



**İNSAN BAX GENİ PROMOTÖR BÖLGESİNİN
FONKSİYONEL ANALİZİ**

Emine TORAMAN

Yüksek Lisans Tezi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Genetik Bilim Dalı

Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

2017

Her hakkı saklıdır

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**İNSAN BAX GENİ PROMOTÖR BÖLGESİNİN FONKSİYONEL
ANALİZİ**

Emine TORAMAN

**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
Genetik Bilim Dalı**

**ERZURUM
2017**

Her Hakkı Saklıdır



TEZ ONAY FORMU

İNSAN BAX GENİ PROMOTÖR BÖLGESİNİN FONKSİYONEL ANALİZİ

Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN danışmanlığında, Emine TORAMAN tarafından hazırlanan bu çalışma, 11/07/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Genetik Bilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (.../...) ile kabul edilmiştir.**

Başkan: Prof.Dr. Orhan ERDOĞAN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Hakan AŞKIN

İmza :

Üye : Doç. Dr.Arzu ALA GÖRMEZ

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu'nun 20.07/2017 tarih ve ..29..../35..... nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cavit KAZAZ

Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

İNSAN BAX GENİ PROMOTÖR BÖLGESİNİN FONKSİYONEL ANALİZİ

Emine TORAMAN

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Genetik Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

Kanserlerin çoğu insan hayatındaki bir takım genetik değişimler sonucu oluşur. Onkogenler ve tümör baskılayıcı genler büyümeyi kontrol eden genlerdir. Onkogenler, normalde büyümeyi uyaran proteinleri kodlar. Aşırı sentezleri, translokasyonları ve mutasyonları sonucu malign transformasyon oluşur. Tümör baskılayıcı genler ise normalde büyümeyi inhibe eden proteinleri kodlar. Bu genlerde delesyonların meydana gelmesi, transkripsiyon olayının gerçekleşmemesi ve protein inaktivasyonu ile fonksiyon kaybına uğramaları halinde istenmeyen durumlar oluşabilmektedir.

Bu çalışmada apoptoz mekanizmasında önemli bir potansiyele sahip olan proapoptotik Bax geninin karakterizasyonu ve promotör bölgesinin fonksiyonel analizi yapıldı. Bu amaçla öncelikle biyoinformatik programlarından ve çeşitli veritabanlarından yararlanılarak Bax geninin 5000 bp'lik promotör bölgesi belirlendi. Fakat çalışmamızın genelinde yapılan analiz çalışmaları işlevsel olduğunu düşündüğümüz 2000 bp 'lik promotör parçası üzerinde gerçekleştirildi. Bu bağlamda öncelikle genin transkripsiyon başlama bölgesi, TATA bağlanma kutusu ve muhtemel p53 bağlanma bölgeleri tespit edildi. Daha sonra çeşitli literatür taramaları ve software programlarıyla bu bölge üzerindeki muhtemel transkripsiyon faktör bağlanma bölgeleri ve motifleri belirlendi. Yapılan analiz çalışmaları sonucunda bu 2000 bp'lik parça işlevsel özelliklerine göre dört alt parçaya ayrıldı. Bu bağlamda öncelikle insan genomik DNA'sı satın alındı. Seçilen bölgelere spesifik dizayn edilen primerlerle PCR yapılarak her bölge saf olarak elde edildi. Her bölgeye ait saf bantlar jelden ekstrakte edilerek pGEM-T Easy vektörüne klonlanarak *Escherichia coli* JM109 bakterisine transfer edildi. Klonlanan her bir parçadan plazmit izolasyonu yapıldı.

2017,75 sayfa

Anahtar Kelimeler: Bax geni, kanser, promotör analizi, transkripsiyon faktörü.

ABSTRACT

Master Thesis

FUNCTIONAL ANALYSIS OF HUMAN BAX GEN PROMOTER REGION

Emine TORAMAN

Atatürk University
Faculty of Science Graduate School
Department of Genetic Sciences
Genetic Sciences

Supervisor: Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

Cancers often result in a number of genetic changes in human life. Oncogenes and tumor suppressor genes are genes that control growth. Oncogenes encode proteins that normally stimulate growth. Malignant transformation occurs as a result of over-synthesis, translocations and mutations. Tumor suppressor genes normally encode proteins that inhibit growth. Undesirable conditions can occur if deletions occur in these genes, if the transcription event does not occur and if protein inactivation results in loss of function.

In this study, the characterization of the proapoptotic Bax gene and the functional analysis of the promoter region, which have an important potential in the apoptosis-free mechanism, were performed.

For this purpose, the 5000 bp promoter region of Bax gene was identified primarily by using bioinformatics programs and various databases. However, the overall analysis of our study was performed on a 2000 bp promoter fragment that we thought was functional. In this context, first, a genome transcription initiation site, a TATA binding box and probable p53 binding sites were identified. Later literature reviews and software programs were used to identify possible transcription attachment regions and motifs on this region. As a result of the analysis studies made, these 2000 bp parts were divided into four sub-parts according to their functional properties. And each fragment was cloned into the pGEM-T Easy vector. In this context, human genomic DNA was first purchased. PCR was performed with primers designed specifically for each region, and each region was obtained in pure form. The pure bands of each region were gel-extracted and transferred into the *E. coli* JM109 bacterium by cloning into the pGEM- T Easy vector. Plasmid isolation was performed from each cloned fragment.

2017, 75 pages

Key Words: Bax gene, cancer, promoter analysis, transcription factor.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimleriyle her zaman yanımda olan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN'a saygı ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarımın bütün safhalarında fakültemizin ve bölümümüzün bütün imkanlarından yararlanmamı sağlayan dekanımız Sayın Prof. Dr.Yüksel ÖZDEMİR ve Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr.Ahmet ADIGÜZEL'e,

Deneyisel çalışmalarımı gerçekleştirmem için bana her türlü imkanı sağlayan Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DAYTAM) müdürü Sayın Prof.Dr.Ramazan ALTUNDAŞ'a

Çalışmalarım esnasında gerekli yardımı ve yakın ilgiyi esirgemeyen bölümdeki tüm hocalarıma, birlikte çalışmaktan ve aynı eğitim ortamını paylaşmaktan mutluluk duyduğum ve tez sürecimde ihtiyacım olan desteği sağlayıp her daim yanımda olan Sayın Atena GHOSIGHAREHAGHAJI'ye, çalışma sürecimde her türlü bilgi ve deneyimini benimle paylaşan ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Sayın Ekrem SULUKAN'a,

Manevi desteklerini her zaman yanımda hissettiğim Sayın Özge ÇAĞLAR ve Sayın Tuğba ORAK'a, tezimi yazarken beni yalnız bırakmayan ablam Ayşe TORAMAN'a hayatım boyunca destekleriyle her zaman yanımda bulduğum sevgili annem, babam ve kardeşlerime tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Emine TORAMAN

Haziran, 2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Kanser.....	1
1.1.1.Kansere sebep olan etkenler	2
1.1.2. Kanser hücrelerinin özellikleri	4
1.1.3. Kanserin moleküler biyolojisi ve karsinogenez	5
1.1.3.a. Karsinogenez süreci 3 aşamada ilerlemektedir.....	5
1.1.4. Tümör büyümesi ile ilgili temel prensipler	7
1.1.4.a. Metastaz.....	7
1.1.4.b. Tümör anjiyogenezi.....	9
1.1.4.c. Kanser genleri	9
1.1.5. Tümör oluşumunun moleküler mekanizması	10
1.1.6. p53 geni	11
1.2. Apoptoz (Programlı hücre ölümü).....	13
1.2.1. Apoptozun morfolojisi.....	14
1.2.2. Apoptozun moleküler mekanizması	15
1.2.3. Apoptotik hücrelerin biyokimyasal özellikleri.....	16
1.2.4. Yolaklar	17
1.2.4.a. Ekstrinsik yolak	17
1.2.4.b. Perforin/Granzim yolağı.....	18
1.2.4.c. İntrinsik yolak.....	19
1.2.5. Apoptozun inhibisyonu	23
1.3. Bcl-2 Ailesi.....	25
1.3.1. Bcl-2 aile üyelerinin genel özellikleri	26

1.4. Transkripsiyonel Regülasyon	28
1.4.1. RNA polimerazlar.....	29
1.4.2. Transkripsiyonda önemli olan bölgeler	29
1.4.2.a. Promotör bölgesi.....	30
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	31
3. MATERYAL ve YÖNTEM	33
3.1 Materyal.....	33
3.1.1 Kimyasal maddeler	33
3.1.2. Çalışmada kullanılan laboratuvar gereçleri	34
3.1.3 Stok solüsyonlar.....	35
3.1.4 Çalışmada kullanılan vektörler	35
3.2 Metotlar.....	36
3.2.1 Çalışmada kullanılan ortamın ve malzemenin temizliği ve sterilizasyonu.....	36
3.2.2 DNA izolasyonu ve klonlama.....	36
3.2.2.a. İnsan genomik DNA'sının temin edilmesi.....	36
3.2.2.b Polimeraz zincir reaksiyonları (PCR).....	36
3.2.2.c. Primer tasarımı.....	36
3.2.2.d. DNA agaroz jel elektroforezi.....	37
3.2.2.e. Agaroz jelden DNA purifikasyonu	37
3.2.2.f. PCR ürünlerinin A:T klonlanması.....	37
3.2.2.g. Plazmit DNA izolasyonu (Miniprep).....	38
3.2.2.h. Kompetent hücre hazırlanması	38
3.2.2.i. Transformasyon	38
3.2.2.j. Çalışmada kullanılan bakteri izolatı	39
3.2.2.k. Bakteriyel kültür ortamı.....	39
3.2.2.l. Antibiyotikler.....	39
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	40
4.2. Bax Gen Promotörünün Klonlanması.....	50
4.2.1 Primer tasarımı.....	50
4.2.2 Polimeraz zincir reaksiyonları (PCR).....	51
4.2.3. Bax gen promotörünün 1922 bp'lık bölgesinin çoğaltılması	52

4.2.3.a. İnsan Bax gen promotörünün 1922 bp bölgesinin pGEM-T Easy vektörüne klonlanması ve <i>E.coli</i> 'ye transformasyonu.....	52
4.2.3.b. Koloni PCR.....	53
4.2.3.c. Plazmit DNA izolasyonu	53
4.2.4. Bax gen promotörünün 1400 bp'lik bölgesinin çoğaltılması	54
4.2.4.a. İnsan Bax gen promotörünün 1400 bp bölgesinin pGEM-T Easy vektörüne klonlanması ve <i>E.coli</i> 'ye transformasyonu.....	55
4.2.4.b. Koloni PCR.....	55
4.2.4.c. Plazmit DNA izolasyonu	55
4.2.5. Bax gen promotörünün 930 bp'lik bölgesinin çoğaltılması	56
4.2.5.a. İnsan Bax gen promotörünün 930 bp bölgesinin pGEM-T Easy vektörüne klonlanması ve <i>E.coli</i> 'ye transformasyonu.....	56
4.2.5.b. Koloni PCR.....	57
4.2.5.c. Plazmit DNA izolasyonu	57
4.2.6. Bax gen promotörünün 390 bp'lik bölgesinin çoğaltılması	57
4.2.6.a. İnsan Bax gen promotörünün 390 bp bölgesinin pGEM-T Easy vektörüne klonlanması ve <i>E.coli</i> 'ye transformasyonu.....	58
4.2.6.b. Koloni PCR.....	58
4.2.6.c. Plazmit DNA izolasyonu	59
4.2.7. Bax geninin 47 bp'lik bölgesinin çoğaltılması	59
4.2.7.a. İnsan Bax gen promotörünün 47 bp bölgesinin pGEM-T Easy vektörüne klonlanması ve <i>E.coli</i> 'ye transformasyonu.....	60
4.2.7.b. Koloni PCR.....	60
4.2.7.c. Plazmit DNA izolasyonu	61
5.TARTIŞMA VE SONUÇ	62
KAYNAKLAR	67
ÖZGEÇMİŞ	76

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Apaf-1	Apoptozu aktive eden faktör 1
dNTP	Deoksinükleotit trifosfat
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
Erb-B	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
Fms	Koloni uyarıcı faktör reseptörü tip 1
ICAD	Caspase Activated DNase'nin İnhibitörü
ICE	İnterlökin-1 beta-dönüştürücü enzim
IGF-1	İnsülin benzeri büyüme faktörü-1'in
Int-2	Fibroblast büyüme faktörü reseptörü
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
MPT	Mitokondriyal geçirgenlik geçiş porları
PARP	Poli [ADP-riboz] polimeraz
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Sis	Trombositlerden salınan büyüme faktörü reseptörü
TAE	Tris Asetik Asit EDTA
TAF	Tümör Anjiyogenez Faktörü
TGF	Transforme Edici Büyüme Faktörleri
Th2	Tip 2 yardımcı T
TNF	Tümör nekroz faktörü
XIAP	X bağlantılı memeli apoptoz proteini inhibitörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Karsinogenezis süreci	7
Şekil 1.2. Metastaz formasyonu	8
Şekil 1.3. Apoptoz sırasında hücrede meydana gelen morfolojik değişimler.....	14
Şekil 1.4. Apoptozun moleküler mekanizması	23
Şekil 1.5. Transkripsiyonun şematik görünümü	28
Şekil 3.1. PGEM-T Easy vektörünün restriksiyon haritası ve klonlama bölgesi.....	35
Şekil 4.1. Bax geninin kromozom üzerindeki yerleşimi.....	40
Şekil 4.2. Bax geninin alternatif ekson yapısı.....	41
Şekil 4.3. İnsan Bax geninin 2000 bp'lik promotör bölgesi ile fare Bax geninin 2000 bp'lik promotörü arasındaki homoloji	44
Şekil 4.4. Dizayn edilen primerlerin uzunlukları, sıcaklıkları ve dizileri	51
Şekil 4.5. 1922 bp bölgenin PCR ile çoğaltılması	52
Şekil 4.6. Koloni PCR sonucunun agaroz jelde görüntülenmesi	53
Şekil 4.7. İzole edilen plazmitlerin agaroz jelde görüntülenmesi	54
Şekil 4.8. 1400 bp bölgenin PCR ile çoğaltılması	54
Şekil 4.9. Koloni PCR sonucunun agaroz jelde görüntülenmesi	55
Şekil 4.10. 930 bp bölgenin PCR ile çoğaltılması	56
Şekil 4.11. Koloni PCR sonucunun agaroz jelde görüntülenmesi	57
Şekil 4.12. 390 bp bölgenin PCR ile çoğaltılması	58
Şekil 4.13. Koloni PCR sonucunun agaroz jelde görüntülenmesi	59
Şekil 4.14. 47 bp bölgenin PCR ile çoğaltılması	60
Şekil 4.15. Koloni PCR sonucunun agaroz jelde görüntülenmesi	61

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar	33
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan laboratuvar gereçleri	34
Çizelge 3.3. Agaroz jel elektroforezi solüsyonları.....	35
Çizelge 4.1. Bax geninin transkript varyantları ile ilgili fenotip, hastalık ve özellikleri.....	40
Çizelge 4.2. Bax geninin transkript varyantları	41
Çizelge 4.3. Bax geni 001 transkriptinin ekzon ve intron yapısı	42
Çizelge 4.4. Bax geninin 2000 bp ‘lik promotör parçasının dizisi ve dizi üzerindeki fonksiyonel bölgeler.....	43
Çizelge 4.5. Bax gen promotörü üzerindeki muhtemel transkripsiyon faktörü..... bağlanma bölgeleri.....	45
Çizelge 4.5. Bax gen promotörü üzerinde sıçan ve fare arasında en fazla homolojinin görüldüğü 440-660 bp arasındaki bölgede bulunan muhtemel transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri	50

1. GİRİŞ

1.1. Kanser

Kanser hücrelerin kontrolsüz bir şekilde bölünmesiyle oluşan bir hastalıktır. Kanserlerin çok çeşitli türleri vardır. Kanserler oluştukları doku ve organlara göre sınıflandırılırlar. Normal hücrelerde hücre bölünmesi ve ölümü arasında dinamik bir denge bulunmaktadır. Fakat kanser hücrelerinde bu denge bozulmaktadır. Kanserleşen hücrelerde hücrenin genetik materyalinde hasarlar ve mutasyonların birikmesi söz konusudur. Kanser, tek bir hücrenin mutasyonu sonucu ortaya çıkabilir. Bu mutasyonlar kanser hücrelerine normal hücrelere göre daha fazla büyüme yeteneği kazandırır. Bunun sonucunda kanser hücreleri normal proliferasyon kontrolünden kaçmaya başlarlar. Meydana gelen ilk mutasyon hücrelerin bölünerek genetik olarak homojen kopyalarını oluşturur. Daha sonra meydana gelen mutasyonlar hücrelerin daha fazla bölünmesine sebep olur (Macdonald et al., 2004). Kanser karsinogenez olarak adlandırılan bir süreç sonunda ortaya çıkan bir hastalıktır. Karsinogenez, çeşitli sebepler sonucunda normal hücrelerin kanser hücresi şekline dönüşümünü açıklayan bir terimdir. Karsinogenezde etkili olan pek çok faktör vardır. Yaş, coğrafi faktörler, çevresel etmenler (fiziksel, biyolojik, kimyasal), inflamasyonlar (*Helicobacter pylori*, Hepatit virüsleri, HIV), prekanseröz hastalıklar ve genetik faktörler karsinogenezde önemli rol almaktadır (Kumar et al., 2014, Bayrak, 2010).

Karsinogenez DNA'daki ölümcül olmayan fakat kalıcı genetik hasarın başlangıcıdır. Bu kalıcı hasar geri dönüşümsüzdür ve bu değişikliğe sahip hücrelerin malign olma olasılığı oldukça yüksektir. Karsinogenez sürecinin oluşumunda temel olarak proto-onkogenlerde, tümör baskılayıcı genlerde, DNA tamir genlerinde ve apoptozu kontrol eden genlerde mutasyonlar meydana gelmektedir. Hücre bölünme döngüsü sürecinde bu genlerde meydana gelen bozukluklardan dolayı hücrelerde onkogenler aktifleşirken tümör baskılayıcı genler, DNA tamir genleri ya da apoptozu kontrol eden genler inaktif hale gelir. Genomik stabilitede bozulma sonucu karsinogenez başlamaktadır (Ueno et al., 2003).

1.1.1.Kansere sebep olan etkenler

a. Genetik ve ailesel özellikler

Normal hücrelerde çekirdek, sitoplazma ve hücre zarında bulunan pek çok gen ve gen ürünü protein fonksiyonu görerek sağlıklı büyüme ve çoğalmayı sağlarlar. Fakat kanser hücrelerinde bu normal kontrol mekanizmalarının bozulması sebebiyle hücreler anormal bir şekilde bölünmeye devam eder (Kumar et al., 2014).

b. Fiziksel yaralanma ve genel enfeksiyonlar

Kanser ile ilgili çalışmalarda, bedensel yaralanmalar sonucunda virüs, mantar ve bakteri gibi nedenlerden dolayı meydana gelen enfeksiyonların tekrarlaması ile enfeksiyonun olduğu yerde kanser görülebileceği belirtilmiştir (Hemşirelik, 2013).

c. Virüsler

Vücuda giren onkojenik virüsler uygun şartlar oluştuğunda hücre çekirdeğinde genetik yapıyı değiştirirler. Bu şekilde DNA ve RNA yapısı bozulan hücre çoğalarak kanserli dokuya dönüşür (Allen et al., 2009).

d. Radyasyon

Yüksek miktarda radyasyona maruz kalınması deri kanserlerine neden olabilmektedir (Hemşirelik, 2013).

e. Hormonlar

Vücutta meydana gelen bazı hormonal değişiklikler kansere yol açabilmektedir. Erken yaşlarda adet gören (10-12 yaş) kız çocuklarında, çocuk doğurmayan ya da 30 yaşından

sonra doğum yapan kadınlar ile menopoza geç giren (50-60 yaşından sonra) kadınlarda meme kanseri riskinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Hemşirelik, 2013).

f. Toksik kimyasal maddeler

Fabrikalarda ve çoğu iş yerlerinde gün içerisinde insan sağlığını olumsuz yönde etkileyecek kimyasal etkenlere maruz kalan işçiler kanser hastalığı için risk grubundadır. Ayakkabı ve deri imalatında çalışanlar bu durumun en iyi örnekleridir. Sigara, kömür, egzoz ve fabrikalardan çıkan dumandan her gün solunum yolu ile inhale edilen binlerce toksik kimyasal madde kansere neden olabilmektedir (karbonmonoksit, etilen, arsenik gibi). Yine tüketilen besinlerin, bazılarının tarlalarda yetiştirilmesi ve hasadı sırasında, bazılarının fabrikalarda işleme ve paketlenme sırasında toksik maddelerle temas ettiği bildirilmektedir (çeşitli tarım ilaçları, makine yağları ve ambalaj maddeleri gibi) (Hemşirelik, 2013).

g. Diyet

Kanserojen maddeler bazı besin maddelerinin yapılarında bulunmaktadır. Bazı besin maddelerinin muhafaza edilmesi, saklanması, depolanması, hazırlanması ve hatalı pişirilmesi sırasında kullanılmaktadır.

Günümüzde yaygın olarak tüketilen bazı besinlerin (et, sucuk vb.) kömür ateşinde pişirilmesi sırasında kanserojen madde ile temas ettiği bilinmektedir. Kızartma yöntemiyle tüketilen besinler de kanserojen özellik taşımaktadır (Hemşirelik, 2013).

h. Alkol

Alkol birçok sağlık sorununa sebep olmakla beraber bazı kanser türlerine yakalanma riskini artırır (Allen et al., 2009).

1. Sigara

Sigara akciğer kanserinin en önemli sebebidir ve kanser riskini 10 ile 20 kat artırır (Colditz et al., 2003).

1.1.2. Kanser hücrelerinin özellikleri

Kanser hücrelerini normal hücrelerden ayıran bazı özellikleri vardır.

1) Büyüyüp çoğalmaları büyüme faktörlerine bağlı değildir. Çünkü kanser hücrelerinde otokrin uyarım denen bir mekanizma vardır. Bu mekanizma sayesinde kendi büyüme faktörlerini kendileri salgılayabilirler. Böylece kendi çoğalmalarını başka bir uyarıya gerek duymadan kendileri yönlendirebilirler. Kanser hücrelerinin büyüme faktörlerine gereksinim duymamalarının nedeni hücre içi sinyal sistemlerinde gerçekleşen bozukluklardır. Hücre çoğalmasını sağlayan sinyal yollarında görev yapan büyüme faktörü reseptörlerinin ya da başka proteinlerin kontrolsüz aktivitesinden kaynaklanır.

2) Tümör hücreleri normal hücrelerden farklı olarak büyümeyi durduran sinyallere karşı duyarsızdırlar. Bu özellikleri sayesinde apoptoz denilen programlı hücre ölümünden kaçabilirler. Tümör hücreleri apoptoza girmedikleri için DNA hasarına yol açan kemoteropötik ilaçlara karşı direnç gösterirler.

3) Kültür ortamında kanser hücreleri ile normal hücreler arasındaki en önemli fark normal hücrelerin çoğalmasının yoğunluğa bağlı inhibisyondan etkilenmesidir. Normal hücreler kültür ortamında bulunan büyüme faktörlerinin miktarına bağlı olarak belirli bir yoğunluğa erişince çoğalmayı keserek G₀ evresinde dururlar. Kanser hücreleri yoğunluğa bağlı inhibisyondan sorumlu normal hücrelerin durmasını sağlayan sinyallerden etkilenmezler.

4) Malin hücreler hücre dışı matriks bileşenlerini parçalayan ve böylece kanser hücresinin normal dokunun içine girişine olanak veren proteazlar salgılar. Örneğin kollejenaz karsinomların bazal laminayı parçalayıp aşarak altındaki bağ dokuya girişini kolaylaştırır.

5) Kanser hücreleri yeni kan damarlarının oluşumunu sağlayan büyüme faktörleri salgırlar. Bu durum anjiyogenez olarak adlandırılır. Bu sayede ihtiyaç duydukları oksijen ve besin ihtiyaçlarını karşılamış olurlar. Bu durum ise kanser hücrelerinin metastatik olarak yayılımına sebep olur.

6) Tümör hücreleri telomeraz enziminin aktivasyonundan dolayı hücreler sınırsız bölünme ve büyüme yeteneğine sahip olurlar (Macdonald et al., 2004).

1.1.3. Kanserın moleküler biyolojisi ve karsinogenez

Kanser, hem çevresel hem de kalıtsal etkenlerden kaynaklı, çok genli, çok faktörlü ve çok basamaklı gelişim gösteren bir hastalıktır (Lichtenstein et al., 2000, Olah, 2005). Kanserın mekanizmasının anlaşılabilmesi için kanserleşmeye sebep olan DNA değişimlerinin belirlenmesi gerekir (Vogelstein and Kinzler, 2004). Karsinogenez; sağlıklı bir hücrenin tümör hücresine dönüşmesi sürecini tanımlamaktadır ve bu süreç çok adımlı bir yapıda ilerlemektedir (Devi, 2005). Karsinogenez sürecini anlamak için; büyüme, invazyon ve metastaza sebep olan, hücre döngüsü mekanizmasında aksaklıklara yol açan genetik değişikliklerin nasıl meydana geldiğinin bilinmesi gerekir (Vogelstein and Kinzler, 2004). Karsinogenezin temelinde büyümenin kontrolünü sağlayan genlerdeki mutasyonlar rol almaktadır (Devi, 2005).

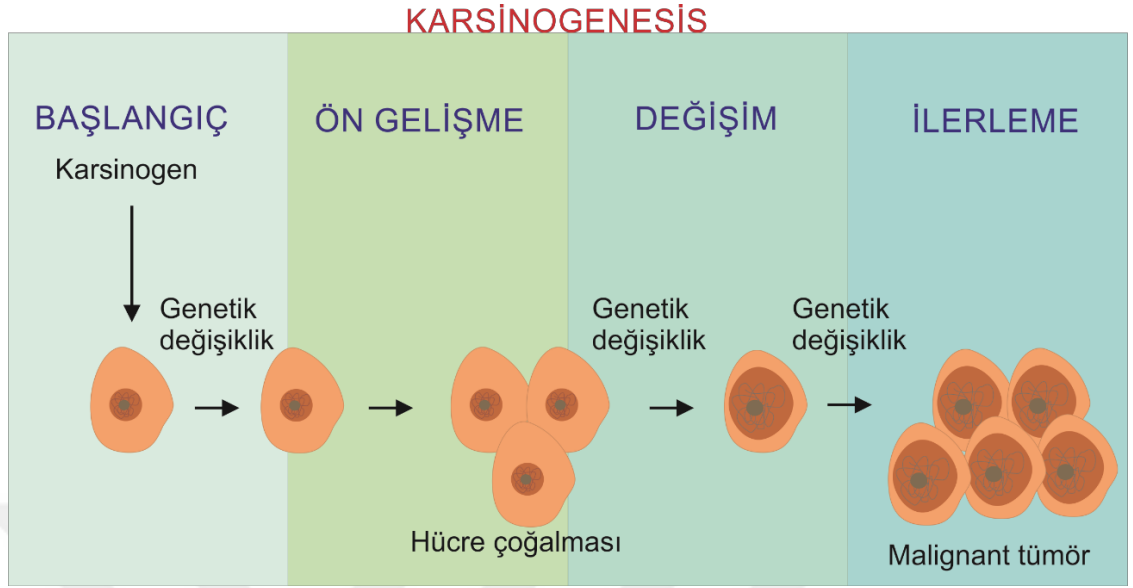
1.1.3.a. Karsinogenez süreci 3 aşamada ilerlemektedir

Başlama: Karsinogenezin ilk aşamasıdır. Hücresel genomda bir ya da daha fazla stabil olan değişiklikler meydana gelir. Bu mutasyonlar spontan olarak ortaya çıkabilir veya bir kanserojene maruz bırakılarak indüklenir (Tütün veya güneş gibi dış etkenler) ve

neoplazi gelişim potansiyelini yaratır. Bu dönüşüme neden olan DNA sekansları onkogenler olarak adlandırılırlar. Neoplastik transformasyon için birden fazla onkogenin aktivasyonu gerekli gibi görünse de, tümör oluşumunun tek bir gen mutasyonu ile başlatılabileceğini gösteren çalışmalar vardır. Bu tümör gen mutasyonları, hücresel davranış üzerinde derin etkilere sahiptir ve hücre proliferasyonunun kontrolü ile ilişkili sinyal yollarına katılan genlerin düzensizleşmesine neden olabilir (Devi, 2005).

İlerleme: Başlatılan hücre, daha da çoğalmaya teşvik edilinceye kadar zararsız kalır. Bu çoğalma birkaç basamak içerir ve teşvik eden uyaranlara tekrar tekrar ve uzun süre maruz kalmayı gerektirir. Neoplastik gelişme, hücre içi ve dışı hücresel ortamdan etkilenir. İlk mutasyonun ifadesi sadece diğer onkojenik mutasyonlar ile etkileşime değil aynı zamanda spesifik gen ekspresyonu (sitokinler, lipid metabolitleri ve bazı forbol esterlerin) kalıplarını (geçici olarak) değiştirebilen faktörlere de bağlı olacaktır. Bu etkileşimler, diğer değişiklikler arasında hücresel büyüme potansiyelinin artmasına neden olacaktır.

Yayılma: Neoplazmadaki ardışık değişimlerin giderek kötü huylu alt popülasyonlara yol açtığı süreçtir. Bu süreçte tümör büyümesi gerçekleşir. Bu süreç, kanserojen uyaranlara tekrar tekrar maruz kalındığında hızlanabilir. Bu aşamada hücreler çoğalır ve tümör boyutunda hızlı bir artışa neden olur. Tümör büyüdükçe, hücreler daha fazla mutasyona uğrayabilir, böylece hücre popülasyonunun heterojenitesi artar.



Şekil 1.1. Karsinogenezis süreci

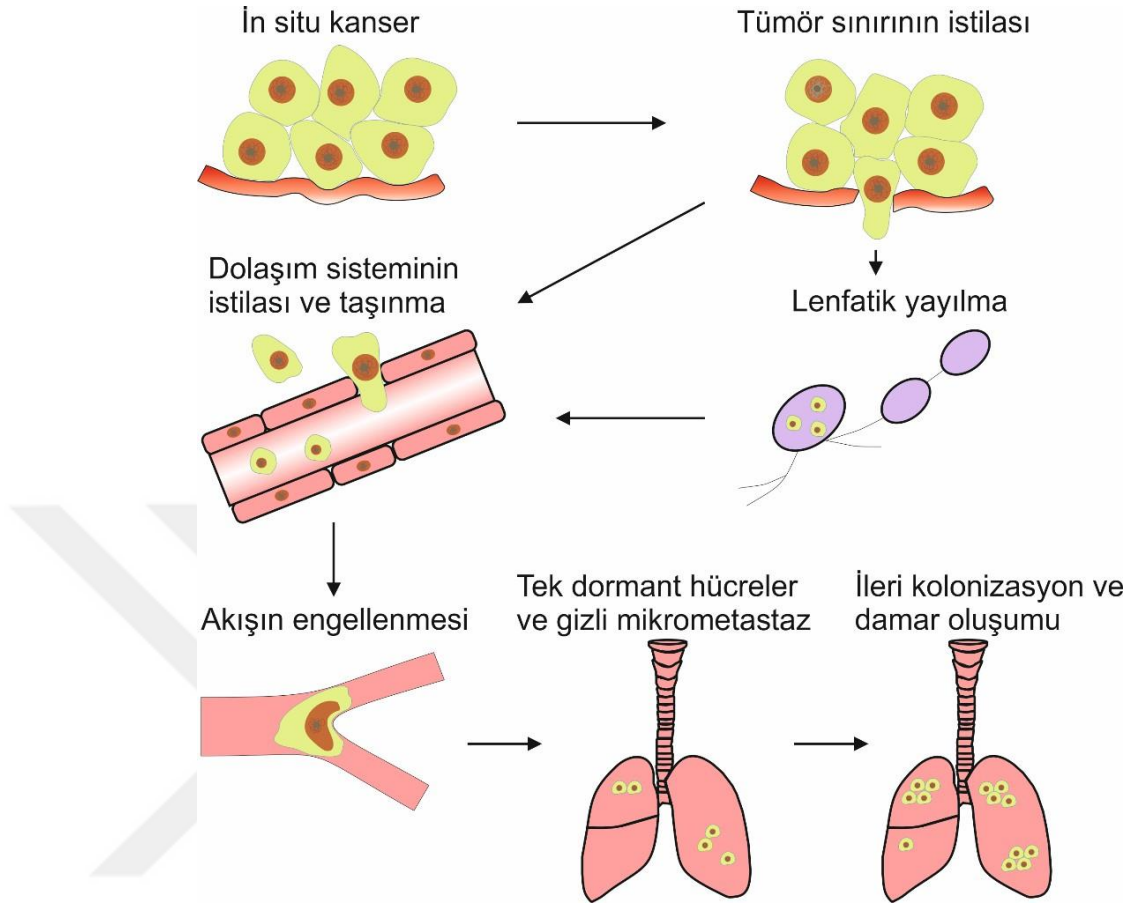
1.1.4. Tümör büyümesi ile ilgili temel prensipler

1.1.4.a. Metastaz

Tümör ilerledikçe, hücreler yapışma özelliklerini kaybettiği için tümör kitlesinden ayrışır ve komşu dokuları istila ederler. Bu hücreler ayrıca kan ve lenf dolaşımına girerler ve metastazı oluşturan birincil bölgeden uzaktaki diğer organlara / dokulara taşınırlar.

Metastaz oluşumuna neden olan basamaklar aşağıda görüldüğü gibidir :

- Komşu normal dokuların işgali,
- Kan ve lenfatik sistemlerde neoplastik hücrelerin yayılması,
- Uzaktaki bölgelerde ikincil tümör büyümesinin kurulması.



Şekil 1.2.Metastaz formasyonu

Tümör metastazındaki adımların birçoğu, spesifik hücre yüzey moleküllerini içeren hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerini içerir. Malin hücrelerin birbirine yapışması düşüktür, bu nedenle primer tümörden ayrılır ve diğer dokuları istila eder. Tümörlerin davranışı, hücre adezyon moleküllerinden (örn. Kaderinler) etkilenir. Gen mutasyonları, diğer faktörlerin yanı sıra tümör vaskülatürünün gelişimi ile metastaz oluşumunun itici gücüdür (Leal et al., 2012).

1.1.4.b. Tümör anjiyogenezi

Tümör büyümesi, yeterli miktarda kan tedarikiyle sağlanan toksik moleküllerin etkin bir şekilde uzaklaştırılması ve büyüme faktörlerinin (besinler, oksijen vb.) sağlanmasına bağlıdır. Yaklaşık olarak 2 mm'den daha büyük tümör büyümesi ancak vasküler arz sağlandığında gerçekleşebilir. Bundan dolayı, büyümek için vasküler oluşum anjiyogeneze ihtiyaç duyulmaktadır. Endotel hücresi proliferasyonunu uyaran bir takım doku faktörleri tanımlanmıştır. Tümör Anjiyogenez Faktörü (TAF), Transforme Edici Büyüme Faktörleri (TGF) ve interlökin 1 bunlara örnektir. Tümör vaskülatörünün oluşumu normal dokulardan farklıdır. Tümör damarları genellikle genişler, bükülür ve damarın endotel tabakasında tümör hücreleri içerebilir. Bu nedenle, normal dokulardaki kan akışı ile karşılaştırıldığında tümördeki kan akışı yavaştır. Ayrıca, tümör mikrovasküler yapısı plazma proteinlerine aşırı permeabilite gösterebilir (Leal et al., 2012).

1.1.4.c. Kanser genleri

Somatik gen mutasyonları, normal bir hücrenin bir kanser hücresine dönüştürülmesinde temel olaydır. Karsinogenez sürecinde rol oynayan birçok farklı gen vardır. Onkogenezin gen mutasyon teorisi, kanserojenlerin DNA ile etkileşimde bulunduğunu ve gende geri dönüşü olmayan değişikliklere neden olduğunu belirtmektedir (nokta mutasyonları). Bu değişiklikler, hücrelerin malign transformasyona yatkın olmasına sebep olur ve farklı gen sınıflarının ardışık mutasyonunu (örn., Proto-onkogenler, onkosupresör genler, hücre döngüsünde yer alan genler) içerir. Tümör mutasyonları arasındaki biyokimyasal etkileşimler, hücre sinyallerinde, proliferasyonda ve farklılaşmada kontrol kaybına neden olarak genomu istikrarsızlaştırır ve dokularda hücrelerin normal etkileşimlerini bozar. Karsinogenezde yer alan iki düzenleyici gen sınıfı vardır: Onkogenler ve onkosupresörler.

Tümör baskılayıcı genler negatif büyüme regülatörleridir. Normal hücrelerde hücre döngüsü ilerlemesini kontrol ederek çoğalmayı düzenlerler. Bu genlerdeki mutasyonlar,

karsinogenezi teşvik eden bir işlev kaybına neden olur. Rb ve p53 genleri üzerinde en fazla çalışılan onkosupresörlerdir. Bu genler tarafından kodlanan proteinler, gen ürünlerinin transkripsiyonunu bloke ederek hücre döngüsünün ilerlemesini inhibe ederler. Rb genindeki mutasyonlar, hücre çoğalmasını arttıran hücre döngüsü ilerlemesinin normal inhibisyon kontrolünün kaybedilmesine neden olabilir. p53, genetik istikrarın ve hücresel dengenin muhafaza edilmesinde önemli bir role sahiptir. p53'teki fonksiyon kaybına neden olan mutasyonlar; apoptozun bastırılmasına, hücre bölünmesinin ilerlemesine ve hücrelerin farklılaşmasının önlenmesine neden olarak neoplazmanın gelişimine yol açar (Leal et al., 2012).

1.1.5. Tümör oluşumunun moleküler mekanizması

Canlıların yaşamını devam ettirebilmesi için hücrelerin sürekli yenilenmesi gerekir. Yaşlanan ve ölen hücreler vücuttan atılırken yerlerine yenileri gelir. Bu denge belli genlerin kontrolü altındadır. Bazı genler hücrelerin bölünüp çoğalmasını sağlarken, bazıları da aşırı hücre çoğalmasını önlerler (Kumar et al., 1992). Bunlar; proto-onkogenler ve anti-onkogenler (tümör supresör genler)'dir. Bu genlerin ekspresyonunun bozulması hücrelerin kontrolsüz çoğalmasına sebep olur (Sutherland, 1999).

Proto-onkogenler: Hücrelerin çoğalmasını kontrol eden genlerdir. Proto-onkogenlerde meydana gelen mutasyonlar bu genlerin onkogenlere dönüşmesine sebep olur. Onkogenler ise, hücre proliferasyonunu hızlandıran genlerdir. Aşırı ifade olmaları durumunda kansere sebep olurlar (Willett et al., 2000).

Günümüzde proto-onkogenlerin; üreme faktörlerini, hücre yüzey reseptörleri ve onların ligandlarını, hücre yüzey reseptörlerinden nükleusa üremeyi stimüle eden sinyalleri taşıyan sinyal moleküllerini (intraseküler sinyal yolağı bileşenleri), gen ekspresyon oranını kontrol eden nükleer transkripsiyon faktörlerini, hücre siklusunun ilerlemesi, DNA bağlayan proteinler, hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması ve apoptotik hücre oluşumunun moleküler kontrolüne katılan molekülleri ve hücre siklusu yolağındaki

bileşenler gibi normal hücre üremesinin regülasyonu için gerekli proteinleri kodladıkları bilinmektedir , (Willett et al., 2000, Brenner et al., 1999).

Hücre siklusu regülatörleri, Int-2 (fibroblast büyüme faktörü reseptörü), sis (trombositlerden salınan büyüme faktörü reseptörü), fms (koloni uyarıcı faktör reseptörü tip 1), erb-B (epidermal büyüme faktörü reseptörü) ve ras proto-onkogenleri proto-onkogenlere örnek olarak verilebilir .

Anti-onkogenler (tümör supresör genler): Hücre çoğalmasını engelleyen genlerdir. Bu genler, aktivitelerini kaybettikleri zaman kansere sebep olmaktadır. Tümör supresör genler, hücre bölünmesini baskılayan genlerdir. Her iki allelde işlev kaybı, kontrolsüz hücre bölünmesine ve tümör büyümesine neden olur. Normal allelin varlığı tümör gelişimini baskılar. Bir etki oluşması için işlev kaybı her iki alleli de etkilemelidir (yani tümör supressör genlerin mutasyonları, hücresel düzeyde resesiftir) (Sutherland, 1999, Willett et al., 2000, Greenberg, 2001, Dzivenu et al., 2009, Dunn et al., 2002).

1.1.6. p53 geni

p53 geni ilk defa 1979 yılında Lane ve Crawford, bunların hemen arkasından da Linzer ve Levine tarafından nükleer fosfoprotein olarak tanımlanmıştır. David Lane ise immunohistokimyasal yöntemlerle insan tümörlerinde p53 genini göstermiştir (Alberts et al., 1994, Levine et al., 1991).

p53 geni 17. kromozomun kısa kolu üzerinde 17p13-1 pozisyonunda bulunan bir tümör süpressör gendir. 16.20 kb uzunluğunda olan bu gen 11 ekzondan oluşmaktadır (Nigro et al., 1989, Levine, 1997).

p53 geninde meydana gelen değişiklikler insan tümörlerinde en sık rastlanan genetik değişikliklerdir (Harris, 1996, Prives and Hall, 1999). İlk tanımlandığı yıllarda sadece bir onkogen olarak görev yaptığı düşünülen p53 geninin daha sonraları sadece mutant

formunun anormal hücre büyümesinde rol oynadığı, normal p53 geninin ise tümör oluşumunu baskıladığı anlaşılmıştır (Greenblatt et al., 1994).

p53 geni hücrelerde normal koşullarda bazal seviyede ve inaktif halde bulunur. Fizyolojik şartlar altında yaşam süresi 20 dakika gibi oldukça kısadır ve ubiquitin aracılığı ile proteolize uğrar. Hücre bölünmesine ya da hücrenin hayatını sürdürmesine müdahale etmez (Haupt et al., 1997, Kubbutat et al., 1997).

Hücrede meydana gelen stres durumları p53'ün aktivasyonuna sebep olabilir. Hipoksi, DNA'da oluşan hasarlar, büyüme sinyallerinin düzensizliği, ısı şoku, onkogenler, nitrik okside maruz kalma p53'ün aktivasyonuna sebep olan sinyallere örnek olarak verilebilir. p53 DNA'nın ve genel anlamda genomun içerdiği bilginin olduğu gibi korunmasını sağlaması nedeniyle "genomun gardiyanı" adını almıştır. p53 miktarı stres koşullarında hızla artar ve aktif hale gelir.

p53 hücrelerde iki şekilde aktivite gösterir:

1-Hücre siklusunun baskılanması ile büyümenin durdurulması

2-Apoptozis

Hücre bölünmesi sırasında G1'den S fazına geçişi kontrol eden mekanizma p53'ün etki ettiği ana mekanizmadır. DNA'da hasar meydana geldiğinde p53 DNA'nın tamirini hücre siklusunun G1 aşamasında bloke eder ve DNA tamir genlerini aktive eder. Zarar görmüş DNA'sı olan ve bunu tamir edemeyen hücre p53 tarafından apoptoza gönderilir. Hücrelerde p53 inaktif olduğu zaman hasar görmüş DNA tamir edilemez ve hücre içerisinde mutasyonlar sabitlenir. Bu durum ise hücrelerde malign transformasyona sebep olur. DNA hasarının yanı sıra, hipoksi de p53'ü aktive edebilir. Tümör anjiogenezi tümör hücrelerinin büyümesinde önemlidir. Hipoksiye giren tümör hücrelerinin p53 genleri eğer aktifse apoptoza giderler. Fakat p53 genleri mutasyona

uğramışsa o zaman hipoksik tümör hücreleri apoptoza dirençli hale gelir (Tsujiimoto et al., 1985).

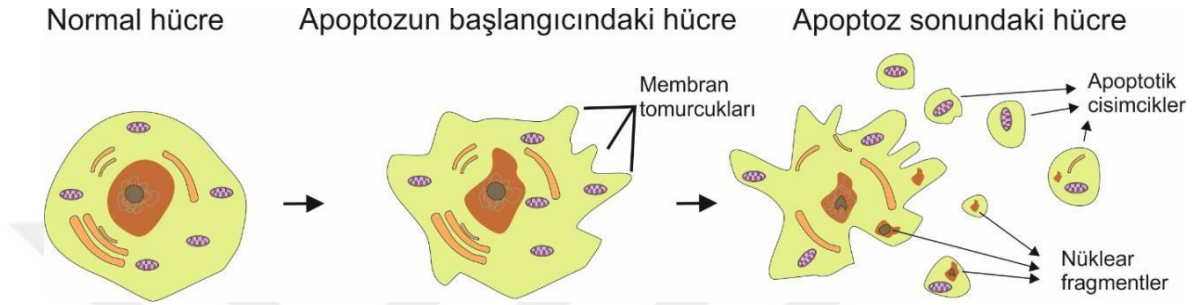
1.2. Apoptoz (Programlı hücre ölümü)

Fizyolojik şartlarda ihtiyaç duyulmayan veya patolojik koşullarda fonksiyonları bozulan hücrelerin, çevreye zarar vermeden, genetik faktörlerin kontrolünde programlı bir şekilde olan ölümüne “apoptoz” denir (Kerr et al., 1972, Elmore, 2007, Zakeri and Lockshin, 2008). Çok hücreli organizmalarda, hücre çoğalması ve hücre ölümü arasında sürekli bir denge mevcuttur. Bu denge organizmanın gelişimi ve doku homeostazisinin sağlanması açısından büyük önem taşır. Bu dengenin bozulması embriyogenez sürecinde hatalara yol açar, ayrıca dejeneratif hastalıkların ve kanserin gelişiminde rol oynar (Danial and Korsmeyer, 2004). Yaşam süresince dokulardaki hücre sayısı apoptoz sayesinde dengede tutulur (Kerr et al., 1972). Programlı hücre ölümü, ökaryotik hücre ölümünün en sık formu olup, tümör regresyonu ve embriyonik gelişim sırasında görülür (Wyllie et al., 1992).

Apoptozis, dokuların gelişim evrelerinde, dokulardaki hücre sayısını belirleyici homeostatik mekanizmada, immün olaylarda, hücrelerin hastalık veya zararlı ajanlara bağlı hasarlanmalarında ve yaşlanma sürecinde rol oynar (Thompson, 1995). Apoptoz, çeşitli eksojen ve endojen uyaranlar tarafından uyarılabilir. Kemoterapötik ajanlar, iyonlaştırıcı radyasyon, oksidanlar, hipertermi, büyüme faktörü veya hormon eksikliği, sitokinler, glukokortikoidler ve çeşitli kimyasallar başlıca apoptoz indükleyicileridir (Majno and Joris, 1995, Mates and Sanchez-Jimenez, 2000).

Apoptoza uğrayan bir hücrenin morfolojik ve biyokimyasal özelliklerinde bir takım değişiklikler oluşur. Öncelikle, apoptoza uğrayan hücrenin tutunduğu yüzeyle arasındaki adezyon ortadan kalkar ve hücre yuvarlaklaşır. Aynı zamanda apoptotik hücrenin komşu hücrelerle olan teması da ortadan kalkar. Apoptoza giden hücrenin hacminde azalma olur ve hücre büzülmesi meydana gelir. Kromatin nüklear membrana yaklaşır ve yoğunlaşır. Hücre membranında kabarcık şeklinde girintili-çıkıntılı yapılar

oluşur ve membran tomurcuklanması meydana gelir. Son olarak apoptotik hücre; apoptotik cisimcik (“apoptotic body”) adı verilen, membranla çevrili, içinde sitoplazmayı, hücresel organelleri ve nükleus fragmentlerini içeren küçük parçalara ayrılır (Willingham, 1999, Saraste and Pulkki, 2000).



Şekil 1.3. Apoptoz sırasında hücrede meydana gelen morfolojik değişimler

1.2.1. Apoptozun morfolojisi

Apoptoz sırasında ortaya çıkan çeşitli morfolojik değişiklikler ışık ve elektron mikroskopisi ile tespit edilmiştir (Hacker, 2000, Elmore, 2007). Apoptozun ilk aşaması boyunca, hücre küçülmesi ve piknozis, ışık mikroskopisi ile görülebilir (Kerr et al., 1972, Elmore, 2007). Hücrenin büzülmesi ile hücrelerin boyutları küçülür, sitoplazma yoğunlaşır ve organeller sıkı bir şekilde paketlenir. Piknozis kromatin yoğunlaşmasının bir sonucudur ve bu apoptozun en karakteristik özelliğidir. Hematoksilen ve eozin boyaması ile yapılan histolojik incelemede, apoptoz tek hücreleri veya küçük hücre kümelerini içerir. Apoptotik hücre, koyu eozinofilik sitoplazma ve yoğun mor nükleer kromatin parçaları ile yuvarlak veya oval bir kitle olarak görülür. Elektron mikroskobu, subselüler değişiklikleri daha iyi tanımlayabilir.

Kromatin yoğunlaşma evresinin başlangıcında, elektron yoğun nükleer madde karakteristik olarak nükleer membranın altında çevresel olarak toplanır, ancak düzgün yoğun çekirdekler de olabilir. Plazma zarının patlamasının ardından karyoreksis ve "tomurcuklanma" adı verilen bir süreç boyunca hücre parçalarının apoptotik cisimlere ayrılması meydana gelir. Apoptotik cisimler, nükleer bir fragman içeren veya içermeyen

sıkı bir şekilde paketlenmiş organellerin bulunduğu sitoplazmadan oluşur. Organel bütünlüğü halen muhafaza edilmekte ve hepsi bozulmamış bir plazma membranı içine alınmaktadır.

Bu cisimler daha sonra makrofajlar, parenkimal hücreler veya neoplastik hücreler tarafından fagositlenir ya da fagolizozomlar içinde degrade edilirler. Apoptotik hücreleri parçalayan ve sindiren makrofajlara "yapışkan vücut makrofajları" denir ve çoğunlukla lenfoid foliküllerin rejeneratif germinal merkezlerinde veya bazen timik kortekste bulunur. Apoptotik hücrelere ait nükleer atıkların parçaları esnek cisimciklerdir. Aslında, apoptozis süreciyle veya apoptotik hücrelerin çıkarılmasıyla ilişkili hiçbir enflamasyon reaksiyonu yoktur, çünkü: (1) apoptotik hücreler hücresel bileşenlerini interstisyel dokuya salmamaktadır; (2) çevreleyen hücreler tarafından çabucak fagositize edilirler, bu nedenle muhtemelen sekonder nekroz önlenir ; ve (3) yutulan hücreler antienflamatuvar sitokinler üretmezler (Savill and Fadok, 2000, Kurosaka et al., 2003).

1.2.2. Apoptozun moleküler mekanizması

Apoptoz mekanizmaları moleküler olayların enerji bağımlı bir kaskadını içerir ve oldukça karmaşıktır. Bugüne kadar yapılan araştırmalar, iki ana apoptotik yol olduğuna işaret ediyor: ekstrinsik veya ölüm reseptörü yolağı ve intrinsik veya mitokondriyal yol. Bununla birlikte, şu anda iki yolağın birbirine bağlı olduğunu ve bir yolaktaki moleküllerin diğerini etkileyebileceğine dair kanıtlar vardır (Igney and Krammer, 2002). T hücrelerinin aracılık ettiği sitotoksiteyi ve perforin-granzime dayalı olarak hücrenin öldürülmesini içeren ek bir yol vardır. Perforin / granzim yolu, ya granzim B ya da granzim A aracılığıyla apoptozu indükleyebilir. Ekstrinsik, intrinsik ve granzim B yolları aynı terminal veya ölüm yolunda birleşir. Bu yol, kaspaz-3'ün kesilmesi ile başlatılır ve DNA parçalanması, sitoskeletel ve nükleer proteinlerin bozunması, proteinlerin çapraz bağlanması, apoptotik cisimlerin oluşması, fagositik hücre reseptörleri için ligandların ekspresyonu ve son olarak fagositik hücreler tarafından alınması ile sonuçlanır. Granzim A yolu da yine benzer şekilde aktivite gösterir,

kaspazdan bağımsız bir hücre ölüm yolunu tek zincirli DNA hasarı vasıtasıyla aktive eder (Martinvalet et al., 2005).

1.2.3. Apoptotik hücrelerin biyokimyasal özellikleri

Apoptotik hücreler, protein bölünmesi, protein çapraz bağlanma, DNA parçalanması ve fagositik tanıma gibi birtakım biyokimyasal modifikasyonları sergilerler (Hengartner, 2000). Kaspazlar pek çok hücrede aktif olmayan bir proenzim formunda yaygın olarak eksprese edilir ve aktive olduktan sonra çoğunlukla diğer prokaspazları aktive ederek bir proteaz kaskadının başlatılmasına izin verir. Bazı prokaspazlar ayrıca otomatik olarak da aktif hale gelebilirler. Bir kaspazın diğer kaspazları aktive edebildiği bu proteolitik kaskad, apoptotik sinyal yolunu güçlendirir ve böylece hızlı hücre ölümüne yol açar.

Kaspazların proteolitik aktivitesi vardır ve proteinleri aspartik asit kalıntılarıyla parçalayabilir, ancak farklı kaspazların komşu aminoasitlerin tanınmasını içeren farklı spesifiklikleri vardır. Kaspazlar başlangıçta aktive edildiğinde, hücre ölümüne karşı geri dönüşümsüz bir şekilde başlamış olur. Bugüne kadar, 10 tane ana kaspaz tanımlanmış ve başlatıcılar (kaspaz-2, -8, -9, -10), efektörler veya uygulayıcılar (kaspaz-3, -6, -7) ve inflamatuvar kaspazlar (kaspaz-1, -4, -5) olarak kategorize edilmiştir (Cohen, 1997, Rai et al., 2005).

Saptanan diğer kaspazlar, septik şok sırasında apoptozu ve sitokin olgunlaşmasını düzenleyen kaspaz -11, amiloid- β ile endoplazmik spesifik apoptozise ve sitotoksositeye aracılık eden kaspaz -12, bir sığırcı geni olarak tanımlanan kaspaz-13 ve olgun dokularda ifade edilmeyip embriyonik dokularda oldukça yüksek oranda ifade edilen kaspaz-14'tür (Hu et al., 1998, Nakagawa et al., 2000, Koenig et al., 2001, Kang et al., 2002). Kapsamlı protein çapraz bağlama, apoptotik hücrelerin başka bir özelliğidir ve doku transglutaminazının ekspresyonu ve aktivasyonu yoluyla meydana gelir (Nemes et al., 1996). Endonükleaz bağımlı Ca^{+2} ve Mg^{+2} tarafından DNA parçalanması da oluşur ve 180 ila 200 baz çiftli DNA fragmanlarının oluşmasına neden olur (Bortner et al., 1995).

Bir diğer biyokimyasal özellik, bitişik hücreler tarafından apoptotik hücrelerin erken dönemde fagositik olarak tanınmasıyla sonuçlanan hücre yüzeyi belirteçlerinin ekspresyonudur ve çevresindeki dokuya en az ödün verilmek suretiyle hızlı fagositoz sağlar. Bu, plazma zarının dış tabakalarında ekspresyonu sağlamak için hücrenin çift katlı lipid tabakasının normal içe dönük fosfatidilserinin hareketi ile sağlanır (Bratton et al., 1997). Fosfatidilserinin dışa salınımı, apoptotik hücrenin yüzeyindeki fagositler için iyi bilinen bir tanımlayıcı ligand olmasına rağmen, yeni çalışmalar, apoptotik hücre temizlemesi sırasında diğer proteinlerin hücre yüzeyinde de maruz kaldığını göstermiştir.

1.2.4. Yolaklar

1.2.4.a. Ekstrinsik yolak

Apoptozu başlatan ekstrinsik sinyal yolları, transmembran reseptör aracılı etkileşimleri içerir. Bunlar, tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör gen süper ailesinin üyesi olan ölüm reseptörlerini içerir (Locksley et al., 2001). TNF reseptör ailesinin üyeleri, benzer sistein açısından zengin hücre dışı alanları paylaşmaktadır ve "ölüm domaini" olarak adlandırılan yaklaşık 80 aminoasitlik bir sitoplazmik alana sahiptir (Ashkenazi and Dixit, 1998). Bu ölüm domaini, ölüm sinyalinin hücre yüzeyinden hücre içi sinyal yollarına iletilmesinde kritik bir rol oynamaktadır. Bugüne kadar, en iyi tanımlanmış ligandlar ve bunlara karşılık gelen ölüm reseptörleri, FasL / FasR, TNF- α / TNFR1, Apo3L / DR3, Apo2L / DR4 ve Apo2L / DR5'dir (Chicheportiche et al., 1997, Ashkenazi and Dixit, 1998, Peter and Krammer, 1998, Suliman et al., 2001, Rubio-Moscardo et al., 2005).

Apoptozun ekstrinsik fazını tanımlayan olayların dizisi, FasL / FasR ve TNF- α / TNFR1 modelleriyle en iyi şekilde karakterize edilir. Bu modellerde reseptörlerin kümelenmesi ve homolog trimerik ligand ile bağlanması vardır. Fas ligandının Fas reseptörüne bağlanması, adaptör proteini FADD'yi bağlar ve TNF ligandının TNF reseptörüne bağlanması, FADD ve RIP alımıyla TRADD adaptör proteininin bağlanmasıyla

sonuçlanır (Hsu et al., 1995, Wajant, 2002). FADD daha sonra, ölüm efektör domaininin dimerizasyonu yoluyla prokaspaz -8 ile bağlanır.

Bu noktada, ölüme neden olan bir sinyal kompleksi (DISC) oluşur ve prokaspaz-8'in otomatik katalitik aktivasyonu meydana gelir (Kischkel et al., 1995). Kaspaz-8 etkinleştirildikten sonra, apoptozun aktivasyon aşaması tetiklenir. Ölüm reseptör aracılı apoptoz, c-FLIP adı verilen ve FADD ve kaspaz-8'e bağlanacak bir protein ile inhibe edilebilir (Kataoka et al., 1998). Potansiyel apoptoz düzenlenmesinin bir başka noktasında, Toso adı verilen, kaspaz-8 işleminin inhibisyonu yoluyla T hücrelerinde Fas'ın indüklediği apoptozu bloke ettiği gösterilen bir protein bulunur (Hitoshi et al., 1998).

1.2.4.b. Perforin/Granzim yolağı

T hücre aracılı sitotoksikite tip IV aşırı duyarlılığın bir varyantıdır. Bu sitotoksik T lenfositleri (CTL'ler) hedef hücreleri ekstrinsik yol ile öldürebilirler ve FasL / FasR etkileşimi, CTL'nin indüklediği apoptozun baskın yöntemidir (Brunner et al., 2003). Bununla birlikte, sitotoksik etkilerini tümör hücreleri ve virüs ile enfekte olmuş hücrelere, transmembran gözenek oluşturan molekül perforinin salgılanmasını ve ardından gözenek boyunca ve hedef hücre içine sitoplazmik granüllerin ekzofitik bir şekilde salınmasını içeren yeni bir yol yoluyla uygulanabilirler (Trapani and Smyth, 2002). Serin proteazlar granzim A ve granzim B, granüller içerisinde en önemli bileşenlerdir (Elmore, 2007).

Granzim B proteinleri aspartat kalıntılarında parçalayacak ve dolayısıyla prokaspaz-10'u aktive edecek ve ICAD (Caspase Activated DNase'nin İnhibitörü) gibi faktörleri parçalayabilecektir (Sakahira et al., 1998). Raporlar ayrıca granzim B'nin Bid'in spesifik kesimi ve sitokrom c salınımının indüksiyonu yoluyla ölüm sinyalinin amplifikasyonu için mitokondriyal yolağı kullanabileceğini göstermiştir (Barry and Bleackley, 2002, Russell and Ley, 2002). Bununla birlikte, granzim B de doğrudan kaspaz -3'ü aktive edebilir. Hem mitokondriyal yolağı hem de kaspaz-3'ün doğrudan harekete geçirilmesi,

granzim B ile indüklenen öldürme için kritik öneme sahiptir (Goping et al., 2003). Son bulgular, bu granzim B sitotoksikite yönteminin, tip 2 yardımcı T (Th2) hücrelerin T hücre genişlemesi için bir kontrol mekanizması olarak kritik olduğunu göstermektedir (Devadas et al., 2006).

Yapılan araştırmalar, aktive Th2 hücrelerinin T hücresi reseptörünün indüklediği apoptoz ile ne ölüm reseptörlerinin ne de kaspazların rol oynamadığını gösteriyor çünkü ligandlarının bloke edilmesi apoptoz üzerinde hiçbir etkiye sahip değildir. Öte yandan, Fas-Fas ligand etkileşimi, ölüm alanlarına sahip adaptör proteinleri ve kaspazlar, sitotoksik Tip 1 yardımcı hücrelerin apoptozu ve regülasyonunda yer alırken granzim B'nin herhangi bir etkisi yoktur. Granzim A, sitotoksik T hücresi tarafından uyarılmış apoptozda da önemlidir ve kaspazdan bağımsız yolları aktive eder. Hücrelere girdikten sonra, granzim A, tümör süpresör gen ürünü olan DNaz NM23-H1 vasıtasıyla DNA kesimini aktive eder (Fan et al., 2003). Bu DNaz, tümör hücresi apoptozunun indüksiyonu yoluyla kanseri önlemek için bağışıklık surveyansında önemli bir role sahiptir.

Nükleozom montaj proteini SET normalde NM23-H1 genini inhibe eder. Granzim A proteazı SET kompleksini parçalayarak NM23-H1'in inhibisyonunu serbest bırakarak apoptotik DNA yıkımına neden olur. NM23-H1'in engellenmesine ek olarak, SET kompleksi kromatin yapısında ve DNA onarımında önemli işlevlere sahiptir. Bu kompleksi oluşturan proteinler (SET, Ape1, pp32 ve HMG2) kromatin ve DNA yapısını korumak için birlikte çalışıyor gibi görünüyor (Lieberman and Fan, 2003). Bu nedenle, bu kompleksin granzim A ile inaktivasyonu DNA ve kromatin yapısının bütünlüğünü bloke ederek apoptozise de katkıda bulunur.

1.2.4.c. İntrinsik yolak

Apoptozu başlatan intrinsik sinyal yolları, hücre içindeki hedeflere doğrudan etki eden ve mitokondriyal başlatılan olaylar olan hücre içi sinyaller üreten reseptör aracılı olmayan çeşitli uyarılar dizisini içerir. İçsel yolu başlatan uyarılar, pozitif veya

negatif bir şekilde hareket edebilecek hücre içi sinyaller üretirler. Negatif sinyaller, bazı ölüm faktörlerinin, hormonların ve sitokinlerin yokluğunu içerir; bu da ölüm programlarının bastırılmamasına ve dolayısıyla apoptozun tetiklenmesine neden olabilir.

Başka bir deyişle, faktörlerin geri çekilmesi, apoptotik supresyonun kaybı ve sonra apoptozun aktivasyonu meydana gelir. Olumlu bir şekilde hareket eden diğer uyarılar, bunlarla sınırlı olmamak üzere, radyasyon, toksinler, hipoksi, hipertermi, viral enfeksiyonlar ve serbest radikallerdir. Tüm bu uyarılar, mitokondriyal geçirgenlik geçiş (MPT) porlarının açılmasına sebep olan, mitokondriyal transmembran potansiyelini kaybetmesine ve sitozole intermembran boşluğundan normalde salıverilmiş pro-apoptotik proteinlerin iki ana grubunun serbest bırakılmasına neden olan iç mitokondriyal zardaki değişikliğe neden olur (Saelens et al., 2004). Birinci grup sitokrom c, Smac / DIABLO ve serin proteaz HtrA2 / Omi'den oluşur (Du et al., 2000, Garrido et al., 2006). Bu proteinler kaspaz bağımlı mitokondriyal yolağı aktive eder.

Sitokrom c, bir "apoptozom" oluşturan prokaspaz-9 ve Apaf-1'i bağlar ve aktive eder (Chinnaiyan, 1999, Hill et al., 2004). Prokaspaz-9'un bu şekilde kümelenmesi kaspaz -9 aktivasyonuna yol açar. Smac / DIABLO ve HtrA2 / Omi'nin IAP (apoptoz proteinlerinin inhibitörleri) aktivitesini inhibe ederek apoptozu teşvik ettiği bildirilmektedir (van Loo et al., 2002, Schimmer, 2004). Pro-apoptotik proteinlerin ikinci grubu, AIF, endonükleaz G ve CAD apoptoz sırasında mitokondriyumdan salınır, ancak bu hücrenin ölmeye karar verdikten sonra meydana gelen geç bir olaydır.

AIF, çekirdeğe girer ve DNA'nın 50-300 kb'lık parçalara ayrılmasına ve çevresel nükleer kromatinin yoğunlaşmasına neden olur (Joza et al., 2001). Nükleer yoğunlaşmanın bu erken biçimi "evre I" yoğunlaşma olarak adlandırılır (Susin et al., 2000). Endonükleaz G aynı zamanda nükleusa translokasyon yapar ve burada nükleer kromatin parçalanarak oligonükleozomal DNA fragmanları üretilir (Li et al., 2001). AIF ve endonükleaz G'nin her ikisi de kaspazdan bağımsız bir şekilde çalışır. CAD, daha sonra mitokondriden salınır ve kaspaz-3 ile bölünmeden sonra oligonükleozomal DNA

parçalanmasına ve daha belirgin ve gelişmiş bir kromatin yoğunlaşmasına neden olan çekirdeğe translokasyon yapar (Enari et al., 1998).

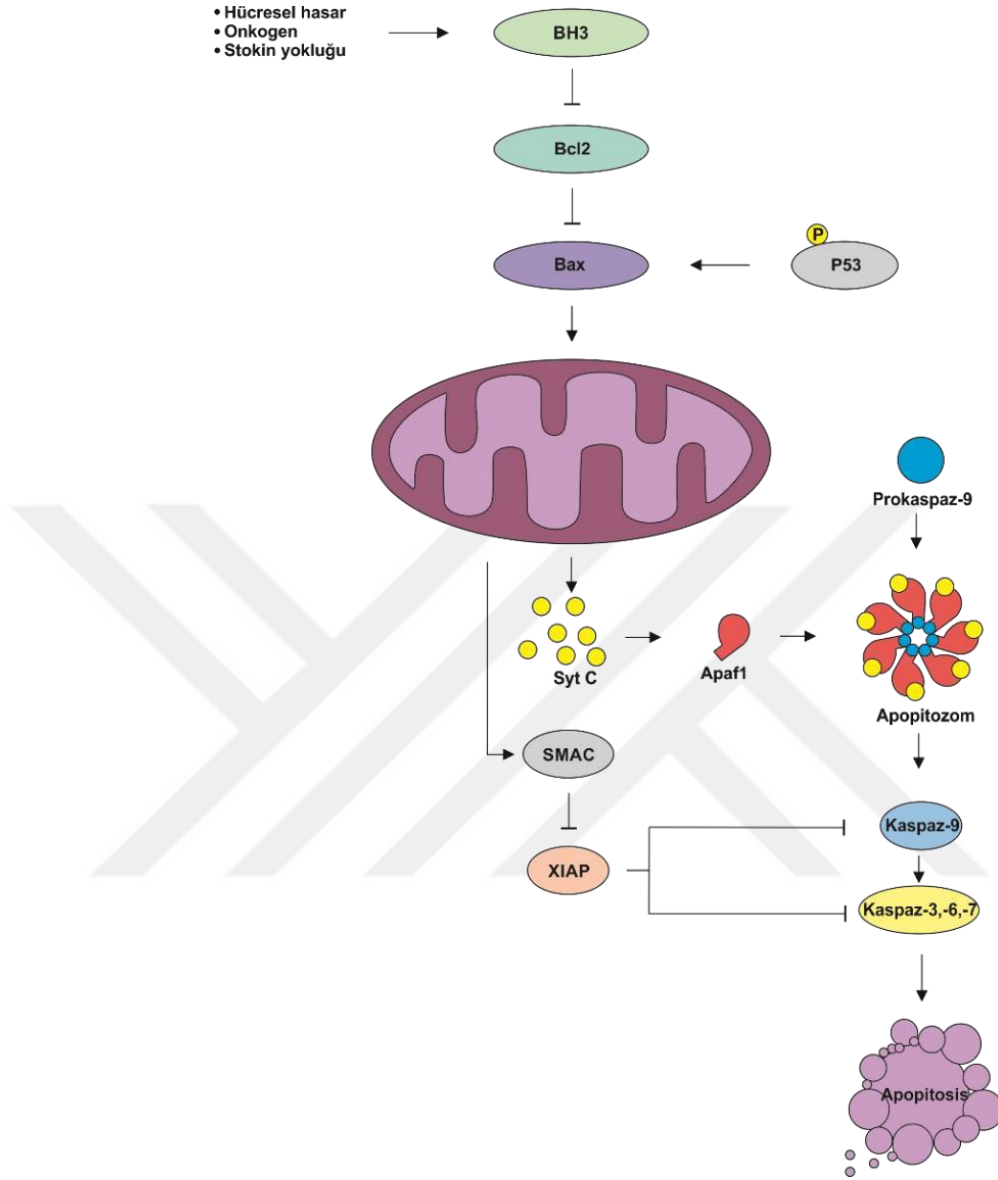
Daha sonra meydana gelen ve daha belirgin olan bu kromatin yoğunlaşması "evre II" yoğunlaşma olarak adlandırılır (Susin et al., 2000). Bu apoptotik mitokondriyal olayların kontrolü ve düzenlenmesi, proteinlerin Bcl-2 familyası üyeleri vasıtasıyla gerçekleşir (Cory and Adams, 2002). Tümör süpresör protein p53, proteinlerin Bcl-2 ailesinin düzenlenmesinde kritik bir role sahiptir, ancak kesin mekanizmalar henüz aydınlatılmamıştır (Schuler and Green, 2001). Bcl-2 ailesi proteinleri mitokondriyal membran geçirgenliğini yönetir ve pro-apoptotik veya antiapoptotik olabilir. Bugüne kadar, Bcl-2 ailesinde toplam 25 gen tespit edilmiştir. Bazı anti-apoptotik proteinler arasında Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, BAG bulunur ve bazı pro-apoptotik proteinler Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik ve Blk'dır.

Bu proteinler özel bir öneme sahiptir, çünkü hücrenin apoptoza gidip gitmeyeceğini belirleyebilirler. Bcl-2 protein ailesinin ana etki mekanizmasının mitokondriyal membran geçirgenliğinin değiştirilmesi yoluyla mitokondriyondaki sitokrom c salınımının düzenlenmesi olduğu düşünülmektedir. Birkaç muhtemel mekanizma incelenmiştir ancak hiçbiri kesin olarak ispatlanmamıştır. Apoptozun Fas yolundaki mitokondriyal hasara, Bid'in kaspaz -8 ile kesilmesi aracılık eder (Li et al., 1998). Bad'in serin fosforilasyonu, çok fonksiyonlu fosfoserin bağ moleküllerinin bir ailesinin üyesi olan 14-3-3 ile ilişkilidir. Bad fosforile edildiğinde, 14-3-3 tarafından yakalanır ve sitoplazmada tutulur ancak Bad fosforile edilmediğinde, sitokrom c'yi serbest bırakmak için mitokondriye yer değiştirir (Zha et al., 1996). Bad aynı zamanda Bcl-Xl veya Bcl-2 ile heterodimerize olur, onların koruyucu etkilerini nötralize eder ve hücre ölümünü teşvik eder (Yang et al., 1995).

Bad tarafından kenetlenmediğinde, hem Bcl-2 hem de Bcl-XL, mekanizma iyi anlaşılmamış olmasına rağmen, sitokrom C'nin mitokondriyumdan salınmasını engeller. Raporlar, Bcl-2 ve Bcl-XL'nin öncelikle kaspaz proteazlarının aktivasyonunu kontrol ederek apoptotik ölümü engellediğini gösteriyor (Newmeyer et al., 2000). "Aven"

olarak adlandırılan ek bir protein hem Bcl-XL hem de Apaf-1'i bağlar ve böylece prokaspaz-9'un aktivasyonunu önler (Chau et al., 2000). Bcl-2 veya Bcl-XL'in aşırı sentezlenmesinin diğerini down-regüle ettiğini, bu iki protein arasında karşılıklı bir regülasyona işaret ettiğini gösteren kanıt vardır. Puma ve Noxa, aynı zamanda pro-apoptoz ile ilgilenen Bcl2 ailesinin iki üyesidir.

Puma, p53 aracılı apoptozda önemli bir rol oynamaktadır. Puma'nın in vitro aşırı ekspresyonu artmış Bax ekspresyonu, Bax konformasyonel değişikliği, mitokondriye translokasyon, sitokrom c salımı ve mitokondriyal membran potansiyelindeki azalma ile aynı zamanda meydana gelmektedir (Liu et al., 2003). Noxa, aynı zamanda p53 ile indüklenen bir başka apoptoz proteinidir. Çalışmalar, bu proteinin mitokondriye lokalize olabileceğini ve anti-apoptotik Bcl-2 familyası üyeleri ile etkileşebildiğini ve bunun da kaspaz-9'un aktivasyonu ile sonuçlandığını gösteriyor (Oda et al., 2000). Hem Puma hem de Noxa p53 tarafından indüklendiğinden, genotoksik hasar veya onkogen aktivasyonu ile ortaya çıkan apoptozise aracılık edebilirler. Myc onkoproteininin hem p53'e bağlı hem de bağımsız mekanizmalar yoluyla apoptozu güçlendirdiği bildirilmiştir (Meyer et al., 2006).



Şekil 1.4. Apoptozun moleküler mekanizması

1.2.5. Apoptozun inhibisyonu

Aşırı apoptoza neden olan birçok patolojik durum (nörodejeneratif hastalıklar, AIDS, iskemi, vb.) vardır ve bu nedenle apoptozu yapay olarak inhibe ederek yararlanabilirler (Nicholson, 2000). Anti-apoptotik mekanizmanın potansiyel yöntemlerinin kısa bir listesi, IAP (apoptoz proteinlerinin inhibitörleri) ailesi, kaspaz inhibisyonu, PARP (poli [ADP-riboz] polimeraz) inhibisyonu, PKB / Akt'in (protein kinaz B) yolağının uyarılmasını ve Bcl-2 proteinlerinin inhibisyonunu içerir. IAP protein ailesi belki de

hem intrinsik hem de ekstrinsik yolları düzenledikleri için apoptozun en önemli düzenleyicisidir (Deveraux and Reed, 1999).

XIAP (X bağlantılı memeli apoptoz proteini inhibitörü) ve survivin, daha iyi bilinen üyeler olarak kalmasına rağmen, sekiz insan IAP proteini tespit edilmiştir (Silke et al., 2002). Şimdiye kadar, IAP ailesinin üyeleri felç, omurilik yaralanmaları, multipl skleroz ve kanser tedavisinde terapötik hedef olarak araştırıldı. Sentetik nonspesifik kaspaz inhibitörü z-VAD-fmk'nin, miyokard enfarktüsü, sıçan ve fare modellerinde miyokardiyal reperfüzyon hasarının şiddetini artırdığı görülmektedir (Mocanu et al., 2000). Kaspaz etkinliğinin spesifik inhibitörleri bazen yararlı da olabilir. Kaspaz I olarak da adlandırılan ICE (İnterlökin-1 beta-dönüştürücü enzim), apoptoz sırasında hücre içi protein bozunmasına aracılık ettiği görülen bir sistein proteazdır (Livingston, 1997). ICE inhibitörleri, interlökin 1 β 'nin azaltılması yoluyla romatoid artrit ve diğer enflamatuvar durumların tedavisi için geliştirildi (Le and Abbenante, 2005).

PARP-1'in hem DNA onarımında hem de apoptozda ikili rolü nedeniyle, PARP-1 inhibitörlerinin farmakolojik kullanımı, iskemik ve inflamatuvar hücre ve organ hasarını hafifletebilir veya antitümör ajanların sitotoksitesini artırabilir (Graziani and Szabo, 2005). PARP-1 nakavt fareleri ile yapılan son araştırmalar, PARP-1 inhibitörlerinin miyokard iskemisi ve reperfüzyon hasarıyla ilişkili yaralanma için etkili bir terapi olabileceğini göstermektedir (Zhou et al., 2006). PKB / Akt sinyalini uyaran ve hücre hayatta kalışını teşvik eden insülin benzeri büyüme faktörü-1'in (IGF-1) infüzyonunun hayvan modellerinde miyokard iskemisinde yararlı olduğu gösterilmiştir (Fujio et al., 2000). Transgenik kardiyak iskemi modelleri ve global beyin iskemisi ile yapılan diğer çalışmalar, Bax'ın ekspresyonunu ve/veya fonksiyonunu inhibe etmenin sitokromun mitokondriden salınmasını önleyebileceğini, mitokondriyal membran potansiyelindeki azalmayı inhibe edebildiğini ve hücreleri apoptosise karşı koruyabileceğini gösteriyor (Hochhauser et al., 2003).

1.3. Bcl-2 Ailesi

İç veya dış fizyolojik uyaranlara ek olarak apoptozu tetikleyen çok çeşitli patolojik hücre hareketleri vardır (Vaux and Korsmeyer, 1999). Çok hücreli organizmalarda, apoptoz veya programlanmış hücre ölümü, neredeyse tüm dokulardaki hücre çoğalması ve ölümü arasında homeostatik denge sağlayan fizyolojik bir süreçtir (Kerr et al., 1972). Apoptoz aşırı oranda üretilen hücrelerin yok edilmesinden sorumludur. Embriyonik gelişme, doku yenilenmesi, hormona bağlı doku atrofisi ve sayısız patolojik koşullar sırasında özellikle önemlidir (Thompson, 1995).

Hücrenin büzülmesi, hücre zarının kabarcıklaşması, nükleer kromatinin yoğunlaşması, kromozomal DNA'nın yer yer nükleozomal bölgede kesilmesi ve çekirdeğin parçalanması apoptozise uğramış bir hücrenin ana morfolojik değişiklikleridir. Hücre zarı kabarcıklarının oluşumu zara bağlı apoptotik cisimlerin salınmasıdır. Normal olarak plazmanın iç yüzünde bulunan fosfatidilserin membran dış yüzüne çıkar ve burada fagositler tarafından alım için bir tanıma sinyali sağlar. Dolayısıyla, apoptoz, hücrelerin hızlı ve etkili biçimde yok edilmesine neden olur (Kerr et al., 1972).

Apoptoz ile ilgili mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır. Kaspazlar sonuçta bir dizi proteini parçalayarak hücrelerin parçalanmasına neden olan bir dizi olaya katılan bir proteaz ailesidir (Thornberry and Lazebnik, 1998). Kaspaz proteolitik kaskadı apoptotik yanıtta merkezi bir nokta oluşturur ve başlatılması çeşitli faktörlerle sıkı bir şekilde düzenlenir. Apoptozun düzenlenmesinde ve kaspaz aktivasyonunun indüklenmesinde Bcl-2 familyasının proteinlerinin önemli bir rol oynadığı bilinmektedir ancak işlevleri henüz tam olarak tanımlanmamıştır (Adams and Cory, 1998). Bcl-2 proteinleri, kaspaz-3 aktivasyonunun ve apoptozun kontrolünde rol oynadığından, bir hücrenin yaşayıp yaşamayacağına karar vermede önemli olabilirler (Chao and Korsmeyer, 1998).

1.3.1. Bcl-2 aile üyelerinin genel özellikleri

Adından da anlaşılacağı üzere, Bcl-2 geni önce insan B hücresi lenfomalarında keşfedildi (Tsujimoto et al., 1985). Bcl-2, apoptozu inhibe ederek hücre sağkalımını uzatan bir proto-onkogendir. Daha sonraki çalışmalar, Bcl-2'nin birçok hücre tipinde çok sayıda uyarıcı tarafından uyarılan apoptozu önleyebileceğini veya erteleyebileceğini göstermiştir (Hockenbery et al., 1990). Bcl-2'nin antiapoptotik fonksiyonunu açıklamak için birkaç hipotez önerilmiştir. Bcl-2, Ca^{2+} homeostazı için bir regülatör görevi görebilir (Gulbins et al., 2000) ve ya bir antioksidan olarak aktivite gösterebilir (Haunstätter and Izumo, 1998). Buna ek olarak, Bcl-2, sonuç olarak apoptozise özgü intraselüler proteolize aracılık eden sitozolik kaspazların mitokondri aktivatörlerinin salınmasını önleyebilir (Chao and Korsmeyer, 1998).

Bcl-2'nin apoptozu aktive eden faktör 1 (Apaf-1) ile ilişkilendirilmesi, sitokrom c salımını ve iki efektör kaspaz olan kaspaz-9 ve 3'ün aktivasyonunu önleyebilir olmasındandır. Ayrıca, Bcl-2, apoptoz sırasında ortaya çıkan mitokondriyel transmembran potansiyelinin çöküşünü modüle ederek etki gösterebilir (Hockenbery et al., 1990). Çeşitli biyokimyasal, genetik ve moleküler tekniklerle, omurgalılarda birçok Bcl-2 homoloğu tanımlandı ve bir Bcl-2 familyası proteini oluşturuldu. Bu aile, Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, A1, Bcl-W (Adams and Cory, 1998) gibi hücre sağkalımını veya Bax, Bak, Bcl-XS, Bok gibi hücre ölümünü destekleyebilen proteinleri içerir (Chao and Korsmeyer, 1998). Bu pro-ve anti-apoptotik proteinler arasındaki göreceli miktarlar veya denge, hücrelerin bir ölüm sinyaline duyarlılığını etkiler.

Apoptozdaki rolüne bakılmaksızın tüm Bcl-2 ailesi üyeleri korunmuş dört Bcl-2 homoloji (BH) domaininden en az birini içermesiyle karakterize edilir ve bunlar BH1-BH4 olarak adlandırılırlar (Adams and Cory, 1998). Genel olarak, anti-apoptotik üyeler, dört domainin tamamının korunmuş dizisine sahiptirler fakat pro-apoptotik moleküller birinci α -sarmal parçanın dizisini kaybetmişlerdir. BH3 domaini, pro-apoptotik üyelerde kritik bir ölüm domaini olarak kabul edilir. Bu kavram, "BH3-domain-only" üyeler

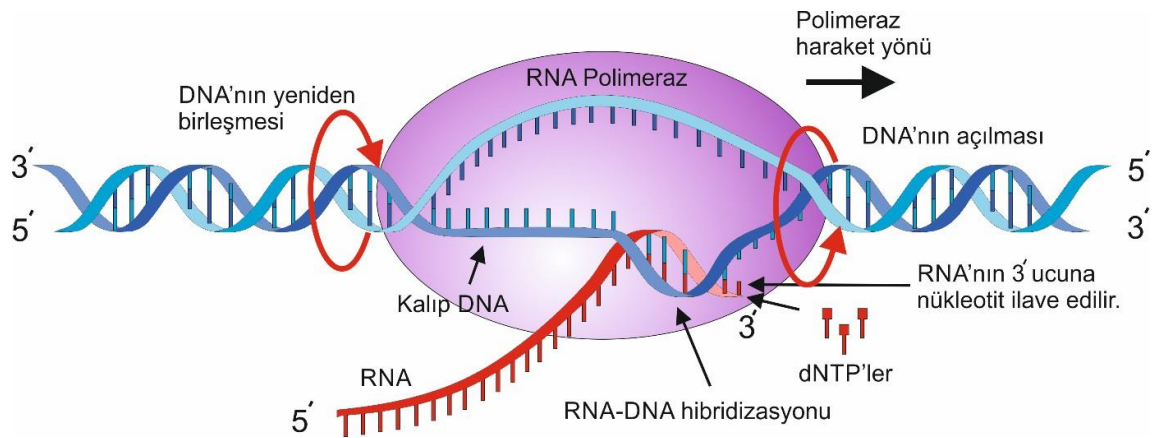
olarak bilinir ve bu domain içindeki tüm üyeler pro-apoptotiktir (Puthalakath and Strasser, 2002).

Bcl-2 proteini, dış mitokondri membranına, endoplazmik retikulum zarına ve çekirdek zarına lokalize olan bir proteindir ve NH₂-terminali sitoplazmaya bakmaktadır. Ailesinin diğer birçok üyesi gibi, Bcl-2'nin, COOH-terminalinde, hücre içi membranlardaki sitozolik yüzeye proteinin sokulmasına izin veren hidrofobik bir alanı vardır (Nguyen et al., 1993); bu hücre içi lokalizasyon fonksiyonları için önemlidir. Bcl-2 ailesinin üyelerinin önemli bir özelliği, bu proteinler arasındaki nötralize edici rekabeti öne sürerek heterodimerler kadar homo- formları oluşturma yetenekleridir. Böylece, Bcl-2 (239 amino asit proteini, 26 kDa), Bcl-2 ile ~% 21 amino asit özdeşliği olan bir proapoptotik protein olan Bax ile heterodimerler oluşturur. Bax'a ilaveten, birkaç diğer genin, Bcl-2 ile dizi homolojisine sahip proteinleri kodladığı ve onunla heterodimerler oluşturma kapasitesi olduğu bildirildi.

Bunların arasında Bcl-X, alternatif bir birleştirme mekanizması vasıtasıyla iki protein üretebilir: Bcl-XL (uzun biçim) ve Bcl-XS (kısa form). Bcl-XL, hücre ölümünü bastıran, Bcl-2 ile % 43 dizi özdeşliğine sahip olan 241 amminoasit proteini olup, 63-aa bölgesi (aa 126-188) Bcl-XL'de bulunamamıştır ve bu bir proapoptotik protein olarak işlev görür (Adams and Cory, 1998). Başka bir Bcl-2 homologu, yaklaşık 140 aa'lık bir bölge üzerinde Bcl-2 ile ~% 35 benzerlik gösteren Mcl-1'dir (Zhu et al., 1996). Şimdiye kadar, Mcl-1'in Bcl-2 ile etkileşime girip girmediği veya hücre ölümünün düzenlenmesinde görev yapıp yapmadığı tam olarak açıklanmamıştır. Antiapoptotik üyeler, özellikle mitokondride, endoplazmik retikulumda ve nükleer membranlarda bulunan integral membran proteinleridir (Krajewski et al., 1994). Pro-apoptotik proteinlerin büyük çoğunluğu sitoplazmada lokalizedir, ancak bir ölüm sinyalini takiben, konformasyonel değişikliğe uğramış gibi gözükmemektedir (Wolter et al., 1997, Griffiths et al., 1999).

2.3. Transkripsiyonel Regülasyon

Bir organizmanın özellikleri, sahip olduğu genetik bilgi ve genetik bilginin çevreye cevabı tarafından belirlenir. Genetik bilginin ifadesi, transkripsiyon ve translasyon olmak üzere iki ardışık basamağı içeren protein sentezi aracılığı ile olur. Birinci basamak, bilginin haberci RNA (mRNA) olarak bilinen bir RNA molekülü formuna dönüştürülmesidir. Transkripsiyon olarak adlandırılan bu olay RNA polimeraz enzimi tarafından gerçekleştirilir (Yıldırım et al., 2007). RNA replikaz enzimi içeren RNA virüsleri ve Retrovirüsler hariç, DNA çift zincirlerinden bir tanesinin kalıp olarak kullanılmasıyla tek zincirli RNA molekülüne dönüştürülmesine transkripsiyon (yazılım) denir (Luleyap, 2008). Transkripsiyon, protein sentezi için olduğu kadar taşıyıcı RNA, ribozomal RNA ve katalitik ve yapısal fonksiyonları olan diğer RNA molekülleri için de bilgileri taşıyan mRNA'ları üretir. Transkripsiyon, dsDNA kalıbına ve ribonükleotit öncülleri olan ATP, GTP, CTP ve UTP'ye gereksinim duyan RNA polimeraz tarafından katalizlenir (Turner et al., 2004). mRNA yazılımına şablon oluşturacak DNA zinciri ve bundan oluşacak RNA zincirleri çok farklı şekillerde isimlendirilmektedir. Transkripsiyonda kalıp olarak kullanılan DNA zinciri için; template = negatif zincir veya antisense zincir gibi farklı tanımlamalar kullanılırken, diğer zincir için kodlayıcı = pozitif zincir veya sense (anlamalı) zincir gibi tanımlamalar kullanılmaktadır (Lodish et al., 2003).



Şekil 1.5. Transkripsiyonun şematik görünümü

2.3.1. RNA polimerazlar

RNA sentezini gerçekleştiren enzim RNA polimerazdır. DNA'yı kalıp olarak kullanıp ribonükleosid 5'- trifosfatların (NTP) polimerizasyonunu 5' → 3' doğrultusunda katalizler. DNA polimerazdan farklı olarak RNA polimerazlar RNA sentezini başlatmak için primere gereksinim duymaz. Bunun yerine transkripsiyon genin başlangıcında belirli bölgelerden *de novo* olarak başlar. RNA polimerazın bağlanıp, transkripsiyonu başlattığı gen ifadesinin düzenlendiği DNA bölgeleri “promotör” olarak isimlendirilir. RNA polimeraz çoklu protein polipeptid zincirlerinden oluşan kompleks bir enzimdir. Prokaryotik RNA polimeraz beş farklı alt üiteden oluşmaktadır. Bunlar; α , β , β' , ω ve σ' dır. σ alt ünitesi diğerlerine göre daha zayıf bağlıdır ve diğer alt üitelerden kolayca ayrılabilir. Merkezi polimerazı α , β , β' ve ω alt üiteleri oluşturur. σ alt birimi transkripsiyon inisiyasyonun başlama bölgesinin tanınması için gereklidir (Cooper and Hausman, 2004).

Ökaryotlarda transkripsiyon prokaryotlardakine benzerdir fakat daha karmaşıktır. Prokaryotlarda tüm genler tek bir RNA polimeraz ile transkribe edilirken, ökaryotik hücreler farklı RNA polimerazlar içerir. Ayrıca prokaryotlarda RNA polimeraz direkt olarak promotör sekansa bağlanabilirken, ökaryotik RNA polimerazlar transkripsiyonu başlatmak için başka proteinler ile etkileşime girmek durumundadır. Ökaryotik hücreler üç farklı RNA polimeraz içermektedir. Protein kodlayan genler RNA polimeraz II ile transkribe edilerek mRNA' ya dönüştürülür. Ribozomal RNA (rRNA) ve transfer RNA'lar (tRNA) ise RNA polimeraz III tarafından transkribe edilir. RNA polimeraz I rRNA'ların büyük parçaları olan 28S, 18S ve 5,8S alt birimlerinin transkripsiyonundan sorumludur. RNA polimeraz III ise tRNA ve rRNA' ların 5S alt birimlerinin transkripsiyonundan sorumlu olan polimerazdır.

2.3.2. Transkripsiyonda önemli olan bölgeler

Ökaryotik canlılarda, transkripsiyonel düzenlenmeyi sağlayan bazı önemli bölgeler bulunmaktadır. Bunlar; transkripsiyon faktörleri ve DNA üzerindeki promotör,

enhancer (arttırıcı), silencer (susturucu) ve response element (cevap elementleri)'dir (Raven and Johnson, 1996, Lodish et al., 2003).

2.3.2.a. Promotör bölgesi

Bir genin transkripsiyonunu başlatmak için RNA polimeraz enziminin bağlandığı DNA dizisine promotör denir. Ökaryotik canlılarda RNA polimeraz II tarafından transkripsiyonu yapılan genlerin iki önemli promotör elemanları vardır. Bunlardan birincisi, temel transkripsiyon faktörlerinin özel bağlanma bölgeleri olarak tanımlanan ve prokaryotlardaki -10 bölgesindeki Pribnow TATA kutusuna homolog işlevi olan, -35 ile -20 baz 5' bölgede yer alan TATAAA dizisi, ve diğeri ise initiator (başlatıcı=*Inr*) olarak tanımlanan *Inr* dizisidir (Luleyap, 2008). Prokaryotik canlılarda promotörün yapısına katılan DNA dizileriyle ilgili olarak yapılan çalışmalarda iki promotör dizisinin birçok gende ortak olduğu bulunmuştur. Bu ortak diziler başlangıç pozisyonu olan +1 referans noktasına göre -10 baz çifti yukarıda yer aldığı için -10 veya TATAAT (Pribnow kutusu) dizisi olarak tanımlanırken, diğeri -35 baz çifti yukarıda yer alan TTGACA promotör dizisidir. Promotör bölgesi ile RNA Polimeraz enzimi arasındaki etkileşimi inceleyen araştırmacılar, iki önemli nokta saptamışlardır. Bunlar; a) Konsensüs dizisi az uyumlu olan promotörlere sahip genlerin transkripsiyonu daha yetersizdir. b) Bu promotör bölgelerinde meydana gelebilecek mutasyonlar promotör fonksiyonunu değiştirir (Lodish et al., 2003).

Diğer cis-etkili kontrol dizileri, bireysel genlerin ekspresyonunu kontrol eden çok sayıdaki kontrol faktörlerinin bağlanma bölgeleri olarak görev yaparlar. Bu diziler her zaman olmasa da çoğunlukla TATA kutusundan önce (upstream) lokalize olmuşlardır. Bu dizilerin her ikisi de TATA kutusundan -100, -120 baz çifti (bç) daha önceki bir bölgede bulunmaktadır. CCAAT ve GC kutusu olarak da adlandırılan GGGCGG dizilerinden oluşan bu bölgelerin tüm ökaryotik genlerin promotör yapısında bulunduğu netlik kazanmamıştır (Alberts et al., 1994, Lodish et al., 2003).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Kanser, doku veya organlardaki hücrelerin düzensiz ve kontrolsüz bölünerek çoğalmasıyla oluşan malign tümörlerin tanımlanmasında kullanılan bir terimdir (2016). Kanser gelişimi karsinogenez olarak adlandırılan bir süreç sonunda ortaya çıkar. Karsinogenez, hücrelerdeki malign transformasyon sürecinde oluşan moleküler, genotipik ve fenotipik değişiklikleri açıklayan bir süreçtir. Karsinogenezde etkili olan pek çok faktör vardır. Yaş, coğrafi faktörler, çevresel etmenler (fiziksel, biyolojik, kimyasal), inflamasyonlar (*Helicobacter pylori*, Hepatit virüsleri, HIV), prekanseröz hastalıklar ve genetik faktörler karsinogenezde önemli rol almaktadır (Kumar et al., 2014, Bayrak, 2010).

Apoptozis; morfogenez, doku homeostasisi, yaşlanma ve istenmeyen zararlı hücrelerin çıkarılmasını içeren çeşitli biyolojik olaylarda rol oynayan ve spesifik reseptör molekülleri-CD95, tümör nekroz faktör, büyüme faktörleri, ultraviyole ışınlar, irradyasyon, ısı şoku, sitotoksik ilaçlar, oksidatif stres ve bakteriler gibi çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik indükleyiciler ile indüklenebilen programlı hücre ölümüdür (Lodish et al., 2003).

Apoptotik metabolik yolda meydana gelen bozukluk, kanser, otoimmün ve nörodejeneratif rahatsızlıkları içeren çeşitli patolojik durumlar ile sonuçlanır (Thompson, 1995, Hanahan and Weinberg, 2000, Bidere et al., 2006). Bax, p53 adlı tümör baskılayıcı proteinin kofaktörü olma işlevine sahip, insanda bulunan bir proteindir. Bax; Bcl-2 associated x protein anlamında kullanılmaktadır (Zhu et al., 1996).

Proapoptotik bir proteindir. Bcl-2 ile % 43 yapısı aynıdır ve Bcl-2 ile homodimerler ve heterodimerler oluşturabilir. Bax predominant olduğunda apoptozis artmaktadır (Oltvai et al., 1993).

Bax geni, Bcl-2 gen ailesinin bir üyesidir. Bax, p53 aracılığıyla indüklenir ve bulunduğu hücrenin apoptoza gidişini hızlandırır (Zhu et al., 1996). Normalde sitozolde lokalizedir;

apoptozis sırasında mitokondri membranına yerleşir (Gross, 1998). İyon kanallarını açarak sitokrom-c salınımına neden olur ve apoptozisi sağlar (Jurgensmeier et al., 1998). Bax fonksiyon kaybının bazı lösemi ve kolon kanserlerinde rol oynadığı gösterilmiştir (Meijerink et al., 1998). Servikte Bax sentezini inceleyen çok az çalışma olmasına karşın bu çalışmaların çoğunda normal ve neoplastik dokuda Bax sentezinin farklı olmadığı gösterilmiştir (Giarnieri et al., 2000).

Bcl-2 (B-cell lymphoma gene-2) protein ailesi üyeleri hücre ölümünün en önemli regülatörleridirler. Bu ailede hem apoptotik hem antiapoptotik üyeler bulunmaktadır. Bcl-2 proteini antiapoptotik proteinlerdendir ve mitokondrinin dış membranı, nükleus membranı ve endoplazmik retikulum membranında lokalizedir (Goping et al., 2003).

Yapılan bir çalışmada gastrik kanserde Bax geninin promotör bölgesinde G/A polimorfizmi incelenmiştir. Hastalardan alınan kan örneklerinin analizi sonucu bu nükleotitlerde polimorfizm olduğu belirlenmiş ve bu polimorfizmin hücrelerde ekspresyonu etkileyebilecek olan Sp1 motiflerini kaldırdığı görülmüştür (Mirmajidi et al., 2016).

Geçmişte yapılan bir çalışmada transkripsiyonel regülasyonda doğal tip ve mutant p53 proteinlerinin fonksiyonel alanları belirlenmiştir (Unger et al., 1993).

Öncelikle Miyashita et al. yaptıkları çalışmalarda Bax gen promotörü üzerindeki TATA bağlanma bölgesini ve muhtemel p53 bağlanma bölgelerini belirlemişlerdir (Miyashita and Reed, 1995).

Bu çalışma ile proapoptotik bir gen olan Bax geninin promotör bölgesi üzerinde bulunan ve genin transkripsiyonu için önemli transkripsiyon faktörlerini barındıran belli başlı bölgeler pGEM-T Easy vektörüne klonladı. Bu şekilde promotör üzerinde belirlenen dört tane bölgenin gen konstraktları oluşturuldu. Biyoinformatik programlarıyla genin promotör bölgesi fonksiyonel olarak analiz edildi.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Kimyasal maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasalların tamamı moleküler biyoloji için uygun saflıktadır. Klonlamada kullanılan vektör sistemleri ve enzimler ise Promega, Sigma, Thermo Scientific firmalarından temin edildi.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar

Kimyasallar	Üretici
LB Agar	Sigma
LB Broth	Sigma
Ampicillin	Sigma
Gliserol	Sigma
DMSO	Sigma
Agaroz	Sigma
X-gal	Sigma
IPTG	Sigma
D(+) glukoz	Sigma
Tris Base	Sigma
Glasiyal Asetik Asit	Sigma
EDTA	Sigma

3.1.2. Çalışmada kullanılan laboratuvar gereçleri

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan laboratuvar gereçleri

Kullanılan Gereç	Modeli
-86 °C Derin Dondurucu	Sanyo Ultra Low
Buz Makinası	Scotsman AF-20 (Authomatic ice machines)
Buzdolabı	Arçelik
Çalkalamalı İnkübatör	Ika ks 4000i çalkalayıcı inkübatör
Otoklav	Hirayama
PH Metre	Schott pH-Meter CG840
Saf su cihazı	Barnstead Easy Pure UV/UF
Soğutmalı santrifüj	Hermle Z 323 K(Germany)
Sıcak su banyosu	Memmert WNB14
Spektrofotometre	Shimadzu UV-3600 Plus
Vorteks	Fısons whırlı-mixer
Agaroz jel elektroforez Tankı	BIO RAD
Jel görüntüleme sistemi	Bio-Rad
PCR	ProFlex™ 3x32-Well PCR
Mikro santrifüj	Hettich
Steril Kabin	WCS Class II Type Biosafety Cabinet
NanoDrop	Epoch
Hassas terazi	Gecavery (UK)
Otomatik pipet	Eppendorf
Magnetik karıştırıcı	Chilten Hotplate Magmetic Stirrer HSBI

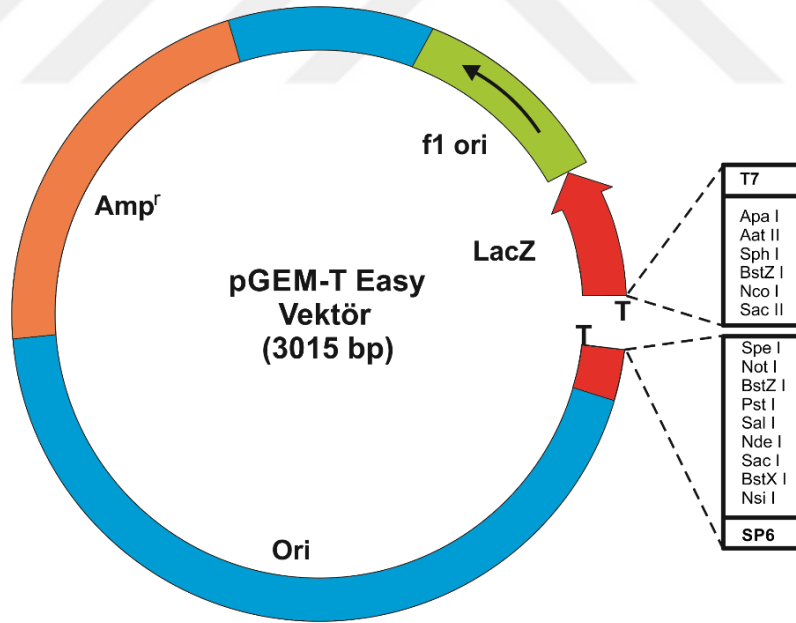
3.1.3 Stok solüsyonlar

Çizelge 3.3. Agaroz jel elektroforezi solüsyonları

Solüsyon	İçeriği
50X TAE	2 M Tris : 242 gram 1 M Asetat : 57,1 mL 100 mM EDTA : 0,5 M EDTA (pH: 8)

3.1.4 Çalışmada kullanılan vektörler

Klonlama amaçlı kullanılan pGEM-T Easy vektörü Promega'dan satın alındı.



Şekil 3.1. pGEM-T Easy vektörünün restriksiyon haritası ve klonlama bölgesi

3.2 Metotlar

3.2.1 Çalışmada kullanılan ortamın ve malzemenin temizliği ve sterilizasyonu

Isıya dayanıklı bütün cam malzemeler, pipet uçları, ependorflar, santrifüj tüpleri, bakteri kültür ortamları 121 °C' de 15 dakika otoklavda steril edildi.

3.2.2 DNA izolasyonu ve klonlama

3.2.2.a. İnsan genomik DNA'sının temin edilmesi

İnsan genomik DNA'sı hazır olarak üretici firmadan satın alınmıştır.

3.2.2.b Polimeraz zincir reaksiyonları (PCR)

PCR reaksiyonları 15 µL hacimde yapıldı. Kalıp olarak farklı konsantrasyonlarda elde edilen genomik DNA örnekleri kullanılarak en iyi sonucu verecek konsantrasyon belirlendi. Her bir primerin son konsantrasyonu 10 pmol olacak şekilde seyreltildi. 10X PCR buffer (sigma), 10 mM dNTP (sigma) ve 2,5 ünite Taq DNA polimeraz (sigma), 25 mM MgCl₂ (sigma) kullanıldı. PCR programı ve döngü sayısı primerlere ve kalıp DNA kaynağına bağlı olarak değişiklik göstermiştir. PCR sonuçları agaroz jelde görüntülenmiş ve istenilen bantlar jelden geri kazanılmıştır.

3.2.2.c. Primer tasarımı

Primer tasarımı için www.restrictionmapper.org, www.ncbi.nlm.nih.gov ve bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/ adreslerinden yararlanıldı. Tasarlanan primerlerin saç tokası yapısı oluşturmamasına, T_m sıcaklıklarının birbirine yakın olmasına ve nükleotitlerin dağılımının mümkün olduğunca eşit olmasına dikkat edildi. Ayrıca tasarlanan primerler veri tabanlarında (GenBank + EMBL + DDBJ + PDB sequences)

bulunan DNA sekansları ile blast yapılarak farklı genlerle en az homoloji gösteren primerler seçilmeye çalışıldı.

3.2.2.d. DNA agaroz jel elektroforezi

DNA elektroforezi için yatay jeller kullanıldı ve 60 volt elektrik akımında yaklaşık 1 saat örnekler yürütüldü. Elektroforez tamponu olarak 1X TAE tercih edildi. Çalışmada genellikle %1 konsantrasyonda agaroz jeller kullanıldı. Elektroforezde ayrılan DNA parçalarının büyüklüğünün belirlenmesi için 100 bp DNA ladder kullanıldı. Elektroforez sonuçları jel görüntüleme sisteminde görüntülenerek fotoğrafları çekildi.

3.2.2.e. Agaroz jelden DNA purifikasyonu

İstenilen DNA bantları UV transilluminator üzerinde agaroz jelden kesilerek alındı ve DNA jel ekstraksiyon kiti (Qiagen) kullanılarak DNA elüe edildi. Jelden kazanılan DNA'nın küçük bir kısmı tekrar jelde yürütülerek kontrol edildi. DNA miktarı ve temizliğinin kontrolü için 260 ve 280 nm dalga boyundaki absorpsiyonları alındı.

3.2.2.f. PCR ürünlerinin A:T klonlanması

Elde edilen PCR ürünleri pGEM-T Easy vektörüne (Promega) protokolde belirtildiği şekilde A:T klonlaması yapıldı. Buna göre 10 µL toplam hacim olacak şekilde, 1 µL pGEM-T vektör, 3 µL insert DNA (PCR ürünü), 5 µL 10 x T4 ligaz tamponu (Promega) ve 1 µL T4 DNA ligaz (Promega) +4 °C'de bir gece veya oda sıcaklığında 3 saat inkübe edildi. Ligasyon sonuçları *E.coli JM109* competent hücrelerine transforme edildi. Transformantların seçimi mavi-beyaz koloni yöntemine göre yapıldı. Bunun için 40 µL ampisillin, 100 µL X-Gal ve 40 µL IPTG içeren LB agar besiyerleri hazırlandı.

3.2.2.g. Plazmit DNA izolasyonu (Miniprep)

Plazmit DNA izolasyonu için Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems kullanıldı. Öncelikle 10 mL steril LB broth besiyerine 10 µL ampisilin eklendi. Besiyerine tek koloni ekim yapıldı ve bir gece 37°C 'de 150 rpm 'de çalkalamalı etüvde inkübe edildi. Bir gecenin sonunda kitin protokolüne uygun olarak plazmit DNA izolasyonu yapıldı. NanoDrop'ta konsantrasyon ölçümü yapılarak saflığı kontrol edildi. Agaroz jel elektroforezi yapılarak da sonucun doğruluğundan emin olundu.

3.2.2.h. Kompetent hücre hazırlanması

Kompetent hücre hazırlanması için 100 mM kalsiyum klorür kullanıldı. Öncelikle 10 mL LB besiyeri içine tek koloni *E.coli JM109* suşundan ekim yapılarak 37°C'de çalkalamalı etüvde bir gece inkübe edildi. Daha sonra bir gecelik kültürden 100 mL LB içine 100 µL inoküle edilerek, OD₆₀₀ 0,5 ile 0,6 arasına gelinceye kadar çalkalamalı etüvde 37°C'de inkübe edildi. 4444 rpm'de 7-10 dakika santrifüj ile hücreler çöktürüldü. 2500 µL 100 mM soğuk kalsiyum klorür ile pellet yeniden çözüldü ve buz üzerinde yarım saat bekletildi. Daha sonra tekrar çöktürülerek süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet 500 µL soğuk kalsiyum klorür ile çözülerek buz içerisinde +4 °C'de saklandı.

3.2.2.i. Transformasyon

Transformasyon için, 100 µL kompetent hücreye 10 µL ligasyon ürünü ilave edilerek buz üzerinde 20 dakika bekletildi. Süre sonunda 42°C'de 30 saniye ısı şoku uygulandı. Hemen ardından buz üzerinde 3-5 dakika bekletildi. Daha sonra 900 µL LB ilave edildi ve 37°C'de çalkalamalı etüvde bir buçuk saat inkübe edildi. Süre sonunda kültür örneği 12.000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi. Süpernatant alındı ve 100 µL örnek uygun antibiyotiği içeren LB agar besiyerine yayılarak bir gece inkübe edildi.

3.2.2.j. Çalışmada kullanılan bakteri izolatu

Çalışma sırasında klonlama için *E.coli JM109* bakteri suşu kullanıldı.

3.2.2.k. Bakteriyel kültür ortamı

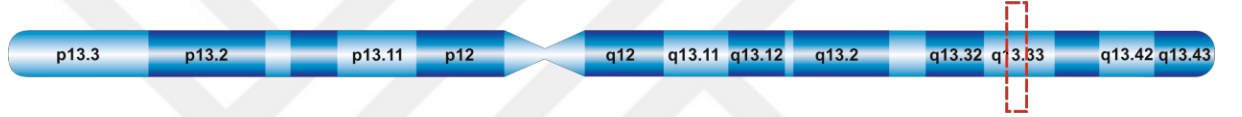
E.coli için gerekli kültür ortamı olarak LB - Broth ve LB-Agar kullanıldı. Toz halinde satın alınan besi yerleri ddH₂O ile hazırlanarak otoklavda steril edildi.

3.2.2.l. Antibiyotikler

Amfisilin 50 mg/mL stok solüsyon şeklinde hazırlandı ve -20 °C’de saklandı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

İnsan Bax geninin regülasyonunun aydınlatılması amacıyla ilk olarak biyoinformatik çalışmaları ile Ensemble programı kullanılarak Bax geninin promotör bölgesi belirlendi. Daha sonra Genomatix veri tabanı kullanılarak promotordaki muhtemel transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri belirlendi. Daha sonra sırasıyla genin promotorunun çoğaltılması ve klonlanması çalışmaları gerçekleştirildi.



Şekil 4.1. Bax geninin kromozom üzerindeki yerleşimi

Çizelge 4.1. Bax geninin traskript varyantları ile ilgili fenotip, hastalık ve özellikler.

Fenotip,hastalık ve özellik	Varyantların sayısı
Bir fenotip açıklaması olan tüm varyantlar	5
T hücreli lenfoblastik lökomi hücre hattı	1
Kolorektal kanser	2
Kolon kanseri	2
Lökomiya,T hücreli lenfoblastik ,somatik	2
T hücreli akut lenfoblastik lökomiya	2

Çizelge 4.2. Bax geninin transkript varyantları

İsim	Transkript ID	Bp	Protein
BAX-001	<u>ENST00000293288.12</u>	1358	218 aa
BAX-006	<u>ENST00000345358.11</u>	793	192 aa
BAX-003	<u>ENST00000415969.6</u>	540	179 aa
BAX-202	<u>ENST00000539787.2</u>	458	140 aa
BAX-005	<u>ENST00000354470.7</u>	433	143 aa
BAX-201	<u>ENST00000391871.4</u>	687	175 aa
BAX-004	<u>ENST00000506183.5</u>	383	126 aa
BAX-002	<u>ENST00000356483.8</u>	677	164 aa
BAX-007	<u>ENST00000515540.5</u>	300	41aa
BAX-009	<u>ENST00000502487.5</u>	1346	Protein kodlamamaktadır.
BAX-010	<u>ENST00000513217.1</u>	869	Protein kodlamamaktadır.
BAX-008	<u>ENST00000513545.5</u>	775	Protein kodlamamaktadır.
BAX-012	<u>ENST00000503726.2</u>	488	Protein kodlamamaktadır.

MDGSGEQPRGG**G****P****T****S****S****E****Q****I****M****K****T****G****A****L****L****L****Q****G**FIQDRAGRMGGEAPELALDPVPQ
DASTKKLSECLKRIGDELDSNMELQ**R****M****I****A****A****V****D****T****D****S****P****R****E****V****F****F****R****V****A****A****D****M****F****S****D****G****N****F**
N**W****G****R****V****V****A****L****F****Y****F****A****S****K****L****V****L****K****A****L****C****T****K****V****P****E****L****I****R****T****I****M****G****W****T****L****D****F****L****R****E****R****L****L****G****W****I****Q****D****Q****G****G**
WVRLKPPHPHHRALTTAPAPPSLPPATPLGPWAFWSRSQWCPLPIFRSSDVVY
NAFSLRV

Şekil 4.2. Bax geninin alternatif ekson yapısı.

Siyah: Alternatif ekson, Mavi: Alternatif ekson, Kırmızı: Çakışan aminoasitler.

Çizelge 4.3. Bax geni 001 transkriptinin ekzon ve intron yapısı

No	Ekzon/ İtron	Başlangıç	Bitiş	Başlan gıç aşama sı	Bitiş Aşaması	Uzunl uk	Dizi
	(5' upstream dizisi)						tgcgccgcccgcggaaccggcgagaggcgccggcgagcgcggtg
1	ENSE00003477122	48,954,929	48,954,962	0	1	34	ATGGACGGGTCCGGGGAGCA GCCAGAGGCGG
	Intron 1-2	48,954,963	48,955,547			585	gtgaggcgggaggcagacggcggg..... cctctcccttcttctctctag
2	ENSE00000853382	48,955,548	48,955,599	1	2	52	GGCCACCAGTCTGAGCAGAT TCATGAAGACAGGGGCCCTTT TGCTTCAGGG
	Intron 2-3	48,955,600	48,955,686			87	gtgagtttgaggctgattattgtg.....caccct tactccatccccactctag
3	ENSE00003478529	48,955,687	48,955,833	2	2	147	TTTCATCCAGGATCGAGCAGG GCCAATGGGGGGGAGGCAC CCGAGCTGGCCCTGGACCCGG TGCTCAGGATGCGTCCACCA AGAAGCTGACGAGTGTCTCA AGCGCATCGGGGACGAACTG GACAGTAACATGGAGCTGCA GAG
	Intron 3-4	48,955,834	48,956,197			364	gtgtgggcccctgaggaccagaag.....g cactgggttctctctctctgag
4	ENSE00003731885	48,956,198	48,956,333	2	0	136	GATGATTGCCGCCGTGGACAC AGACTCCCCCGAGAGGTCTT TTCCGAGTGGCAGCTGACAT GTTTCTGACGCAACTTCAA CTGGGGCCGGGTTGTGCCCTT TTCTACTTTGCCAGCAAAC GGTGCTCAAG
	Intron 4-5	48,956,334	48,960,809			4,476	gtgggcagctgcagggcagtgagcc.....ct aacgccactccactccacag
5	ENSE00002027056	48,960,810	48,961,798	0	0	989	GCCCTGTGCACCAAGGTGCCG GAACATGATCAGAACCATCATG GGCTGGACATTGGACTTCCTC CGGGAGCGGCTGTTGGGCTGG ATCCAAGACCAGGGTGGTTGG GTGAGACTCCTCAAGCCTCCT CACCCACCACCGCGCCCTC ACCACGCCCTGCCCCACCG TCCCTGCCCCCGCCACTCCT CTGGGACCCTGGGCTTCTGG AGCAGGTACAGTGGTGCCCT CTCCCCATCTTCAGATCATCA GATGTGGTCTATAATGCGTTT TCCTTACGTGTCTGATCAATC CCCGATTCACTACCCCTGCTG ACCTCCAGTGACCCCTGACC TCACTGTGACCTTGACTTGAT TAGTGCTTCTGCCCTCCCTG GAGCCTCCACTGCCTCTGGAA TTGCTCAAGTTCAATTGATGAC CCTCTGACCCTAGCTCTTTTCCT TTTTTTTTTTTCCCCACTGAG AAGGGGTCTCGCTATGTTGCC CAGGTTGGTCTCGAACTCCTG GCCTCAAGCGATCCTCCGCGC TCAGCCTCTCAAAGTGCTGGG ATTACAGGTGTGAGCCACCAT GCCTGGCCTGAGTCCAGCTCT TTAATGCCCGTTTCATCTCAGT CCCCTGCCCGCAATCCTGCCT TCTGGCCTCCTCCGTCCCTGAT CCCGCCTCTGCCTGCCAGGG GCTGCCCTGGCCGAGTCACT

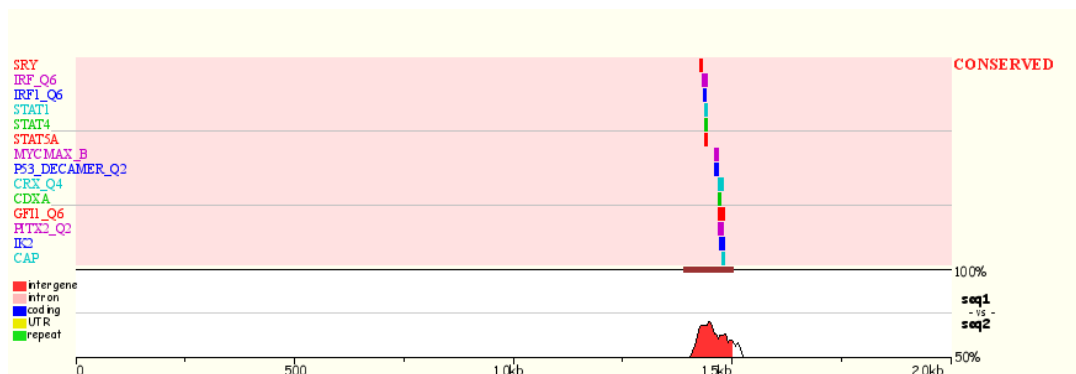
							GAAGCGACTGATGTCCCTGTC TCCAGGACGGCCTCCTCTCCT ACTTTGGGACGCCCACGTGGC AGACCGTGACCATCTTTGTGG CGGGAGTGCTCACC GCCTCAC TCACCATCTGGAAGAAGATGG GCTGAGGCCCCCAGCTGCCTT GGA CTGTGTTTTTCCTCCATA AATTATGGCATT TTTCTGGGA GGGGTGGGGATTGGGGGACG TGGGCATTTTCTTACTTTGT AATTATTGGGGGTGTGGGGA AGAGTGGTCTTGAGGGGTAA TAAACCTCCTTCGGGACACA
	3' downstream sequence						cttcggcatctgagtcactgggctctgccccgct ccccggcagtcagg.....

Çizelge 4.4. Bax geninin 2000 bp ‘lik promotör parçasının dizisi ve dizi üzerindeki fonksiyonel bölgeler

>5' Flanking sequence chromosome:GRCh38:19:48952929:48954928:1

GAGAAGCATT ACACATCCTG GGTGCTATGC GAGCTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTG -2000
AGTTGGAGTT TCCCTCTTGT TACTGAGGCT GGAGTGCAAG GTCACGATCT CAGCTCACTG -1940
CAACCTCTGC CTCCAGATTC AAACGATTCC CCTGCCTCAG CTCCCGAGTA GCTGGGACTA -1880
CAGGTGCCTG CCACCACACC TGGCTAATTT AGAATTTTTA GTAGGGATAG GGTTCACCG -1820
TGTTGGCCAG GCTGGTCTCA AACTCCTGAC CTCAGGTGAT CTACCCATCT CGGCCTCCCA -1760
AAGTGCTGGG ATTACAGAAG TGAGCCACTG AGCCCAACCA GGAGCTTTTT CGAGAAAGAA -1700
GGAAGTCCAA GAGATCTTCC TGACACCCTA GTCTGACTCT GCCCTTGCC TGCTCAAAAT -1640
TTCCCATGTC TTCCAGCGG CCTTCTGGAC ATAGATCAAG TCCCTTCTCT GACAGGCCCA -1580
AACCCTTTAT CATCTGATCC TAGCTCATTT TTCTGAGTTT TCCTTAGTTG CTATTATTTT -1520
CTGTCTAAAAG TGACATGTCA TAATATTCAT AAAGCACACA AGTCTTATGT GTACAGCTCA -1460
ATGAATTGTA AATATGTGTA TACCCGCGG GGCACAGTGG CTCACGCCTG TAATCCCAGC -1400
ACTTTGGGAG GCCGAGGCAG GTGGATCACT TGAGGTCAGG AGCTTGAGAC CAGCCTGACC -1340
AACATAGTGA AACCCCATCT TTAATAAAAA TACAAAATTA GCTGGGCGTG GTGTCGCATG -1280
CCTGCAATTC CAGCTACTTG GGAGGCTGAG GCAGGAGAAT TGCTTGAACC CGGAGGCAGA -1220
GGTTGCAGTA AGCCGAGATC GTGCCATTGC ACTCCATCCT GGGCAACAAG AGCAAACTC -1160
CGTCTCAAAA TAATAATAAT AATAATAATA ATAATAATAA TAATAATGTG TATACCCATG -1100
TAAACACCAT TCAGATAAAA ATATGGCATA TTTGGGGCAC CCGGGGAGTG TCTCTGTGG -1040
CCCCCCCCCT CCATACCCTG CTGATCTATC AGCACAGATT AGTTTCTGCC ACTTTTAAAA -980

●	Muhtemel P53 bağlanma bölgesi
●	Muhtemel P53 bağlanma bölgeleri
●	Ortak baz
●	TATA kutusu
↓	Trankripsiyon başlama sitesi
+1	Start Kodonu
●	Transkripsiyon faktörleri ve altlarındaki diziler bağlanma motiflerini göstermektedir



Şekil 4.3. İnsan Bax geninin 2000 bp’lik promotör bölgesi ile fare Bax geninin 2000 bp’lik promotörü arasındaki homoloji

Çizelge 4.5. Bax gen promotörü üzerindeki muhtemel transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri

Matriks Ailesi	Detaylı Aile Bilgisi	Matrix	Detaylı Matriks Bilgisi	Başlangıç	Bitiş	Zincir	Dizi
NFKB	Nükleer faktoör kappa B/c-rel	NFKAPPAB 65.01	NF-kappa B (p65)	62	76	(+)	gtt gg agt TTCC ctc
NKXH	NKX homeodomain faktör	NKX21.01	NK2 homeobox 1 (Troid transkripsiyon faktör 1)	86	104	(+)	aggc TG Agtgcaaggtca
SF1F	Omurgalı steroidojenik faktör	SF1.01	SF1 steroidojenik faktör 1	93	107	(+)	agtg CAAG gtcacga
MYOD	Myoblast belirleyici faktörler	TCFE2A.01	Transkripsiyon faktör E2a (E12/E47)	175	191	(+)	ggactaca GGTG cctgc
CREB	cAMP-duyarlı eleman bağlama proteinleri	CJUN_ATF2.01	c-Jun/ATF2 heterodimerler	261	281	(+)	aactcc TGAC ctcaggtg atc
TALE	TG Motiflerini Tanyan TALE Homeodomaini	TGIF.01	Homeodomain faktörlerinin TALE sınıfına ait TG ilişkili faktör	548	564	(+)	aagtgacat GTCA taat
TCFF	TCF11 transkripsiyon faktör	TCF11.01	TCF11/LCR-F1/Nrf1 homodimerler	557	563	(+)	GTCA taa
SIX3	Sinüs oküler homeobox homologue 3	SIX3.03	SIX3 / SIXdomain (SD) ve Homeodomain (HD) transkripsiyon faktör	644	664	(+)	acgcctg TAAT cccagc actt
HAND	Sınıf B bHLH transkripsiyon faktörlerinin alt ailesi	TAL1_E2A.01	Lmo2'nin Kompleksi, Tal-1, E2A proteinlerine ve GATA-1'e bağlıdır	671	691	(+)	gccgagg CAGG tgatc actt
ZF02	C2H2 Çinko Parmak Transkripsiyon faktör 2	ZKSCAN3.01	SCAN domains 3 ve KRAB ile çinko parmak	728	750	(+)	tgaaa CCCC atctttacta aaaa
SIX3	Sinüs oküler homeobox homologue 3	SIX3.03	SIX3 / SIX domain (SD) and Homeodomain (HD)	904	924	(+)	ctcaaaa TAAT aataata ata

			transkripsiyon faktör				
SATB	Özel AT zengin dizileri bağlayan protein	SATB1.01	Özellikle timositlerde eksprese edilen AT-zengin dizi-bağlayıcı protein 1 matris bağlanma bölgelerine (MAR'ler) bağlanır.	912	926	(+)	aatAATAataataat
SATB	Özel AT zengin dizileri bağlayan protein	SATB1.01	Özellikle timositlerde eksprese edilen AT-zengin dizi-bağlayıcı protein 1 matris bağlanma bölgelerine (MAR'ler) bağlanır.	918	932	(+)	aatAATAataataat
SATB	Özel AT zengin dizileri bağlayan protein	SATB1.01	Özellikle timositlerde eksprese edilen AT-zengin dizi-bağlayıcı protein 1 matris bağlanma bölgelerine (MAR'ler) bağlanır.	930	944	(+)	aatAATAataataat
SATB	Özel AT zengin dizileri bağlayan protein	SATB1.01	Özellikle timositlerde eksprese edilen AT-zengin dizi-bağlayıcı protein 1 matris bağlanma bölgelerine (MAR'ler) bağlanır.	933	947	(+)	aatAATAataataat
FKH D	Çatal yönetici domain proteinleri	FOXP1.01	Forkhead box P1	955	971	(+)	cccatgtAAACaccatt
GAT A	GATA bağlanma	GATA.01	GATA bağlanma	970	982	(+)	ttcaGATAaaaat

	faktörleri		faktör				
ZTRE	Çinko transkripsiyon düzenleyici element	ZTRE.04	ZTRE motifinin 3' bölgesi	1002	1018	(+)	cgGGAgtgtctctgt
ZF02	C2H2 çinko parmak transkripsiyon faktör 2	ZBTB7.03	7A, pokemonu içeren çinko parmak ve BTB domaini	1016	1038	(+)	tgtggCCCCtccctccat accc
ZTRE	Çinko transkripsiyon düzenleyici element	ZTRE.03	ZTRE motifinin 5' bölgesi	1022	1038	(+)	ccCTCCcctccataccc
GATA	GATA bağlanma faktörleri	GATA1.02	GATA-bağlanma faktör 1	1053	1065	(+)	cacaGATTagtgt
ZF02	C2H2 Çinko parmak transkripsiyon faktör 2	ZKSCAN3.01	SCAN domainleri 3 ve KRAB bulunduran çinko parmak	1121	1143	(-)	agccaCCCCaccagtc atgact / agtcatgactgggtGGG Gtggt
MYT1	MYT1 C2HC çinko parmak protein	MYT1.02	Primer nörogeze katılan MyT1 çinko parmak transkripsiyon faktörü	1249	1261	(+)	aaaAAGTtttaaa
HNF1	Hepatik Nükleer Faktör 1	HNF1.01	Hepatik nükleer faktör 1	1253	1269	(-)	gGTTAattttaaaact / agttttaaaatTAACc
TF2B	RNA polimeraz II transkripsiyon faktör II B	BRE.01	Transkripsiyon faktör II B (TFIIB)'yi tanıyan element	1451	1457	(-)	ccgCGCC / GGCGcgg
E2FF	E2F-myc aktivatör/hücre döngüsü regülatörü	E2F1.01	E2F transkripsiyon faktör 1	1981	1997	(+)	cggcGGCGggagcggc g
HIF1	Hypoxia'yı indükleyebilen faktör, bHLH/PAS protein ailesi	ARNTL.01	Aril hidrokarbon reseptörü nükleer translokator benzeri homodimer	1928	1944	(-)	ccgggtcaCGTGagagc / gctctCACGtgaccgg
HESF	Bölünmüş kompleks enhansırının omurgalı homologları.	DEC1.01	Dec1, Stra13, Sharp2 veya BHLHE40 olarak bilinen temel heliks-loop-heliks protein.	1929	1943	(+)	ctctCACGtgaccgg

EBO X	E-box bağlanma faktörleri	USF.03	Upstream uyarıcı faktör	1928	194 4	(+)	gctctcaCGTGaccg
HESF	Bölünmüş kompleks enhansırının omurgalı homologları.	DEC2.01	Dec2, Sharp1 ya da BHLHE41Bas ic olarak bilinen helix-loop-helix protein	1928	194 2	(-)	gggtcaCGTGagagc / gctctCACGtgaccc
EBO X	E-box bağlanma faktörleri	USF1.01	Upstream uyarıcı faktör 1	1927	194 3	(-)	cgggTCACgtgagagcc / ggctctcacGTGAcccg
HIF1	Hypoxia'yı indükleyebilen faktör , bHLH/PAS protein ailesi	HRE.02	Hipoksia-cevap elementi	1910	192 6	(-)	ccgctgaaCGTGcgtcc / ggacgCACGttcagcgg
EBO X	E-box bağlanma faktörleri	MNT.01	MAX bağlanma proteini	1897	191 3	(+)	gcggcCACGtgaaggac
EBO X	E-box bağlanma faktörleri	USF.01	Upstream uyarıcı faktör	1896	191 2	(-)	tccttCACGtggccgcc / ggcgccaCGTgaagg a
YY1F	Transkripsiyon başlama sitesine bağlanan aktivatör/repr esör	YY2.01	Transkripsiyon faktör yin yang 2	1879	190 1	(+)	cagcggCCATtttgcgg ggccgc
MITF	Mikroftalmin in transkripsiyon faktörü.	CLEAR.01	Eşgüdümlü Lizozomal İfade ve Düzenleme (CLEAR) unsurları TFEB tarafından sınırlandırılmıştır	1850	186 4	(-)	cgggTCACgtgaccg / cggtcacGTGAcccg
HIF1	Hypoxia'yı indükleyebilen faktör, bHLH/PAS protein ailesi	ARNTL.01	Aril hidrokarbon reseptörü nükleer translokator benzeri homodimer	1849	186 5	(-)	ccgggtcaCGTGaccgc / gcgggtCACGtgaccgg
HESF	Bölünmüş kompleks enhansırının omurgalı homologları.	BHLHB2.01	Sınıf B, 2'yi içeren temel helix-loop-helix domain	1850	186 4	(+)	cggtcACGTgacccg
EBO X	E-box bağlanma faktörleri	USF.03	Upstream uyarıcı faktör	1849	186 5	(+)	gcgggtcaCGTGaccg
MITF	Mikroftalmin	CLEAR.01	Eşgüdümlü	1849	186	(+)	gcggTCACgtgaccc

	in transkripsiyon faktörü		Lizozomal İfade ve Düzenleme (CLEAR) unsurları TFEB tarafından sınırlandırılmıştır		3		
HIFF	Hypoxia'yı indükleyebilen faktör , bHLH/PAS protein ailesi	ARNTL.01	Aril hidrokarbon reseptörü nükleer translokator benzeri homodimer.	1848	1864	(+)	tgcggtcaCGTGaccgcg
SF1F	Omurgalı steroidojenik faktör	SF1.01	SF1 steroidojenik faktör 1	93	107	(+)	agtgCAAGgtcacga
GATA	GATA bağlanma faktörleri	GATA1.01	GATA-bağlanma faktör 1	222	234	(+)	taggGATAggggtt
HAND	B sınıfı bHLH transkripsiyon faktörlerinin alt familyası	TAL1_E2A.0	Tal-1, E2A proteinlerine ve GATA-1'e bağlı Lmo2 kompleksi	266	286	(+)	ctgacctCAGGtgatctacc

Çizelge 4.6. Bax gen promotörü üzerinde sıçan ve fare arasında en fazla homolojinin görüldüğü 440-660 bp arasındaki bölgede bulunan muhtemel transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri

Transkripsiyon Faktörü	Transkripsiyon Bağlanma Motifi
SRY_01	AAACaaa
IRF_Q6_01	CaAACAGAAAa
IRF1_Q6	AACAGAA
STAT1_03	CagAAaag
STAT4_01	CaGAAaag
STAT5A_03	CaGAAaag
STAT5A_04	CaGAAaag
MYCMAX_B	AgCTCATGcc
P53_DECAMER_Q2	GctCATGcct
CRX_Q4	CctgTAAtcccag
CDXA_02	CtgtAat
GFI1_Q6	TgtAATCccagcg
PITX2_Q2	TgTAATCCcag
IK2_01	GtaaTCCcagcg
CAP_01	CCAgcgct

4.2. Bax Gen Promotörünün Klonlanması

4.2.1 Primer tasarımı

Öncelikle insan Bax gen promotorunun biyoinformatik olarak restriksiyon haritalaması yapılarak, promotoru kesen ve kesmeyen restriksiyon enzimleri saptandı. Promotor diziyi kesmeyen enzimlerin pGL3-basic vektörünün klonlama bölgesindeki enzimler ile uyum gösterip göstermediği kontrol edildi ve KpnI ve HindIII enzimlerinin hem promotor bölgeyi kesmediği hem de vektörün klonlama bölgesinde olduğu görüldü. Sonuç olarak KpnI ve HindIII enzim kesim bölgeleri seçilerek primerlerde kullanıldı. Promotor dizinin doğru yönde klonlanabilmesi için, KpnI kesim bölgesi forward primerde, HindIII kesim bölgesi ise reverse primerde kullanıldı. Bunun dışında tasarlanan primerlerin saç tokası yapısı oluşturmamasına, Tm sıcaklıklarının birbirine

yakın olmasına ve nükleotitlerin dağılımının mümkün olduğunca eşit olmasına dikkat edildi.

Primer	Uzunluk	Tm	Dizi
Bax Forward-1	26 bç	65 °C	KpnI: 5'-TGGTACCAACCCTTTATCATCTGATC-3'
Bax Reverse-1	22 bç	60 °C	HindIII :5'-TAAGCTTAACGTGCGTCCTTCA-3'
Bax Forward-2	23 bç	63 °C	KpnI: 5'-CCGGTACCTAAACACCATTCAGA-3'
Bax Forward-3	22 bç	64 °C	KpnI: 5'-TGGTACCGGTTATCTCTTGGGC-3'
Bax Reverse-2	22 bç	64 °C	HindIII: 5'-TAAGCTTGTATGGAGGGGAGGG-3'
Vektör ait primer Forward (P1)	17 bç	60 °C	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'
Vektör ait primer Reverse (P5)	17 bç	60 °C	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

Şekil 4.4. Dizayn edilen primerlerin uzunlukları, sıcaklıkları ve dizileri.

4.2.2 Polimeraz zincir reaksiyonları (PCR)

PCR reaksiyonları 15 µL hacimde yapıldı. Buna göre Bax gen promotörünün çoğaltılması için en uygun şartların saptanabilmesi amacıyla PCR bileşenlerinin miktarları ve primerlerin sıcaklıkları belirli oranlarda değiştirilerek PCR şartları optimize edilmeye çalışıldı. Daha sonra her bölge için tablolarda belirtilen protokol ve PCR programı kullanılarak promotör dizi çoğaltıldı. PCR sonucu oluşan ürünler agaroz jelde yürütüldü ve 1922 bç'lik insan Bax promotorüne ait bant görüntüleme sistemi ile görüntülenerek fotoğrafları çekildi.

4.2.3. Bax gen promotörünün 1922 bp'lik bölgesinin çoğaltılması

Bax gen promotörüne ait olan ve belirlenen dört farklı bölgeyi kolay bir şekilde çoğaltabilmek amacıyla kalıp olarak kullanılacak olan 1922 bp 'lik bölge PCR'da çoğaltıldı.



Şekil 4.5. 1922 bp bölgenin PCR ile çoğaltılması

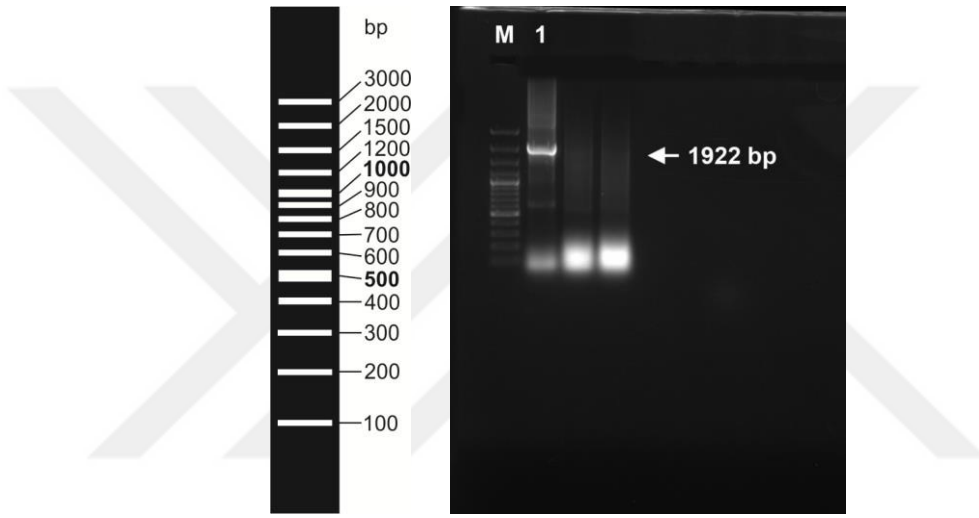
M: Markır; 1,2:1922 bp gen bölgesi

4.2.3.a. İnsan Bax gen promotörünün 1922 bp bölgesinin pGEM-T Easy vektörüne klonlanması ve *E.coli*'ye transformasyonu

PCR ile çoğaltılan 1922 bp'lik promotör bölge pGEM-T Easy vektörüne (Promega) A:T klonlama stratejisi ile klonlandı. Bu amaçla PCR sonucu elde edilen PCR ürünü bir gece +4°C'de ligasyona bırakıldı. Ligasyon ürünü *E.coli JM109* hücrelerine transforme edildi. Amfisilin içeren LB agarlı petrilere mavi-beyaz koloni seçimi yapılabilmesi amacıyla X-Gal ve IPTG yayıldı. Bu petrilere transformasyon yapılmış bakterilerin ekimi yapılarak bir gece 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Oluşan beyaz koloniler insan Bax gen promotörünün 1922 'lik kısmını içeren hücrelerdir. Beyaz kolonilerden üç tanesi seçilerek vektörün geni alıp almadığını kontrol etmek amacıyla koloni PCR yapıldı.

4.2.3.b. Koloni PCR

Klonladığımız gen bölgesini aldığını düşündüğümüz beyaz koloniler seçildi. PCR 'da kalıp olarak kullanılarak koloni PCR yapıldı. Primer olarak vektöre ait olan P1 ve P5 primerleri kullanıldı.



Şekil 4.6. Koloni PCR sonucunun agaroz jelde görüntülenmesi.
M: Markır; 1: 1922 bp gen bölgesi

4.2.3.c. Plazmit DNA izolasyonu

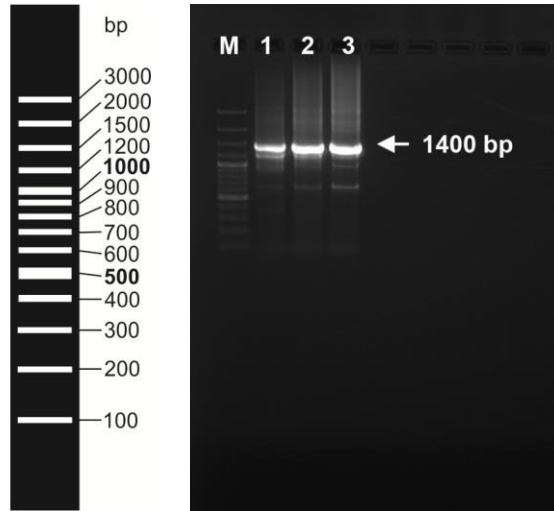
Koloni PCR sonucu istenen gen bölgesini aldığı doğrulanan koloni LB -broth besiyerine ekildi ve hücreler çoğaltıldı. Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems plazmit DNA izolasyon kiti kullanılarak plazmit DNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen plazmitin konsantrasyon ve saflığı NanoDrop'ta ölçüldü, agaroz jel elektroforezinde görüntülendi.



Şekil 4.7. İzole edilen plazmitlerin agaroz jelde görüntülenmesi.

4.2.4. Bax gen promotörünün 1400 bp'lik bölgesinin çoğaltılması

Bu bölgenin çoğaltılması için 1922 bp'lik bölge kalıp olarak kullanıldı. Nonspesifik bağlanmaları engellemek için PCR reaksiyonunda kalıp olarak kullanılan DNA 1/3 oranında sulandırıldı.



Şekil 4.8. 1400 bp bölgenin PCR ile çoğaltılması

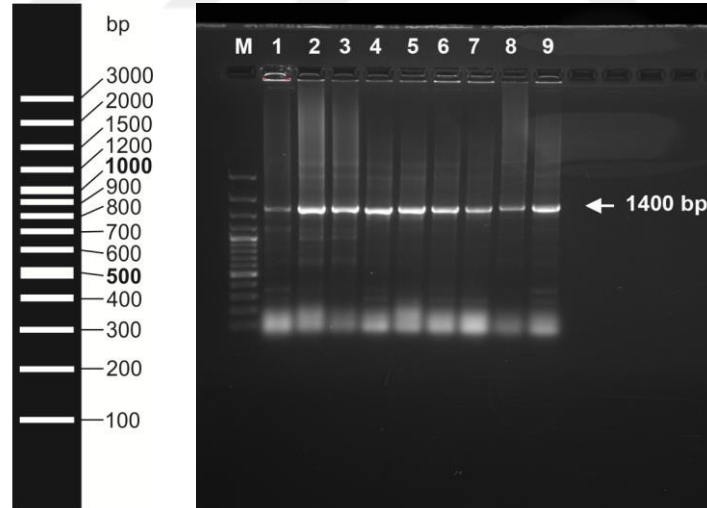
M: Markır; : 1, 2, 3: 1400 bp'lik bölge

4.2.4.a. İnsan Bax gen promotörünün 1400 bp bölgesinin pGEM-T Easy vektörüne klonlanması ve *E.coli*'ye transformasyonu

pGEM-T Easy vektörüne klonlamak için PCR'da elde edilen bantlar agaroz jelden saf olarak ekstrakte edildi. Elde edilen saf ürün vektöre klonlandı ve bakteriye transforme edildi. İnkübasyon sonunda oluşan mavi ve beyaz koloniler kalıp olarak kullanılarak koloni PCR yapıldı.

4.2.4.b. Koloni PCR

Klonladığımız gen bölgesini aldığını düşündüğümüz dokuz tane beyaz koloni seçildi. PCR 'da kalıp olarak kullanılarak koloni PCR yapıldı. Primer olarak vektöre ait olan P1 ve P5 primerleri kullanıldı. Protokol ve PCR döngüsü olarak tüm bölgelerin koloni PCR'ı için ayınısı kullanıldı.



Şekil 4.9. Koloni PCR sonucunun agaroz jelde görüntülenmesi

M: Markır; Koloniler: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9

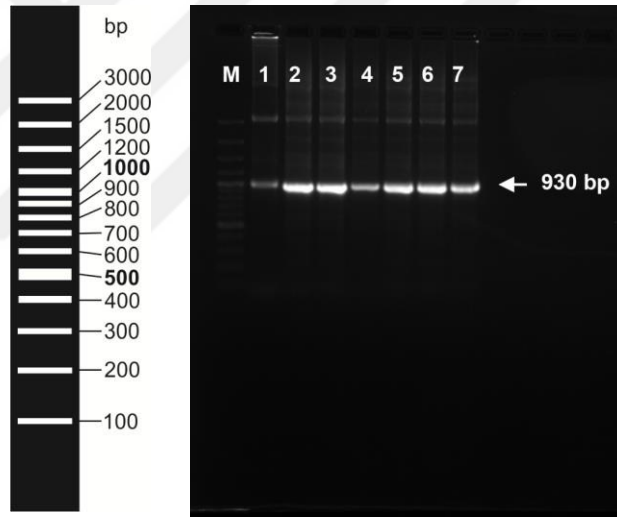
4.2.4.c. Plazmit DNA izolasyonu

Bütün kolonilere bakıldı fakat en saf görüntü 8. kolonide olduğu için bu koloni seçilerek LB broth besiyerine ekildi ve hücreler çoğaltıldı. Wizard® Plus SV Minipreps DNA

Purification Systems plazmit DNA izolasyon kiti kullanılarak plazmit DNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen plazmitin konsantrasyon ve saflığı NanoDrop'ta ölçüldü, agaroz jel elektroforezinde görüntülendi.

4.2.5. Bax gen promotörünün 930 bp'lik bölgesinin çoğaltılması

Bu bölgenin çoğaltılması için 1922 bp'lik bölge kalıp olarak kullanıldı, nonspesifik bağlanmaları engellemek için PCR reaksiyonunda kalıp olarak kullanılan DNA 1/3 oranında sulandırıldı.



Şekil 4.10. 930 bp bölgenin PCR ile çoğaltılması

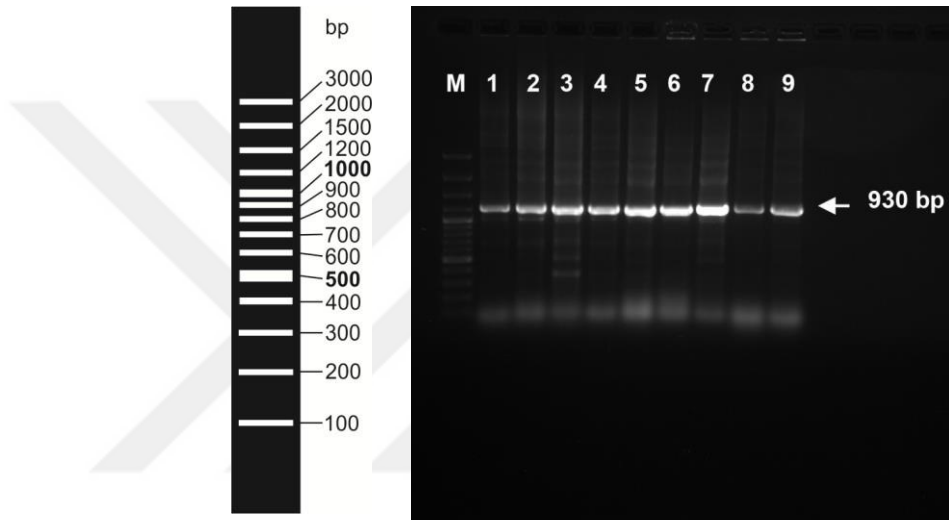
M : Markır; 930 bp bölge: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7

4.2.5.a. İnsan Bax gen promotörünün 930 bp bölgesinin pGEM-T Easy vektörüne klonlanması ve *E.coli*'ye transformasyonu

pGEM-T Easy vektörüne klonlamak için PCR'da elde edilen bantlar agaroz jelden saf olarak ekstrakte edildi. Elde edilen saf ürün vektöre klonlandı, bakteriye transforme edildi. Oluşan mavi ve beyaz kolonilerden koloni PCR yapıldı.

4.2.5.b. Koloni PCR

Seçilen dokuz tane beyaz koloni PCR 'da kalıp olarak kullanılarak koloni PCR yapıldı. Primer olarak vektöre ait olan P1 ve P5 primerleri kullanıldı. Protokol ve PCR döngüsü olarak tüm bölgelerin koloni PCR'ı için aynısı kullanıldı.



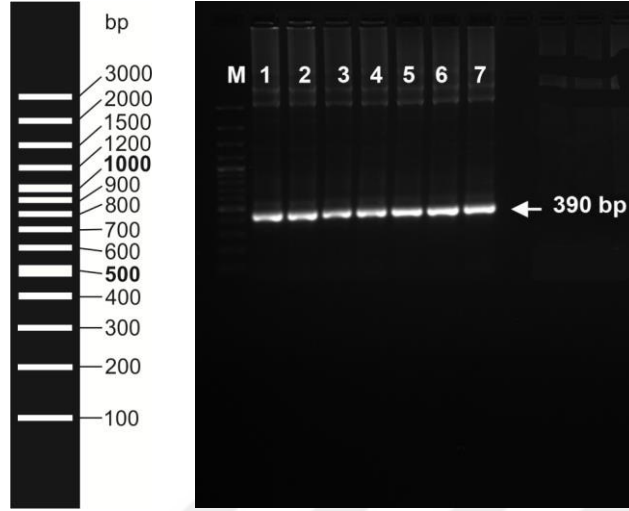
Şekil 4.11. Koloni PCR sonucunun agaroz jelde görüntülenmesi
M: Markır; Koloniler: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9

4.2.5.c. Plazmit DNA izolasyonu

Koloni PCR sonucu 9.koloni seçilerek LB broth besiyerine ekildi ve hücreler çoğaltıldı. Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems plazmit DNA izolasyon kiti kullanılarak plazmit DNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen plazmitin konsantrasyon ve saflığı NanoDrop'ta ölçüldü, agaroz jel elektroforezinde görüntüldü.

4.2.6. Bax gen promotörünün 390 bp'lik bölgesinin çoğaltılması

Bu bölgenin çoğaltılması için 1922 bp'lik bölge kalıp olarak kullanıldı. Fakat nonspesifik bağlanmaları engellemek için PCR reaksiyonunda kalıp olarak kullanılan DNA 1/3 oranında sulandırıldı.



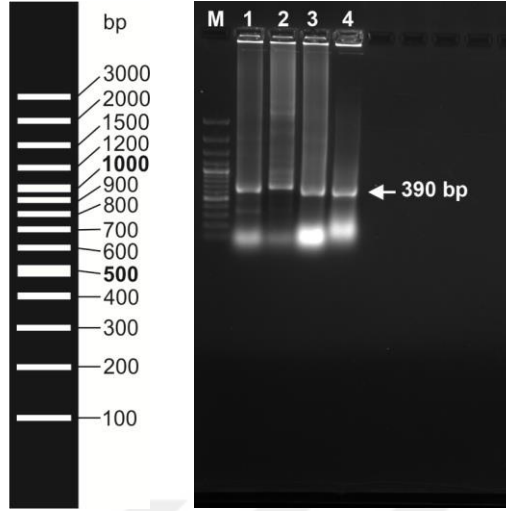
Şekil 4.12. 390 bp bölgenin PCR ile çoğaltılması
M : Markır; 390 bp bölge: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7

4.2.6.a. İnsan Bax gen promotörünün 390 bp bölgesinin pGEM-T Easy vektörüne klonlanması ve *E.coli*'ye transformasyonu

pGEM-T Easy vektörüne klonlamak için PCR'da elde edilen bantlar agaroz jelden saf olarak ekstrakte edildi. Elde edilen saf ürün vektöre klonlandı, bakteriye transforme edildi. Oluşan mavi ve beyaz kolonilerden koloni PCR yapıldı.

4.2.6.b. Koloni PCR

Seçilen dokuz tane beyaz koloni PCR 'da kalıp olarak kullanılarak koloni PCR yapıldı. Primer olarak vektöre ait olan P1 ve P5 primerleri kullanıldı. Protokol ve PCR döngüsü olarak tüm bölgelerin koloni PCR'ı için aynısı kullanıldı.



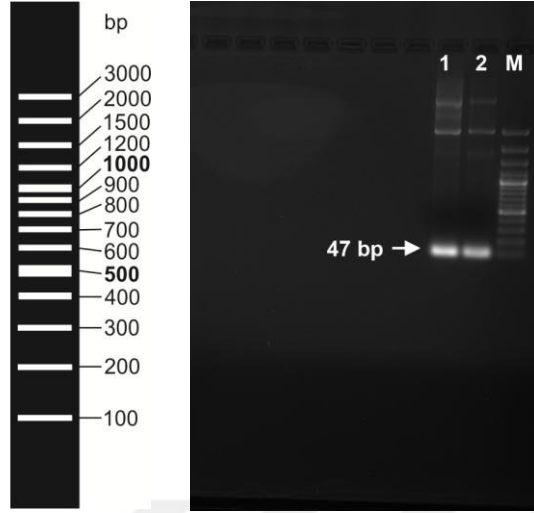
Şekil 4.13. Koloni PCR sonucunun agaroz jelde görüntülenmesi
M: Markır; Koloniler: 1, 2, 3, 4

4.2.6.c. Plazmit DNA izolasyonu

Koloni PCR sonucu en saf görüntüyü veren 4.koloni seçilerek LB broth besiyerine ekildi ve hücreler çoğaltıldı. Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems plazmit DNA izolasyon kiti kullanılarak plazmit DNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen plazmitin konsantrasyon ve saflığı NanoDrop'ta ölçüldü. Daha sonra agaroz jel elektroforezinde görüntülendi.

4.2.7. Bax geninin 47 bp'lik bölgesinin çoğaltılması

Bu bölgenin çoğaltılması için 1922 bp'lik bölge kalıp olarak kullanıldı. Fakat nonspesifik bağlanmaları engellemek için PCR reaksiyonunda kalıp olarak kullanılan DNA 1/3 oranında sulandırıldı.



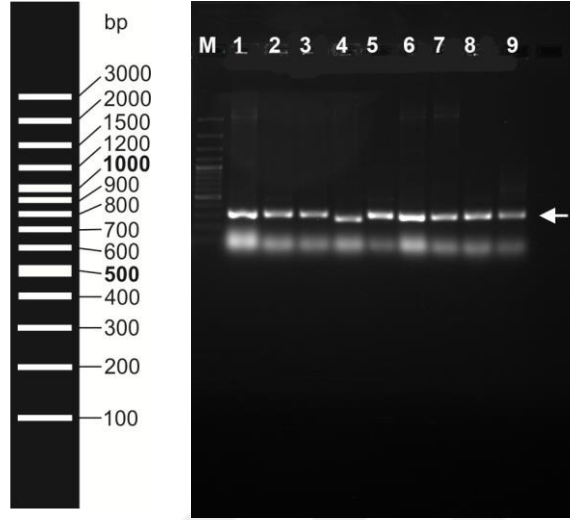
Şekil 4.14. 47 bp bölgenin PCR ile çoğaltılması
M: Markır; PCR ürünleri: 1, 2

4.2.7.a. İnsan Bax gen promotörünün 47 bp bölgesinin pGEM-T Easy vektörüne klonlanması ve *E.coli*'ye transformasyonu

pGEM-T Easy vektörüne klonlamak için PCR'da elde edilen bantlar agaroz jelden saf olarak ekstrakte edildi. Elde edilen saf ürün vektöre klonlandı, bakteriye transforme edildi. Oluşan mavi ve beyaz kolonilerden koloni PCR yapıldı.

4.2.7.b. Koloni PCR

Seçilen dokuz tane beyaz koloni PCR 'da kalıp olarak kullanılarak koloni PCR yapıldı. Primer olarak vektöre ait olan P1 ve P5 primerleri kullanıldı. Protokol ve PCR döngüsü olarak tüm bölgelerin koloni PCR'ı için aynısı kullanıldı.



Şekil 4.15. Koloni PCR sonucunun agaroz jelde görüntülenmesi
M: Markır; Koloniler: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9

4.2.7.c. Plazmit DNA izolasyonu

Koloni PCR sonucu 9.koloni seçilerek LB broth besiyerine ekildi ve hücreler çoğaltıldı. Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems plazmit DNA izolasyon kiti kullanılarak plazmit DNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen plazmitin konsantrasyon ve saflığı NanoDrop'ta ölçüldü, agaroz jel elektroforezinde görüntülendi.

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Yapılan çalışmalarda insan/hamster somatik hücre hibrid DNA analizi ve izotop in situ hibridizasyon ile Bax geninin 19q13.3-q13.4 üzerinde bulunduğu tespit edilmiştir (Apte et al., 1995). Floresan in situ hibridizasyon ile Bax geninin fare kromozomu 7 ve sıçan kromozomu 1q31.2 üzerinde 2 tür arasında benzer olduğu görülmüştür (Matsuda et al., 1996). Bax geni Bcl-2 ile ilişkili bir proteindir. Bax, Bcl-2 ile kapsamlı amino asit homolojisini gösterir ve in - vivo Bcl-2 ile homodimerler ve heterodimerler oluşturur (Oltvai et al., 1993).

Bax geni, Bcl-2'ye zıt bir şekilde çalışan ve apoptozu arttıran Bcl-2'ye bağlı bir proteindir (Oltvai et al., 1993). Bax geninin ekspresyonunun p53 aracılı apoptozla paralellik gösterdiğini ortaya koyan birçok kanıt vardır (Miyashita et al., 1994). Bax geni doğrudan p53 tarafından aktive edilmektedir (Miyashita and Reed, 1995). Bu nedenle, Bax geninin p53 aracılı apoptoz için gerekli olduğu düşünülmektedir (Yin et al., 1997). Bu bağlamda, apoptoz ile bağlantılı olan Bax gibi genlerin somatik olarak mutasyona uğramış olup olmadığını incelemek büyük önem arz etmektedir (Alnemri et al., 1995).

Bax geninin promotör bölgesi, p53 bağlama konsensüs sahasıyla homoloji gösteren 4 motif içerir. p53 bölgesinden yoksun olan tümör hücre hatlarının kullanıldığı ko-transfeksiyon analizlerinde; mutant p53 ekspresyon plazmidlerinin değil, yabancı tiplerin, kloram fenikol asetiltransferazın transkripsiyonunu bozmak için Bax gen promotörünü kullanan bir raportör gen plazmidini transaktif ettiği bulunmuştur. Mutasyonların p53'ün bağlanma alanındaki konsensüs dizilerinde oluşturulması raportör gen plazmidlerinin p53'ün yanıt vermesini ortadan kaldırdığı bildirilmiştir (Miyashita and Reed, 1995). Bax geninden yoksun olan fareler üzerinde yapılan bir araştırmada, proapoptotik Bax molekülünün bir tümör baskılayıcı olarak işlev görebileceği gösterilmiştir (Meijerink et al., 1998).

Meijerink et al. (1998) insan hematopoietik malignitelerini incelemiş ve yaklaşık % 21' lik bir hücre dizisinin, belki de en yaygın olarak akut lenfoblastik lösemi (ALL; 613065) alt grubundaki Bax'ta mutasyona sahip olduğunu bulmuştur (Meijerink et al., 1998).

Proapoptotik Bax proteini, mitokondriye etki ederek hücre ölümünü indükler. Bax'ın kanser hücrelerinde ölüm reseptör aracılı apoptoz için gerekli olabileceği gösterilmiştir (LeBlanc et al., 2002).

Apoptozis, Bcl-2 ailesi üyeleri aracılığı ile gerçekleşir (Adams and Cory, 1998). Bir hücrenin apoptoza eğilimli oluşu heterodimer ya da homodimer formundaki Bcl-2 ailesi genlerinin etkisine bağlıdır. Örneğin; Bcl-2 nin Bax ile olan etkileşiminde Bcl-2 nin oranının daha yüksek olması hücrenin yaşamını sürdürmesini sağlarken, Bax'ın daha fazla olması durumunda hücre ölüme gitmektedir (İnci et al., 2009). Bcl-2 apoptozu engelleme fonksiyonunu ya kaspasların öncü formlarını durdurarak ya da kaspas akışını direkt olarak aktive eden sitoplazmadaki apoptoz uyarıcı faktör (AIF) ve sitokrom-C'nin mitokondriden serbestleşmesini engelleyerek gerçekleştirir (Tsujimoto, 1998).

Bax geni kanser mekanizmasında kanserli hücreyi apoptoza götüren en önemli gendir. Bu nedenle de bu güne kadar bu genle ilgili birçok çalışma yapılmıştır ve yapılmaya devam edilmektedir. Ancak bir genin mekanizmasını iyice anlayabilmek için öncelikle o genin karakterizasyonunu yapmak gerekir.

Çalışmamızda Bax geninin promotör bölgesi biyoinformatik çalışmalarla karakterize edildi. Bu amaçla Genomatix, Ensemble, NCBI, JASPAR, rVISTA gibi çeşitli veritabanları kullanıldı. Ensemble veritabanı ile elde edilen verilere göre Bax geninin 13 tane varyantı olduğu tespit edildi. Bunlardan 9 tanesinin protein kodlarken 4 tanesinin protein kodlamadığı belirlendi. Her bir varyantın aminoasit sayısı ve baz çifti sayısı birbirinden farklıdır. Çalışmamızda Bax-001 transkripti temel alındı. Bu varyantın 1358 bp uzunluğunda olup ve 218 aminoasit içerdiği bilinmektedir. Çalışmamızda Bax geni biyoinformatik çalışmalarla haritalanmış ve analiz edilmiştir. Bax gen haritası

incelendiğinde 5 tane ekzon 4 tane intron içerdiği görülmektedir. Ensemble ve NCBI veritabanlarından elde edilen verilere göre Bax geninin birçok hastalıkla ilişkisi olduğu görülmektedir. Hastalık türlerine göre genin varyant sayısı değişiklik göstermektedir. Yapılan çalışmalarda çalışmanın etkinliğini ve güvenilirliğini artırmak maksadıyla insan genom yapısıyla en fazla benzerlik gösteren fare genom yapısının ilişkisi dikkate alınmaktadır. Dolayısıyla çalışmamızda fonksiyonel bölgeler belirlenirken bu durum dikkate alınarak r-VISTA programı kullanılmış ve iki tür arasında homolojinin en fazla olduğu bölge belirlenmiştir. İnsan ve fare Bax gen promotör bölgeleri kıyaslandığında en yüksek homolojinin 1600 bp ve 1400 bp ile 1000 ve 1100 bp arasındaki bölgede olduğu tespit edilmiştir. İnsan ve farede promoter bölgenin sözü edilen kısımlardaki homolojinin bu kadar yüksek seviyede olması bu bölgelerin transkripsiyon faktör bağlanma bölgeleri için çekirdek bölge olma ihtimalini artırmaktadır. Bir genin ifade edilmesini sağlayan bölge promotör bölgesi olduğu için bu bölgeyi analiz etmek maksadıyla çeşitli yaklaşımlarla bazı çalışmalar yapılmıştır. Örneğin, Semaan et al. (2010) yaptıkları bir çalışmada Bax geninde meydana gelen tek bir nükleotit polimorfizminin retinal gangliyon hücre ölümünü ve transkripsiyonu etkilediği belirlenmiştir. Ve bu tek nükleotit polimorfizminin genin transkripsiyonel aktivitesinde bir azalma meydana getirdiği görülmüştür. Bizim çalışmamızda promotör bölgesi üzerinde transkripsiyonel aktivitede önemli olabilecek fonksiyonel parçalar belirlenmiştir (Semaan et al., 2010). Benzer şekilde, Thornborrow and Manfredi (1999) yaptıkları bir çalışmayla insan Bax promotörü üzerinde p53 proteininin yerleşimini şematize etmişlerdir (Thornborrow and Manfredi, 1999). Hastalıkların moleküler mekanizmasını anlayabilmek maksadıyla genlerin transkripsiyonel regülasyonu ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Bu bağlamda yapılan çalışmalar özellikle bir genin ifade edilmesinde işlevsel rolü olan bölgeler ve proteinler üzerinde yoğunlaşmaktadır. Örneğin; Liao ve ark. çalışmalarında p53 geninin hedef aldığı ve Bax geninin transkripsiyonunda düzenleyici role sahip olan TFIIS.h adlı yeni bir uzama faktörü üzerinde çalışmışlardır (Liao et al., 2016). Yaptıkları çalışmayla bu faktörün p53'ün yeni bir transkripsiyonel hedefi olduğunu ve bunun, apoptoz ile ilişkili Bax geninin transkripsiyon uzamasının etkinliğini artırabileceğini, ancak hücre döngüsü ile ilişkili p21 (CDKN1A) geninin verimliliğini artırabileceğini de göstermişlerdir.

Biz de çalışmamızda Bax geninin transkripsiyonel mekanizmasını aydınlatmayı amaçladık. Öncelikle Miyashita ve ark. yaptıkları çalışmalardan TATA bağlanma bölgesi, muhtemel p53 bağlanma bölgeleri ve Ensemble veritabanından elde edilen verilere göre genin start kodonu, transkripsiyon başlama sitesini tespit etmişlerdi (Miyashita and Reed, 1995). Çalışmada daha önceden tespiti yapılan bölgelerin transkripsiyon bağlanma proteinleri ve p53 bağlanma bölgesi bakımından karakterizasyonu yapılmıştır. Ensemble veritabanındaki verilerle genin 5000 bp uzunluğundaki promotör bölgesinin dizisi belirlendi. Daha sonra çalışmamızda bu parçanın işlevsel bölgelere sahip olduğu düşünülen 2000 bp 'lık parçası ele alındı. Genomatix programı kullanılarak seçilen bu promotör parçası üzerinde özellikle insan ve fare arasında en fazla homolojinin bulunduğu kısımdaki muhtemel yüksek etkiye sahip olduğu düşünülen transkripsiyon faktörü motifleri ve bağlanma yerleri belirlendi. Bu program aynı zamanda bize muhtemel transkripsiyon bağlanma bölgelerinin motiflerini de vermektedir. Motifler nükleotitlerin bulunma yüzdelerine göre çeşitli renklerle ifade edilmiştir (Çizelge 4.4). Motifleri yorumladığımız zaman büyük harfle ya da kırmızı renkle gösterilen diziler bulunma ihtimali yüzde olarak en fazla olan dizilerdir. Homolojinin yüksek olduğu bu kısımda 15 farklı transkripsiyon faktörlerinin bulunduğu belirlendi. Bu bölgelerin genin transkripsiyonunu birinci derecede etkileyebilecek motifler olduğu düşünülmektedir. Bu bilgiler ışığında kalıp olarak alınan 2000 bp'lık promotör parçası işlevsel özelliklerine göre dört parçaya ayrıldı.

Bölgelerin uzunlukları 1400 bp, 930 bp, 390 bp ve 47 bp olarak belirlendi. Bu bölgeler PCR 'da çoğaltıldı. Çoğaltılan bölgeler pGEM-T Easy vektörüne tek tek klonlandı ve plazmitleri izole edildi. Yaptığımız çalışmadan elde edilen veriler ışığında Bax gen promotör bölgesi üzerinde belirlediğimiz fonksiyonel bölgeler tek tek lusiferaz vektörüne klonlanıp aktivite ölçümü yapılabilir. Böylece genin transkripsiyonunda etki mekanizması yüksek olan yerlerin belirlenmiş olmasıyla genin kontrolü sağlanabilir. Transkripsiyonel aktivitede en önemli olan bölge üzerindeki transkripsiyon

faktörlerinde çeşitli site mutasyonları yapıp genin aktivitesindeki değişim incelenebilir. Genin aktivitesini artırmak maksadıyla bahsi geçen transkripsiyon faktörleri üzerinde çeşitli kemoterapötik ilaçların, kimyasalların, inhibitörlerin ve bitki ekstraktlarının etkisi araştırılabilir. Çalışmamız yukarıda bahsi geçen çalışmalara temel teşkil etmesi bakımından önem arz etmektedir.



KAYNAKLAR

- Kanser Biyolojisi ve Onkogenler: Ana bilgi [WWW document]. URL <http://www.stoma-seite.de/SiklusApoptozisKanser.pdf>. [accessed on 16.09.2012]
- National Cancer Institute. What is cancer? [WWW document]. URL <http://www.cancer.gov/about-cancer/what-is-cancer> [accessed on 20.09.2015]
- World Health Organization. Cancer [WWW document]. URL <http://www.who.int/topics/cancer/en/> [accessed on 20.09.2015]
- (2016) *Kanser Nedir*. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Kanser Daire Başkanlığı.
- Adams, J. M. & Cory, S. (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* **281**, 1322-1326.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J. D. (1994) *Molecular Biology of the cell*. Garland Publishing, New York.
- Allen, N. E., Beral, V., Casabonne, D., Kan, S. W., Reeves, G. K., Brown, A., Green, J. & Million Women Study, C. (2009) Moderate alcohol intake and cancer incidence in women. *J Natl Cancer Inst* **101**, 296-305. doi:10.1093/jnci/djn514.
- Alnemri, E. S., Fernandes-Alnemri, T. & Litwack, G. (1995) Cloning and expression of four novel isoforms of human interleukin-1 beta converting enzyme with different apoptotic activities. *J Biol Chem* **270**, 4312-4317.
- Apte, S. S., Mattei, M. G. & Olsen, B. R. (1995) Mapping of the human BAX gene to chromosome 19q13.3-q13.4 and isolation of a novel alternatively spliced transcript, BAX delta. *Genomics* **26**, 592-594.
- Ashkenazi, A. & Dixit, V. M. (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**, 1305-1308.
- Barry, M. & Bleackley, R. C. (2002) Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol* **2**, 401-409. doi:10.1038/nri819.
- Bayrak, Ö. F. (2010) İnsan Kordomalarında Ekspresyon Farkı Olan Mikrorna'ların Ve İlgili Transkriptlerin İncelenmesi Ve Bunların Kordomaların Patogenezindeki Öneminin Belirlenmesi. *Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*.
- .Bidere, N., Su, H. C. & Lenardo, M. J. (2006) Genetic disorders of programmed cell death in the immune system. *Annu Rev Immunol* **24**, 321-352. doi:10.1146/annurev.immunol.24.021605.090513.
- Bortner, C. D., Oldenburg, N. B. & Cidlowski, J. A. (1995) The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol* **5**, 21-26.
- Bratton, D. L., Fadok, V. A., Richter, D. A., Kailey, J. M., Guthrie, L. A. & Henson, P. M. (1997) Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J Biol Chem* **272**, 26159-26165.
- Brenner, C., Bieganski, P., Pace, H. C. & Huebner, K. (1999) The histidine triad superfamily of nucleotide-binding proteins. *J Cell Physiol* **181**, 179-187. doi:10.1002/(SICI)1097-4652(199911)181:2<179::AID-JCP1>3.0.CO;2-8.
- Brunner, T., Wasem, C., Torgler, R., Cima, I., Jakob, S. & Corazza, N. (2003) Fas (CD95/Apo-1) ligand regulation in T cell homeostasis, cell-mediated cytotoxicity and immune pathology. *Semin Immunol* **15**, 167-176.

- Chao, D. T. & Korsmeyer, S. J. (1998) BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* **16**, 395-419. doi:10.1146/annurev.immunol.16.1.395.
- Chau, B. N., Cheng, E. H., Kerr, D. A. & Hardwick, J. M. (2000) Aven, a novel inhibitor of caspase activation, binds Bcl-xL and Apaf-1. *Mol Cell* **6**, 31-40.
- Chicheportiche, Y., Bourdon, P. R., Xu, H., Hsu, Y. M., Scott, H., Hession, C., Garcia, I. & Browning, J. L. (1997) TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J Biol Chem* **272**, 32401-32410.
- Chinnaiyan, A. M. (1999) The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia* **1**, 5-15.
- Cohen, G. M. (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* **326** (Pt 1), 1-16.
- Colditz, G., Ryan, C. T. & Dart, C. H. (2003) *Lifestyle Behaviors Contributing to the Burden of Cancer. In: Fulfilling the Potential of Cancer Prevention and Early Detection*, Curry S, Byers T, Hewitt M (Eds). The National Academies Press, Washington, DC
- Cooper, G. & Hausman, R. (2004) *The Cell*. Washington DC, ASM Pres.
- Cory, S. & Adams, J. M. (2002) The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* **2**, 647-656. doi:10.1038/nrc883.
- Danial, N. N. & Korsmeyer, S. J. (2004) Cell death: critical control points. *Cell* **116**, 205-219.
- Devadas, S., Das, J., Liu, C., Zhang, L., Roberts, A. I., Pan, Z., Moore, P. A., Das, G. & Shi, Y. (2006) Granzyme B is critical for T cell receptor-induced cell death of type 2 helper T cells. *Immunity* **25**, 237-247. doi:10.1016/j.immuni.2006.06.011.
- Deveraux, Q. L. & Reed, J. C. (1999) IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* **13**, 239-252.
- Devi, P. U. (2005) Basics of carcinogenesis. *Health Administrator* **17**, 16-24.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. & Wang, X. (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**, 33-42.
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J. & Schreiber, R. D. (2002) Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* **3**, 991-998. doi:10.1038/ni1102-991.
- Dzivenu, O. K., O'Donnell-Tormey, P. & O'Donnell-Tormey, J. (2009) Cancer and the immune system: the vital connection. Cancer Research Institute, Resources and Publications [WWW document]. URL <http://www.cancerresearch.org/Resources.aspx?id=572>
- Elmore, S. (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* **35**, 495-516. doi:10.1080/01926230701320337.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. & Nagata, S. (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* **391**, 43-50. doi:10.1038/34112.
- Fan, Z., Beresford, P. J., Oh, D. Y., Zhang, D. & Lieberman, J. (2003) Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell* **112**, 659-672.

- Fujio, Y., Nguyen, T., Wencker, D., Kitsis, R. N. & Walsh, K. (2000) Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart. *Circulation* **101**, 660-667.
- Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P. E., Didelot, C. & Kroemer, G. (2006) Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ* **13**, 1423-1433. doi:10.1038/sj.cdd.4401950.
- Giarnieri, E., Mancini, R., Pisani, T., Alderisio, M. & Vecchione, A. (2000) Msh2, Mlh1, Fhit, p53, Bcl-2, and Bax expression in invasive and in situ squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Clin Cancer Res* **6**, 3600-3606.
- Goping, I. S., Barry, M., Liston, P., Sawchuk, T., Constantinescu, G., Michalak, K. M., Shostak, I., Roberts, D. L., Hunter, A. M., Korneluk, R. & Bleackley, R. C. (2003) Granzyme B-induced apoptosis requires both direct caspase activation and relief of caspase inhibition. *Immunity* **18**, 355-365.
- Graziani, G. & Szabo, C. (2005) Clinical perspectives of PARP inhibitors. *Pharmacol Res* **52**, 109-118. doi:10.1016/j.phrs.2005.02.013.
- Greenberg, P. D. (2001) *Mechanism of tumor immunology*. In: Parslow TG, Stites DP, Terr AI, Imboden JB, eds. *Medical Immunology*. New York, NY: McGraw-Hill
- Greenblatt, M. S., Bennett, W. P., Hollstein, M. & Harris, C. C. (1994) Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* **54**, 4855-4878.
- Griffiths, G. J., Dubrez, L., Morgan, C. P., Jones, N. A., Whitehouse, J., Corfe, B. M., Dive, C. & Hickman, J. A. (1999) Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. *J Cell Biol* **144**, 903-914.
- Gross, J. J. (1998) Antecedent- and response-focused emotion regulation: divergent consequences for experience, expression, and physiology. *J Pers Soc Psychol* **74**, 224-237.
- Gulbins, E., Jekle, A., Ferlinz, K., Grassme, H. & Lang, F. (2000) Physiology of apoptosis. *Am J Physiol Renal Physiol* **279**, F605-615.
- Hacker, G. (2000) The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res* **301**, 5-17.
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70.
- Harris, C. C. (1996) Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *J Natl Cancer Inst* **88**, 1442-1455.
- Haunstetter, A. & Izumo, S. (1998) Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ Res* **82**, 1111-1129.
- Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A. & Oren, M. (1997) Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* **387**, 296-299. doi:10.1038/387296a0.
- Hemşirelik (2013) Onkoloji Hastalıkları Ve Bakımı. *T.C. Milli Eğitim Bakanlığı*.
- Hengartner, M. O. (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**, 770-776. doi:10.1038/35037710.
- Hill, M. M., Adrain, C., Duriez, P. J., Creagh, E. M. & Martin, S. J. (2004) Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *EMBO J* **23**, 2134-2145. doi:10.1038/sj.emboj.7600210.
- Hitoshi, Y., Lorens, J., Kitada, S. I., Fisher, J., LaBarge, M., Ring, H. Z., Francke, U., Reed, J. C., Kinoshita, S. & Nolan, G. P. (1998) Toso, a cell surface, specific regulator of Fas-induced apoptosis in T cells. *Immunity* **8**, 461-471.

- Hochhauser, E., Kivity, S., Offen, D., Maulik, N., Otani, H., Barhum, Y., Pannet, H., Shneyvays, V., Shainberg, A., Goldshtaub, V., Tobar, A. & Vidne, B. A. (2003) Bax ablation protects against myocardial ischemia-reperfusion injury in transgenic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **284**, H2351-2359. doi:10.1152/ajpheart.00783.2002.
- Hockenbery, D., Nunez, G., Milliman, C., Schreiber, R. D. & Korsmeyer, S. J. (1990) Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* **348**, 334-336. doi:10.1038/348334a0.
- Hsu, H., Xiong, J. & Goeddel, D. V. (1995) The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* **81**, 495-504.
- Hu, S., Snipas, S. J., Vincenz, C., Salvesen, G. & Dixit, V. M. (1998) Caspase-14 is a novel developmentally regulated protease. *J Biol Chem* **273**, 29648-29653.
- Igney, F. H. & Krammer, P. H. (2002) Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* **2**, 277-288. doi:10.1038/nrc776.
- İnci, A., Yıldırım, A., Yavuz, A. & Düzlü, Ö. (2009) Bazı Protozoon Enfeksiyonlarda Apoptozis. *Erciyes Üniv. Vet. Fak. Derg* **6**, 121-133.
- Joza, N., Susin, S. A., Daugas, E., Stanford, W. L., Cho, S. K., Li, C. Y., Sasaki, T., Elia, A. J., Cheng, H. Y., Ravagnan, L., Ferri, K. F., Zamzami, N., Wakeham, A., Hakem, R., Yoshida, H., Kong, Y. Y., Mak, T. W., Zuniga-Pflucker, J. C., Kroemer, G. & Penninger, J. M. (2001) Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* **410**, 549-554. doi:10.1038/35069004.
- Jurgensmeier, J. M., Xie, Z., Deveraux, Q., Ellerby, L., Bredesen, D. & Reed, J. C. (1998) Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 4997-5002.
- Kang, S. J., Wang, S., Kuida, K. & Yuan, J. (2002) Distinct downstream pathways of caspase-11 in regulating apoptosis and cytokine maturation during septic shock response. *Cell Death Differ* **9**, 1115-1125. doi:10.1038/sj.cdd.4401087.
- Kataoka, T., Schroter, M., Hahne, M., Schneider, P., Irmeler, M., Thome, M., Froelich, C. J. & Tschoop, J. (1998) FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation. *J Immunol* **161**, 3936-3942.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239-257.
- Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H. & Peter, M. E. (1995) Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* **14**, 5579-5588.
- Koenig, U., Eckhart, L. & Tschachler, E. (2001) Evidence that caspase-13 is not a human but a bovine gene. *Biochem Biophys Res Commun* **285**, 1150-1154. doi:10.1006/bbrc.2001.5315.
- Krajewski, S., Bodrug, S., Gascoyne, R., Berean, K., Krajewska, M. & Reed, J. C. (1994) Immunohistochemical analysis of Mcl-1 and Bcl-2 proteins in normal and neoplastic lymph nodes. *Am J Pathol* **145**, 515-525.
- Kubbutat, M. H., Jones, S. N. & Vousden, K. H. (1997) Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* **387**, 299-303. doi:10.1038/387299a0.

- Kumar, V., Abbas, A. & Aster, J. (2014) *Robbins And Cotran Pathologic Basis Of Disease*. Elsevier Health Sciences.
- Kumar, V., Abbas, A. & Robbins, S. L. (1992) *Basic Pathology*. W.B. Saunders Company.
- Kurosaka, K., Takahashi, M., Watanabe, N. & Kobayashi, Y. (2003) Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J Immunol* **171**, 4672-4679.
- Le, G. T. & Abbenante, G. (2005) Inhibitors of TACE and Caspase-1 as anti-inflammatory drugs. *Curr Med Chem* **12**, 2963-2977.
- Leal, A., Lourenço, J. & Cruz, T. (2012) Report on Tumour Growth Modelling and Tumour Computational Simulation
- LeBlanc, H., Lawrence, D., Varfolomeev, E., Totpal, K., Morlan, J., Schow, P., Fong, S., Schwall, R., Sinicropi, D. & Ashkenazi, A. (2002) Tumor-cell resistance to death receptor--induced apoptosis through mutational inactivation of the proapoptotic Bcl-2 homolog Bax. *Nat Med* **8**, 274-281. doi:10.1038/nm0302-274.
- Levine, A. J. (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division.. *Cell* **88**, 323-331.
- Levine, J. A., Momand, J. & Finlay, C. A. (1991) The p53 Suppressor gene. *Nature* **351**, 435-455.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C. J. & Yuan, J. (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**, 491-501.
- Li, L. Y., Luo, X. & Wang, X. (2001) Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* **412**, 95-99. doi:10.1038/35083620.
- Liao, J. M., Cao, B., Deng, J., Zhou, X., Strong, M., Zeng, S., Xiong, J., Flemington, E. & Lu, H. (2016) TFIIS.h, a new target of p53, regulates transcription efficiency of pro-apoptotic bax gene. *Sci Rep* **6**, 23542. doi:10.1038/srep23542.
- Lichtenstein, P., Holm, N. V., Verkasalo, P. K., Iliadou, A., Kaprio, J., Koskenvuo, M., Pukkala, E., Skytthe, A. & Hemminki, K. (2000) Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med* **343**, 78-85. doi:10.1056/NEJM200007133430201.
- Lieberman, J. & Fan, Z. (2003) Nuclear war: the granzyme A-bomb. *Curr Opin Immunol* **15**, 553-559.
- Liu, F. T., Newland, A. C. & Jia, L. (2003) Bax conformational change is a crucial step for PUMA-mediated apoptosis in human leukemia. *Biochem Biophys Res Commun* **310**, 956-962.
- Livingston, D. J. (1997) In vitro and in vivo studies of ICE inhibitors. *J Cell Biochem* **64**, 19-26.
- Locksley, R. M., Killeen, N. & Lenardo, M. J. (2001) The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* **104**, 487-501.
- Lodish, F. L., Berk, A., Matsudaira, I., Kaiser, C., Krieger, M., Scoot, M., Zipursky, S. L. & Darnell, J. (2003) *Molecular Cell Biology*. New York.: Freeman, W. H. & Company.
- Luleyap, H. U. (2008) *Moleküler Genetiğin Esasları*. Adana, : Nobel Kitabevi, pp. 437.
- Macdonald, F., Ford, C. H. J. & Casson, A. G. (2004) *Molecular biology of cancer*. . New

York: BIOS Scientific;.

- Majno, G. & Joris, I. (1995) Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* **146**, 3-15.
- Martinvalet, D., Zhu, P. & Lieberman, J. (2005) Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity* **22**, 355-370. doi:10.1016/j.immuni.2005.02.004.
- Mates, J. M. & Sanchez-Jimenez, F. M. (2000) Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol* **32**, 157-170.
- Matsuda, Y., Kusano, H. & Tsujimoto, Y. (1996) Chromosomal assignment of the Bcl2-related genes, Bcl2l and Bax, in the mouse and rat. *Cytogenet Cell Genet* **74**, 107-110.
- Meijerink, J. P., Mensink, E. J., Wang, K., Sedlak, T. W., Sloetjes, A. W., de Witte, T., Waksman, G. & Korsmeyer, S. J. (1998) Hematopoietic malignancies demonstrate loss-of-function mutations of BAX. *Blood* **91**, 2991-2997.
- Meyer, N., Kim, S. S. & Penn, L. Z. (2006) The Oscar-worthy role of Myc in apoptosis. *Semin Cancer Biol* **16**, 275-287. doi:10.1016/j.semcancer.2006.07.011.
- Mirmajidi, S. H., Najafi, M., Mirmajidi, S. T. & Nasri Nasrabadi, N. (2016) Study of regulatory promoter polymorphism (-248 G>A) of Bax gene in patients with gastric cancer in the northern provinces of Iran. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* **9**, 36-44.
- Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H. G., Lin, H. K., Liebermann, D. A., Hoffman, B. & Reed, J. C. (1994) Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* **9**, 1799-1805.
- Miyashita, T. & Reed, J. C. (1995) Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* **80**, 293-299.
- Mocanu, M. M., Baxter, G. F. & Yellon, D. M. (2000) Caspase inhibition and limitation of myocardial infarct size: protection against lethal reperfusion injury. *Br J Pharmacol* **130**, 197-200. doi:10.1038/sj.bjp.0703336.
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B. A. & Yuan, J. (2000) Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* **403**, 98-103. doi:10.1038/47513.
- Nemes, Z., Jr., Friis, R. R., Aeschlimann, D., Saurer, S., Paulsson, M. & Fesus, L. (1996) Expression and activation of tissue transglutaminase in apoptotic cells of involuting rodent mammary tissue. *Eur J Cell Biol* **70**, 125-133.
- Newmeyer, D. D., Bossy-Wetzel, E., Kluck, R. M., Wolf, B. B., Beere, H. M. & Green, D. R. (2000) Bcl-xL does not inhibit the function of Apaf-1. *Cell Death Differ* **7**, 402-407. doi:10.1038/sj.cdd.4400665.
- Nguyen, M., Millar, D. G., Yong, V. W., Korsmeyer, S. J. & Shore, G. C. (1993) Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence. *J Biol Chem* **268**, 25265-25268.
- Nicholson, D. W. (2000) From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature* **407**, 810-816. doi:10.1038/35037747.
- Nigro, J. M., Baker, S. J., Preisinger, A. C., Jessup, J. M., Hostetter, R., Cleary, K., Bigner, S. H., Davidson, N., Baylin, S., Devilee, P. & et al. (1989) Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* **342**, 705-708. doi:10.1038/342705a0.

- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T. & Tanaka, N. (2000) Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* **288**, 1053-1058.
- Olah, E. (2005) Basic Concepts Of Cancer: Genomic Determination. *The International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* **16**.
- Oltvai, Z. N., Millman, C. L. & Korsmeyer, S. J. (1993) Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **74**, 609-619.
- Peter, M. E. & Krammer, P. H. (1998) Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. *Curr Opin Immunol* **10**, 545-551.
- Prives, C. & Hall, P. A. (1999) The p53 pathway. *J Pathol* **187**, 112-126. doi:10.1002/(SICI)1096-9896(199901)187:1<112::AID-PATH250>3.0.CO;2-3.
- Puthalakath, H. & Strasser, A. (2002) Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Differ* **9**, 505-512. doi:10.1038/sj/cdd/4400998.
- Rai, N. K., Tripathi, K., Sharma, D. & Shukla, V. K. (2005) Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *Int J Low Extrem Wounds* **4**, 138-144. doi:10.1177/1534734605280018.
- Raven, P. H. & Johnson, G. B. (1996) *Biology*. McGraw-Hill, Boston, MA.
- Rubio-Moscardo, F., Blesa, D., Mestre, C., Siebert, R., Balasas, T., Benito, A., Rosenwald, A., Climent, J., Martinez, J. I., Schilhabel, M., Karran, E. L., Gesk, S., Esteller, M., deLeeuw, R., Staudt, L. M., Fernandez-Luna, J. L., Pinkel, D., Dyer, M. J. & Martinez-Climent, J. A. (2005) Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in B-cell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes. *Blood* **106**, 3214-3222. doi:10.1182/blood-2005-05-2013.
- Russell, J. H. & Ley, T. J. (2002) Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* **20**, 323-370. doi:10.1146/annurev.immunol.20.100201.131730.
- Saelens, X., Festjens, N., Vande Walle, L., van Gurp, M., van Loo, G. & Vandenabeele, P. (2004) Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* **23**, 2861-2874. doi:10.1038/sj.onc.1207523.
- Sakahira, H., Enari, M. & Nagata, S. (1998) Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* **391**, 96-99. doi:10.1038/34214.
- Saraste, A. & Pulkki, K. (2000) Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res* **45**, 528-537.
- Savill, J. & Fadok, V. (2000) Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* **407**, 784-788. doi:10.1038/35037722.
- Schimmer, A. D. (2004) Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res* **64**, 7183-7190. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1918.
- Schuler, M. & Green, D. R. (2001) Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans* **29**, 684-688.
- Semaan, S. J., Li, Y. & Nickells, R. W. (2010) A single nucleotide polymorphism in the Bax gene promoter affects transcription and influences retinal ganglion cell death. *ASN Neuro* **2**, e00032. doi:10.1042/AN20100003.

- Silke, J., Hawkins, C. J., Ekert, P. G., Chew, J., Day, C. L., Pakusch, M., Verhagen, A. M. & Vaux, D. L. (2002) The anti-apoptotic activity of XIAP is retained upon mutation of both the caspase 3- and caspase 9-interacting sites. *J Cell Biol* **157**, 115-124. doi:10.1083/jcb.200108085.
- Suliman, A., Lam, A., Datta, R. & Srivastava, R. K. (2001) Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways. *Oncogene* **20**, 2122-2133. doi:10.1038/sj.onc.1204282.
- Susin, S. A., Daugas, E., Ravagnan, L., Samejima, K., Zamzami, N., Loeffler, M., Costantini, P., Ferri, K. F., Irinopoulou, T., Prevost, M. C., Brothers, G., Mak, T. W., Penninger, J., Earnshaw, W. C. & Kroemer, G. (2000) Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med* **192**, 571-580.
- Sutherland, R. L. (1999) *Molecular basis of carcinogenesis*. In: Bishop JF, ed. *Cancer Facts: A Concise OncologyText*. London, UK: CRC Press.
- Thompson, C. B. (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**, 1456-1462.
- Thornberry, N. A. & Lazebnik, Y. (1998) Caspases: enemies within. *Science* **281**, 1312-1316.
- Thornborrow, E. C. & Manfredi, J. J. (1999) One mechanism for cell type-specific regulation of the bax promoter by the tumor suppressor p53 is dictated by the p53 response element. *J Biol Chem* **274**, 33747-33756.
- Trapani, J. A. & Smyth, M. J. (2002) Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* **2**, 735-747. doi:10.1038/nri911.
- Tsujimoto, Y. (1998) Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes Cells* **3**, 697-707.
- Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E. & Croce, C. M. (1985) Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* **228**, 1440-1443.
- Turner, P. C., McLennan, A. G., Bates, A. D. & White, M. R. H. (2004) *Moleküler Biyoloji. Önemli Notlar*. Nobel Yayınları.
- Ueno, T., Toi, M., Biven, K., Bando, H., Ogawa, T. & Linder, S. (2003) Measurement of an apoptotic product in the sera of breast cancer patients. *Eur J Cancer* **39**, 769-774.
- Unger, T., Mietz, J. A., Scheffner, M., Yee, C. L. & Howley, P. M. (1993) Functional domains of wild-type and mutant p53 proteins involved in transcriptional regulation, transdominant inhibition, and transformation suppression. *Mol Cell Biol* **13**, 5186-5194.
- van Loo, G., Saelens, X., van Gurp, M., MacFarlane, M., Martin, S. J. & Vandenabeele, P. (2002) The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death Differ* **9**, 1031-1042. doi:10.1038/sj.cdd.4401088.
- Vaux, D. L. & Korsmeyer, S. J. (1999) Cell death in development. *Cell* **96**, 245-254.
- Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. (2004) Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* **10**, 789-799. doi:10.1038/nm1087.
- Wajant, H. (2002) The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* **296**, 1635-1636. doi:10.1126/science.1071553.
- Willett, W. C., Hunter, D. & Colditz, G. A. (2000) *Causes of Cancer*. In: Graham A, Hingham MA, eds. *Cancer Prevention. The Causes and Prevention of Cancer*. . Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers

- Willingham, D. B. (1999) Implicit motor sequence learning is not purely perceptual. *Mem Cognit* **27**, 561-572.
- Wolter, K. G., Hsu, Y. T., Smith, C. L., Nechushtan, A., Xi, X. G. & Youle, R. J. (1997) Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* **139**, 1281-1292.
- Wyllie, A. H., Duwall, E., McGee, J. D., Issacson, P. G. & Wright, N. (1992) *Oxford Textbook of Pathology*. USA. Oxford University
- Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L. H., Thompson, C. B. & Korsmeyer, S. J. (1995) Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* **80**, 285-291.
- Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M. & Tanyolaç, B. (2007) *Moleküler Biyoloji. Protein Sentezi ve Yıkımı*. . Ankara: Nobel Yayınları. Fen ve Biyoloji Yayınları Dizisi.
- Yin, C., Knudson, C. M., Korsmeyer, S. J. & Van Dyke, T. (1997) Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo. *Nature* **385**, 637-640. doi:10.1038/385637a0.
- Zakeri, Z. & Lockshin, R. A. (2008) Cell death: history and future. *Adv Exp Med Biol* **615**, 1-11. doi:10.1007/978-1-4020-6554-5_1.
- Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J. & Korsmeyer, S. J. (1996) Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* **87**, 619-628.
- Zhou, H. Z., Swanson, R. A., Simonis, U., Ma, X., Cecchini, G. & Gray, M. O. (2006) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 hyperactivation and impairment of mitochondrial respiratory chain complex I function in reperfused mouse hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291**, H714-723. doi:10.1152/ajpheart.00823.2005.
- Zhu, W., Cowie, A., Wasfy, G. W., Penn, L. Z., Leber, B. & Andrews, D. W. (1996) Bcl-2 mutants with restricted subcellular location reveal spatially distinct pathways for apoptosis in different cell types. *EMBO J* **15**, 4130-4141.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
Adı soyadı: Emine TORAMAN Doğum Tarihi: 02.01.1993 Doğum Yeri: PASİNLER Uyruğu: T.C. Adres: Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, 25240, Erzurum Tel: 0534 6523476
Eğitim
Lise: Nenehatun Kız Lisesi, Erzurum (2006-2010) Lisans: Atatürk Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Erzurum (2007-2012) Yüksek Lisans: Atatürk Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Erzurum (2015-2017)
Yabancı Dil Bilgisi
İngilizce