

GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser, çevresel etmenlerden etkilenecek oluşan genetik hasarların birikimi sonucu canlı hücrenin engellenemeyen kötü huylu çoğalmasdır. Doğal yada sentetik kimyasal maddeler, fiziksel etkenler ve virüsler günümüzde kanser etkeni olarak bilinmektedir. Bu etkenler, genetik hasar olarak tanımlanan mutasyonlara yani DNA hasarlarına yol açmaktadırlar. Bu mutasyonların bir çoğu hücre döngüsü hedef genlerinde meydana gelirken bir kısmı ise tümör hücrelerinin buldukları noktalardan taşınmasını ve uzak mesafede yaşamalarını sağlayan anjiyojenik işlemleri uyarmaktadırlar.

İyonize radyasyon ve bazı kimyasallar gibi DNA ve RNA virüsleri de kanser oluşturma yeteneğine sahiptirler.

Yukarıda sözü edilen çevresel nedenlerle yada virüslerin etkisiyle DNA'sı hasar görmüş hücreler, organizmanın zarar görmemesi için programlanmış hücre ölüm mekanizmasını (apoptoz) uyarmaktadırlar.

Bu mekanizma, aşırı hücre bölünmesinden kaynaklanan hücredeki artışın veya işlevsiz yaşlı hücrelerin ortadan kaldırılmasından sorumludur. Apoptotik mekanizmalarda meydana gelen bozukluklar kanser, otoimmün hastalıklar ve hücre azalışına bağlı olarak AIDS ve nörodejenaratif hastalıklara neden olmaktadır.

Genel olarak, apoptoz hücre ölüm reseptörleri yada sirokrom c ve apaf-1 yolu ile uyarılmaktadır. Ölüm reseptörlerinin substratına bağlanması ile aktifleşen ölüm bölgeleri apoptotik sinyal yollarının alt bölgelerinde yer alan enzim ve efektör aktivasyonunu başlatırlar. Sitokrom c ve apaf-1 yolağında ise, DNA hasarının oluşumu ile mitokondri membranının potansiyelinde bozulma gerçekleşir. Bununla birlikte, sitokrom c sitoplazmaya salınır ve daha sonra sitokrom c apaf-1 ile etkileşerek apoptozom denilen yapıları oluştururlar. Bu kompleks inaktif olan prokaspaz-9'un aktif kaspaz-9 haline dönüşümünü sağlamaktadır. Böylelikle, başlatılan aktif kaspaz kaskadı kromatin kondensasyonu ve oligonükleozomal DNA kırılmalarının oluşumuna neden olmaktadır.

İntegrin reseptörleri, hücre-ekstrasellüler yada hücre-hücre etkileşimini sağlarken aynı zamanda hücre yaşamını ve farklılaşmasını etkileyen hücreler arası haberleşmeyi tetikleyen proteinlerdir. İntegrinlerin anoikis için sinyal oluşturdukları bilinmektedir. Bazı integrinler substrata bağlanarak anti-apoptotik sinyal oluşumuna neden olurken bazıları ise aktif olarak apoptotik-uyarıcı sinyal meydana getirmektedirler. Böylece integrinlerin apoptotik mekanizmadaki rolleri belirgin olmayıp özellikle metastazdaki düzenleyici etkilerinin araştırılması son derece önemlidir. Bu nedenle kanserli hücrelerin çeşitli apoptotik uyarıcılara karşı duyarlılık mekanizmalarını geliştirmeleri tedavi için önemlidir. Bu hücrelerin ekstrasellüler proteinlerle etkileşimlerinin ayrıntılı olarak incelenmesi tedavi yollarının aydınlatılmasına olanak sağlayacaktır.

Bu nedenden dolayı tez kapsamında planlanan çalışmanın genel olarak amacı, U2OS osteosarkoma hücrelerinde, cis-platin ile DNA hasarı oluşturulduktan sonra tetiklenen apoptoz mekanizmasının morfolojik ve biyokimyasal olarak belirlenmesi, özgül kaspaz-3 ve kaspaz-9 inhibitörlerinin varlığında kiste duyarlı ELISA yöntemi ile araştırılması, DNA hasarı sonucunda integrin reseptörlerinin

bağlanma fonksiyonlarındaki değişimlerin belirlenmesi, kaspaz-3 ve kaspaz-9 enzimlerinin bu değişimlerdeki fonksiyonlarının incelenmesidir.

KAYNAK BİLGİSİ

KANSER

Kanser, çevresel yada genetik faktörlerin etkisi ile normal bazı genlerin mutasyona uğrayarak fonksiyonlarının bozulması ve buna bağlı olarak da hücrelerin sürekli olarak düzensiz bir çoğalma göstermeleri sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır. Bu hücreler normal hücre davranışını kontrol eden hücresel sinyallere cevap vermek yerine, düzensiz bir şekilde büyüme ve çoğalma, etrafındaki doku ve organları istila etme, farklılaşmamış histolojik yapı gösterme ve uzak dokulara yayılma yeteneğine sahiptirler (http-1).

Anormal çoğalan hücrelerden oluşan tümör, benign yada malign olarak adlandırılır. Benign tümörler, malignant tümörlerin aksine farklı organlara yayılma ve etrafını saran normal dokuları istila etme yeteneğine sahip değildirler (Danen ve ark., 1995).

Erken teşhis ve birincil malignant tümörlerin tedavisi ile kanser hastalarının yaşam süresinin uzatıldığı gösterilmiştir, fakat metastaz halen başarılı bir tedavi için sorun oluşturmaktadır (http-1).

Cerrahi, kemoterapi yada ışın tedavisi yöntemleri ile yaklaşık kanser hastalarının % 50'si tedavi edilebilirken, diğer % 50'sinin ölümüne neden olan kanser mekanizmasının ayrıntılı olarak incelenmesi kanser tedavi metotlarının geliştirilmesi için çok önemlidir ve bu konuda oldukça geniş çalışmalar yapılmaktadır (Nicolson, 1984).

ONKOGENLER

Proto-onkogen adı verilen normal hücresel genler tarafından kodlanan proteinler çeşitli hücresel faaliyetlerde görev almaktadırlar, örneğin, hücre sinyal iletim mekanizmalarında ve hücre büyümesinin düzenlenmesi gibi (Köktürk ve ark., 2003). Bu genler çevresel yada genetik faktörler sonucunda hücre DNA'sında hasar oluşumu ile birlikte fonksiyon değişikliğine uğrarlar ve anormal ve aşırı protein sentezi gerçekleşmektedir. Fonksiyon değişikliğine uğrayan proto-onkogenlere onkogen, protein ürünlerine ise onkoprotein denir (Köktürk ve ark., 2003).

Ras proteini guanozin üç fosfat (GTP) aktivitesine sahip hücre zarı proteindir. Embriyogenez, mitotik artışın olduğu durumlarda ras proteini aktive olmakla birlikte hücre büyümesi ve farklılaşmasında, hücre sinyal iletim mekanizmalarında fonksiyonel olarak role sahiptir. Ras gen ailesi H-ras (Harvey ras), K-ras (Kirsten ras), R-ras, M-ras ve N-ras (Neuroblastoma ras) olmak üzere 5 üyeden oluşmaktadır. Ras onkogeni kanser oluşumunda hücre tipine ve hücre içi efektör proteinlere bağlı olarak etki göstermektedir. İnsan kanserlerinin % 30'unda ras onkogeninin 12, 13 ve 61. kodonlarında nokta mutasyonuna sahip olduğu saptanmıştır (Klug ve Cummings, 2000). Bu kodonlarda meydana gelen mutasyonlar, ras ailesinin aktivitesini değiştirdiğinden, sürekli sinyal aktivitesi oluşmaktadır. Sinyal yolunda meydana gelen bu mitojenik uyarılar, tümör oluşumuna neden olmaktadır (Goeger ve ark., 1997).

Ras proteini sinyal yolunun işleyişine göre apoptoz mekanizmasını inhibe edebildiği gibi diğer taraftan apoptozu uyararak hücre çoğalmasını inhibe edebilmektedir (Downward, 1998).

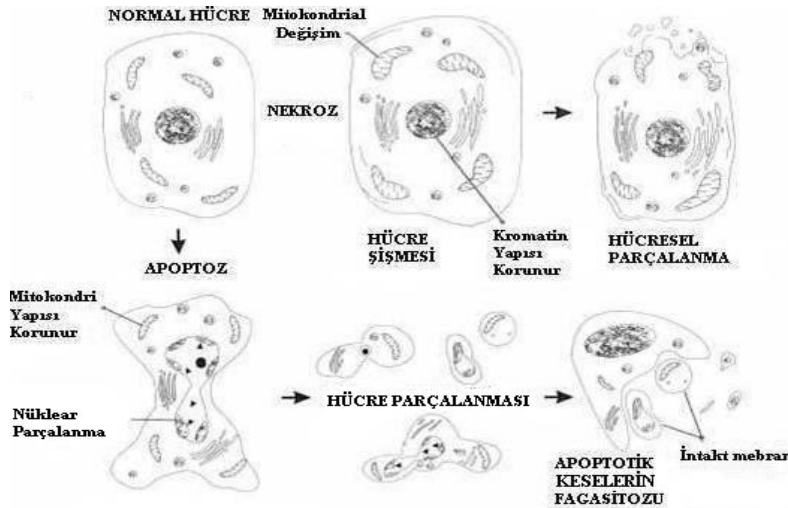
APOPTOZ

Apoptoz sağlıklı doku oluşumu ve gelişimi için gerekli fizyolojik bir mekanizmadır (Kerr ve ark., 1972; Tomei ve Cope, 1991) ve hücre topluluğu içinde istenmeyen hücrelerin uzaklaşmasını sağlayarak organizmanın yaşamsal faaliyetlerinin devamını sağlamaktadır (Kerr ve ark., 1974; Gerschenson ve Rotello, 1992). Bunun yanı sıra, kanser, otoimmün hastalıklar, AIDS, viral enfeksiyon, dejeneratif nöral hastalıklar gibi çok çeşitli hastalıklarda apoptoz mekanizmasının kontrolünde bozukluklar olduğu bilinmektedir (Levine ve ark., 1991; Mattson ve ark., 1992).

Programlanmış hücre ölümü olarak da bilinen apoptozun metabolik olayların devamlılığı için gerekli olan yaşamsal sinyaller yerine komşu hücrelerden ölüm sinyali aldığı veya hücre hasarının yeterli şekilde tamir edilemediği durumlarda uyarıldığı ve bu mekanizmanın genler tarafından düzenlendiği gösterilmiştir (Raff, 1992; Golstein ve ark., 1991).

Apoptozun oluşumu ve gelişimi hücre tipine göre değişmesine rağmen apoptoz mekanizmasının sonuçları benzerdir. Apoptozu uğramış çoğu hücrenin büzülmesi sonucu hacminin azalması gibi morfolojik, nükleozomal parçalanma gibi enzimatik (Tanuma ve ark., 1993; Cohen ve ark., 1992) ve hücreler arası kontakın kaybedilmesi gibi bir çok biyokimyasal değişiklikler gösterdikleri tespit edilmiştir (Wyllie, 1980).

Buna ek olarak, apoptotik hücrelerde kromatin kondensasyonuna bağlı olarak tüm çekirdek içeriği parçacıklar halinde sitoplazmaya dağılmış halde bulunmaktadır. Hızlı şekilde sıvı kaybı olması nedeniyle, apoptotik hücrelerin hücre membranında parçalanmalar oluşur ve sonuç olarak apoptotik keseler olarak bilinen ve içerik olarak sitoplazma, organeller ve DNA parçaları taşıyan yapılar oluşmaktadır. Bu apoptotik keseler ya komşu hücreler yada makrofajlar tarafından endositoz ile ortamdan uzaklaştırılırlar (Huges ve Cildowski, 1996) (Şekil 1).



Şekil 1. Apoptozis ve Nekroz (Pollack ve Leeuwenburgh, 2001)

Apoptozdan farklı bir ölüm şekli olan nekroz ise, hücrenin ve organelerin şişmesi ile karakterize edilir ve bunun sonucunda plazma zarının bütünlüğünün bozulması hızlanır. Plazma zarının parçalanması ile hücre içeriği etrafa yayılır ve iltihap oluşumu riskini artırır. Apoptozda ise bu risk yoktur, çünkü hücre içeriği apoptotik kese denilen vesiküller içinde tutulmaktadır (Huges ve Cildowski, 1996).

Kaspazlar

Apoptozun uyarılması ile, genomik DNA'nın 50-200 kb parçalar halinde kırılması, proteinlerin parçalanması, fosfotidilserinin hücre zarı iç yüzeyinden dış yüzeyine çıkması gibi değişiklikler proteolitik sistem tarafından gerçekleştirilir. Bu sistem içinde proteaz ailesi olarak bilinen kaspazlar (Chang ve Yang, 2000), aktif merkezlerinde sistein amino asiti içeren öncül enzim formunda bulunurlar (Chang ve Yang, 2000; Alnemri ve ark., 1996; http-4). İçerdikleri sistein amino asiti sayesinde substratlarına nükleofilik saldırılar yaparak, her aspartik asit kalıtından sonraki peptid bağlarının parçalanmasına neden olurlar (Alnemri ve ark., 1996).

Yapısal olarak incelendiğinde, kaspazların tümünün proteolitik kısmı yüksek oranda homoloji göstermektedir ve bu kısım 20 kDa (p20) ve 10 kDa (p10) ağırlığındaki iki alt bölümden oluşmaktadır. Bazı prokaspazların yapısında iki alt üniteyi birbirinden ayıran 10 amino asitlik bağlayıcı bölgelerin varlığı tespit edilmiştir (Chang ve Yang, 2000; Thornberry, 1997).

Kaspaz aile üyeleri fonksiyonlarına göre üç grup altında toplanabilirler:

1. Başlatıcı Kaspazlar, bu gruba 2., 8., 9. ve 10. kaspazlar dahildir ve bu kaspazlar pro-apoptotik sinyali alarak, sinyalin alt kısmında kalan diğer kaspaz üyelerinin aktive olmasını sağlarlar. Her biri 100 amino asitten oluşan başlatıcı kaspazlar, transmembran reseptörleri veya sitotoksik etkiye sahip maddeler ile etkileşerek aktif hale geçerler (Krauss, 2001). Bu kaspazlar, adaptör ve düzenleyici proteinlerin farklı kombinasyonları ile etkileşime girerek apoptotik mekanizmanın hücre içerisinde farklı yönlerde devam etmesine neden olurlar. Kaspaz 2'nin aktivasyonu için ölüm bölgesi içeren PIDD (ölüm bölgesi içeren p53 uyarıcı protein) ve adaptör protein olarak da RAIDD' (ölüm bölgesi içeren RIP-ile ilgili protein) nın gerekli olduğu yakın zamanlarda tespit edilmiştir (Tinel ve Tschopp, 2004).

2. Effektör Kaspazlar, bu gruba 3., 6. ve 7. kaspazlar dahildir ve bu kaspazlar çeşitli hücre içi proteinleri enzimatik reaksiyonlarla parçalarlar ve apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar (http-4). Bazı effektör kaspazların bulunuş sebebi tam olarak anlaşılamamıştır (Zheng ve ark., 2000).

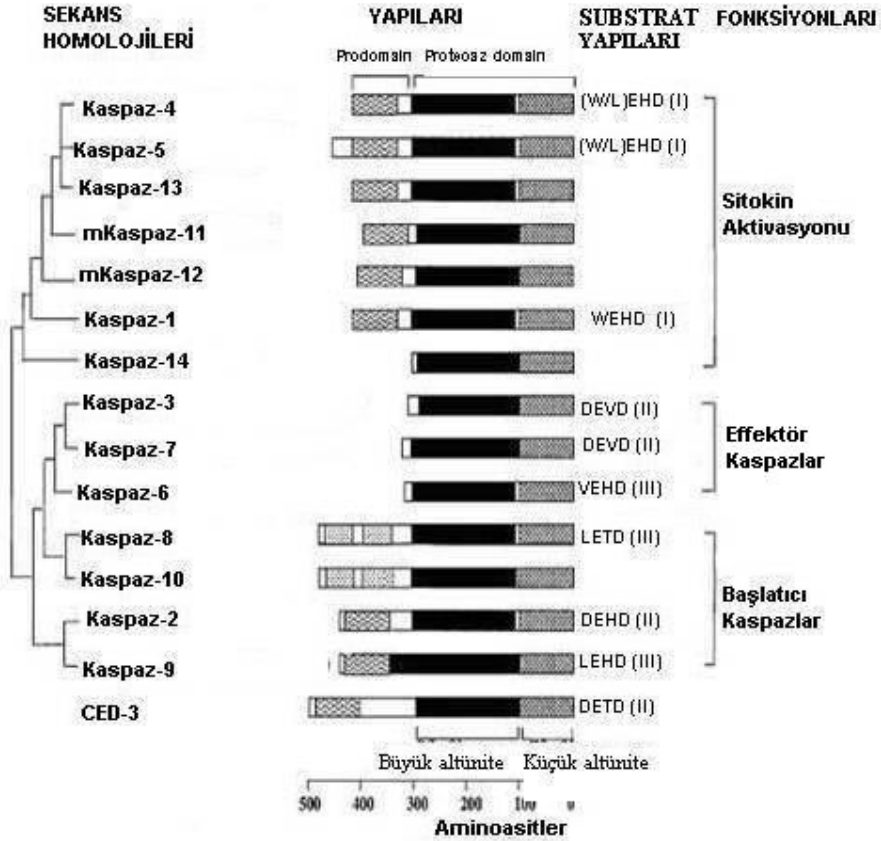
3. Sitokinleri Aktive Eden Kaspazlar ise, hücre sinyal iletiminde önemli role sahip sitokinlerin aktivasyonları için gereklidir. Bu gruba dahil olan Kaspaz 1, interlökin-1 β dönüştürücü enzim (ICE) olarak bilinmekte ve öncül interlökin-1 β 'nin aktif hale geçmesine neden olmaktadır (http-4; Thornberry ve ark., 1992) (**Şekil 2**).

Kaspazların apoptozdaki rolleri sentetik veya doğal inhibitörler kullanılarak tanımlanmış olup (Chang ve Yang, 2000; Schierie ve ark., 1999; Miura ve ark., 1993) bu inhibitörler varlığında apoptozun tamamen bloke edildiği yada

mekanizmanın işleyişinde aksaklıkların olduğu tespit edilmiştir (Chang ve Yang, 2000; Kuida ve ark., 1996; Kuida ve ark., 1998; Varfolomeev ve ark., 1998).

Hücre içinde doğal kaspaz inhibitörlerin haricinde, kaspazların etki çalışmalarında kullanılan ve kaspazların aktif bölgelerine bağlanarak dönüşümlü ya da dönüşümsüz inhibisyon etkisi gösteren geniş sayıda sentetik inhibitör bulunmaktadır. İnhibitörlerin yapısında yer alan aldehit, florometilketon ve klorometilketon gibi fonksiyonel gruplar reaksiyon gerçekleşmesinde önemli rollere sahiptirler (http-3).

Örneğin, Ac-YVAD-CHO (N-Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-aldehit)'nın peptit yapısı kaspaz-1 ve kaspaz-4'ü inhibe etme potansiyeline sahiptir ayrıca, kaspaz-3 ve kaspaz-7 üzerine çok zayıf etkisi olduğu bilinmektedir (http-3). Z-VAD-FMK (N-bezilolksikarbonil-Val-Ala-Asp-florometilketon) inhibitörü ise daha geniş etki spektrumuna sahiptir, kaspaz-1, 3, 4 ve 7 üzerine etkili olduğu gösterilmiştir. DEVD (Asp-Glu-Val-Asp) inhibitörünün ise kaspaz-3'ü inhibe ettiği ve aynı zamanda kaspaz-6,7,8 ve 10 üzerine etkisinin de olduğu gösterilmiştir (http-3).



Şekil 2. Kaspazların Sınıflandırılması (Chang ve Yang, 2000)

Zakeri ve Lockshin (2005) embriyonik gelişim sırasında kaspaz inhibitörlerini kullanarak yaptıkları çalışmada, zVAD-FMK'nın özellikle kaspaz-8'i, YVAD-FMK'nın kaspaz-1'i, DEVD-ZMK'nında kaspaz-3'ü inhibe ettiğini göstermişlerdir.

Yukarıda da belirtildiği gibi kaspazlar, sitoplazmada inaktif öncül-kaspaz formunda bulunurlar ve bunların aktif kaspaz formuna geçmelerini sağlayan değişik mekanizmalar bulunmaktadır. Bu mekanizmalardan birincisi, öncül-kaspaz yapısında yer alan öncül-bölge, yapıdan ayrılır ve geriye heterodimer bir yapı kalır. Daha sonra bu şekilde oluşan iki heterodimer yapı birleşerek iki aktif bölgeye sahip tetramer aktif kaspazı meydana getirir (Krauss, 2001). Prokaspaz-3, 6 ve 7'nin aktivasyonunda olduğu gibi tüm kaspazlar kaspaz kaskatı oluşturularak aktive edilmektedirler (http-2).

İkinci mekanizma, ölüm uyarıcı sinyal kompleksi olarak bilinmektedir ve prokaspazların, ölüm reseptörü-adaptör kompleksine bağlandığı ve bunun sonucunda bölünerek aktif kaspazları oluşturduğu gösterilmiştir (http-2). Üçüncü mekanizmada ise, bir prokaspazın aktif kaspaz formuna geçebilmesi düzenleyici bir alt ünitenin aktivasyonu ile gerçekleştirilir. Örneğin, prokaspaz-9'un aktivasyonu için Apaf-1'in önce sitrokom c ile ATP varlığında birleşmesi, daha sonra ise prokaspaz-9'un bu kompleks ile etkileşerek aktif hale geçmesi gerekmektedir ve bu şekilde oluşan yapıya apoptozom denilmektedir (http-2).

Aktif hale geçen kaspazlar hücre içindeki spesifik substrat molekülleri (**Çizelge 1**) üzerine proteolitik etkiye sahiptirler ve substratlarındaki C-ucundaki aspartik asit kalıtı ve N-ucundaki en az 3 amino asit kalıtını tanıyarak, katalitik reaksiyonun gerçekleşmesini sağlarlar (Krauss, 2001).

Katalitik reaksiyonun ilk basamağında kaspazların aktif merkezlerinde yer alan sistein amino asidinin nükleofilik tiol grubu, substratların aspartik asiti ile tiyoaçil kovalent bir bağ oluşturur. İkinci basamakta ise, histidin amino asitindeki imidazol halkasının yardımıyla amid bağının hidrolizi gerçekleşmektedir (Krauss, 2001) (**Şekil 3**).

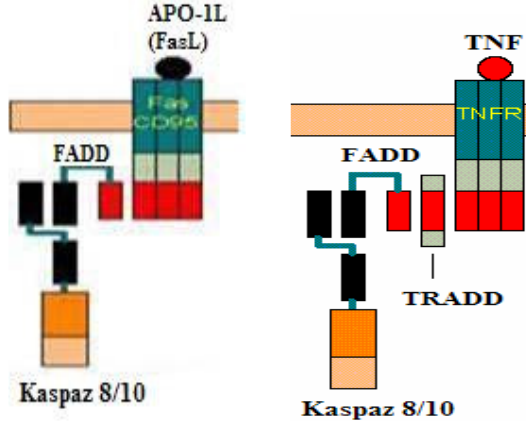
Hücre ölüm proteinleri	Bcl-2, Bcl-x ₁ , Bid, CrmA, IAP, p28 Bap31, p35, Prokaspazlar
Hücre döngüsünde rol oynayan proteinler	Cdc27, Sklin A, MDM2, p21, p27, PITSLRE kinaz Retino blastoma proteini, Wee1 fosfotaz
Hücre iskeleti	Akin, β -Katanin, Fodrin, Gas2, Lamin, Plokoglobin, Gelsolin, Keratin 18 ve 19
Sitokin prekürsörleri	Pro-IL-1 β , Pro-IL-16, Pro-IL-18 (IGIF)
DNA metabolizması ile ilgili substratlar	DNA-bağımlı protein kinaz (DNA-PK), DNA replikasyon kompleksi C (DSEB/RFC140), ICAD, MCM3 DNA replikasyon faktörü, NuMA, PARP, Topoizomeraz 1
Sinir hücreleri proteinleri	APP, Ataksin-3, Androjen reseptörü, Atropin-1, Huntingtin, Preselininler
RNA metabolizması ile ilgili proteinler	Ökaryotik başlatıcı faktör 2 α , Heteronükleer ribonükleer protein C1 ve C2, 70 kDa U1-snRNP
Sinyal proteinleri	Adenomatous poliyfosis coli protein (APC), Akt/PkB, Kalmilin bağımlı kinaz IV, c-Raf, D4-GDP dissociation inhibitör, Fyn tirozin kinaz, Fokal adezyon kinaz, MEKK1, MST/Ksr, PAK-2/hPAK65, Protein kinaz C Δ , Protein kinaz C Φ , protein kinaz C-related kinaz 2, Protein Fosfotaz 2A, Ras GTPaz aktive edici protein
Transkripsiyon faktörleri	Heat shock faktör, GATA-1, I κ B- α , NF- κ B (p50,p65), NFR-2, Sp1, STAT1, Sterol-regulätör element-bağlayıcı protein
Diğer substratlar	Calpastatin, Hsp90, Nedd4, Fosfolipaz A2, Rabaptin-5, Transglutaminaz

Çizelge 1. Kaspaz Enzimlerinin Substratları (Chang ve Yang, 2000)

Apoptoz Mekanizmaları

Hücre tipine ve özelliğine bağlı olarak apoptoz, hücre içinde farklı yollarla aktive edilmektedir.

Ölüm-uyarıcı sinyal kompleksi (DISC) olarak bilinen ve hücre zarı yüzeyinde yer alan Fas-substrat reseptör (APO-1, CD95) ve Tümör Nekroz Faktör Reseptör (TNFR) ailelerine ait reseptörlerin, hücre içine sinyal iletmeleri sonucu apoptoz mekanizması stimüle edilmektedir (Nagata ve Golstein, 1995). Bu sinyal yolunda görev yapan reseptörler, substratları ile etkileşime girdikten sonra, kendi aralarında trimerik bir yapı oluşturmaktadırlar (Ashkenazi ve Dixit, 1998; Wallach ve ark., 1999). Kaspaz-8 ve Kaspaz-10, bu sinyal yolunun aktivasyonu sonucu katalitik etkilerini göstermektedirler. Bu iki kaspaz (**Şekil 4**), ya TNFR'nin aktivasyonu sonucu uyarılır ki bu durumda, ilk önce TNRF'nin yapısında yer alan ölüm bölgeleri, TNRF-bağılı ölüm bölge (TRADD) proteini ile etkileşir (Hsu ve ark., 1995), daha sonra bir adaptör protein (Fas-bağılı protein) yardımı ile TNFR kompleksi, prokaspaz-8 ve prokaspaz-10'a bağlanarak holodimerik bir yapıya dönüşmesini sağlamaktadır. Yada Fas-substrat reseptörünün uyarılması ile prokaspaz-8 ve prokaspaz-10 aktif hale



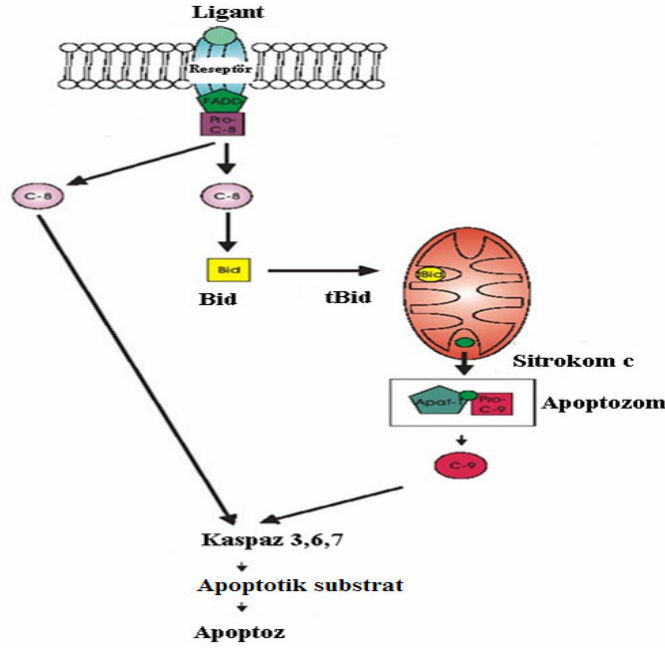
Şekil 4. Kaspaz-8 ve Kaspaz-10'un Hücre Yüzeyi Reseptörleri ile Etkileşimi ([http-5](http://5))

Örneğin, sitoplazma içerisinde lokalize olan Bax protein miktarının DNA hasarına bağlı olarak p53 geninin etkisi ile artması sonucu bu protein oligomerleşerek mitokondriye hareket etmektedir. Sitrokrom c'nin mitokondri dışına çıkmasını ve apoptozun başlatılmasına neden olmaktadır (Zhan ve ark., 1994). Bu mekanizmanın devamında Apaf-1 (Apoptotik proteaz-aktive edici faktör-1) adaptör proteini (Li ve ark., 1997) mitokondri dışına salınan sitrokrom c ile ATP varlığında bağlanmakta ve oligomerizasyon meydana gelmektedir. Bunun etkisiyle prokaspaz-9, ilk önce aktif hale dönüştürülür daha sonraki aşamada ise Kaspaz-3 ve 7 aktifleştirilir (Cain ve ark., 2002) (Şekil 5).

Aktif hale geçen effektör kaspazlar daha sonra substratları ile reaksiyona girerek hücrede apoptotik değişikliklerin meydana gelmesini sağlamaktadırlar. Örneğin; aktifleşen Kaspaz-3, deoksiribonükleaz inhibitörünü (ICAD, Kaspaz tarafından aktive edilen deoksiribonükleaz inhibitör) inaktif hale geçirir, böylece ICAD'ın bağlandığı kaspazla aktifleşen deoksiribonükleazlar (CAD, Kaspaz tarafından aktive edilen deoksiribonükleaz) serbest forma geçer ve buna bağlı olarak da kromatin kondensasyonu ve oligonükleozomal DNA parçalanması oluşmaktadır (Otsu ve ark., 2005).

Apoptotik sinyalin yokluğunda, hücre içinde kaspaz aktivitesi spesifik inhibitörlerle bloke edilmiş durumdadır. Örneğin FADD-benzeri ICE inhibitörü (FLIPs), DISC sinyal yolundaki prokaspaz-8'in aktivasyonunu engellemektedir (Krueger ve ark., 2001; Thornberry ve Lazebnik, 1998).

Apoptoz inhibitörü olarak bilinen IAP ailesi üyelerinden cIAPs, XIAP ve survivin kaspazların inhibisyonundan sorumludur. Bu aileye ait inhibitörler, yapılarında 70 amino asit'den oluşan ve farklı pro-apoptotik proteinlerle etkileşimi sağlayan Bakulovirus IAP tekrar bölgeleri (BIR) içermektedir. Bu bölgeler kaspazların bloke edilmesinde önemli rol oynamaktadırlar (Birnbbaum ve ark., 1994; Crook ve ark., 1993; Deveraux ve Reed, 1999).



Şekil 5. Apoptoz Mekanizmaları (Westphal ve Kalthoff, 2003)

Survivin

IAP ailesinin en küçük üyesi olup, 142 amino asitten meydana gelmiş bir anti-apoptotik proteindir (Altieri, 2003). Homodimerik bir yapıya sahip olup, üç farklı izoformu bulunmaktadır (Bardan ve ark., 2004; Mahotka ve ark., 1999; Conway ve ark., 2000). Survivin-2B, p53 genine bağımlı olarak lösemi hücrelerinin kemoterapiye direncini sağlarken (Zhu ve ark., 2004), survivin Δ Ex3 izoformu ise malignansiyi artırma yeteneğine sahiptir (Mahotka ve ark., 1999). Üçüncü izoform olan survivin 3B'nin ise fonksiyonu tam olarak tanımlanmamıştır.

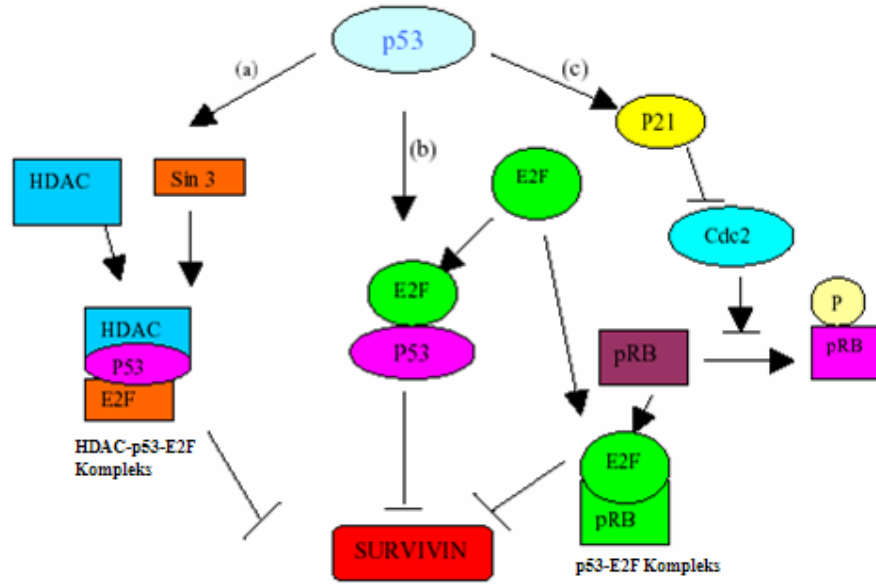
Hücre döngüsünde mitoz bölünmeye bağlı olarak survivin, G2/M evresinde diğer evrelere oranla 10 kat daha fazla sentezlendiği gösterilmiştir (Altieri ve Marchisio, 1999). Çok sayıda farklılaşmış hücrede survivin üretimine rastlanmazken, hızlı bölünen CD +34- kemik iliği hücrelerinde, bazal epitel hücrelerinde ve timositlerde survivin üretildiği tespit edilmiştir (Altieri, 2003; Konno ve ark., 2000; Endoh ve ark., 2001). Kolon, akciğer, meme ve beyin gibi bazı kanser tiplerinde de survivin ekspresyonunun arttığı bilinmektedir, fakat sentez mekanizmasındaki artışın nasıl gerçekleştiği tam olarak anlaşılamamıştır (Sah ve ark., 2006).

Son yapılan çalışmalarda, özellikle pankreas, prostat ve akciğer kanserlerinde p53 ile survivin sentezi sırasında bir bağlantının olduğuna dair kanıtlar bulunmuştur (Mirza ve ark., 2002; Hoffman ve ark., 2002). p53'ün survivin üzerine antagonistik etki göstererek apoptozu uyardığı, bunun yanında survivin proteininde mdm2 ve proteozomları etkileyerek p53 aktivitesini düzenlediği düşünülmektedir (Wang ve ark., 2004). p53'ün survivin üzerindeki negatif etkisini farklı sinyal yolları ile düzenlediği sanılmaktadır. Bu etki p53 tarafından ya HDAC-p53-E2F kompleksi (Mirza ve ark., 2002; Hoffman ve ark., 2002)

oluşturularak E2F-p53 kompleksi yolu ile yada E2F-pRB kompleksi ile sağlanabilmektedir (Şekil 6).

Survivin'in apoptoz inhibitör görevi haricinde hücre bölünmesi sırasında kromozom taşıyıcı protein olarak da görev yaptığı tespit edilmiştir (Adida ve ark., 1998). Survivin, metafaz kromozomlarına bağlanarak kromozomların ayrılmasında ve sitokinezde rol oynamaktadır (Kaitna ve ark., 2000; Skoufias ve ark., 2000; Uren ve ark., 2000; Reiko ve ark., 2003).

Tümör hücrelerinde sentezlenip normal dokularda hemen hemen sentezlenmeyen çok az sayıda proteinlerden bir tanesi olan survivin, kanser belirteci olarak kullanılmaya uygun bir anti-apoptotik proteindir.



Şekil 6. p53 ve Survivin Arasındaki Etkileşim (Sah ve ark., 2006) a) Sin3-HDAC (Histon deasetilaz) etkileşimi, b) p53-E2F kompleks oluşumu, c) pRB-E2F kompleks oluşumu

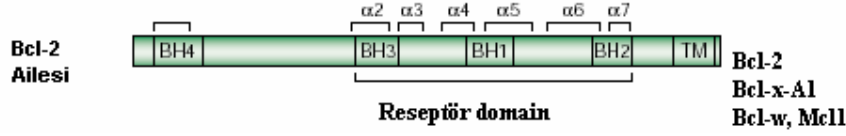
Bcl-2

Bcl-2 proteini yaklaşık 26 kDa ağırlığında (Matsuo ve ark., 1997) bir anti-apoptotik proteindir (Tsujimoto, 1998; Gross ve ark., 1999). α -heliks yapısının uç kısmında yer alan BH-3 bölgesi, diğer moleküller ile etkileşim sağlaması için kullanılmaktadır (Kelekar ve Thompson, 1998) (Şekil 7).

Bcl-2 proteini mitokondri dış zarının sitoplazmik yüzeyinde, endoplazmik retikulum zarında ve çekirdek zarında lokalize olmaktadır (Gren ve Kroemer, 1998). Bcl-2 proteini anti-apoptotik etkisini, mitokondri proteinlerinin, örneğin sitrokrom c (Yang ve ark., 1997; Kluck ve ark., 1997) veya AIF'nın (apoptotik uyarıcı faktör) mitokondriden çıkmasını engelleyerek göstermektedir (Susin ve ark., 1999). Bu engellemeyi de mitokondri zarının potansiyelinin korunmasını sağlayarak başarmaktadır (Susin ve ark., 1999). Pankreas (Talar-Wojnarowska ve ark., 2002), meme, prostat (Iervolino ve ark., 2002), kolorektal (Hague ve ark.,

1994) ve akciğer (Ben Ezra ve ark., 1994) gibi kanser türlerinde bcl-2 proteininin aşırı sentezlendiği tespit edilmiştir.

Pro-survival



Şekil 7. Bcl-2'nin Yapısal Şekli (Cory ve Adams, 2002)

Ekstrasellüler Matriks

Ekstrasellüler matriks (ECM) hücre farklılaşmasında, hücre gelişiminde, apoptoz da, doku oluşumu ve devamlılığının sağlanmasında, tümör oluşumu ve metastaz gibi bir çok normal veya patolojik olaylarda önemli etkiye sahiptirler (Streuli ve ark., 1995; Varner ve ark., 1995; Ruoslahti ve Reed, 1994; Johansson ve ark., 1997).

ECM; glikoproteinler, kollojenler ve proteoglikanlar olmak üzere üç ana bileşikten oluşmaktadır (Villa, 2003).

Glikoproteinler, polipeptit iskeletine kovalan olarak bağlı oligosakkarit zincirleri içeren proteinlerdir (Murray ve ark., 1996). Fonksiyonlarına göre glikoproteinler iki gruba ayrılırlar, ilk grup glikoproteinler yapışkan (adhesive) glikoproteinler olarak bilinirler ve diğer ECM bileşenleri ve hücreler arasında spesifik integrinler yoluyla bağlantı kurarlar. Fibronektin, vitronektin ve laminin bu grubun üyelerindedir. İkinci grup glikoproteinler, hücreler tarafından salınan matrisellüler proteinler olarak bilinirler. ECM bileşenleriyle ve çoklu spesifik hücre yüzeyi reseptörleriyle etkileşerek hücre-matriks etkileşimini sağlarlar. Tenaskin, trombospondin, osteopondin, SPARC (asidik ve sisteince zengin salgılanmış protein) gibi proteinler bu gruba dahil edilmektedir (Raines, 2000).

Kollajenler, genellikle subramolekül kümeler (fibril, filament) şeklinde veya tek başlarına yada diğer ECM bileşikleri ile birlikte bulunmaktadır. En önemli görevleri ECM'nin bütünlüğünün korunması ve hücrelerin matrikse bağlı kalmasına yardımcı olmaktır. Ayrıca sinyal molekülü olarak görev yaparak hücre davranışlarını ve hücreler arası düzenin oluşmasına yardımcı olurlar (Raines, 2000). Kollajen ve hücreler arasındaki iletişim integrinler, diskoidin domain reseptörü ve glikoprotein VI ile sağlanmaktadır (Vogel, 2001).

Proteoglikanlar, kovalan bağlı glikoz-aminoglikanlar içeren proteinlerdir (Murray ve ark., 1996). ECM de bulunmakla birlikte hücre zarının etrafında da bulunurlar. Hücre-hücre ve hücre-ECM tutunumunda etkili oldukları düşünülmektedir (Villa, 2003). Ayrıca hücre göçünde ve sinaptojenesis de etkili oldukları tespit edilmiştir (Bandtlow ve Zimmerman, 2000).

ECM hücre iskeleti ve hücre sinyal yolu ile integrinler sayesinde bağlantı kurmaktadır (Frisch ve Ruoslahti, 1997). İntegrinler ilk olarak 1987 yılında Hynes (Hynes, 1987) tarafından tanımlanmıştır ve α ve β olmak üzere iki alt üniteden oluştuğu tespit edilmiştir (Hynes, 1992). Venter ve ark. (2001) insan genomun da 24 α ve 9 β alt ünitesinin var olduğu gösterilmiştir. ECM integrin etkileşimi sayesinde hücrenin morfolojik değişimi, hücre çoğalması, hücre farklılaşması, gen

ekspresyonu, hücre içi pH değişimi, hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonu kontrol edilebilmektedir (Villa, 2003).

Epitel hücreleri ile yapılan çalışmalarda hücrelerin ECM ile bağlantısını yitirdiklerinde hücrelerin apoptoza gittikleri tespit edilmiştir (Frisch ve Francis, 1994; Khwaja ve ark., 1997) ve buna benzer şekilde, $\alpha\beta3$ integrinin de ECM'de bulunan substratı ile bağlantısını yitirdiğinde kaspaz-8 aktive olup hücreyi apoptoza götürdüğü tespit edilmiştir (Stupack ve ark., 2001; Cheresch ve Stupack, 2002).

İntegrinler aldıkları ekstrasellüler sinyalleri hücre içinde yer alan fokal adezyon kinaz (FAK) (Ilic ve ark., 1998), fosfotidilinositol (PI) 3-kinaz (Lee ve Juliano, 2000) ve mitojen ile aktive olan protein (MAP) kinaz/ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinaz (Howe ve ark., 2002) gibi sinyal proteinlerine aktararak hücre içi sinyal iletim mekanizmalarının uyarılmasına neden olmaktadır.

ECM elemanları, sitokinleri bağlayarak, kanser hücrelerinin bağlanabileceği ve göç edebileceği ortam sağlarlar aynı zamanda hücre yüzey reseptörleri ile etkileşime girerek hücre büyümesi ve yaşamsal sinyal yolları sayesinde tümör hücrelerinin büyümesine katkıda bulunmaktadır (Aznavorian ve ark., 1993; Stetler-Stevenson ve ark., 1993).

Tümör hücrelerinde kendi ekstrasellüler matrix proteinlerini üretip salgılayarak tümör dokusu etrafındaki kompozisyonu oluşturdukları gösterilmiştir. Oluşan bu kompozisyon sayesinde tümör hücreleri hücre çoğalması, farklılaşması ve ölümü ile ilgili spesifik büyüme faktörlerini seçerler (Vasaturo ve ark., 2005).

GEREÇLER

Kullanılan Maddeler

% 70 etanol solüsyonu, akridin oranj, bovin serum albümin, cis-platin, dimetil sülfoksit (DMSO), etidyum bromür (Sigma, Almanya), gliserol, MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difenil tetrazolyum bromür), flurosan işaretli hücre ölüm kiti, kolorimetrik hücre ölüm kiti, hücre proliferasyon kiti (Roche, İsviçre), NP-40, penisilin-streptomisin solüsyonu, sodyum bikarbonat, sodyum klorür, McCoy's 5a besiyeri, L-glutamin, fetal sığır serumu (Gibco, İngiltere), metanol (Merck, Almanya), glisin (Appllichem, Almanya), tripsin/EDTA (Biological Industries, İsrail), kaspaz-9 inhibitörü I, kaspaz-3 inhibitörü I (Calbiochem, Almanya), trombospondin-1, fibronektin (Roche, İsviçre), kollajen (Sigma, ABD).

Sarf Malzemeler

5 ve 10 ml'lik plastik pipetler (HBG, İngiltere), 10, 100, 1000 ve 5000 µl'lik pipet uçları (Gilson, Fransa), 1000 µl'lik mikro santrifüj tüpü (Eppendorf, Almanya), lamel, lam, thoma lamı (Marienfeld, Almanya), 25 ve 75 cm² flask, 96 kuyucuklu plakalar, 15 ve 50 ml'lik santrifüj tüpü (TTP, İsviçre), steril petri kapları (Corning, ABD), polistiren yuvarlak tabanlı tüp (Falcon-Becton Dickinson, Almanya).

Kullanılan Cihazlar

Elisa cihazı (ELx808-IU) (Bio-Tek, ABD), hassas terazi (Ohaus, ABD), immüno-floresan mikroskop ve fotoğraf ataçmanı (Olympus, ABD), invert mikroskop (Olympus, ABD), karbondioksit inkübatörü (Heraeus, Almanya), kuru hava sterilizatörü (Heraeus, Almanya), manyetik karıştırıcı (Heidolph, Almanya), mikro santrifüj (Eppendorf, Almanya), otoklav (Hirayama, Japonya), megafuge 1.0/1.0R santrifüj (Heraeus, Almanya), spektrofotometre (UV-1208, Shimadzu, Japonya), steril kabin (Holten, İngiltere).

YÖNTEMLER

Hücre Kültürü ve Bileşiklerin Hazırlanması

U2OS osteosarkoma hücreleri İngiltere'deki ATTC (Amerikan Doku Kültürü) hücre bankasından sağlanmıştır. Bu hücre tipi 1964 yılında J.Ponten ve E.Saksela tarafından 15 yaşında bir kızın tibia tümöründen elde edilmiştir.

Hücreler, % 10 fetal sığır serumu, % 1 penisilin streptomisin, % 1 L-glutamin içeren McCoy's 5a solüsyonu içerisinde 37 °C'de % 5 CO₂ ve % 95 hava içeren atmosfer ortamında kültürde tutulmuşlardır. Hücreler 1:3 oranında 2x tripsin/EDTA solüsyonu ile alt kültürlere ayrılmışlardır.

Hücre Proliferasyon Deneyi

Tripsinlenerek kültür ortamından toplanan hücreler, toma lamda sayıldıktan sonra, her bir hücre konsantrasyonundan 4 kuyucuk olacak şekilde 96 kuyulu plakalara ekim yapılmıştır. Hücreler 24, 48, 72 ve 96 saat 37 °C'de inkübasyona maruz bırakıldıktan sonra her kuyucuğa % 1 BrdU içeren besiyerinden 20 µl eklenerek 37 °C'de 2 saat bırakılmışlardır. 2 saat sonunda, 200 µl Fix-Denat hücrelere eklenerek 30 dk fiksasyona tabi tutulmuşlardır. Daha sonra, her bir kuyucuğa 100 µl Anti-BrdU konulup 90 dk bekletilmiştir. 1x PBS ile 3 defa yıkama işleminden

sonra her kuyucuğa 100 µl substrat solüsyonu konularak 20 dk reaksiyon için bekletilmiştir ve bu süre sonunda ELx808-IU Bio-Tek plaka okuyucu da 340 nm dalga boyunda okutulmuştur.

Sitotoksosite Deneyi

1×10^4 hücre/ml McCoy's solüsyonu içerisinde süspansiyon haline getirildikten sonra 200 µl hücre süspansiyonu 96 kuyulu hücre kültürü tabakalarının her kuyucuğuna aktarılmış ve aynı zamanda hücrelere final konsantrasyonu 19.2, 9.6, 4.8, 2.4, 1.2, 0.6, 0.30, 0.15, 0.075, 0.0375 µM olarak hazırlanan cis-platin eklenerek 37 °C' de inkübe edilmişlerdir. 24, 48 ve 72 saat inkübasyon süresi sonunda her bir kuyucuğa 20 µl MTT boyası (5mg/ml) eklenmiş ve 2 saat 37 °C' de inkübasyona devam edilmiştir. Canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan tuzlarının çözülmesi için her bir kuyuya 200 µl DMSO eklenerek 10 dk oda ısısında inkübe edilmişlerdir. Renk değişimi, ELx808-IU Bio-Tek plaka okuyucu da 540 nm dalga boyu ile belirlenmiştir. Her bir konsantrasyon deney içerisinde dört farklı kuyuda tekrarlanmıştır. Bileşen ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılığı % 100 olarak kabul edilerek, deney hücrelerinin canlılık oranları % olarak ifade edilmiştir (Zeytinoglu ve ark., 2003).

Akridin Oranj Boyama

Tripsinlenen hücreler hemositometrede sayılarak 1×10^6 hücre/ml gelecek şekilde hücre solüsyonu hazırlanmıştır. 1 ml hücre solüsyonu, steril lamellerin yerleştirildiği cam petri kaplarına aktarılmıştır. Bu aşamada önceden belirlenen konsantrasyonlardaki cis-platin hücrelere eklenerek belli zaman aralıklarında 37 °C de inkübatör ortamında tutulmuşlardır. Bu sürenin bitiminde hücreler 3 defa 2 dk süre ile 1xPBS solüsyonu ile yıkanmıştır. Son yıkama işleminden sonra, cam petrilere 1 ml % 70 etanol eklenerek 5 dakika oda ısısında inkübe edilmişlerdir ve daha sonra 5 defa distile su ile yıkama işlemine tabi tutulmuşlardır. 2 dk 1xPBS'de bekletilen hücreler 1:10 oranında 1xPBS içerisinde seyreltilen 200 µl Akridin oranj (100 µg/ml) ve Etidyum bromür (100 µg/ml) karışımı ile oda ısısında 5 dk inkübe edilmişlerdir. Hücreler 1xPBS ile yıkama işlemine tabi tutulduktan sonra lam ile preparat hazırlanmıştır. Bu aşamadan sonra preparatlar ya hemen floresan mikroskop ile incelemeye alınmış yada +4 °C de 1 hafta saklanmıştır (Cotter ve Martin, 1996).

Tunel Deneyi

Hücreler 1200 rpm de 6 dk santrifüj edilmiş ve toma lamında sayılmışlardır. Her bir kuyucuğa 9×10^3 hücre gelecek şekilde ekim yapıldıktan sonra kuyucuklardan solüsyonlar uzaklaştırmış ve gutaralaldehit ile 1 saat oda sıcaklığında fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra hücreler hafifçe 1xPBS ile yıkanmış ve buz üzerinde (2-8 °C) permabilizasyon solüsyonu ile 2 dk inkübe edilmişlerdir. Bu aşamadan sonra lameller 2 kez PBS ile yıkandıktan sonra kuyucuklar kurutulmuştur ve lameller üzerine 50 µl TUNEL reaksiyon karışımı konulmuştur. Ayrıca negatif kontrol olarak kullanılacak lameller üzerine sadece 50 µl işaret solüsyonundan aktarılmış ve 1 saat 37 °C de inkübe edildikten sonra 3 kez PBS ile yıkanmışlardır. Son aşama olarak lameller ters çevrilerek lamaların üzerine tırnak cilası ile yapıştırılarak immüno floresan mikroskopta 515-550 nm dalga boyunda görüntülenmişlerdir.

Fluoresan-İşaretleme Yöntemi ile Apoptozun Tespiti

200µl solüsyon içerisinde 1×10^3 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara konulmuş ve istenilen konsantrasyonlardaki inhibitörler kuyucuklara eklenerek 1 saat 37 °C de inkübe edilmişlerdir (Del Bello ve Valentini, 2004). Daha sonra 2.4 µM konsantrasyonundaki cis-platin kuyulara eklenerek hücreler 48 saat 37 °C de inkübatör ortamında tutulmuşlardır. 48 saat sonunda 10 dk 200 g'de santrifüj edilerek nekrotik hücreleri içeren üst kısım kuyucuklardan uzaklaştırılmış ve her kuyucuğa 200 µl lizis solüsyonu konularak 30 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda plaka tekrar 200 g 'de santrifüj edilerek üstte oluşan ve apoptoza gitmiş hücrelerin mono ve oligo nükleozomlarından 20 µl alınarak streptavidin ile kaplı kuyucuklara konulmuştur.

Sonraki aşamada her kuyucuğa 80 µl immüno reaksiyon solüsyonu konularak 2 saat oda sıcaklığında inkübe edilmişler ve bu süre sonunda hücreler yıkama solüsyonu ile 3× kere yıkandıktan sonra 100 µl substrat solüsyonu eklenmiş ve 15 dk karanlıkta oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Daha sonra hücreler 450 nm dalga boyunda EL×808-IU Bio-Tek plaka okuyucu da okutulmuştur.

Ekstrasellüler Matriks ile Kaplama

Ekstrasellüler protein olarak fibronectin, kollajen ve trombospondin-1 kullanılmıştır. Lameller 10 µg/ml fibronectin, 10 µg/ml trombospondin-1 yada 4 µg/ml kollajen ile +4 °C bir gece inkübasyona tabi tutulmuşlardır.

İstatistiksel Değerlendirme

Deney sonuçları, SPSS (Statistic Program for Social and Science) istatistik programında günler ve gruplar parametrelerine karşı tek yönlü ANOVA ve Post-Hoc testlerinden Tukey kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

U2OS Osteosarkoma Hücrelerinin Büyüme Eğrisinin Belirlenmesi

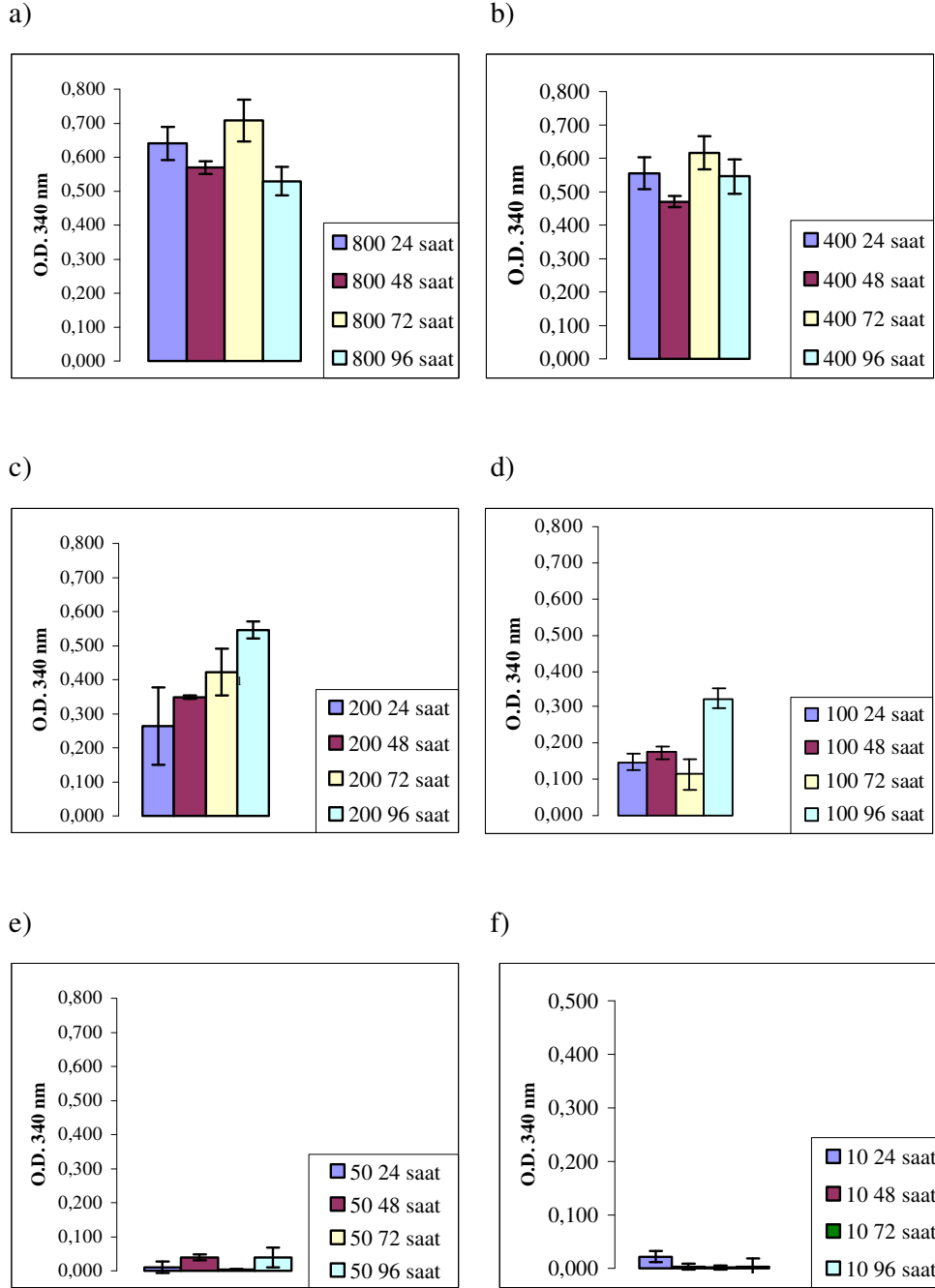
100 µl de farklı konsantrasyonlardaki (8×10^2 , 4×10^2 , 2×10^2 , 1×10^2 , 5×10^1 ve 1×10^1) U2OS hücreleri 24, 48, 72 ve 96 saat inkübe edildikten sonra zamana bağlı DNA sentezindeki artış kolorimetrik olarak (BrdU) ELISA okuyucusu ile 340 nm de tespit edilmiştir.

Başlangıç hücre sayılarına bağlı olarak değişen U2OS büyüme eğrileri **Şekil 8** 'de verilmiştir.

8×10^2 ve 4×10^2 hücre sayısı ile başlandığında hücre çoğalmasının 72 saat sonra sırasıyla 0.708 ve 0.616 O.D. değerlerine yükseldiği tespit edilmiştir. Fakat 96 saat sonunda her iki değerde azalmanın başladığı gözlenmiştir (**Şekil 8a,b**).

Başlangıçta hücre sayısı 2×10^2 yada 1×10^2 alındığında ise, DNA sentezinde zamana bağlı artışlar gözlenmiştir. Özellikle hücre sayısının 2×10^2 olduğunda, hücre çoğalmasının 24 saat sonra 0.264, 48 saat sonra 0.349, 72 saat sonra 0.422 ve 96 saat sonrada 0.546 O.D. değerine yükseldiği bulunmuştur (**Şekil 8c**).

Başlangıç hücre sayısı 5×10^1 yada 1×10^1 'e düşürüldüğünde ise BrdU bağlanma oranı düşük seviyelerde tespit edilmiştir (**Şekil 8 e,f**).



Şekil 8. U2OS Hücre Büyüme Eğrisi. % 10 FCS içerisinde büyütülen farklı konsantrasyonlardaki (8×10^2 (a), 4×10^2 (b), 2×10^2 (c), 1×10^2 (d), 5×10^1 (e), 1×10^1 (f)) U2OS hücreleri 96 kuyulu plakalara aktarılmıştır. 24, 48, 72 ve 96 saat 37°C de inkübe edilmişlerdir. Her zaman dilimi sonunda hücreler BrdU ile 2 saat inkübasyon ortamında tutulmuşlardır. Her bir sonuç noktası 4 farklı kuyunun ortalamasını tanımlamaktadır ve deney iki kez tekrarlanmıştır. Anlamlılık değeri $p < 0.05$, Ortalama değer \pm St. Hata (n=4)

U2OS Hücreleri Üzerine Cis-platinin Sitotoksik Etkileri

U2OS hücreleri 2× tripsin ile kültür ortamından toplanarak, 96 kuyulu plakalara 1×10^4 /ml olacak şekilde ekim yapılmıştır. Daha sonra, farklı konsantrasyonlardaki (19.2, 9.6, 4.8, 2.4, 1.2, 0.6, 0.30, 0.15, 0.075, 0.0375 μM) cis-platin ile hücreler 24, 48 ve 72 saat 37 °C de inkübe edilmişlerdir. Sitotoksik etkinin tespiti için kullanılan MTT boyası, canlı hücre mitokondrial dehidrogenaz enzimlerinin etkisi ile renkli formazan tuzlarına dönüşmektedir (Zeytinoğlu ve ark., 2003).

Konsantrasyona bağlı sitotoksik etki **Şekil 9**'da gösterilmiştir. U2OS hücrelerinin 0.0375-0.6 μM konsantrasyonlarında cis-platin ile 24 saat inkübasyon sonucu % 3-5 oranında sitotoksik etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Cis-platin konsantrasyonunun artması ile sitotoksik etkininde paralel olarak artışı gösterilmiştir (1.2 μM - % 26; 2.4 μM - % 17.5; 9.6 μM - % 40 ve 19.2 μM - % 47 sitotoksik etki). 48 saatlik inkübasyon sonrasında ise, en yüksek cis-platin konsantrasyonunun 24 saate oranla iki kat daha sitotoksik olduğu bulunmuştur (% 86 sitotoksik etki ve $p < 0.05$). Aynı şekilde 9.6 μM – 0.0375 μM konsantrasyon aralığı ile muamele edilen U2OS hücreleri % 90 - % 14 arasında sitotoksik etki göstermiştir. 48 saat inkübasyon sonunda, IC_{50} değeri 4 μM olarak tespit edilmiştir (**Şekil 9**).

İnkübasyon süresinin 72 saate uzatılması ile de U2OS hücrelerinin cis-platine karşı gösterdiği sitotoksik etki konsantrasyona bağlı olarak % 100 ile % 27 arasında değişmektedir.

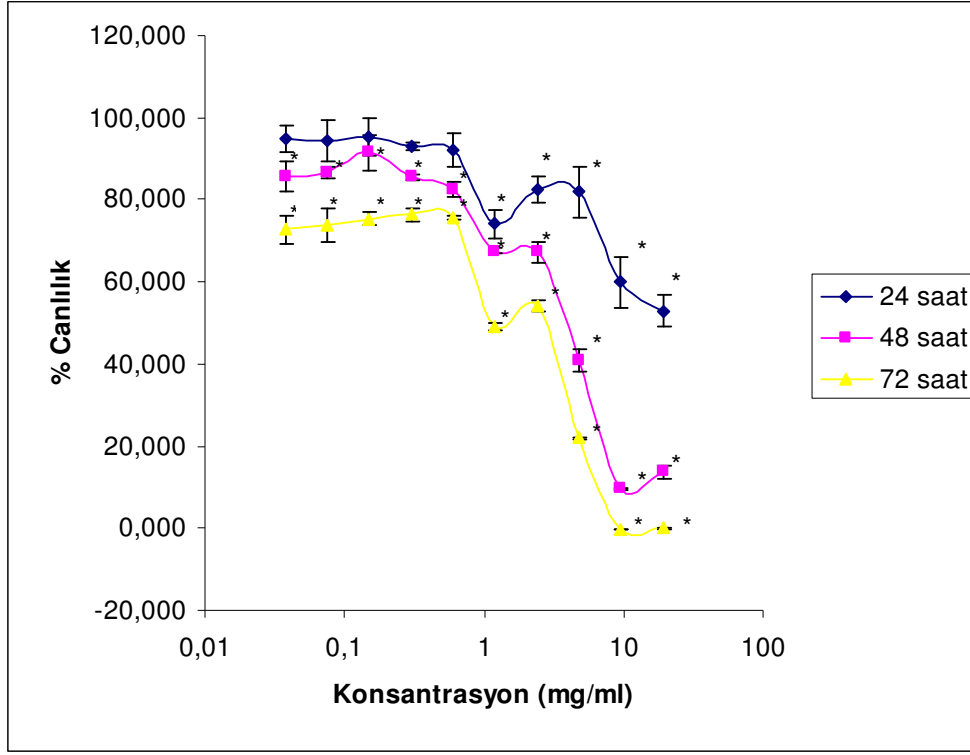
Bu zaman aralığındaki IC_{50} değeri ise 1.2 μM olarak tespit edilmiştir.

Benzer şekilde, TC71 insan Ewing's sarkoma hücreleri ile 48 saat inkübe edilen cis-platinin IC_{50} değeri 630 nM olarak tespit edilmiştir (Zhou ve ark., 2001).

Bunun aksine farklı kanser hücre tipleri kullanılarak sitotoksik etki çalışmaları sonucunda ise, cis-platinin IC_{50} değerinin % 15-20 oranında daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Örneğin, insan akciğer kanser hücreleri (Bel-7402) yada insan fibrosarkoma hücreleri (HT-1080) üzerine cis-platin sitotoksik etkileri incelendiğinde, 24 saat sonra IC_{50} değerlerinin sırasıyla 73.3 μM ve 63.3 μM olduğu tespit edilmiştir (Li ve ark., 2006).

Aynı şekilde, H460, H125, H661 ve M6H7 hücrelerinde ise IC_{50} değeri sırasıyla 8.35 μM , 14.22 μM , 10.35 μM , 7.7 μM olarak bulunmuştur (Paterson ve ark., 1998). Cis-platinin yüksek toksisitesine rağmen metastatik osteosarkoma üzerine diğer kemoterapik ilaçlardan (Örn., Karboplatin) daha etkili olduğu saptanmıştır (Daw ve ark., 2006).

Bu çalışmada belirlenen sitotoksik etkinin (48 saat IC_{50} değeri 4 μM), literatürde yer alan çeşitli hücre tiplerine ve özellikle osteosarkoma hücrelerine kıyasla daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu farkın hem hücre tipine hemde deneysel uygulamadaki farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 9. Cis-platin'in U2OS Hücre Canlılığına Etkisi. 1×10^4 / ml hücre 96 kuyucuklu tabakalara ekildikten sonra 19.2, 9.6, 4.8, 2.4, 1.2, 0.6, 0.3, 0.15, 0.075, 0.0375 μ M konsantrasyonlarında cis-platin ile 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmişlerdir. Her bir veri 4 bağımsız kuyucuğun ortalamasını temsil etmektedir. Kontrol grubunun hücre çoğalma yüzdesi % 100 olarak kabul edilmiştir. Anlamlılık değeri $p < 0.05$, Ortalama değer \pm St. Hata (n=4)

Apoptozun Morfolojik Olarak Belirlenmesi

Cis-platin ile uyarılan U2OS hücre apoptozu, sitoplazmik boya olan akridin oranj ve DNA boyası olan etidyum bromür karışımı kullanılarak hücre morfolojisindeki değişimler gözlenmiştir (Şekil 10).

MTT deneyi ile tespit edilen IC_{50} değeri dikkate alınarak seçilen cis-platin konsantrasyonları (38.4, 19.2, 2.4 μ M) ile hücreler 48 saat inkübe edildikten sonra erken apoptotik hücreler floresan mikroskop yardımıyla incelenmiştir. Cis-platinsiz U2OS hücreleride kontrol hücreleri olarak değerlendirilmiştir (Şekil 10a).

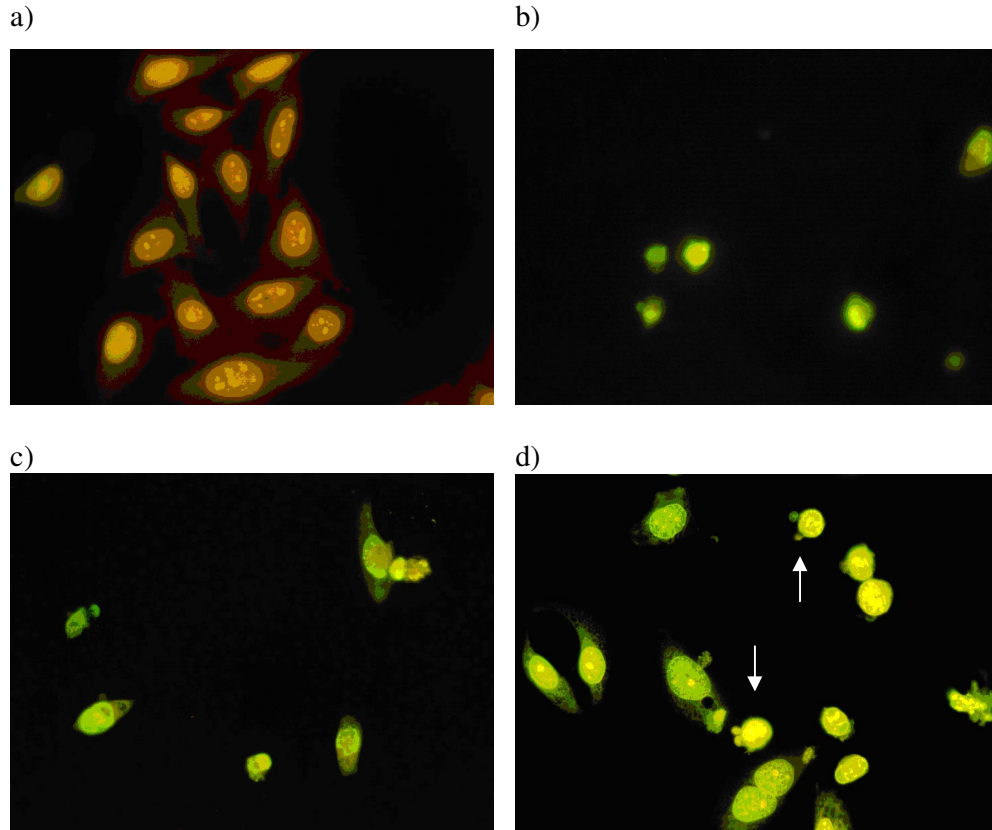
38.4 veya 19.2 μ M cis-platin ile muamele edilen hücrelerde ölüm oranının yüksek olmasından dolayı, çok sayıda hücre, morfolojik olarak incelenemediği gibi gözlenen hücrelerde de apoptotik özellikler tespit edilememiştir (Şekil 10 b ve c). Bunun tersine, 2.4 μ M cis-platin ile 48 saat inkübasyona tabi tutulan U2OS hücrelerinde sitoplazmik küçülme, hücre zarı tomurcuklanması ve apoptotik kesecikler gibi apoptozun morfolojik değişimler gözlenmiştir (Şekil 10d).

Bu koşullar altında, toplam 478 hücreden 115'inin apoptotik özellikler gösterdiği tespit edilmiştir (Apoptotik indeks = 24). Kontrol hücrelerinde ise 484 toplam

hücreden yalnızca 28'nin apoptotik olduğu belirlenmiştir (Apoptotik indeks = 5.8).

Aynı şekilde cis-platin ile muamele edilen A549 (insan akciğer kanser hücresi) hücreleri kullanılarak yapılan morfolojik çalışmada, cis-platin'in A549 hücrelerinde kromatin kondensasyonu ve DNA parçalanmasına neden olduğu tespit edilmiştir (Kosmider ve ark., 2004).

Elde edilen sonuçlar, literatürde yer alan çalışmalarını destekler yöndedir. 2.4 μM cis-platinin 48 saat inkübasyonu sonucu U2OS hücrelerinde morfolojik olarak apoptozu uyardığı tespit edilmiştir.



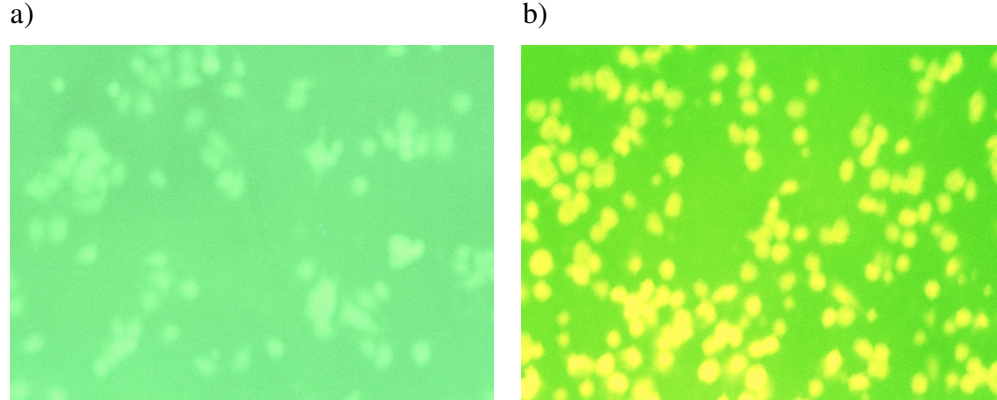
Şekil 10. Cis-platinin U2OS Hücreleri Üzerine Morfolojik Etkileri. U2OS hücreleri 48 saat 38.4, 19.2 ve 2.4 μM cis-platin ile inkübasyona tabi tutulduktan sonra akridin oranj / etidyum bromür ile boyanıp floresan mikroskopta (Olympus) incelenmiştir. a) kontrol hücreleri; b) 38.4 μM cis-platin ile 48 saat inkübe edilmiş hücreler; c) 19.2 μM cis-platin ile 48 saat inkübe edilmiş hücreler ; d) 2.4 μM cis-platin ile 48 saat inkübe edilmiş hücreler

Apoptozun Nüklear Boya ile Belirlenmesi

Cis-platinin neden olduğu U2OS hücre apoptozu TUNEL boyama yöntemi ile incelenmiştir. 48 saat inkübasyon sonunda kontrole kıyasla TUNEL-pozitif nüklear boyamada artış olduğu gözlenmiştir (Şekil 11).

Benzer şekilde farklı konsantrasyonlardaki (25, 50 ve 100 μM) cis-platin ile muamele edilen LLC-PK1 hücrelerinde de nüklear boyama ile DNA parçalanmasının olduğu gözlenmiştir (Liu ve Baliga, 2005).

Bu kapsamda elde edilen sonuçlar, cis-platin muamelesinin morfolojik apoptozun yanı sıra U2OS hücrelerinde nüklear düzeyde DNA parçalanmasına da neden olduğu gösterilmiştir. Bu hücrelerde apoptoz yalnızca erken düzeyde kalmayıp nüklear apoptotik mekanizmanında indüklendiği düşünülmektedir.



Şekil 11. Apoptotik U2OS Hücrelerinin Transferaz-Düzenleyici dUTP (TUNEL) ile Belirlenmesi. 48 saat 2.4 μM cis-platin ile muamele edilen apoptotik hücreler floresan çekirdek boyası ile tanımlanmıştır. a) Kontrol U2OS hücreleri (20×), b) 48 saat 2.4 μM cis-platin ile muamele edilmiş U2OS hücreleri (20×)

Cis-platin'in U2OS Hücrelerinde Apoptozu Uyarması

U2OS hücrelerinin morfolojisindeki erken apoptotik değişimlerin belirlenmesinden sonra, geç apoptotik evrelerin oluşumunu göstermek amacı ile cis-platin (2.4 μM-48 saat) ile muamele edilen hücre DNA'sı Anti-DNA-peroksidaz ile işaretlenmiştir. İşaretli hücre DNA'larının absorbansları 450 nm'de plaka okuyucuda ölçülmüştür. **Şekil 12'**de görüldüğü gibi, 2.4 μM cis-platin ile inkübe edilen U2OS hücreleri, 0.615 absorbans gösterirken, cis-platinsiz kontrol hücre absorbansının 0.177 olduğu bulunmuştur. Deneysel koşullarda cis-platinin U2OS hücre DNA'sında kontrole oranla anlamlı bir kırılmaya neden olduğu tespit edilmiştir. Pozitif kontrol (mono ve oligo nükleozomalar)'ün absorbans değeri ise 0.696 olarak ölçülmüştür.

Cis-platinin ve cis-platin çoklu kompleksi, BBR 3464 kullanılarak yapılan çalışmada, U2OS hücrelerinin cis-platin ile 1 saat muamelesi sonucunda % 15 apoptotik oran tespit edilirken, BBR 3463'ün % 3'lük bir apoptotik orana neden olduğu tespit edilmiştir (Gatti ve ark., 2002).

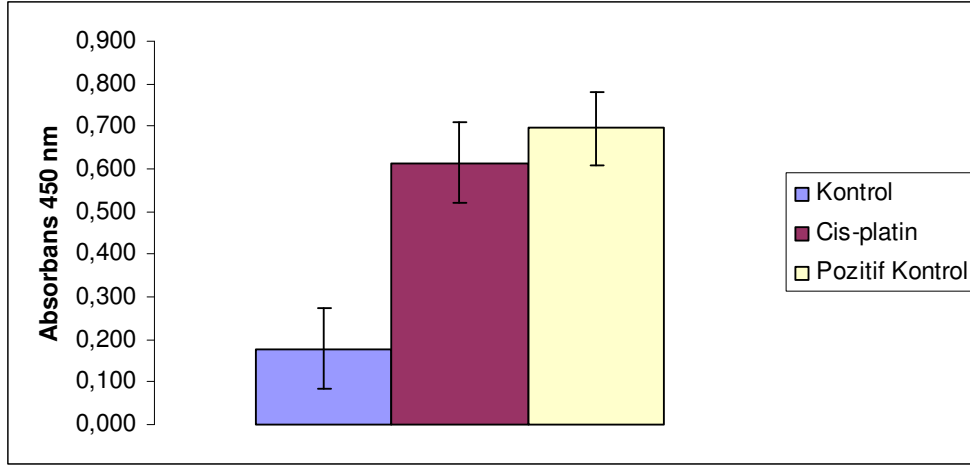
Benzer şekilde, 40 μM cis-platinin 24 saat U2OS hücreleri ile inkübasyon sonucunda apoptotik oranın % 30 olduğu akım sitometresi ile gösterilmiştir (Mirandola ve ark., 2006).

Bu bölümde elde edilen sonuçlar literatür deki çalışmalarını ile paralellik göstermektedir.

Daha düşük konsantrasyonlarda 48 saat inkübasyon sonucu apoptotik oranın bazal düzeyden 3 kat daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

Yukarıda bahsedilen her iki çalışmada da yüksek konsantrasyonlar kullanılmasına rağmen (40-50 μM cis-platin) kısa inkübasyon aralıkları uygulanmıştır. Bu tez

kapsamında da cis-platinin düşük konsantrasyonu (4 µM) kullanılarak inkübasyon süresi uzatılmış ve elde edilen apoptotik oranın benzer olduğu gözlenmiştir.



Şekil 12. U2OS Hücre Apoptozunun Cis-platin ile Uyarılması. U2OS hücreleri cis-platin (2.4 µM) ile 48 saat uyarılmış ve DNA kırılım oranı ELISA- Hücre Ölüm Kiti ile belirlenmiştir. Her bir veri bağımsız yapılan üç deneyin ortalamasını göstermektedir

Cis-platin ile Uyarılan U2OS Hücre Apoptozunda Kaspaz-3 ve -9'un Rolü

Cis-platin ile uyarılmış U2OS hücreleri, farklı konsantrasyonlardaki kaspaz-3 ve kaspaz-9 inhibitörleri ile muamele edildikten sonra toplanan lizatlar, fotometrik enzim-immünoassay ile kalitatif ve kantitatif olarak *in-vitro* ortamda sitoplazmik nukleozom-DNA kompleksinin 450 nm'de ölçülmesi ile tespit edilmiştir.

1×10⁴ ml/hücre 96 kuyucuklu tabakalara aktarıldıktan sonra farklı konsantrasyonlardaki (100-50-25-10 µM) kaspaz-3 (Ac-Asp-Glu-Val-Asp-CHO) ve kaspaz-9 (Z-Leu-Glu(OMe)-His-Asp(OMe)-CH₂F) inhibitörleri ile 1 saat 37⁰ C de inkübasyona tabi tutularak (Del Bello ve Valentini, 2004) enzim aktivitesinin baskılanması sağlanmıştır.

2.4 µM cis-platin ile muamele edilen U2OS hücrelerindeki DNA parçalanma oranı % 87.3 bulunurken (**Şekil 13a**), bu oran 100 µM, 50 µM yada 25 µM kaspaz-3 inhibitörü varlığında sırasıyla % 85.5, % 80.4 ve % 94.1 olarak tespit edilmiştir. İnhibitör konsantrasyonun 10 µM düşürülmesi ile de DNA parçalanma oranı % 46.9 bulunmuş ve anlamlı bir düşüş gözlenmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan nukleozomal DNA parçalanma oranı % 100 kabul edilirken, bazal düzey olarak alınan kontrol hücrelerindeki (cis-platinsiz) DNA parçalanma oranı ise % 19.5 olarak ölçülmüştür.

Del Bello ve Valentini (2004) yaptıkları çalışmada cis-platin ile muamele edilen Me665 melanoma, HeLa (Rao ve ark., 2005) ve SK-NEL-2 (Park ve ark., 2005) hücrelerinde kaspaz-3 inhibitörünün enzim aktivitesini kontrol hücre seviyesine indirdiğini göstermişlerdir.

Kaspaz-9 inhibitörü, kaspaz-3'den farklı olarak konsantrasyona bağlı bir etki göstermiştir. 100 µM kaspaz-9 inhibitörü ile DNA parçalanma oranı % 33.1 iken

bu oran konsantrasyona bağlı olarak artmıştır (50 µM-% 44.1; 25 µM-% 45.9; 10 µM- % 65.5) (**şekil 13b**).

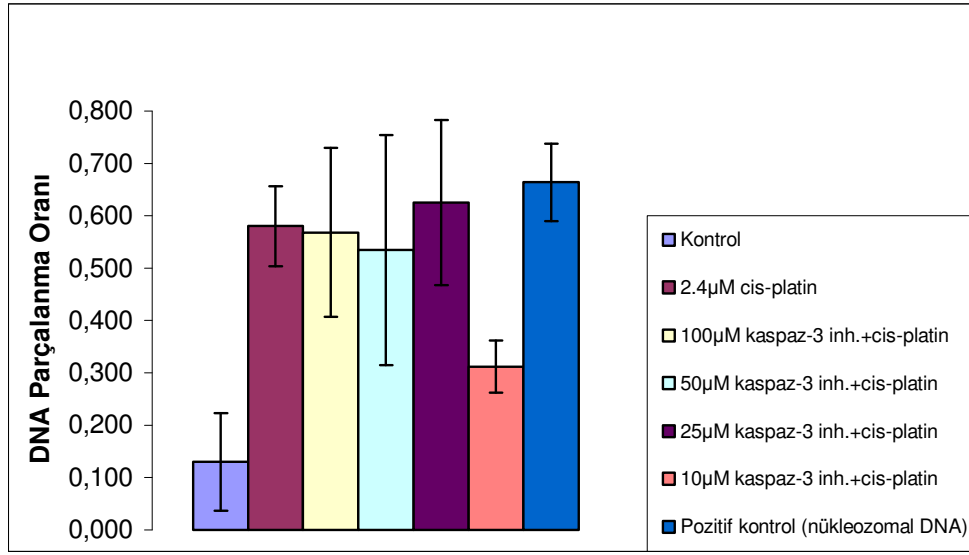
Mueller ve ark. (2003) 3 µM cis-platinli H12.1 (insan testis kanser), SCLC (Bang ve ark., 2004), sıçan nöral (Movsesyan ve ark., 2002) hücrelerindeki apoptotik mekanizmanın kaspaz-9 enziminin aktivasyonu üzerinden gerçekteştiğini spesifik inhibitör kullanarak göstermişlerdir.

Buna ek olarak, OHS (insan osteosarcoma) hücrelerinin interferon –gama (IFN-γ) ile indüklenmesi sonucu, spesifik inhibitörün kaspaz-9 aktivitesini inhibe ettiği tespit edilmiştir, fakat apoptotik hücre oranında bir azalma olmadığından mekanizmanın kaspazlardan bağımsız olduğu düşünölmüştür (Pedersen ve ark., 2004).

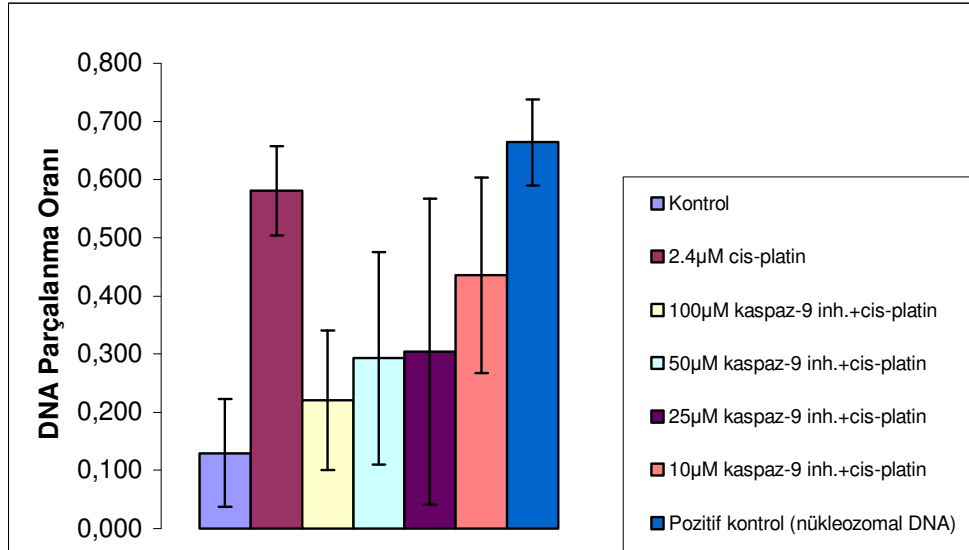
Kaspaz-3 ve kaspaz-9 inhibitörleri kullanılarak elde edilen sonuçlar, konsantrasyona bağlı olarak her iki inhibitöründe U2OS hücre apoptozu üzerine inhibe edici bir etkisi olduğunu gösterilmiştir.

Literatürde yer alan diğer hücrelerin apoptotik mekanizmasına benzer şekilde, cis-platinle uyarılmış U2OS hücrelerinde de apoptotik mekanizmanın kaspaz-3 ve kaspaz-9 ile bağlantılı olduğu düşünölmektedir. Bu kapsamda daha dar spekturumlu inhibitörler kullanılarak çalışmanın tekrarının yapılması gerekmektedir. Yine benzer şekilde, doğrudan kaspaz-3 ve kaspaz-9'un enzim aktivitesinin ölçümöde, bu enzimlerin apoptotik U2OS hücrelerindeki etkilerini tam olarak ortaya koyacağı düşünöncesindeyiz. Bu çalışmaların apoptotik U2OS hücrelerindeki cis-platinin etki mekanizmasının aydınlatılması açasından önem taşımaktadır.

a)



b)



Şekil 13. Kaspaz-3 ve -9 İnhibitörlerinin U2OS Hücre Apoptozu Üzerine Etkileri . Farklı konsantrasyonlardaki (100-50-25 ve 10µM) Kaspaz-3 veya -9 inhibitörleri U2OS hücreleri ile 37°C de 1 saat inkübe edildikten sonra hücre apoptozu 2.4µM cis-platin ile uyarılmıştır. DNA parçalanma oranı ELISA yöntemiyle tespit edilmiştir (Gereçler ve Yöntemler)

U2OS Hücre Apoptozu Üzerine Ekstrasellüler Proteinlerin Etkisi

Uyarılmış U2OS hücre apoptozu üzerine integrinlerin etkisinin araştırılmasında, integrin aktivasyonu çeşitli ekstrasellüler matriks proteinleri kullanılarak sağlanmıştır.

Fibronektin (10 µg/ml), Trombospondin-1 (10 µg/ml) ve Kollajen (4 µg/ml) ile muamele edilmiş kaplar üzerine aktarılan U2OS hücrelerindeki sitoplazmik nükleozom-DNA kompleks oranı ELISA (Elx808-IU) okuyucusu yardımı ile tayin edilmiştir.

U2OS hücre apoptoz oranı cis-platinsiz ortamda % 25.6 oranında iken, 2.4 µM cis-platin eklenmesi ile bu oran % 93.5'e yükselmiştir.

Hücrelerin fibronektine ($\alpha_4\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$) (**Şekil 14a**), kollajene ($\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$) (**Şekil 14b**) ve Trombospondin-1'e ($\alpha_4\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$) (**Şekil 14c**) bağlanmaları sonucunda cis-platinsiz ortamda oluşan apoptoz oranı sırasıyla % 25.6, % 26.9, % 26.9 olarak tespit edilmiştir. Bu deney ortamında her bir ekstrasellüler proteine bağlanan birden fazla integrin olduğundan, integrinlerin spesifik etkilerini gözlemek mümkün olmamıştır. Spesifik monoklonal antikorlar kullanılarak U2OS hücre apoptozu üzerine integrinlerin spesifik etkilerinin araştırılması düşünülmektedir.

2.4 µM cis-platin ile apoptoza götürülmüş U2OS hücreleri ekstrasellüler proteinler ile kaplı ortamlarda inkübe edildiklerinde, fibronektine bağlı hücredeki apoptoz oranı % 69.2, kollajen de % 80.7 ve trombospondin-1 de ise % 78.2 olarak bulunmuştur.

$\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$ ve $\alpha_3\beta_1$ integrinleri için substrat fonksiyonuna sahip kollajen IV proteinini T24E karsinoma (Stupack ve ark., 2001) ve preosteoklast hücrelerinde (Zhoa ve ark., 2005) apoptotik oranı artırdığı tespit edilmiştir. Bunun aksine Jurkat T hücrelerinde ise apoptotik mekanizmanın inhibisyonuna neden olmuştur (Aoudjit ve ark., 2000).

U2OS hücrelerinde, kollajene bağlı apoptotik hücre oranının % 26.9 olduğu ve bu oranın 2.4 µM cis-platin ile muamele edildikten sonra % 80.7'ye yükseldiği gözlenmiştir.

Cis-platinsiz ortamdaki U2OS hücrelerinin kollajene bağlanmayarak apoptozun başladığı düşünülmektedir.

Trombospondin-1'e bağlanan LNCaP (prostotik kanser hücresi) (Bastain ve ark., 2005) ve lenfoma hücrelerinde (Li ve ark., 2003), Trombospondin'in apoptotik süreci tetiklediği tespit edilmiştir.

Benzer şekilde, bu tez kapsamında U2OS hücrelerinde Trombospondin'e bağlanması ile apoptotik oranın % 26.9'a, cis-platinin varlığında ise bu oranın % 78.2'ye ulaştığı gözlenmiştir.

Bu aşamada Trombospondin-1'in U2OS hücrelerinde cis-platinsiz ortamda apoptozu tetiklediği fakat etki mekanizmalarının araştırılması gerektiği düşünülmektedir.

Fibronektine bağlı U2OS hücre apoptotik oranı diğer proteinlere nazaran daha düşük (% 25.6) olduğu belirlenmiştir. Fakat ortama cis-platinin eklenmesi ile

diğer proteinlerde olduğu gibi hücre apoptotik oranının 2.7 katına artığı bulunmuştur.

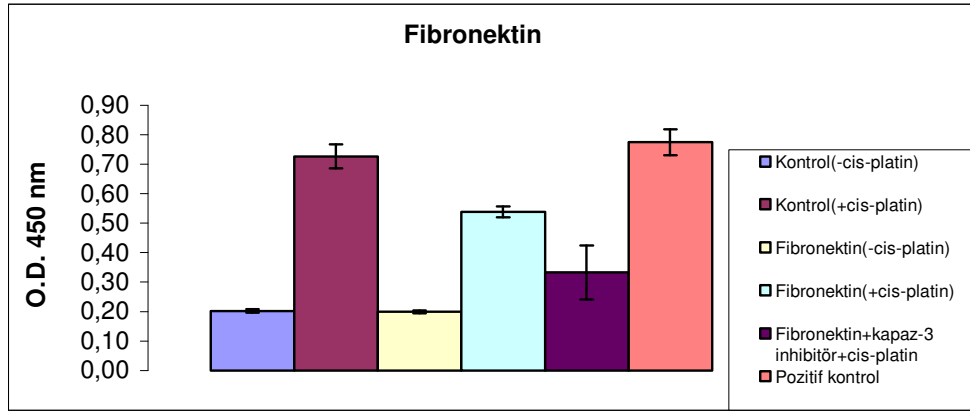
Literatürde, NNCIT (insan embriyonik testis kanser hücresi) (Andjilani ve ark., 2006), NIH3T3 (fare fibroblast) (Wang ve ark., 2002), MM (çok yönlü myeloma) (Chauhaun ve ark., 2003) ve A549 (Gu ve ark., 2002) hücrelerinde fibronektinin apoptozu engellediği yada düşük oranlarda apoptotik hücrenin tespit edildiği yer almaktadır.

Bunun aksine MDA MB 231 ve MCF7 (insan meme adenokarsinoma) hücrelerinde ise Fibronektin'in apoptozu artırdığı tespit edilmiştir (Vasaturo ve ark., 2005). Sonuç olarak, Fibronektin'in apoptoz üzerine etkisinin hücre tipine ve dolaylı olarakda integrin tipine bağlı olarak değişim gösterdiği düşünölmektedir.

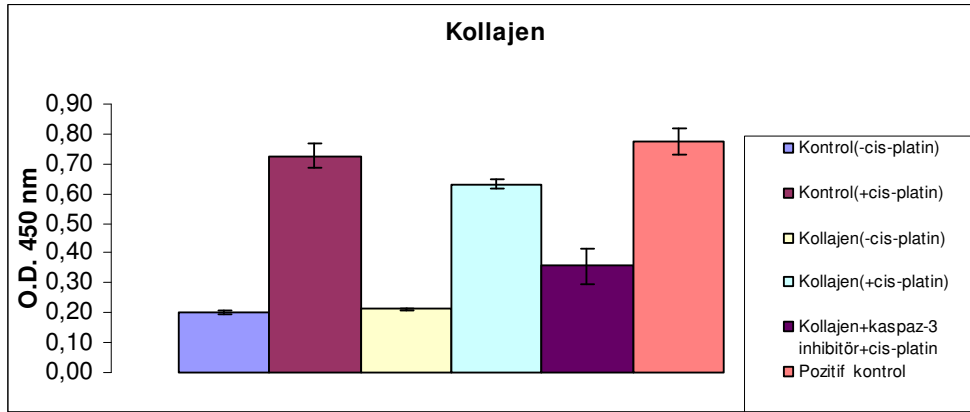
U2OS osteosarkoma hücrelerinde, ECM proteinlerinin ve bu proteinlere bağlı olarak aktive olan integrinlerin apoptotik mekanizmadaki etki süreç ve basamaklarının bu tez kapsamında araştırılması tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde ve uygulamasında yararlı olacağı kanısındayız.

Bu koşullar altında kaspaz-3 enziminin apoptoz oluşumundaki rolünün araştırılması amacı ile ortama 10 µM kaspaz-3 inhibitörü eklenmiştir ve fibronektine bağlı hücrelerde % 42.5, kollajene bağlı hücrelerde % 45.7 ve trombospondin-1'e bağlı hücrelerde ise % 34.7 oranında apoptotik hücre tespit edilmiştir. Bu sonuca bağlı olarak U2OS hücrelerindeki apoptotik mekanizmanın devamında kaspaz-3 enziminin etkili olduğu söylenebilir (**Şekil 14**).

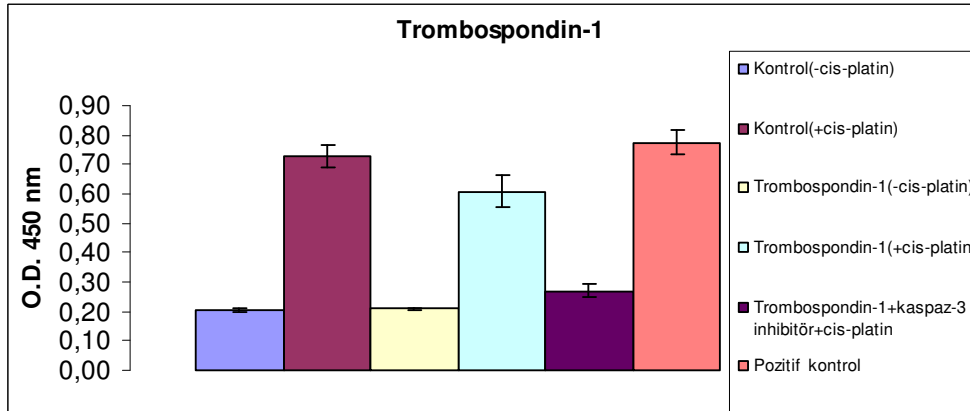
a)



b)



c)



Şekil 14. U2OS Hücre Apoptozu Üzerine Ekstrasellüler Proteinlerin Etkisi 24 saat +4°C de fibronektin (a), kollajen (b) veya trombospondin-1 (c) ile kaplanmış petrilere cis-platinli veya cis-platinli hücreler ekim yapıldıktan 2 saat sonra apoptotik hücre oranı ELISA yöntemi ile tayin edilmiştir. Kontrol hücreler plastik petrilere ekildikten sonra ölçüme alınmıştır. 10 µM kaspaz-3 inhibitörü ile hücreler öncül inkübasyona tabi tutulmuşlardır

SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez kapsamında sonuç olarak, U2OS osteosarkoma hücrelerinin 2.4 mM Cis-platin ile 48 saat muamelesi sonucunda apoptotik mekanizmanın morfolojik ve nükleer boyutta başladığı gözlenmiştir. Bunun paralelinde, benzer deneysel koşullar altında biyokimyasal değişim olarak tanımlanan genomik DNA'nın parçalanması da kantitatif olarak tespit edilmiştir.

U2OS hücrelerinde Cis-platin ile başlatılan apoptotik mekanizmanın, mitokondri membran potansiyelinin değişimine bağlı olarak gerçekleşen sitokrom-c salınım yolağının aktivasyonu ile olabileceği, kaspaz-3 ve kaspaz-9 inhibitörlerinin varlığında incelenmiştir. Apoptotik sinyal iletiminde her iki kaspazında bu sistem içerisinde etkili olduğu düşünülmektedir.

Ayrıca apoptotik U2OS hücrelerinin apoptotik oranlarının integrin aktivasyonuna bağlı olarak da değişim gösterdiği tespit edilmiştir. Özellikle fibronektine bağlanan apoptotik hücre oranında diğer proteinlere oranla azalma gözlenmiştir.

Bu bulgular ışığında, U2OS hücrelerinin integrin profilinin belirleme ve buna bağlı olarak da spesifik monoklonal antikolar yardımıyla apoptoz mekanizmasında etkili olan integrinleri saptama çalışmalarının ileri ki aşamalarda yapılması düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Adida, C., Berrebi, D., Peuchmaur, M., Reyes-Mugica, M. ve Altieri, D.C., Anti-apoptosis gene, survivin, and prognosis of neuroblastoma, *Lancet*, 351, 882-883 (1998).

Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W. ve Yuan, J., Human ICE/CED-3 protease nomenclature, *Cell*, 87, 171 (1996).

Altieri, D.C., Survivin in apoptosis control and cell cycle regulation in cancer, *Prog. Cell Cycle Res.*, 5, 447-452 (2003).

Altieri, D.C. ve Marchisio, C., Surviving apoptosis: an interloper between cell death and cell proliferation, *J. Lab. Invest.*, 79, 1327-1333 (1999).

Andjilani, M., Droz, J.P., Benahmed, M., ve Tabone, E., Down-regulation of FAK and IAPs by laminin during cis-platin-induced apoptosis in testicular germ cell tumors, *Int. J. Oncol.*, 28, 535-542 (2006).

Aoudjit, F. ve Vuori, K., Engagement of the $\alpha 2\beta 1$ integrin inhibits Fas ligand expression and activation-induced cell death in T cells in a focal adhesion dependent manner, *Blood*, 95, 2044-2051 (2000).

Ashkenazai, A. ve Dixit, V.M., Death receptor: signalling and modulation, *Science*, 281, 1305-1308 (1998).

Aznavoorian, S., Murphy, A.N., Stetler-Stevenson, W.G. ve Liotta, L.A., Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis, *Cancer*, 71, 1368-1383 (1993).

Bandtlow, C.E. ve Zimmermann, D.R., Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins, *Physiol. Rev.*, 80, 1267-1290 (2000).

Bang, J.H., Han, E.S., Lim, I. ve Lee, C.S., Differential response of MG132 cytotoxicity against small cell lung cancer cells to changes in cellular GSH contents, *Biochem. Pharm.*, 68, 659-666 (2004).

Bardan, A., Yoshida, A., Ishikawa, K., Goi, T., Yamaguchi, A., Ueda, T. ve Inuzuka, M., Identification of a novel splice variant of the human anti-apoptosis gene survivin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 314, 902-907 (2004).

Bastian, M., Steiner, M. ve Schuff-Werner, P., Expression of thrombospondin-1 in prostate-derived cell lines, *Int. J. Mol. Med.*, 15, 49-56 (2005).

Ben Erza, J.M., Kornstein, M.J., Grimes, M.M. ve Krystal, G., Small cell carcinomas of the lung express the bcl-2 protein, *Am. J. Pathol.*, 145, 1036-40 (1994).

- Beretta, G.L., Gatti, L., Tinelli, S., Elisabetta, C., Colangelo, D., Zunino, F. ve Perego, P., Cellular pharmacology of cisplatin in relation to the expression of human copper transporter CTR1 in different pairs of cisplatin-sensitive and resistant cells, *Biochem. Pharm.*, 68, 283-291 (2004).
- Birnbaum, M.J., Clem, R.J. ve Miller, L.K., An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs, *J. Virol.*, 68, 2521-2528 (1994).
- Boldin, M. P., Goncharov, T. M., Goltsev, Y. V. ve Wallach, D., Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death, *Cell*, 85, 803–815 (1996).
- Boldin, M. P., Varfolomeev, E. E., Pancer, Z., Mett, I. L., Camonis, J. H. ve Wallach, D., A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain, *J. Biol. Chem.*, 270, 7795–7798 (1995).
- Cain, K., Bratton, S.B. ve Cohen, G.M., The Apaf-1 apoptosome: a large caspase activating complex, *Biochimie*, 84, 203–214 (2002).
- Chang, H.Y. ve Yang, X., Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases, *Microbiology and Mol. Biol. Rev.*, 64, 821–846 (2000).
- Chauhan, D., Hideshima, T. ve Anderson, K.C., Apoptotic signaling in multiple myeloma: therapeutic implications, *Int. J. Hematol.*, 78, 114–120 (2003).
- Cheresh, D.A. ve Stupack, D.G., Integrin-mediated death: an explanation of the integrin-knockout phenotype?, *Nat. Med.*, 8, 193-194 (2002).
- Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Tewari, M. ve Dixit, V. M., FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis, *Cell*, 81, 505–512 (1995).
- Cohen, J.J., Duke, R.C., Fadok, U.A. ve Sellins, K.S., Apoptosis and programmed cell death in immunity, *Ann. Res. Immunol.*, 10, 267-293 (1992).
- Conway, E.M., Pollefeyt S., Cornelissen, J., DeBaere, I., Steiner-Mosonyi, M., Ong, K., Baens, M., Collen, D. ve Schuh, AC., Three differentially expressed survivin cDNA variants encode proteins with distinct antiapoptotic functions, *Blood*, 95, 1435-1442 (2000).
- Cory, S. ve Adams, J.M., The Bcl-2 family: regulators of the cellular life or death switch, *Nature Rev.*, 2, 649 (2002).
- Cotter, T.G. ve Martin. S.J., *Techniques in apoptosis (A User's guide)*, Portland Pres, London, 1996.

Crook, N.E., Clem, R.J. ve Miller, L.K., An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif, *J. Virol.*, 67, 2168-2174 (1993).

Daw, N.C., Billups, C.A., Rodriguez-Galindo, C., McCorville, M.B., Rao, B.N., ain, A.M., Jenkins, J.J., Nell, M.D., Meyer, W.H., Osteosarkoma: Results of two consecutive therapeutic trials at st. Jude children's research hospital, *Cancer*, 106, 403-412 (2006).

Danen, E., Muijen, E. ve Ruter, D., Role of integrins is signal transducing cell adhesion molecules in human cutaneous melenoma in human, *Cancer Surveys*, 24, 43-45 (1995).

Del Bello, B. ve Valentini, M.A., Role of caspase-3 and in Apaf-1 proteolytic cleavage and degradation events during cis-platin-induced apoptosis in melanoma cells, *Exp. Cell Res.*, 293, 302-310 (2004).

Deveraux, Q.L. ve Reed, J.C., IAP family proteins-suppressors of apoptosis, *Genes Dev.*, 13, 239-252 (1999).

Downward, J., Ras signalling and apoptosis, *Current Opinion in Genetics & Dev.*, 8, 49-54 (1998).

Endoh, A., Asanuma, K., Moriai, R., Yamada, M., Koyanagi, Y. ve Sato T., Expression of survivin mRNA in CD34C cell, *Clin. Chim. Acta.*, 306,149-151 (2001).

Fearnhead, H.O., Rodriguez, J. ve Govek, E.E., Oncogene-depend apoptosis is mediated by caspase-9, *Proc. Natl. Acad. Sc., USA.*, 95 (23), 13664-13669 (1998).

Frisch, S.M. ve Francis, H., Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis, *J. Cell Biol.*, 124, 619-626 (1994).

Frisch, S.M. ve Ruoslahti, E., Integrins and anoikis, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 9, 701-706 (1997).

Gatti, L., Supino, R., Perego, P., Pavesi, R., Caserini, C., Carenini, N., Righetti, S.C., Zuco, V. ve Zunino, F., Apoptosis and growth arrest induced by platinum compounds in U2-OS cells reflect a specific DNA damage recognition associated with a different p53-mediated response, *Cell Death and Differentiation*, 9, 1352-1359 (2002).

Gerschenson, L.E. ve Rotello, R.J., Apoptosis: a different type of cell death, *FASEB J.*, 6, 2450-22455 (1992).

Golstein, P. ve Ojcius, D.M. ve Young, J.D.E., Cell death mechanisms and immuno system, *Immunol. Rev.*, 121, 29-65, (1991).

Gren, D. ve Kroemer, G., The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria?, *Trends Cell Biol.*, 8, 267–271 (1998).

Groger, A.M., Esposito, V., Muller, M.R., Caputi, M., Kaiser, H.E. ve Giordano, A., Advances in understanding oh lung cancer, *Anticancer Res.*, 17, 2519-2522 (1997).

Gross, A., McDonnell, J.M. ve Korsmeyer, S.J., Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis, *Genes Dev.*, 13, 1899–1911 (1999).

Gu, J., Fujibayashi, A., Yamada, K.M. ve Sekiguchi, K., Laminin-10/11 and fibronectin differentially prevent apoptosis induced by serum removal via phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt- and MEK1/ERK-dependent pathways, *J. Biol. Chem.*, 277 (22), 19922–19928 (2002).

Hague, A., Moorghen, M., Hicks, D., Chapman, M. ve Paraskeva, C., Bcl-2 expression in human colorectal adenomas and carcinomas, *Oncogene*, 9, 3367–3370 (1994).

Hoffman, W.H., Biade, S., Zilfou, J.T., Chen, J. ve Murphy, M., Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene wild type p53, *J. Biol. Chem.*, 277, 3247–3257 (2002).

Howe, A.K., Aplin, A.E. ve Juliano, R.L., Anchorage-dependent ERK signaling–mechanisms and consequences, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 12, 30–35 (2002).

Hsu, H., Xiong, J. ve Goeddel, D. V., The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation, *Cell*, 81, 495–504 (1995).

http-1 en.wikipedia.org/wiki/Cancer

http-2 <http://people.bath.ac.uk/pr1cemb/Apoptosis.htm>

http-3 <http://www.emdbiosciences.com/SharedImages/TechnicalLiterature>

http-4 Apoptozis Ders notları, www20.uludag.edu.tr/~eulukaya (2003).

http-5 <http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch6G.htm>

Huges, F.M. ve Cildlowski, J.A., The Enzymology of Apoptosis, Apoptoz in normal development and cancer, S. Mels (Ed.), Taylor ve Francis Ltd., London, 21-22 (1996).

Hynes R.O., Integrins: a family of cell surface receptors, *Cell*, 48, 549-54 (1987).

Hynes, R.O., Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion, *Cell*, 69, 11-25 (1992).

Iervolivo, A., Trisciuglio, D., Ribatti, D., Candiloro, A., Biroccio, A., Zupi, G., ve Del Bualo, D., Bcl-2 overexpression in human melanoma cells increases

angiogenesis through VEGF mRNA stabilization and HIF-1-mediated transcriptional activity, *The FASEB J.*, 16, 1445-1455 (2002).

Ilic, D., Almeida, E.A., Schlaepfer, D.D., Dazin, P., Aizawa, S. ve Damsky, C.H., Extracellular matrix survival signals transduced by focal adhesion kinase suppress p53-mediated apoptosis, *J. Cell Biol.*, 143, 547-560 (1998).

Johansson, S., Svineng, G., Armulik, A. ve Lohikangas, L., Fibronectin-integrin interactions, *Frontiers in Bioscience*, 2, 126-146 (1997).

Kaitna, S., Mendosa, M., Jantch-Plunger, V. ve Glotar, M., INCENP and aurora like kinase form a complex essential for chromosome segregation and efficient completion of cytokinesis, *Curr. Biol.*, 10, 1072-1081 (2000).

Kelekar, A. ve Thompson, C.B., Bcl-2 family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis, *Trends Cell Biol.*, 8, 324-330 (1998).

Kerr, J.F., Wyllie, A.H. ve Currie, A.R., Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br. J. Cancer*, 26, 239-257 (1972).

Kerr, J.F.R., Harmon, B. ve Searle, J., An electron-microscope study of cell eletion in the anuran tadpole tail during spontaneous metamorphosis with special reference to apoptosis of striated muscle fibres, *J. Cell Sci.*, 14, 571-585 (1974).

Khwaja, A., Rodriguez Viciano, P., Wennstrom, S., Warne, P.H. ve Downward, J., Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway, *EMBO. J.*, 16, 2783-2793 (1997).

Kluck, R.M., Bossy-Wetzel, E., Green, D.R. ve Newmeyer, D.D., The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for bcl-2 regulation of apoptosis, *Science*, 275, 1132-1136 (1997).

Klug, S.W. ve Cummings, M.R., *Concepts of Genetics*, 6th Edition, Printice Hall, Oxford, 2000.

Kim, T.H., Zhao, Y., Barber, M.J., Kuharsky, D.K. ve Yin, X.M., Bid- induced cytochrome c release is mediated by a pathway independent of mitochondrial permeability transition pore and bax, *J. Biol. Chem.*, 275, 39474-39481 (2000).

Konno, R., Yamakawa, H., Ito, K., Sato, S. ve Yajima, A., Expression of survivin and bcl-2 in the normal human endometrium, *Mol. Hum. Rep.*, 6, 529-534 (2000).

Kosmider, B., Zyner, E., Osiecka, R. ve Ochocki, R., Induction of apoptosis and necrosis in A549 cells by the *cis*-Pt(II) complex of 3-aminoflavone in comparison with *cis*-DDP, *Mutation Res.*, 563, 61-70 (2004).

Köktürk, N., Kırışoğlu, C.E., ve Öztürk, C., Akciğer Kanseri Moleküler Biyolojisi, Solunum, 5 (3), 127-138 (2003).

Krauss, G., Biochemistry of signal transduction and regulation, WILEY-VCH, Darms, 456-467 (2001).

Krueger, A., Baumann, S., Krammer, P.H. ve Kirchhoff, S., FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis, Mol. Cell Biol., 21, 8247-8254 (2001).

Kuida, K., Zheng, T.S., Na, S., Kuan, C., Yang, D., Karasuyama, H., Rakic, P. ve Flavell, R.A., Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice, Nature, 384, 368–372 (1996).

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

Lee, J.W. ve Juliano, R.L., Alpha5beta1 integrin protects intestinal epithelial cells from apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B-dependent pathway, Mol. Biol. Cell, 11, 1973–1987 (2000).

Levine, A.J., Monmand, J. ve Finlay, C.A., Oncogene and cell death, Nature, 351, 453-456 (1991).

Li, H., Zhu, H., Xu, C.J. ve Yuan, J., Cleavage of BID by caspase-8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis, Cell, 94, 491–501 (1998).

Liu, H. ve Baliga, R., Endoplasmic reticulum stress-associated caspase-12 mediates cis-platin-induced LLC-PK1 cell apoptosis, J. Am. Soc. Nephrol., 16, 1985–1992 (2005).

Li, J., Zhao, Y.F., Yuan, X.Y., Xu, J.X. ve Gong, P., Synthesis and anticancer activities of novel 1,4-disubstituted phthalazines, Molecules, 11, 574-582 (2006).

Li, K., Yang, M., Yuen, P.M., Chik, K.W., Li, C.K., Shing, M.M., Lam, H.K. ve Fok, T.F., Thrombospondin-1 induces apoptosis in primary leukemia and cell lines mediated by CD36 and Caspase-3, Int. J. Mol. Med., 12, 995-1001 (2003).

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

Mahotka, C., Wenzel, M., Springer, E., Gabbert, H.E. ve Gerharz, C.D., Survivin-deltaEx3 and survivin-2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different antiapoptotic properties, Cancer Res., 59, 6097-6102 (1999).

Mattson, M.P., Cheng, B., Davis, D., Bryant, K., Leibenburg, I. ve Roydel, R.E., beta-amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity, *J. Neurosci*, 12, 376-389 (1992).

Matsuo, H., Marou, T. ve Samoto, T., Increased expression of bcl-2 protein in human uterine leiomyoma and its up-regulation by progesterone, *J. Clin. Endocrinol. and Metabolism*, 82 (1), 293-299 (1997).

Medema, J. P., Scaffidi, C., Kischkel, F. C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P.H. ve Peter, M. E., FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC), *EMBO J.*, 16, 2794–2804 (1997).

Mirandola, P., Sponzili, I., Giuliana, G., Marmioli, S., Rinaldi, L., Binazzi, R., Piccari, G.G., Ramazzotti, G., Gaboardi, G.C., Cocco, L. ve Vitale, M., Anticancer agents sensitize osteosarcoma cells to TNF-related apoptosis-inducing ligand downmodulating IAP family proteins, *Int. J. Oncol.*, 28, 127-133 (2006).

Mirza, A., McGuirk, M., Hockenberry, T.N., Wu, Q., Ashar, H., Black, S., Wen, S.F., Kirschmeier, P., Bishop, W.R., Nielsen, L.L., Ptckett, C.B. ve Liu, S., Human survivin is negatively regulated by wild type p53 and participate in p53-dependent apoptotic pathway, *Oncogene*, 2, 2613–2622 (2002).

Miura, M., Zhu, H., Rotello, R., Hartweg, E.A. ve Yuan, J., Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C.elegans* cell death gene *ced-3*, *Cell*, 75, 653–660 (1993).

Movsesyan, V.A., Yakovlev, A.G., Dabaghyan, E.A., Stoica, B.A. ve Faden, A.I., Ceramide induces neuronal apoptosis through the caspase-9/caspase-3 pathway, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 299, 201–207 (2002).

Mueller, T., Voigt, W., Simon, H., Fruehauf, A., Bulankin, A., Grothey, A. ve Schmoll, H.J., Failure of activation of caspase-9 induces a higher threshold for apoptosis and cis-platin resistance in testicular cancer, *Cancer Res.*, 63, 513–521 (2003).

Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A. ve Rodwell, V.W., Harper'ın Biyokimyası, Barış Kitapevi, İstanbul, 688- 716, 1996.

Muzio, M., Chinnaiyan, A. M., Kischkel, F. C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J. D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P. H., Peter, M. E. ve Dixit, V.M., FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death inducing signaling complex, *Cell*, 85, 817–827 (1996).

Muzio, M., Stockwell, B. R., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S. ve Dixit, V. M., An induced proximity model for caspase-8 activation, *J. Biol. Chem.*, 273, 2926–2930 (1998).

Nagata, S. ve Golstein, P., The Fas death factor, *Science*, 267, 1449–1456 (1995).

Nicolson, G.L., Cell surface molecule and tumor metastasis, *Exp. Cell Res.*, 150, 3-22 (1984).

Otsu, K., Sato, K., Ikeda, Y., Imaia, H., Nakagawa, Y., Ohba, Y. ve Fujii, J., An abortive apoptotic pathway induced by singlet oxygen is due to the suppression of caspase activation, *Biochem. J.*, 389, 197–206 (2005).

Park, B.C., Bosire, K.O., Lee, E.S., Lee, Y.S. ve Kim, J.A., Asiatic acid induces apoptosis in SK-MEL-2 human melanoma cells, *Cancer Letters*, 218, 81–90 (2005).

Paterson, J., Uriel, C., Ergon, M.J., Herscovici, J., Antonakis, K. ve Aloui-Jamalti, A.A., Antiproliferative and apoptotic activities of ketonucleosides and keto-c-glycosides against non-small-cell lung cancer cells with intrinsic drug resistance, *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 42 (4), 779-784 (1998).

Pedersen, K.B., Andersen, K., Fodstad, Ø. ve Mælandsmo, G.M., Sensitization of interferon- γ induced apoptosis in human osteosarcoma cells by extracellular S100A4, *B.M.C., Cancer*, 4, 52, (2004).

Pollack, M. ve Leeuwenburg, C., Apoptosis and aging: role of the mitochondria, *J. Gerontology, Biological Sciences*, 56 (11), B475–B482 (2001).

Raff, M.C., Social controls on cell survival and cell death, *Nature*, 356, 397-400 (1992).

Raines, E.W., The extracellular matrix can regulate vascular cell migration, proliferation, and survival: relationships to vascular disease, *Int. J. Exp. Pathol.*, 81, 173-182 (2000).

Rao, P.V.L., Jayaraj, R., Bhaskar, A.S.B., Kumar, O., Bhattacharya, R., Saxena, P., Dash, P.K. ve Vijayaraghavan, R., Mechanism of ricin-induced apoptosis in human cervical cancer cells, *Biochem. Pharm.*, 69, 855–865 (2005).

Reiko, H., Ronan, K. ve Erich, A.N., Exploring the functional interactions between aurora B, INCENP, and survivin in mitosis, *Mol. Cell Biol.*, 23, 3325–3341 (2003).

Ruoslahti, E. ve Reed, J.C., Anchorage dependence, integrins, and apoptosis, *Cell*, 77, 477-478 (1994).

Sah, K.N., Khan, Z. ve Bisen, S.P., Structural, functional and therapeutic biology of survivin, *Cancer Letters* xx, 1-8 (2006).

Salvesen, G.S. ve Dixit, V. M., Caspases: intracellular signaling by proteolysis, *Cell*, 91, 443–446 (1997).

Schierie, G.S., Hansson, O., Leist, M., Nicotera, P., Widner, H., ve Brundin, P., Caspase inhibition reduces apoptosis and increases survival of nigral transplants, *Nat. Med.*, 5, 97–100 (1999).

Skoufias, D.A., Mollinari, C., Lacroix, F.B. ve Margolis, R.L., Human survivin is a kinetochore-associated passenger protein, *J. Cell Biol.*, 151, 1575–1581 (2000).

Soengas, M.S., Alorcon, R.M., Yoshida, H., Giaccia, A.J., Hakem, R., Mmak, T.W. ve Lowe, S.W., Apaf-1 and caspase-9 in p52-depent apoptosis and tumor inhibition, *Science*, 284 (5411), 156-159 (1999).

Stetler-Stevenson, W.G., Aznavoorian, S. ve Liotta, L.A., Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis, *Ann. Rev. Cell. Biol.*, 9, 541-573 (1993).

Streuli, C.H., Edwards, G.M., Delcommenne, M., Whitelaw, C.B.A., Burdon, T.G., Schindler, C. ve Watson, C.J., Stat5 as a target for regulation by extracellular matrix, *Cell Biol. Chem.*, 270, 21639-21644 (1995).

Stupack, D.G., Puente, X.S., Boutsaboualoy, S., Storgard, C.M. ve Cheresch, D.A., Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins, *J. Cell Biol.*, 155, 459-470 (2001).

Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M. ve Kroemer, G., Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor, *Nature*, 397, 441–446 (1999).

Talar-Wojnarowska, R., Sasor, A., Strzelczyk, J., Janiak, A. ve Maltecka-Panas, E., p53, c-erbB-2, bax and bcl-2 expression in Pancreatic Cancer (PC) and Chronic Pancreatitis (CP), *Pancreatology*, 2, 217–361 (2002).

Tanuma, S., Shiokawa, D., Tanimota, Y., Ikekita, M., Sakagami, H., Takeda, M., Fukuda, S. ve Kochi, M., Benzylideneascorbate induces apoptosis in L929 tumor cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 194, 29-35 (1993).

Thornberry, N.A., The caspase family of cysteine proteases, *Br. Med. Bull.*, 53, 478–490 (1997).

Thornberry, N.A. ve Lazebnik, Y., Caspases: enemies within, *Science*, 281, 1312-1316 (1998).

Thornberry, N.A., Bull, H. G., Calaycay, J.R., Chapman, K.T., Howard, A. D., Kostura, M.J., Miller, D.K., Molineaux, S.M., Weidner, J. R. ve Aunins, J., A

novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes, *Nature*, 356, 768–774 (1992).

Tinel, A. ve Tschopp, J., The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress, *Science*, 304, 843–846 (2004).

Tomei, L.D. ve Cope, F.O., In apoptosis: the molecular basis of cell death, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1991.

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

Uren, A.G., Wong, L., Pakusch, M., Fowler, K.J., Burrows, F.Z., Vaux, D.L. ve Choo, K.H., Survivin and the inner centromere protein INCENP show similar cell cycle localization and gene knockout phenotype, *Curr. Biol.*, 10, 1319–1328 (2000).

Varfolomeev, E.E., Schuchmann, M., Luria, V., Chiannikulchai, N., Beckmann J.S., Mett, I.L., Rebrikov, D., Brodianski, V.M., Kemper, O.C., Kollet, O., Lapidot, T., Soffer, D., Sobe, T., Avraham, K.B., Goncharov, T., Holtmann, H., Lonai, P. ve Wallach, D., Targeted disruption of the mouse caspase-8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally, *Immunity*, 9, 267–276 (1998).

Varner, J.A., Emerson, D.A. ve Luliano, R.L., Integrin alpha 5 beta 1 expression negatively regulates cell growth: reversal by attachment to fibronectin, *Mol. Biol. Cell*, 6, 725-740 (1995).

Vasaturo, F., Mallacrino, C., Sallusti, E., Coppotelli, G., Birarelli, P., Giuffrida, A., Albonici, L., Simonelli, L., Modesti, A., Modesti, M. ve Scarpa, S., Role of extracellular matrix in regulation of staurosporine-induced apoptosis in breast cancer cells, *Oncol. Rep.*, 13, 745-750 (2005).

Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.V., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G. ve Smith, H.O., The Sequence of the Human Genome, *Science*, 291 (5507), 1304 – 1351 (2001).

Villa, M.C., Functional role of extracellular matrix proteins and their receptors in apoptosis and cell survival, *Doktora Tezi*, Universitat Barcelona, Barcelona, İspanya (2003).

Vogel, W.F., Collagen-receptor signaling in health and disease, *Eur. J. Dermatol.*, 11, 506-514 (2001).

Wallach, D., Varfolomeev, E. E., Malinin, N. L., Goltsev, Y. V., Kovalenko, A. V. ve Boldin, M. P., Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms, *Annu. Rev. Immunol.*, 17, 331–367 (1999).

Wang, W.J., Kuo, J.C., Yao, C.C., Chen, R.H., DAP-kinase induces apoptosis by suppressing integrin activity and disrupting matrix survival signals, *J. Cell Biol.*, 159 (1), 169–179 (2002).

Wang, Z., Fukuda, S. ve Pelus, L.M., Survivin regulates the p53 tumor suppressor gene family, *Oncogene*, 23, 8146–8153 (2004).

Westphal, S. ve Kalthoff H., Apoptosis: targets in pancreatic cancer, *Molecular Cancer*, 2, 6 (2003).

Wyllie, A.H., Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation, *Nature*, 284, 555-556 (1980).

Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C.N., Ibrado, A.M., Cai, J., Peng, T.I., Jones, D.P. ve Wang, X., Prevention of apoptosis by bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked, *Science*, 275, 1129–1132 (1997).

Zakeri, Z. ve Lockshin, R.A., Ageneralized caspase inhibitor disrupts early mammalian development, *Int. J. Dev. Biol.*, 49, 43-47 (2005).

Zeytinoğlu, H., İncesu, Z. ve Baser, K.H.C., Inhibition of DNA synthesis by carvacrol in mouse myoblast cell bearing a human N-ras oncogene, *Phytomedicine*, 10 (4), 292-299 (2003).

Zhan, Q., Fan, S., Bae, I., Guillouf, C., Liebermann, D.A., O'Connor, P.M. ve Fornace Jr., A.J., Induction of bax by genotoxic stress in human cells correlates with normal p53 status and apoptosis, *Oncogene*, 9, 3743–3751 (1994).

Zhao, H., Ross, F.P. ve Teitelbaum, S.L., Unoccupied $\alpha_v\beta_3$ integrin regulates osteoclast apoptosis by transmitting a positive death signal, *Mol. Endocrinol.*, 19 (3), 771–780 (2005).

Zheng, T.S., Hunot, S., Kuida, K., Momoi, T., Srinivasan, A., Nicholson, D.W., Lazebnik, Y. ve Flavell, R.A., Deficiency in caspase-9 and caspase-3 induces compensatory caspase activation, *Nat Med.*, 6, 1241–1247 (2000).

Zhou, Z., Jia, S.F., Hung, M.C. ve Kleinerman. E.S., E1A sensitizes HER2/neu overexpressing ewing's sarcoma cells to topoisomerase II-targeting anticancer drugs, *Cancer Res.*, 61, 3394–3398 (2001).

Zhu, N., Gu, L., Findley, H.W., Li, F., Zhou, M., An alternatively spliced survivin variant is positively regulated by p53 and sensitizes leukemia cells to chemotherapy, *Oncogene*, 23, 7545-7551 (2004).