



T.C
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEME KANSER HASTALARININ TEDAVİ SEYRİ İLE SIAH, BIM
VE p53 PROTEİNLERİN SEVİYELERİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
İMMUNOHİSTOKİMYASAL OLARAK ORTAYA KONULMASI**

Luay Talal Hadhal ALSALEEM AGHA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Ahmet ARSLAN

GAZİANTEP

MAYIS 2018

**T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MEME KANSER HASTALARININ TEDAVİ SEYRİ İLE SIAH, BIM
VE P53 PROTEİNLERİN SEVİYELERİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
İMMUNOHİSTOKİMYASAL OLARAK ORTAYA KONULMASI**

Luay Talal Hadhal ALSALEEM AGHA

Tez Savunma Tarihi: 03 Mayıs 2018
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışmasının bir “Yüksek Lisans” derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Prof. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet ARSLAN
Tez Danışmanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

İmzası

- 1. Prof. Dr. Ahmet ARSLAN**
- 2. Doç. Dr. Zafer Çetin**
- 3. Dr. Öğr. Üyesi Abu Shameem Md Saadat KHANDAKAR**

BEYAN

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

Mayıs 2018

Luay Talal Hadhal ALSALEEM AGHA

TEŞEKKÜR

İlk önce yolu acip bana Türkiyede kariyerime devam etmemi sağlayan Allaha hamd olsun

Ve burada

Öncelikle tez danışmanım olan Prof. Dr. AhmetARSLAN' a

teşekkürlerimi sunmak istiyorum. Eğitim sürecim ve tez dönemim boyunca katkılarını esirgemeyen Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI

'ya ve diğer Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca bilimsel katkı ve önerilerini eksik etmeyen değerli bölümdeki arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmamda katkılarını sağlayan, Öğr.Üyesi Abu Shameem Md Saadat KHANDAKAR'a çok teşekkür ederim.

Bütün çalışmalarım süresince beraber uyum içerisinde çalıştığım laboratuvar arkadaşlarıma destek ve hoşgörülerinden dolayı teşekkür ederim.

SANKO Üniversitesi Öğretim Üyesi Doç.Dr. Zafer ÇETİN'e tüm desteğinden dolayı teşekkürü bir borç bilirim.

Babama anneme ve eşime bana verdikleri cesaret ve desteklerinden dolayı teşekkür ederim

Maddi-manevi desteklerini esirgemeyen aileme saygı ve sevgilerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER.....	II
SİMGE VE KISALTMALAR.....	IV
ŞEKİL LİSTESİ	VI
TABLO LİSTESİ	VIII
ÖZET	1
ABSTRACT	2
1.GİRİŞ VE AMAÇ	3
2.GENEL BİLGİLER.....	8
2.1.Meme Kanseri	8
2.1.1.Meme Kanseri Patolojisi ve Sınıflandırılması.....	9
2.1.1.1.Meme Kanserin Histolojik Sınıflandırılması.....	9
2.1.2. Meme Kanserin Moleküler Biyolojisi ve Alt Tipleri	13
2.2.Kanserin Moleküler Biyolojisi	14
2.3.Apoptoz	17
2.3.1. Apoptozun Morfolojisi	18
2.3.2. Apoptozun Nekrozdan Ayırt Edilmesi	20
2.3.3. Apoptoz Mekanizması.....	21
2.3.4. İçsel Apoptoz Yolağı.....	23
2.3.5. Perforin/granzim Yolağı.....	28
2.3.6. Dışsal Apoptotik Yolak.....	29
2.3.7. Uygulama Yolağı	32
2.3.8. Normal Hücre Fizyolojisi İle İlişkili Olan Apoptoz.....	33
2.3.9. Patolojik Durumlarla İlişkilendirilmiş Apoptoz.....	34
2.3.10. Apoptozun Baskılanması.....	37
2.4. Programlanmış Hücre Ölümünün Diğer Biçimleri	38
2.5. Bu Çalışmada İncelenen Proteinler Hakkında Bilgiler	42
2.5.1. Siah E3 Ubiquitin Protein Ligase 1 (SIAH1).....	42
2.5.2. Tümör Protein P53 (TP53).....	43
2.5.2.1.Hücre Stresine ve DNA Hasarına Cevap.....	45
2.5.2.2.Yukarı Akış Önünde p53 Etkinleşmesinin Moleküler Yolakları.....	45
2.5.2.3 Aşağı akış yönünde p53 etkinleşmesinin moleküler mekanizmaları.....	46

2.5.2.4. P53 Yolağındaki Mutasyonlar ve Kanser.....	47
2.5.3. Bcl-2-Like Protein 11 (BIM).....	48
3.GEREÇ VE YÖNTEM	49
3.1.Çalışma Örnekleri ve Analiz Yöntemi	49
3.2.İmmunohistokimyasal Boyama	49
3.3.İstatiksel Analiz.....	50
4.BULGULAR	51
4.1. SIAH Proteinin İfade Seviyesinin Meme Kanseri Hastalarında İmmunohistokimyasal Olarak Tespit Edilmesi	52
4.2. BIM Proteinin İfade Seviyesinin Meme Kanseri Hastalarında İmmunohistokimyasal Olarak Tespit Edilmesi	58
4.3. p53 Proteinin İfade Seviyesinin Meme Kanseri Hastalarında İmmunohistokimyasal Olarak Tespit Edilmesi	62
4.4. Meme Kanseri Dokularında p53 Durumuna Göre SIAH ve BIM Proteinlerinin İfade Seviyeleri.....	67
5.TARTIŞMA.....	69
6.KAYNAKLAR.....	75

SİMGE VE KISALTMALAR

AIDS	Edinilmiş Bağışıklık Yetmezlik Sendromu
ALPS	Otoimmün Lenfoproliferatif Sendrom
ALS	Amyotrofik lateral skleroz
APC	Adenomatöz polipozis koli
APP	Amiloid öncü protein
ATM	Ataksi telenjiektazi mutasyona uğramış gen
BC	Meme Kanseri
BCL2	B-cell lymphoma 2
BH3	Bcl-2 homology domain 3
BIM	Bcl-2-Like Protein 11
Ca	Kalsiyum
CTL	Sitotoksik T Lenfosit
DCC	Deleted in colorectal cancer
DNA	Deoksiribo nükleik asit
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ER	Östrojen Reseptör
FFPE	Formalin fixed paraffin-embedded
GEP	Gen ifadesi profili
GTPase	Guanozin trifosfataz
HAT	Histon asetiltransferaz
HDAC	Histon deasetilaz
HIPK2	Hypoxia-inducible protein kinase-2
HPV	İnsan Papilloma virusu
IAPs	Apoptoz baskılayıcı proteinler
ICAD	Inhibitor of Caspase Activated DNase
LBC-A	Luminal A
LBC-B	Luminal B
LOH	Heterozigotluk kaybı
MEF	Fare embriyonik fibroblast

Mg	Magnezyum
MPT	Mitochondrial permeability transition
p53	Tümör Protein 53
PR	Progesteron reseptörü
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RNA	Ribonukleik asit
SIAH1	Seven in absentia homolog 1
TEM	Transmisyon elektron mikroskobu
TNBC	Üçlü negatif meme kanseri
TNF	Tümör nekroz faktörü
TNM	Tümör, Nodül, Metastaz
UPS	Ubiquitin-proteazom sistemi
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. Göğüs anatomisi ve histolojisinin gösterilmesi	9
Şekil 2.2. İn situ lobüler ve duktal karsinomun gösterilmesi	100
Şekil 2.3. İnvasiv lobüler ve duktal karsinomun gösterilmesi	111
Şekil 2.4. Onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve kanser.....	166
Şekil 2.5. Apoptozun transmisyon elektron mikroskop (TEM) ile gösterilmesi.	1919
Şekil 2.6. İçsel apoptotik yolak boyunca sinyal iletimi.	244
Şekil 2.7. Perforin/granzim yolağı	29
Şekil 2.8. Dışsal apoptotik yolağı boyunca uyarı iletimi	311
Şekil 2.9. P53 ağı - hayatta kalma ve hücre ölüm mekanizmalarının düzenlemesi.	444
Şekil 4.1. SIAH proteinin meme kanserli hastaların normal ve tümör dokularında ifade seviyesi	533
Şekil 4.2. Farklı yaş aralıklarına göre SIAH proteinin ifade seviyesi.....	544
Şekil 4.3. Meme kanseri tanısına göre SIAH proteinin ifade seviyesi,.....	555
Şekil 4.4. Histopatolojik derecelendirmeye göre SIAH proteinin ifade seviyesi,	566
Şekil 4.5. TNM evrelendirilmesine göre SIAH proteinin ifade seviyesi.	577
Şekil 4.6. BIM proteinin meme kanserli hastaların normal ve tümör dokularında ifade seviyesi.	59
Şekil 4.7. Farklı yaş aralıklarına göre BIM proteinin ifade seviyesi.	59
Şekil 4.8. Meme kanseri tanısına göre BIM proteinin ifade seviyesi.	60
Şekil 4.9. Histopatolojik derecelendirmeye göre BIM proteinin ifade seviyesi.	611
Şekil 4.10. TNM evrelendirilmesine göre BIM proteinin ifade seviyesi.	611
Şekil 4.11. p53 proteinin meme kanserli hastaların normal ve tümör dokularında ifade seviyesi.	633
Şekil 4.12. Farklı yaş aralıklarına göre p53 proteinin ifade seviyesi, normal dokularda p53 proteini bulunamadığından grafikte gösterilmemiştir.	644
Şekil 4.13. Meme kanseri alt türü olan invaziv duktal karsinomda p53 proteinin ifade seviyesi. İnvaziv lobular türünde p53 proteini bulunamadığından grafikte gösterilmemiştir.....	655
Şekil 4.14. Histopatolojik derecelendirmeye göre BIM proteinin ifade seviyesi.	655

Şekil 4.15. TNM evrelendirilmesine göre p53 proteinin ifade seviyesi.	666
Şekil 4.16. P53 durumuna göre meme kanseri dokularında SIAH proteininin ifade seviyesi.	677
Şekil 4.17. P53 durumuna göre meme kanseri dokularında BIM proteininin ifade seviyesi.	68



TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. Histolojik derecelemede kullanılan Modifiye Bloom-Richardson sistemi .	111
Tablo 2.2. Meme kanserinde TNM sistemine göre evreleme.....	12
Tablo 2.3. Meme kanseri tümörlerinin TNM sistemi ile sınıflandırılması	112
Tablo 2.4. Apoptozis ve nekrozun morfolojik özelliklerinin karşılaştırılması.	21
Tablo 2.5. İçsel yolak proteinleri, kısaltmalar ve alternatif adlandırmalar.....	27
Tablo 2.6. Dışsal yolak proteinleri, kısaltmaları ve alternatif adlandırma	30
Tablo 2.7. Uygulama yolağı proteinleri, kısaltmaları, ve alternatif isimlendirmeleri. ...	33
Tablo 4.1. Çalışmaya dahil edilen hastaların klinik özellikleri	51
Tablo 4.2. SIAH proteinin ifade seviyesinin çeşitli özelliklere göre gösterilmesi	53
Tablo 4.3. BIM proteinin ifade seviyesinin çeşitli özelliklere göre gösterilmesi	58
Tablo 4.4. p53 proteinin ifade seviyesinin çeşitli özelliklere göre gösterilmesi	63

ÖZET

MEME KANSERİ HASTALARININ TEDAVİ SEYRİ İLE SIAH, BIM VE P53 PROTEİN SEVİYELERİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN İMMUNOHİSTOKİMYASAL OLARAK ORTAYA KONULMASI

Luay Talal Hadhal ALSALEEM AGHA
Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Ahmet ARSLAN
03 Mayıs 2018, 95 sayfa

Kanser önde gelen sağlık problemlerindendir ve meme kanseri sık görülen kanserler arasında yer almaktadır. Gelişen tedavi yöntemlerinin yanı sıra halen meme kanseri etkin bir şekilde tedavi edilememektedir. Dolayısıyla, meme kanserinin tedavi ve tanısında önem arz edecek yeni biyobelirteçlerin belirlenmesi son derece önemli bir konudur. SIAH-1 (Seven in absentia homolog 1) proteini tümör baskılayıcı bir protein olarak bilinmektedir. Yapılan çalışmalar bu proteinin kanser süreçlerinde önemli rollerinin olduğunu göstermekle birlikte bu proteinin meme kanserinin tedavisi ve tanısında kullanılabilirliği tam olarak ortaya konulmamıştır. Bununla birlikte SIAH1 proteinin p53 ve BIM gibi önemli tumor baskılayıcı ve apoptoz tetikleyici proteinler ile ilişkisinin olduğu önceki yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bu tez çalışmasında meme kanseri hastalarının tedavi seyri ile apoptoz sürecinde önemli rol oynayan SIAH, BIM ve p53 proteinlerin seviyeleri arasındaki ilişkinin immunohistokimyasal ve moleküler genetik olarak araştırılması amaçlanmıştır. Sonuç olarak, SIAH1 protein seviyesi meme kanserli hastaların tümörlü dokularında anlamlı bir şekilde azalmıştır. SIAH1 proteinin aksine BIM ifade seviyesinde herhangi anlamlı bir fark saptanamamıştır. Ayrıca, p53 proteini hastaların yaklaşık olarak % 75'inde saptanamamıştır. Ancak %25'inde p53 ifade seviyesinin anlamlı olarak arttığı saptanmıştır. Ayrıca çalışmamızda düşük SIAH1 ifade seviyesinin tümör derecesi, evresi ve meme kanserinin tipi gibi hastaların önemli klinik bulguları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızın bulguları SIAH1'in meme kanser oluşumunda rollerinin olduğunu ve meme kanseri tanı ve tedavisine yönelik yeni bir biyobelirteç olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, BIM, İmmunohistokimya, Meme kanseri, p53, SIAH1

ABSTRACT

The Relationship Between The Level Of Siah1,Bim And P53 Proteins In Associated With The Disease Course In Patients With Breast Cancer

Luay Talal Hadhal ALSALEEM AGHA

Master's thesis, Department of Medical Biology

Supervisor: Prof. Dr. Ahmet ARSLAN

03 may 2018, 94 pages

Cancer is one of the leading health problems and breast cancer is one of the common cancers. In spite of the developing treatment methods, breast cancer cannot be treated effectively. Therefore, the identification of novel biomarkers that will be important in the treatment and diagnosis of breast cancer is of great interest. SIAH1 (Seven in absentia homolog 1) protein is known as a tumor suppressor protein. Although studies have shown that this protein has important roles in cancer processes, its usefulness in the treatment and diagnosis of breast cancer has not been fully elucidated. At the same time, previous studies have shown that the SIAH1 protein is associated with important tumor suppressor and apoptosis triggering proteins such as p53 and BIM. In this thesis study, by using immunohistochemical approach, we aimed to investigate the relationship between the levels of SIAH1, BIM and p53 proteins which play an important role in the prognosis and apoptosis processes of breast cancer patients. As a result, SIAH1 protein level was significantly lessened in tumor tissues of patients with breast cancer. In contrast to SIAH1 protein, no significant difference was detected in BIM expression level. In addition, p53 was not detected in 75% of the breast cancer patients. However, in 25% of the patients, p53 expression was significantly increased. Our study also showed that low SIAH1 expression level is associated with important clinic characteristics of patient such as tumor grade, stage and breast cancer type. Findings of our study show that SIAH1 has roles in breast cancer formation and might be a novel biomarker for the diagnosis and treatment of breast cancer.

Keywords: Apoptosis, BIM, Breast Cancer, Immunohistochemistry, SIAH1, p53

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Meme kanseri tüm ülkelerde önemli bir sağlık sorundur ve ağırlıklı olarak kadın nüfusu etkilemektedir (1). Kadınlarda görülen en yaygın kanser türüdür ve kadın nüfusta kansere bağlı ölümlerin çoğundan sorumludur (1).

Kanser tiplerinin gelişimi ve biyolojisi üzerine uzun yıllardan beri bir hayli çalışmalar yapılmaktadır. Yapılan çalışmalar kanser hücrelerinin ölüm mekanizmasını kaybederek yalancı embriyonel bir hücre gibi davrandığını göstermektedir. Bu aslında o kadar doğru değil. Yine kanserli hücre ve dokusunda ölen ve kalsifiye olmuş bölgeler görmek mümkün. Ne var ki somatik hücrenin bölünme fazının ölüm halinden daha baskın olması kansere kitlesel büyüme imkânı vermektedir. Çalışmaların sonuçları genelleştirildiğinde bir hücrenin büyümesi ve çoğalması, protoonkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin protein ürünlerinin işlevi ve değişikliğinin birbirleriyle uyumluluğunun bozulması sonucu ortaya çıkmaktadır. Protoonkogenler hücre çoğalmasını, farklılaşmasını, hücre döngüsünü düzenleyen ve programlanmış hücre ölümleri sağlayan proteinleri kodlarlar (2). Bu genlerde olabilecek mutasyonlar ve/veya gen ifade düzeylerinde olabilecek değişiklikler somatik hücrede baskın işlevsel özellik kazanmasına yol açar (2). Buna karşılık tümör baskılayıcı gen ürünleri hücre döngüsü için gerekli proteinlerin sentezini baskılayarak hücre çoğalmasını durdururlar ve hücreleri farklılaşmış seviyede tutarlar (3). Tümör baskılayıcı genlerde olabilecek mutasyonlar ile hücre döngüsü üzerindeki baskı ortadan kalkar ve hücre çoğalması ve tümörün gelişmesi imkanı artar (3). Tümör hücrelerinin gelişmesini tetikleyen diğer bir durumda, değişime uğrayan klon hücrenin genomik yapı kararlılığının bozulması ve DNA tamir mekanizmasının bozulmasıdır (4). DNA tamir mekanizmasında olabilecek mutasyonlarda ayrıca kanser gelişimini tetikler (4).

Hücre çoğalması ve farklılaşması ile farklılaşmış hücrelerin yaşlanması sonrası ölümü bir seri genetiksel olarak kontrol edilen işlevler sonucu canlılar organ ve doku bütünlüğünü muhafaza ederler. Proto-onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerin ifade düzeyindeki değişimlere bağlı olarak hücre çoğalması ve hücre ölümü arasındaki denge tümör gelişimi yönünde değişir. Bunlar arasında Myc onkogeni hem hücre çoğalmasını

ve hemde apoptozisi düzenleme özelliği vardır. Myc proteini Max proteini ile birlikte büyüme faktörlerinin varlığında kansere yol açarken eksikliğinde de apoptosisi tetikler (5). Myc geninin aşırı ifadesi veya gen ifadesi düzeninin kaybolması ile apoptotik kontrolün yıkılması arasındaki ilişki tümör gelişimi için gereklidir. p53, APC ve PTEN gibi tümör baskılayıcı gen ürünleri apoptozisi tetikler (3). Bu proteinlerden herhangi birisinde özellikle p53'de işlev bozukluğu apoptozisin azalmasına ve tümör büyümesine yol açar (3). p53, DNA'sı hasarlanan hücreleri apoptozise yönlendirir (6). Bax, FAS/pol ve BCL2 gibi p53 tarafından tetiklenen apoptotik düzenleyici moleküller p53'ün tümör baskılayıcı özelliğini sağlarlar (3). Myc Max yolağıyla ve p53 DNA'nın hasarlanması sebebiyle birlikte hücrenin apoptoza gitmesini sağlarlar. Bunun yanısıra Bcl2 protoonkogeni apoptozu engelleyerek hücrenin canlılığını muhafaza etmesini sağlar. Bcl-2 varlığı hücrenin canlılık ömrünü sağlaması bakımından önemlidir. Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W ve Mcl-1 gibi BCL ailesi proteinlerinin bir kısmı apoptozu engelleyip hücrenin canlılığını korurken Bax, Bak, Bad, Bik, Bid ve BclxS gibi diğer kısmı da apoptozun gelişimini sağlarlar (3).

Apoptozis bir tip programlanmış hücre ölümüdür. Apoptotik hücre ölümünün karakteristik özelliği kendine has yapısal değişikliği olarak yuvarlak hücre ve hücre zarının buruşukluğu, hücre iskelet sisteminin birbirinden ayrılmış olması, kromatinlerinin yoğunlaşması ve DNA'larının kırıklı bir hal almasıdır (7). İnsan anatomisinde dokuların hücrelerinin devamlı yenilenmesi için ve vücudun bağışıklık sisteminin devamlılığında ve vücudun hasara yol açabilecek durumlarında apoptotik mekanizmanın varlığı önemlidir (8). Uyarılara bağlı olarak apoptozis farklı yollarla etkinleştirilirler. Mesela DNA hasarı apoptotik hücre ölümünü p-53 bağımlı yolakla etkinleşir (8). Genel olarak iki temel apoptotik yolakla etkinliğini sürdürür (8). Bunlardan birisi hücre dışı uyarımlı (ekstrinsik) veya ölüm almaçlı yolak ile diğeri içsel (intrinsik) veya mitokondriyal yolak olup (8) her ikisinde de kaspaz uyarı ileti silsilesi iş görür (9).

Dışsal yada ölüm almaçlı uyarı yolağı hücre zarı geçişli almaçların aracılığı ile apoptosisi başlatır. Loksley (10) ölüm almaçlı ölüm yolağının TNF ailesi almaçlarla ilgili olduğunu ifade eder. Bu almaçlardaki ölümle ilgili bölgeler ölüm uyarılarını hücre içi uyarı yollarına aktarırlar (8). Kischkel'e göre; ölüm uyarısının hücre içine aktarımının sonucunda ölüm uyarı bileşenleri (DISC:Death Inducing Signalling

Cascade) oluşur ve bu bileşen işlevsiz yapıdaki prokaspazı keserek etkin kaspaz-8'e dönüştürür (8). Etkin kaspaz-8 apoptozisin başlama safhasını tetikler, apoptozisin başlaması c-FLIP proteininin kaspaz-8'e bağlanmasıyla durdurulur (8).

İçsel yada mitokondriyal ölüm yolağı almaçsız uyarı ileti aracılığıyla apoptozisi tetikler. İçsel yada sitoplazmik uyarıcılar hücre içi hedef moleküller aracılığıyla doğrudan doğruya mitokondriyal iç zar geçirgenliğini değiştirerek kaspaz ilişkili apoptotik yolağı tetiklerler (8). Mitokondriyal yada içsel apoptotik yolak hücrenin çeşitli sebeplerle maruz kaldığı stres durumlarında gelişir ve Bcl-2 ailesi proteinler tarafından düzenlenir (10). Bcl-2 proteinleri aynı zamanda mitokondriyanın dış zarın etrafında öbeklenerek mitokondriyanın yapısının bozulmasını önleyerek antiapoptotik işlev görürler (10). Bazı büyüme faktörlerinin, hormonların ve sitokinlerin eksikliği de apoptozisi tetikler (8). Hücrenin normal yaşlanmasına ilave olarak hücrenin radyasyon, toksinler, serbest radikaller ve viral bulaşım gibi arzu edilmeyen stres ortamlarında apoptozisi uyarırlar (8). Saelens'e göre apoptosisi uyarım durumu mitokondriyal zar yapısında MPT denilen geçirgen gözeneklerin oluşumu (MPT:mitochondrial permeability transition) pro-apoptotik denilen proteinlerin sitoplazmaya geçişini sağlarlar (8). Bu proteinler kaspaz bağımlı mitokondriyal apoptotik yolağı işlevsel hale getirirler (8). Mitokondriyal apoptotik yolağın Bcl-2 aracılığıyla düzenlenmesi Cory ve Adams'a göre p53 tümör baskılayıcı proteinler tarafından düzenlenir (8). Hücrede کافی derişiklikte p53 proteini varsa Bcl-2 proteinleri aracılığıyla hücre ölümü tetiklenirken, yetersiz olduğu durumlarda yine Bcl-2 proteinleri antiapoptotik işlevi görürler. Dolayısı ile Bcl-2 proteinleri mitokondriyanın geçirgenlik özelliğini düzenleyerek hücrenin ölüme gidip gitmeyeceğiniş tayin ederler (8).

Kanserlerin pek çok tiplerinde tümör hücrelerinin apoptotik ölüme karşı direnç kazanmalarının sebebi anti-apoptotik Bcl-2 gibi proteinlerin ifade edilmesini sağlarken Bax gibi anti apoptotik Bcl-2 ailesi proteinlerin gen ifadesinin baskılanmasıyla p53 mekanizması işlevsiz hale getirilmesinden dolayıdır (8). Bax proteinleri, B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) ailesine mensub apoptotik etkisiyle birlikte, özellikle kanserli hastalarda, hücreye çoklu ilaç direncini kazandıran anahtar moleküllerden birisidir (11). Bcl-2'nin hücrede gereğinden fazla sentezlenmesi hücre ölümünü engeller ve düşük seviyede gen ifadesi de hücrenin çeşitli toksinlere karşı duyarlılığını artırır (11). Bax'ın Bcl-2'ye oranı hücrenin apoptosise karşı duyarlılığı hakkında önemli bir göstergedir

(12). Dolayısı ile Bax/Bcl-2 oranı çeşitli karsinomalarda hastalığın seyrinin değerlendirilmesinde bir belirteç olarak kullanılabilir (12). Kaspaz-3 Bax/Bcl-2 oranını düzenler ve apoptosin gelişiminde anahtar rol oynar fakat aynı zamanda Bcl-2 ayrıca kaspazlar için bir ölüm ara ürünüdür ve Bcl-2'nin apoptosise karşı olan işlevini etkisizleştirerek hücre ölümünü hızlandırırlar (12).

Bcl-2 ailesi proteinler üç alt aile grubunda sınıflandırılır. Bunlar; apoptozu baskılayan (antiapoptotik) aile, diğeri apoptozu tetikleyici (proapoptotik) çoklu protein bağlanma bölgeleri (multi homoloji domain) içeren aile ve üçüncüsü de sadece BH3 benzeri protein bağlanma bölgesi içeren Bcl-2 ailesidir (13). Bu proteinlerin bağlanma bölgeleri çeşitli apoptotik durumları başlatmak için önemli olup, Bim sadece BH3 içeren 8 proteinden birisidir (13). Sadece BH3 içeren Bim apoptozu tetikleyici bir proteindir ve pek çok tümör hücrelerinin hücrel matriksle bağlantısını keserek (anoikis) tümör hücrelerinin ölümünü tetikler ve hücrelerin metastatik özellik kazanmasını engeller (13). Hücrenin matriksle bağlantısının koparılmasının sağlanması ölüm almaçlarının ve mitokondriyal apoptotik yolağın işlerlik kazanmasını tetikler (13). Mitokondriyal ölüm yolağında Bim proteini hareketlenir ve hücrel bağlantının kesilmesi başlar (13). Bim'in baskılanması Bim aracılı hücre ölümünü atlanarak tümör hücreleri metastatik özellik kazanır ve kemoterapiye karşı direnç gelişir (13). Bim gen ifadesinin artması mitokondriya'dan sitokrom-C'nin salınımını tetikleyerek apoptozomun oluşumunu ve apoptozoma işlevsel özellik kazandıran kaspaz-9'u etkin hale getirir (13).

SIAH1 (Seven in absentia homolog 1) proteini tümör baskılayıcı bir protein olarak bilinir (14). SIAH1 hücre döngüsü üzerine tümör hücresinin büyümesine olan etkisini hedef proteinin ubiquitinleşmesini ve proteozomal yolla parçalanmasını sağlayarak gösterir (14). Ayrıca SIAH1'in gen ifadesinin yükselmesi (up-regulation) JNK uyarı ileti yoluyla Bim'in gen ifadesini arttırarak hücrel ölümü uyarırlar (14). JNK yolağının SIAH-1 ilişkili apoptosisi tetiklemesi hücre döngüsünün baskılanmasının yanısıra artan Bim gen ifadesinin de JNK yolağı ile bağımlı apoptosisi tetiklemesindendir (15). SIAH-1'in gen ifadesinin baskılanması meme kanseri hücrelerinin yayılım özelliğinin (invazyon) artması ERK uyarı ileti yolağının işlerlik kazanması sayesinde olur (15). ERK uyarı ileti yolağı hücrel çoğalım, farklılaşma ve tümör hücrelerinin yayılımını tetikleyen yoldur. Bu yola normal büyüme ve gelişme döneminde önemli olan bir yola iken kanserli dokunun gelişimin de bir o kadar önemli olan yoldur. SIAH1 kötü

huyly tümör hücrelerinin yayılımını ERK yolağını durdurarak kısmen baskılar (15). Dolayısı ile tümör hücrelerinin baskılanması ve apoptotik mekanizmasının tetiklenmesi p53, p21waf1 ve SIAH1'in iştiraki halihazırda bilinen moleküler mekanizmadır (16). SIAH1, p53, ve p21waf1 proteinleri sentezlenen proteinlerin doğru katlanması, katlanmış proteinlerin açılması ubiquitinleşmesi ve proteinlerin hücre içi geçişlerini düzenleyen moleküller olarak da bilinir (16). SIAH1 BAG-1'e bağlandığında p53' n hücre  oğalımını durdurma etkisini engellerken DCC'ye (deleted in colorectal cancer) bağlandığında proteinlerin ubiquitin-proteozom yolağıyla parçalanmasını da düzenlerler (16). SIAH-1 proteininin N ucu RING  ıkıntı (Ring finger) bölgesini içerir. RING çıkıntı bölgeleri sisteince zengin çinko bağlanma bölgeleridir. Histidin ve sisteinin amino asit yerleşim düzeni korunmuş olup çinkonun bağlanmasına elverişlidir (17).

Ring çıkıntı bölgesi bu bakımdan çoklu ubiquitinleşmeye imkan sağlaması bakımından E3 ubiquitin ligaz enzimi işlevi görür (18). Bu özelliği ile SIAH-1 RING  ıkıntı E3 ligaz işlevine sahip olup çok farklı proteinlerin parçalanmasını sağlar. Bu proteinlerden bazıları DCC,  -katenin, N-CoR, c-myp, Numb ve TRAF2 sayılabilir (19). Aynı zamanda SIAH-1, p53 ve p21waf1 ile birlikte bilinen baskılayıcı etkinlikleriyle tümör gelişimin baskılar ve apoptosisi tetiklerler (16). Meme kanseri hücrelerinin yayılımı SIAH-1 tarafından Bim'den bağımsız olarak engellenirken SIAH-1'in apoptosisi tetiklemesi Bim bağımlıdır (15).  zet olarak SIAH-1 proteininin etkenliği Bim proteininin ifadesini arttırmak suretiyle meme kanserinin gerilemesinde rol oynayabilir (15).

Dolayısıyla, biz bu tez çalışmasında SIAH-1, Bim ve P53 proteinlerinin meme kanserinin patogenezindeki rolünü araştırmayı amaçladık. SIAH-1, Bim ve P53 meme kanseri patogenezindeki rolünü belirlemek amacıyla, imm n histokimyasal boyama yöntemini kullandık.

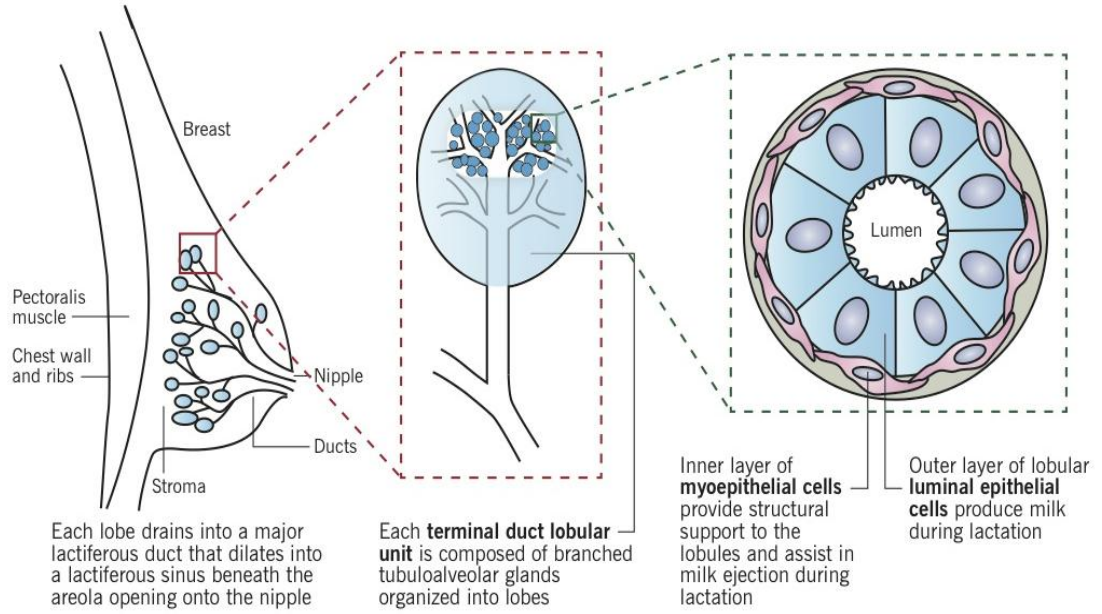
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri

Meme kanseri tüm ülkelerde önemli bir sağlık sorunudur ve ağırlıklı olarak kadın nüfusu etkilemektedir (1). Kadınlarda görülen en yaygın kanser türüdür ve kadın nüfusta kansere bağlı ölümlerin çoğundan sorumludur (1). 2016 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde, 255.180 yeni meme kanseri vakası ve 41.070 meme kanseri ölümüyle sonuçlanacağı tahmin edilmektedir (20). Ayrıca, Türkiye'de 2014 kanser istatistiklerine göre meme kanseri kadınlarda (% 24.9), tüm yaş gruplarında en sık rastlanan kanser türüdür (Türkiye Kanser İstatistikleri, 2014).

Meme kanserinin etiyolojisi tam olarak bilinmemekle birlikte birçok risk faktörü ile ilişkili olduğu bilinmektedir (21, 22). Meme kanseri ile savaşmanın en iyi bilinen yolu, hastalık gelişmeden önce risk etmenlerini kontrol etmektir (22). Bununla birlikte, tüm kanserlerde olduğu gibi meme kanserindeki tüm risk etmenlerini düşünmek çok zordur (21, 22). Kadınların meme kanserine yakalanma riski erkeklerden daha yüksektir. İleri yaş, önceki habis veya iyi huylu tümörler, aile öyküsünde meme kanseri ve genetik yatkınlık, adet menstrüasyon öyküsü, doğurganlık ve emzirme, hormonal etkinlik, fiziksel etkinlik, radyasyona maruz kalma, alkol kullanımı, yağlı diyet ve vücut ağırlığı gibi birçok faktör meme kanseri gelişimi riskini artırmaktadır (23-26).

The breast is composed of glandular and stromal tissue. Glandular tissue includes the ducts and lobules. **Stroma** comprises area between lobes.



Şekil 2.1. Göğüs anatomisi ve histolojisinin gösterilmesi

2.1.1. Meme Kanseri Patolojisi ve Sınıflandırılması

Malign meme tümörlerinin çoğunluğu adenokarsinomdur (27). Adenokarsinomların duktal lobüler üniteden kaynaklandığı düşünülmektedir (27). Skuamöz hücreli karsinom, phyllodes tümörler, sarkom ve lenfoma gibi diğer malign tümörler %5'ten daha azını oluştururlar (27).

2.1.1.1. Meme kanserinin histolojik sınıflandırması

Histolojik olarak meme karsinomları in situ ve invaziv karsinomalar olmak üzere iki gruba ayrılır. In situ karsinomada malign epitel hücreleri kanallar ve asinüs ile çevrili bazal membran ile sınırlı iken invaziv karsinomda neoplastik hücreler stromayı bazal membran boyunca işgal eder (27). Bu nedenle, invaziv karsinomalar, lenfatik ve kan damarlarını istila edebilme kapasitesine sahiptir ve bölgesel lenf nodlarına ve uzak organlara metastaz yaparlar (27, 28). İnvaziv meme karsinomaları, morfolojik olarak farklı fenotipik özellikleri gösterebilen tümörlerdir ve bazıları klinik ve prognostik

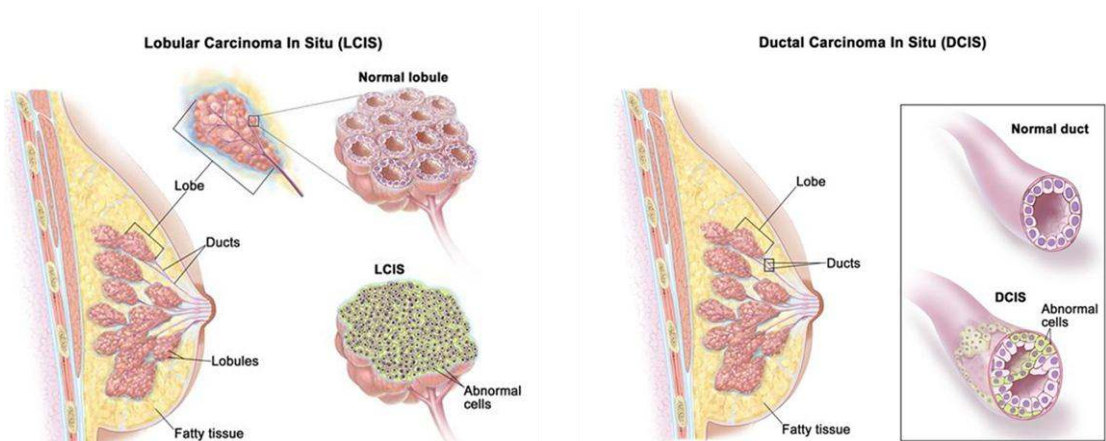
özelliklere sahiptir (27). Bugün, meme kanserinin histolojik sınıflandırması için en sık kullanılan yöntem, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından önerilen sınıflandırmadır (27).

In situ karsinoma

- In situ duktal karsinoma
- In situ lobular karsinoma

Invasive karsinoma

- İnvaziv duktal karsinoma
- İnvaziv lobular karsinoma
- Tübüler karsinoma
- İnvaziv cribriform karsinoma
- Medüller karsinoma
- Müsinöz karsinoma
- İnvaziv papiler karsinoma
- İnvaziv mikropapiler karsinoma
- Apokrin karsinoma
- Sekratuvar (juvenile) karsinoma
- Adenoid kistik karsinoma
- Metaplazi karsinoma
- Nöroendokrin karsinoma
- Enflamatuvar karsinoma

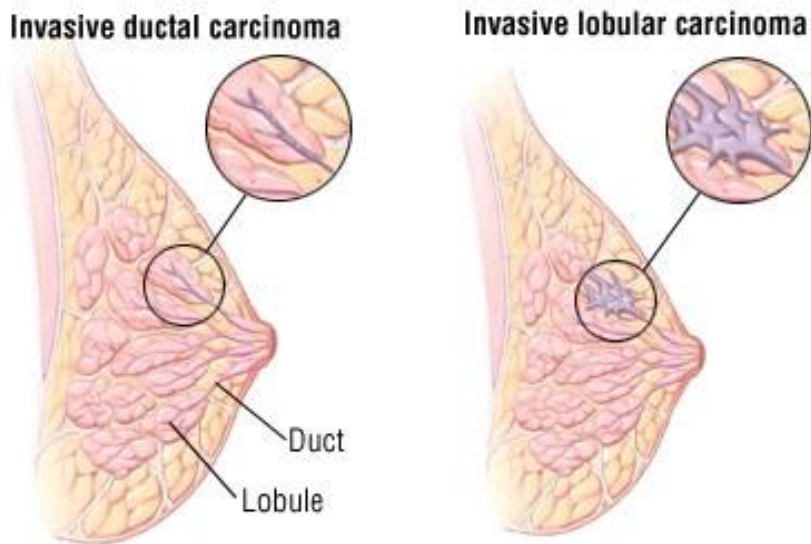


Şekil 2.2. İn situ lobüler ve duktal karsinomun gösterilmesi

Tablo 2.1. Histolojik derecelemede kullanılan Modifiye Bloom-Richardson sistemi (29).

	Skor (puan)
Nukleus özellikleri	
Küçük, tekdüze hücreler	1
Orta derecede boyut ve şekil farkı, nukleol varlığı	2
Belirgin boyut ve şekil farkı, sıklıkla çok sayıda nukleol	3
Tubulus yapımı	
Tümörün büyük kısmında (>75)	1
Orta derecede (%10-75)	2
Minimal veya hiç yok (<10)	3
Mitoz sayısı (x25, alan çapı 0.59 mm-10 alan)	
0-9	1
10-19	2
>20	3

Toplam skor; 3-5: Derece I, 6-7: Derece II, 8-9: Derece III



Şekil 2.3. İnvasiv lobüler ve duktal karsinomun gösterilmesi

Tablo 2.2. Meme kanserinde TNM sistemine göre evreleme (30, 31)

Evreler	Birincil Tümör (T)	Lenf Nodu (N)	Metastaz (M)
Evre 0	Tis	N0	M0
Evre I	T1	N0	M0
Evre IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Evre IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Evre IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
Evre IIIB	T4	N (herhangi)	M0
	T (herhangi)	N3	M0
Evre IV	T (herhangi)	N (herhangi)	M1

Tablo 2.3. Meme kanseri tümörlerinin TNM sistemi ile sınıflandırılması (30, 31)

TNM Sınıflandırması
Primer Tümör: T
Tx: Primer tümör değerlendirilemeyebilir
T0 : Primer tümör bulgusu yok
Tis: Tümör bulgusu olmayan Paget hastalığı in-situ tümör
T1: Tümör 0 ile 2 cm arasında
T1a: Tümör 0,1-0,5 cm arasında (0,5 cm dahil)
T1b: Tümör 0,5-1 cm arasında (1 cm dahil)
T1: Tümör 1-2 cm arasında (2 cm dahil)
T2:Tümör 2-5 cm arasında
T3: Tümör 5 cm den fazla
T4: Tümörün boyutu ne olursa olsun deri ya da toraks duvarına doğrudan ulaşımı
T4a: Toraks duvarına ulaşımı
T4b: Meme derisinde ödem (Peau d'orange dahil), ülserasyon, tümörlü

memede yandaş deri lezyonları

T4c: T4a + T4b

T4d: Enflamatuvar kanser

Paget hastalığında kitle varsa T'yi kitlenin büyüklüğü tayin eder.

T ölçümünde tümörün en büyük boyutu göz önüne alınır.

Bölgesel Lenf Bezleri: N

Nx: Bölgesel lenf bezleri değerlendirilemeyebilir

N0: Bölgesel lenf bezi metastazı yoktur

N1: Aynı taraf koltukaltında bir ya da fazla mobil lenf bezinde metastaz

N2: Aynı taraf koltukaltında bir ya da fazla lenf bezinde metastaz; fakat bu lenf bezleri birbirlerine yada etraftaki dokulara yapışık

N3: Tümörün bulunduğu taraftaki mammaria interna lenf bezi grubuna metastaz

Uzak Metastazlar: M

Mx: Uzak metastazların varlığı değerlendirilemeyebilir

M0: Uzak metastaz yok

M1: Uzak metastazlar mevcut

2.1.2. Meme Kanserinin Moleküler Biyolojisi ve Alt Tipleri

Büyük ölçekli gen ekspresyon profili (GEP) çalışmaları, BC'lerin tek bir tür hastalık olmadığını, dört ana alt türe ayrılabilceğini göstermiştir; luminal A (LBC-A), luminal B (LBC-B), HER2-pozitif, ve üçlü negatif/basal-benzeri. Bu sınıflandırma son zamanlarda doğrulanmış ve genomik verilerle bütünleştirilmiştir. Bu çeşitli alt tiplerin gerçekten de farklı tekrarlayan genomik değişikliklerle ilişkili olduğunu göstermiştir. Batı dünyasında LBC, BC tanısı konanların % 60'ından fazlasını oluşturan en yaygın alt türü temsil eder. Klinik uygulamada, östrojen almacı (ER), progesteron almacı (PR), HER2 ve Ki67 ifadesi gibi birkaç özellik şu anda LBC-A (ER + ve / veya PR +, HER2-, düşük Ki67)'nin LBC-B (ER + ve / veya PR +, HER2- veya HER2 +, yüksek Ki67)'den ayırt edilmesinde kullanılmaktadır. Bu sınıflamanın tedaviye yönelik etkileri vardır, çünkü yukarıdaki belirteçlerin göreceli ifadesine dayalı olarak, LBC hastaları hormon, kemo veya hedefli tedaviler alacak veya almayacaklardır. LBC-A ile karşılaştırıldığında, LBC-B, erken rekürrens ve daha kötü prognoz oranını gösterir ve bu alt grup için uygun tedavinin seçimi klinik hekim için hala zor bir görevdir. Dolayısıyla,

LBC-B'de en uygun (hormon - veya chemo - içermeyen) tedaviyi seçilebilmesi için daha etkili biyobelirteçlerin tanımlanarak klinikte kullanılmasına ihtiyaç vardır (32).

Yukarıda sözü edilen moleküler sınıflandırmanın prognostik önemi de vardır; üçlü negatif ve HER2 + BC daha saldırgan bir ilerlemeye sahiptir. Üstelik BC'nin ilk evrelerinde ve in situ lezyonlarda aynı moleküler özellikler mevcut olduğundan, erken tanının saldırgan olarak tedavi edilmesi gereken potansiyel malign tümörlerin tanımlanmasına (ve çıkarılmasına) yardımcı olabileceği beklenmektedir (32).

2.2. Kanserin Moleküler Biyolojisi

Gelişmiş ülkelerde kardiyovasküler hastalıklar ölümün başlıca sebebidir (34%), ve kardiyovasküler hastalıkların ardından kanser gelmektedir (23%). Kanser, düzensiz hücre büyümesi ve hücrelerin birincil bölgeden vücudun diğer bölgelerine yayılması ile karakterize bir grup hastalıktır. Kanserin sadece % 10'u kalıtsaldır. %70'i sporadiktir, yani mutasyonlar kalıtsal değil, bireyin yaşam süresince ortaya çıkar (20). Kanserin yüzde yirmisi başta virüsler olmak üzere patojenik enfeksiyonlardan kaynaklanmaktadır (33). Tümör kanserle eş anlamlı değildir. Bir tümör benign, pre-malign veya malign olabilir, oysa kanser tanım olarak malign anlamındadır (33, 34). Daha önce birçok bilim adamı, bilimin tümörigenezin nedeni üzerine son cevabı bulduğuna emindi: kanser, kansere bağlı genler tarafından kodlanan proteinleri değiştiren biriken mutasyonların bir sonucudur (35).

Çoğu kanser, kontrollü hücre büyümesinin düzenlenmesinde rol oynayan normal genler olan proto-onkogenlerde mutasyona sahiptir (36). Bu genler, büyüme etmenleri, büyüme etmeni almaçları, sinyal iletim molekülleri ve nükleer yazılım etmenleri (yazılımı başlatmak için genlere bağlanan proteinler) olarak işlev gören proteinleri kodlar (36, 37). Proto-onkogen mutasyona uğradığında veya etkinliği arttığında onkogen olarak adlandırılır ve düzensiz hücre büyümesi ve dönüşümüne sebep olur (36, 37). Hücresel seviyede, tek bir alelde meydana gelen sadece bir mutasyon, kanser gelişiminde onkogenik rol oynamak için yeterlidir. Böyle bir mutasyonun meydana gelme olasılığı, yaş ilerledikçe artar (36-38).

Birçok kansere yatkınlık geni, tümör baskılayıcı genlerdir (3, 4). Bu genler, normal koşullar altında hücre büyümesini baskılamaktadır. Bazıları hücre büyümesini

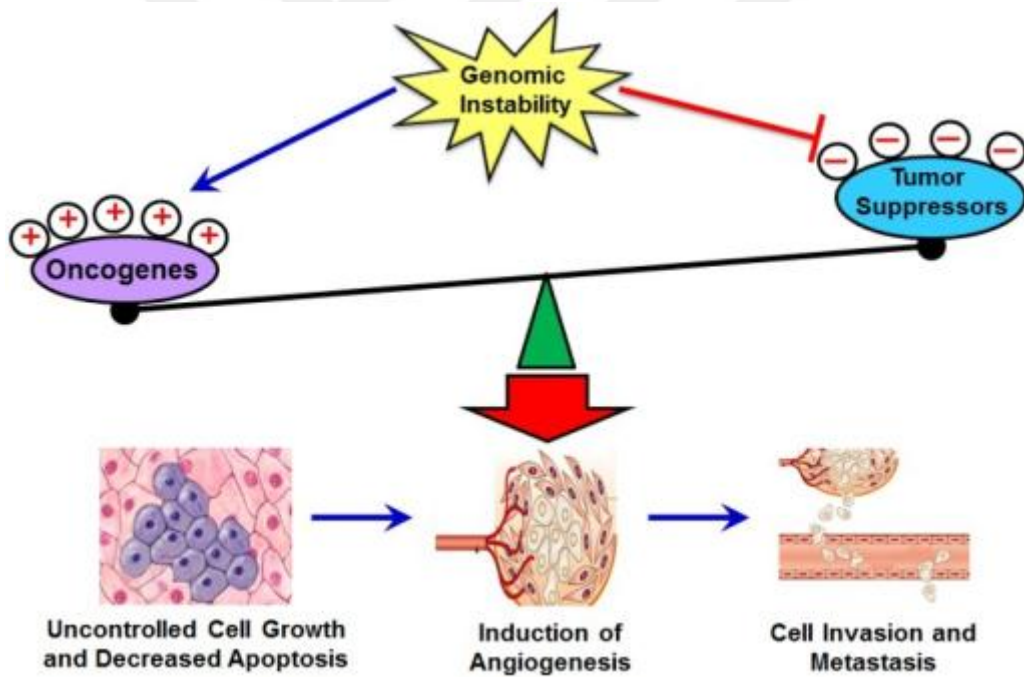
yavaşlatmak amacıyla diğer genler için gerekli olan yazılım etmeni kodlayarak yapar (3, 4). Örneğin, tümör baskılayıcı gen olan TP53'ün protein ürünü p53'tür. P53 doğrudan DNA'ya bağlanır ve hücre büyümesini baskılayan veya hücre ölümünü tetikleyen genlerin sentezlenmesine yol açar (39). Diğer tümör baskılayıcı genler, hücre döngüsünü kontrol etmeye yardımcı olan proteinleri kodlar (39-41). Kanserin ortaya çıkması için bir tümör baskılayıcı genin her iki kopyası da kaybolmuş ya da mutasyon geçirmiş olmalıdır. Tümör baskılayıcı geninde eşey hücre hattı mutasyonu taşıyan bir kişinin, tüm hücrelerinde genin sadece bir fonksiyonel kopyası vardır (39, 40). Bu kişi için, hücrelerinin herhangi birindeki genin ikinci kopyasının kaybedilmesi veya mutasyonu kansere neden olabilir (39, 40).

Alfred Knudson 1971 yılında, kalıtsal retinoblastom adı verilen kalıtsal bir kanser formunun vucutta birden fazla bölgede erken yaşta ortaya çıkmasını açıklamak için çift vuruş hipotezini öne sürmüştür (42). Ancak, vücuttaki her hücrede bulunan bozuk bir genin bir eşey hücre hattı kopyasının aktarılması, kanserin gelişmesine olanak tanımak için yeterli değildir. Somatik olarak genin ikinci kopyasında bir vuruşun (kaybın) meydana gelmesi gerekir ve böylelikle kanser oluşur (43, 44). Bu hipotez, bir eşey hücre hattı mutasyon taşıyıcısının, vücut hücrelerindeki birden fazla bölgeden herhangi birinde ikinci bir somatik mutasyon oluşma ihtimalinin, taşıyıcı olmayan bir kişinin aynı hücrede iki defa mutasyona uğrama olasılığından çok daha fazla olacağını öngörmüştür. Dolayısıyla, çift vuruş hipotezine göre, tümör baskılayıcı genler fenotipik seviyede resesif olarak davranırlar (her iki allel mutasyona uğramalı / kanser gelişiminde kaybolmalıdır). (45-47).

Hereditör kanser sendromlarında, bireylere heterozigot (bir veya daha fazla benzer olmayan gen çiftleri vardır) adı verilir çünkü hayata kansere duyarlılıkla bağlantılı allellerden birinde bir mutasyon (anne babalardan birinden miras alınır) ile başlarlar. Ancak, allellerden birinin var olması durumu dengeler (48, 49). Bu bireyler kansere eğilimlidir çünkü tüm hücreleri zaten kanser ilişkili genlerde yalnızca bir işlevsel allel kopyasına sahiptirler. Eşey hücre hattı mutasyonunu dengeleyen hayati öneme sahip tümör baskılayıcı bir genin hayatın herhangi bir aşamasında kaybı heterozigotluk kaybı olarak bilinen duruma sebep olmaktadır (2, 41, 50).

Onkogenler (tümör oluşumuna sebep olan genler), dizilerinde değişiklik meydana gelirse veya ifadeleri yanlış düzenlenirse, kontrol edilemeyen hücre çoğalmasını

tetikleyebilen hücresel genlerdir (51). Onkogenler başlangıçta hücre çoğalmasının düzenlenmesinde değişikliğe neden olarak çoğunlukla tavuk, fare ve sıçanlarda bir tümöre neden olan genler olarak RNA tümör virüslerinde (retrovirüsler) tanımlanmıştır (51). Yirmiden fazla viral onkogenin proto-onkogenler veya hücresel onkogenler (c-onc) olarak adlandırılan hücresel bir homolog geni olduğu bilinmektedir (51, 52). Hücresel onkogenler hücre içerisinde gerekli yerlerde hücre döngüsü, hücre bölünmesi ve farklılaşması gibi süreçlerin düzenlenmesi için gerekli proteinleri kodlarlar (51, 52). Onkogenler, neredeyse her durumda, hücrelerin büyüme talimatlarını alıp uyguladığı uyarı iletim yollarında görev alır. Bu genleri etkinleştiren mutasyonlar, (1) gelen herhangi bir uyarı olmadan bir proteinin sürekli olarak etkin olmasına sebep olan yapısal mutasyonlar aktivitesine (ör. protein kinazlar veya Ras) veya genin aşırı ifadesine sebep olan veya yanlış zamanda ya da yanlış yerde ifadesine neden olan (örn., büyüme faktörleri veya transkripsiyon faktörleri) düzenleyici mutasyonlardır(53, 54).



Şekil 2.4. Onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve kanser.

İnsan vücudu, tümör süpresör genler tarafından uygulanan ve hücre sayılarını düzenleyen mekanizmalara sahiptir ve yeni hücrelerin doğru olarak çoğaltılan DNA'yı almasını sağlar (3, 50). Birçok tümör baskılayıcı gen ürünü, kontrolsüz büyümenin durdurma işareti olarak hareket eder ve bu nedenle hücre döngüsünü baskılayabilir,

farklılaşmayı hızlandırabilir veya apoptozu tetikleyebilir (3, 50). Bir allelde bir değişikliğin normal işlevini değiştireceği hücrel onkogenlerden farklı olarak, bir tümör baskılayıcı genin her iki alleli, bir tümör gelişmeden önce işlevlerini kaybetmelidir. İlk olay baz değişimi veya delesyon ile meydana gelen mutasyondur. Diğer aleli (allel 2) etkileyen ikinci olay, aynı zamanda bir mutasyon olabilir, ancak işlev kaybı, daha sıklıkla, hatalı bir hücre bölünmesinden (mitotik ayrılmama) veya diğer mekanizmalar ile kromozomun kaybedilmesinden kaynaklanmaktadır. Çift vuruş hipotezi kalıtsal retinoblastoma gibi kanserlerin vücudun çeşitli bölgelerinde erken yaşta ortaya çıkma sebebini açıklamaktadır (3, 39, 46, 50).

Bir tümör baskılayıcı gendeki ilk mutasyon, zigotta (germinal mutasyon, yani etkilenen bir ebeveynden kalıtılan germ hücresi mutasyonu veya yeni mutasyona bağlı olarak) veya ilgili dokunun tek bir hücresinde (somatik mutasyon) mevcut olabilir. Bir alelin fonksiyon kaybı, hücrenin tümör gelişimine yatkın hale gelmesine neden olur. Germ hattı mutasyon sayesinde, tüm hücreler yatkın hale gelir. Tümör, ikinci alelin işlev kaybından sonra ortaya çıkar. Tek bir hücrede somatik mutasyon meydana geldiğinde, her iki allelin işlev kaybı nadiren aynı hücreleri etkiler. Ancak bir germ hücresi mutasyonu ile, ikinci allelin fonksiyon kaybı siktir, çünkü bütün hücreler birinci mutasyonu taşırlar, yani yatkındırlar. Somatik mutasyonda tümör sporadik olarak oluşur (kalıtsal değildir) ve tek hücreli klondan ortaya çıkar (42, 46, 50, 55).

2.3. Apoptoz

Her ne kadar apoptoz kavramının belirli bileşenleri yıllarca önceden açıkça tarif edilmiş ise de, Apoptoz (a-po-toe-sis) terimi, 1972'de Kerr, Wyllie ve Currie tarafından klasik bir makalede ilk kez hücre ölümünün morfolojik olarak farklı bir biçimini tanımlamak için kullanılmıştır (56-58). Memeli hücrelerinde apoptoz sürecinde yer alan mekanizmaların anlaşılması, nematod *Caenorhabditis elegans*'ın gelişimi sırasında oluşan programlanmış hücre ölümünün incelenmesi ile olmuştur (59). Bu organizmada, yetişkin solucan oluşumunda 1090 somatik hücreler üretilir ve bu hücrelerin 131'inin apoptoz veya "programlanmış hücre ölümü" geçirmektedir. Bu 131 hücre, gelişme süreci boyunca belirli noktalarda ölür ve bu da solucanlar arasında esas olarak değişmez ve bu sistemde olağanüstü doğruluk ve kontrol sağlar. Apoptoz, o zamandan beri genetik olarak belirlenmiş hücrelerin yok edilmesini içeren "programlanmış" hücre ölümünün ayırt edici ve önemli bir modeli olarak kabul edildi. Bununla birlikte,

programlanmış hücre ölümünün diğer formlarının tanımlandığına ve programlanmış hücre ölümünün diğer biçimlerinin keşfedilebileceğine dikkat etmek önemlidir (60-62).

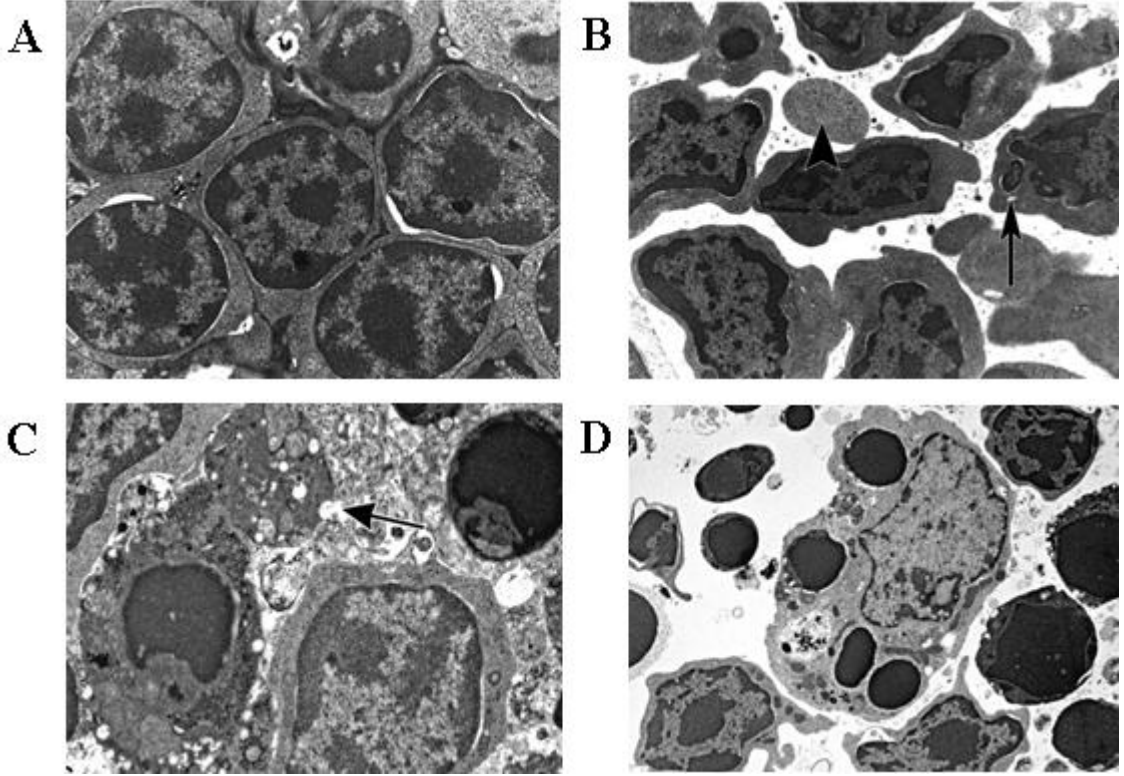
Apoptoz normal koşullarda gelişme ve yaşlanma sırasında dokulardaki hücre nüfusunu korumak için meydana gelen homeostatik bir mekanizmadır (8). Apoptoz, bağışıklık reaksiyonlarında, hücreler hastalık veya zararlı maddelerle hasar gördüğünde bir savunma mekanizması olarak ortaya çıkar (63). Hem fizyolojik hem de patolojik olarak apoptozu tetikleyebilecek çeşitli uyarılar ve koşullar olmasına rağmen, tüm hücreler aynı uyarana karşı ölüme gitmeyecektir. Radyasyon veya kanser kemoterapisinde kullanılan ilaçlar bazı hücrelerde DNA hasarına neden olurlar, bu da p53'e bağımlı bir yolak ile apoptotik ölüme neden olabilir (64). Bazı hormonlar, örneğin kortikosteroidler, bazı hücrelerde (ör. Timosit) apoptotik hücre ölümü tetikleyebilirler, ancak diğer hücreler etkilenmezler (63, 64).

Bazı hücreler ligand bağlanması ve protein çapraz bağlanması ile apoptoza yol açabilen Fas veya TNF almaçlarını ifade eder (65). Diğer hücreler bir hormon ya da büyüme faktörü gibi bir hayatta kalma faktörü tarafından engellenmesi gereken sıradan bir ölüm mekanizmasına sahiptir (65). Ayrıca, apoptozun nekrozdan ayırt edilmesi bir sorun teşkil etmektedir çünkü her iki olay da bağımsız olarak, ardışık olarak veya aynı anda meydana gelebilmektedir (66, 67). Bazı durumlarda, hücrelerin apoptoz ile mi nekroz ile mi öleceğini uyarının çeşiti ve derecesi belirler. Düşük dozlarda, ısı, radyasyon, hipoksi ve sitotoksik anti - kanser ilaçları gibi çeşitli zararlı uyarılar apoptozu indükleyebilir, ancak aynı uyarılar daha yüksek dozlarda nekroza neden olabilir. Son olarak, apoptoz, "kaspazlar" olarak adlandırılan bir grup sistein proteazın etkinleşmesini ve başlangıçtaki uyarıyı hücrenin en sonunda ölümüne bağlayan karmaşık bir olaylar silsilesini içeren düzenlenmiş ve çoğunlukla enerji bağımlı bir süreçtir (68).

2.3.1. Apoptozun Morfolojisi

Işık ve elektron mikroskopisi ile yapılan çalışmalarda, apoptoz sırasında ortaya çıkan çeşitli morfolojik değişiklikler tespit edilmiştir (69). Apoptozun erken safhalarında hücre büzülmesi ve pyknosis, ışık mikroskopisi ile görülebilir (57). Hücrenin büzülmesi ile hücrelerin boyutu daha küçük, sitoplazma yoğun ve organellerin sıkı bir şekilde paketlenmiştir. Pyknosis kromatin yoğunlaşmasının bir sonucudur ve bu apoptozun en karakteristik özelliğidir. Hematoksilen ve eozin boyama ile yapılan histolojik incelemede apoptoz, tek hücreler veya küçük hücre kümeleri içermektedir (8).

Apoptotik hücre koyu eozinofilik sitoplazma ve yoğun mor nükleer kromatin parçaları ile yuvarlak veya oval bir kitle olarak görülür. Elektron mikroskobu, hücre içi değişiklikleri daha iyi tanımlayabilir. Kromatin yoğunlaşma fazının başlangıcında, elektron yoğun nükleer madde karakteristik olarak nükleer membranın altında periferik olarak toplanır, ancak düzgün yoğun çekirdekler de olabilir (Şekil 2.5. A, B) (8).



Şekil 2.5. Apoptozun transmisyon elektron mikroskop (TEM) ile gösterilmesi.

Apoptoz sırasında aşırı derecede plazma zarı tomurcuklanması (blebbing) meydana gelmektedir bunu takiben karyorrhexis ve “budding” olarak adlandırılan bir süreç ile hücre parçacıklarının apoptotik cisimciklere ayrılması meydana gelmektedir (8). Apoptotik cisimcikler, nükleer parçacıklar içeren veya içermeyen şekilde paketlenmiş organellerin bulunduğu sitoplazmadan oluşur (Şekil 2.5. C) (8). Organel bütünlüğü halen muhafaza edilmekte ve bu sağlam bir plazma zarı ile çevrelenmiştir. Bu cisimcikler daha sonra makrofajlar, parenkimal hücreler veya neoplastik hücreler tarafından fagosit edilir ve fagolizozomlar içinde bozunurlar (Şekil 2.5. D) (8). Apoptotik hücreleri yutan ve sindiren makrofajlara " boyanabilen vücut makrofajları" denir ve sıklıkla lenfoid foliküllerin reaktif germinal merkezlerinde veya bazen timik

kortekste bulunurlar (8). Boyanabilen cisimcikler (tingible bodies) apoptotik hücre nükleer enkaz parçacıklarıdır. Apoptozis süreciyle veya apoptotik hücrelerin çıkarılmasıyla esasen iltihaplanma reaksiyonu yoktur çünkü: (1) apoptotik hücreler, hücrel unsurları çevreleyen hücreler arası dokuya salmamaktadırlar çevreleyen hücreler tarafından çabucak fagosite edilirler, bu nedenle muhtemelen sekonder nekroz önlenir ve (2) fagositoz yapan hücreler anti-inflamatuar sitokinler üretmezler (70, 71).

2.3.2. Apoptozun nekrozdan ayırt edilmesi

Apoptotik hücre ölümüne alternatif, hücrenin pasif bir kurban olduğu ve enerjiden bağımsız ölüm şeklini takip ettiği toksik bir süreç olduğu düşünülen nekrozdur. Fakat nekroz, hücre ölümünden sonra oluşan bozunum süreçler anlamına geldiği için, bazıları tarafından hücre ölümü mekanizmasının tanımlanmasında uygun olmayan bir terim olarak düşünülür. Bu nedenle Oncosis, karyoliz ve hücre şişmesi ile nekroza yol açan bir işlemi tarif etmekte kullanılırken, apoptoz, hücre büzülmesi, pyknosis ve karyoreksis ile birlikte hücre ölümüne yol açmaktadır. Bu nedenle, "onkotik hücre ölümü" ve "onkotik nekroz" terimleri, hücre şişmesi eşliğinde hücre ölümü tanımlamanın alternatifleri olarak önerilmiştir, ancak bu terimler şu anda yaygın olarak kullanılmamaktadır. (72, 73).

Apoptoz ve nekroz mekanizmaları ve morfolojileri farklı olmakla birlikte, bu iki süreç arasında örtüşme vardır. Kanıtlar, nekroz ve apoptozun, "apoptoz-nekroz sürekliliği" olarak tanımlanan ortak bir biyokimyasal ağın morfolojik ifadelerini temsil ettiğini ortaya koymaktadır (67). Örneğin, süregelen bir apoptotik işlemi nekrotik bir işleme dönüştüren iki faktör, kaspazların ve hücre içi ATP'nin kullanımında azalmadır (74, 75). Bir hücrenin nekroz veya apoptoz ile ölüp ölmemesi kısmen hücre ölüm sinyalinin doğasına, doku türüne, dokunun gelişim evresine ve fizyolojik ortama bağlıdır (67, 76).

Geleneksel histolojik yöntemler ile, apoptozu nekrozdan ayırmak her zaman kolay değildir ve uyarıcının yoğunluğu ve süresi, ATP tüketiminin derecesi ve kaspazların varlığı gibi faktörlere bağlı olarak aynı anda ortaya çıkabilir (67). Nekroz, genellikle geniş hücre alanlarını etkileyen kontrol edilemeyen ve pasif bir süreçtir, buna karşın apoptoz kontrol edilir ve enerjiye bağlıdır ve tek bir hücre veya hücre kümelerini etkileyebilir. Nekrotik hücre hasarına iki ana mekanizma aracılık eder; Hücrenin enerji kaynağına müdahale ve hücre zarına doğrudan verilen zarar. Nekrozda ortaya çıkan morfolojik değişiklikler arasında hücre şişmesi; sitoplazmik keseciklerin oluşumu;

şışmış endoplazmik retikulum; sitoplazmik cisimcik oluşumu; yoğunlaşmış, şışmış veya yırtılmış mitokondri; ribozomların parçalanması ve ayrılması; organel membranlarının yıkımı; şışmış ve yırtılmış lizozomlar; ve sonunda hücre zarının bozulması yer almaktadır (57, 73, 77). Bu hücre zarı bütünlüğünün kaybı, çevresel dokuya sitoplazmik içeriklerin salınmasıyla sonuçlanır, nihayetinde enflamatuvar hücrelerinin uyarılması ile sonuçlanan kemotaktik sinyaller gönderilir. Apoptotik hücreler, hücresel bileşenlerini çevreleyen interstisyel dokuya salmadığından ve makrofajlar veya bitişik normal hücreler tarafından çabucak fagosite edildiğinden, aslında hiçbir enflamasyon tepkimesi yoktur (70, 71). Pyknosis ve karyorrhexis'in apoptoza özel olmadığını ve nekrozla oluşan sitomorfolojik değişikliklerin bir parçası olabileceğini de not etmek önemlidir (78). Tablo 2.4'te apoptoz ve nekrozun ana morfolojik özellikleri karşılaştırılmıştır.

Tablo 2.4. Apoptozis ve nekrozun morfolojik özelliklerinin karşılaştırılması.

Apoptoz	Nekroz
Tek hücreler veya küçük hücreler kümeleri	Genellikle komşu hücreler
Hücrenin büzülmesi ve konvolüsyonu	Hücre şişmesi
Pyknosis ve karyoreksis	Karyoliz, pyknosis ve karyoreksis
Sağlam hücre zarı	Bozulmuş hücre zarı
Sitoplazma apoptotik cisimlerde tutulur	Sitoplazma salınır
Yangı yok	Genellikle yangı var

2.3.3. Apoptoz Mekanizması

Apoptoz mekanizmaları enerji bağımlı moleküler olaylar silsilesini içeren son derece karmaşık mekanizmalardır. Bugüne kadar yapılan araştırmalar, iki temel apoptotik yol olduğuna işaret ediyor: ölüm reseptörü yolağı olarak bilinen dışsal yolak ve mitokondriyal yolak olarak bilinen içsel yolak. Bununla birlikte, şu anda iki yolağın birbirine bağlı olduğunu ve bir yolağın moleküllerin diğerini etkileyebileceğine dair kanıtlar vardır (79). T hücresi aracılı sitotoksite ve perforin-granzim bağımlı hücre ölümü olarak bilinen bir yolak daha vardır. Perforin / granzim yolu, granzyme B veya granzyme A aracılığıyla apoptozu tetikleyebilir. Dışsal, içsel ve granzim B yolakları

uygulama yolağı olarak bilinen sonda birleşirler. Bu yol, kaspaz-3'ün bölünmesi ile başlatılır ve DNA parçalanması, hücre iskeletinin ve nükleer proteinlerin bozunması, proteinlerin çapraz bağlanması, apoptotik cisimlerin oluşması, fagositik hücre almaçları için ligandların ifadesi ve sonunda fagositik hücreler tarafından alınması ile sonuçlanır. Granzyme A yolu kaspazdan bağımsız bir hücre ölüm yolunu tek sarmallı DNA hasarı vasıtasıyla etkinleştirir (8, 80).

Apoptotik hücreler, proteinlerin parçalanması, proteinlerin çapraz bağlanması, DNA parçalanması ve fagositik tanıma gibi çeşitli biyokimyasal modifikasyonları sergilerler ve bu da daha önce tarif edilen belirgin yapısal patoloji ile sonuçlanır (81). Kaspazlar pek çok hücrede etkin olmayan bir proenzim formunda yaygın olarak ifade edilir ve etkinleştikten sonra çoğu zaman diğer prokaspazları etkinleştirerek bir proteaz silsilesinin başlatılmasına izin verir. Bazı prokaspazlar da bir araya gelerek kendi kendilerinin etkinleştirebilirler. Bir kaspazın diğer kaspazları etkinleştirebildiği bu proteolitik silsile, apoptotik uyarı iletimini artırır ve böylece hızlı hücre ölümüne yol açar (8). Farklı kaspazların komşu amino asitleride içeren farklı tanıma bölgeleri olsa da kaspazların proteolitik etkinlikleri vardır ve proteinleri aspartik asit dizilerinden parçalarlar. Kaspazlar başlangıçta bir kez etkinleştirildiğinde, hücre ölümüne doğru geri döndürülemez bir yola girilmiş olur. Bugüne kadar, on ana caspase tanımlanmış ve bunlar başlatıcılar (kaspaz-2, -8, -9, -10), uygulayıcılar (kaspaz-3, -6, -7) ve inflamatuvar kaspazlar (kaspaz-1, -4, -5) olmak üzere gruplandırılmışlardır (82, 83). Saptanan diğer kaspazlar, septik şok sırasında apoptozu ve sitokin olgunlaşmasını düzenleyen kaspaz -11, amiloid- β ile endoplasmik özgül apoptozise ve sitotoksisteye aracılık eden caspase-12, sıgır geni olduğu öne sürülen kaspaz-13 ve yetişkin dokularda değil, embriyonik dokularda yüksek düzeyde ortaya çıkan kaspaz-14 şeklinde sıralanmaktadır (84-87).

Kapsamlı protein çapraz bağlama, apoptotik hücrelerin bir diğer özelliğidir ve doku transglütaminazının ifadesi ve etkinleşmesi yoluyla elde edilir (88). Ca^{2+} ve Mg^{2+} 'e bağımlı endonükleazlar tarafından DNA parçalanması da meydana gelir ve 180 ila 200 baz çifti uzunluğunda DNA parçacıklarının oluşmasına neden olur (89). Karakteristik bir "DNA merdiveni", etidyum bromür boyaması ve ultraviyole ışık ile agaroz jel elektroforezinde gözlemlenebilir.

Bir diğ er biyokimyasal özellik, kom  u hücreler tarafından apoptotik hücrelerin erken dönemde fagositik olarak tanınmasıyla sonuçlanan hücre yüzeyi belirteçlerinin ifadesidir ve çevresindeki dokuya en az zarar ile hızlı fagositozu sağlar. Bu, hücrenin lipid çift katmanında normal i e bakan fosfatidilserinin plazma zarının dışına doğru hareketi ve ifadesi ile sağlanır (90). Fosfatidilserinin dışa vurumu, apoptotik hücrenin yüzeyindeki fagositler için iyi bilinen bir tanıma ligandı olmasına rağmen, yeni çalışmalar, apoptotik hücre temizlemesi sırasında diğ er proteinlerin de hücre yüzeyinde ifade edildiğini göstermiştir. Bunlara Annexin I ve calreticulin d hildir.

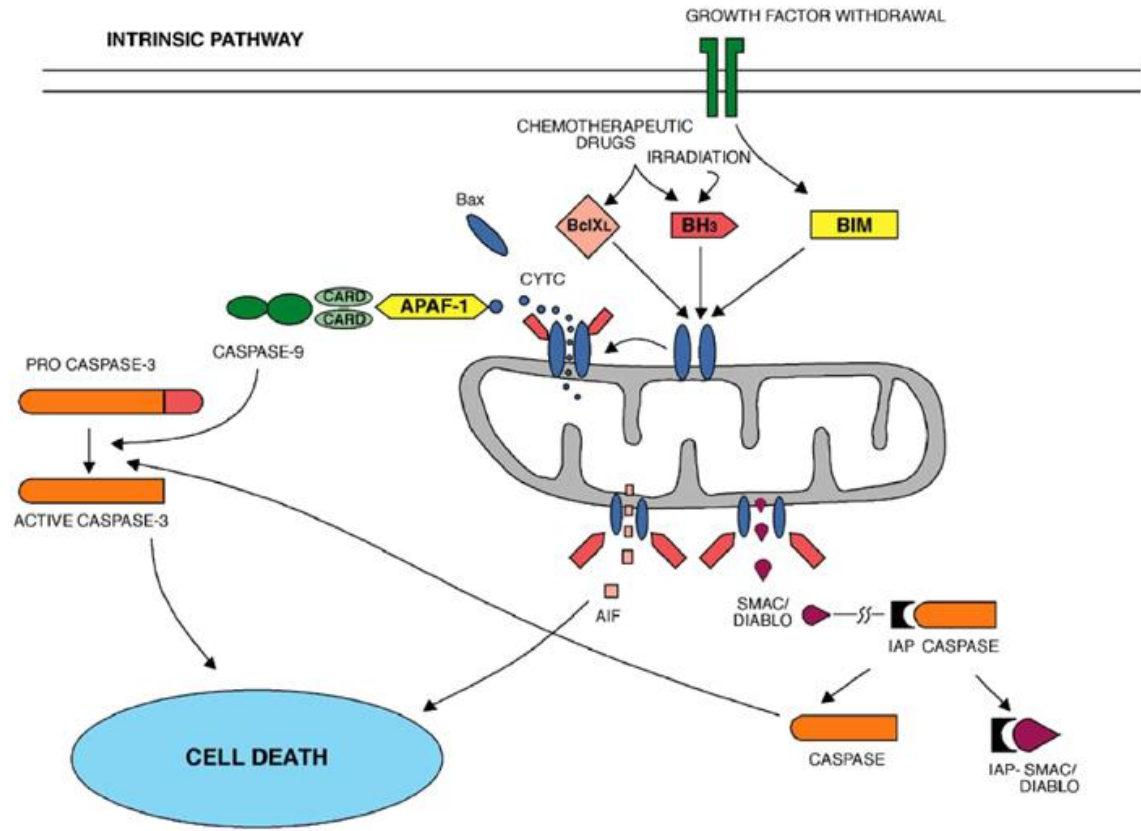
Annexin V kuvvetli ve özgül olarak fosfatidilserin kalıntılarıyla etkileşime giren ve apoptozun saptanması için kullanılabilen fosfatidilserine bağlanan rekombinant bir proteindir (91, 92). Calreticulin, fagositik hücre üzerinde bulunan LDL-almaç ilişkili bir proteine bağlanan bir proteindir ve bir tanıma uyarısı olarak fosfatidilserin ile birlikte işlev gördüğü öngörülmektedir (93). Yapışkan glikoprotein trombospodin-1 etkinle mi  mikrovasküler endotel hücrelerinin dış yüzeyinde eksprese edilebilir ve CD36, kaspaz-3 benzeri proteazlar ve diğ er proteinler ile birlikte reseptör aracılı apoptozu tetikler(94).

2.3.4. İçsel Apoptoz Yolağı

Apoptozu başlatan intrinsik sinyal yolları, hücre içi uyarılar üreten çeşitli almaç kaynaklı olmayan uyarıları içeren direk olarak hedefler üzerinde etki eden ve mitokondiral başlangıçlı olaylardır. İçsel apoptoz yolağını başlatan uyarı pozitif ya da negatif yönde etki edecek hücre içi uyarıların üretilmesine sebep olur. Ölüm yolaklarının baskılanmasının önüne geçen negatif uyarılar arasında belirli büyüme etmenleri, hormonlar ve sitokinleri yokluğu yer almaktadır. Bir başka deyişle, etmenlerin azalması, apoptotik baskılanmanın kaybı ve sonrasında apoptozun etkinle mesi söz konusudur. Pozitif etki gösteren etmenler arasında radyasyon, toksinler, hipoksi, hipertermi, viral enfeksiyonlar ve serbest radikaller yer almaktadır.

Tüm bu uyarılar, Mitochondrial Permeability Transition (MPT) g zeneğinin açılmasına, mitokondriyal zar potansiyelinin kaybedilmesine ve pro-apoptotik proteinlerin iki ana grubunun zarlar arası boşluktan sitozole salınmasına neden olur (95). Birinci grup sitokrom c, Smac / DIABLO ve serin proteaz HtrA2 / Omi'den oluşur (96-99). Bu proteinler kaspaz bağımlı mitokondriyal yolağı etkinleştirir. Sitokrom c, Apaf-1 ve procaspase-9'a bağlanır ve etkinleştirir ve bir "apoptozom" oluşturur ( ekil

2.6.) (100, 101). Prokaspaz-9'un bu şekilde kümelenmesi kaspaz-9 etkinleşmesine yol açar. Smac / DIABLO ve HtrA2 / Omi'nin IAP (inhibitors of apoptosis proteins) etkinliğini baskılayarak apoptozisi teşvik ettiği bildirilmektedir (99, 102). Ayrıca, IAP ile etkileşen ve IAP etkinliğini baskılayan ek mitokondriyal proteinler tespit edilmiştir. Ancak, gen susturma (knockout) deneyleri, tek başına IAP'a bağlanmanın bir mitokondriyal proteini "pro-apoptotik" olarak etiketlemek için yeterli kanıt olmayabileceğini önermektedir (103).



Şekil 2.6. İçsel apoptotik yolak boyunca sinyal iletimi (104).

Pro-apoptotik proteinlerin ikinci grubu olan AIF, endonükleaz G ve CAD, apoptoz sırasında mitokondriden salınır. Ancak bu, hücrenin ölmeyi taahhüt etmesinden sonra oluşan geç bir olaydır. AIF çekirdeğe geçer ve DNA'nın ~ 50-300 kb parçalara ayrılmasına ve çevresel nükleer kromatin yoğunlaşmasına neden olur (105). Nükleer

yoğunlaşmanın bu erken şekli "Evre I" yoğunlaşma olarak adlandırılır (106). Endonükleaz G aynı zamanda çekirdeğe geçer ve burada nükleer kromatini parçalayarak oligonükleozomal DNA parçalarını üretir (107). AIF ve endonükleaz G'nin her ikisi de kaspazdan bağımsız bir şekilde çalışır. CAD, daha sonra mitokondriyumdan salınır ve çekirdeğe geçerek kaspaz-3 ile kesilimden sonra oligonükleozomal DNA parçalanmasına ve daha belirgin ve gelişmiş bir kromatin yoğunlaşmasına neden olur (108). Bu daha sonra ve daha belirgin olan kromatin yoğunlaşması "evre II" yoğunlaşma olarak adlandırılır (106).

Bu apoptotik mitokondriyal olayların kontrolü ve düzenlenmesi, Bcl-2 ailesi proteinlerinin üyeleri vasıtasıyla gerçekleşir (109). Tümör baskılayıcı protein p53, Bcl-2 ailesinin proteinlerin düzenlenmesinde kritik bir role sahiptir, ancak kesin mekanizmalar henüz aydınlatılmamıştır (110). Bcl-2 ailesi proteinleri mitokondriyal membran geçirgenliğini yönetir ve pro-apoptotik veya anti-apoptotik 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 ve bazı pro-apoptotik proteinler arasında Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik ve Blk yer almaktadır. Bu proteinlerin özel önemi vardır, çünkü hücrenin apoptoza gidip gitmeyeceğini veya durduracağını 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 yolağındaki mitokondriyal hasara, Bid proteininin kaspaz-8 ile kesilmesi aracılık eder (10, 111). Bu ölüm-almaç (dışsal) yolağı ve mitokondriyal (içsel) yolak arasındaki "çapraz haberleşme" örneğidir (79). Bad'in serin fosforilasyonu, çok işlevli fosfoerin bağlanan moleküllerinin (multifunctional phosphoserine binding molecules) bir ailenin üyesi olan 14-3-3 ile ilişkilidir. Bad fosforile olduğunda, 14-3-3 tarafından tuzağa düşürülür ve sitosolde tutulur ancak Bad fosforile edilmediğinde Sitokrom c salınımını uyarmak için mitokondriye geçer (112).

Bad ayrıca Bcl-XL veya Bcl-2 ile heterodimerize olur, koruyucu etkilerini baskılar ve hücre ölümünü teşvik eder (113). Bad tarafından kenetlenmediğinde, hem Bcl-2 hem de Bcl-XL bilinmeyen bir mekanizma ile mitokondriden sitokrom C salınmasını engeller. Daha önceki çalışmalar, Bcl-2 ve Bcl-XL'nin öncelikle kaspaz proteazlarının

etkinleşmesini kontrol ederek apoptotik ölümü engellediğini gösteriyor (114). "Aven" olarak adlandırılan bir protein hem Bcl-Xl hem de Apaf-1'e bağlanarak prokaspaz-9'un etkinleşmesini engeller (115). Bcl-2 veya Bcl-Xl'in aşırı ifadesinin diğerinin ifadesinin düşmesine neden olduğunu gösteren kanıtlar vardır. Bu bulgular bu iki protein arasındaki karşılıklı düzenlenmenin olduğunu göstermektedir.

Puma ve Noxa, pro-apoptozda rol oynayan Bcl ailesinin iki üyesidir. Puma, p53 aracılı apoptozda önemli bir rol oynamaktadır. In vitro yapılan çalışmalarda, Puma'nın aşırı ifadesine artmış BAX ifadesi, BAX yapısal değişikliği, mitokondriye göç, Sitokrom c salınımı ve mitokondriyal zar potansiyelinde azalmanın eşlik ettiği gösterilmiştir (116). Noxa, p53 ile tetiklenen apoptozun diğer bir aday aracıdır. Çalışmalar, bu proteinin mitokondriye göç edebileceğini ve anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri ile etkileşebildiğini ve bunun da kaspaz-9'un etkinleşmesi ile sonuçlandığını gösteriyor (117). Hem Puma hem de Noxa, p53 tarafından tetiklenebildiğinden genotoksik hasar veya onkojen etkinleşmesi sonucu ortaya çıkan apoptozise aracılık edebilirler. Myc onkoproteininin hem p53'e bağımlı hem de bağımsız mekanizmalar yoluyla apoptozu arttırdığı bildirilmiştir (118).

Bu yolların daha iyi anlaşılması, tümör oluşumu ve tedavisi açısından büyük öneme sahiptir. Tablo 2.5 ana içsel yolak proteinlerini yaygın olarak kullanılan kısaltmaları ve alternatif adlandırmaları ile birlikte göstermektedir..

Tablo 2.5. İçsel yolak proteinleri, kısaltmalar ve alternatif adlandırmalar (8).

Kısaltma	Protein Adı	Alternatif adlandırma
Smac/DIABLO	Second mitochondrial activator of caspases/direct IAP binding protein with low PI	Yok
HtrA2/Omi	High-temperature requirement	Omi stress regulated endoprotease, serine protease Omi protein A2
IAP	Inhibitor of Apoptosis Proteins	XIAP, API3, ILP, HILP, HIAP2, cIAP1, API1, MIHB, NFR2-TRAF signaling complex protein
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor	APAF1
Caspase-9	CysteinyI aspartic acid-protease-9	ICE-LAP6, Mch6, Apaf-3
AIF	Apoptosis Inducing Factor	Programmed cell death protein 8, mitochondrial
CAD	Caspase-Activated DNase	CAD/CPAN/DFF40
Bcl-2	B-cell lymphoma protein 2	Apoptosis regulator Bcl-2
Bcl-x	BCL2 like 1	BCL2 related protein
Bcl-XL	BCL2 related protein, long isoform	BCL2L protein, long form of Bcl-x
Bcl-XS	BCL2 related protein, short isoform	
Bcl-w	BCL2 like 2 protein	Apoptosis regulator BclW
BAG	BCL2 associated athanogene	BAG family molecular chaperone regülatör
Bcl-10	B-cell lymphoma protein 10	mE10, CARMEN, CLAP, CIPER
BAX	BCL2 associated X protein	Apoptosis regulator BAX
BAK	BCL2 antagonist killer 1	BCL2L7, cell death inhibitor 1
BID	BH3 interacting domain death agonist	p22 BID
BAD	BCL2 antagonist of cell death	BCL2 binding protein, BCL2L8, BCL2 binding component 6, BBC6, Bcl-XL/Bcl-2 associated death promoter
BIM	BCL2 interacting protein BIM	BCL2 like 11
BIK	BCL2 interacting killer	NBK, BP4, BIP1, apoptosis inducing NBK
Blk	Bik-like killer protein	B lymphoid tyrosine kinase, p55-BLK, MGC10442
Puma	BCL2 binding component 3	JFY1, PUMA/JFY1, p53 up-regulated modulator of apoptosis
Noxa	Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	PMA induced protein 1, APR
14-3-3	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein	14-3-3 eta, theta, zeta, beta, epsilon, sigma, gamma
Aven	Cell death regulator Aven	None
Myc	Oncogene Myc	c-myc, Myc proto-oncogene protein

2.3.5. Perforin/granzim yolağı

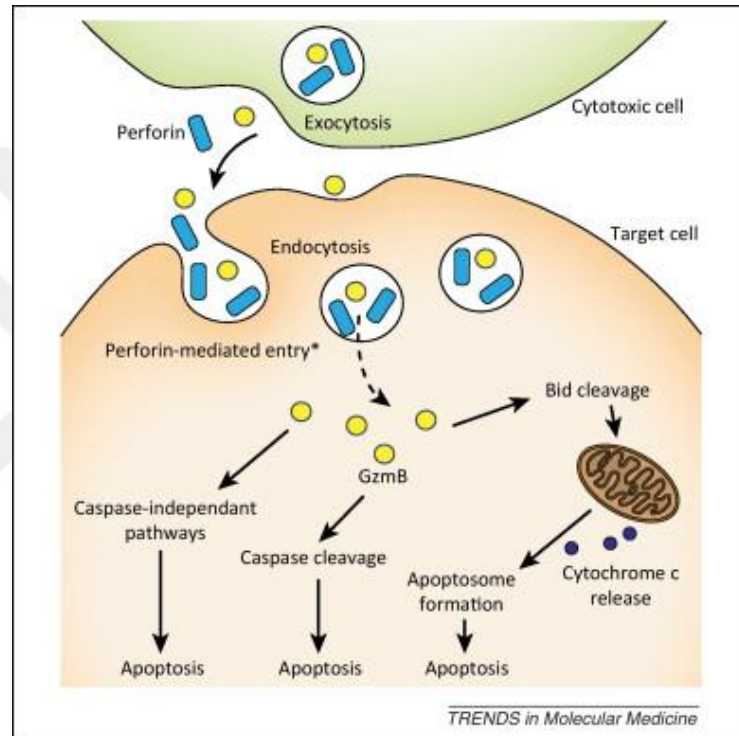
T hücre aracılı sitotoksikite, duyarlı hale getirilmiş CD8 + hücrelerin antijen taşıyan hücreleri öldürdüğü tip IV aşırı duyarlılığın bir çeşitidir. Bu sitotoksik T lenfositleri (CTL'ler) hedef hücreleri dışsal yolak ile öldürebilirler ve FasL / FasR etkileşimi, CTL'nin tetiklediği apoptozun baskın yöntemidir (119). Bununla birlikte, tümör hücreleri ve virüs ile enfekte olmuş hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerini, hücre zarında gözenek oluşturan bir molekül olan perforinin salgılanması ve ardından sitoplazmik granüllerin gözenek boyunca ve hedef hücre içine ekzofitik bir şekilde salınmasını içeren yeni bir yolak yoluyla uygulanabilirler (120). Granzim A ve granzim B serin proteazlar, granüller içerisinde en önemli bileşenlerdir (121).

Granzim B proteinleri aspartat kalıntılarından kesebilir ve böylelikle prokaspaz-10'u etkinleştirebilir ve ICAD (Inhibitor of Caspase Activated DNase) gibi etmenleri kesebilir (122). Önceki raporlar ayrıca granzyme B'nin, Bid'in özgül kesilmesi ve sitokrom c salınımının tetiklenmesi yoluyla ölüm sinyalinin artması için mitokondriyal yolağı kullanabileceğini göstermiştir (123, 124). Bununla birlikte, granzim B de doğrudan caspase-3'ü etkinleştirebilir. Bu yolla, yukarı yönde uyarı iletim yolları atlanır ve apoptozun uygulama evresinin doğrudan tetiklenmesi söz konusudur.

Hem mitokondriyal yolak hem de kaspaz-3'ün doğrudan harekete geçirilmesi, granzim B'nin tetiklediği öldürme için kritik öneme sahiptir (125). Son bulgular, granzyme B sitotoksitesinin bu yönteminin, tip 2 yardımcı T (Th2) hücrelerin T hücre genişlemesi için bir kontrol mekanizması olarak kritik olduğunu ortaya koymaktadır (126). Dahası, bulgular, ne ölüm almaçları ne de kaspazların etkin Th2 hücrelerinin T hücresi almaçıyla tetiklediği apoptoz da rol oynamadığını gösteriyor çünkü ligandlarının baskılanması apoptoz üzerinde hiçbir etkiye sahip değildir. Öte yandan, Fas-Fas ligand etkileşimi, ölüm alanlarına sahip adaptör proteinleri ve kaspazlar, sitotoksik Tip 1 yardımcı hücrelerin apoptoz ve düzenlenmesinde yer alırken granzyme B'nin herhangi bir etkisi yoktur (Şekil 2.7).

Granzyme A, sitotoksik T hücresi tarafından uyarılmış apoptozda da önemlidir ve kaspazdan bağımsız yolakları etkinleştirir. Hücrelere girdikten sonra, granzyme A, bir tümör baskılayıcı gen ürünü olan DNase NM23-H1 vasıtasıyla DNA'da çentik oluşumunu etkinleştirir (127). Bu DNAaz, tümör hücresi apoptozunun tetiklenmesi yoluyla kanseri önlemek için bağışıklık sistemi gözetlemesinde (immune surveillance)

önemli bir role sahiptir. Nükleozom oluşum proteini SET normalde NM23-H1 genini baskılar. Granzim A proteazı SET karmaşımını parçalayarak NM23-H1'in baskılanmasını serbest bırakarak apoptotik DNA yıkımına neden olur. NM23-H1'in baskılanmasına ek olarak, SET karmaşımı kromatin yapısında ve DNA onarımında önemli işlevlere sahiptir. Bu karmaşımı oluşturan proteinler (SET, Ape1, pp32 ve HMG2), kromatin ve DNA yapısını korumak için birlikte çalışıyor gibi gözükmektedir (127). Bu nedenle, bu karmaşımın granzyme A ile baskılanması, DNA ve kromatin yapısının bütünlüğünü bozarak büyük olasılıkla apoptozise de katkıda bulunur.



Şekil 2.7. Perforin/granzim Yolağı (128).

2.3.6. Dışsal Apoptotik Yolak

Apoptozu başlatan dışsal uyarı iletim yolları, transmembran almaç aracılı etkileşimleri içerir. Bunlar, tümör nekroz etmeni (TNF) almaç gen süper ailesi üyesi ölüm almaçları içerir (129). TNF reseptör ailesinin üyeleri, sistein açısından zengin hücre dışı bölgeleri bakımından benzerdirler ve "ölüm bölgesi" olarak adlandırılan yaklaşık 80 amino asitlik sitoplazmik bir kısma sahiptirler (130). Bu ölüm bölgesi, ölüm uyarısının hücre yüzeyinden hücre içi uyarı yollarına iletilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Bugüne

kadar, en iyi tanımlanmış ligandlar ve karşılık gelen ölüm almaçları, FasL/FasR, TNF- α /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 and Apo2L/DR5'dir (130-134).

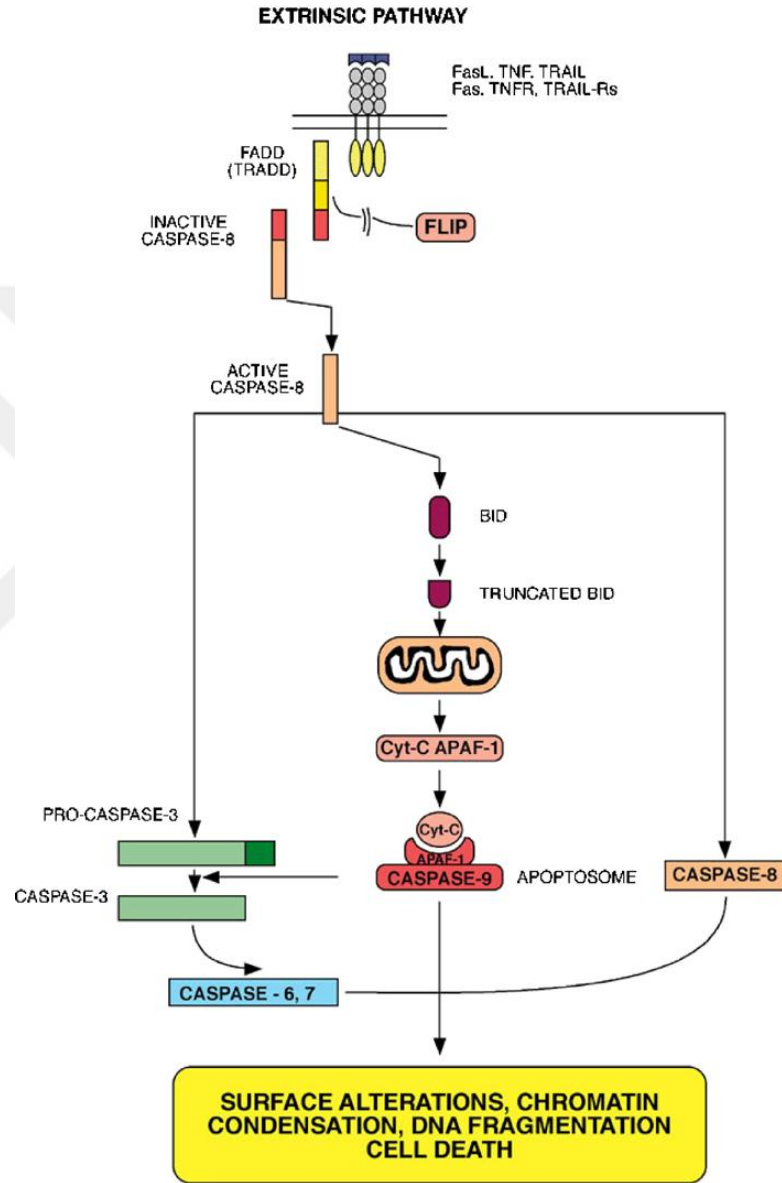
Apoptozun dış fazını tanımlayan olay dizileri en iyi şekilde, FasL / FasR ve TNF- α / TNFR1 modelleriyle tanımlanır. Bu modellerde almaçların kümelenmesi ve homolog trimerik ligand ile bağlanması vardır. Ligand bağlama üzerine, almaçlara bağlanan ilgili ölüm bölgeleri (death domains) içeren adaptör proteinler ortama toplanır. Fas ligandının Fas almaçına bağlanması, adaptör proteini FADD'ın bağlanmasına sebep olur ve TNF ligandının TNF almaçına bağlanması, FADD ve RIP'in ortama gelmesi ile TRADD adaptör proteininin bağlanmasına neden olur.(135-137). FADD daha sonra ölüm etki bölgesi (death effector domain)'in dimerizasyonu ile prokaspaz-8 ile etkileşime geçer. Bu noktada, ölümü tetikleyen uyarı karmaşımı (DISC; death-inducing signaling complex) oluşur ve prokaspaz-8'in oto-katalitik etkinleşmesi meydana gelir (138).

Tablo 2.6. Dışsal yolak proteinleri, kısaltmaları ve alternatif adlandırma (8).

Kısaltma	Protein Adı	Alternatif Adlandırma
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha	TNF ligand, TNFA, cachectin
TNFR1	Tumor necrosis factor receptor 1	TNF receptor, TNFRSF1A, p55 TNFR, CD120a
FasL	Fatty acid synthetase ligand	Fas ligand, TNFSF6, Apo1, apoptosis antigen ligand 1, CD95L, CD178, APT1LG1
FasR	Fatty acid synthetase receptor	Fas receptor, TNFRSF6, APT1, CD95
Apo3L	Apo3 ligand	TNFSF12, Apo3 ligand, TWEAK, DR3LG
DR3	Death receptor 3	TNFRSF12, Apo3, WSL-1, TRAMP, LARD, DDR3
Apo2L	Apo2 ligand	TNFSF10, TRAIL, TNF-related apoptosis inducing ligand
DR4	Death receptor 4	TNFRSF10A, TRAILR1, APO2
DR5	Death receptor 5	TNFRSF10B, TRAIL-R2, TRICK2, KILLER, ZTNFR9
FADD	Fas-associated death domain	MORT1
TRADD	TNF receptor-associated death domain	TNFRSF1A associated via death domain
RIP	Receptor-interacting protein	RIPK
DED	Death effector domain	Apoptosis antagonizing transcription factor, CHE1
caspase-8	Cysteiny aspartic acid-protease 8	FLICE, FADD-like Ice, Mach-1, Mch5
c-FLIP	FLICE-inhibitory protein	Casper, I-FLICE, FLAME-1, CASH, CLARP, MR

Kaspaz-8 etkinleştirildikten sonra, apoptozun uygulama aşaması tetiklenir. Ölüm almaç aracılı apoptoz, c-FLIP adı verilen ve FADD'ye ve kaspaz-8'e bağlanan ve onları etkisiz hale getiren bir protein ile baskılanabilir (139, 140). Olası apoptoz düzenlenmesinin

diğer bir noktası, Toso adı verilen ve kaspaz-8 işleminin baskılanması yoluyla T hücrelerinde Fas kaynaklı apoptozu baskıladığı gösterilen bir proteini içerir (141). Tablo 2.6, ortak kısaltmalar ve her protein için kullanılan alternatif adlandırmadan bazıları ile ana dışsal yol proteinlerini göstermektedir.



Şekil 2.8. Dışsal apoptotik yolağı boyunca uyarı iletimi (104).

2.3.7. Uygulama Yolağı

Dışsal ve içsel apoptotik yollar apoptozun nihai yolağı ve uygulama safhası olarak bilinen noktada sonlanır. Apoptozun bu evresini başlatan uygulama kaspazlarının

etkinleşmesidir (142). Uygulama kaspazları nükleer materyali parçalayan sitoplazmik endonükleazı ve nükleer ve sitoskeletal proteinleri parçalayan proteazları etkinleştirir. Caspase-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7 etki edici veya "uygulayıcı" kaspazlar olarak işlev görür ve sitokeratinler, PARP, plazma zarı sitoskeletal proteini alfa fodrin, nükleer protein NuMA ve diğerleri gibi çeşitli substratları parçalarlar. Sonuç olarak apoptotik hücrelerde görülen morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler görülür (142).

Kaspaz-3, uygulayıcı kaspazlarının en önemlisi olarak kabul edilmektedir ve başlatıcı kaspazlarından herhangi biri tarafından etkinleştirilebilir (kaspaz-8, kaspaz-9 veya kaspaz-10). Kaspaz-3 özellikle endonükleaz CAD'yi etkinleştirir. Çoğalan hücrelerde CAD, baskılayıcısı olan ICAD ile karmaşık halindedir. Apoptotik hücrelerde, etkinleşmiş kaspaz-3 ICAD'ı keserek CAD salınmasına izin verir (122). CAD daha sonra çekirdekdeki kromozom DNA'sını parçalayıp kromatin yoğunlaşmasına neden olur. Caspase-3 ayrıca, hücre iskelet sisteminin yeniden düzenlenmesine ve hücrenin apoptotik cisimciklere parçalanmasına neden olur. Bir aktin bağlayıcı protein olan Gelsolin, aktif kaspaz-3'ün anahtar substratlarından biri olarak tanımlanmıştır. Gelsolin, genellikle aktin polimerizasyonu için bir çekirdek gibi davranır ve ayrıca fosfatidilinositol bifosfat'ı bağlayarak aktin organizasyonunu ve uyarı iletimini ilişkilendirir. Caspase-3, gelsolini parçalar ve gelsolinin parçaları aktin filamentlerini kalsiyumdan bağımsız bir şekilde parçalar. Bu hücre iskeletin, hücre içi taşıma, hücre bölünmesi ve uyarı iletiminde bozulma ile sonuçlanır (143).

Apoptozisin son bileşeni apoptotik hücrelerin fagositik alımıdır. Fosfolipid asimetrisi ve fosfatidilserinin apoptotik hücrelerin yüzeyi üzerinde dışa vurumu ve bunların parçaları bu evrenin ayırt edici özelliklerindendir. Fosfatidilserinin apoptoz sırasında dışa vurma mekanizması tam olarak anlaşılmassa da, aminofosfolipid translokaz etkinliğinin kaybı ve çeşitli sınıfların fosfolipidlerinin nonspesifik flip-flop ile ilişkilendirilmiştir (90). Araştırmalar, FAS, kaspaz-8 ve kaspaz-3'ün, oksidatif stres altındaki eritrositlerde fosfatidilserinin dışa vurumunun düzenlenmesinde yer aldığını gösteriyor. Ancak kaspazdan bağımsız fosfatidilserinin dışa vurumu primer T lenfositlerin apoptozisi sırasında ortaya çıkar (144, 145).

Fosfatidilserinin apoptotik hücrelerin yüzeyinde dışa vurumu daha sonra nonenflamtuvar fagositik tanımayı kolaylaştırır ve böylelikle apoptotik hücrelerin hızlı bir şekilde alınmasına ve yok edilmesine olanak sağlar (146). Hücre bileşenlerinin hiç

serbest bırakılmaması ile bu erken ve verimli alım yöntemi, esas olarak hiçbir enflamatuvar tepki ile sonuçlanmaz. Tablo 2.7’de uygulama yolağında yer alan proteinler, bu proteinlerin yaygın olarak kullanılan kısaltmaları ve alternatif olarak kullanılan isimleri gösterilmiştir.

Tablo 2.7. Uygulama yolağı proteinleri, kısaltmaları, ve alternatif isimlendirmeleri (8).

Kısaltma	Protein Adı	Alternatif Adlandırma
Caspase-3	Cysteiny aspartic acid-protease-3	CPP32, Yama, Apopain, SCA-1, LICE
Caspase-6	Cysteiny aspartic acid-protease-6	Mch-2
Caspase-7	Cysteiny aspartic acid-protease-7	Mch-3, ICE-LAP-3, CMH-1
Caspase-10	Cysteiny aspartic acid-protease-10	Mch4, FLICE-2
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase	ADP ribosyl transferase, ADPRT1, PPOL
Alpha fodrin	Spectrin alpha chain	Alpha-II spectrin, fodrin alpha chain
NuMA	Nuclear mitotic apparatus protein	SP-H antigen
CAD	Caspase-activated DNase	DNA fragmentation factor subunit beta, DFF-40, caspase-activated nuclease, CPAN
ICAD	Inhibitor of CAD	DNA fragmentation factor subunit alpha, DFF-45

2.3.8. Normal Hücre Fizyolojisi İle İlişkili Olan Apoptoz

Normal fizyolojideki apoptozun rolü, eşdeğerindeki mitoz kadar kadar önemlidir. Çeşitli hücre nüfusunun düzenlenmesinde mitoz ve hücre çoğalmasının bir tamamlayıcısıdır, ancak tam tersi bir rolü vardır. Yetişkin insan vücudunda homeostazı korumak için, her gün sadece apoptoz ile ölenlerin dengelenmesi için yaklaşık 10 milyar hücre üretildiği tahmin edilmektedir (147). Bu sayı, normal gelişme ve yaşlanma sırasında veya hastalık sırasında artan apoptoz durumunda anlamlı bir şekilde artabilir.

Apoptoz, çeşitli gelişimsel süreçlerde kritik öneme sahiptir. Örnek olarak hem sinir sistemi hem de bağışıklık sistemi, hücrelerin aşırı üretimi ile ortaya çıkar. Bu ilk aşırı üretimin ardından sırasıyla işlevsel sinaptik bağlantılar veya üretken antijen özgüllükleri oluşturmayan hücrelerin ölümü izlenir (148, 149).

Apoptoz ayrıca vücudun patojenlerle istila edilmiş hücrelerden kurtulması için gereklidir ve enflamatuvar hücrelerin çıkarılmasına ve granülasyon dokusunun skar

dokusuna evrimine dönüşmesine neden olduğu için yara iyileşmesinin hayati bir bileşenidir (150). Yara iyileşmesi sırasında apoptozun düzenlenmesinde meydana gelen bozukluklar, aşırı skarlanma ve fibroz gibi patolojik iyileşme şekillerine yol açabilir (150). Ayrıca, etkin veya oto agresif immün hücreleri olgunlaşma sırasında merkezi lenfoid organlarda (kemik iliği ve timus) veya periferik dokulardaki ortadan kaldırmak için apoptoza ihtiyaç duyulmaktadır (151).

Ayrıca, postovulatar follikülün foliküler atrezisi ve süttten kesme sonrası meme bezi involüsyonunda gibi durumlarda olduğu gibi apoptoz yetişkinlerde yeniden şekillenmenin merkezinde yer almaktadır (152, 153). Ayrıca, organizmalar yaşlandıkça bazı hücreler daha hızlı bozulmaya başlar ve apoptoz yoluyla yok edilir. Bir teori göre, oksidatif stresin, mitokondriyal DNA'ya birikmiş serbest radikallerin verdiği hasar yoluyla yaşla tetiklenen apoptozun patofizyolojisinde birincil bir rol oynadığı öngörülmektedir (154, 155). Çok az veya çok fazla hücre ölümünün gelişimsel bozukluklar, otoimmün hastalıklar, nörodejenerasyon veya kanser gibi patolojilere yol açabileceğinden apoptozun sıkı bir şekilde düzenlenmesi gerektiği açıktır (8).

2.3.9. Patolojik durumlarla ilişkilendirilmiş apoptoz

Hücre ölümünün düzenlenmesindeki anormallikler, kanser, Otoimmün Lenfoproliferatif Sendrom (ALPS), Edinilmiş Bağışıklık Eksikliği Sendromu (AIDS), iskemi ve Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı, Huntington hastalığı ve Amiyotrofik Lateral Skleroz (ALS) gibi nörodejeneratif hastalıklarında içerisinde olduğu birçok hastalığın önemli bileşenidir. Bazılarında yetersiz apoptoz görülürken bazılarında aşırı apoptoz görülmektedir (156).

Kanser, aşırı hücre çoğalması ve/veya hücrelerin ortadan kaldırılmasında düşüş ile birlikte hücre döngüsü düzenlenmesinin normal mekanizmasının işlevsel bozukluğudur (157). Gerçekte, karsinogenez sırasında apoptozun bastırılmasının bazı kanserlerin gelişiminde ve ilerlemesinde merkezi bir rol oynadığı düşünülmektedir (158). Tümör hücrelerinin apoptozu baskılamak için kullandığı çeşitli moleküler mekanizmalar vardır (158).

Tümör hücreleri, Bcl-2 gibi anti-apoptotik proteinlerin ifadesi veya Bax gibi pro-apoptotik proteinlerin ifadesinin azalması veya mutasyonu yoluyla apoptozise direnç kazanabilir (36). Bcl-2 ve Bax'ın ifadesi, tümör baskılayıcı p53 geni tarafından

düzenlenir (159). Bazı insan B hücre lenfoma tipleri Bcl-2'nin aşırı ifadesine sahiptir ve bu hücre ölümündeki bozukluğun kanser oluşumuna katkıda bulunduğuna dair ilk ve güçlü kanıtlardan biridir (160). Kanserde apoptozun bastırılmasının bir başka yöntemi, bağışıklık gözetiminden kaçınılmasını içerir (161).

Bazı bağışıklık sistemi hücreleri (T hücreleri ve doğal öldürücü hücreler) normal olarak tümör hücrelerini perforin / granzim B yolağı veya ölüm-reseptör yolağı vasıtasıyla yok eder (126). Bağışıklık tahribatından kaçınmak için, bazı tümör hücreleri ölüm almaç yolağının T hücreleri tarafından üretilen FasL'ye olan cevabı düşürecektir (126). Bu durumun tümör hücrelerinde Fas almaçının ifadesinin azalması gibi çeşitli şekillerde ortaya çıktığı gösterilmiştir (132, 138). Diğer mekanizmalar, işlevsiz Fas almaçının ifadesi, Fas ligandını salıveren çözünür bir Fas almaç formunun salgılanması veya tümör hücrelerinin yüzeyinde Fas ligandının ifade edilmesidir (162-164). Aslında, bazı tümör hücreleri, tümöre sızan etkinleşmiş lenfositlerin apoptotik yok edilmesine yol açan bir Fas ligandı aracılı "karşı saldırı" yapabilir (165).

Çeşitli hücreSEL uyarı iletim yollarında meydana gelen bozukluklar, apoptozun düzensizleşmesine ve kansere yol açabilir. P53 tümör baskılayıcı geni, hücre döngüsünü düzenleyen bir yazılım etmenidir ve insan tümörigenezinde en yaygın şekilde mutasyona uğramış gendir (166). P53'ün kritik rolü, tüm insan kanserlerinin % 50'sinde mutasyona uğrayan olması ile belirgindir (166). DNA kalıcı olarak hasara uğradığında p53 DNA tamir proteinlerini etkinleştirebilir, DNA hasarı tanınmasında hücre döngüsünü G1/S düzenleme noktasında duraklatabilir, DNA hasarının onarılamaz olduğu kanıtlanırsa apoptozu başlatabilir (167). Bu sistemde bozukluklar meydana geldiğinde tümör oluşması meydana gelebilir (167). Eğer p53 geni hasar görürse, o zaman tümör baskılanması ciddi şekilde azalır (167). p53 geni radyasyon, çeşitli kimyasal maddeler ve insan papillomavirüsü (HPV) gibi virüslerle hasar görebilir (168). Bu genin sadece bir işlevsel kopyasına sahip olan insanlar muhtemelen erken yetişkinlikte tümörlerin gelişimi ile karakterize edilen Li-Fraumeni sendromunu geliştirirler (169, 170).

Ataxia telangiectasia-mutated (ATM) geninde ATM/p53 uyarı iletim yolağı ile tumorigenezde rol oynadığı gösterilmiştir (171). ATM geni, bir tümör baskılayıcı olarak işlev gören bir protein kinazı kodlar. DNA'ya iyonize radyasyon hasarı yoluyla ATM etkinleşmesi DNA onarımını uyarır ve hücre döngüsü ilerlemesini engeller. Bunun gerçekleştiği bir mekanizma, p53'ün ATM'ye bağlı fosforilasyonudur (172).

Daha önce de belirtildiği gibi, p53 daha sonra DNA hasar onarımı için bir kontrol noktasında hücrenin büyümesinin durması uyarısı verir veya hasar tamir edilemezse hücrenin apoptosise gitmesine neden olabilir (171, 172). Bu sistem ayrıca somatik genetik/epigenetik değişiklikler ve HPV gibi onkojenik viral proteinlerin ifadesini içeren bir dizi mekanizma ile etkinsizleştirilebilir ve tümör oluşumuna sebep olabilir (173). Diğer hücrel uyarı iletim yolları da tümör gelişiminde rol oynayabilir. Örneğin, fosfatidilinositol 3-kinaz/AKT yolağının tümör hücrelerinde aşırı ifade edilmesi onları hayatta kalma sinyallerinden bağımsız kılar (174). Apoptozun düzenlenmesine ilaveten, bu yol, hücre çoğalması, büyümesi ve hücre iskelet sisteminin yeniden düzenlenmesi gibi diğer hücrel işlemleri de düzenler (175)

Kansere ek olarak, düşük seviyede apoptoz otoimmün lenfoproliferatif sendrom (ALPS) gibi hastalıklarda sebep olabilir (176). Bu, oto-saldırgan T hücrelerinin yetersiz apoptozu durumunda ortaya çıkar ve bunun sonucunda çoklu otoimmün hastalıklar görülür (176). B hücrelerinin aşırı çoğalması da görülen bir durumdur ve aşırı immünoglobulin üretimine sebep olarak otoimmünite yol açar (176).

Aşırı apoptoz, otoimmün hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar ve iskemi ile bağlantılı yaralanma gibi bazı durumların bir özelliği olabilir (177). CD4+ Yardımcı T hücrelerinin insan bağışıklık eksikliği virüsü (HIV) ile enfekte edilmesinden kaynaklanan AIDS, otoimmün hastalıklara bir örnektir (177). Bu virüs, CD4+ T hücrelerini CD4- almacına bağlanarak enfekte eder. Virüs daha sonra HIV Tat proteininin Fas almacının ifadesini arttırdığı düşünülen T hücrelerine girer, bu durum T hücrelerinin aşırı apoptozu ile sonuçlanır (177).

Alzheimer hastalığı, APP (amiloid öncü protein) ve presenilinler gibi bazı proteinlerde meydana gelen mutasyonların neden olduğu düşünülen bir nörodejeneratif hastalıktır. Presenilinlerin APP'nin amiloid β 'ya işlenmesinde rol aldığı düşünülmektedir. Bu durum plaklar olarak bilinen hücre dışında amiloid β 'nın birikimi ile ilişkilidir ve amiloid β 'nın toplu plaklar formunda bulunması durumunda nörotoksik olduğu düşünülmektedir. Amiloid β 'nın oksidatif strese neden olarak veya nöronlar ve gliada Fas ligand ifadesinin artmasını tetikleyerek apoptozu tetiklediği düşünülmektedir. Aynı zamanda, TNF α salgılanması ve TNF-R1'in etkinleşmesi ile sonuçlanacak olan mikrogliayı da etkinleştirebilir ve apoptosise yol açabilir (178).

Aşırı apoptozun çeşitli iskemi ile ilişkili yaralanmalarda da önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Bir örnek, yetersiz kan beslemesinden kaynaklanan miyokardiyal iskemidir ve kardiyomiyositlerin oksijen sağlanmasında azalmaya ve dolayısıyla ölümlerine sebep olur. Nekroz olsa da, iskemik miyokard dokusunda BAX'in aşırı ifadesi saptanmış ve apoptozu düşürmeyi hedefleyen tedavi ile doku hasarının derecesinin azaltılmasında bir takım başarılar sergilemiştir (179). Bir hipoteze göre iskemi sebebiyle ortaya çıkan hasar apoptoz başlatma yeteneğine sahiptir, ancak iskemi uzarsa nekroz oluşur. Reperfüzyonda olduğu gibi enerji üretimi geri sağlanırsa, iskemi ile başlatılan apoptotik silsile ilerleyebilir (180). Her ne kadar apoptozun miyokardiyal iskemide ne derece rol oynadığı açıklığa kavuşturulmasa da, bu hücre ölüm şeklinin bir rolünün olduğu yönde açık kanıtlar vardır.

2.3.10. Apoptozun Baskılanması

Aşırı apoptozun (nörodejeneratif hastalıklar, AIDS, iskemi, vb.) özgül olarak görüldüğü birçok patolojik durum vardır ve bu nedenle yapay olarak apoptozun baskılanması bu hastalıkların tedavisi açısından yararlı olabilir. Bu alanda bilgilerimiz geliştikçe, yeni hedeflerin tanımlanması ve kullanılması dikkat çekici bir odak noktası olmayı sürdürüyor (181). Anti-apoptotik tedavinin olası yöntemlerinin kısa bir listesi, IAP (apoptoz proteinlerinin inhibitörleri) ailesi proteinlerin uyarılması, kaspaz baskılanması, PARP (poli [ADP-riboz] polimeraz) baskılanması, PKB/Akt'in (protein kinaz B) yolağının uyarılması ve Bcl-2 proteinlerinin baskılanmasını içerir.

IAP protein ailesi belki de apoptozun en önemli düzenleyicileridirler, çünkü hem içsel hem de dışsal apoptotik yolları düzenlemektedirler (182). XIAP (X bağlantılı memeli apoptoz proteini inhibitörü) ve survivin daha iyi bilinen üyeler olmasına rağmen, sekiz insan IAP proteini tanımlanmıştır (183, 184). Şimdiye kadar, IAP ailesinin üyeleri felç, omurilik yaralanmaları, multipl skleroz ve kanser tedavisinde tedaviye yönelik hedef olarak araştırılmıştır. Sentetik özgül olmayan kaspaz baskılayıcısı z-VAD-fmk'nin miyokard reperfüzyon hasarının şiddetini miyokard enfarktüs sıçan ve fare modellerinde azalttığı gösterilmiştir (185). Kaspaz etkinliğinin özgül baskılayıcıları da yararlı olabilir. Kaspaz I olarak bilinen ICE (Interleukin-1 beta-converting enzyme) apoptoz sırasında hücre içi protein bozunmasına aracılık eden bir sistein proteazdır (186). ICE baskılayıcıları, interlökin 1β'nin azaltılması yoluyla romatoid artrit ve diğer enflamatuvar durumların tedavisi için geliştirilmiştir (187).

PARP-1'in hem DNA onarımında hem de apoptozda ikili rolü nedeniyle, PARP-1 baskılayıcılarının farmakolojik kullanımı, iskemik ve inflamatuvar hücre ve organ hasarını hafifletebilir veya antitümör ajanların sitotoksitesini artırabilir (188). PARP-1 knockout farelerle yapılan yeni yapılan bir çalışmada PARP-1 baskılayıcılarının miyokardiyal iske mi ve reperfüzyon hasarıyla ilişkili yaralanma için etkili bir terapi olabileceğini gösterilmiştir (189). PKB/Akt uyarısını iletimini uyaran ve hücrelerin hayatta kalmasını teşvik eden insülin benzeri büyüme faktörü-1'in (IGF-1) infüzyonunun, miyokard iskemisinin hayvan modellerinde yararlı olduğu gösterilmiştir (190).

Transgenik kardiyak iske mi modelleri ve global beyin iskemisi ile yapılan diğer çalışmalar, Bax'ın ifadesinin ve/veya işlevini baskılanmasının sitokrom c'nin mitokondriyondan salınmasını önleyebileceğini, mitokondriyal zar potansiyelindeki azalmayı baskılayabileceğini ve hücreleri apoptozise karşı koruyabileceğini göstermiştir (156, 179). Burada sözü edilen olası tedaviye yönelik yöntemler, bu alandaki geçmiş ve şu anki araştırma çabalarının yalnızca bir kısmını temsil etmektedir. Apoptozun moleküler ve biyokimyasal karmaşıklıkları açıklığa kavuşturulmaya devam edildiğinde, yeni tedavi stratejileri gelişmeye devam edecektir.

2.4. Programlanmış Hücre Ölümünün Diğer Biçimleri

Programlanmış hücre ölümünün apoptotik olmayan diğer biçimlerine dair kanıtlar da vardır. Bu hücre ölüm biçimlerinde göz önünde bulundurulması gereklidir çünkü bu hücre ölüm çeşitlerinin anlaşılması hücre ölüm programlarına yeni bir bakış açısı kazandırabileceği gibi gelişim, homeostazi, neoplazi ve bozunma gibi hayati öneme sahip mekanizmalarda önemli özgül rollere sahip olabilirler. Hücre ölüm mekanizmalarının çok çeşitli fenotip dizilerine ve moleküler mekanizmalara sahip olduğu belirgin hale gelmiştir. Ve bir hücre ölüm şeklinin değiştirilmesinin başka bir hücre ölümüne yol açabileceğine dair kanıtlar vardır. Diğer hücre ölüm tipleri gen etkinleşmesi ve enerjiye bağımlı bir şekilde işlev göstereceğinden dolayı, bunlarda "programlanmış hücre ölümü" formları olarak değerlendirilmektedirler. Bu nedenle, apoptozu özgül olarak tanımlamak için "programlanmış hücre ölümü" teriminin özel olarak kullanımı için bir miktar direnç vardır.

Gen etkinleşmesi ve protein sentezi gerektiren nekrotik benzeri fenotipler vardır, bu yüzden bunlar kesinlikle programlı hücre ölümü formlarıdır (191). Hem nekroz hem de

apoptozun belirli morfolojik özelliklerine sahip olan bu hücre ölüm şekli "aponekroz" (61). Antimisin A ile mitokondriyal solunum zincirini etkileyerek, Formigli ve arkadaşları, hem apoptoz hem de nekrozla dinamik, moleküler ve morfolojik özellikleri paylaşan bir tür hücre ölümü başlattılar (61).

Kaspazdan bağımsız nöronal hücre ölüm mekanizmaları da tespit edilmiştir. Programlanmış hücre ölümünün bu özel tipi, özgül mitokondriyal etmenleri içerebilir. Deneysel modellerde, apoptoz indükleyici faktör (AIF) ve endonükleaz G bu tip hücre ölümünü teşvik etmektedir, bununla birlikte, Smac/DIABLO ve HtrA2/ Omi de katkıda bulunabilir (99, 192). Oppenheim ve arkadaşları (193), kaspazlar genetik olarak silinse bile programlanmış hücre ölümünün memeli nöronlarının gelişmesinde meydana geldiğini göstermişlerdir. Diğer araştırmalar, kaspaz uygulama mekanizmalarının baskılanmasının hasar gören nöronları geçici olarak kurtarabileceğini ve klasik apoptotik özelliklerin kaspaz baskılanmış nöronlarda halen ortaya çıkabileceğini göstermiştir (194). Kaspaz bağımlı ve kaspazdan bağımsız nöronal hücre ölüm mekanizmalarının beyin bölgesine, hücre türüne ve yaşına bağlı olabileceği görülmektedir.

Sperandio ve arkadaşları (62) "paraptoz" olarak adlandırılan morfolojik ve biyokimyasal açıdan apoptozdan farklı programlanmış bir hücre ölümü biçimini tarif etmişlerdir. Bu hücre ölümü şekli kaspaz baskılayıcılarına veya BCL-XL'e cevap vermese de, Apaf-1'den bağımsız alternatif bir caspase-9 etkinliği tarafından işlev göstermektedir. Programlanmış hücre ölümünün bu alternatif biçimi, gelişme sırasında ve Huntington hastalığının ve insan amiyotropik lateral sklerozunun transjenik modellerinde ortaya çıktığı bildirilmektedir (195, 196).

"Otofajinin" programlanmış hücre ölümü için başka bir mekanizma olduğunu ve bunun apoptoza benzer şekilde gelişimsel süreçlerde, insan hastalıklarında ve besin yoksunluğuna karşı hücrel tepkilerde önemli rol oynadığı önünde bulgular vardır (60, 197, 198). Eşanlamlı olarak kullanılan diğer terimler "makro otofaji" ve "otofajik tip II hücre ölümü" şeklindedir (199). Otofajik hücre ölümü, sitoplazmanın ve organellerin çift veya çok zarlı keseciklere paketlenmesi ve daha sonra yıkım için hücrenin kendi lizozomlarına gönderilmesi ile nitelendirilmektedir (200). Bir bakıma, hücre kendisini "cannibalize eder". Otofajinin mekanizmaları ve morfolojisi, hayvanlar, bitkiler ve mayalar kadar çeşitli organizmalar arasında güçlü benzerliklerle evrimsel olarak

korunmaktadır. Otofajinin süreci hem sürekli protein sentezine hem de sürekli olarak ATP'nin varlığına bağlıdır. Otofajinin moleküler mekanizmaları mayada yoğun şekilde çalışılmıştır ve memeli ortologları aydınlatılmaya devam edilmektedir (199, 201, 202).

Apoptozun özgül ultra yapısal özelliklerinin çok azını seçileyerek ve DNA merdiveni yapısını göstermeden bazı hücrelerin kaspazdan bağımsız olarak genler ile etkinleştirilmiş bir hücre ölümüne gidebileceği ortaya konulduğundan dolayı otofajik programlanmış hücre ölümü ayrımı yapılmıştır (82). Ancak bu hücreler apoptoza benzer şekilde poliubiquitin gen ifadesinde artış ile birlikte, denovo gen ifadesine ihtiyaç duymaktadırlar (197, 202). Özgül olarak, otofaji tüm ökaryotik hücrelerde gerçekleşmektedir ve sitoplazmanın ve organellerin paketlenmesi ve lizozomlara veya keseciklere iletilerek yıkımı için hücre içi zarların dinamik olarak yeniden düzenlenmesini içerir. Bu, sitoplazmik bileşenlerin genel devri için en önemli tetikleyici yolak olarak düşünülmektedir.

Eşsiz bir ubiquitin benzeri protein konjugasyon sistemi ve lizozomda veya kesecikte zar kenetleme ve kaynaşmasını yönlendiren bir protein karmaşımı otofajinin önemli bileşenleridir. Genel olarak otofaji süreci dört adıma ayrılabilir: (1) tetikleme, (2) otofagozom oluşumu, (3) lizozom veya kesecik ile kaynaşma ve (4) otofajik cisimciklerin parçalanması ve geri dönüşüm. Moleküler ayrıntılar hala aydınlatılması adına çalışmalar devam etse de, bu işlemin düzenlenmesi çeşitli kinazlar, fosfatazlar ve guanozin trifosfatazlar (GTPazlar) vasıtasıyla gerçekleşmektedir. Otofajinin ve apoptozun birbirine bağlı olduğu ve iki süreç arasında "moleküler anahtarlar" olduğu yönünde bulgular vardır (202). Bu, hücre ölüm yolunun fizyolojik çevre, gelişim evresi, doku tipi ve hücre ölümü uyarısının doğası gibi çeşitli fizyolojik faktörlere bağlı olduğu hem apoptoz hem de nekrozun paylaşılan bir biyokimyasal ağın morfolojik ifadelerini temsil ettiğini gösteren nekroz-apoptoz "süreklilik" veya "paradoks" kavramına benzer (66, 67). Bununla birlikte, çekirdek apoptotik yolak, hücre içi ATP'nin ve kaspazların varlığının değiştirilmesi ile nekrotik fenotipi tetiklemek üzere yönlendirilebilir.

Benzer bir ilişki, apoptoz ile otofaji arasında ortaya çıkabilir. Mitokondrinin hem apoptozu hem de otofajiyi birleştiren merkezi organel olabileceği ileri sürülmüştür (8). Dahası, apoptozda yer alan aynı uyarıların bazıları otofajide de rol oynayabilir. Örneğin, hem apoptoz hem de otofajide, Akt (protein kinaz B) ve p70S6 kinazın eş güdümlü düzenlemesi vardır. İki tip hücre ölümünü birleştiren ağın bir parçası olabilecek diğer

proteinler DAPk, Beclin 1, BNIP3, HSpin1 veya protymosin- α olabilir (199). Malign yönde başkalaşım, otofaji ile apoptoz arasında bir başka bağlantıdır (197).

Kanser gelişiminde hücre çoğalması/apoptozunu kontrol eden yollardaki genetik değişikliklerin rolü iyi belirlenmiştir. Benzer şekilde, azaltılmış otofaji ile kanser arasındaki ilişki de ortaya konulmuştur. Araştırmalar, malign yönde başkalaşım sırasında otofaji uyarı iletimi ilgili çeşitli proteinler ve yolların düzenlenmesinin bozulması, otofagositik etkinliğin azalmasına sebep olduğu gösterilmiştir. Bu, bazı durumlarda, otofajinin, kontrolsüz hücre büyümesini kısıtlayan bir koruyucu mekanizma olarak işlev görebileceğini düşündürmektedir. Otofaji, apoptozise karşı koruyucu bir mekanizma olarak da düşünülmüştür. Lemasters ve arkadaşları (204) apoptozun bir özelliği olan depolarize mitokondrinin, birincil hepatositlerde otofaji ile hızla yok edildiğini gözlemişlerdir. Hasar görmüş mitokondrinin yok edilmesi mitokondriden proapoptotik maddelerin salınmasını engeller, böylece apoptozu önler.

Otofaji, yaşlanmış proteinleri ve sitoplazmik organelleri yok etmek için başlıca hücrel mekanizma olarak düşünülür; Bununla birlikte, otofajik hücre ölümü kavramı, bilim camiasında bir tartışma konusu olmuştur. Çeşitli fizyolojik ve stres koşullarında artmış otofajinin belirgin bir avantajı olduğu için, otofajinin hücreleri ölümden kurtarmak için çalışan önemli uyarlanabilir bir mekanizma olduğu öne sürülmüştür. Diğer bir deyişle, ölmekte olan hücrelerde otofajik veziküllerin varlığı stres koşulları altında, "otofajik hücre ölümünün bir yansıması olmaktan çok, hücre canlılığını korumak için uyarlanabilir bir tepkiyi yansıtabilir. Alternatif olarak, apoptoz ve otofajik hücre ölümü birbirinden bağımsız mıdır yoksa her ikisi de apoptoz-nekroz sürekliliğine benzer bir durumda uygulanabilir mi? Hücre ölümünün tipi, tepkinin şiddetine, hücrel unsurların etkilerine ve/veya diğer uyarı ileti yollarının etkilerine bağlı olabilir (197, 202). Apoptoz ve otofajik programlı hücre ölümünün birbirinden bağımsız olmadığına ve çeşitli morfolojilere kısmen farklı biyokimyasal ve moleküler olayların atfedildiğine dair raporlar bulunmaktadır (197, 202). Bazı hücrelerde ve belirli koşullar altında, otofajinin morfolojik özellikleri, apoptotik hücre ölümünden önce meydana gelebilir, bu apoptozun erken evresini temsil etmektedir. Bu konuda halen tartışmalar devam etmektedir. Ancak, otofajinin moleküler temellerine anlamak, programlı hücre ölümünde ve kanser oluşumundaki rollerini belirlemek için yeni deneysel

yöntemlerin ve belirteçlerin ortaya çıkması ile birlikte otofajik hücre ölümü alanına ilgi giderek artmaktadır.

2.5. Bu çalışmada incelenen proteinler hakkında bilgiler

2.5.1. Siah E3 Ubiquitin Protein Ligase 1 (SIAH1)

Siah E3 Ubiquitin Protein Ligaz (SIAH) (seven in absentia homolog) proteinleri RING tipi E3 ubiquitin ligazlardır ve Drosophila seven in absentia (Sina) proteininin homologudurlar (14). Bu proteinlerin insan homologları SIAH1 ve SIAH2'dir (14). İnsan SIAH proteinleri önemli derecede amino asit dizilimi homolojisi gösterir ve N terminallerinde önemli derecede farklılık gösterirler. SIAH1, seven in absentia homolog (SIAH) protein ailesinin bir üyesidir (14).

SIAH proteinleri hem normal gelişim hem de kanser için önemli düzenleyicilerdir. SIAH proteinleri, seçilen proteinleri poliüpiquitinasyon ile proteazomal bozunum için hedef alarak birincil işlevlerini yerine getirir (205). İlk bulgular tümör baskılanmasında bir rolünün olduğunu gösterse de (16), son yıllarda yapılan araştırmalar, SIAH proteinlerinin, özellikle SIAH2'nin, moleküler mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılmamış olmasına rağmen tümör kaynaklı proteinler olduğunu ve birçok dokuda tümör hücresi çoğalmasını teşvik ettiğini göstermektedir. Artmış SIAH ifade seviyesi prostat, akciğer ve meme kanseri gibi birçok farklı insan kanserlerinde bildirilmiştir (206-208). Son zamanlarda SIAH'ın pankreatik kanserde tümöre özgü bir biyobelirteç olabileceği ortaya konulmuştur. Kanser Genom Atlası SIAH2 geninin birçok insan tümöründe artmış olduğunu bildirmiştir (Örn. akciğer skuamöz hücreli karsinomanın % 30'unda) (209, 210). Hem SIAH1 hemde SIAH2'nin karaciğer kanser hücrelerinin çoğalmasını arttırdığı rapor edilmiştir (207, 211) ve SIAH2 ifadesinin baş ve boyun tümörlerinde tümör büyümesini teşvik ettiği bildirilmiştir (212). Akciğer (206), melanom (213) ve pankreas (214) kanserlerin klinik öncesi fare modellerinde SIAH baskılanması umut verici sonuçlar vermiştir.

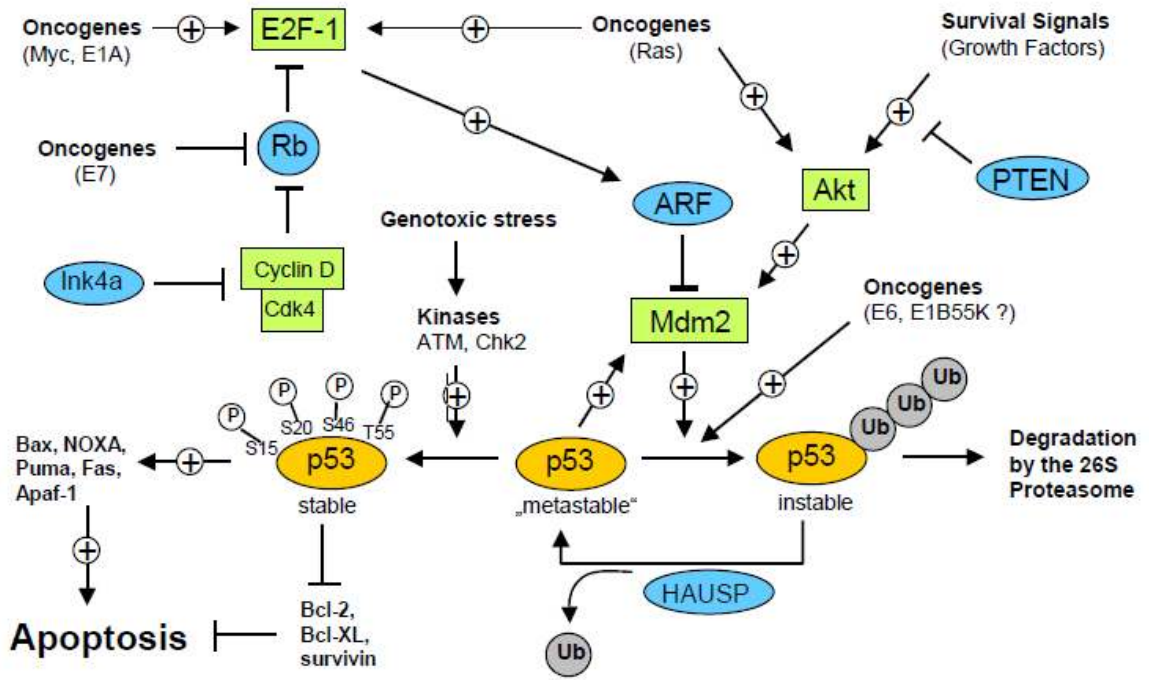
SIAH1, bir E3 ubiquitin ligazı kodlar ve özgül proteinlerin ubiquitinasyon ve proteazom aracılı bozunumunda rol alır. SIAH1'in Parkinson hastalığının gelişmesinde rol oynadığı ve hipoksi ve apoptoz mekanizmalarının düzenlenmesinde yer aldığı bildirilmiştir (14). Bugüne kadar yapılan çalışmalar, SIAH1 proteininin hücre döngüsü, programlanmış hücre ölümü ve onkogeneze gibi biyolojik süreçte önemli roller oynadığını bildirilmiştir

(14). Özellikle, SIAH1'in bazı hedef proteinlerin ubiquitinasyon ve proteazomal bozulması yoluyla apoptotik hücre ölümünü indüklediği ve tümör büyümesini bastırdığı gösterilmiştir (14). Ayrıca, SIAH1'in c-jun-NH2-kinaz (JNK) sinyal yolağının etkinleşmesi yoluyla hücresel apoptozu tetiklediği bildirilmiştir (14). Ayrıca, SIAH1'in meme kanseri hücrelerinin apoptozuna rol oynadığı gösterilmiştir (14).

2.5.2. Tümör Protein P53 (TP53)

Tümör proteini 53 (p53, insan TP53 geni tarafından kodlanır) DNA hasar gördüğünde veya hipoksi ve hücre döngüsü anormallikleri gibi diğer stres koşullarında uyarılır (110). p53 etkilerini iki yolla gösterir. (1) p53, hücrenin S fazına geçişi için gerekli olan Rb'nin CDK/siklin aracılı fosforilasyonunu baskılayan p21'in yazılımını tetikler. (2) Hücredeki DNA hasarı başarıyla onarılamazsa, p53, apoptoz sürecinde rol oynayan genlerin yazılımına aracılık eder. Normal bir hücrede p53, negatif düzenleyicisi olan mdm2 ile baskılanır (215). DNA hasarı veya diğer stres durumlarında, çeşitli yollar p53 ve mdm2 karmaşımının ayrışmasına yol açacaktır. Etkinleştirildikten sonra p53, ya hücrenin onarılmasını ve hayatta kalmasını sağlamak için hücre döngüsü tutuklanmasını tetikleyecek ya da hasar görmüş hücreyi yok etmek için apoptozu tetikleyecektir. P53'ün bu seçimi nasıl yaptığı henüz bilinmemektedir (216-218).

P53 geni, tümör baskılayıcı ve pro-apoptotik bir gendir. P53 proteini bir hücrenin hücre döngüsünü tamamlamasını (1) hücrenin DNA'sı hasar görmüşse veya (2) hücre başka hasar türlerine maruz kalmışsa engeller (219). Hasar hafif olduğunda, p53 hasar onarılan kadar hücre döngüsünü - dolayısıyla hücre bölünmesini durdurur. Hasar büyük olduğunda ve onarılmıyorsa, p53, hücrenin apoptoz ile intihar etmesini tetikler. Bu işlevler p53'ü kanseri önlemede kilit bir oyuncu yapar. Yani, önemli bir tümör baskılayıcı gendir. Tüm insan kanserlerinin yarısından fazlası aslında p53 mutasyonlarına sahiptir ve işlevsel bir p53 proteine sahip değildir. Geleneksel anti-tümör teknikleri (kemoterapi ve radyoterapi) doğrudan tümör hücrelerine zarar vermez, DNA kırıklarının oluşmasına neden olur ve böylece apoptoz yolağını tetiklemek üzere p53'ü etkinleştirir (220).



Şekil 2.9. P53 ağı - hayatta kalma ve hücre ölüm mekanizmalarının düzenlemesi (221).

P53 geni tanımlanan ilk tümör baskılayıcı genidir ve keşfinden bu yana bilim insanları p53 yolağının insan kanserlerinin çoğunda değiştiğini bulmuşlardır (222). Bu genin protein ürünü olan p53, hücrenin tümör baskılayıcı mekanizmasının kalbinde yer almaktadır ve bu nedenle "genomun koruyucusu" lakabı ile anılmaktadır. Hücrel stresin olmadığı durumlarda düşük p53 seviyesi, reaktif oksijen türlerini (ROS) ve daha sonra DNA hasarını azaltan antioksidan etkinliği tetikler. Normal hücre metabolizması DNA ile tepkimeye girebilen ROS üretir (223). Endojen ROS'un tek bir hücrede günlük yaklaşık 20.000 DNA bazını değiştirdiği tahmin edilmektedir. P53 bunu, hidrojen peroksit metabolizmasına katılan proteinler olan glutatyon peroksidaz 1 ve sestrinler gibi antioksidan işlevlere sahip olan genlerin ifadesini arttırarak gerçekleştirir. Bu antioksidan etkinlik, mutasyona karşı korur ve kanseri önlemeye yardımcı olabilir (224).

2.5.2.1. Hücre stresine ve DNA hasarına cevap

Hücresel stres ve DNA hasarı gibi birçok "tehlike uyarısı", p53'ü etkinleştirebilir ve tümör oluşumunu baskılayan birkaç önemli hücre yanıtını tetikleyebilir. Yukarı akış yönünde stres etkinleştiricileri arasında radyasyon, ilaç veya kanserojen kaynaklı DNA hasarı, onkojenik etkinleşme, hipoksi ve düşük ribonükleotid havuzları yer almaktadır (225). Bu koşullar tümörün başlatılmasını besleyebilir. Bu stres sinyallerine yanıt olarak, p53, hücre döngüsü tutuklanması, apoptoz, DNA onarımı ve anjiyogenezin baskılanması da dâhil olmak üzere aşağı akış yönünde hücresel etkilerin ortaya çıkmasını tetikleyebilir (226). Hücre döngüsünü duraklatma yeteneği DNA mutasyonlarının onarılmasına izin verir ve genomdaki çoğalmalarını engeller (227). Apoptoz, mutasyonların çoğalmasını önlemenin bir başka aracıdır; DNA hasarı onarılamıyorsa, hücre intiharı organizmaya bir bütün olarak yarar sağlar. Mutasyon geçiren hücrelerin ölmesi daha iyidir. Apoptoz, p53'ün tümör baskılayıcı işlevine aracılık eden kritik biyolojik süreçtir. P53'ün apoptozun hücresel etkisine katkıda bulunabilecek belirli stres koşulları altında pro-oksidan bir rol oynayabileceği de belirtilmelidir (227). P53 yolağının genel düzenlemesi, bizi her bir tabakayı çözmeye çalışmaya zorlayan olağandışı bir karmaşıklığa sahiptir.

2.5.2.2. Yukarı Akış yönünde p53 etkinleşmesinin moleküler yolakları

P53'ün etkinleştirildiği mekanizma, stres sinyalinin doğasına bağlıdır. Stres, hücresel proteinler tarafından 'algılanır'; bunların çoğu, tehlike uyarılarını fosforilasyon yoluyla p53'e ileten kinazlardır. P53-MDM2 etkileşiminin bozulması, p53'ün yukarı akış etmenleri tarafından etkinleşmesi için esastır (228). P53'ün yukarı akış yönündeki etkinleştiriciler, hücresel stres bildirmek için üç ana bağımsız moleküler yolak kullanmaktadır. İyonize radyasyonun neden olduğu DNA hasarı, iki protein kinaz tarafından uyarılır. DNA çift sarmalı tarafından uyarılan birinci kinaz ATM, ikinci bir kinaz Chk2'yi fosforile eder ve etkinleştirir (229). Hem ATM hem de Chk2 kinazları, p53'ün amino uç bölgelerini fosforile eder ve bu fosforilasyon, MDM2'nin bağlanmasına engel olur. Hücresel stres p53'e ileten ikinci bir moleküler yolak, iki farklı kinaz, ATR ve kazein kinaz II tarafından yürütülür. Bunlar ayrıca p53'ü fosforile eder ve MDM2 ile olan etkileşimini bozar.

Son olarak, Ras gibi etkinleşmiş onkogenler, p53-MDM2 karmaşımının bir başka modülatörü olan p14arf proteininin etkinliğini tetikler. P14arf, INK4a/CDKN2A

geninin iki translayon ürününden bir tanesidir (bir siklin kinaz baskılayıcısı olan p16, diğer üründür) (230). P14arf, p53-MDM2 arabirimine bağlanmaz, ancak MDM2'yi hücrenin çekirdekçisine kenetleyerek işlev görür. Her üç yol da p53'ün MDM2 tarafından parçalanmasını engeller (228, 229).

2.5.2.3. Aşağı akış yönünde p53 etkinleşmesinin moleküler mekanizmalar

P53'ün tümör baskılayıcı etkilerini uyguladığı ana mekanizma, özgül hedef genlerin ifadelerinin tetiklenmesidir (231, 232). Elde edilen protein ağının nasıl bu tepkileri tetiklediğini inceleyelim. (1) Hücre döngüsünün baskılanması: p53'ün merkezi işlevlerinden biri, DNA hasarına tepki olarak hücre döngüsünün durdurulmasına neden olmakta ve böylece bir sonraki kopyalama turundan önce hasarı onarmak için bir fırsat sağlamaktadır, böylece hasar gören DNA'nın çoğaltılması ve yavru hücrelere geçişi önlenecektir ve genomun bakım kolaylaşacaktır. Bu hücrel tepkiden sorumlu moleküler mekanizma p21 geninin yazılımsal uyarımını içerir. Bu genin ürünü olan p21 proteini, birkaç siklin-cdk karmaşımını baskılar ve hücre döngüsünü G1 ile S (ve G2 ile M) geçişlerinde duraklatmaya neden olur (233). Buna ek olarak, p21 aynı zamanda DNA sentezinde ve DNA onarımında rol oynayan bir protein olan PCNA'yı (proliferating cell nuclear antigen) bağlanır. P21 ile etkileşim, DNA tıpkıyapımında PCNA'nın rolünü engellese de DNA onarımında etki etmez (234). Bu nedenle, p21, hücre döngüsünde bir duraklama ve aynı zamanda DNA onarımına olanak sağlamak için p53'ün yeteneğini kolaylaştıran moleküler mekanizmanın önemli bir parçasıdır (235). Apoptoz: Birçok apoptoza aracılık eden genlerin ifadesi yazılımsal olarak doğrudan p53 ile düzenlenir. Hedefler arasında, sırasıyla dışsal ve içsel uyarılara karşılık gelen iki apoptotik yolda yer alan proteinleri kodlayan genler bulunur (110).

Genel olarak, apoptoz sırasında apoptozu teşvik eden proteinler olan pro-apoptotik proteinleri kodlayan genler tetiklenirken, apoptozu baskılayan proteinler olan anti-apoptotik proteinleri kodlayan genler baskılanır. Sitokrom c'nin salınmasına neden olan ve apoptozu etkinleştiren mitokondrial pro-apoptotik proteinler NOXA ve PUMA, tetiklenir (236). Ayrıca, p53, pro-apoptotik protein Bax'ın gen ifadesini tetikleyerek ve anti-apoptotik protein Bcl-2'nin ifadesini baskılayarak, Bcl-2 protein ailesi tarafından dengeyi apoptosise doğru ayarlar (237). Fas alması (FASR), apoptozu uyarmak için hücre dışı (ölüm) uyarılar alan zar geçişli bir almadır. Fas alması geninin ifadesi p53 tarafından tetiklenir. Apoptoz, p53'ün IGF-BP3 (insülin benzeri büyüme etmeni

bağlayıcı protein 3)'i tetiklemesi aracılığı ile hayatta kalma sinyalini baskılaması ile de tetiklenir. IGF-BP3, IGF-1 kendi almacına uyarı iletimini baskılar (238). Bu yolların birlikte etkinleşmesi tam apoptotik cevap için gereklidir. Apoptozu p53 ile tetiklemek için yazılımdan bağımsız mekanizmalar da mevcuttur. (2) DNA tamiri ve anjiyogenez: Örneğin, nükleotid çıkarma tamirinde yer alan XFC geni, özendirici bölgesinde bulunan bir p53 yanıt elemanı aracılığıyla p53 tarafından düzenlenir. Anjiyogenezin bir baskılayıcısı olan trombospondin de yazılımsal olarak p53 ile düzenlenir (229). Bu, ayrıca, p53'ün farklı biyolojik yanıtlarda bir yazılımsal düzenleyici rolü olduğunu desteklemektedir.

2.5.2.4. P53 Yolağındaki Mutasyonlar ve Kanser

Mutasyonların bölünen hücrelerde muhafaza edilmesi daha olası olduğundan p53 mutant hücreler genomik kararsızlık ile karakterizedirler, bu da tümör oluşumuna izin veren bir çevre sağlar (240). Tümör hücrelerinde bulunan p53 yolağı mutasyonlarının yüksek frekansı, muhtemelen tümör baskılanmasından kaçan mutant hücreleri tercih eden seçici baskının bir sonucudur. Bütün p53 mutasyonlarının %75'inden fazlasını yanlış anlamlı (missense) mutasyonlar oluşturur ve tek amino asit değişmesi ile sonuçlanır. Birçok mutant p53 molekülü yabancı tip p53 proteininden daha kararludur ve hücrelerde birikebilir (241). Yanlış anlamlı mutasyonların %90'ından fazlası DNA bağlama bölgesindedir (102-292 amino asitler) ve bunların %30'dan fazlası sadece altı kodonu etkiler, bu nedenle bu bölgeler "sıcak noktalar (hotspots) " olarak adlandırılırlar (241). P53 genindeki mutasyonlara ek olarak, p53 yolağına müdahale etmenin başka yolları da vardır. CHKL genindeki mutasyonlar gibi strese yanıt olarak p53'ün etkinleşmesine neden olan yolaklardaki kusurlar, p53 geninde mutasyon içermeyen kanser hücrelerinde belirlenmiştir (242). Bu durumlarda stres uyarısı, normal hücrelerde olduğu gibi fosforilasyon yoluyla p53'e iletilemez. Ayrıca, MDM2 proteinin aşırı ifadesi, p53'ün düzenlenmesini değiştirdiği ve bunun bir 'p53 inaktive' fenotipe yol açtığını göstermiştir (243). Bax ve FASR gibi aşağı akış efektörlerinin baskılanması yolağın düzenini bozar. P53 proteini birçok stres sinyali ve biyolojik tepkiyi almak ve bunları elde etmek için merkezi bir düğüm olduğundan, p53 yolağındaki bu aksaklıklardan bazıları p53 mutasyonu kadar şiddetli etkilere yol açmayabilir, ancak p53 etkinsizleşmesinin kısmi bir yönünü taklit edebilir ve tümör oluşumuna izin verebilir. Li-Fraumeni sendromu ağırlıklı olarak p53 geninin bir mutasyonu ile karakterize edilir ve geniş bir kanser çeşidine yatkınlığa neden olur (244). Bu otozomal

dominant bir hastalıktır, bu nedenle etkilenen bireyin mutasyonu sonraki nesile aktarma şansı %50'dir. Bu hastalar genel popülasyon ile karşılaştırıldığında 50 yaşından önce kanser gelişme riski 25 kat daha fazladır (245). Bireylerde genç yaşta kanser gelişimi ve birden fazla primer tümörün sıklıkla görülmesi sendromun karakteristik bir özelliğidir. Mutasyon taşıyan ailelerde görülen kanser türleri arasında sarkoma, meme kanseri, lösemi ve beyin tümörleri bulunmaktadır (246). Kanser birkaç kuşak boyunca erken yaşta gelişir. Mutasyona uğramış p53 geninin protein ürünü genomu korumak için işlev görmemektedir ve mutasyon birikimi karşı konulmaz hale gelir, nihayetinde tümör oluşumuna yol açar.

2.5.3. Bcl-2-Like Protein 11 (BIM)

Bu gen tarafından kodlanan protein, BCL-2 protein ailesine aittir. BCL-2 ailesi üyeleri hetero- veya homodimerler oluşturur ve çok çeşitli hücresel aktivitelerde yer alan anti-veya pro-apoptotik düzenleyiciler olarak görev yaparlar. Bu gen tarafından kodlanan protein, Bcl-2 homoloji alanı 3 (BH3) içerir. BCL-2 protein ailesinin diğer üyeleriyle etkileşime girdiği ve bir apoptotik etkinleştirici olarak hareket ettiği gösterilmiştir. Hücre türüne, apoptotik uyarıya ve kemoterapötik ajanlara bağlı olarak, birçok normal ve patolojik hücresel süreçlerin pro-apoptotik Bim proteini tarafından düzenlendiği bildirilmiştir. Yapılan çalışmalar, Bim proteinin meme kanseri de dahil olmak üzere birçok kanserin gelişiminde ve ilerlemesinde yer aldığını ortaya koymaktadır. Bu nedenle, Bim proteini hedeflenmiş kanser tedavisinde kullanılır. Birkaç kemoterapötik ajan, apoptotik hücre ölümünü tetiklemek üzere Bim proteinini hedef almaktadır. Bim'in baskılanması, kanserlerin artmış metastazı ve kemo direnci ile ilişkilendirilmiştir (13).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Çalışma örnekleri ve analiz yöntemi

Bu çalışmada kullanılan örnekler Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Arşivi'nden elde edildi. 57 hastanın meme kanseri dokuları ve komşu sağlıklı göğüs dokusu örnekleri çalışmaya dahil edildi. Bu parafine gömülü doku örnekleri, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Bölümü tarafından immünohistokimyasal yöntemle protein analizine tabi tutuldu. Bu çalışma Gaziantep Üniversitesi yerel etik komitesi tarafından numaralı etik kurul numarası ile onaylandı.

3.2. İmmünohistokimyasal Boyama

Patolojik incelemeler için hematoksilen eozin ile önceden boyanmış olan formalin ile sabitlenmiş parafine gömülü (FFPE) meme kanseri doku örnekleri tekrar incelendi. İmmünohistokimyasal boyama, DAKO Autostainer Evrensel Boyama Sistemi (Autostainer Link 48 DAKO, Glostrup, Danimarka) kullanılarak gerçekleştirildi. Kısaca, 4 µm kalınlığa sahip kesitler, pozitif yüklü mikroskop lamalarına alındı. Ksilol ile deparafinize edilmiş kesitler daha sonra etil alkol serilerinden geçirilerek dehidrasyon işlemine tabi tutuldu. Ardından, antijen geri kazanımı, termostatik banyoda (PT Link) 40 dakika boyunca 96 °C'de (10 mM sitrat tamponu, pH 6) gerçekleştirildi. Kesitler, 30 dakika boyunca 1/200 seyreltilmiş konsantrasyonda anti-p53, anti-SIAH1 ve anti-BIM antikorları ile tekrar inkübe edildi. Streptavidin-biotin immünperoksidaz tekniği (K8000 Envision Flex, DAKO, Glostrup, Danimarka) ile otomatik bir sistem kullanıldı. İmmünojenik reaksiyonlar, renkli görüntü sağlamak için diaminobenzidin tetraklorür (DAB) ile gösterildi. Kesitler, arka plan boyama için hematoksilen ile karşıt boyama işlemine tabi tutuldu. Kesitler ayrıca dehidrasyon için alkol serilerinden geçirildi ve ksilol ile berraklaştıktan sonra balsam ile kaplandı. Boyama sonrası kesitler iki farklı patolog tarafından, klinik bilgi göz önünde bulundurularak, ışık mikroskopisi (Olympus BX51, Tokyo, Japonya) altında 4, 10, 20 ve 40 büyütme ile incelendi. En yoğun nükleer boyama alanlarında en az 200 hücre sayılmıştır. % 5 boyama; "0", 5-10% boyama; "1", % 11-20 boyama; "2", % 20 boyama; "3" olarak skorlandı.

3.3. İstatiksel Analiz

Çalışmanın sonuçları SPSS ve GraphPad programlarını kullanarak istatistiksel olarak değerlendirildi. Tüm sonuçlar için $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



4. BULGULAR

Meme kanseri tanısı konulmuş toplam 57 kadın hastadaki bireysel özellikler Tablo 3.1’de gösterilmiştir. Çalışmaya dahil edilen hastaların yaş ortalaması $51,91 \pm 13,05$ idi. Bunlardan %32,8 45 yaş altı, % 51,7’si 45-65 yaş aralığında ve %15,5’i ise 65 yaş üstüdür. Meme kanseri alt türlerine göre bu hastaların %79,3’ü invaziv duktal karsinoma, %19’u invaziv lobüler karsinoma ve % 1,7’si ise mikst olarak adlandırılan invaziv duktal+lobular türüdür.

Tablo 4.1. Çalışmaya dahil edilen hastaların klinik özellikleri

Demografik veriler		n=58	% n
Yaş	<45 ($38,47 \pm 4,40$)	19	32,8
	45-65 ($53,66 \pm 5,52$)	30	51,7
	>65 ($74,44 \pm 6,44$)	9	15,5
Tanı	İnvaziv duktal	46	79,3
	İnvaziv lobüler	11	19,0
	İnvaziv duktal+lobüler	1	1,7
Evre	G1	5	8,6
	G2	21	36,2
	G3	20	34,5
	Bilinmiyor*	12	20,7
TNM	T		
	T1	11	19,0
	T2	33	56,9
	T3	12	20,7
	T4	1	1,7
	N		
	N0	20	34,5
	N1	13	22,4
	N2	13	22,4
	N3	11	19,0
	M		
	Mx	57	100,0

*İnvaziv duktal karsinomda evreleme bulunmamaktadır.

Hastaların histopatolojik evrelendirilmesine göre, % 8,6’sı evre 1, %36,2’si evre 2, %34,5’i ise evre 3’tür. Ayrıca bu hastaların %20,7’sinin histopatolojik evresi

bilinmemektedir. Meme kanseri evrelerinin tespit edilmesinde, uygun tanı ve tedavi yönteminin belirlenmesinde TNM oldukça önemlidir. Bu çalışmaya dahil edilen hastaların TNM sınıflandırılmasındaki her bir parametreye göre (T, N, M) hastaların frekansı belirlenmiştir. Hastaların ayrıntılı bilgileri Tablo 4.1’de gösterilmiştir.

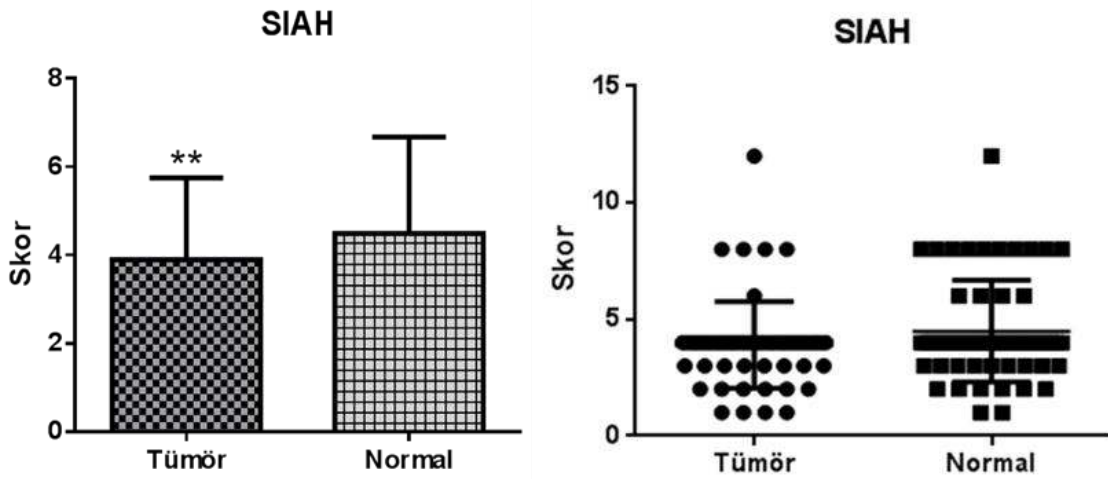
4.1. SIAH proteinin ifade seviyesinin meme kanseri hastalarında immunohistokimyasal olarak tespiti

SIAH proteinin immunohistokimyasal olarak meme kanseri hastalarından alınan normal ve tümörlü dokularında ifade seviyesi belirlenmiştir. Meme kanserinin çeşitli histopatolojik sınıflandırılmasına ve hastaların klinik ve demografik özelliklerine göre SIAH proteininin ifade seviyesini gösteren skora Tablo 4.2’de gösterilmiştir. Analiz sonrasında elde edilen sonuçlara göre, karşılaştırılan tüm parametrelere göre SIAH proteinin ifade seviyesinin normal dokuya kıyasla tümör dokularında düşük olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, invaziv duktal karsinomda SIAH proteinin ifade seviyesi normal dokulara kıyasla tümörlü dokuda anlamlı bir şekilde düşük olarak bulunmuştur. Bunun yanı sıra histopatolojik sınıflandırmada evre 2’de SIAH proteininin anlamlı olarak düşük olduğu gösterilmiştir.

Tablo 4.2. SIAH proteinin ifade seviyesinin çeşitli özelliklere göre gösterilmesi

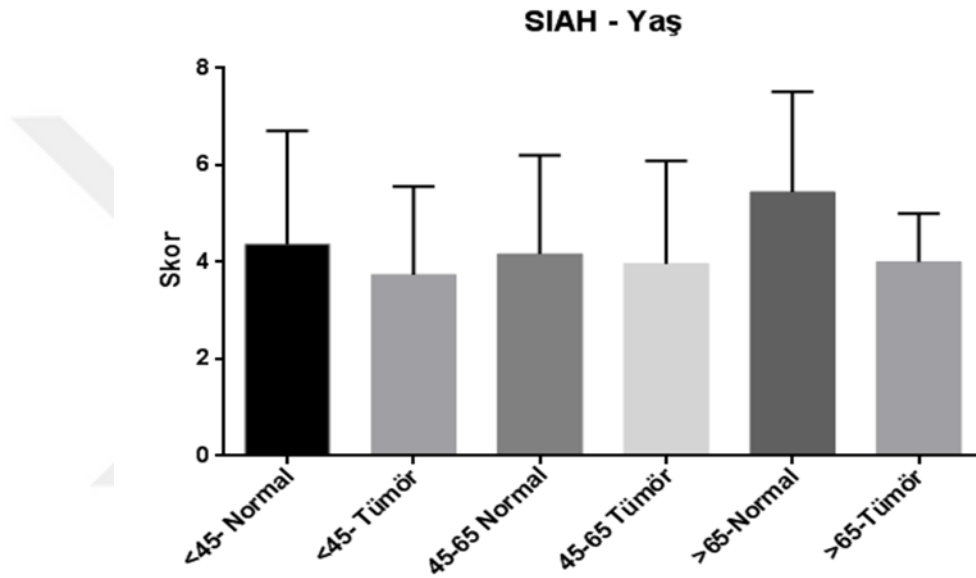
	Özellik	SIAH-normal	SIAH-tümör	P değeri	
Yaş	<45	4,36 ± 2,33	3,73 ± 1,82	0,175	
	45-65	4,16 ± 2,03	3,96 ± 2,12	0,415	
	>65	5,4 ± 2,06	4 ± 1	0,062	
Tanı	İnvaziv duktal	4,3 ± 2,02	3,69 ± 1,54	0,0271	
	İnvaziv lobüler	5 ± 2,75	4,72 ± 2,8	0,500	
	İnvaziv duktal+lobüler	4	4	1	
Evre	G1	4,6 ± 2,4	4 ± 2,34	0,5	
	G2	4,23 ± 1,57	3,19 ± 1,12	0,002	
	G3	4,3 ± 2,4	4,15 ± 1,63	0,769	
TNM	T	T1	4,63 ± 2,06	2,72 ± 1,55	0,001
		T2	4,51 ± 2,16	4,24 ± 1,83	0,403
		T3	3,83 ± 2,16	3,75 ± 1,65	0,999
		T4	3	3	1
	N	N0	4,4 ± 1,87	3,95 ± 1,60	0,300
		N1	5,23 ± 2,62	4,3 ± 2,59	0,031
		N2	4,23 ± 2,04	3,92 ± 1,49	0,562
		N3	3,45 ± 1,80	2,9 ± 1,13	0,25
	M	Mx	4,43 ± 2,15	3,89 ± 1,87	0,014

SIAH proteininin meme kanseri hastalarında normal dokuya kıyasla tümörlü dokuda anlamlı bir şekilde düşük ifade gösterdiği bulunmuştur (p=0,0078) (Şekil 4.1).



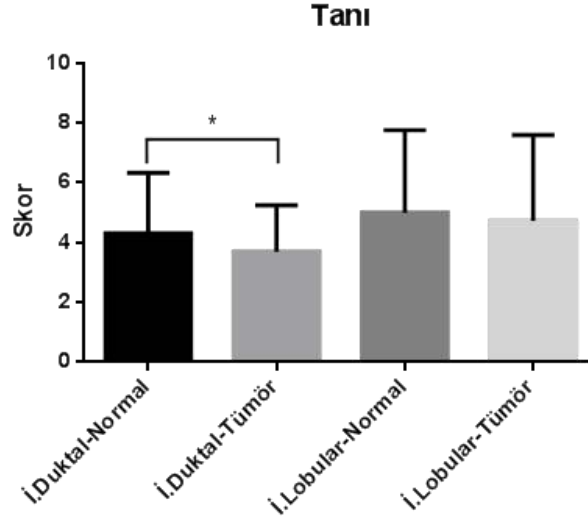
Şekil 4.1. SIAH proteinin meme kanserli hastaların normal ve tümör dokularında ifade seviyesi ** p=0,0078.

Bu çalışmada 58 meme kanseri tanısı konulmuş hastada SIAH proteinin ifade seviyesi belirlenmiştir. Şekil 4.2’de meme kanseri hastalarının yaşına göre (<45, 45-65, >65) SIAH proteinin ifade seviyesi gösterilmiştir. SIAH proteinin yaşa göre kıyaslandığında tümör dokularında düşük olduğu gösterilmiştir. Ancak ifade seviyesindeki bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bunun yanı sıra, 65 yaş üstü hastalarda SIAH proteinin ifade seviyesinin diğer yaş aralığındaki hastalara kıyasla daha yüksek olduğu gösterilmiştir.



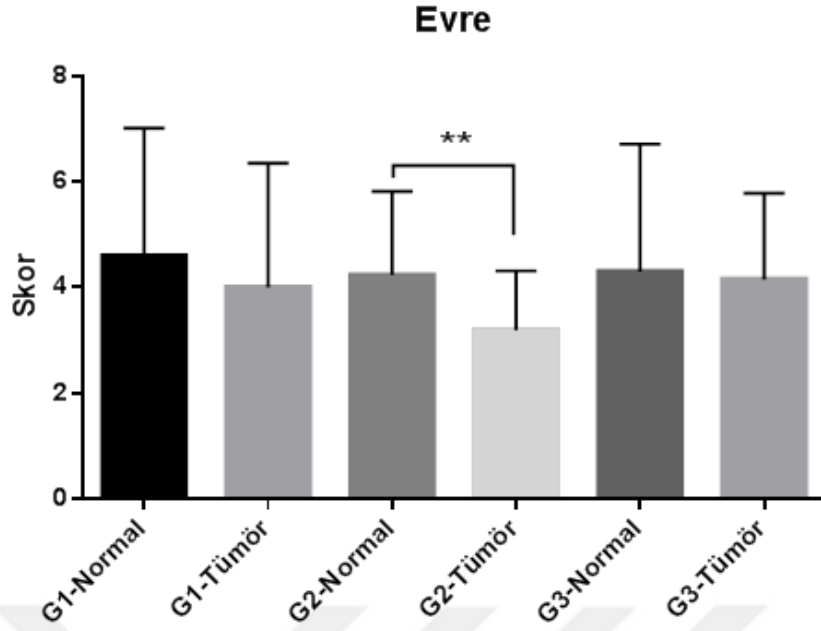
Şekil 4.2. Farklı yaş aralıklarına göre SIAH proteinin ifade seviyesi.

Meme kanseri hastalarının invaziv duktal ve lobular tipi olmasına göre SIAH proteinin ifade seviyesi gösterilmiştir. Buna göre, invaziv duktal karsinomda SIAH proteinin ifade seviyesinin tümör dokularında anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir. Buna ek olarak invaziv lobular karsinomda SIAH proteinin ifade seviyesinin düşük olduğu ancak bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($p=0,0271$) (Şekil 4.3). Mikst olarak adlandırılan invaziv duktal+lobular türünde sadece 1 hasta olduğundan istatistiksel olarak değerlendirilememiştir.



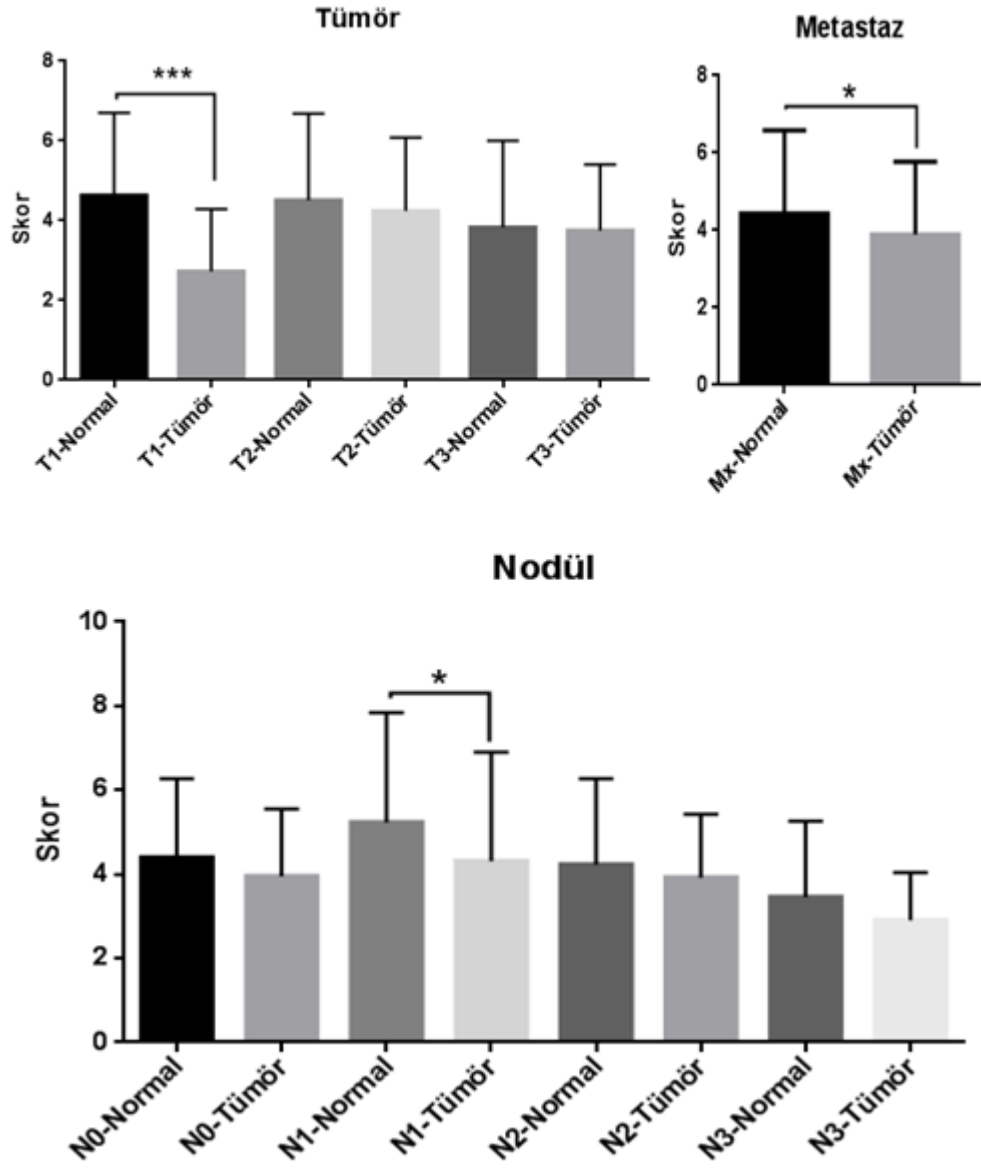
Şekil 4.3. Meme kanseri tanısına göre SIAH proteinin ifade seviyesi,* p=0,0271.

Hastaların histopatolojik derecelendirilmesine göre G1, G2 ve G3 evrelerindeki meme kanseri hastalarının normal dokuya göre tümör dokusunda SIAH proteinin ifade seviyesi gösterilmiştir (Şekil 4.4). Diğer klinik özelliklerde olduğu gibi histopatolojik derecelendirmede de SIAH proteinin ifade seviyesi tümör dokularında düşük olarak bulunmuştur. G1 ve G3 evrelerindeki hastalarda SIAH proteini ifade seviyesindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı değil iken G2 evredeki hastaların tümör dokusunda anlamlı bir düşüş olduğu bulunmuştur (p=0,002).



Şekil 4.4. Histopatolojik derecelendirmeye göre SIAH proteinin ifade seviyesi, ** p=0,002.

TNM evrelendirilmesinde tümör boyutu (T), nodül (N) ve metastaza (M) göre SIAH proteininin meme kanseri dokularında ifade seviyeleri değerlendirilmiştir (Şekil 4.5). Tümör boyutuna göre değerlendirildiğinde T1 grubundaki hastalarda SIAH proteinin ifade seviyesi normal dokulara kıyasla tümörlü dokularda anlamlı bir şekilde düşüş göstermektedir (p=0,001). Buna ek olarak, T2 ve T3 gibi diğer T evrelerinde SIAH proteinin ifade seviyesi normal dokuya göre tümör dokularında azalma göstermektedir. Ancak bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı değildir. T4 grubunda sadece 1 hasta olduğundan istatistiksel analiz yapılamamıştır. Diğer yandan nodüle (N) göre kıyaslandığında, N1 grubundaki hastaların normal dokularına kıyasla tümör dokularında SIAH proteinin ifade seviyesi anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p=0,0313). Buna karşın diğer N gruplarındaki düşük ifade seviyesi istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Şekil 4.5. TNM evrelendirilmesine göre SIAH proteinin ifade seviyesi.

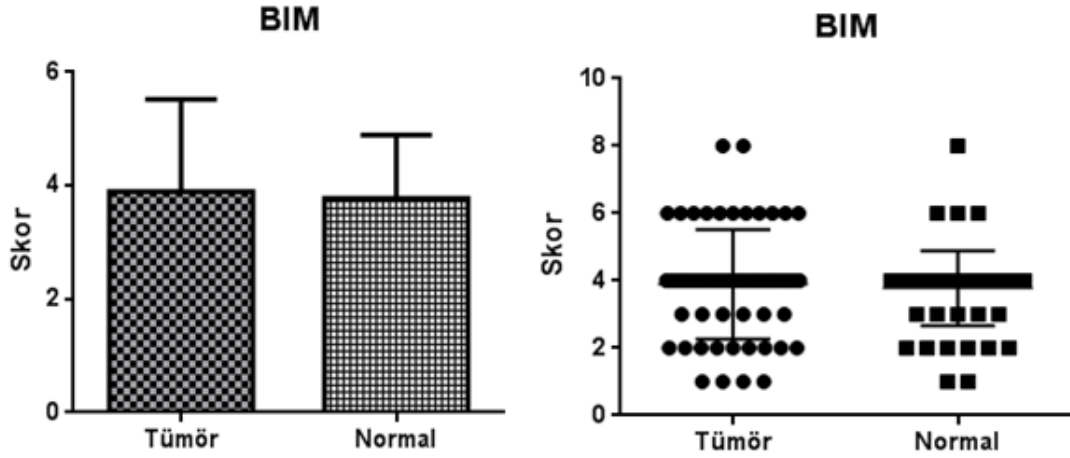
4.2. BIM proteini ifade seviyesinin meme kanseri hastalarında immunohistokimyasal olarak tespiti

BIM proteini immunohistokimyasal olarak meme kanseri hastalarından alınan normal ve tümörlü dokularında ifade seviyesi belirlenmiştir. Meme kanserinin çeşitli histopatolojik sınıflandırılmasına ve hastaların klinik ve demografik özelliklerine göre BIM proteininin ifade seviyesini gösteren skorlama Tablo 4.3’de gösterilmiştir. Analiz sonrasında elde edilen sonuçlara göre, BIM proteinin ifade seviyesinin normal dokuya kıyasla tümör dokularında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. TNM evrelendirilmesinde N0 grubundaki hastalarda BIM proteininin ifade seviyesi normal dokulara kıyasla tümör dokularında anlamlı bir şekilde artış göstermiştir.

Tablo 4.3. BIM proteinin ifade seviyesinin çeşitli özelliklere göre gösterilmesi

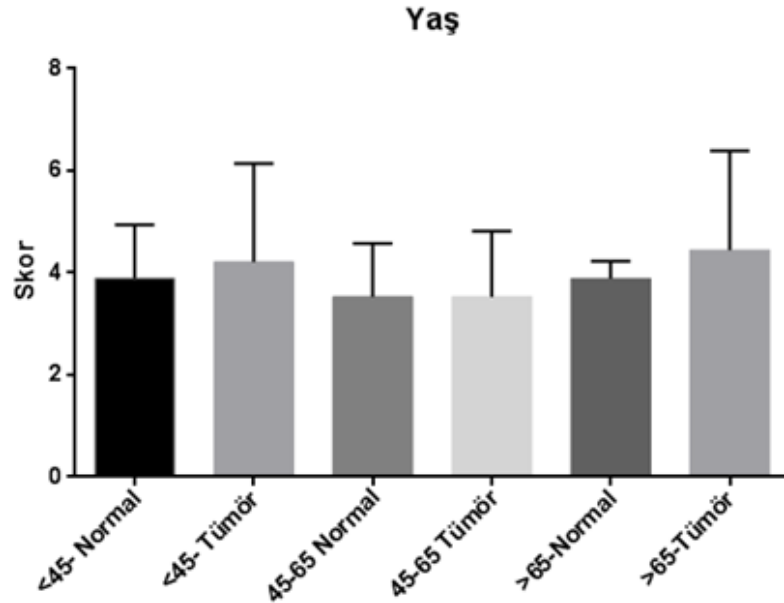
	Özellik		BIM-normal	BIM-tümör	P değeri
Yaş	<45		3,89 ± 1,04	4,21 ± 1,93	0,354
	45-65		3,53 ± 1,04	3,53 ± 1,27	0,843
	>65		3,88 ± 0,33	4,44 ± 1,94	0,500
Tanı	İnvaziv duktal		3,67 ± 0,99	3,89 ± 1,74	0,220
	İnvaziv lobüler		3,81 ± 0,98	3,90 ± 1,30	0,999
	İnvaziv duktal+lobüler		4	4	1
Evre	G1		4,6 ± 1,34	4,2 ± 1,78	0,500
	G2		3,52 ± 1,03	3,85 ± 1,55	0,101
	G3		3,6 ± 0,75	3,85 ± 1,98	0,591
TNM	T	T1	3,81 ± 1,07	4,09 ± 1,70	0,625
		T2	3,66 ± 0,957	3,91 ± 1,54	0,229
		T3	3,58 ± 1,92	3,5 ± 0,79	0,999
		T4	3	4	1
	N	N0	3,5 ± 0,94	4,3 ± 1,89	0,0156
		N1	4,16 ± 0,98	4 ± 1,35	0,750
		N2	3,69 ± 0,85	3,54 ± 1,56	0,812
		N3	3,36 ± 0,81	3,27 ± 1,42	0,999
	M	Mx	3,71 ± 0,97	3,89 ± 1,64	0,178

BIM proteininin meme kanseri hastalarında normal ve tümörlü dokular arasında herhangi anlamlı bir farklılık bulunamamıştır (p>0,05) (Şekil 4.5).



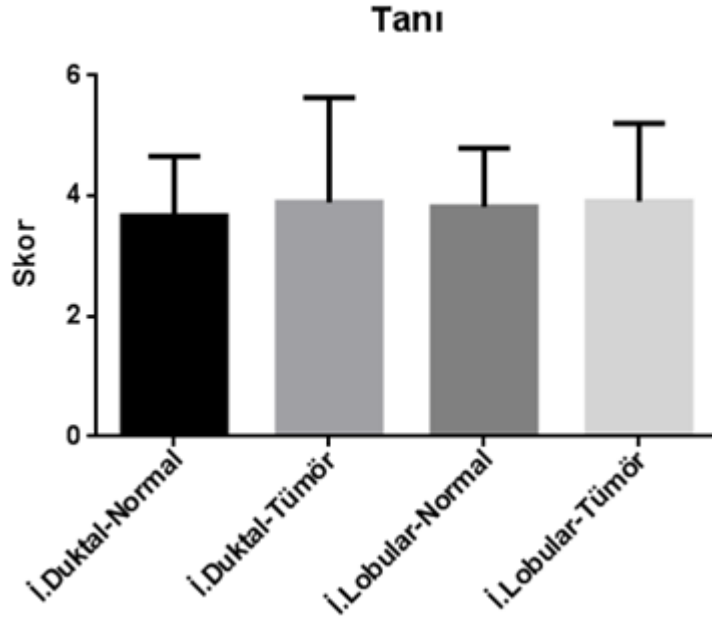
Şekil 4.6. BIM proteinin meme kanserli hastaların normal ve tümör dokularında ifade seviyesi.

Meme kanseri hastalarının yaşına göre BIM proteinin ifade seviyesi gösterilmiştir (Şekil 4.7). BIM proteinin yaşa göre kıyaslandığında tümör dokularında normal dokuya göre farklı yaş aralıklarında değişiklik göstermektedir. BIM proteinin ifade seviyesi farklı yaş aralıklarında normal dokuya göre tümör dokularında artmaktadır. Ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir.



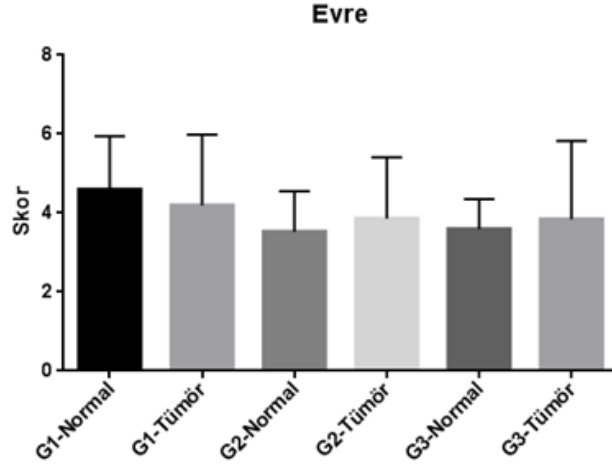
Şekil 4.7. Farklı yaş aralıklarına göre BIM proteinin ifade seviyesi.

BIM proteinin ifade seviyesi meme kanseri hastalarının invaziv duktal ve lobular tipi olmasına göre Şekil 4.8’de gösterilmiştir. İnvaziv duktal ve lobular karsinomlarında BIM proteini ifade seviyesi normal dokuya göre tümör dokularında artış göstermektedir. Bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).

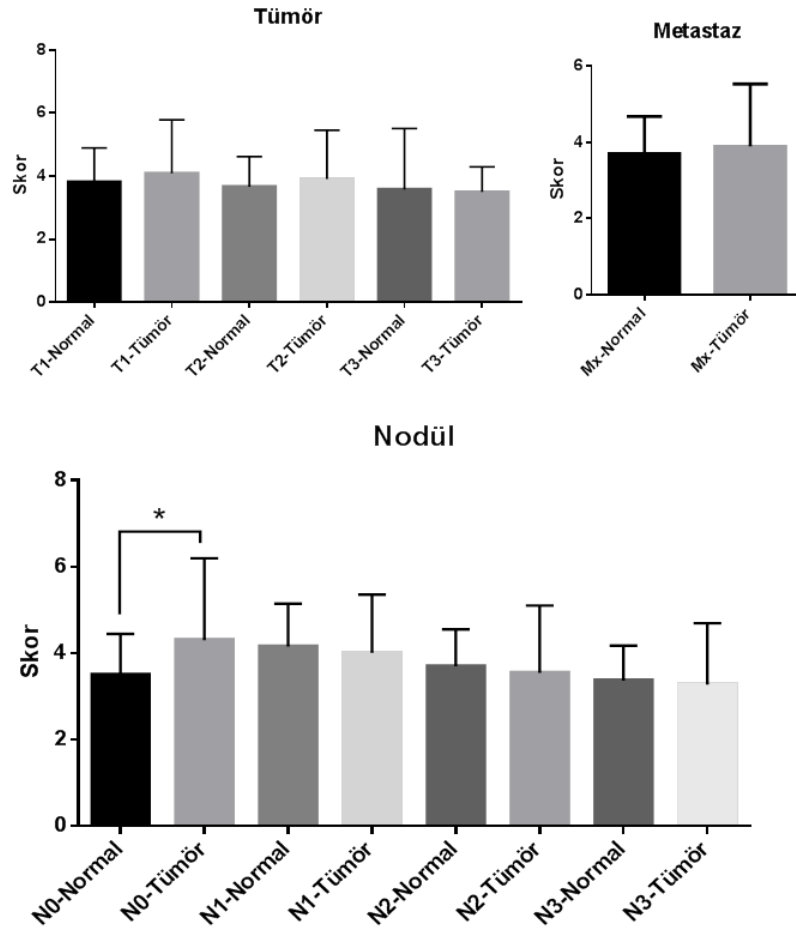


Şekil 4.8. Meme kanseri tanısına göre BIM proteinin ifade seviyesi.

Meme kanseri hastalarının histopatolojik derecelendirilmesine göre G1, G2 ve G3 evrelerindeki BIM proteini ifade seviyesi normal ve tümör dokularında gösterilmiştir (Şekil 4.9). G1 grubunda BIM proteininin ifade seviyesi normal dokuya kıyasla tümör dokularında artış göstermektedir. Ama bu değişim istatistiksel olarak anlamlı değildir. Buna karşın G2 ve G3 gruplarında BIM proteini ifade seviyesi normal dokulara karşın tümör dokularında artmaktadır. Yalnız bu değişim istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).



Şekil 4.9. Histopatolojik derecelendirmeye göre BIM proteinin ifade seviyesi.



Şekil 4.10. TNM evrelendirilmesine göre BIM proteinin ifade seviyesi.

Meme kanseri dokularında TNM evrelendirilmesine göre BIM proteinin ifade seviyesi Şekil 4.10’da gösterilmiştir. Tümör boyutuna göre analiz edildiğinde, bütün T gruplarında BIM proteini ifade seviyesinde anlamlı bir değişim bulunamamıştır. Bunun yanı sıra, nodüle göre kıyaslandığında N0 grubunda BIM proteinin ifade seviyesi normal dokulara göre tümör dokularda artış göstermektedir ($p=0,0156$). Ancak, N1, N2 ve N3 gibi diğer nodül gruplarında anlamlı bir değişim yoktur.

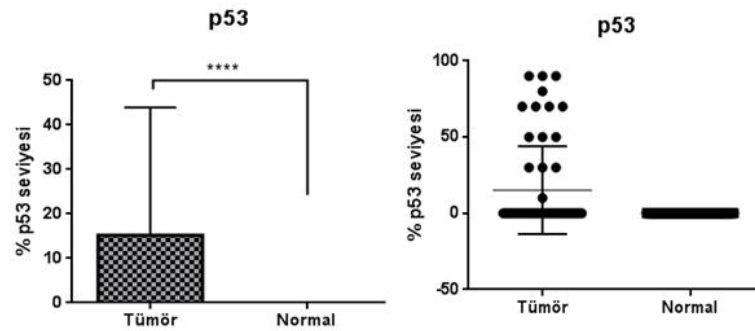
4.3. p53 proteinin ifade seviyesinin meme kanseri hastalarında immunohistokimyasal olarak tespit edilmesi

Toplamda 58 meme kanserli kadından alınan normal ve tümörlü dokuda p53 proteinin ifade seviyesi immunohistokimyasal olarak belirlenmiştir. Meme kanserinin çeşitli histopatolojik sınıflandırılmasına ve hastaların klinik ve demografik özelliklerine göre p53 proteininin ifade seviyesini gösteren skora Tablo 4.4’de gösterilmiştir. Elde edilen bulgulara göre, tümör baskılayıcı bir protein olan p53 proteinin ifade seviyesi normal meme dokularına tümör dokularında anlamlı derecede artış göstermektedir ($p<0,0001$). Bunun yanı sıra, farklı yaş aralığında, tanı çeşidinde, histopatolojik sınıflandırmada ve farklı TNM evrelerinde p53 proteinin ifade seviyesinin normal dokuya kıyasla tümör dokularında ciddi bir şekilde artış gösterdiği bulunmuştur.

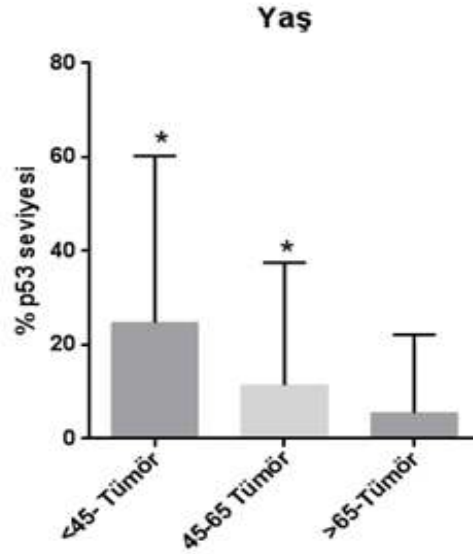
Tablo 4.4. p53 proteinin ifade seviyesinin çeşitli özelliklere göre gösterilmesi

	Özellik	P53-normal	P53-tümör	P değeri	
Yaş	<45	0	24,73 ± 35,49	0,0156	
	45-65	0	11,37 ± 26,14	0,0313	
	>65	0	5,5 ± 16,6	0,999	
Tanı	İnvaziv duktal	0	18,89 ± 31,49	0,0001	
	İnvaziv lobüler	0	0	1	
	İnvaziv duktal+lobüler	0	0	1	
Evre	G1	0	0	1	
	G2	0	9 ± 21,98	0,125	
	G3	0	33,5 ± 37,31	0,002	
TNM	T	T1	0	7,27 ± 16,78	0,500
		T2	0	16,56 ± 31,68	0,0078
		T3	0	20 ± 32,47	0,125
		T4	0	0	1
	N	N0	0	15,26 ± 31,55	0,125
		N1	0	14,61 ± 28,17	0,125
		N2	0	19,23 ± 31,21	0,0625
		N3	0	10,9 ± 24,67	0,500
	M	Mx	0	15,17 ± 28,97	<0,0001

Meme kanseri hastalarından alınan dokulardan 43 tanesinde p53 proteini saptanamamıştır. Bunun yanı sıra, 14 hastada p53 proteini pozitif olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmaya dahil edilen hastaların yaklaşık %24'ünde p53 proteinin saptanırken yaklaşık % 75'inde p53 proteini saptanamamıştır. Ayrıca, yapılan istatistiksel analizler neticesinde meme kanserli hastalarda normal dokulara kıyasla tümörlü meme dokularında p53 proteininin ifade seviyesi anlamlı olarak artış göstermiştir ($p<0,0001$) (Şekil 4.11).

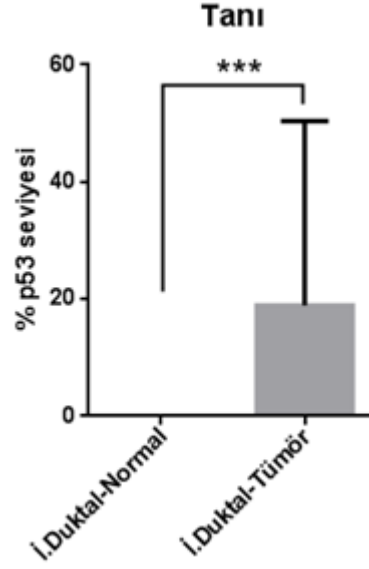
**Şekil 4.11.** p53 proteinin meme kanserli hastaların normal ve tümör dokularında ifade seviyesi.

Bu çalışmada kullanılan arşiv dokularından alınan 58 meme kanserli hastaların yaş aralığına göre p53 proteini ifade seviyesi Şekil 4.12’de gösterilmiştir. Kırk beş yaş altı ve 45-65 yaş aralığındaki hastalarda normal dokuya nispeten tümör dokusunda p53 proteini ifade seviyesi istatistiksel olarak anlamlı olarak bulunmuştur. Ancak 65 yaş üstü hastalarda ise normal dokuya kıyasla tümör dokusunda anlamlı bir artış yoktur. Bunun yanı sıra, yaş ilerledikçe p53 proteinin ifade seviyesinde azalma görülmüştür.



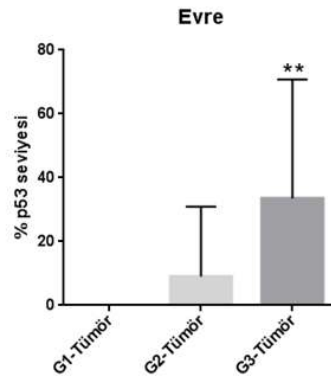
Şekil 4.12. Farklı yaş aralıklarına göre p53 proteinin ifade seviyesi, * $p<0,05$. Normal dokularda p53 proteini bulunamadığından grafikte gösterilmemiştir.

Meme kanserinin tanı türlerine göre invaziv duktal karsinomda normal dokuya kıyasla tümör dokularında p53 proteinin ifade seviyesi anlamlı derecede artış göstermiştir ($p=0,0001$) (Şekil 4.13). Ancak, invaziv lobular karsinomda normal ve tümörlü meme dokularında p53 proteini saptanamamıştır.



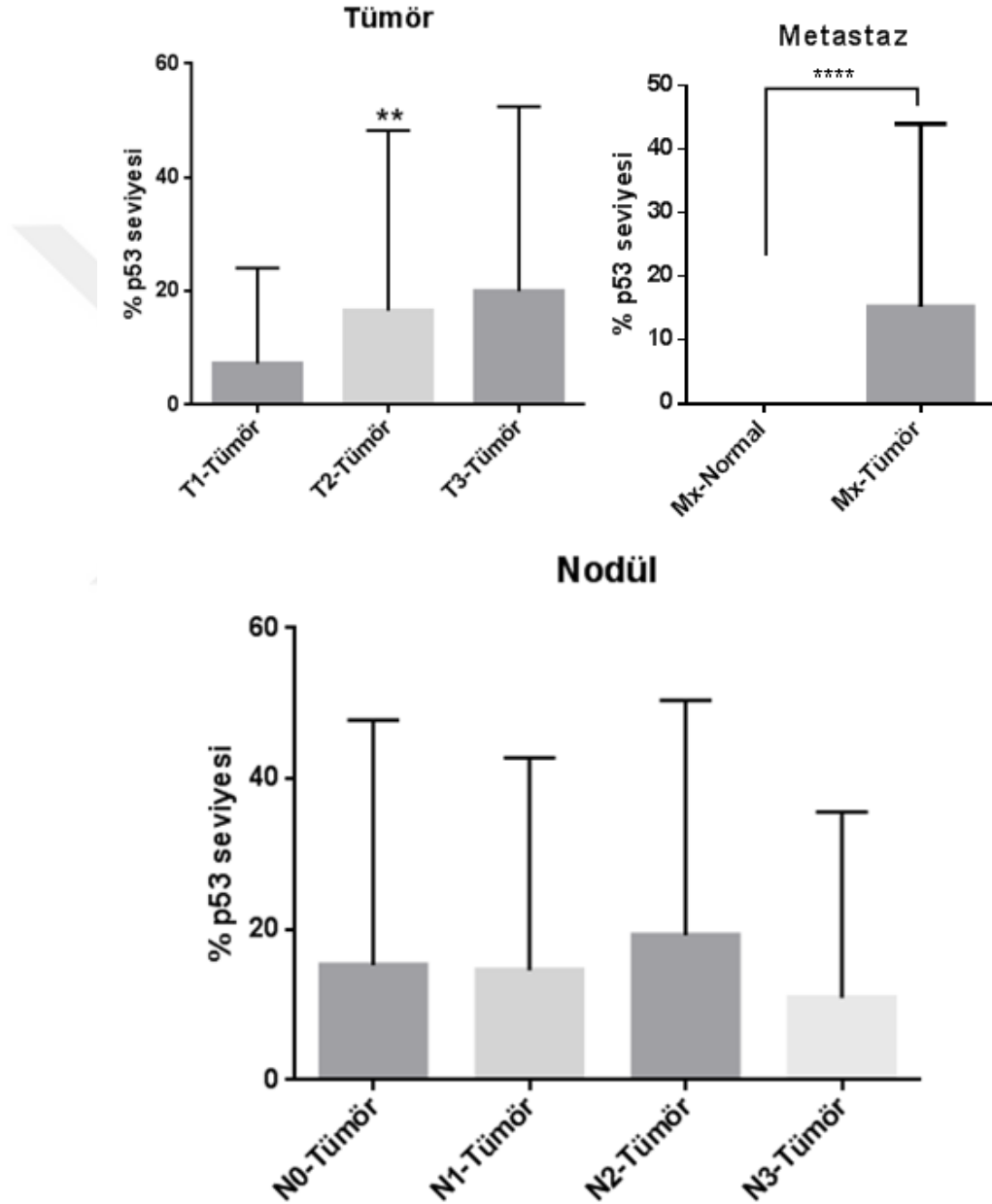
Şekil 4.13. Meme kanseri alt türü olan invaziv duktal karsinomda p53 proteinin ifade seviyesi. *** $p=0,0001$. İnvaziv lobular türünde p53 proteini bulunamadığından grafikte gösterilmemiştir.

Meme kanseri hastalarının histopatolojik derecelendirilmesine göre G1, G2 ve G3 evrelerindeki p53 proteinin ifade seviyesi normal ve tümör dokularında gösterilmiştir (Şekil 4.14). G1 grubundaki hastaların normal dokularının yanı sıra tümör dokularında da p53 proteini saptanamamıştır. Bunun aksine, G2 ve G3 grubundaki hastaların tümör dokularında p53 proteininin ifade seviyesinin anlamlı derecede artış gösterdiği bulunmuştur. Histopatolojik derecelendirmede en yüksek p53 ifadesi G3 grubunda bulunurken G1 grubunda p53 proteini saptanamamıştır.



Şekil 4.14. Histopatolojik derecelendirmeye göre BIM proteinin ifade seviyesi.

Meme kanseri dokularında TNM evrelendirilmesine göre p53 proteinini ifade seviyesi Şekil 4.15'te gösterilmiştir. Tümör boyutuna göre analizler yapıldığında T2 grubundaki hastaların tümör dokularında p53 proteinin ifade seviyesi bu hastaların normal dokularına kıyasla anlamlı bir şekilde yüksek olarak bulunmuştur ($p=0,0078$). Ancak T1 ve T2 gruplarındaki p53 proteinin ifade seviyesi normal dokuya göre artış gösterirken bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir.

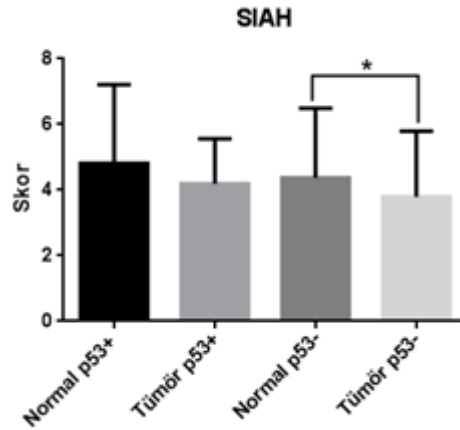


Şekil 4.15. TNM evrelendirilmesine göre p53 proteinin ifade seviyesi. ** $p=0,0078$, **** $p<0,0001$.

Diğer yandan nodül grubunda ise normal dokuya göre tümör dokularında p53 proteinin ifade seviyesi yüksek olarak bulunmuştur. Ama bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı değildir.

4.4. Meme kanseri dokularında p53 durumuna göre SIAH ve BIM proteinlerinin ifade seviyeleri

Çalışmada kullanılan meme kanseri arşiv dokularındaki SIAH, BIM ve p53 proteinlerinin ifade seviyeleri klinik ve demografik özelliklere göre detaylı şekilde açıklanmıştır. P53 pozitif veya negatif olma duruma göre SIAH ve BIM proteinlerinin ifade seviyelerindeki değişimler sırasıyla Şekil 4.16 ve 4.17’de gösterilmiştir.

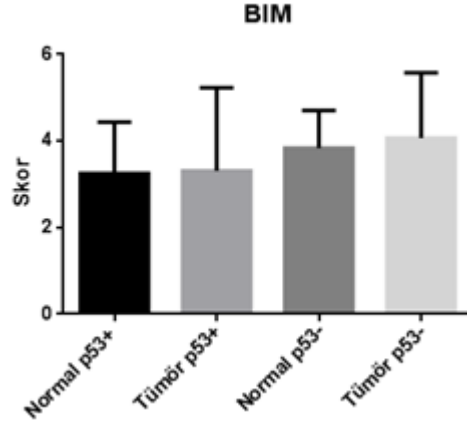


Şekil 4.16. P53 durumuna göre meme kanseri dokularında SIAH proteininin ifade seviyesi. *p=0,0134.

SIAH proteini p53 proteininin pozitif veya negatif olma duruma göre değişim göstermektedir. Her iki durumda da SIAH proteini ifade seviyesi normal ile karşılaştırıldığında tümör dokularda düşük olarak bulunmuştur. Ancak p53 negatif olan hastalardaki SIAH proteininin ifade seviyesindeki düşüş istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0,0134). Bunun yanı sıra, tümör dokularında p53 pozitif ve negatif kendi aralarında karşılaştırıldığında p53 negatif olan hastalarda SIAH proteinin ifade seviyesi azalmıştır (p>0,05).

BIM proteini ifade seviyesi p53 proteinin durumuna göre değişim göstermektedir. P53 pozitif olan hastalarda BIM proteinin ifade seviyesi artmıştır. Benzer olarak p53 negatif

olan hastalarda bu protein ifade seviyesi artış göstermektedir. Ancak bu ifade değişimleri istatistiksel olarak anlamlı değildir. Ek olarak, tümör dokularında p53 pozitif ve negatif kendi aralarında karşılaştırıldığında p53 negatif olan hastalarda BIM proteinin ifade seviyesi artış göstermektedir ($p>0,05$).



Şekil 4.17. P53 durumuna göre meme kanseri dokularında BIM proteininin ifade seviyesi.

5. TARTIŞMA

Meme kanseri, kadınlarda kansere bağlı ölümlerin dünyadaki en önde gelen nedenidir ve yılda 1.3 milyon vaka ve yaklaşık 500.000 ölümle sonuçlanır (20). Prognostik ve terapötik nedenlerden ötürü kadın meme kanseri, östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) alt tipi HER2'nin ifadesine bağlı olarak sınıflandırılmaktadır (247). Meme kanserlerinin sınıflandırılmasında kullanılan daha farklılaşmış bir yaklaşım, tümör derecelendirmesidir (247). Bu nedenle onkologlar, luminal A (düşük dereceli, ER-pozitif), luminal B (yüksek dereceli, ER-pozitif), HER2-aşırı ifade eden meme kanseri, TNBC (ER, PR, HER2'den yoksun üçlü negatif meme kanseri) , normal göğüs benzeri tümörler ve claudin-low (hücre adezyon moleküllerini düşük ifade eden üçlü negatif invaziv duktal karsinomalar) olarak sınıflandırmaktadırlar (247). Tüm meme kanserlerinin yaklaşık % 70'ini temsil eden ER-pozitif meme kanseri, östrojene bağımlı olarak büyür ve bu nedenle anti-östrojenlerle, örneğin ER antagonistleri 4-hidroksitamoksifen ve raloksifen ile tedaviye cevap verir (247). ER-, PR- ve HER2-negatif üçlü negatif meme kanserlerinin halen etkin bir şekilde tedavi edilememektedir. Dolayısıyla meme kanseri alt tiplerine özgü etkin tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için ifade profillerinin detaylı olarak çalışılmasına ihtiyaç vardır (247).

Normal hücrelerde apoptoz kanser gelişimine karşı doğal bir savunma mekanizması olarak kabul edilmektedir ve kanser hücrelerinin apoptoza karşı gösterdiği direnç kanserin en önemli ayırt edici özelliklerinden biri olarak gösterilmektedir. Dolayısıyla, hâlihazırda kullanılan kanser tedavi yöntemlerinin temelini apoptozun kanser hücrelerinde tetiklenmesi oluşturmaktadır. Moleküler olarak kanser, hücre çoğalması, ölümü ve farklılaşması gibi hayati öneme sahip hücresel faaliyetlerin yürütülmesinde ve düzenlenmesinde rol oynayan genlerde meydana gelen bir seri mutasyonlar ve/veya bozukluklardan kaynaklanmaktadır. Kanser oluşumunda rol oynamayan bu genler genel olarak tümör baskılayıcı genler ve onkogenler olarak bilinmektedir (248).

Yaptığımız bu tez çalışmasında apoptozda önemli rolleri olan SIAH1, BIM ve P53 proteinlerinin meme kanseri gelişimindeki rollerini ortaya koymayı amaçladık.

Çalışmamıza toplamda meme kanseri tanısı almış 57 hasta dâhil edilmiştir. Kontrol olarak hastaların sağlıklı dokuları kullanılmıştır. Protein ifade seviyeleri immünohistokimyasal boyama yöntemi ile belirlenmiştir. Sonuçlarımız SIAH1, BIM ve P53 proteinlerinin anlamlı bir şekilde meme kanseri dokularında ayırt edici bir şekilde ifade edildiğinin göstermiştir. Meme kanseri hastalarının tümörlü dokularında SIAH1 protein ifade seviyesi anlamlı olarak düştüğü saptanmıştır ($p=0,0078$). Buna ek olarak, BIM proteininin ifade seviyesinde meme kanseri hastalarında normal ve tümörlü dokular arasında herhangi anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p>0,05$). Ayrıca, p53 ifade seviyesinin meme kanseri hastaların tümörlü dokularında anlamlı olarak arttığı bulunmuştur ($p<0,0001$). Ancak, çalışmaya dâhil edilen hastaların yaklaşık % 24'ünde p53 proteini saptanırken, yaklaşık % 75'inde p53 proteini saptanamamıştır.

Hücreler büyümek ve hayatta kalmak için, proteinlerin aşırı birikimini ve dengesiz bir şekilde ortadan kaldırılmasını önlemelidirler. Proteinlerin proteine çevrim sonrasında poli-ubikitin zincirleri ile işlenmesi proteazom olarak adlandırılan çoklu proteaz karmaşımı vasıtasıyla hücre içi bozunumunu teşvik eder. Bu ubikuitin-proteazom sisteminin (UPS) hassas kontrolü, hasarlı, gereksiz, yanlış katlanmış ve potansiyel olarak zararlı proteinlerin ortadan kaldırılmasını sağlar. Farklı faaliyetlere sahip üç enzim sınıfı, UPS 'nin işlevlerini belirler. Bunlar, E1 ubikitin aktive edici enzim, E2 ubikitin konjugazlar ve E3 ubikitin ligazlar olarak sıralanmaktadır. *Drosophila melanogaster* Seven-in-Absentia (Sina) protein'inin, memeli ortologları olan SIAH1 ve SIAH2 güçlü E3 halka parmak ubikitin ligazlardırlar. Hücre döngüsü, apoptoz ve DNA tamiri gibi önemli biyolojik süreçlerde görev alan hedef proteinlerin ubikitinilasyon ve sonrasında proteazomal bozunmasına aracılık ederler. SIAH1 ve SIAH2 ortak hedefleri tanımlarına rağmen, özgül hedeflerinin olduğu da saptanmıştır. SIAH1 ve SIAH2'nin her ikisinin de, tümör baskılayıcı ve yazılım etmeni olan p53 tarafından tetiklenebilir olsa da, cinsiyet hormonları ve sitokin sinyalleri sadece SIAH2'nin düzenlenmesine katkıda bulunur (247).

Tümör baskılayıcı p53 proteini, DNA eşlenmesi sırasında oluşan strese ve DNA hasarına karşı hücresel cevabın en önemli düzenleyicilerindendir. İlk olarak 1996 yılında, fare SIAH1 proteininin fare miyeloid lösemi hücrelerinde p53 ile indüklenebilir olduğu gösterilmiştir. Ayrıca p53, SIAH proteinleri ve HIPK2 (serine/threonine kinase hypoxia-inducible protein kinase-2) arasında bir ilişkinin olduğu saptanmıştır. HIPK2

tümör baskılayıcı p53'ü etkinleştirir ve hızla büyüyen kati tümörlerde sıklıkla görülen oksijen yoksunluğunu takiben hipoksik gen ifadesini kısıtlar. Ayrıca, SIAH proteinleri, DNA hasarına neden olan hücrel stres koşullarında da etkin rol oynamaktadırlar. DNA hasar sensörü kinazları olan ATM (Ataxia telangiectasia mutated) ve ATR (ATM-related)'nin SIAH1'i fosforile ettiği bilinmektedir. Bu proteine çevrim sonrası düzenleme HIPK2'nin SIAH1-HIPK2 karmaşımından ayrılmaktadır.

Öte yandan, insan meme kanseri hücrelerinde SIAH1 ve daha uzun izoformu olan SIAH1L'nin radyo-duyarlılığı arttırdığı bulunmuştur. RNAi yöntemi kullanılarak yabancı tip p53 ifade eden MCF7 meme kanseri hücrelerinde SIAH1'in susturulması ve mutant p53 ifade eden SKBR3 meme kanseri hücrelerinde aşırı ifade edilmesi SIAH1'in ışınlama sonrasında DNA çift iplik tamirini ve bu kanser hücrelerinin sağ kalımını azalttığını ortaya koymuştur. Ayrıca, bu etkinin sağlanmasında SIAH1'in bozulmamış halka (RING) parmak bölgesinin gerekliliği ortaya konulmuştur (17, 247). Bu veriler, SIAH1'in stres direncini düşürdüğünü gösterirken, Siah1a ve/veya Siah2 genlerinden yoksun olan sıçan embriyonik fibroblastlar (MEF'ler)'da radyasyona ve klinik olarak etken olan etoposid ve doksorubisin gibi DNA'ya zarar veren ilaçlara karşı önemli ölçüde bir farklılık gözlemlenmemiştir. SIAH proteinleri ayrıca p53-bağımlı uyarı iletiminin epigenetik düzenlenmesinde de rol oynamaktadırlar. Histon deasetilazlar (HDAC) ve histon asetiltransferazlar (HATs), p53'ü kontrol eden epigenetik düzenleyicilerdir. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda, SIAH1 ve SIAH2'nin CBP ve p300 HAT proteinlerinin kararlılığını kontrol ettiği gösterilmiştir (247). Sonuç olarak yapılan çalışmalar SIAH proteinlerinin p53 aracılı uyarı iletiminde rol oynadığını göstermiştir.

Meme kanserli hastalarda yapılan daha önceki çalışmalarda 16q12-q13 kromozomal bölgede yerleşik olan SIAH1 genin sıklıkla silindiği saptanmıştır. Bir başka çalışmada, 5 meme kanseri hücre hattından 4'ünde SIAH1 ve uzun varyantı SIAH1L'nin mRNA'sı saptanamamıştır. Ayrıca, yapılan başka bir çalışmada SIAH1'in meme kanseri hücre hatlarında aşırı ifade edilmesi BIM ve JNK sinyal yolağının etkinleşmesi yoluyla hücreleri apoptoza götürdüğü rapor edilmiştir. Ayrıca, SIAH1 ifadesinin meme kanserli hücre hatlarında baskılanması ERK sinyal yolunun etkinleşmesi aracılığıyla hücre istilasını arttırdığı bildirilmiştir (14). Buna ek olarak bir başka çalışmada, 231 meme kanseri hastasının tümörlü dokularında immünohistokimyasal boyama yöntemi ile

SIAH1 ve BIM proteinlerinin ifade seviyeleri analiz edilmiş ve bu iki proteinin ifade seviyesi anlamlı olarak düşük olduğu bulunmuştur. Bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde SIAH1'in BIM aracılığıyla apoptozu tetiklediği görülmektedir. Ayrıca, daha öncede bahsettiğimiz gibi SIAH1 ifadesi p53 aracılığıyla tetiklenmektedir (15).

Öte yandan, Bruzzoni-Giovanelli ve arkadaşları yaptıkları çalışmada meme kanseri hücrelerinde artmış SIAH1 ifade seviyesinin mitoz ve mayozun normal ilerlemesiyle ilişkili bir chromokinesin proteini olan Kid (KIF22) proteinin yıkımını ubiquitin proteazom yolağı ile tetiklediğini ortaya koymuşlardır. Bunun için meme kanseri hücre hatlarına SIAH1'in kalıcı olarak ifade edilmesi sağlanmış ve Kid/KIF22 protein seviyesinin önemli derecede azaldığı bildirilmiştir (249). Bu bulguları destekler bir şekilde başka bir çalışmada meme kanseri hastaların beyin metastazı dokularında birincil meme kanseri tümörlerine kıyasla SIAH1 ifade seviyesinin düşük olduğu saptanmıştır (250). Confalonieri ve arkadaşlarının yaptıkları başka bir çalışmada, düşük SIAH1 ve SIAH2 seviyelerinin azalmış hastalısız sağ kalım olasılığı ile ilişkilendirilmiştir (251).

Öte yandan yapılan çalışmalar birçok SIAH1 hedef proteinin meme kanseri gelişimini teşvik ettiği rapor edilmiştir. Reseptör olmayan tirozin kinaz ACK1/TNK2, transkripsiyon faktörü TCF/LEF, α -tubulin, KID/KIF22 ve BIM bunlardan bazılarıdır. SIAH1 ve SIAH2'nin ACK1'i hedefleyerek proteozomal yıkıma götürdükleri rapor edilmiştir. Yapılan bir çalışmada sıçan meme kanseri metastaz modelinde ACK1'in aşırı ifadesinin farelerin mortalitesinde artışa neden olduğunu bildirmişlerdir. ACK1, EGFR ve protein kinaz B (PKB/AKT) sinyalini de içeren onkogenik sinyal yollarının etkinleşmesi ile insan meme kanseri hücrelerinin çoğalmasını, ilerlemesini ve istilasını arttırmaktadır. Ayrıca, SIAH1 ve ACK1'in tümör kaynaklı meme kanseri hücrelerinin istila yeteneğini antagonistik olarak düzenlediğine dair kanıtlar vardır (247). Başka bir araştırmada, meme kanseri hücrelerinde SIAH1 ve SIAH1L'nin β -catenin ile ilişki olan TCF/LEF transkripsiyon faktörünün etkinliğini azalttığı rapor edilmiştir. TCF/LEF'nin β -catenin aracılığıyla tümör istilasını teşvik ettiği bilinmektedir (247). Ayrıca, meme kanseri hücrelerinde SIAH1'in α -tubulin ve KID/KIF22 ilişkili olduğu ortaya konulmuştur. Bu proteinler mitoz ve mayoz sırasında gereklidirler. SIAH1 KID/KIF22'in proteozomal yıkımına aracılık ettiği rapor edilmiştir.

Öte yandan, yukarıda da bahsettiğimiz gibi kuvvetli pro-apoptotik bir protein olan BIM'in, meme kanseri hücrelerinde SIAH1 tarafından pozitif olarak düzenlendiği bildirilmiştir. Bu bulguları destekler bir şekilde meme kanserli hastalarda yapılan bir çalışmada, 231 meme kanseri hastasında SIAH1 ve BIM düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır (15). SIAH1 aracılı BIM etkinleşmesi JUN kinaz (JNK) ile ilişkilidir ve SIAH1 ERK kinazın uyarı iletimini azaltmaktadır (14).

P53 ilk olarak tanımlanan ve en iyi bilinen tümör baskılayıcı proteinlerin başında gelmektedir. P53, anormal hücrelerin çoğalmasını ortadan kaldırmak ve baskılama üzere işlev görür ve böylece neoplastik gelişimi önler. Normal hücrel koşullar altında p53 sinyal yolağı 'bekleme' modundadır. P53 etkinleşmesi çeşitli hücrel stres koşullarında gerçekleşir. P53 mutasyonu, insan neoplazilerinde tanımlanan en yaygın genetik değişikliktir. İnsan kanserlerinin yaklaşık %50'sinde p53 mutasyonları varlığı tahmin edilmektedir. Mutant proteinler, diziye özgü DNA bağlanması ve hedef proteinlerin etkinleşmesi için neredeyse her zaman kusurludur. Yapılan çalışmalarda, farklı yukarı yönde (upstream) düzenleyici kinazlara bağımlı görünen birkaç bağımsız p53 etkinleşme yolu belirlenmiştir. Bunlardan bazıları ATM, ATR, Chk2 ve p14^{ARF} olarak sıralanabilir. Ayrıca, meme kanserinde p53 mutasyonu, daha saldırgan hastalık ve azalmış genel sağ kalım ile ilişkilidir. P53'teki germ evresi mutasyonları, meme kanseri riskinde artışa neden olan Li-Fraumeni kanser yatkınlığı sendromlu bireylerin yüksek bir bölümünde görülür (252).

Bu meme kanseri gelişiminde P53 etkinliğinin kaybının büyük bir önemi olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla, P53'ün ifade seviyesi ve moleküler yapısı meme kanserlerinde yaygın bir şekilde çalışılmıştır. İlk çalışmalarda, mutant p53 ifadesi, meme kanseri hücre hatlarında gösterilmiştir. P53 genindeki heterozigotluk kaybı (LOH), birincil meme karsinomalarında ortak bir olay olarak gösterilmiştir. Göğüs kanserinde p53 mutasyonunun genel sıklığı yaklaşık% 20 olmasına rağmen, hastalığın bazı türleri yüksek frekanslarla ilişkilidir (253). Örneğin, germ-line BRCA1 ve BRCA2 mutasyon taşıyıcılarında artmış p53 mutasyonu oranı tespit edilmiştir (254, 255). Buna ek olarak tipik medüller meme karsinomlarında çarpıcı bir şekilde, p53 mutasyonu vakaların % 100'ünde görülmektedir (256). Dolayısıyla, P53 yolağının yapısının ve ifadesinin moleküler patolojik analizi tanıda, prognostik değerlendirmede ve nihayetinde meme kanseri tedavisinde büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle yaptığımız

çalışmada, meme kanseri olgularında SIAH1 ve BIM proteinleri ile birlikte p53 ifade seviyesine bakılmıştır. Yaptığımız çalışmada p53 ifade seviyesinin meme kanseri hastaların tümörlü dokularında anlamlı olarak arttığı bulunmuştur ($p<0,0001$). Ancak, çalışmaya dahil edilen hastaların yaklaşık % 24'ünde p53 proteini saptanırken, yaklaşık % 75'inde p53 proteini saptanamamıştır. Yani hastaların büyük çoğunluğunda p53 etkinliği kaybolmuştur.

BIM proteini, BCL2 ailesi proteinlerin pro-apoptotik bir üyesidir. DNA'ya zarar veren maddeler, serum açlığı, paklitaksel ve diğer uyarılar, BIM ifadesini uyararak apoptozu indükleyebilir. Bim, hematopoietik, epitel ve nöronal hücreler gibi çeşitli hücrelerde apoptozu tetikleme yeteneğine sahiptir. Ayrıca meme kanseri hastalarında yapılan bir çalışmada SIAH1 ifade seviyesinin BIM ifade seviyesi ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Bunun yanında SIAH1 aşırı ifadesinin BIM ifadesinin aşırı ifadesine ve apoptozu tetikleyerek hücre istilasını baskıladığı yapılan işlevsel deneyler ile ortaya konulmuştur. Bunun aksine siRNA ile SIAH1 ifadesinin baskılanması BIM ifade seviyesinin azalmasına ve dolayısıyla apoptozu baskılayarak hücre istilasını arttırdığı rapor edilmiştir (15). Dolayısıyla SIAH1'in BIM üzerinden apoptozu tetiklediği düşünülmektedir. Ancak bizim yaptığımız çalışmada BIM protein ifade seviyesinde herhangi bir istatistiksel farklılık saptanamamıştır.

Sonuç olarak, çalışmamızın sonuçları SIAH1'in meme kanseri gelişiminde önemli rollerinin olduğunu göstermiştir. Ancak, önceki bulguları destekler bir şekilde BIM protein ifadesinde anlamlı bir farklılık saptanamamıştır. Bunun nedeni hasta sayımızın az olmasından dolayı olabilir. Dolayısıyla, daha geniş çaplı çalışmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca, çalışmamıza dahil edilen hastaların yaklaşık olarak %75'inde p53 protein ifadesi saptanamamıştır. SIAH1'in p53 aracılığı ile tetiklediği daha önceki yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Dolayısıyla, düşük SIAH1 ifadesinin sebepleri arasında p53 ifadesinin kaybı sıralanabilir. İleride yapılacak olan çalışmalarda, RNAi ve klonlama gibi işlevsel deneyler ile SIAH1 ve ilişkili olduğu protein ve yolların meme kanseri oluşumunda nasıl rol oynadıklarının ortaya koyulması önemlidir. Çalışmamızın bulguları SIAH1'in meme kanseri gelişiminde ve ilerlemesinde önemli rollerinin olduğunu göstermekle birlikte tanı ve tedaviye yönelik yeni bir biyobelirteç olabileceğini göstermektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Kesteloot HE, Zhang J. Differences in breast cancer mortality worldwide: unsolved problems. *Eur J Cancer Prev* 2006;15:416-423.
2. Callahan R. Oncogenes and breast cancer progression. *Basic Life Sci.* 1991;57:143-53; discussion 153-6. 1991.
3. Macleod K. Tumor suppressor genes. *Current Opinion in Genetics & Development* 2000;10:81-93.
4. Lieberman HB, Panigrahi SK, Hopkins KM, Wang L, Broustas CG. p53 and RAD9, the DNA Damage Response, and Regulation of Transcription Networks. *Radiat Res.* 2017 Apr;187(4):424-432.
5. Prendergast GC. Mechanisms of apoptosis by c-Myc. *Oncogene* 1999;18:2967-2987.
6. Hickman ES, Moroni MC, Helin K. The role of p53 and pRB in apoptosis and cancer. *Current Opinion in Genetics & Development* 2002;12:60-66.
7. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death and Differentiation* 2009;16:3-11.
8. Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology* 2007;35:495-516.
9. McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013 Apr 1;5(4):a008656.
10. Li R, Moudgil T, Ross HJ, Hu HM. Apoptosis of non-small-cell lung cancer cell lines after paclitaxel treatment involves the BH3-only proapoptotic protein Bim. *Cell Death and Differentiation* 2005;12:292-303.
11. Kymionis GD, Dimitrakakis CE, Konstadoulakis MM, Arzimanoglou I, Leandros E, Chalkiadakis G, Keramopoulos A, et al. Can expression of apoptosis genes,

bcl-2 and bax, predict survival and responsiveness to chemotherapy in node-negative breast cancer patients? *J Surg Res.* 2001;99:161-168.

12. Salakou S, Kardamakis D, Tsamandas AC, Zolota V, Apostolakis E, Tzelepi V, Papathanasopoulos P, et al. Increased Bax/Bcl-2 ratio up-regulates caspase-3 and increases apoptosis in the thymus of patients with myasthenia gravis. *In Vivo* 2007;21:123-132.

13. Akiyama T, Dass CR, Choong PFM. Bim-targeted cancer therapy: A link between drug action and underlying molecular changes. *Molecular Cancer Therapeutics* 2009;8:3173-3180.

14. Wen YY, Yang ZQ, Song M, Li BL, Zhu JJ, Wang EH. SIAH1 induced apoptosis by activation of the JNK pathway and inhibited invasion by inactivation of the ERK pathway in breast cancer cells. *Cancer Sci* 2010;101:73-79.

15. Wen YY, Yang ZQ, Song M, Li BL, Yao XH, Chen XL, Zhao J, et al. The expression of SIAH1 is downregulated and associated with Bim and apoptosis in human breast cancer tissues and cells. *Molecular carcinogenesis* 2010;49:440-449.

16. Roperch JP, Lethrone F, Prieur S, Piouffre L, Israeli D, Tuynder M, Nemani M, et al. SIAH-1 promotes apoptosis and tumor suppression through a network involving the regulation of protein folding, unfolding, and trafficking: Identification of common effectors with p53 and p21(Waf1). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999;96:8070-8073.

17. Hu G, Fearon ER. Siah-1 N-terminal RING domain is required for proteolysis function, and C-terminal sequences regulate oligomerization and binding to target proteins. *Mol Cell Biol.* 1999 Jan;19(1):724-32. 1999.

18. Borden KLB. RING domains: Master builders of molecular scaffolds? *Journal of Molecular Biology* 2000;295:1103-1112.

19. Habelhah H, Frew IJ, Laine A, Janes PW, Relaix F, Sassoon D, Bowtell DDL, et al. Stress-induced decrease in TRAF2 stability is mediated by Siah2. *Embo Journal* 2002;21:5756-5765.

20. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin.* 2016 Jan-Feb;66(1):7-30.

21. Kushi LH, Kwan ML, Lee MM, Ambrosone CB. Lifestyle factors and survival in women with breast cancer. *The Journal of nutrition* 2007;137:236S-242S.

22. Lotfi MH, Shobairi SCS. Breast cancer risk factors in an urban area of Yazd City-Iran. *Acta Medica Iranica* 2008;46:253-257.
23. Casciato DA, Territo MC. *Manual of clinical oncology*: Lippincott Williams & Wilkins, 2009.
24. Couto E, Hemminki K. Estimates of heritable and environmental components of familial breast cancer using family history information. *British journal of cancer* 2007;96:1740-1742.
25. Largent JA, Capanu M, Bernstein L, Langholz B, Mellekj r L, Malone KE, Begg CB, et al. Reproductive history and risk of second primary breast cancer: the WECARE study. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* 2007;16:906-911.
26. Worsham MJ, Raju U, Lu M, Kapke A, Cheng J, Wolman SR. Multiplicity of benign breast lesions is a risk factor for progression to breast cancer. *Clinical Cancer Research* 2007;13:5474-5479.
27. Eliyatkin N, Yal ın E, Zengel B, Akta  S, Vardar E. Meme Karsinomunda Moleküler Sınıflama: Gelenekselden Yeni D neme Yolculuk. *Meme Sağlığı Dergisi/Journal of Breast Health* 2015;11.
28. Raven RW. Classification of Breast Cancer. *Br Med J*. 1939 Mar 25;1(4081):611-3.
29. İlvan S. Meme Karsinomu Patoloğisi. I.  . Cerrahpa la Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri 2006;54:65-71.
30. Ergun A. Evre I meme kanserli hastalarda prediktif ve prognostik faktörler. Ankara: Başkent Üniversitesi; 2011.
31. Unal M. Meme kanserinde klinik bulgular ve evreleme.   inde: Meme kanseri. . stanbul  niversitesi, Onkoloji Enstitüsü Yayınları 3 1997:129-130.
32. Baldassarre G, Belletti B. Molecular biology of breast tumors and prognosis. *F1000Res*. 2016 Apr 21;5. pii: F1000 Faculty Rev-711.
33. Di Lonardo A, Nasi S, Pulciani S. Cancer: we should not forget the past. *Journal of Cancer* 2015;6:29.
34. Hajdu SI. A note from history: landmarks in history of cancer, part 1. *Cancer*. 2011 Mar 1;117(5):1097-102.
35. Balmain A. Cancer genetics: from Boveri and Mendel to microarrays. *Nat Rev Cancer*. 2001 Oct;1(1):77-82. 2001.

36. Kroemer G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med*. 1997 Jun;3(6):614-20. 1997.
37. Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res*. 1989 Sep 1;49(17):4682-9.
38. Eng C. RET proto-oncogene in the development of human cancer. *J Clin Oncol*. 1999 Jan;17(1):380-93.
39. Sherr CJ, McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell*. 2002 Aug;2(2):103-12.
40. Burkhardt DL, Sage J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer*. 2008 Sep;8(9):671-82.
41. Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *nature* 2001;411:342-348.
42. Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971 Apr;68(4):820-3.
43. Berger AH, Knudson AG, Pandolfi PP. A continuum model for tumour suppression. *Nature*. 2011 Aug 10;476(7359):163-9.
44. Bignell GR, Greenman CD, Davies H, Butler AP, Edkins S, Andrews JM, Buck G, et al. Signatures of mutation and selection in the cancer genome. *Nature*. 2010 Feb 18;463(7283):893-8.
45. Cavenee WK, Hansen MF, Nordenskjold M, Kock E, Maumenee I, Squire JA, Phillips RA, et al. Genetic origin of mutations predisposing to retinoblastoma. *Science*. 1985 Apr 26;228(4698):501-3.
46. Dryja TP, Cavenee W, White R, Rapaport JM, Petersen R, Albert DM, Bruns GA. Homozygosity of chromosome 13 in retinoblastoma. *N Engl J Med*. 1984 Mar 1;310(9):550-3.
47. Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*. 2004 Aug;10(8):789-99.
48. Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet*. 1993 Apr;9(4):138-41.

49. Volinia S, Mascellani N, Marchesini J, Veronese A, Ormondroyd E, Alder H, Palatini J, et al. Genome wide identification of recessive cancer genes by combinatorial mutation analysis. *PLoS One*. 2008;3(10):e3380.
50. Payne SR, Kemp CJ. Tumor suppressor genetics. *Carcinogenesis*. 2005 Dec;26(12):2031-45. Epub 2005 Sep 8.
51. Croce CM. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med*. 2008 Jan 31;358(5):502-11.
52. Bishop JM. Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 1991;64:235-248.
53. Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nature Reviews Cancer* 2003;3:459-465.
54. Rodenhuis S. ras and human tumors. *Semin Cancer Biol*. 1992 Aug;3(4):241-7.
55. Lynch CJ, Milner J. Loss of one p53 allele results in four-fold reduction of p53 mRNA and protein: a basis for p53 haplo-insufficiency. *Oncogene*. 2006 Jun 8;25(24):3463-70.
56. Kerr JFR. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology* 2002;181:471-474.
57. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* 1972;26:239.
58. Paweletz CP, Charboneau L, Bichsel VE, Simone NL, Chen T, Gillespie JW, Emmert-Buck MR, et al. Reverse phase protein microarrays which capture disease progression show activation of pro-survival pathways at the cancer invasion front. *Oncogene* 2001;20:1981-1989.
59. Horvitz HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer research* 1999;59:1701s-1706s.
60. Debnath J, Baehrecke EH, Kroemer G. Does autophagy contribute to cell death? *Autophagy* 2005;1:66-74.
61. Formigli L, Papucci L, Tani A, Schiavone N, Tempestini A, Orlandini GE, Capaccioli S, et al. Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *Journal of cellular physiology* 2000;182:41-49.
62. Sperandio S, de Belle I, Bredesen DE. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2000;97:14376-14381.

63. Norbury CJ, Hickson ID. Cellular responses to DNA damage. Annual review of pharmacology and toxicology 2001;41:367-401.
64. Norbury CJ, Zhivotovsky B. DNA damage-induced apoptosis. Oncogene 2004;23:2797-2808.
65. Reed JC. Mechanisms of apoptosis avoidance in cancer. Current opinion in oncology 1999;11:68.
66. Hirsch T, Marchetti P, Susin SA, Dallaporta B, Zamzami N, Marzo I, Geuskens M, et al. The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. Oncogene 1997;15.
67. Zeiss CJ. The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. Veterinary Pathology 2003;40:481-495.
68. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. Science 1998;281:1312-1316.
69. Hacker G. The morphology of apoptosis. Cell and tissue research 2000;301:5-17.
70. Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, Kobayashi Y. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. The Journal of Immunology 2003;171:4672-4679.
71. Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. nature 2000;407:784-788.
72. Levin S, Bucci TJ, Cohen SM, Fix AS, Hardisty JF, Legrand EK, Maronpot RR, et al. The nomenclature of cell death: recommendations of an ad hoc Committee of the Society of Toxicologic Pathologists. Toxicologic Pathology 1999;27:484-490.
73. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. The American journal of pathology 1995;146:3.
74. Denecker G, Vercammen D, Declercq W, Vandenabeele P. Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors. Cellular and Molecular Life Sciences 2001;58:356-370.
75. Leist M, Single B, Castoldi AF, Kühnle S, Nicotera P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. Journal of Experimental Medicine 1997;185:1481-1486.

76. Fiers W, Beyaert R, Declercq W, Vandenabeele P. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene* 1999;18.
77. Trump BE, Berezesky IK, Chang SH, Phelps PC. The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicologic Pathology* 1997;25:82-88.
78. Cotran RS. Cellular pathology I: cell injury and cell death. *Robbins pathologic basis of disease* 1999:23-25.
79. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature Reviews Cancer* 2002;2:277-288.
80. Martinvalet D, Zhu P, Lieberman J. Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity* 2005;22:355-370.
81. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *nature* 2000;407:770-776.
82. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochemical Journal* 1997;326:1-16.
83. Rai NK, Tripathi K, Sharma D, Shukla VK. Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *The international journal of lower extremity wounds* 2005;4:138-144.
84. Hu S, Snipas SJ, Vincenz C, Salvesen G, Dixit VM. Caspase-14 is a novel developmentally regulated protease. *Journal of Biological Chemistry* 1998;273:29648-29653.
85. Kang SJ, Wang S, Kuida K, Yuan J. Distinct downstream pathways of caspase-11 in regulating apoptosis and cytokine maturation during septic shock response. *Cell Death and Differentiation* 2002;9:1115.
86. Koenig U, Eckhart L, Tschachler E. Evidence that caspase-13 is not a human but a bovine gene. *Biochemical and biophysical research communications* 2001;285:1150-1154.
87. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- β . *nature* 2000;403:98-103.
88. Nemes Jr Z, Friis RR, Aeschlimann D, Saurer S, Paulsson M, Fässler Ls. Expression and activation of tissue transglutaminase in apoptotic cells of involuting rodent mammary tissue. *European journal of cell biology* 1996;70:125-133.
89. Bortner CD, Oldenburg NBE, Cidlowski JA. The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends in cell biology* 1995;5:21-26.

90. Bratton DL, Fadok VA, Richter DA, Kailey JM, Guthrie LA, Henson PM. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *Journal of Biological Chemistry* 1997;272:26159-26165.
91. Arur S, Uche UE, Rezaul K, Fong M, Scranton V, Cowan AE, Mohler W, et al. Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment. *Developmental cell* 2003;4:587-598.
92. Van Engeland M, Nieland LJW, Ramaekers FCS, Schutte B, Reutelingsperger CPM. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *cytometry* 1998;31:1-9.
93. Gardai SJ, McPhillips KA, Frasch SC, Janssen WJ, Starefeldt A, Murphy-Ullrich JE, Bratton DL, et al. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell* 2005;123:321-334.
94. Jimenez-Aleixandre MP, Rodriguez AB, Duschl RA. "Doing the lesson" or "doing science": Argument in high school genetics. *Science Education* 2000;84:757-792.
95. Saelens X, Festjens N, Walle LV, Van Gurp M, van Loo G, Vandenabeele P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 2004;23:2861-2874.
96. Cai J, Yang J, Jones D. Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1998;1366:139-149.
97. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000;102:33-42.
98. Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, Kroemer G. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death & Differentiation* 2006;13:1423-1433.
99. van Loo G, Van Gurp M, Depuydt B, Srinivasula SM, Rodriguez I, Alnemri ES, Gevaert K, et al. The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death and Differentiation* 2002;9:20.
100. Chinnaiyan AM. The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia* 1999;1:5-15.

101. Hill MM, Adrain C, Duriez PJ, Creagh EM, Martin SJ. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *The EMBO journal* 2004;23:2134-2145.
102. Schimmer AD. Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer research* 2004;64:7183-7190.
103. Ekert PG, Vaux DL. The mitochondrial death squad: hardened killers or innocent bystanders? *Current opinion in cell biology* 2005;17:626-630.
104. Testa U. Apoptotic mechanisms in the control of erythropoiesis. *Leukemia* 2004;18:1176-1199.
105. Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CYJ, Sasaki T, et al. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *nature* 2001;410:549-554.
106. Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, Costantini P, et al. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *Journal of Experimental Medicine* 2000;192:571-580.
107. Parrish J, Li L, Klotz K, Ledwich D, Wang X, Xue D. Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in *C. elegans*. *nature* 2001;412:90-94.
108. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *nature* 1998;391:43-50.
109. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer* 2002;2:647-656.
110. Schuler M, Green DR. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. In: Portland Press Limited; 2001.
111. Esposito MD. The roles of Bid. *Apoptosis* 2002;7:433-440.
112. Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X L. *Cell* 1996;87:619-628.
113. Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 1995;80:285-291.
114. Kuwana T, Newmeyer DD. Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Current opinion in cell biology* 2003;15:691-699.

115. Chau BN, Cheng EHY, Kerr DA, Hardwick JM. Aven, a novel inhibitor of caspase activation, binds Bcl-x L and Apaf-1. *Molecular cell* 2000;6:31-40.
116. Liu F-T, Newland AC, Jia L. Bax conformational change is a crucial step for PUMA-mediated apoptosis in human leukemia. *Biochemical and biophysical research communications* 2003;310:956-962.
117. Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, et al. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 2000;288:1053-1058.
118. Meyer N, Kim SS, Penn LZ. The Oscar-worthy role of Myc in apoptosis. In: *Seminars in cancer biology*: Elsevier; 2006. p. 275-287.
119. Jerome KR, Sloan DD, Aubert M. Measurement of CTL-induced cytotoxicity: the caspase 3 assay. *Apoptosis* 2003;8:563-571.
120. Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nature Reviews Immunology* 2002;2:735-747.
121. Pardo Jn, Bosque A, Brehm R, Wallich R, Naval J, MÃ¼llbacher A, Anel A, et al. Apoptotic pathways are selectively activated by granzyme A and/or granzyme B in CTL-mediated target cell lysis. *J Cell Biol* 2004;167:457-468.
122. Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *nature* 1998;391:96-99.
123. Barry M, Bleackley RC. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nature Reviews Immunology* 2002;2:401-409.
124. Russell JH, Ley TJ. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annual review of immunology* 2002;20:323-370.
125. Goping S, Barry M, Liston P, Sawchuk T, Constantinescu G, Michalak KM, Shostak I, et al. Granzyme B-induced apoptosis requires both direct caspase activation and relief of caspase inhibition. *Immunity* 2003;18:355-365.
126. Devadas S, Das J, Liu C, Zhang L, Roberts AI, Pan Z, Moore PA, et al. Granzyme B is critical for T cell receptor-induced cell death of type 2 helper T cells. *Immunity* 2006;25:237-247.
127. Fan Z, Beresford PJ, Oh DY, Zhang D, Lieberman J. Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell* 2003;112:659-672.

128. Hiebert PR, Granville DJ. Granzyme B in injury, inflammation, and repair. *Trends in molecular medicine* 2012;18:732-741.
129. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001;104:487-501.
130. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998;281:1305-1308.
131. Chicheportiche Y, Bourdon PR, Xu H, Hsu Y-M, Scott H, Hession C, Garcia I, et al. TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 1997;272:32401-32410.
132. Peter ME, Krammer PH. Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. *Current opinion in immunology* 1998;10:545-551.
133. Rubio-Moscardo F, Blesa D, Mestre C, Siebert R, Balasas T, Benito A, Rosenwald A, et al. Characterization of 8p21. 3 chromosomal deletions in B-cell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes. *Blood* 2005;106:3214-3222.
134. Suliman A, Lam A, Datta R, Srivastava RK. Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and-independent pathways. *Oncogene* 2001;20:2122-2133.
135. Grimm V, Wyszomirski T, Aikman D, UchmaÅ„ski J. Individual-based modelling and ecological theory: synthesis of a workshop. *Ecological modelling* 1999;115:275-282.
136. Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF- κ B activation. *Cell* 1995;81:495-504.
137. Wajant H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* 2002;296:1635-1636.
138. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *The EMBO journal* 1995;14:5579.
139. Kataoka T, Budd RC, Holler N, Thome M, Martinon F, Irmeler M, Burns K, et al. The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF- κ B and Erk signaling pathways. *Current biology* 2000;10:640-648.

140. Scaffidi C, Schmitz I, Krammer PH, Peter ME. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 1999;274:1541-1548.
141. Hitoshi Y, Lorens J, Kitada S-I, Fisher J, LaBarge M, Ring HZ, Francke U, et al. Toso, a cell surface, specific regulator of Fas-induced apoptosis in T cells. *Immunity* 1998;8:461-471.
142. Slee EA, Adrain C, Martin SJ. Executioner caspase-3,-6, and-7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 2001;276:7320-7326.
143. Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, McGarry TJ, et al. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 1997;278:294-298.
144. Ferraro-Peyret C, Quemeneur L, Flacher M, Revillard J-P, Genestier L. Caspase-independent phosphatidylserine exposure during apoptosis of primary T lymphocytes. *The Journal of Immunology* 2002;169:4805-4810.
145. Mandal D, Mazumder A, Das P, Kundu M, Basu J. Fas-, caspase 8-, and caspase 3-dependent signaling regulates the activity of the aminophospholipid translocase and phosphatidylserine externalization in human erythrocytes. *Journal of Biological Chemistry* 2005;280:39460-39467.
146. Fadok VA, de Cathelineau A, Daleke DL, Henson PM, Bratton DL. Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry* 2001;276:1071-1077.
147. Renahan AG, Booth C, Potten CS. What is apoptosis, and why is it important? *BMJ: British Medical Journal* 2001;322:1536.
148. Nijhawan D, Honarpour N, Wang X. Apoptosis in neural development and disease. *Annual review of neuroscience* 2000;23:73-87.
149. Opferman JT, Korsmeyer SJ. Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nature immunology* 2003;4:410-415.
150. Greenhalgh DG. The role of apoptosis in wound healing. *The international journal of biochemistry & cell biology* 1998;30:1019-1030.
151. Osborne BA. Apoptosis and the maintenance of homeostasis in the immune system. *Current opinion in immunology* 1996;8:245-254.

152. Lund LR, Romer J, Thomasset N, Solberg H, Pyke C, Bissell MJ, Dano K, et al. Two distinct phases of apoptosis in mammary gland involution: proteinase-independent and-dependent pathways. *Development* 1996;122:181-193.
153. Tilly JL, Kowalski KI, Johnson AL, Hsueh AJW. Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology* 1991;129:2799-2801.
154. Harman D. Free radical theory of aging. *Mutation Research/DNAging* 1992;275:257-266.
155. Ozawa T. Mechanism of somatic mitochondrial DNA mutations associated with age and diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 1995;1271:177-189.
156. Hettis SW. To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. *Jama* 1998;279:300-307.
157. King KL, Cidlowski JA. Cell cycle regulation and apoptosis. *Annual review of physiology* 1998;60:601-617.
158. Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994;73:2013-2026.
159. Wang H-G, Miyashita T, Takayama S, Sato T, Torigoe T, Krajewski S, Tanaka S, et al. Apoptosis regulation by interaction of Bcl-2 protein and Raf-1 kinase. *Oncogene* 1994;9:2751-2756.
160. Vaux D, Cory S, Adams J. Bcl-2 and cell survival. *nature* 1988;335:440-442.
161. Smyth MJ, Cretney E, Takeda K, Wilttrout RH, Sedger LM, Kayagaki N, Yagita H, et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) contributes to interferon II-dependent natural killer cell protection from tumor metastasis. *Journal of Experimental Medicine* 2001;193:661-670.
162. Cefai D, Schwaninger R, Balli M, Brunner T, Gimmi CD. Functional characterization of Fas ligand on tumor cells escaping active specific immunotherapy. *Cell Death and Differentiation* 2001;8:687.
163. Cheng J, Zhou T, Liu C, Shapiro JP, Brauer MJ, Kiefer MC, Barr PJ, et al. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* 1994;263:1759-1763.

164. Elnemr A, Ohta T, Yachie A, Kayahara M, Kitagawa H, Fujimura T, Ninomiya I, et al. Human pancreatic cancer cells disable function of Fas receptors at several levels in Fas signal transduction pathway. *International journal of oncology* 2001;18:311-316.
165. Koyama S, Koike N, Adachi S. Fas receptor counterattack against tumor-infiltrating lymphocytes in vivo as a mechanism of immune escape in gastric carcinoma. *Journal of cancer research and clinical oncology* 2001;127:20-26.
166. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74.
167. Pietenpol JA, Stewart ZA. Cell cycle checkpoint signaling:: Cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology* 2002;181:475-481.
168. Lerma E, Matias-Guiu X, Lee SJ, Prat J. Squamous cell carcinoma of the vulva: study of ploidy, HPV, p53, and pRb. *International journal of gynecological pathology* 1999;18:191-197.
169. Gu J, Kawai H, Wiederschain D, Yuan Z-M. Mechanism of functional inactivation of a Li-Fraumeni syndrome p53 that has a mutation outside of the DNA-binding domain. *Cancer research* 2001;61:1741-1746.
170. Varley JM, Evans DG, Birch JM. Li-Fraumeni syndrome--a molecular and clinical review. *British journal of cancer* 1997;76:1.
171. Kitagawa R, Kastan MB. The ATM-dependent DNA damage signaling pathway. In: *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*; Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2005. p. 99-109.
172. Kurz EU, Lees-Miller SP. DNA damage-induced activation of ATM and ATM-dependent signaling pathways. *DNA repair* 2004;3:889-900.
173. Bolt J, Vo QN, Kim W-J, McWhorter AJ, Thomson J, Hagensee ME, Friedlander P, et al. The ATM/p53 pathway is commonly targeted for inactivation in squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN) by multiple molecular mechanisms. *Oral oncology* 2005;41:1013-1020.
174. Brunet A, Datta SR, Greenberg ME. Transcription-dependent and-independent control of neuronal survival by the PI3K/Akt signaling pathway. *Current opinion in neurobiology* 2001;11:297-305.
175. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway in human cancer. *Nature Reviews Cancer* 2002;2:489-501.

176. Worth A, Thrasher AJ, Bobby Gaspar H. Autoimmune lymphoproliferative syndrome: molecular basis of disease and clinical phenotype. *British journal of haematology* 2006;133:124-140.
177. Li CJ, Friedman DJ, Wang C, Metelev V, Pardee AB. Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein. *Science* 1995;268:429.
178. Ethell DW, Buhler LA. Fas ligand-mediated apoptosis in degenerative disorders of the brain. *Journal of clinical immunology* 2003;23:363-370.
179. Hochhauser E, Kivity S, Offen D, Maulik N, Otani H, Barhum Y, Pannet H, et al. Bax ablation protects against myocardial ischemia-reperfusion injury in transgenic mice. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2003;284:H2351-H2359.
180. Freude B, Masters TN, Robicsek F, Fokin A, Kostin S, Zimmermann R, Ullmann C, et al. Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2000;32:197-208.
181. Nicholson DW. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *nature* 2000;407:810-816.
182. Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Genes & development* 1999;13:239-252.
183. Colnaghi R, Connell CM, Barrett RMA, Wheatley SP. Separating the anti-apoptotic and mitotic roles of survivin. *Journal of Biological Chemistry* 2006;281:33450-33456.
184. Silke J, Hawkins CJ, Ekert PG, Chew J, Day CL, Pakusch M, Verhagen AM, et al. The anti-apoptotic activity of XIAP is retained upon mutation of both the caspase 3 and caspase 9 interacting sites. *The Journal of cell biology* 2002;157:115-124.
185. Mocanu MM, Baxter GF, Yellon DM. Caspase inhibition and limitation of myocardial infarct size: protection against lethal reperfusion injury. *British journal of pharmacology* 2000;130:197-200.
186. Livingston DJ. In vitro and in vivo studies of ICE inhibitors. *Journal of cellular biochemistry* 1997;64:19-26.
187. Le GT, Abbenante G. Inhibitors of TACE and Caspase-1 as anti-inflammatory drugs. *Current medicinal chemistry* 2005;12:2963-2977.
188. Graziani G, Szabó C. Clinical perspectives of PARP inhibitors. *Pharmacological research* 2005;52:109-118.

189. Zhou H-Z, Swanson RA, Simonis U, Ma X, Cecchini G, Gray MO. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 hyperactivation and impairment of mitochondrial respiratory chain complex I function in reperfused mouse hearts. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2006;291:H714-H723.
190. Fujio Y, Nguyen T, Wencker D, Kitsis RN, Walsh K. Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart. *Circulation* 2000;101:660-667.
191. Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Gabai VL. Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Experimental cell research* 2003;283:1-16.
192. Ravagnan L, Roumier T, Kroemer G. Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *Journal of cellular physiology* 2002;192:131-137.
193. Oppenheim RW, Flavell RA, Vinsant S, Prevette D, Kuan C-Y, Rakic P. Programmed cell death of developing mammalian neurons after genetic deletion of caspases. *Journal of Neuroscience* 2001;21:4752-4760.
194. Volbracht C, Leist M, Kolb SA, Nicotera P. Apoptosis in caspase-inhibited neurons. *Molecular medicine* 2001;7:36.
195. Dal Canto MC, Gurney ME. Development of central nervous system pathology in a murine transgenic model of human amyotrophic lateral sclerosis. *The American journal of pathology* 1994;145:1271.
196. Turmaine M, Raza A, Mahal A, Mangiarini L, Bates GP, Davies SW. Nonapoptotic neurodegeneration in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2000;97:8093-8097.
197. Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* 2004;23:2891-2906.
198. Schwartz LM, Smith SW, Jones ME, Osborne BA. Do all programmed cell deaths occur via apoptosis? *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1993;90:980-984.
199. Klionsky DJ, Emr SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 2000;290:1717-1721.
200. Noda T, Suzuki K, Ohsumi Y. Yeast autophagosomes: de novo formation of a membrane structure. *Trends in cell biology* 2002;12:231-235.
201. Huang W-P, Klionsky DJ. Autophagy in yeast: a review of the molecular machinery. *Cell structure and function* 2002;27:409-420.

202. Ohsumi Y. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nature reviews Molecular cell biology* 2001;2:211-216.
203. Piacentini M, Evangelisti C, Mastroberardino PG, Nardacci R, Kroemer G. Does prothymosin-[alpha] act as molecular switch between apoptosis and autophagy? *Cell Death and Differentiation* 2003;10:937.
204. Lemasters JJ, Nieminen A-L, Qian T, Trost LC, Elmore SP, Nishimura Y, Crowe RA, et al. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1998;1366:177-196.
205. Hu G, Zhang S, Vidal M, La Baer J, Xu T, Fearon ER. Mammalian homologs of seven in absentia regulate DCC via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes & development* 1997;11:2701-2714.
206. Ahmed AU, Schmidt RL, Park CH, Reed NR, Hesse SE, Thomas CF, Molina JR, et al. Effect of disrupting seven-in-absentia homolog 2 function on lung cancer cell growth. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 2008;100:1606-1629.
207. Behling KC, Tang A, Freyding B, Chervoneva I, Kadakia S, Schwartz GF, Rui H, et al. Increased SIAH expression predicts ductal carcinoma in situ (DCIS) progression to invasive carcinoma. *Breast cancer research and treatment* 2011;129:717-724.
208. Qi J, Nakayama K, Cardiff RD, Borowsky AD, Kaul K, Williams R, Krajewski S, et al. Siah2-dependent concerted activity of HIF and FoxA2 regulates formation of neuroendocrine phenotype and neuroendocrine prostate tumors. *Cancer cell* 2010;18:23-38.
209. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BIA, Jacobsen A, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. In: *AACR*; 2012.
210. Gao J, Aksoy BIA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, Sun Y, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Science signaling* 2013;6:pl1.
211. Malz M, Aulmann A, Samarin J, Bissinger M, Longerich T, Schmitt S, Schirmacher P, et al. Nuclear accumulation of seven in absentia homologue 2 supports motility and proliferation of liver cancer cells. *International journal of cancer* 2012;131:2016-2026.

212. Sun RC, Denko NC. Hypoxic regulation of glutamine metabolism through HIF1 and SIAH2 supports lipid synthesis that is necessary for tumor growth. *Cell metabolism* 2014;19:285-292.
213. Shah M, Stebbins JL, Dewing A, Qi J, Pelliccia M, Ronai ZeA. Inhibition of Siah2 ubiquitin ligase by vitamin K3 (menadione) attenuates hypoxia and MAPK signaling and blocks melanoma tumorigenesis. *Pigment cell & melanoma research* 2009;22:799-808.
214. Schmidt RL, Park CH, Ahmed AU, Gundelach JH, Reed NR, Cheng S, Knudsen BE, et al. Inhibition of RAS-mediated transformation and tumorigenesis by targeting the downstream E3 ubiquitin ligase seven in absentia homologue. *Cancer research* 2007;67:11798-11810.
215. Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 1992;69:1237-1245.
216. El-Deiry WS, Kern SE, Pietenpol JA, Kinzler KW, Vogelstein B. Definition of a consensus binding site for p53. *Nature genetics* 1992;1:45-49.
217. Fornace AJ, Nebert DW, Hollander MC, Luethy JD, Papathanasiou M, Fargnoli J, Holbrook NJ. Mammalian genes coordinately regulated by growth arrest signals and DNA-damaging agents. *Molecular and cellular biology* 1989;9:4196-4203.
218. Funk WD, Pak DT, Karas RH, Wright WE, Shay JW. A transcriptionally active DNA-binding site for human p53 protein complexes. *Molecular and cellular biology* 1992;12:2866-2871.
219. Carr AM. Piecing together the p53 puzzle. *Science* 2000;287:1765-1766.
220. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *nature* 1991;351:453.
221. Gewies A. Introduction to apoptosis. *Apo Review* 2003;3:1-26.
222. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CsC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991;253:49-53.
223. Liu B, Chen Y, Clair DKS. ROS and p53: a versatile partnership. *Free Radical Biology and Medicine* 2008;44:1529-1535.
224. Sablina AA, Budanov AV, Ilyinskaya GV, Agapova LS, Kravchenko JE, Chumakov PM. The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nature medicine* 2005;11:1306-1313.

225. Aladjem MI, Spike BT, Rodewald LW, Hope TJ, Klemm M, Jaenisch R, Wahl GM. ES cells do not activate p53-dependent stress responses and undergo p53-independent apoptosis in response to DNA damage. *Current biology* 1998;8:145-155.
226. Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Brown JP, Sedivy JM, et al. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 1998;282:1497-1501.
227. Meek DW. The p53 response to DNA damage. *DNA repair* 2004;3:1049-1056.
228. Tovar C, Rosinski J, Filipovic Z, Higgins B, Kolinsky K, Hilton H, Zhao X, et al. Small-molecule MDM2 antagonists reveal aberrant p53 signaling in cancer: implications for therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006;103:1888-1893.
229. Hirao A, Kong Y-Y, Matsuoka S, Wakeham A, Ruland Jr, Yoshida H, Liu D, et al. DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science* 2000;287:1824-1827.
230. Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough WG. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell* 1998;92:725-734.
231. Rozan LM, El-Deiry WS. p53 downstream target genes and tumor suppression: a classical view in evolution. *Cell Death and Differentiation* 2007;14:3.
232. Waldman T, Kinzler KW, Vogelstein B. p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer research* 1995;55:5187-5190.
233. Vogt BL, Rossman TG. Effects of arsenite on p53, p21 and cyclin D expression in normal human fibroblasts—a possible mechanism for arsenite's comutagenicity. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 2001;478:159-168.
234. Cayrol C, Knibiehler M, Ducommun B. p21 binding to PCNA causes G1 and G2 cell cycle arrest in p53-deficient cells. *Oncogene* 1998;16.
235. Sengupta S, Harris CC. p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. *Nature reviews Molecular cell biology* 2005;6:44-55.
236. Nakano K, Vousden KH. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Molecular cell* 2001;7:683-694.

237. Hong Y-S, Ham Y-A, Choi J-H, Kim J. Effects of allyl sulfur compounds and garlic extract on the expression of Bcl-2, Bax, and p53 in non small cell lung cancer cell lines. *Experimental & molecular medicine* 2000;32:127-134.
238. El-Deiry WS. Regulation of p53 downstream genes. In: *Seminars in cancer biology*; 1998: Elsevier; 1998. p. 345-357.
239. Grossfeld GD, Ginsberg DA, Stein JP, Bochner BH, Esrig D, Nichols PW, Taylor CR, et al. Thrombospondin-1 expression in bladder cancer: association with p53 alterations, tumor angiogenesis, and tumor progression. *Journal of the National Cancer Institute* 1997;89:219-227.
240. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer research* 1994;54:4855-4878.
241. Yonish-Rouach E, Resnitzky D. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *nature* 1991;352:345.
242. Heiss EH, Schilder YDC, Dirsch VM. Chronic treatment with resveratrol induces redox stress-and ataxia telangiectasia-mutated (ATM)-dependent senescence in p53-positive cancer cells. *Journal of Biological Chemistry* 2007;282:26759-26766.
243. Capoulade C, Paillerets BB-d, Lefrere I, Ronsin M, Feunteun J, Tursz T, Wiels JL. Overexpression of MDM2, due to enhanced translation, results in inactivation of wild-type p53 in Burkitt's lymphoma cells. *Oncogene* 1998;16.
244. Frebourg T, Barbier N, Yan YX, Garber JE, Dreyfus M, Fraumeni Jr J, Li FP, et al. Germ-line p53 mutations in 15 families with Li-Fraumeni syndrome. *American journal of human genetics* 1995;56:608.
245. Hisada M, Garber JE, Li FP, Fung CY, Fraumeni JF. Multiple primary cancers in families with Li-Fraumeni syndrome. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 1998;90:606-611.
246. Soussi T, Legros Y, Lubin R, Ory K, Schlichtholz B. Multifactorial analysis of p53 alteration in human cancer: a review. *International journal of cancer* 1994;57:1-9.
247. Knauer SK, Mahendrarajah N, Roos WP, Krämer OH. The inducible E3 ubiquitin ligases SIAH1 and SIAH2 perform critical roles in breast and prostate cancers. *Cytokine & growth factor reviews* 2015;26:405-413.
248. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer* 2006;6:259-269.

249. Bruzzoni-Giovanelli H, Fernandez P, Veiga L, Podgorniak M-P, Powell DJ, Candeias MM, Mourah S, et al. Distinct expression patterns of the E3 ligase SIAH-1 and its partner Kid/KIF22 in normal tissues and in the breast tumoral processes. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2010;29:10.
250. Palmieri D, Fitzgerald D, Shreeve SM, Hua E, Bronder JL, Weil RJ, Davis S, et al. Analyses of resected human brain metastases of breast cancer reveal the association between up-regulation of hexokinase 2 and poor prognosis. *Mol Cancer Res.* 2009 Sep;7(9):1438-45.
251. Confalonieri S, Quarto M, Goisis G, Nuciforo P, Donzelli M, Jodice G, Pelosi G, et al. Alterations of ubiquitin ligases in human cancer and their association with the natural history of the tumor. *Oncogene.* 2009 Aug 20;28(33):2959-68.
252. Hussain SP, Harris CC. Molecular epidemiology and carcinogenesis: endogenous and exogenous carcinogens. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 2000;462:311-322.
253. Pharoah PDP, Day NE, Caldas C. Somatic mutations in the p53 gene and prognosis in breast cancer: a meta-analysis. *British journal of cancer* 1999;80:1968-1973.
254. Phillips KA, Nichol K, Ozcelik H, Knight J, Done SJ, Goodwin PJ, Andrulis IL. Frequency of p53 mutations in breast carcinomas from Ashkenazi Jewish carriers of BRCA1 mutations. *J Natl Cancer Inst.* 1999 Mar 3;91(5):469-73. 1999.
255. Smith PD, Crossland S, Parker G, Osin P, Brooks L, Waller J, Philp E, et al. Novel p53 mutants selected in BRCA-associated tumours which dissociate transformation suppression from other wild-type p53 functions. *Oncogene.* 1999 Apr 15;18(15):2451-9. 1999.
256. de Cremoux P, Salomon AV, Liva S, Dendale R, Bouchind'homme B, Martin E, Sastre-Garau X, et al. p53 mutation as a genetic trait of typical medullary breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1999 Apr 7;91(7):641-3. 1999.

ÖZGEÇMİŞ VE ESERLER LİSTESİ

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Luay Talal Hadhal AL SALEEM AGHA

Doğum Tarihi: 12.10.1983

Öğrenim Durumu: Yüksek Lisans

Derece	Bölüm / Program	Universite	Yıl
Lisans	Veterinerlik	Musul Üniversitesi	2007
Y. Lisans	Tibbi Biyoloji	Gaziantep Üniversitesi	2018

Yüksek Lisans Tez Başlığı (özeti ekte) ve Tez Danışman(lar)ı : Meme kanser hastalarının tedavi seyri ile SIAH, BIM ve p53 proteinlerinin seviyeleri arasındaki ilişkinin immunohistokimyasal olarak ortaya konulması

Prof. Dr. Ahmet ARSLAN

Doktora Tezi /S. Yeterlilik Çalışması / Tıpta Uzmanlık Tezi Başlığı (özeti ekte) ve Danışman(lar)ı:

Görevler: Yok

Yönetilen Doktora Tezleri / Sanatta Yeterlilik Çalışmaları : Yok

Projelerde Yaptığı Görevler : Yardımcı Araştırmacı

- Meme kanser hastalarının tedavi seyri ile SIAH, BIM ve p53 proteinlerinin seviyeleri arasındaki ilişkinin immunohistokimyasal olarak ortaya konulması

İdari Görevler : Yok

Bilimsel Kuruluşlara Üyelikler: Yok

ESERLER

A. Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler: Yok

B. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler : Yok

C. Yazılan Uluslararası kitaplar veya kitaplarda bölümler : Yok

D. Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

E. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler : Yok