



**İNSAN BCL-2 GENİNE AİT PROMOTÖR
BÖLGESİNİN MOLEKÜLER ANALİZİ**

Betül BAYDAR

Yüksek Lisans Tezi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Genetik Bilim Dalı

Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

2018

Her hakkı saklıdır

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**İNSAN BCL-2 GENİNE AİT PROMOTÖR BÖLGESİNİN
MOLEKÜLER ANALİZİ**

Betül BAYDAR

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

**ERZURUM
2018**

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü



TEZ ONAY FORMU

**İNSAN BCL-2 GENİNE AİT PROMOTÖR BÖLGESİNİN MOLEKÜLER
ANALİZİ**

Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN danışmanlığında, Betül BAYDAR tarafından hazırlanan bu çalışma, 29.06.2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Genetik Bilim Dalı'nda Yüksek lisans tezi olarak oybirliği / oy çokluğu (.../...) ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Hakan AŞKIN

İmza :

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Elanur AYDIN KARATAŞ

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu'nun 19.07/2018 tarih ve 29..../36..... nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet KARAKAN
Enstitü Müdürü

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

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

İNSAN BCL-2 GENİNE AİT PROMOTÖR BÖLGESİNİN MOLEKÜLER ANALİZİ

Betül BAYDAR

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

Danışman Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

BCL-2 (B cell leukemia/lymphoma 2), apoptozis düzenleyici proteinler olan BCL ailesinin antiapoptotik bir üyesidir ve ilk kez t(14; 18) kromozomal translokasyonu olan insan foliküler B hücre lenfomasında tanımlanmıştır. Bu tez çalışmasında, apoptotik süreçte en kritik potansiyele sahip olan antiapoptotik insan BCL-2 geninin transkripsiyonel regülasyonunu aydınlatmak amacıyla promotör bölgesinin karakterizasyonu ve moleküler analizi yapıldı. Bu amaçla öncelikle çeşitli biyoinformatik veri tabanlarından yararlanılarak BCL-2 geninin 5000 bp'lik promotör bölgesi belirlendi. Ancak çalışmamız dahilinde bu bölgenin transkripsiyonel bakımdan işlevsel olduğu düşünülen 2444 bp 'lık parçası kalıp olarak kullanılarak fonksiyonel özelliklerine göre bu bölge üç alt parçaya ayrıldı. Bölgelerin uzunlukları 2372 bp, 610 bp ve 290 bp olarak belirlenerek çalışmamız bu üç promotör parçası üzerinde gerçekleştirildi. Seçilen bölgelere spesifik dizayn edilen primerlerle PCR yapılarak her bölge saf olarak elde edildi. Her bölgeye ait bu saf bantlar jelden ekstrakte edilerek pGEM-T Easy vektörüne klonlanarak *Escherichia coli JM109* bakterisine transfer edildi. Klonlanan her bir parçadan plazmit izolasyonu yapıldı. Aynı şekilde pGL-3 Luc vektörü de *Escherichia coli JM109* bakterisine transfer edildi ve bu bakteride çoğaltıldı. Son olarak klonlanmış pGL-3 Luc vektörü Kpn-I ve Hind-III restriksiyon enzimleriyle kesildikten sonra agaroz jelde yürütüldü ve jelden saf olarak ekstrakte edildi. Genomatix programı kullanılarak belirlenen bu promotör dizisi üzerinde özellikle insan BCL-2 ve BAX arasında en fazla homolojinin bulunduğu muhtemel promotör parçaları klonlanarak, pGL-3 Luc vektörüne aktarılmak üzere elde edildi.

2018, 100 sayfa

Anahtar Kelimeler: BCL-2 geni, apoptozis, promotör analizi. lusiferaz bildirici vektör sistemi.

ABSTRACT

Master Thesis

MOLECULAR ANALYSIS OF HUMAN BCL-2 GENE PROMOTER REGION

Betül BAYDAR

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

Supervisor: Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

BCL-2 (B cell leukemia / lymphoma 2) is an antiapoptotic member of the BCL family of apoptosis regulatory proteins and is first described in the human follicular B cell lymphoma with chromosomal translocation of t (14; 18). In this thesis study, the characterization and molecular analysis of the promoter region was performed in order to elucidate the transcriptional regulation of the antiapoptotic human BCL-2 gene, which has the most critical potential in the apoptotic process. For this purpose, a 5000 bp promoter region of the BCL-2 gene was identified primarily by using various bioinformatic databases. However, within our study, this region was considered to be functional in transcriptional maintenance and the 2444 bp fragment was used as a template and this region was divided into three subfractions according to their functional properties. The lengths of the regions were determined as 2372 bp, 610 bp and 290 bp and our study was carried out on these three promoter fragments. In this context, PCR was performed with primers designed specifically for each region and each region was obtained in pure form. The pure bands of each region were gel-extracted and transferred into the *E. coli JM109* bacterium by cloning into the pGEM- T Easy vector. Plasmid isolation was performed from each cloned fragment. Similarly pGL-3 Luc vector transferred into the *E. coli JM109* bacterium and replicated in this bacteria too. Finally, the cloned pGL-3 Luc vector was digested with restriction enzymes Kpn-I and HindIII, and then was run on agarose gel and extracted purely from this agarose gel. Promoter fragments with the most homology between human BCL-2 and BAX on this promoter sequence determined using the Genomatix program were cloned and transferred to pGL-3 Luc vector.

2018, 100 pages

Keywords: BCL-2 gene, apoptozis, promoter analysis, luciferase reporter vector system.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın seçilmesinde, yürütülmesinde ve sonuca ulaştırılması için her türlü imkanların sağlanmasında, bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sürecinde deneysel çalışmalarımı gerçekleştirmem için Bölümümüzün bütün imkanlarından yararlanmamı sağlayan Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL'e,

Çalışmalarım boyunca emeği geçen Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümündeki hocalarıma,

Çalışmalarımın deneysel kısmında benimle tecrübelerini paylaşan Sayın Arş. Grv. Emine TORAMAN'a ve Sayın Atena GHOSIGHAREHAGHAJI'ye

Yüksek lisans tez çalışmam süresince beni anlayan her konuda destekleyen ve yalnız bırakmayan çok değerli arkadaşlarım Aybüke EROL, Ayşenur BOSTANCI ve Şeyda ALBAYRAK'a çok teşekkür ederim.

Tüm yaşamım boyunca bana olan güvenlerini her an hissettiren, hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan maddi ve manevi desteklerini her an arkamda hissettiğim saygıdeğer babam Cihat BAYDAR, canım annem Arzu BAYDAR, çok kıymetli kardeşlerim Ayşe Berfin BAYDAR ve Zahide Süheyla BAYDAR'a sonsuz minnet ve şükranlarımı sunarım.

Betül BAYDAR

Haziran, 2018

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Apoptosis (Programlı hücre ölümü).....	1
1.1.1. Apoptosisin canlı organizmalardaki yeri ve önemi.....	2
1.1.2. Apoptosisin regülasyonunda rol oynayan genler	3
1.1.3. Apoptozun indüklenmesi.....	4
1.1.4. Apoptozun şekilsel özellikleri (Morfolojisi)	5
1.1.5. Apoptozisteki biyokimyasal olaylar	6
1.1.6. Apoptotik hücre ölümünün aşamaları	7
1.1.7. Apoptozun moleküler mekanizmaları	9
1.1.7.a. Ekstrinsik ve intrinsik yollar arasındaki bağlantı	17
1.1.8. Apoptosisin inhibisyonu.....	19
1.1.9. Apoptosis anormallikleri ve hastalıklar.....	20
1.2. BCL-2 Ailesi	20
1.2.1. BCL-2/BAX protein ailesi.....	25
1.3. Bildirici Vektör Deney Sistemi	28
1.3.1. Haberci genler	28
1.3.2. Lusiferaz bildirici gen analizi (Luciferase reporter gene assay)	29
1.3.2.a. İkili lusiferaz bildirici gen deney sistemi (Dual luciferase reporter gene assay).....	30
1.3.3. Lusiferaz ve çeşitleri	30
1.3.4. Bakterilerde biyoluminesans	31
2. KAYNAK ÖZETLERİ	33
3. MATERYAL ve YÖNTEM	45

3.1. Materyal.....	45
3.1.1. Kimyasal maddeler.....	45
3.1.2. Kullanılan enzimler	46
3.1.3. Çalışmada kullanılan laboratuvar gereçleri.....	46
3.1.4. Kullanılan kitler ve DNA moleküler belirteçleri.....	47
3.1.5. Stok solüsyonlar	48
3.1.6. Çalışmada kullanılan vektörler.....	49
3.1.7. Çalışmada kullanılan bakteri izolatı	50
3.1.8. Bakteriyel kültür ortamı	50
3.2. Yöntem	50
3.2.1. Çalışmada kullanılan ortamın ve malzemenin temizliği ve sterilizasyonu	50
3.2.2. DNA izolasyonu ve klonlama	51
3.2.2.a. Primer tasarımı	51
3.2.2.b. İnsan genomik DNA'sının temin edilmesi.....	52
3.2.2.c. Polimeraz zincir reaksiyonları (PCR).....	52
3.2.2.d. DNA agaroz jel elektroforezi	54
3.2.2.e. Agaroz jelden DNA purifikasyonu.....	54
3.2.2.f. PCR ürünlerinin A/T klonlanması	55
3.2.2.g. Plazmit DNA izolasyonu (Miniprep)	55
3.2.2.h. Kompetent hücre hazırlanması.....	55
3.2.2.i. Ligasyon.....	56
3.2.2.j. Transformasyon.....	56
3.2.2.k. Restriksiyon endonükleaz kesimleri.....	56
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	57
4.1. BCL-2 Gen Promotörünün Klonlanması.....	64
4.1.1. BCL-2 gen promotörünün 2444 bp'lik bölgesinin çoğaltılması	64
4.1.1.a. İnsan BCL-2 gen promotörünün 2444 bp bölgesinin pGEM-T Easy vektör sistemine ligasyonu ve <i>E.coli</i> 'ye transformasyonu.....	64
4.1.1.b. Koloni PCR	65
4.1.1.c. Plazmit DNA izolasyonu	65
4.1.2. BCL-2 gen promotörünün 2372 bp'lik bölgesinin çoğaltılması	66

4.1.2.a. İnsan BCL-2 gen promotörünün 2372 bp bölgesinin pGEM-T Easy vektör sistemine ligasyonu ve <i>E.coli</i> 'ye transformasyonu.....	66
4.1.2.b. Koloni PCR	67
4.1.2.c. Plazmit DNA izolasyonu	67
4.1.3. BCL-2 gen promotörünün 610 bp'lik bölgesinin çoğaltılması	68
4.1.3.a. İnsan BCL-2 gen promotörünün 610 bp bölgesinin pGEM-T Easy vektör sistemine ligasyonu ve <i>E.coli</i> 'ye transformasyonu	68
4.1.3.b. Koloni PCR	68
4.1.3.c. Plazmit DNA izolasyonu	69
4.1.4. BCL-2 gen promotörünün 290 bp'lik bölgesinin çoğaltılması	69
4.1.4.a. İnsan BCL-2 gen promotörünün 290 bp bölgesinin pGEM-T Easy vektör sistemine ligasyonu ve <i>E.coli</i> 'ye transformasyonu	70
4.1.4.b. Koloni PCR	70
4.1.4.c. Plazmit DNA izolasyonu	71
4.2. pGL3 Lusiferaz Vektörünün <i>E.coli</i> 'ye Transformasyonu.....	71
4.2.1. pGL3 Lusiferaz vektörünü taşıyan ve çoğaltan <i>E.coli</i> 'den plazmit izolasyonu	72
4.2.2. pGL3 Lusiferaz vektörünün HindIII ve KpnI kesim enzimleriyle kesilmesi...	72
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	73
KAYNAKÇA.....	83
ÖZGEÇMİŞ	100

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrat Derece
µl	: Mikrolitre
AIF	: Apoptoz İndükleyici Faktör
Apaf-1	: Apoptozu aktive eden faktör 1
CaCl ₂	: Kalsiyum Klorür
c-FLIP	: cellular-FLICE like inhibitory protein
CTL	: Sitotoksik T Lenfosit
dk	: Dakika
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksinükleotit trifosfat
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
ER	: Endoplazmik Retikulum
Erb-B	: Epidermal büyüme faktörü reseptörü
Fms	: Koloni uyarıcı faktör reseptörü tip 1
gr	: Gram
IAP	: Apoptosis protein inhibitorleri (IAP)
ICAD	: Caspase Activated DNase'nin İnhibitörü
ICE	: İnterlökin-1 beta-dönüştürücü enzim
IGF-1	: İnsülin benzeri büyüme faktörü-1'in
Int-2	: Fibroblast büyüme faktörü reseptörü
IPTG	: izopropil β-D-1- tiyogalaktopiranosid
L	: Litre
M	: Molar
mg	: Miligram
MgCl ₂	: Magnezyum Klorür
mL	: Mililitre

mM	: Milimolar
MPT	: Mitokondriyal geçirgenlik geçiş porları
NaOH	: Sodyum Hidroksit
nm	: Nanometre
OD	: Optik Dansite
PARP	: Poli [ADP-riboz] polimeraz
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rDNA	: Ribozomal DNA
RNA	: Ribonükleik Asit
RNaz	: Ribonükleaz Enzimi
Ros	: Radikal oksijen status
rpm	: Dakikadaki dönüş sayısı
Sis	: Trombositlerden salınan büyüme faktörü reseptörü
sn	: Saniye
TAE	: Tris Asetik Asit EDTA
TAF	: Tümör Anjiyogenez Faktörü
TGF	: Transforme Edici Büyüme Faktörleri
Th2	: Tip 2 yardımcı T
TNF	: Tümör nekroz faktörü
V	: Volt
XIAP	: X bağlantılı memeli apoptoz proteini inhibitörü
α	: Alfa
β	: Beta

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Apoptoz sırasında hücrede meydana gelen morfolojik değişimler	6
Şekil 1.2. Apoptozun moleküler mekanizması	10
Şekil 1.3. İntrinsik yolak ile ekstrinsik yolak arasındaki bağlantıyı gösteren model	18
Şekil 1.4. Mitokondriyal (intrinsik yol) ile ekstrinsik yol arasındaki bağlantıyı gösteren şema	18
Şekil 1.5. <i>lux</i> operonu, ilgili genler ve kontrol bölgeleri.	31
Şekil 1.6. Lusiferaz ve 2 alt birimi	32
Şekil 1.7. <i>lux</i> operonu ve yeterli sayı algılama mekanizması	32
Şekil 3.1. DNA marker 3000 bp	47
Şekil 3.2. pGEM-T Easy vektörünün restriksiyon haritası ve klonlama bölgesi.....	49
Şekil 3.3. pGL-3 basic luc reporter vektör haritası.....	50
Şekil 4.1. BCL-2 geninin kromozom üzerindeki yerleşimi kromozom 18.....	57
Şekil 4.2. BCL-2 geninin alternatif ekson yapısı.....	58
Şekil 4.3. İnsan BCL-2 geninin 2500 bp'lik promotör bölgesi ile insan BAX geninin 2500 bp'lik promotörü arasındaki homoloji.....	60
Şekil 4.4. 2444 bp bölgenin PCR ile çoğaltılması	64
Şekil 4.5. Koloni PCR sonucunun agaroz jelde görüntülenmesi	65
Şekil 4.6. 2372 bp bölgenin PCR ile çoğaltılması	66
Şekil 4.7. Koloni PCR sonucunun agaroz jelde görüntülenmesi.....	67
Şekil 4.8. 610 bp bölgenin PCR ile çoğaltılması	68
Şekil 4.9. Koloni PCR sonucunun agaroz jelde görüntülenmesi.....	69
Şekil 4.10. 290 bp bölgenin PCR ile çoğaltılması	70
Şekil 4.11. Koloni PCR sonucunun agaroz jelde görüntülenmesi	71
Şekil 4.12. pGL3 Lusiferaz vektörünün HindIII ve KpnI kesim enzimleriyle kesildikten sonra agaroz jel görüntüsü	72

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Apoptozisin başlatıcıları (Ekstrinsik yol)	12
Çizelge 1.2. Apoptozisin başlatıcıları (İntrinsik yol)	16
Çizelge 1.3. BCL-2 ailesinin sınıflaması	21
Çizelge 1.4. BCL-2 nin yükselmiş seviyelerinin yaygın insan kanserlerindeki yüzdesi	27
Çizelge 3.1. Çalışmalarda kullanılan kimyasallar.....	45
Çizelge 3.2. Çalışmalarda kullanılan enzimler.	46
Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan cihazlar.....	46
Çizelge 3.4. Dizayn edilen primerlerin uzunlukları, sıcaklıkları ve dizileri.....	52
Çizelge 3.5. BCL-2 gen promotörünün 2444 bp'lik bölgesi için kullanılan PCR programı, sıcaklık döngüsü.....	53
Çizelge 3.6. BCL-2 gen promotörünün 2372 bp'lik bölgesi için kullanılan PCR programı, sıcaklık döngüsü.....	53
Çizelge 3.7. BCL-2 gen promotörünün 610 bp'lik bölgesi için kullanılan PCR programı, sıcaklık döngüsü.....	53
Çizelge 3.8. BCL-2 gen promotörünün 290 bp'lik bölgesi için kullanılan PCR programı, sıcaklık döngüsü.....	54
Çizelge 3.9. Koloni PCR için kullanılan PCR programı, sıcaklık döngüsü	54
Çizelge 4.1. BCL-2 geninin transkript varyantları ile ilgili hastalıklar	57
Çizelge 4.2. BCL-2 geninin transkript varyantları.....	58
Çizelge 4.3. BCL-2 geninin 2580 bp'lik promotör parçasının dizisi ve dizi üzerindeki fonksiyonel bölgeler.....	59
Çizelge 4.4. BCL-2 gen promotörü üzerindeki muhtemel transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri.....	60

1. GİRİŞ

1.1. Apoptozis (Programlı hücre ölümü)

Apoptoz, fizyolojik bir ölüm şekli olup, hücre sayısının kontrolü, hücre ölümü ve hücre çoğalması arasındaki dengeyi kontrol eden enerji bağımlı moleküler kaskat olaylarını kapsayan kompleks bir süreçtir. Apoptoz kavramı ilk kez 1972’de Kerr Wyllie tarafından (Kerr *et al.*1972) nekrozdan farklı olan diğer bir ölüm şekli için tanımlanmıştır (Searle *et al.* 1982). Bu terim programlı ve fizyolojik etkenlerden kaynaklanan hücre ölümünü tanımlar.

Apoptoz, olgun organizmada ve normal gelişim sürecindeki farklı hücre tiplerinin hasarlanması esnasında spesifik bazı hücrelerin yok olmasından sorumlu bir mekanizmadır. Apoptozun başlıca amacı yetişkinlerde hasarlı, infekte olmuş yada potansiyel neoplastik hücreleri yok ederek homeostazın devamlılığını sağlamaktır. Apoptotik hücrelerin sayısı bireyin yada organizmanın sağlıklı olup olmayışını tayin ettiğinden moleküler ve fonksiyonel apoptoz mekanizmaları hücrede dengeyi sağlayan önemli bir faktördür (Orrenius *et al* 2011). Apoptozun normalden çok oluşu Alzheimer, ALS, Parkinson ve musküler atrofiler gibi nörodejeneratif hastalıklarla, hematolojik ve otoimmün bozukluklarla, iskemik hasarlarla ilişkilidir ayrıca bakteriyel ve viral enfeksiyonlara , toksinlere bağlı hastalıklara yol açar. Diğer taraftan yetersiz apoptoz ise kanser, premalign hastalıklar, otoimmün ve metabolik bozukluklar, viral enfeksiyonlar ve aterosklerozla sonuçlanır.

Memeli hücrelerinde meydana gelen apoptozis sürecinde gerçekleşen mekanizmalar *Caenorhabditis elegans* nematodunun gelişim sürecinde meydana gelen programlanmış hücre ölümü mekanizmalarını da ihtiva eder (Horvitz *et al.* 1999). *C. elegans* erişkin kurdun oluşumunda 1090 somatik hücre elzemdir fakat bu hücrelerden 131 tanesi programlanmış hücre ölümüne ya da apoptozis uğrar. Apoptozis bu yüzden hücrelerin genetik kökenli saptanmış eliminasyonunu ihtiva eden programlanmış hücre

ölümü şeklinin en önemli ve ayırt edici bir mekanizması olarak bilinir. Bununla beraber programlanmış hücre ölümünün yanısıra yeni tanımlanan ve henüz keşfedilmemiş olan diğer şekillerinin de dikkate alınması oldukça önemlidir (Debnath *et al.* 2005; Formigli *et al.* 2000; Sperandio *et al.* 2000).

Apoptozis, hücrelerdeki genetik programın aktifleşmesiyle harekete geçen bir mekanizmadır (Searle *et al.* 1982). Apoptozis; hücrenin büzülerek tomurcuklanması, kromatin yoğunlaşması ve fragmentasyonu kendini gösteren oldukça kompleks bir süreçtir. Apoptoz, çoğunlukla nekrozis ile karıştırılabilir ancak nekrozis olayında hücre zarlarının geçirgenliği artar, hücrelerin içeriği çevredeki komşu dokulara saçılır ve inflamasyona sebebiyet verir (Searle *et al.* 1982).

1.1.1. Apoptozisin canlı organizmalardaki yeri ve önemi

Canlıların hayat döngüsünün esas faktörleri doğma, büyüme, çoğalma, yaşlanma ve ölümdür. Hayatın devamlılığı organizmalardaki, yapı ve işlevlerinin fizyolojik ihtiyaçlarının belirlediği hudutlar içerisinde korunması ile ilişkilidir. Bu nedenle hücrelerin çoğalması ile hücrelerin ölümü arasında bir denge olması elzemdir. Eğer bu denge bozulursa, yani çoğalandan çok hücre ölümü gerçekleşirse veya da farklılaşırsa dejeneratif hastalıklar, ölen veya da farklılaşanlara kıyasla daha fazla hücre çoğalması durumunda ise kanser olgusuyla ve de otoimmün hastalıklarla karşılaşılır (Mak T. 2003).

Canlılardaki en küçük fonksiyonel unsur olan hücrede meydana gelen ölüm olayı, fizyolojik veya da patolojik süreçler sonucunda meydana gelir. Patolojik bir hücre ölüm şekli olan nekroz, hücre fragmentasyonu ve hücre şişmesi ile karakterizedir ve iskemi, mekanik travma gibi önemli çevresel faktörlerdeki değişikliklerin sebep olduğu pasif bir süreçtir (Kane AB. 1995). Bu ölüm şeklinde hücre içi denetim yolları etkisizdir dolayısıyla hücre kendi kararı ile ölüme gitmez. Bir başka hücre ölüm şekli olan fizyolojik hücre ölümü ise hasarlı, yaşlı ya da anormal hücreleri yok ederek hücrelerin arasındaki homeostazı ve hücrelerin canlılıklarını sürdürmesini indükler (Hockenbery 1995).

1.1.2. Apoptosisin regulasyonunda rol oynayan genler

Apoptosisin düzenlenmesi p53 geni ile harekete geçen devamında ise kaspazların aktivasyonu ile sürdürülen bir süreci kapsar. p53 geni, tümör süpresör gendir ve mutasyona geçirdiğinde hücrenin ömrü uzamaktadır. Genotoksik koşullarla meydana gelen hücre hasarı, p53'ün aktifleşmesine neden olur. p53, hasarı tanıdıktan sonra DNA'ya direk bağlanarak, G1'de hücre döngüsünün durmasını sağlayarak hasarın düzeltilmesi için gerekli olan zamanı kazandırır veya da zarar tamir edilemeyecek kadar çoksa hücreyi apoptozise indükler. Ek olarak BCL-2 ve BAX gruplarının oranlarını düzenlenmesinde p53'ün rol aldığı literatürde belirtilmektedir (Ashkenazi *et al.* 1998; Gilchrist 1998).

Apoptozis regülasyonu bir diğer gen ailesi olan BCL-2/BAX ailesiyle de düzenlenmektedir (Chao *et al.* 1998). Bu aileye ait yaklaşık 20 üye tanımlanmıştır (Roulston *et al.* 1994; Johnson 2000) BCL-2 proteinlerinin bir grubu apoptosisi inhibe (anti-apoptotik) eder, diğer grup ise aktive (pro-apoptotik) eder.

Apoptozis programının hayati bileşenleri kaspazlardır (Johnson 2000; Eichhorst *et al.* 2001). Kaspazlar, proteinleri sadece aspartik asit bulunan bölgelerden kesen sistein proteazlardır. Kaspazlar TNF reseptör gen ailesi üyesidir. Bunların sitoplazmik bölümlerinde ölüm alanı (death domain) denen bir aminoasit dizisi mevcuttur. Literatürde belirtilen altı tane ölüm reseptörü, CD95 (APO-1/Fas), TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand)-R1, TRAIL- R2, TNF-R1, DR6. DR3 gösterilmiştir (Wang *et al.* 2001; Strasser *et al.* 2000). Adaptör proteinlerin işlevi reseptörle gelen sinyal sonucunda kaspazlara bağlanıp onları aktifleştirmektir. Bunları tanımlayan en iyi örnekler Fas (CD95) ve de TNF reseptörü-1 (TNFR1) dir. Fas'ın etkisiyle kaspaz yolağı aktifleşir ve de kaspaz tarafından aktifleştirilen DNaz (caspase-activated DNase; CAD) vasıtası ile başlayan DNA yıkımı devam eder. İlk kez bir proteaz olarak tanımlanan prokaspaz-1dir. Kaspazlar kaskat mekanizması süresince farklı prokaspazları aktifleştirirler (Kaspaz 1,4,5,13). Kaspaz 2,8,10 proteolizisin başlatıcıları iken Kaspaz 3,6,7 ise uygulayıcıları olarak sınıflandırılırlar (Thompson 1998; Hart S 1994).

Kaspaz inhibitörlerinin efektör kaspazları inhibe ederek apoptozu engellediği belirtilmiştir. Ek olarak IAP ailesinin kaspazlardan ayrı olarak transkripsiyon faktörlerin modülasyonu ve hücre siklusunun kontrolünde de yer alarak apoptozun inhibisyonuna sebep olduğu bilinmektedir. Bu inhibitörler malign hücrelerde aşırı fazla gözlenmektedirler.

Survivin, apoptozis inhibitör protein ailesinin bir üyesi olup 27q25 kromozomunda kodlanan 142 aminoasitten meydana gelmiştir. Apoptozis düzenlemesinde temel rol oynayan bir diğer genidir. Normal proliferen olan hücrelerde çok az seviyede bulunmakla beraber aşırı fazla çoğalan hücrelerde ekspresyonu artmaktadır. Endometrial dokuda hiperplazi ve malignite gelişen olgularda da aşırı eksprese olduğu gösterilmiştir. Survivin hücre ölümünü etkileyen proteazlardan kaspaz-3 ve kaspaz-7'yi doğrudan veya dolaylı olarak inhibe ederek apoptozisin regülasyonunda rol oynar (Israels *et al.* 1999). Diğer IAP proteinlerin aksine, survivin embriyonik ve fetal gelişim sırasında da bulunmaktadır. Normal yetişkin dokularda saptanamayacak kadar az bulunduğu ve malignitelerin tümünde belirgin olarak eksprese olduğu gözlemlenmiştir.

1.1.3. Apoptozun indüklenmesi

Apoptozun moleküler mekanizmasının tam olarak bilinmemesi ile birlikte hücrelerdeki genetik kodlarında bulunan ölüm mekanizmasının fizyolojik ve patofizyolojik faktörlerle ve stres koşulları altında aktifleştiği bilinmektedir (Meng *et al.* 2010) Sinyalizasyonu takiben gerçekleşen apoptozis yolağı hücre tipine ve uyarana göre farklılıklarla karakterize olur. Hangi koşulda apoptozisin gelişip gelişmeyeceği hücrenin sahip olduğu anti-apoptotik /inhibitör molekül potansiyeline bağlıdır.

Apoptoz indükleyicileri genel olarak; büyüme faktörleri, onkogenler ve tümör supresör genler olarak üç gruba ayrılabilir. Apoptozun indüklenmesini sağlayan başlıca uyaranlar;

- Büyüme faktörlerinin yoksunluğu

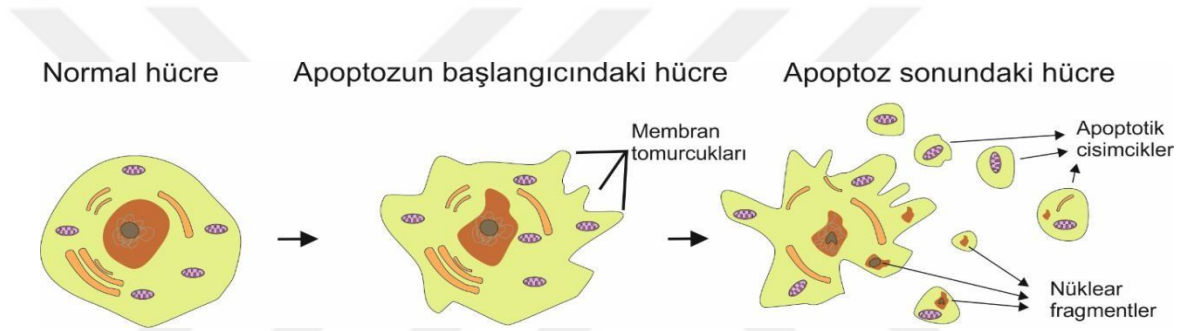
- Sitokinler
- Hücre içindeki kalsiyum oranındaki artış
- TNF (tümör nekroz faktör)-alfa
- TGF(transforming growth factor)-beta
- Fas/FasL sisteminin aktivasyonu
- p53 aktivasyonu
- Viral/ bakteriyel enfeksiyonlar
- Glukokortikoidler ve onkojenler (c-Myc vb.)
- Oksidatif stres

Ayrıca UV, radyasyon, hipertermi, sitotoksik antikanser ilaçlar ve seramid tedavisinin de apoptozun indüklenmesinde rol oynadığı bilinmektedir (Orrenius *et al.* 2011).

1.1.4. Apoptozun şekilsel özellikleri (Morfolojisi)

Apoptozis, dokuda bulunan belirli bir bölgedeki hücrelerin tümünü etkilemez, hücrelerde dağınık olarak meydana gelir ve morfolojik olarak yangısal değişikliklere rastlanmaz. Saptanan ilk şekilsel değişiklik kromatinin çekirdek zarının altında kondanase olarak farklı boyutlarda oval gibi şekillerde sınırlı yoğun kitleler halini almasıdır. Nükleusta, osmiofilik granül kitleleri oluşumu için nükleolus kromatini dağılmış bir hal alır. Fibriler protein merkezi yoğunlaşmış çekirdek kromatinin iç yüzeyinde yoğun granüler kitle oluşturur. Bu nükleus farklılaşmalarıyla aynı anda apoptotik hücre komşu hücrelerden uzaklaşır ve bağlantı noktaları yok edilir. Bazı spesifik yüzey yapıları örneğin mikrovilluslar ortadan kalkar. Hücre hacimce küçülür fakat hücrenin yoğunluğu artar, sitoplazmik organeller kondanase olur ve düz endoplazmik retikulum genişlemiş bir hal alır. Sitoplazma aşırı yoğunlaşır ve vakuol oluşumları meydana gelir. Sisternalar genişler ve hücre zarı ile bütünleşerek hücrenin üst yüzüne doğru tomurcuklanmalar meydana getirirler. Sitoplazmik filamentler ise yan yana gelecek şekilde ve hücre yüzeyine paralel katmanlar halinde toplanırlar (Cummings *et al.* 1997; Kerr *et al.* 1994). Mevcut durumda hücre yüzeyinde tomurcuklanma meydana gelir ve nükleus sınırında bir düzensizlik vardır. Bunların

birbirinden ayrılması ile çekirdek ve sitoplazma değişik boyutlarda “apoptotik cisimcikler” oluşturur. Apoptotik cisimcikler epitelyal yüzeyden dökülebilir ya da genellikle komşu normal parankimal hücreler ya da makrofajlar tarafından fagosite edilirler (Cummings *et al.* 1997; Kerr *et al.* 1994). Bu sürecin son safhasında ise kalıntı çekirdek ve sitoplazmik yapıların genellikle fagosite eden hücrenin fagozomu içinde lizozomal enzimlerle parçalandığı “in vitro otoliz” evresidir. İşte bu hücre parçalanması sırasında hücre içi elemanlar hücreler arası boşluğa dağılmadığı ve proteolitik enzimler ya da toksik oksijen salınımı olmadığı için inflamatuvar yanıt oluşmaz ve komşu hücrelerin zarar görmesi önlenir (Cummings *et al.* 1997; Kerr *et al.* 1994).



Şekil 1.1. Apoptoz sırasında hücrede meydana gelen morfolojik değişimler (Cummings *et al.* 1997; Kerr *et al.* 1994; Toraman 2017).

1.1.5. Apoptozisteki biyokimyasal olaylar

Protein ayrılması; Protein hidrolizi apoptozisin spesifik bir özelliğidir ve kaspazların aktivasyonu ile meydana gelir. Ek olarak kaspaz aktivitesi endonükleazların indüklenmesinde önemli rol oynar (Elmore 2007; Wickremasinghe *et al.* 1999).

Protein çapraz bağlanması (Cross-Linking); Apoptoziste hücreler büzüşerek küçük boyuttaki fragmentlere parçalanır. İşte bu fragmentler; transglutamazlar vasıtasıyla yapılan çapraz bağlanmalar ile sitoplazmik proteinlerin apoptotik cisimlere dönüşümünü sağlar.

DNA yıkımı; Apoptoza uğrayacak hücrelerde DNA parçalanarak 50-300 kilo baz'lık büyük fragmentlere ayrılır. Sonrasında Ca^{2+} ve Mg^{2+} 'a bağımlı endonükleazlar DNA

zincirini, H1 histon bölgesinden 180-200 baz çiftlik ve de katları şeklinde parçalar.

Fagositik tanıma; Apoptoza uğrayacak hücreler, plazma zarlarının dışında fosfatidilserin ve trombospondin ekspresyonu gerçekleştirirler. Fosfatidilserin, sağlıklı hücrelerde plazma membranının içinde bulunurken apoptotik hücrelerde plazma zarının dış yüzeyinde bulunur. Apopto crelerde fosfatidilserin ekspresyonu sayesinde hücrenin fagositozu için makrofajlar ve komşu hücreler tarafından tanınması sağlanır ve bu olay fagositik hücreler için sinyal görevi görür (Elmore 2007; Wickremasinghe *et al.* 1999; Keane *et al.* 2001; Duvall *et al.* 2006).tik hü

1.1.6. Apoptotik hücre ölümünün aşamaları

Apoptozis süreci genel olarak 4 safhada gerçekleşir;

- a. Apoptozun başlatılması (sinyal üretici yolların aktivasyonu)
- b. Hücre içi proteazların (kaspazların) aktivasyonu
- c. Hücrede farklı biyokimyasal ve şekilsel değişikliklerin meydana gelmesi
- d. Fagositoz

Sinyalizasyon sürecini takiben hücre içinde bulunan, proteaz ailesinden olan kaspazlar (Caspase: Cysteine-containing **A**spartate Spesifik **P**roteases) aktifleşir. Bu süreç dahilinde adaptör proteinler vasıtasıyla ölüm reseptörleri, mitokondriden serbestleşen Sit-c, Smac ve Omi gibi apoptotik modulatorler aracılığıyla ise iç sinyaller, farklı zincirleme reaksiyonlar ile sitoplazmadaki efektör kaspazları aktive ederler ve sonuç olarak hücreyi apoptoza götürürler. Ayrıca mitokondriden serbestleşen Endonükleaz G ve AIF gibi modulatorlerde non-kaspaz yoldan hücreyi apoptotik sürece götürebilir.

Ca^{++} artışında olduğu gibi hücre içi metabolik değişiklikler de hücrenin apoptozis sürecine girmesinde rol oynar. Hücre içi artan Ca^{++} düzeyi, inaktif haldeki endonükleaz, proteaz, transglutamaz, fosfolipaz benzeri latent enzimleri aktiveleştirerek programlı hücre ölümüne götürür.. Ca^{++} bağımlı proteazlar ve endonükleazların aktifleşmesi

sitoplazmik proteinlerin parçalanmasına ve apoptozise özgü internukleozomal DNA kırıklarına sebep olur (Zhivotovsky *et al.* 2011). Ca^{++} bağımlı endonükleazlar DNA zincirini, H1 histon bölgesinden 180-200 baz çifti ve katları uzunluğunda parçalara ayırmaktadır (Earnshaw 1995). Katepsin-D ise apoptozun geç safhasında ortaya çıkan bir endopeptidazdır ve de lizozomların proteolitik fonksiyonunun gelişiminde önemli bir role sahiptir (Minarowska *et al.* 2007) Hücre içinde bazı kinazlarda apoptotik süreçte yer alır; örneğin protein kinaz-A apoptozisi uyarırken (Moujalled *et al.* 1998) , protein kinaz-C'nin çoğu izoformunun apoptozisi engellediği bilinmektedir (Reyland 2009). Hücrenin içinden veya dışından gelen sinyaller ile oluşturulan DNA hasarının aktifleştirdiği çoğu genler de hücreyi apoptoza sürükleyebilir. Bu genler içinde en iyi tanımlanan p53 geni DNA hasarı ile aktifleşir, ardından DNA hasar tamiri için hücre siklusunu durdurur; ancak tamir mümkün olmaz ise BCL-2 ailesinden pro-apoptotik BAX proteinini aktive eder ve yine mitokondri aracılığıyla hücrenin apoptozuna sebep olur (Lia *et al.* 2012).

Hücre içi/dışı sinyallerle oluşan apoptotik uyarı hücre içi farklı sinyal yolları üzerinden kromatin kondensasyonu ve DNA kırıklarının oluşumuna sebep olarak hücreyi geri dönüşümsüz bir yola sokar. Hücrede membran, sitoplazma ve nukleus seviyesinde meydana gelen biyokimyasal ve morfolojik değişimler sonuçta hücrenin apoptotik cisimlere ayrılmasına sebep olur. Apoptozun erken safhasında hücreler birleştiği kısımlardan ayrılır, farklılaşmış yüzey reseptörlerini kaybederler ve belirgince büzülerek total ağırlıklarının yaklaşık olarak yarısını kaybederler. Meydana gelen bu büzüşmenin sebebi; Cl, Na, K, taşıyıcı sistemlerin bozulması sebebiyle hücrenin iç ve dış kısmı arasında cereyan eden sıvı kinetiğinin durmasıyla ilişkilidir. Dolayısıyla plazma zarının formunda bozulma ve kabarcıklanmalar meydana gelir bir de parçalara ayrılarak apoptotik cisimlerin oluşumu gerçekleşir. Bu evrede transglutaminaz enzimi de etkili olmaktadır.

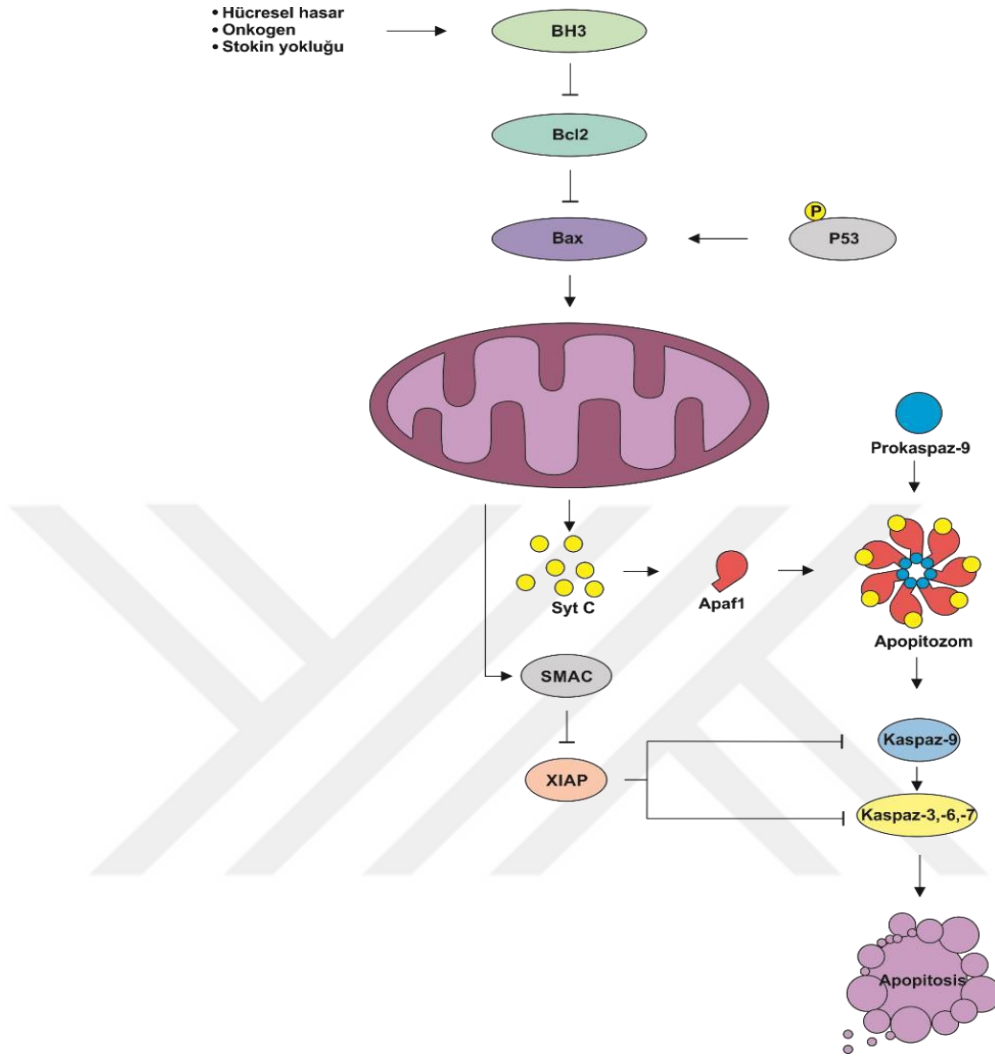
Apoptozun son evresi ise apoptotik cisimlerin fagositozudur. Normalde hücre zarındaki ATP bağımlı translokaz enzimi ile aktif olarak korunan fosfolipit asimetrisi apoptozun indüksiyonunda bozulur. ATP-translokaz enzim aktivitesinin yitilmesi normalde membran iç yüzeyinde bulunan fosfatidilserinin (PS) membranın dış yüzeyine

yerleşmesine ve apoptotik cisimlerin çevre hücrelerce tanınarak fagosite edilmesine neden olur. Apoptotik cisimler nekrozisten farklı olarak sitokin salgılanmasını ve inflamasyon oluşumunu uyarmaksızın makrofajlar ya da komşu hücreler tarafından fagosite edilirler (Zhivotovsky *et al.* 2011).

1.1.7. Apoptozun moleküler mekanizmaları

Apoptozisin moleküler ve genetik detayları ilk kez *C.elegans* nematodunda çalışılmıştır. *C.elegans*’ ta apoptozu başlatan genler Ced-3 ve Ced-4 diye adlandırılmıştır. Ced-3 geni bir sistein proteazı kodlar, bu da memelilerdeki ICE (interleukin 1b converting enzyme)’ye benzemektedir. Ced-4 ise kalsiyuma bağlı bir proteini kodlamakta ve memelilerdeki Apaf-1 ile benzerdir. Ced-9, insanlarda BCL-2 ile homoloji gösterir ve apoptozu inhibe ettiği bilinmektedir.

Hücre yüzeyinin özel ölüm reseptörleri ile etkileşmesi sonucunda apoptozis başlar. Apoptozise karar veren bir hücrenin ilk olarak, hücredeki genetik mekanizmayı uyaran bir sinyal alması gerekir. Sinyal kaynağı hücrenin içinden ya da dışından olabilir. Hücre döngüsü bozuklukları, DNA hasarı, hücredeki Ca^{+} miktarındaki artış, pH farklılıkları, gibi etkenler hücre ölüm sinyallerini harekete geçirir. Sonrasında kaspazların aktivasyonu gerçekleşir. Aktifleşen kaspazlar hedefteki proteinlerin yıkımını sağlayarak, hücre içinde farklılıklara sebebiyet verir (Touchette *et al.* 1991; Keane *et al.* 2001). Hücre apoptotik süreçte ilerledikçe sitoplazmada çıkıntılar meydana gelir. Sonrasında hücre, küçük, zarla çevrili fragmentlere bölünür ve “apoptotik cisimler” oluşturur Oluşan apoptotik cisimler, etraftaki parankimal hücreler ve makrofajlar tarafından fagosite edilir (Touchette *et al.* 1991).



Şekil 1.2. Apoptozun moleküler mekanizması (Toraman 2017)

Apoptosis süreci; enerji bağımlı ve önemli derecede kompleks moleküler kaskat olaylarını ihtiva etmektedir. Daha önceki çalışmalarla ekstrinsik ve intrinsik (mitokondriyal yol) denen iki esas apoptotik yolun olduğu ve bu iki yolun birbiri ile bağlantılı olduğu bildirilmiştir. İntrinsik ve ekstrinsik yola ilave olarak perforin-granzim bağımlı hücre ölümünü ve T-hücre aracılı sitotoksisiteyi ihtiva eden yollar da mevcuttur (Elmore 2007; Duvall *et al.* 2006).

a. Ekstrinsik yol

Ekstrinsik ya da ölüm reseptör yolu, apoptozisi transmembran reseptörler vasıtalı etkileşimlerle başlatan yolu tanımlar. Ekstrinsik yolda TNF reseptör gen süper ailesinin üyelerinden ölüm reseptörlerini ihtiva eden transmembran reseptörler kritiktir. TNF ailesi üyeleri, ortalama 80 aminoasitlik bir sitoplazmik domaine sahip olan öldürücü domain (death domain) ihtiva ederler (Ashkenazi *et al.* 1998) ve bunlar hücrenin üst yüzünden hücre içi sinyal yoluna öldürücü sinyalin iletilmesinde önemli bir görev üstlenirler. Öldürücü reseptörler ve onların ligandı olan TNF- α /TNFR1, FasL/FasR, Apo2L/DR5'i Apo3L/DR3, Apo2L/ DR4 ve ihtiva etmektedir (Ashkenazi *et al.* 1998; Chicheportiche *et al.* 1997; Ashkenazi *et al.* 1999; Peter *et al.* 1998; Suliman *et al.* 2001). Apoptozun ekstrinsik fazını tanımlayan olayların dizisi, TNFR1/ FasL / FasR ve TNF- α kompleksleriyle en iyi şekilde belirlenir. Fas ligandının Fas reseptörüne bağlanması, adaptör proteini FADD'yi bağlar ve TNF ligandının TNF reseptörüne bağlanması, FADD ve RIP alımıyla TRADD adaptör proteininin bağlanmasıyla sonuçlanır (Hsu *et al.* 1995, Wajant, 2002). Sonrasında FADD, ölüm efektör domaininin dimerizasyonu yoluyla prokaspaz -8 ile bağlanır. İşte bu safhada, ölüme neden olan bir ölüm sinyal kompleksi (DISC) oluşur ve prokaspaz-8'in katalitik aktivitesi ortaya çıkar (Kischkel *et al.* 1995). Kaspaz-8 aktive olur olmaz, apoptozun aktivasyon aşaması indüklenir. Ölüm reseptör aracılı apoptoz, c-FLIP adı verilen ve FADD ve kaspaz-8'e bağlanacak bir protein ile inhibisyonu gerçekleşir (Kataoka *et al.* 1998). Potansiyel apoptoz düzenlenmesinin bir başka safhasında, Toso adı verilen, Kaspaz-8 işleminin inhibisyonu yoluyla T hücrelerinde Fas'ın indüklediği apoptozu bloke ettiği gösterilen bir protein bulunur (Hitoshi *et al.* 1998).

Çizelge 1.1. Apoptozisin başlatıcıları (Ekstrinsik yol) (Duvall 2006)

Ölüm reseptörleri Ligandı	
TNF ailesi: TNF-R1	TNF
Fas	FasL
DR3	Tweak
TRAIL-R1(DR4)	TRAIL
TRAIL-R2(DR5)	TRAIL
DR6	DR6L
TAJ	TAJL
THANK-R	THANK
Diğer:	
Mannoz 6-Fosfataz (İnsülin benzeri Büyüme faktörü II reseptörü; ILGF-II)	Granzim B
Tuzak reseptörleri	
TNF ailesi (ölüm reseptörlerini antagonize edenler):	
Solubl Fas	FasL
TRAIL-R3	TRAIL
TRAIL-R4	TRAIL
Tuzak reseptör 3 Osteoprotegerin	TRAIL

b. Perforin/granzim yolu

T hücre aracılı sitotoksikite tip IV aşırı duyarlılığın bir varyantıdır. Sitotoksik T lenfositleri (CTL'ler) hedef hücreleri ekstrinsik yolak ile öldürebilirler ve FasL / FasR etkileşimi, CTL'nin tetiklediği apoptozisin farklı bir tekniğidir (Brunner *et al.* 2003). Bununla birlikte, sitotoksik etkilerini tümör hücrelerine ve virüslerin enfekte ettiği hücrelere, transmembran porlar oluşturan molekül perforinin salgılanmasını devamında ise porlar boyunca ve hedef hücre içine sitoplazmik granüllerin ekzozik bir halde serbest bırakılmasını ihtiva eden yeni bir yol ile uygulanabilirler (Trapani and Smyth 2002). Serin proteaz üyeleri olan granzim A ve granzim B, moleküller içerisindeki çok kritik granüllerdir (Elmore 2007).

Granzim B molekülleri, aspartat kalıntıları parçalayacağı dolayısıyla prokaspaz-10'u aktive edecek ve ICAD (Caspase Activated DNase'nin İnhibitörü) gibi kompleksleri parçalayabilecektir (Sakahira *et al.* 1998). Ayrıca Granzim B'nin Bid'in spesifik kesimi ve sitokrom c salınımının indüksiyonu vasıtasıyla ölüm sinyalinin aktivasyonu için

mitokondriyal yolun kullanılabileceği rapor edilmiştir (Barry and Bleackley, 2002, Russell and Ley 2002). Granzim B ise direkt olarak Kaspaz-3'ü aktive edebilir. Mitokondriyal yolun ve Kaspaz-3'ün direkt olarak harekete geçirilmesi, Granzim B ile tetiklenen infaz için önemli bir yer tutar (Goping *et al.* 2003). Rapor edilen çalışmalarda, Granzim B sitotoksikite mekanizmasının, tip 2 yardımcı T (Th2) hücrelerin kontrol mekanizması olarak oldukça önemli olduğu belirtilmiştir (Devadas *et al.* 2006).

Mevcut çalışmalarda, aktive olmuş Th2 hücrelerinin, T hücre reseptörlerinin tetiklediği programlı hücre ölümü şeklinde kaspazların ve ölüm reseptörlerinin görev almadığı gösterilmiştir. Diğer taraftan kaspazlar, Fas-Fas ligand etkileşimi ve ölüm alanlarına sahip adaptör proteinler sitotoksik Tip 1 yardımcı hücrelerin programlı ölümünde ve düzenlenmesinde rol oynarken Granzim B'nin herhangi bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir. Sitotoksik T hücresi tarafından indüklenmiş apoptozda da Granzim A önemlidir ve kaspazlara bağımlı olmayan kaskatları aktive eder. Granzim A, hücrelere salındığında bir, tümör süpresör gen ürünü olan DNaz NM23-H1 vasıtasıyla DNA kesimini aktive eder (Fan *et al.* 2003).

SET, nükleozom montaj proteinidir ve NM23-H1 geninin inhibisyonundan sorumludur. Granzim A, SET kompleksini parçalayarak NM23-H1'in aktivasyonu gerçekleşir dolayısıyla da DNA yıkımına sebep olur. SET kompleksi, NM23-H1'in engellenmesinde, DNA onarımında ve kromatin yapısında da kritik fonksiyonları vardır. SET kompleksini meydana getiren moleküllerin (SET, HMG2, Ape1, pp32) DNA ve kromatin yapısını korumak için birlikte çalıştığı düşünülüyor (Lieberman and Fan 2003). Bu sebeple, bu kompleksin Granzim A ile inhibisyonu DNA ve kromatin yapısının bütünlüğünü bozarak programlı hücre ölümüne de yardımcı olur.

c. İntrinsik yol

Apoptozu başlatan intrinsik sinyal yolları, hücre içindeki hedeflere doğrudan etki eden ve mitokondriyal başlatılan olaylar olan hücre içi sinyaller üreten reseptör aracılı

olmayan çeşitli uyarılar dizisini içerir. İçsel yolu başlatan uyarılar, pozitif veya negatif bir şekilde hareket edebilecek hücre içi sinyaller üretirler. Negatif sinyaller, bazı ölüm faktörlerinin, hormonların ve sitokinlerin yokluğunu içerir; bu da ölüm programlarının bastırılmamasına ve dolayısıyla apoptozun tetiklenmesine neden olabilir.

Bir diğer deyişle, çeşitli büyüme faktörlerinin geri çekilmesi, apoptotik supresyonun kaybı ve sonrasında apoptozun aktivasyonu meydana gelir. Buna sebep olan diğer uyarılar, bunlardan ibaret değildir ve radyasyon, toksinler, hipoksi, hipertermi, viral enfeksiyonlar ve serbest radikaller de dahil edilebilir. Bütün bu indükleyiciler, mitokondriyal geçirgenlik geçiş (MPT) porlarının açılmasına, mitokondriyal transmembran potansiyelini kaybetmesine ve sitozole intermembran boşluğundan normalde salıverilmiş pro-apoptotik proteinlerin iki ana grubunun serbest bırakılmasına neden olan iç mitokondriyal zardaki değişikliğe neden olur (Saelens *et al.* 2004). Birinci grup serin proteaz HtrA2 / Omi ve Sitokrom c, Smac / DIABLO 'dan oluşur (Du *et al.* 2000; Garrido *et al.* 2006). İşte bu moleküller kaspaz bağımlı mitokondriyal yolağı aktifleştirirler.

Sitokrom c, "apoptozom" kompleksini meydana getiren prokaspaz-9 ve Apaf-1'i bağlar ve de aktifleştirir (Chinnaiyan, 1999, Hill *et al.* 2004). Prokaspaz- 9' un böyle bir birleşimi Kaspaz -9' un aktifleşmesine sebebiyet verir. Smac / DIABLO ve HtrA2 / Omi'nin, IAP (apoptoz proteinlerinin inhibitörleri) aktivitesini bloke ederek programlı hücre ölümünü teşvik ettiği bildirilmiştir (van Loo *et al.* 2002, Schimmer, 2004). Pro-apoptotik proteinlerin ikinci grubu, AIF, endonükleaz G ve CAD apoptoz esnasında mitokondriden salınır, ancak bu hücrenin ölüm kararı verdikten sonra meydana gelen geç bir olaydır.

Nükleusa giren AIF, DNA'nın 50-300 kb'lık fragmentlere parçalanmasına ve çekirdekteki kromatinin yoğunlaşmasına sebeptir (Joza *et al.* 2001). Nükleer yoğunlaşmanın bu erken formu "evre I" yoğunlaşma olarak tanımlanır (Susin *et al.* 2000). Endonükleaz G ise nükleusa translokasyon yapar ve burada nükleer kromatin

parçalanarak oligonükleozomal DNA parçaları üretilir (Li *et al.* 2001). Endonükleaz G ve AIF, kaspazlardan bağımsız çalışırlar. CAD, daha sonra mitokondriden salınır ve Kaspaz-3 ile bölünmeden sonra oligonükleozomal DNA fragmentasyonuna ve fazla belirgin gelişen bir kromatin kondensasyonuna sebep olan nükleusa translokasyon yapar (Enari *et al.* 1998).

Sonrasında meydana gelen ve daha belirginleşen bu kromatin kondensasyonu "evre II" yoğunlaşma olarak ifade edilir (Susin *et al.* 2000). Apoptotik mitokondriyal süreçte ki olayların regülasyonu ve de kontrolü, proteinlerin BCL-2 familyası üyeleri vasıtasıyla gerçekleşir (Cory and Adams 2002). Tümör süpresör protein olan p53' ün, BCL-2 ailesinin düzenlenmesinde kritik bir görev alır, fakat mekanizmalar henüz çok net bir şekilde aydınlatılmamıştır (Schuler and Green 2001). BCL-2 ailesi üyeleri, mitokondriyal membran geçirgenliğini idame ettirir ve pro-apoptotik veya antiapoptotik olmak üzere iki farklı çeşide sahiptir.

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

BAD tarafından tutuklanmadığında, hem BCL-2 hem de BCL-XL sitokrom C'nin mitokondriyumdan salınmasını engeller. Yapılan çalışmalarda, BCL-2 ve BCL-xL'nin öncelikle kaspazların aktivasyonunu yöneterek programlı hücre ölümünü inhibe ettiği

gösterilmiştir (Newmeyer *et al.* 2000). "Aven" denen diğer bir protein ise hem APAF-1 hem de BCL-xL' yi tutuklar ve böylece prokaspaz-9'un aktivasyonunu engeller (Chau *et al.* 2000). BCL-2 veya BCL-xL'in aşırı ekspresyonunun diğerini down-regüle ettiğini, bu iki protein arasında karşılıklı bir regülasyona işaret ettiğini gösteren çalışmalar vardır. Puma ve Noxa, aynı zamanda pro- apoptoz ile ilgilenen BCL-2 ailesinin iki üyesidir.

Puma, p53 aracılı apoptozda kritik bir görev alır. PUMA'nın aşırı sentezlenmesi BAX sentezini artırır ve BAX konformasyonel değişikliği, mitokondriye translokasyon, Sitokrom c salınımı ve mitokondriyal membran potansiyelindeki azalma ile karakterize olur (Liu *et al.* 2003). Noxa ise p53 ile tetiklenen diğer bir apoptotik moleküldür. Yapılan çalışmalarda, bu molekülün mitokondriye yerleşebileceğini ve anti-apoptotik BCL-2 familyası üyeleri ile etkileşebildiğini ve bunun da kaspaz-9'un aktivasyonu ile sonuçlandığı gösterilmiştir (Oda *et al.* 2000). PUMA ve NOXA p53 aracılığıyla tetiklendiğinden, onkogen aktivasyonu ve genotoksik hasar ile oluşan programlı hücre ölümüne yardımcı olurlar. Bir onkoprotein olan Myc' nin hem p53'e bağlı hem de bağımsız mekanizmalar yoluyla apoptozu güçlendirdiği rapor edilmiştir (Meyer *et al.* 2006).

Çizelge 1.2. Apoptozisin başlatıcıları (İntrinsik yol) (Duvall 2006)

Lokalizasyon	Apoptojenik Proteinler
Mitokondri	Sitokrom C Kaspaz-2 Kaspaz-3 Kaspaz-8 Kaspaz-9 Smac/DIABLO AIF SIM-20
Endoplazmik retikulum	Kaspaz-12 Bap31
Golgi kompleksi	Kaspaz-2
Nukleus	TR3
Post mitokondrial (Apoptozomlar)	Apaf-1 dATP Kaspaz-9 Sitokrom C

1.1.7.a. Ekstrinsik ve intrinsik yollar arasındaki bağlantı

Apoptozda intrensik ve ekstrensik yollar birbirlerinden bağımsız olarak ilerlese de, aralarında önemli bir etkileşim vardır. Aralarındaki bu etkileşim Bid proteininin Kaspaz-8 ile aktive edilmiş şekli olan tBid vasıtası ile sağlanmaktadır. Sitoplazmada inaktif halde bulunan Bid, Kaspaz-8 tarafından kırılır dolayısıyla 15 kDal hacminde bir karboksi terminal parçası (tBİD) ortaya çıkar. Oluşan tBİD, BH3 domainine sahip olduğundan proapoptotik BCL-2 ailesi üyelerinin diğerleriyle etkileşimde bulunarak, sitoplazma içerisinden mitokondriye transloke olmalarına yani aktif hale gelmelerine neden olup, sonuçta sitokrom c salıverilmektedir. Ek olarak BİD, TNF ve TRAIL gibi diğer hücre yüzey ölüm reseptörleri aracılığıyla da aktif hale gelebilmektedir. Yapılan çalışmalarda, Bid geni “knock out” edilmiş fare karaciğer hücrelerinde, anti-Fas ve de TNF ile apoptoz tetiklenmeye çalışıldığında, apoptozun oluşmadığı bildirilmiştir (Li *et al.* 1998; Luo *et al.* 1998; Widlak *et al.* 2000). Hücre ölüm reseptörlerinden gelen ölüm sinyalinin mitokondriye taşınmasında BİD’in kritik olduğu ve hayati önem taşıyabileceği öne sürülmektedir. BAX fonksiyonu hasara uğramış insan kolon kanseri hücreleri ile yapılan çalışmalarda, TRAIL indüklü apoptozda mitokondrial salınımın gerekli olduğu gösterilmiştir. Burada asıl gerekli olan molekülün, kaspaz kaskadının negatif regülasyonunu sağlayan, X’e bağlı apoptozu baskılayan protein (XIAP, X-linked Inhibitor of Apoptosis)’ in inhibisyon etkisini ortadan kaldırdığı bilinen Smac/DIABLO olduğu rapor edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda intrensik yol ile ekstrensik yol arasındaki bağlantıda Smac/DIABLO salınımının anahtar vazifesi gördüğü anlaşılmaktadır (Deng *et al.* 2002).

1.1.8. Apoptozisin inhibisyonu

Apoptozis mekanizmasında bulunan ve de apoptozisi inhibe eden moleküllerin (IAP) mevcut olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. IAP familyasının üyeleri;

- XIAP,
- BIRC 2 (cIAP1),
- BIRC 3 (cIAP2),
- NAIP,
- Livin ve Survivin (BIRC 5)' dir (Budhidarmo *et al.* 2015).

İlaveten mitokondride yerleşik bulunan, SMAC (Mitokondriden Türemiş Caspaz İnhibitörü) ve DIABLO (Direk IAP Bağlanan Protein) inhibisyon proteinlerinin varlığı da bildirilmiştir. Alanin-treonin-prolin-fenilalanin aminoasitleri ile IAP proteinleri bağlanma motifleri, prokaspaz-9 ile etkileşime girerek sistein proteaz olan kaspazların birbirlerini parçalamasını engeller. Bu mekanizmalar, efektör Kaspaz-3 ve 7' de de aynıdır. IAP bağlanma motifleri SMAC/DIABLO proteinleri ile alanin-valin-prolin-izolosin aminoasitleri ile etkileşime girerek aktifleşirler. SMAC/DIABLO proteinleri apoptozomu bloke eder ve efektör kaspazların inhibisyonuna neden olur (Budhidarmo *et al.* 2015).

Apoptozisin blokajı hücre içi yollar ile de gerçekleştirilebilir. Bilhassa hücrenin hayatta kalması ile ilişkili PI3K/Akt kaskadında fosfo-Akt tarafından BAD proteini fosforilasyona uğradığında fosfo-BAD konformasyon değişikliğine uğradığından BCL-2 ile heterodimerizasyon yapamayacağı ve BAD' in de homodimer yapı oluşturamayacağından mitokondri membranının yapısal bütünlüğü hasarlanmaz. Bu mekanizmada kilit rolü olan molekül, PTEN (fosfotaz ve tensin homoloğu) tümör baskılayıcı proteindir. PI3K'nın üçüncü halkasındaki fosfat grubunun defosforilasyonunu sağlayan PTEN, onu fosfoinositol-2-fosfata çevirir. Böylece Akt molekülünün fosforilasyonunu engeller (Budhidarmo *et al.* 2015).

1.1.9. Apoptozis anormaliteleri ve hastalıklar

Apoptozis; istenmeyen, yaralanmış, hasarlanmış ve patojenler tarafından enfekte edilmiş hücreleri uzaklaştırmayı sağlar fakat bu süreçte bir bozukluk meydana geldiğinde çeşitli hastalıklar ortaya çıkar. Apoptozisin baskılanması kanser, otoimmün hastalıklar, aterosklerozis gibi çeşitli hastalıklar ile ilişkilidir. Apoptozis mekanizmasının aşırı artması ile ilişkili olan çeşitli hastalıklara örnek olarak ise; bakteriyel infeksiyonlar (*Neisseria meningitidis*), viral infeksiyonlar (AIDS), otoimmün rahatsızlıklar (Multiple Sclerosis), norodejeneratif rahatsızlıklar (Alzheimer's), iskemik yaralanmalar (Myocardial infarction), hematolojik rahatsızlıklar (Myelodysplastic Syndromes) verilebilir (Fadeel *et al.* 1994). Apoptozis mekanizmasının işleyişinin bozulmasının yaşlanma süreci ile de ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Çeşitli çalışmalarla apoptozis regülasyonunu sağlayan proteinlerin miktarında yaşa bağımlı olarak meydana gelen farklılıklar rapor edilmiştir ve otoimmün hastalıklar ve yaşlı insanlardaki norodejeneratif rahatsızlıklar gibi yüksek prevelanstaki maligniteler ile pozitif korelasyonda olduğu bildirilmiştir (Joaquin *et al.* 2001).

1.2. BCL-2 Ailesi

Apoptotik sürecin kontrolünde rolü en iyi tanımlanmış olan BCL-2 (B cell lymphoma/leukemia-2) proto-onkogeni ilk kez t(14; 18) kromozomal translokasyonu olan insan folliküler lenfomasında saptanmış 24-26 kDal'luk protein eksprese eden bir anti-apoptotik gendir.

BCL-2 geni, C-terminusunda tek bir yüksek hidrofobik alana sahip 239 amino asitten oluşan bir 26 kd proteinini kodlar, bu da esas olarak mitokondriyal dış membran içinde lokalize olmasını ve nükleer zarfın daha az bir kısmında lokalize olmasını sağlar (Chen-Levy 1989).

BCL2 proteininin ana rolü, mitokondriyal membranın bütünlüğünü korumak, Sitokrom c serbestleşmesini sağlamak ve daha sonra APAF1'e (apoptozis aktive edici faktör-1).

bağlanmasını engeller. BCL2 proteini, dört Bcl-2 homoloji (BH) domainini (BH1 ila BH4) içerir. BH1, BH2 ve BH3, proteinin, BCL2 protein ailesinin pro-apoptotik üyeleri ile homodimer ve/veya heterodimerleri etkileştiği ve oluşturduğu hidrofobik yarıktır (Thomadaki 2006, Reed 2006).

BCL-2, özellikle apoptozu bloke ederek hücrenin hayatta kalma kinetiğini artırır. Böylece, hücrenin genellikle ATP, yeni RNA ve protein sentezi gerektiren ve hücre büzüşmesi, nükleer parçalanma ve DNA bozunması gibi çeşitli hücresel ultra-yapısal değişikliklere neden olan intihar faaliyetlerine girmesini önler.

BCL-2 gen ailesi üyeleri yapısal ve fonksiyonel karakteristikleri açısından pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyeleri olmak üzere iki ana sınıfa ayrılabilir;

Çizelge 1.3. BCL-2 ailesinin sınıflaması (Stephen *et al.* 2010)

BCL-2 ailesi	BH bölgeleri	Aile üyeleri
Anti-apoptotik	BH 1-4	BCL-2, BCL-W, BCL-XL, A1 ve MCL-1
	BH 1-3	MCL-1
Pro-apoptotik	BH 1-3	BAX, BAK, BOK
	Sadece BH3	BID, BIM, BAD, BIK, BMF, BNIP3, HRK, NOXA and PUMA
	BH 3 ve BH4	BCL-xs

BCL-2 ailesi karşıt etkilere sahip olan iki zıt gruba ayrılır. Bunlardan birincisi pro-apoptotik özellikte olup apoptozu tetikleyici olarak iş görürler. Diğer grup ise anti-apoptotik özellikte olup apoptozu inhibe edici etki göstermektedir. BCL-2 ailesinin pro-apoptotik grubu, mitokondriden, sitokrom c'nin sitoplazmaya bırakılmasını indüklerken, anti-apoptotik grup sitokrom c salınımını engellerler. BCL-2 ailesi proteinleri, 4'e kadar numaralanmış BCL-2 homoloji (BH) bölgesi olarak adlandırılan benzer yapılara sahip, birkaç alfa-heliks yumağından meydana gelmektedirler. BCL-2

ailesi üyeleri fonksiyonel işlevlerine göre üç şekilde gruplandırılırlar (Yang *et al.* 1996; Wickremasinghe *et al.* 1999).

1. BCL-2 alt grubu; üyeleri BCL-2, BCL-XL ve BCL-w, Mcl-1, A1, Boo'dur. Bu gruptaki proteinlerin dört bölgesi (BH1, BH2, BH3, BH4) oldukça fazla homolojiye sahiptir. Tümünün de anti-apoptotik etkisi olup, proteinin C terminalinde zara bağlanma bölgelerine sahiptirler ve mitokondrinin dış zarına yerleşiktirler.

2. BAX alt grubu: üyeleri BAK, BAX ve BOK/MTD'dir. Hepsi pro-apoptotik etkili olup BH1, BH2 ve BH3 bölgelerinde BCL-2'yle benzerlik gösterirler. Difteri toksinini ile BAX, yapısal olarak aşırı bir benzerlik gösterir neredeyse aynıdır. Difteri toksini, endozomal ve lizozomal membranlarda mRNA translasyonunu engelleyen adenozin-5'-difosfat ribozile edici polipeptit A alt ünitesinin sitoplazmaya transportunu gerçekleştirecek boyutlarda porlar dizayn ederek hücrenin ölümüne sebep olur. BAX geni, BCL-2 ile heterodimer bir yapı, kendisi ile de homodimer bir kompleks oluşturabilmektedir. Hücrede aşırı Bax eksprese edildiğinde programlı hücre ölümü artarken, Bcl-2'nin çokça ekspresyonu Bax ile bir heterodimer yapı oluşturmakta ve programlı hücre ölümü baskılanmaktadır. Sağlıklı hücrelerde sitozolde latent formda bulunan Bax proteini, ölüm sinyalleri uyarısı ile mitokondriye geçer. Bax ekspresyonunun p53 tarafından regüle edildiği bildirilmiştir (Rossé *et al.* 1998).

3. BİK alt grubu: BİK, BİD, BİM, BAD, BFM, Hrk/DP5, BLK, NİP3, PUMA, NOXA, BNİP3/NİX' den oluşur. Bunların yalnızca BH3 domainleri BCL-2 ile homoloji gösterir ve bundan dolayı BH3 proteinleri diye de isimlendirilirler. Bu gruptaki proteinler heterodimerler olusturarak eşlerinin aktivitelerini düzenlerler.

Anti-apoptotik genlerden BCL-xL ve BCL-2, sitoplazmadaki Bax geni ve mitokondrial dış membrandaki Bak geni ile heterodimer yapıda kalarak Bak/Bax'ın mitokondrial membranda oligomer oluşturmalarını engeller, dolayısıyla mitokondrial membran permeabilizasyonunu kontrolünü sağlarlar. Bak ve Bax'ın aktivasyonuna ilişkin direk ve indirek model olmak üzere iki model önerilmiştir (Kuwana *et al.* 2002; Laulier *et al.* 2012). Direk modele göre yapısında sadece BH3 içeren proapoptotik BCL-2 aile üyeleri (Bid, Bim, Puma vb) direk olarak Bax ve Bak'ın oligomerizasyonunu, por formasyon

değişimini uyarmaktadır; indirek modele göre ise BH3 içeren proapoptotik üyeler BCL-2' yi inhibe ederek indirek yoldan BAX ve BAK'ı aktifleştirmektedir. Sonuçta her iki modele göre de mitokondrial membranda BAK/BAX oligomerizasyonunun gerçekleşmesi membranda porların oluşumu, permeabilite artışı ve mitokondrial membrandan Sitokrom c gibi apoptotik proteinlerin salınmasına sebep olacak ve hücreyi ölüme götürecektir.

Anti-apoptotik ve aynı zamanda anti-oksidan olarak da bilinen BCL-2 miktarı hücre çeşitlerine göre farklılık gösteren ve hücre içi membranda lokalize olan bir proto-onkogendir. Bu gen, reaktif oksijen türlerinin aşırı miktarda yapıldığı yer olan mitokondrial dış membranda ve onun yanısıra ER ve çekirdek zarında da yer alır. Mitokondrial yerleşke gösteren BCL-2'nin yarattığı etkilere paralel olarak nükleer membrana yerleşik BCL-2; p53, NFκβ, AP1, CRE, NFAT gibi transkripsiyon faktörlerinin nukleustaki aktivitelerini kontrol eder, ER'de yerleşke gösteren BCL-2 ise hücrenin hem apoptotik hem de normal fizyolojik süreçlerinde intrasellüler Ca⁺ seviyesinin düzenlenmesinde rol oynar (Hetz *et al.* 2008). BCL-2 geninin;

- Lenfoid, fibroblastik ve hematopoetik hücrelerin büyümesinin inhibisyonu
- Nöronlarda nörotrofik etkenlerin yoksunluğu
- UV, γ-radyasyon
- Isı şoku
- Sitotoksik bazı lenfokin çeşitleri (TNF)
- Kalsiyum iyonları
- Bazı virüs tipleri
- L- glutamat gibi indükleyici nörotransmitterler
- Serbest radikallerin üretimini indükleyen uyarıcılar ile meydana gelen hücre ölümünü bloke ettiği bildirilmiştir.

BCL-2' nin benzer koruyucu fonksiyonları;

- Anti-apoptotik fonksiyonu için gerekli eşleşme proteinlerinin yokluğu ve

- BCL-2'nin inhibisyonuna neden olan proteinlerin yüksek düzeyde bulunması BCL-2'nin işlevini bozan post-translasyonel değişikliklerin uyarılması durumunda yetersizleşir.
- BCL-2'nin antioksidan özelliklerine ilişkin lipit peroksidasyonunu azalttığı, glutatyon tükenmesi ve H₂O₂'nin yıkıcı etkilerinin neden olduğu apoptotik ölüme karşı direnç geliştirdiği bilinmektedir (Steinman 1995). BCL-2'nin bu özelliğini direk bir anti-oksidan gibi davranarak, redoks-aktif metalleri şelatlayarak yada ROS üretiminin azaltılmasını sağlayarak ifade ettiği düşünülmektedir. Bunların içinde en kabul göreni ise BCL-2'nin ROS üretimini azaltan bir antioksidan olduğu yönündedir (Jang *et al.* 2003). Çünkü BCL-2 özellikle ROS'ların en önemli kaynağı mitokondrinin membranına yerleşik bir proteindir ve hücrenin redoks durumundaki değişikliklere karşı da duyarlıdır.
- BCL-2 geninin fazla eksprese edilmesi nöral dokularda olduğu gibi apoptozu önleyerek koruyucu etkilerini gösterirken; lenfoma, lösemi, prostat, kolon ve mide adenokanserleri, nöroblastoma, renal hücreli kanserler ve melenoma gibi çeşitli insan kanserlerinde de aşırı artmış BCL-2 ekspresyonu görülür (Martinou *et al.* 1994).
- Doğal yaşlanmada, hipokampus da dahil beynin farklı bölgelerinde ve farklı organ dokularında Bcl-2 ekspresyonu ve miktarının araştırılmasına ilişkin çeşitli çalışma bulguları çelişkili görünmektedir. Bu durumun, BCL-2'nin hücre (mitotik/postmitotik hücre) spesifik aktivitesi ve hücrenin sağkalım koşullarının farklılığıyla alakalı olabileceği muhtemeldir (Susnow *et al.* 2009; Kaufmann *et al.* 2001; Pollack *et al.* 2006). Kaufmann ve arkadaşları yaşlı sıçanların hipokampus ve serebellumunda BCL-2 düzeyinin up-regüle olduğunu ve bu up-regülasyonun yaşlanmayla artan oksidatif stres düzeyi ve BCL-2'nin antioksidan karakteri ile ilişkili olabileceğini rapor etmişlerdir (Kaufmann *et al.* 2001). Başka bir çalışmada ise hipokampusta oksidatif stres kaynaklı hücre ölümünde BCL-2 ve BCL-2 mRNA ekspresyonlarının down-regüle olduğu, NAC (N-acetyl cysteine) gibi antioksidan suplementasyonunun ise bu azalışı engellediği bildirilmiştir (Pugazhenthii *et al.* 2003).

1.2.1. BCL-2/BAX protein ailesi

Apoptozisin mitokondriyal yolağın düzenlenmesi BCL-2/BAX gen ailesi ile mümkündür. BCL-2 familyası üyelerinin ürünleri mitokondri ve nükleus membranında, endoplazmik retikulum membranı üzerinde de lokalizedirler ve homodimer ya da heterodimer kompleksler meydana getirerek iş görürler. Çalışmalarda bu heterodimerlerden kritik olan “BCL-2/BAX” oranı “ölüm anahtarı” olarak değerlendirilmektedir. Hücrede, BCL-2'nin oranının Bax oranından daha fazla olması yaşamın devam etmesini sağlarken, Bax'ın oranının BCL-2 nin oranından yüksek olması durumunda hücre programlı ölüme karar verir (Lundberg *et al.* 1999; Wickremasinghe *et al.* 1999).

BCL-2 ailesi üyelerinin önemli bir karakteristiği heterodimer ve homodimer oluşturmalarıdır. Antiapoptotik ve proapoptotik üyeler arasındaki heterodimerizasyon birbirlerinin etkilerini inhibe eder. Bax homodimerizasyonu hücre ölüm sinyali oluşturur. Fakat BCL-2 ve BAX heterodimerizasyonu, Bax fonksiyonunu inhibe eder. BCL-xS, BCL-2'ye bağlanarak, BCL-2 fonksiyonunu inhibe eder. BAX'ın BCL-2 ile etkileşimini engeller ve Bax'ın öldürücü fonksiyonu ortaya çıkar. (Adams *et al.* 1998; Lalier *et al.* 2007).

Fizyolojik ve patolojik birçok olayda apoptozisin regülasyonunda BCL-2 geni kritik bir role sahiptir. BCL-2, güçlü bir ölüm inhibitörüdür. BCL-xL, MCL-1, BFL-1 ve BCL-w gibi diğer anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonu; Bax ve Bak proteinlerinin homooligomerizasyonunu ve aktivasyonunu bloke ederek hücre ölümünü inhibe eder. Bcl-xL mitokondri membran dışında lokalizedir. BCL-xL kaspaz aktivasyonunu, APAF-1 kompleksi üzerinden önler. BCL-xL ve BCL-2 birlikte mitokondri membran permeabilitesini korumakla görevlidirler (Touchette *et al.* 1991; Lalier *et al.* 2007).

Apoptotik uyarıya yanıt olarak BCL-2 ailesinin sadece BH 3 alanını içeren spesifik üyeleri aktive olur. BH3 proteinleri, Bax yada Bak gibi proapoptotik proteinlerin miokondride aktivasyonuna neden olur. Sağlıklı hücrede Bax sitozolde monomerik

formda bulunur. Bax ve Bak mitokondri membranında por oluşumunu indükler. Mitokondrinin selektif iyon geçirgenliği kaybolur. Bax proteininin hidrofobik C terminal ucu belirir ve sitokrom c bırakılmasıyla sonuçlanır (Duvall *et al.* 2006; Wickremasinghe *et al.* 1999; Lalier *et al.* 2007; Adams *et al.* 1998). Apoptozis indükleyici faktör olarak bilinen AIF ve Sitokrom c bulundukları mitokondriden sitoplazmaya geçer. AIF direkt kromatin yoğunlaşmasının ve çekirdek parçalanmasının ortaya çıktığı nükleusa yol alırken, apoptozisin latent safhasında sitokrom c görev görür. Sitoplazmik bir protein olan Apaf-1'in aktivatörü olarak görev yapan Sitokrom c'dir.

Sitokrom c ve APAF-1' in etkileşmesi ile prokaspaz-9 aktifleşir, ATP'nin de katılımı ile oluşan bu komplekse 'apoptozom'denir. Aktifleşen prokaspaz 9 ise çeşitli kaspazların aktifleştirilmesinde görev alır (Lundberg *et al.* 1999).

Sitoplazmada Bid inaktif halde bulunur. Sadece bir BH3 içerir. Fas'ın ligandı ile etkileşimi sonucunda kaspaz 8 aktifleşir. Kaspaz-8 ise BİD'nin bölünerek aktifleşmesine sebep olur. Oluşan tBİD, BCL-2'yi inaktifleştirmek ya da BAX'ı aktifleştirmek amacıyla mitokondri membranına yerleşir ve de mitokondri proteinleri ile etkileşerek apoptozise sebep olur (Keane *et al.* 2001).

BAD, pro-apoptotik bir protein olup, regülasyonu fosforilasyon ya da defosforilasyon şeklinde sağlanır. BAD, genellikle sitoplazmada inaktif olarak fosforile halde saklanır. Bad' in, ölüm sinyali tarafından defosforilasyonu sağlanır. Kalsiyum bağımlı fosfataz, Bad'in defosforilasyonunu sağlar. Defosforile haldeki BAD, BCL-2' nin antiapoptotik proteinlerine bağlanır, bu proteinlerin nötralizasyonunu gerçekleştirerek apoptozise katkıda bulunur. Ayrıca BAD; BCL-xl-BCL-2 heterodimerine bağlanır (Adams *et al.* 1998; Duvall *et al.* 2006).

Sistein proteazlardan olan kaspazlar, hücrelerde normalde inaktif zimojenler olarak üretilirler. Kaspazların birbirlerini aktifleştirebildiği bu mekanizma, apoptoz için gerekli sinyal yollarını fazlalaştırır dolayısıyla programlı hücre ölümü sürecini hızlandırır.

Apoptozis mekanizması hayatın devamlılığı için esastır, dolayısıyla ileride etiyolojisi net olarak bilinmeyen çeşitli hastalık süreçlerinin anlaşılmasında ve tedavisinde çok değerli bir görev üstlenecektir.

Çizelge 1.4. BCL-2 nin yükselmiş seviyelerinin yaygın insan kanserlerindeki yüzdesi

Tümör	BCL-2
Akciğer	Büyük hücreli akciğer kanseri %25 (Pezzella <i>et al.</i> 1993) Adenokarsinoma %12 (Pezzella <i>et al.</i> 1993) Küçük hücreli akciğer kanseri %83-90 (Reeve <i>et al.</i> 1996)
Kolorektal	Adenoma %65-98 (Hao <i>et al.</i> 1997; Yang <i>et al.</i> 1999) Karsinoma %46-60 (Hao <i>et al.</i> 1997; Yang <i>et al.</i> 1999)
Meme	%80 (Krajewski <i>et al.</i> 1999)
Pankreas	%23 (Miyamoto <i>et al.</i> 1999)
Ürogenital	Mesane %23 (Glick <i>et al.</i> 1996) Böbrek %54 (Ghanem <i>et al.</i> 2001)
Lenfoma	Hodgkin's %47-65 (Rassidakis <i>et al.</i> 2002) Non-hodgkin's %9-57 (Gascoyne <i>et al.</i> 1997; Bairey <i>et al.</i> 1999; Xerri <i>et al.</i> 1999) Burkitt's- negatif (Gala <i>et al.</i> 1994)
Lösemi	Akut miyeloid lösemi %13-20 (Schaich <i>et al.</i> 2001; Kornblau <i>et al.</i> 1999) Akut lenfositik lösemi %89-92 (Soslow <i>et al.</i> 1997; Salomons <i>et al.</i> 1999) Kronik miyeloid lösemi %33-54 (Ravandi <i>et al.</i> 2001) Kronik lenfositik lösemi %70-95 (Hanada <i>et al.</i> 1993)
Karaciğer	Nadir (Charlotte <i>et al.</i> 1994)
Over	%30-39 (Kornblau <i>et al.</i> 1999; Schaich <i>et al.</i> 2001)
Beyin	Medullablastoma %5-25 (Krajewski <i>et al.</i> 1997; Sarkar <i>et al.</i> 2002) Glioma %28-92 (Ellison <i>et al.</i> 1995; Krajewski <i>et al.</i> 1997) Oligodendroglioma %16-60 (Delgado <i>et al.</i> 1999; Deininger <i>et al.</i> 1999)
Özafagus	Skuamöz hücre karsinomu %45 (Koide <i>et al.</i> 1997) Adenokarsinoma %20-40 (Katada <i>et al.</i> 1997)
Myeloma	%43 (Tu <i>et al.</i> 1998)

1.3. Bildirici Vektör Deney Sistemi

Bildirici vektörler, gen ekspresyon analizi çalışmalarının en birincil moleküler sistemleridir. Biyokimyada, moleküler biyolojide ve de biyomedikal araştırmalarda sıklıkla tercih edilmektedirler. Reporter vektör sistemlerinden; promotör dizileri, transkripsiyon faktörleri, mRNA işlenmesi ve translasyon araştırmalarında yararlanılmaktadır. Esas olarak bir gen iki işlevsel parçadan meydana gelir: Biri kodlanan protein için bilgi sağlayan DNA dizisidir ki buna “kodlayan bölge” denir. Öteki bölge ise yine kodlayan bölgeye bağlı ve genin ekspresyonunu regüle eden özel DNA dizisidir ki bu da “promotör” olarak adlandırılır. Sıklıkla tercih edilen reporter genler; β -glukuronidaz β -galaktozidaz ve lusiferazdır. Ekspresyonu gerçekleşen reporter vektörün proteinini analiz etmek ve ölçmek için çok çeşitli belirleme teknikleri vardır. Bunlar luminesans, flouresans ve absorbans ölçümüne dayalı saptama teknik ve yöntemleridir.

1.3.1. Haberci genler

Moleküler biyolojide bir geni kontrol eden diğer bir genin faaliyetlerinin gözlenmesinde ve aktivitesinin ölçülmesinde haberci (muhabir) genler görev alır. Gün geçtikçe haberci gen çeşitliliği sürekli artmaktadır. Genellikle sıkça kullanılan haberci genler; lusiferaz geni, yeşil florasan protein (GFP) geni, β - galaktosidaz genidir. Haberci genlerin ifadelerinin ölçümleri kolay,kullanışlı ve doğruluk oranları oldukça yüksektir.

Çizelge 1.5. Çeşitli haberci genler

HABERCI PROTEIN	HABERCI GENLER	KAYNAĞI	SUBSTRAT	TANIMLAMA YÖNTEMİ
Bakteriyal lusiferaz	<i>luxAB</i> veya <i>luxCDABE</i>	Biyoluminesans bakteriler	O ₂ , FMNH ve uzun aldehit zincirleri	Biyoluminesans
Ateş böceği lusiferazı	<i>lucFF</i>	Ateş böceği (<i>Photinus pyralis</i>)	O ₂ , ATP ve lusiferin	Biyoluminesans
Renilla lusiferazı	<i>Rluc</i>	<i>Renilla reniformis</i>	Coelenterazin ve Ca ⁺²	Biyoluminesans
β-galaktosidaz	<i>lacZ</i>	<i>E. coli</i>	Galaktopiranoitler	Kimyasal Luminesans
Floresan protein	<i>gfp</i> , vb.	<i>Aequorea victoria</i> ve derin deniz omurgasızları	—	Floresan

1.3.2. Lusiferaz bildirici gen analizi (Luciferase reporter gene assay)

Lusiferaz reporter gen analizinin genel olarak avantajlarına örnek olarak; aşırı duyarlı, lusiferaz aktivitesinin hücrelerin çoğundaki yoksunluğu, süratli ve ucuz maliyeti verilebilir. *Photinus pyralis* (ateş böceği) lusiferazı Kuzey Amerika’ da yaşayan bir türdür ve yaygınca tercih edilen reporter gendir (Gould *et al.* 1988). Lusiferaz vektörünün eksprese ettiği protein, enzim aktivitesi için translasyon sonrası modifikasyonlara ihtiyaç duymaz, non-toksiktir, ökaryotik ve prokaryotik hücrelerde uygulanımı kullanışlıdır. Firefly lusiferazı; ATP, Mg⁺⁺ ve oksijen varlığında lusiferin proteininin yükseltgenme reaksiyonunu katalize eder. Gerçekleşen bu reaksiyonun sonucu olarak biyolojik bir foton yayımı (bioluminesans) ortaya çıkar (Fan *et al.* 2007).

1.3.2.a. İkili lusiferaz bildirici gen deney sistemi (Dual luciferase reporter gene assay)

İkili lusiferaz reporter gen analizi, her bir hücrede eş zamanlı eksprese edilen iki farklı lusiferaz reporter enzimlerini ihtiva eder. *Firefly* lusiferazı ve *Renilla* (deniztavşanı) lusiferazı göreceli biyoluminesans substratlarından ayrımı sağlanabilir ve cross- aktivite göstermezler. *Firefly* lusiferazı 61 kDal' dur ve sadece bir alt birimi vardır. Lusiferin proteininin iki basamakta gerçekleşen yükseltgenme reaksiyonunu kataliz eder. Bu reaksiyon ile de 560 nm'de biyolojik bir ışık yayımı gerçekleşir. İlk adım reaktif geçiş anhidrit molekülünü oluşturmak için ATP ile proteinin aktivasyonudur. İkinci adım, aktif bir geçiş molekülü oksijenle birlikte, hızlıca yıkılarak oksil-lusiferin ürününü ve karbondioksit ile birlikte ışık demeti veren geçici dioksetan molekülünü meydana getirir (Dewet *et al.* 1985). *Renilla* lusiferazı ise 31 kDal' dur, yine tek bir alt birim ihtiva eder. 'Coelenterazine' proteinini 'coelenteramide' molekülüne oksidasyonunu katalizle eder. Bu reaksiyon sonucunda karbondioksit çıkışının yanı sıra 480 nm'de mavi ışık yayımı meydana gelir (Matthews *et al.* 1977).

1.3.3. Lusiferaz ve çeşitleri

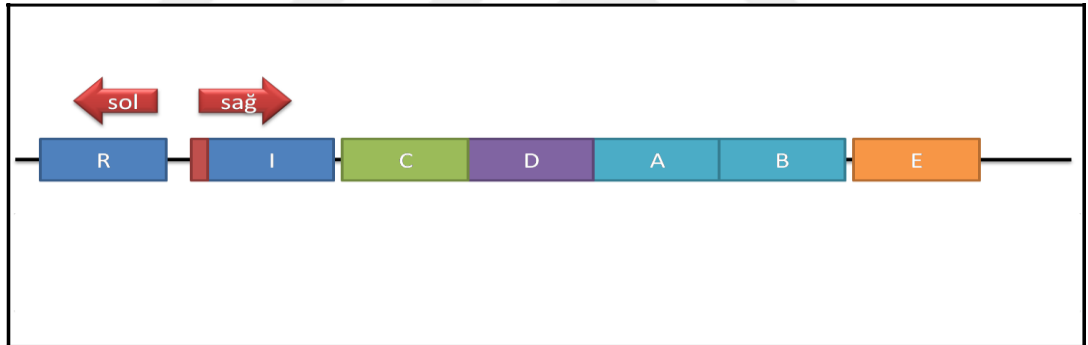
Lusiferazlar bakteriler, mercanlar, ateş böceği gibi farklı canlılar tarafından üretilmektedir. Fakat bu canlılara ait lusiferaz genlerinin dizileri arasında farklılıklar vardır. Bu farklılıklardan dolayı her bir canlının lusiferaz substratı farklı olma kapasitesindedir Genel olarak bu substratlara lusiferin adı verilir Örneğin; ateş böceği lusiferazının substratı D-lusiferin iken *Renilla* lusiferazın substratı koelenterazindir. Lusiferazın doğal substratı olan D-lusiferinin [(S)-2-(6'-hidroksi-2'-benzotiazolil) tiazolin-4-karboksilik asit] katalizlenmesiyle sarı-yeşil ışığın ortaya çıkması olayı biyoluminesans olarak adlandırılır.

Firefly lusiferazı ilk olarak *Photuris pennsylvanica* türünden 1985 yılında Wet ve arkadaşları tarafından izole edilmiş ve ateş böceği lusiferaz geninin 1.8 kb uzunluğunda

olduğu ve proteinin 545 aminoasitten oluştuğu rapor edilmiştir. 1995 yılında Wood ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, ateş böceği lusiferazının diğer enzimlerle homolojisi araştırılmış ve adenilat kinazlara benzerlik gösterdiği bildirilmiştir (Santaniello *et al.* 2009)

1.3.4. Bakterilerde biyoluminesans

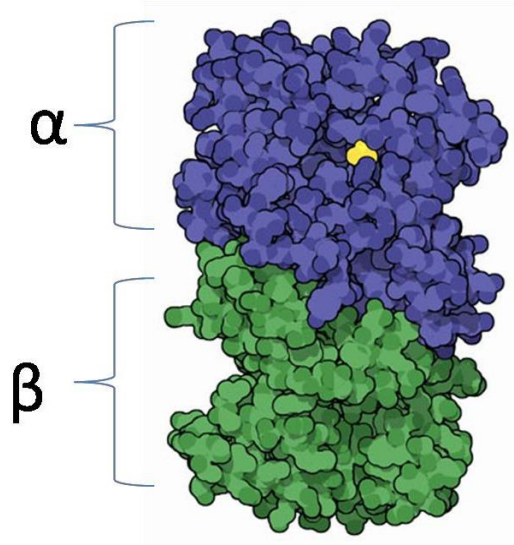
Biyoluminesans olayını gerçekleştirdiği bilinen 3 bakteri cinsi vardır. Bunlar; *Photobacterium*, *Vibrio* ve *Photorhabdus*'dur. Bu cinsler genellikle derin sularda ya serbest şekilde ya da diğer gelişmiş canlılarla mutualist şekilde yaşayabilme potansiyelindedirler. Bakterilerde biyoluminesans kontrolü *lux* adı verilen bir operon tarafından kontrol edilir.



Şekil 1.5. *lux* operonu, ilgili genler ve kontrol bölgeleri (Yılmaz 2013).

Bakteriyel *lux* operonunda sağ ve sol olmak üzere iki yönlü promotor mevcuttur. Sol yönlü olan promotor bölgesi yeterli yoğunluk algılanmasından (quorum sensing) sorumlu iken sağ yönlü promotor bölgesi ise lusiferaz ve substratının sentezlenmesinden sorumludur.

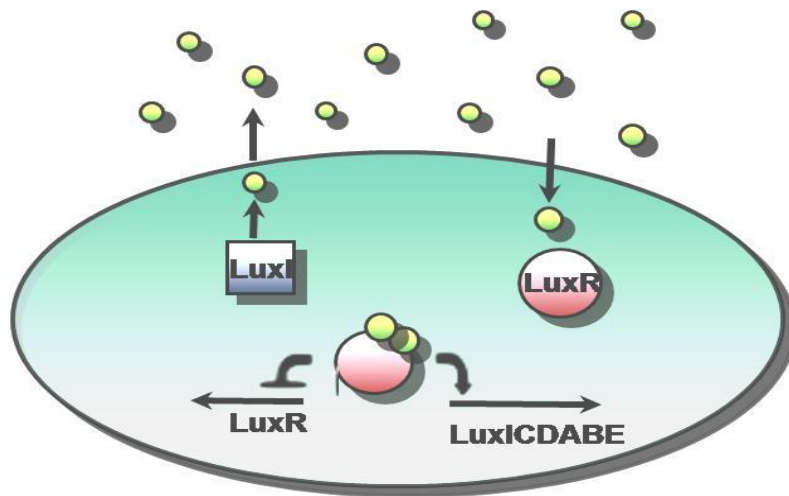
luxA ve *luxB* genleri bakteriyal lusiferaz enziminin α ve β altünitelerinin sentezlenmesinden sorumlu genlerdir(şekil 1.8). *luxC-D-E* genleri ise yağ asidi redüktaz kompleksini meydana getirirler. Bu kompleks lusiferazın substratını oluşturmada görev alır.



Şekil 1.6. Lusiferaz ve 2 alt birimi (Yılmaz 2013).

luxI ve *luxR* genleri *lux* operonundaki düzenleyici genlerdir. *luxI* geni yeterli sayı algılama mekanizmasında oto uyarıcı (autoinducer) olarak iş görür. *LuxR* ise düzenleyici (regülatör) protein sentezinde görev yapar.

Ortamda yeterli sayıda bakteri bulunduğunda promotor sol yönlü çalışarak *LuxR* proteini sentezlenir. *LuxR* proteini de *LuxI* proteini (autoinducer) ile birleşerek promotorun sağ yönlü çalışmasını sağlar. Böylece yapısal genler olan *lux-I-C-D-A-B-E* genleri açılır. Lusiferaz ve substratının sentezi başlamış olur (Şekil 1.9).



Şekil 1.7. *lux* operonu ve yeterli sayı algılama mekanizması (Yılmaz 2013).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Adams *et al.* (2018) Bozulmuş apoptozun, kanser gelişiminde merkezi bir rol oynadığını ve konvansiyonel sitotoksik tedavilerin etkinliğini sınırladığını belirtmişlerdir. BCL-2 protein ailesinin karışık fraksiyonlarının apoptoz ve yapıları üzerinde nasıl değiştiğinin anlaşılması, doğal inhibitörleri olan BH3'e özgü proteinleri taklit ederek çeşitli sağkalım üyelerini hedef alan yeni bir kanser uyuşturucu sınıfı geliştirilmesine yol açtığını bildirmişlerdir. Bu 'BH3 mimetik' uyuşturucu kansere karşı cephanede güçlü yeni silahlar haline geldiğini düşünmüşlerdir. BCL-2'nin spesifik bir inhibitörü olan venetosiklin / ABT-199'un başarılı klinik çalışmaları, kronik lenfositik lösemnin refrakter bir formu ve diğer maligniteler için devam eden çalışmaların skorlarını onayladığını rapor etmişlerdir. Ayrıca, diğer MCL-2 pro-survival üyeleri, özellikle MCL-1'i hedefleyen BH3 mimetikleri ile ilgili klinik öncesi çalışmaları teşvik etmek, venetosiksata dirençli kanserler için umut vaat ettiğini düşünmüşlerdir. Bu gözden geçirme ile, BCL-2 ailesinin kanser gelişimi ve tedavisine olan etkisini ortaya koymakta, aile üyelerinin etkileşimlerinin apoptosisi nasıl tetiklediğini ve BH3 mimetik ilaçların kanser tedavisini ilerletme potansiyelini tartışmışlardır.

Kale *et al.* (2018) BCL-2 protein ailesi, hücre ölümünü esas olarak, intermembran space proteinlerinin, daha sonra kaspaz aktivasyonunun ve apoptozun geri dönüşsüz salınmasına yol açan mitokondriyal dış zar permeabilizasyonunu (MOMP) düzenleyen doğrudan bağlanma etkileşimleri ile kontrol ettiği bilgisini vermişlerdir. BCL-2 aile proteinlerinin afiniteleri ve nispi bolluğu, MOMP'yi düzenleyen anti-apoptotik ve pro-apoptotik BCL-2 ailesi proteinleri arasındaki baskın etkileşimleri dikte ettiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise BCL-2 aile proteinleri arasındaki etkileşimlerin hücre kaderini nasıl yönettiğine vurgu yaparak, MOMP'nin BCL-2 aile düzenlemesinin temel mekanizmalarını vurgulamışlardır. BCL-2 aile proteinlerinin hem konsantrasyonunun hem de afinitelerinin kritik önemini ele alıyoruz ve ya farklılıkların sonuçları nasıl büyük ölçüde değiştirebileceğini göstermişlerdir. Ayrıca, BCL-2 ailesi tarafından MOMP düzenlemesinin çekirdek mekanizmalarını ayırtırmak için tam uzunlukta BCL-2 aile proteinlerinin (kesilmiş versiyonlara veya peptitlere karşı) kullanılmasının

önemini açıklamışlardır. Son olarak, translasyon sonrası modifikasyonların ve farklı hücre içi lokalizasyonların BCL-2 ailesi proteinleri tarafından apoptoz regülasyon mekanizmalarını nasıl değiştirdiğini tartışmışlardır. İnsan hastalıklarında MOMP düzenlemesinin başarılı terapötik müdahalesi, hücrelerde BCL-2 aile proteinleri arasındaki ana bağlanma etkileşimlerine aracılık eden faktörlerin anlaşılmasını gerektirdiğini bildirmişlerdir.

Lu *et al.* (2018) yaptığı bu çalışma ile, sinyal yolları β Wnt yolu ile melanom ve transforme edici büyüme faktörü ile farelerde MiRNA-708 ile ilgili mekanizmaları ve hücre çoğalması, göçü kemik morfogenetik protein ve aktive zara bağlı inhibitörünün hedeflenmesi ve apoptozu değerlendirmeyi amaçlamışlardır. Bu çalışmaya göre altmış fare çalışmaya dahil edilmiş ve bunlardan 40 tanesi daha sonra deney grubuna dahil edilmiş (22 fare, tümör ksenograftında melanom modeli ve 18 fare kullanılmış) ve normal kontrol grubu 20 fareden oluşmuştur. Dokular ve hücre çizgileri içindeki ekspresyon seviyelerini saptamak için Western blot ve revers transkripsiyon kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu kullanmışlardır. Wnt sinyal yolunun aktivitesini tespit etmek için TCF lusiferaz raportörü (TOP-FLASH) ve bir kontrol vektörü (FOP-FLASH) uygulamışlardır. MTT3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolyum bromür deneyi, hücre proliferasyonu, apoptoz, göç ve istila için sırasıyla gerçekleştirmişlerdir, akış sitometrisi ve Transwell tahlil tümör ksenograft prosedürleri sırasında çalışma için alınan çıplak fareler üzerinde gerçekleştirmişlerdir. Sonuç olarak; Normal kontrol grubuna kıyasla, model grup kemik morfogenetik proteinin ve aktive membrana bağlı inhibitör, Wnt10B, P53 ve BCL-2 proteininin artan ifadelerini sergilediğini; TOP-FLASH etkinliği; β -katenin ifadesi; hücre çoğalması; göç; ve miR-708, vasküler endotelial büyüme faktörü, Fas, Bax, Caspase-3 ve yarılmış Kaspaz-3 ve apoptoz oranının azaltırken invazyon yeteneklerinin ifadelerinin azaldığını saptamışlardır.. Boş ve negatif kontrol gruplarına kıyasla, sergilenen miR-708 taklit eden ve küçük müdahale edici RNA-kemik morfogenetik proteini ve aktivin zara bağlı inhibitör grupları, kemik morfogenetik protein ve aktivin zara bağlı inhibitörü Wnt10B, p53 ve BCL-2 ifadeleri azalır ve proliferasyon, migrasyon ve invazyon kabiliyetleri artarken, apoptozisteki artış, vasküler endotelial büyüme faktörü, Fas, BAX, Caspase-3

ve yarılmış Kaspaz-3 ekspresyonları; bununla birlikte TOPflash aktivitesi ve β -katenin ekspresyonunun, düşük seviyeli olduğunu kaydetmişlerdir. miR-708 inhibitörleri grubu zıt bir eğilim sergilediğini görmüşlerdir. Dolayısıyla miR-708 hedefli kemik morfogenetik proteinin ve aktivin membrana bağlı inhibitörün down regülasyonu, dönüştürücü büyüme faktörü β yolağının aktivasyonu ve Wnt yolağının bastırılması yoluyla melanoma hücrelerinin proliferasyonunu ve göçünü inhibe ettiği sonucuna varmışlardır.

Montero *et al.* (2018) İntrinsik apoptozun, BCL-2 protein ailesi tarafından kontrol edildiğini, ancak aile içi etkileşimlerin karmaşıklığı standart moleküler biyoloji teknikleriyle hücre kaderini tahmin etmeyi zorlaştırdığını belirtmişlerdir. BCL-2 aile düzenlemesini ve hücrelerin apoptoz ve anti-apoptotik bağımlılık için hazır bulunuşluklarını nasıl belirleyeceklerini düşünmüşlerdir. Kanser hücreleri sıklıkla onkojenik strese veya anti-kanser tedavisine yanıt olarak anti-apoptotik savunma mekanizmalarını kullandıklarını belirtmişlerdir . Bununla birlikte, anti-apoptotik bağımlılıklarını belirleyerek, bu apoptotik ablukanın üstesinden gelmek için yeni BH3 mimetiklerini kullanabileceklerini düşünmüştürler. Bu eşsiz anti-apoptotik inhibitörlerin gelişimini ve kullanımlarını ve bunların kişiselleştirilmiş kanser tedavisini iyileştirmek için dinamik BH3 profili (DBP) kullanarak diğer anti-kanser ajanlarıyla nasıl birleştirileceğini ana hatlarıyla belirledikleri rapor edilmiştir.

Naderer *et al.* (2018) Apoptozun programlanmış hücre ölüm yolu, istenmeyen ve tehlikeli hücreleri yok ettiği için memeli gelişimi ve bağışıklığı için gerekli olduğunu belirtmişlerdir. Hücrel bağışıklık cevabının bir parçası olarak, apoptoz hücre içi patojenlerin replikatif nişini ortadan kaldırdığını ve enfeksiyonların çözülmesini sağladığını bildirmişlerdir. Apoptozu bozmak için, patojenlerin çeşitli mekanizmalar geliştirdiklerini ve bazı durumlarda, patojenler apoptotik hücre ölümünü indükleyen efektör molekülleri eksprese ettiği hakkında bilgi vermişlerdir. Bu derlemede apoptotik yolakları etkileyen seçilmiş konakçı-patojen etkileşimlerine odaklanmışlardır. Patojenlerin konak hücrelerin kaderini nasıl kontrol ettiklerini ve bunun enfeksiyonların sonucunu nasıl belirlediğini tartışmışlardır. Son olarak, kanser hücrelerinde apoptosisi

aktive eden küçük moleküllü inhibitörler, enfekte hücrelerin apoptotik hücre ölümünü de indükleyebildiğini gözlemlemişlerdir. Bu, enfekte olmuş hücreleri öldürmek için konakçı ölüm faktörlerini hedef almanın, enfeksiyöz hastalıkları tedavi etmek için potansiyel bir tedavi seçeneği olduğu yorumuna varmışlardır.

Zhang *et al.* (2015) Önceki çalışmalarda, AKT down regülasyonu, NF- κ B aktivasyonunun inhibisyonu, ROS üretiminin aracılığı, anti-apoptoz proteinlerinin XIAP ve cIAP-1'in down regülasyonu, BAX'in up regülasyonu ve BCL-2 nin down regülasyonu dahil olmak üzere sanguinarine bağlı apoptotik hücre ölümüne birçok yolun dahil olduğunu gösterdiğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada, ROS oluşumunun ROS temizleyici olan N-asetil-l-sistein (NAC) ile söndürülmesinin sanguinarine bağlı apoptoz etkilerini tersine çevirdiğini, Ayrıca, sanguinarine bağlı sıçan hepatik stellat T6 hücrelerinin (HSC-T6 hücreleri) apoptozun artmış ROS oluşumu ile korele olduğunu ve bunun kaspaz-8'in aktivasyonunu (-3, -6 ve -9) ve mitokondriyal membran potansiyelinde (MMP) azalma ve anti-apoptotik protein BCL-2'nin downregülasyonu takip ettiğini öğrenmişlerdir. BCL-2'nin downregülasyonunun, promotor metilasyonu ve BCL-2 3'-UTR'ye (un-translation reagon) bağlanabilen miR-15a / 16-1 ifadesi ile ilgili olup olmadığının açıklığı hakkında bilgi olmadığını belirtmişlerdir. BCL-2'nin sanguinarine ile indüklenen downregülasyonunun, BCL-2 promotor bölgesinin artan metilasyon oranı ve artmış miR-15a / 16-1 ekspresyonu ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. 5-Aza-2'-deoksisitidin (5'-Aza-CdR) ile HSC-T6 hücrelerinin tedavisi sanguinarine bağlı BCL-2 promotor bölge metilasyonunu durdurduğunu ve BCL2'nin ekspresyonunu geri aldığını rapor etmişlerdir. PEGFP-N1 vektörü kullanılarak BCL-2'nin aşırı ekspresyonu sanguinarine bağlı HSC-T6 hücrelerini apoptotik ölümde önemli ölçüde azaldığını fakat tamamen azaltmadığını gözlemlemişlerdir. Bu gözlemler açıkça BCL-2 down regülasyonunun promotör metilasyonu ve sanguinarine bağlı sıçan HSC-T6 hücrelerinde miR-15a / 16-1 upregulasyonu ile ilişkili olduğunu açıkça gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Fulda *et al.* (2013) Kanser kök hücresinin, kitle içinde, normal kök hücrelere birçok benzerliği paylaştığı, kendi kendine yenilenme, farklılaşma, çoğalma ve seri

transplantasyon üzerine tümörü yeniden oluşturma kapasiteleri bakımından bir popülasyonu temsil ettiğini düşünmüştür. Kanser kök hücrelerinin, tümör büyümesinin sürdürülmesi için kritik olduğu ve tedaviye direnç ve tümör ilerlemesinde rol oynadığı gösterildiğinden, bunlar, terapötik müdahale için ilgili hedefler oluşturduğunu bildirmiştir. Gerçekten de, uzun vadede relapsız sağkalımın elde edilmesi için kanser kök hücrelerinin eradikasyonu önleneyeceğini düşünmüştür. Bununla birlikte, kanser kök hücrelerinin ayırt edici özelliklerinden biri, çevresel ipuçlarına veya sitotoksik uyarılara yanıt olarak apoptoz dahil olmak üzere hücre ölümüne maruz kalmaları olduğunu vurgulamıştır. Tümör hücrelerindeki apoptoz programlarının aktivasyonu, günümüzde kullanılan çoğu kanser terapisinin antitümör aktivitesinin altında kaldığından, kanser kök hücrelerinin apoptozuna karşı içsel direncin üstesinden gelmek için stratejiler geliştirmenin kritik olacağından bahsetmiştir. Bu nedenle, kanser kök hücrelerinin apoptozdan kaçınma yeteneklerinden sorumlu olan moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılması, kanserden muzdarip hastalar için daha etkin tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi amacıyla bu kritik hücre havuzunu hedef alan yeni yollar açabileceği çıkarımına varmıştır.

Bourgarel-Rey *et al.* (2009), kromatin immünopresipitasyon ile BCL-2 promotorü içindeki P1 promotor upstream bölgesinde özgün bir p53 bağlanma bölgesi tanımlamışlardır ve p53'ün vinorelbine-teşvikli BCL-2 down regülasyonuna katkıda bulunduğunu bildirmişlerdir. Vinorelbine-teşvikli apoptoz sırasında gözlenen Bcl-2 protein seviyelerinin azalması, BCL-2 transkripsiyon ve promotör aktivitesinin inhibisyonunun bir sonucu olarak mRNA seviyesindeki azalma ile ilişkilendirmişlerdir. Bu durum içerisinde, BCL-2 transkripsiyonel down-regülasyonuna p53 katkısını değerlendirmişlerdir. Vinorelbine tedavisinin A549 hücrelerindeki bu interaksyonu arttırdığını göstermişlerdir. Bu iş, mikrotübül hedefli ajan tedavisi ile transkripsiyonel seviyede BCL-2 ve p53 arasındaki bağı güçlendirdiğini görmüşlerdir. Bu çalışma ise aynı zamanda mikrotübül hedefli ajanların mekanizmasının hesaplanmasına, etkilerini arttırmaya ve daha iyi anlaşılmasında kullanışlı olacağını bildirmişlerdir.

Bredow *et al.* (2007) p53 tarafından BCL-2 ekspresyonu regülasyonunun anlaşılması için, BCL-2 promotör bölgelerini teker teker ve tam boy promotör durumunda çalışmışlardır. P1 promotörü yüksek p53-bağımsız aktivite gösterdiğinde, P2 promotör aktivitesi p53-elverişli kanser hücre hatlarında baskılanmasını sağlamışlardır. Ek olarak P2 aktivitesi p53^{-/-} fare primer havayolu epitel hücrelerinde p53^{+/+} fare ile karşılaştırıldığında daha yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir. Kromatin immünopresipitasyon analizleri ile p53 CCAAT- ve TATA-elementlerini içeren P2 nin 140 bp lik dizisiyle etkileşime girdiğini doğrulamışlardır. Her nasılsa P1 ve P2 bir yapı içinde bağlandığı zaman P2, p53 bağımsız P1 aktivitesini baskıladığını rapor etmişlerdir. P53 bağımlı bir aktivite ile P1 ve P2 arasında konumlu potansiyel bir özgün promotör tanımlamışlar ve M bölgesi belirlenmiştir. Tam boyut BCL-2 promotörü durumunda ise M, P2 nin P1 üzerindeki p53 bağımlı yöntemle baskılayıcı aktivitesinin etkisini yok ettiğini bildirmişlerdir. Toplu olarak bu dataların, P1 promotörü bcl-2 geninin transkripsiyonu için ana destekçi güç olduğunu ve P1 aktivitesi, M ve P2 tarafından p53 bağımlı ve bağımsız biçimde modüle ettiğini bildirmişlerdir. Bu bulguların, bcl-2 gen ekspresyonu inhibisyonuna yönelik terapiler ve hücre ölümüne teşvik terapileri için çıkarımlar verebileceğini düşünmüşlerdir.

Singh *et al.* (2006) DNA hasarı kemoterapötik ajanlar carboplatin (Carb) ve 5-fluorouracil(5-FU) gibi etkileri çeşitli hücre içi hedefler aracılığıyla sağlanmış olan HPV-pozitif Hep-2 ve KB hücrelerini içeren çeşitli kanser hücrelerinde apoptozu indüklediğini bildirmişlerdir. Yaptıkları çalışmada BCL-2 nin katılımı HEP-2 ve KB hücrelerinin Carb ve 5-FU ya maruz kalmasından sorumlu olduğunu göstermişlerdir. Bu ilaçların her ikisinin de apoptozun potansiyel teşvikçisi olduğunu bildirmişlerdir. Apoptoz, kaspaz-9 aktivasyonu tarafından BCL-2 protein seviyesinin azalması eşliğinde ve BAX ekspresyonunu değiştirmeksizin poli polimeraz kesiminden üstün olduğunu rapor etmişlerdir. İleriki analizler ile BCL-2 mRNA nın down regülasyonu ilaçlarla muamele edilmiş hücrelerde protein kadar iyi olduğunu ortaya çıkarmışlardır. BCL-2 nin ektopik ekspresyonu hücreleri ilaç aracılı DNA hasarı indükleyen apoptoza karşı koruduğunu belirtmişlerdir. Tüm bu dataya dayanarak genotoxik stres HEP-2 ve KB

hücrelerinde BCL-2 nin down regülasyonuna götürdüğünü ki bu da bu hücrelerde stres neticesinde belirleyici bir rol oynadığını rapor etmişlerdir.

Be' langer *et al.* (2005) yaptıkları çalışmada BCL-2 nin adenokarsinoma hücrelerinin büyüme oranlarını regüle edebildiğini göstermek için BCL-2 proteinlerinin farklı seviyelerini exprese eden iki izojenik insan over karsinoma hücre hatlarını kullanmışlardır. İki izojen over kanser hücre hatlarının büyüme oranları XTT analizleri ve flow sitometri ile birlikte P1 boyama ile saptamışlardır. BCL-2 overexpresse SKOV3 hücreleri bir doxycycline-uyarılabilir anti-BCL-2-tek zincir antikoru ifadesi için modifiye etmişler ve BCL-2 protein inhibisyonunun hücre proliferasyonu ve apoptoz üzerine etkilerini hesaplamışlardır. Sonuç olarak BCL-2nin, S fazında karsinoma hücrelerinin proliferasyonunu biriktirerek ilerlettiğini göstermişlerdir. BCL-2 overexpresse SKOV3 hücre hattı önemli derecede hızlı çoğalttığını ve düşük BCL-2 expresse emsali SKOV3.ip1 hücre hattına nazaran G2M fazı sürecine ertelediğini görmüşlerdir. SKOV3 hücrelerinde BCL-2 nin tek zincir antikor aracılıklı inhibisyonu büyüme oranları artışı ve daha hızlı hücre döngüsü süreçleri ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Cisplatin ile tedavi, BCL-2 nin inhibisyonu, cisplatin-teşvikli apoptozu etkilemeksizin G2M fazına girişi erteletip bozarken BCL-2 overexpresse SKOV3 hücrelerinde S fazında çok sayıda hücrelerin birikmesi ile sonuçlandığını rapor etmişlerdir. Bu datalara göre over kanser hücrelerinde BCL-2 S fazındaki hücrelerin apoptozun oranını etkilemeksizin birikimini ilerleterek hücre döngüsü sürecini ertelediği sonucuna varmışlardır. Nitekim onun G0/G1 kontrol noktasındaki bilinen rolüne ek olarak biz ilk kez BCL-2 nin de aynı zamanda S fazını regüle ettiğini göstermişlerdir.

Droin *et al.* (2004) BCL-2 ailesinin farklı üyeleri programlı hücre ölümünü temel regülatörleridir ve bu farklı üyeler bir veya daha fazla BCL-2 homoloji domainlerini paylaşır aynı zamanda birbirlerini düzenleme yetenekleri için gerekli olduğunu bildirmişlerdir. Apoptozun deregülasyonu çok sayıda hastalıkla ilişkili olduğunu ve son on yıl içinde özellikle ; apoptoz nasıl düzenlenirse hastalıkların tedavisinde özgün yollar bulmaya yardım eder diye kavramaya çalışmışlardır. BCL-2 (B cell

leukemia/lymphoma2), BCL-2 ailesinin prototipik üyesidir ve overekspresyonunu indükleyen insan foliküler B hücre lenfomasında t(14;18)(q32;q31) kromozomal translokasyonu sonucu olarak tanımlandığını bildirmişlerdir. Memelileri, *D. melanogaster* ve *C. elegans* ı kapsayan farklı organizmalardaki genetik ve biyokimyasal çalışmaların Bcl-2 ailesinin apoptozun kritik regülatörleri olduğunu belirttiğini söylemişlerdir. Bu incelemede, memeli üyelerine odaklanmış ve onların hastalık ve immüniteye dahililiyetini tartışmışlardır.

Kumazaki *et al.* (2003) yaptıkları çalışmada BCL-2 transfekte normal fibroblastların kültürü, 12 kadar popülasyonun iki katına çıkan seviyelerinin vektör transfektatlarına nazaran kısa bir ömür gösterdiğini rapor etmişlerdir(64 vs 76 popülasyon iki misline çıkan seviyeleri,sırasıyla). Bir MTT analizi ile, BCL-2 overeksprese hücrelerinin (HCA2/BCL-2) vektör kontrol hücrelerinden (HCA2/vector) hidrojen peroksit veya doxorubicin tedavisinden ötürü daha çeşitli growth supresyonu gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Ayrıca HCA2/vector kültüründe değil fakat HCA2/BCL-2 kültüründe önemli sayıda ölü hücreler gözlemlemişlerdir. Diğer BCL-2 ailesi proteinleri ile hem anti-apoptotik hem pro-apoptotik aktiviteli ve diğer apoptoz ilişkili faktörler benzer seviyelerini sürdürürken, BCL-2 nin overekspresyonunun belirtilmesi normal fibroblastların hücre ölümüne duyarlılaşmasında major sebep olduğunu düşünmüşlerdir. Geniş bir kaspaz inhibitörü (z-Val-Ala-Asp-fmk) ve spesifik kaspaz inhibitörleri (acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-CHO, acetyl-Ile-Glu-Thr-Asp-CHO, and acetyl-Leu-Glu-His-Asp-CHO) HCA2/BCL-2 nin hücre ölümünü etkili bir şekilde baskıladığını, hücre ölümünde ve apoptoz ölüm formunda kaspaz-3,8 ve 9-bağımlı yolların dahililiyetini önerdiğini bildirmişlerdir. Beklenmedik bir şekilde hücre ölümünde aktif MEK in dahililiyeti inhibitörler kullanılarak gösterildi ki, BCL-2 ve MAP kinaz kaskadı arasındaki çapraz karışma yaşam ömrünün yanı sıra ölümü de regüle ettiği yorumuna varmışlardır

Mai *et al.* (2003) BCL2 nin, hem küçük hücreli akciğer kanseri (SCLC) hem de küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) hücrelerinde eksprese edilen güçlü bir antiapoptotik protein ve tümör uyarıcısı olduğunu bildirmişlerdir. Nikotin, hücre

sağkalımını uyarmak için BCL2'yi düzenleyebildiğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada ise nikotinin, kemterapötik ajanlarla tedavi sonrası fosforilasyon eksikliği olan S70A mutant BCL-2 değil, SCLC H82 hücreleri ifade eden yabancı tiplerin sağ kalımını sürdürmesiyle ilişkili olan sadece serin 70 bölgesindeki BCL-2 fosforilasyonunun indüklediğini rapor etmişlerdir.

Manion *et al.* (2003) BCL-2 ailesi proteinlerini ilaç dizaynı için cazip hedefler olduğunu bildirmişlerdir. Apoptotik hücre ölümünün esas regülatörleri olarak anti-tümör etkileri için BCL-2 fonksiyonlarının manipülasyonunun mantığı kanser terapötikleri için belki de en güçlü moleküler hedefler olduğunu ileri sürmüşlerdir. Dahası insan kanserlerinin tüm tiplerinde gerçek olarak anti-apoptotik proteinlerin seviyesinin yükseldiğinin gösterildiğini belirtmişlerdir. BCL-2 spesifik antisens oligonükleotidlerinin pre-klinik modellerde ve şu anki çeşitli faz III deneylerinde yaygın anti-kanser aktiviteleri gösterildiğini bildirmişlerdir. Rasyonel ilaç dizaynında bu proteinlerin fonksiyonunun manipülasyonu, biyokimyasal veya moleküler fonksiyonlarının iyice anlaşılmasından yoksun olduğu için engellendiğini düşünmüşlerdir. Daha önceki gayretlerin BCL-2 homoloji ailesi içerisindeki protein-protein interaksiyonunun bozulması üzerine odaklandığını belirtmişlerdir. Bu görevdeki önemli sürecin moleküler modelleme ve ilaç öncülleri kullanılarak yapıldığını rapor etmişlerdir.

Kim *et al.* (2001) Bu derlemede, meme kanserinde apoptozda BCL-2'nin paradoksik rolü açısından antikanser ilaçlar ve tamoksifen ile kombinasyon tedavisinin etkinliğinin ardındaki mantığı tartışmışlardır. Tamoksifen, anti-apoptotik gen BCL-2'yi, BCL-2'nin promotor bölgesindeki bir E2-tepki elemanı aracılığıyla estradiol (E2) üzerindeki etkisi ile indüklediğini belirtmişlerdir. Kemoendokrin tedavisinin etkinliği, tamoksifenin antikanser ilaçların etkisi üzerindeki etkisi açısından değerlendirmişlerdir. Antrasiklin ve non-antrasiklin bazlı rejimler dahil olmak üzere adjuvan kemoterapi, nod pozitif meme kanserinde genel bir sağkalım avantajına sahip olduğunu bildirmişlerdir. Kemoterapinin reseptör pozitif hastalarda yararlı olmasının olası nedenleri küçük ve marjinal olduğunu:

- i) tamoksifen ile eş zamanlı tedavi veya ön tedavi premenopozal hastalarda plazma E2 seviyelerini artırabildiğini, böylelikle azalan kanser hücrelerinde BCL-2'yi azaltabilen kemoterapi ile kombinasyon halinde ilaç duyarlılığını;
- ii) BCL-2'nin indüksiyonu, ağırlıklı olarak, BCL-2 hedeflerinin sitotoksik etkisi olan taksanlara karşı dirençte yer alabildiğini rapor etmişlerdir Yardımcı tedavi için tamoksifen ile birlikte tedavi veya ön tedavi, özellikle non-pozitif meme kanseri olan premenopozal hastalarda BCL-2'nin indüklenmesinin aracılık ettiği bir etki olan antikanser ilaçların etkinliğini azaltabildiğini bildirmişlerdir. Sonuç olarak antikanser ilaçlarla tedavi, reseptör pozitif hastalarda kombinasyon terapisinden sağkalım faydası elde etmek için tamoksifen ile tedavi edilmek zorundadır yorumuna varmışlardır.

Tsujimoto *et al.* (2000) Anti apoptotik ve pro-apoptotik üyelerden oluşan BCL-2 proteinleri ailesi, mitokondrial apoptojenik faktörler, sitokrom c ve AIF nin salınımı ki ölüm proteazları denen kaspazların aktivasyonunu kapsayan downstream işlevsel fazları aktive eden kontrolü tarafından bir hücrenin yaşamını veya ölümünü saptadığını bildirmiştir. Sitokrom-c salınımı memelilerde nitekim apoptotik sinyal transdüksiyonu için merkezi olduğunu, sitokrom-c salınımının mekanizması üzerine yapılan çalışmalar majör bir mesele olduğunu belirtmişlerdir. Sitokrom-c salınımı için, mitokondriyal dış membranının koparılmasını kapsayan ve bir spesifik kanalı dahil eden çeşitli modeller önerildiğini göstermişlerdir. Burada ise son zamanki bulgulara göre BCL-2 ailesi üyelerinin bir hücrenin yaşam veya ölüm kararı üzerindeki rolüne genel bir bakış sağlamışlardır.

Basu *et al.* (1998) Her hücrenin sürekli düzenleme altında genomunun bütünlüğünü devam ettirdiğini bildirmektedirler. Bir hücredeki genomik lezyonların DNA replikasyonu ve hücre bölünmesinden önce tamir edilmeli eğer genomik lezyonlar tamir edilebilir değil ise hasarlı hücreler programlı hücre ölümü veya apoptoz olarak bilinen sistemli bir yol içinde atıldığını belirtmişlerdir. Kontrol edilemeyen hücre proliferasyonu hücrel homeostazı bozduğunu ve bu, organ disfonksiyonu yanı sıra anormalliklerin gelişimi gibi maligniteye götürdüğünü bildirmişlerdir. Biyolojik yolak kontrolünün hücre kaderini moleküler seviyede sıralı olarak organize ettiğini

belirtmişlerdir. Bir onkogen türevli protein BCL-2, hücrel intihar mekanizması yolağında negatif kontrol sunarken, bir BCL-2 homologu protein Bax, BCL-2 ile yarışarak hücre ölümünü ilerlettiğini bildirmişlerdir. Bax-Bax homodimerleri apoptoz indükleyici olarak hareket ederken BCL-2-BAX heterodimer şekli hücreler için bir hayatta kalma sinyaline yol açtığını rapor etmişlerdir. DNA hasarında apoptoza sorumlu ve hücre döngüsünün durmasını indükleyen tümör süpresör protein p53 için Bax ve BCL-2 nin ikisi de transkripsiyonel hedefler olduğu yorumuna varmışlardır. Topyekun bu moleküllerin performansının düzenlenmesi bir hücrenin yaşam ve ölümünün kontrolünde çok önemli olduğunu rapor etmişlerdir.

Miyashita *et al.* (1994) p53 tümör süpresör gen ürünü BCL-2 geninin ekspresyonunu inhibe edebildiğini göstermişlerdir. Bu bildiride, BCL-2 geninden bölgeler içeren CAT reportör gen yapıları ve p53 ekspresyon plazmidlerini dahil eden bir kotransfeksiyon yaklaşımı kullanarak BCL-2 gen ekspresyonunun p53 aracılıklı down regülasyonu için moleküler temelini keşfetmişlerdir. P53 yetersiz insan akciğer kanser hücre hattı H358 transfekte edildiği zaman rapörtör gen yapıları p53 tarafından baskılanmayan upstream dizilerini ve sadece BCL-2 nin promotör bölgesini içerdiğini göstermişlerdir. BCL-2 gen dizilerinin inklüzyonu BCL-2/CAT yapılarındaki 5'UTR ye uyum sağladığını ve her nasılsa p53 bağımlı down regülasyonla sonuçlandığını bildirmişlerdir. BCL-2 geni 5'UTR sinden 195 pp lik bir segmentin SV40 hazır ilkel-bölge promotörünün kontrolü altında CAT içeren heterolog ekspresyon plazmidi üzerine p53 bağımlı engelleme yeteneğinin olduğunu bulmuşlardır. Bu p53 negatif sorumlu element, SV40-CAT transkripsiyon biriminin downstream veya upstream her ikisine de yerleştirildiğinde bir oryantasyon-bağımsız tutum içinde iş gördüğünü rapor etmişlerdir. Bu sonuçlar BCL-2 geni içerisinde negatif sorumlu bir elementin varlığını p53 de bu genin direkt veya indirekt transkripsiyonel down regülasyon ekspresyonunu programlı hücre ölümünün regülasyonunda dahil ettiği yorumuna varmışlardır.

Seto *et al.* (1988) İnsan lenfomasındaki en yaygın translokasyon t(14;18) (q32;q21), alternatif BCL-2 ve çeşitli Ig 3'UTR den sonuçlanan heterojen 4.2-7.2 kb BCL-2-Ig kimerik mRNA lar oluşturduğunu bildirmiştir. Normal insan BCL-2 geni bir

untranslated birinci exon, bir fakültatif 220 bp intron I, bir de muazzam 370 kb intron II ile toplam 3 exon yapısına sahip olduğunu belirtmişlerdir. S₁ koruması ve primer uzama analizi, exon II deki başlama bölgelerinin klasik promotor elementleri ve Ig değişken bölge enhancerleriyle homolog bir dekanükleotid (ATGCAAAGCA) ile ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir. Multipl başlama bölgeleri aynı zamanda exon I de Sp1 bağlama motifleriyle GC-zengin bir bölge bulunduğunu bildirmişlerdir. BCL-2 nin 3'UT içindeki en çok t(14;18) kesim noktası kümeleri gen deregülasyonundaki o durumu ima ettiğini göstermişlerdir. BCL-2 geninin tanıttığı SU-DHL-6 nın Ig sabit lokusوماتik mutasyonu gösterdiğini rapor etmişlerdir. BCL-2-Ig mRNAları değişmemiş bir 2.5 saatlik yarı ömrü gösterirken BCL-2-Ig geninin bir olgun B hücresi için transkripsiyonu uygunsuz derecede yüksek bir oranda ortaya çıktığını tespit etmişlerdir. Böylece transloke olmuş BCL-2 alleli normal kontrol mekanizmasından kaçmış olduğu yorumuna varmışlardır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasal maddeler

Çalışmalarda kullanılan tüm kimyasallar moleküler biyoloji için uygun saflıkta ve sterilliktir. Moleküler biyoloji materyalleri, klonlamada kullanılan vektör sistemleri, PCR çalışmalarında kullanılan kimyasallar ve enzimler Sigma, Thermo Scientific, Promega firmalarından temin edilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmalarda kullanılan kimyasallar.

Kimyasallar	Üretici
EDTA	Sigma
D(+) glukoz	Sigma
CaCl₂	Sigma
Tris Base	Sigma
MgCl₂	Sigma
IPTG	Sigma
DMSO	Sigma
Ampicilin	Sigma
X-gal	Sigma
LB-Broth	Sigma
LB-Agar	Sigma
Etidyum Bromür	Sigma
Gliserol	Sigma
Ethanol	Sigma
Agaroz	Sigma

3.1.2. Kullanılan enzimler

Çizelge 3.2. Çalışmalarda kullanılan enzimler.

<i>Taq</i> DNA polimeraz	ThermoScientific
<i>Hind</i> III Restriksiyon Endonükleaz	ThermoScientific
<i>Kpn</i> I Restriksiyon Endonükleaz	ThermoScientific
DNA ligaz	ThermoScientific

Enzim reaksiyonları üretici firmaların önerdiği tamponlarda gerçekleştirilmiştir.

3.1.3. Çalışmada kullanılan laboratuvar gereçleri

Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan cihazlar

Kullanılan Cihazlar	Model
Çalkalamalı inkübatör	ZHWY – 2102C
Laminar Air Flow	WCS Class II Type Biosafety Cabinet
Deep- Freeze (-86°C)	Glacier
Buz Makinası	Fiocchetti Frigoriferi Scientific
Buzdolabı (+4°C, –20°C)	Vestel
Hassas terazi	Gecavery
Santrifüj	Hettich
Otoklav	HMC Hirayama
pH Metre	Mettler Toledo
Sıcak su banyosu	Memmert
Saf Su Cihazı	MP Minipure
Vorteks	Fisons
Spektrofotometre	Beckman coulter
Nanodrop	Epoch

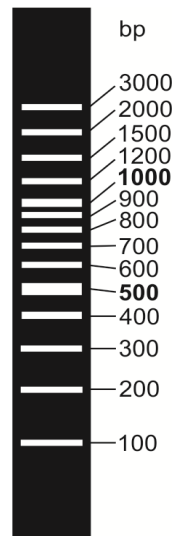
Çizelge 3.3. (devam)

Otomatik pipetler	Eppendorf
Luminometre	Thermo
Agaroz jel elektroforez tankı	BIO RAD
UV Jel Görüntüleme	BIO RAD
PCR	ProFlex™ 3x32-Well PCR
Mikro santrifüj	Thermo
Etüv	Binder

3.1.4. Kullanılan kitler ve DNA moleküler belirteçleri

Hem kimyasal yöntemle izole edilen plazmitlerin temizlenmesinde hem de DNA'nın jelden saflaştırılması işlemlerinde DNA jel ekstraksiyon kiti (Qiagen) kullanılmıştır. Plazmit DNA izolasyonu için ise Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems kullanıldı.

Bu çalışma da Şekil 3.1'de gösterilen DNA moleküler belirteci kullanılmıştır.



Şekil 3.1. DNA marker 3000 bp

3.1.5. Stok solüsyonlar

Amfisilin Solüsyonu; 20 mg/mL olacak şekilde steril didistile su ile hazırlandı ve 0,22 µm çaplı milipor filtreden geçirilerek steril edildi. Steril edilen çözelti, kullanılıncaya kadar -20°C 'de muhafaza edildi.

X-Gal Solüsyonu; 40 mg/mL olacak şekilde hazırlanan çözelti, ışık almayacak şekilde -20°C 'de kullanılıncaya kadar muhafaza edildi.

IPTG Solüsyonu; 23,8 mg/mL olacak şekilde steril didistile su ile hazırlandı ve 0,22 µm çaplı milipor filtreden geçirildi. Steril edilen çözelti -20°C 'de kullanılıncaya kadar muhafaza edildi.

CaCl₂ Solüsyonu (100mM); 1,11 gr CaCl₂, didistile su içinde çözdürüldü, ağzı pamukla kapatılarak otoklavlandı ve buzdolabında $+4^{\circ}\text{C}$ 'de kullanılıncaya kadar muhafaza edildi.

EDTA Tamponu (50mM pH:8.0); 1.46 gr EDTA 90 mL didistile su içerisinde çözüldü, 1 N HCl ve 1 N NaOH ile pH'sı 8,0'e ayarlandı. Daha sonra tamponun son hacmi 100 mL olacak şekilde didistile su ile tamamlandı.

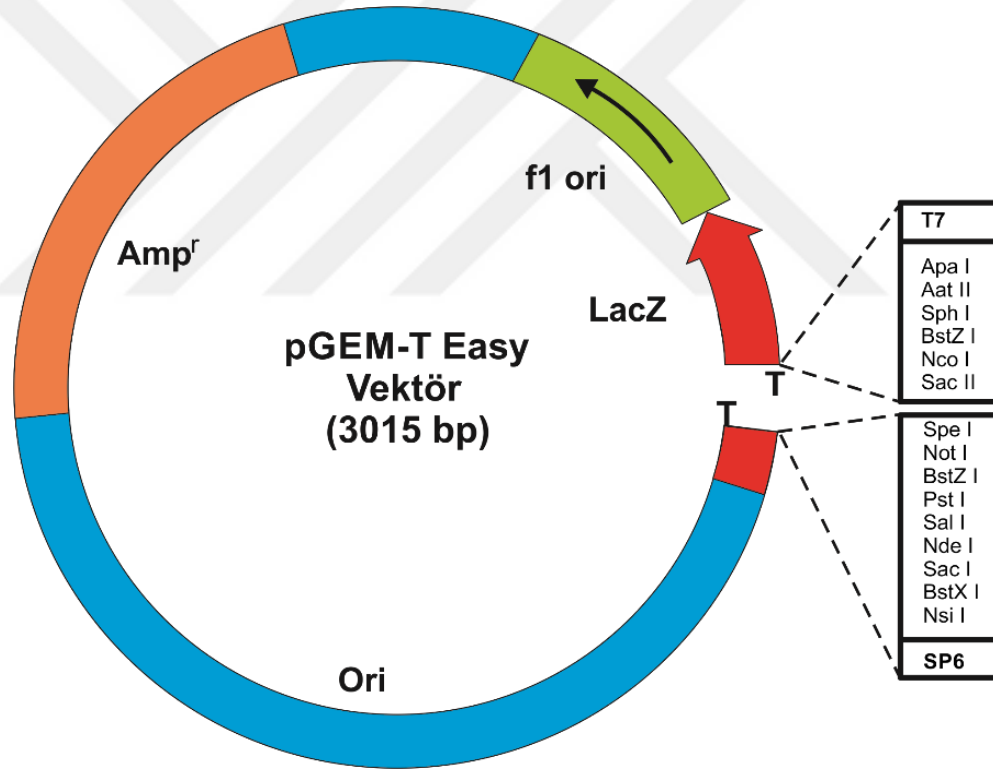
%70'lik EtOH; 70 mL EtOH 30 mL didistile su ile son hacim 100 mL olacak şekilde tamamlandı.

50X TAE Solüsyonu; 242 gr Tris base, 57,1 Ml Asetat, 37,2 gr EDTA tartıldı. pH'sı 8,0 ve son hacim 1 L olacak şekilde didistile su ile tamamlandı.

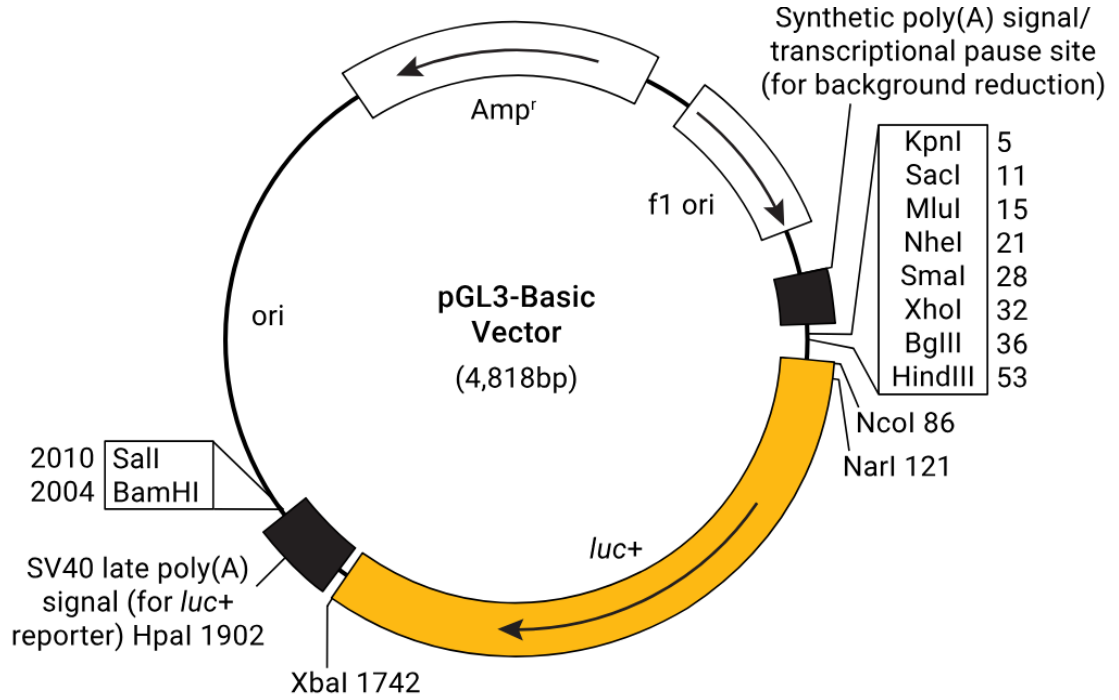
3.1.6. Çalışmada kullanılan vektörler

Klonlama çalışmalarında pGEM-T Easy vektörü ve pGL-3 Basic Luc Reporter vektörü kullanılmıştır. Bu sebepten çoğaltılan PCR ürünleri ilk olarak A-T klonlama amacıyla pGEM-T Easy vektörüne klonlanmıştır.

pGL-3 Basic Luc Reporter vektörü promotör dizisi içermez ancak lusiferaz geni ihtiva eder. İçerdiği bu gen sayesinde bu vektöre klonlanan hedef gen ile beraber hücreye verildiğinde lusiferaz geni ile aktivitesi belirlenmektedir.



Şekil 3.2. pGEM-T Easy vektörünün restriksiyon haritası ve klonlama bölgesi



Şekil 3.3. pGL-3 basic luc reporter vektör haritası

3.1.7. Çalışmada kullanılan bakteri izolatu

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

3.1.8. Bakteriye kültür ortamı

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

3.2. Yöntem

3.2.1. Çalışmada kullanılan ortamın ve malzemenin temizliği ve sterilizasyonu

Isıya dayanıklı bütün cam malzemeler, pipet uçları, ependorflar, santrifüj tüpleri, bakteri kültür ortamları 121°C'de 15 dakika (1,02 atm basınçta) otoklavda steril edildi.

3.2.2. DNA izolasyonu ve klonlama

3.2.2.a. Primer tasarımı

Primer tasarımı için www.restrictionmapper.org, www.ncbi.nlm.nih.gov ve bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/ adreslerinden yararlanıldı. Tasarlanan primerlerin saç tokası yapısı oluşturmamasına, Tm sıcaklıklarının birbirine yakın olmasına ve nükleotitlerin dağılımının mümkün olduğunca eşit olmasına dikkat edildi. Ayrıca tasarlanan primerler veri tabanlarında (GenBank + EMBL + DDBJ + PDB sequences) bulunan DNA sekansları ile blast yapılarak farklı genlerle en az homoloji gösteren primerler seçilmeye çalışıldı.

Bu çalışma için öncelikle insan BCL-2 gen promotorunun biyoinformatik olarak restriksiyon haritalaması yapılarak, promotoru kesen ve kesmeyen restriksiyon enzimleri saptandı. Promotor diziyi kesmeyen enzimlerin pGL3-basic-Luc vektörünün klonlama bölgesindeki enzimler ile uyum gösterip göstermediği kontrol edildi ve KpnI ve HindIII enzimlerinin hem promotor bölgeyi kesmediği hem de vektörün klonlama bölgesinde olduğu görüldü. Sonuç olarak KpnI ve HindIII enzim kesim bölgeleri seçilerek primerlerde kullanıldı. Promotor dizinin doğru yönde klonlanabilmesi için, KpnI kesim bölgesi forward primerde, HindIII kesim bölgesi ise reverse primerde kullanıldı. Bunun dışında tasarlanan primerlerin saç tokası yapısı oluşturmamasına, Tm sıcaklıklarının birbirine yakın olmasına ve nükleotitlerin dağılımının mümkün olduğunca eşit olmasına dikkat edildi.

Çizelge 3.4. Dizayn edilen primerlerin uzunlukları, sıcaklıkları ve dizileri

Primer	Uzunluk	Tm	Dizi
BCL2-F1-primer	21 bp	65°C	KpnI: 5'-TGGTACCAAGAGGACAGGCAC-3'
BCL2-R1-primer	21 bp	65°C	HindIII : 5'- TAAGCTTGCCCCCAGAGAAA-3'
BCL2-F2-primer	22 bp	65°C	KpnI: 5'-AAGGTACCGTTCAGGTGGACAC-3'
BCL2-R2-primer	23 bp	60°C	HindIII : 5' CATAAGCTTCCTTCCCAGAGGAA-3'
BCL2- FP2-primer	26 bp	63°C	KpnI: 5'- AAGGTACCGCTATAACTGGAGAGTGC-3'
BCL2- PNRE primer	25 bp	64°C	KpnI: 5'- AAGGTACCTCAGCATCACAGAGGAA-3'
BCL2- R3 primer	27 bp	64°C	HindIII : 5'- CATAAGCTTCCTTCCCAGAGGAAAAG-3'
Vektörait primer Forward (P1)	17 bp	60°C	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'
Vektörait primer Reverse (P5)	17 bp	60°C	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

3.2.2.b. İnsan genomik DNA'sının temin edilmesi

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

3.2.2.c. Polimeraz zincir reaksiyonları (PCR)

PCR reaksiyonları 15 µL ve 30 µL hacimde yapıldı. Kalıp olarak farklı konsantrasyonlarda elde edilen genomik DNA örnekleri kullanılarak en iyi sonucu verecek konsantrasyon belirlendi. Her bir primerin son konsantrasyonu 10 pmol olacak şekilde seyreltilti. 10X PCR buffer (sigma), 10 mM dNTP (sigma) ve 2,5 ünite Taq DNA polimeraz (sigma), 25 mM MgCl₂ (sigma) kullanıldı. PCR programı ve döngü sayısı primerlere ve kalıp DNA kaynağına bağlı olarak değişiklik göstermiştir. PCR

sonuçları agaroz jelde görüntülenmiş ve istenilen bantlar jelden geri kazanılmıştır.

Çizelge 3.5. BCL-2 gen promotörünün 2444 bp'lik bölgesi için kullanılan PCR programı, sıcaklık döngüsü

96°C	2 dk	
98°C	10 sn	} 30 döngü
58°C	30 sn	
68°C	8 dk	
72°C	10 dk	
+4	∞	

Çizelge 3.6. BCL-2 gen promotörünün 2372 bp'lik bölgesi için kullanılan PCR programı, sıcaklık döngüsü

94°C	4 dk	
94°C	1 dk	} 30 döngü
60°C	1 dk	
72°C	3 dk	
72°C	6 dk	
+4	∞	

Çizelge 3.7. BCL-2 gen promotörünün 610 bp'lik bölgesi için kullanılan PCR programı, sıcaklık döngüsü

95°C	4 dk	
94°C	2 dk	} 35 döngü
55°C	1 dk	
72°C	2 dk	
72°C	5 dk	
+4	∞	

Çizelge 3.8. BCL-2 gen promotörünün 290 bp'lik bölgesi için kullanılan PCR programı, sıcaklık döngüsü

95°C	4 dk	
94°C	2 dk	} 35 döngü
57°C	45 sn	
72°C	1 dk	
72°C	5 dk	
+4	∞	

Çizelge 3.9. Koloni PCR için kullanılan PCR programı, sıcaklık döngüsü

94°C	5 dk	
94°C	1 dk	} 30 döngü
58°C	1 dk	
72°C	4 dk	
72°C	5 dk	
+4	∞	

3.2.2.d. DNA agaroz jel elektroforezi

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

3.2.2.e. Agaroz jelden DNA purifikasyonu

İstenilen DNA bantları UV transilluminator üzerinde agaroz jelden kesilerek alındı ve DNA jel ekstraksiyon kiti (Qiagen) kullanılarak DNA elüe edildi. Jelden kazanılan DNA'nın küçük bir kısmı tekrar jelde yürütülerek kontrol edildi. DNA miktarı ve

temizliğinin kontrolü için 260 ve 280 nm dalga boyundaki absorbansları alındı.

3.2.2.f. PCR ürünlerinin A/T klonlanması

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

3.2.2.g. Plazmit DNA izolasyonu (Miniprep)

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

3.2.2.h. Kompetent hücre hazırlanması

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

3.2.2.i. Ligasyon

Genel olarak reaksiyonlarda vektör:PCR ürünü oranı, 1:3, 1:5, 1:10 olacak şekilde ayarlanmıştır. Ligasyon için hazırlanan karışım, +4°C'de 1 gece boyunca inkübe edilmiştir.

3.2.2.j. Transformasyon

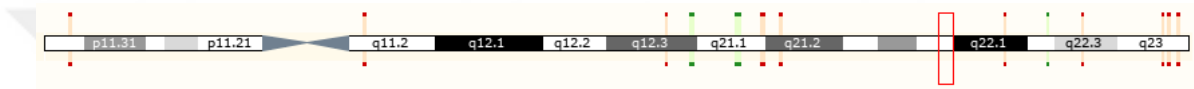
Transformasyon için, 100 µL kompetent hücreye 10 µL ligasyon ürünü ilave edilerek buz üzerinde 20 dakika bekletildi. Süre sonunda 42°C'de 30 saniye ısı şoku uygulandı. Hemen ardından buz üzerinde 3-5 dakika bekletildi. Daha sonra 900 µL LB ilave edildi ve 37°C'de çalkalamalı etüvde bir buçuk saat inkübe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

3.2.2.k. Restriksiyon endonükleaz kesimleri

Pgl3 Lusiferaz vektörünün E.coli JM109 suşuna klonlanması sonrası izole edilen plazmit ve kromozomal DNA'larının restriksiyon endonükleaz kesim reaksiyonları, üretici firmalarının önerdiği tamponlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Plazmit kesimi yaklaşık 45-60 dakikalık sürede gerçekleştirilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

İnsan BCL-2 geninin regülasyonunun aydınlatılması amacıyla ilk olarak biyoinformatik çalışmaları ile Ensemble programı kullanılarak BCL-2 geninin promotör bölgesi belirlendi. Daha sonra Genomatix veri tabanı kullanılarak promotordaki muhtemel transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri belirlendi. Daha sonra sırasıyla genin promotorunun çoğaltılması ve klonlanması çalışmaları gerçekleştirildi.



Şekil 4.1. BCL-2 geninin kromozom üzerindeki yerleşimi kromozom 18

Çizelge 4.1. BCL-2 geninin traskript varyantları ile ilgili hastalıklar

Fenotip, hastalık ve özellik
Mesane karsinoması
Mesane transizyonel hücreli karsinom
Meme difüz büyük B hücreli lenfoma
Körbağırsak adenokarsinoması
Merkezi sinir sistem lenfoması
Kromofor böbrek hücre karsinoma
Kolon adenokarsinoması
Kolorektal adenokarsinoma
Kütanoz melanom
Difüz büyük B hücreli lenfoma
Özofagus squamöz hücre karsinomu
Foliküler lenfoma
Gastrik adenokarsinoma
Hepatoselüler karsinoma
İntravasküler büyük B hücreli lenfoma
Akciğer karsinoması
Lenfoid neoplazmı

Çizelge 4.1. (devam)

Olgun B hücrelerin neoplazmı
Rektal adenokarsinoma
Küçük hücreli akciğer karsinoması
Dalak difüz büyük B hücreli lenfoma
Sınıflandırılmamış renal hücre karsinoması

Çizelge 4.2. BCL-2 geninin transkript varyantları

İsim	Transkript ID	Bp	Protein
BCL2-001	<u>ENST00000398117.1</u>	7461	239 aa
BCL2-002	<u>ENST00000333681.4</u>	3209	239 aa
BCL2-003	<u>ENST00000589955.1</u>	911	205 aa
BCL2-004	<u>ENST00000590515.1</u>	572	Protein kodlamamaktadır.
BCL2-201	<u>ENST00000444484.1</u>	1206	205 aa

Translation (239 aa):

MAHAGRTGYDNREIVMKYIHYKLSQRGYEWDAAGDVGAAPPGAAPAPGIFSSQPGHTPHPAASRDPVARTS
 PLQTPAAPGAAAGPALSPVPPVVHLTLRQAGDDFSRRYRRDFAEMSSQLHLTPFTARGRFATVVEELFRD
 GVNWGRIVAFFEFGGVMCVESVNREMSPLVDNIALWMTEYLNRLHTWIQDNGGWDAFVELYGPSMRPLF
 DFSWLSLKTLLSLALVGACITLGAYLGHK

Şekil 4.2. BCL-2 geninin alternatif ekson yapısı

Siyah: Alternatif ekson, Sarı: Çakışan aminoasitler

Çizelge 4.3. BCL-2 geninin 2580 bp'lik promotör parçasının dizisi ve dizi üzerindeki fonksiyonel bölgeler

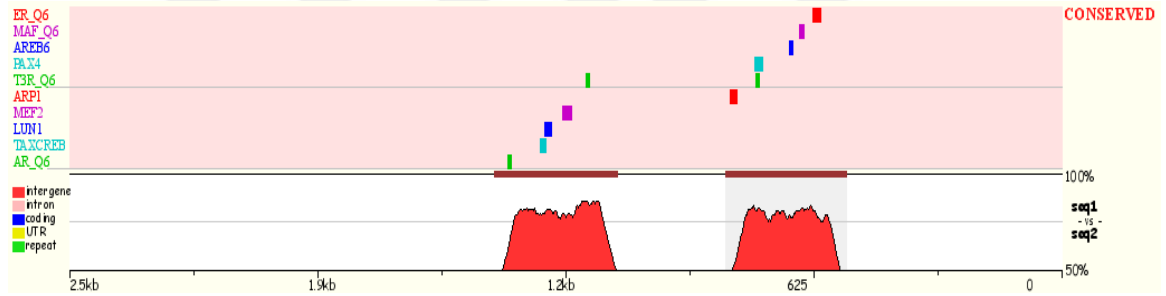
Transcript: BCL2-001 ENST00000398117

5' Flanking sequence chromosome:GRCh38:18:63320129:63322628:-1

CTGGAGCGCT	GAGTTCTGCA	TGGCCTGGGC	CACGGACTAG	GTGTTCAGGT	GGACACGGGC
GGGGATGCGC	GTGCGTGTGT	AGTGCGCGGA	CACCTAGGAA	GCTACT TGAA	AGTAAACACC
<i>FOXF2</i>					
ACGCTCGGGG	CGTCCCTAGA	CATTGCTTAA	AACGTGCAGA	GTCACCTGTC	TTCACAGCAG
GGCAGCGCTG	AGGTCCCACT	GCTGGGGGCG	GTGGGGGGCG	GCATTGGCCT	GGGTCTTCCC
CCGGCGGCCG	AGCGCCGGTA	ACACAACGTG	TGTGTGTGTA	GGCGCGTGTA	CACACTCTCA
TACACGGCTA	GAAAGGGTCC	AGGCGACACA	CACACTCCCA	CATACACGGC	TAGAAAAGGT
CCAGGCGAGA	CACACACACA	CACACACACA	CACACACACA	CTCCACACAC	ACTCACACGG
CCAGAAAGGG	TCCAGGCGGT	TCCCGGCGCT	TTTC CAGCCC	TTGTTTTT AT	GGCGCACCC
<i>LM184</i>					
CCCCCAGCC	GCCCCCTCC	GCACTCCGTC	GTCCGCCCCG	CCCGGCCGCG	TGCGGTTCCC
CGGGAGCCCC	CACCCCGTCG	CGGACCCAG	CGACCACCAA	GTCCGCACGC	GGCTGCGCG
AGGCCTGAGC	AGAAGGCCCC	GCGCACACCC	ACCGCGCCGC	GGCC GCGCGG	GAGGCC TGTG
<i>E2F4</i>					
CCGCCCCGCG	CACCCACTGG	CCGGGCCCCG	CGGGCGCAGC	GGAGCGGGCG	GGTGGCCGGC
CCGGACGCGC	CCTCCCCGGC	CGCGGCCCGG	CGCGCCATGT	GCCCCCGGCG	GGACGCGCCA
CTCCCGGGCC	TGCCCGGGCG	CCTTTAACCC	GGGCCAGGGA	GCGGGGCGGA	GGGGGCGGTC
GGGTGGCTCA	GAGGAGGGCT	CTTT CTTTCT	TCTTTTTTTT G	AATGAACCGT	GTGACGTTAC
<i>LM187</i>					
GCACAGGAAA	CCGGTCGGGC	TGTGCAGAGA	ATGAAGTAAG	AGGACAGGCA	CCACAGCCCC
GCTCCCGCCC	CCTTCCTCCC	GCGCCCGCCC	CTCCGCG CCG	CCTGCCCC GCC	CGCCCGCCGC
<i>NRF1</i>					
GCTCCCGCCC	GCCGCTCTCC	GTGGCCCCGC	CGCGCTGCCG	CCGCCGCCGC	TGCCAGCGAA
GGTGCCGGGG	CTCCGGGCCC	TCCCTGCCGG	CGGCCGTGAG	CGCTCGGAGC	GGGTGCGCG
GCGGGAGCTC	CGGGAGGCGG	CCGTAGCCAG	CGCCGCGCG	CAGGACCAGG	AGGAGGAGAA
AGGAGTCCGA	GCCCGGAGGC	GGGGTGCGCC	GTTGGGGTGC	AGCGGAAGAG	GGGTCCAGG
GGGGAGAACT	TCGTAGCAGT	CATCCTTTTT	AGGAAAAGAG	GGAAAAAATA	AAACCCTCCC
CCACCACCTC	CTTCTCCCCA	CCCCTCGCCG	CACCACACAC	AGCGCGGGCT	TCTAGCGCTC
GGCACC GGCG	GGCCAGGCGC	GTCTGCCTT	CATTTATCCA	GCAGCTTTTC	GGAAAATGCA
TTTGCTGTTC	GGAGTTTAAT	CAGAAGAGGA	TTCTTGCCTC	CGTCCCCGGC	TCCTTCATCG
TCCCTCTCC	CTGTCTCTC	TCCT GGGGAG	GCGTGAAGCG	GTCCCGTGGA	TAGAGATTCA
<i>SMAD2/SMAD3/SMAD4</i>					
TGCCTGTGCC	CGCGCGTGTG	TGCGCGCGTG	TAAAT TGCCC	AGAAG GGA	AACA TCACAG
<i>STAT3</i> <i>FOXO3</i>					
GACTTCTGCG	AATACCGGAC	TGAAAATTGT	AATTCATCTG	CCGCCGCCGC	TGCCTTTTTT
TTTTCTCGAG	CTCTTGAGAT	CTCCGGTTGG	GATTCCCTGCG	GATTGACATT	TCTGTGAAGC
AGAAGTCGGG	GAATCGATCT	GGAAATCCTC	CTAATTTTTA	CTCCCTCTCC	CCGCGACTCC
TGATTCATTG	GGAAGTTTCA	AATCAGCTAT	AACTGGAGAG	TGCTGAAGAT	TGATGGGATC
GTTGCCTTAT	GCATTTGTTT	TGGTTTTTACA	AAAAGGAAAC	TTGACAGAGG	ATCATGCTGT
ACTTAAAAAA	TACAAGTAAG	TTCTCTGCAC	AGGAAAATTGG	TTTAATGTAA	CTTTCAATGG
AAACCTTTGA	GATTTTTTAC	TTAAAGTGCA	TTTCGAGTAAA	TTTAATTTCC	AGGCAGCTTA
ATACATTCTT	TTTAGCCGTG	TTACTTGTAG	TGTGTATGCC	CTGCTTTTAC	TCAGTGTGTA
CAGGGAAACG	CACCTGATTT	TTTACTTA TT	AGTTTGTTTT	TT CTTTAACC	TTTCAGCATC
<i>STAT1/STAT2</i>					
ACAGAGGAAG	TAGACTGATA	TTAACAATAC	TTACTAATAA	TAACGTGCCT	CATGAAATAA
AGATCCGAAA	GGAATTGGAA	TAAAAATTTT	CTGCATCTCA	TGCCAAGGGG	GAAACACCAG
AATCAAGTGT	TCCGCGTGAT	TGAAGACACC	CCCTCGTCCA	AGAATGCAAA	GCACATCCAA
TAAATAGCT	GGATTATAAC	TCCTCTTCTT	TCTCTGGGGG	CCGTGGGGTG	GGAGCTGGGG
CGAGAGGTGC	C(g)TTGGCCCC	CGTTGCTTTT	CCTCTGGGAA	GGATG GCGCA	CGCTGGGAGA
ACAGGGTACG	ATAACCGGGA	GATAGTGATG	AAGTACATCC	ATTATAAGCT	GTGCGAGAGG
GGCTACGAGT	GGGATGCGGG	AGATGTGGGC	GCCGCGCCCC	CGGGGGCCGC	CCCCGCACCG

Çizelge 4.3. (devam)

Yeşil: Muhtemel p53 bağlanma bölgesi (-2392-2362 bp) 30 bp
Kırmızı: CAAT (-101-106) ve TATAA (-83-88) kısmı
Gri bölge: P1 Bölgesi (-58-1431 bp) 1373 bp
Yeşil bölge: P2 bölgesi (+1-58 bp) 58 bp
Mavi (altı çizili): +1 birinci kodon
Turkuaz bölge: PNRE (-85-279) 194 BP
Mor (altı çizili-kalın): TSS
Sarı bölgeler:Transkripsiyon faktörleri e bağlanma motifleri

**Şekil 4.3.** İnsan BCL-2 geninin 2500 bp'lik promotör bölgesi ile insan BAX geninin 2500 bp'lik promotörü arasındaki homoloji**Çizelge 4.4.** BCL-2 gen promotörü üzerindeki muhtemel transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri

Matriks Ailesi	Detaylı Aile Bilgisi	Matrix	Detaylı Matris Bilgisi	Başlangıç	Bitiş	Zincir	Dizi
BRAC	Brachyury gen, mezoderma gelişim-faktör	TBX20.01	T-box transkripsiyon faktör TBX20	30	58	(+)	ccacggactAGGTgttcaggtggacacgg

Çizelge 4.4. (devam)

E2FF	E2F-myc aktivator/hücre siklus düzenleyici	E2F1.01	E2F transkripsiyon faktör 1	54	70	(+)	cacgGGCGgggatgcgc
MZF1	Myeloid çinko parmak1 faktörleri	MZF1.01	Myeloid çinko parmak1 protein MZF1	59	69	(+)	gcGGGGatgcg
TAIP	TGF-beta indüklenmiş apoptozis proteinleri	CSRNP3.01	Sistein-serine-zengin nükleer protein 3	158	164	(+)	aGAGTca
ZFHX	İki elli çinko parmak homeobölgeli transkripsiyon faktörleri	AREB6.02	AREB6 (Atp1a1 düzenleyici element bağlayıcı faktör 6)	159	171	(+)	gagtCACCTgtct
ZICF	ZIC-ailesi üyeleri,serebellumun çinko parmak proteinleri	ZIC2.02	Zic ailesi üyesi 2 (tek eşleştirilmiş Drosophila homologu) (ikincil DNA bağlayıcı tercih)	170	184	(+)	cttcaCAGCagggca
HAND	Class B bHLH transkripsiyon faktörlerinin kıvrımlı altfamilyası	TAL1_E2A.02	T-hücre akut lenfositik lösemi 1, SCL	168	188	(+)	gtcttcaCAGCagggcagcgc
KLFS	Krueppel benzeri transkripsiyon faktörleri	KLF6.01	Kor promotör-bağlayıcı protein (CPBP) ile 3 Krueppel-tip çinko parmaklar (KLF6, ZF9)	199	217	(+)	ctgctgGGGcggtggggg
BEDF	Çinko parmak proteinlerin BED alt sınıfı	ZBED4.01	Çinko parmak, BED-tipi içeren 4; GC-kutusu bağlama bölgesi	203	217	(+)	tggGGGCggtggggg

Çizelge 4.4. (devam)

PLAG	Pleomorfik adenoma geni	PLAG1.02	Pleomorfik adenoma geni 1	202	224	(+)	ctGGGGgcgggtgggggcgcat
SP1F	GC-Box faktörleri SP1/GC	SP4.01	Sp4 transkripsiyon faktörleri	211	227	(+)	gtggggGCGGgcattgg
ZTRE	Çinko transkripsiyon el düzenleyici element	ZTRE.03	ZTRE motifinin 5' yarım bölgesi	333	349	(+)	caCTCCcacatacacgg
PAX3	PAX-3 bağlayıcı bölgeler	PAX3.03	Pax-3 eşleşmiş domain proteini	463	481	(+)	gttttCATGgcgcacacctc
CREB	cAMP-sorumlu element bağlayıcı proteinleri	CREB2CJUN.01	CRE-bağlayıcı protein 2/c-Jun heterodimeri	886	906	(+)	accgtgtgACGTtacgcacag
EBOX	E-box bağlayıcı faktörleri	ATF6.01	ER hasarı/stresi tarafından indüklenmiş, NF-Y ile ilişkili ERSE'yi bağlayan b-zip ailesinin üyesi	774	790	(+)	cgcgCCACtcccgggcc
MOKF	FareKrueppel benzeri faktör	MOK2.02	Çinko parmak protein ile ilişki ribonükleoprotein MOK-2 (insan)	788	808	(+)	gcctgccgcgCCTTtaac
EGRF	EGR/sinir büyüme faktörü indüklemiş protein C & ilişkili faktörler	EGR1.02	EGR1, erken büyüme cevabı 1	825	843	(+)	ggcggaggGGGCggtcggg
NACA	Doğan polipeptid ilişkili kompleks ve koaktivatör alfa	NACA1.01	Doğan polipeptid ilişkili kompleks altünitesi alfa 1	845	857	(+)	ggctCAGAggagg

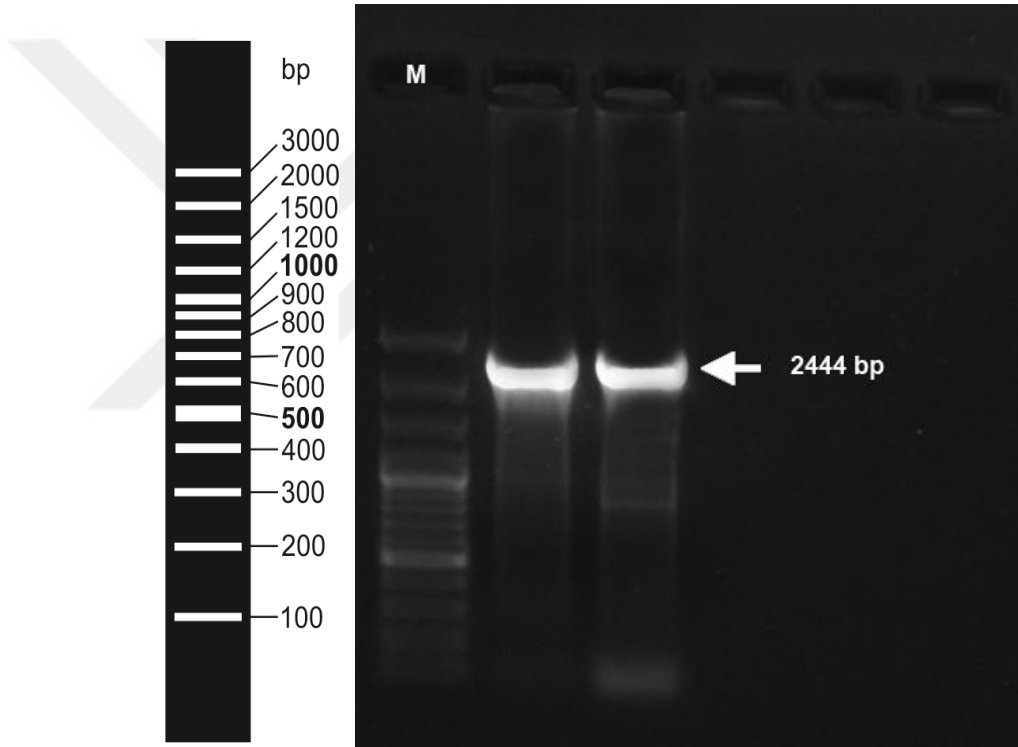
Çizelge 4.4. (devam)

E4FF	Ubikütinöz GLI - Krueppel benzeri çinko parmak ilişkili hücre siklus regülasyonu	E4F.01	GLI-Krueppel-ilişkili transkripsiyon faktör, adenovirus E4 promotörünün düzenleyicisi	891	903	(+)	gtgACGTtacgca
ZF02	C2H2 çinko parmak transkripsiyon faktörleri 2	ZNF300.01	KRAB-içeren çinko parmak protein 300	961	983	(+)	gtctccgCCCCcttctcccgcg
TF2B	RNA polimeraz II transkripsiyon faktör II B	BRE.01	Transkripsiyon faktör II B (TFIIB) tanıyıcı element	979	985	(+)	cgcCGCC
NF1F	Nükleer faktör 1	NF1.03	Palindromik olmayan nükleer faktör I bağlama bölgesi	1059	1079	(+)	cgccgcgcgcgcctGCCAgcga
MIZ1	Myc-etkileşimli çinko parmak protein 1	MIZ1.01	Myc-etkileşimli çinko parmak protein 1, çinko parmak ve BTB domaini içeren 17 (ZBTB17)	1094	1104	(+)	cgggcCCTCcc
PURA	Spesifik dizi içindeki her ikisini de tek zincirli ve çift zincirli DNA bağlayan Pur-alfa	PURALPHA.01	Purince zengin element bağlayıcı protein A	1215	1227	(+)	ggAGGCgggggtgc
ZF5F	ZF5 POZ çinko parmak domaini	ZF5.01	Çinko parmak / POZ domain transkripsiyon faktörü	1220	1234	(+)	cgggggtGCGCcggtg
ETSF	İnsan and fare ETS1 faktörleri	SPI1.02	SPI-1 proto-onkogen; hematopoietik transkripsiyon faktör PU.1	1236	1256	(+)	ggtgcagcGGAAgaggggggtc

4.1. BCL-2 Gen Promotörünün Klonlanması

4.1.1. BCL-2 gen promotörünün 2444 bp'lik bölgesinin çoğaltılması

BCL-2 gen promotörüne ait olan ve belirlenen üç farklı bölgeyi kolay bir şekilde çoğaltabilmek amacıyla kalıp olarak kullanılacak olan 2444 bp'lik bölge PCR ile çoğaltıldı.



Şekil 4.4. 2444 bp bölgenin PCR ile çoğaltılması

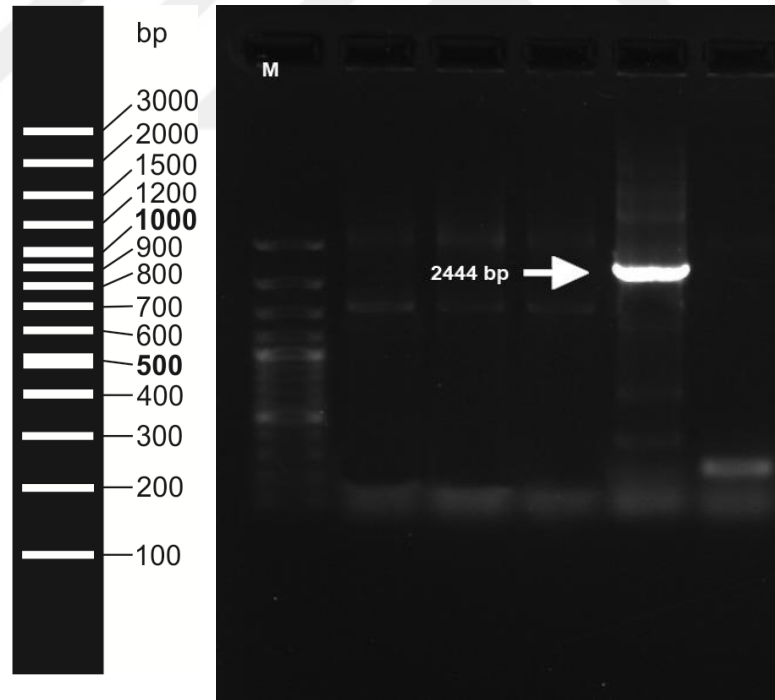
4.1.1.a. İnsan BCL-2 gen promotörünün 2444 bp bölgesinin pGEM-T Easy vektör sistemine ligasyonu ve *E.coli*'ye transformasyonu

PCR ile çoğaltılan 2444 bp'lik promotör bölge pGEM-T Easy vektörüne (Promega) A:T klonlama stratejisi ile klonlandı. Bu amaçla PZR neticesinde elde edilen PZR ürünü ligasyon amacıyla 24 saat +4 °C'de bekletildi. Bu ligasyonu gerçekleştirilmiş ürünün ise *E.coli JM109* hücrelerine transformasyonu gerçekleştirildi. İçerisinde Amfisilin bulunan

LB agarların konulduğu petrilere mavi-beyaz koloni seçimi yapılabilmesi amacıyla X-Gal ve IPTG yayıldı. Bu petrilere transformasyon yapılmış bakterilerin ekimi yapılarak bir gece 37°C’de inkübasyona bırakıldı. Oluşan beyaz koloniler insan BCL-2 gen promotörünün 2444’lük kısmını içeren hücrelerdir. Beyaz kolonilerden beş tanesi seçilerek vektörün geni alıp almadığını kontrol etmek amacıyla koloni PCR yapıldı.

4.1.1.b. Koloni PCR

Klonladığımız gen bölgesini aldığını düşündüğümüz beyaz koloniler seçildi. Bu beyaz koloniler PCR’da kalıp DNA olarak kullanılarak koloni PCR yapıldı. Primer olarak vektöre ait olan P1 ve P5 primerleri kullanıldı. PCR için gerekli olan reaktif ve miktarların olduğu protokolün aynısı kullanıldı.



Şekil 4.5. Koloni PCR sonucunun agaroz jelde görüntülenmesi

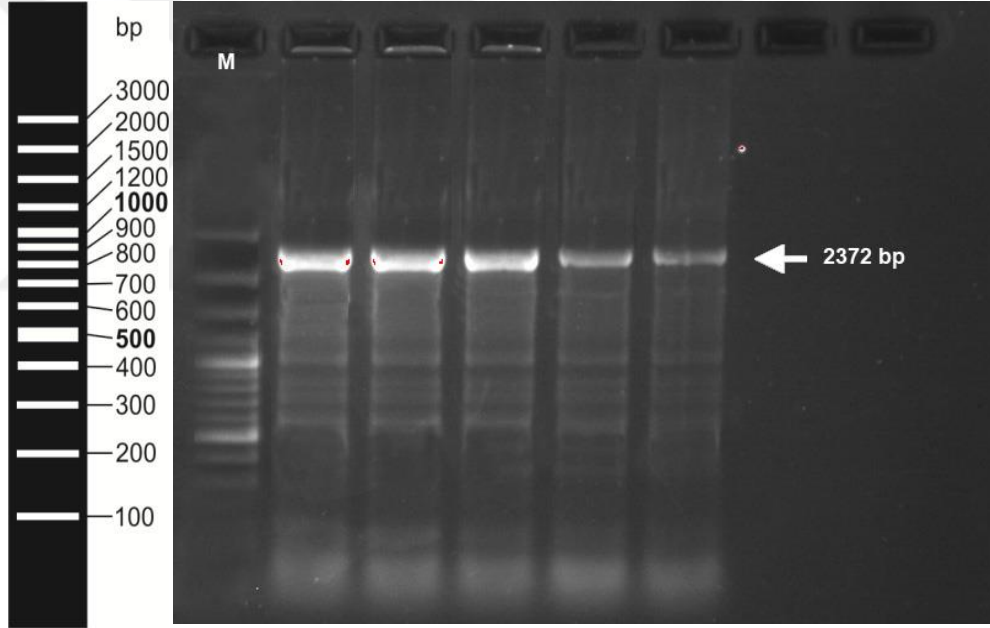
4.1.1.c. Plazmit DNA izolasyonu

Koloni PCR sonucu istenen gen bölgesini aldığı doğrulanan koloni LB-broth besiyerine

ekildi ve hücreler çoğaltıldı. Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems plazmit DNA izolasyon kiti kullanılarak plazmit DNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen plazmitin konsantrasyon ve saflığı NanoDrop'ta ölçüldü.

4.1.2. BCL-2 gen promotörünün 2372 bp'lik bölgesinin çoğaltılması

Bu bölgenin çoğaltılması için 2444 bp'lik bölge kalıp olarak kullanıldı. Nonspesifik bağlanmaları engellemek için PCR reaksiyonunda kalıp olarak kullanılan DNA 1/2 oranında sulandırıldı.



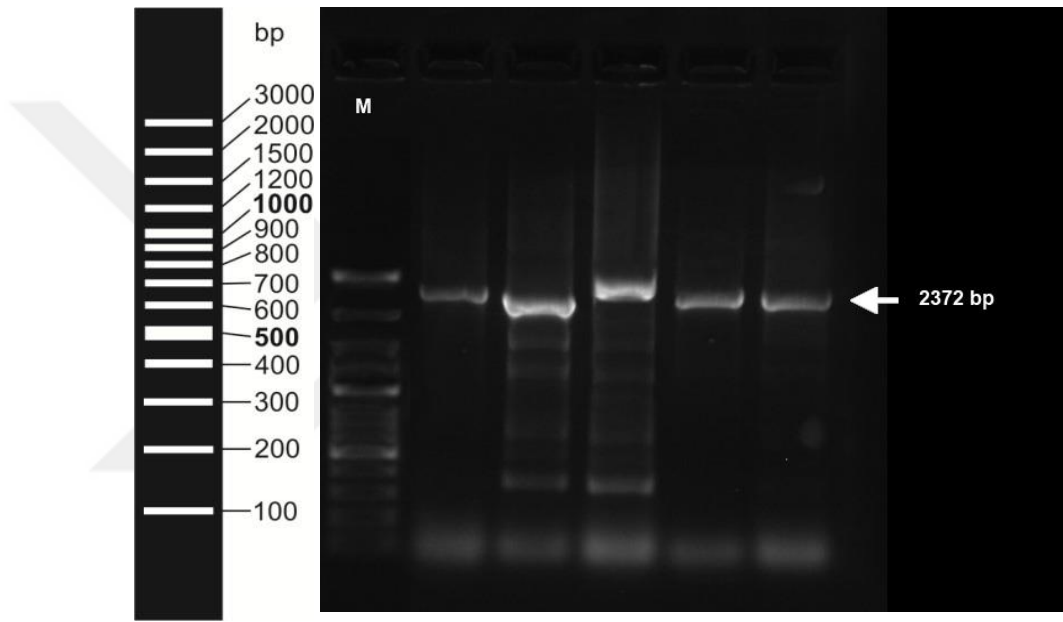
Şekil 4.6. 2372 bp bölgenin PCR ile çoğaltılması

4.1.2.a. İnsan BCL-2 gen promotörünün 2372 bp bölgesinin pGEM-T Easy vektör sistemine ligasyonu ve *E.coli*'ye transformasyonu

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

4.1.2.b. Koloni PCR

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



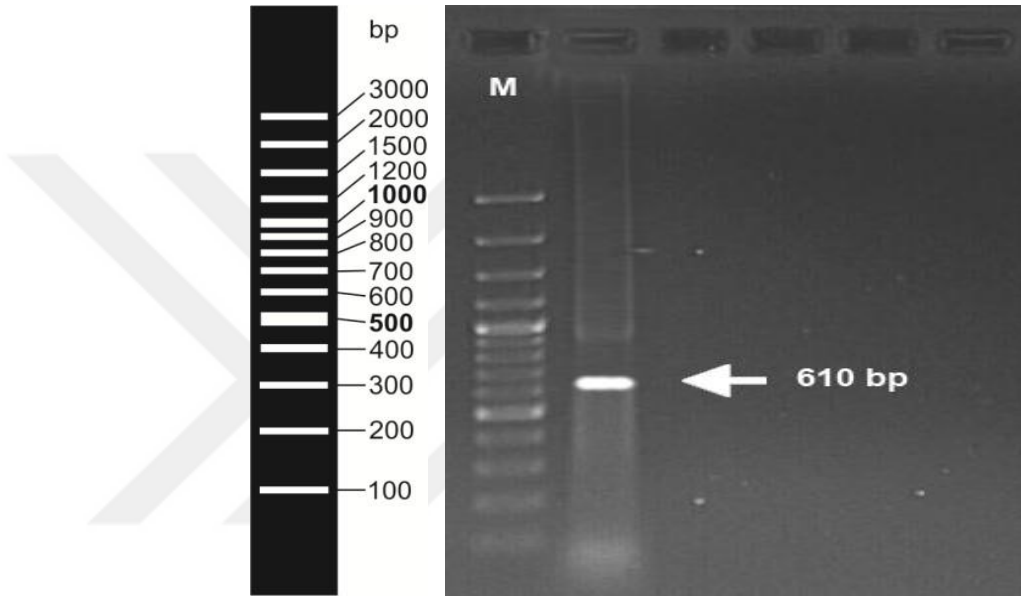
Şekil 4.7. Koloni PCR sonucunun agaroz jelde görüntülenmesi

4.1.2.c. Plazmit DNA izolasyonu

Bütün kolonilere bakıldı fakat en saf görüntü özellikle 3. kolonide olduğu için bu koloni seçilerek LB broth besiyerine ekildi ve koloniler çoğaltıldı. Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems plazmit DNA izolasyon kiti kullanılarak plazmit DNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen plazmitin konsantrasyon ve saflığı NanoDrop'ta ölçüldü, agaroz jel elektroforezinde görüntülendi.

4.1.3. BCL-2 gen promotörünün 610 bp'lik bölgesinin çoğaltılması

Bu bölgenin çoğaltılması için 610 bp'lik bölge kalıp olarak kullanıldı, nonspesifik bağlanmaları engellemek için PCR reaksiyonunda kalıp olarak kullanılan DNA 1/3 oranında sulandırıldı.



Şekil 4.8. 610 bp bölgenin PCR ile çoğaltılması

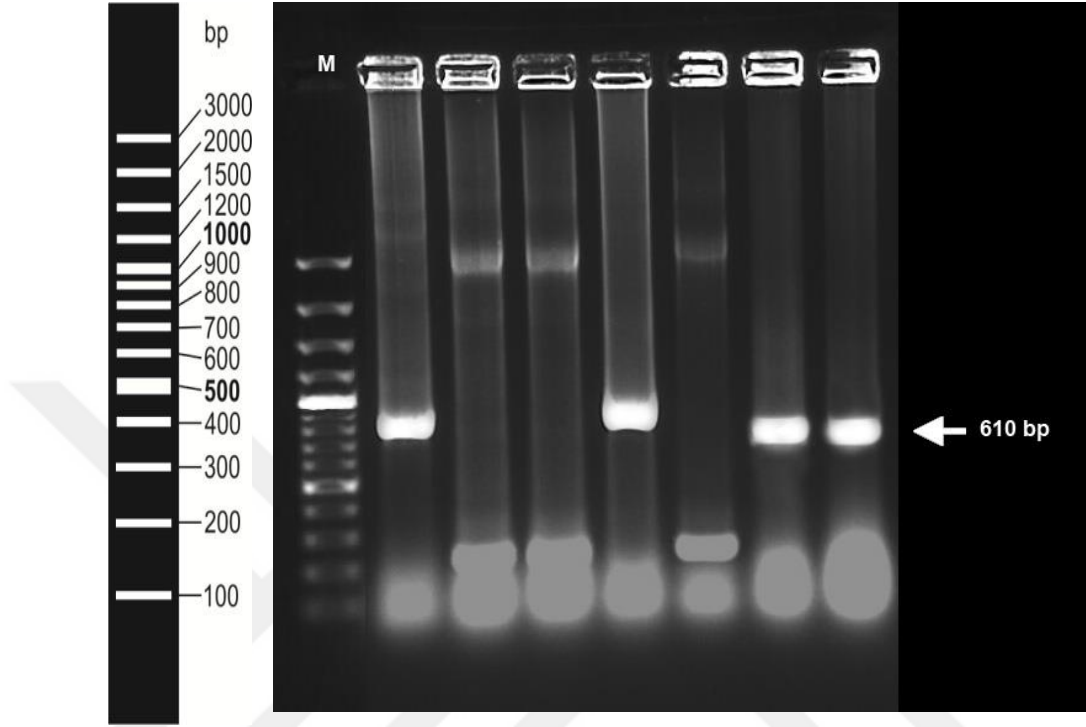
4.1.3.a. İnsan BCL-2 gen promotörünün 610 bp bölgesinin pGEM-T Easy vektör sistemine ligasyonu ve *E.coli*'ye transformasyonu

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

4.1.3.b. Koloni PCR

Seçilen yedi tane beyaz koloni PCR'da kalıp olarak kullanılarak koloni PCR yapıldı. Primer olarak vektöre ait olan P1 ve P5 primerleri kullanıldı. Protokol ve PCR döngüsü

olarak tüm bölgelerin koloni PCR'ı için aynısı kullanıldı.



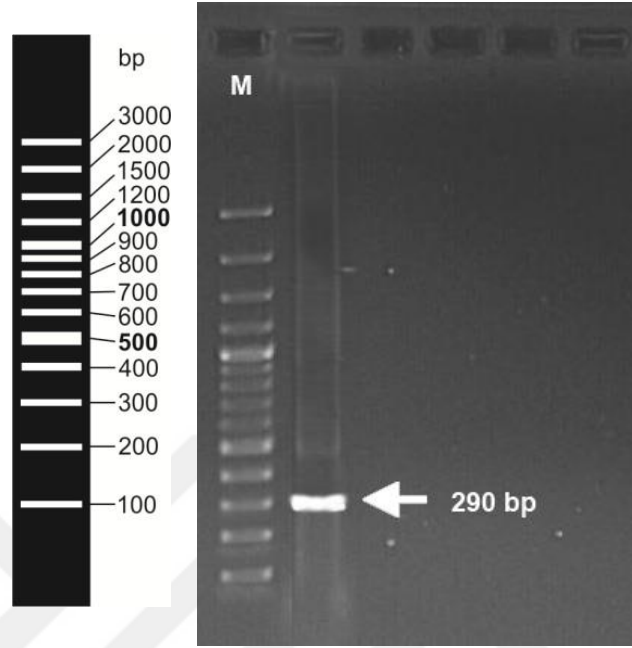
Şekil 4.9. Koloni PCR sonucunun agaroz jelde görüntülenmesi

4.1.3.c. Plazmit DNA izolasyonu

Koloni PCR sonucu özellikle 6. Ve 7.koloni seçilerek LB broth besiyerine ekildi ve hücreler çoğaltıldı. Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems plazmit DNA izolasyon kiti kullanılarak plazmit DNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen plazmitin konsantrasyon ve saflığı NanoDrop'ta ölçüldü, agaroz jel elektroforezinde görüntülendi.

4.1.4. BCL-2 gen promotörünün 290 bp'lik bölgesinin çoğaltılması

Bu bölgenin çoğaltılması için 2444 bp'lik bölge kalıp olarak kullanıldı. Fakat nonspesifik bağlanmaları engellemek için PCR reaksiyonunda kalıp olarak kullanılan DNA 1/3 oranında sulandırıldı.



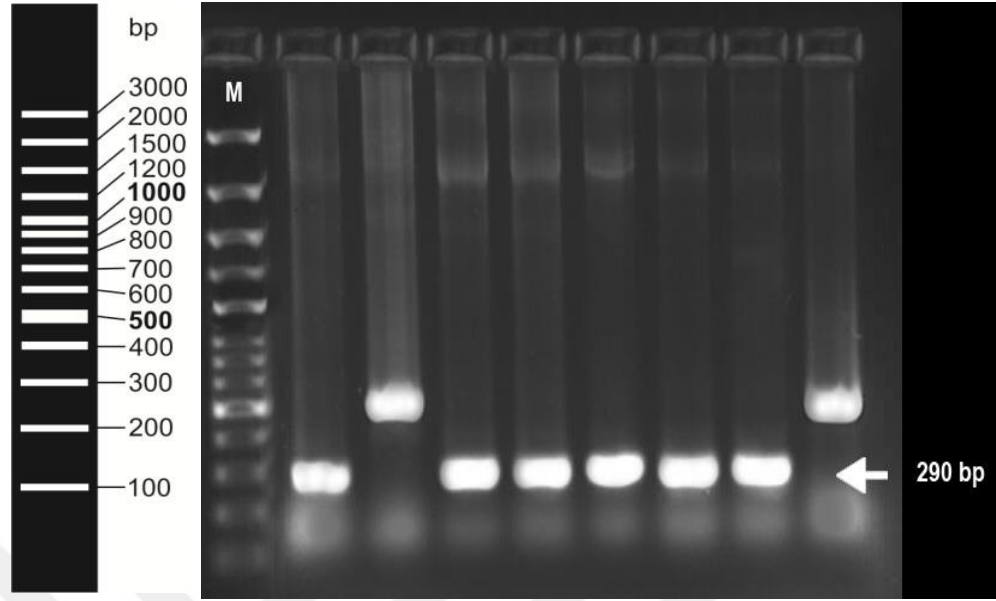
Şekil 4.10. 290 bp bölgenin PCR ile çoğaltılması

4.1.4.a. İnsan BCL-2 gen promotörünün 290 bp bölgesinin pGEM-T Easy vektör sistemine ligasyonu ve *E.coli*'ye transformasyonu

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

4.1.4.b. Koloni PCR

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



Şekil 4.11. Koloni PCR sonucunun agaroz jelde görüntülenmesi

4.1.4.c. Plazmit DNA izolasyonu

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

4.2. pGL3 Lusiferaz Vektörünün *E.coli*'ye Transformasyonu

CaCl₂ ile kompetent hale getirilmiş *E.coli*'den 100 µl alındı üzerine ise 1 µl pGL3 Lusiferaz vektöründen eklendi. Önce 20 dk buzda bekletildi sonra 42 °C'lik su banyosunda 38 sn bekletildi ve sonra tekrar 4 dk buz içerisinde bekletilerek ısı şokuna maruz bırakıldı. Üzerine de daha önceden hazırlanmış olan 900 µl LB- Broth eklendi. 37 °C'de 1,5 saat su banyosunda bekletildi. 6000 rpm de 30 sn boyunca 24 °C'ye ayarlanmış santrifüj cihazıyla santrifüjlendi. Daha sonra içerisinde sadece Amp⁺ olan LB-Agar besiyerine ekim yapıldı. 37 °C inkübatörde bir gece bekletildi ve beyaz

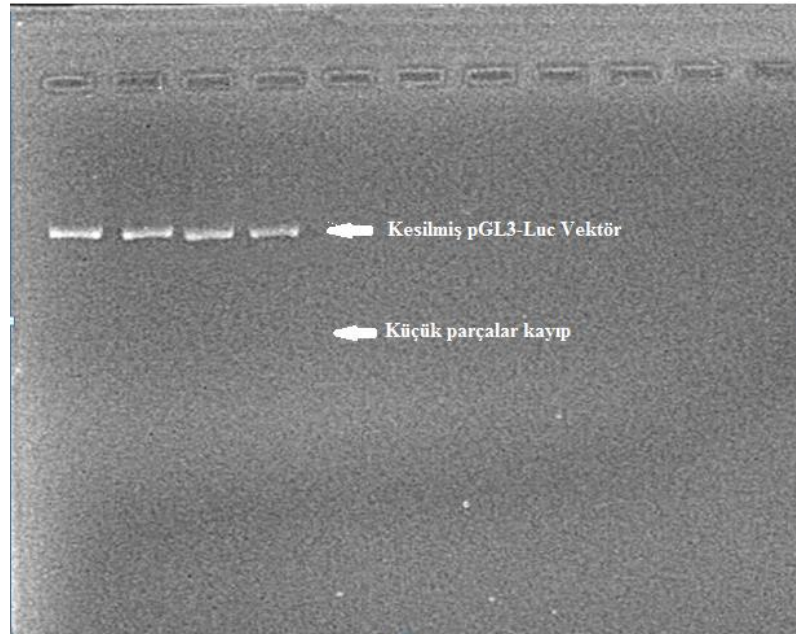
kolonilerin büyümüş olduğu görüldü.

4.2.1. pGL3 Lusiferaz vektörünü taşıyan ve çoğaltan *E.coli*'den plazmit izolasyonu

Bu beyaz koloniler LB broth besiyerine ekildi ve hücreler çoğaltıldı. Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems plazmit DNA izolasyon kiti kullanılarak plazmit DNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen plazmitin konsantrasyon ve saflığı NanoDrop'ta ölçüldü. Daha sonra agaroz jel elektroforezinde görüntülendi.

4.2.2. pGL3 Lusiferaz vektörünün HindIII ve KpnI kesim enzimleriyle kesilmesi

Kesim için gerekli olan reaktifler hazırlandıktan sonra önce 37°C'ye ayarlanmış su banyosunda 30 dk bekletildi. Daha sonra ise 80°C'ye ayarlanmış su banyosunda 10 dk bekletilerek kesim yapıldı. Bu bantlar jelden ekstrakte edildi ve +4°C'de saklandı.



Şekil 4.12. pGL3 Lusiferaz vektörünün HindIII ve KpnI kesim enzimleriyle kesildikten sonra agaroz jel görüntüsü

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Apoptozisin olması veya olmaması tümör gelişiminde kritik öneme sahiptir. Apoptozu uyaranlara (radyoterapi ve kemoterapi gibi) karşı direnç sağlayan bir gen olan BCL-2, düşük dereceli B hücreli non-hodgkin lenfomalarda t(14:18) translokasyonda bulunmuştur. Böylelikle neoplastik hücre büyümesinin hızlı çoğalmadan ziyade hücre ölümünün azalmasıyla da ortaya çıktığı anlaşılmıştır. Öte yandan paradoks şekilde bazı kanser türlerinde özellikle de meme kanserinde tümör büyümesi artan apoptozisle ilişkilendirilmiştir. İnsanlarda BCL-2'nin 16 homoloğu tanımlanmıştır. Bazı üyeleri apoptozisi baskımlarken (BCL-2, BCL-xL, BCL- W), bazıları da apoptozisi tetikler (BAK, BAD, BAX, BID, BIK). BCL-2 esas olarak dış mitokondrial membranda bulunur. Son yıllardaki çalışmalar BCL-2 pozitifliğinin genel sağkalım, lokal kontrol ve hastalıksız sağkalımda bir prognostik faktör olabileceği üzerine yoğunlaşmıştır.

Teorik olarak, BCL-2 geninin iki mekanizma üzerinden tedaviye direnç ve kötü prognoza neden olması beklenir: 1) Tümör hücrelerinin daha hızlı birikimi ile sonuçlanacak şekilde spontan apoptozun önlenmesi. 2) Kullanılan tedavinin tipinden bağımsız olarak tedavi ile ilişkili apoptozun engellenmesidir. BCL-2 ekspresyonunun meme kanserlerinde %70, prostat kanserlerinde %30-60, kolorektal kanserlerde ise %90 oranında pozitif olduğu bildirilmiştir (Yılmaz ve ark., 2015).

Yılmaz ve ark'nın NSCLC (Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri)'li hastalık çalışmalarında %80.4 olgu BCL-2 negatif bulunurken pozitif olgu sayısı %19.6 olarak bulunmuştur. BCL-2 pozitif olguların daha yüksek sağkalım oranlarına sahip oldukları görülmüştür. Fakat bu çalışmadaki pozitif olguların çoğunun skuamöz hücreli karsinom patolojisine sahip olmasının dikkate alınması gereken bir nokta olduğu belirtilmiştir (skuamoz hücreli olanlarda %25 iken adenokarsinomlularda %12) (Yılmaz ve ark., 2015).

Topuz ve ark'nın Malign Melanomalı olgularda yaptıkları çalışmada BCL-2

pozitifliğinin kemoterapiye dirençle ve aynı zamanda kötü prognozla ilişkili olduğu bulunmuştur. Raybaud ve ark.'nın kemoterapi ve radyoterapi alan baş boyun kanserli olgularda tedaviye yanıt değerlendirmesinin yapıldığı çalışmada BCL-2'nin pozitif olduğu olguları tedaviye daha dirençli bulmuşlardır. Orsolya Csuka ve ark.'nın yaptıkları baş-boyun kanserli olgularda yapılan p53, BAX ve BCL-2 çalışmasında, BCL-2 pozitifliğinin tedaviye direnci artırdıkları ve kötü prognoza yol açtıkları bulunmuştur (Topuz ve ark., 2014).

Yapılan çalışmalarda BCL-2 geninin regülasyonu, daha çok hematopoietik soydan hücrelerde araştırıldığı görülmüştür (Miyashita *et al.* 1994; Chen and Boxer 1995; Wilson *et al.* 1996; Catz and Johnson 2001; Wu *et al.* 2001). Bu çalışmalar ile, spesifik BCL-2 gen transkripsiyonuna aracılık eden iki promoter tanımlanmıştır (Young and Korsmeyer 1993). TATA'sız ve GC bakımından zengin P1 promoterinin, açık okuma çerçevesinin 1386-1423 bp yukarısında belirlenen bir transkripsiyonel başlangıç alanı ile baskın olduğu düşünülmektedir (Seto *et al.* 1988). P2 promoteri, P1'in 1.3 kilobaz (kb) downstreaminde bulunur, hem CCAAT hem de TATA dizilerini ve -31 ve -58 pozisyonlarında küçük başlangıç bölgelerini içerir (Seto *et al.* 1988). Bir p53'e bağlı negatif düzenleyici elemanın (NRE), P2 promoter içindeki 195 bp bölgesi aracılığıyla akciğer kanseri hücrelerindeki ekspresyonunu baskıladığına inanılmaktadır (Miyashita *et al.* 1994). Bu bölgede hiçbir p53-bağlama bölgesi bulunmamakla birlikte, hematopoietik hücrelerde yapılan çalışmalar, p53'ün TATA elementinde (Wu *et al.* 2001) etkileşim yoluyla veya CCAAT-box aktivatörü NF-Y ile ilişkili olarak etkisini gösterebileceğini belirtmiştir (Imbriano *et al.* 2005).

Anti-apoptotik proto-onkogen BCL-2'nin ekspresyonu pro-apoptotik p53'ten olumsuz olarak etkilenir. Diğer bir çalışmada ise BCL-2 ifadesinin p53 ile regülasyonunun anlaşılması için, BCL-2 promoter bölgelerini bireysel olarak ve tam uzunluktaki promotör bölge incelenmiştir. P1 promoteri en yüksek p53-bağımsız aktivitesini sergilediği halde, P2 promoter aktivitesi p53-yeterli kanser hücre dizilerinde bastırılmıştır. Kromatin immünopresipitasyon analizleri, p53'ün CCAAT- ve TATA elemanlarını ihtiva eden P2'nin 140 bp'lik bir sekansı içinde etkileştiğini doğrulamıştır.

Bununla birlikte, bir yapıda P1 ve P2 bağlandığında, P2 p53'ten bağımsız olarak P1 aktivitesini bastırdığı görülmüştür. P1 ve P2 arasında bir p53'e bağlı aktiviteye sahip bir potansiyel yeni promoter tanımlanmış ve M olarak adlandırılmıştır. P53-yeterli ve p53-eksik hücrelerdeki M promoter aktivitesinin analizleri, bu 530 bp uzunluğunda M dizisinin, P1 ya da P2 promotör dizilerinden bağımsız olarak bildirici genin ifadesini desteklediğini ortaya çıkarmıştır. Toplu olarak, bu veriler, P1 promoterinin, BCL-2 geninin transkripsiyonu için ana itici güç olduğunu ve P1 aktivitesinin, p53'e bağımlı ve bağımsız bir şekilde M ve P2 tarafından modüle edildiğini göstermektedir. Bu bulgular, BCL-2 gen ekspresyonunu inhibe etmeye ve hücre ölümünü indüklemeye yönelik olan terapiler için önemli etkilere sahip olabilir.

Çoğunlukla hematopoietik hücre dizilerinde yapılan ve P1 veya P2 promotörünün kullanıldığı çalışmalar, farklı pozitif ve negatif düzenleyici elemanlarda etkileşim yoluyla transkripsiyonu etkileyen birçok transkripsiyon faktörünü tanımlamıştır (Lang *et al.* 2005).

B-hücreli lenfoma-2 (BCL-2) geninin promotör bölgesi guanin ve sitozin açısından zengindir. Hücre sağkalımı için düşük seviyelerde BCL-2 ifadesi gereklidir; bununla birlikte, BCL-2 geninin upregülasyonu birçok ortak kanserin oluşumuna yol açabilir ve geleneksel kanser tedavilerine dirençte rol oynadığı bildirilmiştir. BCL-2 P1 promotörünün yukarıdaki 19-58 baz çifti arasındaki bir 39 baz çift bölgesi, BCL-2 transkripsiyonunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Dai ve ark., BCL-2 ,39-mer purin açısından zengin iplikçiğin çoklu intramoleküler G-quadruplex yapıları katlandığını göstermek için NMR ve CD (Circular Dichroism) yöntemlerini kullanmıştır (Dai *et al.* 2006).

BCL-2 genini ve immünoglobulin lokusunu yan yana getiren bir t (14; 18) kromozomal translokasyonun neden olduğu indolent bir neoplazm olan foliküler lenfoma (FL), değişken bir klinik seyre sahiptir ve sıklıkla agresif transformasyona uğrar. BCL-2 geni, FL patogenezi için kritiktir. BCL2, apoptozu inhibe eden bir proteini kodlamaktadır.

IGH lokusu B hücrelerinde aktive olduğu için, translokasyonlu BCL-2 geni FL hücrelerinde aşırı eksprese edilir ve sağkalımlarını artırır.

Bazı mutant BCL-2 proteinleri, in vitro olarak gelişmiş antiapoptotik kapasite sergilemiştir. Buna göre BCL-2 mutasyonları antiapoptotik BCL-2 fonksiyonunu etkileyebilir, ve indüklenmiş sitidin deaminaz ekspresyonu ve lenfomaya bağlı artan transformasyon ve ölüm riski ile ilişkilidir (Blood 2015).

BCL-2 proto-onkogeni sıklıkla insan kanserlerinde ifade edilir ve BCL-2 hem transkripsiyonel hem de transkripsiyon sonrası düzenlenir (Bedi *et al.* 1995; Harigai *et al.* 1996). İlk kez sıçan BCL-2 promotörünü klonladık ve karakterize ettik ve insan muadili BCL-2 (Seto *et al.* 1988; Harigai *et al.* 1996) gibi benzer bir genomik organizasyonu paylaştık. İki tür arasında %85 özdeşlik. Böylece, sıçan BCL-2 geni doğrudan bir b-katenin / Tcf hedefi olarak görünmemektedir. Çeşitli transkripsiyon faktörleri BCL-2'nin düzenleyicileri olarak gösterilmiştir (Wilson *et al.* 1996; Salomoni *et al.* 1997; Smith *et al.* 1998; Mayo *et al.* 1999; Pugazhenti). İnsan BCL-2, özgün bir E2F yanıt elementi içerir (Gomez-Manzano *et al.* 2001) ve cDNA mikrodizi analizi ile E2F1 hedef gen olarak tanımlanmıştır (Muller *et al.* 2001). Burada ilk kez, E2F1'in aynı zamanda protein / DNA dizilerindeki güçlü sinyaller ve E2F1 bölgelerinin silinmesi üzerine promoter aktivitesinin kaybı ile sıçan Bcl-2 genini doğrudan düzenlediğini bildirmekteyiz. Bununla birlikte, özellikle, PhIP-indüklü kolon tümörlerinden gelen b-katenin onkojenik mutantları, BCL-2 promoter aktivitesini ve BCL-2 protein ekspresyonunu kuvvetle aktive ederek, artan b-katenin ve BCL-2 arasındaki bir bağı desteklemektedir.

BCL-2 ailesi, anti-apoptotik protein BCL-2 gibi memeli hücrelerinde apoptosisin korunmuş regülatörleri olan bir protein paneli içerir. Apoptoza yatkınlığı değiştirmedeki önemli rolüne göre, BCL-2 ekspresyon modülasyonunun mekanizmasının deşifre edilmesi, kanser için terapötik stratejilerin tanımlanmasında çok önemli olabilir. M2-A ve R16 dahil olmak üzere naftalimid bazlı DNA aralayıcıları ile tedavi, genellikle BCL-2 hücre içi miktarlarında bir azalmaya yol açar. Bu kemoterapötiklere olan ilgiye,

antikanser özelliklerinin temel anlayışındaki ilerlemeler eşlik ederken, BCL-2 ekspresyonundaki değişikliklerin altında yatan moleküler mekanizma zayıf şekilde anlaşılmaya devam etmektedir. Burada, p53'ün yeni bir naftalimid bazlı DNA interkalasyon maddesi olan B1 tarafından indüklenen BCL-2 down-regülasyonuna katkıda bulunduğunu bildiriyoruz. Gerçekten de, B1 ile indüklenen apoptoz sırasında gözlemlenen BCL-2 protein seviyelerindeki azalma, BCL-2 transkripsiyonunun ve promoter aktivitesinin inhibisyonunun bir sonucu olarak mRNA seviyelerindeki azalmayla koreledir. Bu bağlamda, BCL-2 transkripsiyonel aşağı regülasyonunda p53 katkısını değerlendirdik. MCF7 hücrelerinde P2 promoter TATA kutusuna, promatin immünopresipitasyonu ile p53 bağlanmasında önemli bir artış olduğunu bulduk. Bu veriler, MCF-7 hücrelerinde B1 ile indüklenen kaspazdan bağımsız apoptozun, p53'ün aktivasyonu ve BCL-2'nin aşağı regülasyonu ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir. Çalışmamız, naftalimid bazlı DNA interkalatör tedavisi üzerine transkripsiyonel düzeyde p53 ve BCL-2 arasındaki bağları güçlendirmektedir.

BCL-2 proteini, BCL-2 ailesinin oldukça korunmuş bir üyesidir ve önemli bir apoptoz düzenleyicisidir (Borner 2003). BCL-2'nin apoptosisi nasıl engellediğine dair ortak açıklama, mitokondriyal membran bütünlüğünün korunmasına ve birkaç apoptojenik molekülün mitokondriden salınımının önlenmesine odaklanmıştır (Borner 2003). Bu, kaspazların aktivasyonu için gereklidir ve genellikle apoptozu indüklemek için yeterli kabul edilir (Bao and Shi 2007). Birçok hücrede apoptosise kaspaz aktivasyonu aracılık eder (Earnshaw *et al.* 1999). Cyt c nin sitozole salınması üzerine, kaspaz-9'u içeren, en önemlisi kaspaz-3'ü aktive edecek olan bir kaspaz-9 içeren bir protein kompleksinin apoptozomun, oluşumunu indükler (Earnshaw *et al.* 1999). Apoptoz, zar bağlı ölüm reseptörlerini işaret eden kaspaz-8 ile de indüklenebilir (Bodmer *et al.* 2000). Kaspaz-3 ile parçalanmış proteinler arasında, PARP, DNA onarımındaki rolü ve kaspaz aktivitesi için bir belirteç olarak önemlidir (Decker *et al.* 2000). BCL-2 ekspresyonu hem transkripsiyon hem de transkripsiyon sonrası seviyelerde modüle edilebilir. İki promoter, P1 ve P2, BCL-2 gen transkripsiyonunu kontrol eder (Seto *et al.* 1988). P1 majör transkripsiyonel başlangıç bölgesi (TSS), BCL-2 translasyonel başlangıç sahasının 715 bp yukarısında yer alırken, 3p promotörünün (P2) başlangıç bölgeleri, P1

promotörünün 1.3kb akış yönünde yer almaktadır. Sadece P2 promoteri TATA ve CAAT kutularına sahiptir. Çeşitli transkripsiyon faktörlerinin de dahil olmak üzere BCL-2 transkripsiyonunun pozitif regülasyonuna dahil olduğu bilinmektedir. cAMP duyarlı element bağlayıcı protein (CREBP) (Wilson *et al.* 1996) ve NF-KB (Heckman *et al.* 2002). Bu pozitif transkripsiyon düzenleyicilerin yanı sıra, pre-B hücrelerinde (Chen and Boxer 1995) ve p53 bağlanma bölgelerinde P1 bağlanma alanları dahil olmak üzere bir dizi negatif düzenleyici bölge tarif edilmiştir. Gerçekten de, TATA dizisini ihtiva eden bir 195 bp bölgesinin, PNRE (p53 negatif tepki elementi) aracılığıyla p53'e bağlı bastırmaya aracılık edebileceği gösterilmiştir (Miyashita *et al.* 1994a; Wu *et al.* 2001). Ek olarak, P1 ve P2 arasında bulunan BCL-2 promoter bölgesi, aynı zamanda p53 ile de bastırılmış bir promoter aktivitesi gösterir (Bredow *et al.* 2007).

Bredow ve ark., burada p53'ün yeni bir naftalimid bazlı DNA interkalasyon maddesi olan B1 tarafından indüklenen BCL-2 düşüşünün altında yatan moleküler mekanizmaya odaklanmışlardır. Bu düşüşün, apoptotik protein p53'ü gerektiren bir transkripsiyon seviyesini içerdiğini bildirmişlerdir. P53, P2 promoteri TATA kutusuna bağlanarak BCL-2 aşağı regülasyonuna aracılık eder. B1'in, MCF-7 hücrelerinde, P2 promoteri TATA kutusuna p53 bağlanması yoluyla BCL-2 ekspresyonunun modülasyonunu kapsayabilecek kaspazdan bağımsız bir mekanizma ile apoptosisi indüklediğini ileri sürmüşlerdir.

Ayrıca B1'in promoter aktivitesini azaltarak transkripsiyonel seviyede BCL-2 ekspresyonu üzerinde hareket ettiğini bulmuşlardır. Böylece, B1 ile indüklenen BCL-2 down-regülasyonu muhtemelen iki fenomenin bir kombinasyonu, yani protein yıkımı ve mRNA regülasyonu yoluyla gerçekleşir. BCL-2 promotörü, çeşitli transkripsiyon faktörleri için bağlanma bölgeleri içerir ve kompleks bir protein ağı tarafından düzenlenir. Her bir tedavinin, BCL-2 transkripsiyonunu bozabilecek spesifik bir protein bağlantısı içerebileceği ihtimali vardır.

Bredow ve ark., çalışma dahilindeki ChIP deneyleri ile B1'in, TATA kutusunda bulunan bir bölgede BCL-2 promoteri ile p53 etkileşimini arttırdığını gösteren p53 rolünü doğruladığı belirtilmiştir. BCL-2 promotörünün farklı transkripsiyon faktörleri için birçok bağlanma bölgesi içerdiği için, B1-indüklü BCL-2 azalmasında çeşitli regülasyon proteinlerinin rol oynayabileceğini varsayılabilir. Örneğin, transkripsiyon faktörü NF- κ B'nin, 5-FU ve Karboplatin gibi antikanser ilaçlarla tedavi sırasında BCL-2 gen ekspresyonunun aşağı regülasyonunda rol oynadığı da bildirilmiştir (Singh and Bhat 2004). Bu tür tedavilerle inhibisyonu, BCL-2 promotörünün aşağı regülasyonu ile sonuçlanır. Bu nedenle, p53'ten başka transkripsiyon faktörlerinin de BCL-2 down regülasyonunda yer alması olasılığını dışlayamadıklarını belirtmişlerdir.

Bredow ve ark., bu çalışma ile, p53'ün B1 ile indüklenen apoptozda önemli rolünü ve p53 statüsüne ve BCL-2 tümör profili ekspresyonuna göre tedaviye adapte etme gibi naftalimid bazlı DNA aralayıcılarının verimliliğinin geliştirilmesine yönelik olasılıkları ortaya koyulmuştur. Apoptoz ve ilaç etkinliği arasındaki güçlü ilişki göz önüne alındığında, p53 aktivitesinin takviye edilmesi ve / veya BCL-2 ekspresyonunun ortadan kaldırılması, naftalimid bazlı DNA aralayıcıların uyardığı apoptozu teşvik etmek ve bu tür bir tedaviye hücre duyarlılığını arttırmak için cazip yollar oluşturabileceği düşünülmüştür.

BCL-2 geni kanser mekanizmasında apoptozu engelleyen en önemli gendir. Dolayısıyla de bu güne kadar bu genle ilgili birçok çalışma yapılmıştır ve yapılmaya devam edilmektedir. Ancak bir genin mekanizmasını iyice anlayabilmek için öncelikle o genin karakterizasyonunu ve moleküler analizi yapmak gerekir.

Bu çalışmada BCL-2 geninin promotör bölgesi biyoinformatik çalışmalarla karakterize edildi. Bu amaçla Genomatix, Ensemble, NCBI, JASPAR, rVISTA gibi çeşitli biyoinformatik veritabanları kullanıldı. Ensemble veritabanı ile elde edilen verilere göre BCL-2 geninin 4 tane varyantı olduğu tespit edildi. Bunlardan 3 tanesinin protein kodlarken 1 tanesinin protein kodlamadığı belirlendi. Her bir varyantın aminoasit sayısı ve baz çifti sayısı birbirinden farklıdır. Çalışmamızda BCL2-201 transkripti temel

alındı. Bu varyantın 7461 bp uzunluğunda olup ve 239 aminoasit içerdiği bilinmektedir. Çalışmamızda BCL-2 geni biyoinformatik çalışmalarla haritalanmış ve analiz edilmiştir. BCL-2 gen haritası incelendiğinde 2 tane ekzon 1 tane intron içerdiği görülmektedir. Ensemble ve NCBI veritabanlarından elde edilen verilere göre BCL-2 geninin birçok hastalıkla ilişkisi olduğu görülmektedir. Hastalık türlerine göre genin varyant sayısı değişiklik göstermektedir. Yapılan çalışmalarda çalışmanın etkinliğini ve güvenilirliğini artırmak maksadıyla BCL-2 genom yapısıyla en fazla benzerlik gösteren BAX genom yapısının ilişkisi dikkate alınmaktadır. Dolayısıyla çalışmamızda fonksiyonel bölgeler belirlenirken bu durum dikkate alınarak r-VISTA programı kullanılmış ve iki tür arasında homolojinin en fazla olduğu bölge belirlenmiştir. İnsan BCL-2 ve insan BAX gen promotör bölgeleri kıyaslandığında en yüksek homolojinin 625 bp ve 1200 bp arasındaki bölgede olduğu tespit edilmiştir. İnsan BCL-2 ve BAX promotör bölgesinin sözü edilen kısımlardaki homolojinin bu kadar yüksek seviyede olması bu bölgelerin transkripsiyon faktör bağlanma bölgeleri için çekirdek bölge olma ihtimalini artırmaktadır.

Bir genin ifade edilmesini sağlayan bölge promotör bölgesi olduğu için bu bölgeyi analiz etmek maksadıyla çeşitli yaklaşımlarla bazı çalışmalar yapılmıştır. Örneğin, Bredow *et al.* (2007) p53 tarafından BCL-2 ekspresyonu regülasyonunun anlaşılması için, BCL-2 promotör bölgelerini teker teker ve tam boy promotör durumunda çalışmışlardır. Bizim çalışmamızda promotör bölgesi üzerinde transkripsiyonel aktivitede önemli olabilecek fonksiyonel parçalar belirlenmiştir.

Hastalıkların moleküler mekanizmasını anlayabilmek maksadıyla genlerin transkripsiyonel regülasyonu ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Bu bağlamda yapılan çalışmalar özellikle bir genin ifade edilmesinde işlevsel rolü olan bölgeler ve proteinler üzerinde yoğunlaşmaktadır. Örneğin; Manion *et al.* (2003) Apoptotik hücre ölümünün esas regülatörleri olarak anti-tümör etkileri için BCL-2 fonksiyonlarının manipülasyonunun mantığı kanser terapötikleri için belki de en güçlü moleküler hedefler olduğunu ileri sürmüşlerdir. Dahası insan kanserlerinin tüm tiplerinde gerçek olarak anti-apoptotik proteinlerin seviyesinin yükseldiğinin gösterildiğini

belirtmişlerdir. BCL-2 spesifik antisens oligonükleotidlerinin pre-klinik modellerde ve şu anki çeşitli faz III deneylerinde yaygın anti-kanser aktiviteleri gösterildiğini bildirmişlerdir. Rasyonel ilaç dizaynında bu proteinlerin fonksiyonunun manipulasyonu, biyokimyasal veya moleküler fonksiyonlarının iyice anlaşılmasından yoksun olduğu için engellendiğini düşünmüşlerdir. Daha önceki gayretlerin BCL-2 homoloji ailesi içerisindeki protein-protein interaksiyonunun bozulması üzerine odaklandığını belirtmişlerdir.

Biz de çalışmamızda BCL-2 geninin transkripsiyonel mekanizmasını aydınlatmayı amaçladık. Öncelikle Miyashita *et al.* yaptıkları çalışmalardan TATA bağlanma bölgesi, muhtemel p53 bağlanma bölgeleri ve Ensemble veritabanından elde edilen verilere göre genin start kodonu, transkripsiyon başlama sitesini tespit etmişlerdi (Miyashita and Reed 1995). Çalışmada daha önceden tespiti yapılan bölgelerin transkripsiyon bağlanma proteinleri ve p53 bağlanma bölgesi bakımından karakterizasyonu yapılmıştır. Ensemble veritabanındaki verilerle genin 5000 bp uzunluğundaki promotör bölgesinin dizisi belirlendi. Daha sonra çalışmamızda bu parçanın işlevsel bölgelere sahip olduğu düşünülen 2444 bp'lik parçası ele alındı. Genomatix programı kullanılarak seçilen bu promotör parçası üzerinde özellikle insan BCL-2 ve BAX arasında en fazla homolojinin bulunduğu kısımdaki muhtemel yüksek etkiye sahip olduğu düşünülen transkripsiyon faktörü motifleri ve bağlanma yerleri belirlendi. Bu program aynı zamanda bize muhtemel transkripsiyon bağlanma bölgelerinin motiflerini de vermektedir. Motifler nükleotitlerin bulunma yüzdelerine göre çeşitli renklerle ifade edilmiştir (Çizelge 4.4). Motifleri yorumladığımız zaman büyük harfle ya da kırmızı renkle gösterilen diziler bulunma ihtimali yüzde olarak en fazla olan dizilerdir. Homolojinin yüksek olduğu bu kısımda 10 farklı transkripsiyon faktörlerinin bulunduğu belirlendi. Bu bölgelerin genin transkripsiyonunu birinci derecede etkileyebilecek motifler olduğu düşünülmektedir. Bu bilgiler ışığında kalıp olarak alınan 2444 bp'lik promotör parçası işlevsel özelliklerine göre üç parçaya ayrıldı. Bölgelerin uzunlukları 2372 bp, 610 bp ve 290 bp olarak belirlendi. Bu bölgeler PCR'da çoğaltıldı. Çoğaltılan bölgeler pGEM-T Easy vektörüne tek tek klonlandı ve plazmitleri izole edildi. Aynı şekilde Pgl-3-lusiferaz vektörü de *E.coli* bakterisinin JM109 suşuna transforme edilerek çoğaltıldı. Daha sonra plazmit

izolasyonu yapıldı ve uygun restriksiyon enzimleriyle kesilerek elde ettiğimiz bölgele in kendisine ligasyonu yapılacak şekilde jelden ekstrakte edildi ve +4 °C de bekletildi. Yaptığımız çalışmanın devamı olarak BCL-2 gen promotör bölgesi üzerinde belirlediğimiz fonksiyonel bölgeler tek tek lusiferaz vektörüne klonlanıp aktivite ölçümü yapılacaktır. Böylece genin transkripsiyonunda etki mekanizması yüksek olan yerlerin belirlenmiş olmasıyla genin kontrolü sağlanabilir. Transkripsiyonel aktivitede en önemli olan bölge üzerindeki transkripsiyon faktörlerinde çeşitli site-spesific mutasyonlar yapıp genin aktivitesindeki değişim incelenebilir. Genin aktivitesini artırmak maksadıyla bahsi geçen transkripsiyon faktörleri üzerinde çeşitli kemoterapötik ilaçların, kimyasalların, inhibitörlerin ve bitki ekstraktlarının da etkisi araştırılabilir. Çalışmamız yukarıda bahsi geçen çalışmalara temel teşkil etmesi bakımından önemlidir ve değer arz etmektedir.

KAYNAKÇA

- Adams J. M., Cory S., 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, 281: 1322-1326
- Adams J. M., Cory S., 2018. The BCL-2 arbiters of apoptosis and their growing role as cancer targets. *Cell Death Differ.*, 25(1):27-36.
- Akyol Z., 2014. Denspm ile Paklitaksel'in uyardığı apoptotik hücre ölümünde Poliamin metabolizması rolünün MCF-7 WT ve BCL-2+ hücrelerinde gösterilmesi. Yüksek lisans tezi, Kültür Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Al-Fageeh M., Li Q., Dashwood W. M., Myzak M. C., Dashwood R.H., 2004. Phosphorylation and ubiquitination of onco-genic mutants of b catenin containing substitutions at Asp32. *Oncogene* 23: 4839–4846.
- Andrew T., 2008. Apoptosis and autophagy: regulatory connections between two supposedly different processes. *Apoptosis* 13, 1–9.
- Ashkenazi A., Dixit V. M., 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281:1305-8.
- Ashkenazi A., Pai R. C., Fong S., Leung S., Lawrence D. A., Marsters S. A., Blackie C., Chang L., McMurtrey A. E., Hebert A., DeForge L., Koumenis I. L., Lewis D., Harris L., Bussiere J., Koeppen H., Shahrokh Z., Schwall R. H., 1999. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest* 104:155–162.
- Ashkenazi A., 2008. Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. *Cytokine & Growth factor reviews*, 325-331.
- Bairey O., Zimra Y., Shaklai M., Okon E., Rabizadeh E., 1999. Bcl-2, Bcl-X, Bax, and Bak expres-sion in short- and long-lived patients with diffuse large B-cell lymphomas. *Clin Cancer Res*, 5:2860-6.
- Bao Q., Shi, Y., 2007. Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Differ.* 14, 56–65.
- Baran A., 1999. Tıbbi Biyoloji (Ders Kitabı). Bursa: Güneş Tıp Kitap Evi, 169- 74.
- Baretton G. B., Diebold J., Christoforis G., Vogt M., Müller C., 1996. Apoptosis and immunohistochemical bcl-2 expression in colorectal adenomas and carcinomas. Aspects of carcinogenesis and prognostic significance. *Cancer* 77: 255-264.
- Barr P. J., Tomei. L. D., 1994. *Apoptosis and its role in human disease*. *Biotechnology (N Y)*, 12(5): p. 487-93.
- Basu A., Haldar S., 1998. The relationship between Bcl2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death. *Molecular Human Reproduction* vol.4 no.12 pp.1099-1109.
- Bax-induced release of cytochrome c. *Nature*, 391:496-9
- Be' langer S., Co'te' M., Lane D., L'Espe'rance S., Rancourt C., Piche' A., 2005. Bcl-2 decreases cell proliferation and promotes accumulation of cells in S phase without affecting the rate of apoptosis in human ovarian carcinoma cells. *Gynecologic Oncology* 97 :796 – 806.
- Bedi A., Pasricha P. J., Akhtar A. J., Barber J. P., Bedi G. C., Giardiello F. M., 1995. Inhibition of apoptosis during development of colorectal cancer. *Cancer Res* 55: 1811–1816.

- Bodmer J. L., Holler N., Reynard S., Vinciguerra P., Schneider P., Juo P., Blenis J., Tschopp J., 2000. TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. *Nat. Cell Biol.* 2, 241–243.
- Borner C., 2003. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol. Immunol.* 39, 615–647.
- Bourgarel-Rey V., Savry A., Hua G., Carre' M., Bressin C., Chacon C., Imbert J., Braguer D., Barra Y., 2009. Transcriptional down-regulation of Bcl-2 by vinorelbine: Identification of a novel binding site of p53 on Bcl-2 promoter. *Elsevier, Biochemical Pharmacology* 78:1148–1156.
- Bratton D. L., Fadok V. A., Richter D. A., Kailey J. M., Guthrie L. A., Henson P. M., 1997. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J Biol Chem* 272:26159–65.
- Bredow S., E. Juri D., Cardon K., Tesfaigzi Y., 2007. Identification of a novel Bcl-2 promoter region that counteracts in a p53-dependent manner the inhibitory P2 region. *Elsevier, ScienceDirect, Gene* 404:110–116.
- Brimmell M., Mendiola R., Mangion J., Packham G., 1998. BAX frameshift mutations in cell lines derived from human haemopoietic malignancies are associated with resistance to apoptosis and microsatellite instability. *Oncogene* 16:1803–1812.
- Brunelle J. K., Letai A., 2009. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *J Cell Sci.*, 122(pt 4):437–441.
- Budd R. C., 2002. Death receptors couple to both cell proliferation and apoptosis. *J Clin Invest* 109:437–42.
- Budhidarmo R., Day C. L., 2015. IAPs: Modular regulators of cell signalling. *Semin Cell Dev Biol.*, 80–90.
- Budihardjo I., Oliver H. L.M., 1999. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 15: 269–90.
- Cain K., Bratton S. B., Langlais C., Walker G., Brown D. G., Sun X. M., and Cohen G., 2000. MAPaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes. *J Biol Chem* 275:6067–6070.
- Campos L., Rouault J. P., Sabido O., Oriol P., Roubi N., Vasselon C., Archimbaud E., Magaud J. P., Guyotat D., 1993. High expression of bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. *Blood* 81:3091–3096.
- Catz S. D., Johnson J. L., 2001. Transcriptional regulation of *bcl-2* by nuclear factor kappa B and its significance in prostate cancer. *Oncogene*.20:7342–51.
- Chao D. T., Korsmeyer S. J., 1998. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annual Review of Immunology*, 16: 395–419.
- Charlotte F., L'Hermine A., Martin N., Geleyn Y., Nollet M., Gaulard P., Zafrani E. S., 1994. Immunohistochemical detection of bcl-2 protein in normal and pathological human liver. *Am J Pathol*, 144:460.
- Chau B. N., Cheng E. H., Kerr D.A., Hardwick J. M., 2000. Aven, a novel inhibitor of caspase activation, binds BclxL and Apaf-1. *Mol Cell* 6:31–40.
- Chen H. M., Boxer L. M., 1995. Pi 1 binding sites are negative regulators of *bcl-2* expression in pre-B cells. *Mol Cell Biol.* ,15:3840–7.

- Chen-Levy Z., Nourse J., Cleary M. L., 1989. The bcl-2 candidate proto-oncogene product is a 24-kilodalton integral-membrane protein highly expressed in lymphoid cell lines and lymphomas carrying the t(14;18) translocation. *Mol Cell Biol.*, 9(2):701-10.
- Chicheportiche Y., Bourdon P. R., Xu H., Hsu Y. M., Scott H., Hession C., Garcia I., Browning J. L., 1997. TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J Biol Chem* 272:32401–10.
- Chu W. S., Aguilera N. S., Wei M. Q., Abbondanzo S. L., 1999. Antiapoptotic marker Bcl-X(L), expression on Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease using a novel monoclonal marker, YTH-2H12. *Hum Pathol*, 30:1065-70.
- Conroy L. A., Alexander D. R., 1996. The role of intracellular signalling pathways regulating thymocyte and leukemic T cell apoptosis. *Leukemia*, 10(9):1422-35.
- Cross T. G., Scheel-Toellner D., Heriquez N. V., Deacon E., Salmon M., Lord J. M., 2000. Serine/Threonine protein kinases and apoptosis. *Exp Cell Res* 256:34-41.
- Cummings M. C., Winterford C. M., Walker N. I., 1997. Apoptosis. *Am J Surg Pathol*, 21(1):88-101.
- Dai J., Dexheimer T. S., Chen D., Carver M., Ambrus A., 2006. An intramolecular G-quadruplex structure with mixed parallel/antiparallel G-strands formed in the human BCL-2 promoter region in solution. *J Am Chem Soc* 128: 1096-1098.
- Debnath J., Baehrecke E. H., Kroemer G., 2005. Does autophagy contribute to cell death? *Autophagy* 1:66- 74.
- Decker P., Isenberg D., Muller S., 2000. Inhibition of caspase-3-mediated poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) apoptotic cleavage by human PARP autoantibodies and effect on cells undergoing apoptosis. *J. Biol. Chem.* 275, 9043–9046.
- Deininger M. H., Weller M., Streffer J., Meyermann R., 1999. Antiapoptotic Bcl-2 family protein expression increases with progression of oligodendroglioma. *Cancer*,86:1832-9.
- Delgado M. B., Anderson J. R., Whittle I. R., Wharton S. B., 1999. Expression of Bcl-2 and Bax in oligodendrogliomas and their relationship to apoptosis. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 25:400-7.
- Deng Yibin, Lin Y., Wu X., 2002. TRAIL-induced apoptosis requires Bax-dependent mitochondrial release of Smac/DIABLO. *Genes and Development*.
- Dewet J. R, Wood K. V., Helinski D. R., 1985. Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in escherichia-coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82: 7870-7873.
- Dexheimer T. S., Sun D., Hurley L. H., 2006. Deconvoluting the structural and drug-recognition complexity of the G-quadruplex-forming region upstream of the bcl-2 P1 promoter. *J Am Chem Soc* 128: 5404-5415.
- Droin N. M., Green D. R., 2004. Role of Bcl-2 family members in immunity and disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 1644:179– 188.
- Du C., Fang M., Li Y., Li L., Wang X., 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102:33–42.
- Duvall E., Wyllie A. H., 2006. Death and the cell. *Immunol Today*, 7: 115-119
- Earnshaw W. C., 1995. Nuclear changes in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol*, 7: 337-43.

- Earnshaw W. C., Martins, L. M., Kaufmann, S. H., 1999. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 383–424.
- Eichhorst S. T., Krammer P. H., 2001. Derangement of apoptosis in cancer. *The Lancet*, 358:345-6.
- Ellison D. W., Steart P. V., Gatter K. C., Weller R. O., 1995. Apoptosis in cerebral astrocytic tumours and its relationship to expression of the bcl-2 and p53 proteins. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 21:352-61.
- Elmore S., 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 35(4):495-516.
- Eroz R., Akbulut M., Yılmaz S., Ayvaz A., Sadykhov S., 2010. Age dependent DNase activity in larvae, pupae and adult stages of Mediterranean Flour Moth *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) *Turk. entomol. derg./ Turkish Journal of Entomology*, 34 (1), 3-12.
- Esposti M. D., 2002. The roles of Bid. *Apoptosis* 7:433–40.
- Ethell D. W., Buhler L. A., 2003. Fas ligand-mediated apoptosis in degenerative disorders of the brain. *J Clin Immunol* 23:439– 46.
- Evan G. I., Vousden K. H., 2001. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411:342–348.
- Fadeel B., Orrenius S., Zhivotovsky B., 1999. Apoptosis in human disease: a new skin for the old ceremony? *Biochem Biophys Res Commun* 266:699–717.
- Falschlehner C., Emmerich C. H., Gerlach B., Walczak H., 2007. TRAIL signalling: decisions between life and death. *Int J Biochem Cell Biol.*, 39 (7-8):1462-75.
- Fan F., Wood K. V., 2007. Bioluminescent assays for high-throughput screening. *Assay and Drug Development Technologies*, 5: 127-136.
- Fan Z., Beresford P. J., Oh D. Y., Zhang D., Lieberman J., 2003. Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell* 112:659–72.
- Fanidi A., Harrington E. A., Evan G. I., 1992. Cooperative interaction between c-myc and bcl-2 proto-oncogene. *Nature* 359:554- 556.
- Fisher G. H., Rosenberg F. J., Straus S. E., Dale J. K., Middleton L. A., Lin A. Y., Strober W., Lenardo M. J., Puck J. M., 1995. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* 81:935–946.
- Formigli L., Papucci L., Tani A., Schiavone N., Tempestini A., Orlandini G. E., Capaccioli S., Orlandini S. Z., 2000. Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncytic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J Cell Physiol* 182:41–9.
- Friess H., 1998. Moderate activation of the apoptosis inhibitor bcl-xL worsens the prognosis in pancreatic cancer. *Ann Surg*, 228:780-7.
- Fulda S., 2013. Regulation of apoptosis pathways in cancer stem cells. *Cancer Lett.*, 338(1):168-73.
- Gala J. L., Vermeylen C., Cornu G., Ferrant A., Michaux J. L., Philippe M., Martiat P., 1994. High expression of bcl-2 is the rule in acute lymphoblastic leukemia, except in Burkitt subtype at presentation, and is not correlated with the prognosis. *Ann Hematol*, 69:17-24.

- Gallo O., Bianchi S., 1995. Bcl-2 overexpression and smoking history in head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst* 87: 1024-1025.
- Ganea D., 1996. Apoptosis and the immune response (book review). *Bioscience*, 46: 705.
- Gascoyne R. D., 1997. Prognostic significance of Bcl-2 protein expression and Bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*, 90:244-51.
- Ghanem M. A., 2001. The prognostic significance of apoptosis-associated proteins BCL-2, BAX and BCL-X in clinical nephroblastoma. *Br J Cancer*, 85:1557-63.
- Gilchrist D. G., 1998. Programmed cell death in plant disease: the purpose and promise of cellular suicide. *Annual Review of Phytopathology*, 36: 393- 414.
- Glick S. H., Howell L. P., White R. W., 1996. Relationship of p53 and bcl-2 to prognosis in muscle-invasive transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol*, 155:1754-7.
- Gomez-Manzano C., Mitlianga P., Fueyo J., Lee H. Y., Hu M., Spurgers K. B., 2001. Transfer of E2F-1 to human glioma cells results in transcriptional up-regulation of Bcl-2. *Cancer Res* 61: 6693–6697.
- Gould S. J., Subramani S., 1988. Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology. *Analytical Biochemistry*, 175: 5-13.
- Greenhalgh D. G., 1998. The role of apoptosis in wound healing. *Int J Biochem Cell Biol* 30:1019–30.
- Gu J., Kawai H., Wiederschain D., Yuan Z. M., 2001. Mechanism of functional inactivation of a Li-Fraumeni syndrome p53 that has a mutation outside of the DNA-binding domain. *Cancer Res* 61:1741– 6.
- Hanada M., Delia D., Aiello A., Stadtmauer E., Reed J. C., 1993. Bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 82:1820-8.
- Hao X. P., Ilyas M., Talbot I. C., 1997. Expression of Bcl-2 and p53 in the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Pathobiology*, 65:140-5.
- Harigai M., Miyashita T., Hanada M., Reed J. C., 1996. A cis-acting element in the BCL-2 gene controls expression through translational mechanisms. *Oncogene* 12: 1369–1374.
- Harman D., 1992. Role of free radicals in aging and disease. *Ann N Y Acad Sci* 673:126–41.
- Hart S., 1994. The drama of cellular death. *Bioscience*, 44: 451-5.
- Heckman C., Mochon E., Arcinas M., Boxer L. M., 1997. The WT1 protein is a negative regulator of the normal bcl-2 allele in t(14;18) lymphomas. *J Biol Chem* 272: 19609-19614.
- Heckman C. A., Mehew J. W., Boxer L. M., 2002. NF-kappaB activates Bcl-2 expression in t(14;18) lymphoma cells. *Oncogene* 21, 3898–3908.
- Hetz C., Glimcher L., 2008. The daily job of night killers: alternative roles of the BCL-2 family in organelle physiology. *Trends Cell Biol*, 18: 38-44.
- Hill M. M., Adrain C., Duriez P. J., Creagh E. M., Martin S. J., 2004. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *Embo J* 23:2134–45.
- Hockenbery D., 1995. Defining apoptosis. *Am J Pathol*, 146(1):16-9.

- Hogarth L. A., Hall A. G., 1999. Increased BAX expression is associated with an increased risk of relapse in childhood acute lymphocytic leukemia. *Blood*, 2671-8.
- Horvitz H. R., 1999. Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res* 59:1701-1706.
- Hsu H., Xiong J., Goeddel D. V., 1995. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and Nf-kappa B activation. *Cell* 81:495-504.
- Imbriano C., Gurtner A., Cocchiarella F., Di Agostino S., Basile V., Gostissa M., Dobbelsstein M., Del Sal G., Piaggio G., Mantovani R., 2005. Direct p53 transcriptional repression: in vivo analysis of CCAAT-containing G2/M promoters. *Mol Cell Biol.*, 25:3737-51.
- Ingrassia L., Lefranc F., Kiss R., Mijatovic T., 2009. Naphthalimides and azonafides as promising anti-cancer agents. *Curr. Med. Chem.* 16, 1192-1213.
- Israels L. G., Israels E. D., 1999. Apoptosis. *The Oncologist*, 4: 332-9.
- Itoh N., Nagata S., 1993. A novel protein domain required for apoptosis: mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem* 268:10932-10937.
- Jang J. H., Surh Y. J., 2003. Potentiation of cellular antioxidant capacity by Bcl-2: implications for its antiapoptotic function. *Biochem Pharmacol*, 66: 1371-1379.
- Janicke R. U., Sprengart M. L., Wati M. R., Porter A. G., 1998. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J. Biol. Chem.* 273, 9357-9360.
- Jiang S. X., Sato Y., Kuwano S., Kameya T., 1995. Expression of bcl-2 oncogene protein is prevalent in small cell lung carcinoma. *J Pathol*, 177:135-8.
- Joaquin A. M., Gollapudi S., 2001. Functional decline in aging and disease: a role for apoptosis. *J Am Geriatr Soc* 49:1234-1240.
- Johnson D. E., 2000. Programmed cell death regulation: basic mechanisms and therapeutic opportunities. *Leukemia*, 14: 1340-44.
- Joza N., Susin S. A., Daugas E., Stanford W. L., Cho S. K., Li C. Y., Sasaki T., Elia A. J., Cheng H. Y., Ravagnan L., Ferri K. F., Zamzami N., Wakeham A., Hakem R., Yoshida H., Kong Y. Y., Mak T. W., Zuniga-Pflucker J. C., Kroemer G., Penninger J. M., 2001. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 410:549-554.
- Kale J., Osterlund E. J., Andrews D. W., 2018. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death Differ.*, 25(1):65-80.
- Kane A. B., 1995. Redefining cell death. *Am J Pathol*, 146(1):1-2.
- Katada N., 1997. Apoptosis is inhibited early in the dysplasia-carcinoma sequence of Barrett esophagus. *Arch Surg*, 132:728-33.
- Kataoka T., Schroter M., Hahne M., Schneider P., Irmeler M., Thome M., Froelich C. J., Tschopp J., 1998. FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation. *J Immunol* 161:3936-42.
- Kaufmann J. A., Bickford P.C., Taghialatela G., 2001. Oxidative-stress-dependent up-regulation of Bcl-2 expression in the central nervous system of aged Fisher-344 rats. *Journal of Neurochemistry*, 76: 1099-1108.
- Keane R. W., Kraydieh S., Lotocki G., Bethea J. R., Krajewski S., Reed J. C., Dietrich W. D., 2001. Apoptotic and anti-apoptotic mechanisms following spinal cord injury. *J Neuropathol Exp Neurol*, 60: 422-429.

- Kerr J. F., Winterford C. M., Harmon, B. V., 1994. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73:213–26.
- Kerr J. F., Wyllie A. H., Currie A. R., 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239–57.
- Kerr J. F. R., Harmon B. V., 1991. Definition and incidence of apoptosis: an historical perspective. In: Tomei LD, Cope FO, eds. *Apoptosis: the molecular basis of cell death*, Vol. 3. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 5–29.
- Khanna K. K., Jackson S. P., 2001. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* 27:247–254.
- Kim M. J., Jo D. G., Hong G. S., Kim B. J., Lai M., Cho D. H., 2002. Calpain-dependent cleavage of cain/cabin1 activates calcineurin to mediate calcium-triggered cell death. *Proc Natl Acad Sci*, 99: 9870–9875.
- Kim R., Osaki A., Toge T., 2001. A pitfall in the survival benefit of adjuvant chemotherapy for node- and hormone receptor-positive patients with breast cancer: the paradoxical role of Bcl-2 oncoprotein (review). *Int J Oncol.*, 19(5):1075–80.
- King K. L., Cidlowski J. A., 1998. Cell cycle regulation and apoptosis. *Annu Rev Physiol* 60:601–17.
- Kischkel F. C., Hellbardt S., Behrmann I., Germer M., Pawlita M., Krammer P. H., Peter M. E., 1995. Cytotoxicitydependent APO-1 (Fas/CD95)- associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J* 14:5579–88.
- Kitada S., 1998. Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with In vitro and In vivo chemoresponses. *Blood*, 91:3379–89.
- Kitagawa R., Kastan M. B., 2005. The ATM-dependent DNA damage signaling pathway. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* LXX 70:99–109.
- Koide N., Koike S., Adachi W., Amano J., Usuda N., Nagata T., 1997. Immunohistochemical expression of bcl-2 protein in squamous cell carcinoma and basaloid carcinoma of the esophagus. *Surg Today*, 27:685–91.
- Korkolopoulou P., 2002. Differential expression of bcl-2 family proteins in bladder carcinoma. Relationship with apoptotic rate and survival. *Eur Urol*, 41:274–83.
- Kornblau S. M., 1999. The prognostic impact of BCL2 protein expression in acute myelogenous leukemia varies with cytogenetics. *Clin Cancer Res*, 5:1758–66.
- Kothakota S., Azuma T., Reinhard C., Klippel A., Tang J., Chu K., McGarry T. J., Kirschner M. W., Kohts K., Kwiatkowski D. J., Williams L. T., 1997. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 278:294–8.
- Krajewska M., Moss S. F., Krajewski S., Song K., Holt P. R., Reed J. C., 1996. Elevated expression of Bcl-X and reduced Bak in primary colorectal adenocarcinomas. *Cancer Res*, 56:2422–7.
- Krajewski S., 1999. Prognostic significance of apoptosis regulators in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*, 6:29–40.
- Krajewski S., Krajewska M., Ehrmann J., Sikorska M., Lach B., Chatten J., Reed J. C., 1997. Immunohistochemical analysis of Bcl-2, Bcl-X, Mcl-1, and Bax in tumors of central and peripheral nervous system origin. *Am J Pathol*, 150:805–14.

- Kridel R., Sehn L. H., Gascoyne R. D., 2012. Pathogenesis of follicular lymphoma. *J Clin Invest.*, 122(10):3424-3431.
- Kumar S., 1995. ICE-like proteases in apoptosis. *Trend Biochem Sci* 20:198-202.
- Kumazaki T., Sasaki M., Nishiyama M., Teranishi Y., Sumida H., Eboshida A., Mitsui Y., 2003. Life span shortening of normal fibroblasts by overexpression of BCL-2: a result of potent increase in cell death. *Experimental Cell Research* 285:299–308.
- Kurz E. U., Lees-Miller S. P., 2004. DNA damage-induced activation of ATM and ATM-dependent signaling pathways. *DNA Repair (Amst)* 3:889–900.
- Kuwana T., Mackey M. R., Perkins G., Ellisman M. H., Latterich M., Schneider R., 2002. Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell*, 111: 331-342.
- Küçüköztürk Y., 2007. Maddeler Nasıl Işık Saçar?. Hacettepe Üniversitesi Projesi.
- Lalier L., Cartron P. F., Juin P., Nedelkina S., Manon S., Bechinger B., Vallette F. M., 2007. Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. *Apoptosis*, 12: 887–896.
- Lang G., Gombert W. M., Gould H. J., 2005. A transcriptional regulatory element in the coding sequence of the human *bcl-2* gene. *Immunology.*, 114:25–36.
- Laulier C., Lopez B. S., 2012. The secret life of Bcl-2: Apoptosis-independent inhibition of DNA repair by Bcl-2 family members. *Mutation Research*, 751: 247-257.
- Letai A. G., 2008. Diagnosing and exploiting cancer's to blocks in apoptosis. *Nat Rev Cancer*, 8:121-132.
- Levine A. J., 1997 p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88:323–331.
- Li C. J., Friedman D. J., Wang C., Metele V., Pardee A. B., 1995. Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein. *Science* 268:429–31.
- Li F., Ambrosini G., Chu E. Y., Plescia J., Tognin S., Marchisio P. C., Altieri D. C., 1998. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 396:580–584.
- Li F., 2005. Role of survivin and its splice variants in tumorigenesis. *Br J Cancer* 92:212–216.
- Li H., Zhu H., Xu C. J., Yuan J., 1998. Cleavage of BID by caspase-8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94:491–501.
- Li Q., Dashwood R. H., 2004. Activator protein-2a associates with adenomatous polyposis coli/b-catenin and inhibits b-catenin/T-cell factor transcriptional activity in colorectal cancer cells. *J Biol Chem* 269: 45669–45675.
- Li Q., Dashwood W. M., Zhong X., Al-Fageeh M., Dashwood R. H., 2004. Cloning of the rat b-catenin gene (*Ctnnb1*) promoter and its functional analysis compared with the *Catnb* and *CTNNB1* promoters. *Genomics* 83: 231–242.
- Lia W., Laskara A., Sultana N., Osmana E., Ghosha M., Lia Q., 2012. Cell death induced by 7-oxysterols via lysosomal and mitochondrial pathways is p53-dependent. *Free Radical Biology and Medicine* (in press).
- Liang X., Wu A. B., Xu Y. F., Xu K., Liu J. W., Qian X. H., 2011. B1, a novel naphthalimide-based DNA intercalator, induces cell cycle arrest and apoptosis in HeLa cells via p53 activation. *Invest. New Drugs* 29, 646–658.

- Lieberman J., Fan Z., 2003. Nuclear war: the granzim A-bomb. *Curr Opin Immunol* 15:553–9, 2.
- Liu F. T., Newland A. C., Jia L., 2003. Bax conformational change is a crucial step for PUMA-mediated apoptosis in human leukemia. *Biochem Biophys Res Commun* 310:956–62.
- Llambi F., Moldoveanu T., Tait S.W., 2011. A unified model of mammalian BCL-2 protein family interactions at the mitochondria. *Mol Cell.*, 44(4):517-531.
- Lowe S. W., Schmitt E. M., Smith S. W., Osborne B. A., Jacks T., 1993. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 362:847-849.
- Lu H. J., Yan J., Jin P. Y., Zheng G.H., Zhang H. L., Bai M., Wu D. M., 2018. Mechanism of MicroRNA-708 Targeting BAMBI in Cell Proliferation, Migration, and Apoptosis in Mice With Melanoma via the Wnt and TGF- β Signaling Pathways. *Technol Cancer Res. Treat.*,17:1533034618756784.
- Lund L. R., Romer J., Thomasset N., Solberg H., Pyke C., Bissell M. J., Dano K., Werb Z., 1996. Two distinct phases of apoptosis in mammary gland involution: proteinase-independent and - dependent pathways. *Development* 122:181–93.
- Lundberg A. S., Weinberg R. A., 1999. Control of the cell cycle and apoptosis. *Eur J Cancer*, 15: 531-539.
- Luo X., Budihardjo I., Zou H., Slaughter C., Wang X., 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, 94: 481–490.
- Mai H., May W. S., Gao F., Jin Z., Deng X., 2003. A functional role for nicotine in Bcl2 phosphorylation and suppression of apoptosis. *J Biol Chem.*, 278(3):1886-91.
- Majno G., Joris I., 1995. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*, 146(1):3-15.
- Mak T., 2003. The E. Donnall Thomas Lecture--apoptosis: "tis death that makes life live". *Biol Blood Marrow Transplant*, 9(8):483-8.
- Malhotra J. D., Kaufman R. J., 2011. ER Stress and its functional link to mitochondria: role in cell survival and death. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3: a004424.
- Manion M. K., Hockenbery D. M., 2003. Targeting Bcl-2-Related Proteins in Cancer Therapy. *Cancer Biology & Therapy* 2:4:Suppl. 1, S105-S114.
- Martinou J. C., Dubois-Dauphin M., Staple J. K., Rodriguez I., Frankowski H., Missotten M., 1994. Overexpression of BCL-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron*, 13(4): 1017-1030.
- Martinvalet D., Zhu P., Lieberman J., 2005. Granzim A induces caspase- independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity* 22:355–70.
- Mason R. P., 1999. Effects of calcium channel blockers on cellular apoptosis: implications for carcinogenic potential. *Cancer*. 85(10):2093-102.
- Matsuyama S., Llopis J., Deveraux Q. L., 2000. Changes in intramitochondrial and cytosolic pH: early events that modulate caspase activation during apoptosis. *Nat Cell Biol*, 2: 318-325.
- Matthews J. C., Hori K., Cormier M. J., 1977. Purification and properties of renilla-reniformis luciferase. *Biochemistry*, 16: 85-91.

- Mayo M. W., Wang C., Drouin S. S., Madrid L. V., Marshall A. F., Reed J. C., 1999. WT1 modulates apoptosis by transcriptionally upregulating the bcl-2 proto-oncogene. *EMBO J* 18: 3990–4003.
- Me Cubrey J. A., May W. S., Duronio V., Mufson A., 2000. Serine/threonine phosphorylation in cytokine signal transduction. *Leukemia* 14:9-21.
- Meng S. J., Yu L. J., 2010. Oxidative stress, molecular inflammation and sarcopenia. *Int J Mol Sci*, 11: 1509-1526.
- Meyer N., Kim S. S., Penn L. Z., 2006. The Oscar-worthy role of Myc in apoptosis. *Semin Cancer Biol* 16:275–87.
- Michels J., Johnson P. W., Packham G., 2005. Mcl-1. *Int J Biochem Cell Biol* 37:267–271.
- Minamino T., Kitakaze M., 2010. ER stress in cardiovascular disease. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 48(6): 1105-1110.
- Minarowska A., Miarowski L., Karwowska A., Gacko M., 2007. Regulatory role of cathepsin D in apoptosis. *Folia histochemica et cytobiologica*, 45(3): 159-163.
- Minn A. J., Rudin C. M., Boise L. H., Thompson C.B., 1995. Expression of bcl-xL can confer a multidrug resistance phenotype. *Blood* 86:1903–1910.
- Miyamoto Y., 1999. Immunohistochemical analysis of Bcl-2, Bax, Bcl-X, and Mcl-1 expression in pancreatic cancers. *Oncology*, 56:73-82.
- Miyashita T., Reed J. C., 1995. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80:293–299.
- Miyashita T., Harigai M., Hanada M., and Reed J. C., 1994. Identification of a p53-dependent Negative Response Element in the bcl-2 Gene. *Cancer Research*, 54, 3131-3135.
- Montero J., Letai A., 2018. Why do BCL-2 inhibitors work and where should we use them in the clinic? *Cell Death Differ.*, 25(1):56-64.
- Moujalled D., Weston R., Anderton H., Ninnis R., Goel P., Coley A., 2011. Cyclic-AMP-dependent protein kinase A regulates apoptosis by stabilizing the BH3-only protein Bim. *EMBO*, 12: 77-83.
- Mountz J. D., Zhou T., 2001. Apoptosis and Autoimmunity. In: Koopman WJ ed. *A Textbook of Rheumatology: Arthritis and Allied Conditions*. Lippincott Williams&Wilkins.
- Muller M., Strand S., Hug H., Heinemann E. M., Walczak H., Hofmann W. J., Stremmel W., Krammer P. H., Galle P. R., 1997. Druginduced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53. *J Clin Invest* 99:403–413.
- Muzio M., Salvesen G. S., Dixit V. M., 1997. FLICE induced apoptosis in a cell free system. *J Biol Chem* 272:2952-2956.
- Naderer T., Fulcher M. C., 2018. Targeting apoptosis pathways in infections. *J Leukoc Biol.*, 103(2):275-285.
- Neelam A., Iyer A., 2010. Role of oxidative-nitrosative stress-mediated Bcl-2 regulation in apoptosis and malignant transformation. *Ann. NY. Acad. Sci.*
- Nijhawan D., Honarpour N., Wang X., 2000. Apoptosis in neural development and disease. *Annu Rev Neurosci* 23:73–87.
- Nogai H., Dorken B., Lenz G., 2011. Pathogenesis of non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol.*, 29(14): 1803-1811.

- Norbury C. J., Hickson I. D., 2001. Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:367–401.
- Oda E., Ohki R., Murasawa H., Nemoto J., Shibue T., Yamashita T., Tokino T., Taniguchi T., Tanaka N., 2000. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53- induced apoptosis. *Science* 288:1053–8.
- Ola M. S., Nawaz M., Ahsan H., 2011. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Mol Cell Biochem*, 351: 41-58.
- Olopade O. I., Adeyanju M. O., Safa A. R., Hagos F., Mick R., Thompson C. B., Recant W. M., 1997. Overexpression of BCL-x protein in primary breast cancer is associated with high tumor grade and nodal metastases. *Cancer J Sci Am*, 3:230-7
- Opferman J. T., Korsmeyer S. J., 2003. Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nat Immunol* 4:410– 5.
- Oren M., 1999. Regulation of the p53 tumor suppressor protein. *J Biol Chem* 274:36031–36034.
- Orrenius S., Nicotera P., Zhivotovsky B., 2011. Cell death mechanisms and their implications in toxicology. *Toxicological Sciences*, 119(1): 3-19.
- Orsula C., Eva R., 1997. Predictive Value of p53, Bcl-2 and Bax in the Radiotherapy of Head and Neck Cancer. *Pathology oncology Research* Vol 3, No 3.
- Osborne B. A., 1996. Apoptosis and the maintenance of homeostasis in the immune system. *Curr Opin Immunol* 8:245–54.
- Owen-Schaub L. B., Zhang W., Cusack J. C., Angelo L. S., Santee S. M., Fujiwara T., Roth J. A., Deisseroth A. B., Zhang W. W., Kruzel E., 1995. Wild-type human p53 and a temperaturesensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Mol Cell Biol* 15:3032–3040.
- Ozawa T., 1995. Mechanism of somatic mitochondrial DNA mutations associated with age and diseases. *Biochim Biophys Acta* 1271:177–89.
- Ozen O. A., Kus M. A., Kus I., Alkoc O. A., Songur A., 2008. Protective effects of melatonin against formaldehyde-induced oxidative damage and apoptosis in rat testes: An immunohistochemical and biochemical study. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 54:169-176.
- Parton M., Dowsett M., Smitt I., 2001. Studies of apoptosis in breast cancer. *BJM*, 322: 1528-1532.
- Paweletz N., 2001. Walther Flemming: pioneer of mitosis research. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:72–5.
- Peter M. E., Krammer P. H., 1998. Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)- mediated apoptosis. *Curr Opin Immunol* 10:545–51.
- Pezzella F., 1993 Bcl-2 protein in non-small-cell lung carcinoma. *N Engl J Med*, 329:690-4.
- Pietenpol J. A., Stewart Z. A., 2002. Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology* 181–182:475– 81.
- Pollack M., Phaneuf S., Dirks A., 2006. Role of apoptosis in the normal aging brain, skeletal muscle and heart. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 959: 1.
- Pugazhenth S., Miller E., Sable C., Young P., Heidenreich K. A., Boxer L. M., 1999. Insulin-like growth factor-1 induces bcl-2 promoter through a transcription factor cAMP-response element-binding protein. *J Biol Chem* 274: 2829–2837.

- Pugazhenth S., Nesterova A., Jambal P., Audesirk G., Kern M., Cabell L., 2003. Oxidative stress-mediated down-regulation of bcl-2 promoter in hippocampal neurons. *Journal of Neurochemistry*, 84: 982-996.
- Puthier D., Derenne S., Barille S., Moreau P., Harousseau J. L., Bataille R., Amiot M., 1999. Mcl-1 and Bcl-XL are co-regulated by IL-6 in human myeloma cells. *J Cell Biol* 97:1235-1239.
- Qian X. H., Li Z. G., Yang Q., 2007. Highly efficient antitumor agents of heterocycles containing sulfur atom: linear and angular thiazonaphthalimides against human lung cancer cell in vitro. *Bioorgan. Med. Chem.* 15, 6846–6851.
- Raff M. C., 1992. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356:397-400.
- Rampino N., Yamamoto H., Ionov Y., Li Y., Sawai H., Reed J. C., Perucho M., 1997. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* 275:967–969.
- Rassidakis G. Z., 2002. BCL-2 expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin disease predicts a poorer prognosis in patients treated with ABVD or equivalent regimens. *Blood*, 100:3935-41.
- Ravandi F., 2001. Expression of apoptosis proteins in chronic myelogenous leukemia: Associations and significance. *Cancer*, 91:1964-72.
- Rayboud H., Odin G., 2003. Genic alteration in oral and head and neck squamous cell carcinomas; analysis of international literature. *Pathologie Biologic* 51;176-184.
- Reed J. C., Miyashita T., Takayama S., Wang H. G., Sato T., Krajewski S., Aime S. C., Bodrug S., Kitada S., Hanada M., 1996. BCL- 2 family proteins: regulators of cell death involved in the pathogenesis of cancer and resistance to therapy. *J Cell Biochem* 60:23–32.
- Reed J. C., 1994. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *The J Cell Biology*, 124: 1-6.
- Reed J. C., 2006. Proapoptotic multidomain Bcl-2/Bax-family proteins: mechanisms, physiological roles, and therapeutic opportunities. *Cell Death Differ.*,13(8):1378-86.
- Reeve J. G., Xiong J., Morgan J., Bleehen N. M., 1996. Expression of apoptosis-regulatory genes in lung tumour cell lines: relationship to p53 expression and relevance to acquired drug resist-ance. *Br J Cancer*, 73:1193-200.
- Renahan A. G., Booth C., Potten C. S., 2001. What is apoptosis, and why is it important? *Bmj* 322:1536–8.
- Reyland M. E., 2009. Protein kinase C isoforms: Multi-functional regulators of cell life and death. *Front Biosci* , 14: 2386-99.
- Ribeiro J. M., Carson D. A., 1993. Ca^{2+} / $\text{Mg}^{(2+)}$ - dependent endonuclease from human spleen: purification, properties, and role in apoptosis. *Biochemistry*, 32(35):9129-36.
- Riedl S. J., Salvesen G. S., 2007. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8: 405-413.
- Romero O., Martinez A. C., Camonis J., Rebollo A., 1999. Aiolos transcription factor controls cell death in T cells by regulating Bcl-2 expression and its cellular localization. *EMBO J* 18: 3419–3430.
- Roulston A., Marcellus R. C., Branton P. E., 1999. Viruses and Apoptosis. *Annual Review of Microbiology*, 53: 577-628.

- Saelens X., Festjens N., Vande Walle L., van Gurp M., van Loo G., Vandenabeele P., 2004. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23:2861–74.
- Sakahira H., Enari M., Nagata S., 1998. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391:96–9.
- Salomoni P., Perrotti D., Martinez R., Franceschi C., Calabretta B., 1997. Resistance to apoptosis in CTLL-2 cells constitutively expressing c-Myb is associated with induction of BCL-2 expression and c-MYB-dependent regulation of bcl-2 promoter activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 3296–3301.
- Salomons G. S., 1999. Bcl-2 family members in childhood acute lymphoblastic leukemia: relationships with features at presentation, in vitro and in vivo drug response and long-term clinical outcome. *Leukemia*, 13:1574-80.
- Salveson G. S., Dixit V. M., 1997. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 91:443-446.
- Santaniello E., Meroni G., Rajabi M., 2009. D-Luciferin, derivatives and analogues: synthesis and in vitro/in vivo luciferase-catalyzed bioluminescent activity. *Special Issue Reviews and Accounts ARKIVOC* 265-288.
- Sarkar C., Pramanik P., Karak A. K., Mukhopadhyay P., Sharma M. C., Singh V. P., Mehta V. S., 2002. Are childhood and adult medulloblastomas different? A comparative study of clinico-pathological features, proliferation index and apoptotic index. *J Neurooncol*, 59:49-61.
- Scaffidi C., Schmitz I., Zha J., Korsmeyer S. J., Krammer P. H., Peter M. E., 1999. Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. *J Biol Chem* 274:22532-22538.
- Schaich M., Illmer T., Seitz G., Mohr B., Schakel U., Beck J. F., Ehninger G., 2001. The prognostic value of Bcl-XL gene expression for remission induction is influenced by cytogenetics in adult acute myeloid leukemia. *Haematologica*, 86:470-7.
- Schimmer A. D., 2004. Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res* 64:7183– 90.
- Schmitt C. A., Lowe S. W., 1999. Apoptosis and therapy. *J Pathol* 187:127–137.
- Schwartz D., Rotter V. , 1998. p53-dependent cell cycle control: response to genotoxic stress. *Semin Cancer Biol* 8:325–336.
- Searle J., Kerr J. F. R., Bishop C. J., 1982. Necrosis and apoptosis distinct modes death with fundamentally different significance. *Pathol Annu*, 17: 229-259.
- Seto M., Jaeger U., Hockett R. D., Graninger W., Bennett S., Goldman P., Korsmeyer S. J., 1988. Alternative promoters and exons, somatic mutation and deregulation of the Bcl-2-Ig fusion gene in lymphoma . *The EMBO Journal* vol.7 no. 1 pp. 123 – 131.
- Shamas-Din A., Brahmabhatt H., Leber B., Andrews D. W., 2011. BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis. *Biochim Biophys Acta*, 1813: 508-520.
- Sheikh M. S., Burns T. F., Huang Y., Wu G. S., Amundson S., Brooks K. S., Fornace A. J. Jr., 1998. Deiry WS. p53-dependent and –independent regulation of the death receptor KILLER/DR5 gene expression in response to genotoxic stress and tumor necrosis factor alpha. *Cancer Res* 58:1593–1598.
- Sherr C. J., Weber J. D., 2000. The ARF/p53 pathway. *Curr Opin Genet Dev* 10:94–99.

- Simonian P. L., Grillot D. A., Nunez G., 1997. Bcl-2 and Bcl-XL can differentially block chemotherapy-induced cell death. *Blood* 90:1208–1216.
- Singh S., Chhipa R. R., Vijayakumar M. V., Bhat M. K., 2006. DNA damaging drugs-induced down-regulation of Bcl-2 is essential for induction of apoptosis in high-risk HPV-positive HEp-2 and KB cells. *Elsevier, Cancer Letters* 236 :213–221.
- Singh S., Bhat M. K., 2004. Carboplatin induces apoptotic cell death through downregulation of constitutively active nuclear factor-kappaB in human HPV-18 E6-positive HEp-2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 318, 346–353.
- Slee E. A., Adrain C., Martin S. J., 2001. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem* 276:7320–6.
- Smith M. D., Ensor E. A., Coffin R. S., Boxer L. M., Latchman D. S., 1998. Bcl-2 transcription from the proximal P2 promoter is activated in neuronal cells by the Brn-3a POU family transcription factor. *J Biol Chem* 273: 16715–16722.
- Smyth M. J., Godfrey D. I., Trapani J. A., 2001. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol* 2:293–9.
- Soengas M. S., Alarcon R. M., Yoshida H., Giaccia A. J., Hakem R., Mak T. W., Lowe S.W., 1999. Apaf-1 and caspase-9 in p53- dependent apoptosis and tumor inhibition. *Science* 284:156–159.
- Soslow R. A., Bhargava V., Warnke R. A., 1997. MIC2, TdT, bcl-2, and CD34 expression in parafin-embedded high-grade lymphoma/acute lymphoblastic leukemia distinguishes between distinct clinicopathologic entities. *Hum Pathol*, 28:1158-65.
- Soung Y. H., Lee J. W., Kim S. Y., Jang J., Park Y. G., Park W. S., Nam S. W., Lee J. Y., Yoo N. J., Lee S. H., 2005. CASPASE-8 gene is inactivated by somatic mutations in gastric carcinomas. *Cancer Res* 65:815–821.
- Sperandio S., de Belle I., Bredesen D. E., 2000. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:14376–81.
- Sprick M. R., & Walczak H., 2004. The interplay between the Bcl-2 family and death receptor-mediated apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta*, 1644(2/3), 125–132.
- Srivastava S., Zou Z. Q., Pirollo K., Blattner W., Chang E. H., 1990. Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancerprone family with Li-Fraumeni syndrome [see comments]. *Nature* 348:747–749.
- Steinman H. M., 1995. The bcl-2 oncoprotein functions as a pro-oxidant. *The Journal of Biological Chemistry*, 270: 3487-3490.
- Stephen W. G. T., Douglas R. G., 2010. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. Volume 11.
- Strasser A., Cory S., Adams J. M., 2011. Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases. *EMBO J.* 30(18):3667-3683.
- Strasser A., O'Connor L., Dixit V. M., 2000. Apoptosis signaling. *Annual Review of Biochemistry*, 69: 217-45.
- Suliman A., Lam A., Datta R., Srivastava R. K., 2001. Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways. *Oncogene* 20:2122–33.

- Susnow N., Zeng L., Margineantu D., Hockenbery D. M., 2009. Bcl-2 family proteins as regulators of oxidative stress. *Seminars in Cancer Biology*, 19: 42-49.
- Teitz T., Wei T., Valentine M. B., Vanin E. F., Grenet J., Valentine V. A., Behm F. G., Look A. T., Lahti J. M., Kidd V. J., 2000. Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nat Med* 6:529–535.
- Thomadaki H., Scorilas A., 2006. BCL2 family of apoptosis-related genes: functions and clinical implications in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci.* , 43(1):1-67.
- Thompson E. B., 1998. The many roles of c-Myc in apoptosis. *Annual Review of Physiology*, 60: 575-600.
- Thompson E. B., 1994. Apoptosis and steroid hormones. *Mol Endocrinol*, 8(6): p. 665-73.
- Tilly J. L., Kowalski K. I., Johnson A. L., Hsueh A. J., 1991. Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology* 129:2799–801.
- Toki T., Horiuchi A., Ichikawa N., Mori A., Nikaido T., Fujii S., 1999. Inverse relationship between apoptosis and Bcl-2 expression in syncytiotrophoblast and fibrin-type fibrinoid in early gestation. *Mol Hum Reprod*, 5;(3):246-251.
- Topuz E., Duranyıldız D., 2004. Malign Melanomalı Hastalarda Serum Bcl-2 Düzeyi. *Türk Onkoloji Dergisi Cilt 19, Sayı 4.*
- Toraman E., 2017. İnsan Bax geni promotör bölgesinin fonksiyonel analizi. Yüksek lisans tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Torzewski M., Sarbia M., Heep H., Dutkowski P., Willers R., Gabbert H. E., 1998. Expression of Bcl-X(L), an antiapoptotic member of the Bcl-2 family, in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 4:577-83.
- Touchette N., Fogle S., 1991. Apoptosis: it chimes with mitosis. *JNE Res*, 3: 75-78.
- Trapani J. A., Smyth M. J., 2002. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2:735–47.
- Tsujimoto Y., Yunis J., Onorato S. L., Erikson J., Nowell P. C., Croce C. M., 1984. Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of B-cell lymphomas and leukemias with the t(11;14) chromosome translocation. *Science* 224:1403–1406.
- Tsujimoto Y., Shimizu S., 2000. Bcl-2 family: Life-or-death switch. *FEBS Letters* 466 :6-10.
- Tu Y., 1998. BCL-X expression in multiple myeloma: possible indicator of chemoresistance. *Cancer Res*, 58:256-62.
- Utz P. J., Anderson P., 1998. Posttranslational protein modifications, apoptosis and the bypass of tolerance to autoantigens. *Arthritis Rheum* 41:1152-1160.
- Van der Woude C. J., Jansen P. L., Tiebosch A. T., Beuving A., Homan M., Kleibeuker J. H., Moshage H., 2002. Expression of apoptosis-related proteins in Barrett's metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence: a switch to a more resistant phenotype. *Hum Pathol*, 33:686-92.
- Varley J. M., Evans D. G., Birch J. M., 1997. Li-Fraumeni syndrome—a molecular and clinical review. *Br J Cancer* 76:1–14.
- Vaux D. L., Cory S., Adams J. M., 1988. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, 335(6189):440-442.

- Wajant H., 2002. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* 296:1635–6.
- Wallach D., Boldin M., Varfolomeev E., Beyaert R., Vandenabeele P., Fiers W., 1997. Cell death induction by receptors of the TNF family: towards a molecular understanding. *FEBS Lett* 410:96-106.
- Wang J., Chun H. J., Wong W., Spencer D. M., Lenardo M. J., 2001. Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proceedings of The National Academy of Science of The United States of America (PNAS)*, 98: 13884-8.
- Wang X. W., Harris C. C., 1997. p53 tumor-suppressor gene: clues to molecular carcinogenesis. *J Cell Physiol* 173:247–55.
- Wang, J., Wu A. B., Xu Y. F., Liu J. W., Qian X. H., 2009. M2-A induces apoptosis and G2-M arrest via inhibiting PI3 K/Akt pathway in HL60 cells. *Cancer Lett.* 283, 193–202.
- Waterhouse N. J., Sedelies K. A., Browne K. A., Wowk M. E., Newbold A., Sutton V. R., 2005. A central role for Bid in granzyme B-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 280(6): 4476-82.
- Wet J. R., Wood K. V., Helinski D. R., DeLuca M., 1985. Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in *Escherichia coli*. *PNAS* 82(23):7870-3.
- Wickremasinghe R. G., Hoffbrand A. G., 1999. Biochemical and genetic control of apoptosis: relevance to normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Blood*, 11: 3587- 3600.
- Widlak P., 2000. The DFF40/CAD endonuclease and its role in apoptosis. *Acta Biochim. Pol.*, 47(4), 1037–1044.
- Wilson B. E., Mochon E., Boxer L. M., 1996. Induction of *bcl-2* expression by phosphorylated CREB proteins during B-cell activation and rescue from apoptosis. *Mol Cell Biol.*, 16:5546–56.
- Wood H. G., Clark J. E., 1988. Biological aspects of inorganic polyphosphates. *Annu. Rev. Biochem.*, 57:235–60.
- Wood K. V., 1995. The chemical mechanism and evolutionary development of beetle bioluminescence. *Photochem, Photobiol.* 62:662-673
- Worth A., Thrasher A. J., Gaspar H. B., 2006. Autoimmune lymphoproliferative syndrome: molecular basis of disease and clinical phenotype. *Br J Haematol* 133:124–40.
- Wu Y., Mehew J. W., Heckman C. A., Arcinas M., Boxer L. M., 2001. Negative regulation of *bcl-2* expression by p53 in hematopoietic cells. *Oncogene.*, 20:240–51.
- Wyllie A. H., Arends M. J., Morris R. G., Walker S. W., Evan G., 1992. The apoptosis endonuclease and its regulation. *Semin Immunol*, 4(6):389-97.
- Wyllie A. H., 1992. Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. *Cancer Metastasis Rev*, 11(2):95-103.
- Xerri L., Devilard E., Bouabdallah R., Hassoun J., Chaperot L., Birg F., Plumas J., 1999. Quantitative analysis detects ubiquitous expression of apoptotic regulators in B cell non-Hodgkin's lymphomas. *Leukemia*, 13:1548-53.
- Yang E., Korsmeyer S. J., 1996. Molecular thanatopsis: A discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood*, 88:386-401.

- Yang H. B., Chow N. H., Sheu B. S., Chan S. H., Chien C. H., Su I. J., 1999. The role of bcl-2 in the pro-gression of the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Anticancer Res*, 19:727-30.
- Yılmaz A., Savaş İ., 2005. Distribution of Bcl-2 gene expression and its prognostic value in non-small cell lung cancer. *Tüberküloz ve Toraks Dergisi*, 53(4):323-329.
- Yılmaz Ş., 2013. *Bacillus Thuringiensis* ekzopolifosfataz genine (ppx) ait olası promotorün aktivitesinin lusiferaz haberci geni aracılığıyla ölçülmesi. Yüksek lisans tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Gebze.
- Youle R. J., Strasser A., 2008. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9; 47-59.
- Young R. L., Korsmeyer S.J., 1993. A negative regulatory element in the *bcl-2* 5'-untranslated region inhibits expression from an upstream promoter. *Mol Cell Biol*, 13:3686-97.
- Zamzami N., Brenner C., Marzo I., Susin S. A., Kroemer G., 1998. Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2- like oncoproteins. *Oncogene* 16:2265-2282.
- Zhang D. S., Li Y. Y., Chen X. J., Li Y. J., Liu Z. Y., Xie W. J., Sun Z. L., 2015. BCL2 promotor methylation and miR-15a/16-1 upregulation is associated with sanguinarine-induced apoptotic death in rat HSC-T6 cells. *J Pharmacol Sci*, 127(1):135-44
- Zhivotovsky B., Sten Orrenius S., 2011. Calcium and cell death mechanisms: A perspective from the cell death Community. *Cell Calcium*, 50: 211-221.
- Zhu H., Huang M., Yang F., Chen Y., Miao Z. H., Qian X. H., Xu Y. F., Qin Y. X., Luo H. B., Shen X., Geng M. Y., Cai Y. J., Ding J., 2007. R16, a novel amonafide analogue, induces apoptosis and G2-M arrest via poisoning topoisomerase II. *Mol. Cancer Ther*.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
Adı soyadı: Betül BAYDAR Doğum Tarihi: 20.09.1993 Doğum Yeri: İSTANBUL Uyruğu: T.C. Tel: 0506-966-26-28
Eğitim
Lise: Açık Öğretim Lisesi, Iğdır (2007-2011) Lisans: Bartın Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü (2012-2016) Yüksek Lisans: Atatürk Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Erzurum (2016-2018)
Yabancı Dil Bilgisi
İngilizce