

**Aldo Keto Redüktaz İnhibitorü Olan Kuersetin ve Onun Türevi CHNQ Maddelerinin
Karakterizasyonu ve Kolon Kanseri Üzerine Fonksiyonel Etkilerinin Araştırılması**

Program Kodu: 2513

Proje No: 113S006

Proje Yürütücüsü:

Doç. Dr. Sreeparna Banerjee

Bursiyerler:

Betül Taşkoparan

Esin Gülce Seza

HAZİRAN, 2016

ANKARA

ÖNSÖZ

Aldo-keto redüktazlar (AKR) glikoz indirgeyici ajanlar olarak çok iyi karakterize edilmiş ve diyabet patofizyolojisinde yer alan NAD(P)H'a bağımlı oksidoredüktazlardır. Bu çalışmada, iki farklı aldo-keto redüktaz olan AKR1B1 ve AKR1B10'un kolorekal patofizyolojisinde önemli bir sinyal yolağı olabileceği hipotez edilmiştir. Farmakolojik ve RNA interferans (RNAi) yöntemleri kullanılarak, AKR'lerin özellikle reaktif oksijen türleri (ROT) oluşumuna katkı sağlayıp, çok önemli bir inflamatuvar regülatör olan nükleer faktör κ B (NF- κ B) sinyal yolağını aktifleştirerek kolorektal kanserinin önemli aktörleri olduğu gösterilmiştir.

Bu çalışmada, birleşik ve çok disiplinli bir yaklaşım yoluyla, yeni AKR inhibitörlerinin sentezlenmesi ve AKR enzimlerinin çalışma mekanizmasının ortaya çıkarılması hedeflenmiştir. Elde edilen sonuçlar, kolon kanserinde AKR1B1'in onkojenik, AKR1B10'un tümör baskılayıcı rol oynadığına işaret etmekte olup, bu özgün bulgular literatürde ilk olarak bu projede gösterilmektedir.

Bu çalışma TÜBİTAK ve SLOVAK BİLİMLER AKADEMİSİ tarafından iki yönlü olarak desteklenmektedir.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
TABLolar	vi
ŞEKİLLER.....	vii
ÖZET	xi
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Aldo-keto redüktazlar (AKRler)	1
1.2. AKR'ler ve Hastalıktaki Önemi	2
1.3. AKR inhibitörleri	4
1.4. Çalışmanın Amacı	5
2. LİTERATÜR ÖZETİ	7
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	8
3.1. Kimyasallar	8
3.2. Hücre Kültürü.....	9
3.3. Plazmitler transfeksiyon yöntemleri.....	9
3.3.1. AKR1B1 susturulmasında kalıcı transfeksiyon.....	10
3.3.2. AKR1B10 aşırı ifadesinde kalıcı transfeksiyon.....	10
3.3.3. AKR1B10 aşırı ifadesinde geçici transfeksiyon	11
3.4. Total Protein İzolasyonu	11
3.5. Sitoplazmik-Çekirdeksel Protein İzolasyonu.....	11
3.6. Western Blot.....	12
3.7. Hücre Çoğalması ve Sitotoksosite Deneyleri.....	12
3.7.1. BrdU ile Çoğalma Tayini	12
3.7.2. Hücre Yaşayabilme Deneyi.....	13

3.7.3.	<i>S. cerevisiae</i> Canlılık Deneyi	14
3.8.	Hücre Döngüsü Analizleri	15
3.9.	Apoptoz Deneyleri	16
3.9.1.	Annexin V Boyaması ile Apoptoz Tayini Deneyi.....	16
3.9.2.	Multikaspaz Tespit Deneyi.....	17
3.10.	İnvazyon ve Migrasyon Tayinleri	18
3.12.1	<i>In vitro</i> Yara İyileşme Deneyleri	18
3.12.2	Transwell Migrasyon Deneyleri.....	18
3.13	Yeni Damar Oluşumu Tayini	19
3.14	NF-κB ve AP-1 Raportör Gen Deneyleri	20
3.15	NF-κB ELISA Ölçümleri	21
3.16	Oksidatif Stres Deneyleri	21
3.16.1	Nitroblue Tetrazolium (NBT) Deneyi	21
3.16.2	Dihidroetidyum (DHE) Deneyi.....	22
3.17	Otofaji Deneyleri	22
3.17.1	Asidik Vaküol Oluşum Deneyleri	23
3.17.2	Cyto-ID Otofaji Tespit Deneyleri.....	23
3.18	İstatistiksel Analizler	24
4.	BULGULAR	25
4.1.	Uygun Hücre Hatlarının Belirlenmesi	25
4.2.	Belirlenen hücre hatlarında uygun CHNQ ve kuersetin dozlarının belirlenmesi...26	
4.3.	CHNQ ve Kuersetin'in HCT-116 ve HT-29 hücrelerinin üzerindeki sitotoksik etkileri.....	27
4.4.	CHNQ ve Kuersetin'in HCT-116 ve HT-29 hücrelerinde apoptoz üzerindeki etkileri	28
4.5.	HCT-116 hücrelerinde AKR1B1 susturulması ve hücrel etkileri.....	32
4.5.1	AKR1B1 susturulmuş HCT-116 hücrelerinde hücre çoğalmasının araştırılması.....	32
4.5.2	AKR1B1 susturulmasının ROT oluşumu üzerindeki etkileri.....	33

4.5.3.	Hücre çoğalması ile ilişkili yolların incelenmesi	34
4.5.4.	AKR1B1 susturulmuş HCT-116 hücrelerinde hücre döngüsünün araştırılması.....	35
4.5.5.	AKR1B1 susturulmasının hücre döngüsü üzerindeki etkisinin incelenmesi ..	38
4.5.6.	Hücre döngüsü ile ilişkili yolların incelenmesi.....	39
4.5.7.	AKR1B1 susturulmasının apoptoz üzerindeki etkileri	41
4.5.8.	AKR1B1 susturulmasının hücre hareketliliği üzerindeki etkileri	43
4.5.9.	AKR1B1 susturulmasının hücre göçü üzerindeki etkileri	44
4.5.10.	AKR1B1 susturulmasının anjiyogenez üzerindeki etkileri	45
4.5.11.	AKR1B1 susturulmasının NF- κ B transkripsiyon faktörü üzerindeki etkisi..	46
4.5.12.	AKR1B1 susturulmasının AP-1 transkripsiyonel aktivitesi üzerindeki etkisi	49
4.6.	HCT-116 hücrelerinde AKR1B10 aşırı ifadesi ve hücre etkileri	50
4.6.1.	AKR1B10'u aşırı ifade eden HCT-116 hücrelerinde hücre çoğalmasının araştırılması.....	52
4.6.2.	AKR1B10'u aşırı ifade eden HCT-116 hücrelerinde hücre döngüsünün araştırılması.....	54
4.6.3.	AKR1B10 aşırı ifade eden hücrelerde hücre döngüsü ile ilişkili yolların incelenmesi.....	56
4.6.4.	AKR1B10 aşırı ifadesinin apoptoz üzerindeki etkisi	57
4.6.5.	AKR1B10 aşırı ifadesinin hücre göçü üzerindeki etkileri	58
4.6.6.	AKR1B10 aşırı ifadesinin anjiyogenez üzerindeki etkileri	59
4.6.7.	AKR1B10 aşırı ifadesinin NF- κ B transkripsiyon faktörü üzerindeki etkisi	60
4.7.	Farklı metodlar ile CHNQ uygulanan HCT-116 ve HT-29 hücrelerinde oksidatif stresin araştırılması	63
4.8.	Farklı metodlar ile CHNQ uygulanan hücrelerde oksidatif stresin otofaji üzerindeki etkileri	67
4.9.	CHNQ ile muamele edilen hücrelerde otofaji ve apoptoz ilişkisi	73
4.10.	CHNQ uygulanan <i>S.cerevisiae</i> hücrelerinde oksidatif stres ve otofajinin araştırılması	76

5. SONUÇ ve TARTIŞMA.....	79
6. REFERANSLAR	85

TABLULAR

Tablo 1.1. AKR üyelerinin listesi	2
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılmış olan antikörlerin listesi.	8
Tablo 3.2 . Hücre Süspansiyonu Dilüsyon Tablosu	14
Tablo 4.1. Farklı konsantrasyonlarda CHNQ ve Kuersetin uygulayarak HCT-116 ve HT-29 hücre hatlarında belirlenen IC50 değerleri.....	26
Tablo 4.2. 24 saat süresince farklı konsantrasyonlarda uygulanan CHNQ maddesinin scrambled shRNA, AKR1B1 susturulmuş monoklon 1 ve monoklon 6 HCT116 hücrelerinde IC ₅₀ değerlerinin BrdU metodu ile belirlenmesi.	33

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. 3,7-dihydroxy-2-[4-(2-chloro-1,4-naphthoquinone-3-yloxy)-3-hydroxyphenyl]-5-hydroxychromen-4-one (CHNQ) 'nun ve Kuersetin'in kimyasal yapısı.	5
Şekil 3.1. S.cerevisiae Spotlama Şablonu.....	15
Şekil 3.2. Transwell Migrasyon Çemberinin Görüntüsü.....	19
Şekil 4.1. Farklı hücre hatlarında ifade edilen AKR1B1 (MW: 36kD) ve AKR1B10 (MW: 36kD) seviyeleri. Beta aktin (MW: 42kD) yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.....	25
Şekil 4.2. Seçilen 3 konsantrasyon ile muamele edilen CHNQ ve kuersetin maddelerinin HCT116 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi.	27
Şekil 4.3. Seçilen 3 konsantrasyon ile muamele edilen CHNQ ve kuersetin maddelerinin HT-29 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi.	28
Şekil 4.4. Seçilen 3 konsantrasyon ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinde CHNQ ve kuersetin maddelerinin apoptoz üzerindeki etkileri.....	29
Şekil 4.5. Seçilen 3 konsantrasyon ile muamele edilen HT-29 hücrelerinde CHNQ maddesinin apoptoz üzerindeki etkileri.	29
Şekil 4.6. Farklı shRNA plazmidleri ile 48 saat transfekte edilen HCT-116 hücrelerindeki AKR1B1 (MW: 36kD) seviyeleri. GAPDH (MW: 36kD) yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.	30
Şekil 4.7. 1 µg, 2 µg ve 5 µg miktarlarında AKR1B1 shRNA 4 plazmidini ile transfekte edilmiş HCT-116 kolon kanser hücrelerinde AKR1B1'in ifadesi (MW: 36kD). GAPDH proteini (MW: 36kD) yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.	31
Şekil 4.8. AKR1B1'i kalıcı olarak susturulmuş monoklon HCT-116 hücrelerindeki AKR1B1 ifadesi (MW: 36kD). Beta aktin (MW: 42 kD) yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.	32
Şekil 4.9. AKR1B1 susturulmuş ve kontrol HCT-116 hücrelerinde ROT seviyeleri	33
Şekil 4.10. Seçilen üç konsantrasyon ile 24 saat muamele edilen CHNQ maddesinin scrambled shRNA HCT-116 (NC), AKR1B1 susturulmuş monoklon 1 ve monoklon 6 HCT116 hücrelerinde MAPK/ERK proteinlerinin aktiviteleri üzerindeki etkisinin western blot metodu ile belirlenmesi. Eşit protein yüklenmesi GAPDH proteinleri ile doğrulanmıştır.....	34
Şekil 4.11. AKR1B1 geninin susturulmasının hücre çoğalması üzerindeki etkisinin scrambled shRNA HCT-116, AKR1B1 susturulmuş monoklon 1 ve monoklon 6 HCT-116 hücreleri ile BrdU metodu kullanılarak belirlenmesi. Her bar ortalama ± standart sapma (n=3) göstermektedir. S=saat, ns= istatistiksel olarak anlamlı değil.	35
Şekil 4.12. CHNQ'nun AKR1B1 susturulmuş HCT-116 hücrelerinin hücre döngüsü ilerleyişi üzerindeki etkisi.....	36

Şekil 4.13. CHNQ ile muamele edilen AKR1B1 susturulmuş ve kontrol HCT-116 hücrelerinin hücre döngüsü dağılımı.	37
Şekil 4.14. AKR1B1 susturulmasının HCT116 hücrelerinin hücre döngüsü üzerindeki etkileri. Mavi çizgiler scrambled shRNA hücrelerini, yeşil çizgiler monoklon 1 hücrelerini ve kırmızı çizgiler monoklon 6 hücrelerini temsil etmektedir.	39
Şekil 4.15. AKR1B1 susturulmasının hücre döngüsü üzerindeki ve hücre döngüsü üzerinde görev alan proteinler üzerindeki etkisi.	40
Şekil 4.16. Seçilen bir konsantrasyon ile muamele edilen AKR1B1 susturulmuş HCT-116 hücrelerinde CHNQ maddesinin ve AKR1B1 susturulmasının apoptoz üzerindeki etkileri. ...	42
Şekil 4.17. AKR1B1 susturulmuş ve kontrol HCT-116 hücrelerinde pipet ucuyla açılan yaranın 48 saat sonunda kapanma miktarlarının gösterilmesi.	44
Şekil 4.18. CHNQ maddesinin NC, M1 ve M6 hücrelerinin hücre göçü özelliği üzerindeki etkisi.	45
Şekil 4.19. AKR1B1 susturulmuş hücrelerin yeni damar oluşumu üzerindeki etkileri.	46
Şekil 4.20. AKR1B1 susturulmuş HCT-116 hücrelerinde NF-κB proteinlerinin ifadenmesinin Western Blot yöntemi ile gösterilmesi. Topo-II proteini çekirdeksel protein belirteci olarak kullanılmıştır.	47
Şekil 4.21. AKR1B1 susturulmuş NC, M1 ve M6 hücrelerinde NF-κB transkripsiyonel aktivitesinin incelenmesi.	48
Şekil 4.22. AKR1B1 susturulmuş HCT-116 hücrelerinde NF-κB (p65) DNA bağlanma miktarı.	49
Şekil 4.23. AKR1B1 susturulmuş NC, M1 ve M6 hücrelerinde AP-1 transkripsiyonel aktivitesinin incelenmesi.	50
Şekil 4.24. AKR1B10 geçici transfeksiyonunun western blot ile gösterilmesi.	51
Şekil 4.25. AKR1B10 kalıcı transfeksiyonunun Western Blot yöntemi ile gösterilmesi.	51
Şekil 4.26. HCT-116 hücrelerinde AKR1B10'u kalıcı olarak ifade eden P4 hücrelerinde AKR1B10 ifadesinin kaybolması.	52
Şekil 4.27. HCT-116 hücrelerinde AKR1B10'un geçici transfeksiyonunda ifadenme seviyelerinin 24 ve 72 saatlerde gösterilmesi.	52
Şekil 4.28. Farklı konsantrasyonlarda CHNQ uygulayarak AKR1B10'u aşırı ifade eden HCT-116 hücrelerinde IC50 değerinin belirlenmesi.	53
Şekil 4.29. AKR1B10'u aşırı ifadesinin hücre çoğalması üzerindeki etkilerinin BrdU inkorporasyon metodu ile gösterilmesi.	54

Şekil 4.30. İki farklı konsantrasyon CHNQ ile muamele edilen boş vektör ve AKR1B10 ile transfekte edilmiş HCT-116 hücrelerinde hücre döngüsünün propidyum iyodür boyaması ile akım sitometrisinde gösterilmesi.....	55
Şekil 4.31. CHNQ ile muamele edilen AKR1B10 aşırı ifade eden ve kontrol (EV) HCT-116 hücrelerinin hücre döngüsü dağılımı.....	56
Şekil 4.32. AKR1B10'u aşırı ifade eden hücrelerde hücre döngüsü ile ilişkili yolların western blot yöntemi ile incelenmesi.....	56
Şekil 4.33. Boş vektör ve AKR1B10 ile transfekte edilmiş HCT-116 hücrelerinde Annexin V-PI boyaması ardından akım sitometrisi ile apoptozun incelenmesi.....	58
Şekil 4.34. CHNQ maddesinin boş vektör ve AKR1B10 ile transfekte edilen HCT-116 hücrelerinde hücre göçü üzerindeki etkilerinin Transwell migrasyon deneyi ile incelenmesi.	59
Şekil 4.35. AKR1B10 aşırı ifade eden HCT-116 hücrelerinin yeni damar oluşumu üzerindeki etkileri.....	60
Şekil 4.36. AKR1B10 aşırı ifade eden HCT-116 hücrelerinde NF-κB proteinlerinin ifadenmesinin western blot yöntemi ile gösterilmesi.....	61
Şekil 4.37. CHNQ ile muamele edilmiş ve edilmemiş AKR1B10 aşırı ifade eden HCT-116 hücrelerinde NF-κB transkripsiyonel aktivitenin incelenmesi.....	62
Şekil 4.38. Boş vektör ve AKR1B10 vektörü ile transfekte edilmiş HCT-116 hücrelerinde NF-κB (p65) DNA bağlanma miktarı.	63
Şekil 4.39. Artan konsantrasyonlar ile 24 saat muamele edilen CHNQ maddesinin HCT-116 (açık gri) ve HT-29 (koyu gri) kolon kanser hücreleri üzerindeki oksidatif stres etkisinin NBT metodu ile belirlenmesi.....	64
Şekil 4.40. Seçilen iki konsantrasyon ile 24 saat muamele edilen CHNQ maddesinin HCT-116 (A, C) ve HT-29 (B, D) kolon kanser hücrelerinde ROT oluşumu üzerindeki etkisinin DHE boyama metodu ile belirlenmesi.	65
Şekil 4.41. Seçilen üç konsantrasyon ile 24 saat muamele edilen CHNQ maddesinin HCT-116 ve HT-29 kolon kanser hücrelerinde MAKP/ERK, JNK ve p38 proteinlerinin aktiviteleri üzerindeki etkisinin western blot metodu ile belirlenmesi.	66
Şekil 4.42. Artan konsantrasyonlar ile 24 saat muamele edilen CHNQ maddesinin HCT-116(A) ve HT-29 (B) kolon kanser hücrelerinin hücre döngüsü dağılımının gösterilmesi.....	68
Şekil 4.43. 3 farklı konsantrasyonda CHNQ uygulanan HCT-116 hücrelerinde ROT ilişkili otofajinin başlatılması.....	69
Şekil 4.44. A. CHNQ uygulanan HCT-116 hücrelerinde asidik kesecikli koful (AVO) oluşumu. B ve C: Cyto ID yöntem ile belirlenen CHNQ uygulanan HCT-116 hücrelerinde pankta oluşumu.	71

Şekil 4.45. HT-29 hücrelerinde otofajinin başlatılması.....	72
Şekil 4.46. Artan CHNQ dozlarıyla (10, 20, 40 µM) muamele edilen HT-29 hücrelerinde bozulan lizozomal yıkımın ICAM-1 ile gösterilmesi.....	73
Şekil 4.47. HCT-116 hücrelerinde otofaji ve apoptoz ilişkisi AnnexinV boyaması ile akım sitometrisi kullanılarak araştırılmıştır.....	74
Şekil 4.48. Üç farklı konsantrasyonda CHNQ ve kuersetin uygulanan (A) HCT116 ve (B) HT29 hücrelerindeki XIAP, Kaspaz-3 ve kesilmiş (cleaved) kaspaz-3 seviyeleri. Beta Aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.	75
Şekil 4.49. Seçilen konsantrasyonlarda CHNQ ve kuersetin uygulanan (A) HCT116 ve (B) HT29 hücrelerindeki kaspaz aktiviteleri.	76
Şekil 4.50. CHNQ maddesinin RDKY3615 <i>S.cerevisiae</i> hücrelerinin hücre çoğalması ve canlılığı üzerindeki etkisi.....	77
Şekil 4.51. CHNQ ile muamele edilmiş maya hücrelerinde oksidatif stresin ve otofajinin başlatılması.	77

ÖZET

Aldo-keto redüktazlar (AKR) glikoz indirgeyici ajanlar olarak çok iyi karakterize edilmiş ve diyabet patofizyolojisinde yer alan NAD(P)H'a bağımlı oksidoredüktazlardır. Bu enzimlerin, inflamatuvar tepkiyi başlatabilen lipit peroksidasyon ürünlerinin üretimine aracılık yaptığı da bilinmektedir. Kolondaki kronik inflamasyon çoğunlukla kanser gelişimi ile devam etmektedir. AKR'lar inflamasyonda yer almaktadır ve son çalışmalar bu enzimlerin kanser ilerlemesindeki önemli rolünü ortaya çıkarmıştır.

Bu projede, multidisipliner bir yaklaşım ile AKR1B1 ve yakından ilişkili AKR1B10'u hedefleyen doğal bir madde olan kuersetinin, yarı sentetik türevlerinin detaylı karakterizasyonu ve bunların kolon kanseri etiolojisindeki çeşitli inflamatuvar yollar üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. HCT-116 kolon kanseri hücre hattında, AKR1B1 geni başarılı bir şekilde susturulmuş, AKR1B10 geni de aşırı olarak ifade edilmiştir. AKR1B1 ve AKR1B10 enzimlerini ifade eden yaban tipi HCT-116 hücreleri, AKR1B1 ifadesi susturulmuş ve AKR1B10'u aşırı ifade eden HCT-116 hücreleri hücreler, bu iki farklı AKR enzimi ifadelediği bilinen ve yaban tipi HT-29 hücreleri ile birlikte CHNQ (3,7-dihydroxy-2-[4-(2-chloro-1,4-naphthoquinone-3-yloxy)-3-hydroxyphenyl]-5-hydroxychromen-4-one) ile muamele edilmiştir. CHNQ muamelesi, bütün hücrelerde hücre canlılığını azaltmıştır. Bu durum, apoptozda artış ve G2/M fazında tutuklanmayla takip edilmiştir. Bütün bu etkiler, parental bileşik kuersetine kıyasla çok daha güçlü bir şekilde gerçekleşmiş olup, ilginç bir şekilde, AKR1B1'in susturulmasından veya AKR1B10 'un aşırı ifadesinden bağımsız olarak ilerlemiştir. Dolayısıyla, çalışmada, CHNQ'nun diğer etkileri yalnızca yaban tipi hücrelerde incelenmiştir. Öncelikle, CHNQ, 1,4 naftokinon yapısına sahip olduğu için, bu bileşiğin redoks sinyal yollarında görev alabileceği hipotez edilmiştir. Hipotez ile tutarlı olarak, reaktif oksijen türleri (ROT) seviyelerinde güçlü bir artış ile birlikte mitojen aktive protein kinaz (MAPK) sinyal yolağında artış gözlenmiştir. Aynı zamanda, CHNQ muamelesinden dolayı görülen ölümlerin ROS kaynaklı otofajiden dolayı olduğu *in vitro* olarak iki farklı kolon kanseri hücre hattında ve *in vivo* olarak *S. cerevisiae* maya hücrelerinde gösterilmiştir.

Bunun ardından, AKR'lerin kolon kanseri üzerindeki kendi başına etkileri incelenmiştir. HCT-116 hücrelerinde AKR1B1 susturulması, ROT üretiminde azalmaya sebep olmuş ve bundan dolayı hücre çoğalmasında, hücre hareketliliği ve migrasyonunda, MAPK ve NF-κB sinyal yollarında azalmaya ve hücre döngüsünde gecikmeye neden olmuştur. Bütün bu bulgular, AKR1B1 in kolon kanserinde onkogenik özelliklere sahip olduğunu işaret etmektedir. Öte yandan, HCT-116 hücrelerinde AKR1B0 'un aşırı ifadenmesi hücre çoğalması ve hücre

döngüsünde bir değişime sebep olmazken, NF- κ B'nin nükleer translokasyonunda, DNA bağlanmasında ve transkripsiyonel aktivitesinde önemli azalmalar ile sonuçlanmıştır.

Bulgularımız, AKR enzimlerinin ve bu enzimlerin inhibitörlerinin çeşitli fonksiyonlara sahip olduklarını göstermektedir. İleriye yönelik çalışmalar, kolon kanseri hasta örneklerinde, AKR enzimlerinin ifadenmesinin, aktivitesinin ve altında bulunan sinyal yollarını anlamak yolunda ve muhtemel terapötik yaklaşımlar geliştirmeyi amaçlamaktadır.

Anahtar kelimeler: CHNQ, kuersetin, Aldo-keto redüktazlar (AKRler), AKR1B1, AKR1B10, otofaji, inflamasyon

ABSTRACT

Aldo-keto reductases (AKR) are NAD(P)H dependent oxidoreductases that have been best characterized as glucose reducing agents, and have been implicated in diabetic pathophysiology. These enzymes are also known to mediate the generation of lipid peroxidation metabolic products that can induce an inflammatory response. Chronic inflammation in the colon is very frequently followed by the development of carcinogenesis. Recent studies have revealed that pharmacological inhibition or genetic ablation of these enzymes could prevent colon cancer.

The project encompassed a multidisciplinary approach for the detailed characterization of naturally derived quercetin semi synthetic derivative that target AKR1B1 and the closely related AKR1B10 as well as their effects on various inflammatory pathways involved in the etiology of colon cancer. We have successfully silenced AKR1B1 and overexpressed AKR1B10 in the colon cancer cell line HCT-116. These cells, wild-type HCT-116 cells and wild-type HT-29 cells were treated with CHNQ (3,7-dihydroxy-2-[4-(2-chloro-1,4-naphthoquinone-3-yloxy)-3-hydroxyphenyl]-5-hydroxychromen-4-one). CHNQ treatment resulted in a significant loss of viability in all cells tested. This was accompanied by an increase in apoptosis and cell cycle arrest at G2/M. All of these effects were induced far more strongly than the parental compound quercetin and, interestingly, were independent of the overexpression or silencing of AKRs. Therefore, we have examined the effects of CHNQ alone on wild-type colon cancer cells. Since CHNQ has a 1,4 naphthoquinone structure, we hypothesized that the compound could be involved in redox signaling. We observed a robust induction of reactive oxygen species (ROS) along with an increase in signaling through the mitogen activated protein kinase (MAPK) pathway. Cell death from CHNQ treatment also resulted from ROS induced autophagy both in vitro in colon cancer cell lines and in vivo in *S. cerevisiae* cells.

We next examined the effects of AKRs per se on colon cancer cell lines. Silencing of AKR1B1 in HCT-116 cells resulted in a decrease in the production of ROS, along with a decrease in proliferation, cell motility and migration, reduced MAPK and NF- κ B signaling and a delay in cell cycle progression. All of these data pointed towards AKR1B1 having oncogenic properties in colon cancer cell lines. On the contrary, overexpression of AKR1B10 in HCT-116 cells resulted in no change in proliferation or cell cycle progression, however, a robust inhibition in the nuclear translocation, DNA binding and transcriptional activity of NF- κ B was seen. These data point towards a tumor suppressive function of AKR1B10 in colon cancer.

Our data indicate diverse functions of AKRs and their inhibitors in colon cancer. Future studies are aimed towards understanding the expression, activity and downstream signaling pathways of AKRs in colon cancer patient samples and possible therapeutic approaches.

Keywords: CHNQ, Quercetin, Aldo-keto reductases (AKRs), AKR1B1, AKR1B10, autophagy, inflammation

1. GİRİŞ

1.1. Aldo-keto redüktazlar (AKRler)

Aldo-keto redüktaz süperaillesi, nikotinamid adenin dinükleotit (fosfat) (NAD(P)H) bağımlı oksidoredüktazlardır ve retinaller, steroid hormonları, safra asiti öncüleri, glikoz, lipit peroksidasyon ürünleri, prostaglandinler ve ksenobiyotikleri gibi eksojen birçok substratın katalizinde görev almaktadırlar. Süperaille, 15 tane aileden (AKR1-AKR15) ve 90'dan fazla üyeden oluşmaktadır. Bu enzimler yaklaşık 34-37 kDa ağırlığında monomerik proteinlerdir ve çoğunlukla sitoplazmada bulunmaktadırlar. Fonksiyonel olarak, birbirleri arasında birçok çeşitli özelliğe sahip olmalarında rağmen, hepsi korunmuş bir (β/α)₈ varil yapısıyla piridin nukleotidi bağlanma bölgesine ve yüksek derecede benzer sekans sıralamasına sahiptir (Mindnich ve Penning, 2009). (β/α)₈ varil motifi, üçüncül ve dördüncül yapıların oluşmasını sağlayarak, kofaktörlerin ve metal iyonlarının aktif bölgeye bağlanmasını desteklemekte böylelikle AKR enzimlerine fonksiyonellik sağlamaktadır (Wierenga, 2001).

AKR proteinlerinin isimlendirmesinde, ilk numara aile numarasını temsil ederken (ör: AKR1), ardından gelen harf alt-aileyi (ör:AKR1B) ve bunun da ardından gelen ikinci sayı özgün proteini (ör: AKR1B1) temsil etmektedir. İnsan aldo-keto redüktazları temel olarak 3 ana ailenin altında toplanmaktadırlar: AKR1, AKR6 ve AKR7. Bu 3 ailenin içinde, 15 AKR proteini tanımlanmıştır. Her bir insan AKR'sinin sistematik ve fonksiyonel isimleri Tablo 1.1'de verilmiştir.

Tablo 1.1. AKR üyelerinin listesi (Mindnich ve Penning, 2009)

Sistemik İsim	Fonksiyonel İsim
AKR1A1	Aldehit redüktaz
AKR1B1	Aldoz redüktaz
AKR1B10	İnce bağırsak tipi aldoz redüktaz
AKR1B15	Aldoz redüktaz
AKR1C1	3 α (20 α)-hidroksisteroit dehidrogenaz
AKR1C2	Tip 3 3 α - hidroksisteroit dehidrogenaz
AKR1C3	Tip 2 3 α - hidroksisteroit dehidrogenaz
AKR1C4	Tip 1 3 α - hidroksisteroit dehidrogenaz
AKR1D1	Steroid 5 β -redüktaz
AKR1E2	1,5-Anhidro-D-fruktoz redüktaz
AKR6A3	Potasyum voltaj kapılı kanal, β -altünite-1
AKR6A5	Potasyum voltaj kapılı kanal, β -altünite-2
AKR6A9	Potasyum voltaj kapılı kanal, β -altünite-3
AKR7A2	Aflatoksin aldehit redüktaz 1
AKR7A3	Aflatoksin aldehit redüktaz 2

AKR enzimleri birçok ortak özellik paylaşıyor olmasına rağmen, farklı substratlar kullanmaktadırlar ve dolayısıyla farklı fonksiyona sahiptirler (Mindnich ve Penning, 2009).

1.2. AKR'ler ve Hastalıktaki Önemi

AKR1B alt ailesi, genel olarak aldoz redüktaz olarak bilinirler ve bu enzimeler aldehitlerin alkole ve birçok başka substrata indirgenmesini sağlarlar. AKR1B1 ve AKR1B10, AKR süper ailesinin birçok kanser türüyle ilişkili iki üyesidir, 'dur. AKR1B1 enzimi, poliol yolağının en başında görev almaktadır. NAD(P)H'i kofaktör olarak kullanarak glikozu sorbitole çevirir. Ardından, sorbitol, sorbitol dehidrojenaz enzimi sayesinde yükseltgenerek fruktoza çevrilir (Brownlee, 2001). Öte yandan, AKR1B10, ince bağırsak tipi aldoz redüktaz olarak bilinir. Genel fonksiyonları, aromatik aldehitleri, şekerleri, metilglioksal ve diasetilleri indirgemektedir. Bunun yanında, retinalleri retinole çevirerek hücre çoğalması ve farklılaşmasında görev alan retinoyik asit sinyal yolağını engelleme özelliğine de sahiptir (Nishinaka vd., 2011). AKR1B1 ve AKR1B10

enzimleri aminoasit sekanslarında %71 benzerlik göstermektedir. Substrat kullanma öncelikleri benzer olsa da, farklı doku tiplerinde farklı ifadelenme modeli gösterirler. AKR1B1 tüm doku ve hücre tiplerinde bulunma özelliğine sahipken, AKR1B10 daha çok karaciğer, kolon, ince bağırsak, timüs ve böbreküstü bezinde bulunmaktadır (Laffin ve Petrash, 2012).

4-hydroxy-trans-2-nonenal (HNE) ve onların glutatyon konjugatları (ör. GS-HNE) gibi lipid peroksidasyonu türevli lipid aldehytlerinin, AKR tarafından, DHN (1,4-dihydroxy-nonene) ve GS-DHN (glutathionyl-1,4-dihydroxynonene) gibi inflamasyona aracılık eden alkol türevlerine etkin bir biçimde indirgendiği gösterilmiştir (Ramana, 2011). İndirgenmiş aldehit glutatyon konjugatı GS-DHN'nin, sonunda inflamatuvar cevaba yol açan, ROT (Reaktif Oksijen Türleri) tarafından başlatılan hücre sel sinyal yolağı iletiminde yeni bir aracı olduğu düşünülmektedir (Srivastava vd., 2011). AKR inhibisyonunun hem hücre sel düzeyde hem de hayvan modellerinde, sitokinler, büyüme faktörleri, endotoksinler, yüksek glikoz, allerjenler ve otoimmün reaksiyonlar tarafından indüklenen inflamatuvar sinyali anlamlı bir biçimde engellediği tespit edilmiştir (Ramana vd., 2010). Bu nedenle, aldoz redüktaz inhibitörleri (ARI), ateroskleroz, astım, üveit, sepsis, artrit, periodontit gibi inflamatuvar ve kolon kanseri gibi, aşırı sitokin ve kemokin üretimi ile ilişkili hastalıkların tedavisinde yeni yaklaşımlar sunabilmektedir (Ramana vd., 2010; Ramana, 2011; Ramana vd., 2011; Saxena, vd., 2011; Yadav v.d, 2011).

Kronik inflamasyonun, kanser gelişimiyle ilişkili olduğu ayrıntılı bir biçimde gösterilmiştir (Mariani vd., 2014). Ayrıca AKR'nin aşırı ifadelenmesi, akciğer, meme, prostat, serviks, yumurtalık ve kolon kanseriyle ilişkilendirilmiştir (Laffin ve Petrash, 2012; Liu vd., 2009). AKR inhibisyonunun, bağışıklık sistemi baskılanmış zenograf fare modellerinde ve kanser hücre kültürü çalışmalarında, kanser hücrelerinin çoğalmasını ve sitokin, büyüme faktörleri tarafından uyarılmış inflamatuvar sinyalleri engellediği gösterilmiştir (Liu vd., 2009; Ramana vd., 2010; Saxena vd., 2013; S.K. Srivastava vd., 2006; Tammali vd., 2006; Tammali vd., 2007). Örneğin, antitümör etkili antiinflamatuvar ilaç Sulindac'ın AR inhibisyonuna sebep olarak bu etkiyi gösterdiği düşünülmektedir (Steuber, 2011). Bunlara ek olarak, AKR'nin bazı kanserlerde aşırı ifadelenmesinin doksorubisin direncine yol açtığı, bunun da karbonil indirgenmesi ile ilacın atılımında artış yoluyla olduğu gözlenmiştir (Bains vd., 2013; Plebuch vd., 2007). Bu sebeple, özellikle diyabetik komplikasyonların tedavisi için geliştirilmiş olan AKR inhibitörlerinin, anti kanser amaçlı kullanım için yeniden değerlendirilmeleri önemlidir. Var olan ve FDA tarafından onaylanmış ilaçların başka hastalık alanlarında kullanım potansiyellerinin araştırılması, yeni ilaçların keşfini de destekleyecektir (Simard ve Rauh, 2009).

Kanserde, AKRlerin ifadelenmesi farklı kanser ve doku türlerinde farklılık göstermektedir. Bir Oncomine gen ekspresyonu veri tabanı (<https://www.oncomine.org>) çalışmasına göre, AKR

ifadelenmesi idrar torbası, serviks, beyin, özofagus, böbrek kanserlerinde ve lösemi, lenfoma ve melanomalarda normal dokuya kıyasla daha fazladır. Başka bir çalışmada ise, kanserde AKR'lerin ifade ve aktivitesinde artış olduğu gösterilmiştir (Laffin ve Petrash, 2012) .

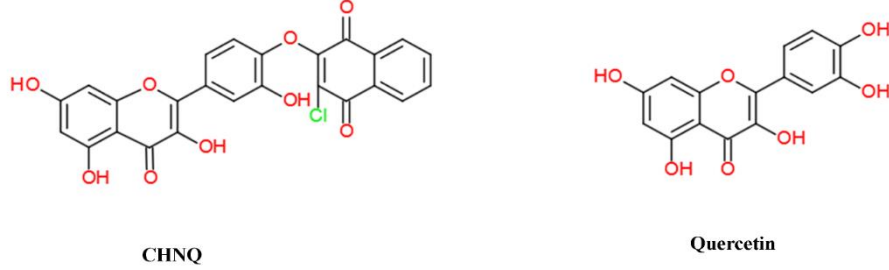
1.3. AKR inhibitörleri

AKR inhibisyonunun, kolon kanseri gibi inflamasyon temelli neoplazilerin tedavisinde etkili bir yöntem olabileceği düşünülmektedir. AKR inhibitörlerinin geliştirilmesi, AKRlerin poliolsu yolağı aracılığı ile diyabet patogenezi ile ilişkilendirildiğinden beri önem kazanmıştır (Alexiou vd., 2009). AKR inhibisyonu temelli birçok ilaç geliştirme denemeleri, mevcut kanser ilaçlarıyla karşılaştırıldığında düşük olmasına rağmen, kabul edilemeyecek toksisite düzeyleri nedeniyle durdurulmuştur. Oysaki, AKR inhibitörleri üzerine toplanan antidiyabetik klinik bulgular, bu inhibitörlerin anti kanser amaçlı dönüşümlerinde kolaylık sağlayacaktır. Bilinen kemoterapi ilaçları ve ARI'lar (AKR inhibitörler) ile bileşik tedaviler ise bütünleşik etkilere yol açabilir ve ARI'ların klinikte kullanımını teşvik edebilir (Liu vd., 2009).

Bugüne kadar, fitokimyasal tedavi araştırmalarında çok çaba sarf edilmiştir. Fitokimyasal grubundan olan flavonoidler, vitamin, mineral ve liflere benzer şekilde sebze ve meyvelerin sağlığa olan etkilerine katkı sağlamaktadırlar. Flavonoidlerin, oksidatif stress, enzimatik olmayan glikolizlenme ve poliolsu yolağı gibi diyabet ile ilişkili komplikasyonların oluşumunda yer alan pek çok mekanizmayı veya etiyolojik faktörü etkilediği gösterilmiştir (Stefek, 2011). Bir flavonol olan kuersetin, insanlarca en çok tüketilen flavonoiddir (Stefek ve Karasu, 2011). Kuersetin ve diğer flavonoidlerin, göz lensi opasifikasyonuna karşı koruyucu etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Bitkilerde kuersetin genellikle glikoz, galaktoz, ramnoz, rutinoz veya ksiloz gibi bir şeker grubu ile birlikte O-glikozid formundadır ve bu form kuersetinin biyoyararlanımını önemli ölçüde etkilemektedir (Cai vd., 2013; Stefek ve Karasu, 2011). Kuersetin ve diğer flavonoidlerin AR'yi inhibe edici etkisi Stefek (2011), Stefek ve Karasu (2011) yayınlarında ayrıntılı bir biçimde anlatılmıştır. Kuersetin, diğer bitkisel polifenoller ve onların sentetik analoglarının anti-proliferatif etkisi, *in vitro* hücre kültürü deneylerinde de gösterilmiştir (Alfa vd., 2006; Loa vd., 2009) Flavonoidlerin anti-proliferatif etki mekanizmaları da gösterilmiştir (Pilátová vd., 2010).

Yakın zamanda kuersetinin yarı sentetik türevleri sentezlenmiş ve hem antioksidan hem de AR inhibitörü özelliklerine sahip olmalarıyla çift yönlü etkileri karakterize edilmiştir (Veverka

vd., 2013). Çalışılan türevler arasında, kuersetinin kloronaftokinon türevi olan CHNQ, en yüksek AR inhibisyonu ve antioksidan aktivitesi ile umut vaat etmektedir.



Şekil 1.1. 3,7-dihydroxy-2-[4-(2-chloro-1,4-naphthoquinone-3-yloxy)-3-hydroxyphenyl]-5-hydroxychromen-4-one (CHNQ) 'nun ve Kuersetin'in kimyasal yapısı.

1.4. Çalışmanın Amacı

AKR'ler, glikoz metabolizmasının poliol yolağında rol alan, glikozu hücre zarından geçemeyen bir bileşik olan sorbitole çeviren aldo-keto redüktaz enzimleridir (Saraswat vd., 2006). Bu enzimlerin aşırı ifadesi veya fazla aktivitesi, sitoplazmada aşırı sorbitol birikmesine sebep olarak oksidatif stres oluşturmaktadır. Bu da, diyabet ve kanser gibi inflamatuvar hastalıkların komplikasyonlarında önemli rol oynamaktadır (Srivastava vd., 2006).

Buradan yola çıkarak, AKR1B1 ve AKR1B10 enzimlerinin kolorektal kanser gelişiminde etkili olabileceği hipotez edilmiştir. Bu amaçla, iki farklı kolorektal kanser hücre hattı, HCT-116 ve HT-29, model olarak seçilmiştir. HCT-116 hücreleri yüksek miktarda AKR1B1 ifade ederken, AKR1B10'u ifade etmemektedir. HT-29 hücrelerinde ise yalnızca AKR1B10 ifadesi görülmüştür (Ebert vd., 2011). Tüm bunlara ek olarak, kolon kanserinde CHNQ'nun rolü ve etkinliğinin kuersetin ile karşılaştırılması ise henüz araştırılmamıştır.

Çalışmadaki amaçlarımız,

1. Özgün, yarı sentetik kuersetin türevi olan CHNQ kullanarak farklı hücre hatlarında AKR1B1 ve AKR1B10'u inhibe etmek ve sonuçlarını gözlemlemek,
2. AKR1B1'i HCT-116 hücrelerinde RNA interferans (RNAi) ile susturarak AKR1B1 baskılanmasının kolorektal karsinogenez üzerindeki etkilerini incelemek,
3. AKR1B10'u HCT-116 hücrelerinde aşırı ifade ederek, bu genin kolorektal karsinogenez üzerindeki etkilerini incelemektir.

Bu birleşik ve çok disiplinli çalışmadan elde edilecek olan sonuçlar, kolon kanseri etiyolojisinde yer alan moleküler mekanizmalarda aldo-keto redüktazların rolü ile, aldo-keto redüktaz inhibitörlerinin etki mekanizmasının anlaşılmasına yardımcı olacaktır. Bu yeni bileşikler, kolon kanseri tedavisinde potansiyel bir terapötik olarak kullanılmak üzere patentlenebilecektir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Kuersetin (Qc) gibi fitokimyasal terapötik ajanların, çeşitli mitojenik sinyal yollarını etkileme özellikleri sayesinde güçlü tümör engelleyici etkileri olduğu gösterilmiştir (Araújo vd., 2011; Ranelletti vd., 2000). Buna karşın, kuersetinin düşük çözünürlüğü ve biyoyararlanılabilirliğinin düşük olmasından dolayı klinik uygulamaları kısıtlıdır (Cai vd., 2013). Kuersetinin özgün yarı-sentetik türevlerinin taranması sonucunda, CHNQ (3,7-dihydroxy-2-[4-(2-chloro-1,4-naphthoquinone-3-yloxy)-3-hydroxyphenyl]-5-hydroxychromen-4) biyolojik etki bakımından en umut veren türev olmuştur (Stefek vd., 2015). Proje ortaklarımızla gerçekleştirdiğimiz önceki bulgularımızda, asetik asitle indüklenmiş koliti iyileştirmede, CHNQ'nun kuersetine karşı daha etkili olduğu *in vivo* olarak gösterilmiştir (Milackova vd., 2015). Bu sonuç, kullanılan farmakolojik konsantrasyonlarda, CHNQ'nun biyoyeterliliğinin, kuersetine kıyasla daha yüksek olduğunu düşündürmektedir.

Kronik inflamasyonun, özellikle kolon kanserinde, neoplastik dönüşümde çok önemli bir etkisi olduğu bilinmektedir. Naftokinonların anti-tümör aktivitelerinin olduğu, ayrıca oksidatif stres yaratarak redoks sinyal yolağını etkilediği gösterilmiştir. CHNQ gibi 1,4-naftokinonlar, 2 adet kinon grubuna sahip olmalarından dolayı redoks tepkimesinde bir ya da iki elektron alarak anyon ya da di-anyon türlerini oluşturmaktadırlar. Bunun sonucunda da, oksijene elektron transferi sonucunda oluşan ve NADPH-sitokrom-P-450 redüktaz gibi flavoenzimlerle katalize olan süperoksit gibi reaktif oksijen türleri (ROT) oluşabilir (Araújo vd., 2011).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, AKR enzimleri retinopati, nöropati, nefropati ve katarakt oluşumu gibi ikincil diyabetik komplikasyonların patojenezinde görev aldığı göstermektedir (Saraswathy vd., 2014). Bu sebeple, birtakım AKR inhibitörleri geliştirilmiş ve diyabetik komplikasyonlar için test edilmiştir. Bu inhibitörler insan sağlığına zarar vermiyor olsalar bile, klinik olarak sınırlı yararlılığa sahiptirler (Tammali vd., 2011). AKR'ler glikoz indirgeyici özelliklerinin yanı sıra oksidatif stres kaynaklı üretilen lipid peroksidasyon türevi aldehit ve onların glutatyon konjugelerini de indirgeme yeteneğine sahiptir. Lipid aldehitler, NF-κB ve AP-1 gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu düzenleyen hücresel sinyalleri etkilediğinden, AKR enzimlerinin inhibisyonu da benzer yolları baskılamaktadır (Ramana, 2011). Bunlara ilaveten, AKR inhibitörlerinin sepsis, astım, kanser ve üveitis gibi inflamatuvar hastalıkları engelleme kapasitesine sahip olabileceği de *in vivo* çalışmalarla gösterilmiştir (Ramana, 2011).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kimyasallar

3,7-Dihydroxy-2-[4-(2-chloro-1,4-naphthoquinone-3-yloxy)-3-hydroxyphenyl]-5 hydroxychromen-4-one (CHNQ), Kuersetin'in N,N-diizopropilsetilamin varlığında 2,3-dikloro-1,4 naftokinon ile alkilenmesiyle sentezlenmiştir (**Şekil 1.1**). Sentez işlemleri BEL/NOVAMANN (Bratislava, Slovakya) firması tarafından yapılmış olup, laboratuvarımıza Slovak partnerlerimiz tarafından sağlanmıştır.

BrdU Çoğalma Kiti ve G418 Roche'dan, Muse Hücre Yaşayabilirliği Kiti, Muse Annexin V ve Ölü Hücre Kiti ve Muse Multicaspaz Kiti Millipore'dan, Kuersetin Tocris'den, Propidyum İyodür (PI), AkridinTuruncusu, Nitroblue Tetrazolyum (NBT), 3-metiladenin (3-MA) ve Sorbinil Sigma'dan, AKR1B1 SureSilencing shRNA Plazmit kiti Qiagen'den, Dihidroetidyum(DHE) Life Technologies'den, Cyto-ID Otofaji Tayin Kiti Enzo Life Sciences'dan, Annexin V Apoptoz Tayin Kiti BD, Pharmingen'den alınmıştır.

Bu çalışmada kullanılmış olan antikörlerin listesi aşağıda **Tablo3.1** de gösterilmektedir.

İsim	Üretici Firma	İsim	Üretici Firma
AKR1B1	Thermo Scientific	p62	Cell Signalling
AKR1B10	Thermo Scientific	ICAM-1	Santa Cruz
XIAP	Santa Cruz	p65	Santa Cruz
Caspase-3	Santa Cruz	p50	Santa Cruz
p-ERK	Santa Cruz	Siklin E	Abcam
Total-ERK	Santa Cruz	P-pRb	Abcam
P-JNK	Cell Signaling	Siklin B1	Abcam
Total- JNK	Cell Signaling	α-tubulin	Santa Cruz
P-p38	Santa Cruz	β-aktin	Santa Cruz
P-AKT	Santa Cruz	GAPDH	Santa Cruz
LC3 I/II	Cell Signaling	Topo-II	Santa Cruz
Beklin-1	Cell Signaling		

3.2. Hücre Kültürü

HT-29 hücreleri (ŞAP Enstitüsü) ve HCT-116 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) hücreleri %10 fetal sıgır serumu (FBS) (v/v), 2 mM L-glutamin, 4,5 g/L glikoz ve 1X penisilin/streptomisin içeren RPMI 1640 besi yerinde büyütülmüştür. CHNQ ve Kuersetin uygulamaları hem %10 serumlu hem de serumsuz medyumda yapılmıştır. CHNQ uygulaması için serumsuz, kuersetin için ise serumlu ortam uygun görülmüştür. Bütün hücreler 37°C de ve %5 CO₂ ve %95 hava içeren inkübatörde büyütülmüştür.

ATCC'den temin edilen HUVEC (insan göbek kordonu endotel hücreleri), hücre yüzey tutunmasını kolaylaştırmak amacı ile önceden jelatin ile kaplanmış hücre kültürü flasklarında/plakalarında kültür edilmiştir. Bu amaçla jelatin solüsyonu (Sigma) 1:10 oranında steril dH₂O ile dilüsyon edilmiş, flask/plaka yüzeyleri bu solüsyon ile kaplanmış ve 37°C'de 1 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda jelatin solüsyonu uzaklaştırılmış; bu şekilde hazırlanan kültür flask ya da plakaları, 4°C'de saklanarak en fazla iki hafta içinde kullanılmıştır. Rutinde, HUVEC hücreleri penisilin/streptomisin (100 units/ml) içeren CC-4133 EGM Bullet kit (Lonza) besiyerinde, 37°C 'de, %5 CO₂'li ortamda büyütülmüştür. HUVEC hücreleri primer hücreler olduğundan, en fazla 5. pasajda olan hücreler deneylerde kullanılmıştır.

S. cerevisiae maya hücreleri (suş: RDKY3615) Dr Kyungjae Myung (National Human Genome Research Institute, MD, ABD) 'dan alınmıştır ve %2 glikoz içeren YPD (yeast extract-maya özütü-, pepton ve dekstrozu) besiyerinde 30°C'de büyütülmüştür.

3.3. Plazmitler transfeksiyon yöntemleri

HCT-116 hücre hattında AKR1B1'in susturulması için gerekli shRNA Plazmiti SureSilencing shRNA Plasmids Kiti (Qiagen) kullanılmıştır. Bu kit AKR1B1'in susturulması için dizayn edilmiş 4 farklı shRNA ve bir adet kontrol (scrambled sequence) plazmit içermektedir.

HCT-116 hücre hattında AKR1B10'un aşırı ifadesi için, AKR1B10 bakteri başlatıcı (promotör) sekansına sahip olan bir plazmit kullanan Dr. Satoshi ve araştırma grubundan bu plazmit alınmıştır (Endo vd., 2009). Plazmit elimize ulaştıktan sonra multi-klonlama bölgesinde (MCS) bulunan *NheI* ve *EcoRI* enzimleri ile kesilerek, yine aynı enzimlerle kesilmiş olan memeli hücreleri için uygun başlatıcı (promotör) sekansını içeren pcDNA3.1(-), Zeo vektörüne

klonlanmıştır. Yapılan sekanslama sonucu, AKR1B10 geninde hiçbir mutasyon olmadığı doğrulanmıştır.

3.3.1. AKR1B1 susturulmasında kalıcı transfeksiyon

AKR1B1'in HCT-116 hücrelerinde susturulması amacıyla bu hücrelere 2 µg miktarındaki belirtilen plazmit 4 saat süre ile transfekte edilmiştir. Sonrasında daha önce laboratuvarımızda belirlenmiş bir konsantrasyondaki (450 µg/ml) neomisin (G418) antibiyotiği transfeksiyon yapılmayan kontrol hücreleri ölene kadar hücrelere verilmiştir. Yaklaşık 10 günün ardından kontrol örneğindeki bütün hücrelerin ölmesiyle transfeksiyon yapılan örneklerdeki hücreler monoklonal koloni seçimi yapılması amacıyla daha büyük bir hücre kültürü plakasına aktarılmıştır. Seçilen koloniler başta kullanılan antibiyotik miktarının yarısında (225 µg/ml) büyütülmeye devam edilmiştir. Farklı kolonilerden elde edilen hücre lizatları ile western blot analizi yapılarak AKR1B1'in susturulduğu koloniler belirlenmiştir.

3.3.2. AKR1B10 aşırı ifadesinde kalıcı transfeksiyon

AKR1B10'un HCT-116 hücrelerinde aşırı ifadesi amacıyla, öncelikle 6 kuyucuklu plakalara kuyucuk başına 5×10^5 hücre ekilmiştir. Ertesi gün, bu hücreler 2 µg pcDNA3.1 (-) boş vektörü (empty vector: EV) ve AKR1B10 klonlanmış pcDNA3.1 (-) vektörü 1:1 oranda Xtremegene HP transfeksiyon ajanı kullanılarak (1 µg plazmit: 1 µl Xtremegene HP) 24 saat transfekte edilmiştir. 24 saatin sonrasında, tüm hücrelere yine daha önce laboratuvarımızda belirlenmiş bir konsantrasyondaki (250 µg/mL) Zeocin antibiyotiği verilmiştir ve bu süreç transfekte olmamış hücreler tamamen ölene devam ettirilmiştir. Yaklaşık 15 günlük antibiyotik seçiminin ardından, kontrol örneğindeki bütün hücrelerin ölmesiyle, transfeksiyon yapılan örneklerdeki hücrelerde koloni seçimi yapılmıştır ve her bir koloni büyütülmek amacıyla 96 kuyucuklu plakanın kuyucuklarına konulmuştur. Her koloni yeterince büyüdükçe daha büyük bir plakaya aktarılıp çoğaltılmıştır. Seçilen koloniler başta kullanılan antibiyotik miktarının yarısında (125 µg/ml) büyütülmeye devam edilmiştir. Farklı kolonilerden elde edilen hücre lizatları ile western blot analizi yapılarak AKR1B10'un aşırı ifadelendiği koloniler belirlenmiştir.

3.3.3. AKR1B10 aşırı ifadesinde geçici transfeksiyon

AKR1B10'un kalıcı ifadesinde istikrarlı koloniler elde edilemediğinden dolayı, bu genin HCT-116 hücrelerinde her deneyden önce geçici olarak transfekte edilmesine karar verilmiştir. Bu amaçla, öncelikle 6 kuyucuklu plakalara kuyucuk başına 5×10^5 hücre ekilmiştir. Ertesi gün, bu hücreler 2 µg pcDNA3.1(-) boş vektörü (empty vector: EV) ve AKR1B10 klonlanmış pcDNA3.1(-) vektörü 1:1 oranda Xtremegene HP transfeksiyon ajanı kullanılarak (2 µg plazmit: 2 µl Xtremegene Hp) 24 saat transfekte edilmiştir. 24 saat transfeksiyonun sonunda, deneyin amacına göre, hücreler ya toplanmıştır ya da besiyeri normal RPMI 1640 ile değiştirilip hücreler 48 veya 72 saat sonunda toplanmıştır.

3.4. Total Protein İzolasyonu

Total protein izolasyonu için proteaz inhibitör kokteyli, fosfataz inhibitör kokteyli ve 1mM sodyum ortovanadat ve 1mM sodyum florid içeren hücre lizis tamponu M-PER kullanılmıştır. Yapışkanlığını kaybeden hücreler 4°C de 14.000 x g 'de 10 dakika boyunca santrifüjlenmiş ve total protein içeren süpernatant alınmıştır. Protein konsantrasyonu ölçümleri Bradford yöntemi ile Coomassie Plus Deney kiti kullanılarak yapılmıştır.

3.5. Sitoplazmik-Çekirdeksel Protein İzolasyonu

Sitoplazmik ve çekirdeksel proteinlerin ayrı ayrı izolasyonu için, AKR1B1 kalıcı olarak susturulmuş veya AKR1B10 geçici olarak transfekte edilmiş hücrelerden, yaklaşık 1×10^7 hücre, önce hücre kültürü plakasında bir kez soğuk steril PBS'de yıkanmış ve kazıyıcı (scraper) yardımıyla eppendorf tüplerine aktarılmıştır. 300 x g 'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra, süpernatant atılmış ve hücreler 1X fosfataz inhibitörü içeren PBS'de çözülmüştür. Ardından, örnekler tekrar 300 x g 'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatantlar atılmıştır. Sitoplazmik fraksiyonun izolasyonu için, hücre pelletleri 300 µl hipotonik solüsyonda (100 mM HEPES pH:7,5, 40 mM NaF, 100 µM Na₂MoO₄ ve 1 mM EDTA) çözülmüş, hücre süspansiyonu daha önce buzda soğutulmuş eppendorf tüplerine aktarılmış ve buzda 15 dakika inkübe edilmiştir. 15 dakikalık inkübasyon periyodunun ardından, her örneğe %10'luk NP-40 'den 75 µl eklenmiş ve pipetlenerek karıştırılmıştır. Sonra, bütün sitoplazmik fraksiyonu almak için, örnekler yüksek

hızda 30 saniye döndürülmüştür. Süpernatantlar daha önceden buzda soğutulmuş yeni eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Pelletler ise 80 µl Çekirdeksel Ekstraksiyon Solüsyonunda (nuclear extraction buffer: 20 mM HEPES pH:7.9, 0.2 mM EDTA, 3 mM MgCl₂, 840 mM NaCl, 20 % gliserol) çözülmüş ve 15'şer saniye yüksek hızda vortekslenmiştir. Bu aşamadan sonra, örnekler buza konmuş 15 dakika yüksek hızda sallanmıştır. Sonra, 30'ar saniye vortekslenmiş ve tekrar 15 dakika buzda ve yüksek hızda sallanmıştır. Son olarak, örnekler 4°C'de, 14000 x g'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatantlar alınarak yeni eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Bu kısım da çekirdeksel fraksiyondur.

3.6. **Western Blot**

Örnekler izole edilip konsantrasyonu ölçüldükten sonra, 30-50 µg protein sodyumdodesilsülfat poliakrilamit jel elektroferezinde (SDS-PAGE) yürütülmüş ve PVDF membrana transfer edilmiştir. Daha sonra membran %5 yağsız süt veya BSA (bovin serum albümin) içeren PBS-T veya TBS-T ile 1 saat bloklanmış, uygun birincil antikolar ile bir gece boyunca problanmıştır. Daha sonra yaban turpu peroksidazı (horse radish peroxidase-HRP) işaretli ikincil antikor (1:2000 dilüsyon) ile 1 saat oda sıcaklığında muamele edilmiştir. Daha sonra, membran üstüne BioRad Clarity ECL Substratı eklenmiş, kemiluminesan sinyal Chemi-Doc MP (BioRad, USA) görüntüleme cihazı ile görüntülenmiştir.

3.7. **Hücre Çoğalması ve Sitotoksosite Deneyleri**

CHNQ ve kuersetinin hücrelere uygulanmasının ve AKR1B1'in susturulması ve AKR1B10'un aşırı ifadesinin kolon kanseri hücrelerinin çoğalma ve yaşayabilme üzerindeki etkileri 3 farklı teknikle test edilmiştir.

3.7.1. **BrdU ile Çoğalma Tayini**

5-bromo-2'-deoksiüridin (BrdU) timidin bazının analogu olan sentetik bir nükleozittir. Bu deney timidin bazı yerine BrdU maddesinin hücresel çoğalma sırasında DNA zincirine yerleşmesi prensibiyle çalışmaktadır. Hücre çoğalmasının tespitinde kullanılan bir diğer metot olan MTT

(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) yöntemi hücrelerdeki metabolik faaliyeti NAD(P)H'a bağlı oksidoredüktaz enzimleri (aynı zamanda AKR enzimlerini de içerirler) aracılığı ile tespit ettiği için deney sonucuna etki etme olasılığından dolayı tercih edilmemiştir. CHNQ ve kuersetin maddelerinin en etkili çalıştığı deney ortamını bulmak amacıyla, sırasıyla, serumlu ve serumsuz ortamlarda hücrelere uygulanmışlardır. Kit ile birlikte sağlanan protokole dayanarak, öncelikle hücreler 96 kuyucuklu plakalarda 100 µl'lik hacimlerde, 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda CHNQ ve kuersetin ile muamele edilmiştir. Bu sürenin sonunda BrdU etiketleme solüsyonu (BrdU labeling solution) kuyucuk başına 10 µM BrdU gelecek şekilde eklenip 2 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. 2 saatlik inkübasyonun süresinin sonunda, BrdU etiketleme solüsyonu hücrelerden kaldırılmış ve kitte sağlanan fiksatif ajan olan Fix/Denat solüsyonundan kuyucuk başına 200 µl eklenip oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra, fiksatif ajan plakaya hafifçe vurarak uzaklaştırılmış, kuyucuk başına 1:1000 seyreltilmiş 100 µl anti-BrdU-POD peroksit konjuge edilmiş BrdU antikoru eklenmiş ve oda sıcaklığında 90 dakika inkübe edilmiştir. Antikor konjugatı kaldırıldıktan sonra, hücreler 3 defa 200-300 µl yıkama solüsyonu PBS ile yıkanmıştır ve kuyucuk başına 100 µl kitte sağlanan substrat solüsyonu eklenmiştir. Substrat solüsyonu oda sıcaklığında yaklaşık 30 dakika inkübe edilmiştir ve daha sonra mikropilaya okuyucuda 370 nm dalga boyunda absorbanslar ölçülmüştür. Referans dalga boyu olarak 492 nm kullanılmıştır.

AKR1B1 susturulmasının ve AKR1B10 aşırı ifadesinin hücre çoğalması üzerindeki etkisini gözlemlemek amacıyla öncelikler 96 kuyucuklu plakalara yaklaşık 1×10^4 hücre ekilmiştir. Bunun ardından hücreler 24 ve 48 saat büyümeye bırakılmış ve her bir sürenin sonunda BrdU çoğalma tayini protokolü yukarıda anlatıldığı üzere uygulanmıştır.

3.7.2. Hücre Yaşayabilme Deneyi

CHNQ ve kuersetinin hücreler üzerindeki sitotoksikite etkisini araştırmak için 3 farklı konsantrasyon belirlenerek 24 saat süresince HCT116 ve HT29 hücre hatlarına muamele edilmiş ve Muse™ Sayım ve Yaşayabilirlik Kiti (Muse™ Count and Viability Kit) ile sonuçlar analiz edilmiştir. Bu kit canlı ve ölü hücrelerin 2 farklı DNA boyasıyla boyanması esasına dayanmaktadır. Bu boyalardan biri membran bütünlüğü bozulan hücrelerde DNA'yı boyayarak ölen ve ölmekte olan hücreleri canlı ve sağlıklı hücrelerden ayırmak için kullanılmaktadır. Diğer

boya ise membrandan geçebilmekte ve çekirdeği boyayarak hücrenin boyutu ile ilişkisini belirlemek için kalıntılardan ayırarak total hücre miktarının belirlenmesini sağlamaktadır.

Öncelikle, 6 kuyucuklu plakalarda kuyucuk başına yaklaşık 1×10^6 hücre ekilmiştir. Ertesi gün, hücreler gerekli CHNQ (HCT-116 hücreleri için 5 μ M, 10 μ M ve 25 μ M; HT-29 hücreleri için 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M) ve Kuersetin (HCT-116 hücreleri için 50 μ M, 100 μ M ve 200 μ M; HT-29 hücreleri için 100 μ M, 200 μ M, 300 μ M) konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilmiştir. Bu sürenin sonunda, hücrelerin önce besi yerleri toplanmış, daha sonra her bir kuyucuk 500 μ l soğuk PBS ile yıkanmış ve toplanmıştır. Son olarak, hücreler 200 μ l Tripsin/EDTA (%0,25) ile 37°C'de yaklaşık 5 dakika muamele edilip, hücrelerin plakalardan kalkması sağlanıp besi yerleriyle aynı tüplere toplanmıştır. Bunun ardından, hücreler Thoma hemasitometre ile sayılmış ve her bir hücre süspansiyonundan 2×10^6 hücre alınmıştır. Hücreler 1000 x g'de 1 dakika santrifüj edilmiş, süpernatantları atılmış ve hücre peleti 500 μ l %10 FBS içeren RPMI 1640 besiyerinde çözülmüştür. Böylece her bir örnek için hücre konsantrasyonu 500 μ l'de 2×10^6 'ye denk getirilmiştir.

Tablo 3.2 . Hücre Süspansiyonu Dilüsyon Tablosu

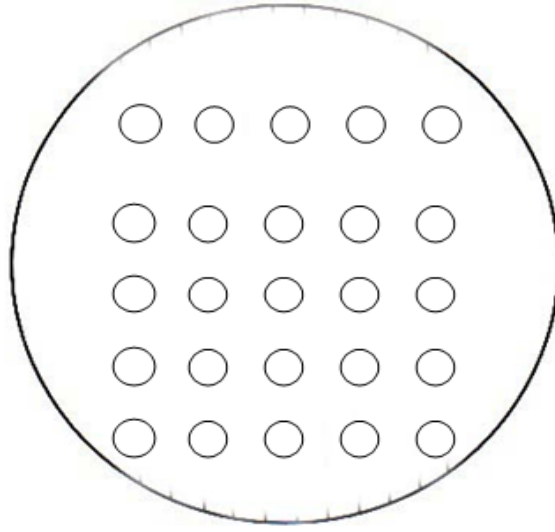
Orjinal Hücre Süspansiyonunun Konsantrasyonu	Dilüsyon Faktörü	Hücre Süspansiyon Hacmi	Sayım ve Yaşayabilirlik Solüsyonunun Hacmi	Seyreltilmiş Hücrelerin Konsantrasyonu
$1 \times 10^5 - 1 \times 10^6$	10	50 μ l	450 μ l	$< 1 \times 10^5$
$1 \times 10^6 - 1 \times 10^7$	20	20 μ l	380 μ l	$< 5 \times 10^5$
$1 \times 10^7 - 2 \times 10^7$	30	20 μ l	780 μ l	$< 5 \times 10^5$

Kit protokolünde verildiği ve **Tablo 3.2'** de gösterildiği üzere, elimizde hücre konsantrasyonuna uyumlu olacak şekilde, her bir örnek için 380 μ l Sayım ve Yaşayabilirlik solüsyonu 20 μ l hücre süspansiyonuyla karıştırılmış ve 5 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda, tüm örnekler MUSE Hücre Analizör'ünde okunmuştur.

3.7.3. *S. cerevisiae* Canlılık Deneyi

CHNQ maddesinin varlığında *S. cerevisiae* hücrelerinin yaşayabilme yetilerini belirlemek amacıyla yapılan bu deneyde, öncelikle maya hücreleri -80 °C'de tutulan gliserol stoktan alınıp 5 ml'lik YPD besiyerinde 30 °C'de 200 rpm'de sallanarak bir gece büyütülmüştür. Ertesi gün,

5 ml'lik kültür 20 mL'lik YPD besiyerine aktarılmış ve hücrelerin OD₆₀₀ değerleri 0,6-0,8 aralığına gelene kadar büyütülmüştür. Daha sonra kültür, 5 farklı falkon tüpüne bölünerek 0, 100, 500 ve 750 µM CHNQ ile YPD besiyerinde 24 saat muamele edilmiştir. 24 saatin sonunda, hücreler toplanmış, steril PBS ile bolca yıkanmıştır. Daha sonra, 100 µl'lik hacimlerde 1'den 10⁻⁴ dilüsyona kadar 10'ar kat seri seyreltme yapılarak, her bir dilüsyondan 10 µl hacminde **Şekil 3.1'** deki Spotlama Şablonu kullanılarak YPD-Agar petrilere ekilmiştir. Petriler kurutulduktan sonra, 30°C'de inkübe edilmiş ve 24 saat sonra görüntülenmiştir.



Şekil 3.1. *S.cerevisiae* Spotlama Şablonu

3.8. Hücre Döngüsü Analizleri

CHNQ maddesinin hücre döngüsü üzerindeki etkilerinin gözlemlenmesi amacıyla yapılan bu deneyde öncelikle 6-kuyucuklu plakalara 1×10^6 miktarında hücre ekilmiştir. Hücreler, plakalara yapıştıktan sonra, daha önce belirlenmiş 3 farklı konsantrasyonda (HCT-116 hücreleri için 5 µM, 10 µM ve 25 µM; HT-29 hücreleri 10 µM, 20 µM, 40 µM) 24 saat muamele edilmiştir. Muamele süresinin sonunda, hücreler öncelikle soğuk PBS te yıkanmış ve daha sonra Tripsin/EDTA (%0,25) ile muamele edilerek plakadan kaldırılmıştır. Bunun ardından hücreler sayılmış ve her bir örnekten yaklaşık 1×10^6 hücre alınmıştır. Toplanan hücreler, fiksasyon amacıyla önce 300 x g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Pellet 1 mL soğuk PBS'de çözülmüş ve

tekrar 300 x g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Pelletlerin üzerinde ~50 µl PBS kalacak şekilde süpernatantlar atılmıştır. Ardından, orta seviyede vorteksleyerek, her bir örneğe 1 ml %70 'lik soğuk etanol eklenmiştir. Fiksasyonun yeterli derecede sağlanabilmesi için, örnekler Propidyum İyodür ile boyanmadan önce en az 2 saat -20 °C'de bekletilmiştir.

Fiksasyon sağlandıktan sonra, örnekler oda sıcaklığında 300 x g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir ve süpernatant atılmıştır. Etanolün tamamen uzaklaştırılması için, hücre pelletleri 500 µl PBS 'de çözülmüş, tekrar 300 x g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Pelletler, örnek başına 250 µl Propidyum İyodür boyama solüsyonu (250 µl PBS'de hazırlanmış %0,1'lik Triton X-100, 50 µg RNase A ve 5 µl 1mg/ml stoktan alınmış Propidyum İyodür) gelecek şekilde çözülmüştür. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika inkübe edildikten sonra hücreler BD Accuri C6 Akım Sitometrisi'nde FL-3 kanalında analiz edilmiştir.

3.9. Apoptoz Deneyleri

CHNQ ve kuersetin maddelerinin, AKR1B1 susturulmasının ve AKR1B10 aşırı ifadesinin hücreler üzerindeki etkilerini gözlemlemek amacıyla Annexin V boyaması ve Multicaspaz Tespiti olarak iki farklı deney uygulanmıştır.

3.9.1. Annexin V Boyaması ile Apoptoz Tayini Deneyi

CHNQ ve kuersetinin apoptoz üzerindeki etkileri Muse™ Annexin V ve Ölü Hücre Deney Kiti (Muse™ Annexin V & Dead Cell Assay Kit) ile belirlenmiştir. Kit içeriğinde Annexin V boyası ve 7-AAD boyası bulunmaktadır. Bu boyalardan Annexin V hücre membranında bulunan fosfatidilserinlere bağlanma özelliğine sahipken, 7-AAD DNA'ya bağlanma özelliğine sahiptir. Deney için, öncelikle, 6-kuyucuklu plakalarda kuyucuk başına yaklaşık 1×10^6 hücre ekilmiştir. Ertesi gün, hücreler gerekli CHNQ (HCT-116 hücreleri için 5 µM, 10 µM ve 25 µM; HT-29 hücreleri için 10 µM, 20 µM, 40 µM) ve Kuersetin (HCT-116 hücreleri için 50 µM, 100 µM ve 200 µM; HT-29 hücreleri için 100 µM, 200 µM, 300 µM) konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilmiştir. Bu sürenin sonunda, hücrelerin önce besi yerleri toplanmış, daha sonra her bir kuyucuk 500 µl soğuk PBS ile yıkanmış ve toplanmıştır. Son olarak, hücreler 200 µl Tripsin/EDTA (%0,25) ile 37 °C'de yaklaşık 5 dakika muamele edilip, hücrelerin plakalardan kalkması sağlanıp besi yerleriyle aynı tüplere toplanmıştır. Bunun ardından, hücreler Thoma

hemasitometre ile sayılmış ve hücre konsantrasyonu tüm örneklerde 1×10^6 /ml olacak şekilde eşitlenmiştir. Daha sonra her bir örnekten 100'er µl yeni tüplere aktarılmış ve üzerine 100 µl Muse Annexin V ve Ölü Hücre solüsyonu eklenmiş ve vorteks yardımıyla karıştırılmıştır. Hücre ve boya karışımları, karanlıkta ve oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildikten sonra, örnekler Muse Hücre Analizörü'nde analiz edilmiştir.

AKR1B1 susturulmuş ve AKR1B10 aşırı ifade eden hücrelerde apoptozu gözlemlemek için BD Pharmingen FITC-Annexin V kiti (Cat no: 556419) kullanılmıştır. Deney için, öncelikle, 6-kuyucuklu plakalarda kuyucuk başına yaklaşık 1×10^6 hücre ekilmiştir. Hücrelere gerekli muameleler yapıldıktan sonra yukarıda da anlatıldığı üzere, hücreler besi yerleri ile birlikte toplanmıştır. Toplanan hücreler 2 kere soğuk PBS ile yıkanıp, ardından hücre konsantrasyonu 1×10^6 /ml olacak şekilde 1X Bağlanma Solüsyonunda (Binding Buffer) (0,1 M HEPES (pH 7,4), 1,4 M NaCl, 25 mM CaCl₂) çözülmüştür. Daha sonra her bir örnekten 100 µl'lik bir süspansiyon yeni bir tüpe aktarılmış ve üzerine 5 µl kitte sağlanan FITC-Annexin V boyası ile birlikte 50 µg/mL 'lik stok Propidyum Iyodür'den 10 µl eklenmiştir. Bu karışım önce nazikçe vorteks edilmiş, daha sonra oda sıcaklığında ve karanlıkta 15 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda, her bir örneğin üzerine 400 µl 1X Bağlanma Solüsyonu daha eklenip BD Accuri C6 Akım Sitometrisi'nde FL-1 ve FL-3 kanalında analiz edilmiştir.

3.9.2. Multikaspaz Tespit Deneyi

CHNQ ve Kuersetin maddelerinin HCT-116 hücrelerinde toplam kaspaz aktivitesini gözlemlemek için yapılan bu deneyde Muse Multikaspaz Kiti kullanılmıştır. Deney için, öncelikle, 6-kuyucuklu plakalarda kuyucuk başına yaklaşık 1×10^6 hücre ekilmiştir. Ertesi gün, hücreler gerekli CHNQ (HCT-116 hücreleri için 5 µM, 10 µM ve 25 µM; HT-29 hücreleri için 10 µM, 20 µM, 40 µM) konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilmiştir. Üretici firmanın önermiş olduğu protokolün takip edildiği bu deneyde, hücreler **Bölüm 3.7** ve **3.9.1'** de belirtildiği gibi toplanmış ve hücre yoğunluğu 1×10^6 /ml olacak şekilde kitte sağlanan 1X Kaspaz Solüsyonunda çözülmüştür. Her örnekten 50 µl alınarak yeni tüplere konmuştur ve üzerine 5 µl Muse Multikaspaz Solüsyonun eklenmiştir. Örnekler, hızlıca pipetlenerek karıştırıldıktan sonra, tüplerin kapakları gevşek bir şekilde kapatılıp 30 dakika boyunca %5 CO₂ içeren 37°C inkübatörde bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda, her bir örneğe 150 µl Muse Kaspaz 7-AAD

solüsyonu eklenip tekrar hızlıca pipetlenerek karıştırılmıştır. Son olarak, örnekler oda sıcaklığında ve karanlıkta 5 dakika inkübe edildikten sonra Muse Hücre Analizörü'nde analiz edilmiştir.

3.10. İnvazyon ve Migrasyon Tayinleri

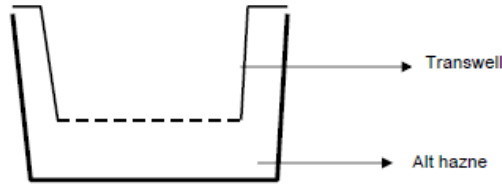
3.12.1 *In vitro* Yara İyileşme Deneyleri

Yara iyileşmesi analizi, *in vitro* ortamda doğrudan hücre göçünü çalışmak için geliştirilmiş, basit, ucuz tekniklerden biridir. Bu metot *in vivo* ortamdaki yara iyileşmesi süresince hücre göçünü gösteren bir taklittir.

AKR1B1 susturulmuş HCT-116 hücrelerinde hem AKR1B1 susturulmasının hem de CHNQ maddesinin bu hücrelerin hücre göçü üzerinde etkisini gözlemlemek amacıyla, 12 kuyucuklu plakalara yaklaşık 5×10^5 hücre ekilmiş ve hücreler hücre kültürü plakasına yapıştıktan sonra gerekli CHNQ muameleleri yapılmıştır. Hücreler, hücre kültürü plakasının yüzeyini tamamen kapladığı zaman, 200µl'lik steril pipet uçları yardımıyla yüzeyde yaralar açılmıştır. Hücreler, steril 1X PBS solüsyonu ile yıkandıktan sonra hücrelerin besi yeri tazelenmiştir ve 0 saat fotoğrafları çekilmiştir. Daha sonra, her 24 saatte bir hücrelerin besiyerleri tazelenip, 48 saat boyunca hücrelerin hareketliliği ve yarayı kapatabilme yetenekleri fotoğraflandırılmıştır. Fotoğraflandırmalar, bölümümüzde Prof. Dr. Mayda Gürsel'in laboratuvarında bulunan JuLi Smart Cell Imager ile yapılmış olup, hücrelerin göç miktarları gerçek ölçekli cetvel yardımıyla ölçülüp analizi yapılmıştır.

3.12.2 Transwell Migrasyon Deneyleri

AKR1B1 susturulmuş ve AKR1B10'u aşırı ifade eden HCT-116 hücrelerinde hem AKR1B1 susturulmasının hem de CHNQ maddesinin bu hücrelerin hücre göçü üzerinde etkisini gözlemlemek amacıyla 0.8 µm porlara sahip 24-Transwell plakalar kullanılmıştır.



Şekil 3.2. Transwell Migrasyon Çemberinin Görüntüsü

Öncelikle, 12 kuyucuklu plakalara yaklaşık 5×10^5 hücre ekilmiş ve hücreler hücre kültürü plakasına yapıştıktan sonra gerekli CHNQ muameleleri yapılmıştır. Daha sonra, hücreler Tripsin/EDTA (%0,25'lik) ile toplanıp hemositometre ile sayılmıştır. Her bir örnekten 5×10^4 hücre alınarak 24 kuyucuklu plakalarda, 100 μ l %1'lik FBS içeren RPMI 1640 besiyerinde **Şekil 3.2**'de gösterilen düzeneğin üst kısmındaki Transwell' e ekilmiştir. Düzeneğin alt haznesine ise 500 μ l %10'luk FBS içeren RPMI 1640 besiyeri konulup, 48 saat boyunca hücrelerin az FBS içeren kısımdan çok FBS içeren kısma göç etmeleri beklenmiştir. 48 saatin sonunda, Transwell'ler 24 kuyucuklu plakalardan çıkarılmış ve Transwell'in üst yüzeyinde kalan göç etmemiş hücreler 2 defa eküvyon ile kazınmıştır. Daha sonra, Transwell'lerin 10 dakika boyunca %100 metanolde fiksasyonu sağlanmış ve hemen ardından 2 dakika boyunca Giemsa solüsyonunda boyanmıştır. Boyama sonunda, distile suyla bolca yıkanan Transweller, çeker ocakta tamamen kurutulduktan sonra, kesilerek imersiyon yağı yardımıyla lamların üzerine konmuştur. Göç etmiş hücreler ters ışık mikroskobu (Leica, Almanya) altında sayılmış ve fotoğraflanmıştır.

3.13 Yeni Damar Oluşumu Tayini

HUVEC hücreleri, anjiyogenez çalışmalarında en çok kullanılan endotel hücre tiplerinden biridir. Bu hücreler, kanser hücrelerinden alınmış şartlandırılmış besiyerlerinde inkübe edildiğinde *in vitro* tüpler oluşturma yetisine sahiptirler.

Şartlandırılmış besiyeri elde edilmesi amacıyla, hücre yoğunluğu %70'e ulaştığında, mevcut besiyeri, taze besiyeri ile değiştirilmiş, hücreler bu besiyerinde 72 saat boyunca inkübe edilmiştir. 72. saatin sonunda, toplanan "şartlandırılmış besiyeri", 1000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Toplanan süpernatant ya hemen kullanılmış, ya da 500 μ l'lik bölüntüler halinde kullanım için -80°C 'de saklanmıştır.

Yeni damar oluşumu tayini için, deneye başlamadan bir gece önce Matrigel -20°C 'den çıkarılmış ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'de buz içerisinde gece boyu erimeye bırakılmıştır. Aynı zamanda, -20°C 'ye bir kutu filtreli 100 μl 'lik pipet tipi ve bir paket 96-kuyucuklu plaka konmuştur. Ertesi gün, yine buz üzerinde her bir kuyucuğa 40 μl MatriGel paylaştırılmış ve 30 dakika 37°C 'de donması beklenmiştir. Bu süre zarfında, HUVEC'ler 1:1 oranında endotel hücre besiyeri ve AKR1B1 susturulmuş veya AKR1B10 aşırı ifade eden HCT-116 hücrelerinden alınmış şartlandırılmış besiyeri ile karıştırılmıştır. MatriGel tamamen donduğunda, bu karışımdan kuyucuk başına 100 μl eklenmiş ve 9 saat 37°C 'de %5 CO_2 içeren hücre kültürü inkübatöründe inkübe edilmiştir. 9 saatin sonunda, HUVEC'lerin oluşturduğu tüpler çevrik ışık mikroskopu altında görüntülenmiş ve tüp analizleri Wimasis (<http://www.wimasis.com>) tarafından yapılmıştır.

3.14 NF- κB ve AP-1 Raportör Gen Deneyleleri

Raportör gen deneyleleri için NF- κB 'nin transkripsiyonel aktivitesi PathDetect sistemi (NF- κB konsensüs dizini 5 kopya olarak lusiferaz geninin önüne klonlanmış plazmit) ve AP-1 'in transkripsiyonel aktivitesi yine PathDetect sistemi (AP-1 konsensus dizini 7 kopya olarak lusiferaz geninin önüne klonlanmış plazmit) kullanılmıştır. Her iki düzenekte de normalizasyon için phRL-TK (Promega) Renilla plazmiti kullanılmış ve İkili Lusiferaz Analizi yapılmıştır.

Bu amaçla, 48 kuyucuklu plakalara, her bir hücre tipinden kuyucuk başına 5×10^4 hücre gelecek şekilde ekilmiştir. Ekimden 24 saat sonra, 1(ng):250(ng) oranında olacak şekilde, Renilla Lusiferaz (phRL-TK, Promega): NF- κB veya AP-1 Firefly Lusiferaz vektörleriyle, Xtreme gene HP transfeksiyon ajanının (Roche) ürün klavuzunda önerildiği üzere 1:2 oranında transfekte edilmiştir. Transfeksiyonu takip eden 24 saat sonunda, Promega Dual Luciferaz Kit (Ref No:E1910) kullanılarak sonuçlar analiz gerçekleştirilmiştir. Bunun için, öncelikle kitin bütün solüsyon ve kimyasalları (Pasif Liziz Solüsyonu, Stop&Glo Solüsyonu, Stop&Glo Kimyasalı ve LARII Kimyasalı) oda sıcaklığında eritilmiştir. 5X pasif liziz solüsyonu steril distile su kullanılarak 1X'e seyreltilmiş, hücreler 1X PBS solüsyonuyla bir kez yıkandıktan sonra üzerlerine yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanan liziz solüsyonundan her bir kuyucuğa 50 μl eklenmiştir. Hücre plakaları oda sıcaklığında 20 dakika boyunca hafifçe sallanmış, böylelikle hücrelerin liziz olmaları sağlanmıştır. Lizis sırasında luminesans okuyucusu kullanıma hazırlanmıştır. Bunun için kuyucuk başına 25 μl gelecek şekilde LARII ve Stop&Glo solüsyonları (50X Stop&Glo kimyasalı, Stop&Glo solüsyonuyla 1X'e seyreltilerek), Turner Biosystems Micro-Plaka okuyucusu tüplerine eklenmiştir. 20 dakikalık lizis sonunda, lizatlar 96

kuyucuklu beyaz/opak plaka kuyucuklarına 20'şer µl konulup, Turner Biosystems Micro-Plaka okuyucusunda lüminesans değerleri okunmuştur. Analiz Firefly/Renilla oranları karşılaştırılacak şekilde yapılmıştır.

3.15 NF-κB ELISA Ölçümleri

Bu yöntem NF-κB konsensus DNA dizisi bağlanmış 96-kuyucuklu plaka üzerine proteinlerin bağlanması ve bağlanan proteinlerin NF-κB alt ünitesi p65'e özel antikorlar ile tespitini içerir. Bunun için NF-κB (human p65) Transcription Factor Assay kiti (Cayman Chemicals, ABD) kullanılmıştır. AKR1B1 susturulmuş ve AKR1B10 aşırı ifade edilmiş hücrelerden üreticinin önerdiği şekilde (aynı zamanda **3.5**'de anlatılmıştır) nükleer proteinler elde edilmiş ve bağlanma tamponu ile 4°C'de gece boyu inkübe edilmiştir. Ertesi gün bağlanmayan proteinler yıkama tamponu ile 5 defa yıkanmış ve birincil antikor eklenerek 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Tekrar yıkama tamponu ile 5 defa yıkandıktan sonra 1saat ikincil antikor ile oda sıcaklığında inkübasyon yapılmış, yıkama tamponu ile 5 defa daha yıkanmış ve 30 dk geliştirme çözeltisinde bekletilmiştir. Daha sonra durdurma çözeltisi eklenmiş ve 450 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

3.16 Oksidatif Stres Deneyleri

CHNQ uygulamasının bu iki kolon kanser hücre hattı üzerindeki oksidatif stres ile ilgili etkisi nitro blue tetrazolium (NBT) ve dihidroetidyum bromür (DHE) boyaması metotları uygulanarak incelenmiştir.

3.16.1 Nitroblue Tetrazolium (NBT) Deneyi

NBT deneyi, reaktif oksijen türlerinden (ROT) süper oksit varlığında tetrazolium tuzunun formazan maddesine dönüşmesi prensibiyle çalışmaktadır. Bu kolorimetrik metod sarı olan tetrazolium tuzunun mavi formazana dönüşmesiyle değişen absorbansı ile değerlendirilir. Bu amaçla, 96 kuyucuklu plakalara, her bir hücre tipinden kuyucuk başına 2×10^4 hücre gelecek şekilde ekim yapılmıştır. Ekimden 24 saat sonra, hücreler farklı CHNQ konsantrasyonları (10, 20, 40, 60, 100 µM) ve her kuyucuk için 0,25 mg/mL NBT solüsyonu ile birlikte 6 saat 37°C'de

%5 CO₂ içeren hücre kültürü inkübatöründe inkübe edilmiştir. 6 saatin sonunda, hücreler %70 metanol ile fikse edilmiş ve daha sonra kurumaya bırakılmıştır. Fikse edilen hücrelerdeki mavi formazan kristalleri 120 µl 2M potasyum hidroksit (KOH) ve 140 µl DMSO ile çözülmüştür. Daha sonra her bir kuyucuktaki değişim mikropilaka okuyucu ile 620 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

3.16.2 Dihidroetidyum (DHE) Deneyi

Dihidroetidyum (DHE) normal şartlarda sitoplazmada mavi florasan veren bir maddedir. Serbest radikaller varlığında oksitlendiği zaman ise, hücre DNA'sının arasına girer ve hücre çekirdeğinde kırmızı florasan verir. Bu florasan ışığa, akım sitometrisi ile saptanabilmektedir. Bunun için, ilk olarak 6 kuyucuklu plakalarda kuyucuk başına yaklaşık 1 x 10⁶ hücre ekilmiştir. Ertesi gün, HCT-116 ve HT-29 hücreleri farklı konsantrasyonlarda CHNQ (HCT-116 hücreleri için 10 ve 25 µM, HT-29 hücreleri için 20 ve 40 µM) maddesi ile 24 saat muamele edilmiştir. Bu sürenin sonunda hücreler toplanmış ve hemositometre ile sayılmıştır. Her bir örnekten 5 x 10⁵ hücre alınmış ve 200 x g'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve pelletler 500 µl DHE boyama solüsyonunda (steril PBS'te 3.2 mM hazırlanmıştır) çözülmüştür. Örnekler 37°C'de 15 dakika inkübe edildikten sonra BD Accuri C6 Akım Sitometresinde FL-3 kanalında (605nm dalga boyu) analiz edilmiştir.

S.cerevisiae hücrelerinde CHNQ maddesinin oksidatif stres üzerindeki etkilerini gözlemlemek için, hücreler kültürlenmiş, eşit miktarda bölünmüş ve ardından, 500 µM CHNQ maddesi ile 24 saat boyunca muamele edilmiştir. Kontrol muameleleri olarak, %2,5 DMSO (vehikül kontrol), 5 mg/ml rapamisin (pozitif kontrol; 3 saat 30°C), ve CHNQ ile birlikte 20 mM N-asetilsistein (NAC, antioksidant) kullanılmıştır. Ardından, hücreler steril PBS ile bolca yıkanmıştır ve hücre pelletleri 5mg/ml DHE boyama solüsyonunda çözülüp 30°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Örnekler, BD Accuri C6 Akım Sitometresinde FL-3 kanalında (605 nm dalga boyu) analiz edilmiştir.

3.17 Otofaji Deneyleri

CHNQ uygulamasının bu iki kolon kanser hücre hatları (HCT-116 ve HT-29) üzerindeki otofaji ile ilgili etkisi asidik vaküol oluşumu deneyi ve Cyto-ID otofaji tespit deneyleri uygulanarak incelenmiştir.

3.17.1 Asidik Vaküol Oluşum Deneyleri

Akridin turuncusu (akridine orange-AO) otofaji durumunda, otofajik vaküollere ve hücredeki diğer asidik kompartmanlara girip, burada protonlanarak kırmızı kanalda florasan ışığa veren zayıf bir bazdır. Bunun için, ilk olarak 6-kuyucuklu plakalarda kuyucuk başına yaklaşık 1×10^6 hücre ekilmiştir. Ertesi gün, HCT-116 ve HT-29 hücreleri farklı konsantrasyonlarda CHNQ (HCT-116 hücreleri için 5, 10 ve 25 μM , HT-29 hücreleri için 10, 20 ve 40 μM) maddesi ile 24 saat muamele edilmiştir. Bu muamelelere ek olarak hücreler, bir otofaji inhibitörü olan 3-metiladenin (3-MA; 5mM) ile 24 saat muamele edilmiştir. 24 saat muamelenin ardından, hücreler toplanmış ve hemositometre ile sayılmıştır. Her örnekten 5×10^5 hücre alınmış ve bir kez PBS'de yıkanmıştır. Daha sonra, pelletler 500 μl 100mg/mL AO içeren PBS'de çözülmüş ve 15-20 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonun, hücreler iki kez PBS'de yıkanıp, en son 300 μl PBS'de çözülmüştür. Örnekler, BD Accuri C6 Akım Sitometrisi'nde FL-2 kanalında analiz edilmiştir.

3.17.2 Cyto-ID Otofaji Tespit Deneyleri

Cyto-ID Otofaji Tespit Kiti (Enzo, Life Sciences) yalnızca birikmiş otofajik vaküolleri boyayarak, otofajik vaküolleri ölçer ve lizozomal olarak inhibe edilmiş canlı hücrelerdeki otofajik akışı denetler. Bu sayede, otofajinin kolaylıkla tespit edilmesini sağlar. CHNQ ile muamele edilen hücrelerdeki otofajik durumu tespit edebilmek için, öncelikle 6 kuyucuklu plakalarda kuyucuk başına yaklaşık 1×10^6 hücre ekilmiştir. Ertesi gün, HCT-116 hücreleri 25 μM CHNQ, 10 mM NAC, 1 μM Rapamisin veya 20 μM Klorokuin (otofaji indükleyici maddeler) ile 24 saat muamele edilmiştir. Muamelenin ardında, hücreler toplanmış ve sayılmıştır. Her örnekten $1,5 \times 10^5$ hücre alınmış ve kit ile birlikte sağlanan 1X Deney Solüsyonu'nda yıkanmıştır. Santrifüj ile çöktürülen hücreler 150 μl Cyto-ID boyama solüsyonunda çözülmüş, örnekler oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda, hücreler tekrar 1X deney solüsyonunda yıkanmış ve en son 200 μl 1X deney solüsyonunda çözülmüştür. Örnekler, BD Accuri C6 Akım Sitometrisi'nde FL-1 kanalında analiz edilmiştir.

Konfokal mikroskop analizleri için, cam yüzeyli petri kaplarına (35 mm, In Vitro Scientific, Sunnyvale, ABD) 2×10^5 hücre ekilmiş ve hücreler 25 μM CHNQ, 10 mM NAC, 1 μM Rapamisin veya 20 μM Klorokuin ile 24 saat muamele edilmiştir. Muamelenin sonunda,

hücrelerin üzerinde besiyeri kaldırılmış ve hücreler 2 kez 1X Deney solüsyonu ile yıkanmıştır. Bunu takiben, hücreler 100 µl Cyto-ID boyama solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra hücreler bir kez 1X deney solüsyonuyla yıkanmış ve üzerlerine 100 µl besiyeri konmuştur. Örnekler, Leica Konfokal Mikroskopu (Wetzlar, Almanya) ile görüntülenmiştir (uyarılma dalga boyu: 463 nm, ışınım dalga boyu 534 nm).

S.cerevisiae hücrelerinde CHNQ maddesinin otofaji üzerindeki etkilerini gözlemlemek için, hücreler 3.7.3'te tarif edildiği kültürlenmiş, eşit miktarda bölünmüş ve ardından, 500 µM CHNQ maddesi ile 24 saat boyunca muamele edilmiştir. Kontrol muameleleri olarak, %2,5 DMSO (vehikül kontrol), 50 mM H₂O₂ (pozitif kontrol; 3 saat 30°C), ve CHNQ ile birlikte 20 mM NAC (antioksidant) kullanılmıştır. 24 saatlik inkübasyonun sonunda, hücreler toplanmış, steril PBS ile bolca yıkanmış ve 250 µl PBS'de çözülmüştür. Hücre süspansiyonunun üzerine 250 µl Cyto-ID boyama solüsyonu eklenmiş, pipetleyerek karıştırılmış ve karanlıkta, 30°C'de 20 dakika inkübe edilmiştir. Örnekler, BD Accuri C6 Akım Sitometrisi'nde FL-1 kanalında analiz edilmiştir.

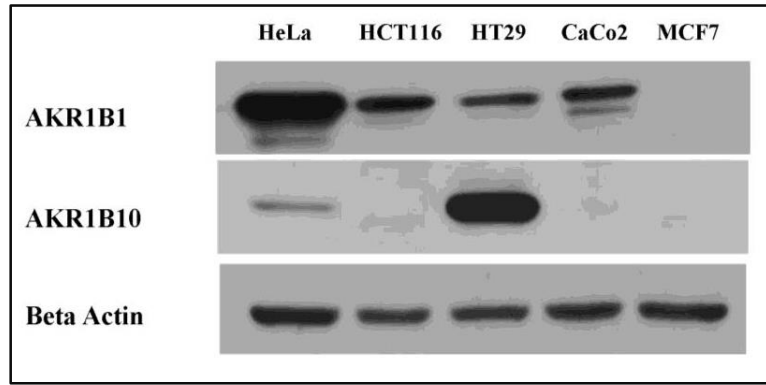
3.18 İstatistiksel Analizler

Elde edilen bulguların analizi ve grafik çizimi GraphPad Prism 6 yazılımı (La Jolla, CA, ABD) kullanılarak yapılmıştır. Deney bulguları arasındaki istatistiksel anlamlılık tek yönlü veya iki yönlü (one way veya two way) ANOVA kullanılarak araştırılmıştır (ns – anlamlı değil-: $p > 0.05$; * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$).

4. BULGULAR

4.1. Uygun Hücre Hatlarının Belirlenmesi

Farklı hücre hatlarındaki AKR1B1 ve AKR1B10 ifadelerini belirlemek amacıyla HCT-116, HT-29 ve CaCo2 (kolon kanseri), MCF-7 (meme kanseri) ve HeLa (rahim ağzı kanseri) hücre hatlarından elde edilen lizatlar ile western blot analizi yapılmıştır. **Şekil 4.1**, laboratuvarımızda bulunan farklı hücre hatlarında ifade edilen AKR1B1 ve AKR1B10 seviyelerini göstermektedir.



Şekil 4.1. Farklı hücre hatlarında ifade edilen AKR1B1 (MW: 36kD) ve AKR1B10 (MW: 36kD) seviyeleri. Beta aktin (MW: 42kD) yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.

Şekil 4.1' de görüldüğü üzere farklı hücre hatları farklı seviyelerde AKR1B1 ve AKR1B10 protein ifadesine sahiptir. HeLa hücre hattı hem AKR1B1 hem de AKR1B10 protein ifadesine sahiptir. HCT-116 ve CaCo2 hücrelerinde AKR1B1 ifadesi görülmüş olup AKR1B10 ifadesi saptanmamıştır. HT-29 hücrelerinde az miktarda AKR1B1 ve yüksek miktarda AKR1B10 ifadesi gösterilmiştir. MCF-7 hücre hattında ise iki protein ifadesi de belirlenememiştir. Bu deney sonucunda AKR1B10 ifade etmeyen HCT-116 ve yüksek miktarda AKR1B10 ifadesi bulunan HT-29 kolon kanser hücre hatlarıyla sonraki deneylere devam edilmesine karar verilmiştir. CaCo2 hücrelerinin kolaylıkla farklılaşma sürecine girdikleri gösterildiğinden (Astarıcı vd., 2012) ve HeLa hücreleri kolon kanser hücre hattı olmadığından dolayı sonraki deneylerde kullanılmamıştır. MCF-7 hücrelerinde ise AKR1B1 ve AKR1B10 ifadeleri saptanmadığı için deneysel amacımıza uygun olmadığı düşünülmüştür.

4.2. Belirlenen hücre hatlarında uygun CHNQ ve kuersetin dozlarının belirlenmesi

CHNQ ve kuersetinin hücrelere uygulanmasının kanser hücre çoğalması üzerindeki etkileri BrdU inkorporasyon yöntemi ile belirlenmiştir. CHNQ ve kuersetin, en etkin deney ortamını bulmak amacıyla serumlu ve serumsuz ortamlarda hücrelere uygulanmışlardır. Hücreler 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda CHNQ ve kuersetin ile muamele edilmiş, daha sonra BrdU metodu ile hücre çoğalmaları belirlenmiştir. **Tablo 4.1**'de serumlu ve serumsuz ortamda uygulanan CHNQ ve kuersetinin HCT-116 ve HT-29 kolon kanser hücre çoğalmaları üzerindeki etkileri ve IC₅₀ (hücre çoğalmasının %50 oranında inhibisyonuna sebep olan konsantrasyon) değerleri verilmiştir.

Tablo 4.1.Farklı konsantrasyonlarda CHNQ ve Kuersetin uygulayarak HCT-116 ve HT-29 hücre hatlarında belirlenen IC₅₀ değerleri.

HCT-116	Serumlu (24 saat)	Serumsuz (24 saat)
<i>CHNQ (µM)</i>	30.3±1	10.3±2.6
<i>Kuersetin (µM)</i>	117±8.9	X
HT-29	Serumlu (24 saat)	Serumsuz (24 saat)
<i>CHNQ (µM)</i>	23.21±2.4	X

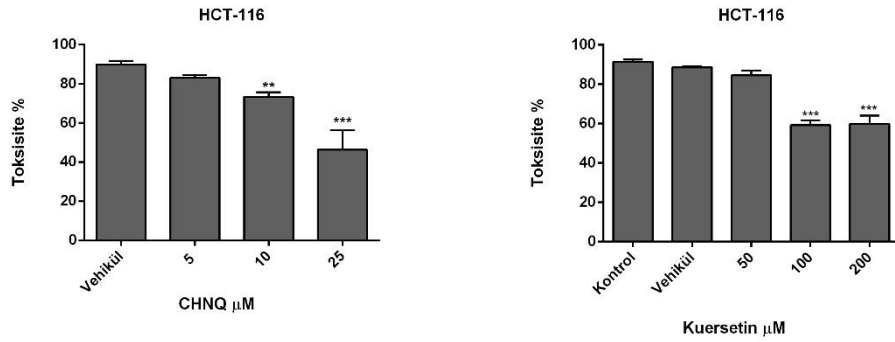
Maddeler 24 saat süreyle serumlu ve serumsuz ortamlarda hücrelere verilmiştir. Hücre miktarını belirlemek için BrdU inkorporasyon metodu kullanılmıştır.

Tablo 4.1'de de görüldüğü gibi düşük molaritelerde belirlenen IC₅₀ değerleri, CHNQ maddesinin serumlu ve serumsuz ortamlarda türevi olduğu kuersetin maddesinden daha etkili bir şekilde çalıştığını göstermektedir. HCT-116 hücreleri 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda CHNQ maddesi ile muamele edilmiş ve bu hücre hattı için belirlenen IC₅₀ değerleri serumlu ortamda 30 µM, serumsuz ortamda 10 µM olarak belirlenmiştir. Aynı hücre hattına kuersetin maddesi uygulandığında serumlu ortamda IC₅₀ değeri 117 µM iken serumsuz ortamda hücre çoğalmasında belirgin bir azalma görülmemiştir. Bu sonuçlara dayanarak, farklı koşullarda görülen farklı etkilerden dolayı bileşiklerin en etkili çalıştığı ortamlarda hücrelere muamele yapılmasına karar verilmiştir. Sonraki deneylerde CHNQ muamelesi serumsuz

ortamda, kuersetin muamelesi ise serumlu ortamda yapılmıştır. HT-29 hücrelerine serumsuz ortamda 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda CHNQ maddesi uygulanmış ve IC₅₀ değeri 23 µM olarak belirlenmiştir. Serumlu ortamda uygulanan kuersetin ise yüksek konsantrasyonda bile hücre çoğalmasında önemli bir değişime neden olmamıştır.

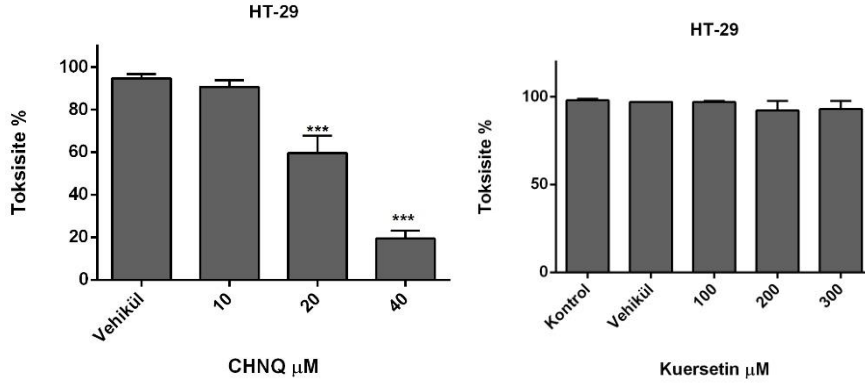
4.3. CHNQ ve Kuersetin'in HCT-116 ve HT-29 hücrelerinin üzerindeki sitotoksik etkileri

CHNQ ve kuersetinin hücreler üzerindeki sitotoksik etkisini araştırmak için 3 farklı konsantrasyon belirlenerek HCT-116 ve HT-29 hücre hatlarına 24 saat süresince belirlenen dozlarla muamele edilmiş ve Muse™ Sayım ve Canlılık Kiti (Muse™ Count and Viability Kit) ile sonuçlar analiz edilmiştir.



Şekil 4.2.Seçilen 3 konsantrasyon ile muamele edilen CHNQ ve kuersetin maddelerinin HCT116 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi.

HCT-116 kolon kanser hücre hattı üzerine CHNQ'yu kuersetin ile karşılaştırdığımızda daha düşük miktarlarla daha etkili bir biçimde hücre ölümüne sebep olduğunu göstermiş bulunmaktayız (**Şekil 4.2**).

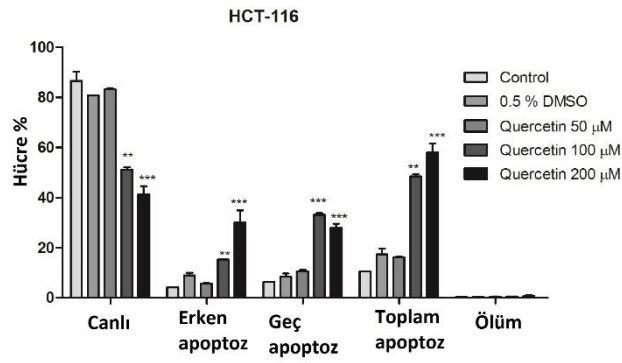
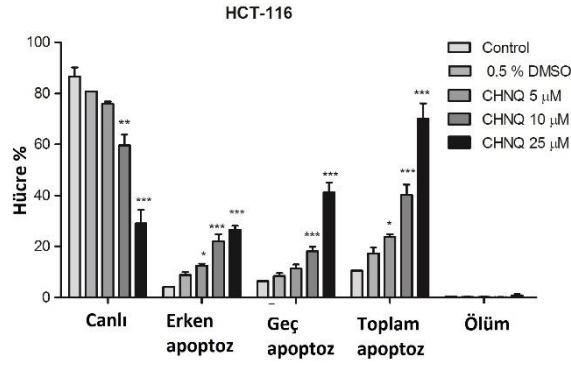


Şekil 4.3.Seçilen 3 konsantrasyon ile muamele edilen CHNQ ve kuersetin maddelerinin HT-29 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi.

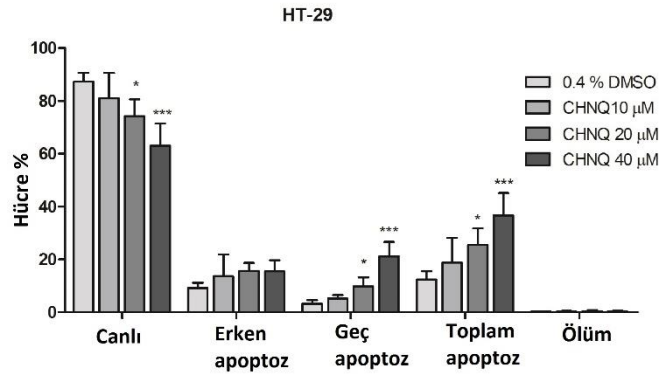
Şekil 4.3' te görüldüğü gibi 20 ve 40 μ M konsantrasyonları önemli oranda hücre ölümüne sebep olmuştur. Aynı koşullarda yapılan kuersetin muamelesi ise hiçbir uygulama yapılmayan HT-29 hücreleri ile aynı sonucu vermiştir. Muse™ Sayım cihazından elde ettiğimiz sonuçlar BrdU inkorporasyon metodu ile ortaya çıkarılan bulguları doğrulamaktadır.

4.4. CHNQ ve Kuersetin'in HCT-116 ve HT-29 hücrelerinde apoptoz üzerindeki etkileri

CHNQ ve kuersetinin kanser hücre hatları üzerindeki hücre çoğalmasını inhibe edici etkileri gösterildikten sonra bu maddelerin apoptoz üzerindeki etkileri Muse™ Annexin V ve Ölü Hücre Deney Kiti (Muse™ Annexin V & Dead Cell Assay Kit) ve bazı apoptoz belirteci olan proteinlerin western blot analizi ile gösterilmiştir. Muse™ Annexin V ve Ölü Hücre Deney Kiti içerisinde hücrelerin apoptoz durumuna geçtiğinde hücre membranlarında bulunan fosfatidilserinlere bağlanan Annexin V ve membran bütünlüğü bozulduğunda DNA'ya bağlanan 7-AAD boyası bulunmaktadır. Böylece bu kit yardımı ile hücre popülasyonundaki canlı hücreler, erken ve geç apoptoz evresinde bulunan hücreler ve ölü hücreler ayırt edilebilmektedir. Muse™ Annexin V ve Ölü Hücre Deneyi için HCT-116 ve HT-29 hücreleri CHNQ ve kuersetin ile önceden seçilen 3 farklı konsantrasyonda 24 saat süreyle muamele edilmiştir.



Şekil 4.4.Seçilen 3 konsantrasyon ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinde CHNQ ve kuersetin maddelerinin apoptoz üzerindeki etkileri.

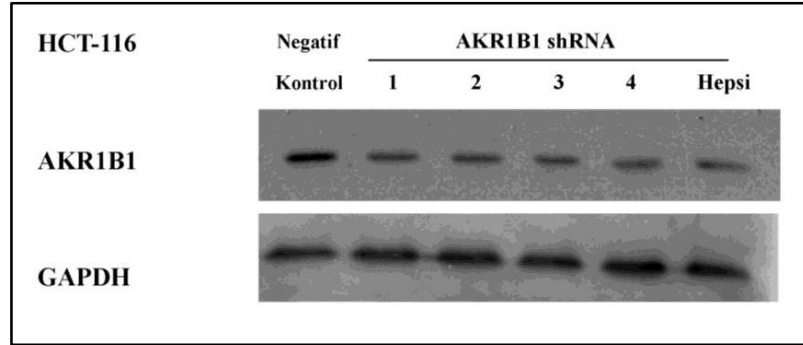


Şekil 4.5.Seçilen 3 konsantrasyon ile muamele edilen HT-29 hücrelerinde CHNQ maddesinin apoptoz üzerindeki etkileri.

Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'te görüldüğü üzere CHNQ hem HCT-116 hem de HT-29 hücre hatlarında artan doz miktarıyla beraber apoptozun da artmasına sebep olmuştur. Kuersetin

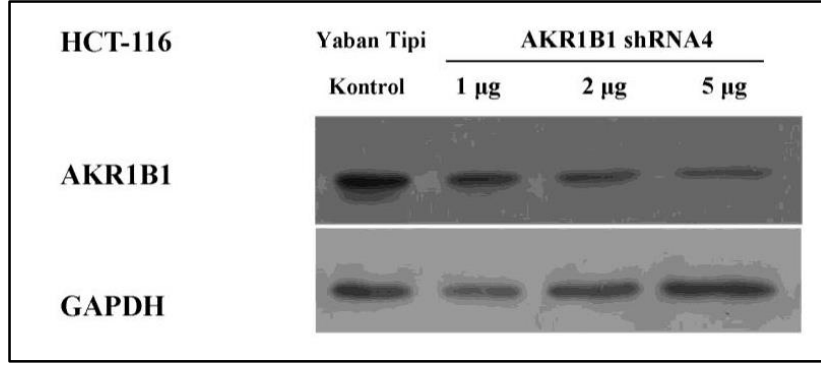
maddesi de yükselen doz miktarıyla apoptoza giren HCT-116 hücre miktarını arttırmıştır fakat CHNQ kadar etkili olmamıştır. HT-29 hücrelerinde kuersetin ile muamele edildiğinde toksisite gözlenmemiş olduğundan (bkz.Şekil 4.3 ve Tablo 4.1), bu hücrelerde apoptoz tayini yapılmamıştır.

CHNQ ile karşılaştırıldığında, kuersetinin hücre çoğalması ve apoptoz üzerindeki etkisi oldukça düşük olduğundan, devam eden deneylerde farklı hücre hatlarında yalnızca CHNQ'nun etkisi araştırılmıştır. HCT-116 hücrelerinde AKR1B1 susturulması ve hücrel etkileri CHNQ ile muamelenin ardından HCT-116 ve HT-29 hücrelerinde görülen hücre çoğalmasında azalma ve apoptozda artışın AKR1B1 ifadesi ile ilişkili olup olmadığını araştırmak amacıyla, HCT-116 hücrelerinde AKR1B1 ifadesi shRNA (short hairpin RNA) teknolojisi kullanılarak susturulmuştur. Bu amaçla Qiagen SureSilencing shRNA Plasmids kiti satın alınmıştır. Bu kit AKR1B1'in susturulması için tasarlanmış 4 farklı shRNA ve bir adet kontrol (scrambled sequence) plazmiti içermektedir. Transformasyon yoluyla çoğaltılan plazmitlerin memeli hücre hatlarında kalıcı ifadesi için yapılan transfeksiyon deneyinde seçilimi sağlamak için neomisin geni kullanılmıştır. Plazmitler arasından en etkili çalışanını seçmek amacıyla Şekil 4.6 'da gösterildiği gibi 4 plazmit ayrı ayrı ve beraber olacak şekilde HCT-116 hücre hattına 48 saat süreyle geçici olarak transfekte edilmiş ve bu sürenin sonunda elde edilen hücre lizatları ile western blot analizi yapılmıştır.



Şekil 4.6. Farklı shRNA plazmidleri ile 48 saat transfekte edilen HCT-116 hücrelerindeki AKR1B1 (BW: 36kD) seviyeleri. GAPDH (MW: 36kD) yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.

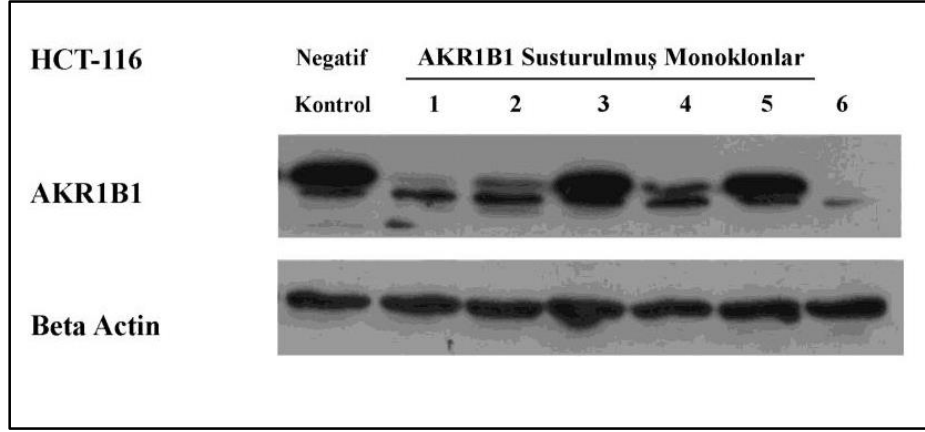
Bu deneyin sonucunda 4 numaralı plazmit memeli hücrelerinde kalıcı olarak ifade edilmek amacıyla seçilmiştir. Kalıcı transfeksiyon deneyinde en etkili sonucu verecek DNA miktarını belirlemek amacıyla farklı miktarlardaki (1, 2 ve 5 µg) 4 numaralı plazmit 48 saat süreyle HCT-116 hücrelerine transfekte edilmiştir. Elde edilen lizatlar ile western blot analizi yapılmıştır.



Şekil 4.7. 1 µg, 2 µg ve 5 µg miktarlarında AKR1B1 shRNA 4 plazmidi ile transfekte edilmiş HCT-116 kolon kanser hücrelerinde AKR1B1'in ifadesi (MW: 36kD). GAPDH proteini (MW: 36kD) yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.

Şekil 4.7'de görüldüğü gibi 2 ve 5 µg miktarında DNA kullanılan örnekler hemen hemen aynı etkiyi göstermiştir. Fakat fazla miktardaki DNA ve transfeksiyon maddesi hücreler üzerinde toksik etki göstereceğinden 2 µg DNA kalıcı transfeksiyon deneyinde kullanılmak üzere seçilmiştir.

Kullanılacak plazmit ve miktarı belirlendikten sonra kalıcı olarak AKR1B1'in HCT-116 hücrelerinde susturulması amacıyla bu hücrelere 2 µg miktarındaki 4 numaralı plazmid 48 saat süre ile transfekte edilmiştir. Sonrasında daha önce laboratuvarımızda belirlenen konsantrasyondaki (450 µg/ml) neomisin (G418) antibiyotiği transfeksiyon yapılmayan kontrol hücreleri ölene kadar hücrelere verilmiştir. Yaklaşık 10 günün ardından kontrol örneğindeki bütün hücrelerin ölmesiyle transfeksiyon yapılan örneklerdeki hücreler koloni seçimi yapılması amacıyla daha büyük bir flaska aktarılmıştır. Seçilen koloniler başta kullanılan antibiyotik miktarının yarısında (225 µg/ml) büyütülmeye devam edilmiştir. Farklı kolonilerden elde edilen hücre lizatları ile western blot analizi yapılarak AKR1B1 susturulmuş koloniler belirlenmiştir. Deney sonucu **Şekil 4.8'**de gösterilmiştir.



Şekil 4.8. AKR1B1'i kalıcı olarak susturulmuş monoklon HCT-116 hücrelerindeki AKR1B1 ifadesi (MW: 36kD). Beta aktin (MW: 42 kD) yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.

Farklı seviyelerde susturulmuş iki adet monoklon (1 ve 6) ve kontrol plazmiti transfekte edilen poliklon hücreleri sonraki deneylerde kullanılmak amacı ile seçilmiştir. Raporun burdan sonraki kısmında, kontrol plazmiti ile transfekte edilmiş hücreler NC, susturulmuş iki monoklon ise M1 ve M6 olarak adlandırılacaktır.

4.5. HCT-116 hücrelerinde AKR1B1 susturulması ve hücresel etkileri

4.5.1. AKR1B1 susturulmuş HCT-116 hücrelerinde hücre çoğalmasının araştırılması

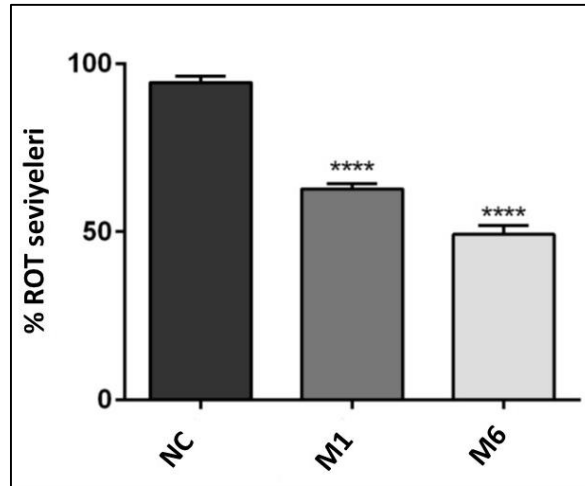
CHNQ'nun hücrelere uygulanmasının hücre çoğalması üzerindeki etkileri BrdU inkorporasyon yöntemi ile belirlenmiştir. CHNQ maddesi daha önce etkinliğinden dolayı seçilen serumsuz ortamda ve farklı konsantrasyonlarda, NC, M1 ve M6 hücrelerine uygulanmıştır. Hücreler 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda CHNQ ile muamele edilmiş daha sonra BrdU metodu ile hücre çoğalmaları belirlenmiştir. **Tablo 4.2** 'de serumsuz ortamda uygulanan CHNQ'nun HCT-116 AKR1B1 susturulmuş monoklon ve scrambled shRNA hücrelerinde hücre çoğalmaları üzerindeki etkileri ve IC₅₀ (hücre çoğalmasının %50 oranında inhibisyonuna sebep olan konsantrasyon) değerleri verilmiştir. Yapılan istatistiksel testler sonucunda yaban tipi hücrelerin IC₅₀ değerleri ile scrambled shRNA HCT116 ve monoklon hücrelerinin IC₅₀ değerleri arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür.

Tablo 4.2. 24 saat süresince farklı konsantrasyonlarda uygulanan CHNQ maddesinin scrambled shRNA, AKR1B1 susturulmuş monoklon 1 ve monoklon 6 HCT116 hücrelerinde IC₅₀ değerlerinin BrdU metodu ile belirlenmesi.

	IC ₅₀ (µM)
Yaban tipi HCT-116	10.3±2.6
Scrambled shRNA (NC)	9.5±1.95
Monoklon 1	11.05±2.35
Monoklon 6	12.4±2.6

4.5.2. AKR1B1 susturulmasının ROT oluşumu üzerindeki etkileri

AKR1B1'in daha önce oksidatif stres üzerinden sebep olunan inflamasyona yol açtığı gösterilmiştir (Maccari ve Ottanà, 2014). Ayrıca, AKR enzimleri NAD(P)H'ları kullanarak glikozu sorbitole çevirdikleri için oksidatif stres oluşturma açısından yüksek kapasiteye sahiptirler. Bu sebeple, AKR1B1 susturulmasının ROT oluşumu üzerindeki etkilerini gözlemek amacıyla NBT deneyi uygulanmıştır.



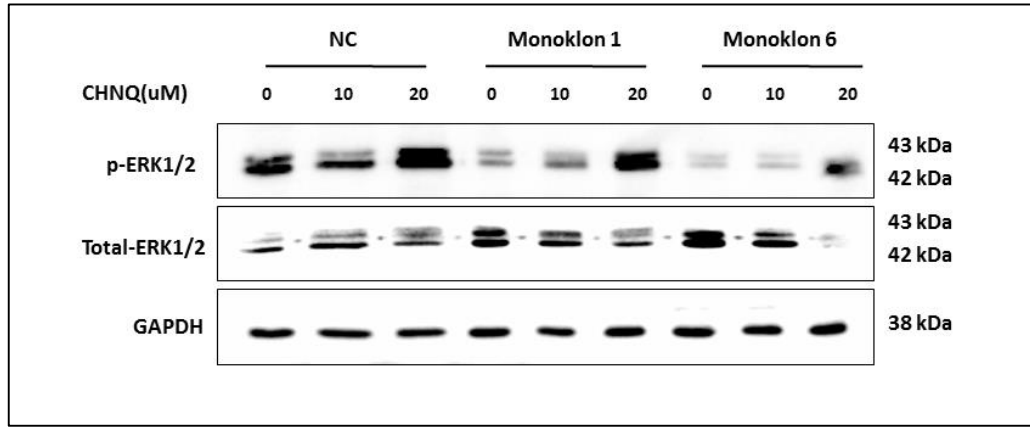
Şekil 4.9. AKR1B1 susturulmuş ve kontrol HCT-116 hücrelerinde ROT seviyeleri

NC, M1 ve M6 hücreleri 96-kuyucuklu plakalarda, 5 saat NBT solüsyonu ile inkübe edilmiş, metanol ile fix edilmiş ve ardından kurutulmuştur. Oluşan formazan kristalleri bazık DMSO'da

çözölmüş ve çözünmeyen elde edilen mavi renk mikropilaka okuyucuda 620 nm'de okunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre, AKR1B1 susturulmuş hücrelerde kontrol hücrelere kıyasla daha az ROT oluşumu gözlenmiştir (**Şekil 4.9**).

4.5.3. Hücre çoğalması ile ilişkili yolların incelenmesi

Mitojen tarafından aktive edilen protein kinaz (MAPK) sinyal yolağı hücre içinde hücre çoğalması, apoptoz ve farklılaşma gibi önemli fonksiyonları regüle etmektedir (Keyse, 2000; Rho vd., 2011). 24 saat süresince 10 ve 20 µM CHNQ uygulanan NC, M1 ve M6 hücrelerinden elde edilen 30 µg protein lizatları ile western blot metodu uygulanarak fosfo-ERK1/2, ve total ERK1/2 proteinlerinin ifadeleri **Şekil 4.10**'da gösterilmiştir.

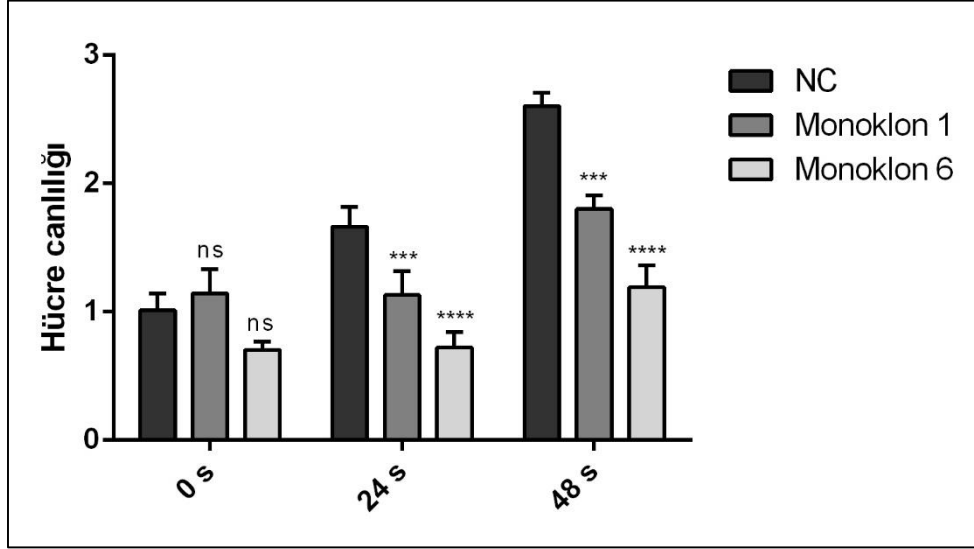


Şekil 4.10. Seçilen üç konsantrasyon ile 24 saat muamele edilen CHNQ maddesinin scrambled shRNA HC-T116 (NC), AKR1B1 susturulmuş monoklon 1 ve monoklon 6 HCT116 hücrelerinde MAPK/ERK proteinlerinin aktiviteleri üzerindeki etkisinin western blot metodu ile belirlenmesi. Eşit protein yüklenmesi GAPDH proteinleri ile doğrulanmıştır.

Mitojen ile aktive olan ERK proteinini aktivitesi fosforile formlarının miktarından belirlenmektedir. **Şekil 4.10**'da görüldüğü üzere uygulanan CHNQ dozundaki artışla birlikte fosfo-ERK miktarlarında artış gözlenmiştir.

Western blot sonuçlarında, CHNQ ile muamele edilmemiş scrambled shRNA HCT-116 ile monoklon 1 ve monoklon 6 hücrelerini karşılaştırdığımızda; fosfo-ERK formlarında azalma gözlemlenmiştir (bkz. **1, 4 ve 7. sütunlar**). Bu sebeple, AKR1B1 susturulmuş monoklon hücrelerinin, scrambled shRNA HCT-116 hücrelerine kıyasla bölünme hızlarının ve hücre canlılık kapasitelerini gözlemek amacıyla, 24, 48 ve 72 saat zamanlamalı BrdU

inkorporasyon deneyleri yapılmıştır. Hücreler serumlu ortamlarda 24 saat, 48 saat ve 72 saat boyunca büyütülmüş olup, verilen zamanların sonunda BrdU inkorporasyon deneyleri uygulanmıştır.



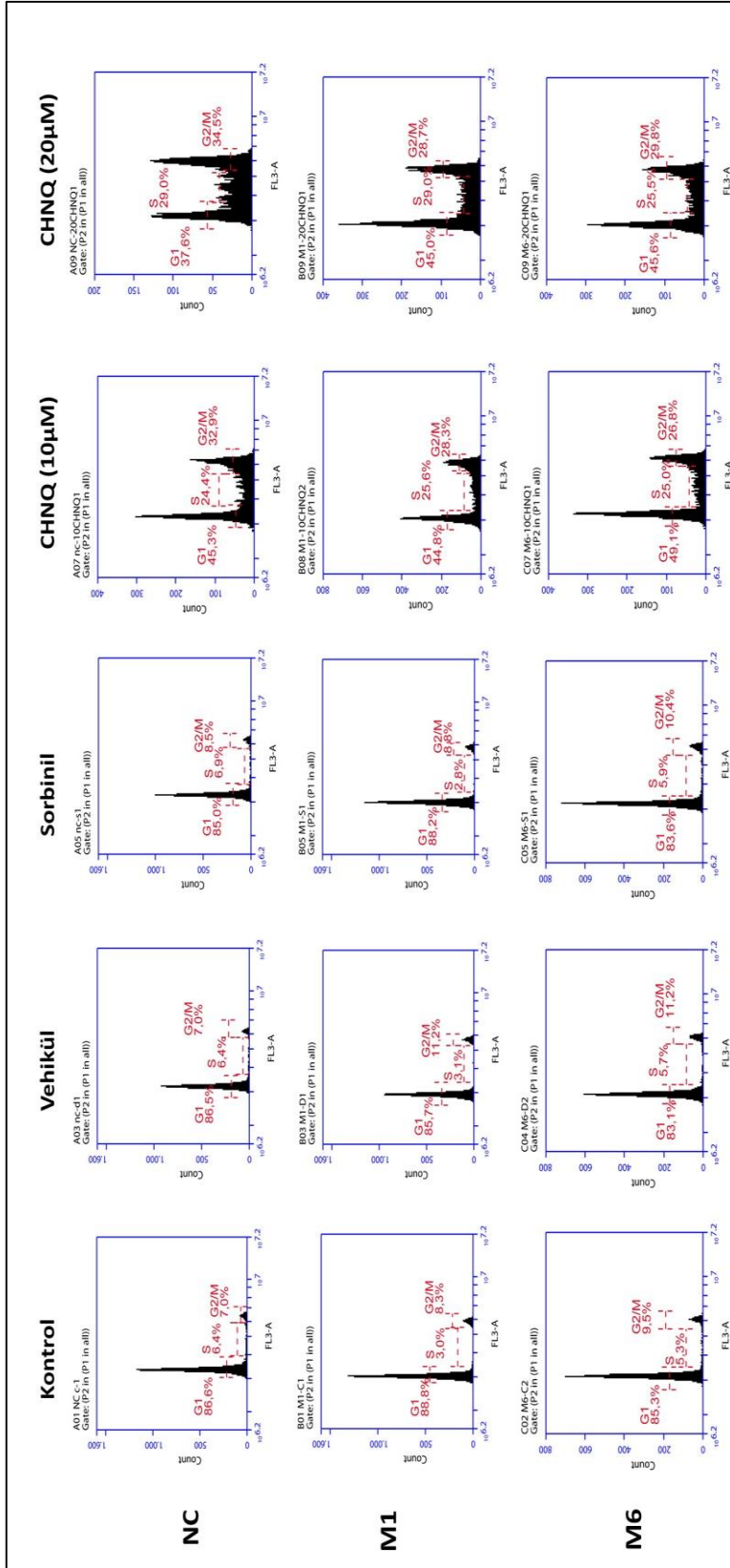
Şekil 4.11. AKR1B1 geninin susturulmasının hücre çoğalması üzerindeki etkisinin scrambled shRNA HCT-116, AKR1B1 susturulmuş monoklon 1 ve monoklon 6 HCT-116 hücreleri ile BrdU metodu kullanılarak belirlenmesi. Her bar ortalama \pm standart sapma (n=3) göstermektedir. S=saat, ns= istatistiksel olarak anlamlı değil.

Şekil 4.11'de görüldüğü üzere, 24 saat, 48 saat ve 72 saat zaman dilimlerinde AKR1B1 susturulmuş Monoklon 1 ve Monoklon 6 hücrelerinin bölünme hızlarında ve canlılık kapasitelerinde scrambled shRNA HCT-116 hücrelerine kıyasla ciddi oranda azalma gözlenmektedir. Bu durum western blot sonucunda gördüğümüz CHNQ ile muamele edilmemiş hücrelerin fosfo-ERK miktarlarındaki değişimi destekler niteliktedir. Bu sonuçlara göre, AKR1B1 geninin onkojenik bir etkisinin olduğunu, dolayısıyla bu genin susturulmasının hücre çoğalmasını olumsuz yönde etkilediğini düşünmekteyiz.

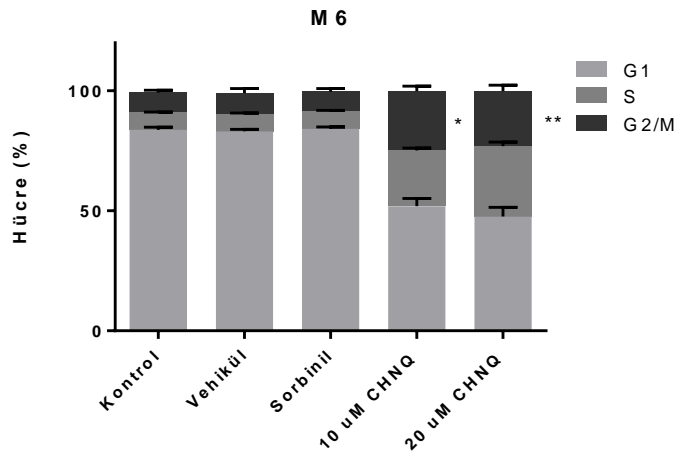
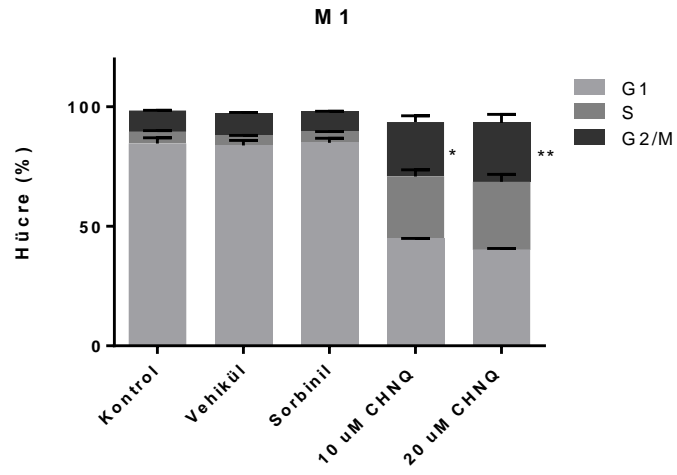
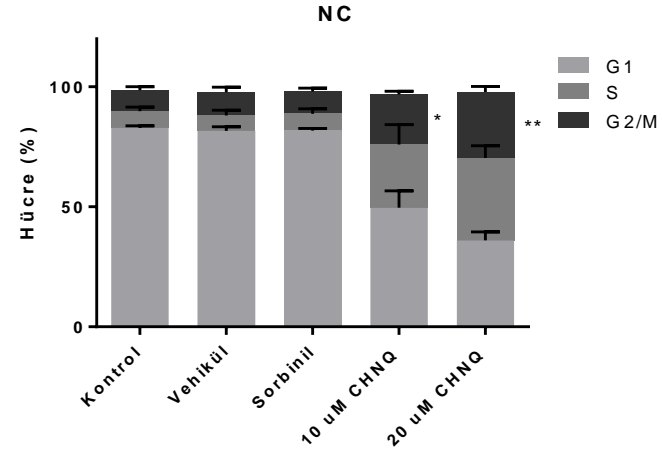
4.5.4. AKR1B1 susturulmuş HCT-116 hücrelerinde hücre döngüsünün araştırılması

CHNQ'nun IC₅₀ değerleri belirlenen AKR1B1 susturulmuş HCT-116 hücreleri, iki farklı CHNQ konsantrasyonu (10 ve 20 μ M) muamele edilmiştir. Daha sonra, %70'lik soğuk etanol ile sabitlenen hücreler, Propidyum İyodür (PI) ile boyanmıştır. PI, DNA kontentini değerlendirmek amacıyla en sık kullanılan florasan boyalardan biridir. DNA üzerinde iki baz arasına girerek,

535 nm dalga boyunda uyarılır ve 617 nm dalga boyunda ışımaya verir. Bu sayede, PI ile boyanan hücrelerinin hücre döngüsü akım sitometresinin FL-3 kanalında değerlendirilir.



Şekil 4.12.CHNQ'nun AKR1B1 susturulmuş HCT-116 hücrelerinin hücre döngüsü üzerindeki etkisi.



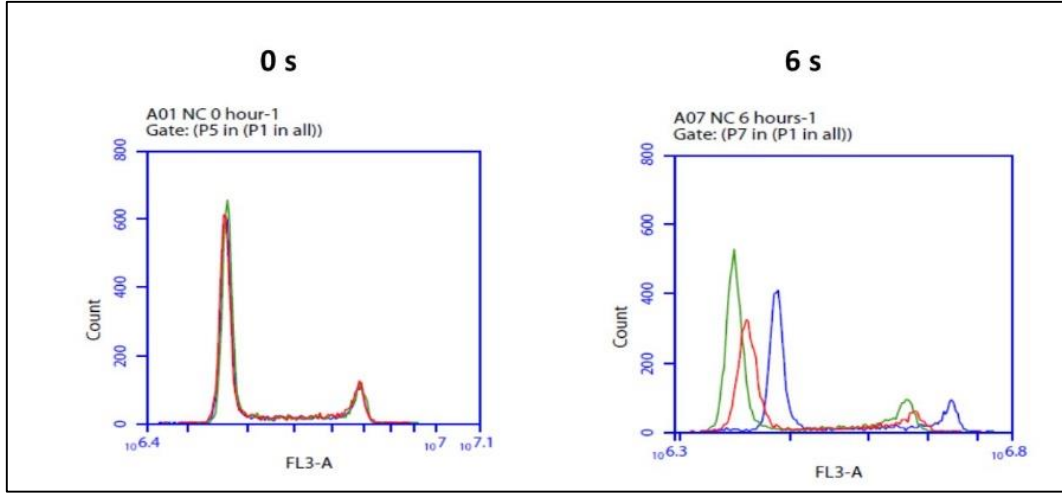
Şekil 4.13. CHNQ ile muamele edilen AKR1B1 susturulmuş ve kontrol HCT-116 hücrelerinin hücre döngüsü dağılımı.

AKR1B1 susturulmuş kontrol poliklon ve monoklon HCT-116 hücrelerinde hücre döngüsü ilerlemesinin belirlenmesi amacıyla PI boyama metodu uygulanmıştır. Bunun için, hücreler serumsuz ortamda 24 saat boyunca %0,4 DMSO, 20 µM Sorbinil (AKR1B1 ve AKR1B10 inhibitörü), veya 10 ve 20µM CHNQ ile muamele edilmiş; ardında PI ile boyanmıştır.

Şekil 4.12'de görüldüğü üzere, CHNQ muamelesi, hem kontrol poliklon hücrelerinde, hem de AKR1B1 susturulmuş monoklon hücrelerinde, AKR1B1'in susturulmasından bağımsız olarak, G2/M fazında bloklanmaya sebep olmaktadır.**Şekil 4.13**'te, kontrol poliklon ve AKR1B1 susturulmuş hücrelerinde, her bir hücre döngüsü fazında bulunan hücre yüzdeleri verilmiştir. Buradan da anlaşılacağı üzere, CHNQ'nun hücre döngüsü üzerindeki etkisi, AKR1B1'den bağımsızdır.

4.5.5. AKR1B1 susturulmasının hücre döngüsü üzerindeki etkisinin incelenmesi

Şekil 4.10 'da gösterildiği üzere, AKR1B1 susturulmasının ve CHNQ etkisinin mitojen tarafından aktive edilen protein kinaz (MAPK) sinyal yolağı üzerindeki etkileri gösterilmiştir. Bu sonuçlara dayanarak, CHNQ ile muamele edilmemiş scrambled shRNA HCT-116 ile monoklon 1 ve monoklon 6 hücreleri karşılaştırıldığında, fosfo-ERK1/2 protein formunda azalma gözlemlenmiştir. Bu azalmanın hücre döngüsündeki etkisini gözlemlemek amacıyla, NC, M1 ve M6 HCT-116 hücreleri bir gece boyunca serumsuz besiyerinde bekletilmiş ve hücrelerin çoğunun G1 fazında senkronize olması sağlanmıştır. Daha sonra, serumsuz besiyeri serumlu besiyeri ile değiştirilip, 0 ve 6. saatlerde toplanan hücreler PI ile boyanarak hücre döngüleri izlenmiştir.

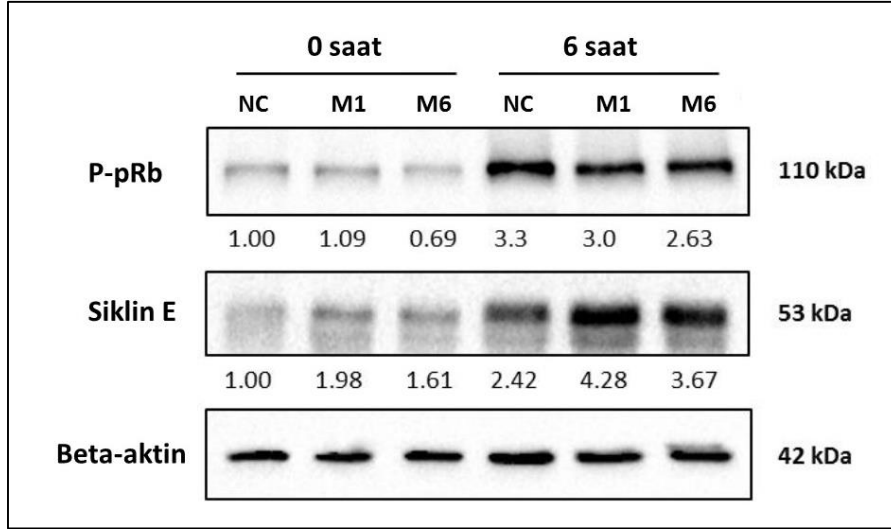


Şekil 4.14. AKR1B1 susturulmasının HCT116 hücrelerinin hücre döngüsü üzerindeki etkileri. Mavi çizgiler scrambled shRNA hücrelerini, yeşil çizgiler monoklon 1 hücrelerini ve kırmızı çizgiler monoklon 6 hücrelerini temsil etmektedir.

Şekil 4.14.'te de görüldüğü üzere, monoklon 1 ve monoklon 6 hücreleri hücre döngüsünü scrambled shRNA hücrelerine kıyasla daha geriden takip etmektedir ve bu fark 6 saat ve sonrasında belirgin bir şekilde gözlemlenmektedir.

4.5.6. Hücre döngüsü ile ilişkili yolların incelenmesi

Akım sitometrisinde elde edilen sonuçlara göre, M1 ve M6 hücreleri, en belirgin olarak, 6. saatte hücre döngüsü bakımından scrambled shRNA hücrelerine göre geride kalmaktadır. Bu sebeple, serumsuz besiyerinde bir gece senkronize edilen NC, M1 ve M6 hücrelerinden, besiyerinin serumlu besiyeri ile değiştirilmesinin ardından 0. ve 6. saatlerde protein izole edilmiştir.



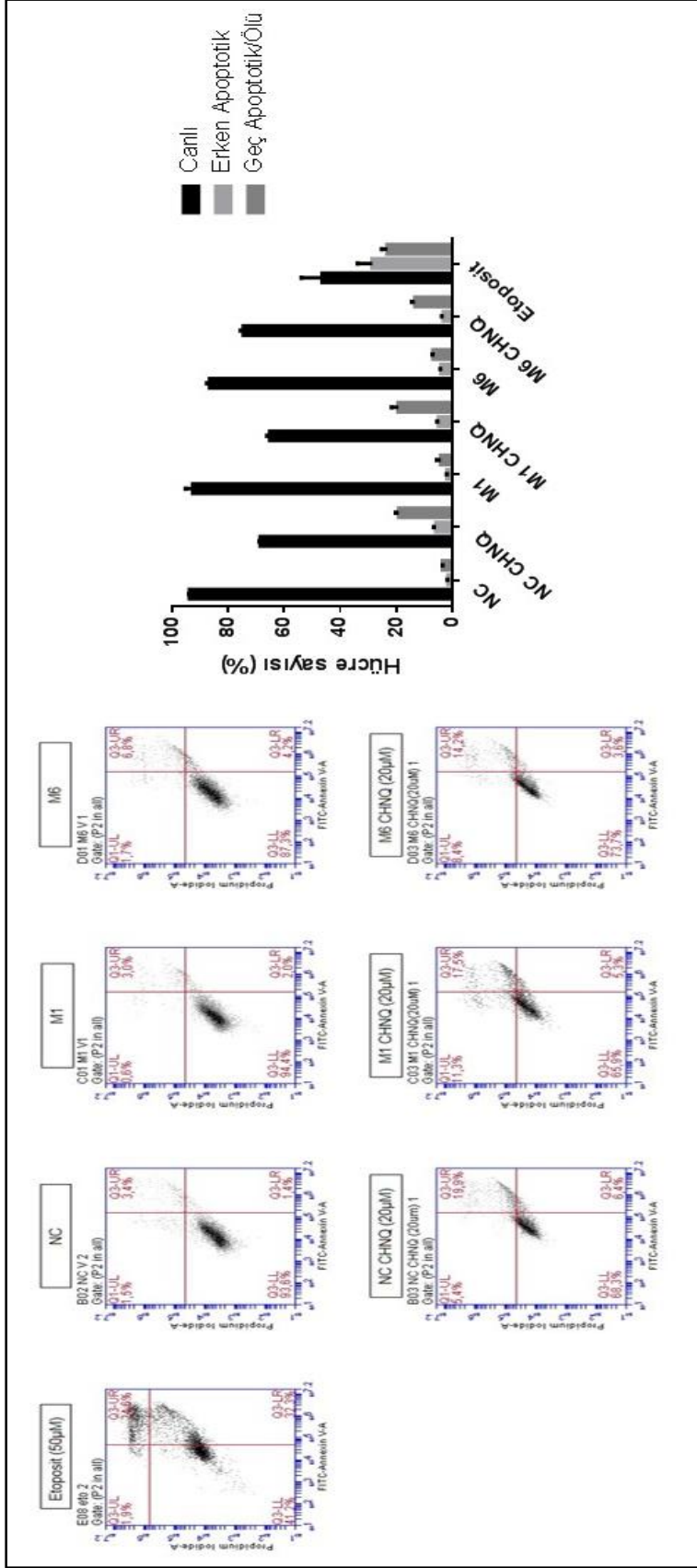
Şekil 4.15. AKR1B1 susturulmasının hücre döngüsü üzerindeki ve hücre döngüsü üzerinde görev alan proteinler üzerindeki etkisi.

Siklin E proteini, siklin protein ailesinin bir üyesidir. Hücre döngüsü süresinde, G1 fazında Cdk2'ye (cyclin-dependent kinase) bağlanarak, G1 fazından S fazına geçişi sağlayarak hücre bölünmesini kontrol eder. Siklin E/ Cdk2 birlikte retinablastoma proteinini (Rb) fosforlayarak, G1 fazında ilerlemeyi tetiklemektedir. Hücreler, hücre döngüsünün bu fazındayken Siklin E proteini aktif olarak bulunmaktadır. Ancak hücreler, bu fazdan çıktından sonra, Siklin E hızlı bir şekilde yıkılır ve bir sonraki fazda aktif olması gereken Siklin B1 aktive olur.

Şekil 4.15 'de de görüldüğü üzere, 0 saatte, diğer bir deyişle hücreler tamamen senkronize halde G₀ fazında beklerken, Siklin E seviyeleri eşittir. Ancak 6 ıncı saatte, M1 ve M6 hücrelerinde, Siklin E seviyelerinde sırasıyla yaklaşık %60 ve %40 artış gözlenmektedir. Bununla uyumlu olarak, 0. saatte fosforile pRB seviyeleri eşitken, 6. saatte M1 ve M6 hücrelerinde p-Rb daha azdır. Bu sonuçlara bakarak, NC hücrelerinin M1 ve M6 hücrelerine kıyasla, hücre döngüsünün bu fazını bitirip bir sonraki faza geçtiği, ancak M1 ve M6 hücrelerinin hala bu fazda buldukları söylenebilir. Dolayısıyla, bu sonuçlar akım sitometrisinde elde edilen sonuçları destekler niteliktedir.

4.5.7. AKR1B1 susturulmasının apoptoz üzerindeki etkileri

CHNQ maddesinin ve AKR1B1 susturulmasının hücre apoptozu üzerindeki etkilerini gözlemek amacıyla hücrelere Annexin V ve Propidyum İyodür boyaması yapılmıştır. Bu boyalardan Annexin V, hücre zarında bulunan fosfatidilserinlere bağlanma yetisine sahip FITC işaretli bir proteindir; PI ise DNA'yı boyayan bir florasan boyadır. Normal bir hücrede, hücre zarı zarar görmemiş haldeyken, fosfatidilserinler hücre membranının içinde bulunur, dolayısıyla dışardan Annexin V verilse bile bu hücreler boyanmayacaktır. Benzer şekilde, hücre ve çekirdek zarı zarar görmemiş sağlıklı bir hücrede PI de hücre içine giremeyeceği için herhangi bir boyama olmayacaktır. Ancak, hücre apoptoza girdiği zaman, öncelikle hücre zarı zarar görecektir ve Annexin V bu hücreleri boyayabilecektir. Apotozun daha ileri aşamalarında ise, artık çekirdek zarı da zarar göreceği için, hücreler hem Annexin V hem de PI ile boyanabilecektir.



Şekil 4.16. Seçilen bir konsantrasyon ile muamele edilen AKR1B1 susturulmuş HCT-116 hücrelerinde CHNQ maddesinin ve AKR1B1 susturulmasının apoptoz üzerindeki etkileri.

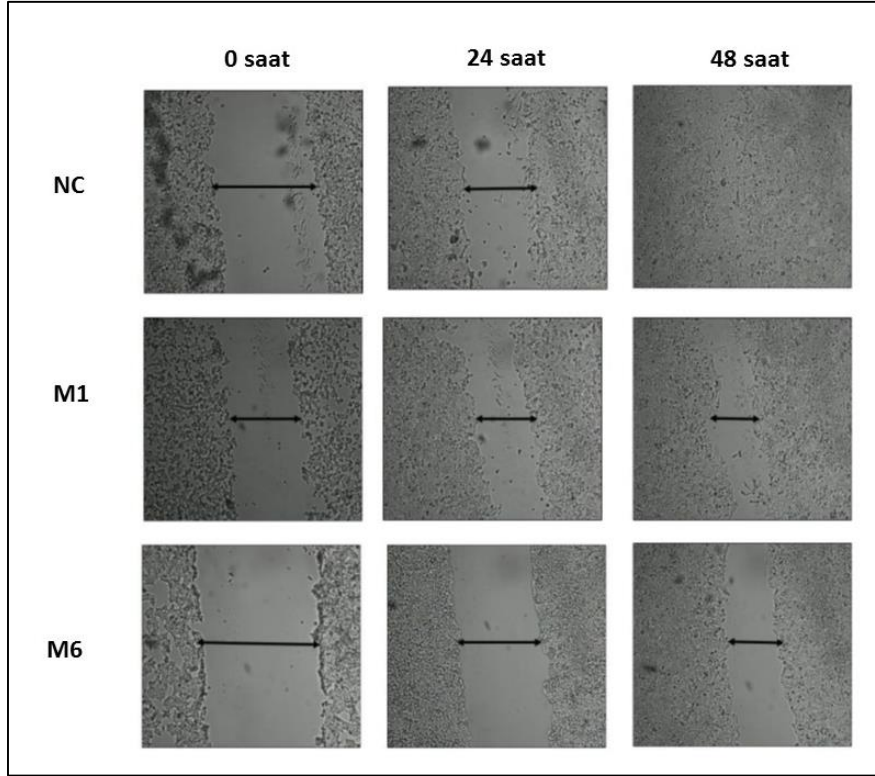
Şekil 4.16 'daki grafiklere göre, sol alt kısımdaki (LL) hücreler iki boya tarafından da boyanmamış, sağlıklı ve canlı hücreleri gösterirken, sağ alt kısımdaki (LR) hücreler sadece Annexin V ile boyanmış erken apoptotik hücreleri, sağ üst kısımdaki (UR) hücreler hem Annexin V hem de PI ile boyanmış geç apoptotik ve ölü hücreleri göstermektedir.

Etoposid (50 µM) bir topoizomeraz II enzimi inhibitörüdür. DNA ile üçlü bir kompleks kurarak DNA ipliğinde kırılmalara sebep olur. Bu özelliğinden ötürü bu kimyasalın apoptoza sebep olduğu bilinmektedir (Kang vd., 2010). Bu sebeple, apoptoz deneyinde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

NC, M1 ve M6 hücrelerinin apoptoz profilleri kıyaslandığı zaman, hücreler arasında ciddi bir fark gözlenmezken, CHNQ'nun her üç hücrede de apoptoza yol açtığı görülmüştür. Ancak, her hücrede de aynı seviyede apoptoz olduğu görülmektedir ve bu sonuçlar CHNQ'nun AKR1B1 üzerinden çalışmadığını destekler niteliktedir.

4.5.8. **AKR1B1 susturulmasının hücre hareketliliği üzerindeki etkileri**

AKR1B1 susturulmasının ve susturulmuş hücrelerde CHNQ maddesinin hücre hareketliliğine etkisini gözlemlemek amacıyla *in vitro* yara iyileşme deneyi yapılmıştır. Bu metot *in vitro* ortamdaki yara iyileşmesi süresince hücre göçünü gösteren bir taklittir. CHNQ muamelesi için, çok fazla hücre ölümüne sebep olmayacak bir konsantrasyon olan 10 µM seçilmiştir.



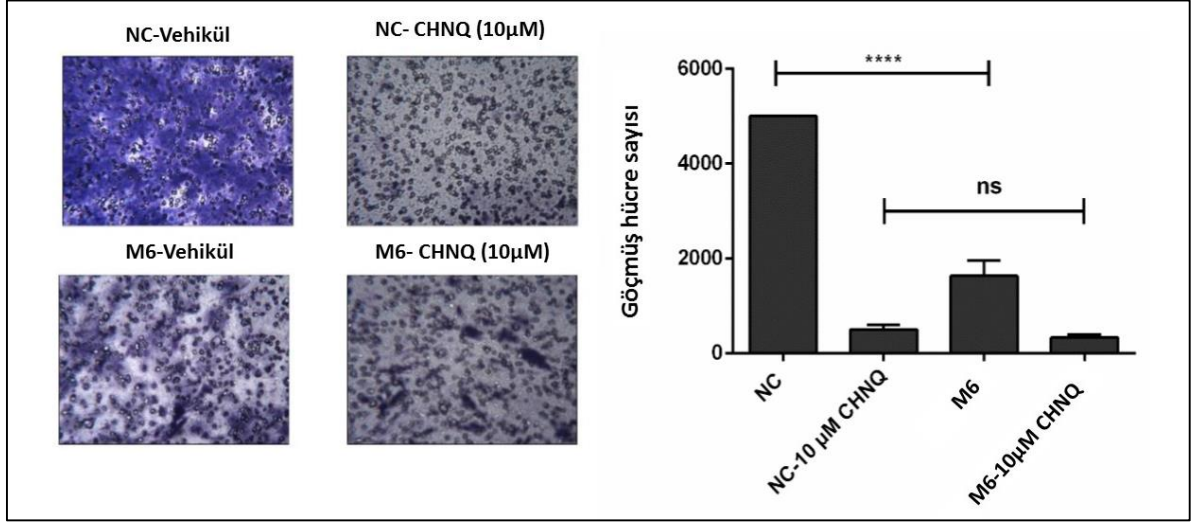
Şekil 4.17. AKR1B1 susturulmuş ve kontrol HCT-116 hücrelerinde pipet ucuyla açılan yaranın 48 saat sonunda kapanma miktarlarının gösterilmesi.

Şekil 4.17' de görüldüğü üzere, CHNQ tüm hücrelerde yara iyileşme sürecini yavaşlatmaktadır. Bunun yanında sadece NC, M1 ve M6 hücrelerinin hareketliliğini kıyasladığımız zaman, 48 saatlik sürenin sonunda NC hücrelerinin yarası tamamen kapattığı ancak AKR1B1 susturulmuş M1 ve M6 hücrelerinin hala açık yaraya sahip oldukları görülmektedir. Bu hücrelerin daha az hareketliliğe sahip olmaları, **Bölüm 4.5.3'**te gösterilen düşük proliferasyon hızı ve **Bölüm 4.5.5'**da gösterilen hücre döngüsündeki gecikme ile birbirini destekler niteliktedir.

4.5.9. AKR1B1 susturulmasının hücre göçü üzerindeki etkileri

AKR1B1 susturulmasının ve susturulmuş hücrelerde CHNQ maddesinin hücre göçü üzerindeki etkilerini gözlemlemek amacıyla Transwell migrasyon deneyi yapılmıştır. Bu deney, hücrelerin düşük konsantrasyonda serum içeren bir kompartmandan yüksek konsantrasyonda serum içeren başka bir kompartmana geçmesi temeline dayanır. CHNQ muamelesi için, çok

fazla hücre ölümüne sebep olmayacak bir konsantrasyon olan 10 µM seçilmiştir. Göç etmiş hücre sayısı ile boyanma miktarı doğru orantılıdır.

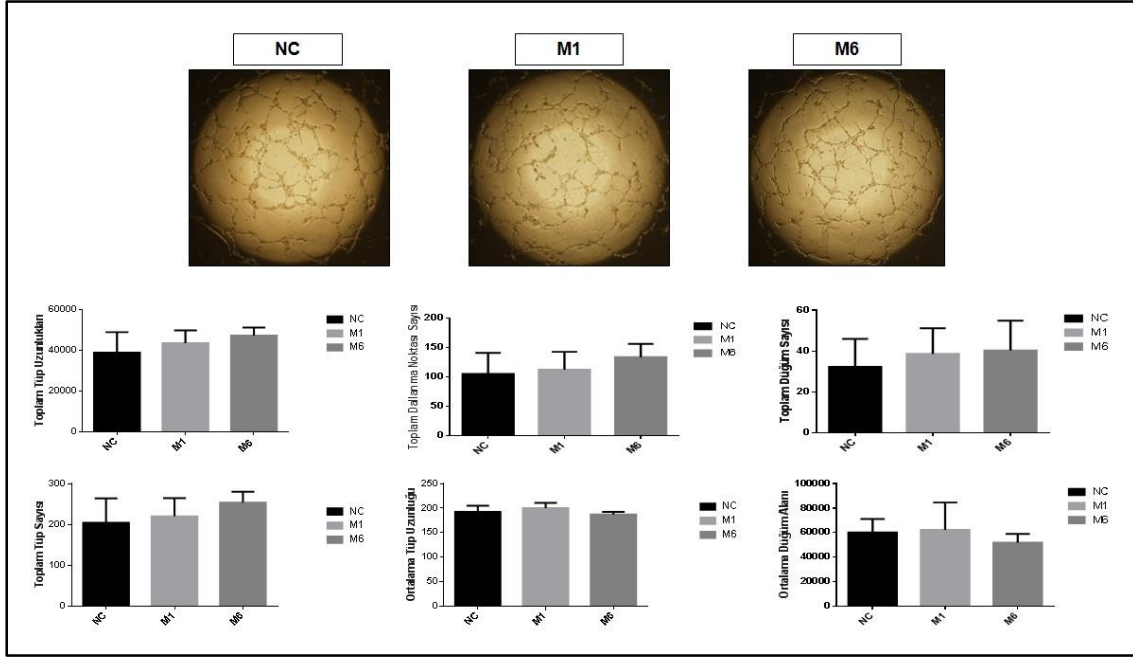


Şekil 4.18.CHNQ maddesinin NC, M1 ve M6 hücrelerinin hücre göçü özelliği üzerindeki etkisi.

Şekil 4.18'de görüldüğü üzere, CHNQ muamelesi hem NC hücrelerinin hem de M6 hücrelerinin Transwell üzerinden göçünü ciddi seviyede etkilemiştir. Buna ek olarak, CHNQ ile muamele edilmemiş (vehikül) NC ve M6 hücrelerini kıyasladığımız zaman, M6 hücrelerinin daha az boyandıklarını, dolayısıyla, daha az göç etmiş olduklarını görmekteyiz.

4.5.10. AKR1B1 susturulmasının anjiyogenez üzerindeki etkileri

Anjiyogenezin *in vitro* olarak değerlendirilmesinde en yaygın olarak kullanılan deney endotel hücrelerin tüp benzeri yapılar oluşturabilme kabiliyetine dayalı bir deney olan yeni tüp oluşumu deneyidir. Kanser hücrelerinin şartlandırılmış besiyerleri, bu tüplerin yüksek miktarda tüp oluşturmasını indükleyecek faktörlere sahiptir. AKR1B1 susturulmuş HCT-116 hücrelerinde bu durumu indükleyecek bir değişikliğin olup olmadığını gözlemlemek amacıyla, 72 saatlik besiyeri toplanmış ve HUVEClar 1:1 oranında endotel hücre besiyeri:koşullu besiyeri kullanılarak daha önceden Matrigel ile kaplanmış 96-kuyucuklu plakalara ekilmiştir. 6 saatlik inkübasyonun ardından tüp oluşumları değerlendirilmiştir.



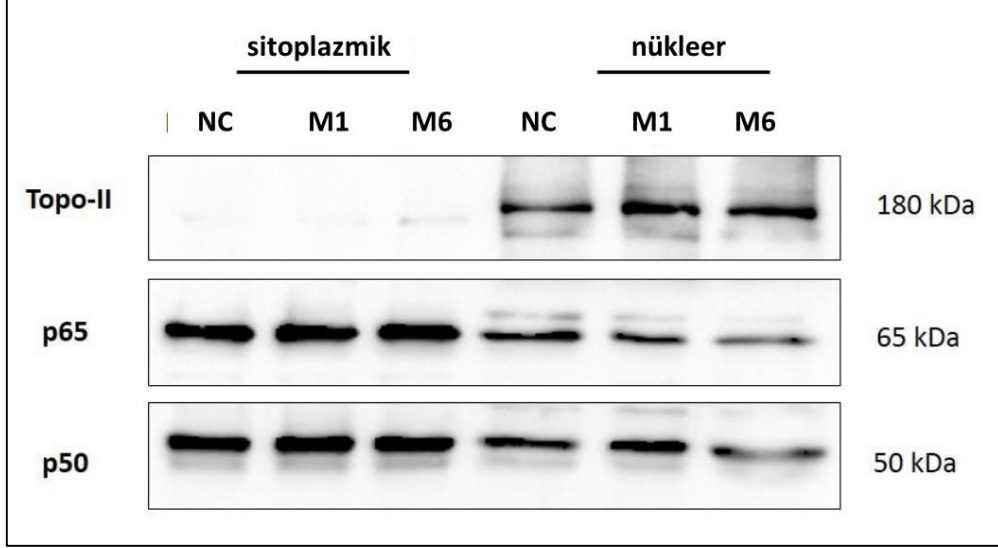
Şekil 4.19. AKR1B1 susturulmuş hücrelerin yeni damar oluşumu üzerindeki etkileri.

Şekil 4.19'da görüldüğü üzere, HCT-116 hücrelerinde AKR1B1 susturulması, HUVEC hücrelerinde yeni damar oluşumu etkileyen istatistiksel olarak anlamlı bir değişime neden olmamıştır.

4.5.11. AKR1B1 susturulmasının NF- κ B transkripsiyon faktörü üzerindeki etkisi

Nükleer faktör- κ B (NF- κ B)/Rel proteinleri NF- κ B2 p52/p100, NF- κ B1 p50/p105, c-Rel, RelA/p65 ve RelB proteinlerinden oluşmaktadır. Bu proteinler, inflamasyon, stres tepkisi, B-hücresi gelişimi vb gibi birçok biyolojik süreçte gen ifadesini düzenlemek amacıyla dimerik halde görev alan transkripsiyon faktörleridir. Normal şartlarda bu proteinler, I κ B proteinine bağlı olarak inaktif şekilde dururlar. Dışardan gelen herhangi bir inflamatuvar etki ile birlikte IKK kompleksi active olarak I κ B proteinlerini fosforile eder. Bu fosforilasyon, I κ B'nin proteazom ile yıkımına sebep olarak, NF- κ B proteinlerini serbest bırakır. Aktif NF- κ B/Rel kompleksinin RelA/p65 alt ünitesi nükleer translokasyon ve transaktivasyon özelliğine sahiptir. Böylece, çekirdekten içeri girerek transkripsiyon faktörü olarak görev alır.

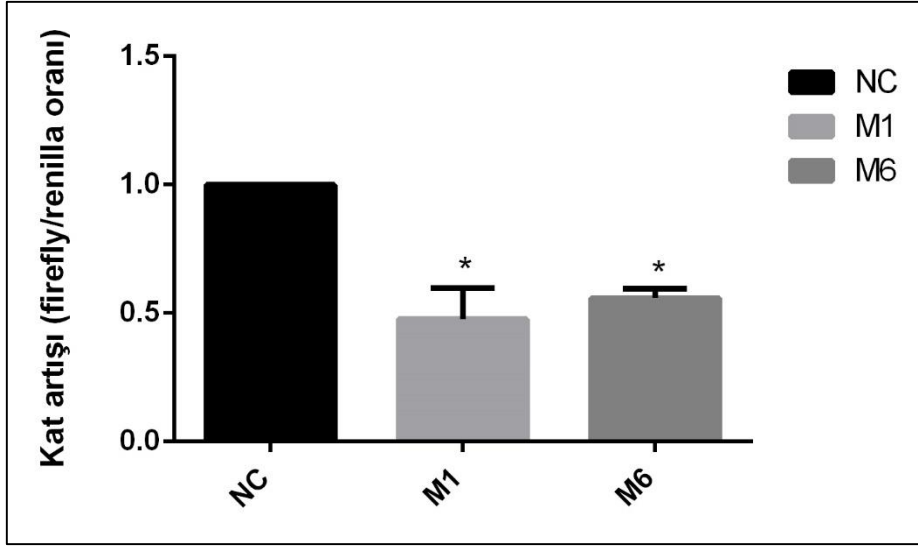
AKR1B1 susturulmasının bu proteinlerin ifadenmesini gözlemlemek amacıyla, ilk olarak NC, M1, M6 hücrelerinde sitoplazmik ve çekirdeksel protein fraksiyonu yapılmış ve ardından western blot tekniği ile ifadenme seviyelerine bakılmıştır.



Şekil 4.20. AKR1B1 susturulmuş HCT-116 hücrelerinde NF- κ B proteinlerinin ifadenmesinin Western Blot yöntemi ile gösterilmesi. Topo-II proteini çekirdeksel protein belirteci olarak kullanılmıştır.

Yukarıdaki şekilde görüldüğü üzere, M1 ve M6 hücrelerinin çekirdeksel protein fraksiyonundaki p65 seviyesinde NC hücrelerine kıyasla azalma görülmektedir. Bu durum, AKR1B1 susturulmasının anti-inflamatuar etkilerinin olabileceği yönünde umut verici bir özelliğe sahiptir.

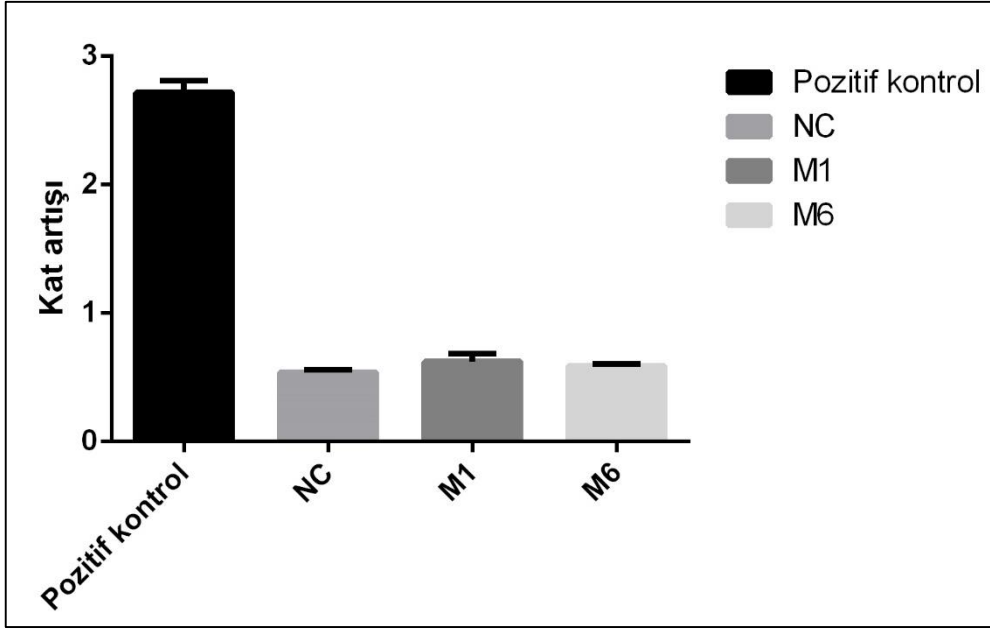
NF- κ B transkripsiyon faktörünün ifadenmesi **Şekil 4.20**'de gösterilmesinin ardından, bu sonucu doğrulamak amacıyla, transkripsiyonel aktiviteyi gösteren bir deney olan lusiferaz tayini deneyi yapılmıştır. Bu amaçla, 5 kopya NF- κ B (TGGGGACTTTCCGC) kuvvetlendirici dizi içeren PathDetect sistemi kullanılmıştır. Deneyde aynı zamanda, CHNQ maddesi de kullanılmış; onun da NF- κ B transkripsiyonel aktivitesi üzerindeki etkileri gözlemlenmiştir.



Şekil 4.21. AKR1B1 susturulmuş NC, M1 ve M6 hücrelerinde NF-κB transkripsiyonel aktivitesinin incelenmesi.

Lusiferaz NF-κB transkripsiyonel aktivite deneyinden elde edilen bulgular western blot sonuçlarını destekler niteliktedir: M1 ve M6 hücrelerindeki NF-κB transkripsiyonel aktivitesinin NC hücrelerine göre daha az olduğu açıkça görülmektedir.

AKR1B1 susturulmuş HCT-116 hücrelerinde protein miktarlarında ve NF-κB aktivite azalmasında görülen bu değişimin NF-κB DNA bağlanmasına nasıl etki ettiğini incelemek için ELISA yöntemi kullanılmıştır.

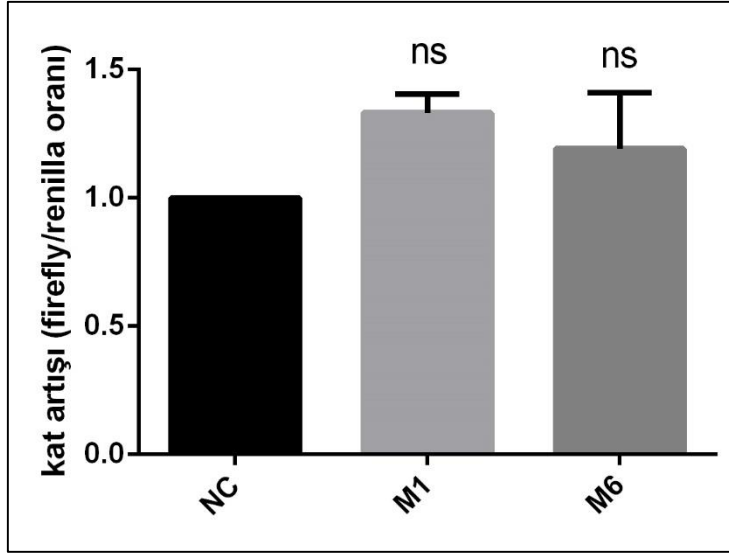


Şekil 4.22. AKR1B1 susturulmuş HCT-116 hücrelerinde NF-kB (p65) DNA bağlanma miktarı.

Kitle birlikte sağlanan rekombinant p65 proteinin pozitif kontrol olarak kullanıldığı deneyde, beklenmeyen bir şekilde, AKR1B1 susturulmuş hücrelerde p65 DNA bağlanma kapasitesi ile kontrol (NC) hücrelerinde p65 DNA bağlanma kapasitesi arasında bir farklılık görülmemiştir (**Şekil 4.22**). Bu deneyin, erken pasaj NC, M1 ve M6 hücreleriyle tekrarlanması planlanmaktadır.

4.5.12. AKR1B1 susturulmasının AP-1 transkripsiyonel aktivitesi üzerindeki etkisi

Aktivatör Protein 1 (AP-1) gen ifadenmesini sitokinler, büyüme faktörleri, stres, bakteriyel ve viral enfeksiyonlar gibi bir çok uyarıcıya karşı düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. Bu protein, proliferasyon ve apoptoz gibi bir çok hücrel işlemi kontrol etmektedir. AP-1'in transkripsiyonel aktivitesini göstermek amacıyla lusiferaz tayini deneyi yapılmıştır. Bu amaçla, 7 kopya AP-1 (TGACTAA) kuvvetlendirici dizi içeren PathDetect sistemi kullanılmıştır.

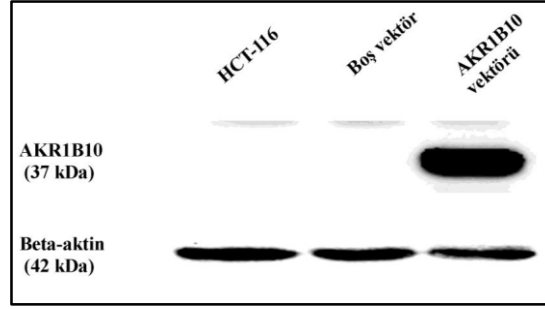


Şekil 4.23. AKR1B1 susturulmuş NC, M1 ve M6 hücrelerinde AP-1 transkripsiyonel aktivitesinin incelenmesi.

Şekil 4.23' teki sonuçlara göre NC, M1 ve M6 hücreleri arasında AP-1 proteininin transkripsiyonel aktivitesi açısından herhangi bir fark gözlemlenmemiştir.

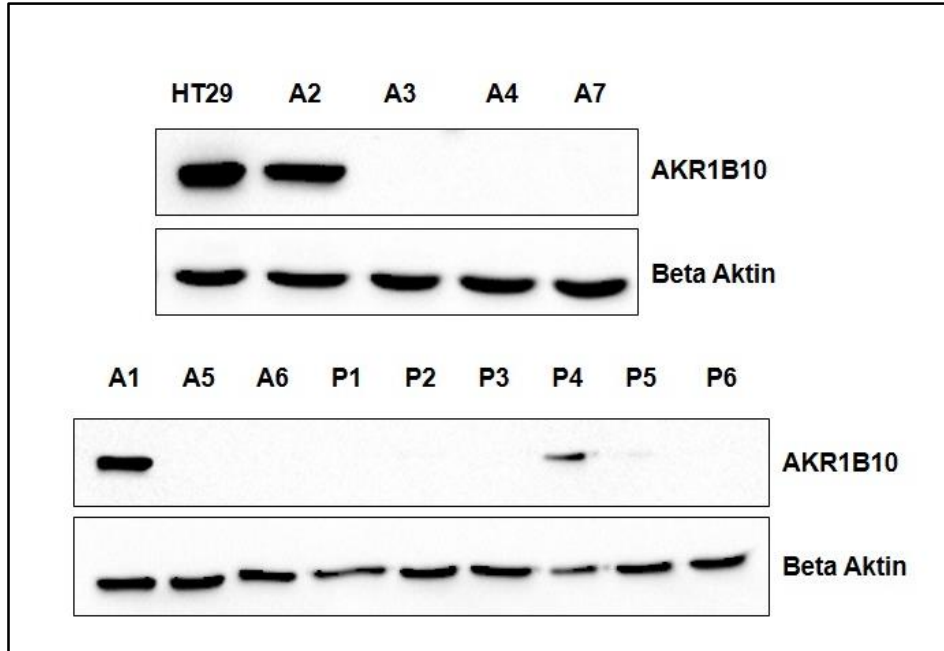
4.6. HCT-116 hücrelerinde AKR1B10 aşırı ifadesi ve hücresel etkileri

AKR1B10 geninin pcDNA3.1(-) vektörüne klonlanıp, sekanslama ile doğrulanmasının ardından, HCT-116 hücreleri bu vektörle transfekte edilmiş ve transfekte hücrelerden, ifadenmenin gerçekleştirilebildiğini gözleme total protein izole edilmiştir. **Şekil 4.24'**te görüldüğü üzere, hiç transfekte edilmemiş hücrelerde ve sadece boş vektörle transfekte edilmiş hücrelerde AKR1B10 ifadenmesi gözlenmezken, AKR1B10 vektörü ile yapılan transfeksiyon başarıyla gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.24.AKR1B10 geçici transfeksiyonunun western blot ile gösterilmesi.

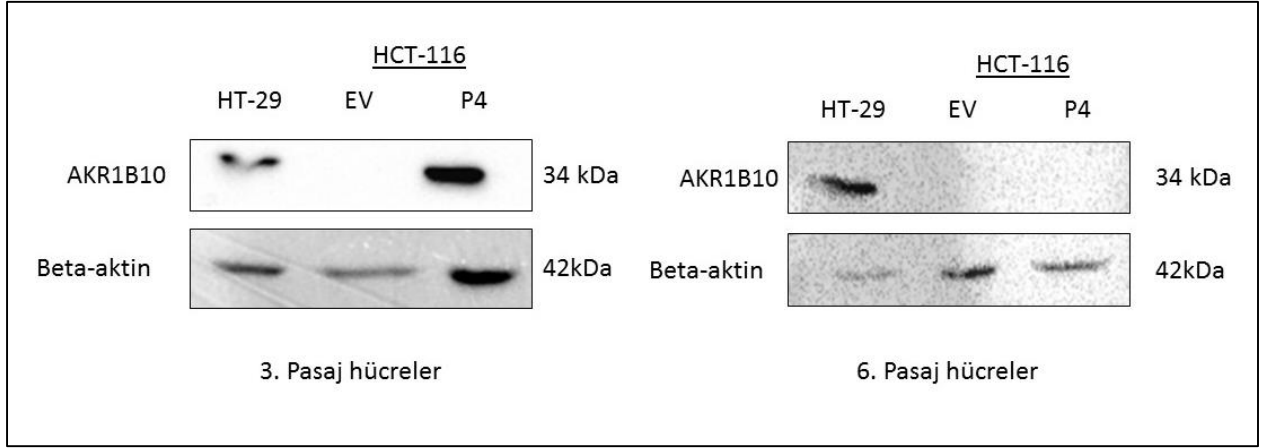
Elde edilen bu sonuçların ardından, HCT-116 hücrelerinde AKR1B10 kalıcı transfeksiyonu için yapılmıştır ve Zeocin (memeli hücreleri için seçilim antibiyotiği) ile AKR1B10'u kalıcı olarak ifade eden 7 adet monoklon (A1-A7) ve 6 adet poliklon (P1-P6) seçilmiştir (**Şekil 4.25**).



Şekil 4.25.AKR1B10 kalıcı transfeksiyonunun Western Blot yöntemi ile gösterilmesi.

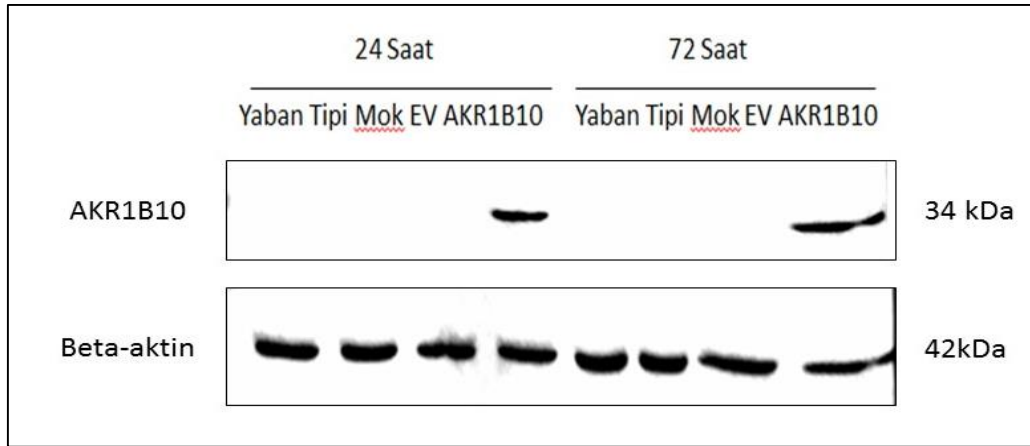
Seçilmiş olan monoklonal ve poliklonal hücrelerden protein izole edilerek AKR1B10 ifadesi kontrol edilmiştir. HT-29 hücrelerinden elde edilen protein pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Seçilen 7 monoklondan yalnızca 2 tanesi (A1 ve A2) AKR1B10'u ifadelerken, poliklonlardan yalnızca 1 tanesi (P4) AKR1B10'u ifade etmektedir.

A1 ve A2 monoklonları alt pasajlama yapılırken, hücre kültürü plakasına yapışmamış ve tamamen kaybedilmişlerdir. Bu sebeple P4 hücreleri ile devam edilmeye karar verilmiştir. Ancak P4 hücrelerinde ise zamanla AKR1B10 ifadesinin kaybedildiği görülmüştür (**Şekil 4.26**).



Şekil 4.26.HCT-116 hücrelerinde AKR1B10'u kalıcı olarak ifade eden P4 hücrelerinde AKR1B10 ifadesinin kaybolması.

HCT-116 hücrelerinde AKR1B10 'un kalıcı ifadesi çeşitli sebeplerle sağlanamadığı için, deneylere geçici transfeksiyonla devam edilmesine karar verilmiştir. Geçici transfeksiyon ile 72 saate kadar protein üretimi olduğu Western Blot ile kanıtlanmıştır (**Şekil 4.27**).

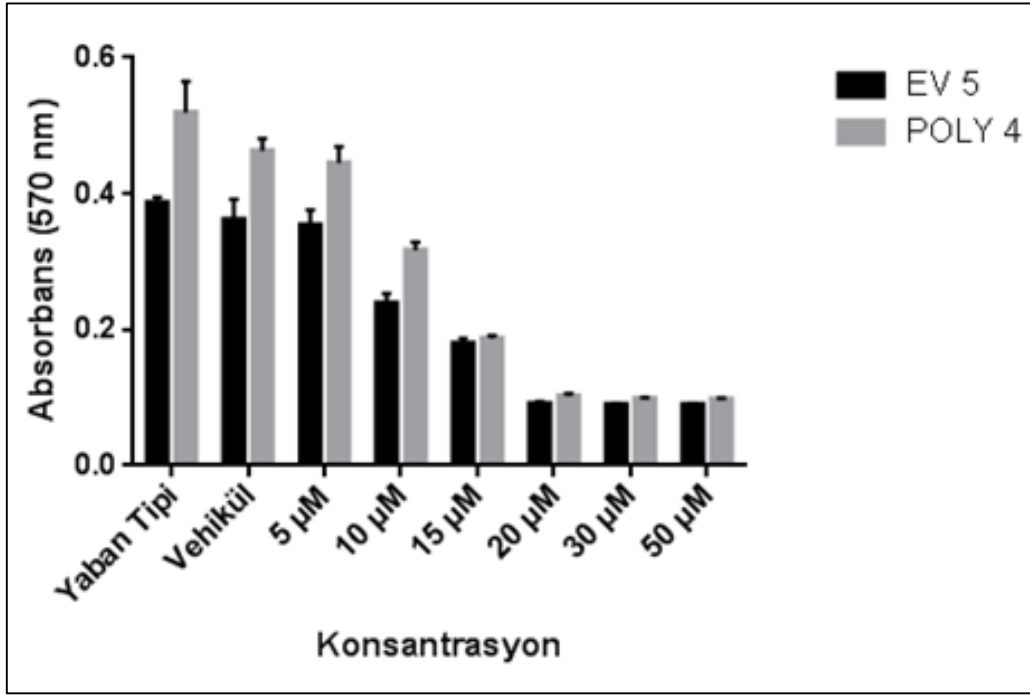


Şekil 4.27.HCT-116 hücrelerinde AKR1B10'un geçici transfeksiyonunda ifadelenme seviyelerinin 24 ve 72 saatlerde gösterilmesi.

4.6.1. AKR1B10'u aşırı ifade eden HCT-116 hücrelerinde hücre çoğalmasının araştırılması

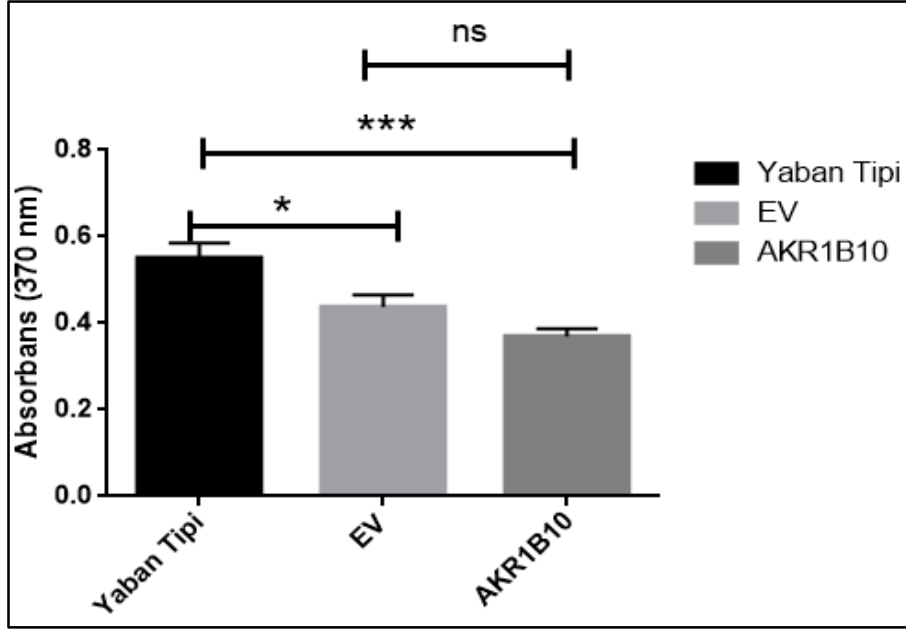
CHNQ maddesi serumsuz ortamda ve farklı konsantrasyonlarda (0-50 μ M aralığında) AKR1B10 aşırı ifade eden HCT-116 hücrelere uygulanmıştır. Hücreler 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda CHNQ ile muamele edilmiş daha sonra MTT metodu ile hücre çoğalmaları belirlenmiştir (**Şekil 4.28**). Bu çalışma erken pasaj AKR1B10 aşırı ifade eden poliklon hücreleri

ile yapılmıştır. AKR1B10 ifadesi ilerleyen pasajlarda kaybedildiğinden, deneylere geçici transfeksiyon ile devam edilmiştir.



Şekil 4.28.Farklı konsantrasyonlarda CHNQ uygulayarak AKR1B10'u aşırı ifade eden HCT-116 hücrelerinde IC₅₀ değerinin belirlenmesi.

Elde edilen sonuçlara göre (**Şekil 4.28**), CHNQ'nun sitotoksik etkisi diğer hücrelerle benzer şekilde olup, AKR1B10'u aşırı ifade eden hücrelerdeki IC₅₀ değeri yaban tipi hücrelerle benzerdir ve CHNQ'nun hücre çoğalmasını etkileme kapasitesi AKR1B10 ifadenmesinden bağımsızdır. Bu sonuçların ardından, AKR1B1 susturulmasının HCT-116 hücrelerinde hücre çoğalmasını negatif yönde etkilediği göz önünde bulundurularak, AKR1B10'un kendi başına hücre çoğalmasını etkileyip etkilemediği BrdU inkorporasyon yöntemi ile incelenmiştir.



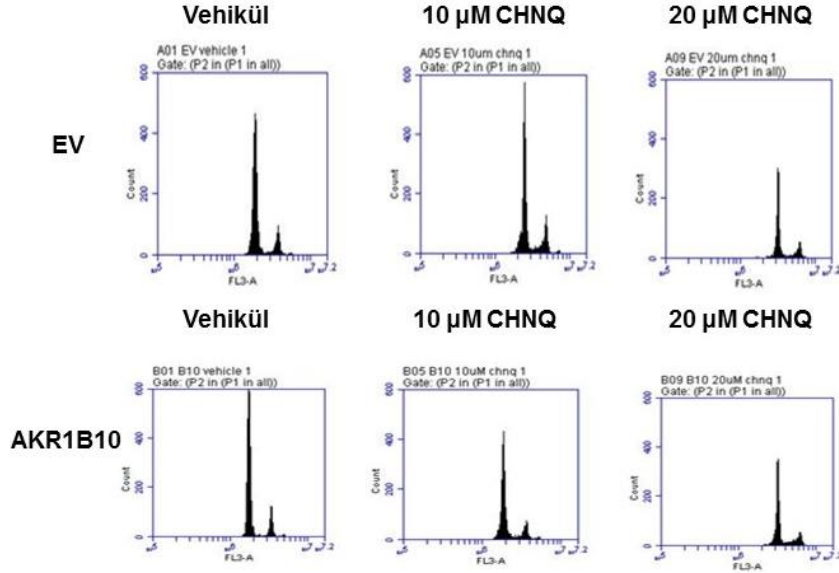
Şekil 4.29. AKR1B10'u aşırı ifadesinin hücre çoğalması üzerindeki etkilerinin BrdU inkorporasyon metodu ile gösterilmesi. (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, ns: istatistiksel olarak anlamlı değil).

Üç bağımsız deney sonucuna göre boş vektörle transfekte edilen hücrelerle kıyaslandığında AKR1B10 vektörü ile transfekte edilen hücrelerin hücre çoğalmasında bir fark gözlenmemiştir. Aradaki fark, istatistiksel olarak anlamlı bir değişim ifade etmemektedir. Bu deneyde transfeksiyon 96 kuyucuklu plakalarda gerçekleştirilmiştir. Bu deney düzeneğinde transfeksiyon etkinliği kontrol edilemediğinden (western blot gibi), deneyin 6 kuyulu plakalarda tekrarlanması ve hücre canlılığının transfeksiyon ardından hücre sayımı ile belirlenmesi planlanmaktadır. Bu amaçla laboratuvarımızda bulunan TC20 (Biorad) hücre sayım cihazı kullanılacaktır.

4.6.2. AKR1B10'u aşırı ifade eden HCT-116 hücrelerinde hücre döngüsünün araştırılması

CHNQ'nun IC_{50} değerleri belirlenen AKR1B10 aşırı ifade eden HCT-116 hücreleri, iki farklı CHNQ konsantrasyonuyla (10 ve 20 μM) 24 saat muamele edilmiştir. Daha sonra, %70'lik soğuk etanol ile sabitlenen hücreler, Propidyum İyodür (PI) ile boyanmıştır. Propidyum İyodür, DNA kontentini değerlendirmek amacıyla en sık kullanılan florasan boyalardan biridir. DNA üzerinde iki baz arasına girerek, 535 nm dalga boyunda uyarılır ve 617 nm dalga boyunda

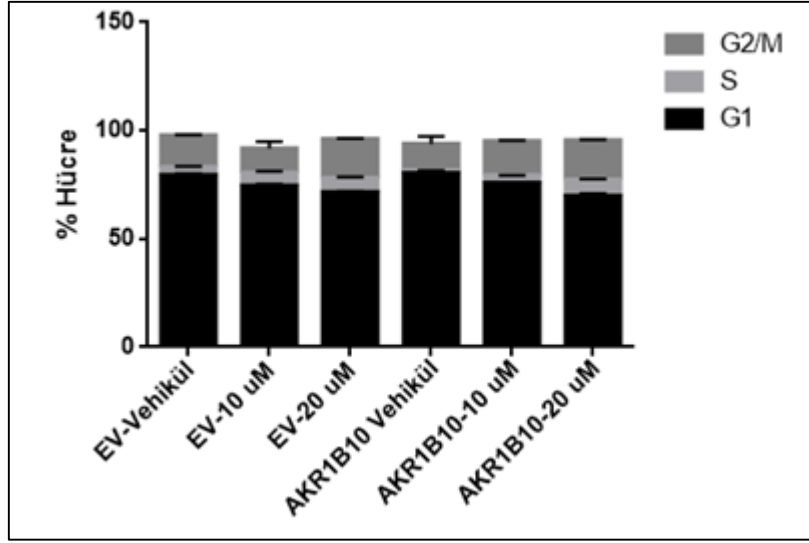
ışıma verir. Bu sayede, PI ile boyanan hücrelerinin hücre döngüsü akım sitometresinin FL-3 kanalında değerlendirilir.



Şekil 4.30. İki farklı konsantrasyon CHNQ ile muamele edilen boş vektör ve AKR1B10 ile transfekte edilmiş HCT-116 hücrelerinde hücre döngüsünün propidyum iyodür boyaması ile akım sitometrisinde gösterilmesi.

AKR1B10 aşırı ifade eden HCT-116 hücrelerinde hücre döngüsü ilerlemesinin belirlenmesi amacıyla PI boyama metodu uygulanmıştır. Bunun için, hücreler serumsuz ortamda 24 saat boyunca %0,4 DMSO (Vehikül), 10 ve 20μM CHNQ ile muamele edilmiş; ardından PI ile boyanmıştır.

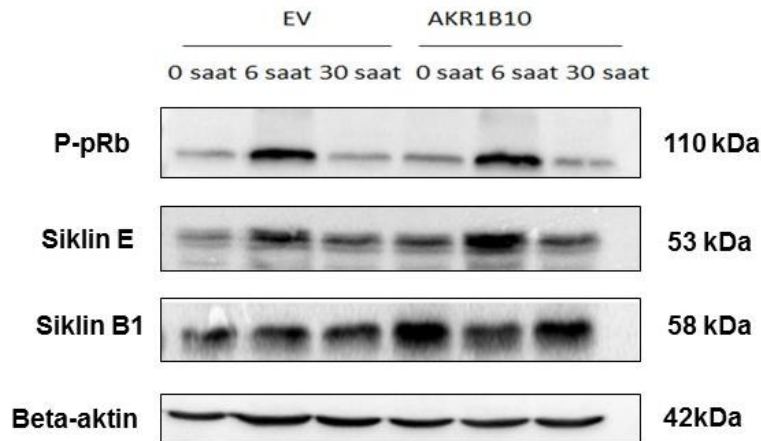
Şekil 4.30'de görüldüğü üzere, CHNQ muamelesi, hem kontrol EV hücrelerinde, hem de AKR1B10 aşırı ifade eden hücrelerde, AKR1B10'in varlığından bağımsız olarak aktivite göstermektedir. Buradan da anlaşılacağı üzere, CHNQ'nun hücre döngüsü üzerindeki etkisi, AKR1B10 ifadesinden bağımsızdır (**Şekil 4.31**).



Şekil 4.31.CHNQ ile muamele edilen AKR1B10 aşırı ifade eden ve kontrol (EV) HCT-116 hücrelerinin hücre döngüsü dağılımı.

4.6.3. AKR1B10 aşırı ifade eden hücrelerde hücre döngüsü ile ilişkili yolların incelenmesi

Daha önce akım sitometrisi ile yapılan deneylerde CHNQ'nun AKR1B10 aşırı ifade eden hücrelerde hücre döngüsü ile ilişkili herhangi bir etkisi görülmemiştir. AKR1B10 aşırı ifadesinin HCT-116 hücrelerinde herhangi bir hücre döngüsünü etkileyici yapıya sahip olup olmadığını gözlemlemek amacıyla hücre döngüsü ile ilgili proteinlerin ifadesi western blot yöntemi ile incelenmiştir.



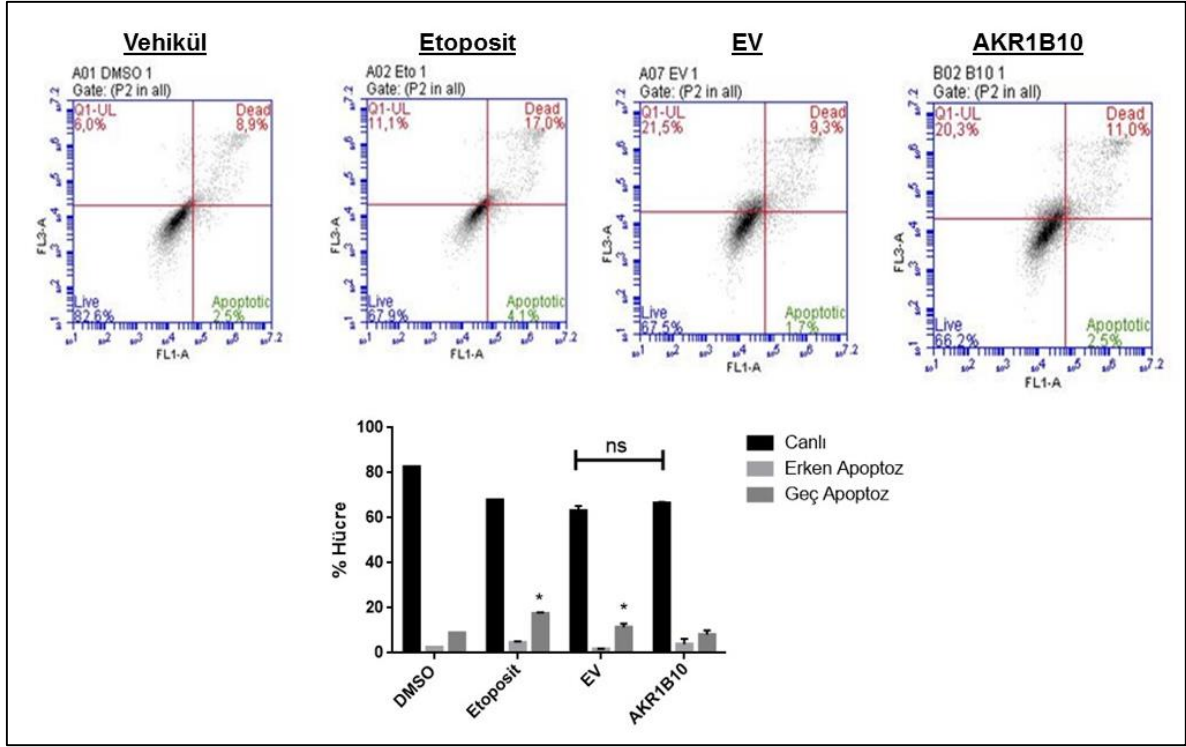
Şekil 4.32 AKR1B10'u aşırı ifade eden hücrelerde hücre döngüsü ile ilişkili yolların western blot yöntemi ile incelenmesi.

Bu amaçla, öncelikle ~%70 yoğunluktaki HCT-116 hücreleri Xtremegene HP ile 1:1 oranında serumsuz besiyerinde transfekte edilmiştir. Bu süreç, hem transfeksiyonu sağlarken aynı zamanda hücreler serumsuz besiyerinde tutuldukları için tüm hücrelerin G1 fazında senkronize olmasını da sağlamaktadır. Senkronizasyon ve transfeksiyonun ardından, hücreler 6 saat ve 30 saat sürelerine kadar serum içeren besiyerinde inkübe edilip, bu süreçlerin sonunda protein izole edilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre, P-Rb seviyeleri EV ve AKR1B10 ile transfekte edilen hücrelerde fark göstermezken, Siklin E ve Siklin B1 seviyeleri her saat noktasında EV hücrelere kıyasla AKR1B10 aşırı ifade eden hücrelerde daha yüksektir (**Şekil 4.32**). Bu sonuçlar AKR1B10 aşırı ifadesinin kendi başına hücre döngüsünü etkilediğini göstermektedir.

4.6.4. AKR1B10 aşırı ifadesinin apoptoz üzerindeki etkisi

CHNQ maddesinin hücre apoptozu üzerindeki etkilerini gözlemlemek amacıyla hücrelere Annexin V ve Propidyum İyodür boyaması yapılmıştır. Elde edilen önceki sonuçlara göre, CHNQ hücrelerde güçlü bir apoptozu sebep olmaktadır. CHNQ'nun sitotoksik etkilerinin AKR1B10'dan bağımsız olduğunu ve hücre döngüsünde AKR1B10'a bağlı olarak farklı bir etki göstermediğini göz önünde bulundurarak, Annexin V boyaması sadece AKR1B10'u aşırı ifade eden ve boş vektörle transfekte edilmiş HCT-116 hücrelerinde yapılmış ve incelenmiştir.

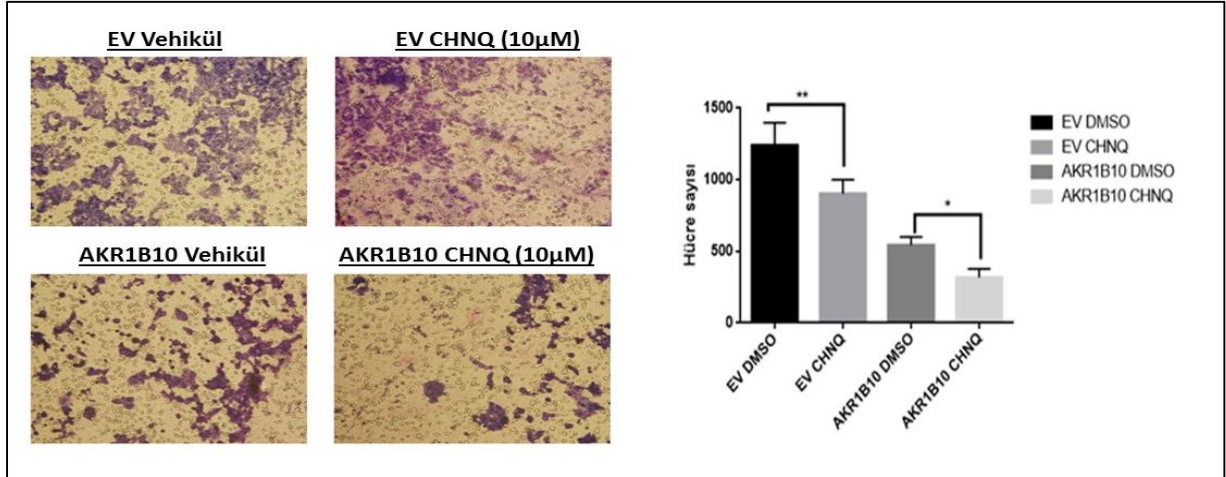


Şekil 4.33 Boş vektör ve AKR1B10 ile transfekte edilmiş HCT-116 hücrelerinde Annexin V-PI boyaması ardından akım sitometrisi ile apoptozun incelenmesi (* $p < 0,05$).

Annexin V apoptoz tayini ile boş vektör ve AKR1B10 geninin geçici transfeksiyonun apoptoz üzerindeki etkisi incelenmiştir. Etoposid (50 μM) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Sonuçlara göre, etoposid hücre apoptozunu indüklerken, boş vektör ve AKR1B10 ile transfekte edilen hücreler arasında anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir.

4.6.5. AKR1B10 aşırı ifadesinin hücre göçü üzerindeki etkileri

AKR1B10 aşırı ifadesinin ve aşırı ifade edilen hücrelerde CHNQ maddesinin HCT-116 hücrelerinin hücre göçü üzerindeki etkilerini gözlemlmek amacıyla Transwell migrasyon deneyi yapılmıştır. Bu deney, hücrelerin düşük konsantrasyonda serum içeren bir kompartmandan yüksek konsantrasyonda serum içeren başka bir kompartmana geçmesi temeline dayanır. CHNQ muamelesi için, çok fazla hücre ölümüne sebep olmayacak bir konsantrasyon olan 10 μM seçilmiştir. Göç etmiş hücre sayısı ile boyanma miktarı doğru orantılıdır.

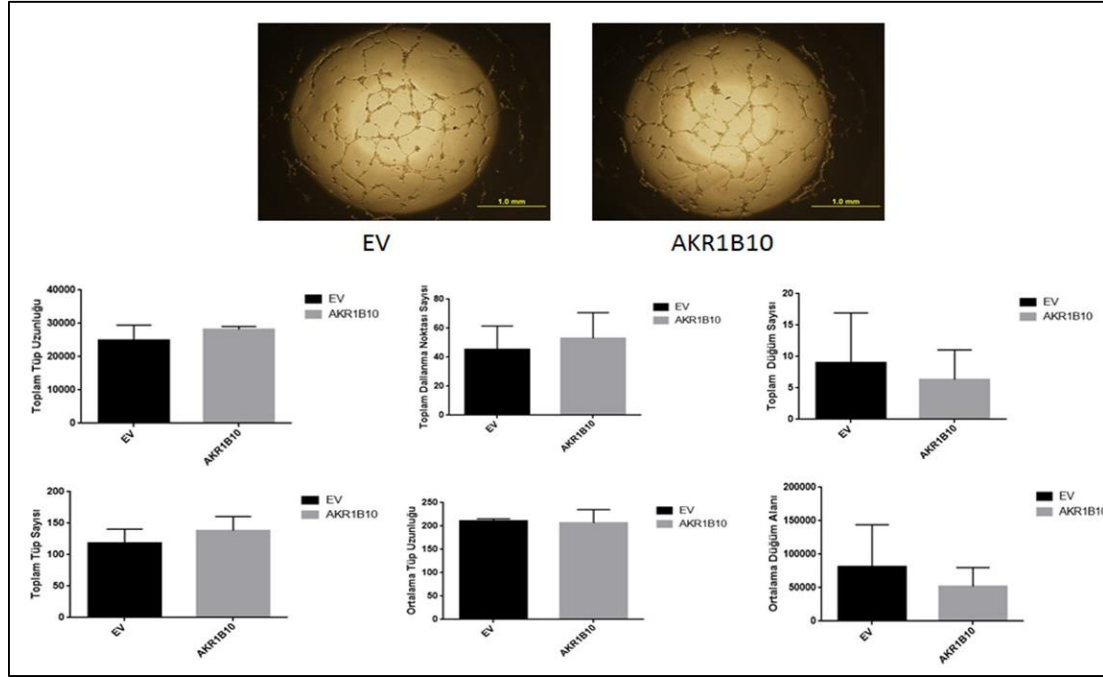


Şekil 4.34 CHNQ maddesinin boş vektör ve AKR1B10 ile transfekte edilen HCT-116 hücrelerinde hücre göçü üzerindeki etkilerinin Transwell migrasyon deneyi ile incelenmesi.

AKR1B10 aşırı ifadelенmesinin transwell migrasyon deneyi ile 10 µM CHNQ muamele edilerek yapılmıştır (**Şekil 4.34**). Beklendiği üzere, hücrelerin CHNQ ile muamelesi hücre sitotoksik etkilerden dolayı hücre göçünü azaltmıştır. İlginç bir şekilde, AKR1B10 aşırı ifadesi de, CHNQ varlığından bağımsız olarak, hücrelerin hareketliliğini azaltmıştır: membrandan karşı tarafa olan göçün azaldığı gözlenmiştir. Şimdiye kadar elde edilen bu sonuçlar AKR1B10 ifadesinin tümör baskılayıcı özelliklere sahip olabileceği yönündedir.

4.6.6. AKR1B10 aşırı ifadesinin anjyogenez üzerindeki etkileri

AKR1B10'u aşırı ifade eden HCT-116 hücrelerinde endotel hücrelerde yeni tüp oluşumunu etkileyecek bir değişikliğin olup olmadığını gözlemlemek amacıyla, HCT-116 hücreleri öncelikle 24 saat boyunca Xtreme gene HP ile 1:1 oranında boş vektör ve AKR1B10 vektörüyle transfekte edilmiş, 24 saatlik sürenin sonunda transfeksiyon yapılan besiyeri kaldırılmış ve 48 saat boyunca serumlu besiyerinde inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda besiyeri toplanmış ve HUVEC'ler 1:1 oranında endotel hücre besiyeri:koşullu besiyeri kullanılarak daha önceden Matrigel ile kaplanmış 96-kuyucuklu plakalara ekilmiştir. 6 saatlik inkübasyonun ardından tüp oluşumları değerlendirilmiştir.

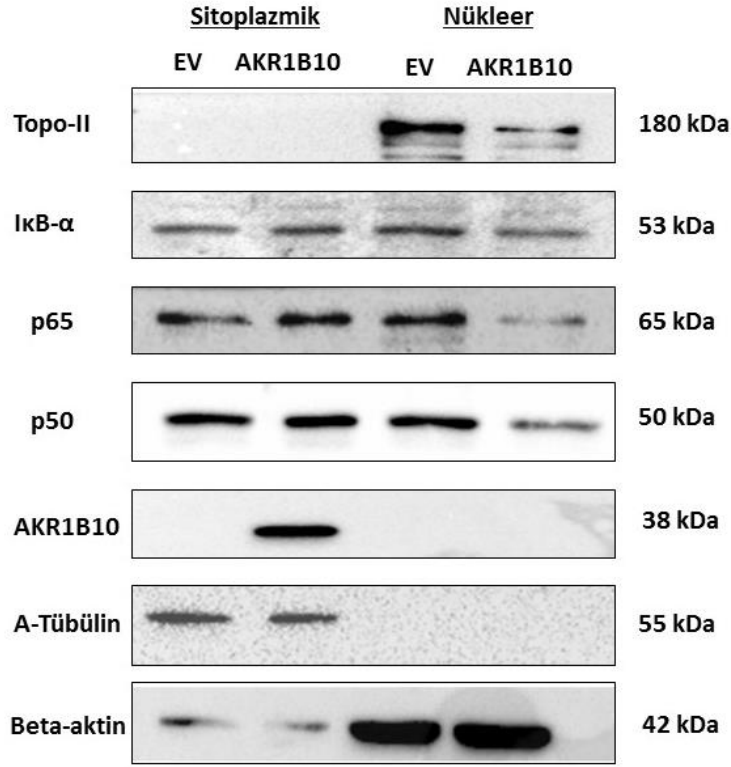


Şekil 4.35 AKR1B10 aşırı ifade eden HCT-116 hücrelerinin yeni damar oluşumu üzerindeki etkileri.

Yeni damar oluşumu deneyinden (**Şekil 4.35**) elde edilen sonuçlara göre, boş vektör ile transfekte edilen hücrelerle kıyaslandığında, AKR1B10 ile transfekte edilen hücreler yeni damar oluşumu ve dolayısıyla anjiyogenez üzerinde bir etkiye sahip olmadığı çıkarımı yapılmaktadır.

4.6.7. AKR1B10 aşırı ifadesinin NF- κ B transkripsiyon faktörü üzerindeki etkisi

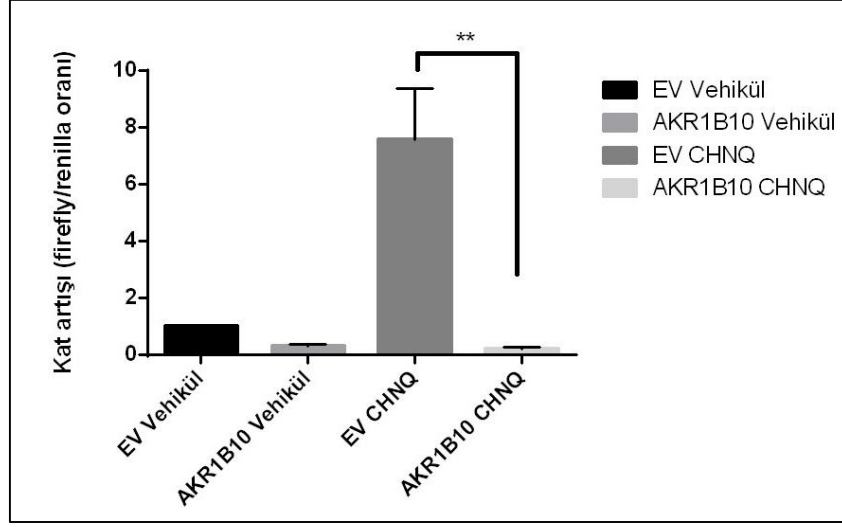
AKR1B10 aşırı ifadesinin NF- κ B protein ifadesi ve hücre içi lokalizasyonundabir değişime neden olup olmadığını gözlemlemek amacıyla, ilk olarak boş vektörle veya AKR1B10 vektörüyle transfekte edilmiş HCT-116 hücrelerinden sitoplazmik ve çekirdeksel protein fraksiyonları toplanmış ve ardından western blot tekniği ile protein ifadenme seviyeleri incelenmiştir.



Şekil 4.36 AKR1B10 aşırı ifade eden HCT-116 hücrelerinde NF-κB proteinlerinin ifadenmesinin western blot yöntemi ile gösterilmesi. Topo-II proteini çekirdeksel protein, α-tübülün proteini sitoplazmik protein belirteci, beta aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.

Yukarıdaki şekilde görüldüğü üzere, AKR1B10 aşırı ifade eden hücrelerin çekirdeksel protein fraksiyonundaki p65 ve p50 seviyesinde EV kontrol hücrelerine kıyasla azalma görülmektedir. Bununla birlikte, IκB-α'nın ifadenme seviyesi de ciddi miktarda azalmıştır. AKR1B10 aşırı ifadenmesi NF-KB proteinleri engelleyerek sitoplazmada kalmalarını sağlamaktadır. Bu da NF-KB'nin etkilediği gen ifadenmelerinin azaldığı anlamına gelecektir. Bu durum, AKR1B10 aşırı ifadesinin anti-inflamatuar etkilerinin olabileceği yönünde umut verici bir özelliğe sahiptir.

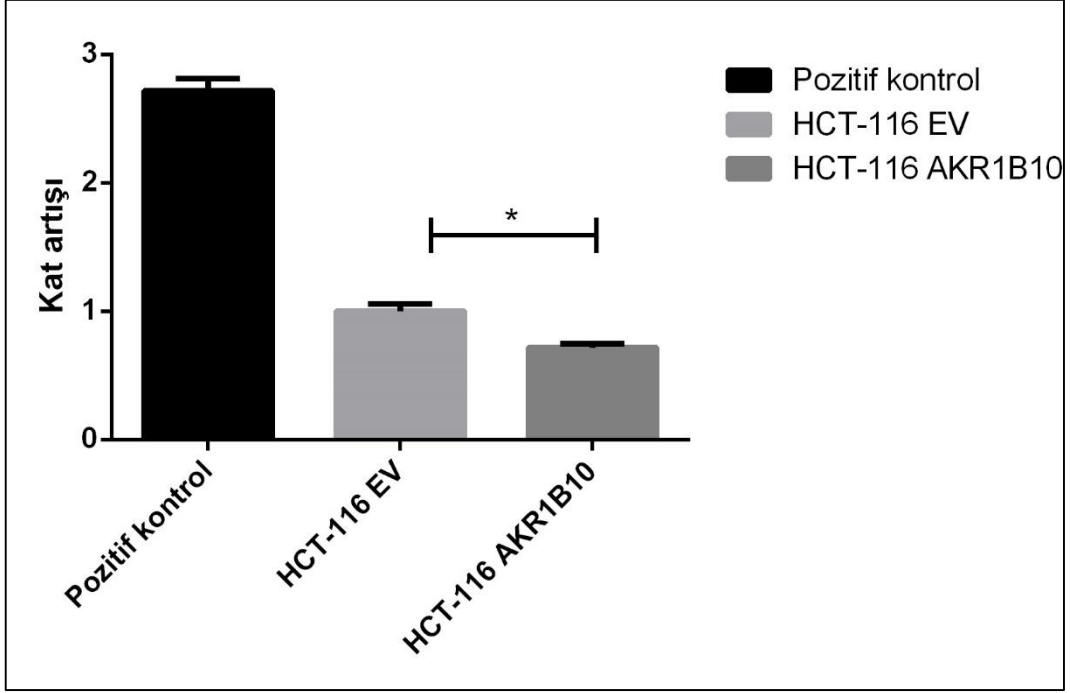
NF-κB transkripsiyon faktörünün ifadenmesinin gösterilmesinin ardından (**Şekil 4.36**), bu sonucu doğrulamak amacıyla, transkripsiyonel aktiviteyi gösteren bir deney olan lusiferaz tayini deneyi yapılmıştır. Bu amaçla, 5 kopya NF-κB (TGGGGACTTTCCGC) kuvvetlendirici dizi içeren PathDetect sistemi kullanılmıştır. Deneyde aynı zamanda, CHNQ maddesi de kullanılmış; onun da NF-κB transkripsiyonel aktivitesi üzerindeki etkileri gözlenmiştir.



Şekil 4.37 CHNQ ile muamele edilmiş ve edilmemiş AKR1B10 aşırı ifade eden HCT-116 hücrelerinde NF-κB transkripsiyonel aktivitenin incelenmesi.

Şekilde görüldüğü gibi CHNQ ile muamele edilmiş ve boş vektör veya AKR1B10 geni geçici transfeksiyonu yapılmış olan HCT-116 hücre grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlemlenmiştir. Literatürde daha önce gösterildiği üzere, ROT oluşumu NF-κB yolağını hedefleyerek ifadelenebilir ve aktivitesini etkileyebilmektedir. Bununla tutarlı olarak, CHNQ ile muamele edilen boş vektör transfekte hücrelerde NF-κB aktivitesi ciddi miktarda artmıştır. Ancak, aynı bulgu AKR1B10 varlığında görülmemektedir (**Şekil 4.37**). AKR1B10 aşırı ifade eden hücrelerde CHNQ'nun hücre çoğalması, hücre döngüsü ve hücre apoptozu üzerindeki etkisi AKR1B10 ifadesinden bağımsızdır. AKR1B10 aşırı ifadesinin, boş vektör ile transfekte edilmiş kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında NFκB aktivitesinde azalmaya neden olduğu görülmüştür. Ek olarak, CHNQ ile muamele edilmiş kontrol hücrelerinde (boş vektör ile transfekte edilmiş hücreler) NFκB aktivitesinde önemli bir artış görülürken, aynı durum CHNQ ile muamele edilen AKR1B10 aşırı ifade eden hücreler için söz konusu değildir. Bu sonuçlara bakarak, CHNQ'nun AKR1B10 tarafından inaktif bir ürüne metabolize edildiğini öngörmekteyiz.

Bu sonuçların ardından, aynı hücrelerde, NF-κB aile üyesi olan p65'in DNA bağlanma kapasitesini gösteren p65 ELISA deneyi yapılmıştır. Öncelikle, hücreler daha önce tarif edildiği üzere transfekte edilmiş ve nükleer ve sitoplazmik fraksiyonlarına ayrılmış, elde edilen nükleer fraksiyonlar p65'in bağlandığı DNA parçalarıyla kaplanmış ELISA plakasına konmuştur.



Şekil 4.38 Boş vektör ve AKR1B10 vektörü ile transfekte edilmiş HCT-116 hücrelerinde NF-κB (p65) DNA bağlanma miktarı.

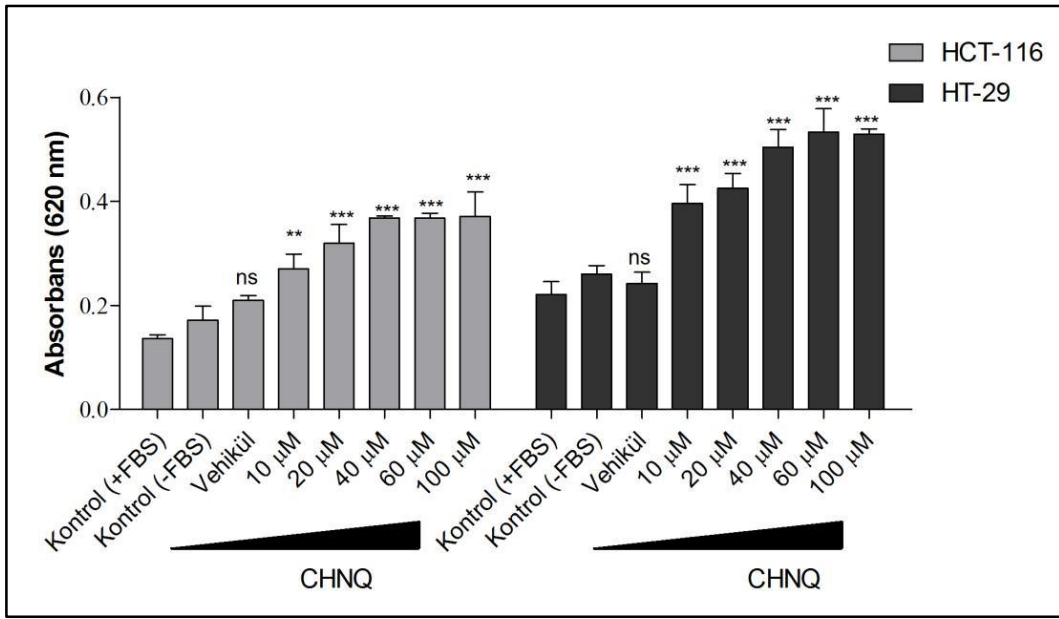
AKR1B10 aşırı ifade edilen HCT-116 hücrelerinde NF-κB konsensus dizisine bağlanan p65 miktarı belirgin biçimde azalmıştır (**Şekil 4.38**). Kitle birlikte sağlanan rekombinant p65 pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Sonuçlar western blot ve NF-κB lusiferaz aktivite sonuçlarıyla uyumludur.

4.7. Farklı metodlar ile CHNQ uygulanan HCT-116 ve HT-29 hücrelerinde oksidatif stresin araştırılması

CHNQ'nun kolon kanseri hücreleri üzerindeki çeşitli fizyolojik etkilerinin AKR1B1 ya da AKR1B10 ifadesinden bağımsız olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, MAP kinaz ve NFκB yolakları ile hücre proliferasyonu ve hücre döngüsü gibi süreçlerde görülen etkiler ROT üretimine bağlı olabilir. CHNQ, 1,4 naftokuinon yapılı olduğundan, bu çalışmamızda ayrıca CHNQ'nun yaban tipi HCT-116 ve HT-29 hücrelerinde ROT oluşumuna ve ROT ile ilintili yolaklara etkisi incelenmiştir.

CHNQ uygulamasının HCT-116 ve HT-29 kolon kanser hücre hatlarında oksidatif strese etkisi nitro blue tetrazolium (NBT) ve dihidroetidyum bromür (DHE) boyaması metotları uygulanarak incelenmiştir.

NBT deneyi, reaktif oksijen türlerinden (ROT) süper oksit varlığında tetrazolium tuzunun formazan maddesine dönüşmesi prensibiyle çalışır. Bu kolorimetrik metod sarı olan tetrazolium tuzunun mavi formazana dönüşmesiyle değişen absorbansı ile değerlendirilir. Hücrelerdeki oksidatif stresin CHNQ'ya bağlı olan değişimi **Şekil 4.39**'ta gösterilmiştir. HCT-116 ve HT-29 hücreleri farklı konsantrasyonlarda CHNQ'ya maruz bırakılarak NBT miktarındaki değişim spektrometre ile 620 nm dalga boyu kullanılarak belirlenmiştir.

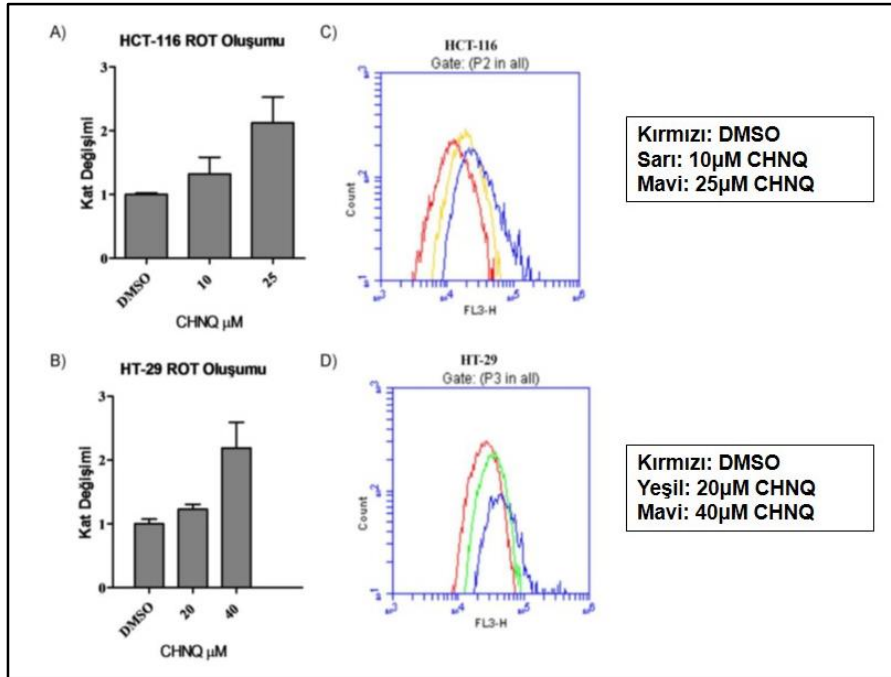


Şekil 4.39. Artan konsantrasyonlar ile 24 saat muamele edilen CHNQ maddesinin HCT-116 (açık gri) ve HT-29 (koyu gri) kolon kanser hücreleri üzerindeki oksidatif stres etkisinin NBT metodu ile belirlenmesi. Her bar ortalama absorbans \pm standart sapma (n=3) göstermektedir.

Şekil 4.39'da görüldüğü üzere artan CHNQ konsantrasyonu ile birlikte elde edilen absorbans her iki hücre hattında da anlamlı seviyede artmıştır. NBT sonucu göstermiştir ki HCT-116 ve HT-29 hücrelerine uygulanan CHNQ maddesi bu hücre hatlarındaki reaktif oksijen türlerinin artmasına sebep olmaktadır. Yüksek miktardaki ROT oluşumunun kanser hücrelerinde ölüme sebep olduğu bilinmektedir (Yang vd., 2013; Glasauer vd., 2014). Düşük konsantrasyonlarda uygulanan CHNQ'nun dahi hücredeki ROT miktarının önemli ölçüde artmasına sebep olması bu maddenin prooksidant özellikte olduğunu ve bu yolla kanser hücrelerinin ölümüne sebep olabileceğini öngörmektedir. Serumlu ve serumsuz ortamda büyüyen kontrol HCT-116 ve HT-

29 hücreleri arasında oksidatif stres oluşumunda bir fark görülmemiştir. Ayrıca DMSO uygulaması yapılan vehikül hücrelerinde de anlamlı miktarda bir ROT artışına rastlanmamıştır.

Dihidroetidyum bromür (DHE) boyaması oksidatif stresin belirlenmesinde kullanılan bir diğer yöntemdir. Bu metot, dihidroetidyum bromürün reaktif oksijen türlerinin varlığında oksidasyona uğrayarak 2-hidroksietidyuma dönüşmesi esasına dayanmaktadır. Bu madde yükseltgeninceye kadar mavi ışınım yaparken yükseltgendikten sonra kırmızı ışınım yaymaktadır. IC₅₀ değerlerine göre seçilen CHNQ konsantrasyonları 24 saat serumsuz medyumda HCT-116 ve HT-29 hücrelerine uygulanmış ve DHE boyaması yapıldıktan sonra ışınım miktarı akış sitometrisinde ölçülmüştür. Bu metodun en önemli özelliği kırmızı ışınımın 20 dakikadan sonra yavaş yavaş kaybolmasından dolayı örneklerin boyamadan hemen sonra akış sitometrisinde ölçülmesidir.

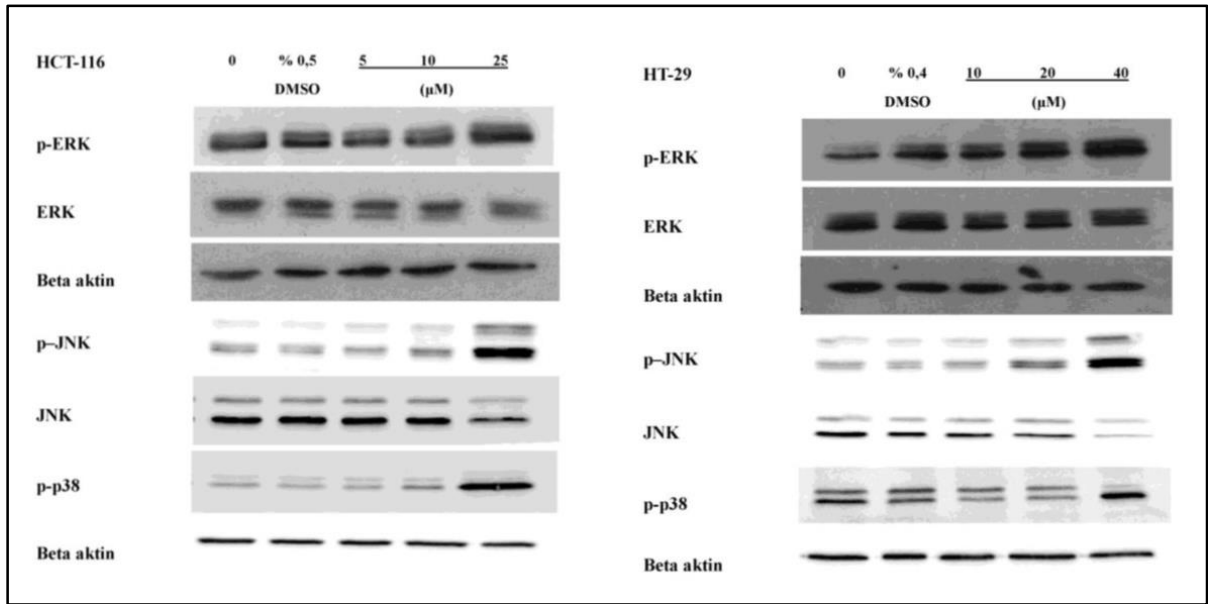


Şekil 4.40.Seçilen iki konsantrasyon ile 24 saat muamele edilen CHNQ maddesinin HCT-116 (A, C) ve HT-29 (B, D) kolon kanser hücrelerinde ROT oluşumu üzerindeki etkisinin DHE boyama metodu ile belirlenmesi. Her bar kat değişimi \pm standart sapma (n=3) göstermektedir.

DHE boyaması sonuçları yüksek konsantrasyonda uygulanan CHNQ' nun oksidatif stresi daha etkili bir şekilde arttırdığını göstermektedir. Bu sonucun hem HCT-116 (**Şekil 4.40-A**) hem de HT-29 (**Şekil 4.40-B**) hücre hattı için aynı olduğu gösterilmiştir. Ayrıca akış sitometrisinden elde edilen ışınım miktarlarındaki değişim her bir renk bir konsantrasyonun ışınımını temsil edecek şekilde HCT-116 (**Şekil 4.40-C**) ve HT2-9 (**Şekil 4.40-D**) hücreleri için grafiğe aktarılmıştır. Kırmızı, yeşil ve mavi sırası ile HCT-116 için vehikül, 10 ve 25 μ M; HT-29 için

vehikül, 20 ve 40 μM konsantrasyonunda CHNQ uygulanan örneklerdeki değişimi göstermektedir. DHE boyamasından elde ettiğimiz sonuç NBT metoduyla CHNQ uygulamasından sonra ROT oluşumunun arttığını gösteren sonuç ile aynı doğrultudadır. İki farklı metot ile CHNQ maddesinin hücre içinde oksidatif stresi arttırdığı doğrulanmıştır.

Hücre içerisinde yer alan önemli sinyal yollarından mitojen tarafından aktive edilen protein kinaz (MAPK) yolağı hücre çoğalması, apoptoz ve farklılaşma gibi önemli süreçleri düzenlemektedir (English ve Cobb, 2002; Keyse, 2000; Rho vd., 2011). Bu sinyal yolağını oluşturan ERK, JNK ve p38 proteinleri hücredeki oksidatif stres durumuyla doğrudan ilişkilidir. NBT ve DHE boyamasından elde ettiğimiz bulgular ışığında artan ROT oluşumu ile MAPK sinyal yolağı ilişkisi incelenmiştir. 24 saat süresince 5, 10 ve 25 μM CHNQ uygulanan HCT-116 ve 10, 20, 40 μM CHNQ uygulanan HT-29 hücrelerinden elde edilen protein lizatları ile western blot tekniği uygulanarak ERK, JNK ve p38 proteinlerinin ifadeleri kontrol edilmiştir.



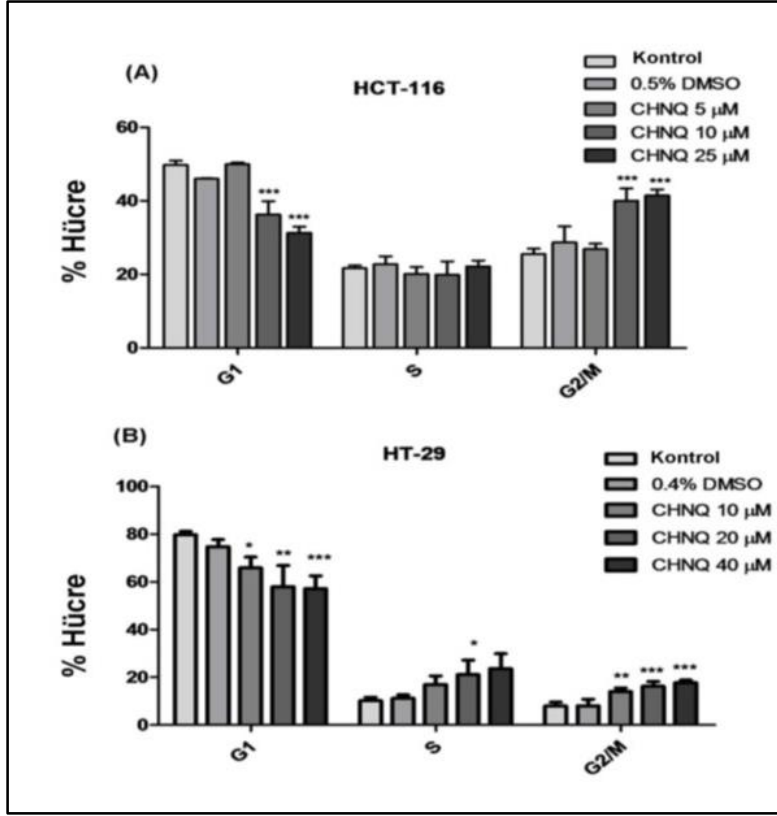
Şekil 4.41.Seçilen üç konsantrasyon ile 24 saat muamele edilen CHNQ maddesinin HCT-116 ve HT-29 kolon kanser hücrelerinde MAKP/ERK, JNK ve p38 proteinlerinin aktiviteleri üzerindeki etkisinin western blot metodu ile belirlenmesi.

Stres ve mitojen ile aktive olan ERK, JNK ve p38 proteinlerinin aktiviteleri fosforile formlarının miktarından belirlenmektedir. **Şekil 4.41'** de görüldüğü üzere uygulanan CHNQ dozundaki artışla birlikte fosfo-ERK, fosfo-JNK ve fosfo-p38 miktarlarında da artış gözlenmiştir. Bu artış hem HCT-116 hem de HT-29 hücre hattında belirgin olarak ifade edilmiştir. Fosfo-p38'i gösteren özgül bandın altta bulunan bant olduğunu önceki çalışmalarımızda göstermiş

bulunmaktayız (Enayat vd., 2013). MAPK sinyal yolağında yer alan bu proteinlerin aktivitesindeki artış NBT ve DHE boyaması ile belirlediğimiz oksidatif stres durumundaki artışı desteklemektedir. Bunun yanında özellikle bu yolaktaki JNK proteinin hücre ölümü ve apoptozu pro-apoptotik proteinler ve p53 üzerinden düzenlediği bilinmektedir (Ip ve Davis, 1998). Bu bulgular bir önceki proje döneminde gözlemlediğimiz ve raporumuzda yer alan Annexin V boyaması ile tespit edilen apoptozdaki artışı doğrulamaktadır. Bu bulgular, CHNQ maddesinin kanserli hücrelerde ROT oluşumunu arttırdığını ve hücrelerin ROT tarafından indüklenen otofaji mekanizması üzerinden öldüğünü düşünmekteyiz.

4.8. Farklı metotlar ile CHNQ uygulanan hücrelerde oksidatif stresin otofaji üzerindeki etkileri

Yüksek reaktif oksijen türleri (ROT) seviyelerinin DNA veya hücrede hasara sebep olduğu, DNA replikasyonunu baskıladığı ve dolayısıyla hücre döngüsünde tutuklanmaya sebep olduğu bilinmektedir. Bu sebeple, CHNQ muamelesinin HCT-116 ve HT-29 hücrelerinde hücre döngüsü üzerindeki etkileri araştırmıştır.



Şekil 4.42. Artan konsantrasyonlar ile 24 saat muamele edilen CHNQ maddesinin HCT-116(A) ve HT-29 (B) kolon kanser hücrelerinin hücre döngüsü dağılımının gösterilmesi. Önemli farklar, kontrol-muamele edilmemiş- hücelere kıyasla elde edilmiştir. Her bar ortalama hücre yüzdesi \pm standart sapma (n=3) göstermektedir. Analizler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ardından post-hoc Tukey çoklu karşılaştırma testi ile yapılmıştır. * p < 0.05, ** p < 0.01 ve *** p < 0.001.

Şekil 4.2'te görüldüğü üzere arttan CHNQ konsantrasyonu ile birlikte G2/M fazındaki hücrelerin yüzdesi artarken, DMSO uygulaması yapılan vehikül hücrelerinde (kontrol hücreleri) hücre döngüsü tutuklanması gözlenmemiştir. Bu sonuç, CHNQ muamelesi sonucu artan ROT seviyelerinin hücre döngüsünün G2/M fazında tutuklanmaya sebep olduğunu kanıtlar niteliktedir (Verbon, vd, 2012).

Oksidatif stres aynı zamanda otofaji yoluyla hücre ölümünü tetikleyerek, oksitlenmiş proteinlerin, DNA'nın ve lipidlerin temizlenmesini sağlar. Otofaji sırasında, çift zarlı otofagozomlar lizozomlarla birleşerek otolizozomları oluşturur. Bu zarların yeni oluşmuş otofagozomlar ile birleşmesi, uzanımı ve genişlemesi LC3-II proteini tarafından yürütülmektedir. LC3 proteini lipitlendiği zaman, LC3-II proteinine dönüşür (16 kDa) ve bu yüzden jel üzerinde LC3-I proteininden (18 kDa) daha hızlı ilerlemektedir. Bu sebeple, ilk

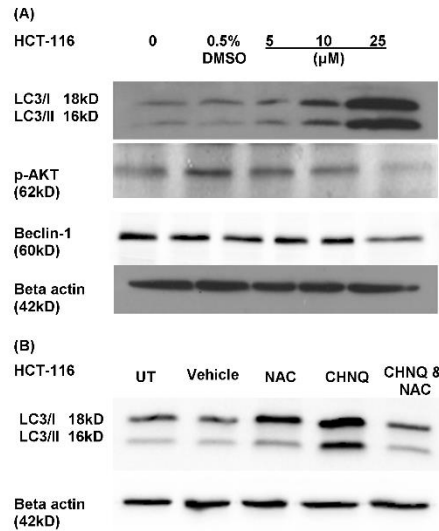
olarak HCT-116 hücrelerinde CHNQ muamelesinin LC-3 proteini üzerindeki etkileri İncelenmiştir.

Western blot sonuçlarında, CHNQ uygulanan hücrelerin hem LC3-I, hem LC3-II seviyelerinde ciddi bir artış gözlenmiştir (**Şekil 4.43**). Bu sonuçlar bize, bu hücrelerde otofaji sürecinin uyarıldığını göstermektedir.

Bunun yanında, hücre büyümesinin merkezi denetmeni, rapamisinin memelilerdeki hedef protein kompleksi (mammalian target of rapamycin complex 1-mTORC1) de hücresel strese bağlı olarak otofajide görev almaktadır. PI3K-AKT yolağı, mTORC1'i negatif olarak düzenleyerek kanser hücrelerinin hayatta kalabilme yeteneklerinde büyük rol oynamaktadır. **Şekil 4.43**'te gösterilen western blot sonuçlarında, CHNQ uygulanmış hücrelerin fosforlanmış AKT seviyelerinde ciddi miktarda azalma gözlenmiştir.

VPS34'ün-lipid kinaz boşluklu protein- aktivitesini düzenleyen Beclin-1 proteini de fagofor (phagophore) oluşumunu desteklemektedir. Ancak beklenmeyen bir şekilde, CHNQ uygulanmış HCT-116 hücrelerinde Beclin-1 seviyelerinde azalma görülmüştür.

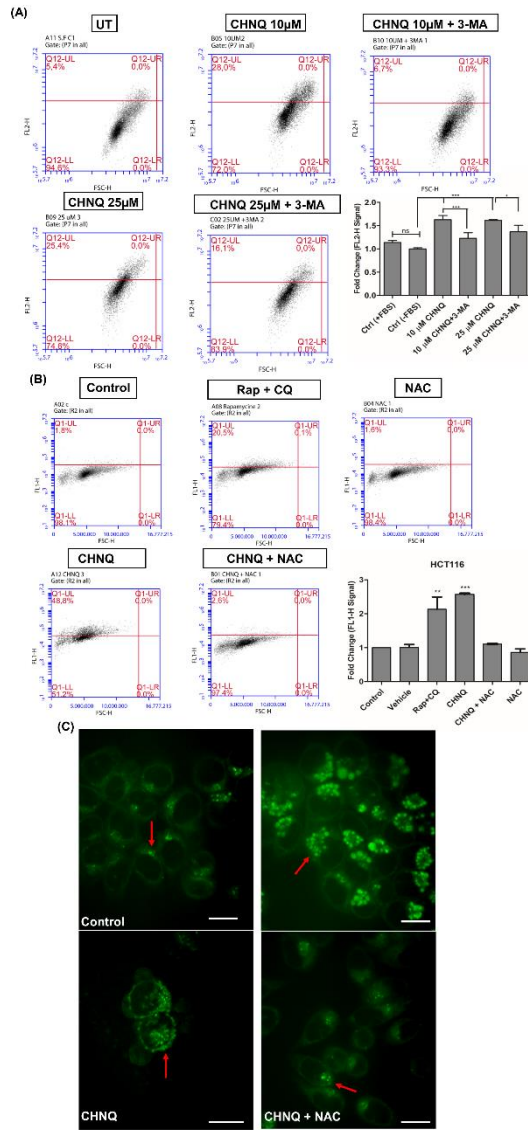
Otofajinin ROT oluşumu sebebiyle olup olmadığını araştırmak üzere, HCT-116 hücreleri hem CHNQ hem de bir antioksidan olan N-acetil sistein (N-acetyl cysteine-NAC) ile muamele edilmiştir. Tek başına NAC uygulanması LC3 proteininin lipitlenmesine yol açmazken, CHNQ ve NAC'nin birlikte uygulanması LC3-II seviyesinde ciddi bir azalmaya neden olmuştur.



Şekil 4.43. 3 farklı konsantrasyonda CHNQ uygulanan HCT-116 hücrelerinde ROT ilişkili otofajinin başlatılması.

Lizozomlar ve otolizozomların asidik kesecikli organeller (acidic vesicular organelles-AVO) oluşturduğu bilinmektedir. Dolayısıyla, CHNQ uygulanmış HCT-116 hücrelerinin otofajiye girdiğini teyit etmek amacıyla, iki farklı deney uygulanmıştır (**Şekil 4.44**). Bu deneylerden birincisinde CHNQ uygulanan hücreler florasan bir boya olan Cyto-ID kullanılmıştır. Cyto-ID özellikle otofajik kofulları boyamaktadır. Deneylerden ikincisinde ise, akridin turuncusu (acridine orange) kullanılmıştır ve bu boya yalnızca asidik kofulları boyamaktadır. Boyanan hücreler daha sonra akım sitometrisi ile analiz edilmiştir. Bu testlerde 3- metiladenin (3-MA) otofaji inhibitörü olarak kullanılmıştır ve AVO oluşumunu engellemesi beklenmektedir. CHNQ ile muamele edilip, Cyto-ID boyası ile boyanan hücreler akım sitometrisinin FL-1 kanalında analiz edilmiştir. Rapamisin (Rap) ve Klorokin (CQ) otofajiye sebep olduğu bilinen maddelerdir ve bu deney düzeneğinde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Bu sonuçlara bakarak, CHNQ muamelesinin AVO oluşumunda istatistiksel olarak önemli bir artışa sebep olduğu görülmektedir. Akridin turuncusu ile boyanıp ardından akım sitometrisinin FL-2 kanalında analiz edilen HCT-116 hücrelerinde de AVO oluşumu gözlenmiştir: 10 ve 25 µM CHNQ uygulaması asidik kofullarda ciddi bir artış olduğunu gösterilen ($p<0.001$), CHNQ'nun otofaji inhibitörü olan 3-MA ile birlikte uygulandığında hücrelerde bu etki tersine dönmüştür; bir başka deyişle AVO oluşumu sebepli otofaji engellenmiştir.

CHNQ veya Rap+CQ uygulanıp, Cyto-ID ile boyanan hücrelerde otofajik pankta oluşumu konfokal mikroskop ile gözlenmiştir. Pankta oluşumunun CHNQ ve NAC'nin beraber muamele edildiği hücrelerde ciddi bir seviyede azaldığı görülmektedir. CHNQ'nun yalnız uygulanmasında hücrelerde morfolojik değişiklikler gözlenirken, CHNQ'nun NAC ile beraber uygulandığı hücrelerde bu morfolojik değişimlerin onarıldığı görülmüştür.

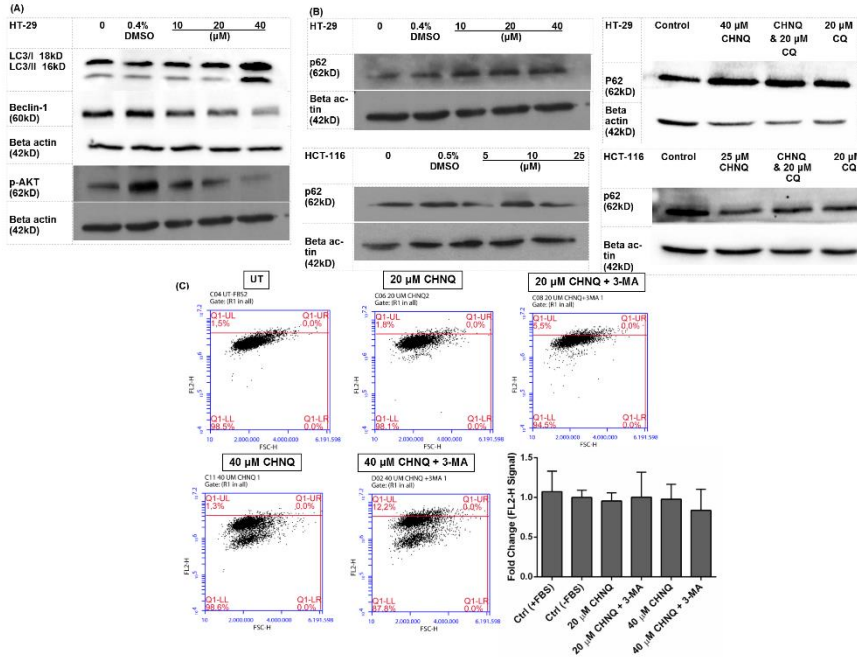


Şekil 4.44A. CHNQ uygulanan HCT-116 hücrelerinde asidik kesecikli koful (AVO) oluşumu. **B** ve **C:** Cyto ID yöntem ile belirtilen CHNQ uygulanan HCT-116 hücrelerinde pankta oluşumu.

HT-29 hücrelerinde otofaji sürecine bakıldığında, LC3 proteininin lipitlenmesinin yanı sıra AKT/PKB yolağının fosforlanıp aktive olmasındaki azalma dolayısıyla güçlü bir otofaji başlangıcı görülmektedir. HCT-116 hücrelerinde görülen CHNQ uyulanmasıyla görülen Beklin-1 seviyelerindeki azalma HT-29 hücrelerinde de görülmektedir. P62/SQSTM1, LC3-ilişkili domain (LC3-interacting domain-LIR) yoluyla, kargo ve otofaji mekanizmasıyla etkileşmesinden dolayı kargo reseptörü olarak görev almaktadır. p62 proteini kargoları tanıyıp otofagozomlara taşıyarak otofajik akışı sağlar. HCT-116 hücrelerinde CHNQ uygulaması p62

protein düzeyinde azalmaya neden olurken, HT-29 hücrelerinde p62'nin birikmesine sebep olmuştur. Klorokuin (CQ), lizozomal pH'ı artırıp, otofagozomun lizozom ile birleşmesini engeller. Bu şekilde lizozomal protein yıkımını da önlemiş olur. HCT-116 ve HT-29 hücreleri 20 μ M CQ ile veya 40 μ M CHNQ ile muamele edildiklerinde, HT-29 hücrelerinde p62 birikmesi görülmüştür. Görülen bu sonuç, lizozomal yıkım kapasitesinin kaybedildiğini kanıtlar niteliktedir. Ancak bu değişim, CHNQ ile muamele edilmiş HCT-116 hücrelerinde görülmemiştir.

Diğer yandan, otofajinin ilerlemesi AVO oluşumunu gerektirmektedir. HT-29 hücrelerinde, CHNQ uygulaması AVO oluşumunda bir değişime yol açmamıştır. Dolayısıyla, HT-29 hücrelerinde CHNQ uygulanmasının, başarılı bir otofagozom çekirdeklenmesi ile (LC3-I/II artışıyla teyit edilmiştir) otofaji sürecini başlattığı, ancak, lizozomlardaki bozulmuş asitlenmeden dolayı otofaji sürecinin tamamlanmasının engellendiği öngörülmektedir.

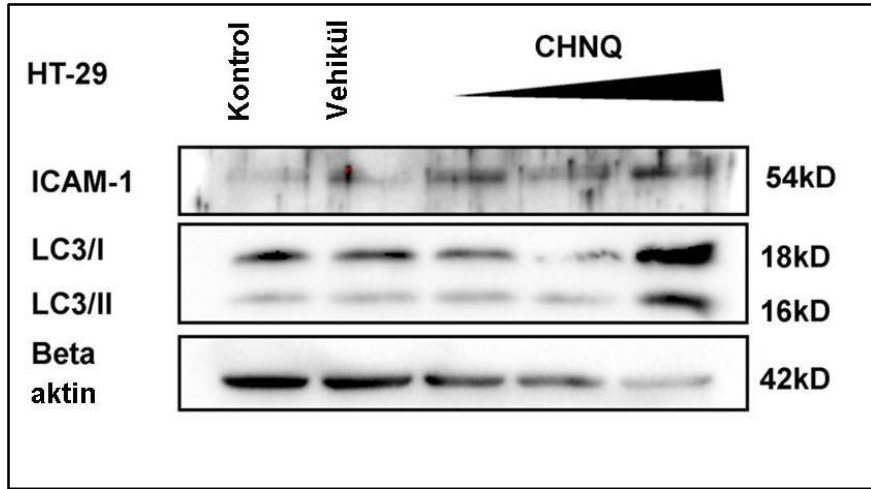


Şekil 4.45 HT-29 hücrelerinde otofajinin başlatılması. A. HT-29 hücrelerinde otojanin tetiklenmesi. B. HCT-116 hücrelerinde p62 seviyesi artan CHNQ konsantrasyonu ile azalırken, aynı etki HT-29 hücrelerinde görülmemektedir: p62 seviyesi HT-29 hücrelerinde CHNQ konsantrasyonuna bağlı olarak artmaktadır. Lizozomal asidifikasyon inhibitörü olan klorokin (CQ) HT-29 hücrelerinde CHNQ'ya benzer etki göstermiş, p62 protein seviyesinde artışa neden olmuştur. C. CHNQ ile muamele edilen HT-29 hücrelerinde asidik vakül oluşumu (AVO) açısından kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında bir fark görülmemiştir.

Şekil 4.45A'da görüldüğü üzere, artan CHNQ dozlarıyla muamele edilen HT-29 hücrelerinde, kontrol ve vehikül hücreleri ile kıyaslandığında, LC3-I ve LC3-II protein seviyelerinde artma,

AKT proteinin fosforlanmasında ve Beklin 1 ifadesinde azalma görülmektedir. **Şekil 4.45 B** HT-29 hücrelerinin farklı dozlarda yalnızca CHNQ ile muamele edilmesi (sol üst panel), 40 μ M CHNQ ile muamele edilmesi (sağ üst panel), klorokin (CQ) ile muamele edilmesi veya CHNQ ve CQ birleşimi ile muamele edilmesi p62'nin hücre içinde birikmesine yol açtığını göstermektedir. p62 birikmesi, bu hücrelerde otofajik akışın engellendiğini göstermektedir. Aynı birikme HCT-116 hücrelerinde görülmemiştir. Bu durum, bu hücre tipinde otofajinin başarılı bir şekilde tamamlandığını açıklar niteliktedir. Son olarak, **Şekil 4.45C**'de akridin turuncusu ile boyanan HT-29 hücrelerinde, farklı CHNQ konsantrasyonlarının AVO oluşumunu etkilemediği görülmektedir.

Çalışmada lizozomda yıkılabilen bir membran proteini olan ICAM-1'in ifade düzeyi de incelenmiştir. Farklı CHNQ konsantrasyonlarıyla muamele edilen HT-29 hücrelerinde ICAM-1 birikimi gözlenmiştir. Aynı hücrelerde, LC3-I/II seviyelerinde de güçlü bir artış olduğu görülmüştür. Bu sonuçlara dayanarak, bu hücrelerde otofajinin başlatılabildiği ancak lizozomdaki son asitleme aşaması ve otofagozom yıkımının sorunlu olduğunu öngörmekteyiz (**Şekil 4.46**).

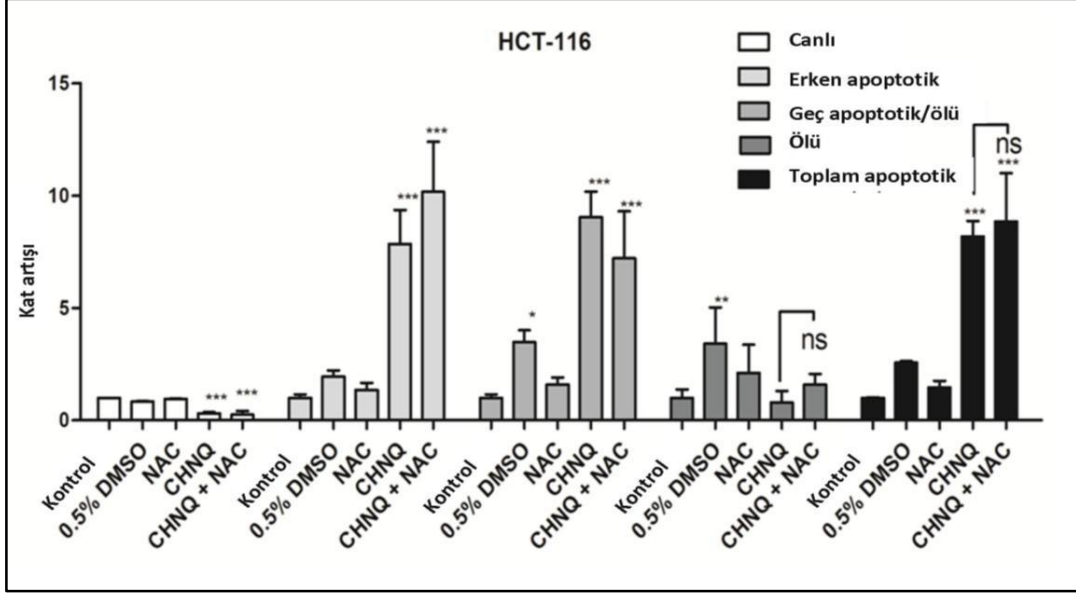


Şekil 4.46 Artan CHNQ dozlarıyla (10, 20, 40 μ M) muamele edilen HT-29 hücrelerinde bozulan lizozomal yıkımın ICAM-1 ile gösterilmesi.

4.9. CHNQ ile muamele edilen hücrelerde otofaji ve apoptoz ilişkisi

CHNQ ile muamele edilen hücrelerde, otofajinin apoptozla ilişkili olup olmadığını anlamak amacıyla, HCT-116 hücreleri CHNQ, NAC ve CHNQ-NAC birleşimi ile muamele edilmiştir. Bu

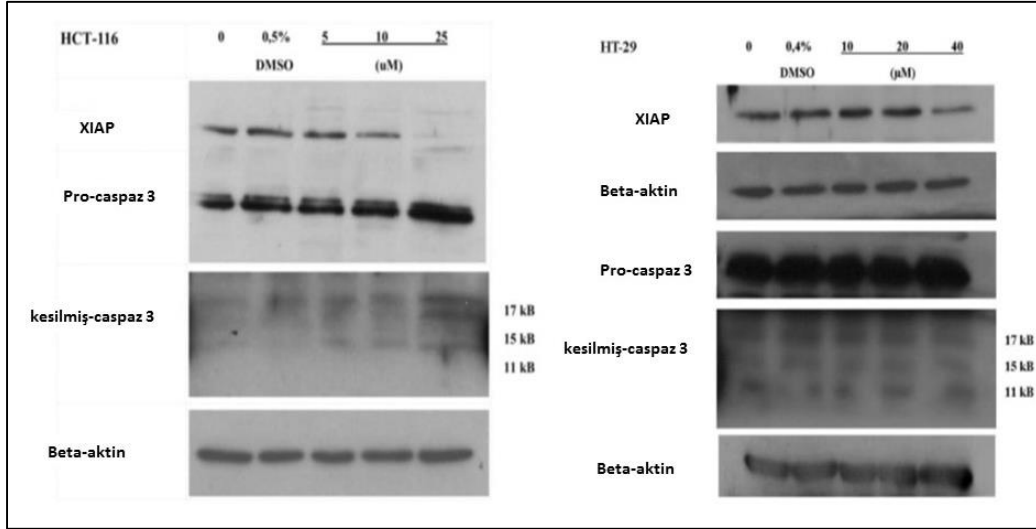
deney düzeneğinin arkasındaki mantıksal temel şu şekildedir: NAC'nin daha önce, CHNQ uygulamasından dolayı başlayan otofajiyi başarılı bir şekilde baskıladığı görülmüştür, ancak NAC kendi başına otofajiyi başlatmamaktadır. Dolayısıyla, CHNQ ve NAC birlikte uygulandığında, otofaji süreci baskılanmalıdır ve görülen herhangi bir hücre ölümü sadece apoptoz üzerinden olmalıdır.



Şekil 4.47 HCT-116 hücrelerinde otofaji ve apoptoz ilişkisi AnnexinV boyaması ile akım sitometrisi kullanılarak araştırılmıştır.

Hücreler yalnızca NAC ile muamele edildiğinde, az miktarda apoptoz görülmüştür. Yalnızca CHNQ ile muamele edilen hücrelerde ise çok güçlü bir apoptoz başlangıcı görülmektedir. Diğer yandan, hücreler CHNQ ve NAC ile birlikte muamele edildiğinde, sadece CHNQ ile muamele edilen hücrelerle benzer seviyede apoptoz görülmektedir (**Şekil 4.47**). Bu sonuçlara dayanarak, bu hücrelerdeki apoptoz sürecinin otofaji sürecinden bağımsız olarak ilerlediğini öne sürmekteyiz.

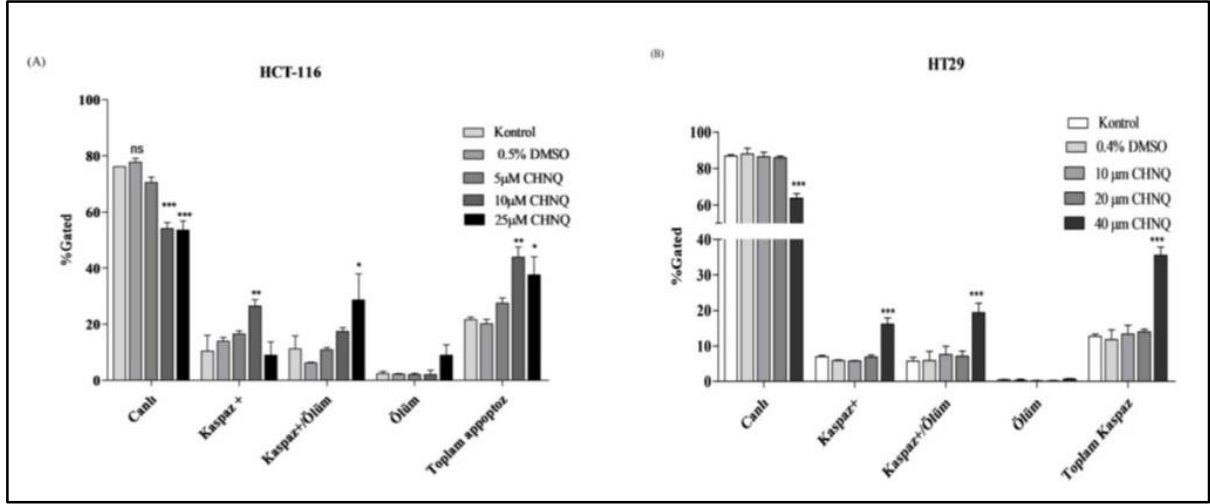
Ek olarak, apoptoz belirteci olan XIAP (anti-apoptotik) ve kaspaz-3 (pro-apoptotik) proteinlerinin CHNQ ve kuersetin muamelesinden sonraki değişimleri western blot yöntemi ile incelenmiştir (**Şekil 4.48**).



Şekil 4.48 Üç farklı konsantrasyonda CHNQ ve kuersetin uygulanan (A) HCT116 ve (B) HT29 hücrelerindeki XIAP, Kaspaz-3 ve kesilmiş (cleaved) kaspaz-3 seviyeleri. Beta Aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.

XIAP miktarı iki hücre hattında da uygulanan en yüksek dozdaki CHNQ örneklerinde önemli bir azalma göstermiştir. Aktif kaspaz 3 ise HCT-116 hücre hattında bir artış gösterirken HT-29 hücrelerinde bir değişikliğe sebep olmamıştır.

Annexin V boyaması ve western blot deneylerine ek olarak CHNQ ve kuersetin maddelerinin kolon kanser hücrelerindeki kaspaz aktiviteleri üzerindeki etkisi Muse™ MultiKaspaz Kiti ile araştırılmıştır (**Şekil 4.49**). Kaspaz proteinleri apoptozu destekleyici sinyallerin varlığında programlı hücre ölüm süreci içerisinde merkezi bir rol oynamaktadırlar. Kaspaz proteinlerinin aktiviteleri hücredeki apoptoz işleyişini gösteren önemli belirteçlerden biridir. Muse™ MultiKaspaz Kiti aynı anda birçok farklı kaspaz proteininin (caspase-1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, ve 9) aktivitesini ölçülebilmektedir. MultiKaspaz Kiti aktif kaspaz proteinlerine bağlanan ve floresan taşıyan VAD peptidi ve ölü hücrelerin belirlenmesinde kullanılan 7-AAD boyası içermektedir.

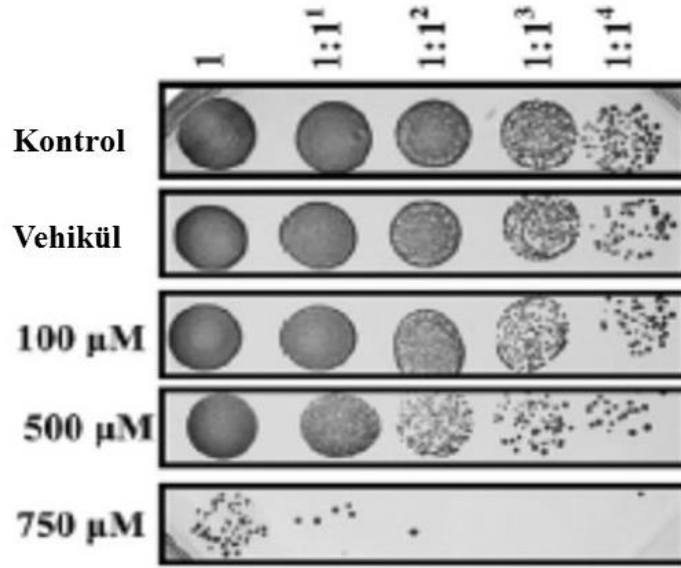


Şekil 4.49.Seçilen konsantrasyonlarda CHNQ ve kuersetin uygulanan (A) HCT116 ve (B) HT29 hücrelerindeki kaspaz aktiviteleri.

Yukarıda da görüldüğü gibi artan dozla birlikte CHNQ, HCT-116 ve HT-29 hücrelerinde total kaspaz aktivitesini artırma özelliği göstermiştir. Artan kaspaz aktivitesi CHNQ ile muamele yapılan hücrelerin apoptoz sürecine girdiğini göstermektedir. Diğer bir deyişle, Muse™ MultiKaspaz deneyinden elde ettiğimiz sonuçlar ile Muse™ Annexin V ve Ölü Hücre Deneyinin sonuçları paralellik göstererek birbirini desteklemektedir. CHNQ muamelesi ardından HT-29 hücrelerinde görülen apoptozun kaspaz-3'ten bağımsız olduğunu düşünmekteyiz.

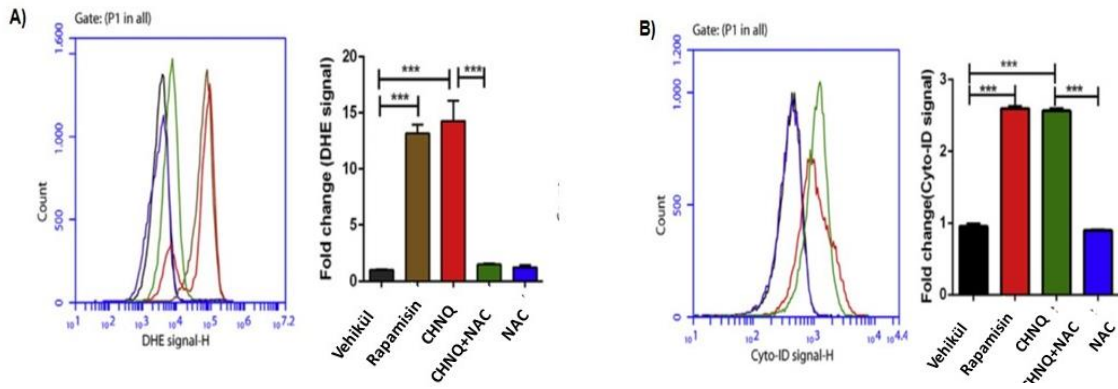
4.10. CHNQ uygulanan *S.cerevisiae* hücrelerinde oksidatif stres ve otofajinin araştırılması

CHNQ maddesinin, *in vivo* bir model olan *S.cerevisiae* (suş:RDKY3615) maya hücrelerindeki etkilerini görebilmek amacıyla, ilk olarak CHNQ ile muamele edilen bu hücrelerin canlılıkları kontrol edilmiştir.



Şekil 4.50. CHNQ maddesinin RDKY3615 *S.cerevisiae* hücrelerinin hücre çoğalması ve canlılığı üzerindeki etkisi.

Maya hücreleri öncelikle 0-750 µM CHNQ ile muamele edilmiş ardından seri seyreltme yapılarak YPD-Agar petrilere ekilmiştir. **Şekil 4.50**'de görüldüğü üzere, 500 µM CHNQ konsantrasyonunda canlılıkta ciddi bir azalma görülmüş ve diğer deneylere bu konsantrasyonda devam edilmiştir.



Şekil 4.51. CHNQ ile muamele edilmiş maya hücrelerinde oksidatif stresin ve otofajinin başlatılması.

Şekil 4.51-A'da verilen sonuçlara göre, 500 µM CHNQ ile muamele edilen maya hücrelerinde güçlü miktarda oksidatif stres görülmüştür. Bununla birlikte yalnızca NAC (antioksidan) ile muamele edilen hücrelerde herhangi bir ROT oluşumu gözlenmezken, CHNQ ve NAC beraber muamele edildiğinde ise ROT oluşumunda geri dönme durumu söz konusudur.

Öte yandan, 500 µM CHNQ ile muamele edilen maya hücrelerinden otofajinin başladığı görülmüştür (**Şekil 4.51-B**). Beklendiği gibi antioksidan NAC ile yapılan muamele herhangi bir otofaji belirtisi göstermezken, CHNQ ve NAC'ın beraber kullanılması CHNQ tarafından başlatılan etkiyi geri döndürmede etkisiz olmuştur. Bu sonuçlar, maya hücrelerinde ROT oluşumunun otofajinin gerçekleşmesinde bir önkoşul olmadığını göstermektedir.

5. SONUÇ ve TARTIŞMA

Aldo-keto redüktaz (AKR) enzim ailesinin diyabetik komplikasyonların gelişmesindeki önemli rolü açık bir şekilde gösterilmiştir (Alexiou vd., 2009). Son çalışmalar, bu enzimlerin aynı zamanda inflamatuvar hastalıkların gelişiminde de önemli bir role sahip olduğunu açığa çıkarmıştır. Ancak, AKR1B1'in kolorektal kanser üzerindeki rolü pek fazla bilinmemektedir. AKR1B1'in kolorektal kanseri hücre hatlarında sorbinil ve zopolrestat gibi bazı bilinen inhibitörler ile inhibe edilmesinin büyüme faktörü kaynaklı hücre çoğalmasını, hücre döngüsünü ve ROT oluşumunu inhibe ettiği daha önce gösterilmiştir (Ramana vd., 2010). Çalışmamızda, AKR enzimlerinin hem farmakolojik inhibisyonu, hem RNAi kullanılarak susturulması hem de aşırı ifadesi ile kolorektal kanser üzerindeki öneminin anlaşılması amaçlanmıştır.

Doğal polifenollerin kanser hücrelerinde birçok önemli sinyal iletim yolağını etkilediği bilinmektedir (Hasima ve Ozpolat, 2014). Ancak, bu bileşiklerin, örneğin kuersetinin, biyoyararlılığı oldukça düşüktür. Kuersetinin aktivitesini ve biyoyararlılığını artırmak için başlatılan bu projede, kuersetinin bir naftokinon türevi olan CHNQ tasarlanmış ve sentezlenmiştir. CHNQ, kuersetinin katekol parçasıyla birlikte O-arillenmiş naftokuinon parçasını taşımaktadır, ve bu da gözlenen değişimlere açıklama getirmektedir. Bu çalışmada, kuersetin ve CHNQ'nun sitotoksik rolleri incelenmiş ve hem kuersetin ile ve hem CHNQ ile kolon kanseri hücre hatlarında hücre çoğalmasında azalma ve apoptozda ise artış gözlemlenmiştir. CHNQ'nun etkileri kuersetine göre çok daha fazla olmakla olup, hücre çoğalmasını daha fazla inhibe etmiş ve apoptozu arttırmıştır.

Naftokinonlar, bir bileşiğin indirgenmesinde döngüsel işlemlerine aracılık eden bir bileşik sınıfıdır. Bunu takiben, reaksiyon ürününün oto-oksidasyonu sürekli bir reaktif oksijen türleri (ROT) oluşumuna sebep olmaktadır. Bir elektronun indirgenmesiyle, CHNQ'nun 1,4 naftokuinon parçası yarı-kinonlar oluşturup, direk olarak oto-oksidasyonla tekrar kuinona çevirilip ROT oluşturabilmektedir. Buna ek olarak, kuinonlar elektrofiliktirler ve nukleofilik olan hücresel makromoleküller ile tepkimeye girip hücresel sitotoksiteyi artırabilirler.

Kanser hücreleri yüksek metabolik stres ve çoğalma kapasitelerinden dolayı zaten endojen olarak yüksek ROT seviyelerine sahip olduğu için, buna ek olarak gelen ROT hücreleri oksidatif zarara daha duyarlı hale getirir. Böylelikle ROT, apoptoz veya otofaji gibi seçici hücre ölüm mekanizmalarını aktive edebilmektedir. Naftokinonların oksidatif stres oluşumunu indüklediği bilinmektedir; bu sebeple, CHNQ ile muamele edilmiş yaban tipi, AKR1B1 susturulmuş veya AKR1B10 aşırı ifade eden hücrelerde ROT oluşumunu incelenmiştir. Tutarlı olarak, yalnızca

kolon kanseri hücre hatları'nda değil aynı zamanda bir maya hücresi olan *S. cerevisiae* hücrelerinde de çok güçlü ve hızlı ROT oluşumu gözlemlenmiştir. Bunun sonucu olarak, ROT aracılığıyla başlatılan sinyal yolları sayesinde, CHNQ ile muamele edilmiş epitel hücrelerde G2/M fazında hücre döngüsü tutuklanması görülmüştür. Bu noktaya kadar elde ettiğimiz bulgular AKR1B1 susturulmasının veya AKR1B10 aşırı ifadenmesinin kontrol hücrelere kıyasla hücresel özelliklerde değişime neden olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, CHNQ'nun çalışılan modellerde bir AKR inhibitörü olmaktan çok, bir ROT indükleyicisi olarak görev yaptığını düşündürmektedir. Bu konuyla ilgili, literatürde çok az bilgi bulunmaktadır. Yalnızca birkaç çalışmada, kolon kanserinde AKR1B1'in farmasötik inhibisyonunun inflamatuvar sinyalleri, hücre çoğalmasını, metastazı ve anjiyogenezi azalttığı gösterilmiştir. Bu sebeple, hipotezimizi test etmek amacıyla, AKR1B1 susturulmuş veya AKR1B10 aşırı ifade eden hücrelerde hücre çoğalması, hücre döngüsü dağılımı, hücre hareketliliği ve inflamatuvar sinyal yolları incelenmiştir.

Yaptığımız çalışmalar göstermektedir ki AKR1B1 mitojenik etki gösterirken, AKR1B10 aşırı ifadesinin hücre proliferasyonu, apoptoz ve hücre döngüsü ilerleyişi süreçlerinde anlamlı bir etkisi yoktur. Her iki proteinin de poli-ol yolağında benzer etkinliğe sahip olduğu düşünüldüğünde elde edilen bu sonuç şaşırtıcıdır (Mindnich ve Penning, 2009). Kanser hücreleri diyabetik nöropati tedavisi için kullanılan güçlü bir AKR baskılayıcısı olan fidarestat ile muamele edildiğinde, fidarestatın kanser hücrelerinin G1 fazından S fazına geçişlerini geciktirdiği daha önce gösterilmiştir (Ramana vd., 2010). Senkronize edilmiş hücrelerin hücre döngüsü dağılımını zamana bağlı olarak incelediğimizde, AKR1B1 geni susturulmuş hücrelerin hücre döngüsündeki devamlılığı en erken 6. saat olmak üzere önemli oranda gecikme göstermişlerdir. Örneğin, kontrol HCT-116 hücreleri S fazına 6. saatte başladıklarında AKR1B1 geni susturulmuş hücrelerin hala G1 fazında ilerledikleri gözlemlenmiştir. Benzer olarak 6. saatte, kontrol hücreleri hücre döngüsünün S fazının sonlarına yaklaşırken, AKR1B1 geni susturulmuş hücrelerin halen G1 fazında olduğu görülmüştür. 6. saatte, kontrol hücrelerine kıyasla, AKR1B1 geni susturulmuş hücrelerde oldukça yüksek miktarda Siklin E görülmüştür. Fazla miktarda Siklin E'nin, pRB'nin hiper-fosforile formu ile birlikte gözlenmesi gerekmesine rağmen, elde ettiğimiz western blot sonuçları bu yönde değildir. Bunun sebebi büyük olasılıkla, antikörün özellikle Ser 807/811 rezidüsünde sadece mono fosforilasyonu tanınması ve hiper-fosforilasyonu tanımamasıdır. Dolayısıyla, 6. saatte, AKR1B1 susturulmuş hücreler G1/S fazındayken Siklin E yüksek oranda aktiftir; ancak kontrol hücrelerinde büyük olasılıkla bu fazı tamamlanmış olduğundan bu hücrelerde düşük Siklin E ifadesi görülmektedir. Genel olarak, bu sonuçlar AKR1B1 inhibisyonunun hücre proliferasyonunda düzenleyici bir etkisinin olduğuna ve hücre döngüsünde gecikmeye sebep olduğuna işaret etmektedir. Senkronize

edilerek transfekte edilen AKR1B10'u aşırı ifade eden hücrelerde de Siklin E ve pRb fosforilasyonundaki benzer trend gözlenmiş olmakla birlikte, bir G2/M fazı proteini olan Siklin B1 miktarlarında da önemli farklılıklar belirlenmiştir.

Hücre döngüsü ve proliferasyon metastatik potansiyel ile ilişkili süreçlerdir (Ouhtit vd., 2013). Çalışmamızda, HCT-116 hücrelerinde AKR1B1 geninin susturulmasının metastazla ilişkili bir başka süreç olan motiliteyi de etkileyecek herhangi bir fonksiyonel değişikliğe sebep olup olmadığını da araştırdık. AKR1B1 geni susturulmuş HCT-116 hücrelerinin Transwell göç testinde kontrol hücrelerine göre göç kabiliyetindeki azalma gösterilmektedir. Hücre hareket kabiliyetindeki değişim, *in vitro* yara açma testi ile de gösterilmiştir. Buna göre AKR1B1 geni susturulmuş hücrelerin kontrol hücrelerden önemli oranda daha az hareketli olduğu görülmüştür. AKR1B1 in farmakolojik baskılanmasının, kolon kanseri hücrelerindeki büyüme faktörünün tetiklediği, ICAM, VCAM ve E-cadherin adhezyon moleküllerini azaltarak göç ve invazyonu baskıladığı bilindiği için elde ettiğimiz sonuçlar beklenen sonuçlardır (Tammali vd., 2011). Öte yandan, AKR1B10 aşırı ifadesinde bu deney yöntemi tercih edilmemiştir, çünkü AKR1B10 aşırı ifadesine geçici transfeksiyon yöntemi ile devam edilmektedir ve geçici transfeksiyonu takiben geçen 48 saatlik süre yara iyileşmesi için yeterli olmayacaktır. Hücre döngüsü devamlılığı, motilitesi ve proliferasyonu kanserin temel ayırıcı özellikleridir (Hanahan vd., 2011). Bu yollara etkisi anlamında NF- κ B, bahsedilen süreçlerde kilit rol oynamaktadır. Ayrıca NF- κ B ve AP-1 gibi transkripsiyon faktorlerinin, oksidatif stres ile aktif hale geldiği bilinmektedir (Morgan ve Liu, 2011) AKR1B1 susturulmuş hücrelerde AP-1 ve NF- κ B aktivasyonu incelenmiştir. Lusiferaz testinde, AP-1'de herhangi bir aktivasyon görülmemişken, kontrol hücrelerle kıyaslandığında AKR1B1 susturulmuş hücrelerde, NF- κ B'nin hem nükleer translokasyonunda hem de transkripsiyonel aktivitesinde önemli bir düşüş görülmüştür. Benzer şekilde, AKR1B10 aşırı ifade edilmiş hücrelerde, NF- κ B'nin nükleer translokasyonunda, transkripsiyonel aktivitesinde ve DNA bağlanma kapasitesinde azalma, farklı yöntemlerle gösterilmiştir. Genel olarak elde ettiğimiz verileri değerlendirildiğimizde, AKR1B1 geninin susturulması ile azalan ROT üretiminin NF- κ B aktivasyonunda da azalmaya neden olduğu ve akabinde hücre proliferasyonunda ve motilitesinde azalma ile hücre döngüsünün ilerleyişinde aksamaya sebep olduğunu önermekteyiz. Öte yandan, AKR1B10 geninin aşırı ifadesi hücre proliferasyonunu ve hücre döngüsü süreçlerinde bir değişime yol açmazken, NF- κ B aktivasyonunda azalmaya neden olarak anti-inflamatuar etkilere neden olabileceğini öngörmekteyiz.

Otofaji, proteinlerin, sitoplasmik bileşenlerin ve lizozomdaki organellerin yıkımını veya geri dönüşümünü sağlayan katabolik bir hücre işlemidir. Hücresel stresin artmasıyla (ör: ROT birikimi) birçok otofaji ilişkili genlerin aktivasyonuna ihtiyaç duyan iyi organize edilmiş bir hücre olayıdır. Bu sebeple, CHNQ ile muamele edilmiş HCT-116 ve HT-29 hücrelerinde ROT tarafından indüklenmiş otofaji incelenmiştir. ROT tarafından indüklemiş MAPK proteini olan ERK1/2 aktivitesi, otofajiye ve otofajik hücre ölümüne sebep olabilmektedir (Eum ve Lee, 2011). Buna ilaveten, MAPK yolağını aktive etme kapasitesine sahip epidermal büyüme faktörü (EGF) stimülasyonu, MAPK proteinlerinin otofaji ile ilgili proteinler ile (ATG12, ATG5 ve LC3-II) birlikte konuşlandığı gösterilmiştir (Martinez-Lopez vd, 2013). Dolayısıyla, çalışmamızda, ROT tarafından indüklenmiş MAPK yolağının aktivasyonu CHNQ ile muamele edilmiş iki hücre hattında da görülmüş olup, otofaji başlatılmasından etkili olmuş olacağı düşünülmektedir. Ayrıca, CHNQ ve bir antioksidan olan NAC ile muamele edilmiş HCT-116 hücrelerinde görülen otofajik belirteçlerin yok olması bu kanıyı desteklemektedir.

Otofajinin otofagozomun nucleasyonundan sorumlu LC-3 ve Beklin-1 gibi proteinleri içerdiği bilinmektedir. Yakın zamanda, otofaji için, Beklin-1'den bağımsız bir non-kanonik mekanizma önerilmiştir. Yüksek dozda CHNQ ile muamele edilen HCT-116 ve HT-29 hücrelerinde, lipitlenmiş LC-3 (LC3-II) seviyelerinde güçlü değişimler ve AKT/PKB fosforilasyonunda azalma görülmüştür. Bununla birlikte, Beklin-1 seviyelerinde artıştan ziyade bir azalış görülmüştür. Ancak, Beklin-1'in otofaji sürecindeki gerekliliği henüz tam olarak anlaşılmış değildir. (Hasima ve Ozpolat, 2014).

Daha sonra deneylere, CHNQ ile muamele edilmiş HCT-116 ve HT-29 hücrelerindeki otofajik işleyiş, p62 protein seviyeleri araştırılarak devam edilmiştir. p62 seviyelerinde azalma, otofajik akışın ve asidik vaküol oluşumunun (AVO) bir belirteci olup, otofagozom lizozomla birleşirken olmaktadır. Bu iki durum, CHNQ ile muamele edilmiş HCT-116 hücrelerinde gözlenirken, CHNQ ile muamele edilmiş HT-29 hücrelerinde p62 seviyelerinin arttığı görülmüş ve herhangi bir AVO oluşumu veya otofajik akış görülmemiştir (akridin turuncusu boyaması ve Cyto-ID yöntemleri ile). Ayrıca, CHNQ ve bir otofaji inhibitörü olan Klorokin ile birlikte muamele edilmiş HT-29 hücrelerinin p62 seviyelerinde gözle görülür bir artış gözlenmiştir. Bu nedenle, CHNQ ile muamele edilmiş HT-29 hücrelerinde CHNQ'nun ROT'u aktifleştirdiği ve otofajinin başlatıldığı görülmektedir. Ancak, büyük ihtimalle lizozomların asitlenmesi gerçekleşemediği için otofaji tamamlanamamıştır. Benzer bir tamamlanamamış otofaji neuregülin ile muamele edilmiş LNCaP prostat kanseri hücrelerinde ve doğal bir poliprenoik asit olan geranilgeranoik asit ile muamele edilmiş HuH-7 hepatoma hücrelerinde rapor edilmiştir. Her iki çalışma da otofajinin ROT ile indüklenerek erken aşamalarının başlatılmasını göstermektedir; ancak,

otofagolizozomun olgunlaşması ve otofajinin geç aşamaları p62 seviyelerinin artış ile kısıtlanmıştır (Schmukler vd, 2012; Okamoto vd, 2011).

Nitrojen eksikliğinde otofajiye uğradığı bilinen (Zimmerman vd, 2013) *S.cerevisiae* suşu (RDKY3615), CHNQ ile muamele edildiğinde vehikül kontrole göre otofajide 2.6 kat artış görülmüştür. Ancak, ilginç bir şekilde bu hücrelerdeki otofaji ROT üretimine bağlı olarak artmamıştır ve hücrelere CHNQ ve antioksidant NAC'nin bir arada muamele edildiğinde otofajide tersine dönüş olmamıştır. Benzer bir fenomen iskelet kas hücrelerinde gösterilmiş, NAC ile muamele hücreler bazal seviyede otofajiden korunmuş, ancak açlıktan kaynaklanan otofajiden korunamamıştır. ROT'un konstitütif otofajiye neden olduğu, fakat açlıktan kaynaklanan otofajinin ROT üreten mitokondriden bağımsız olduğu konusunda çalışmalar mevcuttur (Qi vd, 2014). Literatürdeki bilgilere dayanarak, maya hücrelerinin CHNQ ile muamele edilmesi ile görülen otofajinin açlıktan kaynaklanan otofajiye daha yakından benzemesinden dolayı, ROT üretiminden bağımsız olarak başlamış olabileceği önerilmiştir. Dolayısıyla, CHNQ'nun farklı hücre tiplerinde otofajiye sebep olduğuna şüphe yokken, bu sürece sebep olan sinyal mekanizmalarının farklı modellerde farklı olması mümkündür. Apoptoz ve otofaji genellikle karşılıklı bağımlı olaylar olarak gösterilmişlerdir. Otofajinin metabolik stres sırasında enerji sağlaması ve kanser gelişimini ilerletmesi ile yaygın bir şekilde hayatta kalma mekanizması olarak düşünülmesine rağmen, uzatılmış otofaji tümörjenezini olumsuz yönde düzenleyebilmektedir. Son çalışmalar, belirli koşullarda, p53, PI3K/AKT eksenini ve Bcl-2 ve Beclin-1 arasındaki etkileşimin, otofaji ve apoptozu paralel olarak aktive edebileceğini göstermiştir. Böylece kusurlu apoptoz düzeneğinden dolayı kemoterapiye dirençli hücrelerde, otofajik hücre ölümü uygulaması alternatif bir mekanizma olarak düşünülebilir. HCT-116 hücreleri CHNQ ile muamele edildiğinde, apoptoz ve otofajinin güçlü bir şekilde başladığı gözlenmiştir. Bu süreçlerin birbirleriyle ilgili olup olmadığını anlamak için yalnızca CHNQ ile muamele edilmiş (otofaji tetiklenmiş) ve CHNQ ve NAC ile birlikte muamele edilmiş (otofaji engellenmiş) HCT-116 hücrelerindeki apoptoz değerlendirilmiştir. İki durumda da, apoptoz benzer seviyelerde tetiklenmiştir. Tek başına NAC muamelesi ise otofajiye ya da apoptozu sebep olmamaktadır. Bu nedenle, bu veriler CHNQ ile muamele edilmiş hücrelerde otofaji ve apoptozun birbirleriyle paralel olaylar olabileceğini göstermektedir.

Özetle, bu araştırma projesinde pek çok yeni bilgi elde edilmiştir. İlk önemli bilgi, CHNQ'nun türevlendiği kuersetin molekülü ile karşılaştırıldığında daha etkin bir kanser öldürücü ajan olduğudur. CHNQ yüksek miktarda ROT oluşuma neden olarak otofaji, hücre döngüsü tutuklanması ve apoptoz süreçlerini etkilemektedir. İkincil olarak, CHNQ, Slovak partnerlerimiz tarafından AKR inhibitörü olarak tasarlanmış olmasına rağmen, kolon kanser epitel

hücrelerinde gözlenen CHNQ fizyolojik etkilerinin AKR1B1 ve AKR1B10 ifadesinden bağımsız olduğundan göstermiş bulunmaktayız. Gözlenen etkiler büyük olasılıkla CHNQ muamelesi ardından artan ROT düzeyi ile ilişkil olmalıdır. Çalışmada elde ettiğimiz bir diğer önemli bulgu ise AKR1B1 ve AKR1B10 ifadesinin hücre içi ROT aracılığı ile hücre proliferasyonu, hücre döngüsü ilerleyişi, mitojenle aktive olan yolları ve NF-κB aktivasyonunu etkilemesidir. Çalıştığımız çeşitli fizyolojik süreçler göz önüne alınıp birlikte değerlendirildiğinde, AKR1B1 ve AKR1B10'un birbiriyle ters olarak çalıştığını görülmektedir: AKR1B1 onkogenik, AKR1B10 ise tümör baskılayıcı özellikler göstermiştir. Bu sonuçlar, bazı AKR'ler tümörjenik etki gösterirken bazıları tümör baskılayıcı rol oynadığından, AKR inhibitörlerinin kolorektal kanserde tedavi amaçlı kullanımında dikkatli olunması gerektiğine işaret etmektedir. Bu çerçevede, kolon kanseri hastalarında AKR1B1 ve AKR1B10 ifade düzeylerinin belirlenmesi, bahsedilen proteinlerin ifade düzeyleri ile prognostik ve diagnostik belirteçlerdeki değişimlerin karşılaştırılması olarak incelenmesi elzemdir.

6. REFERANSLAR

- Alexiou, P., Pegklidou, K., Chatzopoulou, M., Nicolaou, I., & Demopoulos, V. J. 2009. "Aldose reductase enzyme and its implication to major health problems of the 21(st) century.", *Current Medicinal Chemistry*, 16(6), 734–52.
- Alía, M., Mateos, R., Ramos, S., Lecumberri, E., Bravo, L., & Goya, L. 2006. "Influence of quercetin and rutin on growth and antioxidant defense system of a human hepatoma cell line (HepG2).", *European Journal of Nutrition*, 45(1), 19–28.
- Araújo, J. R., Gonçalves, P., Martel, F., Ito, H., Gonthier, M. P., Manach, C. 2011. "Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines.", *Nutrition Research*, 31(2), 77–87.
- Bains, O. S., Szeitz, A., Lubieniecka, J. M., Cragg, G. E., Grigliatti, T. A., Riggs, K. W., & Reid, R. E. 2013. "A Correlation between Cytotoxicity and Reductase-Mediated Metabolism in Cell Lines Treated with Doxorubicin and Daunorubicin.", *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 347(2), 375–387.
- Brownlee, M. 2001. "Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications.", *Nature*, 414, 813–820.
- Cai, X., Fang, Z., Dou, J., Yu, A., & Zhai, G. 2013. "Bioavailability of quercetin: problems and promises.", *Current Medicinal Chemistry*, 20(20), 2572–82.
- Ebert, B., Kisiela, M., W, V., Maser, E., Wsól, V., & Maser, E. 2011. "Proteasome inhibitors MG-132 and bortezomib induce AKR1C1, AKR1C3, AKR1B1, and AKR1B10 in human colon cancer cell lines SW-480 and HT-29.", *Chemico-Biological Interactions* 191, 239–249.
- Endo, S., Matsunaga, T., Mamiya, H., Ohta, C., Soda, M., Kitade, Y., ... Hara, A. 2009. "Kinetic studies of AKR1B10, human aldose reductase-like protein: Endogenous substrates and inhibition by steroids.", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 487(1), 1–9.
- Eum, K.-H., & Lee, M. 2011. "Crosstalk between autophagy and apoptosis in the regulation of paclitaxel-induced cell death in v-Ha-ras-transformed fibroblasts.", *Molecular and Cellular Biochemistry*, 348(1-2), 61–68.

- Hanahan, D., Weinberg, R. A. 2011. "Hallmarks of cancer: The next generation", *Cell*, 144(5), 646–674.
- Hasima, N., & Ozpolat, B. 2014. "Regulation of autophagy by polyphenolic compounds as a potential therapeutic strategy for cancer.", *Cell Death & Disease*, 5, e1509.
- Kang, K., Lee, S. B., Yoo, J.-H., & Nho, C. W. 2010. "Flow cytometric fluorescence pulse width analysis of etoposide-induced nuclear enlargement in HCT116 cells.", *Biotechnology Letters*, 32(8), 1045–52.
- Laffin, B., & Petrash, J. M. 2012. "Expression of the aldo-ketoreductases AKR1B1 and AKR1B10 in human cancers.", *Frontiers in Pharmacology*, 104.
- Liu, J., Wen, G., & Cao, D. 2009. "Aldo-keto reductase family 1 member B1 inhibitors: old drugs with new perspectives.", *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 4(3), 246–253.
- Loa, J., Chow, P., & Zhang, K. 2009. "Studies of structure-activity relationship on plant polyphenol-induced suppression of human liver cancer cells.", *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 63(6), 1007–16.
- Maccari, R., & Ottanà, R. 2014. "Targeting aldose reductase for the treatment of diabetes complications and inflammatory diseases: New insights and future directions.", *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(5), 2047–2067.
- Mariani, F., Sena, P., & Roncucci, L. 2014. "Inflammatory pathways in the early steps of colorectal cancer development", *World Journal of Gastroenterology*, 20, 9716–9731.
- Martinez-Lopez, N., Athonvarangkul, D., Mishall, P., Sahu, S., & Singh, R. 2013. "Autophagy proteins regulate ERK phosphorylation.", *Nature Communications*, 4, 2799.
- Milackova, I., Rackova, L., Majekova, M., Mrvova, N., & Stefek, M. 2015. "Protection or cytotoxicity mediated by a novel quinonoid-polyphenol compound?", *General Physiology and Biophysics*, 34(1), 51–64.
- Mindnich, R. D., & Penning, T. M. 2009. "Aldo-keto reductase (AKR) superfamily: genomics and annotation.", *Human Genomics*, 3(4), 362–70.
- Nishinaka, T., Miura, T., Okumura, M., Nakao, F., Nakamura, H., & Terada, T. 2011. "Regulation of aldo-keto reductase AKR1B10 gene expression: Involvement of transcription factor Nrf2.", *Chemico-Biological Interactions*, 191, 185–191.

- Okamoto, K., Sakimoto, Y., Imai, K., Senoo, H., Shidoji, Y. 2011. "Induction of an incomplete autophagic response by cancer-preventive geranylgeranoic acid (GGA) in a human hepatoma-derived cell line.", *The Biochemical Journal*, 440(1), 63–71.
- Ouhtit, A., Gaur, R. L., Abdraboh, M., Ireland, S. K., Rao, P. N., Raj, S. G., Raj, M. H. G. 2013. "Simultaneous Inhibition of Cell-Cycle, Proliferation, Survival, Metastatic Pathways and Induction of Apoptosis in Breast Cancer Cells by a Phytochemical Super-Cocktail: Genes That Underpin Its Mode of Action.", *Journal of Cancer*, 4(4), 703–715.
- Pilátová, M., Stupáková, V., Varinská, L., Sarisský, M., Mirossay, L., Mirossay, A., ... Mojzis, J. 2010. "Effect of selected flavones on cancer and endothelial cells.", *General Physiology and Biophysics*, 29(2), 134–43.
- Plebuch, M., Soldan, M., Hungerer, C., Koch, L., & Maser, E. 2007. "Increased resistance of tumor cells to daunorubicin after transfection of cDNAs coding for anthracycline inactivating enzymes.", *Cancer Letters*, 255(1), 49–56.
- Ramana, K. V. 2011. "Aldose reductase: new insights for an old enzyme.", *Biomolecular Concepts*, 2, 103–114.
- Ramana, K. V., Tammali, R., & Srivastava, S. K. 2010. "Inhibition of aldose reductase prevents growth factor-induced G1-S phase transition through the AKT/phosphoinositide 3-kinase/E2F-1 pathway in human colon cancer cells.", *Molecular Cancer Therapeutics*, 9(4), 813–824.
- Ranelletti, F. O., Maggiano, N., Serra, F. G., Ricci, R., Larocca, L. M., Lanza, P., ... Piantelli, M. 2000. "Quercetin inhibits p21-RAS expression in human colon cancer cell lines and in primary colorectal tumors.", *International Journal of Cancer*, 85(3), 438–445.
- Saraswat, M., Mrudula, T., Kumar, P. U., Suneetha, A., Rao Rao, T. S., Srinivasulu, M., & Reddy, B. 2006. "Overexpression of aldose reductase in human cancer tissues.", *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 12(12), 525–529.
- Saraswathy, R., Anand, S., Kunnumpurath, S. K., Kurian, R. J., Kaye, A. D., & Vadivelu, N. 2014. "Chromosomal Aberrations and Exon 1 Mutation in the AKR1B1 Gene in Patients with Diabetic Neuropathy.", *The Ochsner Journal*, 14(3), 339–342.
- Saxena, A., Shoeb, M., Ramana, K. V., & Srivastava, S. K. 2013. "Aldose reductase inhibition suppresses colon cancer cell viability by modulating microRNA-21 mediated programmed

- cell death 4 (PDCD4) expression." *European Journal of Cancer*, 49(15), 3311–3319.
- Schmukler, E., Shai, B., Ehrlich, M., & Pinkas-Kramarski, R. 2012. "Neuregulin promotes incomplete autophagy of prostate cancer cells that is independent of mTOR pathway inhibition.", *PloS One*, 7(5).
- Simard, J. R., & Rauh, D. 2009. "Chemical and structural biology to direct the repurposing of sulindac." *ChemMedChem*, 4(11), 1793–5.
- Srivastava, S. K. S., Yadav, U. C. S., Reddy, A. B. M., Saxena, A., Tammali, R., Shoeb, M., ... Ramana, K. V. 2011. "Aldose reductase inhibition suppresses oxidative stress-induced inflammatory disorders". *Chemico-Biological Interactions*, 191, 330–338.
- Srivastava, S., Ramana, K. V., Tammali, R., Srivastava, S. K., & Bhatnagar, A. 2006. "Contribution of aldose reductase to diabetic hyperproliferation of vascular smooth muscle cells.", *Diabetes*, 55(4), 901–910.
- Stefek, M. 2011. "Natural flavonoids as potential multifunctional agents in prevention of diabetic cataract." *Interdisciplinary Toxicology*, 4(2), 69–77.
- Stefek, M., & Karasu, C. 2011. "Eye lens in aging and diabetes: effect of quercetin." *Rejuvenation Research*, 14(5), 525–34.
- Steuber, H. 2011. "An old NSAID revisited: crystal structure of aldose reductase in complex with sulindac at 1.0 Å supports a novel mechanism for its anticancer and antiproliferative effects." *ChemMedChem*, 6(12), 2155–7.
- Tammali, R., Ramana, K. V., Singhal, S. S., Awasthi, S., & Srivastava, S. K. 2006. "Aldose reductase regulates growth factor-induced cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in human colon cancer cells." *Cancer Research*, 66(19), 9705–9713.
- Tammali, R., Ramana, K. V., & Srivastava, S. K. 2007. "Aldose reductase regulates TNF-alpha-induced PGE2 production in human colon cancer cells." *Cancer Letters*, 252(2), 299–306.
- Tammali, R., Reddy, A. B. M., Saxena, A., Rychahou, P. G., Evers, B. M., Qiu, S., ... Srivastava, S. K. 2011. "Inhibition of aldose reductase prevents colon cancer metastasis.", *Carcinogenesis*, 32(8), 1259–67.
- Tammali, R., Reddy, A. B. M., Srivastava, S. K., & Ramana, K. V. 2011. "Inhibition of aldose reductase prevents angiogenesis in vitro and in vivo.", *Angiogenesis*, 14(2), 209–221.

- Tammali, R., Srivastava, S. K., & Ramana, K. V. 2011. "Targeting aldose reductase for the treatment of cancer.", *Current Cancer Drug Targets*, 11(5), 560–71.
- Verbon, E. H., Post, J. A., & Boonstra, J. 2012. "The influence of reactive oxygen species on cell cycle progression in mammalian cells.", *Gene*, 511(1), 1–6.
- Veverka, M., Gallovič, J., Švajdlenka, E., Veverková, E., Prónayová, N., Miláčková, I., & Štefek, M. 2013. "Novel quercetin derivatives: synthesis and screening for anti-oxidant activity and aldose reductase inhibition.", *Chemical Papers*, 67(1), 76–83.
- Wierenga, R. . K. 2001. "The TIM-barrel fold: A versatile framework for efficient enzymes.", *FEBS Letters*, 492(3), 193–198.
- Yadav, U. C. S., Ramana, K. V., & Srivastava, S. K. 2011. "Aldose reductase inhibition suppresses airway inflammation.", *Chemico-Biological Interactions*, 191, 339-345.
- Zimmermann, C., Santos, A., Gable, K., Epstein, S., Gururaj, C., Chymkowitch, P., ... Enserink, J. M. 2013. "TORC1 inhibits GSK3-mediated Elo2 phosphorylation to regulate very long chain fatty acid synthesis and autophagy.", *Cell Reports*, 5(4), 1036–46.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Doç. Dr. SREEPARNA BANERJEE
Proje No:	113S006
Proje Başlığı:	Aldo Keto Redüktaz İnhibitörü Olan Kuersetin ve Onun Türevi CHNQ Maddelerinin Karakterizasyonu ve Kolon Kanseri Üzerine Fonksiyonel Etkilerinin Araştırılması
Proje Türü:	Uluslararası
Proje Süresi:	36
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	ORTA DOĞU TEKNİK Ü.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/07/2013 - 01/07/2016
Onaylanan Bütçe:	309800.0
Harcanan Bütçe:	291565.18
Öz:	<p>Aldo-keto redüktazlar (AKR) glikoz indirgeyici ajanlar olarak çok iyi karakterize edilmiş ve diyabet patofizyolojisinde yer alan NAD(P)H?a bağımlı oksidoredüktazlardır. Bu enzimlerin, inflamatuvar tepkiyi başlatabilen lipid peroksidasyon ürünlerinin üretimine aracılık yaptığı da bilinmektedir. Kolondaki kronik inflamasyon çoğunlukla kanser gelişimi ile devam etmektedir. AKR?lar inflamasyonda yer almaktadır ve son çalışmalar bu enzimlerin kanser ilerlemesindeki önemli rolünü ortaya çıkarmıştır.</p> <p>Bu projede, multidisipliner bir yaklaşım ile AKR1B1 ve yakından ilişkili AKR1B10?u hedefleyen doğal bir madde olan kuersetinin, yarı sentetik türevlerinin detaylı karakterizasyonu ve bunların kolon kanseri etiyojisindeki çeşitli inflamatuvar yollar üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. HCT-116 kolon kanseri hücre hattında, AKR1B1 geni başarılı bir şekilde susturulmuş, AKR1B10 geni de aşırı olarak ifade edilmiştir. AKR1B1 ve AKR1B10 enzimlerini ifade eden yaban tipi HCT-116 hücreleri, AKR1B1 ifadesi susturulmuş ve AKR1B10?u aşırı ifade eden HCT-116 hücreleri hücreler, bu iki farklı AKR enzimi ifadelediği bilinen ve yaban tipi HT-29 hücreleri ile birlikte CHNQ (3,7-dihydroxy-2-[4-(2-chloro-1,4-naphthoquinone-3-yloxy)-3-hydroxyphenyl]-5-hydroxychromen-4-one) ile muamele edilmiştir. CHNQ muamelesi, bütün hücrelerde hücre canlılığını azaltmıştır. Bu durum, apoptozda artış ve G2/M fazında tutuklanmayla takip edilmiştir. Bütün bu etkiler, parental bileşik kuersetine kıyasla çok daha güçlü bir şekilde gerçekleşmiş olup, ilginç bir şekilde, AKR1B1?in susturulmasından veya AKR1B10 ?un aşırı ifadesinden bağımsız olarak ilerlemiştir. Dolayısıyla, çalışmada, CHNQ?nun diğer etkileri yalnızca yaban tipi hücrelerde incelenmiştir. Öncelikle, CHNQ, 1,4 naftokinon yapısına sahip olduğu için, bu bileşiğin redoks sinyal yollarında görev alabileceği hipotez edilmiştir. Hipotez ile tutarlı olarak, reaktif oksijen türleri (ROT) seviyelerinde güçlü bir artış ile birlikte mitojen aktive protein kinaz (MAPK) sinyal yolağında artış gözlenmiştir. Aynı zamanda, CHNQ muamelesinden dolayı görülen ölümlerin ROS kaynaklı otofajiden dolayı olduğu in vitro olarak iki farklı kolon kanseri hücre hattında ve in vivo olarak S. cerevisiae maya hücrelerinde gösterilmiştir.</p> <p>Bunun ardından, AKR?lerin kolon kanseri üzerindeki kendi başına etkileri incelenmiştir. HCT-116 hücrelerinde AKR1B1 susturulması, ROT üretiminde azalmaya sebep olmuş ve bundan dolayı hücre çoğalmasında, hücre hareketliliği ve migrasyonunda, MAPK ve NF-?B sinyal yollarında azalmaya ve hücre döngüsünde gecikmeye neden olmuştur. Bütün bu bulgular, AKR1B1 in kolon kanserinde onkojenik özelliklere sahip olduğunu işaret etmektedir. Öte yandan, HCT-116 hücrelerinde AKR1B0 ?un aşırı ifadenmesi hücre çoğalması ve hücre döngüsünde bir değişime sebep olmazken, NF-?B?nin nükleer translokasyonunda, DNA bağlanmasında ve transkripsiyonel aktivitesinde önemli azalmalar ile sonuçlanmıştır. Bulgularımız, AKR enzimlerinin ve bu enzimlerin inhibitörlerinin çeşitli fonksiyonlara sahip olduklarını göstermektedir. İleriye yönelik çalışmalar, kolon kanseri hasta örneklerinde, AKR enzimlerinin ifadenmesinin, aktivitesinin ve altında bulunan sinyal yollarını anlamak yolunda ve muhtemel terapötik yaklaşımlar geliştirmeyi amaçlamaktadır.</p>
Anahtar Kelimeler:	CHNQ, kuersetin, Aldo-keto redüktazlar (AKRler), AKR1B1, AKR1B10, otofaji, inflamasyon

Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır
Projeden Yapılan Yayınlar:	<p>1- 2-Chloro-1,4-naphthoquinone derivative of quercetin as an inhibitor of aldose reductase and anti-inflammatory agent (Makale - İndekli Makale),</p> <p>2- Effects of AKR1B1 silencing in HCT-116 colon cancer cells (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum),</p> <p>3- CHNQ exerts antitumor activity against colorectal cancer through the induction of apoptosis and oxidative stress (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Sözlü Sunum),</p> <p>4- CHNQ, a novel 2-Chloro-1,4-naphthoquinone derivative of quercetin, induces oxidative stress and autophagy both in vitro and in vivo (Makale - İndekli Makale),</p> <p>5- Treatment with the quercetin analog CHNQ induced oxidative stress both in vitro and in vivo (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum),</p>

TÜBİTAK