



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

**DOKTORA
TEZİ**

**MCF-7 HÜCRELERİNDE HÜCRE ÖLÜMÜ VE
RHO KİNAZ ARASINDAKİ OLASI
İLİŞKİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

BURÇİN İBİŞOĞLU

FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

AĞUSTOS 2016



**MCF-7 HÜCRELERİNDE HÜCRE ÖLÜMÜ VE RHO KİNAZ
ARASINDAKİ OLASI İLİŞKİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Burçin İBİŞOĞLU

**DOKTORA TEZİ
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

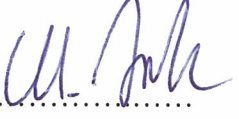
AĞUSTOS 2016

Burçin İBİŞOĞLU tarafından hazırlanan hazırlanan “MCF-7 Hücrelerinde Hücre Ölümü ve Rho Kinaz Arasındaki Arasındaki Olası İlişkinin Değerlendirilmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Farmakoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman/Başkan: Prof. Dr. Mustafa ARK

Farmakoloji Anabilim Dalı (Ecz), Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~

.....

Üye : Prof. Dr. Nilüfer Nermin TURAN DURAL

Farmakoloji Anabilim Dalı (Ecz), Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~

.....

Üye : Prof. Dr. Erden BANOĞLU

Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

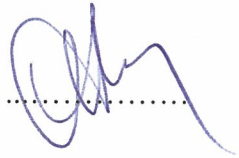
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~

.....

Üye : Prof. Dr. Arzu ONAY BEŞİKÇİ

Farmakoloji Anabilim Dalı (Ecz), Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~

.....

Üye : Prof. Dr. Pelin KELİCEN UĞUR

Farmakoloji Anabilim Dalı (Ecz), Hacettepe Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~

.....

Tez SavunmaTarihi: 19/08/2016

Jüri üyeleri tarafından DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Burçin

Burçin İBİŞOĞLU

19.08.2016

MCF-7 HÜCRELERİNDE HÜCRE ÖLÜMÜ VE RHO KİNAZ ARASINDAKİ OLASI İLİŞKİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

(Doktora Tezi)

Burçin İBİŞOĞLU

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ağustos 2016

ÖZET

Kaspazlar, apoptoz sırasında proteaz kaskadının aktive edilmesinde rol almakta, anahtar yapısal proteinlerin ve önemli hücrel sinyallerin aktivasyonuna/ inaktivasyonuna yol açmaktadır. Diğer taraftan küçük G proteini Rho ve onun downstream efektörü Rho kinazın (ROCK 1 ve ROCK 2) hücre kontraksiyonu, proliferasyonu, apoptozu ve migrasyonu gibi çok çeşitli fizyopatolojik mekanizmada yer aldığı gösterilmiştir. Rho kinazlar yapısal olarak otoinhibitör aktiviteye sahiptir. ROCK 1'in, efektör kaspazlardan kaspaz-3 ile, ROCK 2'nin granzim B veya kaspaz-2 ile kesilerek aktive olduğu bilinmektedir. MCF-7 hücrelerinde kaspaz-3 geninin ekson 3 bölgesinden 47 baz çifti genomik bir mutasyonla fonksiyonel olarak silinmiştir. Bu nedenle birçok çalışma MCF-7 hücrelerinde apoptozun kaspaz-3 ile ilişkilendirilen birçok karakteristik özelliğinin (DNA fragmentasyonu, membran blebnelmesi gibi) gözlemlenmediğini söylemektedir. Bu tez kapsamında yapılan çalışmalar sırasında, kaspaz-3 bulunmayan MCF-7 hücrelerinde çeşitli ajanlar ile indüklenen hücre ölümünde, ROCK 1'in kesildiği ve bu kesilmenin kaspaz inhibitörlerine duyarlı olduğu tespit edilmiştir. ROCK 1'in gerçekten kaspaz-2 aracılığı ile kesilip kesilmeyeceğini belirlemek için, öncelikle bu proteinin aminoasit sekansı incelenmiştir. Yapılan biyoinformatik incelemelerde kaspaz-2 için birkaç olası ROCK 1 tanıma bölgesi olduğu saptanmıştır. Kaspaz-2'nin ROCK 1'i kesip kesmediğini doğrulamak için 3 farklı hücre lizatı (HeLA, MCF-7, MDA-MB-231) rekombinant aktif kaspaz-2 ile inkübe edilmiştir. Her üç hücre lizatında da eksojen aktif kaspaz-2 inkübasyonu ile ROCK 1 kesilmesi gözlenmiştir. Bu bulgular, hem ilaçla indüklenen hücre ölümü ile endojen olarak hem de eksojen aktif kaspaz-2 uygulaması sonucu meydana gelen ROCK 1 kesilmesinden, kaspaz-2'nin de sorumlu olabileceğine işaret etmektedir. Sonuç olarak, apoptotik süreçte kaspaz-2 aracılı yeni bir ROCK 1 kesilme bölgesinin belirlenmesi kanser tedavisinde yeni tedavi yaklaşımlarına katkı sağlayabilecektir.

Bilim Kodu : 1018.1
Anahtar Kelimeler : Apoptoz, kaspaz, rho-rho kinaz
Sayfa Adedi : 144
Danışman : Prof. Dr. Mustafa ARK

EVALUATION OF THE POSSIBLE RELATIONSHIP BETWEEN CELL DEATH AND RHO KINASE IN MCF-7 CELLS

(Ph. D. Thesis)

Burçin İBİŞOĞLU

GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

August 2016

ABSTRACT

Caspases play role in activating the protease cascade during apoptosis and lead to activation/inactivation of the key structural proteins and cellular signalings. On the other hand, it is shown that small G protein Rho and its downstream effector Rho kinase (ROCK 1 and ROCK 2) are involved in several pathophysiologic mechanisms such as cell contraction, proliferation, apoptosis and cell migration. ROCK has constitutive autoinhibitory activity. It is known that ROCKs are activated after ROCK 1 is cleaved by caspase 3, which is one of the effector caspases, and ROCK 2 is cleaved by caspase 2 and granzyme B. 47 base pairs located in exon 3 of caspase-3 gene is functionally removed with a genomic mutation in MCF-7 cells. Therefore, many studies state that many caspase 3-related apoptotic characteristics features (such as DNA fragmentation, membrane blebbing etc.) are not observable in MCF-7 cells. During the studies within the context of this thesis, it is observed that ROCK 1 is cleaved in various agents induced cell death in caspase-3-deficient MCF-7 cells, and that cleavage is sensitive to caspase inhibitors. Therefore, first the amino acid sequence of that protein has been analyzed for whether ROCK 1 might be literally cleaved by caspase 2. In bioinformatics analysis, it is found that there exist several possible recognition sequences of ROCK 1 for caspase-2. To confirm whether caspase-2 cleaves ROCK 1, three different cell lysates (HeLa, MCF-7 and MDA-MB-231) were incubated with recombinant active caspase-2. Cleavage of ROCK 1 with active caspase-2 incubation was observed for all three cell lysates. These findings suggest that caspase-2 might also be responsible for ROCK 1 cleavage endogenously in various agents-induced cell death and exogenously with recombinant active caspase-2 incubation as well. As a result, determination of a new possible caspase-2 mediated ROCK 1 cleavage site in the apoptotic process will contribute to new therapeutic approaches in cancer treatment.

Science Code : 1018.1
Key Words : Apoptosis, caspase, rho-rho kinase
Page Number : 144
Advisor : Prof. Dr. Mustafa ARK

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince, gösterdiği her türlü ilgi, destek ve anlayış için, bilgi ve deneyimleri ile yetişmemde büyük emeği olan tez danışmanım Prof. Dr. Mustafa Ark'a,

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde teşvik ediciliği ve yönlendirmesi ile bana yardımcı olan Prof. Dr. Nilüfer Nermin Turan Dural'a ve Prof. Dr. Erden Banoğlu'na,

Doktora eğitimimde bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan değerli hocalarım Prof. Dr. Nurettin Abacıoğlu'na, Prof. Dr. Fatma Akar'a ve Doç. Dr. Orhan Uludağ'a,

Orta Doğu Teknik Üniversitesi öğretim üyesi Doç. Dr. Rengül Çetin Atalay'a ve Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Mesude İşcan'a,

Doktora eğitimim boyunca, Yurt İçi Doktora Burs Programı ile beni destekledikleri için Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu-Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na,

Doktora süresince gelişmemde büyük katkısı olan ve her sıkıştığım da yardımına koşan Dr. Ecz. Aysun Özdemir'e, doktora eğitimine aynı zamanda başladığımız ve bu süreç boyunca bütün zorlukları birlikte atlattığımız Uzm. Ecz. Yaprak Dilber Şimay'a,

Tez yazım sürecinde desteklerini esirgemeyen arkadaşlarım Zeynep Özcan, Nur Banu Bal, Sevtap Han, Gözde Öztürk ve Elif Baysalman'a,

Doktora eğitimim sayesinde tanıdığım ancak erken kaybettiğim en özel arkadaşlarımdan Biljana Yaren'e,

Tez yazım sürecinin özellikle son dönemlerinde verdiği destek ve motivasyon için sevgili Necati Çağan'a,

Doktora süresince ve hayatımın her evresinde bana destek olan, hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan canım AİLEME,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xii
RESİMLERİN LİSTESİ	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Kanser	5
2.1.1. Kanser hücrelerinin karakteristik özellikleri	6
2.1.2. Kanser tedavisinin genel prensipleri	9
2.1.3. Antikanser ilaçların sınıflandırılması.....	10
2.1.4. Yeni tedavi yaklaşımları	14
2.2. Küçük G Proteinleri ve Rho/Rho Kinaz Yolağı	17
2.2.1. Küçük G proteinleri	17
2.2.2. Rho/Rho kinaz yolağı.....	18
2.2.3. Rock aktivasyonunun düzenlenmesi	19
2.2.4. Rock ekspresyonu, lokalizasyonu ve substratları	21
2.2.5. Apoptotik morfolojik olayların düzenlenmesinde ROCK'un rolü	25
2.3. Apoptoz ve Diğer Hücre Ölümleri	27
2.3.1. Apoptoz ve önemi	27
2.3.2. Kaspazlar.....	32

	Sayfa
2.3.3. Kaspaz substratları ve substrat spesifitesi	43
2.3.4. Kaspaz inhibitörleri	46
2.4. Diğer Hücre Ölümleri	50
2.4.1. Otofaji	50
2.4.2. Nekroz	51
2.4.3. Kornifikasyon (Boynuzlaşma)	52
2.4.4. Mitotik katastrof.....	52
2.4.5. Anoikis	53
2.4.6. Eksitotoksisite	53
2.4.7. Paraptozis	53
2.4.8. Piroptoz	54
2.4.9. Pironekroz	54
2.4.10. Entozis.....	54
2.5. Na ⁺ /K ⁺ ATPaz Yapı ve İşlevleri	55
2.6. Kardiyak Glikozitler.....	58
2.6.1. Kardiyak glikozitlerin olası sitotoksik etki mekanizması	59
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	61
3.1. Gereç.....	61
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	61
3.1.2. Kullanılan cihazlar.....	63
3.1.3. Kullanılan çözeltiler	65
3.2. Yöntemler.....	70
3.2.1. Hücre kültürü	70
3.2.2. Standart kemoterapötik ve kardiyak glikozitlerin sitotoksisiteilerinin değerlendirilmesi	71
3.2.3. Hücre homojenatlarının hazırlanması	72

	Sayfa
3.2.4. Bradford protein miktar tayini	72
3.2.5. Western-Blot	73
3.2.6. Faz kontrast ve immünofloresans mikroskobi	73
3.2.7. Hücre ölümünün belirlenmesi	74
3.2.8. İstatiksel analiz.....	75
4. BULGULAR	77
4.1. Standart Kemoterapötiklerin ve Kardiyak Glikozitlerin MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücre Dizilerindeki Sitotoksik Etkileri.....	77
4.1.1. Standart kemoterapötiklerin ve kardiyak glikozitlerin MCF-7 hücre dizisindeki sitotoksik etkileri.....	77
4.1.2. Ouabain ve oksaliplatinin MDA-MB-231 hücre dizisindeki sitotoksik etkileri	83
4.2. Ouabainin ve Oksaliplatinin MCF-7 Hücre Dizisindeki Sitotoksitesine Kaspaz İnhibisyonunun Etkisi	86
4.3. Ouabainin ve Oksaliplatinin MCF-7 Hücre Dizisindeki Sitotoksitesine Rho Kinaz İnhibisyonunun Etkisi.....	89
4.4. Kardiyak Glikozitlerin ve Standart Kemoterapötiklerin MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücre Dizileri Üzerindeki Morfolojik Etkileri	91
4.4.1. Faz kontrast mikroskobik görüntüler	91
4.5. Ouabain ve Oksaliplatin Uygulanmış Hücrelerde Apoptotik Hücre Oranının Belirlenmesi.....	102
4.6. MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücre dizilerinde Standart Kemoterapötiklerin ve Kardiyak Glikozitlerin ROCK 1 kesilmesi Üzerindeki Etkileri.....	103
4.7. MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücre Dizilerinde Ouabain ve Oksaliplatinin indüklediği ROCK 1 Kesilmesine ROCK inhibisyonunun etkisi	105
4.8. MCF-7 Hücre Dizisinde Ouabain ve Oksaliplatinin İndüklediği ROCK 1 Kesilmesine Kaspaz İnhibisyonunun Etkisi	107
4.9. Rekombinant Aktif Kaspaz-2'nin MCF-7, MDA-MB-231 ve HeLa Hücre Dizilerindeki ROCK 1 Kesilmesine Etkileri	108
4.10. MCF-7 hücre dizisinde Ouabain ve Oksaliplatinin ROCK 2 Kesilmesi Üzerindeki Etkileri.....	109

Sayfa

4.11. MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücre Dizilerinde Oubain ve Oksaliptatinin ERM Ekspresyonuna ve Fosforilasyonuna Etkileri.....	110
4.12. Kaspaz-3 Proteinin MCF-7 Hücre Dizisinde Olmadığının Doğrulanması	111
4.13. MCF-7 Hücre Dizisinde Oubain ve Oksaliptatin ile İndüklenen Kaspaz-2 ve Kaspaz-7 Aktivasyonunun Gösterilmesi.....	112
4.14. Ouabain ve Oksaliptatinin MCF-7 hücre dizinde PARP Kesilmesi Üzerindeki Etkileri.....	113
4.15. MCF-7 hücrelerinde Ouabain, Oksaliptatin ve Bunların ROCK İnhibitörü Kombinasyonlarının ROCK 1 Lokalizasyonuna Etkisinin Floresan Mikroskopi ile İncelenmesi.....	113
5. TARTIŞMA.....	115
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	123
KAYNAKLAR	125
ÖZGEÇMİŞ	143

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.1. Standart kemoterapötiklerin ve kardiyak glikozitlerin MCF-7 hücrelerindeki IC50 değerleri	83
Çizelge 4.2. Standart kemoterapötiklerin ve kardiyak glikozitlerin MCF-7 hücrelerindeki IC50 değerleri	86



ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. ROCK 1 ve 2'nin fonksiyonel bölgeleri	19
Şekil 2.2. ROCK aktivasyonu	20
Şekil 2.3. ROCK'un substratları ve fonksiyonları	24
Şekil 2.4. Apoptotik yolların şematik gösterimi	31
Şekil 2.5 Kaspazların yapısı	33
Şekil 4.1. MCF-7 hücrelerinde oksaliplatinin konsantrasyon bağımlı sitotoksik etkileri	78
Şekil 4.2. MCF-7 hücrelerinde doksorubisinin konsantrasyon bağımlı sitotoksik etkileri	79
Şekil 4.3. MCF-7 hücrelerinde ouabainin konsantrasyon bağımlı sitotoksik etkileri ..	80
Şekil 4.4. MCF-7 hücrelerinde bufalinin konsantrasyon bağımlı sitotoksik etkileri ..	81
Şekil 4.5. MCF-7 hücrelerinde digoksinin konsantrasyon bağımlı sitotoksik etkileri	82
Şekil 4.6. MDA-MB-231 hücrelerinde ouabainin konsantrasyon bağımlı sitotoksik etkileri	84
Şekil 4.7. MDA-MB-231 hücrelerinde oksaliplatinin konsantrasyon bağımlı sitotoksik etkileri	85
Şekil 4.8. Ouabainin MCF-7 hücrelerindeki sitotoksitesine kaspaz inhibisyonunun etkisi	87
Şekil 4.9. Oksaliplatinin MCF-7 hücrelerindeki sitotoksitesine kaspaz inhibisyonunun etkisi	88
Şekil 4.10. Ouabainin MCF-7 hücrelerindeki sitotoksitesine Rho kinaz inhibisyonunun etkisi	89
Şekil 4.11. Oksaliplatinin MCF-7 hücrelerindeki sitotoksitesine Rho kinaz inhibisyonunun etkisi	90
Şekil 4.12. Kardiyak glikozit ve standart kemoterapötiklerin MCF-7 hücrelerinde tomurcuklu hücre sayısına etkisi	93
Şekil 4.13. MCF-7 hücrelerinde oksaliplatin ve Y27632 ön uygulamasının tomurcuklu hücre sayısına etkisi	95

Şekil	Sayfa
Şekil 4.14. Oksaliplatin uygulanmış MCF-7 hücrelerinde, kaspaz inhibitörü ön uygulamasının tomurcuklu hücre sayısına etkisi	98
Şekil 4.15. Kardiyak glikozit ve standart kemoterapötiklerin MDA-MB-231 hücrelerinde tomurcuklu hücre sayısına etkisi.....	100
Şekil 4.16. Ouabain uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerinde, kaspaz inhibitörü ön uygulamasının tomurcuklu hücre sayısına etkisi	102
Şekil 4.17. MCF-7 hücrelerinde kaspaz inhibisyonunun ouabain ve oksaliplatinin indüklediği hücre ölümü üzerindeki etkisi.....	103
Şekil 4.18. MCF-7 hücrelerinde ouabain, oksaliplatin, digoksin, doksorubisin ve bufalinin indüklediği hücre ölümlerinin ROCK 1 (906-1012 aa.) kesilmesi üzerindeki etkisi.	104
Şekil 4.19. MDA-MB-231 hücrelerinde ouabain, oksaliplatin, digoksin, doksorubisin ve bufalinin indüklediği hücre ölümlerinin ROCK 1 (906-1012 aa.) kesilmesi üzerindeki etkisi.	104
Şekil 4.20. MCF-7 hücrelerinde ouabain ve oksaliplatinin indüklediği hücre ölümünün ROCK 1 (-N terminal ROCK 1 antikoru) kesilmesi üzerindeki etkisi.	105
Şekil 4.21. MCF-7 hücrelerinde ROCK inhibisyonunun ouabainin ve oksaliplatinin indüklediği ROCK 1 kesilmesine etkileri	106
Şekil 4.22. MDA-MB-231 hücrelerinde ROCK inhibisyonunun ouabainin ve oksaliplatinin indüklediği ROCK 1 kesilmesine etkileri.	106
Şekil 4.23. MCF-7 hücrelerinde kaspaz inhibisyonunun ouabainin indüklediği ROCK 1 kesilmesi üzerindeki etkileri	107
Şekil 4.24. MCF-7 hücrelerinde kaspaz inhibisyonunun oksaliplatinin indüklediği ROCK 1 kesilmesi üzerindeki etkileri	108
Şekil 4.25. Rekombinant Aktif Kaspaz-2'nin HeLa, MCF-7, MDA-231 hücrelerinde zaman bağımlı ROCK 1 kesilmesine etkisi	109
Şekil 4.26. MCF-7 hücrelerinde ouabain ve oksaliplatinin indüklediği hücre ölümünün ROCK 2 kesilmesi üzerindeki etkisi.....	109
Şekil 4.27. MCF-7 hücrelerinde ouabain ve oksaliplatinin ERM fosforilasyonuna etkisi	110
Şekil 4.28. MDA-MB-231 hücrelerinde ouabain ve oksaliplatinin ERM ekspresyonuna ve fosforilasyonuna etkisi.....	111

Şekil	Sayfa
Şekil 4.29. HeLa, MCF-7, MDA-231 hücrelerinde kaspaz-3 ekspresyonunun gösterilmesi.	111
Şekil 4.30. Ouabain ve oksaliplatinin MCF-7 hücrelerinde kaspaz-2 aktivasyonuna etkileri	112
Şekil 4.31. Ouabain ve oksaliplatinin MCF-7 hücrelerinde kaspaz-7 aktivasyonuna etkileri	112
Şekil 4.32. Ouabain ve oksaliplatinin MCF-7 hücrelerinde PARP kesilmesi üzerindeki etkileri	113
Şekil 5.1. İnsan Rho kinaz 1 (ROCK 1) aminoasit sekansı (1354 aa.).	118
Şekil 5.2. Oksaliplatin ve ouabain ile indüklenen hücre ölümünün şematize anlatımı ..	120

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. Kardiyak glikozit ve standart kemoterapötik uygulama sonrası MCF-7 hücrelerinin faz kontrast görüntüleri.....	92
Resim 4.2. Rock inhibitörü (Y27632) varlığında ouabain ve oksaliplatin uygulama sonrası MCF-7 hücrelerinin faz kontrast görüntüleri.....	94
Resim 4.3. Kaspaz inhibitörlerinin MCF-7 hücrelerinin morfojik görüntüsü üzerine etkisi	96
Resim 4.4. Oksaliplatin uygulanmış MCF-7 hücrelerinde, kaspaz inhibitörü ön uygulamasının hücrelerin morfojik görüntüsü üzerindeki etkisi	97
Resim 4.5. Kardiyak glikozit ve standart kemoterapötik uygulama sonrası MDA-231 hücrelerinin faz kontrast görüntüleri.....	99
Resim 4.6. Kaspaz inhibitörlerinin MDA-231 hücrelerinin morfolojik görüntüsü üzerine etkisi	101
Resim 4.7. MCF-7 hücrelerine ouabain ve oksaliplatin uygulaması sonrasında ROCK 1 proteinin lokalizasyonu etkileri.....	114

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
A	Alanin
C	Sistein
D	Aspartat
g	Gram
G	Glisin
E	Glutamat
F	Fenilalanin
I	İzolösin
mg	Miligram
ng	Nanogram
L	Litre
M	Molar
ml	Mililitre
Na⁺	Sodyum
nM	Nanomolar
K	Lizin
K⁺	Potasyum
kDa	Kilodalton
KCl	Potasyum Klorür
L	Lösin
NaCl	Sodyum Klorür
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arjinin
S	Serin
T	Treonin

X	Bilinmeyen aminoasit
V	Valin
Y	Tirozin
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar

Kısaltmalar

Açıklamalar

AA	Araşidonik asit
AP-1	Aktivatör Protein 1
APS	Amonyum persülfat
ALS	Amyotrofik lateral skleroz
ATG	Otofaji ilişkili gen
BH3	Bcl-2 homologu
CAD	Kaspaz aktive DNaz
CARD	Kaspaz alım bölgesi
COX-2	Siklooksijenaz -2
DBB	Dijital benzeri bileşik
DD	Ölüm bölgesi
DED	Ölüm efektör bölgesi
DEVD	Kaspaz-3 inhibitörü
DISC	Ölümlle indüklenen sinyalizasyon kompleksi
DNA	Deoksiribonükleik asit
DR	Ölüm reseptörü
ER	Endoplazmik retikulum
ECM	Ekstrasellüler matriks
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ENOS	Endoteliyal nitrik oksit sentaz
ERM	Ezrin-radiksin-moesin proteinleri
FADD	Fas-ilşkili ölüm bölgesi
FAK	Fokal adezyon kinaz

Kısaltmalar**Açıklamalar**

GAP	GTPaz aktive eden protein
GEF	Guanin nükleotid değiştirici faktör
HeLa	İnsan servikal kanser hücresi
HER2	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
IC₅₀	Maksimum inhibisyonun % 50'sini oluşturan ilaç konsantrasyonu
ICE	İnterlökin dönüştürücü enzim
IFN-α	İnterferon alfa
IRS-1	İnsülin reseptör substratı-1
IgG	İmmünglobulin G
KG	Kardiyak glikozit
LPS	Lipopolisakkarit
MCF-7	İnsan meme kanser hücresi
MDA-MB-231	İnsan meme kanser hücresi
MLCP	Miyozin hafif zincir fosfotaz
MOMP	Mitokondri dış membran permeabilizasyonu
NHE1	Sodyum değiş tokuşcusu
PARP	Poli (ADP-riboz) polimeraz
PTEN	Fosfotaz ve tensin homologu
RNA	Ribonükleik asit
ROCK 1	Rho kinaz 1
ROCK 2	Rho kinaz 2
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SMaz	Sfingomiyelinaz
TNF	Tümör nekroz faktör
VAD	Pan-kaspaz inhibitörü
VDVAD	Kaspaz-2 inhibitörü
VEGF	Vasküler endotelial büyüme faktörü

1. GİRİŞ

Kanser tüm dünyada önemli sağlık sorunlarının başında gelmektedir. Türkiye’de 1970’lerde kanser ölüm nedenleri arasında dördüncü sırada yer alırken, günümüzde kardiyak hastalıklardan sonra ikinci sırada yer almaktadır. Çok çeşitli kanser tipleri olmasına rağmen, hepsi anormal hücrelerin kontrol dışı çoğalması ile başlamaktadır. Kanser hücreleri hakkında daha fazla bilgiye sahip olunması ile birlikte yeni tedavi yaklaşımları ortaya çıkmaktadır.

Apoptoz, organizmanın normal gelişimi boyunca homeostazın sağlanması ve hastalıklarda istenmeyen hücrelerin uzaklaştırılması için organizmanın geliştirdiği temel bir biyolojik işlemdir (Kerr, Wyllie ve Currie, 1972). İntrinsik ve ekstrinsik olmak üzere iki temel yolak tarafından kontrol edilen apoptoz, hücre içi veya dışından gelen uyarılara cevaben uygun yolağın tetiklenmesi ile gerçekleşebilir. Her iki apoptotik yolakta da, morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerden sorumlu aspartat spesifik sistein proteazlar olan kaspazlar görev alır. Kanser hücrelerinin çoğunluğu, genetik bir mutasyonla veya proapoptatik faktörlerin inaktivasyonu, antiapoptotik faktörlerin aktivasyonu ile apoptoza direnç geliştirmiş olabilir.

Küçük G proteini Rho ve onun *downstream* efektörü Rho kinaz (ROCK) yolağı ise hücre proliferasyonu, migrasyonu, kontraksiyonu ve apoptoz gibi çok çeşitli fizyolojik ve patolojik olayda yer almaktadır (Ark ve diğerleri, 2004; Ark, Özdemir ve Polat, 2010; Price ve Collard, 2001; Rath ve Olson, 2012). 160 kDa molekül ağırlığına sahip, serin/treonin kinaz etkinlikli ROCK 1 ve ROCK 2, Rho’nun en önemli efektörleridir. ROCK’lar yapısal olarak otoinhibitör etkiye sahiptir. İnaktif halde iken katlanmış yapıda bulunan ROCK’ların karboksi terminal plekstrin homoloji (PH) bölgesi ve Rho bağlanma bölgesi (RBB), kinaz bölgesi üzerine inhibisyon yapar. Enzimin etkinlik gösterebilmesi için inhibitör karboksi terminali ile kinaz bölgesi arasındaki etkileşimin bozulması gerekmektedir. Çeşitli mediyatörlerin karboksi terminaline bağlanması veya inhibitör karboksi terminalinin kesilmesi ile bu etkileşim bozulabilir. Örneğin aktif Rho’nun, ROCK’un karboksi terminalindeki Rho bağlanma bölgesine bağlanması ile veya araşidonik asit gibi lipid mediyatörler plekstrin homoloji bölgesi ile etkileşerek ROCK’u aktive edebilir.

Ayrıca ROCK 1'in karboksi terminalinden kaspaz-3 ile, ROCK 2'nin ise kaspaz-2 ve granzim B ile kesilerek aktive olduğu bilinmektedir (Sapet ve diğerleri, 2006; Sebbagh ve diğerleri, 2001; 2005).

ROCK, apoptozun işlem fazı boyunca meydana gelen, hücre kontraksiyonu, dinamik membran tomurcuklanması (blebilenmesi), apoptotik hücrelerin fragmentasyonu ve apoptotik cisim oluşumunu içeren, birçok morfolojik olayın temel bir düzenleyicisi olarak bilinmektedir. Ayrıca ROCK substratlarının birçoğu hücre ölümü ve canlılığının düzenlenmesinde yer almaktadır.

MCF-7 meme kanseri hücre dizisinde kaspaz-3 geni genomik bir mutasyonla fonksiyonel olarak silinmiştir. Kaspaz-3, apoptozda meydana gelen birçok morfolojik ve biyokimyasal değişiklikten sorumlu en önemli efektör kaspazdır. Bu nedenle birçok çalışma, apoptozun karakteristik özelliklerinden (DNA fragmentasyonu, membran tomurcuklanması (blebilenmesi) gibi) birçoğunun MCF-7 hücrelerinde gözlemlenmediğini söylemektedir. (Reiner ve diğerleri, 1998; Sebbagh ve diğerleri, 2001, Böing ve diğerleri, 2013). Ancak bazı çalışmalarda MCF-7 hücrelerinde apoptoz sırasında DNA fragmentasyonu için kaspaz-3'ün gerekli olmadığı da gösterilmiştir (Gee ve diğerleri, 2002). Bir başka çalışmada ise, MCF-7 hücrelerinde ROCK 1 kesilmesi gösterilmiştir. Ancak bu kesilmenin kaspaz-3 olmadığı için, genel olarak kaspazdan bağımsız bir mekanizma ile kesildiği ileri sürülmüştür (Coudray ve diğerleri, 2005). Walsh ve ark. larının yaptığı bir çalışmada ise eksojen kaspaz-7 uygulaması ile Jurkat hücrelerinde ROCK 1'in kesildiği gösterilmiştir (Walsh ve diğerleri, 2008).

Daha önceki çalışmalarımız sırasında MCF-7 hücrelerinde, çeşitli ajanlarla indüklenen hücre ölümlerinde membran tomurcuklanması olduğunu gözlemledik. Ayrıca bu hücre dizilerinde hücre ölümü ile birlikte ROCK 1'in kesildiğini belirledik. Normalde kaspaz-3 eksprese eden hücrelerde ROCK 1 kaspaz-3 tarafından kesilmekte ve bu şekilde aktif hale gelen enzim apoptotik hücre ölümlerinde görülen membran tomurcuklanmasına neden olmaktadır. MCF-7 hücrelerinde kaspaz-3 eksprese edilmediğinden ROCK 1'in nasıl kesildiği, kesilen ROCK 1'in aktif olup olmadığı ve membran tomurcuklanmasına aracılık edip etmediği tam olarak bilinmemektedir.

Biz de bu tez kapsamındaki çalışmalarla, *i.* Kaspaz-3 bulunmayan MCF-7 hücrelerindeki ROCK 1 kesilmesine kaspaz-3 dışında diğerkaspaz(lar)ın aracılık edip etmediğini, *ii.* ilaçla indüklenen hücre ölümlerinde ROCK'un aktive olup olmadığını ve *iii.* ROCK aktivasyonunun membran tomurcuklanmasına neden olup olmadığını belirlemeyi amaçladık.



2. GENEL BİLGİ

2.1. Kanser

Kanser tüm dünyada önemli sağlık sorunlarının başında gelmektedir. Kanser gelişimine neden olan çevresel ve genetik birçok faktör bulunmaktadır. Hücrelerde kimyasal, fiziksel, biyolojik ve/veya genetik etkenlerin biri veya kombinasyonları ile karsinogenez oluşabilir (Pitot, 1993). Karsinogenez oluşumu üç ayrı aşamaya ayrılabilir: başlangıç, gelişme ve ilerleme. Başlangıç genellikle tek bir gen mutasyonu gibi geri dönüşümsüz genetik değişikliklerden oluşur. Gelişim, başlangıç hücrelerinin artan proliferasyonu ile ilişkilidir. İlerleme ise daha çok genetik mutasyonunun birikimiyle malign ve invaziv fenotip oluşumuna neden olur. Anlaşıldığı üzere kanser çok basamaklı ve çok bileşenli kompleks bir hastalıktır (Martinez, Parker, Fultz, Ignatenko ve Gerner, 2003: 1-50).

İyonize radyasyon, UV radyasyon ve kimyasal birçok ajan normal hücrelerde DNA hasarına sebep olur. Eğer bu DNA hasarı tamir edilemezse mutasyon adı verilen kalıcı değişiklikler oluşur. Kanser, hücrelerin DNA mutasyonları sonucu kontrolsüz bölünüp çoğalması ve zamanla yayılarak metastaz oluşturdıkları bir hastalıktır.

Tümör gelişimi boyunca, spesifik onkogenler tarafından tetiklenen hücre ölümünün bozulması kontrolsüz hücre proliferasyonuna neden olmaktadır (Mayur ve diğerleri, 2013).

İmmün sistemin gözetiminden kaçarak hızla bölünerek çoğalan hücreler bulundukları bölgede farklı kitleler oluştururlar. Zamanla lenf veya kan dolaşımı yolu ile uzak organlara giderek yayılım gösterirler. Kontrolsüz bölünerek çoğalan hücrelerin artan oksijen ve besin ihtiyacı çoğaldıkları bölgede tümör vaskülarizasyonuna (anjyogenez) neden olur (Gupta ve Qin, 2003).

Kanser hücrelerindeki genetik değişiklikler, ‘kanser genlerinin’ iki temel ailesinde tanımlanmıştır: onkogenler ve tümör supresör (baskılayıcı) genler. Onkogenler ile kodlanan proteinler genellikle uyarıcı olarak ve tümör baskılayıcı genler ile kodlananlar ise inhibitör olarak neoplastik fenotipte yer alır. Proto-onkogenlerin mutasyonal aktivasyonu ile oluşan onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerin mutasyonal inaktivasyonu kanser gelişimi için gereklidir. Proto-onkogen mutasyonlarının neredeyse hepsi somatiktir. Bilinen üç istisna

RET, MET ve CDK4 proto-onkogenleridir ve mutasyonları sırasıyla çoklu endokrin neoplazi tip 2, papiller böbrek kanseri, kalıtsal melanoma hastalıklarının nesiller boyunca aktarılmasına neden olabilir. Tümör baskılayıcı gen mutasyonları ise kalıtsal veya somatik oluşabilir (Olah, 2005).

2.1.1. Kanser hücrelerinin karakteristik özellikleri

KontROLSÜZ PROLİFERASYON

Kemik iliği ve gastrointestinal sistemde bulunan sağlıklı hücreler sürekli hızlı bir şekilde bölünme özelliğine sahiptir ve genellikle geçerli olan kanser hücrelerinin proliferasyon hızı normal hücrelerden yüksektir. Olgusu bu hücreler için doğru değildir. Yani bazı kanser hücreleri normal hücrelerden daha hızlı çoğalırken bazıları daha yavaş çoğalmaktadır. Bu noktada önemli olan kanser hücrelerinin normal olarak düzenlenen hücre bölünmesi ve doku büyümesi mekanizmasından kurtulmasıdır. Peki tümör hücrelerinin kontrollsüz proliferasyonuna yol açan değişiklikler nelerdir? Tümör supresör genlerin inaktivasyonu veya proto onkogenlerin onkogenlere dönüşümü hücrede büyümenin bağımsızlaşması ve birçok hücresel sistemde değişiklik kontrollsüz proliferasyona neden olmaktadır (Range, Dale, Ritter, Flower, ve Henderson, 2012: 674).

APOPTOZA DİRENÇ

Apoptoz programlı hücre ölümüdür, ve antiapoptotik genlerdeki genetik mutasyon kanser için ön koşuldur. Proapoptatik faktörlerin inaktivasyonu veya antiapoptotik faktörlerin aktivasyonu ile apoptoza direnç gelişmiş olabilir.

Ancak apoptotik hücreler uzun süre önce kanserde gözlenmiştir. Bu durum, yüksek mitotik orana sahip olmalarına rağmen, bazal hücreli cilt kanserlerinin neden yavaş büyüme hızına sahip olduklarını açıklamaktadır (Kerr, Wyllie ve Currie, 1972). Işınlanmış ve sitotoksinler uygulanmış tümörlerde artan apoptoz oranı, kanser tedavisinde apoptozun indüklenebileceğini göstermektedir (Searle, Lawson, Abbott, Harmon ve Kerr, 1975).

Ancak, apoptozda başarısızlığın kansere neden olduğu çok sonra anlaşılmıştır. Bir hücre ölüm inhibitör proteini olarak kodlanmış olan ve genellikle foliküler lenfomalarda yerleşmiş olan bcl-2 geninin keşfinin ardından açığa çıkmıştır (Vaux, Cory ve Adams, 1988). Bcl-2

doku kültürü hücrelerinde eksprese edildiğinde, çeşitli ilaç ve toksinler uygulandığında sadece apoptozdan korumazlar aynı zamanda hücrelerde çoklu ilaç direnci fenotipine de neden olurlar (Strasser, Harris ve Cory, 1991). Bu durum bcl-2 gibi apoptoz inhibe edici genlerin sadece tümör gelişiminde bir role sahip olmadığını aynı zamanda tedaviye yanıtı da belirlediği göstermektedir. Ancak tek başına apoptozun inhibisyonu kansere neden olmaz. Bcl-2 ile apoptozun inhibisyonuyla birlikte c-myc gibi geleneksel bir büyümeyi uyarıcı onkogen aktivasyonu hızla kanser gelişimine neden olabilir (Strasser, Harris, Bath ve Cory, 1990).

Telomeraz ekspresyonu

Telomerler kromozomların sonlarında bulunan ve kromozomları nükleotik parçalanmalardan, istenmeyen kromozom uçlarının birleşmesinden koruyan özelleşmiş yapılardır. Her hücre bölünmesinde telomerler 50-150 baz çifti kısılır ve zamanla fonksiyonunu kaybeder. Bu noktada DNA replikasyonu sona erer ve hücreler senesent (yaşlanmış) olur.

Kök hücre, kemik iliği, gastrointestinal sistemin epitel hücreleri ve kanser hücreleri gibi hızlı olarak bölünün hücreler telomeraz eksprese ederler. Telomeraz, telomerleri oluşturan ve koruyan bir enzimdir. Tamamen farklılaşmış somatik hücrelerin çoğunda bu enzim bulunmazken, son aşama malign tümörlerin %95'i bu enzimi eksprese etmektedir. Bu da kanser hücrelerinin ölümsüzlüğünü açıklamaktadır (Cong ve Wright, 2002).

Tümörle ilişkili kan damarlarının kontrolü

Kontrolsüz proliferasyon ile büyüyen tümörler 1-2 mm çapına kadar difüzyon ile besinleri alabilirler ancak daha fazla büyüdüklerinde yeni kan damarlarının oluşumu (anjyogenez) gereklidir. Anjyogenez büyüyen tümör ile oluşan büyüme faktörlerine cevaben meydana gelmektedir.

Anjyogenez, önceden mevcut damarlardan yeni kılcal kan damarlarının oluşmasıdır. Sadece hamilelik, organ gelişimi, menstrüel siklus ve yara iyileşme gibi normal fizyolojik koşullarda yer almaz, aynı zamanda tümör gelişimi, invazyon ve metastaz gelişiminde önemli rol oynamaktadır (Vives ve diğerleri, 2013).

Fizyolojik anjiyogenezin gelişmesinin bir sonucu olarak oluşan fonksiyonel yeni kan damarları düzenlidir ve damar ağı tam bir arteriovenöz farklılaşmaya sahiptir. Karsinogenez durumunda ise olgunlaşmamış çok sayıda düzensiz yeni kan damarlarının oluşumu gözlenmektedir.

Aynışma ve fonksiyon kaybı

Farklılaşmamış kök hücrelerin bölünmesiyle oluşan kardeş hücreler bölünmeye devam ederken zamanla olgunlaşarak ilgili dokunun olgun hücrelerini oluştururlar ve programlanmış fonksiyonlarını yerine getirmeye hazırdırlar. Örneğin, fibroblast olgunlaştığında salgı yapar ve ekstrasellüler matriksi düzenler, olgun kas hücreleri kasılabilir. Kanseri hücrelerinin temel özelliklerinden biri farklı derecelerde aynışmalarıdır. Genel olarak, daha az farklılaşmış kanserler daha hızlı ve kötü bir seyre sahiptir (Hanahan ve Weinberg, 2000).

İnvazivlik

Normal hücreler genel olarak oluşturdukları dokunun dışında bulunmazlar. Bunun nedeni ise, doku veya organ büyümesindeki farklılaşma boyunca, normal hücreler ortamla ilişkili olarak birlikte gelişirler. Apoptozdan koruyucu çeşitli dokulara spesifik yaşama faktörleri ile hücreler arası ilişkinin korunması sağlanır. Böylece yanlışlıkla ortamdaki uzaklaşan herhangi bir hücre yaşama sinyallerini kaybeder ve ölür.

Örneğin, rektumun normal mukozal epitelindeki hücreler tahrip olmalarına rağmen devamlı olarak çoğalarak, epitel düzenini korurlar. Rektal mukozada bir kanser hücresi ise rektumda oluşan diğer dokuları ve özellikle pelvik organlarındaki diğer dokuları istila eder. Kanseri hücreleri fonksiyonlarını kaybetmekle kalmayıp mutasyon yoluyla normal hücrelere etki ederler ve enzim (metalloproteinazlar) salgılayarak ekstrasellüler matriksi bozup hareket edebilirler (Fidler, 1978).

Metastaz

Primer tümörlerin bulundukları dokudan ayrılarak kan damarları veya lenfatik sistem ile başka bir bölgeye taşınmasıyla oluşan sekonder tümörlerdir. Birçok kanserde ölümün temel sebebi metastaz olmakla birlikte kanser tedavisindeki temel problemlerden biridir. (Hanahan ve Weinberg, 2011)

2000’li yılların başlarında, invazyon ve metastaz altında yatan mekanizmalar büyük ölçüde bilinmemekteydi. Epitel doku karsinomları patolojik olarak yüksek derecede maligniteye sahip olduklarında gösterdikleri lokal invazyon ve uzak metastaz, kanser hücrelerinin hem şekillerinin hem de diğer hücelere ve ekstrasellüler matrikse tutunma özelliklerinin değişmesi ile ilişkilidir. En iyi karakterize edilmiş değişiklik, bir hücre-hücre tutunma molekülü olan e-kaderinin kanser hücreleri tarafından kaybını içerir. Bitişik epitel hücreleri ile adherens kavşak oluşturulmasıyla, e-kaderin epitel hücrelerinin hareketsiz olarak bir arada tutulmasına yardımcı olur. E-kaderin ekspresyonunun azalması ile invazyon ve metastaz artarken, ekspresyonunun artması invazyon ve metastaza antagonistik etki yapmaktadır (Cavallaro ve Christofori, 2004).

2.1.2. Kanser tedavisinin genel prensipleri

Hızla çoğalan lösemi trasplante edilmiş farelerde, malign hücrelerin büyük bir kısmının, sitotoksik ilacın terapötik dozu ile tahrip edildiği gösterilmiştir. Böylece, bu doz hücrelerin %99.99’nu öldürmüştür, eğer bu tümörde 10^{11} hücre olsaydı, hala 10 milyon (10^7) malign hücre canlı kalmış olacaktı. Aynı prensiple hızlı çoğalan tümör bulunan insanlarda, kemoterapi uygulaması ile olabildiğince total hücrenin tamamına yakını tahrip edilemeye çalışılmaktadır. Geri kalan kanserli hücelere karşı savaşta immünolojik savunma mekanizmaları düşünülmektedir.

Kanser tedavisindeki önemli zorluklardan biri de kanser bulgularının çok geç ortaya çıkmasıdır. Bir tümör tek bir hücreden oluşmakta ve eksponensiyel (2^n) olarak çoğalmaktadır. Kanser hücrelerinin ikiye katlama süresi kanser türüne göre değişiklik göstermektedir. Örneğin; Burkitt's lenfoma yaklaşık 24 saatte, bazı lösemiler 2 haftada, meme kanserleri 3 ayda ikiye katlanmaktadır. Genellikle yaklaşık 30 katlamada, 2 cm çapında bir hücre kitlesi oluşmaktadır ve 10^9 hücre içermektedir. Ancak böyle bir tümör tanı

sınırları içerisinde kolaylıkla fark edilmektedir. Bunun üzerine bir 10 katlanma sonucu hücre sayısı 10^{12} ulaşacaktır ve ölümcül olması muhtemel tümör kitlesi haline dönüşecektir.

Ancak bu şekilde eksponensiyel olarak çoğalma her kanser hücresinde meydana gelmemektedir. Katı (solid) tümörlerde; akciğer, mide, uterus gibi, büyüme hızı lösemilere göre azalmaktadır. Çünkü kandan hücreler yeterince faydalanamamaktadır. Böylelikle tüm tümörler sürekli çoğalmaya devam etmemektedir. Bu durum 3 sınıf hücre ile açıklanmaktadır:

Bölüm A, bölünen hücreleri içermektedir ve çoğunlukla hücreler hücre siklusunda bulunmaktadırlar.

Bölüm B, dinlenme fazındaki hücreleri içerir. Genellikle bölünmeyen ancak bölünme potansiyeline sahip hücrelerden oluşur.

Bölüm C, bölünmeyen ancak tümör hacmine katkıda bulunan hücrelerden oluşur.

Bölüm A'daki hücreler genel sitotoksik ilaçlara cevap vermekteyken, B'deki hücreler bu ilaçlara daha dirençlidir. Bölüm C'dekiler ise tedavi için bir sorun teşkil etmemektedir. Kansere karşı kullanılan çoğu ilaç çoğalmayı (DNA hasarı oluştururlar böylece apoptozu indüklerler) önleyicidir. Bu etkileri nedeniyle sağlıklı hücreleri de etkilerler ve kemik iliği baskılanması, yara iyileşmesinin gecikmesi, saçlarda dökülme, çocuklarda büyümenin baskılanması, kısırlık ve teratojeniteye neden olurlar (Range, Dale, Ritter, Flower, ve Henderson, 2012: 676).

2.1.3. Antikanser ilaçların sınıflandırılması

Son 50 yılda kanser tedavisindeki uygulamalar oldukça gelişmiştir. Testis kanseri, lösemi gibi tedavi edilemez kanser türleri için yeni tedavi yöntemleri bulunmuştur. Cerrahi, radyoterapi, endokrin tedavisi eski yöntemler olmalarına rağmen hala kanser tedavisinde yaygın kullanıma sahiptir. Bunların dışında kemoterapi, transplantasyon ve adjuvan terapi kanser tedavisinde kullanılmaktadır.

Kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar temel olarak aşağıdaki genel kategoriler altında gruplandırılmaktadırlar:

Sitotoksik ilaçlar

Alkilleyici ajanlar: Alkilleyici ajanlar nükleofilik bölge içeren diğer moleküllere, özellikle DNA, RNA ve çeşitli enzimlere kovalent bağlar ile alkil gruplarını aktararak sitotoksik etki gösterirler. DNA sentezinin inhibisyonu, RNA ve protein sentezini inhibe etmek için gerekli olan konsantrasyondan daha düşük olan ilaç konsantrasyonlarında meydana gelmektedir. Hücrede makro moleküllerde ve düşük molekül ağırlıklı bileşenlerde bulunan sülfidril, amino, fosfat, hidroksil, karboksil grupları alkilasyon için nükleofilik hedeflerdir. DNA'da genellikle guaninin N7 ve O6 atomlarını, adenin N1 ve N3, sitozinin N3 atomlarını alkilerler. Bu grup antikanser ilaçların en geniş sınıfını oluşturmaktadır. nitrojen hardallar (mekloreteamin, siklofosfamid), alkil sülfonatlar (bisülfan) , nitrozürelere (karmustin, streptozosin), etileniminler ve metileniminler (altreamin, tiyotepa), triazenler (dakarbazin, temolozomid) olmak üzere (Swift ve Golsteyn, 2014) beş alt grupta incelenmektedir.

Antimetabolitler: Nükleotit, vitamin, aminoasit gibi hücrede doğal olarak bulunan bileşiklere yapısal olarak benzemektedirler. Enzimlerin aktif bölgeleri için doğal substratlar ile yarışır veya doğrudan DNA veya RNA'ya bağlanarak hücre büyümesi ve proliferasyonunu etkilerler.

Folik asit antagonistleri: metotreksat, folik asiti tetrahidrofolata dönüştüren dihidrofolat redüktaz enzimini kompetitif olarak inhibe eder. Böylece timidilat ve pürin biyosentezinin bozulması aracılığıyla DNA sentezi inhibe olmaktadır.

Pürin analogları: DNA veya RNA ile direkt etkileşerek pürin nükleotitlerinin biyosentezini inhibe ederler. 6-tiyoguanin, 6 - merkaptopurin bu grubun üyelerindendir.

Pirimidin analogları: DNA sentezini inhibe ederler. Sitarabin kompetitif olarak DNA polimerazı inhibe ederek S- fazındaki hücreleri öldürmektedir. 5- fluorourasil ise timidilat sentez enzimini inhibe eder. S ve G1 fazında aktiftir(Longley, Harkin ve Johnston, 2003).

Sitotoksik antibiyotikler: DNA ve RNA sentezini inhibe ederler. İlk üyelerden olan daktinomisin (aktinomisin D) DNA'ya bağlanarak DNA polimeraz özellikle de RNA polimerazın transkripsiyon yapmasını engeller. Doksorubisin ve daunorubisin ise DNA iplikleri arasına girerek transkripsiyonu ve replikasyonu etkiler. Daha önemli etkisi ise DNA

ve topoizomeraz enzimi ile kompleks oluşturarak DNA sarmalının oluşmasını engellemektir. Bleomisin DNA kırıklarına sebep olmakta böylece DNA, RNA ve protein sentezini bozmaktadır.

Bitkisel kaynaklı bileşikler: Bitkisel kaynaklı bileşikler vinka alkoloitleri (vinkristin, vinblastin, vinorelbin), epipodofilotoksinler (etoposet, teniposet) ve taksanlar (paklitaksel) olmak üzere üç alt sınıftan oluşmaktadır. Vinka alkoloitleri; tubuline bağlanarak metafazda siklusun durmasına neden olurlar. Böylece hücre bölünmesi tamamlanamaz. Etoposet, popfilitoksinin yarı sentetik türevidir, topoizomeraz II enzimi ile kompleks oluşturarak DNA'da tek zincir kırılmalarına neden olur. Paklitaksel, tubulin dimerlerine ve mikrotubulin filamentlerine bağlanıp onları stabilize ederek mitozun bozulmasına neden olur (Pezzuto, 1997).

Hormonlar

Hormona duyarlı dokularda (meme, prostat, uterus gibi) gelişen tümörlerin tedavisinde kullanılırlar. Tümörün büyümesini hormon olarak ters etki ile, hormon antagonistleri veya endojen hormon sentezini inhibe eden ajanlar ile inhibe edebilirler. Hücre siklusundan ziyade hücre proliferasyonu ve farklılaşması esnasında etkilidirler.

Glukokortikoidler: prednizolon ve deksametazon lenfosit proliferasyonunu inhibe ederler. Lösemi ve lenfomalarda kullanılırlar.

Östrojenler: dietilstilbestrol ve etinilestradiol androjen bağımlı prostatik tümörlerin pallatif tedavisinde kullanılırlar.

Antiöstrojenler: tamoksifen, endojen östrojen ile yarışarak östrojen reseptörlerine bağlanarak östrojen duyarlı genlerin transkripsiyonunu inhibe ederler.

Gonadotropin salıverici hormon analogları: Goserelin, buserelin, triptorelin gonadatropin salınımını inhibe eder. Premenopoz kişilerde meme kanserinde ayrıca prostat kanserinde kullanılırlar.

Adrenal hormon sentez inhibitörleri: Trilostan ve aminoglutetimid seks hormonların sentezini inhibe eder. Postmenopozol meme kanserinin tedavisinde kullanılırlar.

Monoklonol antikorlar

Kanser hücrelerinde genellikle dokuya özgü üretilen reseptör sayısı artmıştır. Bu reseptörleri ve büyüme faktörlerini hedef alan monoklonal antikorlar klinik uygulaması en fazla olan kanser immünoterapi uygulamasıdır.

Monoklonal antikorlar farelerin spesifik antijenlerle aşılmasına ve B lenfositlerle myeloma hücrelerinin hibridoma oluşturmasıyla üretilirler. Meme, akciğer kanseri, kolorektal kanser, melanoma, çeşitli lenfoma ve lösemilerde kullanılan en az 12 adet monoklonal antikor bulunmaktadır. Monoklonal antikorların hedefleri; epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) gibi büyüme faktörlerini veya kanser hücrelerine özgü bulunan antijenleri hedef alırlar.

Monoklonal antikorların kanser hücrelerine etkisi üç temel mekanizma ile gerçekleşmektedir. Bu mekanizmalar, 1) kanser hücrelerinin bölünme ve anjiyogeneze kullandıkları sinyal yollarını harekete geçiren faktörlerin ve reseptörlerin antikor bağlanmasıyla inhibe edilmesi, 2) antikora bağlı hücrel sitotoksisteyi ve 3) komplement aktivasyonu ile komplemente bağlı sitotoksisteyi içermektedir. Klinikte kullanılan başlıca monoklonal antikorlar olan; panitumumab, setuksimab, matuzumab EGFR'ye; anti-VEGF monoklonal antikor ve bevasizumab büyüme faktörüne ve trastuzumab HER2' ye bağlanarak etkilerini gösterirler (Houghton ve Scheinberg, 2000).

Protein kinaz inhibitörleri

Protein kinazlar, sinyal iletimi yoluyla birçok proteinin fosforilasyonunu/aktivasyonunu sağlarlar. Hücrede membranda ve sitoplazmada olmak üzere tirozin kinazlar iki farklı yerleşim göstermektedirler. Bu proteinler, katalitik özelliklerine göre (fosforilasyona uğrayan aminoasit türü) tirozin ve serin/treonin kinazlar olarak da sınıflandırılır. Membranda bulunan protein kinazlara reseptör protein kinazlar adı verilir. Bu reseptörlerden bazıları; insülin reseptörü, büyüme faktörleri (EGF, VEGF, PDGF, FGF, NGF) reseptörleri ve efrin reseptörleri (EphA, EphB)'dir. Sitoplazmik protein kinazlar arasında ise Src, Abl, fokal adezyon kinazı (FAK) ve "Janus Family Kinases (JAK)" proteinleri yer almaktadır.

Protein kinazlar dört farklı mekanizma ile onkojenik değişime yol açabilir

1. Protoonkogenin retroviral transdüksiyonu,
2. Genomik rearanjmanlar,
3. Fonksiyon kazanma mutasyonları,
4. Protein kinazın aşırı sentezlenmesi (Doğan ve Güç, 2004).

İmatinib, Bcr/Abl onkojenik sitoplazmik kinazlarını inhibe eder. Bu kinazlar kronik miyeloid löseminin oluşumunda temel etken olarak düşünölmektedirler. İmatinib gibi, protein kinazları inhibe ederek spesifik onkojenik kinazların inhibisyonu ile büyüme faktörlerinin sinyalizasyonunu inhibe eden başka ajanlar da bulunmaktadır. Örneğin dasatinib ve nilotinib bcr-abl kinazı, erlotinib EGFR kinazı, sunitinib ise bir çok kinazı inhibe etmektedir (Range, Dale, Ritter, Flower, ve Henderson, 2012: 684-5).

2.1.4. Yeni tedavi yaklaşımları

Aşağıda bahsedilecek olan immünoterapi, gen terapisi ve diğer yeni ilaçların gelişimi kanser tedavisi açısından çok değerli görölmüşür. Ancak bu ilaçların gelişimi, onlardan beklenen tedaviyi karşılamaya yeterli olmamıştır. Kanser tedavisindeki gelişmelere bakıldığında, 1980’lerde keşfedilen insan onkogenleri ve tümör supresörlerinin çoğu 1990’larda sadece tanımlanabilmiştir. Bunların çoğunun etkileri ve etkileşimleri tam olarak bugüne kadar anlaşılamamıştır.

Kanser tedavisinde başka bir yaklaşımsa, yeni ilaç geliştirilmesindense, hastalıktan korunma ve erken teşhisin önemidir. Tedavi gelişiminin daha erken aşamalarında, çok çeşitli ve karmaşık kabul edilen insan kanserlerinin moleküler biyolojisinin anlaşılması esas alınmıştır. Terapötik metotların, radyasyon ve sitotoksik ilaçların nitelikleri ve farklı tedavi türlerinin kombinasyonları daha iyi anlaşılmıştır. Örneğin, onkolitik virüslerle gen terapisi ile sitotoksik kemoterapi kombine edilmiştir. Aslında hem ‘geleneksel’ hem de ‘yeni’ tedavi yaklaşımları birleştirilerek, her hastanın farklı özelliklerinin göz önüne alındığı bireysel terapi yaklaşımı başlamış bulunmaktadır.

İmmünoterapi

İmmünoterapi tartışmasız kanser tedavisinin en önemli kavramlarından biridir. Tedavinin temeli vücudun kendi kaynaklarının kansere karşı kullanılmasıdır. Ayrıca, farklı çalışmalar immünoterapinin kanserin gelişimini ilk etapta önleyebildiğini göstermiştir. Bunu kanıtlayan bazı durumlar sınıflandırılmıştır: 1- Çeşitli lenfomalar, lösemiler, sarkomalar, cilt kanserleri ve servikal kanserler, AIDS hastaları gibi immün yetersizliği olan hastalarda sıklıkla görülmektedir. 2- İnterlökinler ve interferonlarla immün reaksiyonun uyarılması birçok kanserin (kronik miyeloid lösemi, metastatik renal karsinomlar) tedavisinde kullanılmaktadır. 3- Hematopoetik öncü hücrelerin nakli ile kök hücre tedavisi bir graft-tümör reaksiyonu ile lösemilere ve bazı katı tümörlere karşı aktif olduğu düşünülmektedir. 4- kendiliğinden kaybolmuş bir kaç kanser vakası ise genellikle başarılı immunoterapiye atfedilmektedir.

Birçok kanser hastasında kanser-spesifik antijenlere antikorların ve kanser hücrelerine karşı T hücrelerinin yöneldiği görülmüştür. Hatta bu tür antikorların belirlenmesi kanser teşhisi için kullanılmaktadır. Tümör dokusu çoğunlukla immün hücreler, makrofajlar, nötrofiller ve tümör hücresi antijenlerine karşı spesifite gösteren sitotoksik T-hücrelerini içermektedir.

Ancak, spontan immün yanıt tüm kanser türlerine karşı oluşmamaktadır. İleri evredeki kanserlerde, hastanın immün sistemi sadece tümör kitlesinin vücuda yayılmasının üstesinden gelebilir. Kanser gelişiminin erken evrelerinde bile, ancak hastanın kansere immün yanıtı genellikle yetersizdir. Kanser hücreleri TGFβ1 sekresyonu, FAS regülasyonunda azalma veya antijen peptit oluşumunun ve kanser hücre yüzeyinde ko-aktivatör proteinlerin azaltılması gibi çeşitli mekanizmalar ile immün yanıtı kaçarlar.

İmmünoterapi, hastanın immün sistemindeki anti-tümör cevabı etkili bir şekilde engelliyorsa, başarılı olabilir. Yayınlanmış bazı yeni immünoterapiler şunlardır: IL-2, IFNα gibi sitokinlerin uygulanması ile sitotoksik T hücrelerinin aktivasyonu, adjuvant tedavi (BCG) ile endojen immün cevabın uyarılması, tümör antijenlerine karşı aşılama ile anti-tümör T-hücreleri ve B- hücrelerinin oluşumunun ve yayılımının artması, dendritik hücrelerde bulunan tümör antijenlerinin dışarıdan uygulanması ile T-hücrelerinin aktivasyonu, tümör virüslerine karşı aşılama ile erken evrelerde kanserden korunma veya kanserin yok edilmesi (Schulz, 2005; 486-7).

Anjiyogenez ve metalloproteinaz inhibitörleri

Tümör hücreleri, tümör büyümesini ve normal dokulara invazyonu ve metastazı kolaylaştıran metalloproteinazları ve anjiyojenik faktörleri üretir. Bu mekanizmanın hedefi kullanılan ilaçlar ile metastazın önlenmesidir.

Anjiyogenez birçok kanserin büyümesinden metastazına kadar önemli bir basamaktır. Bu açıdan tedavi için mükemmel bir hedef olarak görülmektedir. Anjiyogenezdeki çoğalan hücreler çoğunlukla normal endotelial hücrelerdir ve genomik stabiliteden yoksundurlar. Bu nedenle gerçek kanser hücreleri dışında tedaviye direnç daha az olasıdır. Birçok anjiyogenez inhibitörü, endostatin ve anjiyostatin benzeri fizyolojik anjiyogenez inhibitörü, VEGFA veya VEGF reseptörlerine karşı antikolar ve VEGFR, PDGFR ve FGFR tirozin kinazlarının kimyasal inhibitörleri klinik çalışmalarda kullanılmaktadır (Falm, 2004).

Siklo-oksijenaz inhibitörleri

Güçlü epidemiyolojik ve deneysel kanıtlar, siklo-oksijenaz inhibitörlerinin kronik kullanımının gastrointestinal ve olasılıkla diğer bölgelerdeki kanserlere karşı koruyucu olduğunu göstermektedir. COX-2 (siklooksijenaz-2) izoformu kanserlerin yaklaşık %85'inde aşırı miktarda sentezlenmektedir ve bu kaynaktan oluşan prostanooidler hücrelerin apoptotik ölümden kaçmasına olanak sağlayan sinyalizasyon yolağını aktive edebilir. COX-2 inhibitörü selekoksib memeli modellerinde meme ve gastrointestinal kanser insidansını azaltmıştır ve var olan tümörlerin gerilemesini sağlamıştır. Böylece, COX-2 inhibisyonu antikanser ilaç gelişimi için potansiyel olarak yeni bir ilaç hedefi olarak görülmektedir.

Antisens oligonükleotitler

Antisens oligonükleotitleri, gen ekspresyonunun inhibe edebilen spesifik mRNA kodlayan tek zincirli DNA'yı tamamlayan sentetik sekanslardır. Bir antisens ilaç olan, augmerosen, anti-apoptotik faktör Bcl-2'yi down-regüle etmektedir. Erken klinik çalışmalarda, bu ilaç standart antikanser ilaçlara karşı malign melonomaları duyarlılaştırmaktadır.

Gen terapisi

Tasarlanmış genler, antisense oligonükleotitler veya siRNA'ler gen terapisi amacıyla kullanılmaktadır ve kanser hücrelerine seçici toksisite açısından geleneksel yaklaşımlara karşı büyük bir avantaja sahiptirler. Ancak hedef hücrelere bu genlerin (p53 veya büyüme faktörü antisense DNA gibi) ulaşımı gibi birçok teknik problem henüz çözülememiştir. Bazı makul başarılar elde edilse de bu konuda klinik çalışmalar devam etmektedir.

Çoklu ilaç kullanımına karşı oluşan direncin geri çevrilmesi

Birçok toksik olmayan ilaç (verapamil gibi) P-glikoproteinleri inhibe ederek çoklu ilaç kullanımı ile oluşan direnci geri çevirebilir. Bu etkiyi gösteren diğer ilaçlar araştırılmaktadır. Ayrıca, antikorların, immünotoksinlerin, antisens oligonükleotitlerin veya lipozom ile çevrelenmiş ajanların kullanımı çoklu ilaç direnci olan hücrelerin azaltılmasında faydalı olabilir. (Range, Dale, Ritter, Flower, ve Henderson, 2012: 687).

2.2. Küçük G Proteinleri ve Rho/Rho Kinaz Yolağı

2.2.1. Küçük G proteinleri

Küçük G Proteinleri süper ailesinin yüzün üzerinde üyesi bulunmaktadır. Bunlar yapısal benzerliklerine göre 5 alt aileye sınıflandırılmıştır. Bunlar; Ras ailesi GTPazları (Ras, Rap ve Ral...), Rho ailesi GTPazları (Rho, Rac, cdc42), Arf ailesi GTPazları (Arf1-Arf6, Arl1-Arl7 ve Sar), Rab ailesi GTPazları (60'tan fazla üyesi bulunmaktadır, örneğin Rab5) ve Ran ailesi GTPazlarıdır. Küçük GTPazlar molekül ağırlığı 20-30 kDa aralığında olan monomerik G proteinleridir. Genel olarak, Ras ailesi GTPazları hücre sinyalizasyonunu düzenlerken gen transkripsiyonunda değişmelere de neden olmaktadır. Rho ailesi GTPazlarının temel fonksiyonu ise aktin hücre iskeletinin düzenlenmesidir, ayrıca gen transkripsiyonu üzerinde de etkileri bulunmaktadır. Rab ve Arf ailesi GTPazları hücrenin farklı membran kompartmanları arasındaki veziküler trafiğin oluşum, füzyon ve hareketinden sorumludur. Ran GTPazları ise hem mikrotübül organizasyonunu hem de nükleositoplazmik protein transportunu düzenlemektedir (Bhattacharya, Babwah ve Ferguson, 2004).

2.2.2. Rho/ Rho kinaz yolağı

Rho temel olarak hücre iskeletinin düzenlenmesinde görev alsa da tümör hücrelerinin oluşumu, gelişimi ve migrasyonunda da önemli rollere sahip olduğu gösterilmiştir. Rho ailesi GTPazları ise hücre siklusunun ilerlemesi, gen ekspresyonu ve aktin hücre iskeletinin kontrolü gibi birçok farklı biyolojik olayın düzenlenmesinde yer almaktadır (Takai ve diğerleri, 2001). RhoA, Rac1 ve Cdc42 bu ailenin en çok çalışılan üyeleridir (Coleman, Marshall ve Olson, 2004). GTP ile bağlandığında, bu proteinler hücre sinyalizasyonunda yer alan ve biyolojik cevaplara aracılık eden down stream efektörlerini aktive veya inaktive ederler. (Croft ve Olson, 2006). RhoA ve RhoC birçok efektör proteini aktive etmektedir. Serin treonin kinaz olan ROCK 1 (ROCK β) ve ROCK 2 (ROCK α veya Rho kinaz) Rho'nun en önemli *downstream* efektörlerindendir (Riento ve Ridley, 2003). Rho-GTP tarafından aktive edildikten sonra ROCK, LIM kinaz 1 (LIMK1), LIMK 2, miyozin hafif zincir (MLC2) ve ERM gibi birçok substratı fosforillemektedir. Bu fosforilasyon olayları boyunca, ROCK filamentöz aktin stabilizasyonu ve artmış miyozin ATPaz aktivitesini düzenlemektedir. Böylece aktin miyozin stress liflerinin ve integrin içeren fokal adezyonların oluşumuna yol açmaktadır (Leung, Chen, Manser ve Lim, 1996; Uehata ve diğerleri, 1997)

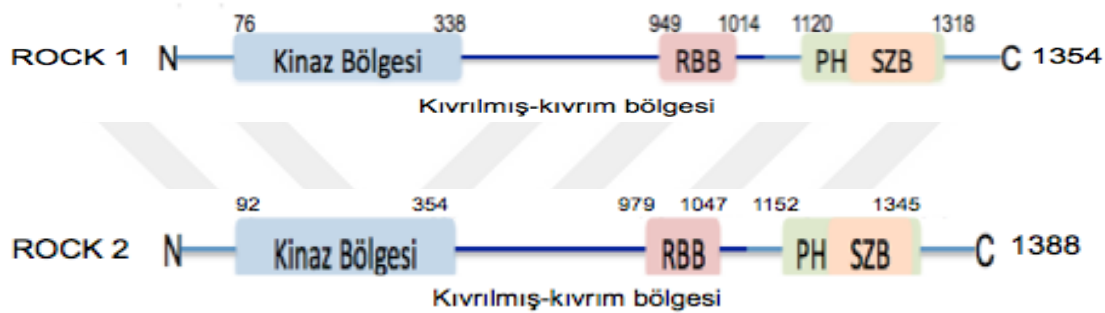
ROCK'un yapısı

İnsanlarda, ROCK 1 ve ROCK 2 sırasıyla 18. (18q11.1) ve 2. (2p24) kromozomlarda yer almakta ve her iki Rho kinaz da 33 ekson içermektedir. ROCK 1 1354 aminoasitten oluşurken, ROCK 2 1388 aminoasitten oluşmaktadır ve molekül ağırlıkları yaklaşık 160kDa'dur (Julien ve Olson, 2014). Bu iki ROCK homologu primer aminoasit sekanslarında %64, kinaz bölgelerinde %92 ve kıvrılmış-kıvrım bölgesinde %55 benzerlik göstermektedir (Nakagawa ve diğerleri, 1996).

ROCK'lar da kinaz bölgelerinin amino (-N) terminal ve karboksi (-C) terminal uzantıları katalitik aktivite için esansiyeldir. ROCK'ların katalitik aktiviteden sorumlu kinaz bölgeleri N terminalinde bulunmaktadır ve bunu yaklaşık 600 amino asitten oluşan amfipatik α heliks yapısındaki kıvrılmış kıvrım bölgesi takip etmektedir (Samuel ve Olson, 2010). Karboksi terminal bölgesinde, plekstrin homoloji (PH) bölgesi bulunmaktadır ve sisteince zengin çinko parmak benzeri motif alanı ile (CRD) iki kısma ayrılmıştır. Devamında Rho bağlayıcı

bölge (RBB) bir paralel kıvrılmış kıvrım dimerinden oluşmaktadır ve özellikle GTP bağlı aktif RhoA ve RhoC ile bağlanmaktadır (Dvorsky, Blumenstein, Vetter ve Ahmadian, 2004).

Kristal yapı çalışmalarında ROCK'un iki dimerizasyon bölgesine sahip olduğu açığa çıkarılmıştır: yaklaşık 70 rezidümlük N-terminal dimerizasyon bölgesi ve kıvrılmış kıvrım helikal bölgesi. Kıvrılmış kıvrımdaki rezidümler, N-terminal kinaz bölgesi ile C-terminal inhibitör bölge arasındaki etkileşime neden olarak N-terminalinin katalitik aktivitesinin inhibisyonuna neden olmaktadır (Blumenstein ve Ahmadian, 2004).

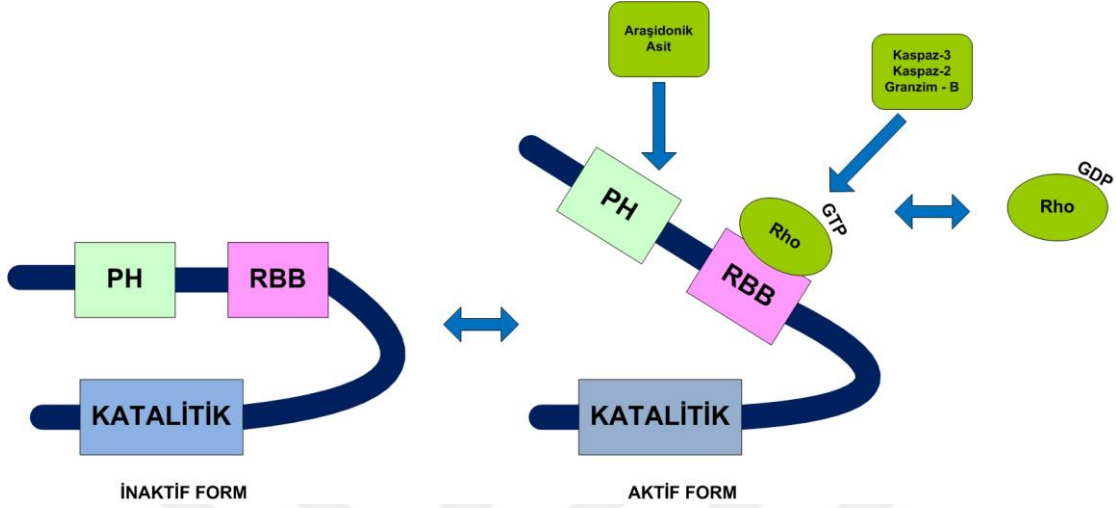


Şekil 2.1. ROCK 1 ve 2'nin fonksiyonel bölgeleri. N: Amino terminali, RBB: Rho Bağlayıcı Bölge, PH: Plekstrin homoloji bölgesi, SZB: Sisteince zengin bölge, C: karboksit terminali

2.2.3. ROCK aktivasyonunun düzenlenmesi

ROCK'lar yapısal olarak otoinhibitör etkiye sahiptir. İnaktif halde iken yapılarında bulunan karboksit terminali, kinaz bölgesi üzerine otoinhibisyon yapmaktadır. Enzimin etkinlik gösterebilmesi için inhibitör karboksit terminali ile kinaz bölgesi arasındaki etkileşimin bozulması gerekmektedir. Bu etkileşim ya çeşitli substratların karboksit terminaline bağlanmasıyla ya da karboksit terminalinin proteolitik olarak kesilmesiyle bozulabilir. Aktif Rho'nun ROCK'un karboksit terminalinde bulunan Rho bağlama bölgesine (RBB) bağlanmasıyla karboksit terminali ile katalitik bölge arasındaki etkileşim bozularak enzim aktif hale gelir. Ayrıca araşidonik asit ve sfingosilfosforilkolin gibi lipid mediyatörlerde karboksit terminalinde bulunan plekstrin homoloji bölgesi ile etkileşerek ROCK'u aktive edebilir (Feng ve diğerleri, 1999; Shirao ve diğerleri, 2002). Bunların dışında ROCK 1'in karboksit terminalinin kaspaz-3 (DETD1113) (Coleman ve diğerleri, 2001; Sebbagh ve diğerleri, 2001), ROCK 2'nin karboksit terminalinin ise sitotoksik T lenfositlerden salgılanan granüllerde bulunan proapoptotik enzim olan granzim B ile direkt olarak kesilmesiyle

aktivasyonları gerçekleşebilir (Sebbagh ve diğerleri, 2005). Şekil 2.2.'de konformasyonel değişikliğe bağlı ROCK aktivasyon durumu şematize edilmiştir.



Şekil 2.2. ROCK aktivasyonu

Rho bağımlı ROCK aktivasyonu hücre tipine bağlı olarak kontraktilite, hücre permeabilisyonu, migrasyonu, proliferasyonu ve apoptozuna kadar birçok değişime sebep olabilmektedir. Ayrıca, PI3,4,5P3 ve PI4,5P2 gibi inositol fosfolipidler ROCK 1'in değil ancak ROCK 2'nin PH bölgesi ile etkileşebilir ve PI-3 kinaz aktivitesi ile ROCK 2 düzenlenebilir. Dimerizasyon ve/veya transfosforilasyon ATP için bağlanma bölgesi olarak düzenlenmesi ile ROCK aktivitesinin düzenlenmesinde rol oynayabilir.

Apoptoz sırasında ROCK 1 DETD1113 kesilme bölgesinden kaspaz-3 tarafından kesilerek aktive olmaktadır (Coleman ve diğerleri, 2001). Apoptotik hücrelerde ROCK 1'in aktivasyonundan kaspaz-3'ün sorumlu olduğu düşünülmektedir ve kaspaz-3 bulunmayan MCF-7 meme kanseri hücrelerinde ROCK 1 kesilmesinin olmaması ancak kaspaz 3 transfeksiyonundan sonra ROCK 1'in kesilmesi kanıt olarak gösterilmiştir (Sebbagh ve diğerleri, 2001). Ayrıca ROCK 1 kesilmesi birçok apoptotik hücrede kaspaz inhibitörleri ile inhibe edilmiştir. Bununla birlikte, ROCK 1'in kaspaz-3'den bağımsız kesilmesi ekstrasellüler ATP ile indüklenen ve P2XY ATP reseptörü aracılı apoptozda ve kanser hücrelerine BCG9331 (timidilat sentaz inhibitörü) ve SN-38 (topoizomeraaz inhibitörü) uygulaması ile gözlenmiştir (Coudray ve diğerleri, 2005). Ancak, sitotoksik lenfosit granül ile indüklenen apoptoz sırasında proapoptotik proteaz granzim B ile insan ROCK 2'si IGLD1131 bölgesinden kesilmektedir. ROCK 1'de ise bu bölgeden kesilme gözlenmemiştir.

Ayrıca ROCK 2, trombine cevaben endotel hücrelerinde kaspaz-2 ile kesilerek de aktive olmaktadır (Sapet ve diğerleri, 2006).

ROCK'un pozitif düzenleyicilerinin yanı sıra negatif düzenleyicileri de bulunmaktadır. Küçük GTP bağlı protein RhoE ile ROCK 1'in N terminal bölgesinden etkileşimi(1-420 aminoasit), Rho'nun Rho bağlanma bölgesine bağlanmasını engeller (Ongusaha ve diğerleri, 2006). Ayrıca Gem ve Rad, Raf-1, p21 ve Aurora-A/serin/treonin/kinaz 15 gibi diğer negatif regülatörler ROCK'a bağlanarak inhibe etmektedirler (Manapov, Muller ve Rychly, 2005).

2.2.4. ROCK ekspresyonu, lokalizasyonu ve substratları

ROCK proteinlerinin embriyojenez boyunca ve yetişkin dokularda eksprese edildiği rapor edilmiştir. Doku spesifik gen ekspresyonu ve düzenlenmesi (the Tissue-specific Gene Expression and Regulation-TiGer) veri tabanı kullanılarak ROCK1 ve ROCK2'nin dağılım paterni açığa çıkarılmıştır (Liu ve diğerleri, 2008). Her iki proteinde benzer dağılım paterni göstermekle birlikte birkaç spesifik organ ve/veya dokuda ekspresyon seviyelerinin önemli ölçüde bir diğerinden fazla olduğu gösterilmiştir. Özellikle, timüs ve kanda ROCK 1 ekspresyonu önemli ölçüde fazla iken, ROCK 2 ekspresyonunun yok denecek kadar az olduğu gösterilmiştir. ROCK 2 beyin ve iskelet kaslarında daha baskın olarak bulunurken, ROCK 1 karaciğer, testis ve böbreklerde daha fazla miktarda bulunmaktadır. Hem ROCK 1 hem de ROCK 2 vasküler düz kas ve kalpte eksprese olmaktadır (Wei ve diğerleri, 2001).

Kinazların biyolojik etkileri sadece aktivasyon durumunu yansıtmamaktadır, aynı zamanda proteinlerin hücre içi lokalizasyon durumunu etkilemektedir. Birçok çalışmada iki ROCK izoformunun subsellüler lokalizasyonu incelenmiştir. Önceki çalışmalarda, ROCK2 lokalizasyonu büyük çoğunlukla sitozolik dağılım göstermiştir. Aktif RhoA mutantının aşırı ekspresyonu ile, büyük ölçüde aktin mikofilamentleri ile ilişkili olarak, ROCK2 hem internal hem de periferel hücre membranlarında gözlenmiştir. ROCK 2'nin hücre içi dağılımı ile ilgili sonraki çalışmalar, ROCK 2'nin sitokinez boyunca kesilme bölgesinde biriktiğini açığa çıkarmıştır ve kontraktıl halka oluşumunda rol oynadığını göstermiştir (Kosako ve diğerleri, 1999).

Ayrıca, ROCK 2'nin büyüyen hücrelerin nükleusunda, stres liflerinde (Katoh ve diğerleri, 2001), serumdan yoksun bırakılmış hücrelerin filamentöz vimentin ağında ve

sentrozomlarda da lokalize olduğu gösterilmiştir (Ma ve diğerleri, 2006). İnsan Protein Atlası (Human Protein Atlas, www.proteinatlas.org) tarafından bildirilen iki bağımsız antikör ile elde edilen veriler büyük ölçüde sitoplazmik lokalizasyon gösterdiğini desteklemektedir. Üç farklı antikör ile birçok hücre tipinde ROCK 1'in hücre içi lokalizasyonu baskın olarak sitoplazmik olmasına rağmen, henüz net olarak tanımlanamamıştır (www.proteinatlas.org). Bazı çalışmalar ise ROCK 1'in plazma membranı ve sentrozom ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Chevrier ve diğerleri, 2002).

Dinlenme durumunda ROCK 1 ve ROCK 2 esas olarak sitozolde bulunurken, Rho aktivasyonu ile membrana lokalize olmaktadır. siRNA kullanılarak yapılan iki ayrı çalışmada ROCK 1 ve ROCK 2 sıçan embriyonik fibroblastlarında farklı dağılım göstermiştir ve farklı miyozin bölgelerinde yer almaktadır. Bu fibroblastlarda, ROCK1 temel olarak diffüz ve perinükleer lokalizasyon göstermektedir ve stres lifleri ve fokal adezyon oluşumu için gereklidir. ROCK 2 ise, hem hücre membranında hem de perinükleer dağılım göstermektedir ve fagositoz için gereklidir. (Yoneda, Multhaupt ve Couchman, 2005).

Aktif ROCK proteinleri, birçok biyolojik işlemde yer alan alt hedefleri farklı gruplarından fosforilemektedir. Kinaz bölgelerinden yüksek benzerlik gösteren her iki ROCK izoformunun, çok sayıda ortak substratı bulunmaktadır. ROCK substratlarının tespitine yönelik çalışmaların çoğunda, peptit fosforilasyon tarama ile standart olmayan bölgelerde bulunmasına rağmen, fosforilasyon için gerekli amino asit sekansının R/KXXS/T veya R/KXS/T (R, arjinin; K, lizin; S, serin; T, Treonin; X, herhangi bir amino asit) olduğu gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda 20'den fazla ROCK substratı belirlenmiştir (Şekil 2.3.).

ROCK sinyalizasyonu, Rho'nun birçok downstream hücresel fonksiyonunda yer almaktadır; ROCK için tanımlanmış temel rollerden biri aktin-miyozin hücre iskeletinin düzenlenmesidir. Bununla ilişkili olarak miyozin hafif zincir (MLC) ve MLC fosfotazın miyozin bağlanma alt ünitesi ROCK'un ilk belirlenmiş substratlarıdır. ROCK direkt MLC üzerine etki ederek veya indirekt olarak MLC fosfotazın inhibisyonu ile MLC fosforilasyonunu arttırabilir. Artmış MLC fosforilasyonu, aktomiyozin kontraktilitesinin uyarılmasına neden olmaktadır. Fosforile miyozin II düzenleyici hafif zincir (MLC), miyozin ATPaz ile aktive ederek aktomiyozin kontraktilitesini düzenlemektedir, böylece bir kasılma kuvveti oluşturarak F-aktin ile etkileşimi sağlamaktadır. ROCK'un Ser-19 ve Thr-

18'den MLC fosforilasyonu, MLC kinaz fosforilasyonu ile aynı bölgeden meydana gelmektedir (Nakagawa ve diğerleri, 1996).

Ancak, havayolu düz kas hücrelerinde, kalsiyum azaldığında MLC kinaz aktivasyonunun sonlanması, G-protein aktivasyonuna cevaben MLC fosforilasyonunun azalması ile sonuçlanmaktadır. Bu durum, ROCK'un büyük ölçüde defosforilasyonun inhibisyonu ile indirekt olarak MLC fosforilasyonunun artmasına katkıda bulunduğunu göstermektedir. Dahası, stres liflerini indüklemek ve fokal adezyonların toplanması için MLC fosforilasyonu MLCK, MRCK ve ROCK tarafından düzenlenmektedir. ROCK fibroblastların merkezinde stres liflerinin oluşumunda yer alırken, MLCK ve MRCK periferde fonksiyon göstermektedir. Bir fosfotaz kompleksi (PPIM) MLC defosforilasyonuna aracılık etmektedir. MYPT1'in ROCK tarafından Thr-695 ve Thr-850'den fosforilasyonu, miyozinin fosfotazdan ayrılması ile MLC defosforilasyonunun inhibisyonuna neden olmaktadır, böylece net MLC fosforilasyonunun artışına ve sonraki miyozin ATP aktivasyonuna olanak sağlamaktadır.

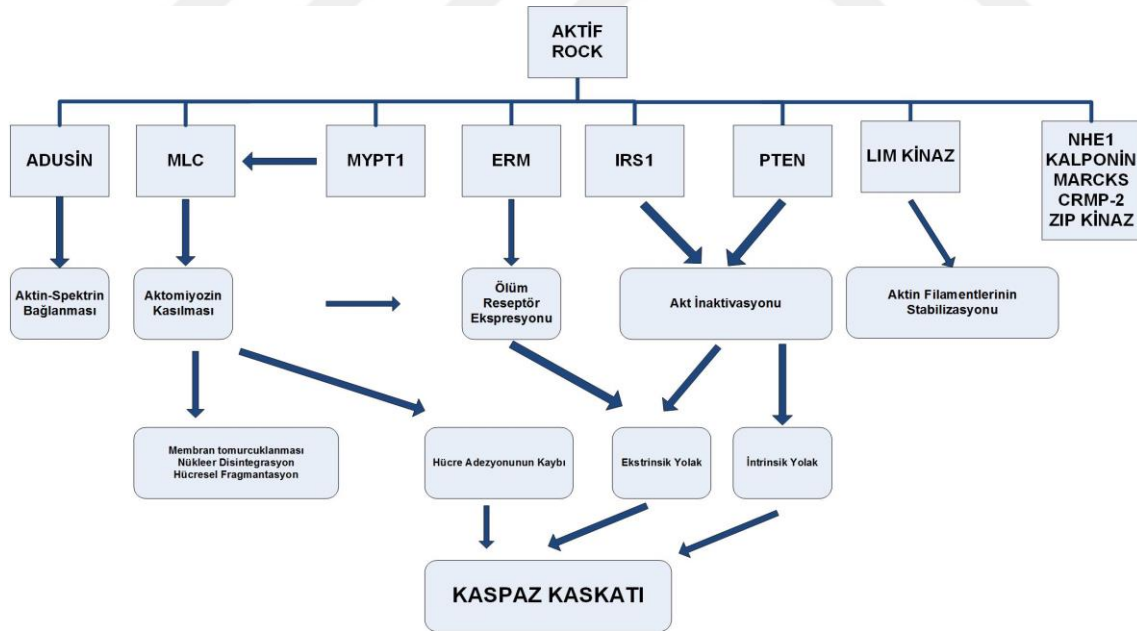
ROCK substratlarının çoğu, aktin hücre iskeletini düzenleyen hücre proteinleri ile ilişkilidir. MLC ve MYPT1'in yanı sıra, kalponin, LIM kinazlar, ezrin/radiksin/moesin (ERM), addusin, sodyum-hidrojen değiş tokuşcusu (NHE1) ve ZIP kinaz diğer önemli ROCK substratlarındandır.

ROCK, aktivasyon bölgesinin Thr-508 ve Thr-505 noktalarından sırasıyla LIM kinaz 1 ve 2 fosforilasyonu ile aktin filament dinamiklerini de düzenlemektedir. Aktif LIM kinazlar, aktin kesilme proteini kofilini fosforile ve inaktive ederek, hücrede aktin filament sayısında net bir artış görülmektedir. ROCK aktivasyonu bir seri aktin-miyozin aracılıklı kontraktıl güçlerin oluşumuna yol açarak morfolojik değişikliklere neden olmaktadır (Julian ve Olson, 2014).

Ezrin/radiksin/moesin (ERM) proteinleri aktin filament/ plazma membran etkileşiminde yer almaktadır ve Rho ile düzenlenmektedir. Ezrin Thr567'den, Radiksin Thr 564'den ve moesin The558'den ROCK ile fosforillenerek, -N ve -C terminalleri arasındaki etkileşim bozularak aktif hale geçerler (Matsui ve diğerleri, 1998).

ROCK substratlarının birçoğu da hücre ölümü ve canlılığının düzenlenmesinde yer almaktadır. Apoptotik hücrelerde MLC fosforilasyonunun ve aktomiyozin kontraksiyonunun artışı plazma membran tomurcuk (membran blebbing) oluşumunu düzenlemektedir. Kaspaz-3 aracılı ROCK 1 aktivasyonu birçok hücre tipinde MLC fosforilasyonunun artışıyla sorumludur. Fosfotaz ve tensin homoloğu (PTEN) yeni belirlenen ROCK substratlarından biridir. ROCK ile PTEN fosforilasyonu, PTEN'in fosfotaz aktivitesini uyarır. PTEN hem proteinleri hem de fosfoinositidleri defosforile eder ve fosfoinositol (PI)3-kinaz/Akt yolağının (hücre canlılığını da içeren birçok biyolojik işlemde önemli rollere sahiptir) negatif bir düzenleyicisidir (Liu ve diğerleri, 2005).

HEK hücrelerinde, ROCK aktivasyonu ile Akt fosforilasyonunun azalmasına aracılık etmektedir. Azalan PTEN aktivitesi endotel hücrelerinde ROCK inhibisyonunun koruyucu etkilerine ve kardiyomiyositlerde ROCK 1 baskılanmasının koruyucu etkilerine katkıda bulunabilir. Ayrıca ROCK, vasküler düz kas hücrelerinde etkileşimde olduğu, insülin reseptör substratı 1 (IRS1) sinyalizasyonu ve PI3-kinaz aktivasyonunun negatif düzenleyicisidir.



Şekil 2.3. ROCK'un substratları ve fonksiyonları

2.2.5. Apoptotik morfolojik olayların düzenlenmesinde ROCK'un rolü

ROCK, apoptozun işlem fazı boyunca meydana gelen, hücre kontraksiyonu, dinamik membran bleblenmesi, nükleer parçalanma ve apoptotik hücrelerin fragmentasyonu ve apoptotik cisim oluşumunu içeren, birçok morfolojik olayın temel bir düzenleyicisi olarak bilinmektedir.

Membran tomurcuklanması (Membran blebbing)

Apoptozun işlem fazı birçok morfolojik değişiklik ile karakterizedir ve üç evreden oluşmaktadır: salım, membran tomurcuklanması ve yoğunlaşma (condensation). Salım evresi boyunca, ölü bir hücre ekstrasellüler matriks ve etrafındaki hücrelerle olan bağlantısını kaybeder ve yuvarlaklaşmaya başlar. Bu çekilme fazını plazma membran bleblenmesi takip eder. Geçici olan bu tomurcuklanması aşamasından sonra yoğunlaşma evresi başlamaktadır. Bu evrede hücreden tek bir apoptotik cisim oluşabilir veya hücre birçok apoptotik cisme parçalanabilir. Plazma membran bleblenmesi MLC fosforilasyonu ve aktomiyozin kasılması ile düzenlenmektedir. İlk kez anti-Fas uygulanmış Jurkat hücrelerinde ve TNF α - uygulanmış NIH3T3 hücrelerinde, kaspaz-3 aracılı ROCK 1 aktivasyonunda apoptotik hücrelerdeki membran tomurcuklanmasının düzenlenmesi gösterilmiştir. Kaspaz-3 aracılı ROCK 1 aktivasyonu, MLC fosforilasyonunun artışı ve aktomiyozin kontraksiyonu aracılığıyla membran tomurcuk oluşumu için hem gerekli hem de yeterlidir. (Coleman ve diğerleri, 2001; Sebbagh ve diğerleri, 2001). Ancak birçok çalışmada apoptotik uyarandan bağımsız olarak da birçok hücre tipinde tomurcuk oluşumu gözlenmiştir.

Kaspaz-3 aracılı ROCK 1 aktivasyonu, apoptotik hücrelerde membran tomurcuklanmasını indükleyen temel yollardan biri olarak görülmesine rağmen, membran tomurcuklanması Rho'dan bağımsız veya kaspazdan bağımsız ROCK aktivasyonunda bazı apoptotik koşullar altında meydana gelebilir (Lane, Allan ve Woodman, 2005). Hem ROCK 1 hem de ROCK 2, Rho ile aktive olarak MLC fosforilasyonunu ve aktomiyozin kontraksiyonunu düzenleyebilir. Vahşi tip ROCK 2'nin aşırı ekspresyonu veya yapısal olarak aktif mutant ROCK 2 aktin-miyozin kontraktilesinin aktivasyonu aracılığıyla membran tomurcuklanmasını indükleyebilir. Ayrıca ROCK 2, ancak ROCK 1 değil, sitotoksik lenfosit granullerinde bulunan granzim B aracılı kesilme (Asp 1131) ile aktive olabilir. Bu ROCK

2 kesilmesi kaspaz-3 aktivasyonundan bağımsız olarak membran tomurcuklanmasını indükleyebilir (Sebbagh, Hamelin, Bertoglio, Solary ve Breard, 2005).

Apoptotik hücrelerin parçalanması (Fragmentasyonu)

Apoptozun işlem fazı boyunca, bir hücre kendini apoptotik cisim olarak paketleyerek içeriğini sızdırmaz. Apoptotik cisimler fagositoz aracılığı ile çevre dokular tarafından uzaklaştırılır (Lauber, Blumenthal, Waibel ve Wesselborg, 2004). Apoptotik hücreler fagositoza hazırlık için birçok değişikliğe uğrarlar. Bunlar nükleer fragmentasyon, parçalanmış DNA'nın membran bleblerine lokalizasyonu, apoptotik cisimlerin büzülme ve/veya fragmentasyonu ve yüzeylerinde fagositik belirteç eksprese etmeleridir. NIH3T3 hücrelerinde, ROCK aktivasyonu ve sonrasında MLC fosforilasyonu apoptotik nükleer parçalanma ve DNA parçalarının tomurcuklara ve apoptotik cisimlere yeniden lokalizasyonu için gereklidir (Croft ve diğerleri, 2005). Ayrıca ROCK aktivitesi ve aktomiyozin kontraksiyonu, geç apoptotik tomurcuklarda endoplazmik retikulum ve kromatin içeren tomurcuk oluşumuna katkıda bulunmaktadır.

Ayrıca, Y27632 ile ROCK inhibisyonu COS-7 hücrelerinde apoptotik hücre fragmentasyonunu ve PC12 hücrelerinde golgi fragmentasyonunu engellemektedir. İşlem fazında meydana gelen ROCK bağımlı bu olaylar için aktomiyozin kontraksiyonu gereklidir. İlginç olarak, ROCK aktomiyozin kontraksiyonundan bağımsız olarak fagositik yüzey belirteçlerinin ekspresyonunu kontrol etmektedir. Y-27632 varlığında ölen hücreler, inhibitör olmaksızın ölen hücrelere göre daha az verimli şekilde fagosit olmaktadır. Ek olarak, siRNA ile susturulmuş ROCK1, ancak ROCK2 değil, ölen hücrelerin fragmentasyonunu inhibe etmektedir (Orlando, Stone ve Pittman, 2006). Ancak, Y27632 varlığında ölen Jurkat hücreleri, inhibitör olmaksızın ölen hücreler ile aynı oranda makrofajlar ile fagosit edilmişlerdir. Bu çalışmalar, fagositoz için ölen hücrelerin hazırlanmasında ROCK'un öneminin hücre tipi ve/veya apoptotik uyarana bağlı olduğunu göstermektedir.

Apoptotik hücrelerin fagositozu

Ölen hücrelerin dokudan yok edilmesinde makrofajlar, dentritik hücreler ve diğer doku hücreleri görev almaktadır. Dokunun yeniden oluşmasında ve immün cevabın

düzenlenmesinde, apoptotik hücrelerin hızlı ve etkili fagositozu ikincil nekrozis ve inflamasyon önlenmesinde kritik bir rol oynamaktadır. Apoptotik hücrelerin fagositik temizlenmesi dört ayrı basamaktan oluşmaktadır: Fagositlerin apoptotik hücrelerin olduğu bölgede toplanması; birçok köprü molekül ve reseptör aracılığı ile fagositlerce tanınma; apoptotik hücrelerin yutulması ve fagositlerin içinde yutulmuş hücrelerin yıkılması. Son çalışmalar Rho ve ROCK'un aktin hücre iskeletinin düzenlenmesi aracılığıyla apoptotik hücrelerin temizlenmesinde yer aldığını göstermiştir.

Apoptotik hücrelerin yutulması boyunca Rho aktivitesinin azaldığı gözlenmektedir. Ayrıca, Rho bazal fagositozu negatif olarak etkilemektedir. Örneğin Rho aracılı sinyalizasyonun inhibisyonu apoptotik hücrelerin alımını arttırmaktadır. Yutulma üzerindeki negatif etkiden primer olarak ROCK sorumlu görünmektedir. (Tosello-Tramont, Nakada-Tsukui ve Ravichandran, 2003). Apoptotik hücrelerin makrofajlar veya fibroblastlar ile yıkılımı boyunca, Rho/ROCK/ERM sinyalizasyon yolağı fagozomların hızlı olgunlaşmasına katkıda bulunmaktadır. Rho/ROCK/ERM sinyalizasyonunun blokajı apoptotik hücreleri içeren fagozomların olgunlaşma hızını geciktirmektedir.

2.3. Apoptoz ve Diğer Hücre Ölümleri

2.3.1. Apoptoz ve önemi

Apoptoz terimi ilk kez Kerr, Wyllie ve Curre tarafından 1972 yılında morfolojik olarak farklı formda bir hücre ölümünü tanımlamak amacıyla kullanılmıştır (Kerr, Wyllie ve Currie, 1972; Paweletz, 2001; Kerr, 2002). Memeli hücrelerinde apoptoz sürecine dahil mekanizmaların anlaşılması nematod *Caenorhabditis elegans* gelişimi sırasında meydana gelen programlanmış hücre ölümü ile aydınlatılmıştır (Horvitz, 1999). Bu organizmalarda 1090 somatik hücre bulunmaktadır ancak gelişimleri süresince 131 hücre ölmeye programlanmıştır. Bu 131 hücrenin ölümü gelişim süresince solucanlar arasında değişmeyen belirli noktalardan olağanüstü doğruluk ve kontrol ile gerçekleşmektedir. Apoptoz genetik olarak belirlenen hücrelerin yok edilmesi olarak tanımlanan farklı ve önemli bir hücre ölümü olarak kabul edilmiştir. (Formigli ve diğerleri, 2000; Sperandio, Belle ve Bredesen, 2000).

Apoptoz gelişim ve yaşlılık sırasında, dokularda hücre popülasyonunu korumak için homeostatik mekanizma olarak meydana gelmektedir. Apoptoz ayrıca immun

reaksiyonlarda veya hücreler hastalık veya zararlı ajanlarla hasara uğradığında bir savunma mekanizması olarak da görülmektedir. (Norbury ve Hickson, 2001). Apoptozu tetikleyen fizyolojik ve patolojik uyarılar ve durumlar çok çeşitli olmasına rağmen, tüm hücreler zorunlu olarak aynı uyarana yanıt olarak ölür. Bazı hücrelerde kanser kemoterapisinde kullanılan ilaçlar ve radyasyon p53 yolu ile apoptotik hücre ölümüne sebep olabilir. Kortikosteroid gibi bazı hormonlar bazı hücrelerde (örneğin, timositler) apoptotik ölüme yol açarken diğer hücreleri etkilememektedir.

Bazı hücreler, ligand bağlama ve protein çapraz-bağlanması yoluyla apoptoza neden olan Fas veya TNF reseptörlerine sahiptirler. Bazı hücreler ise, bir hormon ya da büyüme faktörü gibi, bir sağkalım faktörü ile bloke edilen ölüm yoluna sahiptir. Nekroz ve apoptoz birbirinden bağımsız olarak eş zamanlı meydana gelebilen iki ayrı işlemdir (Hirsch ve diğerleri, 1997; Zeiss, 2003). Bazı durumlarda, bu uyarıcıların tipi ve/veya derecesi hücrenin apoptoz veya nekroz ile hücre ölümünün belirleyicisidir. Düşük dozlarda, sıcaklık, radyasyon, hipoksi ve sitotoksik antikanser ilaçlar apoptozu indüklerken, yüksek konsantrasyonlarda nekroza sebep olabilirler.

Apoptoz, kompleks kaskadın bir uyararla başlatılması ile kaspazlar olarak adlandırılan bir grup sistein proteazın aktivasyonu ve nihai olarak hücre ölümü ile sonlanan kordineli ve genellikle enerji bağımlı bir işlemdir. Aşağıda farklı apoptotik yollar detaylı olarak anlatılmıştır. Şekil 2.4'te apoptotik yollar şematize edilmiştir.

Intrinsik ve ekstrinsik yollar

Intrinsik apoptotik yolak: mitokondri ve endoplazmik retikulum

Fiziksel ve kimyasal hasarlar (UV radyasyon, ısı şoku, osmotik şok, hipoksi), tümör baskılayıcı genler ile hücrel onkogenlerin ekspresyonunun değişmesi (örneğin c-Myc, c-Fos, p53, PTEN), hücre iskelet yapısının bozulması, DNA hasarı (örneğin mutajenik ajanlar, sitostatikler, antimetabolitler), büyüme faktörleri/sitokinlerin tükenmesi, nükleotit/ATP eksikliği, hatalı katlanmış proteinlerin birikimi ve diğer stress faktörleri intrinsik apoptotik yolağı başlatabilir. Intrinsik apoptotik yolak başlangıçta çok farklı uyarılar ile tetiklense de, mitokondri dış membran permeabilizasyonu (MOMP), reaktif oksijen türlerinin artması ve mitokondrial fizyon gibi hepsi kaçınılmaz bu önemli olaylarla sonuçlanmaktadır. Daha

sonra, sitokrom c ve diğer proapoptotik moleküller Smac/DIABLO (ikincil mitokondrial kaspaz aktivatör türevi/düşük pH'da direkt IAP bağlayıcı protein), AIF (apoptoz indükleyici factor) ve endonükleaz G hasarlı mitokondriden sitoplazmaya salınır. (Liu, Kim, Yang, Jemmerson, ve Wang, 1996; Susin ve diğerleri, 1999; Du, Fang, Li, Li, ve Wang, 2000; Li, Luo ve Wang, 2001).

Mitokondrial iç membran boşluklarından proapoptotik moleküllerin salınımının düzenleyici mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Proapoptotik Bcl-2 üyeleri Bax/Bak, mitokondride çeşitli stress sinyallerine cevaben oligomerize olarak dış membranda porlar oluşturarak mitokondri dış membran permeabilizasyonuna yol açarlar (Green, 2000). Farklı hücre hasarları endoplazmik retikulumdan kalsiyum salımını indükler ve bunu mitokondrinin hızlı kalsiyum alımı takip eder. Kalsiyum birikimi, mitokondrial reaktif oksijen türlerinin üretimini tetikler ve mitokondrial permeabilite geçiş porlarının açılmasına yol açarak mitokondrial iç membrane potansiyelinin yok olmasına, iç membran matriksinin osmotik şişmesine, mitokondri dış membran permeabilizasyonu ve proapoptotik mediyatörlerin salınımına neden olur (Brookes, Yoon, Robotham, Anders ve Sheu, 2004; Petrosillo, Ruggiero, Pistolese ve Paradies, 2004).

ER stresi proapoptotik uyarıların taşınmasında merkezi bir rol oynar ve miyokardiyal enfarktüs, inme ve nörodejeneratif hastalıklarda (Alzheimer hastalığı, amiyotrofik lateral skleroz (ALS), Parkinson hastalığı) önemli bir durum olabilir. (Rao ve diğerleri, 2001; Bassik ve diğerleri, 2004). Sitoplazmada adaptor protein Apaf-1 (ATP/dATP varlığında) sitokrom c ve prokaspaz 9'a bağlanır ve apoptozom adı verilen multi protein kompleksi oluşturur. (Finucane ve diğerleri, 1999; Susin ve diğerleri, 1999a; Arnoult ve diğerleri, 2003). Prokaspaz 9 aktivasyonu ile prokaspaz 3 aktivasyonunun başlamasıyla genel efektör apoptotik yolak başlatılmış olur.

Ekstrinsik apoptotik yolak: ölüm ligandları ve reseptörleri

Bir ölüm ligandının uygun ölüm reseptörüne bağlanması ekstrinsik reseptör aracılı apoptotik yolağı indükler. Ölüm ligandları tümör nekroz edici faktör (TNF) ailesinden olan tip II membran glikoproteinleridir. TNF ailesinden sitokinler sitotoksik etkileri de dahil immun sistemin kontrol ve manipülasyonuna katılırlar (MacEwan, 2002). Ölüm ligandları fizyolojik olarak membran bağlı veya çözünmüş formlarında proteolitik olarak kesilmiş olarak

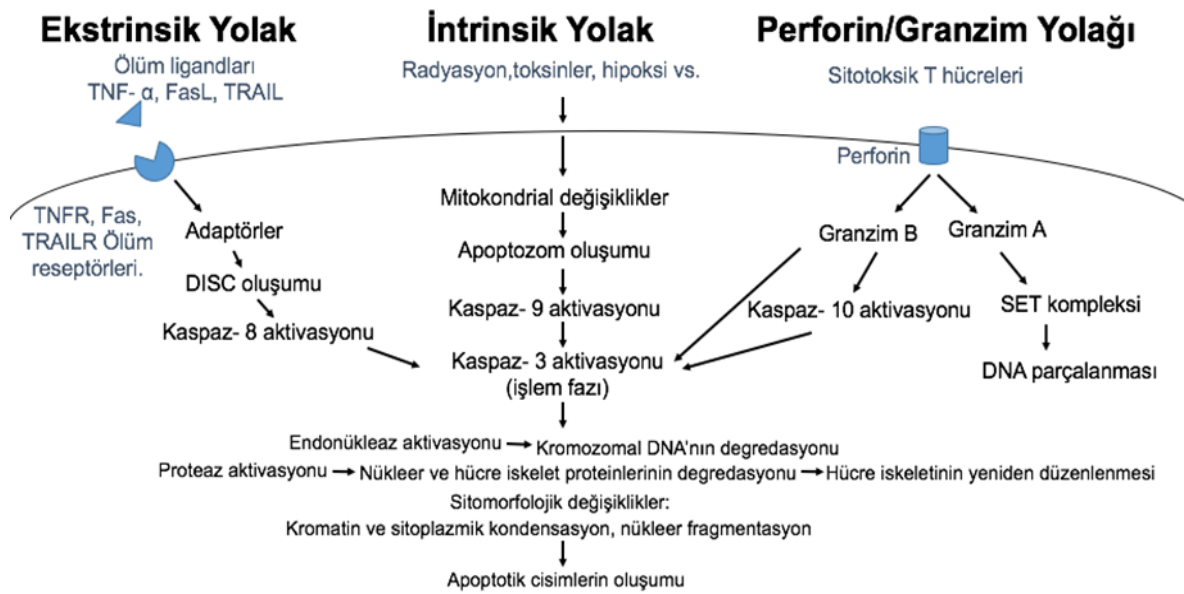
bulunurlar. TNF (ligand) ailesi TNF- α (TNFSF2, kaşektin), Fas ligand (TNFSF6, FasL, CD95 ligand, Apo-1L) ve TNF- α - ilişkili apoptoz indükleyici ligandan oluşmaktadır.

TNF ailesi ölüm ligandları için reseptörler TNF reseptör (TNF-R) super ailesi bir ölüm reseptörü alt grubuna ait tip 1 membran proteinleridir. TNF-R ailesi proteinleri ligandlar ve bu reseptörlerin bağlanmasına aracılık eden sisteince zengin ekstrasellüler bölgenin varlığı ile karakterizedirler. Bu reseptörlerin apoptotik sinyali aktarma kabiliyetinin temelinde ölüm reseptörleri (DR) ve tuzak reseptörlerine ayrılmasıdır. Ölüm reseptörlerinin intrasitoplazmik bölgedeki kısmı olan, büyük ölçüde korunmuş olan ölüm bölgesi motifleri (DD), ölüm sinyalinin iletiminden sorumludur. Ölüm reseptörleri TNF-R1, Fas (TNFRSF6, Apo-1, CD95), DR4 (TNFRSF10A, TRAIL-R1, APO-2, MGC9365), DR5 (TNFRSF10B, TRAIL-R2, KILLER/DR5, TRICK2), DR3 and DR6'dan oluşmaktadır (Sheridan ve diğerleri, 1997; Wu, Kim ve El Deiry, 2000). TNF reseptör ailesi üyelerinden ölüm ligandlarına bağlanan fakat fonksiyonel bir ölüm bölgesi motifi bulunmayan ve apoptotik sinyali iletemeyenlere tuzak reseptörler denilmektedir: DcR1 (TNFRSF10C, TRAIL-R3, TRID), DcR2 (TNFRSF10D, TRAIL-R4, TRUNDD), DcR3, osteoprotegerin (OPG) (Shipman and Croucher, 2003). Böylece tuzak reseptörleri ölüm reseptörleri ile ölüm ligandları için yarışır. Ölüm ve tuzak reseptörlerinin lokal konsantrasyonu ölüm ligandı ile indüklenen apoptoz için hücrenin duyarlılık/direncinde kritik olmaktadır. (Ashkenazi ve Dixit, 1998).

TNF ligandı TNF reseptör kompleksine bağlanarak aktif bir konformasyonel değişikliği indükler veya daha yüksek dereceden reseptör komplekslerinin oluşumunu sağlar. Ligand reseptör bağlanması reseptör adaptor sitoplazmik ölüm bölgelerinin homofilik etkileşimine yol açar. Adaptor proteinler Fasla ilişkili ölüm bölgesi (FADD) veya TNF- α - ilişkili ölüm bölgesi (TRADD) multiprotein ölümle indüklenen sinyalizasyon kompleksi (DISC) oluşumuyla sonuçlanan homolog ölüm bölgesi (DED) motifleri aracılığıyla prokaspaz 8 (FADD benzeri interlökin-1 dönüştürücü enzim, FLICE) ve 10'un alımına izin ver (Chinnaiyan ve diğerleri, 1996). Prokaspaz 8 (veya 10) yakınlık indüksiyon mekanizması ile otoaktive olmaktadır. Bcl ailesi üyelerinden Bid veya prokaspaz 3 gibi diğer prokaspazlar DISC için substratlardır. Bunların kesilimi intrinsik ve ekstrinsik apoptotik yollar arasındaki bir etkileşim noktasını göstermektedir (Chou ve diğerleri, 1999).

Granzim B/ perforin apoptotik yolağı

İki klasik apoptotik yolağın dışında (intsinsik ve ekstrinsik), apoptozu indükleyici iyi tanımlanmış ekstrinsik aksesuar yolak olan, granzim B yolağı da bulunmaktadır (Lord, Rajotte, Korbitt ve Bleackley, 2003). Granzim B kaspazlar gibi spesifik olarak substratlarını Asp kalıntılarından kesen, serin proteaz, bir lenfosit granüler enzimdir (granzim). Granzimler aktive edilmiş sitotoksik T lenfositleri (CTL) ve doğal öldürücü hücrelerde (natural killer- NK) ekspresyona sahiptir. Granzim B kendi reseptörü olan mannoz-6 fosfat/insulin benzeri büyüme faktörü II reseptörüne bağlanır ve endositoz olur fakat perforin tarafından salınana kadar endositik veziküllerde tutulur. Sitoplazmada, granzim B direkt olarak hem birçok prokaspazı hem de diğer apoptotik yolak bileşenlerini (örneğin Bid) ve downstream kaspaz hedeflerini (kaspaz ile aktive olan DNAz (CAD)) keser ve aktive eder (Barry ve diğerleri, 2000).



Şekil 2.4. Apoptotik yolların şematik gösterimi (Elmore, 2007)

Seramid/ sfingomiyelin yolağı: temel apoptotik kaskadın benzeri

Seramidler farklılaşma, büyümenin baskılanması, hücre yaşlanması, çeşitli stress cevapları ve apoptozun düzenlenmesinde yer alan sfingolipid sinyal mediyatörleridir (Hannun, 1996). Çeşitli stress uyaranları ile sfingomyelinazların (SMaz) aktivasyonu, sfingomiyelinin hidroliziyle fosfatidilkolin ve seramid oluşumuna neden olur. Ayrıca sitoplazmik membran, lizozom, ER ve mitokondride seramid oluşumunun gözlemlendiği bölgelerdir. Seramidin

intraselüler seviyelerindeki artış tamamen anlaşılamamış bir yolak ile direkt mitokondrinin tahribiyle apoptotik ölüm programını indüklemektedir. (Green, 2000; Siskind, Kolesnick ve Colombini, 2002). Direkt olarak apoptozu indüklemelerinin haricinde seramidlerin apoptotik işlemlerin kuvvetlendirilmesi/ birleştirilmesinde de önemli rol oynadıkları görülmektedir.

Sağlıklı hücrelerde fosfolipidler, sfingomiyelini plazma membranının iç yüzünde ve fosfotidilserin/fosfotidiletanolamini dış yüzünde tutarak plazma membran asimetrisini korumaktadırlar. Apoptozun erken fazı boyunca aktif kaspazlar bu translokasyonu inhibe ederler ve plazma membran lipidlerinin lokasyonunu bozarlar (örneğin; fosfotidilserin eksternalizasyonu ve sfingomiyelin internalizasyonu). Bunun dışında, kaspazlar SMazları keser ve aktive ederler. Kaspaz aktivasyonu ile internalize olmuş sfingomiyelinlerin hidrolizinden sonra sitozolik seramid seviyeleri artarak seramid aracılı apoptotik kaskadın tetiklenmesi ile ölüm sinyallerinin artışına sebep olur. Dahası, hidroliz ile plazma membranından sfingomiyelinlerin kaybı, kolesterol moleküllerinin kaybına neden olarak plazma membrana akışkanlığının bozulmasıyla sonuçlanır. Tüm bunlar nihai hücre ölümüne katkıda bulunmaktadır. Kaspazların dışında, ölüm ligandları (örneğin TNF- α , FasL, ve TRAIL) ile aktive olmuş ölüm reseptörleri de potent bir SMaz indükleyicileridir ve iyi bilinen apoptotik yolak ile dayanışma içindedirler. (Tepper ve diğerleri, 1995; Lee ve Amoscato, 2004).

2.3.2. Kaspazlar

Kaspazların yapısı, sınıflandırılması ve aktivasyonu

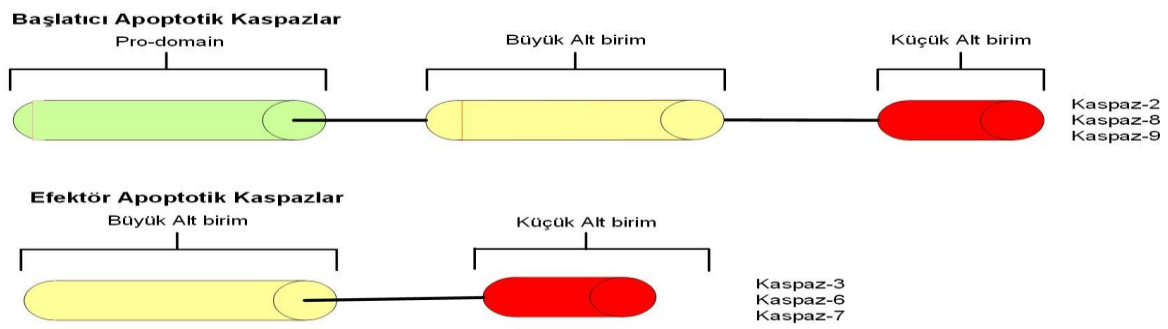
Kaspazların yapısı ve sınıflandırılması

Kaspazlar, apoptozda görev alan morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerden sorumlu olan aspartat spesifik sistein proteazlardır (Inoue, Browne, Melino, ve Cohen, 2009).

Kaspazlar hücrede zimojen (inaktif enzim prekürsörleridir, aktif enzim haline dönüşmek için biyokimyasal değişime uğramaları gerekir) olarak sentezlenen N terminalinde prodomain ve devamında büyük bir alt ünite (p-20, 17-21kDa) ve küçük bir alt üniteye (p-10, 10-13 kDa)

sahiptir (Şekil 2.3). Prokaspazların birçoğunda p20 ve p10 alt üniteleri küçük bağlayıcı bir sekansla ayrılmıştır.

Büyük prodomaine sahip kaspazlar, inflamatuvar kaspazlar (grup 1: kaspaz-1, kaspaz-4, kaspaz-5, kaspaz-11-14) ve apoptozu başlatıcı kaspazlar (grup 2: kaspaz-2, kaspaz-8, kaspaz-9, kaspaz-10) olarak adlandırılırken, 20-30 aminoasitli küçük prodomaine sahip kaspazlar ise (grup 3: kaspaz-3, kaspaz-6, kaspaz-7) efektör kaspazlar olarak adlandırılmıştır.



Şekil 2.5. Kaspazların yapısı

Kaspaz ön bölgeleri (prodomains): Prokaspazların büyük prodomainleri ölüm bölgesi süper ailesi adı verilen yapısal motiflere sahiptir (Weber ve Vincenz, 2001). Ölüm bölgeleri 80-100 rezidülük apoptotik sinyal transdüksiyonunda yer alan uzun motiflerdir. Bu süper aile ölüm bölgesi (death domain- DD), ölüm efektör bölgesi (death effector domain- DED) ve kaspaz alım (recruitment) bölgesine (CARD) sahiptir. Bu motiflerin her biri homotipik etkileşim ile diğer proteinlerle etkileşmektedir. Ölüm bölgesi süper ailesinin tüm üyeleri 6 ya da 7 antiparalel amfipatik α -heliks içeren benzer yapılar ile karakterize edilir. Yapısal benzerlik, tüm alım bölgeleri (domain) için ortak bir evrimsel kökeni göstermektedir (Hofmann, 1999). Ancak, homotipik etkileşimlerin doğası süper ailesi içinde farklılık göstermektedir. DED hidrofobik etkileşimleri kullanırken, DD ve CARD elektrostatik etkileşimlere dayanmaktadır (Eberstadt, 1998).

Prokaspaz-8 ve -10 kendi prodomainlerinde iki ardışık ölüm efektör bölgesine (DED) sahiptir. CARD prokaspaz -1, -2, -4, -5, -9, -11 ve -12'de bulunmaktadır (Fuentes-Prior ve Salvesen, 2004). DED'ler ve CARD'lar ölüm veya inflamasyonla indüklenen sinyal kompleksi başlatıcı kaspazların alımından sorumludur ve sonuç olarak kaspazların proteolitik aktivasyonu ile inflamasyonu veya apoptozu başlatırlar.

Aktif kaspaz heterotetramerlerinin yapısı. Bir prokaspazın Asp-X bölgesinden kesilmesi ile heterotetramer p202-102 içeren olgun kaspaz oluşur ve prodomainin serbest kalmasına neden olur. Olgun kaspazlardan kaspaz-1, kaspaz-2, kaspaz-3, kaspaz-7, kaspaz-8 ve kaspaz-9'un X ışını yapıları tayin edilmiştir. Tüm kaspazların genel yapısı benzerdir. Her heterodimer (p10-p20) birkaç paralel β - tabakasının oluşumuyla sonuçlanan hidrofobik etkileşimler ile oluşmaktadır. 2 heterodimer α -helikslerle çevrili 12 şeritli β tabakası aracılığıyla etkileşir. Bu sözde kaspaz katlanması proteazlar arasında eşsiz bir kuaterner yapıdır ve sadece kaspazlar ve gingipain R (*Porphyromonas gingivalis* 'dan elde edilen sistein proteaz) için tanımlanmıştır. Kaspaz heterotetramerlerinde, 2 heterodimer kafa-kuyruk yapısında hizalanmışlardır. Buna uygun olarak, 2 aktif bölge molekülün karşı ucunda konumlanmıştır. Aktif merkez yapısı, her iki alt-birimden oluşan bir amino asit kalıntısı ihtiva eder. Katalitik bölge bir sistein sülfodril grubundan (Cys285) ve bir histidin imidazol halkasından (His237) oluşan bir DİAD içerir (Wilson ve diğerleri, 1994). İkisinde p20 altünitesiden yer almaktadır. Sistein proteaz tetrahedral geçiş hali Cys285 ve Gly238 omurga amid proton ile hidrojen bağlanması yoluyla stabilize edilmektedir

Önemli görülen bazı kaspazlar aşağıda detaylı olarak anlatılmıştır.

Kaspaz-1, -11 ve -5

Kaspaz-1 ve -11'den yoksun fareler bu kaspazların spesifik fonksiyonları hakkında daha detaylı bilgi elde edilmesini sağlamıştır. Kaspaz -1'in silinmesi hayvan gelişiminde hiçbir hastalık etkisi göstermemiştir ve bu farelerden elde edilen embriyonik fibroblastlar ve timositler çeşitli apoptotik uyarılara tam duyarlılık göstermişlerdir. Kaspaz-1 bulunmayan farelerde ise proinflamatuvar sitokinlerden IL-1b ve IL-18'in işlenmesi ve sekresyonunda ve LPS ile indüklenen septik şoka direnç gibi bozukluklar gözlenmiştir. Ancak kaspaz-1 yokluğunda, IL-1a sekresyonu devam etmesine rağmen aktivasyonunun neden olmadığı bilinmemektedir.

İlginç olarak, kaspaz-1 büyük olasılıkla kaspaz-11'in *downstream* hedefi olmasına rağmen, kaspaz-1'den yoksun farelerde kaspaz-11 ekspresyonu indüklenememiştir (Kang ve diğerleri, 2000).

Transgenik farelerde kaspaz-1'in aktif bölge mutantının ekspresyonu İL-1b sekresyonunu inhibe etmiştir ve bu farelerdeki nöronlar kısmen in vitro tropik faktör yoksunluğu ile indüklenen hücre ölümüne ve in vivo iskemik beyin hasarına karşı dirençlidir. ilginç olarak bu fareler ayrıca bir amyotrofik lateral sklerozis fare modeli olan transgenik SOD eksprese eden mutant farelerde, motor fonksiyon bozukluğunda gecikmiş bir etki göstermiştir (Friedlander ve diğerleri, 1997).

Murin kaspaz-11'i kaspaz-1 ile yüksek derecede homoloji göstermektedir. Kaspaz -11'den yoksun fareler normal olarak gelişirler ancak endotoksik şoka dirençlidirler ve kaspaz-11 direkt olarak pro IL-1b'yi işlememesine rağmen, kaspaz-1 aktivasyonundan ve IL-1b sekresyonundan yoksundur. (Wang ve diğerleri, 1996). Bu da kaspaz-11'in kaspaz 1 aktivasyonunda kritik bir rol oynadığını göstermektedir. Kaspaz-11 ve onun insan homolog benzeri kaspaz-5, kaspaz-1 ile kompleks bir form oluşturarak kaspaz-1 aktivasyonuna aracılık etmede önemli bir aşama olabilir (Martinon, Burns ve Tschopp, 2002). Ancak kaspaz -11 veya kaspaz -5'in direkt olarak kaspaz-1'i kestiğine dair in vivo veya in vitro bir kanıt yoktur. Zıt olarak, septik şok ve beyin iskemisini takiben apoptoza aracılık eden direkt bir proteolitik kesilme ile kaspaz-11, kaspaz-3'ü aktive etmektedir.

Kaspaz-2

Kaspaz ailesinin en dikkat çeken üyelerinden biridir. Uzun CARD taşıyan ön bölgesi (prodomain) kaspaz-2'nin çeşitli apoptotik uyaranlara cevaben erken aktivasyonunu sağlar ve aşırı eksprese olduğu sistemlerde Fas ile RAIDD aracılı etkileşmesi onun başlatıcı bir kaspaz olarak rol oynadığını göstermektedir (Ahmad ve diğerleri, 1997). Diğer taraftan, kaspaz-3 gibi efektör kaspazlar tarafından aktive edilebilir ve substrat tercihleri de efektör kaspaz sınıfında yer alır. (Li ve diğerleri, 1997). Kaspaz-2'nin diğer bir özelliği de hücre içi lokalizasyonun çekirdek ve golgi olmasıdır (Mancini ve diğerleri, 2000). Kaspaz-2'nin çekirdeğe alımı prodomaininde bulunan iki nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) ile gerçekleşir, fakat kaspaz-2'nin çekirdek havuzunun önemi henüz bilinmemektedir. Ancak mutant NLS ile kaspaz-2'nin sitozolik formunun aşırı ekspresyonu apoptozun indüklenmesine tamamen uygundur. (Baliga ve diğerleri, 2003). Golgide, kaspaz-2 ile apoptozla ilişkili olarak yapısal protein golgin 160'ın kesilmesi aracılığıyla bu organelin fragmentasyonuna katkıda bulunabilir (Mancini ve diğerleri, 2000). Bu nedenle, kaspaz-2 organel spesifik apoptotik olaylara katkıda bulunabilir. Ancak, bu sonuçlar aşırı eksprese

olduğu sistemlerde elde edilmiştir ve apoptotik olaylara kaspaz-2'nin etkisini inceleyen daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Kaspaz-2 ekspresyonunu inhibe etmek için oluşturulan, sempatik nöronların nörotrofik faktör yoksunluğu, hipokampal nöronlarda Ab ile indüklenen apoptoz ve lenfositlerde Fas aracılı ölüm gibi birkaç in vitro hücre ölüm modeli sistemleri kullanılmıştır (Haviv, Lindenboim, Yuan ve Stein, 1998). Ancak kaspaz-2'den yoksun fareler canlıdır ve kaspaz-2 bulunmayan hücrelerde birçok uyarana karşı apoptoz normal olarak indüklenmektedir. Bu farelerde gözlenen tek apoptotik gösterge, dişi mutant farelerin overlerinde aşırı germ hücresi oluşması, kemoterapötik ilaçla indüklenen apoptozda oositlerin direnci ve granzim B uygulanmış lenfositlerin ölümünün azalmasıdır (Bergeron ve diğerleri, 1998). Troy ve arkadaşları tarafından yapılan son araştırma olan kaspaz-2'den yoksun farelerde, genel nöron spesifik apoptotik kusurların eksikliği kaspaz-2'den yoksun sempatik nöronlarda kaspaz-9 yolağının kaspaz-2 fonksiyonunu üstlendiği kompenzasyon (telafi) mekanizmaları ile açıklanmaktadır.

Yeni bir yaklaşımla, küçük engelleyici RNA molekülleri (short interfering RNA molecules (siRNA)) kullanılarak endojen protein ekspresyon seviyeleri azaltılmıştır. Bu metot aslında kaspaz-2 için başarılı bir şekilde kullanılmış ve kültüre hücrelerde genotoksik stres aracılı hücre ölümünde kaspaz-2'nin rolü gösterilmiştir Böylece, transgenik farelerden farklı olarak, siRNA çeşitli apoptotik sistemlerde kaspaz-2'nin rolünün değerlendirilmesinde kullanılabilir.

Birçok yeni çalışma, *downstream* kaspaz ağı aktivasyonundan ziyade, kaspaz -2'nin hücre ölümüne aracılık eden kaspaz olmayan substratlara primer olarak etki ettiğini göstermiştir. Bu bağlamda, kaspaz-2'nin direkt olarak Bid'in kesilmesine aracılık ederek mitokondriden apoptojenik faktörlerin salımına neden olduğu gösterilmiştir (Lassus, Opitz-Araya ve Lazebnik, 2002). Tüm bu bulgular kaspaz-2'nin diğer kaspazlardan çok farklı özelliklere sahip olduğunu göstermektedir fakat in vivo hücre ölümündeki gerçek rolü hakkındaki bilgi hala oldukça azdır.

Kaspaz-12

Diğer kaspazlardan farklı olarak murin kaspaz-12 spesifik olarak endoplazmik retikulumda (ER) bulunmaktadır. Kaspaz-12 bulunmayan farelerin gelişimi normaldir. Ancak, kaspaz-12 silinmiş hücreler in vivo ve in vitro özellikle ER stresi ile indüklenen hücre ölümüne dirençlidir. Bu veriler kaspaz-12'nin ER düzensizliklerinde spesifik bir sensör olduğunu göstermektedir. Alzheimer hastalarında ER stresinin rolü, kaspaz-12'den yoksun kortikal nöronlarda Ab-sitotoksitesinin azalmış olmasıyla gösterilmiştir (Nakagawa ve diğerleri, 2000).

ER-stresi aracılı hücre ölümünün merkezinde kaspaz-12 yer alsada, kaspaz-12'nin upstream ve downstream yolları henüz tanımlanmamıştır. Şu ana kadar kaspaz-7 ve kalpainin kaspaz-12 ile aktivasyonunun yanı sıra kaspaz-12'nin sitokrom c'den bağımsız olarak kaspaz-9 aktivasyonunda yer aldığı da öne sürülmektedir (Morishima, Nakanishi, Takenouchi, Shibata ve Yasuhiko, 2002).

Kaspaz-8

Kaspaz-8'in özellikleri çok iyi karakterize edilmiştir ve ölüm reseptörü sinyal yolağında apikal kaspaz olarak rol oynamaktadır. Örneğin, kaspaz-8'den yoksun Jurkat hücreleri Fas ve TRAIL-R2'ye tamamen ve TNF- α ile indüklenen apoptoza kısmen dirençlidirler (Sprick ve diğerleri, 2000). Kaspaz-8 bulunmayan embriyolardan MEF, Fas, TNF ve DR3 reseptörleri ile indüklenen apoptoza dirençlidir, fakat UV radyasyon ve deksametazon gibi diğer yollardan gerçekleşen apoptoza duyarlıdırlar. İlginç olarak, jurkat hücrelerinde kaspaz-8 inaktivasyonu reseptör aracılı hücre ölümünü tamamen engelleyememektedir (Holler ve diğerleri, 2000).

Kaspaz-8'den yoksun fareler hiperemiye bağlı kalıcı abdominal hemoraji ve kardiyak kas gelişiminin bozulması nedeniyle embriyonik gelişimlerinin 11,5. gününde ölmektedir (Varfolomeev ve diğerleri, 1998). Ayrıca, kaspaz-8'den yoksun embriyolarda miyeloid progenitor hücrelerin sayısında azalma görülmüştür. FADD bulunmayan farelerde kalp kası gelişimi ve hematopoezde önemli bir rol oynayan ölüm reseptörü sinyal yolağında benzer fenotip göstermişlerdir (Yeh ve diğerleri, 1998). FADD bulunmamasının ayrıca T hücrelerinin aktivasyonunu ve B hücrelerinin gelişimini engellediği gösterilmiştir.

Homozigot kaspaz-8 mutasyonları ile sadece bozulmuş lenfosit apoptozu değil hem de ototimmün lenfoproliferatif bozukluk (ALPS) Fas sinyalizasyonu bozulmuş hastalarda görülmüştür. Yani kaspaz-8 in-vivo immün cevabın düzenlenmesinde hem negatif hem pozitif rol oynayabilmektedir.

Kaspaz-8'in apikal kaspaz rolüne ek olarak, kaspaz-6 gibi downstream kaspazlarla da aktive olabilir. Birkaç çalışmada, sitotoksik ilaçlar Fas ligandından bağımsız Fas kümelenmesi ve kaspaz-8 aktivasyonu aracılı ölüm reseptörü sinyal mekanizmasını aktive etmektedir (Chen ve Lai, 2001). Kaspaz-3 bulunmayan, orta serebral arteri çıkarılarak inme fare modeli olarak kullanılan bu farelerde, kaspaz-8'in kaspaz-3'ün yerine geçtiği gösterilmiştir (Le ve diğerleri, 2002). Tüm bu veriler kaspaz-8'in ölüm reseptörü yolağına ek olarak çok çeşitli hücre tipi, içeriği ve sinyalizasyonuna bağlı apoptotik fonksiyonlara sahip olduğunu göstermektedir.

Kaspaz-9

Kaspaz-9 mitokondrinin downstreami olarak hücre içi önemli bir kaspaz sinyalizasyonu amplifikatörüdür. Kaspaz-9 bulunmaması 12,5. embriyonik günde anormalliklerin başlamasıyla neo-natal embriyonik ölümle sonuçlanmaktadır (Hakem ve diğerleri, 1998). İlginç olarak, birkaç canlı kalan homozigot mutant belirli bir kusur göstermemiştir (Kuida ve diğerleri, 1998). Kaspaz-9 bulunmayan embriyolarda apoptoz ve kaspaz-3 aktivasyonundaki bozulmadan dolayı büyümüş ve bozulmuş bir beyincik gözlenmiştir. Buna rağmen, kaspaz-9 bulunmayan farelerde ölümün nedeninin apoptozdaki bozulmadan mı veya bu kaspazın bilinmeyen apoptotik bir fonksiyonundan mı kaynaklandığı bilinmemektedir.

Kaspaz-9 bulunmayan timositler, MEFlar, embriyonik kök hücreler ve splenositler çeşitli uyarılara karşı (UV radyasyon, sitotoksik ilaçlar ve deksametazon gibi) bozulmuş apoptoz göstermiştir. Apaf-1 bulunmayan fareler kaspaz-9'a benzer bir fenotip göstermiştir. Kaspaz-2'de belirtildiği gibi bazı kaspazları bulunmayan farelerde telafi olarak kaspaz ailesinin farklı üyelerinin ekspresyonu değişmiş olabilir. Hem kaspaz-3 hem de kaspaz-9 bulunmayan farelere anti-Fas antikorunun enjeksiyonu ölümcül olmuştur. Ancak kaspaz-3 ve kaspaz-9 bulunmayan farelerde kaspaz-6 ve -7'nin kompensatuvar olarak indüklenmesi bu sonuçların nedeni olarak düşünülmektedir (Zheng ve diğerleri, 2000).

Kaspaz -3, -6, -7

Efektör kaspaz ailesinin üyelerinden bu üç kaspaz yüksek derecede homologdur. Kaspaz-3 bulunmayan MCF-7 hücrelerinde apoptoz sürecinin analizi, CAD/DFF40- aracılı internükleozomal DNA degradasyonunun aktivasyonunda spesifik olarak kaspaz-3'ün gerekli olduğunu göstermiştir. (Tang ve Kidd, 1998). Kaspaz-3 bulunmayan farelerde bir batında doğan fareler vahşi tiplerine göre daha küçüktür ve çoğu apoptozun yokluğundan dolayı nöronal hiperlazi nedeniyle prenatal olarak ölmüştür (Kuida ve diğerleri, 1996).

Kaspaz-3 bulunmayan hayvanlardan elde edilen birçok hücre tipinde yapılan hücre ölümü analizleri membran blebilenmesi, DNA degradasyonu ve nükleer fragmentasyon gibi apoptotik işaretlerin tamamen inhibe olduğunu açığa çıkarmıştır. (Zhang, Cado, Chen, Kabra ve Winoto, 1998). Diğer taraftan, kaspaz-3 bulunmayan MEFlar (mouse embriyo fibroblastları) nihai ölümden kurtulamamış ve nükleer kondensasyon ve fosfotidil serin açığa çıkması gibi birçok apoptotik özelliği göstermemiştir. Benzer şekilde hücresiz apoptotik sistemlerde kaspaz-3'ün tükenmesi birçok substrat kesilmesi, DNA fragmentasyonu, kromatin marjinalizasyonu gibi downstream olayların çoğunu inhibe derken, kaspaz-7 veya -6'nın ortadan kaldırdığında bu etkiler gözlenmemiştir (Slee ve diğerleri, 2001). Böylece, kaspaz-3 spesifik downstream olayların tamamında olmasa da çoğunda önemli bir efektördür. Kaspaz-3'ün aksine kaspaz-6 ve -7 ise önemli bir fonksiyona sahip değildir.

Yukarıdaki bilgiler bir ikilem yaratmaktadır, çünkü hiçbir efektör kaspaz apoptozun tüm yönleriyle gerçekleşmesini tamamiyle kontrol edemez. Ancak bazı efektör kaspazlar, örneğin kaspaz-7 için ER stresi gibi, (Rao ve diğerleri, 2001) bazı spesifik yollarda belirgin bir role sahip olabilirler, fakat genel apoptotik olayların çoğunda elzem olmasalar da tüm apoptotik özelliklerin tamamen ortadan kalkması için üçünün birden inhibisyonu gerekli olabilir. Alternatif olarak, kaspaz-3 apoptozda birincil rol oynayabilir fakat yokluğunda kompensatuvar (dengeleyici) mekanizmalar yeni bir yolak ortaya çıkarabilir (Slee, Adrain ve Martin, 2001). Bu tür dengeleyici mekanizmanın birden fazla spesifik örneği bulunmaktadır. Örneğin kaspaz-8 kaspaz-3 aktivitesini ikame ettirebilir. (Le ve diğerleri 2002); kaspaz-9 inaktivasyonu kaspaz-3 ve -6 aktivasyon kaybına yol açarken, kaspaz-7'yi aktive edebilir (Marsden ve diğerleri, 2002); kaspaz-9 kaspaz-2 ile yer

değiştirebilir (Troy ve diğerleri, 2001); kaspaz-3 ve -9'un silinmesi kaspaz-6 ve -7'nin dengeleyici mekanizması ile sonuçlanabilir (Zheng, Hunot, Kuida ve Momoi, 2000).

Kaspaz sinyalizasyonu

Kaspaz aktivasyon mekanizması: Tüm kaspazlar hücrelerde katalitik olarak inaktif zimojenler olarak üretilirler ve apoptoz sırasında proteolitik olarak kesilerek, aktivasyonlarının gerçekleşmesi gerekmektedir. Efektör kaspazlar başlatıcı veya apikal kaspazlar ile aktive olurlar. Ancak, apoptozda temel bir soru başlatıcı kaspazların nasıl aktive olduğu ve spontan hücre ölümünden korunmak için bu aktivasyonun nasıl düzenlendiğidir. Genellikle apikal kaspaz aktivasyonunda birkaç kaspaz zimojeni bir araya gelerek büyük protein komplekslerinin oluşumu yer almaktadır. (Mittl ve diğerleri, 1997; Chang ve diğerleri, 2002). Tüm başlatıcı kaspazlar başlatma kompleksi içine alımı sağlayan DD süperailesinin (DED veya CARD), bir üyesinin varlığı ile karakterizedir.

Prokaspaz-8 ve -10 için bir aktifleştirici kompleks olarak ölümü indükleyici sinyal kompleksi: Prokaspaz-8 ve -10 ölüm reseptörleri ile etkileşerek apoptotik yolağı tetikleyen apikal kaspazlardır. TNF reseptör süper ailesinin birkaç üyesi (TNFR1, CD95 [Fas/APO-1], TRAIL-R1, TRAIL-R2, DR3, DR6) intrasellüler kısımlarında ölüm bölgesi (DD) içerir. (Ashkenazi ve Dixit, 1998). Uygun ligandlar ile CD95 ve TRAIL-R1/R2'nin uyarılması ölümle indüklenen sinyalizasyon kompleksinin (DISC) oluşumu ile sonuçlanır. CD-95 ve TRAIL-R1/R2 DISC oligomerize, bazen de trimerize, reseptörler oluşur, DD içeren adaptör molekül FADD/MORT 1 (Fasla ilişkili ölüm bölgesi), prokaspaz 8'in 2 izoformu (prokaspaz-8/a [FLICE, MACH α 1, Mch5] ve prokaspaz-8/b [Mach α 2]), prokaspaz-10, ve hücresel FLICE-inhibitör proteinler (c-FLIPL/S/R) (Peter ve Krammer, 2003). DISC'teki moleküller arası etkileşimler homotipik iletişime dayanmaktadır. FADD'ın ölüm efektör bölgesi (DED) ile prokaspaz-8 , -10 ve FLIPL/S/R'ın ölüm efektör bölgesi N terminaline karşılık etkileşime girer. Böylece DISC oluşumu prokaspaz-8 ve 10 moleküllerinin birbirine yaklaşması ile sonuçlanır.

Prokaspaz-8 aktivasyonu, indüklenmiş yakınlık modeline ("induced proximity" model) göre yüksek lokal konsantrasyonlarda ve prokaspaz moleküllerinin uygun karşılıklı konumlanmaları ile DISC'te kendi otoproteolitik aktivasyonlarına yol açtıkları düşünülmektedir (Boatright ve diğerleri, 2003). Bir takım in vitro çalışmaya göre güçlü bir

kanıt, prokaspaz 8'in otoproteolitik aktivasyonu reseptör kompleksinde oligomerizasyon ile meydana gelmektedir. Ayrıca, prokaspaz molekülleri ile dimer oluşumu proteolitik aktiviteye sahiptir ve prokaspaz-8'in proteolitik işlenmesi prekürsor dimerler arasında meydana gelmektedir. İlginç olarak, prokaspaz-8 ve olgun kaspaz-8 farklı substrat spesifitesine sahiptir (Chang, Xing, Capacio, Peter ve Yang, 2003). Bunun olgun kaspaz-8'in işleni sırasında, kaspaz-8 aktif merkezindeki konformasyonel değişikliklerden meydana geldiği düşünülmektedir.

İki basamaklı modele göre, prokaspaz 8'in işlenmesi 2 ayrı kesilme olayı içerir (Scaffidi, Medema, Krammer ve Peter, 1997). Birinci kesilme basamağı proteaz bölgeleri arasında meydana gelir ve ikinci kesilme basamağı prodomain ve büyük proteaz altünitesi arasından gerçekleşir. Buna uygun olarak, birinci kesilme basamağından sonra p43/p41 ve p10 alt üniteleri oluşur. Her iki parçalanma ürünü, p43/p41 DED etkileşimi ile ve p10 büyük proteaz bölgesi etkileşimi ile DISC'e bağlı olarak kalmaktadır. İkinci kesilme basamağının sonucu olarak, p43/p41 prodomaini p26/p24 ve p18e işlenir. Böylece, DISC'te aktif kaspaz-8 heterotetramerleri oluşur. Sonrasında, olgun kaspaz-8 heterotetramerleri apoptotik süreçleri tetiklemek üzere sitozole salınır (Lavrik ve diğerleri, 2003).

Ayrıca prokaspaz-10'da DISC'te aktive olarak aktif bir heterotetramer oluşturur. Ancak, prokaspaz-8 yokluğunda CD95 veya TRAIL-R1/R2 stimülasyonuna cevaben hücre ölümünü indükleyip indükleyemeyeceği tartışmalıdır.

Prokaspaz 9 için aktivasyon kompleksi olarak apoptozom: Sitotoksik stress, ısı şoku, oksidatif stress ve DNA hasarı gib bir takım apoptotik uyaran mitokondriden sitokrom c salımına neden olur. Sitokrom c salımını apoptozom adı verilen büyük molekül ağırlıklı sitoplazmik kompleks oluşumu takip eder (Chinnaiyan, 1999). Memelillerde apoptozomun merkezi iskele proteini Apaf-1 (apoptotik proteaz aktive edici faktör) olarak bilinen hermafrodit bir solucan olan *Caenorhabditis elegans*'taki programlı hücre ölümünde yer alan CED-4 homoloğu 140 kDa'luk bir proteindir. Sitokrom c ve dATP varlığında, Apaf-1 oligomerize olarak çok büyük bir apoptozom kompleksi (700–1,400 kDa) oluşur. Prokaspaz-9'un CARD etkileşimi ile komplekse alımıyla aktivasyonu gerçekleşir. Biyokimyasal olarak prokaspaz-9 aktivasyonunun dimerizasyonla meydana geldiği gösterilmiştir. Ayrıca, prokaspaz-9'un proteolitik aktivasyonu dimerizasyondan sonra gerçekleşir ve kaspaz-9 dimerlerinin stabilizasyonu için önemli olan iç bölge bağlarının

(interdomain) kesilmesi ile sonuçlanır (Jiang ve Wang, 2000).

Kaspaz-1 ve -5 için aktivasyon kompleksi olarak inflamozom: Başlatıcı kaspaz-1 ve -5 aktivasyonu inflamozom adı verilen komplekste meydana gelir. İnflamozomda hem prokaspaz -1 ve -5 hem de CARD içeren protein NALP-1 bulunmaktadır. Bu kompleksin oluşumu mikrobiyal patojenlere immün cevapta bir role sahip olan sitokinler IL-1 β and IL-18'in aktivasyonu ile sonuçlanır (Martinon ve Tschopp, 2004).

Efektör kaspaz kaskadı: Efektör kaspaz kaskadının aktivasyonu ekstrinsik (ölüm reseptörü aracılı) ve intrinsik (mitokondri aracılı) olmak üzere farklı yollardan olmaktadır.

Ölüm reseptörü aracılı apoptozda, iki tip sinyalizasyon yolağı bulunmaktadır. İlk tipte hücreler yüksek seviyede DISC oluşumu ve artmış aktif kaspaz 8 miktarı ile karakterizedir. Aktif kaspaz-8 direkt olarak efektör kaspaz-3 ve -7'nin aktivasyonuna yol açar. Diğer durumda ise mitokondriden sitokrom c salınımı için kaspaz-8, Bcl-2 ailesi proteinlerinden Bid'i terminal kısmına ayırır. Bid ve t-Bid mitokondriye transloke olarak mitokondriyal porları açarak sitokrom c salınmasını sağlar. Mitokondriden sitokrom c salınmasıyla apoptozom oluşur ve prokaspaz-9 aktivasyonu gerçekleşir. Aktif kaspaz-9 da downstreami efektör kaspaz-3 ve -7 yi aktive eder. İkinci tip sinyalizasyon Bcl-2 ve Bcl-xL (anti-apoptotik proteinler) gibi Bcl-2 ailesi üyeleri ile engellenebilir.

Intrinsik yolak UV veya γ -radyasyon, büyüme faktörlerinin yokluğu ve kemoterapötik ilaçlar gibi bir dizi faktor ile tetiklenerek mitokondriden sitokrom c salınımı ile apoptozom oluşumuna yol açarak prokaspaz-9'u aktive eder. (Jiang ve Wang, 2000). Kaspaz-9 da efektör kaspaz-3 ve -7'yi keserek ölüm kaskadını başlatır (Robertson, Enoksson, Suomela, Zhivotovsky ve Orrenius, 2002).

Hücrel kaspaz inhibitörleri

Kaspazların etkisi hem DISC'te kaspaz aktivasyonunun engellenmesi hemde enzimatik kaspaz aktivitesinin inhibisyonu ile birkaç seviyede düzenlenebilir. c-FLIP proteinleri ölüm reseptörleri ile indüklenen apoptozun iyi bilinen inhibitörleridir. C-FLIPler DISC'e alımlarını kolaylaştırmak için N terminalinde peş peşe 2 DED'e sahiptir. Protein düzeyinde üç c-FLIP izoformu tanımlanmıştır: c-FLIPL, c-FLIPS ve c-FLIPR (Golks, Brenner, Fritsch,

Krammer ve Lavrik, 2005). Aşırı ekspresyon durumlarında tüm izoformlar DISC'te işlenmesini engelleyerek prokaspaz-8 aktivasyonunu inhibe ederler. Aynı zamanda, düşük konsantrasyonlarda c-FLIPL DISC'te, c-FLIPL-prokaspaz-8 heterodimerleri ile prokaspaz-8 aktivasyonunu kolaylaştırır (Micheau ve diğerleri, 2002).

IAP (apoptoz inhibitörü) ailesi proteinleri, XIAP, c-IAP1, c-IAP2 ve ML- IAP/livin de dahil olmak üzere 8 memeli ailesi üyelerini kapsamaktadır. Spesifik olarak başlatıcı kaspaz-9 ve efektör kaspaz-3 ve -7'yi inhibe eder. IAPların aktivitesi Drosophila proteinleri Reaper, Hid ve Grim'in yapısal homoloğu olan (Du, Fang, Li, Li ve Wang, 2000). Smac/DIABLO ile düzenlenmektedir. Smac/DIABLO apoptoz sırasında mitokondriden salınarak IAP'sı inhibe ederek kaspaz aktivasyonunu kolaylaştırır. Omi/HtrA2 IAP fonksiyonunu düzenleyen diğer bir modülatördür. Omi/HtrA2 mitokondride lokalize serin proteazdır ve Smac'a benzer bir mekanizma ile sitozole salınarak IAP'sı inhibe eder. IAP'lar sadece doğal kaspaz inhibitörleri değildir. Baculaviral p35 proteini bir pan kaspaz inhibitörüdür ve çoğu kaspazı inhibe etmektedir. IAP'sa sadece kaspaz-3, -7 ve -9'u etkiler. (Miller, 1999). P35 ile kaspaz inhibisyon mekanizması p35 ve kaspaz arasında bir tiyo ester bağının oluşumu ile karakterize bir inhibitor kompleksinin oluşumunu içermektedir. Diğer bir pan kaspaz inhibitörü, ser- pin CrmA, sığır çiçeği virüsünden (cowpox) köken almaktadır. CrmA inhibisyon mekanizması kaspaz aktif merkezinin kovalent modifikasyonu ile gerçekleşmektedir.

2.3.3. Kaspaz substratları ve substrat spesifitesi

Genellikle kaspaz spesifitesi hakkında en bilinen özellik substratlarını aspartik asit (Asp) kalıntılarından kesmeleridir. Aslında bir peptit/proteinin iyi bir kaspaz substratı olabilmesi için birçok başka koşulu da sağlaması gerekmektedir. Asp içeren peptitleri kesin olarak substrat veya substrat değil olarak tanımlamak yerine iyi, orta, kötü kaspaz substratı olarak belirtmek daha doğrudur. Bir peptit dizisi P4 -P3 -P2 -P1 -P1' ve P1 -P1' arasındaki bağ kesilebilir bağ ise eğer 1) P1 kalıntısı Asp ise, istisnai olarak Drosophila kaspaz Dronc, görece kaspaz-9 in vitro Glu'dan sonrada kesebilmektedir; 2) P1' kalıntısı küçük bir aminoasittir ve Gly, Ser veya Ala olabilir. 3) P4-P3-P2 kalıntıları katalitik etkileşimler için tamamlayıcı niteliktedir. P4-P2'deki optimal kalıntılar (XXX(D/G)) vasat bir substratı mükemmel bir kaspaz substratına çevirebilir. Örneğin efektör kaspazlarca DEV(D/G) peptidi daha etkili kesilirken WEH(D/G) peptidi daha az etkili kesilmektedir. Ancak

inflamatuvar kaspazlar için bu durumun tam tersi doğrudur. Doğal protein substratlarda iki kural daha geçerlidir. 4) Substrat kesilme bölgesi (P4-P1') sulu ortama maruz kalmaktadır. Bu nedenle doğal substrat katlanma döngüleri proteoliz olmaya eğilimlidir. 5) Kaspazlar ve substratları ko-lokalizedir (Pop ve Salvesen, 2009).

Kaspazların yapısı ve substrat tanıma mekanizması

Aktif kaspaz -1, -2, -3, -7, -8 and -9'un yapısı tayin edilmiş, kaspaz spesifitesi ve katalitik özellikleri hakkında büyük oranda bilgiler elde edilmiştir. (Riedl ve Shi, 2004). Bir aktif kaspaz, her bir monomerinde büyük ve küçük alt üniteler bulunan bir homodimerdir. Aktif enzimde her bir monomer altı anti-paralel β -ipliğinden ve devamında sürekli bir 12 iplikçikli β -tabakasından oluşur. Çeşitli α -heliks ve kısa β -iplikçikler merkezi B-tabakası etrafında yer alır ve bir küresel kıvrım meydana getirir. Dört kıvrım yapan döngü (L1-L4) ile oluşturulan aktif bölgeleri, β tabakanın iki karşıt uçlarında yer almaktadır. L1 ve L2'nin bir kısmı katalitik Cys kalıntısı içerir ve p20 alt ünitesinin bir parçasıdır. L3 ve L4 ise p10 alt ünitesinde bulunmaktadır. Kaspaz aktivasyonu boyunca, L2 kıvrımı p10 ve p20 arasından kesilerek iki segmente ayrılır. L2 kıvrımının C terminal bölgesi komşu monomerin aktif bölgesi ile stabilize olmaktadır. Tüm kaspazlarda, dört kıvrım arasında L1 ve L3 nispeten daha korunmuş uzunluk ve içeriğe sahipken, L2 ve L4 daha yüksek derecede varyasyon göstermektedir (Pop ve Salvesen, 2009).

Bu dört aktif bölge kıvrımı kaspaz substratlarının sekans spesifitesini belirler. Substratlarda P4-P3-P2-P1 pozisyonları için bağlayıcı kısımlar sırasıyla S4-S3-S2-S1 alt bölgeleri olarak bilinmektedir. S1 ve S3 alt bölgeleri tüm kaspazlarda nerdeyse aynı iken S2 ve S4 alt bölgeleri korunmuştur. S1 alt bölgesi, L1'de bir Arg kalıntısı, L' başlangıcında bir Gln kalıntısı ve L3 sonunda bir Arg kalıntısı olmak üzere değişmeyen üç kalıntıdan oluşmaktadır. (Riedl ve Shi, 2004). En temel bağlanma bölgesi olarak P1 pozisyonunda Asp yer alır. Kaspaz-3 ve kaspaz-7 tercihen aromatik S2 alt bölgesinde küçük alifatik kalıntılar (Ala, Val). bulundurur. Zıt olarak, S2 alt bölgesi başlatıcı kaspazlarda daha büyüktür ve böylece daha ağır yan zincirdeki kalıntıları daha iyi tolere edebilir. L3 kıvrımındaki Arg kalıntısı S1 alt bölgesine katıkıda bulunur ve P3 kalıntısına temel-zincir-temel-zincir hidrojen ile, tercihen Glu'da S3 alt bölgesine bağlanır (Li ve Yuan, 2008).

S4 alt bölgesi farklı kaspazlara temel spesifite özelliği sağlar (Degterev, Boyce ve Yuan, 2003). Kaspaz-1 büyük hidrofobik kalıntılar bulunan en geniş S4 alt ünitesine sahiptir. Zıt olarak, Kaspaz-2, -3 ve -7 P4 pozisyonunda daha dardır ve tercihen bir Asp kalıntısına sahiptir. Kaspaz-8 ve -9'un S4 alt bölgesi orta pozisyonları işgal eder ve küçük hidrofobik Val veya Leu kalıntılarından yana tercih gösterir. Ancak kaspaz-8 P4 pozisyonunda hem küçük hidrofobik (Ile) hemde asidik (Asp) kalıntılara eşit toleranstadır. Kaspaz-2 etkili bir substrat kesilmesi için ekstra bir S5 alt bölgesine ihtiyaç duyar. (Schweizer, Briand ve Grutter, 2003). Kaspaz-3 ve -7'nin aksine, küçük hidrofobik bir P5 kalıntısının bulunması ile katalitik etkinlikte 35 kat artış görülmektedir. Floresans peptid substratlar kullanılarak yapılan sistematik bir çalışma P10 pozisyonundaki kalıntıların seçicilik derecesini göstermiştir. Küçük kalıntılar (Gly, Ala and Ser) P10 pozisyonunu tercih etmektedir ve büyük aromatik yan zincir daha iyi tolere edilmektedir, yüklü kalıntılar veya prolin ise tercih edilmemektedir.

Kaspaz substrat kesilmesi ile meydana gelen anahtar morfolojik değişiklikler

Proteinlerin çoğu için kaspaz aracılı kesilmenin sonuçları tam olarak anlaşılamamıştır. Bununla birlikte birkaç durumda, bazı proteinlerin proteolizi hücre ölümünün morfolojik değişiklikleri ile ilgilidir. Buna DNaz inhibitörü ICAD klasik bir örnektir. Kaspaz-3 ile ICAD'ın kesilmesi aktif CAD nükleazları serbest hale getirir ve apoptotik DNA fragmentasyonlarına aracılık eder (Crawford ve Wells, 2011). Ayrıca DNA helikaz olan akinüs ve helikardın kesilmesi kromatin kondensasyonuna ve nükleer remodellinge katkıda bulunur. Gelsolin, ROCK1 ve PAK2 gibi birkaç substratın kesilmesi ise apoptozda klasik morfolojik özellik olan membran blebilenmesinde görülmektedir. Kaspaz-3 ile gelsolin kesilmesi F aktini depolimerize edebilen yapısal olarak aktif fragment oluşturur. Gelsolin bulunmayan nötrofillerde apoptoz sırasında oldukça gecikmiş membran blebilenmesi görülmektedir. Bu da blebilenmede kaspazla aktive olan gelsolin ile aktinin yeniden organize olması gerekliliğini göstermektedir (Geng ve diğerleri, 1998). Kaspazlar ayrıca ROCK-1'i kesip aktive ederek miyozin hafif zinciri fosforile ederek membran blebilenmesine sebep olurlar (Coleman ve diğerleri, 2001; Sebbagh ve diğerleri, 2001).

Kaspazlar ara filamentlerden sitokreatin-18 ve vimentin 103 gibi hücre iskelet yapısında, veya Gas291 ve plektin gibi filament organizasyonuna aracılık eden birçok proteini de tahrip eder. Bu kesilmeler hücre morfolojisindeki apoptotik değişikliklere direkt olarak katkıda

bulunur. Fodrin gibi kortikal aktin ağı proteinleri, ekstrasellüler matriks proteinleri ve kortikal aktin filamentlerine bağlanan birçok fokal adezyon proteini kaspazların hedefidir. Bu tür substratlara örnek fokal adezyon kinaz olan, Cas veya paksilindir (Lesay, Hickman ve Gibson, 2001). Bu proteinlerin kesilmesi hücrenin büzülmesine ve yüzeyden kopmasına katkıda bulunur ve önemli ölçüde anti-apoptotik integrin sinyalini engeller. Kaspaz substratlarının büyük bir oranı hücre adezyonunda veya tutunma ve ara boşluklarda hücre-hücre iletişimde yer alırlar. Örneğin β -katenin, e-kaderin, plakoglobin veya desmoglein.

Kaspazlar nükleustaki birçok proteini keserek nükleusun tahribatını başlatırlar. İki boyutlu jel elektroforezi ile yaklaşık olarak 70 nükleer matriks proteininin apoptoz sırasında bozulduğu veya yer değiştirdiği gösterilmiştir (Gerner ve diğerleri, 2002). Birçok kesilme, nükleer laminin dağılmasına ve birçok nükleer por bileşeninin bozulmuş nükleer transportuna yol açar. DNA tamirinin inhibisyonu, örneğin PARP-1 veya ATM ve DNA-PK kesilmesi ile, apoptoz sürecini ilerletmektedir. Diğer hedeflenen faktörler, DNA polimeraz Pol ϵ , MCM3 veya replikasyon faktörü RFC140 gibi DNA sentezi ve replikasyonunda yer almaktadır. Ayrıca transkripsiyonel rolü olan veya nükleer matrikste yapısal fonksiyonlara sahip olan ve kromatine bağlanan birçok protein yıkılır. Hemen hemen tüm durumlarda, bu kesilmeler artık DNA'ya bağlanamayan veya nükleer matrikste kromatin stabilizasyonu için uygun olmayan proteinlerin üretimi ile sonuçlanır. Birkaç istisna dışında hemen hemen tüm makromolekül sentez yolları kaspazlarca bozulmuştur. RNA helikaz A ve U1 70kDa snRNP gibi birleşme faktörü ve en az sekiz farklı heterojen nükleer ribonükleoprotein kesilmesi RNA sentezi, işlenmesi ve transportunun durmasına yol açar. Dahası, eIF2a, eIF3 ve eIF4G proteinleride içeren başlatıcı faktörlerin inaktivasyonu ve translasyonu veya eIF2-a fosforilasyonu ile protein sentezinin engellemesine yol açar (Erhardt, Tomaselli ve Cooper, 1997).

2.3.4. Kaspaz inhibitörleri

Viral ve hücresel kaspaz inhibitörleri

Virüsler çoğalmak için bir konakçı hücreye ihtiyaç duyarlar. Bu nedenle viral çoğalmayı engellemenin en etkili yolu infekte hücrenin kendini öldürmesidir. Ancak, virüslere karşı bir savunma mekanizması olarak kullanılan apoptoza karşı virüsler, hücre ölümü inhibitörleri

taşırlar. Birçok viral hücre ölümü inhibitörü aktif kaspazlara bağlanarak etki gösterir (Ray ve diğerleri, 1992).

İlk tanımlanan kaspaz inhibitörü Cowpox virüsü tarafından üretilen Sitokin cevabı değiştiricisi (Cytokine Response Modifier A (CrmA)), kaspaz-1 inhibitörü olarak etki göstermektedir. Kaspazların apoptozdaki rolleri keşfedilmeden önce, virüslerin CrmA'yı IL-1b ile tetiklenen inflamatuvar cevabın azaltılması için aktif kaspaz-1 bağlanarak etki ettiği varsayılmıştır. Bu varsayım apoptozda anahtar rol oynayan kaspazların tanımlanması ile enfekte olmuş hücrelerin gerçekten de crmA ile intiharının engellendiği doğrulanmıştır (Ray ve Pickup, 1996).

CrmA

CrmA, kaspaz-1 için inhibitör sabiti yaklaşık 10 pikomolar ve kaspaz-8 için ise 300 pM'dan daha azdır ve bu konsantrasyonlarda bu kaspazlara bağlanabilir ve bu kaspazları inhibe edebilir. Bu şekilde crmA, kaspaz-1 ile olgun IL-1b ve IL-18 üretimini ve kaspaz-8 aracılı TNF reseptör ailesi ile tetiklenen apoptozu engelleyebilir (Tewari ve Dixit, 1995.) CrmA'nın gösterilen inhibitör katsayıları, kaspaz-3, -6 ve -7'yi in vivo inhibe edemezken, kaspaz-10 ile ilgili sonuçlarda bazı tutarsızlıklar bulunmaktadır (Garcia-Calvo ve diğerleri, 1998). CrmA in vitro 2nM inhibitör konsantrasyonunda kaspaz-9'u inhibe etmesine rağmen, kaspaz-9 silinmiş hayvanlardan elde edilen lenfositler, deksametazona dirençlidir, fakat genetik yapısı değiştirilmiş farelerden elde edilen lenfositlerin eksprese ettiği crmA dirençli değildir ve crmA in vivo kaspaz-9'u inhibe edememektedir (Kuida ve diğerleri, 1998).

Proteinaz inhibitörü (PI-9)

CrmA'nın en yakın memeli homoloğu, serin proteaz inhibitörü lökosit elastaz inhibitörüdür fakat bu serpin aktif P1 bölgesinde asidik bir kalıntıya sahip değildir ve kaspazları inhibe edemez. Sitotoksik lenfosit serpin proteinaz inhibitörü 9 (PI-9) (ayrıca granzim B inhibitörü olarak da bilinmektedir.) crmA'nın yakın akrabasıdır fakat, omurgalı serpinleri arasında psödosubstrat bölgesinde asidik bir kalıntı taşıması açısından tektir. İn vitro deneylerde PI-9 kaspazları inhibe edemez fakat granzim B'yi inhibe edebilir. Bununla uyumlu olarak, granzim B aracılı apoptozu karşı hücreleri koruyabilirken, kaspaz-8 kullanılan CD95 yolağını inhibe edemez (Bird ve diğerleri, 1998).

p35

Bir bakulovirüs protein olan p35, viral enfekte böcek hücrelerinde savunma olarak apoptozu inhibe edebilir. Birçok böcek kaspazını inhibe edebilmesinin yanı sıra, p35 *C. elegans* CED-3 ve memeli kaspazlarından -1, -3, -6, -7, -8 ve -10'u 10nM 'dan daha az inhibitör konsantrasyonu ile inhibe edebilir. Fakat kaspaz olmayan sistein veya serin proteazları inhibe edemez. Kaspaz ile P1 kalıntısından (Asp87) kesildikten sonra, p35 SDS ile ayrılarak bir kompleks oluşturur. p35'in kesilmiş alt ünitesi kaspazlarla birlikte bir inhibitör kompleksi olarak kalır ve p35, crmA'dan tamamen farklı bir şekilde çalışır. (Clem ve diğerleri, 1991).

IAPs

Lois Miller ve arkadaşları tarafından bakulovirüs ürünlerinden tanımlanan apoptoz protein inhibitörleri (IAPs) p35-silinmiş bakuloviral suşu ile enfekte hücrelerin apoptozunu inhibe edebilmektedir. Daha sonra, genetik ve sekans bazlı bir dizi deney ile bir grup hücrel IAP homologu mantarlarda, *C.elegans*'ta, *Drosophila* ve omurgalılarda tayin edilmiştir.

IAPs'ların anti-apoptotik fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir. Böcek sistemlerinde yapılan genetik ve biyokimyasal çalışmalar bazı IAPs'ların etkisinin grim, reaper ve hid gibi apoptoz aktive edici proteinler ile etkileşimleri aracılığı ile olabileceğini göstermektedir. Ancak biyokimyasal çalışmalarda, böcek ve omurgalı IAPs'ların direkt olarak aktif kaspazlara bağlanarak ta etki ettiğini göstermiştir. *Drosophila* DIAP1 memeli kaspaz-3'ü inhibe edebilmektedir.

Memeli IAPs'ları XIAP (MIHA, hILP), MIHB (c- IAP1), MIHC (c-IAP2), NAIP ve Survivin kaspazlara bağlanarak inhibe ettikleri gösterilmiştir. Ancak XIAP ve survivinin inhibisyon katsayısı diğer IAPs'lardan düşüktür ve bu onların in vivo daha potent olduklarını göstermektedir. XIAP ve Survivin kaspaz-3 ve -7'yi inhibe ettiği gösterilmiştir (LaCasse, Baird, Korneluk ve MacKenzie, 1998).

Sentetik kaspaz inhibitörleri

Apoptoz uygunsuz olarak iskemik vasküler hastalıklar (kalp krizi, felç) ve dejeneratif hastalıklar (Alzheimer hastalığı, motor nöron hastalıkları) gibi birçok hastalıkta

görülmektedir. Bu nedenle farmakolojik kullanım için kaspaz inhibitörlerinin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır. Bu tür sentetik kaspaz inhibitörleri aynı zamanda deneysel modellerde kaspaz aktivitesinin değerlendirilmesi için de faydalıdır.

Kaspazlar yaklaşık 20 sistein proteaz ailesinden biridir. Iyodamit gibi sistein proteaz inhibitörlerinden bazıları kaspazlarda katalitik sistein ile reaksiyona girer ve onları inhibe eder. Fakat bu inhibitörler kaspazlar için spesifik değildir.

Birçok spesifik kaspaz inhibitörü kaspazların substrat kesilme bölgeleri temel alınarak geliştirilmiştir. Bu peptitler aktif kaspazlar için yalancı substratlar olarak etki gösterirler ve kompetitif inhibisyon yaparlar. Bunlar içerdikleri aspartat kalıntısına göre sınıflandırılırlar; örneğin tek bir aspartate kalıntısı içeren, Boc-aspartil(OMe)-florometilketon: Boc- Asp-FMK; üçlü kalıntı içeren, benzoksikarbonil-val-ala-asp(OMe)florometilketon: z-VAD-FMK; dörtlü kalıntı içeren, YVAD-FMK.

Sentetik inhibitörlerin kimyasal etki mekanizması peptitlerin bağlı olduğu kimyasal gruplar ile ilişkilidir. Floro veya kloro metil keton gruplarına uygun peptitlerin bağlanması irreversible kompetitif inhibitörleri oluşturur. Aktif bölge sistein ile bir tiyometil keton II formları enzimin inaktivasyonu ile sonuçlanır. Halometil ketonlar yüksek derecede reaktiftir ve kaspazlar için tamamen spesifik değildirler. Peptitler aldehit grupları (-CHO) ile bağlandığında (veya nitriller veya ketonlarla) reversible inhibitor olarak etki gösterirler. Bunlar proteazı kimyasal olarak değiştirmeksizin kaspaz substratı olarak etki gösterirler. Inhibitörün her iki sınıf içinde hız sınırlandırıcı basamağı, enzim-inhibitör ilişkisinin olduğu görülmektedir. In vitro potent iken, hücrede peptit kaspaz inhibitörlerinin aktivitesi membran permeabilitesi ile sınırlıdır. -FMK bulunanlar, aldehit bazlı inhibitörlerden çok daha permeabildir. Aldehit bazlı inhibitörlerin 1 μ M'dan daha düşük konsantrasyonlarda canlı hücrelere girişleri zayıftır ve de kaspazları inhibe edememektedirler.

Peptit kaspaz inhibitörleri in vitro kaspaz aktivitesini yüksek pikomolardan düşük nanomolar aralığında inhibe edebilmektedir. Halometil keton bağlı peptit YVAD aldehit bağlı peptit ile benzer kinetiğe sahiptir. Ac-WEHD-CHO, Ac-DEVD-CHO, Ac-YVAD-CHO, t-butoksikarbonil-IETD-CHO ve t-butoksikarbonil-AEVD-CHO kaspazlara karşı geniş bir aralıktaki konsantrasyonda (75pM-10 μ M) spesifite ve seçicilik göstermektedirler.

Bu proteaz inhibitörler katepsin gibi diğer proteazları etkili şekilde inhibe edebilen iyodoasetamid, z-VAD-FMK, z-DEVD-FMK ve Ac- YVAD-CMK gibi genel sistein proteaz inhibitörlerinden daha spesifik olmalarına rağmen, aynı konsantrasyonda hem doku kültüründe hem de in vitro genellikle kaspazlara etki göstermektedirler. YVAD-CHO yaygın olarak spesifik kaspaz inhibitörü olarak kullanılmaktadır ve potent olarak kaspazları inhibe etmektedir. Diğer kaspaz inhibitörlerinin hedefi sadece spesifik kaspazlar değildir. Örneğin, genis bir aralıkta kaspaz inhibisyonu yapmadığı ve potent olarak kaspaz-3'ü inhibe ettiği kabul edilsede DEVD-CHO güçlü şekilde kaspaz-7 ve-8'i de inhibe etmektedir. Z-VAD-CHO ise güçlü bir şekilde kaspaz-1, -3, -5, -7, -8 ve -9'u inhibe ederken kaspaz-2 için iyi bir inhibitör değildir (Ekert, Silke ve Vaux, 1999).

2.4. Diğer Hücre Ölümleri

2.4.1. Otofaji

Otofaji lizozomlarla sitoplazmik bileşenlerin parçalanmasını anlatmak için kullanılan genel bir terimdir (Cuervo, 2004). Bu işlem ekstrasellüler ve plazma membran proteinlerinin endositoz aracılı lizozomal parçalanmasından oldukça farklıdır. Makrotofaji, mikrotofaji ve şaperon aracılı olmak üzere üç çeşit otofaji belirlenmiştir (Genel olarak otofaji terimi makrotofaji için kullanılmaktadır.). Otofajiye otofagozom adı verilen bir organel aracılık etmektedir. Otofagozom sitoplazmanın bir kısmını yutan selektif olmayan bir degradasyon sistemidir.

Otofaji besin eksikliğine adaptasyon, intrasellüler protein ve organellerin temizlenmesi, gelişim, yaşlanma karşıtı, mikroorganizmaların yok edilmesi, hücre ölümü, tümör baskılanması gibi çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik rollere sahiptir (Mizushima, 2005).

Hücreler besin eksikliği ve stress durumunda metabolizmalarını sürdürülebilmek için hücresel protein ve organellerini parçalayabilirler. Otofaji genel olarak otofagozomlar içerisine toplanmış sitoplazmik içeriğin lizozomlar ile parçalanması ile karakterizedir (Glick, Bart ve Macleod, 2010). Otofagozom bozulmuş sitoplazmik organelleri veya sitozolu içeren çift membranlı yapıdır. (Levine ve Klionsky, 2004). Otofagozomlar ve lizozomlar arasındaki birleşme otofagozom ve lümen içeriğini asidik lizozomal hidrolazlarla parçalayan otolizozomları oluşturur. Bu katabolik süreç otofajik yolun tamamlandığını

göstermektedir. Otofagozomların lizozomlarla birleşmesi engellendiği zaman, otofaji inhibisyonuna rağmen otofagozomların birikimi devam etmektedir (González-Polo ve diğerleri, 2005). Otofagozom sayısındaki aşırı artış otofajik yolağı indükler ve bu durumun fonksiyonel testlerle otofajik olup olmadığının doğrulanması gerekir. Otofajiyi test etmek için yaygın kullanılan bir teknik veziküler yapılarıdaki (otofagozomlar veya otolizozomlar olabilir) GFP-LC3 füzyon proteinlerinin yeniden dağılımının tayin edilmesidir. Ancak, otofaji belirteci olarak kullanılan GFP-LC3 artmış otofajik katabolizmanın tayini için yeterli değildir.

Otofajik hücre ölümü morfolojik olarak (özellikle transmisyon elektron mikroskopisi ile) kromatin kondensasyonu olmaksızın meydana gelen bir hücre ölümüdür fakat sitoplazmada yaygın vakuolizasyon görülmektedir. Apoptotik hücrelerin aksine, otofajik ölen hücrelerin fagositlerle ilişkisi ya çok azdır yada yoktur (Clarke, 1990).

2.4.2. Nekroz

Nekrotik hücre ölümü veya nekroz morfolojik olarak hücre hacminin artması, organellerin şişmesi, plazma membranının parçalanması ve hücre içeriğinin kaybıyla karakterizedir. Uzun bir süre için, nekroz hücre ölümünün kontrolsüz bir formu olarak kabul edilmiştir. Ancak sonraki bulgular nekrozun sinyal transdüksiyon yolları ve katabolik bir dizi mekanizma ile düzenlendiğini göstermiştir (Golstein ve Kroemer, 2007). Örneğin ölüm bölgesi reseptörleri (TNFR1, Fas/CD95 ve TRAIL-R gibi) and Toll- benzeri reseptörler (TLR3 ve TLR4) kaspaz inhibitörleri varlığında nekroza yol açtıkları gösterilmiştir. Knockout/ knockdown ve nekrostatin- 1 kimyasal inhibisyonu ile kanıtlandığı üzere TNFR1-, Fas/CD95-, TRAILR- ve TLR3- aracılı hücre ölümü kinaz RIP-1 bağımlı görünmektedir. Bu ifadenin kullanımı ile ilgili herhangi bir genel bir fikir birliği olmamasına rağmen, bazı yazarlarca nekrozun düzenlenmiş bir mekanizma olduğunu belirtmek için ‘nekroptoz’ teriminin kullanılması önerilmiştir. Programlanmış ve tesadüfî nekroz arasında bir ayrım yapmak için, biyokimyasal bir seviyede, RIP-1 inhibisyonu ile önlenabilen hücre ölümü nekroptoz olarak tanımlanabilir (Degterev ve diğerleri, 2008).

Çeşitli mediyatörler, organeller ve hücresel işlemler nekrotik hücre ölümünde yer almaktadır, fakat bunların birbiriyle ilişkisi tam olarak bilinmemektedir. Mitokondrial değişimler (reaktif oksijen türlerinin oluşumu, nitrik oksit ile nitroksatif stress ve genellikle

siklofilin D ile kontrol edilen mitokondri membrane permeabilizasyonu), lizozomal değişiklikler (lizozomal membran permeabilizasyonu), nükleer değişiklikler (PARP hiperaktivasyonu ve ardından NAD^+ hidrolizi), lipid bozulması (fosfolipazlar, lipoksijenazlar ve sfingomiyelinazların aktivasyonunu takiben), sitozolik kalsiyum konsantrasyonunun artması mitokondrial aşırı yükle sonuçlanır ve kaspaz olmayan proteazların aktivasyonu nekroza sebep olan nedenlerden bazılarıdır. (Golstein ve Kroemer, 2007).

Nekrotik hücre ölümünün bazı örneklerinde, serin/treonin kinaz RIP1'in önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Şimdiye kadar, kesin surette nekrozu tanımlamak için kullanılabilecek biyokimyasal değişimler konusunda görüş birliği bulunmamaktadır. Hücrelerde erken plazma membran permabilizasyonu (apoptozda geç oluşmaktadır) oluştuğunda, apoptotik ve otofajik göstergeler negatif ise genellikle nekrotik hücre ölümü olarak kabul edilir (Nicotera ve Melino, 2004).

2.4.3. Kornifikasyon (boynuzlaşma)

Epidermiste meydana gelen, apoptozdan biyokimyasal ve morfolojik olarak farklı olan spesifik bir programlı hücre ölümü formudur. Kornifiye deri tabakasının (mekanik dirençli, esnek, su geçirmezlik ve yapısal olarak kararlı) oluşumu için gerekli olan ölü keratinositler, spesifik proteinleri (keratin, lorikrin, SPR ve involukrin) ve lipidleri içeren korneosit oluşumuna yol açar. Kornifikasyon daha az 'keratinizasyon' veya 'kornifiye kaplama oluşumu' olarak da adlandırılmaktadır (Candi, Schmidt ve Melino, 2005) ve bu genel olarak diğer çekirdeklerini kaybetmiş dokulara yol açan benzer bir terminal farklılaşma programı olarak kabul edilir (örneğin lens epiteli ve olgun kırmızı kan hücreleri). Korneositlerin aksine, hem olgun kırmızı kan hücreleri hemde lens epiteli stresle indüklenen hücre ölümüne maruz kalma yeteneğine sahiptir ve böylece sadece kornifikasyon gerçek bir hücre ölüm programı olarak kabul edilebilir (Counis ve diğerleri, 1998; Testa, 2004).

2.4.4. Mitotik katastrof

Mitotik katastrof, bozulmuş /başarısız mitoz sonrasında kısa veya sürekli meydana gelen mikronükleasyon (kromozomların eşit olarak kardeş kromozamları oluşturamamasıyla oluşur.) ve multinükleasyon (benzer veya heterojen boyutlarda iki veya daha fazla

çekirdeğin oluşması) gibi morfolojik değişimlerin eşlik ettiği bir hücre ölüm şeklidir. Ancak mitotik katastrof apoptotik morfolojiye veya nekroza yol açabilir. Sonuç olarak, eğer hücre ölümünde çok çekirdeklilik görülüyor veya hücre ölümü metafaz sırasında meydana geliyorsa mitotik katastrof kabul edilebilir (Castedo ve diğerleri, 2004).

2.4.5. Anoikis

Tutunarak çoğalan hücrelerin yüzeye ya da diğer hücrelere bağlanma kaybı ile meydana gelen bir tür apoptozdur. Kendine özgü bir indüksiyon formuna sahip olmasının yanı sıra, anoikis ile ilişkili hücre ölümünün moleküler mekanizmaları aktive edilmiş klasik apoptoza benzerdir. İlk olarak doku gelişimi ve homeostazın sağlanması gibi fizyolojik işlemlerde epitel ve endotel hücrelerinde tanımlanmıştır. Yüzeyden ayrılmış hücrelerin yeni matrise hatalı bağlanmasını ve çoğalmalarını engelleyerek organizma için bir savunma mekanizması olarak etki eder (Paoli, Giannoni ve Chiarugi, 2013).

2.4.6. Eksitotoksisite

Bu hücre ölüm formu, glutamate gibi eksitator aminoasitlerin N-metil D-aspartat Ca^{+2} geçirgen kanallarını açarak sitozolik Ca^{+2} miktarının artmasına ve ölüm sinyal yollarının aktivasyonuna yol açar. Eksitotoksisite apoptoz ve nekroz gibi diğer ölüm tipleri ile çakışabilir ve kritik bir durum olarak mitokondri membrane permeabilizasyonunu içerebilir. Bu nedenle nitrik oksit gibi ortak regülatörlerin varlığında eksitotoksisite ayrı bir hücre ölüm şekli olarak kabul edilemez (Orrenius, Zhivotovsky ve Nicotera, 2003).

2.4.7. Paraptozis

Bu terim genel olarak morfolojik ve biyokimyasal olarak apoptozdan farklı bir programlı hücre ölümünü tanımlamak için kullanılmaktadır. Birçok hücre tipinde, paraptozis insülin benzeri büyüme faktörü reseptörü I ile tetiklenmektedir ve yoğun sitoplazmik vakualizasyon ve mitokondriyal şişme eşlik etmektedir. Fakat diğer apoptotik morfolojik değişimler gözlenmemektedir. Paraptozis kaspaz inhibitörleri veya anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin aşırı ekspresyonu ile engellenmemektedir. Mitojen-aktif protein kinaz familyasının belirli üyelerini kapsayan bir sinyal yolağından kaynaklanmaktadır (Sperandio, de Belle ve Bredesen, 2000).

2.4.8. Piroptoz

Piroptoz ilk olarak *Salmonella typhimurium* ile infekte olmuş makrofajlarda tanımlanmıştır. interlökin-1 β dönüştürücü enzim olarak bilinen apikal kaspaz-1 aktivasyonunu içermektedir. *S. typhimurium* ile indüklenen kaspaz-1 aktivasyonu Ipaf (Apaf-1 ilişkili bir NLR proteini) aracılığıyla meydana gelir. Ancak *Bacillus anthracis* öldürücü toksin ile indüklenen piroptozda Ipaf gerekli değildir ve NLR proteinlerinden ziyade Nalp1 proteinini içerirler (Fink, Bergsbaken ve Cookson, 2008). Ayrıca lipopolisakkarit uygulanmış makrofajlar adaptor protein ASC aracılığıyla piroptaza girerler. ASC ve kaspaz-1 birlikte piroptozom olarak bilinen bir supramoleküler sitoplazmik kompleks oluştururlar. Böylece, kaspaz-1 aktivasyonu farklı bir yoldan piroptozu indükler. Hücre ölümünün bu formu IL-1 β ve IL-18 salımına yola açarak, lokal ve sistemik inflamatuvar reaksiyonlarda rol oynamaktadır (Martinon ve Tschopp, 2007). Haliyle piroptoz geçiren makrofajlar tipik apoptotik morfoloji göstermelerinin yanı sıra nekrozla ilişkili bazı özellikler de göstermektedir.

2.4.9. Pironekroz

Nalp3 ve ASC yüksek bakteri/makrofaj oranında *S. flexneri* ile infekte makrofajların nekrotik ölümünde yer alır ve pironekroz denilen bu durum HMGB-1, kaspaz -1 ve IL-1 β salımıyla ilişkilidir. Piroptoz kaspaz-1 gerekliliğine bağlı olarak pironekrozdan ayrılmaktadır (Willingham ve diğerleri, 2007).

2.4.10. Entozis

Entozis, Huntington hastalığı olan kişilerin lenfositlerinde ‘hücre sel yamyamlığın’ bir formu olarak tanımlanan bu yeni hücre ölümünde bir hücre kendine komşu canlı başka bir hücreyi yutarak fagozom içinde öldürür. (Mormone ve diğerleri, 2008). Kaspaz-3 ve beclin-1 bulunmayan, göreceli olarak apoptoz ve otofajiye uygun olmayan MCF-7 meme kanseri hücreleri entozise en uygun hücrelerdir. Entozis özellikle diğer katabolik reaksiyonlar baskılandığında ortaya çıktığı varsayılan yoldur. Entozis Bcl-2 veya Z-VAD-fmk ile inhibe olmaz, ve internalize olan hücreler normaldir. Daha sonra muhtemelen lizozomal bozulma ile yok olmaktadır. Nadir durumlarda, internalize olan hücreler, hücre içinde bölünebilir veya salınabilir. Bu nedenle, hücre-hücre içi morfolojisinin (entosis) gerçekten yeni bir hücre ölümünü temsil edip etmediği henüz netlik kazanmamıştır (King ve diğerleri, 2007).

2.5. Na⁺/K⁺ ATPaz Yapı ve İşlevleri

1957 yılında, Dr. Jean C. Skou, Na⁺/K⁺ adenosin trifosfatı (ATPaz) bir hücrenin içindeki ve dışındaki iyon akımını kontrol eden bir mekanizma olarak tayin etmiştir. Bu önemli protein sınıfının keşfi Skou'ya 1997 yılın kimya alanında Nobel ödülü kazandırmıştır. Na⁺ / K⁺ - ATPaz, bakteriler, arkeler, ve ökaryotlarda plazma zarından bazı iyonların, metallerin ve lipidlerin taşınması katılan P-tipi ATPaz ailesinin (aynı zamanda E1-E2 ATPaz olarak da bilinen) bir üyesidir. Büyük bir moleküler pompa ailesi olan P-tipi ATPazlar, iki aşamalı ATP hidrolizi ile elde edilen enerjiyi kullanarak, hücre içindeki ve dışındaki iyon geçişini düzenlerler (Lopez-Marques ve diğerleri, 2015). Bu alfa-helikal ipliklerden oluşan primer taşıyıcılar, pompa içindeki korunmuş bir anahtar Asp kalıntısını otofosforilasyon ile katalize edebildikleri için P-tipi ATPaz olarak adlandırılmışlardır. P-tipi ATPaz'lar 5 alt aileye ayrılabilirler. Na⁺/K⁺, sarkoplazmik retikulum Ca⁺², gastrik H⁺/K⁺ ve H⁺-ATPaz, PII ATPaz alt ailesinin üyelerindendir. Bu enzimler ATP hidrolizi yoluyla spesifik substratların aktif transport ile taşınmasında görev almaktadırlar. Na⁺/K⁺ ATPaz ve H⁺/K⁺ ATPaz antiport (bir iyon hücre içine taşınırken başka bir iyon da hücre dışına atılmaktadır.) olarak işlev yaparken, bu ailenin diğer üyeleri uniport (iyon konsantrasyonuna bağlı olarak tek bir iyonun taşınması.) olarak bilinmektedirler (Palmgren ve Nissen, 2011).

Temel integral membran proteinlerinden biri olan Na⁺/K⁺ ATPaz, plazma membranının elektrokimyasal gradientinin düzenlenmesine yardımcı olur. Böylece plazma zarında meydana diğer reaksiyonlar için hayati önem taşıyan, hücre zarının dinlenme potansiyeli sağlanmış olur. Na⁺/K⁺ ATPaz pompası 3 sodyum iyonunu hücre dışına atarken, 2 potasyum iyonunu hücre içine taşımaktadır. Pompa etkisi ve iyon kanallarının seçici geçirgenliği dinlenme membran potansiyelinin canlı memeli hücrelerinde plazma zarı boyunca -30, -70mV arasında tutulmasını sağlamaktadır. Na⁺/K⁺ ATPaz, ayrıca sodyum ve potasyum iyonlarını düzenleyerek hücre hacminin korunmasında büyük bir rol oynamaktadır. İyon dengesinin korunması ile birlikte, sodyum-potasyum pompası sıkı bağlantıların oluşmasını sağlamaktadır. Bu faktörler, hücrenin osmotik basınç ile şişme veya parçalanmasının önlenmesine katkıda bulunmaktadır (Vedovato ve Gadsby, 2014).

Na⁺/K⁺ ATPaz, α ve β alt ünitelerinden ve birçok dokuda bulunan FXYD protein ailesine üye olan düzenleyici alt ünitelerden oluşan bir hetero- oligomerdur. α alt ünitesi zarı 10 kez geçmektedir (M1 –M10) ve Na⁺ ve K⁺ için bağlanma bölgelerine, ayrıca aktivatör (A),

nükleotit bağlanma (N) ve fosforilasyon bölgesi (P) olmak üzere ATP hidrolizinin de gerçekleştiği 3 sitoplazmik bölgeye sahiptir (Morth ve diğerleri, 2011). İnsanlarda, Na^+/K^+ ATPaz'ın α alt ünitesinin 4 farklı izoformu bulunmaktadır; $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ olmak üzere. Bu izoformlar farklı genlerle kodlanmaktadır, bunlar sırasıyla; $\alpha 1$ polipeptit (ATP1A1), ATP1A2, ATP1A3 ve ATP1A4'tür. $\alpha 1$ izoformu benzer şekilde çoğu hücrede bulunurken, $\alpha 2$ izoformu daha çok iskelet, kalp, düz kas, beyin (çoğunlukla astrositlerde), akciğer ve yağ dokusunda bulunmaktadır. $\alpha 3$ birincil olarak nöronlarda ve kalpte sentezlenirken, $\alpha 4$ sadece sperm hücrelerinde tayin edilmiştir. β alt ünitesinin ise 3 farklı izoformu ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$) bulunmaktadır. $\beta 1$ (ATP1B1) izoformu birçok dokuda bulunurken, $\beta 2$ (ATP1B2), daha çok nöronlarda ve aynı derecede sıçan kalbinde sentezlenmektedir. $\beta 3$ ise testislerde ve *Xenopus laevis*'in erken beyin gelişimi boyunca nöronlarında tayin edilmiştir (Kaplan, 2002).

α alt ünitesi enzimin katalitik özelliğinden sorumludur. β alt ünitesi ise küçük bir glikoproteindir ve enzim için bir şaperon olarak görev yapmaktadır. β alt ünitesi, α alt ünitesinin M7 ve M10 helikalları ile etkileşmektedir. Reaksiyonu katalize edememektir ancak α alt ünitesinde iyon transportunun düzenlenmesine yardımcı olmaktadır. β alt ünitesi ayrıca epitelyal polarizasyonun, hücre hareketinin korunması ve hücrenin invaziliğinin sürdürülmesine yardımcı olmak gibi fonksiyonlara sahiptir. β alt ünitesinin baskılanması, hücrenin hareketliliği ile ilişkilidir. Bu baskılanma sıkı kavşakların kaybına yol açarak hücre hareketini tetikleyerek kanser metastazına neden olmaktadır.

Yedi alt ünitesi bulunan FXYD (γ alt ünitesi), temel olarak FXYD2 olarak bilinmektedir ve 66-68 aminoasitten oluşan küçük bir polipeptittir. FXYD2, FXYD protein ailesinin bir parçasıdır ve katalitik alt ünitenin aktivitesinin düzenlenmesinden sorumludur. FXYD2 hücrelerin açık iyon porlarında gösterilmiştir. Bu protein ayrıca α alt ünitesinde, ligand afinitesinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Cheung ve diğerleri, 2013).

Sodyum-potasyum pompası, aktif taşıma ile çalışan bir antiporttur (bir iyon hücre içine taşınırken başka bir iyon da hücre dışına atılmaktadır). Hücrenin plazma membranı üzerinde bulunmaktadır ve 3 sodyum iyonunu hücre dışına atarken 2 potasyum iyonunu da hücre içine taşımaktadır. Bu iyonların değiş-tokuşu aktif taşıma yoluyla gerçekleşmektedir ve böylece hücre içinde düşük konsantrasyonda sodyum ve yüksek konsantrasyonda potasyum iyonu bulunması sağlanmış olmaktadır. ATP molekülünün ADP'ye hidrolizi ile açığa çıkan enerji, bu iyonların konsantrasyon eğimine karşı taşınmasında kullanılmaktadır. ATP molekülü α

alt ünitesinin N- bölgesi ile etkileşmektedir. ATP hidrolizinden sonra, inorganik fosfat P- bölgesinde bilinmeyen bir kalıntıya bağlanmaktadır (Vedovato ve diğerleri, 2014).

Katalitik alt ünite de bulunan çok sayıda bölge kinaz aktivitesiyle ilişkilidir. Na^+/K^+ ATPaz, fosforilasyon bölgesi olarak korunmuş bir aspartat taşımasının yanı sıra protein kinaz, protein fosfotaz ve transmembran iyon taşınması için de bölgelere sahiptir. Endojen kardiyotonik steroidler ve ouabain gibi dijital ilaçlar agonist olarak etki ederler ve Na^+/K^+ ATPazı aktive ederek pompanın tirozin fosforilasyonu ve protein kinaz kaskadlarının ekstrasellüler sinyal düzenleme kinazları (ERK1/2), protein kinaz C (PKC)) aktivasyonuna yol açarlar. Ayrıca reaktif oksijen türlerinin mitokondriyel üretimini arttırırlar ve hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu düzenlerler.

Ancak, tirozin fosforilasyonu Na^+/K^+ ATPazın $\alpha 1$ aktivitesini düşürebilir ve tüm tirozin fosforilasyonunu arttırabilir. İn vitro, insülin genellikle Ser, Thr ve Tyr rezidülerinin fosforilasyonunu stimüle edebilir ve ERK1/2 pompayı fosforile edebilir. Na^+/K^+ ATPaz'da ERK tanıma bölgesi Thr 96'dır ve uygun bağlanma iyi korunmuş olan Pro-X-X-Thr-Pro bölgesinden olmaktadır. Üç sodyum molekülü α alt ünitesine bağlandığında, holoenzimdeki fosforilasyon aracılığıyla hücre dışına taşınabilmektedir. Sodyum-potasyum pompasının konformasyonundaki değişiklikler potasyum iyonlarının bağlanmasına izin verir. Daha sonra protein defosforile olduğunda meydana gelen konformasyonel değişiklikler iki potasyum iyonunun hücre içine taşınmasını sağlamaktadır. Potasyum iyonları sitoplazmaya salındıktan sonra, pompa tekrar doğal konformasyonuna döner ve döngü bu şekilde devam eder (Nyblom ve diğerleri, 2013).

Kardiyak glikozitler yapılarında steroid halka bulunan doğal bileşiklerdir ve konjestif kalp yetmezliği, kardiyak aritminin tedavisinde kullanılmaktadırlar. Bu doğal bileşikler Na^+/K^+ ATPaz pompasına bağlanarak inhibe ederler ve hücre içi sodyum miktarını arttırırken potasyum miktarının azalmasına neden olurlar. Son araştırmalar, kardiyak glikozitlerin sodyum pompası ile etkileşerek, birçok hücrede kompleks sinyalizasyon kaskadlarını indüklediğini ve çeşitli etkilere yol açtığını göstermiştir. Na^+/K^+ ATPaz aracılığıyla, MAPK aktivasyonu hücresel proliferasyon ve farklılaşmanın düzenlenmesinde kritik bir rol oynamaktadır. MAP aktivasyonunun yanı sıra, ERK1/2 aktivasyonu hücre büyümesi ve farklılaşması için gereklidir ve nükleotit sentezi, gen transkripsiyonu, protein sentezi ve hücre

siklusunun ilerlemesini de içeren birçok substratı aktive etmektedir (Whitmarsh ve Davis, 2000).

2.6. Kardiyak Glikozitler

Kardiyak glikozitler, bir çok bitki ve hayvan türünde bulunan spesifik olarak Na^+/K^+ ATPaz inhibitörü olarak bilinen kimyasal bileşenlerin bir sınıfıdır (Prassas ve Diamandis, 2008). Kardiyak glikozit içeren bitkiler 1500 yıldan daha fazla süredir diüretik, emetik, abortif, antineoplastik ve kalp toniği olarak kullanılmaktadır. 18. yüzyılda, doktor ve bilim insanı William Withering, konjestif kalp yetmezliği olan hastalardaki ödemin yüksük otu (*Digitalis purpurea* L.) uygulamasından sonra azaldığını keşfetmiştir (Newman, Yang, Pawlus ve Block, 2008). Bu buluştan sonra kardiyak glikozitler izole edilmiş ve farmakolojik etkileri araştırılmıştır ve sonuç olarak konjestif kalp yetmezliği, kardiyak aritmi ve atriyal fibrilasyon tedavisinde kullanılmışlardır (Rahimtoola ve Tak, 1996).

Kardiyak glikozitler (KG) yapısal olarak iki kısımdan oluşmaktadır. Birinci kısım, aglikan adı verilen steroid iskelet taşıır ve pozitif inotropik etkiden sorumludur. İkinci kısım, aglikan kısmının A halkasının 3 numaralı konumda , β -pozisyonundaki hidroksil grubu üzerindeki oligosakkaritlerden (şeker) oluşmaktadır.

Kalp glikozitleri aglikan halkalarındaki farklılığa göre iki gruba ayrılırlar. Aglikan halkasının 17 numaralı konumuna doymamış beş üyeli lakton halkasının β -konumunda bağlanmasıyla oluşan sınıf kardenolitlerdir (digoksin, ouabain vs). Diğer grup ise, aglikanın 17 numaralı konumuna piron halkasının bağlanmasıyla oluşmaktadır ve bufedienoitler (bufalin, marinobufagenin, prosillaridin A vs.) olarak adlandırılmaktadır (Melero, Medardea, Feliciano, 2000).

Na^+/K^+ -ATPaz veya sodyum pompası, tüm memeli hücrelerinde Na^+ ve K^+ iyonlarının aktif transportundan sorumludur. Na^+/K^+ -ATPaz, α (1234), β (123) ve FXYD (fosfolemma) olmak üzere üç alt birimden oluşmaktadır. Hücre iyon dengesinin ve hücre hacminin sağlanmasından sorumlu integral membran proteinidir. Proteinin ekstrasellüler kısmında kadiyotonik steroid bağlayıcı bölge, intrasellüler kısmında ise hücre içindeki bazı proteinlerle etkileşim bölgeleri bulunmaktadır.

Na^+/K^+ -ATPaz'ın hücredeki fonksiyonu, potasyum iyonlarının hücre içine alınması, hücre içindeki sodyumun ise dışarı atılmasıdır, bu atılım ve alım 2/3 oranında gerçekleşmektedir. Böylece hücre içi iyon dengesi sağlanmakta ve hücre hacmi korunmaktadır.

Kardiyak glikozitler sodyum pompasının ekstrasellüler yüzeydeki α alt ünitesine bağlanarak pompalama fonksiyonunu inhibe ederler. İnhibisyon sonucunda hücre içi sodyum düzeyleri artarak $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ -değiş tokuşcusunu aktive ederek hücre içi sodyum seviyesi azaltılırken Ca^{+2} düzeylerinde artışa sebep olmaktadır. Na^+/K^+ -ATPaz inhibisyonu ile hücre içi Ca^{+2} iyonlarındaki artış kalp kası kontraktilitesini arttırmaktadır (Kaplan, 2002).

Na^+/K^+ -ATPaz üzerindeki inhibitor etkilerine ek olarak, kardiyak glikozitler, epitel hücrelerinde konsantrasyon bağımlı çeşitli hücresel yanıtlara neden olurlar. Yüksek kardiyak glikozit (KG) konsantrasyonunda Na^+/K^+ -ATPaz inhibisyonu ve sonucunda hücre içi Ca^{+2} artışı, reaktif oksijen türlerinde artışa, endositik membran proteinlerinin geri dönüşümünün düzenlenmesine, ATP oluşumunun azalmasına, büyümenin durmasının indüklenmesine ve hücre ölümüne yol açabilir. KG uygulaması boyunca hücre içi Ca^{+2} birikimi, hücre Ca^{+2} girişini arttırarak ve/veya hücre içi Ca^{+2} depolarının salınımı MAPK ve Akt sinyal yolağını aktive edebilir. Kardiyak glikozitlerin nanomolar konsantrasyonunun Na^+/K^+ -ATPaz üzerindeki inhibitor etkisi minimaldir. Fakat p53 sentezini azaltabilir ve Src, EGFR, Akt ve MAPK sinyal transdüksiyon yollarını aktive edebilir. Bu sinyal yollarının aktivasyonunun sonucunda proliferasyonda artış ve apoptoz indükleyici ajanlara direnç gelişebilir.

2.6.1. Kardiyak glikozitlerin olası sitotoksik etki mekanizması

Kardiyak glikozitler bilindiği üzere Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesini inhibe etmektedir. bu pompa, tüm memeli hücrelerinde plazma membranında bulunan elektrojenik bir iyon transportu olarak görev yapan transmembran bir enzimdir. Na^+/K^+ -ATPaz her bir döngüde bir ATP kullanarak, hücre içinden üç Na^+ iyonunu dışarı atarken, iki K^+ iyonunu da hücre içine taşır. Böylece Na^+/K^+ -ATPaz'ın birincil rolü yüksek intrasellüler K^+ ve düşük intrasellüler Na^+ düzeylerini korumaktır. Bu pompa ayrıca hücre hacminin, sitoplazmik pH'nın Ca^{+2} seviyelerinin korunmasında sırasıyla Na^+/H^+ ve $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ değiş tokuşcuları ile birlikte önemli bir role sahiptir. Ayrıca Na^+ bağımlı glukoz ve amino asit taşınması gibi ikincil taşıma olaylarında da rol oynamaktadır.

Na^+/K^+ -ATPaz'ın kardiyak glikozitler ile inhibisyonu, hücre içi Ca^{+2} seviyelerinin artmasına yol açarak, kalp hızında azalmaya, kalp kontraksiyonunda ise artışa neden olmaktadır. Ancak, Na^+/K^+ -ATPaz'ın inhibisyonunu takiben, hücre içi K^+ 'un azalması, Na^+ ve Ca^{+2} , artması apoptozu indükleyebilir. Dijitoksin ile Na^+/K^+ -ATPaz'ın inhibisyonu ve hücre içi Ca^{+2} artışı prostat kanseri hücrelerinde apoptozun indüklenmesine yol açmıştır. Hücre içi K^+ 'un azalması, Na^+ ve Ca^{+2} artması ile apoptozun indüklenmesinin yanı sıra sitotoksik etki mekanizması hücre içi asidifikasyon, IL- 8 üretiminin ve $\text{TNF-}\alpha/\text{NF-}\kappa\text{B}$ yolağının baskılanması, DNA topoizomerez II inhibisyonu ve Src kinaz yolağının aktivasyonunu içermektedir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

% 30 Akrilamid/Bis (Bio-Rad)

% 4-12 Bis-Tris jel (İnvitrogen)

Amonyum persülfat (Santa Cruz)

Alexa Fluor® 488 Signal Amplification Kit For Mouse Antibodies (Roche)

Bradford (Bio-Rad)

Bromofenol mavisi (Sigma)

Bufalin (Santa Cruz)

Developer-Geliştirici (Kodak)

Digoksin (Fluka)

DMEM (Invitrogen)

Doksorubisin (Tocris)

ECL (Amersham Biosciences)

ERM antikoru (Cell Signaling)

Fetal Sığır Serum Gold (PAA)

Fixer-Sabitleyici (Kodak)

PBS (Gibco)

Glisin (Merck)

HRP Konjuge-Anti Mouse (Pierce)

HRP Konjuge-Anti Rabbit (Pierce)

Kaspaz 2 Antikoru (Cell signaling)

Kaspaz-3 Antikoru (Cell Signaling)

Kaspaz-7 Antikoru (Santa Cruz)

Metanol (Merck)

Nitrosellüloz membran (Bio-Rad)

N-terminal ROCK 1 antikoru (Abcam)

Oksaliplatin (Tocris)

Ouabain (Sigma)

Penisilin-Streptomisin (Gibco)

P-ERM antikoru (Abcam)

Proteaz inhibitörü (Roche)

PVDF membran (Bio-Rad)

ROCK 1 Antikoru (BD- 611137)

ROCK 1 Antikoru (Santa Cruz-17794)

ROCK 1 Antikoru (Abcam- 156284)

ROCK 2 Antikoru (BD)

RNA'sız su (Dharmacon)

Slow Fade Anti Kit (İnvitrogen)

Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Bio-Rad)

Temed (Amresco)

Tris HCl (Merck)

Tween 20 (Amresco)

X-Işını Filmi (Kodak)

Y27632 (Sigma)

Yağsız süt tozu (Pınar)

z-fmk-DEVD (Tocris)

z-fmk-VAD (Tocris)

z-fmk-VDVAD (Tocris)

β -merkaptotanol (Sigma)

3.1.2. Kullanılan cihazlar

Çalkalayıcı (IKA)

CO₂ Etüvü (Sanyo)

Elektroforez Tank (Bio Rad)

Elektroforez Tank (Invitrogen)

Faz Kontrast- Floresan Mikroskop (Leica)

Hassas terazi (Shimadzu)

Isıtıcı (FALC)

Mikropipet (Eppendorf Research)

Mikroskop Kamerası (Leica DFC 420C)

Plaka okuyucu (Molecular Devices)

Santrifüj (Nüve)

Su banyosu (Nüve)

Supersonic Homojenizatör (SONICS)

Tank Blot (Bio Rad)

Tank Blot (Invitrogen)

Vortex (Firlabo)

xCELLigence Real Time Cell Analyzer DP (xCelligence Gerçek zamanlı Hücre analiz Sistemi) (Roche)

3.1.3. Kullanılan çözeltiler

Tuzlu fosfat tamponu (PBS- phosphate buffered saline)

NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.42 g
KH ₂ PO ₄	0.24 g

Katı maddeler 800 ml dH₂O'da çözülür. PH 7.4'e ayarlandıktan sonra 1000 ml'ye tamamlanır. Sterilizasyonu için laminar akımlı kabin altında 0.2 µm por çaplı membrandan süzülür.

TBS-T Çözeltisi

Tris Baz	3.03 g
NaCl	8g

Katı maddeler 800 ml dH₂O'da çözülür ve pH 7.4'e ayarlanır. Total hacim 1000 ml'ye tamamlanır ve çözeltiye 1 ml Tween-20 eklenir.

Homojenizasyon çözeltisi

Tris-HCl	50 mM
NaCl	400 mM
EGTA	2 mM
EDTA	1 mM

DTT	1 mM
Proteaz inhibitörü	0.5 tablet/100ml
NaF	1 mM

Leammlı Örnek Tamponu

SDS Stok solüsyon (10%)	20 ml
Sükroz	2.5 g
Bromofenol blue	0.25 g

pH 6.8 olan 0.5 M tris ile 45ml'ye tamamlanır. Final solüsyonu 1.2 M β -merkaptetanole ihtiyaç duyar. Buffer 1ml'lik alikuatlara bölünür ve -20°C'de saklanır. Kullanmadan önce 500 μ l sample buffer'a 55 μ l β -merkaptetanol eklenir.

%4' lük SDS-PoliakrilamiJel (Yüklemeli jeli)

dH ₂ O	4.76 ml
%30 Akrlamid	1040 μ l
1M Tris(pH 6.8)	390 μ l
% 10 SDS	65 μ l
% 10 APS	50 μ l
TEMED	5-6 μ l

% 7'lik SDS-Poliakrilamid Jel

dH ₂ O	2.5
%30 Akrlamid	1.15
1.5M Tris(pH 8.8)	1.3
% 10 SDS	0.05
% 10 APS	0.05
TEMED	0.35

%12'lik SDS-Poliakrilamid Jel

dH ₂ O	1.6 ml
%30 Akrlamid	2.0 ml
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3 ml
%10 SDS	0.05 ml
%10 APS	0.05 ml
Temed	0.002 ml

10x Yürütücü tampon sistemi

Tris Base	30.3 g
Glisin	150.14 g
SDS	1.0 g

Katı maddeler 800 ml dH₂O'da çözülür. pH 8.3'e ayarlanır ve total hacim 1000ml'ye tamamlanır. Oda sıcaklığında saklanır.

10x yürütücü tampon sistemi (Küçük molekül ağırlıklı proteinler için)

Tris Base 30.3 g

Glisin 150.14 g

Katı maddeler 800 ml dH₂O'da çözülür. pH 8.3'e ayarlanır ve total hacim 1000ml'ye tamamlanır. Oda sıcaklığında saklanır.

Elektroforez çözeltisi

dH₂O 900 ml

10xYürütücü Tampon Sistemi 100 ml

Transfer Çözeltisi

dH₂O 800 ml

Metanol 100 ml

10xYürütücü Tampon Sistem 100 ml

Sükroz çözeltisi

Tris base pH 7.4 484.5 mg

Sükroz 1,8 g

EDTA 74.44 mg

150 ml dH₂O'da 484.5 mg Tris çözülür ve pH'sı 7.4'e ayarlanır. Daha sonra süktroz ve EDTA eklenir ve hacim 200 ml'ye tamamlanır. +4 °C'de saklanır. Çözelti kullanılacağı zaman 25 ml alınır ve içine ½ tablet proteaz inhibitörü konulur.

Denatürasyon çözeltisi

SDS	500 mg
EDTA	93.06 mg
Dithiothreitol	77.1 mg
Proteaz inhibitor kokteyli	1 tablet

SDS ve EDTA 50 ml dH₂O'da çözülür. +4 °C'de saklanır. Dithiothreitol, proteaz inhibitör tablet çözelti kullanılacağı zaman taze olarak çözeltiye eklenir.

Reaksiyon çözeltisi

Hepes	691 mg
NaCl	146.1 mg
Chaps	50 mg
EDTA	186,12 mg
Gliserol	2,5 ml
DTT	77.1 mg

HEPES 40ml dH₂O içinde çözünür. pH'sı 7,4 ye ayarlanır. Tartılan diğer maddeler ilave edilir ve hacim 50 ml'ye dH₂O ile tamamlanır.

%3.7 lik Paraformaldehit çözeltisi

1g paraformaldehit tartılır ve üzerine 10 ml dH₂O ilave edilir. 50°C sıcak tabla üzerine alınır. Üzerine 1 damla 1M NaOH ilave edilir ve büyük bir kısmı eriyene kadar ısıtmaya devam edilir. Stok 0.2µm'lik filtreden süzülür. % 10'luk paraformaldehit stok çözelti elde edilir.

% 10'luk stok formaldehitten 10ml % 3.7'lik çözelti eldesi

%10'luk stoktan 3.7ml alıp üzerine 6.3 ml PBS konulur ve % 3.7'lik 10 ml çözelti elde edilir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre kültürü

Deneylerde meme kanseri MCF-7 ve MDA-MB-231, serviks kanseri HeLa olmak üzere 3 farklı tip kanser hücre hattı kullanılmıştır. MDA-MB-231 ve HeLa hücreleri Orta Doğu Teknik Üniversitesi Enformatik Enstitüsü öğretim üyesi Doç. Dr. Rengül Çetin Atalay'dan, MCF-7 hücreleri ise Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Mesude İşcan'dan alınmıştır.

Kanser hücre dizileri % 10 serum, % 1 penisilin-streptomisin içeren DMEM'li besiyerinde 37°C'de % 5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre edilmiştir. Tutunarak çoğalan bu hücreler bulundukları kabın tabanını % 70-80 oranında kaplayana kadar iki günde bir besiyerleri değiştirilerek çoğaltılmışlar ve daha sonra pasajlanmışlardır. Pasajlama işlemi ve diğer tüm işlemler laminar akımlı steril kabin içerisinde gerçekleştirilmiştir.

Pasajlama işlemi sırasında, %70-80 oranında çoğalmış hücrelerin üzerindeki besiyeri atılır ve 1 kez PBS ile yıkanır. Daha sonra hücrelerin üzerine 37°C sıcaklıktaki % 0.25'lik Tripsin-EDTA solüsyonu ilave edilir ve inkübatörde yaklaşık 1-5 dakika bekletilir. Hücrelerin zeminden ayrıldığı mikroskop ile kontrol edildikten sonra hücrelerin üzerine besiyeri ilave edilir ve hücrelerle birlikte steril falkona alınır. Tripsin ile yüzeyden kaldırılan hücreler 400g (1500 rpm)'de, 25°C'de 10 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonrası hücre pelletinin üzerinde bulunan süpernatant atılır ve hücreler taze besiyeri ile süspande edilerek deney için uygun hücre kaplarına ekilir. Deneye alınana hücrelere, çeşitli ilaçlar kombine ve tek başlarına (standart kemoterapötik: oksaliptatin, doksorubisin; kardiyak glikozitler: ouabain, digoksin, bufalin; Rho kinaz inhibitörü: Y27632; pan kaspaz inhibitörü: z- VAD-fmk; kaspaz 3 inhibitörü: z-DEVD-fmk; kaspaz 2 inhibitörü: z-VDVAD-fmk) belirli sürelerde ve konsantrasyonlarda uygulanmıştır. Y27632 (10 µM) kardiyak glikozit uygulamasından 30 dk önce, kaspaz inhibitörleri (50 µM) ise kardiyak glikozit ve standart kemoterapötik uygulamasından 2 saat önce hücrelere uygulanmıştır.

Deneylerde kullanılacak hücre miktarını belirlemek için hücre sayımı Neubauer lamı kullanılarak yapılmıştır. Pasajlama işleminde hücreler santrifüj edilip, süpernatant atıldıktan sonra 5 ml besiyeri ile yeniden süspande edilmiştir. Resüspande edilen hücrelerden 20 µl bir eppendorfa alındı ve üzerine 20 µl % 4'lük tripan mavisi eklendi. Neubauer lamı üzerine lamel kapatılarak ve iki yüzey arasına tripan mavisi ve hücre karışımı pipet ile yavaşça aktarılmıştır. Mikroskop kullanılarak lam üzerindeki tripan mavisi ile boyanmamış olan canlı hücreler sayıldı (16 küçük kareden oluşan büyük kareler sayıldı). Aşağıda bulunan formül üzerinden ml'deki hücre sayısı hesaplandı ve deney için gerekli hücre sayısına göre besiyeri ile dilüsyon yapılarak kültür kaplarına hücre ekimi gerçekleştirildi.

$$\text{Hücre/ml} = \frac{\text{Sayılan toplam canlı hücre} \times 2 \times 10^4}{\text{Sayılan kare sayısı}}$$

3.2.2. Standart kemoterapötik ve kardiyak glikozitlerin sitotoksitesinin değerlendirilmesi

XCELLigence Real Time Cell Analyzer DP (xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemleri) sistemi kullanılarak hücrelerin çoğalma profili ve ilaçların sitotoksitesini ile oluşan hücre ölümü değerlendirilmiştir. Sistem 16 çukurlu tabanında mikro altın elektrotlar bulunana özel plakara sahiptir. Hücreler bu plakalar ekilir ve tabana tutunan hücre sayısı arttıkça elektrik akımına karşı oluşan direnç miktarı artmaktadır. Ancak standart kemoterapötik ve kardiyak glikozitlerle indüklenen hücre ölümüyle birlikte, hücreler plakanın yüzeyinden ayrılmakta ve direnç azalmaktadır. Elde edilen direnç değeri 'hücre indeksi' olarak adlandırılmaktadır.

Standart kemoterapötiklerin ve kardiyak glikozitlerin sitotoksitesini belirlemek için e-plakaların her bir çukuruna 8000 MCF-7 ve 5000 MDA-MB-231 hücresi ekilmiştir. Hücre indeksi ~1'e ulaştıkça ilaç uygulamasına geçilmiştir. Standart kemoterapötikler ve kardiyak glikozitler artan konsantrasyonda tek başlarına ve/veya inhibitörlerle kombinasyon şeklinde hücrelere verilmiştir.

Standart kemoterapötik olan oksaliptatin ve doksorubisinin, kardiyak glikozit olan ouabain, bufalin, digoksinin IC50 değerleri cihazdan elde edilen orijinal eğrilerin altında kalan alanların ölçülmesi ile hesaplandı. İlaç verilme anından itibaren hücre indeksi normalize

edilmiştir. Normalize hücre indeksi aşağıdaki formül ile program tarafından hesaplanmaktadır.

$$\text{Normalize Hücre İndeksi} = \frac{\text{Orijinal Hücre İndeksi}}{\text{Normalize Edilen Zaman}}$$

Standart kemoterapötik ve kardiyak glikozitlerin oluşturduğu sitotoksosite üzerine ROCK ve kaspaz inhibisyonunun (pan kaspaz, kaspaz-2, kaspaz-3) etkileri xCelligence RTCA-DP sistemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Sistemin plakalarına ekilen MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin, hücre indeksi 1 civarı olduğunda hücrelere literatürde yaygın olarak kullanılan konsantrasyonda ROCK inhibitörü (10 μ M) veya kaspaz inhibitörleri (50 μ M) ön uygulaması yapılmıştır. ROCK inhibitörü 30 dk, kaspaz inhibitörleri ise standart kemoterapötik veya kardiyak glikozit uygulamasından 2 saat önce hücrelere uygulanmıştır. İlaçların hücreler üzerindeki etkileri gerçek zamanlı olarak takip edilmiştir. Deney sonrasında elde edilen orijinal traselerin eğimi ölüm hızının göstergesi olarak sistemin programından hesaplanmış ve analiz edilmiştir.

3.2.3. Hücre homojenatlarının hazırlanması

Deney planına göre ilaç uygulanmış hücrelerin inkübasyon süresi sonunda faz kontrast mikroskopi ile görüntüleri çekilmiştir. Hücreler soğukta kazınarak, 400g'de 4°C'de 10 dk santrifüj edilerek hücreler çöktürülmüştür. Tüplerde bulunan süpernatant atılmış ve hücre pelletleri homojenizasyon tamponu ile [50 mM Tris-HCL pH 7.5, 400 mM NaCl, 2 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1 mM DTT ve proteaz inhibitör kokteyl (Roche)] süspande edildikten sonra ultrasonik homojenizatörde hücreler homojenize edilmiştir. Tekrar örnekler 10000xg'de 10 dk +4°C'de santrifüj edildikten süpernatant alınmış ve protein miktar tayinleri yapılmıştır.

3.2.4. Bradford protein miktar tayini

Homojenizasyonu yapılan ve western blot yönteminde kullanılacak olan örneklerin total protein miktarı bradford yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Standart olarak kit içeriğinde bulunan 2000 μ g/ml konsantrasyonundaki sığır serum albumini 4 kez distile su ile 1:1 oranında dilüe edilmiştir. Dilüsyon sonucunda 1000 μ g/ml, 500 μ g/ml, 250 μ g/ml ve 125

$\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarında standartlar elde edilmiştir. Elde edilen hücre lizatları 1:2 oranında distile su ile dilüe edilmiştir. Standartlar ve hücre lizatları 96 çukurlu plakaya 3'erli olacak şekilde 5 μl yüklenmişlerdir. Daha sonra standart ve örneklerin üzerine 200 μl Bradford reajanı eklenmiştir. Örneklerin absorbansı ELISA plaka okuyucuda 595 nm'de okutulmuştur. Standartların konsantrasyonlarına karşı okutulan absorbans değerleri kullanılarak GraphPad Prism programı kullanılarak doğru çizilmiştir (lineer regresyon). Bu doğrunun denklemi kullanılarak absorbansları bilenen örneklerin total protein miktarı hesaplanmıştır. Elde edilen konsantrasyonlar dilüsyon katsayısı olan 2 ile çarpılmıştır.

3.2.5. Western Blot

Total protein miktarları belirlenen hücre lizatları 1:6 oranında Laemmli çözeltisi ile karıştırılır ve 100°C 'deki su içerisinde 5 dk bekletilirler. ROCK 1 (BD), ROCK-2, PARP proteinleri için %7'lik SDS PAGE jel, kaspaz-2, -3, -7 proteinleri için %12'lik SDS PAGE jel ve ERM, p-ERM proteinleri için ise %10'luk SDS PAGE kullanılmıştır. Ayrıca N- terminal ROCK 1 antikoru için % 4-20'lik Bis Tris jel kullanılmıştır. Protein miktarları hesaplanan miktarda örnekler uygun jellere yüklenmiştir. Jeller tank sistemi içine yerleştirildikten sonra elektroforez edilmiştir. Bu işlem sonunda jeldeki proteinler nitroselüloz membrana (0.22 μm veya 0.45 μm por çaplı) transfer edilmiştir. ROCK, ERM ve PARP proteinleri için jel 350 mA 60 dk, kaspaz-2, -3, -7 proteinleri için jel 125mA 30dk transfer edilmiştir. Transfer bitiminde membranlar %5'lik yağsız süt tozu ile 1 saat bloklanmıştır. Bloklamadan sonra membranlar 3 kez 5'er dk TBS-T ile yıkanmış ve birincil antikor ile gece boyu, daha sonra ikincil antikor ile 2 saat inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrası membranlar TBS-T ile yıkanmış ve kemülominasans özelliğe sahip çözeltiler ile muamele edilerek X-ışını filme karanlık odada basılmıştır. GAPDH ve aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.

3.2.6. Faz kontrast ve immüno Floresan mikroskopi

Hücreler uygun kültür kaplarında çoğaltıldıktan ve ilaç uygulandıktan sonra morfolojileri faz kontrast mikroskopi ile incelenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir. Çekilen fotoğraflardan tomurcuklu hücreler sayılmış ve tomurcuklu hücre sayısının %'si ve tomurcuklu hücre sayısına Rock inhibisyonunun etkisi değerlendirilmiştir.

Ayrıca ilaç uygulaması sonrası hücrelerin morfoloji değişimi ve ROCK proteinin lokalizasyonu floresan mikroskopi yöntemi ile incelenmiştir. İnhibitörler ve ilaç ile inkübasyon sonrasında hücreler 1 kez soğuk PBS ile yıkanmış ve %3.7'lik paraformaldehit çözeltisi ile oda sıcaklığında 15 dk fikse edilmiştir. Fiksasyon sonrası hücreler 3 kez PBS ile yıkanmıştır ve %0.2'lik Triton X-100 ile 7 dk permeabilize edilmiştir. Hücreler tekrar 3 kez PBS ile yıkanmıştır. Hücreler %6'luk BSA çözeltisi ile 30 dk bloklanmıştır. ROCK-1 boyaması için hücreler gece boyu ROCK-1 antikoru(1/50) (Santa Cruz) ile inkübe edilmiştir. Hücreler 3 kez pbs ile yıkandıktan sonra ikincil antikor olarak kullanılan Alexa Flour-488 kitinin içinde bulunan ilk ikincil antikor (mouse- anti rabbit) ile 45 dk, daha sonra 3kez PBS ile yıkanan hücreler diğer ikincil antiorla (goat- anti rabbit) 45 dk inkübe edilmiştir. Hücreler 3 defa PBS ile yıkandıktan sonra hücre f-aktinlerinin görüntülenmesi için 25 µg/ml rodamin falloidin (*rhodamine- phalloidin*) ile 3 saat inkübe edilmiştir. Tekrar hücreler 3 defa PBS ile yıkanmış ve nükleik asitleri görüntülemek için DAPI çözeltisi (0.1 µg/ml) ile 15 dk inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonunda hücreler 3 kez PBS ile yıkanmıştır ve her bir çukura PBS ile dilüe edilmiş 1:1 *Slow Fade Anti Kit* (A)'dan hücre yüzeyini kaplayacak kadar konulmuş ve floresan mikroskobide hücre morfolojileri uygun filtreler kullanılarak incelenmiştir.

3.2.7. Hücre ölümünün (apoptotik/ nekrotik) belirlenmesi

Annexin V/ propidium iodid (PI) boyaması apoptoz ve nekrozun belirlenmesinde kullanılan yöntemlerden biridir. Canlı hücrede membran fosfolipidlerinden olan fosfatidilserin (PS) hücre membranının sitozolik yüzeyinde yerleşmiştir. Ancak hücre apoptoza girdiğinde hücre membranının iç yüzeyinde bulunan PS hücre zarının dış kısmına transloke olmaktadır. Bu yöntemde, floresans bir madde ile işaretli Annexin V PS'ye bağlanarak apoptotik hücrelerin görünür hale gelmesini sağlamaktadır. Ayrıca nekrotik hücrelerde, hücre membran bütünlünün bozulması ile birlikte hücre içerisine rahatlıkla girerek nükleik asitlere bağlanan PI kullanılarak nekrotik hücreler belirlenecektir.

TALI görüntü temelli hücre sayıcı cihaz için uygun olan Tali® Apoptosis Kit – Annexin V Alexa Fluor® 488 and Propidium Iodide kullanılarak hücre ölümü/canlılığı belirlenmiştir. Hücre ölümü indüklendikten sonra, kit kullanımına uygun olarak hücreler Annexin V ve PI ile boyandıktan sonra tali slaytlara yüklenerek, cihaz tarafından hücre sayımı gerçekleştirilmiştir.

Annexin V ile boyanan hücreler yeşil, PI ile boyananlar kırmızı, hem annexin hem PI ile boyanan hücreler sarı renkte sinyal vermektedir. Canlı hücreler ise her ikisi ile de boyanmamaktadır. Özetle canlı hücreler, Annexin-PI-; erken apoptotik hücreler, Annexin V+PI-; geç apoptotik hücreler, Annexin V+PI+; nekrotik hücreler, Annexin-, PI+ olmalarına göre belirlenmiştir ve %'de olarak hesaplanmışlardır.

3.2.8. İstatistiksel analiz

İkili gruplarda, gruplar arasındaki farkın değerlendirilmesinde student ortalamalar arası “unpaired” t testi, çoklu karşılaştırmalarda tek-yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılmıştır. Deneysel veriler ortalama $\pm$ ortalamaların standart hatası şeklinde ifade edilmiştir. 0.05'ten küçük p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



4. BULGULAR

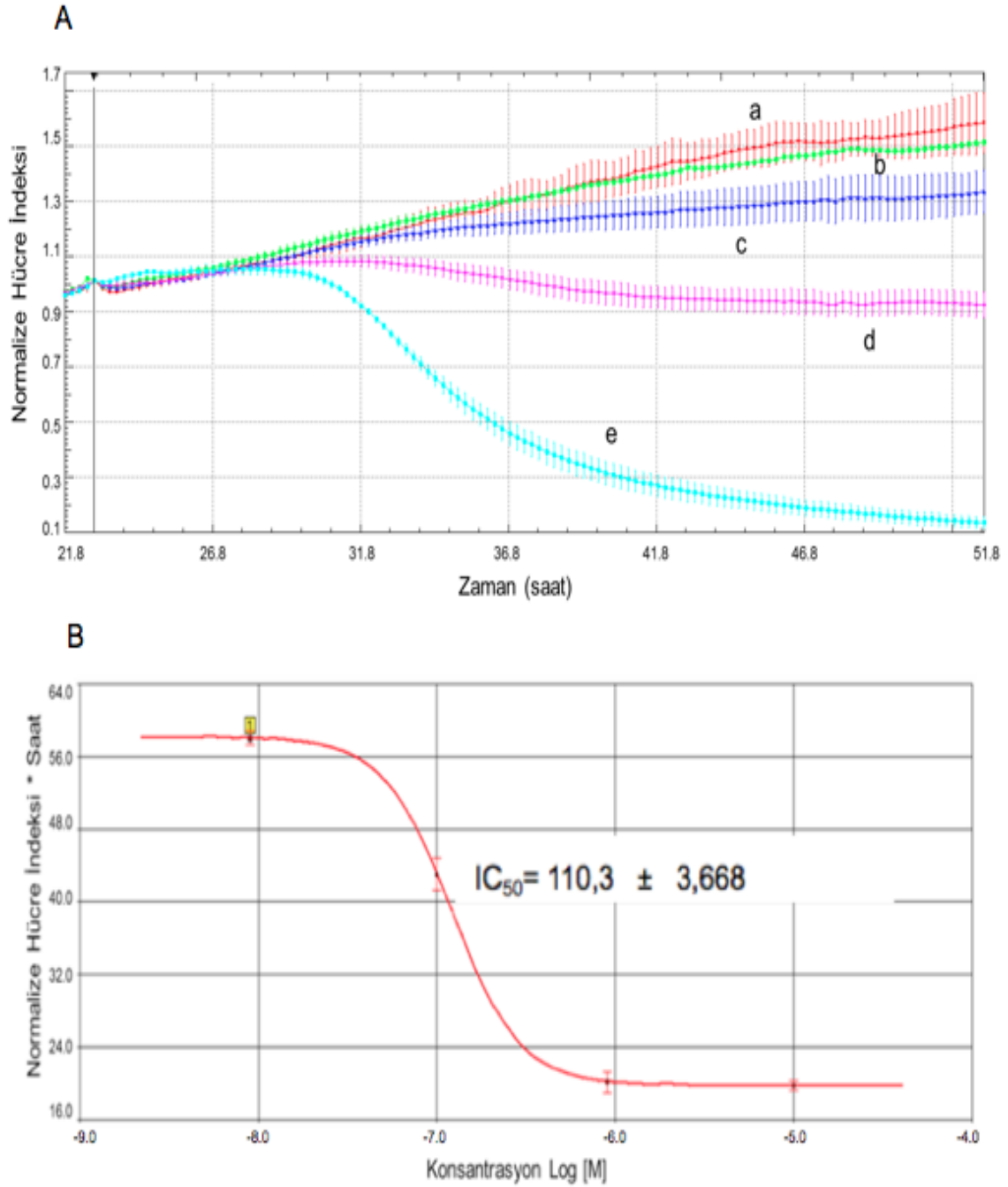
4.1. Standart Kemoterapötiklerin ve Kardiyak Glikozitlerin MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücre Dizilerindeki Sitotoksik Etkileri

4.1.1. Standart kemoterapötiklerin ve kardiyak glikozitlerin MCF-7 Hücre dizisindeki sitotoksik etkileri

Proliferasyonları devam eden MCF-7 hücrelerine standart kemoterapötik olan oksaliptatin ve doksorubisin uygulaması hücrelerin konsantrasyona bağımlı olarak tutunmuş oldukları kültür kabı zemininden ayrılmasına neden olmuştur (Şekil 4.1, Şekil 4.2). En yüksek konsantrasyon olan 300 μM oksaliptatin, ilaç uygulama süresinden yaklaşık 24 saat sonra hücrelerin % 100'ünün plaka yüzeyinden ayrılmasına sebep olmuştur. İlaç uygulaması sonrasında xCelligence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile elde edilen eğrilerden IC_{50} değerleri hesaplanmıştır. IC_{50} değeri oksaliptatin için $110,3 \pm 3,668 \mu\text{M}$, doksorubisin için $5.627 \times 10^{-1} \pm 3.056 \times 10^{-2} \mu\text{M}$ ($\text{IC}_{50} \pm \text{SH}$) olarak hesaplanmıştır.

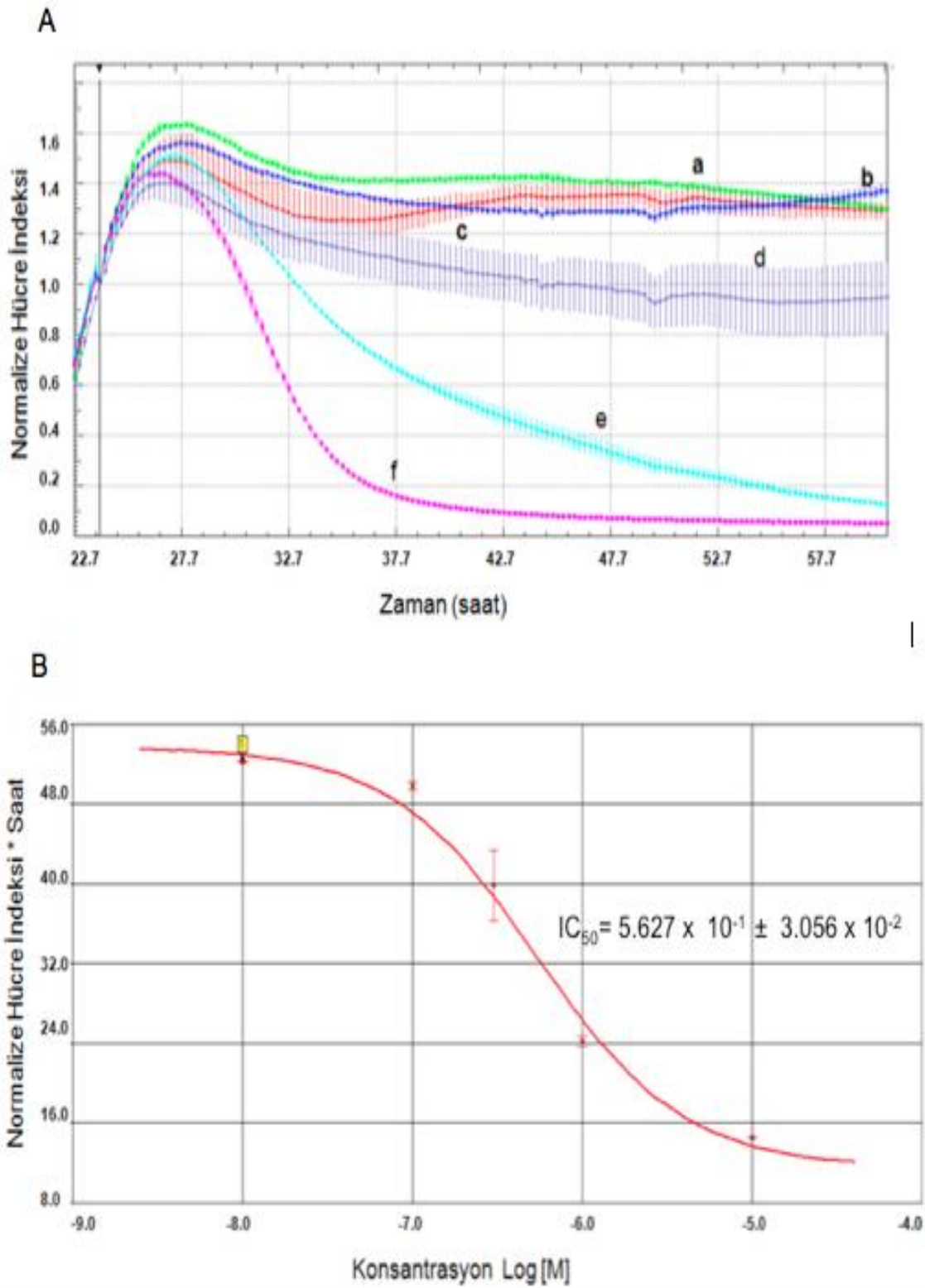
Ayrıca proliferasyonları devam eden MCF-7 hücrelerine kardiyak glikozit olan ouabain, bufalin ve digoksin uygulanmıştır. İlaç uygulama sonrası hücreler tutundukları hücre kültür kabı yüzeyinden konsantrasyon bağımlı olarak ayrılmışlardır. İlaç uygulaması sonrasında xCelligence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile elde edilen eğrilerden IC_{50} değerleri hesaplanmıştır. IC_{50} değeri ouabain için $7,0296 \times 10^{-2} \pm 2,786 \times 10^{-2} \mu\text{M}$, bufalin için $1,4632 \times 10^{-2} \pm 5,562 \times 10^{-3} \mu\text{M}$ ve digoksin için $8.730 \times 10^{-1} \pm 8.460 \times 10^{-2} \mu\text{M}$ olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.3., Şekil 4.4., Şekil 4.5.). MCF-7 hücrelerine uygulanmış standart kemoterapötikler ve kardiyak glikozitlere ait IC_{50} değerleri Çizelge 4.1'de yer almaktadır.

Uygulanan standart kemoterapötikler ve kardiyak glikozitlerin IC_{50} değerleri karşılaştırıldığında oksaliptatinin IC_{50} değeri diğer ajanlara göre anlamlı olarak yüksek çıkmıştır. Bu durum oksaliptatinin diğer ajanlara göre MCF-7 hücre dizisinde daha az potent olduğunu göstermektedir.

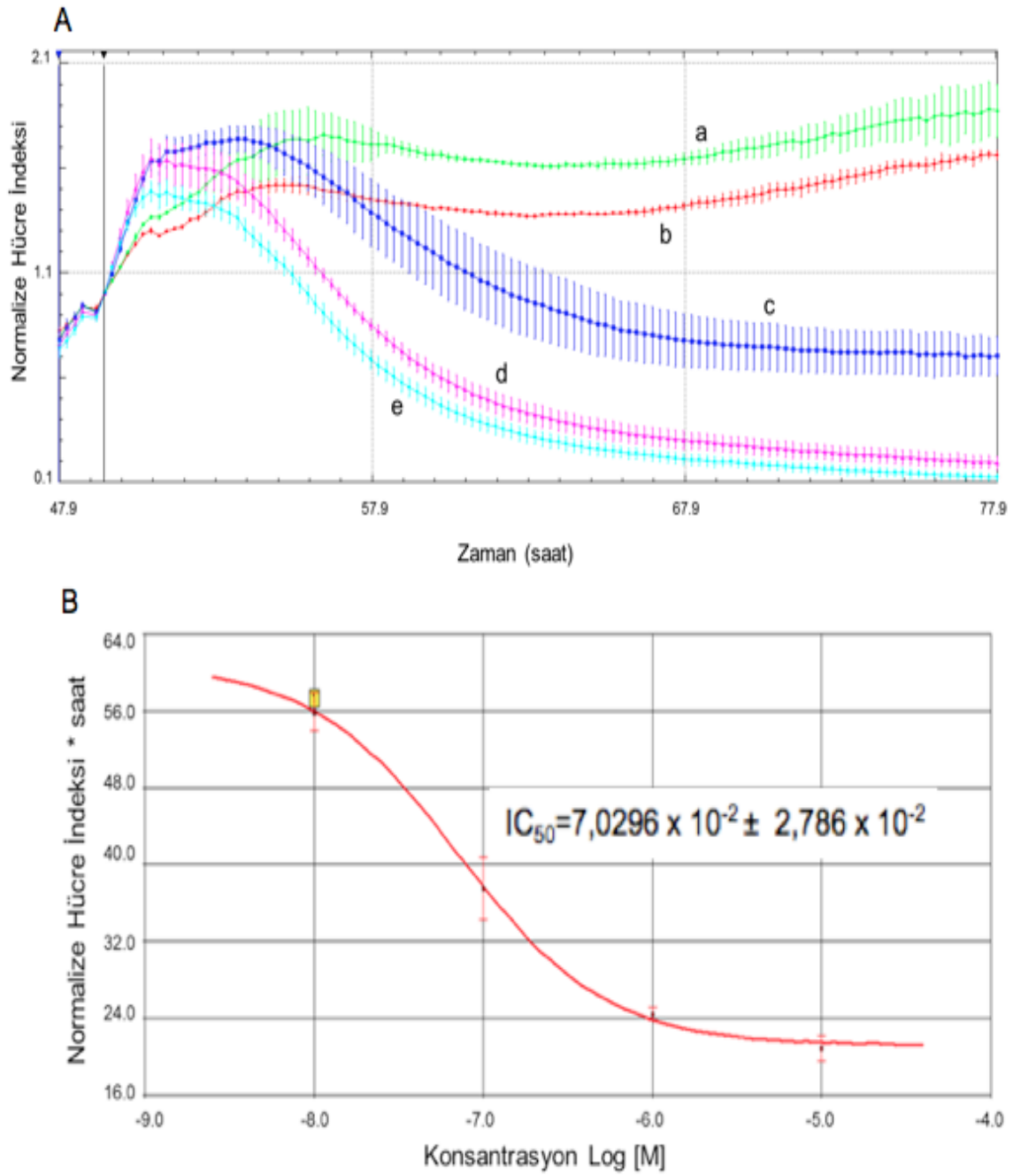


Şekil 4.1. MCF-7 hücrelerinde oksaliplatinin konsantrasyon bağımlı sitotoksik etkileri.

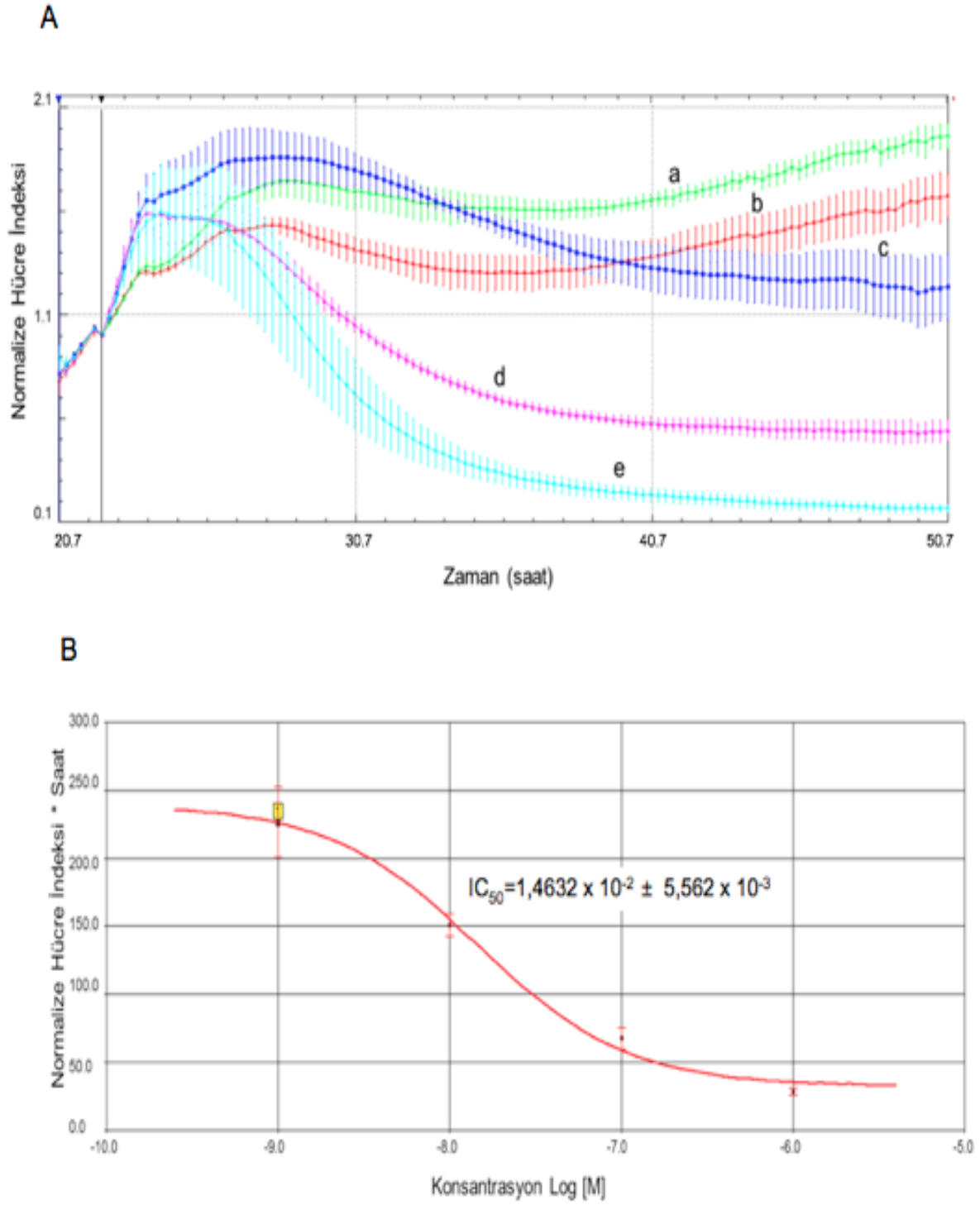
A. Orijinal eğri xCelligence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile elde edilmiştir: **a:** kontrol, **b:** 10 µM oksaliplatin, **c:** 30 µM oksaliplatin, **d:** 100 µM oksaliplatin, **e:** 300 µM oksaliplatin. B. MCF-7 hücrelerinde oksaliplatine ait temsili konsantrasyon-cevap eğrisi (n=3)



Şekil 4.2. MCF-7 hücrelerinde doksorubisinin konsantrasyon bağımlı sitotoksik etkileri. A. Orijinal eğri xCelligence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile elde edilmiştir: a: 10nM doksorubisin, b: 100nM doksorubisin, c: kontrol, d: 300nM doksorubisin, e: 1 µM doksorubisin, f: 10 µM doksorubisin B. MCF-7 hücrelerinde doksorubisine ait temsili konsantrasyon-cevap eğrisi (n=3)

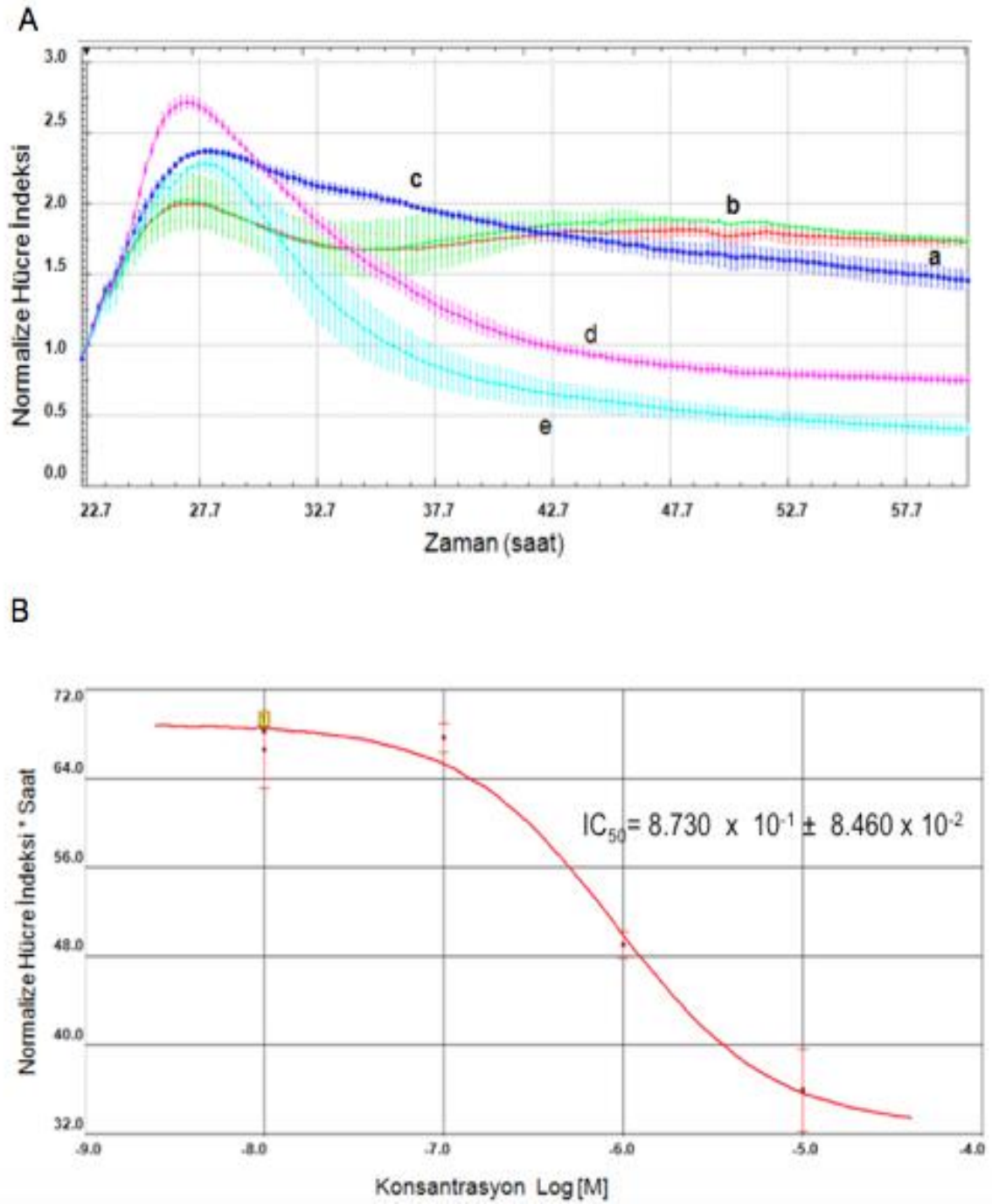


Şekil 4.3. MCF-7 hücrelerinde ouabainin konsantrasyon bağımlı sitotoksik etkileri, A. Orijinal eğri xCelligence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile elde edilmiştir: a: 10nM ouabain, b: kontrol, c: 100nM ouabain, d: 1µM ouabain, e: 10 µM ouabain. B. MCF-7 hücrelerinde ouabaine ait temsili konsantrasyon-cevap eğrisi (n=3)



Şekil 4.4. MCF-7 hücrelerinde bufalinin konsantrasyon bağımlı sitotoksik etkileri

A.Orijinal eğri xCelligence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile elde edilmiştir: a: 1nM bufalin, b: kontrol, c:10nM bufalin, d:100nM bufalin, e: 1 µM bufalin B. MCF-7 hücrelerinde bufaline ait temsili konsantrasyon-cevap eğrisi (n=3)



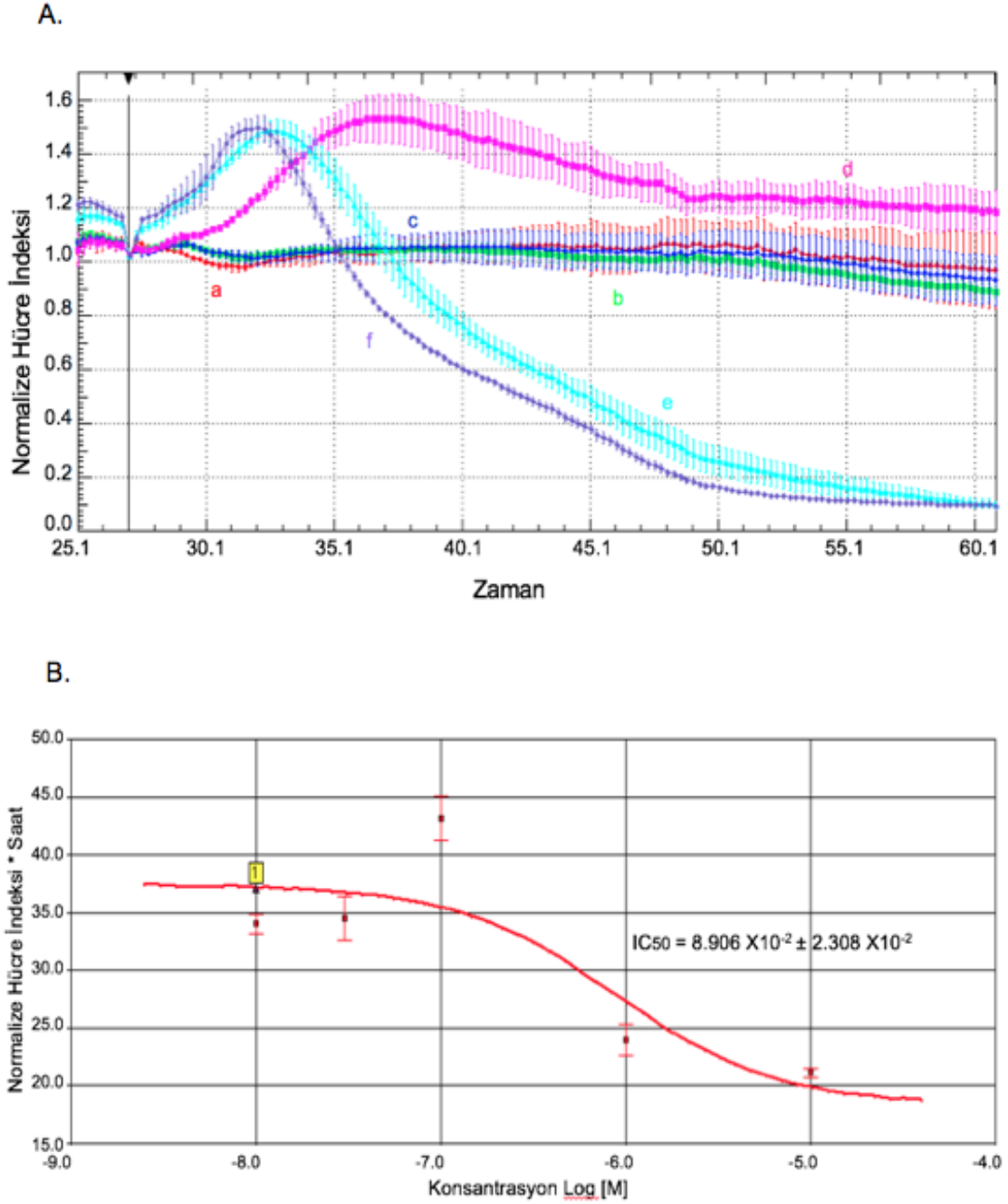
Şekil 4.5. MCF-7 hücrelerinde digoksinin konsantrasyon bağımlı sitotoksik etkileri
 A. Orijinal eğri xCelligence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile elde edilmiştir: a: kontrol, b: 10nM digoksin, c: 100nM digoksin, d: 1µM digoksin, e: 10µM digoksin B. MCF-7 hücrelerinde digoksine ait temsili konsantrasyon-cevap eğrisi (n=3)

Çizelge 4.1. Standart kemoterapötiklerin ve kardiyak glikozitlerin MCF-7 hücrelerindeki IC₅₀ değerleri. * diğer gruplara göre farklılık (p<0.05)

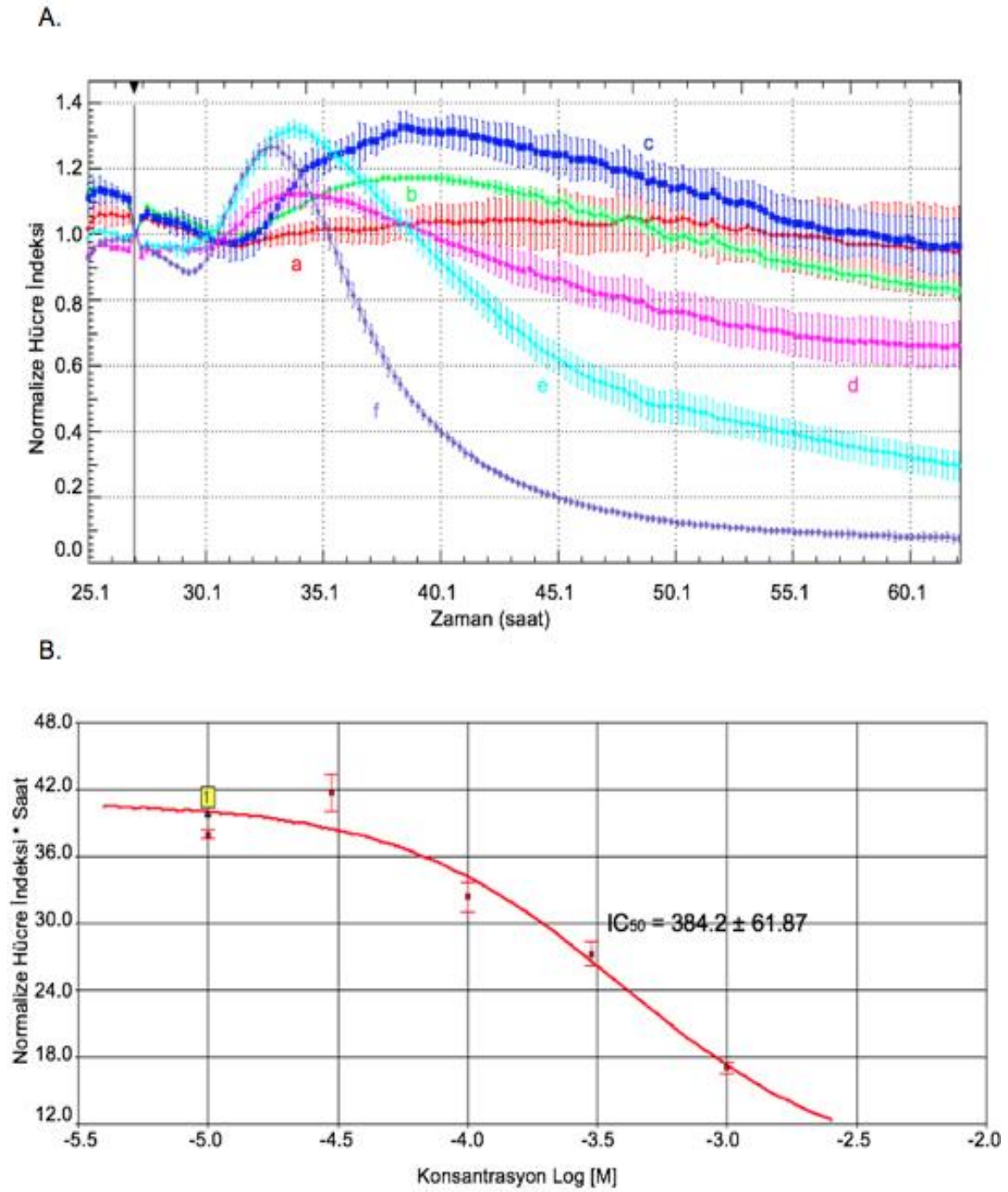
Kullanılan sitotoksik ilaçlar	IC ₅₀ ± SH (µM)
Oksaliplatin	110,3 ± 3,668 *
Doksorubisin	5.627 x 10 ⁻¹ ± 3.056 x 10 ⁻²
Ouabain	7,029 x 10 ⁻² ± 2,786 x 10 ⁻²
Bufalin	1,463 x 10 ⁻² ± 5,562 x 10 ⁻³
Digoksin	8.730 x 10 ⁻¹ ± 8.460 x 10 ⁻²

4.1.2. Ouabain ve oksaliplatinin MDA-MB-231 hücre dizisindeki sitotoksik etkileri

Proliferasyonları devam eden MDA-MB-231 hücrelerine standart kemoterapötik olan oksaliplatin ve kardiyak glikozit olan ouabain uygulaması hücrelerin konsantrasyona bağımlı olarak tutunmuş oldukları kültür kabı zemininden ayrılmasına neden olmuştur (Şekil 4.6., Şekil 4.7.). En yüksek konsantrasyonlar olan 10 µM ouabain ve 1mM oksaliplatin, ilaç uygulama süresinden yaklaşık 24 saat sonra hücrelerin % 100'ünün plaka yüzeyinden ayrılmasına sebep olmuştur. İlaç uygulaması sonrasında xCelligence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile elde edilen eğrilerden IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. IC₅₀ değeri oksaliplatin için 384,2 ± 61.87 µM, ouabain için 8.906 x 10⁻² ± 2.308 x 10⁻² µM (IC₅₀ ± SH) olarak hesaplanmıştır. MDA-MB-231 hücrelerine uygulanmış oksaliplatin ve ouabaine ait IC₅₀ değerleri Çizelge 4.2'de yer almaktadır.



Şekil 4.6. MDA-MB-231 hücrelerinde ouabainin konsantrasyon bağımlı sitotoksik etkileri. A. Orijinal eğri xCelligence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile elde edilmiştir. a: kontrol, b: 10 nM ouabain, c: 30 nM ouabain, d: 100 nM ouabain, e: 1 µM ouabain, f: 10 µM ouabain. B. MDA-MB-231 hücrelerinde ouabaine ait temsili konsantrasyon cevap eğrisi (n=3)

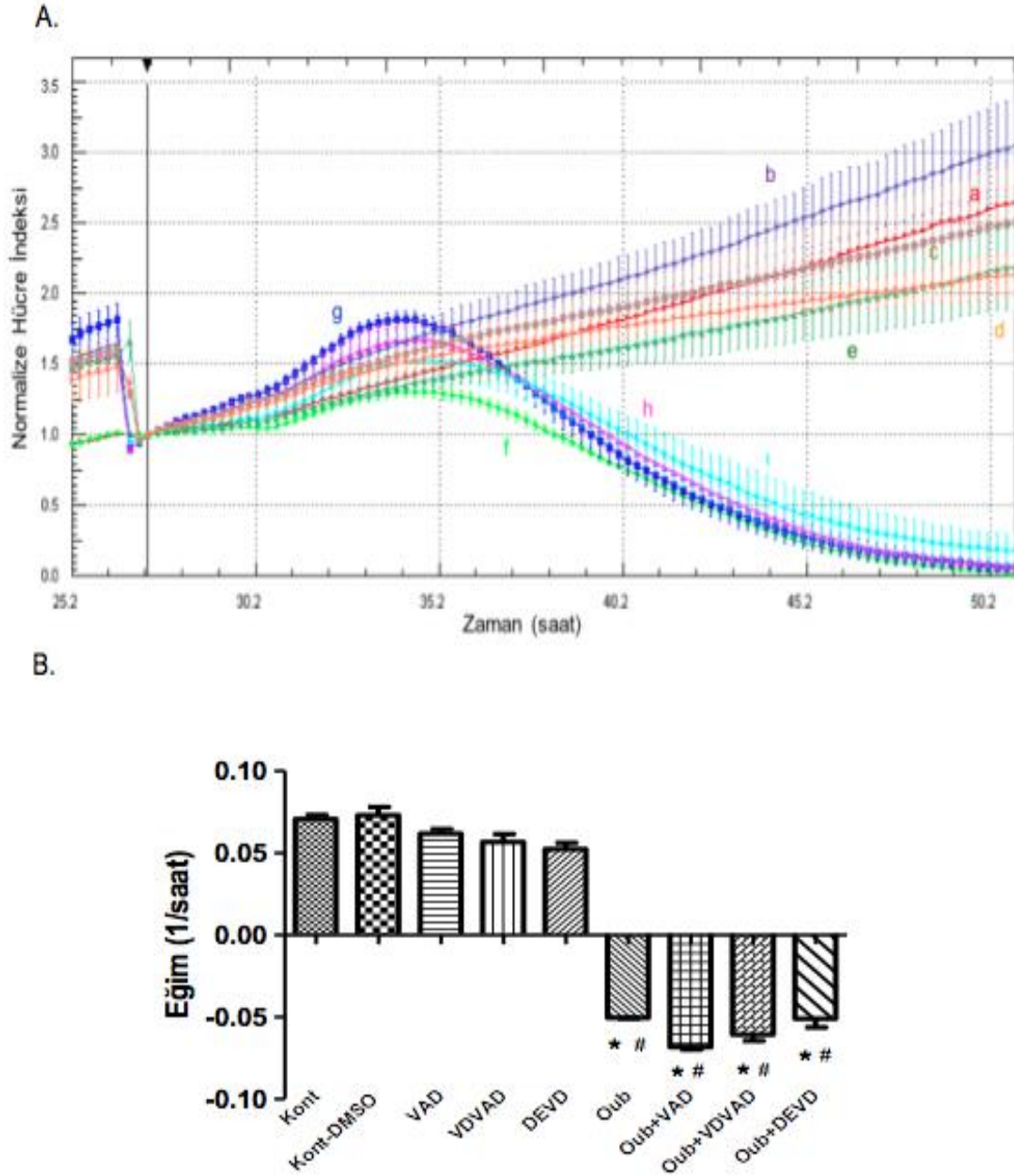


Çizelge 4.2. Ouabain ve oksaliplatinin MDA-MB-231 hücrelerindeki IC₅₀ değerleri

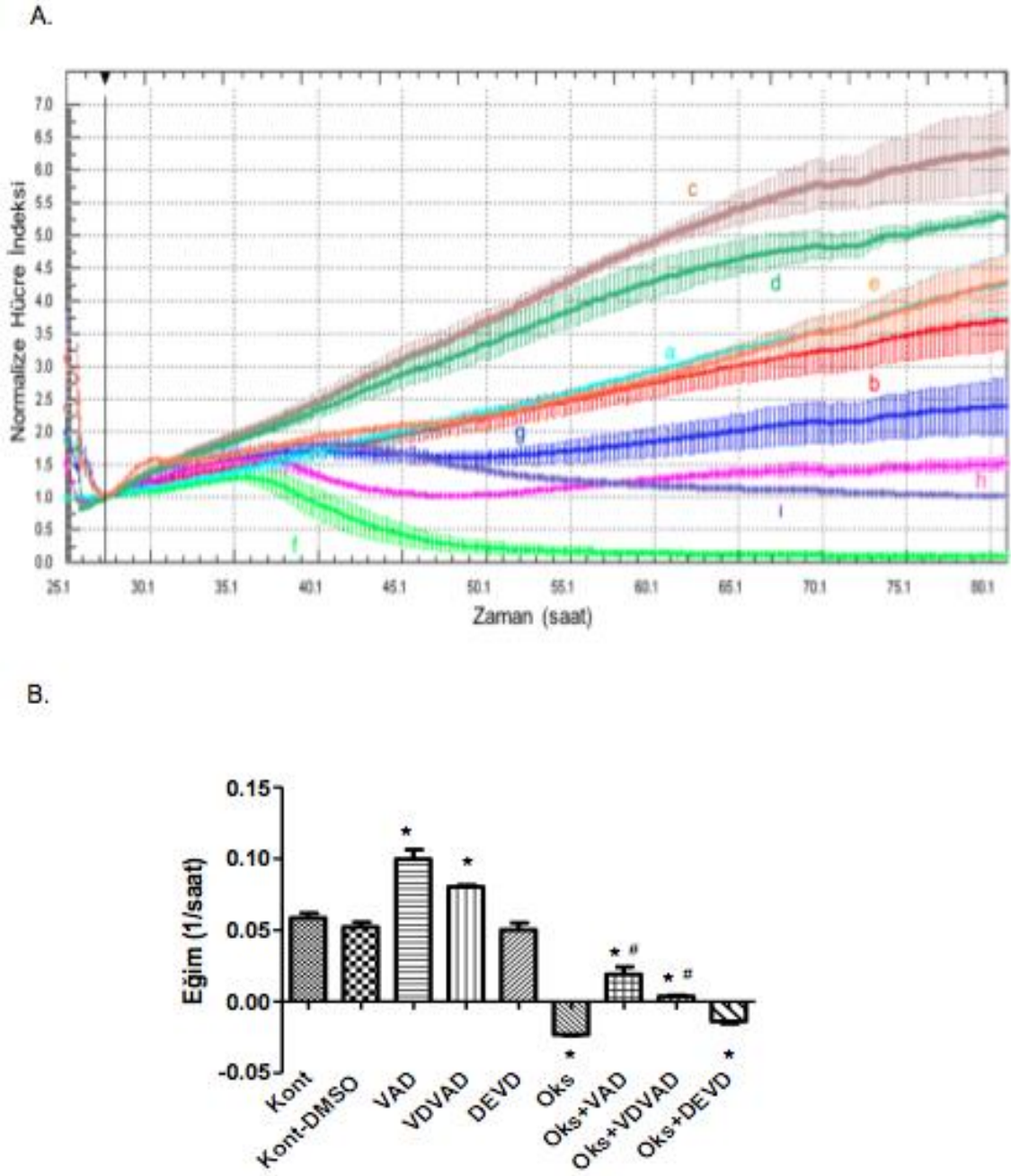
Kullanılan sitotoksik ilaçlar	IC ₅₀ ± SH (μM)
Ouabain	8.906 X 10 ⁻² ± 2.308 X 10 ⁻²
Oksaliplatin	384.2 ± 61.87

4.2. Ouabainin ve Oksaliplatinin MCF-7 Hücre Dizisindeki Sitotoksitesine Kaspaz İnhibisyonunun Etkisi

Meme kanser hücre dizisi olan MCF-7 hücrelerine 10 μM ouabain ve 300 μM oksaliplatin uygulaması hücreleri hızlı bir şekilde öldürmüştür. z-VAD-fmk (pan-kaspaz inhibitörü), z-VDVAD-fmk (kaspaz-2 inhibitörü), z-DEVD-fmk (kaspaz-3 inhibitörü) ouabain ve oksaliplatin uygulanmadan 2 saat önce 50 μM konsantrasyonunda hücelere verilmiştir. Her üç kaspaz inhibitörü de, ouabainin indüklediği hücre ölüm oranını etkilememiştir (Şekil 4.8.). Ancak oksaliplatinin indüklediği hücre ölümü pan kaspaz inhibitörü z-VAD-fmk ön uygulaması ile anlamlı olarak azalmıştır (Şekil 4.9.).



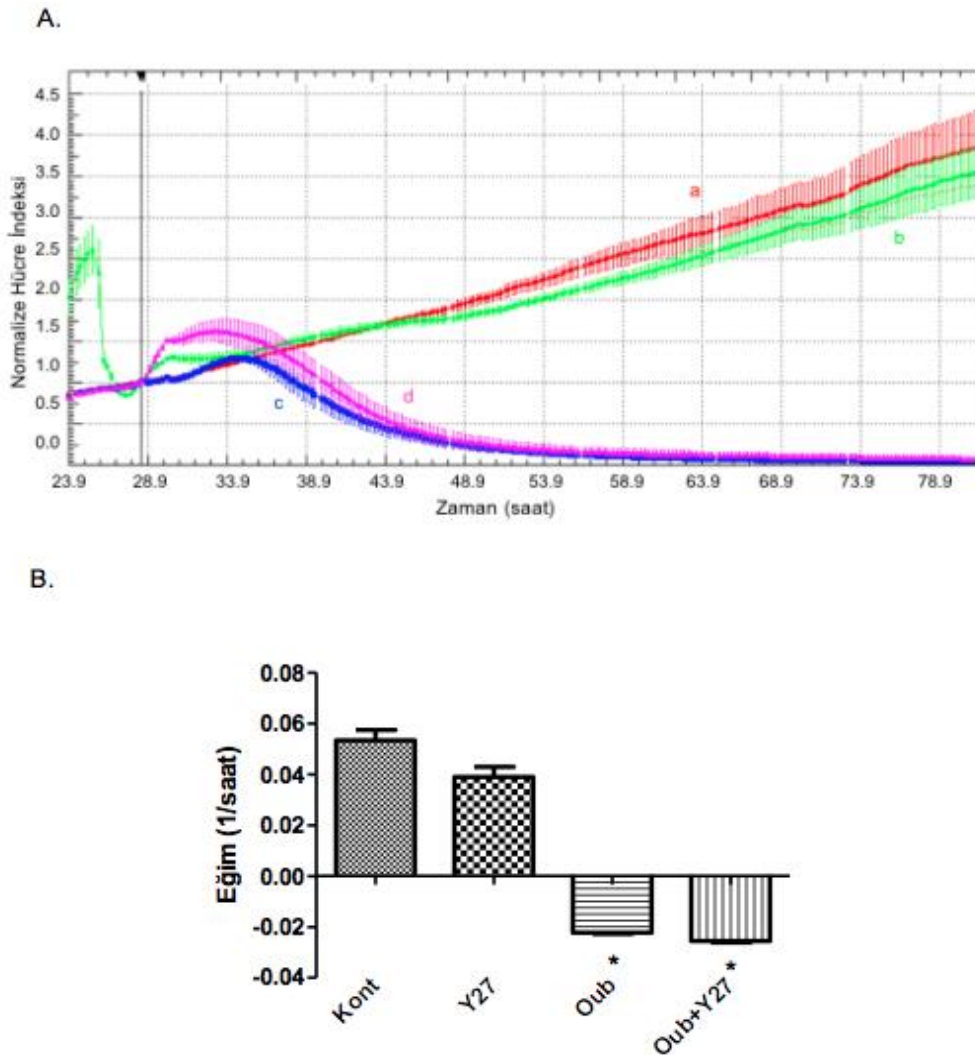
Şekil 4.8. Ouabainin MCF-7 hücrelerindeki sitotoksitesine kaspaz inhibisyonunun etkisi. Orijinal eğri xCelligence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile elde edilmiştir. a:kontrol, b: kontrol-DMSO, c: 50 μ M z-VAD-fmk, d: 50 μ M z-VDVAD-fmk, e: 50 μ M z-DEVD-fmk, f: 10 μ M ouabain, g: 10 μ M ouabain+50 μ M z-VAD-fmk, h: 10 μ M ouabain+50 μ M z-VDVAD-fmk, i: 10 μ M ouabain+50 μ M z-DEVD-fmk, B. MCF-7 hücrelerinde kaspaz inhibitörü ön uygulamasının ouabain sitotoksitesine etkisi (n=3). Kont: kontrol, kont-DMSO: kontrol-Dimetilsülfoksit, VAD: 50 μ M z-VAD-fmk, VDVAD: 50 μ M z-VDVAD-fmk, DEVD: 50 μ M z-DEVD-fmk, Oub: 10 μ M ouabain, Oub+VAD: 10 μ M ouabain+50 μ M z-VAD-fmk, Oub+ VDVAD: 10 μ M ouabain+ 50 μ M z-VDVAD-fmk, Oub+DEVD: 10 μ M ouabain+50 μ M z-DEVD-fmk.* kontrol gruplarına göre anlamlı farklılık. # Sadece kaspaz inhibitörlü gruplara göre anlamlı farklılık (P<0.05, n=3)



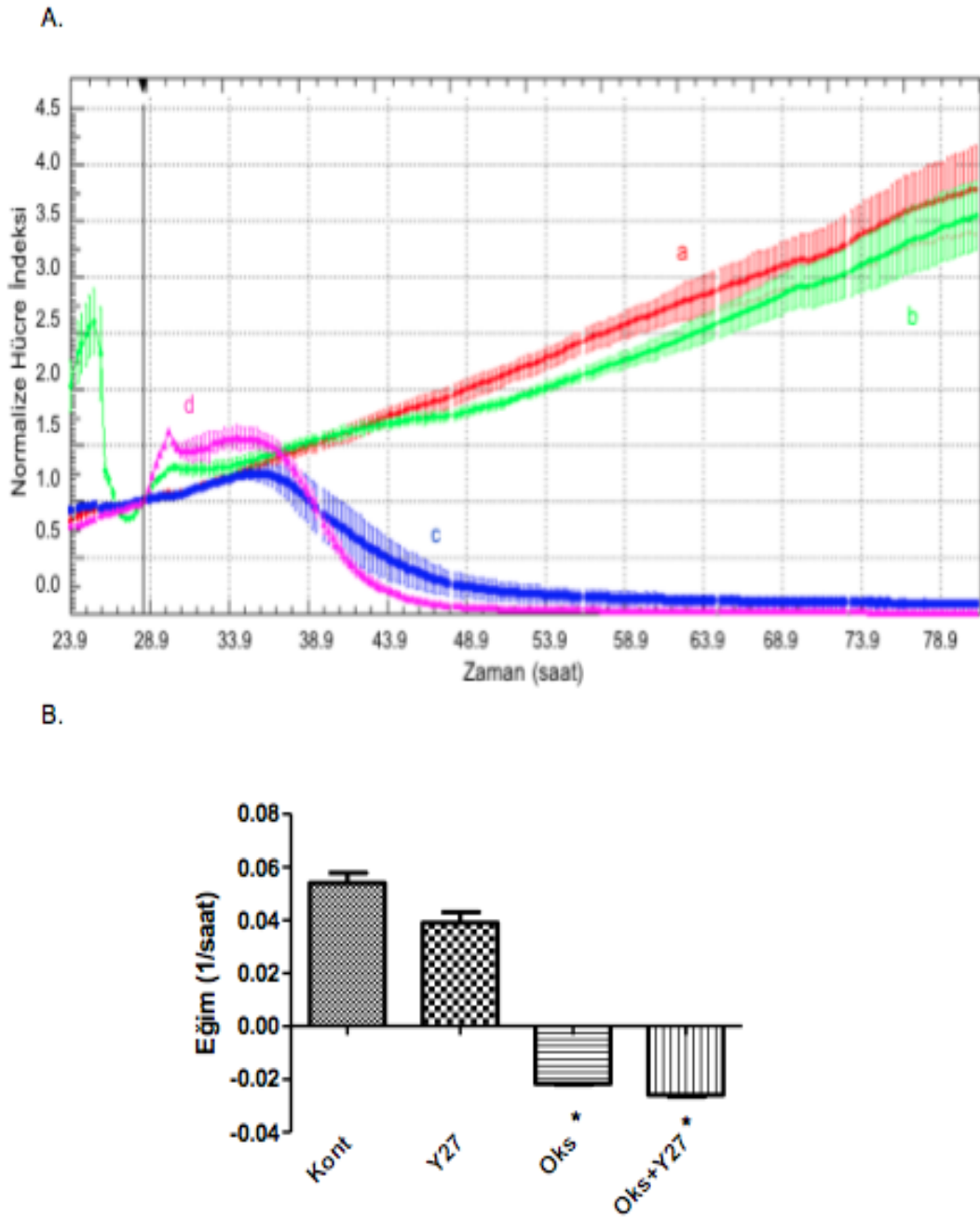
Şekil 4.9. Oksaliplatinin MCF-7 hücrelerindeki sitotoksitesine kaspaz inhibisyonunun etkisi. A. Orijinal eğri xCelligence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile elde edilmiştir. a: kontrol, b: kontrol-DMSO, c: 50 μ M z-VAD-fmk, d: 50 μ M z-VDVAD-fmk, e: 50 μ M z-DEVD-fmk, f: 300 μ M oksaliplatin, g: 300 μ M oksaliplatin + 50 μ M z-VAD-fmk, h: 300 μ M oksaliplatin + 50 μ M z-VDVAD-fmk, i: 300 μ M oksaliplatin + 50 μ M z-DEVD-fmk, B. MCF-7 hücrelerinde kaspaz inhibitörü ön uygulamasının oksaliplatin sitotoksitesine etkisi (n=3). Kont: kontrol, kont-DMSO: kontrol-Dimetilsülfoksit, VAD: 50 μ M z-VAD-fmk, VDVAD: 50 μ M z-VDVAD-fmk, DEVD: 50 μ M z-DEVD-fmk, Oks: 300 μ M oksaliplatin, Oks+VAD: 300 μ M oksaliplatin + 50 μ M z-VAD-fmk, Oks+VDVAD: 300 μ M oksaliplatin + 50 μ M z-VDVAD-fmk, Oks+DEVD: 300 μ M oksaliplatin + 50 μ M z-DEVD-fmk. * kontrol gruplarına göre anlamlı farklılık. # oksaliplatine göre anlamlı farklılık (P<0.05, n=3)

4.3. Ouabainin ve Oksaliplatinin MCF-7 Hücre Dizisindeki Sitotoksitesine Rho Kinaz İnhibisyonunun Etkisi

Meme kanser hücre dizisi olan MCF-7 hücrelerinde 10 μ M ouabain ve 300 μ M oksaliplatin uygulaması hücreleri hızlı bir şekilde öldürmüştür. Y27632 ön uygulaması ile elde edilen ROCK inhibisyonu, ouabain ve oksaliplatinin indüklediği hücre ölüm hızını etkilememiştir (Şekil 4.10. ve Şekil 4.11.).



Şekil 4.10. Ouabainin MCF-7 hücrelerindeki sitotoksitesine Rho kinaz inhibisyonunun etkisi. A. Orijinal eğri xCelligence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile elde edilmiştir. a: kontrol, b: 10 μ M Y27632, c: 10 μ M ouabain, d. 10 μ M ouabain + 10 μ M Y27632. B. MCF-7 hücrelerinde Rho kinaz inhibitörü ön uygulamasının ouabain sitotoksitesine etkisi (n=3). Kont: kontrol, Y27: 10 μ M Y27632, Oub: 10 μ M ouabain Oub+Y27: 10 μ M ouabain + 10 μ M Y27632, * kontrol grubuna göre anlamlı farklılık (P<0.05, n=3)

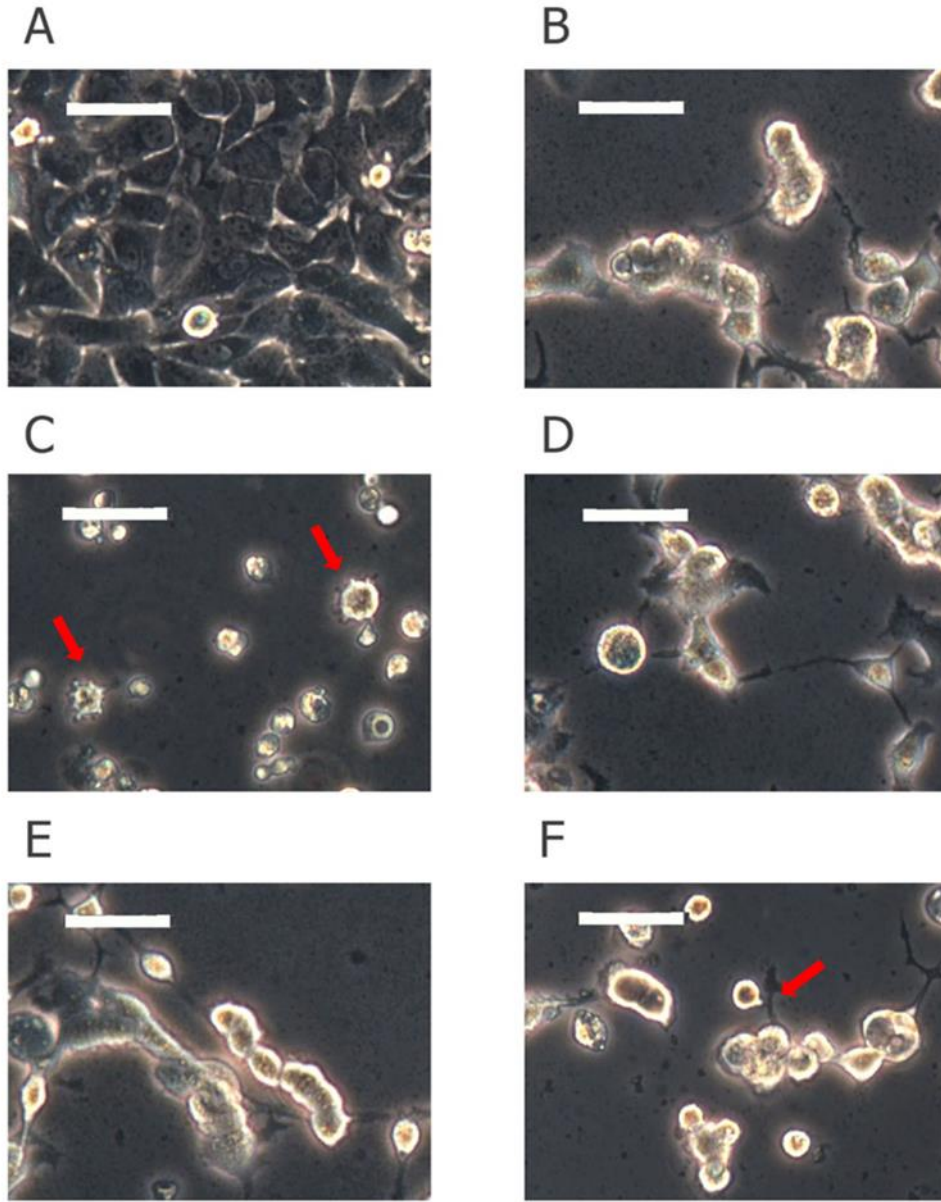


Şekil 4.11. Oksaliplatinin MCF-7 hücrelerindeki sitotoksitesine Rho kinaz inhibisyonunun etkisi. A. Orijinal eğri xCelligence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile elde edilmiştir. a: kontrol, b: 10 μ M Y27632, c: 10 μ M oksaliplatin d. 10 μ M oksaliplatin + 10 μ M Y27632. B. MCF-7 hücrelerinde Rho kinaz inhibitörü ön uygulamasının ouabain sitotoksitesine etkisi (n=3). Kont: kontrol, Y27: 10 μ M Y27632, Oub: 10 μ M ouabain Oub+Y27: 10 μ M ouabain + 10 μ M Y27632, * kontrol grubuna göre anlamlı farklılık. # oksaliplatine göre anlamlı farklılık (P<0.05, n=3)

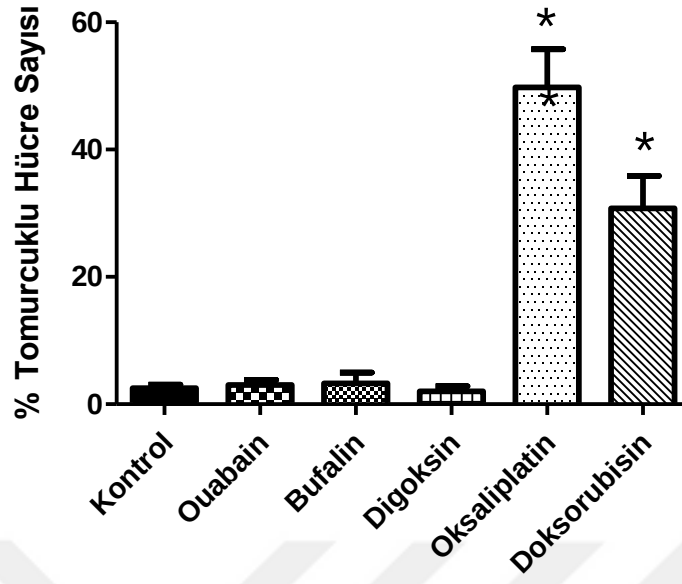
4.4. Kardiyak Glikozitlerin ve Standart Kemoterapötiklerin MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücre Dizileri Üzerindeki Morfolojik Etkileri

4.4.1. Faz kontrast mikroskopik görüntüleri ve hücre membran tomurcuklanması üzerine etkileri

MCF-7 hücreleri tutunarak çoğalan hücrelerdir. Proliferasyoları devam ederken çoğaltıldıkları plakanın yüzeyini tek tabakalı olarak sarmaktadırlar. MCF-7 hücrelerine 24 saat 10 μ M ouabain, 300uM oksaliptatin, 1uM bufalin, 10 uM digoksin ve 3 uM doksorubisin uygulaması bu hücrelerin plaka yüzeyinden ayrılmasına neden olmuştur. Kardiyak glikozit uygulanmış hücreler büzülüp, birleşerek plaka yüzeyinden ayrılırken, standart kemoterapötik uygulanmış hücreler tek tek yüzeyden ayrılmış ve bu hücrelerde membran tomurcuk oluşumu da gözlenmiştir (Resim 4.1. ve Şekil 4.12).

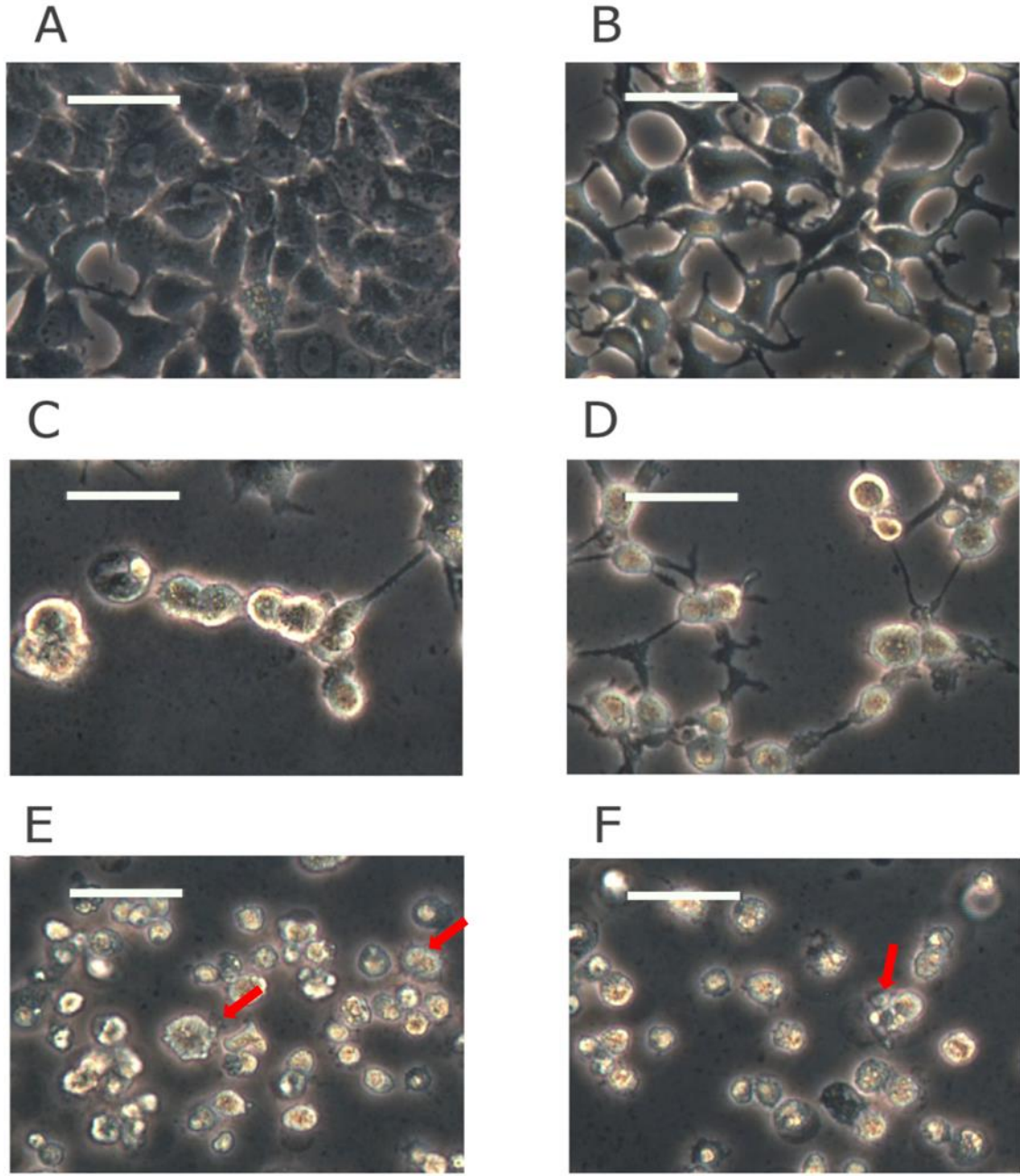


Resim 4.1. Kardiyak glikozit ve standart kemoterapötik uygulama sonrası MCF-7 hücrelerinin faz kontrast görüntüleri A: Kontrol, B: 10 μ M ouabain, C: 300 μ M oksaliplatin, D: 1 μ M bufalin, E: 10 μ M digoksin, F: 3 μ M doksorubisin. Tomurcuklu hücreler kırmızı okla gösterilmiştir (Fotoğraflar x200 büyütme ile çekilmiştir, skala:50 μ m)

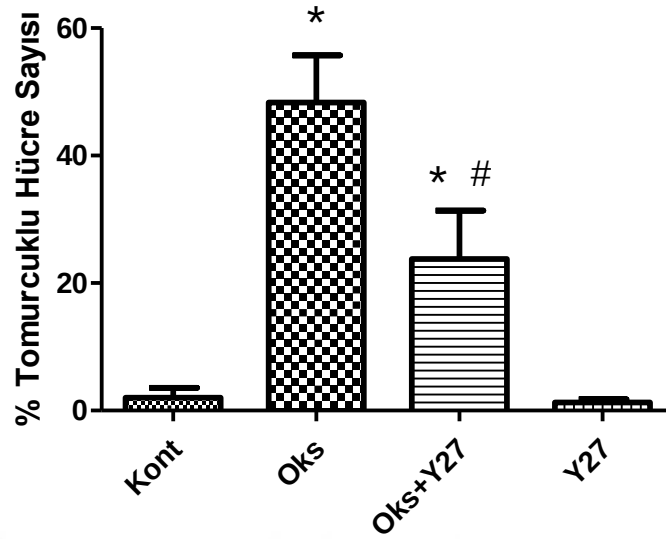


Şekil 4.12. Kardiyak glikozit ve standart kemoterapötiklerin MCF-7 hücrelerinde tomurcuklu hücre sayısına etkisi. 10 μ M ouabain, 300 μ M oksaliplatin, 1 μ M bufalin, 3 μ M dokсорubisin, 10 μ M digoksin, ($p < 0.05$, $n = 4$)

Ouabain ve oksaliplatinin MCF-7 hücreleri üzerindeki morfolojik etkilerine Rho Kinaz ön uygulamasının etkileri incelenmiştir. Ouabain uygulanmış MCF-7 hücrelerinde membran tomurcuk oluşumu gözlenmezken, oksaliplatin uygulanmış hücrelerde membran tomurcuk oluşumu gözlenmektedir. Oksaliplatin ile indüklenen membran tomurcuk oluşumu Rho kinaz inhibitörü Y27632 (10 μ M Y27632, 30 dak) ön uygulaması ile anlamlı olarak azalmıştır (Resim 4.2. ve Şekil 4.13.)

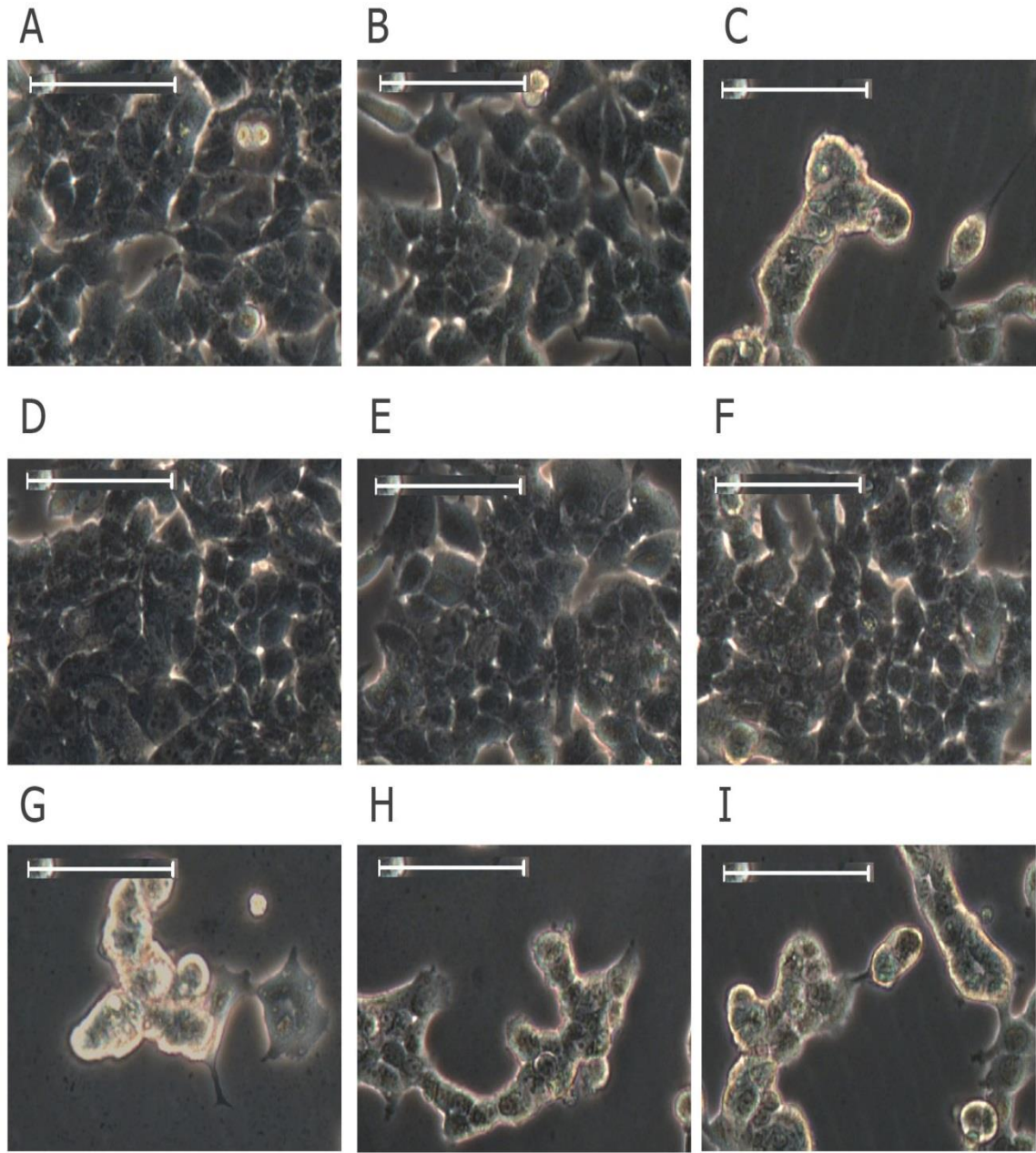


Resim 4.2. Rock inhibitörü (Y27632) varlığında ouabain ve oksaliplatin uygulama sonrası MCF-7 hücrelerinin faz kontrast görüntüleri. A.Kontrol, B. 10 μ M Y27632, C.10 μ M ouabain, D. 10 μ M ouabain +10 μ M Y27632, E. 300 μ M oksaliplatin, F. 300 μ M oksaliplatin+10 μ M Y27632. Tomurcuklu hücreler kırmızı okla gösterilmiştir (Fotoğraflar x200 büyütme ile çekilmiştir, skala:50 μ m)

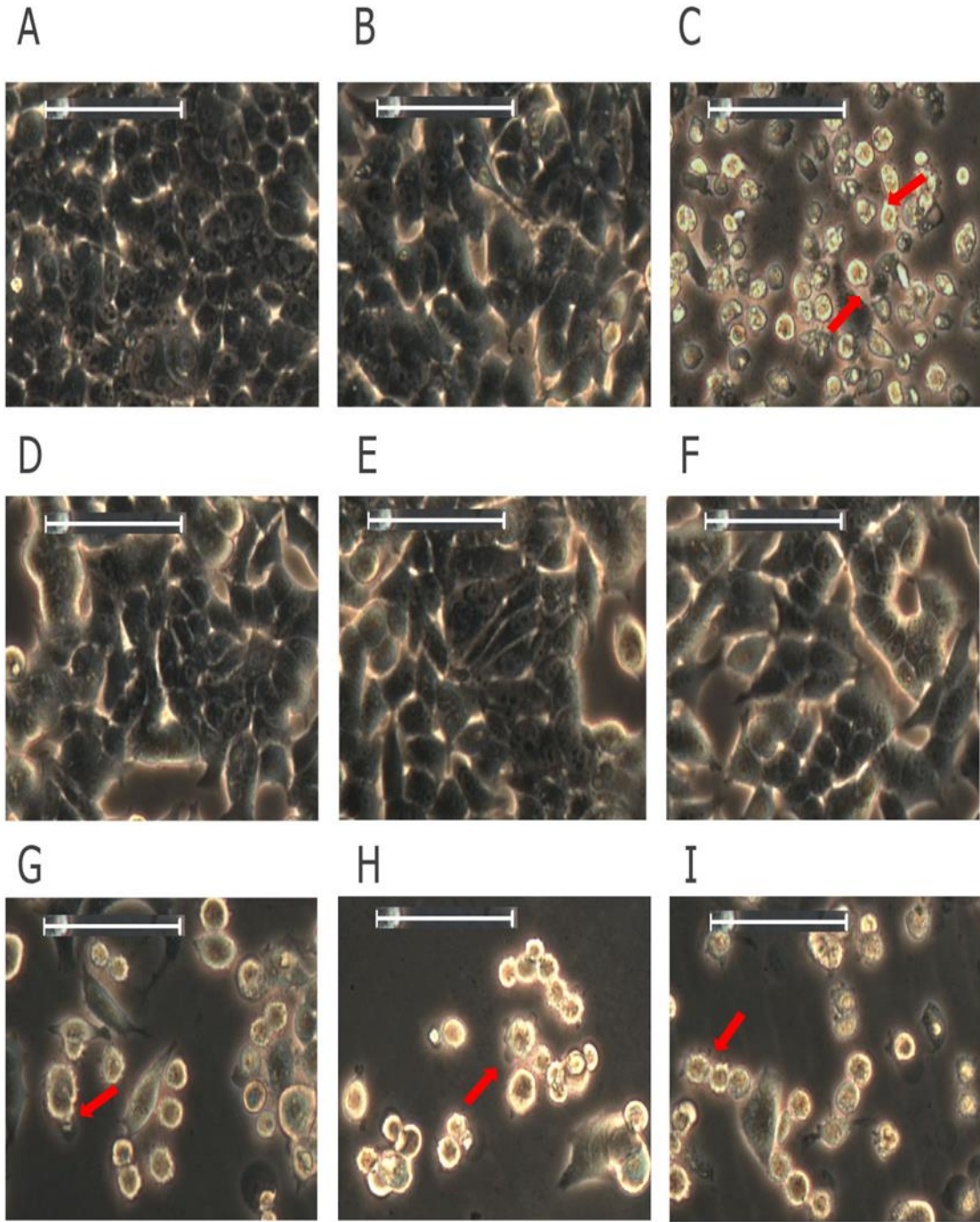


Şekil 4.13. MCF-7 hücrelerinde oksaliplatin ve Y27632 ön uygulamasının tomurcuklu hücre sayısına etkisi. * kontrol grubuna göre anlamlı farklılık, # oksaliplatin grubuna göre anlamlı farklılık. Kont: Kontrol, Oks: 300 µM oksaliplatin, Oks+Y27: 300 µM oksaliplatin +10 µM Y27632, Y27:10 µM Y27632 (p<0.05, n=4)

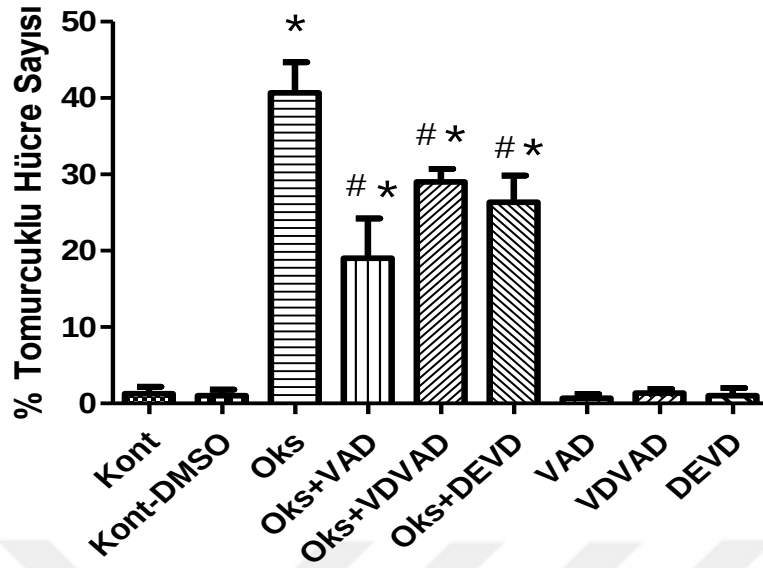
Ouabain ve oksaliplatinin MCF-7 hücreleri üzerindeki morfolojik etkilerine kaspaz inhibitörlerinin ön uygulamasının etkileri incelenmiştir. Ouabain uygulanmış MCF-7 hücrelerinde membran tomurcuk oluşumu gözlenmezken, oksaliplatin uygulanmış hücrelerde membran tomurcuk oluşumu gözlenmektedir. Oksaliplatin ile indüklenen membran tomurcuk oluşumu kaspaz inhibitörleri (z-VAD-fmk, z-VDVAD-fmk, z-DEVD-fmk, 50 µM, 2 saat) ön uygulaması ile anlamlı olarak azalmıştır (Resim 4.3.;4.4 ve Şekil 4.14.).



Resim 4.3. Ouabain uygulanmış MCF-7 hücrelerinde, kaspaz inhibitörü ön uygulamasının hücrelerin morfojik görüntüsü üzerindeki etkileri. A: kontrol, B: kontrol DMSO, C: 10 μ M ouabain, D: 50 μ M z-VAD-fmk, E: 50 μ M z-VDVADfmk, F: 50 μ M z-DEVD-fmk, , G: 10 μ M ouabain +50 μ M z-VAD-fmk, , H: 10 μ M ouabain +50 μ M z-VDVAD-fmk, I: G: 10 μ M ouabain+50 μ M z-DEVD-fmk (Fotoğraflar x200 büyütme ile çekilmiştir, skala: 100 μ m)

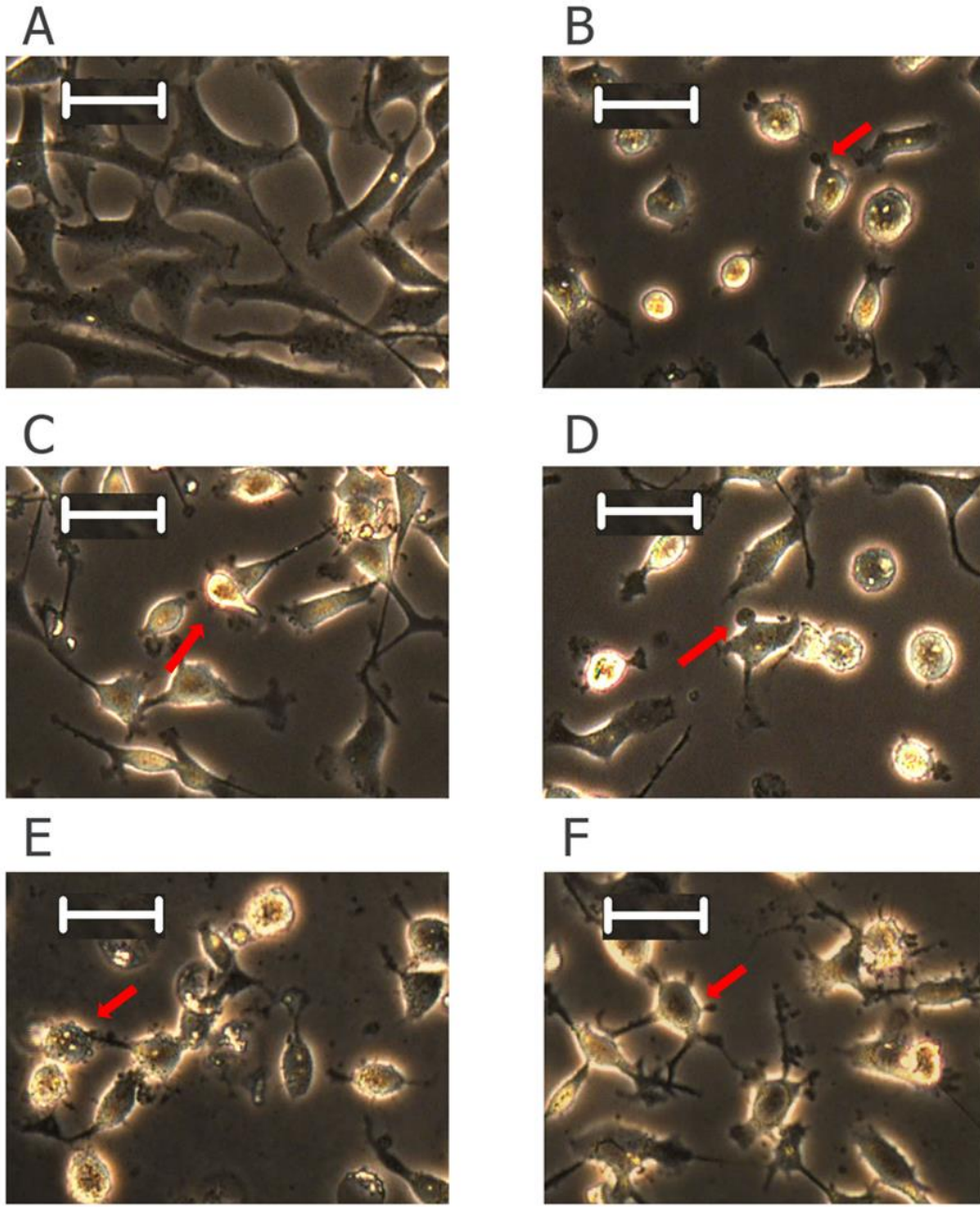


Resim 4.4. Oksaliplatin uygulanmış MCF-7 hücrelerinde, kaspaz inhibitörü ön uygulamasının hücrelerin morfojik görüntüsü üzerindeki etkileri. A: kontrol, B: kontrol DMSO, C: 300 μ M oksaliplatin, D: 50 μ M z-VAD-fmk, E: 50 μ M z-VDVAD-fmk, F: 50 μ M z-DEVD-fmk, , G: 300 μ M oksaliplatin +50 μ M z-VAD-fmk, , H: 300 μ M oksaliplatin +50 μ M z-VDVAD-fmk, I: 300 μ M oksaliplatin +50 μ M z-DEVD-fmk. (fotoğraflar x200 büyütme ile çekilmiştir. Skala: 100 μ m)

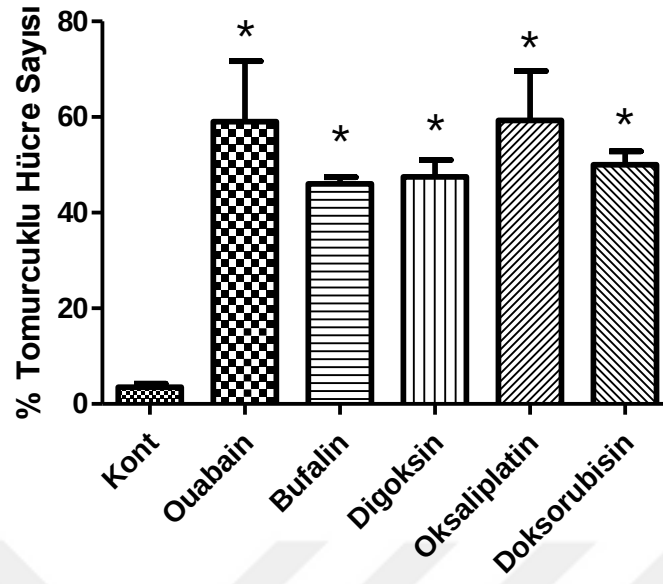


Şekil 4.14. Oksaliptatin uygulanmış MCF-7 hücrelerinde, kaspaz inhibitörü ön uygulamasının tomurcuklu hücre sayısına etkisi. * kontrol grubuna göre anlamlı farklılık, oksaliptatin grubuna anlamlı göre farklılık. kont: kontrol, Oks: 300 μ M oksaliptatin, Oks + VAD : 300 μ M oksaliptatin+50 μ M z-VAD-fmk, Oks+VDVAD: 300 μ M oksaliptatin +50 μ M z-VDVAD-fmk, Oks + DEVD : 300 μ M oksaliptatin +50 μ M z-DEVD-fmk, vad: 50 μ M z-VAD-fmk, vdvad: 50 μ M z-VDVADfmk, devd: 50 μ M z-DEVD-fmk (n=3)

Kardiyak glikozit ve standart kemoterapötik uygulama sonrası MDA-231 hücrelerinin faz kontrast görüntüleri incelenmiştir. MDA-MB-231 hücrelerine 24 saat 10 μ M ouabain, 300uM oksaliptatin, 1uM bufalin, 10 uM digoksin ve 3 uM doksorubisin uygulaması bu hücrelerin plaka yüzeyinden ayrılmasına neden olmuştur. Hem kardiyak glikozit hem de standart kemoterapötik uygulanmış hücreler büzülüp, yüzeyden ayrılmış ve bu hücrelerde membran tomurcuk oluşumu gözlemlenmiştir (Resim 4.5. ve şekil 4.15).

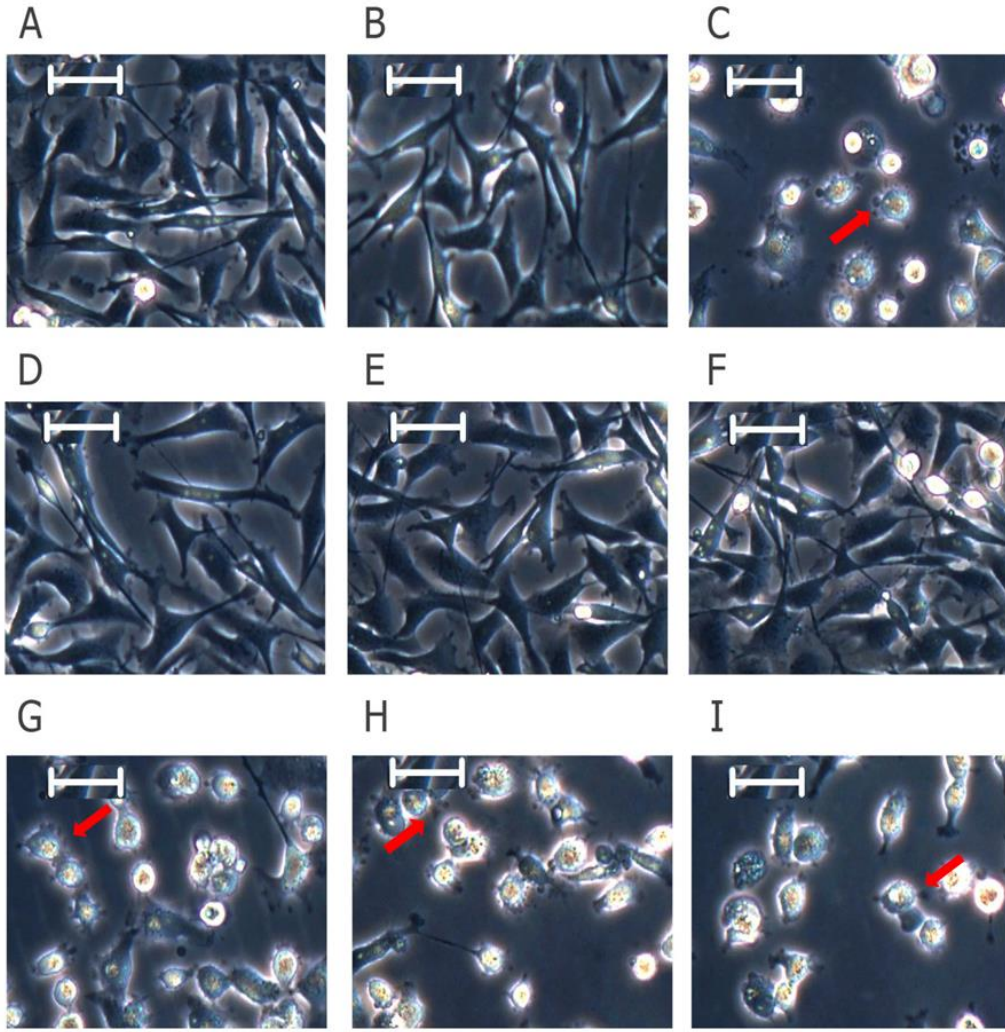


Resim 4.5. Kardiyak glikozit ve standart kemoterapötik uygulama sonrası MDA-MB-231 hücrelerinin faz kontrast görüntüleri A: Kontrol, B: 10 μ M ouabain, C: 300 μ M oksaliplatin, D: 1 μ M bufalin, E: 10 μ M digoksin, F: 3 μ M doksorubisin (Fotoğraflar X200 büyütme ile çekilmiştir, skala: 50 μ m)

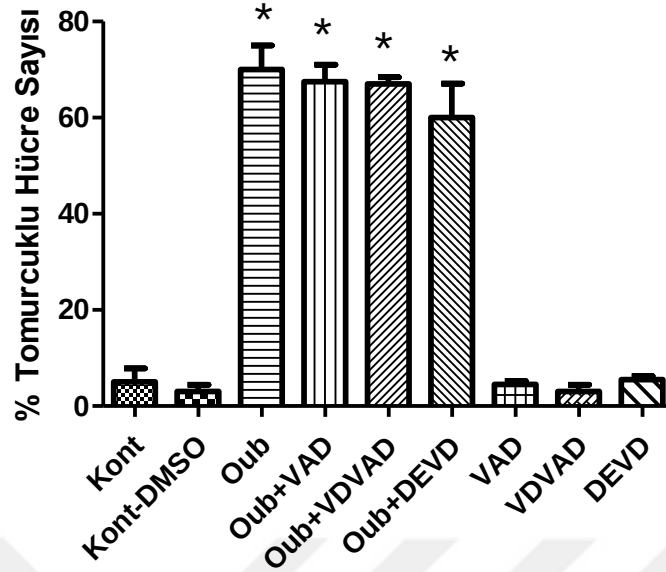


Şekil 4.15. Kardiyak glikozit ve standart kemoterapötiklerin MDA-MB-231 hücrelerinde tomurcuklu hücre sayısına etkisi. 10 μ M ouabain, 300 μ M oksaliptatin, 1 μ M bufalin, 10 μ M digoksin, 3 μ M doksorubisin ($p < 0.05$, $n=3$)

MDA-MB-231 hücrelerinde ouabain uygulaması ile oluşan membran tomurcuklanmasına, kaspaz inhibitörlerinin (z-VAD-fmk, z-VDVAD-fmk, z-DEVD-fmk, 50 μ M, 2 saat) ön uygulamasının etkisi olmamıştır (Resim 4.6. ve Şekil 4.16.).



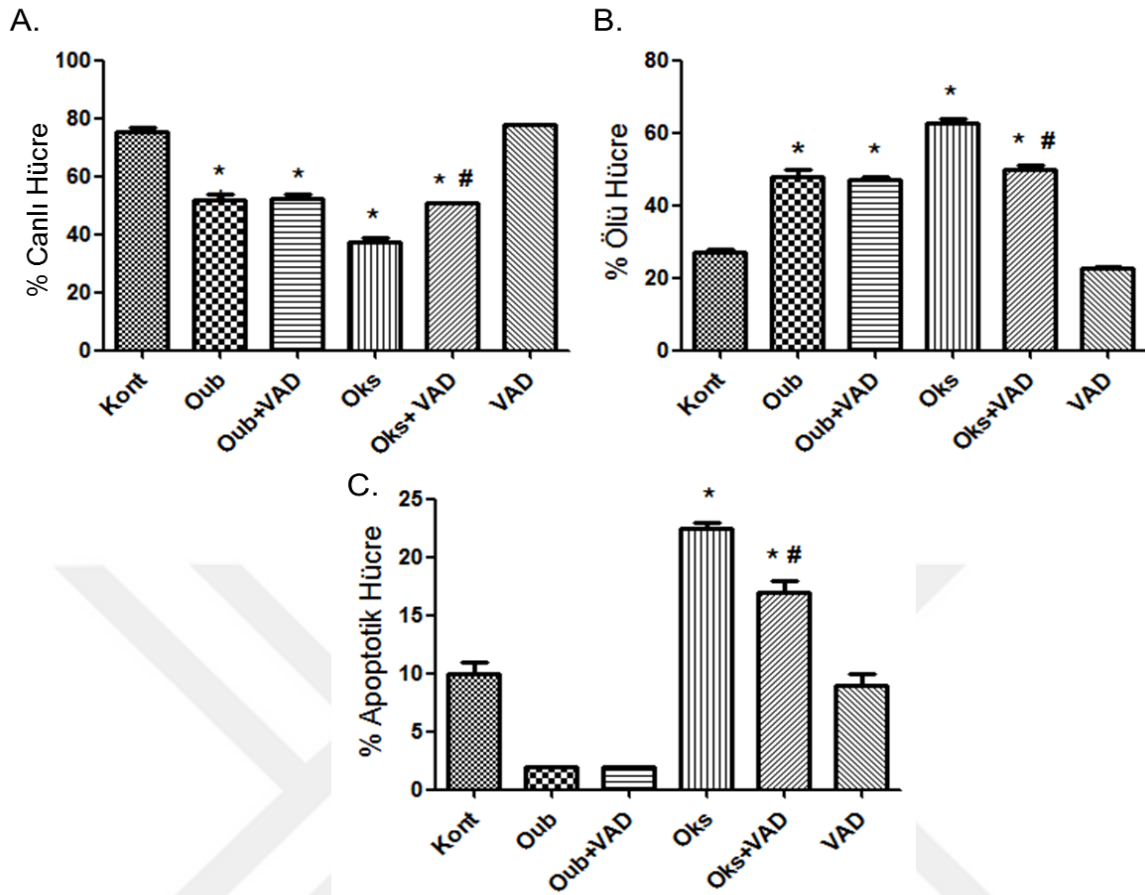
Resim 4.6. Ouabain uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerinde, kaspaz inhibitörü ön uygulamasının hücrelerin morfojik görüntüsü üzerindeki etkileri. A: kontrol, B: kontrol DMSO, C: 10 μ M ouabain, D: 50 μ M z-VAD-fmk, E: 50 μ M z-VDVAD-fmk, F: 50 μ M z-DEVD-fmk, G: 10 μ M ouabain + 50 μ M z-VAD-fmk, H: 10 μ M ouabain + 50 μ M z-VDVAD-fmk, I: 10 μ M ouabain + 50 μ M z-DEVD-fmk (Fotoğraflar x200 büyütme ile çekilmiştir, skala: 100 μ m)



Şekil 4.16. Ouabain uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerinde, kaspaz inhibitörü ön uygulamasının tomurcuklu hücre sayısına etkisi. * kontrol grubuna göre anlamlı farklılık, Kont: kontrol, Oub: 10 μ M ouabain, Oub + VAD: 10 μ M ouabain +50 μ M z-VAD-fmk, , Oub + VDVAD: 10 μ M ouabain +50 μ M z-VDVAD-fmk, Oub + DEVD :10 μ M ouabain +50 μ M z-DEVD-fmk, VAD: 50 μ M z-VAD-fmk, VDVAD: 50 μ M z-VDVADfmk, DEVD: 50 μ M z-DEVD-fmk ($p < 0.05$, $n = 3$)

4.5. Ouabain ve Oksaliptatin Uygulanmış MCF-7 Hücrelerinde Apoptotik Hücre Oranının Belirlenmesi

MCF-7 hücrelerine 10 μ M ouabain ve 300 μ M oksaliptatin uygulanarak hücre ölümü indüklenmiştir. 50 μ M pan kaspaz inhibitörü (z-VAD-fmk) ouabain ve oksaliptatin uygulamasından 2 saat önce hücrelere verilerek hücre ölümünde kaspaz inhibisyonunun etkisi değerlendirilmiştir. Ouabain ile indüklenen hücre ölümünde annexin V boyaması gözlenmezken, oksaliptatin uygulaması sonucu ölen hücreler annexin V ile boyanmıştır. Bu durum oksaliptatin uygulaması sonucunda hücrelerde apoptotik ölüm meydana geldiğini göstermektedir. Ayrıca kaspaz inhibitörü ile kombine edilmiş oksaliptatin grubundaki apoptotik hücre sayısı sadece oksaliptatin verilmiş gruba göre anlamlı olarak azalmıştır (Şekil 4.17.)



Şekil 4.17. MCF-7 hücrelerinde kaspaz inhibisyonunun ouabain ve oksaliplatinin indüklediği hücre ölümü üzerindeki etkisi. A: % canlı hücre sayısı, B: % ölü hücre sayısı, C: % Apoptotik hücre sayısı. * kontrol grubuna göre anlamlı farklılık, # oksaliplatin grubuna anlamlı göre farklılık

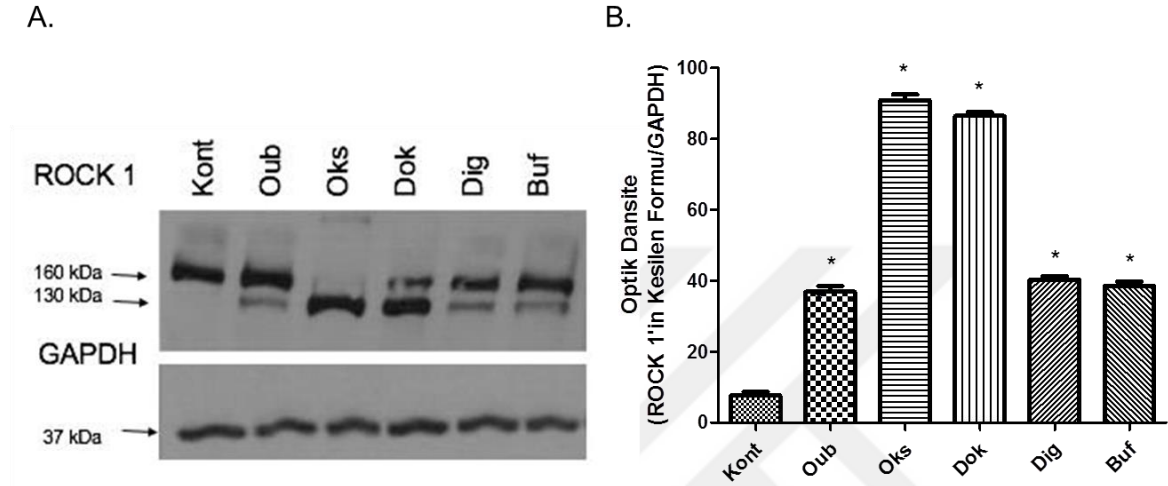
4.6. MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücre Dizilerinde Standart Kemoterapötiklerin ve Kardiyak Glikozitlerin ROCK 1 Kesilmesi Üzerindeki Etkileri

MCF-7 hücrelerine 10 μ M ouabain, 300 μ M oksaliplatin, 3 μ M doksorubisin, 10 μ M digoksin, 1 μ M bufalin uygulaması (24 saat) ROCK 1'in kesilmiş ve aktif olan 130 kDa formunun kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmasına neden olmuştur. Oksaliplatin ve doksarubisin uygulamasında ise diğer ajanlara göre daha fazla aktif ROCK 1 formunun oluştuğu belirlenmiştir (Şekil 4.18.).

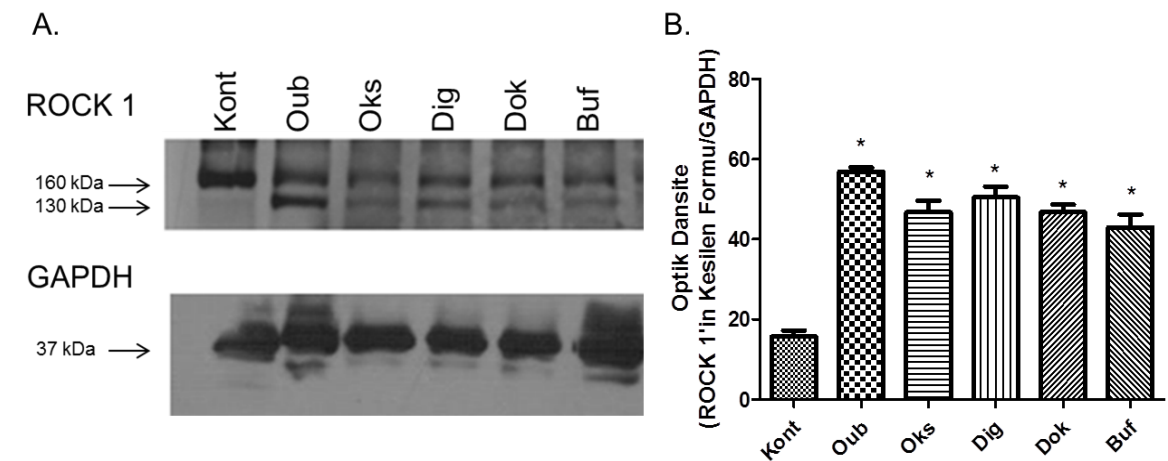
MDA-MB-231 hücrelerine de aynı şekilde 10 μ M ouabain, 300 μ M oksaliplatin, 3 μ M doksorubisin, 10 μ M digoksin, 1 μ M bufalin uygulaması (24 saat) ROCK 1'in kesilmiş ve aktif olan 130 kDa formunun kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmasına neden olmuştur.

MCF-7 hücrelerinin aksine tüm ajanlarda yaklaşık aynı oranda aktif ROCK 1 formunun oluştuğu belirlenmiştir (Şekil 4.19.)

Bu çalışmalarda kullanılan ROCK 1 antikorları (BD) ROCK 1'i 906-1012 aminoasit aralığından tanımaktadır.

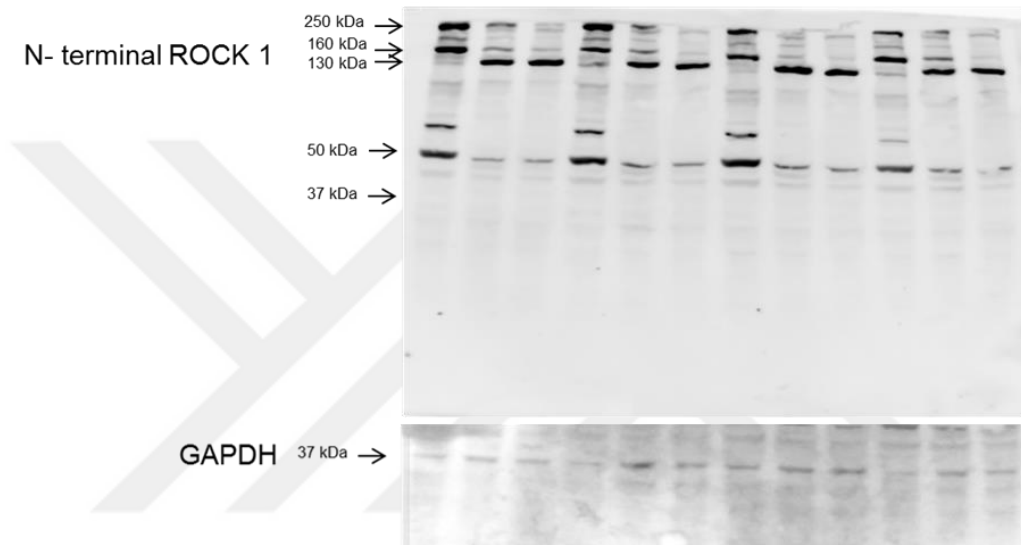


Şekil 4.18. MCF-7 hücrelerinde ouabain, oksaliplatin, digoksin, doksorubisin ve bufalinin indüklediği hücre ölümünün ROCK 1 (906-1012 aa.) kesilmesi üzerindeki etkisi. A. MCF-7 hücrelerinde ROCK 1 proteini için temsili immüno blotlar. B. ROCK 1 kesilmesi için yapılan dansitometrik analiz. Kont: kontrol, Oub: 10 μ M ouabain, Oks:300 μ M oksaliplatin, Dok: 3 μ M doksorubisin, Dig: 10 μ M digoksin, Buf: 1 μ M bufalin ($p < 0.05$, $n=3$)



Şekil 4.19. MDA-MB-231 hücrelerinde ouabain, oksaliplatin, digoksin, doksorubisin ve bufalinin indüklediği hücre ölümünün ROCK 1 (906-1012 aa.) kesilmesi üzerindeki etkisi. A. MDA-MB-231 hücrelerinde ROCK 1 proteini için temsili immüno blotlar. B. ROCK 1 kesilmesi için yapılan dansitometrik analiz. Kont: kontrol, Oub: 10 μ M ouabain, Oks:300 μ M oksaliplatin, Dok: 3 μ M doksorubisin, Dig: 10 μ M digoksin, Buf: 1 μ M bufalin ($p < 0.05$, $n=3$)

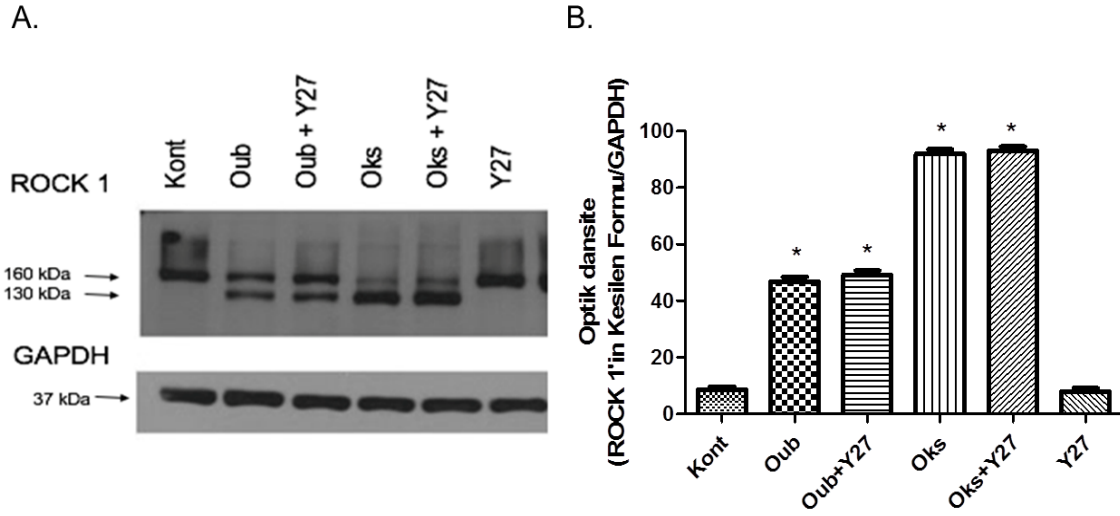
Ayrıca ROCK 1'i N terminalinin yanındaki 15 aminoasitlik bölgeden tanıyan N terminal ROCK 1 antikoru da, ROCK 1'in farklı bölgelerden kesilip kesilmediğini doğrulamak için kullanılmıştır. Ancak elde edilen bantlar 906-1012 aminoasit aralığından tanıyan antikor ile elde edilen bantlarla aynı büyüklüktedir. Aynı zamanda yaklaşık 250 kDa ve 50 kDa büyüklüğünde, 130 kDa'ki kesilme paternine benzer kesilmiş fragmentler oluştuğunu gözlemledik (Şekil 4.20.).



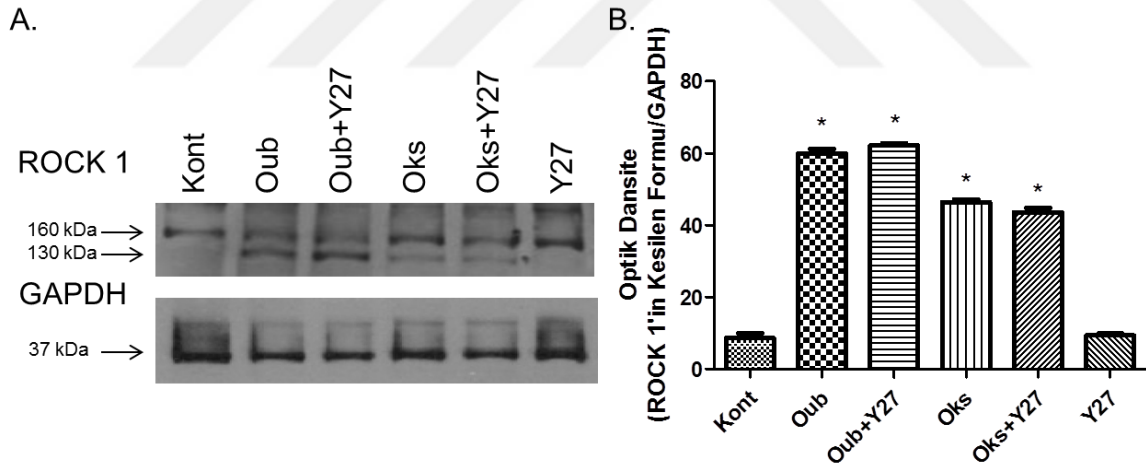
Şekil 4.20. MCF-7 hücrelerinde ouabain ve oksaliplatinin indüklediği hücre ölümünün ROCK 1 (-N terminal ROCK 1 antikoru) kesilmesi üzerindeki etkisi. MCF-7 hücrelerinde ROCK 1 ve GAPDH proteini için temsili immünoblotlar.

4.7. MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücre Dizilerinde Ouabain ve Oksaliplatinin indüklediği ROCK 1 Kesilmesine ROCK inhibisyonunun etkisi

Ouabain ve oksaliplatinin indüklediği ROCK 1 kesilmesi üzerindeki ROCK inhibisyonunun etkisini değerlendirmek için hücreler 30 dakika 10 μ M Y27632 (Rho kinaz inhibitörü) ile inkübe edilmiştir. Sonrasında 10 μ M ouabain ve 300 μ M oksaliplatin uygulanmıştır. Hem MCF-7 hem de MDA-MB-231 hücre dizilerinde, ouabain ve oksaliplatinin indüklediği ROCK 1 kesilmesinde Rho kinaz inhibisyonunun etkisi olmamıştır (Şekil 4.21. ve Şekil 4.22.).



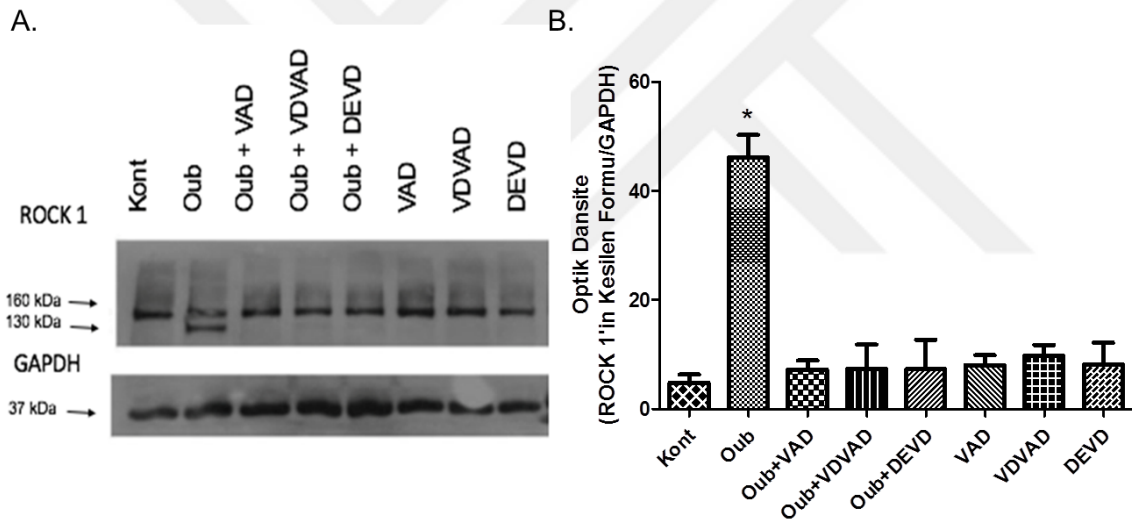
Şekil 4.21. MCF-7 hücrelerinde ROCK inhibisyonunun ouabainin ve oksaliplatinin indüklediği ROCK 1 kesilmesine etkileri. A. MCF-7 hücrelerinde ROCK 1 proteini için temsili immünoblotlar. B. MCF-7 hücrelerinde ROCK 1 kesilmesi için yapılan dansitometrik analiz. Kont: kontrol, Oub: 10 μ M Ouabain, Oub+Y27: 10 μ M Ouabain+10 μ M Y27632, Oks:300 μ M oksaliplatin, Oks+Y27: 300 μ M oksaliplatin + 10 μ M Y27632, Y27: 10 μ M Y27632 ($p < 0.05$, $n=3$)



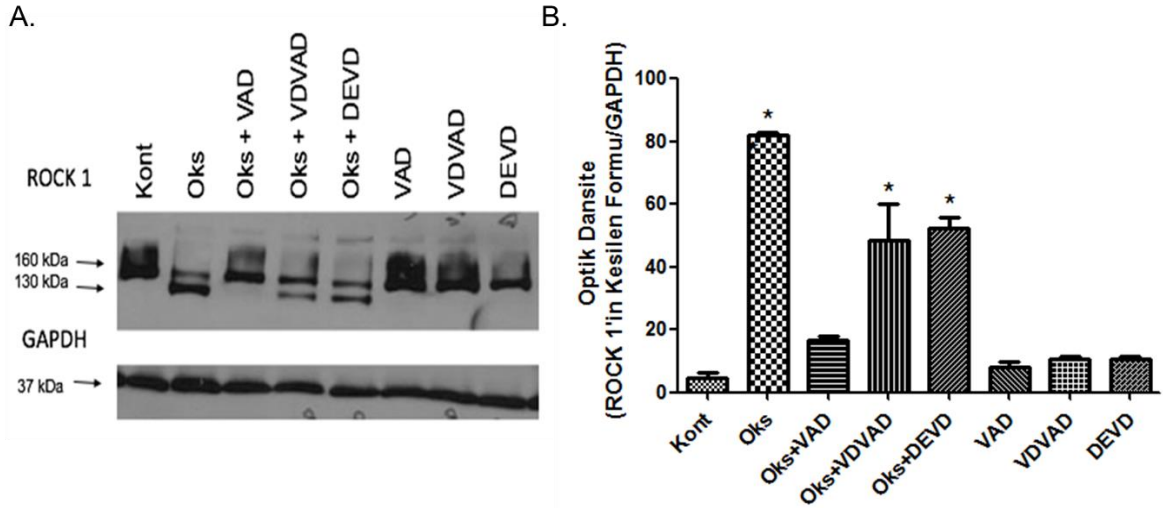
Şekil 4.22. MDA-MB-231 hücrelerinde ROCK inhibisyonunun ouabainin ve oksaliplatinin indüklediği ROCK 1 kesilmesine etkileri. A. MDA-MB-231 hücrelerinde ROCK 1 proteini için temsili immünoblotlar. B. MDA-MB-231 hücrelerinde ROCK 1 kesilmesi için yapılan dansitometrik analiz. Kont: kontrol, Oub: 10 μ M Ouabain, Oub + Y27: 10 μ M Ouabain + 10 μ M Y27632, Oks:300 μ M oksaliplatin, Oks+Y27: 300 μ M oksaliplatin + 10 μ M Y27632, Y27: 10 μ M Y27632 ($p < 0.05$, $n=3$)

4.8. MCF-7 Hücre Dizisinde Ouabain ve Oksaliplatinin İndüklediği ROCK 1 Kesilmesine Kaspaz İnhibisyonunun Etkisi

MCF-7 hücrelerinde ouabain ve oksaliplatin ile indüklenen ROCK 1 kesilmesi kaspaz inhibitörlerine duyarlıdır. Ouabain ile indüklenen ROCK 1 kesilmesi pan-kaspaz inhibitörü (50 μ M z-VDVAD-fmk, 2 saat), kaspaz -3/7 inhibitörü (50 μ M z-DEVD-fmk, 2 saat) ve kaspaz -2 inhibitörü (50 μ M z-VDVAD-fmk, 2 saat) ön uygulaması ile tamamen inhibe olmaktadır (Şekil 4.23.). Oksaliplatin ile indüklenen ROCK 1 kesilmesi pan-kaspaz inhibitörü (50 μ M z-VDVAD-fmk, 2 saat) ile tamamen, kaspaz -3/7 inhibitörü (50 μ M z-DEVD-fmk, 2 saat) ve kaspaz -2 inhibitörü (50 μ M z-VDVAD-fmk, 2 saat) ön uygulaması ile kısmen inhibe olmaktadır (Şekil 4.24.)



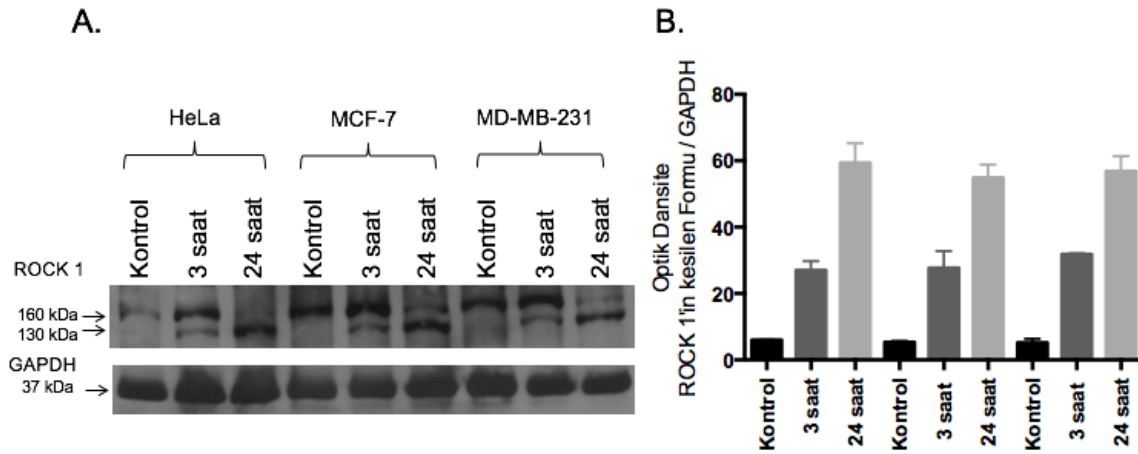
Şekil 4.23. Kaspaz inhibisyonunun ouabainin indüklediği ROCK 1 kesilmesi üzerindeki etkisi A. MCF-7 hücrelerinde ROCK 1 proteini için temsili immünoblotlar. B. MCF-7 hücrelerinde ROCK 1 kesilmesi için yapılan dansitometrik analiz. Kont: kontrol, Oub: 10 μ M ouabain, Oub+VAD: 10 μ M ouabain+50 μ M z-VAD-fmk, Oub+VDVAD: 10 μ M ouabain+50 Mm VDVAD-fmk, Oub+ DEVD: 10 μ M ouabain+50 μ M z-DEVD-fmk, VAD: 50 μ M z-VAD-fmk, VDVAD: 50 μ M z-VDVAD-fmk, DEVD: 50 μ M z-DEVD-fmk.* kontrol grubuna göre anlamlı farklılık ($p<0.05$, $n=3$)



Şekil 4.24. Kaspaz inhibisyonunun oksaliplatinin indüklediği ROCK 1 kesilmesi üzerindeki etkisi. A. MCF-7 hücrelerinde ROCK 1 proteini için temsili immünoblotlar. B. MCF-7 hücrelerinde oksaliplatinin indüklediği ROCK 1 kesilmesi için yapılan dansitometrik analiz. kont: kontrol, Oks: 300 μ M oksaliplatin, Oks+VAD: 300 μ M oksaliplatin+50 μ M z-VAD-fmk, , Oks+ VDVAD: 300 μ M oksaliplatin+50 μ M z-VDVAD-fmk, Oks+DEVD: 300 μ M oksaliplatin+50 μ M z-DEVD-fmk, VAD: 50 μ M z-VAD-fmk, VDVAD: 50 μ M z-VDVAD-fmk, DEVD: 50 μ M z-DEVD-fmk. * kontrol grubuna göre anlamlı farklılık ($p<0.05$, $n=3$)

4.9. Rekombinant Aktif Kaspaz-2'nin MCF-7, MDA-MB-231 ve HeLa Hücre Dizilerindeki ROCK 1 Kesilmesine Etkileri

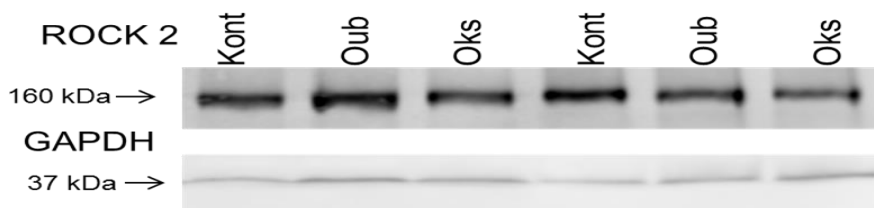
MCF-7, HeLa ve MDA-MB-231 hücre lizatları zaman bağımlı olarak rekombinant aktif kaspaz-2 ile inkübe edilmiştir. Rekombinant aktif kaspaz-2 uygulanan her üç hücre tipinde de ROCK 1 kesilmesi zaman bağımlı olarak artmıştır (Şekil 4.25.).



Şekil 4.25. Rekombinant Aktif Kaspaz-2'nin HeLa, MCF-7, MDA-231 hücrelerinde zaman bağımlı ROCK 1 kesilmesine etkisi. A. HeLa, MCF-7, MDA-231 hücrelerinde ROCK 1 proteini için temsili immüno blotlar. B. ROCK 1 kesilmesi için yapılan dansitometrik analiz. Kontrol: 24 saat inkübasyon süresi sonundaki kontrol hücreleri, 3 saat: Rekombinant aktif kaspaz-2 ile 3 saat inkübe edilmiş hücreler, 24 saat: Rekombinant aktif kaspaz-2 ile 24 saat inkübe edilmiş hücreler ($p < 0.05$, $n = 3$)

4.10. MCF-7 Hücre Dizisinde Ouabain ve Oksaliptatinin ROCK 2 kesilmesi Üzerindeki Etkileri

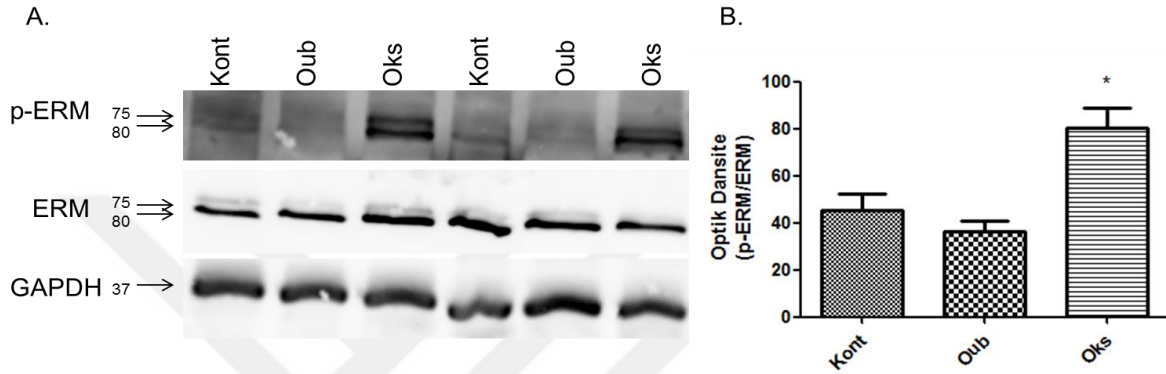
MCF-7 hücrelerine 10 μ M ouabain ve 300 μ M oksaliptatin uygulanmış ve ROCK 2 bu ajanlarla indüklenen hücre ölümünde kesilmemiştir (Şekil 4.26.).



Şekil 4.26. MCF-7 hücrelerinde ouabain ve oksaliptatinin indüklediği hücre ölümünün ROCK 2 kesilmesi üzerindeki etkisi. MCF-7 hücrelerinde ROCK 2 proteini için temsili immüno blotlar. Kont: kontrol, Oub: 10 μ M ouabain, Oks: 300 μ M oksaliptatin

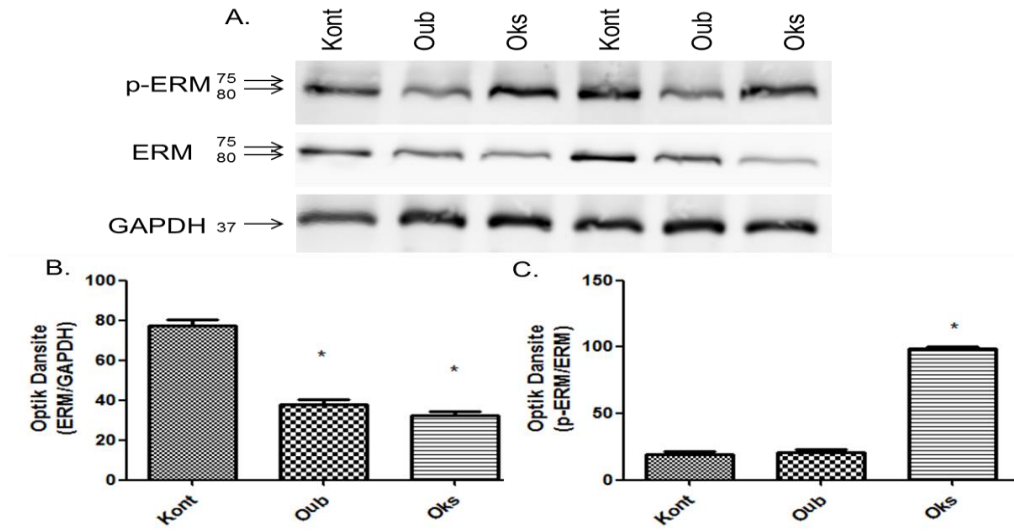
4.11. MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücre Dizilerinde Ouabain ve Oksaliplatinin ERM Ekspresyonuna ve Fosforilasyonuna Etkileri

10 μ M ouabain ve 300 μ M oksaliplatin uygulandıktan sonra MCF-7 hücrelerinde ERM fosforilasyon düzeylerine bakılmıştır. Oksaliplatin uygulanmış gruplarda kontrol gruplarına göre ERM fosforilasyonu anlamlı olarak artmıştır (Şekil 4.27.).



Şekil 4.27. MCF-7 hücrelerinde ouabain ve oksaliplatinin ERM fosforilasyonuna etkisi. A. Fosfo (p-ERM), ERM ve GAPDH proteinleri için temsili immünoblotlar. B. ERM fosforilasyonu için yapılan dansitometrik analiz. Kont: kontrol, Oub: 10 μ M ouabain, Oks:300 μ M oksaliplatin. * Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık ($p<0.05$, $n=3$)

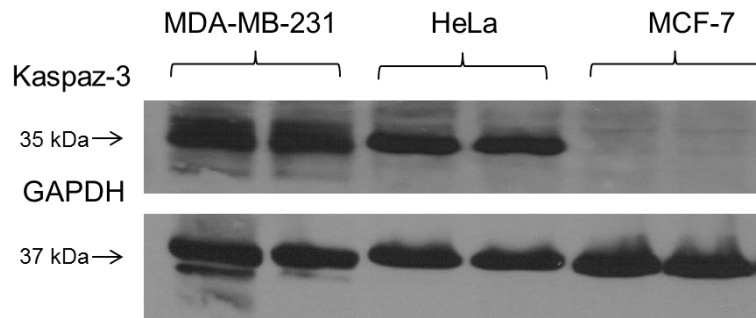
Ayrıca MDA-MB-231 hücrelerine de 10 μ M ouabain ve 300 μ M oksaliplatin uygulandıktan sonra ERM ekspresyon ve fosforilasyon düzeylerine bakılmıştır. Oksaliplatin ve ouabain gruplarının ERM ekspresyonu kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır. Oksaliplatin uygulanmış gruplarda ise kontrol gruplarına göre ERM fosforilasyonu anlamlı olarak artmıştır (Şekil 4.28.).



Şekil 4.28. MDA-MB-231 hücrelerinde ouabain ve oksaliplatinin ERM ekspresyonuna ve fosforilasyonuna etkisi. A. Fosfo (p-ERM), ERM ve GAPDH proteinleri için temsili immünoblotlar. B. ERM ekspresyonu için yapılan dansitometrik analiz. C. ERM fosforilasyonu için yapılan dansitometrik analiz. Kont: kontrol, Oub: 10 μ M ouabain, Oks: 300 μ M oksaliplatin. * Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık ($p < 0.05$, $n = 3$)

4.12. Kaspaz-3 Proteininin MCF-7 Hücre Dizisinde Olmadığının Doğrulanması

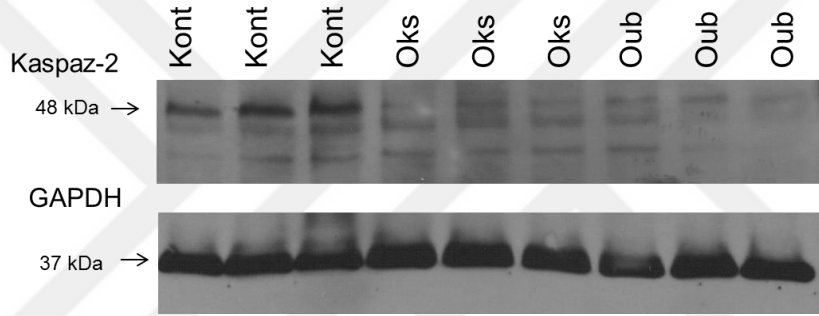
MCF-7, HeLa ve MDA-MB-231 hücre lizatları kaspaz-3 antikoru ile blotlanmıştır. MCF-7 hücrelerinde kaspaz-3 olmadığı teyit edilmiştir (Şekil 4.29.).



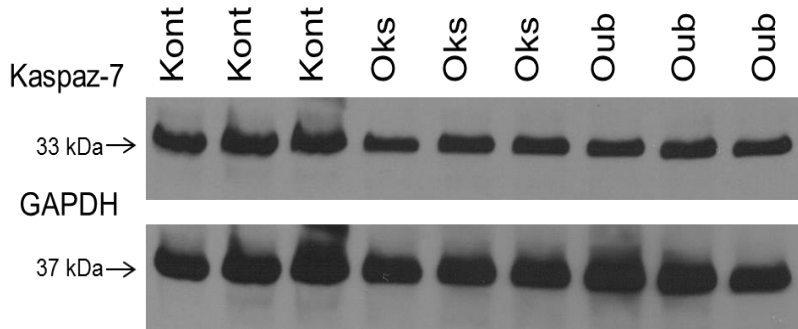
Şekil 4.29. HeLa, MCF-7, MDA-231 hücrelerinde kaspaz-3 ekspresyonunun gösterilmesi. Kaspaz-3 proteini için temsili immünoblotlar

4.13. MCF-7 Hücrelerinde Oubain ve Oksaliplatin ile İndüklenen Kaspaz-2 ve Kaspaz-7 Aktivasyonunun Gösterilmesi

10 μ M ouabain ve 300 μ M oksaliplatin uygulanmış MCF-7 hücrelerinde prokaspaz-2 kontrol hücrelerine göre azalmıştır. Prokaspaz-2 (48 kDa) kesilerek aktive olur ve 19 kDa ve 12 kDa'luk aktif kaspaz-2yi oluşturur. Ancak molekül ağırlığı küçük olan bu aktif kaspazları gözlemleyemedik. İlaç verilmiş gruplardaki prokaspaz-2 miktarındaki azalma bu gruplarda kaspaz-2'nin aktive olduğunu göstermektedir (Şekil 4.30.). aynı şekilde oksaliplatin ve ouabain verilmiş gruplarda prokaspaz-7 (33 kDa) düzeyleri kontrol gruplarına göre azalmıştır ve bu azalma kaspaz-7'nin aktive olduğunu göstermektedir (Şekil 4.31.).



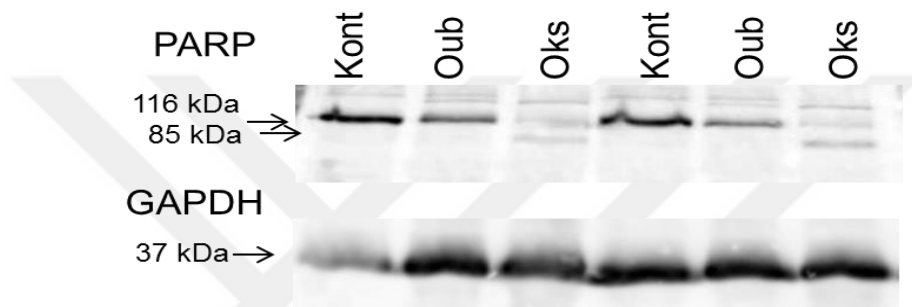
Şekil 4.30. Ouabain ve oksaliplatinin MCF-7 hücrelerinde prokaspaz-2 düzeylerine etkisi, MCF-7 hücrelerinde kaspaz-2 proteini için temsili immüno blotlar. Kont: kontrol, Oub: 10 μ M ouabain, Oks:300 μ M oksaliplatin



Şekil 4.31. Ouabain ve oksaliplatinin MCF-7 hücrelerinde prokaspaz-7 düzeylerine etkisi, MCF-7 hücrelerinde kaspaz-7 proteini için temsili immüno blotlar. Kont: kontrol, Oub: 10 μ M ouabain, Oks:300 μ M oksaliplatin

4.14. Oubain ve Oksaliplatinin MCF-7 Hücre Dizisinde PARP Kesilmesi Üzerindeki Etkileri

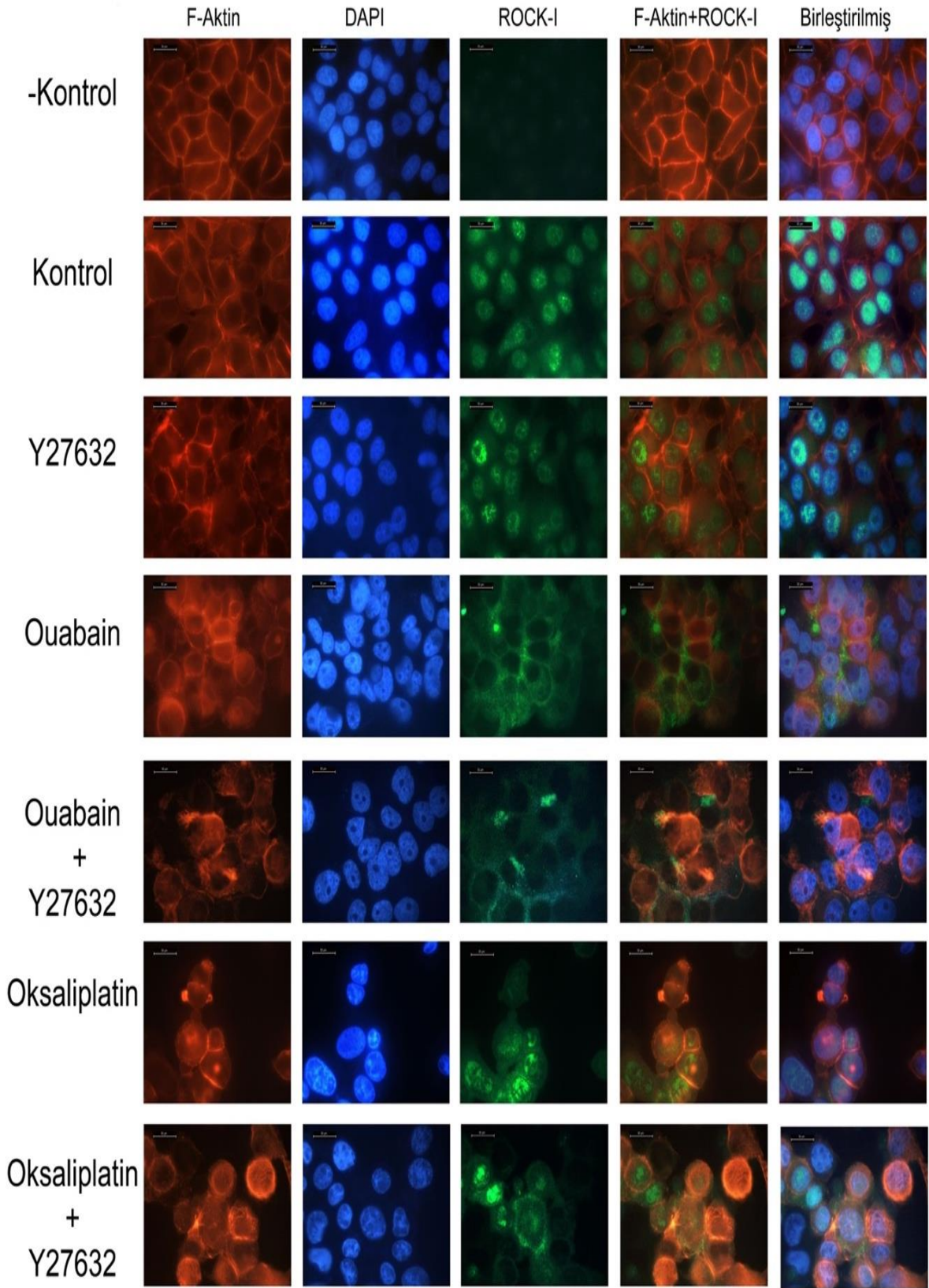
MCF-7 hücrelerine 10 μ M ouabain ve 300 μ M oksaliplatin uygulanarak hücre ölümü indüklenmiştir. PARP (Poly(ADP-riboz) Polimeraz) hücrede DNA hasarının onarılmasında görev alır. Ancak apoptoz sırasında aktif kaspaz-3 ile kesilerek inaktif hale gelmektedir. Kaspaz-3 bulunmayan MCF-7 hücrelerinde de, oksaliplatin ile hücre ölümünün indüklendiği gruplarda PARP kesilerek inaktif hale gelmiştir (Şekil 4.32.).



Şekil 4.32. Oubain ve oksaliplatinin MCF-7 hücre dizisinde PARP kesilmesi üzerindeki etkileri, PARP proteini için temsili immüno blotlar. Kont: kontrol, Oub: 10 μ M ouabain, Oks:300 μ M oksaliplatin

4.15. MCF-7 Hücre Dizisinde Ouabain, Oksaliplatin ve Bunların ROCK İnhibitörlü Kombinasyonlarının ROCK 1 Lokalizasyonuna Etkisinin Floresan Mikroskopi ile İncelenmesi

Ouabain ve oksaliplatinin MCF-7 hücrelerinde meydana getirebileceği morfolojik değişimler ve ROCK inhibisyonunun bu değişimlere olan etkisini incelemek için floresan mikroskopisinden yararlanılmıştır. Bu çalışmalarda hücrelerde hücre iskeletini oluşturan f-aktin lifleri rhodamine-phalloidin ile kırmızıya, çekirdekler ise DAPI ile maviye boyanmıştır. Ayrıca ilaç uygulaması sonu ROCK 1 proteinin lokalizasyonunun belirlenmesi amacıyla hücreler ROCK-1 antikoru ile inkübe edilmiştir ve ROCK 1 proteini yeşil ile işaretlenmiştir. Kontrol ve Y27632 uygulanmış gruplarda ROCK 1 nükleus yoğunlukta olmak üzere tüm hücresel kompartmanlarda bulunurken, ouabain uygulanmış gruplarda daha çok perinükleer lokalizasyon göstermektedir. Oksaliplatin uygulanmış gruplardaki ROCK 1 lokalizasyonu ise kontrol grupları ile benzerdir (Resim 4.7.).



Resim 4.7. MCF-7 hücrelerine ouabain ve oksaliplatin uygulaması sonrasında ROCK 1 proteinin lokalizasyonu etkileri (Fotoğraflar X1000 büyütme ile çekilmiştir ve Adobe Photoshop CS2 programı ile birleştirilmiştir)

5. TARTIŞMA

Karsinogenez boyunca apoptozun baskılanması, bazı kanser türlerinin oluşmasında ve ilerlemesinde merkezi rol oynamaktadır. Apoptotik sürecin işleyiş mekanizmasının anlaşılması kanser tedavisine yeni yaklaşımlar getirmesi açısından önemlidir.

Apoptoz, hücre içi veya dışından gelen uyarılara cevaben uygun yolağın tetiklenmesi ile intrinsik ve ekstrinsik olmak üzere iki temel yolak tarafından gerçekleşebilir. Her iki apoptotik yolda da, morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerden sorumlu aspartat spesifik sistein proteazlar olan kaspazlar görev alır. Kaspazlar, apoptoz sırasında proteaz kaskadının aktive edilmesinde rol almakta, anahtar yapısal proteinlerin ve önemli hücresel sinyallerin aktivasyonuna/inaktivasyonuna yol açmaktadır (Kerr, 2002).

Diğer taraftan küçük G proteini Rho ve onun downstream efektörü Rho kinazın (ROCK 1 ve ROCK 2) hücre kontraksiyonu, proliferasyonu, apoptozu, ve migrasyonu gibi çok çeşitli fizyopatolojik mekanizmada yer aldığı gösterilmiştir. (Ark ve diğerleri, 2004; Ark, Özdemir ve Polat, 2010; Price ve Collard, 2001; Rath ve Olson, 2012). ROCK, apoptozun işlem fazı boyunca meydana gelen, hücre kontraksiyonu, dinamik membran blebilenmesi, apoptotik hücrelerin fragmentasyonu ve apoptotik cisim oluşumunu içeren, birçok morfolojik olayın temel bir düzenleyicisi olarak bilinmektedir. Ayrıca ROCK substratlarının birçoğu hücre ölümü ve canlılığının düzenlenmesinde yer almaktadır (Li ve diğerleri, 2005).

ROCK'lar yapısal olarak otoinhibitör aktiviteye sahiptirler. Enzimin etkinlik gösterebilmesi için inhibitör karboksi terminali ile kinaz bölgesi arasındaki etkileşimin bozulması gerekmektedir. Bu etkileşim karboksi terminalinin proteolitik olarak kesilmesi ile bozulabilir. ROCK 1'in, efektör kaspazlardan kaspaz-3 ile, ROCK 2'nin Granzim B veya kaspaz-2 ile kesilerek aktive olduğu bilinmektedir (Sapet ve diğerleri, 2006; Sebbagh ve diğerleri, 2001; 2005).

Daha önce yaptığımız çalışmalar sırasında, çeşitli ajanlarla indüklenen hücre ölümünde kaspaz-3 bulunmayan MCF-7 hücrelerinde ROCK 1 kesilmesi olduğunu gözlemledik. Kaspaz-3'ün apoptotik süreçte meydana gelen (DNA fragmentasyonu, membran blebilenmesi gibi) birçok morfolojik değişiklikten sorumlu olduğu bilinmektedir. ROCK 1 kesilmesinin yanı sıra MCF-7 hücrelerinde çeşitli ajanlar ile indüklenen hücre ölümünde

membran bleblenmesi oluştuğunu da gözlemledik. Bu tez kapsamında yapılan çalışmalarla amacımız, çeşitli ajanlarla hücre ölümü indüklenmiş MCF-7 hücrelerinde kaspaz-3 olmaksızın meydana gelen ROCK 1 kesilmesinde hangi kaspazların rol aldığının, ilaçla indüklenen hücre ölümlerinde ROCK'un aktive olup olmadığının ve ROCK aktivasyonunun apoptotik membran bleblenmesinde rolü olup olmadığının aydınlatılmasıdır.

İlk olarak hücre ölümünü indüklemek amacıyla kullandığımız standart kemoterapötiklerin (oksaliptatin ve doksorubisin) ve kardiyak glikozitlerin (ouabain, digoksin ve bufalin) IC₅₀ değerlerini hesapladık. Hem MCF-7 hem de MDA-MB-231 hücreleri için hesaplanan IC₅₀ değerleri arasında, oksaliptatinin IC₅₀ değeri diğer ajanlara göre anlamlı olarak daha yüksek çıkmıştır. Bu da oksaliptatinin diğer ajanlara göre daha az potent olduğunu göstermektedir.

Apoptotik süreçte kaspazlar aktive olarak birçok yapısal proteinin aktivasyonuna/inaktivasyonuna yol açarak hücrenin  l me gitmesine neden olurlar (Fischer, Janicke ve Schulze-Osthoff, 2003). MCF-7 hücrelerinde ouabain ve oksaliptatin ile ind klediğimiz hücre ölümünde kaspaz inhibisyonunun etkisini değerlendirdik. Bu amaçla kullanılan kaspaz-2, kaspaz-3/-7 ve pan-kaspaz inhibitörlerinin  n uygulaması ouabain ile indüklenen hücre ölümünde anlamlı bir değişikliğe sebep olmadığını belirledik. Ancak oksaliptatin ile indüklenen hücre ölümü pan-kaspaz inhibitörü varlığında anlamlı olarak azaldığını tespit ettik ve bu durum oksaliptatin ile indüklenen hücre ölümünde kaspazların rol aldığına (apoptotik) işaret etmektedir.

Oksaliptatin ve ouabain ile indüklenen hücre ölümünün apoptotik olup olmadığını belirlemek için annexin V ile hücreleri inkübe ettik. Canlı hücrelerde membran fosfolipidlerinden olan fosfotidilserin (PS) hücre membranının sitozolik yüzeyinde yerleşmiştir. Ancak hücre apoptoza girdiğinde hücre membranının i  yüzeyinde bulunan PS hücre zarının dış kısmına transloke olmaktadır. Floresans bir madde ile işaretli Annexin V PS'ye bağlanarak apoptotik hücrelerin görünür hale gelmesini sağlamaktadır. MCF-7 hücrelerinde oksaliptatin ile indüklenmiş hücre ölümünde annexin V pozitif hücre sayısının anlamlı olarak arttığını belirledik. Bu durum oksaliptatin ile indüklenen ölümün apoptotik olduğuna işaret etmektedir.

ROCK'un apoptotik hücre ölümlerinde gözlenen membran bleblenmesine aracılık eden faktörlerden biri olduğu gösterilmiştir (Leverrier and Ridley, 2001; Coleman ve diğerleri,

2001). Bu nedenle biz de MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre dizilerinde ouabain, oksaliplatin, digoksin, doksorubisin ve bufalin ile indüklenen hücre ölümündeki morfolojik değişiklikleri değerlendirdik. MCF-7 hücrelerinde oksaliplatin ve doksorubisin (standart kemoterapötikler) uygulaması ile membran bleblenmesi gözlenirken, ouabain, bufalin ve digoksin (kardiyak glikozitler) uygulamasında membran bleblenmesinin olmadığını gözlemledik. Ancak MDA-MB-231 hücrelerinde tüm ajanların membran bleblenmesini indüklediğini belirledik.

Böing ve arkadaşları, MCF-7 hücrelerine aktif kaspaz-3 verildikten sonra oluşan membran bleblenmesinin Y27634 ile inhibe olduğunu göstermiştir. Biz de MCF-7 hücrelerine oksaliplatin uyguladıktan sonra meydana gelen membran bleblenmesinin ROCK inhibitörü ile anlamlı olarak azaldığını tespit ettik. Ayrıca MCF-7 hücrelerinde oksaliplatin ile indüklenen membran bleblenmesi kaspaz inhibitörleri varlığında da anlamlı olarak azalmaktadır. Bu durum ouabain ve oksaliplatin aracılı hücre ölümünün MCF-7 hücrelerinde farklı yollar üzerinden olduğunu ve oksaliplatin aracılı hücre ölümünde oluşan bleblenmede kaspaz aracılı ROCK 1 aktivasyonunun rolü olabileceğini göstermektedir.

Daha önceki çalışmalarda, HeLa hücrelerinde kardiyak glikozitler ile indüklenen hücre ölümünde ROCK 2'nin kaspaz-2 ile kesildiği gösterilmiştir (Ark, Özdemir ve Polat, 2010). Apoptotik hücre ölümünde gözlenen membran bleblenmesinde ROCK 2'nin rolünü belirlemek için ROCK 2'nin kesilip kesilmediğine baktık. Ancak MCF-7 hücrelerinde oksaliplatin ve ouabain ile indüklenen hücre ölümünde ROCK 2'nin kesilmediğini gözlemledik. Bu durum MCF-7 hücrelerinde standart kemoterapötik ile indüklenen hücre ölümünde gözlenen membran bleblenmesinde ROCK 2'nin rolü olmadığını göstermektedir.

ROCK'lar inhibitör karboksi terminalinden kesilerek aktif hale gelebilirler. Apoptotik hücre ölümü indüklendiğinde, ROCK 1'in DETD 1113 bölgesinden kaspaz-3 ile kesilerek aktive olduğu gösterilmiştir. Daha önceki çalışmalarımız sırasında kaspaz-3 olmayan MCF-7 hücrelerinde gözlemlediğimiz ROCK 1 kesilmesini hem kardiyak glikozitlerle hem de standart kemoterapötiklerle indükledik. Aynı ajanlarla MDA-MB-231 hücrelerinde de ROCK 1 kesilmesi oluştuğunu gözlemledik.

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde kardiyak glikozit ve standart kemoterapötikler ile indüklenen hücre ölümünde oluşan ROCK 1 kesilmesinin kaspaz aracılı olup olmadığını

tespit edebilmek için farklı kaspaz inhibitörleri kullandık. MCF-7 hücrelerinde ouabain ile indüklenen hücre ölümünde gözlenen ROCK 1 kesilmesinin kaspaz inhibitörlerine duyarlı olduğunu tespit ettik. Bu kesilme pan-kaspaz (z-VAD-fmk), kaspaz-2 (z-VDVAD-fmk) ve kaspaz-3/-7 (z-DEVD-fmk) inhibitörleri varlığında tamamen inhibe olmuştur (Kaspaz-3 ve kaspaz-7'nin substrat spesifiteleri benzerdir. Bu nedenle kaspaz-3 inhibitörü z-DEVD-fmk, aynı zamanda kaspaz-7'yi inhibe etmek için de kullanılmaktadır.). MCF-7 hücrelerinde oksaliptatin ile indüklenen hücre ölümünde gözlenen ROCK 1 kesilmesi ise pan-kaspaz inhibitörü ile tamamen, kaspaz-2 ve kaspaz-3/-7 inhibitörleri ile kısmen inhibe olmuştur. Bu durum ROCK 1 kesilmesinde kaspaz-2 ve/veya kaspaz-7'nin de rolü olabileceğini göstermektedir.

Ancak literatürde ROCK 1'in kaspaz-2 tarafından kesildiğine dair bir bilgi bulunmamaktadır. ROCK 1'in gerçekten kaspaz-2 aracılığı ile kesilip kesilmeyeceğini belirlemek için, öncelikle bu proteinin aminoasit sekansını inceledik (Şekil 5.1.). ROCK 1'in kaspaz-2 tarafından tanınma bölgesi olabilecek farklı aminoasit sekanslarına sahip olduğunu belirledik. ROCK 1 üzerinde bulunan VGTPD (235-239), VLALD (183-187), VLDID (1167-1171), VTQGD (1179-1183) aminoasit sekanslarının olası kaspaz-2 tanıma bölgeleri olabileceğini tespit ettik (<http://caspdb.sanfordburnham.org>) (Şekil 5.1.).

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
MSTGDSFETR	FEKMDNLLRD	PKSEVNSDCL	LDGLDALVYD	LDFPALRKNK	NIDNFLSRYK	DTINKIRDLR	MKAEDYEVVK	VIGRGAFGEV	QLVRHKSTRK
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
VYAMKLLSKF	EMIKRSDSAF	FWEEEDIMAF	ANSPWVVLQF	YAFQDDRYLY	MVMEYMPGGD	LVNLSNVDV	PEKWARFYTA	EVVLALDAIH	SMGFHHRDVK
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
PDNMLLDKSG	HLKLADFGTC	MKMNKEGMVR	CDTAVGTPDY	ISPEVLKSQG	GDGYGREGCD	WWSVGVFLEYE	MLVGDTFPFYA	DSLVTYSKI	MNHKNSLTFF
310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
DDNDISKEAK	NLICAFLTDR	EVLRLGRNGVE	EIKRHLFFKN	DQWAWETLRD	TVAPVVPDLS	SDIDTSNFDD	LEEDKGEEET	FPIPKAFVGN	QLPFVGFITY
410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
SNRRYLSSAN	PNDNRTSSNA	DKSLQESLQK	TIYKLEELH	NEMQLKDEME	QKCRSTSNKL	DKIMKELDEE	GNQRRNLEST	VSQIEKEKML	LQHRINEYQR
510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
KAEQENKRRR	NVENEVSTLK	DQLEDLKKVS	QNSQLANEKL	SQLOKQLEEA	NDLLRTESDT	AVRLRKSHTE	MSKSISQLES	LNRELQERNR	ILENSKSQTD
610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
KDYQLQAIL	EAERRDRGHD	SEMIGDLQAR	ITSLQEEVKH	LKHNLKVEG	ERKEAQDMLN	HSEKEKNLE	IDLNYKLKSL	QQRLEQEVNE	HKVTKARLTD
710	720	730	740	750	760	770	780	790	800
KHQSIIEAKS	VAMCEMEKKL	KEEREAREKA	ENRVVQIEKQ	CSMLDVLKQ	SQKLEHLTG	NKERMEDEVK	NLTQLQEQES	NKRLLQLNEL	KTQAFADNL
810	820	830	840	850	860	870	880	890	900
KGLEKQMKQE	INTLLEAKRL	LEFELAQLTK	QYRGNEGQMR	ELQDQLEAEQ	YFSTLYKTQV	KELKEEIEEK	NRENKKIQE	LQNEKETLAT	QLDLAETKAE
910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000
SEQLARGLLE	EQYFELTOES	KKAASRNQRE	ITDKDHTVSR	LEEANSMLTK	DIEILRRNE	ELTEKMKKAE	EEYKLEKEEE	ISNLKAAFEK	NINTERTLKT
1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100
QAVNKLAEIM	NRKDFKIDRK	KANTQDLRKK	EKENRKLQLE	LNQEREKFNQ	MVVKHQKELN	DMQAQLVEEC	AHRNELQMQ	ASKESDIEQL	RAKLLDLSDS
1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200
TSVASFPSAD	ETDGNLPESR	IEGWLSVPMR	GNIKRYGWKK	QYVVSSKKI	LFYNDEQDKE	QSNPSMVLDI	DKLFHVRPVT	QGDVYRAETE	EIPKIFQILY
1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300
ANEGECRKDV	EMEPVQAEK	TNFQNHKGHE	FIPTLYHFPA	NCDACAKPLW	HVFKPPPALE	CRRCHVKCHR	DHLDKKEDLI	CPCKVSYDVT	SARDMLLLAC
1310	1320	1330	1340						1350
SQDEQKKWVT	HLVKIPKPN	PSGFVRASPR	TLSTRSTANQ	SFRKVVKNST	GKTS				

Şekil 5.1. İnsan Rho kinaz 1 (ROCK 1) aminoasit sekansı (1354 aa.). Kinaz aktivitesinden sorumlu bölge mavi ile gösterilmiştir (76-338 aa.) Kırmızı alanlar olası kaspaz -2 (VGTPD (239-240), VLALD (183-187), VLDID (1167-1171), VTQGD (1179-1183)) kesilme bölgeleridir. Oto-inhibitor bölge yeşil ile gösterilmiştir (1115 - 1354). Kahverengi alan ise kaspaz-3 (DETD1113) kesilme bölgesini göstermektedir.

Bu verilerden hareketle kaspaz-2'nin ROCK 1 kesilmesinde rolü olup olmadığını belirlemek için üç farklı hücre lizatını (HeLA, MCF-7, MDA-MB-231) rekombinant aktif kaspaz-2 ile zaman bağımlı olarak inkübe ettik. Her üç hücre lizatında da eksojen aktif kaspaz-2 inkübasyonu ile ROCK 1 kesilmesi gözlemlendi. Bu bulgular, hem ilaçla indüklenen hücre ölümü ile endojen olarak hem de eksojen aktif kaspaz-2 uygulaması sonucu meydana gelen ROCK 1 kesilmesinden, kaspaz-2'nin de sorumlu olabileceğine işaret etmektedir.

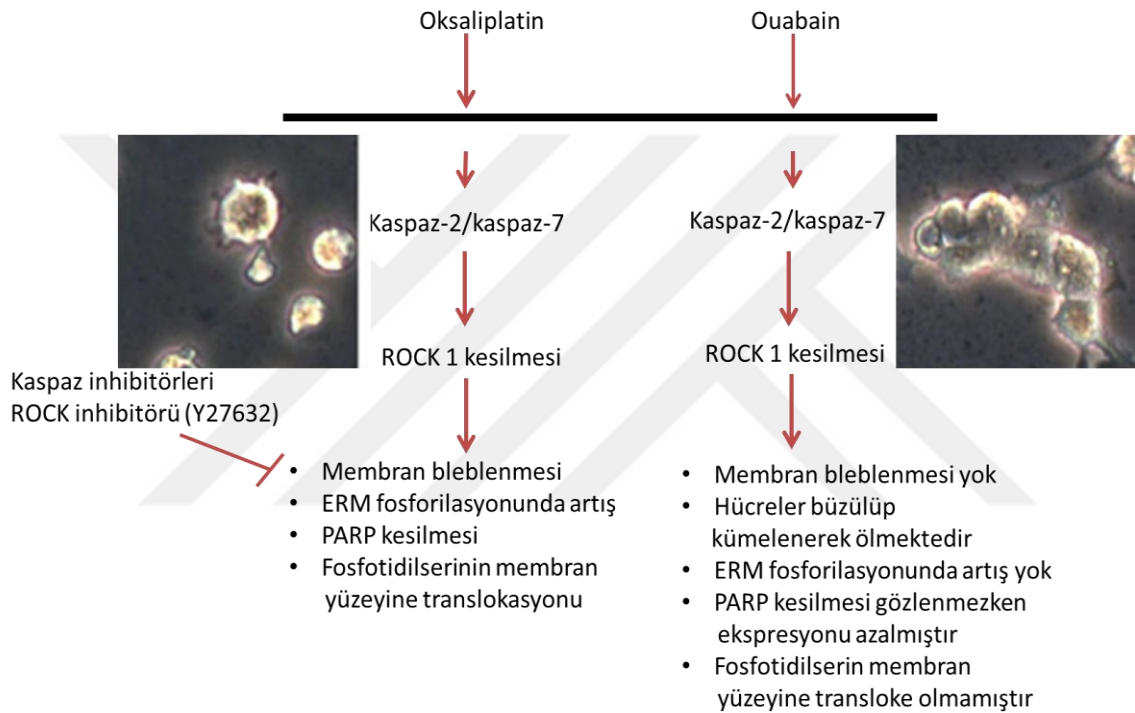
Kaspaz-2 aracılıklı ROCK 1 kesilmesinin hangi bölgeden olduğunu tespit etmek için, ROCK 1'i farklı bölgelerden tanıyan antikörler kullandık. Hem ROCK 1'i 906-1012 aminoasit aralığından tanıyan antikör ile hem de ROCK 1'i -N terminalinden tanıyan antikör ile eşit büyüklükte (~130 kDa) ROCK 1 fragmentleri gözlemledik. Bu durum kaspaz-2'nin ve/veya başka bir kaspazın ROCK 1'i kaspaz-3 ile yakın veya aynı bölgeden kestiğine işaret etmektedir. Aynı zamanda yaklaşık 250 kDa ve 50 kDa büyüklüğünde, 130 kDa'ki kesilme paternine benzer kesilmiş fragmentler oluştuğunu gözlemledik. Bu fragmentlerin ROCK 1 dimerlerinden mi oluştuğunun aydınlatılması gerekmektedir.

Kaspaz-2 ve/veya kaspaz-7'i hem ROCK 1 kesilmesinden hem de hücre ölümünde gözlenen morfolojik değişikliklerden sorumlu olabileceği için bu kaspazların hücre ölümü sırasındaki aktivasyon durumlarına baktık. MCF-7 hücrelerinde ouabain ve oksaliplatin ile indüklenen hücre ölümünde hem kaspaz-2'nin hem de kaspaz-7'nin aktive olduğunu belirledik.

Ezrin/radiksin/moesin (ERM) proteinleri aktin filament/plazma membran etkileşiminde yer almaktadır ve ROCK'un *downstream* efektörü oldukları bilinmektedir. Ezrin Thr567'den, Radiksin Thr564'den ve moesin The558'den ROCK ile fosforillenerek, aktif hale gelmektedir. Hem MCF-7 hem de MDA-MB-231 hücrelerinde oksaliplatin ile indüklenen hücre ölümünde, ERM fosforilasyonu artmıştır. ERM proteinlerinin membran blebilenmesinde rolü olduğu ve bleblerde lokalize olduğu gösterilmiştir (Charras, Hu, Coughling ve Mitchison, 2006). Oksaliplatin ile ERM fosforilasyonunun artması bu hücrelerde gözlemlenen membran blebilenmesinde ERM aktivasyonunun rolünün olabileceğine işaret etmektedir.

MCF-7 hücrelerinde kardiyak glikozit uygulanmış gruplarda, standart kemoterapötiklere oranla ROCK 1'in daha az kesildiği görülmektedir. Oubain ile hücre ölümünün indüklendiği

gruplarda membran bleblenmesinin gözlenmemesi ayrıca ERM fosforilasyonunda bir artışın olmaması ROCK 1'in yeterince kesilmemesinden kaynaklanıyor olabilir. Ouabain ve oksaliplatin verilen hücrelerin farklı morfolojilerde öldükleri görülmektedir. Ouabain verilen hücreler büzülüp bir araya gelerek ölürken, oksaliplatin verilmiş hücrelerde membran bleblenmesi gözlenmekte ve hücreler birleşmeden ayrı ayrı ölmektedir. Hücre ölümlerindeki bu morfolojik farklılıklar ROCK 1'den bağımsız farklı bir mekanizmadan da kaynaklanıyor olabilir (Şekil 5.2.).



Şekil 5.2. Oksaliplatin ve ouabain ile indüklenen hücre ölümünün şematize anlatımı

PARP'ın apoptotik hücre ölümlerinde kaspaz-3 aracılıklı kesildiği bilinmektedir (Rodriquez ve diğerleri, 2006). Bazı çalışmalar, substrat spesifitelerinin benzerliğinden dolayı kaspaz-7'nin kaspaz-3'ün rolünü üstlendiğini göstermiştir. Diğer bir çalışmada ise kaspaz-2'nin yapısal olarak başlatıcı kaspazlara benzemesine karşın, substrat spesifitesinin efektör kaspazlara (kaspaz-3,-6,-7) benzediği söylenmiştir. Biz de kaspaz-3 bulunmayan MCF-7 hücrelerinde oksaliplatin uygulaması ile indüklenen hücre ölümünde PARP'ın kesildiğini gözlemledik. Bu bilgiler PARP kesilmesinde kaspaz-2 ve/veya kaspaz-7'nin rol alabileceğini göstermektedir.

ROCK 1'in inaktif halde sitoplazmada, aktif halde iken de membrana transloke olduğu bilinmektedir (Yoneda, Multhaupt ve Couchman, 2005). Biz de ouabain ve oksaliplatin ile

indüklenen hücre ölümünde, ROCK 1 lokalizasyonlarında değişiklik olup olmadığını değerlendirdik. Ouabain verilen hücrelerde ROCK 1 daha çok perinükleer dağılım gösterirken, oksaliptatin uygulanmış hücrelerde nükleus ağırlıklı olmak üzere tüm hücre alanlarında diffüz ROCK 1 proteini bulunduğunu gözlemledik. Bu durum kardiyak glikozitler ve standart kemoterapötik ilaçlarla indüklenen hücre ölümlerinde gözlemlediğimiz morfolojik farklılıkların, ROCK 1 lokalizasyonlarındaki farklılıklardan kaynaklanabileceğine işaret etmektedir.

Bu tez kapsamında elde ettiğimiz veriler, MCF-7 hücrelerinde gözlenen ROCK 1 kesilmesinde ve membran blebilenmesinde kaspaz-2'nin rolü olabileceğine işaret ederken, bu olay sadece MCF-7 hücrelerinde kaspaz-3 olmaksızın ROCK 1'in kesilmesi açısından önemli değil aynı zamanda ROCK 1'in yeni bir düzenlenme mekanizmasının açığa çıkarılması bakımından da önem taşımaktadır.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yaptığımız deney sonuçlarından elde ettiğimiz veriler, kaspaz-3 bulunmayan MCF-7 hücrelerinde ROCK 1'in kesildiğini ve bu kesilmenin kaspaz inhibitörlerine (pan-kaspaz, kaspaz-2 ve kaspaz-7) duyarlı olduğunu göstermektedir. Ayrıca eksojen rekombinant aktif kaspaz-2 inkübasyonu ile üç farklı hücre lizatında ROCK 1 kesilmesini tespit ettik. Yaptığımız biyoinformatik incelemeler ROCK 1 üzerinde olası kaspaz-2 kesilme bölgelerinin olduğunu göstermektedir. Bu durum MCF-7 hücrelerinde çeşitli ajanlarla indüklenen hücre ölümünde gözlemlenen ROCK 1 kesilmesinden kaspaz-2 nin sorumlu olabileceğine işaret etmektedir.

Hem –N terminal ROCK 1 antikoru hem de proteini 906-2012 aminoasit aralığından tanıyan ROCK 1 antikoru ile elde edilen ROCK 1 kesik fragmentleri aynı büyüklüktedir. Kaspaz-3 bulunmayan MCF-7 hücrelerinde tespit edilen ROCK 1 kesilmesi kaspaz-3 aracılıklı ROCK 1 kesilmesi (DETD1113) ile aynı ve/veya yakın bölgelerden olabilir. MCF-7 hücrelerinde ROCK 1'in kesin olarak hangi bölgeden kesildiğini doğrulamak için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Kaspaz-2 ve kaspaz-7'nin ROCK 1 kesilmesindeki rolünün netleşebilmesi için, kaspaz-2 ve kaspaz-7 siRNA yapılarak ROCK 1 kesilmesi üzerindeki etkileri incelenmelidir.

Ayrıca MCF-7 hücrelerinde oksaliptatin ile indüklenen hücre ölümünde membran blebilenmesi, PARP'ın kesilmesi ve annexin V boyamasının görülmesi kaspaz-3 olmaksızın bu hücrelerin apoptotik öldüğüne işaret etmektedir. Bu veriler, diğer çalışmaların aksine apoptotik hücre ölümünde kaspaz-3'ün rolü olmaksızın membran blebilenmesi gibi apoptotik morfolojik değişikliklerin olabileceğini göstermektedir.

MCF-7 hücrelerinde oubain ve oksaliptatin ile indüklenen hücre ölümlerinde gözlenen morfolojik ve biyokimyasal (ROCK 1 kesilme miktarı, membran blebilenmesi, PARP kesilmesi, ERM fosforilasyonu) farklılıklar, bu ajanların farklı yollar üzerinden hücre ölümünü indüklediğine işaret etmektedir. Bu nedenle, ROCK 1'in hangi kaspaz(lar) aracılığı ile nereden kesildiğinin belirlenmesi apoptotik süreçlerin aydınlatılması açısından önem taşımaktadır.

Sonuç olarak bulgularımız, ROCK 1'in başlatıcı kaspazlardan olan kaspaz-2 aracılığı ile de kesilebileceğine işaret etmektedir. Olası kaspaz-2 aracılıklı yeni bir ROCK 1 kesilme mekanizmasının aydınlatılması apoptotik yolların daha iyi anlaşılmasına ve dolayısıyla kanser tedavisinde yeni tedavi yaklaşımlarına katkı sağlayabilecektir.



KAYNAKLAR

- Ahmad, M., Srinivasula, S. M., Wang, L., Talanian, R. V., Litwack, G., Fernandes-Alnemri, T. and Alnemri, E. S. (1997). CRADD, a novel human apoptotic adaptor molecule for caspase-2, and FasL/tumor necrosis factor receptor-interacting protein RIP. *Cancer Research*, 57, 615–619.
- Ark, M., Ozveren, E., Yazici, G., Korkmaz, B., Büyükaşar, K., Arikan, O., Kubat, H., Songu-Mize, E. (2004). Effects of HA-1077 and Y-27632, two rho-kinase inhibitors, in the human umbilical arter. *Cell Biochemistry Biophysics*, 41(3),331-342.
- Ark, M., Ozdemir, A., Polat, B. (2010). Ouabain-induced apoptosis and Rho kinase: a novel caspase-2 cleavage site and fragment of Rock-2. *Apoptosis*, 15(12), 1494-1506.
- Ashkenazi, A., and Dixit, V. M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science Magazine*, 281, 1305-1308.
- Baliga, B.C., Colussi, P.A., Read, S.H., Dias, M.M., Jans, D.A. and Kumar S. (2003). Role of prodomain in importin-mediated nuclear localization and activation of caspase-2. *The Journal of Biological Chemistry*, 14, 278(7), 4899-905.
- Barry, M., Heibein, J. A., Pinkoski, M. J., Lee, S. F., Moyer, R. W., Green, D. R. and Bleackley, R. C. (2000). Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule- mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving Bid. *Molecular and Cellular Biology*. 20(11), 3781-3794.
- Bassik, M. C., Scorrano, L., Oakes, S. A., Pozzan, T. and Korsmeyer, S. J. (2004) Phosphorylation of BCL-2 regulates ER Ca²⁺ homeostasis and apoptosis. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 23(5), 1207-1216.
- Bergeron L., Perez G. I., Macdonald G., Shi L., Sun Y., Jurisicova A., Varmuza S., Latham K.E., Flaws J.A., Salter J.C., Hara H., Moskowitz M.A., Li E., Greenberg A., Tilly J.L. and Yuan J. (1998). Defects in regulation of apoptosis in caspase-2-deficient mice. *Genes and Development Journal*, 12(9), 1304–1314.
- Bird, C.H., Sutton, V. R., Sun, J. R., Hirst, C. E., Novak, A., Kumar, S., Trapani, J. A. and Bird, P. I. (1998). Selective regulation of apoptosis-the cytotoxic lymphocyte serpin proteinase inhibitor 9 protects against granzyme B-mediated apoptosis without perturbing the Fas cell death pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 18, 6387, 6398.
- Blumenstein, L. and Ahmadian, M.R. (2004). Models of the cooperative mechanism for Rho effector recognition: implications for RhoA-mediated effector activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(8), 53419-26.
- Boatright, K.M., Renatus, M., Scott, F.L., Sperandio, S., Shin, H., Pedersen, I.M., Ricci,

- J.E., Edris, W.A., Sutherlin, D.P., Green, D.R., Salvesen, G.S. (2003). A unified model for apical caspase activation. *Molecular Cell*, 11, 529–541
- Böing, A.N., Stap, J., Hau, C.M., Afink, G.B., Ris-Stalpers, C., Reits, E.A., Sturk, A., Van Noorden, C.J.F., Nieuwland, R. (2013). Active caspase-3 is removed from cells by release of caspase-3-enriched vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1833, 1844–1852.
- Brookes, P. S., Yoon, Y., Robotham, J. L., Anders, M. W. and Sheu, S. S. (2004) Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love- hate triangle. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 287(4), C817-C33.
- Candi, E., Schmidt, R. and Melino, G. (2005). The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6, 328–340.
- Castedo, M., Perfettini, J.L., Roumier, T., Andreau, K., Medema, R. and Kroemer, G. (2004). Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene*, 23, 2825–2837.
- Cavallaro, U. and Christofori, G. (2004). Cell adhesion and signalling by cad- herins and Ig-CAMs in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 4, 118–132.
- Chang, D.W., Xing, Z., Capacio, V.L., Peter, M.E., and Yang, X. (2003). Interdimer processing mechanism of procaspase-8 activation. *EMBO Journal*, 22, 4132–4142.
- Chang, D.W., Xing, Z., Pan, Y., Algeciras-Schimmich, A., Barnhart, B.C., Yaish-Ohad, S., Peter, M.E. and Yang, X. (2002). c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95- mediated apoptosis. *EMBO Journal*, 21, 3704–3714.
- Chen, Y. and Lai, M.Z. (2001). c-Jun NH2-terminal kinase activation leads to a FADD-dependent but Fas ligand-independent cell death in Jurkat T cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 8350–8357.
- Cheung, J. Y., Zhang, X. Q., Song, J., Gao, E., Chan, T. O., Rabinowitz, J. E., Koch, W. J., Feldman, A. M. and Wang, J. (2013). Coordinated regulation of cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger and Na⁺-K⁺-ATPase by phospholemman (FXYP1). *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 961, 175–90.
- Chevrier, V., Piel, M., Collomb, N., Saoudi, Y., Frank, R., Paintrand, M., Narumiya, S., Bornens, M. and Job, D. (2002). The Rho-associated protein kinase p160ROCK is required for centrosome positioning. *The Journal of Cell Biology*, 157(5), 807-17.
- Chinnaiyan, A. M., Tepper, C. G., Seldin, M. F., O'Rourke, K., Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Krammer, P. H., Peter, M. E. and Dixit, V. M. (1996). FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor- induced apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(9), 4961-4965.

- Chinnaiyan, A.M. (1999). The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia*, 1, 5–15.
- Charras, G.T., Hu, C.K., Cuoghling, M., Mitchison, T.J. (2006). Reassembly of contractile actin cortex in cell blebs. *The Journal of Cell Biology*, 6, 175(3), 477–90.
- Chou, J. J., Li, H., Salvesen, G. S., Yuan, J. and Wagner, G. (1999). Solution structure of BID, an intracellular amplifier of apoptotic signaling. *Cell*, 96, 615–624.
- Clarke, P.G. (1990). Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anatomy and Embryology*, 181, 195–213.
- Clem, R. J., Fechheimer, M. and Miller, L. K. (1991). Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. *Science*, 254, 1388–1390.
- Coleman M. L., Sahai E. A., Yeo M., Bosch M., Dewar A. and Olson M. F. (2001). Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nature Cell Biology*, 3(4), 339–345.
- Coleman, M. L., C. J. Marshall, and M. F. Olson. (2004). RAS and RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5, 355– 366.
- Coleman, M.L., Sahai, E.A., Yeo, M., Bosch, M., Dewar, A. and Olson, M.F. (2001). Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nature Cell Biology*, 3(4), 339–345.
- Cong Y. S., Wright W. E. and Shay J.W. (2002). Human Telomerase and Its Regulation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 407–425.
- Coudray, A.M., Louvet, C., Kornprobst, M., Raymond, E., Andre, T., Tournigand, C., Faivre, S., De Gramont, A., Larsen, A.K. and Gespach, C. (2005). Increased anticancer activity of the thymidylate synthase inhibitor BGC9331 combined with the topoisomerase I inhibitor SN-38 in human colorectal and breast cancer cells: induction of apoptosis and ROCK cleavage through caspase-3-dependent and -independent mechanisms. *International Journal of Oncology*, (27), 553–561.
- Counis, M. F., Chaudun, E., Arruti, C., Oliver, L., Sanwal, M., Courtois, Y. and Torriglia, A. (1998). Analysis of nuclear degradation during lens cell differentiation. *Cell Death & Differentiation*, 5, 251–261.
- Crawford, E.D. and Wells, J.A. (2011). Caspase Substrates and Cellular Remodeling. *Annual Review of Biochemistry*, 80, 1055–87.
- Croft D.R., Coleman M.L., Li S., Robertson D., Sullivan T., Stewart C.L. and Olson M.F. (2005). Actin-myosin-based contraction is responsible for apoptotic nuclear disintegration. *The Journal of Cell Biology*, 168(2), 245–255.

- Croft, D. R. and Olson, M. F. (2006). The Rho GTPase Effector ROCK Regulates Cyclin A, Cyclin D1, and p27Kip1 Levels by Distinct Mechanisms. *Molecular and Cellular Biology*, 26(12), 4612–4627.
- Cuervo, A.M. (2004). Autophagy: In sickness and in health. *Trends in Cell Biology*, 14, 70–77.
- Degterev, A., Boyce, M. and Yuan, J. (2003). A decade of caspases. *Oncogene*, 22, 8543–8567.
- Degterev, A., Hitomi, J., Gernscheid, M., Ch'en, I.L., Korkina, O., Teng, X., Abbott, D., Cuny, G.D., Yuan, C., Wagner, G., Hedrick, S.M., Gerber, S.A., Lugovskoy, A. and Yuan J. (2008). Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nature Chemical Biology*, 4:313–321.
- Doğan, A. L. ve Güç, D. (2004). Sinyal iletimi mekanizmaları ve kanser. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 35, 34-42.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. and Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 102(1), 33-42.
- Dvorsky, R., Blumenstein, L., Vetter, I.R. and Ahmadian, M.R. (2004). Structural insights into the interaction of ROCKI with the switch regions of RhoA. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 7098-104.
- Eberstadt, M., Huang, B., Chen, Z., Meadows, R.P., Ng, S.C., Zheng, L, Lenardo, M.J., Fesik and S.W. (1998). NMR structure and mutagenesis of the FADD (Mort1) death-effector domain. *Nature*, 392, 941–945.
- Ekert, P. G., Silke, J. and Vaux, D.L. (1999). Caspase inhibitors. *Cell Death & Differentiation*, 6(11), 1081-6.
- Elbaz, H.A., Stueckle, T.A., Tse, W., Rojanasakul, Y. and Dinu, C.Z. (2012). Digitoxin and its analogs as novel cancer therapeutics. *Experimental Hematology & Oncology*, 1(1), 4.
- Elmore, S., (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35, 495–516.
- Erhardt, P., Tomaselli, K.J. and Cooper, G.M. (1997). Identification of the MDM2 oncoprotein as a substrate for CPP32-like apoptotic proteases. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 15049–15052.
- Falm, E. (2004). Angiogenesis inhibitors in clinical development; where are we now and where are we going. *British Journal of Cancer*, 90, 1-7.

- Feng, J., Ito, M., Kureishi, Y., Ichikawa, K., Amano, M., Isaka, N., Okawa, K., Iwamatsu, A., Kaibuchi, K., Hartshorne, D. J., Nakano, T. (1999). Rho-associated kinase of chicken gizzard smooth muscle. *The Journal of Biological Chemistry*, 274 (6), 3744–52.
- Fidler, I. J. (1978). Tumor Heterogeneity and the Biology of Cancer Invasion and Metastasis. *American Association for Cancer Research*, 38, 2651.
- Fischer, U., Janicke, R. U. And Schulze-Osthoff, K. (2003). Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death and Differentiation*, 10, 76–100.
- Fink, S.L., Bergsbaken, T. and Cookson, B.T. (2008). Anthrax lethal toxin and *Salmonella* elicit the common cell death pathway of caspase-1-dependent pyroptosis via distinct mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 4312–4317.
- Formigli, L., Papucci, L., Tani, A., Schiavone, N., Tempestini, A., Orlandini, G. E., Capaccioli, S., and Orlandini, S. Z. (2000). Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncletic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *Journal of Cellular Physiology*, 182(1), 41–9.
- Fuentes-Prior, P. and Salvesen, G.S. (2004). The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochemical Journal*, 384(2), 201–232.
- Garcia-Calvo, M., Peterson, E. P., Leiting, B., Ruel, R., Nicholson, D. W. And Thornberry, N. A. (1998). Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 32608–32613.
- Geng, Y.J., Azuma, T., Tang, J.X., Hartwig, J.H., Muszynski, M., Wu, Q., Libby, P. and Kwiatkowski, D.J. (1998). Caspase-3-induced gelsolin fragmentation contributes to actin cytoskeletal collapse, nucleolysis, and apoptosis of vascular smooth muscle cells exposed to proinflammatory cytokines. *European Journal of Cell Biology*, 77, 294–302.
- Gee, Mc, M.M., Hyland, E., Campiani, G., Ramunno, A., Nacci, V., Zisterer, D.M. (2002). Caspase-3 is not essential for DNA fragmentation in MCF-7 cells during apoptosis induced by the pyrrolo-1,5-benzoxazepine, PBOX-6. *The Federation of European Biochemical Societies Letters*, 515,(1–3), 66–70.
- Gerner, C., Gotzmann, J., Frohwein, U., Schamberger, C., Ellinger, A. and Sauermann, G. (2002). Proteome analysis of nuclear matrix proteins during apoptotic chromatin condensation. *Cell Death & Differentiation*, 9, 671– 681.
- Glick, D., Barth, S. and Macleod, K. F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of Pathology*, 221(1): 3–12.

- Golks, A., Brenner, D., Fritsch, C., Krammer, P.H., and Lavrik, I.N. (2005). C-FLIPR: a new regulator of death receptor-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 14507–14513.
- Golstein, P. and Kroemer, G. (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in Biochemical Sciences*, 32, 37–43.
- González-Polo, R. A., Boya, P., Pauleau, A. L., Jalil, A., Larochette, N., Souquère, S., Eskelinen, E. L., Pierron, G., Saftig, P. and Kroemer, G. (2005). The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death. *Journal of Cell Science*, 118, 3091–3102.
- Green, D. R. (2000). Apoptosis and sphingomyelin hydrolysis. The flip side. *The Journal of Cell Biology*, 150(1), F5-F7.
- Gupta, M.K. and Qin, R.Y. (2003). Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis. *World Journal of Gastroenterology*, 9(6), 1144-55.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *The Journal Cell*, 144(5), 646-74.
- Hannun, Y. A. (1996). Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science Magazine*, 274(5294), 1855-1859.
- Haviv, R., Lindenboim, L., Yuan, J. and Stein, R. (1998). Need for caspase-2 in apoptosis of growth-factor-deprived PC12 cells. *Journal of Neuroscience Research*, 52(5), 491–497.
- Hirsch, T., Marchetti, P., Susin, S. A., Dallaporta, B., Zamzami, N., Marzo, I., Geuskens, M., and Kroemer, G. (1997). The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene*, 15, 1573–81.
- Hofmann, K. 1999. The modular nature of apoptotic signaling proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 55(8-9), 1113–1128.
- Holler N., Zaru R., Micheau O., Thome M., Attinger A., Valitutti S., Bodmer J.L., Schneider P., Seed B. and Tschopp J. (2000). Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nature Immunology*, 1(6), 489–495.
- Horvitz, H. R. 1999. Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Research*, 59, 1701s–1706s.
- Houghton A.N. and Scheinberg D.A. (2000). Monoclonal antibody therapies-a 'constant' threat to cancer. *Nature Medicine Journal*, 6(4), 373-4.

- Inoue, S., Browne, G., Melino, G. and Cohen, G.M. (2009). Ordering of caspases in cells undergoing apoptosis by the intrinsic pathway. *Cell Death and Differentiation*, 16(7), 1053–1061.
- Jain M. V., Paczulla A. M., Klonisch T., Dimgba F. N., Rao S. B., Roberg K., Schweizer F., Lengerke C., Davoodpour P., Palicharla V. R., Maddika S. and Los M. (2013). Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 17(1), 12-29.
- Jiang, X. and Wang, X. (2000). Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 31199–31203.
- Julian, L. and Olson, M. F. (2014). Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK) Structure, regulation, and functions. *Small GTPases*, 5, e29846.
- Kaplan, J. H. (2002). Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annual Review of Biochemistry*, 71, 511–35.
- Kerr, J. F. (2002). History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Journal of Toxicology*, 181–182, 471–4.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H. and Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), 239-257.
- Kosako, H., Goto, H., Yanagida, M., Matsuzawa, K., Fujita, M., Tomono, Y., Okigaki, T., Odai, H., Kaibuchi, K. and Inagaki, M. (1999). Specific accumulation of Rho-associated kinase at the cleavage furrow during cytokinesis: cleavage furrow-specific phosphorylation of intermediate filaments. *Oncogene*, 18(17), 2783- 8.
- Kuida, K., Haydar, T. F., Kuan, C. Y., Gu, Y., Taya, C., Karasuyama, H., Su, M. S., Rakic, P. and Flavell, R. A. (1998). Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9(3). *Cell*, 94, 325– 337.
- Kuida, K., Zheng, T. S., Na, S., Kuan, C., Yang, D., Karasuyama, H., Rakic, P. and Flavell, R. A. (1996). Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature*, 384(6607), 368–372.
- LaCasse, E.C., Baird, S., Korneluk, R. G. and MacKenzie, A. E. (1998). The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene*, 17, 3247-3259.
- Lane J. D., Allan V. J. and Woodman P. G. (2005). Active relocation of chromatin and endoplasmic reticulum into blebs in late apoptotic cells. *Journal of Cell Science*, 118(17), 4059–4071.

- Lassus, P., Opitz-Araya, X. and Lazebnik, Y. (2002). Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization. *Science Magazine*, 297(5585), 1352–1354.
- Lauber K., Blumenthal S. G., Waibel M. and Wesselborg S. (2004). Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. *Molecular Cell*, 14(3), 277–287.
- Lavrik, I., Krueger A, Schmitz I, Baumann S, Weyd H, Krammer P.H. and Kirchhoff S. (2003). The active caspase-8 hetero- tetramer is formed at the CD95 DISC. *Cell Death & Differentiation*. 10, 144–145.
- Le, D. A., Wu, Y., Huang, Z., Matsushita, K., Plesnila, N., Augustinack, J.C., Hyman, B.T., Yuan, J., Kuida, K., Flavell, R.A. and Moskowitz, M.A. (2002). Caspase activation and neuroprotection in caspase-3- deficient mice after in vivo cerebral ischemia and in vitro oxygen glucose deprivation. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 99(23), 15188–15193.
- Lee, Y. J. and Amoscato, A. A. (2004) TRAIL and ceramide. *Vitamins and Hormones Journal*, 67, 229-255.
- Lesay, A., Hickman, J.A. and Gibson, R.M. (2001). Disruption of focal adhesions mediates detachment during neuronal apoptosis. *Neuroreport*, 12, 2111–2115.
- Leung, T., Chen, X. Q., Manser, E., and Lim, L. (1996). The p160 RhoA- binding kinase ROK α is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton. *Molecular and Cellular Biology*, 16, 5313–5327.
- Leverrier, Y. and Ridley, A. (2001). Apoptosis: caspases orchestrate the ROCK 'n' bleb. *Nature Cell Biolog*, 3, E91 - E92.
- Levine, B. and Klionsky, D. J. (2004). Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Developmental Cell*, 6, 463–477.
- Li Z., Dong X., Wang Z., Liu W., Deng N., Ding Y., Tang L., Hla T., Zeng R., Li L. and Wu D. (2005). Regulation of PTEN by Rho small GTPases. *Nature Cell Biology*, 7, 399–404.
- Li, H., Bergeron, L., Cryns, V., Pasternack, M.S., Zhu, H., Shi, L., Greenberg, A. and Yuan, J. (1997). Activation of caspase-2 in apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 21010–21017.
- Li, J. and Yuan, J. (2008). Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*, 27, 6194–6206.
- Li, L. Y., Luo, X. and Wang, X. (2001) Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*, 412(6842), 95-99.

- Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R. and Wang, X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 86(1), 147-157.
- Longley D.B., Harkin D.P., and Johnston P.G. (2003). 5-fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer*, 3(5), 330–338.
- Lopez-Marques, R.L., Poulsen, L. R., Bailly, A., Geisler, M., Pomorski, T. G. and Palmgren, M. G. (2015). Structure and mechanism of ATP-dependent phospholipid transporters. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1850, 461–75.
- Lord, S. J., Rajotte, R. V., Korbitt, G. S., Bleackley, R. C. (2003). GranzymeB: a natural born killer. *Immunological Reviews Journal*.193(1), 31-38
- Ma, Z., Kanai, M., Kawamura, K., Kaibuchi, K., Ye, K. and Fukasawa, K. (2006). Interaction between ROCK II and nucleophosmin/B23 in the regulation of centrosome duplication. *Molecular and Cellular Biology*, 26(23), 9016- 34.
- MacEwan, D. J. (2002) TNF ligands and receptors – a matter of life and death. *British Journal of Cancer*, 135(4), 855-875.
- Manapov F., Muller P. and Rychly J. (2005). Translocation of p21(Cip1/WAF1) from the nucleus to the cytoplasm correlates with pancreatic myofibroblast to fibroblast cell conversion. *Gut*, 54, 814–822.
- Mancini, M., Machamer, C.E., Roy, S., Nicholson, D.W., Thorn-berry, N.A., Casciola-Rosen, L.A. and Rosen, A. (2000). Caspase-2 is localized at the Golgi complex and cleaves golgin-160 during apoptosis. *The Journal of Cell Biology*, 149(3), 603–612.
- Marsden, V. S., O'Connor, L., O'Reilly, L. A., Silke, J., Metcalf, D., Ekert, P. G., Huang, D. C., Cecconi, F., Kuida, K., Tomaselli, K. J., Roy, S., Nicholson, D. W., Vaux, D. L., Bouillet, P., Adams, J. M. and Strasser, A. (2002). Apoptosis initiated by Bcl-2-regulated caspase activation independently of the cytochrome c/Apaf-1/caspase-9 apoptosome. *Nature*, 419, 634–637.
- Martinez I., J. D., Parker, M. D., Fultz, K. E., Ignatenko, N. A. and Gerner, E. W. (2003). *Molecular Biology of Cancer*, Arizona: John Wiley&Sons, Inc, Chapter One, 1-50.
- Martinon, F. and Tschopp, J. (2007). Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell Death & Differentiation*, 14, 10–22.
- Matsui, T., Maeda, M., Doi, Y., Yonemura, S., Amano, M., Kaibuchi, K., Tsukita, S. and Tsukita, S. (1998). Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association. *The Journal of Cell Biology*, 140(3), 647–657.

- Melero, C.P., Medardea, M. and Feliciano, A.S. (2000). A short review on cardiotonic steroids and their aminoguanidine analogues. *Molecules*, 5, 51-81.
- Micheau, O., Thome, M., Schneider, P., Holler, N., Tschopp, J., Nicholson, D.W., Briand, C. and Grütter, M.G. (2002). The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *Journal of Biological Chemistry*, 277:45162–45171.
- Miller, L.K. (1999). An exegesis of IAPs: salvation and surprises from BIR motifs. *Trends in Cell Biology*, 9, 323–328.
- Mittl, P.R., Di Marco, S., Krebs, J.F., Bai, X., Karanewsky, D.S., Priestle, J.P., Tomaselli, K.J., Grütter, M.G. (1997). Structure of recombinant human CPP32 in complex with the tetrapeptide acetyl-Asp-Val-Ala-Asp fluoromethyl ketone. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 6539–6547.
- Mizushima, N. (2005). The pleiotropic role of autophagy: From protein metabolism to bactericide. *Cell Death & Differentiation*, 12 (Suppl. 2), 1535–1541.
- Morishima, N., Nakanishi, K., Takenouchi, H., Shibata, T. and Yasuhiko, Y. (2002). An Endoplasmic Reticulum Stress-specific Caspase Cascade in Apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(37), 34287–34294.
- Mormone, E., Matarrese, P., Tinari, A., Cannella, M., Maglione, V., Farrace, M. G., Piacentini, M., Frati, L., Malorni, W. and Squitieri, F. (2006). Genotype-dependent priming to self- and xeno-cannibalism in heterozygous and homozygous lymphoblasts from patients with Huntington's disease. *Journal of Neurochemistry*, 98, 1090–1099.
- Morth, J. P., Pedersen, B. P., Buch-Pedersen, M. J., Andersen, J. P., Vilsen, B., Palmgren, M. G. and Nissen, P. (2011). A structural overview of the plasma membrane Na⁺,K⁺-ATPase and H⁺-ATPase ion pumps. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12, 60–70.
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B.A. and Yuan, J. (2000). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*, 403(6765), 98–103.
- Nakagawa, O., Fujisawa, K., Ishizaki, T., Saito, Y., Nakao, K. and Narumiya, S. (1996). ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *FEBS Letters*, 392(2), 189-93.
- Newman, R.A., Yang, P., Pawlus, A.D. and Block, K.I. (2008). Cardiac Glycosides as Novel Cancer Therapeutic Agents. *Molecular Interventions*, 8(1), 36-49.
- Nicotera, P. and Melino, G. (2004). Regulation of the apoptosis-necrosis switch. *Oncogene*, 23:2757–2765.
- Norbury, C. J. and Hickson, I. D. (2001). Cellular responses to DNA damage. *Annual Review*

of Pharmacology and Toxicology, 41, 367–401.

- Nyblom, M., Poulsen, H., Gourdon, P., Reinhard, L., Andersson, M., Lindahl, E., Fedosova, N. and Nissen, P. (2013). Crystal structure of Na⁺,K⁺-ATPase in the Na⁺-bound state. *Science*, 342, 123–7.
- Oláh, E. (2005). Basic Concepts of Cancer: Genomic Determination. *The Journal of The International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 16(2).
- Ongusaha P. P., Kim H. G., Boswell S. A., Ridley A. J., Der C. J., Dotto G. P., Kim Y. B., Aaronson S. A. and Lee S. W. (2012). RhoE is a pro-survival p53 target gene that inhibits ROCK I-mediated apoptosis in response to genotoxic stress. *Current Biology*, 22, 2466–2472.
- Orlando K. A., Stone N. L. and Pittman R. N. (2006). Rho kinase regulates fragmentation and phagocytosis of apoptotic cells. *Experimental Cell Research*, 312(1), 5–15.
- Orrenius, S., Zhivotovsky, B. and Nicotera, P. (2003). Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4, 552–565.
- Overholtzer, M., Mailleux, A. A., Mouneimne, G., Normand, G., Schnitt, S. J., King, R. W., Cibas, E. S. and Brugge, J. S. (2007). A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion. *Cell*, 131, 966–979.
- Palmgren, M. G. and Nissen, P. (2011). P-type ATPases. *Annual Review of Biophysics*, 40, 243–66.
- Paweletz, N. (2001). Walther Flemming: pioneer of mitosis research. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2, 72–5.
- Peter, M.E. and Krammer, P.H. (2003). The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death & Differentiation*, 10, 26–35.
- Petrosillo, G., Ruggiero, F.M., Pistolese, M. and Paradies, G. (2004). Ca²⁺ -induced reactive oxygen species production promotes cytochrome c release from rat liver mitochondria via mitochondrial permeability transition (MPT)-dependent and MPT-independent mechanisms: role of cardiolipin. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 53103–53108.
- Pezzuto, J. M. (1997). Plant-Derived Anticancer Agents. *Biochemical Pharmacology*, 53(2), 121–133.
- Pitot, H. C. (1993). Cancer. *The Molecular Biology of Carcinogenesis*, 72(3), 962–70.
- Pop, C. And Salvesen, G.S. (2009). Human caspases: activation, specificity, and regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 284(33), 21777–81.

- Prassas, I. and Diamandis, E. P. (2008). Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(11), 926-935.
- Price, L.S., Collard, J.G. (2001). Regulation of the cytoskeleton by Rho-family GTPases: implications for tumour cell invasion. *Cancer Biology*, 11, 167–173.
- Rahimtoola, S.H. and Tak, T. (1996). The use of digitalis in heart failure. *Current Problems in Cardiology*, 21(12), 781-853.
- Range, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., Flower, R. J. and Henderson, G. (2012). *Rang and Dale's Pharmacology*. (Yedinci Baskı). Çin: Elsevier Inc. 674-676..
- Rao, R. V., Hermel, E., Castro-Obregon, S., del Rio, G., Eller- by, L. M., Ellerby, H. M. and Bredesen, D. E. (2001) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(36), 33869- 33874.
- Rath, N. and Olson, M.F. (2012). Rho-associated kinases in tumorigenesis: re-considering ROCK inhibition for cancer therapy. *European Molecular Biology Organization reports*, 13, 900-908.
- Ray, C.A. and Pickup, D.J. (1996). The mode of death of pig kidney cells infected with cowpox virus is governed by the expression of the crmA gene. *Virology*, 217, 384, 39.
- Ray, C.A., Black, R.A., Kronheim, S.R., Greenstreet, T. A. , Sleath, P. R., Salvesen, G.S. and Pickup, D.J. (1992). Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Cell*, 69, 597,604.
- Riedl, S.J. and Shi, Y. (2004). Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5, 897–907.
- Riento, K. and A. J. Ridley. (2003). Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4, 446–456.
- Robertson, J.D., Enoksson, M., Suomela, M., Zhivotovsky, B. and Orrenius, S. (2002). Caspase-2 acts upstream of mitochondria to promote cytochrome c release during etoposide-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 277(33), 29803-9.
- Rodríguez-Hernández, A., Brea-Calvo, G., Fernández-Ayala, D.J., Cordero, M., Navas, P., Sánchez-Alcázar, J.A. (2006). *Apoptosis*, 11(3),453.
- Samuel, M.S. and Olson, M.F. (2010). Dying alone: a tale of rho. *Cell Stem Cell*, 7, 135-6.

- Sapet, C., Simoncini, S., Lloriod, B., Puthier, D., Sampol, J., Nguyen, C., Dignat-George, F. and Anfosso, F. (2006). Thrombin-induced endothelial microparticle generation: identification of a novel pathway involving ROCK-II activation by caspase-2. *Blood Journal*, 108(6), 1868–1876.
- Scaffidi, C., Medema, J.P., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1997). FLICE is predominantly expressed as two functionally active isoforms, caspase-8/a and caspase-8/b. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 26953–26958.
- Schulz W.A. (2007). *Molecular Biology of Human Cancers, An Advanced Student's Textbook* (İkibinyedinci Baskı). Netherlands: Springer Inc. 486-7.
- Schweizer, A., Briand, C. and Grutter, M.G. (2003). Crystal structure of caspase-2, apical initiator of the intrinsic apoptotic pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 42441–42447.
- Searle, J., Lawson, T. A., Abbott, P. J., Harmon, B. and Kerr, J. F. (1975). An electron-microscope study of the mode of cell death induced by cancer- chemotherapeutic agents in populations of proliferating normal and neoplastic cells. *The Journal of Pathology*, 116(3), 129-138.
- Sebbagh, M., Hamelin J., Bertoglio J., Solary E. and Breard J. (2005). Direct cleavage of ROCK II by granzyme B induces target cell membrane blebbing in a caspase-independent manner. *Journal of Experimental Medicine*, 201(3), 465–471.
- Sebbagh, M., Renvoize, C., Hamelin, J., Riche, N., Bertoglio, J. and Breard, J. (2001). Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nature Cell Biology*, 3(4), 346–352.
- Sheridan, J. P., Marsters, S. A., Pitti, R. M., Gurney, A., Skubatch, M., Baldwin, D., Ramakrishnan, L., Gray, C. L., Baker, K., Wood, W. I., Goddard, A. D., Godowski, P. and Ashkenazi, A. (1997). Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science Magazine*, 277(5327), 818-821.
- Shi, J. and Wei, L. (2007). Rho kinase in the regulation of cell death and survival. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis (Warsz)*. 55(2), 61–75.
- Shipman, C. M. and Croucher, P. I. (2003). Osteoprotegerin is a soluble decoy receptor for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo2 ligand and can function as a paracrine survival factor for human myeloma cells. *Cancer Research*. 63(5), 912-916.

- Shirao S., Kashiwagi S., Sato M., Miwa S., Nakao F., Kurokawa T., Todoroki N-Ikeda, Mogami K., Mizukami Y., Kuriyama S., Haze K., Suzuki M. and Kobayashi S. (2002). Sphingosylphosphorylcholine is a novel messenger for Rho-kinase-mediated Ca^{+2} sensitization in the bovine cerebral artery: unimportant role for protein kinase C. *Circulation Research*, 91(2), 112–9.
- Siskind, L. J., Kolesnick, R. N. and Colombini, M. (2002). Ceramide channels increase the permeability of the mitochondrial outer membrane to small proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(30), 26796-26803.
- Slee, E. A., Adrain, C. and Martin, S.J. (2001). Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 276,7320–7326. Makale yok?
- Sperandio, S., de Belle, I., and Bredesen, D. E. (2000). An alternative, non- apoptotic form of programmed cell death. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 97(26), 14376–81.
- Sprick M. R., Weigand M. A., Rieser E., Rauch C. T., Juo P., Blenis J., Krammer P. H. and Walczak H. (2000). FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity*, 12(6), 599– 609.
- Strasser, A., Harris, A. W. and Cory, S. (1991). Bcl-2 transgene inhibits T cell death and perturbs thymic self-censorship. *The Journal Cell*, 67(5), 889-999.
- Strasser, A., Harris, A. W., Bath, M. L. and Cory, S. (1990). Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. *Nature*, 348(6299), 331-333.
- Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D. R., Aebersold, R., Siderovski, D. P., Penninger, J. M. And Kroemer, G. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis- inducing factor. *Nature*, 397(6718), 441-446.
- Swift, L. H. and Golsteyn, R. M. (2014). Genotoxic Anti-Cancer Agents and Their Relationship to DNA Damage, Mitosis, and Checkpoint Adaptation in Proliferating Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(3), 3403-31.
- Takai, Y., Sasaki, T. and Matozaki, T. (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiological Reviews*, 81(1),153-208.

- Tang, D. and Kidd, V.J. (1998). Cleavage of DFF-45/ICAD by multiple caspases is essential for its function during apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 28549–28552.
- Tepper, C. G., Jayadev, S., Liu, B., Bielawska, A., Wolff, R., Yonehara, S., Hannun, Y. A. and Seldin, M. F. (1995). Role for ceramide as an endogenous mediator of Fas-induced cyto- toxicity. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 92(18), 8443-8447.
- Testa, U. (2004). Apoptotic mechanisms in the control of erythropoiesis. *Leukemia*, 18, 1176–1199.
- Tewari, M. And Dixit, V. M. (1995). Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus crmA gene product. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 3255-3260.
- Tosello-Tramont, A.C., Nakada-Tsukui, K. and Ravichandran, K.S. (2003). Engulfment of apoptotic cells is negatively regulated by Rho-mediated signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(50), 49911–49919.
- Troy, C. M., Rabacchi, S. A., Friedman, W. J., Frappier, T. F., Brown, K. and Shelanski, M. L. (2000). Caspase-2 mediates neuronal cell death induced by beta-amyloid. *The Journal of Neuroscience*, 20(4), 1386-92.
- Troy, C.M., Rabacchi, S.A., Hohl, J.B., Angelastro, J.M., Greene, L.A. and Shelanski, M.L. (2001). Death in the balance: alternative participation of the caspase-2 and -9 pathways in neuronal death induced by nerve growth factor deprivation. *Journal of Neuroscience*, 21, 5007–5016.
- Uehata, M., Ishizaki, T., Satoh, H., Ono, T., Kawahara, T., Morishita, T., Tamakawa, H., Yamagami, K., Inui, J., Maekawa, M., and Narumiya S. (1997). Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature*, 389, 990–994.
- Varfolomeev, E. E., Schuchmann M., Luria V., Chiannilkulchai N., Beckmann J. S., Mett I. L., Rebrikov D., Brodianski V. M., Kemper O. C., Kollet O., Lapidot T., Soffer D., Sobe T., Avraham K.B., Goncharov T., Holtmann H., Lonai P. and Wallach D. (1998). Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity*, 9(2), 267–276.
- Vaux, D. L., Cory, S. and Adams, J. M. (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, 335(619), 440-442.
- Vedovato, N. and Gadsby, D.C. (2014). Route, mechanism, and implications of proton

- import during Na⁺/K⁺ exchange by native Na⁺/K⁺-ATPase pumps. *The Journal of General Physiology*, 143, 449–64.
- Vives, M., Ginestà, M. M., Gracova, K., Graupera, M., Casanovas, O., Capellà, G., Serrano, T., Laquente, B. and Viñals, F. (2013). Metronomic chemotherapy following the maximum tolerated dose is an effective anti-tumour therapy affecting angiogenesis, tumour dissemination and cancer stem cells. *International Journal of Cancer*, 133(10), 2464.
- Weber, C.H., and Vincenz, C. (2001). The death domain superfamily: a tale of two interfaces. *Trends in Biochemical Sciences Journal*, 26(8), 475–81.
- Wei, L., Roberts, W., Wang, L., Yamada, M., Zhang, S., Zhao, Z., Rivkees, S.A., Schwartz, R.J. and Imanaka-Yoshida, K. (2001). Rho kinases play an obligatory role in vertebrate embryonic organogenesis. *Development*, 128(15), 2953–2962.
- Whitmarsh, A.J. and Davis, R.J. (2000). A central control for cell growth. *Nature*, 403, 255–256.
- Willingham, S. B., Bergstralh, D. T., O'Connor, W., Morrison, A. C., Taxman, D. J., Duncan, J. A., Barnoy, S., Venkatesan, M. M., Flavell, R. A., Deshmukh, M., Hoffman, H. M. and Ting, J. P. (2007). Microbial pathogen-induced necrotic cell death mediated by the inflammasome components CIAS1/cryopyrin/ NLRP3 and ASC. *Cell Host & Microbe*, 2, 147–159.
- Wilson, K. P., Black, J. A., Thomson, J. A., Kim, E. E., Griffith, J. P., Navia, M. A., Murcko, M. A., Chambers, S. P., Aldape, R. A. and Raybuck, S. A. (1994). Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature*, 370, 270–275.
- Wu, G.S., Kim, K., El Deiry, and W.S. (2000). KILLER/DR5, a novel DNA-damage inducible death receptor gene, links the p53-tumor suppressor to caspase activation and apoptotic death. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 465, 143–151.
- Yeh, W.C., Pompa, J.L., McCurrach, M.E., Shu, H.B., Elia, A.J., Shahinian, A., Ng, M., Wakeham, A., Khoo, W., Mitchell, K., El-Deiry, W.S., Lowe, S.W., Goeddel, D.V. and Mak, T.W. (1998). FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science*, 279(5358), 1954–1958.
- Yoneda, A., Mulhaupt, H. A. and Couchman, J. R. (2005). The Rho kinases I and II regulate different aspects of myosin II activity. *The Journal of Cell Biology*, 170(3), 443–453.
- Zeiss, C.J. (2003). The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Veterinary Pathology*, 40(5), 481–95.
- Zhang, J., Cado, D., Chen, A., Kabra, N. H. and Winoto, A. (1998). Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking

FADD/Mort1. *Nature*, 392(6673), 296–300.

Zheng, T.S., Hunot, S., Kuida, K., Momoi, T., Srinivasan, A., Nicholson, D.W., Lazebnik, Y. and Flavell, R.A. (2000). Deficiency in caspase-9 or caspase-3 induces compensatory caspase activation. *Nature Medicines*, 6(11), 1241–1247.





ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : İBİŞOĞLU, Burçin
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 15.05.1988- Şabanözü
 Medeni hali : Bekar
 Telefon : 0533 956 88 96
 e-mail : burcinibisoglu@gmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi/Farmakoloji Anabilim Dalı	Devam ediyor
Lisans	Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2011
Lise	Nermin Mehmet Çekiç Anadolu Lisesi	2006

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2016-Halen	Erzincan Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

Özdemir, A., Şimay, Y. D., **İbişoğlu, B.**, Yaren, B., Bülbül, D., Ark, M. (2016). Cardiac glycoside- induced cell death and Rho/Rho kinase pathway: Implication of different regulation in cancer cell lines. *Steroids*, 109, 29-43.

Özdemir, A., **İbişoğlu, B.**, Şimay, Y. D., Polat, B., Ark, M. (2015). Ouabain induces Rho-dependent rock activation and membrane blebbing in cultured endothelial cells. *Molecular Biology*. 49(1), 138-143.

Ulusal ve Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan

Bildiriler:

İbişoğlu, B., Özdemir, A., Şimay, Y. D., Ark, M. A novel proteolytic cleavage of ROCK 1 by caspase-2. 7th European Congress of Pharmacology. June 26-30, Istanbul/Turkey .

Yıldız, M., Senol, F. S., Ozdemir, A., **Ibisoglu, B.**, Simay, Y. D., Erdogan Orhan, I., Ark, M. Cytotoxic Activity Appraisal of Different Extracts From Cyclotrichium Niveum L. in Three Cell Lines. The 18th International Congress Phytopharm. 2014, Saint Petersburg/ Russia.

Ibisoglu, B., Simay, Y. D., Ozdemir, A., Ark, M. Combination of ouabain and a specific ROCK inhibitor Y27632 in HeLa cells: implication of therapeutic benefits. Experimental Biology. 2014, San Diego/ USA.

Hoşbaş, S., **İbişoğlu, B.**, Şimay, Y. D., Deliorman Orhan D., Ark, M. Aqueous Extract of Daphne Pontica L. (Thymelaeaceae) Induces Senescence In Hela Cells. International Conference on Natural Products Utilization. 2013, Bansko/Bulgaria.

Özdemir, A., **İbişoğlu, B.**, Şimay, Y. D., Yaren, B., Ark, M. Cleavage of ROCK II: As a Common Phenomenon in Cell Death. Experimental Biology. 2013, Boston/ USA.

Şimay, Y. D., Hoşbaş, S., **İbişoğlu, B.**, Yıldız, M., Özdemir, A., Ark, M. Rock inhibition reduces senescent cell size. Experimental Biology. 2013, Boston/ USA.

Hobiler

Yeni yerler görmek, seyahat, kitap okumak, farklı kültürleri keşfetmek.



GAZİ GELECEKTİR..

