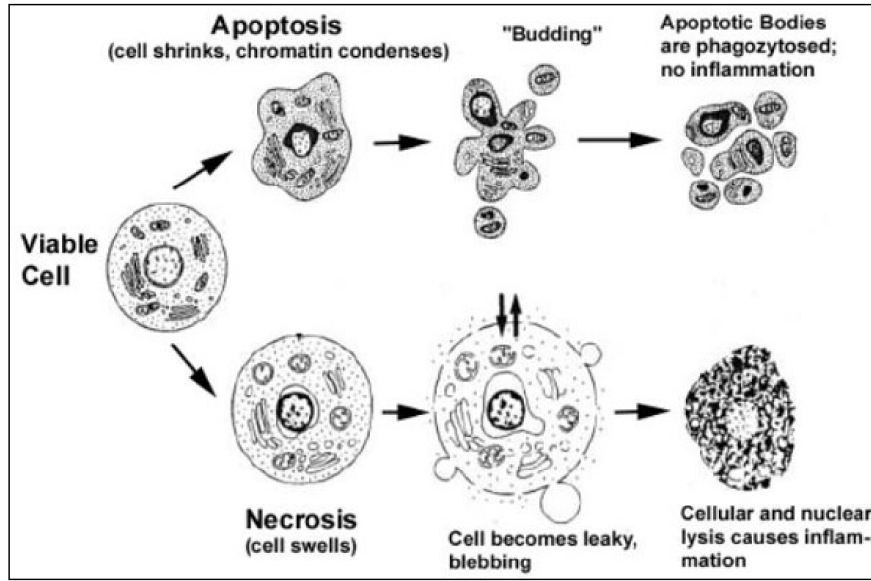
Hücre ölümü, ölen hücrelerin ilk dönüşümsüz adımı ya da geriye dönüş olmayan noktayı geçinceye kadar, dönüşümlü bir olay olarak nitelendirilebilir. Hücre ölümü terminoloji komitesi (NCCD; Nomenclature Committee on Cell Death), bir hücreye ölü denebilmesi için, hücrede gözlenmesi gereken morfolojik değişimleri belirlemiştir. Bu değişimler Tablo 2.3’de belirtildiği gibi; plazma membran bütünlüğünün kaybı, hücre parçalanması ve komşu hücreler tarafından yutulma’dır [Takemura et al., 2013]. Hücre ölümünü tanımlamada kullanılan bazı biyokimyasal olaylar; kitlesel kaspaz aktivasyonu, mitokondriyel transmembran geçirgenliğinin ($\Delta\Psi_m$) kaybı, mitokondri dış membranının geçirgenliğinin tamamlanması (MMP) ve çevredeki normal hücrelere ölüm sinyali yayan fosfatidilserin (PS) artıklarının yayılması olarak sıralanmaktadır [Takemura et al., 2013].

Tablo 2.3: Ölen hücrelerde görülen değişiklikler.

Hücre ölümünün morfolojik kriteri	Notlar
Plazma membran geçirgenliğinin kaybı	Plazma membranının yıkılması sonucunda hücre kimliğinin kaybı
Hücre parçalanması	Nükleusa sahip hücrenin ayrık veziküllerde tamamen fragmentlenmeye maruz kalması (genellikle apoptotik veziküller)
Komşu hücreler tarafından yutulma	Ölü hücrenin ya da fragmentlerin komşu hücreler tarafından fagositozu.

Hücre ölümü genellikle morfolojik olarak 3 ana kısımda incelenir; Apoptoz (tip 1), otofaji (tip 2) ve nekroz (tip 3).

Nekroz ya da nekrotik hücre ölümü, bazı morfolojik değişimler ile tanımlanmıştır. Bunlar şekil 2.10'da [Web 2, 2014] görüldüğü gibi; hücrenin hacimlenmesi, organellerin şişmesi ve plazma membranının parçalanmasını takiben intraselüler içeriğin kaybolmasıdır. Nekroz, apoptoz ya da otofajinin olmadığı durumlarda değerlendirilen bir hücre ölümü tipidir ve uzun süre boyunca raslantısal, kontrolsüz hücre ölümü şekli olarak adlandırılmıştır [Denecker et al., 2001]. Ancak kanıtlar nekrotik hücre ölümü olayının, sinyal iletim yolları ve katabolik mekanizmalar ile düzenlendiğini desteklemektedir. Nekroz, birçok aracı kimyasal madde, organeller ve hücresel yolları kapsamına rağmen bunlar arasındaki ilişkiler henüz aydınlatılamamıştır. Ayrıca nekroza neden olan öğeler ve dolaylı etkileri çok açık değildir. Fakat lizozomal ve nükleer değişiklikler, mitokondriyel başkalaşım, lipit degradasyonu ve sitozolik kalsiyum konsantrasyonunun yükselmesi bu etkilerden bazılarıdır [Farber JL., 1982], [Henriquez et al., 2008]. Mitokondriyel başkalaşım; ROS üretimi, nitrik oksit ya da benzer bileşiklerin sebep olduğu nitroksidatif stres ve siklofilin D tarafından sıklıkla kontrol edilen MMP ile alakalıdır. Lizozomal değişimler; Fenton reaksiyonuyla (Bir ROS türü olan hidrojen peroksitin demir ile birleşmesi sonucu ortaya çıkan reaksiyon) ROS üretilmesi ve lizozomal membran geçirgenliği ile ilgilidir. Nükleer değişimler; poli (ADP-riboz) polimeraz 1 (PARP-1)'in yüksek miktarda aktivasyonu ve beraberindeki nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^+)'ın hidrolizi ile bağlantılıdır. Lipit degradasyonu, fosfolipazların, lipoksigenazların ve sfingomiyelinazların aktivasyonunu takip eder. Sitosolik kalsiyum konsantrasyonundaki artış, mitokondriyel yüklenmeye ve kaspaz olmayan proteazların (kalpainler ve katepsinler gibi) aktivasyonuna sebep olur [Golstein and Kroemer, 2007], [Nicotera et al., 2004]. Ayrıca reseptörle etkileşen serin-treonin kinaz 1 (RIP1)'in tüm nekroz olaylarında olmasa da birkaç tanesinde çok önemli rol oynadığı gözlenmiştir [Takemura et al., 2013].



Şekil 2.10: Nekroz ve apoptoza uğrayan hücrelerin kaderi.

Yunancada kendini yemek anlamına gelen otofaji, fizyolojik bir süreçtir. Doku ve organ gelişimi sırasında gereksiz olan hücrelerin elenmesi otofajik ölüm ile gerçekleştirilir. Otofaji ayrıca gıda yoksunluğu ya da gerekli büyüme faktörlerinden dolayı oluşan akut strese karşı selüler savunma oluşturabilir ya da hücre ölümüne sebep olabilir. Bu süreçte hücre, lizozomal bozunma yolağındaki otofagozomlar ile kendini oluşturan hücre içi organelleri gibi bileşenlerine ayırır. Otofagozomlar iki membranlı, bozulmuş sitoplazmik organelleri ve sitozölü içeren yapılardır. Otofagozomlar da endozomlar, lizozomlar ve apoptotik kabarcıklar gibi veziküllerin alt grubunda yer alır. Lizozomların otofagozomlar ile birleşmesi sonucu otolizozomlar oluşur. Otolizozomların içinde otofagozom iç membranı ve asidik lizozomal hidrolazlar tarafından degrade edilmiş lüminal içerikler bulunur. Otofaji hem normal şartlarda, hem de açlık gibi stres durumlarında hayatta kalabilme amaçlı bir fonksiyona sahiptir. Otofajik bozunma sırasında, ATP üretim seviyesini ve protein sentezini arttırmak ve hücre yaşamını devam ettirebilmek için, membran lipitleri ve proteinler otofagozomlar içinde bozunur. Lizozomların otofagozomları içine alma olayı engellendiğinde otofagozomlar düzenli olarak birikmeye başlar.

Otofajik hücre ölümünün mekanizması çok iyi bilinmemekle birlikte yapılan araştırmalarda apoptozda görev yapan Bcl-2 ailesinin, otofaji üzerinde de etkili olduğu düşünülmektedir. Bcl-2 gen ailesinden BH3 üyesi Beclin-1, otofajik süreçte görev alabilir [Zeng et al., 2006]. Bcl-2 anti-apoptotik bir protein olmasına rağmen, Beclin-1'e bağlanarak, Beclin-1'in otofajik ölümü başlatmasını baskılar. Beclin-

1/Bcl-2 kompleksinin bozulması ise, otofajik indüklenmeye yol açar. Bazı çalışmalarda, otofajik hücre ölümünde, Beclin-1 ve NF-kB sinyal yolları arasında cross-talk olduğu görülmüştür [Takemura et al., 2013].

Üç temel hücre ölümü mekanizmasının dışında (apoptoz, otofaji, nekroz) programlı hücre ölümü tipleri de bulunmuştur. Bunlar şekil 2.11’de [Bredesen, 2007]’de görüldüğü gibi; paraptoziz, kalsiyum aracılı hücre ölümü, AIF/PARP bağımlı hücre ölümü ve onkozisdir.

Tirozin kinaz reseptör sınıfına dahil olan, İnsülin benzeri büyüme faktörü reseptörü 1 (IGF-1R)’in yüksek miktarda aktive olması, hücre ölümünün apoptotik olmayan kısımlarından biri olan paraptozizin gerçekleşmesine neden olur. Paraptoziz, endoplazmik retikulum ve mitokondrinin kabarcıklaşmasından dolayı morfolojik olarak tip 3 (nekroz) hücre ölümüne benzemektedir. Paraptoziz sırasında kaspaz aktivitesi görülmez. Ayrıca Bcl-2 ve kaspaz inhibitörleri de bu hücre ölüm şeklini inhibe etmezler. Ancak ERK2 inhibitörünün paraptozizi inhibe ettiği bulunmuştur. Fakat ERK1 inhibitörünün herhangi bir aktivitesi gözlenmemiştir.

Kalsiyum aracılı hücre ölümü Driscoll ve arkadaşları [Syntichaki et al., 2002], [Bianchi et al., 2004] tarafından, *Caenorhabditis elegans* üzerindeki çalışmalarda tanımlanmıştır. Bu hücre ölümü tipinde, mec-4 gibi mutant kanal proteinleri eksprese olur. Kalsiyum aracılı hücre ölümü, morfolojik olarak diğer hücre ölümü tiplerinden zarsı sarmal kesikler ile ayrılır. Hücreye kalsiyum girişi ile başlar, kalpein ve katepsin aracılı olarak devam eder ve kalretikulin ile inhibe edilir.

AIF/PARP bağımlı hücre ölümü Dawsons ve arkadaşları [Yu et al., 2002] tarafından tanımlanmıştır. Dawsons hücre ölümünün apoptotik olmayan şekli sonucunda poli- (ADP-riboz) polimeraz (PARP)’ın aktive olduğunu ve apoptoz indükleyici faktör (AIF)’ün mitokondriden nukleusa yer değiştirdiğini gözlemlemiştir. AIF, DNA fragmentlendiğinde endonükleaz G ve DNA fragmentasyon faktör ile birlikte ortaya çıkan bir flavoproteindir. Bu hücre ölümü tipinin DNA hasarına sebep olan hidrojen peroksit gibi ajanlar tarafından aktive edildiği bulunmuştur.

Bir bölgenin kansız kalması durumunda gözlenen hücre ölümü tipi onkozis olarak adlandırılır. Onkozisin morfolojisi hakkında geniş araştırmalar yapılmış olmasına rağmen biyokimyasal yolları henüz tanımlanmamıştır. Onkozisin plazma membranı iyonik pompalarındaki aksamadan dolayı oluştuğu düşünülmektedir.

Onkozisın potansiyel araçlardan birinin kalpain ailesi proteazı olabileceği düşünülmektedir [Bredesen, 2007].

Types →	Convicted Killers		New Suspects (Innocent until proven guilty)			
	Apoptosis	Autophagic	Paraptosis	Calcium-mediated	AIF/PARP-dependent	Oncosis
Characteristics ↓						
Morphology	Chromatin condensation, nuclear fragmentation, apoptotic bodies	Autophagic vacuoles	ER swelling, mitochondrial swelling	Membrane whorls	Mild chromatin condensation	Cellular swelling
Triggers	Death receptors, trophic factor withdrawal, DNA damage, viral infections, etc.	Serum, amino acid starvation, protein aggregates	Trophotoxicity	Calcium entry, deg mutants	DNA damage, glutamate, NO	Ischemia, excitotoxicity
Mediators	Caspases, BH family, etc.	JNK? MKK7? Atg orthologs	ERK2, Nur77	Calpains, cathepsins	PARP, AIF	JNK
Inhibitors	Caspase inhibitors, BH family, etc.	JNK inhibitors?	U0126 (MEK), DN Nur77	Calreticulin, some calpain inhibitors?	PARP inhibitors	JNK inhibitors
Examples	Type I pcd, nuclear pcd	Type II pcd	Type III pcd, cytoplasmic pcd	C. elegans deg mutants	Some excitotoxic pcd	Ischemic pcd

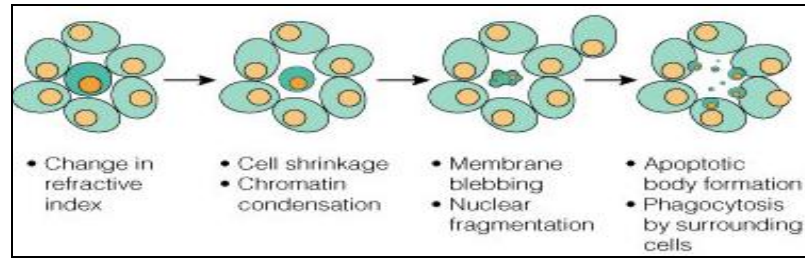
Şekil 2.11: Programlı hücre ölümü çeşitleri.

2.4.1. Apoptoz

Apoptoz, gelişim ve olgunlaşma sırasında, hücre ölümü ve doku homeostazisinin kontrolü ve düzenlenmesinden sorumlu olan programlı hücre ölümünün en çok çalışılan tipidir [Loetscher et al., 2001]. Apoptoz terimi ilk olarak 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından hücre ölümünün özel bir morfolojik şekli olarak tanımlanmıştır [Takemura et al., 2012]. Birçok hücrede apoptoz, UV ışınması ya da oksidatif stres sonucu DNA'da meydana gelen hasardan dolayı gerçekleşir [Abastado, 1996]. Bunun yanında sağlıklı, yetişkin insan vücudunda da apoptoz görülür. İmmün sistemi ve doku homeostazisini korumak amacıyla saniyede yaklaşık 100,000 hücre ölür [Loetscher et al., 2001]. Fakat metabolizma içinde apoptoz belli bir düzen içinde olmalıdır. İnsanlarda apoptozun aşırı ya da yetersiz olması birçok patolojik sonuca neden olabilir. Apoptotik mekanizmaların baskılanması otoimmün hastalıklara ve kansere sebep olabilir. Örneğin sıklıkla apoptotik proteaz aktive edici faktör 1 (Apaf-1)'in, malignant melanoma gibi kanserlerde aktif halde olmadığı görülmüştür. Diğer taraftan apoptozun normal olmayan şekilde fazla gerçekleşmesi nörolojik hastalıklara neden olur [Shi, 2002].

Yüksek miktarda düzenlenmiş bir süreç olan apoptoz üç fazda incelenebilir. Bu fazlardan ilki, hücre ölüm reseptörlerinin aktivasyonu, mitokondriyel yolak ya da endoplazmik retikulum gibi uyarıcılarla apoptozun başlatıldığı, başlama ya da sinyal fazıdır. İkinci faz; başlatıcı kaspazların ve bazı kinaz/fosfatazların yer aldığı sinyal iletimi fazıdır. Üçüncü faz ise efektör kaspazların görev aldığı ölüm fazıdır [Sreedhar and Csermely, 2004].

Apoptoz hem morfolojik hem de fizyolojik olarak çok iyi tanımlanmıştır. Nükleer yoğunlaşma, hücre büzülmesi ve membran kabarcıklanması morfolojik değişimler olarak tanımlanırken, kaspazların aktive olması ve spesifik endonükleazların aktifleşmesinden dolayı nükleer DNA'yı 180-200 oligonükleozomal fragmente bölmesi sonucu meydana gelen nükleer DNA fragmentlenmesi ise fizyolojik değişimler içinde sayılabilir [Sreedhar and Csermely, 2004]. Apoptotik hücrede meydana gelen değişiklikler, şekil 2.12'de [Web 3, 2014] de görüldüğü gibi, apoptoza uğrayacak olan hücrenin yuvarlaklaşması (piknoz), yalancı ayak oluşumu, selüler hacmin azalması, kromatin yoğunlaşması, nükleer parçalanma, sitoplazmik organellerin yapısında modifikasyonların iz miktarda görülmesi, sürecin son aşamasına kadar hücrenin bütünlüğünü koruyan membranın kabarcıklanması, hücrenin apoptotik veziküller oluşturarak fragmentlenmesi ve son olarak çevre hücreler tarafından (genel olarak makrofajlar) yutulmadır [Sreedhar and Csermely, 2004].



Şekil 2.12: Hücrelerin, programlı hücre ölümlerinden biri olan apoptoza uğradıklarında geçirdikleri değişimler.

İçsel ve dışsal uyarılar apoptozda şekil 2.13'de [Motadi et al., 2007] gösterildiği gibi, ölüm reseptör aracılı olarak bilinen dışsal yolağı ve mitokondriyel aracılı olarak bilinen içsel yolağı aktive edebilir. Tümör nekrosis faktör- α (TNF- α) ve Fas gibi ölüm ligantları, kendi membran reseptörlerine bağlanarak ölüm reseptörü yolağını aktive ederler. Bu reseptörlerin bağlanması, adaptör proteinleri

güçlendirerek sitozolik ölüm indükleyici sinyal kompleksini oluşturur. Bu kompleks kendilerinden daha sonra görev alan ve ölüm kaspazlarını aktive eden başlatıcı kaspazların aktivasyonunu tetikler. Mitokondrinin hasar görmesi, düzensiz oksidatif fosforilasyona, reaktif oksijen türlerinden (ROS) kaynaklanan oksidatif strese ve mitokondri membranının dış yüzeyinin geçirgenliğinde değişmelere neden olur. Bax/Bak, Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik proteinleridir. Bcl-2 tarafından negatif olarak düzenlenirler [Tsujimoto, 1998], [Lomonosova and Chinnadurai, 2008]. Bax/Bak proteinlerinin oligomerizasyonu MMP değiştiren iyon iletken kanallarını oluşturur. Dış mitokondriyel membran geçirgenliğinin kaybı, matriks ve iç membran boşluğu arasında bulunan pro-apoptotik faktörlerin sitozolik salınımını teşvik eder. Oluşan apoptotik sinyal sonucunda apoptozom oluşur. Hem içsel yolak hem de dışsal yolak kaspaz bağımlı apoptoz yollarıdır [Takemura et al., 2013].

2.4.1.1. Dışsal (Extrinsic) Yolak

Dışsal yolak, selüler bağışıklığın temel aracı yolağıdır. Fakat bunun yanında ilaç tedavisine cevap olarak da aktive olabilir [Zengemesiter-Wittke and Hopkins-Donaldson, 2005]. Dışsal apoptoz yolağı, hücre membranında bulunan ölüm reseptörlerinin aktivasyonu ile başlatılır. TNF- α , TRAIL ya da FasL hedef hücrede kendi reseptörlerine bağlanarak yolağı başlatırlar. Memelilerde beş adet ölüm reseptörü izole edilmiştir. Bunlar; Tümör nekrozis faktör tip-1 reseptörü (TNFR1), Fas, ölüm reseptörü 3 ve TNF-bağımlı apoptoz indükleyici ligand 1 ve 2 (TRAIL-R1 ve TRAIL-R2)'dir. Bu reseptörler sitoplazmik bölgelerinde ölüm domainleri içerirler. Bu reseptörlerin içinden Fas en iyi tanımlanmış olanıdır [Zengemesiter-Wittke and Hopkins-Donaldson, 2005], [Sakamaki and Satou, 2008].

Dışsal yolakta ilgili ligantların bağlanması, reseptör ölüm domainlerinin kümelenmesine ve reseptör trimerizasyonuna neden olur. Ölüm reseptörlerinin sitosolik kısmı, ölüm tetikleyici sinyal kompleksini (DISC) oluşturur. DISC, adaptör molekülü olan, Fas ilişkili ölüm domaini içeren protein (FADD) ile birbirine bağlanarak DISC-FADD kopleksini oluşturur. Bu kompleks p53 tarafından düzenlenir. DISC-FADD kompleksi, ölüm efektör domainlerinden (DED, D4/D5) başlatıcı kaspazlardan olan kaspaz-8 ve -10'a bağlanır. Böylece aktif halde olmayan prokaspaz-8'in otokatalitik kesimi gerçekleşir [Motadi et al., 2007]. Kaspaz-8'in aktivasyonu, Bid proteininin kesilmesine ve aktive olmasına sebep olur. Bid, Bcl-2

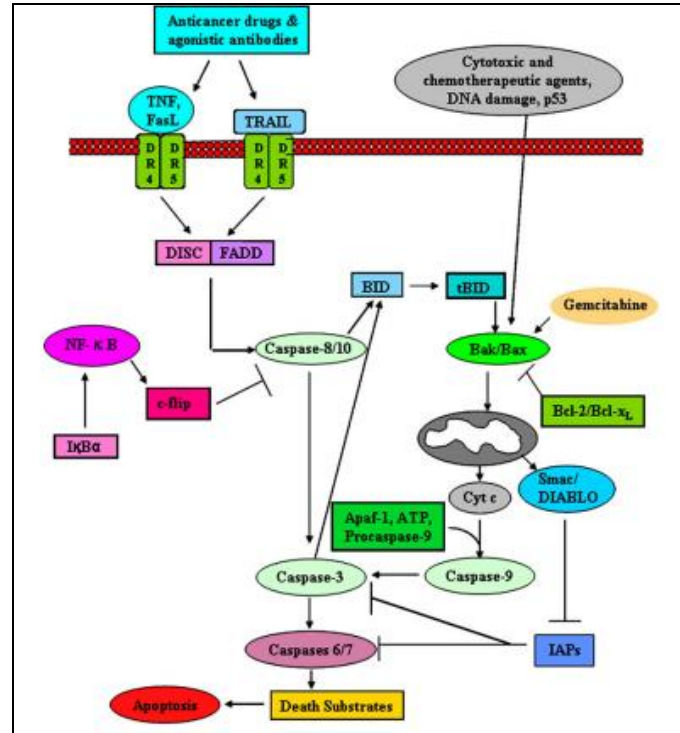
protein ailesinin, pro-apoptotik bir üyesidir ve apoptozun içsel yolağı ile dışsal yolağını birbirine bağlar [Hector and Prehn, 2008]. Aktive olan kaspaz-8, kaspaz-3 gibi efektör kaspazları aktive eder. Kaspaz-3, ölüm substratlarının kesiminden sorumludur ve apoptotik hücrenin, DNA fragmentlenmesi, nükleer fragmentlenme, membran tomurcuklanması ve diğer morfolojik ve biyokimyasal değişimleri gibi iyi bilinen karakteristik özelliklerinin ortaya çıkmasına sebep olur [Portt et al., 2011]. Dışsal yolak, kaspaz-8 aktivasyonunu engelleyen c-FLIP'le ve aktivatör ve efektör kaspazları etkileyen, apoptotik protein inhibitörü (IAP) ile bloklanabilir [Zengemesiter-Wittke and Hopkins-Donaldson, 2005].

2.4.1.2. İçsel (Intrinsic) Yolak

İçsel ya da mitokondri bağımlı yolak, çok çeşitli apoptotik uyarıcılar tarafından başlatılabilir. Bu uyarıcılar; ultraviyole ışınları, steroidler, kimyasal ilaçlar ya da büyüme faktörü yoksunluğu gibi etmenler olabilir. Bcl-2 ailesinin hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotik üyeleri içsel yolağı düzenleyebilir [Sakamaki and Satou, 2008]. Tüm Bcl-2 ailesi proteinlerinin, farklı moleküler fonksiyonları olmasına rağmen alfa-helikal Bcl-2 domain homolojileri (BH) moleküler dizilim açısından benzerlik gösterir. Örneğin anti-apoptotik Bcl-2, 4BH domaininden (BH1-4) oluşurken, pro-apoptotik Bax, BH1-3 ve BH3 domainlerini içerir [Hector and Prehn, 2009].

Mitokondri aracılı apoptozda çok sayıda protein rol oynar. Bunlardan, Bcl-2 protein ailesinin pro-apoptotik üyesi olan Bax, mitokondriyel p53'ün, anti-apoptotik bir protein olan Mcl-1 ile etkileşimi sonucunda aktive olur. Ancak sitokrom c aracılı apoptoz, Bax ya da p53'ün etkili olmadığı zamanda da gerçekleşebilir [Johnstone et al., 2002]. Apoptozun dışsal yolağında kaspaz-8'in aktifleşmesi sonrasında Bid, aktifleşerek tBid haline dönüşür. Böylece, tBid aracılığıyla dışsal yolak ve içsel yolak birleşmiş olur [Portt et al., 2011]. İçsel yolakta önemli rolü olan diğer protein grubu ise Smac/DIABLO'dur. Smac/DIABLO, IAP'ın etkisini tersine çevirerek kaspaz aktivasyonunu artırır [Fulda and Debatin, 2006]. Bcl-2 ailesinin anti-apoptotik üyelerinden olan Bcl-2 ve Bcl-xL, sitokrom c ve Smac/DIABLO salınımını kontrol eder. Kaspaz-9 ve ardından aktifleşen kaspazların aktivasyonu ise IAPs tarafından kontrol edilir [Zengemesiter-Wittke and Hopkins-Donaldson, 2005].

İçsel apoptoz yolağında, hücre ölümü gerçekleşirken çeşitli etkilerle aktif hale gelen p53; Bax, Puma ve Noxa'nın ekspresyonunu artırır [Zengemesiter-Wittke and Hopkins-Donaldson, 2005]. Bax ve Bak proteinlerindeki konformasyonel değişim apoptotik sinyali başlatır [Hector and Prehn, 2009]. Bu pro-apoptotik proteinler, mitokondrinin dış membranına tutunarak, membran geçirgenliğini değiştirirler. Bu değişim sonucunda membran üzerinde porlar oluşur [Motadi et al., 2007]. Bu porlardan, Smac/DIABLO, HtRA2, apoptoz indükleyici faktör (AIF) ve sitokrom c gibi apoptotik mitokondriyel proteinlerin, mitokondri iç membran boşluğundan sitozole salınımı gerçekleşir [Fulda and Debatin, 2006]. Sitosolde, ATP varlığında, sitokrom c, Apaf-1 ve prokaspaz-9 apoptozomu oluşturur. Böylece kaspaz-9 aktif hale gelir. Sitosole bırakılan kaspaz-9, efektör kaspazlardan olan kaspaz-3 ve -7'yi aktifleştirerek hücre ölümüne sebep olur [Johnstone et al., 2002].

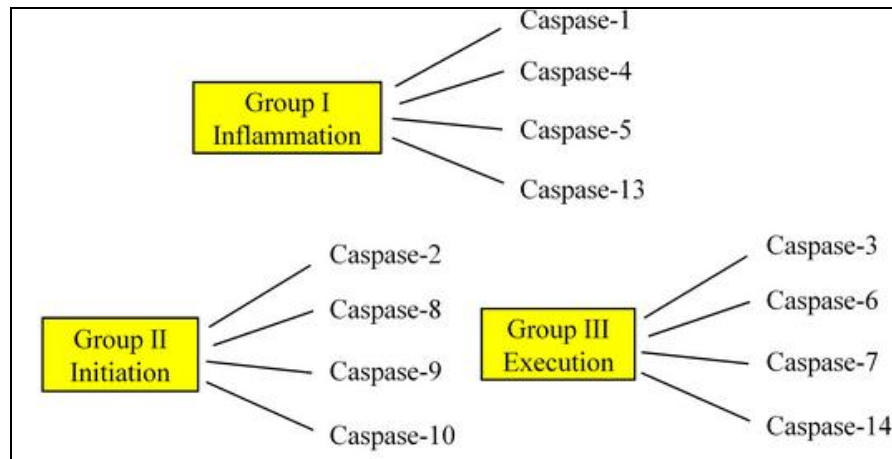


Şekil 2.13: Apoptozun içsel ve dışsal yolağı.

2.4.2. Kaspazlar

Kaspazlar tetrapeptit motifleri ve substratlarında aspartat artıklarının kesilmeleri ile tanınan sistein proteaz ailesi üyeleridir. Kaspazlar, apoptozun başlatılmasında ve devam ettirilmesinde görev alırlar. Aynı zamanda inflamatuvar

sitokinlerin olgunlaşması ve işlevlerinin yerine getirilmesinde rol oynarlar. Omurgalılarda ve omurgasızlarda türlerde çeşitli kaspazlar tanımlanmıştır. İnsanlarda toplam 11 tane kaspaz bilinmektedir. Bunlar kaspaz-1'den kaspaz-10'a kadar olan kaspazlar ile kaspaz-14'tür. Kaspaz-11,-12 ve -13 ise rodent gibi diğer memelilerde tanımlanmıştır. 14 memeli kaspazı fonksiyonel benzerlikleri incelenerek, filolojik olarak birkaç gruba ayrılmıştır. Kaspazların 2 alt grubu, şekil 2.14'de [Web 4, 2014] görüldüğü gibi başlatıcı kaspazlar (kaspaz-2, -8, -9 ve -10) ve efektör kaspazlar (kaspaz-3, -6 ve -7) olarak apoptoz sinyal yolağında görev alırlar. Diğer alt grubu ise inflamatuvar kaspazlar (kaspaz-1, -4, -5, -11, -12 ve -13) olarak isimlendirilmiştir. Kaspaz-14 ise apoptotik ya da inflamatuvar kaspazlara dahil olmayan tek kaspazdır [Lippens et al., 2000]. Son çalışmalarda kaspaz-15, -16, -17 ve -18'de tanımlanmıştır fakat fonksiyonları henüz tam olarak anlaşılamamıştır [Eckhart et al., 2005]. Buna ek olarak balıklara özel kaspazlar, caspy, caspy2 ve kaspaz tanıma domaini (CARD)-casp8 tanımlanmıştır [Masumoto et al., 2003], [Sakamaki et al., 2007]. Kaspazlar hayvanlarda evrimsel açıdan korunmuştur. Fakat farklı organizmalarda, farklı kaspazların görev alması evrim boyunca türlerinin değişikliğe uğradığını göstermektedir.



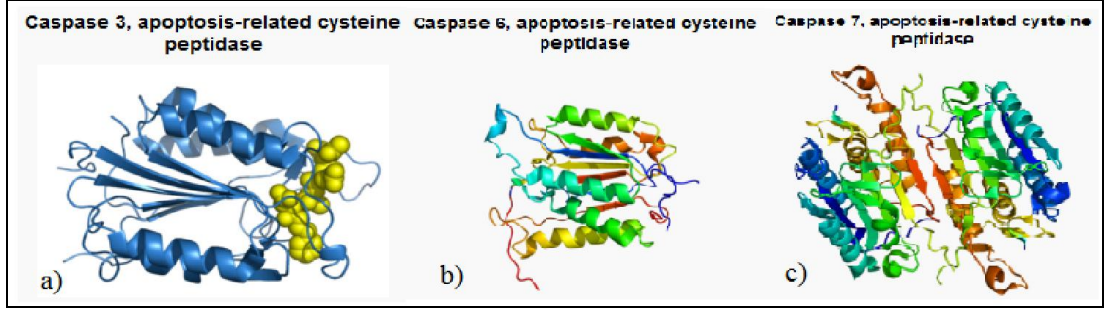
Şekil 2.14: Kaspazların görevlerine göre grupları.

Kaspazlar, genellikle prodomain ve katalitik kaspaz bölgelerinden (CAsC) oluşan aktif olmayan zimojen şeklinde sentezlenirler. Kaspaz-3, -6, -7, -14, -16 ve -17 kısa prodomaine sahipken, diğer kaspazlar uzun prodomaine sahiptirler. Kaspaz-1, -2, -4, -5, -9, -11, -12, -13 ve CARD-casp8'in prodomaini, kaspaz tanıma domaini

(CARD) olarak tanımlanır. Kaspaz-8, -10 ve -18, prodomainlerinde sürekli tekrar eden motifler içerirler. Bu motiflere ölüm efektör domaini (DED) adı verilir. Kaspaz-15, caspy ve caspy2, amino uçlarında pirin (PYD) domaini içerir. CARD, DED ve PYD, six helix bundle yapısı gösterir ve geniş sinyal komplekslerinin bu yapılar tarafından düzenlendiği düşünülmektedir. Büyük ve küçük alt ünitelerin oluşumunda kaspazlar otomatik olarak kesilirler. 2 büyük ve 2 küçük alt ünitenin bir araya gelmesinden oluşan aktif kaspazlar, hedef substratın özel dizisini tanıyarak kesim yaparlar [Sakamaki and Satou, 2008].

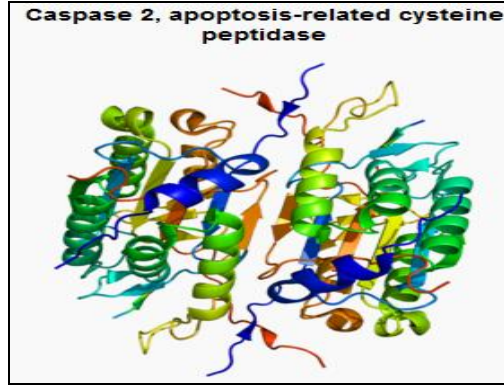
2.4.2.1. Apoptozda Görevli Kaspazlar

CASc ile bağlantı kurmuş olan kısa prodomain, kaspaz-3, -6 ve -7 için ortak yapıdır. Kurulan bu bağlantıdan dolayı, prodomainlerin diğer moleküllerde kompleks yapılar oluşturması mümkün değildir. Bundan dolayı metabolizma içinde aktif olmadan bulunan kaspaz-3, -6 ve -7'nin aktiveleştirilebilmesi için diğer kaspazlara ihtiyaçları vardır. Şekil 2.15 a), b) ve c)'de [Web 5, 2014], [Web 6, 2014], [Web 7, 2014] moleküler yapıları gösterilen bu üç kaspaz türü, apoptotik yolun son basamaklarında infazcı olarak görev alırlar. Kaspaz-3 apoptotik yolda, substratların çoğunu kesen temel efektör kaspazdır ve kaspaz-8 ve -9 aracılığıyla aktif olur [Sakamaki and Satou, 2008]. Kaspaz-7, yapı ve fonksiyon olarak kaspaz-3'e benzemektedir [Wei et al., 2000], [Degterev et al., 2003]. DNA tamir enzimi olan poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP), kaspaz-3 tarafından da aktiveştirilmesine rağmen, kaspaz-7 bu süreçte daha etkindir. Kaspaz-6, protein yapısı bakımından, kaspaz-3 ve -7 ile benzerlik göstermesine rağmen, farklı hareket eder. Kaspaz-6'nın apoptotik yolda rolü tam olarak anlaşılamamıştır. Apoptotik sinyal başladıktan sonra, sürecin ilerleyen aşamalarında rol oynadığı düşünülmektedir, efektör kaspazlar içine de dahil edilebileceği göz önünde bulundurulmaktadır [Sakamaki and Satou, 2008].



Şekil 2.15: a) Kaspaz-3, b) Kaspaz-6 ve c) Kaspaz-7'nin moleküler yapıları.

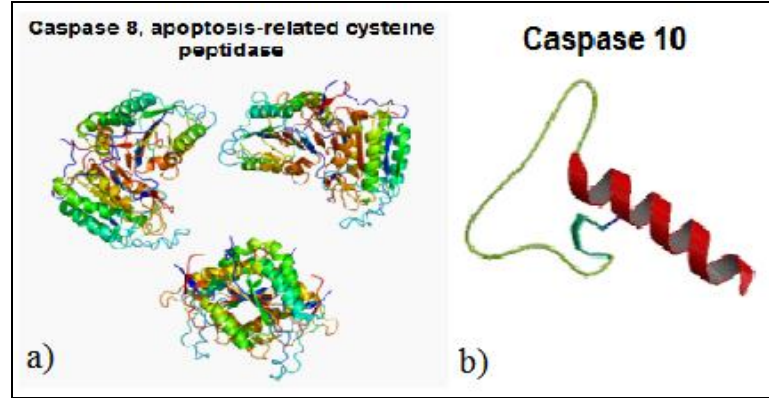
Kaspaz-2, CARD olarak adlandırılan uzun prodomain içeren ve apoptozda rol oynayan bir başlatıcı moleküldür. Prokaspaz-2'nin, CARD-CARD etkileşimi sonucunda aktif formda bulunan kaspaz-2'ye dönüştüğü bilinmektedir. Kaspaz-2, DNA hasarı sonrası, mitokondri dış membranının geçirgenliği ve apoptotik faktörlerin salınımı açısından önemlidir [Zhivotovsky and Orrenius, 2005]. Şekil 2.16'da [Web 8, 2014] moleküler yapısı görülen kaspaz-2 aynı zamanda ölüm reseptörü bağlantılı olarak da aktive olabilir. Kaspaz-2, apoptotik yolakta çok önemli bir konumda bulunmasına rağmen, timosit ve nöronal apoptozda görev almaz. Bu da, bu hücrelerde kaspaz-2'nin yerini başka bir kaspazın aldığını düşündürmektedir [Sakamaki and Satou, 2008].



Şekil 2.16: Kaspaz-2'nin moleküler yapısı.

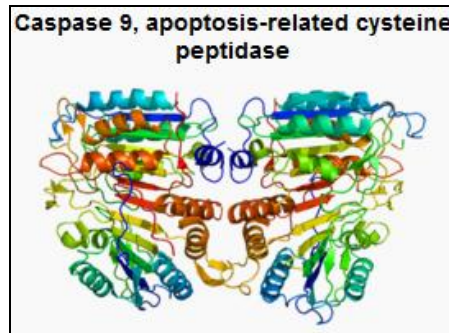
Kaspaz-8, amino terminal ucunda tekrarlayan DED motifleri ve karboksil ucunda ise aktif CASC proteaz domaini taşır. Kaspaz-8, Fas gibi hücre yüzey ölüm reseptörleri aracılığıyla meydana gelen apoptozda anahtar moleküldür [Sakamaki and Satou, 2008]. Şekil 2.17 a) ve b)'de [Web 9, 2014], [Web 10, 2014] moleküler yapısı görülen kaspaz-10 yapısal açıdan kaspaz-8'e çok benzerdir. Yapısında iki adet DED

ve CASc bulunur [Lamkanfi et al., 2002]. Kaspaz-8'in dışsal yolda başlatıcı kaspaz olarak rol aldığı kanıtlanmış olmasına rağmen, kaspaz-10'nun rolü henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. C-FLIP, kaspaz-8 aktivasyonunu düzenleyen bir moleküldür. Yapısında iki DED ve bir inaktif CASc bulunduran c-FLIP, yapısal olarak kaspaz-8 ve -10'a benzer. Bundan dolayı bu molekülleri kodlayan genlerin filogenetik olarak benzer olduğu hipotezi öne sürülmüştür [Sakamaki and Satou, 2008].



Şekil 2.17: a) Kaspaz-8 ve b) Kaspaz-10'nun moleküler yapısı.

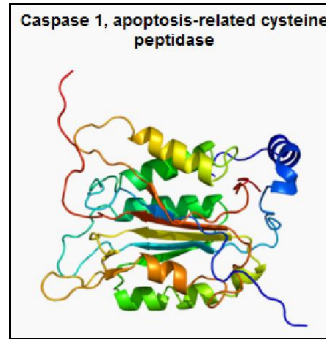
Moleküler yapısı şekil 2.18'de gösterilen [Web 11, 2014] kaspaz-9, N-terminalinde CARD motifi taşıyan başlatıcı kaspazlar grubuna dahil olan kaspazdır. Kaspaz-9, içsel yolda önemli bir role sahiptir [Li et al., 1997]. Prokaspaz-9 kesildikten sonra aktif halde bulunan kaspaz-9 haline gelir ve sürecin devamında gerekli olan efektör kaspazları aktiveleştirir [Hakem et al., 1998], [Kuida et al., 1998]. Prokaspaz-9'un kaspaz-9'a dönüşmesi için, bir adaptör molekül olan Apaf-1 ile homofilik CARD-CARD etkileşimini gerçekleştirmesi gerekir [Sakamaki and Satou, 2008].



Şekil 2.18: Kaspaz-9'un moleküler yapısı.

2.4.2.2. İnflamatuar Kaspazlar

Kaspaz 1, interlökin (IL)-1 β -converting enzim (ICE) olarak da bilinir. Şekil 2.19’da moleküler yapısı gösterilen bu molekül [Web 12, 2014] aktif olmayan prointerlökin-1 β ’yı, memelilerde inflamasyonun temel aracı molekülü olan aktif sitokin IL-1 β haline dönüştüren süreçte görev alır [Cerretti et al., 1992] [Thornberry et al., 1992]. Aktif kaspaz-1 aynı zamanda, IL-18, IL-1F7 β ve IL-33 gibi diğer sitokinler üzerinde de etkilidir [Nadiri et al., 2006]. CARD prodomainine sahip kaspaz-1’in aktivasyonu, CARD-CARD etkileşimi ile oluşan ve inflamazom adı verilen sitozolik kompleks ile gerçekleştirilir. Yapılan çalışmalarda patojenler tarafından gerçekleştirilen ve apoptoz ve nekrozdan ayrı olarak değerlendirilen bir hücre ölümü çeşidi olan piroptozisin, kaspaz-1 aktivasyonu ile gerçekleştiği gözlenmiştir [Fernandes-Alnemri et al., 2007]. Bundan dolayı kaspaz-1, inflamasyonda, inflamatuvar sitokinlerin olgunlaşması için oldukça önemlidir. Aynı zamanda pro-apoptotik molekül olarak da rol oynayabilir [Sakamaki and Satou, 2008].



Şekil 2.19: Kaspaz-1’in moleküler yapısı.

Kaspaz-4, -5, -11, -12 ve -13’te aynı kaspaz-1 gibi inflamatuvar kaspazlar grubuna girer. Bu moleküller de CARD prodomainine sahiplerdir. Kaspaz-4 ve -5, protein yapısı olarak birbirlerine çok benzemektedir. Primatlar CASP4 ve CASP5 geninin ikisine birden sahiplerdir. Bu iki genin, primatlar ve diğer memelilerin ayrılmasından sonra CASP4/5 geninin arka arkaya kopyalanması ile ortaya çıktığı düşünülmektedir. Fare kaspaz-11’i ve inek kaspaz-13’ü, primatlardaki kaspaz-4 ve -5 ile ortologlardır. Memelilerde, kaspaz-4, -5, -11 ve -13 genleri, CASP1 geni ile kromozom üzerinde küme oluşturur. Bu kaspazlar insanlarda CASP1, CASP5,

CASP4 ve CASP12 olarak düzenlenirken, farelerde, casp1, casp11 ve casp12 olarak, ineklerde ise casp1, casp13 ve casp12-benzeri olarak düzenlenirler. Kuşlar, balıklar ve amfibilerde ise casp1 hariç, bağlantılı olabilecek başka bir gen yoktur. Memelilerde, evrimin erken aşamalarında gen çoğaltılması olduğu düşünülmektedir. Genom veri tabanı araştırmaları, Casp1 ve Casp1- benzeri genlerinin, genomun aynı bölgesinde bulunduğunu desteklemektedir [Sakamaki and Satou, 2008].

İnsan kaspaz-4'ünün proteaz aktivitesi kaspaz-1 ile karşılaştırıldığında çok yüksek olmamasına rağmen, proIL-1 β , proIL-18 ve proIL-1F7 β ile direkt olarak etkileşebilir fakat kaspaz-5'te bu etkileşimler görülmez [Lin et al., 2000], [Kumar et al., 2002]. İnsanlardaki kaspaz-5'in ortoloğu olan fare kaspaz-11'inin kaspaz-1'i kesme kapasitesi vardır [Kang et al., 2000]. Casp-11 geni susturulmuş farelerde yapılan araştırmalar bu verileri desteklemektedir [Wang et al., 1998]. Bu mutant farelerin IL-1 β üretiminde başarısız olduğu ve casp-1 geni susturulmuş farelerdeki fenotipe benzer olarak, bakteriyel endotoksinler tarafından teşvik edilen, endotoksik şoka karşı dayanıklılık gösterdiği gözlenmiştir. Bunun yanında, kaspaz-11'in kaspaz-1 ile ortak çalıştığı ve kaspaz-1'in üst basamak aktivatörü olabileceği öne sürülmüştür. Benzer olarak insan kaspaz-5'i kaspaz-1 ile kompleks oluşturarak, kaspaz-1'i aktif hale getirebilir [Martinon et al., 2002]. İnsan kaspazlarından kaspaz-4 ve -5 ve fare kaspazlarından kaspaz-11 için tanımlanan substratların sayısı çok az olmasına rağmen, bu kaspazlar, kaspaz-3 kesiminde görev alır. Bu durum, bu kaspazların da apoptotik süreçte görev alabileceğini öne sürmektedir. Henüz yeterli veri bulunmamasına rağmen, kaspaz-1'in yanında kaspaz-4, -5 ve -11'inde inflamatuvar hücre ölümünde görevli olduğu görülmektedir [Sakamaki and Satou, 2008].

Kaspaz-12'yi kodlayan gen, inflamatuvar kaspazları kodlayan diğer genlerle, aynı kromozomal bölgede bulunmaktadır. Fakat fonksiyon olarak kaspaz-12'nin diğer inflamatuvar kaspazlardan farklı olduğu düşünülmektedir. Çünkü fare kaspaz-12'sinin, endoplazmik retikulum (ER) stresi bağlantılı hücre ölümünde görev aldığı görülmüştür [Nakagawa et al., 2000]. Kaspaz-12'sinde bozukluk olan fare embriyonik fibroblastlarının genotoksik uyarılar tarafından uyarılan apoptoza karşı dirençli olduğu belirlenmiştir. Fakat kaspaz-12'nin bu özelliği evrim sürecinde tüm memelilerde her zaman korunmamıştır. Örneğin polimorfizmden dolayı insan kaspaz-12'si, kesilmiş protein olarak eksprese edilebilir [Sakamaki and Satou, 2008].

2.4.2.3. Terminal Farklılaşması Gerektiren Kaspazlar

Kaspaz-14, kaspaz-3, -6 ve -7 gibi kısa prodomaine benzerdir. Kaspaz-14'ün moleküler fonksiyonları, diğer kaspazlarla kıyaslandığında belirsiz kalmıştır. Bunun sebebi kaspaz-14'ün apoptoz ya da inflamatuvar yanıtında gerekli olmadığının düşünülmesidir. Kaspaz-14'ün ekspresyonu sadece epidermisin bazal tabakasının üstü ve saç folikülleri ile kısıtlıdır. Kaspaz-14'ün proteolitik aktivasyonu keratin katmanının oluşumu ile ilgili olduğundan, bu kaspazın temel görevinin keratinosit farklılaşması olduğu düşünülmektedir [Lippens et al., 2000]. Kaspaz-14 eksikliği olan farelerde yapılan çalışmalar, kaspaz-14'ün, su kaybı ve ultraviyole ışınların hasar verdiği, fillaggrin proteinini ve fonksiyonunu koruma sürecinde görev aldığı görülmüştür [Denecker et al., 2007]. Ayrıca kaspaz-14'ün zararlı çevre koşullarında da koruma sağlamaktadır. Kaspaz-14, kaspaz-1, -2, -4, -8 ve -10 gibi uzun prodomaine sahip kaspazlarla etkileşime girer. Ayrıca deney ortamında aktif kaspaz-8 ve -10 ile ve canlı ortamlarda ise ölüm reseptörlerinin ligasyonundan sonra, uzun prodomainli kaspazlarla etkileştiği bilinmektedir. Bu durum kaspaz-14'ün hücre ölüm yollarında görev alabiliyor olma ihtimalini akıllara getirmektedir [Sakamaki and Satou, 2008].

2.4.2.4. Tanımlanamamış Fizyolojik Etkileri Olan Kaspazlar

CARD-casp8'in kaspaz katalitik bölgeleri kaspaz-8 ile oldukça benzerlik göstermektedir [Sakata et al., 2007]. CARD-casp8, filogenetik ağaçta, kaspaz-8, -10 ve c-FLIP ile aynı grupta bulunmaktadır. CARD-casp8'in cDNA'sı ilk olarak kedibalığında elde edildiği için, balık kaspaz-8'i olarak da adlandırılmaktadır. Ancak CARD bölgesine sahip olmasına rağmen, N-terminal bölgesinde iki adet DED grubuna sahip olmaması açısından kaspaz-8'den farklıdır. Bu gen, CARD-casp8 olarak adlandırılmasına rağmen, balıklar dışındaki omurgalılarda bulunmaz. Bundan dolayı balıklara özel gen olarak da adlandırılabilir. Balık evriminde, atalardan gelen casp8 geninin ayrılarak casp8 ve casp8-benzeri genleri oluşturduğu ve böylece atasal casp8-benzeri genin, DED ve CARD bölgelerine sahip olduğu düşünülmektedir [Sakamaki and Satou, 2008].

Kaspaz-15, kaspaz ailesine son yıllarda dahil olmuştur [Eckhart et al., 2005]. Bu molekül, memeli kaspazlarının prodomainlerinde bulunmayan PYD kıvrımlarına

sahiptir. Filogenetik araştırmalarda, kaspaz-15'in kaspaz katalitik bölgesinin en çok kaspaz-14'e benzediği bulunmuştur. Bu durum kaspaz-15'in, kaspaz-14 aracılı sinyal yolağında görev alabilme ihtimalini ortaya çıkarmıştır fakat henüz bu tezi destekleyen sonuçlara rastlanmamıştır. Kaspaz-15'in aktivasyonunun, PYD içeren proteinlerin PYD-PYD etkileşimi sonucunda oluşabildiği düşünülmektedir. Kaspaz-15, insan ya da fare gibi bazı memelilerde bulunmadığı ya da aktif halde olmadığı için, hayvanlardaki fonksiyonu tam olarak anlaşılamamaktadır [Eckhart et al., 2006].

Kaspaz-14-benzeri genin mRNA'ları belirlenmiştir fakat açık okuma ereveslerini (open reading frame) tanımlamak imkansız olduğu için gen ürünlerinin fonksiyonel olup olmadığını anlamak zordur. Bu yüzden bu genin insanda etkisiz bir gen olma ihtimali vardır. Keseli hayvanda cDNA dizilimlerinin bir araya getirilmesiyle, 300 amino asitlik açık okuma çerçevesini bulmak mümkündür. Farklı bir tür keseli hayvanda ise, cDNA'lar kaspaz-16 olarak tanımlanmıştır. Bu alışmalar sonucunda, kaspaz-16'nın, kaspazlar içinde, yapısal olarak en çok kaspaz-14'e uyumluluk gösterdiği belirlenmiştir. Moleküler filogenetik analizler sonucunda, kaspaz-14, -15 ve -16'nın, filogenetik ağaçta aynı grupta olduğu gösterilmiştir [Sakamaki and Satou, 2008].

2.4.3. p53

p53 DNA hasarı, hücresel stres faktörleri, hipoksi, onkojen aktivasyonu, açlık, mitokondriyal ve ribozomal süreçlerde görev alan anahtar molekül görevindedir. p53 hücre döngüsünün kontrolünde, programlanmış nekrozda, otofajide, metabolizmada, kök hücre homeostazisinde, anjiyogenez ve yaşlanmada görev alan genlerin aktivasyonu ve baskılanmasında görev alan bir transkripsiyon faktörüdür. Hücrenin içinde bulunduğu koşullara bağlı olarak hücre ölümünü, yaşlılığı, hücre döngüsünün durdurulmasını veya DNA onarımını uyarabilir [Stegh, 2011].

Bilinen tüm tümörlerin %50'sinin p53 geninde mutasyon bulunmaktadır. p53 proteini, asidik bir N terminal transaktivasyon domaini, prolince zengin bir domain, sekans-spesifik DNA bağlanma domaini, oligomerizasyon domaini ve C- terminal düzenleyici domainden oluşur. p53'n transaktivasyon domaini hem p53'n p300 gibi koaktivatrlerinin bağlanması hem de MDM2 gibi moleküllerin bağlanması düzenlenmesi için gereklidir.

Yabani tip p53 homotetramer olarak görev alır. p53 mutantları kanser hücrelerinin çoğalmasından sorumlu moleküllerin çoğunun transaktivasyonundan sorumludur. p53'te gerçekleşen kanser ilişkili mutasyonların çoğunluğu anlamsız mutasyonlardır. Bu mutasyonlar genellikle en korunmuş bölge olan DNA bağlanma domaininde gerçekleşir ve bilinen yaklaşık 6 tane hot spot noktası bulunmaktadır. Wtp53 stres bulunmayan koşullarda çok kısa ömürlü bir protein iken, missense mutasyonlar sonucu oluşan mutant p53 molekülü çok daha uzun bir yarı ömre sahiptir. Mutant p53ün wtp53 üzerinde baskın bir negatif etkisi vardır. Mutant p53, wt üzerindeki etkisine bağlı olmaksızın onkojenik veya fonksiyon kazanma aktivitesi gösterebilir. Mutant p53 RNA veya protein sentezinin olmadığı durumda bile varlığını sürdürebilir. Nükleusun olmadığı durumlarda dahi p53 aktivasyonu ile apoptoz gerçekleşmektedir. Stoplazmik p53 transaktivasyondan bağımsız olarak apoptozu uyarabilir. Yine de nükleer p53 tarafından düzenlenen transkripsiyon olmadan endojen stoplazmik p53 işlev görmeyebilir. p53 tarafından transk aktive edilen promotor dizileri ya çok az homoloji göstermekte ya da hiç göstermemektedirler. Bu durum mutant p53'ün DNA dizisi yerine DNA'nın yapısal motifine ilgi gösterdiğine dair hipotez geliştirilmesine neden olmuştur. p53'ün mutasyon şekli çoğu kanser için, özellikle göğüs kanseri, belirleyici özelliktedir. Mutant p53; DNA sentezi, hücre bölünmesi, hücrenin hayatta kalması, kimyasal direnç, anormal sentrozomlar, gen kopyasında artış, somatik hücre programlanması, kök hücre karakterizasyonu, doku yapısının bozulması, anjiyogenez, hücre göçü, hücre invazyonu ve hücre metastazında görev alır [Freed-Pastor and Prives, 2012].

MDM2; p53'ün transaktivasyon domainine bağlanarak bu domainin fonksiyonunu, buna bağlı olarak da p53'ün biyokimyasal aktivitesini engeller. MDM2 aynı zamanda p53'e özel bir E3 ubiquitin ligaz gibi davranarak, p53'ün ubiquitinasyonuna ve proteozomal yıkımına yol açar [Levine and Oren, 2009].

MDM2 geni p53'ün direkt transkripsiyonel hedeflerinden biridir. p53 ve MDM2 arasında negatif geri besleme mekanizması bulunduğu için p53'ün MDM2 ifadenmesini arttırması p53 parçalanmasına ve p53 aktivitesinin azalmasına neden olur. MDMX de p53'ün N terminal bölgesine bağlanarak aktivitesini engellemektedir. MDM2'nin E3 ligaz aktivitesi için ilk olarak MDMX ile dimer oluşturması gerekmektedir. MDM2 veya MDMX'in inaktivasyonu aşırı p53 aktivasyonu sonucunda farelerde erken embriyonik dönemde ölüm gerçekleşmesine neden olmuştur. MDM2-p53 negatif geri besleme mekanizmasının bozulma sebebi

olarak mutant p53'ün MDM2'yi transkripsiyonel olarak aktive edememesi gösterilmektedir [Freed-Pastor and Prives, 2012].

p53 apoptozu iki farklı şekilde düzenler; Dışsal ve içsel yolaktaki apoptozu düzenleyici moleküllerin transkripsiyonel aktivasyonu veya Bcl-2 ailesi proteinleri ile mitokondriyal membranlar arasındaki ilişkiye bağlı olarak mitokondriyal membran fizyolojisinde değişiklik.

p53 indüksiyonu DR4 ve DR5 genlerinin fazla ifadelenmesine neden olmaktadır. p53 aynı zamanda özellikle kaspaz-8 gibi öncü reseptör sinyallerinin ve kaspaz-8 aktivatörü olan PERP proteininin ifadelenmesini uyarır.

p53 mitokondriyal ve post-mitokondriyal apoptoz sinyalinde görev alan çok sayıda genin (Bax, PUMA, NOXA, Apaf-1, Kaspaz-9) transaktivasyonuna ve bu aktivasyon sonucunda mitokondri membran bütünlüğünün bozulmasına ve kaspaz aktivasyonuna sebep olur. p53 kaspaz 8 ve 9'un yanı sıra kaspaz-2 aracılığıyla apoptoz başlamasını da düzenler. Kaspaz-2 direkt olarak ölüm kaspazlarını aktifleştirmemesine rağmen mitokondri zarının geçirgenliğinin artmasına yol açarak programlanmış hücre ölümünü uyarır [Stegh, 2012].

Stres sinyaline cevap olarak stoplazmik p53 mitokondriye translokasyon yapar ve burada Bcl-2 ailesi üyeleriyle etkileşime girerek onların inhibisyonunu ya da aktivasyonunu sağlayabilir. Bunun sonucunda mitokondri zarının geçirgenliği artar ve kaspazlar aktif hale gelir. Bu translokasyon p53 bağımlı apoptozda gerçekleşirken, p53 bağımlı hücre döngüsü durdurulmasında veya p53 bağımsız apoptozda gerçekleşmez.

p53'ün Bcl-xl/2 ile olan etkileşimi tamamen elektrostattır. p53'ün pozitif yüklü DNA bağlanma domaini, Bcl-xl/2'nin negatif yüklü asidik yüzeyiyle etkileşime girer. p53'ün çekirdek domaini aynı zamanda mitokondriyal dış membranda bulunan Bak proteiniyle etkileşime girerek onun Mcl-1 bağlanmasını engeller ve aktif formda kalmasını sağlar.

Stress olmayan koşullarda p53 sitozolik Bcl-xl ile kompleks durumundadır. Stres durumunda ilk olarak p53 hedef geni olan Puma'yı transaktive eder. Fazla miktarda üretilen PUMA p53'ü Bcl-xl'den ayırarak aktivasyonunu sağlar ve kendisi Bcl-xl'yle kompleks oluşturarak olası bir etkileşimi engeller. Serbest formdaki p53 sitozolik Bax'ı aktive eder. Bu yolakta p53 aktivasyonu için Puma ve Bax gerekiyken, ölüm sinyali tarafından uyarılan p53'ün translokasyonu Puma ve Baxtan bağımsızdır. Mitokondriyal p53 çok etkilidir ve tBid'in çözülebilir ve çözülemez

apoptogenik faktörlerin salgılanmasını sağlamasına yardımcı olur ve bu süreçte de Puma ve Bax'a ihtiyaç duyulmaz. p53 görevli diğer proteinlerin olmadığı durumlarda da Bax'ı aktive edebilir [Vaseva and Moll, 2009].

p53 DNA hasarına cevap olarak gerçekleşen katepsin Q transaktivasyonunu sağladığı için programlanmış nekrozla da bağlantılı görünmektedir. Katepsin Q lizozomal bir proteazdır ve sitozolde ROS ile birlikte çalışarak hücrel substratların parçalanmasında ve programlanmış nekrozun uyarılmasında görev alır [Stegh, 2012].

p53 otofajiden sorumlu genleri transaktive edebilmesine rağmen, p53'ün normal seviyeleri otofajiyi inhibe etmektedir. p53 üzerinde meydana gelen delesyonlar veya kimyasal inhibisyonlar otofajiyi uyarmaktadır. Otofaji baskılanması stoplazmik p53'e bağlıdır ve otofajinin gerçekleşmesi için, otofajinin fizyolojik uyarıcılarının stoplazmik p53 moleküllerini yok etmesi gerekmektedir. Stoplazmik p53 otofajinin pozitif düzenleyicisi olan AMP-bağımlı kinazın inhibisyonundan ve negatif düzenleyicisi olan mTOR'un aktivasyonundan sorumludur.

Normal p53 seviyeleri otofajiyi engellerken otofajinin engellenmesinin genellikle kanserleşmeyle bağlantılı olması bu durumun mutant p53 aktivitesi sonucu gerçekleştiğini ortaya çıkarmıştır. DNA bağlanma bölgesi silinen p53 moleküllerinin otofajiyi engelleme yeteneklerinde bir azalma olmaması bu durumun p53'ün yapısal özellikleriyle bağlantılı olmadığını ortaya çıkarmıştır. Aynı şekilde p53'ün fonksiyonunda değişikliğe neden olan nokta mutasyonlarının otofaji inhibisyonuna olan etkisi incelendiğinde herhangi bir fark görülmemiştir. Bu durum p53 ve otofaji ilişkisinin farklı bir yolla gerçekleştiğini göstermektedir [Levine and Oren, 2009].

p53; PUMA, NOXA ve PIG3'ün fazla ifadelenmesiyle ROS üretimini uyarak apoptoz ve yaşlanma gibi süreçleri kontrol edebilmektedir. Yüksek stres seviyeleri ROS üretimini uyarak hücre ölümüne neden olurken, ortalama stres seviyeleri p53'ün ROS üretimine karşı fonksiyonlarını uyarak hata onarımını ve hücrenin hayatta kalmasını sağlar [Stegh, 2012].

2.4.4. Poli ADP-Riboz Polimeraz (PARP)

PARP, NAD^+ 'yi substrat olarak kullanarak ADP-riboz polimerlerini sentezleyen ve hedef proteinlerin glutamat, aspartat veya lizinlerine transferini sağlayan polimeraz enzimidir. PARP ailesinin üyeleri PARP imza motifi adı verilen ve aktif bölgede yer alan çok korunmuş bir diziye sahiplerdir. PARP 1-5 asıl PARP

aktivitesini gösteren enzimlerdir. PARP 6-8, 10-12 ve 14-16, sadece bir molekül ADP-riboz molekülü transfer edebilmekteyken, PARP 9 ve 13 NAD⁺ bağlanma bölgeleri olmadığı için neredeyse inaktif formlardır. PARP-1 ve PARP-2, PAR moleküllerinin bağlanmasını katalizleyerek hasar bölgelerinde kromatin dekontansasyonuna, onarım mekanizmalarının aktif hale gelmesine ve DNA hasarının onarılmasına yol açarlar. PARP moleküllerinin hem hedef proteinleri hem de hedef DNA dizileri birbirlerinden farklıdır. Dolayısıyla herbirinin kendine özel biyolojik fonksiyonu bulunmaktadır. DNA hasarı sırasında gerçekleşen PARP üretiminin %90'ından PARP-1 sorumludur. PARP moleküllerinde bulunan DNAN bağlanma domaini, DNA hasarını tanımadan sorumlu iki çinko parmak bölgesi içerir. B domaini ise nükleer lokalizasyon sinyali ve kaspaz-3 için kesim bölgesi içermektedir. PARP-1 daha çok DNA'daki tek zincir hasarlarında bağlanırken, PARP-2 DNA'da oluşan boşluklara bağlanmaktadır. PARP histonlara PAR bağlayarak kromatin yapısının modifikasyonunu sağlar. PARP-1, DNA hasarı olan bölgelerde geçici kromatin yapısı oluşturarak transkripsiyonu baskılar ve DNA hasarının düzeltilmesine olanak sağlar. Hasar olmadığı zamanlarda ise PARP sürekli transkribe olan genlerin promotör bölgelerine bağlanarak buralarda kromatin yapısının oluşmasını engeller ve transkripsiyonun devamlılığını sağlar. Malignant lenfoma, Ewing's sarkoma, göğüs, akciğer, karaciğer, mesane ve yumurtalık kanseri gibi çok sayıda kanser türünde PARP-1'in hem mRNA hem de protein seviyesinde fazla miktarda ifadelendiği gösterilmiştir [Yelamos et al., 2011].

PARP-1 normal koşullarda en aktif transkribe olan genlerin promotör bölgelerinde yer alır. DNA hasarı gerçekleştiği zaman PARP-1 hasarın bulunduğu yere doğru relokale olur. Bu durum promotörlerin etrafındaki PARP-1 moleküllerin tamamının konumunun değişmesine yol açar [Krishnakumar and Kraus, 2010]. DNA hasarı olmadığı durumda poly ADP ribozilasyon çok seyrek gerçekleşirken, DNA hasarı sırasında 100 kat artmaktadır. PARP-1 inhibisyonu kaspaz-3, -7 ve -9'un aktivasyonunu azaltmaktadır [Zhang et al., 2012].

PARP, stres sensörü ve stres cevabının düzenleyicisi olarak da tanımlanabilir. PARP, NAD moleküllerini ADP-riboz monomerlerini elde etmek için kullanarak, PAR polimerlerinin histonlar, DNA tamir proteinleri, transkripsiyon faktörleri, kromatin düzenleyicileri gibi hedef moleküllere ve kendisine bağlanmasını katalizler. Genotoksik stres sonucu aktif hale gelen PARP hem nükleozom yapısında bulunan DNA'ya hem de hasarlı DNA yapılarına bağlanabilir. JNK-1 tarafından fosforlanarak

hidrojen peroksit tarafından uyarılan hücre ölümü sırasında aktivasyonunun devamını sağlayan PARP, oksidatif hasarın olduğu durumlarda DNA onarımını sağlayarak ve okside olmuş nükleer proteinlerin ortadan kaldırılmasına yardımcı olarak hücre homeostazisinin yeniden kurulmasına yardımcı olur. PARP aktivitesinin inhibisyonu hücrede protein karbonil içeriğinin ve oksidize DNA'nın artmasına neden olmaktadır. Aktif PARP molekülü p53 proteininin stabilizasyonunu sağlayarak apoptotik sürecin başlamasına yardımcı olur. Aktif kaspazlar PARP-1 molekülünü 24 kDa ve 89 kDa'lık iki fragment halinde keserek, PARP-1'in aşırı aktivasyonu sonucu oluşabilecek NAD^+ ve ATP miktarlarındaki azalmayı engeller ve nekrozdan kaçışı sağlar. PARP-1'in aşırı aktive olduğu durumlarda, hücresel NAD^+ ve ATP stokları tükenmekte ve hücre enerji krizi yüzünden apoptotik yolak yerine nekroz yolağına girmektedir [Luo and Kraus, 2012].

PARP apoptoz sırasında kaspazlar tarafından, özellikle kaspaz-3, kesilmektedir. DNA hasarı gerçekleştiği zaman PARP hasarın olduğu zincire bağlanır ve NAD^+ kullanarak uzun PAR zincirleri sentezler. PARP'ın bu polimeraz etkinliği büyük ölçüde DNA hasarına bağlıdır. Bu durum hücrede sürekli NAD^+ sentezine ve buna bağlı olarak da ATP miktarında azalmaya neden olmaktadır. ATP miktarındaki bu azalma çoğu hücre tipinde DNA hasarına bağlı hücre ölümünün asıl sebebidir. Yüksek miktarda ATP bulunduran hücreler apoptozis yolağına girmekteyken, düşük ATP seviyeleri nekroza neden olmaktadır [Herceg and Wang, 1999].

Apoptoz sırasında gerçekleşen olaylardan biri de DNA onarımında, DNA stabilitesinde ve transkripsiyonun düzenlenmesinde görevli olan PARP enziminin kaspaz -3 ve -7 tarafından kesilmesidir. PARP-1'in kesimi sonucu, DNA'ya bağlanmadan sorumlu iki çinko parmak motifi otomodifikasyon ve katalitik domainlerden ayrılır ve böylece PARP'ın hasarlı DNA bölgesine bağlanması engellenir. PARP'ın kesimi apoptoz sırasında genel olarak görülen bir olay olmasına rağmen PARP varlığı apoptoz için esansiyel değildir. PARP-1 bulunmayan hücreler DNA hasarına yol açan ajanlara karşı daha hassaslardır. TNF'nin uyardığı oksidatif stres ve DNA hasarı PARP'nin aktivasyonuna, bu aktivasyon da ATP miktarında azalmaya ve nekroza neden olmaktadır. CD95'e bağlı olarak gerçekleşen apoptozis sırasında kesimle PARP inaktif hale getirilir ve apoptotik sürecin devamlılığı sağlanır [Los et al., 2002].

2.5. Sinyal Yolakları

2.5.1. Mitojen Tarafından Aktive Edilen Protein Kinazlar (MAPKs)

Mitojen tarafından aktive edilen protein kinazlar (MAPKs), hücre içi sinyalleri düzenleyen serin treonin kinazlar ailesinin üyeleridir. Ökaryotik hücrelerin hepsinde bulunurlar. Hücre çekirdeğinden bilgi aktarılması konusunda çok önemli bir yere sahip olan MAPK'lar, transformasyon, ölüm, yaşam, farklılaşma ve hücre proliferasyonunu da içeren çok çeşitli hücresel aktivitelerde görev alırlar. Şekil 2.20'de görüldüğü gibi [Kim and Choi, 2009], memeli MAPK ailesi temel olarak üç gruba ayrılır; Ekstraselüler sinyal düzenleyici kinazlar (ERK) ailesi, p38 MAPK ailesi ve stres aktive edici protein olarak da bilinen, c-Jun NH₂- terminal kinaz (JNK) ailesi. MAPK sinyalleri en az 3 bileşenden oluşmaktadır. Aktivasyonun sinyal iletimini başlatmasının ardından, MAP3K (MAP kinaz kinaz kinaz) aktifleştirilir. Aktifleşen MAP3K, MAP2K'i (MAP kinaz kinaz) ve ardından MAPK'ı (MAP kinaz) aktive etmektedir. Aktif hale gelen MAPK'ler ise diğer protein kinazları ve transkripsiyon faktörlerini fosforilleyerek aktif hale getirirler ve cevap oluşumu gerçekleşir.

2.5.1.1. p38 Sinyal Yolağı

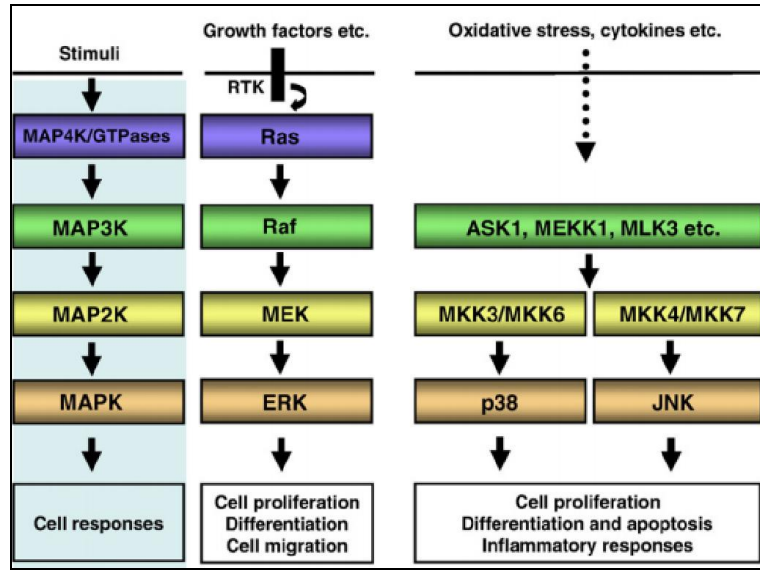
Bir diğer MAPK ailesi üyesi olan p38 sinyal yolağının p38- α , - β , - γ , - δ olmak üzere 4 adet izoformu bilinmektedir [Kim and Choi, 2010]. Çok çeşitli hücresel uyarılar, p38 sinyal yolağını aktive edebilir. Hiperosmolarite, ısı şoku, radyasyon gibi birçok stress kaynağına cevap olarak p38 yolağı aktive olmaktadır. Bunların yanında interlökinler, tümör nekrosis faktör- α (TNF- α), transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β) gibi pro-inflamatuar sitokinlerin hücreye uygulanması da bu yolağı aktive edebilmektedir. p38 ile yapılan çalışmalar sonucunda, p38'in serin kinaz aktivitesinin, transkripsiyon faktörlerinin fosforillenmesi ve gen transkripsiyonunun düzenlenmesi, sitokin üretiminin uyarılması, aktin sitoskelet elemanlarının düzenlenmesi gibi etkilerinin yanında apoptozun uyarılması ve hücre farklılaşması gibi etkilerinin de olduğu görülmüştür. p38 yolağının aktivasyonu, gelen uyarının türüne göre farklı cevaplar oluşmasına sebep olabilmektedir. Örneğin, eritropoetin-

bağımlı farklılaşmada p38 hücre farklılaşmasında görev alırken, akut promiyolitik lösemi hücrelerinde negatif düzenleyici olarak etki gösterir. Bunun yanında p38'in hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotik etkilerinin olduğu da bilinmektedir.

p38 sinyal yolağı aktive olurken, ERK sinyal yolağına benzer şekilde, aktif hale gelen molekül bir sonraki molekülün substratı olarak görev alır. p38 MAP kinazın (MAPK), aktif hale gelmesi için Thr-Gly-Tyr motifinden fosforillenmesi gerekmektedir. p38'in fosforillenmesi ise bir üst basamağındaki, MKK3, MKK6 ve aynı zamanda JNK sinyal yolağında aktivatörü olan MKK4, MAP kinaz kinaz'ları (MAPKK) tarafından gerçekleştirilir. p38 yolağındaki MAPKK'leri aktive eden proteinler ise, Tak1, ASK1 ve MLK3'tür [Platanias, 2003].

2.5.1.2. c-Jun NH₂- Terminal Kinazlar (JNK Sinyal Yolağı)

MAP kinaz ailesinin bir diğer grubu ise JNK sinyal yolağıdır. Bu yolağın izoform enzimleri ise JNK1, JNK2 ve JNK3'tür. p38 sinyal yolağında olduğu gibi, interleokinler, tümör nekrosis faktör- α (TNF- α) ve transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β) gibi pro-inflamatuar sitokinler, JNK sinyal yolağını da aktive ederler. Bunların yanında genotoksik, osmotik, hipoksik ya da oksidatif stres gibi hücrel stresler de JNK sinyal yolağını aktive edebilirler. Bu yolağın en alt basamağında JNK bulunurken, JNK'yi aktive eden MAP2K'ler, MKK4 ve MKK7'dir. MAP2K'leri aktive eden MAP3K'ler ise ASK1, MEKK1 ve MLK3'tür. P38 ve JNK sinyal yolaklarının aktive olması için gereken MAP3K'ler aynıdır. Bunun yanında bir MAP2K olan MKK4, hem p38 hem de JNK sinyal yolağının MAPK'lerini aktive edebildiği için bu iki yolak arasında geçişler olabilmektedir. JNK sinyal yolağında da hücrelerin kaderi, aynı p38'de olduğu gibi, hücre apoptozu, proliferasyonu ya da farklılaşması olabilir [Kim and Choi, 2010].



Şekil 2.20: MAPK sinyal yolağının akışı.

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasal Maddeler

Gallik asit (GA; 3,4,5-triphydroxyl-benzoic acid) (G7384) Sigma Aldrich. RPMI 1640 (R6504), Medium 199 (M5017) Sigma Aldrich, Fetal Bovine Serum (Hyclone, SV30180.03), Penicillin-Streptomycin (Hyclone, SV30010), Sodyum-bikarbonat (Sigma- Aldrich S8875), L-glutamin (GIBCO, 25030), EGF (Sigma, E9644)'dir. Trypsin 10X (Lonza, BE17-160E), Puck's Salin-A ise, NaCl (Sigma, S3014), KCl (Sigma, P5405), Glukoz (Sigma, G7021) ve Sodyum Bikarbonat (Sigma, S8875) kullanılarak hazırlanmıştır. Hücre kültüründe PBS hazırlanırken, Na₂HPO₄ (Sigma, S3264) ve KH₂PO₄ (Sigma, P9791) kullanılmıştır. Dondurma mediumu hazırlanırken kullanılan DMSO (Sigma, D5879) Sigma-Aldrich'den temin edilmiştir. Deneyler sırasında kullanılan sinyal yolak inhibitörleri; CL-387,785 (Calbiochem, 233100), SB202190 (Sigma Aldrich, S7067) ve SP600125 (Sigma Aldrich, S5567)'dir. Agaroz (Sigma Aldrich, A9539) ve Red Safe Nucleic Acid Staining Solution (Intron, 21141) kullanılmıştır. Ayrıca, yağsız süt tozu (%5'lik), ECL (Thermo Scientific 32106; Thermo Scientific Plus, 32132), Akrilamit/Bisakrilamit (MP BIAC3752, % 40) kullanılmıştır.

3.1.2. Hücre Hatları

Met5A kontrol hücreleri ATCC'den satın alınmıştır. Met5A hücre hatlarının çoğu ise homojen tipte ve normal plevral hücrelere benzer [Web 13, 2014]. Kullanılan hücre hatları MM'ya sahip hastalardan elde edilen SPC212 hücreleri Friburg Üniversitesi Histoloji Embriyoloji Enstitüsü'nden hediye edilmiştir. SPC212 hücre hatları, heterojen fenotipe sahiptir, yapışkan ve tek tabakalı olarak büyürler [Web 14, 2014].

3.1.3. Cihaz ve Diğer Malzemeler

Hücre kültüründe, CO₂ inkübatörü (ThermoForma), laminar akım kabini (Hera Safe), su banyosu (Memmert), ışık mikroskobu (Nikon TMS), santrifüj (Beckman Coulter, Allegra X-22) kullanılmıştır. Bu cihazların dışında solüsyonlar hazırlanırken, hassas terazi (Precisa), manyetik karıştırıcı (Heidolph), pH metre (Mettler Toledo), otoklav (Hirayama, HVE-50), vortex (yellowline TTS2) kullanılmıştır. Plaka okuyucu (Thermo, Varioskan Flash), jel görüntüleme sistemi (BioRad, ChemiDoc XRS+), dikey elektroforez ve transfer sistemi (BioRad Mini Protean), soğutmalı mikrosantrifüj (Beckman Coulter, 22R), mikrosantrifüj (Beckman Coulter, Microfuge16), orbital shaker (IKA, Yellow line), ısıtıcı blok (VWR) kullanılmıştır. Hücreler ve bazı kimyasallar, -80°C dondurucu (Sanyo, MDF-192) ve sıvı azot tankı (Arpege 140)'nda saklanmıştır. Ayrıca 96 kuyulu doku kültürü plate'ler (92096) TPP'den temin edilmiştir.

3.1.4. Kullanılan Solüsyonlar

• M199

4,75 gr Medium 199 ve 0,62 gr NaHCO₃ tartılarak, ayrı ayrı 50'şer ml otoklavlanmış distile su içinde, manyetik karıştırıcı kullanılarak iyice çözülmüştür. İyice homojen hale gelen çözeltiler 0,22 µM'lık filtre kullanılarak sterilize edilmiştir. Ardından bu karışım, 333 ml otoklavlanmış distile suya eklenmiştir. 5 ml pen/strep (toplam hacmin %1'i), 50 ml FBS (toplam hacmin %10'u), 10 ml HEPES (son konsantrasyon 20 mM), 2 ml L-glutamin (son konsantrasyon 0,75 mM), karışımın içine eklenmiştir. Son olarak 1445 µl hidroksikortizon, 250 µl insülin ve 10 µl EGF kullanılarak pH 7,2-7,4 arasına ayarlanmıştır.

• RPMI

5,2 gr RPMI ve 1 gr NaHCO₃ tartılarak, ayrı ayrı 50'şer ml otoklavlanmış distile su içinde, manyetik karıştırıcı kullanılarak iyice çözülmüştür. Daha sonra 0,22 µM'lık filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir. Ardından bu karışımın içine 345 ml otoklavlanmış su eklenmiştir. 5 ml pen/strep (toplam hacmin %1'i) ve 50 ml FBS (toplam hacmin %10'u) eklenerek pH'ı 7,2-7,4 arasına ayarlanmıştır.

- 10X PBS

80 gr NaCl (son konsantrasyon 1370 mM), 2 gr KCl (son konsantrasyon 27mM), 14,49 gr Na₂HPO₄ (son konsantrasyon 100 mM) ve 2,49 gr KH₂PO₄ (son konsantrasyon 20 mM) tartılarak yaklaşık 100 ml otoklavlanmış distile su içinde magnetik karıştırıcı yardımıyla homojen hale gelinceye kadar karıştırılmıştır. Ardından 0,22 µM'lık filtre yardımıyla sterilize edilir ve son hacmi otoklavlanmış distile su ile 1 lt'ye tamamlanır. pH'ı 7,4'e ayarlandıktan sonra kullanılmıştır.

- Puck's Saline A

8 gr NaCl, 0,4 gr KCl, 1,0 gr Glukoz, 0,005 gr Fenol red ve 0,35 gr NaHCO₃ ayrı ayrı tartılarak aynı beherin içine konulmuştur. Üstlerine 100 ml otoklavlanmış distile su konularak manyetik karıştırıcıda homojen bir karışım elde edilinceye kadar karıştırılmıştır. Ardından tüm karışım 1 lt'ye tamamlanarak pH'ı 7,2'ye ayarlanmıştır.

- 1X Tripsin

Ticari firmalardan alınan 10X'lik tripsin, 1X'lik Puck's Salin A kullanılarak 1:10 oranında seyreltilip hücre kültürü çalışmalarında kullanılmıştır.

- Gallik Asit (GA)

Gallik asitin ana stoğu hazırlanırken öncelikle etanol içinde çözünmüştür. 100mM'lık ana stok hazırlanırken, 17,01 mg gallik asit tartılarak, bir ependorf içinde 1 ml etanolle karıştırıp iyice çözölmüştür. Ara stoklar serumsuz besiyeri kullanılarak hazırlanmıştır.

- SB202190

Ana stok hazırlanırken 5 mg inhibitör 1,32 ml DMSO içinde çözölmüştür. Ardından ara stoklar hazırlanarak deneylerde kullanılmıştır.

- SP600125

Ana stok hazırlanırken 10 mg 1,82 ml DMSO içinde çözölmüştür. Ardından ara stoklar hazırlanarak deneylerde kullanılmıştır.

- Hücre Dondurma (stok) solüsyonu

FBS ve DMSO, hacimce %5 (v/v) olacak şekilde kar ıstırılarak stok    zelti hazırlanmıştır. Örneğin; son hacmi 50 ml olacak şekilde hazırlanan stok solüsyonunu hazırlamak için 47,5 ml FBS ve 2,5 ml DMSO kullanmak gerekmektedir. Hazırlanan stok    zelti -20  C’de saklanmıştır.

- 10X SDS-Yürütme Tamponu

30,3 gr Tris Base, 144,1 gr Glisin ve 10 gr SDS ayrı ayrı tartılarak bir beherin içine konmuştur. 100 ml distile su ile magnetik kar ıstırıcıda kar ıstırılarak iyice     nmeleri sağlanmıştır. Kar ı ımın homojenitesi sağlandıktan sonra distile su ile 1 lt’ye tamamlanmıştır.

- 10X Transfer Tamponu

30,3 gr Tris Base ve 144,1 gr Glisin ayrı ayrı tartılarak beher içinde 100 ml distile su içinde     lm  t r. Ardından distile su ile 1 lt’ye tamamlanmıştır.

- 4X SDS Yükleme (Laemmli) Boyası

0,134 ml Tris-HCl (0,2 M pH: 6,8), 0,8 gr SDS (%40 SDS’ten 0,4 ml), %40 gliserol (0,8 ml), %0,4 (w/v) Bromophenol Blue (%3’l kten 0,267 ml) ve  -Merkaptoetanol (%100’l k olan stoktan 0,4 ml) bir ependorfun içine konularak son hacim 2 ml olacak şekilde distile su eklenmiştir. Eperdorfun içindeki tüm kimyasalların iyice kar ı ması sağlanarak kar ı ım homojen hale geldikten sonra alimünyum folyo ile sarılarak -20 C’de saklanmıştır.

- 10X TBS

0,5 M Tris-HCl (%100’l k Tris-HCl’dan 250 ml, pH:7,4) ve 1,5 M NaCl (4 M NaCl’dan 187,5 ml) yaklaşık 800 ml distile su içinde     l p pH’ı 7,4-7,6’ya ayarlanarak son hacim 1 lt’ye tamamlanmıştır.

- 1X TBS-T

10X TBS tamponu 1:10 oranında distile su ile seyreltilerek 1X TBS tamponu elde edilmiştir. Hazırlanan 1X TBS tamponu içine %0,1 (v/v) olacak şekilde Tween20 eklenerek 1X TBS-T hazırlanmıştır.

- Membran Bloklama Solüsyonu

Hazırlanacak hacim miktarının %5'i (w/v) kadar süt tozu tartılarak 1X TBS-T içinde çözülerek membran bloklama solüsyonu hazırlanmıştır.

- Tris-HCl

SDS-Poliakrilamid jel için iki ayrı Tris-HCl çözeltisi gerekmektedir. Tris-HCl, 1,5 M'lık (pH 8,8) ve 1 M'lık (pH 6,8) olarak hazırlanmıştır. İstenilen hacim için 1,5 M olacak şekilde distile su içinde çözülmüştür. Ardından pH'ları 8,8 ve 6,8 olacak şekilde ayarlanıp çözeltiler son hacimlerine tamamlanmıştır.

- 50X TAE

Distile su içerisinde 0,5 M EDTA çözeltisi hazırlanıp pH'sı yaklaşık 8'e ayarlanmıştır. Başka bir beher içinde 242 gr Tris yaklaşık 700 ml distile su içinde çözülmüştür. Ardından 57,1 ml glasiyel asetik asit ve 100 ml 0,5 M EDTA eklenip çözeltinin pH'ı 8,5'e ayarlanmıştır. Son olarak toplam hacim 1 L'ye tamamlanmıştır.

- 1X TAE

Agaroz jel hazırlanırken ya da TAE yürütme tamponu olarak kullanılacağı zaman, 50X TAE, 1:50 oranında distile su ile seyreltilerek kullanılmıştır.

3.1.5. Kullanılan Kit ve Antikorlar

Caspase-3 (Cell signalling, 9608), Caspase-8 (Cell Signalling, 9746), Caspase-9 (Cell signalling, 9508), p53 (SC-98), p-p53 (9284), PARP, β -aktin antikorları kullanılmıştır. Ayrıca, BCA Protein Assay Kit (Thermo, 23227), Caspase-8 Colorimetric Assay Kit (K113-200), Caspase-9 Colorimetric Assay Kit (K119-200) ve Quick Apoptotic DNA Detection Kit (Biovision, K120-50) kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Kültürü ve Alt Kültürleme

Met5A hücreleri M199, SPC212 hücreleri ise RPMI 1640 besiyerlerinde, 37°C’de %5 CO₂ ortam koşullarını sağlayan inkübatörde büyütülmüştür. Besiyerleri %10 FBS içermektedir. Hücrelerin besiyerleri 2-3 günde bir değiştirilerek %90-100 büyüme oranına ulaşması beklenmiştir. Hücreler, 1:3 oranı korunarak alt kültürleme yapılmıştır. Alt kültürleme yapılırken adherent hücreler 1X Tripsin yardımıyla kaldırılarak tüpe aktarılmıştır. Ardından 1000 rpm’de 5 dakika santrifüjlenen hücrelerin, üstteki tripsin besiyeri atılarak, taze besiyeri kullanılarak ekimi yapılmıştır.

3.2.2. Hücre Stoklanması ve Dondurulmuş Hücrelerin Çöktürülmesi

Tripsin kullanılarak kaldırılan hücreler, 1000 rpm’de 5 dakika çöktürülürler. Üstteki tripsin-besi yeri karışımı atıldıktan sonra %5 DMSO, %95 FBS içeren, 1 ml dondurma solüsyonunda karıştırılırlar. Ardından kriyo tüplere alınarak bir gece -80°C tutulurlar. Ertesi gün sıvı azot tankına alınarak uzun süreli saklanırlar. Tekrar kullanılacak hücreler sıvı azot tankından çıkarılarak, hızlıca çözündürülmüş ve daha önce 37°C’ye ısıtılan RPMI besi yerinden 7-8 ml ile karıştırılarak 1000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilirler. Santrifüj sonrasında üst süpernatant kısmı atılır. Dibe çöken hücreler üzerilerine besiyeri eklenerek flasklara ekim yapılır.

3.2.3. DNA Merdivenlenme (Fragmentasyon) Analizleri

40 mm’lik her petride 5 X 10⁵ hücre olacak şekilde ekim yapıldıktan 24 saat sonra tüm besiyeri yenilenerek 0-200 µm konsantrasyonlarda GA uygulaması yapılmıştır. GA uygulanmış Met5A ve SPC212 hücrelerinde, GA’nın DNA üzerinde yaptığı etkiyi gözlemlemek amacıyla GA uygulanmış hücrelerden DNA izolasyonu yapılarak fragmentlenme agaroz jelde incelenmiştir. Hücrelere 100 µM ve 200 µM GA konsantrasyonları uygulanarak, 24 ve 48 saatlik hücre merdivenlenmesi gözlenmiştir.

3.2.3.1. DNA İzolasyonu

Belirlenen saatlerde (24-48 saat) tripsinlenen hücreler 5 dakika 1000 rpm’de santrifüj edildikten sonra PBS kullanılarak yıkanmıştır. Pipet kullanılarak süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldıktan sonra hücrelere 35’er µl TE liziz buffer eklenerek nazikçe aşağı yukarı pipetleme yapılmıştır. Ardından 5 µl RNAaz eklenen örnekler 37°C’de 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında her örneğe 5 µl proteinaz K eklenerek, iyice karıştırıldıktan sonra 30 dakika 50°C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda her örneğe 5’er µl Amonyum asetat solüsyonu ve 50’şer µl izopropanol eklendikten sonra iyice karıştırılan hücreler, -20°C’de 10 dakika inkübe edilmiştir. DNA’yı çöktürmek için her örnek 4°C’de, 15 dakika, 13000 rpm’de santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant atılarak DNA pelletine 0,5 ml %70’lik etanol eklenerek ve 4°C’de, 10 dakika, 13000 rpm’de santrifüjlenmiştir. Ependorf içindeki etanol atıldıktan sonra kalan etanolün uçması için 10 – 15 dakika ependorfların kapakları açık bırakılarak bekletilmiştir. Tüm etanol uçtukten sonra DNA pelletleri 30 µl DNA süspansiyon buffer’ın da homojen olacak şekilde çözülmüştür.

3.2.3.2. Agaroz Jel Elektroforezi

Elde edilen DNA’lar % 1,2’lik agaroz jelde yürütülmüştür. Agaroz jel (0.72 gr, 60 ml) TAE buffer içinde çözülerek ve içine 3 µl red safe eklendikten sonra agaroz jel kuyularına her örnekten 1’er µg yüklenerek 5V/cm olacak şekilde 50 V’da yürütülmüştür.

3.2.4. Kaspaz Aktivite Testleri

SPC212 hücrelerine GA (Gallik Asit) uygulaması yapılarak apoptotik proteinler, kaspaz-8 ve kaspaz-9 proteinlerinin aktivasyonları, doza ve zamana bağlı analiz edilmiştir. 0 - 200 µM konsantrasyonları seçilerek, 0 - 48 saatlerinde, GA’in kaspaz aktivitesi üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Ekim yapılırken, 150 mm’lik petri kaplarına her bir petride 5×10^6 hücre olacak şekilde ekim yapıldıktan sonra 24

saat sonra her bir petrideki besiyerleri çekilerek besiyeri tazelenmiş ve son molaritelere uygun olacak şekilde GA uygulaması yapılmıştır.

3.2.4.1. Hücre Lizizi

12, 24 ve 48. saatlerde petrilerin içindeki besiyerleri uzaklaştırılarak PBS ile hücreler toplandıktan sonra 5 dakika 1000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra besiyerleri atılarak hücreler üzerine (200'şer µl) liziz buffer eklenerek ve hücrelerin zarlarının parçalanması sağlanmıştır. Ependorflar buz üzerinde 10 dakika bekletilerek inkübe edildikten sonra, 10000 g'de 1 dakika santrifüj edilip örnekler ileri kullanımlar için -20° C'de saklanmıştır.

3.2.4.2. Protein Miktarının Belirlenmesi (BCA Yöntemi)

Protein miktarlarının belirlenmesi için BCA yöntemi kullanılmıştır. Öncelikle BSA standartları, son konsantrasyonları; 0,125 mg/ml - 2 mg/ml olacak şekilde hazırlanmıştır. BCA protein belirleme kiti kullanılarak, çalışma solüsyonu hazırlandı. 1000 µl Reaktif A ile 20 µl Reaktif B solüsyonu karıştırılarak elde edilen çalışma reaktifi, ışıktan olabildiğince uzak tutularak hazırlanmıştır. Her bir BSA standardından 10'ar µl alıp 96 kuyulu microplate'in ikişer kuyusuna konulmuştur. Kör olarak kaspaz-8, -9 kiti içinde bulunan ve deneylerde kullanılan liziz buffer kullanılmıştır. Standartların eklendiği kuyulara çalışma solüsyonları eklenerek 30 saniye çalkalayıcı ile iyice karışmaları sağlanmıştır. Karanlık ortamda 37°C'de 30 dakika boyunca inkübe edilen örneklerin 562 nm'de standartların absorbans ölçümü yapılarak elde edilen absorbans değerleri ile excel kullanılarak standart grafiği çizilerek örneklerin protein miktarlarının tayininde kullanılmıştır.

3.2.4.3. Kaspaz 8 ve 9 Proteinlerinin Aktivasyonlarının Belirlenmesi

Kaspaz 8 ve kaspaz 9 proteinlerinin aktivasyonunu ölçmek için her bir örnekte 100 µg proteinin kaç µl lizatta bulunduğu hesaplanmıştır. Buna göre 96'lık plate'e her bir kuyuda 100 µg protein olacak şekilde çiftli olarak hazırlanmıştır. Kuyulardaki hacimler 50 µl olacak şekilde liziz buffer ile tamamlandıktan sonra her bir kuyuya,

10 mM DTT içeren (Her 1 ml'lik 2X reaction buffer için 10 µl DTT), 50'er µl 2X reaction buffer ve 5'er µl 4mM substrat eklenmiştir. Örnekler 37°C'de 2 saat inkübe edildi. Varioskan cihazı ile 405 nm'de ölçüm yapılmıştır.

3.2.5. Sinyal Yolak İnhibitörleri ve Kaspaz Aktivitelerinin Ölçümü

P38 sinyal yolağı inhibisyonu için SB202190, JNK sinyal yolağı inhibisyonu için SP60012 ve GA kullanılarak Kaspaz-8 ve kaspaz-9 kolorimetrik aktiviteleri değerlendirilmiştir. Bu deneyler yapılırken SB, SP ve CL inhibitörlerinin son konsantrasyonu 10 µM olarak seçilmiştir. Hücre ekiminin ardından, hücreler 24 saat boyunca 37°C, %5 CO₂, içeren ortamda inkübe edildikten sonra besiyerleri yenilenerek ilgili konsantrasyonlardaki sinyal yolak inhibitörleri eklenmiştir. 2 saat sonra son konsantrasyonları 75 µM, 100 µM ve 200 µM olacak şekilde GA uygulamaları yapılmıştır. Protein konsantrasyonları belirlenerek kaspaz aktiviteleri ölçülmüştür.

3.2.6. Gallik Asitin Kaspaz 8 ve 9, p53 ve PARP Proteinlerine Etkisinin İncelenmesi

3.2.6.1. Proteinlerin Eldesi ve Total Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Her petride 2X10⁶ hücre olacak şekilde ekim yapıldıktan 24 saat sonra GA uygulaması (0 - 200 µM) yapılmıştır. Belirlenen saatin sonunda hücrelerin besiyerleri atılıp petriler üzerine 2'şer ml soğuk PBS eklenmiştir. Hücreler kazınarak tüplere alınmış 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı atılarak elde kalan hücrelerin üzerilerine, proteaz ve fosfataz inhibitör karışımı eklenerek soğuk liziz tamponundan 200 µl eklenmiştir. Liziz, insülin enjektörü kullanılarak yapılmıştır. Proteinleri elde etmek için tüpler 14000Xg'de 7 dakika 4°C sıcaklıkta santrifüj edildikten sonra 3.2.4.2.'da anlatıldığı şekilde BCA protein analizi yapılarak toplam protein miktarları belirlenmiştir.

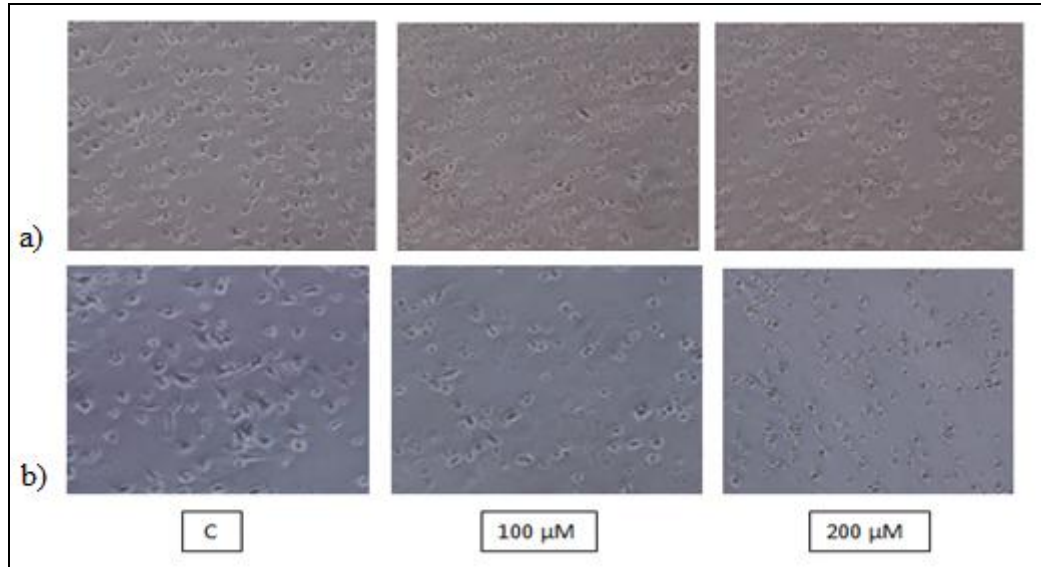
3.2.6.2. SDS-PAGE ve Western Blotlama

Belirlenmiş konsantrasyonlarda ve 3, 6, 12, 24 saatlerde GA uygulanmış örneklerin analizleri SDS-PAGE ve Western Blot ile değerlendirilmiştir. 15'er µg örnek 4X örnek yükleme tamponu ile karıştırılarak 95°C'de 5 dakika inkübe edilerek proteinler denatüre edilmiştir. Ardından örnekler %10'luk jel kuyularına yüklenmiştir. Moleküler ağırlık belirteci olarak Thermo scientific page Ruler prestained protein marker (10-170 kDa) kullanılmıştır. 1,5 saat 110 V'da proteinler PVDF membrana transfer edildikten sonra membran %5 (w/v) yağsız süt tozu içeren 1X TBS-T içerisinde, 80-100 rpm'de oda sıcaklığında 1 saat çalkalanarak bloklama işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından membran 1X TBS-T ile üç kez (5, 10 ve 5 dakika süreyle) 240 rpm'de çalkalanarak yıkanmıştır. %5'lik yağsız süt tozu içerisinde belli oranlarda seyreltilen primer antikorlarla +4°C'de, gece boyu, 80-100 rpm'de çalkalanarak inkübe edilmiştir. Primer antikorlar membran üzerinden alınarak, membran 1X TBS-T ile 3 kez yıkanmıştır. Ardından %5'lik yağsız süt tozu içerisinde belirlenen oranlarda seyreltilerek hazırlanan sekonder (ikincil) antikor eklenerek ve +4°C'de 1,5 saat 80-100 rpm'de çalkalanarak inkübe edilmiştir. Ardından membran 1X TBS-T ile 3 kez yıkanarak oda sıcaklığında 5 dakika ECL uygulandıktan sonra Bio-Rad Chemi-Doc XRS cihazıyla görüntülenmiştir.

4. SONUÇLAR

4.1. Gallik Asitin SPC212 Hücre Morfolojileri Üzerine Etkisinin Konsantrasyon ve Zamana Bağlı Belirlenmesi

Petrilere ekimi yapılan 5×10^6 sayısındaki SPC212 hücrelerine (0 - 200 μM) konsantrasyonlarda GA uygulanarak 24. ve 48. saatlerde ışık mikroskopunda incelenmiştir. 24. saatte kontrol hücreleri ve 100 μM GA eklenmiş hücreler morfolojik olarak birbirlerine benzerken, 200 μM GA eklenmiş hücrelerde ise morfolojik değişimler gözlenmektedir. Bu değişimlere ilaveten GA uygulanmamış kontrol hücrelerine göre hücre sayısında azalma da belirlenmiştir. 48. saatte ise 100 μM ve 200 μM GA uygulanan hücrelerin normal morfolojilerinde değişim gözlenirken sayısında da azalma belirlenmiştir.



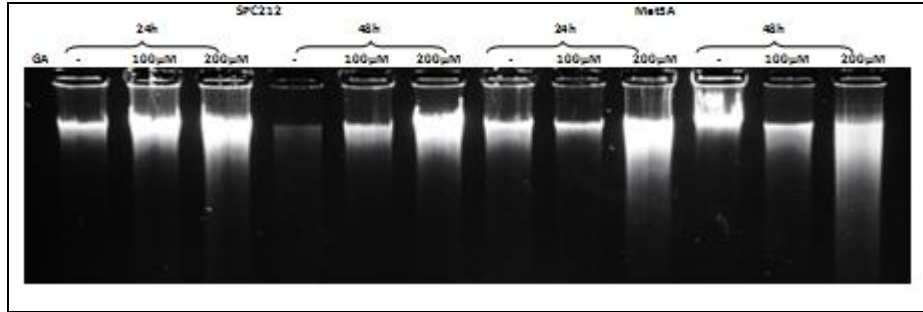
Şekil 4.1: Kontrol, 100 μM ve 200 μM konsantrasyonlarda GA uygulanmış SPC212 hücrelerinin a) 24. saatteki ve b) 48. saatteki 40X büyütülmüş mikroskopik görüntüleri.

4.2. Gallik Asitin Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi

4.2.1. DNA Fragmentlenmesinin Konsantrasyona ve Zamana Bağlı Belirlenmesi

GA'nın SPC212 ve Met5A hücrelerinin merdivenlenmesine yol açıp açmayacağı konsantrasyona (0 - 200 μ M) ve zamana bağlı olarak incelenmiştir. 5×10^5 hücre sayılarak ekimi yapıldıktan sonra 24. saatte besiyerleri değiştirilen hücrelere (100 μ M ve 200 μ M) konsantrasyonlarda GA uygulaması yapılmıştır. 24. ve 48. saatlerde bu örneklerden DNA izolasyonu yapılmıştır. Ardından % 1,2'lik agaroz jelde fragmentasyon DNA analizi yapılmıştır.

Yapılan çalışma sonucunda, GA uygulanan SPC212 ve MET5A kontrol hücrelerinde 24. ve 48. saatlerde, kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında, özellikle 200 μ M'lık konsantrasyonlarda tipik DNA merdivenlenmesi modeli gözlenmesine de degridasyona bağımlı smear görüntüsü elde edilmiştir.



Şekil 4.2: GA'nın doza ve zamana bağlı olarak spc212 ve Met5A hücrelerinde sebep olduğu DNA fragmentasyonu.

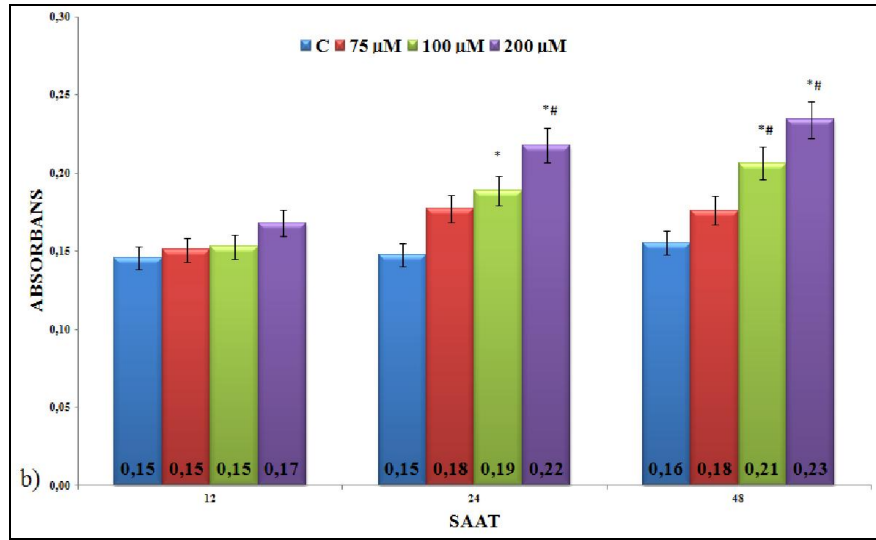
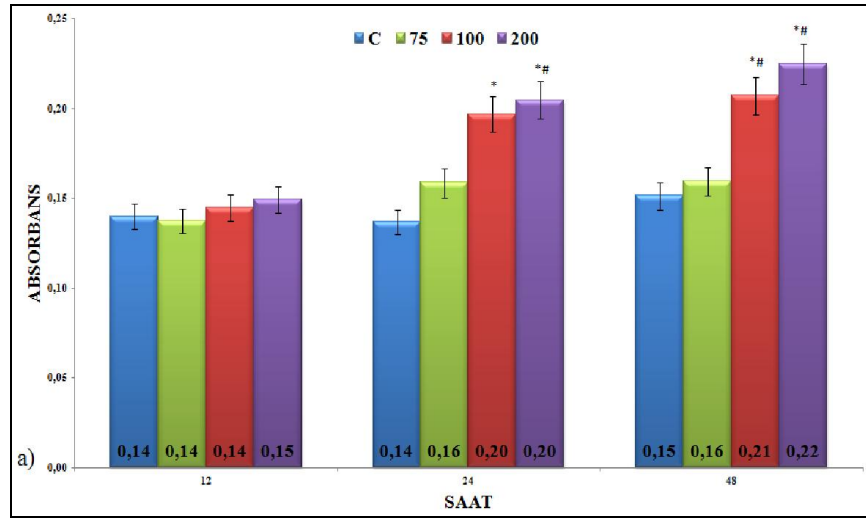
4.2.2. Kaspaz Aktivitelerinin Belirlenmesi

GA uygulanan SPC212 hücrelerinde kaspaz-8 ve kaspaz-9 protein aktiviteleri zamana (12 - 48 saat) ve doza bağlı olarak (0 - 200 μ M) değerlendirilmiştir. Hücre ekimini izleyen 24 saat sonrasında besiyerleri tazelenerek GA uygulanmıştır. Belirlenen saatlerde örneklerin lizizleri yapıldıktan sonra protein miktarı BCA assay ile ölçülerek, kaspaz aktivite testleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.3). Buna ek olarak kaspaz-8 ve -9 proteinin kesimlerini incelemek amacıyla protein analizleri yapılmıştır (Şekil 4.4). Şekil 4.3'te istatistik analizleri SPSS programında Dunnett's

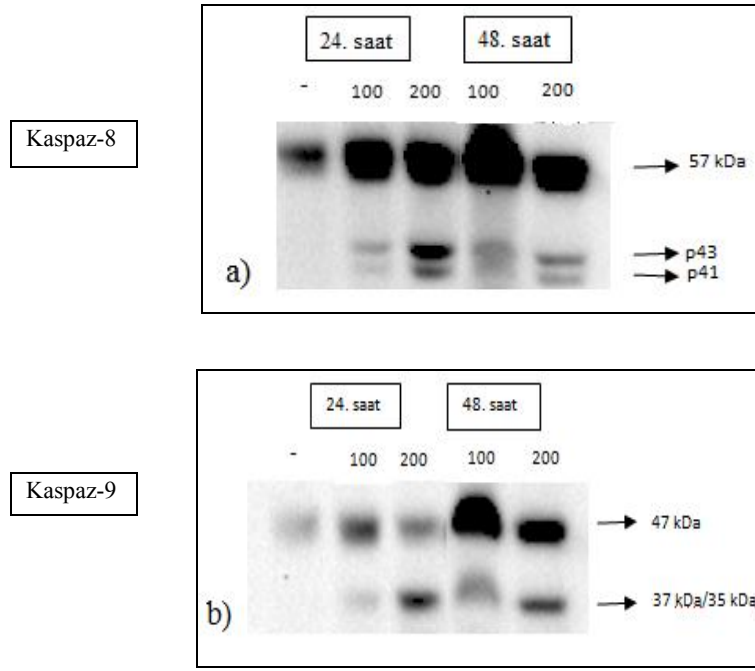
ve Benferroni testleriyle gerçekleştirilmiştir. P değeri * $P<0,05$ ve # $p<0,01$ belirlenerek hesaplanmıştır.

Sonuçlara göre, hem kaspaz- 8 hem de kaspaz-9'un aktivitesinin 12. saat içinde değişim göstermediği belirlenmiştir. 24. saatten itibaren 100 μM ve üzeri konsantrasyonlarda her iki kaspaz aktivitesinde artış olduğu gözlenmiştir.

Protein miktarını ölçtüğümüz western blot analizi sonuçlarına göre, kaspaz-8 proteininin GA uygulanmamış kontrol hücrelerinde kesiminin gerçekleşmediğini sadece 57 kDa'luk prokaspaz-8' in görüldüğü belirlenmiştir. 100 μM GA uygulanmış olan hücrelerde ise prokaspaz-8'in kesimi gerçekleştiği için 43 ve 41 kDa'luk bantlar gözlenirken, 200 μM GA uygulanmış hücrelerde bu bantlara ek olarak 18 kDa'luk bantlar belirlenmiştir. Kaspaz-9 proteini seviyesine bakıldığında ise, kaspaz-8 sonuçlarına benzer şekilde GA uygulanmamış kontrol hücrelerinde 47 kDa' luk prokaspaz-9 gözlenirken, GA uygulanmış hücrelerde prokaspaz-9'un kesimi gerçekleşmiştir.



Şekil 4.3: GA'nın SPC212 hücreleri üzerindeki etkisi. a) Kaspaz-8 ve b) Kaspaz-9 proteini üzerindeki etkisi.



Şekil 4.4: Kaspaz -8 ve -9 proteinlerinin hücredeki değişimlerinin belirlenmesi. a) 24. ve 48. saatlerde kaspaz-8 kesimleri b) 24. saatte ve 48. saatte kaspaz-9 kesimleri.

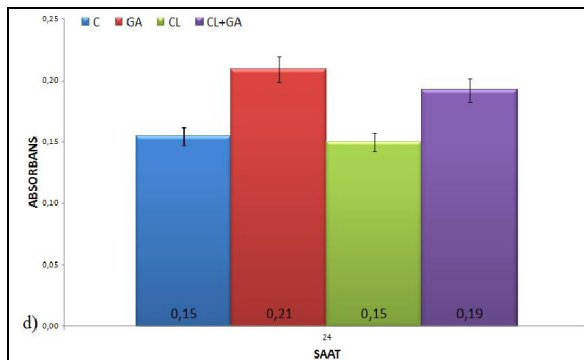
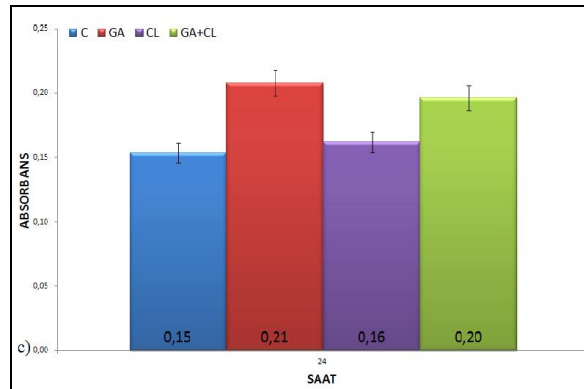
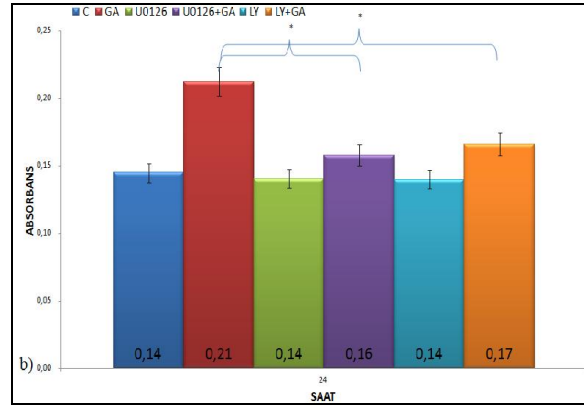
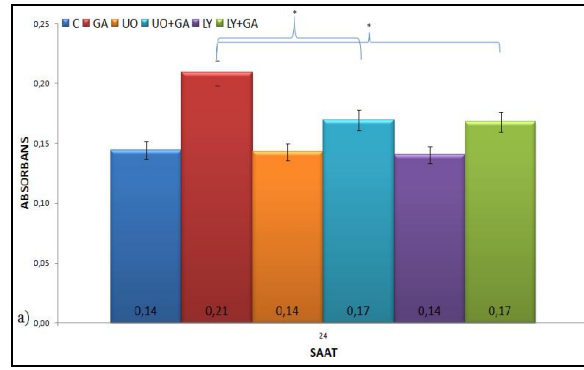
4.2.3. Sinyal Yolak İnhibitörleri ve Gallik Asit Etkileşiminin Kaspaz Aktivitesine Etkisinin Belirlenmesi

Stres durumlarında hücreleri apoptoza yönlendirdiği bilinen önemli iki sinyal yolağı p38 ve JNK sinyal yollarıdır [Sui et al., 2014]. Bu amaçla SPC212 hücre hattında GA aracılı apoptoz cevabının bu iki yolak bünyesinde olup olmadığını analiz etmek için GA uygulanması ile birlikte sinyal yolak inhibitörleri (SB203580 ve SP600125) de kullanılmıştır.

Daha önce de bahsedildiği gibi petrilere ekilen hücrelerin 24 saat sonra besiyerleri değiştirilerek 100 μ M konsantrasyonda GA uygulaması yapılmıştır. GA uygulamasından 2 saat önce, p38 sinyal yolağı inhibitörü olan SB203580, JNK sinyal yolağı inhibitörü olan SP600125 ve EGFR inhibitörü olan CL387,785, 10 μ M final konsantrasyonlarda petrilere eklenmiştir. Belirlenen zamanlarda lizizleri yapılan hücrelerin toplam protein miktarı BCA yöntemi ile ölçülerek kaspaz-8 ve -9 aktivite deneyleri için protein konsantrasyonları belirlenmiştir.

Şekil 4.5'te gösterildiği gibi, yapılan çalışma sonucunda, sadece yolak inhibitörleri kullanılan örneklerde kaspaz aktivasyonunda etkin bir değişim görülmemiştir. GA ile birlikte p38 sinyal yolağı inhibitörü olan SB203580 uygulanan hücrelerde kaspaz 8 ve 9 aktivitesinde azalma gözlenirken, JNK sinyal yolağı

inhibitörü olan SP600125 (Şekil 4.5 a) ve b)) ve CL387,785 kullanılan hücrelerde ise kaspaz aktivitesinde bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 4.5 c) ve d)).

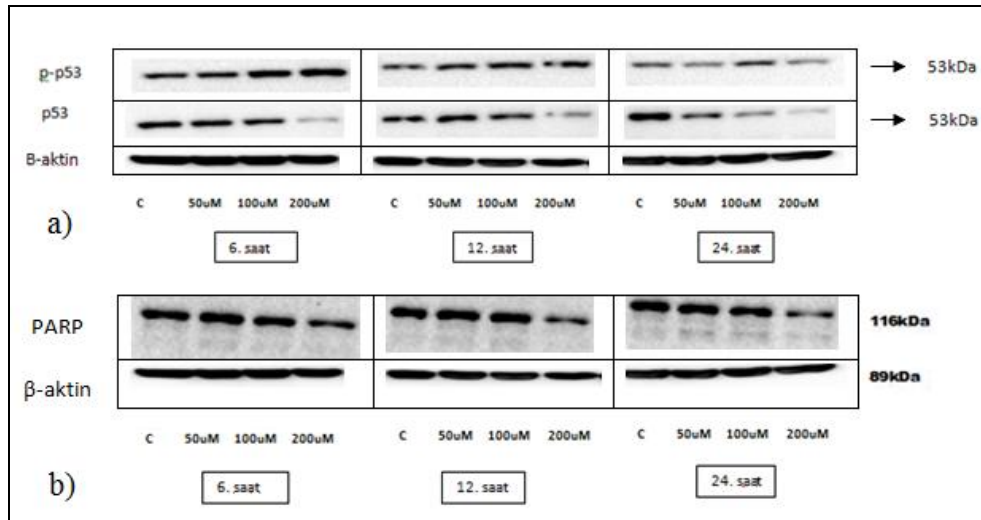


Şekil 4.5: JNK (SP600125), p38 (SB203580) ve EGFR (CL-387,785) inhibitörleri ile GA'nın SPC212 hücre hattındaki kaspaz aktivitesinin değerlendirilmesi. İnhibitörler 10 μ M ve GA 100 μ M olarak uygulanmıştır. a), c) Kaspaz-8, b), d) Kaspaz-9 aktivitelerini göstermektedir.

4.2.4. p53 ve PARP Proteinlerinin Aktivitesinin Belirlenmesi

0 - 200 μ M GA uygulanmış hücrelere 6, 12 ve 24. saatlerde GA uygulaması yapılarak p53 fosforilasyonları ve aktivasyonları ile PARP kesimleri incelenmiştir. Şekil 4.6'da görüldüğü üzere 6 saat içinde 100 μ M ve üzerinde p-p53 fosforilasyonunda kontrole göre artış gösterdiği gözlenmektedir. Bu artış 24 saat içinde ise azalmıştır. Toplam p53 seviyesinin 200 μ M konsantrasyonunda 6 saatten itibaren azalma gözlenirken 100 μ M'da bu azalma 24 saat içinde gerçekleşmiştir (Şekil 4.6 a)).

PARP proteini bilindiği gibi bir tamir enzimidir. DNA hasarının fazla olduğu durumlarda kaspazlar (Kaspaz-3 ve -7) tarafından kesilmektedir. Kaspazlar Şekil 4.6 b)'de görüldüğü üzere PARP seviyesinde kesime bağlı olarak 6. saatten itibaren 200 μ M konsantrasyonda azalma gözlenmiştir. β -aktin aktarma kontrolü olarak kullanılmıştır.



Şekil 4.6: p53 ve PARP protein seviyeleri 50 μ M, 100 μ M ve 200 μ M GA uygulanan SPC212 hücrelerinde a) p-p53, p53 ve b) PARP proteini seviyelerindeki değişimler.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

MM teşhisi ve tedavisi güç bir hastalıktır. Bu konuda yapılan çalışmaların sayısı artmasına rağmen henüz etkili bir tedavi yöntemi bulunamamıştır. GA ise, anti-tümör etkisinden dolayı, farklı kanser türlerinde yaygın olarak çalışılan ve hücre hatlarında tümör fenotipinde gerilemeye yol açtığı belirlenmiş bir ajandır [Madlener et al., 2007]. Bilgilerimiz doğrultusunda GA'nın malignant mezotelyoma hücre hatlarında etkisi ile ilgili çalışma bulunmamaktadır. Buradan yola çıkarak projemizde iki hücre hattında Met5A (Kontrol) ve SPC212 (Malignant mezotelyoma) hücreleri kullanılmıştır. Daha önce GA ile ilgili yaptığımız diğer tez çalışmalarında, GA'nın sitotoksik etkisi kontrol hücrelerinde minimum olmasına rağmen, MM hücrelerinde daha düşük konsantrasyonlarda ve kısa sürede sitotoksikite gösterdiği belirlenmiştir. Buna ilaveten benzer çalışmalar da bu durumu desteklemektedir [You et al., 2010]. GA'nın kanser hücrelerine göre normal hücrelerde sitotoksikite göstermemesi onun seçici bir ajan olduğunu düşündürmektedir. Çalışmamızda öncelikle GA uygulamasıyla SPC212 hücrelerindeki değişim morfolojik olarak belirlenmiş ve canlı hücre sayısında azalma ışık mikroskopunda belirlenmiştir. Daha sonra bu azalışın apoptozla bağlantılı olup olmadığını araştırmak için DNA merdivenlenmesi ve Kaspaz aktivasyonları enzimatik olarak değerlendirilmiştir. İlaveten kaspaz proteinlerinin kesimleri de incelenmiştir. Ek olarak JNK ve p38 MAPK aktivasyonlarının GA ile düzenlenen apoptozdaki rolü araştırılmıştır.

DNA'nın hasar aldıktan sonra endonükleaz enzimleriyle 180-200 baz çiftlik kesimi apoptozun belirteci olarak tanımlanmaktadır [Sreedhar and Csermely, 2004]. SPC212 ve MET5A hücrelerinde, 24. saatte ve 48. saatte 200 µM GA uygulanan konsantrasyonlarda DNA'nın parçalandığı gözlenmektedir. Fakat bu parçalanmanın düzenli sayıdaki baz çiftlerini oluşturacak şekilde değil, smear görüntüsünde olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlarımız GA'nın, hücrelerde 100 µM'ın üzerinde dozlarda DNA'nın parçalanmasına neden olduğunu işaret etmektedir. Yapılan bir çalışmada Fumagilin'nin, HUVEC, malignant (HM) ya da normal (NM-1) mezotelyal hücre hatları kullanılarak 96 saat içinde DNA merdivenlenmesi incelenmiştir. Alınan sonuçlara göre fumagilinin malignant mezotelyoma hücre DNA'larında smear görüntüsüne yol açtığı gözlenmiştir [Catalano et al., 2010]. Yapılan bir diğer çalışmada ise, cis-platin uygulanmış olan murin malignant mezotelyoma hücrelerinde (AB1, AB12, AC29, AC34) farklı konsantrasyonlarda

tipik DNA merdivenlenmesi gözlenmiştir [Fox et al., 2005]. İlaveten lösemi hücre hattı olan K562 hücrelerine GA uygulaması merdivenlenmeye neden olmuştur [Reddy et al., 2012]. DNA fragmentasyonu apoptozun belirteci olsa da her hücre tipinde tipik fragmentlenme gözlenemeyebilir. Bu tip görünüm nekrotik ölüm ya da seconder nekroz sonucunda da gerçekleşebilir [Kok et al., 2002]. Bu sonuçlar nedeniyle GA'nın uygulanan dozlarda apoptotik etkisinin olup olmadığını belirlemek amaçlı olarak kaspaz aktivasyonları araştırılmıştır.

Sonuçlar doğrultusunda, SPC212 hücrelerinde GA'nın 100 μ M ve üzeri dozlarında, zamana bağlı olarak, kaspaz-8 ve kaspaz-9 proteininin aktivasyona neden olduğu ve bu aktivasyonun 24. saatten başlayarak, 48. saate kadar devam ettiği belirlenmiştir. HeLa hücreleri ve HUVEC hücreleri kullanılarak yapılan deneylerde, (0 - 400 μ M) GA uygulanmış olan hücrelerdeki apoptoz oluşumu annexin V ve rodamin boyama yapılarak değerlendirilmiştir. Benzer şekilde 100 μ M dozlarda HeLa hücrelerinde GA'nın apoptoza neden olduğu gözlenirken, kontrol HUVEC'te ise 400 μ M üzerinde hücre ölümü tespit edilmiştir [You et al., 2010]. Daha öncede belirttiğimiz gibi diğer çalışmamızda GA'nın normal hücrelerden ziyade malignan mezotelyoma proliferasyonunu inhibe ettiği tespit edilmiştir (veri gösterilmiyor). Tez çalışması kapsamındaki GA'nın yarattığı apoptotik etkinin de bu çalışmalarımıza benzer şekilde 100 μ M doz üzerinde ve 24 saat içinde gerçekleştiği de belirlenmiştir. İlaveten bu sonucu destekler şekilde protein analiz çalışmalarımızda da kaspaz-8'de kontrol hücrelerinde sadece 57 kDa'luk prokaspaz gözlenirken, 100 μ M ve 200 μ M GA uygulanmış olan hücrelerde ise kesilmiş p43/p41 ve 18 kDa'luk kesimlerin olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar dış yolağın aktive olarak kaspaz-8 kesiminin gerçekleştiğine, böylece apoptotik sinyalin başlatıldığına işaret etmektedir. HL-60 hücreleriyle yapılmış bir çalışmada GA içeriği yoğun olan *Toona sinensis* yaprakları kullanılarak kaspaz-8 protein aktivitesi araştırılmıştır. Araştırma sonuçlarına göre *Toona sinensis* özütünün, prokaspaz-8'den kaspaz-8 kesimini konsantrasyon ve doza bağlı olarak arttırdığı görülmüştür [Huang et al., 2012]. Buna ilaveten apoptotik iç yolağı araştırmak için benzer şekilde kaspaz -9'da da GA uygulanmamış hücrelerde, 24 saatte, sadece 47 kDa'luk prokaspaz-9 olarak gözlenmiştir. 100 μ M ve üstü dozlarda ise Kaspaz-9 kesiminin gerçekleştiğini gözlemlemekteyiz. Yapılan diğer bir çalışmada DU145 hücrelerine 100 μ M GA uygulanarak zamana bağımlı kaspaz proteini aktivasyonu gözlenmiştir. Çalışma sonucunda prokaspaz-9'un zamana bağlı olarak miktarının azaldığı gözlenmiştir [Chen et al., 2009]. HL-60 hücreleri ile

yapılan çalışmada ise *Toona sinensis* özütünün prokaspaz-9'un kesilerek kaspaz-9'u aktive ettiği doza ve zamana bağlı olarak gösterilmiştir [Huang et al., 2012]. Tüm bu sonuçlar doğrultusunda GA hücrelerimizde kaspaz-8 ve -9 bağımlı apoptoz yollarını aktive etmektedir. Buna ilaveten kaspaz aktivasyonlarında hangi sinyal yolağının katkısı olduğunu belirlemek amaçlı olarak p38 ve JNK inhibitörleri kullanılmıştır. Bu sonuçlar SB202190'ın GA muamelesi sonucu oluşan kaspaz-8 ve kaspaz-9 aktivasyonunun bloke ettiğini göstermektedir. Buna karşın JNK inhibitörü ve EGFR inhibitör uygulaması kaspaz aktivasyonlarında herhangi bir değişime yol açmamıştır. Bu sonuçlar hücrelerimizde GA ile düzenlenen her iki kaspaz aktivasyonunun p38 aktivasyonu ile bağlantılı olabileceğini düşündürmektedir.

p53 protein analizleri de p53 proteininin GA uygulanan hücrelerde aktive olduğunu göstermektedir. DNA zararı durumunda p53 serin 15 ve 20 artıklarından fosforile olmaktadır. Çalışmamızda kullandığımız p53 antikoru proteini serin 15 artığından fosforile olduğu durumda belirlenmektedir. Bu durum GA'nın 100 µM ve üzeri konsantrasyonlarda DNA hasarına yol açtığına işaret etmektedir. Diğer bir çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgularımız doğrultusunda GA'nın 100 µM ve üzeri konsantrasyonlarda p38'i aktive ettiğini belirledik. Benzer çalışmalarda p53'ün aktivasyonunun p38 üzerinden düzenlediği gösterilmiştir [Lin et al., 2011], [Kim et al., 2005]. Bu kapsamda bulgularımızda p53'ün aktivasyonunun p38 üzerinden olabileceğini de düşündürmektedir.

Araştırmalarımız kapsamında bir DNA tamir enzimi olan PARP'ın miktarı da araştırılmıştır. Alınan sonuçlara göre, kontrol hücrelerinde PARP protein seviyesi, 200 µM GA uygulanmış olan konsantrasyonlarda düşmektedir. Bu durum PARP'ın, DNA'nın fazla hasarı durumunda kaspaz-3 ve -7 tarafından kesilmesinden kaynaklanmış olabileceğini düşündürmektedir [Gilliams-Francis et al., 2003]. 200 µM GA'nın hücreler için oldukça sitotoksik olduğunu belirtmektedir.

Tüm sonuçlarımız doğrultusunda GA, MM hücrelerinde hem kaspaz-8 aracılı dışsal yolak, hem de kaspaz-9 aracılı içsel yolak vasıtasıyla apoptoza neden olmaktadır. İlaveten GA tarafından aktive edilen p38 sinyal yolağı kaspaz-8 ve -9 aracılı apoptoz üzerinde etkilidir. Çalışmamızda GA'nın p38 sinyal yolağının apoptoz üzerinde etkili olması; p53 proteininin aktive olması ve p38'in p53'ü aktive ettiğiyle ilgili literatür çalışmalarına da dayanarak, p38 sinyal yolağı üzerinden aktive olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca PARP proteininin, 200 µM GA kullanılan hücrelerde miktarının azalması GA'nın DNA'ya verdiği aşırı hasardan dolayı kaspaz

proteinlerinin PARP'ı kesmesinden dolayı olduğunu düşünmekteyiz. Gelecek çalışmalarda, kaspaz-8 ve kaspaz-9 sinyal yolakları arasında görev alan Bid proteinin aktivasyonu incelenerek içsel ve dışsal yolak arasında herhangi bir etkileşim olup olmadığının gözlenmesi, ayrıca p38 sinyal yolağında yer alan aracı moleküllerin incelenmesi ve apoptoz sinyalinin hangi moleküllerin rotasıyla iletildiği araştırılması düşünülmektedir. Tüm bu sonuçlar incelendiğinde GA'nın anti-proliferatif ve apoptotik bir ajan olarak kanser tedavisinde kullanılabilir bir aday olduğuna işaret etmektedir.

KAYNAKLAR

- Abastado J. P., (1996), “ Apoptosis: function and regulation of cell death.”, *Immunol.*, 147 (7), 443-456.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., (2006) “Molecular Biology of the Cell”, 4th edition, Garland Science.
- Bianchi L., Gerstbrein B., Frokjaer-Jensen C., Royal D. C., Mukherjee G., Royal M. A., Xue J., Schafer W. R., Driscoll M., (2004), “The neurotoxic MEC-4(d) DEG/ENAC sodium channel conducts calcium: implications for necrosis initiation.”, *Nat Neurosci*, 7 (12), 1337–1344.
- Bredesen D. E., (2007), “ Key Note Lecture: Toward a Mechanistic Taxonomy for Cell Death Programs.”, *National Institute of Health*, 38 (2), 652–660.
- Cagle P. T., Truong L. D., Roggli V. L., Greenberg S. D., (1989), “ Immunohistochemical differentiation of sarcomatoid mesotheliomas from other spindle cell neoplasms.”, *Am J Clin Patol*, 92 (5), 566-71.
- Catalano A., Romano M., Robuffo I., Strizzi L., Procopio A., (2001), “ Methionine aminopeptidase-2 regulates human mesothelioma cell survival: role of Bcl-2 expression and telomerase activity.”, *American Journal of Pathology*, 159 (2), 721-731.
- Cerretti D. P., Kozlosky C. J., Mosley B., Nelson N., Van N. K., Greenstreet T. A., March C. J., Kronheim S. R., Druck T., Cannizzaro L. A., Huebner K., Black T. A. (1992), “Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme.”, *Science*, 256 (5053), 97–100.
- Chen H., Wu Y., Chia Y., Chang F., Hsu H., Hsieh Y., Chen C., Yuan S., (2009), “ Gallic acid, a major component of *Toona sinensis* leaf extracts, contains a ROS-mediated anti-cancer activity in human prostate cancer cells.”, *Cancer Letters*, 286 (2), 161–171.
- Chuang C., Liu H., Wu L., Chen C., Chang J., Hsu S., (2010), “ Gallic acid induced apoptosis of lung fibroblasts via a reactive oxygen species-dependent ataxia telangiectasia mutated-p53 activation pathway.”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (5), 2943-2951.
- Degtarev A., Boyce M., Yuan J., (2003), “A decade of caspases.”, *Oncogene*, 22 (53), 8543–8567.
- Denecker G., Vercammen D., Declercq W., Vandenabeele P., (2001), “ Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors.”, *Cell Mol Life Sci*, 58 (3), 356-370.

Denecker G, Hoste E., Gilbert B., Hocheplied T., Ovaere P., Lippens S., Van den Broecke C., Van Damme P., D'Herde K., Hachem J. P., Borgonie G., Presland R. B., Schoonjans L., Libert C., Vandekerckhove J., Gevaert K., Vandenabeele P., Declercq W., (2007), "Caspase-14 protects against epidermal UVB photodamage and water loss.", *Nature Cell Biology*, 9 (6), 666–674.

Devasagayam T. P. A., Tilak J. C., Bloor K. K., Sane K. S., Ghaskadbi S. S., Lele R. D., (2004), "Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects.", *JAPI*, 52, 794-804.

Eckhart L., Ballaun C., Uthman A., Kittel C., Stichenwirth M., Buchberger M., Fischer H., Sipos W., Tschachler E., (2005), "Identification and characterization of a novel mammalian caspase with proapoptotic activity.", *Journal of Biological Chemistry*, 280 (42), 35077–35080.

Eckhart L., Uthman A., Sipos W., Tschachler E., (2006), "Genome sequence comparison reveals independent inactivation of the caspase-15 gene in different evolutionary lineages of mammals.", *Molecular Biology and Evolution*, 23 (11), 2081–2089.

Farber J. L., (1982), "Biology of disease: membrane injury and calcium homeostasis in the pathogenesis of coagulative necrosis.", *Lab Invest*, 47 (2), 114-123.

Fox S. A., Kusmiaty Loh S. S. W., Dharmarajan A. M., Garlepp M. J., (2005), "Cisplatin and TNF- α downregulate transcription of Bcl-xL in murine malignant mesothelioma cells.", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 337 (3), 983–991.

Freed-Pastor W. A., Prives C., (2012), "Mutant p53: one name, many proteins.", *Genes Development*, 26 (12), 1268–1286.

Fulda S., Debatin K. M., (2006), "Resveratrol modulation of signal transduction in apoptosis and cell survival: A mini-review.", *Cancer Detection and Prevention*, 30 (3), 217-223.

Gilliams-Francis K. L., Quaye A. A., Naegel J. R., (2003), "PARP cleavage, DNA fragmentation, and pyknosis during excitotoxin-induced neuronal death.", *Experimental Neurology*, 184 (1), 359 –372.

Golstein P., Kroemer G., (2007), "Cell death by necrosis: towards a molecular definition.", *Trends Biochem Sci*, 32 (1), 37-43.

Hector S., Prehn J. H. M., (2009), "Apoptosis signalling proteins as prognostic biomarkers in colorectal cancer: A review.", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1795 (2), 117-129.

Henriquez M., Armisen R., Stutzin A., Quest A. F., (2008), "Cell death by necrosis, a regulated way to go.", *Curr Mol Med*, 8 (3), 187-206.

Herceg Z., Wang Z., (1999), “ Failure of Poly(ADP-Ribose) Polymerase Cleavage by Caspases Leads to Induction of Necrosis and Enhanced Apoptosis.”, *Molecular and Cellular Biology*, 19 (7), 5124–5133.

Huang P., Hseu Y., Lee M., Kumar K. J. S., Wu C., Hsu L., Liao J., Cheng I. Kuo Y., Huang S., Yang H., (2012), “ In vitro and in vivo activity of gallic acid and *Toona sinensis* leaf extracts against HL-60 human promyelocytic leukemia.”, *Food and Chemical Toxicology*, 50 (10), 3489–3497.

Jacobson M., McCarthy N., (2002), “Apoptosis”, 1st Edition, Oxford University Press.

Johnstone R. W., Ruefli A. A., Lowe S. W., (2002), “ Apoptosis: A Link between Cancer Genetics and Chemotherapy.”, *Cell*, 108 (2), 153-164.

Kang S. J., Wang S., Hara H., Peterson E. P., Namura S., Amin-Hanjani S., Huang Z., Srinivasan A., Tomaselli K. J., Thornberry N. A., Moskowitz M. A., Yuan J., (2000), “Dual role of caspase-11 in mediating activation of caspase-1 and caspase-3 under pathological conditions.”, *Journal of Cell Biology*, 149 (3), 613–622.

Kaur M., Velmurugan B., Rajamanickam S., Agarwal R., Agarwa C., (2009), “ Gallic Acid, an Active Constituent of Grape Seed Extract, Exhibits Anti-proliferative, Pro-apoptotic and Anti-tumorigenic Effects Against Prostate Carcinoma Xenograft Growth in Nude Mice.”, *Pharmaceutical Research*, 26 (9), 2133-2140.

Kim E. K., Choi E., (2010), “ Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases.”, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1802 (4), 396–405.

Kim S. J., Ko C., Park C., Kim B., Sung T., Koh D., Kim N., Oh K., Chung S., Park R., (2005), “p38 MAP kinase regulates benzo(a)pyrene-induced apoptosis through the regulation of p53 activation.”, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444 (2), 121–129.

Kok Y., Swe M., Sit K., (2002), “ Necrosis has orderly DNA fragmentations.”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 294 (5), 934–939.

Kuida K., Haydar T. F., Kuan C. Y., Gu Y., Taya C., Karasuyama H., Su M. S., Rakic P., Flavell R. A., (1998), “Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9.”, *Cell*, 94 (3), 325–337.

Kumar S., Hanning C. R., Brigham-Burke M. R., Rieman D. J., Lehr R., Khandekar S., Kirkpatrick R. B., Scott G. F., Lee J. C., Lynch F. J., Gao W., Gambotto A., Lotze M. T., (2002), “Interleukin-1F7B (IL-1H4/IL-1F7) is processed by caspase-1 and mature IL-1F7B binds to the IL-18 receptor but does not induce IFN-gamma production.”, *Cytokine*, 18 (2), 61–71.

Lamkanfi M., Declercq W., Kalai M., Saelens X., Vandenabeele P., (2002), “Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man.”, *Cell Death and Differentiation*, 9 (4), 358–361.

Levin A. J., Oren M., (2009), “ The first 30 years of p53: growing ever more complex.”, *Nat Rev Cancer*, 9 (10), 749–758 .

Li P., Nijhawan D., Budihardjo I., Srinivasula S. M., Ahmad M., Alnemri E. S., Wang X., (1997), “Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade.”, *Cell*, 91 (4), 479–489.

Lin F., Hsu J., Chou C., Wu W., Chang C., Liu H., (2011),” Activation of p38 MAPK by damnacanthal mediates apoptosis in SKHep 1 cells through the DR5/TRAIL and TNFR1/TNF- α and p53 pathways.”, *European Journal of Pharmacology*, 650 (1), 120–129.

Lin X. Y., Choi M. S., Porter A. G., (2000), “Expression analysis of the human caspase-1 subfamily reveals specific regulation of the CASP5 gene by lipopolysaccharide and interferon-gamma.”, *Journal of Biological Chemistry*, 275 (51), 39920–39926.

Lippens S., Kockx M., Knaapen M., Moetier L., Polakowska R., Verheyen A., Garmyn M., Zwijsen A., Formstecher P., Huylebroeck D., Vandenabeele P., Declercq W., (2000), “Epidermal differentiation does not involve the pro-apoptotic executioner caspases, but is associated with caspase-14 induction and processing”, *Cell Death and Differentiation*, 7 (12), 1218-1224.

Liu K., Ho H., Huang A., Ji B., Lin H., Chueh F., Yang J., Lu C., Chiang J., Meng M., Chung J., (2011), “ Gallic acid Provokes DNA Damage and Suppresses DNA Repair Gene Expression in Human Prostate Cancer PC-3 Cells.”, *Environmental Toxicology*, 28 (10), 579-587.

Locatelli C., Flippin-Monterio F. B., Creczynski-Pasa T. B., (2013), “Alkyl esters of gallic acid as anticancer agents: A review”, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 60, 233-239.

Loetscher H., Niederhauser O., Kemp J., Gill R., (2001), “ Is caspase-3 inhibition a valid therapeutic strategy in verebral ischemia?”, *Drug Discovery Today*, 6 (13), 671-680.

Lomonosova E., Chinnadurai G., (2008), “BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview.”, *Oncogene*, 27 (1), 2-19.

Los M., Mozoluk M., Ferrari D., Stepczynska A., Stroh C., Renz A., Herceg Z., Wang Z., Schulze-Osthoff K., (2002), “ Activation and Caspase-mediated Inhibition of PARP: A Molecular Switch between Fibroblast Necrosis and Apoptosis in Death Receptor Signaling.”, *Molecular Biology of the Cell*, 13 (3), 978–988.

Lu Y., Jiang F., Jiang H., Wu K., Zheng X., Cai Y., Katakowski M., Choppb M., To S. T., (2010), “Gallic acid suppresses cell viability, proliferation, invasion and angiogenesis in human glioma cells.”, *European Journal of Pharmacology*, 641 (2-3), 102–107.

Luo X., Kraus W. L., (2012), “On PAR with PARP: cellular stress signaling through poly(ADP-ribose) and PARP-1.”, *Genes Development*, 26 (5), 417–432.

Madlener S., Illmer C., Horvath Z., Saiko P., Losert A., Herbacek I., Grusch M., Elford H. L., Krupitza G., Bernhaus A., Fritzer-Szekeres M., Szekeres T., (2007), "Gallic acid inhibits ribonucleotide reductase and cyclooxygenases in human HL-60 promyelocytic leukemia cells.", *Cancer Letters*, 245 (1-2), 156–162.

Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jime'nez L., (2004), "Polyphenols: food sources and bioavailability.", *Am J Clin Nutr*, 79 (5), 727– 747.

Mansouri M. T., Farbood Y., Sameri M. J., Sarkaki A., Naghizadeh B., Rafeirad M., (2013), "Neuroprotective effects of oral gallic acid against oxidative stress induced by 6-hydroxydopamine in rats.", *Food chemistry*, 138 (2-3), 1028-1033.

Mansouri M. T., Naghizadeh B., Ghorbanzadeh B., Farbood Y., Sarkaki A., Bavarsad K., (2013), "Gallic acid prevents memory deficits and oxidative stress induced by intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats.", *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 111, 90-96.

Martinon F., Burns K., Tschopp J., (2002), "The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta.", *Molecular Cell*, 10 (2), 417–426.

Masumoto J., Zhou W., Chen F. F., Su F., Kuwada J. Y., Hidaka E., Katsuyama T., Sagara J., Taniguchi S., Ngo-Hazelett P., Poastlethwait J. H., Nunez G., Inohara N., (2003), "Caspase-1: a zebrafish caspase activated by ASC oligomerization required for pharyngeal arch development.", *Journal of Biological Chemistry*, 278 (6), 4268–4276.

Motadi L. R., Misso N. L., Dlamini Z., Bhoola K. D., (2007), "Molecular genetics and mechanisms of apoptosis in carcinomas of the lung and pleura: Therapeutic targets", *International Immunopharmacology*, 7 (14), 1934–1947.

Nadiri A., Wolinski M. K., Saleh M., (2006), "The inflammatory caspases: key players in the host response to pathogenic invasion and sepsis.", *Journal of Immunology*, 177 (7), 4239–4245.

Nakagawa T., Zhu H., Morishima N., Li E., Xu J., Yankner B. A., Yuan J., (2000), "Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid beta.", *Nature*, 403 (6765), 98–103.

Nicetara P., Bernassola F., Melino G., (1999), "Nitric oxide (NO), a signaling molecule with a killer soul.", *Cell Death Differentiation*, 6 (10), 931-933.

Platanias L. C., (2003), "The p38 mitogen-activated protein kinase pathway and its role in interferon signaling.", *Pharmacology Therapeutics*, 98 (2), 129-142.

Portt L., Norman G., Clapp C., Greenwood M., Greenwood M. T., (2011), "Anti-apoptosis and cell survival: A review.", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1813 (1), 238-259.

Reddy T. C., Reddy D. B., Aparna A., Arunasree K. M., Gupta G., Achar C., Reddy G. V., Lakshmipathi V., Subramanyam A., Reddanna P., (2012), "Anti-leukemic effects of gallic acid on human leukemia K562 cells: Downregulation of COX-2, inhibition of BCR/ABL kinase and NF- κ B inactivation.", *Toxicology in Vitro*, 26 (3), 396–405.

Sakamaki K., Satou Y., (2008), "Caspases: evolutionary aspects of their functions in vertebrates.", *Journal of fish Biology*, 74 (4), 727-753.

Sakamaki K., Nozaki M., Kominami K., Satou Y., (2007), "The evolutionary conservation of the core components necessary for the extrinsic apoptotic signaling pathway, in medaka fish.", *BMC Genomics*, 141 (8), 1471-1486.

Sakata S., Yan Y., Satou Y., Momoi A., Ngo-Hazelett P., Nozaki M., FurutaniSeiki M., Postlethwait J. H., Yonehara S., Sakamaki K., (2007), "Conserved function of caspase-8 in apoptosis during bony fish evolution.", *Gene*, 396 (1), 134–148.

Shi Y., (2002), "Mechanism of caspase activation and Inhibition during apoptosis.", *Molecular Cell*, 9 (3), 459-470.

Sreedhar A. S., Csermely P., (2004), "Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy A comprehensive review.", *Pharmacology Therapeutics*, 101 (3), 227-257.

Sriram P. S., Antony V. B., (2007), "Advances in pleural disease", *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 4 (2), 103-108.

Stegh A. H., (2012), "Targeting the p53 signaling pathway in cancer therapy - The promises, challenges, and perils.", *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 16 (1), 67–83.

Syntichaki P., Xu K., Driscoll M., Tavernarakis N., (2002), "Specific aspartyl and calpain proteases are required for neurodegeneration in *C. elegans*.", *Nature*, 419 (6910), 939–944.

Takemura G., Kanoh M., Minatoguchi S., Fujiwara H., (2013), "Cardiomyocyte apoptosis in the failing heart-A critical review from definition and classification of cell death.", *International Journal of Cardiology*, 167 (6), 2373-2386.

Thornberry N. A., Bull H. G., Calaycay J. R., Chapman K. T., Howard A. D., Kostura M. J., Miller D. K., Molineaux S. M., Weidner J. R., Aunins J., Elliston K. O., Ayala J. M., Casanoparallel F. J., Chin J., Ding G. J. F., Egger L. A., Gaffney E. P., Limjuco G., Palyha O. C., Raju S. M., Rolandoparallel A. M., Salley J. P., Yamin T. T., Lee T. D., Shively J. E., MacCross M., Mumford R. A., Tocciparallel M. J., (1992), "A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes.", *Nature*, 356 (6372), 768–774.

Tounpanakis D., Theocharis S. E., (2011), "DNA repair systems in malignant mesothelioma.", *Cancer Letters*, 312 (2), 143-149.

Tsujimoto Y, (1998), "Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria?", *Genes Cells*, 3 (11), 697-707.

Vaseva A. V., Moll Ute M., (2009), "The mitochondrial p53 pathway.", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1787 (5), 414–420.

Verma S., Singh A., Mishra A., (2013), "Gallic acid: Molecular rival of cancer.", *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 35 (3), 473-485.

Wagner J. C., Sleggs C. A., Marchand P., (1960), "Diffuse pleural mesothelioma and asbestos exposure in the North Western Cape Province", *Br J Ind Med*, 17 (4), 260–71.

Wang S., Miura M., Jung Y. K., Zhu H., Li E., Yuan J., (1998), "Murine caspase-11, an ICE-interacting protease, is essential for the activation of ICE.", *Cell*, 92 (4), 501–509.

Wei Y., Fox T., Chambers S. P., Sintchak J., Coll J. T., Golec J. M., Swenson L., Wilson K. P., Charifson P. S., (2000), "The structures of caspases-1, -3, -7 and -8 reveal the basis for substrate and inhibitor selectivity.", *Chemistry Biology*, 7 (6), 423–432.

Yang H., Chang W., Chia Y., Huang C., Lu F., Hsu H., Hseu Y., (2006), "Toona sinensis extracts induces apoptosis via reactive oxygen species in human premyelocytic leukemia cells.", *Food and Chemical Toxicology*, 44 (12), 1978–1988.

Yelamos J., Farres J., Llacuna L., Ampurdanes C., Martin-Caballero J., (2011), "PARP-1 and PARP-2: New players in tumour development.", *Am J Cancer*, 1 (3), 328-346.

Yoon C., Chung S., Lee S., Park Y., Lee S., Park M., (2013), "Gallic acid, a natural polyphenolic acid, induces apoptosis and inhibits proinflammatory gene expressions in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes.", *Joint Bone Spine*, 80 (3), 274-279.

You B. R., Kim S. Z., Kim S. H., Park W. H., (2011), "Gallic acid-induced lung cancer cell death is accompanied by ROS increase and glutathione depletion.", *Mol Cell Biochem*, 357 (1-2), 295-303.

You B. R., Moon H. J., Han Y. H., Park W. H., (2010), "Gallic acid inhibits the growth of HeLa cervical cancer cells via apoptosis and/or necrosis", *Food and Chemical Toxicology*, 48 (5), 1334–1340.

Yu S. W., Wang H., Poitras M. F., Coombs C., Bowers W. J., Federoff H. J., Poirier G. G., Dawson T. M., Dawson V. L., (2002), "Mediation of poly(adp-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor.", *Science*, 297 (5579), 259–263.

Zangemeister-Wittke U., Hopkins-Donaldson S., (2005), "Apoptosis regulation and drug resistance in malignant pleural mesothelioma", *Lung Cancer*, 49 (1), 105-108.

Zeng X., Overmeyer J. H., Maltese W. A., (2006), "Functional specificity of the mammalian Beclin-Vps34 PI 3-kinase complex in macroautophagy versus endocytosis and lysosomal enzyme trafficking.", *J Cell Sci*, 119 (2), 259-270.

Zhang F., Lau S. S., Monks T. J., (2012), "A Dual Role for Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 During Caspase-Dependent Apoptosis.", *Toxicological Sciences*, 128 (1), 103–114.

Zhivotovsky B., Orrenius S., (2005), "Caspase-2 function in response to DNA damage.", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 331 (3), 859–867.

Zitting A., Husgafvel-Pursiainen K., Rantanen J., (2002), "Environmental tobacco smoke - a major preventable cause of impaired health at work.", *Scand J Work Environ. Health*, 28 (2), 3-6.

Zucali P. A., Ceresoli G. L., Vincenzo F. D., Simonelli M., Lorenzi, E., Gianoncelli L., Santoro A., (2011), "Advances in the biology of malignant pleural mesothelioma." *Cancer Treatment Reviews*, 37 (7), 543-558.

Web 1, (2014), <http://www.mesothelioma-tr.org/halk/halkicin.php>, (Erişim Tarihi: 10/01/2014).

Web 2, (2014), <http://www.celldeath.de/encyclo/aporev/aporev.htm>, (Erişim Tarihi: 12/01/2014).

Web 3, (2014), http://worldwide.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applicationsguide/apoptosis/?_utma=1.421642624.1395063598.1395063598.1395063598.1&_utmb=1.1.10.1395063598&_utmc=1&_utmx=&_utmz=1.1395063598.1.1.utmcsr=google.com.tr|utmccn=%28referral%29|utmcmd=referral|utmctt=imgres&_utmv=-&_utmh=28829756, (Erişim Tarihi: 09/01/2014).

Web 4, (2014), <http://www.intechopen.com/books/neurodegenerative-diseases/caspases-in-alzheimer-s-disease>, (Erişim Tarihi: 12/01/2014).

Web 5, (2014), http://en.wikipedia.org/wiki/Caspase_3, (Erişim Tarihi: 15/01/2014).

Web 6, (2014), http://en.wikipedia.org/wiki/Caspase_6, (Erişim Tarihi: 15/01/2014).

Web 7, (2014), http://en.wikipedia.org/wiki/Caspase_7, (Erişim Tarihi: 15/01/2014).

Web 8, (2014), http://en.wikipedia.org/wiki/Caspase_2, (Erişim Tarihi: 15/01/2014).

Web 9, (2014), http://en.wikipedia.org/wiki/Caspase_8, (Erişim Tarihi: 15/01/2014).

Web 10, (2014), <http://www.uscnk.com/directory/Caspase-10-Cysteiny-aspartate-specific-proteinases-10%28CASP10%29-1161.htm>, (Erişim Tarihi: 15/01/2014).

Web 11, (2014), http://en.wikipedia.org/wiki/Caspase_9, (Erişim Tarihi: 15/01/2014).

Web 12, (2014), http://en.wikipedia.org/wiki/Caspase_1, (Erişim Tarihi: 15/01/2014).

Web 13, (2014), www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-9444.aspx?slp=1, (Erişim Tarihi: 12/01/2014).

Web14, (2014), www.phculturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=11120717&collection=ecacc_gc, (Erişim Tarihi: 12/01/2014).

ÖZGEÇMİŞ

Ebru Turhanlar 2009 yılında Ege Üniversitesi Biyokimya bölümünden mezun oldu. Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü (GYTE), Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans eğitimini 2014 yılında tamamlamıştır.