



T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PRİMER PROSTAT KANSERİNE BAĞLI KASPAZ -2 GEN EKSPRESYONLARININ İNCELENMESİ

Orçun İŞLER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Nisan-2012
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PRİMER PROSTAT KANSERİNE BAĞLI KASPAZ -2 GEN EKSPRESYONLARININ İNCELENMESİ

Orçun İŞLER

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Hasibe Cingilli VURAL

2012, 93 Sayfa

Jüri
Doç. Dr. Tuna UYSAL
Yrd. Doç. Dr. Hasibe Cingilli VURAL
Yrd. Doç. Dr. Nesrin TURAÇLAR

Prostat karsinomu erkeklerde en çok görülen internal malinitedir. Kansere bağlı ölümlerde ise ikinci sırada yer alır.

Azalmış apoptozis malinite gelişimine katkıda bulunmaktadır. Zamanı geldiğinde normal olarak apoptozise gidemeyen hücreler, sonlandırdıkları mutasyonların etkisiyle malin hücrelere dönüşme potansiyeli taşırlar.

Son yıllarda yürütülen araştırmalar neticesinde, apoptozisten sorumlu moleküler mekanizmalar açıklığa kavuşmuştur. Bu çalışmalar sonucunda, kaspaz adı verilen, intrasellüler proteazların; apoptosisin gerek direkt, gerekse indirekt morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerinden sorumlu olduğu ortaya konulmuştur.

Yaptığımız bu tezde; kaspaz ailesinin en iyi korunmuş üyesi ve öncül kaspazlardan biri olan kaspaz-2 üzerinde çalışılmıştır. Çalışmamızın amacı; öncelikle prostat kanserli dokularda kaspaz-2 genine ait iki varyantta HRM yöntemi ile tek nokta mutasyonlarının saptanmasıdır. Ayrıca iki varyant üzerinde RT-PZR yöntemiyle kaspaz-2 gen ifadesinin saptanarak kanser gelişme mekanizması ile etkisi araştırıldı.

Çalışmada HRM yönteminde; kontrol için sağlıklı bireylerden alınan 6 adet kan ve parafin bloklara emdirilmiş olan 12 adet prostat kanserli solid doku örnekleri kullanılmıştır. Gen ekspresyonu çalışmasında ise; HRM çalışmasında kullanılan prostat kanserli solid doku örneklerinden 9 adedi ve kontrol olarak β- aktin geni kullanılmıştır.

Sonuçlarımız prostat tümör oluşumunda düzensiz kaspaz kaskadının ilişkisi olduğunu mantıklı bir şekilde ortaya koymuştur. Tahminlere göre, anahtar kaspazların ekspresyonlarının yok olması durumunda kötü huylu prostat hücrelerinde apoptozise karşı koruma görülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Apoptozis, gen ifadesi, kaspaz-2, prostat kanseri

ABSTRACT

MS THESIS

DETECTION OF CASPASE 2 GENE EXPRESSIONS WITH PRIMER PROSTATE CANCER

Orcun ISLER

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOLOGY

Advisor: Asist. Prof. Dr. Hasibe Cingilli VURAL

2012, 93 Pages

Jury
Assoc. Prof. Tuna UYSAL
Asist. Prof. Dr. Hasibe Cingilli VURAL
Asist. Prof. Dr. Nesrin TURACLAR

Prostate cancer is the most common internal malignancy in men. It is in second place in cancer-related deaths.

Decreased apoptosis contributes to the development of malignancy. That can not go to apoptosis the normal cells, when the time comes, so normal or healthy cells are transformed malignant cells by the effect of mutations.

As a result of research conducted in recent years, molecular mechanisms are clarified responsible for apoptosis. As a result of these studies, It has been determined that intracellular proteases which is caspase-called apoptosis both directly, and indirectly responsible for the morphological and biochemical changes.

In the present study we investigate Caspase 2 is one from the precursor caspase and a member of the family's most well-preserved caspase. The aim of our study, primarily in prostate cancer tissues are determined the single point mutations at two variant belong to caspase-2 gene using HRM method.

Furthermore, we were investigated the effect of the mechanism of cancer development and caspase 2 gene expression on two variant with RT-PCR method.

In this study with HRM method used 6 different blood samples of healthy individuals for control and 12 pieces of solid tissue samples of parafin-embedded blocks with prostate cancer. In a study of gene expression; 9 solid tissue samples with prostate cancer, which is defined in HRM and β-actin gene was used as control.

Our results showed that related to the formation of prostate tumor of irregular caspase cascade. According to estimates, in case of none expression of key caspases protection is seen against apoptosis in malignant prostate cells.

Key words: Apoptosis, gene expression, caspase 2, prostate cancer

ÖNSÖZ

Son yıllarda yürütülen araştırmalar neticesinde, apoptozisten sorumlu moleküler mekanizmaların açıklığa kavuşturulması ile kaspazların ne kadar önemli olduğu ortaya konulmuştur. Apoptozis gibi yaşamsal bir olayda görev almaları ve özellikle kanser tedavisine yönelik çalışmalarda hedef alınması nedeniyle kaspaz moleküllerinin önemi günden güne artmaktadır. Bu fikirlerden yola çıkılarak yapılan tez çalışmamda öncül kaspazlardan biri olan ve tümör baskılayıcı olarak görev yaptığı öne sürülen Kaspaz-2'nin prostat kanseri üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

Tezimin her aşamasında yardımlarını benden esirgemeyen danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Hasibe (CİNGİLLİ) VURAL (Selçuk Üniversitesi Moleküler Biyoloji A.B.D.)'a, tezimde çalışma materyali sağlayan Konya Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Patoloji Bölümü'ne, tez projemi destekleyerek gerekli maddi olanağı sağlayan Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne (BAP), çalışma arkadaşlarıma ve her zaman büyük desteğini gördüğüm aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Orçun İŞLER
KONYA-2012

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

ÖNSÖZ ..... **vi**

İÇİNDEKİLER ..... **vii**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **x**

1. GİRİŞ **1**

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **5**

2. 1. Kanser 5
2.1.2. Kanserin tanımı 5
2.1.3. Kanserin oluşumu 5
2.1.4. Kanserin biyolojisi 6
2.1.5. Kanserin özellikleri 7
2.1.6. Sık görülen kanser türleri 7
2. 2. Prostat kanseri 7
2.2.1. Nedenleri 9
2.2.2. Belirtiler 10
2.2.3. Risk kitlesi 10
2.2.4. Prostat kanserinde TNM evrelendirme kriterleri 10
2.2.5. Patolojik özellikler 12
2.2.6. Tanı 13
2.2.7. Tedavi 15
2. 3. Kanserin moleküler gelişimi ve metabolik yolak 16
2. 4. Apoptozis 17
2.4.1. Apoptozis süreci 20
2. 5. Nekroz 21
2. 6. Apopitoz ve Nekroz Arasındaki Farklar 21
2. 7. Apoptozis ve Kanser 24
2. 8. Hücre Siklusu ve Apoptozisin Prostat Kanserlerindeki Önemi 25
2. 9. Kaspazların Apoptozis ile İlişkisi 26
2. 10. Kaspazlar (Cystein-dependent Aspartate Spesific Proteases) 26
2.10.1. Kaspazların filogenetik olarak sınıflandırılması 28
2.10.2. Kaspazların işlevlerine göre sınıflandırılması 29
2.10.3. Kaspaz aktivasyonu 30
2.10.4. Apoptoziste ölüm yolağı (Ölüm Fazı) 34
2.10.5. Kaspazların etkilediği hedef noktalar 34
2.10.6. Kaspaz aktivasyonu ve otofaji arasındaki ilişki 34
2.10.7. Kaspaz substratları ve apoptozisin geç aşamaları 35
2.10.8. Kaspazlar ailesindeki mutasyonlar ve kanser 35
2.10.9. Tedavi amaçlı kaspazların kullanımı 37
2. 11. Kaspaz-2 38
2. 12. Gen Ekspresyonu 43
2. 13. Mutasyon 44

2.13.1. Mutasyon çeşitleri ... 45
2.13.2. Nokta mutasyonları ... 46
2. 14. Nokta Mutasyon Tanımlama Yöntemleri ... 46
2.14.1. SSCP (Tek zincir konformasyon polimorfizm; Single Strand Conformation Polymorphism) ... 47
2.14.2. HRM (High Resolution Melting) analizi ... 49
2.14.3 Otomatik DNA dizi analizi ... 51
2. 15. Gerçek Zamanlı PZR (Real time PZR, RT-PZR) ... 52
2. 16. SYBR Green I ... 55

3. MATERYAL VE YÖNTEM ... 57

3. 1. Biyolojik Materyal ... 57
3. 2. Moleküler Materyal ... 57
3. 3. Histopatolojik Yöntemler ... 58
3.3.1. Doku örneklerinin histopatolojik çalışması ... 58
3. 4. Moleküler Yöntemler ... 58
3.4.1. Parafinli bloklardan deparafinasyon ... 58
3.4.2. DNA izolasyonu ... 59
3.4.2.1 EZ1 biorobot (Qiagen) DNA izolasyon cihazı ile izolasyon ... 59
3.4.3. DNA kalitesinin tanımlanması ... 59
3.4.3.1 Agaroz jel elektroforezde yöntemi ... 59
3.4.3.2 Mikro hacim (nanodrop) spektrofotometre değerlendirmesi ... 60
3.4.4. HRM (High Resolution Melting Curve) yöntemi ile mutasyon tanımlama . 61
3.4.4.1 HRM koşulları ... 62
3.4.5. RNA izolasyonu ... 62
3.4.5.1 RNeasymini kit ile RNA izolasyonu ... 62
3.4.6. RNA kalitesinin tanımlanması ... 63
3.4.6.1 Mikro hacim (nanodrop) spektrofotometre değerlendirmesi ... 63
3.4.7. Housekeeping gen ... 63
3.4.8. Gen ekspresyonu ... 66
3.4.8.1 İzole edilen RNA'ların cDNA'ya dönüştürülmesi ... 66
3.4.8.2 Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunda gen ekspresyon çalışması ... 67
3.4.9. Değerlendirme ... 67
3.4.10. İstatistiksel analiz ... 67

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA ... 68

4. 1. Histopatolojik Bulgular ... 68
4. 2. Moleküler Test Bulguları ... 69
4.2.1. DNA izolasyon bulguları ... 69
4.2.2. RNA izolasyon bulguları ... 70
4.2.3. HRM bulguları ... 71
4.2.4. RT-PZR'de gen ekspresyon bulguları ... 72

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER ... 76

5.1 Sonuçlar ... 76
5.2. Öneriler ... 77

6. KAYNAKLAR 81

ÖZGEÇMİŞ 94

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

dl: desilitre
dH_2O: distile su
gr: gram
L: Litre
mA: miliAmper
mg: miligram
$MgCl_2$: Magnezyum klorür
ml: mililitre
mm: milimetre
mM: miliMolar
ng: nanogram
nm: nanometre
pH: $-\log[H^+]$
γ: gama
°C: santigrad derece
µ: mikron
µg: mikrogram
µl: mikrolitre

Kısaltmalar

ABD: Amerika Birleşik Devletleri
AIDS: Acquired Immune Deficiency Syndrome
AIF: Apoptozis indükleyici faktör
APAF: Apoptotik proteazları aktifleştirici faktör
ASA: Allel Spesifik Amplifikasyon
ATP: Adenozin trifosfat
Bax: Bcl-2 ile ilgili X proteini
Bcl: B hücreli lenfoma
bç: baz çifti
Bid: BH3 genini etkileyen bölge
CAD: Kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz
CARD: Kaspaz takviye bölgesi
Caspase: Cysteine-dependent aspartate specific protease
cc: santimetre küp
CD4+T: Akyuvarlar, T yardımcı hücreleri
CDI: Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri
cDNA: Tamamlayıcı deoksiribonükleik asit
CED: Hücre ölüm anomalisi
Ct: Eşik devri
DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol
dATP: deoksiAdenozin trifosfat
DED: Ölümcül efektör bölgesi
DFF: DNA parçalama faktörü
DGGE: Denatüre edici jel elektroforezi
dHPLC: Denatüre edici yüksek performanslı sıvı kromatografisi

dk: dakika
DLD: D- laktat dehidrojenaz
DNA: Deoksiribonükleik asit
DNA-PK: DNA bağımlı Protein Kinaz
DNAz: Deoksiribonükleaz
FADD: Fas proteini ile ilgili ölümcül bölge
GAPDH: Gliseraldehid 3-Fosfat Dehidrojenaz
HA: Heterodubleks Analizi
HE: Hematoksilen Eozin
HIV: Human Immunodeficiency Virus
HRM: Yüksek çözünürlüklü erime eğrisi
IAP: Apoptozis proteinlerinin inhibitörü
ICAD: Kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörü
ICE: İnterlökin 1-beta dönüştürücü enzim
kb: kilobaz
kD: kilo Dalton
MDE: Mutation Detection Enhancement
mRNA: Mesajcı ribonükleik asit
NF_KB: Nüklear transkripsiyon faktörü
NH_2: Amino
NK: Doğal öldürücü
PAP: Prostat spesifik asit fosfataz
PARP: Poli ADP Riboz Polimeraz
PCR: Polymerase chain reaction
PIDD: p53- uyarıcı ölümcül protein içeren bölge
PIN: Prostatik intraepitelyal neoplazi
pRB: Retinobalstoma protein
PSA: Prostat Spesifik Antijeni
PSMA: Prostat Spesifik Membran Antijeni
PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAIDD: RIP- Ich-1 proteini ile ilişkili ölüm bölgesi
RFLP: Restrüksiyon parça uzunluk polimorfizmi
RIP: Reseptör etkileşimli protein
RNA: Ribonükleik asit
ROS: Reaktif oksijen türleri
rpm: dakika başına düşen devir sayısı
RT-PCR: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
s: saniye
SREBP: Sterol düzenleyici element bağlayıcı protein
SSCP: Tek zincirli konformasyon polimorfizmi
TAE: Tris asetik asit etilen diamin tetra asetik asit
TGCE: Sıcaklık gradiyentli kapiler elektroforezi
Tm: Erime sıcaklığı
TNF: Tümör nekroz faktörü
TNFR: Tümör nekroz faktörü reseptörü
TRADD: Tümör nekroz faktörü reseptörü ile ilgili ölümcül bölge
TRIAL: Tümör nekroz faktörü - ilişkili apoptozisi indükleyen reseptör ligandı
TURP: Prostatın transüretral rezeksiyonu
V_1: Varyant 1
V_2: Varyant 2

1. GİRİŞ

Prostat, erkek üreme sisteminin parçası olan bir salgı bezidir. Asıl işlevi meninin sıvı kısmını oluşturmaktır. Meninin seminal kese sıvısı ile birlikte %95'ini prostatik salgı oluşturur. Böylece meninin miktarını çoğaltarak spermin döllenme kapasitesini arttırır.

Prostat kanseri de diğer kanser türleri gibi vücuttaki hücre büyümesinin bozularak sonuç olarak tümör adı verilen bir doku kitlesi oluşturması durumudur. Tam olarak sebebi bilinmese de yaş, ırk ve genetik faktörlerin büyük rol oynadığı tespit edilmiştir. Ayrıca; tümör gelişimine apoptozisin azalmasının neden olduğu yapılan araştırmalarda görülmüştür. Bununla birlikte; hücre çoğalması lehine apoptotik kontrol kaybı, prostat kanseri başlangıcı ve ilerlemesinden sorumlu olabilmektedir (da Motta ve ark., 2009).

Diğer taraftan prostat kanserlerini diğer kanserlerden farklı yapan özellik, prostat kanserlerinin çok odaklı yapıda olmasıdır. Buradaki esas önemli özellik DNA hasarındaki defekt ve yolaktaki kontrol merkezlerinin belirtileridir (Coussens ve Werb, 2008).

Hücre siklusu, çoğalmak (prolifere olmak) üzere uyarılmış bir hücrede gerçekleşen ve bir dizi geçici biyokimyasal aktivitelerin ve morfolojik değişikliklerin görüldüğü bir süreçtir. Bir siklusa giren hücre, morfolojik ve genetik olarak birbirine tıpa tıp benzeyen iki hücre oluşumuyla döngüyü tamamlar. Hücre proliferasyonu hücre siklusu içinde yer alan bazı kontrol noktaları (check-points) tarafından düzenli olarak kontrol edilir. Hücre siklusu proliferasyon, farklılaşma (diferansiyasyon) ve apoptozis gibi temel hücresel fonksiyonları düzenlediğinden büyüme ile yakın ilişki içinde bulunur. Bu düzenleme özelliğinin olması organizmadaki hemen hemen her tür fizyolojik (örneğin doku hemostazisi) ve patolojik durumlarda (örneğin tümör oluşumu) hücre siklusunun ne denli kritik bir öneme sahip olduğunu göstermektedir. Nitekim, kanserlerde hücre siklusunun regulatör proteinleri olan siklinler veya siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri (*CDI*)'nin düzeylerinde anormallikler saptanmıştır. Örneğin, siklin D meme ve skuamoz hücre tümörlerinde aşırı eksprese olmaktadır. Bir tür *CDI* geni olan *p16* geninin ailesel melanom ve pankreatik kanser olgularında rearranje (yeniden aktif) olduğu bulunmuştur.

Apoptozis ve hücre siklusu birbirleriyle kompleks ve yakın bir ilişki içinde çalışırlar. Örneğin apoptozisde rol alan bir protein olan *p53* aynı zamanda hücre siklusunu durduran ve hücreye DNA'sındaki hasarları onarması için zaman kazandıran bir işlev görür.

Hücrelerin normal apoptotik süreçten kaçmalarını sağlayan bir özellik kazanmaları hemen bütün kanser hücrelerinde gözlenen bir özelliktir. Tümör hücreleri ya antiapoptotik proteinlerin aşırı yapımıyla ya da proapoptotik proteinlerin yapımlarının ya da etkilerinin azalmasıyla apoptozisten kaçınırlar. Kanserleşme ve apopitoz düzenlemesinin bozulması arasındaki ilişki kemoterapötiklere ya da radyasyona direnç oluşturarak da klinik tıbbı ilgilendiren sonuçlara yol açabilmektedir. Apoptozis, antikanser aktivite için en kabul edilebilir mekanizmalardan biridir (Sanmartín ve ark., 2008).

Programlı hücre ölümü adıyla anılan apoptozis, hücre intiharı olarak da bilinmektedir. Hücrede bazen yeni proteinlerin sentezini, hücre iskeletinin yıkımı için bazı proteaz enzimlerin ve DNA'nın parçalanması için DNAz'ların aktif hale geçmesini tetikleyen, aktif olarak düzenlenen bir süreçtir (Solakoğlu, 2009).

Apoptozis, nekrozisden farklı olarak, fizyolojik şartlar altında da meydana gelen ve genel olarak doku homeostazisini sağlayan bir hücre ölüm şeklidir (Ulukaya, 2001).

Apopitoz çok hücreli bir organizmanın embriyonik dönemdeki gelişiminden başlayarak erişkin bir organizma olarak varolmasına ve yaşlanmasına dek birçok gelişim aşamasında organizmada homeostazisin sürmesini sağlayan önemli bir fizyolojik işlevdir.

Tanımlandığı günlerden bu yana geçen yaklaşık 40 yıl içinde apopitozun tüm çok hücreli canlılarda önemli ölçüde korunan ve hem temel adımlar, hem de uygulayıcı proteinlerdeki özdeş yapılar açısından birbirine benzeyen genetik bir yolla belirlendiği saptanmıştır. Apopitoz temel olarak iki yolla başlatılır: 1) hücre dışından tetiklenen, pozitif (*TNF α* varlığı) ya da negatif (büyüme faktörü yokluğu) ekstrensek yol 2) hücre içinde DNA hasarı, endoplazmik retikulum stresi ya da mitokondriden tetiklenen intrensek yol şeklindedir (Solakoğlu, 2009).

Apoptozisin düzenleyici mekanizmaları çok komplekstir. *ROS*, kaspazın aktivasyonu, tümör nekroz edici faktör (*TNF*), protein kinaz ve mitokondriyal yolak apoptozisin temelini oluştururlar (Sanmartín ve ark., 2008).

İster hücre içi, isterse hücre dışı mekanizmayla başlamış olsun, apoptotik süreç kaspazlar adı verilen proteolitik enzimler tarafından gerçekleştirilir. Kaspazlar, bugüne dek bir düzine farklı türü tanımlanan, sitoplazma da inaktif proenzimler halinde bulunan, aktif katalitik bölgesinde sistein içeren ve substratlarını aspartat içeren özgül bir bölgeden kesen proteaz enzimlerdir (**caspase**= **c**ysteine-dependent **asp**artate spesific prote**ase**s) (Solakoğlu, 2009). Apoptozisin mekanizması gerçek anlamda tam olarak açıklanamamasına rağmen, apoptozis ile bağlantı kurulan en önemli olay kaspazların aktivasyonudur (Choen, 2000). Kaspazlar kalsiyum bağımsız hücre içi sistein proteaz sınıfının en önemli bölümünü oluştururlar (Akdaş ve Çevik, 2002).

İlk kez morfolojik kriterlere göre belirlenen apoptozis, 80'li yılların sonuna doğru DNA kırıklarının oluştuğunun ortaya çıkarılmasıyla birlikte bu kırıkların saptanmasına yönelik yöntemlerle belirlenmeye başlanmıştır. 90'ların ortalarında ise apoptotik hücrelerde kaspazların aktifleştiği bulundu. Böylece, kaspaz aktivasyonlarının belirlenmesine yönelik metodlarla saptanabilen apoptozis, 90'ların sonuna doğru fosfatidilserin translokasyonunu belirleyen yöntemlerle de saptanmaya başlanmıştır.

Kaspazlardaki defektler otoimmün hastalıklara, kanser ve bazı nörolojik bozuklukların oluşumuna katkıda bulunabilir (Kidd ve ark., 2000; Norberg ve ark., 2010).

14 adet kaspaz arasında başlatıcı olarak görev yapan kaspazlardan biri olan kaspaz-2; ikinci olarak tanımlanan kaspazdır. Kaspaz-2'nin fonksiyonu hala tam olarak anlaşılamamıştır. Uzun prodomain içermesinin yanı sıra; çeşitli apoptotik uyarıcılara cevap verebilmesi (Harvey ve ark., 1997) ve *Fas* ile *RAIDD* (RIP- associated protein with a death protein) aracılı etkileşim (Ahmad ve ark., 1997; Degterev ve ark., 2003) sağlamak gibi başlatıcı kaspazların aksine karakterler taşımaktadır. Substrat tercihi nedeniyle kaspaz-3 ve -7'ye daha yakındır ve bir cellat olan kaspaz-3 tarafından aktive bile olmaktadır. Kaspaz-2'nin tek olan özelliklerinden bir diğeri hücrede sitosolde değil, çekirdek ve golgi aygıtında lokalize olmasıdır (O'Reilly ve ark., 2002; Baliga ve ark., 2003). Ayrıca kaspaz-2 mitokondriyal geçirgenliğe yol gösterme aktivitesi, *Bid* (Bcl-2 genini aktifleştiren protein) proteinini aktifleştirmesi ve apoptozisi indükleyerek DNA hasarı durumunda önemli bir rol üstlenmesi gibi görevleri de bulunmaktadır (Robertson ve ark., 2004; Bonzon ve ark., 2006). Genotoksik strese yanıt olarak; ya kaspaz-2'nin ya da nüklear transkripsiyon faktörünün (NF_KB) aktivasyonu *PIDD*'in farklı izoformları tarafından kontrol edilmektedir ve öncü hücreler apoptozise ve sağ

kalıma gitmektedir (Cuenin ve ark., 2008). Ancak, kaspaz-2 hayvan modellerindeki fizyolojik hücre ölümlerinin çoğu için gerekli değildir. Son yapılan çalışmalardan biri göstermiştir ki; fare yaşlanmasında kaspaz-2'nin bozulması önemli bir etkiye sahiptir ve kaspaz-2'nin eksikliği farelerde oksidatif olarak zarara uğramış hücrelerin ortadan kaldırılabilmesini tehlikeye sokmaktadır (Zhang ve ark., 2007). Kaspaz-2'nin çok fazla ayırıcı özelliğe sahip olması ve fonksiyonları anlaşıldıkça ilgi çekici bir hale gelmiştir.

Kaspaz-2'nin; DNA zararına cevaben aktifleştiği bilinmektedir ve DNA zararı ve apoptotik yolağın sorumluluğu arasında önemli bir bağlantı sağlamaktadır (Robertson ve ark., 2002; Panaretakis ve ark., 2005; Zhivotovsky ve Orrenius, 2005).

Kaspaz ailesinin genleri; programlı hücre ölümünün başlatılması ve yürütülmesinde kritik bir rol oynamaktadır. Kaspazlardaki bir değişiklik insan kanser gelişiminde etkili olmaktadır. Mevcut çalışmada immunohistokimyasal doku örneklerinde kaspaz-2 gen ekspresyonunun ve her bir doku için ekspresyon yüzdelerinin tanımlanması sağlanacaktır. Ayrıca prostat kanserli biyopsi örneklerinde apoptotik hücrelerin oluşumunu sağlayan kaspaz kaskadlarından kaspaz-2 geninin özgün varyantlarının mutasyonları da tanımlanacaktır. Böylelikle normal doku, kan ve normal DNA örneklerinde de moleküler genetik testlerin uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar prostat kanser hücrelerinde kaspaz-2 gen ekspresyonunun kanser gelişme mekanizması ile etkisi de araştırılacaktır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2. 1. Kanser

2.1.2. Kanserin tanımı

Kanser; İngilizce' de "yengeç" anlamına gelmektedir. Bu adın verilme nedeni yengecin düşmanını kıstırdıktan sonra, uzun ve dişli kollarıyla sıkıca tutup; yavaş yavaş kemirerek yemesinden ileri gelmektedir. Tedavi edilmediği takdirde, insanı giderek zayıflatıp halsiz düşüren ve sonunda öldüren bu hastalığa, bu nedenle **kanser** adı verilmiştir.

Biyolojik olarak kanser; organizmada kontrolsüz çoğalan hücrelerin normal işlevi olan hücrelerin yapısını bozması sonucu ortaya çıkan, 200'den fazla türü tanımlanan bir hastalık grubudur.

Kanser tek bir hastalık olmayıp, vücuttaki tüm doku ve organlarda kanser gelişebilmektedir. Bütün dünyada çok korkulan bir hastalıktır. Kanserin korkulan bir hastalık oluşunun başlıca nedeni öldürücülük düzeyinin yüksek olması ve sık görülmesidir. Günümüzde dünyada her yıl 10-11 milyon kişi bir çeşit kanser hastalığına yakalanmaktadır. Bu hastaların 7 milyon kadarı ise; aynı yıl içinde hayatını kaybetmektedir (Bilir, 2008).

Batı toplumlarında her yıl 250-350 kişiden biri kansere tutulmaktadır. 60 yaşın üzerindeki grupta ise, kanser sıklığı çok artmakta 300 kişide 4-5 civarına yükselmektedir. Ülkemizde kesin istatistikler bulunmamakla birlikte insidansın bunun yarısı kadar olduğu tahmin edilmektedir.

2.1.3. Kanserin oluşumu

Kanserlerin yaklaşık %80-90'ı çevresel faktörlerce oluşturulur ve önlenebilme potansiyeli vardır. Kalıtım yoluyla kanser oluşma olasılığı çevresel faktörlere oranla çok daha azdır.

X-ışınları, ultraviyole ışınları gibi fiziksel faktörler ve bazı ilaçlar, polisiklik aromatik hidrokarbonlar gibi kimyasal faktörlerin yanında virüsler de biyolojik olarak kanser oluşturabilirler.

Kimyasal karsinojenler (hidrokarbonlar, aflatoksin, sigara, bazı ilaçlar vb) ya uygulandıkları yerde (örn: cilt), ya absorbe edildikleri yerde (örn: barsak), ya da

metabolizmanın durumuna göre karaciğer, böbrek gibi organlarda, bazen de direkt olarak ilgisiz bir bölgede kanser oluşturabilirler. Ancak, karsinojene maruz kalma kanser oluşturmak için tek başına yeterli bir neden değildir. Karsinojenler ancak uygun yer ve zamanda kanser oluşturabilirler (Özmen, 2005).

2.1.4. Kanserin biyolojisi

Normalde hücreler belli bir kontrol altında, ihtiyaca göre bölünerek çoğalmaktadırlar. Hücreler bir taraftan programlı ölüm ya da "apoptoz" denen olay ile yok olurken, diğer taraftan da büyüme faktörlerinin etkisiyle çoğalır. Büyüme faktörleri normalde DNA'daki çeşitli genlerin etkisiyle oluşan proteinlerdir. Bu genler mutasyona (değişime) uğrayarak hücrelerin aşırı büyümesine sebep olurlarsa, o zaman kanser oluşur ve bu genlere de "onkogen" denir.

Kanser genleri ya da onkogenler 70'li yılların sonlarına doğru bulunmaya başlanmış ve günümüze kadar çok aktif araştırmaların konusunu oluşturarak, kanserin daha iyi anlaşılmasına, tanı ve tedavinin geliştirilmesine hizmet etmişlerdir.

Onkogenleri oluşturan mutasyonlar, karsinojen maddelerin, virüslerin ve X ışınlarının etkisiyle meydana gelir.

Kanser bir organda oluştuktan sonra, uzak doku ve organlara da yayılma dediğimiz yerleşmeler yapar ve genel olarak hastalar yayılmalar nedeniyle kaybedilir. Hızlı ilerleyen kanserlerde yayılma erken, daha iyi gidişli kanserlerde ise yayılma geç oluşur. Metastaz oluşumu tesadüften çok, kanser hücrelerinin bazı organlara kolay yerleşmelerini sağlayan özelliklerine bağlıdır. Örneğin, kolon kanserleri karaciğere, prostat kanserleri kemiğe metastaz yapmayı tercih etmektedir. Burada, kanserli dokuda kan akımı, damar hücrelerinin aktivasyonu gibi faktörler rol oynamaktadır.

Onkogenlerin yanında anti-onkogenler de çok önemlidir. Onkogenler kansere sebep olurken, anti-onkogenler kanseri önleyen genlerdir. Anti-onkogenlere "tümörü baskılayan genler" de denir. Bunlar doğal hallerinde iken, yani mutasyona uğramamış hallerinde iken hücre bölünmesini ve çoğalmasını frenleyen, durduran genlerdir. Örnek olarak retinoblastoma genini ve *p53* genini gösterebiliriz.

2.1.5. Kanserin özellikleri

"Kontrolsüz çoğalma"; esas özellik olmakla birlikte, kanser hücresinin başka biyolojik karakteristikleri de vardır. Bunlar arasında hücre kültürlerinde kontakt inhibisyondan kaçabilme, bölünebilmek için dış uyaranlara (sinyallere) gereksinim göstermeme, çoğalmayı baskılayıcı sinyallere duyarsızlık, apoptozisten kaçabilme, anjiyogenezi uyarabilme ve yayılma yapabilme sayılabilir.

2.1.6. Sık görülen kanser türleri

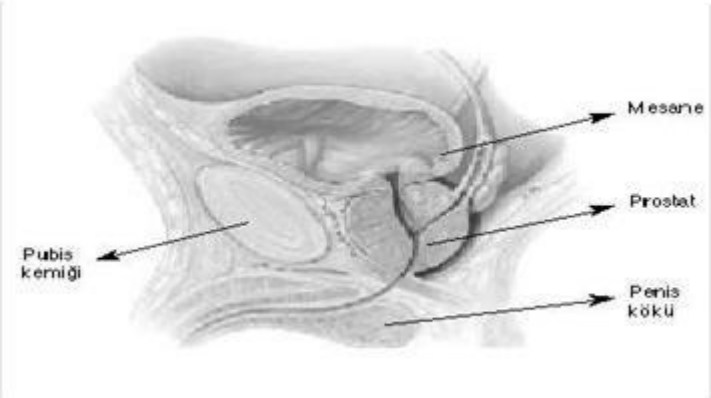
İnsan vücudunda hemen bütün organlarda kanser meydana gelebilir. Bununla birlikte her organda kanser meydana gelmesi olasılığı aynı değildir. Bazı organların kanserleri daha sık görülmektedir. İnsan vücudundaki en büyük organ deri olduğundan gerçekte en sık görülen kanser deri kanseridir. Derinin vücudun dış yüzeyini kaplaması ve dış ortamdaki etkenlerle doğrudan karşı karşıya olması da bunda etkendir. Ancak deri kanseri oldukça yavaş seyirli bir hastalıktır ve genellikle vücutta yayılmaz, hastaların ölümüne de yol açmaz. Bu nedenle sık görülmekle birlikte deri kanseri fazla önemsenmez.

Kadınlarda sık görülen kanser türleri meme kanseridir. Meme kanserinden sonra kadınlarda sık görülen türler akciğer kanseri, mide ve kalın barsak kanserleri ile rahim kanseri şeklinde sayılabilir. Erkeklerde ise; deri kanseri, akciğer kanseri, mide kanseri, gırtlak kanseri, kalın barsak kanseri ve prostat kanseri en sık görülen kanser türleridir (Bilir, 2008).

2. 2. Prostat kanseri

Prostat sadece erkeklerde pelviste bulunan en önemli cinsel salgı bezidir. Prostat bezi, mesanenin (idrar torbasının) idrar yoluna bağlandığı yerde, idrar borusunu çepeçevre saran bir organdır. Prostat, kapsül denen bir kılıf ile diğer organlardan ayrılmıştır. Prostatın çıkardığı salgının aktığı küçük kanalcıklar idrar yoluna bağlıdır. Tohum (sperm) kanalları ve meni keseciklerinin çıkışları da idrar yolunun bu bölümüne bağlanır. Prostat, meninin en büyük bölümünü üreten organdır. Akışkanlığı düşük olan meni sıvısı erkeğin her cinsel boşalmasında spermlerle ve meni keseciklerinden ve sperm kanallarından gelen sıvıyla karışarak idrar yolundan dışarı fışkırtılır. Meni

sıvısının içinde, spermlerin beslenmesi, hareket edebilmesi ve nakli için önemli olan unsurlar mevcuttur.



Şekil 2.1. Prostatın şematik şekli

Birçok erkekte yaşın ilerlemesiyle prostatın idrar yolunun hemen yanındaki iç bölümünde iyi huylu bir tümör oluşur. Bu iyi huylu tümör prostatın parmakla dokunulduğunda algılanabilecek gibi büyümesine yol açar. Prostat 60 yaşındaki bir erkekte ortalama 30 ila 40 mm büyüklüktedir. Bu yaklaşık iki ceviz büyüklüğü demektir. Bu iyi huylu ve prostat hiperplazisi (aşırı büyüme) adı verilen büyüme idrar yolunu daraltarak idrar yapmada zorluklara sebep olabilir. Bu tür şikayetler ortaya çıktığında, danışmak üzere bir üroloji uzmanına gidilmelidir.

Buna karşılık prostat kanseri; prostat bezinin içinde bulunan kanalcıklarda oluşur. Prostat kanserlerinin ilk ön aşamaları sık sık genç erkeklerde de ortaya çıkar. Ancak birçok erkekte bu ön aşamalar bütün ömür boyunca durağan kalır, bir karsinom haline gelmezler. Ancak bazı erkeklerde bu ön aşamalardaki hücreler prostat kanserli hücreler haline dönüşür, böylece meydana çıkan kanser hücreleri prostatın içinde yer alan küçük düğümler oluşturur. Birçok kereler bu düğümler prostatın içinde bir kaç yerde görülür.

Prostat bezindeki kanser hücrelerinin üreme hızı farklı farklı olabilir. Eğer tümör hücreleri normal prostat bezi hücrelerine benzer yapıdaysa, üreme hızı da düşük olur. Tümör hücreleri normal bez hücrelerinden ne kadar farklıysa, kanser düğümlerinin büyüme hızı da o kadar yüksek olur.

Kanser düğümlerinden biri yaklaşık olarak 4 milimetre büyüklüğe (bu aşağı yukarı bir fındık büyüklüğü demektir) ulaştığında – veya eğer bu kanser düğümü özellikle saldırgan hücrelerden oluşmuş ise – prostattaki kanser hücrelerinden bazıları

gruplar halinde damarlar ve lenf yolları üzerinden prostattan çıkabilirler. Bu kanser hücreleri lenf bezlerine ulaşarak çoğunlukla kemiklerde yeni tümörler (yayılmalar) oluştururlar.

Prostat kanseri; ABD'de erkeklerde en sık görülen malinensi olup, bu populasyondaki ölümlerin %10'undan sorumludur (Drago ve ark., 1980; Rosai, 2004). Gelişmiş ülkelerin verilerine göre, prostat kanseri ikinci en sık tanı konulan ve dördüncü en sık ölüme yol açan malinite olduğu için dünya çapında önemli bir sağlık sorunudur (Grossfeld ve ark., 1998; Walsh, 2002). Elli yaşın üzerindeki erkeklerde prostat kanseri görülme sıklığı otopsi çalışmalarıyla %30 oranında bulunmuştur. Hastaların %75'i 75 yaş ve üzerindedir (Tanagho ve McAninch, 1995). Prostat kanseri erkeklerdeki kanserlerin başında gelip, bunu ikinci olarak akciğer kanseri izlemektedir (Korkud ve Karabay, 1993). Ölüm oranları da bununla aynıdır. Siyah erkeklerde görülme sıklığı beyaz erkeklere göre 1,5 kat daha fazladır (Tanagho ve McAninch, 1995; Michael ve Pins, 2002). Çoğu ülkede yaşla beraber insidenste artma vardır. Prostatik karsinomda hormonal faktörler de rol oynar. Hastalık puberteden önce hadım edilenlerde görülmez (Kumar ve ark., 2000; Rosai, 2004).

Prostat kanserini diğer üro-onkolojik hastalıklardan ayıran en önemli özellik; 1980'li yılların ikinci yarısında prostat spesifik antijen'in (PSA) bir tümör belirteci olarak tanımlanıp kullanıma girmesiyle, bu hastalığın biyokimyasal olarak taranabilir ve tanısı çok erken evrelerde konulabilir bir hastalık durumuna gelmiş olmasıdır (Polascik ve ark., 1999).

2.2.1. Nedenleri

Prostat kanserinin kesin sebebi bilinmemekle birlikte, tespit edilen bazı risk faktörleri vardır. Bu risk faktörleri yaş, ırk ve genetik faktörlerdir. Nedeni ne olursa olsun, prostat kanserinde bugün için kabul edilen en önemli risk faktörü yaşlanmadır. Prostat kanseri gelişme riski 50 yaşından sonra artmaya başlar. Oksidatif stres, hipoksi, inflamasyon ve sıklıkla DNA baz lezyonları prostat kanserinin gelişimini etkilemektedir (De Marzo ve ark, 2007).

2.2.2. Belirtiler

Prostat kanseri genellikle kanser üretraya (idrar kesesini penise bağlayan kanal) baskı yapacak kadar büyümeden herhangi bir belirti vermez. Bu büyüme sık idrara çıkma, işeme sırasında ağrı ve zayıf ya da düzensiz idrar akışı gibi işemeyle ilgili sorunlar ve ejakulasyonda kan ve ağrı gibi belirtilere neden olabilir. Pek çok erkekte yaşlılıkla birlikte prostat büyümesi meydana geldiğinden, bu belirtiler her zaman kanser olduğu anlamına gelmez. Prostat kanserinin daha ciddi bir safhaya doğru ilerlediğini gösteren belirtiler arasında iştah kaybı, zayıflama ve kemiklerde sürekli ağrı sayılabilir.

2.2.3. Risk kitlesi

Genellikle 50 yaş üzeri erkeklerin hastalığıdır (Akdaş ve Çevik, 1996). Eğer yeterince uzun yaşarsa hemen hemen tüm erkeklerde prostat kanseri gelişir. Yaş arttıkça prostat kanseri gelişme riski artar. Prostat kanserlerinin %85'i 65 yaşın üzerindeki erkeklerde saptanır. Ailesinde, özellikle birinci derece akrabalarında prostat kanseri olanların prostat kanserine yakalanma oranı olmayanlara göre daha fazladır (Canatan ve ark, 2004). Gerçek anlamda kalıtsal prostat kanseri çok nadirdir ve genellikle 55 yaşın altındaki erkeklerde görülür. Henüz bilinmeyen nedenlerden ötürü Afrika kökenlilerde prostat kanseri gelişme riski daha yüksektir. Asya kökenliler bu açıdan daha düşük risk taşımaktadırlar (Özen, 2005).

2.2.4. Prostat kanserinde TNM evrelendirme kriterleri

Tümörün yayılması (T), lenf düğümlerinin hastalanması (N) ve hastalığın başka organlara sıçramasıdır (M). Prostat kanserinin derecelendirilmesi aşağıdaki gibidir:

T evreleri

T0; tümör tespit edilmemiştir.

T1; dijital rektal muayenesinde tespit edilemeyen fakat biyopsi ya da prostektomi örneği incelemesi neticesinde teşhis edilmiş olan kanserli hücrelerine atıfta bulunur. T1 prostat kanserleri T1a, T1b ve T1c olarak sınıflandırılırlar.

T1a, TURP (transurethral resection of the prostate) iyi huylu prostat büyümelerini tedavi etmek için yapılan ameliyat esnasında tesadüfen tespit edilen prostat kanserini tarif eder. Bu operasyon prostat bezinin büyüyerek üretra üzerine baskı yaparak idrar yapmayı zorlaştırdığı durumlarda bu belirtileri ortadan kaldırmak amacı ile yapılır.

Prostat dokusu alınıp mikroskop altında incelendiğinde ameliyatı yapan doktorun hiç tahmin etmemesine rağmen kanser bulgularına rastlanabilir. T1a, alınan prostat dokusunun %5'inin kanserli ve %95'inin iyi huylu olduğunu belirtir.

T1b, yine TURP esnasında bulunan kanseri tanımlar fakat bu defa kanserli hücreler %5'ten fazladır.

T1c, PSA test sonuçları yüksek olduğu için kanserden şüphelenildiği durumlarda yapılan iğne biyopsisi ile alınan prostat doku örneklerinin mikroskop altında incelenmesi ile tespit edilen kanserleri belirtir.

T2; doktorun prostat kanseri varlığını DRM (dijital rektal muayene) ile hissedilmesi ve kanserin daha prostat içinde kaldığı durumlarda düşünüldüğü anlamına gelir. Bu kategori; T2a, T2b ve T2c olarak kategorilendirilir.

T2a, kanserin sadece prostatın sağ ve solunda olduğu, fakat her iki tarafta birlikte mevcut olmadığı ve söz konusu tarafın sadece yarısında bulunduğu anlamına gelir (Gleason skoru 7 ve üzerinde olanlar).

T2b, kanser yine tek taraftadır ama bulunduğu tarafın yarısından fazla yeri kaplanmıştır.

T2c, bu kategoride kanser her iki taraftadır**.**

T3; kanser prostat bezini saran kenarın (kapsül) dışına geçmiştir. Prostata ve seminal keseciklere direk komşu dokulara ulaşmıştır ancak başka organa bulaşmamıştır. Bu grup da T3a ve T3b kategorilerine ayrılır.

T3a, kategorisinde kanser prostat bezinin dışındadır ve seminal keseciklere ulaşmamıştır.

T3b, kanser seminal keseciklere ulaşmıştır.

T4; kanserin mesane boynu ve dış uzantısı, pelvisteki rektum kasları ya da pelvis duvarı gibi prostata komşu dokulara (seminal keseciklerden başka dokular) ulaştığı anlamına gelir.

N evreleri

Nx; kanserin lenf bezlerine ulaştığını tespit eden testlerinin yapılmadığı anlamına gelmektedir.

N0; kanser yakındaki lenf bezlerine ulaşmadı anlamına gelmektedir.

N1; pelvisteki lenf bezlerine yayılma anlamına gelmektedir.

M evreleri

Mx; uzak organlara yayılma testlerinin yapılmadığı anlamına gelmektedir.

M0; kanser bölgesel bezlerin dışına bulaşmamış anlamına gelmektedir.

M1; kanserin uzak organlara ulaştığı anlamına gelmektedir.

M1a, kanserin uzak lenf bezlerine ulaştığı anlamına gelmektedir.

M1b, kanserin kemiklere ulaştığı anlamına gelmektedir.

M1c, kanserin beyin, akciğer, karaciğer gibi uzak organlara ulaştığı anlamına gelmektedir.

Prostat kanserinde doku örnekleri incelemesiyle «Gleason Skoru» da belirlenir. Skoru oluşturan sayılar 2–10 arasındadır ve tümörün ne kadar büyüdüğünü gösterir: Gleason Skoru'nda 3, yavaş büyüme anlamına gelir (göreceli iyi huylu tümör). Gleason Skoru'nda 9, hızlı büyüme anlamına gelir (saldırgan tümör) (Prostatakrebs**,** 2010).

2.2.5. Patolojik özellikler

Prostat kanseri iki büyük grupta incelenebilir. Periferal duktus ve asinilerin adenokarsinomu (sekonder) ve büyük duktusların karsinomu (primer). Bu morfolojik ayrım her iki tümörün de farklı orijinden köken aldığı inanışına göre yapılmaktadır. Ancak (daha önce memede olduğu gibi) bu histolojik yaklaşım, her iki paternin sıklıkla bir arada görülmesi özelliğine ters düşmektedir. Diğer bir alternatif yaklaşım ise, tümörün yapısını belirleyenin tümörün orijini değil de büyüme bölgesinin etkili olduğudur. Tümörlerin büyük kısmı ilk kategoriye aittir ve birçok çalışma, bu kategoriyi referans alarak tümörlerde derecelendirme, evreleştirme, prognoz ve tedavi protokolleri ortaya koyarak yapılmıştır. Bu iki büyük tümör tip aynı anda prostatta görülmektedir, bunlar aynı neoplazmlarda kombine özellikler taşıyan nadir tümörlerdir (Rosai, 2004).

Periferal duktus ve asinilerin adenokarsinomu: Prostatik karsinomların genelde posterior lobda görüldüğü sıklıkla vurgulanmaktadır. Bu lobun sınırlarının değişik olmasından dolayı, bu yaklaşım esas olarak doğrudur. Bundan daha önemli bir gerçek ise; prostatik karsinomların esas olarak periferal zondan posterior, lateral veya anterior olarak hastalığın geç dönemleri hariç periüretral bölümleri kapsayacak şekilde çıkmasıdır (Walsh, 2002).

Bütün olarak tümörün görülmesi zor olabilir, ancak genellikle gri veya sarımsı renkte, düzensiz sınırlı, sert kitle şeklindedir (Michael, 2002).

Mikroskobik olarak, prostatik adenokarsinom geniş bir spektruma sahip olup anaplastik tümörden, normal prostatik glanddan zor ayrımı yapılabilen iyi diferansiye neoplazmlara kadar uzanabilir. 4 büyük yapısal patern vardır. Bunlar; orta büyüklükte

glandlar, küçük glandlar, diffüz tek hücre şeklinde infiltrasyon ve kribriform paterndir (Rosai, 2004). Bunlara ek olarak son yıllarda ortaya konulan bir başka tip ise; glomeruloid paterndir.

Atrofik prostatı taklit eden veya benin hiperplastik glandlara benzeyen iki zıt tümör tipi tehlikeli değişik kanser varyasyonlarıdır. İlki, atrofik değişikliklere sahip prostatik adenokarsinom olarak tanımlanır. Bu tümör, belirgin sitoplazmalı ve iri nükleuslü hücrelerden oluşmaktadır. Bu hücreler malindir, çünkü infiltratif büyüme paterni, nükleer genişleme, makronükleol göstermektedir. Çevrede sıradan karsinom izlenmektedir. İkinci varyant, psödohiperplastik prostatik adenokarsinom olarak adlandırılmıştır. Glandlar, benin glandları taklit eder, papiller yapı içerip dallanmalar gösterirler. Nükleer genişleme, makronükleol, mitoz, intraluminal kristaloid mevcudiyeti ve bazen çevrede PIN varlığı lezyonun tanımlanmasını sağlar. Bu paternler sıklıkla kombinasyon şeklinde görülürler. Bilinmesi gereken, ister tek bir patern isterse de kombinasyon şeklinde paterne sahip tümörde Gleason skorlama sisteminin uygulanmasıdır.

Büyük duktusların karsinomu (primer): Normalde periüretral lokalizasyonda bulunan büyük duktuslardan köken alan prostatik karsinom grubudur. Sistoskopik olarak polipoid villöz veya infiltratif üretral komponentlerdir (Rosai, 2004).

2.2.6. Tanı

Prostat epitelinde rutin olarak 2 tane demonstratif belirleyici vardır, bunlardan biri PAP diğeri PSA'dır (Fink ve Galen 1978; Michael ve Pins, 2002). Poliklonal veya monoklonaldırlar. Benin ve malin lezyonları ayırmada yararlı değildir ancak metastatik tümörlerde tümörün prostat orijinli olduğunu gösterir (Walsh, 2002). Aynı zamanda indiferansiye vakalarda da pozitiftir. Ayrıca hormon terapisi alan vakaların takibinde de önemlidir (Sternberg ve ark., 1999). Bu belirleyiciler, kötü diferansiye prostatik karsinom ve transisyonel hücreli karsinomun ayırıcı tanısında *34βE12, Leu7, CK7 ve p53* ile beraber kullanıldıklarında yararlıdır (Wojno ve Epstein 1995; Rosai, 2004). PSA düzeyinin ölçülmesi; elle yapılan muayene, ultrason, röntgen, prostattan parça alarak prostat kanseri tanısı yapılır. PSA, prostatta üretilen bir madde olduğundan bunun kanda olması gereken miktardan fazla olması tanı konmasında önemlidir. Normal değer **4 ng/dl** ve daha düşük olmalıdır. Prostat kanserinin tespiti için PSA en sık kullanılan

belirteç olmakla birlikte özgüllüğü düşüktür. Prostat kanseri tanısında yeni belirteçler bulmak için çok sayıda araştırma yapılmaktadır.

Prostattan alınan biyopsi örneğine histopatolojik olarak mikroskobik olarak inceleme sonucu kanser tanısı konabilir. Ayrıca bizim yaptığımız gibi prostat / kanseri markırları (kanser belirteçleri) ile yapılan moleküler genetik çalışmalar neticesinde de kesin olarak bireyin kanser olduğu tesbit edilebilmektedir.

Çizelge 2.1. Yaşa bağlı olarak gelişen PSA değerleri

60 yaş üzeri kişilerde risk

PRM	PSA (ng/ml)	
	4-10	10 üstü
NORMAL	Düşük	Orta
ANORMAL	Yüksek	Yüksek

60 yaş altı kişilerde risk

PRM	PSA (ng/ml)		
	0-2,5	2,5-4	4 üstü
NORMAL	Düşük	Orta	Orta
ANORMAL	Yüksek	Yüksek	Yüksek

Gleason skoru 2 ile 4 arası olan tümörler normal hücrelere çok benzeyen ve yavaş büyüyen hücrelerden oluşur. Gleason skoru 7 olanların prognozu göreceli olarak daha kötüdür. 8 ile 10 arası skor verilen tümörler ise daha kötü seyirli olanlardır.

Diğer bir prostat ile ilişkili belirleyici ise prostat spesifik membran antijendir (PSMA). Bu membran bağlayıcı glikoprotein tüm prostat adenokarsinom tiplerinden eksprese edilir. Bu ekspresyon benin epitelden itibaren artmaya başlayıp yüksek derece PIN ve adenokarsinoma kadar artış devam eder (Wojno ve Walsh, 2002; Rosai, 2004).

Prostatik karsinomlar için yüksek hassasiyet ve özgünlük değerine sahip bir başka belirleyici ise P504S, sitoplazmik proteindir. Tümör farklılaşmasıyla ilgilidir, her zaman karsinomda bulunmaz, atipik adenomatöz hiperplazi ve PIN'larda da izlenebilir. İğne biyopsilerindeki küçük karsinom odaklarının belirlenmesinde, psödohiperplastik ve köpüklü hücreli gland tümörleri gibi zor tümör tiplerinin tanımlanmasında önem taşır (Rosai, 2004).

Prostatik karsinom hücreleri genelde androjen ve progesteron reseptörleri ile pozitif boyanırken daha az oranda östrojen reseptörü pozitiftir. *Her-2-neu* proteini

androjene bağlı prostat kanserlerinde, meme karsinomlarındakine benzer şekilde salgılanmaktadır (Wojno ve Walsh, 2002).

Prostat kanseri hücreleri düşük moleküler ağırlıklı keratin ile pozitif reaktivite verir. Ürotelial karsinomların tersine *CK7* ve *CK20* ile daha nadir pozitif reaksiyon verir. *Leu7, EMA, catepsin D, glikoprotein A-80, PTH-ilişkili protein, gastrik asit proteinase, gasricsin* ile de pozitif boyanır (Rosai, 2004). *34βE12*, yüksek moleküllü keratin olarak bilinir, prostat bezlerinin bazal hücrelerinde boyanır, tanıda yardımcıdır (Sternberg ve ark., 1999; Wojno ve Walsh, 2002). Benin glandlarda mevcuttur adenokarsinomlarda yoktur (Wojno ve Epstein, 1995; Tolunay, 1999).

Prostat adenokarsinomları, normal prostat dokusu ile karşılaştırıldığında *E-cadherin* ve diğer hücre adezyon proteinleri *catenin/E-cadherin* kompleksleri prostat karsinomlarında normal prostat dokusuna göre azalmış miktarda salgılanmaktadır (Rosai, 1994; Soler ve ark., 1997). Karsinomlarda, immünoreaktivitenin derecesi, *Gleason grade* ile belirlenen diferansiasyon derecesi ile ilişkilidir (Walsh, 2002; Rosai, 2004).

2.2.7. Tedavi

Prostat kanseri tedavileri kapsamında prostat bezinin çıkarılması, hormon tedavisi ve radyoterapi yer alır. Bu tedavilerin hepsinde başta cinsel isteğin kaybedilmesi, ereksiyon olamama ve ereksiyonu sürdürememe, idrarını tutamama olmak üzere çeşitli yan etki riskleri mevcuttur. Bu riskler nedeniyle, pek çok erkek hastalıklarının izlenmesini ve ancak mecbur kalındığında tedavi uygulanmasını tercih eder. Erken tanı konması ve erken evrelerinde tedavi uygulanması halinde, yakındaki kemiklere sıçramamış olması şartıyla prostat kanseri tedavi edilebilir. Ancak yukarıda anlatılan tedavilerin yanı sıra; dışarıdan ışın tedavisi (perkutane radyoterapi), içerden ışın tedavisi (brakiterapi) ve kemoterapi gibi tedavi yöntemleri de kullanılmaktadır (Prostatakrebs**,** 2010).

Dışardan ışın tedavisi; 7-8 hafta boyunca haftada 5 tedavi verilerek yapılır. Her tedavi yaklaşık 10 dakika sürer. Dışarıdan ışın tedavisi gören hastanın, hastaneye yatırılması söz konusu olmaz. İçeriden ışın tedavisi; hastanede küçük radyoaktif misketçiklerin (radioaktive "korn") prostat içine yerleştirilmesi ile gerçekleştirilir. Misketçikler prostata yerleştirilir ve radyoaktif etkisi zamanla ortadan kalkar.

Dışardan ışın tedavisinin yan etkileri; dışarıdan ışın tedavisi, idrar torbası iltihabı ile aynı belirtileri verebilir. Yani; sık sık idrara çıkma, idrar boşaltma esnasında yanma gibi. Bu belirtiler genellikle tedavi tamamlanınca ortadan kalkar. Işın tedavisi bazı erkeklerde idrar torbasını küçültür ve bu hastalar eskisine göre daha sık işerler. Çoğu erkekte sık sık ishal ve bağırsakların tam boşalamadığı görülür. Bazı erkekler hayatları boyunca bu problemler ile yaşamak zorunda kalır. Dışarıdan ışın tedavisi, ereksiyon (sertleşme) problemleri riskini de arttırır. Ereksiyon problemleri ilk yıllardan itibaren başlayarak yavaş yavaş ortaya çıkar ve bir daha ortadan kalkmaz. Bazı erkekler ilaçlardan yardım görebilir (Holten ve Smith, 2008) .

2. 3. Kanserin moleküler gelişimi ve metabolik yolak

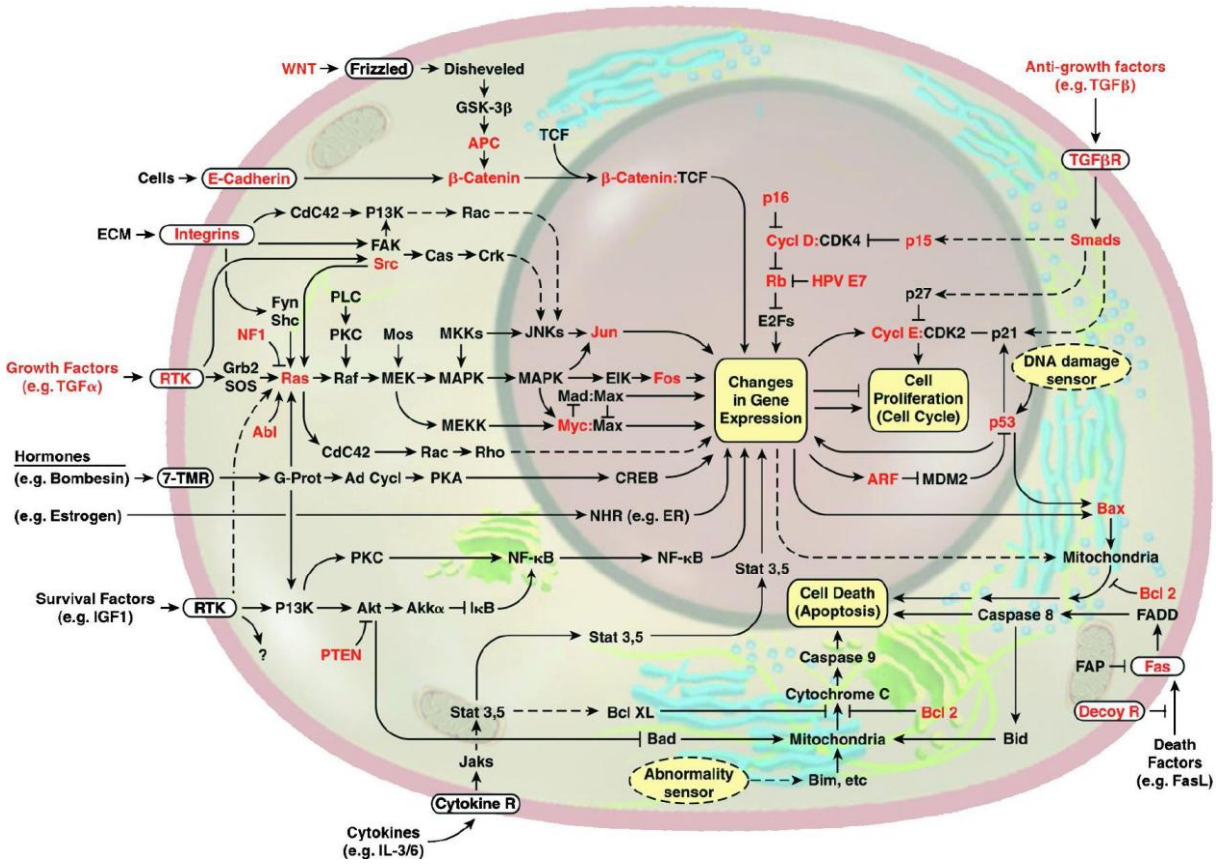
Kanserin temel özelliklerinden biri klonalite olmasıdır (tek hücreden çoğalma). Birçok tümörün tek hücreden türediği X kromozomu inaktivasyonu ile gösterilmiştir. Dişi hücrelerde X kromozomunun biri embriyo gelişimi sırasında rastlantısal olarak heterokromatine dönüşerek inaktifleşir. X kromozomundaki genlerden biri için heterozigot olan dişilerde farklı hücrelerde farklı alleler anlatım yapar. Normal doku farklı inaktif X kromozomlarını taşıyan hücrelerin karışımından oluştuğu için heterozigot dişilerin normal dokusunda iki allelin de anlatımı görülür. Tümör dokusunda ise heterozigot X kromozomu genlerinden sadece bir tanesinin anlatım yaptığı görülür. Bu, X inaktivasyonunun tümör gelişmeden önce tamamlandığını ve söz konusu tümörü oluşturan hücrelerin hepsinin aynı hücreden türevlendiğini gösterir.

Kanser hücresi birbirini izleyen değişiklikler sonucu oluştuğundan pek çok kanser türü ileri yaşlarda ortaya çıkar. Kanserin görülme sıklığının yaşla birlikte artması birçok kanser türünün yıllar boyunca biriken çok sayıda anomalinin sonucu olduğunu düşündürür. Hücresel düzeyde kanserin gelişimi mutasyonları içeren çok aşamalı bir süreç sonunda çoğalma, canlı kalma, istila ve yayılma yetenekleri artan hücrelerin seçilmesi şeklinde ortaya çıkar. Metabolik olarak kanser gelişimi genel olarak şu şekilde meydana gelir:

1) Tümör başlangıcı: Bir tek hücrenin çoğalmasına neden olan genetik değişikliğin (mutasyon) sonucu meydana gelir.

2) Tümör ilerlemesi: Hücre çoğalmasına paralel olarak tümör hücrelerinden oluşan hücre topluluğu da giderek büyür ve bu topluluktaki diğer hücrelerde de mutasyonlar gelişir. Bazı mutasyonlar hücreye daha hızlı çoğalma gibi avantajlar kazandırır ve tümör

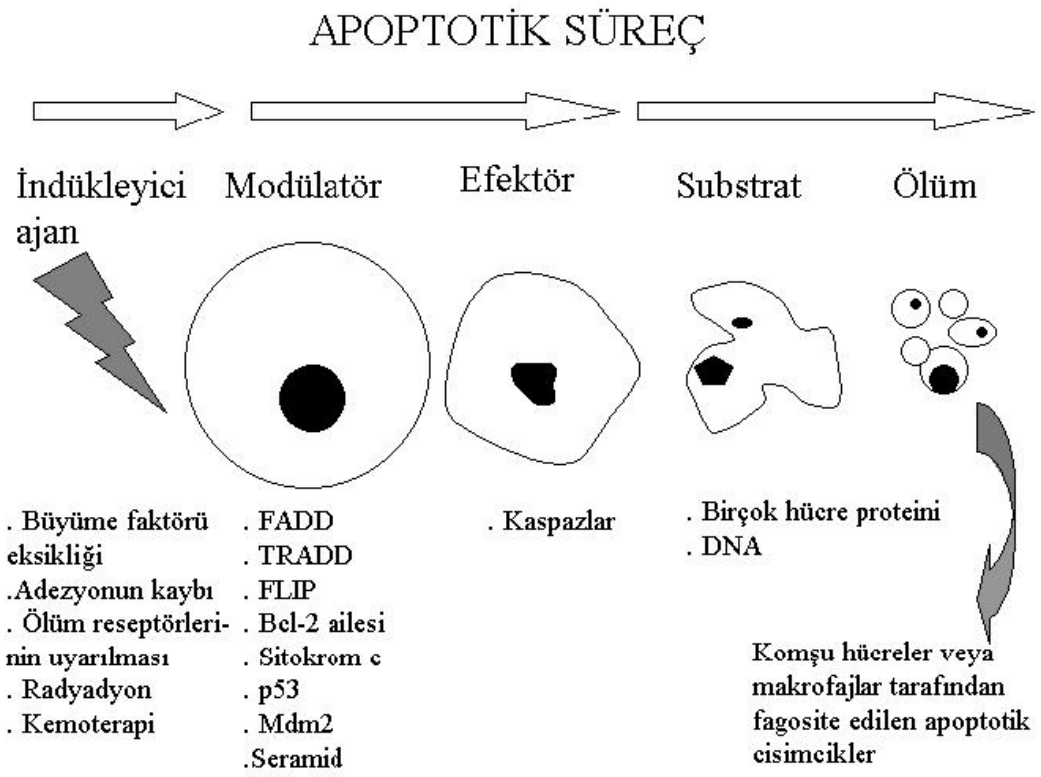
klonu içerisinde baskın hale geçerler. Bu hücrelerin bazılarının da hızlı çoğalma, invazyon, yayılma gibi özellikleri kazanmasıyla avantajlı yeni bir hücre klonu ortaya çıktığından bu işleme **klonal seçilim** adı verilir. Klonal seçilim tümör gelişimi boyunca devam eder ve tümörler bu nedenle giderek daha hızlı çoğalarak **malin** özellik kazanırlar.



Şekil 2.2. Moleküler kanser yolakları

2. 4. Apoptozis

Apoptozis; gelişmiş organizmalarda hücreler arası ilişkilerin gereği olarak gereksinim duyulmayan, fonksiyonları bozulan, biyolojik görevini tamamlamış veya hasarlanmış hücrelerin çevreye zarar vermeden ortadan kaldırılmasını sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür (Derici, 2007).



Şekil 2.3. Apoptozisin genel görünümü

Bu olay embriyolojik gelişim ve erişkin dokunun yaşamının sürdürülmesinde anahtar rol oynar (Akşit ve Bildik, 2008).

Apopitoz, klasik hücre ölüm şekli olarak bilinen nekrozdan birçok özelliği açısından oldukça farklı bir programlanmış hücre ölümüdür (Ulukaya, 2003). Her saniye yaklaşık bir milyon hücremiz apopitozla vücuttan uzaklaştırılarak yerine yenileri yapılmaktadır (Derici, 2007).

Apoptozis organizmada proliferasyonla (bir diğer anlamda hücre siklusuyla) bir denge halinde birçok dokuda (örneğin deri, ince barsak, kan) doğal olarak oluşur. Şu anda bu paragrafı okurken bile milyonlarca hücremiz apoptozis yoluyla ölmektedir. Fakat buna karşılık olarak milyonlarcası da mitozis yoluyla tekrar yapılmaktadır. Sonuçta, dokunun hücresel içeriği sayısal olarak hep aynı kalır. Böylece doku homeostazisi yani yeniden yapım ve yıkımın bir uygunluk içinde oluşu apoptozis/proliferasyon dengesinin sağlıklı bir şekilde sürdürülmesine bağlıdır. Son yıllarda, bu dengenin bozulmasının birçok önemli hastalığın patogenezinde rol aldığı gözlenmiştir. Örneğin, bu dengenin apoptozisin hızlanmasına yol açacak biçimde bozulmasının Alzheimer hastalığı gibi bazı nörodejeneratif hastalıkların veya AIDS'in

patogenezinde, apoptozisin baskılanmasına yol açacak şekilde bozulmasının ise karsinogenezisde rol aldığı düşünülmektedir.

Hücrenin bu süreci enerji gerektirmektedir. Enerji gereksinimi apoptozisi nekrozisten ayıran önemli bir farktır. Araştırma sonuçlarına göre ATP'nin hücre içi düzeyinin de hücre ölüm şeklinin seçiminde belirleyici bir rol üstlendiğini göstermektedir (Hetts, 1998). Deneysel çalışmalarda, ATP bulunan ortamlarda seçilen hücre ölüm şekli apoptozis olurken; ATP yoksunluğu olan ortamlarda hücre ölümü daha çok nekrozis şeklinde gerçekleşmektedir.

Deneysel verilere dayanarak; apoptozisin son evresinde çekirdek kondensasyonu (yoğunlaşması) ve DNA yıkımı için, glikoliz ve mitokondrial solunum ile ATP sağlanmasının gerekli olduğu ileri sürülmüştür. ATP, apoptozisin geç dönemlerinde harekete geçen bazı özel kaspazların aktivasyonunda da önemli bir etmendir (Kerr ve ark., 1972; Hetts, 1998; Amore ve Coppo, 2000; Tunalı, 2002).

Ayrıca apoptozis; hücre küçülmesi, kromatin yoğunlaşması, çekirdek içinde bulunan DNA'nın bozulması ve sonunda hücrenin "apoptotik cisim" adı verilen parçacıklara ayrılması özellikleriyle de nekrozisten ayırt edilmektedir (Gözüaçık, 2011**).**

Apoptozisin hızının bozulduğu, yani yavaşladığı veya arttığı şartlarda çeşitli hastalıklar ortaya çıkmaktadır (Demirol, 2008). Apoptozis mekanizmasının tetiklenememesi veya mekanizmanın herhangi bir basamağında meydana gelen değişikliklerin tümör gelişimine katkıda bulunduğu da yapılan deneysel çalışmalarla ispatlanmıştır (Akşit ve Bildik, 2008; Derici, 2007).

İnsan hücrelerinde apoptozisi sağlayan genlerin belirlenmesi, *Caenorhabditis elegans* nematodundaki *CED* genlerinin tanımlanmasına bağlı olmuştur.

Bu gen ailesinin üyelerinden *CED- 9* insanda apoptozisi baskılayan *BCL- 2* geni ile *CED- 4* kaspaz aktifleşmesine olanak sağlayan *APAF- 1* geni ile ve *CED- 3* ise; memeli hücrelerinde hücre ölümünü sağlayan proteazlar olan kaspazlar ile homologdur.

CED genlerinden; *CED- 3* ve *CED- 4* genlerinin ürünleri apoptozis için gerekli iken, *CED- 9* bu genleri inhibe ederek apotozise engel olmaktadır. *CED- 3* sistein içeren bir aspartil proteaz, yani bir kaspazdır.

Bu enzim, DNA tamir enzimleri, çekirdek zarı komponentleri ve apoptotik hücredeki DNA'nın yıkımından sorumlu endonükleazlar gibi birçok hücresel proteini aktive etmektedir.

2.4.1. Apoptozis süreci

Apoptozis süreci;

- DNA hasarına genlerin yanıtı,
- Hücre membranı tarafından ölüm sinyallerinin alınması (Fas ligandı),
- Hücreye doğrudan proteolitik enzim girişi (granzim) olmak üzere üç farklı şekilde işleyebilir.

Diğer taraftan birçok hormonun apoptozis sürecini artırdığı veya azalttığı bilinmektedir. Apopitoz sürecinde belli başlı üç anahtar bileşen vardır. Bunlar;

- Bcl- 2 ailesi proteinleri,
- **Kaspazlar**
- APAF-1 (Apoptotic Protease Activating Factor-1) proteinidir.

Bu bileşenler;

- Biyokimyasal aktivasyon,
- Apoptoziste gözlenen mitokondriyal hasar,
- Çekirdek zarı kırılması,
- DNA fragmentasyonu,
- Kromatin yoğunlaşması,
- Apoptotik cisimlerin şekillenmesi gibi morfolojik değişikliklerden sorumludur.

Apoptozisin özet olarak belli başlı aşamaları;

- Apoptozisin indüksiyonu
- Hücre yüzey ölüm reseptörlerinin uyarılması
- *Sitokrom c*'nin salıverilmesi
- Apoptozom oluşumu (*sitokrom c*+*Apaf–1*+kaspaz–9)
- Mitokondrial transmembran potansiyelin değişmesi
- Kaspazların aktivasyonu
- Fosfatidilserinin hücre membranının iç yüzünden dış yüze transloke olması
- DNaz'ın aktivasyonu sonucu DNA'nın fragmentasyonu (internukleozomal DNA fragmentasyonu)
- Yapısal proteinlerin yıkılmasına bağlı olarak apoptozise özgü morfolojik değişikliklerin meydana gelmesi olarak bilinmektedir (Ulukaya, 2003).

2. 5. Nekroz

Nekroz, bir veya daha fazla sayıda hücrenin, dokunun ya da organın geri dönüşemez şekilde hasar görmesi sonucu görülen patolojik ölümdür. Örneğin; bir yanık durumunda aşırı ısıya maruz kalan vücut parçası nekroza uğrayıp cansız doku haline gelebilir. Diğer sebepler; yaralanma, enfeksiyon, kanser, enfarktüs, zehirlenme ve enflamasyon olabilir.

2. 6. Apopitoz ve Nekroz Arasındaki Farklar

Nekroz fizyolojik bir ölüm şekli olmamasına rağmen apopitoz hem fizyolojik hem de patolojik şartlar altında meydana gelebilir. Diğer bir ifadeyle apopitoz hem sağlıkta hem de hastalıkta karşımıza çıkmaktadır. Apopitoz morfolojik olarak özgündür. Nekrozda hücre içine aşırı sıvı girmesi sonucu hücre şişerken, apoptotik hücre tam tersine küçülür (cell shrinkage). Nekrozda kromatin şekli hemen hemen normal hücredeki görüntüye benzerdir ama apoptotik hücrenin kromatini nükleus membranının çevresinde toplanır (kromatin agregasyonu) ve kondanse olur. Nekrotik hücrenin plazma membranı bütünlüğünü kaybeder ve hücre içinden dışına hücre içi materyallerinin çıkışı gerçekleşir. Oysa apoptotik hücre membranı intaktır ve üzerinde küçük cepcikler (membrane blebs) oluşur. Nekrotik hücre sonra lizise uğrar ama apoptotik hücre küçük cisimciklere parçalanır. Apoptotik cisimcikler membranla kaplıdır değişen miktarlarda nükleus veya diğer hücre içi yapılar içerirler. Nekrozda plazma membranının bütünlüğünün bozularak hasarlanması nedeniyle hücre içeriğinin dış ortama salıverilmesi sonucu inflamasyon uyarılır. Oysa apopitozda apoptotik hücre veya cisimcikler plazma membranı hasarlanmadan komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edildiklerinden inflamasyon oluşmaz (Çizelge 2.2) (Proskuryakov ve ark., 2003).

Çizelge 2.2. Apoptozis ve nekrozis arasındaki farklar

ÖZELLİK	NEKROZ	APOPTOZ
Yol açan nedenler	İskemi Hipertermi Hipoksi Litik viral enfeksiyon Toksik maddelerin yüksek konsantrasyonları Şiddetli oksidatif stres	Büyüme faktörü eksikliği Hücre yaşlanması HIV Kanser ilaçları Radyasyon Yüksek doz glukokortikoid Fas veya TNFR-1 reseptörlerinin aktivasyonu Sitotoksik T lenfositler Çok şiddetli olmayan oksidatif stres
Morfolojik özellikler	Hücre membran bütünlüğünün kaybı Hücre şişmesi Organellerin disintegrasyonu Endoplazmik retikulumun dilatasyonu Büyük vakuollerin oluşumu Hücre lizisi	İntakt hücre membranı, membranda cepciklerin oluşumu Kromatinin nükleer membran civarında toplanması ve yoğunlaşması Hücre küçülmesi Hücrenin intakt mitokondri, ribozom, nükleus parçaları ve diğer organelleri içeren membranla kaplı apoptotik cisimciklere parçalanması

Biyokimyasal özellikler	Bozulmuş iyon hemostazisi ATP gerekmez (pasif süreç) +4°C'de gerçekleşebilir. DNA rasgele parçalanır (agaroz jel elektroforezinde "smear" görüntüsü) Postlitik DNA fragmentasyonu (ölümün geç safhasında)	İyi kontrollü, bazı aktivasyonların ve enzimatik basamakların olması ATP gereklidir (aktif süreç) +4°C'de gerçekleşmez DNA internükleozomal alanlarda 180 kb çiftinin katları olacak şekilde kırılır mono ve oligonükleozomlara ayrılır (agaroz jel elektroforezinde merdiven paterni) Prelitik DNA fragmentasyonu (erken evrede gerçekleşir)
Diğer özellikler	Hücreler gruplar halinde ölür Fizyolojik olmayan (patolojik) etkiler sonucu gerçekleşir. Lizozomal enzimler salınır İnflamasyona neden olur.	Hücreler tek tek veya birkaçı bir arada ölür. Fizyolojik şartlarda da gerçekleşebilir. Komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edilirler. İnflamasyon görülmez.

Apoptotik hücrelerdeki endonükleaz aktivasyonu kromatinin oligonükleozomal parçacıklara ayrılmasına neden olur. Bu enzim kalsiyum ve magnezyum bağımlı olup, DNA'da tipik olarak 180-200 baz çifti ve katları biçiminde bir parçalanmaya yol açar. Bu parçalanma paterni, agoroz jel elektroforezinde merdiven biçiminde "ladder pattern"

izlenir ve apopotoz için tipiktir (Agaroz jel elektroforez güvenilir sonuçlar veren kalitatif bir analiz yöntemidir).

2. 7. Apoptozis ve Kanser

Apopitoz/proliferasyon dengesindeki bozulma tümör gelişiminde rol oynamaktadır. Apopitoz mekanizmasının tetiklenememesi (*p53* gen defektleri) veya mekanizmanın herhangi bir basamağında meydana gelen değişiklik (*Bcl–2*'nin artışı, *Fas* gen kusurları gibi) tümör gelişiminde rol almaktadır. Ayrıca tümör hücrelerinin doğal immün mekanizmalarla ortadan kaldırılamamasının da tümör gelişiminde özellikle de tümör hücrelerinin yayılımında önemli olduğu düşünülmektedir. Genellikle tümör hücreleri sitotoksik T lenfositler veya doğal katil hücreler tarafından *Fas/FasL* bağımlı apopitoz yoluyla ortadan kaldırılır. Fakat tümör hücrelerinin, tam ters bir biçimde immün sistemden kaçabildiği de bilinmektedir (Lozano ve Elledge, 2000; Derici, 2007). Malin hücrelerin, konak immünitesinden kaçışı ve sitotoksik immün sistem hücrelerinin tümör hücreleri tarafından ortadan kaldırılması kanser gelişimi ve progresyonu açısından çok önemlidir.

Bu olgularda tümör hücrelerinin, ölüm faktörü üreterek (*FasL*) sitotoksik T lenfositlerde ve *NK* hücrelerde apopitozu başlattığı düşünülmektedir. Tümör hücrelerinin apopitoza rezistans geliştirmesinin sebebi olarak sitoplazmik membranda *FasL* artışı ve *Fas* reseptör düzeyinde azalmanın yanında, başka potansiyel mekanizmalar da tanımlanmıştır. Bunlardan biri de gen defektleridir. Apopitozla ilişkili proteinlerin ekspresyonlarının ya da mutasyonlarının değerlendirilmesi tedaviye yanıtı ve/veya yaşam süresini tahmin ettirebilir. Kanser hücreleri, apopitoz karşıtı olan *Bcl–2*, *c–myc* gibi sağkalım genlerini aşırı derecede eksprese ederek ölümden sorumlu genleri baskılarlar (Carr, 2000). *Survivin* ve *Bcl–2* proteinlerinin aşırı ekspresyonları tümör prognozu ile ilişkilendirilmiştir. *Survivin*'in aşırı ekspresyon düzeyleri nöroblastom ve kolon kanserlerinde ileri evre ve kötü prognozla ilişkilidir. Bazı B hücre lösemileri ve lenfomaları, prostat tümörleri ve nöroblastomlarda *Bcl–2* proteinini aşırı düzeyde eksprese ederler. Alınması gereken ölüm sinyalleri de böylece önlenir (Curtin ve Cotter, 2003; Jaattela, 2004; Derici, 2007).

2. 8. Hücre Siklusu ve Apoptozisin Prostat Kanserlerindeki Önemi

Malin hastalıklar, klasik olarak kontrolsüz aşırı hücre proliferasyonunun olduğu hastalıklar olarak bilinir. Oysa aşırı proliferasyonun yanında azalmış apoptotik hücre ölüm hızının da malinite gelişimine katkıda bulunduğu görülmüştür. Zamanı geldiğinde normal olarak apoptozise gidemeyen ve bundan dolayı beklenenden daha uzun süre yaşayan hücreler, genomlarında mutasyonların sona ermesiyle malin hücrelere dönüşme potansiyeli taşırlar (Ulukaya, 2003).

Her saniyede yaklaşık bir milyon hücre apoptozisle vücuttan uzaklaştırılmaktadır. Bunların yerine yenileri yapılmaktadır. Yapım (mitozis) ile yıkım (apoptozis) arasında kontrollü bir denge vardır. İşte bu dengenin apoptozisin lehine veya aleyhine bozulması birçok önemli hastalığın patogenezine katkıda bulunur. Apoptozisin yavaşladığı durumların; diğer birçok kanser türünde olduğu gibi prostat kanser oluşumuna da etkisi olduğu yapılan çalışmalarda görülmektedir.

Hücre populasyon dinamiğinde, karşılıklı olgu olarak apoptozis ve kanser ile sık sık karşılaşılabilmektedir. Azalmış apoptozis, otoimmün hastalıklar ve birçok kanser için karakteristiktir. ROS ve ürünlerinin kanserde anahtar rol oynadığı ve oksidatif hasarın apoptozisin başlatılmasında etkili olduğu bildirilmiştir. Böylece ROS ürünleri, oksidatif hasar ve apoptozisin birbirleriyle güçlü ilişkileri vardır (Wei ve ark., 2001; Kosova ve Arı, 2011).

Hücre çoğalması lehine apoptotik kontrol kaybı, prostat kanseri başlangıcı ve ilerlemesinden sorumlu olabilir (Motta ve ark., 2009).

Prostat kanseri D vitamin yetersizliği ve güneş ışınlarından az yararlanmayla ilişkilendirilmektedir. Vitaminin 1,25(OH)2D3 yapısı prostat hücre proliferasyonunu inhibe eder. Antikanser aktivitesini hücreleri G1/G0 fazında yakalayarak ve apoptozisi arttırarak yapar. Ayrıca onkogenleri ve tümör baskılayıcı genlerini regüle eder ve hastalığın dağılımı ile yayılmasını inhibe eder (Tuncer, 2009).

Çinko'nun, hücre siklusundaki G2/M fazında hücre siklus duraklamasının indüksiyonu ve apoptozisi yoluyla insan prostat kanser hücre büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir (Liang ve ark., 1999; Divrik, 2005).

Tümör oluşumu genel olarak organizmanın çok basamaklı kontrol sisteminin kapanmasıyla gerçekleşir. En tanınmış tümör baskılayıcı geni *p53*, hücre siklusunda görev alan bir transkripsiyon faktördür. Tümörlerin yarıdan fazlasında *p53* geninde

mutasyon gösterilmiştir (Hollstein ve ark., 1991). Mutasyonu takiben yabani tip *p53*'te hem bir fonksiyon kaybı hem de yeni bir onkojenik özellik kazanmış protein olarak değişmiş bir fonksiyon kazanımı karşımıza çıkabilmektedir (Roemer, 1999). *p53* çok fonksiyonlu ve nükleik protein olarak stres altında olmayan hücrede çok düşük konsantrasyonlarda inaktif olarak bulunur. Görev olarak hücre fonksiyon ve siklusunun idamesinin kontrolünde merkezi bir role sahiptir. *p53* geni DNA-hasarı (Nelson ve Kastan, 1994), hipoksi (Graeber ve ark., 1996), ışın tedavisi (Lowe ve Ruley, 1993) ve ısı şoku (Vogelstein ve ark., 2000; Vousden, 2002) gibi pek çok genotoksik stres faktörü aracılığıyla aktive edilir. Bu aktivasyon hücre içinde *p53*-konsantrasyonunda sürekli bir yükselişe ve transkripsiyon faktör olarak *p53*'te bir indüksiyona sebep olur. *p53* hücre siklusunun durdurulması veya apoptozis aracılığıyla büyümenin inhibisyonu gibi değişik hücresel reaksiyonlara katılır (Karakuş, 2010).

2. 9. Kaspazların Apoptozis ile İlişkisi

Son yıllarda yürütülen araştırmalar neticesinde, apoptozisten sorumlu moleküler mekanizmalar açıklığa kavuşmuştur. Bu çalışmalar sonucunda, kaspaz adı verilen intrasellüler proteazların; apoptozisin gerek direkt, gerekse indirekt morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerinden sorumlu olduğu ortaya konulmuştur (Yüksel ve ark., 2008).

Apoptoziste, kaspazların fonksiyonu apoptotik sinyallerle aktive olmak (efektör) ve apoptotik süreci başlatmada bu aktifliğe cevap olarak proapoptotik (apopitozu uyarıcı) sinyaller (initiatör) üretmektir.

2. 10. Kaspazlar (Cystein-dependent Aspartate Spesific Proteases)

Kaspaz adı; enzimin katalitik aktivitesinden kaynaklanmaktadır ve bu bir grup enzim aktif merkezlerinde sistein yer aldığından sistein proteazlar olarak da adlandırılmaktadır.

Hücre sitoplazmasında inaktif prekürsörler (zimojen) olarak bulunurlar, fakat farklı süreçlerle aktif hale getirilirler; bu süreçler çoğu kez zimojenlerin ön bölgelerinin belirli bölgelerden kesilmesini sağlamaktadır.

Ayrıca bu süreçler; birçok hücre tipinde, çeşitli apoptotik uyarıcılara yanıtta, büyüme faktörü iptalinin gerçekleşmesinde, sitotoksik ilaç veya ölümcül reseptör ligand tedavisinde ve antijen reseptör bağlanması sırasında oluşur.

Kaspazlar; apoptozis sırasında birbirlerini aktifleştirerek proteolitik bir kaskad (şelale tarzı reaksiyon dizisi)'a neden olurlar.

Hedef proteinleri aspartat rezidülerinden sonraki peptid bağını kırarak parçalarlar.

Hücre ölümünde rol alan çok sayıda molekül kaspazlar tarafından yönlendirilirler. Örneğin; apoptozis sırasında özgün ve sistematik biçimde DNA parçalanmasını sağlayan nükleazları kaspazlar aktive eder (Tunalı, 2002).

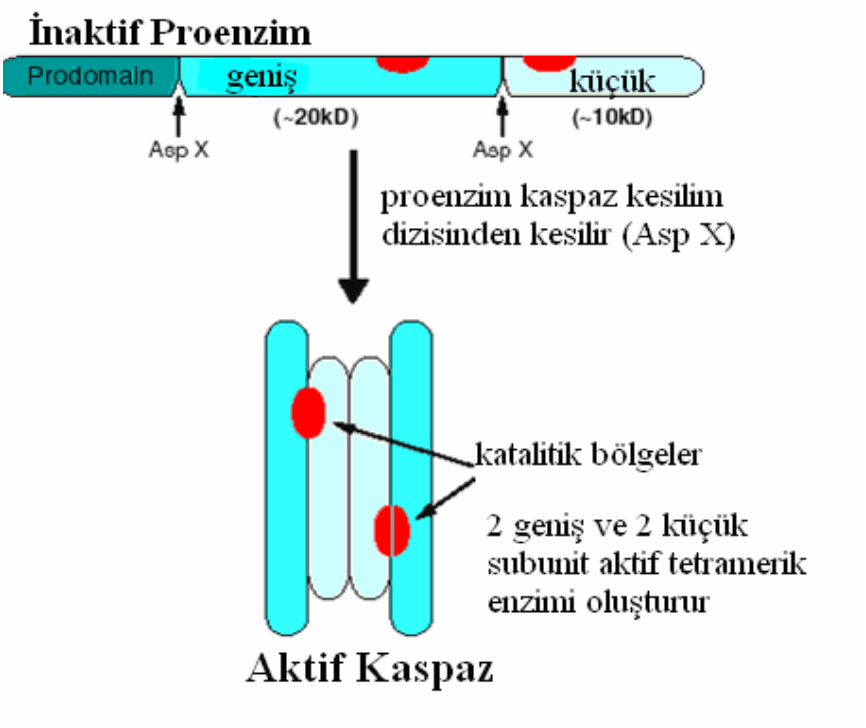
Apoptotik hücre ölümü, proinflamatuvar sitokin olgunlaşması gibi hücre ölümünün birçok formunda ve hücre farklılaşmasında önemli roller oynamaktadırlar.

Kaspazlar; yapı ve özgün substrat bakımından aminoasit dizileri ile benzer özellikler taşımaktadırlar ve tümü tanımlanmış proenzimlerdeki (30- 50 kD) gibi 3 bölge içerir.

Bunlardan biri; NH_2- terminal bölgesidir. Bu kısım; hücre bölünme bölgesinde en az dört aminoasit tanıyan ve bu etkili kataliz için gerekli tüm şartları sağlayan, tetrapeptid tanıma motifi ile kaspazlar arasında önemli bir şekilde fark yaratan ve onların biyolojik fonksiyonlarının çeşitliliğini açıklayan bir bölgedir.

Diğer iki bölgeyi ise; büyük bir alt birim (yaklaşık 20 kDa) ve küçük bir alt birim (yaklaşık 10 kDa) oluşturmaktadır.

Kaspazlar aktive edildikten sonra ise, NH_2- terminal bölgesi ile birlikte iki büyük ve iki küçük alt birimin oluşturduğu bir heterotetramer yapısından meydana gelmektedirler.



Şekil 2.4. Aktif kaspazın yapısı (Antar, 2005)

İlk bulunan kaspaz *ICE* (interlukin 1- [beta] Converting Enzyme)'dir. Sonradan bu enzim prokaspaz-1 olarak adlandırılmış olup aktif haline ise kaspaz- 1 denilmektedir. Fakat kaspaz- 1'in inflamatuvar bir kaspaz olması nedeni ile hücre ölümünde açık bir rolü yoktur.

Şimdiye kadar memeli hücrelerinde; 12 tanesi insan enzimlerinde bulunan toplamda 14 tane kaspaz tanımlanmıştır.

2.10.1. Kaspazların filogenetik olarak sınıflandırılması

Filogenetik olarak kaspaz 4, 5, 11, 12, 13 ve 14; kaspaz-1 altfamilyasına mensuplardır. Kaspaz-2; kaspaz- 9'a dizi bazında en yakın olan kaspaz üyesidir fakat filogenetik olarak gruplandırıldığında tek başınadır. Kaspaz 3, 6, 7, 8, 9 ve 10 ise; kaspaz-3 altfamilyasına mensuplardır. Alternatif sınıflandırmalar ise; kaspazın sahip olduğu ön bölgenin yani N- terminal kısmın uzun veya kısa olmasına veya substrat özgüllüğüne dayanmaktadır.

2.10.2. Kaspazların işlevlerine göre sınıflandırılması

Kaspazlar işlevlerine göre 3 gruba ayrılırlar:

1- Başlatıcı kaspazlar: Kaspaz-2, 8, 9 ve 10.

Başlatıcı kaspazlar apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara yani ikincil kaspazlara iletirler. Başlatıcı kaspazların N-terminal kısmı hem kaspazların aktivasyonunda aracı rol oynar, hem de sitokin aktivasyonuna yol açarak kaspaz dışı apoptotik yolakları aktive eder.

2- Etkili (Efektör) kaspazlar: Kaspaz 3, 6 ve 7.

Başlatıcı kaspazlardan gelen her apoptotik sinyal spesifik bir efektör kaspazı aktive eder ve bunu belirleyen N-terminal kısımlardır.

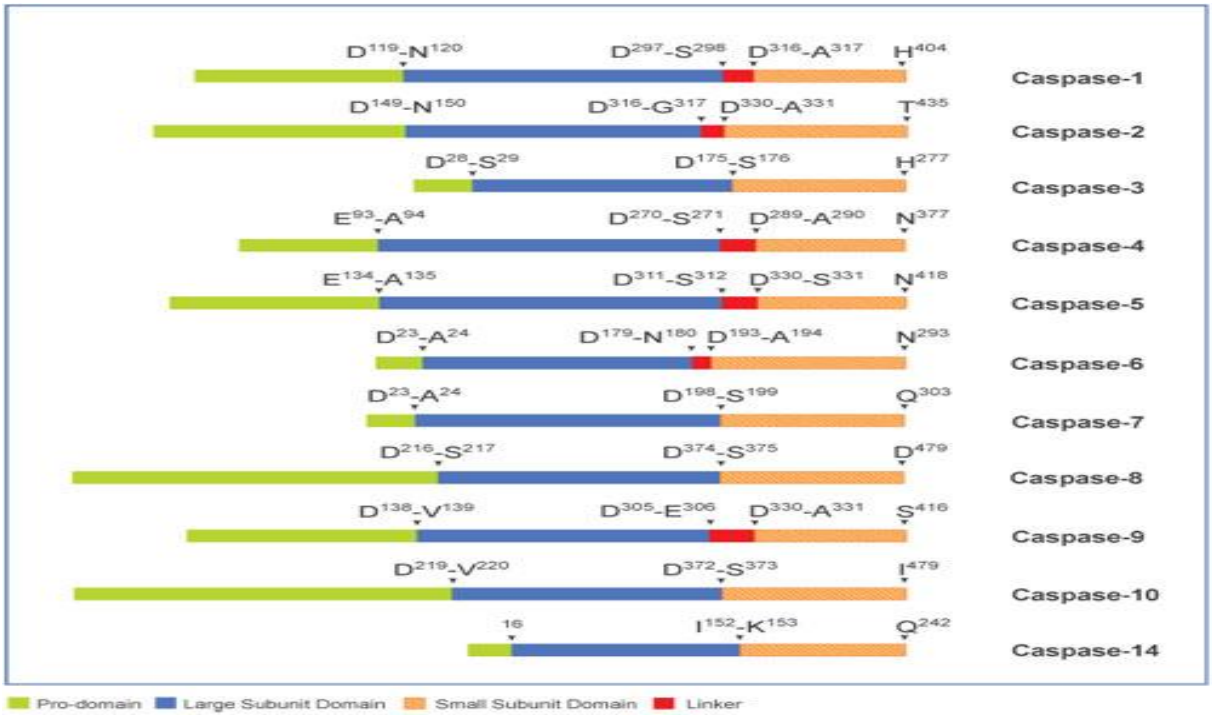
3- İnflamatuvar kaspazlar: Kaspaz 1, 4, 5, 11, 12, 13 ve 14.

Doğuştan patojenlere karşı bağışıklık sağlar ve lenfokin üretiminden sorumludurlar.

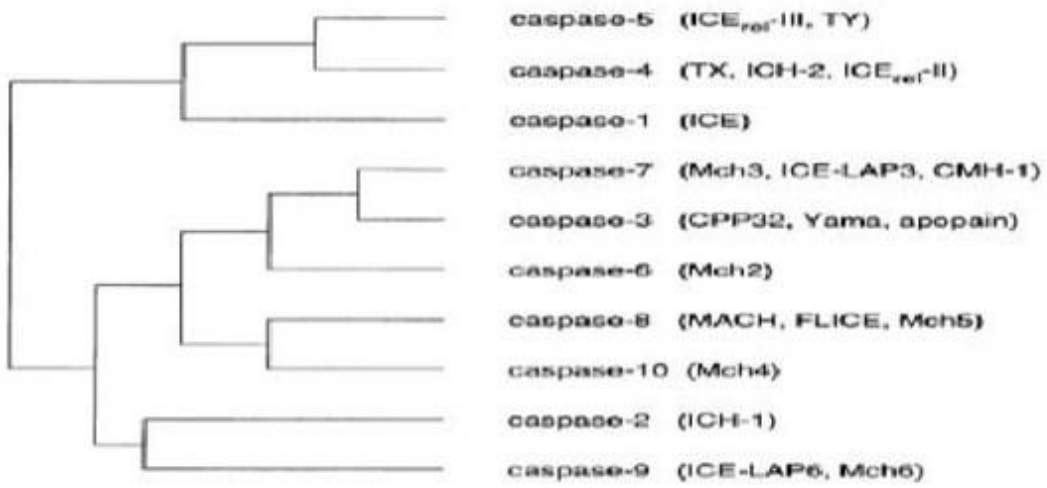
Kaspaz 14'ün dışında tüm inflamatuvar ve başlangıç kaspazları uzun bir N-terminal bölgeye sahiptir. Bu kaspazlardan 1, 2, 4, 5, 9, 11, 12 ve 13'ün uzun N-terminal bölgesi "Caspase Recruitment Domain (*CARD*) – Kaspaz iyileştirme bölgesi" olarak isimlendirilirken, kaspaz 8 ve 10'un N- terminal bölgesi "Death Effector Domain (*DED*)" olarak isimlendirilir.

Apoptozisi indükleyen sinyaller spesifik olarak bu bölgelere bağlanırlar. Bu bölgeler prokaspazlar arasında protein-protein aracılı etkileşime neden olur ve prokaspazların aktivasyonunda önemli rol oynarlar.

Karşıt olarak efektör kaspazlar ise; kısa N- terminal bölgesine sahiptir ve bu bölgeler arasında herhangi bir etkileşim beklenmez. Fakat bu bölgeler; hücrenin apoptotik çöküşünü teşvik eden hücreler arası substratları aktifleştirmede anahtar rol oynarlar.



Şekil 2.5. Kaspazların yapısı



Şekil 2.6. İnsan kaspaz ailesi ve alternatif isimleri

2.10.3. Kaspaz aktivasyonu

Kaspaz ailesinin üyeleri *Bcl-2* ailesinden gelen sinyallerle pro-apoptotik (apopitozu uyarıcı) ve anti-apoptotik (apopitozu baskılayıcı) dengeyi etkilemektedir. Bunun sonucunda kaspaz aktivasyonu ve apoptozisin regülasyonu gerçekleşmektedir.

Hem *TNF* (Tumor Nekrosis Factor) ilişkili, hem de mitokondriyal apoptotik yolakların ortak olarak aktive ettiği mekanizma kaspaz aktivasyonudur. Aktivasyon

olayı ya kaspaz-9 bağlayıcı protein olan *APAF-1*'in oligomerize olmak üzere indüklenmesi ile apoptozisin regülasyonunu sağlayan intrensek yolak ya da hücre yüzey ölüm reseptörlerinin aktivasyonu olan ekstrensek yolak ile gerçekleşmektedir.

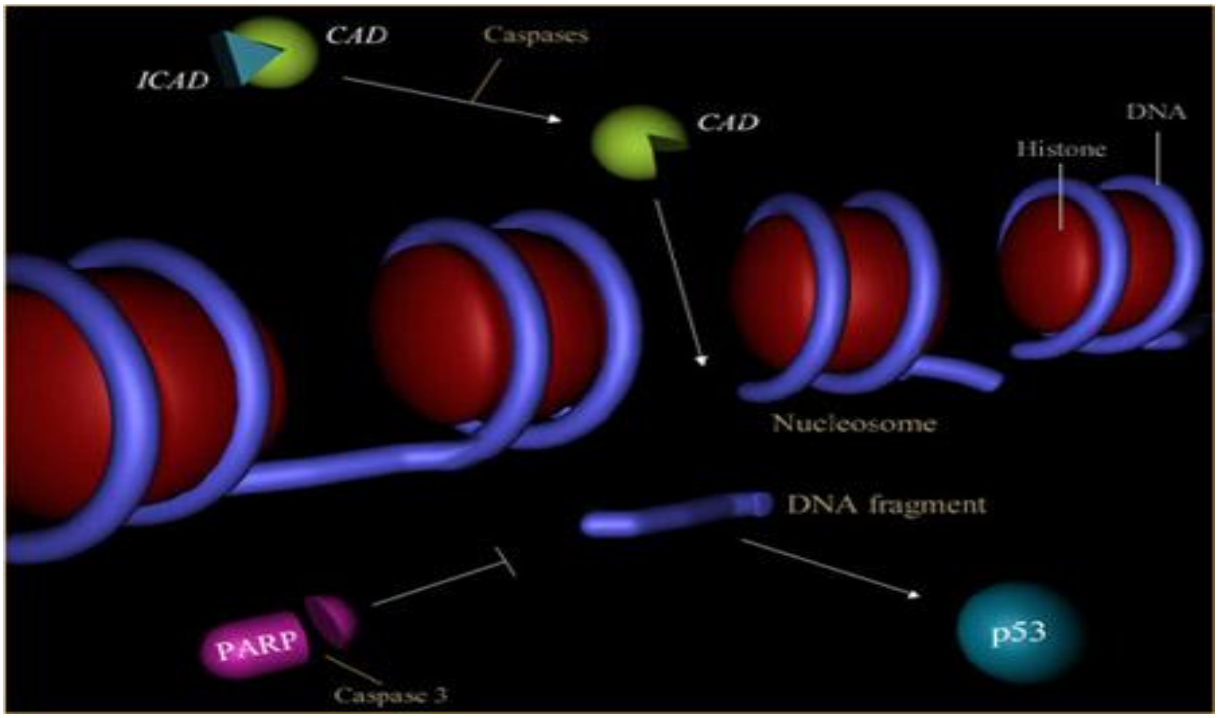
Yani apoptotik ölümün esas celladı "kaspaz ailesidir".

1- Apoptozis regülasyonu ve intrensek yolak

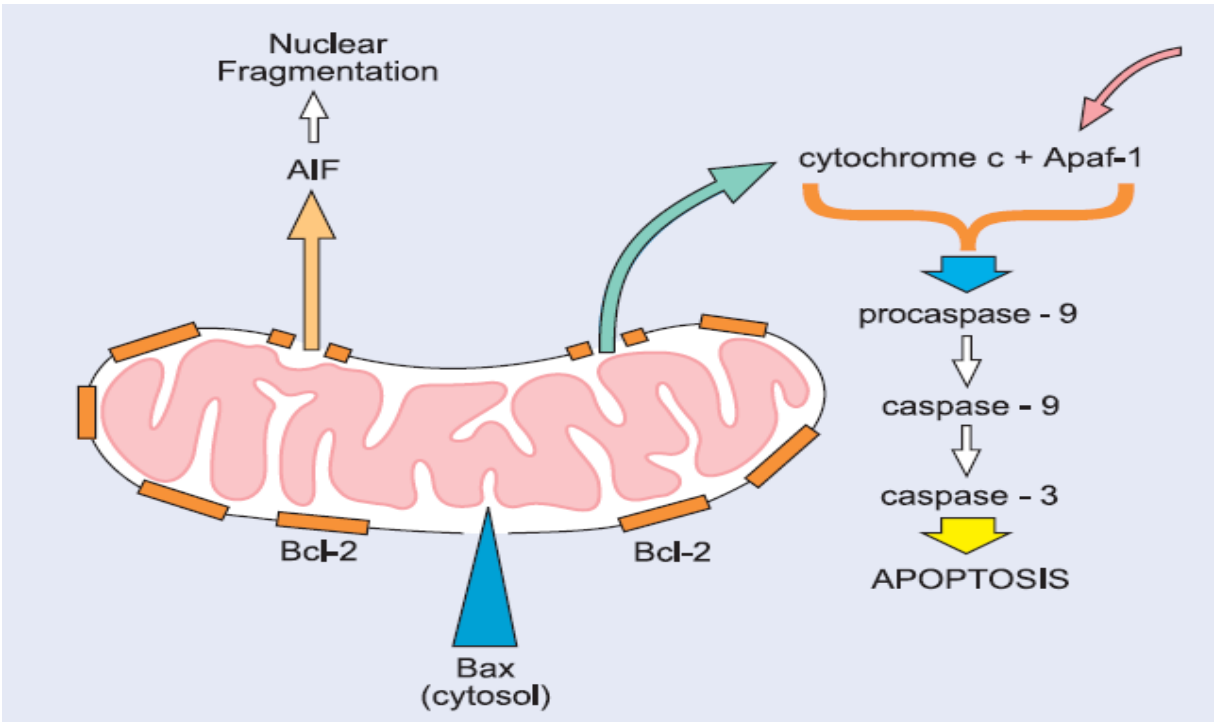
Apoptozis regülasyonu; *Bcl-2* / *Bax* gen ailesi ile sağlanır. Bu ailenin 20 üyesi tanımlanmıştır ve bunlardan bazıları apopitoz inhibitörüdür (antiapoptotik), bazıları ise apoptozisi uyaran proapoptotik genler olarak tanımlanmaktadır.

Apoptotik sinyalin alınmasından sonra *Bax* (proapoptotik) proteinleri, mitokondri zarının iyon geçirgenliğini (permeabilitesini) azaltabilir. Zardaki bu değişiklikler nedeniyle oluşan hücresel stres sonucunda; *sitokrom c* ve *AIF* (Apoptosis Inducing Factor- Apoptozis İndükleyici Faktör) gibi mitokondri zarı içinde yer alan faktörler sitoplazmaya geçerler. *AIF* doğrudan yoğunlaşan kromatine ve parçalanan çekirdeğe yönelirken, sitoplazmadaki sitokrom c apoptozisin en son basamağında yer alan intrensek yolağın başlaması için tetikleyici mekanizmayı oluşturmaktadır. *Sitokrom c*, dATP varlığında bir sitoplazma proteini olan *APAF* (Apoptosis Activating Factor-Apopitoz aktive edici faktör)-1'e bağlanarak prokaspaz-9'u aktive eder ve sitokrom c, dATP ve *Apaf- 1*'den oluşan bu kompleks "apoptozom" olarak isimlendirilir. Apoptozom, bir seri kaspaz aktivasyonunu başlatır ve hücreyi ölüme sürükler.

Seri olarak gerçekleşen bu olayda apoptozis regülasyonu bu şekilde gerçekleşirken kaspaz aktivasyonu ise şu şeklide gerçekleşmektedir: Apoptozom inaktif prokaspaz-9'un aktif kaspaz-9 haline dönüşmesini sağlar. Aktif kaspaz-9 ise; efektör kaspazlardan prokaspaz-3'ü aktive eder ve aktif kaspaz-3 oluşur. Aktif kaspaz-3 kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörünü = *ICAD*'ı inaktifleştirir. Böylece *ICAD*'ın bağladığı kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz (*CAD*) serbestleşir ve bu da apoptozisin karakteristik bulgularından olan kromatin kondensasyonu (yoğunlaşması) ve oligonükleozomal DNA fragmantasyonuna neden olur.



Şekil 2.7. İntrensek yolakta DNA fragmentasyonu



Şekil 2.8. İntrensek yol ile apopitozun regülasyonu

Bu reaksiyonlar kompleman veya pıhtılaşma mekanizmalarındakine benzer bir biçimde oluşur ve sitoplazmadaki yapısal proteinlerin sindirimine, kromozomal DNA'nın parçalanmasına, hücrenin fagosite edilmesine yol açmaktadırlar.

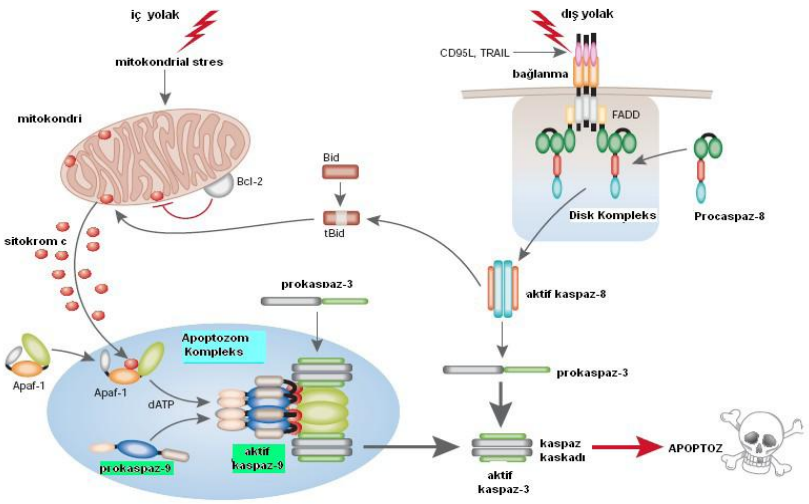
Apoptotik hücre ölümü regülasyonundaki defektler; hücre birikiminin olduğu kanser, damarların açılmasına yönelik yapılan tedavilere rağmen hücre büyümesi sonucu tekrar tıkanıklık gelişmesi sonucu oluşan restenoz gibi hastalıklara yol açabildiği gibi, hücre yıkımının arttığı otoimmün rahatsızlıklar, nörodejeneratif hastalıklar, Alzheimer gibi rahatsızlıklara da yol açabilmektedir.

2- Apoptozis sinyalinin iletim kaskadı ve ekstrensek yolak

Plazma membranındaki ölüm reseptörlerinin sinyalleriyle ilişkilidir ve kaspaz aktivasyonunun indüklediği hücre ölümü olarak da isimlendirilir. *FADD* ya da benzeri protein-protein komplekslerini içeren yolaktır. Küçük molekül ağırlıklı ligandların, bir veya daha fazla membrandan eksprese olan ölüm reseptörlerine bağlanması ile tetiklenir.

Bu reseptörler için gerekli olan ligandlar; *TNF* (Tumor Nekrosis Factor)- α, *Fas ligandı* ve TNF-related apoptosis inducing ligand [TNF- ilişkili apoptozisi indükleyen reseptör ligandı (*TRIAL*)]'dır. Aktivasyon sonucu ligandlar ilgili reseptörlere bağlanmaktadır ve bu reseptörler kaspaz-8'i aktive eden bir adaptör protein olan *FADD* ile ilişki kurarak kaspaz-8'i aktive eder. Aktif kaspaz-8'in, kaspaz-9'a benzer bir mekanizma ile diğer kaspazları kaskad halinde aktive etmesi sonucu ölümü indükleyen sinyal kompleksi oluşmaktadır. Bu ölüm sinyali nükleusa kadar iletilerek sonuçta DNA'nın yıkımına neden olur ve bu da hücrenin fagosite edilmesine sebep olmaktadır.

Örneğin; sitotoksik T-hücreleri virüs ile enfekte olmuş hücreleri Fas reseptörlerini uyararak öldürmektedirler.



Şekil 2.9. Apoptoziste içsel ve dışsal yolakta kaspaz aktivasyon mekanizması

2.10.4. Apoptoziste ölüm yolağı (Ölüm Fazı)

Bu faz içsel ve dışsal yolakların her ikisinin de apoptozis basamağının tamamlandığı son yolak olarak tanımlanmıştır. Aktif kaspaz-8 ölüm kaspazları olan kaspaz- 3 ve kaspaz- 7'yi etkinleştirmektedir. Etkin hale gelen kaspaz-3 ise diğer ölüm kaspazı olan kaspaz- 6'yı etkinleştirir ve bunun sonucunda sitoplazmik endonükleaz aktive hale gelirken nüklear ve sitoiskelet proteinleri azalır. Böylece apoptozis meydana gelir ve hücre ölüme gider.

2.10.5. Kaspazların etkilediği hedef noktalar

DNA hasarının tamirinden sorumlu Poli ADP Riboz Polimeraz (PARP), DNA-bağımlı protein kinaz (DNA-PK), nükleus membranının integritesini sağlayan laminler, DNA'nın parçalanmasına yol açan nükleazları inhibe eden DNA fragmentasyon faktörü (DFF 45) adlı protein, hücre içi kolesterol homeostazisinden sorumlu bir integral protein olan Sterol Düzenleyici Element Bağlayıcı Protein (SREBP-1), bir tümör baskılayıcı gen olan Retinoblastom geni ve hücre iskelet proteinlerinden Fodrin olarak özetlenebilmektedir.

Bazı hücrelerin ölümü kaspaz-3'ten bağımsız olarak gelişebilir. Kaspaz-3, -7 ve -9; apoptozis inhibitörü ailesinin proteinleri (*IAP*) tarafından selektif olarak inhibe edilir ve böylece apoptotik mekanizmayı durdururlar. *IAP*'ler ayrıca hücre siklusunu da etkileyerek apoptozisi durdurabilir. *IAP* proteini "*survivin*" insan kanserlerinin büyük bir kısmında aşırı ifade edilir. Bu inhibitörler birçok malin hücreler tarafından aşırı eksprese edilmektedir.

2.10.6. Kaspaz aktivasyonu ve otofaji arasındaki ilişki

Otofaji, hücre içi makro moleküllerin ve organellerin lizozomlarda parçalanmasına yol açan bir mekanizmadır.

Bazı koşullarda otofajinin kaspaz aktivasyonu için gerekli olduğu kanıtlanmıştır. Örneğin; otofajinin, $CD4^+$ T hücrelerinin HIV ile enfeksiyonu sırasında kaspaz-bağımlı hücre ölümü için gerekli olduğu gösterilmiştir.

Bazi otofaji proteinlerinin kaspaz veya kalpain gibi proteazlar tarafından kesilmesi sonrası apoptozis yolağında görev yaptıkları da gözlemlenmiştir.

2.10.7. Kaspaz substratları ve apoptozisin geç aşamaları

Apoptozis önceleri belirli morfolojik değişikliklerle tanımlanmıştır. Aslında, hem mitoz hem de apoptozis substrat bağlanmasının kaybı, kromatin yoğunlaşması ve nüklear laminlerin bozunması ile karakterize edilir. Günümüzde bu değişiklikler kaspaz etkinleşmesine ve bunun sonuçlarına bağlanmaktadır.

Bilinen 60 kadar kaspaz substratının çoğu kaspaz-3 tarafından özel olarak kesilebilir ve kaspaz-3, prokaspaz-2, -6, -7 ve -9'u işleme tabi tutabilir.

Substratların çok sayıda olmasına karşın, kaspazların proteaz etkinliği özgündür ve apoptozis ile ilgili morfolojik değişimlerin çoğunun nedenidir.

Kaspazlar, aktin dahil hücre iskeletinin kilit bileşenlerini ve yanı sıra nüklear laminleri ve diğer yapısal proteinleri keserler. Kaspazlar tarafından kesilen enzim sınıfları, DNA metabolizmasında ve onarımında rol alan proteinleri kapsar. Örneğin; poli ADP-riboz polimeraz (*PARP*) ve DNA'ya bağımlı protein kinaz. Diğer substrat sınıfları arasında çeşitli kinazlar, sinyal transdüksiyonu yollarındaki pro-proteinler ve hücre çevriminin kontrolünde rol alan proteinler sayılabilir.

Bazı substratların kesilmesi hücre türüne özgüdür. *ICAD*/*DFF* kompleksi bu substratlar arasında yer almaktadır. Bu kompleksin ayrılması ile apoptozisten korunmuş yaşayan hücre proteinleri kaspazlar vasıtası ile inaktif hale gelmektedir. Bu substratın bir alt ünitesi heterodimerik DNA fragmentasyon faktörü olan *DFF-45* ve diğer alt ünitesi ise bir endonükleaz inhibitörü olan *CAD* yani kaspaz tarafından aktifleştirilen DNAaz'dır. *ICAD* 'nin kaspaz-3 tarafından kesilmesi inhibisyonu kaldırır ve *CAD*'nin endonükleaz etkinliğini başlatır.

2.10.8. Kaspazlar ailesindeki mutasyonlar ve kanser

Apoptozisin aksaklığı tümörlerin patogenezinde önemli bir rol oynar. Tümör hücresinin hayatta kalması; antiapoptotik yolların aktivasyonu veya proapoptotik sinyalizasyonun inaktive olması ile uyarılmaktadır. Kanser hücrelerinde apoptozisin baskılanması için iki önemli yol bulunmaktadır:

1- somatik ve somatik olmayan mutasyonlar, proapoptotik moleküllerin ekspresyonlarının kaybı.

2- apoptozis inhibitör moleküllerinin aşırı ekspresyonu

Apoptozisin somatik mutasyonları ile ilgili genler birkaç proteine etki eder. Kaspaz ailesindeki mutasyonlar; kötü huylu tümörlerde sık olarak rastlanmaktadır.

Çalışmaların birkaçı göstermiştir ki; kaspaz-8'in mutasyona uğraması kanserin farklı tiplerine yol açmaktadır. Soung ve meslektaşları; mide kanseri hastalarında (162 hasta), meme kanseri hastalarında (93 hasta), büyük hücreli akciğer kanseri hastalarında (185 hasta) ve akut lösemi hastalarında (88 hasta) *SSCP* yöntemini kullanarak kaspaz-8 genindeki mutasyonları incelemişlerdir. İlginç bir şekilde kaspaz-8 mutasyonları mide kanserli hastalarda saptanırken diğer kanser tiplerinde görülmemiştir. Ayrıca kaspaz-8 mutasyonlarının 13 tane olduğunu ve bunların tümünün erken evredeki mide kanserlerinde değil ileri evredeki mide kanserlerinde görüldüğü saptanmıştır.

Kaspaz-9'un mutasyonal analizi nöroblastoma dokularında uygulanmıştır. Bununla birlikte tümörlü dokularda kaspaz-9'un somatik olmayan mutasyonları da tespit edilmiştir.

Bir diğer çalışmada; kanserli hastalardan rasgele seçilen 80 mide kanserli, 104 kolorektal kanserli ve 69 akciğer kanserli hastaların tümörlü dokularından ve normal dokulardan genomik DNA'lar izole edilerek kaspaz-9'un bağlanma bölgeleri tespit edilmiştir. Bu hastalardan 2 barsak kanserli ve bir mide kanserli hastada kaspaz-9'un sessiz mutasyonları tespit edilmiştir.

Kaspaz-3'ün mutasyonu meme kanserinde tespit edilmiştir. Ayrıca; bir mide kanseri, bir akciğer kanseri, dört barsak kanseri, bir karaciğer kanseri ve birçok kemik iliği kanseri vakasında kaspaz-3'ün mutasyonu tespit edilmiştir.

90 kolon kanserli hastadan 2'sinde, 50 özofagus kanserli hastadan 1'inde ve 33 gırtlak kanserli hastadan 1'inde ise; kaspaz-7'nin somatik mutasyonları tespit edilmiştir.

Birkaç bilimsel çalışma inflamasyonun kanserde önemli rol oynadığını göstermiştir. Kanser hücreleri birçok inflamatuvar aracılar üretir ve etrafını saran hücrelerle birbirine bağlantılıdır.

Soung ve arkadaşları; son zamanlarda kanserde inflamatuvar kaspazlardan 1, 4 ve 5'in muhtemel bir şekilde rolü olduğunu araştırmışlardır ve 337 farklı tipteki kanserli hastalarda (103 barsak kanseri, 60 meme kanseri, 60 karaciğer kanseri, 54 mide kanseri ve 60 akciğer kanseri vakası) Kaspaz 1, 4 ve 5 için somatik mutasyonlar tanımlanmıştır.

343 kanserli hastadan 2'sinde ve 54 mide kanserli hastanın hepsinde kaspaz-1'in mutasyonu saptanmıştır.

337 kanserli hastadan 2'sinde ve 103 barsak kanserli hastanın hepsinde kaspaz-4 mutasyonu saptanmıştır.

Kaspaz-5 mutasyonları ise; 337 kanserli hastanın 15'inde saptanmıştır. Bu 15 hastanın kanser tipleri 9'u mide kanseri, 4'ü barsak kanseri, 1'i invaziv meme kanseri ve 1'i akciğer kanseridir.

2.10.9. Tedavi amaçlı kaspazların kullanımı

Aşırı apoptozisin çok ciddi patolojik hastalıklara neden olduğu günümüzde yapılan araştırmalarla ispatlanmıştır. Bunlar; nörodejeneratif hastalıklar, iskemi-reperfüzyon hasarı, graft-versus-host hastalığı ve otoimmun hastalıklardır. Kaspazlar bu hastalıklarda; apoptoziste zorunlu görevlerinin olması ve küçük molekül inhibitör tedavisinde işe yaramaları nedeni ile etkili ve potansiyel hedeflerdir. Örneğin; apoptozisi önleyen *p53* ekspresyonu vasıtası ile Drosophila mutantlarında retinal dejenerasyonla oluşan körlük önlenmektedir ve bu göstergenin nedeni kaspazların inhibisyonu ile fonksiyonel bir şekilde hücre ölümünün önüne geçilmesidir. Buna göre; peptidil kaspaz inhibitörleri felçte, miyokardial iskemi-reperfüzyon hasarı, karaciğer hastalığı ve travmatik beyin hasarı gibi hastalıklara etkilidir.

Bu nedenle kaspazları hedef alarak birçok hastalığın tedavisi gerçekleşmektedir.

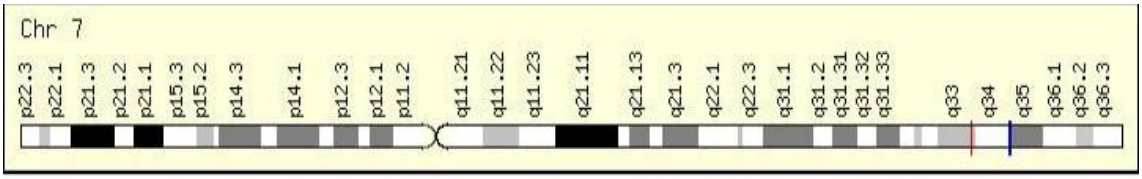
Kanserli hastalarda kullanılan kemoterapi tedavisinin başarısızlığına 2 ana problem yol açmaktadır. Bu problemler; normal hücreler üzerinde toksik etki oluşturmak ve kanser hücrelerini öldürmedeki başarısızlıktır. Bu problemlerin her ikisi de kemoterapotik ilaçlar ve ışınlamanın etkisi ile normal ve kanserli hücrelerin ölmesinden kaynaklanmaktadır. Bu zarar çoklu aşamalar vasıtası ile hücre ölümüne kadar taşınır, kaspaz ve apoptozisin aktivasyonunu negatif şekilde etkilemektedir. Bu etkilenme gerçekleşirse terapi başarısız olmaktadır.

Son zamanlarda bu başarısızlığın kaldırılmasına yönelik tedavi yöntemleri geliştirilmiştir. Bu amaçla kanser hücrelerine özellikle de tedavi periyodunda etkili (doz miktarı ve diğer ajanlar açısından) yöntemlerin seçilmesi ve tedavi periyodunun belirlenmesi için öncelikli olarak kaspaz gen grupları üzerinde ekspresyon çalışmaları yapılmaktadır. Kaspazlar apoptozis ve nekrozis döngüsünde seçici markerlar olmaları nedeni ile de tedavi aşamasında hedef alınan gen gruplarıdır.

Bu amaçla yaptığımız araştırmada, kaspaz gen ekspresyonunun sağlıklı bireylerde hasta bireylere oranla daha yüksek olduğu tanımlanmıştır.

2. 11. Kaspaz-2

Kaspaz-2 geni; 7. Kromozomun q34-q35 bandına yerleşik durumdadır.



Şekil 2.10. Kaspaz-2 geninin kromozom haritası

Kaspaz üyeleri arasında en iyi korunmuş olan kaspaz-2 memelilerde bulunan diğer kaspazlara göre evrimsel olarak *CED-3* (Caenorhabditis elegans proteazı)'e daha yakındır (Yuan ve ark., 1993; Kumar, 1994). Kaspaz-2 başlatıcı kaspazlarla (özellikle kaspaz-1 ve -9) homolog dizilere sahiptir ve onun bölünme özgünlüğü örneğin kaspaz-3 ve -7 gibi efektör kaspazlara daha yakındır. Başlatıcı ve efektör kaspazların her ikisinin de özelliklerini sergileyen kaspaz-2 tüm kaspaz üyeleri arasında tektir (Zhivotovsky ve Orrenius, 2005; Krumschnabel ve ark., 2009).

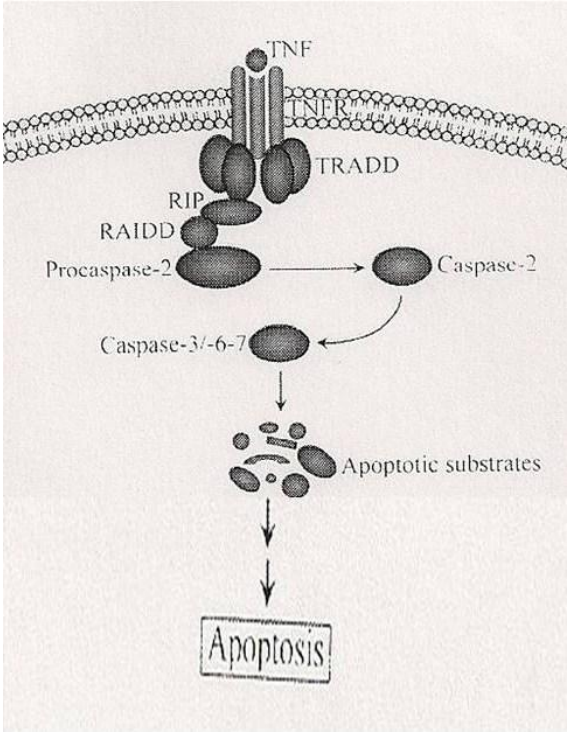
Hücreler apoptozis için uyarıldığı zaman, endojen kaspaz-2 ilk olarak 32-,33- ve 14- kDa.luk üç fragmente ayrılır ve daha sonra bu fragmentlerden başka 18- ve 12-kDa.luk aktif alt ünitelere ayrılmaktadır (Li ve ark., 1997).

Kaspaz-2 diğer kaspazlardan farklı olarak hücrede sitosolde değil, çekirdek ve golgi aygıtında lokalize olmaktadır (O'Reilly ve ark., 2002; Baliga ve ark., 2003).

Kaspaz-2; apoptozisin düzenlenmesinde önemli bir protein olarak tanımlanmıştır. Son zamanlarda yapılan birkaç yayında kaspaz-2 aktivasyonunun düzenlenmesinde yeni mekanizmalar tanımlanmıştır. Bu mekanizmalardan biri; kaspaz-2 fonksiyonunu *p53*'e bağlayıcı *PIDDosome* adlı aktifleştirici bir kompleksin rolünü içermektedir. Bu bilgiyle uyumlu olarak, hücre döngüsünün düzenlenmesini ve DNA tamirini içeren apoptotik olmayan süreçlerde kaspaz-2'nin potansiyel rolü olduğu birçok çalışmada kanıtlanmıştır. Buna göre; kaspaz-2 için tümör-baskılayıcı fonksiyonu olduğu da ileri sürülmüştür.

İyi bir şekilde karakterize edilmiş kaspaz-2 aktivasyon mekanizmasının DNA hasarına cevap vermesinin yanı sıra, bu kaspazın diğer fizyopatolojik aktivasyon altyapıları daha az açıklanmıştır. Burada, tümör hücrelerinde konvansiyonel veya

moleküler olarak hedeflenmiş antikanser ajanları diğer kemoterapotik ajanların etkisi (Mhaidat ve ark., 2007) ile uyumlu olarak konsantrasyon ve zamana bağlı kaspaz-2 aktivitesini sağlamışlardır. Bu koşullar altında kaspaz-2 aktivasyonu; kaspaz-2'nin prodomainini uzaklaştırarak onu aktive eden kaspaz-3'ün aktivasyonundan önce gelir ve bu aktivasyon tekdüze değildir (Van de Craen ve ark., 1999).



Şekil 2.11. Kaspaz-2 bağımlı prokaspaz-aktivasyon yolağı (RIP: receptor-interacting protein, reseptör etkileşimli protein; TNF: tumour necrosis factor, tümör nekroz edici faktör; TNFR: TNF receptor, TNF reseptörü; TRADD: TNFR- associated death domain; TNFR ile ilgili ölümcül domain)

Kaspaz- 2 başlangıçta beyin gelişimi boyunca baskılanmış olan sinirsel olarak ifade edilen bir kaspaz olarak tanımlanmıştır (Kumar ve ark., 1992). Bu fikirler programlanmış hücre ölümü boyunca kaspaz-2'nin kritik bir rol üstlendiğini ileri sürmüştür.

Prokaspaz-2 hücre sitoplazmasında ve golgi kompleksinde bulunur ve bazı hücre tiplerinin çekirdeğinde esas olarak bulunan tek prokaspazdır. Tahminlere göre nispeten kaspaz-2 için onun karakteristik olarak tek olmasını sağlayan birkaç substrat bulunmaktadır. Bu nedenle kaspaz-2'nin mevcut apoptotik ve apoptotik olmayan fonksiyonu daha fazla tartışmaya açık bir konu haline gelmiştir.

Çalışmaların çoğu kaspaz-2'nin hücrelerin bazı tiplerinde apoptozis başlatıcısı olarak görev aldığını göstermiştir. Read ve arkadaşlarının (2002); yaptığı çalışmada bazı

hücrelerde *sitokrom-c* ve *Apaf-1* olmaksızın prokaspaz-2'nin bir protein kompleksi içine kendiliğinden takviye olduğu görülmüştür. Bu kompleks; takviyeci prokaspaz-2'nin yeteri kadar aktive edilmesiyle oluşmaktadır. Bu durumda prokaspaz-2; *sitokrom-c* ve diğer apoptozis faktörlerinin mitokondri içine yayılmasıyla aktive olan prokaspaz-9 aktivasyonunun olduğu kaskadın yukarısına doğru aktive olur (Read ve ark., 2002).

Aynı yılda yapılan Paroni ve arkadaşlarının (2002); araştırma sonuçları apoptozisin erken evresinde, çekirdek içerisindeki kaspaz-2'nin sitosol içerisine girmeden mitokondrial fonksiyon bozukluğuna neden olabileceğini göstermiştir. *Sitokrom-c* salınımı nüklear gözeneklerde belirgin bir şekilde değişikliğe neden olmamıştır. Sadece apoptozisin geç aşamasında, kaspaz-2 nüklear porların difüzyon sınırlarında artış olması nedeniyle sitosol içerisine girmiştir. 2002'de Mendelsohn ve arkadaşları; bir pozitif hücre devri düzenleyicisi olan *cyclin D3*' ün kaspaz-2 ile etkileşime girmekte olduğunu ve onu dengede tuttuğunu bulmuşlardır (Mendelsohn ve ark., 2002). Bu etkileşim hücre ve apoptozis dengesinin kurulmasını sağlayan *cyclin D3* ve kaspaz-2'nin önemli rollere sahip olduğunu göstermektedir.

Son birkaç yılda kaspaz-2'nin aktivasyon mekanizması ve fonksiyonunun yoğun şekilde araştıran bir grup apoptozis olayında bu enzimin açıkça rolü olduğu görüşüne varmışlardır (Zhivotovsky ve Orrenius, 2005; Krumschnabel ve ark., 2009). Verilerin büyük çoğunluğu gerçekleşmesine rağmen bulgulardaki tutarsızlıklar nedeniyle kesin sonuçlara varılamamıştır. Buna göre, son yapılan birkaç yayında kaspaz-2'nin potansiyel fonksiyonlarıyla onun aktivasyonuna bağlı bilinmeyen mekanizmaları önceden tanımlanmıştır ve bu enzimin görevlerine ışık tutulmuştur (Nutt ve ark., 2005; Andersen ve ark., 2009). Bu yeni bulgular kaspaz-2 aktivasyonunun düzenlenmesinde birkaç kinazın ilişkili olduğunu, yanı sıra bu enzimin örneğin *p53* uyarıcı ölümcül protein içeren domain (*p53*-inducible death domain-containing protein, *PIDD*) gibi çeşitli aktivasyon yollarının olduğunu ortaya çıkarmıştır. Böylece, apoptotik olmayan süreçlerdeki kaspaz-2'nin hücre döngüsünün düzenlenmesi ve DNA tamiri gibi yeni görevleri ortaya çıkarılmıştır (Shi ve ark., 2009).

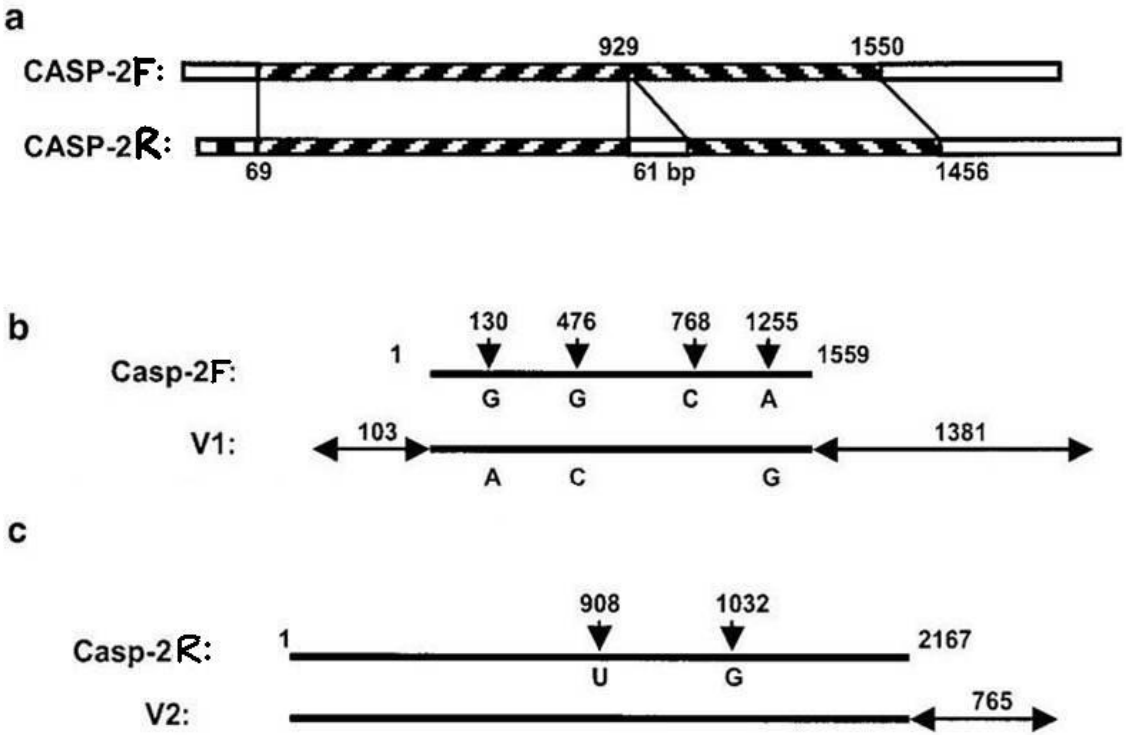
Kaspaz-2 özellikle hücre içi proteazların aktivasyonundan sorumlu olan adaptör genler olmasının yanı sıra yaşlanma ile ilgili gen ekspresyonunu uyaran sinyal reseptörüdürler. Son yapılan çalışmalardan biri göstermiştirki; fare yaşlanmasında kaspaz-2'nin bozulması önemli bir etkiye sahiptir ve kaspaz-2'nin eksikliği farelerde oksidatif olarak zarara uğramış hücrelerin ortadan kaldırılabilmesini tehlikeye

sokmaktadır (Zhang ve ark., 2007). Kaspaz-2'nin çok fazla ayırıcı özelliğe sahip olması ve fonksiyonları anlaşıldıkça ilgi çekici bir hale gelmiştir.

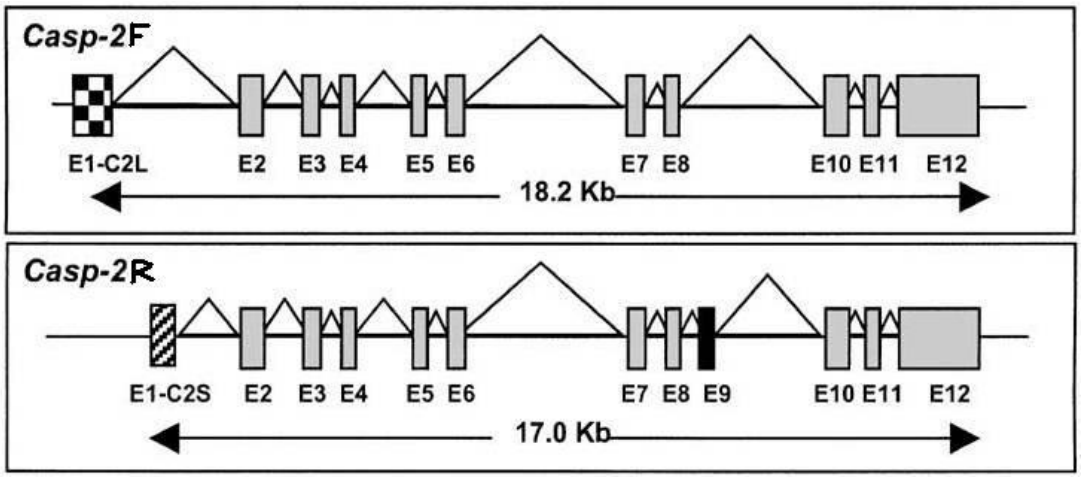
Kaspaz-2'nin; DNA zararına cevaben aktifleştiği bilinmektedir ve DNA zararı ve apoptotik yolağın sorumluluğu arasında önemli bir bağlantı sağlamaktadır (Robertson ve ark., 2002; Panaretakis ve ark., 2005; Zhivotovsky ve Orrenius, 2005).

İnsanlarda kaspaz-2 geni, *Ich1*, 3' bölgesindeki alternatif eklenmelerden dolayı mRNA çeşitlerinin en az iki farklı formunu kodlamaktadır (Wang ve ark., 1994). Uzun olan kaspaz-2F izoformunun aşırı ekspresyonu programlanmış hücre ölümünün teşvik edildiğini göstermektedir (Kumar ve ark., 1994); tam tersine ekspresyonun azaldığı durumda çeşitli uyarıcılara cevap olarak antisens teknolojisi tarafından apoptozisin ertelendiği görülmüştür (Kumar, 1995; Troy ve ark., 2000; Droin ve ark., 2001a). Diğer taraftan, kısa izoform olan kaspaz-2R'nin aşırı ekspresyonu ise; memelilerde hücre ölümünü baskı altında tutabilir (Wang ve ark., 1994; Kumar, 1995; Droin ve ark., 2001b). Bu gözlemler kaspaz-2'nin programlanmış hücre ölümünün gelişme ve uyarılma aşamasında pozitif ve negatif düzenleyici olarak aktif olabilmektedir (Logette ve ark., 2003).

Öncü- mRNA (pre- mRNA)'nın 3' sonunda 61 bç.lik bir eksonun eklenmesi veya atlanması durumunda iki mRNA formasyonu oluşur ve bu şekilde sırasıyla kısa ve uzun olmak üzere kaspaz-2'nin izoformları meydana gelmektedir (Wang ve ark., 1994; Cote ve ark., 2001a). Alternatif ekson-9'un araya eklenmesi erken bir durdurma kodonu oluşturur ve bunun sonucunda kaspaz-2R meydana gelmektedir (Wang ve ark., 1994; Cote ve ark., 2001b). Buna göre; iki mRNA formasyonu 5' sonunda (her iki izoformda da ortak olan birinci eksonda) ayırıcı transkripsiyonel başlatma bölgelerinin ve/veya alternatif atlama organizasyonlarının mevcut olduğu öne sürülmektedir. Kaspaz-2 gen ekspresyonunun ilk çalışmasında, incelenen çoğu dokuda uzun olan izoformun baskın olarak eksprese olduğu; kalp, beyin ve iskelet kaslarında ise kısa olan izoformun baskın olduğu gösterilmiştir (Wang ve ark., 1997).



Şekil 2.12. Kaspaz-2F (Forward) ve -R (Reverse) cDNA dizilerinin şematik şekli. a) Kaspaz-2F ve –R cDNA'larının 5' kısımları (kodlanmamış ekson-1) farklıdır ve kaspaz-2R cDNA dizisinin ekson-9' unda 61 bç araya sokulmuştur. b) Kaspaz-2F cDNA dizisi ve bu diziye göre V_1 gösterilmiştir. c) Kaspaz-2R cDNA dizisi ve bu diziye göre V_2 gösterilmiştir



Şekil 2.13. Kaspaz-2 geni ve onun esas izoformlarının şematik olarak gösterilmesi. Kaspaz-2F ve –R' nin ekson/intron organizasyonunun yanı sıra atlama(sıçrama) olayının gösterilmesi. Bu gen 12 ekson içerir, iki izoform arasında kodlanmamış olan birinci ekson değişikilik gösterir ve ekson-9'u sadece kaspaz-2R mRNA içerir

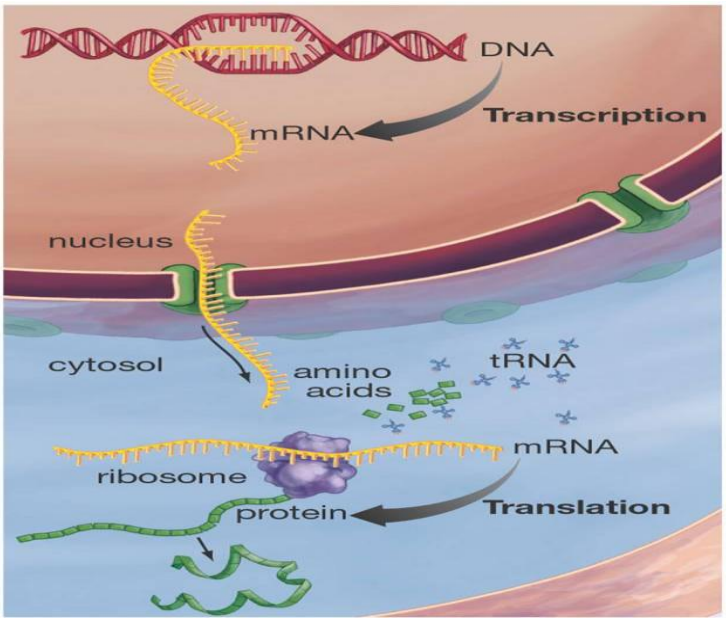
2. 12. Gen Ekspresyonu

DNA'da saklanan genetik bilgilerin bir RNA molekülü (mRNA, tRNA, rRNA) sentezi suretiyle kopyalanması veya yazılmasına transkripsiyon adı verilir. Transkripsiyonla RNA'ya kopyalanan, bir protein molekülüne ait genetik bilgilerin okunması veya bir protein molekülü haline çevrilmesine translasyon adı verilir.

Transkripsiyon ve translasyon olaylarının toplamı, **gen ekspresyonu** olarak tanımlanır.

Gen ekspresyonunun düzenlenmesi çeşitli aşamalarda olur:

1) Primer transkriptlerin oluşumu
2) Primer mRNA'dan matür (olgun) mRNA oluşumu
3) mRNA'nın sitoplazmaya geçişi
4) mRNA'nın yıkılımı
5) Protein sentezi
6) Proteinlerin posttranslasyonal modifikasyonu (Altınışık, 2009).
7) Protein yıkılımı



Şekil 2.14. Gen ekspresyonu

2. 13. Mutasyon

Çok hücreli organizmalarda bir canlının hücre genomu içindeki DNA dizilimleri ile genetik bilgisinde veya tek hücreli organizmalarda, örneğin bir virüsün, DNA ya da RNA diziliminde meydana gelen kalıcı değişmelerdir (Herder Lexikon der Biologie, 2004). Mutasyonlar; hücre içinde oluşan ani ve spontan değişimler olarak da bilinir.

Mutasyonlar, genel olarak eşey hücresi mutasyonları ve somatik mutasyonlar olmak üzere ikiye ayrılır. Doku hücreleri içinde gerçekleşen bir mutasyon, kalıtsal olamayacağı için kuşaktan kuşağa aktarılmaz. Vücut hücresi (somatik) mutasyonları bu anlamda kalıtsal değildir. Eşey (üreme) hücresi mutasyonları, diğer ismiyle eşey hücresi mutasyonları ise kalıtsaldır ve bir sonraki nesillere aktarılır (Rolf Knippers, 1997). Bireyin kalıtsal özelliklerinin ortaya çıkmasını sağlayan genetik şifre, herhangi bir nedenden dolayı (DNA onarımı, mayoz bölünme veya DNA replikasyonu sırasında meydana gelen hatalar, transpozonlar, virüsler, X ışını, radyasyon, ultraviyole, bazı ilaç ve mutajen kimyasallar, ani sıcaklık değişimleri vb. etkenlerle) bozulabilir (Seyffert, 2003; Bertram, 2000; Aminetzach ve ark., 2005; Burrus ve Waldor, 2004). Bunun yanında hipermutasyon gibi hücresel süreçlerde organizmanın kendisi tarafından da tetiklenebilir (Seyffert, 2003). Bu durumda DNA'nın sentezlediği protein veya enzim bozulur. Böylece canlının, proteinden dolayı yapısı, enzimlerinden dolayı metabolizması değişebilir.

Mutasyonlar, kalıtsal materyalin normal kombinasyonunu değiştirmeyen, kalıtsal yapıda meydana gelen bütün değişikliklerdir. Mutasyon terimi genel olarak,

- Kromozom yapısının değişmesini,
- Kromozom sayısının değişmesini,
- Genlerdeki değişiklikleri kapsar.

Bu anlamda mutasyonlar, sitogenetikte değişimlerin kapsamlarına göre; genom mutasyonu, kromozom mutasyonu ve gen mutasyonu olarak adlandırılıp üçe ayrılırlar. Genom mutasyonları kromozom sayısındaki değişmeler olup kromozom mutasyonları ise ışık mikroskobu altında incelenebilen ve kromozomun iç yapısında oluşan değişimlerdir. Gen mutasyonları ise; ışık mikroskobu altında görünmeyen ve tek bir geni kapsayan mutasyonlardır.

Mutasyonlar, dizilimlerde farklı türde değişimlere yol açabilirler; Bu anlamda bir mutasyon, canlı organizmanın fenotipik özelliklerinde **negatif** veya **pozitif** etkilere sahip olabileceği gibi **nötr** mutasyonlar hiç bir etkiye sahip olmayabilirler (durağan veya sessiz mutasyonlar). Bu tür değişimler, bir gen ürünün değişmesinde veya genin doğru ya da tamamen işlemesini engellemede herhangi bir etkileri olmayabilir. *Drosophila melanogaster* sineği üzerinde yapılan çalışmalar, gen tarafından oluşturulan bir proteinin mutasyonunda, bu mutasyonun yaklaşık %70'inin zararlı etkilere sahip olduğunu, geri kalanının ise ya nötr ya da zayıf faydalı etki gösterdiğini ortaya koymaktadır (Sawyer ve ark., 2007). Mutasyonların genler üzerindeki zararlı etkileri nedeniyle, organizmalar mutasyonları gidermek için DNA onarımı gibi mekanizmalara sahiptir (Bertram, 2000).

Genetik materyal olarak RNA kullanan virüsler, sürekli ve hızlı bir şekilde çoğalıp geliştikleri için onlara avantaj sağlayan hızlı mutasyon oranlarına sahiptir (Drake ve Holland, 1999), ve bu şekilde insan bağışıklık sistemi gibi savunma mekanizmalarını atlatabilir ve reaksiyonlardan kaçabilirler (Holland ve ark., 1982).

2.13.1. Mutasyon çeşitleri

- Kromozom yapısının değişmesi
- Kromozom sayısının değişmesi
- Gen (Nokta) mutasyonları

2.13.2. Nokta mutasyonları

DNA nükleotit dizisinde oluşan ve gelecek nesile aktarılabilen değişiklikler olarak adlandırılırlar.

Nokta mutasyonlar, genellikle bir veya birkaç nükleotitte meydana gelen mutasyonlardır. DNA'da baz çifti yer değiştirmeleri sonucunda ya da bir baz çiftinin girmesi ve çıkması (insersiyon-delesyon) sonucunda oluşurlar. Tüm mutasyon durumlarında olduğu gibi nokta mutasyonlar sonucu meydana gelen fenotipik değişimler de, nokta mutasyonun neresinde gerçekleştiğine bağlıdır.

Üreme hücrelerinde oluşan nokta mutasyonları döllere aktarılır. Örneğin, orak hücre anemisinde hemoglobinin bir polipeptit zincirini sentezleyen geninde bir nokta mutasyonu oluşmuştur. Bu ise tek bir nükleotitte değişme (kalıp DNA zincirinde), anormal bir proteinin üretilmesine neden olur. Timin yerine adenin girmesi, mRNA'da adenin yerine urasilin gelmesine ve bu da translasyonda valin adlı amino asitin yanlışlıkla proteinin yapısına girmesi bu hastalığın temelini oluşturur.

2. 14. Nokta Mutasyon Tanımlama Yöntemleri

Kalıtsal hastalıkların prenatal ya da postnatal tanısı veya populasyonda taşıyıcı taraması yapılarak hastalıkların önüne geçilmesi, aileye ve bireye verilen hem maddi, manevi hasarın önlenmesinde hem de topluluklar için gen frekanslarının belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Tanıyı kolaylaştırmak için bugüne kadar, pek çok mutasyon tarama yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemler, süre, pratik uygulanabilirlik, maliyet gibi özellikleri göz önünde tutularak kullanılmaktadır.

Küçük delesyonlar, insersiyonlar ve nokta mutasyonları için tek zincir konformasyon polimorfizm analizi (*SSCP*), heterodubleks analizi (*HA*), denatüre edici jel elektroforezi (*DGGE*), restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (*RFLP*), allel spesifik amplifikasyon (*ASA*), high resolution melting curve analiz yöntemi (*HRM*) ve DNA dizi analizi gibi çeşitli mutasyon tarama teknikleri tanımlanmıştır. Mutasyon taraması için kullanılacak, metodun seçiminde göz önüne alınabilecek başlıca kriterler şunlardır; hangi tip biyolojik materyalin kullanılacağı, hangi tip nükleik asitin analiz edileceği, saptanacak mutasyonun daha önceden bilinip bilinmediği, saptanacak potansiyel mutasyonların ne kadar fazla olduğu, kullanılacak metodun ne kadar

güvenilir olduğu ve ne ölçüde standardize edilebileceği, testin nasıl uygulanacağı, rutin tanı için uygun olup olmadığı, testin maliyeti ve kalite değerlendirmesi.

2.14.1. SSCP (Tek zincir konformasyon polimorfizm; Single Strand Conformation Polymorphism)

PZR-*SSCP* tekniği ilk olarak, insanlarda fenil ketonuri ve kistik fibrosis gibi kalıtsal bozukluklara neden olan genlerdeki single nükleotit dizisinin saptanması için geliştirilmiştir (Çiftci, 2003).

Bu yöntemde PZR ürünleri denatüre edilir ve denatüre edici olmayan poliakrilamid jel elektroforezine uygulanır. Bu durumda DNA'nın tek zinciri nükleotid içeriğine bağlı olarak sulu ortamda yeni bir konformasyona sahip olacaktır. Bu konformasyon, esas olarak zincir içi baz çiftleşmelerine bağlı olarak oluşan ikincil yapıdır. Teorik olarak, dizideki herhangi bir baz değişikliği bu konformasyonda değişikliğe neden olabilecektir. Çoğu konformasyonlar, mutant dizi aynı yüke sahip olsa bile fiziksel şekil veya büyüklüğü yeterince değiştirirler ve akrilamid gibi bir matriks ile yapılan elektroforezde hareket farklılığına neden olurlar. Elektroforezdeki farklı hareket, tek zincirli DNA parçalarının ikincil yapılarında değişik şekillerin oluşumuna bağlıdır (Orita ve ark., 1989).

Optimal bir *SSCP* stratejisi belirlemek için beş önemli parametrenin düzenlenmesi gereklidir. Bunlar; analiz edilecek DNA parçasının uzunluğu, elektroforez sırasında tercih edilen sıcaklık, PZR denatürasyon yöntemi, jelin özellikleri (jel matriksi, iyon konsantrasyonu, denatüran ajan varlığı) ile mutasyonun tipi ve bulunduğu yerdir.

SSCP tekniği ile mutasyona uğramış tek iplikçikli DNA'lar ile mutasyona uğramamış DNA, poliakrilamid jelde ayırt edilir. Hedef nükleik asit PZR ile amplifiye edildikten sonra, tek iplikçikli olacak şekilde denatüre edilir. Denatüre ürünler, poliakrilamid jelde elektroforeze tabi tutulur. Elektroforezde kullanılan jel, mutasyon saptamak için kullanılan özel bir jeldir ve MDE (mutation detection enhancement) olarak adlandırılmaktadır (Felmlee ve ark., 1995).

SSCP analizinde en iyi sonuç, DNA 150-200 bç uzunlukta olduğu zaman elde edilmektedir. Dizinin boyu küçüldükçe, mutant dizilerin görülme şansı artmaktadır. 183 bç.lik bir DNA parçasında tek baz değişikliklerinin %83'ü 307 bç.lik bir parçada %58'i saptanabilmiştir. Bir başka çalışmada, 200 bç ve altındaki büyüklüklerde tek baz

değişiklikleri daha yüksek duyarlılıkla saptanabilmiştir. Örneğin 212 bç.lik 2 globün geni parçasında tek baz değişikliği yaklaşık %70 oranında bulunurken, 600 bç.lik bir parçada 29 mutasyondan sadece biri saptanabilmiştir. 155 bç.lik parçalarda da %97 ve %96 oranlarında tek baz değişikliği gösterilmiştir. 150 bç.nin altındaki parçalarda *SSCP* analizinin duyarlılığı küçük DNA parçalarının ikincil yapı oluşturmalarındaki güçlükler nedeniyle azalmaktadır. 200 bç.nin üzerindeki büyüklüğe sahip DNA'larda da tek baz değişikliği ile daha az konformasyonal değişiklik oluşmaktadır ve bunun jelde görülmesi güçleşmektedir (Fan ve ark., 1993; Sheffield ve ark., 1993). Optimal koşullar altında mutasyon saptama oranı %80-90'dır (Özkara, 2003).

Analizi yapılan DNA parçasının hangi bölgesinde mutasyon olduğu, nükleotid değişikliğinin özelliği (transisyon ya da transversiyon) ve DNA parçasının nükleotid içeriği de *SSCP* analizinin duyarlılığını etkilemektedir. Bu faktörlerin herbirinin DNA molekülünde ikincil yapıyı etkilemesi beklenmektedir. *SSCP*'nin duyarlılığı, transversiyon ya da transizyonlar için farklı bulunmamıştır. İkisi de benzer sıklıkta saptanabilmektedir: sırasıyla %76 ve %81. Yalnız G → T transversiyonları, tamamlayıcı dizideki C → A transversiyonlarından daha düşük sıklıkta saptanabilmektedir, sırasıyla %57, %82. Eksonların yan bölgelerindeki değişik nokta mutasyonlarını saptamak için yapılan çalışmada mutasyonlar farklı oranlarda duyarlılık ile tayin edilmiştir. Eğer mutasyon içeren yan bölge ikincil yapıya katılıyorsa, mutasyon bu bölgeyi bozmuş olacağından *SSCP* ile saptanması kolaylaşmaktadır. Eğer mutant bölgenin ikincil yapıyı oluşturmada rolü yoksa mutasyon saptanamayabilir. Ayrıca pürin içeriğinin daha fazla olduğu DNA tek zinciri jelde daha hızlı yürümekte ve daha belirgin değişiklikler göstermektedir. Buna bağlı olarak da DNA'nın bazen esas, bazen de tamamlayıcı zinciri mutasyonu diğerinden daha iyi göstermektedir (Sheffield ve ark., 1993).

Bu yöntemin kullanılmasının nedenleri mutasyonların %80-90'ının tespit edilebiliyor olması, hızlı, kolay ve ucuz kullanıma sahip olması gibi avantajlarının bulunmasıdır. Fakat *SSCP* yönteminin düşük pH'de tamponlar kullanılması nedeniyle uzun fragmentlerin tercih edilememesi, mutasyonların % 10-20 tespit edilememesi, radyoaktif ve mutajen özellikli kimyasalların kullanılması ve mutasyonu tanımlamak için dizi analizi gerektirmesi gibi çeşitli dezavantajları vardır.

2.14.2. HRM (High Resolution Melting) analizi

HRM analizi, real-time PZR'nin kullanıma girmesi ile birlikte 1997'de geliştirilen bir yöntemdir (Lay ve Wittwer 1997; Ririe ve ark., 1997).

Genetik hastalıkların klinik tanısının doğrulanması, genotip–fenotip ilişkisinin kurulması ve doğum öncesi tanı verilebilmesi için bu hastalıklara yol açan mutasyonların tanımlanması gereklidir. Bu nedenle, değişik mutasyon tarama yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden biri de High Resolution Melting (*HRM*) analizidir. *HRM* analizi DNA'nın sıcaklıkla denatürasyonunun floresan boya ölçümü ile takibi esasına dayanır.

HRM analizi; mutasyon taraması ve genotiplendirme başta olmak üzere genetik haritalama, asosiyasyon çalışmaları, aday gen taraması, DNA metilasyon analizi gibi birçok çalışmada da kullanılabilmektedir. Uygulaması kolay ve hızlı bir yöntemdir (Corbett Life Science, 2006).

High-resolution melting (*HRM*) analiz yöntemi ayrıca, tek nokta mutasyonlarının belirlenmesinde ve çift zincirli DNA'larda heterodubleks yapının saptanarak tiplendirilmesinde kullanılan en yeni ve ucuz metottur (Grievink ve Stowell, 2007). *HRM* homojen kapalı bir tüp sistemi içinde mutasyon taranması ve genotiplendirme dışında pahalı olan oligonükleotidlerin etiketlenmesini sağlar. Yeni nesil sistemler çift zincirli DNA'lar üzerine bağlanan boyalar sayesinde heterodubleks yapıların belirlenmesi tekniğine dayanmaktadır. Heterodubleks ürünler ikinci bir en düşük erime sıcaklığı varlığında tanımlanır (Wittwer ve ark., 2003).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)'ndan sonra 10–15 dakikalık sürede gerçekleştirilmektedir (Wittwer ve ark., 2005). Hassas ölçüm özelliğine sahip olduğu için DNA denatürasyonu çok iyi takip edilmektedir. Bu nedenle, nükleotid değişimlerini saptamak için *HRM* analizinin etkili bir yöntem olduğu düşünülmektedir. Yöntemi uygularken, standart PZR bileşenlerine ve çift zincirli DNA'nın varlığında floresan sinyal veren boyalara ihtiyaç duyulmaktadır (Montgomery ve ark., 2007).

Çünkü bu boyaların yardımıyla DNA denatürasyonu takip edilebilmektedir. Artan sıcaklığa karşılık, çift zincirli DNA'nın tek zincirli DNA'ya ayrılması ile floresan sinyal şiddetinde azalma meydana gelmektedir (Ririe ve ark., 1997). Florometrik cihazlar, sıcaklık artışına bağlı olarak değişen bu sinyal şiddetini görüntüleyecek şekilde tasarlanmıştır (Montgomery ve ark., 2007). *HRM*'nin gücü, cihazın sıcaklık kontrolüne,

sıcaklık ve floresan ölçümüne (Herrmann ve ark., 2006), floresan boyalara (Wittwer ve ark., 2003) ve PZR ürününün saflığına (Montgomery ve ark., 2007) bağlıdır. Cihazın sözü edilen faktörlerden kaynaklanan yüksek çözünürlük kapasitesi, hassas ölçüm sağlamaktadır. Hassas ölçüm, artan her 0,1-1,0 °C sıcaklığın neden olduğu floresan sinyal şiddeti değişiminin kayıt edilebildiğini ifade etmektedir. Bu durum, DNA denatürasyonunun çok iyi takip edildiğinin bir göstergesidir.

Çift zincirli DNA'ya bağlanma özelliği olan floresan boyalar: *HRM* analizinde, çift zincirli DNA'yı tek zincirli DNA'dan floresan sinyal şiddetindeki değişimle ayırt etmemize olanak veren boyalara ihtiyaç duyulmaktadır (White ve Potts, 2006). DNA denatürasyonunun doğru bir şekilde takip edilebilmesi, floresan sinyalin doğru ölçülmesine bağlıdır. Bunu, DNA molekülünün floresan boya ile olan doygunluğu sağlamaktadır. Doygunluk terimi, çift zincirli DNA'ya özgül olan floresan boyanın DNA molekülüne yoğun olarak bağlanmasını ifade etmektedir. Amplifiye edilen DNA moleküllerinin boya ile doygunluğa ulaşabilmesi için yüksek konsantrasyonlarda boya kullanımı gereklidir. *Etidyum bromür, propidyum iyodit, DAPI* ve *hoechst* gibi boyalar birinci nesil boyaları temsil etmektedir. Bu boyalar, genellikle nükleik asit görüntülemede ve floresan mikroskop incelemelerinde DNA işaretlemede kullanılmaktadırlar. Çoğu mutajenik ve karsinojeniktir. Ayrıca, bazıları çift zincirli DNA'ya özgül değildir (Cosa ve ark., 2001).

HRM analizi için *SYBR Green* gibi ikinci nesil boyalar kullanılabilmektedir. Ancak, bu boyalar yüksek konsantrasyonlarda kullanıldıklarında PZR inhibitörü olarak etki göstermektedir (Monis ve ark., 2005).

Boyaların düşük konsantrasyonlardaki kullanımları ise; denatürasyonla açılan DNA çift zincirinden ayrılmalarından sonra henüz denatüre olmamış bölgelere yeniden bağlanmalarıyla sonuçlanmaktadır. DNA'dan boyanın ayrılmasıyla floresan sinyali şiddetinin azalması gerekirken, boyanın çift zincirli DNA'ya tekrar bağlanmasıyla floresan sinyali şiddetinde bir değişiklik olmamaktadır. Başka bir deyişle, floresan sinyali şiddeti hatalı ölçülmektedir. Bu durumda, denatürasyon kinetiklerinin görüntülenmesi, dolayısıyla Tm derecesi saptama hassasiyeti azalmaktadır (White ve Potts, 2006).

Son dönemlerde, *LC Green, Eva Green* ve *SYTO9* adı verilen üçüncü nesil boyalar geliştirilmiştir. Bu boyaların PZR'yi inhibe edici etkileri daha düşüktür. Bu nedenle, yüksek konsantrasyonlarda kullanılabilmektedirler (Monis ve ark., 2005).

Boya konsantrasyonunun yüksek olması, DNA'nın boya moleküleriyle olan doygunluğunu arttırmaktadır. DNA boya doygunluğuyla; denatürasyon sonucunda çift zincirli DNA'dan ayrılan boyaların, denatüre olmamış bölgelere yeniden bağlanmalarının azaltıldığına inanılmaktadır (White ve Potts, 2006).

Bu boyaların kullanımıyla ölçülen floresan sinyali şiddetindeki değişiklik, çift zincirli DNA'nın tek zincirli DNA'ya ayrılmasını doğru oranda yansıtmaktadır. Bir başka deyişle, yüksek doygunluktaki boyaların kullanımı, *HRM* analizinin mutasyon saptama hassasiyetini arttırmaktadır (Wittwer ve ark., 2003; Herrmann ve ark., 2006).

Type-it® HRM™ PCR (Qiagen) Sistemi real time PZR sonrası analizini içerir ve bu çalışmaların tek bir formatta gerçekleşmesini sağlar. Sistemde 36- veya 72- lik rotorlar bulunmaktadır ve deney süresi yaklaşık 1 saat sürmektedir.

Type-it® HRM™ PCR (Qiagen) sistemi yazılım programı; farklı erime eğrilerinde grafikler halinde dizilerdeki farklı değişimleri göstermektedir. Heterozigot örnekleri homozigot örneklerden en iyi şekilde ayırır ve değişik şekillerdeki erime eğrileri şeklinde gösterir. Bu farklılıklar grafikler halinde en iyi şekilde gösterilir, çünkü en küçük farklılıklar bile erime sıcaklığında apaçık belli olmaktadır (Wittwer ve ark., 2003). Başka bir deyişle, farklı homozigot örnekler, en iyi erime sıcaklığındaki değişimlerden ayrılmaktadır. Genotipler arasındaki farklılıkların gelişmesiyle en küçük amplikonlar bulunmuştur (Gundry ve ark., 2003).

2.14.3 Otomatik DNA dizi analizi

Genomik DNA dizilerinin belirlenmesi için yapılan bir testtir. PZR ile amplifiye edilmiş DNA fragmentlerinin dizilerinin direkt olarak belirlenmesi için floresan boya ile işaretli terminatörleri içeren otomatik DNA dizileme prosedürü uygulanmaktadır. Bu yöntem ile 300-500 bç.lik DNA fragmentleri 24 saat içinde belirlenebilir (Çiftci, 2003). Amplifikasyon sonucunda elde edilen ürünlerinin identifikasyonunda, DNA dizileme prosedürü "altın standart" olarak kabul edilmektedir (Musser ve ark., 1996). İnsan Genom Projesi gibi büyük projeler çok sayıda DNA dizi analizi yapılmasını gerektirmektedir. Artan analiz sayısı, uzun zaman ve yüksek iş gücü gerektirir. Bu gelişmeler sonucunda otomasyon kaçınılmaz olmuştur. Otomatik analizde Sanger'in enzimatik DNA sentezine dayanan zincir sonlanma yöntemi kullanılmıştır (Sambrook ve ark., 1989).

Bu yöntemin kullanılabilmesi için uygun laboratuvar alt yapısına gereksinim duyulması ve maliyetinin yüksek olması, tüm örneklerin dizi analiziyle incelenmesini zorlaştırmaktadır. Bu nedenle; tek zincir konformasyon polimorfizm analizi (*SSCP*) (Orita ve ark., 1989), denatüre edici yüksek performanslı sıvı kromatografisi (*dHPLC*) (Xiao ve Oefner, 2001), denatüre edici jel elektroforezi (*DGGE*) (Fischer ve Lerman 1983), sıcaklık gradiyentli kapiler elektroforezi (*TGCE*) (Gelfi ve ark., 1994) ve Heterodubleks Analizi (*HA*) (Nataraj ve ark., 1999) gibi ön tarama yöntemleri ile nükleotid değişimleri taranmaktadır. Bu yöntemlerin tümünde amaç; genin tamamını dizi analiziyle incelemek yerine değişiklik gösteren ekzon veya intronları saptamak ve sadece bu bölümleri dizi analizine almaktır (Rossiter ve Caskey, 1990; Tawata ve ark., 2000). Bu yöntemlerin de kendi içlerinde dezavantajları bulunmaktadır. Örneğin, *SSCP* yönteminin DNA değişimlerini saptama etkinliği %70-80'dir. Ayrıca bu yöntemlerin çoğunda mutasyonların saptanması için jel ya da matriks ayrımına gerek duyulması ve analiz süresinin en az 4-5 saat olması nedeniyle ortak dezavantajlar bulunmaktadır.

2. 15. Gerçek Zamanlı PZR (Real time PZR, RT-PZR)

1988 yılında "Thermus aquaticus" bakterisinden saflaştırılan, ısıya dayanıklı polimerazın (taq polimeraz) kullanımı ile birlikte polimeraz zincir reaksiyonları için (PCR) otomatize termal siklüs cihazları geliştirilmeye başlanmıştır. Floresan ışıma tekniklerinin de kullanıma girmesiyle kinetik revers transkriptaz-PZR (RT-PZR)'de bir devrim yaşanmaktadır. Bu sayede tümör hücrelerinin ilaç dirençlerinden kemoterapi taramalarına ve tümör evrelerinin moleküler saptanmasına kadar uzanan bir çok farklı alanda gen anlatımını sayısal bir değer olarak ölçmek mümkün olmaktadır.

Bu gelişim sayesinde artık gen kopya ürünlerinin düzeylerini sayısal değerlere dönüştürerek ölçmek, devam eden PZR reaksiyonunu ekranda izleyerek "Real Time" (eşzamanlı) olarak reaksiyonun gidişine müdahale etmek ve PZR döngülerinin sayısıyla oynayabilmek de mümkündür. Birçok adlandırmayla anılan bu teknolojiye floresan okuma yapması nedeniyle yabancı yayınlarda Floresan Kantitatif RT-PZR, Kantitatif-kinetik PZR gibi çeşitli adlar altında rastlamak mümkündür (Sayitoğlu, 2005).

Gerçek zamanlı kantitatif PZR nükleik asitlerin miktarlarının belirlenmesinde günümüzde kullanılan bir metotdur. Bu teknoloji "homojen PZR" ismiyle de tarif edilmektedir. "Real-time PZR"de oluşan ürün miktarı reaksiyon boyunca oluşan ürün

miktarıyla orantılı olarak artan floresan boya ve probların verdiği sinyalin izlenmesiyle anlaşılır ve amplifikasyonun devir sayısı belirli miktardaki DNA moleküllerinin elde edilmesi açısından da gereklidir. Çift zincirli DNA'ya bağlanan "*SYBR-Green I*" floresan boya en basit metotdur. "*SYBR-Green I*" boya ile belirleme çok iyi işleyen bir metotdur fakat reaksiyon ortamında herhangi bir çift zincirli DNA bulunduğunda floresan ışıma yapabilir. Bu primer-dimer oluşumu da olabilir. Çalışılan her DNA'nın kendine özgü Tm sıcaklığı vardır (Günel, 2007).

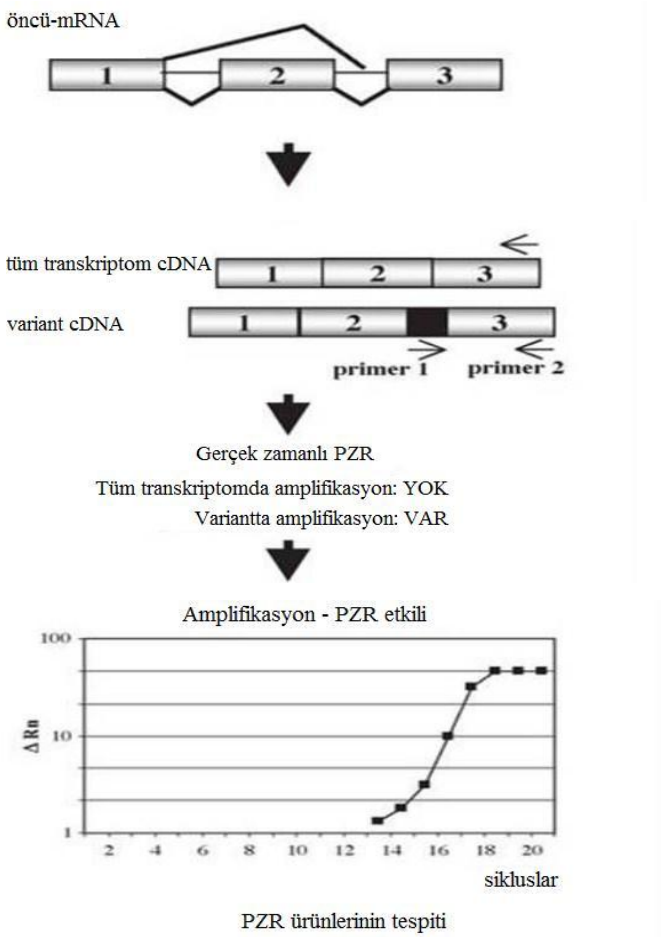
Gerçek zamanlı PZR 10^6 hücre populasyonu içindeki tek bir hücrede ifade edilen gen ifade düzeyini belirleyebilecek kadar hassas ve güvenilir bir metoddur. Konvensiyonel PZR "plato fazında" değerlendirilirken, gerçek zamanlı PZR esnasında veri "logaritmik büyüme fazında" tespit edilebilmektedir. Teknik iki kat artmış değişimi belirleyebilme hassasiyetindedir (Nolani ve ark., 2006).

RT-PZR, her polimeraz zincir reaksiyonunda logaritmik fazdaki ürünün eş zamanlı olarak tespit edilmesini sağlayan duyarlı bir tekniktir. RT-PZR'de, *SYBR Green* gibi interkalasyon yapabilen boyaların kullanımıyla veya florojenik problarla amplikon birikimi tespit edilmektedir (Klein, 2002).

Gerçek zamanlı PZR cihazları, her polimeraz zincir reaksiyonunda floresansın tespit edilmesini sağlayan fluorometre ve "*thermal cycler*" dan meydana gelmektedir. Çalışmaya ait floresan veriler RT-PZR cihazına bağlı bir bilgisayarda toplanmaktadır. Grafik haline getirilen bu veriler gerçek zamanlı PZR analizi için geliştirilen özel yazılımlarla analiz edilmektedir (Peters ve ark., 2004).

Her PZR döngüsündeki floresan ışımanın kaydedilmesi ile başlangıçtan itibaren logaritmik fazda ürün artışına hangi noktada ulaşıldıgı, eş zamanlı olarak izlenebilmektedir. Nükleik asit hedef molekülünün çok sayıdaki kopyasının oluşturulabildiği anda artan miktarda floresan ışıma görülmektedir. Önemli artışı işaret eden eşik değer kullanıcı tarafından ayarlanabilir. Ct (*threshold cycle*) degişkeni; tespit edilen floresan ışınım eşik değerinin aşıldıgı döngü sayısını belirtmektedir (Real Time Amplification on the Rotor Gene Real Time Summary Verison 1,7).

Mutlak ve göreceli miktar analizi, nicel RT-PZR verilerinin analizinde kullanılmaktadır. Göreceli miktar analizinde kullanılan metodlar arasında iki standart eğri ve karşılaştırmalı ΔΔCt metodu bulunmaktadır (Peters ve ark., 2004).



Şekil 2.15. RT-PZR'nin şematik şekli. Bir intronun eklenme tipleri klasik RT-PZR yönteminde kullanılan ekleme organizasyonunu genişleten primerler tarafından belirlenmektedir. Yakın izoformların miktarı kantitatif PZR tarafından analiz edilmektedir

Kantitatif gen ekspresyonu çoğu biyolojik amaçlı araştırma laboratuarlarının esasını oluşturmaktadır. RT-PZR, RNA'dan onun transkripsiyonunu takiben cDNA'yı uzatarak oluşturur. RT-PZR, her PZR döngüsü sonrasında yayılan floresanı algılayarak amplifikasyon sürecini ölçmek için kullanılan özel aletlerdir. Uygun primer tasarımı ve iyi bir teknik, güvenilir reaktifler ve cihazlar ile birleşince yüksek kalitede veri oluşturmak için kritik önemdedir. Pek çok aşama sürecinden oluştuğu gibi, bu cihazda sağlam bir temel belirleyen tutarlı ve güvenilir veri elde etmek önemlidir.

Yıllar boyunca sürekli yüksek kalitede veri elde etmenin iki basit ilkeye bağlı olduğu görüşü savunulmuştur: aynı miktarda yeterli kalitedeki RNA'lar içeren her bir revers transkripsiyon reaksiyonunun normalleşmesi ve içteki uygun kontrol geninin doğrulanması. Çoğu niceliksel gen ekspresyon çalışmalarının bir başka amacı, bir örnekle başka bir örnek arasında gen ifadesini karşılaştırmaktır. Gen ekspresyonu; ilaç tedavisine tabii tutulan ve kontrol amacıyla tedavi edilmemiş farklı hücre ve doku

örneklerinin karşılaştırılmasını ve hastalıklı olmayan dokulara karşı hastalıklı olanlarda gen ekspresyonunun ölçülmesini içermektedir. RT-PZR verileri yaygın bir iç kontrolle normalize edilmektedir. Uygun olan genler genellikle deney koşulları altında değişmeyen ekspresyona sahip olan house-keeping genlerdir. Deney koşulları altında iç kontrol genleri değişirse bu değişimin tanımlanması için ilgili genlerin ölçülmesinden önce RT-PZR tarafından kontrol geninin ekspresyonu ölçülmektedir. İç kontrol genini geçerli kılan en doğru yol her bir revers transkriptaz reaksiyon çalışmasında eşit miktarlarda RNA içermesiyle sağlanmaktadır. Aksi takdirde, deney veya her bir reaksiyonda tanımlanan RNA'daki farklılıklar yüzünden iç kontrol geninde dalgalanma nedeniyle doğru bir şekilde sonuçlanmaz (Schmittgen, 2006).

Gerçek Zamanlı Polimerize Zincir Reaksiyonu (Real-time PZR) günümüzde, özellikle mikrobiyoloji ve adli tıp laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. PZR'nin kullanım amacı, hedeflenen DNA'nın çoğaltılmasını takiben ölçülmesidir. PZR, bir DNA numunesindeki spesifik bir diziyi tespit etmeye ve miktarını ölçmeye (DNA kopya sayısı cinsinden) yarar. Bu tespiti yapabilmek için, DNA kopyalarının başlangıç noktası olarak kullanılacak nükleik asit dizisi olan "primer"e ihtiyaç vardır. DNA polimeraz yardımıyla hedef dizi çoğaltılır ve tespit edilebilir hale gelir. Tespit aşamasında çeşitli PZR cihazları kullanılabilir. Son dönemlerde tür tayininde Real-Time PZR kullanımı artmıştır. Real-Time PZR kitlerinin hassasiyeti genellikle %0,5 civarındadır ancak bazı analiz parametreleri değiştirilerek daha düşük seviyelere ulaşılabilir (Beuselinck ve ark., 2005).

Real-time PZR'de ürünlerin analizi reaksiyon sırasında yapılmaktadır. Bu nedenle, agaroz jel elektroforezi, DNA bantlarının mor ötesi ışık altında görüntülenmesi gibi işlemlerin uygulanmasına gerek kalmamaktadır. Real-time PZR ürünlerinin kalitatif ve kantitatif analizlerinde, diziye özgün olmayan floresan boyalardan ya da diziye özgün problardan yararlanılmaktadır. Böylece sonuçlar anında alınmakta, kontaminasyon riski azalarak tüm işlemler sıcaklık döngüleri başlayınca otomatik olarak devam etmektedir (Morrison ve ark., 1998).

2. 16. SYBR Green I

Spesifik olmayan çift zincirli DNA'nın çoğaltımında "*SYBR Green I*" yöntemi kullanılır. Bu yöntemde kullanılan floresan boya sadece çift zincirli DNA'ya

bağlandığından çoğalan DNA miktarındaki artışa paralel olarak real-time PZR cihazında okunan floresanın miktarı da eş zamanlı olarak artar. "*SYBR-Green I*" en fazla kullanılan boya çeşitidir ve 497 nm dalga boyunda yükseltgenir ve 520 nm dalga boyunda indirgenir. Çift sarmal DNA'nın küçük oluğuna bağlanan boya 30 amplifikasyon döngüsü sonrası yalnızca aktivitesinin % 6'sını kaybeder. Çoğaltımın başında reaksiyon karışımında çift zincirli DNA molekülü, primerler ve "*SYBR-Green I*" boyası bulunmaktadır. Bağlı olmayan serbest DNA molekülü çok az bir floresan ışıma yapar.

Primerler bağlanıp uzama başladığında boya molekülü çift zincirli DNA'nın arasına girer ve floresan yayılımı başlar. Başlangıçtaki döngü boyunca sinyal zayıftır; ürün miktarı arttıkça floresan miktarı hızla artar ve bu artıs real-time cihazının monitöründen izlenebilir.

Bu yöntem optimize edilmiş PZR şartlarında ve dizaynı iyi yapılmış primerler ile çok fazla sayıda hedef genin çoğaltılmasına olanak verir. Floresan işaretli problara ihtiyaç göstermediği için maliyeti ucuzdur. Bunun yanı sıra yöntemin dezavantajları da vardır. İstenmeyen PZR ürünlerin çoğalması ile yine floresan açığa çıkacağından her zaman istediğimiz DNA'nın çoğaldığını işaret etmez yanlış pozitif sonuç almak mümkündür. Ortamda hedef DNA dizisi olmadığında primerlerin birbiri ile bağlanmaları sonucunda "primer dimer"leri olarak adlandırılan ve çift zincirli DNA bölgelerinin oluşumu ile floresan ışıma gözlenebilir. Çoğaltılan DNA'nın istenilen hedef bölge olup olmadığını anlayabilmek için DNA'ların erime eğrisi analizleri ("melting curve", "dissociation") yapılması gerekmektedir. Erime eğrisi analizi yapılmak istendiğinde cihaz PZR tüplerini yavasça ısıtmaya başlar. Çift zincirli DNA birbirinden ayrılmaya başladığında (melting temperature= Tm) floresan boya serbest kalır ve okunan floresan miktarı da düşer. Her bir DNA'nın belirli bir erime sıcaklığı (Tm) derecesi vardır. Bu erime sıcaklığı çoğalan DNA parçalarının uzunluğuna ve içerdiği GC/AT oranına bağlıdır. Spesifik olmayan ürünlerin çoğalmasında (primer dimer'lerinde) aradığımız DNA parçasının Tm derecesi arasında farklılık olacaktır. Tm derecesinin farklı olması her ürünün kendine özgü uzunluğu ve gen dizisi içermesindendir. Bu yüzden Tm sıcaklığı her ürün için özeldir. Çoğunlukla bu yöntemle bilinmeyen iki DNA dizisi karşılaştırılmak istendiğinde yöntem güvenilir bir şekilde kullanılabilir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3. 1. Biyolojik Materyal

HRM çalışmasında; kontrol için Konya Genetikon genetik tanı ve tedavi merkezinden sağlıklı bireylerden alınan 6 adet kan ve Konya Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Patoloji Bölümü'nden parafin bloklara emdirilmiş olarak alınan 12 adet prostat kanserli solid doku örnekleri kullanılmıştır. Gen ekspresyonu çalışmasında ise; HRM çalışmasında kullanılan prostat kanserli solid doku örneklerinden 9 adedi kullanılmıştır.

3. 2. Moleküler Materyal

HRM çalışması için; Kaspaz-2 genine ait iki adet primer dizisi çalışılmıştır ve bu primerler Teknik Kimya tarafından sentezlenmiş olup ticari olarak kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. HRM çalışmasında kullanılan Kaspaz-2'ye ait Varyant 1 (V1) ve Varyant 2 (V2) primer dizileri ve Tm dereceleri

Gen		Oligonükleotid dizisi	Tm
Kaspaz-2 Varyant 1	F	5'-CAC CTC CCC ATC ATC CAC-3'	58.0
	R	5'-GAG ATT CCC ACA TCC CTG AG-3'	60.0
Kaspaz-2 Varyant 2	F	5'- GCA CTT ATC AAG GAT CGG GA-3'	58.0
	R	5'- ATG GGC ACA GGA AAC AAG TC-3'	58.0

Gen ekspresyonu çalışması için; kaspaz- 2 genine ait iki adet izoform mRNA primer dizisi çalışılmıştır. Bu çalışmada kullanılan primerler ise, Primer design tarafından sentezlenmiş olup ticari olarak kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. Gen ekspresyınu çalışmasında kullanılan Kaspaz-2'ye ait İzoform 1 ve İzoform 2 primer dizileri

Gen		**Oligonükleotid dizisi**
Kaspaz-2 İzoform 1	F	5'-CGC GGG GTC TTG GTC C-3'
	R	5'-AGG ATG CAT GCC ACA CAC T-3'
Kaspaz-2 İzoform 2	F	5'- GGA AGA AAT CTG CTG CAC CAC-3'
	R	5'- TTC TAA CAA TTC GCT CAA CAA CAG-3'

3. 3. Histopatolojik Yöntemler

3.3.1. Doku örneklerinin histopatolojik çalışması

Bu çalışmada prostat kanserli biyopsi örneklerinin histopatolojik çalışmaları Konya Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Patoloji Bölümü tarafından yapılmıştır ve bu çalışmalar neticesinde elde edilen parametreler tarafımıza bildirilmiştir.

3. 4. Moleküler Yöntemler

3.4.1. Parafinli bloklardan deparafinasyon

1- Parafin bloktan 10'ar µ.luk kesitler alınır ve ependorf tüplere konulur.
2- Her tüpe 1'er cc Xylol eklenir ve 1 saat 37 °C'de bekletilir.
3- 13000 rpm'de 15 dk. santrifüj edilir.
4- Xylol yenilenerek 2. ve 3. adım tekrar edilir.
5- Ependorf tüplere absolute alkolden 1'er cc eklenir ve 37 °C'de 30 dk. bekletilir.
6- 13000 rpm'de10 dk. santrifüj edilir.
7- Alkol yenilenerek 5. ve 6. adım tekrarlanır. Dokulara dikkat edilerek alkol atılır.
8- % 75'lik alkolden ependorf tüplere 1'er cc eklenir ve 37 °C'de 30 dk. bekletilir.
9- 13000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilir. Alkol yenilenerek 8. ve 9. adım tekrarlanır.
10- Alkol atılır ve ependorf tüplere 1'er cc saf su eklenir. 37 °C'de 15 dk. bekletilir.
11- 13000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilir. Saf su yenilenerek 9. ve 10. adım tekrarlanır. Saf su atılır.
12- Ependorf tüplerin kapağı açılarak kurumaya bırakılır.

3.4.2. DNA izolasyonu

Bu projede HRM çalışmasında kullanılmak üzere kolay kullanımı, hızlı sonuç vermesi ve yüksek kalitede genomik DNA izolasyonu yapması nedeniyle EZ1 biorobot (Qiagen) DNA izolasyon cihazında izolasyon yapılmıştır.

Sağlıklı kontrol kanlarından DNA izolasyonu EZ1 biorobot (Qiagen) DNA izolasyon cihazında Blood kitle ve parafinden arındırılmış doku örneklerinden EZ1 biorobot (Qiagen) DNA izolasyon cihazında Tissue kitle yapılan izolasyon yöntemi kullanılmıştır.

3.4.2.1. EZ1 biorobot (Qiagen) DNA izolasyon cihazı ile izolasyon

1- Parafinden arındırılan prostat dokularından 20-40 mg alınıp sterilize edilmiş havanlara konulur.
2- Havan içerisindeki dokular -196 °C'lik sıvı azotta ezilerek toz hainle getirilir.
3- Ezilen dokular spatula yardımıyla godelere konulur.
4- Godelerdeki dokular üzerine 190 µL G_2 buffer ve 10 µL proteinaz-K eklenir.
5- 37 °C'de 1 gece inkübasyona bırakılır.
6- 300 g'de 2 dk. santrifüj edilir.
7- Süpernatant kısımlar dikkatlice çekilir, ayrı godelere alınır.
8- Cihaz hazırlanır. Elusyon volümü 100 µL seçilir, örnek miktarı 200 µL seçilir.
9- Cihazın yönlendirmesine göre protokol başlatılır.
10- Protokol süresi 20 dakikaya ayarlanır.
11- Protokolden sonra DNA'lar elde edilir ve elde edilen DNA'lar agaroz jele yüklenir.

3.4.3. DNA kalitesinin tanımlanması

3.4.3.1. Agaroz jel elektroforez yöntemi

200-50.000 bç boyutları arasındaki DNA ve RNA moleküllerini tanımlamakta kullanılan standart yöntem agaroz jel elektroforezidir. Agaroz jelin avantajları proteinlere daha düşük afinitesi, nükleik asitler için iyi sonuç vermesi, mükemmel dansitometrik okumaya olanak sağlayan kurutulduktan sonra kalan doğal saydamlığıdır. Genellikle 0,5-1,0 gr agaroz/dl 'lik bir tampon istenen jel dayanıklılığını ve iyi göç özelliklerini sağlar (Cagatay, 2006).

Çalışmamızda izole edilen DNA'lar kalite tespiti için %1'lik agaroz jelde elektroforez cihazında (Biorad) yürütülmüştür.

Bu amaçla 1 gr agaroz tartılıp 100 ml 1XTAE (Tris- Asetik Asit-EDTA) içerisinde kaynatılarak tamamen çözülmesi sağlandı. Bu sırada jel dökme tablası kalıba yerleştirildi ve izolasyon ürünlerinin yükleneceği kuyucukları oluşturmak için tablaya tarak yerleştirildi. Oda sıcaklığına kadar soğutulan agaroz çözeltisi tablaya döküldü. Jel polimerleştikten sonra tarak çıkartıldı ve jel tabladan çıkartılarak içerisinde 1L 1XTAE (Tris-Asetik Asit-EDTA) tampon bulunan elektroforez tankının içerisine yerleştirildi. 7 µL izolasyon ürünü (DNA ve RNA) için 3 µL jel yükleme boyası (loading dye) eklenip jeldeki kuyuya yüklendi. Jel elektroforez tankı güç kaynağına bağlandı ve 45 dk. süreyle 150 Volt 75 mA şiddetinde akım uygulandı.

Agaroz jel içindeki izolasyon ürünlerini görünür hale getirmek için floresan özellikteki etidyum bromür stok çözeltisinden 2–3 µL alınıp yaklaşık 500 ml saf su içerisinde iyice karıştırıldı. Agaroz jel bu solusyon içinde 15 dakika bekletildikten sonra izolasyon ürünleri jel görüntüleme sisteminde incelendi.

3.4.3.2. Mikro hacim (nanodrop) spektrofotometre değerlendirmesi

NanoDrop teknolojisi küvet veya kapiler kullanmadan microvolume örnekleri iki optik kaideleri arasında tutan ve ölçmek için yüzey gerilimi kullanan yenilikçi bir örnek tutma sistemine dayanmaktadır. NanoDrop spektrofotometre proteinlerin 0,5-2 mcL damlacıkları, DNA, RNA ve diğer biyomoleküllerin hızlı ve kolay bir şekilde ölçmek için bu teknolojiyi kullanır. Moleküler teknikler sürekli analiz için küçük miktarlarda malzeme kullanmak geliştikçe bu yeteneği giderek daha önemli hale gelmiştir. Mikro hacim spektrofotometre örnek çok olduğu koşullar için idealdir. Bol miktarda örnek mevcuttur ancak; kullanım kolaylığı, hızlı ölçüm döngüsü ve geniş konsantrasyon aralığında spektrofotometreye uygun hale getirmesi nedeniyle tercih edilmektedir. Ölçüm döngüsü de büyük ölçüde bilim adamlarının kendi iş akışı boyunca verimliliğini arttırmıştır.

Örnek doğrudan algılama yüzeyi üstüne yerleştirilir ve yüzey gerilimi, fiber optik uçları arasında bir sıvı sütunu oluşturulur. Bu sıvı sütunu dikey bir optik yol oluşturur. Xenon flaş lambası, ışık kaynağı ve lineer bir CCD dizi örnek geçer ışığında analiz etmek için kullanılır bir spektrometre sağlar.

Sistem küvetler gibi geleneksel çevreleme cihazlarını içermediği için birçok avantajı vardır. Çok küçük miktarda numune ölçümü için gerekli olan temizleme sadece bir laboratuvar beziyle optik yüzeyleri silerek gerçekleştirilir ve yol uzunluğu ölçümü sırasında gerçek zamanlı olarak değiştirilebilir.

Nanodrop spektrofotometre; DNA, RNA, protein ve diğer biyomoleküllerin absorbansını ölçmek için tam spektrumlu bir spektrofotometredir (Desjardins, 2009).

Bu çalışmada izole edilen DNA'ların konsantrasyon ve kalite ölçümlerinin yapılabilmesi için nanodrop (NanoDrop 2000c thermo) cihazı kullanıldı. Cihazda ölçümü yapılmak üzere DNA örneklerinden 1 µL alınıp A_{260}/A_{280} değerleri ölçüldü.

3.4.4. HRM (High Resolution Melting Curve) yöntemi ile mutasyon tanımlama

Çalışmamın bu kısmında immünohistokimyasal doku örneklerinde HRM analiz yöntemi ile bir tümör baskılayıcısı olarak ileri sürülen kaspaz-2 genindeki; tek nokta mutasyonları tespit edilmiştir.

3.4.4.1. HRM koşulları

4'lü reaksiyon tüplerine konulan 5 µl'lik her bir sağlıklı kontrol DNA ve her bir prostat ca'lı DNA örneği üzerine; 2X HRM Mix (HotStarTaq Plus DNA Polymerase, EvaGreen Dye, optimized concentration of Q-Solution, dNTPs, and $MgCl_2$)' inden 12,5 µl, Forward primerden 1,75 µl, Reverse primerden 1,75 µl, dH_2O' dan 4 µl alınarak hazırlanan reaksiyon karışımından konularak cihazda çalışılmasına hazır hale getirilmiştir.

25 µl hacimli örnekler cihaza yerleştirildikten sonra cihazda 72-well rotor ayarı seçilmiştir ve PZR optimizasyon koşulları denatürasyon için 95ºC 10 dk, primerlerin hedef bölgeye tutunması için her bir primer için gerekli olan sıcaklık 58ºC 30 dk, primerlere nükleotid eklenerek komplementer DNA'nın polimerizasyonu için gerekli olan sıcaklık 72ºC 10 dk olarak belirlenmiştir. Bu üç farklı sıcaklığın ardarda uygulanmasından oluşan döngünün, 40 kez tekrarlanması ile reaksiyon gerçekleştirilmiştir.

3.4.5. RNA izolasyonu

RNA izolasyonunda; hızlı protokol basamaklarına sahip olması, dakikalar içinde yüksek kalitede ve kullanıma hazır total RNA'nın elde edilmesini sağlaması nedeniyle deparafinize edilmiş dokulardan RNeasy Mini kit (Qiagen) kullanılarak total RNA izolasyonu üretici firmanın önerdiği protokol kullanılarak yapılmıştır. Bu nedenlerden dolayı ayrıca manuel RNA izolasyon yöntemleri tercih edilmemiştir.

3.4.5.1. RNeasy mini kit ile RNA izolasyonu

1- Eppendorf tüpler içinde bulunan 20 mg'lik dokular üzerine 30 mg Lysis Buffer konulur ve ısıtıcılı çalkalayıcıya yerleştirilip 37 °C'de 2 saat bekleterek dokuların parçalanması sağlanır.

2- Parçalanan 20 mg'lik dokular üzerine 600 µL Buffer RLT konulur. Bu karışım 2 ml'lik koleksiyon tüpleri içerisine yerleştirilmiş olan QIAshredder spin kolonlar içine pipetle aktarılır ve 15000 rpm'de 2 dk. santrifüj edilir.

3- Daha sonra tekrar 15000 rpm'de 3 dk. santrifüj edilir. Süpernatant dikkatlice alındıktan sonra yeni mikrosantrifüj tüplerine konulur.

4- Süpernatantlar üzerine temizleme amacıyla % 70'lik ethanol konulur ve pipetaj yapılır. Bu basamakta santrifüj yapılmaz.

5- Örneklerin 700 µL'si 2 ml'lik koleksiyon tüplerinin içine yerleştirilmiş spin kolonlar içerisine konulur kapakları kapatılarak 10000 rpm'de 15 s santrifüj edilir.

6- İçerisinde örnek bulunan spin kolonlar başka koleksiyon tüplerine yerleştirilir ve kapakları açılarak üzerine 700 µL Buffer RW1 konulur. Kapaklar tekrar kapatılarak 10000 rpm'de 15 s santrifüj edilerek spin kolonlardaki membranların yıkanması sağlanmış olur.

7- İçerisinde örnek bulunan spin kolonlar başka koleksiyon tüplerine yerleştirilir ve kapakları açılarak üzerine 500 µL Buffer RPE konulur. Kapaklar tekrar kapatılarak 10000 rpm'de 15 s santrifüj edilerek spin kolonlardaki membranların yıkanması sağlanmış olur.

8- İçerisinde örnek bulunan spin kolonlar başka koleksiyon tüplerine yerleştirilir ve kapakları açılarak üzerine 500 µL Buffer RPE konulur. Kapaklar tekrar kapatılarak

10000 rpm'de 2 dk. santrifüj edilerek spin kolonlardaki membranların yıkanması sağlanmış olur.

9- İçerisinde örnek bulunan spin kolonlar başka koleksiyon tüplerine yerleştirilir ve 15000 rpm'de 1 dk. kapağı kapalı şekilde santrifüj edilir.

10- İçerisinde örnek bulunan spin kolonlar 1.5 ml'lik koleksiyon tüpleri içerisine yerleştirilir. Kapakları açılarak üzerlerine 50 µL RNase-free water konulur. Kapaklar tekrar kapatılır, 10000 rpm'de 1dk santrifüj edilerek RNA'nın ayrıştırılması sağlanmış olur (RNeasy mini kit mini book).

3.4.6. RNA kalitesinin tanımlanması

3.4.6.1. Mikro hacim (nanodrop) spektrofotometre değerlendirmesi

Bu çalışmada izole edilen RNA'ların konsantrasyon ve kalite ölçümlerinin yapılabilmesi için nanodrop (NanoDrop 2000c thermo) cihazı kullanıldı. Cihazda ölçümü yapılmak üzere RNA örneklerinden 1 µL alınıp A_{260}/A_{280} değerleri ölçüldü.

3.4.7. Housekeeping gen

Housekeeping genler her hücrede esas olarak eksprese olan özel gen destekleyici elementler olarak tanımlanır fakat onların ifadesi düzensiz olduğu için aslında gerekliliği esas değildir (Azizkhan ve ark., 1993). Ancak housekeeping genlerin moleküler biyoloji deneylerinde kullanılırken aynı hücreden hücreye, örnekten örneğe, tedaviden tedaviye ve/veya hastadan hastaya ekspresyonun aşamalarında değişmeden kaldığı kabul edilir. Bu görüş tüm metodolojilerde onaylanması gerekirken, housekeeping gen ekspresyonunun biyolojik varyasyonlara sahip olup olmadığı verilerin normalleştirilmesi aracılığıyla doğrulanmadığı takdirde zor belirlenmektedir. Öyleyse housekeeping gen ekspresyonu deneyin tek hakemidir (Glare ve ark., 2002).

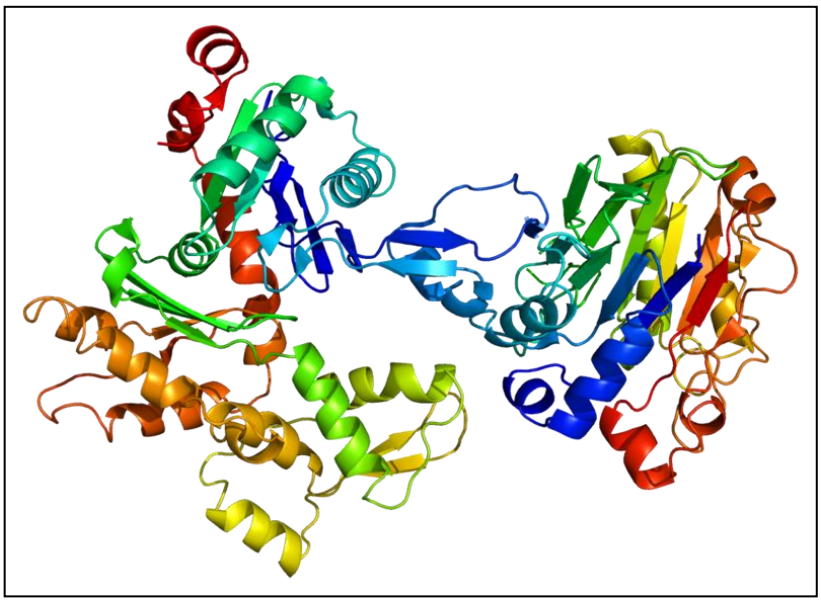
Housekkeping genler çok çeşitli olup; bu genlerden bazıları örneğin *HSP90* ve *Beta-actin*, oldukça sabit seviyelerde eksprese olurken, bazıları ise belirli şartlara bağlı olarak ekprese olmaktadır (Greer ve ark., 2010). Gen ekspresyonunda kullanılan en yaygın iki housekeeping gen *β-aktin* ve *GAPDH* (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)'dır. Bunun nedeni, ekspresyonlarının tutarlı olmasındandır (Gilliland ve ark., 1990). *β-aktin* bir hücre iskeleti proteini, *GAPDH* ise glikoliz olayının bir enzimidir. Gen ekspresyonu sorunlu olarak gerçekleşebilir (Glare ve ark., 2002). Bu

durumda çoğu insan hücresi hücre başına 5-10 kopya oluşturabilir. Housekeeping genler ise; bu durumda hücre başına en az 25 kopya oluşturur ve bazı zamanlar bu sayı 1000'lere ulaşabilmektedir.

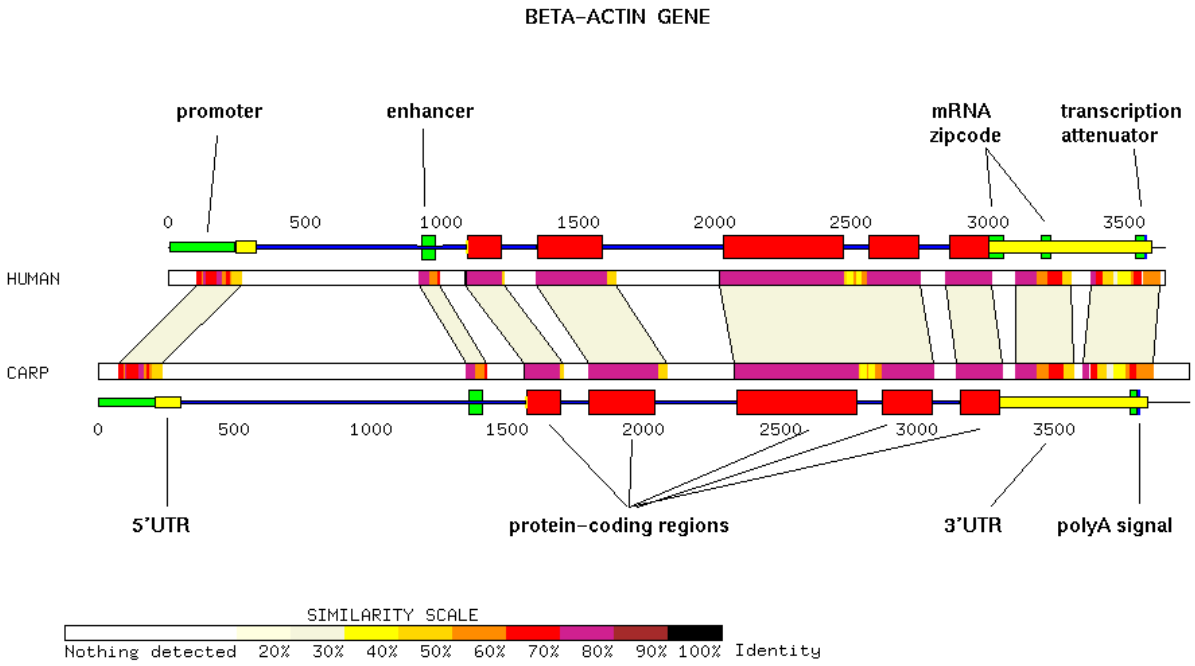
Aktinler hücre hareketini, yapısını ve bütünlüğünü sağlayan yüksek düzeyde korunmuş proteinlerdir. Gen adı ACTB olan Beta-aktin geni; insanlarda tanımlanmış olan 6 farklı aktin izoformlarından biridir. Hücre iskeletinde kasla ilgili olmayan iki aktinden biridir. Beta-aktin; genellikle diğer aktinler arasında yük kontrolünün sağlanması, hücrelerin bütünlüğünün sağlanması, protein bozulmasını sağlar ve Western Blooting tekniğinde kullanılmaktadır. Bu özellikleri nedeniyle gen ekspresyon çalışmasında housekkeping gen olarak beta-aktin kullanıldı. *β- aktin* de Primer design tarafından sentezlenmiştir. Liyofilize haldeki beta-aktin 300 reaksiyonluk olduğu için 330 µl dH_2O ile sulandırılarak kullanıldı.

Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan β- aktin oligonükleotid primerinin dizileri, Tm derecesi ve cDNA üzerinde çoğalttığı dizinin uzunluğu

Gen	No		Oligonükleotid dizisi	Tm	bç
β- aktin	NM_001101.2	F	5'- CGCAAAGACCTGTACGCCAAC -3'	63	164
		R	5'- GAGCCGCCGATCCACACG -3'	63	



Şekil 3.1. Beta aktin proteinin yapısı



Şekil 3.2. β- aktine ait kromozom haritası

3.4.8. Gen ekspresyonu

3.4.8.1. İzole edilen RNA'ların komplementer DNA (cDNA)'ya dönüştürülmesi

İzole edilen RNA'lar sulandırılarak konsantrasyonları eşitlenmiştir ve sulandırılan RNA'ları cDNA'ya dönüştürmek için Precision nanoScript ™ Reverse Transcription kit (Primer Design Ltd.) kullanılmıştır.

- Annealing aşaması

1- 0.2 ml'lik PZR tüplerine her bir RNA örneği konulur ve üzerine belirteçler konulmuştur.

Çizelge 3.4. Annealing aşamasında kullanılan karışım protokolü

İçerik	1 reaksiyon
Kalıp RNA (2ng-2µg)	5 µl
RT primer (KIRMIZI)	1 µl
RNase/DNase free water (BEYAZ)	4 µl
Toplam	10 µl

2- 10 µl'lik karışımların bulunduğu PZR tüplerinin kapakları kapatılır ve ısıtıcılı çalkalayıcıda 65 °C'de 5 dakika tutudu.

3- Karışımın ani bir şekilde soğuması için ısıtıcıdan çıkarılan tüpler hemen buz içine konuldu.

- Uzama aşaması

1- Aşağıda verilen tablodaki protokole göre bir karışım oluşturuldu.

Çizelge 3.5. Uzama aşamasında kullanılan karışım protokolü

İçerik	1 reaksiyon
NanoScript 10X Buffer (BEYAZ)	2,0 µl
dNTP karışımı (TURUNCU)	1,0 µl
DTT 100mM	2,0 µl
RNAse/DNAse free water (BEYAZ)	4,0 µl
NanoScript enzyme (BEYAZ)	1,0 µl
TOPLAM	10 µl

2- Buzdaki örneklerin her birinin üzerine 10 µl'lik tablodaki protokole göre hazırlanan karışımdan konuldu.

3- Tüplerin ağızları kapatılarak vorteksleme işlemi yapıldı ve 25 °C'de (oda sıcaklığında) inkübe edildi. Sonra 55 °C'de 20 dk. inkübe edildi.

4- Oluşturulan karışım 75°C'de 15 dk. inkübe edildi.

5- cDNA örneklerini kullanana kadar -20 °C'de sakladık.

3.4.8.2. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunda gen ekspresyon çalışması

β-aktin, Kaspaz-2 izoform 1 ve Kaspaz-2 izoform 2 genlerinin amplifikasyonları için nicel RT- PZR şartları;

Çizelge 3.6. Gen ekspresyonunda kullanılan karışım protokolü

2X PCR MIX	10 µl
Primer prob mix	1 µl
dH_2O	4 µl
cDNA	5 µl
Toplam	**20 µl**

Protokol

95 °C'de 10 dk. (Enzim aktivasyonu)

95 °C'de 15 s (Denatürasyon)
55 °C'de 30 s (Veri toplama)
72 °C'de 15 s (Bağlanma)
} 50 döngü

3.4.9. Değerlendirme

Bu yöntemde önce hasta örneklerinin ortalama Ct değerleri β-aktin için ayrı ayrı hesaplandı. Kontrol gen ekspresyonu olarak β-aktin kullanıldı. Sonuçlar Comperative Ct yöntemi ile hesaplandı. β-aktin gen ekspresyonu internal kontrol olarak tanımlanmıştır.

3.4.10. İstatistiksel analiz

Hücre canlılığı, apopitoz ve nekrotik oranlardaki değişimler "tek yönlü Anova" testiyle SPSS 15.0 istatistik programı kullanılarak değerlendirildi. Prostat kanserli hastalarda kaspaz-2 gen ekspresyon düzeyi ile sağlıklı örnekler ve beta-aktin gen ekpresyon düzeylerindeki farklılıklar "REST (2009 V2.0.13)" istatistik programı ile karşılaştırıldı. 0.05'den küçük olan p değerleri istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul

edildi. Ayrıca, apoptotik genlerden olan kaspaz-2'de artmış olan mRNA ekspresyon düzeyleri, prostat kanserli hücrelerin apopitoza giderken kaspaz kaskadını kullandığını göstermiştir.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4. 1. Histopatolojik Bulgular

Çizelge 4.1. Prostat parametreleri

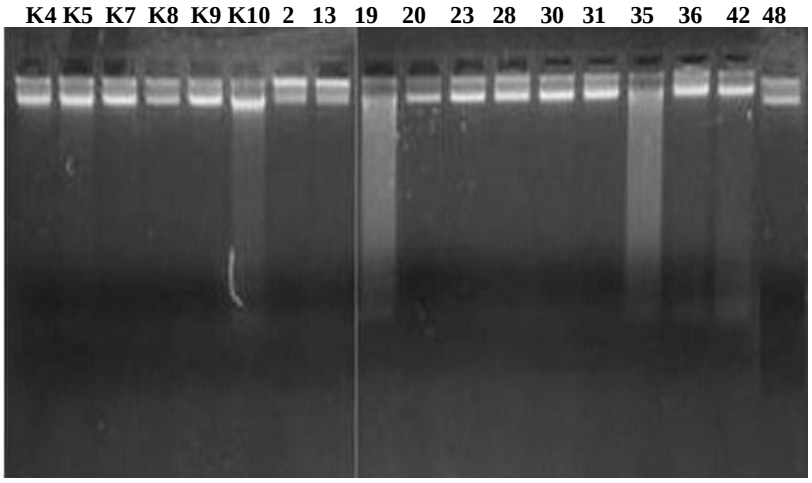
Prostat Kanser Karakteristikleri					
Örnek no	**Hastanın yaşı**	**Gleason Skoru (ng/dl) (PSA)**	**TNM (Tümör-nod-yayılma)**	**Ailesel kanser hikayesi**	**Hastanın taşıdığı diğer kanser tipleri**
2	58	5	NA	Yok	Yok
13	49	5	NA	Yok	Yok
19	69	6	T_{1a}	Testis	Yok
20	59	5	T_{1a}	Yok	Yok
23	70	8	T_{2b}	Yok	Yok
28	89	5	NA	Yok	Yok
30	62	8	T_{1c}	Mesane	Yok
31	51	5	T_{2a}	Yok	Yok
35	58	7	T_{1c}	Mesane	Yok
36	65	7	T_{2a}	Testis, kolon	Kolon
42	72	9	N_0	Böbrek	Akciğer
48	67	7	T_{1c}	Mesane	Yok

Tablodaki TNM değerlerine göre; 42 numaralı hastada kanser gözlenmemiştir. 2, 13 ve 28 numaralı hastalarda tümör total verilere göre sağlıklı ve sağlıklıya yakındır. 19 ve 20 numaralı hastalarda tümör iyi huyludur (alınan prostat dokusunun % 5'i kanserli

ve %95' i iyi huylu tümör). 30 ve 48 numaralı hastalarda kanser tespit edilmiştir. 36 numaralı hastada tümör prostatın sadece tek tarafında lokalize olmuştur. 23 numaralı hastada kanser bulunduğu bölgeden yayılmaya başlamıştır ve 70 yaşın altındakilerde bireylerde gözlenmektedir.

4. 2. Moleküler Test Bulguları

4.2.1. DNA izolasyon bulguları



Şekil 4.1. Agaroz jeldeki DNA izolasyon görüntüleri

Çizelge 4.2. Kan ve prostat dokularından izole edilen DNA'ların nano-drop sonuçları

Kan ve Prostat Doku Numaraları	Nükleik Asit Konsantrasyonu	A_{260}/A_{280}
KAN 4	90,5 ng	1,98
KAN 5	28,0 ng	1,86
KAN 7	258,0 ng	1,75
KAN 8	142,0 ng	1,43
KAN 9	80,0 ng	2,34
KAN 10	26,0 ng	1,53
PROSTAT 2	105,0 ng	1,84
PROSTAT 13	149,0 ng	1,87
PROSTAT 19	159,0 ng	1,85
PROSTAT 20	98,5 ng	1,85
PROSTAT 23	16,5 ng	1,91

PROSTAT 28	90,0 ng	1,29
PROSTAT 30	263,5 ng	1,91
PROSTAT 31	241,0 ng	1,85
PROSTAT 35	197,0 ng	1,96
PROSTAT 36	164,0 ng	1,84
PROSTAT 42	86,0 ng	2,04
PROSTAT 48	67,0 ng	1,84

DNA örneklerinde proteinin en az miktarda olduğunun belirlenmesi için A_{260} / $A_{280} \geq 1,8$ olması gereklidir. Tablodaki A_{260} / A_{280} ölçüm değerlerine göre her bir örneğin standarta yakın izole olduğu görülmektedir. Grafiklerin doğru değerleri verebilmesi için örnekleri sulandırarak nükleik asit konsantrasyonlarını 16 ng' de eşitledik.

4.2.2. RNA izolasyon bulguları

Çizelge 4.3. Prostat dokularından izole edilen RNA'ların nano-drop sonuçları

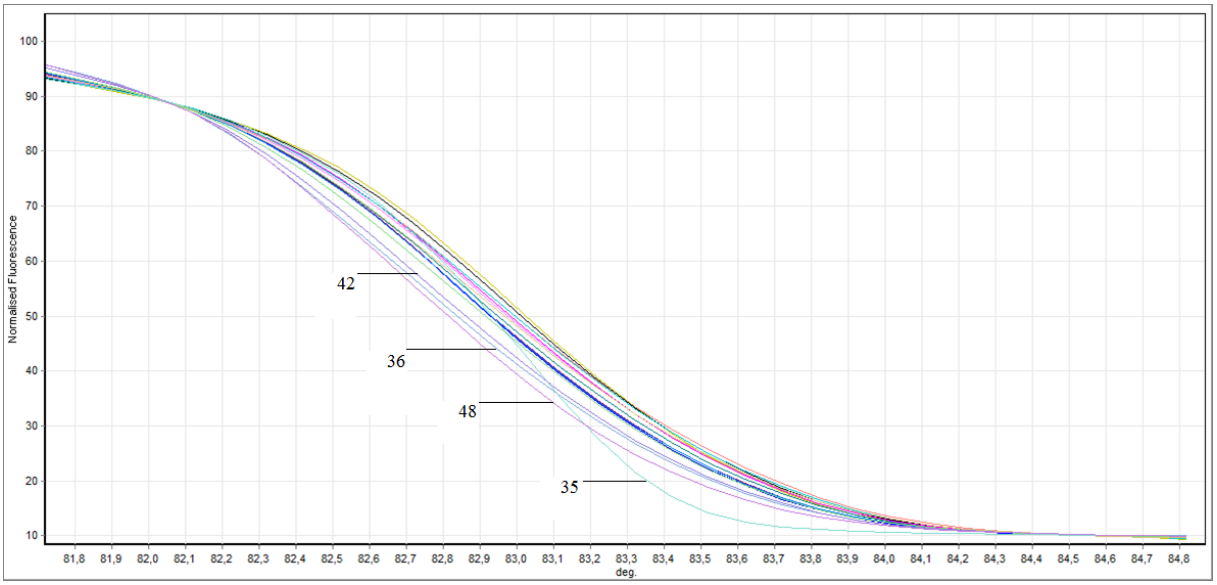
Prostat Doku Numaraları	**Nükleik Asit Konsantrasyonu**	**A_{260} / A_{280}**
13	4,5	1,72
19	5,8	1,70
28	8,5	1,81
30	10,8	1,91
31	7,5	1,91
35	6,8	1,90
36	7,4	2,02
42	8,6	1,75
48	8,8	1,87

RNA örneklerinde proteinin en az miktarda olduğunun belirlenmesi için A_{260} / $A_{280} > 1,8$ olması gereklidir. Tablodaki A_{260} / A_{280} ölçüm değerlerine göre her bir örneğin standarda yakın derecede izole olduğu görülmektedir. Grafiklerin doğru değerleri verebilmesi için örnekleri sulandırarak nükleik asit konsantrasyonlarını 4 ng' de eşitledik.

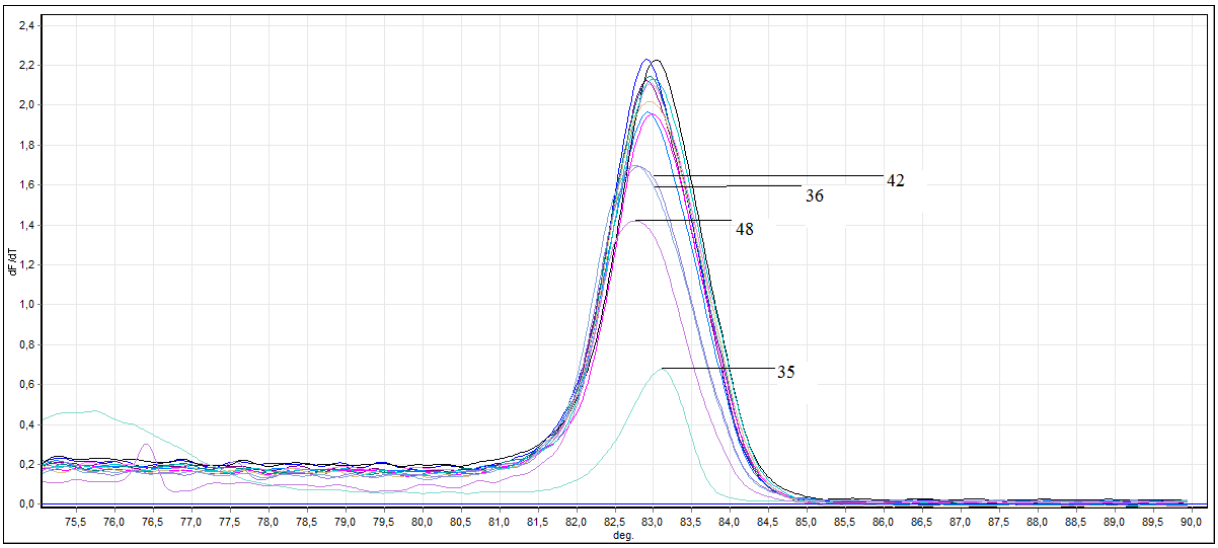
4.2.3. HRM bulguları

Yaptığımız HRM çalışmasında ise; prostat dokularında kaspaz-2 geninin Varyant-1 ve Varyant-2'sinde mutasyon yani anlamlı bölgeler tespit edilmiştir.

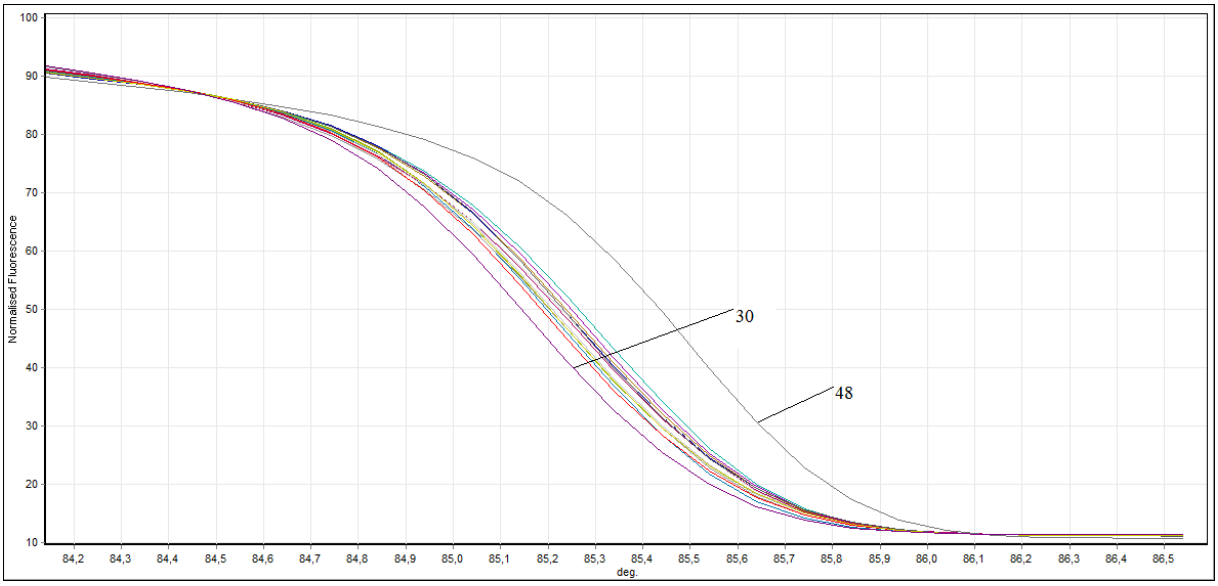
Varyant-1 için; 35, 36, 42 ve 48 numaralı örneklerde mutasyon saptanırken, Varyant-2 için ise; 30 ve 48 numaralı örneklerde mutasyon saptanmıştır (Şekil 4.2., Şekil 4.3., Şekil 4.4., Şekil 4.5.).



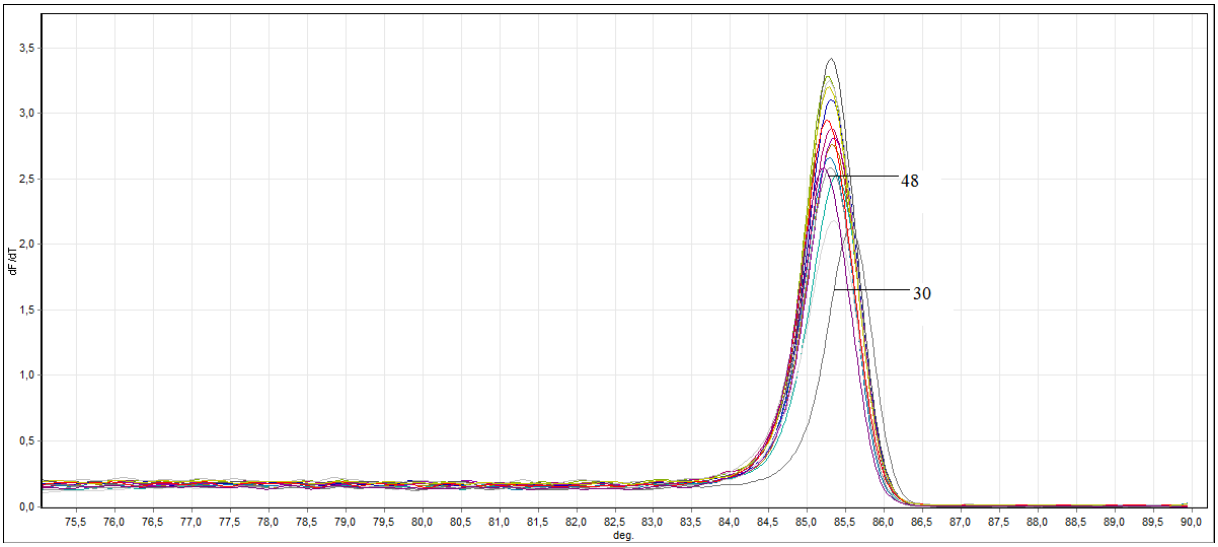
Şekil 4.2. Kaspaz- 2 Varyant- 1 HRM analiz görüntüsü



Şekil 4.3. Kaspaz- 2 Varyant- 1 Melting curve analiz görüntüsü



Şekil 4.4. Kaspaz- 2 Varyant- 2 HRM analiz görüntüsü



Şekil 4.5. Kaspaz- 2 Varyant- 2 Melting curve analiz görüntüsü

4.2.4. RT-PZR'de gen ekspresyon bulguları

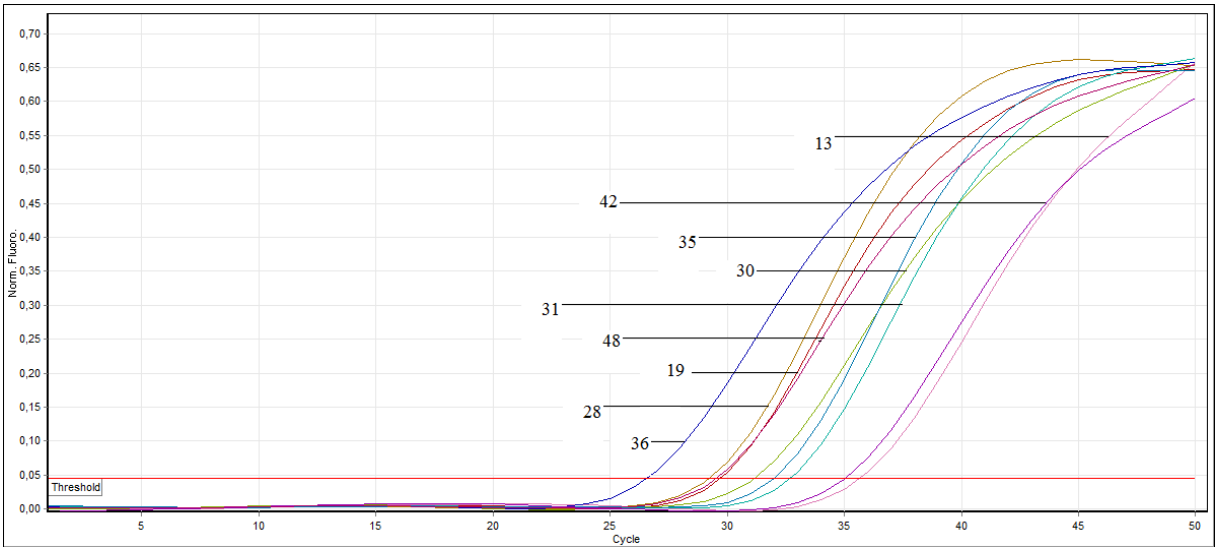
Konya Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi Patoloji Bölümü'nde bulunan 12 adet primer prostat kanserli hastalardan biyopsi örnekleri alınıp histopatolojik incelemeye tabi tutularak her bir hastanın anemnezleri de dikkate alınıp; yaş, TNM evreleri, Gleason skorları, kansere yatkınlık ve ailesel hikaye parametreleri ile birlikte Konya Genetikon genetik tanı ve tedavi merkezinden temin edilen sağlıklı

gönüllü bireylerden 10 adet kan örneği öncelikli olarak RT-PZR'ye dayalı tekniklerden biri olan *HRM* ile mutasyon analizi ve apoptotik yolaktaki en önemli hücre ölüm efektörü olan kaspaz-2 (izoform-1 ve -2) ve pozitif kontrol amaçlı *β-aktin* ile gen ekspresyon dereceleri ve ekspresyon değerleri araştırılmıştır.

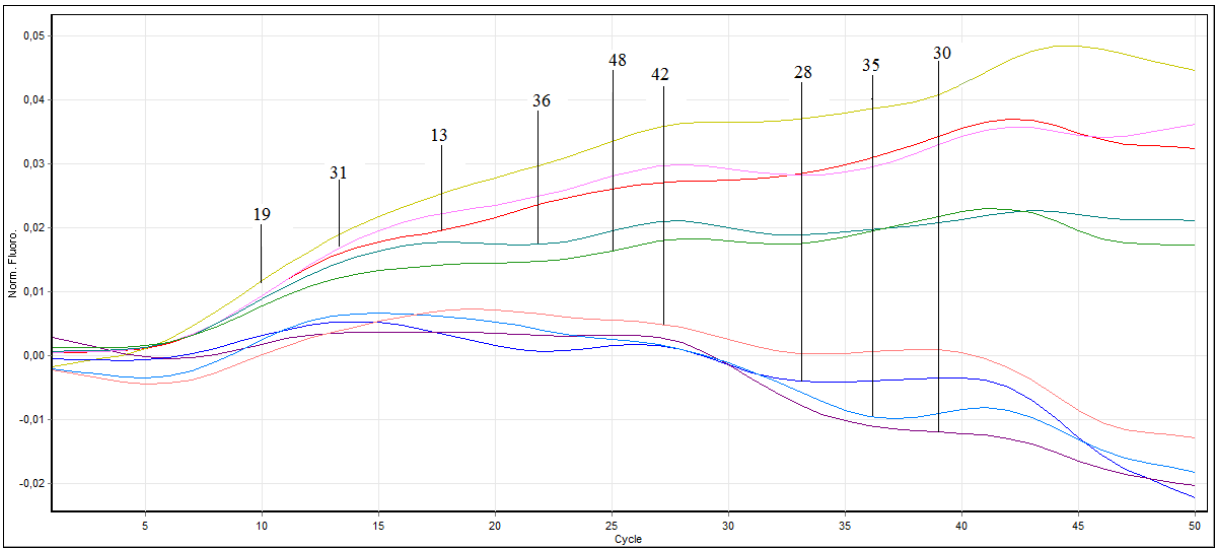
RT-PZR öncesi elde edilen RNA örnekleri RT-PZR çalışmasında kullanılmak üzere -80 °C'de muhafaza edilmiştir. Sonra gen ekspresyonu için reverse transkriptaz enzim protokolü ile cDNA'ya dönüştürülmüştür. Tabloda PZR çalışmasında kullanılan primerlerin dizisi, Tm değeri ve uzunlukları belirtilmiştir. PZR çalışmalarında her hücrede aynı seviyede eksprese olma özelliğine sahip *β-aktin* geni PZR etkinliğinin ölçümüne olanak vermesi sebebiyle pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Çalışmamızın amacı primer prostat kanserli hastalarda kaspaz kaskadını oluşturan gen gruplarından kaspaz-2'ye ait izoform-1 ve izoform-2 genlerinin ekspresyonunun RT-PZR yöntemiyle apopitoz ve nekroz ilişkisini ortaya koymaktır. Bu çalışmada kaspaz-2; kaspazlar arasında evrimsel olarak korunmuş en uç üye olması (Krumschnabel ve ark., 2009) ve hücre iskeletinin bozulması (Ho ve ark., 2008), mitotik yıkım (Castedo ve ark., 2004), *p53* genine bağlı DNA zararı (Baptiste-Okoh ve ark., 2008) ve son yıllarda daha fazla üzerinde durulan ve çalışılan tümör baskılayıcı olması gibi endoplazmik retikulum stresiyle ilgili birden fazla gene sinyal verme özelliği (Upton ve ark., 2008) nedeniyle kullanılmıştır. Kontrol gen ekspresyonu olarak da *β-aktin* kullanılmıştır. Sonuçlar mutasyona uğramış gen dizileri ve ekspresyon dereceleri dikkate alınarak birlikte değerlendirilmiştir. Genel değerlendirmelere bakıldığında kaspaz gen ekspresyonlarının kanser hücrelerinde baskılandığı, sağlıklı bireylerde ise artış gösterdiği gözlenmiştir. Buna göre tümör hücrelerinde gen ekspresyonunun baskılanması ile apopitozun indüklenebileceği tespit edilmiştir.

55 °C'de amplifiye edilen RT-PZR döngüsüne göre prostat kanserli hastalarda kaspaz-2 ve *β-aktin* gen ekspresyonu değerleri karşılaştırıldığında prostat kanserli hastalardan 13 numaralı örneğe ait grafiklere göre kaspaz-2'nin ekspresyon derecesi düşükken; *β- aktin*' in ekspresyon derecesi yüksek bulunmuştur (Şekil 4.6., 4.7.).



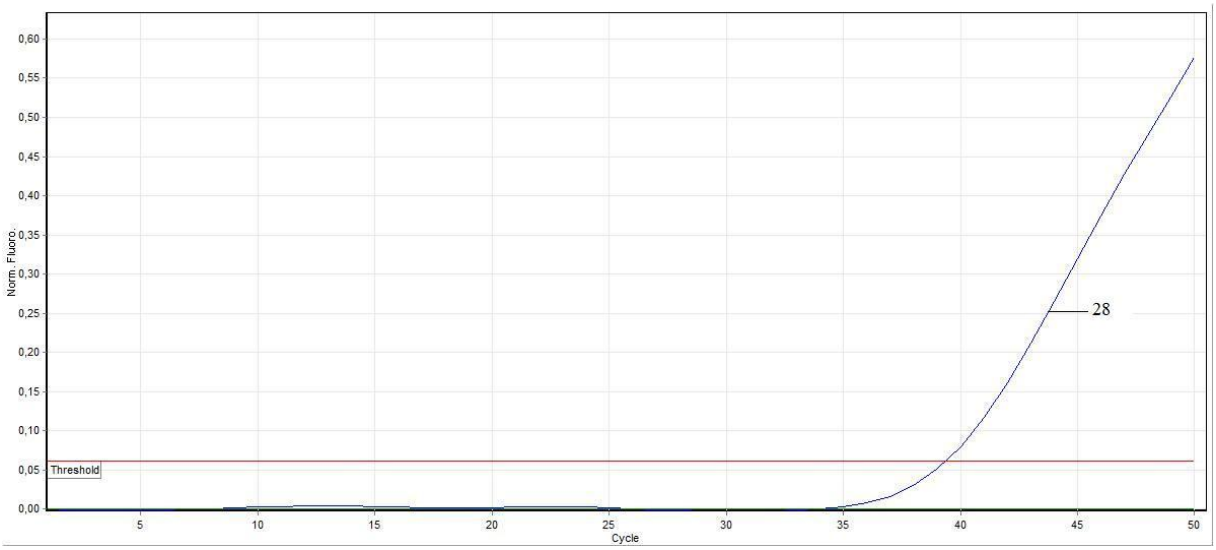
Şekil 4.6. Prostat ca'lı örneklerde 55°C'deki β- Aktin gen ekspresyon görüntüsü



Şekil 4.7. Prostat ca'lı örneklerde 55°C'deki Kaspaz-2 Varyant-1 gen ekspresyon görüntüsü

Deney sonuçlarına göre; kaspaz-2 gen ekspresyonunun Gleason skoru (PSA) değerleri 5 ve üzerinde olan bireylerde azaldığı görülmektedir.

28 nolu hastaya yanlış teşhis konulmuş olup bireyin kanser olmadığı ya da bireyin çok yaşlı olduğu düşünülmektedir. Kaspaz- 2'nin ageing (yaşlanmaya bağlı) rol oynaması nedeniyle yaşlılıkla ilgili olarak bu gen yolağının apototik hücre ekpresyonunu hızlandırdığı ortaya konulmuştur (Şekil 4.8.).



Şekil 4.8. Prostat ca'lı örneklerde 60°C'deki Kaspaz-2 Varyant- 2 gen ekspresyon görüntüsü

Kaspaz düzeyi artan olgularda nekrotik hücre ve dokularda azalma gözlenmektedir. Kaspaz-2'nin V_1 ve V_2 gen ekspresyon yüzdelerine bakıldığında ortalama olarak 19, 30, 31, 35, 36, 42 ve 48 numaralı örnekler prostat kanserli olup TNM evrelemesine göre; T_{1a}, T_{1c}, T_{2a} ve T_{2b} evrelerini göstermektedir. 19, 30, 35, 36, 42 ve 48 numaralı bireylerde ailesel yatkınlığın da göz önüne alınması gerektiğini vurgulamaktadır.

Çalışmanın sonuçlarına göre; kaspaz-2 genlerinin tümör baskılayıcı potansiyele sahip olma durumunu işaret eder biçimde metastatik/kanser olmayan hücrelerde sentezlendiği ama nekrotik hücrelerde sentezlenmediği görülmüştür. Daha sonraki çalışmalar için bu genlerin primer ve sekonder insan tümörlerinde ekspresyon profillerinin incelenmesi bu genlerin metastatik ilgisi için daha kesin sonuçlar elde etmemizi sağlayacaktır.

Elde edilen verilere göre kaspaz genlerinin nekrotik hücrelerin şekillenmesinde etkili olmadığı sağlıklı bireylerde apoptotik hücrelerde etkili olduğu gözlenmiştir.

Kaspaz-2 gen ekspresyonu normal prostat hücrelerinde prostat kanserli hücrelerden daha yüksektir. Bu çalışmada gen ekspresyonu ile klinik göstergeler arasındaki ilişki incelenmemiştir ve kaspaz-2 prostat adenokarsinomları için diagnostik ve prognostik marker olarak kullanılabilineceği öne sürülmüştür.

Son yapılan bir çalışma; DNA hasarına cevap olarak hücre siklusunun G2/M evresindeki kontrol noktasının onarımında nüklear kaspaz-2'nin görevini kapsamaktadır

(Shi ve ark., 2009). Bununla birlikte bu sonuçlar müşterek bir şekilde hücre devrindeki süreçte kaspaz-2'nin görev aldığını ileri sürmüştür.

Özet olarak, bu çalışmada kaspaz-2'nin geniş bir tümör baskılayıcı ağda fonksiyonlarının olduğu gösterilmiştir. Apoptozis düzenleyicilerinin görevleri arasında; tümörlerde terapötik imkanların sürdürülebilmesi için kaspaz aktivitesinin yeniden düzenlenmesi stratejileri yer almaktadır (Fesik, 2005). Burada sunulan verilere dayanarak kaspaz-2 aktivitesinin düzenlenmesi tümörlerde yararlı olabilmektedir ve bu nedenle potansiyel olarak genel hücre koruyucu yolakta vazgeçilmez bir öğe haline gelmiştir (Karin, 2006).

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

Çalışmamızda kaspaz-2 geninin mRNA seviyesindeki ekspresyon analizi RT-PZR çalışmalarıyla belirlenmiştir. RT-PZR çalışmalarında kaspazların prostat kanseri teşhisi konmuş hasta genomunda apoptotik yolaktaki etkisinin yanı sıra nekrotik hücrelerden indükleyici ajanlar olduğunu kanıtlamak için insanlarda var olan kaspaz-2 geninin ekspresyonu aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Yapılan çalışmada prostat kanserinde kaspaz gen ekspresyonunun yüksek tümör grade'i ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Kaspaz ekspresyonunun lokal ileri evre prostat kanserli hastalarda daha düşük olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda, hastaların 8'inde (%85) kaspaz-2 ekspresyonu görülmüştür. Prognostik faktörler ile ilişkisi incelendiğinde; sadece PSA değeri 20 ng/ml'den fazla olan hastalarda anlamlı bulunmuştur.

Sonuçta, bizim gözlemlerimiz prostat tümör oluşumunda düzensiz kaspaz kaskadının ilişkisi olduğunu mantıklı bir şekilde ortaya koymuştur. Tahminlere göre, anahtar kaspazların ekspresyonlarının yok olması durumunda kötü huylu prostat hücrelerinde apoptozise karşı koruma görülmektedir. Şimdiki bulgular kaspazların sadece hastalığın ilerlemesinde bir marker olarak değil potansiyel olarak da önemli bir değerde tanımlanıyor olmasını göstermektedir. Bunun yanında kaspazlar, ileri derecedeki prostat kanserinde apoptotik sürecin etkili aktivasyonu için terapotik olarak hedef alınmaktadır. İleriye yönelik çalışmalarda, hormonal terapi öncesi ve sonrası hastalığı ileri derecede olan hastalardan alınan doku örneklerinin çoğunluğunda kötü

huylu prostat kanseri için terapötik yöntemlerin gelişmesinde kaspazlara potansiyel olarak gerek duyulduğu kanıtlanmaktadır.

Çalışma sonucunda bu genin ekspresyonunun kanserli örneklerde çok düşük düzeylerde izlenmesinin iyi prognoz belirtisi olduğu anlaşılmaktadır. Araştırma, kantitatif "real time PZR" yardımıyla apoptozis kantifikasyonunda apoptozisin şu ana dek proteinden saptanıyor olmasına karşı getirilen önemli bir gelişmedir. Ayrıca gene ait ekspresyon analizleri, mutasyon tanımlama ve RNA analizi gen kantifikasyonu bu amaçla uygulanan başarılı çalışmalardandır. Kantitatif "real time PZR" yardımıyla minimal rezidüel hastalıklarla bağlantılı özgün gen düzeylerinin saptanması kliniklere büyük katkı sağlayacak potansiyeldedir.

Prostat kanserinde kaspaz-2 gen ekspresyon anlatımı bir belirteç olarak anılmaktadır ve nekrotik ve apoptotik hücrelerin gelişmesinde terapiye yanıt ölçümünde de kantifiye edilmektedir.

Yaptığımız çalışmada kaspaz gen ekspresyonlarının kanser hücrelerinde baskılandığı ve sağlıklı bireylerde ise ekspresyon hızlarının arttığı gözlemlenmiştir.

Yüksek kaspaz-2 ekspresyonu ile apopitoz arasında anlamlı bir ilişki mevcuttur ($p<0,05$). Sonuç olarak kaspaz-2'nin prostat kanserli bireylerde tümör oluşumunda, tümör baskılayıcı gen olarak rol oynadığı da kabul edilebilmektedir. Apoptotik hücrelerde aktif rol oynamaktadır. Nekrotik hücrelerde ise ekspresyon hızı düşüktür. Ayrıca bu çalışma ile birlikte, yaşlanma ve apopitoz arasında da bir ilişki olduğu saptanmıştır.

5.2. Öneriler

Artan kanıtlar kaspazların apoptotik olmayan süreçte görev aldıklarını ve proteazların bu ailesinin çok çeşitli fonksiyonlarının olduğunu göstermektedir. Apoptotik proteinlerin ölümle ilgili olmayan görevleri evrimsel olarak korunmuştur ve onların öldürücü fonksiyonlarından daha eski tarihi geçmişleri bulunmaktadır (Algeciras-Schimnich ve ark., 2002). Örneğin, kaspaz-2 gibi evrimsel olarak korunmuş proteinler tarafından kontrol edilen; DNA tamirini tam anlamıyla sağlamak ve genomik dengenin korunması eski hücresel süreçler bu proteinlerin dengeleyici mekanizmaları tarafından korunmaktadır. *PIDD* veya kaspaz-2'nin fenotipik fonksiyonlarının herhangi birinin yokluğu bu proteinlerin önemsiz fonksiyonlara sahip olduğunu göstermez. Bu

eksikliklerin fenotipte az miktarda gözükebilmesi durumunda bile kanser gibi patolojik bozukluklar, kısırlık ve erken yaşlanma gözlenebilmektedir. Nitekim, şimdilerde kaspaz-2 tümör baskılayıcı olarak tanımlanmaktadır. Buna göre; son zamanlarda kaspaz-2'nin hücre devrinin düzenlenmesinde rol aldığı gösterilmektedir. Çünkü tümör-baskılayıcı proteinlerin çoğunun hücre döngüsünün düzenlenmesinde rol aldığı bilinmektedir büyük olasılıkla bu iki yeni bulgu kaspaz-2'nin fonksiyonlarını belirlemektedir. Bununla birlikte, endojen tümör baskılamada kaspaz-2'nin mekanik destekleyici olarak nasıl görev yaptığı tam anlamıyla açıklanamamıştır (Ho ve ark., 2009).

Apoptotik ve apoptotik olmayan süreçlerde kaspazların görevlerinin kontrol edilmesi amacıyla, bu enzimler sonradan kazanılan aktivasyon mekanizmalarına sahiptir. Gerçekte; farklı komplekslerde kaspaz-2'nin özel aktivasyon mekanizmaları onun ayırıcı fonksiyonlarını açıklamak için çeşitli hücreler arası bölgelerde tespit edilmiştir ve bu komplekslerin içine doğru kaspaz-2'nin bağlanması faktörleri düzenlemektedir. Fakat fosforilasyon kontrolünün yanısıra kaspaz aktivasyonunun/aktivitesinin aşamalarının süreçleri hala tam anlamıyla açıklanamamıştır. Kaspaz aktivasyonunun geleneksel görüşü apoptozis boyunca tek düze fonksiyonla sonuçlanan "hepsi veya hiçbiri" olayı olarak tanımlanmıştır. Buna karşın, elde edilen veriler kısmi aktivasyonun yanı sıra çeşitli hücre ölümleri ile sonuçlanan kaspazların aktivasyon aşaması, onların farklı fonksiyonlarını belirlemektedir vurgusunu yapmaktadır. Bildiğimiz kadarıyla bu son bulgulardan dolayı kaspaz-2'nin fonksiyonları gün geçtikçe artmaktadır. Kaspaz-2'nin tam anlamıyla görevini açıklamaya ilaveten, yeni geliştirilen kaspaz-2 substratlarının tanımlanması önemli bir hedef haline gelmiştir. Bizim bu çalışmadaki arayışımız; bu tahmin edilemeyen şaşırtıcı enzimlerin fonksiyonlarının deşifre edilmeye çalışılmasıdır.

Birçok hastalığın patogenezinde, apoptozisin kısmen veya büyük oranda payı bulunmaktadır. Peki, bu hastalıklarda apoptozisin modülasyonuyla, hastalığın önlenmesi veya tedavisi mümkün müdür? Bu sorunun cevabı, şu an için en azından teorik olarak evettir. Apoptozis regülasyonunda görev alan pozitif ve negatif etkili moleküllerin keşfi ile yeni tedavi hedefleri ortaya çıkmıştır. Bunlar intihar reseptörlerinin bloke edilmesi, pseudokaspazlar, kaspaz inhibitörleri ve apoptozis ilişkili gen ekspresyonunun düzenlenmesini içermektedir.

Hücrelerde kaspaz-2'nin güçlendirilmiş ekspresyonu potansiyel olarak otoproteolitik işlem aracılığı (Troy ve Shelenski, 2003) ya da uyarılmış proksimite (Bouchier- Hayes ve ark., 2009) gibi aktif bir enzimin üretimiyle ilgilidir.

Bazı yazarlar hastalıkların patogenezinin, tek başına apoptozis ya da nekroz olarak ayrılamayacağını, her iki hücre ölüm mekanizmasının ortak olarak işe karıştığını belirtmektedir.

Apoptotik ölümlerin hücre içi tetikçiliğini yapan kaspaz enzimleri ile daha çok nekrotik hücre ölümlerinde işe karışan kalpain ve katepsin gibi enzimler arasında geri bildirim ilişkisi olduğu, sadece apoptozisin bloke edilmesi ile nekrotik ölümün ve diğer yeni tarif edilen hücre ölüm şekillerinin şiddetlenebileceği üzerinde durulmaktadır (Yakovlev ve Faden, 2004).

Sonuç olarak, apoptozis prostat kanseri gibi birçok hastalığın etiyopatogenezinde yer almaktadır. Bu hastalıkların patogenezlerinin aydınlatılması gelecekte bu hastalıklara karşı yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde de rol oynayabilecektir.

Yaşlanma olayını açıklamaya çalışan çok sayıdaki hipoteze rağmen, halen tam olarak tanımlanmamıştır. Bazı hücre tiplerinde fizyolojik şartlarda yaşlanma ile apopitozun arttığını sonuç olarak biriken kanıtlar göstermektedir. Bununla birlikte genetik hasarlı hücrelerde apoptozis yaşlanma ile baskılanır. Sonuçta apoptozis yaşlanma ve tümör oluşumunda önemli oynamaktadır. Apopitoz, çok sayıda düzenleyici mekanizmanın işe karıştığı kompleks bir süreçtir. Günümüzde apoptozisi düzenleyen mekanizmalar ve moleküller hızla açığa kavuşmakta, yaşlanma süreci ile birlikte gelişen hücre ölümünün düzenlenmesi ve hastalıklarla ilişkisi ortaya konmaktadır. Yaşlanma ile birlikte fazla sayıda ve erken hücre ölümü organ bozuklukları ve hastalıklara neden olmaktadır. Apopitozun daha iyi anlaşılmaya başlanması sonucu, programlı ve fizyolojik hücre ölümünün düzenlenmesini sağlayacak maddelerin uygulanması ile yaşlanma süreci kontrol altına alınabilecektir.

Yakın gelecekte geleneksel olarak kullanılan radyoterapi ve kemoterapi kanser tedavisinin ilerisinde olan apopitoz-duyarlaştırıcı stratejilerinin kombine uygulamaları üzerinde durulacaktır. Kaspazları aktifleştiren ajanların ve/veya inaktive eden inhibitörlerin klasik kemoterapötiklerle birleştirilmesi tekli ajan protokollerinden daha etkili olacaktır. İlaç ile indüklenmiş apoptozisin kuvvetlendirilmesinin farklı kaspaz kaskadı hedefli ajanlar tarafından yapıldığı çeşitli kötü tümörler içeren meme, prostat, akciğer, kalın barsak, mesane ve ovaryum kanseri, beyin tümörü üzerindeki

çalışmalarda ortaya konulmuştur. Tümör hücrelerinin tedavisinde kaspaz kaskadı hedefli ajanların ve iyonize radyasyonun birleştirilerek kullanılması dikkatleri önemli miktarda üzerine toplamıştır. Örneğin, ribozim aracılı survivin ekspresyonunun inhibisyonu insan melanom hücrelerini γ-ışınlamasına daha duyarlı hale getirmektedir. Benzer şekilde, DLD-1 kolon kanser hücrelerinde apoptozisin artışı eksprese olan kaspaz-8 ve X- ray ışıması adenoviral bir vektörle transfeksiyonu gözlenmiştir.

6. KAYNAKLAR

Ahmad, M., Srinivasula, S. M., Wang, L., Talanian, R.V., Litwack, G., Fernandes-Alnemri, T., Alnemri, E. S., 1997, CRADD, a novel human apoptotic adaptor molecule for caspase-2, and FasL/tumor necrosis factor receptor-interacting protein RIP, *Cancer Res*., 57, 615–619.

Akdaş, A., Çevik,İ, 1996, Prostat Spesifik Antijen, Özen, H. A., Özkardeş, H., Benign Prostat Hiperplazisi, *Hekimler Yayın Birliği*, Ankara, 112-124.

Akşit, H., Bildik, A., 2008, Apoptozis, *YYÜ Vet Fak Derg*, 19 (1), 55-63.

Algeciras-Schimnich, A., Barnhart, B. C., Peter, M. E., 2002, Apoptosis-independent functions of killer caspases, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 14 (6), 721-726.

Altınışık, M., 2009, Gen ifadesi: replikasyon, transkripsiyon, translasyon, posttranslasyonel modifikasyonlar, *Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi A.B.D.*, ppt.

Aminetzach, Y. T., Macpherson, J. M., Petrov, D. A., 2005, Pesticide resistance via transposition-mediated adaptive gene truncation in Drosophila, *Science*, 309 (5735), 764–767.

Amore, A., Coppo, R., 2000, Role of apoptosis in pathogenesis and progression of renal disease, *Nephron*, 86 (2), 99-104.

Andersen, J. L., Johnson, C. E., Freel, C. D., Parrish, A. B., Day, J. L., Buchakjian, M. R., Nutt, L. K., Thompson, J. W., Moseley, M. A. ve Kornbluth, S., 2009, Restraint of apoptosis during mitosis through interdomain phosphorylation of caspase-2, *EMBO J*., 28 (20), 3216-3227.

Antar, V., 2005, Bir Genel Kaspaz İnhibitörü Olan Qvd-Oph'nin Nöroprotektif Etkilerinin Deneysel Spinal Kord Travması Modelinde İncelenmesi, Uzmanlık tezi, *Sağlık Bakanlığı Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Kliniği*, İstanbul.

Azizkhan, J. C., Jensen, D. E., Pierce, A. J., Wade, M., 1993, Transcription from TATA-less promoters: dihydrofolate reductase as a model, *Crit. Rev. Eukaryot Gene Expr.*, 3 (4), 229–254.

Baliga, B. C., Colussi, P, A., Read, S. H., Dias, M. M., Jans, D. A., Kumar, S., 2003, Role of prodomain in importin-mediated nuclear localization and activation of caspase-2, *J. Biol. Chem.*, 278 (7), 4899–4905.

Baptiste-Okoh, N., Barsotti, A. M., Prives, C., 2008, A role for caspase 2 and PIDD in the process of p53-mediated apoptosis, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 105 (6), 1937–1942.

Bertram, J., 2000, The molecular biology of cancer, *Mol. Aspects Med.*, 21 (6), 167–223.

Beuselinck, K., van Ranst, M., van Eldere, J., 2005, Automated extraction of viral-pathogen RNA and DNA for high-throughput quantitative real-time PCR, *J. Clin. Microbiol.* 43 (11), 5541-5546.

Bilir, N., 2008, Sigara ve Kanser, *Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.B.D.*

Bonzon, C., Bouchier-Hayes, L., Pagliari, L. J., Green, D. R., Newmeyer, D. D., 2006, Caspase-2- induced apoptosis requires bid cleavage: a physiological role for bid in heat shock induced death, *Mol. Biol. Cell*, 17 (5), 2150–2157.

Bouchier-Hayes, L., Oberst, A., McStay, G. P., Connell, S., Tait, S. W., Dillon, C. P., Flanagan, J. M., Beere, H. M., Green, D. R., 2009, Characterization of cytoplasmic caspase-2 activation by induced proximity, *Mol. Cell*., 35 (6), 830–840.

Burrus, V., Waldor, M., 2004, Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements, *Res. Microbiol.*, 155 (5), 376–386.

Canatan, H., Halifeoğlu, İ., Gürsu, M. F., Ardıçoğlu, A., Dinçoğlu, D., Bakan, İ., 2004, Serum leptin düzeylerinin prostat kanserli ve benign prostat hiperplazili hastalarda ve sağlıklı kontrollerde (genç ve yaşlı) saptanması, *Fırat Tıp Dergisi*, 9 (4), 112-115.

Carr, A. M., 2000, Cell cycle, piecing together the p53 puzzle, *Science*, 287 (5459), 1765–1766.

Castedo, M., Perfettini, J. L., Roumier, T., Valent, A., Raslova, H., Yakushijin, K., Horne, D., Feunteun, J., Lenoir, G., Medema, R., Vainchenker, W. ve Kroemer, G., 2004, Mitotic catastrophe constitutes a special case of apoptosis whose supression entails aneuploidy., *Oncogene*, 23 (25), 4362-4370.

Choen, G. M., 1997, Caspases, the executioners of apoptosis, *Biochem. J.*, 326 (1), 1-16.

Corbett Life Science, 2006, High Resolution Melt Assay Design and Analysis, CorProtocol™ 6000-1-Sept06, *Corbett Research*, Avustralya.

Cosa, G., Focsaneanu, K. S., McLean, J. R. N., McNamee, J. P. ve Scaiano, J. C., 2001, Photophysical properties of fluorescent DNAdyes bound to Single- and double-stranded DNA in aqueous buffered solution, *Photochemistry and Photobiology*, 73 (6), 585–599.

Cote, J., Dupuis, S. ve Wu, J. Y., 2001, Polypyrimidine track-binding protein binding downstream of caspase-2 alternative exon 9 represses its inclusion, *J. Biol. Chem.*, 276 (11), 8535–8543.

Cote, J., Dupuis, S., Jiang, Z. ve Wu, J. Y., 2001, Caspase-2 pre-mRNA alternative splicing: identification of an intronic element containing a decoy 3' acceptor site, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98 (3), 938–943.

Coussens, L. M. ve Werb, Z., 2002, Inflamattion and cancer, *Nature*, 420, 860-867.

Cuenin, S., Tinel, A., Janssens, S., Tschopp, J., 2008, p53-induced protein with a death domain (PIDD) isoforms differentially activate nuclear factor-kappaB and caspase-2 in response to genotoxic stress, *Oncogene*, 27 (3), 387–396.

Curtin, J. F. ve Cotter, T. G., 2003, Apoptosis: Historical perspectives, *Assays Biochem*., 39, 1–10.

Çiftçi, A., 2003, Antimikrobiyel Direncin Genetik Metotlar ile Saptanması, *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 1 (1), 22-28.

da Motta, V. P., Malafaia, O., Ribas-Filho, J. M., Czeczko, N. G., Ribas, C. A. P. M., Cuenca, R. M., 2009, Caspase- 3 and CD-34 expression in prostate adenocarcinoma, *Rev. Col. Bras. Cir.*, 36 (3), 223-229.

Degterev, A., Boyce, M., Yuan, J., 2003, A decade of caspases, *Oncogene*, 22, 8543–8567.

Demirol, M., 2008, Endojen hiperterminin infant rat modeline oluşturacağı olası serebral hasarın ve değişik tedavi yöntemlerinin hasardaki yerinin araştırılması, Uzmanlık tezi, *Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD*., Elazığ.

Derici, E., 2007, Rho kinaz ve siklooksijenaz inhibitörleri ile siklofosfamid kombinasyonlarının çeşitli tümör hücre serilerine etkileri, Doktora tezi, *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Mersin.

Desjardins, P., Hansen, J. B., Allen, M., 2009, Microvolume protein concentration determination using the NanoDrop 2000c spectrophotometer, *J. Vis. Exp*., 33, 1610.

Divrik, T., 2005, Prostat kanseri için koruyucu ilaç yaklaşımları 'chemoprevention-ilaçlar', *Üroonkoloji Bülteni*, 1.

Drago, J. R., Goldman, L. B., Gershwin, M. E., 1980, Evaluation of nonhormonal cytotxic chemotherapy in the nb rat prostate adenocarcinoma, *Cancer*, 46 (2), 273-278.

Drake, J. W. ve Holland, J. J., 1999, Mutation rates among RNA viruses, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96 (24), 13910–13913.

Droin, N., Bichat, F., Rebe, C., Wotawa, A., Sordet, O., Hamman, A., Bertrand, R. ve Solary, E., 2001a, Involvement of caspase-2 long isoform in Fas-mediated cell death of human leukemic cells, *Blood*, 97, 1835–1844.

Droin, N., Rebe, C., Bichat, F., Hammann, A., Bertrand, R. ve Solary, E., 2001b, Modulation of apoptosis by procaspase-2 short isoform: selective inhibition of chromatin condensation, apoptotic body formation and phosphatidylserine externalization, *Oncogene*, 20, 260–269.

Dunn, S. E., Hardman, R. A., Kari, F. W., Barret, J. C., 1997, Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) alters drug sensitivity of HBL100 human breast cancer cells by

inhibition of apoptosis induced by diverse anticancer drugs, *Cancer Res*., 57, 2687-2693.

Fan, E., Levin, D. B., Glickman, B. W., Logan, D. M., 1993, Limitations in the use of SSCP analysis, *Mutat. Res*., 288 (1), 85-92.

Felmlee, T. A., Liu, Q., Whelen, C., Williams, D., Sommer, S. S., Persing, D. H, 1995, Genotypic detection of Mycobacterium tuberculosis rifampin resistance: comparison of single-strand conformation polymorphism and dideoxy fingerprinting, *J. Clin. Microbiol.*, 33 (6), 1617-1623.

Ferreira, C. G., Span, S. W., Peters, G. J., Kruyt, F. A. E., Giaccone, G., 2000, Chemotherapy triggers apoptosis in a caspase-8-dependent and mitochondria-controlled manner in the non-small cell lung cancer cell line NCI-H460, *Anticancer Res.*, 60 (24), 7133-7141.

Fesik, S. W., 2005, Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery, *Nat. Rev. Cancer*, 5 (11), 876–885.

Fink, D. J., Galen, R. S., 1978, Immunologic dedection of prostatic acid phosphatase, *Human Pathology*, 9 (6), 621-623.

Fischer, S. G. ve Lerman, L. S., 1983, DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80 (6), 1579-1583.

Gelfi, C., Righetti, P. G., Cremonesi, L. ve Ferrari, M, 1994, Detection of point mutations by capillary electrophoresis in liquid polymers in temporal thermal gradients, *Electrophoresis*, 15 (1), 1506- 1511.

Gemba, K., Ueoka, H., Kiura, K., Tabata, M. ve Harada, M., 2000, Immunohistochemical detection of mutant p53 protein in small-cell lung cancer: relationship to treatment outcome, *Lung Cancer*, 29 (1), 23-31.

Glare, E. M., Divjak, M., Bailey, M. J., Walters, E. H., 2002, β-Actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalising mRNA levels, *Thorax*, 57, 765–770.

Gorgoulis, V. G., Zacharatos, P., Mariatos, G., Liloglou, T., Kokotas, S., Kastrinakis, N., Kotsinas, A., Athanasiou, A., Foukas, P., Zoumpourlis, V., Kletsas, D., Ikonomopoulos, J., Asimacopoulos, P. J., Kittas, C., Field, J. K., 2001, Deregulated expression of c-mos in non-small cell lung carcinomas: Relationship with p53 status, genomic instability, and tumor kinetics, *Cancer Res*., 61 (2), 538-549.

Gözüaçık, D., 2011, Otofaji ve Sinyal Yolakları, *Sabancı Üniversitesi, Biyolojik Bilimler ve Biyomühendislik Programı,* İstanbul.

Graeber, T. G., Osmanian, C., Jacks, T., Housman, D. E., Koch, C. J., Lowe, S. W. ve Giaccia, A. J., 1996, Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours, *Nature*, 379 (6560), 88-91.

Greer, S., Honeywell, R., Geletu, M., Arulanandam, R., Raptis, L., 2010, Housekeeping genes; expression levels may change with density of cultured cells, *J. Immunol. Methods*, 355 (1–2), 76–79.

Grievink, H., Stowell, K. M., 2007, Identification of ryanodine receptor 1 single-nucleotide polymorphisms by high resolution melting using the LightCycler 480 System, *Anal. Biochem.*, 374 (2), 396-404.

Grossfeld, G. D., Hayward, S. W., Tlsty, T. D., Cunha, G. R., 1998, The role of stroma in prostatic carcinogenesis, *Endocrine-Related Cancer*, 5, 253-270.

Gundry, C. N., Vandersteen, J. G., Reed, G. H., Pryor, R. J., Chen, J., Wittwer, C. T., 2003, Amplicon melting analysis with labeled primers: A closedtube method for diVerentiating homozygotes and heterozygotes, *Clin. Chem.*, 49 (3), 396–406.

Günel, T., 2007, Gen Anlatımının Kantitatif Analizi "Real-Time PCR", *Bilimsel Mektup*, 27 (5), İstanbul.

Harvey, N. L., Butt, A. J., Kumar, S., 1997, Functional activation of Nedd2/ICH-1 (caspase-2) is an early process in apoptosis, *J. Biol. Chem.*, 272 (20), 13134–13139.

Herder Lexikon der Biologie, 2004, *Mutation.*

Herrmann, M. G., Durtschi, J. D., Bromley, L. K., Wittwer, C. T. ve Voelkerding, K. V., 2006, Amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping: cross-platform comparison of instruments and dyes, *Clinical Chemistry*, 52 (3), 494-503.

Hetts, S. W., 1998, To die or not to die. An overview of apoptosis and its role in disease, *JAMA*, 279 (4), 300-307.

Ho, L. H., Read, S. H., Dorstyn, L., Lambrusco, L., Kumar, S., 2008, Caspase-2 is required for cell death induced by cytoskeletal disruption, *Oncogene*, 27 (24), 3393-3404.

Ho, L. H., Taylor, R., Dorstyn, L., Cakouros, D., Bouillet, P., Kumar, S., 2009, A tumor suppressor function for caspase-2, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*,106 (13), 5336–5341.

Hoffman, B. ve Liebermann, D. A., 1994, Molecular controls of apoptosis: Differentiation/growth arrest primary response genes, proto-oncogenes, and tumor suppressor genes as positive and negative modulators , *Oncogene*, 9, 1807-1812.

Holland, J., Spindler, K., Horodyski, F., Grabau, E., Nichol, S., VandePol, S., 1982, Rapid evolution of RNA genomes, *Science*, 215 (4540),1577–1585.

Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. ve Harris, C. C., 1991, p53 mutations in human cancers, *Science*, 253 (5015), 49-53.

Holten, I., Smith, E., 2008, Prostat kanseri [online], http://kbnet4.cancer.dk/webshop/DownloadFiler/13908-tyrkiskprostatakraeft.pdf, [Ziyaret tarihi: 20 Ekim 2011]

İnci, O., 1995, Ürogenital tümörler, *Nobel Tıp Kitabevleri*, İstanbul, 106-134.

Jaattela, M., 2004, Multiple cell death patways as regulators of tumor initiation and progression, *Oncogene*, 449 (2), 175–185.

Karakuş, E., 2010, Östrojen-bağımlı Meme Kanseri ve Sodyum-bağımlı Organik Anyon Taşıyıcı, *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.*,5 (3), 155–166.

Karin, M., 2006, Nuclear factor-[kappa]B in cancer development and progression, *Nature*, 441, 431–436.

Kataoka, M., Wiehle, S., Spitz, F., Schumacher, G., Roth, J. A., Cristiano, R. J., 2000, Down-regulation of bcl-2 is associated with p16(INK4)-mediated apoptosis in non-small cell lung cancer cells, *Oncogene*, 19 (12), 1589-1595.

Kawabe, S., Munshi, A., Zumstein, L. A., Wilson, D. R., Roth, J. A., Meyn, R. E., 2001, Adenovirus-mediated wild-type p53 gene expression radiosensitizes non-small cell lung cancer cells but not normal lung fibroblasts, *Int. J. Rad. Biol.*, 77 (2),185-194.

Kerr, J. F. R. ve Winterford, C. M., 1994, Apoptosis its significance in cancer and cancer therapy, *Cancer*, 73 (8), 2013-2026.

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

Kidd, V. J., Lahti, J. M., Teitz, T., 2000, Proteolytic regulation of apoptosis, *Semin Cell Dev. Biol.*, 11 (3), 191-201.

Klein, D., 2002, Quantification Using Real Time PCR Technology: Application and Limitation, *Trends in Molecular Medicine*, 8, 6-29.

Korkud, G., Karabay, K., 1993, Üroloji, *İstanbul Üniversitesi Basımevi*, İstanbul, 584 - 592.

Kosova, F. ve Arı, Z., 2011, Prostat kanseri ve apoptozis ilişkisi, *Klinik ve Deneysel Araştırmalar Dergisi*, 2 (1), 124-131.

Krumschnabel, G., Sohm, B., Bock, F., Manzl, C., Villunger, A., 2009, The enigma of caspase-2: the laymen's view, *Cell Death Differ*, 16 (2), 195-207.

Kumar, S., 1995, Inhibition of apoptosis by the expression of antisense *Nedd2*, FEBS Lett., 368 (1), 69–72.

Kumar, S., Kinoshita, M. ve Noda, M., 1997, Characterization of a mammalian cell death gene Nedd2, *Leukemia*, 11 (3), 385–386.

Kumar, S., Kinoshita, M., Noda, M., Copeland, N. G. ve Jenkins, N. A., 1994, Induction of apoptosis by the mouse Nedd2 gene, which encodes a protein similar to the product of the Caenorhabditis elegans cell death gene ced-3 and the mammalian IL-1 beta-converting enzyme, *Genes Dev.*, 8 (14), 1613-1626.

Kumar, S., Tomooka, Y., Noda, M., 1992, Identification of a set of genes with developmentally down-regulated expression in the Mouse brain, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 185 (3), 1155-1161.

Langendijk, H., Thunnissenb, E., Arendsc, J. W., Jonga, J. D., Velded, G. T., Lamerse, R., Guineef, D., Holdenf, J. ve Woutersd, M., 2000, Cell proliferation and apoptosis in stage III inoperable non-small cell lung carcinoma treated by radiotherapy, *Radiotherapy and Oncology*, 56, 197-207.

Lay, M. J. ve Wittwer, C. T., 1997, Real-time fluorescence genotyping of factor V Leiden during rapid cycle PCR, *Clinical Chemistry*, 43 (12), 2262-2267.

Lee, D., Scott, A. L., Jerry, A. L., 2000, Potent and selective nonpeptide inhibitors of caspases 3 and 7 inhibit apoptozis and maintain cell functionally, *J. Biol. Chem.*, 275 (21), 16007- 16014.

Leech, S. H., Olie, R. A., Gautschi, O., Simoes-Wust, A. P., Tschopp, S., Haner, R., Hall, J., Stahel, R. A., Zangemeister-Wittke, U., 2000, Induction of apoptosis in lung-cancer cells following bcl-xL anti-sense treatment, *Int. J. Cancer*, 86 (4), 570-576.

Li, H., Bergeron, L., Cryns, V., Pasternack, M. S., Zhu, H., Shii, L., Greenbergi, A. ve Yuan, J., 1997, Activation of Caspase-2 in apoptosis, *J. Biol. Chem.*, 272 (34), 21010–21017.

Liang, J. Y., Liu, Y. Y., Zou, J., Franklin, R. B., Costello, L. C., Feng, P., 1999, Inhibitory effect of zinc on human prostatic carcinoma cell growth, *Prostate*, 40 (3), 200-207.

Logette, E., Wotawa, A., Solier, S., Desoche, L., Solary, E., ve Corcos, L., 2003, The human caspase-2 gene: alternative promoters, pre-mRNA splicing and AUG usage direct isoform-specific expression, *Oncogene*, 22, 935–946.

Lowe, S. W. ve Ruley, H. E., 1993, Stabilization of the p53 tumor suppressor is induced by adenovirus 5 E1A and accompanies apoptosis, *Genes Dev.*, 7, 535-545.

Lozano, G. ve Elledge, S. J., 2000, p53 sends nucleotides to repair DNA, *Nature*, 404 (6773), 24–25.

Macluskey, M., Baillie, R., Chandrachud, L. M., Pendleton, N., Schor, A. M., 2000, High levels of apoptosis are associated with improved survival in non-small cell lung cancer, *Anticancer Res*., 20 (3B), 2123-2128.

Mendelsohn, A. R., Hamer, J. D., Wang, Z. B., Brent, R., 2002, Cyclin D3 activates caspase 2, connecting cell proliferation with cell death, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 6871−6876.

Mhaidat, N. M., Wang, Y., Kiejda, K. A., Zhang, X. D., Hersey, P., 2007, Docetaxel-induced apoptosis in melanoma cells is dependent on activation of caspase-2, *Mol. Cancer Ther.*, 6 (2), 752-761.

Michael, R. ve Pins, M. D., 2002, Differantial diagnosis in surgical pathology, *W.B.Saunders, Company*, Philadelphia , 540-546.

Monis, P. T., Giglio, S. ve Saint, C. P., 2005, Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis, *Analytical Biochemistry*, 340 (1), 24- 34.

Montgomery, J., Wittwer, J. T., Palais, R., ve Zhou, R., 2007, Simultaneous mutation scanning and genotyping by high-resolution DNA melting analysis, *Nature Protocols*, 2 (1), 59-66.

Morrison, T. B., Weis, J. J., Witter, C. T., 1998, Quantification of low copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification, *Biotechniques*, 24, 954–958.

Musser, J. M., Kapur, V., Williams, D. L., Kreiswirth, B. N., VanSoolingen, D., Embden, J. D. A., 1996, Characterization of the catalase peroxidase gene and inhA locus in izoniasid – resistant and – susceptible strains of M. tuberculosis by automated DNA sequencing, *J. Infect. Dis.*, 173, 196-202.

Nataraj A. J., Olivos-Glander, I., Kusukawa, N. ve Highsmith, W. E. Jr., 1999, Single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for gel-based mutation detection, *Electrophoresis*, 20 (6), 1177-1185.

Nelson, W. G. Ve Kastan, M. B., 1994, DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways, *Mol. Cell Biol.*, 14 (3), 1815-1823.

Nolani, T., Hands, R. E., Bustin, S. E., 2006, Quantification of mRNA using real time RT-PCR, *Nature Protocols*, 1, 3.

Norberg, E., Orrenius, S., Zhivotovsky, B., 2010, Mitochondrial regulation of cell death: processing of apoptosis-inducing factor (AIF), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 396 (1), 95-100.

Nutt, L. K, Margolis, S. S., Jensen, M., Herman, C. E., Dunphy, W. G., Rathmell, J. C. ve Kornbluth, S., 2005, Metabolic regulation of oocyte cell death through the CaMKII-mediated phosphorylation of caspase-2, *Cell*, 123 (1), 89-103.

O'Reilly, L. A., Ekert, P., Harvey, N., Marsden, V., Cullen, L., Vaux, D. L., Hacker, G., Magnusson, C., Pakusch, M., Cecconi, F., Kuida, K., Strasser, A., Huang, D. C., Kumar, S., 2002, Caspase-2 is not required for thymocyte or neuronal apoptosis even though cleavage of caspase-2 is dependent on both Apaf-1 and caspase-9, *Cell Death Differ*, 9 (8), 832–841.

Ojeda, F., Diehl, H. A., Folch, H., 1994, Radiation induced membrane changes and programmed cell death: possible interrelationships, *Scanning Micros.*, 3, 645-651.

Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K. ve Sekiya, T., 1989, Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single strand

conformation polymorphisms, Proceedings *of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86 (8), 2766-2770.

Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T., Hayashi, K., 1989, Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction, *Genomics*, 5 (4), 874-879.

Ozawa, H., Keone, R. W., Marcilla, A. E., 2002, Thetapeutic stragies targetting caspase inhibition following spinal cord injury in rats, *Exp. Neurol.*, 177, 306-313.

Özen, H., 2005, Prostat kanseri [online], Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji A.B.D., http://www.pcteknik.net/hastaliklar/3317-prostat-kanseri-merak-ettiginiz-sorular-ve-yanitlari.html [Ziyaret tarihi: 15 Eylül 2010]

Özkara, H. A., 2003, Mutasyon Tarama Yöntemleri, *Türk Klinik Biyokimya Derg.*, 1, 47-53.

Özmen, M. M., 2005, Yaşlılık ve kanser, *Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Genel Cerrahi Kliniği*, Ankara.

Panaretakis, T., Laane, E., Pokrovskaja, K., Björklund, A. C., Moustakas, A., Zhivotovsky, B., Heyman, M., Shoshan, M. C., Grandér, D., 2005, Doxorubicin requires the sequential activation of caspase-2, protein kinase Cdelta and c-Jun NH2-terminal kinase to induce apoptosis, *Mol. Biol. Cell*, 16 (8), 3821- 3831.

Paroni, G., Henderson, C., Schneider, C., Brancolini, C., 2002, Caspase-2 can trigger cytochrome c release and apoptosis from the nucleus, *J. Biol. Chem.*, 277 (17), 15147−15161.

Peters, I. R., Helps, C. R., Hall, E. J., Day, M. J., 2004, Real-Time RT-PCR: Considerations for Efficient and Sensitive Assay Design, *Journal of Immunological Methods*, 286, 203–217.

Polascik, T. J., Oesterling, J. E., Partin, A. W., 1999, Prostate spesific antigen: a decade of discovery - what we have learned and where we are going, *J. Urol.*, 162 (2), 293-306.

Proskuryakov, S. Y., Konoplyannikov, A. G., Gabaib, V. L., 2003, Necrosis: a specific form of programmed cell death?, *Experimental Cell Research*, 283 (1), 1–16.

Prostat Kanseri, *Prostatakrebs***,** 2010.

Read, S. H., Baliga, B. C., Ekert, P. G., Vaux, D. L., Kumar, S., 2002, A novel apaf-1-independent putative caspase-2 activation complex, *J. Cell Biol.*, 159 (5), 739−745.

Ririe, K. M., Rasmussen, R. P. ve Wittwer, C.T., 1997, Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction, *Analytical Biochemistry*, 245 (2), 154-160.

Robbins, S. L., Cotran, R. S., Kumar, V., 2000, Basic pathology, 6, *WB Saunders Company*, Philadelphia, 516-519.

Robertson, J. D., Enoksson, M., Suomela, M., Zhivotovsky, B., Orrenius, S., 2002, Caspase-2 acts upstream of mitochondria to promote cytochrome c release during etoposide-induced apoptosis, *J. Biol. Chem.*, 277 (33), 29803-29809.

Robertson, J. D., Gogvadze, V., Kropotov, A., Vakifahmetoglu, H., Zhivotovsky, B., Orrenius, S., 2004, Processed caspase-2 can induce mitochondria-mediated apoptosis independently of its enzymatic activity, *EMBO Rep*., 5 (6), 643–648.

Roemer, K., 1999, Mutant p53: gain-of-function oncoproteins and wild-type p53 inactivators, *Biol. Chem.*, 380, 879-887.

Rolf Knippers, 1997, Molekulare Genetik, *Thieme.*

Rosai, J., 2004, Rosai and ackerman's surgical pathology, 9, *Mosby*, Newyork, 1361-1412.

Rossiter, B. J. F. ve Caskey, C. T., 1990, Molecular scanning methods of mutation detection, *The Journal of Biological Chemistry*, 265 (22), 12753-12756.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., 1989, Molecular Cloning, a laboratory manual, *Cold spring harbor laboratory Press*, New York.

Sanmartín, C., Plano, D., Palop, J. A., 2008, Selenium compounds and apoptotic modulation: a new perspective in cancer therapy, *Mini Rev. Med. Chem.*, 8 (10), 1020-1031.

Sawyer, S. A., Parsch, J., Zhang, Z., Hartl, D. L., 2007, Prevalence of positive selection among nearly neutral amino acid replacements in Drosophila, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104 (16), 6504–6510.

Sayitoğlu-Aydın, M., 2005, Hematoloji'de real time pcr, *Türk hematoloji derneği moleküler hematoloji ve sitogenetik alt komitesi temel moleküler hematoloji kursu*.

Schmittgen, T. D., 2006, Quantitative Real-Time RT-PCR, *Application note NanodropND-1000 Spectrophotometer*.

Seyffert, W., 2003, Lehrbuch der Genetik, 2, *Spektrum*.

Sheffield, V. C., Beck, J. S., Kwitek, A. E., Sandstrom, D. W., Stone, E. M., 1993, The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions, *Genomics*, 16, 325-332.

Shi, M., Vivian, C. J., Lee, K. J., Ge, C., Morotomi-Yano, K., Manzl, C., Bock, F., Sato, S., Tomomori-Sato, C., Zhu, R., Haug, J. S., Swanson, S. K., Washbum, M. P., Chen, D. J., Chen, B. P. C., Villunger, A., Florens, L., Du, C., 2009, DNA-PKcs-PIDDsome: a nuclear caspase-2- activating complex with role in G2/M checkpoint maintenance, *Cell*, 136, 508-520.

Solakoğlu, Z., 2009, Apoptoz varlığı ya da yokluğu bir hastalık nedeni, *Klinik Gelişim*, 22 (3), 20-25.

Soler, A. P., Harner, G. D., Knudsen, K. A., McBrearty, F. X., Grujic, E., Salazar, H., Han, A. C., Keshgegian, A. A., 1997, Expression of p-cadherin identifies prostate-

specific-antigen-negative cells in epithelial tissues of male sexual accessory organs and in prostatic carcinomas. Implications for prostate cancer biology, *Am. J. Pathol.*, 151 (2), 471-478.

Sternberg, S. S., Antonioli, D. A., Carter, D., Mills, S. E., Oberman, H. A., 1999, Diagnostic surgical pathology, *W.B. Saunders Company*, Philadelphia, 1899-1934.

Taija, M., Kiviharju-af, H., Marikki, L., 2008, Genetic changes and DNA damage responses in the prostate, *Prostate*, 68 (8), 902-918.

Tanagho, E. A., McAninch, J. W., 1995, Smith's general urology, 4, *A. Simon & Schuster Company*, San Francisco, 410-427.

Tanaka, F., Otake, Y., Yanagihara, K., Yamada, T., Miyahara, R., Kawano, Y., Li, M., Inui, K., Wada, H., 2001, Apoptosis and p53 status predict the efficacy of postoperative administration of UFT in non-small cell lung cancer, *Br. J. Cancer*, 84 (2), 263-269.

Tawata, M., Aida, K. ve Onaya, T., 2000, Screening for genetic mutations, *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 3 (1), 1-9.

Tolunay, Ö., 1999, Prostat kanseri tanısında immünohistokimya, *XIV.Ulusal Patoloji Kongresi*, Antalya, Türkiye.

Troy, C. M., Rabacchi, S. A., Friedman, W. J., Frappier, T. F., Brown, K. ve Shelanski, M. L., 2000, Caspase-2 mediates neuronal cell death induced by beta-amyloid, *J. Neurosci.*, 20 (4), 1386–1392.

Troy, C. M., Shelanski, M. L., 2003, Caspase-2 redux, *Cell Death Differ*, 10 (1), 101–107.

Tunalı, M., 2002, Apoptozis, periodontal doku sağlığı ve patolojilerinde rolü, Doktora semineri, *Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Periodontoloji A.B.D.*, Konya.

Tuncer, M., 2009, Türkiye'de kanser kontrolü, *Koza matbaacılık*, Ankara.

Ulukaya, E., 2001, Akciğer Kanserleri Tanı ve Tedavide Temel İlkeler ve Uygulamalar: Bölüm III- Hücre Siklusu ve Apoptozis, Kayıhan E., Özyardımcı N., Bursa.

Ulukaya, E., 2003, Apoptozis Ders Notları, Ankara.

Umbas, R., Isaacs, W. B., Bringuier, P. P., Schaafsma, H. E., Karthaus, H. F. M., Oosterhof G.O., Debruyne, F. M., Schalken, J. A., 1994, Decreased e-cadherin expression is associated with poor prognosis in patients with prostate cancer, *Cancer Research*, 54, 3929-3933.

Upton, J. P., Austgen, K., Nishino, M., Coakley, K. M., Hagen, A., Han, D., Papa, F. R., Oakes, S. A., 2008, Caspase-2 cleavage of BID is a critical apoptotic signal downstream of endoplasmic reticulum stres, *Mol. Cell Biol.*, 28 (12), 3943–3951.

Van de Craen, M., Declercq, W., Van den brande, I., Fiers, W., Vandenabeele, P., 1999, The proteolytic procaspase activation network: an in vitro analysis, *Cell Death Differ*, 6 (11), 1117-1124.

Vogelstein, B., Lane, D. ve Levine, A. J., 2000, Surfing the p53 network, *Nature*, 408 (6810), 307-310.

Volm, M. ve Koomagi, R., 2000, Relevance of proliferative and pro-apoptotic factors in non-small cell lung cancer for patient survival, *Br. J. Cancer*, 82 (10), 1747-1754.

Vousden, K. H., 2002, Activation of the p53 tumor suppressor protein, *Biochim. Biophys. Acta*, 1602 (1), 47-59.

Vrdoljak, E., Bill, C. A., Stephens, L. C., Van Der Kogel, A. J., Ang, K. K., Tofilon, P. J., 1992, Radiation-induced apoptosis of oligodendrocytes in vitro, *Int. J. Rad. Biol.*, 62, 475-480.

Walsh, P. C., 2002, Campbell's urology, 4, *Saunders*, Philadelphia, 3003-3082.

Wang, L., Miura, M., Bergeron, L., Zhu, H. ve Yuan, J., 1994, *Ich*-1, an *Ice/ced-3*-related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death, *Cell*, 78 (5), 739–750.

Wei, Q., Kazimierz, S., Kadiiska, M., 2001, Mechanism of arsenicinduced cross tolerance to nickel cytotoxicity, genotoxicit and apoptosis in rat liver epithelial cells, *Toxicological Science*, 63 (2), 189-195.

White, H. ve Potts, G., 2006, Mutation scanning by high resolution melt analysis, Evaluation of RotorGene ™ 6000 - Corbett Life Science, HR1 ™ and 384 well LightScanner™ -Idaho Technology, *NGRLW_HRM_1.0, United Kingdom*.

Wittwer, C. T., Reed, G. H., Gundry, C. N., Vandersteen, J. G., Pryor, R. J., 2003, High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen, *Clin. Chem.*, 49 (6), 853–860.

Wittwer, C. T., Kusukawa, N., 2005, Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 4, Burtis, C., Ashwood, D. ve Bruns, D., *Elsevier*, New York , 1407-1449.

Wojno, K. J., Epstein, J. I., 1995, The utility of basal cell-specific anti-cytokeratin antibody (34Be12) in the diagnosis of prostate cancer, *Am. J. Surg. Pathol.*, 19 (3), 251-260.

Xiao, W. ve Oefner, P. J., 2001, Denaturing high-performance liquid chromatography: a review, Human Mutation, 17 (6), 439-474.

Yakovlev, A. G., Faden, A. I., 2004, Mechanisms of neural cell death: implications for development of neuroprotective treatment strategies, *NeuroRx*, 1 (1), 5-16.

Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M., Horvitz, H. R., 1993, The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme, *Cell*, 75 (4), 641-652.

Yüksel, B., Handemir Kılıç, S., Taşdemir, N., Batıoğlu, S., 2008, Apoptosis ve Kaspaz Sistemi, *Jinekoloji- Obstetrik ve neonatoloji Tıp dergisi*.

Zhang, Y., Padalecki, S. S., Chaudhuri, A. R., De Waal, E., Goins, B. A., Grubbs, B., Ikeno, Y., Richardson, A., Mundy, G. R., Herman, B., 2007, Caspase-2 deficiency enhances aging-related traits in mice, *Mech. Ageing Dev.*, 128 (2), 213–221.

Zhivotovsky, B., ve Orrenius, S., 2005, Caspase-2 function in response to DNA damage, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 331 (3), 859-867.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Orçun İŞLER
Uyruğu : TÜRKİYE
Doğum Yeri ve Tarihi : ANKARA- 07.07.1986
Telefon : 0505 7830284
e-mail : orcunisler@gmail.com

EĞİTİM

Derece		**Adı, İlçe, İl**	**Bitirme Yılı**
Lise	:	**Aydınlıkevler Lisesi, Altındağ, ANKARA**	**2004**
Üniversite	:	**Selçuk Üniversitesi Biyoloji Bölümü, Selçuklu, KONYA**	**2009**
Yüksek Lisans	:	**Selçuk Üniversitesi Biyoloji A.B.D., Selçuklu, KONYA**	**2012**
Doktora	:		

YABANCI DİLLER

İngilizce

YAYINLAR

"Journal of Applied Biological Science" adlı derginin 2010/1. sayısında bana ve danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Hasibe (Cingilli) VURAL'a ait olan "Reproduction by Seed and Tissue Culture of Soybean (Glycine max (L.) Merr.) Growing in Turkey" isimli makalemiz yayınlanmıştır.