T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PRO-APOPTOTİK VE ANTİ-APOPTOTİK PROTEİNLERİN EGCG İLE TETİKLENEN APOPTOZ MEKANİZMASINDAKİ ROLLERİNİN HCT-116 KOLON KANSER HÜCRELERİNDE İNCELENMESİ

AYŞENUR ÇATALER KARAKUŞ

BİYOKİMYA YÜKSEK LİSANS

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2011

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2009970203

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PRO-APOPTOTİK VE ANTİ-APOPTOTİK PROTEİNLERİN EGCG İLE TETİKLENEN APOPTOZ MEKANİZMASINDAKİ ROLLERİNİN HCT-116 KOLON KANSER HÜCRELERİNDE İNCELENMESİ

BİYOKİMYA YÜKSEK LİSANS

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AYŞENUR ÇATALER KARAKUŞ

Danışman Öğretim Üyesi: Prof.Dr. A.Semra KOÇTÜRK

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 200980 talep numarası ile desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2009970203

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Tıbbi Biyokimya Yüksek Lisans programı öğrencisi Ayşenur Çataler Karakuş, **'PRO-APOPTOTİK VE ANTİ-APOPTOTİK PROTEİNLERİN EGCG İLE TETİKLENEN APOPTOZ MEKANİZMASINDAKİ ROLLERİNİN HCT-116 KOLON KANSER HÜCRELERİNDE İNCELENMESİ'** konulu Yüksek Lisans tezini 23.01.2012 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

Prof. Dr. A.Semra KOÇTÜRK
BAŞKAN

Prof. Dr. Canan ÇOKER
ÜYE

Prof. Dr. Kemal BAYSAL
ÜYE

Doç. Dr. Pınar AKAN
ÜYE

Doç. Dr. Zekiye Sultan ALTUN
ÜYE

Prof. Dr. Hüray İŞLEKEL
(YEDEK ÜYE)

Yrd. Doç. Dr. Zahide ÇAVDAR
(YEDEK ÜYE)

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

İÇİNDEKİLER……..…..…i
TABLOLAR DİZİNİ…….iv
ŞEKİLLER DİZİNİ…….…..v
KISALTMALAR……...……..……vii
TEŞEKKÜR……..…..…..ix
ÖZET……..……1
ABSTRACT……3
1. GİRİŞ VE AMAÇ……..…….…..5
2. GENEL BİLGİLER……..6
2.1. Hücre Yaşam Döngüsü ve Kanser Oluşumu…….....6
2.1.1. Hücre Yaşam Döngüsü.....6
2.1.2. Hücre Yaşam Döngüsü Kontrolü.....7
2.1.3. Kanser Oluşumu ve Kanser Hücresinin Karakteristik Özellikleri.....8
2.1.4. Kolon Kanseri.....9
2.2. Apoptoz.....10
2.2.1. Kaspazlar ve Kazpaz Aktivasyonu.....12
2.2.2. Başlatıcı Kazpazlar.....14
2.2.3. İntrinsik Yolak.....15
2.2.3.1. Bcl-2 Ailesi……..16
2.2.4. Entrinsik Yolak…….....18
2.3. Kanser Terapisinde Apoptozun Önemi.....20
2.3.1. Apoptoz Tetiklenmesinde Polifenollerin Önemi……..……..20
2.3.1.2. Çay Polifenolleri……..21
2.3.2. Yeşil Çay…….22
2.3.2.1. Yeşil Çayın Antioksidan-Prooksidan etkisi……22
2.3.2.2. Apoptoz ve Hücre Yaşam Döngüsü Regülasyonu……..24
2.3.2.3. Kolon Kanserinde Yeşil Çayın Etkinliği…….26

3. GEREÇ VE YÖNTEM.....27
3.1. Araştırmanın Tipi.....28
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....28
3.3. Araştırmanu Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları……28
3.4. Çalışma Materyali……..28
3.5. Araştırmanın Değişkenleri……..…28
3.6. Veri toplama Araçları…….....28
3.6.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler…….....28
3.6.2. EGCG Solüsyonun Hazırlanması……..……..31
3.6.3. Hücre Kültürü.....31
3.6.4. Hücre Canlılık Analizi.....31
3.6.4.1. MTT Testine Uygun Hücre Sayısını İncelenmesi …….….32
3.6.4.2. Hücre Ölümünü Tetikleyen EGCG Konsantrasyonun ve İnkübasyon Süresinin Doğrulanması ……...32
3.6.5. Akış Sitometrik Analiz.....33
3.6.6. Western-Blot Analizi.....33
3.6.6.1. Hücre Lizizi.....33
3.6.6.2. BCA Protein Tayini…….34
3.6.6.3. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi……..34
3.6.6.4. Semi-dry Transfer……35
3.6.6.5. Membran Bloklama ve Antikor ile Muamele Etme…….……35
3.6.7. Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Apoptotik Gen Profilinin İncelenmesi….36
3.6.7.1. RNA İzolasyonu……...36
3.6.7.2. cDNA Sentezi……..36
3.6.7.3. Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu…….37
3.6.8. Transfeksiyon……..38
3.6.8.1. EGFP-aktinplasmidinin çoğaltılması ve HCT116 hücrelerine transfeksiyonu……..38
3.6.8.1.1 Plasmid Transformasyonu……..38
3.6.8.1.2.EGFP-aktin Plasmidinin HCT-116 Hücrelerine Transfeksiyonu……..39
3.6.8.1.3. Hiperfect Transfeksiyon Reaktifi ile Plasmid Transfeksiyonu…….....40
3.6.9. siRNA Transfeksiyonu……41
3.6.10. Gen Susturumundan Sonra Apoptotik Hücre Ölümünün Analizi…….41

3.6.11. DCFDA ile Hücre içi ROT Ölçümü……41
3.7. Araştırmanın Planı ve Takvimi….....43
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi.....44
3.9. Araştırmanın sınırlılıkları.....44
3.10. Etik Kurul Onayı.....44
4. BULGULAR.....45
4.1.HCT-116$^{Bax+/+}$ ve HCT116$^{Bax-/-}$ Hücrelerinde Bax Protein Ekspresyonunun Doğrulanması ……...45
4.2. MTT Testine Uygun Hücre Sayısının Belirlenmesi……..45
4.3. HCT-116 Hücre Hattında Hücre Ölümünü Tetikleyen EGCG Konsantrasyonun ve İnkübasyon Süresinin Doğrulanması……..…..…47
4.4. EGCG'nin Apoptotik Etkisinin Doğrulanması…….…….48
4.5. EGCG'nin Kaspaz Proteinleri Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi…….……49
4.6. EGCG'nin Apoptotik Gen Ekspresyonlarına Etkisinin İncelenmesi……..….58
4.7. Hiperfect Transfeksiyon Ajanının siRNA Transfeksiyonu Çalışmaları İçin Etkinliğinin İncelenmesi……...59
4.8.siRNA ile Susturumun Real-Time PZR İle Doğrulanması …..……...…….60
4.9.Kaspaz 8 ve Kaspaz 9 Susturumunun Apoptoz Düzeyine Etkisinin İncelenmesi……..60
4.10. EGCG'nin Hücre içi ROT Düzeylerine Etkisinin İncelenmesi……..…….62
5. TARTIŞMA.....63
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....69
7. KAYNAKLAR.....70
8. EKLER.....82
EK-1 Etik Kurul Onayı.....82
EK-2 Özgeçmiş…….……...84

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler ve kitler……...……..28
Tablo 2. Human Apoptosis Panel, 96 immobilize edilmiş gen-spesifik probların plak düzeni38

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. Hücre Yaşam Döngüsü ve Fazları…….……6
Şekil 2. Hücre yaşam döngüsü kontrolünde rol oynayan proteinler……..7
Şekil 3. Apoptotik süreçteki bir hücre…….……11
Şekil 4.a. Başlatıcı ve sonlandırıcı kaspazların altüniteleri. b.Proteolitik kesim ile kaspaz enzim aktivasyonu……....13
Şekil 5. Apoptoz sürecinde intrinsik ve ekstrinsik yolaklarda görevli proteinler……....16
Şekil 6. BCL-2 protein ailesi üyeleri ……...……18
Şekil 7. Yeşil çayda bulunan başlıca polifenoller…….……21
Şekil 8. Canlı hücreler tarafından MTT'nin formazan tuzuna metabolizasyonu……..32
Şekil 9. EGFP-aktin plasmidi……39
Şekil 10. HCT-116$^{Bax+/+}$ ve HCT116$^{Bax-/-}$ hücre hatlarında Bax proteini western-blot analizi X-Ray film görüntüsü……...…….45
Şekil 11a. HCT-116$^{Bax+/+}$ hücre hattında 24-72 saat Etoposit ile inkübasyon sürecinde % canlılık değerlerinin değişimi…….……..…….46
Şekil 11b. HCT-116$^{Bax-/-}$ hücre hattında 24-72 saat Etoposit ile inkübasyon sürecinde %canlılık değerlerinin değişimi…..…….……....46
Şekil 12a. HCT-116$^{Bax-/-}$ hücre hattında 24-72 saat 100uM EGCG ile inkübasyon sürecinde % canlılık değerlerinin değişimi……...……47
Şekil 12b. HCT-116$^{Bax+/+}$ hücre hattında 24-72 saat 100uM EGCG ile inkübasyon sürecinde % canlılık değerlerinin değişimi …....……..48
Şekil 13. 100 μM EGCG ile 24 saat inkübasyon süresinde elde edilen akım sitometrik Annexin-V/PI analiz sonuçları. …….……48-49
Şekil 14. HCT-116$^{Bax+/+}$hücrelerinde pro-kaspaz-8 proteinin western-blot analizi A. X-Ray film görüntüsü, B. Dansitometrik analiz ile pro-kaspaz 8/Aktin oranının grafiksel ifadesi….50
Şekil 15. HCT-116$^{Bax-/-}$hücrelerinde pro-kaspaz-8 proteinin western-blot analizi A. X-Ray film görüntüsü, B. Dansitometrik analiz ile pro-kaspaz 8/Aktin oranının grafiksel ifadesi….51
Şekil 16. HCT-116$^{Bax+/+}$hücrelerinde pro-kaspaz-9 proteinin western-blot analizi A. X-Ray film görüntüsü B. Dansitometrik analiz ile pro-kaspaz 9/Aktin oranının grafiksel ifadesi..…52
Şekil 17. HCT-116$^{Bax-/-}$ hücrelerinde pro-kaspaz-9 proteinin western-blot analizi A. X-Ray film görüntüsü B. Dansitometrik analiz ile pro-kaspaz 9/Aktin oranının grafiksel ifadesi…..53

Şekil 18. HCT-116$^{Bax+/+}$ hücrelerinde pro-kaspaz-3 proteinin western-blot analizi A. X-Ray film görüntüsü B. Dansitometrik analiz ile pro-kaspaz 3/Aktin oranının grafiksel ifadesi…..54
Şekil 19. HCT-116$^{Bax-/-}$ hücrelerinde pro-kaspaz-3 proteinin western-blot analizi A. X-Ray film görüntüsü B. Dansitometrik analiz ile pro-kaspaz 3/Aktin oranının grafiksel ifadesi …55
Şekil 20. HCT-116$^{Bax-/-}$ hücrelerinde PARP-1 proteinin western-blot analizi A. X-Ray film görüntüsü B. Dansitometrik analiz ile cleaved-PARP-1 /Aktin oranının grafiksel ifadesi ….56
Şekil 21. HCT-116$^{Bax-/-}$ hücrelerinde PARP-1 proteinin western-blot analizi A. X-Ray film görüntüsü, B. Dansitometrik analiz ile cleaved-PARP-1/Aktin oranının grafiksel ifadesi.…57
Şekil 22. HCT-116 Bax+/+ ve Bax-/- hücre hatlarında EGCG ile tetiklenen apoptotik genlerin ekspresyonunda saptanan kat artışları …….…….58
Şekil 23. 1.5 ul Hiperfect (A), 3.0 ul Hiperfect (B), 4.5 ulHiperfect (C) kullanılarak yapılan EGFP-aktin plasmid transfeksiyonu florasan görüntüleri…….……59
Şekil 24. HCT-116$^{Bax+/+}$ hücrelerinde siCASP8 transfeksiyonunun Real-Time PZR ile kontrolü…….60
Şekil 25. HCT-116$^{Bax+/+}$ hücrelerinde kaspaz-8 ve kaspaz-9 susturumunun akış sitometri Annexin V-PI grafikleri……61
Şekil 26. HCT-116$^{Bax+/+}$ hücrelerinde 100µM EGCG ile 24 saat inkübasyonda hücre içi ROT ölçümü……...62

KISALTMALAR

EGCG: (-)-Epigallokatekin-gallat

mRNA: Messenger RNA

MTT: 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür

PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

DNA: Deoksiribonükleik asit

CDK4: Siklin bağımlı kinaz 4

MPF: Mitoz Başlatıcı Faktör (Mitosis Promoting Factor)

CDK: Siklin Bağımlı Kinaz

RAS: Rat sarkoma protein

APC: Adematöz polipozis koli

K-Ras: Kirsten rat sarkoma protein

NOD2: Nükleotide bağlı oligomerizasyon bölgesi içeren protein 2 (NOD2)

p53: Tümör supresör Protein 53

BCL-2: B-hücresi Lenfoma 2

COX-2: Siklooksijenaz 2

STAT3: Signal iletici ve aktivatör transkripsiyon 3

UV: Ultraviyole

KASPAZ: Sistein-Aspartik Proteaz

NuMA: Nükleer/Mitotik Aparat Proteini

ICAD: Kaspaz-3 endonükleaz inhibitör proteini

CAD enzimi: Kazpaz-aktive endonükleaz

Apaf-1: Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1

VDAC: Voltaj-bağımlı anyon kanalları

PTP: Permeability transition pore

ANT: Adenin Nükleozid Translokatörü

BH: Bcl-2 homolojisi

TNF: Tümör Nekroz Faktörü

DD: Ölüm Bölgesi

TNFr: TNF reseptör

FasL: Fas ligandı

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

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

FADD: Fas-ilişkili DD (*Fas-associated death domain*)

DED: Ölüm effektör bölgesi (*death-effector domain*)

FLIP: FLICE inhibitör proteini

TRADD: TNFr ile ilişkili ölüm bölgesi (TNFr *associated death domain)*

RIP: Reseptör-Etkileşim Proteini (*reseptor interaction protein*)

TRAF2: TNFr ile ilişkili faktör 2 proteini (TNFr *associated factor 2*)

NF-κB-IκB: nükleer faktör inhibitör kinaz kompleksini ()

AP-1: Aktivatör Protein-1

NHEK: İnsan Normal Keratinosit Hücreleri

VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

ECM: Ekstraselüler Matriks

MMP: Matriks Metalloproteinazlar

Z-VAD-FMK: Genel Kaspaz İnhibitörü

DEVD-CHO: Spesifik Kaspaz-3 İnhibitörü

siRNA: Small-interefering RNA

DCFDA: 2',7' –diklorofloresin diasetat

ROT: Reaktif Oksijen Türleri

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca, laboratuvar çalışmalarında ve tez yazım aşamasında her türlü desteğini gördüğüm, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım ve her konuda yardım isteyebileceğim değerli danışman hocam Prof. Dr. A.Semra KOÇTÜRK'e,

Desteğini ve güler yüzünü asla esirgemeyen Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Hocam Prof.Dr.Canan ÇOKER'e ve Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine,

Çalışmanın çeşitli aşamalarında fikirlerini paylaşan ve malzeme desteğini esirgemeyen Yrd. Doç.Dr. Bünyamin AKGÜL, Doç.Dr. Yusuf BARAN ve Prof.Dr. Kemal Sami KORKMAZ, Prof.Dr. Kemal BAYSAL'a,

Hematoloji Anabilim Dalından Dr. Halil Ateş'e ve GEMHAM Araştırma Merkezinden Ergül MUTLU'ya,

Eğitimim boyunca desteğini her zaman hissettiğim Sayın Hocam Doç.Dr. Pınar AKAN'a ve değerli arkadaşım Dr.Özlem Gürsoy ÇALAN'a,

Çalışmada yardımlarını esirgemeyen ekip arkadaşım Güneş ÖZEN'E ve her konuda desteğini gördüğüm arkadaşlarım Kemal Uğur TÜFEKCİ ve Didem KELEŞ'e,

Her türlü laboratuvar imkanı sağlayan AR-GE ve AR-LAB çalışanlarına,

Tüm hayatım boyunca beni hiç yalnız bırakmayan canım Aileme,

Özellikle tezin yazım aşamasında benimle her türlü bilgi birikimini paylaşarak bana ayrıca destek olan ve sabır, sevgi ve güler yüzünü benden hiç esirgemeyen eşim Erman KARAKUŞ'a teşekkür ederim.

Ayşenur ÇATALER KARAKUŞ

PRO-APOPTOTİK VE ANTİ-APOPTOTİK PROTEİNLERİN EGCG İLE TETİKLENEN APOPTOZ MEKANİZMASINDAKİ ROLLERİNİN HCT-116 KOLON KANSER HÜCRELERİNDE İNCELENMESİ

Ayşenur Çataler Karakuş, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, 35340, İnciraltı, İzmir

ÖZET

Yeşil çay ekstraktı olan EGCG kolay elde edilebilen, ucuz ve toksik olmayan katekin türevi bir polifenol bileşiğidir. Çeşitli kanser hücrelerinde programlı hücre ölümünü tetikleyebildiğinden kemoterapötik ajan olarak kullanımı yoğun olarak araştırılmaktadır. Buna rağmen EGCG'nin etkisi hücre tipine göre değişkenlik göstermektedir ve apoptoz mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Özellikle kolon karsinoma üzerinde gerçekleştirilen çalışmalar oldukça kısıtlıdır ve henüz EGCG'nin kolon kanserinde pro- ve anti-apoptotik genlerin ekspresyon profiline etkisini gösteren bir çalışma mevcut değildir. Bu bilgiler ışığında bu çalışmada, kolon karsinoma hücrelerinde apoptozu tetikleyen dozda EGCG'nin pro- ve anti-apoptotik genlerin ekspresyonlarına etkisi, artış gösteren ve apoptotik süreçte önemli rol oynayan proteinlerin mRNA düzeyinde susturulması ile bu proteinlerin apoptotik süreç açısından öneminin incelenmesi amaçlanmıştır. Bunun yanısıra EGCG'nin prooksidan özelliği ile hücrede oluşturduğu oksidatif etkinin hücre içi reaktif oksijen düzeyinin ölçülmesi ile incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaç doğrultusunda çalışmada HCT-116$^{Bax+/+}$ ve HCT116$^{Bax-/-}$ insan kolorektal tümör hücre hatları kullanıldı. EGCG'nin hücre canlılığı üzerine etkisi MTT yöntemi ile, hücre ölüm tipi ve yüzdesi akış sitometrik analiz ile belirlendi. İntrensek ve ekstrinsik apoptotik yolakta görevli kazpazların protein ekspresyon değişimleri western-blot analizi ile incelendi. EGCG'nin pro- ve anti-apoptotik gen ekspresyon düzeylerine etkisi Real-Time PZR yöntemi ile belirlendi. İntrensek ve ekstrinsik apoptoz yolaklarının başlatıcı kaspazları olan kaspaz-8 ve kaspaz-9 genleri susturulmak üzere seçildi ve EGCG'nin etkinliğinde kaspaz-8 ve -9'un önemi incelendi. EGCG'nin hücrede oluşturduğu oksidatif etki oluşan reaktif oksijen türevlerinin akış sitometrik analizi ile saptandı.

Elde edilen gen ve protein ekspresyon analiz verileri değerlendirildiğinde EGCG'nin apoptotik etkisini ağırlıklı olarak kaspaz 8 enzim aracılı ekstrinsik yolak ile gösterdiği ancak kaspaz 9 enzim aracılı intrinsik yolağın dolaylı olarak apoptotik etkiyi güçlendirdiği ve etkide EGCG'nin oluşturduğu hücre içi ROT'ların da etkin olduğu öngörülmektedir.

Anahtar Sözcükler: EGCG, Kolon kanseri, İntrinsik apoptoz, Ekstrinsik apoptoz

INVESTIGATION OF PRO-APOPTOTIC AND ANTI-APOPTOTIC PROTEINS IN THE APOPTOTIC MECHANISM TRIGGERED BY EGCG IN HCT-116 COLON CANCER CELLS

Ayşenur Çataler, Dokuz Eylül University, Institute of Health Sciences, Department of Medical Biochemistry, 35340, İnciraltı, İzmir

ABSTRACT

EGCG, a catechin derivative polyphenol, exist in green tea, is easy-to-handle and non-toxic. Its potential chemoteraputic usage is studied recently because it is ability to trigger programmed-cell death. However, its effect may change according to cell type and apoptotic mechanism has not been explained yet. Especially, the sudies on colon carcinoma are limited and any study about the effect of EGCG on pro-and apoptotic gene expression profile does not exist yet. According to this information, in this study, it is aimed to reveal the effects of apoptosis-triggering dose of EGCG on pro-and apoptotic gene expression and to investigate the importance of overexpressed apoptotic proteins by gene-silencing. Beside of this, oxidative influence of EGCG, produced in a cell by its prooxidant property, was intended for measurement with rective oxygen species.

On this aim, HCT- $116^{Bax+/+}$ ve $HCT116^{Bax-/-}$ human colorectal tumor cell lines were used in the study. The effect of EGCG on cell viability is determined with MTT method, cell death type is examined by flow cytometric analyses. The changes in protein expression levels of caspases is determined by western-blotting method. The effect on pro-and apoptotic gene expression is analysed by Real-Time PCR method. The initiator caspases of intrinsic and extrinsic apoptosis pathways, caspase-8 and caspase-9 is selected for gene-silencing by siRNA.Reactive oxygen species produced by oxidative effects of EGCG was determined by flow cytometry.

According to obtained gene and protein expression data, it is claimed that the apoptotic effect of EGCG occurs via caspase 8 enzyme-mediated extrinsic pathway, but caspase 9 enzyme-mediated intrinsic pathway enhances this effect indirectly and intracellular ROS production by EGCG has also roles in the mechanism.

Key Words: EGCG, Colon cancer, Intrinsic apoptosis, Extrinsic apoptosis

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Batı ülkelerinde en yüksek üçüncü insidansa ve ikinci mortaliteye sahip kanser türü kolon kanseridir. Asya ülkelerinde düşük kolon kanseri insidansının sebeplerinden birinin de yeşil çay tüketimi olduğu düşünülmektedir. Yeşil çayın kanser engelleyici etkisi son zamanlarda yaygın olarak araştırılmaktadır. Yapılan çalışmalar yeşil çayda bulunan katekin türevi polifenol bileşiklerinin hücre proliferasyonunun durmasına ve hücrede programlı hücre ölümünün (apoptoz) tetiklenmesine sebep olduğunu göstermektedir. Bu katekin türevleri arasından yeşil çayda en çok bulunan *epigallocatechin-3-gallate*'ın (EGCG) pek çok kanser hücre hattında apoptotik etki gösterdiği daha önce yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. Buna karşın, EGCG'nin kolon karsinoma hücre hattındaki (HCT-116) apoptotik etkisini araştırmaya yönelik çalışmaların sayısı oldukça kısıtlıdır.

Apoptoz pek çok proteinin bir arada etkidiği son derece kontrollü bir hücre ölüm sürecidir. Apoptoz temelde ölüm reseptörleri aracılığı ile kaspaz-8 aktivasyonu (ekstrinsik yolak) veya mitokondri membranından sitokrom-c'nin salınması ile kaspaz-9 aktivasyonu (intrinsik yolak) sonucunda gerçekleşebilmektedir. Çoklu ekspresyon analizi ile EGCG'nin apoptoz mekanizmasında etkin olan genlerin belirlenmesine yönelik çalışmaların sayısı oldukça azdır. Daha önce yapmış olduğumuz çalışmalar sonucunda; 24 saatte 100uM EGCG'nin HCT-116 kolon karsinoma hücre hattında apoptozu tetiklediğini göstermiş bulunmaktayız (TÜBİTAK Proje No: SBAG-108S088). Bu araştırmada amacımız:

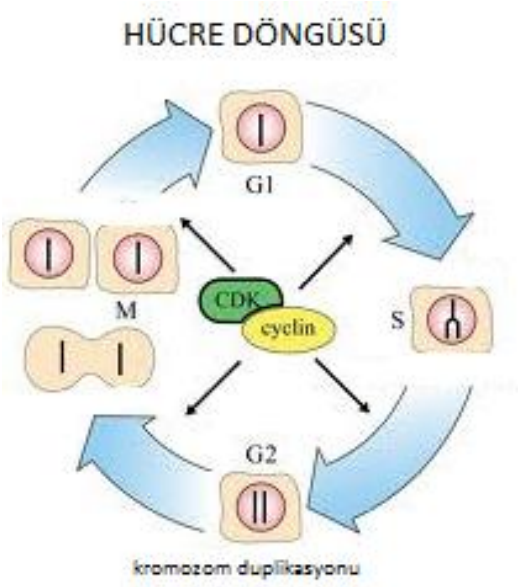
- EGCG solüsyonu ile 24 saat inkübasyon süresinde HCT 116 Bax +/+ ve Bax-/- hücrelerinde tetiklenen apoptoz mekanizmasında pro- ve anti-apoptotik gen ekspresyonlarının değişimini ve ekstrinsik/intrinsik apoptotik mekanizmada rol alan kaspaz protein düzeylerinin değişimini belirlemek,
- Artış gösteren genlerin protein ekspresyonunu mRNA düzeyinde susturarak pro-apoptotik Bax proteini varlığı ve yokluğunda bu proteinlerin ekstrinsik ve intrinsik apoptoz mekanizması için önemini ortaya koymak,
- EGCG'nin hücre içi ROT oluşturma kapasitesini incelemektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hücre Yaşam Döngüsü ve Kanser Oluşumu

2.1.1. Hücre Yaşam Döngüsü

Hücrenin yaşam döngüsü, hücrelerin birbirini takip eden bölünme (mitoz) ve bölünmeye hazırlık (interfaz) sürecidir. Bu süreç G_1, S, G_2 ve M fazlarından meydana gelmektedir (1). İnterfaz sürecinin ilk fazı G_1; mitozun bitişi ile DNA sentezinin (S) başlangıcı arasında kalan sürece verilen isimdir. Bu faz DNA sentezine yani replikasyona hazırlık fazıdır. Hücre bu fazda, replikasyon için gerekli olan çeşitli proteinlerin sentezini gerçekleştirir. S fazında ise DNA replikasyonu gerçekleşir ve kromozom sentezi bu fazda tamamlanır hücre diploid özellik kazanır. Sentez tamamlandıktan sonra hücre G_2 fazında mitoza hazırlığı başlatır. Mitoz sürecinde gerekli olan mikrotübüller bu fazda sentezlenir. Mitoz (M) fazında ise nükleusun (karyokinez) ve sitoplazmanın (sitokinez) bölünmesi gerçekleşir. Kardeş kromatidlerin birbirlerinden ayrılması ve mikrotübüller aracılığı ile hücrenin zıt kutuplarına taşınması bu fazda gerçekleşir. Bu faz sonucunda iki yeni kardeş hücre meydana gelir (Şekil 1)(2).

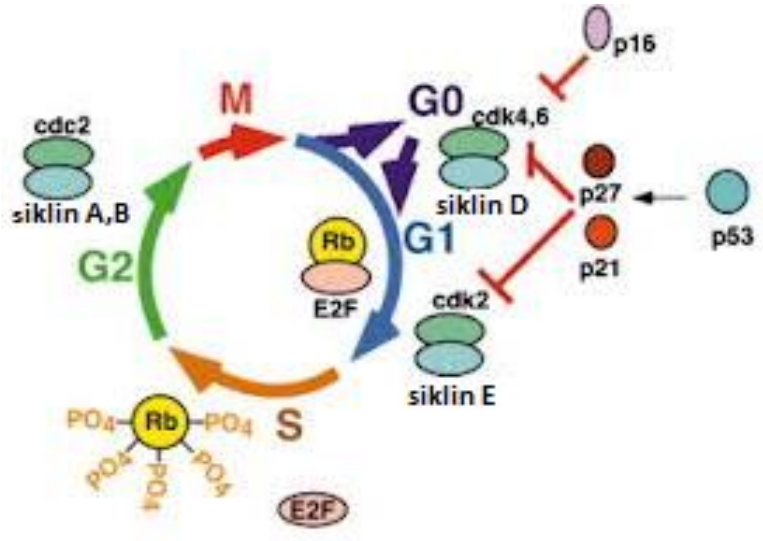


Şekil 1. Hücre Yaşam Döngüsü ve Fazları
(http://www.biology.arizona.edu/Cell_Bio/tutorials/cell_cycle/main.html)

2.1.2. Hücre Yaşam Döngüsü Kontrolü

Hücrenin yaşam döngüsü siklin ve siklin bağımlı kinazlar adı verilen çeşitli proteinler aracılığı ile kontrol edilir. Düzenleyici siklin proteinleri ve katalitik siklin bağımlı kinaz enzimleri heterodimer formunda aktivite gösterirler (3). Bu heterodimerin asıl görevi çeşitli hücre içi proteinlerin forforillenmesi ile hücre yaşam döngüsünün devamlılığının sağlamaktır. Siklinlerin baskılanması hücre yaşam döngüsünün duraksamasına neden olur (4).

Hücre yaşam döngüsünün kontrol noktaları hücrenin bir fazdan diğerine geçişi için çeşitli faktörlerin uygunluğunun kontrol edildiği noktalardır. Hücrenin içerisinde bulunduğu fazın tamamlanıp tamamlanmadığı ve bir sonraki faza geçiş için koşulların uygun olup olmadığı bu kontrol noktalarında kontrol edilir (5).



Şekil 2. Hücre yaşam döngüsü kontrolünde rol oynayan proteinler (6).

G_1 fazındaki kontrol noktası (restriksiyon noktası) hücrenin bölünmeye devam edebilmek amacıyla S fazına geçip geçmeyeceğine karar verdiği noktadır.Hücre bu noktada bölünmeye ya da yaşam döngüsünde duraksamaya karar verir. CDK4 (siklin bağımlı kinaz 4) ve siklin D proteinlerinin oluşturduğu heterodimer, bölünmeye devam sinyalini uyarırken, tümör baskılayıcı p16 ya da p21 proteinleri CDK4'ü inhibe ederek hücresin S fazına geçişini engeller ve böylece hücreler yaşam döngüsünün G_1 fazında duraksatılmış olur (Şekil 2) (6). Ayrıca hücre bu noktada G_0 dinlenme fazına geçişi de uyarabilir. Bu fazda hücre yaşam döngüsünün dışına çıkmıştır ve tekrar döngüye girene kadar bölünmez. Sinir hücreleri ve kalp kası hücreleri gibi hücreler normal koşullarda bu fazdadırlar ve bölünmedikleri için hücre

yaşamdöngüsüne devam etmezler. G_0 fazındaki karaciğer ve böbrek parenkimal hücreleri gibi bazı hücreler özel durumlarda normal yaşam döngüsüne geri dönebilirler (7).G_2 fazındaki kontrol noktasında ise hücrenin mitoza geçiş için uygunluğu kontrol edilir. Eğer hücrenin DNA'sı hasarlanmış ise siklin bağımlı kinazları aktifleştiren mitoz başlatıcı faktör (*Mitosis Promoting Factor* - MPF) inhibe edilir ve böylece hücre döngüsü G_2 fazında duraksar (8). Benzer şekilde p21 proteini de G_1 fazında olduğu gibi G_2 fazında da p53 üzerinden DNA hasarı ile uyarılarak siklin/CDK kompleksini inhibe eder ve hücre döngüsünü duraksatır (6).Metafazdaki kontrol noktasında ise kromozomların mitotik plak üzerine yerleşimleri kontrol edilir. Eğer kromozomlar düzgün bir şekilde yerleşmediyse hücre buna yanıt olarak siklin-B proteini yıkar. Böylece hücre metafazdan anafaza geçemez ve mitoz tamamlanamaz (9).

2.1.3. Kanser Oluşumu ve Kanser Hücresinin Karakteristik Özellikleri:

2008 yılı verilerine göre dünyada 12,7 milyon kanser vakası olduğu ve 7,6 milyon kanserden ölüm gözlendiği belirlenmiştir. Kanser büyük çoğunlukla genomik bir hastalıktır ve gelişimde kalıtsal faktörler en büyük rolü oynar (13, 14, 15). DNA kendi genomik bütünlüğünü korumak için onarım mekanizmasına sahiptir. Kimyasal yapısı gereği, spontan hidroliz, reaktif oksijen-nitrojen türleri gibi intrinsik metabolik ürün saldırısı, çevresel zararlı kimyasalların etkileşimi gibi kimyasal modifikasyonlara açıktır. Bir günde hücre başına gerçekleşen tek-zincir kırılmaları ve spontan baz kayıplarının tahmini sayısı 104 gibi yüksek bir sayıdır. (16, 17). Kanser oluşum mekanizmasında ardışık mutasyonlar sonucu hücre döngüsünün kontrolden çıkması gözlenmektedir. Bu mutasyonlar genellikle DNA onarım enzimlerinde inaktifleşme, proto-onkogenlerde aktifleşme-onkogene dönüşüm ve tümör baskılayıcı genlerde inaktifleşme olarak görülmektedir (12).Normal bir hücrenin kanser hücresine dönüşümü tümör supresör genlerinde, protoonkogenlerde, DNA-onarım enzimlerinde oluşan mutasyonlar ve epigenetik değişimlerle zaman içinde gerçekleşen aşamalı bir süreçtir.

Yüzyıllar içinde gelişen insan kanserleri de çok aşamalı bir süreçten geçer. Tıpta ve moleküler biyolojideki gelişmeler bu sürecin birçok biyokimyasal fonksiyondan sorumlu gende mutasyonların devamlı birikimi ve epigenetik bozuklukların sorumlu olduğunu ortaya çıkarmıştır. Başlangıç safhasında, mutasyona uğramış DNA'da onarım mekanizmalarının

çalışmaması, gelişme safhasında genomik kararsızlık ile oluşan heterojenite, hayatta kalma ve büyüme baskılıyacılardan kaçma gibi avantajlar sağlar. İlerme safhasında ise tümör dokusunun komşu dokularla etkileşimi sonucu metastaz gelişir (18). Bu çok aşamalı durum birçok malign karsinomada gösterilmiştir (19).

Hücre yaşam döngüsü ve kanser gelişimi yakından ilişkili konulardır. DNA hasarını algılayarak p21 proteinini aktifleştiren ve bu sayede hücre döngüsünün ilerlemesine engel olan p53 proteini katı tümörlerin %50'sinden fazlasında mutanttır (10). p53, p21 ya da p16 gibi tümör baskılayıcı proteinlerhücre yaşam döngüsünü duraksatma aktivitesi gösterirken, siklinler ve CDK'lar hücreyi bölünmeye doğru yönlendirdiklerinden onkogen olarak adlandırılırlar. Çeşitli kanser türlerinde bu tümör baskılayıcı proteinlerin eksikliği, siklin ve CDKların ise aşırı ekspresyonu söz konusudur (11). Kanserin karakteristik özelliklerinden en önemlisinin kontrolsüz hücre bölünmesi olduğu düşünüldüğünde protein ekspresyon profilindeki bu değişimin önemi anlaşılmaktadır. Benzer şekilde bir proto-onkogen olan RAS proteini aktifleştiğinde siklinD-CDK4 kompleksini aktifleştirerek hücre döngüsünün ilerlemesine neden olur. Tüm insan tümörlerinin %20-30'unda RAS aktifleşmesi görülmektedir (12).

Karsinogenez ve kanser gelişiminin karakteristik özellikleri kanserden korunma ve kanserin tedavisi açısından bize ipuçları vermektedir. Çok aşamalı karsinogenezis sürecinde, genlerden birinin mutasyonu tolere edilebilirken her iki genin mutasyonu hücre ölümüne yol açmaktadır (20). Tümör hücresinde genomik karasızlık sonucu oluşan bu heterojeniteden dolayı, kanser hastalığının özellikle son safhalarında tek bir moleküler hedefe yönelerek tedavi yanıtının alınması mümkün olmamaktadır. Bu nedenle, özellikle premalignant lezyonların invaziv kanserlere dönüşümünü önlemek için doğal ve sentetik ajanların kullanılımına yönelinmektedir.

2.1.4. Kolon Kanseri

Çeşitli kanser türleri tüm dünyadaki ölümlerin %13'ünden ve batı ülkelerinde ölümlerin %25inden sorumludur (21). Tümörün köken aldığı dokunun tipine göre beş farklı kanser türünden bahsedilebilir: karsinoma, sarkoma, lenfoma ve lösemi, kök hücre tümörleri ve blastoma. Karsinomalar epitelyal hücrelerden türevlenenmalign tümörlerdir ve tüm kanser

türlerinin %85'ini kapsarlar. En yaygın görülen karsinoma türleri meme, kolon, prostat ve akciğer kanseridir (22).

Tüm dünyada en yüksek üçüncü mortaliteye ve insidansa sahip kanser türü olan kolon kanseri yılda 655.000 kişinin ölümünden sorumludur (23). Batı ülkelerinde kolon kanser mortalitesi akciğer kanserinden sonra ikinci sıradadır. Doğu ülkelerine kıyasla batı ülkelerinde yüksek mortalite görülmesiyle batı beslenme alışkanlıkları arasında bir ilişki olduğu düşünülmektedir. Özellikle aşırı kırmızı et, işlenmiş et tüketimi ve düşük meyve-sebze tüketimi kolon kanseri için risk faktörü olarak kabul edilmektedir (25). Kolon kanserinde hücre tipi çoğunlukla salgı dokusu hücrelerinden türevlenen adenokarsinomadır. Adenokarsinomanın dışında, epitelyal doku hücrelerinden türevlenen karsinoma ve lenfositlerden türevlenen lenfoma da kolon kanserinde görülen tümör hücre tipleri arasındadır (26). Kolon kanserinde DNA replikasyon ve onarım enzimlerindeki mutasyonlarla birlikte; APC, K-Ras, NOD2 ve p53 genlerinde de mutasyon görülebilmektedir (27).

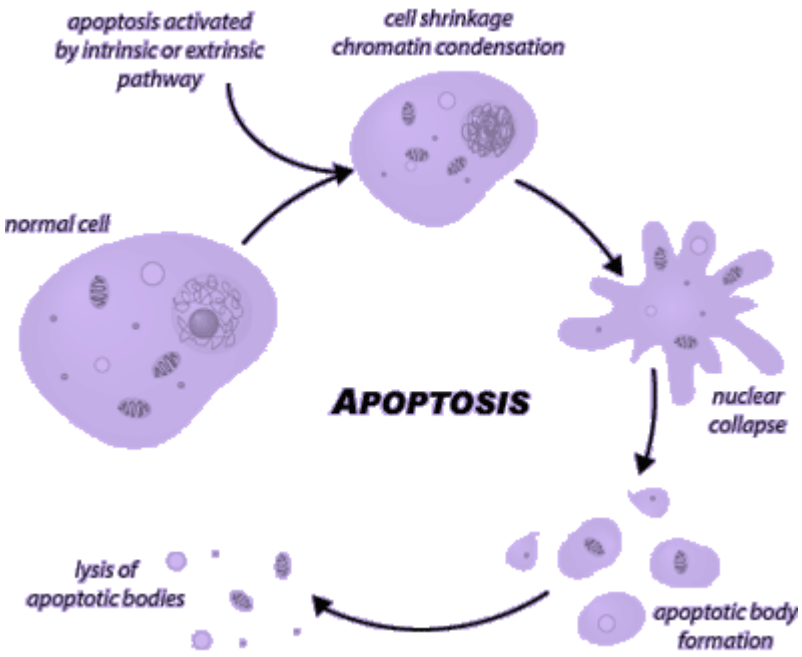
Bu güne kadar yapılan çalışmalarda kolon kanserinde apoptozdan kaçışta önemi olan faktörlerden bazıları: normal dokudaki APC gen ekspresyonunda azalış, BCL-2, c-MYC gen ekspresyonlarında artış, gen metilasyonlarında azalış, kanser başlangıç safhasından gelişme safhasına geçişte RAS, COX-2, SMAD2-4, STAT3, siklin D1, VEGF gibi hücre büyümesinde görevli gen ekspresyonlarında artış, p53 ve p16 tümör supresör gen ekspresyonlarında azalış olarak sayılabilir. (21)

2.2. Apoptoz

Apoptoz hücre-içi ve hücre-dışı pek çok sinyal tarafından iki temel yolak üzerinden aktifleşen ve pek çok protein tarafından regüle edilen, kontrollü ve programlı bir hücre ölüm sürecidir (28). Fizyolojik şartlardaki çok hücreli organizmalarda, hem gelişim esnasında hem de gelişimini tamamlamış organizmaların homeostazının sağlanmasında istenmeyen hücrelerin yok edilmesi için evrimleşmiş en önemli mekanizmadır (29). Apoptoz mekanizması potansiyel zararlı hücrelerin yok edilmesi görevini üstlendiğinden pek çok hastalık ile yakın ilişkilidir. Aşırı apoptoz, fazla hücre kaybı nedeniyle iskemik ve nörodejeneratif hastalıklara sebep olurken, yetersiz apoptoz otoimmün hastalıklara ve kansere neden olabilmektedir. Fizyolojik süreçte büyüme faktörlerinin hücreye ulaşamaması veya

hücrenin oksidatif stres, hipoksi, iyonize radyasyon, UV ya da ilaç uygulamaları gibi farklı etkenlerin etkisinde kalması sonucunda oluşan hasarlı hücrelerin yok edilebilmesi için apoptotik mekanizma tetiklenebilmektedir (30).

Morfolojik olarak apoptoz süreci; plazma membranının tomurcuklanması, fosfotidil serin kalıntılarının membranın dış yüzeyine yönelmesi, hücre büzüşmesi, kromatin kondenzasyonu ve hücre içeriğinin çoklu membran kaplı parçacıklar halinde dağılarak komşu hücreler ve fagositler tarafından yutulmasını kapsayan bir süreçtir (31). Morfolojik değişimler, hücresel bütünlük ve canlılık için gerekli olan polipeptidlerin proteolitik yıkımı ile gerçekleşmektedir. Yıkım süreci spesifik sistein proteazlar olan kaspazların aktivitesi sayesinde meydana gelmektedir (32). Apoptotik hücre ölüm mekanizmasında hücre içi bileşenlerin membran ile çevrilmiş apoptotik parçacıklar halinde çevre dokuya dağılması oldukça önemlidir. Bu nedenle nekrotik hücre ölüm mekanizması ile hücre içi bileşenlerin çevre dokuya dağılması sonucunda meydana gelen enflamasyon, apoptotik hücre ölüm mekanizmasında oluşmamaktadır(Şekil 3). Hasarlanmış hücrelerin yok edilmesini hedefleyen terapilerde çoğunlukla spesifik olarak apoptozun tetiklenmesi tercih edilmektedir .



Şekil 3. Apoptotik süreçteki bir hücre (31)

Pek çok farklı molekül tarafından hassas bir şekilde kontrol edilen apoptoz mekanizması, kaspazların bir kaskad oluşturacak şekilde aktifleşmelerini sağlayan iki yolak tarafından tetiklenmektedir. Hücre membranında bulunan ölüm reseptörlerinin aktifleşmesi ile karakterize edilen ekstrinsik yolak ve mitokondri-apoptozom sisteminin aktifleşmesi ile karakterize edilen intrinsik yolak. Her iki yolağın ayrıntılarına değinmeden önce apoptoz mekanizmasında kilit rolü oynayan kaspazlardan bahsetmek gerekmektedir. Kaspaz enzimlerinin aktivitesi apoptozun tetiklenmesinden DNA fragmantasyonuna, plazma membranının tomurcuklanmasından, fosfolipid asimetrisinin bozulmasına kadar tüm apoptoz sürecinde yer almaktadır (30).

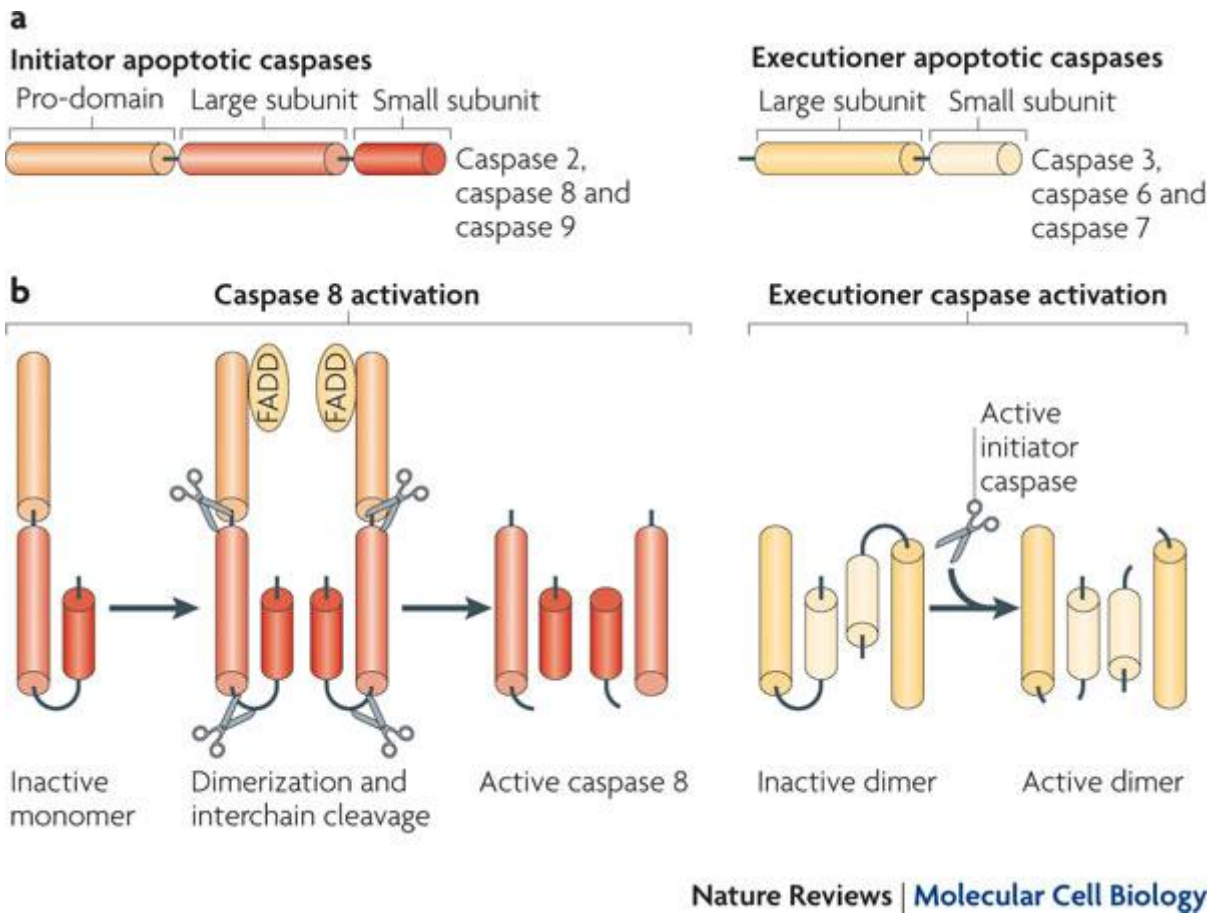
2.2.1. Kaspazlar ve Kaspaz Aktivasyonu

Proteolitik olaylarda kalpainler, katepsinler ve proteozom gibi pek çok proteazın etkisi bilinse de, asıl rol oynayanlar proteinleri aspartat kalıntılarından sonra kesen hücre içi sistein proteazlar yani kaspaz ailesi enzimleridir (32). İnsanlarda bilinen 12 kaspazdan 7'sinin (kaspaz -2, -3, -6, -7, -8 , -9 ve -10) apoptotik süreçte yer aldığı saptanmıştır. Kaspazlar, öncül formlarında inaktif zimojenler olarak sentezlenmekte ve apoptoz sırasında aktifleşmektedirler Kaspaz enzimleri hem aktivitelerinde hem de regülasyonlarında önemli olan büyük ve küçük alt birimlerden oluşmaktadırlar (32).

Kaspaz enzimleri, apoptoz sürecindeki rolleri göz önünde bulundurularak iki ana grupta incelenebilir. Başlatıcı (*initiator*) kaspazlar, çeşitli hücre-içi ya da hücre-dışı sinyalleri proteolitik aktiviteye çevirerek kaspaz kaskadının başlatılmasından sorumlu olan kaspazlardır. Hücre dışı sinyaller ile aktifleşen başlatıcı kaspazlar (kaspaz-8 gibi) ekstrinsik yolağı, hücre içi sinyaller aracılığıyla aktifleşen başlatıcı kaspazlar ise (kaspaz-9 gibi) intrinsik yolağı başlatarak kaspaz kaskadını tetiklerler. Sonlandırıcı (*executioner*) kaspazlar ise hücre içerisindeki spesifik polipeptid hedeflerini proteolitik olarak keserek apoptoz mekanizmasının tamamlanmasını sağlayan enzimlerdir (Şekil 4) (33).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar kaspaz aktivasyon sürecinin başlatıcı kazpazlar için (kaspaz-2, -8, -9 -10) ve sonlandırıcıkaspazlar için (kaspaz-3, -6, -7) farklı olduğunu göstermektedir (34). Başlatıcı kaspaz aktivasyonuna model olarak intrinsik yolağın başlatıcısı olan prokaspaz-9'un aktifleşmesi kullanılabilir. Prokaspaz-9 ters yerleşmiş katalitik sistein ve

histidin kalıntıları içeren ve bu nedenle substrat bağlama cebine substratın ulaşamadığı monomerik bir proteindir. Kaspaz-9'un dimerizasyonu sonucu gerçekleşen konformasyonel değişim sayesinde proteinin substrat bağlama cebi açılır ve katalitik kalıntılar aktivite gösterebilecekleri şekilde yerleşir (35,36). Böylece aktif kaspaz-9 sonlandırıcı kaspazları keserek aktifleştirir ve intrinsik yolak üzerinden apoptoz süreci başlamış olur. Prokaspaz-8 ve prokaspaz-10 da (ekstrinsik yolak başlatıcı kaspazları) benzer şekilde dimerizasyon ile aktifleşen sitoplazmik monomerlerdir. Bu proteinlerin aktifleşmesinde de kaspaz-9 gibi proteolitik kesim söz konusu değildir (37). Başlatıcı kaspazların aksine, sonlandırıcı kaspazların zimojenleri fizyolojik koşullarda dimerik yapıdadır ve bu kaspazların aktivasyonu çeşitli aspartat kalıntılarından kesilmeleri ile gerçekleştirilmektedir (37). Spesifik kesim bölgelerinden biri küçük ve büyük alt birimler arasındaki aspartat kalıntısı, bir diğeri de öncül bölge ile büyük alt birim arasındaki aspartat kalıntısıdır (38). Bu kalıntılardan kesilmeleri sonlandırıcı kaspazların aktifleşmelerini sağlar.



Şekil 4.a. Başlatıcı ve sonlandırıcı kaspazların altüniteleri. b.Proteolitik kesim ile kaspaz enzim aktivasyonu (33)

2.2.2. Başlatıcı Kaspazlar

Başlatıcı kaspazlar, sonlandırıcı kaspazları aktifleştirdiklerinde apoptotik süreç başlamış olur. Sonlandırıcı kaspazlar pek çok hedef proteini proteolitik olarak keser ve böylece apoptoz sürecine özgün hücre içi olaylar gerçekleşir. Sonlandırıcı kaspazların arasında fonksiyonu en iyi tanımlanmış olan kaspaz-3 proteininin aktifleştikten sonra yüzlerce susbstratı seçici olarak kestiği bilinmektedir. (33). Bu proteolitik yıkım apoptoz sürecinde gerçekleşen pek çok morfolojik değişimin temelini oluşturmaktadır. Örneğin, kaspaz-3 aktin-kesici enzim gelsolin'i keserek aktifleştirir. Bu enzimin aktivasyonu apoptozun en karakteristik morfolojik değişimlerinden olan plazma membranında tomurcuklanmaya neden olmaktadır (39). Kaspaz-3 aynı zamanda lamin B, nükleer/mitotik aparat proteini (NuMA) ve sitokeratinler gibi hücre içi sito-iskelet elemanlarının kesiminden de sorumludur (33, 40). Bu proteinlerin temel fonksiyonunun hücrenin şeklinin korunması olduğu düşünüldüğünde, kaspaz-3 aktivitesi ile bu proteinlerin kesiminin apoptotik süreçteki morfolojik değişim açısından önemi anlaşılabilir.

Kaspaz aracılı protein yıkımı apoptotik hücrelerde gözlemlenen bazı biyokimyasal olayların da temelini oluşturmaktadır. Kaspaz-3, endonükleaz inhibitör proteinini (inhibitor of caspase-activated endonuclease, ICAD) keserek serbest kalan CAD enzimi (caspase-activated endonuclease) ile DNA'nın fragmantasyonunun gerçekleşmesine olanak sağlar (40). Bunun yanı sıra kaspaz-3 pek çok protein kinaz enzimini hedefler. Bu enzimlerin inhibitör bölgelerini keserek aktivasyonunu sağlamaktadır (33). Bu protein grubundan olan protein kinaz Cδ enziminin aktivasyonu ile fosfatidilserin fosfolipidinin normal koşullarda bulunduğu plazma membranının iç kısmından dış kısmına dönüşünü katalizleyen *phospholipid scramblase* enzimi aktifleşir. Hücre mebranının fosfolipid asimetrisindeki bu kayıp apoptozun karakteristik göstergelerinden biridir ve makrofajların yüzeylerinde bulunan fosfatidilserin reseptörleri tarafından apoptotik hücrelerin tanımlanması ile apoptotik hücrenin makrofajlar tarafından fagositozu gerçekleşebilir (41,42).

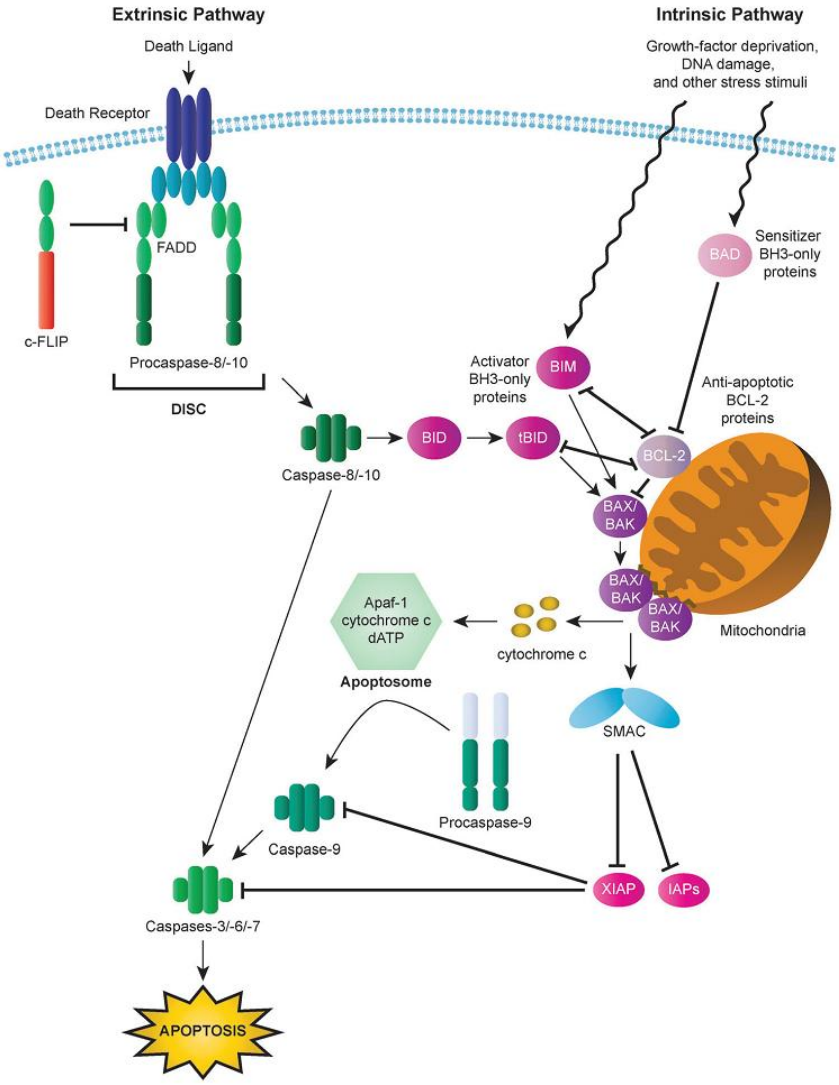
Farklı proteinlerin kaspaz aracılı yıkılımı ile başta DNA onarım mekanizmaları ve protein translasyon sistemi olmak üzere hücresel sağ kalım için gerekli olan pek çok mekanizma inhibe edilerek hücre mutlak bir ölüm sürecine sürüklenmiş olur (43).

2.2.3. İntrinsik Yolak

İntrinsik yolak (mitokondriyal yolak); çeşitli sinyaller tarafından mitokondri dış membranının geçirgenliğinde değişim olması sonucunda kaspaz-9'un aktifleşmesi ile sonuçlanan apoptotik aktivasyon sürecidir. Bu süreçteki en kritik basamak, spesifik polipeptidlerin mitokondrideki membranlar arası alandan sitoplazmaya salınmalarıdır. Membranlar arası bölgeden salınan proteinler arasında en çok, elektron transport sisteminin bir bileşeni olan ve normal koşullarda mitokondri iç membranına zayıf bağlanmış konumda bulunan, sitokrom c araştırılmıştır. Apoptotik süreçte mitokondriden sitokrom c salınması hızlı, kantitatif bir süreçtir ve kaspaz-9 aktivasyonu üzerinden apoptozun tetiklenmesine neden olur (44).

Sitokrom c sitoplazmaya geçtikten sonra öncelikle adaptör Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) proteinine bağlanır (45). Bu bağlanma sonucu protein kompleksinde ATP bağımlı bir konformasyonel değişim meydana gelir ve prokaspaz-9 yapıya katılır (46). Sonuçta oluşan 700 kDa büyüklüğündeki kompleks, çoklu Apaf-1 ve kaspaz-9 moleküllerini içerir ve "apoptozom" olarak adlandırılır (47). Bu kompleksin etkisiyle aktifleşen kaspaz-9, kaspaz-3'ü aktifleştirerek intrinsik yolak üzerinden apoptozun tetiklenmesine neden olur (Şekil 5).

Bu süreci başlatan sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya geçişinin biyokimyasal temelleri halen tartışma konusudur (49). Bazı modeller sitokrom c salınmasının voltaj-bağımlı anyon kanalları (VDAC) ve adenin nükleozid translokatörü (ANT) gibi mitokondriyal membran proteinleri ile mitokondri matriks proteini siklofilin D tarafından oluşturulan *permeability transition pore* (PTP) adı verilen porlar aracılığı ile gerçekleştiğini savunmaktadır (50). Ancak fareler üzerinde gerçekleştirilen denemeler ANT'ın, VDAC'ın ve siklofilinin apoptotik süreçte rolü olabileceğini fakat gerekliliğinin düşük düzeyde olduğunu göstermiştir. (51-52). Yapılan çalışmalar Bcl-2 ailesi proteinlerinin sitokrom c salınmasındaki en temel kontrol mekanizması olduğunu göstermektedir. (53, 54)



Şekil 5. Apoptoz Sürecinde İntrinsik ve Ekstrinsik Yolaklarda Görevli Proteinler (Plati ve ark., 2011)

2.2.3.1. Bcl-2 Ailesi

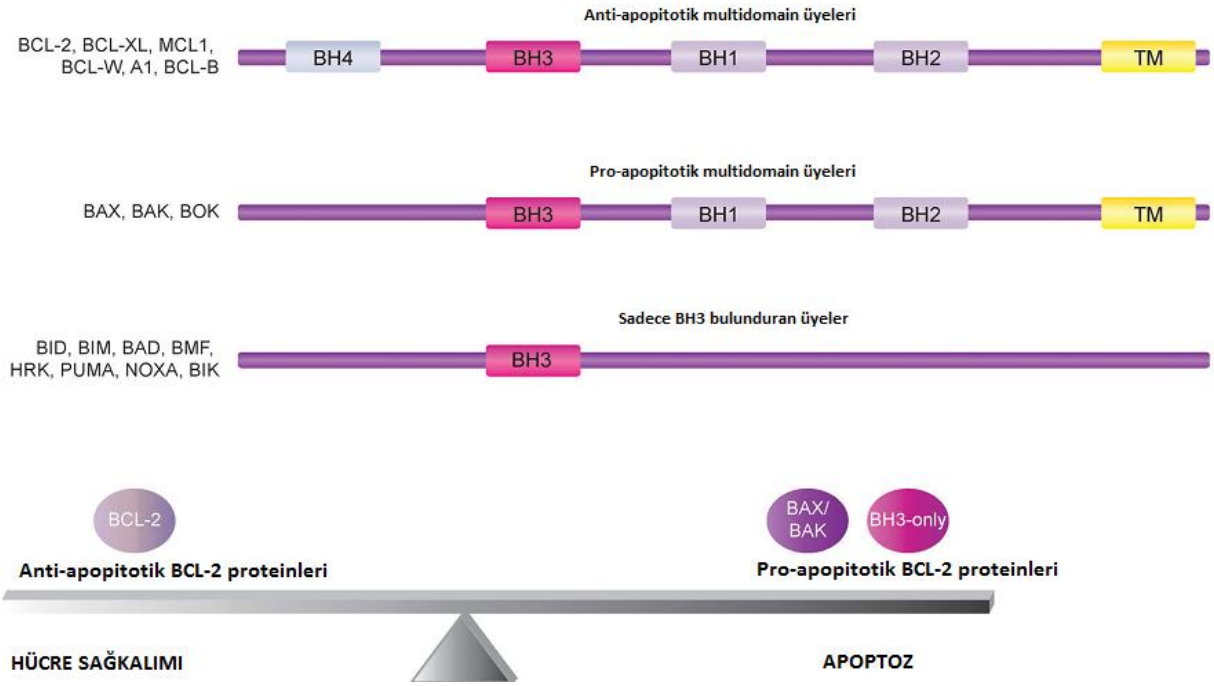
Bcl-2 ailesi proteinleri mitokondriden sitokrom c salınmasını kontrol eden bir protein ailesidir. Bu ailenin ilk keşfedilen üyesi olan Bcl-2'nin hücre ölümünü engelleyici bir rolü olduğu gösterilmiştir (54). Bugüne kadar yapılan çalışmalar sonucunda benzer homoloji gösteren 20 gen tanımlanmıştır. Bcl-2 ailesine ait proteinler, fonksiyonel ve yapısal kriterler göz önünde bulundurulduğunda, üç farklı grup halinde incelenebilir. Anti-apoptotik özellik gösteren grup I (Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl1, Boo/Diva, Nrf3 ve Bcl-B), pro-apoptotik özellik gösteren grup II (Bax, Bak, Bok/Mtd) ve grup III (Bid, Bak, Bik, Bim, Blk, Bmf, Hrk, Bnip3, Nix, Noxa, PUMA ve Bcl-G) (Şekil 6) (55).

Anti-apoptotik grup I üyeleri genellikle oldukça korunmuş dört BH bölgesini (Bcl-2 homolojisi) ve mitokondri dış membranı, endoplazmik retikulum membranı gibi çeşitli hücre içi membran yüzeylerine bağlanabilmelerine olanak sağlayan C terminal transmembran bölgesini içermektedirler. Pro-apoptotik grup II üyeleri ise N terminal BH4 bölgesi dışında tüm diğer BH bölgelerini ve transmembran bölgesini içermektedirler. Son olarak grup III üyeleri diğer gruplara göre oldukça heterojendir ve tek ortak homolojileri 15 amino asitlik BH3 bölgesidir. (55).

Güncel bilgiler başta Bax ve Bak olmak üzere grup II üyelerinin doğrudan sitokrom c salınmasını sağladığını göstermektedir (56). Bax ve Bad proteinlere ait genlerden her hangi birinin delesyonu apoptozu kısmen engellemektedir. Her iki proteine ait genlerin birlikte delesyonu ise apoptozun tamamen engellenmesine neden olmaktadır. Bu sonuçlar apoptozun intrinsik yolağında bu iki proteinin bir arada gösterdikleri etkinin önemini ortaya koymaktadır (57). Bax proteini apoptotik olmayan hücrelerde sitoplazmada ya da mitokondri yüzeyine zayıf bağlı halde bulunmaktadır ancak apoptoz tetiklendiğinde Bax mitokondri dış membranına transloke olmaktadır (58). Mitokondri membranına göç Bax'ın konformasyonunda değişime ve oligomerizasyonuna neden olmaktadır (59). Bak proteini ise normalde mitokondri dış membranında bulunurken apoptoz sırasında konformasyonel bir değişim geçirerek membranın iç taraflarına göç eder (60). Bax ve/veya Bak proteinlerinin mitokondri dış membranında sitokrom c salınmasını sağlayacak porlar oluşturdukları düşünülmektedir. Buna karşın bu porun yapısı ve por oluşumunun ayrıntıları henüz tam olarak aydınlatılmış değildir (60).

Bax ve Bak proteinlerinin mitokondriye geçişi ve mitokondri membranında por oluşturmaları grup III proteinleri tarafından sağlanmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar grup III üyesi proteinlerin etkilerini iki temel mekanizma üzerinden gösterdiklerini ortaya koymaktadır (61). Bim ya da tBid gibi grup III üyeleri Bax ile doğrudan etkileşerek proteinin membrana göçünü sağlamaktadırlar. Bid proteinin ekstrinsik yolak başlatıcısı kaspaz-8 tarafından kesilmesiyle tBid meydana gelir ve apoptozun intrinsik-ekstrinsik yolakları arasındaki ilişkinin ortaya konulması açısından Bid proteini önemlidir (62). PUMA,

Bmf ve Bad gibi diğer grup III üyeleri ise anti-apoptotik grup I üyelerine bağlanıp onları etkisizleştirerek dolaylı yoldan apoptozun gerçekleşmesini sağlamaktadırlar (63).



Şekil 6. BCL-2 protein ailesi üyeleri (Plati ve ark, 2011)

2.2.4. Ekstrinsik Yolak

Apoptozun ekstrinsik yolağı aynı zamanda ölüm reseptörleri (*death receptor*) yolağı olarak da bilinmektedir ve hücre dışı bir sinyalin plazma membranına bağlı reseptörler aracılığıyla apoptotik aktiviteye dönüşmesi olarak tanımlanmaktadır (28). İzole tümör nekroz faktörü (TNF) ve lenfotoksin proteinlerinin kültüre tümör hücrelerinin ölümüne neden olduğu ilk kez 1969 yılında ortaya konulmuştur (64).

TNF ailesi, reseptör proteinlerin hücre dışı bölgelerine bağlanarak etki göstermektedir. TNF ailesinde 19 farklı ligand bulunmaktadır ve bu ligandlar TNF reseptör (TNFr) ailesine ait 29 farklı reseptöre bağlanmaktadır (65). TNF ailesinin her bir üyesi TNFr ailesine ait bir ya da daha fazla reseptöre ve bazı reseptörler de bir ya da daha fazla liganda bağlanabilmektedir. TNFr ailesinin apoptozu tetikleyebilen alt sınıfına ait proteinler ölüm bölgesi (*Death Domain*-DD) adı verilen oldukça korunmuş 80 amino asitlik bir sekansı içermektedirler ve bu bölgeyi

içeren reseptörlere ölüm reseptörleri adı verilmektedir. Apoptozun ekstrinsik yolağında önemli rol üstlenen ölüm reseptörleri, TNF'nin bağlandığı (TNF-α, TNFSF2), FasL'ın bağlandığı ve TNFr-apoptoz-tetikleyici lingandın (TNFr-apoptosis-inducing ligand-TRAIL) bağlandığı reseptörlerdir. Diğer dört TNFr üyeleri ise (NGFR, EDAR, DR3 ve DR6) DD içermelerine rağmen apoptoza neden olmazlar (66). Apoptoz tetikleyebilen TNFr üyeleri ekstrinsik yolak başlatıcı kaspazlarını (kaspaz-8, -10) bağlayarak kaspaz kaskadını tetiklerler. Ligandın ölüm reseptörüne bağlanmasından sonra reseptörün yapısında meydana gelen konformasyonel değişim, ölüm-tetikleyici sinyal kompleksi (*death-inducing signaling complex*-DISC) adı verilen protein kompleksinin oluşmasını sağlar. DISC ilk olarak FasL-Fas apoptoz sinyalinde tanımlanmıştır (67). TRAIL ligandının ölüm reseptörlerine bağlanması da benzer şekilde gerçekleşmektedir. Ligand bağlı Fas reseptörüne ya da TRAIL bağlı ölüm reseptörüne Fas-ilişkili DD (*Fas-associated death domain*-FADD) adı verilen adaptör protein komplementer DD üzerinden bağlanır (68). FADD, DD dışında ölüm-efektör bölgesini de içermektedir (*death-effector domain*-DED) ve insan genomunda hem DED hem DD içeren tek proteindir. Bağlı FADD başlatıcı kaspazlara (kaspaz-8, -10) komplementer DED bölgesi üzerinden bağlanır (69). DISC kompleksinin oluşumu tamamlandıktan sonra kaspaz-8, -10 oto-proteolitik aktivite ile aktifleşir ve kompleksten ayrılarak sitoplazmaya geçer. Aktifleşmiş kaspaz-8 ve -10 sonlandırıcı kaspazları (kaspaz-3 ve -7) keserek aktifleştirir (Şekil 5).

TNF ligandının etki mekanizmasında ise, TNF, TNF-R1 reseptörüne bağlanır ve oluşan kompleksin yapısına TNFr ile ilişkili DD proteini (TNFr *associated death domain*-TRADD), reseptör-etkileşim proteini (*reseptor interaction protein*-RIP) ve TNFr ile ilişkili faktör 2 proteini (TNFr *associated factor 2*-TRAF2) katılarak kompleks 1 oluşturulur. Kompleks 1 nükleer faktör inhibitör kinaz kompleksini (NF-κB-IκB) keserek NF-κB yolağının aktifleşmesine neden olur (70). Mekanizma kompleks 1 reseptörün yapısından ayrılması FADD ve kaspaz-8 ile kompleks 2'yi oluşturması ile devam etmektedir. Ortamda yeterli miktarda FLIP proteini varsa apoptotik süreç engellenebilir, yoksa kompleks 2 kaspaz-8 proteinini aktifleştirerek apoptoza neden olur (71,72).Sonuç olarak; hücrede kompleks 2 tarafından tetiklenecek olan apoptoz, kompleks 1 aktivitesi ile engellenmektedir. Bu denge bozulduğunda ise apoptozun intrinsik yolağı aktifleşmiş olmaktadır.

2.3 Kanser Terapisinde Apoptozun Önemi

15 yıldır devam eden çalışmalar, kanser tedavisinde kullanılan tüm ilaçların apoptozu tetikleyebildiğini göstermektedir. Apoptotik yolakların aktifleştirilmesi kanser terapisinin temel ilkelerinden biridir. Çoğu kanser ilacı neden oldukları DNA hasarı üzerinden etki göstermektedir ve kanser hücrelerinin DNA onarım mekanizmalarındaki yetersizlikten yararlanarak hücreleri apoptotik sürece sürüklemektedir (73). Kanser ilaçlarının etkinliğini arttırabilmek ve olası direnç mekanizmalarının önüne geçebilmek amacıyla antinoeplastik ajanların aktifleştirdikleri apoptotik yolakların tanımlanması güncel araştırma konusudur. *Doxorubicin, etoposide, teniposide, methotrexate, cisplatin* ve *bleomycin* gibi pek çok ajan NF-κB ve AP-1 yolakları üzerinden FasL sentezini tetikler. Ayrıca DNA hasarına neden olan ajanlar p53 yolağı üzerinden Fas reseptör ekspresyonunun artışına neden olmaktadır (74). Her ne kadar bu bulgular ekstrinsik yolağı işaret etse de, çeşitli gözlemler FasL ve Fas etkileşiminin ilaç ile tetiklenen apoptozda hücrelerin öldürülebilmesi için şart olmadığını ortaya koymaktadır (75-76). Bunun ötesinde anti-Fas antikorlarının daha önceden bahsedilen ilaçlarla tetiklenen apoptozu engelleyemediği ortaya konmuştur (77). Sonuç olarak bazı istisnalar dışında (5-fluorouracil, proteozom inhibitörleri, *trans*-restinoik asit ve fenretinide gibi) çoğu anti-kanser ilaç tarafından tetiklenen apoptoz Fas/FasL sisteminden bağımsız olarak işlemektedir (78). Bunun yanı sıra, çoğu ilaç ile tetiklenen apoptotik süreçte sitokrom c salınımı ve beraberinde gerçekleşen Bax translokasyonu gösterilmiştir (79). Bu çalışmayı destekleyen diğer bir çalışmada ise Bax ve Bak proteinlerinin birlikte delesyonunun, ilaç ile tetiklenen apoptozun inhibisyonuna neden olduğu saptanmıştır (80). Anti-apoptotik Bcl-2 üyelerinin ilaç ile tetiklenen apoptoz sürecini inhibe etmesi intrinsik yolağın önemini vurgulaması açısından önemli verilerdir.

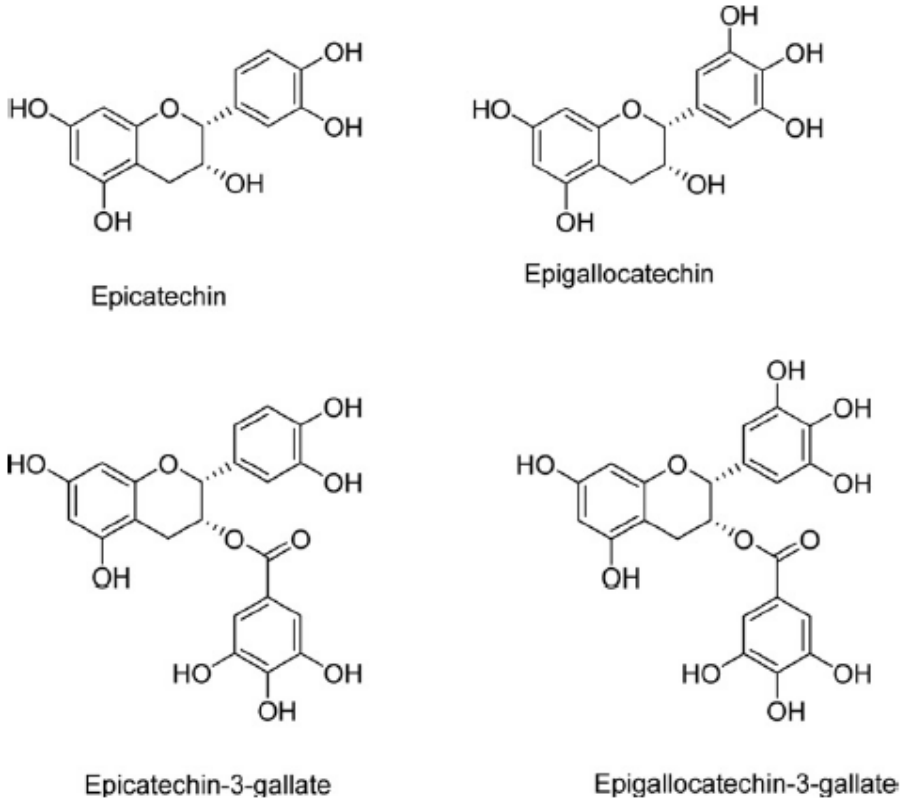
2.3.1. Apoptoz Tetiklenmesinde Polifenollerin Önemi

Çayın (Camiella sinensis) kurutulmuş yapraklarından hazırlanan içeçekler dünyada sıklıkla tüketilen içeçekler arasındadır. Son zamanlarda, çay güzel kokusu ve aromasından çok epidemiyolojik ve biyolojik verilerle desteklenen kanser, kardiyovasküler hastalıklar, obezite, diyabet ve nörodejenaratif hastalıklar başta olmak üzere birçok kronik ve dejenaratif hastalığın önlenmesinde potansiyel role sahip olduğu ön plandadır. Bu özelliği çayda fizyolojik olarak aktif bileşiklerin araştırılmasına yol açmıştır. Çaydaki fenolik ve polifenolik bileşiklerin biyolojik aktiviteleri arasında, antioksidan aktivite gösterme, NO üretimini

uyarma, vasodilasyon, zenobiyotik-metabolize edici enzimlerin regülasyonu, artmış yağ asidi oksidasyonu ve insülin direnci, ve glukoz absorbsiyonu ve utilizasyonu modülasyonu sayılabilir (81).

2.3.1.2. Çay Polifenolleri

Çayın bütün tipleri (beyaz, yeşil, oolong, siyah) aynı botanik orijine sahiptir fakat sadece işlenim bakımından farklılık gösterirler. Çay yaprakları kolaylıkla ekstrakte edilebilir polifenoller ve özellikle katekin adı verilen flavanollerden oluşurlar. Çayda bulunan başlıca 4 katekin (−)-epikatekin (EC), (−)-epigallokatekin (EGC), (−)-epikatekin gallat (ECG), ve (−)-epigallokatekin gallat (EGCG)'dir ve düşük düzeylerde de olsa bunların epimerik formları olan katekin (C), gallokatekin (GC), katekin-gallat (CG), and gallokatekin-gallat (GCG) bulunabilir. Yeşil çay ise çayın neredeyse işlenmemiş halidir ve bu sayede katekin profili yeni toplanmış çayınkine oldukça benzer (82) (Şekil 7).



Şekil 7. Yeşil çayda bulunan başlıca polifenoller (21)

2. 4. Yeşil Çay

Camellia sinensis bitkisinden 5000 yıldır çay ürünleri üretilmektedir. Çay bitkisinden üretim tekniklerindeki farklılıklara göre çay; siyah çay (%75), yeşil çay (%23) ve oolong (%2) çayı elde edilmektedir. Siyah çay üretiminde yapraklar ezilerek çay polifenollerinin kondenzasyonuna sebep olan enzimatik oksidasyon ve fermentasyon işlemleri gerçekleştirilmektedir. Yeşil çay üretiminde ise taze yapraklar ısıtılarak enzimlerin inaktivasyonu sağlanmakta böylece polifenoller oksidasyondan korunmuş olmaktadır. Oolong çayı ise yeşil yaprakların kısmi-fermantasyonu ile üretilmektedir. Böylece yeşil ve siyah çay karışımı elde edilmektedir. Her biri "*Camellia sinensis"* bitkisinden elde edilse de faklı üretim teknikleri bu çayların farklı bir kimyasal bileşime sahip olmasına neden olmaktadır. Siyah çayın temel antioksidan kapasitesini teaflavinler ve tearubiginler gibi kompleksantioksidanlar oluştururken yeşil çay'ın temel oksidan kapasitesini kimyasal olarak daha basit bir yapıya sahip olan katekinler oluşturur. (83).

Yeşil çay ekstraktları geleneksel Çin tıbbında kronik hastalıkların tedavisinde ve engellenmesinde yüz yıllardır kullanılmaktadır (84). Yeşil çay ekstraktından elde edilen temel katekin, toplam polifenollerin %50-80'ini oluşturan (-)-epigallokatekin-gallatdır (EGCG). Bir bardak demlenmiş yeşil çayda (200mL suda kaynatılan 2g çay yaprağı) 200-300mg EGCG bulunmaktadır. Her ne kadar EGCG'nin moleküler hedefleri ve EGCG tarafından regüle edilen hücre içi sinyal yolakları tamamen belirlenmemiş olsa da EGCG'nin anti-kanser etkisinde birden fazla mekanizmanın geçerli olduğu öne sürülmektedir. EGCG'nin pek çok kanser türünde hücre büyümesini inhibe ettiği, hücre yaşam döngüsünde duraksamaya yol açtığı ve apoptozu tetiklediği gösterilmiştir (85,86,87).

2.3.2.1. Yeşil Çayın Antioksidan-Prooksidan Etkisi

Günümüzde kanserin DNA, lipid ya da proteinlerin; UV ışık, kanserojenler ve serbest radikallerin etkisi ile oksidatif stres sonucunda hasar görmesine bağlı olarak gelişebildiği bilimektedir. EGCG'nin oksidatif lipid ve DNA hasarını anlamlı ölçüde düşürdüğü gösterilmiştir (88,89). Katiyar ve ark. 40μM EGCG'nin UVB'ye maruz kalan insan normal keratinosit hücrelerinde (NHEK) H_2O_2 üretimini %66 ile %80 arasında inhibe edebildiğini ve UVB ile tetiklenen ERK1/2, JNK ve p38 fosforilasyonunu engellediğini göstermişlerdir (90).

Ayrıca EGCG'nin lipid peroksidasyonunu engelleyerek oksidatif hasara karşı koruyucu bir molekül olarak davrandığı öne sürülmektedir (91).

EGCG ve diğer polifenol türevi antioksidanlar oksidatif hasarı çeşitli mekanizmalar aracılığı ile engeller. Öncelikle antioksidanlar; reaktif azot ve oksijen türevlerini hücre bileşenlerine zarar vermeden nötralize ederek, bulundukları ortamdaki serbest radikalleri temizlerler. Bunun ötesinde bazı metal iyonlarına karşı yüksek afiniteye sahip olduklarından metal şelatlayıcı olarak davranırlar ve serbest radikal oluşumunu tetikleyecek redoks-aktif geçiş metallerini inaktive ederler. Yapılan çalışmalar EGCG'nin; peroksidaz aktiviteleri nedeniyle oksidatif hasara neden olabilecek lipoksigenaz, siklooksigenaz ve ksantin oksidaz enzimlerini inhibe ederek oksidatif hasarı engellediğini öne sürmektedir (92).

Bazı durumlarda antioksidan moleküller metal iyonlarını indirgeyerek hidrojen peroksit oluşumuna neden olabilir (93). Benzer şekilde EGCG'nin, Cu(II) ve Fe(III) komplekslerinin varlığında pro-oksidan olarak davranarak DNA hasarına neden olduğu savunulmaktadır (92). EGCG'nin hücre ölümünü tetikleme özelliğinin, en azından in-vitro koşullarda, bu pro-oksidan aktiviteye bağlı olduğu düşünülmektedir (94). EGCG'nin insan özafagal skuamöz hücre karsinoma hücre hatlarında (KYSE 510 ve 150) ve lösemi hücre hattında (HL-60) DNA hasarına neden olduğu belirtilmektedir (95). Sağlıklı insan lenfositlerinde Kanadzu ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışmada, EGCG'nin 10μM ve daha düşük konsantrasyonlarda DNA kırıklarını engellediği, 1000μM ve daha yüksek konsantrasyonlarda DNA kırıklarının oluşmasına neden olduğu gösterilmiştir (96). Hwang ve ark.'ın HT29 kolon kanser hücrelerinde gerçekleştirdiği çalışmada EGCG'hücre içi ROT artışına neden olduğu ve AMPK sinyal yolğı aktivasyonu sonucu apoptozu tetiklediği gösterilmiştir (97). Na Young Min ve ark. ise HCT-116 kolon karsinoma, HEK293 insan embriyonik böbrek hücreleri ve MRC5 insan fetal akciğer fibroblast hücrelerinde gerçekleştirdiği çalışmada EGCG'nin ROS oluşturma kapasitesinin hücre tipine göre değiştiği ve özellikle kanser hücrelerinde ROS oluştururarak apoptozu tetiklediği gösterilmiştir (98). Bütün bu çalışmalar yeşil çayın hücrelerde prooksidan özellik göstererek hücre ölümünü tetikleyebileceğini göstermektedir. Ancak bu etkisi hücre tipine ve EGCG konsantrasyonuna göre farklılık göstermektedir.

2.3.2.2. Apoptoz ve Hücre Yaşam Döngüsü Regülasyonu

Kanser hücrelerinin karakteristik özelliklerinden biri de programlı hücre ölümünden kaçabilmeleridir. Apoptoz kompleks genetik olaylar ile regüle edilen bir süreçtir. Bu süreçteki en önemli transkripsiyon faktörlerinden biri de p53'tür. Genomun gardiyanı olarak adlandırılan p53 hücre yaşam döngüsünün regülasyonunda, apoptozun tetiklenmesinde ve DNA onarım mekanizmalarının işlemesinde kritik öneme sahiptir. p53 proteini DNA hasarını belirleyerek ve hücre yaşam döngüsünde duraksamanın gerçekleşmesini sağlamakta ve redoks potansiyel değişikliklerine cevap olarak apoptozu tetiklemektedir. Katı tümörlerin %50'den fazlasında p53 delesyonu ya da nokta mutasyonu mevcuttur (99).

Çay polifenollerinin p53 aktivasyonuna neden olduğu belirtilmektedir (100). EGCG normal hücreleri etkilemeden farklı kanser hücre hatlarında p53 aktivasyonu üzerinden apoptoz tetikleyebilmekte ve hücre yaşam döngüsünde duraksamaya neden olmaktadır (101). Çeşitli çalışmalar sonucunda akciğer, kolon, pankreas, deri ve prostat kanserlerinde de benzer sonuçlar elde edilmiştir (102). Prostat kanseri hücre hattında (LNCaP) gerçekleştirilen bir çalışmada, p53 aktivasyonun p21 ve Bax ekspresyon artışına, NF-κB inhibisyonun Bcl-2 ailesi proteinlerinde ekspresyon azalışına ve böylece Bax/Bcl-2 oranındaki artışa bağlı olarak apoptozun tetiklendiği ve hücrelerin G0/G1 fazında duraksadığı gösterilmiştir.(103).Hatsak ve ark. LnCaP hücre hattında 20-80μM EGCG ile tetiklenen apoptozun p53-bağımlı olduğunu ve p53-/- mutasyonu olan hücrelerde apoptozun gerçekleşmediğini göstermiştir. Bax ve p21'in siRNA ile susturulması ile apoptozun önlenebildiği aynı çalışmada gösterilmiştir (104). EGCG ile tetiklenen apoptozda p53 bağımlılığını gösteren başka çalışmalar da mevcuttur (105, 106).

NMR spektroskopi ile gerçekleştirilen bir çalışmada EGCG'nin anti-apoptotik Bcl-2 ailesinin BH3 bölgesine doğrudan bağlanabildiği gösterilmiştir. Bu bağlanma, EGCG'nin anti-apoptotik Bcl-2 üyelerini inhibe etme mekanizmasının temelini oluşturduğu düşünülmektedir (107).

Islam ve ark.'nın yaptığı çalışmada insan kondrosarkoma (HTB-94) hücre hattında EGCG'nin düşük konsantrasyonlarda dahi (5μM) hücrelerde DNA fragmantasyonu ile

belirlenen apoptoz tetiklenmesine ve kaspaz-3 aktivasyonuna sebep olduğunu gösterilmiştir. Aynı çalışmada genel kaspaz inhibitörü (Z-VAD-FMK) ve spesifik kaspaz-3 inhibitörü (DEVD-CHO) kullanılarak apoptozun engellendiği de belirlenmiştir (108). Buna karşın, EGCG ile gerçekleştirilen çalışmaların çoğunda apoptoz EGCG'nin 50μM'dan yüksek konsantrasyonlarında gözlemlenmiştir. Qanungo ve ark.'nın yaptıkları çalışmada çeşitli pankreatik kanser hücre hatlarında 100μM EGCG ile 24 saat inkübasyon sonucu apoptoz tetiklendiğinde; mitokondriden sitokrom c salınması, aktif kaspaz-3 ve kaspaz-9 immüno-flouresan mikroskopisi ve western blot yöntemleri ile belirlenmiştir (109). Gupta ve ark.'nın yaptıkları çalışmada da epidermoid karsinoma (A431) hücre hattında EGCG ile apoptoz tetiklendiğinde kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 ekspresyonlarında artış olduğu western blot analizi ile belirlenmiştir. Aynı çalışmada genel kaspaz inhibitörü (zVDAC) veya spesifik kaspaz-3 inhibitörü (Z-VAD-FMK) kullanılarak apoptozun engellendiği gösterilmiştir (110). EGCG'nin kaspaz-9 aktivasyonunu ve sitokrom c salınmasını sağladığına dair çalışmalar mevcuttur (109). Roy ve ark.'nın 2005 yılında yaptıkları bir çalışmada (20-60μg/ml) EGCG'nin insan meme kanser hücre hattında (MDA-MB-468) Bcl-2 anti-apoptotik proteininin ekspresyonunda azalmaya sebep olduğu ve Bax pro-apoptotik proteinin ekspresyonunda da artışa yol açtığı belirlenmiştir (105). Qin ve ark. tarafından 2007'de yapılmış bir çalışmada da benzer şekilde insan mesane kanser hücre hattında (T24) EGCG'nin, Bcl-2 ve Bcl-xL anti-apoptotik protein konsantrasyonlarında azalmaya, Bax ve Bad pro-apoptotik protein konsantrasyonlarında ise artışa neden olduğu gösterilmiştir (111). Bu sonuçlar; EGCG'nin apoptotik etki mekanizmasında intrinsik yolağın temel olduğunu ifade etmektedir. Anti-kanser ilaçlarının çoğunun da aynı yolağı kullandığı düşünüldüğünde bu beklenen bir sonuçtur.

Buna karşın sayıları daha az olmakla beraber EGCG'nin ekstrinsik yolak üzerinden apoptoz tetikleyebildiğini gösteren çalışmalar da mevcuttur. Das ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada 50μM EGCG ile malin nöroblastoma hücre hattında (SH-SY5Y) tetiklenen apoptozun mekanizmasında kaspaz-9 ve kaspaz-3'ün yanı sıra kaspaz-8 aktivasyonunun da yer aldığı ve bu enzimlerin inhibitörleri kullanılarak hücre ölümünün engellendiği saptanmıştır (112). İnsan lenfoma hücre hattında (U937) yapılan bir çalışmada ise EGCG'nin FAS reseptörüne bağlanarak kaspaz-8 aktivasyonuna sebep olduğu belirtilmiştir (113).

EGCG'nin apoptotik mekanizması ile ilgili çalışmalar inclendiğinde; etkisinin hücre hattına ve kullanılan katekin konsantrasyonuna göre farklılık gösterdiği görülmektedir. HPV-16 ile ilişkili servikal kanser hücre hattında, Ahn ve ark. tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada 24 saatte 35μM EGCG konsantrasyonunda hücre yaşam döngüsünün G1 fazında duraksaması belirlenmiştir. Apoptoz ise aynı sürede ancak 100μM konsantrasyonda gözlenebilmiştir (114). MCF7 meme kanseri hücre hattında yapılan bir çalışmada 24 saat 30μM EGCG ile muamele edilen hücrelerde akış sitometrik DNA analizi ile G0/G1 duraksaması gösterilmiştir (115). Hsuuw ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada ise, insan meme kanser hücre hattında (MCF-7) 50μM EGCG konsantrasyonunda apoptozun, 100μM'ın üzerinde konsantrasyonlarda ise nekrozun tetiklendiği gösterilmiştir (116). Bu çalışmalar EGCG'nin anti-kanser mekanizmasında apoptoz kadar hücre yaşam döngüsünde duraksamanın ve nekrozun da etkin olabileceğini göstermektedir. Bunun dışında, EGCG'nin lipid sentezinden sorumlu olan yağ asidi sentaz enzimini inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu enzim normal hücrelerde düşük düzeylerde eksprese edilirken pek çok kanser tipinde (prostat, meme, yumurtalık, endometriyum, akciğer ve kolon) bu enzimin ekspresyonu artmaktadır. EGCG hem sağlıklı hücrelerde hem de kanser hücrelerinde enzim inhibisyonuna neden olmaktadır ancak sadece kanser hücrelerinde apoptozu tetiklemektedir. Bu durumun, malonil-CoA gibi toksik özellik gösteren lipid öncüllerinin birikmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (117). Bütün çalışmalar göz önüne alındığında EGCG'nin anti-kanser mekanizması halen tam olarak aydınlatılamamıştır ve dolayısıyla güncel araştırma konusudur.

2.3.2.3. Kolon Kanserinde Yeşil Çayın Etkinliği

Doğu ülkelerinde görülen düşük kolon kanser insidansı ile beslenme alışkanlıklarının, özellikle de yeşil çay tüketiminin ilişkili olduğu düşünülmektedir (26). Japonyada 8552 olgu ile gerçekleştirilen prospektif bir çalışmada yeşil çay tüketiminin akciğer, kolon ve karaciğer kanserine karşı koruyucu etkisi olduğu savunulmaktadır (118). Çin toplumunda yapılan bir çalışmada ise yeşil çay tüketenlerde kolon kanserinin ortaya çıkma riskinin tüketmeyenlere oranla daha düşük olduğu gösterilmiştir (119). Bu çalışma, Sun ve arkadaşlarının 2005 yılına kadar yapılan 21 çalışmanın verileri ile gerçekleştirdikleri meta analiz sonuçları ile de desteklenmektedir (120).

EGCG'nin kolon kanseri üzerine etkisini araştıran in-vitro çalışmalarda çoğunlukla kolon adenokarsinoma hücre hatları kullanılmıştır ancak kolorektal karsinoma hücre hatlarındaki etkisini inceleyen çalışma sayısı oldukça kısıtlı sayıdadır. Useato ve ark.'nın çalışmasında ise benzer şekilde EGCG'nin ve diğer yeşil çay polifenollerinin (EGC ve EC) büyüme inhibisyonu üzerinde etkisi incelenmiştir (121). EGCG'nin apoptotik etki mekanizması kanser hücre hatlarına göre farklılık göstermektedir. Ancak HCT-116 kolorektal karsinoma hücre hattında EGCG'nin apoptotik etkisini inceleyen tek çalışma 2008 yılında Inaba ve ark. tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, EGCG'nin hücre canlılığı, apoptoz ve hücre yaşam döngüsü üzerine etkisi araştırılmıştır (122). Çalışmanın sonuçları EGCG'nin hücrelerde DNA fragmantasyonuna neden olduğunu göstermesine karşın, apoptotik mekanizmasının belirlenmesine yönelik bir veri sağlamamaktadır. Bu nedenle EGCG'nin HCT-116 kolorektal karsinoma hücre hatlarındaki apoptotik etki mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik çalışmalar halen güncel araştırma konuları arasındadır.

3.GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi:

Çalışma deneysel (*in vitro*) bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı:

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuarlarında Şubat 2011-Aralık 2012 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları

Hücre kültürü çalışmasıdır.

3.4. Çalışma materyali:

Çalışmamızda Peter Vogelstein laboratuarları tarafından oluşturulan (1) ve Prof. Dr. Henning Walzack (Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg-Germany) tarafından hediye edilen HCT-116$^{Bax+/+}$ ve HCT116$^{Bax-/-}$ insan kolorektal tümör hücre hatları kullanılmıştır.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri:

- mRNA ve protein ekspresyonu değişimleri (bağımlı değişken)
- EGCG dozu ve inkübasyon süresi (bağımsız değişken)

3.6. Veri toplama araçları:

3.6.1 Kullanılan Kimyasal maddeler ve kitler

Tablo 1. Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler ve kitler

(-)Epigallokatekin-gallat	Sigma	E4143
Annexin V-FITC ApoptosisDetection Kit 1	BD Pharmingen	556547
BCA Protein Assay Kit	ThermoScientific	23225
Cell Proliferation Kit MTT 1	Roche	11965007001

Transcriptor First StrandcDNASynthesis Kit	Roche	4379012001
Real Time-ready Human Apoptosis Panel, 96	Roche	05392063001
NucleoSpin® PlasmidIsolation Kit	MachereyNagel	740588.10
ECL+Plus Western BlottingSystem	Amersham	RPN 2132
2-Merkaptoetanol	Sigma	M7154
2-Propanol	Fluka	59304
%40'lık 29:1Akrilamid-bisakrilamid solüsyonu	AppliChem	A0385
Amonyum persülfat	Sigma	A3678
Bromfenol mavisi sodyumtuzu	Sigma	B5525
Caspase-8 FlexitubesiRNA	Qiagen	1027417
Caspase-9 FlexitubesiRNA	Qiagen	1027418
Dimetilsülfoksit	AppliChem	A7248
Etoposit	Ebewe	
Formaldehit	Sigma	F-8775
FetalBovine Serum	Biochrom	S-0115
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas	SM1811
Gliserol	AppliChem	A2926
Hiperfect Transfection Reagent	Qiagen	301707
L-Glutamine (200mM)	Biochrom	K 0282
McCoy's 5A modified medium	Biochrom	F1015

OPTI-MEM reduced serum medium	Invitrogen	11058-021
Metanol	Riedel-de Haen	34860
Nonfat dry milk blotto	SantaCruz	sc-2325
PBS-Dulbecco 1x	Biochrom	L1825
Penisilin/Streptomisin	Biochrom	A 2213
Complete, Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche	11836153001
Superoksit dismutaz enzimi	Sigma	S-7008
TEMED	Sigma	T-7024
Triton X-100	Sigma	T-8787
Trizma Baz	Sigma	T-6066
Trifan mavisi	Biochrom	L-6323
Tripsin/EDTA	Biochrom	L 2143
Tween 20	Sigma	P5927
EGFP-aktin plasmidi	Clonetech	611151
SOC medium	Sigma	S1797
GCI-5α Chemically Compotent *E.Coli* Cells	GeneCopoeia	STK200-10
LB Agar	Sigma	L2897
LB Broth	Sigma	L3022
Caspase-8-spesifik primer	Fermentas	

3.6.2 EGCG Solüsyonun Hazırlanması

Serum içeren besi ortamları içinde 5 ünite/ml SOD'un bulunması EGCG'nin stabilitesinin ve yarı ömrünün 30 dakika gibi kısa süreden 24 saatten daha fazla süreye kadar artırabildiğini gösteren çalışmaya dayanarak tüm çalışmalarımızda EGCG solüsyonuve 5 ünite/ml SOD içeren McCoy's 5A ortamı ile hazırlanan EGCG solüsyonu kullanıldı (123).

3.6.3 Hücre Kültürü

Azot tankında dondurulmuş halde bulunan HCT-116 kolon karsinoma hücre hatları, uygun ortamda çözülerek deneylerde kullanılmak üzere çoğaltıldı.

Yöntem: Sıvı azot tankında saklanan HCT-116 insan kolon karsinoma hücreleri McCoy's5A ortamında %10 fetal bovine serum (FBS), %1 L-glutamin, %1 penisilin/streptomisin ilave edilmesi ile 75 cm^2'lik hücre kültür kaplarında kültüre edildi. Kültür kapları 37^oC'de %5 CO_2 / %95 hava içeren inkübatörde inkübe edildi. Hücre sayımı için 1xTripsin-EDTA çözeltisi flasklara eklenerek tüm hücreler süspansiyon haline gelinceye dek 37°C de inkübe edildi. Kültür kabının içeriği toplandı ve 1300rpm'de 5dk.santrifüjlendi. Süpernatan atıldıktan sonra pelletteki hücreler 1 ml ortam ile süspanse edilerek hücre sayımı yapıldı. Hücre sayımı %0,4'lükTrypan Blue/PBS çözeltisi kullanılarak *Neubauer-Improved* lamında mikroskobik olarak yapıldı. Tüm deneyler için gereken hücre miktarı 6 ve 96 kuyulu, 25 cm^2, 75 $cm^{2'}$lik kültür kaplarına istenen sayılarda ekildi.

3.6.4. Hücre Canlılık Analizi

Yöntem Prensibi:

Yöntem prensibi metabolik olarak aktif olan hücrelerde mitokondriyal süksinat dehidrogenaz enziminin sarı tetrazolyum tuzu MTT'yi (3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) mor renkli formazan kristallerine dönüştürmesine dayanmaktadır. Bu hücresel indirgeme piridin nükleotid kofaktörleri olan NADH ve NADPH'la ilişkilidir. Oluşan formazan kristalleri 0.01 M HCl / %10 SDS ile çözündürülerek oluşan mor renkli çözelti spektrofotometrik olarak ELISA okuyucuda ölçülür (124-125).

Şekil 8. Canlı hücreler tarafından MTT'nin formazan tuzuna metabolizasyonu

Yöntem:

3.6.4.1 MTT Testine Uygun Hücre Sayısının İncelenmesi

Hücreler 96 kuyulu plaklara 0,4-0,6-0,8-1x10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi. Hücre adezyonu ve hücre sayısı duplikasyonu için 24 saat beklendikten sonra ortam içerikleri istenen konsantrasyonlarda100µM Etoposit içeren ortamlar ile değiştirildi. İnkübatörde istenen sürelerde (24-48-72 saat) inkübasyon gerçekleştirildikten sonra üreticinin talimatlarına göre MTTcanlılık analizi gerçekleştirildi. Elde edilen verilere göre hücre canlılığını %50 oranında inhibe edebilen EGCG dozundaki hücre sayısı ileriki denemelerde kullanılmak üzere seçildi.

3.6.4.2 Hücre Ölümünü Tetikleyen EGCG Konsantrasyonun ve İnkübasyon Süresinin Doğrulanması

Hücreler 96 kuyucuklu plaklara 0,6x10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi. Hücre adezyonu ve hücre sayısı duplikasyonu için 24 saat beklendikten sonra ortam içerikleri istenen konsantrasyonlarda (0-50-100µM) EGCG ve pozitif kontrol olarak kullanılan 1µM Stausporin içeren ortamlar ile değiştirildi. İnkübatörde istenen sürelerde (24-48 saat) inkübasyon gerçekleştirildikten sonra üreticinin talimatlarına göre analizi gerçekleştirildi. Elde edilen verilere göre %50 hücre canlılığını inhibe edebilen etkin EGCG dozu ve inkübasyon süresi ileriki denemelerde kullanılmak üzere seçildi.

3.6.5. Akış Sitometrik Analiz

Yöntem Prensibi:

Yöntem apoptoz sırasında Annexin-V ve membran bütünlüğü bozulmuş hücre içine giren Propidiumiyodid (PI) floresan boyalarının moleküllere bağlanması ile apoptotik/nekrotik hücrelerin belirlenmesi temeline dayanmaktadır. Apoptotik hücre ölümü sırasında hücremembranının iç yüzeyinden dış yüzeyine dönen bir membran fosfolipidi olan fosfatidil serin moleküllerinin Ca^{+2} iyonu varlığında floresan boya Annexin-V ile bağlanması sonucu apoptotik hücre ölüm yüzdesi belirlenmektedir. Sağlıklı hücrelerde hücre içine giremeyen, membrandan geçemeyen ve DNA'ya bağlanamayan PI boyası ise hücre membran bütünlüğünün bozulması ile hücre içine geçerek DNA'ya bağlanarak nekrotik hücre ölüm yüzdesini belirtmektedir (126-128).

Yöntem:

6-kuyulu kültür kaplarının kuyucuklarına $5x10^5$ hücre/kuyucuk ekim yapıldı.24 saat beklendikten sonra kuyucukların ortamları 0-100µMkonsantrasyonlarda EGCG ve 10Ü/ml SüperoksidDismutaz (SOD) içeren (örnek) ve EGCG-SOD içermeyen (kontrol) ortamlarla değiştirildi. 24 saat süre ile inkübasyon gerçekleştirildi.6-kuyulu kültür kaplarının içerdiği besi ortamları ayrı tüplere aktarıldı. Hücreler tripsinize edilerek kaldırıldı ve kendi tüplerine aktarıldı. Kuyucuklar son olarak PBS ile yıkandı ve kendi tüplerine aktarıldı. Hücre süspansiyonu 1300rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatan atıldı ve her bir pellet *FITC Annexin-V ApoptosisDetection Kit 1* içeriğinde olan 1 ml 1X Bağlanma Tamponu ile süspanse edildi. Her bir tüpten 100'er ul ayrı bir tüpe aktarıldı ve üzerine Propidim İyodür Boyama Solüsyonu ve FITC-Annexin V Boyama Solüsyonundan 5'er ul eklendi ve tüpler karanlıkta 15 dakika inkübe edildi. Her bir tüpe 400µl 1X Bağlanma Tamponu ilave edildi ve Akış Sitometride okuma gerçekleştirildi.

3.6.6. Western-Blot analizi

Yöntem Prensibi:

Bir hücre topluluğunda veya doku homojenatında ilgilenilen bir proteinin, SDS jel elektroforezi ile molekül ağırlığına göre ayrımlanması sonrası o proteine özgül antikorlar kullanılarak belirlenmesi temeline dayanmaktadır (129-133).

Yöntem:

3.6.6.1 Hücre Lizizi

Hücrelerin üst fazları falkon tüplere alınıdıktan sonra hücreler scrapper yardımı ile kaldırılarak yine aynı falkon tüplerde toplandı. PBS ile birkaç kez yıkama yapılarak kalan hücreler de toplandı. 25°C de 1300 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Hücre peletleri 1 ml PBS ile süspanse edilerek ependorf tüplere toplandı. Ependorflar +4C de 2500 rpm de 5 dakika santrifüjlenip süpernatantlar aspire edildi. $2x10^6$ hücre/ 100 µl liziz tamponu (50 mMTris-Cl PH 7.4, %1 Triton X-100, %0.1 SodyumDeoksikolat, %0.1 SDS, 150 mMNaCl, 1 mM EDTA PH 8.0, Proteaz İnhibitör Kokteyli 1X) olacak şekilde hücre pelleti buz üstünde süspanse edildi. Süspansiyonlara %25 güçte 20sn süreyle sonikasyon uygulandı. Süspansiyonlar buz üzerinde 30 dakika inkübe edildikten sonra+4°C de 14000 rpm de 20 dakika santrifüj edildi. Elde edilen pelet mitokondriyal, süpernatant ise sitozolik farksiyon olarak ayrıldı. Sitozolik fraksiyonlar farklı eppendorf tüplere alındıktan sonra -80°C'de saklandı (141).

3.6.6.2. BCA Protein Tayini

Yöntemin prensibi:

Alkali koşullarda protein tarafından Cu^{+2} iyonunun Cu^{+1} iyonuna indirgenmesi sırasında BCA reaktifinin renk değiştirmesine dayanır (132).

Yöntem:

Lize edilen hücrelerin sitozolik fraksiyonlarındaki total protein konsantrasyonlarının belirlenmesi için BCA (Bikinkoninik asit) protein tayini *(Thermo-Pierce BCA kit)* yöntemi uygulandı. Örnekler ve 2,0-0,025 mg/ml arası değişen konsantrasyonda BSA standartları aynı plakaya 25 ul olacak şekilde pipetlendi ve her bir örnek 225 ul BCA reaktifi ile karıştırılarak plaka 37ºC'de 30dk. bekletildi. Süre sonunda plaka okuyucuda kolorimetrik olarak 562 nmde okuma gerçekleştirildi. Elde edilen absorbans verilerine karşılık gelen BSA

standardkonsantrasyonları ile standard grafiği çizildi. Standard grafiğinden elde edilen y=ax+b denklemi kullanılarak örneklerin total protein konsantrasyonları hesaplandı.

3.6.6.3.Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE):

Yöntemin prensibi:

Elektrik akımı altında proteinlerin indirgeyici ajanlar kullanılarak molekül ağırlıklarına göre ayrılmasına dayanır (135).

Yöntem:

Bu çalışmada, %12'lik ayrımlayıcı jel (1.5M Tris-Cl 4X (pH8.8) / SDS, %40'lık 29:1 akrilamid-bisakrilamid karışımı, dH_2O, %10 APS, TEMED)ve %5'lik paketleyici jel (0.5M Tris-Cl 4X (pH 6.8) / SDS, %40'lık 29:1 akrilamid-bisakrilamid karışımı, dH_2O, %10 APS, TEMED)kullanıldı. Örnekler jel kuyucuklarına yüklenmeden önce 2X yükleme tamponu (4X Tris-CL, pH6.8/ SDS, %4 SDS, %20 Gliserin, 2 ml 2-Merkaptoetanol, %0.001 bromfenol mavisi, dH_2O) ile karıştırılarak 95°Cderecede 5dk.denatüre edildi. Denatüre örnekler jel kuyucuklarına yüklendikten sonra jel tankı1X Yürütme Tamponu ile (0.025 M Tris,%0,1 SDS, 0.192 M Glisin, pH8.3) dolduruldu. Elektroforez 80V'da 2.5-3 saat sürdürüldü.

3.6.6.4.Semi-dry Transfer

Yöntemin prensibi:

Jel boyunca protein ağırlıklarına göre ayrımlanmış olarak bulunan protein bantlarının elektrik akımı altında pozitif yüklü bir yüzeye aktarımına dayanır. Pozitif yüklü yüzey olarak nitroselüloz veya PVDF membran kullanılabilir (136).

Yöntem:

Nitroselüloz membranve Whatman kağıtları doğrudan transfer tamponunda (1X TOWBIN Transfer Tamponu (0.025 M Trizmabaz, 0.192M Glisin, %20 Metanol) ıslatıldı. En alta Whatman – membran – jel –Whatman olacak şekilde sandviç sistemi şeklinde sıralandı. Bio-Rad Turbo transfer cihazında "*Standard SD*" modu seçilerek 30dk. daproteinlerin membrana transfer olması sağlandı.

3.6.6.5. Membran Bloklama ve Antikor ile Muamele Etme

Yöntemin prensibi:

Bloklama işlemi membran üzerinde bulunan total proteine antikorun özgül olmayan bir şekilde bağlanmasını önlemek amacı ile uygulanmaktadır. Epitopları %3-5 yağsız süt tozu ile kapatılması ile antikor ilgilenilen proteine daha özgül şekilde bağlanmaktadır.

Yöntem:

Nitrosellüloz membranlar bloklama solüsyonu (%5 yağsız süttozu 1X TBS-T(100 mMTris, 1.4 M NaCl, pH 7.4, %0,1 Tween-20) ile oda sıcaklığında 1 saat düşük devirde çalkalandı.Bloklama sonrası membranlar 1XTBS-T ile 2 kere çalkalandı. Antikor çözeltileri %3 süttozu içeren 1X TBS-T de hazırlandı. Kullanılan primer antikorlar için önerilen sürelerde ve konsantrasyonlarda antikor muamelesi yapıldı (+4 derecede gece boyu). Membran 1XTBS-T ile 1x15dk. 3x5dk.yıkandı. Sekonder antikor çözeltileri %5 süttozu içeren 1X TBS-T de hazırlandı. Kullanılan sekonder antikor için önerilen sürelerde ve konsantrasyonlarda antikor muamelesi yapıldı. Membran 1XTBS-T ile 1x15dk., 3x5 dakika yıkandı**.** Karanlıkta membran başına 1 ml ECL Plus film solüsyonu (A:B 40:1, 1000ul A + 25 ul B) eklenerek AGFA Developer film banyo cihazında görüntü alındı.

3.6.7. Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Apoptotik Gen Profilinin İncelenmesi

Yöntemin Prensibi:

DNA amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalin ölçülmesi ile kantitatif sonuç verebilen bir PCR yöntemidir. Çift zincirli DNA'ya bağlandıkları zaman floresan sinyal veren boyalar (örneğin, cybergreen) kullanılarak amplifikasyona bağlı DNA artışı floresans miktarı ile ölçülmektedir.(138)

Yöntem:

Yöntem hücre topluluğundan total RNA izolasyonu, elde edilen mRNA dizilerinden cDNA sentezi ve apoptoz paneli ile gerçek zamanlı cDNA amplifikasyonu basamaklarını içermektedir.

3.6.7.1 . RNA izolasyonu

Yöntemin prensibi:

Yöntem hücre topluluğu veya doku gibi biyolojik materyallerden total RNA'nın saflaştırılmasına dayanmaktadır (139).

Yöntem:

Bu çalışmada 0-100uM EGCG konsantrasyonu ve 24 saat inkübasyon süresi uygulanmış hücreler hücre kazıyıcı ile toplanarak *HighPure RNA Isolation Kit* ile üreticinin talimatlarına göre total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. UV spektrofotometrede A_{260} / A_{280} oranına bakılarak RNA kalite kontrolü gerçekleştirildi. Kalite kontrolü $A260/A_{280}$ oranına göre yapıldı. Oranın 1,8 ile 2,0 arasında olan örnekler kaliteli kabul edildi.

3.6.7.1.cDNA Sentezi

Yöntemin Prensibi:

mRNA dizilerinden çeşitli primerler (oligo-dT, randomhexamer, sekansa özgül) ve revers-transkriptaz enzimi kullanılarak komplementer dizinin sentezlenmesiyle çift zincirli cDNA dizilerinin elde edilmesine dayanır (140).

Yöntem:

Total RNAdaki mRNA dizilerinden Revers Transkriptaz PZR yöntemi ile randomhexamerprimerleri kullanılarak her bir koşul için Transcriptor First StrandcDNASynthesisKit ile cDNA sentezi PZR cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.

3.6.7.2.Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Yöntemin Prensibi:

Aynı yolakta ya da sistemde görevli gen dizilerinin ekspresyon profili oluşturmak, eş zamanlı olarak çok sayıda genin ekspresyon düzeylerini belirlemekamacıyla gen spesifik probların plastik, silikon benzeri katı bir yüzeye tutturularak oluşturulan sistemlerde cDNA amplifikasyonuna dayanmaktadır (140).

Yöntem:

*Real Time Ready Human Apoptosis*Panel, 96 kullanılarak Real-Time PZR ile cDNA amplifiaksyonu LightCycler 480 cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. İki farklı koşul için iki adet 96 kuyulu plaka kullanıldı. Her bir kuyucukta bulunan özgül problar (84 adet pro- ve anti-apoptotik gen, 12 kontrol probu) sayesinde istenen genlerin cDNA amplifikasyonu gerçek zamanlı olarak takip edildi. cDNAamplifikasyonunun kalite kontrolü *"melting curve"* (erime eğrisi) analizi ile gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar internet ortamında *(http://www.SABiosciences.com/PZRarraydataanalysis.php)* işlenerek iki koşula ait gen profilleri çıkarıldı. Her bir reaksiyondan elde edilen Ct değerleri ΔΔCt yöntemine göre analiz edildi. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülüyle de ekspresyon değişim miktarları hesaplandı. Gen profillerinin karşılaştırılması ile apoptotik süreçte etkin rol oynayan genler susturulmak üzere seçildi.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1 AKT1	2 APAF1	3 AVEN	4 BAD	5 BAG1	6 BAK1	7 BAX	8 BBC3	9 BCL2	10 BCL2L1	11 BCL2L10	12 BCL2L11
B	13 BCL2L13	14 BCL2L2	15 BID	16 BIK	17 BIRC2	18 BIRC3	19 BIRC5	20 BOK	21 CAD	22 CASP1	23 CASP10	24 CASP12
C	25 CASP14	26 CASP2	27 CASP3	28 CASP4	29 CASP5	30 CASP6	31 CASP7	32 CASP8	33 CASP8AP2	34 CASP9	35 CFLAR	36 CRADD
D	37 DFFA	38 DIABLO	39 endoG	40 FADD	41 FAM96A	42 FAM96B	43 FAS	44 FASLG	45 HMGB1	46 HRK	47 HSP90B1	48 HTRA2
E	49 LRDD	50 MCL1	51 NFKB1	52 NFKB2	53 NGFR	54 PMAIP1	55 PTEN	56 REL	57 RELA	58 RELB	59 SOCS2	60 SOCS3
F	61 STAT1	62 STAT5A	63 STAT5B	64 TNF	65 TNFRSF10A	66 TNFRSF10B	67 TNFRSF10C	68 TNFRSF10D	69 TNFRSF11B	70 TNFRSF1A	71 TNFRSF1B	72 TNFRSF21
G	73 TNFRSF25	74 TNFSF8	75 TNFSF10	76 TNFSF11	77 TP53	78 TP53I3	79 TRAF1	80 TRAF2	81 TRAF3	82 TRAF5	83 TRAF6	84 TRAF7
H	85 ACTB	86 B2M	87 GAPDH	88 HPRT1	89 RPL13A	90 18S	91 YWHAZ	92 RT+	93 RT+	94 RT+	95 RT-	96 RT-

H1 – H7: Reference genes
H8 – H10: RT positive control
H11 – H12: RT minus control

Tablo 2. *Human Apoptosis Panel*, 96 immobilize edilmiş gen-spesifik probların plak düzeni.

3.6.8. Transfeksiyon

3.6.8.1.EGFP-aktin Plasmidinin Çoğaltılması ve HCT116 Hücrelerine Transfeksiyonu

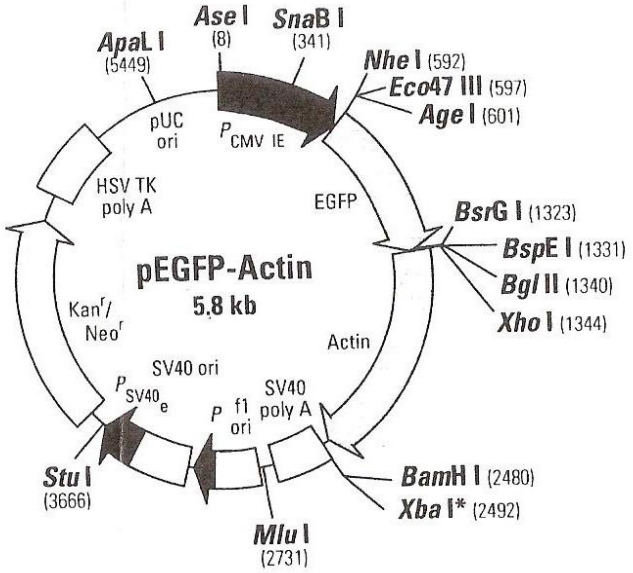
3.6.8.1.1. Plasmid Transformasyonu

Yöntem prensibi

Replikasyon orijini bulunduran bir plasmid DNA'nın DNA alabilme özelliği bulunan bir bakteride (kompotent) amplifike edilmesi işlemine dayanır. Bu işlemde genelde antibiyotik direnç geni bulunduran plasmid DNA kullanılır, bu plasmidi bulunduran bakteri antibiyotiğe duyarlı hale gelir ve bu sayede plasmidi bulunduran bakteri kolonisinin seleksiyonu sağlanır (140).

Yöntem:

EGFP-aktin plasmidini çoğaltmak amacıyla kompetent E. coli DH5α kullanılarak bakteriyel transformasyon yapıldı. Bu işlemde öncelikle -80°C'de bulunan kompetent hücreler çıkarılarak buz üzerinde çözülmeleri sağlandı. Çözünen kompetent hücrelerden 100 µl alınıp üzerine 100ng plasmidden eklendi. Buz üzerinde 45 dkinkübe edildi. Daha sonra 2dk. 42°C'lik su banyosunda bekletildi ve hemen buza alındı. Sonrasında bakterilerin antibiyotik dayanıklılık genini eksprese edebilmeleri için bakterilere 250µl SOC *(Super Optimal broth with Catabolite repression)* besi yeri eklendi.1 saat boyunca 37°C'de çalkalanarak inkübe edildi. İnkübasyon sonrası bakteriler 100 µg/mlKanamisin içeren katı LB(Lysogenybroth) besi yerine ekildi. Gece boyu 37°C'de inkübe edilerek transformasyon olan bakterilerin üreyip koloni oluşturması sağlandı. İkinci gün ise oluşan kolonilerden pipet yardımıyla örnek alınarak 30 µg/mlKanamisin içeren sıvı LB-broth besiyerine ekildi. Gece boyu 37°C'de inkübe edilerek bakterilerin çoğalması sağlandı. Çoğalan bakterilerden Nucleospin Plasmid izolasyon kitinin protokolüne göre plasmid DNA izolasyonu gerçekleştirildi.



Şekil 9. EGFP-aktin plasmidi

3.6.8.1.2. EGFP-aktin Plasmidinin HCT-116 Hücrelerine Transfeksiyonu

Yöntemin prensibi:

Transfeksiyon, ökaryotik hücre ya da doku kültüründeki hücrelerin çeşitli DNA aktarım teknikleri ve ajanlar ile plasmid transformasyonuna denir. (138)

Yöntem:

12 mmlik yuvarlak camlar 24-kuyulu plakanın kuyularına yerleştirildi. Camlar üzerine 100 ul Fetalbovine serum cam dışına taşmayacak şekilde (bombe şeklinde kalacak) kondu. 5-10 dk beklendi. Cam üzerindeki serum çekildikten sonra 25,000 hücre/100 ul besi ortamı olacak şekilde hazırlanan hücre süspansiyonu cam dışına taşmayacak şekilde koyuldu ve dikkatlice inkübatöre kaldırıldı. 4-5 saat süreyle hücrenin adhezyon süreci izlendi. Hücrelerin adherent olduğundan emin olduktan sonra 400 ul besi ortamı daha kuyucuğa eklendi.24 saat sonra plasmid transfeksiyonu protokolü başlatıldı:

24 saat sonra hücre üzerindeki besi ortamı serumsuz ve antibiyotiksiz OPTI-MEM ile değiştirildi. Ayrı bir eppendorf tüpe tek kuyucuk için 100 ul OPTI-MEM + (1,5- 3- 4,5ul Hiperfect + 0.25ug plasmid eklendi. Düşük devirde vortekslenerek karıştırıldı. 10-15 dk. transfeksiyon komplekslerinin oluşumu için beklendi. Üzerlerinde 500 ul OPTI-MEM olan hücreler üzerine transfeksiyon karışımı eklendi. Plate yavaşca sallanarak komplekslerin homojen dağılımı sağlandı. 12 saat sonra camlar üzerindeki hücreler %3 formaldehit ile fiksasyon ve DAPI boyamasından sonra florasan mikroskopi ile izlendi.

3.6.8.1.3. Hiperfect Transfeksiyon Reaktifi ile Plasmid Transfeksiyonu

Hücreler 24-kuyulu plakanın kuyucuklarına $5x10^4$ hücre/kuyucuk olacak şekilde saat camları üzerine ekildi. Hücre adezyonu ve hücre sayısı duplikasyonu için 24 saat beklendikten sonra ortam içerikleri üreticinin talimatlarına göre kuyucuk başına 100ul OPTI-MEM içerisinde 1.5-3.0-4. 5 µl Hiperfect ve EGFP-aktin plasmidi içeren ortamlar ile değiştirildi. İnkübatörde 24 saat inkübasyon gerçekleştirildikten sonra camlar üzerindeki hücrelerin fiksasyonu işleminin ardından floresan mikroskop ile görüntüler alındı. Elde edilen görüntülerde GFP sinyali orta düzeyde olan kuyucuktaki Hiperfect miktari (3µl) siRNAtransfeksiyonu denemelerinde kullanılmak üzere seçildi (138).

3.6.9. siRNA Transfeksiyonu:

Yöntemin prensibi:

RNA inteferans olarak adlandırılan 18-21 nükleotidlik dsRNA dizilerinin hücreye dışarıdan verilmesiyle bu RNA dizisine komplementer mRNA'nın yıkılımı ve önceden belirlenmiş genlerin susturulmasıdır (138).

Yöntem:

6-kuyucuklu plakalara 5 x 10^5 hücre/kuyucuk ekim yapıldı. 100 µL OPTI-MEM, 12 µL transfeksiyon ajanı ve belirlenen gen ürününe ait siRNAkonsantrasyonu 5 nM olacak şekilde karıştırılarak 15 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.Bu süre sonunda bu karışım kuyucuklara aktarıldı ve hücreler normal hücre kültürü koşulları altında 24 saat inkübe edildi. siRNA içeren ortam kuyucuklardan atıldıktan sonra 100 µM EGCG ile 24 saat inkübasyon gerçekleştirildi. İnkübasyon sonucunda hücreler kuyucuklardan toplandı. Hücre lizizi ve RNA izolasyonunun ardından spesifik kaspaz-8 primeri ile Real time- PZR analizi gerçekleştirildi.

3.6.10. Gen Susturumundan Sonra Apoptotik Hücre Ölümünün Analizi

Gen susturum işlemi gerçekleştirildikten sonra elde edilen hücrelerde Annexin-V Akış SitometrikApoptoz / Nekroz Analizi tekrar çalışıldı.

3.6.11. DCFDA ile Hücre içi ROT Ölçümü

Yöntemin prensibi:

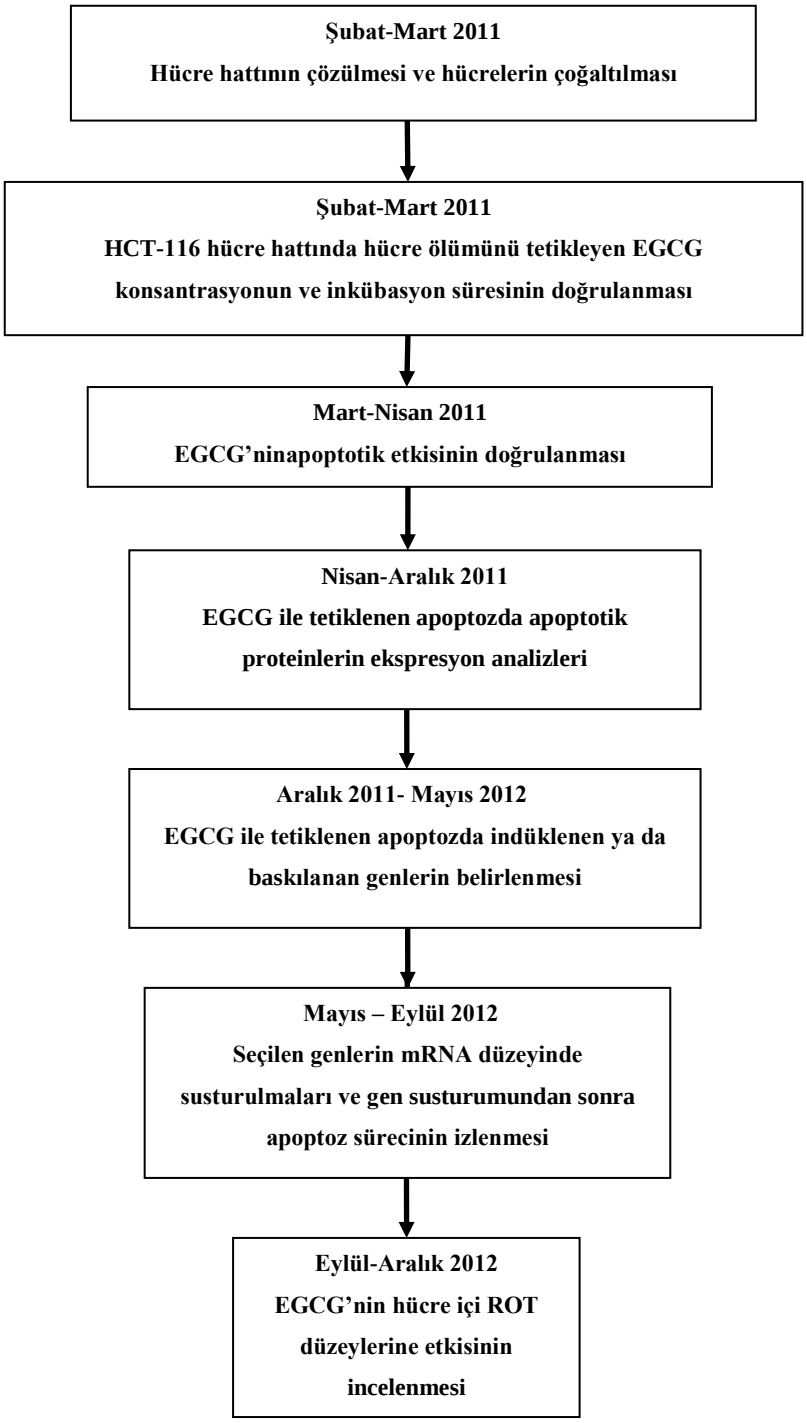
Reaktif Oksijen Türlerinin belirlenmesinde kullanılan bileşiklerden DCFH-DA'nın hücre içinde asetat grupları esterazlar tarafından uzaklaştırılıp, oksidasyon meydana geldikten sonra floresans emisyon vermesine ve bu emisyonun floresan akış sitometrisi, floresan mikroskop veya mikroplaka okuyucuda ölçülmesine dayanan bir yöntemdir (150).

Yöntem:

HCT-$116^{Bax+/+}$ hücreleri; 6-kuyulu kültür kaplarına ekildi. HCT-116 hücreleri 24 saat 37°C'de %5 CO_2'li inkübatörde %10 FBS içeren Mc Coy's 5A besi ortamı ile inkübasyona bırakıldı. %70 konfluent olunca ortama atıldı yerine %1 FBS içeren fenol redsiz ortam konuldu ve 24 saat beklendi. 24 saat sonunda üstü atıldı ve % 1 FBS içeren 100µM EGCG+ SOD'lu besi ortamı eklendive 24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Sürenin bitiminde

kuyucuklar tripsinize edildi ve PBS ile yıkanarak FACS tüplerine alındı. Tüpler 1500 g 5 dakika santrifüj ile çöktürülüp ve hücre ortamı uzaklaştırıldı.. Hücreler üzerine son konsantrasyonu 10 µM olacak şekilde fenol redsiz ortamda DCFH-DA eklendi.30 dakika inkübasyona bırakıldı.İnkübasyon sonunda tekrar santrifüj edilen tüplerin üst kısmı atıldı ve 500 µl PBS ile yıkandı. PBS ile ikinci kez santrifüj edilerek sonrasında üst kısım atıldı. Daha sonra tüpler üzerine 1ml PBS eklendi ve 10.000 hücre, saniyede 250-300 hücre geçecek şekilde, 530 nm deBD Facs-Calibur Akış sitometrisiyle analiz edildi. Histogram plot analizi yapılarak pozitif ve negatif kontrol hücrelerinde elde edilen eğrinin ortalama FL1 değerinin kayması ölçüldü. Sonuçlar geometrik ortalama (geometrik mean) cinsinden hesaplandı.

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi:



3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Her deney koşulu için hücreler 3'er kez ekildi ve deneyler en az 3'er kez tekrarlanarak, elde edilen veriler Student's t test analizi SPSS 15.0 programı ile $p<0.05$ anlamlılık düzeyinde negatif kontrolden elde edilen veriler ile karşılaştırılarak istatistiksel olarak değerlendirildi.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları:

Çalışma in vitro çalışmadır. Bu yüzden in vivo ve klinik çalışmalarla desteklenmelidir.

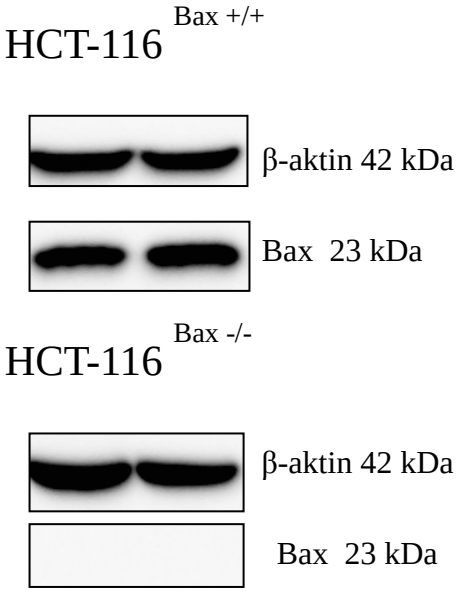
3.10. Etik Kurul Onayı

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu 18 Haziran 2009 tarih ve 12.14.2009 no.lu toplantısında; 110/2009 protokol numaralı çalışmamızın etik açıdan sakıncalı olmadığına karar vermiştir.

4. BULGULAR

4.1. HCT-116$^{Bax+/+}$ ve HCT116$^{Bax-/-}$ Hücrelerinde Bax Protein Ekspresyonunun Doğrulanması

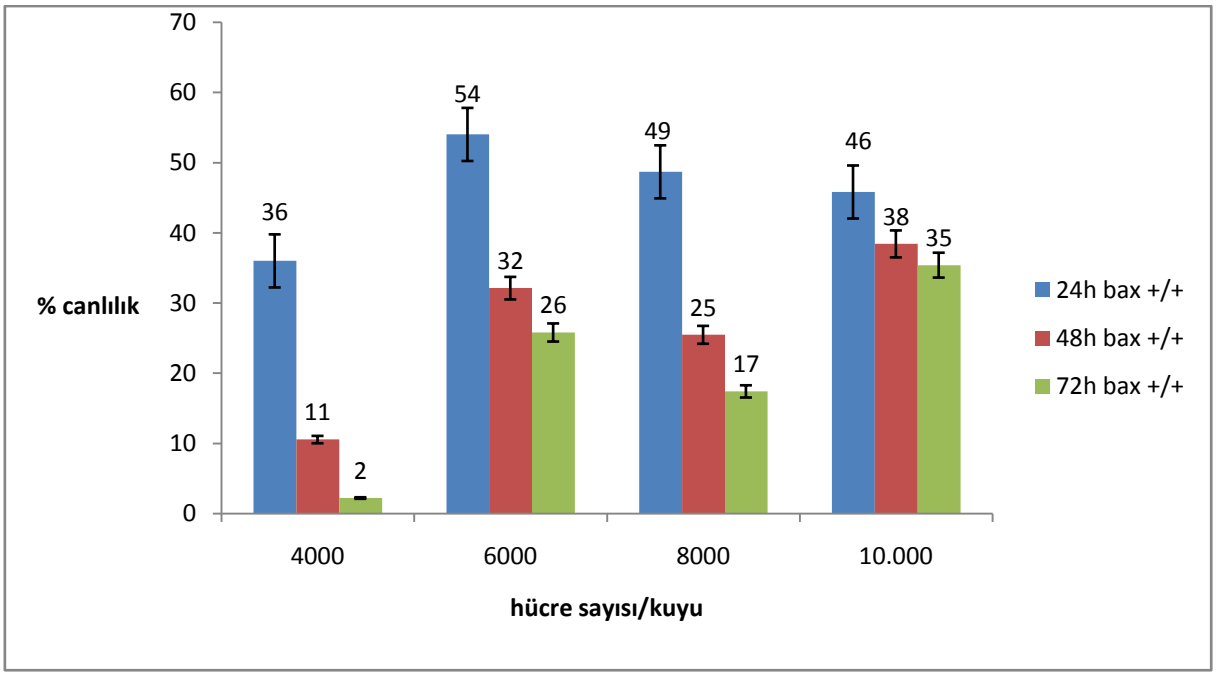
HCT-116$^{Bax+/+}$ ve HCT116$^{Bax-/-}$ insan kolorektal tümör hücre hatlarında bax protein ekspresyonunun doğrulanması amacıyla yapılan Bax proteini western-blot analizinde HCT-116$^{Bax+/+}$ hücrelerinden elde edilen örneklerde Bax protein ekspresyonu olduğu, HCT116$^{Bax-/-}$ hücrelerinden elde edilen örneklerde Bax protein ekspresyonu olmadığı gözlendi.



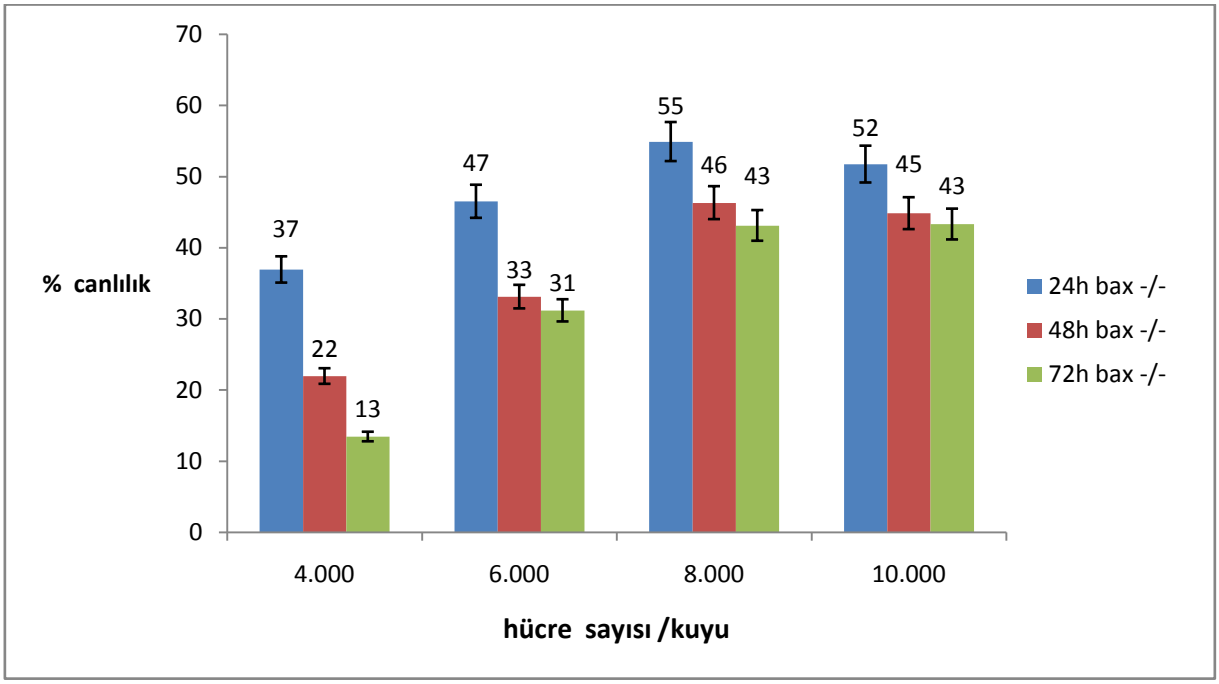
Şekil 10. HCT-116$^{Bax+/+}$ ve HCT116$^{Bax-/-}$ hücre hatlarında Bax proteini western-blot analizi X-Ray film görüntüsü

4.2. MTT Testine Uygun Hücre Sayısının Belirlenmesi:

HCT-116$^{Bax+/+}$ ve HCT116$^{Bax-/-}$ insan kolorektal tümör hücre hatlarında, 24-72 saat aralığında,MTT testinin çalışılmasına en uygun hücre sayısının belirlenmesi için 96 kuyulu plaklara 0,4-1x10^4 aralığındaki sayıda hücre ekildi. 24, 48 ve 72 saat süre ile Etoposit indüklemesi sonucunda elde edilen canlılık verileri değerlendirilerek çalışmamıza en uygun hücre sayısı saptandı. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde tekrarlanabilir ve 24 saatte %50 canlılığın elde edildiği hücre sayısının her iki hücre hattı için 6x10^{3}olduğuna karar verildi (Şekil 9a, 9b).



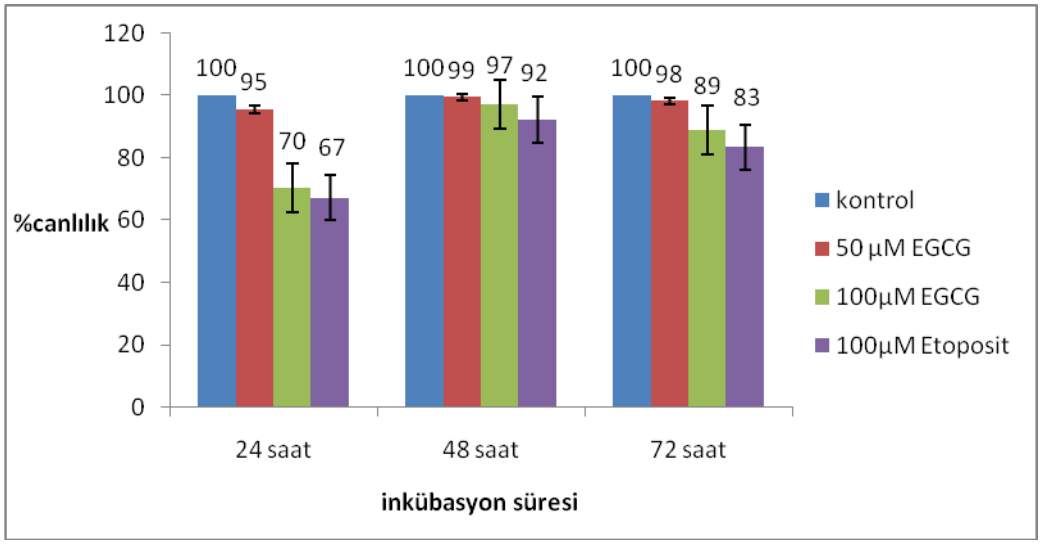
Şekil 11a. HCT-116$^{Bax+/+}$ hücre hattında 24-72 saat Etoposit ile inkübasyon sürecinde % canlılık değerlerinin değişimi (Ort±SD, her koşul 9 kez tekrarlanmıştır).



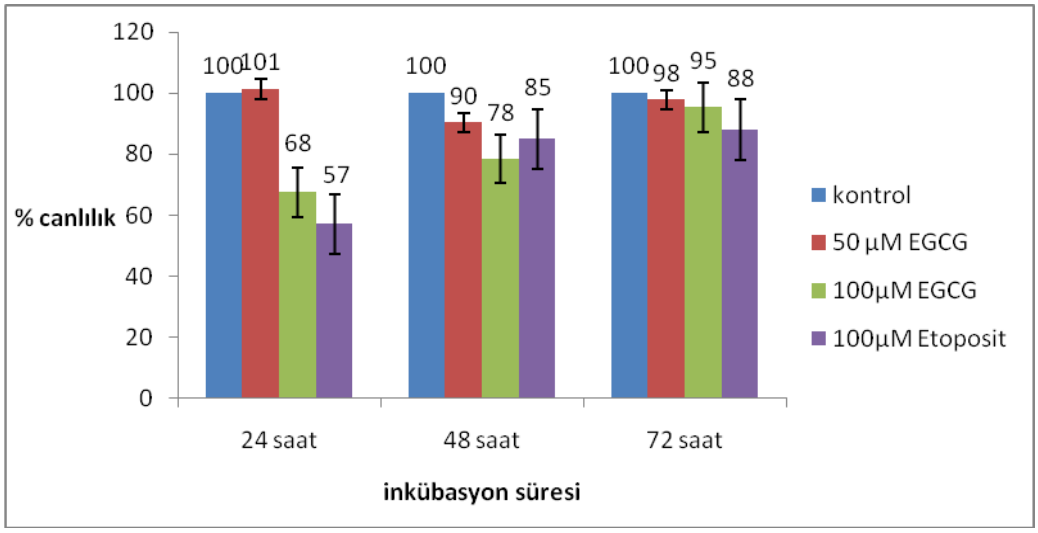
Şekil 11b. HCT-116$^{Bax-/-}$ hücre hattında 24-72 saat Etoposit ile inkübasyon sürecinde % canlılık değerlerinin değişimi (Ort±SD, her koşul 9 kez tekrarlanmıştır).

4.3. HCT-116 Hücre Hattında Hücre Ölümünü Tetikleyen EGCG Konsantrasyonun ve İnkübasyon Süresinin Doğrulanması

MTT testine ve inkübasyon sürelerine en uygun hücre sayısı belirlendikten sonra daha önceki çalışmalarımızda belirlenmiş olan (174) etkin EGCG konsantrasyon ve inkübasyon değerleri tekrar çalışılarak doğrulaması yapıldı. Bu amaçla 24 ve 48 saat inkübasyon sürelerinde 0-50-100µM konsantrasyonlarında EGCG'nin hücre canlılığına etkisi *MTT* yöntemi ile izlendi. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde; EGCG solüsyonukonsantrasyonunun, 24 saat inkübasyon süresinde %35-45 arasında canlılığın azalmasına neden olduğu belirlenerek bu konsantrasyonda deneylere devam edilmesine karar verildi (Şekil 10a, 10b).



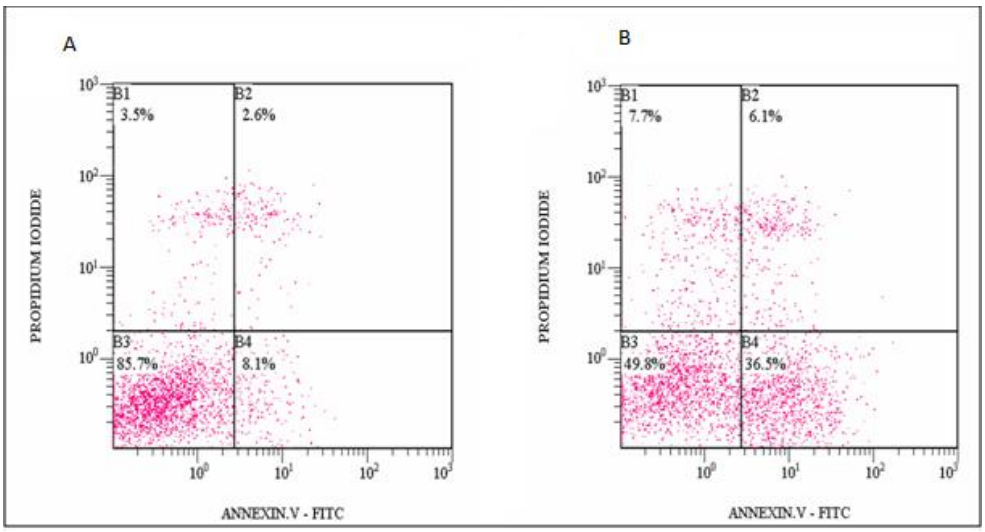
Şekil 12a. HCT-116$^{Bax-/-}$ hücre hattında 24-72 saat 100uM EGCG ile inkübasyon sürecinde % canlılık değerlerinin değişimi (Ort±SD, her koşul 9 kez tekrarlanmıştır).



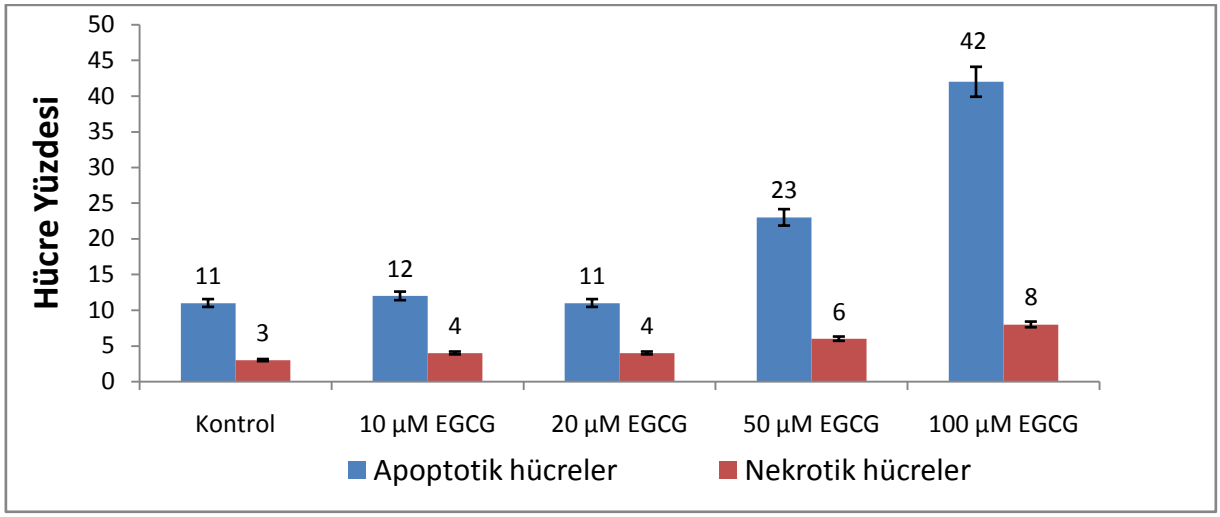
Şekil 12b. HCT-116$^{Bax+/+}$ hücre hattında 24-72 saat 100uM EGCG ile inkübasyon sürecinde % canlılık değerlerinin değişimi (Ort±SD, her koşul 9 kez tekrarlanmıştır).

4.4. EGCG'nin Apoptotik Etkisinin Doğrulanması:

0-100 µM EGCG ile 24 saat inkübasyon süresinde gerçekleşen hücre ölüm tipi (apoptotik/nekrotik) akış sitometrik Annexin-V/ PI yöntemi ile değerlendirildi. 100µM EGCG ile 24 saat inkübe edilen hücrelerde apoptoz indüksiyonu doğrulandı. EGCG uygulaması yapılmayan hücrelerin %11'inin (Şekil 11A, C) ve 24 saat 100 µM EGCG uygulaması yapılan hücrelerin %42'sinin (Şekil 11B, C) apoptotik olduğu saptandı. EGCG uygulanan hücrelerde nekrotik hücre ölümünde artış saptanmadı.



Şekil 13. HCT-116$^{Bax+/+}$ hücrelerinde 100 µM EGCG ile 24 saat inkübasyon süresinde elde edilen akış sitometrik Annexin-V/PI analiz sonuçları. A. Kontrol, B. EGCG solüsyonuuygulaması



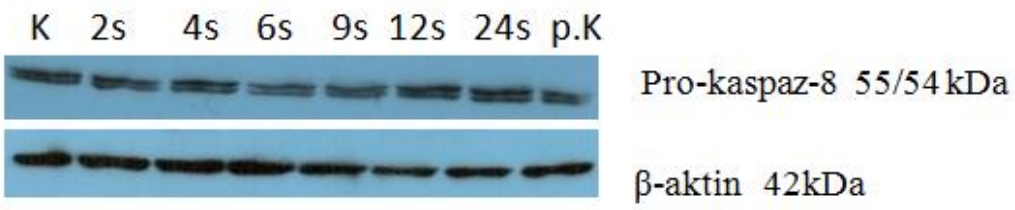
Şekil 13C. Akış sitometrik analiz sonuçlarının grafiksel ifadesi (Apoptotik hücreler, Nekrotik hücreler

4.5. EGCG'nin Kaspaz Proteinleri Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi

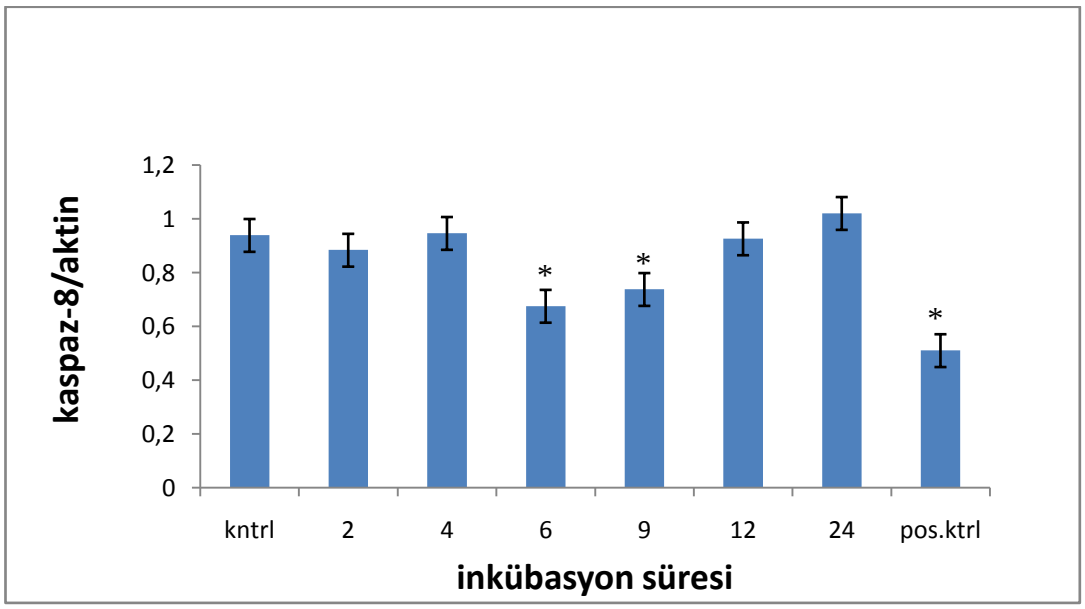
100µM EGCG'nin pro-kaspaz-8, pro-kaspaz-9, pro-kaspaz-3 ve PARP-1 proteinlerinde neden olduğu ekspresyon değişimleri 0-2-4-6-9-12-24 saatlerde western-blot analizi ile incelendi. HCT-116$^{Bax+/+}$ ve HCT116$^{Bax-/-}$ hücre hatlarında protein ekspresyonları negatif kontrol grubuna göre dansitometrik analiz ortalama değerleri ile karşılaştırıldı. Verilerin istatistiksel anlamlılığı *Student's-t-test* analizi ile $p<0,05$ anlamlılık düzeyinde değerlendirildi.

100 µM EGCG ile 0-2-4-6-9-12-24 saat inkübe edilen HCT-116$^{Bax\ +/+}$ hücrelerinin pro-kaspaz-8 ekspresyonlarında negatif kontrole göre 6. ve 9. saatlerde $p<0.041$ düzeyinde istatistiksel anlamlı azalış olduğu saptandı (Şekil 14A, B).

A



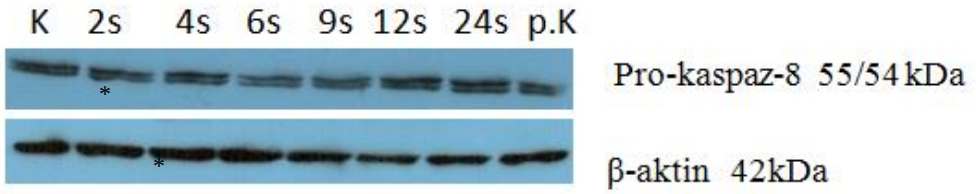
B



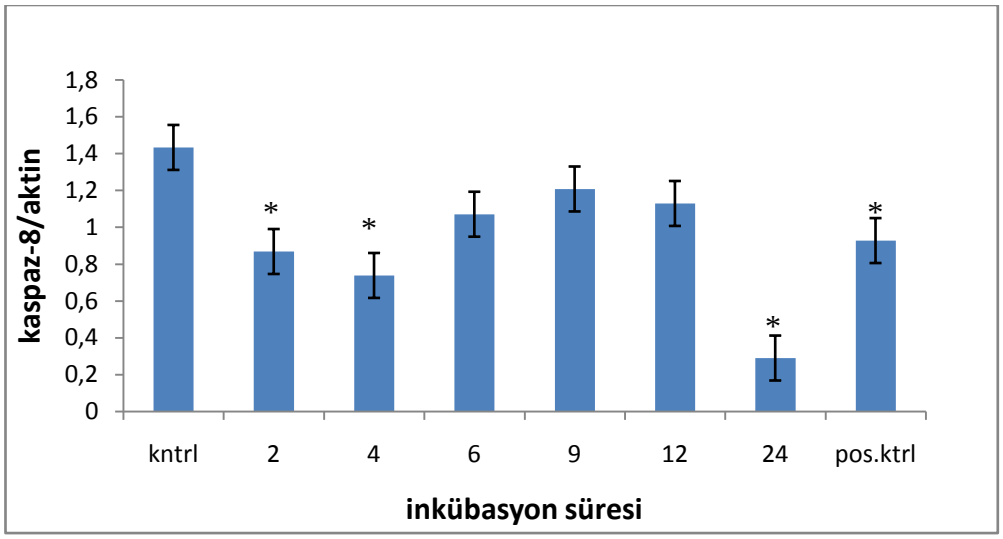
Şekil 14. HCT-116$^{Bax+/+}$hücrelerinde pro-kaspaz-8 proteinin western-blot analizi A. X-Ray film görüntüsü B. Dansitometrik analiz ile pro-kaspaz 8/Aktin oranının grafiksel ifadesi, (*$p<0.05$ düzeyinde istatistiksel anlamlılık, deneyler 6 kez tekarlanmıştır)

100 µM EGCG ile 0-2-4-6-9-12-24 saat inkübe edilen HCT-116Bax $^{-/-}$ hücrelerinin pro-kaspaz-8 ekspresyonlarında negatif kontrole göre 2. ve 4. saatlerde $p<0.038$ düzeyinde, 24. saatte ise $p<0.012$ düzeyinde anlamlı azalış gösterdiği saptandı (Şekil 15A, B).

A



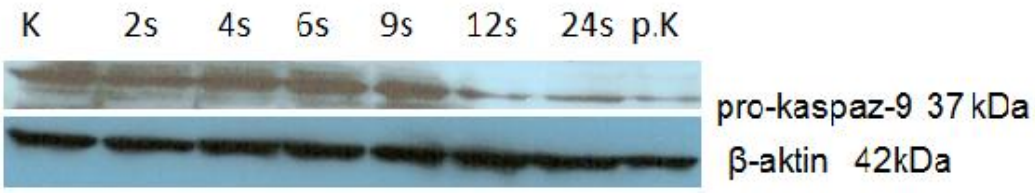
B



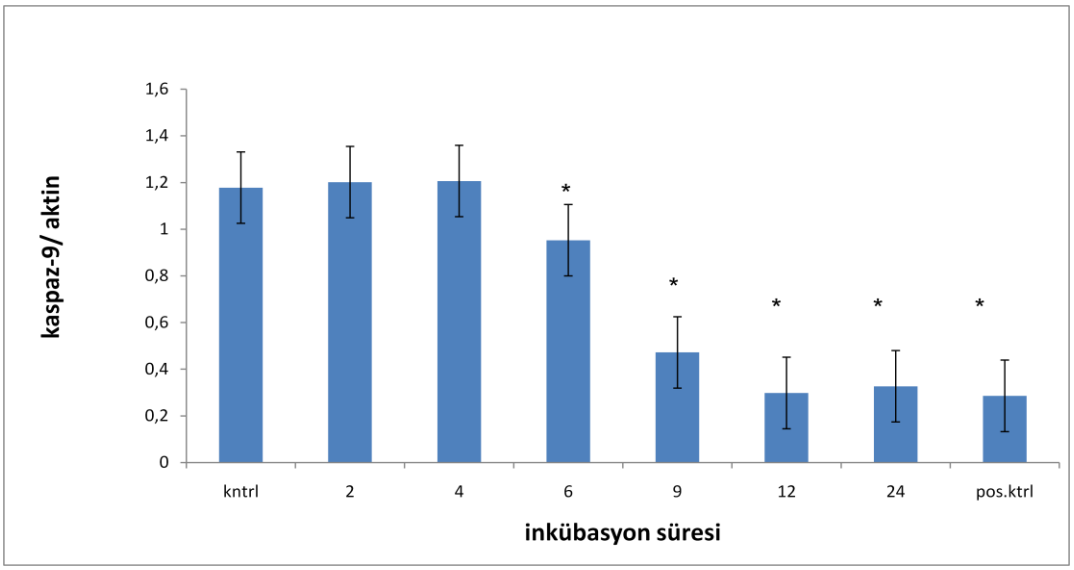
Şekil 15. HCT-116$^{Bax-/-}$ hücrelerinde pro-kaspaz-8 proteinin western-blot analizi A. X-Ray film görüntüsü B. Dansitometrik analiz ile pro-kaspaz 8/Aktin oranının grafiksel ifadesi (*$p<0.05$ düzeyinde istatistiksel anlamlılık, deneyler 6 kez tekarlanmıştır)

100 µM EGCG ile 0-2-4-6-9-12-24 saat inkübe edilen HCT-116Bax $^{+/+}$ pro-kaspaz-9 ekspresyonlarında negatif kontrole göre 6. saatte $p<0.033$ düzeyinde, 9.,12., 24. saatlerde $p<0.012$ düzeyinde anlamlı azalış gösterdiği saptandı (Şekil 16A,B)

A



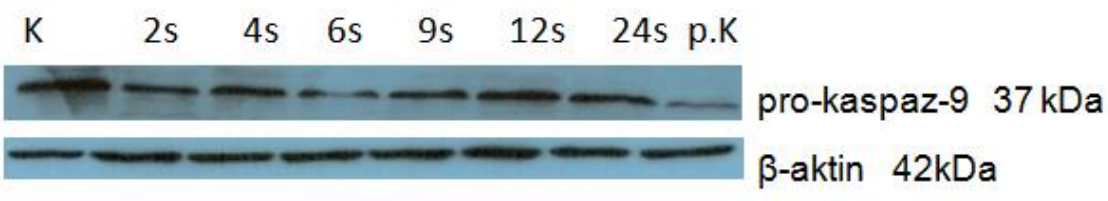
B



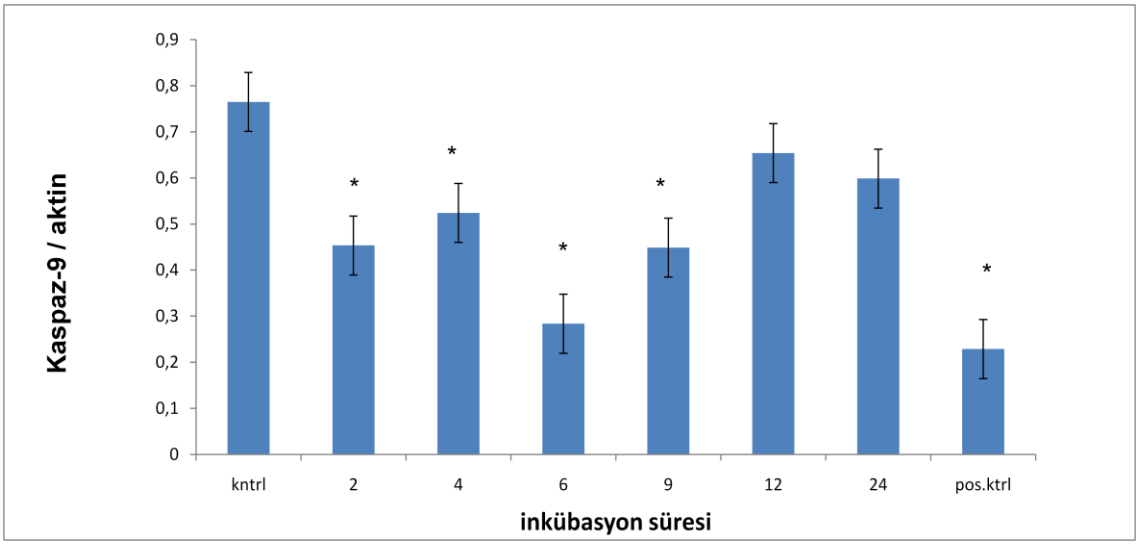
Şekil 16. HCT-116$^{Bax+/+}$ hücrelerinde pro-kaspaz-9 proteinin western-blot analizi A. X-Ray film görüntüsü B. Dansitometrik analiz ile kaspaz-9/Aktin oranının grafiksel ifadesi (*$p<0.05$ düzeyinde istatistiksel anlamlılık, deneyler 6 kez tekarlanmıştır)

100 uM EGCG ile HCT-116$^{Bax\ -/-}$ hücrelerinin 0-2-4-6-9-12-24 saat inkübasyonu sonucunda pro-kaspaz-9 ekspresyonunda negatif kontrole göre 2., 4. ve 9. saatlerde $p<0.032$ düzeyinde, 6. Saatte ise $p<0.022$ düzeyinde anlamlı azalış gösterdiği saptandı (Şekil 17A, B).

A



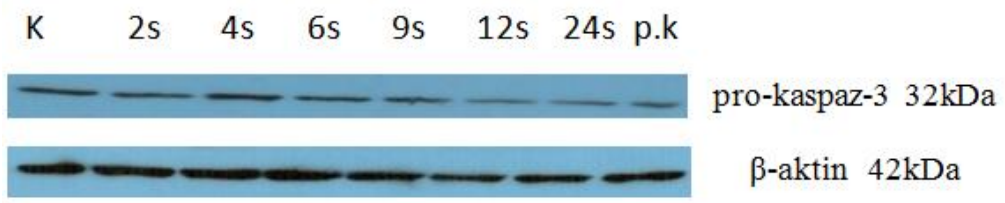
B



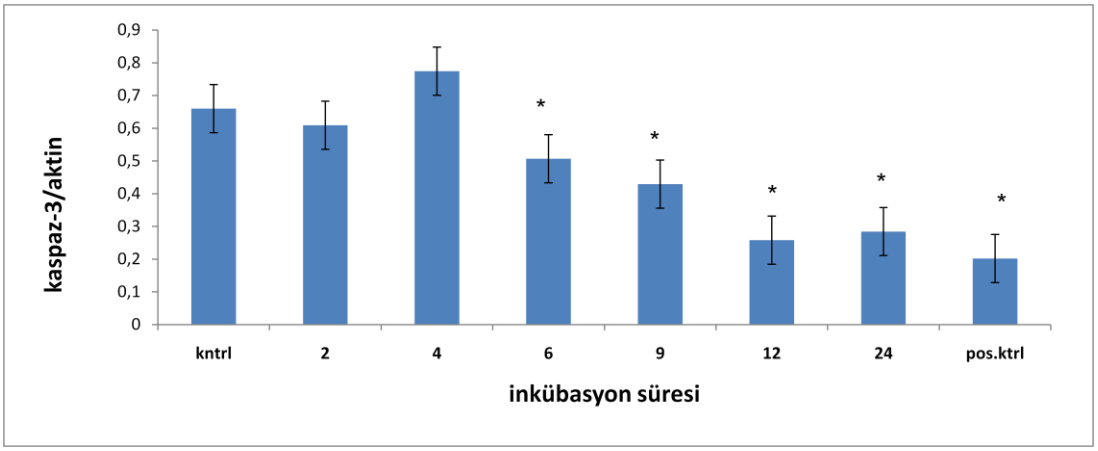
Şekil 17. HCT-116$^{Bax-/-}$ hücrelerinde pro-kaspaz-9 proteinin western-blot analizi A. X-Ray film görüntüsü B. Dansitometrik analiz ile pro-kaspaz 9/Aktin oranının grafiksel ifadesi (*$p<0.05$ düzeyinde istatistiksel anlamlılık, deneyler 6 kez tekarlanmıştır)

100 uM EGCG ile HCT-116 $^{Bax\ +/+}$ hücrelerinin 0-2-4-6-9-12-24 saat inkübasyonu sonucunda pro-kaspaz-3 ekspresyonunda negatif kontrole göre 6., 9. saatlerde $p<0.042$ düzeyinde, 12. ve 24. saatlerde ise $p<0.024$ düzeyinde anlamlı azalış gösterdiği saptandı (Şekil 18A, B).

A



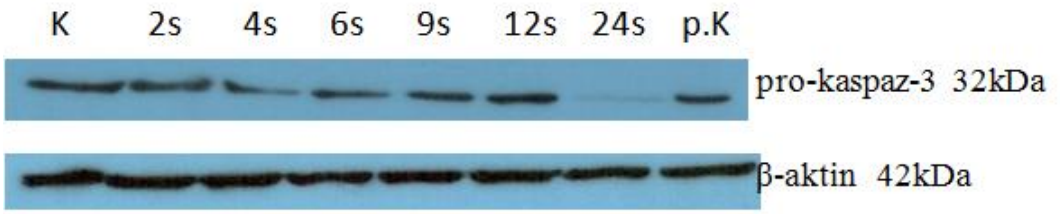
B



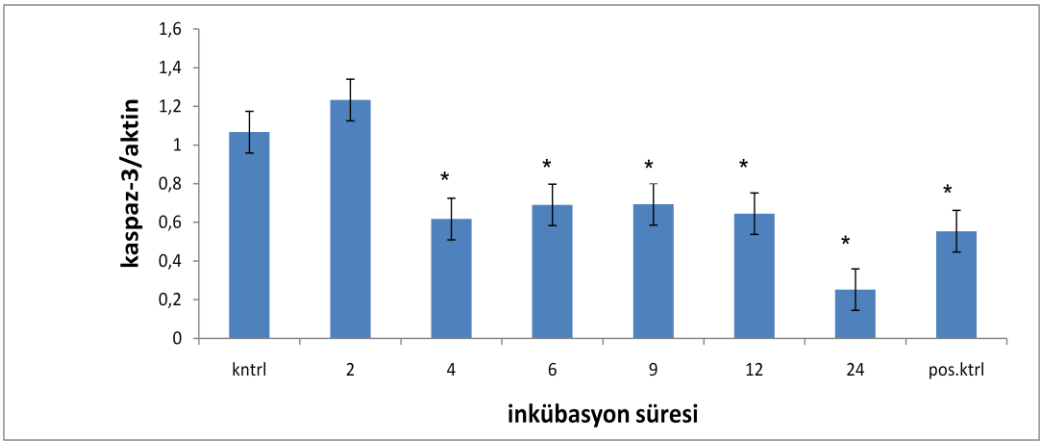
Şekil 18. HCT-116$^{Bax+/+}$hücrelerinde pro-kaspaz-3 proteinin western-blot analizi A. X-Ray film görüntüsü B. Dansitometrik analiz ile pro-kaspaz 3/Aktin oranının grafiksel ifadesi (*$p<0.05$ düzeyinde kontrole göre istatistiksel anlamlı, deneyler 6 kez tekarlanmıştır)

100 uM EGCG ile HCT-116$^{Bax\ -/-}$ hücrelerinin 0-2-4-6-9-12-24 saat inkübasyonu sonucunda pro-kaspaz 3 ekspresyonunda negatif kontrole göre 4.,6., 9 ve 12. saatlerde $p<0.032$ düzeyinde, 24. saatte ise $p<0.012$ düzeyinde anlamlı azalış gösterdiği saptandı (Şekil 19A,B).

A



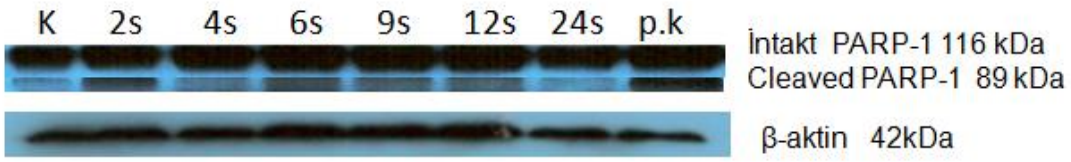
B



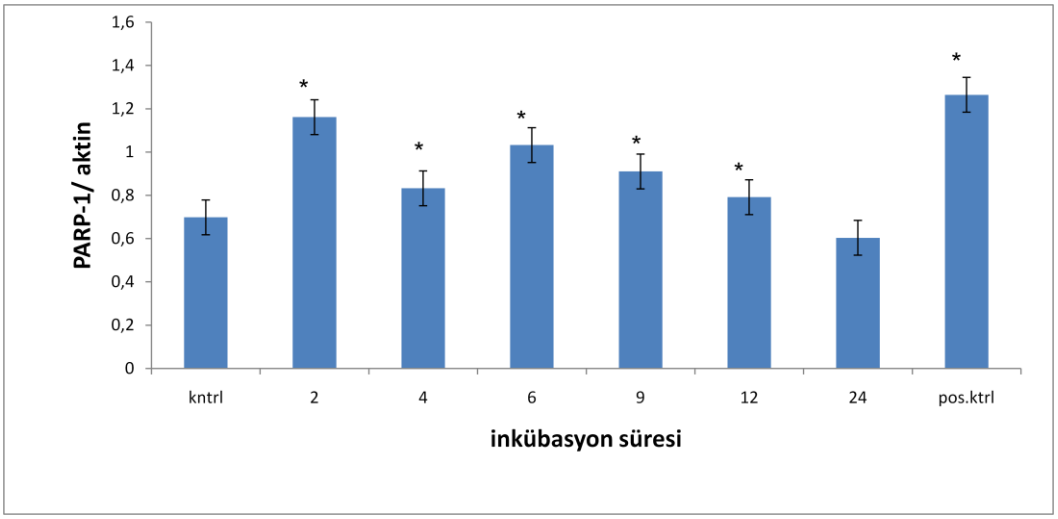
Şekil 19. HCT-116$^{Bax-/-}$ hücrelerinde pro-kaspaz-3 proteinin western-blot analizi A. X-Ray film görüntüsü B. Dansitometrik analiz ile pro-kaspaz 3/Aktin oranının grafiksel ifadesi (*$p<0.05$ düzeyinde istatistiksel anlamlılık, deneyler 6 kez tekarlanmıştır)

100 uM EGCG ile HCT-116$^{Bax\ -/-}$ hücrelerinin 0-2-4-6-9-12-24 saat inkübasyonu sonucunda *cleaved*-PARP-1 ekspresyonunda negatif kontrole göre 4., 6. ve 9. saatlerde $p<0.033$ düzeyinde, 2. ve 12. Saatlerde ise $p<0.022$ düzeyinde anlamlı artış gösterdiği saptandı (Şekil 20A, B).

A



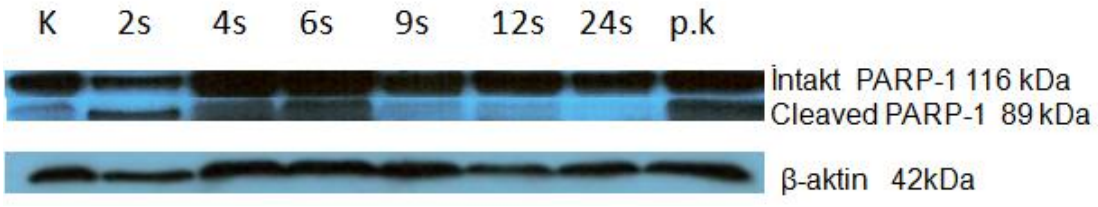
B



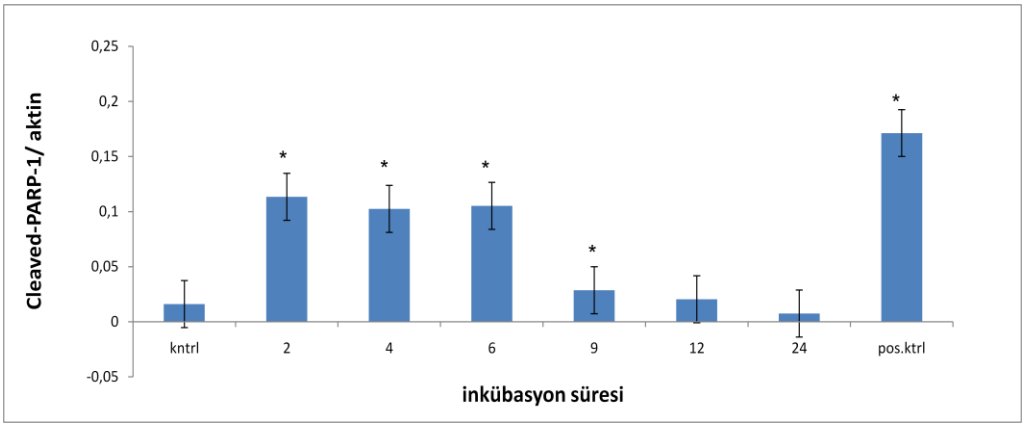
Şekil 20. HCT-116$^{Bax+/+}$ hücrelerinde PARP-1 proteinin western-blot analizi A. X-Ray film görüntüsü B.Dansitometrik analiz ile cleaved-PARP-1/Aktin oranının grafiksel ifadesi (*$p<0.05$ düzeyinde istatistiksel anlamlılık, deneyler 6 kez tekarlanmıştır)

100 uM EGCG ile HCT-116$^{Bax\ -/-}$ hücrelerinin 0-2-4-6-9-12-24 saat inkübasyonu sonucunda cleaved-PARP-1 ekspresyonunda negatif kontrole göre 2.,4. ve 6. saatlerde $p<0.015$ düzeyinde, 9. Saatte ise $p<0.044$ düzeyinde anlamlı artış gösterdiği saptandı (Şekil 21A, B).

A



B



Şekil 21. HCT-116$^{Bax-/-}$ hücrelerinde PARP-1 proteinin western-blot analizi A. X-Ray film görüntüsü B. Dansitometrik analiz ile cleaved-PARP-1/Aktin oranının grafiksel ifadesi (*$p<0.05$ düzeyinde istatistiksel anlamlılık, deneyler 6 kez tekarlanmıştır.

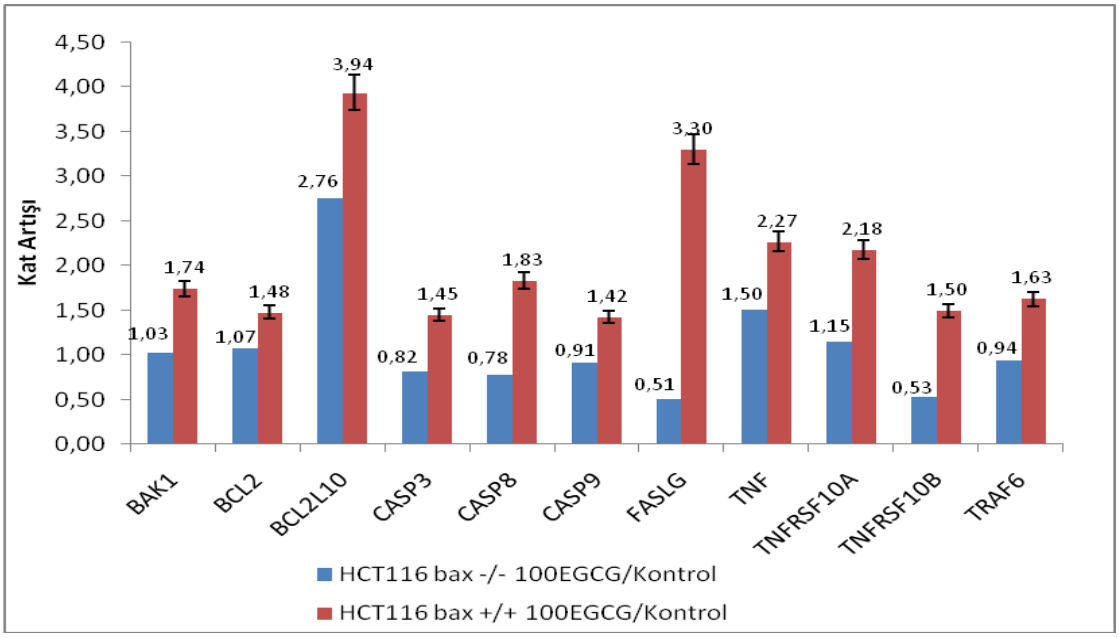
4.6. EGCG'nin Apoptotik Gen Ekspresyonlarına Etkisinin İncelenmesi:

Apoptoz sürecinde etkili 84 farklı genin mRNA düzeylerindeki değişim apoptotik panel array yöntemi ile belirlenmiştir. Denemede iki farklı koşuldan elde edilen mRNAlar kullanıldı.

a. EGCG solüsyonuile 24 saat inkübe edilen hücreler

b. EGCG'nin ortama ilave edilmediği kontrol hücreleri

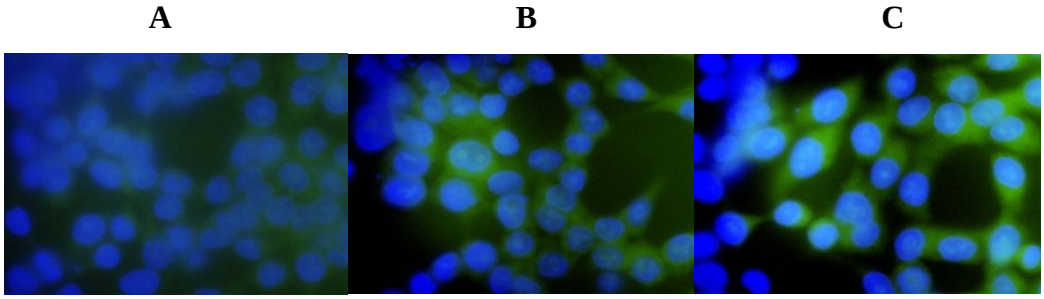
İstenen genlerin cDNA amplifikasyonu gerçek zamanlı olarak takip edildi. cDNA amplifikasyonunun kalite kontrolü "*melting curve*" analizi ile gerçekleştirildi. 84 gene ait ekspresyon profili 2 kez çalışmanın ortalaması alınarak çıkarıldı. Apoptotik panel array yöntemi ile elde edilen 84 gene ait ekspresyon verileri ve ΔΔCt değerleri *Roche* firması tarafından sağlanan yazılım ile değerlendirildi ve ekspresyon değerleri negatif kontrole göre kat artışı olarak hesaplandı. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde EGCG'nin apoptotik genler üzerinde HCT 116 $^{Bax\ +/+}$ hücre hattında HCT 116$^{Bax-/-}$ hücre hattına göre daha etkin olduğu saptandı (Şekil 22). HCT116 Bax +/+ hücre hattında çok daha fazla genin etkilenmesi ve artış göstermesi nedeniyle bundan sonraki çalışmalara sadece HCT116 Bax+/+ hücreleri ile devam edildi. İntrinsik ve ekstrinsik apoptotik yolaklarda etken olan kaspaz-8 ve kaspaz-9'un EGCG'nin apoptotik etkisindeki rolünü belirlemek üzere bu genlerin susturumunun yapılmasına ve apoptoz miktarındaki değişimin incelenmesine karar verildi.



Şekil 22. HCT-116 Bax+/+ ve Bax-/- hücre hatlarında EGCG ile tetiklenen apoptotik genlerin ekspresyonunda saptanan kat artışları (Ort. kat artış, RT-PZR 2 kez tekarlanmıştır)

4.7.Hiperfect Transfeksiyon Ajanının siRNA Transfeksiyonu Çalışmaları için Etkinliğinin İncelenmesi:

HCT-116 hücrelerinde Hiperfect Transfeksiyon Ajanı ile transfeksiyonun etkin çalışıp çalışmadığı EGFP-aktin plasmidinin (Eucaryotic Green Fluorecence Protein) kullanılması ile saptandı. Bu amaçla HCT-116$^{Bax+/+}$ hücre hattında farklı Hiperfect Transfeksiyon Ajan miktarları (1.5µl - 3.0µl - 4.5µl) kullanılarak hücrelere en iyi EGFP sinyali verilmesini sağlayan transfeksiyon ajan miktarı belirlendi (Şekil 23A,B,C)

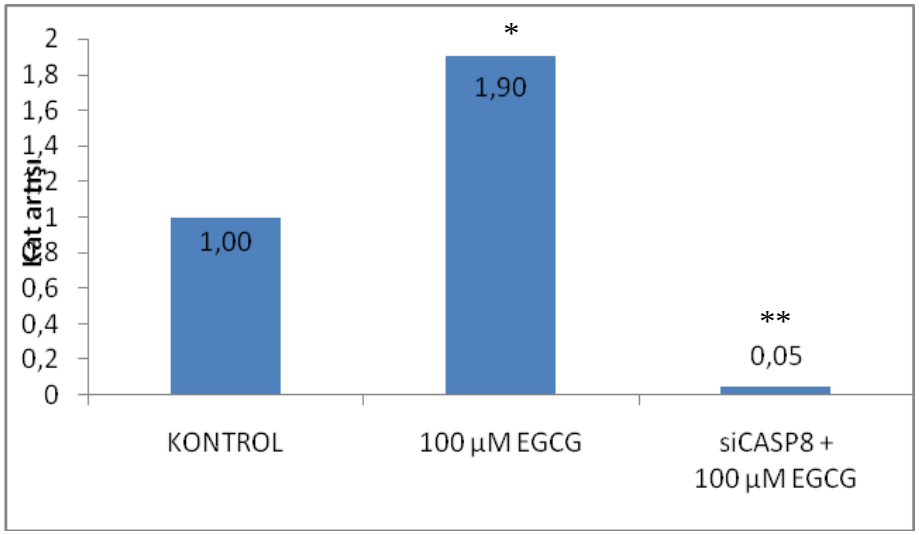


Şekil 23. 1.5 ul Hiperfect (A), 3.0 ul Hiperfect (B), 4.5 ulHiperfect (C) kullanılarak yapılan EGFP-aktin plasmid transfeksiyonu florasan görüntüleri.

Fluoresan mikroskop ile alınan görüntülere bakıldığında GFP sinyalinin 1,5 ul Hiperfect ile yapılan transfeksiyonda zayıf olduğu, 4.5 ul ile ise fazla olduğu görüldü. Bir sonraki denemelerde ve siRNA transfeksiyonunda kullanılmak üzere üretici firmanın önerdiği optimum miktar olan 3 ul Hiperfect (24-kuyulu plaka için 3ul, 6-kuyulu plaka için 12ul Hiperfect) seçildi.

4.8. siRNA ile Susturumun Real-time PZR ile Doğrulanması

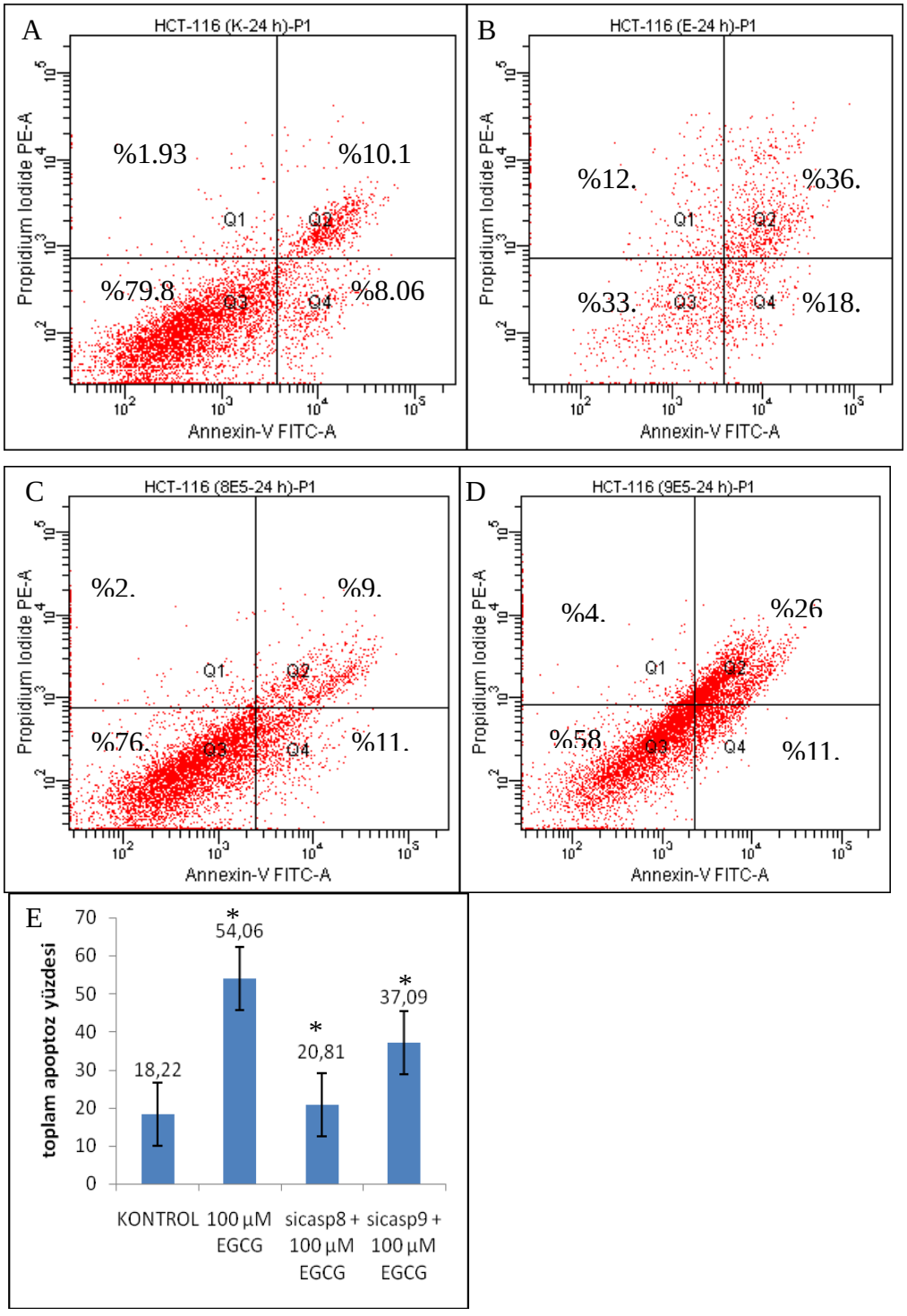
100 uM EGCG ile HCT-116$^{Bax+/+}$ hücrelerinin 24 saat inkübasyonu ile siCASP8 transfeksiyonunun Real-Time PZR ile kontrolü sonucunda kaspaz-8 ekspresyonunun negatif kontrole göre yaklaşık 200 kat azaldığı saptanmıştır (Şekil 22).



Şekil 24. HCT-116$^{Bax+/+}$ hücrelerinde siCASP8 transfeksiyonunun Real-Time PZR ile kontrolü, (*p<0.05 düzeyinde istatistiksel anlamlı artış, **p<0.05 düzeyinde istatistiksel anlamlı azalış)

4.9. Kaspaz 8 ve Kaspaz 9 Susturumunun Apoptoz Düzeyine Etkisinin İncelenmesi

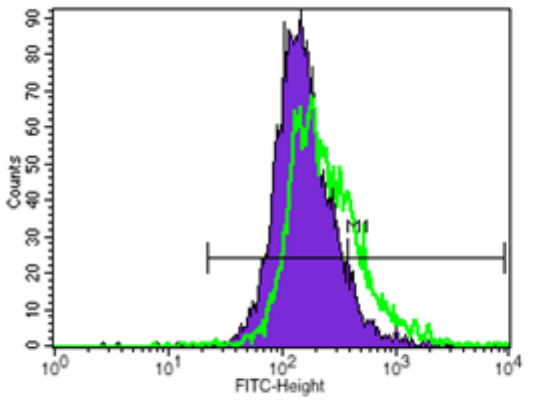
100 uM EGCG ile HCT-116$^{Bax\ +/+}$ hücrelerinin 24 saat inkübasyonu ile siCASP8 ve siCASP9 transfeksiyonundan sonra apoptotik hücre yüzdelerindeki değişiklik akış sitometrik Annexin V-PI yöntemiyle belirlendi. Transfeksiyon ve EGCG uygulanmamış kontrol grubunda %18,22 düzeyinde apoptoz bulunurken (Şekil 25A), 100 µM EGCG uygulanmış grupta %54 düzeyinde apoptoz saptandı (p<0,001)(Şekil 25B), siCASP8 transfeksiyonu ve 100 µM EGCG uygulanmış grupta %20,81 (p<0,048) (Şekil 25C), siCASP9 transfeksiyonu ve 100 µM EGCG uygulanmış grupta %37,09 (p<0,012) (Şekil 25D).



Şekil 25. HCT-116$^{Bax+/+}$ hücrelerinde kaspaz-8 ve kaspaz-9 susturumunun akış sitometri Annexin V-PI grafikleri. Transfeksiyon ve EGCG uygulanmamış kontrol grubu (A), 100 µM EGCG uygulanmış grup (B), siCASP8 transfeksiyonu ve 100 µM EGCG uygulanmış grup (C), siCASP9 transfeksiyonu ve 100 µM EGCG uygulanmış grup (D), Her grupta saptanan toplam apoptotik hücre yüzdelerinin grafiksel ifadesi (E). (*$p<0.05$ düzeyinde istatistiksel anlamlı artış)

4.9. EGCG'nin Hücre içi ROT Düzeylerine Etkisinin İncelenmesi

HCT-116$^{Bax+/+}$ hücrelerinde EGCG solüsyonuile 24 saat inkübasyonun hücre içi ROT düzeylerine etkisi, DCFH-DA (2′,7′- diklorodihidrofloresin diasetat) indikatörü kullanılarak akış sitometrik analiz ile belirlendi. EGCG solüsyonuile 24 saat inkübasyonun HCT-116$^{Bax+/+}$ hücrelerinde yaklaşık % 29.0oranında ROT oluşturduğu saptandı (Şekil 26).



Kontrol grubu

Marker	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean
All	9246	100.00	92.46	161.81	142.21
M1	9236	99.89	92.36	161.98	142.65

Deney grubu

Marker	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean
All	6607	100.00	66.07	219.44	179.46
M1	6595	99.82	65.95	219.81	180.31

ROT artışı

Şekil 26. HCT-116$^{Bax+/+}$ hücrelerinde EGCG solüsyonuile 24 saat inkübasyonda hücre içi ROT ölçümü.

5. TARTIŞMA

Son on yıldır kanser oluşumunun toksik olmayan doğal ürünler kullanılarak önlenmesi ve tedavisi ile ilgili yapılan araştırma sayısı artış göstermiştir. Bu maddeler arasında diyetle alınan polifenoller kanser-önleyici olmalarının yanı sıra terapötik olarak da kullanılan doğal ajanlardır. Polifenollerin hücre poliferasyonu, differensiyasyonu, apoptoz, enflamasyon, anjiyogenez ve metastaz ile ilgili hücreler arası sinyal ileti yolaklarında anahtar rollere sahiptir olduğu belirtilmesine karşın, bu yolaklardaki etki mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (144). Çok sayıda polifenol bileşiğin arasında, özellikle yeşil çay polifenolleri birçok insan malignitesinde yüksek oranda kanser önleyici etkilerinin bulunması ile dikkat çekmektedir. Yeşil çayda yüksek oranda bulunan bir polifenol olan EGCG'nin hücre transformasyonunu ve poliferasyonunu azaltma, hücre döngüsünde duraksama ve apoptozu artırma gibi kemopreventif etkileri bulunmaktadır (145). Yapılan i*n-vitro* çalışmalarda lösemi, melanom, meme kanseri, akciğer ve kolon hücrelerinde EGCG'nin büyümeyi inhibe ettiği ve apoptozu arttırdığı gösterilmiştir (146). EGCG'nin bu etkileri ve olası etki mekanizmalarının ortaya çıkarılması için pek çok *in-vitro ve in-vivo* çalışma yapılmasına karşın *in-vivo* mekanizmaları henüz tam olarak anlaşılamamıştır. EGCG etki mekanizmaları ile ilgili bilgiler ışığında planlanmış olan bu çalışmada HCT 116 kolon karsinoma hücre hatlarında EGCG'nin hücre ölümü, pro-apoptotik Bax proteini, intrinsik ve ekstrinsik apoptotik yolaklar üzerindeki etkinliğinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçtan hareketle öncelikli olarak daha önceki çalışmamızda elde edilen verilerin ışığında (143) EGCG'nin hücre canlılığına etkisinin ve dozunun doğrulanması çalışmaları yapılmıştır. Hücre canlılık analizleri değerlendirildiğinde EGCG ile 24 saat inkübe edilen HCT-116$^{Bax+/+}$ ve HCT116$^{Bax-/-}$ hücrelerinde 100μM EGCG'nin hücre hatlarında sırasıyla %30-32 oranında hücre ölümüne neden olduğu saptanmıştır. EGCG ile inkübe edilen hücrelerde 48. ve 72. saatte saptanan canlılık artışının EGCG'nin yarılanma ömrünün 24 saat sonunda azalmasına bağlı olabileceği düşünülmüştür. Bu amaçla, tüm çalışma boyunca hazırlanan EGCG çözeltileri EGCG'nin yarılanma ömrünü ve stabilitesini arttıran süper oksid dismutaz enzim ilavesi ile hazırlanmıştır (151). EGCG'nin kolon kanseri hücre hatlarında hücre canlılığı üzerine etkilerini inceleyen çalışmalardan elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında değerlerin farklılık gösterdiği görülmektedir. Uesato ve ark. (122)

yaptıkları çalışmada HCT-116 hücrelerinde 24 saat EGCG inkübasyonu için elde edilen IC_{50} değerinin 71,3μM belirtilmiştir. Çalışmamızda 24 saat EGCG inkübasyonunda IC_{50} değerinin 100μM'ın üzerinde olduğu belirlenmiştir. Hücre hatları ile yapılan çalışmalarda sıklıkla rastlanan bu doz farklılıklarının *in-vitro* çalışmalarda hücre hatlarının pasaj sayılarının eşit olmamasına ve *in vitro* koşulların farklılıklarına bağlı olabileceğini düşünmekteyiz.

EGCG'nin olası apoptotik ve nekrotik etkisinin değerlendirilebilmesi amacıyla Annexin-V apoptoz / nekroz analizi kullanılmıştır. Apoptotik hücre membranında bulunan PS kalıntılarına bağlanan FITC işaretli Annexin-V'in vermiş olduğu fluoresan şiddeti, apoptotik hücrelerin saptanmasında yönteminin temel prensibini oluşturmaktadır. Membran bütünlüğü bozulan nekrotik hücrelere girebilen PI fluoresan boyasının Annexin V ile birarada kullanılması ile bu yöntem, apoptoz/nekroz ayrımının gerçekleştirilmesine olanak sağlamaktadır (152). Yapılan çalışmada, 100μM EGCG ile 24 saat inkübe edilen hücrelerde apoptoz indüksiyonu doğrulanmıştır. EGCG uygulaması yapılmayan hücrelerin %11'i ve 24 saat 100μM EGCG uygulaması yapılan hücrelerin %42'sinin apoptotik olduğu saptanmıştır. EGCG uygulanan hücrelerde nekrotik hücre ölümünde ise artış saptanmamıştır. Nekrotik hücre ölüm oranının düşük olması, EGCG'nin kanser hücrelerini çevre hücrelere zarar vermeden ölüme sürükleyen bir teröpatik ajan veya teröpatik ajan desteği olabileceğini ifade etmektedir.

EGCG'nin ekstrinsik ve intrinsik apoptoz yolaklarında rol alan kaspaz-8 ve kaspaz-9 enzimlerinin aktivasyonuna etkisi, 24 saat 100μM EGCG uygulaması yapılan hücrelerdeki kaspaz enzim aktivitelerinin zaman dilimleri içinde western blot analizi ile incelenmesi ile değerlendirilmiştir. Kaspaz-8 aktivasyonunun HCT-$116^{Bax\ +/+}$ hücrelerde 6., 9. saatlere ve HCT-$116^{Bax\ -/-}$ hücrelerde 2.,4.saatlerde gerçekleşmesi; EGCG'nin ilk etkilerini ekstrinsik apoptoz yolağı ile kısa sürede gösterdiğini düşündürmektedir. Verilerimiz, Helieh S. Oz ve Jeffrey L Ebersole'un (154) 100μM EGCG ile IEC-6 insan epiteliyal ince bağırsak hücrelerinde yapmış olduğu çalışma ile paralellik göstermektedir. Kaspaz 8 aktivasyonun HCT-$116^{Bax\ -/-}$ hücrelerinde, HCT-$116^{Bax\ +/+}$ hücrelerine göre daha erken zaman diliminde gerçekleşebilmesi EGCG'nin öncelikli olarak ekstrinsik yolağı kullanabildiğini ve Bax proteininin apoptoz tetiklemesinde öncelikli olmadığını düşündürmektedir.

100μM EGCG uygulaması yapılan hücrelerde intrinsik apoptoz tetiklenmesinde rol alan kaspaz-9 aktivasyonu incelendiğinde; HCT-116$^{Bax\ +/+}$ hücrelerinde 6.saatten başlayarak 24.saate kadar artarak devam ettiği, HCT-116$^{Bax\ -/-}$ hücrelerde ise 2.-4.-6. saatlerde başlayarak 9.saatte son bulduğu saptanmıştır. HCT-116$^{Bax+/+}$ hücrelerinde 6.saatten başlayarak aktivasyonunun artması, HCT-116$^{Bax-/-}$ hücrelerinde ise daha erken (2. saat) zaman diliminde aktivasyonun gerçekleşmesi; EGCG'nin ekstrinsik yolağı öncelikli olarak kullandığını doğrulamakta ancak Bax proapoptotik protein varlığında apoptotik etkinin daha güçlü ve uzun süreli olabileceğini göstermektedir. Bunun yanı sıra, Bax$^{-/-}$ hücrelerin EGCG uygulamasına daha duyarlı olma nedeninin; mitokondri membranının Bcl_2/Bax oranındaki değişimine ve buna bağlı olarak mitokondri membran potansiyel değişimine bağlı olabileceğini düşünmekteyiz ancak bu çalışmamızda mitokondri membran potansiyel değişimini ölçme olanağımız bulunamadığı için kesin olarak ifade etmemiz mümkün olamamaktadır.

Aynı zaman dilimlerinde incelenen kaspaz-3 aktivasyonun HCT-116$^{Bax\ +/+}$ hücrelerinde kaspaz-9 aktivasyonuna benzer zaman dilimlerinde aktivasyon gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca saptanan kaspaz 3 aktivasyonu, bir DNA fragmantasyon ürünü olan PARP-1 kesim ürünlerinin aynı zaman dilimlerinde saptanması ile de desteklenmiştir. EGCG'nin apoptotik etkisinin Bax proteini varlığında Bax proteininin yokluğuna göre daha uzun zaman dilimine yayılması bize EGCG'nin hem ekstrinsik hem intrinsik yolakları kullanabildiğini ancak Bax protein yokluğunda kaspaz-9 aktivasyonun azalmasına bağlı olarak (9.saatte biten aktivasyon) apoptotik mekanizmanın sadece kaspaz-8 aracılı olarak sürdüğünü devam ettiğini göstermektedir. EGCG'nin ağırlıklı olarak ekstrinsik apoptotik yolağı kullandığı Srivastava ve ark.'nın TRAIL dirençli meme kanser hücrelerinde yapmış oldukları çalışmada; EGCG'nin kaspaz 8 aktivasyonuna neden olduğu ve diğer sonlandırıcı kaspazların da bu aktivasyon aracılığı ile dolaylı olarak gerçekleştiği vurgulanmıştır (155). HCT-116$^{Bax\ +/+}$ ve HCT-116$^{Bax\ -/-}$ hücre hatlarında elde ettiğimiz kaspaz protein ekspresyon analizleri ve PARP-1 kesim verileri birlikte değerlendirildiğinde, kolon karsinoma hücrelerinin kaspaz aktivasyon mekanizmasının araştırmacıların TRAIL dirençli meme kanser hücreleri için öngördükleri mekanizma ile paralellik gösterdiğini düşünmekteyiz.

Westen blotlama analizleri ile elde edilen kaspaz protein ve mekanizma verilerinin aynı zamanda mRNA düzeyinde desteklenmesi amacıyla 84 apoptotik gene ait immobilize

probların bulunduğu *apoptoitikpanel array* sistemi kullanılarak 24 saat 100 μM EGCG uygulaması yapılan hücrelere gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu uygulandı. Gen ekspresyonlarında kat değişim değeri olarak 1.0 ve üstü kabul edildi ve 84 apoptotik genden 1.0'ın üstünde artış gösteren genler dikkate alındı. mRNA ekspresyon analizlerinde kaspaz-8, kaspaz-9 ve kaspaz-3 gen ekspresyonlarının HCT-116$^{Bax-/-}$ hücrelerde negatif kontrole göre kat değişimleri oldukça düşük olarak saptandı (kat değişim <1.0). HCT-116$^{Bax+/+}$ hücrelerde ise kat değişimleri >1.0 bulundu. Bu araştırmada amacımız, EGCG'nin ekstrinsik ve intrinsik yolaklardan hangisini daha etkin kullandığını ve Bax proteininin rolünü belirlemek olduğu için bu aşamadan sonraki deneylerde kaspaz 8 ve kaspaz 9 susturumunun yapılmasına ve gen susturumu sonrası EGCG'nin apoptotik etkinliğinin incelenmesine karar verildi. Bax$^{-/-}$ hücrelerde söz konusu gen ekspresyonlarının kat değişimlerine bakıldığında Bax$^{+/+}$ hücrelere göre anlamlı bir kat değişimi saptanmadığı ve protein ekspresyon analizleri sonucunda da Bax proteininin öncelikli rol oynamadığı belirlendiği için gen susturumu çalışmalarına sadece Bax$^{+/+}$ hücreler kullanılarak devam edilmesine karar verildi. Apototik gen ekspresyon, protein ekspresyon analizleri göz önüne alındığında da görüleceği gibi Bax proteinin varlığının veya yokluğunun apoptotik hücre ölümünde öncelikli bir rol oynamadığını ancak apoptotik etkiyi güçlendiren bir faktör olduğunu öngörmekteyiz. HCT 116 kolon karsinoma hücrelerinde EGCG'nin etki mekanizmasına yönelik karşılaştırabileceğimiz bir çalışma henüz bulunmadığı için Bax proteinin öncelikli olmadığını ifade eden bu bulgularımızın literatüre katkı sağlayacağını düşünmekteyiz. Bunun yanı sıra gen ekspresyon analizlerinde elde edilen kaspaz 8, TNF, FASL, TRAF6, BCL2L10 (kat değişim; 1.83, 3.30, 2.27, 2.18, 3.94) gibi ekstrinsik yolakla ilişkili genlerdeki kat artışları, western-blot analizinde 24.saatte saptanan yüksek kaspaz-8 aktivasyonu ve PARP-1 kesimi ile de desteklenmektedir. Chan ve ark.'nın (164) meme kanser hücrelerinde EGCG'nin apototik etki mekanizması ilgili çalışmalarında kaspaz 3 aktivasyonu, nuklear kondenzasyon, PARP-1 kesimi, Bax protein ekspresyonunda artış belirlenmesine karşın,bizim HCT-116 hücrelerinde gerçekleştirdiğimiz çalışma kaspaz aktivasyonları yönünden bu çalışmaya benzerlik gösterse de, Bax ekspresyon artışı yönünden farklılık göstermektedir. Ancak gen ekspresyon analizi verilerimiz göz önüne alındığında proapoptotik bir protein olan Bak ekspresyonunda 1.74 kat değişimin saptanması, bize HCT 116 kolon karsinoma hücrelerinde bir mitokondrial pro apoptotik protein olan Bak'ın mitokondri membranında Bax proteinine göre daha etkin rol alabileceğini ifade etmektedir.

Western-blotlama analizlerinde elde edilen protein ekspresyon değerleri ve *apoptotik panel array* analizinde ekstrinsik yolak ile ilişkili genlerin kat artışları göz önüne alınarak, EGCG ile tetiklenen apoptozun ağırlıklı olarak ekstrinsik yolak aracılı olduğunun düşünüldü. Kaspaz 8 ve kaspaz 9'un ekstrinsik/intrinsik apoptoz tetikleme mekanizmasındaki rolü göz önüne alınarak kaspaz-8 ve kaspaz 9 gen susturumlarının yapılması ile EGCG'nin apoptotik etkisindeki değişimin incelenmesine karar verildi. Yapılan gen susturumunun etkinlik kontrolü için siCASP8 transfeksiyonu ve 24 saatte 100μM EGCG uygulaması yapılan HCT-$116^{Bax+/+}$ hücrelerinde kaspaz-8 gen ekspresyon değişimi spesifik kaspaz 8 primeri ile Real-Time PZR analizi yapılarak saptandı. Erime eğrisi analizinde elde edilen $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri hesaplanarak gen ekspresyonunda kontrole göre yaklaşık 200 kat azalış saptandı ve gen susuturum deneylerimizin başarılı olduğu doğrulandı. Kaspaz 8 ve kaspaz 9 gen susturumlarından sonra 100μM EGCG ile 24 saat muamele edilen HCT-$116^{Bax+/+}$ hücrelerindeki apoptotik hücre ölümü, Annexin V/ PI akış sitometrik analiz ile değerlendirilirdi. Gen susturumu yapılmadan 100μM EGCG ile 24 saat muamele edilen hücrelerde yapılan analizde total %54 oranında apoptoz bulunması EGCG'nin daha önce elde ettiğimiz verilere benzer şekilde apoptotik hücre ölümünü tetiklediğini doğrulamaktadır. siCASP8 transfeksiyonu ve kaspaz 8 gen susturumu sonrasında uygulanan 100mM EGCG'nin hücrelerde total %20.81 düzeyinde, siCASP9 transfeksiyonundan ve kaspaz 9 gen susturumu sonrasında uygulanan 100mM EGCG'nin ise hücrelerde total %37.90 düzeyinde total apoptotik hücre ölümüne yol açtığı belirlendi. Elde edilen bu veriler de bize EGCG'nin HCT-$116^{Bax+/+}$ hücrelerde öncelikli olarak ekstrinsik yolağı kullandığını, ekstrinsik yolak bloke edildiğinde de oluşan apoptotik hücre ölümünün kısmen mitokondri bütünlüğünün bozulmasına bağlı olabileceğini göstermektedir. İntrinsik yolağın bloke edilmesini sağlayan siCASP9 transfeksiyonundan elde edilen akış sitometrik veriler EGCG'nin apoptotik etkisinde kaspaz 9'un kısmen etkili olabileceğini ve ağırlıklı rolü olmadığını ortaya koymaktadır. Kaspaz 9 gen ekspresyon analizleri ve akış sitometrisinde elde edilen total apoptoz yüzdeleri değerlendirildiğinde EGCG'nin intrinsik apoptozu tetikleme mekanizmasının sadece kaspaz 9'a bağlı olmayabileceği, mitokonri membran bütünlüğünün bozulmasına ve membranlar arası bölgeden proapoptotik proteinlerin salınmasına (endoG, AIF vb.) veya EGCG'nin hücrede reaktif oksijen türevlerinin (ROT) oluşturmasına bağlı olabileceğini düşündürmektedir. Bu amaçla EGCG solüsyonuuygulamasının HCT 116 $Bax^{+/+}$ hücrelerinde oluşturabileceği ROT düzeyinin saptanmasına karar verildi.

EGCG uygulamasının HCT 116 $Bax^{+/+}$ hücrelerinde oluşturabileceği ROT düzeyini belirlemek amacıyla yapılan akış sitometrik ROT analizinde 24 saat EGCG solüsyonuuygulanan hücrelerde kontrole göre %29.0 oranında ROT artışı saptanmıştır. EGCG'nin bir antioksidan olduğu gibi (98-100) aynı zamanda prooksidan etki gösterdiğini gösteren çalışmalar da literatürde yer almaktadır. Na Young Min ve ark.'ın HCT-116 kolon karsinoma, HEK293 insan embriyonik böbrek hücreleri ve MRC5 insan fetal akciğer fibroblast hücrelerinde gerçekleştirdiği çalışmalarda EGCG'nin ROS oluşturma kapasitesinin hücre tipine göre değiştiği ve özellikle kanser hücrelerinde ROS oluştururarak apoptozu tetiklediği gösterilmiştir (97). Hwang ve ark.'ın HT29 kolon kanser hücrelerinde gerçekleştirdiği çalışmada ise 100µM EGCG'nin 6 saatte hücre içi ROT artışına neden olduğu ve AMPK sinyal yolağı aktivasyonu sonucu apoptozu tetiklediği gösterilmiştir (98). Ayrıca G.-X.Li ve ark.'nın (157) H1299 insan akciğer kanseri hücrelerinde ve tümör fare ksenograftlarında yaptığı çalışmada 50µM EGCG'nin 24 saatte ROT oluşumunu indüklediği ve oluşan ROTların oksidatif DNA hasarına yol açarak apoptozu tetiklediği in vitro ve in vivo olarak gösterilmiştir. WenJuan Li ve ark.'ın (l58) SMMC7721 insan hepatoselüler karsinoma hücreleri ile yaptığı çalışmada EGCG'nin ROT artışı sağlaması ile mitokondri membran potansiyelini düşürdüğü, Bcl-2 ailesi proteinlerinin ve sitokrom c'nin mitokondriden sitozole taşınmasıyla kaspaz-9 ve kaspaz 3 aracılı intrinsik apoptotik yolağı tetikleyerek apoptozu indüklediği savunulmaktadır. Yapılan bu çalışmalar göz önüne alındığında, yapmış olduğumuz bu çalışmada da EGCG'nin HCT-116 hücrelerinde kaspaz 8 aracılı ekstrinsik yolağı öncelikli kullandığını, ROT'ların artışı ile kaspaz 9, kaspaz 3 ve PARP-1 aktivasyonlarının dolaylı olarak intrinsik yolağı aktive ettiği ve apoptotik etkiyi güçlendirdiğini düşünmekteyiz. Çalışmamızda sitoplazmik sitokrom c salınımı incelenememiş olamasına karşın 24 saat EGCG uygulaması sonrası artan ROT verileri bu düşüncemizi desteklemektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

EGCG'nin biyolojik yararlanımı göz önüne alındığında emilim mekanizmasına bağlı olarak hücreler ile etkileşim süresinin en fazla olduğu sistem gastrointestinal sistemdir. Bu açıdan kanser önleyici ve kemotörepatik etkileri ile ilgili olan çalışmalar için yeşil çay tüketiminin daha düşük olduğu batı ülkelerinde insidansı yüksek olan kolon kanserlerlerinde (26) EGCG ile ilgili çalışmaların öncelikli olduğunu düşünmekteyiz. EGCG'nin etki mekanizmasının hücre tipine göre farklılık göstermesi kanser tedavisinde destek ajanı olarak kullanılması düşünüldüğünde etki mekanizması bilinmesi ve açıklanması gereken bir konu olarak ortaya çıkmaktadır. Her kanser hücresinde değişkenlik gösterebilen ve hücrenin apoptotik mekanizmadan kaçışını sağlayan mutasyonlar göz önüne alındığında, EGCG'nin eröpatik etkinliği için hücre tipine göre etki mekanizmasının açıklanması ile kanser tedavisine destek olunabileceğini düşünmekteyiz.

Sonuçlarımız HCT-116 kolon karsinoma hücrelerinde EGCG'nin ağırlıklı olarak ekstrinsik apoptotik mekanizmayı tetiklediği ve kanser hücrelerini ölüme sürüklediğini göstermiştir. EGCG'nin ekstrinsik apoptoz tetiklenme mekanizmalarındaki mutasyonlara bağlı olarak hücre ölümünden kaçan kolon kanserlerinde tedaviyi destekleyen bir ajan olarak kullanılabileceğini öngörmekteyiz. EGCG'nin HCT 116 etki mekanizmasına yönelik yapılan bu *in vitro* çalışmalarımızın detaylandırılması ve *in vivo* deneyler ile doğrulanması gerektiğini düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Nurse P. A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell* 2000; 100:71–78
2. Smith JA, Martin L. Do cells cycle? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1973;70:1263-7.
3. Murray AW. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* 2004;116:221–234
4. I.-E. Symeonidou, S. Taraviras, and Z. Lygerou. Control over DNA replication in time and space. *FEBS Letters,* 2012; 586:2803-2812.
5. M. B. Kastan and J. Bartek. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature,* 2004;432:316-323.
6. Macaluso M, Montanari M, Cinti C, Giordano A. Modulation of cell cycle components by epigenetic and genetic events. *Semin Oncol.* 2005;32(5):452-7
7. M. V. Blagosklonny. Cell senescence: Hypertrophic arrest beyond the restriction point. *Journal of Cellular Physiology,* 2006;209:592-597
8. M. Bollen, D. W. Gerlich, and B. Lesage. Mitotic phosphatases: from entry guards to exit guides. *Trends in cell biology,* 2009;19:531-541.
9. Karp G. Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments (4 ed.). *Hoboken, NJ: John Wiley and Sons*. 2005;598–599
10. Vazquez A, Bond EE, Levine AJ, Bond GL. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;12:979-87
11. Zhang H. Molecular signaling and genetic pathways of senescence: Its role in tumorigenesis and aging. *J Cell Physiol.* 2007;210:567-74.
12. Y. Pylayeva-Gupta, E. Grabocka, and D. Bar-Sagi. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat Rev Cancer,* 2011;11:761-774.
13. Jemal, A., Bray, F., Center, M.M. Global cancer statistics. *CA Cancer J. Clin,* 2011;61:69-90.
14. Foulkes, W.D. Inherited susceptibility to common cancers. *N. Engl. J. Med.* 2008; 359:2143-2153.
15. P. Demant. The genetic factors in cancer development and their implications for cancer prevention and detection. *Radiat Res,* 2005;164:462-6.
16. C. J. Lord and A. Ashworth. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature,* 2012;481:287-94.

17. Sander M., Cadet J., Casciano D.A .Proceedings of a workshop on DNA adducts: biological significance and applications to risk assessment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2004; 208:1-20.
18. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell,* 2011; 144:646-674.
19. Hanahan D., Weinberg R.A.. Hallmarks of cancer. *Cell,* 2000;100:57-70.
20. Kaelin Jr., W.G.. The concept of synthetic lethality in the context of anti-cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*, 2005;5:689-698.
21. Ruhul Amin A.R.M., Zhang H., Shin Dong M. Molecular Aspects of Cancer Prevention by Green Tea: An Overview, Tea in Health and Disease Prevention, *Academic Press*, 2013;751-766,
22. World Health Organization. WHO. Cancer. 2006
23. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y. Cancer Statistics. *CACancer J Clin*. 2008;58: 71-96
24. Arab L, Il'yasova D. The epidemiology of tea consumption and colorectal cancer incidence. *J Nutr*. 2003;133:3310-3318.
25. Kang H, O'Connell JB, Leonardi MJ, Maggard MA, McGory ML, Ko CY. Rare tumors of the colon and rectum: a national review. *Int J Colorectal Dis.* 2007; 22:183-9.
26. K. A. Oien. Pathologic Evaluation of Unknown Primary Cancer. *Seminars in oncology*, 2009;36:8-37.
27. Laurent-Puig P., Agostini J., and Maley K.. [Colorectal oncogenesis]. *Bull Cancer*, 2010;97:1311-21.
28. Fuchs Y. and Steller H. Programmed Cell Death in Animal Development and Disease. *Cell,* 2011;147:742-758.
29. Hague A., and Paraskeva, C. Apoptosis and disease: a matter of cell fate. *Nature Cell Death and Differentiation*. 2004; 1-7.
30. Favaloro B., Allocati N., Graziano V., Di Ilio C., and De Laurenzi V. Role of apoptosis in disease. *Aging,* 2012;4:330-49.
31. Tait J. F. Imaging of Apoptosis. *Journal of Nuclear Medicine*, 2008;49:1573-1576.
32. Fischer U, Janicke RU, Schulze-Osthoff K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* 2003; 10:76–100.
33. Stephen W. G. Tait and Douglas R. Green. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2010; 11:621-632.

34. Youle RJ. Cell Biology. Cellular demolition and the rules of engagement. *Science* 2007; 315:776–7.
35. Renatus M, Stennicke HR, Scott FL, Liddington RC, Salvesen GS. Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9. *Proc Natl Acad Sci* USA 2001; 98:14250–5.
36. Boatright KM, Renatus M, Scott FL, et al. A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell,* 2003; 11:529–41.
37. S. H. MacKenzie and A. C. Clark. Death by caspase dimerization. *Adv Exp Med Biol,* 2012;747:55-73.
38. Fuentes-Prior P. and Salvesen G. S. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem. J.,* 2004;384:201-232.
39. S. Khurana and S. P. George. Regulation of cell structure and function by actin-binding proteins: Villin's perspective. *FEBS Letters,* 2008;582:2128-2139.
40. Cullen S. P., Luthi A. U., and Martin S. J. Analysis of apoptosis in cell-free systems. *Methods,* 2008;44:273-9.
41. Frasch SC, Henson PM, Kailey JM, et al. Regulation of phospholipid scramblase activity during apoptosis and cell activation by protein kinase Cδ. *J Biol Chem* 2000; 275:23065–73.
42. Hoffmann PR, deCathelineau AM, Ogden CA, et al. Phosphatidylserine (PS) induces PS receptor mediated macropinocytosis and promotes clearance of apoptotic cells. J *Cell Biol* 2001; 155:649–59.
43. Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 2004;305:626–9.
44. Goldstein JC, Waterhouse NJ, Juin P, Evan GI, Green DR. The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol,* 2000; 2:156–62.
45. Adams J. M. and Cory S.. Apoptosomes: engines for caspase activation. *Current Opinion in Cell Biology,* 2002;14:715-720.
46. Shi Y. Apoptosome: The Cellular Engine for the Activation of Caspase-9. *Structure,* 2002;10:285-288.
47. Reubold T. F. and Eschenburg S., A molecular view on signal transduction by the apoptosome. *Cellular Signalling,* 2012;24:1420-1425.

48. Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 2001;15:2922–33.
49. Zamzami N, Kroemer G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:67–71.
50. Anflous K, Armstrong DD, Craigen WJ. Altered mitochondrial sensitivity for ADP and maintenance of creatine-stimulated respiration in oxidative striated muscles from VDAC1-deficient mice. *J Biol Chem* 2001; 276:1954–60.
51. Kokoszka JE, Waymire KG, Levy SE, et al. The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature* 2004; 427:461–5.
52. Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, et al. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* 2005; 434:652–8.
53. Hockenbery DM, Nuñez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990; 348:334–6.
54. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 1999; 13:1899–911.
55. Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 2003; 22:8590–607.
56. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 2001; 292:727–30.
57. Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ. Movements of bax from cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* 1997;139:1281–92
58. Antonsson B, Montessuit S, Sanchez B, Martinou JC. Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J Biol Chem* 2001;276:11615–23.
59. Griffiths GJ, Dubrez L, Morgan CP, et al. Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. *J Cell Biol* 1999;144(5):903–14.
60. Epand RF, Martinou JC, Montessuit S, Epand RM, Yip CM. Direct evidence for membrane pore formation by the apoptotic protein Bax. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;298:744–9.

61. Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Chipuk JE, et al. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell* 2005;17:525–35.
62. Billen L. P, Shamas-Din A, and Andrews D. W. Bid: a Bax-like BH3 protein. *Oncogene,* 2008;27:47.
63. S. N. Willis and J. M. Adams. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol,* 2005;17:617-25.
64. Granger GA, Shacks SJ, Williams TW, Kolb WP. Lymphocyte *in vitro* cytotoxicity: specific release of lymphotoxin-like materials from tuberculin-sensitive lymphoid cells. *Nature* 1969; 221:1155–7.
65. Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, et al. Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 1984; 312:724–9.
66. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:745–56.
67. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, et al. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 1995;14:5579–88.
68. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 1995; 81:505–12.
69. Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, et al. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death–inducing signaling complex. *Cell* 1996; 85:817–27.
70. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 2003; 10:45–65.
71. Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 1995; 81:495–504.
72. Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 1996;84:299–308.
73. Kaufmann SH, Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res* 2000; 256:42–9.

74. Müller M, Strand S, Hug H, et al. Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO-1-Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53. *J Clin Invest* 1997; 99:403–13.
75. Eischen CM, Kottke TJ, Martins LM, et al. Comparison of apoptosis in wild-type and Fas-resistant cells: chemotherapy-induced apoptosis is not dependent on Fas/Fas ligand interactions. *Blood* 1997; 90(3):935–43
76. Tolomeo M, Dusonchet L, Meli M, et al. The CD95/CD95 ligand system is not the major effector in anticancer drug-mediated apoptosis. *Cell Death Differ* 1998; 5:735–42.
77. Tani E, Kitagawa H, Ikemoto H, Matsumoto T. Proteasome inhibitors induce Fas-mediated apoptosisby c-Myc accumulation and subsequent induction of FasL message in human glioma cells. *FEBSLett* 2001; 504:53–8.
78. Kottke TJ, Blajeski AL, Martins LM, et al. Comparison of paclitaxel-, 5-Fluoro-2_-deoxyuridin eand epidermal growth factor-induced apoptosis: evidence for EGF-induced anoikis. *J Biol Chem* 1999; 274:15927–36.
79. Makin GWJ, Corfe BM, Griffiths GJ, Thistlethwaite A, Hickman JA, Dive C. Damage-induced Bax N-terminal change, translocation to mitochondria and formation of Bax dimers/complexes ocur regardless of cell fate. *EMBO J* 2001; 20:6306–15.
80. Jia L, Patwari Y, Srinivasula SM, et al. Bax translocation is crucial for the sensitivity of leukaemic cells to etoposide-induced apoptosis. *Oncogene* 2001; 0:4817–26.
81. McKay DL, Blumberg JB. The role of tea in human health: an update. *J Am Coll Nutr.* 2002;21:1-13.
82. M. G. Ferruzzi, The influence of beverage composition on delivery of phenolic compounds from coffee and tea, *Physiol. Behav.* 2010;100:33–41.
83. Bliss RM. Brewing up the latest tea research. *Agric Res*. 2003;51:10-13.
84. Singh, Brahma N, Sharmila Shankar, and Rakesh K Srivastava. Green Tea Catechin, Epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Mechanisms, Perspectives and Clinical Applications. *Biochemical pharmacology*, 2011; 82: 1807–1821
85. Liao S. The medicinal action of androgens and green tea epigallocatechin gallate. *Hong Kong Med J.* 2001;7:369-374.
86. Yang CS, Wang ZY. Tea and cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:1038–49.
87. Yang CS, Maliakal P, Meng X. Inhibition of carcinogenesis by tea. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2002;42: 25–54.

88. Frei B, Higdon JV. Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies. *J Nutr.* 2003;133:3275-3284.
89. Rietveld A, Wiseman S. Antioxidant effects of tea: evidence from human clinical trials. *J Nutr.* 2003;133:3285-3292.
90. Katiyar SK, Afaq F, Azizuddin K, Mukhtar H. Inhibition of uvb-induced oxidative stress-mediated phosphorylation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways in cultured human epidermal keratinocytes by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2001;176: 110–117.
91. Erba D, Riso P, Colombo A, Testolin G. Supplementation of Jurkat T cells with green tea extract decreases oxidative damage due to iron treatment. J Nutr. 1999;129: 2130–2134.
92. Herbert V. Prooxidant effects of antioxidant vitamins. Introduction. J. Nutr. 1996;126: 1197–200.
93. Furukawa A, Oikawa S, Murata M, Hiraku Y, Kawanishi S. (-)-Epigallocatechin gallate causes oxidative damage to isolated and cellular DNA. *Biochem Pharmacol.* 2003;66:1769-1778.
94. Lambert JD, Yang CS. Mechanisms of cancer prevention by tea constituents. J. Nutr. 2003;133, 3262–3267.
95. Elbling L, Weiss RM, Teufelhofer O, et al. Green tea extract and (-)-epigallocatechin-3-gallate, the major tea catechin, exert oxidant but lack antioxidant activities. *FASEB J.* 2005;19:807-809.
96. Kanadzu M, Lu Y, Morimoto K. Dual function of (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) in healthy human lymphocytes. *Cancer Lett.* 2006;241:250-255.
97. Hwang JT, Ha J, Park IJ, Lee SK, Baik HW, Kim YM, Park OJ. Apoptotic effect of EGCG in HT-29 colon cancer cells via AMPK signal pathway. *Cancer Lett.* 2007;247:115-21.
98. Na Young Min et al, Selective death of cancer cells by preferential induction of reactive oxygen species in response to (-)-epigallocatechin-3-gallate, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2012;1: 91–97
99. Vazquez A, Bond EE, Levine AJ, Bond GL. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7:979-87.
100. Chung FL, Schwartz J, Herzog CR, Yang YM. Tea and cancer prevention: studies in animals and humans. *J Nutr.* 2003;133:3268-3274.

101. Ahmad N, Feyes DK, Nieminen AL, Agarwal R, Mukhtar H. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells, *J. Natl. Cancer Inst*. 1997;1881–1886.
102. Khan N, Afaq F, Saleem M, Ahmad N, Mukhtar H. Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (-) -epigallocatechin-3-gallate, *Cancer Res.* 2006;2500–2505
103. Hastak K, Gupta S, Ahmad N, Agarwal MK, Agarwal ML, Mukhtar H. Role of p53 and NF-kappaB in epigallocatechin-3-gallate-induced apoptosis of LNCaP cells, *Oncogene* 2003;4851–4859.
104. Hastak K, Agarwal MK, Mukhtar H, Agarwal ML. Ablation of either p21 or Bax prevents p53-dependent apoptosis induced by green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate. *FASEB J.* 2005;789-91
105. Roy AM, Baliga MS, Katiyar SK. Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis in estrogen receptor-negative human breast carcinoma cells via modulation in protein expression of p53 and Bax and caspase-3 activation. *Mol Cancer Ther.* 2005;4:81-90.
106. Kuo PL, Lin CC. Green tea constituent (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits Hep G2 cell proliferation and induces apoptosis through p53-dependent and Fas-mediated pathways. *J Biomed Sci.* 2003;10:219-27.
107. Leone M, Zhai D, Sareth S, Kitada S, Reed JC, Pellecchia M. Cancer prevention by tea polyphenols is linked to their direct inhibition of antiapoptotic Bcl-2-family proteins, *Cancer Res.* 63 2003;8118–8121.
108. Islam S, Islam N, Kermode T, Johnstone B, Mukhtar H, et al. Involvement of caspase-3 in epigallocatechin-3-gallate-mediated apoptosis of human chondrosarcoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000;270:793–97.
109. Qanungo S, Das M, Haldar S, Basu A. Epigallocatechin-3-gallate induces mitochondrial membrane depolarization and caspase-dependent apoptosis in pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* 2005 26:958-967
110. Gupta S, Hastak K, Afaq F, Ahmad N, Mukhtar H. Essential role of caspases in epigallocatechin-3-gallate-mediated inhibition of nuclear factor kappa B and induction of apoptosis. *Oncogene*. 2004;23:2507-22.
111. Qin J, Xie L-P, Zheng X-Y, Wang Y-B, Bai Y, Shen H-F, Li L-C, Dahiya R. A component of green tea, (-)-epigallocatechin-3-gallate, promotes apoptosis in T24 human

bladder cancer cells via modulation of the PI3K/Akt pathway and Bcl-2 family proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2007;354:852–857.

112. Das A, Banik NL, Ray SK. Mechanism of apoptosis with the involvement of calpain and caspase cascades in human malignant neuroblastoma SH-SY5Y cells exposed to flavonoids. *Int J Cancer.* 2006;119:2575-85.
113. Hayakawa S, Saeki K, Sazuka M, Suzuki Y, Shoji Y, Ohta T, Kaji K, Yuo A, Isemura M. Apoptosis induction by epigallocatechin gallate involves its binding to Fas. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;285:1102-6.
114. Ahn WS, Huh SW, Bae SM, et al. A major constituent of green tea, EGCG, inhibits the growth of a human cervical cancer cell line, CaSki cells, through apoptosis, G(1) arrest, and regulation of gene expression. *DNA Cell Biol.* 2003;22:217-224.
115. Liang YC, Lin-Shiau SY, Chen CF, Lin JK. Inhibition of cyclin-dependent kinases 2 and 4 activities as well as induction of Cdk inhibitors p21 and p27 during growth arrest of human breast carcinoma cells by (-)-epigallocatechin-3-gallate. *J. Cell Biochem*. 1999;1–12
116. Hsuuw YD, Chan WH, Ann NY. Epigallocatechin gallate dose-dependently induces apoptosis or necrosis in human MCF-7 cells. *Acad Sci.* 2007;1095:428-40.
117. Brusselmans K, De Schrijver E, Heyns W, Verhoeven G, Swinnen JV. Epigallocatechin-3-gallate is a potent natural inhibitor of fatty acid synthase in intact cells and selectively induces apoptosis in prostate cancer cells. *Int JCancer*. 2003;106:856-862.
118. Imai K, Suga K, Nakachi K. Cancer-preventive effects of drinking green tea among a Japanese population. *Prev. Med.* 1997;26:769–775.
119. Zhang B, Li X, Nakama H, Zhang X, Wei N, Zhang X, Xhang L. A case-control study on risk of changing food consumption for colorectal cancer. *Cancer Invest*. 2002;20:458–463.
120. Sun CL, Yuan JM, Koh WP, Yu MC. Green tea, black tea and colorectal cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies. Carcinogenesis 2006;27:1301–1309.
121. Uesato S, Kitagawa Y, Kamishimoto M, Kumagai A, Hori H, Nagasawa H. Inhibition of green tea catechins against the growth of cancerous human colon and hepatic epithelial cells. *Cancer Lett,* 2001;170(1):41-4.
122. Inaba H, Nagaoka Y, Kushima Y, Kumagai A, Matsumoto Y, Sakaguchi M, Baba K, Uesato S. Comparative examination of anti-proliferative activities of (-)-epigallocatechin

gallate and (-)-epigallocatechin against HCT116 colorectal carcinoma cells. *Biol Pharm Bull*. 2008;31:79-84.

123. Z. Hou, S. Sang, H. You, M. J. Lee, J. Hong, K. V. Chin, and C. S. Yang. Mechanism of action of (-)-epigallocatechin-3-gallate: auto-oxidation-dependent inactivation of epidermal growth factor receptor and direct effects on growth inhibition in human esophageal cancer KYSE 150 cells. *Cancer Res*, 2005;65:8049-56.
124. Patterson MK. Measurement of growth and viability of cells in culture. In: Jakoby WB & Paston IH (eds) *Cell Culture*, 1979;11:141-151.
125. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65:55-63.
126. Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, Traganos F. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry*. 1992;13:795-808.
127. Vermes I, Hanen C, Steffens NH and Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995;184:39-51
128. Nıcolett I, Mıglıoratı G, Paglıaccı MC, Grıgnanı F and Rıccardı CA. Rapid And Simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 1991;139:271–279.
129. Chen C, Shen G, Hebbar V, Hu R, Owuor ED, Kong AN. Epigallocatechin-3-gallate-induced stress signals in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Carcinogenesis*. 2003 Aug;24:1369-78.
130. B.Vogelstein, D.Lane, AJ. Levine, Surfngthe p53 network, Nature 2008; 408:307-31
131. Basic Cell Culture. A Practical Approac Ed: J.M: Davis, *Oxford University Press Inc.*,1994.
132. Berridge, MV. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts. *Biochemica*, 1996; 4:15-19.
133. Lau ST, Lin ZX, Liao Y, Zhao M, Cheng CH, Leung PS. Brucein D induces apoptosis in pancreatic adenocarcinom acellline PANC-1 through theactivation of p38-mitogen activated protein kinase. *Cancer Lett*, 2009.
134. Weber K, Osborn M. Thereliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J BiolChem.*1969; 244: 4406–4412.

135. Towbin, H. et al. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *In: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. Bd.* 1979;76:4350–4354.

136. Vermes I, Hanen C, Steffens Nakken H and Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J ImmunolMethods* 1995; 184:39-51

137. Lai YM, Mohammed KA, Nasreen N, Baumuratov A, Bellew BF, Antony VB. Induction of cell cycle arrest and apoptosis by BCG infection in cultured human bronchial airway epithelial cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2007;293:393-401.

138. İleri Moleküler Hücre Biyolojisi Teknikleri Uygulamalı Eğitimi Kitabı, TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü,2010

139. Ju, T.,*et. al*. *J. Biol. Chem 2002;*277:178-186.

140. Antibodies a Laboratory Manual, Harlow, E. AndLane, D.,Cold Spring HarborPress. Cold Spring Harbor, NY: 1988;449.

141. Tanaka H. *et al.* Eastern blotting and immunoaffinity concentration using monoclonal antibody for ginsengsaponins in the field of traditional chinese medicines. *J Agric Food Chem.2007*; 55(10):3783–7

142. Tanaka H. *et al.* Eastern blotting and immunoaffinity concentration using monoclonal antibody for ginsengsaponins in the field of traditional chinese medicines. *J Agric Food Chem.2007*; 55:3783–7

143. Ali Burak Özkaya, Prof.Dr.Semra Koçtürk, 2011 "HCT–116 Kolon Kanser Hücre Hattında Yeşil Çay Etken Maddesi Olan (-)-Epigallokatekin–3 gallat'ın Apoptoz Etki Mekanizmasının İncelenmesi" konulu tez.

144. Aggarwal BB, Shishodia S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochem Pharmacol*, 2006;71:1397–421.

145. Shankar S, Chen Q, Srivastava RK. Inhibition of PI3K/AKT and MEK/ERK pathways act synergistically to enhance antiangiogenic effects of EGCG through activation of FOXO transcription factor. *J Mol Signal*, 2008;3:7.

146. Khan N, Afaq F, Saleem M, Ahmad N, Mukhtar H. Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Res* 2006;66:2500–5.

147. *Current Protocols in Molecular Biology*. http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/0471142727
148. Vogelstein, B.,& Gillespie, D. Preprative an analytical purification of DNA from agarose *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979;76:615-619.
149. Sambrook, J. et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd.Edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press 1989.
150. Eruslanov E and Kusmartsev S, Identification of ROS Using Oxidized DCFDA and Flow-Cytometry, *Advanced Protocols in Oxidative Stress II*, ed. Donald Armstrong Totowa, NJ: Humana Press, 2010; 594:57–72
151. Zhe Hou et al, Mechanism of action of (-)-epigallocatechin-3-gallate: auto-oxidation-dependent inactivation of epidermal growth factor receptor and direct effects on growth inhibition in human esophageal cancer KYSE 150 cells, *Cancer research*, 2005;17: 8049–8056
152. http://www.biology.arizona.edu/Cell_Bio/tutorials/cell_cycle/main.html
153. Plati, Jessica, Octavian Bucur, and Roya Khosravi-Far. Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. *Integrative biology: quantitative biosciences from nano to macro*, 2011;4: 279–296.
154. Helieh S Oz and Jeffrey L Ebersole, Green tea polyphenols mediated apoptosis in intestinal epithelial cells by a fadd-dependent pathway, *Journal of cancer therapy*, 2010;3:105–113
155. Srivastava RK, Kurzrock R, Shankar S. MS-275 sensitizes TRAIL-resistant breast cancer cells, inhibits angiogenesis and metastasis, and reverses epithelialmesenchymal transition in vivo. *Mol Cancer Ther*, 2010;9:3254–66
156. Chan HY, Wang H, Tsang DS, Chen ZY, Leung LK. Screening of chemopreventive tea polyphenols against PAH genotoxicity in breast cancer cells by a XREluciferase reporter construct. *Nutr Cancer*, 2003;46:93–100
157. Guang-Xun Li et al, Pro-oxidative activities and dose-response relationship of (-)-epigallocatechin-3-gallate in the inhibition of lung cancer cell growth: a comparative study in vivo and in vitro, *Carcinogenesis*, 2010;5: 902–910,
158. WenJuan Li, ShaoPing Nie, Qiang Yu and MingYong Xie. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China J. Agric. Food Chem, 2009; 57:6685–6691

8. EKLER

EK-1 ETİK KURUL ONAYI

203

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI

Tel. : 0 232 - 259 87 73 - 259 87 74 Fax : 0 232 - 259 06 41 İnciraltı 35340-İzmir

Sayı : B.30.2.DEÜ.0.01.00.00 / 12590

24 HAZIRAN 2009

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Fakültemiz Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulu Başkanlığı tarafından Dekanlığımıza iletilen; 110/2009 Protokol numaralı Biyokimya Anabilim Dalı Başkanlığı Öğretim Üyelerinden Prof.Dr.Ayşe Semra KOÇTÜRK'ün proje yöneticisi ve Araş.Gör.Ali Burak ÖZKAYA'nın sorumlusu olduğu, **"Pro-Apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin EGCG ile tetiklenen apoptoz mekanizmasındaki rollerinin HCT-116 kolon kanser hücrelerinde incelenmesi"** isimli proje ile ilgili Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulu Kararı ve sonuç ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve ilgiliye iletilmesi hususunda gereğini rica ederim.

Prof.Dr. Hakan ABACIOĞLU
Dekan

Ek: Etik Kurul Kararı

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK VE LABORATUVAR ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU

Etik Kurul Üyeleri
Prof.Dr.A.Arzu SAYINER
Prof.Dr.Tunç ALKIN
Prof.Dr.Mustafa SEÇİL
Doç.Dr.M.Hakan ÖZDEMİR
Doç.Dr.Vesile ÖZTÜRK
Doç.Dr.Murat DUMAN
Doç.Dr.Güven ASLAN
Doç.Dr.Servet AKAR
Yard.Doç.Dr.Murat ÖRMEN
Öğr.Gör.Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN
Yunus KARSLI

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Etik Kurulumuzun 18 Haziran 2009 tarih ve 12/14/2009 no.lu toplantısında; 110/2009 Protokol numaralı Biyokimya Anabilim Dalı Başkanlığı Öğretim Üyelerinden Prof.Dr.Ayşe Semra KOÇTÜRK'ün proje yöneticisi ve Araş.Gör.Ali Burak ÖZKAYA'nın sorumlusu olduğu, **"Pro-Apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin EGCG ile tetiklenen apoptoz mekanizmasındaki rollerinin HCT-116 kolon kanser hücrelerinde incelenmesi"** isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.

Katılanların oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

Prof. Dr.A.Arzu SAYINER
Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları
Etik Kurul Başkanı

Etik Kurul Sekreteri
Hatice İĞCİ

Tel: 0232 412 22 54

ÖZGEÇMİŞ

AYŞENUR ÇATALER KARAKUŞ

TC Kimlik No / Pasaport No:	13687715198
Doğum Yılı:	28.11.1985
Yazışma Adresi :	Çağla Sok. No:6 D:2 Balçova/İZMİR
Telefon :	05543492925
Faks :	
e-posta :	aysenur.85@hotmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
T.C.	İYTE	Fen Fakültesi	Mol.Bio.ve Genetik		2009

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı			
Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı		**Tamamlanan**	**Devam Eden**
	Yüksek Lisans		
	Doktora		
	Uzmanlık		
Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/ sorumluluk/olay/üyelik vb.)			

ÖDÜLLER

	Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
☐			

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

" HCT-116 Kolon Karsinoma Hücrelerinde Pro-Apoptotik Bax Proteinin Egcg'nin Apoptotik Etkisi Üzerindeki Rolü" başlıklı poster, 23.Türk Biyokimya Kongresi Türk Biyokimya Derneği 2011
"Uzun Dönem Whey Protein Kullanımı Karaciğer Hasarı Yaratabilir!" başlıklı poster, 24.Türk Biyokimya Kongresi Türk Biyokimya Derneği 2012
8. Uluslararası Katılımlı Türk Toksikoloji Derneği kongresi "Negative Effect of Long and Short Time Application Whey Protein on Rat Liver; An Histologic and Biochemical Study" başlıklı poster