

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KOLON KANSERİNİN TEDAVİSİNDE FENOTİYAZİN YAPILI
BİLEŞİKLERİN KULLANIMLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ
VE ETKİ MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI**

Felis CAN

**Biyokimya Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ANKARA

2022

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KOLON KANSERİNİN TEDAVİSİNDE FENOTİYAZİN YAPILI
BİLEŞİKLERİN KULLANIMLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ
VE ETKİ MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI**

Felis CAN

**Biyokimya Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Kevser Biberoglu**

ANKARA

2022

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KOLON KANSERİNİN TEDAVİSİNDE FENOTİYAZİN YAPILI
BİLEŞİKLERİN KULLANIMLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ VE ETKİ
MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI
Öğrenci: Felis CAN
Danışman: Doç. Dr. Kevser BİBEROĞLU

Bu tez çalışması 30/06/2022 tarihinde jürimiz tarafından "Biyokimya Programı" nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Ediz DEMİRPENÇE

TOBB ETÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya A.B.D

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Kevser BİBEROĞLU

Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bilimleri, Biyokimya A.B.D

Üye: Prof. Dr. Hatice Asuman ÖZKARA

Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Biyokimya

Üye Prof. Dr. Özden TACAL

Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bilimleri, Biyokimya A.B.D

Üye: Doç. Dr. Gülnihal Kulaksız ERKMEN

Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri, Tıbbi Biyokimya A.B.D

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

04 Temmuz 2022,

Prof. Dr. Müge Yemişçi Özkan

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

07 /07/2022

(İmza)

Felis CAN

1

¹“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullandığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlerle ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.

Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında zgn olduğunu, Doç. Dr. Kevser Biberoğlu danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

(İmza)

Felis CAN

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında görüş, bilgi ve deneyimleri ile beni destekleyen; fikirlerinden, bilim insanı kişiliğinden ve insaniyetinden çok şey öğrendiğim, bana her zaman örnek olacak olan sevgili hocam Doç. Dr. Kevser Biberoglu'na sonsuz teşekkür ederim.

Her zaman ve her zorluk karşında yanımda olan, maddi ve manevi hiçbir desteğini esirgemeyen sevgili anne ve babama teşekkür ederim.

Çalışmanın gerçekleşmesinde katkılarından dolayı TÜBİTAK-SBAG'a (Proje No. 119S905) teşekkür ederim.

ÖZET

Can, F., Kolon Kanserinin Tedavisinde Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin Kullanımlarının Değerlendirilmesi ve Etki Mekanizmalarının Araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Programı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2022. Epidemiyolojik çalışmalar, kanser ve nörodejeneratif hastalıkları birbirleri ile ilişkilendirmektedir. Alzheimer hastalığı ile yakından ilişkili olan amiloid prekürsör protein (APP), kanser ile ilgili araştırmalarda oldukça dikkat çekmektedir. Son araştırmalar, aşırı eksprese edilen APP ve onun homolog aile üyesi olan APLP2'nin inhibe edilmesinin ya da bu proteinlerin proteolitik kesim enzimlerine (α - ve β -sekretazlar gibi) karşı geliştirilen inhibitörlerin, kanser hücrelerinin çoğalmasını azalttığını göstermektedir. Bu tez çalışmasında, HT-29 kolon kanseri hücrelerinde fenotiyazin yapılı bileşiklerin [toluidin mavisi (TBO) ve 1,9-dimetil-metilen mavisi (DMMB)], hücre canlılığı, APP/APLP2 işlenmesi ve fosfotidil inozitol-3-kinaz (PI₃K)-AKT sinyalizasyon yolağı üzerindeki etkileri, akım sitometri, MTT ve Western blot yöntemleri kullanılarak değerlendirildi. HT-29 hücrelerinin, 0-10 μ M TBO veya 0-1.25 μ M DMMB ile 24 saat muamelesi sonucunda, hücre canlılığı anlamlı olarak azaldı. Western blot sonuçları hem TBO hem de DMMB'nin total APP, sAPP α ve α -sekretaz ADAM10 ekspresyonlarını azalttığını gösterdi. APLP2 ve sAPLP2 (çözünür APLP2) düzeyleri üzerinde azaltıcı etki gösterirken, TBO herhangi bir değişime neden olmadı. PI₃K-AKT sinyalizasyon substratlarından biri olan GSK-3 β ekspresyonu üzerinde her iki bileşik de azaltıcı etki gösterirken, p-GSK-3 β Ser9 düzeylerinde artışa neden oldu. Dolayısıyla, HT-29 hücre canlılığında görülen azalma, fenotiyazin yapılı bileşiklerin APP ve/veya APLP2 işlenmesi üzerindeki direkt etkilerine ve bu proteinlerin işlenmesinde rol olan α -sekretazı azaltmasına ve ayrıca GSK-3 β 'nin inaktif formundaki artışa neden olmasına bağlanmıştır. Sonuç olarak, fenotiyazinlerin kanserle ilişkili proteinler üzerindeki çoklu etkileri nedeni ile kolon kanserinin tedavisindeki yeni ilaç tasarımlarına katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kolon kanseri, amiloid prekürsör protein, α -sekretaz, fenotiyazin yapılı bileşikler

Destekleyen Kurum: TÜBİTAK (Proje No. 119S905)

ABSTRACT

Can, F., Evaluation of the Use of Phenothiazine Structured Compounds in the Treatment of Colon Cancer and Investigation of Their Effect Mechanism, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Biochemistry Department of Master Thesis, Ankara, 2022. Epidemiological studies associate cancer and neurodegenerative diseases with each other. Amyloid precursor protein (APP), which is closely related to Alzheimer's disease, attracts attention in cancer research. Recent research indicates that inhibiting APP and its homologous family member APLP2 or inhibitors against proteolytic cleavage enzymes (such as α - and β -secretases) of these proteins reduces cancer cell proliferation. In this thesis, the effects of phenothiazine-structured compounds [toluidine blue (TBO) and 1,9-dimethyl-methylene blue (DMMB)] on cell viability, APP/APLP2 processing, and phosphatidyl inositol-3-kinase (PI₃K)-AKT signaling pathway were evaluated using flow cytometry, MTT, and Western blot methods in HT 29 colon cancer cells. Cell viability was significantly reduced after 24 h of treatment of HT-29 cells with 0-10 μ M TBO or 0-1.25 μ M DMMB. Western blot results showed that both TBO and DMMB reduced the expressions of total APP, sAPP α and α -secretase ADAM10. While DMMB had a reducing effect on APLP2 and sAPLP2 levels, TBO did not cause any change. While both compounds had a reducing effect on expression levels of GSK-3 β , which is one of the PI₃K-AKT signaling substrates, they led to increase p-GSK-3 β -Ser9 levels. Thus, the observed decrease in HT-29 cell viability has been attributed to direct effects of phenothiazine structured compounds on APP and/or APLP2 processing and their ability to decrease α -secretase, which is involved in the processing of these proteins and also their ability to increase of the inactive form of GSK-3 β . As a result, it is thought that phenothiazines may contribute to new drug designs in the treatment of colon cancer due to their multiple effects on cancer-related proteins.

Keywords: Colon cancer, amyloid precursor protein, α -secretase, phenothiazine compound

Supporting Institution: TUBITAK (Project No. 119S905)

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI	iii
YAYINLAMA ve FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiii
TABLolar	xv
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kolon Kanseri	3
2.2. APP Aile Üyelerinin İşlenmesi	4
2.3. sAPP Fragmanlarının Fonksiyonları	7
2.4. APP ve APLP2 Genleri ve Protein Yapıları	7
2.5. APP Ailesi Üyelerinin Kanserdeki Ekspresyonları ve Etkileri	9
2.5.1. Meme Kanserinde APP Ailesi Üyeleri	11
2.5.2. Prostat Kanserinde APP Ailesi Üyeleri	12
2.5.3. Akciğer Kanserinde APP Ailesi Üyeleri	12
2.5.4. Pankreas Kanserinde APP Ailesi Üyeleri	13
2.5.5. Kolon Kanserinde APP Ailesi Üyeleri	14
2.6. Matriks Metalloproteinazlar	14
2.6.1. Bir Disintegrin ve Metalloproteinaz ADAM	15
2.6.2. ADAM10	18
2.7. Fosfoinozid-3 Kinaz (PI ₃ K) / Protein kinaz B (AKT) Sinyal İletim Yolunun Fonksiyonu ve Karakterizasyonu	20
2.7.1. PI ₃ K/AKT Sinyal Yolu ve APP	23
2.7.2. AKT Aktivasyonunun Hücre Proliferasyonundaki Rolü ve Glikojen Sentaz Kinaz3	23
2.8. Fenotiyazin Yapılı Bileşikler	25
3. GEREÇ ve YÖNTEM	29
3.1. Kullanılan Kimyasallar	29

3.1.1. Kullanılan Cihazlar	29
3.2. Yöntemler	29
3.2.1. HT-29 Hücre Kültürü Çalışmaları	29
3.2.2. Fenotiyazin Yapılı Bileşikler ile Muamele ve Hücre Lizatlarının Elde Edilmesi	30
3.2.3. Protein Tayini	30
3.2.4. Akım Sitometri	31
3.2.5. MTT Analizi	33
3.2.6. Western Blot	33
3.2.7. İstatistiksel Değerlendirmeler	36
4. BULGULAR	37
4.1. Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin HT-29 Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri	37
4.2. Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin Kanser Olmayan Kontrol Hücrelerin (HEK293, Human Embryonic Kidney Cells) Canlılığı Üzerine Etkileri	41
4.3. Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin HEK293 ve HT-29 Hücre Proliferasyonu Üzerindeki Etkilerinin MTT ile Değerlendirilmesi	44
4.4. HT-29 Hücrelerinde Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin Total APP, sAPP α , APLP2 ve sAPLP2 Düzeyleri Üzerine Etkileri	46
4.4.1. HT-29 Hücrelerinde Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin Hücre İçi Total APP Düzeyleri Üzerine Etkileri	46
4.4.2. HT-29 Hücrelerinde Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin Çözünür sAPP α Düzeyleri Üzerine Etkileri	49
4.4.3. HT-29 Hücrelerinde Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin Hücre İçi Total APLP2 Düzeyleri Üzerindeki Etkileri	51
4.4.4. HT-29 Hücrelerinde Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin Çözünür APLP2 (sAPLP2) Düzeyleri Üzerine Etkileri	54
4.4.5. HT-29 Hücrelerinde Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin ADAM10 Düzeyleri Üzerine Etkileri	56
4.5. Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin HT-29 Hücrelerinde PI ₃ K/AKT Yolağı Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi	59
4.5.1. Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin HT-29 Hücrelerinde AKT ve GSK-3 α/β Fosforilasyonu Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi	59
4.5.2. Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin HT-29 Hücrelerinde PTEN Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi	64
5. TARTIŞMA	66
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	72
7. KAYNAKLAR	73

8. EKLER

EK 1 Orjinallik Çıktısı

83

EK 2 Dijital Makbuz

84

9. ÖZGEÇMİŞ

85

SİMGELER VE KISALTMALAR

AKT	Protein kinaz B
AH	Alzheimer Hastalığı
APLP2	Amiloid prekürsör benzeri protein-2
APP	Amiloid prekürsör protein
CTF	C-terminal fragman
DMMB	1,9- Dimetil-metilen mavisi
eIF-2B	Ökaryotik protein sentezi başlatma faktörü-2B
EGF	Epidermal büyüme faktörü
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
GSK-3	Glikojen sentaz kinaz-3
GSK-3α	Glikojen sentaz kinaz-3 α
GSK-3β	Glikojen sentaz kinaz-3 β
IRS	İnsülin reseptörü substratı
NSCLC	Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücreleri
MB	Metilen mavisi
MMP	Matriks metalloproteinaz
PDK1	3-fosfoinozidit bağımlı protein kinaz 1
PI$_3$K	Fosfotidil inozitol 3-kinaz
PIP3	Fosfotidil inozitol trifosfat
PI$_3$K-PKB/AKT	Fosfoinozidit-3-kinaz-protein kinazB/AKT
RTK	Reseptör tirozin kinaz
sAPPα	Çözünür amiloid prekürsör protein alfa
TBO	Toluidin mavisi
TGF- β	Transforme edici büyüme faktörü- B
VEGF	Vasküeler endotel büyüme faktörü

ŞEKİLLER

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Çalışmada kullanılan fenotiyazin yapıları	2
2.1. APP ve APLP2'nin sekretazlarla işlenmesi	6
2.2. APP ve APLP2'nin disülfid bağları ve tahmini-post translasyonel modifikasyonlarını içeren domain ve alt-domainlerinin grafiksel gösterimi	8
2.3. APP işleme enzimlerinin sinyal yokları ile bağlantısının meme kanserindeki tedavi edici rolü	12
2.4. ADAM'ın genel yapısı	16
2.5. ADAM'ın moleküler etkileşimleri	17
2.6. Meme kanserinde hücre göçünde APP ve ADAM10 için önerilen model	20
2.7. Protein kinaz B/AKT yolunun işlevleri	21
2.8. GSK-3 izoformları: GSK-3 α ve GSK-3 β	24
2.9. GSK-3 inhibitörlerinin çeşitli hastalıklarla ilişkisi	25
2.10. Fenotiyazinlerin keşif süreci	26
3.1. Kültür ortamları ve hücre lizatlarında, BCA protein tayini yönteminin basamakları	31
3.2. PI'nın, ölü ve canlı hücreler üzerindeki etkisi	32
3.3. Western Blot yönteminin temeli ve antikor etkileşimleri	36
4.1. TBO'nun HT-29 hücre canlılığı üzerine etkilerini gösteren temsili mikroskop görüntüleri	37
4.2. DMMB'nin HT-29 hücre canlılığı üzerine etkilerini gösteren temsili mikroskop görüntüleri	38
4.3. TBO'nun HT-29 hücre canlılığı üzerindeki etkisi	39
4.4. DMMB'nin HT-29 hücre canlılığı üzerindeki etkisi	40
4.5. TBO'nun HEK293 hücre canlılığı üzerine etkisi	42
4.6. DMMB'nin HEK293 hücre canlılığı üzerine etkisi	43
4.7. Fenotiyazin yapıları bileşiklerin HEK293 ve HT-29 hücre canlılığı üzerindeki etkileri	45
4.8. HT-29 hücrelerinde TBO'nun intrasellüler total APP üzerindeki etkileri	47
4.9. HT-29 hücrelerinde DMMB'nin intrasellüler total APP üzerindeki etkileri.	48
4.10. HT-29 hücrelerinde TBO'nun sAPP α üzerindeki etkileri	49

4.11.	HT-29 hücrelerinde DMMB'nin sAPP α üzerindeki etkileri	50
4.12.	HT-29 hücrelerinde TBO'nun APLP2 üzerindeki etkileri	52
4.13.	HT-29 hücrelerinde DMMB'nin APLP2 üzerindeki etkileri	53
4.14.	HT-29 hücrelerinde TBO'nun sAPLP2 üzerindeki etkileri	54
4.15.	HT-29 hücrelerinde DMMB'nin sAPLP2 üzerindeki etkileri	55
4.16.	HT-29 hücrelerinde TBO'nun ADAM10 üzerindeki etkileri	57
4.17.	HT-29 hücrelerinde DMMB'nin ADAM10 üzerindeki etkileri	58
4.18.	HT-29 hücrelerinde TBO'nun p-AKT Ser-473 ve AKT düzeyleri üzerindeki etkileri	60
4.19.	HT-29 hücrelerinde DMMB'nin p-AKT Ser-473 ve AKT düzeyleri üzerindeki etkileri	61
4.20.	HT-29 hücrelerinde TBO'nun pGSK-3 β Ser9 ve GSK-3 β düzeyleri üzerindeki etkileri	62
4.21.	HT-29 hücrelerinde DMMB'nin pGSK-3 β Ser9 ve GSK-3 β düzeyleri üzerindeki etkileri	63
4.22.	HT-29 hücrelerinde TBO'nun PTEN üzerine etkileri	64
4.23.	HT-29 hücrelerinde DMMB'nin PTEN üzerine etkileri	65

TABLULAR

<u>Tablo</u>		<u>Sayfa</u>
2.1.	Farklı kanser hücre tiplerinde APLP'nin ekspresyonu ve rolü	10
2.2.	Farklı kanser hücre tiplerinde APLP2'nin ekspresyonu ve rolü	10
3.1	Western Blot yönteminde kullanılan primer antikorlar	35

1. GİRİŞ

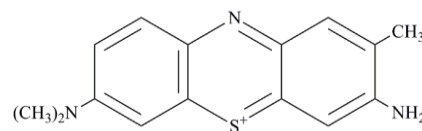
Kansere bağılı ölümlerin en sık nedenlerinden biri olan kolon kanseri, evrensel bir sorun olarak nitelendirilmektedir. Epidemiyolojik çalışmalar, kanser ve nörodejeneratif hastalıkları birbirleri ile ilişkilendirmektedir. Transmembran bir protein olan amiloid prekürsör protein (APP), kanser ile ilgili araştırmalarda son zamanlarda oldukça dikkat çekmektedir. Üç APP aile üyesinden (APP, APLP2 ve APLP1) biri olan APP, en fazla çalışılan protein olup, kırılması sonucu β -amiloid peptid oluşumunun neden olduğu Alzheimer hastalığında (AH) temel rol oynamaktadır (2). AH'nda, APP'nin proteolitik olarak işlenmesi, 2 yol ile gerçekleşmektedir: (i) α -sekretaza bağılı amiloidojenik olmayan yol (ii) β -sekretaza bağılı amiloidojenik yol. Bu yollarda, sekretazlar adı verilen bir grup enzim tarafından proteolitik kırılma sonucu farklı fonksiyonları olan fragmanlar üretilmektedir. APP'nin yanı sıra, diğere üyeler de sekretazlar tarafından parçalanarak C-terminal fragmanları (CTF) salınmasına neden olmaktadır (3). Son araştırmalar, kanser hücrelerinde aşırı eksprese edilen APP ve/veya APLP2'nin inhibe edilmesinin ya da bu proteinlerin proteolitik kesim enzimlerine (β -sekretazlar gibi) karşı geliştirilen inhibitörlerin kanser hücre çoğalmasını azalttığını göstermektedir (4, 5). Çünkü, APP ve amiloid prekürsör-benzeri protein-2 (APLP2) ekspresyonlarının ve bunların kesim ürünleri CTF'lerin birçok kanser türünde, kanser hücre proliferasyonuna korelasyon göstererek arttığı bulunmuştur (4). Kolon kanseri ile ilgili *in-vitro* ve *in-vivo* çalışmalarda, APP'nin büyüme için gerekli olduğu bildirilmiştir (6). APP'nin, α -sekretazlar (ADAM10) tarafından kesilmesi ile oluşan çözünür, sekrete formu sAPP α 'nin sadece nöronal sağlığı destekleme işlevi olmayıp, aynı zamanda hücre büyümesi, çoğalması ve migrasyonu ile de yakından ilişkili olduğu tespit edilmiştir (7). Pankreas kanseri hücre hatları ile yapılan bir çalışmada, α -sekretaz (ADAM10) aracılı sAPP α oluşumu inhibe edildiğinde, hücre büyümesinin ve proliferasyonun etkili bir şekilde azaldığı gösterilmiştir (8).

Yakın zamanda laboratuvarımızda gerçekleştirilen çalışmalarda, fenotiyazin yapısına sahip azur B bileşiğinin total APP ve sAPP α üzerinde göstermiş olduğu etkili azalma (9), ayrıca TBO ve TH'nin PS70 hücrelerinde total APP ve sAPP α düzeylerinde yine, azaltıcı etki göstermesi (10), fenotiyazin yapısına sahip

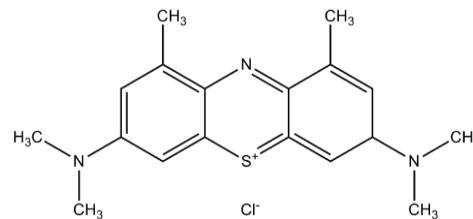
bileşiklerin, antikanser etkiye katkı sağlayabileceği hipotezini güçlendirmektedir. Üç farklı fenotiyazinle (klorpromazin, flufenazin ve trifluofenazin) yapılan bir çalışmada, kanserle ilişkili WNT, MAPK gibi yollarda antitümör etkilerin olabileceği bildirilmiştir (11). Başka bir çalışmada fenotiyazinlerin, 3-fosfoinozitol-bağımlı kinaz 1 (PDK1)/AKT yolağının *downstream* hedeflerine oldukça spesifik oldukları ve *nude* farelerde insan tümör hücrelerini etkili bir şekilde baskıladıkları gösterilmiştir (12). Tüm bu gelişmeler nedeniyle, fenotiyazin yapılı bileşikler kanserin tedavisinde, potansiyel ilaç adayları olarak oldukça dikkat çekmektedir.

Bu çalışmanın amacı, fenotiyazin yapılı bileşiklerin [toluidin mavisi (TBO) ve 1,9-dimetil-metilen mavisi (DMMB)] (Şekil 1.1) kolon kanserinin tedavisindeki rolünü belirlemek ve onların etki mekanizmalarını araştırmaktır. Çalışma kapsamında öncelikle, HT-29 kolon kanseri hücre modeli kullanılarak sözü edilen bileşiklerin total APP ile APLP2 ve bunların kesim ürünleri (sAPP α ve sAPLP2) ile yakından ilişkisi olan α -sekretazlar (ADAM10) üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Ayrıca, sAPP α 'nın, fosfotidil inozitol-3-kinaz (PI₃K)-AKT kinaz sinyalizasyon yolağında anahtar bir aktivatör rol oynaması nedeni (13) ile bu yolak açısından da hücre canlılığı üzerindeki etkileri değerlendirilecektir.

Çalışma, kolon kanserinin tedavisindeki yeni ilaçların tasarımlarına katkılar sağlaması açısından önem taşımaktadır.



Toluidin Mavisi



1,9-Dimetil-Metilen Mavisi

Şekil 1.1. Çalışmada kullanılan fenotiyazin yapılı bileşikler

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kolon Kanseri

Kanser ülkemizde ve dünyada ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır. Küresel olarak bakıldığında her 6 ölümden biri, ülkemizde ise her 5 ölümden biri kanser nedeniyle gerçekleşmektedir (14). Kolorektal kanser, dünyada kanser ölümlerinin üçüncü önde gelen nedenidir ve gelişmekte olan ülkelerde görülme sıklığı giderek artmaktadır. Kuzey Amerika, Batı Avrupa, İskandinavya, Yeni Zelanda ve Avustralya gibi gelişmiş ülkeler başta olmak üzere tüm dünyada yaygın olarak rastlanır. Kanser ile ilişkili ölümlerin ~ %10'undan sorumludur (15, 16).

Dünyada erkeklerde üçüncü ve kadınlarda ikinci en sık rastlanan kanser türü olup 2012'de ~ 694.000 ölüm ve 1.4 milyon yeni vaka bildirilmiştir. 2030 yılına kadar %60 artarak 2.2 milyon yeni vaka ve 1.1 milyon ölüme ulaşması beklenmektedir (17, 18). Amerika Birleşik Devletleri'nde kolon kanserinden ölümlere bakıldığında tüm kanser ölümleri içerisinde ikinci sırada yer almaktadır. 2019 yılına kadar olan tüm verilere bakıldığında 1.5 milyondan fazla kişiye kolorektal kanser tanısı konulmuştur. 2020 yılında ise ~ 147.950 kişiye kolorektal kanser teşhisi konulacağı ve 53.200 kişinin bu hastalıktan öleceği öngörülmektedir (19, 20). Türkiye'de ise 2016 yılı kanser verileri incelendiğinde kolorektal kanser üçüncü sırada yer almaktadır. Kolorektal kanser sporadik olarak ortaya çıkan ve beslenme şekli ile yakından ilişkili olan bir hastalıktır. Vakalar incelendiğinde sadece %5'inin kalıtsal olduğu görülmektedir. Kolon kanseri genellikle 50 yaş ve sonrasında görülmektedir. Hastalığın gelişiminde yaşla birlikte artan mutasyonlar dışında; çevresel faktörler, adenom ve karsinom öyküsü, özellikle enflamatuvar barsak hastalıkları sayılmaktadır. Bu nedenle, kolon kanserinin gelişim mekanizmalarını anlamak ve alternatif tedavi yolları geliştirmek oldukça önemlidir (21, 22).

Kanser gelişimi için bir onkogenin aktivasyonu veya bir kanser baskılayan gende kayıp olması yeterlidir. Kolorektal kanserde; (i) APC, K-ras ve DCC gibi hücre sinyal yollarında bir anormallik, (ii) p53 ve yanlış eşleşmelerden sorumlu tamir genleri gibi genomik stabiliteyi korumada görevli genlerde bir hata olması

halinde kanser gelişimi olmaktadır. Bu doğrultuda mevcut sporadik kolorektal kanser olguları incelendiğinde %60'ından fazlasında APC tümör süpresör geninde ve p53 tümör süpresör geninde inaktive edici mutasyonlara rastlanırken K-ras onkogeninde aktive edici mutasyonlara rastlanmıştır. Geri kalanında ise, hatalı eşleşmeler ve tamir mekanizmaları hatalarıyla birlikte Bax geninde fonksiyon kayıpları gözlenmiştir (23, 24). Kolon kanserinde prognoz, tanı aşamasındaki evreye bağlıdır. 5 yıllık sağkalım oranı lokalize hastalık için %90 iken, tanı anında metastatik durumda bu oran %13'e düşmektedir. Bu yüksek mortalite, kolorektal kanserde tümör hücrelerinin geleneksel kemoterapötik ajanlara ve/veya hedeflenmiş tedavi ilaçlarına karşı kazanılmış direncinden kaynaklanmaktadır. Şu anda, epidermal büyüme faktörü reseptörüne (EGFR) yönelik monoklonal antikolar ile hedeflenmiş tedaviler ve esas olarak kolon kanserine neden olan mutasyon kaynağını (KRAS, NRAS, BRAF ve PIK3CA) hedefleyen ilaçlar tasarlanmaktadır (25).

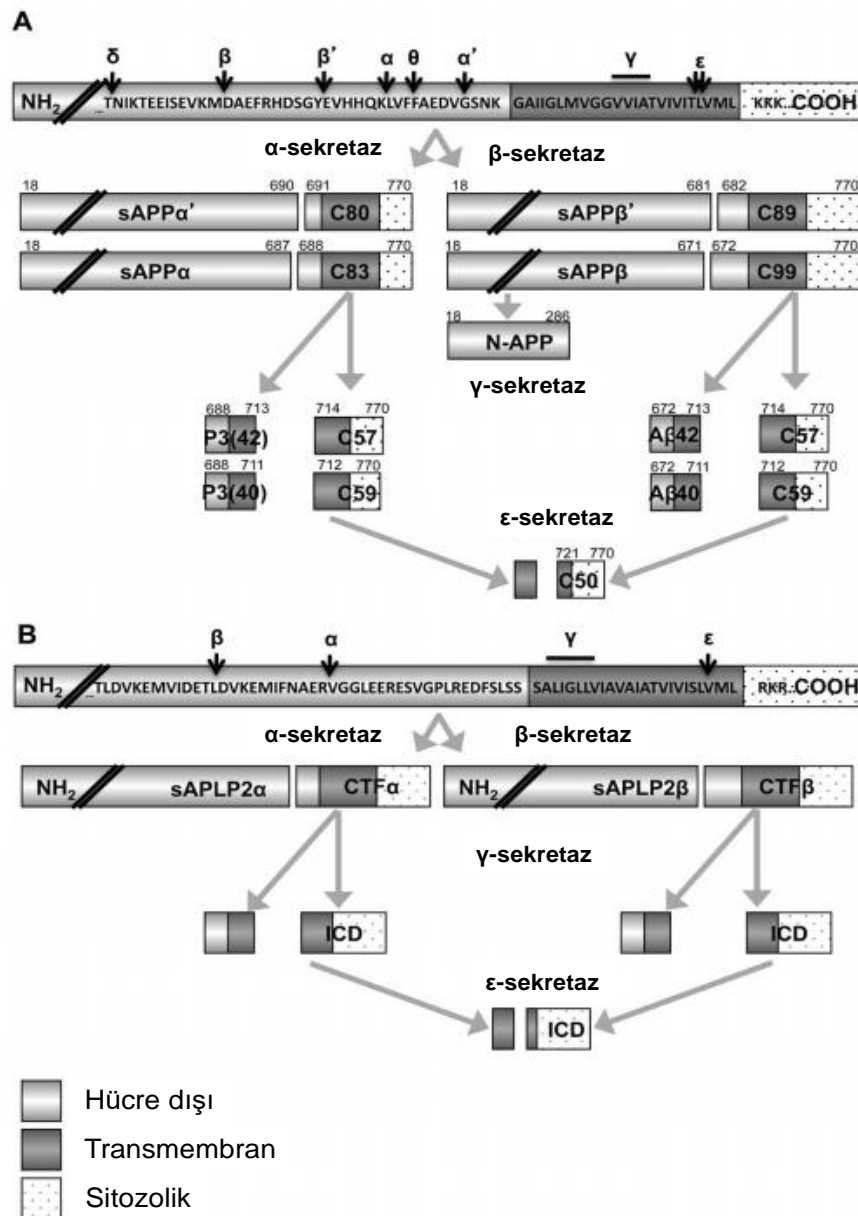
AH ile ilişkili APP'nin çeşitli kanser türlerinde aşırı eksprese olduğunu bildiren birçok çalışma mevcuttur. Ancak bu protein ailesinin önemi henüz tam anlamı ile anlaşılamamıştır (26, 27). APP'nin insan tümörlerindeki rolüne ait ilk çalışmalardan bir tanesi kolon kanserinde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, insan kolon karsinom hücrelerinde APP düzenleniminin ERK'ler üzerinden gerçekleştirildiği belirtilmiştir (28). Pankreas kanseri hücrelerinde APP'nin yüksek seviyelerde proteolitik işleme tabi tutulduğu ve sAPP'nin *in vitro* ortamda toplanarak pankreatik kanser proliferasyonunun ilerlediği tespit edilmiştir (29). Ayrıca, APP'nin ve sAPP α 'nin tiroid ve paratiroid tümörlerinde arttığı ve hücre farklılaşmasını düzenlediği bulunmuştur (30). APP'nin aynı zamanda, androjen bağımlı prostat kanserinin büyümesinin düzenlenmesinde yer aldığı da bildirilmiştir (31).

2.2. APP Aile Üyelerinin İşlenmesi

Üç APP aile üyesinden biri olan APP, en fazla çalışılan protein olup, kırılması sonucu β amiloid peptid oluşumunun neden olduğu AH ile ünlüdür (32, 33). Her bir APP aile üyesi (APP, APLP1 ve APLP2), sekretazlar tarafından parçalanarak büyük bir ekstraselüler domain ve daha küçük C-terminal fragmanların salınmasına neden olmaktadır (34, 35). APP ve APLP2'nin kırılması, insülin-benzeri büyüme faktörü 1

(IGF-1) hormonu ile regüle edilmektedir (36-38). IGF-1'in kanser progresyonunda bilinen bir rolü vardır ve birçok çalışma IGF-1 reseptör sinyal inhibisyonunun, kanser için potansiyel terapötik bir yaklaşım olduğunu göstermiştir (39-41). Bazı çalışmalar, IGF-1'in APP ve APLP2'nin α -sekretaz yıkımını arttırdığını, bunun da β -amiloid üretiminin down regüle olması ile sonuçlanabileceğini önermektedirler (36, 38). Ancak, bazı çalışmalar ise IGF-1'in gerçekte, β -amiloid oluşumunu ilerlettiğini belirtmektedir. Bu nedenle, IGF-1'in APP ve APLP2'nin işlenmesi ve kanserdeki fonksiyonu üzerindeki etkisini tamamen anlamak için ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, β -sekretazın inhibisyonunun pankreas kanser hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi araştırılmış ve birçok kimyasal β -sekretaz inhibitörü geliştirilmiştir (4). Bunlardan bazılarının ise AH'nın klinik çalışmalarında güvenli ve etkin oldukları gösterilmiştir. Bu çalışmalarda, pankreas kanser hücreleri β -sekretaz enzim inhibitörleri ile muamele edildiğinde, hücrelerde APLP2 C-terminal fragmanlarının azaldığı görülmüştür. Bu hücrelerin β -sekretaz inhibitörleri ile muamele edilmesi, hücrelerin büyüme ve canlılığında azalmaya yol açmıştır. Transforme edilmeyen pankreas hücre hattı kontrol olarak kullanıldığında ise; β -sekretaz inhibitörlerinin bu hücre hattında büyüme ve canlılığı azaltmadığı gözlenmiştir (3).



Şekil 2.1. APP ve APLP2'nin sekretazlarla işlenmesi. Sekretaz enzimleri ile proteolitik kırılma sonucunda oluşan fragmanlar A. APP'nin fragmanları B. APLP2'nin fragmanları. APP ve APLP2'nin amino asitleri gösterilmiştir. “//” işaretleri kesilmiş dizileri belirtmek için kullanılmıştır. N-terminal uçlar NH₂ ve karboksil uçlar COOH ile belirtilmiştir. A. β sekretaz1 ve 2 (BACE1 ve BACE2), β bölgesinden keserken, BACE1 için alternatif kesim bölgesi β' ve BACE2 için θ bölgesidir. İki α-sekretaz kesim bölgesi, α ve α' olarak tanımlanmıştır. γ ve ε bölgeleri, γ-sekretaz enzimleri tarafından kesilir. APP'nin C-terminal fragmanları (CTF) C99, C89, C83 ve C80'dir; hücre içi domainleri (ICDs) C59, C57 and C50'dir. B. BACE1 (β), ADAM10 (α) ve γ-sekretaz kesim bölgeleri (γ), APLP2 için tanımlanmıştır. APLP2 CTF'leri, oluşumlarından sorumlu sekretaz tarafından ayırt edilir. APLP2'nin hücre içi domainleri ICD olarak belirtilmiştir.

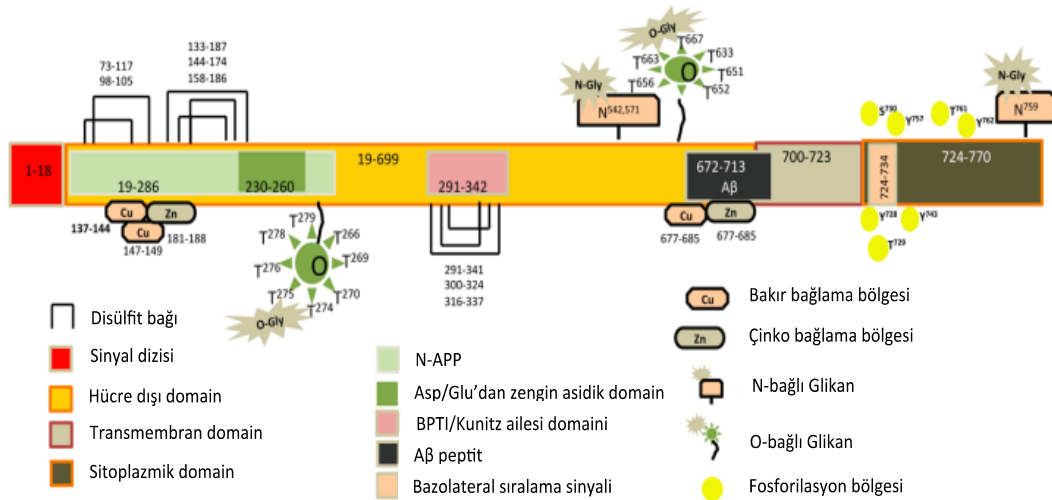
2.3. sAPP Fragmanlarının Fonksiyonları

APP'nin proteolizinden sonra, sAPP α ve sAPP β hücre dışı ortama salınarak hücre büyümesi, sinaps oluşumu ve nöronların büyümesi gibi görevlerde rol alırlar. sAPP α (ve sAPP β) fragmanları p75 nörotrofin reseptörü ile etkileşerek nöron büyümesini uyarmaktadır (42). sAPP α 'nın, APP *knockout* farelerden elde edilen nöron kültüründe, omurga dansitesini azalttığı rapor edilmiştir (43). sAPP α 'nın aynı zamanda yetişkin nöron öncül hücrelerinde bir proliferasyon faktörü olarak etki gösterdiği bulunmuştur (44). sAPP α 'nın sinir hücrelerinde koruyucu etkisi varken, sAPP β 'nin daha az koruyucu ya da bazen nöronlar için zararlı bile olabileceği belirtilmektedir (45). Hücre dışına salınımlarına paralel olarak, birçok veri sAPP'lerin nöral büyüme ve proliferasyonu düzenleyen etkileşimlerde sinyal molekülü olarak etki ettiğini belirtmektedir.

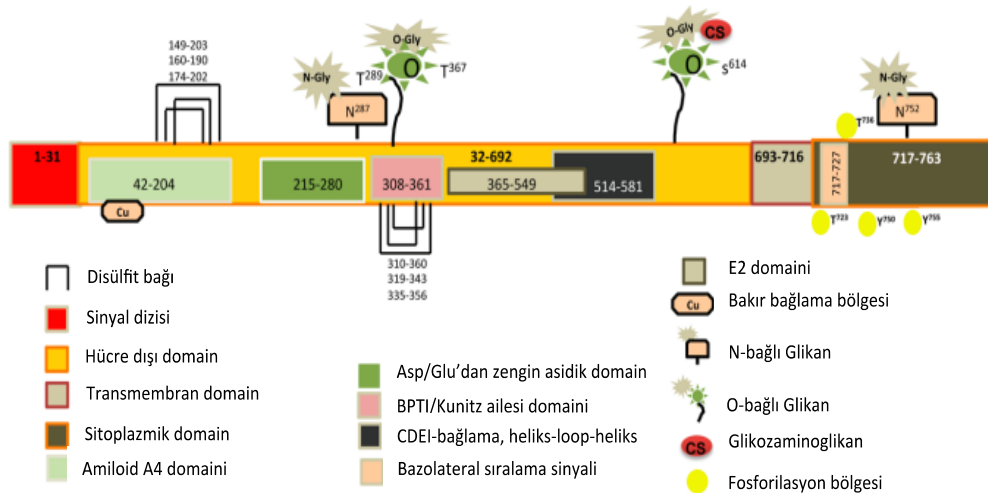
2.4. APP ve APLP2 Genleri ve Protein Yapıları

Memelilerde APP protein ailesinin üç üyesi bulunmaktadır. Bunlar APP, APLP1 ve APLP2'dir. APP benzeri protein olarak tanımlanan APLP1 ve APLP2, türler arasında yüksek oranda korunan tip I transmembran glikoproteinlerdir. Bu üç proteinin tümü, yüksek sekans homolojisine sahiptir. Her birinin hücre dışı bir alanı, bir transmembran alanı ve ~ 50 amino asit uzunluğunda bir sitoplazmik kuyrukları vardır (3, 46). APP ailesi üyeleri, üç farklı kromozomda bulunan genler tarafından kodlanmaktadır. İnsan APP geni, 21. kromozomda (21q21) bulunurken, insan APLP2 geni ise, 11. kromozomda (11q24) bulunmaktadır. APP ve APLP2 genetik olarak ilişkili olmalarına rağmen, transkripsiyonel olarak farklı olmaları nedeniyle, farklı sekans motiflerine sahiptirler (47, 48).

A) APP domain organizasyonu



B) APLP2 domain organizasyonu



Şekil 2.2. APP ve APLP2'nin *disulfit* bağları ve tahmini-post translasyonel modifikasyonlarını içeren domain ve alt-domainlerinin grafiksel gösterimi. A. APP (P05067). 770 amino asitlik izoformu gösterilmiştir B. APLP2 (Q06481). 763 amino asitlik izoformu gösterilmiştir. N-glikan tahminleri NetNGlyc 1.0 Server ile yapılmıştır (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>). O-glikan tahminleri NetOGlyc 3.1 Server ile yapılmıştır (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>). Fosforile birimlerin tahminleri PhosphoSite ile yapılmıştır (<http://www.phosphosite.org/homeAction.do>). APLP2'nin bazı izoformlarında, kondroitin sülfat (35) glikozaminoglikan modifikasyonları Serin 614 bölgesinde meydana gelir (3).

APP'nin hücre dışı domaini 2 disülfit düğümü (3 adet üst üste çakışan disülfit bandı) içerir ve bu düğümler büyüme faktörlerinin içerisindeki disülfit düğümlerine benzerler (49). APP'nin disülfit düğümlerini oluşturmak için kullanılan sistein birimleri APLP2'de korunmuştur. APP ve APLP2'nin hücre dışı bölümünde, sığır pankreas tripsin inhibitörü (BPTI)/Kunitz proteaz inhibitörü domaini ve içinde aspartik ve glutamik asit birimlerince zengin bir domaini içeren pek çok daha küçük domainler içerirler (50, 51). APP ve APLP2'nin hücre dışı bölgesindeki Kunitz proteaz inhibitör domaini, değişen etkinliklerde pek çok proteazı (ör; tripsin, kimotripsin, plazmin ve kallikrein enzimleri) inhibe eder (52). Kunitz proteaz inhibitör domain tarafından inhibe edilen başka bir proteaz ise koagülasyon faktörü XIa'dır (53). Özellikle, tümör hücreleri tarafından üretilen mezotripsin, çözünür ve sekrete olan APP ektodomainin Kunitz proteaz inhibitör domainini parçalar ve tümör mikroçevrenin prokoagülan karakterine katkı sağlar (54).

Şekil 2.2'de gösterildiği gibi; APLP2 ve APP'nin hücre dışı domainleri, bakır ve çinko iyonları da bağlamaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, bakır varlığının prostat kanser hücrelerinde APP ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada, APP 770 splice varyantının bakır-bağlama bölgesinin, bakır-aracılı prostat kanser hücre büyümesinin inhibisyonunu azalttığı bulunmuştur (3).

2.5. APP Ailesi Üyelerinin Kanserdeki Ekspresyonları ve Etkileri

APP ve/veya APLP2 ekspresyonu pankreas, kolon, meme, prostat, akciğer ve diğer kanserler gibi birçok kanser tipinde anormal olarak değişmektedir (Tablo 2.1 ve 2.2). Ayrıca APP'nin kanser hücrelerinde hem büyüme hem de invazyon fonksiyonlarını da içeren çok çeşitli rollere sahip olduğu gösterilmiştir (3).

Tablo 2.1. Farklı kanser hücre tiplerinde APP'nin ekspresyonu ve rolü (3).

Kanser	APP Ekspresyonu ve Etkileri
Meme	APP hücre büyümesini, motiliteyi, canlılığı ve AKT yolağı proteinlerinin fosforilasyonunu arttırmaktadır.
Kolon	APP, ERK yolağı proteinlerinin fosforilasyonunu artırır ve proliferasyonu arttırmaktadır.
Gastro-intestinal nöroendokrin	APP intestinal karsinoidlerinde eksprese edilir, erken endozom ve mikrovezikül markırları ile kısmi kolokelize olmaktadır.
Akciğer	APP, proliferasyonu arttırmakta ve hücre boyutu anormalliklerine neden olmaktadır.
Melanoma	Perinükleer APP boyaması ve çözünür APP sekresyonunda artış olmaktadır. APP, proliferasyonu kolaylaştırmaktadır.
Pankreas	APP, proliferasyonu arttırmaktadır.
Prostat	APP proliferasyonu ve göçü artırır, metaloproteinaz ve EMT ile ilişkili proteinlerin seviyelerini modüle eder ve MAP kinaz fosfataz ve Notch sinyal yollarını down regüle etmektedir.
Tiroid	Tümör dokularında APP boyaması artış gösterir. Tümör boyutunun artışı, kapsül dışı invazyon ve lenf düğümlerine yayılma ile ilişkilidir.

Tablo 2. 2. Farklı kanser hücre tiplerinde APLP2'nin ekspresyonu ve rolü (3).

Kanser Tipi	APLP2 Ekspresyonu ve Etkileri
Meme Kanseri	APLP2 proliferasyonu artar.
Kolon Kanseri	APLP2 proliferasyonu artar.
Gastrointestinal Kanseri	APLP2, bağırsak karsinoidlerinde eksprese edilir.
Akciğer Kanseri	Sonuçlar iyi anlaşılmamış olsada, akciğer nöroendokrin tümörlerinde APLP2 ekspresyonu azalmıştır.
Melanoma Kanseri	APLP2, MDA-MB435S hücrelerindeki HLA sınıf I yüzey ekspresyonunu azaltır.
Pankreas Kanseri	APLP2 göçü, proliferasyonu, invazyonu ve metastazı artırır.

2.5.1. Meme Kanserinde APP Ailesi Üyeleri

APP ekspresyonu, motilite ve proliferasyon gibi metastatik eğilimler gösteren meme kanseri hücre hatlarında artmaktadır. Metastatik potansiyele sahip çeşitli meme kanseri hücre hatlarında APP, *knock down* edildiğinde, hücrelerin büyümesi durmakta ve hücre döngüsü inhibitörü p27^{kip1}'in indüksiyonu nedeniyle G1 evresine girmektedir. Ayrıca, APLP2 ekspresyonunun *knock down* edildiği yüksek metastatik potansiyeli olan bu hücre hatlarında, *cleaved* kaspaz 3 ve PARP yıkım ürünleri gibi apoptoz markırlarının da indüksiyona uğradığı belirtilmiştir. APP-*knock down* edilmiş meme kanseri hücrelerinde hem 3 boyutlu *in vitro* hücre kültüründe hem de *in vivo* fare modelinde tümör büyümesinin azaldığı gösterilmiştir. APP'nin, IGF-1'in varlığında meme kanseri hücrelerinde migrasyonu indüklediği belirtilmiştir (55). Başka bir çalışmada ise; ER-pozitif meme kanseri vakalarının, ER-negatif vakalara göre nüks etme riskinin, APP ile pozitif korelasyon gösterdiği belirtilmiştir. Yani, artan APP kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir (56). APP ve APP'nin işlenmesinde görev alan enzimler, kanser hücrelerinin çoğalmasında, büyümesinde, adezyonda ve hareketlerinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. APP ve işlenmesinde görev alan enzimlerin aşırı sentezi, meme kanserinde önemli ayırt edici özellikler olarak ortaya çıkmaktadır. APP ve işleme enzimlerinin, yani γ -sekretaz ve α -sekretazın, AKT fosforilasyonu ve Notch sinyal yolları yoluyla güçlü bir şekilde bağlantılı olduğu bulunmuştur. Bu nedenle, APP, γ -sekretaz veya α -sekretazın hedeflenmesi, meme kanseri ve hatta metastaz sürecinde etkili bir strateji olarak düşünülmektedir (57).



Şekil 2.3. APP işleme enzimlerinin sinyal yokları ile bağlantısının meme kanserindeki tedavi edici rolü (57).

2.5.2. Prostat Kanserinde APP Ailesi Üyeleri

APP'nin, androjen aracılı sinyalizasyon yollarının katıldığı prostat kanserinin büyüme ve proliferasyonunu indüklediği tespit edilmiştir. Histolojik çalışmalarında, normal insan prostat hücreleri APP bakımından yoksun bulunurken %50 yaşam oranına sahip prostat kanserli hastaların sitoplazmasında yoğun APP'ye rastlanmıştır. APP'nin prostat kanserindeki önemi, APP'nin knock down edildiği *in vivo* hayvan modellerinde, tümör büyümesinin baskılandığı çalışmalarla gösterilmiştir (58).

2.5.3. Akciğer Kanserinde APP Ailesi Üyeleri

APP'nin özellikle sekretuar formu, akciğer kanserlerinde upregüle olmaktadır. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücreleri (NSCLC) APP-spesifik siRNA ile transfekte edildiğinde, siklin C'nin destabilize olduğu, dolayısı ile G0/G1 hücre siklusunun durduğu, pRb fosforilasyonunun azaldığı, hücre boyutunda anormallikler ve membran geçirgenliği nedeni ile nekrozisin gerçekleştiği gösterilmiştir (59). NSCLC ile yapılan başka bir çalışmada APP metastaz ile ilişkilendirilmiştir. Bunun yanı sıra hem APP hem de fosforile APP prognostik faktör olarak kabul edilirken, fosforile APP üzerine çalışmaların artırılmasının gerekliliği vurgulanmıştır (60).

ONCOMINE veri kaynağına göre, nöroendokrin akciğer tümörlerinde APLP1'in upregülasyonu, APLP2'nin ise downregülasyonu gözlenmiştir (61).

2.5.4 Pankreas Kanseri APP Ailesi Üyeleri

Yapılan çalışmalar, sekrete APP'nin otokrin büyüme faktörlerine etki ederek pankreas kanser hücrelerinin yanı sıra tiroid epitel hücre ve fibroblastların proliferasyonunu arttırdığını göstermiştir (29). Başka bir çalışmada ise; α -sekretazların kesimi sonucu, APP'nin sekrete bir formunun hücre canlılığına ve migrasyona yardım ettiği gösterilmiştir (62). Pankreas kanser hücrelerinin gemsitabinin ile tek başına muamele edilmesi yerine, α -sekretaz inhibitörü batimastat ile birlikte kullanılmasının, proliferasyonu önemli düzeyde düşürdüğünü göstermiştir. Batimastat ile inkübe olan hücreler, APP'nin rekombinant sekrete formu ile muamele edildiğinde büyüme kapasitesinin arttığı bulunmuştur. Bu çalışma ile, α -sekretaz aracılı APP sekresyonunun pankreas kanser hücre büyümesine katkı sağladığı doğrulanmıştır (8).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, pankreas kanser hücre hatlarında APP'nin overekspresyonunun yanı sıra, APLP2'nin de (hem tam-uzunlukta, hem de parçalanmış formlarının) overeksprese olduğu belirtilmiştir ve ayrıca immünohistokimyasal çalışmalar ile APLP2'nin insan pankreas tümör örneklerinde overekspresyonu gösterilmiştir (4). Ortotopik pankreas kanser fare modelinde, APLP2 ekspresyonunun down-regüle edilmesi, tümör ağırlığının ve metastazın sınırlanması ile sonuçlanmıştır. İnsan pankreas kanser metastazlarında yapılan çalışmalar, APLP2'nin metastatik lezyonlarda, özellikle barsak ve diyaframda arttığı bulunmuştur. Aynı zamanda, aynı hastaların primer tümör ve karaciğer metastaz örneklerinin büyük kısmında (% 38) pozitif APLP2 ekspresyonu bulunmuştur (27).

2.5.5. Kolon Kanserinde APP Ailesi Üyeleri

Kolon kanserinde, APP ve APLP2'nin aşırı ekspresyonu söz konusudur (26). Hem *in vivo* hem de *in vitro* çalışmalar, APP'nin kolon kanseri hücrelerinde büyüme ve çoğalmayı teşvik ettiğini göstermiştir (6). Ayrıca APP çalışmalarından elde edilen sonuçlarla uyumlu olarak APLP2'nin knock-down edilmesi, Caco2 kolon kanser hücrelerinin proliferasyonunu azaltmıştır (26). Kolon kanser hücrelerinde, APLP2 ekspresyonu, insan lökosit antijen-B-ilişkili transkript 3 (Bat3) ekspresyonu ile pozitif ilişkilidir. Bat3, APLP2 ile etkileşmekte ve onun proteazom tarafından yıkımını engellemektedir (63). Bu sonuçlar, Bat3'ün APLP2'yi stabilize ederek, APLP2'nin kolon kanser hücre büyümesini artırma kabiliyetini kolaylaştırdığını göstermektedir.

2.6. Matriks Metalloproteinazlar

Matriks metalloproteinazları (MMP), ekstrasellüler matriks ile bazal membran komponentlerini parçalama yeteneğine sahip olup ve aktif bölgesinde çinko içeren homolog bir enzim ailesidir. Nötral pH'da aktif olan, multigenik bir endopeptidaz ailesi üyesidir (64).

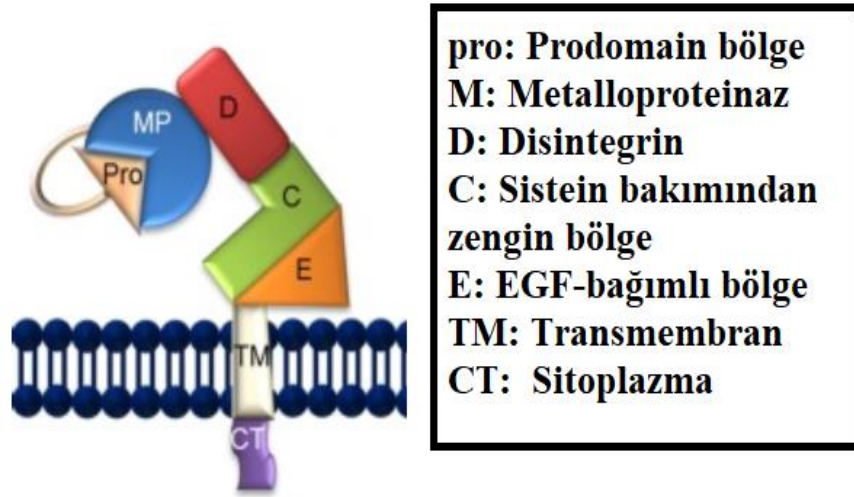
Tümü proenzim olarak fibroblastlar, osteoblastlar, kondrositler, endotel hücreleri, makrofajlar, nötrofiller gibi çeşitli bağ dokusu hücrelerinden salınmaktadır. MMP'ler yara iyileşmesi, kemiğin yeniden yapılanması, uterus ve meme dokusu fizyolojik fonksiyonları, ovülasyon, embriyogenezis, laktasyon gibi fizyolojik süreçlerde yer aldığı gibi aynı zamanda artrit, tümör hücresinin invazyonu ve metastaz gibi patolojik süreçlerde de rol oynamaktadırlar (65). MMP ailesi, Zn^{+} iyonu içermektedir. Bu nedenle, şelatlayıcı ajanlarla inhibe olabilmektedirler. İnaktif formda salgılanırlar, dolayısıyla proteolitik aktivitelerini göstermeleri için aktive olmaları gerekmektedir (64). MMP'lerin primer yapısı incelendiğinde bu proteinlerin farklı bölgeler içerdiği görülmektedir (65).

1. Predomain Bölgesi: İlk tanımlanan bölgedir. Daha sonra uzaklaştırılan sinyal peptid dizisidir. Bu sebeple inaktif olarak sentezlenen MMP'de bulunmaz. 80-90 amino asit içeren N-terminal propeptididir.

2. Prodomain Bölgesi: Korunmuş *PRCGVPDV* dizesi içerir. Prodomain bölgesinin çıkarılması, inaktif proenzimin aktif forma dönüşmesini sağlamaktadır.
3. Katalitik Bölge: Histidin amino asidi bakımından zengin bir bölgedir.
4. Prolinden Zengin Bölge: Katalitik bölge ile son bölge arasında yer almaktadır.
5. Hemopeksin Benzeri Bölge: N- ve C-terminal kısımları bağlayan disülfid bağı içerir ve katalitik bölgeye 5-10 amino asitlik prolinden zengin bir bölge ile bağlanmaktadır. Bu bölgenin fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir. Fakat substrat spesifitesini sağlama veya hücre yüzey reseptör alanını tanıma fonksiyonu gösterdiği düşünülmektedir.

2.6.1. Bir Disintegrin ve Metalloproteinaz ADAM

ADAM (A Disintegrin and Metalloproteinase) proteinleri, hücre adezyonu, hücre yüzey reseptörleri ve sinyal moleküllerinin proteolizinden sorumlu moleküllerdir. Ortalama 750 amino asit uzunluğunda olan ADAM proteinleri, yılan zehiri metalloproteinazları (Snake Venom Metalloproteinase, SVMP) ve trombospondin motifli ADAM'lar (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs, ADAMTS) ile Adamalizin alt ailesini oluşturmaktadırlar (66, 67). Disintegrin ve metalloproteazlar, transmembran proteinleridir ve yaklaşık 40 tipi bulunmaktadır. İnsandaki ~ 600 proteazdan 22'si ADAM proteaz ailesine aittir (68). ADAM'lar prodomain, metalloproteinaz bölgesi, disintegrin benzeri bölge, sisteinden zengin bölge, EGF benzeri bölge, transmembran bölge ve sitoplazmik kuyruk olmak üzere farklı işlevlere sahip bölgelerden oluşmaktadır (69).



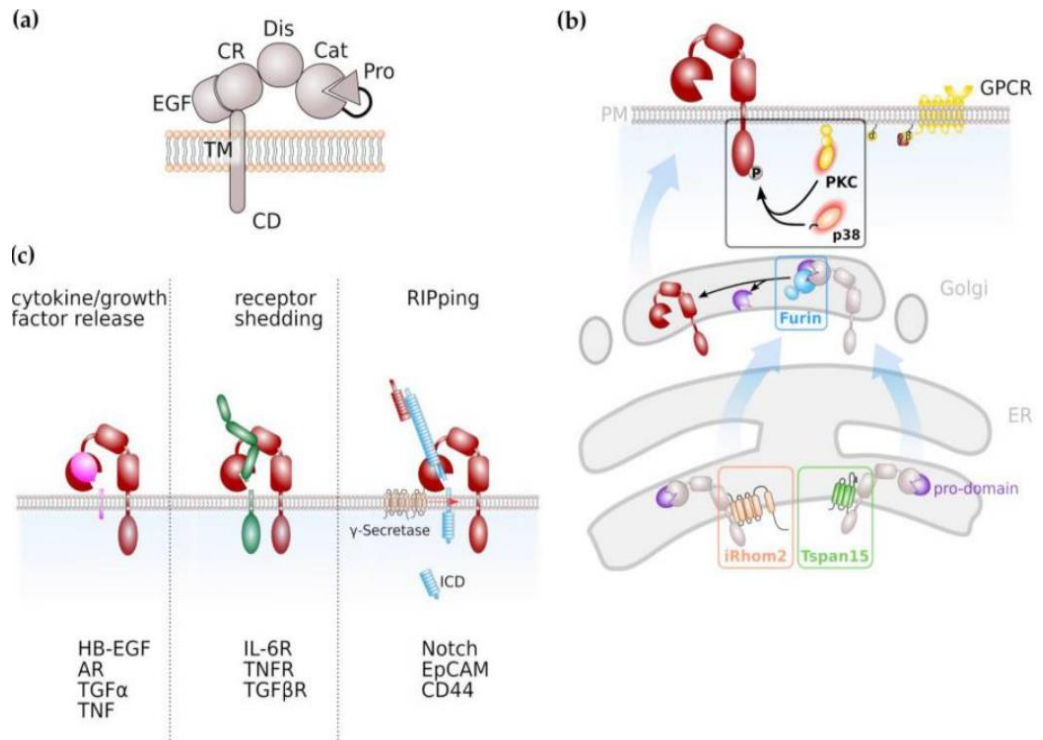
Şekil 2.4. ADAM'ın yapısal şekli (69).

ADAM proteinlerini oluşturan bölgelerin işlevleri birbirinden farklılık göstermektedir:

1. Prodomain Bölgesi: Golgide kesilmekte ve ardından olgun forma dönüşmesi sağlanmaktadır.
2. Metalloproteinaz Bölgesi: Potansiyel olarak proteinaz fonksiyonuna sahip bölgedir.
3. Katalitik Olarak Aktif Bölge: 3 histidinli, met-dönüşlüdür (HEXGHXXGXXHD), çinko bağlama bölgesine sahiptir.
4. Disintegrin Bölgesi: Hücre-hücre adezyon sürecinde rol almaktadır. Aynı zamanda, sisteinden zengin bölgeyle beraber katalitik aktivitenin düzenlenmesi ve substrat hedeflenmesinde görev almaktadır.

ADAM'ların epidermal büyüme faktörü (EGF), heparin bağlayıcı-EGF benzeri büyüme faktörü (HB-EGF), TNF- α , vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), E-kadherin, N-kadherin, Fas Ligand, EGFR Ligand, transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β), TNF- α reseptörü 1-2, CD44, L-selektin, Erb4/HER4, sortilin, APP, Notch reseptörü gibi çok sayıda substratı bulunmaktadır (70, 71). İnsan genomu, gelişimsel olayların gerçekleşmesi için gerekli olan 22 farklı ADAM geni kodlamaktadır. Spermatogenez, döllenme, gastrointestinal sistem fonksiyonları, merkezi sinir sistemi (MSS), damarlanma ve bağışıklık olaylarında ADAM'ların görev aldığı bilinmektedir. Bunun yanı sıra, yapılan çalışmalarda düzensiz ADAM

fonksiyonlarının kısırlık, AH, kanser gibi pek çok patofizyolojik olayda rol oynadığı düşünülmektedir (70). ADAM'lar proteolitik aktivite oluşturucu veya sinyal iletim yollarını aktive edici olabilirler. ADAM proteaz aktivitesinin düzenlenmesi en iyi şekilde aile üyelerinden ADAM10 ve ADAM17 için açıklanmıştır. İnaktif rhomboids (iRhoms) ve tetraspaninler (Tspans) sekretuar yol boyunca ADAM'ların olgunlaşmasında rol oynamaktadırlar. ADAM17'nin proteolitik aktivite göstermesi için plazma membranına yerleşmesi gerekmektedir. ADAM17 aktivitesi için vazgeçilmez bir faktör, *rhomboid* aile üyesi (RHBDF)-2 geni tarafından kodlanan inaktif rhomboid proteaz (iRhom)-2'dir. iRhom2 ER'de lokalizedir ve ADAM17'yi ER'dan golgiye taşımaktadır. ADAM10'un tek farkı, hücre zarına taşınması iRhom2 yokluğundan etkilenmemesidir. ADAM10'un ER içindeki TspanC8 ailesinin üyeleriyle etkileşerek plazma membranında olgunlaşması teşvik edilmektedir (Şekil 2.5) (72-75).



Şekil 2.5. (a) ADAM genel yapısı, (b) ADAM10 ve ADAM17'nin olgunlaştırılma metabolizması, (c) büyüme faktörleri ve sitokinlerin ADAM proteaz üzerine etkisi (76)

2.6.2. ADAM10

ADAM10 endopeptidaz, adezyon molekülleri, sinyal reseptörleri ve büyüme faktörlerini hidrolize eden, tip I transmembran metalloproteinazlardır. TNF α ve APP'yi işleyebildikleri tespit edilmiştir (77, 78). Son yıllarda, α -sekretazlar önemli bir araştırma konusu haline gelmiştir. ADAM10 ve ADAM17, tarihsel olarak en iyi Notch sinyalizasyonundaki rolü ve daha yakın zamanlarda AH'nın patofizyolojisi ile ilişkilendirilmiş olup bununla birlikte, ADAM10 ve ADAM17'nin apoptoz, hücre yapışması, hücre metabolizması, kanser proliferasyonu, kanser metastazı ve diğer fonksiyonlara ek olarak otoimmünite de dahil olmak üzere çok sayıda biyolojik fonksiyonda yer aldığı çalışmalarla bildirilmiştir (79, 80).

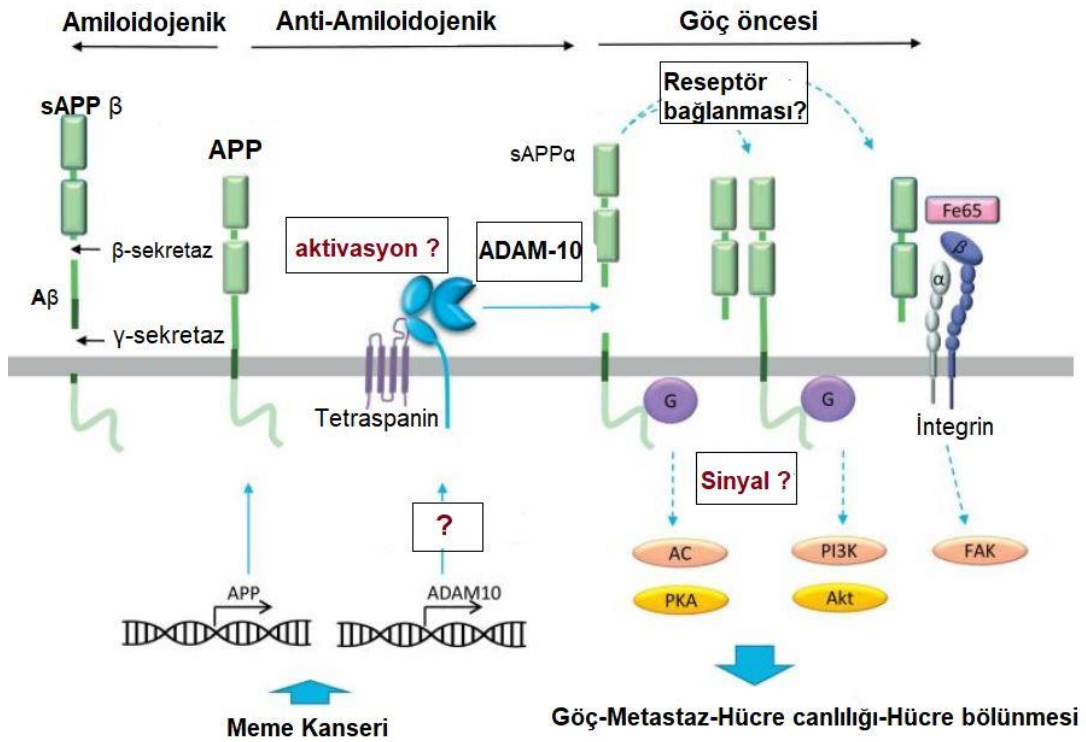
ADAM10'un farelerde gelişim için gerekli olduğu ve ADAM10 geni eksik olan hayvanların embriyonik dönemin 9/10. gününde öldüğü bilinmektedir. Bu embriyonik kusurlar özellikle kalp, MSS, bağışıklık sistemi, kardiyovasküler sistem, epidermis, bağırsak ve vasküler endotelyumda meydana gelir. Notch sinyalizasyonunda kusur olan hayvanlarda benzer embriyonik anormallikler bulunmaktadır. Bu nedenle, ADAM10'un yokluğuyla ilişkili yukarıdaki embriyonik anomalilerin birçoğu, Notch sinyalizasyonunun etkinleştirilememesine bağlı olabileceği düşünülmektedir (81). Araştırmacılar, en belirgin şekilde Notch sinyal yolu, EGF benzeri büyüme faktörleri, bazı adezyon molekülleri ve bunların reseptörleri dahil olmak üzere artan sayıda ADAM10 substratı belirlemişlerdir. ADAM10 için doğrulanmış substratlar arasında APP ve spesifik EGFR ligandları bulunmaktadır. APP'nin spesifik bir rolünün olduğu düşünülmektedir. Ek olarak, ADAM10 tarafından kesildiği gösterilen diğer proteinler arasında E-kaderin, N-kaderin, L1 ve CD44 bulunmaktadır (82, 83). ADAM10 ve ADAM17'nin substratlarından olan HB-EGF, EGFR'nin G proteinine bağlı reseptörler tarafından transaktivasyonunda anahtar rol oynamaktadır. Son çalışmalarda, HB-EGF gen ekspresyonunun çeşitli insan kanserlerinde önemli ölçüde yükseldiğini ve ekspresyon seviyesinin diğer EGFR ligandlarından çok daha yüksek olduğunu göstermiştir (84, 85).

ADAM10 epitelyal hücreler, düz kas hücreleri ve enterik nöronlar dahil olmak üzere tüm hücre tiplerinde eksprese edilmektedir. Bunun dışında ADAM10'un

lökositler, çeşitli doku hücreleri ve kanser hücreleri dahil olmak üzere birçok hücre tipinin göçünde önemli rol oynadığı bildirilmektedir (86).

Gastrointestinal organlar oldukça karmaşık dokulardan oluşmakta ve bu dokuların çoğu, hücre çoğalması ve farklılaşmasıyla sürekli olarak yenilenmektedir. Ayrıca, hasarlı veya enfekte olmuş dokulardan yayılan sinyaller, doku kök hücrelerinin mobilizasyonuna, hasarlı dokunun yenilenmesine ve yeniden şekillenmesine katkıda bulunmaktadır. Disintegrin ve metalloproteaz ailesinin üyeleri, tüm bu süreçlerde yer almaktadır. Parakrin sinyal transdüksiyonunun anormal aktivasyonu, gastrointestinal tümörlerin gelişimi için anahtardır ve bu nedenle, ADAM proteazlarının gastrointestinal tümör oluşumunda belirleyici bir rol oynaması şaşırtıcı değildir (76). 85 adet kolorektal kanser hastası (48 erkek, 37 kadın) üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada ise, ADAM10 ve ADAM28'in serum düzeyi ile klinik evrenin derecesi arasında bir ilişki olduğu gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, kolorektal kanserin gelişiminde bu proteinlerin potansiyeli ve prognostik değeri hakkında pozitif öngöründe bulunulmuştur (87).

ADAM10'un, APP bölünmesini ve hücre göçünü destekleyebilecek bir mekanizma içerisinde yer aldığı düşünülmektedir (88). Bu doğrultuda yapılan bir çalışmada, meme kanseri hücre hatlarında APP'nin hücre canlılığı ve göçündeki rolü araştırılmıştır. Aynı çalışmada, APP'nin meme kanserindeki fonksiyonel rolleri siRNA kullanılarak *in vitro* ve tümör ksenograft modelde de incelenmiştir (89). APP, meme kanseri hücre dizilerinde proteolitik bölünmeye uğrayarak sAPP α oluşumunu arttırmıştır. Artan sAPP α 'nin hücre göçünü ve çoğalmasını desteklediği bildirilmiştir (89). RNA interferansı kullanılarak APP ekspresyonunun devre dışı bırakılması sonucunda, ksenograft modellerde meme kanseri büyümesinin ve hücre göçünün azaldığı gözlemlenmiştir. sAPP α oluşumu henüz tanımlanmamış olup çeşitli sinyal yolları aracılığı ile meme kanserinde hücre göçünü indüklediği düşünülmektedir. Sinyal yolları içerisinde PKA, PI₃K, AKT ve FAK dahil olmak üzere birçok sinyal yolları ile ilişkisinin araştırılması gerekmektedir (88, 89).



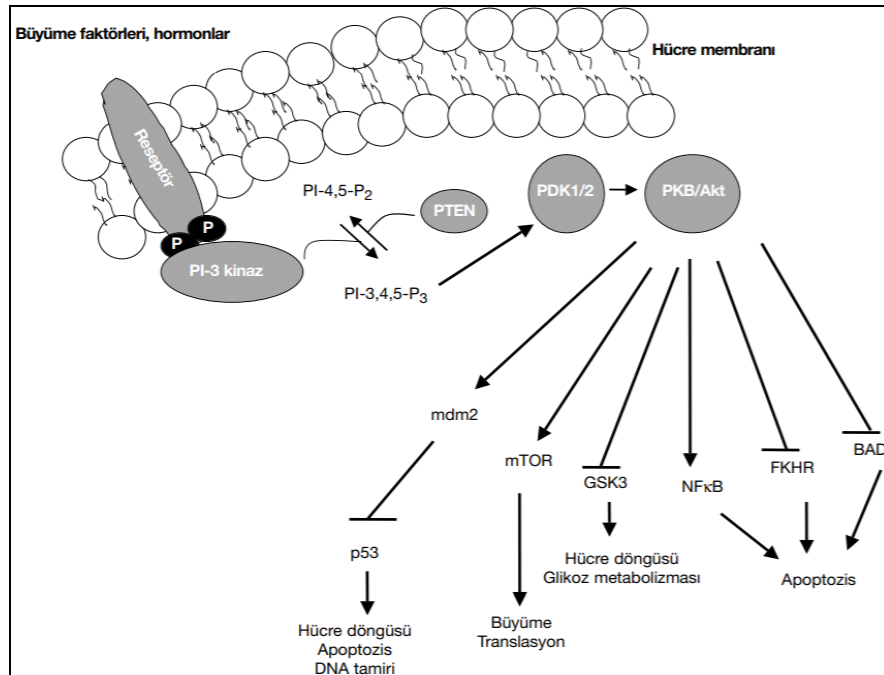
Şekil 2.6. Meme kanserinde hücre göçünde APP ve ADAM10 için önerilen model (88).

2.7. Fosfoinozitol-3 Kinaz (PI₃K)/Protein kinaz B (AKT) Sinyal İletim Yolunun Fonksiyonu ve Karakterizasyonu

Fosfoinozitol-3-kinaz-protein kinaz B/AKT (PI₃K-PKB/AKT) yolunun tanımlanması, aktive edici reseptör tirozin kinazların (RTK'lar) 1980'lerin başında ciddi bir şekilde insülin reseptör sinyalinin karakterize etme girişimleriyle başlamıştır. Bu mütevazı başlangıçlar, insülin reseptörü substrat (IRS) proteinleri yoluyla insülin reseptörü sinyalinin bileşenlerinin ve mekanizmasının tanımlanmasına ve bunun sonucunda da 3-fosfoinozitol bağımlı protein kinaz 1 (PDK1) ile PKB/AKT aracılı aktivasyonun tanımlanmasına yol açtı (90). Fosfoinozitol-3 kinazlar (PI₃K), hücre büyümesi, metabolizma, proliferasyon, glukoz homeostazı ve vezikül trafiğinin düzenlenmesinde rol alan bir protein ailesidir (91). PI₃K'lar, üç farklı sınıflandırmaya göre yapılarına, bağlanma şekline, aktivasyonu ve substratına göre PI₃KI, PI₃KII ve PI₃KIII şeklinde ayrılmaktadır. IA sınıfı enzimlerinin en iyi nitelendirilmiş grubu PI₃K'dır. IA grubu PI₃K'lar iki alt üniteden oluşmaktadır (92).

- a) p110 katalitik alt ünite (p110 α , p110 β , p110 γ)
- b) p85 regülatör alt ünite (p85 α , p85 β , p55 γ , p55 α , p50 α)

PI₃K, inositol halkasının 3 konumlu hidroksil grubunu fosforile edebilen bir kinazdır. PI₃K iki bölgeden oluşmaktadır. Birincisi, katalitik bir P110 alanı ve ikincisi bir düzenleyici P85 bölgesidir. PI₃K'nın aktivasyonu tipik olarak, aktive edilmiş reseptöre bağlı düzenleyici alt birim yoluyla doğrudan uyarılabilir veya insülin reseptörü substrat (IRS) proteinleri gibi adaptör moleküller yoluyla dolaylı olarak aktive edilebilmektedir. PI₃K, ayrıca bir GTP bağlayıcı RAS proteini ile aktive edilebilmektedir (93). Reseptörün uyarılmasından sonra PI₃K, hücre membranında inositol fosfolipidlerin fosforilasyonunu katalizlemektedir. Fosfotidil inositol trifosfat (PIP₃), bu yolla oluşan bir lipid mediatörü olup, PIP₃ bağımlı kinazlar (PDK) ve protein kinaz B'nin (AKT) aktivasyonundan sorumludurlar (Şekil 2.7). Protein kinaz B, AKT1 ve AKT2 genleri tarafından kodlanan bir proteindir. Bu genler, viral v-akt onkogeninin insanda bulunan homologlarıdır (94).



Şekil 2.7. Protein kinaz B/AKT yolunun işlevleri (95).

Sitokinler ve büyüme faktörleri PI₃K ve Akt yolunu aktive etmektedirler böylece hücreler için yaşama sinyalleri oluşmaktadır. PI₃K/AKT yolağı apoptozun inhibisyonunda ve hücre proliferasyonunun uyarılmasında rol oynamaktadır. Tümör

baskılayıcı bir protein olan PTEN ise, PI₃K sinyalizasyon yolağının düzenlenmesinde en önemli görevi üstlenip, PIP₃ oluşumunu inhibe eden negatif bir düzenleyicidir (96).

PTEN, hücre ölümüne birçok apoptotik uyarıya cevaben PI₃K/AKT yolağının negatif yönde düzenleyerek duyarlılığı arttırmaktadır. PI₃K/AKT hücre canlılık yolağındaki düzenleyici rolüne ek olarak, aynı zamanda büyüme faktörü-indüklü SHc fosforilasyonunu inhibe etmekte ve MAP kinaz sinyal yolağını baskılamaktadır. Bu durum, PTEN'nin PI₃K/AKT sinyal yolağından bağımsız rolleri olduğunu göstermektedir. AKT'nin pankreas kanseri dahil birçok kanserde aşırı eksprese edildiği ve yüksek düzey AKT eksprese eden hücrelerin apoptoz uyarılarına daha dirençli olduğu rapor edilmiş olup, pankreatik kanserin %60'ında AKT2'nin aktivasyonu veya amplifikasyonunun meydana geldiği gözlenmiştir (97).

Karsinogenezde etkili olan PI₃K sinyal yolu değişimleri şöyle sıralanmaktadır:

1. PI₃K'nın sentezi artabilir.
2. PTEN tümör baskılayıcı proteini mutasyon ile fonksiyon kaybına uğrayabilir.
3. PKB sentezi kanser hücrelerinde (meme, over, mide, pankreas, prostat) artabilir.
4. PTEN'in işlev kaybı veya PKB'nin aşırı sentezlenmesi sürekli mTOR aktivasyonuna yol açmaktadır.
5. 4E proteininin sentezi artabilir (95).

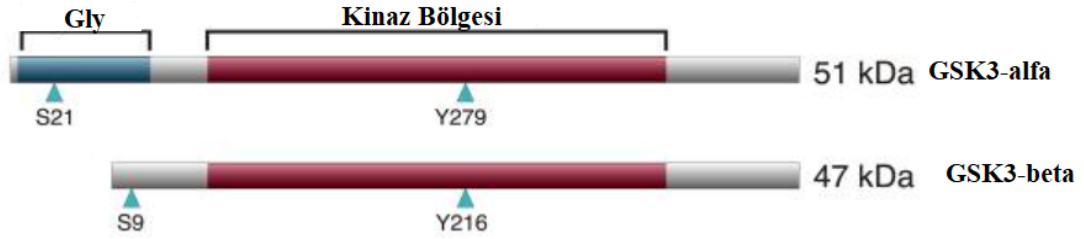
Protein kinaz B aktivasyonunun hücre döngüsü üzerindeki etkileri de karsinogenez sürecinde önem taşımaktadır. p21 proteini hücre döngüsünün erken G1 fazında siklin D ve siklin bağımlı kinaz 4/6 (cdk4/6) kompleksi üzerinde pozitif uyarıcı etki yapmaktadır. Protein kinaz B, p21'in stabil formunun oluşumunu tetiklemekte ve hücre döngüsünün ilerlemesine uyarıcı yönde etki etmektedir. Buna ek olarak, p21'in degradasyonunu uyaran proteini de inhibe etmektedir (95).

2.7.1. PI₃K/AKT Sinyal Yolu ve APP

AH ile yakından ilişkisi olan APP'nin biyolojisi üzerine yapılan çalışmaların birçoğu patojenik mekanizmalar ve terapötik fırsatlar üzerine odaklansa da araştırmalar dikkat çekici bir şekilde APP ailesi üyelerinin büyüme ve gelişmeden, kanser mekanizmasındaki rollerine doğru kaymaya başlamıştır. PI₃K/AKT/GSK-3 β sinyal yolunun A β maruziyetinden doğrudan etkilendiğini ve AH beyinlerinde değiştiğini göstermektedir. Ayrıca A β oligomerlerinin, PI₃K/AKT yolunun modülasyonu yoluyla, insülin reseptörlerinin ekspresyonunu ve yoğunluğunu modüle ettiği ve AH hastalarında fosforile AKT seviyelerinde değişiklikler olduğu bildirilmiştir (98). Yakın zamanda ise, sAPP α ile PI₃K/AKT sağkalım yolunun aktivasyonunu doğrudan araştırmak için, serumdan yoksun SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri ile *in vitro* Akt-kinaz deneyleri gerçekleştirilmiş, bu kapsamda, trofik faktörlerin geri çekilmesi ile AKT aktivitesi ve pGSK-3 β seviyesinde belirgin bir azalma meydana geldiği ve total APP ile sAPP α 'nın, G-protein aracılı PI₃K-AKT sinyalizasyon yolağını aktive ettiği belirtilmiştir (99).

2.7.2. AKT Aktivasyonunun Hücre Proliferasyonundaki Rolü ve Glikojen Sentaz Kinaz 3

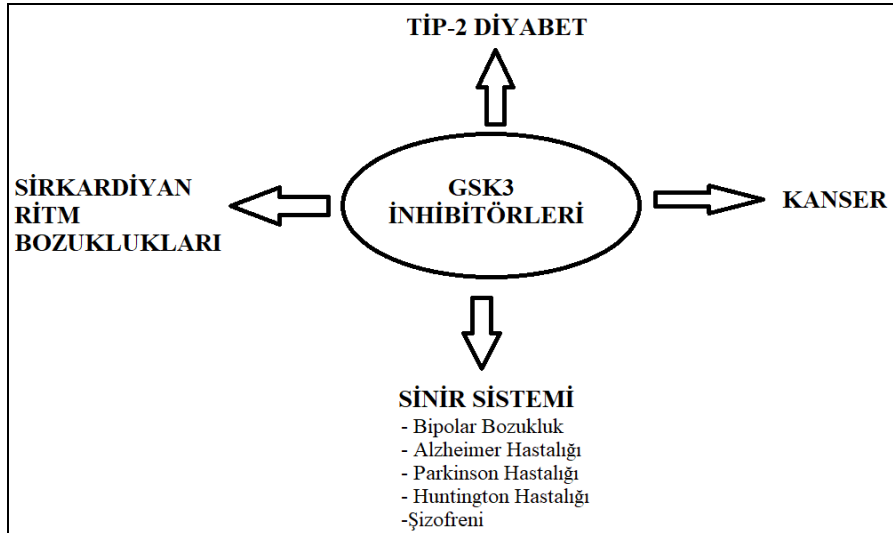
Glikojen sentaz kinaz 3 (GSK-3) serin/treonin protein kinaz ailesinin bir üyesidir. İlk kez 1980'lerde düzenleyici kinaz olarak keşfedilmiştir (100). GSK-3; glikojen metabolizması, hücre çoğalması, hücre döngüsü, göç, bağışıklık, interlökin üretimi, protein kinaz ile adaptif değişimler gibi birçok hücresel olayda görev almaktadır. Hücrelerde yapısal olarak aktif olması ve aktivitesinin inhibisyonu ile düzenlenmektedir. Memelilerde GSK-3 alfa (GSK-3 α) ve GSK-3 beta (GSK-3 β) olmak üzere 2 izoformu mevcuttur. Bu izoformlar, kendi içerisinde yüksek homoloji göstermektedir. İki izoform arasındaki kütleli fark GSK-3 α 'nın N-terminal ucundaki zengin glisin bölgesinden kaynaklanmaktadır (101).



Şekil 2.8.. GSK-3'nin izoformları: GSK-3 α ve GSK-3 β (Gly: Glisince zengin bölge, S9 ve S21: N-terminal serin fosforilasyon bölgeleri, Y216 ve Y279: tirozin fosforilasyon bölgeleri) (101).

GSK-3 α ve GSK-3 β yapısal olarak birbirlerine benziyor olsa da işlevsel olarak aynı değildir (Şekil 2.8). Fare embriyolarında, GSK-3 β 'nin homozigot delesyonu hepatositleri apoptoza götürürken, GSK-3 α yoksunu fareler hayatta kalabilmektedir. Ancak glikoz metabolizmasındaki kusurlar nedeni ile yaşam süreleri kısalmaktadır (101, 102).

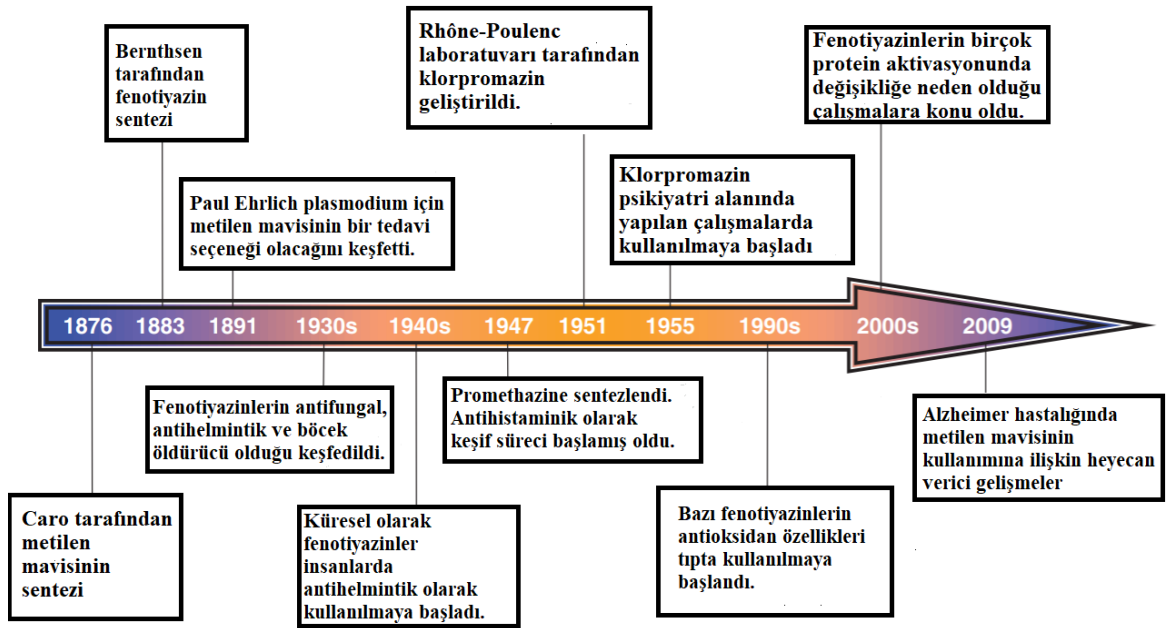
GSK-3'ün aktivasyonu veya inaktivasyonu; Wnt, reseptör tirozin kinaz ve G proteinine bağlı hücrel yanıtlar dahil olmak üzere çok sayıda sinyal yolunu düzenlemektedir (101). Hücrelerin insülin ile uyarılması, PI₃K bağımlı mekanizma ile GSK-3'ün inaktivasyonuna neden olmaktadır. Her iki GSK-3 izoformu, PKB fosforilasyonu ile sonuçlanmaktadır. Bu fosforilasyon, GSK-3'ün aktivitesini inhibe etmektedir. GSK-3'ün PI₃K-bağımlı inhibisyonu, glikojen sentaz ve ökaryotik protein sentezi başlatma faktörü-2B (eIF-2B) dahil olmak üzere GSK-3 substratlarının defosforilasyonuna neden olmaktadır. Bu durum, glikojen ve protein sentezinin artmasına neden olmaktadır (101). İnsülin dışında da pek çok uyarıcı, GSK-3'ü serin fosforilasyon yolu ile inaktive etmektedir. Serin fosforilasyon yolu EGF ve PDGF gibi büyüme faktörleri aracılı ERK/MAPK yolağı ile GSK-3 inaktivasyonuna sebep olmaktadır (101). Kanserin gelişim sürecinde tümör hücreleri birçok fenotipik özellik kazanmaktadır. Bu değişimler, tümör hücrelerinin hızlı ve sınırsız çoğalmalarına ve hatta metastaza neden olmaktadır. Sinyal iletim yollarını ve sinyal proteinlerini hedef alan onkogenik mutasyonlara sık olarak rastlanmaktadır. Sinyal iletiminde meydana gelen değişimler, hücrenin çoğalma veya yaşama işlevlerinin kontrolünü ortadan kaldırmaktadır. GSK-3 aktivitesindeki artış, kanser ve birçok hastalığın patofizyolojisinde rol oynadığı için günümüzde GSK-3'ün inhibe edilerek yeni tedavi yollarının geliştirilmesine odaklanılmıştır (103, 104).



Şekil 2.9. GSK-3 inhibitörlerinin çeşitli hastalıklarla ilişkisi (103).

2.8. Fenotiyazin Yapılı Bileşikler

Fenotiyazin yapılı bileşikler, antihelmintik özelliğe sahip olup, MSS'ini etkilemektedirler (105). 1880'lerin sonlarında, Paul Ehrlich sıtma tedavisi için bir ilaç tasarlamak üzere fenotiyazinleri kullanan ilk kişi olmuştur. Ardından 1891'de Berlin'de bir hastanede iki sıtma hastası üzerinde metilen mavisi (MB) deneysel tedavi yöntemi olarak kullanılmıştır. Sıtma hastalarında MB'nin tedavi edici rolü olduğu tespit edilmiştir. 20. yüzyılın ortalarına kadar birçok çiftlik hayvanında ve insanda antihelmintik olarak kullanılmıştır. Ayrıca, Ehrlich MB metabolizmasını ve redoks döngüsünün kendine özgü özelliğini tanımlayan ilk kişi oldu (105). Fransa'da Rhône-Poulenc Laboratuvarındaki küçük bir araştırma grubu antihistaminik etkilere sahip fenotiyazin türevleri geliştirmişlerdir. 1950'lerde anestezi etkilere sahip fenotiyazin türevleri tasarlanmıştır. Bunun dışında, fenotiyazinlerin herbirinin önemli birer antibakteriyel aktiviteye sahip oldukları tespit edildi. Özellikle, tüberküloz tedavisinde ve antibiyotiklere dirençli bakteri türlerindeki etkileri gösterilmiştir (105, 106).



Şekil 2.10. Fenotiyazınların keşif süreci (105).

DMMB, Taylor mavisini olarak da bilinmekte olup, MB'nin bir türevidir. DMMB, doku boyama uygulamalarında sıklıkla kullanılan metakromatik özellikli bir boyadır. Tümör hücreleri, virüs ve parazit tedavilerinde kullanılmaktadır (107). MB, DMMB ve TBO'nun *N. Caninum* üzerindeki anti-parazitik etkileri *in vitro* ve *in vivo* modeller kullanılarak gösterilmiştir (108).

Son 20 yılda, oksidatif stresin sebep olduğu patolojik durumlar üzerinde fenotiyazın bileşiklerinin etkileri incelenmektedir. Yakın zaman a ise, şizofreni dahil olmak üzere birçok nörolojik hastalığın tedavisinde fenotiyazın bileşiklerinin kullanılabilirliği düşünülmektedir (105). Fenotiyazınlar, nispeten ucuz bileşiklerdir. Bu yüzden yaygın olarak temin edilebilmektedirler. Şimdiye kadar, 5000'den fazla fenotiyazın türevidi sentezlenmiş olup kimyasal ve biyolojik aktiviteleri nedeni ile son derece önemli birer araştırma konusu olmuşlardır (109). Fenotiyazınlar farklı proteinlerin yanı sıra, DNA ile de etkileşime girebilmektedirler. Yapılan bir çalışmada, fenotiyazın türevlerinden klorpromazin ve perfenazinin, plazmit DNA pBR322'ye interkale olduğu gösterilmiştir. İnterkalasyon ile fenotiyazınlar DNA analogunun arasına girmektedirler. Bu nedenle, DNA yapısal değişimler göstermektedir. Bu durum, DNA onarım süreçlerinin ve replikasyonun engellenmesine sebep olmaktadır (110). Ayrıca fenotiyazınların, ökaryotik

hücrelerde Ca^{+2} taşıma proteini olan kalmodüline bağlanarak, inhibe ettiği bilinmektedir (109, 110). MB, katyonik yapıli bir fenotiyazin bileşığıdir. Suda ve organik çözücülerde çözünebilmektedir. 1876'da tekstil boyası olarak sentezlenmiştir. 1891'de tıbbi uygulamalara araştırma konusu olmuştur. Klinik uygulamalarda 1-4 mg/kg aralığının güvenli doz olduğu gösterilmiştir (1, 111, 112). MB sıtma, methemoglobinemi, kardiyopulmoner baypas, septik şok tedavisinde kullanılmaktadır. Düşük dozlu MB'nin, mitokondriyal elektron taşıma zincirinde serbest radikal üretiminin azalmasına yol açabileceğı gösterilmiştir (1). Son yıllarda MB'nin, Parkinson hastalığında (113), AH'de (114), iskemik inme ve travmatik beyin hasarlarında (115) nöroprotektif etkileri olduğu bildirilmiştir. MB'nin AH'de amiloid- β oluşumunu inhibe ettiğı düşünölmektedir. Transgenik PSAPP fare modelinde, hayvanlara oral yolla 3 mg/kg olarak verildiğinde, hayvanlardaki davranış bozukluğunu önemli derecede önlediğı ve A β ekspresyonunu da önemli ölçüde azalttığı bulunmuştur (114). HT-22 hücre hattı ile yapılan çalışmalarda ise MB'nin, amiloid agregasyonunu azalttığı gösterilmiştir (114, 116). Ayrıca, MB'nin ana metaboliti olan Azur B'nin, sAPP α ve A β düzeylerini AH hücre modeli olan PS70 hücrelerinde doza bağılı olarak azalttığı bulunmuştur (117). Yine aynı hücre modelinde, TBO ve TH'nin, APP seviyelerini düşürerek, A β patolojisini de azalttığı gösterilmiştir (10). Bunun yanı sıra, deneysel olarak subaraknoid kanama sonrası uygulanan MB'nin nörolojik disfonksiyonu ve beyin ödemi azalttığı gözlemlenmiştir. MB uygulamasının AKT ve GSK-3 β 'nin fosforilasyonunu teşvik ederek çekirdekte MEF2D (miyozite özgü güçlendirici faktör 2, kas ve nöronal farklılaşma, gelişmede görev alır) konsantrasyonunu arttırdığı bildirilmiştir (118).

Fenotiyazinler, anti-kanser ilaç tasarımında yapısal bir iskelet oluşturmaktadır. Son yıllarda bu yapısal iskelet üzerinden tasarlanan farklı fenotiyazin bileşikler, birçok kanser çalışmasına konu olmuştur. Bu bileşiklerin birçoğı ise, yeni kanser ajanı olarak tanımlanmıştır. Bu doğrultuda hayvan deneyleri ile yapılan kanser çalışmalarda, fenotiyazin yapıli bileşik olan dimetilbenzantrazen kanser gelişimini azaltmıştır. Bu gibi çalışmalar fenotiyazin yapıli bileşiklerin mekanizmasının anlaşılması için öncül olmuştur (119, 120). Lösemi ve lenfoma klinik çalışmalarda klorpromazin ve trifluoperazinin doza bağılı olarak apoptozu

teşvik ederken, bu bileşiklerin normal hücrelere herhangi bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir. Bu tür çalışmalar, fenotiyazin yapılı bileşiklerin tümör proliferasyonunu inhibe edebileceği fikrini desteklemektedir. Bu fikirden yola çıkarak, meme kanseri ve akciğer kanserinde fenotiyazin yapılı bileşiklerin anti-tümör aktivitesi incelenmiştir. Bu bileşiklerin, hücre sinyal yolları ile yakından ilişkili olduğu tahmin edilmektedir. Wnt, MAPK gibi sinyal mekanizmalarına etki ederek, hücre proliferasyonunu azalttığı düşünülmektedir. Çalışmalarda MAPK8, IGF1R, GSK3 β , FGFR2 ve MAPK10'u dolaylı yollardan ya da doğrudan etkilediği üzerine tartışmalar mevcuttur (11, 121).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasallar

HT-29 (HTB-38) hücreleri ATCC'den satın alındı. BCA protein assay kit, Pierce'dan (ABD); Mini-Protean TGX Stain Free Gels, Any kDa Gel (Bio-RAD); toluidin blue O (TBO) ve 1,9-dimethyl-methylene blue (DMMB), Sigma-Aldrich (St. Louis, ABD)'den satın alındı. Aksi belirtilmediği takdirde; diğer tüm kimyasallar, Sigma-Aldrich, Merck (Almanya) veya Biological Industries (İsrail) kaynaklıydı.

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Hücre kültürü çalışmaları, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nın alt yapısı (laminar flow kabin, inverted mikroskop, CO₂ inkübatörü, santrifüj, su banyosu vb.) kullanılarak gerçekleştirildi. Örneklerin protein konsantrasyonlarını belirlemek için Biotek Powerwave mikropilaka okuyucusu, protein elektroforezi için BioRad Mini-Protean 3 ve membrana transfer için BioRad Mini Trans-Blot elektroforetik transfer hücresi kullanıldı. Bio-Rad ChemiDoc XRS+ jel görüntüleme cihazı kullanılarak jel ve membranlar görüntülendi. Hücre canlılık çalışmalarında ise, BD Accuri C6 Plus akım sitometri cihazından yararlanıldı.

3.2. Yöntemler

3.2.1. HT-29 Hücre Kültürü

Hücre kültürü çalışmalarında, HT-29 kolon kanseri hücre hattı kullanıldı. Hücreler, öncelikle 75 cm²'lik flasklarda %10 fetal sıgır serumu (FBS), 100 ünite/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren McCoy's 5A Medium ortamında %70-80 yaygınlık gösterene kadar çoğaltıldı. Uygun yoğunluğa eriştiklerinde, %0.25 tripsin-EDTA kullanılarak tripsinize edildi ve stok yapmak amacıyla, hücreler antibiyotiksiz ve %5 DMSO içeren tam besiyeri içerisinde dondurularak saklandı. Ayrıca, ileriki çalışmalarda kullanılması gereken dozu belirlemek için, kontrol amaçlı olarak kanser olmayan sağlıklı HEK293 hücreleri kullanıldı. Bu hücreler ise, %10 FBS ve 100 ünite/ml penisilin-100 µg/ml streptomisin içeren Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) besiyerinde çoğaltıldı.

3.2.2. Fenotiyazin Yapılı Bileşikler ile Muamele ve Hücre Lizatlarının Hazırlanması

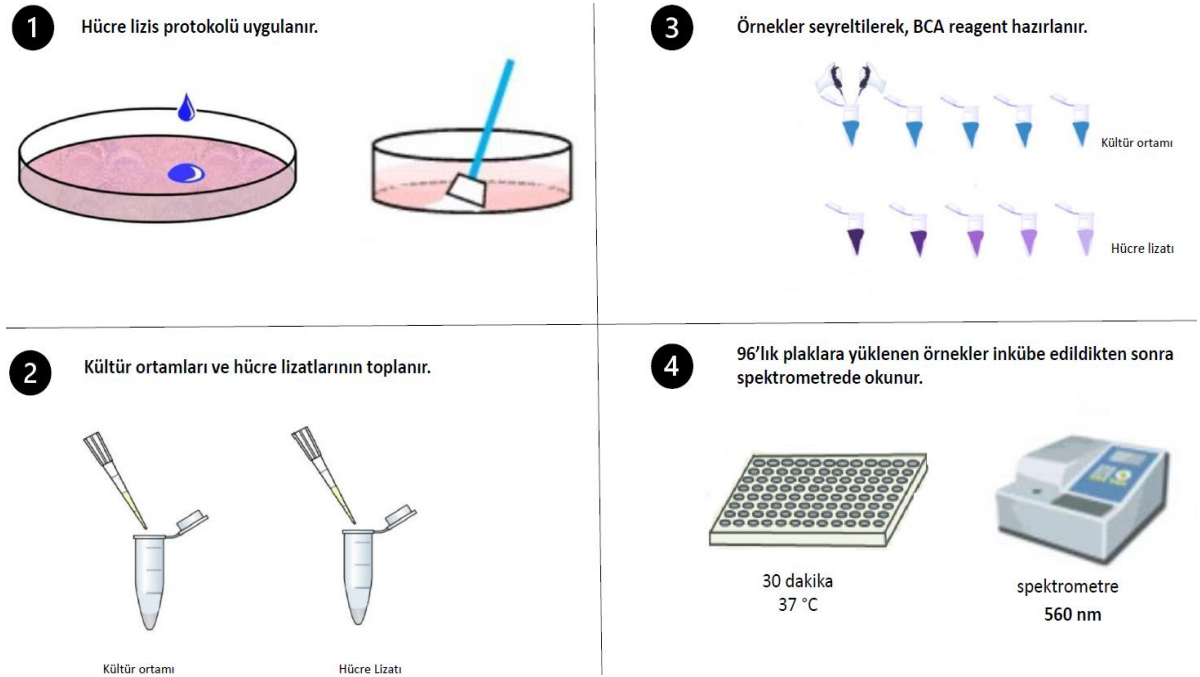
HT-29 hücreleri, fenotiyazin yapılı bileşiklerle muamele öncesinde, 6 kuyulu (3×10^5 hücre/kuyucuk) veya 100 mm x 20 mm plaklar içerisine (1×10^6 hücre/plak) ekildi. Hücreler tutunup %70-80 yoğunluk gösterene kadar çoğaltıldı.

Uygulama günü, stok fenotiyazin çözeltileri, metanol veya PBS içerisinde taze hazırlanarak, 0.2 µm filter ile sterilize edildi. Hücrelerin bulunduğu ortam, %1 FBS içeren taze renksiz RPMI ortamı ile değiştirilerek, HT29 hücreleri, 0.5-40 µM fenotiyazin yapılı bileşiklerle (TBO ve DMMB) ve PBS/metanol (kontrol) ile 37°C'de ve %5 CO₂ varlığında 24 saat muamele edildi. 24 saatin sonunda, kültür ortamları toplanarak hücre artıklarını uzaklaştırmak amacıyla 250 g'de 10 dk santrifüjleme yapıldı ve kullanılmaya kadar -20 °C'de saklandı.

Hücre lizatlarını elde etmek için, hücreler önce soğuk PBS ile yıkandı ve ardından 1 mM EDTA, 1 mM fenilmetilsulfonil florür (PMSF) ve proteaz inhibitör karışımı içeren RIPA tamponu (150 mM NaCl, %1 IGEAL^(R)CA-630, %0.5 sodyum deoksikolat, %0.1 SDS ve 50 mM Tris, pH 8.0) içerisinde 30 dk buz üzerinde inkübe edildi ve hücrelerin plaktan ayrılması sağlandı. Daha sonra herbir örnek, 4°C ve 13000 g'de 30 dk santrifüjlenerek süpernantlar elde edildi ve örnekler kullanılmaya kadar -20 °C'de porsiyonlar halinde saklandı.

3.2.3. Protein Tayini

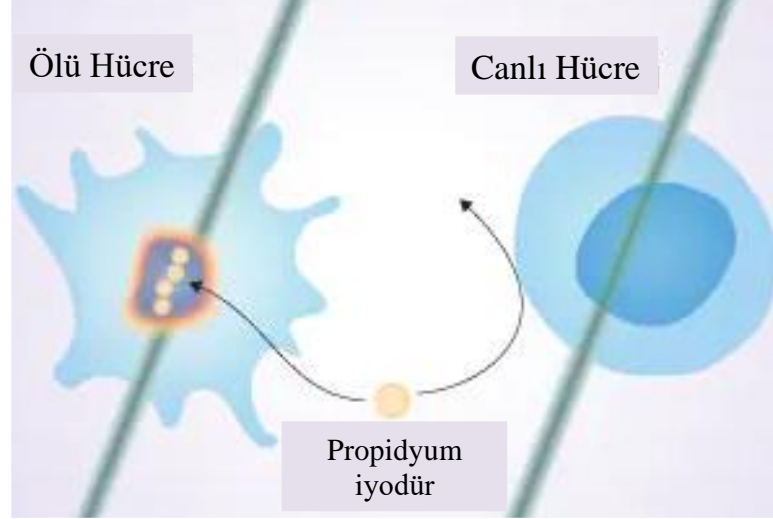
Çalışmada, HT-29 hücre lizatlarının ve besiyerine salınan total protein miktarı, BCA protein tayin yöntemine göre belirlendi (Şekil 3.1). BCA (bikinkoninik asit) protein tayini, bir numunedeki toplam protein miktarını belirlemede kullanılan biyokimyasal bir tekniktir. Yöntemde, birinci reaksiyon biüret reaksiyonu olup, Cu⁺² iyonları peptidlerin azotlarına bağlanır ve Cu⁺¹'e indirgenmektedir. İkinci reaksiyonda Cu⁺¹, BCA ile reaksiyona girerek mor renkli bir yapı oluşturmaktadır. Oluşan mor rengin şiddeti, protein konsantrasyonu ile doğru orantılı olup, absorbanslar 562 nm'de ölçüldü (122).



Şekil 3.1. Kültür ortamları ve hücre lizatlarında, BCA protein tayini yönteminin basamakları.

3.2.4. Akım Sitometri Yöntemi

Akım sitometri, süspansiyon halindeki hücreleri veya partikülleri bir sıvı içerisinde tek tek fiziksel veya kimyasal özelliklerine göre analiz edebilen teknolojik bir cihazdır. Akım sitometri sistemi 3 ana kısımdan oluşmaktadır. Öncelikle sıvı içerisindeki hücreler, özel boyalarla muamele edildikten sonra tek sıra halinde akış kanalı içerisinde geçmektedirler. Süspansiyon halindeki hücreler burada, lazer ışıkla karşılaşmaktadırlar. Özelleşmiş boyalar aracılığı ile ışık, uygun dedektörler ve filtreler ile çeşitli dalga boylarına dönüştürülür. Bu farklı dalga boyları ise, özelleşmiş bilgisayar programları aracılığı ile algılanmakta ve hücreler hakkında bizlere bilgi sağlamaktadır (123-125) (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. PI'nın, ölü ve canlı hücreler üzerindeki etkisi (R&D Systems'in Propidyum iyodürün hücre canlılığı akım sitometri protokolünden Türkçeleştirilerek alınmıştır.)

Çalışmada, TBO ve DMMB'nin HT-29 ve HEK293 hücre canlılığı üzerine etkileri aşağıda yer alan protokol esas alınarak akım sitometrisi yöntemi ile analiz edildi:

1. HT-29 hücreleri ve HEK293 hücreleri, 6 kuyucuklu hücre kültürü plaklarına 1×10^5 hücre olarak şekilde ekildi.
2. 24 saat inkübe edilerek hücrelerin plağa tutunmasına izin verildi.
3. Bu süre sonunda, hücreler taze besiyeri ile değiştirildi.
4. Stok TBO ve DMMB çözeltileri (0.25-4 mM) sırasıyla; PBS ve metanolde taze hazırlanıp, 0.2 μ m filtre ile sterilize edildi.
5. Son derişimler, TBO için 1.25-40 μ M ve DMMB için 0.5-15 μ M olacak şekilde kültür ortamlarına eklenerek, 24 saat muamele edildi.
6. Ardından, kuyucuklardaki kültür ortamı FACS tüplerine alındı.
7. Hücreler 0.5 ml PBS ile yıkanarak yine aynı sıvı FACS tüpü içerisine aktarıldı.
8. Her kuyucuğa, 0.5 ml %0.25 (w/v) tripsin-EDTA eklenerek hücreler kaldırıldı ve 1.5 ml besiyeri eklendi, ardından hücre süspansiyonları FACS tüplerine alındı.
9. Kuyular, iki defa 0.5 mL PBS ile yıkandı ve ardından bu sıvılar da aynı tüp içerisine eklendi.
10. FACS tüpleri, 400 x g'de 5 dk santrifüj edildi.

11. Üstte kalan süpernatant uzaklaştırıldı ve hücrelerin üzerine yıkama amaçlı bir miktar PBS eklenerek tekrar 400 x g'de 5 dk santrifüj edildi.
12. PBS tekrar uzaklaştırıldı ve tüplerdeki çöken hücrelerin üzerine 1 µl 100 µg/mL PI eklendi.
13. 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyonun ardından her analiz, BD Accuri C6 Plus akım sitometri cihazında (Becton Dickinson, BD, Franklin Lakes, NJ, USA) gerçekleştirildi.
14. Veriler, BD Accuri CFlow yazılımı ile analiz edildi. Sonuçlar, kontrole göre canlı hücre yüzdesi olarak ifade edildi.

3.2.5. MTT Analizi

HT-29 ve HEK293 hücreleri, 96-kuyulu plaklar kullanılarak her kuyuda 7500 hücre olacak şekilde ekildi. HT-29 hücreleri için %10 fetal sığır serumu (FBS), 100 ünite/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren McCoy's 5A Medium ortamında; HEK293 hücreleri ise %10 FBS, 100 ünite/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren DMEM ortamı içerisinde 37°C'de, %5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat boyunca inkübe edilerek, hücrelerin plağa tutunmasına izin verildi. İnkübasyon sonunda ortam, fenol red içermeyen taze kültür ortamı (100 µl) ile değiştirilerek, HEK293 hücreleri, kontrol (PBS) ve 0-80 µM TBO ve 0-30 µM DMMB ile HT-29 hücreleri ise, kontrol (PBS) ve 0-10 µM TBO ve 0-1.25 µM DMMB ile 24 saat muamele edildi. Sonrasında 12 mM MTT stok solüsyonundan her kuyucuğa 10 µl eklendi ve plaklar, 37°C'de 4 saat inkübe edildi. Hücreler MTT ile işaretlendikten sonra, kuyucuklarda 25 µl kalacak şekilde ortam azaltıldı. Formazan kristallerinin çözünmesi için 50-100 µl DMSO, her kuyucuğa eklendi ve 37°C'de 10 dakika inkübe edildi. Daha sonra Biotek Powerwave mikropilaka okuyucusu (BioTek, Highland Park, ABD) kullanılarak 540 nm'de absorbanslar ölçüldü. Sonuçlar kontrole göre % olarak verildi.

3.2.6. Western Blot

HT-29 hücrelerinde fenotiyazin yapıları bileşiklerin hücre içi total APP, APLP2, sAPP α , sAPLP2 ve α -sekretaz (ADAM10) ekspresyonu üzerine olan etkileri, Western Blot yöntemi ile analiz edildi. Aynı zamanda, AKT kinaz

üzerindeki etkileri ise, endojen fosfo-AKT, total AKT ve fosfo-GSK-3 α/β (Ser21/9) ekspresyonlarına bakılarak Western Blot yöntemi ile değerlendirildi.

Yine aynı hücrelerde fenotiyazin yapıları bileşiklerin PI₃K yolağı üzerine etkileri, PI₃K'ı fosforilleyen ve bir tümör süpresör olan PTEN üzerinden değerlendirildi.

- **SDS-PAGE**

1. Hücre lizatları (15-70 μ g protein/kuyucuk), 1:1 oranında 2x Laemmli tamponu (0.125 M Tris/HCl pH 6.8, %20 gliserol, %4 SDS, %0.0025 bromfenol mavisi, %10 β -merkaptoetanol) ile karıştırıldı.
2. Örnekler, 95 °C'de 5 dk kaynatıldı.
3. Lizatlar, Bio-Rad stain free any kDTM Mini-Protean^(R)TGXTM precast jelle yüklendi ve 200 V'da 25 dk boyunca SDS-PAGE işlemine tabi tutuldu.
4. Çözünür proteinler (sAPP α ve sAPLP2) için ise, kültür ortamları toplanarak analizler gerçekleştirildi.

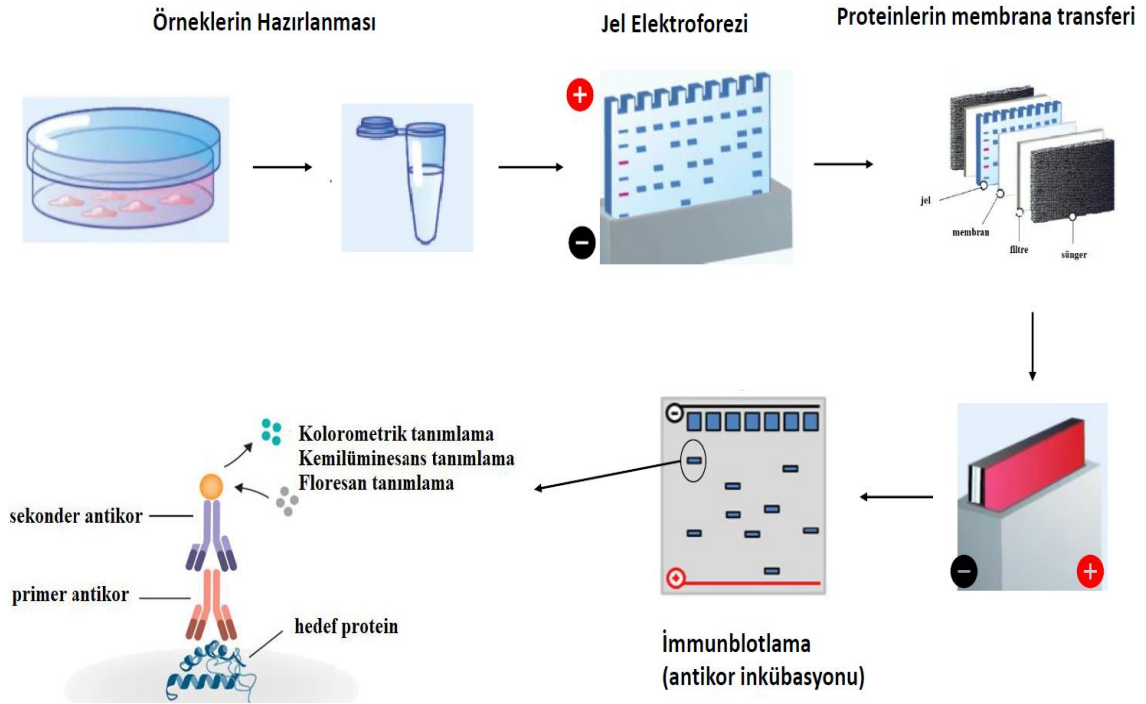
- **Proteinlerin Membrana Transferi ve Görüntüleme İşlemleri**

1. SDS-PAGE işleminin ardından, jeller, UV ışığı altında 1 dk aktive edildi ve tüm proteinler Bio-Rad ChemiDoc XRS+ cihazı ile görüntülendi.
2. Jeldeki proteinlerin transferi için 0.45 μ m'lik PVDF membran kullanılarak Bio-Rad mini trans-blot elektroforetik transfer hücresi ile 1 saat boyunca 100 V'da transfer edildi.
3. Ardından, öncesinde UV ışığı ile aktive edilmiş proteinleri içeren membran görüntüsü alındı.
4. Primer antikor ile muamele öncesinde membran, %5 yağsız süt tozu içeren TBS-T (20 mM Tris, 150 mM NaCl ve %0.05 (v/v) Tween 20, pH 7.6) tamponu içerisinde oda sıcaklığında (25 °C) 3 saat çalkalandı, spesifik olmayan bölgeler bloklandı.
5. Daha sonra, %3 yağsız süt tozu içeren TBS-T içerisindeki uygun primer antikor ile 4°C'de gece boyunca inkübe edildi (Tablo 3).
6. Primer antikorun fazlası, membranın 3x10 dk süreyle TBS-T tamponu ile yıkanması ile uzaklaştırıldı.

7. Sekonder antikor aşamasında HRP ile konjüge sekonder antikor (1:40.000) ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
8. Bağlanmayan sekonder antikor fazlası, membranın 3x10 dk süreyle TBS-T tamponu ile yıkanarak ile uzaklaştırıldı.
9. Son basamakta, ECL veya Clarity Max ECL substrat ile 5 dk inkübe edildi ve Bio-Rad görüntüleme cihazı kullanılarak protein bantları elde edildi.
10. Bantların dansitometrik analizleri β -aktine veya total proteine göre normalizasyonları, ImageLab™, sürüm 5.1 yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi.

Tablo 3.1. Western Blot yönteminde kullanılan primer antikorlar

Primer Antikor	Hedef	Köken	Seyrelme faktörü	Ticari Firma
Anti- β -Amiloid 1-16 (6E10)	İnsan beta amiloid 1-16	Fare monoklonal	1:1000	BioLegend
APLP2 (ab140624)	APLP2	Fare Monoklonal	1:10000	Abcam
ADAM10	ADAM10	Tavşan Monoklonal	1:1000	Abcam
Fosfo-AKT	Fosfo-AKT (Ser473)	Tavşan Poliklonal	1:400	Cell Signaling
AKT	Total AKT	Tavşan Poliklonal	1:1000	Cell Signaling
Fosfo-GSK-3 α/β	Fosfo-GSK-3 α/β	Tavşan Poliklonal	1:400	Cell Signaling
GSK- β	GSK- β	Tavşan Monoklonal	1:1000	Cell Signaling
PTEN	Total PTEN	Tavşan Monoklonal	1:1000	Cell Signaling
Anti- β -Aktin	β -Aktin	Fare Monoklonal	1:5000	Sigma-Aldrich



Şekil 3.3 Western Blot yönteminin temeli ve antikor etkileşimleri.

Membranlar, farklı bir primer antikorla muamele edilmek istendiğinde, daha önceki primer ve sekonder antikorları kaldırmak için aşağıdaki protokole göre, Western blot stripping tamponu kullanıldı:

- Membranlar, 30 dk oda sıcaklığında Western blot stripping tamponu içerisinde çalkalandı.
- Ardından 4 defa 15 dk aralıklarla TBS-T ile yıkandı.
- Tekrar bloklanması için %5 yağsız süt tozu ile muamele edildi.
- Son aşamada, uygulanmak istenen primer ve sekonder antikorlar ile yukarıda belirtildiği şekilde işlemler tekrarlandı.

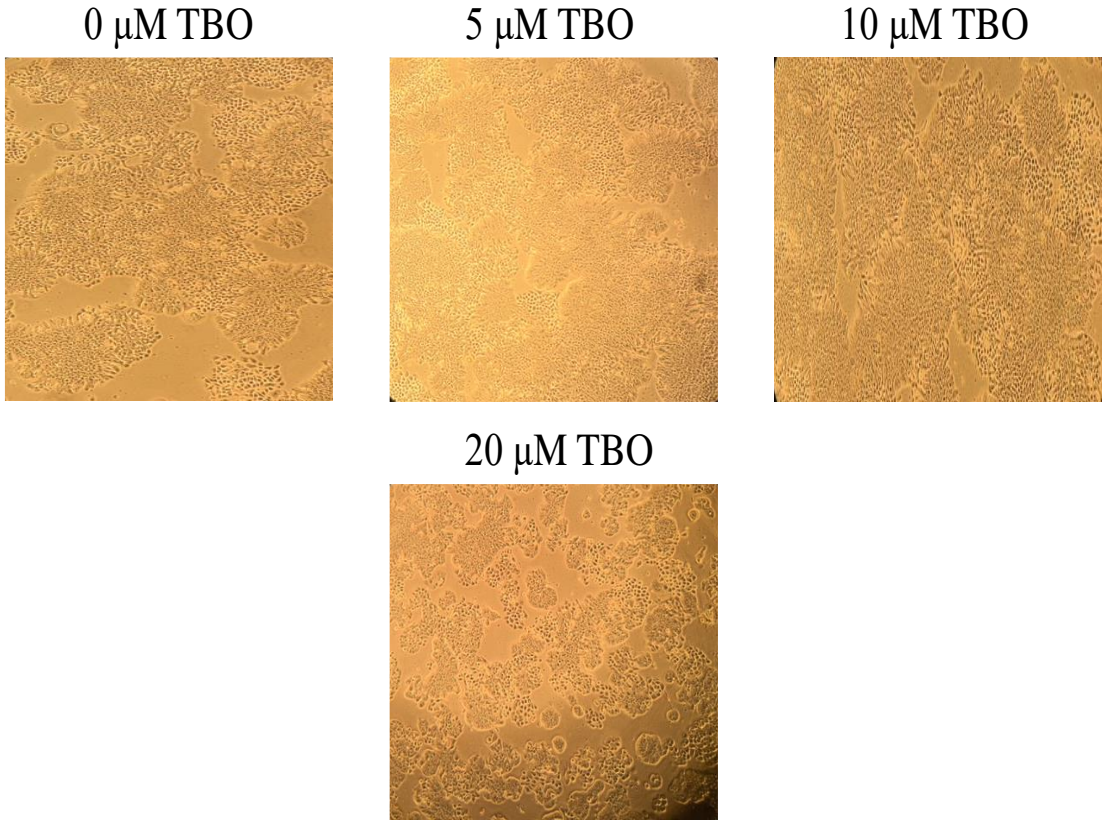
3.2.7. İstatistiksel Değerlendirmeler

Elde edilen veriler, ortalama \pm ortalamanın standart hatası (SH) olarak gösterilmiştir. Hücre kültürü çalışmalarından elde edilen sonuçlar, çoklu gruplar arası farklılıklar, ordinary oneway ANOVA analizi ile; kontrole göre ikili karşılaştırmalar, Dunnett's post hoc testi ile değerlendirildi. Her analiz en az 3 bağımsız deneyin verileri kullanılarak gerçekleştirildi. $p \leq 0.05$ değerleri anlamlı olarak alındı. İstatistiksel yazılım olarak GraphPad Prism 5, sürüm 5.03 kullanıldı.

4. BULGULAR

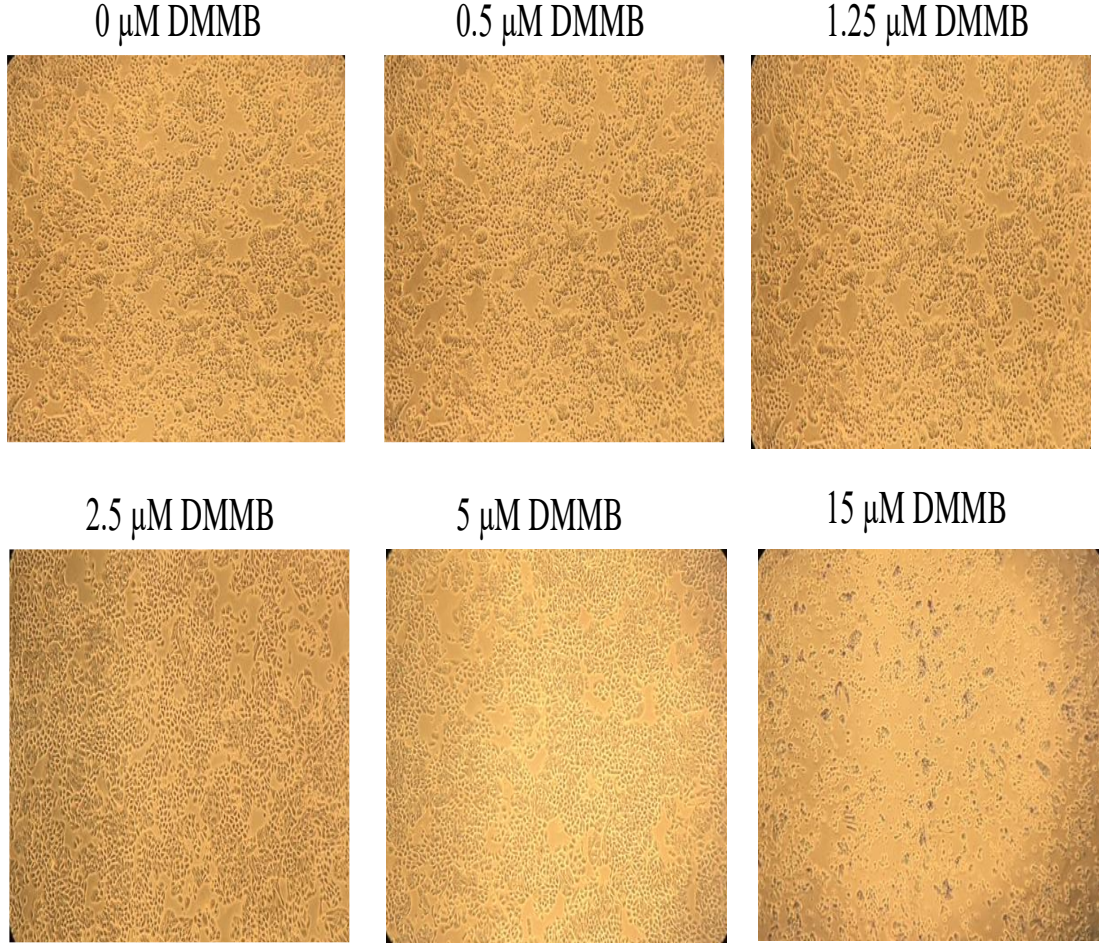
4.1. Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin HT-29 Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri

Çalışmada, HT-29 hücreleri 0-20 μM TBO veya 0-15 μM DMMB ile 24 saat muamele edildi. 24 saat sonunda hücreler, inverted mikroskop ile incelendiğinde; TBO'nun kontrol hücrelere göre herhangi bir konsantrasyonda hücre canlılığını etkilemediği (Şekil 4.1) gözlemlendi.



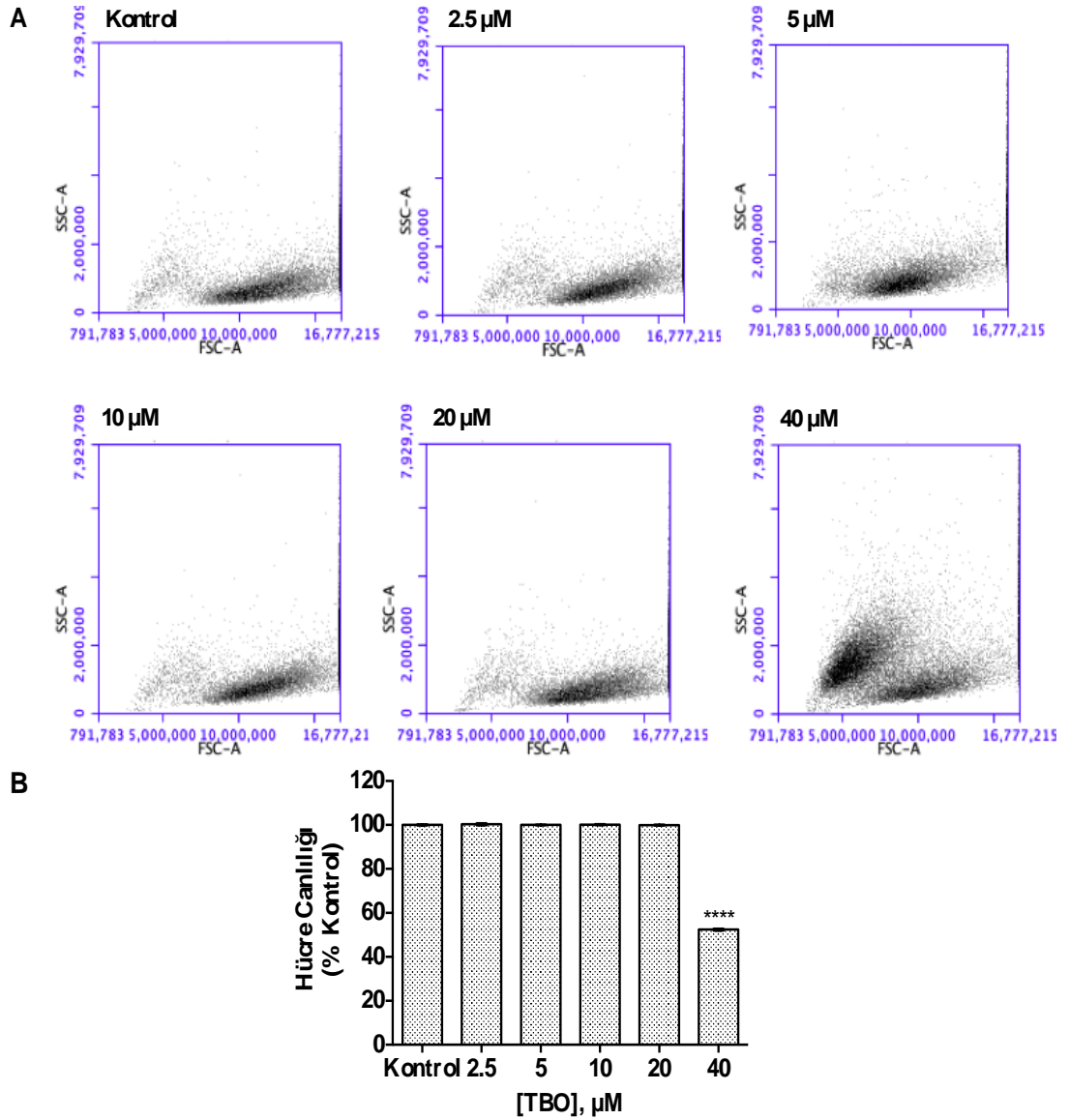
Şekil 4.1. TBO'nun HT-29 hücre canlılığı üzerine etkilerini gösteren temsili mikroskop görüntüleri. 0-20 μM TBO ile 24 saat muamele edilen HT-29 hücrelerinde, hücre canlılığındaki değişim (Eclipse TS100 Işık mikroskopu, Nikon; 10X büyütme)

DMMB'nin ise, 5 μM konsantrasyondan sonra hücre canlılığını etkilediği gözlemlendi (Şekil 4.2).



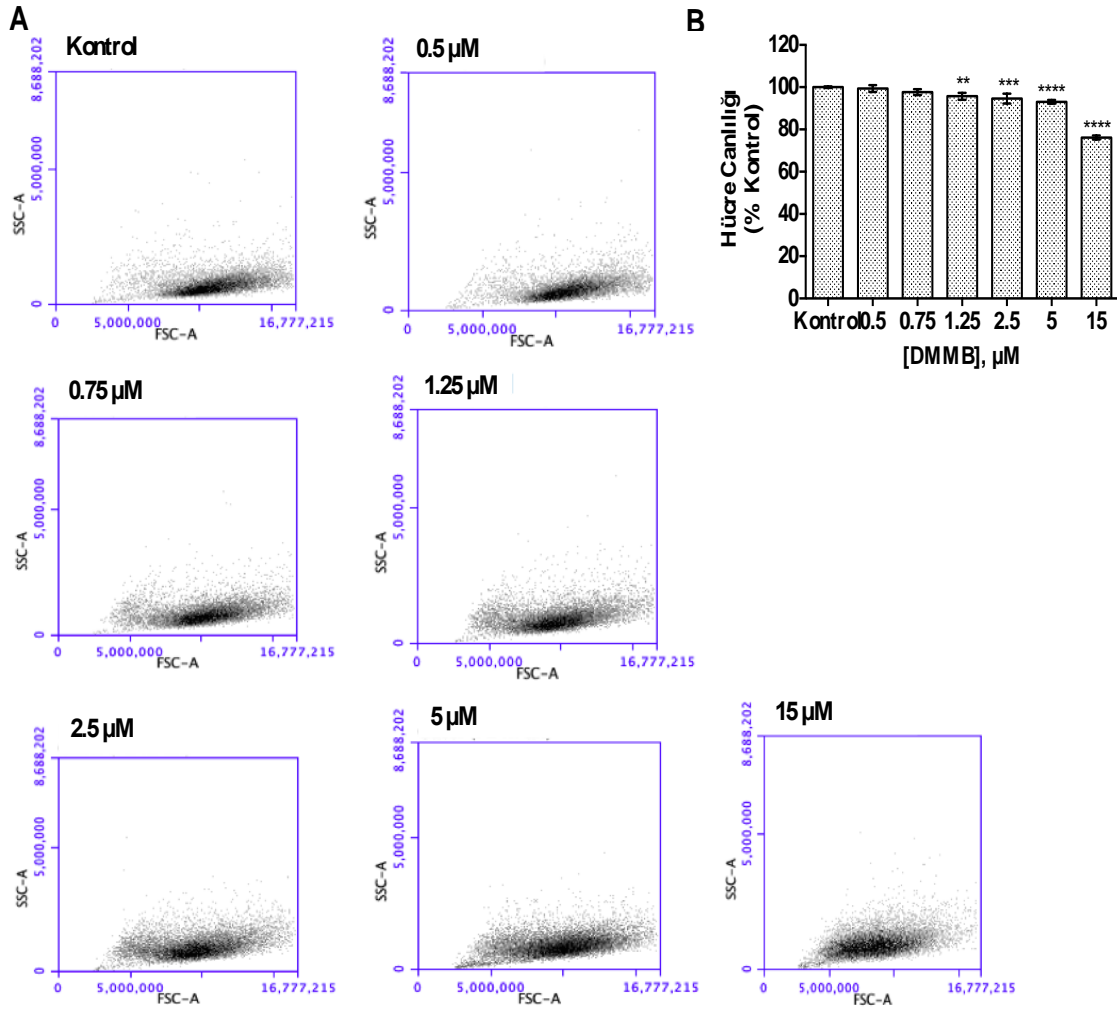
Şekil 4.2. DMMB'nin HT-29 hücre canlılığı üzerine etkilerini gösteren temsili mikroskop görüntüleri. 0-15 μM DMMB ile 24 saat muamele edilen HT-29 hücrelerinde, hücre canlılığındaki değişim (Eclipse TS100 Işık mikroskopu, Nikon; 10X büyütme)

Ancak daha kesin bir sonuç için; TBO veya DMMB'nin HT-29 hücre canlılığı üzerine etkileri, propidyum iyodür (PI) kullanılarak, akım sitometrisi ile analiz edildi. Bu sonuçlara göre; TBO'nun kontrole göre hücre canlılığını sadece %47.5 azalma ile 40 μM konsantrasyonda etkilediği bulundu (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. TBO'nun HT-29 hücre canlılığı üzerindeki etkisi. 0-40 μM TBO ile 24 saat muamele edilen HT-29 hücrelerinde, hücre canlılığındaki değişim, akım sitometrisi ile değerlendirildi. (A) TBO ile muamele edilmiş HT-29 hücrelerinde ölü ve canlı hücre dağılımını gösteren temsili akım sitometrisi grafikleri. (B) TBO ile muamele sonrasında akım sitometrisi ile ölçülen hücre canlılığındaki değişimin kontrole göre yüzdesel olarak ifadesi, ort \pm SH olarak gösterilmiştir. (n=3-6; ordinary oneway ANOVA; ****, $p < 0.0001$).

DMMB ise, kontrol ile kıyaslandığında 1.25 μM , 2.5 μM , 5 μM ve 15 μM konsantrasyonda sırasıyla %4.3, %5.4, %7 ve %23.8 oranlarında hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı tespit edildi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. DMMB'nin HT-29 hücre canlılığı üzerindeki etkisi. 0-15 μM DMMB ile 24 saat muamele edilen HT-29 hücrelerinde, hücre canlılığındaki değişim, akım sitometrisi ile değerlendirildi. (A) DMMB ile muamele edilmiş HT-29 hücrelerinde ölü ve canlı hücre dağılımını gösteren temsili akım sitometrisi grafikleri. (B) DMMB ile muamele sonrasında akım sitometrisi ile ölçülen hücre canlılığındaki değişimin kontrole göre yüzdesel olarak ifadesi, ort \pm SH olarak gösterilmiştir. (n=3-6; ordinary oneway ANOVA; **, $p<0.01$); ***, $p<0.001$; ****, $p<0.0001$).

4.2. Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin Kontrol Hücrelerin (HEK293, Human Embryonic Kidney Cells) Canlılığı Üzerindeki Etkileri

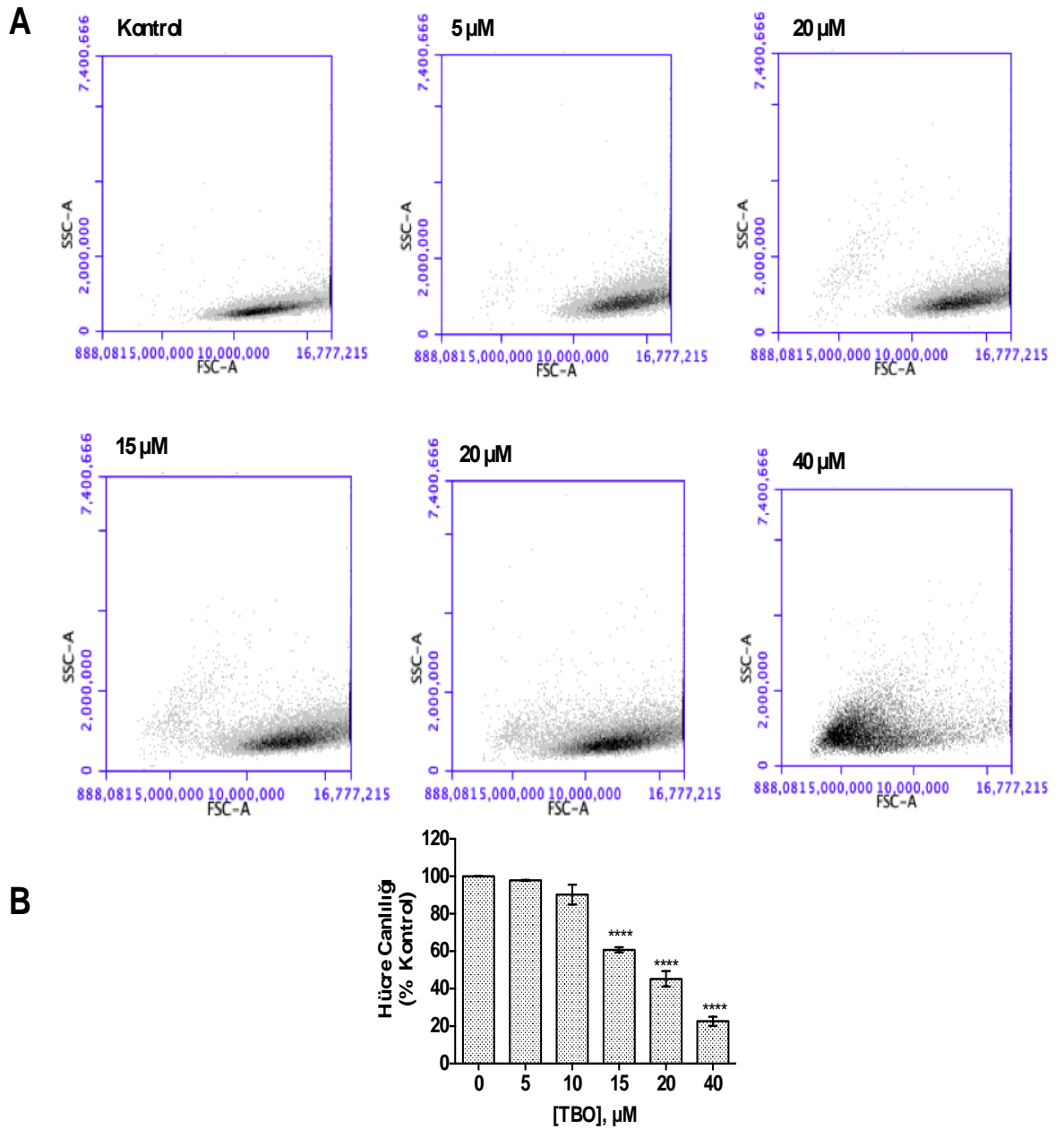
Söz konusu bileşiklerin, kanserin olası tedavisinde güvenli bir şekilde kullanılabilmesi için kullandığımız konsantrasyonlar, kanser hücresi olmayan HEK 293 kontrol hücreleri üzerinde test edildi. Çalışmada, HEK293 hücreleri 0-40 μM TBO veya 0-15 μM DMMB ile 24 saat muamele edildi. 24 saat sonunda hücreler, TBO veya DMMB'nin HEK293 hücre canlılığı üzerine etkileri, PI kullanılarak, akım sitometrisi ile değerlendirildi.

Buna göre; TBO'nun kontrole göre 15 μM , 20 μM ve 40 μM konsantrasyonlarında sırasıyla %39, %55 ve %77 oranlarında hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı tespit edildi.

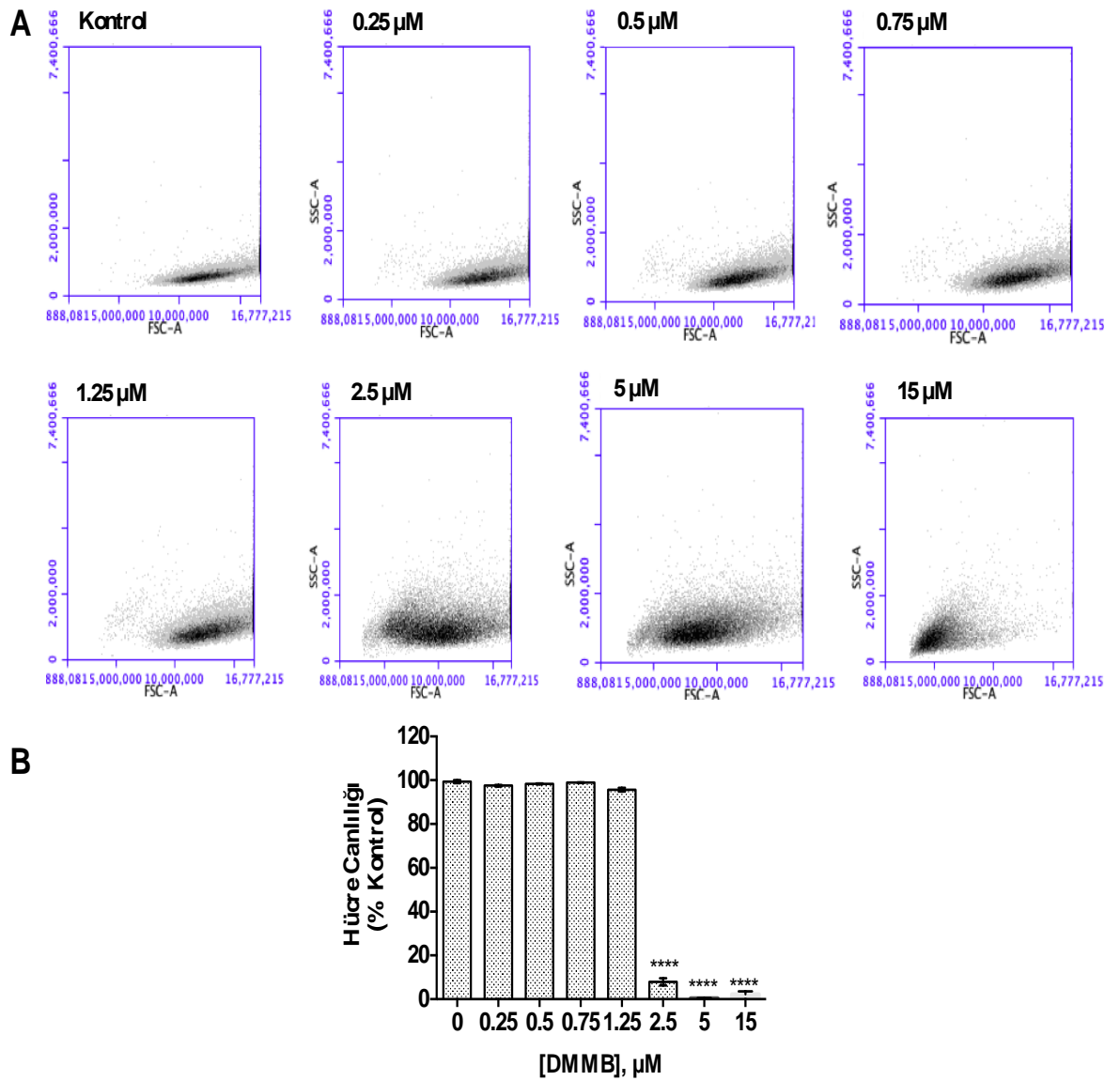
DMMB'nin ise kontrol ile kıyaslandığında 2.5 μM , 5 μM ve 15 μM konsantrasyonda sırasıyla %92, %99 ve %97 oranlarında hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı tespit edildi.

Sonuç olarak; HEK293 hücrelerinin TBO ile 24 saat muamele edilmesi, 10 μM üzerindeki dozlarda normal hücreleride etkilediği için, HT-29 kolon kanseri hücrelerinde ileriki aşamalarda 10 μM 'dan fazla kullanılamamasına karar verildi.

HEK293 hücrelerinin DMMB ile 24 saat muamele edilmesinde ise; 2.5 μM konsantrasyonunda ve üzerindeki dozlarda normal hücreleri etkilediği için, HT-29 kolon kanseri hücrelerine ileriki aşamalarda 1.25 μM 'a kadar eklenmesine karar verildi.



Şekil 4.5. TBO'nun HEK293 hücre canlılığı üzerine etkisi. 0-40 μM TBO ile 24 saat muamele edilen HEK293 hücrelerinde, hücre canlılığındaki değişim, akım sitometrisi ile değerlendirildi. (A) TBO ile muamele edilmiş HEK293 hücrelerinde ölü ve canlı hücre dağılımını gösteren temsili akım sitometrisi grafikleri. (B) TBO ile muamele sonrasında akım sitometrisi ile ölçülen hücre canlılığındaki değişimin kontrole göre yüzdesel olarak ifadesi, ort \pm SH olarak gösterilmiştir. (n=3-6; ordinary oneway ANOVA; ****, $p < 0.0001$).



Şekil 4.6. DMMB'nin HEK293 hücre canlılığı üzerine etkisi. 0-15 μM DMMB ile 24 saat muamele edilen HEK293 hücrelerinde, hücre canlılığındaki değişim, akım sitometrisi ile değerlendirildi. (A) DMMB ile muamele edilmiş HEK293 hücrelerinde ölü ve canlı hücre dağılımını gösteren temsili akım sitometrisi grafikleri. (B) DMMB ile muamele sonrasında akım sitometrisi ile ölçülen hücre canlılığındaki değişimin kontrole göre yüzdesel olarak ifadesi, ort \pm SH olarak gösterilmiştir. (n=3-6; ordinary oneway ANOVA; ****, $p < 0.0001$).

4.3. Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin HEK293 ve HT-29 Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkilerinin MTT ile Değerlendirilmesi

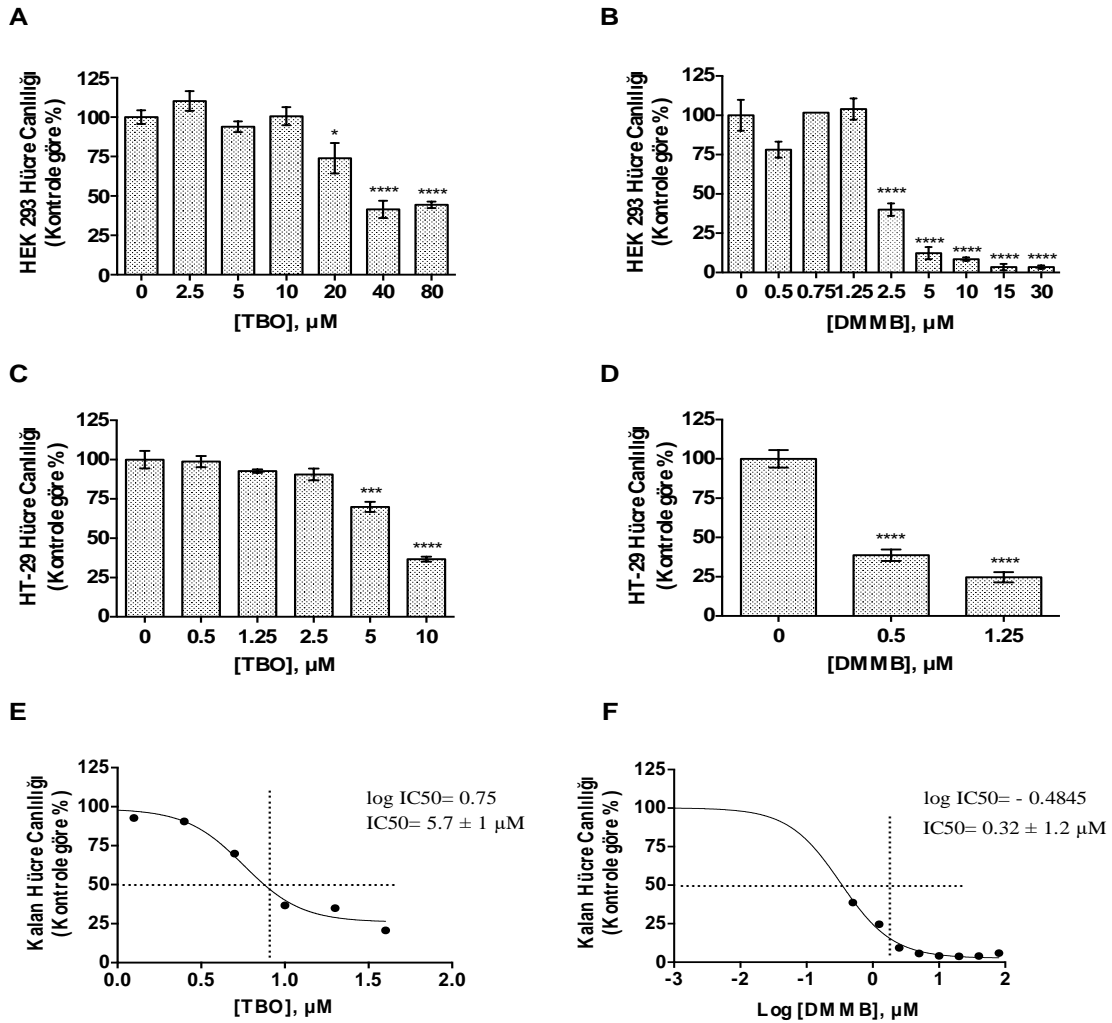
Fenotiyazin yapılı bileşikler ile 24 saat muamele sonrasında, kanser olmayan HEK293 hücre canlılığına etkisi, MTT yöntemi ile değerlendirildi. Buna göre, TBO ile 24 saat muamele sonrasında kontrole göre 20 μM , 40 μM ve 80 μM konsantrasyonlarında sırasıyla %35, %61 ve %53 oranlarında hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı tespit edildi. DMMB ise, kontrol ile kıyaslandığında 2.5 μM , 5 μM , 10 μM , 15 μM ve 30 μM konsantrasyonda sırasıyla %60, %87.6, %93.5, %97.8 ve %96.7 oranlarında hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı tespit edildi (Şekil 4.7).

Kanser olmayan HEK293 hücrelerinin TBO veya DMMB ile 24 saat muamelesi sonrasında elde edilen MTT bulguları ve akım sitometrisi sonuçları paralellik göstermesi nedeniyle, TBO için 10 μM üzerindeki dozlarda kanser olmayan bu hücreleri etkilediği için, HT-29 kolon kanseri hücrelerinde ileriki aşamalarda 10 μM 'dan fazla kullanılmadı. DMMB için ise; 2.5 μM konsantrasyonunda ve üzerindeki dozlarda kanser olmayan bu hücreleri etkilediği için, HT-29 kolon kanseri hücrelerine ileriki aşamalarda 1.25 μM 'a kadar muamele yapıldı.

Fenotiyazin yapılı bileşikler ile 24 saat muamele sonrasında, HT-29 hücre canlılığına etkisi, MTT yöntemi ile değerlendirildi. Buna göre, hem TBO hem de DMMB, artan dozla birlikte kontrole göre hücre canlılığını, kontrole göre anlamlı olarak azaltmaktadır.

TBO ile muamele edilen hücrelerde, hücre canlılığı 5 μM ve 10 μM 'da anlamlı bir azalma göstererek kontrole göre sırasıyla %30 ve %63 oranında azalırken, DMMB'nin ile muamele edilen hücrelerde, hücre canlılığı 0.5 μM ve 1.25 μM 'da anlamlı bir azalma göstererek kontrole göre sırasıyla %61 ve %73 oranında azalmaktadır (Şekil 4.7).

Özetle, HT-29 hücrelerinin 24 saat muamele sonrasında çalışılan konsantrasyonları TBO için 0-10 μM ve DMMB için 0-1.25 μM olarak belirlendi. Her bir hücre hattı için MTT analizlerinden elde edilen sitotoksosite eğrileri, Şekil 4.7'de gösterilmektedir. Eğrilerin fit edilmesi için, dört parametrelili lojistik (4PL) regresyon tekniği kullanılarak her bir bileşik için IC50 değerleri (TBO için 5.7 ± 1 μM ; DMMB için 0.32 ± 1.2 μM) hesaplandı.



Şekil 4.7. Fenotiyazin yapıları bileşiklerin HEK293 ve HT-29 hücre canlılığı üzerindeki etkileri. (A) 0-80 μM TBO (n= 7-8) ile 24 saat muamele sonrasında, HEK293 hücrelerinde MTT ile ölçülen hücre proliferasyonundaki değişim (B) 0-30 μM DMMB (n= 5-6) ile 24 saat muamele sonrasında, HEK293 hücrelerinde MTT ile ölçülen hücre canlılığındaki değişim. (C) 0-10 μM TBO (n= 6-10) ile 24 saat muamele sonrasında, HT-29 hücrelerinde MTT ile ölçülen hücre canlılığındaki değişim (D) 0-1.25 μM DMMB (n= 6-10) ile 24 saat muamele sonrasında, HT-29 hücrelerinde MTT ile ölçülen hücre canlılığındaki değişim. Deney verileri, ort \pm SH olarak gösterilmiştir (ordinary oneway ANOVA; *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$).

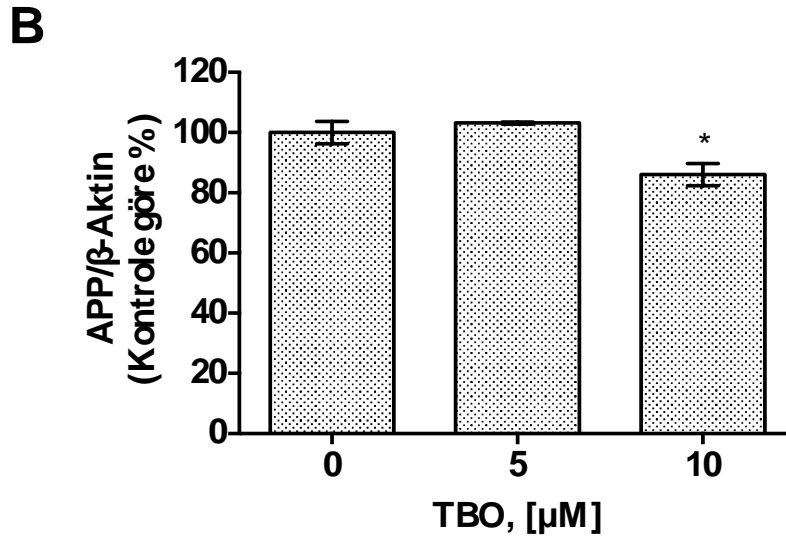
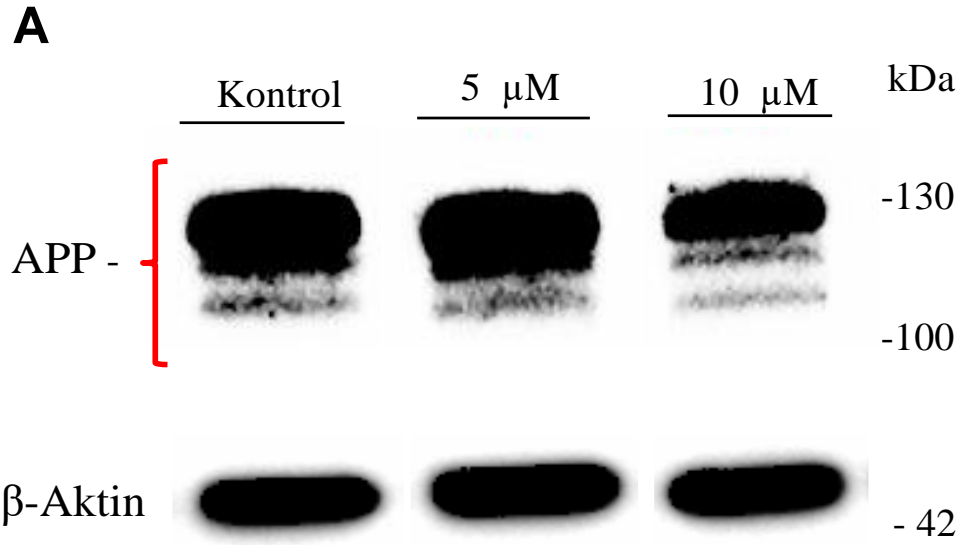
4.4. HT-29 Hücrelerinde Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin Total APP, sAPP α , APLP2 ve sAPLP2 Üzerindeki Etkileri

4.4.1. HT-29 Hücrelerinde Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin Hücre İçi Total APP Düzeyi Üzerindeki Etkileri

Birçok kanserde, kolon kanseri dahil olmak üzere APP'nin aşırı ekspresyonu söz konusudur (3). Bu nedenle, HT-29 hücre lizatlarında fenotiyazin yapılı bileşiklerin total APP düzeylerine etkisi, insan A β peptidinin 1-16 amino asit sekansına spesifik 6E10 antikoru kullanılarak, Western Blot yöntemi ile değerlendirildi.

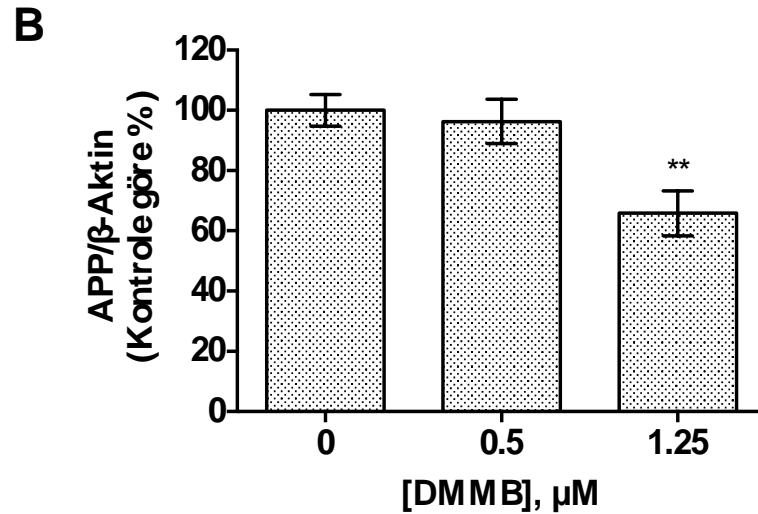
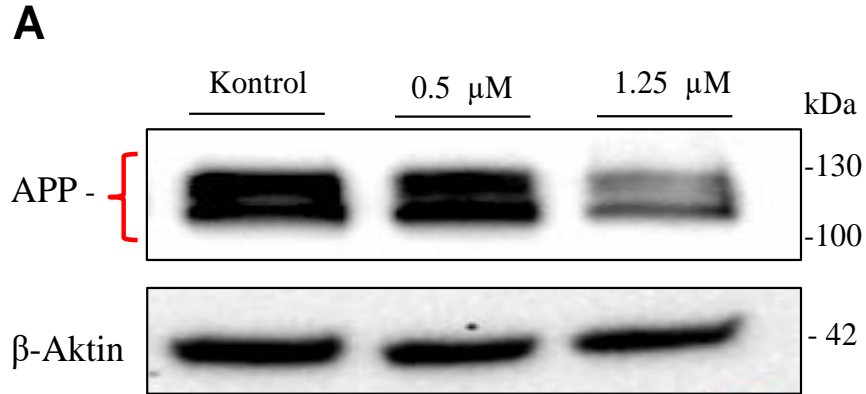
Western blot sonuçları, hücre içindeki APP'nin mRNA işlemeden ve posttranslasyonel modifikasyonlardan dolayı ~ 110 (olgunlaşmamış APP) ve 130 kDa (olgunlaşmış APP) arasında bantlar vermektedir. Dansitometrik analizler için, APP'ye ait gözlenen tüm bantların yoğunlukları birleştirilerek, β -aktine göre normalize edildi ve veriler kontrolün yüzdesi olarak gösterildi.

Sonuçlar, TBO bileşiğinin hücre içi total APP düzeylerini doğrudan etkileyerek, azalttığını işaret etti. Şekil 4.8'de görüldüğü gibi, 10 μ M TBO ile muamele edilmiş hücrelerde hücre içi APP düzeyleri kontrole göre %14 oranında anlamlı olarak azaldı.



Şekil 4.8. HT-29 hücrelerinde TBO'nun intrasellüler total APP düzeyleri üzerindeki etkileri. (A) 0-10 μ M TBO uygulaması sonrası HT-29 hücre lizatlarında intrasellüler APP'nin Western blot görüntüsü (B) APP'nin β -aktine göre normalizasyonları sonrası dantsitometrik analizleri. 30 μ g protein yüklendi. Deney verileri, ort \pm SH olarak gösterilmiştir (n=3; ordinary oneway ANOVA; *, $p < 0.05$).

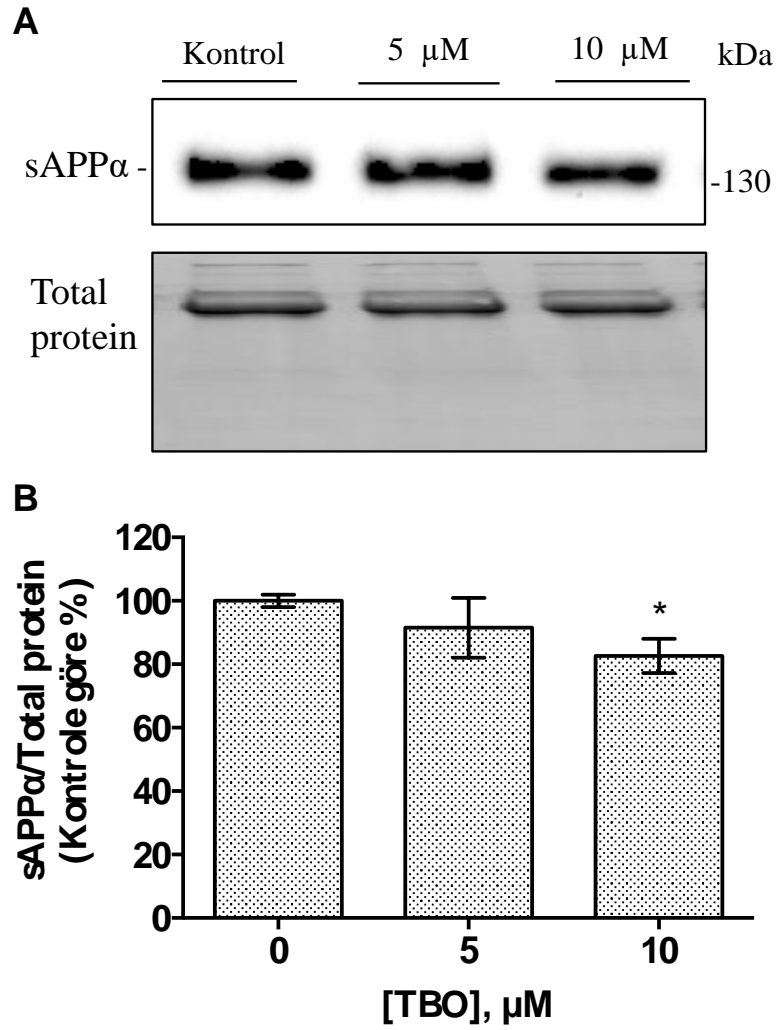
DMMB bileşiği ise; aynı şekilde hücre içi total APP düzeylerini direk olarak etkileyerek, ekspresyon düzeylerini azaltmaktadır. Dansitometrik analizde tüm bantların yoğunlukları birleştirilerek (olgunlaşmış ve olgunlaşmamış) β -aktine göre normalize edilmiştir. Şekil 4.9’da görüldüğü gibi, 1.25 μ M DMMB ile muamele edilmiş hücrelerde intrasellüler APP düzeyleri kontrole göre %34 oranında anlamlı olarak azaldı.



Şekil 4.9. HT-29 hücrelerinde DMMB’nin intrasellüler total APP düzeyleri üzerindeki etkileri. (A) 0-1.25 μ M DMMB uygulaması sonrası HT-29 hücre lisatlarında intrasellüler APP’nin Western blot görüntüsü (B) APP’nin β -aktine göre normalizasyonları sonrası dansitometrik analizleri. 30-60 μ g protein yüklendi. Deney verileri, ort \pm SH olarak gösterilmiştir. (n=4-5; ordinary oneway ANOVA; **, $p < 0.01$).

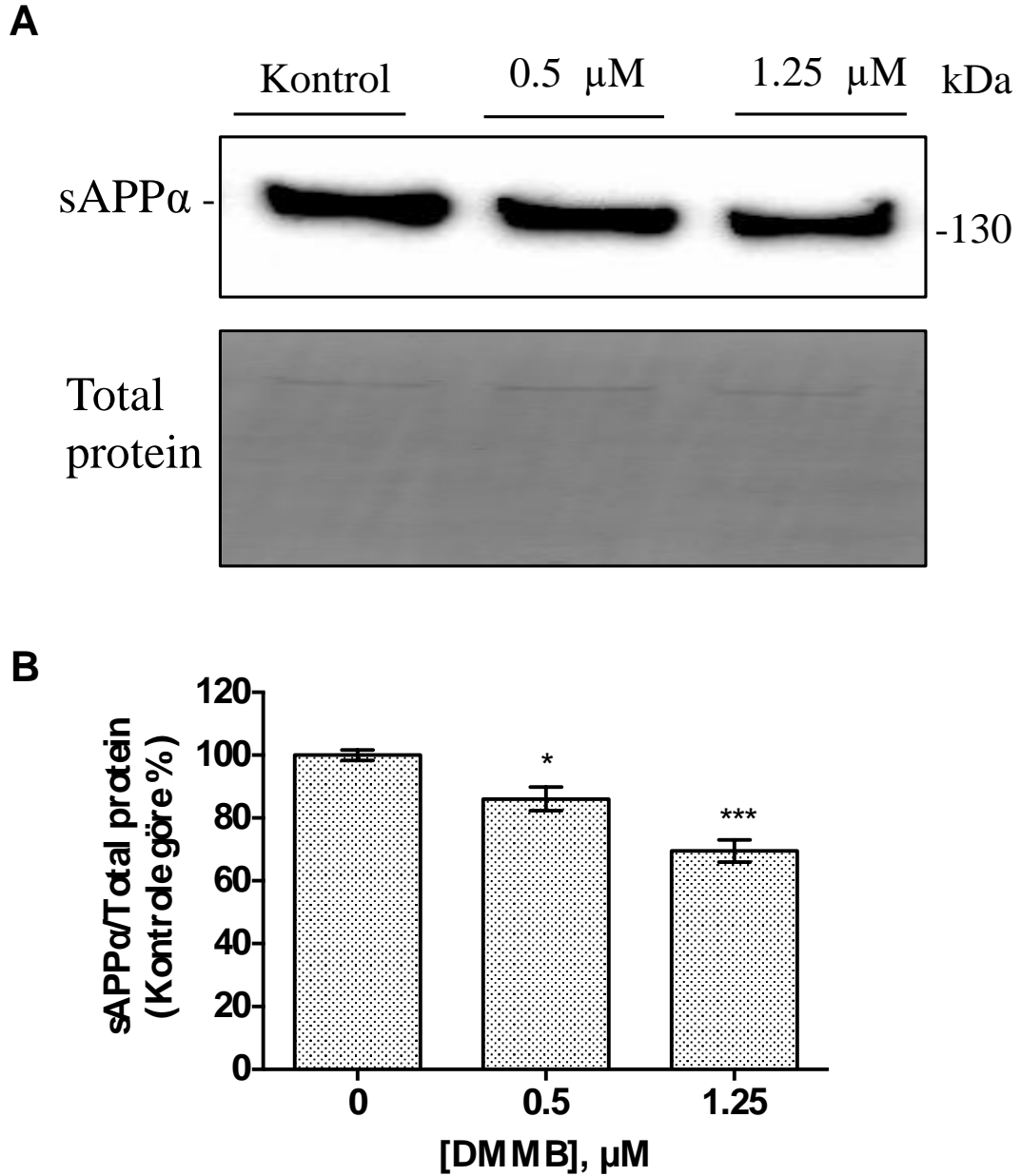
4.4.2. HT-29 Hücrelerinde Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin Çözünür sAPP α Düzeyi Üzerine Etkileri

Çözünür sAPP α düzeyleri, Western blot yöntemi kullanılarak incelendi (Şekil 4.10). Her örnek için sAPP α düzeyleri, her örneğin toplam protein miktarlarına göre ImageLab yazılımı yardımıyla normalize edildi. Sonuçlara göre, 10 μ M TBO'nun sAPP α düzeylerini kontrol grubuna göre %17 oranında anlamlı olarak azalttığı bulundu (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. HT-29 hücrelerinde TBO'nun sAPP α düzeyleri üzerindeki etkileri. (A) 0-10 μ M TBO uygulaması sonrası HT-29 hücrelerinin kültür ortamında sAPP α 'nın Western blot görüntüsü (B) sAPP α 'nın total proteine göre normalizasyonu sonrası dansitometrik analizi. 11-20 μ g protein yüklendi. Deney verileri, ort \pm SH olarak gösterilmiştir. (n= 4-8; ordinary oneway ANOVA; *, $p < 0.05$).

DMMB bileşiminin ise; aynı şekilde sAPP α düzeyini kontrol ile karşılaştırıldığında; 0.5 μ M konsantrasyonda %14 azalırken, 1.25 μ M DMMB ile muamele edilmiş hücrelerde kontrole göre %30 oranında anlamlı olarak azaldı.



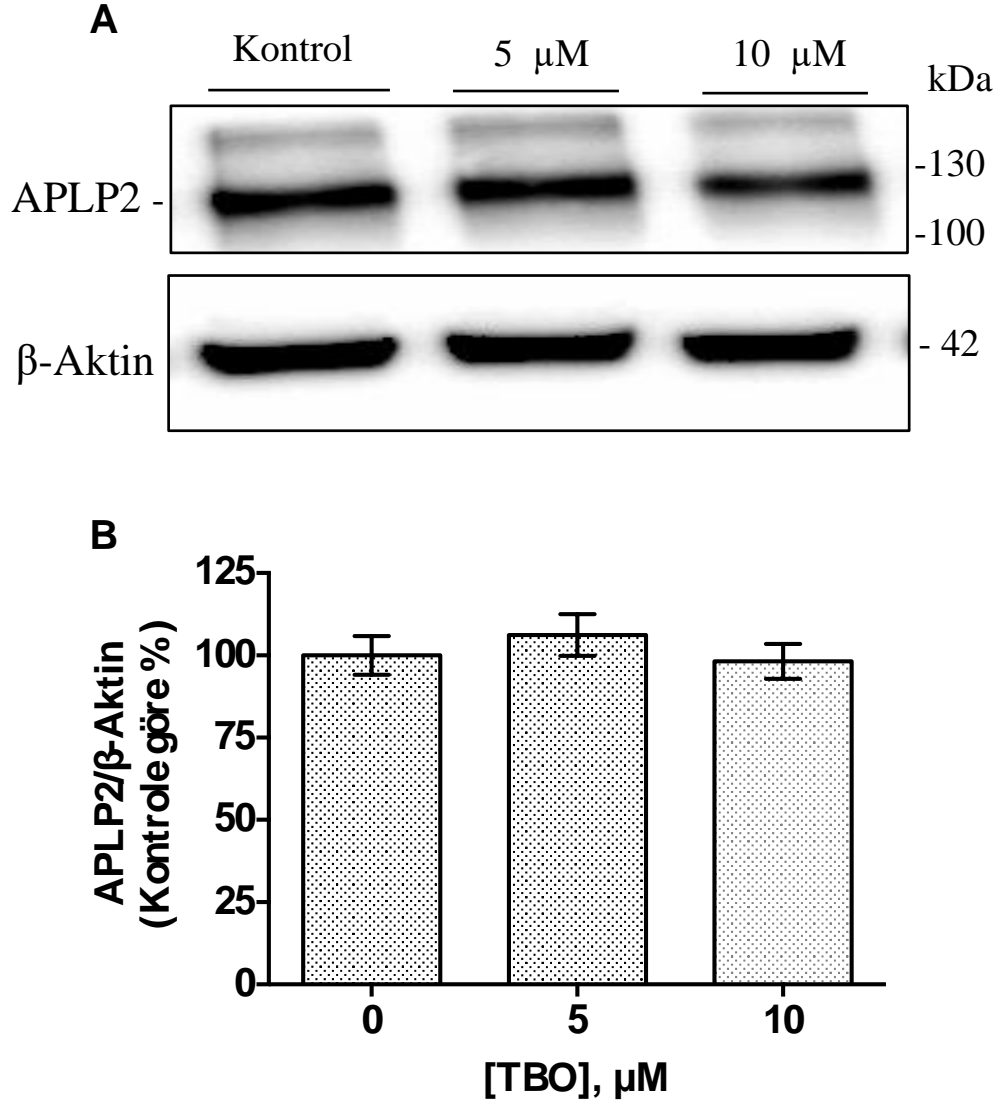
Şekil 4.11. HT-29 hücrelerinde DMMB'nin sAPP α düzeyleri üzerindeki etkileri. (A) 0-1.25 μ M DMMB uygulaması sonrası HT-29 hücrelerinin kültür ortamında sAPP α 'nın Western blot görüntüsü (B) sAPP α 'nın total proteine göre normalizasyonu sonrası dansitometrik analizi. 6 μ g protein yüklendi. Deney verileri, ort \pm SH olarak gösterilmiştir. (n=3; ordinary oneway ANOVA; *, p < 0.05; ***, p < 0.001).

4.4.3. HT-29 Hücrelerinde Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin Hücre İçi Total APLP2 Düzeyi Üzerindeki Etkileri

APP'ye benzer şekilde, birçok doku APLP2 ekspresyonuna sahiptir ve APLP2 ekspresyonundaki aşırı artış pankreas, kolon, meme, prostat ve akciğer gibi çeşitli kanser türleri ile ilişkilendirilmiştir (3). Bu nedenle, HT-29 hücre lizatlarında fenotiyazin yapılı bileşiklerin APLP2 düzeylerine etkisi, rekombinant insan APLP2 insan antikorunu kullanılarak, Western blot yöntemi ile değerlendirildi.

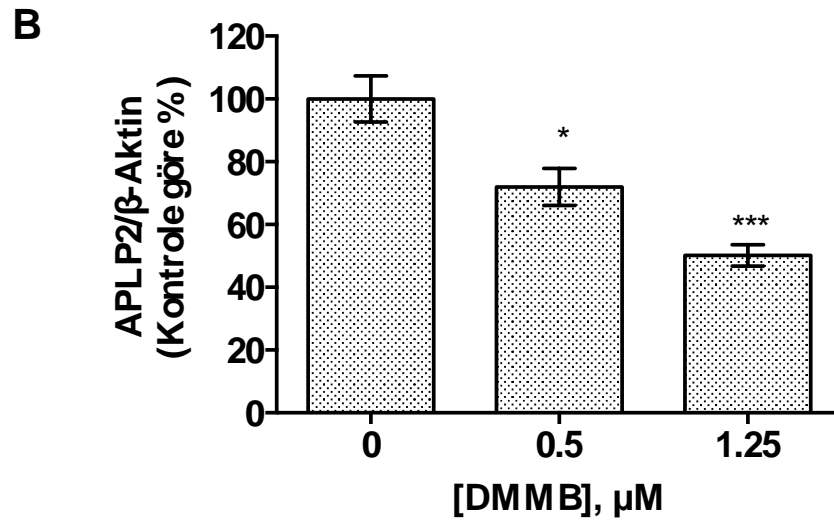
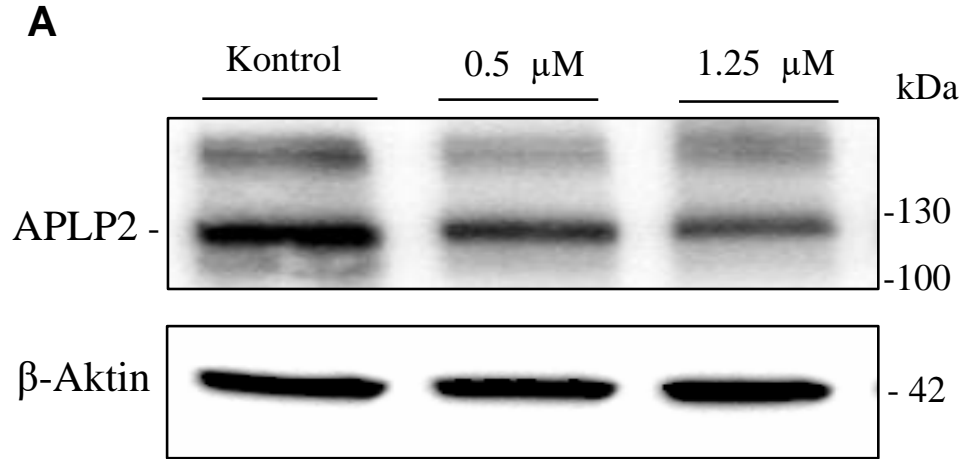
Western blot sonuçları, hücre içindeki APLP2'nin mRNA işlemlerinden ve posttranslasyonel modifikasyonlardan dolayı ~250 (glukozaminoglikan formu) ve 130-100 kDa (olgunlaşmış APLP2) arasında olmak üzere 2 adet bant verdiğini göstermektedir (Şekil 4.12). Dansitometrik analizler için, APLP2'ye ait gözlenen bantın (130-100 kDa) yoğunluğu, β -aktine göre normalize edildi ve veriler kontrolün yüzdesi olarak gösterildi.

Sonuçlar, fenotiyazin yapıları TBO bileşiğinin hücre içi APLP2 düzeylerinde herhangi anlamlı bir değişikliğe yol açmadığını gösterdi (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. HT-29 hücrelerinde TBO'nun APLP2 düzeyleri üzerindeki etkileri. (A) 0-10 μ M TBO uygulaması sonrası HT-29 hücre lizatlarında APLP2'nin Western blot görüntüsü (B) APLP2'nin β -aktine göre normalizasyonları sonrası dansitometrik analizleri. 40-50 μ g protein yüklendi. Deney verileri, ort \pm SH olarak gösterilmiştir (n=3-5; ordinary oneway ANOVA).

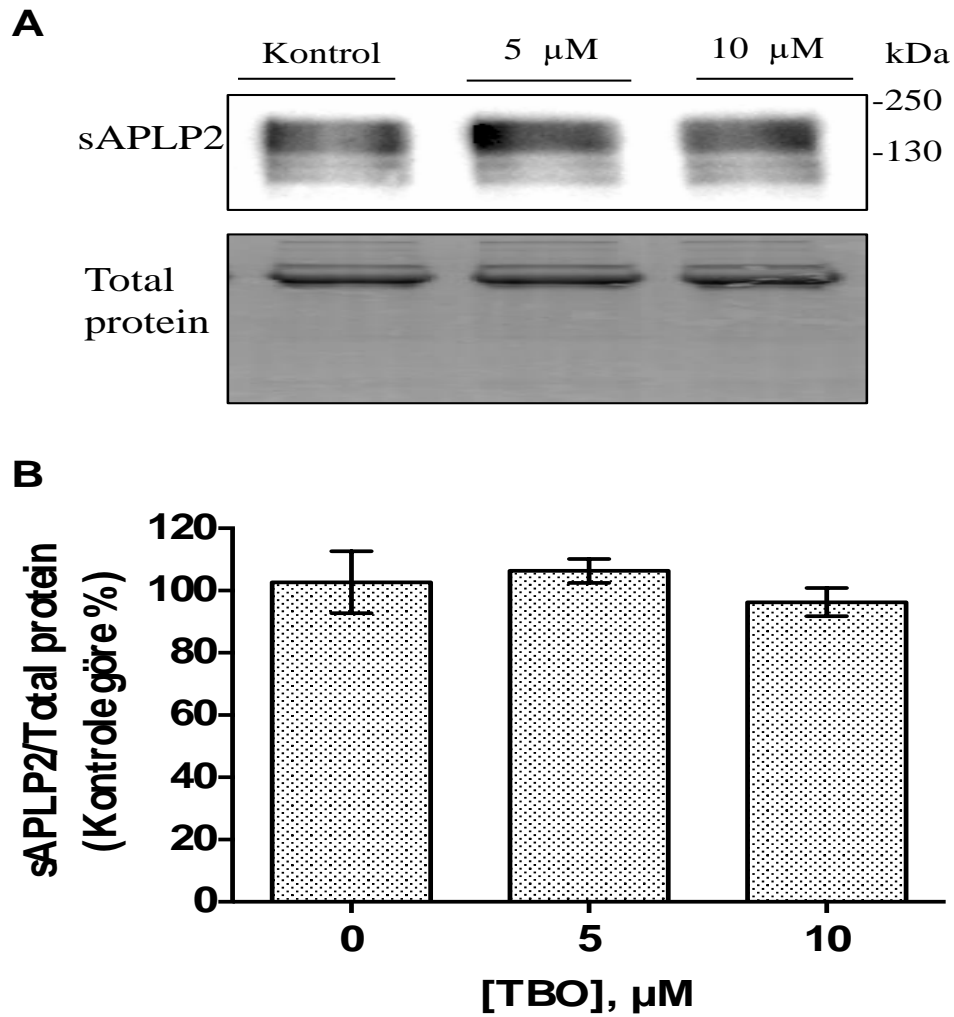
DMMB ise, kullanılan tüm konsantrasyonlarda APLP2 (130-100 kDa) düzeylerini anlamlı olarak azalttı. Şekil 4.13’de görüldüğü gibi, 0.5 μ M DMMB ile muamele edilmiş hücrelerde intrasellüler APLP2 düzeyi %28 oranında azalırken; 1.25 μ M DMMB ile muamele edilmiş hücrelerde intrasellüler APLP2 düzeyi kontrole %50 oranında anlamlı olarak azaldı.



Şekil 4.13 HT-29 hücrelerinde DMMB’nin APLP2 düzeyleri üzerindeki etkileri. (A) 0-1.25 μ M DMMB uygulaması sonrası HT-29 hücre lizatlarında APLP2’nin Western blot görüntüsü (B) APLP2’nin β -aktine göre normalizasyonları sonrası dansitometrik analizleri. 40-60 μ g protein yüklendi. Deney verileri, ort \pm SH olarak gösterilmiştir (n=5; ordinary oneway ANOVA; *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$).

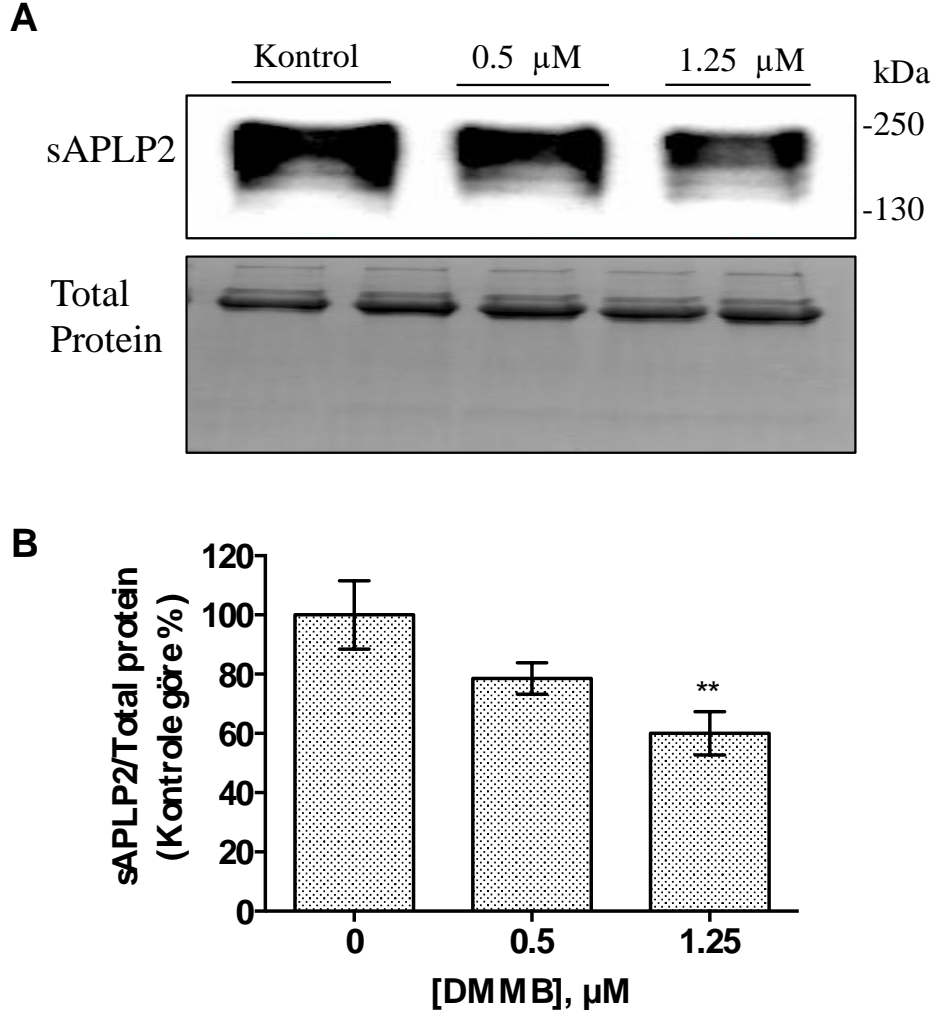
4.4.4. HT-29 Hücrelerinde Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin Çözünür APLP2 (sAPLP2) Düzeyi Üzerine Etkileri

Çözünür sALPP2 düzeyleri, Western blot yöntemi kullanılarak incelendi. Her örnek için sAPLP2 düzeyleri, her örneğin toplam protein miktarlarına göre ImageLab yazılımı yardımıyla normalize edildi. Sonuçlara göre, fenotiyazin yapılı TBO bileşiğinin hücre dışına salgılanan sAPLP2 düzeylerinde anlamlı bir değişikliğe yol açmadığı bulundu (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. HT-29 hücrelerinde TBO'nun sAPLP2 düzeyleri üzerindeki etkileri. (A) 0-10 µM TBO uygulaması sonrası HT-29 hücrelerinin kültür ortamında sAPLP2'nin Western blot görüntüsü (B) sAPLP2'nin total proteine göre normalizasyonları sonrası dansitometrik analizleri. 20 µg protein yüklendi. Deney verileri, ort ± SH olarak gösterilmiştir (n = 9; ordinary oneway ANOVA).

DMMB ise, sAPLP2 düzeylerini sadece 1.25 μM 'da anlamlı olarak azalttı. Şekil 4.15'de görüldüğü gibi, 1.25 μM DMMB ile muamele edilmiş hücrelerde kültür ortamına salgılanan sAPLP2 düzeyleri kontrole %40 oranında anlamlı olarak azaldı.



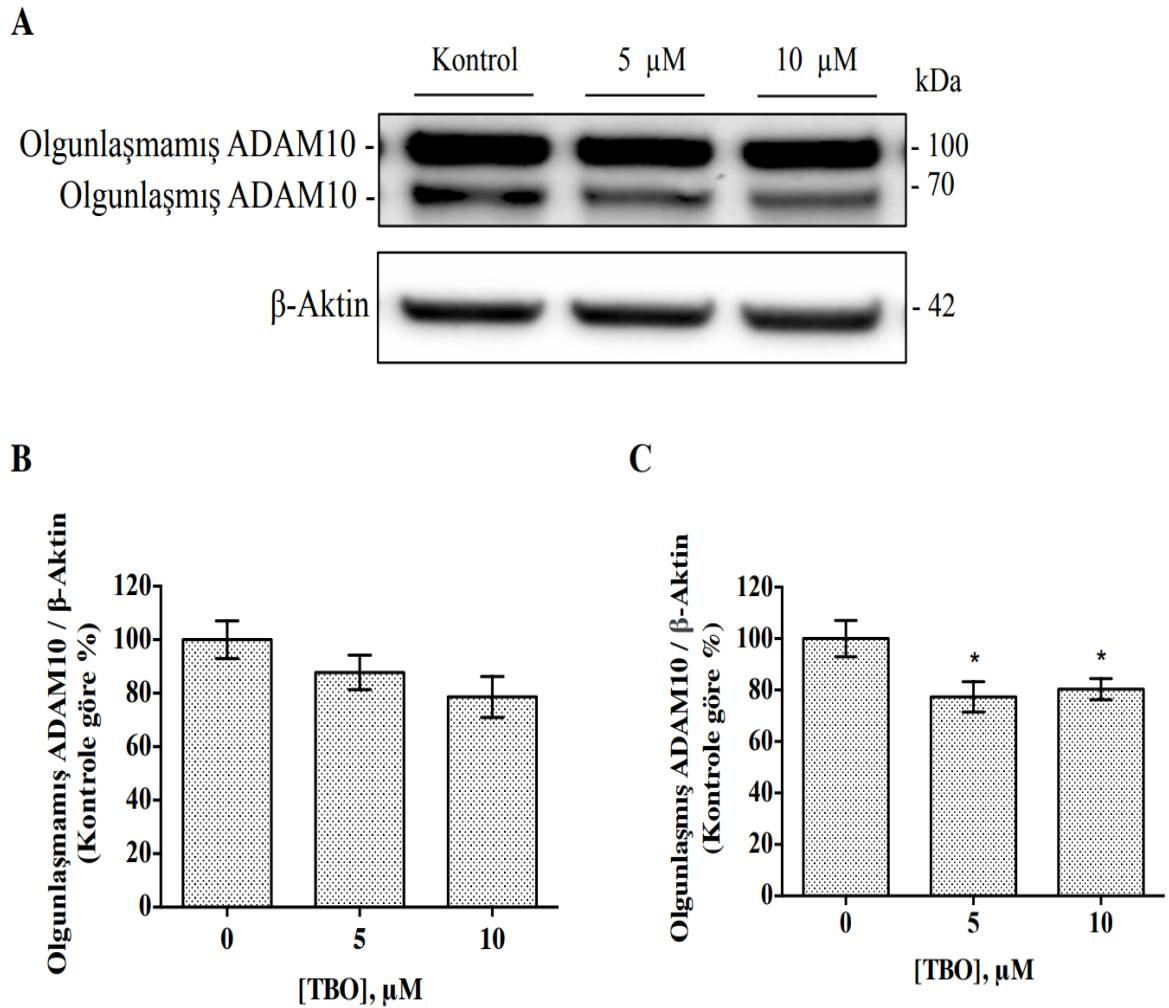
Şekil 4.15. HT-29 hücrelerinde DMMB'nin sAPLP2 düzeyleri üzerindeki etkileri. (A) 0-1.25 μM DMMB uygulaması sonrası HT-29 kültür ortamında sAPLP2'nin Western blot görüntüsü (B) sAPLP2'nin total proteine göre normalizasyonları sonrası dansitometrik analizleri. 20-24 μg protein yüklendi. Deney verileri, ort \pm SH olarak gösterilmiştir (n= 4-5; ordinary oneway ANOVA; **, $p < 0.01$).

4.4.5. HT-29 Hücrelerinde Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin ADAM10 Düzeyi Üzerine Etkileri

α -sekretaz enzimi ile APP ve APLP2'nin kırılması sonucunda meydana gelen fragmanlardan bir tanesi de sırasıyla büyük, çözünür N-terminal fragman sAPP α ve sAPLP2'dir. Dolayısıyla çalışmada, HT-29 hücrelerinde gözlenen sAPP α ve sAPLP2 üzerindeki fenotiyazinlerin inhibe edici etkisinin, APP ve APLP2'nin işlenmesinde rol oynayan α -sekretaz (ADAM 10) enzimi aracılığıyla olup olmadığı, rekombinant Anti-ADAM10 [EPR5622] antikoru kullanılarak Western Blot yöntemi ile test edildi.

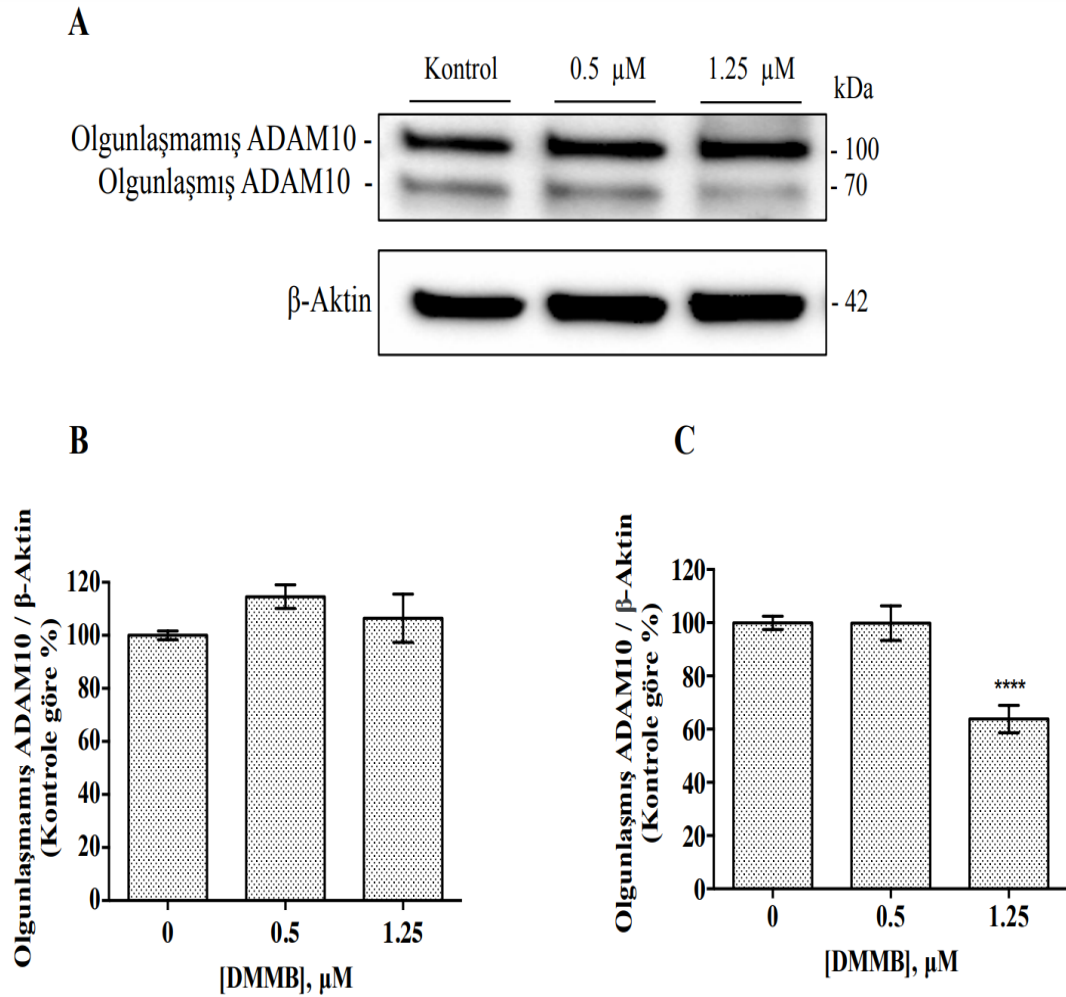
Sonuçlar, hücre içindeki ADAM10'un mRNA işlemlerinden ve posttranslasyonel modifikasyonlardan dolayı ~100 (olgunlaşmamış ADAM10, immature form) ve 70 kDa (olgunlaşmış ADAM10, mature form) olmak üzere iki bant verdiğini göstermektedir. Dansitometrik analizler için, ADAM10'a ait gözlenen iki bant için elde edilen bant yoğunlukları, β -aktine göre normalize edildi ve veriler kontrolün yüzdesi olarak gösterildi.

Kantitatif analizler sonucunda, TBO'nun hiçbir konsantrasyonunda olgunlaşmamış ADAM10 ekspresyon (proenzim, inaktif enzim, immature form) düzeyleri açısından kontrole göre; istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Olgunlaşmış ADAM10 (enzimin aktif formu, mature form) ise, 5 μ M ve 10 μ M TBO ile kontrole göre sırasıyla %23 ve %20 oranında anlamlı olarak azalma gösterdi (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. HT-29 hücrelerinde TBO'nun ADAM10 düzeyleri üzerindeki etkileri. (A) 0-10 μ M TBO uygulaması sonrası HT-29 hücre lizatlarında ADAM10'un Western blot görüntüsü (B) olgunlaşmamış ADAM10 ve (C) olgunlaşmış ADAM10'nin β -aktine göre normalizasyonları sonrası dansitometrik analizleri. 40-70 μ g protein yüklendi. Deney verileri, ort \pm SH olarak gösterilmiştir. (n=3; ordinary oneway ANOVA; *, $p < 0.05$).

DMMB bileşiği ile muamele sonrasında ise; olgunlaşmamış ADAM10 (proenzim, inaktif enzim, immature form) düzeylerinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. Olgunlaşmış ADAM10 ise 1.25 μ M DMMB ile %36 oranında anlamlı olarak azalma gösterdi (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. HT-29 hücrelerinde DMMB'nin ADAM10 düzeyleri üzerindeki etkileri. (A) 0-1.25 μ M DMMB uygulaması sonrası HT-29 hücre lizatlarında ADAM10'un Western blot görüntüsü (B) Olgunlaşmamış ADAM10 ve (C) olgunlaşmış ADAM10'nin β -aktine göre normalizasyonları sonrası dansitometrik analizleri. 30-70 μ g protein yüklendi. Deney verileri, ort \pm SH olarak gösterilmiştir. (n= 5-8; ordinary oneway ANOVA; ****, $p < 0.0001$).

4.5. Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin HT-29 Hücrelerinde PI₃K/AKT Yolağı Üzerindeki Etkilerinin Değerlendirilmesi

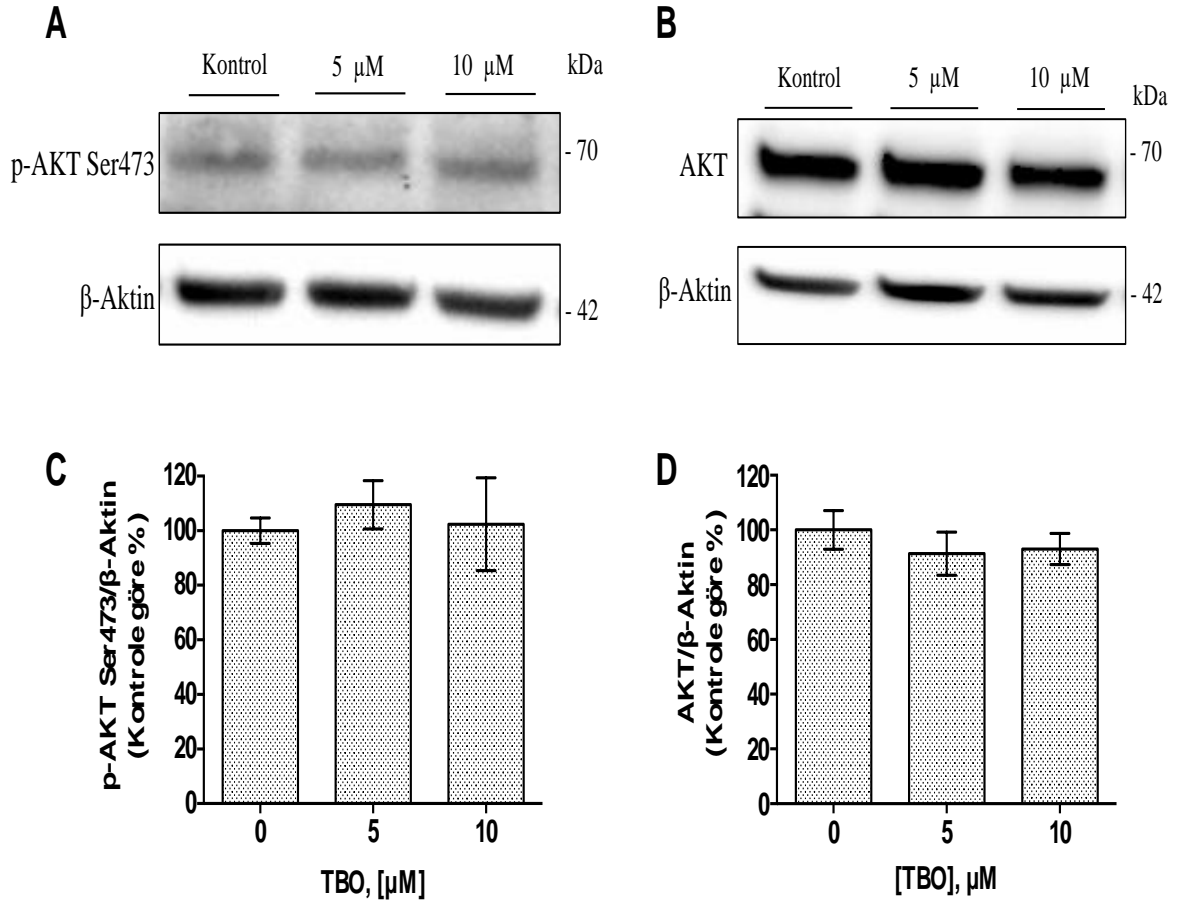
4.5.1. Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin HT-29 Hücrelerinde AKT ve GSK-3 α/β Fosforilasyonu Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi

Bilindiğı üzere, PI₃K/AKT yolağı apoptozun inhibisyonunda ve hücre proliferasyonunun uyarılmasında rol oynamaktadır. GSK-3 β ise, AKT'nin aşağı yolak substratlarından bir tanesi olup, ana regülatörü, AKT'dir.

GSK-3 β 'nin aktivitesi, Ser9 ve Tyr216 birimlerinin fosforilasyonu ile düzenlenmektedir. PI₃K yolunun aktivasyonu ile AKT aktive olmakta ve AKT de GSK-3 β 'yi Ser9'dan fosforilleyerek onu inhibe etmektedir.

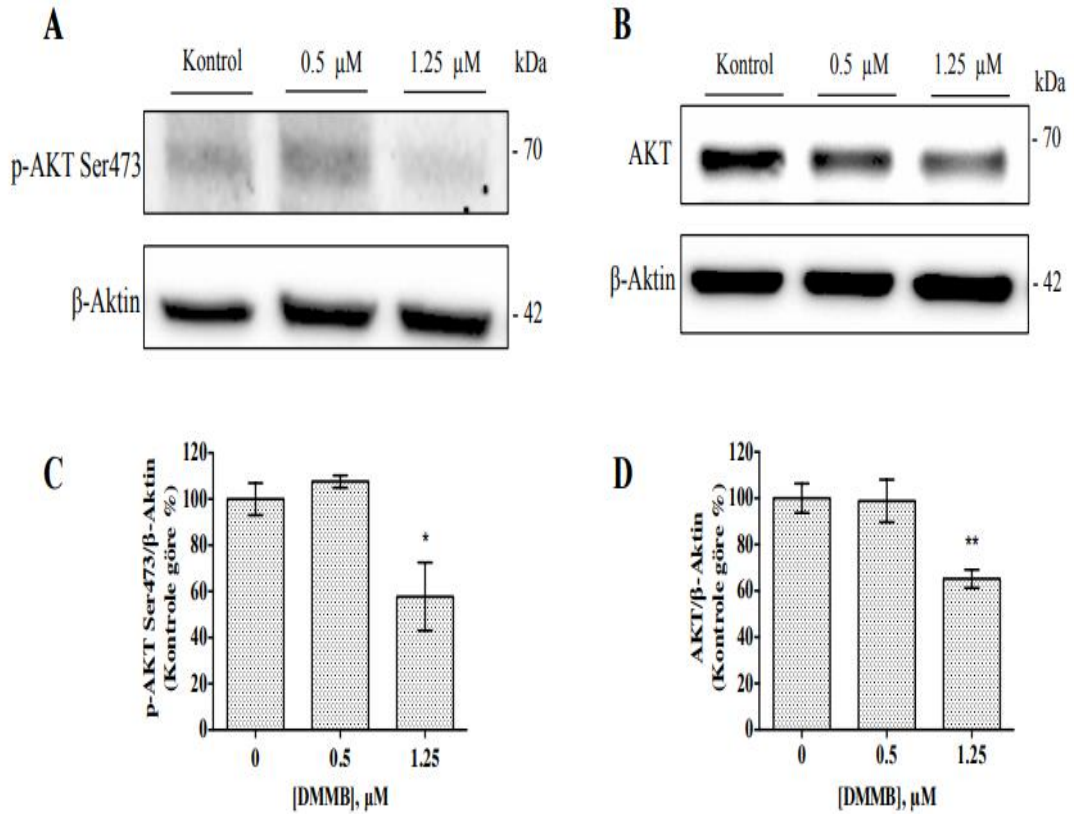
Çalışmada, fenotiyazin yapılı bileşikler ile 24 saat muamelenin ardından gözlenen hücre canlılığındaki azalmanın, APP ve/veya APLP2 işlenmesinin yanı sıra, PI₃K/AKT yolağı üzerindeki etkileri nedeniyle de meydana gelip gelmediğı hücre lizatlarında Western Blot yöntemi kullanılarak araştırıldı.

Western blot sonuçları, ~ 60 kDa'da AKT ve fosforile AKT Ser473'e ait bandın varlığını gösterdi. Kontrol ile karşılaştırıldığında; TBO varlığında AKT ve p-AKT Ser473 ekspresyon düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi (Şekil 4.18).



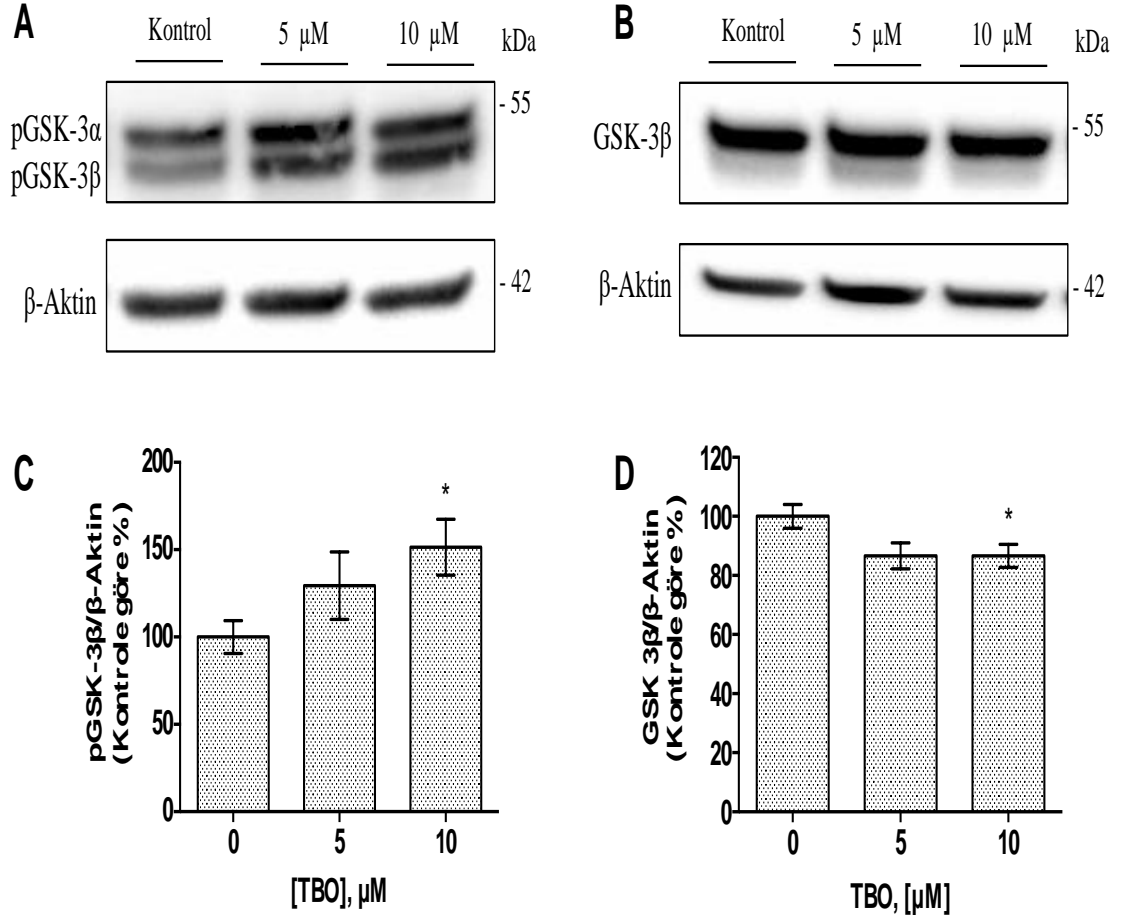
Şekil 4.18. HT-29 hücrelerinde TBO'nun p-AKT Ser473 ve AKT düzeyleri üzerindeki etkileri. 0-10 μ M TBO uygulaması sonrası HT-29 hücre lizatlarında (A) p-AKT'nin ve (B) AKT'nin Western blot görüntüsü (C) p-AKT'nin ve (D) AKT'nin β -aktine göre normalizasyonları sonrası dansitometrik analizleri. 30-70 μ g protein yüklendi. Deney verileri, ort \pm SH olarak gösterilmiştir. (n=3-5; ordinary oneway ANOVA).

Diğer taraftan DMMB ile 24 saat muamele sonrasında; DMMB'nin hem p-AKT hem de AKT düzeylerini 1.25 μ M konsantrasyonunda kontrole göre azalttığı ve bu azalmanın istatistiksel açıdan anlamlı oldukları gözlemlendi (Şekil 4.19). 1.25 μ M DMMB ile muamele edilen hücrelerde p-AKT, %42 oranında azalırken, AKT düzeyleri %35 oranında azaldı.



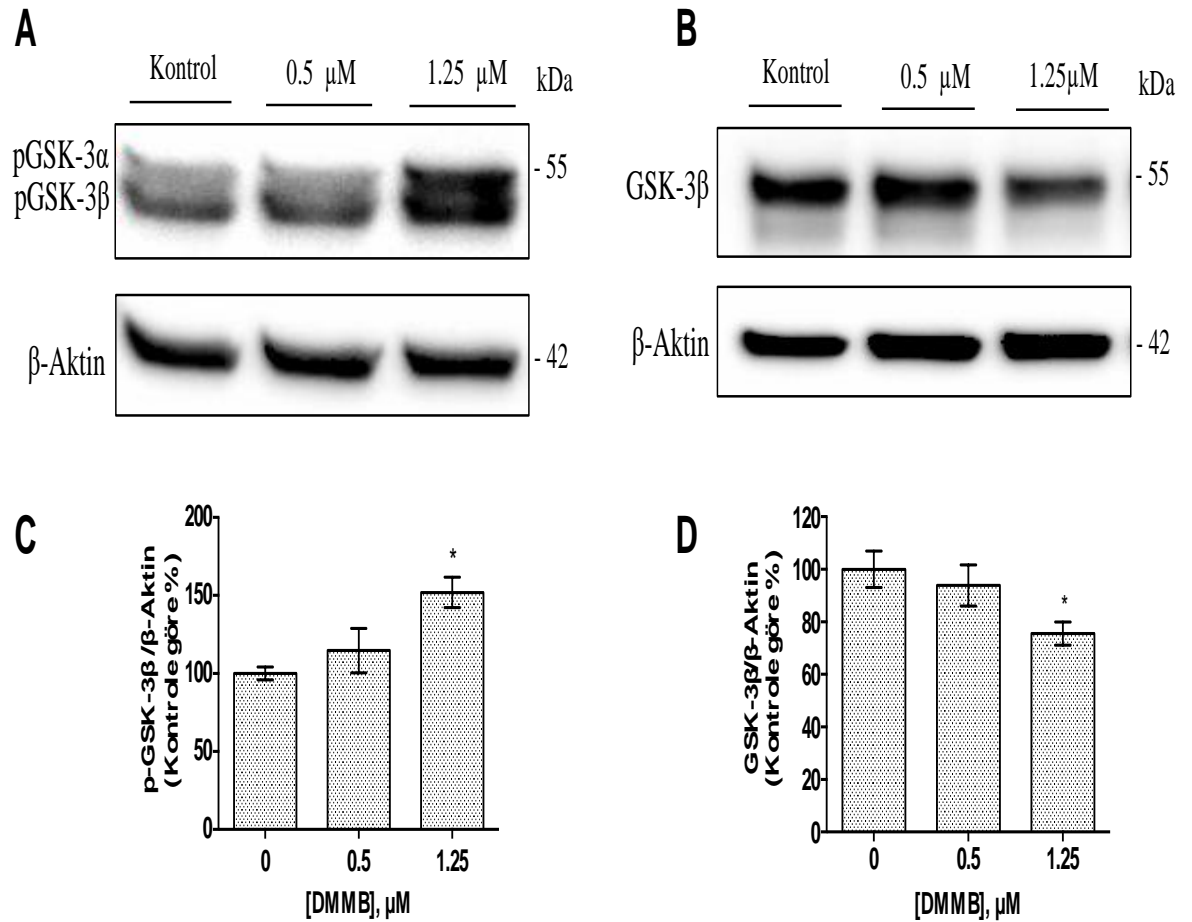
Şekil 4.19. HT-29 hücrelerinde DMMB'nin p-AKT Ser473 ve AKT düzeyleri üzerindeki PI₃K/AKT yolağı üzerine etkileri. 0-1.25 μ M DMMB uygulaması sonrası HT-29 hücre lizatlarında (A) p-AKT'nin ve (B) AKT'nin Western blot görüntüsü (C) p-AKT'nin ve (D) AKT'nin β -aktine göre normalizasyonları sonrası densitometrik analizleri. 60-70 μ g protein yüklendi. Deney verileri, ort \pm SH olarak gösterilmiştir. (n=3-5; ordinary oneway ANOVA; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$)

TBO'nun pGSK-3 β Ser9 ve GSK-3 β ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi Western blot yöntemi ile incelendiğinde; kontrole göre 10 μ M TBO ile pGSK-3 β (~ 46 kDa)'nın %51 oranında anlamlı olarak arttığı (Şekil 4.20); GSK-3 β 'nın (~ 46 kDa) düzeylerinde ise sadece 10 μ M TBO için %10 oranında anlamlı bir azalma gözlemlendi.



Şekil 4.20. HT-29 hücrelerinde TBO'nun pGSK-3 β Ser9 ve GSK-3 β düzeyleri üzerine etkileri. 0-10 μ M TBO uygulaması sonrası HT-29 hücre lizatlarında (A) pGSK-3 β ve (B) GSK-3 β 'nin Western blot görüntüsü (C) pGSK-3 β ve (D) GSK-3 β 'nin β -aktine göre normalizasyonları sonrası dansitometrik analizleri. 60-70 μ g protein yüklendi. Deney verileri, ort \pm SH olarak gösterilmiştir. (n= 6; ordinary oneway ANOVA; *, $p < 0.05$).

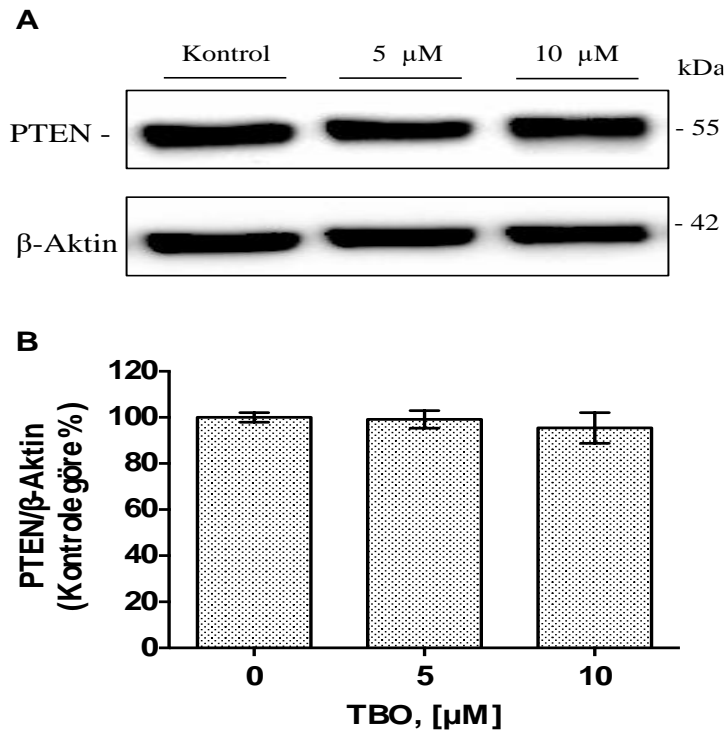
DMMB'nin pGSK-3 β Ser9 ve GSK-3 β ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi Western blot yöntemi ile incelendiğinde ise; kontrole göre 1.25 μ M DMMB ile pGSK-3 β (~ 46 kDa)'nın %52 oranında anlamlı olarak arttığı (Şekil 4.21); GSK-3 β 'nin (~ 46 kDa) düzeylerinde ise sadece 1.25 μ M DMMB için %24 oranında anlamlı bir azalma gözlemlendi.



Şekil 4.21. HT-29 hücrelerinde DMMB'nin pGSK-3 β Ser9 ve GSK-3 β düzeyleri üzerine etkileri. 0-1.25 μ M TBO uygulaması sonrası HT-29 hücre lizatlarında (A) pGSK-3 β ve (B) GSK-3 β 'nin Western blot görüntüsü (C) pGSK-3 β ve (D) GSK-3 β 'nin β -aktine göre normalizasyonları sonrası dansitometrik analizleri. 60-70 μ g protein yüklendi. Deney verileri, ort \pm SH olarak gösterilmiştir. (n= 6; ordinary oneway ANOVA; *, $p < 0.05$).

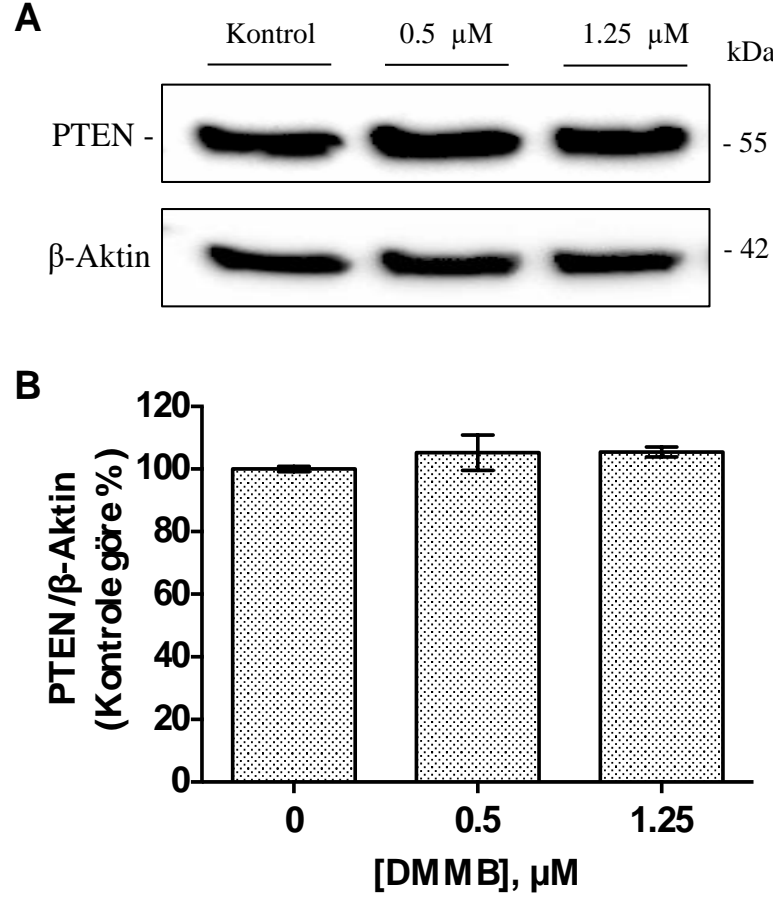
4.5.2. Fenotiazin Yapılı Bileşiklerin HT-29 Hücrelerinde PTEN Üzerindeki Etkilerinin Değerlendirilmesi

Tümör baskılayıcı bir protein olan PTEN, PI₃K sinyalizasyon yolağının düzenlenmesinde en önemli oyuncu olup, PIP3 oluşumunu inhibe eden negatif bir düzenleyicidir. TBO için AKT ve p-AKT düzeylerinde herhangi bir değişim gözlenmezken, DMMB'nin AKT ve p-AKT düzeylerinde azalmaya yol açması nedeniyle, bu yolağın negatif düzenleyici olan PTEN üzerinde herhangi bir etkiye neden olup olmadığı Western Blot yöntemi ile değerlendirildi. Western blot sonuçları, PTEN'in ~ 55 kDa'da bant verdiğini göstermektedir (Şekil 4.22). Dansitometrik analizler için, PTEN'e ait gözlenen bant için elde edilen bant yoğunlukları, β -aktine göre normalize edildi ve veriler kontrolün yüzdesi olarak gösterildi. Kantitatif analiz sonrasında, TBO'nun hiçbir konsantrasyonunda PTEN düzeylerinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişime neden olmadığı bulundu (Şekil 4.22).



Şekil 4.22. HT-29 hücrelerinde TBO'nun PTEN üzerine etkileri. (A) 0-10 μ M TBO uygulaması sonrası HT-29 hücre lizatlarında PTEN'in Western blot görüntüsü (B) PTEN'in β -aktine göre normalizasyonları sonrası dansitometrik analizleri. 40-70 μ g protein yüklendi. Deney verileri, ort \pm SH olarak gösterilmiştir. (n=5; ordinary oneway ANOVA)

Benzer şekilde, DMMB'nin de hiçbir konsantrasyonunda PTEN düzeylerinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişime neden olmadığı bulundu (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. HT-29 hücrelerinde DMMB'nin PTEN üzerine etkileri. (A) 0-1.25 μ M DMMB uygulaması sonrası HT-29 hücre lizatlarında PTEN'in Western blot görüntüsü (B) PTEN'ni β -aktine göre normalizasyonları sonrası dansitometrik analizleri. 30-70 μ g protein yüklendi. Deney verileri, ort \pm SH olarak gösterilmiştir. (n= 4-5; ordinary oneway ANOVA).

5. TARTIŞMA

Nörodejenerasyon ve kanser iki ayrı patolojik hastalık olmasına rağmen, artmakta olan kanıtlar, bu iki hastalığın genetik ve moleküler anomaliler açısından ortak mekanizmalar paylaştığını göstermektedir. AH'nın gelişimi ile ilişkili olan APP proteini, transmembran bir protein olup, beyin dokusunda yüksek oranda eksprese edilmektedir. APP ve yine aynı aileden olan APLP2, birçok kanser türünde aşırı eksprese edilmekte ve her ikisi de kanserin karakteristik özellikleri olan anormal büyüme, göç ve invazyon ile ilişkilendirilmektedir (3, 126).

Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin HT-29 Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri

Birçok araştırma, çeşitli kanser türlerinde artan APP ve APLP2 ekspresyonlarının kanser hücre proliferasyonu ile önemli ölçüde korelasyon gösterdiğini belirtmektedir (6, 30, 31). PS70 hücreleri kullanarak yaptığımız daha önceki çalışmalarımızda, fenotiyazin yapısına sahip azur B, TBO ve TH'nin total APP ve sAPP α düzeylerini azaltması (9, 10) nedeni ile bu tez çalışmasında, TBO ve DMMB'nin, APP ve/veya APLP2'nin proteolitik işlenmesini etkileyebileceği ve böylece insan kolon kanseri hücrelerinin (HT-29) canlılığını azaltabileceği hipotez edildi.

Bu kapsamda, fenotiyazin yapılı bileşiklerin kanserin olası tedavisinde güvenli bir şekilde kullanılabilmesi ya da tedaviye pozitif katkı sağlayabilmeleri için, kullanılması öngörülen konsantrasyonlar, öncelikle kanser hücresi olmayan sağlıklı HEK293 hücrelerinde MTT ve PI temelli akım sitometri analizleri sonucunda, TBO için 10 μ M'ın; DMMB için ise 1.25 μ M'ın üzerinde olmaması gerektiği tespit edildi. HT-29 kolon kanseri hücrelerinde ise, söz konusu konsantrasyonlarda, PI temelli akım sitometri sonuçları ne TBO ne de DMMB'nin hücre canlılığında etkili bir azalmaya neden olmadığını gösterdi.

PI, membran bütünlüğü bozulmuş ölü hücrelerin içerisine giren ve DNA çift zincirine bağlanarak hücreleri boyama özelliğine sahip bir boyadır ve sadece nekrotik hücreleri boyamaktadır. Örneğin, erken apoptoz aşamasında veya hali hazırda apoptoza uğrayan hücreleri tespit edememektedir (127). Dolayısıyla bu sonuçlar, kesin olarak fenotiyazin yapılı bileşikler hücre canlılığını etkileyemez

anlamına gelmemektedir. Bu nedenle, söz konusu bileşiklerin HT-29 hücre canlılığı üzerindeki etkileri, canlı hücrelerin metabolik aktivitesinin bir göstergesi olan MTT yöntemi ile değerlendirildi ve her iki bileşiğinde etkili bir şekilde hücre canlılığını azalttığı bulundu. Ayrıca, TBO ve DMMB'nin IC_{50} değerleri karşılaştırıldığında, DMMB'nin ($IC_{50}= 0.32\pm 1.2 \mu M$), TBO'ya ($IC_{50}= 5.7\pm 1 \mu M$) göre daha etkili bir şekilde hücre canlılığını etkilediği gözlemlendi.

Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin HT-29 Hücrelerinde APP ve APLP2 İşlenmesi Üzerindeki Etkileri

Çalışmanın bu aşamasında, HT-29 hücreleri 24 saat boyunca TBO ve DMMB ile muamele edildi. Ardından, hücre lizatlarında total APP, APLP2, ADAM10 ve kültür ortamlarında ADAM10 kesim ürünleri sonucu oluşan sAPP α ve sAPLP2 ekspresyon düzeyleri Western Blot ile değerlendirildi. Sonuçlara göre, her iki bileşik de hücre içi total APP, sekrete olan sAPP α ve ADAM10 ekspresyonunu etkileyerek kontrole göre azaltmıştır. Bu sonuç, daha önce laboratuvarımızda fenotiyazinlerle yapılan diğer çalışmalar ile gördüğümüz APP ekspresyonundaki azalma sonucu kurulan hipotezimizi doğrulamaktadır (9, 10). Yine çok yakın bir zamanda laboratuvarımızda gerçekleşen bir çalışmada, TBO ve MB bileşiğinin pankreas kanseri hücrelerinde aşırı eksprese olan APLP2 ekspresyonunu ve proteolitik işlenmesinde rol alan β -sekretazı azaltarak, pankreas kanseri hücrelerinin büyüme ve çoğalmasını azalttığı bulundu (128).

sAPP α ekspresyonunda görülen azalma, bu bileşiklerin APP üzerindeki direkt etkisinden yani APP ekspresyonunu azaltması kaynaklı olabileceği gibi, ADAM10 düzeylerini azaltmaları nedeniyle de meydana gelebileceği şeklinde yorumlandı. APLP2 ve sAPLP2 ekspresyonları üzerinde TBO etki göstermezken, DMMB, TBO'dan farklı olarak hem APLP2'yi hem de kültür ortamına salınan formu sAPLP2'yi azaltmaktadır. Yine aynı şekilde, bu durum DMMB'nin APLP2 ekspresyonu üzerindeki direkt etkisi veya ADAM10 ekspresyonu üzerindeki azaltıcı etkisi nedeniyle olabileceği şeklinde düşünüldü. Ayrıca bu bileşiklerin APP ve/veya APLP2'nin proteolitik işlenmesi üzerindeki etkileri, endoplazmik retikulum ve Golgi

arasında gerçekleşen APP trafiğini değiştirmeleri nedeniyle ya da bu proteinlerin, vezikül içerisindeki yıkımlarını tetiklemeleri neticesinde de gerçekleşmiş olabilir.

Diğer taraftan, bu bileşikler, henüz olgunlaşmamış APP ve/veya APLP2'nin katlanmasını bozarak ER'de kalmalarını ve söz konusu proteinlerin hücre yüzey trafiğini engellemiş olabilir. α -sekretaz kesimi sonucu meydana gelen sAPP α ; tirozin kinaz, protein kinaz A veya protein kinaz C gibi değişik kinaz aktivitesine sahip enzimleri de içeren sinyal yolağı tarafından düzenlenmektedir (129). Bu bilgiler ışığında, fenotiyazinlerin söz konusu sinyal yolağı üzerinde de inhibe edici etkileri nedeniyle sAPP α salınımını azaltıyor olabileceği düşünüldü. Daha önce yapılan bir çalışmada, pankreatik kanser hücrelerindeki APP ve proteolitik işlenmesi sonucu oluşan sAPP α ekspresyonunun, *in vitro* ve *in vivo* koşullarda çok arttığı ve bu hücrelerin büyümesine katkı sağladığı tespit edilmiştir (126, 130).

APP ve/veya APLP2'nin ve α -sekretazların, AKT fosforilasyonu ve Notch sinyal yolları ile de bağlantılı olabileceği ileri sürülmektedir (99, 131). Bu nedenle, kanser ve kanserin yayılım süreçlerinde APP ve α -sekretazın hedeflenmesinin iyi bir terapötik strateji olabileceği düşüncesi literatürde giderek yaygınlaşmaktadır (57). TBO ve DMMB'nin sinyal yolları üzerindeki etkilerini ve sekretazlar üzerindeki hedeflemelerini anlamak için daha detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin HT-29 Hücrelerinde PI₃K/AKT Yolağı Üzerindeki Etkilerinin Değerlendirilmesi

AKT aktivasyonunu tetikleyen ana olay; IGF-1, PDGF, sitokinler, hormonlar ve mitojenler gibi ligandların hücre zarı reseptörlerine bağlanmasıdır. Ligandların reseptöre bağlanması ile PI₃K ve alt basamakları aktive olmaktadır. PI₃K'nın p110 katalitik biriminin aktivasyonu ile AKT, PDK1 tarafından Thr308'den ve mTOR ile Ser473'den fosforilasyon ile konformasyonel değişikliğe uğrayarak hücre içindeki konumunu değiştirmektedir (132). Bu sayede, birçok substratı fosforilleyerek hücre içi olaylarda görev almaktadır. Literatürdeki çalışmalarda, bu yolakların ve proteinlerin kanserin başlangıcı ve ilerlemesinde görev aldığı bilinmektedir. Bu çalışmalardan yola çıkarak son zamanlarda ATP-rekabetçi ve allosterik inhibitörler olmak üzere iki farklı grup AKT inhibitörleri tasarlanmaktadır (132). ATP-rekabetçi

inhibitörler, AKT'nin aktif bölgesine bağlarak ATP bağlanarak engel olmaktadır. Allosterik inhibitörler ise, aktivasyon bölgesine bağlanarak fosforilasyonu ve aktivasyonu engellemektedirler (132).

LY278031, oldukça seçici ve güçlü bir rekabetçi AKT inhibitörü olup, A2780 (yumurtalık) ve HCT116 (kolon) ksenograft modellerinde tümör büyümesini azalttığı gösterilmiştir. Bu kanser türlerinde Faz I denemeleri yapılarak günde 500 mg alan hastalar arasında tedavinin 8. gününde alınan biyopsi örneklerinin %50'sinden fazlasında AKT ekspresyonunda azalma izlenmiştir (132, 133).

MSC2363318A; p70S6K, AKT1 ve AKT3'ün seçici ve güçlü bir ATP-rekabetçi inhibitörüdür. Meme kanserli hastalardan üretilen ksenograft modellerinde MSC2363318A'nın etkisi değerlendirildiğinde, AKT aktivasyonunu bloke ederek iyileştirici rol oynadığı düşünülmüştür (132, 134).

AKT fosforilasyonundaki artışın, apoptozu inhibe ederek hücre proliferasyonunda rol oynadığı, bu yolla hücrenin hayatta kalmasını ve tümör oluşumunu desteklediği bilinmektedir. Yüksek pAKT ekspresyonu literatürde kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (135). 64 adet glioblastomlu hastadan alınan doku örnekleri immünokimyasal tekniklerle incelendiğinde, %50'den fazlasında pAKT ekspresyonunun yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bu sayede, yüksek pAKT ekspresyonlarının klinikte birer biyobelirteç olarak kullanılabileceği düşünülmektedir (135).

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, total APP ve sAPP α 'nın, G-protein aracılı PI₃K-Akt kinaz sinyalizasyon yolağını aktive ettiği gösterilmiştir (99). Daha önceki çalışmalarda insülin ve IGF-1 uyarımının, PI₃K-bağımlı olarak APP sekresyonunda artışına neden olduğu tespit edilmiştir (36, 136, 137). Ayrıca, PI₃K aktivitesinin inhibe edilmesinin, hatta uyarım olmasa dahi, APP trafiğini ve salgılanmasını azalttığı bulunmuştur (137, 138). Serin/treonin kinaz aktivitesine sahip olan AKT, Ser473 ve Thr308 üzerinden fosforilasyon ile kontrol edilmektedir (139). Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde; çeşitli kanser türlerinde AKT ekspresyonunda artışlar mevcuttur (139). Pankreas kanseri dahil olmak üzere birçok kanser türünde görülen bu artış, aynı zaman apoptozdaki dirençle bağlantılıdır (97). Kolon kanseri hücre hattı olan HCT-116 ile yapılan bir çalışmada, AKT

ekspresyonunun oldukça yüksek olduğu bildirilmiştir. Bu çalışma kapsamında yeni tasarlanmış bir AKT inhibitörü olan SC66, HCT-116 hücreleri üzerinde uygulandığında, toplam AKT ve p-AKT ekspresyon düzeylerinde azalma görülmüştür. Bu veriler, AKT blokajının p-GSK-3 β seviyesinin azalmasına yol açtığı anlamına da gelmektedir. Bu durum, SC66'nın AKT inhibisyonu yoluyla GSK-3 β aktivasyonunu hızlandırdığını düşündürmüştür (139). GSK-3, PI₃K/AKT sinyalizasyonunun anahtar efektörüdür. Normal koşullar altında, GSK-3 β hücrelerde yapısal olarak aktiftir ve aktivitesi, Ser9 ve Tyr216 birimlerinden fosforilasyon seviyeleri arasındaki denge ile düzenlenmektedir. PI₃K yolunun aktivasyonu ile AKT aktive olmakta, GSK-3 β ise, AKT tarafından Ser9 ve Tyr216 fosforilasyonu ile düzenlenmektedir (140). Ser9 fosforilasyonu, GSK-3 β 'nin aktivitesini inhibe ederken, Tyr216 fosforilasyonu ise aktivitesini arttırmaktadır. Yapılan bir çalışmada artan GSK-3 β ekspresyonu ve aktivitesi ile, Ser9 ve Tyr216 birimlerindeki diferansiyel fosforilasyondaki bozulmanın, tümör hücrelerinde β -katenin aktivasyonu ile ilgisi olmayan hem kolon kanseri hücre hatlarının hem de klinik kolorektal kanserlerin karakteristiği olduğu gösterilmiştir.

Tüm bu bilgiler ışığında, TBO ile DMMB'nin söz konusu yollar üzerindeki etkileri değerlendirildi. Bu kapsamda, her iki bileşiğin HT-29 hücre lizatlarında AKT, p-AKT, p-GSK-3 α /3 β ve PTEN ekspresyon düzeyleri üzerinde etkili olup olmadığı araştırıldı. TBO varlığında, AKT ve aktif p-AKT Ser473 ekspresyon düzeyleri anlamlı bir değişim göstermezken, AKT'nin aşağı yolak substratlarından bir tanesi olan GSK-3 β 'nin fosforilasyonunun (Ser9) anlamlı olarak arttı ve total GSK-3 β ekspresyon düzeyi azaldı. Bu sonuç TBO'nun, AKT sinyali yolağından bağımsız olarak GSK-3 β 'yi Ser9 fosforilasyonunu arttırarak inaktive ettiğine işaret etmektedir. Lityum iyi bilinen bir GSK-3 β inhibitörü olup (141), ovaryum kanseri hücre hattı SKOV3 ile yapılan bir çalışmada, p-GSK-3 β Ser9 (GSK-3 β 'nin inaktif formu) ekspresyonunu arttırarak ovaryum kanseri hücre büyümesini baskılamıştır (142). Bu çalışmadan farklı olarak, pankreas kanseri hücre hatları üzerinde uygulanan, yeni tasarlanmış bir GSK-3 inhibitörü olan AR-A014418 ile muamele sonrasında ise, GSK-3 fosforilasyonunun ve Notch sinyali yolağında yer alan proteinlerin

ekspresyonlarının azalması sonucu, hücre proliferasyonunda bir gerilemenin olduğu bildirilmiştir (143).

DMMB varlığında ise, AKT ve aktif p-AKT Ser473 ekspresyon düzeyleri azalırken, total GSK-3 β azalmakta ancak ilginç bir şekilde p-GSK-3 β Ser9 ekspresyonu artmaktadır. Bu sonuç DMMB'nin TBO'ya benzer şekilde, AKT sinyali yolağından bağımsız olarak GSK-3 β 'yı Ser9 fosforilasyonunu arttırması suretiyle, onu inaktive ettiğine işaret etmektedir. Yine başka bir çalışmada, lityumun, kolon kanseri hücre canlılığını ve proliferasyonunu ROS/GSK-3 β /NF- κ B yolağı üzerinden azaltması ile ilgili yeni bir mekanizma olabileceği düşünülmektedir. Dolayısıyla, söz konusu yolak açısından da bu bileşiklerin etkilerinin değerlendirilmesi faydalı olacaktır. DMMB'nin TBO'dan farklı olarak, AKT ve pAKT (Ser473) düzeylerini düşürmesinin, DMMB'nin AKT üzerine olan direkt etkisi nedeniyle olabileceği ve bu durumun kanser hücre proliferasyonunun azalması için pozitif katkı sağlayabileceği düşünüldü.

Kolon kanseri hastalarında %20-40 oranında PTEN ekspresyonunda kayıplar izlenmektedir. PTEN konsantrasyonları, kanser gelişimini ve şiddetini güçlü bir şekilde etkilediğinden, hücresel PTEN seviyelerinin korunması onkogenezi önlemede kritik önem taşımaktadır (144, 145). Çalışmanın son aşamasında, TBO ve DMMB'nin tümör baskılayıcı PTEN ekspresyonu üzerindeki etkileri değerlendirildiğinde; her iki bileşiğin PTEN ekspresyonu üzerinde herhangi bir değişime neden olmadığı bulunmuştur.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Kanser hücrelerinde maligniteyi arttıran APP ve APLP2'nin spesifik yollarının deşifre edilmesi ve bu proteinlerin kanser sürecindeki rollerinin tamamen anlaşılması, bu proteinleri hedef alan yeni terapötik yöntemlerin geliştirilebilmesi açısından çok önemlidir. Bu tez çalışmasında, fenotiyazin yapısındaki TBO ve DMMB'nin, APP ve/veya APLP2 ile bu proteinlerin işlenmesinde rol olan α -sekretaz düzeyini azalttığı gösterildi. Aynı zamanda, bu bileşiklerin GSK-3 β ekspresyonunu azaltmasının ve inaktif formu olan p-GSK-3 β (Ser9)'yu arttırmasının, kanserin tedavisinde umut vaat eden yeni GSK-3 β inhibitörleri arasına katılabileceğine işaret etmektedir. TBO ve DMMB'nin farklı proteinler üzerinden etki ederek kolon kanseri hücre hattı HT-29'un canlılığını azaltması, umut vaad edici olup, kolon kanserinin tedavisinde potansiyel ilaç adayları olabileceğini düşündürmektedir.

Öneriler:

- Fenotiyazinlerin, HT-29 hücrelerinde apoptotik etkilerinin değerlendirilmesi yararlı olacaktır.
- GSK-3 aktivasyonu, kanser için önemli olup, çeşitli kanser türlerinde GSK-3 aktivasyonu farklılık göstermektedir. GSK-3'ün sinyal yollarına etkisinin ileriki çalışmalarda ayrıntılı bir şekilde incelenmesi gerekmektedir.
- Fenotiyazinlerin, farklı kanser türlerindeki ve kanserle ilişkili farklı sinyal yolları üzerindeki etkilerinin ayrıntılı araştırılması önem taşımaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Clifton J, 2nd, Leikin JB. Methylene blue. *Am J Ther.* 2003;10(4):289-91.
2. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *science.* 2002;297(5580):353-6.
3. Pandey P, Sliker B, Peters HL, Tuli A, Herskovitz J, Smits K, et al. Amyloid precursor protein and amyloid precursor-like protein 2 in cancer. *Oncotarget.* 2016;7(15):19430-44.
4. Peters HL, Tuli A, Wang X, Liu C, Pan Z, Ouellette MM, et al. Relevance of amyloid precursor-like protein 2 C-terminal fragments in pancreatic cancer cells. *Int J Oncol.* 2012;41(4):1464-74.
5. Paris D, Quadros A, Patel N, DelleDonne A, Humphrey J, Mullan M. Inhibition of angiogenesis and tumor growth by beta and gamma-secretase inhibitors. *Eur J Pharmacol.* 2005;514(1):1-15.
6. Meng JY, Kataoka H, Itoh H, Koono M. Amyloid beta protein precursor is involved in the growth of human colon carcinoma cell in vitro and in vivo. *Int J Cancer.* 2001;92(1):31-9.
7. Tsang JYS, Lee MA, Chan T-H, Li J, Ni Y-B, Shao Y, et al. Proteolytic cleavage of amyloid precursor protein by ADAM10 mediates proliferation and migration in breast cancer. *EBioMedicine.* 2018;38:89-99.
8. Woods NK, Padmanabhan J. Inhibition of amyloid precursor protein processing enhances gemcitabine-mediated cytotoxicity in pancreatic cancer cells. *J Biol Chem.* 2013;288(42):30114-24.
9. Biberoglu K, Yuksel M, Tacal O. Azure B affects amyloid precursor protein metabolism in PS70 cells. *Chem Biol Interact.* 2019;299:88-93.
10. Yuksel M, Biberoglu K, Onder S, Akbulut KG, Tacal O. Effects of phenothiazine-structured compounds on APP processing in Alzheimer's disease cellular model. *Biochimie.* 2017;138:82-9.
11. Qi L, Ding Y. Potential antitumor mechanisms of phenothiazine drugs. *Sci China Life Sci.* 2013;56(11):1020-7.
12. Choi JH, Yang YR, Lee SK, Kim SH, Kim YH, Cha JY, et al. Potential inhibition of PDK1/Akt signaling by phenothiazines suppresses cancer cell proliferation and survival. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1138:393-403.
13. Fresno Vara JA, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, Gonzalez-Baron M. PI₃K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev.* 2004;30(2):193-204.
14. Müdürlüğü TCSBHSG. Türkiye Kanser İstatistikleri, 2016 2019 [Available from: <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-istatistikleri/yillar/2016-yili-turkiye-kanser-i-statistikleri.html>].
15. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin.* 2009;59(4):225-49.

16. Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Prz Gastroenterol.* 2019;14(2):89-103.
17. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 1999;49(1):33-64, 1.
18. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut.* 2017;66(4):683-91.
19. Siegel RL, Miller KD, Goding Sauer A, Fedewa SA, Butterly LF, Anderson JC, et al. Colorectal cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin.* 2020;70(3):145-64.
20. Miller KD, Nogueira L, Mariotto AB, Rowland JH, Yabroff KR, Alfano CM, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. *CA Cancer J Clin.* 2019;69(5):363-85.
21. Hawk ET, Limburg PJ, Viner JL. Epidemiology and prevention of colorectal cancer. *Surg Clin North Am.* 2002;82(5):905-41.
22. Gönen Ö. Kolorektal Kanser Epidemiyolojisi. *Türkiye Klinikleri Journal of Surgery.* 2004;9:57-65.
23. Signore M, Buccarelli M, Pilozzi E, De Luca G, Cappellari M, Fanciulli M, et al. UCN-01 enhances cytotoxicity of irinotecan in colorectal cancer stem-like cells by impairing DNA damage response. *Oncotarget.* 2016;7(28):44113-28.
24. Labianca R, Beretta GD, Kildani B, Milesi L, Merlin F, Mosconi S, et al. Colon cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2010;74(2):106-33.
25. Verset L, Tommelein J, Decaestecker C, De Vlieghere E, Bracke M, Salmon I, et al. ADAM-17/FHL2 colocalisation suggests interaction and role of these proteins in colorectal cancer. *Tumor Biol.* 2017;39(3).
26. Moss AC, Doran PP, Macmathuna P. In Silico Promoter Analysis can Predict Genes of Functional Relevance in Cell Proliferation: Validation in a Colon Cancer Model. *Transl Oncogenomics.* 2007;2:1-16.
27. Pandey P, Rachagani S, Das S, Seshacharyulu P, Sheinin Y, Naslavsky N, et al. Amyloid precursor-like protein 2 (APLP2) affects the actin cytoskeleton and increases pancreatic cancer growth and metastasis. *Oncotarget.* 2015;6(4):2064-75.
28. Jing-Yan Meng Hiroaki Kataoka HIMK. Amyloid β protein precursor is involved in the growth of human colon carcinoma cell in vitro and in vivo. *The International Journal of Cancer.* 2001;92(1):31-9.
29. Hansel DE RA, Wehner S, Herzog V, Yeo CJ, Maitra A. Increased Expression and Processing of the Alzheimer Amyloid Precursor Protein in Pancreatic Cancer May Influence Cellular Proliferation. *Cancer Research.* 2003;63(21):7032-7.
30. Krause K, Karger S, Sheu SY, Aigner T, Kursawe R, Gimm O, et al. Evidence for a role of the amyloid precursor protein in thyroid carcinogenesis. *J Endocrinol.* 2008;198(2):291-9.

31. Takayama K, Tsutsumi S, Suzuki T, Horie-Inoue K, Ikeda K, Kaneshiro K, et al. Amyloid precursor protein is a primary androgen target gene that promotes prostate cancer growth. *Cancer Res.* 2009;69(1):137-42.
32. Goedert M. Neuronal localization of amyloid beta protein precursor mRNA in normal human brain and in Alzheimer's disease. *EMBO J.* 1987;6(12):3627-32.
33. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* 2002;297(5580):353-6.
34. Eggert S, Paliga K, Soba P, Evin G, Masters CL, Weidemann A, et al. The proteolytic processing of the amyloid precursor protein gene family members APLP-1 and APLP-2 involves alpha-, beta-, gamma-, and epsilon-like cleavages: modulation of APLP-1 processing by n-glycosylation. *J Biol Chem.* 2004;279(18):18146-56.
35. Vassar R, Kovacs DM, Yan R, Wong PC. The beta-secretase enzyme BACE in health and Alzheimer's disease: regulation, cell biology, function, and therapeutic potential. *J Neurosci.* 2009;29(41):12787-94.
36. Adlerz L, Holback S, Multhaup G, Iverfeldt K. IGF-1-induced processing of the amyloid precursor protein family is mediated by different signaling pathways. *J Biol Chem.* 2007;282(14):10203-9.
37. Araki W, Kume H, Oda A, Tamaoka A, Kametani F. IGF-1 promotes beta-amyloid production by a secretase-independent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;380(1):111-4.
38. Jacobsen KT, Adlerz L, Multhaup G, Iverfeldt K. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1)-induced processing of amyloid-beta precursor protein (APP) and APP-like protein 2 is mediated by different metalloproteinases. *J Biol Chem.* 2010;285(14):10223-31.
39. Coulter DW, Blatt J, D'Ercole AJ, Moats-Staats BM. IGF-I receptor inhibition combined with rapamycin or temsirolimus inhibits neuroblastoma cell growth. *Anticancer Res.* 2008;28(3A):1509-16.
40. Seccareccia E, Brodt P. The role of the insulin-like growth factor-I receptor in malignancy: an update. *Growth Horm IGF Res.* 2012;22(6):193-9.
41. Weigel B, Malempati S, Reid JM, Voss SD, Cho SY, Chen HX, et al. Phase 2 trial of cixutumumab in children, adolescents, and young adults with refractory solid tumors: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer.* 2014;61(3):452-6.
42. Hasebe N, Fujita Y, Ueno M, Yoshimura K, Fujino Y, Yamashita T. Soluble beta-amyloid Precursor Protein Alpha binds to p75 neurotrophin receptor to promote neurite outgrowth. *PLoS One.* 2013;8(12):e82321.
43. Tyan SH, Shih AY, Walsh JJ, Maruyama H, Sarsoza F, Ku L, et al. Amyloid precursor protein (APP) regulates synaptic structure and function. *Mol Cell Neurosci.* 2012;51(1-2):43-52.

44. Demars MP, Bartholomew A, Strakova Z, Lazarov O. Soluble amyloid precursor protein: a novel proliferation factor of adult progenitor cells of ectodermal and mesodermal origin. *Stem Cell Res Ther.* 2011;2(4):36.
45. Chasseigneaux S, Allinquant B. Functions of Abeta, sAPPalpha and sAPPbeta : similarities and differences. *J Neurochem.* 2012;120 Suppl 1:99-108.
46. Collin RW, van Strien D, Leunissen JA, Martens GJ. Identification and expression of the first nonmammalian amyloid-beta precursor-like protein APLP2 in the amphibian *Xenopus laevis*. *Eur J Biochem.* 2004;271(10):1906-12.
47. Yoshikai S, Sasaki H, Doh-ura K, Furuya H, Sakaki Y. Genomic organization of the human amyloid beta-protein precursor gene. *Gene.* 1990;87(2):257-63.
48. Yang Y, Martin L, Cuzin F, Mattei MG, Rassoulzadegan M. Genomic structure and chromosomal localization of the mouse CDEI-binding protein CDEBP (APLP2) gene and promoter sequences. *Genomics.* 1996;35(1):24-9.
49. Reinhard C, Hebert SS, De Strooper B. The amyloid-beta precursor protein: integrating structure with biological function. *EMBO J.* 2005;24(23):3996-4006.
50. Dyrks T, Weidemann A, Multhaup G, Salbaum JM, Lemaire HG, Kang J, et al. Identification, transmembrane orientation and biogenesis of the amyloid A4 precursor of Alzheimer's disease. *EMBO J.* 1988;7(4):949-57.
51. Sandbrink R, Masters CL, Beyreuther K. Similar alternative splicing of a non-homologous domain in beta A4-amyloid protein precursor-like proteins. *J Biol Chem.* 1994;269(19):14227-34.
52. Petersen LC, Bjorn SE, Norris F, Norris K, Sprecher C, Foster DC. Expression, purification and characterization of a Kunitz-type protease inhibitor domain from human amyloid precursor protein homolog. *FEBS Lett.* 1994;338(1):53-7.
53. Badellino KO, Walsh PN. Localization of a heparin binding site in the catalytic domain of factor XIa. *Biochemistry.* 2001;40(25):7569-80.
54. Salameh MA, Robinson JL, Navaneetham D, Sinha D, Madden BJ, Walsh PN, et al. The amyloid precursor protein/protease nexin 2 Kunitz inhibitor domain is a highly specific substrate of mesotrypsin. *J Biol Chem.* 2010;285(3):1939-49.
55. Lim S, Yoo BK, Kim HS, Gilmore HL, Lee Y, Lee HP, et al. Amyloid-beta precursor protein promotes cell proliferation and motility of advanced breast cancer. *BMC Cancer.* 2014;14:928.
56. Takagi K, Ito S, Miyazaki T, Miki Y, Shibahara Y, Ishida T, et al. Amyloid precursor protein in human breast cancer: an androgen-induced gene associated with cell proliferation. *Cancer Sci.* 2013;104(11):1532-8.
57. Danish Rizvi SM, Hussain T, Subaiea GM, Shakil S, Ahmad A. Therapeutic Targeting of Amyloid Precursor Protein and its Processing Enzymes for Breast Cancer Treatment. *Curr Protein Pept Sci.* 2018;19(9):841-9.

58. Miyazaki T, Ikeda K, Horie-Inoue K, Inoue S. Amyloid precursor protein regulates migration and metalloproteinase gene expression in prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;452(3):828-33.
59. Sobol A, Galluzzo P, Liang S, Rambo B, Skucha S, Weber MJ, et al. Amyloid precursor protein (APP) affects global protein synthesis in dividing human cells. *J Cell Physiol.* 2015;230(5):1064-74.
60. Ito S, Miki Y, Saito R, Inoue C, Okada Y, Sasano H. Amyloid precursor protein and its phosphorylated form in non-small cell lung carcinoma. *Pathol Res Pract.* 2019;215(8):152463.
61. Arvidsson Y, Andersson E, Bergstrom A, Andersson MK, Altiparmak G, Illerskog AC, et al. Amyloid precursor-like protein 1 is differentially upregulated in neuroendocrine tumours of the gastrointestinal tract. *Endocr Relat Cancer.* 2008;15(2):569-81.
62. Schmitz A, Tikkanen R, Kirfel G, Herzog V. The biological role of the Alzheimer amyloid precursor protein in epithelial cells. *Histochem Cell Biol.* 2002;117(2):171-80.
63. Wu W, Song W, Li S, Ouyang S, Fok KL, Diao R, et al. Regulation of apoptosis by Bat3-enhanced YWK-II/APLP2 protein stability. *J Cell Sci.* 2012;125(Pt 18):4219-29.
64. Ennis BW, Matrisian LM. Matrix degrading metalloproteinases. *J Neurooncol.* 1994;18(2):105-9.
65. Sethi CS, Bailey TA, Luthert PJ, Chong NH. Matrix metalloproteinase biology applied to vitreoretinal disorders. *Br J Ophthalmol.* 2000;84(6):654-66.
66. Giebel N, Zigrino P. A Disintegrin and Metalloprotease (ADAM): Historical Overview of Their Functions. *Toxins (Basel).* 2016;8(4):122.
67. Huovila AP, Turner AJ, Pelto-Huikko M, Karkkainen I, Ortiz RM. Shedding light on ADAM metalloproteinases. *Trends Biochem Sci.* 2005;30(7):413-22.
68. Wetzel S, Seipold L, Saftig P. The metalloproteinase ADAM10: A useful therapeutic target? *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2017;1864(11 Pt B):2071-81.
69. Tousseyn T, Jorissen E, Reiss K, Hartmann D. (Make) stick and cut loose--disintegrin metalloproteases in development and disease. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2006;78(1):24-46.
70. Mochizuki S, Okada Y. ADAMs in cancer cell proliferation and progression. *Cancer Sci.* 2007;98(5):621-8.
71. Woods N, Trevino J, Coppola D, Chellappan S, Yang S, Padmanabhan J. Fendiline inhibits proliferation and invasion of pancreatic cancer cells by interfering with ADAM10 activation and beta-catenin signaling. *Oncotarget.* 2015;6(34):35931-48.

72. Adrain C, Zettl M, Christova Y, Taylor N, Freeman M. Tumor necrosis factor signaling requires iRhom2 to promote trafficking and activation of TACE. *Science*. 2012;335(6065):225-8.
73. McIlwain DR, Lang PA, Marezky T, Hamada K, Ohishi K, Maney SK, et al. iRhom2 regulation of TACE controls TNF-mediated protection against *Listeria* and responses to LPS. *Science*. 2012;335(6065):229-32.
74. Dornier E, Coumailleau F, Ottavi JF, Moretti J, Boucheix C, Mauduit P, et al. TspanC8 tetraspanins regulate ADAM10/Kuzbanian trafficking and promote Notch activation in flies and mammals. *J Cell Biol*. 2012;199(3):481-96.
75. Termini CM, Gillette JM. Tetraspanins Function as Regulators of Cellular Signaling. *Front Cell Dev Biol*. 2017;5:34.
76. Schumacher N, Rose-John S, Schmidt-Arras D. ADAM-Mediated Signalling Pathways in Gastrointestinal Cancer Formation. *Int J Mol Sci*. 2020;21(14).
77. Turner AJ, Hooper NM. Role for ADAM-family proteinases as membrane protein secretases. *Biochem Soc Trans*. 1999;27(2):255-9.
78. Saftig P, Lichtenthaler SF. The alpha secretase ADAM10: A metalloprotease with multiple functions in the brain. *Prog Neurobiol*. 2015;135:1-20.
79. Smith TM, Jr., Tharakan A, Martin RK. Targeting ADAM10 in Cancer and Autoimmunity. *Front Immunol*. 2020;11:499.
80. Dusterhöft S, Lokau J, Garbers C. The metalloprotease ADAM17 in inflammation and cancer. *Pathol Res Pract*. 2019;215(6):152410.
81. Hartmann D, de Strooper B, Serneels L, Craessaerts K, Herreman A, Annaert W, et al. The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Hum Mol Genet*. 2002;11(21):2615-24.
82. Mullooly M, McGowan PM, Kennedy SA, Madden SF, Crown J, N OD, et al. ADAM10: a new player in breast cancer progression? *Br J Cancer*. 2015;113(6):945-51.
83. Dempsey PJ. Role of ADAM10 in intestinal crypt homeostasis and tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2017;1864(11 Pt B):2228-39.
84. Higashiyama S, Nanba D. ADAM-mediated ectodomain shedding of HB-EGF in receptor cross-talk. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1751(1):110-7.
85. Sahin U, Weskamp G, Kelly K, Zhou HM, Higashiyama S, Peschon J, et al. Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J Cell Biol*. 2004;164(5):769-79.
86. . !!! INVALID CITATION !!! .
87. Walkiewicz K, Nowakowska-Zajdel E, Strzelczyk J, Dziegielewska-Gesiak S, Muc-Wierzgon M. Serum levels of ADAM10, ADAM12, ADAM17 AND ADAM28 in colorectal cancer patients. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2017;31(4):929-34.

88. Wozniak J, Ludwig A. Novel role of APP cleavage by ADAM10 for breast cancer metastasis. *EBioMedicine*. 2018;38:5-6.
89. Tsang JYS, Lee MA, Chan TH, Li J, Ni YB, Shao Y, et al. Proteolytic cleavage of amyloid precursor protein by ADAM10 mediates proliferation and migration in breast cancer. *EBioMedicine*. 2018;38:89-99.
90. Hemmings BA, Restuccia DF. PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(9):a011189.
91. Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet*. 2006;7(8):606-19.
92. Geering B, Cutillas PR, Nock G, Gharbi SI, Vanhaesebroeck B. Class IA phosphoinositide 3-kinases are obligate p85-p110 heterodimers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(19):7809-14.
93. Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(8):550-62.
94. Staal SP. Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(14):5034-7.
95. Doğan A.L GD. Sinyal İletim Mekanizmaları ve Kanser. *Hacettepe Tıp Dergisi*. 2004;35:34-42.
96. Salmena L, Carracedo A, Pandolfi PP. Tenets of PTEN tumor suppression. *Cell*. 2008;133(3):403-14.
97. Roy SK, Srivastava RK, Shankar S. Inhibition of PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways causes activation of FOXO transcription factor, leading to cell cycle arrest and apoptosis in pancreatic cancer. *J Mol Signal*. 2010;5:10.
98. Jimenez S, Torres M, Vizuete M, Sanchez-Varo R, Sanchez-Mejias E, Trujillo-Estrada L, et al. Age-dependent accumulation of soluble amyloid beta (A β) oligomers reverses the neuroprotective effect of soluble amyloid precursor protein-alpha (sAPP(alpha)) by modulating phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt-GSK-3 β pathway in Alzheimer mouse model. *J Biol Chem*. 2011;286(21):18414-25.
99. Milosch N, Tanriover G, Kundu A, Rami A, Francois JC, Baumkötter F, et al. Holo-APP and G-protein-mediated signaling are required for sAPP α -induced activation of the Akt survival pathway. *Cell Death Dis*. 2014;5:e1391.
100. Embi N, Rylatt DB, Cohen P. Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur J Biochem*. 1980;107(2):519-27.
101. Doble BW, Woodgett JR. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci*. 2003;116(Pt 7):1175-86.
102. Robertson H, Hayes JD, Sutherland C. A partnership with the proteasome; the destructive nature of GSK3. *Biochem Pharmacol*. 2018;147:77-92.

103. Meijer L, Flajolet M, Greengard P. Pharmacological inhibitors of glycogen synthase kinase 3. *Trends Pharmacol Sci.* 2004;25(9):471-80.
104. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100(1):57-70.
105. Ohlow MJ, Moosmann B. Phenothiazine: the seven lives of pharmacology's first lead structure. *Drug Discov Today.* 2011;16(3-4):119-31.
106. Hendricks O, Butterworth TS, Kristiansen JE. The in-vitro antimicrobial effect of non-antibiotics and putative inhibitors of efflux pumps on *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents.* 2003;22(3):262-4.
107. Taylor KB, Jeffree GM. A new basic metachromatic dye, I:9-dimethyl methylene blue. *Histochem J.* 1969;1(3):199-204.
108. Pereira LM, Mota CM, Baroni L, Bronzon da Costa CM, Brochi JCV, Wainwright M, et al. Inhibitory action of phenothiazinium dyes against *Neospora caninum*. *Sci Rep.* 2020;10(1):7483.
109. Pluta K, Morak-Mlodawska B, Jelen M. Recent progress in biological activities of synthesized phenothiazines. *Eur J Med Chem.* 2011;46(8):3179-89.
110. Sudeshna G, Parimal K. Multiple non-psychiatric effects of phenothiazines: a review. *Eur J Pharmacol.* 2010;648(1-3):6-14.
111. Oz M, Lorke DE, Petroianu GA. Methylene blue and Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol.* 2009;78(8):927-32.
112. Schirmer RH, Adler H, Pickhardt M, Mandelkow E. "Lest we forget you--methylene blue...". *Neurobiol Aging.* 2011;32(12):2325 e7-16.
113. Rojas JC, Bruchey AK, Gonzalez-Lima F. Neurometabolic mechanisms for memory enhancement and neuroprotection of methylene blue. *Prog Neurobiol.* 2012;96(1):32-45.
114. Mori T, Koyama N, Segawa T, Maeda M, Maruyama N, Kinoshita N, et al. Methylene blue modulates beta-secretase, reverses cerebral amyloidosis, and improves cognition in transgenic mice. *J Biol Chem.* 2014;289(44):30303-17.
115. Di Y, He YL, Zhao T, Huang X, Wu KW, Liu SH, et al. Methylene Blue Reduces Acute Cerebral Ischemic Injury via the Induction of Mitophagy. *Mol Med.* 2015;21:420-9.
116. Dubey T, Gorantla NV, Chandrashekara KT, Chinnathambi S. Photoexcited Toluidine Blue Inhibits Tau Aggregation in Alzheimer's Disease. *ACS Omega.* 2019;4(20):18793-802.
117. Biberoglu K, Yuksel M, Tacal O. Azure B affects amyloid precursor protein metabolism in PS70cells. *Chem Biol Interact.* 2019;299:88-93.
118. Chen C, Zhou F, Zeng L, Jiang Z, Hu Z. Methylene blue offers neuroprotection after intracerebral hemorrhage in rats through the PI3K/Akt/GSK3beta signaling pathway. *J Cell Physiol.* 2019;234(4):5304-18.
119. Motohashi N, Gollapudi SR, Emrani J, Bhattiprolu KR. Antitumor properties of phenothiazines. *Cancer Invest.* 1991;9(3):305-19.

120. Polliack A, Levij IS. Antineoplastic effect of chlorpromazine in chemical carcinogenesis in the hamster cheek pouch. *Cancer Res.* 1972;32(9):1912-5.
121. Zhelev Z, Ohba H, Bakalova R, Hadjimitova V, Ishikawa M, Shinohara Y, et al. Phenothiazines suppress proliferation and induce apoptosis in cultured leukemic cells without any influence on the viability of normal lymphocytes. Phenothiazines and leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2004;53(3):267-75.
122. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985;150(1):76-85.
123. Herzenberg LA, Parks D, Sahaf B, Perez O, Roederer M, Herzenberg LA. The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. *Clin Chem.* 2002;48(10):1819-27.
124. Laerum OD, Farsund T. Clinical application of flow cytometry: a review. *Cytometry.* 1981;2(1):1-13.
125. Davis EG, Wilkerson MJ, Rush BR. Flow cytometry: clinical applications in equine medicine. *J Vet Intern Med.* 2002;16(4):404-10.
126. Hansel DE, Rahman A, Wehner S, Herzog V, Yeo CJ, Maitra A. Increased expression and processing of the Alzheimer amyloid precursor protein in pancreatic cancer may influence cellular proliferation. *Cancer Res.* 2003;63(21):7032-7.
127. Crowley LC, Scott AP, Marfell BJ, Boughaba JA, Chojnowski G, Waterhouse NJ. Measuring Cell Death by Propidium Iodide Uptake and Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protoc.* 2016;2016(7).
128. Biberoglu K, Yuksel M, Onder S, Tacal O. Effects of toluidine blue O and methylene blue on growth and viability of pancreatic cancer cells. *Drug Development Research.*n/a(n/a).
129. Yang H-Q, Sun Z-K, Yang W-M, Han H-M, Ma J-J, Li W. Effects of rivastigmine on secreted amyloid precursor protein and beta-amyloid secretion in neuroblastoma SK-N-SH cells. *Neurochemical Journal.* 2013;7(3):215-20.
130. Venkataramani V, Rossner C, Iffland L, Schweyer S, Tamboli IY, Walter J, et al. Histone deacetylase inhibitor valproic acid inhibits cancer cell proliferation via down-regulation of the Alzheimer amyloid precursor protein. *J Biol Chem.* 2010;285(14):10678-89.
131. Tousseyn T, Thathiah A, Jorissen E, Raemaekers T, Konietzko U, Reiss K, et al. ADAM10, the rate-limiting protease of regulated intramembrane proteolysis of Notch and other proteins, is processed by ADAMS-9, ADAMS-15, and the gamma-secretase. *J Biol Chem.* 2009;284(17):11738-47.
132. Shariati M, Meric-Bernstam F. Targeting AKT for cancer therapy. *Expert Opin Investig Drugs.* 2019;28(11):977-88.
133. Angevin E, Cassier PA, Italiano A, Goncalves A, Gazzah A, Terret C, et al. Safety, tolerability and antitumour activity of LY2780301 (p70S6K/AKT inhibitor) in combination with gemcitabine in molecularly selected patients with advanced or metastatic cancer: a phase IB dose escalation study. *Eur J Cancer.* 2017;83:194-202.

134. Machl A, Wilker EW, Tian H, Liu X, Schroeder P, Clark A, et al. M2698 is a potent dual-inhibitor of p70S6K and Akt that affects tumor growth in mouse models of cancer and crosses the blood-brain barrier. *Am J Cancer Res*. 2016;6(4):806-18.
135. Suzuki Y, Shirai K, Oka K, Mobaraki A, Yoshida Y, Noda SE, et al. Higher pAkt expression predicts a significant worse prognosis in glioblastomas. *J Radiat Res*. 2010;51(3):343-8.
136. Gasparini L, Gouras GK, Wang R, Gross RS, Beal MF, Greengard P, et al. Stimulation of beta-amyloid precursor protein trafficking by insulin reduces intraneuronal beta-amyloid and requires mitogen-activated protein kinase signaling. *J Neurosci*. 2001;21(8):2561-70.
137. Solano DC, Sironi M, Bonfini C, Solerte SB, Govoni S, Racchi M. Insulin regulates soluble amyloid precursor protein release via phosphatidyl inositol 3 kinase-dependent pathway. *FASEB J*. 2000;14(7):1015-22.
138. Petanceska SS, Gandy S. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor wortmannin alters the metabolism of the Alzheimer's amyloid precursor protein. *J Neurochem*. 1999;73(6):2316-20.
139. Liu Y, Huang Y, Ding J, Liu N, Peng S, Wang J, et al. Targeting Akt by SC66 triggers GSK-3beta mediated apoptosis in colon cancer therapy. *Cancer Cell Int*. 2019;19:124.
140. Sutherland C, Leighton IA, Cohen P. Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *Biochem J*. 1993;296 (Pt 1):15-9.
141. Stambolic V, Ruel L, Woodgett JR. Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics Wingless signalling in intact cells. *Current Biology*. 1996;6(12):1664-9.
142. Cao Q, Lu X, Feng YJ. Glycogen synthase kinase-3beta positively regulates the proliferation of human ovarian cancer cells. *Cell Res*. 2006;16(7):671-7.
143. Kunnimalaiyaan S, Gamblin TC, Kunnimalaiyaan M. Glycogen synthase kinase-3 inhibitor AR-A014418 suppresses pancreatic cancer cell growth via inhibition of GSK-3-mediated Notch1 expression. *HPB (Oxford)*. 2015;17(9):770-6.
144. Haddadi N, Lin Y, Travis G, Simpson AM, Nassif NT, McGowan EM. PTEN/PTENP1: 'Regulating the regulator of RTK-dependent PI3K/Akt signalling', new targets for cancer therapy. *Mol Cancer*. 2018;17(1):37.
145. Chen CY, Chen J, He L, Stiles BL. PTEN: Tumor Suppressor and Metabolic Regulator. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:338.

8. EKLER

EK-1. Orjinallik Ekran Çıktısı

Kolon Kanserinin Tedavisinde Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin Kullanımlarının Değerlendirilmesi ve Etki Mekanizmalarının Araştırılması

ORJİNALLİK RAPORU

% **13**
BENZERLİK ENDEKSİ

% **13**
İNTERNET KAYNAKLARI

% **3**
YAYINLAR

% **6**
ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	% 3
2	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 1
3	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1
4	acikerisim.erdogan.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
5	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	% 1
6	www.istanbulsaglik.gov.tr İnternet Kaynağı	% 1
7	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1
8	acikerisim.akdeniz.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1

EK-2. Dijital Makbuz**Dijital Makbuz**

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Felis Can
Ödev başlığı: Son YL tezi 04.07.22
Gönderi Başlığı: Kolon Kanserinin Tedavisinde Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin ...
Dosya adı: SI_NDE_FENOTI_YAZI_N_YAPILI_BI_LES_I_KLERI_N_KULLANIML...
Dosya boyutu: 30.72M
Sayfa sayısı: 99
Kelime sayısı: 17,904
Karakter sayısı: 120,162
Gönderim Tarihi: 04-Tem-2022 04:15ÖS (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 1866559450



9. ÖZGEÇMİŞ

I-Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı

: Felis CAN