



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BOR TÜREVLERİNİN BENİGN PROSTAT HİPERPLAZİSİ
(BPH) ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

ELİF SOYA

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ
Prof. Dr. MEHMET KORKMAZ

MANİSA

2016



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BOR TÜREVLERİNİN BENİGN PROSTAT HİPERPLAZİSİ
(BPH) ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

ELİF SOYA

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ
Prof. Dr. MEHMET KORKMAZ

TEZ SINAV JÜRİSİ
Prof. Dr. MEHMET KORKMAZ
Prof. Dr. NEVİN ERENŞOY
Doç. Dr. NURAY ALTINTAŞ

MANİSA – 2016

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Elif SOYA

ÖNSÖZ

Eğitimim süresince ve tez çalışmamda yanımda olan sevgili hocam ve tez danışmanım Prof.Dr. Mehmet KORKMAZ'a, hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen, yüksek lisans döneminde laboratuvarımda, bana teknik destek sağlayan ve tez çalışmamda çok yardımcı olan Yard.Doç.Dr. Burcu ERBAYKENT TEPEDELEN'e en kalbi duygularla teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca yetişmemde desteklerini ve katkılarını esirgemeyen, Anabilim Dalımız öğretim üyelerimizden Prof. Dr. Selim UZUNOĞLU ve Doç. Dr. Nuray ALTINTAŞ hocalarıma teşekkür ederim.

Hayatım boyunca hep yanımda olan Canım Annem Selin ELVERMEZ YILMAZ'a ve Eşimle birlikte hayatıma dahil olan SOYA ailesine çok teşekkür ederim.

Yoğun tez dönemimde bana her zaman destek olan ve moral veren sevgili Eşim Seçkin SOYA'ya sabrından dolayı teşekkür ederim.

ELİF SOYA

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
TABLO DİZİNİ	XI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XII
ÖZET	1
ABSTRACT.....	3
1. GİRİŞ	5
2. GENEL BİLGİLER	8
2.1. Bor ve Türevleri.....	8
2.1.1. Bor ve Hücresel Fonksiyonları	9
2.1.2. Borun Canlılara Etkisi.....	11
2.1.3. Bor Aktivitesinin Biyokimyasal Mekanizması	12
2.2. Benign Prostat Hiperplazisi (BPH)	14
2.3. Apoptozis (Programlı Hücre Ölümü).....	16
2.3.1. Kaspazlar (Hücresel Giyotinler)	18
2.3.2. Kaspaz Aktivasyonu	21
2.3.3. Kaspaz Aktivitesinin Düzenlenmesi	23
2.3.4 Apoptozis Sırasında Çekirdekte Görülen Değişimler	23
2.3.5. Memeli Hücrelerinde Apoptozis	25
2.3.6. p53 ve Apoptozis	30
2.4. DNA Hasarı	36
2.4.1. DNA Moleküllerindeki Değişimler.....	37
2.4.2. DNA Çift Zincir Kırıkları (ÇZK).....	44

2.4.3. Kronik İnflamasyon Sürecinde ROT Oluşumu ve DNA Hasarı	47
2.4.4. DNA Hasarı Yanıt Mekanizması	49
3. GEREÇ VE YÖNTEM	61
3.1. GEREÇ	61
3.1.1. Hücre Dizisi	61
3.1.2. Kimyasal Maddeler	61
3.1.3. Malzemeler	63
3.1.4. Aygıtlar	64
3.2. Yöntem	65
3.2.1. Sterilizasyon	65
3.2.2. Tampon ve Solusyonların Hazırlanması	66
3.2.3. Hücre Kültürü	72
3.2.4. BPH-1 Hücre Hattının Üreme Kinetiği Eğrisinin Çıkartılması	75
3.2.5. Sitotoksosite Analizleri (MTT)	75
3.2.6. Western-Blot (İmmunoblotlama) Uygulamaları	76
3.2.7. İmmüno Floresan İşaretleme	80
4. BULGULAR	82
4.1. Hücre Üreme Kinetiği	82
4.2. Sitotoksosite Analizleri (MTT)	83
4.3. Western-Blot Uygulamaları	87
4.4. İmmüno Floresan	91
5. TARTIŞMA	96
6. KAYNAKLAR	101

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1 Kaspaz Enzimlerinin Yapısı	19
Şekil 2.2 Kaspaz Zincirinin Aktivasyonu	21
Şekil 2.3 Kaspaz Aktivasyon Mekanizmaları	22
Şekil 2.4 Apoptoz Sırasında Çekirdekte Görülen Değişiklikler	24
Şekil 2.5 Hücrelerde Görülen Apoptozis Başlatıcı Sinyaller.....	26
Şekil 2.6 Apoptozom Oluşumu	28
Şekil 2.7 Mitokondrinin Apoptoziste Aldığı Roller.....	30
Şekil 2.8 İnsan p53 Geninin Yapısı	31
Şekil 2.9 p53'ün Transkripsiyon Bağımlı Etkileri.....	32
Şekil 2.10 Apoptoziste p53'ün Sitoplazma ve Çekirdekteki İşlevleri	34
Şekil 2.11 Apoptoziste p53 Ağı	35
Şekil 2.12 Her Bir DNA Hasarı Yanıt Mekanizmasında Rol Oynayan Anahtar Proteinler ..	37
Şekil 2.13 DNA Bazları	39
Şekil 2.14 Kanserojen Ajanlar	40
Şekil 2.15 Reaktif Oksijen Türleri Tarafından DNA'da Oluşturulan Oksitlenmiş Baz Örnekleri	41
Şekil 2.16 Bir Siklobüttilimin Dimerinin Yapısı	42
Şekil 2.17 Timin Dimeri Yapısı.....	42
Şekil 2.18 Tek Zincir Kırıklarının Birleşerek Çift Zincirin Kırılmasına Sebep Oluşları.....	43

Şekil 2.19 Tek Zincir Kırıklarının Çift Zincir Kırıklarına Dönüşmesi	45
Şekil 2.20 Kronik İnflamasyon Sürecinde ROT ve RNT Oluşumu.....	49
Şekil 2.21 DNA Hasarı Yanıtında Rol Oynayan Proteinler.....	52
Şekil 2.22 DNA Hasarı veya Replikasyon Çatalına Karşı Oluşan Yanıtların, Hücrenin Kaderi, Genomik Kararsızlık ve Kanser Gelişiminin Genel Şeması	53
Şekil 2.23 ATM Kinaz Proteininin Şematik Görünümü	54
Şekil 2.24 DNA Hasarına (Çift Zincir Kırıklarına) Karşı Oluşturulan Yanıt Sırasında Uyarılan Hücre Döngüsü Kontrol Noktası Yolakları.....	55
Şekil 2.25 Çeşitli Ajanların DNA Kırığı Yaratması ve Buna Karşı Oluşan pH2AX ^(Ser139) Fosforilasyonu.....	58
Şekil 2.26 DNA Çift Zincir Kırığı Sonucu Nükleer Odak Oluşumları İçin Bir Model	60
Şekil 3.1 Hemositometrenin Mikroskop Altında Görüntüsü	75
Şekil 4.1 BPH-1 Hücrelerinin Üreme Kinetiği	82
Şekil 4.2 BPH-1 Hücre Hattında DPB Uygulamasının Zaman ve Konsantrasyona Bağlı Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisi	84
Şekil 4.3 DPB'ın BPH-1 Hücre Hattında Graphpad Yazılım Programı İle % Canlılık Değerlerine Karşı Logaritmik Konsantrasyonlarından Elde Edilen Proliferasyon Eğrileri... 84	
Şekil 4.4 BPH-1 Hücre Hattında BA Uygulamasının Zaman ve Konsantrasyona Bağlı Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisi.	85
Şekil 4.5 BA'ın BPH-1 Hücre Hattında Graphpad Yazılım Programı İle % Canlılık Değerlerine Karşı Logaritmik Konsantrasyonlarından Elde Edilen Proliferasyon Eğrileri... 85	
Şekil 4.6 BPH-1 Hücre Hattında BO Uygulamasının Zaman ve Konsantrasyona Bağlı Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisi.	86
Şekil 4.7 BO'nun BPH-1 Hücre Hattında Graphpad Yazılım Programı İle % Canlılık Değerlerine Karşı Logaritmik Konsantrasyonlarından Elde Edilen Proliferasyon Eğrileri... 86	
Şekil 4.8 48 Saat Süreyle DPB İle Muamele Edilen BPH-1 Hücrelerinde DNA Hasarı ve Apoptotik Yolaklarda Görev Alan Kritik Proteinlerin Ekspresyon Seviyelerindeki Değişimler.....	88

Şekil 4.9 Image J Analiz Programı Ile β -Aktin Seviyelerine Göre Normalize Edilen ATM, pATM Ve pH2AX Proteinlerinin Kantitatif Olarak Ekspresyon Kat Değişiklikleri. 89

Şekil 4.10 Image J Analiz Programı Ile β -Aktin Seviyelerine Göre Normalize Edilen p53 ve p-p53 Proteinlerinin Kantitatif Olarak Ekspresyon Kat Değişiklikleri. 89

Şekil 4.11 Image J Analiz Programı Ile β -Aktin Seviyelerine Göre Normalize Edilen Clv. Kaspaz-3 ve Clv. Kaspaz-9 Proteinlerinin Kantitatif Olarak Ekspresyon Kat Değişiklikleri.90

Şekil 4.12 Image J Analiz Programı Ile β -Aktin Seviyelerine Göre Normalize Edilen PARP ve Clv. PARP Proteinlerinin Kantitatif Olarak Ekspresyon Kat Değişiklikleri..... 90

Şekil 4.13 BPH-1 Hücrelerinde 48 Saat Süreyle DPB uygulamasının DNA Hasarı Belirteci H2AX ve ATM Fosforilasyonuna (pH2AX^(Ser139) ve pATM^(Ser1981)) Etkisi 92

Şekil 4.14 BPH-1 Hücrelerinde 48 Saat Süreyle DPB Uygulamasının DNA Hasarı Belirteci 93

Şekil 4.15 BPH-1 Hücrelerinin DNA Hasarı Sonucu Oluşturdıkları Odak Sayısı 94

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1 Apoptoz ve Nekroz Arasındaki Farklılıklar.....	18
Tablo 2.2 Kaspazların Hedef Proteinleri.....	20
Tablo 2.3 Apoptozis Sırasında P53'ün Hedef Genleri.....	31
Tablo 3.1 Bor Türevlerinin Moleküler Ağırlıkları.....	66
Tablo 3.2 Ayırma Jeli Bileşenleri	71
Tablo 3.3 Ön Ayırma Jeli bileşenleri	71
Tablo 3.4 Film Solüsyonu Bileşenleri.....	71
Tablo 3.5 Protein Büyüklüklerine Göre Jel Yüzdeleri.....	78
Tablo 4.1 DPB, BA ve BO'in GraphPad Yazılım Programı Kullanılarak BPH-1 Hücre Hattında Elde Edilen IC ₅₀ Değerleri.	87

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ATM -Ataksiya Telangiektasia Mutant Protein

APS - Amonyum Persülfat

B - Bor

BA - Borik Asit

BO - Bor Oksit

BPH - Benign Prostat Hiperplazi

BPH-1 - Benign Prostat Hiperplazi Hücre Hattı

CDC42 - Hücre bölünmesi kontrol proteini homologu 42

Clv. – Cleaved (Kesilmiş)

DAPI - 4,6-diamidino-2-phenylindole

DMEM F12 - Hücre Kültürü Besiyeri

DMSO - Dimetilsülfoksit

DNA - Deoksiribonükleik Asit

DNA-BD - DNA Bağlanan Domain

ÇZK - DNA Çift Zincir Kırıkları

DU145 - İnsan Prostat Kanseri Beyin Metastazı Hücre Hattı

DPB - Disodyum Pentaboratdekahidrat

ECM - Ekstraselüler Matriks

EEG - Elektroensefalogram

EDTA - Etilendiamin Tetraasetik Asit

ENU - Etilnitrozüre

EMS - Etilmetansülfonat

FAK - Fokal Adhezyon Kinaz

FBS - Fötal Sığır Serumı

FGF2 - Fibroblast Büyüme Faktörü 2

FSH - Folikül Uyarıcı Hormon

HR - Homolog Rekombinasyon

HRT - Hormon Replasman Tedavisi

H₂O₂ - Hidrojen Peroksit

H2AX - H2A Histon Ailesinin X Üyesi

IC₅₀ - Hücre Proliferasyonun %50 Oranında İnhibe Eden Konsantrasyon Değeri

IL-6 - İnterlokın-6

IL-8 - İnterlokın-8

LH - Lütein hormon

LHRH - Lütein Hormonu Salgılatıcı Hormon

LPS - Lipopolisakkarid

LNCaP - İnsan Prostat Kanseri Lenf Nodu Metastazı Hücre Hattı

LUTS - Lower Urinary Tract Symptoms

MMS - Metilmetan Sülfonat

MTT - Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (Sitotoksisite testi kimya)

NHEJ - Homolog Olmayan Uç Birleştirme

NLS - Nükleer Lokalizasyon Sinyali

PBS - Fosfat Tamponu

PC-3 - İnsan Prostat Kanseri Kemik Metastazı Hücre Hattı

PI3K - Fosfotidilinositol 3-kinaz

PIKKs - Fosfotidilinozitol-3 Kinaz İlişkili Kinazlar

PSA - Prostat Spesifik Antijen

Rac1 - Ras ile ilişkili C3 botulinum toksini substratı 1

RHO – Ras Homolog

ROT - Reaktif Oksijen Türleri

RPMI 1640 - Hücre Kültürü Besiyeri

RNT - Reaktif Nitrojen Türleri

SDS - Sodyum Dodesil Sülfat

TBS - Trisile Tamponlanmış Tuz Solüsyonu

TBS-T - Tween-20 İçeren ve Trisile Tamponlanmış Tuz Solüsyonu

TEMED - N,N,N',N'-tetramethyl- ethane-1,2-diamine

TET - Tetramerizasyon Domaini

TNF- α - Tümör Nekroz Faktör - α

PARP - Poly ADP Ribose Polymerase

BOR TÜREVLERİNİN BENİĞN PROSTAT HİPERPLAZİSİ (BPH) ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Öğrencinin Adı: ELİF SOYA

Danışmanı: Prof. Dr. MEHMET KORKMAZ

Anabilim Dalı: TIBBİ BİYOLOJİ

ÖZET

Benign prostat hiperplazisi (BPH) erkeklerde en sık görülen benign adenom olup mesane çıkımında tıkanıklığa neden olmaktadır. BPH, prostat büyümesi ve kronik enflamasyon ile ilişkili önemli klinik semptomlara yol açan kompleks bir sendromdur. Erkeklerin yaklaşık % 40'ı hayatları boyunca bu hastalığa yakalanma riski taşımaktadırlar. BPH histolojik olarak prostat epitel ve stromal hücrelerin aşırı derecede çoğalması ile tanımlanmaktadır ve proliferasyonda, farklılaşmada, apoptoz ve senesensteki değişiklikleri içeren kompleks hücresel değişimler sonucu meydana gelmektedir.

Bor ve türevlerinin anti-enflamatuvar ve immün yanıt düzenleyici özellikleri nedeniyle, kronik enflamasyon ve hücre proliferasyonu ile karakterize edilen BPH gibi hastalıkların tedavisinde potansiyel olarak kullanılabileceği öngörülebilir. Bununla birlikte gerek epidemiyolojik gerekse hayvan ve laboratuvar çalışmalarından bor ve türevlerinin anti-proliferatif etkilerine ek olarak anti-kanserojen bir özelliğe de sahip olduğu görülmektedir.

Bu bağlamda çalışmanın en önemli çıkarımlarından birisi BPH-Bor türevleri ilişkisinin daha ileri boyutta irdelenmesi gerekliliğidir. Bor ve türevlerinin hücre sinyalizasyon sistemini etkilemesi ya da birçok biyokimyasal süreçte rol oynayan bir olayın oluşumunu ve/veya aktivitesini etkilemesi, BPH hücrelerinin büyümesini ve enflamasyonu engelleyecek bir hedef molekül olma olasılığını artırmaktadır. Dolayısıyla epidemiyolojik çalışmaların yanısıra, ilginin bor bileşiklerinin BPH

hücrelerinin çoğalmasını engelleyecek, anti-proliferatif etkisini gösterecek hücrel ve moleküler çalışmalara çevrilmesi gerekmektedir.

Bu kapsamda çalışmamızda BPH-1 hücre hattında bor türevlerinin apoptoz ve DNA hasarı üzerine etkilerinin moleküler açıdan değerlendirilmesi amaçlanmıştır. İlk olarak BPH-1 hücre hattının üreme kinetiğine bakıldı ve BO (Bor Oksit), BA (Borik Asit) ve DPB (Disodyum Pentaborat Dekahidrat) maddelerinin sitotoksiste denemeleri yapıldı. DPB etkin sonuç verdiği için bu kimyasalla diğer denemelere devam edildi. En iyi sonucu DPB verdiği için bu kimyasalla devam edildi. Daha sonra DPB'in DNA hasarı üzerine etkisi, Western Blot yöntemi ile pH2AX, pATM ve ATM antikorları aracılığıyla değerlendirildi. Aynı zamanda immunofloresan yöntemiyle de pH2AX ve pATM odak sayıları ile DNA hasarı miktarları ölçüldü. Bor ve türevlerinin BPH-1 hücre hattında apoptoz üzerine etkileri ise, yine Western Blotlama yöntemiyle, p53, p-p53, PARP, kaspaz-3, kaspaz-9 antikorlarının düzeylerine bakıldı. Bu tez çalışmamız çerçevesinde ilk kez DPB uygulamasıyla BPH-1 hücre hattında apoptotik hücrelerin ve DNA hasarına uğramış hücrelerin zamana ve doza bağımlı olarak arttığı belirlenmiştir.

Anahtar sözcükler: BPH, Bor Türevleri, DNA Hasarı, Apoptozis, pH2AX.

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF BORON DERIVATIVES ON BENIGN PROSTATIC HYPERPLASIA (BPH)

Student's Name: ELİF SOYA

Advisor: Prof. Dr. MEHMET KORKMAZ

Department: MEDICAL BIOLOGY

ABSTRACT

Benign prostatic hyperplasia (BPH) is the most common benign adenoma in men, which leads to caused occlusion on the exits of the bladder. Also BPH is a complex syndrome that causes significant chronic symptoms associated with chronic inflammation and prostate enlargement. Approximately 40 % of men have the risk of developing this disease throughout their lives. BPH is histological characterized by the proliferation of prostatic epithelial and stromal cells and also it occurs due to complex cellular changes which include alterations in proliferation, differentiation and senescence.

It was thought that boron and its derivatives could be used as potential treatment of diseases that were characterized by chronic inflammation and cell proliferation such as BPH because of anti-inflammatory and immune response regulatory properties. However it is shown that boron has an anti-carcinogenic property in addition to anti- proliferative effect from the results of epidemiological, animal and laboratory studies.

In this respect one of the most important results of this study that it reveals the need for further examined the relationship between boron exposure and BPH. Boron and its derivatives apparently has diverse effects through influencing a cell signaling system or the formation and/or activity of an entity involved in many

biochemical processes and these effects increase the likelihood of becoming a target molecule, which prevent the growth of BPH cells.

In this context, the boron derivatives in the our study the effects of BPH-1 cell line apoptosis and DNA damage was aimed at determining the molecular terms. Firstly, it is viewed BPH-1 cell line growth kinetics and cytotoxicity test of BA (Boric acid), BO (Boron oxide) and DPB (Disodium pentaborate decahydrate) was made substance. Because DPB gave more effective results among boron derivatives, following assays were carried out by this chemical. Then, pH2AX, pATM and ATM antibodies were examined in Western blot technique in order to investigate the effects of DPB on DNA damage while DNA damage amounts were calculated with pH2AX and pATM foci numbers by immunofluorescent microscope. Finally, apoptotic effects of boron derivatives on BPH-1 cells were also investigated with p53, p-p53, PARP, caspase-3 and caspase-9 antibodies by Western Blotting. With this study, it was firstly determined that DPB treatment with BPH-1 cell line leads to apoptotic cell and DNA damage increase in dose and time dependent manner.

Key Words: BPH, Boron Derivatives, DNA Damage, Apoptosis, pH2AX.

1. GİRİŞ

BPH hastalığında gözlenen fenotipe yol açan patolojik değişikliklerin yanı sıra büyümeyi regüle eden spesifik mekanizma ve hastalığın etiyolojisi ise tam olarak bilinmemektedir. BPH gelişimi için en önemli risk faktörleri androjenlerin varlığı, yaşlanma, östrojenler, adrenerjik reseptörleri ve enflamasyon sürecidir (Siejka ve ark. 2010). BPH patogeneğinde insülin, epidermal, fibroblast ve keratinosit büyüme faktörleri gibi büyüme faktörleri ile interlökin-8 (IL-8) gibi enflamatuvar kemokinlerin rol oynadığı düşünülmektedir. Prostatik bir enflamasyonunun varlığı BPH gelişiminin klinik olarak öngörülmesine olanak sağlamaktadır. BPH için anti-proliferatif ve anti-enflamatuvar terapinin klinik yanıtlarını değerlendiren veriler ise oldukça kısıtlıdır.

Bor bileşikleri, sindirim ve solunum sistemi tarafından % 100'e kadar absorbe edilmekte ve bütün dokulara BA olarak dağıtılmaktadır (Henderson ve ark. 2009; Nielsen ve Meacham 2011). İnsanlarda, absorbe edilen bor bileşenleri 24 saat ya da daha az bir yarılanma ömrüne sahiptir ve diyetle alınan borun % 83-98'i üre ile bir kaç gün içinde atılmaktadır (Henderson ve ark. 2009). Bu sebeple, insan vücudunda bor birikimi olmamaktadır. Günümüzde Dünya Sağlık Örgütü (WHO) günlük güvenli bor alımının 1 ile 13 mg arası olmasını, 28 mg/günü geçmemesini tavsiye etmektedir. Bu bulgular erişkin insanlar için günde en az 1 mg bor alımının uzun ve daha iyi bir yaşam için insanlara yardımcı olacağı düşüncesini doğurmaktadır (Nielsen ve Meacham 2011; Nielsen 1996).

Bor türevlerinin insan sağlığı üzerinde yararlı etkileri olduğu hayvanlarda çeşitli metabolik aktivite deneyleri ve sınırlı sayıdaki epidemiyolojik çalışmalarla gösterilmiştir (Nielsen ve Meacham 2011, Benderdour ve ark. 1998). BA, Lewis asidi olarak rol oynayıp metabolizmayla ilişkili pek çok enzimin aktivitesine etki etmektedir (Nielsen ve Meacham 2011, Korkmaz ve ark. 2014). Bu sebeple, bor ve türevleri; peptidaz, proteaz, proteazom, arjinaz, nitrik oksit sintaz ve transpeptitazlar gibi kemoprevensiyonda önemli pek çok enzimin etkin bir inhibitörüdür (Gallardo-Williams ve ark. 2003; Bradke ve ark. 2008; Mcauley ve ark. 2011). Örneğin, prostat

kanseri veya prostat rahatsızlıklarında sıklıkla yükselen prostat-spesifik antijeni (PSA) bor türevlerinin en önemli hedefidir (Gallardo-Williams ve ark. 2003; Scorei ve Popa 2010). Bor ayrıca insanlarda immün sistemle, tiroid hormonuyla ve insülin metabolizmasıyla da ilişkilidir. Dahası, bor; magnezyum, kalsiyum ve D vitaminiyle ilişkili kemik metabolizmasında önemli bir rol oynamaktadır. Buna ek olarak, bor, kadınlarda menapoz sonrası dönemde steroid hormonlarının düzenlenmesinde iş görmekte ve antioksidan özellikler taşımaktadır (Bradke ve ark. 2008; Korkmaz ve ark. 2011; Duydu ve ark. 2011).

Doğada elementer formda bulunmayan bor, organizmaya alındıktan sonra Borik asit ($B(OH)_3$) ve oldukça az bir kısmı borat anyonlarına ($B(OH)_4$) dönüşerek kan ve dokularda temsil edilir. Bor ve türevlerinin anti-enflamatuvar ve immün yanıt düzenleyici özellikleri nedeniyle, kronik enflamasyon ve hücre proliferasyonu ile karakterize edilen BPH gibi hastalıkların tedavisinde potansiyel olarak kullanılabileceği öngörülebilir. Bununla birlikte gerek epidemiyolojik gerekse hayvan ve laboratuvar çalışmalarından borun anti-enflamatuvar etkilerine ek olarak anti-kanserojen bir özelliğe de sahip olduğu gösterilmiştir.

DNA (Deoksiribonükleik asit) çift zincir kırıkları hücre ölümü veya delesyon, heterozigotluğun kaybı, translokasyonlar ve kromozon kayıpları gibi çeşitli genetik değişikliklerle sonuçlanan kritik genetik lezyonlardır (Khanna ve Jackson 2001; Shrivastav ve ark. 2008). Diğer lezyonlar kadar sık gözükmeselerde, çift zincir kırıkları oldukça zor tamir mekanizması gerektirdiği için aşırı derecede toksik lezyonlardır (Jackson ve Bartek 2009). DNA replikasyonundan ya da mitozdan önce tamir edilmezlerse, hücre ölümüne sebep olmakta veya tamamen tamir edilmezlerse, tümör oluşumuna sebep olan genomik kararsızlıklara sebep olmaktadır (Shrivastav ve ark. 2008; Lees-Miller ve Meek 2003). Çift zincir kırıkları endojen veya ekzojen DNA hasar ajanları ile meydana gelmektedir (Czornak ve ark. 2008; O'Driscoll ve Jeggo 2006). Hidrojen peroksit ya da irinotekan, doksorubisin, etoposid gibi topoizomeraz I ve II'ler ile meydana gelen DNA ligasyonu inhibe eden ajanlar gibi reaktif oksijen türlerinin oluşumu çift zincir kırıklarının oluşumuna sebep olmaktadır (Lieber ve ark. 2003; Ohnishi ve ark. 2009). $pH2AX^{(Ser139)}$ odak frekansı her bir

fokusun tek bir çift zincir kırığını göstermesi sebebiyle çift zincir kırık miktarı ile orantılıdır (Huang ve ark. 2005).

Bu kapsamda çalışmamızda, BPH-1 hücre hattında bor türevlerinin apoptoz ve DNA hasarı üzerine etkilerinin moleküler açıdan değerlendirilmesi amaçlandı. Çalışmamızda ilk başta BPH-1 hücre hattının üreme kinetiği çıkarılıp, BO, BA ve DPB maddelerinin MTT (2H-Tetrazolium, 2-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-3,5-diphenyl-bromide) denemeleri yapıldı. En etkin sonucu DPB verdiği için bu kimyasalla devam edildi. Daha sonra DPB'nin DNA hasarı üzerine etkisi araştırmak için Western Blot yöntemi ile pH2AX, pATM ve ATM antikorları aracılığıyla değerlendirildi. Aynı zamanda immunofloresan yöntemiyle de pH2AX ve pATM odak sayıları ile DNA hasarı miktarları ölçüldü. Bor ve türevlerinin BPH-1 hücre hattında apoptoz üzerine etkileri ise, yine Western Blotlama yöntemi ile, p53, p-p53, PARP, kaspaz-3, kaspaz-9 antikorlarının düzeylerine bakılarak belirlendi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Bor ve Türevleri

Sindirim ve solunum sistemi yoluyla % 100'e yakın bir oranda emilen bor, organizmaya alındıktan sonra borik asit ve oldukça az bir kısmı borat anyonlarına ($B(OH)_4$) dönüşmekte ve bir homeostatik mekanizma ile kan ve dokularda oldukça sabit bir seviyede kalmakta ve bu homeostasis primer olarak böbrek tarafından ayarlanmaktadır (Korkmaz ve ark. 2007c; Bakırdere ve ark. 2010; Nielsen ve ark. 2011). Emilen bor bileşiklerinin 24 saat veya daha az sürede yarılanıp birkaç gün içinde % 90'dan fazlasının hızlı bir şekilde üriner yolla atıldığı kanıtlanmıştır. Aynı şekilde günlük alınan bor miktarının idrarda % 85'inin temsil edildiği hesaplanmıştır (Korkmaz ve ark. 2007c; Bakırdere ve ark. 2010). Dolayısıyla uzun yıllar yüksek bor etkisinde kalan bireylerin vücudunda bor birikimi gerçekleşmemektedir. Bununla birlikte 2011 yılında yapılan çalışmada yüksek bor maruziyetinde (14.45 ± 6.57 mg/gün) seminal sıvıdaki bor miktarının kandaki seviyesine göre daha yüksek olduğu bulunmuş ancak bu birikimin FSH, LH ve toplam testosteron seviyesine, sperm konsantrasyonuna ve morfolojisine herhangi bir yan etkisi olmadığı gözlenmiştir (Duydu ve ark. 2011). Bor maddesinin düşük toksisiteye sahip olması ve vücutta birikmemesi gibi farmakolojik özellikleri, çekici bir kanser tedavisi ajanı olmasına yol açmaktadır. Ancak mekanizmasının henüz tam olarak anlaşılamaması potansiyel kullanımını engellemektedir (Bradke ve ark. 2008; McAuley ve ark. 2011).

Bugün, günlük toplam bor alımı dünya devletleri arasında değişiklik göstermekte ancak WHO tarafından günlük güvenli bor alımının 1-13 mg arasında olabileceği ve günlük alımın 28 mg/gün değerini aşmaması gerektiği önerilmektedir (WHO 2008; Meacham ve ark. 2009; Nielsen ve ark. 2011). Dolayısıyla 1 mg/gün'den az miktarlarda alımın, borun optimum aktivitesi için yetersiz olduğu ve 1 mg'dan fazla alımların ise insan sağlığı için yararlı olduğu sonucuna ulaşılmaktadır. Diğer bir deyişle bu bulgular 1 mg/gün üzerindeki bor alımlarının insanların daha uzun ve daha iyi bir yaşam sürmelerine yardımcı olabileceğini ileri

sürmektedir. Dolayısıyla meyve, sebze, fındık ve baklagillerin tüketimi yoluyla bor alımının artışı makul bir diyet tavsiye olarak kabul edilmelidir (Nielsen ve ark. 2011).

2.1.1. Bor ve Hücresel Fonksiyonları

Doğada genellikle borat formu şeklinde bulunan bor elementi yer kabuğunda, atmosferde, denizde, toprakta, kömürde, yeraltı ve yerüstü sularında ve sedimentlerde yüksek oranda bulunmaktadır (Rainey ve ark. 1999). 1980 yılından beri iz element olarak tanımlanan bor, 1996 yılında epidemiyolojik verilerin eksikliği de dikkate alınarak WHO tarafından “insan sağlığı için olası temel elementler” sınıfına alınmıştır (Nielsen 2008). WHO; havadan 0.44 µg/gün, içme suyundan 0.2-0.6 mg/gün, diyetle 1.2 mg/gün alınması, kısıtlı sınırlı verilerin ışığında, şimdilik normal miktarlar olarak kabul etmektedir (Nielsen 2008; Korkmaz ve ark. 2007).

Bor, insanlar ve hayvanlar için esansiyel olabilir (Hunt 1993). İnsanda bor alımının temel yolu, ağızdan yiyecekler ve içme suyu ile olmaktadır (Cao ve ark. 2008). Sindirim ve solunum sistemi yoluyla % 100’e yakın bir oranda emilen bor, organizmaya alındıktan sonra BA ve oldukça az bir kısmı borat anyonlarına $B(OH)_4^-$ dönüşmekte ve homeostatik mekanizma ile kan ve dokularda oldukça sabit bir seviyede kalmaktadır, bu homeostasis primer olarak böbrekler tarafından ayarlanmaktadır (Btech ve ark. 1990a;b).

Benderdour ve arkadaşları (1997), bor elementinin, proteoglikan, kollajen ve proteinlerin salınımını artırma yolu ile yara iyileşmesinde önemli bir rol oynayarak, ekstrasellular matriksin sentezini etkilediğini göstermişlerdir. Ayrıca kollajen sentezi ve TNF- α salınımını uyardığını bulmuşlardır. Borik asit, yalnızca aşırı miktarlarda tüketildiğinde toksik olduğu görülmektedir, çünkü hayvanlar ve insanlar fazla miktardaki boru uzaklaştırırlar (Benderdour ve ark. 1998; 2000).

Borun yara iyileşmesi üzerine etkinliğini inceleyen birkaç çalışma vardır. Erbaykent ve arkadaşlarının (2016) yaptığı bir çalışmada BA’in doza bağlı olarak

HS-2 hücre hattında yara iyileşmesi ivmesini arttırdığı gösterilmiştir. Bir başka çalışmada ise BA dezenfektan ve antiseptik özelliğinin yanısıra yara iyileşmesi üzerinde olumlu etkiye sahip olduğu yapılan az sayıdaki çalışmalarda da görülmüştür. % 3'lük BA solüsyonuyla tedavinin, derin yaraların iyileşmesini önemli derecede arttırdığının bulunması bu çalışmalardan biridir (Cao ve ark. 2008).

Borun insan beyin fonksiyonları ve bilişsel performans üzerine etki ettiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. İnsanlarda beyin ve fizyolojik fonksiyonun ölçülmesi çalışmalarında diyetle yetersiz miktarda bor alımının, hem elektroensefalogramda (EEG) daha düşük frekans aktivitesine yol açtığı, hem de bilişsel ve motor testlerde daha az bir performans gösterildiği ortaya konulmuştur (Penland 1994; 1998). Bor madeninde çalışan işçiler üzerinde yapılan bir çalışmada işçilerin depresyon düzeyleri araştırılmış ve işçilerin aldıkları depresyon puanlarına göre depresyonda olmadıkları belirlenmiştir. Mahabir ve arkadaşları (2008) tarafından yapılan bir araştırmada ise; kadınlarda bor alımı ve akciğer kanseri arasında ters bir ilişki olduğu bildirilmiş düşük düzeyde bor alan kadınlar ve HRT (hormon replasman tedavisini) kullanmayan kişilerdeki akciğer kanseri oranların önemli artış gösterdiği saptanmıştır.

İnsanlar için iz elementi olarak kabul edilen bor elementinin, organizma da birçok önemli göreve sahip olabileceği düşünülmektedir (Korkmaz 2008; Bradke ve ark. 2008; Nielsen ve ark. 2011). Bor insan vücudunda enzim aktivitesini düzenler, insülin metabolizmasında ve bağışıklık sisteminde görev alır (Korkmaz ve ark. 2007d). Magnezyum, vitamin D ve kalsiyum ile ilişkili olan bor, kemik metabolizmasında da önemli görevlere sahiptir (Korkmaz 2008; Duydu ve ark. 2011). Bor kadınlarda menopoz sonrası steroid hormonların düzenlenmesinde de görev alır ve antioksidan özelliğe sahiptir (Korkmaz 2011a; Müezzinoğlu ve ark. 2011). Borun hem sıçanlarda hem de insanlarda östrojen takviyesi etkinliğini artırdığı gösterilmiştir (Korkmaz 2011a). Bor aynı zamanda tiroid hormon metabolizmasını da etkilemekte ve insülin aktivitesini kolaylaştırmaktadır (Nielsen ve ark. 2011).

In vitro çalışmalar borun enflamatuvar yanıtta rol oynayan kan hücrelerinin popülasyonunu veya akut ya da kronik enflamasyon sonucu oluşan reaktif oksijen türlerinin metabolizmasını etkileyerek immün yanıtı etkilediğini işaret etmektedir. Aşırı miktarda olan reaktif oksijen türleri glutasyon, süperoksit dismutaz ve katalaz reaksiyonlarında parçalanmaktadır ve borun reaktif oksijen türlerinin parçalanmasını etkilediğine dair kanıtlar bulunmaktadır. Bordan yoksun erkek ve kadınlara (0.25 mg/gün) yapılan bor takviyesi (3 mg/gün) eritrosit süperoksit dismutaz konsantrasyonunu önemli derecede arttırmaktadır (Nielsen 1996). Bununla birlikte kalsiyum fruktoboratın oksidatif strese maruz bırakılan kültür hücrelerinde hücre içi süperoksit iyonlarının miktarını azalttığı bulgulanmıştır (Nielsen ve ark. 2011). Kalsiyum fruktoborat LPS (Lipopolisakkarit) ile uyarılan RAW264.7 makrofaj hücrelerinde interlokın-1b, interlokın-6 ve nitrik oksit salınımı azalmaktadır (Scorei ve ark. 2011b). Dolayısıyla kalsiyum fruktoboratın hem anti-enflamatuvar hem de anti-oksidan ajan olarak rol oynadığı düşünülmektedir (Scorei ve ark. 2011a). Durick ve arkadaşları (2005) tarafından yapılan bir çalışmada ise, borun NF-kB transkripsiyon faktörü aracılığıyla pro-enflamatuvar sitokinlerin aktivasyonunu ve dolayısıyla enflamasyon prosesini engelleyebileceğine dair kanıtlar bulunmuştur.

2.1.2. Borun Canlılara Etkisi

Yerkabuğu denizler yeraltı-yerüstü suları bor içermektedir. Bor yatakları çevresinde içme ve kullanma suları bor yoğunlukları yüksek yerde yaşamını sürdürenler bor ve bileşiklerine evre yoluyla ve temelde yiyecek ve içeceklerle maruz kalmaktadır (Bakirdere ve ark. 2010). Pek çok araştırma borun bitki yaşamında temel element toprakta hatta insan yaşamında belli sınırlarda olmak kaydıyla önemli olduğunu göstermektedir. Bor endüstri atık sonucu limit değerleri aştığında suda yaşayan canlılara veya tarımsal sulamada kullanılması halinde bitkilere zarar verebilmektedir. Endüstride, tarımsal alanlarda ve içme sularındaki bor konsantrasyonu çevresel açıdan oldukça önemlidir (Howe 1998; Murray 1998).

İnsanlarda ve hayvanlarda alınan borun fazlası vücuttan atıldığı için BA ancak yüksek dozlarda alındığı zaman toksik etki gösterebilir (Draize ve Kelley

1959; Sutherland ve ark. 1998). 18 ile 20 g arasında bir yetişkin dozunun ölümcül olduğu gösterilmesine rağmen, bor sebebiyle ölüm nadir görülmektedir ve hatta bazı yetişkinler 80-297 g boru tolere edebilmektedir (Von Burg 1992). BA potansiyel lethal dozunun genellikle yeni doğanlar için 3 ila 6 g, yetişkinler için 15 ila 20 g olduğu belirtilmektedir (WHO verileri 2010). Hayvanlarda ve insanlarda absorbe edilen BA, metabolize edilmeden hızlı bir şekilde pasif difüzyon yolu ile vücut sıvılarına yayılmaktadır (Korkmaz ve ark. 2010). İnsan kanında % 98.4 oranında BA ve % 1.6 oranında da borat anyonu şeklindedir. Bor kemik dokuda birikmektedir fakat yumuşak dokularda herhangi bir bor birikmesi olmamaktadır (Korkmaz ve ark. 2007). Sağlıklı insanda yapılan çalışma tam kan, serum ve idrar bor konsantrasyonu ortalamasının sırasıyla 0.06, 0.02, 0.75 olduğunu göstermiştir (Abou-Shakra ve ark. 1989).

2.1.3. Bor Aktivitesinin Biyokimyasal Mekanizması

Borun biyokimyasal olarak esansiyelliği BA'dan kaynaklanmaktadır. BA bir Lewis asidi olarak davranmakta ve tetrakovalent bileşikler oluşturmak için bazlardan bir elektron çiftini kabul etmektedir. BA, hidroksil grupları birbirlerine yakın ve cis-konumunda oldukları zaman organik bileşiklerin hidroksil grupları ile ester kompleksleri oluşturmaktadır (Barranco ve ark. 2006; Scorei ve ark. 2011b). Borun bu özelliği peptidaz, proteaz, proteazom, arginaz, nitrik oksit sentaz ve transpeptidaz gibi enzimler için etkili bir inhibitör olarak rol oynamasını sağlamaktadır (Gallardo ve ark. 2003; Bradke ve ark. 2008; McAuley ve ark. 2011). Bu şekilde bor, bağ doku yapılarının ve membran bileşenlerinin degradasyonunu azaltarak enflamasyonu düzenlemektedir. Serin proteazlar (kimotripsin, katepsin, elastaz, hepsin gibi) hidrolazların bir alt sınıfıdır ve aktif lökositler tarafından salınan en önemli proteolitik enzimlerdir. Salınan reaktif oksijen türlerinin yanı sıra bu enzimler bağ doku yapılarını, membran bileşenlerini ve çözünür proteinleri proteoliz ile parçalayarak enflamasyon yanıtı artırmaktadırlar. Dolayısıyla bor, enflamasyon sürecinde artan enzimatik aktiviteleri azaltacak bir represyon sinyali olarak fonksiyon göstermekte ve enflamatuvar hastalıklara yakalanma riskini azaltmaktadır (Hunt ve ark. 1999).

Bor, hücre yüzeyindeki ve membranlardaki moleküller ile cis-diol oluşturmakta ve hücre membranı fonksiyonunu, membran bütünlüğünü ve sinyalizasyonu etkilemektedir. Bor alımı ve prostat kanseri arasındaki biyolojik olarak ters olan ilişkinin, cis-diol bağlantıları aracılığıyla testosteronu ve PSA fonksiyonunu etkilemesi nedeniyle steroid hormonlara, metabolik regülasyona, anti-tümör metabolitlere ve hücre proliferasyonunun regülasyonuna bağlı olduğu düşünülmektedir (Meacham ve ark. 2009). Gallardo-Williams ve arkadaşları (2003), BA ve 3-nitrofenil boronik asitin PSA'nin proteolitik aktivitesini inhibe ettiğini bulmuşlardır ve bu durumun prostat adenokarsinomu gelişimini ve hücre proliferasyonunu azaltabileceğini düşünmektedirler.

Bor aynı zamanda hücre membranında cis-hidroksil gruplarını içeren fosfoinozidler, glikoproteinler ve glikolipidler ile diester borat kompleksleri oluşturarak da biyoaktivitesini göstermektedir. Diester borat kompleksleri kalsiyum şelatörü ve/veya redoks metabolizması düzenleyecisi olarak rol oynayarak membran bütünlüğünü ve fonksiyonunu etkilemektedir. Bitkilerde yapılan çalışmalar sonucunda ise borun transkripsiyon faktörleri ile etkileşen bir hücresel sinyal olarak rol oynadığı ve bazı genlerin ekspresyonunu etkilediği düşünülmektedir. Bu hipotez borun hücre farklılaşmasını, organogenezi ve embriyogenezi etkileyebileceğini desteklemektedir (Nielsen ve ark. 2011).

Hücre migrasyonundaki anormallikler birçok metastatik tümörün önemli bir özelliğidir. Metastaz için en önemli hücresel hedefler GTP-bağlanma proteinlerinin RHO (Ras Homolog) ailesinin en iyi karakterize edilmiş üyeleri RhoA (Ras homolog gene family, member A) , Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1) ve CDC42 (Cell division control protein 42)'dir. Bu moleküller birçok malignan kanser türünde aşırı seviyede eksprese edilmekte ve fokal adhezyon regülasyonu, aktin hücre iskeletinin organizasyonu, epitel yara iyileşmesi ve hücre migrasyonunda ve ayrıca enflamatuvar yanıtta önemli rol oynamaktadırlar. McAuley ve arkadaşları (2011) tarafından yapılan çalışmada BA ve fenil boronik asitin DU145 hücrelerinde aktin dağılımını değiştirdiği ve Rho ailesi üyelerinin aktivitesini azalttığı

bulunmuştur. BA ve fenil boronik asitin gösterdiği bu anti-migrasyon yanıtı nedeniyle yeni anti-kanser tedavileri için uygun adaylar olabileceği düşünülmektedir.

BA'nın meme ve prostat kanseri hücre kültüründe apoptozu indüklemesinin olası mekanizmalarından birinin fokal adhezyon kinazdaki (FAK) değişikliklerin olduğu düşünülmektedir. FAK birçok insan kanser hücre hattında yüksek seviyede eksprese edilmekte ve integrin-aracılı sinyal yolağında esansiyel bir rol oynamaktadır. Ayrıca; hücre göçünde, anjiyogeneze ve enflamasyon/yara iyileşmesinde önemli görevleri bulunmaktadır (Meacham ve ark. 2009; Nielsen ve ark. 2011). Fosforilasyon reaksiyonları aracılığıyla FAK'daki konformasyonel değişiklikler apoptozu baskılayan ve hücre göçünü uyaran hücre içi ve dışı yanıtların oluşmasına yol açmaktadır (Nielsen ve ark. 2011). BA uygulaması sonucunda FAK fosforilasyonundaki 4 kat azalma ile birlikte kaspaz-3 aktivitesinin artması kanser hücrelerinde apoptotik aktivitenin arttığını işaret etmektedir (Meacham ve ark. 2009; Nielsen ve ark. 2011).

2.2. Benign Prostat Hiperplazisi (BPH)

BPH erkeklerde en sık görülen benign adenom olup, mesane çıkımında tıkanıklığa neden olarak prostat büyümesi ve kronik enflamasyon ile ilişkili önemli klinik semptomlara yol açan kompleks bir sendromdur (Sutton ve ark. 2006; Penna ve ark. 2009). 40 yaşından itibaren BPH insidansı yaşla birlikte artış göstermektedir ve erkeklerin yaklaşık % 40'ı hayatları boyunca bu hastalığa yakalanma riski taşımaktadırlar (Fong ve ark. 2005; Schauer ve ark. 2011). Sadece Amerika'da yılda yaklaşık 4 milyar dolar bir maliyet ile 300,000'den fazla BPH ameliyatının gerçekleşmesi yeni tedavi yaklaşımlarına hedef olabilecek spesifik mekanizmaları anlamaya yönelik araştırmalara olan gerekliliği açık bir şekilde ortaya koymaktadır (Schauer ve ark. 2011). BPH histolojik olarak prostat epitel ve stromal hücrelerin aşırı derecede çoğalması ile tanımlanmaktadır ve proliferasyonda, farklılaşmada, apoptoz ve senesesteki değişiklikleri içeren kompleks hücresel değişimler nedeniyle gerçekleşmektedir (Castro ve ark. 2004; Hallstrom ve ark. 2008; Penna ve ark. 2009; Schauer ve ark. 2011). BPH hastalığında gözlenen fenotipe yol açan patolojik

değişikliklerin yanı sıra büyümeyi regüle eden spesifik mekanizma ve hastalığın etiyojisi ise tam olarak bilinmemektedir. BPH gelişimi için en önemli risk faktörleri androjenlerin varlığı, yaşlanma, östrojenler, adrenerjik reseptörleri ve enflamasyon sürecidir (Siejka ve ark. 2010). Bununla birlikte, son zamanlarda yapılan çalışmalar ile, gerçekleşen bir çok kompleks değişimin kronik enflamasyon ve yara iyileşmesi süreci ile ilişkili olduğu daha anlaşılır hale gelmektedir. BPH'nin bir hastalık olarak oluşum ve gelişiminde kronik yara tamiri yanıtının oluşması oldukça olasıdır (Schauer ve ark. 2011). BPH için kullanılan medikal terapiler terazosin gibi adrenerjik bloke edici ajanları ve finasteride gibi 5- α redüktaz inhibitörlerini içermektedir. Farmakolojik tedavinin cerrahi müdahalenin azalmasına yol açmasına rağmen kullanılan ilaçlar uzun süreli bir gerileme sağlamamakta ve bazı hastalarda tedavi için uygun olmamaktadır. Ayrıca anti-androjenler ve lütein hormonu salgılatıcı hormon (LHRH) agonistleri gibi diğer hormonal tedavilerin etkinliği ve kabul edilebilirliği ise azdır. Bu nedenle BPH'nin medikal tedavisinin daha fazla geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (Siejka ve ark. 2010).

Birçok etiyojistik varsayım, BPH'ın başlangıcı olarak prostat enflamasyonunu işaret etmektedir. Kronik prostat enflamasyonu olan hastalarda BPH riskinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Chughtai ve ark. 2011). BPH yaşla, değişen hormon seviyeleri ve kronik enflamasyon ile ilişkili doku homeostazisindeki değişikliklere yanıt olan bir reaktif fenotip olarak nitelendirilebilir. Değişen sitokin/kemokin ekspresyonunun BPH odakları ile ilişkili olduğu ve pro-enflamatuvar sitokinlerin BPH gelişimine yol açtığı birçok çalışmada gösterilmiştir (Chughtai ve ark. 2011; Schauer ve ark. 2011). Prostat mikroçevresi tarafından üretilen bu pro-enflamatuvar sitokinler arasında yer alan IL-8 (İnterlökin 8) ise kronik enflamasyon ve hücre proliferasyonu arasındaki anahtar bağlantı olarak kabul edilmekte ve IL-8'in BPH'nin güvenilir bir belirteci olabileceği düşünülmektedir (Penna ve ark. 2009; Chughtai ve ark. 2011; Schauer ve ark. 2011). Dış bir uyaran varlığında prostat epitel hücreleri tarafından üretilen IL-8 doğrudan epitel hücrelerin ve FGF2 (Fibroblast growth factor 2) indüksiyonu ile komşu stromal hücrelerin proliferasyonunu uyarmaktadır. FGF2 potansiyel olarak otokrin stromal büyüme faktörü ve az oranda da parakrin epitel büyüme faktörü olarak rol oynamaktadır. Bu şekilde IL-8, BPH

patogenezi için kritik olan anormal proliferasyonunu uyarmaktadır (Giri ve ark. 2001; Castro ve ark. 2004).

Prostattaki benign ve/veya premalign lezyonlar epitel hücrelerinin stromal hücreler ve ekstrasellüler matriksi (ECM) içeren doku mikroçevresi ile etkileşimindeki değişiklikler nedeniyle oluşabilmektedir. Fibroblastların, endotel hücrelerin ve prostat epitel hücrelerinin ECM'e tutunmaları bir hücrenin yalnızca yapısal desteği için değil kritik yaşamsal sinyaller için de gerekmektedir. Hücrelerin ECM'e tutunmaları öncelikli olarak integrinler ile kollajen, laminin ve fibronektini tanıyıp bağlanan hücre yüzey reseptörleri aracılığıyla gerçekleşir (Sutton ve ark. 2006). Bununla birlikte ECM, BPH'de epitel hiperplazisinin gelişiminde değişen kemokin ve sitokin oranlarının etkisine aracılık edilmesinde oldukça kritiktir. Tenascin-C BPH'de ekspresyonu değişen bir ECM glikoproteinidir. Yara iyileşmesi ve hiperplazi bölgelerinde aşırı eksprese olan birçok faktör Tenascin-C seviyesini regüle etmek için fonksiyon göstermektedir. Schauer ve arkadaşları (2011), fibroblast migrasyonunun FAK aktivasyonuna bağlı olduğunu ve Tenascin-C ekspresyonunun FAK indüksiyonu aracılığıyla uyarıldığını göstermiştir.

2.3. Apoptozis (Programlı Hücre Ölümü)

Apoptozis, yani programlı hücre ölümü, organizmaların gelişimi sırasında, sağlıklı organizmalarda görülen normal hücrel bir süreçtir. Çok hücreli organizmalarda hücre bölünmesiyle artan hücre sayısı hücre ölümleriyle dengelenir. Eğer bir organizmada bir hücreye artık gereksinim duyulmuyorsa, hücre içi ölüm programları aktive edilerek o hücrenin intihar süreci başlatılır. Bu intihar sürecinde Yunanca'da yaprak dökümü anlamına gelen apoptozis (programlı hücre ölümüyle) gerçekleşir. Programlı hücre ölümünün işlevi, tüm metazoonlarda tanımlandığı kadarıyla evrimsel süreçte korunmuş yollardan biridir. Canlıların başarılı bir organ gelişimini sağlayabilmesi, embriyonik gelişme sırasında gerçekleşen hücre ölümlerine bağlıdır. Hücre farklılaşması ve değişik hücrelere dönüşmesi, hem hücre bölünmesinin hemde hücre ölümünün kontrol edildiğini göstermektedir. Bu nedenledir ki embriyonik gelişme sırasında, her hücre komşu hücrelerden bağımsız

biçimde hareket edebilmiş ve her bir hücre ileride dönüşeceği hücre tipine değişeceği süreci uygun bir denge içerisinde tamamlayabilmektedir. Erişkin hücrelerde ise apoptozis, normal hücre homeostazisini sağlamaktadır. Bu durum özellikle uzun yaşam süresi olan, fizyolojik olduğu kadar patolojik birçok ölüm sinyalini de entegre etmesi gereken memeliler için oldukça önemlidir. Örneğin, apoptotik yolda görev alan genlerin işlev kaybı ya da kazanımı (gain/loss of function) hücrel homeostazinin bozulmasına yol açarak çeşitli hastalıkların ortaya çıkmasına neden olabilir. Yetersiz apoptozis kanser ve otoimmün hastalıklara, hızlandırılmış hücre ölümü ise akut ve dejeneratif birçok hastalığa yol açabilmektedir (Arandjelovic ve Ravichandran 2015).

Apoptozis terimi, ilk kez 1972 yılında Kerr vd tarafından özel bir morfoloji gösteren hücre ölümleri için kullanılmıştır. Yaptıkları çalışmalarda apoptozise uğrayan hücrelerin çekirdeklerinin yoğunlaştığını ve hücre içeriklerinin membran ile çevrili kesecikler (vesiküller) içerisine alındığını belirlemişler ve bunların komşu hücreler tarafından elendiğini gözlemlemişlerdir (Kerr ve ark. 1972).

Vücudumuzda yaklaşık 210 tip hücre bulunur ve her bir hücrenin yaşam döngüsü; doğum, farklılaşma, işlev görme ve ölüm evrelerinden oluşur. İnsanda yaklaşık 5×10^{11} kan hücresi programlı hücre ölümüyle her gün elenir (Karam ve ark 2009). Her bir hücre tipinin farklı bir yaşam süresi vardır. Örneğin nötrofiller dokuda 4 gün, eritrositler kanda 120 gün, beyin ve sinir hücreleri ise 50 ile 100 yıl arasında yaşarlar. Özellikle embriyonik gelişme sırasında hücre ölümünün önemli bir yeri vardır. Erişkin organizmalarda da bu süreç devam eder çünkü hücre çoğalmasıyla hücre ölümleri dengede kalmak zorundadır. Eğer böyle bir denge olmasaydı, dokular hücre çoğalmasıyla sürekli büyümek zorunda kalırdı (Green 2011).

Genel olarak canlı organizmalarda iki ana hücre ölüm biçimi vardır. Bunlardan biri nekroz (nekrotik ölüm) hücre yaralanmaları sonucu hücrenin zarar görerek şişip patlayarak ölmesi, diğeri ise apoptozistir. Hücreler apoptozis sırasında birçok uyarana ölüme giderler ancak bu ölüm programlı, kontrollü ve düzenli bir biçimde gerçekleşir. Bu süreç nekrotik hücre ölüm sürecinden farklıdır. Nekrotik

ölümde hücre kontrolsüz biçimde ölüme gider, hücre parçalanır, enflamasyon görülür. Apoptoziste ise hücre kendi ölümü sırasında aktif rol alır ve kendi ölümünün her aşamasına katkıda bulunur. Bu nedenle de apoptozis hücre intiharı olarak da bilinir. Nekrozda patlayan hücrenin içerikleri komşu hücrelere de zarar verirken, apoptoziste çevre hücreler zarar görmez ve ölen hücreden etkilenmezler (Alberts ve ark 2008). Nekroz ve apoptozis sırasında görülen değişimler Tablo 2.1'de gösterilmektedir.

Apoptozis için sinyal alındıktan sonra hücrede birçok biyokimyasal ve morfolojik değişim gözlenir. Hücre küçülmeye ve kondanse olmaya başlar, hücre iskeleti dağılır ve çekirdek zarı yer yer erir. Çekirdek DNA'sı parçalara ayrılır. Apoptozisin erken evrelerinde kaspaz (caspases) proteinleri salınmaya başlar ve aktive olan bu proteinler hücresel birçok substratın kesilmesine hem aracılık eder hem de neden olur. Kaspaz enzimleri ayrıca hücrenin diğer sindirim enzimlerini de harekete geçirirler. Bunun sonucunda hücre hem biyokimyasal hemde morfolojik (dış görünüm) olarak değişir (Fesik ve Shi 2001).

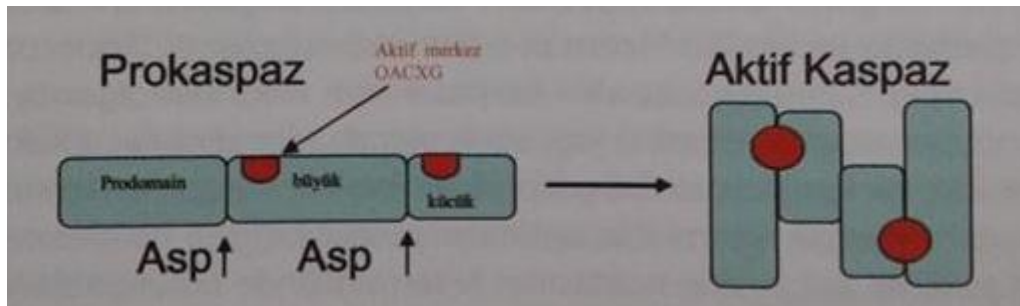
Apoptozis	Nekroz
Kromatin kondensasyonu	Çekirdeğin şişmesi
Hücre küçülmesi	Hücrenin büyümesi ve şişmesi
Organel ve hücre membranlarının bütünlüğü	Organellerin bütünlüğünün bozulması
Komşu hücreler tarafından çabuk yutulma (eliminasyon-fagositoz)	Hücrelerin parçalanması ve içeriklerinin çevreye dağılması
DNA fragmentasyonu	Enflamasyon

Tablo 2.1 Apoptoz ve Nekroz Arasındaki Farklılıklar (Fink ve Cookson 2005)

2.3.1. Kaspazlar (Hücresel Giyotinler)

Kaspaz enzimleri büyük bir proteaz enzim ailesidir. Aktif merkezlerinde sistein amino asidi taşırlar ve hedefledikleri proteinleri aspartik asit birimlerinden kestikleri için bu ismi almışlardır (C-Asp-ase; C:sistein amino asiti simgesi, Asp:aspartik asit, -ase:kesici enzim eki). Kaspazlar hücre içerisinde inaktif

zimojenler olarak sentezlenirler ve prokaspaz adını alırlar (Shalini ve ark. 2015). Bu inaktif prokaspaz enzimleri apoptozis sinyalinin alınmasıyla birlikte diğer kaspazlar tarafından aspartik asit birimlerinden kesilerek aktive edilirler. Aktive olan kaspaz diğer kaspazları keserek inaktif formdan aktif forma dönüştürür. Kaspazlar büyük ve küçük olmak üzere iki altbirimden oluşur ve N-terminallerinde pro-domainleri bulunur. Büyük ve küçük altbirimler birbirleriyle etkileşime girerek enzimin aktif merkezini oluştururlar. Enzimin pro-domaini çeşitlilik gösterir; CARD (caspase recruitment domain) ve DED (death effector domain) enzimin pro-domaininde bulunan özel motiflerdir ve protein-protein etkileşiminde görev alırlar (Jang ve ark. 2015). Enzim tam aktivitesini 2 kesme noktasından kesildikten sonra gösterir (Şekil 2.1). Evrimsel süreçte korunmuş olan sistein, enzimin aktif merkezinde bulunur ve bu amino asidi çevreleyen dizi de evrimsel süreçte korunmuştur. Kristalografi çalışmaları iki tane heterodimerin bir araya gelerek tetramer yapıda aktif kaspaz enzimini oluşturduğunu ortaya koymuştur. Böylece her enzim iki tane aktif merkeze sahip olmaktadır. Apoptozis sırasında kaspazlardan ilk görev alanlar (upstream caspases) başlatıcı (initiator) ya da öncü kaspazlardır ve bunların uzun pro-domainleri bulunur. Apoptotik yolağın sonraki aşamalarında görev alan kaspaz enzim zincirinin diğer üyeleri ise efektör (downstream caspases) kaspazlar olarak adlandırılırlar. Effektör kaspazlar başlatıcı bir kaspazla aktive edilirler. Amino asit kütüphanelerinin taranmasıyla her bir kaspaz enzimi için optimum kesme bölgesi belirlenmiş ve bu bölgenin aspartik asit kesme noktasının N-terminalinde bulunan dört amino asitlik bir motif olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu motifin görevlerinden biri kaspazın hedeflediği proteinin seçimini belirlemek, diğeri ise ilgili kaspazın peptid inhibitörlerle inaktive olmasına aracılık etmektir (Riedl ve Shi, 2004).



Şekil 2.1 Kaspaz Enzimlerinin Yapısı

Kaspaz 2, 8, ve 10 başlatıcı kaspazlardandır, 3, 6 ve 7 ise efektör kaspazlardır. Kaspazlar hücrelerde yüzden farklı proteini substrat olarak kullanırlar (Tablo 2.2).

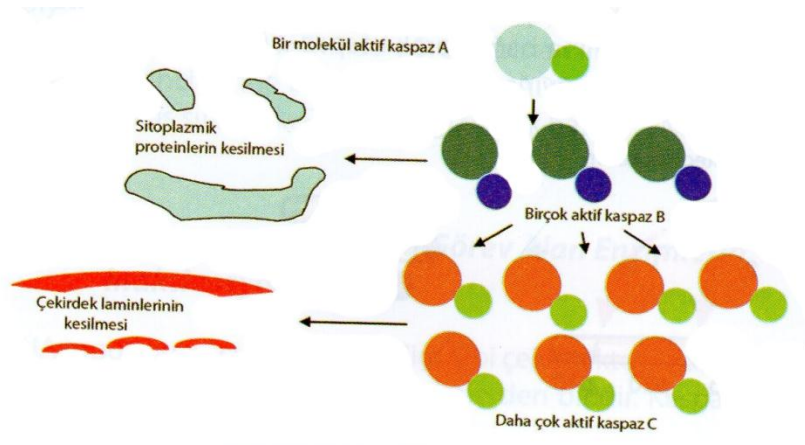
KASPAZ	ALTERNATİF ADI	SUBSTRATLARI	İŞLEVİ
KASPAZ-1	ICE	İTERLÖKİN-8, LAMİNLER	APOPTOZİS, ENFLAMASYON
KASPAZ-2	ICH-1,Nedd2	GOLGİN-160, LAMİNLER	APOPTOZİS
KASPAZ-3	CPP32, YAMA, Apopain	PARP, SREB, KASPAZ-6, KASPAZ-7, KASPAZ-9, DNA-PK,MDM2, B-CATENİN, LAMİNLER, NUMA, TOPOİZOMERAZ-1, FAK, CALPASTATİN, P21, ICAD	APOPTOZİS
KASPAZ-4	ICH-2, ICERELII	KASPAZ-1	APOPTOZİS, ENFLAMASYON
KASPAZ-5	ICERELIII, TY		APOPTOZİS, ENFLAMASYON
KASPAZ-6	MCH2		APOPTOZİS
KASPAZ-7	MCH3.ICE-LAP3,CMH-1	PARP, GAS2, SREB1, EMAP II, FAK, CALPASTATİN, P21	APOPTOZİS
KASPAZ-8	FLICE, MACH, MCHS	KASPAZ-3, KASPAZ-4, KASPAZ-6, KASPAZ-7, KASPAZ-9, KASPAZ-10, KASPAZ-13, PARP, BID	APOPTOZİS
KASPAZ-9	Apaf-3, ICE-LAP6, MCH6	KASPAZ-3, PRO-KASPAZ-9, KASPAZ-7, PARP	APOPTOZİS
KASPAZ-10	FLICE-2,MCH4	KASPAZ-3, KASPAZ-4, KASPAZ-6, KASPAZ-7, KASPAZ-9,	APOPTOZİS
KASPAZ-11	ICH-3, ICE-B		APOPTOZİS, ENFLAMASYON
KASPAZ-12	ICE-C		APOPTOZİS
KASPAZ-13	ERICE		ENFLAMASYON

Tablo 2.2 Kaspazların Hedef Proteinleri

2.3.2. Kaspaz Aktivasyonu

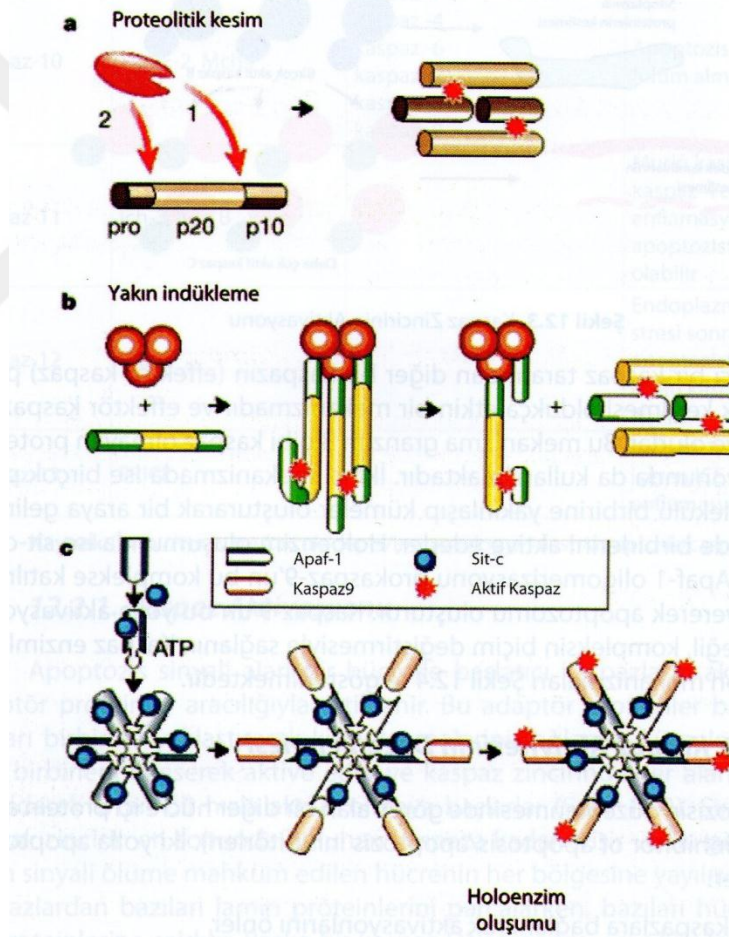
Apoptozis sinyali alan bir hücrede başlatıcı kaspazların aktivasyonları adaptör proteinler aracılığıyla tetiklenir. Bu adaptör proteinler başlatıcı kaspazları birbirine yaklaştırarak kümelenmelerini sağlar ve kümeleşen başlatıcılar birbirlerini keserek aktive eder ve kaspaz zincirinde yer alan diğer üyeler giderek artan bir hızla aktive olmaya başlarlar (Şekil 2.2). Sinyal gittikçe artarak zincirin en sonunda bulunan kaspaza kadar erişir ve bu giderek artan ölüm sinyali ölüme mahkûm edilen hücrenin her bölgesine yayılır. Aktive olan kaspazlardan bazıları lamin proteinlerini parçalarken, bazıları hücre içi iskelet proteinlerine saldırır. Başka bir kaspaz DNaz enzimi aracılığıyla onu inhibe eden proteine bağlanıp DNaz'ın serbest kalmasını sağlar ve serbest kalan DNaz çekirdek DNA'sını parçalara ayırır. Kaspaz zincirinde yer alan enzimler bir kez aktive olduktan sonra geriye dönüş yoktur ve bulundukları hücreyi ölüme sürüklerler. Dolayısıyla aktiviteleri hücrelerde sıkı biçimde kontrol altında tutulur. Kaspaz aktivasyonunda 3 temel mekanizma vardır (Hengartner 2000):

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



Şekil 2.2 Kaspaz Zincirinin Aktivasyonu

Başlatıcı bir kaspaz tarafından diğer bir kaspazın (effektör kaspaz) proteolitik olarak kesilmesi oldukça etkin bir mekanizmadır ve efektör kaspazlar bu yolla aktive olurlar. Bu mekanizma granzim B gibi kaspaz olmayan proteazların aktivasyonunda da kullanılmaktadır. İkinci mekanizmada ise birçok pro-kaspaz-8 molekülü birbirine yaklaşıp kümeler oluşturarak bir araya gelir ve çapraz biçimde birbirlerini aktive ederler. Holoenzim oluşumunda ise sit-c ve ATP-bağımlı Apaf-1 oligomerizasyonu prokaspaz-9'un bu komplekse katılmasına olanak vererek apoptozomu oluşturur (Hengartner 2000). Kaspaz-9'un bu yolla aktivasyonu proteolitik değil, kompleksin biçim değiştirmesiyle sağlanır (Cullen ve Martin 2009). Kaspaz enzimlerinin aktivasyon mekanizmaları Şekil 2.3' de gösterilmektedir.



Şekil 2.3 Kaspaz Aktivasyon Mekanizmaları

2.3.3. Kaspaz Aktivitesinin Düzenlenmesi

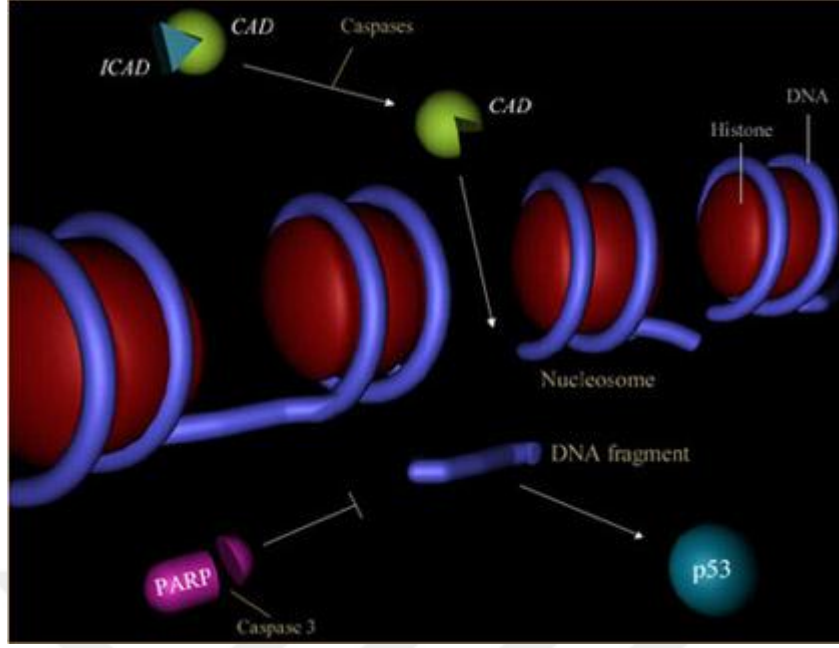
Apoptozisin düzenlenmesinde görev alan bir diğer hücre içi protein ailesi IAP'lardır (inhibitor of apoptosis/apoptosis inhibitörleri). İki yolla apoptozisi inhibe ederler (Breckenridge ve ark. 2003):

- a) Prokaspazlara bağlanarak aktivasyonlarını önler,
- b) Aktif kaspazlara bağlanarak aktivite göstermelerini engeller.

IAP proteinleri ilk kez böcek viruslarında tanımlanmıştır. Bu proteinler enfekte ettikleri böcek hücrelerinin kendi kendilerini öldürmelerini önleyerek virüsün replikasyonu için yeterli zamanı kazandırmaktadırlar. Bu proteinler hücrel homologları da dahil olan birkaç tane BIR domainine (Baculovirus IAP tekrarları) sahiptirler. Bu domainleri aracılığıyla doğrudan ya da dolaylı olarak kaspazları inhibe ettikleri düşünülmektedir. SMAC-DIABLO ve OMI-HTR2 mitokondrinin membranlar arası boşluğunda bulunan iki tane proteindir. Bu proteinler apoptozis sırasında salınırlar. Her iki protein de IAP bağlanma motifi taşır ve kaspazların IAP ile inhibisyonunu antagonize eder. SMAC dimer halindeyken XIAP'ın BIR2 domainine bağlanarak kaspaz-3'ü aktive ederken, monomer halde kaspaz-9'dan XIAP'ı ayırır (Lawen 2003; Breckenridge ve ark. 2003)

2.3.4 Apoptozis Sırasında Çekirdekte Görülen Değişimler

Apoptozisin en belirgin özelliği kromozomal DNA'nın nükleozomal birimlere parçalanmasıdır. Apoptotik hücrelerde çekirdek DNA'sının parçalanması kaspaz aktivasyonu sonrası birkaç yolla gerçekleşir (Yuan ve Horvitz 2004) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 Apoptoz Sırasında Çekirdekte Görülen Değişiklikler

2.3.4.1. DNA Onarımında Görevli Enzimlerin İnaktivasyonu

Poly (ADP-riboz) polimeraz enzimi (PARP) kaspazların ilk tanımlanan substratıdır. PARP, DNA onarımında görevli bir enzimdir. DNA hasarları sırasında kırık DNA zincirlerine bağlanarak poly (ADP-riboz) sentezini katalizler. Kaspaz-3 apoptozis sırasında PARP'a bağlanarak hasarlı DNA'nın onarılmasını önler.

2.3.4.2.Yapısal Çekirdek Proteinlerinin Yıkılması

Laminler çekirdek içi proteinlerdir ve kromatin ve çekirdek membranı arasında etkileşime aracılık ederek çekirdeğin şeklini belirlerler. Kaspaz-6 apoptotik hücrelerde laminleri parçalayarak kromatin kondensasyonuna ve çekirdeğin fragmentasyonuna neden olur.

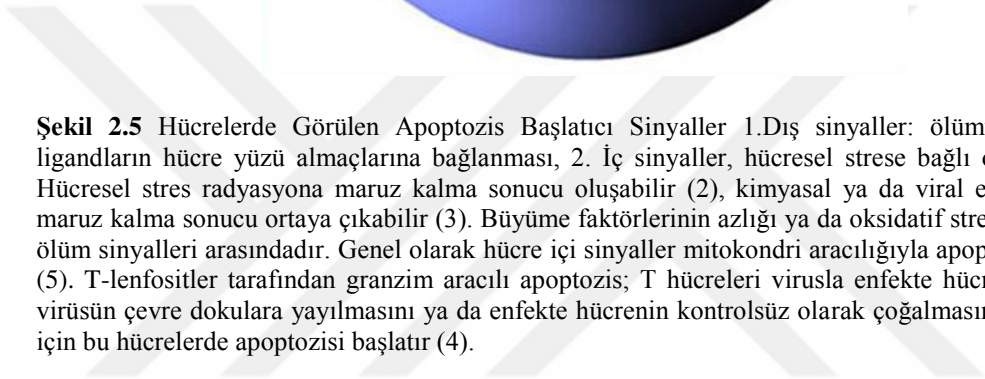
2.3.4.4. DNA Fragmentasyonu

Apoptotik hücrelerin DNA'sı, agaroz jel elektroforezinde merdiven basamağına benzer (ladder formasyonu) bir yapı biçiminde görülür. Bu fragmentasyon apoptotik hücrelerde CAD (caspase activated DNaz) enzimi tarafından DNA'nın nükleozom birimlerine kesilmesiyle sağlanır. CAD normal hücrelerde ICAD'a (inhibitor of CAD, DNA fragmentasyon faktör 45 olarak da bilinir) bağlı inaktif formda bulunur ancak apoptozis sinyali alan hücrelerde kaspazlar tarafından (kaspaz-3) kesilir ve CAD'i serbest bırakır ve bu enzim DNaz olduğu için çekirdek DNA'sının hızlı biçimde 50-200 baz çiftlik nükleozomal fragmanlara kesilmesini sağlar.

2.3.5. Memeli Hücrelerinde Apoptozis

2.3.5.1. Apoptozisin İndüksiyonu

Memeli hücrelerinde apoptozis birkaç yolla indüklenir. Hücrelerin bu uyarılara verdiği yanıt, gelen uyarının türüne göre değişir. Çünkü apoptozis sırasında birçok sinyal gönderilir ve bu sinyaller farklı hücrelerde farklı biçimde algılanırlar ve süreç de bu farklılıklara göre işler. Memeli hücrelerinde iki tane büyük apoptotik yolak belirlenmiştir: ölüm almacı (extrinsic) dış ve mitokondriyel (intrinsic) iç yolak (Şekil 2.5) (Fulda ve Debatin 2006).

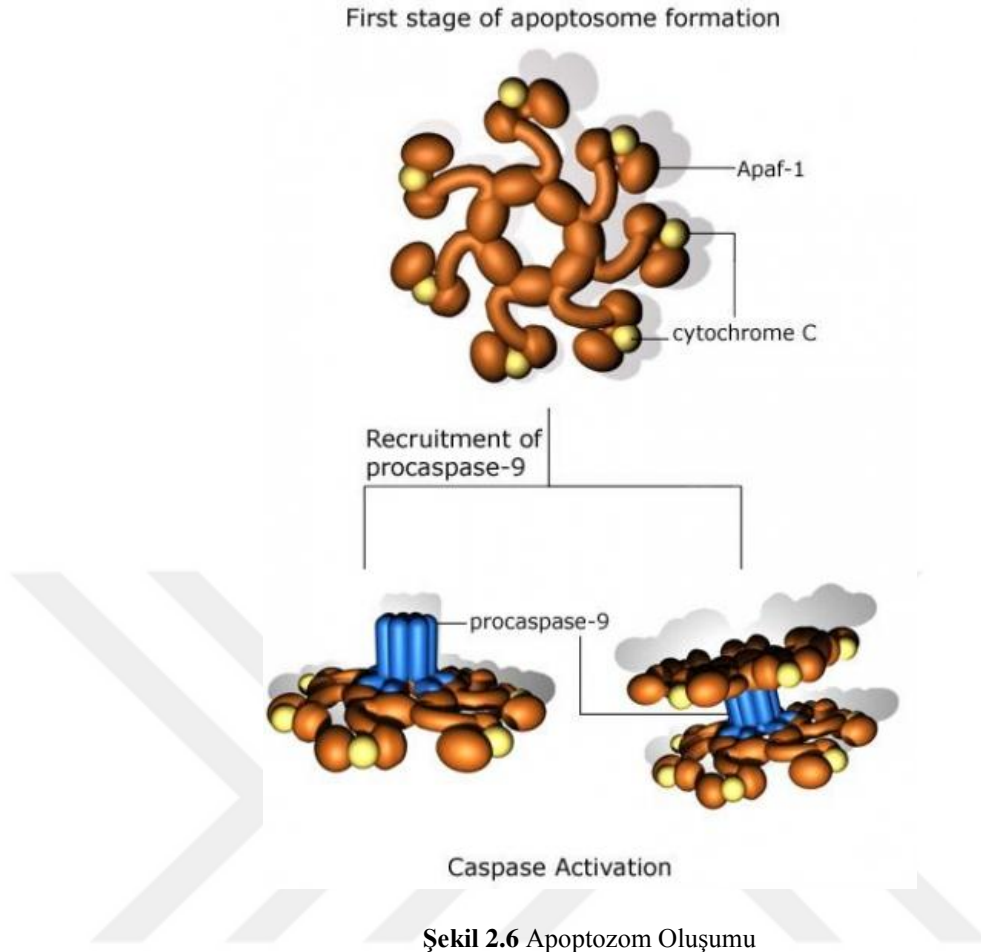


sağlar. Bu aktivasyon süreci apoptozom oluşumuyla sağlanır. Apoptozom çok proteinli bir yapıdır ve sit-c, Apaf-1, pro-kaspaz-9 ve ATP içerir.

2.3.5.2. Apaf-1 ve Apoptozom

Apoptotik proteaz aktivasyon faktörlerinin (Apaf) üç gruba ayrılır; Apaf-1 (CED-4'e homoloji gösteren adaptör/amplifikatör protein), Apaf-2 (sit-c) ve Apaf-3 (kaspaz-9). Başlatıcı kaspaz olan kaspaz-9 Apaf-1'e bağlandığında kendi kendisini aktive eder. Aktive olan kaspaz-9 efektör kaspaz-3'ü keserek aktivasyonuna yol açar. Kaspaz-9 ATP/dATP varlığında Apaf-1'de bulunan VVD40 domaini aracılığıyla sit-c'ye bağlanarak aktive olur. Apaf-1 ve kaspaz-9'da önemli bir domain bulunur ve CARD olarak adlandırılır. Apaf-1'in CARD domaini iki tane WD40 domaini ile bir arada tutulur. Bu VVD40 domainleri aracılığıyla Apaf-1 sit-c'ye bağlanır. Bu bağlanma VVD40 domainlerine bağlı olarak bulunan CARD domaininin yerini kaybetmesine neden olur. ATP/dATP'nin Apaf-1'e bağlanmasıyla molekül şekil değişimine uğrar ve direksiyon ya da tekerleğe benzer bir heptamer meydana gelir. Bu yapıda yedişer molekül Apaf-1, sit-c ve ATP bulunur. Apoptozom olarak adlandırılan bu yapı, komplekse yedi molekül prokaspaz-9'un katılmasına olanak tanır (Cain ve ark. 2002; Bratton ve Salvesen 2010).

Kaspazın nasıl aktive olduğu tam olarak bilinmesede iki olasılık ileri sürülmektedir. 1) Apaf-1, sit-c ve prokaspaz-9 üçü birden sitoplazmik prokaspaz-9 komplekse katılır katılmaz harekete geçerek aktivasyonu gerçekleştirir, 2) iki apoptozom birbiriyle etkileşime girer ve başka bir apoptozomda yer alan prokaspaz-9'u aktive eder. CARD ve CED-4 homoloji domainleri direksiyonun göbek kısmını oluştururken dışa doğru uzanan çıkıntılar WD40 domainlerini içerir. Prokaspaz-9 gövdeye bağlanır (Cain ve ark. 2002; Bratton ve Salvesen 2010) (Şekil 2.6).



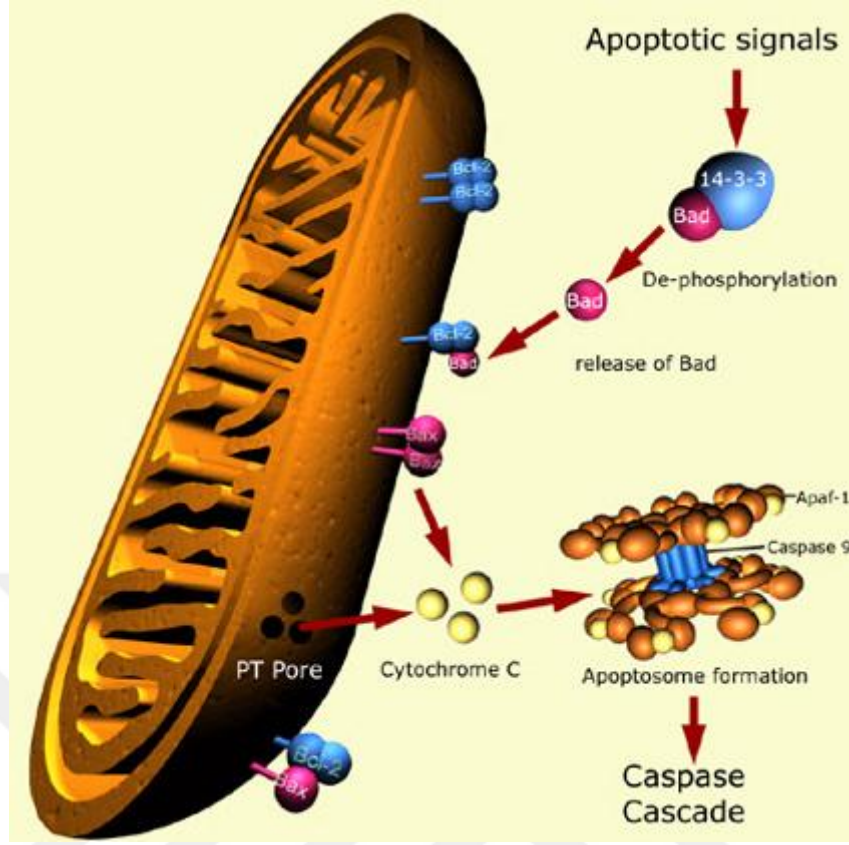
2.3.5.3. Mitokondrinin Apoptozisteki Rolü

Mitokondri hücre ölümünün kontrol edilmesinde önemli bir role sahiptir ve hücrenin iki ana ölüm yolağından biri (iç yolak) bu organelde gerçekleşir. Bir sonraki başlıkta anlatılacağı gibi dış mitokondri membranında bulunan antiapoptotik Bcl-2 ailesi proteinleri (Bcl-2 ve Bcl-XL) hücrenin yaşamasını teşvik ederken, bu protein grubunun proapoptotik üyeleri olan Bad ve Bax'la mitokondri membranında doğrudan etkileşerek ya da antiapoptotik üyelere bağlanarak heterodimerik molekülleri oluştururlar ve hücreyi ölüme sürüklerler. Mitokondriyel apoptozis yolağı hücrenin dışından gelen uyarılara ya da hücre içi DNA hasarları sonrası oluşan uyarılara karşı hücreler tarafından kullanılan en yaygın yolaktır. Hücrenin bu uyarılara farklı yolları kullanarak verdiği yanıtlar genellikle Bcl-2 ailesinin proapoptotik üyelerinin aktivasyonu ile mitokondride birleşir. Her zaman olmasa da genellikle hücre içi membranlara tutunarak hücredeki varlığını sürdüren Bcl-2'nin

aksine, Bad, Bax, Bim, Bid'i de kapsayan üyeler sitoplazma ve organeller arasında mekik dokurlar. Bu proteinlerin sitoplazmik formları inaktif ama aynı zamanda savaşa hazır protein havuzunu oluştururlar. Proapoptotik sinyaller bu proteinleri hücrenin ölüm-kalım savaşının yer alacağı mitokondriye yönlendirirler (Ardjomande ve Martinou 2005).

Proapoptotik üyelerin aktivasyonu proteoliz ya da defosforilasyon mekanizmalarıyla gerçekleşir. Pro- ve antiapoptotik aile üyeleri mitokondrinin yüzeyinde karşılaşır ve burada henüz aydınlatılamamış bir mekanizmayla sit-c salınımının kontrolü için yarışmaya girerler. Eğer proapoptotik moleküller baskın gelir ve kazanırsa mitokondriden bir dizi molekül salınır. Bunlardan en önemlisi sit-c'dir. Sit-c, Apaf-1 ve prokaspaz-9 ile birleşir ve apoptozomu oluşturur ve böylelikle prokaspaz-9 aktivasyonu gerçekleşir. Ölüm almacı yolağı (dış yolak) ile mitokondriyel yolak, kaspaz-3 aktivasyonu düzeyinde birleşir. Kaspaz-3'ün aktivasyonu ve aktivitesi IAP proteinleri tarafından inhibe edilir. Mitokondriden salınan Smac/DIABLO proteinleri de IAP inhibitörleridir. Kaspaz-3 yolağının altında apoptotik program dallanmaya başlar ve bu dallanmanın sonucunda sinyal tüm hücreye iletilir ve hücre sonunda ortadan kaldırılır (Burlacu 2003).

Ölüm almacı ve mitokondriyel apoptozis yolları arasındaki çapraz etkileşim ve birleşmeler proapoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinden Bid tarafından sağlanır. Bid'in kaspaz-8 tarafından kesilmesi ölüm aktivitesini artırır ve proteinin mitokondriye girmesine olanak verir. Bid mitokondriden sit-c çıkışını gerçekleştirir. Birçok durumda bu iki yolak arasındaki etkileşim minimum düzeydedir ve her bir yolak bağımsız bir biçimde çalışır. Mitokondrinin apoptozis sırasında üstlendiği roller Şekil 2.7'de gösterilmiştir.



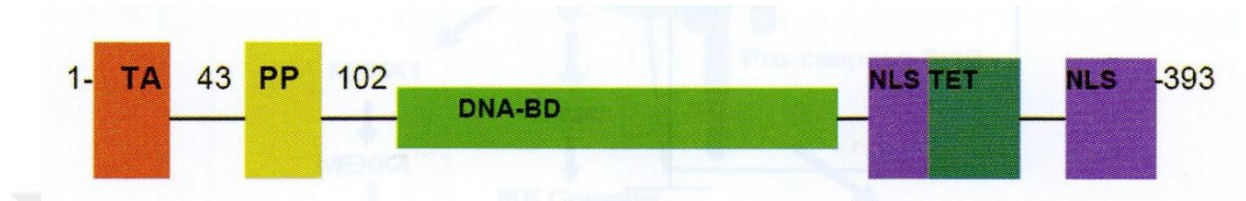
Şekil 2.7 Mitokondrinin Apoptoziste Aldığı Roller. Ölüm sinyaline yanıt olarak mitokondriden sit-c salınır. Sit-c daha sonra Apaf-1, prokaspaz-9 ve ATP ile etkileşerek apoptozomu meydana getirir. Apoptozom ise kaspaz-9 aktivasyonuna ve dolayısıyla kaspaz zincirinde kaspaz-9'un altında yer alan diğer kaspazların aktive olmasını neden olur. Bax dış mitokondri membranında por oluşturarak membran potansiyelinin kaybolmasını sağlayarak sit-c ile AİF'in (apoptosis inducing factor) bu pordan salınmasına aracılık eder. Bcl-2 ve Bcl-XL por oluşumunu önlemektedir. Bax ya da Bad'in Bcl-2 ya da Bcl-XL ile heterodimer oluşturması bu proteinlerin koruyucu etkilerini ortadan kaldırır. Bax ve Bad proteinlerinin ayrıca geniş çaplı por oluşturdukları ve bu pordan sit-c'nin salındığı ve böylece apoptozisin başlatıldığı ileri sürülmektedir.

2.3.6. p53 ve Apoptozis

2.3.6.1. p53 Yapısı

p53 ilk olarak 1979 yılında onkogen olarak tanımlanmış, ancak daha sonra yapılan araştırmalarla en önemli tümör baskılayıcı genlerden biri olduğu belirlenmiştir. p53 kromozom 17'de yerleşiktir ve 53 kDa'luk bir protein kodlar. p53 proteini çeşitli genlerin ifade düzeylerini kontrol eden bir transkripsiyon faktörüdür. Hücre döngüsünün normal biçimde seyri p53 tarafından sağlanır. Eğer hücrede normal olmayan bir durum söz konusu ise hücre döngüsü p53 tarafından duraksatılır.

p53'ün önemli görevlerinden biri de hücrel streste apoptozisi tetiklemesidir. Normal gelişme sırasında gerçekleşen apoptozis-te görev almayan p53 tümör baskılayıcı geni çeşitli kanserlerde mutasyona uğramaktadır. Tüm kanserlerin yaklaşık %50'sinde p53 mutasyonu görülür (Baptiste ve Prives 2004). Çeşitli biyolojik olaylarda anahtar rol oynayan bu proteinin yapısı Şekil 2.8 'de ve apoptozis sırasında transkripsiyonunu düzenlediği genlerin listesi Tablo 2.3'te görülmektedir.



Şekil 2.8 İnsan p53 Geninin Yapısı. TA: Transaktivasyon domaini, PP: Prolin zengin regülör domain, DNA-BD: DNA bağlanan domain, NLS: Nükleer lokalizasyon sinyali, TET: Tetramerizasyon domaini.

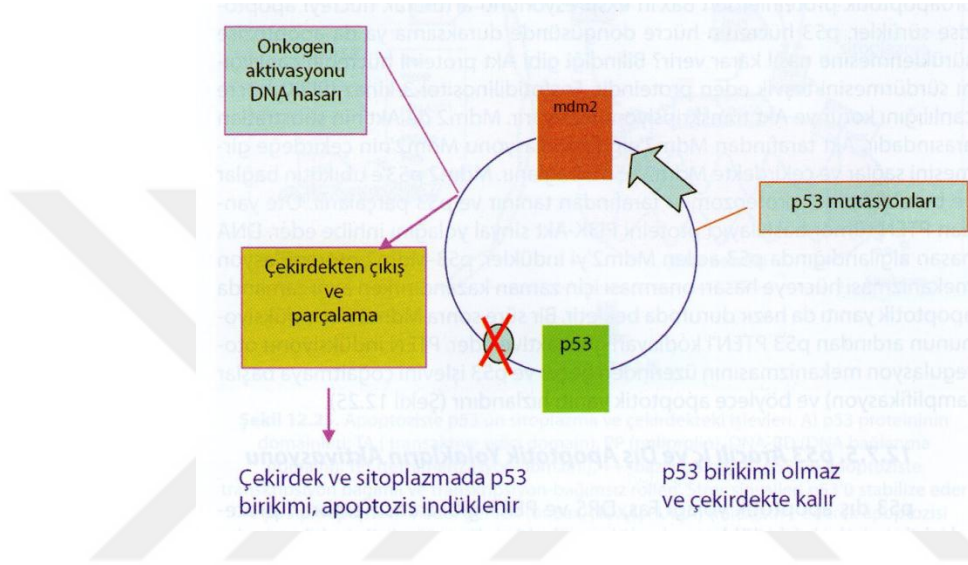
p53 hedef genleri • Bcl-2 Proteinleri Bax, Puma, Noxa, Bid • Ölüm almaçları DR5, CD95, Fas • Adaptörler Apaf-1 • Diğerleri p53AIP1, p53DINP1, Peg3, PERP, PIG1
--

Tablo 2.3 Apoptozis Sırasında p53'ün Hedef Genleri

2.3.6.2. p53 Düzenlenmesi

Tümör baskılayıcı gen p53, DNA hasarı ve onkogenik transformasyon sonucu aktive olur. Strese girmeyen, hasara uğramamış hücrelerde p53 konsantrasyonu belirlenemeyecek kadar azdır ve sitoplazmada tutularak çekirdeğe girişi önlenir. Transaktivasyon domaini inaktif durumdadır (Haupt ve ark 2003).

Hücre içi düzeyi mdm2 proteininin varlığına bağlıdır ve p53 sıkı biçimde Mdm2 tarafından kontrol altında tutulur. p53 Mdm2 ekspresyonunu da indükleyerek kendi kendisinin inhibisyonunu sağlar. Mdm2 p53'ün transaktivasyon domainine bağlanır ve transkripsiyonu aktive etmesini önler (Schuler ve Green 2005) (Şekil 2.9).



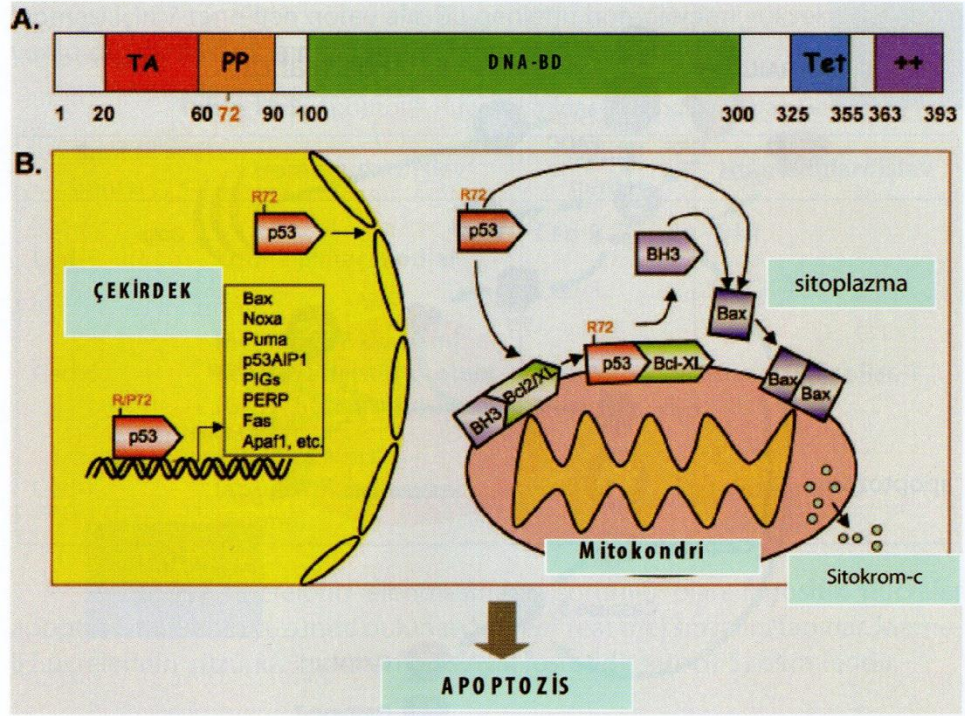
Şekil 2.9 p53'ün Transkripsiyon Bağımlı Etkileri. Onkogen aktivasyonu ve DNA hasarını takiben p53 birikmeye başlar ve apoptozis indüklenir. p53 mutasyona uğradığında DNA hasarına yanıt veremez.

2.3.6.3. p53 Aktivasyonu

DNA hasarları dolaylı olarak p53'ün stabilizasyonuna ve hücrede birikmesine neden olur. ARF (ya da p19) proteini mdm2'ye bağlanarak p53'ü serbest bırakır. Hipoksia, mikrotübül ya da büyüme faktörü azlığı da p53 aktivasyonunu tetikler. Belirli serin/treonin birimlerinden proteinin fosforile edilmesi de aktivasyona neden olur. PARP, DNA-PK, ATM (Ataksiya Telangiektasia Mutant Protein), ATR ve Chk2 p53 aktivasyonunda rol alan proteinlerdir. p53 bir kez aktive olduktan sonra yarı ömrü iki katına çıkar ve aktivitesi 100 kat artar (Knittel ve ark 2015) .

2.3.6.4. p53 İşlevleri

p53 hücre döngüsündeki kontrol noktalarını, DNA hasarı ve onarımı ve apoptoziste rol oynayan genlerin aktivasyonunu düzenler. DNA hasarlarının onarılması için çeşitli genleri aktive ederek hücre döngüsünü G1 evresinde durdurur. Eğer DNA hasarı büyük ve hücrenin onaramayacağı bir hasarsa, p53 proapoptotik proteinlerden Bax'ın ekspresyonunu arttırarak hücreyi apoptozise sürükler. p53 hücrenin hücre döngüsünde duraksama ya da apoptozise sürüklenmesine nasıl karar verir? Bilindiği gibi Akt proteini hücrenin canlılığını sürdürmesini teşvik eden proteindir. Fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) hücre canlılığını korur ve Akt transkripsiyonunu uyarır. Mdm2 de Akt'nin substratları arasındadır. Akt tarafından Mdm2'nin fosforilasyonu Mdm2'nin çekirdeğe girmesini sağlar ve çekirdekte Mdm2 p53'e bağlanır. Mdm2 p53'e ubiquitin bağlar ve bu ubiquitinler proteozomlar tarafından tanınır ve p53 parçalanır. Öte yandan PTEN tümör baskılayıcı proteini PI3K-Akt sinyal yolağını inhibe eder. DNA hasarı algılandığında p53 acilen Mdm2'yi indükler. p53-Mdm2 otoregülasyon mekanizması hücreye hasarı onarması için zaman kazandırırken aynı zamanda apoptotik yanıtı da hazır durumda bekletir. Bir süre sonra Mdm2'nin indüksiyonunun ardından p53 PTEN'i kodlayan geni aktive eder. PTEN indüksiyonu otoregülasyon mekanizmasının üzerinden geçer ve p53 işlevini çoğaltmaya başlar (amplifikasyon) ve böylece apoptotik yanıtı hızlandırır (Baptiste ve Privesp 2004) (Şekil 2.10).



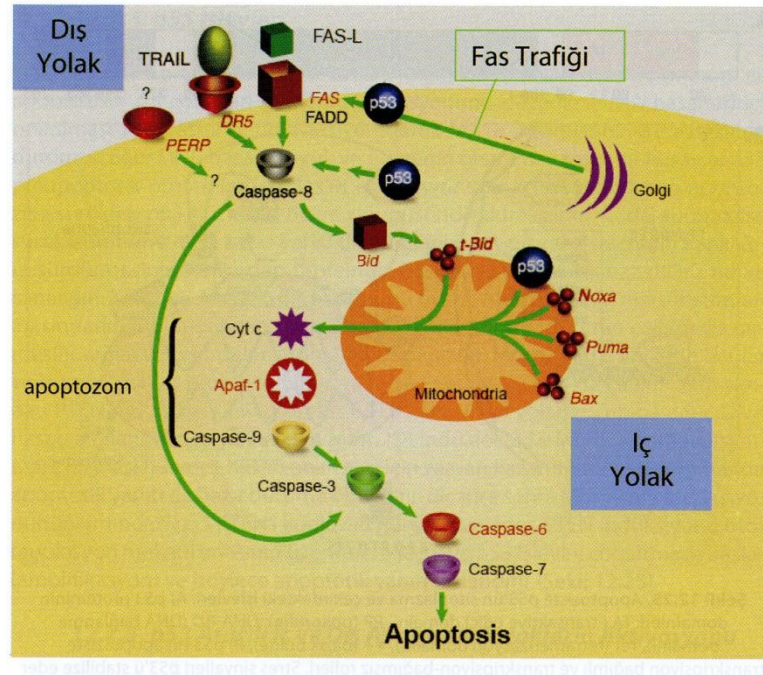
Şekil 2.10 Apoptoziste p53'ün Sitoplazma ve Çekirdekteki İşlevleri. A) p53 proteininin domainleri: TA (transaktif edici domain), PP (poliprolin), DNA-BD (DNA bağlanma domaini), Tet (tetramerizasyon domaini), ++ (bazik bölge), B) p53'ün apoptoziste transkripsiyon bağımlı ve transkripsiyon-bağımsız rolleri. Stres sinyalleri p53'ü stabilize eder ve p53 proapoptotik hedef genleri (ör:Bax, NOXA, PUMA) transaktif ederek apoptozisi başlatır. Sitoplazmik p53 ya direkt Bax oligomerizasyonunu indükler ya da dolaylı olarak mitokondride Bcl-2/Bcl-XL proteinlerine bağlı proapoptotik BH3-only proteinleri serbest bırakır. Serbest kalan BH3-only proteinler ise daha sonra Bax oligomerizasyonunu sağlar, sit-c salınımını aktive ederek apoptozise yol açar (Baptiste ve Privesp 2004).

2.3.6.5. p53 Aracılı İç ve Dış Apoptotik Yolakların Aktivasyonu

p53 dış apoptotik yolağı Fas, DR5 ve PERP gibi transmembran proteinlerinin genlerini indükleyerek aktive ederken, iç apoptotik yolda proapoptotik ve antiapoptotik genleri sırasıyla aktive/inhibe eder (Şekil 2.11). İç yolda daha önce de açıklandığı gibi apoptozis sinyali hücreye ulaştığında Bcl-2 ailesi proapoptotik proteinler sitoplazmadan mitokondri dış membranına yerleşirler ve mitokondriden sitoplazmaya sit-c salınmasına neden olurlar. Sit-c daha sonra Apaf-1 ve prokaspaz-9'a bağlanarak kaspaz-9'un proteolitik aktivasyonunu sağlar ve kaspaz-9'da kaspaz zincirinde bulunan diğer kaspazları aktive eder (Haupt ve ark. 2003).

Apoptozisi indükleyen ve apoptozisi baskılayan genlerin ekspresyon düzeyleri arasındaki denge yabancı tip (wild-type) p53 tarafından apoptozisi indükleyen genler lehine değiştirilir. p53 apoptozisi bu yolla indüklemektedir. Hücrede DNA hasarı hücrenin bu hasarı onarma kapasitesini aştığında p53 hücrenin apoptozise girmesine rehberlik eder. Hasarlı hücrede bir yandan Bax geninin transkripsiyonunu artırırken bir yandan da Bid, PUMA, NOXA ve Apaf-1 'in ifade edilmelerini indükler (Haupt ve ark. 2003).

1999'dan günümüze kadar yapılan çalışmaların sonuçları p53'ün aynı zamanda transkripsiyondan bağımsız yollarda da görev aldığını ve etkisini gösterdiğini ortaya koymuştur. p53'ün mitokondri düzeyinde direkt apoptotik etkisinin olduğu açıklanmıştır. p53 bu etkisini sitoplazmada doğrudan Bcl-XL'e bağlanarak Bax ve Bid proteinlerinin salınmasını sağlayarak gerçekleştirir. p53'ün mitokondride birikmesi hızlı gerçekleşen bir olaydır ve apoptozis başlar başlamaz p53 miktarında artmaya başlar. p53'ün mitokondrideki apoptotik eylemi transkripsiyon-bağımlı apoptotik yolağı hızlandırmasıyla gerçekleşmektedir (Haupt ve ark. 2003).



Şekil 2.11 Apoptoziste p53 Ağı. İç ve dış yolak Bid aracılığıyla birleştirilir. p53 hedef genleri kırmızı yazılmıştır (Haupt ve ark. 2003)

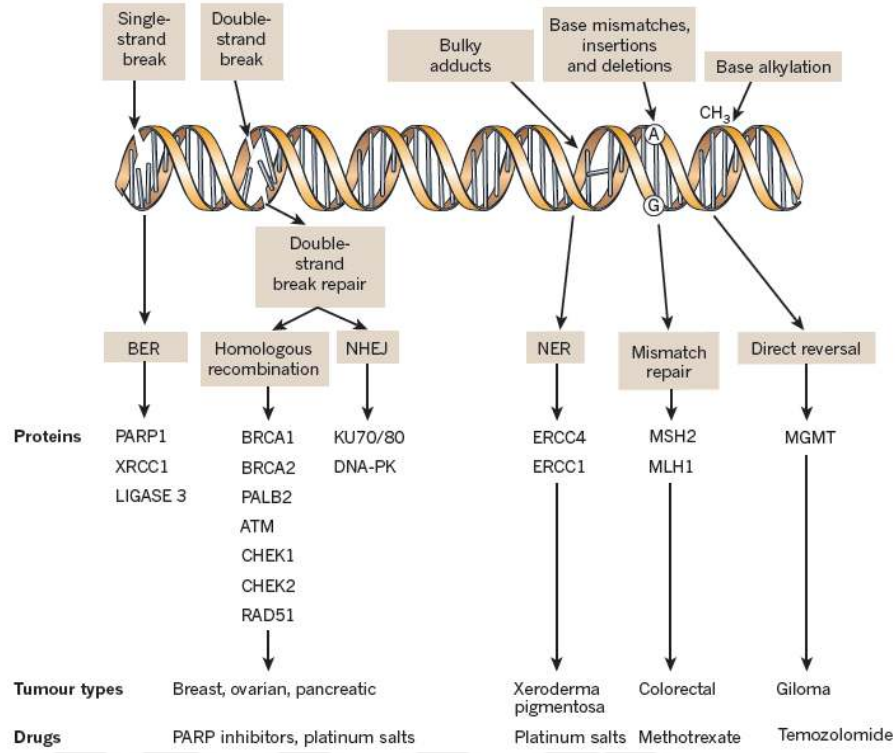
2.3.6.6. p53-Aracılı Lizozomal-Mitokondriyel Apoptozis Yolağı

Hücrede lizozomların zarar görmesi p53 aracılı apoptoziste erken meydana gelen olaylardan biridir. p53 ile indüklenen apoptoziste lizozom membranının yırtılmasını mitokondrinin hasarı izler. İnterloklin-6 (IL-6) etkin biçimde lizozom ve mitokondrilerde p53 tarafından indüklenen değişimleri inhibe etmektedir. Diğer apoptozis inhibitörleri sadece mitokondrideki değişimleri inhibe eder. Ayrıca lizozomlardan salınan enzimler tarafından kaspazların direkt olarak aktive edilebileceği öngörülmektedir (Li ve ark. 2012).

2.4. DNA Hasarı

Bir canlıya ait tüm genetik bilgiyi taşıyan DNA molekülü doğal olarak veya çevresel faktörlerin etkisiyle sürekli hasara maruz kalmaktadır. İnsan hücrelerinde metabolik aktiviteler ve çevresel faktörler (UV ışığı gibi) sonucu günde 1 milyon hücrenin zarar görmesi olasıdır. Bu etkenler, DNA'nın yapısını ve dahası diğer nesillere aktarılan genetik bilgiyi değiştirebilirler. Genetik materyalin moleküler bütünlüğünde ekzojen veya endojen faktörlerin etkisiyle meydana gelen tüm bu değişiklikler ise "DNA hasarı" olarak adlandırılmaktadır (Dinant ve ark. 2008).

DNA hasarı ve onarım mekanizmalarındaki bozukluklar ile kanser, yaşlanma ve birçok genetik hastalık arasında nedensel bir ilişkinin varlığı birçok deneysel ve epidemiyolojik veri ile gösterilmiştir (Şekil 2.12).



Şekil 2.12 Her Bir DNA Hasarı Yanıt Mekanizmasında Rol Oynayan Anahtar Proteinler. DNA hasarı yanıt yolağındaki kusurlar nedeniyle karakterize edilen tümör tipleri ve bu kusurları hedefleyen ilaçların şematik gösterimi. BER: Baz eksizyon tamiri, NER: nükleotid eksizyon tamiri, NHEJ: Homolog olmayan uç birleştirme tamiri (Lord and Ashworth 2012).

2.4.1. DNA Moleküllerindeki Değişmeler

DNA'nın yapısını değiştirebilmek için üç farklı mekanizma vardır: (1) replikasyon esnasında baz substitüsyonları (2) bazların veya N-glikosidik bağın kendi kimyasal kararsızlıklarından kaynaklanan baz değişimleri ve (3) diğer kimyasalların ve çevresel ajanların faaliyeti sonucu oluşan değişmeler. Bu değişmeler aşağıdaki bozuklukları oluştururlar (Beldüz ve ark. 2010):

Diğer zincirdeki karşılığı ile hidrojen bağı yapamayan hatalı bir baz: Bu çeşit, bir replikasyon hatası olup, hatanın editing fonksiyonunca düzeltilmemiş olması sonucu ortaya çıkar; bu çeşit bir hatanın meydana gelişi nadirdir. Daha genel bir hata çeşidi, sitozinin kendiliğinden deaminasyonu sonucu urasile dönüşmesi ve müteakip replikasyonda urasilin timine dönüştürülmesi sonucu ortaya çıkar. Sitozin -> Urasil -> Timin transisyonundan daha az görülen bir hata çeşidi de adeninin

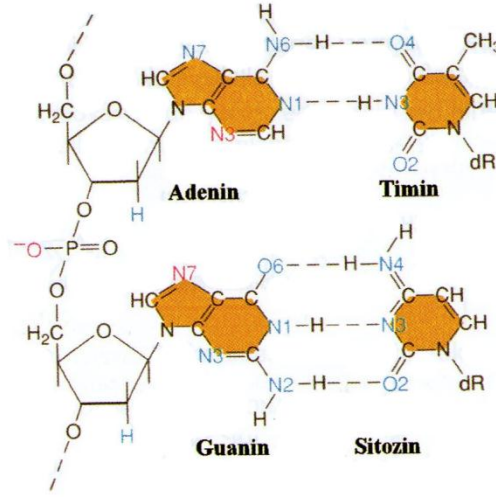
deaminasyonu ile hipoksantin oluşumudur. Hipoksantin timin yerine sitozin ile baz çifti yapar. Bu hatayı hipoksantin N-glikosilaz düzeltir.

Eksik bazlar: Çok az miktarlarda da olsa, pürin nükleotidinin N-glikozidik bağı fizyolojik sıcaklıklarda kolayca kırılır. Bu işleme depurinasyon denir. Çünkü DNA'dan pürin kaybolmuştur. Depurinasyonun hızı, pH 7 ve 37 °C' de 1 pürin/300 pürin/gün'dür. Bu, bir memeli hücresinde günde 10^4 kadar pürin kaybı demektir, her bir bakteri kuşağında ise 0.25 pürin, bir günde kayboluyor demektir. Bu miktar, pH düşerken veya artarken artar. Bir zamanlar kimyasal savaşta kullanılmış, şu anda kanser tedavisinde kullanılan alkile edici ajanlar denen zararlı kimyasallar, bilhassa guanin ile reaksiyona girerek pürin halkasının N7'sine alkil grubu ilave ederler. Bu alkillerine N- glikosidik bağını zayıflatır ve depurinasyon hızını büyük miktarda arttırır. N- glikosidik bağının kırılması, N- glikosilaz tamir sistemlerinde ilk adım olduğundan, doğru yapının tekrar kazanılması, apuridik asit (AP) nükleaz yolu ile olur.

Farklı bazlar: Bazlar, çeşitli fiziksel ve kimyasal ajanların etkisiyle, asıllarından çok farklı bileşiklere çevrilebilirler. Örneğin: doğal olarak meydana gelen radyo izotoplar veya X- ışınlarından yayılan beta partikülleri gibi, iyonize edici radyasyon pürin ve pirimidin halkalarını kırabilir ve çeşitli tip kimyasal değişikliklere sebep olabilir.

Çevremizdeki birçok doğal ya da sentetik bileşik elektrofiliktir, yani negatif yüke karşı ilgileri vardır. Elektrofilik bileşikler, başka moleküllerin negatif yük merkezlerini arar ve onlara bağlanırlar. Ayrıca metabolizma sırasında birçok bileşik de elektrofilik bileşiklere çevrilir. Vücuttaki en önemli negatif yük merkezli bileşik DNA'dır. Her bir fosfatın tam bir negatif yükü vardır. Ayrıca bazlar üzerinde kısmi negatif yüklü merkezler vardır. Elektrofiller bu negatif yükleri bulduklarında onlara saldırır ve genellikle alkil grupları denilen karbon içeren gruplar ilave ederler. Bu olaya alkilasyon denir.

Şekil 2.13'de DNA'daki yük merkezleri gösterilmektedir. DNA'da fosfodiester bağından başka, alkilleyici ajanların en çoktercih ettikleri merkezler, Guanin'in N7 ve Adenin'in N3 gruplarıdır. DNA'da bunlardan başka da, alkilleyici ajanların alkile edebildiği merkezler vardır fakat şekilde gösterilmemiştir.

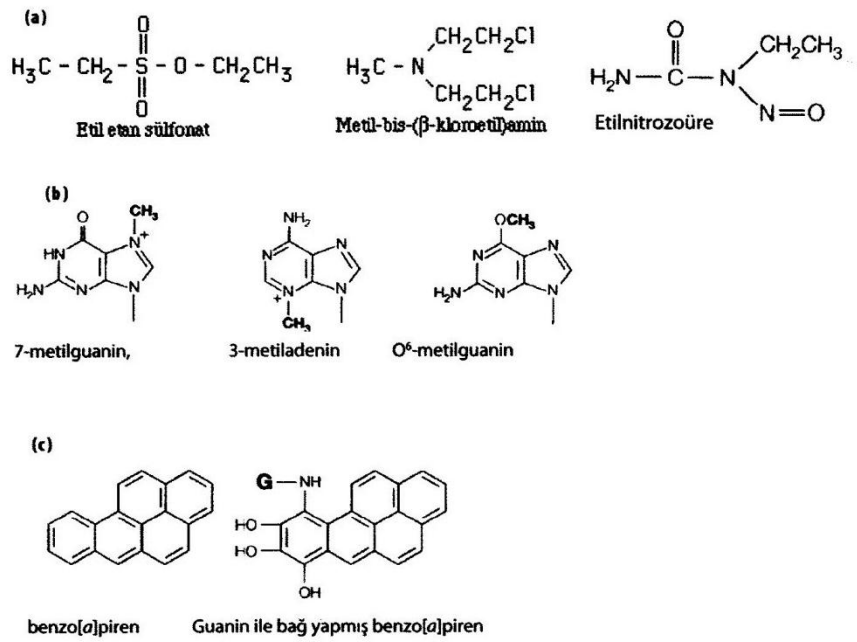


Şekil 2.13 DNA Bazları. DNA'nın elektrofillerce en çok tercih edilen elektronca zengin merkezleri N7 guanin ve N3 adenindir. Diğer merkezler daha az tercih edilirler (Weaver 2003).

Guanin'in N7 grubunun alkilenmesi baz eşleşmesinde değişikliğe sebep olmadığından zararsızdır fakat Adenin'in N3 grubunun alkilenmesi (3 mA), adeninin hiçbir baz ile uygun olarak eşleşmesine müsaade etmediğinden, ciddi sorunlara yol açar, bu yüzden 3 mA'ya "kodlamayan baz" (noncoding baz) adı verilir. DNA polimeraz, 3 mA ile yapılan hiçbir baz eşleşmesini doğru kabul etmez bu yüzden replikasyon bu noktada askıda kalır. Böyle bir engelleme sitotoksik olur, hücreyi öldürür.

Baz eşleşmesinde rol alan bütün azot ve oksijen atomları, alkilenmeye maruz kalır. Bu atomlar alkile olursa, baz eşleşmesi bozulur ve mutasyon meydana gelir. En yaygın alkilleyici ajanlara örnek olarak, metilmetan sülfonat (MMS) ve etilnitrozüre (ENU) verilebilir (Şekil 2.14a). Alkilleyici ajanlar tarafından metillenmiş bazlara tipik örnekler: 7-metilguanin, 3-metiladenin, 3-metilguanin ve O⁶-metilguanin'dir (Şekil 2.14b). Etilmetansülfonat (EMS) ile Guanin'in 06 pozisyonunun alkilenmesi,

bazın tautomerik formunu değiştirerek C yerine T ile baz eşleşmesi yapmasına ve neticede, G:C baz çifti A:T'ye dönüşerek mutasyona sebep olur. Ayrıca alkilleyicilerin DNA'da sebep olduğu yapısal değişimler, replikasyon ve transkripsiyon sırasında DNA zincirlerinin ayrılmasını engelleyebileceklerinden, potansiyel öldürücüdürler. Bazıları da dolaylı olarak mutasyona sebep olur. Mesela O⁶-metilguanin, replikasyon sırasında timin ile baz eşleşmesi yapabilir. Çevremizdeki çoğu kanser ajanları (kanserojenler), elektrofildir ve DNA'yı alkilleyerek mutasyona ve netice olarak kansere sebep olurlar.



Şekil 2.14 Kanserojen Ajanlar. a) Alkilleyici ajanlar, b) Alkillenmiş bazlar, c) Diol epoksinin guanin ile kovalent bağ yapmış hali.

Karşı baz ile bağ yapılmasına engel olan maddelerden biri de kömür katranı olan benzo[a]piren'dir. Bu madde karsinojendir. Bu madde karaciğerde P-450 tarafından metabolize edilir. Bu maddenin metaboliklerinden biri (bir diol epoksit) guanine kovalent olarak bağlanabilir (Şekil 2.14c). Başka aromatik alkilleyici ajanların birçoğu DNA ile kovalent bağlar yapabilir. Bu karaciğer karsinojeni olan aflatoksin B₁'de DNA ile kovalent bağ yapar. Bütün alkilasyonlar, baz eşleşmesini değiştirmez, dolayısı ile mutajenik değildirler. Bazı alkilasyonlar, DNA replikasyonunun durmasına ve eğer hücre bu hasarı tamir etmeden DNA'sını replike

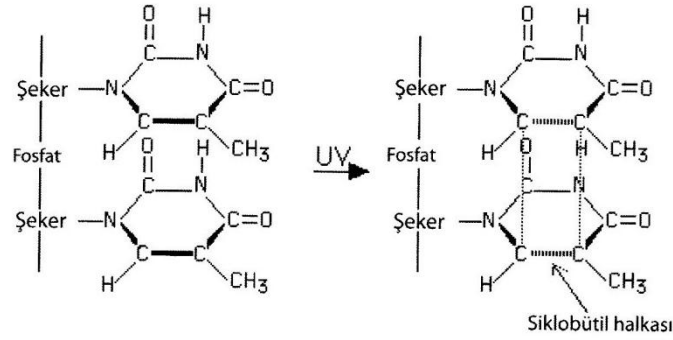
ederse, mutasyona sebep olur. Baz çiftleşmesini bozan eşleşmelere sebep olan alkilasyonlar ise, mutajeniktir.

Çoğu metabolik reaksiyonlarda üretilen serbest radikaller de, birkaç önemli değişmeye sebep olabilirler. Bütün aerobik hücrelerde normal şartlarda, süperoksit, hidrojen peroksit ve en önemlisi hidroksil radikalleri (-OH) gibi reaktif oksijenin varlığı sebebi ile oksidatif hasar meydana gelebilir. Hidroksil radikalleri DNA ile birkaç noktada bağ yaparak özellikleri değişmiş oksidatif ürünleri, mesela 8-oksoguanin, 2-oksoadenin ve 5-hidroksimetilurasil oluşturur. Bunların miktarı, radyasyonun iyonize edici etkisi sebebi ile suyun hidrolizi ile oluşan hidroksil radikallerince arttırılabilir (Şekil 2.15).

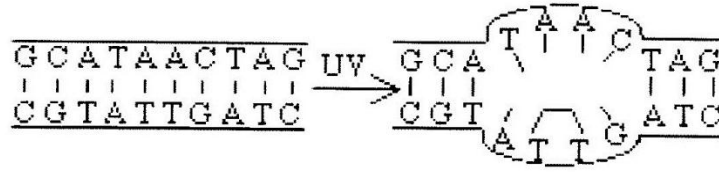


Şekil 2.15 Reaktif Oksijen Türleri Tarafından DNA’da Oluşturulan Oksitlenmiş Baz Örnekleri

UV radyasyonu, aynı DNA zincirinde yan yana bulunan primidinleri çapraz bağlarla bağlayarak, primin dimerleri oluştururlar. Bu dimerler içinde en önemlisi Şekil 2.16’da gösterilen timin dimeridir. Timin dimerlerinin sebep olduğu en önemli etkiler aşağıdakilerdir: (1) DNA’nın yapısı aynı zincir üzerindeki iki timinin birbirine doğru çekilmesi sonucu bozulur (Şekil 2.17). (2) Yapıdaki bu bozulma neticesi, karşı zincirdeki adeninler ile hidrojen bağı (yapan grupların hala mevcut olması sebebiyle) hala mümkündür fakat önemli miktarda zayıflamıştır. DNA polimeraz, bu bazın karşısına hangi bazı koyacağını bilemediğinden, dimer bölgesinde replikasyon çatalının ilerlemesi engellenir.



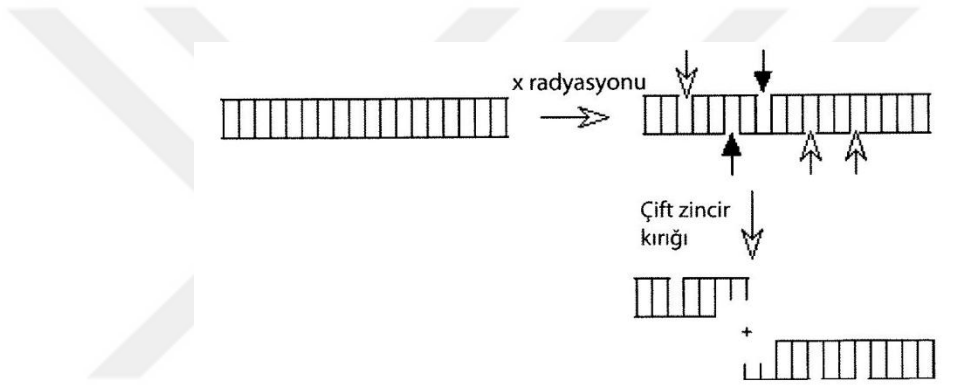
Şekil 2.16 Bir Siklobütültimin Dimerinin Yapısı. UV radyasyonuna maruz bırakıldıktan sonra, bir DNA zincirinde yanyana bulunan timin dimerleri, şekilde ince kırık çizgilerle gösterilen bağların oluşmasıyla birbirlerine bağlanırlar. Ölçekli çizilmemiş olmakla birlikte, bu bağlar, yanyana bulunan timin düzlemleri arasındaki mesafeden daha kısadırlar, bu yüzden çift zincirli yapının biçimi bozulur. Her timinin C=C çift bağı (sol panelde kalın çizgiyle gösterilmiştir), her siklobütıl halkasında C-C tek bağına (sağ panelde kalın kırık çizgilerle gösterilmiştir) dönüştürüldüğünden, timin halkasının şekli de değişir (Freifelder 1987).



Şekil 2.17 Timin Dimeri Yapısı. İki timin bir dimer oluşturduklarında, birbirlerine yaklaştıkları için DNA sarmalının biçimi bozulur. Dimer, birbiriyle birleşmiş iki çizgi olarak gösterilmiştir (Freifelder 1987).

Tek zincir kırıkları: Farklı radyasyon tipleri farklı hasarlara sebep olurlar. İyonize edici radyasyon (Örnek: Gamma ve X-ışınları) da, UV ışınları gibi doğrudan DNA'yı etkileyebilirler fakat UV ışınlarına göre oldukça yüksek enerjilidirler. Bununla birlikte yaptıkları hasarların çoğunu, özellikle DNA'nın etrafındaki suyu iyonize ederek yaparlar. Oluşan bu bileşikler, serbest radikallerdir ve eşleşmemiş elektronlu kimyasal bileşiklerdir. Serbest radikaller, özellikle oksijen içeren serbest radikaller (Örneğin 'OH), oldukça reaktiftirler ve çevrelerindeki moleküllere saldırırlar. DNA'ya saldırdıklarında, tek ve/veya çift zincir kırıkları yaparlar. Çift zincir kırıkları tek bir anda meydana gelebilir. X-ışınları, doğal kozmik ışınları, elektron ışımaları, gama ışınları ve radyoterapide kullanılan çeşitli tip radyasyon ışımaları gibi oldukça yüksek iyonize güce sahip radyasyona maruz kalmak bunu meydana getirebilir.

Tek zincir kırıkları kolayca tamir edilirler fakat çift zincir kırıklarının tamiri zordur. Çift zincir kırıkların tam karşılıklı olması gerekmez, birbirlerinden birkaç baz uzakta fakat zıt zincirlerde olması kromozomların kopmasına dolayısı ile mutasyonlara sebep olurlar. (Şekil 2.18). Enerjitik radyasyon durumunda, kırık bağlara yakın bazlar da genellikle kırılırlar. Radyasyondan başka çeşitli ajanlar da fosfodiester bağını kırabilirler. En yaygın kimyasallar arasında peroksidazlar, sülfidril taşıyan bileşikler (Örneğin, sistein) Fe^{+2} ve Cu^{+2} gibi metal iyonları vardır. Hücrelerde bulunan DNaz'larda, muhtemelen sık sık fosfodiester kesikleri de yapar.

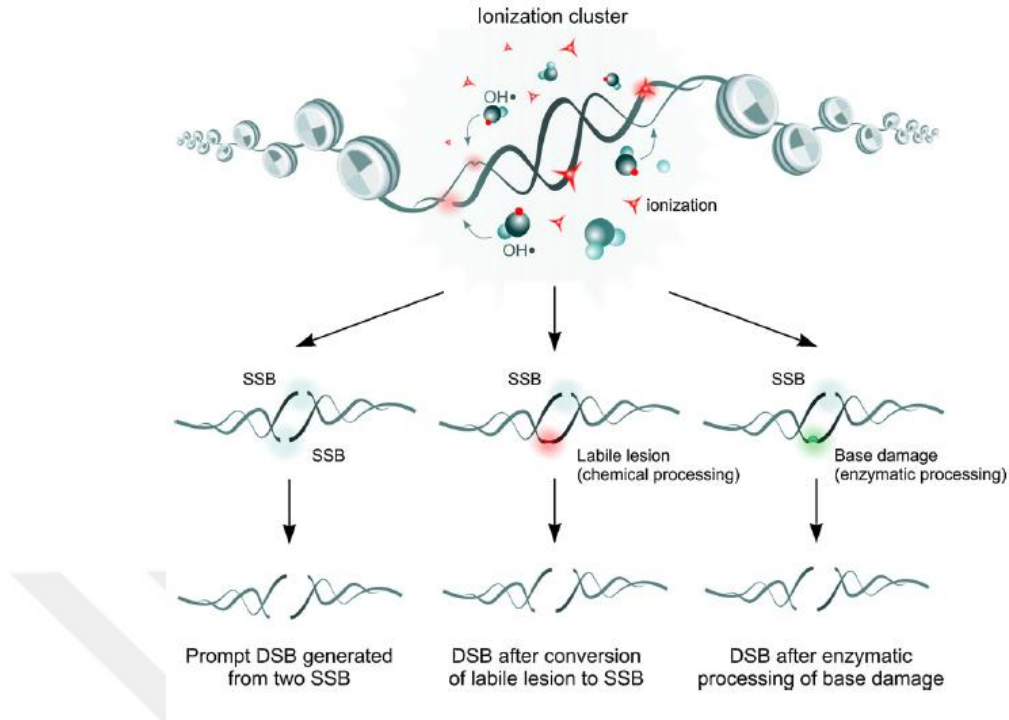


Şekil 2.18 Tek Zincir Kırıklarının Birleşerek Çift Zincirin Kırılmasına Sebep Oluşları. Çift zinciri kıran tek zincir kırıkları koyu uçlu oklarla gösterilmiştir (Freifelder 1987).

Çapraz bağlanma (Kros-linking): Bazı antibiyotik (örneğin, mitomisin C) ve nitrit iyonu gibi bazı reaktifler çift zincir DNA'nın karşılıklı bazları arasında kovalent köprüler oluşturabilir. Bu durum, DNA replikasyonu sırasında zincirlerin birbirinden ayrılmasına engel olur ve sarmalın yapısının yer yer bozulmasına sebep olur. Tanımlanan her bir bozukluk, varolan birçok tamir mekanizmasından biri tarafından düzeltilebilir. DNA'nın tamir edildiği ilk önce bakterilerde gözlenmiş ve ilk defa, en iyi şekilde bakterilerde araştırılmıştır. Fakat tamir işi evrenseldir, bugün ökaryotik mikroorganizmalar ve memeli hücrelerinde de tamiratın var olduğu bilinmektedir.

2.4.2. DNA Çift Zincir Kırıkları (ÇZK)

Normal metabolik aktiviteler veya IR gibi dışsal etkiler DNA heliksinin omurgasında fosfodiester bağlarını kırarak DNA çift zincir kırıkları (ÇZK) oluşturmaktadır (Şekil 2.19) (Hallstrom 2007). DNA replikasyonu esnasında meydana gelen yanlış eşleşmeler ile topoizomerez -I ve -II enzim aktivitesinin başarısızlığından kaynaklanan çift zincir kırıkları fizyolojik süreçler esnasında ortaya çıkabilmektedir. DNA hasarı ayrıca oksidatif solunum veya redoks döngüsü sonucu üretilen reaktif oksijen bileşikleri nedeniyle de üretilmektedir. Reaktif oksijen ve nitrojen bileşikleri inflamasyon ve enfeksiyon bölgelerinde makrofajlar ve nötrofiller tarafından da üretilmektedir (Jackson and Bartek 2009). Bu şekilde ortaya çıkan serbest radikallerin şeker birimlerine oksidatif saldırısı sonucu tek zincir kırıkları oluşmaktadır (Jackson and Bartek 2009; Polo and Jackson 2011). Bununla birlikte bu şeker lezyonları kimyasal ya da enzimatik bir işleme maruz kaldığında, DNA-replikasyon aparatı tek zincir kırığı veya diğer mevcut lezyonlar ile karşılaştığında ve karşıt DNA zincirlerinde birbirlerine yakın konumlarda (<12 baz çifti) tek zincir kırığı meydana geldiğinde DNA çift zincir kırıkları oluşmaktadır (Jackson and Bartek 2009; Lieber ve ark. 2003; Mladenov and Iliakis 2011).



Şekil 2.19 Tek Zincir Kırıklarının Çift Zincir Kırıklarına Dönüşmesi. İyonize radyasyon muamelesi sonucu oluşan tek zincir kırıkları hemen ya da hasarlı şekerlerin kimyasal olarak işlenmesi veya hasarlı bazların enzimatik olarak işlenmesi sonucu ÇZK'larına dönüşebilir (Mladenov and Iliakis 2011).

Tek zincir kırıkları çoğu zaman baz-eksizyon (kesilerek çıkartılma) tamir enzimleri ya da DNA replikasyon çatalı ile etkileşerek potansiyel olarak çift zincir kırığına dönüşme eğilimi göstermektedirler. Tek zincir kırıkları serbest radikaller ile doğrudan veya daha yaygın olarak apürinik bölgelerin ya da sitozin deaminasyonunun veya diğer hasarlı bazların tamiri sonucu ortaya çıkmaktadır. Örneğin öncelikli olarak tek zincir kırığı oluşturan *4-nitroquinoline-N-oxide* ve hidrojen peroksit (H_2O_2) de ÇZK'ı üretmektedir (Lieber ve ark. 2003; Ohnishi ve ark. 2009). DNA çift zincir kırıklarının aksine DNA tek zincir kırıkları insan hücrelerinde sık görülen endojen DNA lezyonlarıdır (günde hücre başına 10000 DNA lezyonu). Normal insan hücrelerinde yaklaşık olarak %1 DNA tek zincir lezyonunun hücre başına yaklaşık olarak 50 endojen ÇZK'na dönüştürüldüğü hesaplanmıştır. Bu miktar 1,5-2,0Gy IR ile üretilen ekzojen ÇZK'larının miktarı ile benzerdir (Ohnishi ve ark. 2009).

Mayoz esnasında homolog kromozomlar arası rekombinasyonun gerçekleşmesi için ve hematopoietik V(D)J rekombinasyonu, apoptotik DNA fragmentasyonu ile senesens gibi süreçlerde programlı bir şekilde DNA çift zincir kırıkları oluşturulur (Ohnishi ve ark. 2009). Ayrıca telomer boyunun kritik bir düzeyde kısılması da çift zincir kırığına yol açmaktadır. Ek olarak S/G2 fazı hücrelerinde normal DNA replikasyonu sırasında ÇZK'larına veya duran replikasyon çatalına yanıt olarak pH2AX^(Ser139) ekspresyonu gerçekleşebilir. Dolayısıyla normal metabolik koşullar altında oluşan spontan DNA hasarı fizyolojik koşullarda endojen ÇZK'larının üretim mekanizmasına önemli derecede katkıda bulunmaktadır. Hiperozmotik stres, hipoksi ve ısı şoku gibi stresler de pH2AX^(Ser139) fosforilasyonunu uyarmaktadır ancak bu tip streslerin nasıl bir mekanizma ile ÇZK'larını oluşturduğu bilinmemektedir (Ohnishi ve ark. 2009). Egzojen ya da endojen olarak gerçekleşen çift zincir kırıkları arasındaki farklılık kırıkların birleştirilmesinden önce hangi faktörlerin gerekli olduğunu etkilemekte; diğer bir deyişle çift zincir kırığının nasıl ve hangi durumda olduğu onarım için kullanılacak olan mekanizmayı belirlemektedir (O'Driscoll and Jeggo 2006).

ÇZK'lar hücre ölümü ya da delesyon, heterozigosite kaybı, translokasyon ve kromozom kayıpları gibi çeşitli genetik değişiklikler ile sonuçlanan kritik lezyonlardır (Khanna and Jackson 2001; Shrivastav ve ark. 2008). ÇZK'leri diğer lezyonlar kadar sık oluşmasada tamir edilmeleri oldukça zor olan son derece toksik lezyonlardır (Jackson and Bartek, 2009). ÇZK'leri bütün bir kalıp zincirin yokluğu nedeniyle tamirlerinin zor olmasından ve DNA molekülünün devamlılığını bozmalarından dolayı genomik bütünlüğü ve hücre yaşamını tehdit etmektedirler (Mladenov and Iliakis 2011). ÇZK'leri DNA replikasyonundan ya da mitozdan önce tamir edilemezlerse hücre ölümüne yol açmakta, yanlış tamir edildiklerinde ise genomik kararsızlığa neden olarak tümörleşmeyi uyarmaktadır (Lees-Miller and Meek 2003; Shrivastav ve ark. 2008).

2.4.3. Kronik İnflamasyon Sürecinde ROT Oluşumu ve DNA Hasarı

Oksidatif stres sonucunda oluşan hasarlar, genellikle kronik enflamasyon kaynaklıdır ve bunlar kalıtsal olabileceği gibi sonradan kazanılan viral, bakteriyel, parazitik enfeksiyonlar veya kimyasal indüksiyonlar sonucunda da oluşabilirler (Hussain ve ark. 2003; Loft and Poulsen 1996). Kronik inflamasyon süresince, uzun bir zaman periyodunda yüksek ROT (Reaktif oksijen türleri) seviyesi DNA hasarını tetikler. Bu hasar, kanser bağlantılı genlerdeki nokta mutasyonları ve DNA onarımı, apoptoz ve hücre döngüsünde rol alan esansiyel hücresel proteinlerdeki modifikasyonlar şeklinde oluşabilir. Ayrıca bu hasar ve mutasyonların, proto-onkogenler veya tümör baskılayıcı genler üzerinde meydana gelmesi de karsinogenezi tetikleyebilir (Khandrika ve ark. 2009).

Kanserleşme; başlama, gelişme ve ilerleme olarak tanımlanmış 3 temel basamağı içeren bir süreçtir. Oksidatif stres, bu 3 basamağın tümü ile etkileşmektedir. ROT, kanserleşmenin başlama basamağında, DNA üzerinde gen mutasyonları ve yapısal değişiklikler yaratarak DNA hasarı oluşturabilir. Gelişme basamağında ise, anormal gen ekspresyonu, hücre-hücre iletişiminin blokajı ve ikinci-mesajcı sistemlerin modifikasyonuna katkıda bulunabilmektedir. Bu değişimler, başlangıçtaki hücre popülasyonunun proliferasyonunda artış ya da apoptoz oranında azalmaya neden olur. Son olarak, oksidatif stres, kanserin ilerleme basamağına da daha fazla DNA hasarı oluşturarak genetik kararsızlığın artışı ile kanserleşme sürecine katkıda bulunur (Guyton and Kensler 1993).

Son yıllarda yapılan araştırmalarda, ROT'un kronik inflamasyon ve kanser arasındaki bağlantıyı oluşturduğunu gösteren birçok çalışma yapılmıştır. Tümör promotörlerinin önemli bir karakteristik özelliği, inflamatuvar hücrelerin toplanmasını ve ROT üretmelerini uyarma yeteneğidir. Bazı ön denemelerde, ROT'un tümör başlangıcındaki rolüne ilişkin çıkarımlar, DNA hasarı yaratan bir ajan olduğu ve mutasyon oranını artırarak onkojenik transformasyona neden olduğu yönündeydi. Ancak, yeni çalışmalarda, genomik instabiliteyi indüklemesine ek olarak, ROT'un bazı özgül sinyal yollarını da aktive edebildiği ve bu şekilde hücresel proliferasyonu, anjiyogenezi ve metastazı regüle ederek tümör gelişimine katkıda

bulunduğu ortaya çıkarılmıştır (Finkel 2003; Reuter ve ark. 2010).

ROT'un tümörijenik özelliğinin, hücre proliferasyonu ve migrasyonu artırma yeteneğinden kaynaklandığı bildirilmiştir. ROT, DNA hasarı oluşturarak tümörleşmeyi başlatan ve ilerleten genetik lezyonlara neden olmaktadır. Diğer yandan, hücresel yaşlanma ve hücre ölümünü de ind kleyebildiğinden antit m rijenik olarak da fonksiyon gösterebilmektedir. Ancak ROT'un hangi yönde fonksiyon göstereceği hücre ve doku tipine, ROT üretimini oluşturduğu yere ve konsantrasyonuna bağlıdır (Reuter ve ark. 2010).

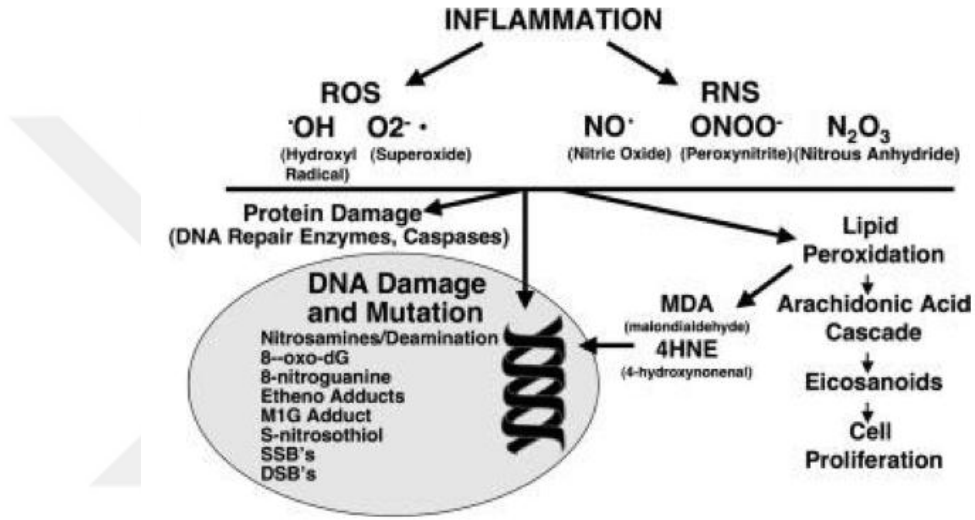
ROT  retilimi karşısında doğru hücresel yanıt, daha fazla oksidatif hasar oluşmasının engellenmesi ve hücre canlılığının devamı açısından kritiktir. Ancak, çok fazla hücresel hasar oluştuğuunda, etrafındaki hücrelerin yararı için o hücrenin ortadan kaldırılması, çok hücreli bir canlının avantajıdır. Bu nedenle, ROT oksidatif stresin şiddetine bağlı olarak apoptotik ya da nekrotik ölümü tetikleyebilir (Finkel 2003).

Sitokinler ve büyüme faktörleri, kendi sinyal yolaklarının aktivasyonuyla, ikinci mesajcılar olarak ROT üretilirler ve bunu o bölgedeki NADPH oksidazları aktive ederek gerçekleştirirler (Ushio-Fukai 2009). Bununla birlikte, ROT,  zellikle TNF  sinyal yolağı olmak üzere birçok sinyal iletim yolağında rol oynamaktadır. Ayrıca DNA hasarına neden olarak p53 yolağının üst ve alt basamaklarını da etkileyebilir (Liu ve ark. 2008).

ROT, apoptotik ve nekrotik hücre ölümünde de rol oynamaktadır. Genellikle, düşük düzeydeki oksidatif stress apoptozu uyarırken, yüksek konsantrasyondaki ROT mitokondri depolarizasyonuna bağlı ATP üretimini azaltarak ATP bağımlı kaspaz aktivasyonunun baskılanması yolu ile nekrotik hücre ölümüne neden olmaktadır (Takeda ve ark. 1999; Teramoto ve ark. 1999; Saito ve ark. 2006). TNF  tarafından indüklenmiş ROT'un bazı moleküler hedefleri tanımlanmıştır. Bunlar, oksidatif stres varlığında artan p53 aktivasyonu, PI3K yolağı ve p85'tir (Liu ve ark. 2008). Ancak bu yolakların TNF- ROT hücre ölüm yolakları üzerinde önemli bir

etkisinin olup olmadığı henüz bilinmemektedir (Morgan ve ark. 2008).

ROT ve RNT'un (reaktif nitrojen türleri) anti-tümörijenik etki gösterdiği durumlar da çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Belirli hücrel koşullarda, ROT ve RNT, anti-tümörijenik bir sonuç olan epitel hücre yaşlanmasına neden olmaktadır. p38 üzerinden, hücre proliferasyonu ve tümörleşmeyi azaltır, apoptosis signal regulating kinase-1'i aktive ederek de apoptozu artırır (Şekil 2.20) (Schetter ve ark. 2010).



Şekil 2.20 Kronik İnflamasyon Sürecinde ROT ve RNT Oluşumu. Reaktif türler, kanser- ilişkili genlerde nokta mutasyonları oluşumu gibi DNA hasarlarına, DNA onarımı, apoptoz ve hücre döngüsünde yer alan hayati hücrel proteinlerde modifikasyonlara neden olabilir. MDA: Malondialdehit, 4-HNE: 4- hidroksinonenal (Hussain and Harris 2007).

2.4.4. DNA Hasarı Yanıt Mekanizması

DNA hasarına karşı oluşan hücrel yanıt kanser biyolojisindeki en önemli alanlardan birisidir (Kastan and Bartek 2004). ÇZK'larının genom kararlılığı üzerine minimal etki oluşturacak şekilde tamir edilmelerini sağlayabilmek için hücreler kompleks bir DNA hasarı yanıtı başlatırlar (Ohnishi ve ark. 2009). DNA hasarı yanıt yolları, hücreyi DNA hasarının varlığı ile uyaran ve uygun yanıtları organize eden sinyal iletimi ve DNA onarım mekanizmalarını kapsamaktadır.

ÇZK'ı ile aktive edilen sinyal iletim süreçleri ATM ve ATR gibi fosfotidilinozitol-3 kinaz ilişkili kinazlara (PIKKs) bağlıdır (O'Driscoll and Jeggo 2006). ÇZK'ı tamir yolları ise temel olarak homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) ve homolog rekombinasyonu (HR) içermektedir (Jackson and Bartek 2009; O'Driscoll and Jeggo 2006). NHEJ ve HR yolları ATR ya da ATM-bağımlı bir şekilde düzenlenmektedir (O'Driscoll and Jeggo 2006).

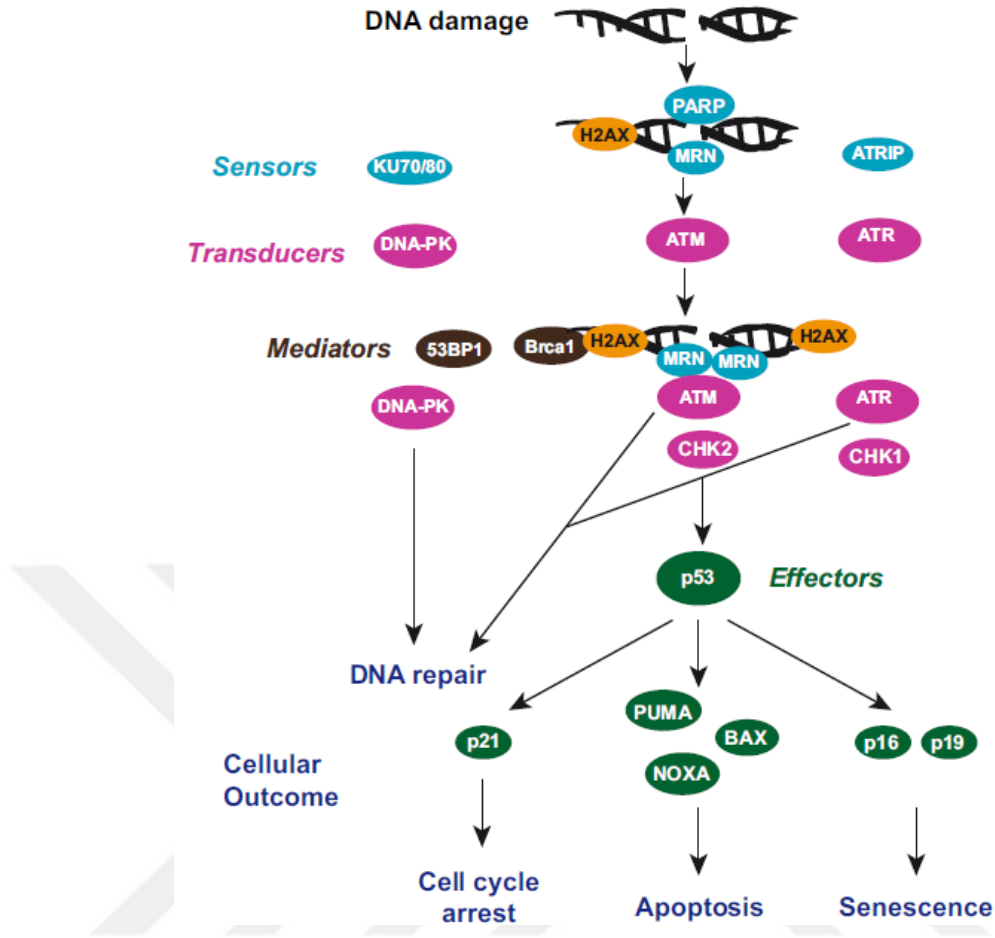
DNA çift zincir kırık tamirinde rol alan HR yolağının öncelikli fonksiyonu replikasyon çatalındaki kırıkları onarmak iken NHEJ yolağı ise DNA'nın herhangi bir yerindeki çift zincir kırığını onarabilmektedir. HR tamiri öncelikli olarak kardeş kromatidlerin uygun olduğu geç S ve G2 fazında gerçekleşmektedir (Jeggo and Lobrich 2006; Shrivastav ve ark. 2008; Valerie and Povirk 2003). HR ile ilişkili olan birçok protein gereklidir çünkü replikasyonun birçok döngüsünde replikasyon çatalının salınımı gerçekleşmektedir. NHEJ ise hücre döngüsü boyunca fonksiyon göstermekte ve özellikle G1 ve erken S fazında kırıkları birleştirmede baskın olmaktadır (Langerak and Russell 2011; Shrivastav ve ark. 2008; Valerie and Povirk 2003). NHEJ ayrıca V(D)J rekombinasyonu esnasında gerçekleşen kırıkları birleştirmede de rol almaktadır (O'Driscoll and Jeggo 2006). Hücrelerin hangi tamir yolağını seçeceğinde ise tamir kalıplarının uygunluğu, hücre döngüsünün fazı, proliferasyon hızı ve özgül hücre tiplerinin fonksiyonları önemli olmaktadır (Shrivastav ve ark. 2008).

Birçok ÇZK tamir proteini yalnızca NHEJ ya da HR yolağında rol oynuyormuş gibi gözükse de MRN kompleksi, BRCA1, H2AX, PARP-1, RAD18, DNA-PKcs ve ATM proteinleri her iki yolağı da etkilemektedir. DNA-PKcs temel olarak memeli NHEJ yolağında rol oynamaktadır ancak aynı zamanda ATM proteini ile karşılıklı etkileşimi ve DNA-PKcs veya ATM tarafından fosforillenen HR'da görev alan en az 12 proteinin regülasyonu gibi kompleks bir regülasyon mekanizmasıyla HR yolağını da etkilemektedir. HR ile NHEJ faktörleri bağımsız olarak kırık bölgesine yerleşmekte ve NHEJ faktörleri HR faktörlerinden daha hızlı bir araya gelmektedir (Kim ve ark. 2005; Shrivastav ve ark. 2008). NHEJ faktörleri saniyeler içinde kırık bölgesine yerleşip genelde 2 saat sonunda ayrılmakta iken HR

faktörleri kırık bölgesine daha geç yerleşip daha uzun süre kalmaktadır (Polo and Jackson 2011). Bununla birlikte HR faktörleri tamir edilmemiş lezyonlarda devamlı olarak bulunmakta iken NHEJ faktörlerinin hasar bölgesine yerleşmeleri geçici olmaktadır (Kim ve ark. 2005).

2.4.4.1. Sinyal İletimi

Sinyal iletim yolağı hasarı algılama aracı ve sinyali ileten proteinleri ve hücre döngüsünün durdurulması veya apoptozis gibi belirli bir yanıtı oluşturan efektör proteinleri içermektedir. Hasarı algılama proteinleri (sensörler) doğrudan ya da dolaylı olarak DNA hasarını tanımakta ve genetik anormalliğin varlığını işaret etmek ve biyokimyasal kontrol noktası kaskadını başlatmak için fonksiyon göstermektedir. Sinyali ileten proteinler (transdüserler) genellikle hedef proteinleri fosforilleyerek sensörlerden gelen hasar sinyalini çoğaltan protein kinazlardır. Efektör proteinler ise temel olarak sinyali ileten kinazların hedef proteinleridir. DNA hasarı sonucu efektör proteinlerindeki modifikasyonlar hücre döngüsünün durdurulması, DNA tamiri, apoptoz veya senesens gibi belirli bir hücresel yanıtın oluşumuna yol açarak genomik bütünlüğü sağlamaktadır (Hallstrom 2007; O'Driscoll and Jeggo 2006). DNA hasarı aracıları (mediyatörler) olarak bilinen diğer protein grubu ise kavramsal olarak sensör ve transdüserler arasında yer almaktadır ve hasar sinyalini çoğaltmanın yanı sıra hasarın tanınmasında modülatör (ayarlayıcı) proteinler olarak fonksiyon göstermektedir (Blanpain ve ark. 2011; Hallstrom 2007).

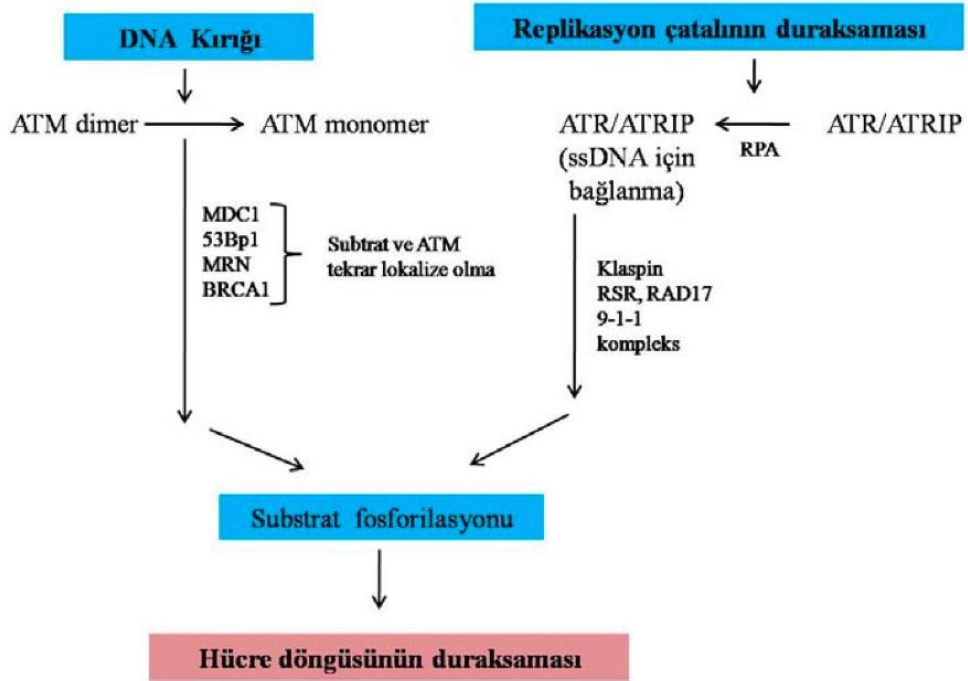


Şekil 2.21 DNA Hasarı Yanıtında Rol Oynayan Proteinler (Blanpain ve ark. 2011)

2.4.4.2. ATM Aktivasyonu ve Yanıtı

DNA hasarı sinyalinde rol oynayan memeli PIKK kinazları ATM, ATR, ATX/SMG-1 ve DNA-PKcs'ni içermektedir (Ohnishi ve ark. 2009; Valerie and Povirk 2003). Bu fonksiyonel olarak benzer ve oldukça büyük olan proteinler (350-450kDa) glutaminden sonra serin ve treonin artıklarından birçok substratı fosforillemektedir (Czornak ve ark. 2008; Valerie and Povirk 2003). Geniş çaplı yapılan proteomik çalışmalarında DNA hasarına yanıt olarak fosforillenen 700'den fazla protein tanımlanmıştır (Czornak ve ark. 2008; Huen and Chen 2008). Bu kinazlar DNA hasarı için genomu izleyen ve hasar sinyalini diğer proteinlere ileterek hücrel yanıtı koordine eden büyük protein kompleksleri içerisinde yer almaktadırlar (Tanaka ve ark. 2006; Valerie and Povirk 2003).

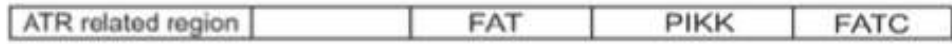
ATM ve DNA-PKcs DNA çift zincir kırıklarına karşı oluşturulan yanıtta majör role sahip iken, ATR sinyali ya iyonize radyasyon (IR) tarafından tetiklenen lezyonlar replikasyonu bloke ettiği zaman ya da tamir edilemeyen DSB bölgelerinde nükleaz kesimi ile tek zincir DNA bölgelerinin oluşmasıyla aktif olmaktadır (Hallstrom 2007; Huen and Chen 2008; Jeggo and Lobrich 2006). Bunun nedeni ATR sinyalinin tek zincir bölgeleri ile aktive edilmesidir. Bu tek zincir bölgelerini RPA kaplamakta ve ATR ile ortağı olan ATRIP' in bir araya gelmesini sağlamaktadır. (O'Driscoll ve Jeggo, 2006). ATM hücre döngüsünün durdurulması, DNA tamiri ve apoptoza neden olan sinyal kaskatlarını başlatarak ÇZK'larına yanıt vermektedir (Hallstrom 2007). ATM; p53, MDM2, Chk2, Chk1, NBS1, BRCA1, FANCD2, SMC1, RAD17, 53BP1, MDC1 gibi G1, S faz içi ve G2/M kontrol noktalarında görev alan birçok proteini fosforilleyerek fonksiyon göstermektedir (Hallstrom 2007; Kim ve ark. 2005; Tanaka ve ark. 2006).



Şekil 2.22 DNA Hasarı veya Replikasyon Çatalına Karşı Oluşan Yanıtların, Hücrenin Kaderi, Genomik Kararsızlık ve Kanser Gelişiminin Genel Şeması. Replikasyon çatalının durması, hücresel ATR aktivitesinin başlamasını uyarmaktadır. DNA hasarı, doğrudan ATM'yi aktive eder ve replikasyon çatalının durmasına neden olur. Böylece hücresel ATR kinazları aktive de etmektedir. Aktif ATM ve ATR kinazların diğer protein ve substratlar ile kombinasyonları hücrenin dışında saptanmalarına yardımcı olmaktadır. Eğer genomik kararsızlık da meydana gelirse bu durum hücresel transformasyona katkıda bulunabilir (Kastan and Bartek 2004).

ATM hasarsız hücrelerde inaktif dimer olarak bulunmaktadır (Czornak ve ark. 2008; Hallstrom 2007). İnaktif konformasyonda ATM'nin kinaz bölgesi diğer ATM molekülünün FAT (FRAP/ATM/TRRAP) bölgesi tarafından bloke edilmektedir. Hücrelerin IR'a maruz kalmaları hızlı bir şekilde FAT bölgesi içinde lokalize olan ser1981'den molekül içi otofosforilasyonu tetiklemekte ve inaktif ATM dimerlerinin ayrılarak enzimatik olarak aktif monomerlere dönüşmesi sonucunda ATM aktivasyonuna neden olmaktadır (Hallstrom 2007). ATM aktivasyonu iyonize radyasyondan sonra dakikalar içerisinde gerçekleşmektedir. ATM aktivasyonu için kesin bir mekanizma hala tam olarak bilinmemekte olup fonksiyonel MRN kompleksinin ATM aktivasyonunda rol oynadığı düşünülmektedir (Hallstrom 2007).

(A) ATM kinase

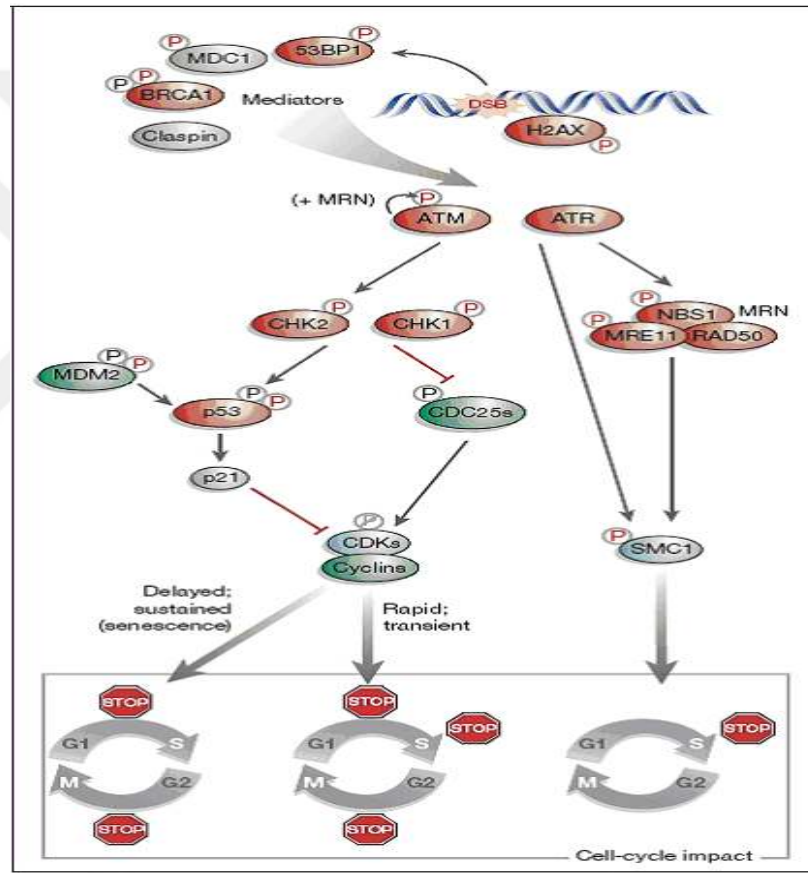


Şekil 2.23 ATM Kinaz Proteininin Şematik Görünümü. a. ATM kinaz N-terminal ATR-ilişkili bölgeyi ve FAT (sol) ile FATC (sağ) bölgeleri ile kuşatılmış C-terminal PIKK kinaz bölgesini içermektedir (Czornak ve ark. 2008).

DNA hasarına etkili bir yanıt başlangıç ATM aktivasyonunu ve ATM'nin substratlarının bulunduğu bölgeye hareketini gerektirmektedir. Lee ve Paul MRN kompleksinin saflaştırılmış ATM dimeri için ÇZK sensörü olarak rol oynadığını ve *in vitro*'da ATM'yi kırık DNA bölgelerine yerleştirdiğini göstermişlerdir. Dahası Falck ve arkadaşları NBS1'in C-terminalinin ATM'ye bağlanmasının aktif ATM'nin ÇZK bölgesine yerleşmesi için gerekli olduğunu göstermişlerdir (Hallstrom 2007). MRN kompleksi ATM'nin kırık bölgesinde alıkonma zamanını artırarak ATM'nin substratlarını fosforilleme yeteneğini kolaylaştırmaktadır (Jeggo and Lobrich 2006). BRCA1'in de ATM'nin kırık bölgelerine lokalize olması ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Hallstrom 2007).

Aktif ATM hücre döngüsünde, apoptoz ve tamirde rol oynayan birçok substratı fosforilleyerek DNA hasarına yanıt vermektedir. MRN kompleksinin üyeleri, histon H2AX ve RAD17 gibi çift zincir kırıklarının tanınması ile ilişkili proteinler ATM ile fosforillenen hedeflerdendir. CHEK1 ve CHEK2 kinazlarının

ATM tarafından fosforillenmeleri bu kinazların DNA tamir yollarının kavşağında ve hücre döngüsü yollarında yer almalarına yol açmaktadır (Tanaka ve ark. 2006). ATM hücre döngüsünün durmasını üç kritik noktada düzenlemektedir. G1-S noktasında duraklama replikasyondan önce DNA hasarı onarımı için uzun bir zaman sağlamaktadır. ATM bağımlı G1-S duraklaması TP53 ve CHEK2'ye bağlıdır ve siklin-bağımlı kinaz inhibitörü p21'in aktivasyonunu gerektirmektedir. Bunun dışında S-fazı kontrol noktası ve G2-M noktası ATM tarafından regüle edilmektedir (Driscoll ve Jeggo 2006).



Şekil 2.24 DNA Hasarına (Çift Zincir Kırıklarına) Karşı Oluşturulan Yanıt Sırasında Uyarılan Hücre Döngüsü Kontrol Noktası Yolları. Tümör baskılayıcılar kırmızı renkte ve proto-onkogenler yeşil renkte gösterilmiştir. ATM ve ATR kontrol noktası kinazları, ağır birçok bileşenini, hem doğrudan (kırmızı "P") hem de dönüştürücü kinazlar CHK2 ve CHK1 (siyah "P") yoluyla fosforlamaktadır. BRCA1 proteini, DNA onarımına ve hücre döngüsünün durdurulmasına katkıda bulunurken, p53 kontrol genleri hücre ölümü ve DNA onarım mekanizmalarında görev yapmaktadır. Hücre döngüsü fazının ve kuşatma süresinin p53 aracılıklı olduğu saptanmıştır. ATM/ATR ve CHK2/CHK1 tarafından düzenlenen global kontrol noktası ağı, hücrel yanıtlarını, DNA onarımı, transkripsiyon, kromatin şekillenmesi ve hücre ölümünü içeren hücre döngüsünün ilerlemesinden daha fazla etkilemektedir (Kastan and Bartek 2004).

ATM ve ATR bağımlı sinyal yollarında önemli bir adım ATM ya da DNA-bağımlı protein kinaz tarafından gerçekleştirilen H2AX fosforilasyonudur. γ -H2AX odağının oluşumu TP53BP1, MDC1, BRCA1 ve MRN kompleksi gibi aracı proteinlerin kırık bölgesinde kalması için gereklidir.

2.4.4.3. H2AX Fosforilasyonu

DNA tamiri, kromatin yapısı içerisinde meydana gelmek zorundadır. Kromatinin en temel birimi ise DNA'nın etrafında sarıldığı dört çekirdek histonundan her birinin iki kopyasından oluşan nükleozomdur. Nükleozom yapısını meydana getiren dört çekirdek histonu H2A, H2B, H3 ve H4'tür. Bu proteinlerden her biri nükleozom çekirdek yapısı için merkezi olan bir histon katlanma domaini içerirler (Foster ve Downs 2005).

DNA replikasyonu ve tamiri gibi olayları kolaylaştırmak için kromatin yapısının ve kompozisyonunun değiştirildiği birçok mekanizma vardır. Bu mekanizmalar histon proteinlerinin kovalent modifikasyonunu, ATP' ye bağımlı kromatinin yeniden düzenlenmesi ve histon varyantlarının kromatin içine ve dışına karşılıklı değişimini içermektedir. Histonlar post-translasyonel modifikasyonlar ile güçlü bir şekilde değiştirilmektedir ve bilinen modifikasyonlar lizin amino asitlerinin asetilasyonu ve ubikitinasyonu, lizin ve arginin amino asitlerinin metilasyonu ve serin ile treonin amino asit bölgelerinin fosforilasyonunu içermektedir. Bu modifikasyonlar histonların yükünü değiştirebilir ve DNA ile yoğunlaşma yeteneklerini etkileyebilir ya da kromatin-ilişkili proteinler için bağlanma yüzeyleri yaratabilmektedirler (Foster ve Downs 2005).

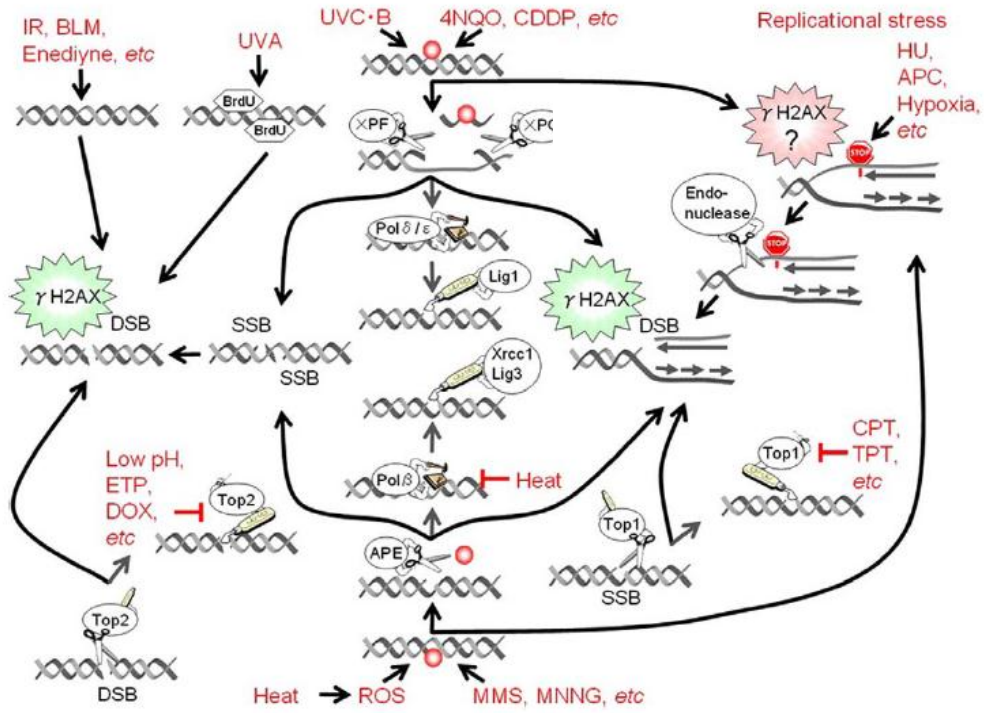
Histon H2A varyantı H2AX, kromatinin ana bileşenlerindendir ve yüksek organizmalarda toplam hücresel H2A'nın yaklaşık % 2-25'ini temsil etmektedir (Hallstrom, 2007). Bütün histon çekirdekleri NH₂- ve COOH-terminal motifleri içermekte ve post-transkripsiyonel modifikasyonlara bu bölgelerden uğramaktadırlar. Histon H2AX'in C-terminal kuyruğundaki serin 139 amino asidinden (SQE motifinden) fosforilasyonu ise memeli hücrelerinde çift zincir kırıklarına karşı

oluşturulan en erken yanıtlardan birisidir (Mukherjee ve ark. 2006). İyonize radyasyon ya doğrudan enerji yoğunlaşması ile ya da dolaylı yoldan reaktif oksijen türlerinin oluşumu aracılığıyla ÇZK'larını oluşturmaktadır (Lieber ve ark., 2003; O'Driscoll and Jeggo 2006; Shrivastav ve ark. 2008). Fosforilasyon, γ -radyasyon ile oluşan DNA hasarından sonra dakikalar içinde ($\sim 1-3$ dk) gerçekleşmektedir ve fosforillenen H2AX molekülleri pH2AX^(Ser139) olarak adlandırılmaktadır (Bristow ve ark. 2007; Foster and Downs 2005; Huang ve ark. 2005). Her bir ÇZK'ı yaklaşık 2000 pH2AX^(Ser139) molekülünün fosforillenmesine neden olmakta ve buda 2Mbp'lik bir bölgeye yani kromatinin % 0.03'lük kısmına karşılık gelen bir modifikasyon ile sonuçlanarak tamir sinyalini çoğaltmaktadır (Rossetto ve ark. 2010).

pH2AX^(Ser139) odakları sadece IR'a maruz kalındıktan sonra değil aynı zamanda serbest radikal üretimi ile etki eden bleomisin ve tirapazamin, topoizomerez-II aracılıklı DNA ligasyonunu önleyen doksorubisin ve etoposid gibi klasik ÇZK'larını uyaran ajanlara maruz kalındığında da görülmektedir. Düşük pH'da topoizomerez-II aracılıklı DNA ligasyonunu önleyerek pH2AX^(Ser139) odakları oluşturmaktadır. N-metil-N-nitro-N-nitrozoguanidin ve adozelesin gibi mono-fonksiyonel alkilleyici ajanlar ile üretilen DNA lezyonları da ÇZK'larına ve pH2AX^(Ser139) odak oluşumuna yol açmaktadır. Bunların dışında doğrudan yüksek oranda ÇZK'ı oluşturan kalikeamisin- $\gamma 1$ antibiyotiği etkili bir şekilde pH2AX^(Ser139) odak oluşumunu uyarmaktadır. Sisplatin ve Aktinomisin D gibi DNA çapraz bağlayıcı ajanlarına maruz kalınması da ÇZK'ı ve pH2AX^(Ser139) odak oluşumu ile sonuçlanmaktadır (Ohnishi ve ark. 2009).

DNA topoizomerez-I ve -II inhibitörleri (kamptotesin, etoposid gibi) anti-tümör ilaçlar olarak yaygın şekilde kullanılmaktadırlar. Bunlar DNA'ya bağlanıp topo-I ya da topo-II ile DNA arasındaki kovalent bağlarla oluşan kompleksleri kararlı duruma getirerek aktivite göstermektedirler (Huang ve ark. 2005; Tanaka ve ark. 2006). UVC, UVB, hidroksiüre, afidikolin, adozelesin, metil mesilat ve heksavalent kromiyum (Cr(VI)) yoluyla uyarılan replikasyon stresine yanıt olarak H2AX molekülleri fosforillenmektedir. Bu koşullar altında pH2AX^(Ser139) odak oluşumları sadece S fazı hücrelerinde (aktif replikasyon çatalını içeren hücreler)

gerçekleşmektedir. Alkil eklentileri, pirimidin dimerleri ve çapraz bağlar gibi replikasyonu bloke edici bir lezyon ile karşılaşıldığı zaman DNA polimeraz bloke olan bölgede durmaktadır (Ohnishi ve ark. 2009; Shrivastav ve ark. 2008). Bu durum özgül bir endonükleaz tarafından tanınan Y-şekilli DNA yapısının oluşumu ile sonuçlanmakta ve ardından endonükleaz kalıp zincirde bir çentik meydana getirerek lezyonun yakınında ÇZK'nın oluşumuna yol açmaktadır (Ohnishi ve ark. 2009).



Şekil 2.25 Çeşitli Ajanların DNA Kırığı Yaratması ve Buna Karşı Oluşan $\gamma\text{H2AX}^{(\text{Ser139})}$ Fosforilasyonu (Takahashi and Ohnishi 2005).

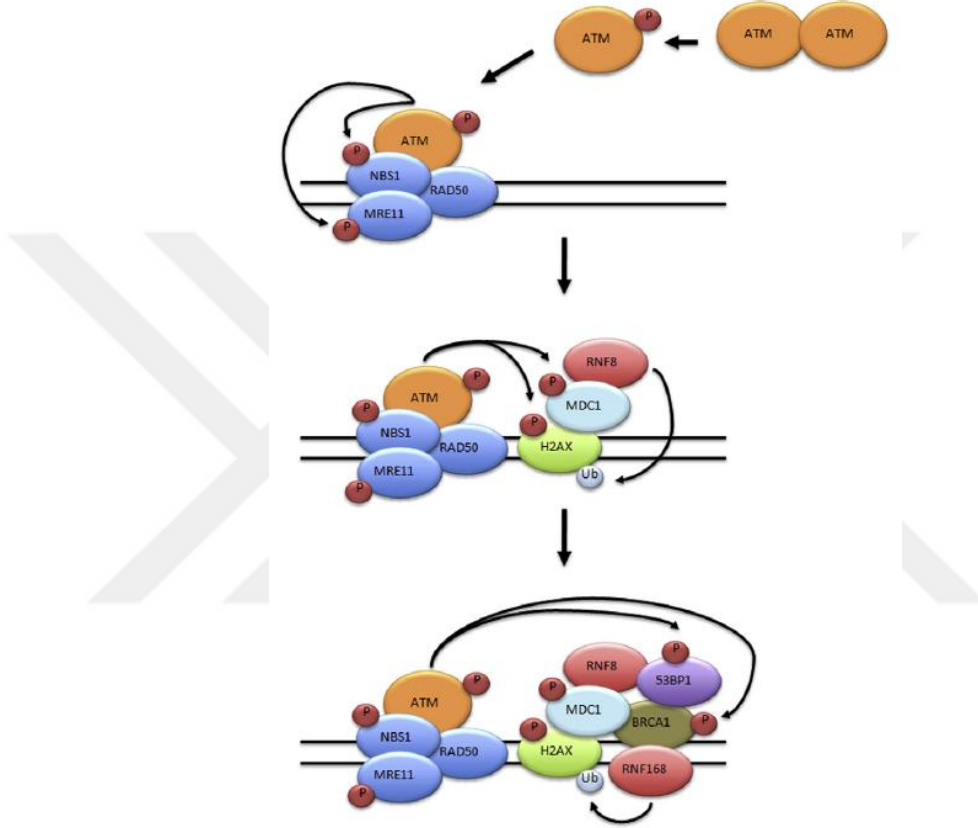
IR yada genotoksik ajanlar aracılığıyla DNA çift zincir kırıklarının uyarılmasından sonra kromatinde $\gamma\text{H2AX}^{(\text{Ser139})}$ varlığı özgül antikorlar yoluyla ayrı ayrı nükleer odaklar şeklinde belirlenebilmektedir (Huang ve ark. 2005; Jeggo and Lobrich 2006). Her bir odak tek bir DNA çift zincir kırığını temsil ettiği için odakların sıklığı çift zincir kırığı miktarı veya diğer bir deyişle DNA hasarı miktarı ile orantılı olmaktadır (Huang ve ark. 2005). Aynı zamanda $\gamma\text{H2AX}^{(\text{Ser139})}$ odaklarının kaybedilme hızı DNA onarımı hızı ile bağlantılıdır (Jeggo and Lobrich 2006). $\gamma\text{H2AX}^{(\text{Ser139})}$ odakları ekzojen ya da endojen kaynaklar yoluyla oluşabilmektedir. Endojen kaynaklar sonucu oluşan H2AX fosforilasyonunu temsil

eden pH2AX^(Ser139) odakları ekzojen kaynaklarla oluşanlara göre genellikle daha küçük boyutta ve bulanık olmaktadır (Czornak ve ark. 2008; Huang ve ark. 2005).

H2AX fosforilasyonu, DNA hasarı kontrol noktası aktivasyonunda anahtar bir rol oynamakta olup; defosforilasyonu hücre döngüsünün devam etmesine olanak sağlamak için kontrol noktası sinyalinin azalması bakımından önemlidir (Shrivastav ve ark. 2008). PIKK ailesi üyelerinden ATM, ATR ve DNA-PK'ın DNA hasarına yanıt olarak bu motifin fosforilasyonundan sorumlu oldukları gösterilmiştir (Foster and Downs 2005; Lobrich ve ark. 2010). pH2AX^(Ser139) fosforilasyonu kararlı bir odak oluşumu için diğer bir deyişle RAD50, RAD51, TP53BP1, MDC1, BRCA1 ve MRN kompleksi gibi aracı proteinlerin ve kromatin yeniden düzenlenme komplekslerinin bir araya gelmesi ve kırık bölgesinde alıkonmaları için gereklidir (Jeggo and Lobrich 2006; O'Driscoll and Jeggo 2006). pH2AX^(Ser139) yokluğunda NBS1, BRCA1, MDC1 ve 53BP1 gibi proteinler kırık bölgelerine yerleşememektedir (Dinant ve ark. 2008). Genomik bütünlüğün korunmasında H2AX'in kesin fonksiyonu net bir şekilde tanımlanamamıştır ancak pH2AX^(Ser139)'in kırık DNA uçlarını tanıyarak bağlanan ve DNA tamirini uyarıcı DNA hasarı yanıtı proteinleri için bir yerleşim bölgesi sağladığı düşünülmektedir (Hallstrom 2007).

Tüm bu bilgiler ışığında DNA hasarı sonucu nükleer odak oluşumu için bir model oluşturulduğunda, ilk olarak DNA çift zincir kırıkları MRN kompleksi tarafından tanınmaktadır. Bu proteinlerin kırık bölgesine ilk yerleşimi ATM, H2AX ve MDC1'den bağımsız olmaktadır. NBS1 ise aktif ATM'nin kırık bölgesine yerleşmesini sağlamaktadır. Kırık bölgesinde histon H2AX, NBS1 ile aralarında köprü görevi gören MDC1'e bağlandıktan sonra ATM tarafından saniyeler içerisinde fosforillenmektedir. Dolayısıyla MDC1 diğer DNA hasarı yanıt proteinlerinin birikebileceği bir alan sağlamak için mediyatör protein olarak rol oynamaktadır. ATM ile MRN/MDC1 arasındaki etkileşim ilave ATM moleküllerinin kırık bölgesine yerleşmesini artırmaktadır ve böylece daha etkili bir H2AX fosforilasyonunu tetikleyerek ilk çift zincir kırık bölgesinin daha uzaklara yayılmasını ve görünür pH2AX^(Ser139) odaklarının oluşumunu sağlamaktadır. Bu modelde MDC1 hasar sinyalini çoğaltan bir molekül olarak fonksiyon göstermekte,

pH2AX^(Ser139) ile birlikte 53BP1 ve BRCA1'in devamlı olarak kırık bölgesinde birikmesini kolaylaştırmaktadır. Aktif ATM DNA hasarına 53BP1, BRCA1, MDC1 ve MRN kompleksi gibi kırık bölgesindeki proteinleri ya da p53 gibi birçok substratı fosforilleyerek yanıt vermektedir. Bu protein kümeleri kırık bölgesinde kompleks bir etkileşim ağı ve sinyal yolağı oluşturmaktadır (Derheimer and Kastan, 2010; Hallstrom 2007).



Şekil 2.26 DNA Çift Zincir Kırığı Sonucu Nükleer Odak Oluşumları İçin Bir Model (Derheimer and Kastan 2010).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Hücre Dizisi

- BPH-1 Hücre Hattı (*Leibniz Institute*, DSMZ, Almanya) (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures ACC 143)'den temin edildi.

3.1.2. Kimyasal Maddeler

- Disodyum Pentaborat Dekahidrat-DPB, ($\text{Na}_2\text{O} \cdot 0.5\text{B}_2\text{O}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), BOREN, Ulusal Bor Enstitüsü
- Borik Asit-BA, BOREN, Ankara, Türkiye (Ulusal Bor Enstitüsü)
- Boroksit-BO, BOREN, Ankara, Türkiye (Ulusal Bor Enstitüsü)
- Tripan mavisi solüsyonu (SIGMA, T-6146)
- Coomassie Brilliant Blue (BIORAD)
- RPMI-1640 (GIBCO, 52400-025)
- Tripsin-EDTA (GIBCO 3103382)
- Dimetil sülfoksit (SIGMA D8418)
- Fötal Dana Serum (FBS) (PAA, A15-649)
- L-glutamin (L-glu) (Biochrom AG, K0283)
- Penisilin/ Streptomisin (P/S) (Biochrom AG, A2213)
- Fosfat Tamponu (Phosphate Buffered Saline / PBS)
- NaCl (SIGMA, S3014)
- KCl (Merck)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck, K22287176)
- HCl (SIGMA T5941)
- NaCl (SIGMA S3014)
- Tris.Cl (SIGMA T5941)
- SDS (SIGMA L4390)

- Sodyum Deoksikolat (SIGMA D6750)
- EDTA (SIGMA K5134)
- EGTA (SIGMA E3889)
- Proteaz inhibitor kokteyli (Roche- 04693159001, Almanya)
- Fosfataz inhibitör kokteyli (Roche- 04906837001, Almanya)
- NaF 100X (100mM), (Merck- B815549 606, ABD)
- NaVO3 100X (200mM) (Fluka- 72060, Almanya)
- PMSF 100X (100 mM) (Fluka- 93482, Almanya)
- İzopropanol (Merck K35707095 607)
- Akrilamid (SIGMA A9099)
- N, N- metilenbisakrilamid (SIGMA M2022)
- Amonyum persülfat (APS) (SIGMA, A9164)
- TEMED (SIGMA T9281)
- Trizma baz (SIGMA, T6066)
- APS (SIGMA)
- Glisin (Biochemika/FLUKA, 50046)
- Brom fenol mavisi (Merck, L54971322-525)
- Metanol (Merck, K34212908503)
- Triton X-100 (SIGMA- T8787, Almanya)
- Beta-merkaptotanol (SIGMA, M3148)
- Yağsız süt tozu (PINAR)
- ECL PLUS kiti (GE Healthcare Amersham Western Blot detection system, RPN2132)
- Protein ölçüm kiti (Biorad DC Protein Assay)
- Bovine Serum Albumin-BSA (USB- 10857, ABD)
- EtOH (Merck)
- MetOH (Merck)
- Developer (Sıvı film banyosu, Hacettepe defikser)
- Fikser (Sıvı film banyosu, Hacettepe defikser)
- Thiazolyl blue tetrazolium bromide /MTT(SIGMA- ALDRICH , M5655)
- Anti-mouse IgG (Invitrogen Molecular Probes, Alexa Fluor 594) (Invitrogen- A11005, ABD)

- Anti-rabbit IgG (Invitrogen Molecular Probes Alexa Fluor 488) (Invitrogen- A11008, ABD)
- 4,6-diamidino-2-phenylindole / DAPI (Sigma- D9564, Almanya)
- β -Aktin antikorü , (Sigma-A5316, Almanya)
- p-H2AX^(S139) antikorü , (Milipore,05-636)
- ATM antikorü , (Milipore , 07-1286)
- pATM^(S1981) antikorü , (Abcam 81292)
- p53 antikorü , (Cell Signaling 9282)
- Phospho-p53^(Ser15) antikorü , (Cell Signaling 9284)
- Cleaved Caspase-9 (Asp330) antikorü , (Cell Signaling 9501)
- Cleaved Caspase-3 (Asp175) antikorü , (Cell Signaling 9661)
- Cleaved PARP (Asp214) antikorü , (Cell Signaling 9541)
- Anti-rabbit IgG horse radish peroxidase (HRP) (Amersham NA934)
- Anti-mouse IgG horse radish peroxidase (HRP) (Amersham NA931)

3.1.3. Malzemeler

- 1-10, 20-200 ve 100-1000 μ l otomatik pipetler (Brand)
- 1.5-2 ml Eppendorf tüpler (Isolab)
- 1-10, 20-200 ve 100-1000 μ l mikropipet ucu (VERTEX)
- Steril cam pipetler (ISOLAB)
- 22x22 mm No: 1 lamel (Marienfeld- 0101050)
- Transfer aparatı (BIO-RAD 1703989)
- Yürütme aparatı (BIO-RAD 1658006FC)
- Whatman kağıtları (Milipore)
- Polyvinylidene fluoride (PVDF) transfer membranı (Hybond NE1706)
- Pozlamanın gerçekleştiğı kaset (Amersham Hypercassette RPN 11643)
- Film (LUCKY medikal X-ray film)
- Asetat kağıtları(ALEX)
- Hücre kazıyıcı (TPP 9903 Cell Scraper)
- Hücre kültürü plate, 96 kuyucuklu (Sarstedt , Almanya)
- Hücre kültürü plate, 6 kuyucuklu (Sarstedt , Almanya)

- Doku kültürü kabı 100×20mm (Sarstedt , Almanya)
- Doku kültürü kabı 60×15mm (Sarstedt , Almanya)
- Doku kültürü kabı 35×10mm (Sarstedt , Almanya)
- Doku kültürü Flaskı, 25cm² (Sarstedt , Almanya)
- Doku kültürü Flaskı, 75cm² (Sarstedt , Almanya)
- Filtreli steril pipet ucu , 2ml (Costar)
- Filtreli steril pipet ucu , 5ml (Costar)
- Filtreli steril pipet ucu , 10ml (Costar)
- Filtreli steril pipet ucu , 25ml (Costar)
- Filtreli steril pipet ucu , 50ml (Costar)
- Kryo tüp Steril, 1 ml (Clearline, Biosigma)
- Pasteur Pipeti steril (FL Medica)
- Santrifüj tüpü steril 15ml (ISOLAB)
- Santrifüj tüpü steril 50ml (ISOLAB)

3.1.4. Aygıtlar

- Class II güvenlik kabini (Esco)
- CO₂'li inkübatör (Esco)
- Floresan ekli invörted ışık mikroskobu (Leica DMIL)
- Soğutmalı santrifüj (Sigma- B6916)
- Ultrasaf su cihazı(ELGA PURELAB Q)
- pH metre (METTLER TOLEDO)
- Manyetik karıştırıcı (M TOPS)
- ETÜV (NÜVE)
- Nitrojen tankı ve aktarma ünitesi (Chart, MVE, Cleveland)
- Su banyosu (NÜVE BATH)
- Vakum pompası(VACUUM PUMP)
- Vortex (Dragonlab MX-S)
- Hassas Terazı (SARTORIUS)
- Sonikatör (Bandelin Sonopuls UW 2070)
- Soğutmalı santrifüj (SIGMA, B6916)

- Santrifüj (Eppendorf, centrifuge, 5415 D)
- Blok ısıtıcı (WEALTEC HB-2)
- Microplate Reader (Biotek FLx800)
- Hemositometre (Neubauer)
- Çalkalayıcı (Biosan Shaker-Rocker MR-12)
- +4° C buzdolabı (ARÇELİK)
- -20° C derin dondurucu (ARÇELİK)
- -86° C derin dondurucu (NEW BRUNSWICK)

3.2. YÖNTEM

Bu çalışma TÜBİTAK 113S700 nolu ve “Bor ve Türevlerinin Benign Prostat Hiperplazisi (BPH) Üzerine Anti-Proliferatif ve Anti-Enflamatuvar Etki Mekanizmasının Araştırılması” adlı proje tarafından desteklenmiştir. Tüm deneyler ve çalışmalar Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalına ait laboratuvarlarda gerçekleştirildi.

3.2.1. Sterilizasyon

Ticari firmalardan sağlanan tüm plastik malzemeler steril alındı. Cam malzemeler ve bazı sıvı malzemeler (PBS ve dH₂O) 121 °C’de 45 dakika otoklavlandı. Otoklavla steril edilemeyen bazı sıvı maddeler 0.22 µm por çapındaki mikrobiyolojik filtrelerden süzülerek steril edildi. Steril hücre kültürü kabini, kullanımdan önce ultraviyole ışık ile steril edildi. Hücre kültürü kabinine alınacak malzemeler ise % 70 alkolle silinerek kabin içerisine alındı. Her ay hücre kültürü laboratuvarındaki yüzeyler % 70 alkolle silinerek steril ortam yaratıldı.

3.2.2. Tampon ve Solusyonların Hazırlanması

❖ Bor ve Türevlerinin Hazırlanması

Bor türevleri	Moleküler ağırlıkları
DPB	590.1
BO	69.68
BA	61.832

Tablo 3.1 Bor türevlerinin moleküler ağırlıkları

- 100 mM 1 mL DPB için 0.05901 gram,
- Bor oksit için 0.0069 gram,
- Borik asit için 0.0061 gram tartıldı ve 1 mL dH₂O'da çözdürüldü ve en fazla 1 ay süre ile oda sıcaklığında muhafaza edildi.

❖ Fosfat Tamponu (Phosphate Buffered Saline / PBS)

- 1.41 g Na₂HPO₄.H₂O
- 8.0 g NaCl
- 0.2 g KCl
- 1 litre dH₂O
- Yukarıdaki kimyasallar tartılıp 900 ml dH₂O içerisinde çözüldürdükten sonra 1M HCl ile pH 7.4'e ayarlandı ve dH₂O 1 litreye tamamlandı.
- 121°C'de 45 dakika otoklavlandı.
- Oda sıcaklığında muhafaza edildi.

❖ 0.5 M EDTA

- 16.81 g EDTA
- 100 ml dH₂O
- EDTA 90 ml dH₂O içerisinde çözüldürdükten sonra pH 7.0'a ayarlandı ve dH₂O 100 ml 'ye tamamlandı.
- Oda sıcaklığında muhafaza edildi.

❖ **0.5 M EGTA**

- 19.02 g EGTA
- 100 ml dH₂O
- EGTA 90 ml dH₂O içerisinde çözdürdükten sonra pH 7.0'a ayarlandı ve dH₂O 100 ml 'ye tamamlandı.
- Oda sıcaklığında muhafaza edildi.

❖ **1 M KCl**

- 74.55 g KCl
- 1 litre dH₂O'da çözdürüldü.
- Oda sıcaklığında muhafaza edildi.

❖ **10 M NaOH**

- 40 g NaOH
- 100 ml dH₂O'da çözdürüldü.
- Oda sıcaklığında muhafaza edildi.

❖ **5 M NaCl**

- 292.2 g NaCl
- 1 litre dH₂O' da çözdürüldü.
- Oda sıcaklığında muhafaza edildi.

❖ **30 x NaF**

- 378 mg NaF (0.9 M NaF)
- 10 ml dH₂O'da çözdürüldü.
- -20°C'de muhafaza edildi.

❖ **Jel boyama solüsyonu (Gel Staining)**

- 0.25 g Coomassie Brilliant Blue
- 45 ml MeOH
- 10 ml asetik asit

- 45 ml dH₂O
- Oda sıcaklığında muhafaza edildi.

❖ **Ponceau-S membran boyama solüsyonu (Membrane Staining)**

- 0.05 g Ponceau-S (% 0.1)
- 2.5 ml Glasial asetik asit (% 5)
- 47.5 ml dH₂O
- Oda sıcaklığında muhafaza edildi.

❖ **Boya Akıtma solüsyonu (Destaining)**

- 50 ml MeOH (% 10)
- 50 ml Glasial asetik asit (% 10)
- 400 ml dH₂O
- Oda sıcaklığında muhafaza edildi.

❖ **DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole)**

- 1.0 µg/ml DAPI
- 1 µg/ml p-phenylenediamin (antifade)
- % 30 Glycerol
- % 70 PBS
- -20°C’de muhafaza edildi.

❖ **10X SDS-PAGE JEL Transfer Tamponu**

- 30.0 g Trizma base
- 144.0 g Glisin
- 1 litre dH₂O’da çözdürüldü.
- Oda sıcaklığında muhafaza edildi.

❖ **1X SDS-PAGE JEL Transfer Tamponu**

- 100 ml 10X Transfer Buffer
- 200 ml 100% MeOH
- 700 ml dH₂O

Veya

- 3.0 g Trizma base
- 14.4 g Glycine
- 800 ml dH₂O
- 200 ml MeOH
- Oda sıcaklığında muhafaza edildi.

❖ **10X TBS (10 mM Tris.HCl, 150 mM NaCl)**

- 12.1 g Trizma base
- 80.0 g NaCl
- 1 L dH₂O
- Yukarıdaki kimyasallar tartılıp 900 ml dH₂O içerisinde çözdürdükten sonra 1M HCl ile pH 8.0'a ayarlandı ve dH₂O ile 1 litreye tamamlandı.
- Oda sıcaklığında muhafaza edildi.

❖ **TBS-T(10 mM Tris.HCl, 150 mM NaCl, Tween 20)**

- 1X TBS içine
- % 0.1 Tween 20 ilave edildi.

❖ **% 30Akrilamid karışımı**

- % 29 (w/v) akrilamid (500 ml için 145 g)
- % 1 (w/v) N,N'-metilen-bisakrilamid (500 ml için 5 g)
- Karışım hazırlandıktan sonra 0.22 µm por çapındaki filtreden geçirildi.
- Filtreden 20 dak. boyunca hava geçirildi.
- +4°C' de karanlıkta saklandı.

❖ **10X SDS-PAGE JEL Yürütme Tamponu**

- 30.0 g Trizma base
- 144.0 g Glisin
- 10.0 g SDS
- Hacim dH₂O ile 1 L'ye tamamlandı.

❖ **4X Ön Ayırma Jeli Tamponu**

- 0.5 M Tris-Cl (pH: 6.8)
- % 0.4 SDS

❖ **4X Ayırma Jeli Tamponu**

- 1.5 M Tris-Cl (pH: 8.8)
- % 0.4 SDS

❖ **4X SDS-PAGE JEL Laemli Buffer/Yürütme Tamponu**

- 40 mM Tris-HCl (pH: 6.8)
- 4 mM EDTA
- % 4 SDS
- % 20 Gliserol
- 200 µl Brom fenol mavisi (10 ml için)
- Kullanımdan önce % 10 β-Merkaptoetanol eklendi.

❖ **RIPA buffer**

- 10 mM Tris-Cl, pH: 8.0
- % 0.1 SDS
- % 1 Triton X-100
- % 0.1 Sodyum Deoksikolat
- 1 mM EDTA
- 1 mM EGTA
- 140 mM NaCl

Kullanımdan önce gerekli miktarda proteaz inhibitörü (NaF, Na₃VO₄, PMSF ve 7X PIC) eklenmelidir.

Ayırma jeli (Separating) (10 ml)	6%	8%	10%	12%	15%
1) 4x ayırma-jel tamponu	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
2) % 30 akrilamid karışımı	2.0	2.7	3.3	4	5
3) H ₂ O	5.4	4.7	4.1	3.4	2.4
4) % 10 APS	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
5) TEMED	0.008	0.006	0.005	0.005	0.005

Tablo 3.2 Ayırma Jeli bileşenleri

Ön Ayırma (Stacking) Jeli		10 ml	5ml	2.5 ml
	1) 4x ön ayırma jeli tamponu	2.5 ml	1.25	0.625
	2) % 30 akrilamid karışımı	1.7 ml	0.85	0.425
	3) H ₂ O	5.7 ml	2.85	1.425
	4) % 10 APS	0.15 ml	0.075	0.038
	5) TEMED	0.010 ml	0.005	0.005

Tablo 3.3 Ön Ayırma Jeli bileşenleri

	Developer Solüsyonu	Fixer Solüsyonu
2 LİTRE SOLÜSYON	650 ml dH₂O 1 L A solution 350 ml dH₂O	600 ml dH₂O 1L A solution 100 ml B solution 300 ml dH₂O

Tablo 3.4 Film solüsyonu bileşenleri

3.2.3. Hücre Kültürü

Tez çalışmasında Benign Prostat Hiperplazisi Hücre Hattı BPH-1 kullanıldı. Hücrelerin besin gereksinimlerini karşılamak amacıyla ortam olarak RPMI-1640 üzerine,

- İnaktive edilmiş (56 °C su banyosunda 30 dakika inkübe edildi ve oda sıcaklığına gelene kadar bekletildi) % 10 Fötal Sığır Serum (FBS)
- % 1 L-glutamin (L-glu)
- % 1 Penisilin/ Streptomisin (P/S) ilave edilerek ortam kullanıma hazır hale getirildi.

3.2.3.1. Hücrelerin Üretilmesi

Steril cam pastör pipetleri kullanarak vakum pompası yardımıyla ortam uzaklaştırıldı.

Hücre yoğunluğuna uygun hacimde taze besi ortamı hücreler üzerine ilave edildi (10 cm'lik kültür kapları için 8 ml ortam) ve 37 °C'de % 5 CO₂'li inkübatöre kaldırıldı.

BPH-1 hücre hattının üretilmesi için birer gün aralıklarla eski besi ortamı vakum pompası ile uzaklaştırıldıktan sonra su banyosunda önceden 37 °C'de ısıtılmış RPMI-1640 'den 8 ml yavaşça eklendikten sonra, 37 °C'de % 5 CO₂'li inkübatöre kaldırıldı.

3.2.3.2. Hücrelerin Pasajlanması

- Steril cam pastör pipetleri kullanarak vakum pompası yardımıyla ortam uzaklaştırıldı.
- Kültür yüzeyi Ca²⁺ ve Mg²⁺ içermeyen steril PBS ile bir kez yıkandı.

- PBS uzaklaştırıldıktan sonra 1 ml tripsin-EDTA solüsyonu ilave edildi ve 37 °C'de % 5 CO₂'li inkübatörde 3-4 dakika hücreler yüzeyden kalkana kadar bekletildi.
- Hücre yoğunluğuna uygun hacimde taze besi ortamı hücreler üzerine ilave edildi ve hücreler pipet yardımıyla homojenize edildi.
- Homojenize edilen hücreler yeni kültür kabındaki ortamın üzerine yavaşça ilave edildi ve büyümeleri için 37 °C'de % 5 CO₂'li inkübatöre kaldırıldı.

3.2.3.3. Hücrelerin Dondurulması ve Çözdürülmesi

3.2.3.3.1. Dondurma İşlemi

- Steril cam pastör pipetleri kullanarak vakum pompası yardımıyla ortam uzaklaştırıldı.
- Kültür yüzeyi Ca²⁺ ve Mg²⁺ içermeyen steril PBS ile bir kez yıkandı.
- PBS uzaklaştırıldıktan sonra 1 ml tripsin-EDTA solüsyonu ilave edildi ve 37 °C'de % 5 CO₂'li inkübatörde 3-4 dakika hücreler yüzeyden kalkana kadar bekletildi.
- Hücreler üzerine 3-4 ml besi ortamı eklenerek hücreler pipetleme ile homojen hale getirildi.
- 150 rcf'de 5 dk santrifüjlenerek elde edilen hücre pelleti üzerine % 90 FBS ve % 10 DMSO ilave edildi ve hücre peleti pipetlenerek homojen hale getirildi. Daha sonra hücreler 1ml hacimde kriyotüplere aktarılarak -86 °C derin dondurucuda ve/veya -196 °C'de sıvı azot içerisinde saklandı.

3.2.3.3.2. Çözdürme İşlemi

Stoklanmış hücrelerden araştırma veya üretim amacıyla yeni kültürler hazırlanabilir. Çözdürülecek olan hücreler -86 °C derin dondurucudan çıkarıldıktan hemen sonra 37 °C su banyosunda çözdürüldü. Ardından hücre kültür kabındaki 37

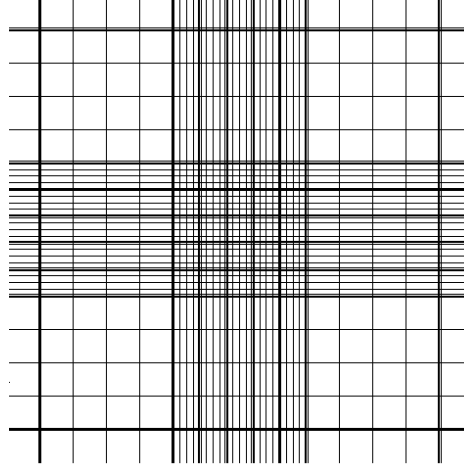
°C'ye ısıtılmış 8 ml ortamın üzerine dikkatlice ilave edildi ve sekiz haraketi yaparak hücrelerin eşit dağılması sağlandı.

3.2.3.4. Hücre Sayımı

- Steril cam pastör pipetleri kullanarak vakum pompası yardımıyla kültür kabındaki ortam uzaklaştırıldı.
- Kültür yüzeyi Ca^{2+} ve Mg^{2+} içermeyen steril PBS ile bir kez yıkandı.
- PBS uzaklaştırıldıktan sonra 1 ml tripsin-EDTA solüsyonu ilave edildi ve 37 °C'de % 5 CO_2 'li inkübatörde 3-4 dakika hücreler yüzeyden kalkana kadar bekletildi.
- Hücreler üzerine 3-4 ml besi ortamı eklenerek hücreler pipetleme ile homojen hale getirildi.
- 150 rcf'de 5 dk santrifüjlenerek elde edilen hücre pelleti 1 ml ortamda homojen hale getirildi.
- Sayım için hücre süspansiyonundan 10 μl alınıp tripan mavisıyla 100 μl 'ye tamamlandı.
- Karışım pipetle homojenize edildi.
- Hemositometre üzerine bir lamel koyulur ve sayılacak hücre süspansiyonu bu ikisi arasına pipetle kenardan verildi.
- Hücreler görülen 9 büyük karede sayıldı.

Mililitredeki hücre sayısını (hücre sayısı/ml) belirlemek için aşağıdaki formülden yararlanıldı:

$$\text{Hücre sayısı/ml} = \frac{\text{Sayılan hücre miktarı} \times \text{Dilüsyon oranı (10)} \times 10^4}{9}$$



Şekil 3.1 Hemositometrenin Mikroskop Altında Görüntüsü

3.2.4. BPH-1 Hücre Hattının Üreme Kinetiği Eğrisinin Çıkartılması

- Kültürde bulunan BPH-1 hücreleri hemositometre ile sayılıp 3 tekrar olacak şekilde kültür kaplarına eşit olarak ekildi.
- Her bir kültür kabında bulunan hücre miktarı her gün sayılarak kayıt altına alındı.
- Bu işlem aralıksız olarak 16 gün devam ettirildi ve hücrelerin üreme miktarları hesaplandı.

3.2.5. Sitotoksikite Analizleri (MTT)

Sitotoksikite analizleri için kolorimetrik bir yöntem olan MTT (3- [4,5-dimethylthiazol- 2- yl]- 2,5- diphenyl- tetrazolium bromide) oluşumu ölçüldü. Hücre çoğalması; steril olarak PBS tamponunda hazırlanan 5 mg/mL MTT stok solüsyonun, kullanımdan az önce 1:10 oranında üretim ortamı ile dilüe edilip, 0.5 mg/ml oranında hazırlandı. BPH 1 hücre hattında ,Ulusal Bor Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiş olan DPB, BA, BO maddelerinin anti-proliferatif etkileri denendi. Doz aralığı 1 μ M -10 μ M- 100 μ M- 500 μ M- 1 mM- 2.5 mM- 5 mM- 7.5 mM olarak belirlendi. 96 kuyucuklu kültür kaplarına kuyucuk başına 8×10^3 hücre ekilerek 24, 48 ve 72 saat süreyle madde uygulaması yapıldı. Süreler dolduktan sonra vakum

pompası ile maddeli ortam uzaklaştırılıp 5 mg/mL MTT, ortamla 0.5 mg/ml seyreltikten sonra kuyucuk başına 200 µL eklendi. 96 kuyucuklu kültür kabındaki MTT ışıktan etkilenmemesi için alüminyum folyo ile sarılıp 37 °C’de % 5 CO₂’li inkübatörde 4 saat bekletildi. Süre dolduktan sonra MTT içeren ortam atılıp, oluşan mavi formazan kristallerinin 200 µL % 100 DMSO içerisinde çözülmesi sağlandı. Oluşan mavi formazan miktarı 570-690 nm referans aralıklarında mikroparka okuyucu kullanılarak ölçüldü. % Hücre canlılığı, madde uygulanan hücrelerin absorbansı / kontrol hücrelerinin absorbansı olarak hesaplandı. Sonuçlar Microsoft Excel (XP) ve GraphPad yazılımı aracılığıyla grafiksel olarak değerlendirildi, her bir maddenin IC₅₀ değeri (hücre proliferasyonunun % 50 oranında inhibe eden konsantrasyon değeri) hesaplandı.

3.2.6. Western-Blot (İmmunoblotlama) Uygulamaları

Western-Blot yönteminde amaç, doz ve zamana bağlı etkilerin optimize edilerek poliakrilamid jellerde proteinlerin yürütülmesi, ayrıştırılması ve özgül antikolar ile yapılan işaretlemeler sonucunda ilgilenilen proteinlerin ekspresyon seviyelerindeki değişikliklerin belirlenmesidir.

3.2.6.1. Protein İzolasyonu

- Belli dozdaki maddenin saati dolduktan sonra ortam uzaklaştırıldı ve hücreler soğuk PBS ile bir defa yıkandı.
- Hücreler üzerine RIPA Modified liziz tamponu ilave edilerek (0.5 ml → 10⁷ cells/ 100 mm petri/ 150 cm² flask; 0.25 ml → 10⁶ cells/60 mm petri) hücreler bir kazıyıcı ile kazındı ve pipetleme yapıp ependorf tüplerine aktarıldı (tüm bu işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi).
- Kullanımdan önce RIPA Modified liziz tamponu içerisine gerekli miktarda proteaz inhibitörleri [PIC (Proteaz İnhibitörü-hazır stok kullanılır- roche cocktail-14X), NaF (son konsantrasyon 1mM, stok 30X), NaVO₃ (son konsantrasyon 1 mM, stok 100X), PMSF (100 X’lik hazır

stok kullanılır, son konsantrasyon 1mM), Phosphatase inhibitörü (hazır stok kullanılır-Roche cocktail-20X seyreltme)] ilave edildi.

- Örnekler buz üzerinde 15 dakikada bir karıştırılarak 45 dakika inkübe edildi.
- Tamamen hücre parçalanması/homojenizasyonu için % 25 güçte, % 50 pulse, 1 kez 20 saniye sonikasyon yapıldı.
- Örnekler +4 °C'de 12,000 rcf'de 10 dk santrifüj edildi ve süpernatant toplam hücresel protein olarak yeni ependorf tüplerine aktarıldı ve protein lizatu -86 °C'ye kaldırıldı.

3.2.6.2. Protein Miktarının Belirlenmesi

Elde edilen lizatlardaki protein miktarı Lowry protein miktarı ölçüm kiti (Biorad DC Protein Assay) kullanılarak aşağıdaki protokole göre belirlendi.

- 96-kuyucuklu hücre kültürü kaplarına 2.5 µl protein lizatu örneği eklendi. Kör örneğinde protein lizatu yerine 2.5 µl RIPA modified tamponu kullanıldı.
- Protein örnekleri üzerine 12.5 µl A+S reaktifinden ilave edildi. A+S reaktifi kullanımdan önce A/S oranı 50 olacak şekilde toplam örnek miktarına göre hazırlandıktan sonra örnekler üzerine dağıtıldı.
- Son olarak karanlıkta örnekler üzerine 100 µl B reaktifinden eklenerek 15 dk oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı.
- İnkübasyon bitiminde mikropłaka okuyucuda 690 nm'de absorbans ölçümleri yapıldı.
- Elde edilen absorbans değerlerinden, albümin protein standart grafiğı ile elde edilen denklem aracılığıyla protein miktarları µg /µl olarak belirlendi.

3.2.6.3. Proteinlerin SDS-PAGE ile Ayrılması

- SDS-PAGE aparatının camları sırasıyla dH₂O-etanol-izopropanol ile silinir ve jelin dökülmesi için camlar ve sıkıştırma aparatına yerleştirilerek hazır hale getirildi.

- Jel konsantrasyonu proteininin moleküler ağırlığına göre seçildikten sonra ayırma jeli hazırlandı ve aparata döküldü (hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilmelidir) ve üst yüzeyi izopropanol ile düzleştirilerek donması için 30-40 dakika bekletildi.

Protein Büyüklüğü (kDa)	Jel Yüzdesi (%)
4-40	20
12-45	15
10-70	12
15-100	10
25-200	8

Tablo 3.5 Protein Büyüklüklerine Göre Jel Yüzdeleri

- Donan ayırma jelinin üzerindeki izopropanol uzaklaştırıldıktan sonra depolama jeli hazırlandı. Aparata depolama jeli dökülerek tarak yerleştirilir ve donması için 30-40 dakika beklendi.

3.2.6.4. Örneklerin Hazırlanması

- Gerekli hacimde 4X yükleme tamponu içerisine % 10 oranında beta-merkaptotanol eklendi ve kısa bir santrifüj yapıldı.
- Protein lizatlarından 100 µg miktara karşılık gelen hacim üzerine su ve 4X yükleme tamponu (7.5 µl) eklenerek toplam hacim 30 µl'ye tamamlandı.
- Hazırlanan protein örnekleri 95 °C' de 5 dk denatüre edildi.
- Denatürasyonun hemen ardından örnekler buz üzerine alındı ve jele yüklemeyen önce kısa bir santrifüj yapıldı.
- Kuyucuklara yüklenen örnekler uygun voltajda (80 V) ve jelin en sonuna gelene dek (3-4 saat) yürütüldü.

3.2.6.5. Membrana Transfer

- İmmuno-blot sandviç aparatının içine sırasıyla bir sünger, iki adet Whatman kağıdı, proteinlerin yürüdüğü jel, PVDF membran, iki adet Whatman kağıdı ve bir sünger yerleştirilerek aparat hazır hale getirildi.
- PVDF membran aparat içine yerleştirilmeden önce metanol içinde, sünger ve whatman kağıdı ise +4 °C’de soğutulmuş transfer tampon ile ıslatıldı.
- Sandviç aparatı jeldeki proteinlerin membrana transfer edilebilmesi amacıyla transfer aparatına yerleştirildi.
- Transfer aparatının içerisine 1X transfer tamponu döküldü ve aparatın kenarlarına soğutucu blok yerleştirildi. Gece boyu +4 °C’de 90 mA’de manyetik karıştırıcı üzerinde transfere bırakıldı.

3.2.6.6. Primer Antikor ile İşaretleme

- Western blot aparatından çıkarılan membran bir kez 5 dakika TBS-T ile yıkandı.
- Bloklama solüsyonuyla (TBS-T içinde % 5 süt tozu) oda sıcaklığında 1 saat inkübasyon yapıldı.
- Bloklamadan sonra membran TBS-T ile 2 defa yıkandı.
- Membran uygun konsantrasyondaki primer antikor solüsyonu ile oda sıcaklığında 1 saat veya gece boyu +4 °C’de çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı.

3.2.6.7. Sekonder Antikor ile İşaretleme

- Primer antikor solüsyonundan alınan membran 1×15 ve ayrıca 3×5 dakika TBS-T ile yıkandı.
- 1 saat sekonder antikor inkübasyonuna (% 0.5 süt tozu içeren TBS-T içerisinde) bırakıldı.
- 1×15 ve 3×5 dakika TBS-T ile yıkama yapıldı.

3.2.6.8. Bantların Görüntülenmesi

- Karanlık odada membran üzerine hazırlanan ECL-plus kiti solüsyonu (A:B solüsyonu 1:1 oranında 1 ml olarak hazırlandı) döküldü.
- Solüsyonun membran üzerine tamamen yayılması için, 5 dakika inkübe edildi.
- Kasetin içinde iki asetat kâğıdı arasına yerleştirilen membran üzerine film konularak farklı sürelerde pozlama gerçekleştirildi.
- Film 3 dakika developer ve 5 dakika fikser solüsyonundan geçirilerek bantlar film üzerinde görüntülendi.

3.2.7. İmmüno Floresan İşaretleme

İmmüno floresan yönteminde araştırılan protein, özgül antikorlarla işaretlenerek floresan ışık altında mikroskopik inceleme yapıldı.

3.2.7.1. Hücrelerin Hazırlanması

% 70 EtOH'de bekletilen lamellerin steril kabin içinde kağıt mendil üzerine konularak kuruması beklendi ve ardından lameller 6 kuyucuklu kültür kaplarına düzgün bir şekilde yerleştirildi. Hücreler; içlerinde lamel bulunan kültür kaplarına 2 ml ortam içerisinde % 50-60 yoğunlukta olacak şekilde pasajlandı ve 37 °C'de % 5 CO₂'li inkübatörde 24 saat inkübe edildi. Hücreler madde uygulamaları yapıp deney tasarımına uygun şekilde kültür edildi. Madde uygulama süresi dolduktan sonra lamellerin üzerindeki hücreler fikse edildi.

3.2.7.2. Fiksasyon

- Ortam uzaklaştırılıp 1 ml PBS ile bir kez yıkama yapıldı.
- 1 ml % 4 paraformaldehit eklenerek hücreler oda sıcaklığında 1 saat fikse edildi.
- 1 ml PBS ile 1 kez yıkama yapıldı.

- Oda sıcaklığında ve çalkalayıcı üzerinde 1 ml % 0.2 Triton X-100 içeren PBS ile 5 dk inkübasyon yapılarak hücreler geçirgen hale getirildi.
- 1 ml PBS ile bir kez yıkama yapıldı.

3.2.7.3. Antikor İşaretleme

- % 1 BSA içeren PBS ile 5 dakika oda sıcaklığında bloklama yapıldı ve bloklama solüsyonu uzaklaştırıldı.
- Kullanım konsantrasyonları optimize edilmiş primer antikorlar % 1 BSA içeren PBS içerisinde seyreltilerek her lamele 50 µl hacimde damlatıldı ve lamellerin üzeri parafilm ile kapatılarak 37 °C’de 1 saat inkübasyona bırakıldı.
- Parafilmeler uzaklaştırılarak 4 defa PBS yıkaması yapıldı.
- % 1 BSA içeren PBS içerisinde seyreltilen sekonder antikorlar her lamele 50 µl hacimde damlatıldı ve lamellerin üzeri parafilm ile kapatılarak 37 °C’de 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Parafilmeler uzaklaştırılarak 4 defa PBS yıkaması yapıldı.
- Lameller üzerine 1 ml % 70 EtOH eklendi ve oda sıcaklığında 1 dakika bekletildi.

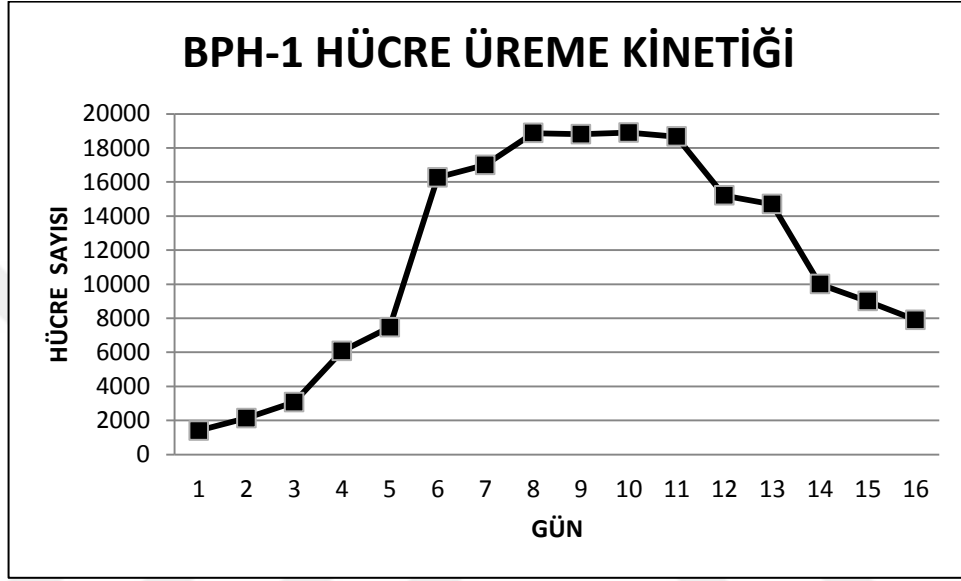
3.2.7.4. DAPI ile boyama

- Lameller üzerine 1 ml % 100 EtOH eklendi ve 1-2 dakika bekletildi.
- % 100 etanol içindeki hücreler 6 kuyucuklu kültür kaplarından çıkarılarak kağıt mendiller üzerine konuldu ve kuruması bekledi.
- Hücrelerin lamel üzerinde tutunduğu yüzeye 10 µl DAPI (0.25 µg/ml) damlatıldı ve ters çevrilerek lamaların üzerine kapatıldı.
- Floresan mikroskobu ile inceleme yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. Hücre Üreme Kinetiği

BPH-1 hücre hattına ilişkin üreme kinetiği eğrisi Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1 BPH-1 Hücrelerinin Üreme Kinetiği

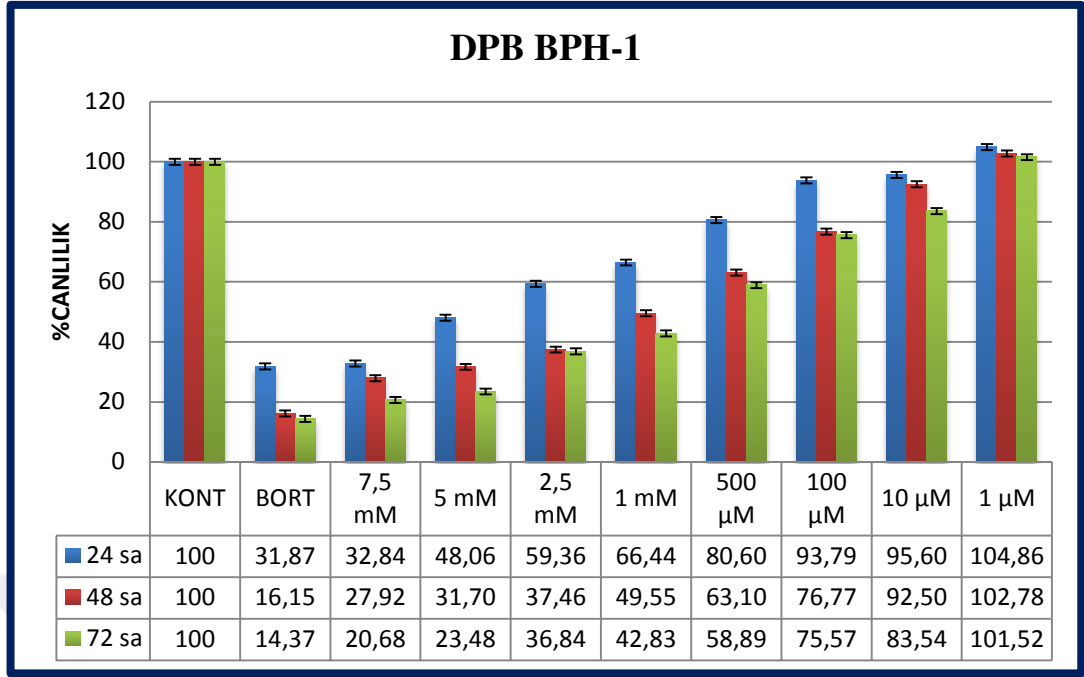
- Adaptasyon fazı: 1-3. gün arası
- Logaritmik faz: 3-8. gün arası
- Tepe fazı: 8-11. günler
- Ölüm fazı : 11. gün ve sonrası şeklinde belirlendi.

Elde edilen verilere göre, bu hücre hattında madde uygulaması ve sonrasındaki sitotoksiste ve protein izolasyonu işlemlerinin yapılması için 3 ile 8. günler arası en uygun zamanlar olarak belirlendi. Sonuç olarak bu hücre hattında gerçekleştirilen bütün uygulamalar logaritmik faz süresinde yapıldı.

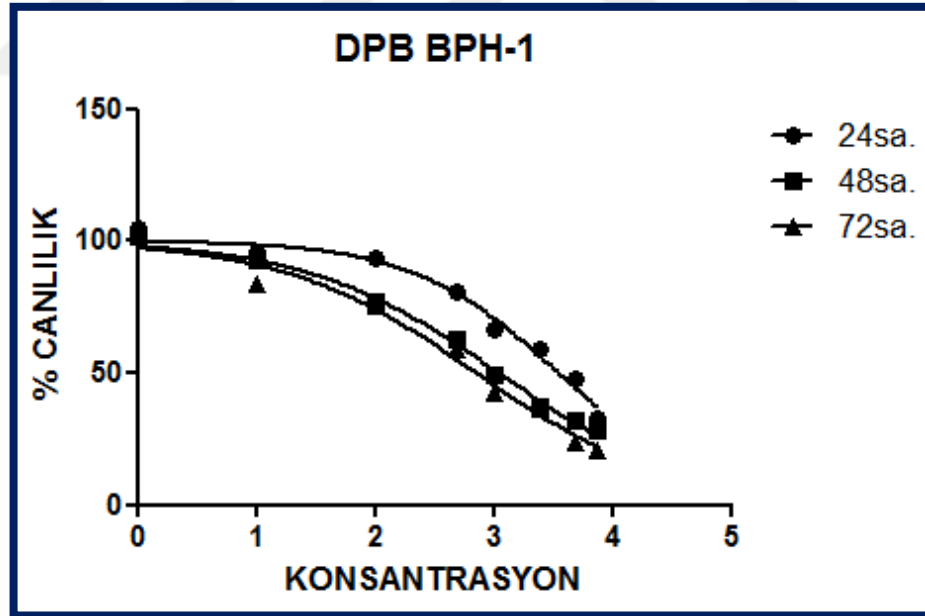
4.2. Sitotoksisite Analizleri (MTT)

Tez çalışması kapsamında MTT ile sitotoksisite denemeleri; hücre kültürlerinin büyüme profillerinin çıkarılması, maddelerin uygulama süreleri ve dozlarına bağlı olarak gözlenecek sitotoksik veya anti-proliferatif etkinin belirlenmesi ve bu etkilerin gözleendiği optimum konsantrasyon değerlerinin (IC_{50} değerlerinin) belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bununla birlikte, düşük konsantrasyonda aktivite gösteren en etkin bileşiğin belirlenebilmesi için de sitotoksisite analizlerinden yararlanılmıştır.

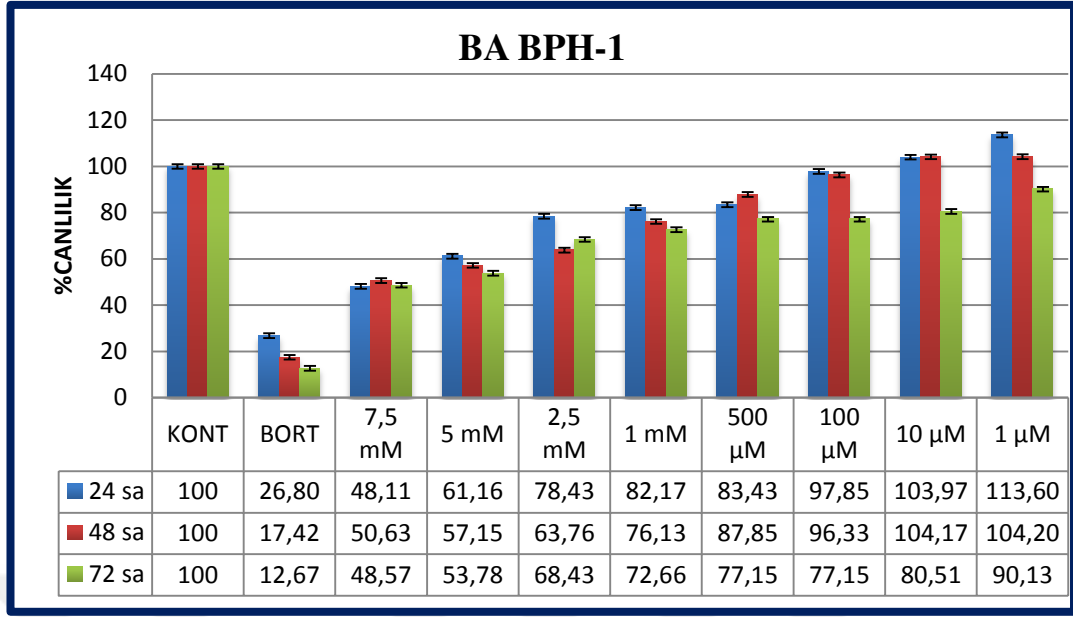
İlk olarak BPH-1 hücre hattında (BOREN) Ulusal Bor Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiş olan BO, BA ve DPB anti-proliferatif etkileri karşılaştırmalı olarak denendi. BPH-1 hücrelerinin belirlenen optimum sayıda (8×10^3 hücre/kuyucuk) 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekilmesinden sonra, hücrelere belirli dozlarda (7.5 mM - 5 mM – 2.5 mM - 1 mM - 500 μ M - 100 μ M - 10 μ M - 1 μ M) 24, 48 ve 72 saat süreyle madde uygulaması yapılmış ve uygulamalardan sonra 570-690 nm dalga boylarında spektrofotometrik ölçüm yapılarak sonuçlara ulaşıldı. Ölçüm sonucunda elde edilen absorbans değerlerinden, kontrol hücreleri % 100 olarak kabul edilip madde uygulamalarında gözlenen % canlılık değerleri hesaplandı ve BPH-1 hücre hattında % canlılık eğrileri oluşturuldu (Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7). Ayrıca GraphPad yazılımı kullanılarak uygulanan tüm maddelerin IC_{50} değerleri belirlendi (Tablo 4.1).



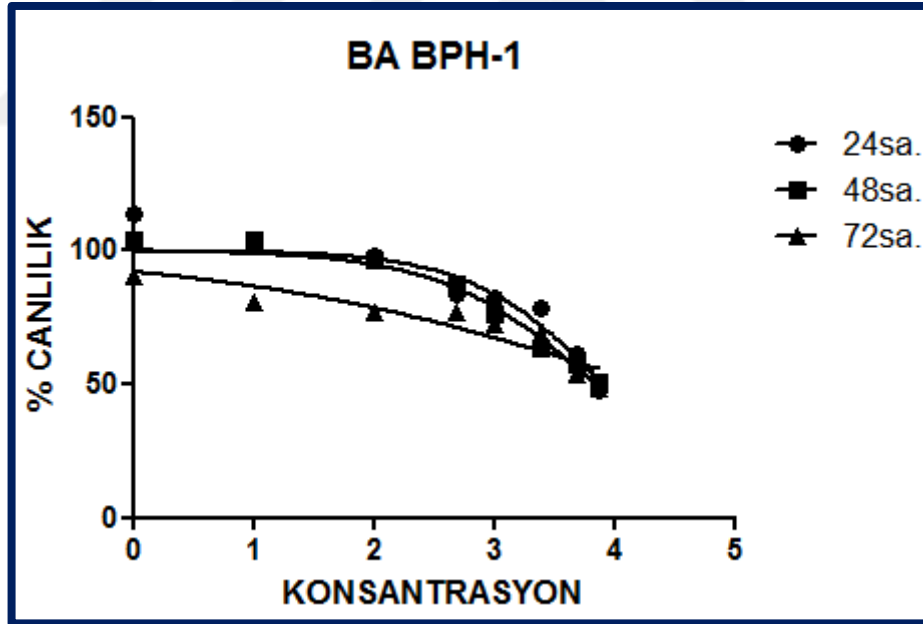
Şekil 4.2 BPH-1 Hücre Hattında DPB Uygulamasının Zaman ve Konsantrasyona Bağlı Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisi.



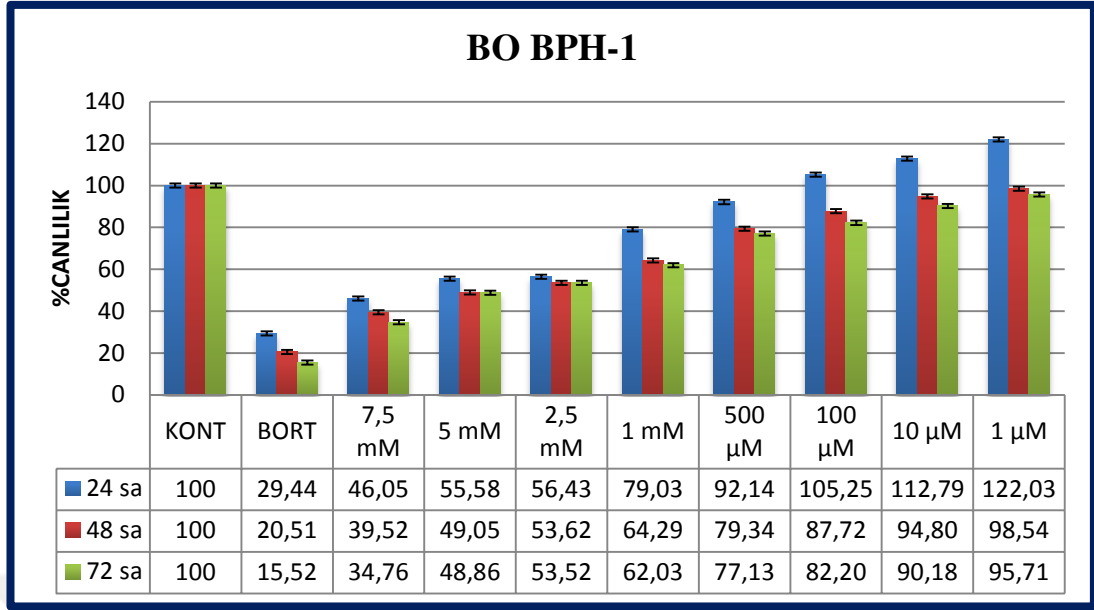
Şekil 4.3 DPB'in BPH-1 Hücre Hattında Graphpad Yazılım Programı İle % Canlilik Değerlerine Karşı Logaritmik Konsantrasyonlarından Elde Edilen Proliferasyon Eğrileri ($p < 0.05$).



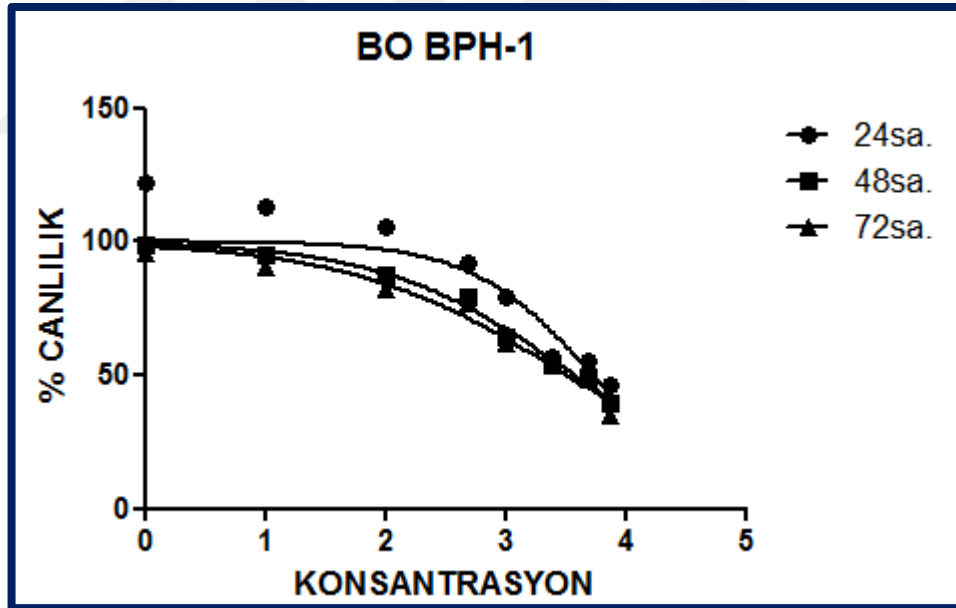
Şekil 4.4 BPH-1 Hücre Hattında BA Uygulamasının Zaman ve Konsantrasyona Bağlı Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisi.



Şekil 4.5 BA'ın BPH-1 Hücre Hattında Graphpad Yazılım Programı İle % Canlılık Değerlerine Karşı Logaritmik Konsantrasyonlarından Elde Edilen Proliferasyon Eğrileri ($p < 0.05$).



Şekil 4.6 BPH-1 Hücre Hattında BO Uygulamasının Zaman ve Konsantrasyona Bağlı Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisi.



Şekil 4.7 BO'nun BPH-1 Hücre Hattında Graphpad Yazılım Programı İle % Canlilik Değerlerine Karşı Logaritmik Konsantrasyonlarından Elde Edilen Proliferasyon Eğrileri ($P < 0.05$).

Bu deneme sonucunda BPH-1 hücrelerinde DPB'ın, BO ve BA'e kıyasla çok daha etkin bir anti-proliferatif ajan olduğu belirlendi.

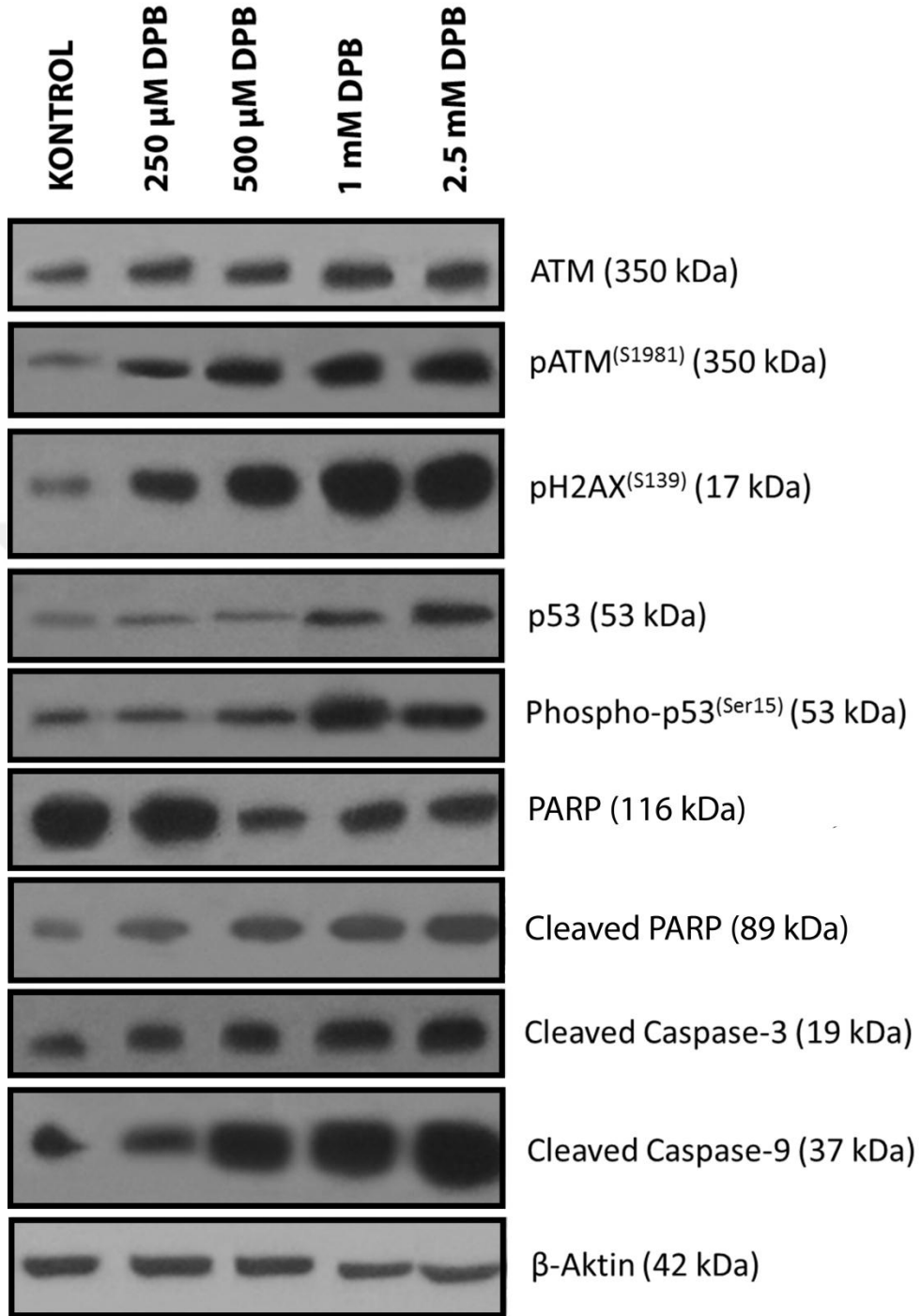
	24 saat	48 saat	72 saat
DPB	2,505 μ M	1,112 μ M	816.6 μ M
BA	7,151 μ M	5,737 μ M	5,099 μ M
BO	5,385 μ M	3,757 μ M	3,283 μ M

Tablo 4.1 DPB, BA ve BO'in Graphpad Yazılım Programı Kullanılarak BPH-1 Hücre Hattında Elde Edilen IC₅₀ Değerleri.

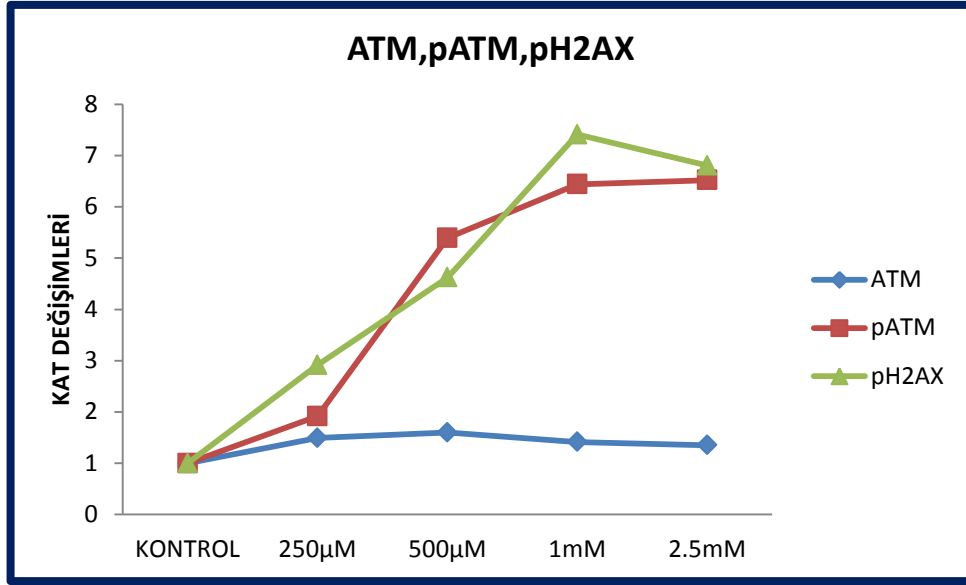
Tüm sitotoksosite analizlerinin sonuçları değerlendirildiğinde, BPH-1 hücre hattında hücre proliferasyonunun inhibisyonu açısından en etkin olan ve en düşük IC₅₀ değerine sahip olan maddenin DPB olduğu belirlendi (Tablo 4.1). Bu veriler doğrultusunda BPH-1 hücrelerine IC₅₀ değerine yakın konsantrasyon aralıklarında 48 saat süreyle DPB uygulaması yapılarak western-blot ve immunofloresan analizleri gerçekleştirildi.

4.3. Western-Blot Uygulamaları

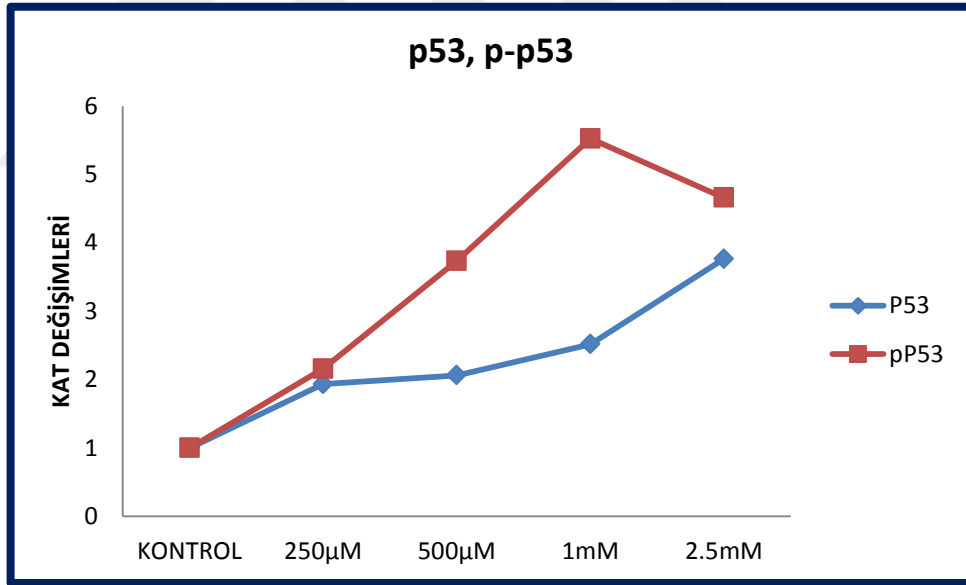
Bu çalışmada Western-Blot uygulaması ile DPB maddesinin BPH-1 hücre hattında DNA hasarı ve apoptoz yolağındaki etkinliği sorgulanmaya çalışıldı. Bu amaç doğrultusunda hücre hatlarına 48 saat süreyle madde uygulaması yapılarak protein izolasyonları gerçekleştirildi ve SDS-PAGE jellerinde yürütüldü. DPB IC₅₀ değerine yakın konsantrasyon aralıklarında olacak şekilde kontrol (Madde uygulanmamış 48 saat süre ile inkübatörde bekletilen BPH-1 hücreleri) 250 μ M - 500 μ M - 1 mM - 2.5 mM değerlerinde hücrelere uygulandı ve doza bağımlı etkinliği incelendi.



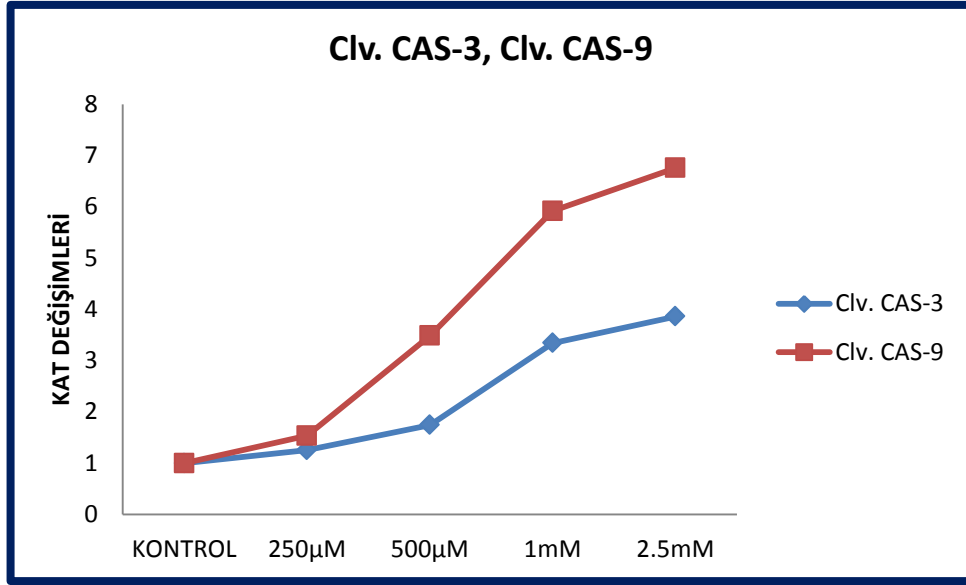
Şekil 4.8 48 Saat Süreyle DPB ile Muamele Edilen BPH-1 Hücrelerinde DNA Hasarı ve Apoptotik Yolaklarda Görev Alan Kritik Proteinlerin Ekspresyon Seviyelerindeki Değişimler.



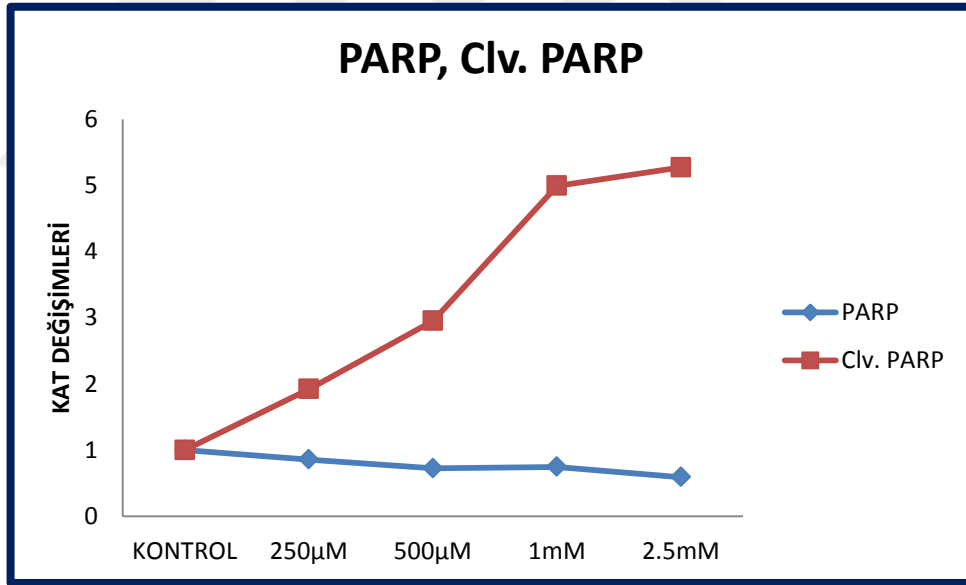
Şekil 4.9 Image J Analiz Programı ile β -Aktin Seviyelerine Göre Normalize Edilen ATM, pATM ve pH2AX Proteinlerinin Kantitatif Olarak Ekspresyon Kat Değişiklikleri.



Şekil 4.10 Image J Analiz Programı İle β -Aktin Seviyelerine Göre Normalize Edilen p53 ve p-p53 Proteinlerinin Kantitatif Olarak Ekspresyon Kat Değişiklikleri.



Şekil 4.11 Image J Analiz Programı ile β -Aktin Seviyelerine Göre Normalize Edilen Clv. Kaspaz-3 ve Clv. Kaspaz-9 Proteinlerinin Kantitatif Olarak Ekspresyon Kat Değişiklikleri.



Şekil 4.12 Image J Analiz Programı ile β -Aktin Seviyelerine Göre Normalize Edilen PARP ve Clv. PARP Proteinlerinin Kantitatif Olarak Ekspresyon Kat Değişiklikleri.

Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'daki protein seviyesi değişiklikleri incelendiğinde, elde edilen sonuçlara göre, 48 saat madde uygulama dozunun artışı ile birlikte $\text{pH2AX}^{(\text{Ser139})}$ ve $\text{pATM}^{(\text{Ser1981})}$ ekspresyonlarının arttığı bununla birlikte ATM'nin ekspresyonunda fazla bir değişiklik olmadığı gözlemlendi. Bu deneme sonucunda

DPB'nin, BPH-1 hücrelerinde pH2AX^(Ser139) ve pATM^(Ser1981) protein seviyelerinin özellikle 1 mM ve 2.5 mM' da önemli ölçüde artışına yol açtığı ve böylece DPB maddesinin BPH-1 hücrelerinde DNA hasarı oluşumunu tetiklediği sonucuna varıldı.

DNA hasarı ile ilişkili proteinlerin seviyesi incelendikten sonra, DPB uygulanmış BPH-1 hücrelerinde apoptozla ilgili kritik proteinlerin seviyesindeki değişiklikler incelendi. İlk olarak p53 ve p-p53 proteinlerinin ekspresyon seviyelerine bakıldı ve kontrole kıyasla madde uygulaması ile birlikte önemli derecede bir artış gözlemlendi. p-p53 ekspresyon seviyesinin özellikle 1 mM DPB uygulamasında en yüksek düzeye ulaştığı belirlendi (Şekil 4.8 ve Şekil 4.10).

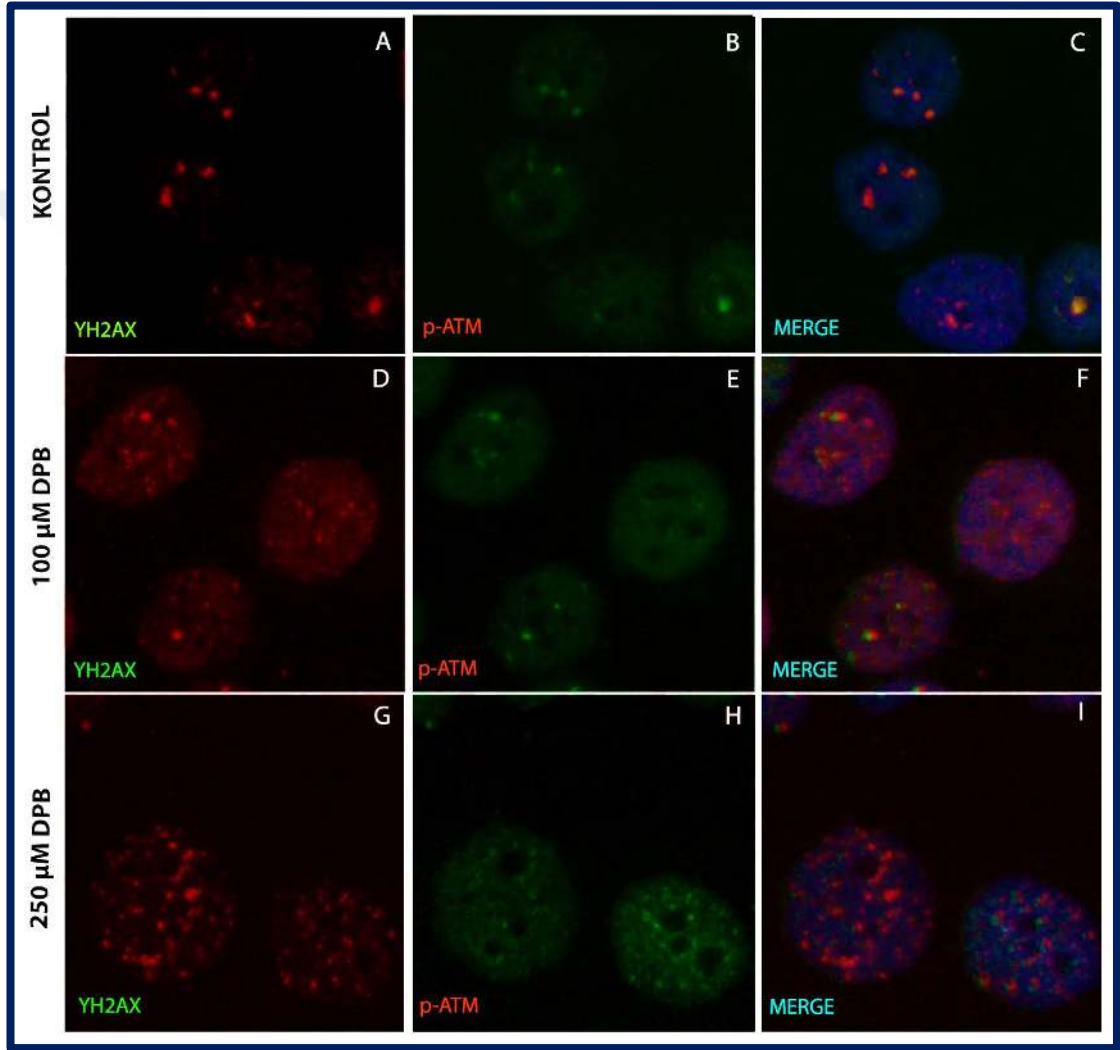
p-p53 ve p53 proteinlerinin yanı sıra apoptozda görevli aktif kaspaz-3 ve aktif kaspaz-9 proteinleri Western-Blot yöntemi ile incelendi. Her iki proteindeki kat değişimleri göz önüne alındığında madde uygulanmamış kontrol hücrelerine oranla 48 saat DPB uygulama dozunun artışı ile birlikte aktif kaspaz-9 ve aktif kaspaz-3 protein seviyelerinin arttığı gözlemlendi (Şekil 4.8 ve Şekil 4.11). Image J analiz programı ile bu artışın aktif kaspaz-9 için kontrole kıyasla yaklaşık 6 kat, aktif kaspaz-3 için ise kontrole kıyasla yaklaşık 3 kat olduğu belirlendi. Ayrıca Şekil 4.8 ve Şekil 4.11'de görüldüğü üzere PARP seviyesinin DPB uygulanmış BPH-1 hücrelerinde dozla doğru orantılı bir şekilde azaldığı bununla birlikte kırılmış PARP seviyesinin ise tam tersi olarak arttığı gözlemlendi.

Sonuç olarak Western-Blot analizleri ile DNA hasarı ile ilişkili incelenen pH2AX^(Ser139) ve pATM^(Ser1981) protein seviyelerinin arttığı, ATM proteininin sabit kaldığı, apoptozda görevli olan p-p53, p53, aktif kaspaz-9, aktif kaspaz-3 ve kırılmış PARP protein seviyelerinin arttığı, PARP protein seviyesinin ise azaldığı belirlendi. Tüm bu veriler doğrultusunda DPB maddesinin BPH-1 hücrelerinde DNA hasarını tetiklediği ve apoptoza yol açtığı kanısına varıldı.

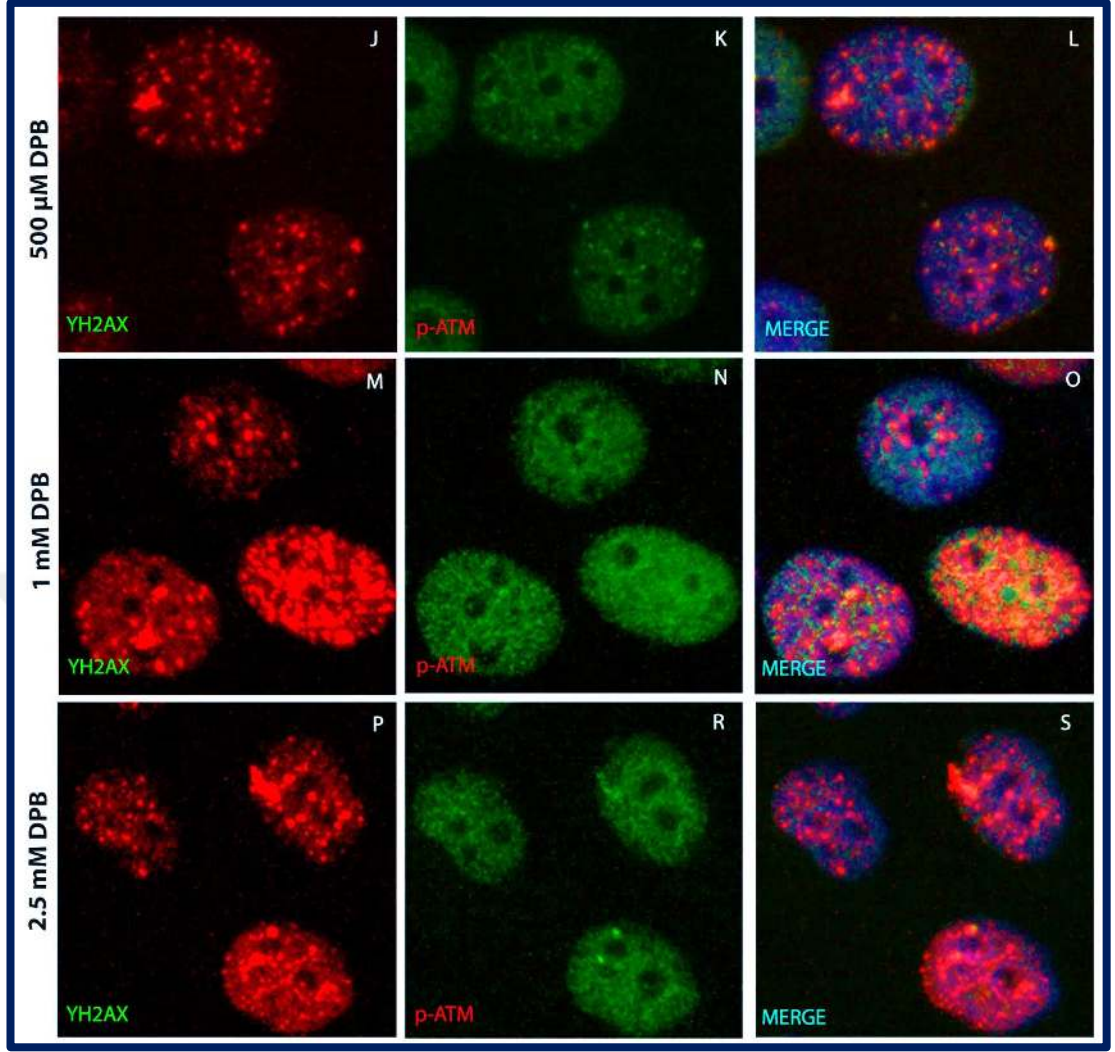
4.4. İmmünofloresan

DPB'nin DNA çift zincir kırık oluşumu aracılığıyla DNA hasarına etkisini değerlendirmek amacıyla immünofloresan mikroskopisi denemesi yapıldı. DPB'nin

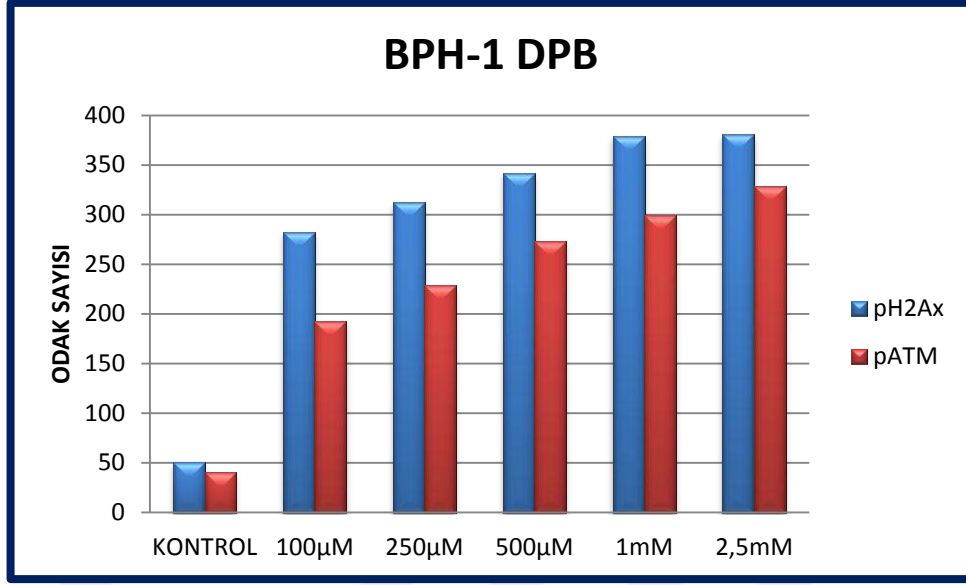
DNA çift zincir kırık oluşumuna sebep olabileceği hipotezinden yola çıkarak pH2AX^(Ser139) odak oluşumları ve pATM^(Ser1981) seviyesi incelendi. Bu amaçla, BPH-1 hücreleri kültür kapları içerisine yerleştirilmiş etanol ile sterilize edilmiş lameller üzerinde üretilerek, immunofloresan için hazırlandı. DPB varlığında ve yokluğunda (kontrol) pH2AX^(Ser139) odak oluşumları ve pATM^(Ser1981) seviyesi belirlendi.



Şekil 4.13 BPH-1 Hücrelerinde 48 Saat Süreyle DPB Uygulamasının DNA Hasarı Belirteci H2AX ve ATM Fosforilasyonuna (pH2AX^(ser139) ve pATM^(Ser1981)) Etkisi. A,B,C. Madde uygulanmamış kontrol hücreleri. D,E,F. 100 µM DPB uygulanmış hücreler. G,H,I. 250 µM DPB uygulanmış hücreler. pH2AX^(ser139) AlexaFlour 594 (Kırmızı), pATM^(Ser1981) AlexaFlour 488 (Yeşil) ve hücre nukleusları DAPI ile işaretlenmiştir. C, F ve I tüm işaretlemelerin aynı bölgelerinin birleştirilmiş görüntüsünü (merge) temsil etmektedir. Bütün imajlar aynı büyütme (60X) ve aynı pozlama ayarlarında çekildi.



Şekil 4.14 BPH-1 Hücrelerinde 48 Saat Süreyle DPB Uygulamasının DNA Hasarı Belirteci H2AX ve ATM Fosforilasyonuna ($\text{pH2AX}^{(\text{Ser139})}$ ve $\text{pATM}^{(\text{Ser1981})}$) Etkisi. J, K, L. 500 μM DPB uygulanmış hücreler. M, N, O. 1 mM DPB uygulanmış hücreler. P, R, S. 2.5 mM DPB uygulanmış hücreler. $\text{pH2AX}^{(\text{Ser139})}$ AlexaFlour 594 (Kırmızı), $\text{pATM}^{(\text{Ser1981})}$ AlexaFlour 488 (Yeşil) ve hücre nukleusları DAPI ile işaretlenmiştir. L, O ve S tüm işaretlemelerin aynı bölgelerinin birleştirilmiş görüntüsünü (merge) temsil etmektedir. Bütün imajlar aynı büyütme (60X) ve aynı pozlama ayarlarında çekildi.



Şekil 4.15 BPH-1 Hücrelerinin DNA Hasarı Sonucu Oluşturdıkları Odak Sayısı. pH2AX^(S139) odak sayısı ve pATM^(S1981) seviyesi her bir hücre nükleusu için ölçüldü ve ortalama değerler grafiğe aktarıldı. Hücre başına odak oluşumu dikkate alındı. Her bir örnek grubu için en az 200 hücre sayıldı ($p \leq 0.01$).

İmmüno Floresan ile elde edilen görüntüler dikkate alındığında, madde uygulanmamış kontrol hücrelerinde bazal miktarda H2AX ve ATM fosforilasyonu görülmektedir. 100 µM DPB uygulanmış BPH-1 hücrelerinde fosforilasyon seviyesinin düşük olduğu, ancak bu düşük fosforilasyon seviyesinin doza bağımlı bir biçimde DPB uygulaması ile birlikte arttığı belirlendi.

Şekil 4.15'te görüldüğü gibi, 100 µM DPB varlığında ortalama pH2AX^(Ser139) odak sayısı ve pATM^(S1981) seviyesi kontrole göre sırayla 5.60 ve 4.80 kat arttığı saptandı. 250 µM DPB uygulanmış hücrelerde ise ortalama pH2AX^(Ser139) odak sayısı ve pATM^(S1981) seviyesinin kontrole göre sırayla 6.12 ve 5.78 kat arttığı belirlendi. Son olarak, 500 µM DPB uygulanmış hücrelerde ortalama pH2AX^(Ser139) odak sayısı ve pATM^(S1981) seviyesi kontrole göre sırayla 6.78 ve 6.82 kat artış kaydedildi.

En fazla odak sayısı artışı 1 mM ve 2.5 mM' da görülmüştür. 1 mM DPB varlığında ortalama pH2AX^(Ser139) odak sayısı ve pATM^(S1981) seviyesi kontrole göre sırayla 7.52 ve 7.48 kat arttığı, 2.5 mM DPB uygulanmış hücrelerde ise ortalama

pH2AX^(Ser139) odak sayısı ve pATM^(S1981) seviyesi kontrole göre sırayla 7.55 ve 8.21 kat arttığı belirlendi.

İmmünofloresan denemesi ile elde edilen veriler doğrultusunda, DPB maddesinin DNA çift zincir kırıklarına neden olarak DNA hasara yol açtığı sonucuna varıldı.



5. TARTIŞMA

BPH, kötü huylu olmayan stromal ve epitelyal bir hücre çoğalmasdır. Genellikle prostat genişlemesine ve düşük üriner sistem semptomlarına (LUTS) sebep olmaktadır (Sutton ve ark. 2006; Penna ve ark. 2009; Lin ve ark. 2014; 2015; Norström ve ark. 2016). Hormonal, genetik ve çevresel faktörler gibi bazı sebepler BPH gelişimi ile ilişkilendirilmiş olmasına rağmen, BPH patogenezindeki anormal büyümeyi düzenleyen moleküler mekanizma hakkında bilinenler çok azdır (Siejka ve ark. 2010; Xie ve ark. 2015). BPH tedavisi, cerrahi müdahale ya da bazı yan etkileri sebebiyle daha sınırlı olan farmakolojik terapiden oluşmaktadır (Lin ve ark. 2015; Zhang ve ark. 2015; Norström ve ark. 2016; Sarbishegi ve ark. 2016). Bu sebeple, BPH semptomlarını azaltabilecek yeni ajanların bulunmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Deney hayvanlarında ve kısıtlı epidemiyolojik çalışmalarda, borun insan ve hayvanlar için birçok yararlı etkisi olan bir biyoaktif mineral element olduğu gösterilmiştir (Nielsen ve ark. 2011). Bor türevlerinin yararlı etkileri olarak anti-proliferatif, anti-enflamatuvar ve anti-kanserojen özelliklerini gösteren günümüze kadar çalışmalar yapılmıştır (Barranco ve ark. 2007; Korkmaz 2008). Bu yüzden, bor türevlerinin BPH tedavisinde umut verici ajanlar olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, bor türevlerinin BPH üzerine etkilerini gösteren çalışmalar çok azdır. Yapılan kısıtlı çalışmalarda yüksek miktarda bor alan erkeklerde prostat büyümesi riskinin azaldığı bulunmuştur. Sudaki bor düzeyinin artmasıyla prostat kanseri, prostat büyümesi riskinin ve ölüm oranlarının azaldığı literatürde ortaya konulmuştur (Korkmaz, 2011; Müezzinoğlu ve ark. 2011). Müezzinoğlu ve ark.ları (2011) tarafından yapılan çalışma sonucunda günlük yüksek bor maruziyeti yoluyla prostatik hücresel prosese bağlı hiperplazi oluşumunun azalabileceği yönünde izlenim edinilmiştir. Diğer bir çalışmada, bor bölgesinde uzun yıllardır yaşayan insanların fertilité ve prostat kanseri ile ilişkileri sorgulanmış ve çalışmanın sonucunda 6.48 mg/gün kronik bor maruziyetinin DSO 1999 ölçütlerine göre sperm profiline hiç bir olumsuz etkisi olmadığı saptanırken, prostat kanserini önleyebileceğini düşündürmüştür. (Sayılı ve ark. 1998; Korkmaz ve ark. 2007; Korkmaz ve ark. 2011).

Bu tez çalışmasında, prostat dokusunun farklılaşma özelliklerinden yola çıkarak, BPH gelişiminde önemli olabileceği düşünülen DNA hasarı ve apoptozda görevli kritik protein seviyelerinin, bor türevleri varlığında değişimlerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, öncelikle BPH-1 hücre hattının üreme kinetiği çıkartılıp, hücre hattında gerçekleştirilen bütün uygulamalar logaritmik faz süresinde yapılmıştır. MTT deneyleri ile bor türevlerinin (BO, BA ve DPB) sitotoksosite analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu denemenin sonucunda, DPB'nin BO ve BA'ya göre daha düşük konsantrasyonda IC_{50} değeri verdiği ve hücre proliferasyonunun inhibisyonu açısından en etkin madde olduğu belirlenmiştir. Belirlenen konsantrasyon değerleri ve zaman dikkate alınarak Western-Blot metodu ile DNA hasarı ve apoptozda görev alan; p $H2AX^{(Ser139)}$, p $ATM^{(Ser1981)}$, ATM, p-p53, p53, aktif kaspaz-9, aktif kaspaz-3, kırılmış PARP, ve PARP proteinlerinin seviyelerindeki değişimler incelenmiştir. Son olarak immunofloresan yöntemi ile doza bağlı DPB uygulamasının DNA hasarına etkisinin ölçülmesi için p $H2AX^{(Ser139)}$ ve p $ATM^{(Ser1981)}$ proteinlerinin fosforilasyonuna bakılmıştır.

Literatürde farklı hücre grupları üzerinde farklı bor bileşenleri kullanılarak yapılmış pek çok çalışma mevcuttur. Bu çalışmalardan birinde, DPB'nin DU145 prostat kanser hücre hattında anti-proliferatif etkisi araştırılmış ve sitotoksitesi WST-1 tetrazolium tuzunun canlı hücrelerce kesilmesi prensibine dayanan bir kolorimetrik denemeyle belirlenmiştir (Korkmaz ve ark. 2014). WST-1'in redüksiyon yüzdesine bağlı olarak canlı hücrelerin hesaplanmasıyla elde edilen sonuçlar, DPB uygulamasının zamana ve doza dayalı bir şekilde büyümeyi inhibe ettiğini göstermiştir. 24 saat için 3.5 mM, 48 ve 72 saat için 2.1 mM olarak hesaplanan IC_{50} değerlerine rağmen, DU145 hücrelerinin hayatta kalması 7 mM DPB uygulamasında % 70'ten fazla baskılanmıştır. Bizim yaptığımız tez çalışmasında ise DPB maddesinin BPH-1 hücre hattında IC_{50} değerleri 24 saat için 2505 μ M, 48 saat için 1112 μ M ve 72 saat için 816.6 μ M olarak hesaplanmıştır. Bu veriler dikkate alındığında DPB maddesinin DU145 prostat kanseri hücre hattına göre BPH-1 hücre hattında anti-proliferatif etkisinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Yine aynı çalışmada, DPB uygulamasıyla apoptotik hücrelerin zamana ve doza bağımlı olarak arttığı belirlenmiştir. Aktin organizasyonunun bozulmasıyla DPB uygulanmış

hücrelerin invazyon ve metastaz kapasitesinin düştüğü ve hücrelerin çoğalma kabiliyetlerinin azaldığı belirlenmiştir. Bu yüzden DPB'in prostat kanserinde apoptozu teşvik ederek tedavi etme özelliği sebebiyle önemli bir terapötik ajan olabileceği düşünülmektedir. Apoptozun bütün mekanizmalarına nasıl etki ettiği bilinmemesine rağmen, ilk kez bu çalışmada DU145 hücrelerinde telomerez aktivitesini baskıladığı gösterilmiştir (Korkmaz ve ark. 2014). Tümör hücrelerindeki sitotoksik etkisi veya FAK, RhoA, RacI, Cdc42 ve MAPK gibi proteinlerin aktivitesini azaltması DPB'nin apoptotik etkisini açıklayabilecek bazı mekanizmalardır. Tez çalışmamızda ise BPH-1 hücre hattında DPB uygulanması sonucu DNA çift zincir kırıkları oluştuğu, bu kırıkların hücrelerin tamir edemeyeceği kadar çok olduğundan hücrelerin apoptoza teşvik edildiği görülmüştür. Bu çalışma ile tez çalışmamızın ortak bir sonucu olarak, DPB maddesinin her iki çalışmada da anti-proliferatif ve apoptoza teşvik eden bir ajan olabileceği düşünülmektedir.

Literatürden bildirildiği ve elde edilen sonuçlarla desteklendiği üzere, bor türevi olan DPB'in yüksek miktarda bor içerdiği ve hücre içine girebilmeyi kolaylaştıracak yan gruplar içermesinden dolayı BO ve BA'e göre çok daha etkili bir anti-proliferatif ajan olduğu düşünülmektedir. 2008 yılında Korkmaz ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücre hatlarında bor türevleri olan boraks pentahidrat, BA ve DPB'in hücre büyümesi üzerine etkileri incelenmiş ve özellikle DPB'in hücre büyümesini engelleyici bir özelliğe sahip olduğu gözlenmiştir (Korkmaz 2008).

ATM proteini DNA çift zincir kırıklarına karşı oluşturulan yanıtta majör role sahiptir. ATM; G1, S faz içi ve G2/M kontrol noktalarında görev alan birçok proteini fosforilleyerek fonksiyon göstermektedir (Hallstrom 2007). Histon H2AX gibi çift zincir kırıklarının tanınması ile ilişkili proteinler ATM ile fosforillenen hedeflerdendir. Çalışmamızda hem Western-Blot hemde immunofloresan denemelerinde artan H2AX ve ATM fosforilasyonları ile DPB maddesinin BPH-1 hücrelerinde DNA hasarına yol açtığı görülmüştür.

Tez çalışmamızın hipotezine göre DPB, BPH-1 hücre hattında DNA hasarına yol açmaktadır ve pro-kaspaz halindeki kaspaz-9 aktive olarak aktif kaspaz-9'a dönüşmektedir. Aktive olan kaspaz-9, effektör kaspaz-3'ü keserek, kaspaz-3 aktivasyonuna yol açar. Kaspaz-3, apoptoz sırasında PARP'a bağlanarak hasarlı DNA'nın onarılmasını önler. Bu bilgiler ile orantılı biçimde yaptığımız tez çalışmasının Western-Blot sonuçlarında aktif kaspaz-9 ve aktif kaspaz-3 proteinlerinin 48 saat süre ile DPB uygulanmış BPH-1 hücre hattında doza bağlı artışları kaydedilmiştir ve bu sonuçlara göre BPH-1 hücrelerin apoptoz yolağına girdiği görülmektedir.

PARP enzimi DNA tamirinde rol oynar ve bu enzimin proteolitik yıkımı DNA onarımını engeller (Boulares ve ark. 1999). PARP aynı zamanda Ca/Mg'ye bağlıdır ve DNA'yı apoptoz boyunca parçalayan endonükleazları inhibe eder (Knappen ve ark. 1998). Bu bilgilerle tutarlı olarak, 48 saat süre ile DPB uygulanmış BPH-1 hücre hatlarında PARP proteininin doza bağlı azalışı DNA'nın tamir mekanizması yoluna girmediğini gösterirken kırılmış PARP seviyesinin tam tersi artış göstermesi ise hücrelerin apoptoz yolağına girdiğini göstermektedir.

Apoptozun ana düzenleyicisi p53'ün, DNA hasarlanmasına yanıt olarak hücre ölümünü başlatıcı işlev gördüğü bilinmektedir. DNA hasarlanması olan normal hücrelerde p53 protein düzeyinde belirgin bir artışla hücre döngüsü G1 'de bloke olur. Büyümenin durmasından sonra DNA onarımı, hücre DNA' sının çoğaldığı S fazına geçmeden önce tamamlanır. Genom hasarı büyük boyutlarda ise hücre programlı hücre ölümüne girer (Lei ve ark. 2006). Bu araştırmanın sonuçlarına p53 ve p-p53 antikollarının seviyeleri yönünden de bakıldığında, kontrole kıyasla DPB uygulanmış BPH-1 hücrelerinde doza bağlı artış olduğu ve hücrelerin apoptoza girdiği bir kez daha gösterilmiştir.

Bu tez çalışmamız çerçevesinde ilk kez DPB uygulamasıyla BPH-1 hücre hattında apoptotik hücrelerin ve DNA hasarına uğramış hücrelerin zamana ve doza bağımlı olarak arttığı belirlenmiştir. Tüm bu sonuçlar tez çalışmamızın anti-proliferatif özelliğe sahip olan bor ve türevlerinin, kronik enflamasyon ve aşırı hücre

proliferasyonu ile karakterize edilen BPH, LUTS ve prostat kanseri hastalıklarından korunmanın yanısıra, tedavi edici potansiyelininde olabileceğini düşündürmektedir.



6. KAYNAKLAR

Abou-Shakra FR, Havercroft JM, Ward NI. Lithium and boron in biological tissues and fluids. *Trace Elem. Med.* 1989; 6: 142.

Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; 281 (5381): 1322-1326.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Chapter 18 Apoptosis: Programmed Cell Death Eliminates Unwanted Cells. *Molecular Biology of the Cell* (textbook) (5th ed.) 2008; Garland Science. p.1115.

Arandjelovic S, Ravichandran KS. Phagocytosis of apoptotic cells in homeostasis. *Nat Immunol.* 2015; 16(9): 907-917.

Ardjomande SL, Martinou JC. Regulation of Bcl-2 proteins and of the permeability of the outer mitochondrial membrane. *C. R. Biologies* 2005; 328: 616-631.

Bakırdere S, Örenay S, Korkmaz M. Effect of Boron on Human Health. *The Open Mineral Processing Journal* 2010; 3: 54-59.

Baptiste N, Prives C. p53 in the Cytoplasm: A Question of Overkill Cell 2004; 487-489.

Barranco WT, Eckhert CD. Cellular changes in boric acid-treated DU-145 prostate cancer cells. *Br J Cancer* 2006; 94: 884–890.

Beldüz AO, Hatipoğlu R, Özkan H. DNA replikasyonu ve Onarımı. *Moleküler Biyoloji*, Sayfa 424, Editörler: Yıldırım A, Bardakçı F, Karataş M, Tanyolaç B. *Protein Sentezi ve Yıkımı*, 2010, Nobel Yayın Dağıtım.

Benderdour M, Bui-Van T, Dicko A, Belleville F. In vivo and in vitro effects of boron and boronated compounds. *J Trace Elem Med Biol.* 1998; 12(1): 2–7.

Benderdour M, Hess K, Dzondo-Gadet M, Dousset B, Nabet P, Belleville F. Effect of boric acid solution on cartilage metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1997; 234: 263-268.

Benderdour M, Hess K, Dzondo-Gadet M, Nabet P, Belleville- Nabet F, Dousset B. Boron matrix and TNF- α synthesis in human fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998; 246: 746-751.

Benderdour M, Van Bui T, Hess K, Dicko A, Belleville F, Dousset B. Effects of boron derivatives on extracellular matrix formation. *J Trace Elem Med Biol.* 2000; 14(3): 168-173.

Blanpain C, Mohrin M, Sotiropoulou PA, Passegue E. DNA-damage response in tissue-specific and cancer stem cells. *Cell Stem Cell* 2011; 8: 16-29.

Boulares AH, Yakovlev AG, Ivanova V, Stoica BA, Wang G, Iyer S, Smulson M. Role of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis. Caspase 3-resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cells. *J Biol Chem.* 1999; 274(33): 22932-22940.

Bradke TM, Hall C, Carper SW, Plopper GE. Phenylboronic acid selectively inhibits human prostate and breast cancer cell migration and decreases viability. *Cell Adhes Migr* 2008; 2(3): 153–160.

Bratton SB, Salvesen GS. Regulation of the Apaf-1–caspase-9 apoptosome. *J Cell Sci.* 2010; 123: 3209-3214.

Breckenridge DG, Germain M, Mathai JP, Nguyen M, Shore GC. Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene* 2003; 22(53): 8608-8618.

Bristow RG, Ozcelik H, Jalali F, Chan N, Vesprini D. Homologous recombination and prostate cancer: a model for novel DNA repair targets and therapies. *Radiother Oncol.* 2007; 83: 220-230.

Btech MF, Martin C, Borrelly J, Hartemann P. Traitement des plaies profondes avec perte de substance; Interet d'une solution d'acide borique a 3%. *Presse Medicale* 1990a; 19: 1050-1052.

Btech MF, Martin C, Pichon C, Borrelly J, Hartemann P. The clinical and bacteriologic outcome of wounds using different Local antiseptic. *J. Orthop. Surgery B.* 1990b; 4: 123-129.

Burlacu A. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *J. Cell. Mol. Med.* 2003; 7: 249-257.

Cain K, Bratton SB, Cohen GM. The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie* 2002; 84(2-3): 203-214.

Cao J, Jiang L, Zhang X, Yao X, Geng C, Xue X, Zhong L. Boric acid inhibits LPS-induced TNF- α formation through a thiol-dependent mechanism in THP-1 cells. *J Trace Elem Med Biol.* 2008; 22(3): 189-195.

Castro P, Xia C, Gomez L, Lamb DJ, Ittmann M. Interleukin- 8 Expression Is Increased in Senescent Prostatic Epithelial Cells and Promotes the Development of Benign Prostatic Hyperplasia, *The Prostate* 2004; 60: 153-159.

Chughtai B, Lee R, Te A, Kaplan S. Role of Inflammation in Benign Prostatic Hyperplasia. *Reviews in Urology* 2011; 13: 147-150.

Cullen SP, Martin SJ. Caspase activation pathways: some recent progress. *Cell Death and Differentiation* 2009; 16: 935–938.

Czornak K, Chughtai S, Chrzanowska KH. Mystery of DNA repair: the role of the MRN complex and ATM kinase in DNA damage repair. *J Appl Genet.* 2008; 49: 383–396.

Derheimer FA, Kastan MB. Multiple roles of ATM in monitoring and maintaining DNA integrity. *FEBS Lett.* 2010; 584: 3675-3681.

Dinant C, Houtsmuller AB, Vermeulen W. Chromatin structure and DNA damage repair. *Epigenetics Chromatin* 2008; 1:9.

Draize JH, Kelley EA. The urinary excretion of boric acid preparations following oral administration and topical applications to intact and damaged skin of rabbits. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1959; 1: 267-276.

Durick KA, Tomita M, Hunt C, Bradley D. Evidence that boron down-regulates inflammation through the NF-KB pathway. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* 2005; 19(5): A1705.

Duydu Y, Başaran N, Ustundag A, Aydın S, Undeger U, Ataman OY, Aydos K, Duker Y, Ickstadt K, Waltrup BS, Golka K, Bolt HM. Reproductive toxicity parameters and biological monitoring in occupationally and environmentally boron-exposed persons in Bandırma, Turkey. *Arch Toxicol.* 2011; 85: 589–600.

Erbaykent-Tepedelen B, Soya E, Korkmaz M. Boric Acid Reduces the Formation of DNA Double Strand Breaks and Accelerates Wound Healing Process, *Biological Trace Element Research*, DOI 10.1007/s12011-016-0729-9.

Fesik SW, Shi Y. Controlling the caspases. *Science* 2001; 294(5546): 1477–1478.

Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun.* 2005; 73(4): 1907-1916.

Finkel T. Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol.* 2003; 15: 247-254.

Fong YK, Milani S, Djavan B. Natural history and clinical predictors of clinical progression in benign prostatic hyperplasia. *Curr. Opin. Urol.* 2005; 15: 35–38.

Foster ER, Downs JA. Histone H2A phosphorylation in DNA double-strand break repair. *Febs J.* 2005; 272: 3231-3240.

Freifelder D. *Molecular Biology.* 1987, Jones and Bartlett Publishers.

Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 2006; 25: 4798–4811.

Gallardo-Williams MT, Maronpot RR, Wine RN, Brunssen SH, Chapin RE. Inhibition of the enzymatic activity of prostate- specific antigen by boric acid and 3-nitrophenyl boronic acid. *Prostate* 2003; 54: 44–49.

Giri D, Ittmann M. Interleukin-8 Is a Paracrine Inducer of Fibroblast Growth Factor 2, a Stromal and Epithelial Growth Factor in Benign Prostatic Hyperplasia. *Am J Pathol.* 2001; 159: 139-147.

Green D. *Means to an End: Apoptosis and other Cell Death Mechanisms.* Cold Spring Harbor, NY 2001: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Guyton KZ, Kensler TW. Oxidative mechanisms in carcinogenesis. *Br Med Bull.* 1993; 49: 523-544.

Hallstrom TA. p53 and DNA damage checkpoint response in the human prostate. Molecular and Cancer Biology Program, Biomedicum Helsinki, Department of Virology, Haartman Institute. University of Helsinki, 2007, Finland.

Hallstrom TM, Laiho M. Genetic changes and DNA damage responses in the prostate. *Prostate* 2008; 68: 902-918.

Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y. Apoptosis - the p53 network. *Journal of Cell Science* 2003; 116: 4077-4085.

Henderson K, Stella S, Kobylewski S, Eckhert CD. Receptor activated Ca²⁺ release is inhibited by boric acid in prostate cancer cells. *PLoS One* 2009; 4(6): 1–10.

Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407: 770-776.

Howe PD. A review of boron effects in the environment. *Biol. Trace Elem. Res.* 1998; 66: 153-166.

Huang X, Halicka HD, Traganos F, Tanaka T, Kurose A, Darzynkiewicz Z. Cytometric assessment of DNA damage in relation to cell cycle phase and apoptosis. *Cell Prolif.* 2005; 38: 223–243.

Huen MS, Chen J. The DNA damage response pathways: at the crossroad of protein modifications. *Cell Res.* 2008; 18: 8-16.

Hunt CD, Idso JP. Dietary Boron as a Physiological Regulator of the Normal Inflammatory Response: A Review and Current Research Progress. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine* 1999; 12: 221–233.

Hunt CD. Boron. In: Macrae R, Robinson RK, Sadler MJ, Eds. *Encyclopedia of Food Science, Food Technology and Nutrition*. London 1993: Academic Press; 440-447.

Hussain SP, Harris CC. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials, *Int J Cancer* 2007; 121(11): 2373-2380.

Hussain SP, Hofseth LJ, Haris CC. Radical Causes of Cancer. *Nature* 2003; 3: 276–285.

Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 2009; 461: 1071–1078.

Jang TH, Kim SH, Jeong JH, Kim S, Kim YG, Park HH. Crystal structure of caspase recruiting domain (CARD) of apoptosis repressor with CARD (ARC) and its implication in inhibition of apoptosis. *Sci Rep.* 2015; 5:9847.

Jeggo P, Lobrich M. Radiation-induced DNA damage responses. *Radiat Prot Dosimetry* 2006; 122: 124-127.

Karam JA. Apoptosis in Carcinogenesis and Chemotherapy. Netherlands 2009: Springer.

Kastan MB, Bartek J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 2004; 432: 316-323.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 1972; 26(4): 239–257.

Khandrika L, Kumar B, Koul S, Maroni P, Koul HK. Oxidative stress in prostate cancer, *Cancer Lett.* 2009; 282(2): 125-136.

Khanna KK, Jackson SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet.* 2001; 27: 247–254.

Kim JS, Krasieva TB, Kurumizaka H, Chen DJ, Taylor AM, Yokomori K. Independent and sequential recruitment of NHEJ and HR factors to DNA damage sites in mammalian cells. *J Cell Biol.* 2005; 170: 341-347.

Knaapen M, De Bie M, Muhring J, Kockx M. Cleaved PARP as a Marker for Apoptosis in Tissue Sections. *American Journal of Pathology* 1998; 152: 885.

Knittel G, Liedgens P, Reinhardt HC. Targeting ATM-deficient CLL through interference with DNA repair pathways. *Front Genet.* 2015; 6: 207.

Korkmaz M, Şaylı U, Şaylı BS, Bakırdere S, Titretir S, Ataman OY, Keskin S. Estimation of human daily boron exposure in a boron-rich area. *British Journal of Nutrition* 2007c; 98: 571–575.

Korkmaz M, Uzgoren E, Bakırdere S, Aydın F, Ataman OY. Effects of Dietary Boron on Cervical Cytopathology and on Micronucleus Frequency in Exfoliated Buccal Cells. *Environ Toxicol.* 2007d; 22: 17–25.

Korkmaz M. Bor Mineralinin İnsanda Erkek Fertilitesi ve Prostat Kanseri Etkisinin Belirlenmesi. PROJE NO: BOREN AR-GE/6, 2007e, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.B.D.

Korkmaz M. Farklı Bor Konsantrasyonlarının Meme Kanseri Hücrelerinin Büyümesine Olası Etkilerinin Araştırılması, PROJE NO: BOREN–2007-G0150, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.B.D., 2008.

Korkmaz M. Boron: Environmental Exposure and Human Health. In: *Encyclopedia of Environmental Health*, Ed: Nriagu JO, Burlington: Elsevier 2011a; 442–445.

Korkmaz M, Yenigün M, Bakırdere S, Ataman OY, Keskin S, Muezzinoglu T, Lekili M. Effects of chronic boron exposure on semen profile. *Biol Trace Elem Res* 2011b; 143(2): 738–750.

Korkmaz M, Avcı CB, Gunduz C, Aygunes D, Tepedelen BE. Disodium pentaborate decahydrate (DPD) induced apoptosis by decreasing hTERT enzyme activity and disrupting F-actin organization of prostate cancer cells. *Tumor Biol.* 2014; 35: 1531–1538.

Langerak P, Russell P. Regulatory networks integrating cell cycle control with DNA damage checkpoints and double-strand break repair. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2011; 366: 3562-3571.

Lawen A. Apoptosis—an introduction. *BioEssays* 2003; 25: 888-896.

Lees-Miller SP, Meek K. Repair of DNA double strand breaks by non- homologous end joining. *Biochimie* 2003; 85: 1161–1173.

Lei Q, Jiao J, Xin L, Chang CJ, Wang S, Gao J, Gleave ME, Witte ON, Liu X, Wu H. NKX3.1 stabilizes p53, inhibits AKT activation, and blocks prostate cancer initiation caused by PTEN loss, *Cancer Cell* 2006; 9: 367-378.

Li W, Laskar A, Sultana N, Osman E, Ghosh M, Li Q, Yuan XM. Cell death induced by 7-oxysterols via lysosomal and mitochondrial pathways is p53-dependent. *Free Radic Biol Med*. 2012; 53(11): 2054-2061.

Lieber MR, Ma Y, Pannicke U, Schwarz K. Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003; 4: 712–720.

Lin J, Zhou J, Xu W, Hong Z, Peng J. Qianliening capsule inhibits benign prostatic hyperplasia angiogenesis via the HIF-1 α signaling pathway. *Exp Ther Med*. 2014; 8(1): 118-124.

Lin J, Zhou J, Zhong X, Hong Z, Peng J. Inhibition of the signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway by Qianliening capsules suppresses the growth and induces the apoptosis of human prostate cells. *Mol Med Rep*. 2015; 11(3): 2207-2214.

Liu B, Chen Y, St Clair DK. ROS and p53: a versatile partnership. *Free Radic Biol Med*. 2008; 44(8): 1529-1535.

Lobrich M, Shibata A, Beucher A, Fisher A, Ensminger M, Goodarzi AA, Barton O, Jeggo PA. GammaH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: strengths, limitations and optimization. *Cell Cycle* 2010; 9: 662-669.

Loft S, Poulsen HE. Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J Mol Med*. 1996; 74: 297–312.

Lord CJ, Ashworth A. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature* 2012; 481: 287-294.

Mahabir S, Spitz MR, Barrera SL, Dong YQ, Eastham C, Forman MR. Dietary boron and hormone replacement therapy as risk factors for lung cancer in women. *Am J Epidemiol*. 2008; 167(9): 1070-1080.

Mcauley EM, Bradke TA, Plopper GE. Phenylboronic acid is a more potent inhibitor than boric acid of key signaling networks involved in cancer cell migration. *Cell Adhes Migr*. 2011; 5(5): 382–386.

Meacham S. What Do We Know about Boron in Relation to Human Health? IV. Uluslararası Bor Sempozyumu 2009, Eskişehir-TURKEY, pp: 533-546.

Mladenov E, Iliakis G. Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of non-homologous end joining pathways. *Mutat Res*. 2011; 711: 61-72.

Morgan MJ, Kim YS, Liu ZG. TNF alpha and reactive oxygen species in necrotic cell death, *Cell Res*. 2008; 18(3): 343-349.

Müezzinoğlu T, Korkmaz M, Neşe N, Bakırdere S, Arslan Y, Ataman OY, Lekili M. Prevalence of prostate cancer in High Boron-Exposed Population: A Community-Based Study. *Biol Trace Elem Res*. 2011; 144(1): 49–57.

Mukherjee B, Kessinger C, Kobayashi J, Chen BP, Chen DJ, Chatterjee A, Burma S. DNA-PK phosphorylates histone H2AX during apoptotic DNA fragmentation in mammalian cells. *DNA Repair (Amst)* 2006; 5: 575-590.

Murray FJ. A Comparative Review Of The Pharmacokinetics Of Boric Acid in Rodents And Humans. *Biol. Trace Elem. Res*. 1998; 66: 331-341.

Nielsen FH. Evidence for the nutritional essentiality of boron. *J Trace Elem Exp Med*. 1996; 9: 215–229

Nielsen FH. Is Boron Nutritionally Relevant. *Nutrition Reviews* 2008; 66(4): 183-191.

Nielsen FH, Meacham SL. Growing evidence for human health benefits of boron. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine* 2011; 16(3): 169–180.

Norström MM, Rådestad E, Sundberg B, Mattsson J, Henningssohn L, Levitsky V, Uhlin M. Progression of benign prostatic hyperplasia is associated with pro-

inflammatory mediators and chronic activation of prostate-infiltrating lymphocytes. *Oncotarget* 2016; doi: 10.18632/oncotarget.8051

O'Driscoll M, Jeggo PA. The role of double-strand break repair - insights from human genetics. *Nat Rev Genet.* 2006; 7: 45-54.

Ohnishi T, Mori E, Takahashi A. DNA double-strand breaks: their production, recognition, and repair in eukaryotes. *Mutat Res.* 2009; 669: 8–12.

Penland JG. Dietary boron, brain function, and cognitive performance. *Environ Health Perspect.* 1994; 102(7): 65-72.

Penland JG. The importance of boron nutrition for brain and psychological function. *Biol Trace Elem Res.* 1998; 66(1-3): 299-317.

Penna G, Fibbi B, Amuchastegui S, Corsiero E, Laverny G, Silvestrini E, Chavalmane A, Morelli A, Sarchielli E, Vannelli GB, Gacci M, Colli E, Maggi M, Adorini L. The Vitamin D Receptor Agonist Elocalcitol Inhibits IL-8-Dependent Benign Prostatic Hyperplasia Stromal Cell Proliferation and Inflammatory Response by Targeting the RhoA/RhoKinase and NF-kB Pathways. *The Prostate* 2009; 69: 480-493.

Polo SE, Jackson SP. Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. *Genes Dev.* 2011, 25. 409-433.

Rainey CJ, Nyquist LA, Christensen RE, Strong PL, Culver BD, Coughlin JR. Daily Boron Intake from the American Diet. *J. Am. Diet. Assoc.* 1999; 99: 335–340.

Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med.* 2010; 49: 1603-1616.

Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2004; 5(11): 897–907.

Rossetto D, Truman AW, Kron SJ, Cote J. Epigenetic modifications in double-strand break DNA damage signaling and repair. *Clin Cancer Res.* 2010; 16: 4543-4552.

Saito Y, Nishio K, Ogawa Y, Kimata J, Kinumi T, Yoshida Y, Noguchi N, Niki E. Turning point in apoptosis/necrosis induced by hydrogen peroxide. *Free Radic Res.* 2006; 40: 619-630.

Sarbishegi M, Khani M, Salimi S, Valizadeh M, Sargolzaei AF. Antiproliferative and Antioxidant Effects of *Withania coagulans* Extract on Benign Prostatic Hyperplasia in Rats. *Nephrourol Mon.* 2016; 8(1):e33180.

Saylı BS, Tuccar E, Elhan AH. An assessment of fertility in boron-exposed Turkish subpopulations, *Reprod. Toxicol*, 1998; 12-3: 297-304.

Schauer IG, Rowley DR. The functional role of reactive stroma in benign prostatic hyperplasia, *Differentiation* 2011; 82: 200–210.

Schetter AJ, Heegaard NH, Harris CC. Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. *Carcinogenesis* 2010; 31(1): 37-49.

Schuler M, Green DR. Transcription, apoptosis and p53:catch-22. *TRENDS in Genetics* 2005; 21:3.

Scorei RI, Popa R Jr. Boron-containing compounds as preventive and chemotherapeutic agents for cancer. *Anti Cancer Agents Med Chem* 2010; 10(4): 346–351.

Scorei R, Mitrut P, Petrisor J, Scorei I. A Double-Blind, Placebo-Controlled Pilot Study to Evaluate the Effect of Calcium Fructoborate on Systemic Inflammation and Dyslipidemia Markers for Middle-Aged People with Primary Osteoarthritis. *Biol Trace Elem Res.* 2011a; 144(1): 253–263.

Scorei RI, Rotaru P. Calcium Fructoborate—Potential Anti-inflammatory Agent. *Biol Trace Elem Res.* 2011b; 143: 1223–1238.

Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, Kumar S. Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death & Differentiation* 2015; 22(4): 526–539.

Shrivastav M, De Haro LP, Nickoloff JA. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res.* 2008; 18: 134–147.

Siejka A, Schally AV, Block NL, Barabutis N. Mechanisms of inhibition of human benign prostatic hyperplasia in vitro by the luteinizing hormone-releasing hormone antagonist cetrorelix. *BJU International* 2010; 106: 1382-1388.

Sutherland B, Strong P, King JC. Determining human dietary requirements for boron. *Biol. Trace Elem. Res.* 1998; 66: 193-204.

Sutton MT, Yingling, M, Vyas A, Atiemo H, Borkowski A, Jacobs SC, Kyprianou N. Finasteride Targets Prostate Vascularity by Inducing Apoptosis and Inhibiting Cell Adhesion of Benign and Malignant Prostate Cells. *The Prostate* 2006; 66: 1194-1202.

Takahashi A, Ohnishi T. Does gamma H2AX foci formation depend on the presence of DNA double strand breaks? *Cancer Lett.* 2005; 229: 171-179.

Takeda M, Shirato I, Kobayashi M, Endou H. Hydrogen peroxide induces necrosis, apoptosis, oncosis and apoptotic oncosis of mouse terminal proximal straight tubule cells. *Nephron* 1999; 81(2): 234-238.

Tanaka T, Kurose A, Huang X, Dai W, Darzynkiewicz Z. ATM activation and histone H2AX phosphorylation as indicators of DNA damage by DNA topoisomerase I inhibitor topotecan and during apoptosis. *Cell Prolif.* 2006; 39: 49-60.

Teramoto S, Tomita T, Matsui H, Ohga E, Matsuse T, Ouchi Y. Hydrogen peroxide-induced apoptosis and necrosis in human lung fibroblasts: protective roles of glutathione. *Jpn J Pharmacol.* 1999; 79(1): 33- 40.

Ushio-Fukai M. Compartmentalization of redox signaling through NADPH oxidase-derived ROS. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11(6): 1289-1299.

Valerie K, Povirk LF. Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene* 2003; 22: 5792-5812.

Von Burg R. Toxicology update. J. Appl. Tox. 1992; 12: 149–152.

Weaver RF. Molecular Biology. 2003, McGrawHill Higher Education.

WHO (World Health Organization) Boron: 8.1.1. Short term toxicity and poisoning incidents. Environmental health criteria 204: Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1998. [Online] Available: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc204.htm>.

Xie C, Sun X, Chen J, Ng CF, Lau KM, Cai Z, Jiang X, Chan HC. Down-regulated CFTR During Aging Contributes to Benign Prostatic Hyperplasia. J Cell Physiol. 2015; 230(8): 1906-1915.

Yan Cui, Meiko I. Winton, Zuo-Feng Zhang, Charlene Rainey, James Marshall, Jean B. De Kernion, Curtis D. Eckhert. Dietary Boron Intake and Prostate Cancer Risk. Oncology Reports 2004; 11: 887-892.

Yuan J, Horvitz HR. A First Insight into the Molecular Mechanisms of Apoptosis. Cell 2004; 116: 53-56.

Zhang N, Ji N, Jiang WM, Li ZY, Wang M, Wen JM, Li Y, Chen X, Chen JM. Hypoxia-induced autophagy promotes human prostate stromal cells survival and ER-stress. Biochem Biophys Res Commun. 2015; 464(4): 1107-1112.

ÖZGEÇMİŞ

Adı	ELİF	Soyadı	SOYA
Doğum Yeri	Yalova	Doğum Tarihi	15.09.1988
Uyruğu	T.C	Telefon	0535 490 36 63
E-mail	tamarayilmaz@gmail.com		

Eğitim Düzeyi	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Celal Bayar Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	2014-Devam etmekte
Lisans	Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü (Moleküler Biyoloji ve Genetik Ağırlıklı)	2008 – 2013
Lise	Şehit Osman Altinkuyu Anadolu Lisesi	1996 – 2004

İş Deneyimi Görevi	Kurum	Süre	Yer
Stajyer	Güneş Patoloji Laboratuvarları	Temmuz- Ağustos 2012	Alsancak, İZMİR
Stajyer	New York University, Department of Genetics	Mart-Nisan 2014	New York, ABD
Stajyer	Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji AD. Laboratuvarı	Haziran-Temmuz 2012	Bornova, İZMİR

Yayınlar

Tepedelen BE, Soya E, Korkmaz M. Boric Acid Reduces the Formation of DNA Double Strand Breaks and Accelerates Wound Healing Process. Biol Trace Elem Res. 2016 May 6.

Tez

• Lisans Bitirme Projesi; “Sığırlarda WNT3A (Wingless-Related MMTV Integration Site 3A) Geninin İncelenmesi”, 2013, Tez Danışmanı: Doç. Dr. Cemal ÜN.

Proje ve Projede Yaptığı Görevler

- Bor ve Türevlerinin Benign Prostat Hiperplazisi (BPH) Üzerine Anti-Proliferatif ve Anti-Enflamatuvar Etki Mekanizmasının Araştırılması, TÜBİTAK 1001 Projesi, Bursiyer
- Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, İzmir; Proje Adı: Sığırlarda WNT3A (Wingless-Related MMTV Integration Site 3A) Geninin İncelenmesi; Proje Yürütücüsü: Elif SOYA, TÜBİTAK 2209, 2012-2013.

Analitik Temel Bilgiler

- Hücre Kültürü
- DNA-RNA-Protein-Mitokondriyal DNA İzolasyonu
- PCR, Jel Elektroforezi, Primer Tasarımı
- SDS-PAGE, Western Blot, Southern Blot, ELISA
- Biyoinformatik Analizler (Blast vb.), Sekans Yorumlamaları
- Mikrotomla Kesit Alma, Histokimyasal Teknikler
- İmmunofluoresan teknikler
- Hücre Kültürü

Sertifikalar

- T.C Milli Eğitim Bakanlığı, Bilgisayar Meslek Dalı Eğitim Programları Kurs Sertifikası, Halk Eğitim Merkezi, Yalova, 11 Eylül-06 Ekim 2006.
- T.C Milli Eğitim Bakanlığı, Yabancı Dil (İngilizce) Kurs Sertifikası, Halk Eğitim Merkezi, Yalova, 09 Temmuz-03 Eylül 2006.
- Deniz Kaplumbağaları Araştırma, Kurtarma ve Rehabilitasyon Merkezi (DEKAMER) Deniz Kaplumbağalarının Korunması ve İzlenmesi Çalışmalarına Katılım Sertifikası, Haziran-Ağustos 2011.
- Başarı Belgesi, Fakülteler ve Yüksekokullar arası Voleybol Turnuvaları, Fen Fakültesi, Ege Üniversitesi, İzmir, 2009-2013.

Katılınan Kongreler ve Sempozyumlar

- "Kanser ve Genetik kursu" eğitimi 30 Mart 2016 Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye.,
- "Kanser Kök Hücre" bilimsel toplantı 15 Mayıs 2015 Celal Bayar Üniversitesi, Manisa, Türkiye,
- "1.Onkolojide Araştırma Uygulama Kursu" 1 Nisan 2015, 9 Eylül Üniversitesi, İzmir, Türkiye,
- "Laboratuvar Güvenliği" eğitimi 31 Mart 2015 Celal Bayar Üniversitesi, Manisa, Türkiye,
- "Tıbbi Bilimlerde Celal Bayar Üniversitesi Genç Araştırmacı Adaylarına Yönelik Proje Hazırlama ve Yürütme Çalıştayı" eğitimi 22-23 Ocak 2015 Celal Bayar Üniversitesi, Manisa, Türkiye,
- "MicroRNA cancer biomarkers and next generation sequencing techniques" çalıştay, 4-5 Kasım 2014, Gediz Üniversitesi, İzmir, Türkiye.
- "TOEFL Course", Campus Education English Learning Center", Temmuz 2013- Mayıs 2014, New York, ABD.
- "21. Ulusal Biyoloji Kongresi", 3-7 Eylül 2012, İzmir, Türkiye.
- "Discussion Meeting on Sialoglycobiology", 26-27 Kasım 2011, Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye.

- "International 9. İUGEN Molecular Biology and Genetics Students Winter School", 4-6 Mart 2011, İstanbul, Türkiye.
- "Symposium of Bioinformatics and Bionanotechnologic Methods in Oncology", Mayıs 2010, Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye.

Bilgisayar Bilgisi

- Microsoft Office Programları
- Mega 5.2 (Biyoinformatik Programı)
- Graphpad analiz programı
- Image J analiz programı
- Adobe Photoshop

Yabancı Diller

- İngilizce: Çok iyi seviyede okuma ve konuşma
- Gürcüce: Çok iyi
- Rusça: Orta seviye

Eğitim Sınav Sonuçları

- Lisans Bitirme Puanı: 73,3 / 100, 14.06.2013.
- Lise: Bitirme puanı: 87,2 / 100, 2008.

Katılınan Aktiviteler

- Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Voleybol Takımı; 2009-2013
- Arjantin Tango, Ege Üniversitesi Arjantin Tango Topluluğu, 2009.
- Yalova Liselerarası 2000 metre koşu yarışmaları, İkincilik Derecesi, 2005.
- Yalova Kardeş Şehir Projesi, Barış Elçiliği, 2012.

Turnitin Orijinallik Raporu

BOR TÜREVLERİNİN BENİGN PROSTAT HİPERPLAZİSİ (BPH) ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI Elif Soya tarafından



Quick Submit (Quick Submit) den

- 20-Haz-2016 17:08 GST' de işleme konu
- NUMARA: 685285023
- Kelime Sayısı: 17713

Benzerlik Endeksi

%12

Kaynağa göre Benzerlik

Internet Sources:

%5

Yayınlar:

N/A

Öğrenci Ödevleri:

%9

kaynaklar:

- 1 3% match (06-Ağu-2015 tarihli öğrenci ödevleri)
Submitted to Harran Üniversitesi on 2015-08-06
- 2 3% match (01-Haz-2015 tarihli öğrenci ödevleri)
Submitted to Ege Üniversitesi on 2015-06-01
- 3 1% match (04-Ara-2012 tarihli internet)
[http://vfdergi.yyu.edu.tr/archive/2008/19_2/2008_19_\(2\)_73-78.pdf](http://vfdergi.yyu.edu.tr/archive/2008/19_2/2008_19_(2)_73-78.pdf)
- 4 1% match (09-May-2012 tarihli internet)
<http://www.solucan.web.tr/e-saglik/prostat/page/4/>
- 5 1% match (27-Nis-2016 tarihli öğrenci ödevleri)
Submitted to Dumlupınar University on 2016-04-27
- 6 1% match (22-Ara-2015 tarihli öğrenci ödevleri)
Submitted to Selçuk Üniversitesi on 2015-12-22
- 7 < 1% match (21-Tem-2015 tarihli öğrenci ödevleri)
Submitted to Afyon Kocatepe University on 2015-07-21
- 8 < 1% match (01-Eki-2015 tarihli öğrenci ödevleri)
Submitted to Harran Üniversitesi on 2015-10-01
- 9 < 1% match (09-May-2012 tarihli internet)
<http://www.mpoullis.net/bsapoptosis/apoptosis1/07.htm>
- 10 < 1% match (29-May-2016 tarihli internet)