

**BETA-KATENİN İLE APOPTOZİS ARASINDAKİ İLİŞKİNİN  
SİTOLOJİK VE İMMÜNOSİTOKİMYASAL YÖNTEMLERLE  
ARAŞTIRILMASI**

**EXAMINATION OF INTERACTION BETWEEN BETA-  
CATENIN AND APOPTOSIS BY CYTOLOGICAL AND  
IMMUNOCYTOCHEMICAL METHODS**

**Hanife Güler DÖNMEZ**

**PROF. DR. Şayeste DEMİREZEN**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi  
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin  
Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü  
DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2015

## ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

10/07/2015

HANİFE GÜLER DÖNMEZ

## ÖZET

# BETA-KATENİN İLE APOPTOZİS ARASINDAKİ İLİŞKİNİN SİTOLOJİK VE İMMÜNOSİTOKİMYASAL YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

**Hanife Güler DÖNMEZ**

**Doktora, Biyoloji Bölümü**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Şayeste DEMİREZEN**

**Temmuz 2015, 235 sayfa**

Çalışmamızda  $\beta$ -katenin proteini ile apoptozis arasındaki ilişkinin sitolojik ve immünositokimyasal olarak araştırılması amacıyla 224 hastanın servikovajinal örnekleri incelenmiştir. Bu olgular içinde hiçbir enfeksiyon ve atipik değişiklik saptanmayan 144 olgu (%64,3) kontrol grubu, 80 olgu (%35,7) ise çalışma grubu olarak kabul edilmiştir. Çalışma grubu ise atipik olgular ( $n=17$ , %21,3) ve enfeksiyon olguları ( $n=63$ , %78,7) olmak üzere iki kategoride değerlendirilmiştir. Sitolojik olarak apoptotik hücresel değişiklikler de saptanarak, kaydedilmiştir.

İmmünositokimyasal yöntem kullanılarak  $\beta$ -katenin proteini ve apoptotik hücrelerin varlığı araştırılmıştır. Apoptotik hücrelerin saptanması için aktif kaspaz 3, 8, 9 antikorları kullanılmıştır.  $\beta$ -katenin proteininin zardaki pozitifliği ve sitoplazmadaki zayıf pozitifliği Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunun inaktif olduğunu gösterirken, sitoplazmadaki ve çekirdekteki pozitiflik ise sinyal yolunun aktif olduğunu göstermektedir. Bu verilere dayanarak, 224 olgunun 44'ünde (%19,6) sinyal yolunun aktif, 180'inde (%80,6) ise inaktif olduğu belirlenmiştir. Apoptotik

hücrelerle  $\beta$ -katenin proteini arasındaki ilişki incelendiğinde,  $\beta$ -katenin proteininin hücre zarında, sitoplazmada ve çekirdekte negatif olduğu ve apoptotik hücrelerde Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunun inaktif durumda olduğu görülmüştür. Aktif kaspaz enzimlerine ait bulgular incelendiğinde; 224 olgunun 95'inde (%42,4) aktif kaspaz 3 [apoptozis (+)], 79'unda (%35,3) aktif kaspaz 3 ve 8 veya aktif kaspaz 3, 8 ve 9 [ölüm reseptörleri aracılı apoptozis(+)], 5'inde (%2,2) ise aktif kaspaz 3 ve 9 [mitokondri aracılı apoptozis (+)] enzimlerinin pozitif olduğu saptanmıştır.

Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu aktivitesi ile apoptozis ve ölüm reseptörleri aracılı apoptozis arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu belirlenirken ( $p<0,05$ ), sinyal yolu ile mitokondri aracılı apoptozis arasında ise bir ilişkiye rastlanmamıştır ( $p>0,05$ ). Aktif kaspaz 3, 8 ve 9 enzimlerine ait H-skor ortalamaları sinyal yolu aktif ve inaktif olgularda birbirleriyle karşılaştırıldığında, sinyal yolu aktif olgularda H-skoru ortalamalarının, sinyal yolu inaktif olan olgulara kıyasla daha yüksek olduğu ve H-skor ortalamaları arasında istatistiksel olarak da anlamlı bir ilişki olduğu görülmüştür ( $p<0,05$ ).

$\beta$ -katenin proteininin hücre zarı H-skorları; apoptozis, ölüm reseptörleri aracılı ve mitokondri aracılı apoptozis varlığıyla karşılaştırıldığında, apoptozis, ölüm reseptörleri aracılı ve mitokondri aracılı apoptozis pozitif olan olgularda zardaki  $\beta$ -katenin pozitifliğinin azaldığı belirlenmiştir. Ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ( $p>0,05$ ). Kaspaz enzimleri arasındaki ilişki incelendiğinde aktif kaspaz 3, 8 ve 9 enzimleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir pozitif korelasyon olduğu bulunmuştur. Bu üç enzimin birindeki artışın diğerlerinde de artışa neden olduğu sonucuna gidilmiştir ( $p<0,05$ ).

Tüm bu sonuçlar doğrultusunda apoptotik hücrelerde Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunun inaktif durumda olduğu, ancak apoptotik hücrelerin apoptozis sonucu azalan epitel hücreleri telafi etmek için apoptotik olmayan hücrelerde Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunu aktivitesini uyardığı ve bu şekilde epitel dokunun bütünlüğünün korunduğu yorumu yapılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Beta-katenin, Wnt sinyal yolu, apoptozis, servikovajinal simir, adezyon, kaspaz, immünositokimya

## **ABSTRACT**

# **EXAMINATION OF INTERACTION BETWEEN BETA-CATENIN AND APOPTOSIS BY CYTOLOGICAL AND IMMUNOCYTOCHEMICAL METHODS**

**Hanife Güler DÖNMEZ**

**Doctor of Philosophy, Department of Biology**

**Supervisor: Prof. Dr. Şayeste DEMİREZEN**

**July 2015, 235 pages**

In our study, cervicovaginal samples of 224 cases were evaluated to examine interaction between  $\beta$ -catenin protein and apoptosis. Of these cases, 144 cases (64.3%) without any infection and atypical changes were the control group, 80 cases (35.7%) were formed the study group. Study group was evaluated in two categories as atypical cases ( $n=17$ , 23.3%), and infectious cases ( $n=63$ , 78.7%). Apoptotic cellular changes were also observed cytologically.

$\beta$ -catenin protein and the presence of apoptotic cells were investigated by using immunocytochemical method. To detect apoptotic cells, active caspase 3, 8, and 9 antibodies were used. Positivity of membranous  $\beta$ -catenin staining with weak cytoplasmic staining indicated that Wnt/ $\beta$ -catenin signaling was inactive, while positivity in the cytoplasm and nucleus showed active signaling. Thus, in 44 of 224 cases (19.6%) signaling pathway was active, in 180 cases (80.4%) was inactive. In the examination of interaction between apoptotic cells and  $\beta$ -catenin, it was

observed that  $\beta$ -catenin protein was negative in the cell membrane, cytoplasm and nucleus and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling was showed inactive in apoptotic cells. In the examination of the findings related with activated caspases, active caspase 3 were positive in 95 of 224 cases (42.4%) [apoptosis (+)], active caspase 3 and 8 or active caspase 3, 8, and 9 were positive in 79 cases (35.3%) [death receptor mediated apoptosis (+)], and active caspase 3, 9 were positive in 5 cases (2.2%) [mitochondria mediated apoptosis (+)].

Statistically significant relationship between activity of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling, apoptosis and death receptor mediated apoptosis were determined ( $p < 0.05$ ), while there was no association between signaling activity and mitochondria mediated apoptosis ( $p > 0.05$ ). When the mean of H-scores belonging to active caspase 3, 8, and 9 were compared with each other in view of signaling activity, the mean of H-scores were higher in the signaling active cases than the signaling inactive cases, also statistically significant relationship were found between H-scores ( $p < 0.05$ ).

When the H-scores of membranous  $\beta$ -catenin protein were compared with the presence of the apoptosis, death receptor mediated and mitochondria mediated apoptosis, decreasing of membranous positivity were detected in apoptosis, death receptor mediated and mitochondria mediated apoptosis. However, these decreases were not statistically significant ( $p > 0.05$ ). In analysing the relationship between the caspase enzymes, significant positive correlation between active caspase 3, 8 and 9 was found. Thus, increase in one of the three enzymes caused increases in others ( $p < 0.05$ ).

In accordance with all these findings, Wnt/ $\beta$ -catenin signaling were inactive in apoptotic cells; however it was thought that apoptotic cells induce Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in non-apoptotic cells to compensate decreases in epithelial cells as a result of apoptosis in order to maintain for epithelial tissue integrity.

**Key words:** Beta-catenin, Wnt signaling pathway, apoptosis, cervicovaginal smear, adhesion, caspase, immunocytochemistry

## TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca emeğini, desteğini ve değerli bilgilerini hiçbir zaman esirgemeyen Sayın danışman hocam Prof. Dr. Şayeste Demirezen'e içtenlikle teşekkür ederim. Çalışma kapsamında sitolojik örneklerin alınmasını sağlayarak bu çalışmanın ortaya çıkmasında büyük katkıları olan Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Öğretim Üyesi değerli hocam Sayın Prof. Dr. M. Sinan Beksaç'a çok teşekkür ederim. Tez İzleme Komitesinde bulunan sayın hocalarım Prof. Dr. Nursel Gül ve Doç. Dr. Pergin Atilla'ya çalışmaya olan değerli katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Örneklerin alınması aşamasındaki değerli katkılarından dolayı sayın Dr. Gökhan Boyraz'a ve hemşire Gülay Yar'a, istatistiksel analizlerin yapılmasındaki katkılarından dolayı Sayın Sinan İyisoğlu'na, lisansüstü eğitimime başladığım günden bu yana beni her konuda sonsuz sabır ve sevgiyle teşvik eden, birlikte çalışmaktan büyük keyif aldığım sayın hocam Uzm. Remma Gülsoy'a, hep yanımda olan sevgili dostlarım Arş. Gör. Gülcan Şahal, Arş. Gör. Şeküre Çulha Erdal ve Arş. Gör. Handan Sevim'e, tezin şekilsel olarak düzenlenmesindeki değerli yardımlarından dolayı Arş. Gör. Dr. Seçil Karahisar Turan'a içtenlikle teşekkür ederim.

Yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca verdiği bursla lisansüstü eğitimimde büyük katkısı olan TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na (BİDEB) teşekkür ederim.

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince desteklenmiştir. Proje Numarası: 013D07601001-308 ve Proje Numarası: FDK-2015-6981.

Hayatıma kattıkları herşey için sevgili anneme, babama ve kardeşime sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum. Ve son olarak hayatımın her döneminde sevgisi ve sonsuz desteği ile yanımda olan sevgili eşim H. Taylan Dönmez'e çok teşekkür ediyorum.

# İÇİNDEKİLER

	<u>sayfa</u>
ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR .....	v
İÇİNDEKİLER .....	vi
ÇİZELGELER .....	x
ŞEKİLLER .....	xiii
KISALTMALAR .....	xix
1. GİRİŞ.....	1
1.1. $\beta$ -katenin proteininin yapısı ve hücredeki görevleri.....	1
1.1.1. $\beta$ -katenin proteininin hücre-hücre adezyon görevi.....	2
1.1.2. $\beta$ -katenin proteininin sentrozomlardaki rolü.....	6
1.1.3. $\beta$ -katenin proteininin Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal mekanizmasındaki rolü.....	7
1.2. Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu mekanizması ve bu sinyal yolunda görev alan biyomoleküller.....	7
1.2.1. Wnt sinyal molekülünün özellikleri, sentezi ve salgılanması .....	7
1.2.2. Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu mekanizması .....	14
1.2.2.1. Hedef hücre yüzey reseptörlerinin aktivasyonu .....	14
1.2.2.2. Yıkıcı kompleksin inhibisyonu .....	18
1.2.2.3. Transkripsiyonel kompleksin aktivasyonu.....	24
1.2.3. Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunun apoptozis ile ilişkisi.....	27
1.3. $\beta$ -katenin proteininin çeşitli hastalıkların oluşumundaki rolü .....	28
1.4. $\beta$ -katenin proteininin kanser tanılarındaki belirleyici rolü .....	30
1.5. $\beta$ -katenin proteininin bazı hastalıkların tedavisindeki rolü.....	31
1.6. Hücre ölümü tanımı ve geçmişten bugüne hücre ölümü.....	32
1.7. Hücre ölümü tipleri ve mekanizmalarına genel bir bakış.....	35
1.7.1. Programlı hücre ölümü tipleri .....	35
1.7.1.1. Apoptozis .....	35
1.7.1.2. Otofaji .....	36
1.7.1.3. Nekroptozis .....	38
1.7.1.4. Mitotik çöküş .....	40
1.7.1.5. Kornifikasyon .....	40
1.7.1.6. Netozis.....	41
1.7.1.7. Paraptozis .....	42
1.7.1.8. Anoikis .....	42



1.7.1.9. Entozis .....	43
1.7.1.10. Piroptozis .....	44
1.7.2. Programlı olmayan hücre ölümü .....	45
1.7.2.1. Nekroz .....	45
1.8. Apoptozis mekanizmasında görev alan biyomoleküller .....	46
1.8.1. Ligandlar .....	46
1.8.1.1. TNF $\alpha$ proteini .....	47
1.8.1.2. FASL proteini .....	48
1.8.1.3. TRAIL (TNFSF10/Apo2L).....	48
1.8.2. Reseptörler .....	49
1.8.2.1. TNFR1 .....	50
1.8.2.2. FAS (CD95/APO-1) reseptörü.....	50
1.8.2.3. TRAIL reseptörü (TRAILR1/TRAILR2) .....	51
1.8.3. Kaspazlar.....	52
1.8.4. Kaspaz substratları .....	56
1.8.5. Kaspaz inhibitörleri.....	57
1.8.6. Adaptör proteinler .....	59
1.8.7. Sitokrom c.....	60
1.8.8. Bcl-2 Ailesi .....	61
1.8.8.1. Bcl-2 .....	62
1.8.8.2. Bax .....	62
1.8.8.3. Bak .....	63
1.8.8.4. Bim .....	64
1.8.8.5. Bid .....	64
1.8.8.6. Bad .....	65
1.8.9. p53.....	65
1.9. Apoptotik hücre ölümü mekanizmaları .....	67
1.9.1. Ölüm reseptörü aracılı apoptotik yol.....	67
1.9.1.1. Fas-FasL aracılı apoptotik yol .....	67
1.9.1.2. TNF $\alpha$ -TNFR1 aracılı apoptotik yol.....	70
1.9.1.3. TRAIL-TRAILR1/TRAILR2 aracılı apoptotik yol .....	70
1.9.2. Mitokondri aracılı apoptotik yol.....	71
1.9.2.1. Kaspaz bağımlı mitokondri aracılı apoptotik yol.....	71
1.9.2.2. Kaspaz bağımsız mitokondri aracılı apoptotik yol.....	75
1.9.3. Granzim aracılı apoptotik yol.....	75
1.9.4. Endoplazmik retikulum aracılı apoptotik yol.....	76
1.10. Apoptotik hücrelerde gözlenen biyokimyasal ve morfolojik değişiklikler.....	76

1.10.1. Kromatin yoğunlaşması (kondensasyonu).....	77
1.10.2. DNA kırıklarının oluşumu (fragmentasyonu).....	78
1.10.3. Hücre-hücre bağlantılarının bozulması.....	78
1.10.4. Hücre büzüşmesi (cell shrinkage) .....	79
1.10.5. Hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi.....	80
1.10.6. Hücre zarı tomurcuklanması (Blebbing) .....	82
1.10.7. Hücre zarı asimetrisinin değişmesi.....	83
1.10.8. Organellerde meydana gelen değişiklikler .....	84
1.10.9. Apoptotik cisimciklerin oluşumu.....	87
1.11. Apoptotik hücrelerin ortadan kaldırılma mekanizmaları .....	87
1.11.1. Tanıma.....	88
1.11.2. Fagositik hücreler tarafından yapılan fagositoz .....	91
1.11.3. Epitel hücreleri tarafından yapılan fagositoz.....	95
1.13. Apoptozisin fizyolojik ve patolojik olaylardaki rolü.....	96
1.13.1. Apoptozisin fizyolojik olaylardaki rolü .....	96
1.13.2. Apoptozisin patolojik olaylardaki rolü.....	98
1.13.2.1. Apoptozisin artışına bağlı oluşan hastalıklar.....	98
1.13.2.2. Apoptozisin inhibisyonuna bağlı hastalıklar .....	100
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	102
2.1. Klinik verilerin elde edilmesi .....	102
2.2. Sitolojik inceleme için örneklerin hazırlanması, boyanması ve değerlendirilmesi.....	102
2.3. İmmünohistokimyasal inceleme için örneklerin hazırlanması, boyanması ve değerlendirilmesi.....	103
2.3.1. İmmünohistokimyasal inceleme için örneklerin hazırlanması.....	103
2.3.2. İmmünohistokimyasal boyama metodu .....	103
2.3.3. Negatif ve pozitif kontrol.....	105
2.3.4. İmmünohistokimyasal boyama sonuçlarının değerlendirilmesi .....	106
2.4. İstatistiksel analiz.....	108
3. SONUÇLAR.....	109
3.1. Servikovajinal örneklerin sitolojik olarak incelenmesi .....	109
3.2. Servikovajinal örneklerin immünohistokimyasal olarak incelenmesi .....	122
3.2.1. $\beta$ -katenin proteininin immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi.....	123
3.2.2. Aktif kaspaz 3 enziminin immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi.....	130
3.2.3. Aktif kaspaz 8 enziminin immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi.....	135
3.2.4. Aktif kaspaz 9 enziminin immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi.....	139
3.3. İstatistiksel değerlendirme.....	141

3.3.1. Kontrol grubu ve çalışma grubundaki atipik ve enfeksiyonlu olguların $\beta$ -katenin proteini açısından karşılaştırılması.....	141
3.3.2. Kontrol grubu olguları ile çalışma grubundaki atipik ve enfeksiyonlu olguların apoptozis, ölüm reseptörleri aracılı apoptozis ve mitokondri aracılı apoptozis açısından karşılaştırılması.....	146
3.3.3. $\beta$ -katenin proteini ile apoptozis, ölüm reseptörleri aracılı apoptozis ve mitokondri aracılı apoptozis varlığı arasındaki ilişkinin araştırılması .....	158
3.3.4. Apoptotik belirleyicilerin birbirleri ile karşılaştırılması .....	162
4. TARTIŞMA.....	164
5. KAYNAKLAR .....	189

## ÇİZELGELER

	<u>Sayfa</u>
<b>Çizelge 2. 1.</b> Papanicolaou boyama metodu.....	103
<b>Çizelge 2. 2.</b> Antikor seyreltme oranları .....	104
<b>Çizelge 2. 3.</b> İmmünotokimyasal değerlendirme için örnek tablo.....	107
<b>Çizelge 3. 1.</b> Çalışma kapsamındaki olguların değerlendirilmesi.....	109
<b>Çizelge 3. 2.</b> Çalışma grubunda atipik hücresel değişiklikler gösteren olgular...	110
<b>Çizelge 3. 3.</b> Çalışma grubundaki enfeksiyon olguları .....	111
<b>Çizelge 3. 4.</b> Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu aktivitesinin immünotokimyasal olarak değerlendirilmesi .....	124
<b>Çizelge 3. 5.</b> Apoptozis varlığının immünotokimyasal olarak değerlendirilmesi	130
<b>Çizelge 3. 6.</b> Aktif kaspaz 3, aktif kaspaz 8 ve aktif kaspaz 9 enzimlerin immünotokimyasal olarak değerlendirilmesi .....	139
<b>Çizelge 3. 7.</b> Kontrol grubu olguları ile atipik olguların Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu aktivitesinin varlığı açısından karşılaştırılması.....	142
<b>Çizelge 3. 8.</b> Kontrol grubu olguları ile ASCUS, LSIL ve HSIL olgularının Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu aktivitesinin varlığı açısından karşılaştırılması .....	142
<b>Çizelge 3. 9.</b> ASCUS, LSIL ve HSIL olgularının Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu aktivitesinin varlığı açısından karşılaştırılması.....	143
<b>Çizelge 3. 10.</b> Normal olgularla enfeksiyon olgularının Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu aktivitesi varlığı açısından karşılaştırılması .....	143
<b>Çizelge 3. 11.</b> Kontrol grubu olguları ile BV, Fungal enfeksiyon, TV, SV ve inflamasyon olgularının Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu aktivitesinin varlığı açısından karşılaştırılması .....	144
<b>Çizelge 3. 12.</b> Kontrol grubu olguları ile atipik ve enfeksiyonlu olguların $\beta$ -katenin proteininin hücre zarı, sitoplazma ve çekirdekteki H-skor ortalamaları açısından karşılaştırılması .....	145
<b>Çizelge 3. 13.</b> Kontrol grubu, atipik ve enfeksiyonlu olgularda sinyal aktivitesi açısından $\beta$ -katenin proteininin hücre zarı, sitoplazma ve çekirdekteki H-skor ortalamalarına ait histogram .....	145
<b>Çizelge 3. 14.</b> Kontrol grubu olguları ile atipik olguların apoptozis, ölüm reseptörleri aracılı apoptozis ve mitokondri aracılı apoptozis varlığı açısından karşılaştırılması .....	147

<b>Çizelge 3. 15.</b> Kontrol grubu olguları ile ASCUS olgularının apoptozis, ölüm reseptörleri aracılı apoptozis ve mitokondri aracılı apoptozis varlığı açısından karşılaştırılması .....	147
<b>Çizelge 3. 16.</b> Kontrol grubu olguları ile LSIL olgularının apoptozis, ölüm reseptörleri aracılı apoptozis ve mitokondri aracılı apoptozis varlığı açısından karşılaştırılması .....	148
<b>Çizelge 3. 17.</b> Kontrol grubu olguları ile HSIL olgularının apoptozis, ölüm reseptörleri aracılı apoptozis ve mitokondri aracılı apoptozis varlığı açısından karşılaştırılması .....	148
<b>Çizelge 3. 18.</b> Kontrol grubu olguları ile enfeksiyon olgularının apoptozis, ölüm reseptörleri aracılı apoptozis ve mitokondri aracılı apoptozis varlığı açısından karşılaştırılması .....	149
<b>Çizelge 3. 19.</b> Kontrol grubu olguları ile BV olgularının apoptozis, ölüm reseptörleri aracılı apoptozis ve mitokondri aracılı apoptozis varlığı açısından karşılaştırılması .....	151
<b>Çizelge 3. 20.</b> Kontrol grubu olguları ile Fungal enfeksiyon olgularının apoptozis, ölüm reseptörleri aracılı apoptozis ve mitokondri aracılı apoptozis varlığı açısından karşılaştırılması .....	151
<b>Çizelge 3. 21.</b> Kontrol grubu olguları ile TV olgularının apoptozis, ölüm reseptörleri aracılı apoptozis ve mitokondri aracılı apoptozis varlığı açısından karşılaştırılması .....	152
<b>Çizelge 3. 22.</b> Kontrol grubu olguları ile SV olgularının apoptozis, ölüm reseptörleri aracılı apoptozis ve mitokondri aracılı apoptozis varlığı açısından karşılaştırılması .....	152
<b>Çizelge 3. 23.</b> Kontrol grubu olguları ile inflamasyon olgularının apoptozis, ölüm reseptörleri aracılı apoptozis ve mitokondri aracılı apoptozis varlığı açısından karşılaştırılması .....	153
<b>Çizelge 3. 24.</b> Kontrol grubu olguları ile enfeksiyon ve atipik olguların kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 H-skor ortalamaları açısından karşılaştırılması .....	154
<b>Çizelge 3. 25.</b> Kontrol grubu, enfeksiyon olguları ve atipik olguların aktif kaspaz 3, aktif kaspaz 8 ve aktif kaspaz 9 enzimlerine ait H-skor değerlerini gösteren bar grafiği .....	154

<b>Çizelge 3. 26.</b> Kontrol grubu olguları ile enfeksiyon ve atipik olguların aktif kaspaz 3, aktif kaspaz 8 ve aktif kaspaz 9 enzimlerine ait H-skor ortalamaları açısından birbirleri ile ayrı ayrı karşılaştırılması .....	155
<b>Çizelge 3. 27.</b> Kontrol grubu olgularında apoptozis ile Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu aktivitesinin varlığı arasındaki ilişkinin incelenmesi .....	159
<b>Çizelge 3. 28.</b> Kontrol grubunda Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu aktif olan hastaların aktif kaspaz 3, aktif kaspaz 8 ve aktif kaspaz 9 enzimlerine ait H-skorlarının karşılaştırılması .....	159
<b>Çizelge 3. 29.</b> Sinyal aktif ve inaktif olgularda aktif kaspaz enzimlerine ait H-skor ortalamalarının karşılaştırıldığı histogram .....	160
<b>Çizelge 3. 30.</b> Kontrol grubunda, apoptozis, ölüm reseptörleri aracılı apoptozis ve mitokondri aracılı apoptozis pozitif ve negatif olan olgularda $\beta$ -katenin proteininin hücre zarı H-skorlarının karşılaştırılması .....	162
<b>Çizelge 3. 31.</b> Aktif kaspaz 3, aktif kaspaz 8 ve aktif kaspaz 9 enzimlerine ait H-skor ortalamaları arasındaki korelasyon analizi .....	163
<b>Çizelge 3. 32.</b> Aktif kaspaz 3, aktif kaspaz 8 ve aktif kaspaz 9 enzimlerine ait H-skor ortalamaları arasındaki korelasyon analizi sonu oluşturulan matris grafiği .	163

# ŞEKİLLER

Sayfa

<b>Şekil 1. 1.</b> $\beta$ -katenin proteininin yapısında bulunan bölgelerin şematik görünümü. 1	
<b>Şekil 1. 2.</b> Adezyon kemeri ve bu bağlantıda görev alan biyomoleküller. .... 5	5
<b>Şekil 1. 3.</b> Wnt sinyal molekülünün sentezi, salgılanması ile yakın mesafedeki hücreleri (1) ve uzak mesafedeki hücreleri etkileme (2) mekanizması ..... 11	11
<b>Şekil 1. 4.</b> Wnt proteinleri Glipikanlara bağlanarak hedef hücre zarındaki reseptörlerine ulaşmaktadır. .... 13	13
<b>Şekil 1. 5.</b> Hedef hücre yüzey reseptörlerinin aktivasyonu ..... 15	15
<b>Şekil 1. 6.</b> Yıkıcı kompleksin yapısı ve $\beta$ -katenin proteininin yıkım basamakları.. 22	22
<b>Şekil 1. 7.</b> Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunun inaktif ve aktif olduğu durumların şematik görünümü ..... 24	24
<b>Şekil 1. 8.</b> Apoptozis mekanizmasını uyanan ligandlar ve ölüm reseptörleri ile etkileşimi..... 51	51
<b>Şekil 1. 9.</b> Başlatıcı ve efektör kaspazların aktivasyonu ..... 56	56
<b>Şekil 1. 10.</b> Fas-FaL ve TNF $\alpha$ -TNFR1 aracılı apoptotik mekanizmalar..... 69	69
<b>Şekil 1. 11.</b> Kaspaz bağımlı mitokondri aracılı apoptozis mekanizması..... 74	74
<b>Şekil 1. 12.</b> Hücre büzüşmesi. .... 80	80
<b>Şekil 1. 13.</b> Hücre zarı tomurcuklanması ..... 83	83
<b>Şekil 1. 14.</b> Apoptotik hücrelerde fosfatidilserin (PS) hücre zarının iç yüzünden dış yüzüne taşınması ..... 84	84
<b>Şekil 1. 15.</b> Apoptozise bağlı olarak ER dağılır, Golgi organeli parçalanır ve veziküler trafik bozulur. Mitokondri ise fragmentasyona uğrar..... 86	86
<b>Şekil 1. 16.</b> Apoptotik hücrelerin makrofajlar tarafından tanınması ve fagositozu. 91	91
<b>Şekil 1. 17.</b> Fagozom ve fagolizozom oluşumunun basamakları ..... 95	95
<b>Şekil 3. 1.</b> Önemi Belirsiz Atipik Skuamoz Hücrelerin (ASCUS) görüldüğü bir olguda çekirdekte az oranda büyüme, çekirdek zarında hafif düzensizlik ve hafif hiperkromatizm (ok) gösteren atipik hücre (E) dikkati çekmektedir (PAP, x1000).....113	113
<b>Şekil 3. 2.</b> Hafif Dereceli Skuamoz İntraepitelial Lezyon (LSIL) saptanmış bir olguda çekirdek zarında düzensizlik (ok başı) ve çekirdek etrafında koilos (ok) adı	

verilen geniş bir boşluk bulunan koilostotik hücre dikkati çekmektedir (PAP, x1000). .....	113
<b>Şekil 3. 3.</b> Yüksek Dereceli Skuamoz İntraepitelyal Lezyon (HSIL) saptanmış olan bir olguda, çekirdek/sitoplazma oranı artmış, iri çekirdekli ve ASCUS ile LSIL'e göre daha koyu boyanmış (ok) hücreler dikkati çekmektedir. Ayrıca kromatinde kaba kümelenmeler ve çekirdek zarında girinti çıkıntılar (ok başı) olduğu da görülmektedir (PAP, x1000). .....	114
<b>Şekil 3. 4.</b> Fungal enfeksiyon varlığını gösteren pseudohif (ok başı) ve blastosporlar (ok) görülmektedir. Pseudohifin epitel hücre (E) sitoplazması içine girmek üzere olduğu dikkatimizi çekmiştir (ok başı) (PAP, x1000). .....	114
<b>Şekil 3. 5.</b> Bakteriyal vajinozis (BV) varlığını gösteren yüzeyi tamamen mikroorganizmalarla kaplı bir ipucu hücresi görülmektedir (PAP, x1000). .....	115
<b>Şekil 3. 6.</b> Epitel hücrelerinin (E) hemen yanında kendisinden bir ton koyu boyanan oval çekirdeği ile bir <i>Trichomonas vaginalis</i> (ok başı) görülmektedir (PAP, x1000). .....	115
<b>Şekil 3. 7.</b> Sitolitik vajinozis (SV) varlığını gösteren bol laktobasiller, bazofilik kümelenmiş hücre grupları, çıplak çekirdekler (ok başı) ve lizis olmuş sitoplazmik parçacıklar (ok) dikkati çekmektedir (PAP, x400). .....	116
<b>Şekil 3. 8.</b> Enfeksiyon etkenleri bulunmayan ancak inflamasyon bulgularını gösteren bir olguda hücrelerin üzerine adeta yapışmış şekilde görülen bol PMNL'ler (ok) ve perinükleer hale (ok başı) bulunan bir hücre dikkati çekmektedir (PAP, x1000). .....	116
<b>Şekil 3. 9.</b> Piknotik çekirdek (ok başı) içeren küçük bir apoptotik hücrenin etrafında olan kalın bir boşluk (ok) dikkati çekmektedir (PAP, x1000). .....	117
<b>Şekil 3. 10.</b> Apoptotik hücre zarının tomurcuklanma şeklinde dışarı doğru yuvarlaklar oluşturduğu, bu yuvarlakların en dış sınırının kalınlığının arttığı (ok) ve tomurcuklanma gösteren hücre zarına yakın bölgedeki sitoplazmanın boyanmadığı (ok başı), bu bölgenin adeta diğer sitoplazma kısmı ile ilişkisinin bozulduğu görülmektedir (PAP, x1000). .....	117
<b>Şekil 3. 11.</b> Çekirdek kromatininin dağılarak kümeler şeklinde çekirdeğin periferinde biriktiği (ok) ve adeta saat yüzü görünümü aldığı dikkat çekmektedir. Ayrıca hücrenin sitoplazmasının derin girintiler oluşturduğu (kivrık ok) ve çekirdeğin, çekirdek çevresindeki sitoplazma ile bağlantısını kaybederek (ok başı) küçülmeye başladığı da görülmektedir (PAP, x1000). .....	118



<b>Şekil 3. 12.</b> Çekirdekte karyolizis (ok) ve karyopiknozis (ok başı) olaylarının görüldüğü apoptotik hücreler görülmektedir (PAP, x1000). .....	118
<b>Şekil 3. 13.</b> Normal bir epitel hücrenin yanında çekirdeğinde karyorekzis görülen bir apoptotik hücre dikkati çekmektedir (PAP, x1000). .....	119
<b>Şekil 3. 14.</b> Piknotik çekirdek içeren bir hücreden, içinde çekirdek parçaları bulunan küçük bir parçanın ayrılmak üzere olduğu (ok) dikkati çekmektedir. Ayrıca, çekirdeğinde karyolizis (ok başı) değişikliği gösteren bir apoptotik hücre görülmektedir (PAP, x1000). .....	119
<b>Şekil 3. 15.</b> Bol köpüklü sitoplazmaya sahip bir makrofajın (m) içinde; piknotik çekirdekli, etrafı az sitoplazmalı yapıların (ok başı) fagosite edilmiş olduğu görülmektedir. Alanda piknotik çekirdekli yapılar da dikkati çekmektedir (ok) (PAP, x1000). .....	120
<b>Şekil 3. 16.</b> Çok çekirdekli bir dev makrofajın büyük bir apoptotik hücreyi (ok başı) fagosite etmek üzere yalancı ayaklar uzattığı görülmektedir (PAP, x1000). .....	120
<b>Şekil 3. 17.</b> Normal bir epitel hücrelerinin küçük piknotik çekirdekli bir yapıyı hücre içine almak istercesine yalancı ayaklar (ok başı) uzattığı tespit edilmiştir (PAP, x1000). .....	121
<b>Şekil 3. 18.</b> Küçük piknotik çekirdekli bir yapının (ok başı) tamamının epitel hücresi (E) içine alınmış olduğu dikkati çekmektedir (PAP, x1000). .....	121
<b>Şekil 3. 19.</b> Negatif kontrol örnekleri .....	122
<b>Şekil 3. 20.</b> Pozitif kontrol örnekleri .....	123
<b>Şekil 3. 21.</b> Epitel hücrelerin zarlarında zayıf (+), orta (++) , kuvvetli (+++) ve çok kuvvetli (++++) pozitiflikler görülmektedir. ....	125
<b>Şekil 3. 22.</b> Epitel hücrelerin birbirlerine temas ettikleri noktanın daha koyu boyandığı (ok başı) dikkati çekmektedir (x1000). .....	125
<b>Şekil 3. 23.</b> Pozitif (ok başı) bir normal çok katlı yassı epitel hücrenin yanında, piknotik çekirdekli, hücre zarı, sitoplazma ve çekirdeği (ok) $\beta$ -katenin proteini açısından negatif bir hücre görülmektedir (x1000). .....	126
<b>Şekil 3. 24.</b> Epitel hücrelerin sitoplazmalarında zayıf (+), orta (++) , kuvvetli (+++) ve çok kuvvetli (++++) pozitiflikler görülmektedir. Ayrıca çekirdekteki pozitiflik de (ok) dikkati çekmektedir. ....	126
<b>Şekil 3. 25.</b> Pozitif hücrelerin arasında, hücre zarı, sitoplazması ve çekirdeği $\beta$ -katenin (ok) proteini açısından negatif, piknotik çekirdekli bir apoptotik hücre görülmektedir (x1000). .....	127

<b>Şekil 3. 26.</b> Çekirdeklerinin tamamı $\beta$ -katenin proteini açısından pozitif (ok) hücreler görülmektedir (x1000).....	127
<b>Şekil 3. 27.</b> Çekirdek zarında (ok) $\beta$ -katenin proteini açısından pozitiflik görülen bir hücre dikkati çekmektedir (x1000).....	128
<b>Şekil 3. 28.</b> Sitoplazması $\beta$ -katenin proteini açısından pozitif olan bir hücrenin çekirdeğinde kromatininin bir kısmında pozitiflik görülürken diğer tarafının negatif olduğu dikkati çekmektedir (x1000). ....	128
<b>Şekil 3. 29.</b> HSIL varlığı belirlenen olguda sitoplazması oldukça koyu (++++) ve çekirdeği pozitif olan atipik hücreler dikkati çekmektedir (x1000). ....	129
<b>Şekil 3. 30.</b> LSIL varlığı belirlenen olguda $\beta$ -katenin proteini açısından negatif (E) bir hücrenin yanında sitoplazması oldukça kuvvetli (++++) boyanan, çekirdeği negatif atipik bir hücre görülmektedir (x1000).....	129
<b>Şekil 3. 31.</b> Apoptozis pozitif olgulardan birinde bir hücrenin tüm sitoplazmasının (ok) aktif kaspaz 3 ile pozitif boyandığı, hücrenin bir kısmının (ok başı) yuvarlak bir şekil alarak, kopmak üzere olabileceği dikkati çekmektedir (x1000).....	131
<b>Şekil 3. 32.</b> Hücre zarında tomurcuklanma olduğu belirlenen bir apoptotik hücrede, tomurcuklanmanın olduğu bölgelerde aktif kaspaz 3 enziminin pozitif (ok) olduğu dikkati çekmiştir (x1000). ....	131
<b>Şekil 3. 33.</b> Tomurcuklanma olmadığı halde hücre zarında yer yer kümelenmiş pozitifliğin olduğu apoptotik bir hücre dikkati çekmektedir (x1000). ....	132
<b>Şekil 3. 34.</b> Hücre zarının çevresinde (ok) aktif kaspaz 3 enzimi açısından kalın bir pozitiflik olduğu dikkati çekmektedir (x1000). ....	132
<b>Şekil 3. 35.</b> Aktif kaspaz 3 açısından negatif olan hücrelerin (E) arasında sitoplazması ve çekirdeği (ok başı) oldukça koyu boyanan (++++) bir apoptotik hücre görülmektedir (x1000).....	133
<b>Şekil 3. 36.</b> Aktif kaspaz 3 açısından çekirdek zarı (ok başı) pozitif olan bir hücre görülmektedir (x1000). ....	133
<b>Şekil 3. 37.</b> Aktif kaspaz 3 açısından negatif olan bir hücrenin yalancı ayaklar oluşturarak sitoplazması ve çekirdeği aktif kaspaz 3 pozitif olan (ok başı) bir apoptotik hücreyi fagosite etmek üzere olduğu dikkati çekmektedir (x1000). ....	134
<b>Şekil 3. 38.</b> Aktif kaspaz 3 açısından negatif olan bir epitel hücrenin içinde aktif kaspaz 3 açısından pozitif olan (ok başı) az sitoplazmalı piknotik çekirdekli bir apoptotik yapı dikkati çekmektedir (x1000). ....	134

<b>Şekil 3. 39.</b> Makrofaj sitoplazması içinde aktif kaspaz 3 açısından pozitif olan çok sayıda apoptotik yapı (ok başı) dikkati çekmektedir (x1000). .....	135
<b>Şekil 3. 40.</b> Hücre zarının aktif kaspaz 8 enzimi açısından pozitif olduğu görülmektedir (x1000). .....	136
<b>Şekil 3. 41.</b> Hücre zarındaki pozitifliğin gittikçe sitoplazmaya yayıldığı (ok başı) dikkati çekmektedir (x1000). .....	136
<b>Şekil 3. 42.</b> İki apoptotik hücrenin sitoplazmasının aktif kaspaz 8 açısından pozitif olduğu (ok), bir hücrede ise hem sitoplazmanın tümünde, hem de çekirdekte pozitiflik olduğu (ok başı) görülmektedir (x1000). .....	137
<b>Şekil 3. 43.</b> Çekirdeğinde karyolizis görülen apoptotik bir hücrenin sitoplazmasının tümünde orta (++) derecede pozitiflik olduğu, çekirdeğin ise negatif olduğu dikkati çekmektedir (x1000). .....	137
<b>Şekil 3. 44.</b> Aktif kaspaz 8 açısından negatif olan bir epitel hücrenin zarında aktif kaspaz 8 enzimi açısından pozitif apoptotik bir hücrenin şekline uygun bir çöküntü oluştuğu ve apoptotik hücrenin epitel hücre içine girmek üzere olduğu dikkati çekmektedir (x1000). .....	138
<b>Şekil 3. 45.</b> Aktif kaspaz 8 enzimi açısından pozitif olan bir hücrenin etrafı bir makrofaj (m) ve nötrofil lökosit (n) tarafından sarılmıştır. Makrofajın apoptotik hücreyi, hücre içine almak üzere olduğu görülmüştür (x1000). .....	138
<b>Şekil 3. 46.</b> Aktif kaspaz 9 enzimi açısından negatif epitel hücrelerinin (E) arasında, sitoplazması aktif kaspaz 9 enzimi açısından kuvvetli pozitif olan (ok) bir apoptotik hücre dikkati çekmektedir (x1000). .....	140
<b>Şekil 3. 47.</b> Hücre zarı etrafı (ok başı) ile çekirdek çevresinde aktif kaspaz 9 enzimi açısından orta derecede pozitiflik olduğu, sitoplazmanın diğer kısımlarının ise negatif olduğu (ok) görülmektedir (x1000). .....	140
<b>Şekil 3. 48.</b> Orta (++) derece pozitif olan apoptotik hücrenin (ok başı) normal epitel hücre (E) çekirdeğini kenara iterek hücre içine girdiği, aynı hücrenin yalancı ayak oluşturarak (ok) ikinci bir apoptotik hücreyi içine almak üzere olduğu görülmektedir. Ayrıca sitoplazması aktif kaspaz 9 enzimi açısından pozitif (kivrik ok) bir diğer apoptotik hücre de dikkati çekmektedir (x1000). .....	141
<b>Şekil 3. 49.</b> BV pozitif olan bir olguda hücre yüzeyi tamamen mikroorganizmalarla kaplı, sitoplazması yer yer dejenere olmuş bir ipucu hücrenin sitoplazma (ok) ve çekirdeğinde (ok başı) aktif kaspaz 3 enzimi açısından pozitiflik olduğu	

görülmektedir. Ayrıca çekirdeği pozitif boyanmış bir diğer hücre de dikkati çekmektedir (x1000).....	156
<b>Şekil 3. 50.</b> BV pozitif olan bir olguda etrafında bol miktarda serbest kokobasil tarzı mikroorganizmalar bulunan aktif kaspaz 8 enzimi açısından pozitif (ok başı) bir apoptotik hücre görülmektedir (x1000). .....	156
<b>Şekil 3. 51.</b> İnflamasyon pozitif olan bir olguda etrafında bol miktarda PMNL bulunan aktif kaspaz 3 enzimi açısından pozitif (ok başı) bir apoptotik hücre görülmektedir (x1000). .....	157
<b>Şekil 3. 52.</b> İnflamasyon pozitif olan bir olguda etrafında bol miktarda PMNL bulunan aktif kaspaz 8 enzimi açısından pozitif (ok başı) bir apoptotik hücre görülmektedir (x1000). .....	157
<b>Şekil 3. 53.</b> Küçük büyütmede, hücre zarı, sitoplazma ve çekirdeği negatif olan ve buna dayanarak Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu inaktif durumda olan apoptotik hücreler (ok başı) ve çevrede sinyal yolu aktif apoptotik olmayan epitel hücreleri görülmektedir (x400). .....	161
<b>Şekil 3. 54.</b> Hücre zarı, sitoplazma ve çekirdeği negatif olan ve buna dayanarak Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu inaktif durumda olan apoptotik hücreler (ok başı) ve sitoplazması kuvvetli boyanan sinyal yolu açısından aktif apoptotik olmayan epitel hücreleri görülmektedir (x1000).....	161
<b>Şekil 4. 1.</b> Apoptotik hücrede aktif kaspaz 3 enzimi aktivitesine bağlı olarak iPLA <sub>2</sub> ve PGE <sub>2</sub> sentezi görülmektedir. PGE <sub>2</sub> ise apoptotik olmayan hücrelerde Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunun aktivasyonuna neden olmaktadır.....	185

## KISALTMALAR

A $\beta$	Amiloid Beta
ABP	Aktin Bağlanma Proteinleri
AIF	Apoptozis Uyarıcı Faktör
AML	Akut Miyeloid Lösemi
ANT	Adenozin Nükleotid Translokaz Enzimi
Apaf-1	Apoptotic Protease Activating Factor-1
APC	Adenomatöz Poliposis Koli
Arm	Armadillo
ASCUS	Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance
ATF6	Activating Transcription Factor 6
Atg	Otofaji İlişkili Genler
$\beta$ -katenin	Beta katenin
Bad	Bcl-2 Associated Death Promoter
Bak	Bcl-2 Homologous Antagonist Killer
Bax	Bcl-2 İlişkili X Proteini
Bcl-2	B-cell lymphoma Gene-2
BCL-9	B-cell CLL/Lymphoma 9 Protein
Bid	BH3 Interacting-Domain Death Agonist
Bim	Bcl-2 Interacting Mediator
BiP	Binding İmmunoglobulin Protein
BV	Bakteriyal vajinozis
Ca <sup>+2</sup>	Kalsiyum
CAD	Kaspaz Aktiviteli Deoksiribonükleaz
CARD	Caspase Activation and Recruitment Domains
CBD	Catenin-Binding Domain
CIN	Servikal İntraepitelyal Neoplazi
CK2	Kazein Kinaz 2
CKI $\alpha$	Kazein Kinaz I Alfa
CRD	Cystein Rich Domain
CtBP	C-Terminal Bağlanma Proteinleri
CTNND1	Catenin (Cadherin-Associated Protein), Delta 1

CTNNB1	Catenin (Cadherin-Associated Protein)Beta-1
Daax	Death Domain-Associated Protein
Dally	Division Abnormally Delayed Protein
DD	Death Domain
DED	Death Effector Domain
DFF40DNA	Fragmentasyon Faktörü
DISC	Death Inducing Signaling Complex
dRP S19	Covalent Dimer of Ribosomal Protein S19
EGF-like repeat	Epidermal Büyüme Faktörü Benzeri Bölge
EMAP II	Endotelial Monosit Aktive Edici Polipeptid II
EMT	Epitelyal-Mezenkimal Geçiş
ER	Endoplazmik Retikulum
ERM Proteinleri	Erzin, Radiksin ve Moezin proteinleri
FADD	Fas İlişkili Ölüm Domaini
FASL	Fas Ligand
FLIP	FLICE-Benzeri İnhibitör Protein
Frat-1	Frequently Rearranged in Advanced TCell Lymphoma-1
Fz	Frizzeld
G2A	G Protein-Coupled Receptor 2A
GAG	Glikozaminoglikan
GER	Granüler Endoplazmik Retikulum
GPI	Glikozilfosfatidilinositol
Groucho/TLE	Transducin-Like-Enhancer of Split
GSK3β	Glikojen Sentetaz Kinaz 3 Beta
HCC	Hepatosellüler Karsinoma
HIPK2	Hemeodomain-Interacting Protein Kinaz-2
HIV	Human İmmundefficiency Virüs
HMG	High-Mobility Group Bölgesi
HPV	Human Papilloma Virüs
HSIL	High Grade Squamous Intraepitelial Lesion
HSPG	Heparan Sülfat Proteoglikanlar
Htra2/Omi	High Temperature Requirement Protein A2
IAP	Apoptozis Proteinleri İnhibitör Ailesi
ICAD	Kaspaz Aktiviteli Deoksiribonükleaz İnhibitör

ICAM3	Hücreler Arası Adezyon Molekülü 3
IGFRI	İnsülin İlişkili Büyüme Faktörü Reseptörü
IP <sub>3</sub> R	İnositol 1,4,5 Trifosfat Reseptörü
iPLA <sub>2</sub>	Calcium-Independent Phospholipases A <sub>2</sub>
JDM	Juxtamembran Domain
JNK	Jun N-Terminal Kinaz
KLL	Kronik Lemfoblastik Lösemi
L-CAM	Liver Cell Adhesion Molecule
LPC	Lizofosfatidilkolin
LRP5/6	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein Reseptör İlişkili Protein
LSIL	Low Grade Squamous Intraepitelial Lesion
MAPK	Mitojen Aktive Protein Kinaz Enzimlerinin
MBOAT	Membrane-Bound O-Acyltransferase Family
MCF-7	Meme Kanseri Hücre Hattı
MDCK	Madin Darby Canine Kidney
Mdm2	Murine/Human Double Minute 2
MFG-E8	Milk Fat Globule EGF Factor 8
MLC	Miyosin Hafif Zinciri
MLKL	The Mixed Lineage Kinase Domain Like Protein
MLS	Mitokondriyal Lokalizasyon Dizisi
MMTV	Fare Meme Tümörü
MOMP	Mitochondri Outer Membrane Permeability
NAD <sup>+</sup>	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NCCD	Hücre Ölümü Nomenklatür Komitesi
NET	Nötrofil Ekstrasellüler Tuzak
NHS	Normal At Serumu
NK hücreler	Doğal Öldürücü Hücreler
NF-κβ	Nükleer Faktör-Kappa Beta
NLK	Nemo-Like Kinase
NLS	Nuclear Localisation Signal
NuMa	Nuclear Mitotic Apparatus Protein
PARP-2	Poli (ADP-Riboz) Polimeraz-2
PBS	Tuzlu Fosfat Tamponu
PERK	Protein Kinase RNA (PKR)-Like ER Kinase

PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PGH <sub>2</sub>	Prostaglandin H <sub>2</sub>
PI3K	Fosfoinozimid 3-Kinaz
PI3P	Fosfatidilinositol 3-Fosfat
PIDDozom	p53 Uyarıcı Ölüm Bölgesi İçeren Kompleks
PIP2	Fosfatidilinositol-4,5-Bifosfat
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5-Trifosfat
PKB	Protein Kinaz B
PKC	Protein Kinaz C
PLAD	Preligand Assembly Domain
PMNL	Polimorfonükleer Lökositler
porc	Porcupine
PP2A	Protein Fosfataz 2A
PPPSP	Prolin-Prolin-Prolin-Serin-Prolin
PSR	PtdSer Reseptörü
PtdSer	Fosfatidilserin
Rb	Retinoblastoma
RIP1	Receptor-İnteracting Protein 1
ROCK I	Rho İlişkili Kinaz
Ror2	Receptor Tyrosine Kinase-Like Orphan Receptor-1/2
RTK	Reseptör Tirozin Kinazlar
Opg	Osteoprotegerin
opm	Opossum
OST	Oligosakkaril Transferaz
S1P	Sfingozin-1-Fosfat
sFRP	Secreted Frizzled-Related Protein
Smac	Mitokondri Kökenli İkinci Kaspaz Aktivatör
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
SOST	Sclerostin
SV	Sitolitik vajinozis
TCF-1	T-Cell Factor-1
TM	Transmembran Bölgesi
TNF	Tümör Nekroz Faktör
TNFR	Tümör Nekroz Faktör Reseptör



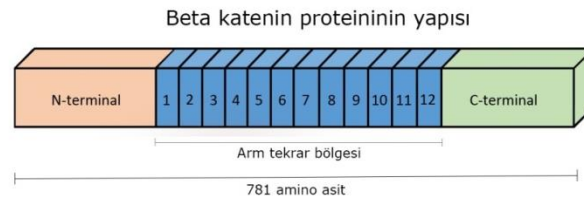
TRADD	Tümör Nekroz Faktör Reseptörü İlişkili Ölüm Domaini
TRAF	TNF Reseptörü İlişkili Faktör
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TV	<i>Trichomonas vaginalis</i>
VDAC	Voltaj Bağımlı Anyon Seçici Kanal Protein 1
Vps34	Vesicle-Mediated Vacuolar Protein Sorting 34
wg	wingless
Wls	Wntless
WIF	Wnt Inhibitory Factor
WRE	Wnt-Responsive Element
YWTD	Tirozin-Triptofan-Treonin-Aspartat

# 1. GİRİŞ

## 1.1. $\beta$ -katenin proteininin yapısı ve hücredeki görevleri

Beta katenin ( $\beta$ -katenin) proteini insanlarda 3. kromozomun uzun kolunda (3p21) yer alan ve 17 ekzon bölgesi içeren “Cadherin-Associated Protein Beta-1 (CTNNB1)” geni tarafından kodlanır. Bu protein, 781 amino asitten oluşur ve 92 kDa molekül ağırlığına sahiptir [1].  $\beta$ -katenin proteininin yapısında fonksiyonel olarak önemli üç bölge bulunmaktadır [2]. Bu bölgelerden biri 130 amino asitten oluşan N-terminal bölgesidir [1]. Serin ve treonin amino asitleri bakımından zengin olan bu bölgenin sitozoldeki çeşitli enzimler tarafından fosforillenmesi  $\beta$ -katenin proteininin yıkılması için etiket görevi görür [3]. Dolayısıyla, N-terminal bölgesi  $\beta$ -katenin proteininin hücre içindeki miktarının ayarlanmasında ve yarı ömrünün belirlenmesinde kritik rol oynamaktadır [1].

$\beta$ -katenin proteininin yapısında (Şekil 1.1) bulunan diğer bir bölge ise proteinin merkezinde bulunan ve 42 amino asit rezidüsünün 12 defa tekrar edilmesi ile oluşan “Arm tekrar” bölgesidir [4], [5]. Bu tekrar bölgesi, 550 amino asit rezidüsünden oluşmaktadır ve ilk olarak 1989 yılında *Drosophila melanogaster*'de bulunan Armadillo proteininde (arm) saptanmıştır [6]. Mayalardan insana kadar korunduğu belirlenen bu tekrar bölgesini içeren çok sayıda protein tanımlanmıştır. Bu proteinler “Arm tekrar bölgesi protein ailesi (arm-repeat proteins)” içinde sınıflandırılmaktadır [7].



**Şekil 1. 1.**  $\beta$ -katenin proteininin yapısında bulunan bölgelerin şematik görünümü ([2]'den yararlanılarak yeniden çizilmiştir).

$\beta$ -katenin proteininin *Drosophila*'da bulunan arm proteini ile homolog olduğu ve Arm tekrar bölgesi içerdiği saptanmıştır. Arm tekrar bölgesi,  $\beta$ -katenin proteininin üç boyutlu konformasyonunu ve buna bağlı olarak da fonksiyonunu etkilemektedir [5]. Bu bölge H1, H2 ve H3 olarak adlandırılan 3 adet  $\alpha$ -heliksten oluşur. Birbirine anti-paralel konumlu olan H2 ve H3 heliksleri, daha kısa olan H1'e dik şekilde yerleşmiştir. H1 ile H2 arasında bulunan glisin amino asit rezidüleri evrimsel olarak

korunmuştur ve Arm tekrar bölgesinin konformasyonunda önemli rol oynamaktadır [8]. Bu üçlü  $\alpha$ -heliks yapısı,  $\beta$ -katenin proteininin artı yüklü oluklardan oluşan son şeklinin oluşmasını sağlamaktadır. Bu pozitif yüklü oluklar, çok sayıda biyomolekül için de bağlanma bölgesi oluşturur. Yapılan çalışmalarda hem hücre adezyonunda, hem de Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunda görev alan çok sayıda biyomolekülün Arm tekrar bölgesine bağlandığı belirlenmiştir [5], [8]. Ayrıca bu tekrar bölgesinin  $\beta$ -katenin proteinine proteolitik yıkıma karşı dayanıklılık sağladığı da gösterilmiştir [8].

$\beta$ -katenin proteininin yapısında bulunan diğer bir önemli bölge ise 100 amino asitten oluşan ve proteinin C-terminalinde yer alan transaktivasyon bölgesidir [9]. *Xenopus laevis* ile yapılan çalışmalarda bu C-terminal bölgesinin çekirdekdeki transkripsiyon faktörlerine bağlandığı ve bu faktörlerin aktifleşmesine neden olduğu belirlenmiştir [10]. Bu nedenle  $\beta$ -katenin proteini bir ko-aktivatör olarak tanımlanmaktadır.  $\beta$ -katenin proteini bu şekilde, Wnt proteininin hücre zarında bulunan reseptörlerine bağlanmasıyla hücreye gelen sinyali sitoplazmadan çekirdeğe kadar taşır [1].

$\beta$ -katenin proteininin hücredeki rolü ile ilgili olarak ilk çalışma 1989 yılında Ozawa ve çalışma grubu tarafından yapılmış, bu proteinin hücre-hücre bağlantılarında rol oynadığı belirlenmiştir [11]. Daha sonra bu proteinin Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunda transkripsiyon ko-aktivatörü olarak görev yaptığı ortaya konmuştur [2]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise sentrozomlarda  $\beta$ -katenin proteininin varlığı belirlenmiş ve bu proteinin mitoz bölünmede de rol oynadığı ifade edilmiştir [12].

### **1.1.1. $\beta$ -katenin proteininin hücre-hücre adezyon görevi**

$\beta$ -katenin proteini hücrelerin yan yüz bağlantılarından adezyon kemerinde (*Zonula adherens*) hücre içi bağlayıcı protein olarak görev almaktadır [13]. Adezyon kemeri evrimsel olarak korunmuş bir hücre-hücre bağlantısıdır. Hücreleri bir arada tutarak dokuların oluşmasını sağlayan bu bağlantının, hücre polaritesinin sağlanması, hücre hareketi, proliferasyon ve farklılaşma gibi biyolojik süreçlerde de rol oynadığı gösterilmiştir [14], [15].

Adezyon kemeri bağlantısında hücreler arası bağlayıcı proteinler “Calcium dependent adhesion (Kaderin)” proteinleridir [16]. Kaderin proteinleri ilk kez 1983

yılında tavuklarda yapılan bir çalışma sırasında tanımlanmış ve “Liver cell adhesion molecule (L-CAM)” olarak adlandırılmıştır [17]. Tavukların ardından farelerde L-CAM proteinine homolog olan Uvomorulin proteini saptanmıştır [18], [19]. Daha sonra, bu proteinler Kaderin olarak adlandırılmıştır [20]. Kaderin protein ailesi üyeleri buldukları dokuya göre isimlendirilmektedir. Örneğin, epitel hücrelerinde bulunan Kaderin proteini E-kaderin, plasentada ifade olan P-kaderin, endotel hücrelerde sentezlenen VE-kaderin, nöral dokularda ve kas hücrelerinde bulunan N-kaderin ve kalp kasında ifade olan ise H-kaderin olarak adlandırılır [21], [22], [23], [24]. Çalışmamızda epitel hücreleri incelendiğinden aşağıda detaylı olarak epitel hücrelerinde bulunan E-kaderin proteinine değinilecektir.

E-kaderin proteini, insanlarda 16. kromozomda yer alan “Calcium-Dependent Adhesion Protein 1 (CDH1)” geni tarafından kodlanmaktadır. Bu gen, evrimsel olarak türler arasında korunmuş, 16 ekzon ve 15 intron bölgesinden oluşmaktadır [25], [26]. Bu genin kodladığı E-kaderin proteini ise yaklaşık 120 kDa molekül ağırlığına sahiptir [21].

E-kaderin proteininin yapısı incelendiğinde, ekstrasellüler matrikse uzanan ve 110 amino asit rezidüsünden oluşan N-terminal ucun, birbirini tekrar eden 5 tekrar bölgesinden oluştuğu belirlenmiştir. Bu bölge “extracellular cadherin” veya “EC bölgesi” olarak adlandırılır [27], [28]. EC bölgesi, ekstrasellüler matrikse uzanan N-terminalden hücre içine uzanan C-terminale doğru EC1-EC5 olarak numaralandırılır [29]. Yapılan çalışmalarda bu tekrar bölgelerine kalsiyum ( $Ca^{+2}$ ) iyonun bağlandığı ve bu bağlanmanın E-kaderin proteininin N-terminal ucunda konformasyonel bir değişime neden olduğu saptanmıştır. Bu konformasyonel değişim, E-kaderin proteinini komşu hücrede bulunan ve aynı şekilde konformasyonel değişime uğramış diğer E-kaderin proteini ile bağlanmaya uygun hale getirir. Bu nedenle, E-kaderin proteininin adezyon fonksiyonu için ortamda  $Ca^{+2}$  iyonunun bulunması gereklidir [30], [31]. Yapılan hücre kültürü çalışmalarında ortama EDTA ve EGTA benzeri  $Ca^{+2}$  bağlayıcıları (şelatör) eklendiğinde hücrelerin birbirlerinden ayrıldığı gözlenmiştir [32]. Dolayısıyla, E-kaderin  $Ca^{+2}$  bağımlı bir protein olarak tanımlanır.

Karşılıklı iki epitel hücrelerinde bulunan E-kaderin proteini birbirine bağlanarak hücre-hücre adezyonunu sağlamaktadır. Aynı tip Kaderin proteinlerinin birbiri ile bağlanması “homofilik etkileşim” olarak adlandırılmaktadır [33]. Bu homofilik

etkileşim özellikle embriyonik gelişim sırasında hücre tabakalarının birbirinden ayrılmasında önemli rol oynamaktadır. Örneğin, embriyoda ektoderm tabakasında bulunan hücreler bol miktarda E-kaderin proteini ifade etmektedir. Ektoderm tabakasındaki hücreler hücre zarlarında bulunan E-kaderin proteinleri ile birbirlerine tutunurlar. Embriyonik gelişim sırasında, ektoderm tabakasındaki hücrelerden bazıları N-kaderin sentezleyen hücrelere dönüşmektedir. Hücre zarında E-kaderin bulunan hücrelerle N-kaderin bulunan hücrelerin birbirine tutunmadığı ve N-kaderin içeren hücrelerin E-kaderin ifade eden hücrelerden ayrılarak birbirleri ile homofilik etkileşime girdikleri belirlenmiştir. Bu etkileşimin nöral tüp oluşumu için önemli olduğu ifade edilmektedir [34].

Karşılıklı E-kaderin molekülleri arasındaki bağlantının moleküler detayları tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak Zhang ve çalışma grubu [35] tarafından önerilen modele göre, E-kaderin proteinlerinin N-terminalinde bulunan EC1 bölgeleri arasında bir etkileşim olduğu ifade edilmektedir (Şekil 1.2). EC1 bölgesinin yapısı incelendiğinde bu bölgede bulunan His<sup>79</sup>-Ala<sup>80</sup>-Val<sup>81</sup> amino asit rezidülerinin evrimsel olarak korunduğu ve E-kaderin-E-kaderin ilişkisinde görev yaptığı öne sürülmüştür. Ayrıca bu bölgeye bağlanan 4 adet Ca<sup>+2</sup> iyonunun E-kaderin proteininin adeziv rolü açısından önemli olduğu da belirtilmiştir [36].

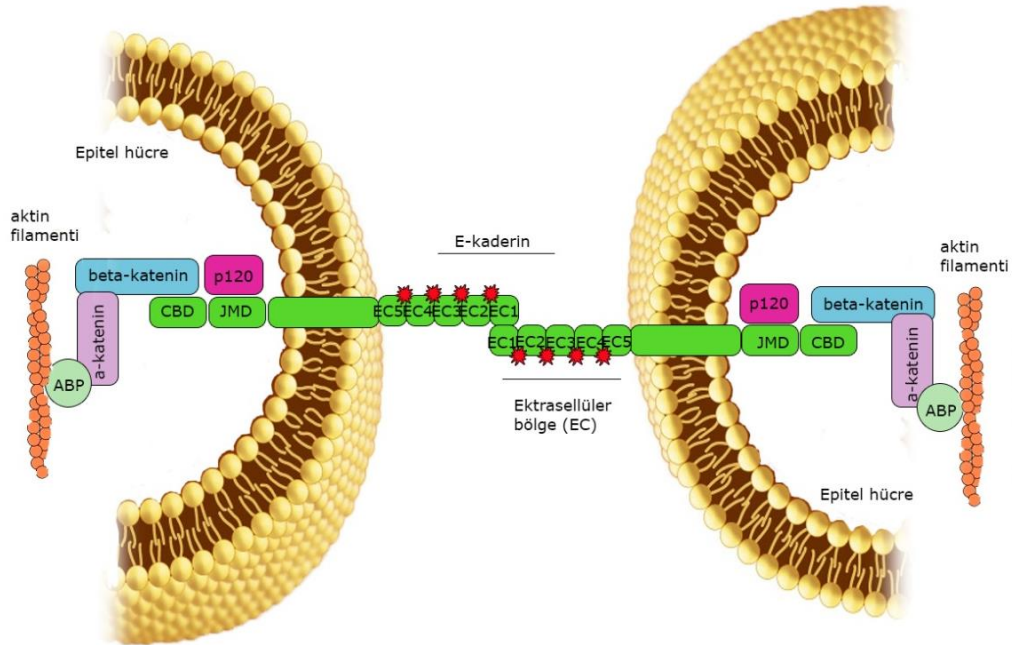
Ekstrasellüler matrikse uzanan N-terminal bölgesini, hücre zarını dıştan içeri doğru kat eden tek bir transmembran bölgesi (TM) izler. Bu nedenle, Kaderin proteinleri tek geçişli basit transmembran proteinleri olarak tanımlanır [37].

Sitoplazma içine uzanan C-terminal bölgesi ise 151-160 amino asit uzunluğundadır ve Kaderin proteinlerinin tümünde bulunur. Kaderin alt tiplerinde bu bölgenin amino asit benzerliğinin %69-89 oranında olduğu gösterilmiştir [38]. C-terminal bölgesi detaylı olarak incelendiğinde “Juxtamembran domain (JMD)” ve “catenin-binding domain (CBD)” olmak üzere iki bölge içerdiği görülmüştür [39].

JMD bölgesinin, p120 adı verilen bir proteine bağlanma bölgesi oluşturduğu belirlenmiştir. p120 proteini CTNND1 geni tarafından kodlanan 968 amino asit uzunluğunda, 108 kDa moleküler ağırlığa sahip bir proteindir [40], [41]. Bir ucu ile E-kaderin proteininin sitoplazmik ucuna bağlanan p120, diğer ucu ile mikrotübüllere bağlanarak E-kaderin proteini ile mikrotübüller arasında köprü görevi görür [42], [43]. Ayrıca yapılan çalışmalarda p120 proteininin hem E-kaderin

proteinine yapısal dayanıklılık kazandırdığı ve yıkımını engellediği, hem de E-kaderin proteininin adezyon bölgesinde birikmesini sağladığı gösterilmiştir [44], [45], [46]. E-kaderin proteininin C-terminalinde bulunan diğer bir bölge ise CBD bölgesidir ve  $\beta$ -katenin proteininin E-kaderin proteinine bu bölgeden bağlandığı ifade edilmektedir [41].

Adezyon kemeri oluşurken ilk aşamada iki epitel hücresi arasında bulunan E-kaderin proteinleri, N-terminal uçlarından birbirine tutunur. Bu tutunma ile birlikte çok sayıda homofilik E-kaderin proteini hücre zarında biraya gelir [47]. Biraraya gelen E-kaderin proteinlerinin sitoplazmik ucunda konformasyonel bir değişim meydana gelir. Bu değişime bağlı olarak sitoplazmada bulunan  $\beta$ -katenin proteini yapısında bulunan Arm tekrar bölgesi ile E-kaderin proteininin sitoplazmik ucunda bulunan CBD bölgesine bağlanır [48]. Oluşan bu kompleks “Kaderin/Katenin” kompleksi olarak adlandırılmaktadır [49].  $\beta$ -katenin proteininin bu kompleksin devamlılığını sağladığı ve E-kaderin proteininin sitoplazmik bölgesini yıkımdan koruduğu belirlenmiştir [50].



**Şekil 1. 2.** Adezyon kemeri ve bu bağlantıda görev alan biyomoleküller ([50]’den yararlanılarak yeniden çizilmiştir).

$\beta$ -katenin proteini E-kaderin proteinine bağlandıktan sonra sitoplazmada bulunan  $\alpha$ -katenin proteini hücre zarına doğru çekilir ve  $\beta$ -katenin proteinine bağlanır.  $\alpha$ -katenin insanlarda 5. kromozomda bulunan CTNNA1 geni tarafından kodlanan, 102 kDa molekül ağırlığına sahip aktin bağlayıcı bir proteindir [51]. Desai ve çalışma grubu [52] tarafından *Drosophila*'da yapılan çalışmalarda  $\alpha$ -katenin proteininin bir ucu ile  $\beta$ -katenin proteinine bir ucu ile de aktin filamentlerine bağlandığı ve  $\beta$ -katenin ile aktin filamentleri arasında köprü oluşturduğu belirlenmiştir.

$\alpha$ -katenin proteininin  $\beta$ -katenin proteinine bağlanması, sitoplazmada bulunan çeşitli aktin bağlayıcı proteinlerin hücre zarına çekilmesine ve bu proteinlerin  $\alpha$ -katenin'e bağlanmasına neden olur. Yapılan çalışmalarda bu aktin bağlayıcı proteinlerin, daha çok aktin filamentinin bağlantı bölgesinde toplanmasını sağladığı ve hücre-hücre bağlantısını kuvvetli hale getirdiği ifade edilmektedir [53]. Vinkülin,  $\alpha$ -aktinin, Afadin, Eplin/Lima 1 ve Formin-1 bu aktin bağlayıcı proteinlere örnek olarak verilebilir [54]. Böylece, bu proteinlere tutunan aktin filamentleri hücreyi çepeçevre kuşatır ve epitel dokunun bütünlüğü sağlanmış olur [55], [56]. Hücre-hücre adezyonundaki rolünün yanı sıra  $\alpha$ -katenin proteininin çekirdeğe girerek RNA sentezinde ve kromatin organizasyonunda görev yaptığı da gösterilmiştir [57].

Adezyon kemeri oluştuktan sonra, bu bağlantının devamlılığının sağlanması gerekmektedir. Bağlantının devamlılığı ise fosforilasyonlarla düzenlenir [56].  $\beta$ -katenin veya E-kaderin proteinlerinin serin ve treonin amino asit rezidülerinden fosforilasyonu Kaderin-Katenin kompleksinin stabilizasyonunu artırırken, tirozin amino asit rezidülerinin fosforilasyonu kompleksin dağılmasına neden olmaktadır [58].

### **1.1.2. $\beta$ -katenin proteininin sentrozomlardaki rolü**

Son yıllarda yapılan çalışmalarda sentrozomlarda  $\beta$ -katenin proteininin varlığı belirlenmiş ve bu proteinin mitoz bölünmede rol oynadığı rapor edilmiştir [59]. Mitoz bölünmenin S fazında hücre sitoplazma ve çekirdeğinde  $\beta$ -katenin proteini miktarının arttığı, G2/M fazında maksimum seviyeye ulaştığı, G1 fazında ise aniden düştüğü belirlenmiştir. Özellikle G2 evresindeki  $\beta$ -katenin artışının sentrozomlarda mikrotübül oluşumunu düzenleyerek, sentrozomun maturasyonu

ve fonksiyonunu etkilediği ifade edilmektedir [12]. Ayrıca  $\beta$ -katenin proteininin bipolar mitoz mekiğinin oluşumunda da rol oynadığı ortaya konmuştur [60].

$\beta$ -katenin proteininin N-terminal bölgesinin fosforillenmesi yıkımı için etiket görevi görmektedir. Ancak yapılan çalışmalarda N-terminalinde S33, S37 ve T41 rezidüleri fosforillenmiş  $\beta$ -katenin proteininin sentrozomlarda biriktiği immünofloresans yöntemi ile saptanmıştır. Mitoz bölünmenin interfaz evresi boyunca ana hücre sentrozomlarında bulunan fosfo- $\beta$ -katenin proteininin daha sonra yavru hücre sentrozomlarına aktarıldığı gösterilmiştir [61].  $\beta$ -katenin proteininin N-terminalinde bulunan bu fosforillenme bölgelerindeki mutasyonların, mitoz mekiği, sentrozomlar ve mikrotübülerde defektlere neden olduğu da rapor edilmiştir [62].  $\beta$ -katenin proteininin bu yeni görevi ile ilgili mekanizma henüz tam olarak ortaya konulamamıştır [12]. Bu nedenle konu ile ilgili çalışmalar hala devam etmektedir.

### **1.1.3. $\beta$ -katenin proteininin Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal mekanizmasındaki rolü**

$\beta$ -katenin proteininin hücre-hücre bağlantılarının yanı sıra Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunda da görev yaptığı ortaya konulmuştur [1]. Bu sinyal yolu sitoplazma ve çekirdekte bulunan  $\beta$ -katenin proteini miktarını düzenlemektedir [63], [64]. Sinyal yolu inaktifken sitoplazmada hızla parçalanan  $\beta$ -katenin, sinyal aktivitesi ile birlikte sitoplazma ve çekirdekte birikir [65]. Çekirdekte biriken  $\beta$ -katenin, transkripsiyon faktörlerini aktifleştirerek c-myc, cyclin-D1 gibi birçok genin ifade edilmesine neden olur [10], [66], [67].

## **1.2. Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu mekanizması ve bu sinyal yolunda görev alan biyomoleküller**

### **1.2.1. Wnt sinyal molekülünün özellikleri, sentezi ve salgılanması**

Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunun sinyal molekülü Wnt proteindir. Bu protein WNT geni tarafından kodlanır. Sharma ve Chopra [68], 1976 yılında *Drosophila melanogaster*'de yaptıkları çalışmada kanatların ve halter organının kaybolmasına neden olan bir mutasyonun varlığını saptamışlardır. Bu mutasyonu belirledikleri lokusu "kanatsızlık" anlamına gelen "wingless (wg)" olarak adlandırmışlardır. Ardından, 1982 yılında Nusse ve Varmus [69] fare meme tümörü (MMTV) ile yaptıkları çalışmada, bu virüsün genomunu entegre ettiği konak hücre lokus



bölgesini “integrated-1” olarak adlandırmışlardır. Daha sonra yapılan çalışmalarda, farede saptanan bu int-1 geni ile *Drosophila*'nın gelişimi sırasında segment polaritesinin sağlanmasında görev alan wingless (wg) geni arasında fonksiyon ve sekans benzerliği olduğu belirlenmiştir. Bunun üzerine 1991 yılında wingless ve int-1 geninin isimleri birleştirilerek WNT oluşturulmuştur [70].

İnsanda tanımlanmış 19 adet WNT geni bulunmaktadır ve bu genlerin bir hidra türü olan *Amphimedon queenslandica*'dan insana kadar evrimsel olarak korunduğu tespit edilmiştir [71]. Yapılan çalışmalarda WNT geni tarafından kodlanan Wnt proteinlerinde amino asit benzerliğinin %27-83 oranında olduğu gösterilmiş ve tüm Wnt proteinlerinin sinyal mekanizmasını başlatma özelliğine sahip olduğu saptanmıştır [72], [73]. Wnt proteinleri 350-400 amino asitten meydana gelir ve yaklaşık 40 kDa molekül ağırlığına sahiptir [73]. Bu proteinler, embriyonik ve erişkin kök hücreler tarafından sentezlenmektedir [74]. Wnt proteinlerinin yapısında evrimsel olarak korunmuş, 22-25 adet sistein rezidüsü bulunduğu belirlenmiştir [72]. Tüm Wnt proteinlerinde bulunan bu sistein rezidülerinin Wnt-hedef hücre zarı etkileşiminde rol oynadığı ve proteinin sinyal fonksiyonu açısından önemli olduğu ifade edilmektedir [65]. Ayrıca sistein rezidüleri arasında kurulan molekül içi disülfid bağları Wnt proteinlerinin üç boyutlu yapısının sağlanmasında ve buna bağlı olarak da fonksiyonel bir sinyal protein haline gelmelerinde önemli rol oynar [72], [75].

Wnt proteinlerinin N-terminal bölgesinde ribozomlarda sentezlenen Wnt proteininin, Endoplazmik Retikulum (ER) lümenine hedeflenmesini sağlayan hidrofobik bir sinyal dizisi bulunur [76]. Hidrofobik sinyal dizisi 16-30 amino asit rezidüsünden oluşur ve 5-16. amino asitler yüklü ve polar özelliktedir [77].

ER lümenine geçen Wnt polipeptidinin bir sinyal protein haline gelebilmesi için iki önemli post-translasyonel modifikasyon geçirmesi gerekmektedir. Bu modifikasyonlardan ilki, Wnt polipeptid zincirinde bulunan Asparajin amino asit rezidülerine şeker eklenmesidir [78]. Bu şekilde proteinlere şeker eklenmesi glikozilasyon olarak tanımlanır [79]. Glikozilasyon reaksiyonu, ER zarı üzerinde yer alan, “Oligosakkaril transferaz (OST)” enzimi tarafından gerçekleştirilir [80]. Farklı Wnt proteinlerinde, farklı asparajin rezidülerine şeker eklenmektedir. Örneğin; Wnt2B proteininde Asn295 rezidüsüne şeker eklenirken, Wnt3A'da ise Asn87 ve Asn298 rezidülerine şeker eklenir [78], [81].

Wnt proteininin geçirdiği glikozilasyonun önemi henüz tam olarak ortaya konulamamıştır [82]. Mason ve çalışma grubu [83] tarafından 1992 yılında yapılan araştırmada glikozilasyonun Wnt'nin üretildiği hücreden salınması için gerekli olmadığı belirlenmiştir. Bu sonuçların aksine, Komekado ve arkadaşlarının [78] yaptıkları araştırmada glikozilasyon merkezleri mutant olan Wnt proteininin üretildiği hücrede biriktiği ve salgılanmadığı gösterilmiştir. Ayrıca Tanaka ve çalışma grubu [84] tarafından glikozilasyonun diğer bir post-translasyonel modifikasyon olan lipid modifikasyonunu uyardığı da öne sürülmüştür. Bu görüşün aksine Gao ve çalışma grubu [85] tarafından yapılan çalışmada glikozilasyonun Wnt proteininin hücreden dışarı salgılanmasında rolü olduğu ancak lipid modifikasyonu etkilemediği ifade edilmiştir. Tüm bu çalışmalara bağlı olarak, glikozilasyonun lipid modifikasyondan daha önce gerçekleştiği ve Wnt proteininin sentezlendiği hücreden salınmasında rolü olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Glikozilasyonun ardından gerçekleşen modifikasyon Wnt'nin yapısına lipid gruplarının eklenmesidir [78]. Wnt'nin yapısında bulunan yüklü amino asit rezidülerine palmitik ve palmitoleik asit adı verilen lipid grupları eklenir [86]. Bu lipid modifikasyonu gerçekleştiren enzim ER zarında bulunan ve “zar ile ilişkili O-açıltransferaz ailesinin (membrane-bound O-acyltransferase family [MBOAT])” bir üyesi olan “porcupine (porc)” enzimidir [87], [85]. Bu enzim, Wnt'nin yapısında bulunan 77. sistein ve 209. serin amino asit rezidülerine sırasıyla palmitik ve palmitoleik asit gruplarını ekler [76]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda palmitoleik asitin Wnt'nin üç boyutlu yapısında hidrofobik bir oluk oluşturduğu ve Wnt'nin hedef hücre zarında bulunan reseptörlerine bağlanmasını direkt olarak etkilediği gösterilmiştir [88]. Ayrıca lipid modifikasyonun Wnt'nin sentezlendiği hücre içinde ER'den Golgi'ye, Golgi'den sitoplazmaya doğru gideceği yerin belirlenmesinde önemli olduğu da rapor edilmiştir [89].

Wnt'nin primer amino asit dizisi incelendiğinde proteinin hidrofilik karakterde olduğu düşünülmüş ancak fonksiyonel özellik gösteren Wnt proteini uzun yıllar saflaştırılamamıştır. Daha sonra 2003 yılında Willert ve araştırma grubu [90] tarafından yapılan bir çalışmada Wnt3A proteininin geçirdiği lipid modifikasyonların hidrofilik özellik gösteren Wnt proteininin hidrofobik hale gelmesine neden olduğu belirlenmiştir. Bu şekilde fonksiyonel durumdaki Wnt proteini saflaştırılabilmektedir. Lipid gruplarının enzimatik olarak uzaklaştırılmasının ya da lipid gruplarının

bağlandığı sistein rezidüsünde meydana gelen mutasyonların Wnt'nin sinyal fonksiyonunun kaybolmasına neden olduğu da yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur [91].

Post-translasyonel modifikasyonlara uğramış Wnt'nin, ER'den sonra hücre içindeki ilerleyişi ve ekstrasellüler matrikse salınma mekanizması ile ilgili çalışmalar hala devam etmektedir. Wnt proteini post-translasyonel modifikasyona uğradığı ER'den Golgi organeline gitmektedir. Wnt'nin ER'den Golgi organeline taşınmasında p24 protein ailesi görev yapmaktadır [92]. p24 proteinleri mayalardan memelilere kadar evrimsel olarak korunmuş transmembran proteinlerdir. p24 proteinlerinin kargo reseptör olarak görev yaptıkları ve proteinlerin ER'den Golgi'ye, Golgi'den ER'ye taşınmasında rol oynadıkları belirlenmiştir [93]. *Drosophila melanogaster*'de yapılan bir çalışmada p24 proteinlerinden "opossum'un (opm)" Wnt proteininin ER'den Golgi organeline taşınmasında görev yaptığı saptanmıştır [92].

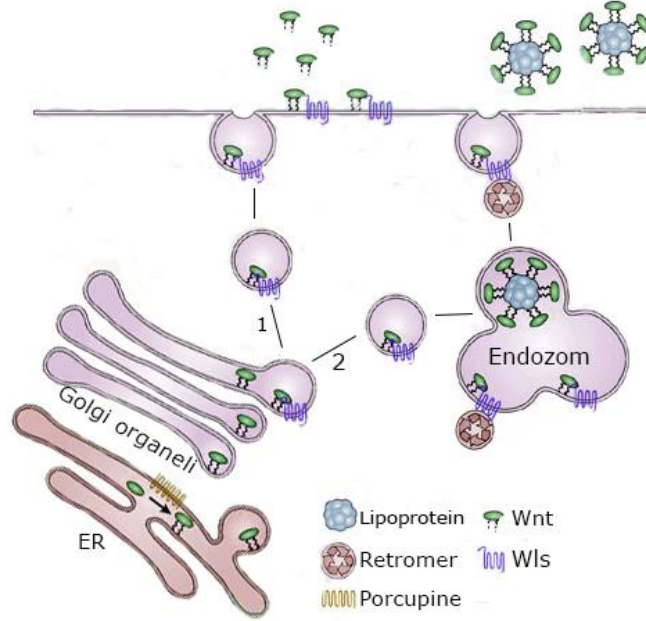
p24 proteinleri ile ER'den Golgi organeline taşınan Wnt proteininin bu organelde bir değişiklik geçirip geçirmediği bilinmemektedir. Golgi organeline taşınan Wnt proteini, Golgi organelinin trans yüzüne yerleşmiş olan ve yedi-geçişli bir transmembran proteini olan "Wntless (Wls)" kargo proteini tarafından gerçekleştirilir [94].

ER'den Golgi organeline gelen Wnt, palmitoleik asit bağlı 209. serin amino asidi rezidüsü ile Wls proteinine bağlanır. Bu şekilde "Wnt-Wls kompleksi" oluşur. Daha sonra, Golgi organelinin trans yüzünün tomurcuklanmasıyla "Wnt-Wls" kompleksini içeren bir taşıyıcı vezikül oluşur [95]. Bu taşıyıcı vezikül iki yol izleyebilir (Şekil 1.3);

1. Wnt-Wls kompleksini içeren taşıyıcı vezikül doğrudan hücre zarına yönelir ve hücre zarı ile kaynaşarak içeriğini ECM'ye bırakır. Bu şekilde hücre dışına salınan Wnt proteini yakın mesafede bulunan hedef hücreleri etkilemektedir [96], [97].

2. Wnt-Wls kompleksini içeren taşıyıcı vezikül, içinde lipoprotein biyomolekülleri bulunan bir endozoma taşınır. Taşıyıcı vezikül ve endozom zarı kaynaşır ve Wnt endozom içinde lipoproteinlerle birleşir. Lipoproteinlerle birleşmiş Wnt, endozom zarının tomurcuklanmasıyla oluşmuş bir vezikül içinde tekrar sitozole verilir. Buradan hücre zarına gönderilen bu vezikül, ekzositoz ile içeriğini hücre dışına

bırakır. Ekstrasellüler matrikse bırakılan lipoprotein ile bağı Wnt'nin, bir konsantrasyon gradienti oluşturarak uzakta bulunan hedef hücelere doğru ilerlediği ve sinyal mekanizmasını başlattığı saptanmıştır [98].



**Şekil 1. 3.** Wnt sinyal molekülünün sentezi, salgılanması ile yakın mesafedeki hüceleri (1) ve uzak mesafedeki hüceleri etkileme (2) mekanizması ([99]'dan değiştirilerek yeniden çizilmiştir).

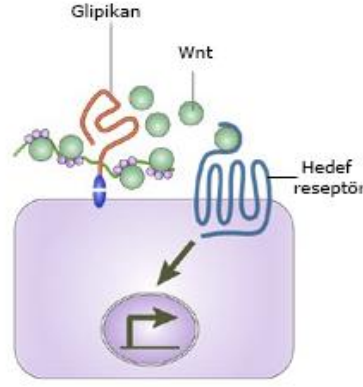
Mutant Wls proteinleri ile yapılan çalışmalarda, Wnt'nin Golgi organelinde biriktiği ve bu nedenle Wls kargo proteininin Wnt'nin sentezlendiği hücreden salgılanması için önemli olduğu belirlenmiştir [95], [100]. Son yıllarda yapılan bir çalışmada ise Wls'nin aşırı ifadesinin Wnt'nin hedef hücre zarında bulunan reseptörünün sentezini baskıladığı ve bu şekilde Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunun inhibe olduğu saptanmıştır. Bu nedenle Wls proteininin, hem Wnt molekülünün salgılanmasında, hem de sinyal fonksiyonunda önemli role sahip olduğu yorumu yapılmıştır [101].

Wnt'nin Golgi organeli-hücre zarı ve Golgi organeli-endozom arasında taşıma mekanizmasında kargo reseptör olarak görev yapan Wls proteininin tekrar Golgi organeline geri dönmesi gerekmektedir. Wls proteininin geri kazanılmasında görev yapan kompleks Retromer kompleksi olarak adlandırılır [102], [103]. Retromer kompleksi, ilk olarak *Saccharomyces cerevisiae*'de saptanmış, beş alt üiteden oluşan heteropentamerik bir komplekstir. Yapılan çalışmalarda bu kompleksin mayalardan memelilere kadar evrimsel olarak korunduğu gösterilmiştir [104].

Retromer kompleksi'nin yokluğunda Wls kargo proteini endozom zarında kalır ve hızla parçalanır. Sonuçta Wls, Golgi organeline geri dönemediğinden Wnt proteininin Golgi organeline biriktiği ve salgılanamadığı belirlenmiştir [105]. Ayrıca hücre zarına yerleşmiş olan Wls proteininin de tekrar Golgi organeline dönmesi gerekmektedir. *Caenorhabditis elegans*'da yapılan bir çalışmada Wls'nin bu tekrar geri kazanılma mekanizmasında "Kazein kinaz 2 (CK2)" enziminin görev yaptığı belirlenmiştir. CK2 mutant olan hücrelerde Wls'nin hücre zarında kaldığı ve tekrar Golgi organeline dönemediği belirlenmiştir. Wls, Golgi organeline geri dönemediğinde Wnt proteininin Golgi organeline biriktiği ve sentezlendiği hücreden salgılanamadığı ifade edilmiştir [94].

Ekstrasellüler matrikse salınan Wnt proteininin hedef hücreye taşınma mekanizması ile ilgili çalışmalar da hala devam etmektedir. Bu konuda çok sayıda model ortaya konmuştur. Bu modellerden birinde Wnt proteininin heparan sülfat proteoglikanlar (HSPG) ile bağlandığı ve hedef hücreye taşındığı öne sürülmüştür [106]. HSPG'ler bir protein merkeze bağlı uzun zincirli glikozaminoglikanlardan (GAG) oluşur. HSPG sentezinde görev yapan enzimde meydana gelen bir mutasyonun Wnt proteininin ECM'de birikmesine ve Wnt sinyal aktivitesinin azalmasına neden olduğu belirlenmiştir [107], [108]. Yapılan çalışmalarda Wnt'nin bağlandığı HSPG'lerin Glipikanlar olduğu gösterilmiştir (Şekil 1.4) [109], [110]. Glipikanlar, hücre zarına "Glikozilfosfatidilinositol (GPI)" ile bağlanan HSPG'lerdir (Şekil 1.4). *Drosophila melanogaster* ile yapılan çalışmalarda Wnt ile ilişkili iki adet Glipikan saptanmıştır. Bu Glipikanlar'dan biri "Division abnormally delayed proteini (Dally)", diğeri ise "Dally-benzeri protein (Dlp)"dir. Hücre kültürü ortamında her iki Glipikan'ın da Wnt proteinine bağlanarak proteinin hedef hücrelere taşınmasında rol oynadığı rapor edilmiştir [109], [111].

Wnt'nin hedef hücreye ulaşması ile ilgili olarak ortaya konulan diğeri bir modelde ise post-translasyonel modifikasyon ile Wnt'nin yapısına eklenen lipid grupları ve endozomlarda eklenen lipoproteinlerin rol oynadığı ifade edilmektedir. Lipid modifiye olarak ECM'ye salgılanan Wnt proteinlerinin misel yapısı oluşturduğu ve bu şekilde hedef hücreye taşındığı öne sürülmektedir [97], [112].



**Şekil 1. 4.** Wnt proteinleri Glipikanlara bağlanarak hedef hücre zarındaki reseptörlerine ulaşmaktadır ([113]'den değiştirilerek çizilmiştir).

Wnt'nin hedef hücrelere ulaşması ile ilgili olarak öne sürülen modellerden bir diğeri ise Hsuing ve çalışma grubu [114] tarafından ortaya konmuştur. Bu modelde, hedef hücrede aktin filamentlerinde bir yeniden düzenlenme olduğu ve hücre zarında "sitonem" adı verilen bir çıkıntı oluştuğu öne sürülmektedir. Bu çıkıntı Wnt sentezleyen hücreye doğru uzanmaktadır. Sentezlenen Wnt'nin bu çıkıntıda bulunan reseptörlerine bağlandığı ve bu şekilde hedef hücreye ulaştığı öne sürülmektedir.

Hedef hücreye ulaşan Wnt sinyali, hücre siklusunun düzenlenmesi ile hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması, hücre adezyonu, yeni damarların oluşum süreci (anjiojenez), apoptozis ve adipogenez gibi biyolojik olaylarda önemli rol oynamaktadır [115]. Hedef hücreye, bu biyolojik süreçlerin aktif hale gelmesi için herhangi bir uyarı gelmediği durumda sinyal yolu inaktif durumdadır. Bu inhibisyon, ekstrasellüler matrikse salınan Wnt sinyal molekülünün "inhibitör proteinler" tarafından inaktif halde tutulması ile sağlanır (Şekil 1.5). Bu inhibitör proteinler, Wnt proteinine ya direkt olarak bağlanabilir ve onun reseptörlerine bağlanmasını engeller ya da hedef hücre zarında bulunan reseptörlerine bağlanarak Wnt proteininin reseptörleri ile ilişki kurmasına engel olur [116], [117]. Bu inhibitör proteinlerden "Secreted frizzled-related protein1 (sFRP1)", sFRP2, sFRP3, sFRP4, sFRP5, "Wnt inhibitory factor (WIF)" ve Cerbeus hem Wnt'ye, hem de reseptörlerine bağlanabilir ve bu şekilde sinyal mekanizmasını inaktif durumda tutar [117]. Dkk1, Dkk2, Dkk3, Dkk4'ten oluşan Dickkopf protein ailesinin üyeleri ise Wnt proteininin reseptörlerine bağlanarak, Wnt-reseptör kompleksinin oluşmasını engeller [118].

Diğer bir inhibitör protein ise “Sclerostin (SOST)” proteindir. SOST proteini ilk defa otozomal resesif bir hastalık olan ve kemiklerin gereğinden fazla büyümesi ile karakterize sklerosteozisli bir hastada tanımlanmıştır. *Xenopus laevis* embriyolarında yapılan çalışmalarda SOST proteinlerinin Wnt'nin hedef hücre zarındaki reseptörlerine direkt olarak bağlandığı ve Wnt-reseptör ilişkisini bozarak sinyal mekanizmasını inhibe ettiği belirlenmiştir [119].

Kremen2 ise hedef hücre zarında bulunan bir transmembran proteindir. Yapılan çalışmalarda Kremen2 proteininin Wnt'nin hedef hücre zarındaki reseptörüne direkt olarak bağlandığı ve reseptörün hızlı bir şekilde endositozis ile hücre içine alınmasına neden olduğu saptanmıştır. Reseptörün hücre içine alınması ile Wnt-reseptör ilişkisi engellenmektedir. Bu şekilde sinyal yolu inaktif hale gelmektedir [120].

### **1.2.2. Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu mekanizması**

Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu mekanizması 3 basamakta incelenebilir [73]:

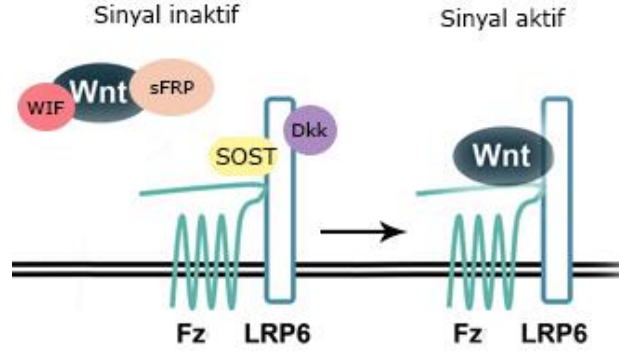
1. Hedef hücre yüzey reseptörlerinin aktivasyonu
2. Yıkıcı kompleksin inhibisyonu
3. Transkripsiyonel kompleksin aktivasyonu

#### **1.2.2.1. Hedef hücre yüzey reseptörlerinin aktivasyonu**

Wnt sinyal proteini sentezlendiği hücreden salgılanarak, etki edeceği hedef hücre zarına ulaşır ve hedef hücre zarında bulunan reseptörlerine bağlanır. Bu bağlanma Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu mekanizmasının başlamasını sağlar. Hedef hücre zarında bulunan Wnt reseptörleri; “Frizzeld (Fz)” ve “Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör ilişkili protein5/6 (LRP5/6)”dır [121].

FZD geni tarafından kodlanan Fz proteinleri 537-706 amino asit uzunluğuna ve yaklaşık 63-80 kDa molekül ağırlığına sahip transmembran proteinleridir [122]. Bu proteinlerin bir ucu ECM'ye uzanırken, diğer ucu ise zarın bir ucundan diğerine 7 adet kıvrım oluşturarak sitozol içine uzanır. İnsanlarda tanımlanmış 10 adet Fz reseptörü bulunmaktadır. Fz reseptörünün üç boyutlu yapısı incelendiğinde, N-terminal ucunda 120 amino asit uzunluğunda, sistein amino asitlerince zengin bir

bölge olduğu görülmüştür. Fonksiyonel olarak da önemli olan bu bölge “cystein rich domain (CRD)” olarak adlandırılmıştır. Yapılan çalışmalarda, Wnt proteininin Fz reseptörünün yapısında bulunan bu CRD bölgesine bağlandığı belirlenmiştir [123]. Bununla birlikte 19 Wnt proteininin bu 10 Fz reseptörünün hangilerine bağlandığı, farklı bağlanmaların sinyal aktivitesi üzerine etkisi olup olmadığı henüz ortaya konulamamıştır [88].



**Şekil 1. 5.** Hedef hücre yüzey reseptörlerinin aktivasyonu ([117]’den yararlanılarak çizilmiştir).

LRP reseptörleri ise bir ekstrasellüler domain ve kısa bir sitoplazmik kuyruğa sahip, basit transmembran proteinleri olarak sınıflandırılmaktadır. Bu reseptörler yaklaşık 1615 amino asit uzunluğunda ve 180 kDa molekül ağırlığındadır [124]. Memelilerde LRP5 ve LRP6 ile temsil edilen bu reseptörlerin *Drosophila*’daki homoloğu ise Arrow proteindir [125]. LRP5 ve LRP6 reseptörlerinin ekstrasellüler domainlerinin birbirleriyle %73, sitoplazmik domainlerinin ise %64 oranında sekans benzerliği gösterdiği saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda hem LRP5, hem de LRP6’nın Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu aktivasyonunda görev yaptığı belirlenmiştir [126]. Bu nedenle sinyal yolu mekanizması anlatılırken reseptör LRP5/6 olarak adlandırılmaktadır. Yapılan çalışmalarda, her iki reseptörün de sinyal aktivitesine sahip olmasına rağmen LRP6’nın LRP5’ten daha aktif olduğu gösterilmiştir [124].

LRP reseptörlerinin üç boyutlu yapısı incelendiğinde ekstrasellüler matrikse uzanan N-terminalinde yaklaşık 29 amino asit rezidüsünden oluşan bir sinyal sekans bölgesi olduğu belirlenmiştir. LRP reseptörünün sentezlendikten sonra hücre zarına yerleşmesini sağlayan bu sinyal dizinin ardından “epidermal büyüme faktörü benzeri bölge (EGF-like repeat)” olarak adlandırılan ve sistein amino asitleri bakımından zengin, dört adet EGF tekrarı yer alır. Bu tekrar bölgelerinin



reseptör-ligand ilişkisinin sağlanmasında görev yaptığı belirlenmiştir [127]. EGF tekrar bölgelerinin arasında ise Tirozin-Triptofan-Treonin-Aspartat (YWTD) amino asitlerinin tekrarlanması ile oluşan YWTD motifleri bulunur. Yapılan çalışmalarda farklı Wnt tiplerinin LRP5/6 reseptörünün farklı bölgelerine bağlandığı rapor edilmiştir. Örneğin Wnt9 ilk tekrar bölgesine bağlanırken, Wnt3A son tekrar bölgesine bağlanmaktadır [124].

LRP5/6'nın sitoplazmik ucu ise yaklaşık 200 amino asit uzunluğundadır. Bu reseptörün sitoplazmik ucunda bulunan Prolin-Prolin-Prolin-Serin-Prolin (PPPSP) amino asitlerinden oluşan motif, Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunun aktivitesi için önemlidir. Bu motifte meydana gelen mutasyonların sinyal aktivitesinin bozulmasına neden olduğu gösterilmiştir [128].

Wnt proteini hedef hücre zarına ulaştığında yapısında bulunan, lipid modifikasyona uğramış Sistein amino asit rezidüleri ile zarda bulunan Fz reseptörünün Sistein amino asitleri bakımından zengin CRD bölgesine bağlanır. Bu şekilde "Wnt-Fz kompleksi" kurulmuş olur [88]. Yapılan çalışmalarda, bu bağlanmanın ardından LRP5/6'nın, "Wnt-Fz" ikilisine bağlandığı belirlenmiştir (Şekil 1.5). Bu şekilde "Wnt-Fz-LRP5/6" üçlü kompleksi oluşur. Bu kompleks sinyal yolunun başlaması için gereklidir [124].

Son yıllarda yapılan çalışmalarda Fz ve LRP5/6 dışında hedef hücre zarında Wnt proteinlerinin bağlanabileceği farklı reseptörler de belirlenmiştir. Bu reseptörlerden biri "Receptor Tyrosine Kinase-like Orphan Receptor-1/2 (Ror2)"dir. Ror2 transmembran proteini de Fz reseptörüne benzer şekilde ekstraselüler matrikse uzanan N-terminal bölgesinde Sistein amino asitlerince zengin bir CRD bölgesi içermektedir. Mikels ve çalışma grubunun [129] 2006 yılında yaptıkları çalışmada Wnt5a'nın Ror2 reseptörüne bağlanarak Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu aktivitesini inhibe ettiği belirlenmiştir. Ancak mekanizma tam olarak aydınlatılamamıştır.

Diğer bir reseptör ise tirozin kinaz aktivitesine sahip bir transmembran proteini olan RyK/Derailed'dir. Bu reseptörün Wnt-Fz ikilisine ko-reseptör olarak görev yaptığı saptanmış, ancak mekanizma henüz tam olarak ortaya konulamamıştır [130]. Bu reseptörlerin dışında Wnt'nin Cripto, MuSK, ZNRF3, RNF43, Rspodin, VANGL1 ve VANGL2, PTK7/CCK4 gibi çok sayıda reseptörle olan ilişkisi hala araştırılmaktadır [131].

Son yıllarda yapılan çalışmalarda hedef hücreye ulaşan Wnt'nin, hedef hücre zarında bulunan reseptörlerine bağlanmasının ardından, Wnt-reseptör kompleksinin klatrin aracılı endositozis mekanizmasıyla hücre içine alındığı gösterilmiştir [132], [133]. Blitzer ve Nusse [134] tarafından yapılan deneylerde Wnt-reseptör kompleksini içeren vezikülün hücre zarından ayrılarak sitozole verilmesini sağlayan Dinamin proteinindeki bozuklukların sinyal aktivitesini %70-90'dan %20-30'a düşürdüğü gözlenmiştir. Endositozis mekanizmasının Wnt sinyal mekanizmasındaki rolü ile ilgili çalışmalar hala devam etmektedir.

Wnt proteininin Fz ve LRP5/6 reseptörlerinin ekstrasellüler bölgelerine bağlanması, reseptörlerin intrasitoplazmik bölgelerinde konformasyonel değişime neden olur. Bu konformasyonel değişimler sinyalin ekstrasellüler matriksten sitoplazmaya aktarılmasında kritik basamağı oluşturur. Yapılan çalışmalarda, bu konformasyonel değişimlerin etkisi ile gerçekleşen iki önemli fosforillenme reaksiyonunun varlığı belirlenmiştir. Bunlardan ilki "Dishevelled (Dvl)" proteininin fosforillenmesidir. İkinci fosforillenme reaksiyonu ise Wnt'nin hücre zarındaki reseptörlerinden biri olan LRP5/6'nın sitoplazmik kuyruğunda gerçekleşir [124].

**Dvl proteininin fosforillenmesi:** Wnt proteini hücre zarında bulunan Fz reseptörüne bağlandığında bu reseptörde meydana gelen konformasyonel değişim sitoplazmada bulunan Dvl proteinini hücre zarına doğru çeker [135]. DVL geninin ürünü olan Dvl proteini, yaklaşık 700 amino asitten oluşur ve 78 kDa molekül ağırlığına sahiptir. Dvl, yapısında çok sayıda fosforillenebilir serin ve treonin amino asit rezidüleri içeren bir fosfoproteindir [136]. Dvl proteininin Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunda görev yaptığı *Drosophila*'da yapılan segment polaritesi çalışmaları sırasında gösterilmiştir [137].

Dvl proteininin yapısı incelendiğinde N-terminal bölgesinde DIX, merkezinde PDZ ve C-terminalinde ise DEP olmak üzere fonksiyonel 3 bölgenin varlığı belirlenmiştir [136]. Sinyal aktivitesi ile birlikte hücre zarına yönelen Dvl, yapısındaki PDZ domaini ile FZ'nin yapısındaki PDZ domainine bağlanır [138]. Bu bağlanma sonucu Dvl, sitozolde bulunan CK1 $\epsilon$ , PAR1 ve CK2 enzimleri tarafından fosforillenir [139].

**LRP5/6'nin fosforillenmesi:** Sinyal mekanizmasının başlaması ile sadece zarda bulunan Fz reseptöründe değil, LRP5/6 reseptörünün yapısında da konformasyonel bir değişim meydana gelmektedir. Bu değişimin etkisi ile LRP5/6 proteininin hücre içi kısmında bulunan "Prolin-Prolin-Prolin-Serin-Prolin (PPPSP)" motifi "Glikojen sentetaz kinaz 3 beta (GSK3 $\beta$ )" ve "Kazein kinaz I gamma (CKI $\gamma$ )" enzimleri tarafından fosforillenir [128]. LRP5/6 enziminin fosforillenme reaksiyonları ile ilgili olarak çeşitli modeller ortaya konulmuştur. Bu modellerden birinde CKI $\gamma$  enziminin LRP5/6'nin sitoplazmik kuyruğunu PPPSP motifi dışında bir bölgeden fosforillediği, bu fosforillenme reaksiyonunun da PPPSP motifinin GSK3 $\beta$  tarafından fosforillenmesini uyardığı öne sürülmüştür. GSK3 $\beta$  enziminin substrat olarak CKI enzimleri ile fosforillenmiş substratları tercih etmesi, bu modeli destekler niteliktedir [140].

Dvl proteininin ve LRP5/6 reseptörünün fosforillenme reaksiyonlarının hedefi sitozolde bulunan ve çeşitli proteinlerin bir araya gelmesi ile oluşan yıkıcı komplekstir [73].

#### **1.2.2.2. Yıkıcı kompleksin inhibisyonu**

Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu, Wnt sinyal molekülünün hedef hücre zarında bulunan Fz ve LRP5/6 reseptörlerine bağlanması ile başlar. Bu bağlanma ile hücre yüzey reseptörleri aktifleşir. Bu aktivasyonun ardından gelen ikinci basamak ise yıkıcı kompleksin inhibisyonudur. Yıkıcı kompleks; Axin, "Adenomatöz poliposis koli (APC)", "GSK3 $\beta$ " ve "CKI $\alpha$ " biyomoleküllerinden oluşmaktadır. "Axin-APC-GSK3 $\beta$ -CKI" kompleksine sinyal yolu inaktif durumdayken  $\beta$ -katenin proteininin yıkılmasından sorumlu olduğu için "yıkıcı kompleks" adı verilmektedir [141]. Yapılan çalışmalarda Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunun aktivasyonu ile birlikte yıkıcı kompleksin inhibe olduğu, buna bağlı olarak da parçalanamayan  $\beta$ -katenin proteininin sitoplazmada birikerek çekirdeğe taşındığı ortaya konmuştur. Çekirdeğe giren  $\beta$ -katenin proteini ise sinyal yolunun hedef aldığı genlerin transkripsiyonunu aktifleştirmektedir [142]. Yıkıcı kompleksin aktivitesi sinyal yolunun aktif ve inaktif oluşuna göre aşağıda ayrı ayrı incelenecektir.

### **a. Sinyal yolu inaktif durumda iken;**

Sinyal yolu inaktif durumda iken yıkıcı kompleks aktif durumda bulunmaktadır. Sitoplazmada aktif halde bulunan yıkıcı kompleks,  $\beta$ -katenin proteinini yakalayarak fosforillenmesini ve buna bağılı olarak da parçalanmasını sağlamaktadır (Şekil 1.6). Bu şekilde  $\beta$ -katenin proteininin sitoplazmadaki yarı ömrü kontrol edilmiş olur. Yapılan çalışmalarda sinyal yolu inaktif hücrelerde, aktif yıkıcı kompleksin etkisi ile  $\beta$ -katenin proteininin yarı ömürünün yaklaşık 50 dakika olduğu gösterilmiştir. Yıkıcı kompleks inaktif olduğu durumda ise bu süre 3 saate kadar uzamaktadır [3].

Yıkıcı kompleksin oluşumunda ilk basamak yıkıcı kompleksi oluşturan proteinlerin bir araya gelmesidir. İlk olarak sitozolde bulunan Axin proteini, GSK3 $\beta$  enzime bağlanır [143]. Axin proteini yıkıcı kompleksi bir arada tutan, 862 amino asit uzunluğunda ve 95,6 kDa molekül ağırlığına sahip bir proteindir. Fare embriyoları ile yapılan çalışmalar sırasında fused gen lokusunun ürünü olarak tanımlanan bu proteinin yapısı incelendiğinde N-terminal bölgesinde RGS, C-terminali bölgesinde ise DIX adı verilen ve fonksiyonel açıdan önemli iki bölge olduğu belirlenmiştir [144]. Bu bölgelerin, Axin-GSK3 $\beta$ , Axin-APC, Axin-Dvl ve Axin- $\beta$ -katenin etkileşiminde görev aldığı saptanmıştır. Dolayısıyla Axin, yıkıcı kompleksi oluşturan moleküllere bağlanarak onları bir arada ve birbirine yakın durumda tutan bir yapı iskelesi gibi rol oynamaktadır [145].

Yıkıcı kompleksi oluşturmak amacıyla Axin proteinine bağlanan GSK3 $\beta$  enzimi sitozol, çekirdek ve mitokondride bulunan, 420 amino asit uzunluğunda ve 47 kDa molekül ağırlığına sahip bir serin/treonin kinazdır [146], [147]. Bu enzim erişkin ve embriyonik dönemde çok sayıda biyomolekülün fosforillenmesinden sorumludur. Bu şekilde hücre siklusunda, mikrotübül organizasyonunda, apoptozis, osteogenez ve kondrogenez gibi çeşitli biyolojik süreçlerde görev yapar. Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunda ise yıkıcı kompleksin yapısında bulunmaktadır [147].

Axin proteini ile GSK3 $\beta$  enzimi arasındaki ilişki incelendiğinde, Axin proteininin enzimin katalitik bölgesinden uzak bir noktaya bağlandığı ve enzimin katalitik aktivitesini etkilemediği belirlenmiştir [148]. Bir araya gelen “Axin-GSK3 $\beta$ ” kompleksine daha sonra APC proteini bağlanır ve “Axin-GSK3 $\beta$ -APC” üçlü kompleksi kurulmuş olur. APC geni tarafından kodlanan APC proteini, 2843 amino asit uzunluğundadır ve yaklaşık 310 kDa molekül ağırlığına sahiptir [149].

Proteinin merkezinde “Serin-Alanin-Metionin-Prolin” amino asitlerinin üç defa tekrar edilmesinden oluşan ve SAMP adı verilen bir bölge bulunur. Yapılan çalışmalarda APC proteininin SAMP domaini ile Axin proteinin N-terminalinde bulunan RGS domainine bağlandığı gösterilmiştir. APC'nin N-terminal bölgesiyle de  $\beta$ -katenin proteinine bağlanabildiği belirlenmiştir [150]. APC proteininin C-terminal bölgesi ise yıkıcı kompleksteki görevinden bağımsız olarak, proteinin mikrotübüllere bağlanmasını sağlar. APC, mitoz bölünme sırasında iğ ipliklerinin oluşması, kinetokorların birbirine tutunması ve mikrotübüllerin stabilizasyonunun sağlanmasında da rol oynamaktadır [151].

APC'nin Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolundaki rolü hala araştırma konusudur. Bu nedenle çeşitli araştırmacılar tarafından farklı modeller ortaya konmuştur. APC'nin yıkıcı kompleksin yapısına katılarak  $\beta$ -katenin proteininin fosforillenmesi ve ortadan kaldırılmasında görev aldığı en çok kabul gören görüştür [152]. Bunun dışında, APC proteininin  $\beta$ -katenin proteininin sitoplazmada tutulmasını sağladığı ve bu şekilde sinyal yolunun negatif regülatörü olarak görev yaptığı da belirtilmiştir [153]. Diğer bir araştırma grubu tarafından APC'nin çekirdeğe girerek, sinyal yolunun aktivasyonu ile çekirdeğe giren  $\beta$ -katenin proteinine bağlandığı öne sürülmektedir. Bu bağlanma ile  $\beta$ -katenin proteininin sitoplazmaya tekrar taşındığı ve bu şekilde genlerin transkripsiyonunun önlendiği düşünülmektedir [154]. Ayrıca çekirdeğe giren APC proteininin, transkripsiyonu inhibe eden çeşitli biyomoleküller ile kompleks oluşturarak genlerin ifadesini engellediğini öne süren araştırmacılar da vardır [155].

Yıkıcı kompleksin diğer bileşeni ise CKI $\alpha$  enzimidir. CKI $\alpha$ , kazein kinaz I enzim ailesinin bir üyesidir ve proteinlerdeki serin/treonin amino asit rezidülerinin fosforillenmesinde görev alan bir protein kinazdır. CKI $\alpha$  tek bir polipeptid zincirinden oluşan monomerik bir enzimidir. Bu enzim, 337 amino asit uzunluğa ve yaklaşık 38 kDa molekül ağırlığa sahiptir ve çeşitli biyolojik süreçlerde rol oynayan birçok proteinin fosforillenmesinden sorumludur [156]. CKI $\alpha$ , yıkıcı kompleksin yapısında bulunan Axin proteininin C-terminal bölgesine bağlanır. Böylece, CKI $\alpha$ 'nın da yapıya eklenmesi ile “Axin-GSK3 $\beta$ -APC ve CKI $\alpha$ 'dan” oluşan yıkıcı kompleks bir araya gelmiş olur (Şekil 1.6) [141].

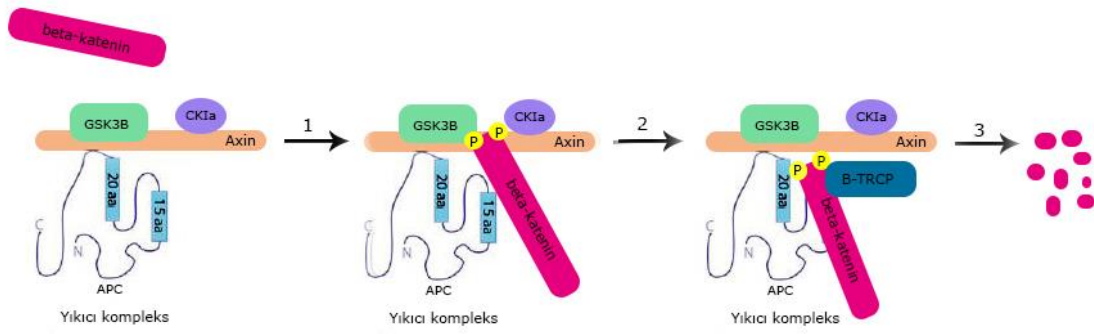
Yıkıcı kompleksin oluşumundan sonra ikinci basamak yıkıcı kompleksi bir arada tutan Axin proteininin, 609. treonin ve 614. serin rezidülerinden GSK3 $\beta$  enzimi

tarafından fosforillenmesidir [157]. Bu fosforillenme reaksiyonu Axin proteininin  $\beta$ -katenin proteinine olan bağlanma ilgisini arttırmaktadır. Bu şekilde sitoplazmada sentezlenen  $\beta$ -katenin proteini yıkıcı kompleks tarafından yakalanır [158], [159].

Üçüncü basamakta,  $\beta$ -katenin proteini fosforillenen Axin proteininin N-terminal bölgesine bağlanır. Bu bağlanma  $\beta$ -katenin proteininde konformasyonel bir değişime neden olur. Bu değişimle birlikte proteinin N-terminal bölgesinde bulunan 45. Serin amino asit rezidüsü yıkıcı kompleksin yapısındaki CKI $\alpha$  enzimi tarafından fosforillenir [160]. Bu fosforillenme reaksiyonunun ardından GSK3 $\beta$  enzimi sırasıyla 41. treonin, 37. ve 33. serin rezidülerinden  $\beta$ -katenin proteinini fosforiller. Yapılan çalışmalarda CKI $\alpha$  tarafından gerçekleştirilen fosforillenme reaksiyonunun, GSK3 $\beta$  enziminin fonksiyonu için gerekli olduğu belirlenmiştir [161].

Dördüncü basamakta ise yıkıcı kompleksin yapısında bulunan APC proteini de CKI $\alpha$  ve GSK3 $\beta$  enzimleri tarafından fosforillenir. Bu fosforillenme reaksiyonunun APC proteininin  $\beta$ -katenin proteinine bağlanma ilgisini 140 kat arttırdığı belirlenmiştir. Bu şekilde  $\beta$ -katenin proteininin Axin proteininden ayrıldığı, APC'ye bağlandığı ve böylece yeni bir  $\beta$ -katenin proteininin Axin proteini tarafından yakalanabildiği öne sürülmektedir [159], [162].

Yıkıcı kompleksin etkisiyle 33. ve 37. Serin rezidülerinden fosforillenen  $\beta$ -katenin proteini SCF ubiquitin ligaz kompleksinin bir alt birimi olan "Beta-Transducin Repeat Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase ( $\beta$ -TrCP1)" enzimi tarafından tanınır [163]. Bu enzim kısa ömürlü sitoplazmik proteinlerin lizozom dışında yıkılmalarını sağlayan "ubikilasyon-proteozom yolunda" görev almaktadır.  $\beta$ -TrCP1 enzimi tarafından tanınan fosforillenmiş  $\beta$ -katenin proteinine E3 ligaz enzimi tarafından ubiquitin eklenir. Ubikitin, mayalardan insana kadar evrimsel olarak korunmuş, 76 amino asit uzunluğunda ve 9 kDa molekül ağırlığına sahip küçük bir proteindir. Bu protein diğer proteinlere kovalent olarak bağlanarak; ya proteinleri fonksiyonel olarak aktif hale getirir ya da yıkılmaları için proteozomlara yönlendirir. Ubikitinin, C-terminalinde bulunan glisin amino asiti (G76) ile diğer proteinlerin lizin rezidülerine bağlandığı gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda proteinlerin proteozomal degradasyona yönlendirilebilmesi için en az 4 ubiquitin proteininin yapıya bağlanması gerektiği saptanmıştır. Bu şekilde yıkılacak proteinlerle yıkılmayacak proteinler birbirinden ayrılmış olur [164].



**Şekil 1. 6.** Yıkıcı kompleksin yapısı ve  $\beta$ -katenin proteininin yıkım basamakları görülmektedir. İlk basamakta  $\beta$ -katenin yıkıcı komplekse bağlanır ve CK1 $\alpha$  ve GSK3 $\beta$  tarafından fosforillenir (1). İkinci basamakta ise fosforillenen  $\beta$ -katenin Axin proteininden ayrılır ve fosforil grupları  $\beta$ -TRCP tarafından tanınır (2). Üçüncü basamakta ise  $\beta$ -katenin parçalanır (3) ([152]'den değiştirilerek yeniden çizilmiştir).

Ubikitinleri proteinlere ekleyen sistem E1, E2 ve E3 olarak adlandırılan ligaz enzimleri tarafından kontrol edilmektedir [165]. E1 enzimi ubikitin aktive edici enzimdir. Bu enzime ubikitin bağlandığında ubikitin aktifleşir ve ikinci basamakta aktifleşen ubikitin E2 adı verilen ubikitin konjugasyon enzimine aktarılır. Sonraki basamakta görev alan E3 ligaz enzimi ubikitin proteinlere kovalent olarak bağlanmasını sağlar.  $\beta$ -katenin proteininin N-terminalinde bulunan lizin rezidülerine E3 ligaz enzimi tarafından eklenen çok sayıda ubikitin proteini, 26S proteozomlar için etiket görevi yapar [166].

Proteozomlar yaklaşık 50 proteinin bir araya gelmesiyle oluşmuş makromoleküllerdir. Proteozomlar, ubikitinle işaretli proteinlerin yıkımından sorumludur [167]. Enerji gereksinimi olan bu süreç için ATP'yi hidroliz etme özelliğine sahiptirler. Bu nedenle ATPaz olarak sınıflandırılırlar. Proteozomlar tarafından parçalanan proteinler 2-24 amino asit uzunluğunda kısa peptidler olarak sitozole verilir ve burada peptidazlar tarafından hızla amino asitlerine ayrılırlar. Proteozomlar tarafından tanınan ubikitinlenmiş  $\beta$ -katenin proteini parçalanmaktadır. Yıkılan  $\beta$ -katenin proteininin çekirdeğe giremediği ve buna bağlı olarak da sinyal yolunun hedef genlerinin transkripsiyonunun gerçekleşmediği saptanmıştır [168].

## **b. Sinyal yolu aktif durumda iken;**

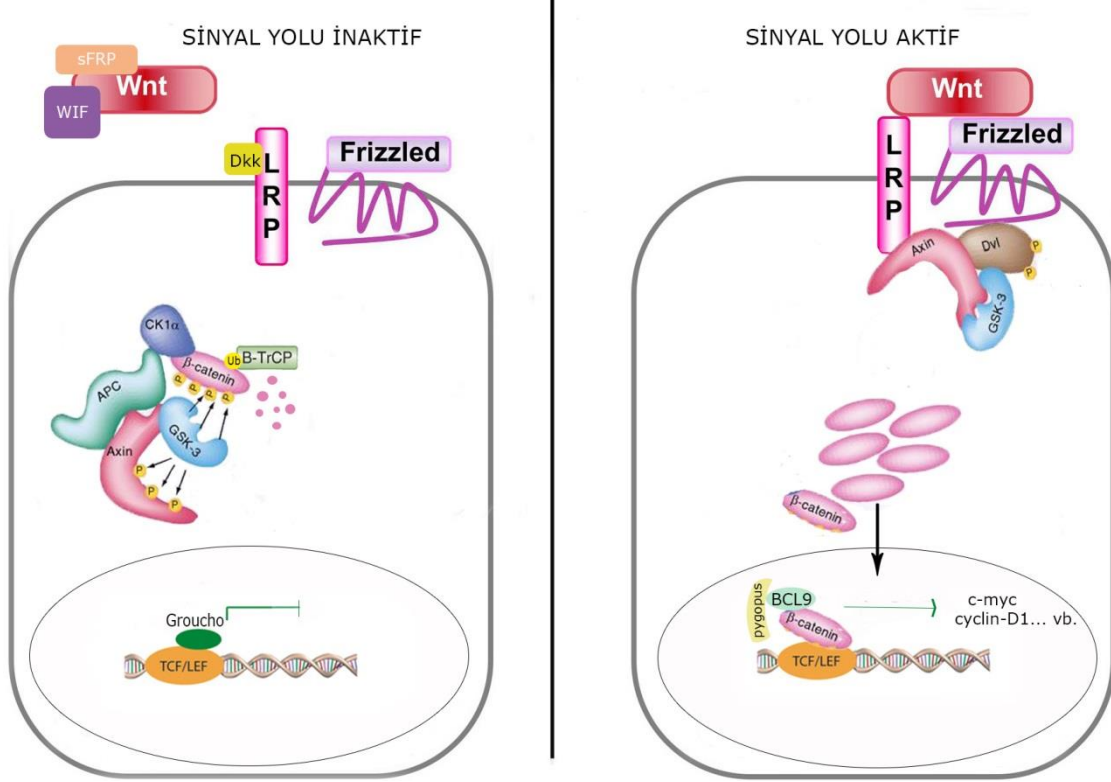
Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu aktive olduğunda yıkıcı kompleks inhibe edilir. Yıkıcı kompleksin inaktif hale gelmesindeki kritik basamak bu kompleksi bir arada tutan Axin proteininin yapıdan ayrılmasıdır. Axin proteininin yıkıcı kompleksten ayrılma mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu konu ile ilgili yapılan çalışmalarda Axin proteininin, sinyal aktivitesi ile birlikte fosforillenen Dvl proteinine ve LRP5/6'nın sitozolik kuyruğuna yüksek afinite gösterdiği ve bunun sonucu olarak yıkıcı kompleksin sitoplazmadan hücre zarına doğru yöneldiği öne sürülmektedir. Hücre zarına gelen Axin bir ucu ile LRP5/6'nın fosforillenmiş sitozolik kuyruğuna bağlanırken, bir ucu ile de fosforillenmiş Dvl proteinine tutunur. Dvl proteininin N-terminalinde bulunan DIX bölgesi Axin proteininde de bulunmaktadır ve yapılan çalışmalarda Axin ile Dvl'nin bu bölgelerinin direkt olarak bağlandığı ve inhibe edildiği gösterilmiştir [169], [170].

Yıkıcı kompleksin yapısında bulunan ve  $\beta$ -katenin proteininin fosforillenmesinden sorumlu olan GSK3 $\beta$  enziminin inhibisyonu da sinyal aktivitesi açısından oldukça önemlidir. Bu inhibisyon ile ilgili olarak 3 farklı model ortaya konmuştur. Bu modellerden birinde sitoplazmadan hücre zarına yönelen yıkıcı kompleksin yapısındaki GSK3 $\beta$  enziminin hücre zarında yer alan LRP5/6'nın sinyal aktivitesi ile birlikte fosforillenen sitoplazmik kuyruğuna direkt olarak bağlandığı ve bunun da enzim aktivitesini ortadan kaldırdığı belirlenmiştir [171]. İkinci modelde ise GSK3 $\beta$  enziminin 9. serin amino asit rezidüsünün fosforillendiği, buna bağlı olarak enzim aktivitesinin ortadan kalktığı öne sürülmektedir [172]. Üçüncü modelde ise GSK3 $\beta$  enziminin, "frequently rearranged in advanced T-cell lymphoma-1 (Frat-1)" adı verilen bir inhibitör protein tarafından inhibe edildiği ve bu şekilde GSK3 $\beta$ 'nin  $\beta$ -katenini fosforilleme etkisinin ortadan kaldırıldığı ifade edilmektedir [173]. Ancak Frat-1'in mutant olduğu hücrelerde Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu aktivitesinin devam ediyor olması bu modelin detaylı olarak araştırılması gerektiği sonucunu oluşturmuştur [73].

Sonuçta, sinyal yolunun aktivitesine bağlı olarak inhibe olan yıkıcı kompleks,  $\beta$ -katenin proteinini fosforilleyemez (Şekil 1.7). Fosforillenemeyen  $\beta$ -katenin proteini, proteozomlarda parçalanamaz ve sitozolde birikir. Biriken  $\beta$ -katenin proteini çekirdeğe girerek, burada bulunan transkripsiyon faktörlerini aktive eder ve Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunun hedef genlerinin transkripsiyonunu başlatır. Bu



aktivasyonla, hem sinyal yolunda görev yapan proteinlerin transkripsiyonu gerçekleşir, hem de proliferasyonda, hücre siklusunda, farklılaşmada önemli rol oynayan birçok genin transkripsiyonunun kontrolü sağlanmış olur [64].



**Şekil 1. 7.** Wnt/β-katenin sinyal yolunun inaktif ve aktif olduğu durumların şematik görünümü ([174] ve [121] kaynaklardan yararlanılarak yeniden çizilmiştir).

### 1.2.2.3. Transkripsiyonel kompleksin aktivasyonu

Yıkıcı kompleksin inhibe olmasıyla birlikte fosforillenemeyen dolayısıyla parçalanamayan β-katenin proteininin sitoplazmadaki miktarı hızla artmaktadır. Bu birikim belirli bir düzeye geldiğinde β-katenin proteini çekirdeğe girer [175]. β-katenin proteininin çekirdeğe giriş mekanizması hala araştırma konusudur. Bu proteinin yapısı incelendiğinde, çekirdeğe giriş için gerekli olan NLS sinyallerinin bulunmadığı belirlenmiştir. Dolayısıyla, β-katenin proteininin çekirdek içine girişinin klasik taşıma faktörlerinden bağımsız olduğu gösterilmiştir [176], [177].

$\beta$ -katenin proteininin yapısındaki armadillo tekrar bölgesi ile doğrudan çekirdek kılıfına bağlandığı ve çekirdeğe taşındığı öne sürülmektedir [176]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise  $\beta$ -katenin proteininin armadillo tekrar bölgesi ile çekirdek por kompleksinin yapısında bulunan Nükleoporin 62 (Nup 62), Nup 153 ve Nup 358'e bağlandığı ve çekirdek içine taşındığı da rapor edilmiştir [178]. Bazı araştırmacılar ise Axin, APC ve LEF-1'in  $\beta$ -katenin proteinine bağlanarak çekirdeğe taşınmasında görev yaptığını öne sürmektedir [142], [179], [180], [181].

Çekirdeğe giren  $\beta$ -katenin burada bulunan transkripsiyon faktörlerine bağlanarak onların aktif hale gelmesine neden olmaktadır. Bu nedenle  $\beta$ -katenin ko-aktivatör olarak tanımlanmaktadır [182]. Bu transkripsiyon faktörleri sınıfının memeli hücrelerinde 380-620 amino asit uzunluğuna ve 42-68 kDa molekül ağırlığına sahip "T-cell factor-1 (TCF-1)", TCF-3, "Lymphoid enhancer-binding factor 1 (LEF-1)" ve TCF-4 olmak üzere dört üyesi olduğu belirlenmiştir [183].

TCF/LEF-1 transkripsiyon faktörlerinin yapısında fonksiyonel olarak iki önemli bölge bulunmaktadır. Bu bölgelerden ilki, proteinin C-terminal ucunda bulunan, "AGATCAAAGGG" nükleotidlerinden oluşmuş ve "high-mobility group bölgesi (HMG)" olarak adlandırılan DNA bağlanma bölgesidir [184]. TCF/LEF-1, bu bölge ile DNA'daki CCTTTGWW (W:T ya da A olabilir) konsensus dizisine bağlanır. Bu DNA dizisi "Wnt-responsive element (WRE)" olarak adlandırılır. WRE bölgesinin yaklaşık 300-400 genin ifadesini düzenlediği belirlenmiştir [185].

TCF/LEF1'in yapısındaki ikinci bölge ise 60 amino asitten oluşan ve proteinin N-terminalinde bulunan  $\beta$ -katenin bağlanma bölgesidir. TCF/LEF-1 transkripsiyon faktörlerinin genlerin transkripsiyonu aktive edebilmeleri için  $\beta$ -katenin proteine bağlanması gerekmektedir [186]. Sinyal yolu inaktif durumdayken, başka bir deyişle  $\beta$ -katenin çekirdeğe girmeden önce TCF/LEF1, çekirdekte bulunan çeşitli inhibitör proteinlerle bağlı halde ve inaktif durumda bulunmaktadır. TCF/LEF1'in aktivitesini engelleyen inhibitörler "Transducin-like-Enhancer of split (Groucho/TLE)", "CREB-bağlanma proteini (CBP)" ve "C-terminal bağlanma proteini (CtBP)". Bu inhibitör moleküller TCF/LEF-1 transkripsiyon faktörlerine bağlı bulunur. Sinyal yolu aktivitesi ile birlikte çekirdeğe giren  $\beta$ -katenin bu inhibitör moleküller ile yer değiştirir. Bu durum çekirdekte artan  $\beta$ -katenin konsantrasyonuna bağlı olarak TCF/LEF-1'in  $\beta$ -katenin proteinine olan ilgisinin artmasından kaynaklanmaktadır. Yapılan çalışmalarda  $\beta$ -katenin proteininin

çekirdekdeki konsantrasyonu 2 katına çıkmadan transkripsiyonun aktifleşmediği görülmüştür [187], [188].

Çekirdekte TCF/LEF-1 ile  $\beta$ -katenin proteini arasındaki ilişkiyi düzenleyen 2 ko-faktör tanımlanmıştır. Bu moleküllerden biri “B-cell CLL/lymphoma 9 protein (BCL-9)”, diğeri ise Pygopus’dur. Sinyal yolu aktif duruma geçip  $\beta$ -katenin çekirdeğe girdiğinde BCL-9,  $\beta$ -katenin proteininin arm tekrar bölgesine bağlanır. Bu bağlanmanın ardından BCL-9- $\beta$ -katenin kompleksine Pygopus bağlanır. Bu üçlü kompleks TCF/LEF-1’e bağlanarak bu transkripsiyon faktörünün konformasyonunu değiştirir. Bu konformasyonel değişim çok sayıda kromatin yeniden düzenlenme faktörünün yapıya katılmasını sağlar. Bu şekilde transkripsiyon kompleksi oluşmuş olur. Bu kompleks DNA’ya bağlanır ve Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunun hedef aldığı c-myc ve cyclin D1 gibi hedef genlerin ifadesi gerçekleşir (Şekil 1.7) [186], [189].

Sinyal bittiğinde transkripsiyonun inhibe olması gerekmektedir. Bunun için de  $\beta$ -katenin proteininin transkripsiyon faktörlerinden ayrılıp çekirdekten sitozole çıkması gerekir. Yapılan çalışmalarda TCF/LEF-1’in, “Nemo-like kinase (NLK)” tarafından fosforillendiği gösterilmiştir. Bu fosforillenme TCF/LEF-1’in  $\beta$ -katenin proteinine olan ilgisini azaltır. Bu şekilde TCF/LEF-1  $\beta$ -katenin proteininden ayrılır [190]. Serbest kalan  $\beta$ -katenin proteininin ise Axin, APC ve RanBP3 moleküllerinin yardımı ile sitozole geri döndüğü düşünülmektedir ancak çalışmalar hala devam etmektedir [177], [179], [191].  $\beta$ -katenin proteininin ayrılmasının ardından TCF/LEF-1 transkripsiyon faktörünün DNA’ya bağlanma bölgesi, “Hemeodomain-interacting protein kinaz-2 (HIPK2)” enzimi tarafından fosforillenir. Bu fosforillenme TCF/LEF-1’in DNA’dan ayrılması ve transkripsiyonun kontrollü bir şekilde inhibe edilmesi için gereklidir. DNA’dan ayrılan TCF/LEF-1 transkripsiyon faktörlerine tekrar inhibitör moleküller bağlanır ve bu şekilde sinyal inaktif durumda olduğunda transkripsiyon da inaktif durumda tutulmuş olur [192].

Son yıllarda yapılan çalışmalarda Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunda görev alan TCF/LEF-1 transkripsiyon faktörlerine bağlanan inhibitör moleküllerin çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılabileceği gösterilmiştir [193]. Örneğin, Jang ve çalışma grubu [194] tarafından 2015 yılında meme kanseri hücreleri ile yapılan bir çalışmada kullanılan düşük molekül ağırlıklı bir inhibitör molekülün,  $\beta$ -katenin proteini ile yarışmaya girerek TCF/LEF-1 transkripsiyon faktörlerine bağlandığı rapor edilmiştir. Bu bağlanma sonucunda  $\beta$ -katenin proteini ile TCF/LEF-1

transkripsiyon faktörleri arasındaki ilişkinin bozulduğu ve kontrolsüz sinyal aktivasyonunun bu şekilde engellendiği belirlenmiştir.

### **1.2.3. Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunun apoptozis ile ilişkisi**

Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunun apoptozis ile ilişkisini araştıran çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalardan bazıları sinyal yolunun apoptozisi aktive ettiğini, bazıları ise inhibe ettiğini belirtmektedir. Bu nedenle bu iki mekanizma arasındaki ilişki hala tam olarak netlik kazanmamıştır [195].

Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu ile apoptozis arasındaki ilişki ilk olarak *Drosophila melanogaster*'de yapılan çalışmalar sırasında ortaya konmuş, bu çalışmada sinyal yolunun negatif düzenleyicilerinden biri olan APC molekülünde meydana gelen bir bozukluğun, sinyal yolu aktivasyonuna neden olduğu ve sonuç olarak da *Drosophila*'nın retinal nöronlarında apoptozisin uyarıldığı gösterilmiştir [196]. *Drosophila*'da yapılan bir diğer çalışmada da Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunun apoptozisi indüklediği ve omurgalıların göz gelişiminde sinyal yolu aktivitesinin önemli olduğu ifade edilmiştir [197]. Daha sonra kuşlarda yapılan çalışmalarda arka beynin embriyonik gelişimi sırasında sinyal yolunun apoptozisi uyardığı tespit edilmiştir [198]. Memelilerde yapılan hücre kültürü çalışmalarında da benzer sonuçlar elde edilmiştir [199].

Bu çalışmaların aksine Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu aktivitesinin hücre proliferasyonunu arttırdığını ancak apoptozisi inhibe ettiğini bildiren çalışmalar da bulunmaktadır. Bu çalışmalarda sinyal yolunun apoptozisin inhibisyonuna neden olmasının, hücrelerin onkojenik dönüşümünde önemli olduğu belirtilmiştir [200], [201]. Chen ve çalışma grubu [202] tarafından kemoterapik ilaçlar kullanılarak apoptozis indüklenmiş hücrelerde yapılan bir çalışmada ise Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunun mitokondriden sitokrom c salınmasını engelleyerek apoptozisi inhibe ettiği ifade edilmiştir.

Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu ile apoptozis arasındaki ilişki araştırılırken, sinyal yolunda görev alan  $\beta$ -katenin, Axin ve APC gibi biyomoleküller de incelenmiştir. Yapılan çalışmalarda, apoptozis ile birlikte aktif duruma geçen kaspaz enzimlerinin  $\beta$ -katenin proteinini N-terminali ve C-terminalinde bulunan farklı bölgelerden kestiği yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Aktif kaspaz 3 ve kaspaz 7 enzimlerinin  $\beta$ -

katenin proteinini 459. ve 764. aspartat rezidüülerinden, aktif kaspaz 6 enziminin ise 11. 17. ve 58. aspartat rezidüülerinden kestiği saptanmıştır [203], [204], [205], [206]. Apoptozis ile birlikte, kaspaz 3 enzimi aktifleştikten 24-48 saat içinde sitoplazmadaki  $\beta$ -katenin miktarının hızla düştüğü gösterilmiştir [207]. Kesilen  $\beta$ -katenin proteininin hücre zarı, sitoplazma ve çekirdekte bulunmadığı, buna bağlı olarak da hem hücre-hücre adezyonu, hem de sinyal yolundaki transkripsiyon faktörlerini aktiveleştirme rolünün ortadan kalktığı belirlenmiştir [203], [205].

Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunda bulunan yıkıcı kompleksin yapısında yer alan Axin proteininin de apoptozis ile ilişkisi çeşitli araştırmacılar tarafından incelenmiştir. Axin proteininin UV uyarımı gibi stresle indüklenen apoptozisde görev yaptığı Li ve çalışma grubu tarafından yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. UV'ye bağlı olarak oluşan DNA hasarı varlığında Axin proteini, "death domain-associated protein (Daax)" adı verilen bir proteine bağlanır. Axin-Daax kompleksinin p53'ün aktivitesini arttırarak hücreleri ölüme sürüklediği bildirilmiştir [208].

Morin ve çalışma grubu tarafından kolon kanser hücreleri (HT29) ile yapılan bir hücre kültürü çalışmasında, artan APC sentezinin hücrelerde apoptozisi uyardığı belirlenmiştir [209]. Aynı hücrelerde Chen ve çalışma grubu tarafından yapılan çalışmada ise normal APC proteininin apoptozisi indüklediği, mutant APC'nin ise kaspaz 3, kaspaz 7 ve kaspaz 9 ifadesini azaltarak apoptozisin inhibisyonuna neden olduğu belirlenmiştir [202].

### **1.3. $\beta$ -katenin proteininin çeşitli hastalıkların oluşumundaki rolü**

$\beta$ -katenin hem hücre-hücre adezyonunda, hem de Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunda görev yapan bir proteindir. Bu protein ile ilişkili hastalıklar;  $\beta$ -katenin proteininde meydana gelen bozukluklar nedeniyle olabileceği gibi, Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunda görev yapan Axin, APC ve Dvl gibi biyomoleküllerdeki bozukluklara bağlı da olabilir. Sinyal yolunun kontrolsüz aktivasyonuna neden olan mutasyonlar hangi biyomolekülde meydana gelirse gelsin, genellikle  $\beta$ -katenin proteininin sitoplazma ve çekirdekte birikimi ile sonuçlanmaktadır. Bu birikim de çekirdekteki genlerin anormal şekilde ifade edilmesine neden olmaktadır. Bu şekilde  $\beta$ -katenin proteini hem embriyonik, hem de erişkin dönemde çeşitli hastalıkların oluşum sürecinde rol oynar [210].

$\beta$ -katenin proteininde meydana gelen mutasyonların kolorektal [211], endometriyal [212], gastrik [213], hepatosellüler kanser [214], melanoma [215] ile over [216] prostat [217] ve tiroid kanserlerinde [218] rolü olduğu gösterilmiştir. Bu mutasyonlar genellikle  $\beta$ -katenin proteinini kodlayan CTNNB1 geninin 3. ekzon bölgesinde bulunan 33., 37. ve 45. serin ile 41. treonin amino asit rezidülerinde gerçekleşir. Bu amino asit rezidüleri yıkıcı komplekste bulunan CK1 $\alpha$  (S45) ve GSK3 $\beta$  enzimlerinin  $\beta$ -katenin proteinini fosforillediği noktalardır (S33, S37 ve T41). Bu amino asit rezidülerinin fosforillenmesi,  $\beta$ -katenin proteininin yıkımı için etiket görevi görür. Bu mutasyonların varlığında, yıkıcı kompleks tarafından  $\beta$ -katenin proteini fosforillenemez ve yıkılamaz. Buna bağlı olarak da sitoplazma ve çekirdekte birikerek hastalıkların oluşumunda rol oynayan anormal transkripsiyona neden olur [219]. Bu çalışmaların yanı sıra  $\beta$ -katenin proteininin 34. ve 38. glisin (G), 32. aspartik asit (D), 49. lizin (K), 35. izolösin (I) ve 36. histidin (H) rezidülerinde de mutasyonların varlığı ve hastalıkların oluşumunda rol oynadığı belirlenmiştir [220].

$\beta$ -katenin proteinindeki bozukluktan kaynaklanan hastalıklara hepatosellüler karsinoma örnek verilebilir [221]. Karaciğerdeki primer tümörlerin %85-%90'nını Hepatosellüler karsinoma (HCC) oluşturmaktadır. Bu kanser oluşumunda karaciğerde meydana gelen travmalar, alkol bağımlılığı, aflatoksin ve metabolik karaciğer hastalıkları temel risk faktörleri olarak belirlenmiştir [222]. De La Coste ve çalışma grubu [214] tarafından 1998 yılında yapılan bir çalışmada HCC'li hastaların %50'den fazlasında  $\beta$ -katenin proteinini kodlayan CTNNB1 geninde mutasyon varlığı saptanmıştır.  $\beta$ -katenin dışında Axin ve APC proteinlerinde meydana gelen bozukluklar, Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu inhibitörleri sFRP1, 2 ve 3'ün metilasyonlarının da  $\beta$ -katenin proteinindeki mutasyonlara benzer şekilde sinyal yolunun kontrolsüz aktivasyonuna neden olduğu ve HCC oluşumunda rol oynadığı rapor edilmiştir [223], [224], [225].

Endometriyal kanser oluşumu sürecinde de  $\beta$ -katenin proteininin rolü olduğu belirlenmiştir [226], [227], [228]. Fukushi ve çalışma grubu [212] tarafından yapılan bir araştırmada endometriyal kanserli olguların yaklaşık %13'ünde (10/76)  $\beta$ -katenin proteinini kodlayan CTNNB1 geninde oluşan mutasyonların varlığını belirlenirken, Liu ve çalışma grubunun [228] 2014 yılında yaptıkları genç ve obez endometriyal kanserli hastaları içeren çalışmada bu oran %87 (47/54) olarak

bulunmuştur. Tüm mutasyonların proteinin N-terminalinde bulunan Serin/Treonin rezidülerinde gerçekleştiği, bunun sonucu olarak da sitozolde biriken  $\beta$ -kateninin sinyal yolunun kontrolsüz aktivasyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Bu kontrolsüz aktivasyonun endometriyal karsinogenez sürecinde önemli rolü olduğu düşünülmüştür.

$\beta$ -katenin proteininin zardaki E-kaderin proteinine bağlandığı bölgede meydana gelen mutasyonlar  $\beta$ -katenin proteininin E-Kaderin proteininden ayrılmasına ve hücre-hücre adezyonunun bozulmasına neden olmaktadır. Bu durumun da tümör hücrelerinin orijin aldığı dokudan ayrılıp metastaz ile farklı dokulara yerleşmesine olanak sağladığı belirtilmektedir [229]. Hücre zarındaki  $\beta$ -katenin ifadesindeki değişim Epitelyal-mezenkimal geçişte önemli role sahiptir. Epitel hücrelerinin mezenkimal hücrelere dönüşümü “epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT)” olarak tanımlanır. Bu değişimin sonucunda hücre polaritesi ve hücre-hücre adezyonu özelliklerini yitiren epitel hücreleri, migrasyon ve invazyon özelliği gösteren mezenkimal hücrelere dönüşürler. EMT'nin özellikle epitelyal kanserlerin oluşumunda ve ilerlemesinde önemli rolü olduğu ifade edilmektedir [230], [231]. EMT ile ilgili yapılan çalışmalarda hücrelerde hücre-hücre bağlantılarının azaldığı gösterilmiştir. Bu azalmanın,  $\beta$ -katenin proteininin zardaki E-kaderin proteinine bağlandığı bölgede meydana gelen mutasyonlar sonucu olduğu belirtilmektedir [232].

#### **1.4. $\beta$ -katenin proteininin kanser tanılarındaki belirleyici rolü**

$\beta$ -katenin proteini Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunun hedef molekülü olması nedeniyle bu sinyal yolunun rol oynadığı kanserlerin tanısında belirleyici olarak kullanılmaktadır. Çalışmalarda, sinyal yolunun aktivitesinin değerlendirilmesi amacıyla  $\beta$ -katenin proteininin hücredeki varlığı ve lokalizasyonu araştırılmaktadır. Sadece hücre zarındaki boyanma sinyal yolu aktivitesi açısından negatif olarak değerlendirilirken, hücre zarına ek olarak sitoplazma ve/veya çekirdekteki birikim pozitif olarak kabul edilir.

Lin ve araştırma grubunun [233] meme kanseri hücre hattı (MCF-7) ve biyopsi materyalleri ile yaptıkları çalışmanın sonucunda, hem hücre hattı, hem de dokuda  $\beta$ -katenin ekspresyonunun normal hücrelere kıyasla arttığı ve  $\beta$ -katenin proteininin belirleyici olarak kullanılabileceği belirtilmiştir. Benzer şekilde, Bodnar ve çalışma

grubu [234] epitelyal over kanserli hastalardan alınmış örneklerde immünohistokimyasal olarak  $\beta$ -katenin ifadesinin arttığını saptamışlardır. Buna bağlı olarak da Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunun over kanseri oluşum sürecinde rolü olduğu ve  $\beta$ -katenin proteininin belirleyici olarak kullanılabileceğini rapor etmişlerdir.

$\beta$ -katenin proteini ile hastalıkların seyri ve sağ kalım arasındaki ilişki de araştırılmıştır. 2013 yılında kolorektal kanserli hastalarda yapılan bir meta analizde  $\beta$ -katenin proteinin çekirdekdeki birikiminin hastalığın seyrini ve sağ kalımı olumsuz yönde etkilediği bildirilmiştir [235]. Tüm bu sonuçlar doğrultusunda, Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunun aktif olup olmadığı hücrelerde  $\beta$ -katenin proteininin varlığı ve lokalizasyonundaki değişiklikler incelenerek saptanabilmektedir.

### **1.5. $\beta$ -katenin proteininin bazı hastalıkların tedavisindeki rolü**

$\beta$ -katenin proteininin karsinogenez sürecinde önemli rolü olduğu ortaya konulduktan sonra, bu proteinin aktivitesini engellemeye yönelik araştırmalar yapılmıştır. Bu araştırmaların temelini, 2002 yılında Kim ve araştırma grubunun [236] farklı evrelerdeki kolorektal adenokarsinoma (SW48 ve DLD1) hücre hatlarında  $\beta$ -katenin inhibisyonunun malign özellikleri geri çevirdiğini gösterdikleri çalışma ile atılmıştır. Bu çalışmanın ardından  $\beta$ -katenin proteinine yönelik inhibitör molekül arayışları hız kazanmıştır.

Lepourcelet ve çalışma grubu [193] tarafından PKF115-584 ve PKF222-815 adı verilen iki düşük ağırlıklı inhibitör molekül spesifik olarak çekirdekte bulunan  $\beta$ -katenin/TCF transkripsiyon kompleksine bağlanmakta ve bu şekilde sinyal yolu aktivasyonunu engellemektedir. Minke [237] ve Gandhirajan [238] yaptıkları iki ayrı çalışmada CGP049090 ve PFK115-584 isimli inhibitörleri akut miyeloid lösemi (AML) ve Kronik lenfoblastik lösemi (KLL) hastalarından elde edilen hücreler ve hücre hatları üzerinde denemişlerdir. Her iki kanser türünde de bu inhibitörlerin kullanıldığı hücre hatlarında ve hastalardan elde edilen hücrelerde Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunun hedefi olan c-myc, cyclin-D1 ve survivin genlerinin ifadesinde azalma olduğu gösterilmiştir.

PKF118-310 adı verilen inhibitör ise farklı araştırmacılar tarafından prostat kanseri, meme kanseri ve osteosarkom hücrelerinde denenmiştir. Bu uygulama sonucunda



sinyal yolu aktivitesindeki azalmanın yanı sıra kanser hücrelerinin bazal membranı eritip bağ dokuya geçmesinde rol oynayan matriks metalloproteinaz 9 enziminin de inhibe olduğu ve bu şekilde invazyonun da engellendiği belirlenmiştir [239], [240].

Direkt olarak  $\beta$ -katenin proteinini inhibe eden moleküller dışında, Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunun inhibisyonunu ve buna bağlı olarak da hücre içinde  $\beta$ -katenin düzeyinin azalmasını sağlayan inhibitörler saptanmıştır. Bu inhibitörlerden CCT036477'nin hedefi hücredeki Dvl proteindir. Dvl proteininin inhibe edilmesi, yıkıcı kompleksin sitoplazmada aktif olarak kalmasına, buna bağlı olarak da yıkıcı kompleks tarafından fosforillenen  $\beta$ -katenin proteininin proteozomlarda parçalanmasına neden olmaktadır. Bu şekilde sitoplazmadaki  $\beta$ -katenin proteini düzeyi azalır.  $\beta$ -katenin proteini çekirdeğe giremediğinden transkripsiyon inaktif halde kalır. Bunun sonucunda da c-myc ve cyclin-D1 gibi kanser oluşumunda rol oynadığı öngörülen genlerin ifadesi engellenmiş olur [241].

Bitkilerden elde edilen çeşitli kimyasalların da Wnt/ $\beta$ katenin sinyal yolu aktivitesi üzerindeki inhibitör etkisi araştırılmaktadır. Bu çalışmalardan bazılarında *Stephania tetrandra* bitkisinin köklerinden elde edilen alkaloidlerin  $\beta$ -katenin/TCF transkripsiyon kompleksini inhibe ettiği belirlenmiştir [242]. Curcumin adı verilen ve zerdeçal (*Curcuma longa*) bitkisinden elde edilen fenolik bileşiğin de doza bağlı olarak %58-78 arasında sinyal yolu aktivitesini azalttığı gösterilmiştir [243]. Bu çalışmanın aksine, 2011 yılında Zhang ve çalışma grubu [244] curcumin ile yaptıkları çalışmada, bu bileşiğin  $\beta$ -katenin yıkımında görev yapan GSK3 $\beta$  enzimini inhibe ettiğini belirlemişlerdir. Curcumin'e bağlı olarak inhibe olan GSK3 $\beta$  nedeniyle  $\beta$ -katenin proteininin fosforillenemediği ve yıkımının engellendiği saptanmıştır. Sitoplazma ve çekirdekte biriken  $\beta$ -katenin ise sinyal yolunun hedef genlerinin anormal transkripsiyonuna neden olmaktadır. Sonuçta, Wnt/ $\beta$ -katenin kontrolsüz aktivasyonunu engellemeye yönelik çalışmalar düşük dozlarda kullanılabilir, güvenilir ve daha yüksek verime sahip inhibitörlerin bulunması amacıyla hala devam etmektedir.

### **1.6. Hücre ölümü tanımı ve geçmişten bugüne hücre ölümü**

Canlı bir organizmada uyarılabilirlik, büyüme, üreme ve uyum sağlama gibi canlılık özelliklerinin bulunduğu en küçük birim hücredir. Hücreler buldukları mikroçevrede sürekli olarak uyarılır ve bu uyarılara uygun cevap verir. Bu işleyişi

aksatan etkenlere bağı olarak hücrelerin canlılığını kaybetmesine ise hücre ölümü denir [245].

Hücreler ilk olarak 1665 yılında Robert Hooke tarafından “Cellula” adı verilen odacık şeklinde boşluklar olarak tanımlanmıştır. Ardından Mathias Schleiden ve Theodor Schwann 1839 yılında yayınladıkları hücre teorisiyle dokuların hücrelerden oluştuğunu ifade etmişler, hücrenin yapısı aydınlatıldıkça, hücre ölümü ile ilgili çalışmalar da yapılmaya başlanmıştır [246].

Hücre ölümü ile ilgili olarak ilk bulgular 1842 yılında Carl Vogt tarafından amfibilerin metamorfozu sırasında notokord ve kıkırdakta bazı hücrelerin öldüğünü gösteren çalışma ile ortaya konmuştur [247], [248]. Yeni hücrelerin ancak kendileri gibi başka hücrelerin bölünmeleri ile meydana geldiğini ifade eden Rudolf Virchow, 1855 yılında bütün hastalıkların hücrelerin hasarı sonucu ortaya çıktığını belirtmiş, bir yıl sonra da hücrelerin doğal ölümü olarak adlandırdığı “nekrobiyozis” terimini tanımlamıştır [249].

*Diptera* pupalarıyla yapılan çalışmalarda normal gelişim sırasında hücrelerin öldüğü Weismann tarafından 1864 yılında gözlemlenmiş, 1872’de Stieda endokondral kemikleşme sırasında kıkırdak hücrelerinin öldüğünü saptamıştır. Hücre ölümüyle ilgili tüm bu bulguların ardından 1885 yılında Flemming, kromatolizis adını verdiği hücre ölümünü tavşanlardaki ovarian foliküllerde yaptığı çalışmalar sonucunda rapor etmiştir. Bir yıl sonra Nissen, Flemming’in tavşanlarda tanımladığı kromatolizisi köpek, tavşan ve kedilerin meme bezlerinde gözlemlemiştir [248], [250].

Hücre ölümünün farklı doku ve organlarda belirlenmesinin ardından, ölen hücrelerin ortak morfolojik özellikleri olup olmadığı araştırılmıştır. Bunu saptamak amacıyla, 1889 yılında Beard balık embriyolarında yaptığı araştırmada, ölen duyu nöronlarının suyunu kaybederek büzüştüğü, çekirdek ve çekirdekçiklerini kaybettiklerini göstermiştir [251]. Ardından, 1894’te ise Schmaus ölen hücrelerde görülen morfolojik değişiklikleri çekirdek erimesi (karyolizis), çekirdek kırılması (karyorekzis) ve çekirdek büzüşmesi (hiperkromatozis) şeklinde tanımlamıştır [252].

Hücre ölümü ile ilgili olarak ilk sınıflandırmayı 1951 yılında Glücksmann yapmıştır. Ayrıca çalışmasında ölen hücrelerin suyunu kaybederek büzüştüğünü, nükleus

büzülmesi ile kromatopignozun ve hiperkromatozun oluştuğunu, buna karşın mitokondrinin değişmeden kaldığını, dejenere hücrelerin ise fagositoz ile ortadan kaldırıldığını açıklamıştır [253].

Hücre ölümünü saptamaya ve tanımlamaya yönelik çalışmalar devam ederken, hücre ölümüne neden olan etkenlerle ilgili çalışmalar da artmıştır. 1964 yılında Lockshin böceklerin larva gelişimi sırasında programlı bir hücre ölümünün gerçekleştiğini saptamış ve ilk olarak programlı hücre ölümü tarifini yapmıştır [254]. 1965 yılında Kerr, portal ven ligasyonunun ardından oluşan hipoksik ortam nedeniyle karaciğer hücrelerinin öldüğünü ifade etmiştir [255]. Bir yıl sonra yayınlanan iki çalışmada amfibi metamorfozu sırasında hücre ölümü gerçekleşmeden önce DNA sentezine gerek olduğu belirlenmiş ve hücre ölümünün zamana bağlı olduğu gösterilmiştir [256].

Kerr, Wyllie ve Currie 1972 yılında nekrozdan farklı olarak fizyolojik bir hücre ölümü olarak tanımladıkları "apoptozis" terimini ortaya koymuşlardır. Yunanca bir terim olan apoptozis, kelime anlamı olarak yaprakların ağaçtan doğal olarak, kendiliğinden düşmesi anlamına gelmektedir [257]. Bu çalışmanın ardından, 1976 yılında *Caenorhabditis elegans*'ın başlangıçta 1090 olan hücre sayısının, nematodun hermafroditik formdan yetişkin forma dönüşümü sırasında 131 hücre azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca DNA endonükleazların aktivitesini kontrol eden ve hücre ölümü ile ilişkili olarak saptanmış ilk gen olan nuc-1 geni de tanımlanmıştır [258], [259]. Bu organizma model alınarak yapılan apoptozis çalışmaları araştırmacılara 2002 yılında Nobel Ödülü kazandırmıştır.

Gelişen teknoloji ve yeni metodlarla birlikte hücre ölümünü kontrol eden ced genleri, Fas/Apo-1/CD95, BCL-2 ve p53 genlerinin apoptozisdeki rolleri ortaya konulmuş [260], [261], yapılan çalışmaların sayısı arttıkça araştırmacılar tarafından farklı hücre ölümü tipleri tanımlanmıştır. Bunun sonucunda da sınıflandırmada karışıklıklar yaşanmaya başlamıştır. Hücre ölümü araştırmalarında bu karışıklığın ortadan kaldırılması amacıyla 2005 yılında "Hücre ölümü Nomenklatür Komitesi (NCCD)" kurulmuş, bu komite hücre ölümünü morfolojik özelliklerin yanı sıra biyokimyasal ve fonksiyonel özelliklere dayanarak sınıflandırmıştır [262].

## 1.7. Hücre ölümü tipleri ve mekanizmalarına genel bir bakış

Hücre ölümü farklı yazarlar tarafından farklı özellikler doğrultusunda sınıflandırılmıştır [263].

- Morfolojik özelliklere göre; apoptozis, nekroz, otofaji
- Enzimlerin özelliklerine göre; kaspaz bağımlı, kaspaz bağımsız hücre ölümü
- Fonksiyonel durumuna göre; programlı ve programlı olmayan hücre ölümü
- İmmünolojik özelliklerine göre; immünojenik ve immünojenik olmayan hücre ölümü

Hücre ölümü nomenklatür komitesi sınıflandırmanın morfolojik kriterlere göre yapılması gerektiğini belirtmiş ve hücre ölümünü Tip I, Tip II ve Tip III hücre ölümü olarak gruplandırmıştır. Tip I hücre ölümü apoptozisi içerken, Tip II hücre ölümü ise yanlış katlanmış ya da gereğinden fazla sentezlenmiş proteinlerin ve fonksiyonunu kaybetmiş organellerin ortadan kaldırılmasını sağlayan otofaji mekanizmasını kapsamaktadır. Tip III hücre ölümü ise patolojik bir hücre ölümü tipi olan nekrozu içermektedir [262].

### 1.7.1. Programlı hücre ölümü tipleri

Programlı hücre ölümü genetik faktörlerle kontrol edilen, birçok biyomolekül tarafından düzenlenen, enerji bağımlı fizyolojik bir süreçtir. Yapılan çalışmalarda; Apoptozis, Otofaji, Nekroptozis, Mitotik çöküş, Kornifikasyon, Netozis, Paraptozis, Anoikis, Entozis ve Piroptozis olmak üzere çeşitli programlı hücre ölümü tipleri tanımlanmıştır [262].

#### 1.7.1.1. Apoptozis

Apoptozis, biyolojik görevini tamamlamış ya da hasarlı hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlayan ve genetik olarak düzenlenen programlı bir hücre ölümüdür. Eğer hücre, etrafındaki hücrelerle ilişkisini kaybeder veya onarılamayacak bir hasara uğrarsa apoptozis mekanizması başlar. Bu şekilde embriyonik gelişim sürecinde dokuların şeklinin oluşması ve yaşam süresince dokunun aynı büyüklük ve şekilde kalması apoptozis ile sağlanır. Bu şekilde gelişim sırasında ve yetişkin dönemde hücre sayısı sabit tutulur. Yaşlanmış, hasara uğramış, virüs ile enfekte olmuş hücrelerin yanı sıra, kendi hücrelerine

karşı reaktivite gösteren immün sistem hücrelerinin ortadan kaldırılmasında da apoptozis mekanizmasının rolü vardır [264].

*Caenorhabditis elegans* nematodu üzerinde yapılan çalışmalarda 1090 olan hücre sayısının, hermafroditik formdan yetişkin forma dönüşümü sırasında 131 hücre azaldığı ve geriye kalan 959 hücrenin yetişkin nematodu oluşturduğunun görülmesi apoptozisin genetik ve moleküler mekanizmalarının anlaşılmasında oldukça önemli bir yere sahiptir. Bu çalışma ile apoptozisin birbirini izleyen 3 temel basamaktan oluştuğu belirlenmiştir [259];

1. Apoptozisin başlaması için hücre içi veya hücre dışı uyarıya ihtiyaç vardır.
2. Hücre içinde bulunan inaktif proteazların aktif hale gelmesi ile hücreler ölür.
3. Ölen hücreler diğer hücreler tarafından ortadan kaldırılır.

Apoptozis, hücre sitoplazmasının suyunu kaybederek yoğunlaşması ve çekirdeğin piknozu ile başlar. Bu süreçte hücre zarı ise bozulmadan kalır. Bir sonraki evrede, çekirdek parçalanır. Parçalanmış çekirdek ve organeller apoptotik cisimcikler olarak adlandırılan veziküller içine alınır. Böylece hücre içeriğinin salınmasıyla oluşacak inflamasyonun oluşması engellenir. Son basamakta ise bu apoptotik cisimcikler komşu hücreler ya da makrofajlar tarafından fagosite edilerek ortamdan uzaklaştırılır [265].

Kanser başta olmak üzere çeşitli hastalıkların oluşum sürecinde apoptozisin rolünün saptanması, bu hastalıklara yönelik yeni tanı ve tedavi yöntemlerinin belirlenmesinde apoptozis mekanizmasını önemli hale getirmektedir. Bu nedenle apoptozis ile ilgili çalışmalar artarak devam etmektedir.

#### **1.7.1.2. Otofaji**

Otofaji, hücre içinde bulunan yanlış katlanmış ve hatalı sentezlenmiş makromoleküllerin, hasarlı ya da yaşlanmış organellerin zarla çevrili bir vezikül içine alınarak, lizozomlarla birleştirilmesi sonucu parçalanmasına yol açan bir mekanizmadır. Otofaji, hücrelerin kendi kendini (auto) yemesi (phagy) anlamına gelmektedir. Bu mekanizmayla hücreler, besin eksikliği ile karşılaştıklarında hayatsal fonksiyonlarını devam ettirebilmek için sahip oldukları hücre içi yapıları parçalamaktadır [266].

Otofaji ilk olarak hücrelerin stres koşullarına karşı oluşturdukları bir sağ kalım mekanizması olarak tanımlanmış, son yıllarda yapılan çalışmalarla hücre ölümü, yaşlanma ve hücre içi patojenlerin yıkımı gibi süreçlerde rol oynadığı belirlenmiştir. Özellikle, otofaji anormalliklerinin kanser başta olmak üzere çeşitli metabolik, immünolojik ve nörodejeneratif hastalıklardaki etkisinin gösterilmesi otofajiye olan ilgiyi arttırmıştır [267], [268].

Otofaji; makrootofaji, mikrootofaji ve şaperon aracılı otofaji olarak sınıflandırılmaktadır [269]. Kısaca otofaji olarak da adlandırılan makrootofaji, yanlış katlanmış ya da hatalı sentezlenmiş proteinler ile hasar görmüş organellerin ortadan kaldırılmasından sorumludur [270]. Mikrootofajide ise hücre sitozolünün bir parçası lizozom zarı ile çevrelenir ve hücre içeriği lizozom içine alınarak sindirilir [271]. Şaperon aracılı otofaji, KFERQ motifine sahip proteinlerin, şaperon adı verilen proteinler tarafından lizozomlara taşınmasıyla meydana gelmektedir [272].

“Otofaji ilişkili genler (Atg)” ve Beclin-1 genlerinin otofaji mekanizmasının gerçekleşmesinde ve düzenlenmesinde görev aldıkları belirlenmiştir [269]. Otofaji mekanizması izolasyon zarı adı verilen ve kaynağı henüz belli olmamış olan çift katlı zar yapısının oluşması ile başlar. Yapılan çalışmalarda bu zarın; hücre zarı, Golgi organeli, ER ya da mitokondri zarından kaynaklanabileceği öne sürülmüştür. Oluşan izolasyon zarı iki uçtan birbirine doğru uzayarak sindirilecek protein ya da organelin etrafını sarar. Meydana gelen bu çift zarlı vezikül otofagozom adını almaktadır. Bu otofagozom sitozolde lizozomla birleşir ve otofagolizozom olarak adlandırılır. Lizozomlar, tek zarla çevrili içinde hidrolitik enzimler içeren organellerdir. Zarda bulunan proton pompaları sitozolden lizozom içine hidrojen iyonu pompalayarak lizozom sıvısını pH=5’de tutar. Otofagolizozomun oluşması ile birlikte bu enzimler aktif hale geçer ve içerik parçalanır. Bu parçalanma sonucu oluşan ürünler lizozom zarındaki taşıyıcı proteinler ile tekrar sitozole verilerek, hücre tarafından yeniden kullanılır [273].

Otofaji ile apoptozis arasındaki ilişki anti-apoptotik Bcl-2 üyelerinin, otofajinin temel proteini olan Beclin-1 proteinine bağlanarak otofajiyi baskılandığının belirlenmesi ile ortaya konmuştur. Bu şekilde anti-apoptotik proteinlerin aynı zamanda anti-otofajik özellikler gösterdiği ve bu iki ölüm mekanizmasının birlikte düzenlendiği saptanmıştır [274]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise apoptozis varlığında aktif

duruma geçen kaspazların Beclin-1, Atg4 ve Atg5 proteinini parçalayarak, apoptozis sırasında otofajinin baskılanmasını sağladığı gösterilmiştir [275]. Bu sonuçların aksine, kaspazlar tarafından kesilen Atg protein parçalarının mitokondri dış zarına yerleştiği ve zar geçirgenliğini bozarak apoptozis mekanizmasının aktif duruma geçmesinde rol oynadıkları görülmüştür [276]. Bu iki mekanizma arasındaki ilişki tam olarak ortaya konulamamıştır ve hala araştırılmaktadır.

### **1.7.1.3. Nekroptozis**

Sıcaklık, pH değişikliği, iskemi ve enfeksiyon gibi nedenlere bağlı olarak hücreler programsız bir şekilde nekroz ile ölmektedirler [277]. Ancak, Vercammen ve araştırma grubu [278] 1998 yılında, bir kaspaz inhibitörü (zVAD-FMK) ile muamele ettikleri L929 hücrelerine (fibrosarkoma hücre hattı) TNF $\alpha$  uygulamışlar ve hücrelerin nekroz morfolojisi göstererek öldüğünü gözlemlemişlerdir. Bunun üzerine, TNF $\alpha$  ile uyarılarak kaspaz aktivitesinden bağımsız olarak gerçekleşen bu hücre ölümü tipine programlı nekroz olarak tanımlanan “nekroptozis” adı verilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda FasL'nin de nekroptozis mekanizmasını uyarabileceği belirlenmiştir [279]. Nekroptozis mekanizması da apoptozis gibi hem fizyolojik hem de patolojik olaylara bağlı olarak gerçekleşen programlı bir hücre ölümü tipidir. Yapılan çalışmalarda boyuna büyüyen kemiklerde kondrositlerin nekroptozis ile öldüğü gösterilmiştir [280].

Nekroptozis, TNF $\alpha$ , FasL ve lipopolisakkaritlerin hücre zarındaki TNFR1, TNFR2, TRAIL2 reseptörlerine bağlanması ile başlar. Bu uyarılar dışında iyonize radyasyon, çeşitli kemoterapik ilaçlar, glutamat ve Ca<sup>+2</sup> artışı da nekroptozis mekanizmasının başlamasına neden olmaktadır [281]. Mekanizmanın başlaması için hücreye uyarı geldiğinde, sitoplazmada bulunan ve proteinlerin serin/treonin amino asit rezidülerini fosforilleyen bir kinaz olan “Receptor-interacting protein 1 (RIP1)” hücre zarına doğru çekilir [282]. RIP-1 enzimi sitoplazmada aktif ve inaktif olmak üzere iki formda bulunur. Aktif hale gelebilmesi için 161. serin amino asit rezidüsünden otofosforilasyonuna ihtiyaç vardır. Nekroptozis mekanizmasının başlamasıyla fosforillenen RIP-1 katalitik olarak aktif hale gelir [283].

Aktif hale geçen RIP-1 enziminin sitozolde bulunan RIP-3 enzimini fosforillediği belirlenmiştir [284]. RIP3 enzimi de RIP-1 enzimi gibi bir serin/treonin kinazdır ve RIP-1 enzimi ile RIP3 enziminin katalitik domainleri %33 oranında benzerlik

göstermektedir. RIP-1 aktivitesi ile fosforillenen RIP3 enzimi, RIP1 enzimine bağlanır. Oluşan RIP1-RIP3 kompleksi “nekrozom” ya da “kompleks IIb” olarak adlandırılır. Bu kompleksin oluşumu nekroptozisin gerçekleşmesi için gereklidir [285].

Nekroptozisin uyarılması ile oluşan nekrozom kompleksi, sitozolde bulunan ve “The mixed lineage kinase domain like protein (MLKL)” olarak adlandırılan proteini 357. treonin ve 358. serin amino asit rezidülerinden fosforiller. MLKL'nin bloke olduğu hücrelerde nekroptozisin gerçekleşmediği belirlenmiştir. Bu nedenle, MLKL'nin fosforillenmesi nekroptozis mekanizması için kritik basamak olarak kabul edilmektedir [286].

Nekrozom tarafından fosforillenen MLKL enziminin hücre zarına yerleşerek, burada bir por oluşumuna neden olduğu, oluşan bu porlar ile hücre dışından içine kalsiyum ve sodyum girdiği ve buna bağlı olarak da artan su girişi ile hücrenin şiştiği belirlenmiştir. Bu şekilde hücre içi iyon dengesi bozulmaktadır [286]. Yapılan bazı çalışmalarda nekroptozise bağlı olarak mitokondrideki ROS üretiminin arttığı ve mitokondri fonksiyonlarının bozulduğu da gösterilmiştir [287] [288]. Ancak son yıllarda bu çalışmalardan farklı olarak mitokondrideki bozulmanın nekroptozis için gerekli olmadığı ve hücre tiplerine göre bu durumun değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir. Dolayısıyla nekroptozis mekanizmasında mitokondrinin rolü hala tam olarak aydınlatılamamıştır [289]. Sonuç olarak, nekroptozise uğrayan hücrelerde hücre zarı bütünlüğü bozulur. Bu bozulmaya bağlı olarak da hücre içinden dışına hücre içi materyalleri çıkar ve hücreler ölür [277].

Apoptozis ile nekroptozis arasındaki ilişki araştırma konusudur. Nekroptozis mekanizmasında, TNF $\alpha$  ile uyarım sonucu kaspaz 8 enzimi inhibe olmaktadır. Apoptozisde ise kaspaz 8 enzimi mekanizmanın başlaması için kritik öneme sahiptir. Ayrıca yapılan çalışmalarda apoptozis ile birlikte aktif durumdaki kaspaz 8'in, RIP1 ve RIP3'ü yıkılmasını sağladığı, buna bağlı olarak da nekrozom kompleksinin (RIP1-RIP3 kompleksi) oluşumuna engel olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle aktif kaspaz 8 enzimi nekroptozis mekanizmasının negatif düzenleyicisi olarak kabul edilmektedir [290].



#### **1.7.1.4. Mitotik çöküş**

“Mitotik çöküş” ya da “mitotik katastrofi” ilk olarak ısıya duyarlı bir maya tipi olan *Schizosaccharomyces pombe*'nin mutant suşlarında kromozom ayrılmasındaki problemlerin gözlenmesi ile tanımlanmıştır [291]. Daha sonra memeli hücrelerinde gerçekleşen mitoz bölünme sırasındaki hataların sonucunda gerçekleşen hücre ölümüne “mitotik çöküş” adı verilmiştir. Mitotik çöküş sonucu ölen hücre birden fazla çekirdek içermektedir. Ayrıca mitotik çöküş sonucu çekirdekte kromatin kondensasyonu da gözlenmektedir. Kromatin kondensasyonu apoptotik hücrelerin de önemli morfolojik karakterlerinden biridir. Bu nedenle bazı araştırmacılar tarafından kromatin kondensasyonu mitotik çöküş için spesifik bir değişiklik olarak kabul edilmemektedir [292].

Apoptozis ile mitotik katastrofi arasındaki ilişki araştırılmaktadır. Anti-apoptotik bir protein olan Bcl-2'in aşırı ifadesi HeLa hücrelerinde apoptozisi engellerken, mitotik katastrofiye neden olmaktadır. Ayrıca hücreler kaspaz inhibitörü zVAD-FMK ile muamele edildiğinde multinükleer hücrelerin oluşumunun engellenmediği buna bağlı olarak da mitotik çöküşün apoptozisden farklı olduğu ifade edilmiştir [293].

#### **1.7.1.5. Kornifikasyon**

Dış ortamın etkilerine karşı bariyer oluşturan derinin en dış tabakasında epidermis bulunur ve bu tabakada en üstte bulunan hücreler korneositler olarak adlandırılır [294],[295]. Korneositler, epitel hücrelerin “kornifikasyon” adı verilen aktif, hızlı ve genetik olarak kontrol edilen bir süreçle ölümü sonucu oluşmaktadır. Epitel hücreleri, bazal tabakadan ayrıldıklarında kornifikasyon süreci başlar [295]. Kornifikasyonun başlaması ile birlikte Kaspaz 14, transglutaminaz-1, transglutaminaz-2 ve transglutaminaz-5 gibi enzimler aktif hale gelir. Bu enzimler hücrelerin sitoplazmasında bulunan filaggrin, lorikrin ve involucrin gibi proteinler ile yağ asitleri ve seramid gibi lipidlerin parçalanmasını sağlar. Kornifikasyonla birlikte hücre sitoplazmasında bulunan organeller de lizozomal enzimler tarafından sindirilir ve hücreler ölür. Ölen bu hücreler deride bariyer fonksiyonunu oluşturmaktadır [296], [297].

### 1.7.1.6. Netozis

Netozis, sadece nötrofil lökositlerde gözlenen bir hücre ölümü tipidir. Nötrofil lökositler enfeksiyonlara karşı doğal bağışıklıkta rol oynayan hücrelerdir. Bu hücreler karşılaştıkları patojen mikroorganizmaları fagosite etmelerinin yanı sıra salgıladıkları antimikrobiyal peptidlerle de savunmaya katkıda bulunurlar [298]. İlk kez 2004 yılında Brinkman ve araştırma grubu [299] tarafından “nötrofil ekstrasellüler tuzak (NET)” olarak adlandırılan bir savunma mekanizması ortaya konmuştur. NET, nötrofil lökositlerin hücre dışına salgıladıkları kromatinden (DNA ve histonlar) ve granüller içinde bulunan proteinlerden oluşur. NET, mikroorganizmaları yakalayıp etrafını adeta bir örümcek ağı gibi sarar ve daha etkili bir savunma sağlar [298].

IL-8, TNF $\alpha$  ve lipopolisakkarit gibi uyarıcı moleküllerin nötrofillerin hücre zarında bulunan reseptörlerine bağlanması ile hücre çekirdeği lobüler yapısını kaybeder, kromatin yoğunlaşır, iç ve dış çekirdek zarları birbirinden ayrılır. Aynı anda, sitozolde bulunan ve antimikrobiyal peptidler içeren granüller parçalanır. Kromatin ve peptidler hücre içinde bir araya gelerek bir agregat oluşturur. Hücre zarı yırtılır ve içeriğin tamamı hücre dışına salınır. Hücre dışına salınan kromatin ve antimikrobiyal peptidlerden meydana gelen bu içerik NET olarak adlandırılır [300], [301]. NET oluşumu ile sonuçlanan bu aşamadan sonra, çekirdeğini ve içeriğindeki granülleri kaybeden nötrofil lökosit ölür. Bu hücre ölümü Steinberg ve araştırma grubu tarafından 2007 yılında “Netozis (‘NETosis’)” olarak tanımlanmıştır [302].

Apoptozis ile netozis arasındaki ilişkiyi ortaya koymak amacıyla bazı çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalardan birinde netozis ile ölen hücrelerin “beni ye” sinyali oluşturmadığı ortaya koymuştur. Bu nedenle netozis ile ölen hücrelerin apoptotik hücrelerden farklı olarak fagositler tarafından ortadan kaldırılmadığı belirlenmiştir. Bu durum NET yapısının devamlılığını sağlayan en önemli faktörlerden biridir. Bu şekilde NET yapısı bozulmadığından mikroorganizmalarla etkin bir biçimde mücadele edilmektedir [301]. Netozis sonucu ölen hücrede apoptozis mekanizmasından farklı olarak hücre zarında tomurcuklanma, kromatin kondensasyonu gibi morfolojik değişimlerin de gerçekleşmediği belirlenmiştir [303]. Ayrıca kaspaz inhibitörleri ile yapılan çalışmalarda netozis mekanizmasının etkilenmediği, buna bağlı olarak da kaspaz enzimlerinin netozis sürecinde rol

oynamadığı ortaya konmuştur. Tüm bu çalışmalar sonucunda netozis mekanizmasının farklı bir hücre ölümü tipi olduğu yorumu yapılmıştır [304].

#### **1.7.1.7. Paraptozis**

Sprendio ve çalışma grubu [305] tarafından literatüre kazandırılan paraptozis terimi, Yunanca apoptozis ile ilişkili anlamına gelmektedir. Yapılan çalışmalarda apoptozis inhibitörlerinin varlığında paraptozisin etkilenmediği bu nedenle farklı bir programlı hücre ölümü tipi olduğu ortaya konmuştur [306].

Paraptozis, “Mitojen aktive protein kinaz enzimlerinin (MAPK)” rol oynadığı bir programlı hücre ölümü tipidir [305]. MAPK, mayalardan insanlara kadar evrimsel olarak korunmuş, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve hücre ölümünü düzenleyen enzimlerdir. Bir MAPK enzimi olan Jun N-terminal kinaz (JNK) ve MAPK enzimini fosforilleyen bir kinaz enzimi olan MEK’in paraptozis mekanizmasında görev yaptığı gösterilmiştir [305]. Paraptozis mekanizması, hücre zarında bulunan “Tümör nekroz faktör reseptör süper ailesi 19 (TNFRFS19/TAJ/TROY)”, “İnsülin ilişkili büyüme faktörü reseptörü (IGFRI)” ve “nörokinin-1 reseptörünün”, “İnsülin büyüme faktörü-1 (IGF-1)” ve Peptid Nörotransmitter madde P gibi faktörler tarafından uyarılmasıyla başlar [307]. Bu uyarının ardından hücre dışından hücre içine doğru bol miktarda kalsiyum ve bir miktar da sodyum iyonlarının geçişi gerçekleşir. Sitoplazmada aşırı vakuolizasyon, mitokondri ve ER’de şişme gözlenir. Çekirdek yoğunlaşır ve parçalanır. Hücre içi artan kalsiyum iyonunun mitokondri fonksiyonlarının bozulmasına ve MAPK’ın aktifleşmesine neden olduğu saptanmış ancak mekanizmanın detayları henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu nedenle Paraptozis ile ilgili çalışmalar hala devam etmektedir [296].

#### **1.7.1.8. Anoikis**

İlk kez Frisch ve çalışma grubunun [308] 1994 yılında yaptıkları çalışmada ortaya koydukları anoikis terimi, Yunanca evsiz anlamına gelmektedir. Anoikis hücre-hücre ve hücre-ekstrasellüler matriks bağlantılarının bozulması sonucunda ortaya çıkan programlı bir hücre ölümü tipi olarak tanımlanır. Hücre-hücre ve hücre matriks etkileşiminde rol oynayan moleküller, sadece hücreleri bir arada tutmaz,

aynı zamanda görev aldıkları çeşitli sinyal yolları ile hücre proliferasyonu, farklılaşması ve hücre ölümünde de rol oynarlar [309]. Anoikis mekanizmasında hücreye yaşamını devam ettirmek için gerekli uyarılar ulaşamaz. Hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerinin bozulmasına bağlı olarak da hücre ölümü gerçekleşir [308]. Bu mekanizmanın basamakları hala araştırılmakla birlikte integrin reseptörlerinin bu hücre ölümünde görev aldığı rapor edilmiştir [310].

Son yıllarda anoikis mekanizmasının tümör metastazı ile ilişkisi araştırma konusudur. Normalde hücreler, hücresel bağlantılarını kaybettiklerinde ölmektedirler. Tümör hücrelerinde ise anoikis mekanizmasının engellendiği belirlenmiştir. Bu şekilde, hücreler ölümden kurtularak yaşamaya devam ederler ve metastatik özellik kazanarak köken aldıkları dokudan ayrılıp farklı bir bölgeye yerleşebilme özelliği kazanırlar [310], [311].

#### **1.7.1.9. Entozis**

Entozis, ilk kez Mormone ve araştırma grubu tarafından Huntington hastalarının lenfoblastlarında hücresel kanibalizm olarak tanımlanmıştır [312]. Ancak daha sonra yapılan çalışmalarda kanibalizm ile entozis mekanizmalarının birbirinden farklı olduğu belirlenmiştir. Kanibalizm'in seçici olmadığı, hücre içine alınan diğer hücrenin tipinin önemli olmadığı ifade edilmektedir. Entozis mekanizmasında ise aynı türden iki hücreden biri diğerinin içine girmektedir [313]. Bu nedenle Entozis, Yunanca "içeride olan" anlamına gelen entos kelimesinden türemiştir ve matriksten ayrılan bir hücrenin diğer hücre içine alınması olarak tanımlanmıştır. Hücre içine alınan bu hücreler lizozomlarla sindirilmektedir. Yapılan çalışmalarda bu hücrelerin nadiren de olsa diğer hücrenin içinden tekrar dışarı salınabildiği gösterilmiştir [314].

Entozis mekanizması hücrenin matriksle olan bağlantısının kopmasıyla başlar. Matriksten ayrılan hücre, diğer hücrenin zarında bulunan E-kaderin molekülüne bağlanır. Bu bağlanmanın ardından Rho GTPaz ve ROCK proteinlerinin uyarılmasına bağlı olarak hücre iskeleti yeniden düzenlenir. Oluşan yalancı ayaklar hücre içine alınacak hedef hücrenin etrafını çevreler. Miyozin II'nin kontraktıl kuvveti ile hedef hücrenin, diğer hücre içerisine alınmasını sağlar. İçeri alınan hücrenin etrafı bir zarla çevrilir ve fagozom oluşturur. Bu fagozom, lizozomla birleşerek, içeri alınan hücre ortadan kaldırılır [313].

Son yıllarda yapılan çalışmalarda hücre zarı ile hücre iskeleti arasında köprü görevi gören Ezrin proteininin entozis mekanizmasında rol oynadığı gösterilmiştir [315]. Entozis mekanizmasında hedef hücre komşu hücreye bağlandığında, Ezrin proteini fosforillenerek aktif hale geçer ve hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesini sağlar. Wang ve çalışma grubunun [316] insan epitel hücre karsinoma hücre hattı (A431) kullanarak yaptıkları çalışmada Ezrin proteininin sentezlenmediği hücrelerde entozisin baskılandığını rapor edilmiştir.

Entozis'in en çok meme kanseri hücre hattı olan MCF-7'de görüldüğü belirlenmiştir. MCF-7 hücrelerinde hem apoptozisde rol oynayan kaspaz 3 enzimi, hem de otofaji de rol oynayan Beclin-1 proteini bulunmamaktadır. Otofaji ve apoptozis mekanizmalarının bulunmadığı bu hücrelerde hücre ölümünün entozise bağlı olarak gerçekleştiği öne sürülmektedir [314]. Ayrıca, tümör hücrelerinin, hücre içine aldıkları diğer hücreyi parçalayarak besin ve enerji kaynağı olarak kullandıkları ifade edilmektedir [317].

#### **1.7.1.10. Piroptozis**

Piroptozis, *Salmonella typhimurium* ile enfekte makrofajlarda Kaspaz 1'in aktivasyonu ile sonuçlanan bir programlı hücre ölümü olarak tanımlanmıştır. Piroptozis terimi, Yunanca'da ateş veya yangın anlamına gelen "pyro" ve dökülme anlamına gelen "ptosis" kelimelerinin bir araya getirilmesiyle oluşturulmuştur [318].

*Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Shigella flexneri*'nin makrofajların içinde replike olan mikroorganizmalar olduğu yapılan çalışmalarda belirlenmiştir. Bu mikroorganizmalarla enfekte makrofajların hücre zarında 1.1–2.4 nm çapında porlar oluştuğu gösterilmiştir. Bu porlardan hücre içine  $Ca^{+2}$  geçişi olur. Hücre içine giren  $Ca^{+2}$  iyonlarının sitozolde inaktif durumda bulunan Kaspaz 1 enziminin aktivasyonunda rol oynadığı ifade edilmektedir. Ayrıca hücre içine  $Ca^{+2}$  iyonunun girişiyle iyon dengesi bozulur, hücre içine dışardan su girişi olur. Hücre içine su girişi ile birlikte hücre şişer ve hücre iskeleti bozulur. Hücre zarındaki bozulma sonucu hücre içeriği nekroza benzer şekilde hücre dışına çıkar ve salgılanan proinflamatuvar sitokinlerle birlikte bağışıklık sistemi de uyarılır [319].

Piroptozis ile apoptozis arasındaki ilişkileri araştıran çalışmalarda piroptozis varlığında DNA'nın parçalandığı ancak çekirdek bütünlüğünün korunduğu belirlenmiştir. Piroptozis'de DNA'nın parçalanması apoptozis mekanizmasında

DNA parçalanmasından sorumlu olan CAD enziminden bağımsız olarak gerçekleşmektedir, ancak henüz bu enzim tanımlanamamıştır. Ayrıca Piroptosis mekanizmasında, apoptozisde görev alan kaspaz 3 ve kaspaz 7 ile Sitokrom c'nin etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Bu nedenle piroptosis mekanizması farklı bir programlı hücre ölümü tipi olarak sınıflandırılmıştır [319].

Hem nekroptosis hem de piroptosis mekanizmalarında Kaspaz 1 enzimi rol oynamaktadır. İki mekanizma arasındaki fark araştırıldığında nekroptosis mekanizmasında görev alan RIP-1 ve RIP-3 enziminin, piroptosis mekanizmasında rol oynamadığı belirlenmiştir [320].

Bazı mikroorganizmaların piroptosis mekanizmasını inhibe ederek patojenik özellikler gösterdiği de literatürde ifade edilmektedir. Bu mikroorganizmalardan biri veba etkeni olan *Yersinia pestis*, diğeri ise çiçek hastalığının etkeni olan Pox virüstür. Her iki mikroorganizmanın da Piroptosis mekanizmasını baskılayarak IL-18 ve IL-1 $\beta$  salgılanmasını engellediği belirlenmiştir [319], [321]. Bu şekilde savunma sisteminden kurtulan bu etkenlere bağlı olarak enfeksiyon gelişmektedir.

## **1.7.2. Programlı olmayan hücre ölümü**

### **1.7.2.1. Nekroz**

Nekroz, Yunanca "ölü vücut" anlamına gelen "Nekros" kelimesinden türetilmiştir [322]. Nekroz, apoptozisten farklı olarak akut hasar durumunda görülen, programlı olmayan ve geri dönüşümsüz bir hücre ölümü tipidir. Nekroza neden olan etkenlere; oksijen yetersizliği (hipoksi), fiziksel hasar, hipertermi, kompleman aktivasyonu, UV, iskemi, pH değişiklikleri, arsenik, siyanür, insektisidler gibi toksik maddeler ve ağır metaller maruziyet örnek verilebilir [323], [324], [325].

Dışarıdan gelen bu fiziksel ve kimyasal uyarılar DNA tamirinden sorumlu nükleer bir enzim olan "Poli (ADP-riboz) polimerazı (PARP)" etkiler. Bu enzim substrat olarak NAD<sup>+</sup>ı kullanır. NAD<sup>+</sup> ise ATP sentezinde rol oynayan önemli bir koenzimdir. Nekroz ile birlikte PARP çok miktarda NAD<sup>+</sup> parçalar ve hücrede NAD<sup>+</sup> kaybına neden olur. Bu durumda ATP sentezi bozulur [326], [327]. ATP'nin azalması nedeniyle hücre zarında yer alan ve aktif taşıma yapan iyon pompası görev yapamaz. Bu şekilde hücrenin iyon dengesi bozulur. İyon dengesi bozulan hücreye su girişi olur ve buna bağlı olarak hücre şişer ve sitoplazmada vakuoller

oluşur. Hücre içindeki sıvı miktarının artışı organellerin yapısını ve fonksiyonlarını da etkilemektedir. [328]. Lizozom zarının parçalanması ise nekrozda kritik basamağı oluşturmaktadır. Lizozomların parçalanması ile ortaya çıkan enzimler hücre zarını oluşturan lipidleri peroksidasyona uğratar ve hücre zarının yapısının tamamen bozulmasına neden olur. Bunun sonucu olarak da hücre içeriği dışarı salınır. Hücre ölümünü takiben hücre içeriğinin hücreler arası boşluğa salınması inflamasyona ve kemotaktik faktörlerin salınmasına sebep olur. Bunun sonucunda makrofaj ve nötrofiller nekrotik dokuya göç ederek, nekrotik dokuyu fagosite eder. Apoptosis ile nekroz arasındaki en büyük fark nekroz mekanizması sonucunda inflamatuvar değişiklikler ortaya çıkarken, apoptozis sonucunda hücre içeriği dışarı salınmadan ölen hücrelerin ortamdaki uzaklaştırılmasıdır [329].

### **1.8. Apoptosis mekanizmasında görev alan biyomoleküller**

Apoptosis çok sayıda biyomolekülün birbirleri ile etkileşimleri sonucu oluşur. Bu mekanizma yaklaşık 40 yıl öncesinde tanımlanmış olmasına rağmen apoptozis sürecinde görev alan biyomoleküllerle ilgili çalışmalar hala devam etmektedir. Aşağıda apoptozisin uyarılmasında görev yapan ligandlar ve reseptörleri, apoptozis mekanizmasında görev alan kaspaz enzimleri, substratları, bu enzime yardımcı adaptör proteinler ve bu enzimleri inhibe eden inhibitör proteinler ile apoptozisi düzenleyen “B-cell lymphoma gene-2 (Bcl-2)” protein ailesi, p53 ve Sitokrom c proteinlerine ait detaylı bilgiler verilecektir.

#### **1.8.1. Ligandlar**

Hücre zarında bulunan reseptörlerine bağlanarak apoptozis mekanizmasının başlamasını sağlayan proteinler “ligand” olarak adlandırılmaktadır. Bu ligandlar “Tümör Nekroz Faktör (TNF)” süper ailesi olarak adlandırılan geniş bir protein ailesinin üyesidirler. 19 üyeden oluşan TNF süper ailesi inflamasyon, apoptozis, proliferasyon, invazyon, anjiogenezis, morfogenezis gibi süreçlerde rol oynamaktadır [330]. Bu ailenin üyelerinden TNF $\alpha$ , FasL ve TRAIL apoptozis ile ilişki olarak üzerinde en çok çalışma yapılan proteinlerdir.

### 1.8.1.1. TNF $\alpha$ proteini

“Tümör Nekroz Faktör (TNF)”, ilk olarak 1962 yılında *Mycobacterium* ile enfekte farelerin, tümör gelişimine daha dirençli olduğunun belirlenmesi ile keşfedilmiştir [331]. Daha sonra 1975 yılında Carswel ve çalışma grubu [332] tarafından endotoksin verilmiş farelerin serumlarında saptanan bir molekülün, tümör dokusunda nekroza yol açtığı gösterilmiş ancak molekülün yapısı 1985 yılına kadar tam olarak anlaşılamamıştır. Beutler ve çalışma grubu [333], endotoksin uygulanan makrofajlarda üretilen ve kaşektin adını verdikleri bir faktörün kaşeksiye neden olduğunu rapor etmişlerdir. Daha sonra yapılan moleküler analizlerde kaşektin olarak isimlendirilen bu biyomolekülün TNF olduğu saptanmıştır [334].

Endotoksin uyarımına bağlı olarak molekül ağırlığı 17 kDa olan ve makrofajlardan salgılanan faktör TNF $\alpha$ , 20 kDa olan ve lenfositlerden salgılanan faktör TNF $\beta$  ya da Lemfotoksin olarak adlandırılmıştır [335]. Bu iki faktör arasındaki amino asit benzerliğinin yaklaşık %30 olduğu saptanmış ve etkilerini aynı reseptöre bağlanarak gerçekleştirdikleri gösterilmiştir [336].

TNF $\alpha$  insanlarda 6. kromozomun kısa kolunda bulunan TNFA geni tarafından kodlanan, 233 amino asit uzunluğa ve 17 kDa molekül ağırlığına sahip bir proteindir. TNF $\alpha$ ; makrofajlar, bazofiller, monositler, T ve B hücreleri, doğal öldürücü hücreler ile keratinositler, fibroblastlar, yağ hücreleri, nöronlar, düz kas hücreleri ve tümör hücrelerinden sentezlenmektedir [337], [338]. Toksinler, virüsler, mantarlar, parazitler, IL-1 ve TNF $\alpha$ 'nın kendisi de TNF $\alpha$  sentezini arttırmaktadır [337], [339]. TNF $\alpha$  ilk olarak bir transmembran proteini olarak sentezlenir, daha sonra ADAM17 ya da TACE adı verilen matriks metalloproteinaz enzimleri tarafından kesilir ve hücre zarından ayrılarak ekstrasellüler matrikse salgılanır [340].

Salgılanan TNF $\alpha$ , hücre zarında bulunan reseptörü TNFR1'e bağlandığında hücre içinde üç mekanizmayı aktifleştirir [283]. Bu mekanizmalardan ilki hücre proliferasyonu ile sonuçlanan NF- $\kappa$ B sinyal mekanizmasıdır. NF- $\kappa$ B bir transkripsiyon faktörüdür. Sitoplazma içinde inaktif halde bulunur. Aktive olduğunda çekirdeğe taşınır. Çekirdekte ise proliferasyonda ve enfeksiyonlara karşı oluşturulan immün yanıtta rol alan çok sayıda genin ifade edilmesini sağlar [341]. TNF $\alpha$ 'nin reseptörüne bağlanması ile aktive ettiği ikinci mekanizma bir programlı hücre ölümü tipi olan Nekroptozis'dir. Bu mekanizma TNF $\alpha$ 'nın hücre zarındaki TNFR1 reseptörlerine bağlanması ile başlar. Bu bağlanma sonucu



sitozolde nekrozom adı verilen bir kompleks oluşur ve hücreler ölüme sürüklenir [342]. TNF $\alpha$ 'nın aktifleştirdiği diğer bir mekanizma ise ölüm reseptörleri aracılı apoptozis'dir. TNF $\alpha$ , TNFR1 reseptörlerine bağlandığında Kaspaz 8 aktivasyonuna neden olarak apoptotik mekanizmayı aktif hale getirmektedir. TNF $\alpha$ , apoptozisdeki bu rolü nedeniyle kanser gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde hedef molekül olarak da kullanılmaktadır [343].

#### **1.8.1.2. FasL proteini**

"Fas Ligand (FasL)", 1993 yılında 281 amino asit uzunluğunda ve 40 kDa molekül ağırlığına sahip bir transmembran proteini olarak tanımlanmış, TNF süper ailesinin üyelerinden biridir. FasL aynı zamanda CD178, CD95L veTNFSF6 olarak da adlandırılmaktadır [344]. Bu ligandın CD8+ sitotoksik T-lenfositlerde ve NK hücrelerinin zarında bir transmembran proteini olarak bulunduğu belirlenmiştir [345]. Bununla birlikte Lenfoblastik lösemili hastalarla yapılan çalışmalar sırasında zara bağlı halde bulunan FasL'nin matriks metalloproteinaz enzimleri tarafından kesilerek ECM'ye salgılandığı da saptanmıştır [346]. Hem hücre zarında bulunan, hem de ECM'ye salgılanan FasL'nin Fas reseptörüne bağlanması sonucu apoptozis mekanizmasının başladığı bildirilmiştir [344].

Yapılan çalışmalarda, tümör hücrelerinin immün sistemden korunmak için FasL sentezlediği belirlenmiştir. Bu FasL, Fas reseptörü eksprese eden lenfositlere bağlanır. Bu şekilde normalde tümör hücrelerini öldürmesi beklenen T-lenfositlerin, Fas aracılı apoptoz yoluyla ortadan kaldırıldıkları gösterilmiştir. Böylece FasL eksprese eden tümör hücreleri immün sistem hücrelerinden kurtulmaktadırlar [347], [348].

#### **1.8.1.3. TRAIL (TNFSF10/Apo2L)**

"TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)" insanlarda 3. kromozomdaki TNFSF10 geni tarafından kodlanan, 32 kDa ağırlığında ve 281 aminoasit uzunluğunda bir transmembran proteindir. Yapılan çalışmalarda TRAIL'in FasL ile %28, TNF $\alpha$  ile %23 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir [349]. TRAIL aynı zamanda APO-2L olarak da adlandırılmaktadır [350].

TRAIL; monosit, makrofaj, dendritik hücreler, doğal öldürücü hücreler, sitotoksik T-lenfositler, hepatositler, nöronlar, epitel hücreleri ve leyding hücreleri tarafından sentezlenir ve hedef hücre zarlarında bulunan TRAIL reseptörlerine bağlanır [351]. TRAIL'in reseptörlerine bağlanması ölüm reseptörü aracılı apoptotik mekanizmanın aktifleşmesini sağlar. TRAIL hücre zarında bir transmembran proteini olarak bulunabildiği gibi matriksmetalloproteinaz enzimleri tarafından kesilerek ECM'ye de salgılanır. Yapılan çalışmalarda her iki formun da apoptozisi indüklemeye özelliği olduğu belirlenmiştir [352].

TRAIL kanser hücrelerinde apoptozise neden olmaktadır. TRAIL'in lösemi, multiple miyeloma, nöroblastom, akciğer, kolon, meme, prostat, pankreas, böbrek, tiroid kanser hücrelerinde apoptozisi uyardığı yapılan hücre kültürü çalışmalarında gösterilmiştir [353], [354]. TRAIL mutant fare modelleri ile yapılan çalışmalarda, farelerin gelişim bozukluğu göstermeksizin yaşamaya devam ettiği ancak özellikle hematolojik kanserlerin oluşumunda artış olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle TRAIL kanser tedavisinde kullanılabilecek potansiyel bir hedef olarak nitelendirilmektedir [355].

Son yıllarda yapılan çalışmalarda kanser hücreleri dışında *Streptococcus pneumoniae* ile enfekte makrofajların ortadan kaldırılmasında da TRAIL ligandının görev yaptığı belirlenmiştir. Alveollerde bulunan Nötrofil lökositlerden salgılanan TRAIL, *Streptococcus pneumoniae* ile enfekte alveolar makrofajın zarında bulunan reseptörüne bağlanır ve makrofaj apoptozise uğrar. Bu şekilde bakterilerin çoğalmasının engellendiği ifade edilmektedir [356]. Ayrıca Haamed ve çalışma grubu tarafından yapılan bir çalışmada akciğer endotel ve epitel hücrelerinden salgılanan TRAIL'in düz kas hücrelerinde proliferasyona neden olduğu ve bunun sonucunda da damarda basıncın arttığı saptanmıştır. Bu basınç artışının pulmoner arteriyel hipertansiyona neden olduğu öne sürülmektedir [357].

### **1.8.2. Reseptörler**

Apoptozisde görev alan reseptörler "Tümör Nekroz Faktör Reseptör (TNFR)" süper ailesinin üyeleridir. TNFR süper ailesinin 40'dan fazla üyesi vardır ve apoptozis dışında inflamasyon, otoimmünite ve organogenezis'de rol oynamaktadır [358].

### 1.8.2.1. TNFR1

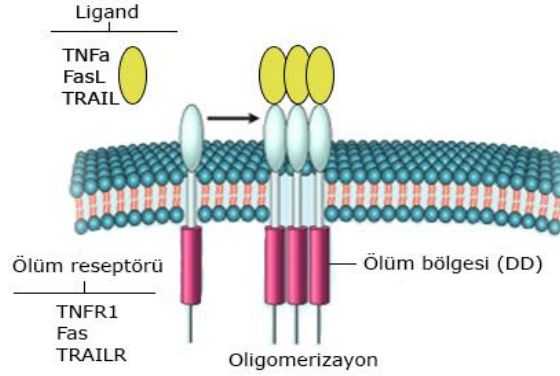
TNFR1 reseptörü insanlarda 12. kromozomda bulunan TNFRSF1A geni tarafından kodlanır. TNFR1, 434 amino asit uzunluğundadır ve yaklaşık 50 kDa molekül ağırlığa sahiptir. Reseptörün yapısı incelendiğinde 190 amino asit uzunluğunda ekstrasellüler, 23 amino asit uzunluğunda transmembran ve 221 aminoasit uzunluğunda intrasellüler domainden oluştuğu belirlenmiştir [359]. TNFR1 reseptörünün ekstrasellüler domaininde ligandın bağlanmasını sağlayan ve sistein amino asitleri bakımından zengin bir bölge bulunur. Bu bölge “preligand assembly domain (PLAD)” olarak adlandırılmaktadır [358].

TNFR1 reseptörünün ligandı TNF $\alpha$ 'dır. TNF $\alpha$ , reseptöre bağlandığında 3 adet TNF $\alpha$  ve hücre zarında monomerik halde bulunan üç adet TNFR1 reseptörü non-kovalent olarak bir araya gelir ve oligomerize olur (Şekil 1.8). Bu trimerik yapı apoptozisin başlaması için gereklidir [360].

TNFR1'in sitoplazmik kuyruğunda ölüm bölgesi (death domain, DD) olarak adlandırılan bir bölge bulunur. TNF $\alpha$ , TNFR1'e bağlandığında reseptörün sitoplazmik kuyruğunda konformasyonel bir değişim meydana gelir. Bu değişimin etkisiyle ölüm bölgesine sitoplazmada bulunan çeşitli adaptör proteinler bağlanır ve ölüm reseptörleri aracılı apoptozis mekanizması bu şekilde başlamış olur [359], [361].

### 1.8.2.2. FAS (CD95/APO-1) reseptörü

Fas reseptörü, insanlarda 10. kromozomun uzun kolunda bulunan TNFRSF6 geni tarafından kodlanan, 335 amino asit uzunluğunda ve yaklaşık 37 kDa molekül ağırlığına sahip bir transmembran proteindir [362]. Yapılan çalışmalarda bu reseptörün kalp, akciğer, karaciğer ve böbrek gibi çok sayıda dokuda ifade edildiği gösterilmiştir [363]. Fas reseptörünün yapısı incelendiğinde hücrenin içine uzanan bir intrasellüler bölge, hücre zarını boydan boya geçen bir transmembran bölgesi ve hücre dışına uzanan bir ekstrasellüler bölge olmak üzere üç kısımdan oluştuğu saptanmıştır. Reseptörün hücre dışına uzanan ekstrasellüler bölgesinin TNFR1 ile önemli ölçüde benzerlik gösterdiği belirlenmiş ve bu reseptör TNFRSF6 olarak sınıflandırılmıştır. Bu ekstrasellüler bölge yapısında 2-6 adet sisten amino asit rezidüsü içerir ve bu bölge ligand bağlanması için önemlidir [364].



**Şekil 1. 8.** Apoptozis mekanizmasını uyanan ligandlar ve ölüm reseptörleri ile etkileşimi olur ([359]'dan yararlanılarak yeniden çizilmiştir).

Fas reseptörünün ligandı FasL'dir. Yapılan çalışmalarda FasL'nin reseptörün ekstrasellüler bölgesine bağlandığı ifade edilmektedir. FasL'nin Fas reseptörüne bağlanması sonucu 3 adet FasL ve 3 adet Fas reseptöründen oluşan trimerik bir kompleks oluşur. Bu apoptozis mekanizmasının başlaması için gereklidir (Şekil 1.8) [365]. Fas reseptörünün sitoplazmik bölgesi 145 amino asitten oluşur ve bu bölgede "ölüm bölgesi" olarak adlandırılan "DD ölüm motifi (death domain)" bulunmaktadır. FasL, Fas ile bağlandığında, reseptörün hücre içi kısmı çok sayıda adaptör proteinle ilişki kurarak apoptozis uyarısının ekstrasellüler matriksten hücre sitoplazmasına taşınmasını sağlar [366].

### 1.8.2.3. TRAIL reseptörü (TRAILR1/TRAILR2)

Fas ve TNFR1 dışında TRAIL reseptörleri de apoptozis mekanizmasının başlamasında rol oynayan reseptörlerdir. TRAIL reseptörü ilk olarak 1997 yılında Pan ve araştırma grubu [367] tarafından tanımlanmış ve TRAILR1 olarak adlandırılmıştır. Daha sonra, TRAILR1 dışında TRAILR2, TRAILR3, TRAILR4 ve Osteoprotegerin (Opg) olmak üzere 4 adet reseptör daha tanımlanmıştır [368]. TRAIL reseptörlerinin karaciğer, nöronlar, miyositler, kolon, bronş epiteli, Leydig hücrelerinde ifade edildiği belirlenmiştir [351].

Apoptozis mekanizmasının başlaması için TRAIL ve TRAIL reseptörlerinin trimerizasyona uğraması gerekmektedir. Bunun için üç adet TRAIL ve üç adet TRAIL reseptörü biraraya gelmektedir (Şekil 1.8). Bu trimerizasyon ile reseptörün

intrasellüler bölgeleri birbirine yakın duruma getirilir ve sitoplazmada bulunan adaptör proteinler reseptöre doğru çekilir. TRAIL reseptörü adaptör protein ilişkisi apoptozis uyarısının ECM'den hücre içine aktarılmasında önemli basamağı oluşturmaktadır [369].

TRAIL reseptörlerinden TRAILR1 ve TRAILR2, sitoplazmaya uzanan kısımlarında ölüm bölgesine sahiptir ve TRAIL bu reseptörlere bağlandığında apoptozis mekanizması aktif hale geçer [351]. Ölüm bölgesinden yoksun diğer reseptörler ise apoptozisi uyarmazlar ve decoy reseptörleri olarak sınıflandırılırlar [370].

### 1.8.3. Kaspazlar

Kaspazlar, apoptozis mekanizmasında görev alan sistein proteazlardır (**C**ysteine **A**spartate **S**pecific **P**rote**A**SEs). Bu enzimler, aktif merkezlerinde sistein amino asit rezidüsü bulunduğu ve hedefledikleri proteinleri aspartik asit rezidülerinden sonra gelen amino asit rezidüsünden kestikleri için bu şekilde adlandırılmışlardır [371].

Kaspazlar, sitozolde 30-50 kDa molekül ağırlığına sahip inaktif zimojenler olarak sentezlenirler. İnaktif durumdaki bu enzimler “prokaspaz” olarak isimlendirilir. Bu prokaspaz enzimlerinin yapısında fonksiyonel açıdan önemli iki bölgenin varlığı belirlenmiştir. Bu bölgelerden biri enzimin N-terminalinde bulunan ve “prodomain” bölgesi olarak adlandırılan düzenleyici bölgedir. Prodomain bölgesi, enzimin aktivitesini ve diğer biyomoleküllerle olan etkileşimini düzenleyen amino asit motifleri içerir. İkinci bölge ise enzimin C-terminalinde bulunan ve enzimatik olarak aktif olan “katalitik domain”dir [372].

Prodomain bölgesinde bulunan amino asit motifleri detaylı olarak incelenmiş ve “Caspase activation and recruitment domains (CARD)”, “Death effector domain (DED)”, “Death domain (DD)” ve “PYRIN” olmak üzere dört farklı bölge tanımlanmıştır. Yapılan çalışmalarda Apoptozis mekanizmasında rol oynayan çeşitli reseptör, efektör, adaptör ve inhibitör proteinlerde de bu bölgelerin varlığı belirlenmiştir [373]. Bu bölgeleri içeren tüm proteinler “Death domain (DD) süper ailesi” içinde sınıflandırılmaktadır [374]. Bu motifler arasındaki amino asit bezerliği düşük olmasına rağmen, benzer üç boyutlu yapıya sahip oldukları gösterilmiş ve bu yapı, “ölüm bölgesi katlantısı (death domain fold)” olarak adlandırılmıştır [375].

**Caspase activation and recruitment domains** olarak adlandırılan CARD bölgesi, ilk olarak 1997 yılında Hofmann ve çalışma grubu [376] tarafından tanımlanmıştır. Bu bölge 90-100 amino ait uzunluğundadır ve birbirine anti-paralel 6 adet  $\alpha$ -heliksten oluşmaktadır CARD sadece kaspaz enzimlerinde değil, çeşitli biyolojik süreçlerde görev alan çok sayıda proteinin yapısında da bulunmaktadır [377]. CARD bölgesi içeren bu proteinler birbirlerine yapılarında bulunan CARD bölgelerinden bağlanırlar. Bu nedenle CARD domainleri arasında gerçekleşen bu etkileşim homofilik bir etkileşim olarak tanımlanır. CARD bölgesi yüklü amino asitler bakımından zengin olduğundan CARD-CARD etkileşiminde bölgeler arasında elektrostatik etkileşim görülmektedir. CARD bölgesi içeren tüm proteinler, “CARD protein ailesi” olarak sınıflandırılmaktadır [378].

**Death effector domain** olarak adlandırılan DED bölgesi, kaspazların N-terminalinde bulunan prodomainde yer alır. DED bölgesi de CARD gibi, sadece kaspazlarda değil, apoptozis mekanizmasında görev alan diğer proteinlerin yapısında da bulunur. DED-DED homofilik etkileşimi başta apoptozis olmak üzere hücrede gerçekleşen çeşitli biyolojik süreçlerde görev alır ve DED-DED bağlantısında bölgeler arasında hidrofobik etkileşim kurulur [372]. DED bölgesi içeren proteinler incelendiğinde, DED bölgeleri arasındaki benzerlik %4,7-%25,3 olarak bulunmuştur [379], [380]. Ancak DED bölgesinin üç boyutlu yapısı incelendiğinde diğer motifler gibi birbirine anti-paralel 6 adet  $\alpha$ -heliksten oluştuğu görülmüştür. DED bölgesi içeren bu proteinler “DED protein ailesi” olarak sınıflandırılmaktadır [381].

**Death domain** olarak adlandırılan DD bölgesi de diğer motifler gibi birbirine anti-paralel 6 adet  $\alpha$ -heliksten oluşur. Bu bölge de CARD ve DED bölgeleri gibi, diğer proteinlerdeki DD bölgeleri ile bağlanarak homofilik etkileşim gösterir. Sadece kaspazların prodomaininde değil, özellikle apoptozis mekanizmasında görev alan diğer proteinlerin yapısında da bulunan bu domain içerdiği yüklü amino asitlerle moleküller arasında elektrostatik bir çekim oluşturur. Yüklü amino asitlerin  $\alpha$ -heliksin yüzeyinde bulunması DD bölgeleri arasında oluşan elektrostatik etkileşim için önemlidir [382].

**Pyrin domaini**, 2000 yılında apoptozis ve inflamasyonda rol oynayan çeşitli proteinlerde belirlenmiş olan, yaklaşık 95 amino asit rezidüsünden oluşan bir motiftir [383]. Apoptozisdeki rolünün belirlenmesinin ardından DD, DED ve CARD

proteinleri gibi Pyrin domainine sahip proteinler de DD süper ailesi içinde sınıflandırılmıştır. Bu bölge, birbirine anti-paralel 6 adet  $\alpha$ -heliksten oluşmakta ve çok sayıda protein-protein etkileşiminde görev almaktadır [375].

Kaspazların yapısında prodomain dışında, enzimin aktif bölgesi olarak da adlandırılan bir **Katalitik bölge** bulunur. Bu Katalitik bölge, enzimin C-terminalinde yer alır ve 20 kDa molekül ağırlığına sahip büyük alt ünite (p20) ile 10 kDa molekül ağırlığına sahip bir küçük alt üniteden (p10) meydana gelir [384]. Bu alt üniteler arasında 10 amino asit uzunluğunda kısa bir “bağlayıcı (linker) bölge” yer almaktadır [385]. Büyük alt ünite Histidin ve Sistein amino asit rezidüleri içeren katalitik olarak aktif bölgedir. Küçük alt birim ise çok sayıda substrat için bağlanma bölgesi oluşturur. Enzimin, substratlarda bulunan aspartik asit aminosit bölgelerini tanıyan bu bölgesinde; Arg179, His237, Gln283, Cys285, Arg341 ve Ser347 rezidülerinden oluşan 7 amino asitin evrimsel olarak tüm kaspaz tiplerinde korunduğu belirlenmiştir [386].

İnsanlarda tanımlanmış 12 adet kaspaz enzimi bulunmaktadır. Bu enzimler Kaspaz 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 ve Kaspaz 14'tür. Kaspaz 11 farelerde, Kaspaz 13 ise sıgırlarda saptanmıştır ve insanlardaki ortologları sırasıyla Kaspaz 4 ve Kaspaz 5 enzimleridir [387], [388]. Kaspazlar genellikle fonksiyonlarına ve prodomain yapılarına göre sınıflandırılmaktadırlar. Bu sınıflandırmalar dışında bazı araştırmacılar tarafından substrat tercihlerine ve filogenetik ilişkilere göre de gruplandırma yapılmıştır [389], [390].

### **Fonksiyonlarına göre Kaspazlar [390];**

**1. İnflamatuar Kaspazlar:** Kaspaz 1, 4 ve 5 bu grupta yer alır. Bu enzimler proinflamatuvar sitokinleri aktiveleştirerek bağışıklık sisteminde görev alır.

**2. Başlatıcı Kaspazlar:** Kaspaz 2, 8, 9, 10 ve 12 bu grupta yer alır. Bu enzimler apoptozis sürecinin başlamasından ve düzenlenmesinden sorumludur. Bu nedenle Düzenleyici Kaspazlar olarak da adlandırılırlar.

**3. Efektör Kaspazlar:** Kaspaz 3, 6 ve 7 bu grupta yer alır. Bu enzimler apoptozis sürecinde aktifleşerek hücrede 300'den fazla substratın parçalanmasını sağlar.

Bu sınıflandırmaların dışında kalan Kaspaz-14 enzimi ise keratinositlerde üretilir ve kornifikasyon sürecinde rol oynar [391].

## **Prodomain yapılarına göre Kaspazlar;**

Kaspazların prodomainleri fonksiyonlarına göre farklılık gösterir. Başlatıcı ve inflamatuvar kaspazların yaklaşık 100 amino asit uzunluğunda bir prodomaini bulunurken, efektör kaspazlar ise 30 amino asitten daha kısa bir prodomaine sahiptir. Bunun nedeni başlatıcı kaspazların uzun prodomain bölgesinde enzimin aktivasyonunu düzenleyen adaptör proteinlerle bağlanmasını sağlayan bir bölgenin varlığıdır. Adaptör protein-başlatıcı kaspaz ilişkisi enzimin otokatalitik aktivasyonu için kritik basamağı oluşturur. Kısa prodomaine sahip olan efektör kaspazlar ise uzun prodomaine sahip olan bir başlatıcı kaspaz tarafından kesildiklerinde aktif hale geçerler [384].

**1. Uzun prodomaine sahip Kaspazlar;** Kaspaz 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10 ve 12

**2. Kısa prodomaine sahip Kaspazlar;** Kaspaz 3, 6, 7 ve 14

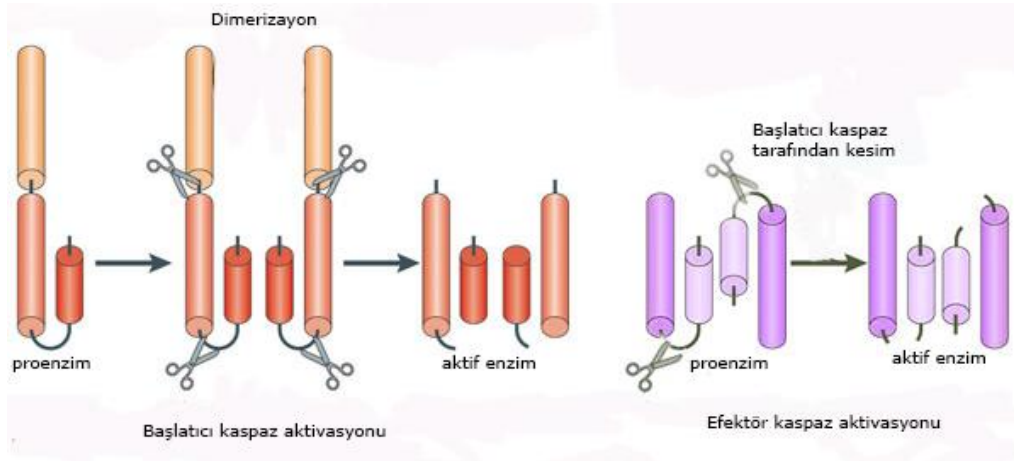
İnaktif zimojenler halinde sentezlenen kaspazların aktif hale geçişleri hücredeki fonksiyonlarına göre değişmektedir. İnaktif durumdaki başlatıcı kaspazlar ve inflamatuvar kaspazlar sitozolde monomerik formda bulunurlar ve aktif duruma geçmeleri için dimerize olmaları gerekmektedir. Efektör kaspazlar ise inaktif dimerler halinde bulunurlar (Şekil 1.9). Bunun nedeni efektör kaspazların başlatıcı kaspazlara kıyasla daha hidrofobik özellikte olmalarıdır. Efektör kaspazların aktivasyonu için bir başlatıcı kaspaz tarafından kesilmesi gerekmektedir [392].

Apoptotik sinyalin hücreye ulaşması ile sitoplazmada bulunan adaptör proteinler başlatıcı kaspazların prodomaininde bulunan DED ve CARD motiflerine bağlanır. Hücrelerde başlatıcı kaspazlara adaptör proteinlerin bağlanması ile oluşan üç farklı başlama kompleksi tanımlanmıştır. Bu kompleksler; kaspaz 8 ve kaspaz 10 enzimlerinin aktifleşmesinden sorumlu **ölüm indükleyici sinyal kompleksi (DISC)**, kaspaz 9 enziminin aktifleşmesinden sorumlu **apoptozom kompleksi** ve kaspaz 2 enziminin aktifleşmesini sağlayan **p53 uyarıcı ölüm bölgesi içeren kompleks (PIDDozom)** olarak adlandırılmaktadır [393], [394], [395]. Adaptör proteinlerin kaspazlara bağlanması ile oluşan bu kompleksler, monomerik formda bulunan başlatıcı kaspazları biraraya getirir. Bu şekilde DED domainleri karşı karşıya gelen başlatıcı kaspazlar dimerize olur. Bu dimerizasyon başlatıcı kaspazların aktif hale geçmesi için gereklidir [384].



İnflamatuar kaspazların aktif hale geçmesi için de dimerize olmaları gerektiği belirlenmiştir. Bu dimerizasyon için inflammatuar kaspazlara adaptör proteinler bağlanır. Bu bağlanma sonucu oluşan kompleks **inflamazom** olarak adlandırılır. İnflamozom, inflammatuar kaspazların bir araya gelerek dimerize olmasını sağlar. Dimerize olan inflammatuar kaspazlar, aktif duruma geçer ve inflamasyon sürecinde rol oynar [384], [392].

Efektör kaspazlar ise başlatıcı ve inflammatuar kaspazlardan farklı olarak enzimatik yıkım sonucu aktif duruma geçer. Efektör kaspazların aktiveleşme süreci ile ilgili detaylı bilgiler kaspaz 7 enziminin kristal yapısı ile ilgili yapılan çalışmalar sırasında ortaya konmuştur [396]. Efektör kaspazların aktivasyonu enzimin prodomain ve katalitik domainleri arasında bulunan peptid bağlarının aktif duruma geçmiş olan bir başlatıcı kaspaz enzimi tarafından kırılması ile başlar (Şekil 1.9). Bu şekilde katalitik domain, prodomainden ayrılır [386]. Daha sonra birbirinden ayrılan büyük ve küçük katalitik alt birimler, büyük alt birim küçük alt birimle karşılıklı gelecek şekilde bir heterodimer oluşturur. Oluşan heterodimerler birleşerek iki aktif merkez içeren tetramerik yapıda aktif bir kaspaz enzimini meydana getirir. Biyolojik olarak aktif kaspaz enziminin prokaspaz forma göre yaklaşık 2000 kat daha etkin olduğu gösterilmiştir [397].



**Şekil 1. 9.** Başlatıcı ve efektör kaspazların aktivasyonu ([384]'den yararlanılarak çizilmiştir).

#### 1.8.4. Kaspaz substratları

Kaspaz enzimleri aktif hale geçtiklerinde hücre içinde çok sayıda biyomolekülü substrat olarak kullanarak parçalar. İlk olarak 1998 yılında Stroh ve çalışma grubu

[398] tarafından 65 farklı substratın kaspaz enzimleri tarafından parçalandığı belirlenmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalar sonucunda, kaspaz enzimlerinin bugüne kadar memelilerde tanımlanmış yaklaşık 400 adet substratı olduğu rapor edilmiştir [399].

Kaspaz substratları sitoplazma ve çekirdeğin yapısal proteinleri, çeşitli sinyal mekanizmalarında görev yapan proteinler, transkripsiyonu düzenleyici proteinler, hücre siklusunu düzenleyen proteinler ve DNA ile ilişkili proteinler şeklinde sınıflandırılmaktadır. Kaspazlar tarafından kesilen bu substratlardan bazıları aktif durumdan inaktif duruma geçerken, bazıları inaktif durumdan aktif duruma geçer. Buna ek olarak kaspazlar tarafından kesilen bazı substratların hücre içindeki lokalizasyonu değişirken, bazıları yeni fonksiyonlar kazanır [400]. Apoptotik uyarı takiben aktif hale geçen kaspaz enzimleri tarafından parçalanan bu substratlar apoptozisin erken ya da geç safhalarında görev yapabilir. Yapılan çalışmalarda bir hücrede kaspazlar tarafından parçalanan bir substratın, başka bir hücre tipinde parçalanmadığı ve buna bağlı olarak da substratlardan bazılarının hücre tipine özgü olduğu gösterilmiştir. Substratlar değişmesine rağmen kaspaz enzimleri hedef proteindeki özgül amino asit dizilerini tanıyarak, bu aminoasitleri aspartik asit rezidünden sonra keserek ayırır. Kaspaz enzimleri tarafından parçalanan bu substratlar sonucu hücrelerde hücre zarı, sitoplazma ve çekirdekte çeşitli morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler ortaya çıkar ve hücre ölüme sürüklenir [206].

#### **1.8.5. Kaspaz inhibitörleri**

Kaspaz enzimlerinin aktivasyonu kaspaz inhibitörleri adı verilen çeşitli proteinler tarafından düzenlenmektedir. Bu inhibitör proteinleri içeren en önemli ailelerden biri "Apoptozis proteinleri inhibitör ailesidir (IAP)". IAP protein ailesi yapısında çinko bağlanma bölgesi içeren ve hem başlatıcı, hem de efektör kaspazlara bağlanarak onların inhibisyonuna neden olan proteinleri içerir. Bu proteinler ilk olarak virüsle enfekte böceklerde tanımlanmıştır [401]. Bir virüs tarafından enfekte edilen hücrelerde, virüs genomu konak hücre genomuna entegre olur. Bu durumda virüsle enfekte hücre kendi proteinlerinin yanı sıra virüsün genomunda kodlanan proteinleri de sentezler. Virüs genomunda kodlanan bu IAP proteinleri virüsle enfekte konak hücrelerinin ölmelerini engellemek için üretilmektedir. Bu şekilde

viral enfeksiyonun devamlılığı sağlanmaktadır. IAP proteinlerinden memelilerde bulunan bazıları XIAP, cIAP1, cIAP2, NAIP, Bruce, Survivin, pIAP olarak adlandırılmaktadır [402]. IAP ailesi üyelerinin insanlarda özellikle hematolojik malignansilerin oluşumunda rol oynadığı son yıllarda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. IAP proteinlerinin inhibe edilerek lösemi ve lenfoma tedavisinde kullanılabilceği düşünülmektedir [403].

Mitokondri ve ölüm reseptörleri aracılı apoptotik yolların her ikisi de IAP ailesi tarafından kontrol edilmektedir. Apoptozis uyarısının başlamasının ardından bu IAP'ların ortadan kaldırılması gerekmektedir. Apoptozis mekanizmasının aktifleşmesiyle, mitokondriden salgılanan çeşitli faktörlerin sitozolde bulunan IAP'a bağlanarak bu proteini bloke ettiği belirlenmiştir. Bu şekilde IAP, kaspaz enzimlerine bağlanamaz ve aktif durumda kalan kaspaz enzimleri substratlarını parçalayarak apoptozis sürecini devam ettirir [402].

Mitokondriden salgılanan ve IAP'ın etkisini ortadan kaldıran bu faktörlerden biri "Mitokondri Kökenli İkincil Kaspaz Aktivatör (Smac)" olarak adlandırılan Smac proteindir [404]. Smac, 239 amino asit uzunluğunda ve 27 kDa molekül ağırlığında mitokondriyal bir proteindir. Bu proteinin N-terminal bölgesinde 55 amino asit uzunluğunda mitokondriyal hedefleme dizisi bulunmaktadır. Protein sitozolde sentezlenip, mitokondriye geçtikten sonra bu dizi yapıdan uzaklaştırılır. Bu hedefleme dizisinin yapıdan ayrılması ile Smac proteininde yeni bir N-terminal bölgesi oluşur. Apoptotik uyarıyı takiben mitokondriden sitoplazmaya salınan Smac, yeni N-terminal bölgesiyle IAP'a bağlanarak onu bloke eder. Bloke olan IAP kaspazlara bağlanamadığı için kaspaz enzimleri aktif hale geçerek apoptozisin uyarılmasını sağlarlar [405], [406].

Smac'ın yanı sıra bir Serin proteaz enzimi olan "High Temperature Requirement Protein A2 (Htra2/Omi)" de apoptotik uyarının ardından mitokondriden sitoplazmaya salınmaktadır. Htra2/Omi, IAP'ları parçalar ve bu şekilde IAP-kaspaz kompleksinin kurulması engellenir. IAP kaspazlara bağlanamadığından, kaspazlar aktifleşerek hücrelerin ölümüne yol açar [406].

IAP dışında, ölüm reseptörlerine bağlı apoptozisin inhibisyonunda görev yaptığı belirlenen endojen bir faktör daha tanımlanmıştır. Bu inhibitör molekül "FLICE-benzeri inhibitör protein (FLIP)" olarak adlandırılır. FLIP, başlatıcı kaspazlardan

kaspaz 8 ve kaspaz 10'un DD bölgesine bağlanarak Ölüm reseptörü aracılı apoptotik yolu baskılar [407]. Yapılan araştırmalarda Kaspaz 8'in tam olarak aktif hale gelebilmesi için sitozolde inhibitörünün de bulunması gerektiği belirlenmiştir [392].

#### **1.8.6. Adaptör proteinler**

Apoptozise neden olan ligandlar hücre zarında bulunan reseptörlerine bağlandığı zaman reseptörler aktive olarak sitozolde bulunan çeşitli adaptör proteinler ile birleşir. Bu şekilde ekstrasellüler bir ölüm sinyali intraselüler hale gelmiş olur. "Fas ilişkili ölüm domaini (FADD) proteini" yaklaşık 23 kDa molekül ağırlığa sahip, 208 amino asit uzunluğunda bir adaptör proteindir. İnsanlarda 11 kromozomun uzun kolunda bulunan FADD geni tarafından kodlanır. Yapısı incelendiğinde, C-terminalinde DD, N-terminalinde ise DED domaini bulunduğu gösterilmiştir [408]. Apoptozisin uyarılmasının ardından FADD sitoplazmadan hücre zarına çekilir ve yapısında bulunan DD domaini ile hücre zarında bulunan Fas reseptörünün DD domainine bağlanır. N-terminalinde bulunan DED domaini ise prokaspaz 8 ve prokaspaz 10 enziminin DED bölgesine bağlanır. Bu bağlanma, başlatıcı prokaspazların aktif hale geçmesinde ve apoptozisin uyarılmasında kritik basamağı oluşturur [409].

"Tümör nekroz faktör reseptörü ilişkili ölüm domaini (TRADD) proteini", insanlarda 16. Kromozomda bulunan TRADD geni tarafından kodlanan, 312 amino asit uzunluğunda ve yaklaşık 34 kDa molekül ağırlığına sahip bir adaptör proteindir. Apoptotik uyarının ardından hücre zarında bulunan TNFR1 reseptörünün hücre içi kısmına TRADD bağlanır. TRADD proteinine ise diğer bir adaptör protein olan FADD bağlanır. TRADD ve FADD bağlantısının kurulması ile prokaspaz 8 ve prokaspaz 10 enzimleri FADD adaptör proteine bağlanarak aktif hale getirilir. Bu şekilde ölüm reseptörleri aracılı apoptotik yol uyarılmış olur. TRADD adaptör proteini sadece apoptozisde değil hücrelerin hayatta kalması için gerekli çok sayıda proteinin sentezini düzenleyen NF- $\kappa$ B sinyal mekanizmasında da görev yapar. Bu durumda TNFR1 ile bağlanan TRADD, FADD ile etkileşmez [410]. Ancak hücrede gerçekleşen bu iki ayrı mekanizmada, hücrenin hangi yolu, nasıl seçtiği tam olarak aydınlatılamamıştır [411].

“TNF reseptörü ilişkili faktör (TRAF)” proteinleri TRAF genleri tarafından kodlanan, altı farklı izoformu tanımlanmış adaptör proteinlerdir. Apoptozis ile ilişkili olarak en çok çalışılan TRAF proteinleri TRAF1 ve TRAF2’dir. Diğer adaptör proteinlerin aksine hücre zarında bulunan TNFR1 reseptörlerine bağlandıklarında kaspaz inhibitörlerini sitoplazmadan hücre zarına doğru çeker. Hücre zarına gelen IAP, burada bulunan prokaspaz 8 enzimine bağlanarak ve bu enzimi inhibe eder. Buna bağlı olarak da apoptozis mekanizmasının baskılandığı ifade edilmektedir [412].

### 1.8.7. Sitokrom c

Sitokrom c, elektron transportunda görev alan suda çözünür bir hem proteindir. Yaklaşık 12 kDa molekül ağırlığına sahip, 105 amino asit uzunluğunda olan bu protein, apositokrom olarak adlandırılan bir öncül şeklinde serbest ribozomlarda sentezlenir. Sitozolda sentezlenen apoSitokrom c, mitokondrinin iç ve dış zarları arasında bulunan boşluğa yerleşir [413]. Burada bir liyaz enzimi tarafından yapısına hem grubu eklenen apoSitokrom c, holoSitokrom c haline gelir. HoloSitokrom c, kısaca Sitokrom c olarak adlandırılmaktadır. Hem grubunun Sitokrom c’nin apoptotik fonksiyonları için gerekli olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur [414].

Sitokrom c, normal hücrelerde mitokondri iç ve dış zarları arasında bulunmaktadır. Zarlar arası boşlukta bulunan Sitokrom c’nin burada serbest halde değil, mitokondri iç zarında bulunan Kardiyolipin molekülüne bağlı halde bulunduğu belirlenmiştir. Kardiyolipin ise Sitokrom c’nin zarlar arası boşlukta kalmasını ve mitokondriden sitozole salınmasını önlemektedir. Sitokrom c ile Kardiyolipin arasındaki bağlantı elektrostatik ve hidrofobik etkileşimler sonucu oluşmaktadır [415]. Apoptotik uyarının ardından Kardiyolipin molekülü oksidasyona uğrar ve bu oksitlenme Kardiyolipin molekülünün Sitokrom c’den ayrılmasına neden olur [414]. Liu ve çalışma grubu tarafından [416] 1996 yılında yapılan çalışmada apoptotik uyarı ile birlikte mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamış bir şekilde Sitokrom c proteininin mitokondriden sitoplazmaya salındığı belirlenmiştir. Mitokondriden sitoplazmaya salgılanan az miktardaki Sitokrom c, ER zarında bulunan “inositol 1,4,5 trifosfat reseptörüne (IP<sub>3</sub>R)” bağlanır ve ER’den sitozole Ca<sup>+2</sup> salgılanmasını sağlar. ER’den salınan bu Ca<sup>+2</sup> mitokondriden daha fazla miktarda Sitokrom c çıkışını uyarır [417].

Sitokrom c sitoplazmaya salındığında mitokondride elektron taşıma sistemi ve buna bağlı olarak da mitokondrinin fonksiyonları bozulmaktadır [418]. Sitoplazmaya salınan bu Sitokrom c'nin efektör bir kaspaz olan kaspaz 3'ün aktivasyon sürecinde rol oynayarak hücreleri ölüme sürüklediği de gösterilmiştir [419].

#### **1.8.8. Bcl-2 Ailesi**

“B-cell lymphoma gene-2 (Bcl-2)” protein ailesi üyeleri mitokondri aracılı apoptotik mekanizmayı düzenleyen tek geçişli transmembran proteinleridir. Bcl-2 protein ailesinin ilk üyesi olan Bcl-2 proteinini kodlayan BCL-2 geni, ilk olarak 1984 yılında akut lenfoblastik lösemili bir çocuk hastada tanımlanmıştır. Bu hastada 14. kromozomda bulunan ve immüoglobulin ağır zincirini kodlayan bölge, 18. kromozomda fonksiyonu bilinmeyen bir bölgeye transloke olmuştur [420]. Bu geçiş daha sonra foliküler lenfomada da saptanmış ve karakterize edilmiştir [421]. Bcl-2 ailesinin fonksiyonlarının mitokondri ile ilişkili olduğu 1990 yılında ortaya konmuş, Bcl-2 proteinlerini ve mitokondiyi içeren mitokondri aracılı apoptotik yolu açıklayan çeşitli modeller öne sürülmüştür [422].

Bugüne kadar memelilerde tanımlanmış 15 üyesi bulunan Bcl-2 protein ailesi fonksiyonlarına göre iki grupta incelenir. Bu gruplardan biri apoptozisi indükleyici etkiye sahip olan pro-apoptotik proteinler, diğeri ise apoptozisi baskılayan anti-apoptotik proteinlerden oluşur. Pro-apoptotik Bcl-2 proteinleri, mitokondrinin iç ve dış zarları arasında bulunan Sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya saliverilmesini ve buna bağlı olarak apoptozisin indüklenmesini sağlar. Anti-apoptotik Bcl-2 proteinleri ise kaspazların ve adaptör proteinlerin inaktivasyonuna neden olarak apoptozisi baskılar [423]. Dolayısıyla, pro- ve anti-apoptotik üyelerin aktivitesi hücrelerin hayatta kalmasına veya ölümüne neden olmaktadır [424]. Anti-apoptotik Bcl-2 üyelerinden bazıları; bcl-2, bcl-xL, bcl-w'den oluşur. Bax, bak, bok, bcl-xs ise proapoptotik Bcl-2 üyelerinden bazılarıdır [423].

Bcl-2 proteinlerinin yapısı incelendiğinde BH1, BH2, BH3 ve BH4 adı verilen ve evrimsel olarak korunmuş bölgelerin varlığı belirlenmiştir. Bu bölgelerin tamamını içeren Bcl-2 proteinlerinin anti-apoptotik özellikte olduğu belirlenmiş (bcl-2bcl-xL, bcl-w... vb.), 2 ya da 3 BH bölgesi içeren proteinlerin ise pro-apoptotik oldukları gösterilmiştir (bax, bak, bok... vb.) Bu pro-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin

aktivasyonu ise yapısında sadece BH3 bölgesi içeren Bcl-2 proteinleri tarafından gerçekleştirilmektedir (bad, bid, bim... vb.) [425].

#### **1.8.8.1. Bcl-2**

Bcl-2 protein ailesinin anti-apoptotik üyelerinden biri olan Bcl-2 proteini insanlarda 18. kromozomda bulunan BCL2 geni tarafından kodlanır. Sitozol, mitokondri, ER ve çekirdekte varlığı belirlenmiş olan bu protein, 239 amino asit uzunluğunda ve yaklaşık 26 kDa molekül ağırlığına sahip bir proteindir [426], [427]. Özellikle mitoz bölünmenin G<sub>2</sub>/M fazında Bcl-2 proteininin hücrelerin apoptozise uğramasını engellediği belirlenmiştir. Bu etkisi nedeniyle anti-apoptotik bir protein olarak tanımlanmaktadır [428]. Bcl-2 proteini sentezlendikten sonra yapısında bulunan 70. serin amino asit rezidüsüne “protein kinaz C (PKC)” tarafından fosforil grubu eklenmektedir. Bu post-translasyonel modifikasyonun proteinin anti-apoptotik fonksiyonu için önemli olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur [429]. Fosforillenen Bcl-2 proteini, pro-apoptotik Bcl-2 üyelerine bağlanarak onların apoptozisi indüklemeye özelliklerini inhibe eder. Bu şekilde hücreler hayatta kalır [430]. Apoptozisin uyarılmasının ardından aktifleşen kaspaz 3 enzimi, Bcl-2 proteinini parçalar. Bu parçalanma ile proteinin yapısındaki BH4 bölgesi yapıdan ayrılır. BH4 bölgesi ayrılan Bcl-2 proteini mitokondri dışı zarına yerleşir ve Sitokrom c'nin mitokondriden sitozole salınmasını sağlayarak, apoptozis mekanizmasını iletir [430].

#### **1.8.8.2. Bax**

“Bcl-2 ilişkili X proteini (Bax)” 1993 yılında Bcl-2 proteini ile ilişkili olarak tanımlanmış, 9 adet  $\alpha$ -heliksten oluşan sitozolik bir proteindir [431]. İnsanlarda 19. kromozomun uzun kolunda bulunan BAX geni tarafından kodlanan bu protein, 192 amino asit uzunluğundadır ve yaklaşık 21 kDa molekül ağırlığına sahiptir [432]. Sağlıklı hücrelerde Bax proteini sitozolde inaktif bir monomer şeklinde bulunur [433]. Yapılan çalışmalarda Bax ile Bcl-2 proteininin yapısal olarak benzer olduğu gösterilmiştir. Fakat bu yapısal benzerliğe rağmen Bcl-2'nin hücrelerin hayatta kalmasını uyarırken (anti-apoptotik), Bax'ın apoptozisi uyardığı (pro-apoptotik) rapor edilmiştir [431].

Bax inaktif durumdayken yapısında bulunan  $\alpha$ -heliksler kovalent olmayan etkileşimlerle birbiri üzerine gelecek şekilde katlanmıştır. Bax proteini fonksiyonel olarak aktif durumda olmadığından, bu durum “kapalı pozisyon” olarak adlandırılır. Isı ve pH değişiklikleri, deterjan gibi kimyasal maddeler varlığında ve BH3 bölgesine sahip bir Bcl-2 üyesi Bax proteinine bağlandığında, proteinin inaktif durumdan aktif duruma geçtiği belirlenmiştir [434], [435]. Bax proteininin aktivasyonu sırasında konformasyonel bir değişim meydana gelir ve  $\alpha$ -heliksin yüzeyinde bulunan hidrofobik grup yapıdan ayrılır. Bu konformasyonel değişim sonucunda 6A7 epitopu olarak adlandırılan bölge açığa çıkar. Bu şekilde Bax inaktif sitozolik bir proteinden, mitokondri dış zarına yerleşebilen aktif bir protein haline gelir [436].

6A7 epitop bölgesi açığa çıkmış olan aktif durumdaki 4 adet Bax proteini biraraya gelerek oligomerize olur ve henüz aydınlatılamayan bir mekanizma ile mitokondri dış zarına yerleşir. Mitokondri dış zarına yerleşen Bax burada por oluşturur. Bu por oluşumu için Bax proteininin mutlaka BH3 bölgesi içeren bir başka Bcl2 üyesi ile bağlanması gerektiği ifade edilmektedir. Bu da inaktif durumdaki Bax'ın neden mitokondri dış zarına yerleşerek por oluşturmadığını açıklamaktadır. Oluşan bu por ile mitokondri dış zarının geçirgenliği bozulur ve Sitokrom c mitokondriden sitozole salınarak hücrenin ölümüne neden olur [437].

### **1.8.8.3. Bak**

“Bcl-2 homologous antagonist killer (Bak)” proteini, mitokondri dış zarında yerleşmiş, apoptozisi indüklemeye özelliğine sahip bir transmembran proteini olarak tanımlanmıştır [438]. Daha sonra, bu proteinin sitozolde ve ER’de de bulunduğu saptanmıştır [439]. İnsanlarda 6. kromozomda bulunan BAK1 geni tarafından kodlanan Bak proteini, 211 amino asit uzunluğunda ve yaklaşık 24 kDa molekül ağırlığındadır [440]. Apoptozis inaktif olduğu durumda, Bak proteini mitokondri dış zarında monomerik formda ve inaktif halde tutulur [438]. Bak proteininin sağlıklı hücrelerde nasıl inaktif halde tutulduğu hala çalışma konusudur. Apoptotik uyarı ile birlikte monomerik formdaki Bak proteinleri mitokondri dış zarında biraraya gelerek homodimer oluşturur. Bu birleşmenin çinko iyonu varlığında gerçekleştiği ifade edilmektedir [441].



Bak proteinlerinin homodimerizasyon mekanizması detaylı olarak incelendiğinde bir Bak proteininin yapısında bulunan BH3 bölgesi ile diğer Bak proteininin 3. ve 4.  $\alpha$ -heliksleri arasında bulunan hidrofobik oluğa bağlandığı, bu BH3 bölgesi-hidrofobik oluk etkileşiminin de homodimerizasyon için gerekli olduğu belirlenmiştir [438], [442]. Yapılan çalışmalarda Bak proteininin yapısında bulunan BH3 bölgesinin spesifik antikolar kullanılarak bloke edilmesinin, Bak proteinlerinin biraraya gelerek homodimer oluşturmasını engellediği belirlenmiştir. Bu şekilde bir araya gelen Bak proteinleri mitokondri dış zarında por oluşturur. Oluşan bu porlar dış zarın geçirgenliğini bozar ve Sitokrom c'nin mitokondriden sitozole salınmasına neden olur [443]. Ayrıca Bak proteininin anti-apoptotik özellikteki Bcl-2 proteinine bağlandığı ve bu proteinin apoptozisi engelleyici özelliğini ortadan kaldırarak apoptozisin uyarılmasını sağladığı da belirlenmiştir [444].

#### **1.8.8.4. Bim**

“Bcl-2 interacting mediator (Bim)” sağlıklı hücrelerde mikrotübüllere bağlı halde bulunan, pro-apoptotik bir Bcl-2 üyesidir. İnsanlarda 2. kromozomda bulunan BCL2L11 geni tarafından kodlanan Bim proteininin, apoptozis mekanizmasında rol oynadığı O'Connor ve çalışma grubu [445] tarafından yapılan çalışmalar sırasında ortaya konmuştur. Bim proteini 22 kDa molekül ağırlığına sahiptir ve 198 amino asitten oluşur. BimL, BimS ve BimEL olmak üzere 3 izoformu tanımlanmış olan Bim proteini pro-apoptotik bir Bcl-2 üyesidir [446]. Yapılan çalışmalarda tüm izoformların BH3 bölgesi içerdiği ve apoptozisi indükleme özelliğine sahip olduğu saptanmıştır [447]. Apoptotik uyarı ile birlikte mikrotübüllerden salınan Bim proteini, mitokondri dış zarına taşınır. Mitokondri dış zarında Bak ve Bax proteinlerine bağlanarak onların aktifleşmesinde rol oynadığı belirlenen Bim proteini bu şekilde mitokondri aracılı apoptozis mekanizmasında görev yapar [448].

#### **1.8.8.5. Bid**

İnsanlarda 22. kromozomda bulunan BID geni tarafından kodlanan “BH3 interacting-domain death agonist (Bid)” proteini ilk olarak Wang ve çalışma grubu [449] tarafından 1996 yılında tanımlanmıştır. 195 amino asit uzunluğunda ve yaklaşık 22 kDa molekül ağırlığına sahip Bid proteini, pro-apoptotik bir Bcl-2

üyesidir. Diğer Bcl-2 üyelerinden farklı olarak Bid, C-terminalinde mitokondri zarına yerleşebilecek hidrofobik bir amino asit rezidüsü taşımamaktadır. Bu nedenle Bid sitozolde serbest halde bulunur ve oluşan apoptotik uyarıyı diğer Bcl-2 üyelerine ileten bir sinyal molekül gibi davranır.

Yapısında sadece BH3 domaini içeren Bid proteini, apoptotik sinyal yokken sitozolde inaktif durumda bulunur. Ölüm reseptörleri aracılı yolun aktivasyonu ile aktif duruma geçen kaspaz 8 enzimi, Bid proteinini C-terminalinden keser. Bu kesim sonucu oluşan Bid, tBid olarak adlandırılır. tBid, mitokondri dış zarında bulunan Bax ve Bak proteinlerine bağlanır [419]. Bu bağlanma ile aktif hale geçen Bak ve Bax, mitokondri dış zarında por oluşturarak mitokondri aracılı apoptozisde rol oynar. Bu şekilde mitokondri ve ölüm reseptörleri aracılı apoptotik mekanizmalar birbirine bağlanmış olur [438].

#### **1.8.8.6. Bad**

“Bcl-2 associated death promoter (Bad)” yapısında sadece BH3 bölgesi içeren, proapoptotik bir Bcl-2 üyesidir [450]. İnsanlarda 11. kromozomda bulunan BAD geni tarafından kodlanan Bad proteini, 168 amino asit uzunluğundadır ve yaklaşık 19 kDa molekül ağırlığına sahiptir [451]. Sağlıklı hücrelerde Bad proteini sentezlendikten sonra yapısında bulunan 112., 136. ve 155. Serin amino asit rezidülerinden fosforillenir. Bu post translasyonel modifikasyonun hücreler için bir yaşam sinyali olduğu ifade edilmektedir [452]. Apoptotik uyarıyı takiben Bad proteininin yapısında bulunan fosforil grupları, “protein fosfataz 2A (PP2A)” tarafından uzaklaştırılır. Böylece Bad proteini defosforile olur. Defosforile olan Bad proteini, anti-apoptotik Bcl-2 üyelerine bağlanarak bu proteinlerin apoptozisi inhibe etme özelliklerini ortadan kaldırır. Bu şekilde apoptozis mekanizmasını indükleyici özellik gösterir [453].

#### **1.8.9. p53**

İnsanlarda 17. kromozomun kısa kolunda yer alan TP53 geni tarafından kodlanan p53, apoptozisde anahtar rol oynayan proteinlerden biridir. Yaklaşık 53 kDa molekül ağırlığına sahip, 393 amino asit uzunluğundaki bu protein DNA'da meydana gelen hasara bağlı olarak hücre siklusunu durduran ve DNA hasarını

onarması için hücreye zaman kazandıran bir transkripsiyon faktörüdür [454]. p53 proteini ilk olarak 1979 yılında DeLeo ve çalışma grubu tarafından tümör oluşumunu uyaran bir molekül olarak tanımlanmıştır [455]. Daha sonra yapılan çalışmalarda tümör oluşumunu uyaran bu p53 proteininin mutasyona uğradığı, normal (wild type) p53 proteininin hücrelerde tümör oluşumunu önleyen bir tümör baskılayıcı protein olduğu ortaya konmuştur [456].

Normal şartlar altında sitoplazmada bulunan p53 proteini oldukça kısa ömürlüdür ve hücredeki miktarı azdır. p53'ün hücredeki miktarı ve lokalizasyonu sıkı kontrol altındadır. Mitoz bölünmenin G1 fazında sitoplazmada bulunan p53, G1/S geçişi sürecinde çekirdeğe girer. Bölünen hücre mitoz bölünmenin S fazına geçtiğinde ise p53 tekrar sitozole dönmektedir. p53 proteininin sitoplazma ve çekirdek arasındaki transferi oldukça hızlı gerçekleşen, ATP bağımlı bir süreçtir [457]. p53 proteininin yapısı incelendiğinde çekirdeğe giriş çıkış için gerekli olan nükleer lokalizasyon sinyal bölgelerini (NLS) içerdiği belirlenmiştir [458].

p53 proteininin hücredeki miktarı "Murine/Human Double Minute 2 (Mdm2)" adı verilen bir ubiquitin-protein ligaz tarafından kontrol edilir. Mdm2, çekirdekte bulunan p53 proteininin N-terminal bölgesine bağlanarak, proteinin yapısına ubiquitin grupları ekler [459]. Mdm2 tarafından eklenen ubiquitin grupları, p53 proteininin yapısında konformasyonel değişime neden olur ve çekirdekte sitoplazmaya çıkış için gerekli olan sinyal dizisinin açığa çıkmasını sağlar. Sitoplazmaya çıkan p53 proteininin yapısındaki bu ubiquitin grupları proteinin proteozomal yıkımı için etiket görevi görür [458].

DNA'da meydana gelen bir hasar varlığında, p53 proteini yapısındaki çok sayıda bölgeden çeşitli kinazlar tarafından fosforillenir. Özellikle 15., 20. Serin, ve 18. Treonin amino asit rezidülerinin fosforillenmesi sonucu p53 ile Mdm2 birbirinden ayrılır. Bu da p53'ün hem sitoplazma, hem de çekirdekteki miktarını artmasına neden olmaktadır [454], [459]. Ayrıca bu fosforillenme reaksiyonlarının p53 proteininin transkripsiyon faktörü fonksiyonu için de gerekli olduğu gösterilmiştir. DNA'ya bağlanan p53 proteini, mitoz bölünmenin G1 ve G2 fazlarında bölünmenin durmasını ve DNA onarımını sağlayan çeşitli proteinlerin transkripsiyonunu uyarır. Bu şekilde hasarlı hücreye hatanın düzeltilmesi ve hayatta kalması için fırsat tanınmış olur. Hasar onarılmayacak boyuttaysa p53; Fas, Bax, Apaf-1 gibi proapoptotik genlerin ifadesine neden olarak hücreyi apoptozise sürükler [460].

Düzeltilmeyecek düzeyde hatalı DNA'ya sahip bir hücrenin apoptozis ile ortadan kaldırılması gereklidir. Hatalı DNA'ya sahip bu hücreler ölmedikleri durumda normal bir hücreden kanser hücresine dönüşümün gerçekleşebildiği yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur. İnsan kanserlerinin yaklaşık yarısında p53 geninde veya p53 geninin hücredeki seviyesini düzenleyen çeşitli biyomoleküllerde mutasyonların varlığı saptanmıştır. p53 bozuk olduğunda, hatalı hücreler hücre bölünmesine devam ederler ve apoptozisden kaçarlar. Ayrıca bölünme devam ettikçe ilave mutasyonlar geçirerek karsinogenez sürecini ilerletirler. Bu nedenle p53 karsinogenez süreci ile ilgili olarak yapılan çalışmaların merkezinde yer alan proteinlerden biridir [454].

### **1.9. Apoptotik hücre ölümü mekanizmaları**

Apoptozis mekanizması çok sayıda biyomolekülün yer aldığı, enerji bağımlı karmaşık bir mekanizmadır. Yapılan araştırmalar sonucunda hücrelerde; Ölüm reseptörleri aracılı apoptotik yol, Mitokondri aracılı apoptotik yol, Granzim aracılı apoptotik yol ve ER aracılı apoptotik yol olmak üzere 4 temel apoptotik mekanizma belirlenmiştir [461].

#### **1.9.1. Ölüm reseptörü aracılı apoptotik yol**

Çeşitli sitokinler, büyüme faktörlerindeki eksiklikler veya ölüm reseptörlerine bağlanabilecek ligandlarının varlığı, ölüm reseptörü aracılı apoptotik mekanizmayı aktif hale getirmektedir. Ligand-reseptör etkileşimi sonucunda reseptörde oluşan konformasyonel değişimler kaspazlar ve Bcl-2 proteinlerinin de dâhil olduğu çok sayıda proteinin rol oynadığı apoptozis mekanizmasının başlamasına neden olur. Ölüm reseptörü aracılı apoptozis mekanizması Fas-FasL aracılı yol, TNF $\alpha$ -TNFR1 aracılı yol ve TRAIL-TRAILR aracılı yol olmak üzere ligand-reseptör kompleksindeki farklılıklara göre 3 grupta incelenmektedir [461].

##### **1.9.1.1. Fas-FasL aracılı apoptotik yol**

FasL, reseptörü olan Fas'a bağlandığında, monomerik durumda bulunan üç adet Fas reseptörü hücre zarında biraraya gelir. Böylece Fas reseptörü oligomerize olur [462]. Fas-FasL etkileşiminin kurulması ile reseptörün sitoplazmik kuyruğunda

konformasyonel bir değişim meydana gelir. Bu değişimin etkisi ile sitozolde serbest halde bulunan FADD adaptör proteini hücre zarına doğru çekilir [463]. Zira yönelen FADD, Fas reseptörünün sitoplazmik kuyruğunda bulunan DD bölgesine, kendi yapısında bulunan DD bölgesi ile bağlanır. Bu bağlanma, inaktif durumda bulunan prokaspaz 8 enziminin sitoplazmadan hücre zarına doğru yönelmesinde neden olur [464]. Hücre zarına ulaşan prokaspaz 8 enzimi yapısında bulunan DED bölgesi ile FADD adaptör proteininin yapısında bulunan DED bölgesine bağlanır. “Fas reseptörü-FADD adaptör proteini-prokaspaz 8” enziminden oluşan bu üçlü kompleks “ölüm indükleyici sinyal kompleksi (DISC; death inducing signaling complex)” olarak adlandırılır [465], [466].

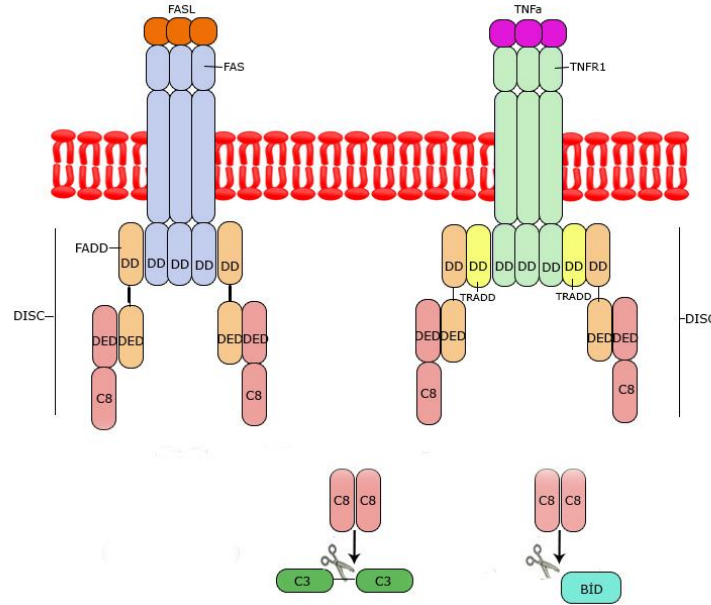
Prokaspaz 8 enziminin yapısında bulunan DED bölgesi ile FADD adaptör proteinine bağlanması enzimin aktif hale geçmesi için sinyal görevi görür. Prokaspaz 8 enzimin aktivasyonundaki ilk basamak homodimerizasyondur. DISC yapısı iki adet prokaspaz 8 enziminin karşılıklı olarak biraraya gelmesi için platform oluşturur. Bu homodimerizasyon prokaspaz 8 enziminin kendi kendini kesmesine (otokatalitik kesim) neden olur [467].

Prokaspaz 8 enziminin aktivasyonu sırasında ilk olarak katalitik domaini oluşturan büyük ve küçük alt birimler arasındaki 374. ve 384. Aspartik asit rezidülerinden kesim gerçekleşir [467]. Ardından, prodomain ile katalitik domain arasındaki 216. Aspartik asit rezidüsünden kesim yapılır. Bu kesim enzimin hücre zarından ayrılarak sitozole verilmesi için gereklidir [468]. Kesimler sonucunda oluşan p10 ( $\alpha$ ) ve p18 ( $\beta$ ) birimleri karşılıklı olarak biraraya gelerek ( $\alpha_2\beta_2$ ) Aktif kaspaz 8 enzimini oluşturur. İşlenmiş olan aktif enzim DISC yapısından ayrılarak, sitozole salınır [467], [468].

Büyük ve küçük alt birimlerin arasında gerçekleşen ilk kesimin doğruluğu, enzimin aktivitesi için kritiktir. Bu nedenle, ilk olarak bu iki bölge arasındaki noktadan kesim gerçekleştirilir. Bu şekilde işlenmemiş ya da hatalı işlenmiş olan enzimin sitozole salınmasını engellenmiş olur. Daha sonra prodomain ile katalitik domainler birbirinden ayrılır. Bu kesim ile hücre zarından ayrılan Aktif kaspaz 8 enzimi sitozole verilmektedir [467].

Aktif kaspaz 8 enziminin sitoplazmada iki önemli substratı vardır. Substratlardan biri çok sayıda biyomolekülün kesilmesinden ve buna bağlı olarak apoptotik

morfolojinin ortaya çıkmasından sorumlu olan kaspaz 3 enzimidir. Prokaspaz 3 şeklinde sentezlenen kaspaz 3 enzimi sitoplazmada inaktif dimerler halinde bulunur [392]. Aktif kaspaz 8 enzimi, prokaspaz 3 enzimini prodomain ve katalitik domainler arasında yer alan bağlayıcı bölgeden keser. Bu bağlayıcı bölgenin kesilmesiyle prokaspaz 3 enziminin büyük ve küçük katalitik alt birimleri birbirinden ayrılır [469]. Prokaspaz 3 enziminin aktivasyonu için gerekli olan son aşama 2 büyük ve 2 küçük alt birimin karşılıklı olarak biraraya gelmesidir. Bu şekilde büyük ve küçük alt birimleri içeren bir heterotetramer oluşur. Bu heterotetramer, hidrofobik etkileşimler ile bir arada tutulur ve biyolojik olarak aktivite gösteren Aktif kaspaz 3 enzimi meydana getirir [470]. Oluşan Aktif kaspaz 3 enzimi pek çok hedef proteini proteolitik olarak keser ve böylece apoptozis sürecine özgü hücre içi olaylar gerçekleşir (Şekil 1.10) [206].



**Şekil 1. 10.** Fas-FaL ve TNF $\alpha$ -TNFR1 aracılı apoptotik mekanizmalar görülmektedir. DD: ölüm bölgesini, DED: Death effector domaini, C8: Kaspaz 8, C3: Kaspaz 3'ü göstermektedir. ([471]'dan yararlanılarak yeniden çizilmiştir).

Aktif kaspaz 8 enziminin substratlardan bir diğeri ise proapoptotik bir Bcl-2 üyesi olan Bid proteindir. Sitoplazmada bulunan bu proteinin C-terminalinden kesilmesi ile 15 kDa molekül ağırlığına sahip bir C-terminal parçası oluşur (p15). Bu parça, tBid olarak adlandırılır. tBid sadece BH3 bölgesine sahiptir ve oluşan tBid, Bak ve Bax proteinlerinin aktifleşmesine neden olur. Aktif hale geçen Bax ve Bak

proteinlerinin mitokondri dışı zarına translokasyonu mitokondri iç ve dış zarları arasındaki boşlukta bulunan Sitokrom c'nin sitozole salınmasını sağlar. Sitozole salınan Sitokrom c'de kaspaz aktivasyonuna neden olarak hücreyi ölüme sürükler. Bu şekilde mitokondri ile ölüm reseptörleri aracılı apoptotik mekanizmalar birbirine bağlanır [419]. Ölen hücreler komşu hücreler ya da fagositler tarafından ortamdaki uzaklaştırılır [206].

#### **1.9.1.2. TNF $\alpha$ -TNFR1 aracılı apoptotik yol**

TNF $\alpha$ , reseptörü olan TNFR1'e bağlandığında monomerik formda bulunan üç adet TNFR1 biraraya gelerek trimerize olur [472], [473]. TNF $\alpha$ -TNFR1 etkileşiminin kurulması ile reseptörün sitoplazmik kuyruğunda konformasyonel bir değişim meydana gelir. Bu konformasyonel değişimin etkisi ile sitoplazmada bulunan ve TRADD adı verilen adaptör protein, reseptörün hücre içi kuyruğuna doğru çekilir. TRADD, yapısında içerdiği DD bölgesi ile TNFR1'in hücre içi kuyruğunda bulunan DD bölgesine bağlanır [410].

Reseptör ile TRADD bağlandıktan sonra, sitoplazmada bulunan FADD adaptör proteini hücre zarına doğru çekilir. Hücre zarına ulaşan FADD, yapısında bulunan DD bölgesi ile TRADD adaptör proteininin yapısında bulunan DD bölgesine bağlanır [474]. Bu bağlanma inaktif durumda bulunan prokaspaz 8 enziminin sitoplazmadan hücre zarına doğru yönelmesine neden olur. Hücre zarına gelen Prokaspaz 8 enzimi ise yapısında bulunan DED bölgesi ile FADD adaptör proteininin yapısında bulunan DED bölgesine bağlanır. Bu homofilik bağlanma ile Fas-FADD-prokaspaz 8 enziminden oluşan DISC kompleksi meydana gelir [466].

Fas-FasL aracılı apoptotik yolda olduğu gibi TNF $\alpha$  aracılı yolda da aktif duruma geçen kaspaz 8 enzimi, kaspaz 3 ve kaspaz 7 gibi efektör kaspazları aktif hale getirir. Efektör kaspazlar da çok sayıda substratı parçalayarak hücreyi ölüme sürükler (Şekil 1.10) [206].

#### **1.9.1.3. TRAIL-TRAILR1/TRAILR2 aracılı apoptotik yol**

TRAIL, hücre zarında bulunan TRAILR1 ve TRAILR2 reseptörlerine bağlanır. Bu bağlanma ile 3 adet reseptör biraraya gelerek trimerik bir reseptör kompleksi oluşturur [368]. Bu oligomerizasyon reseptörün sitoplazmik kuyruğunda

konformasyonel bir değişime neden olur ve sitozolde bulunan FADD adaptör proteini hücre zarına doğru çekilir. Reseptörün hücre içi kuyruğuna FADD, FADD adaptör proteinine ise prokaspaz 8 enzimi bağlanır. Bunun sonucunda diğer ölüm reseptörleri yollarında olduğu gibi DISC oluşur ve inaktif durumdaki prokaspaz 8, Aktif kaspaz 8 enzimi haline gelir [394]. Başlatıcı bir kaspaz olan Aktif kaspaz 8; kaspaz 3 ve kaspaz 7 gibi efektör kaspazları aktif hale geçirerek hücreyi ölüme sürükler [467].

### **1.9.2. Mitokondri aracılı apoptotik yol**

Hücreler, ölüm reseptörlerine bağlanan ligandların yanı sıra; iyonize radyasyon, viral enfeksiyon, serbest radikallerden dolayı oluşan oksidatif hasar, hücre içinde  $Ca^{+2}$  iyonu konsantrasyonunun artışı, pH'nın azalması ve DNA hasarı sonucunda da ölmektedir [475], [476]. Hücre içinde oluşan bu uyarılar mitokondri aracılı ya da intrinsik apoptotik yolun aktivasyonuna neden olmaktadır. Hücre ölümü terminoloji komitesinin 2009 yılında yapılan toplantısında mitokondri aracılı apoptotik yol; kaspaz bağımlı ve kaspaz bağımsız olmak üzere ikiye ayrılmıştır [296].

#### **1.9.2.1. Kaspaz bağımlı mitokondri aracılı apoptotik yol**

Mitokondri; dış zar, iç zar, zarlar arası bölge ve matriks olmak üzere 4 kısımdan oluşan ve hücrede enerji üretiminden sorumlu olan organeldir. Mitokondri dış zarının seçici geçirgenliği (MOMP; mitochondria outer membrane permeability) apoptotik süreçte anahtar rol oynar [477]. Mitokondri aracılı apoptozis, mitokondrinin MOMP'sinin ve buna bağılı olarak işlevinin bozulması olarak tanımlanmaktadır [478]. MOMP, Bcl-2 protein ailesi tarafından kontrol edilmektedir [476].

Mitokondri aracılı apoptotik mekanizmanın anahtar molekülü ise Sitokrom c'dir. Mitokondride normalde iç ve dış zarlar arasında bulunan Sitokrom c, apoptotik uyarıyı takiben mitokondriden sitozole salınmaktadır [416]. Yapılan çalışmalarda, Bcl-2 proteinlerinin; mitokondri zarında yeni porlar oluşturarak, önceden var olan porların açılmasını sağlayarak ya da mitokondri dış zarının lipid konsantrasyonunu değiştirerek mitokondri zar geçirgenliğini etkiledikleri belirtilmiştir. Porlar açıldığında ise zarlar arasında bulunan Sitokrom c, sitozole salgılanmaktadır [479].



Sitokrom c'nin sitozole salınma mekanizması tam olarak ortaya konulamamıştır. Bu mekanizma ile ilgili olarak çok sayıda model öne sürülmüştür. Bu modellerden birinde mitokondri iç zarındaki geçirgenliğin değişimi sonucu Sitokrom c'nin sitozole salındığı öne sürülmektedir. Sağlıklı hücrelerde mitokondri iç zarında ADP/ATP derişimini kontrol eden "Adenozin nükleotid translokaz (ANT) enzimi" bulunur [480]. Stres koşullarında bu enzimde konformasyonel değişiklik meydana gelir. Bu konformasyonel değişimle birlikte ANT enzimi ligand spesifik bir translokazdan non-spesifik bir por haline gelir. İç zar ve dış zar arasındaki su ve iyonlar mitokondri matriksine geçer. Matriks, suyun girişi ile birlikte şişer. Bunun sonucu olarak iç zar, dış zara doğru genişler. İç zarın dış zara temas ettiği noktalarda dış zarda yeni porlar oluştuğu ve Sitokrom c'nin mitokondriden sitozole salındığı öne sürülmektedir [475].

İkinci modelde "voltaj bağımlı anyon seçici kanal protein 1 (VDAC)" görev yapmaktadır. VDAC 1 sağlıklı hücrelerde mitokondri dış zarında yerleşmiş olan ve sitozolden mitokondriye anyon geçişini kontrol eden bir transmembran proteindir. Apoptotik uyarı ile birlikte sitozolde inaktif durumda olan Bax proteini dimerize olarak aktifleşir ve mitokondri dış zarındaki VDAC 1'e bağlanır. Bax'ın VDAC 1'e bağlanması kanalın konformasyonunu değiştirir ve açılan kanaldan Sitokrom c sitozole salınır [475].

Üçüncü modelde ise var olan kanallardaki değişiklikten ziyade yeni bir por oluşumunun gerçekleştiği ileri sürülmektedir. Apoptotik uyarıyı takiben aktif hale geçen üç adet Bax proteininin C-terminal bölgeleri ile mitokondri dış zarına yerleştiği ve burada protein bir por oluşturduğu belirlenmiştir [481], [437].

Dördüncü modelde ise Bax proteininin apoptotik uyarıyı takiben aktifleşerek mitokondri dış zarına bağlandığı ve buradaki lipid konsantrasyonunu değiştirerek lipid porlar oluşturduğu ifade edilmektedir [482].

Sonuç olarak önerilen bu modellerin tamamında MOMP bozulur ve mitokondride zarlararası boşlukta bulunan Sitokrom c sitozole salınır. Sitozole salınan Sitokrom c, sitoplazmada bulunan "Apoptotic protease activating factor 1'e (Apaf-1)" bağlanmaktadır. Apaf-1, ilk olarak *C. elegans*'da CED-4 olarak tanımlanmıştır [483]. Apaf-1 proteininin yapısı incelendiğinde, N-terminalinde CARD bölgesinin varlığı belirlenmiştir. Bu CARD bölgesinin Apaf-1'in apoptotik fonksiyonu için

gerekli olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Proteinin C-terminalinde ise Triptofan ve Aspartik asit amino asit rezidülerinin 40 defa tekrarlanması ile oluşan ve “WD-40 bölgesi” olarak adlandırılan 13 adet tekrar bölgesi içerdiği saptanmıştır [484]. Yapılan çalışmalarda WD-40 tekrar bölgesinin apoptozis inaktif durumdayken proteinin N-terminalindeki CARD bölgesini kapattığı ve Kaspaz 9-Apaf-1 etkileşiminin bu şekilde engellendiği belirlenmiştir. Bu şekilde hücreler apoptozisten korunmaktadır [485].

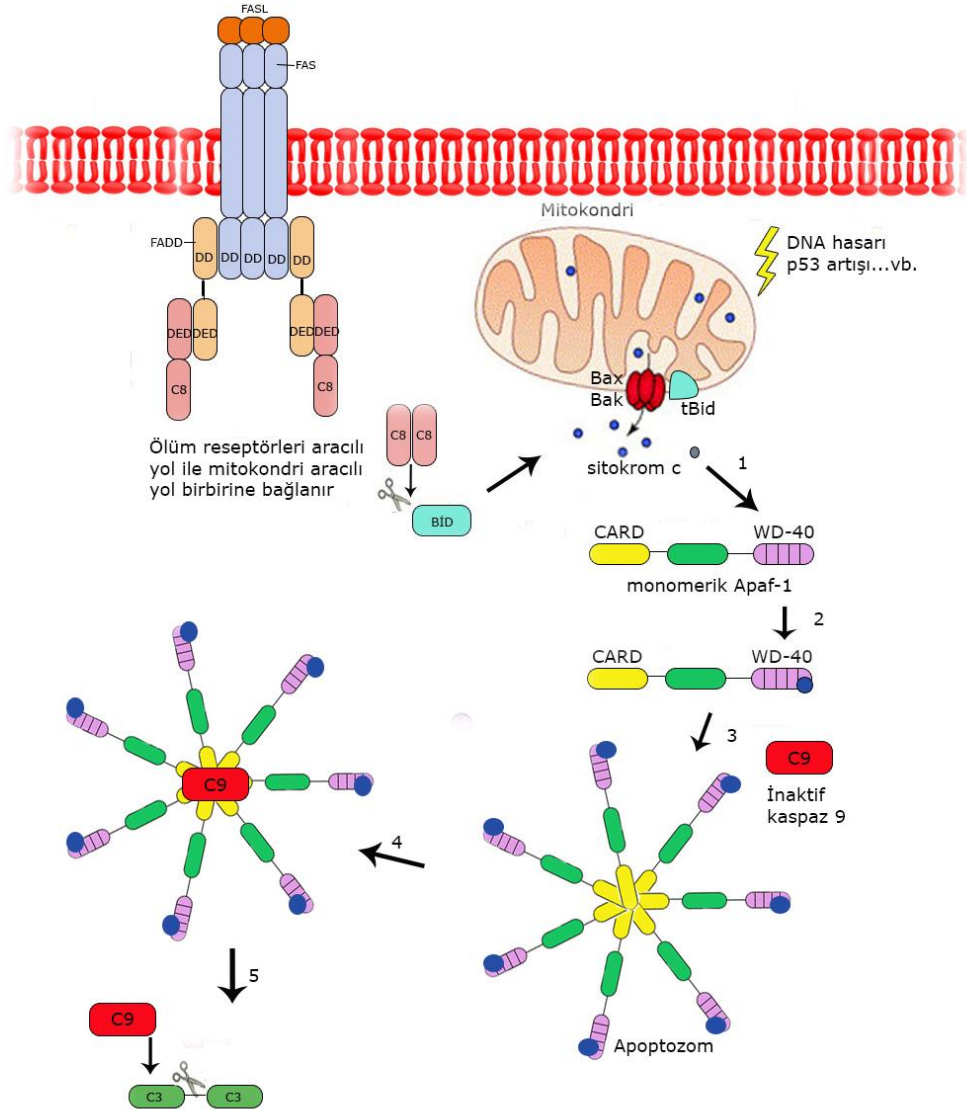
Apoptotik uyarı ile birlikte mitokondriden sitozole gelen Sitokrom c, Apaf-1’in C-terminalinde bulunan WD-40 tekrar bölgesine bağlanır [486]. Sitokrom c’nin bağlanması Apaf-1 proteininde konformasyonel bir değişikliğe neden olur. Bu bağlanma inaktif bir monomer olan Apaf-1 proteininin oligomerizasyonuna neden olmaktadır. Bu oligomerizasyon sonucu proteinin yapısındaki CARD bölgesi açığa çıkar. Sonuçta, 7 adet Apaf-1, 7 adet Sitokrom c ve 7 adet ATP molekülü biraraya gelerek “apoptozom” olarak adlandırılan tekerlek benzeri kompleksi (Wheel like) oluşturur (Şekil 1.11) [487], [488].

Bu kompleksin oluşumuyla sitozolde bulunan prokaspaz 9 enzimi Apaf-1 proteininin CARD domaine doğru çekilir. Prokaspaz 9, N-terminalinde bulunan CARD bölgesi ile Apaf-1’in N-terminalinde bulunan CARD bölgesine bağlanır [489]. Prokaspaz 9’un, aktif kaspaz 9’a dönüşüm mekanizması henüz tam olarak ortaya konmamıştır. Yapılan çalışmalarda kaspaz 9 aktivasyonu ile ilgili olarak iki farklı model ortaya konmuştur.

Bu modellerden birinde, apoptozom kompleksinin çok sayıda prokaspaz 9 enzimini biraraya topladığı ve bölgesel olarak prokaspaz 9 enzim konsantrasyonunun arttığı öne sürülmektedir. Sonuçta, birbirine yakın olarak biraraya gelen prokaspaz 9 enzimlerinin dimerize olarak aktif hale geçtiği ifade edilmektedir. Diğer modelde ise apoptozom kompleksine bağlanan prokaspaz 9 enziminin yapısında konformasyonel bir değişim olduğu ve bu değişimin de enzimin katalitik aktivitesini arttırdığı belirtilmektedir. Bu modele göre prokaspaz 9 aktivasyonu için sadece enzimlerin konsantrasyonunun artması yeterli değildir, mutlaka konformasyonel değişime ihtiyaç vardır [490].

Sonuçta prokaspaz 9, aktif kaspaz 9 haline gelir ve şelale şeklinde reaksiyonlardan oluşan kaspaz kaskadını başlatır. Aktif kaspaz 9 enzimi, kaspaz 3

enzimini aktif hale getirir. Aktif kaspaz 3 enzimi ise hem çok sayıda substratı, hem de daha fazla prokaspaz 9 enziminin aktivasyonunu sağlayarak pozitif geri bildirimle daha fazla enzimin aktif hale gelmesini sağlar. Bu şekilde hücre ölüme sürüklenir (Şekil 1.11) [491]. Mitokondri, apoptotik yolların kesiştiği kavşak noktasıdır. Bu nedenle mitokondriden Sitokrom c'nin sitozole salınması apoptotik süreçte geri dönüşümsüz evreyi ifade eder [492].



**Şekil 1. 11.** Kaspaz bağımlı mitokondri aracılı apoptozis mekanizması. Sitokrom c mitokondriden salınır (1), Sitokrom c monomerik durumda bulunan Apaf-1 molekülünün WD-40 bölgesine bağlanır (2), Apoptozom oluşur (3), inaktif durumdaki kaspaz 9 enzimi yapısındaki CARD bölgesi ile apoptozomun CARD bölgesine bağlanır ve aktif duruma geçer (4), aktif kaspaz 9 enzimi inaktif kaspaz 3 enzimini keserek aktifleştirir (5) ([400]'den yararlanılarak yeniden çizilmiştir).

### 1.9.2.2. Kaspaz bağımsız mitokondri aracılı apoptotik yol

Mitokondriden Sitokrom c dışında, “apoptozis uyarıcı faktör (AIF)”, smac/diablo ve endonükleaz G gibi biyomoleküller de salınır. Bu moleküllerden biri olan AIF, 69 kDa molekül ağırlığına sahip, 613 amino asit uzunluğunda bir flavoproteindir. Kaspaz enzimleri bulunmayan *Dictyostelium discoideum* cıvık mantarında AIF'nin apoptozisi uyardığı belirlenmiştir [493].

AIF proteininin yapısı incelendiğinde N-terminalinde “Mitokondriyal lokalizasyon dizisi (MLS)” içerdiği belirlenmiştir. Sitoplazmada sentezlenen AIF, bu sinyal dizisi ile mitokondriye hedeflenir. Mitokondriye gelen AIF, iç ve dış zarları arasındaki boşluğa yerleşmektedir [479]. Burada proteolitik olarak kesime uğrar ve proteini mitokondriye hedefleyen MLS dizisi ayrılır. Apoptotik uyarıyı takiben Sitokrom c ile birlikte sitoplazmaya salınan AIF, kaspaz enzimlerinden bağımsız bir şekilde kromatin yoğunlaşmasına ve DNA fragmentasyonuna neden olmaktadır [494].

### 1.9.3. Granzim aracılı apoptotik yol

İlk olarak 1986 yılında Masson ve çalışma grubu [495] tarafından tanımlanan Granzimler, Sitotoksik T lenfositlerin ve doğal öldürücü hücrelerin (NK hücreleri) sitoplazmik granüllerinde bulunan Serin proteaz enzimleridir. Granzimler bu sitoplazmik granüller içinde hedef hücrenin zarında por oluşturan perforinler ile birlikte paketlenmişlerdir [496]. Sitotoksik T lenfositler ve NK hücreleri virüsle enfekte hücreye veya kanser hücrelerine bağlandığında granzim ve perforin içeren granüller hücre zarına yönelir ve iki hücrenin temas ettiği bölgeye ekzositozis ile salgılanır. Hücreler arası boşluğa salınan Perforinlerin hedef hücre zarına bağlanarak burada por oluşturduğu belirlenmiştir. Granzimler bu perforin porlarından hedef hücreye girer. Granzimlerin yanı sıra, perforin porlarından hücre içine  $Ca^{+2}$  girişi de olmaktadır. Bu durum sitozoldeki  $Ca^{+2}$  miktarının hızla artmasına neden olmaktadır [497].

Hedef hücre içine giren Granzim, sitoplazmada inaktif durumda bulunan prokaspaz 8 enzimini, biyolojik olarak aktif durumdaki kaspaz 8 enzimine dönüştürdüğü belirlenmiştir. Aktif duruma geçen kaspaz 8 enzimi, kaspaz 3 ve kaspaz 7 gibi efektör kaspazları aktif hale geçirir. Efektör kaspazlar da çok sayıda substratı parçalayarak virüsle enfekte hücreler veya kanser hücrelerinde apoptotik mekanizmanın uyarılmasına neden olmaktadır [206].

#### **1.9.4. Endoplazmik retikulum aracılı apoptotik yol**

“Endoplazmik retikulum (ER)” sitoplazmada bulunan tübül, vezikül ve sisternalardan oluşan zarlar sistemidir. Bu sistem proteinlerin post translasyonel modifikasyonları ve doğru şekilde katlanmalarında rol oynar [498]. Hatalı katlanmış proteinlerin birikimi ER’de strese yol açmaktadır. Bu stres henüz tam olarak aydınlatılamamış bir mekanizma ile apoptozisi indüklemektedir [499].

Memeli hücrelerinde, ER lümeninde katlanmamış proteinlerin birikimi sonucu oluşan strese rol oynayan üç adet reseptör tanımlanmıştır. ER zarında bulunan bu reseptler “İnositol-requiring protein-1 (Ire1)”, “Activating transcription factor 6 (ATF6)” ve “Protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase (PERK)” olarak adlandırılan transmembran proteinleridir. Bu reseptörlerin ER lümenine bakan kısımları bir şaperon proteini olan “Binding immunoglobulin protein (BiP)” ile ilişkilidir. ER stresi varlığında BiP, bu reseptörlerden ayrılarak hatalı katlanmış proteinlere bağlanır. Bu durumda zarıda bulunan reseptörler biraraya gelerek oligomerize olur [499]. Bu reseptörler ayrı ayrı çok sayıda proteini etkileyerek ER stresini ortadan kaldırır. Eğer hatalı katlanmış protein miktarı fazla ise bu reseptörlerin aktivitesi yeterli olmamaktadır. Bu durumda, bu reseptörlerin “CHOP (CCAAT/ Enhancer Binding Protein (C/EBP) Homolog Protein)” adı verilen bir proteinin ifadesini arttırdığı gösterilmiştir. Bu faktörün ER aracılı apoptozisin indüklenmesinde rol oynadığı belirlenmiş ancak mekanizma henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. [500].

ER stresi aynı zamanda ER zarında yer alan Bax ve Bak proteinlerinde konformasyonel değişime neden olur. Bu değişimle birlikte Bax ve Bak proteinleri biraraya gelerek oligomerize olur. Oligomerize olan proteinlerin ER zarında por oluşumuna neden olduğu belirlenmiştir. Sitolln aksine ER lümeninde  $Ca^{+2}$  konsantrasyonunu yüksektir ve oluşan bu porlardan  $Ca^{+2}$  iyonunun sitozole salındığı belirlenmiştir. Sitolde  $Ca^{+2}$  konsantrasyonunun artması Kalpain enzimini aktif hale getirmektedir. Aktif Kalpain enziminin sitozolde inaktif durumda bulunan prokaspaz 12’yi keserek aktiveştirerek hücreyi lme sürüklediği ifade edilmektedir [501].

#### **1.10. Apoptotik hücrelerde gözlenen biyokimyasal ve morfolojik değişiklikler**

Ölüm reseptörleri aracılı ve mitokondri aracılı apoptotik yolların aktivasyonu sonucunda hücrelerde çeşitli biyokimyasal ve morfolojik değişiklikler meydana

gelmektedir. Bu değişiklikler aktif hale geçen efektör kaspazların sitoplazmada ve çekirdekte bulunan hedef proteinlerini parçalamaları sonucunda ortaya çıkar. Apoptozise bağlı olarak ortaya çıkan biyokimyasal değişimler hücre içinde  $Ca^{+2}$  artışı,  $Ca^{+2}$  bağımlı endonükleazların ve proteazların aktifleşerek DNA kırıklarına ve yapısal proteinlerin parçalanmasında neden olmasıdır. Apoptozis ile birlikte morfolojik olarak hücre hacminde azalma, hücre zarında tomurcuk oluşması, çekirdek hacminde azalma, DNA kırıklarının oluşması ve sitoplazmik organelerde değişiklikler gerçekleşir. En son aşamada apoptotik cisimcikler oluşur ve bu cisimcikler komşu hücreler veya immün sistem hücreleri tarafından ortadan kaldırılır. [265].

#### **1.10.1. Kromatin yoğunlaşması (kondensasyonu)**

DNA, ekirdek içinde kromatin halinde bulunur ve çekirdek kılıfına Lamin A, Lamin B1, Lamin C, Topoizomeraz II $\alpha$  ve “Nuclear mitotic apparatus protein (NuMa)” gibi çeşitli proteinlerin yardımıyla tutunur. Yapılan çalışmalarda apoptotik uyarı ile birlikte hücrenin çekirdeğinde DNA’nın yoğunlaştığı belirlenmiştir. Bu yoğunlaşma mekanizmasında görev alan enzimler ve görevleri ise henüz tam olarak aydınlatılamamıştır [502].

Tone ve çalışma grubunun 2007 yılında yaptıkları çalışmanın sonuçlarına göre, kromatin kondensasyonu ilk olarak DNA’nın, çekirdek kılıfına temas ettiği bölgede bir halka oluşturacak şekilde birikmesiyle başlar (ring condensation). Bu süreçte AIF proteininin görev yaptığı düşünölmektedir [503].

İkinci basamakta ise DNA’nın çekirdek kılıfına tutunduğu bölgedeki Adenin ve Timin amino asitlerince (AT bölgesi) zengin bölge kesilir [504]. Aynı zamanda, DNA’yı çekirdek kılıfına bağlayan proteinler de parçalanır [502], [505]. Böylece DNA ile çekirdek kılıfı arasındaki bağlantı kopar. Bu bağlantının kopması ile DNA, DNAaz aktivitesine duyarlı hale gelir. Apoptotik uyarı ile birlikte aktif duruma geçen DNAaz enzimlerinin etkisiyle çekirdekte yüksek moleköl ağırlıklı DNA parçaları oluşur (50-300 kb) [504]. Bu DNA parçaları incelendiğinde DNA’nın çekirdeğin periferinde adeta inci bir gerdanlık şeklinde bulunduğu belirlenmiştir. Son basamakta ise bu yüksek moleköl ağırlıklı DNA parçaları çekirdeğin merkezinde biraraya gelir ve kromatin kondensasyonu tamamlanır. Bu son basamağın enerji bağımlı olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur [503].

Arends ve çalışma grubu tarafından 1990 yılında timositlerle yapılan bir çalışmada kromatin kondensasyonunun DNA fragmentasyonunun gerçekleşmesi için gerekli olduğu gösterilmiş, ancak daha sonra hepatositler ve oligodendrositlerle yapılan araştırmalar bu sonuçları desteklememiştir. DNA kondensasyonu ve fragmentasyonu arasındaki ilişki hala araştırılmaktadır [504], [506], [507].

### **1.10.2. DNA kırıklarının oluşumu (fragmentasyonu)**

DNA kırıklarının oluşumu apoptozis mekanizmasına özgü önemli bir reaksiyondur. Bu reaksiyonu katalizleyen endonükleaz enzimi, “Kaspaz aktiviteli deoksiribonükleaz’dır (CAD)”. Sitozolde yeralan bu enzim normal şartlar altında hücreyi apoptozisten koruyan “kaspaz aktiviteli deoksiribonükleaz inhibitör (ICAD)” proteini ile bağlı halde bulunur. Apoptotik bir uyarı geldiğinde aktif duruma geçen efektör kaspazlar, sitoplazmada CAD’a bağlı bulunan ICAD inhibitör proteinini yıkarak CAD enzimini serbest bırakır [508].

Serbest kalan CAD enzimi sahip olduğu nükleer lokalizasyon sinyali ile çekirdeğe taşınır. Çekirdeğe giren CAD, çift zincirli DNA’yı tanıyarak nükleozomlar arasından DNA’yı kırar ve 180 (base pair) bp uzunluğunda DNA fragmentleri oluşturur. CAD enziminin fonksiyonu H1 Histon proteini tarafından düzenlenir. CAD enziminin H1 Histon proteini ile bağlanmasının internükleozomal yıkım için kritik basamağı olduğu ifade edilmektedir [509]. Oluşan 180 bp’lik DNA parçaları agaroz jel elektroforezinde yürütüldüğünde merdiven görünümü (ladder patern) meydana getirir ve bu şekilde hücrelerde apoptozis varlığı belirlenebilir. Ayrıca CAD aktivitesi sonucu oluşan DNA’daki serbest nükleotid uçlarının, işaretli dUTP’ler ile bağlanması TUNEL yönteminin de temelini oluşturmaktadır [510].

### **1.10.3. Hücre-hücre bağlantılarının bozulması**

Apoptotik uyarının ardından, ölen hücreler ile çevresindeki komşu hücreler arasındaki hücre-hücre bağlantıları bozulmaktadır. Apoptozis ile birlikte aktif hale geçen kaspaz 3 enzimi, adezyon kemerinde görev yapan  $\beta$ -katenin proteinini N-terminalinde ve C-terminalinde bulunan farklı bölgelerden kesmektedir. [511], [512]. N-terminal bölgesi kesilen  $\beta$ -katenin proteini hücreleri bir arada tutan Kaderin proteininin sitoplazmik kuyruğundan ayrılır. Bu durum Kaderin proteininin

zardaki stabilizasyonunu bozar ve proteinin ifadesi azalır. Karşılıklı hücrelerde bulunan Kaderin proteinleri arasındaki bağlantının kopması, hücrelerin birbirinden ayrılmasına neden olur. Sonuçta hücre-hücre bağlantıları bozulan apoptotik hücre yuvarlaklaşır [513], [514], [515]. Apoptozisin ilerlemesiyle birlikte Kaderin proteinlerinin de farklı bölgelerden kaspaz enzimleri tarafından kesildiği yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur [516].

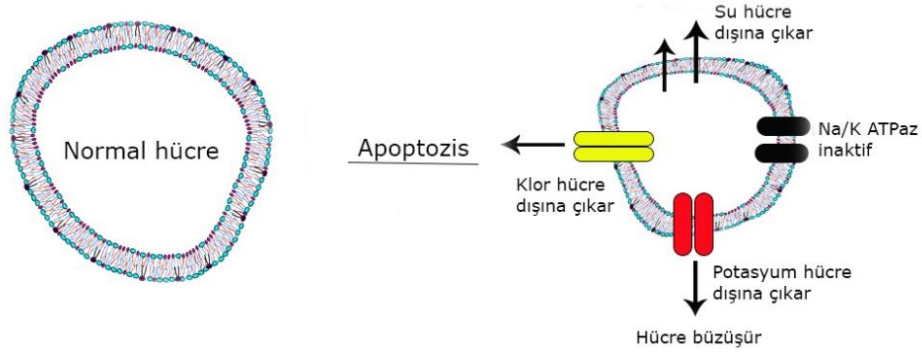
Sadece adezyon kemeri değil hücreleri birbirine bağlayan diğer bir bağlantı olan desmozomlar da apoptozis ile birlikte bozulmaktadır. Desmozomlar adezyon kemerinin altında yer alan düğme benzeri yapılardır. Desmoglein ve Desmocollin glikoproteinleri, hücreleri bir arada tutan bağlayıcı transmembran proteinleridir. Kaderin süper ailesinin üyesi olan bu proteinler “Desmozomal Kaderinler” olarak da adlandırılır. Bu proteinlerin sitoplazmik ucuna desmoplakin, desmoplakine ise tonofilamentler tutunur. Hücreyi çepeçevre kuşatan bu filamentlerin hem hücreleri bir arada tuttuğu, hem de hücreye mekanik dayanıklılık sağladığı belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda desmozomların yapısında bulunan desmoglein-3, desmocollin-3, desmoplakin 1 ve desmoplakin 2 proteinlerinin aktif kaspaz enzimleri tarafından parçalandığı gösterilmiştir. Bu şekilde desmozomların bozulduğu ve bu durumun apoptotik hücrelerin komşu hücrelerden ayrılmasında rol oynadığı saptanmıştır [517].

#### **1.10.4. Hücre büzüşmesi (cell shrinkage)**

Komşu hücre ile bağlantısı kopan apoptotik hücre, haciminin neredeyse yarısını kaybeder. Hücre büzülmesi (cell shrinkage) olarak adlandırılan bu süreç hücre zarında bulunan iyon kanallarındaki değişiklikler sonucu gerçekleşir [518]. Hücre içinde ve dışında iyonlar belirli bir konsantrasyonda bulunur. Hücre iyon dengesini korumak için büyük miktarda ATP harcamaktadır [519].

Normal koşullar altında hücre içinde  $K^+$  iyonu yaklaşık 140 mM konsantrasyonda bulunur ve bu iyon hücre içinde dışarıya göre daha fazladır [520]. Yu ve çalışma grubu [521] tarafından yapılan çalışmalarda apoptotik hücrelerde, hücre içinde  $K^+$  iyon konsantrasyonunun azaldığı belirlenmiştir. Apoptotik uyarıyla birlikte hücre zarında bulunan voltaj kapılı potasyum kanallarının sürekli açık kaldığı, bu nedenle hücre içinden dışına  $K^+$  iyonu çıktığı ve buna bağlı olarak da sitoplazmik  $K^+$  iyonu konsantrasyonunun azaldığı saptanmıştır [522], [523].





**Şekil 1. 12.** Hücre büzüşmesi ([524]'den yararlanılarak yeniden çizilmiştir).

Normal koşullarda hücre içinde  $K^+$  iyonu azaldığında  $Na^+/K^+$  ATPaz pompası ATP harcayarak hücre içinden dışına 3 molekül  $Na^+$  iyonu taşırken, hücre dışından içine 2 molekül  $K^+$  iyonu taşır. Ancak yapılan çalışmalarda apoptotik hücrelerde  $Na^+/K^+$  ATPaz pompasının inhibe olduğu belirlenmiştir. Bunun sonucunda hücrede azalan  $K^+$  dışardan alınarak telafi edilememektedir [525].  $K^+$  iyonunun hücreden çıkışı ile bozulan iyon dengesi sonucu,  $K^+/Cl^-$  simporter taşıyıcı proteininin yardımı ile  $Cl^-$  iyonu da hücreden dışarı çıkar. Böylece, hücre çevresinde ozmotik basınç artar. Çevrede artan ozmotik basınç nedeniyle, su difüzyon ile hücre dışına çıkar (Şekil 1.12). Böylece hacmi azalan apoptotik hücre, büzüşür [520], [525].

#### 1.10.5. Hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi

Aktin filamentleri yaklaşık 43 kDa molekül ağırlığına sahip evrimsel olarak korunmuş bir protein olan Aktin proteinlerinden meydana gelir. Aktin proteini G-aktin olarak adlandırılan globüler bir monomer halinde sentezlenir. Daha sonra bu monomerik birimler bir araya gelerek F-aktin adı verilen filamentöz bir yapı oluşturur [526]. Bu F-aktin zincirine "aktin bağlanma proteinleri (ABP)" adı verilen yardımcı proteinler bağlanır. Bu proteinlerle birlikte aktin filamentleri hücrenin şeklinin sağlanmasında, bölünmesinde ve hücre hareketinde önemli rol oynarlar. Apoptozis sürecinde sitoplazmada bulunan aktin filamentlerinin ve ABP'lerin de etkilendiği belirlenmiştir [54], [527].

"Madin Darby Canine Kidney (MDCK)" hücreleri ile yapılan bir hücre kültürü çalışmasında UV ile apoptozisin uyarılmasının ardından, hem apoptotik hücrelerin, hem de apoptotik hücre ile temas eden normal hücrelerin yan yüz bağlantı

bölgelerinde aktin ifadesinin arttığı görülmüştür. Bu aktin molekülleri “apoptotik aktin halkası” olarak adlandırılan bir halka yapısı oluşturmaktadır [528].

Apoptotik hücrelerde aktin birikimi kromatin yoğunlaşması ile eş zamanlı olarak apoptozisin erken aşamalarında gerçekleşmektedir. Komşu hücrelerde aktin moleküllerinin birikimine neden olan uyarıyla ilgili çalışmalar devam etmektedir. Bu amaçla yapılan bir çalışmada erken apoptotik, geç apoptotik ve apoptotik olmayan hücreler MCDK hücreleri ile aynı ortama konmuş ve sadece erken apoptotik hücrelerin apoptotik olmayan MCDK hücrelerinde aktin birikimini arttırdığı belirlenmiştir. Yan yüz bağlantı bölgelerinde biriken aktin filamentlerinin kasılarak hücre-hücre bağlantılarının ayrılmasına neden olduğu saptanmıştır. Bunun daha sonra detaylı olarak anlatılacak olan hücre zarı tomurcuklanmasının (blebbing) da başlangıcını oluşturduğu belirlenmiştir [528].

Apoptozisin geç evresinde ise aktin filamentlerinin efektör kaspazlar tarafından yıkıldığı saptanmıştır. Bu yıkım sonucu 15 kDa (tAktin) ve 31 kDa (Fractin) molekül ağırlığına sahip iki aktin parçası olduğu belirlenmiştir [529]. tAktin parçasının 293 T, HeLa ve A431 hücrelerinde hücre büzülmesi ve hücre zarının tomurcuklanmasında rol oynadığı gösterilmiştir [527], [529]. Ayrıca dışardan (ektopik olarak) bu 15kDa'luk tAktin parçası hücre kültürü ortamında hücrelere uygulandığında kaspaz aktivitesinden bağımsız olarak hücrelerde apoptozise özgü morfolojik değişikliklerin olduğu da rapor edilmiştir [527].

Aktin filamentlerinin yanı sıra “aktin bağlanma proteinlerinde (ABP)” de apoptozise bağlı olarak çeşitli değişiklikler olduğu gözlenmiştir. Apoptozis ile birlikte değişikliğe uğrayan ABP'lerden biri G-aktin birimlerinin bir araya gelerek F-aktin zincirlerini oluşturmasını engelleyen Timozin- $\beta$ 'dir. Normalde hücrelerde G-aktin/F-aktin dengesinin sağlanmasında görevli olan bu proteinin, apoptotik uyarıyla birlikte sentezinin arttığı belirlenmiştir. Artan Timozin- $\beta$ 'nin, G-aktin monomerlerinin bir araya gelerek filament oluşturmasını engellediği, bu şekilde monomerik formda kalan G-aktin nedeniyle hücre iskeletinin bozulduğu saptanmıştır [530].

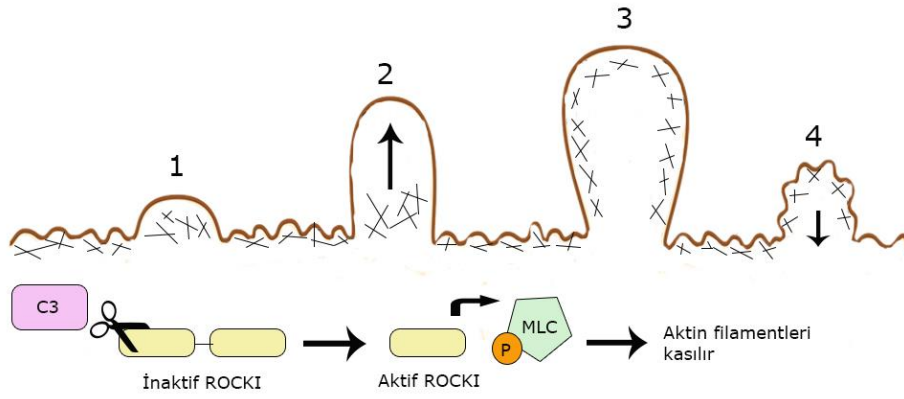
Sadece Aktin filamentleri değil mikrotübüller de apoptozise bağlı olarak bozulmaktadır. B50 rat nöron hücreleri sisplatin ile uyarıldığında mikrotübüllerin yapısında bulunan tübülün proteinlerinin daha kalın yığınlar oluşturmak üzere bir araya geldiği ve buna bağlı olarak da mikrotübüllerin yapısının bozulduğu

belirlenmiştir. Mikrotübüllerin bozulması hem hücre şeklinin bozulmasına, hem de hücre içi veziküler trafiğin aksamasına neden olmaktadır [531]. Sitokeratin, vimentin, nükleer laminler gibi ara filamentler de apoptotik uyarı ile aktiveleşen kaspaz enzimlerinin substratlarıdır [532], [533], [534].

#### **1.10.6. Hücre zarı tomurcuklanması (Blebbing)**

Hücre-hücre bağlantılarının ayrılmasının ardından apoptotik hücre zarında çıkıntılar oluşmaya başlar. Bu oluşum “hücre zarı tomurcuklanması” ya da “blebbing” olarak adlandırılır [535]. Bu olayın mekanizması araştırıldığında Rho adı verilen bir G proteininin ve “Rho ilişkili kinaz (ROCK I)” aktivitesinin önemli olduğu belirlenmiştir [536]. G protein ailesi yaklaşık 21-35 kDa molekül ağırlığına sahip; Rho, Rac, Rab ve Ras gibi proteinlerden oluşan ve hücre hareketi, proliferasyonu, farklılaşması ve hücre adezyonu gibi biyolojik süreçlerde görev alan bir protein ailesidir. Bu ailenin bir üyesi olan Rho proteini, aktin filamentlerinin organizasyonunu düzenlemektedir. Rho proteini normal koşullar altında GDP ile bağlı halde bulunmaktadır. GDP ile bağlı bu form inaktif Rho olarak tanımlanır. Rho'nun GTP ile bağlanması aktivelediğini göstermektedir [537]. Aktif duruma geçen GTP ile bağlı Rho proteini, sitoplazmada bulunan ROCK I enzimine bağlanır. Bu bağlanma ile inaktif durumdaki ROCK I enzimi aktif duruma geçer [538].

ROCK I enzimi aktif duruma geçtiğinde sitoplazmada bulunan “Miyozin hafif zinciri (MLC)” fosforiller. Bu fosforillenme reaksiyonu ile MLC, aktin filamentlerinin kasılmasına neden olur. Bu şekilde hücre hareketi ve hücre bölünmesi için gerekli olan şekil değişiklikleri gerçekleştirilmiş olur. Rho/Rho kinaz yolağının hücre iskeletinin düzenlenmesindeki rolünün belirlenmesinin ardından, bu sinyal yolunun apoptozise bağlı olarak oluşan hücre zarı tomurcuklanmasında da rolü olabileceği düşünülmüştür [539], [540]. Apoptozis ile birlikte aktiveleşen kaspaz 3 enziminin substratlarından biri de ROCKI enzimidir. Bu enzimin normal şartlar altında sitoplazmada inaktif halde bulunmasını sağlayan düzenleyici bölgesi, aktif kaspaz 3 tarafından kesilir [541]. Kesilen ROCKI enzimi aktif hale geçer. Aktif ROCK I enzimi ise MLC'nin aşırı şekilde fosforilasyonuna ve aktin filamentlerinin kasılmasına neden olur [542].



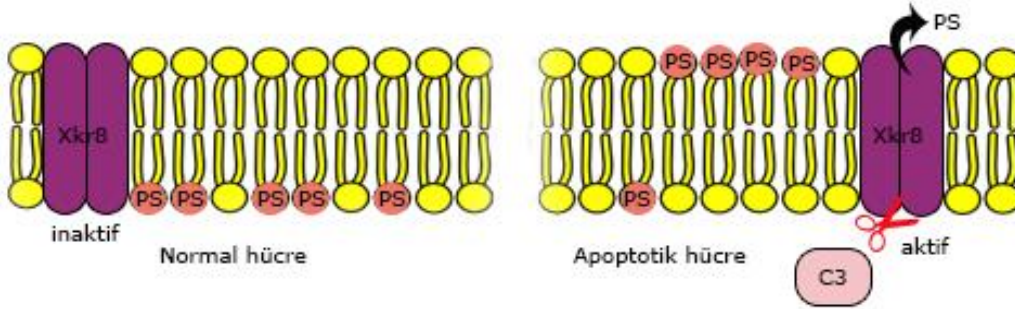
**Şekil 1. 13.** Hücre zarı tomurcuklanması. Aktin filamentlerinin kasılması ile hücre zarı ile bağlantısı kopar, bu kasılda ROCK1 enziminin rol oynamaktadır (1). Sitoplazma oluşan tomurcuğa doğru akar (2). Tomurcuğun giderek büyür (3) ve aktin filamentlerinin yeniden şekillenmesi ile tomurcuk bir miktar küçülür (4) ([535]'den yararlanılarak yeniden çizilmiştir).

Apoptotik hücrelerde periferde biriken ve apoptotik aktin halkasını oluşturan, aktin filamentlerinin kasılması ile hücre zarının tomurcuklanmaya başladığı belirtilmiştir. Bu aşama “çekirdeklenme” veya “nükleasyon” basamağı olarak tanımlanır. Bu aşamadaki en önemli nokta oluşan tomurcukta hücrenin korteksinde bulunan aktin ve miyozin filamentleri ile hücre zarı arasındaki bağlantının kopmasıdır. [535], [536]. İkinci aşama “uzama” aşamasıdır. Bu aşamada sitoplazma blebe doğru akar ve bu bölgede büyük bir şişkinlik oluşur [543]. Oluşan bu şişkinlik sitoplazmanın hidrostatik basıncı nedeniyle meydana gelmektedir [544]. Bu noktada hücre zarının da genişlemesi gerekmektedir. Çünkü hücre zarının belirli bir noktaya kadar esneme yeteneği vardır. Sitozol ile birlikte bölgeye taşınan lipidler zara eklenerek hücre zarının parçalanmasını engeller [545]. Son aşamada tomurcuğun korteksinde aktin miyozin filamentlerinden oluşan hücre iskeleti tekrar şekillenir. Bu durumda, tomurcuk bir miktar küçüldüğünden bu evre “küçülme” ya da “büzüşme” evresi olarak adlandırılır (Şekil 1.13). Bu evrede “Erzin, Radiksin ve Moezin proteinlerinin (ERM proteinleri)” ifadesinin arttığı yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur ancak mekanizma henüz tam olarak aydınlatılamamıştır [535].

#### 1.10.7. Hücre zarı asimetrisinin değişmesi

Hücre zarının lipid tabakasının dış yüzünde fosfatidilkolin ve sfingomiyelin bulunurken, iç yüzünde fosfatidilserin (PtdSer), fosfatidilinositol ve fosfatidiletanol

amin bulunur. Bu durum “hücre zarı asimetrisi” olarak adlandırılır. Hücre zarının bu asimetrik yapısı, zarda bulunan Filipaz, Flofaz ve Skramblaz enzimleri tarafından sağlanır [546].



**Şekil 1. 14.** Apoptotik hücrelerde fosfatidilserin (PS) hücre zarının iç yüzünden dış yüzüne taşınmaktadır. ([547]'den yararlanılarak yeniden çizilmiştir)

Apoptozis ile birlikte hücre zarının iç yüzünde yer alan Fosfatidilserin (PtdSer), yer değiştirerek hücre zarının dış yüzüne yerleşir [546]. Bu yer değişikliğinde “X Kell Blood Group Precursor-Related Family, Member 8 (Xkr8)” enziminin görev yaptığı 2013 yılında Suzuki ve çalışma grubu [547] tarafından yapılan çalışmada gösterilmiştir. Normal koşullar altında hücre zarında bulunan bu enzim, inaktif durumdadır. Apoptozisin uyarılması ile gerçekleşen kaspaz aktivasyonu sonucu bu enzim efektör kaspaz 3 ve kaspaz 7 enzimleri tarafından kesilir. Bu kesim Xkr8 enziminin aktifleşmesine neden olur. Aktif Xkr8 enzimi, hücre zarının iç yüzünde bulunan PtdSer molekülünün, hücre zarının dış yüzüne taşınmasına neden olur (Şekil 1.14). Yapılan çalışmalarda apoptotik hücrenin dış yüzeyinde PtdSer miktarının normal hücrelere göre 280 kat arttığı gösterilmiştir [548]. Dış yüze taşınan PS, fagositler için “beni ye” sinyali olarak algılanır. Yapılan transfeksiyon çalışmalarında, hücre zarının dış yüzünde PS bulunan normal nöronların, makrofajlar tarafından fagositozla ortamdan uzaklaştırıldığı gösterilmiştir. Bu durum nörodejeneratif hastalıklarda PS'nin hücre içinden dışına taşınmasını sağlayan Xkr8 enziminde meydana gelen bir defektin rolü olabileceğini göstermiştir [547].

#### 1.10.8. Organellerde meydana gelen değişiklikler

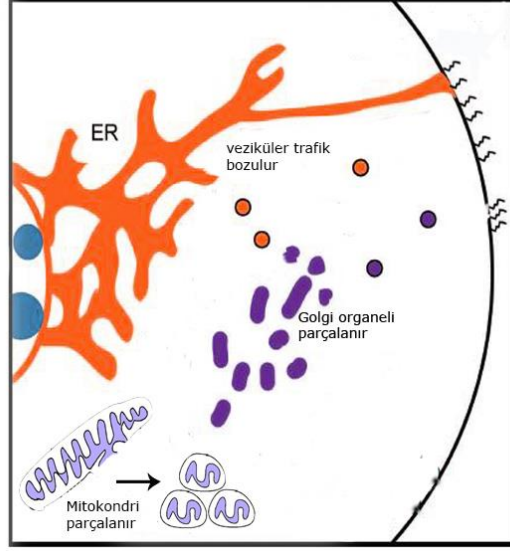
Apoptozis ile ölen hücrelerin organellerinde de çeşitli değişiklikler olduğu yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur (Şekil 1.15). Apoptozis mekanizmasının başlaması

ile **Endoplazmik retikulum (ER)** genişler ve şişer. HeLa hücreleri ile yapılan çalışmalarda apoptotik uyarının ardından ER'nin sisternalarının genişleyerek tüm hücre sitozolünü kapladığı belirlenmiştir [549]. Apoptozisin ilerlemesiyle birlikte ER, hücre zarına temas eder [550]. ER'nin hücre zarına temas etmesi sonucu ER lümeninde bulunan proteinlerin bir kısmı apoptotik hücre zarına yerleşirken, bir kısmı ECM'ye salgılanır. Özellikle ER proteinlerinden Calreticulin ve Calnexin'in fagositler tarafından "beni ye" sinyali olarak algılandığı belirlenmiştir [551]. ER'nin fonksiyonunun bozulması ER-Golgi organeli arasındaki veziküler trafiğin de bozulmasına neden olmaktadır. Apoptozisin ilerlemesiyle birlikte ER'nin parçalara ayrıldığı ve apoptotik cisimcikler içinde çekirdekle birlikte paketlenildiği belirlenmiştir [552].

ER'nin aksine **Golgi organeli** apoptotik uyarı ile birlikte parçalara ayrılmaktadır [553]. Golgi organelinde bulunan "Golgi ReAssembly Stacking Protein (GRASP65)", Golgin-160, "Golgi vezikül transport proteini (p115)", Giantin ve Syntaxin gibi proteinler, apoptozis ile birlikte aktif duruma geçen kaspaz enzimleri tarafından kesilir [552], [554], [555]. Bu proteinlerin parçalanmasının Golgi organelinin parçalanmasında görev yaptığı gösterilmiş, ancak mekanizma henüz tam olarak ortaya konamamıştır. Yapılan çalışmalarda Golgi organelinde bulunan prokaspaz 2 enziminin apoptotik uyarıya bağlı olarak aktifleştiği ve Golgi organelinde bulunan bu proteinlerin yıkımında rol oynadığı gösterilmiştir [554]. Ayrıca efektör kaspazlar kaspaz 3 ve kaspaz 7 enzimleri de bu yıkımda görev yapmaktadır. Parçalara ayrılan Golgi organeli sitoplazmada belli bölgelerde yoğun agregatlar oluşturur. Golgi organelinin dağılması ile veziküler trafik de bozulmaktadır [550].

**Lizozomlar** ökaryotik hücrelerin sitoplazmasında bulunan ve çok sayıda enzim içeren organellerdir. Apoptozis ile birlikte lizozomların küçüldükleri fakat sayılarının kontrol hücrelerine göre arttığı saptanmıştır [556]. TNF $\alpha$ , TNFR1'e bağlandığında lizozomlarda bulunan Sfingomiyelinaz ve Seramidaz enzimleri aktif hale gelir. Bu enzimler lizozomlardaki Sfingozin miktarını artırır. Sfingozin, deterjan özelliğine sahip bir moleküldür ve bu özelliği nedeniyle lizozom zarının geçirgenliğini bozar. Lizozom zarınının geçirgenliğinin bozulması ile lizozom lümeninde bulunan ve Katepsin adı verilen enzimler sitozole salınır [556], [557]. Katepsin enzimleri Sistein proteazlardır. Lizozomlarda inaktif durumda bulunan bu enzimler Sfingozin

tarafından aktif hale getirilir. Aktif Katepsin enzimleri de kaspaz enzimleri gibi sitozolde bulunan Bcl-2 ailesi proteinlerinden Bid ve Bax'ı keser. Bu kesimle birlikte aktif hale geçen pro-apoptotik Bcl-2 üyeleri mitokondri dışı zarına yerleşerek, zarın geçirgenliğini değiştirir. Sonuçta mitokondriden sitozole salınan Sitokrom c ile birlikte apoptozis mekanizması gerçekleşir [549], [557].



**Şekil 1. 15.** Apoptozise bağlı olarak ER dağılır, Golgi organeli parçalanır ve veziküler trafik bozulur. mitokondri ise fragmentasyona uğrar. ([550]'den değiştirilerek çizilmiştir).

**Mitokondri** apoptozis de rol oynayan temel organellerden biridir. Apoptotik aktivite ile birlikte mitokondri dışı zarındaki geçirgenliğin bozulması apoptozis mekanizmasının kritik basamaklarından birini oluşturmaktadır [477], [478]. Yapılan çalışmalarda mitokondride morfolojik olarak da değişiklikler meydana geldiği belirlenmiştir. Elektron mikroskopik incelemelerde mitokondrinin küçük parçacıklar halinde özellikle çekirdek çevresinde kümeler oluşturduğu gözlenmiştir. Ayrıca mitokondrinin şişmiş ve içinde vakuoller bulunan parçacıklar halinde görüldüğü de rapor edilmiştir [558].

Mitokondrinin bölünmesi ya da parçalara ayrılması (fission) olarak tanımlanan fragmentasyon ve iki mitokondrinin iç ve dış zarlarının kaynaşması anlamına gelen füzyon (fusion), mitokondrinin hücre içindeki devamlılığını sağlayan en önemli faktörlerdir. Apoptozis ile birlikte mitokondrinin fragmentasyonu artarken, füzyonu ise baskılanmaktadır [559].

**Çekirdekçik**, çekirdek içinde rRNA ve proteinden oluşan ve etrafı zarla çevrili olamayan yapıdır. Apoptozis sonucu çekirdekçiğin tamamen kaybolduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Ancak timositler ve lenfositlerle yapılan çalışmalarda apoptozis süresinde çekirdekçikte herhangi bir bozulma olmadığı, içte bulunan fibriller ve dışta bulunan granüler bölgelerin elektron mikroskopik olarak görüldüğü belirlenmiştir [560], [561].

#### **1.10.9. Apoptotik cisimciklerin oluşumu**

Apoptotik sürecin son aşamasında, parçalanan çekirdek ve organelleri içeren zarla çevrili apoptotik cisimcikler oluşur. Hem ölüm reseptörleri, hem de mitokondri aracılı apoptotik mekanizmalar sonucunda ölen tüm hücrelerde apoptotik cisimcikler oluşmaktadır [562]. Bu apoptotik cisimcikler hücre içeriğinin ortama yayılmasını engelleyerek inflamasyona neden olmadan, apoptotik olmayan komşu hücreler ya da fagositler tarafından ortadan kaldırılır [563].

Hücre zarının tomurcuklanmasının (blebbing) apoptotik cisimciklerin oluşumu için başlangıç basamağı olduğu ortaya konmuştur. Daha sonra yapılan çalışmalarda ROCK I enzim aktivitesini inhibe eden inhibitör moleküllerin, apoptotik cisimciklerin oluşumunu engellediği belirlenmiş, buna bağlı olarak da aktin filamentleri ve miyozin II'nin apoptotik cisimciklerin oluşumunda da rol oynadığı öne sürülmüştür [564], [565]. Apoptotik cisimciklerin geçirimli elektron mikroskopik görüntüleri incelendiğinde, bu cisimciklerin içinde ER ve yoğunlaşmış kromatinler olduğu görülmüştür. ER ve kromatinlerin apoptotik cisimcikler içine taşınması gerekmektedir. Bu taşıma mekanizmasında mikrotübüllerin görev yaptığı rapor edilmiştir. Ancak, mikrotübüllerin bulunmadığı hücrelerde apoptotik cisimcikler içinde ER ve kromatin saptanmış olması bu mekanizmada mikrotübüllerin tek başına görev yapmadığını ortaya koymuştur. Apoptotik cisimciklerin oluşum mekanizması hala araştırılmaktadır [562].

#### **1.11. Apoptotik hücrelerin ortadan kaldırılma mekanizmaları**

Apoptozis sonrasında oluşan apoptotik hücreler fagositoz ile ortamdaki uzaklaştırılırlar. Apoptozisin ardından ortadan kaldırılmayan hücreler ikincil nekroz adı verilen bir süreçle içeriklerini ekstrasellüler matrikse bırakırlar ve inflamasyona



neden olur. Bu nedenle apoptotik hücrelerin fagositoz ile ortadan kaldırılması dokuların gelişimi ve homeostazisinin sağlanması için önemlidir [566]. Apoptotik hücrelerin ortadan kaldırılması tanıma ve fagositoz olmak üzere 2 basamakta gerçekleşmektedir.

### 1.11.1. Tanıma

Apoptotik hücrelerin ortadan kaldırılmasında; komşu hücreler, makrofajlar, nötrofil lökositler ve dendritik hücreler rol oynamaktadır. *C.elegans*'ta yapılan çalışmalarda apoptotik hücrelerin tamamen ölmeden hemen önce fagositoz ile ortamdaki uzaklaştırıldığı ve inflamasyonun oluşmadığı saptanmıştır [567], [568]. Bu hücrelerin ortamdaki uzaklaştırılmaları için normal hücrelerden farklı oldukları anlaşılmalıdır. Bu nedenle bu hücrelerin “**beni bul (find me)**” ve “**beni ye (eat me)**” olarak adlandırılan sinyaller oluşturduğu belirlenmiştir (Şekil 1.16) [569].

Apoptotik hücrelerin ortamdaki uzaklaştırılmasındaki ilk basamak ölen hücreden salgılanan ve savunma hücrelerinin apoptotik hücreyi bulmasını sağlayan “**beni bul (find me)**” sinyalidir. Bu sinyali alan fagositler apoptotik hücreye yönelir. İkinci basamakta apoptotik hücrenin zarında bulunan “**beni ye (eat me)**” sinyallerini tanıyan fagositler apoptotik hücreye bağlanır. Üçüncü basamakta ise apoptotik hücre fagositoz ile hücre içine alınır ve hücre parçalara ayrılır [570].

“Beni bul” sinyali olarak tanımlanan ilk protein ribozomun alt ünitesi ile ilişkili bir protein olan “covalent dimer of ribosomal protein S19 (dRP S19)” proteindir ve 1998 yılında Horino ve çalışma grubu [571] tarafından saptanmıştır. Çalışmada, miyelositik lösemi hücre hattı olan HL-60 hücreleri, 60 dk. boyunca 43°C sıcaklık ile muamele edilmiştir. Apoptozisin uyarılmasından 24 saat sonra, dRP S19'un apoptotik hücrelerden salındığı ve makrofajların apoptotik hücrelere doğru çekilmesinde rolü olan bir kemoreaktan olduğu gösterilmiştir. dRP S19 proteininin apoptotik hücrelerden nasıl salındığı ve tüm hücrelerden salınan evrensel bir sinyal olup olmadığı hala araştırma konusudur [570], [571].

Horino ve çalışma grubunun ardından Knies ve çalışma grubu “endotelial monosit aktive edici polipeptid II (EMAP II)” adı verilen ve makrofajların apoptotik hücrelere ulaşmasını sağlayan yeni bir sinyal molekül tanımlamışlardır. EMAP II hücrelerde 45 kDa molekül ağırlığına sahip inaktif bir monomer olarak sentezlenir ve daha

sonra 23 kDa molekül ağırlığına sahip, biyolojik olarak aktif formuna dönüşür. Bu kesimin sadece apoptotik hücrelerde olduğu, normal ve nekrotik hücrelerde gerçekleşmediği belirlenmiştir. Bu nedenle EMAP II proteininin apoptozise özgü bir “beni bul” sinyali olduğu ortaya konmuştur [572].

Daha sonra yapılan çalışmalar sonucunda çok sayıda “beni bul” sinyal molekülü tanımlanmıştır. Fraktalkin, lizofosfatidilkolin (LPC), Sfingozin-1-fosfat (S1P), ATP ve UTP bu moleküllere örnek olarak verilebilir [569], [573].

“Fraktalkin (CXC3CL1)”, apoptotik hücre zarında bulunan bir proteindir. Apoptotik B-hücreleri ve nöronlarla yapılan çalışmalarda henüz tanımlanmamış olan bir proteaz tarafından kesilen bu proteinin, ekstrasellüler matrikse salındığı belirlenmiştir. Fraktalkin, fagositik hücrenin zarında bulunan Fraktalkin/CX3CR1 reseptörüne bağlanır ve fagositik hücreyi apoptotik hücre doğru yönlendiren bir kemokin olarak görev yapar [574].

“Lizofosfatidilkolin (LPC)” molekülünün de “beni bul” sinyali olarak görev yaptığı rapor edilmiştir [567]. Yapılan çalışmalarda çeşitli hücre hatları UV, Staurosporin ve Mitomisin C gibi apoptozis uyarıcıları ile uyarılmış ve hücrelerin süpernatantları makrofaj hücreleri üzerine uygulanmıştır. Çalışma sonucuna göre elde edilen süpernatantların kemoreaktan özellikte olduğu ve makrofajları kendine doğru çektiği gösterilmiştir. Ayrıca bu kemoreaktan maddenin apoptozisin erken safhasındaki hücrelerden salgılandığı da çalışma kapsamında ortaya konmuştur. Daha sonra araştırmacılar bu kimyasal maddenin özelliklerini tanımlamak amacıyla apoptotik hücre süpernatantlarını ısı, DNaz, RNaz ve proteinaz K ile muamele etmişler ve kemoreaktan maddenin aktivitesini kaybetmediğini belirlemişlerdir. Bunun üzerine, süpernatana kloroform ve dietileter gibi yağ çözücüler uygulanmış ve kemoreaktan özelliğın ortadan kalktığı görülmüştür. Sonuç olarak kemoreaktan özellik gösteren bu molekülün lipid özellikte olduğu belirlenmiştir. Bu sinyal molekülünün lipid olduğunun belirlenmesinin ardından yapılan çalışmalarla LPC olduğu gösterilmiştir. LPC, Fosfatidilkolin’in “Kalsiyum bağımsız Fosfolipaz A<sub>2</sub> (iPLA<sub>2</sub>)” enzimi tarafından LPC’ye dönüştürülmesi ile oluşur. Apoptozis ile aktiveleşen kaspaz 3 enziminin apoptotik hücrelerde LPC sentezinden sorumlu iPLA<sub>2</sub> sentezini uyardığı saptanmıştır [575]. Apoptozis ile birlikte sentezlenen LPC, ekstrasellüler matrikse salınır ve fagositlerin zarında bulunan “G protein coupled

receptor (G2A)” reseptörüne bağlanır. Bu bağlanmanın ardından fagositik hücreyi kendisine doğru çeken bir “beni bul” sinyali olarak görev yapar [576].

S1P de “beni bul” sinyal moleküllerinden biridir. Apoptotik hücrelerden salınan S1P lipid molekülünün, fagositlerin zarında bulunan S1P reseptörüne bağlandığı ve fagositleri apoptotik hücrelere doğru çektiği gösterilmiştir [577].

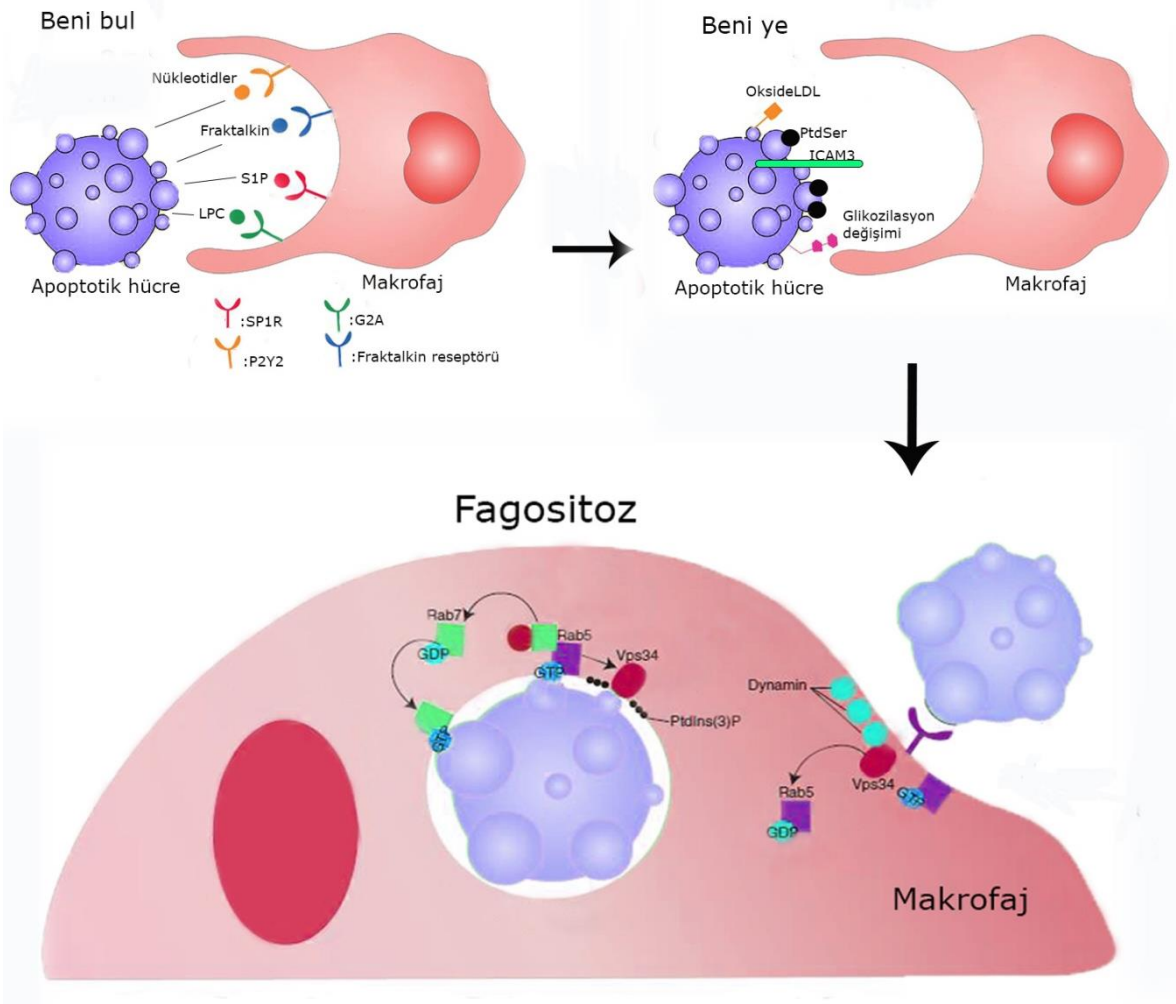
Düşük miktarda salgılanan ATP ve UTP’nin de *in vivo* ve *in vitro* koşullarda kemoreaktan olarak görev yaptığı saptanmıştır. Bu mekanizmadaki kritik nokta ATP ve UTP’nin düşük miktarda salgılanmasıdır çünkü nekroz mekanizmasında fazla miktarda ATP ve UTP salgılanmaktadır [570], [578]. Apoptozis ile birlikte, hücre zarında bulunan Panneksin kanallarının C-terminalleri Aktif kaspaz 3 ve kaspaz 7 enzimleri tarafından yıkılır. Bu kesim sonucu Panneksin kanalları sürekli olarak açık kalır. Bu nedenle apoptozis süresinde ATP ve UTP apoptotik hücreden ekstrasellüler matrikse salınır. Bu ATP ve UTP, makrofaj zarında bulunan ve P2Y2 olarak adlandırılan pürin reseptörüne bağlanır. Bu bağlanma ile birlikte fagositlerin apoptotik hücreye doğru hareket ettiği belirlenmiştir [578], [579].

Tüm bu “beni bul” sinyalleri fagositlerin hücre zarında bulunan reseptörlerine bağlandıklarında, bu savunma hücrelerinden çok sayıda yardımcı molekülün salgılanmasına neden olur. Bu moleküller apoptotik hücrelerin ortadan kaldırılmasına katkıda bulunan moleküllerdir. Örneğin apoptotik hücrelerden sentezlenen Fraktalkin, peritoneal makrofajlardan “milk fat globule EGF factor 8 (MFG-E8)” adı verilen bir faktör salınmasını uyarır. Yapılan çalışmalarda bu faktörün *in vitro* koşullarda apoptotik timositlerin ortadan kaldırılmasını hızlandırdığı gösterilmiştir [580], [581].

“Beni bul” sinyalleri ile apoptotik hücreye ulaşan fagositlerin apoptotik hücreyi tanıyarak, bu hücreye bağlanması gerekmektedir. Bu tanıma için apoptotik hücreler tarafından oluşturulan sinyaller “beni ye” sinyali olarak tanımlanmaktadır. Apoptotik hücrelerde hücre zarında bulunan proteinlerin glikozilasyonundaki değişiklikler sonucu yüzeyin yükünün değişmesi, hücre zarında bulunan LDL reseptörünün oksidasyonu, “Hücrelerarası adezyon molekülü 3’ün (ICAM3)” sentezlenmesi, Kalretikulin ve Anneksin 1 proteinlerinin sitoplazmadan apoptotik hücre zarına lokalizasyonu “beni ye” sinyallerini oluşturur. Tüm bu mekanizmaların yanı sıra normalde hücrelerde hücre zarının iç yüzünde bulunan PtdSer

molekülünün hücre zarının dış yüzeyine taşınması tüm apoptotik hücrelerde görülen evrensel “beni ye” sinyali olarak tanımlanmaktadır [548], [573], [582] .

Beni ye sinyalleri ile yapılan çalışmalar canlı hücreleri fagositozdan koruyan “**beni yeme (don't eat me)**” sinyallerinin de ortaya konulmasını sağlamıştır. Canlı hücrelerin hücre zarında bulunan CD31 ve CD47 proteinlerinin sağlıklı hücrelerin fagositozunu engellediği, apoptozisin uyarılmasıyla birlikte hücre zarındaki ifadeleri azalan bu proteinlerin etkisinin ortadan kalktığı saptanmıştır [583], [584].



**Şekil 1. 16.** Apoptotik hücrelerin makrofajlar tarafından tanınması ve fagositozu ([569]’den değiştirilerek yeniden çizilmiştir).

### 1.11.2. Fagositik hücreler tarafından yapılan fagositoz

Apoptotik hücrelerin ortadan kaldırılmasında görev yapan fagositik hücreler makrofajlar, dendritik hücreler ve nötrofil lökositlerdir. “Beni bul” sinyalleri ile

apoptotik hücelere ulaşan fagositler, “beni ye” sinyallerini tanıyarak apoptotik hüceleri normal hücelerden ayırır ve apoptotik hücelere bağlanır (Şekil 1.16). Fagositlerin hücre zarında “beni ye” sinyallerinin tanınmasını ve fagositlerin apoptotik hücelere bağlanmasını sağlayan çok sayıda reseptör tanımlanmıştır. Bu reseptörlere “PtdSer reseptörü (PSR)”, Lektinler, “G protein-coupled receptor 2A (G2A)”, CD36, CD68, LRP1/CD91, Mer ve CD14 örnek verilebilir [569], [570].

PSR, apoptotik hücre zarındaki PtdSer fosfolipidini tanıyan bir reseptördür. Apoptotik hüceleri tanıyan tüm hücelerin zarlarında bu reseptörün bulunduğu belirlenmiştir. PSR'nin TGF $\beta$  sentezini arttırarak ve TNF $\alpha$  sentezini inhibe ederek apoptozis sonucunda inflamatuvar cevabın oluşmasını engellediği de gösterilmiştir [584]. İlginç olarak, *Trypanosoma* ve *Leishmania* parazitlerinin konak hücre zarındaki PSR reseptörüne bağlandığı ve fagositlerden anti-inflamatuvar sitokinlerin salgılanmasını sağladığı gösterilmiştir. Bu şekilde bu patojenler, bağışıklık sisteminden kaçmakta ve enfeksiyona neden olmaktadır. Bu olay “apoptotik mimikri” olarak adlandırılmaktadır [585], [586], [587].

Fagositler apoptotik hüceleri tanıyıp bağlandıktan sonra, temas noktası çukurlaşır ve oluşan yalancı ayaklar ile apoptotik hücrenin etrafı sarılır. Bunun için fagosit sitoplazmasında bulunan aktin iskeletinde bir yeniden düzenlenme olması gerekmektedir [588]. Bu yeniden düzenlenme çok sayıda biyomolekülün rol oynadığı iki sinyal mekanizması ile düzenlenmektedir [589].

Bu sinyal mekanizmalarından ilki, *C.elegans*'ta tanımlanan CED-2/CED-5/CED-10/CED-12-yoludur. Yapılan çalışmalarda bu sinyal mekanizmasının memelilerdeki homoloğunun Crk II/DOCK-180/Rac1/ELMO-sinyal yolu olduğu belirlenmiştir. Apoptotik hücre, makrofaj zarındaki reseptörlerine bağlandığında, makrofaj zarında bulunan Crk II proteini, Dock180 ve ELMO proteinlerini sitoplazmadan hücre zarına doğru çeker. Biraraya gelen Crk II, Dock180 ve ELMO birbirine bağlanarak üçlü bir kompleks oluşturur. Oluşan bu kompleks Rac-1 enzimine bağlanarak onun aktif hale geçmesini sağlar. Rac-1 enzimi, aktin polimerizasyonunda rol oynayan faktörleri aktiveştirir ve yalancı ayakları oluşturacak olan çıkıntı bölgelerinde birikimini sağlar [590].

İkinci mekanizma ise *C.elegans*'ta tanımlanan ve CED-1, CED-6 ve CED-7 proteinlerinin görev yaptığı sinyal mekanizmasıdır. Bu mekanizmada CED-1 ve

CED-7 hücre zarında bulunurken, CED-6 sitoplazmada adaptör protein olarak görev yapar. Bu sinyal mekanizmasının memelilerdeki homoloğu LRP1/MEGF10-GULP-ABCA1/ABCA7 sinyal yoludur. Apoptotik hücre, makrofaj hücre zarı ile bağlandığında, zarında bulunan LRP1, konformasyonel değişime uğrar ve sitozolde bulunan Gulp adaptör proteinine bağlanır. Gulp adaptör proteini ve sinyal yolunda görev alan diğer proteinler henüz tam olarak aydınlatılmamış olan bir mekanizma ile aktin filamentlerinin yalancı ayakları oluşturan çıkıntı bölgesinde polimerize olmasına neden olmaktadır [589].

Apoptotik hücre, makrofaj zarı ile temas ettiğinde aktin filamentleri apoptotik hücrenin etrafını saracak şekilde zarın uzamasını ve yalancı ayak oluşmasını sağlamaktadır. Daha sonra yalancı ayakların iki ucu bir araya gelir ve apoptotik hücrenin etrafını sarılmış olur. Bu şekilde oluşan ve apoptotik hücreyi içeren vezikül “fagozom” olarak adlandırılmaktadır [589], [591].

Apoptotik hücreyi taşıyan bu fagozomun hücre zarından ayrılması gerekmektedir (Şekil 1.17). Bu ayrılma işlemi Dinamin adı verilen ve GTPaz aktivitesine sahip bir protein görev yapmaktadır. Dinamin proteini apoptotik hücrenin makrofaj ile temas ettiği bölgede birikir [589]. Dinamin sahip olduğu GTPaz aktivitesi ile GTP’yi hidrolize eder ve ortaya çıkan enerji Dinamin proteininin yapısında konformasyonel bir değişime neden olur. Bu konformasyonel değişim apoptotik hücreyi içeren vezikülün boyun kısmını gerer ve vezikülün kopmasını sağlar [592].

Dinamin proteini ayrıca sitozolde bulunan ve “vesicle-mediated vacuolar protein sorting 34 (Vps34)” adı verilen enzime bağlanır. İlk olarak *S. cerevisiae*’de tanımlanmış olan Vps34 bir “Fosfoinozid 3-Kinaz (PI3K)” enzimidir. Bu enzim sitozolde bulunan Rab5 proteinini hücre zarına doğru çeker. Hücre zarına ulaşan Rab5, burada bulunan Dinamin tarafından aktifleştirilir. *C.elegans*’ta yapılan çalışmalar aktif Rab5 enziminin fagozom maturasyonunda önemli role sahip olduğunu göstermiştir [593].

Aktif duruma geçen Rab5 enzimi apoptotik hücreyi içeren fagozom zarına yerleşir. Zarında Rab5 içeren fagozom, “Rab5+ fagozom” olarak adlandırılır. Aktif Rab5 enzimi daha fazla Vps34 proteininin fagozom zarında birikmesini sağlar. Fagozom zarında biriken Vps34, fagozom zarında bulunan fosfatidilinositol moleküllerini

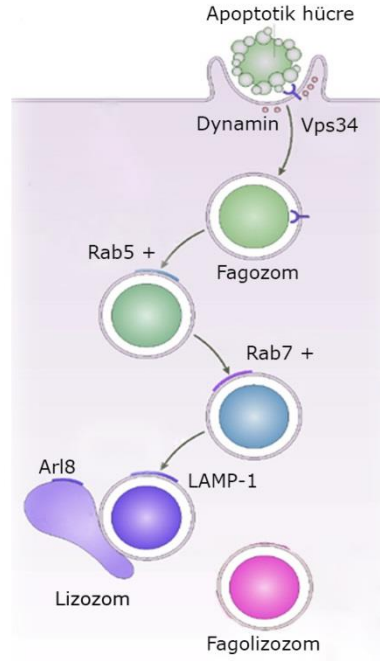
fosforiller ve “fosfatidilinositol 3 fosfatın (PI3P)” birikimine neden olur. PI3P'nin fagozom maturasyonu için önemli olduğu ifade edilmektedir [594], [595], [596].

Aktif Rab5 enziminin sitozolde bulunan Rab7 enzimini aktive ettiği ve fagozom zarına yönlendirdiği de belirlenmiştir. Rab7, fagozom zarına yerleşir ve Rab5 fagozom zarından ayrılır. Bu fagozom “Rab7+ fagozom” olarak adlandırılır. Bu değişikliğin fagozomun lizozomla birleşerek “fagolizozom” oluşturması için kritik basamak olduğu belirlenmiştir. Ayrıca Rab7 aktivitesi ile birlikte endozomun içine sitozolden H<sup>+</sup> iyonu pompalanmasını sağlayan V-ATPaz kanalı aktif hale geçer. Bu şekilde apoptotik hücreyi içeren vezikülün yani fagozomun pH'sı düşer [597].

Oluşan fagozomun ortadan kaldırılabilmesi için sitozolde bulunan primer lizozomlarla birleşmesi gerekmektedir. Lizozomla birleşmiş fagozoma “fagolizozom” adı verilir. Sasaki ve çalışma grubu [598] tarafından 2013 yılında yapılan çalışmada lizozom zarında bulunan Arl8 proteininin, lizozomların apoptotik hücreyi içeren fagozomlara doğru yönelmesinde görev yaptığı belirlenmiştir. Arl8 mutant hücrelerde fagozomların lizozomlarla birleşmediği, Rab7+ evrede kaldığı ve fagosit sitoplazmasında çok sayıda vezikül bulunduğu gösterilmiştir. Bu nedenle Arl8'in fagolizozom oluşumunda önemli rol oynadığı yorumu yapılmıştır. Fagozom zarında ise “lizozom ilişkili zar proteini-1 (LAMP1)” adı verilen bir protein bulunur. Bu proteinin de fagolizozom oluşumunda rol oynadığı gösterilmiştir [597].

Oluşan fagozom, hücre merkezine doğru hareket eder ve primer lizozomla birleşir. Fagozomların lizozom ile birleşmesi farklı fagositlerde farklı mekanizmalarla kontrol edilmektedir. Örneğin nötrofil lökositlerde fagozom-lizozom füzyonunun, Ca<sup>+2</sup> iyonuna bağımlı bir süreç olduğu ancak makrofoljarda Ca<sup>+2</sup>'ye ihtiyaç olmadığı gösterilmiştir [599].

Fagolizozom oluşumunun ardından lizozomal enzimlerin aktivitesi ile apoptotik hücrenin önce sitoplazması ardından çekirdeği parçalanır [600]. Bu parçalanma lizozom lümeninde bulunan ve asit hidrolazlar olarak adlandırılan proteaz, nükleaz, glikozidaz, lipaz, fosfolipaz, fosfataz ve sülfataz enzimlerinin aktivitesi ile gerçekleşir. Hücrelerin parçalanmasının ardından ortaya çıkan sindirim ürünleri lizozom zarında bulunan taşıyıcı proteinlerle sitozole taşınır. Bu biyomoleküller hücre tarafından tekrar kullanılabilir [569].



**Şekil 1. 17.** Fagozom ve fagolizozom oluşumunun basamakları görülmektedir ([597]'den değiştirilerek çizilmiştir).

### 1.11.3. Epitel hücreleri tarafından yapılan fagositoz

Fagositlerin yanı sıra apoptotik hücreye komşu olan hücreler tarafından da fagositoz gerçekleştirilmektedir. Bu hücreler “profesyonel olmayan (non-professional) ya da amatör fagositler” olarak adlandırılmaktadır [601]. Fagositler ve komşu hücrelerin apoptotik hücreleri ortadan kaldırma özellikleri Parniak ve çalışma grubu [600] tarafından 2000 yılında yapılan bir çalışmada araştırılmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre hareketli olan makrofajlar hızla apoptotik hücreye yönelir ve kısa sürede apoptotik hücreyi sindirir. Komşu hücreler ise apoptotik hücreyi fagosite ettikten saatler sonra sindirmektedir. Bu zaman farkının nedeni hala araştırılmaktadır.

Yapılan çalışmalarda mezengial hücrelerin, düz kas hücrelerinin, hepatositlerin ve endotel hücrelerin fagositoz yaptığı gösterilmiştir [602], [603], [604], [605]. Meme bezi ile yapılan histolojik bir çalışmada Hematoksilen eozin ile boyanmış kesitlerde apoptotik cisimler içeren epitel hücreleri saptanmış ve epitel hücrelerinin de apoptotik hücrelerin ortadan kaldırılmasında görev yaptığı belirlenmiştir [606].

Apoptozis sonucu komşu epitel hücre ile apoptotik hücre arasındaki hücre-hücre bağlantısı kopmaktadır. Apoptotik hücrenin komşu hücre tarafından fagosite



edilebilmesi için iki hücrenin birbirine tekrar bağlanması gerekmektedir. Akciğer alveolar epitel hücreleri ve meme bezi hücreleri ile yapılan çalışmalarda epitel hücre zarında bulunan integrin ve PSR reseptörlerinin apoptotik hücrelere bağlanmada rol oynadığı belirlenmiştir [606], [607]. Komşu hücreler tarafından gerçekleştirilen fagositoz mekanizması tam olarak ortaya konulamamıştır. Bu konu ile ilgili çalışmalar hala devam etmektedir

Epitel hücreler de fagositler gibi inflamatuvar sitokinler sentezler ve inflamasyon sürecine katkıda bulunurlar. Apoptotik hücrenin fagositozu ile birlikte epitel hücrelerden TGF $\beta$ -1 sentezlendiği ve inflamasyonun baskılandığı gösterilmiştir [606]. Hücre içine alınan ve apoptotik hücreyi içeren vezikül fagozom adını alır. Bu fagozom primer lizozomla birleşerek fagozozom olarak tanımlanır. Lizozom içindeki enzimlerin etkisi ile apoptotik hücre parçalanır. Oluşan monomerlerden hücre için kullanılacak olanları tekrar sitozole verilir. Böylece apoptotik hücre inflamasyona yol açmadan ortadan kaldırılmış olur [600].

### **1.13. Apoptozisin fizyolojik ve patolojik olaylardaki rolü**

Apoptozis, biyolojik olarak görevini tamamlamış ya da hasarlı hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlayan programlı bir hücre ölümü tipidir. Eğer hücre, etrafındaki hücrelerle ilişkisini kaybeder veya onarılamayacak bir hasara uğrarsa apoptozis mekanizması başlar. Erken embriyonik dönemden itibaren apoptozis, fizyolojik ve patolojik birçok olayda önemli rol oynar. Bu şekilde gelişim sırasında dokunun yapısal şekli oluşurken, yaşam süresince dokunun aynı büyüklük ve şekilde kalması da sağlanır [608].

#### **1.13.1. Apoptozisin fizyolojik olaylardaki rolü**

**Timus:** İmmün sistem hücreleri olan T-lenfositler Timus'da olgunlaşır. T-lenfositlerin organizmanın kendi dokularına karşı otoreaktivite gösterme potansiyeli olanları ve fonksiyonel olmayanları kan dolaşımına girmeden önce Timus'da apoptozis ile ortadan kaldırılır [609]. Fas reseptörü veya Fas ligandı taşımayan farelerde yapılan çalışmalarda otoreaktivite gösteren T-lenfositlerin ortadan kaldırılmadığı buna bağlı olarak da lenfadenopati, splenomegali ve multipl otoimmün hastalıkların geliştiği belirlenmiştir [610].

**İnce bağırsak:** İnce bağırsakta bulunan epitel doku hızlı bir şekilde yenilenmektedir. Bu yenilenmede apoptozisin rol oynadığı gösterilmiştir. İnce bağırsaklarda bulunan hücreler kriptaların tabanından, kriptaların ucuna doğru gerçekleştirdikleri ve 3-5 gün süren göçün sonunda apoptozis ile ölürek bağırsak lümenine dökülmektedir. Ölen hücrelerin yerini ise kriptaların tabanında yeni oluşan hücreler almaktadır [611].

**Uterus:** Menstruasyon sırasında endometriyum tabakasında bulunan endometriyal hücreler apoptozis sonucu ölür ve menstruasyon kanamasıyla birlikte dökülerek ortamdaki uzaklaştırılır [612].

**Meme:** Laktasyonun ardından meme bezlerinin gerilemesinde apoptozis mekanizmasının görev yaptığı belirlenmiştir [613].

**Beyin:** Beynin embriyonik gelişimi sırasında gereğinden fazla oluşan nöronların azaltılması, hedefine ulaşamayan aksonlar nedeniyle oluşan hataların ortadan kaldırılmasında apoptozis rol oynamaktadır [614].

**Göz:** Embriyoda gözün gelişimi sırasında lens çukurunun invaginasyonu ve yüzey ektoderminden ayrılarak lensin oluşmasında, korneal epitelyal yüzeyin gelişmesinde apoptozis rol oynar [615]. Ayrıca kaspaz-3 ve Apaf-1 mutant farelerle yapılan çalışmalarda retinada gereğinden fazla hücre birikimi olduğu ve bu durumun da normalden daha kalın bir retinanın oluşumuyla sonuçlandığı belirlenmiştir [616].

**İmplantasyon:** Döllenmenin ardından oluşan zigot, art arda mitoz bölünmeler geçirerek blastomer denilen hücreleri oluşturur. Blastomer sayısı 12-32 olduğu evrede embriyo "morula" olarak adlandırılır. Morulanın uterusu girmesinin hemen ardından ise "blastokist" oluşur. Gebeliğin devam edebilmesi için blastokistin uterus duvarını döşeyen endometriyuma tutunması gerekmektedir. Blastokistin endometriyal hücrelere temas ettiği bölgelerde, endometriyal hücreler apoptozisle ölürek blastokistin uterusu yerleşmesinde önemli rol oynar [617].

**Testis:** Her iki testiste günlük sperm üretimi insanda saniyede yaklaşık 1000 yeni spermatozoa olmasına rağmen spermlerin yaklaşık %75'i spermatogenez esnasında apoptozis ile ölmektedir [618].

**Ovaryum:** Ovaryumların gelişimi sürecinde üretilen hücrelerin yaklaşık %99'u ovülasyondan önce apoptozis ile ortadan kaldırılmaktadır. Oogoniyaların ve

oositlerin ölümlerinde Bcl-2'nin rol oynadığı gösterilmiştir. Ayrıca menopozda over foliküllerinin atrezisi hormonların azalmasına bağlı olarak apoptozis ile gerçekleşmektedir [617].

### **1.13.2. Apoptozisin patolojik olaylardaki rolü**

Dokuların normal şekilde gelişimi ve devamlılığı için hayat ve ölüm arasındaki denge sağlanmalıdır. Bu denge hangi tarafa bozulursa bozulsun patolojik olaylarla sonuçlandığı belirlenmiştir.

#### **1.13.2.1. Apoptozisin artışına bağlı oluşan hastalıklar**

Çeşitli Nörodejeneratif bozuklukların apoptozisin gereğinden fazla gerçekleşmesiyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Örneğin, demans ile karakterize bir hastalık olan **Alzheimer hastalığı'nda** beyin hücrelerinin olması gerekenden daha erken bir zamanda öldüğü saptanmış, ancak bu olayın mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Alzheimer hastalarından alınan örneklerde ölen nöronlarda aktif kaspaz enzimlerine rastlanmıştır olması da bu düşüncüyü destekler niteliktedir. Nöronlarda apoptozisi neyin indüklediği ise hala araştırma konusudur. Yapılan çalışmalarda "Amiloid beta (A $\beta$ )" peptidinin mitokondride, Sitokrom oksidaz aktivitesini azalttığı ve hidrojen peroksit sentezini arttırdığı belirlenmiştir. Mitokondrinin fonksiyonlarındaki bu bozulmanın da mitokondri aracılı apoptotik yolun aktivasyonuna neden olduğu ve hücrelerin ortadan kaldırıldığı düşünülmektedir [619].

**Parkinson hastalığı** beyinde dopamin üreten hücrelerin kaybı ile karakterize diğer bir nörodejeneratif hastalıktır. Dopaminerjik nöronlarda p53, Fas, TNFR ve kaspaz ifadesinin arttığı gösterilmesi bu hastalığın patogeneğinde apoptozisin aşırı aktivitesinin rolü olabileceğini göstermiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda, hücrelerde serbest radikaller aracılığı ile oluşan oksidatif stresin ve hücre içi Ca<sup>+2</sup> dengesinin bozulmasının nöronlarda apoptozise neden olduğu ve Parkinson hastalığının oluşumu ve ilerleme sürecinde önemli rol oynadığı bildirilmiştir [620].

**Retinitis pigmentosa** retinada bulunan fotoreseptör hücrelerin programlanandan önce ve aşırı şekilde ölümü ile karakterize dejeneratif bir retinal hastalıktır. Nörodejeneratif hastalıklarda olduğu gibi *Retinitis pigmentosa* hastalığında da

apoptozisdeki artışın, hastalığın patogenezinde rolü olduğu belirlenmiş fakat mekanizma tam olarak ortaya konulamamıştır. Yapılan çalışmalarda, hastalardan alınan kan örneklerinde gama ve alfa globülinlerin arttığı belirlenmiş, inflamasyonun retinal hücrelerde apoptozisi uyarabileceği yorumu yapılmıştır [621]. Ayrıca son yıllarda yapılan çalışmalarda mikroglialdan sentezlenen TNF $\alpha$ 'nın fotoreseptör hücrelerde ölüm reseptörü aracılı apoptozisin uyarılmasına neden olduğu da ifade edilmiştir [622].

**AIDS;** bir retrovirüs olan “İnsan immünyetmezlik virüsü (Human immunodeficiency virüs; HIV)” ile enfeksiyon sonucu bağışıklık sisteminin çökmesi ile karakterize bir hastalıktır. HIV'in hedef hücresi CD4+ T-lenfositlerdir. Bu virüsün zarf yapısında bulunan glikoproteinler, T-lenfositlerin yüzeyinde bulunan CD4 proteinine bağlanmaktadır. Bu durum da HIV'in hücre spesifitesini oluşturan en önemli faktördür. HIV, CD4'e bağlandığında hücre içine alınır ve RNA reverse transkriptaz enzimi ile RNA şeklinde olan genomu DNA'ya çevrilir. Ardından T-lenfosit genomuna viral genom entegre olur [623]. HIV viral genleri CD4+ T-lenfositleri tarafından ifade edildiğinde bu hücrelerde FasL ifadesinin arttığı, Fas reseptörü sentezininin ise azaldığı gösterilmiştir. Bunun sonucunda FasL içeren virüsle enfekte T-lenfositler, enfekte olmayan normal hücrelerle karşılaştığında, normal hücrenin zarında bulunan Fas ile etkileşim kurar. Fas-FasL etkileşimi normal hücrenin apoptozisine neden olur. Bu mekanizma, virüsle enfekte olmamış CD4+ T-lenfositlerin hızlı bir şekilde kaybını açıklamaktadır. HIV ile enfekte hücrelerde ise Fas reseptörünün ifadesi azaldığından bu hücrelerde apoptozis uyarılması engellenir ve bu şekilde enfekte hücreler hayatta kalarak enfeksiyon devamlılığı sağlanır [624].

**Diyabet,** karbohidrat, yağ ve protein metabolizmasındaki bozukluklar sonucunda insülin hormonunun hedef dokulardaki etkisinin kaybı ve/veya insülin sentezindeki bozukluklar sonucunda oluşan metabolik bir hastalıktır [625]. Hem Tip I hem Tip II Diyabet hastalarında insülin sentezleyen pankreatik  $\beta$ -hücrelerinin Fas-FasL aracılı apoptozis ile ortadan kaldırılması sonucu insülin sentezi azalır. Bu durumda kandaki şekerin dokulara ulaşamadığı ve Diyabetin ortaya çıktığı yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir [626], [627].

**Sepsis,** kana bakteri ya da toksinlerinin karışması olarak tanımlanan klinik bir sorundur. Sepsisin oluşumu sırasında bakteri toksinlerinin ve konağın kendi

proinflamatuvar sitokinlerinin bağıışıklık sistemi hücreleri ile bağırsak, karaciğer ve akciğer hücrelerinde Fas-FasL aracılı apoptozise neden olduğu belirlenmiştir [628].

### **1.13.2.2. Apoptozisin inhibisyonuna bağılı hastalıklar**

Normal bir hücrenin **kanser** hücreğine dönüşüm sırasında, büyüme faktörlerinin sürekli sentezlenmesi, yeni damarların oluşumunu uyaran sinyallerin oluşturulması, köken aldıkları dokudan ayrılma ve diğere dokulara yayılma için gerekli faktörlerin salgılanması gibi özellikler kazandıkları belirlenmiştir. Bu özelliklerin yanı sıra kanser hücrelerinin apoptozisi inhibe edecek stratejiler geliştirdikleri de yapılan çalışmalar sırasında ortaya konmuştur. Bu şekilde hatalı genoma sahip hücreler proliferasyona devam etmekte ve bu durum kanser sürecini ilerleten yeni mutasyonların oluşumuna olanak sağlamaktadır. Apoptozis ve kanser oluşumu ile ilgili yapılan çalışmalarda kanser hücrelerinin farklı yollarla apoptozisten kurtuldukları saptanmıştır. Antiapoptotik ve proapoptotik Bcl-2 üyeleri arasındaki dengenin bozulması, kaspaz enzimlerinin aktivitesindeki azalma, p53 geninde oluşan mutasyonlar, ölüm reseptörlerindeki metilasyonlar ve kaspaz inhibitörlerinin sentezindeki artışın kanser oluşumuna neden olabileceği bildirilmiştir [629].

Ayrıca son yıllarda çalışmalar decoy adı verilen reseptörler üzerinde yoğunlaşmıştır. Kanser hücrelerinde, Decoy 1, Decoy 2 ve Decoy 3 olmak üzere 3 izoformu bulunan bu reseptörün ifadesinin arttığı belirlenmiştir. Bu reseptöre Ölüm reseptörleri aracılı apoptotik mekanizmanın başlaması için gerekli olan FasL ve TRAIL ligandları bağlanır. Bu bağlanma sonucu apoptozis uyarılmaz ve bu şekilde hücrelerde apoptozis mekanizması baskılanır. Apoptozisten kurtulan hücreler kontrolsüz şekilde proliferasyona devam eder [370].

Çeşitli **viral enfeksiyonlar** hücrelerde apoptozis mekanizmasını baskılayarak viral genomun çok sayıda hücreye aktarılmasını sağlamaktadır. Enfekte ettiği hücrelerde apoptozis mekanizmasının inhibisyonuna neden olan virüslerden biri de Human papilloma virüsüdür (HPV). HPV genomu enfekte ettiği hücrenin genomuna fiziksel olarak entegre olur ve konak hücre virüsün proteinlerini sentezlemeye başlar [630]. Bu proteinlerden E6 ve E7 onkoproteinleri, konak hücrelerinde tümör baskılayıcı gen ürünleri ile ilişki kurar. Bu onkoproteinlerin

tümör baskılayıcı proteinlere bağlanması ile hücrel proliferasyonun kontrolü bozulmaktadır. Normalde enfekte hücreler viral enfeksiyona cevaben p53'ü aktive eder. Böylece hücre, mitoz bölünmenin G1 fazında durdurularak, apoptozis uyarılır. Bu şekilde virüsle enfekte hücrelerin proliferasyonu engellenir. Yapılan *in vitro* çalışmalarda tip 16 ve 18 HPV E6 proteinlerinin bir tümör baskılayıcı protein olan p53'e bağlandığı gösterilmiştir [631]. E6 proteininin p53 proteinine bağlanması ile p53 proteininin aktivitesi engellenir. Böylece viral genomu sahip hücreler apoptozisten korunur ve çoğalmasına devam eder. Yapılan çalışmalarda HPV'nin servikal kanser başta olmak üzere baş-boyun kanserleri, oral kanserler, meme ve akciğer kanseri oluşumunda da rolü olduğu gösterilmiştir [632], [633], [634].

Tüm bu literatür bilgileri ışığında çalışmamızda servikovajinal yaymalarda  $\beta$ -katenin proteini ile apoptozis arasındaki ilişkinin sitolojik ve immünohistokimyasal yöntemler kullanılarak araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, apoptozis varlığında hücrede hem  $\beta$ -katenin proteinin varlığında ve lokalizasyonundaki değişikliklerin belirlenmesi, hem de bu değişikliklerin ölüm reseptörlerine bağlı apoptotik yol ve mitokondriye bağlı apoptotik yollarla olan ilişkisine dair sonuçların elde edilmesi hedeflenmiştir.

## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'na çeşitli jinekolojik şikayetlerle veya rutin kontrol amacıyla başvuran ve gebe olmayan 224 hastayı kapsamaktadır. Çalışmamız Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Araştırmalar Yerel Etik Kurulu tarafından tıbbi etik açıdan uygun bulunmuştur (LUT12/170, 2012).

### 2.1. Klinik verilerin elde edilmesi

Hastalardan örnekler alınmadan önce hastanın yaşı, son adet tarihi, doğum yapıp yapmadığı, hormon tedavisi alıp almadığı, menstruasyon siklusunun düzeni, ameliyat geçirip geçirmediği, rahim içi araç (RİA) kullanıp kullanmadığı, kasık ağrısı, kaşıntı, akıntı, yanma gibi jinekolojik şikâyetlerinin olup olmadığı öğrenilmiş, elde edilen veriler bilgisayara kaydedilmiştir. Ayrıca muayene esnasında serviksin dış görüntüsü incelenmiş, mukoza yüzeyinde herhangi bir kistik oluşum, hemorajik alan veya veziküler yapının olup olmadığı da hastanın klinik bilgilerine eklenmiştir.

### 2.2. Sitolojik inceleme için örneklerin hazırlanması, boyanması ve değerlendirilmesi

Her hastaya jinekolog tarafından spekülüm takılmış ve servikal fırça (cytobrush) yardımı ile servikovajinal örnekler alınmıştır. Alınan örnekler kurşun kalemlerle hastaların isimleri yazılmış olan rodajlı lamlara tek yönlü olarak yayılmıştır. Sitolojik inceleme için her hastadan iki adet servikovajinal yayma hazırlanmıştır. Hazırlanan yaymalar havada kurutulmadan %96'lık etil alkol içine konularak tespit edilmiş ve aşağıda verilmiş olan Çizelge 2.1'deki metoda uygun şekilde rutin Papanicolaou boyama yöntemine göre boyanmıştır. Boyanan yaymalar mikroskopik inceleme için entellan kullanılarak lamel ile kapatılmıştır. Mikroskopik incelemede binoküler mikroskop kullanılmış ve görülen alanın 1/4'ü tekrar görülecek şekilde titizlikle ve dikkatle yapılmıştır. İlk tarama x10'luk objektif ile yapılmış, daha detaylı incelemede ise x40'lık ve immersiyon (x100) objektifleri kullanılmıştır. Elde edilen bulgular doğrultusunda gerekli görülen alanların fotoğrafları çekilerek kaydedilmiştir.

## Çizelge 2. 1. Papanicolaou boyama metodu

1. %85'lik etil alkol	12. %85'lik etil alkol
2. %70'lik etil alkol	13. <b>Orange-G (3')</b>
3. %50'lik etil alkol	14. %95'lik etil alkol
4. Distile su	15. %95'lik etil alkol
5. <b>Hematoksilen-Eozin (2,5')</b>	16. <b>Eozin-Asit (3')</b>
6. Musluk suyu	17. %95'lik etil alkol
7. %1'lik Hidroklorik asit (HCL)	18. %95'lik etil alkol
8. Distile su	19. Absolü etil alkol
9. Doymus LiCO <sub>3</sub>	20. Etil Alkol-Ksilol
10. %50'lik etil alkol	21. Ksilol
11. %70'lik etil alkol	22. Ksilol

### 2.3. İmmünohistokimyasal inceleme için örneklerin hazırlanması, boyanması ve değerlendirilmesi

#### 2.3.1. İmmünohistokimyasal inceleme için örneklerin hazırlanması

Hastalara jinekolog tarafından spekülüm takılarak servikal fırça yardımı ile alınan servikovajinal örneklerin bir kısmı üzerinde hastaların ismi yazan adesiv lamlara tek yönlü olarak yayılmıştır. Bu yaymalar havada kurutulmaksızın %96'lık etil alkolle tespit edilmiştir. Alınan örnekler plastik preparat kutularına konularak, hava almaması için kutuların etrafı alimünyum folyo ile sıkıca sarılmıştır. Alimünyum folyo ile sarılmış her plastik kutu, üzerine hastanın adı soyadı, dosya numarası ve örneğin alındığı tarihi bulunduran etiketler yapıştırılarak boyama işlemi yapılincaya kadar -21°C'lik derin dondurucuda saklanmıştır.

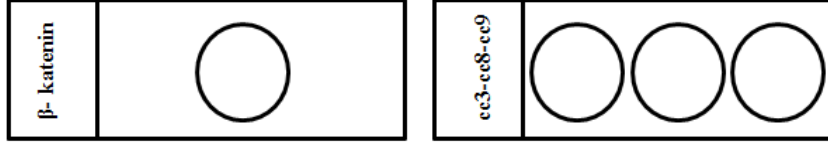
#### 2.3.2. İmmünohistokimyasal boyama metodu

İmmünohistokimyasal boyama metodu olarak Avidin-Biyotin-Peroksidaz boyama yöntemi uygulanmıştır. Boyama işlemi yapılırken bir defada 15 hasta preparatı boyanmış ve bütün işlem basamakları oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Boyama tekniğinin uygulanış şekli aşağıdaki gibidir:

**1. Fiksasyon:** Tespit maddesi olarak %96'lık etil alkol kullanılmıştır.

**2. Uygulama alanının belirlenmesi:** Hidrofobik kalem ile aşağıdaki şekilde uygulama alanları sınırlanmıştır.





**3. Endojen peroksidaz blok:** Tuzlu fosfat tamponu (PBS) ile hazırlanmış %0.3'lük  $H_2O_2$  ile 5 dk. inkübasyonun ardından 10 dk. PBS (Santa Cruz) ile yıkama yapılmıştır.

**4. Normal serum ile blokaj:** Kit içeriğinde (Vectastain Universal ABC kit, Vector lab.) bulunan %2,5'lük Normal At Serumu (NHS) ile 20 dk. boyunca inkübasyon yapılmıştır.

**5. AvidinD/Biotin blokajı:** Avidin D ile 15 dk. inkübasyonun ardından 5 dk. PBS ile yıkama yapılmıştır (Avidin D/Biotin kit, Vector lab.). Daha sonra, biotin ile 15 dk. inkübasyonun ardından 10 dk. boyunca tekrar PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.

**6. Primer antikor:** Primer antikorlar, antikor seyreltme (diluent solution) solüsyonu ile tabloda verilen oranlarda seyreltilmiştir. Oda sıcaklığında primer antikor ile 30 dk. inkübasyonun ardından 2 kere 5 dk. boyunca PBS ile yıkama yapılmıştır.

**Çizelge 2. 2.** Antikor seyreltme oranları

Antikor	Seyreltme oranı	Antikor özelliği	Marka
Beta katenin	1/100	Tavşan monoklonal antikor	Cell Signaling Technologies
Aktif kaspaz 3	1/400	Tavşan monoklonal antikor	Cell Signaling Technologies
Aktif kaspaz 8	1/100	Tavşan monoklonal antikor	Cell Signaling Technologies
Aktif kaspaz 9	1/100	Tavşan poliklonal antikor	Pierce, Thermo Scientific

**7. Sekonder antikor:** Kit içeriğinde bulunan evrensel at sekonder antikor ile 30 dk. inkübasyonun ardından 2 kere 5 dk. boyunca PBS ile yıkama yapılmıştır.

**8. Reagent solüsyonu (ABC):** Kit içeriğinde bulunan Reagent solüsyonu ile 30 dk. inkübasyonun ardından 2 kere 5 dk. boyunca PBS ile yıkama yapılmıştır.

**9. Kromojen (DAB):** 1 ml substrat solüsyonuna bir damla Diaminobenzidin (DAB) (Vector Lab.) konularak hazırlanan kromojen solüsyonunda 5 dk. inkübasyonun ardından 10 dk. distile su ile yıkama yapılmıştır.

**10. Hematoksilen ile zemin boyanması:** 20 sn. boyunca boyanan örnekler, su tamamen renksiz hale gelene kadar musluk suyu ile yıkanmıştır.

**11. Etil alkol-Ksilol basamağı ile kapatmaya hazırlık:** Örnekler, 1'er dk. boyunca %70, %85, %95, absolü etil alkol, etil alkol ksilol, ksilol'de bekletilmiştir.

**12. Kapatma:** Lam üzerine bir damla entellan damlatılarak lamel kapatılmıştır.

### **2.3.3. Negatif ve pozitif kontrol**

Her boyama periyodunda bir adet negatif kontrol örneği de boyanmıştır. Bunun için primer antikörün uygulandığı basamak dışında tüm basamaklar uygulanmış, bu şekilde boyamanın spesifik olup olmadığı kontrol edilmiştir.

Negatif kontrol dışında, uygulanan boyama yönteminin doğruluğunu kontrol etmek için pozitif kontrol aşağıda verilen prosedüre uygun şekilde yapılmıştır. Pozitif kontrol için normal (kaspaz 3, 8 ve 9) ve kanserli kolon ( $\beta$ -katenin) dokusundan alınan kesitler kullanılmıştır.

**1. Deparafinizasyon:** Kesitler, dokudaki parafinin uzaklaştırılması için etüvde 60 derecede 30 dk. boyunca ısıtılmıştır. Daha sonra örnekler oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. Ardından ksilol ve alkolden oluşan serilerden geçirilen örnekler son olarak PBS içine alınmıştır.

Ksilol (2x5 dk.), Absolü etil alkol (2 dk.), %95'lik etil alkol (2 dk.), %85'lik etil alkol (2 dk.), %70'lik etil alkol (2 dk.), %50'lik etil alkol (2 dk.), dH<sub>2</sub>O (2x5 dk.) ve PBS (2x5 dk).

**2. Antijen geri kazanma:** Antijen geri kazanma işlemi için dokular, PBS ile seyreltilerek hazırlanmış sitrat tamponu (pH=6, 1:10) içinde mikrodalga fırında 15 dk. boyunca ısıtılmış ve daha sonra oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır.

**3.** Bu basamağın ardından tüm işlemler immünohistokimyasal boyama metodundaki 3. basamaktan itibaren devam ettirilmiştir.

#### **2.3.4. İmmünohistokimyasal boyama sonuçlarının değerlendirilmesi**

İmmünohistokimyasal yöntemle göre hazırlanan ve boyanan örnekler binoküler mikroskopta x10 ve x40 objektiflerle incelenmiş, değerlendirilmiş ve gerekli görülen alanların fotoğrafları çekilerek, kaydedilmiştir.

Olguların immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi için, her bir olguya ait preparatta rastgele 10 alan seçilmiş ve bu 10 ayrı alanda hem pozitif hem de negatif hücreler olmak üzere tüm hücreler sayılmış ve yüzdeleri alınmıştır. Pozitif hücrelerin sayımı sırasında ise, pozitiflik derecesi 4 kategoride değerlendirilmiştir. Hücrelerin boyanma yoğunluklarına dikkat edilerek zayıf (+), orta (++), kuvvetli (+++) ve çok kuvvetli (++++), pozitif olacak şekilde hücreler ayrı ayrı titizlikle sayılmış ve yüzdeleri hesaplanarak kaydedilmiştir.

İmmünohistokimyasal yöntemle göre hazırlanan örnekler incelenirken ilk aşamada  $\beta$ -katenin proteininin hücre zarında, sitozolde ve çekirdekdeki lokalizasyonları belirlenmiştir. Hücre zarındaki  $\beta$ -katenin pozitifliği, bu proteinin hücre-hücre bağlantılarındaki varlığını göstermiş,  $\beta$ -katenin proteininin sadece hücre zarında görülmesi ve/veya sitoplazmanın zayıf (+) olarak boyanması Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunun inaktif olduğu kabul edilmiştir. Sitoplazmanın orta (++), kuvvetli (+++), veya çok kuvvetli (++++), çekirdeğin ise pozitif (+) boyandığı durumlarda sinyal yolunun aktif durumda olduğu kabul edilmiştir.

İmmünohistokimyasal olarak apoptozis varlığının belirlenmesi amacıyla aktif kaspaz 3, aktif kaspaz 8 ve aktif kaspaz 9 enzimlerine karşı antikorlar kullanılmıştır. Seçtiğimiz antikorlar spesifik olarak sadece enzimin aktif formunu tanımaktadır ve inaktif form ile diğer kaspazlara bağlanmamaktadır. Buna bağlı olarak da aktif kaspaz 3 pozitif olgular apoptozis (+), aktif kaspaz 3,8 ve aktif kaspaz 3,8,9 pozitif olan olgular ölüm reseptörleri aracılı apoptozis (+), aktif kaspaz 3 ve 9 pozitif olan olgular ise mitokondri aracılı apoptozis açısından (+) kabul edilmiştir.

İmmünohistokimyasal inceleme sonuçlarının sayısal bir şekilde ifade edilmesi amacıyla her bir antikor için, tüm olgularda H-skor değerleri hesaplanmıştır. H-skor hesaplanırken Detre ve araştırma grubu [635] tarafından önerilen hesaplama yöntemi kullanılmıştır.

### Uygulanan formül aşağıdaki şekildedir:

**Hskor**=[(+) pozitif olan hücrelerin yüzdesi]×1+[(++) pozitif olan hücrelerin yüzdesi]×2+[(+++) pozitif olan hücrelerin yüzdesi]×3+[(++++) pozitif olan hücrelerin yüzdesi]×4

**Çizelge 2. 3.** Tek bir olguya ait immünohistokimyasal değerlendirme için örnek tablo

İmmün boyama		(-)	(+)	(++)	(+++)	(++++)	Toplam	H-skor
Aktif kaspaz 3	Hücre sayısı	142	18	34	217	211	622	254,2
	Yüzde (%)	22,8	2,9	5,5	34,9	33,9	100	
Aktif kaspaz 8	Hücre sayısı	214	128	40	2	5	389	60,2
	Yüzde (%)	55	32,9	10,3	0,5	1,3	100	
Aktif kaspaz 9	Hücre sayısı	300	13	6	6	1	326	24
	Yüzde (%)	92	4,1	1,8	1,8	0,3	100	

Bu skorum yönteminde, örneğin aktif kaspaz 3 antikoruna için zayıf (+) pozitif boyanan hücrelerin yüzdesi hesaplanmış ve çıkan sonuç 1 ile çarpılarak bir değer elde edilmiştir. Daha sonra orta (++) pozitiflikte boyanan hücrelerin yüzdesi hesaplanmış ve bu sonucun 2 ile çarpılması ile de bir değere ulaşılmıştır. Kuvvetli (+++) pozitiflikte boyanan hücreler için benzer şekilde bu hücrelerin yüzdesi hesaplanmış ve sonuç 3 ile çarpılarak üçüncü bir değer elde edilmiştir. Son olarak çok kuvvetli (++++) pozitiflikte boyanan hücreler için de, bu hücrelerin yüzdesi hesaplanmış ve sonuç 4 ile çarpılarak dördüncü bir değer elde edilmiştir. Daha sonra elde edilen bu 4 değer toplanmış ve her olgu için aktif kaspaz 3 enzimine ait "H-skor değeri" elde edilmiştir. Bu işlemler aktif kaspaz 3, aktif kaspaz 8 ve aktif kaspaz 9 antikorları için her bir olguda hesaplanmıştır.  $\beta$ -katenin antikoruna için ise her bir olguda ayrıca hücre zarı, sitoplazma ve çekirdekteki  $\beta$ -katenin proteini pozitifliği için ayrı ayrı H-skorlar elde edilmiştir.

#### **2.4. İstatistiksel analiz**

Sitolojik ve immünohistokimyasal değerlendirme sonucu elde edilen bulguların istatistiksel analizinde “Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 22 (IBM)” paket programı kullanılmıştır. “Chi-square” ve “Fisher’s Exact Test” ile varlık yokluk durumları değerlendirilirken, iki grup arasında H-skor ortalamaları açısından farklılık olup olmadığı non-parametrik bir test olan “Mann Whitney-U” testiyle, ikiden fazla grup için H-skor ortalamaları arasındaki farklılık ise “Kruskal Wallis-H” testi ile araştırılmıştır. Ayrıca, “Korelasyon” analizi ile Spearman Rho katsayısı kullanarak aktif kaspaz 3, 8 ve 9 enzimlerine ait H-skor ortalamaları arasında bir ilişki olup olmadığı da incelenmiştir. İstatistiksel anlamlılık sınırı  $p < 0,05$  olarak kabul edilmiştir.

### 3. SONUÇLAR

Çalışma kapsamında çeşitli şikayetler veya rutin kontrol amacıyla Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği'ne başvuran, 20-76 (ortalama:41,3±12,3) yaş aralığındaki 224 hasta değerlendirilmiştir. Bu hastalardan alınan servikovajinal örnekler ilk aşamada Papanicolaou yöntemi ile boyanıp, enfeksiyon etkenleri ve atipik hücrelerin varlığı açısından sitolojik olarak incelenmiştir. İkinci aşamada, aynı olgular  $\beta$ -katenin, aktif kaspaz 3, aktif kaspaz 8 ve aktif kaspaz 9 antikoları ile immünohistokimyasal yöntem kullanılarak boyanmıştır. Her iki yöntem ile elde edilen bulgular istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve sonuçlar kaydedilmiştir.

#### 3.1. Servikovajinal örneklerin sitolojik olarak incelenmesi

Çalışma kapsamında Papanicolaou yöntemine göre boyanmış 224 olguya ait örnekler atipik hücresel değişiklikler ve enfeksiyon etkenleri açısından sitolojik olarak değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda hiçbir enfeksiyon etkeni ve atipik hücresel değişiklik saptanmayan 144 (%64,3) olgu kontrol grubu, diğer 80 (%35,7) olgu ise çalışma grubu olarak kabul edilmiştir. Çalışma grubundaki 80 olgunun 17'sinde (%21,3) atipik hücresel değişiklikler saptanırken, 63'ünde (%78,7) ise çeşitli enfeksiyon etkenlerinin varlığı belirlenmiştir. Elde edilen bu bulgular doğrultusunda çalışma grubu "atipik olgular" ve "enfeksiyon olguları" olmak üzere 2 ayrı grupta incelenmiştir. Kontrol ve çalışma grubuna ait bulgular Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

**Çizelge 3. 1.** Çalışma kapsamındaki olguların değerlendirilmesi

Sitolojik Bulgular			TOPLAM
Kontrol grubu	Çalışma grubu (n=80, %35,7)		
	Atipik olgular	Enfeksiyon olguları	
144 (%64,3)	17 (%21,3)	63 (%78,7)	224

Çalışmamızda atipik hücresel değişikliklerin saptandığı 17 olgunun 5'inde (%29,4) çekirdekte az oranda büyüme, çekirdek zarında hafif düzensizlik ve

hiperkromatizm gösteren atipik hücreler görülmüştür (Şekil 3.1). Bu olgular, Önemi Belirsiz Atipik Skuamoz Hücreler [Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance (ASCUS)] olarak değerlendirilmiştir. On yedi olgunun 8'inde (%47,1) ise ASCUS'a göre daha iri çekirdekli ve daha hiperkromatik olan Hafif Dereceli Skuamoz İntraepitelial Lezyon [Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion (LSIL)] sınıflamasına ait hücreler gözlenmiştir. Ayrıca çekirdek zarında düzensizlikler ve çekirdek etrafında koilos adı verilen geniş boşlukları bulunan koilostotik hücreler de görülmüştür. (Şekil 3.2). Bazı alanlarda, çekirdek (N)/sitoplazma (C) oranının normale göre 3 kat artış gösterdiği, iri çekirdekli ve ASCUS ile LSIL'e göre daha koyu boyanmış hücrelere rastlanmıştır. Çekirdek detaylı olarak incelendiğinde kromatide kaba kümelenmeler ve çekirdek zarında girinti çıkıntılar olduğu dikkatimizi çekmiştir (Şekil 3.3). Bu tip bulgular 17 olgunun 4'ünde (%23,5) görülmüş olup, Yüksek Dereceli Skuamoz İntraepitelial Lezyon'a [High Grade Squamous Intraepithelial Lesion (HSIL)] olarak değerlendirilmiştir. Atipik hücresel değişikliklere ait bulgular Çizelge 3.2'de sunulmuştur.

**Çizelge 3. 2.** Çalışma grubunda atipik hücresel değişiklikler gösteren olgular

Sitolojik Bulgular	Atipik olgular (n=17, %100)	
	Hasta sayısı	Yüzde (%)
ASCUS	5	29,4
LSIL	8	47,1
HSIL	4	23,5
TOPLAM	17	100

Çalışma grubundaki (n=80) enfeksiyon olgularında (n=63) ise 17 olguda (%26,9) fungal enfeksiyon varlığını gösteren pseudohif ve blastosporların varlığı saptanmıştır (Şekil 3.4). Altmış üç olgunun 11'inde (%17,4) ipucu (clue cell) hücrelerinin varlığı, laktobasillerin yokluğu ve alanda serbest kokobasillerin bulunduğu belirlenmiştir (Şekil 3.5). Ayrıca 3 (%4,8) olguda *Trichomonas vaginalis* (TV), 6 (%9,6) olguda ise Sitolitik vajinozis (SV) varlığını gösteren bol laktobasiller, bazofilik kümelenmiş hücre grupları, çıplak çekirdekler ve lizis olmuş sitoplazmik

parçacıklar dikkati çekmiştir (Şekil 3.6 ve Şekil 3.7). Bununla birlikte, 63 olgunun 26'sında (%41,3) ise enfeksiyon etkenleri olmamakla birlikte, çok bol polimorfonükleer lökositler (PMNL), binükleasyonlar ve perinükleer halelerin bulunduğu saptanmıştır. PMNL'lerin hücreler üzerinde çok bol miktarda adeta yapışmış şekilde bulunması dikkatimizi çekmiştir (Şekil 3.8). Saptamış olduğumuz tüm bu sitolojik bulgular Çizelge 3.3'de verilmiştir.

**Çizelge 3. 3.** Çalışma grubundaki enfeksiyon olguları

Sitolojik Bulgular	Enfeksiyon olguları (n=63, %100)	
	Hasta sayısı	Yüzde (%)
Fungal enfeksiyon	17	26,9
Bakteriyal vajinozis (BV)	11	17,4
<i>Trichomonas vaginalis</i> (TV)	3	4,8
Sitolitik vajinozis (SV)	6	9,6
İnflamasyon	26	41,3
<b>TOPLAM</b>	63	100

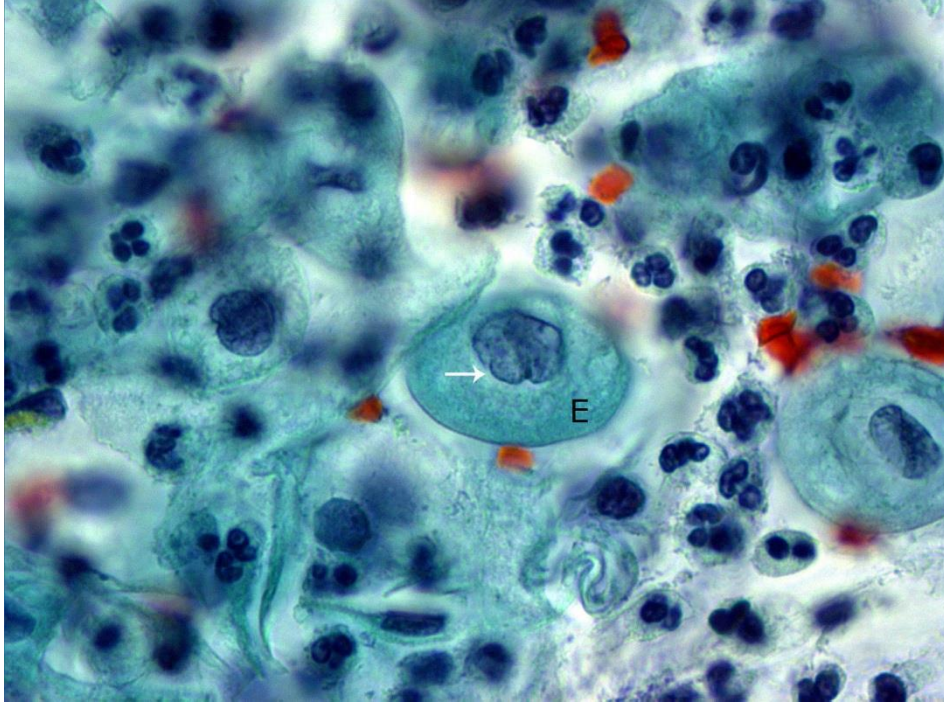
Apoptotik hücrel değişikliklere ait tüm bulgular ışık mikroskopik olarak gözlemlenmiştir. Apoptotik hücrelerin hücre zarında meydana gelen değişiklikler Şekil 3.9'da ve Şekil 3.10'da sunulmuştur. Şekil 3.9'da görüldüğü gibi çekirdeği piknotik olan küçük apoptotik hücrelerin etrafında, kalın bir boşluğun bulunması dikkatimizi çekmiştir. Hücrenin etrafında devam eden bu boşluğun, tüm hücrenin etrafında aynı kalınlıkta olduğu ve hücre zarının dışarı doğru hafif çıkıntı oluşturduğu noktada bu boşluğunda hafif çıkıntı oluşturduğu gözlenmiştir. Diğer önemli bir bulgu hücre zarının ileri derecede şekil değiştirerek tüm çevrenin adeta tomurcuklanma şeklinde dışarı doğru yuvarlaklar oluşturmasıdır. Şekil 3.10'da görüldüğü gibi bu tomurcuk şeklindeki yapıların en dış sınırının koyu boyandığı ve kalınlığının arttığı görülmüştür. Tomurcuklanma gösteren hücre zarına yakın bölgedeki sitoplazmanın boyanmadığı, bu bölgenin adeta diğer sitoplazma kısmı ile ilişkisinin bozulduğu belirlenmiştir.



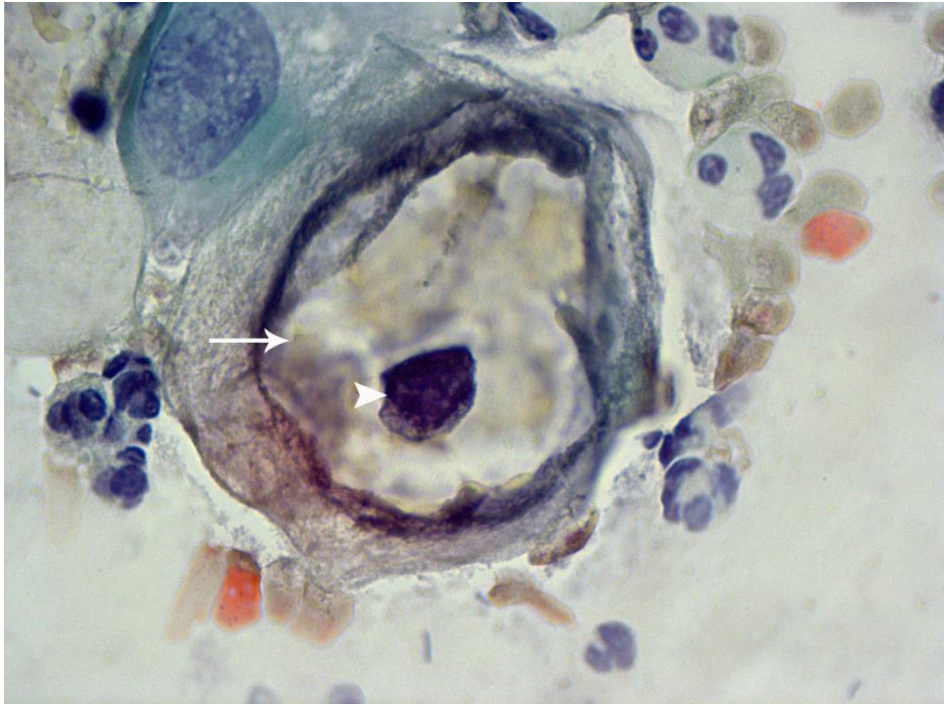
Apoptotik hücrelerin çekirdeklerindeki ışık mikroskobik bulgulardan biri çekirdek kromatininin dağılarak kümeler halinde çekirdeğin periferinde toplanması ve adeta saat yüzü görünümü almasıdır. Çekirdek kromatininin bu tür bozulmalar gösterdiği hücrenin sitoplazmasının da tomurcuklanmayı aşarak sitoplazmik uzantılar ve derin girintiler oluşturduğu dikkati çekmiştir. Bu hücrenin çekirdeğine dikkat edildiğinde çekirdeğin çekirdek çevresindeki sitoplazma ile bağlantısını kaybettiği ve küçülmeye başladığı da görülmektedir (Şekil 3.11). Kromatindeki bu kümelenmenin yanı sıra çekirdekteki diğer apoptotik bulgular karyolizis, karyorekzis ve karyopiknozis olaylarının görülmesidir. Bu 3 bulgu da ışık mikroskobik olarak Şekil 3.12 ve Şekil 3.13'te sunulmuştur. Apoptotik gelişim için ilginç olan diğer bir sitoplazmik bulgu da piknotik çekirdek içeren bir hücre sitoplazmasının küçük parçalara ayrılmasıdır (Şekil 3.14).

Apoptotik hücrelerle makrofajlar arasında ilişki olduğu ışık mikroskobik olarak saptanmıştır. Bol köpüklü sitoplazması ve hücre uzantıları olan makrofajların içinde; piknotik çekirdekli, etrafı az sitoplazmalı yapıların fagosite edilmiş olduğu görülmüştür. Fagosite edilmiş bu yapıların çevrede serbest olarak da bulunduğu dikkati çekmiştir (Şekil 3.15) Çok çekirdekli bir dev makrofajın büyük bir apoptotik hücreyi fagosite etmek üzere yalancı ayaklar uzattığı da belirlenmiştir (Şekil 3.16).

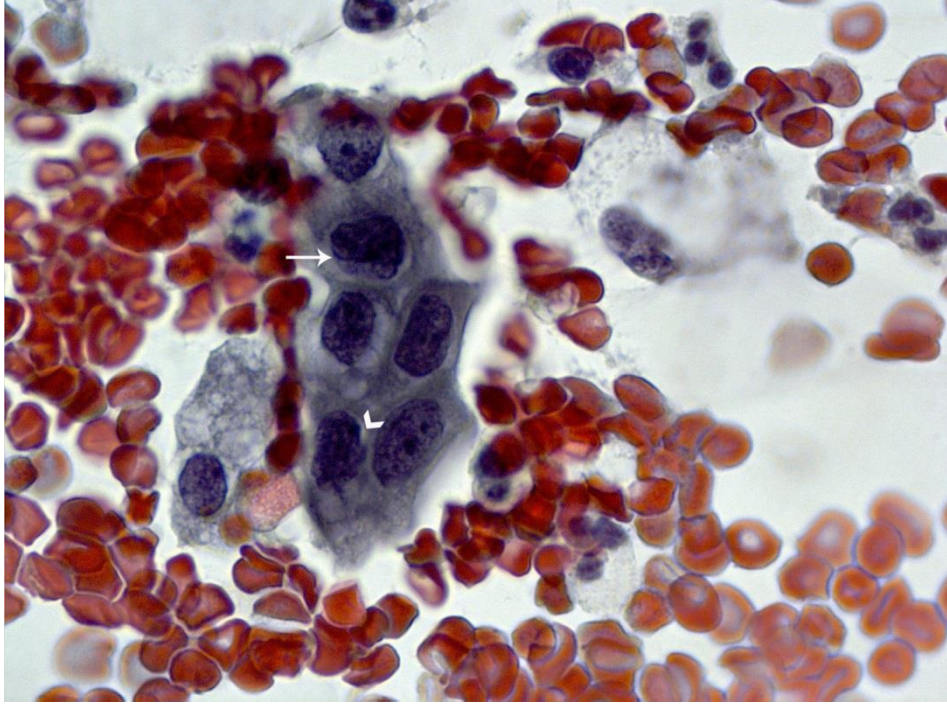
Apoptotik hücrelerin çok katlı yassı epitel hücreleriyle de iletişim halinde olduğu tespit edilmiştir. Epitel hücrelerin küçük apoptotik yapılarla karşılaştığında, bu yapıyı adeta içeri almak istercesine yalancı ayaklar uzattığı şekil 3.17'da görülürken, yapının tamamının epitel hücresi içine alınmış olduğu da Şekil 3.18'de gözlenmiştir.



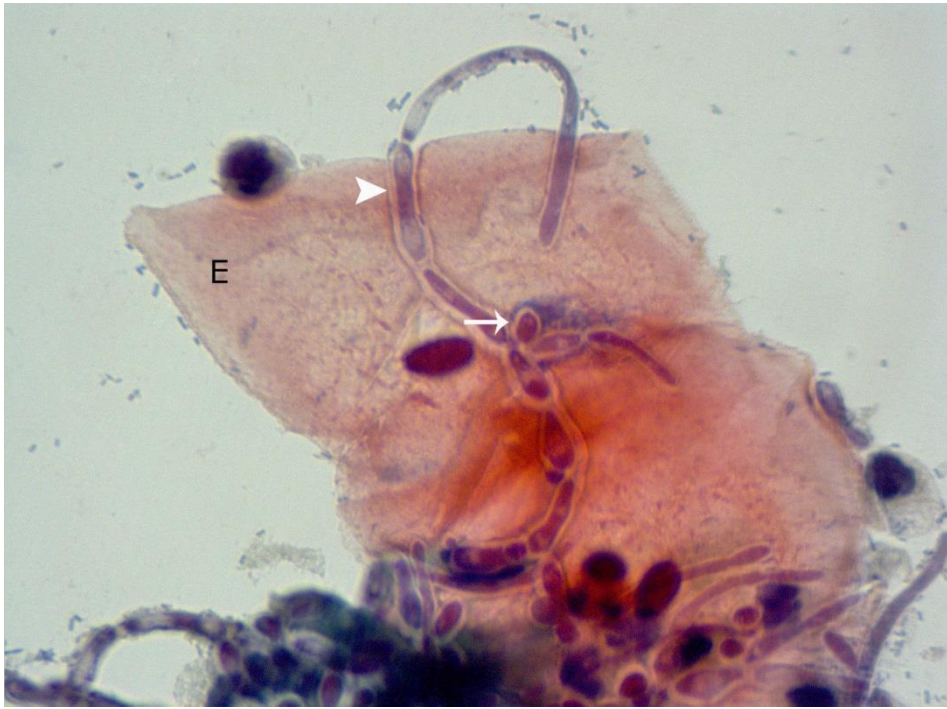
**Şekil 3. 1.** Önemi belirsiz atipik skuamoz hücrelerin (ASCUS) görüldüğü bir olguda çekirdekte az oranda büyüme, çekirdek zarında hafif düzensizlik ve hafif hiperkromatizm (ok) gösteren atipik hücre (E) dikkati çekmektedir (PAP, x1000).



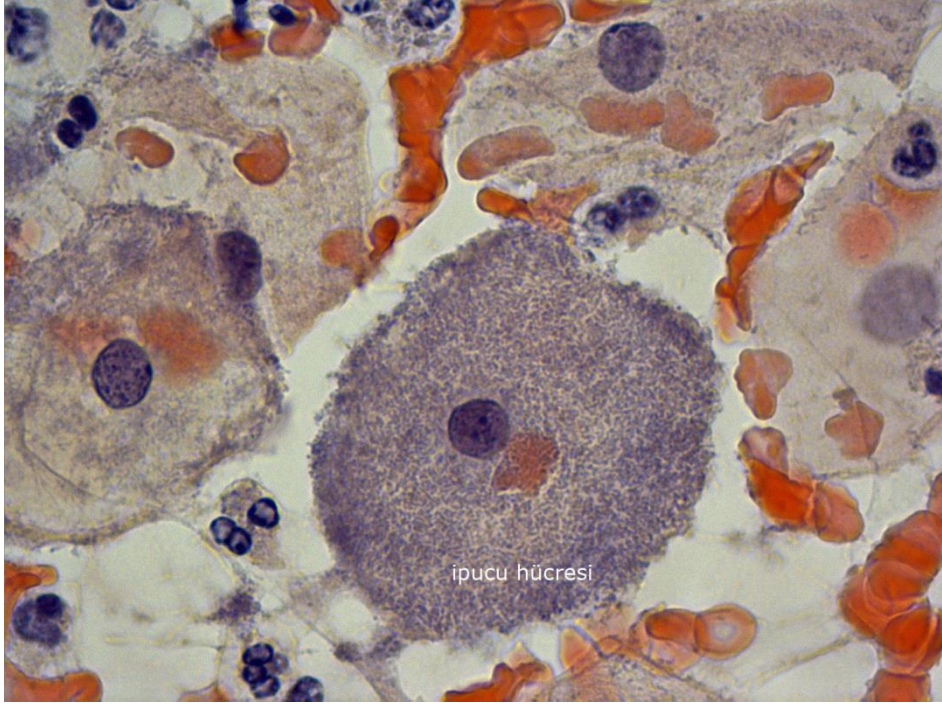
**Şekil 3. 2.** Hafif dereceli skuamoz intraepitelial lezyon (LSIL) saptanmış bir olguda çekirdek zarında düzensizlik (ok başı) ve çekirdek etrafında koilos (ok) adı verilen geniş bir boşluk bulunan koilostotik hücre dikkati çekmektedir (PAP, x1000).



**Şekil 3. 3.** Yüksek dereceli skuamoz intraepitelyal lezyon (HSIL) saptanmış olan bir olguda, çekirdek/sitoplazma oranı artmış, iri çekirdekli ve ASCUS ile LSIL'e göre daha koyu boyanmış (ok) hücreler dikkati çekmektedir. Ayrıca kromatinde kaba kümelenmeler ve çekirdek zarında girinti çıkıntılar (ok başı) olduğu da görülmektedir (PAP, x1000).



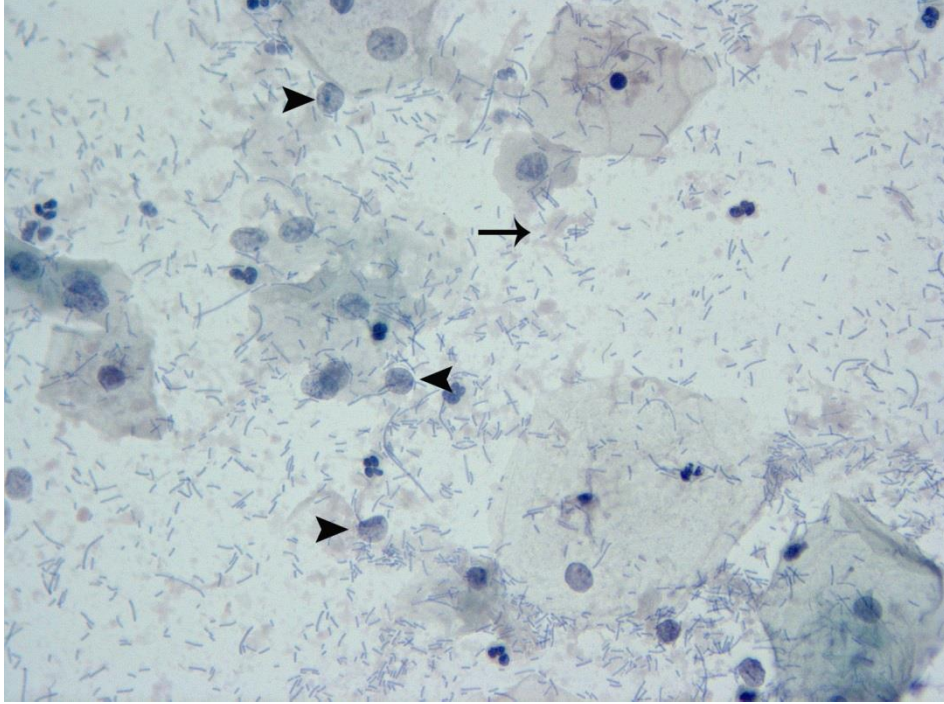
**Şekil 3. 4.** Fungal enfeksiyon varlığını gösteren pseudohif (ok başı) ve blastosporlar (ok) görülmektedir. Pseudohifin epitel hücre (E) sitoplazması içine girmek üzere olduğu dikkatimizi çekmiştir (ok başı) (PAP, x1000).



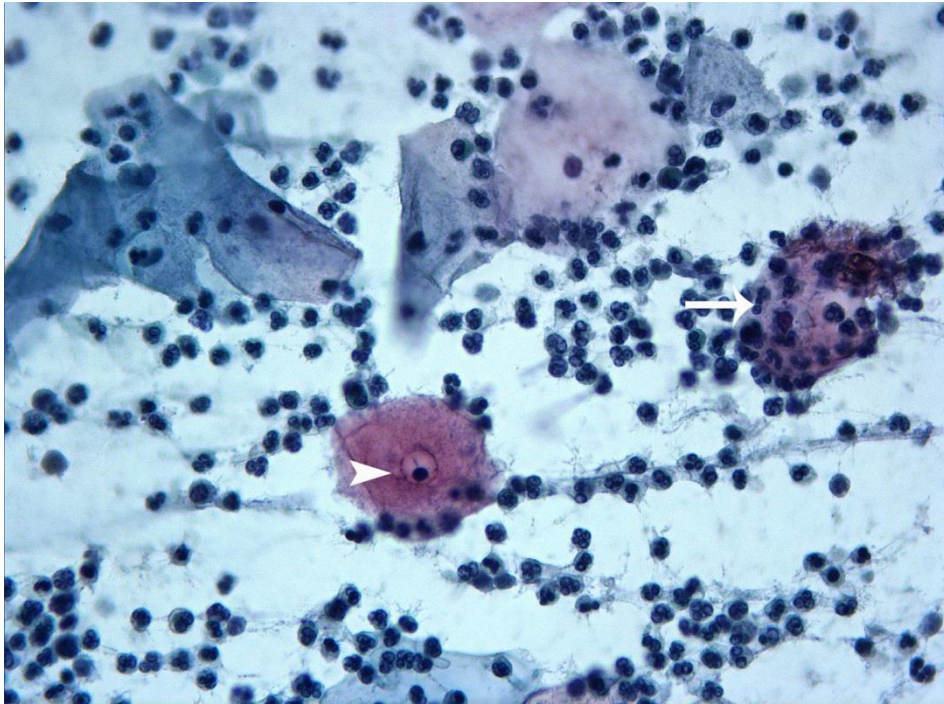
**Şekil 3. 5.** Bakteriyal vajinozis (BV) varlığını gösteren yüzeyi tamamen mikroorganizmalarla kaplı bir ipucu hücresi görülmektedir (PAP, x1000).



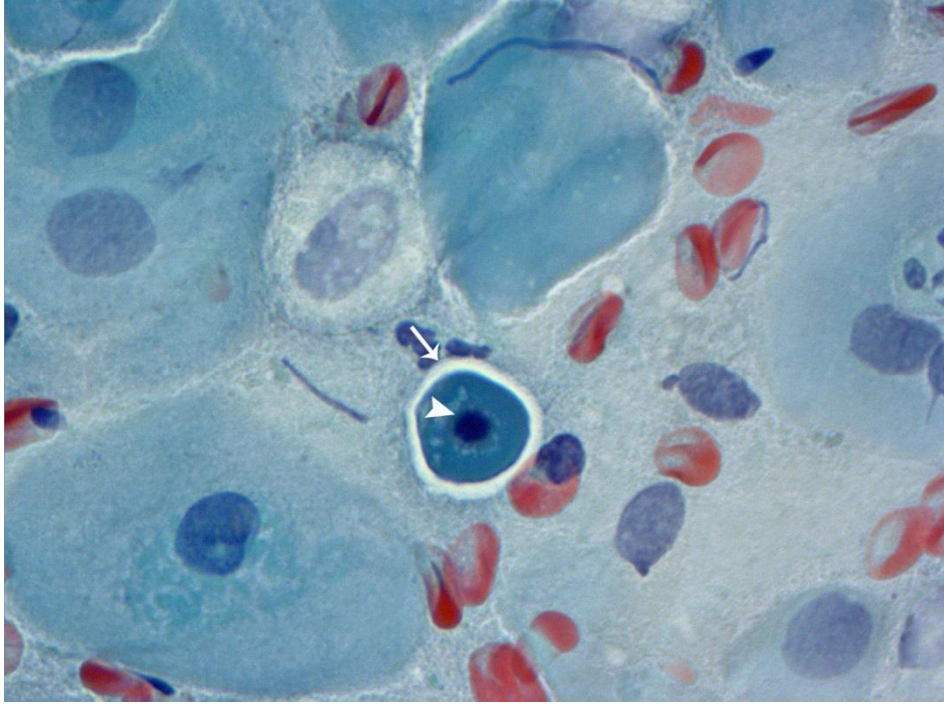
**Şekil 3. 6.** Epitel hücresinin (E) hemen yanında kendisinden bir ton koyu boyanan oval çekirdeği ile bir *Trichomonas vaginalis* (ok başı) görülmektedir (PAP, x1000).



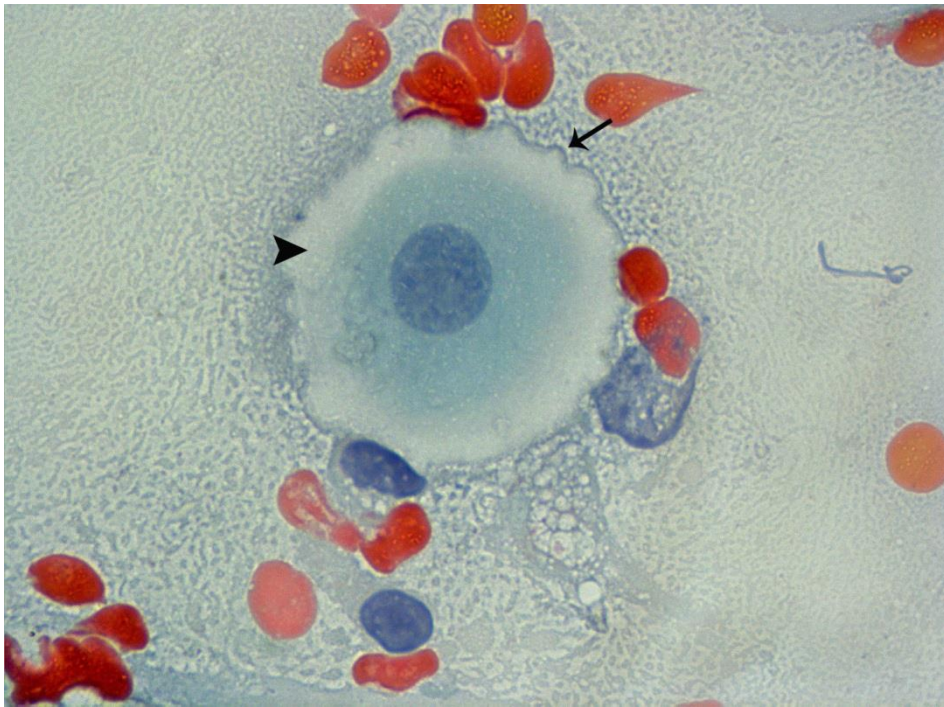
**Şekil 3. 7.** Sitolitik vajinozis (SV) varlığını gösteren bol laktobasiller, bazofilik kümelenmiş hücre grupları, çıplak çekirdekler (ok başı) ve lizis olmuş sitoplazmik parçacıklar (ok) dikkati çekmektedir (PAP, x400).



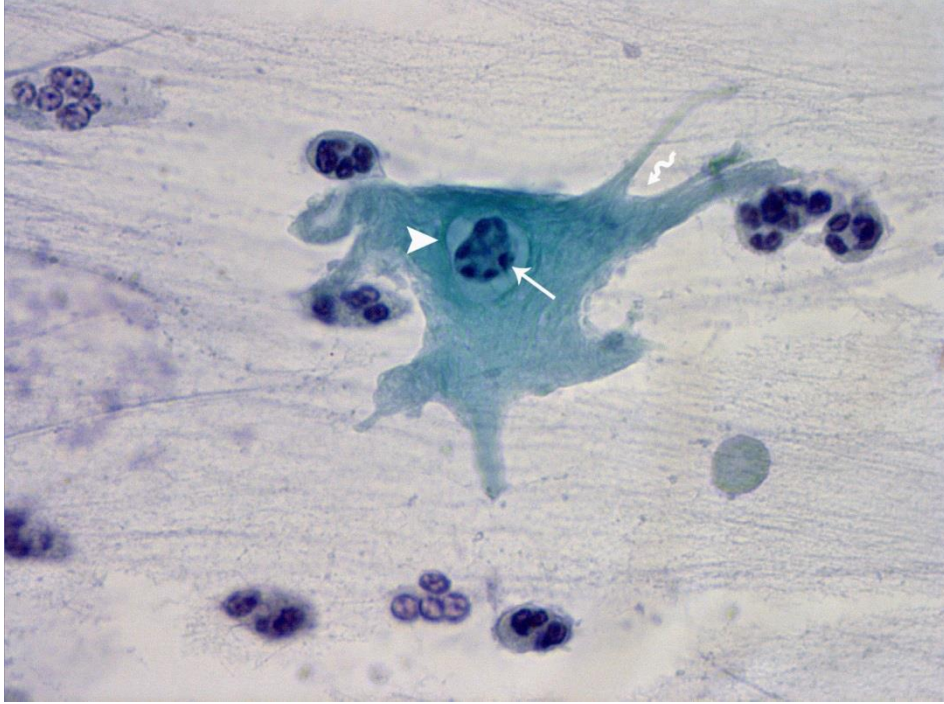
**Şekil 3. 8.** Enfeksiyon etkenleri bulunmayan ancak inflamasyon bulgularını gösteren bir olguda hücrelerin üzerine adeta yapışmış şekilde görülen bol PMNL'ler (ok) ve perinükleer halo (ok başı) bulunan bir hücre dikkati çekmektedir (PAP, x400).



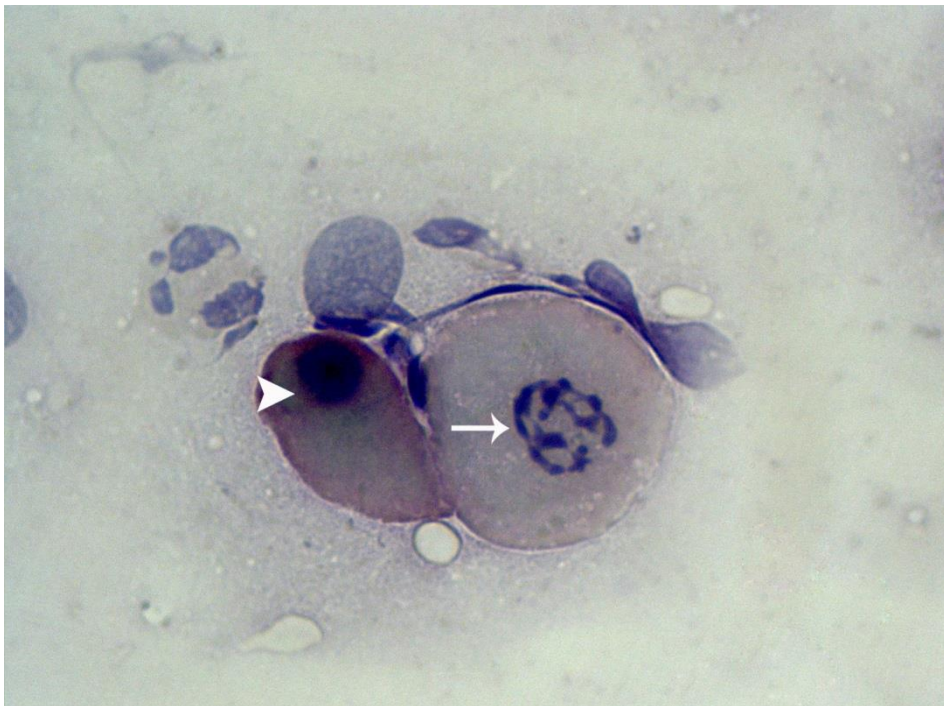
**Şekil 3. 9.** Piknotik çekirdek (ok başı) içeren küçük bir apoptotik hücrenin etrafında olan kalın bir boşluk (ok) dikkati çekmektedir (PAP, x1000).



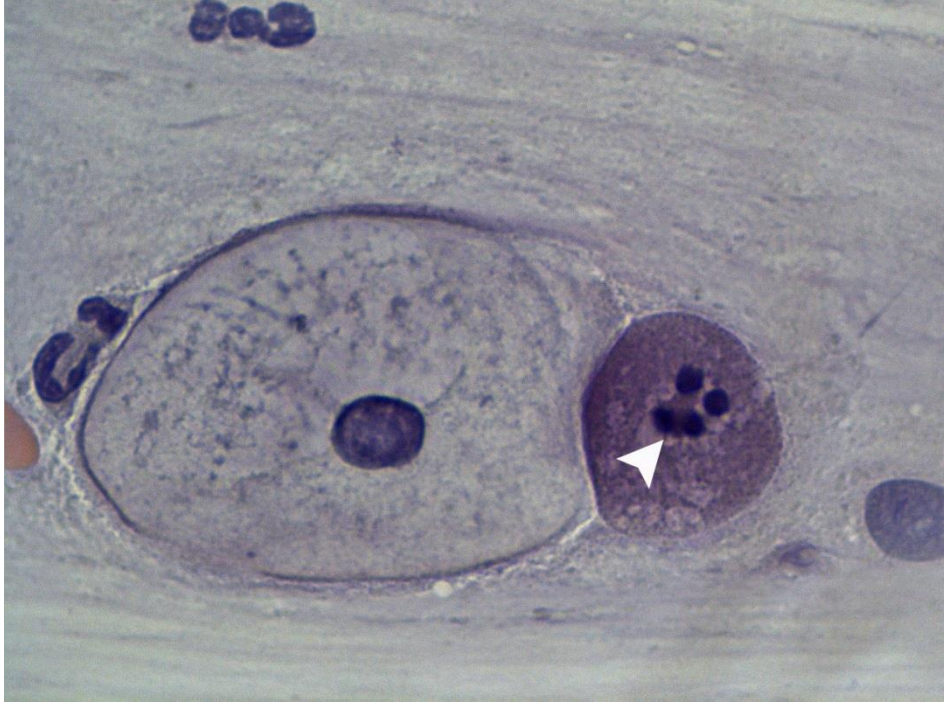
**Şekil 3. 10.** Apoptotik hücre zarının tomurcuklanma şeklinde dışarı doğru yuvarlaklar oluşturduğu, bu yuvarlakların en dış sınırının kalınlığının arttığı (ok) ve tomurcuklanma gösteren hücre zarına yakın bölgedeki sitoplazmanın boyanmadığı (ok başı), bu bölgenin adeta diğer sitoplazma kısmı ile ilişkisinin bozulduğu görülmektedir (PAP, x1000).



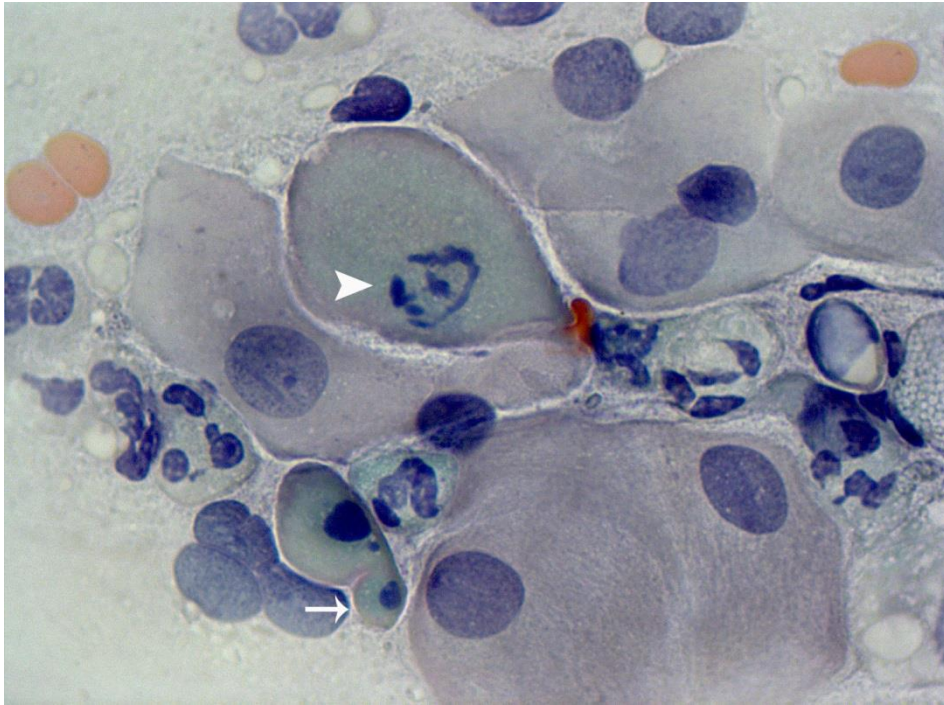
**Şekil 3. 11.** Çekirdek kromatininin dağılarak kümeler şeklinde çekirdeğin periferinde biriktiği (ok) ve adeta saat yüzü görünümü aldığı dikkati çekmektedir. Ayrıca hücrenin sitoplazmasının derin girintiler oluşturduğu (kırık ok) ve çekirdeğin, çekirdek çevresindeki sitoplazma ile bağlantısını kaybederek (ok başı) küçülmeye başladığı da görülmektedir (PAP, x1000).



**Şekil 3. 12.** Çekirdekte karyolizis (ok) ve karyopiknozis (ok başı) olaylarının görüldüğü apoptotik hücreler görülmektedir (PAP, x1000).

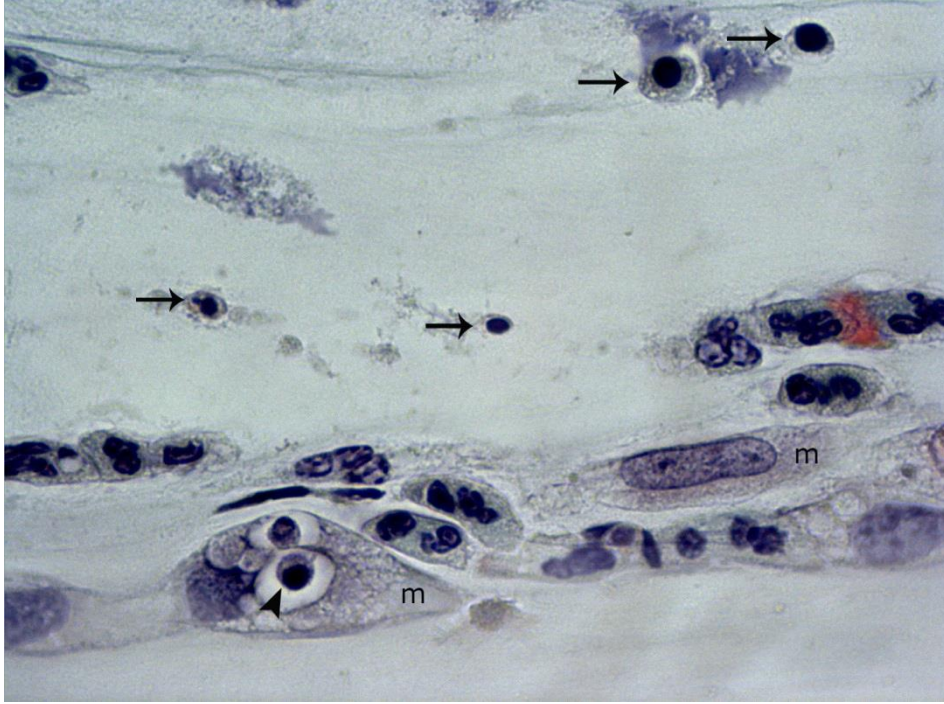


**Şekil 3. 13.** Normal bir epitel hücrenin yanında çekirdeğinde karyorekzis (ok başı) görülen bir apoptotik hücre dikkati çekmektedir (PAP, x1000).

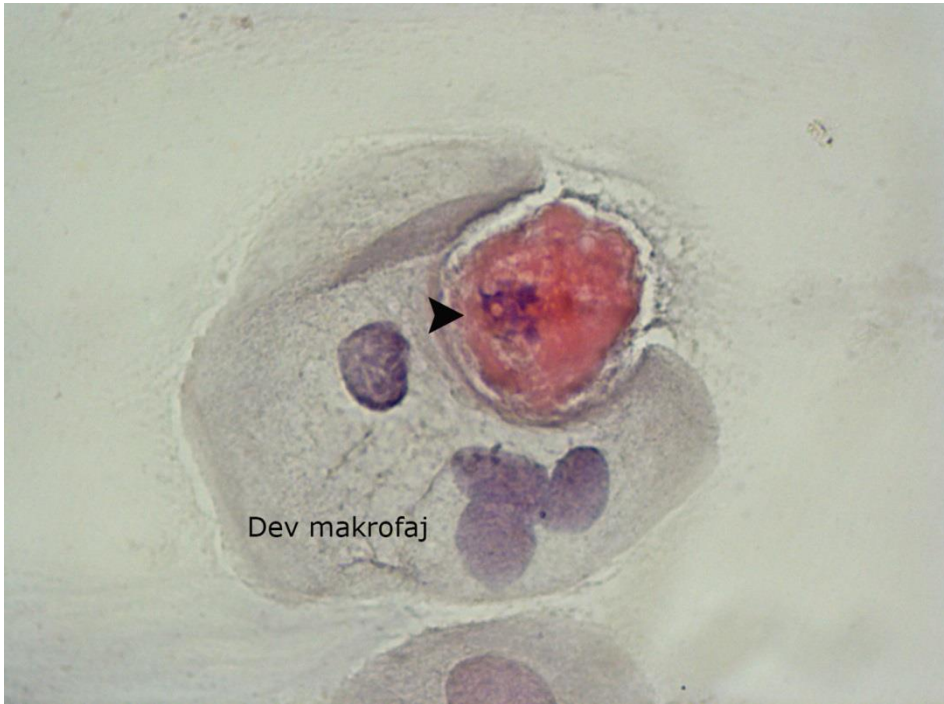


**Şekil 3. 14.** Piknotik çekirdek içeren bir hücreden, içinde çekirdek parçaları bulunan küçük bir parçanın ayrılmak üzere olduğu (ok) dikkati çekmektedir. Ayrıca, çekirdeğinde karyolizis (ok başı) değişikliği gösteren bir apoptotik hücre görülmektedir (PAP, x1000).

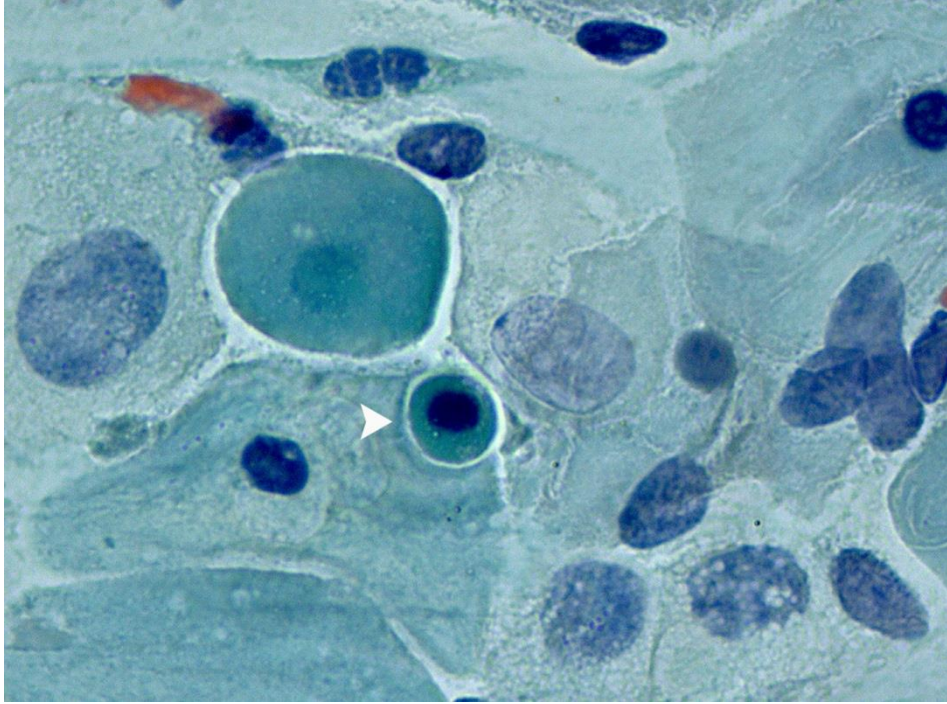




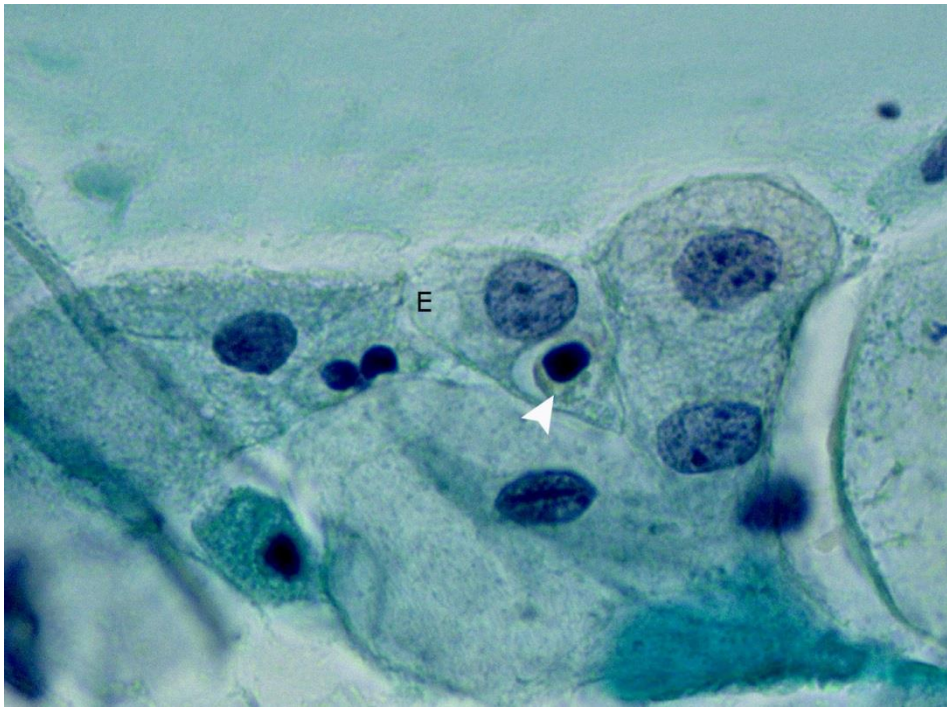
**Şekil 3. 15.** Bol köpüklü sitoplazmaya sahip bir makrofajın (m) içinde; piknotik çekirdekli, etrafı az sitoplazmalı yapıların (ok başı) fagosit edilmiş olduğu görülmektedir. Alanda piknotik çekirdekli yapılar (ok) da dikkati çekmektedir (PAP, x1000).



**Şekil 3. 16.** Çok çekirdekli bir dev makrofajın büyük bir apoptotik hücreyi (ok başı) fagosit etmek üzere yalancı ayaklar uzattığı görülmektedir (PAP, x1000).



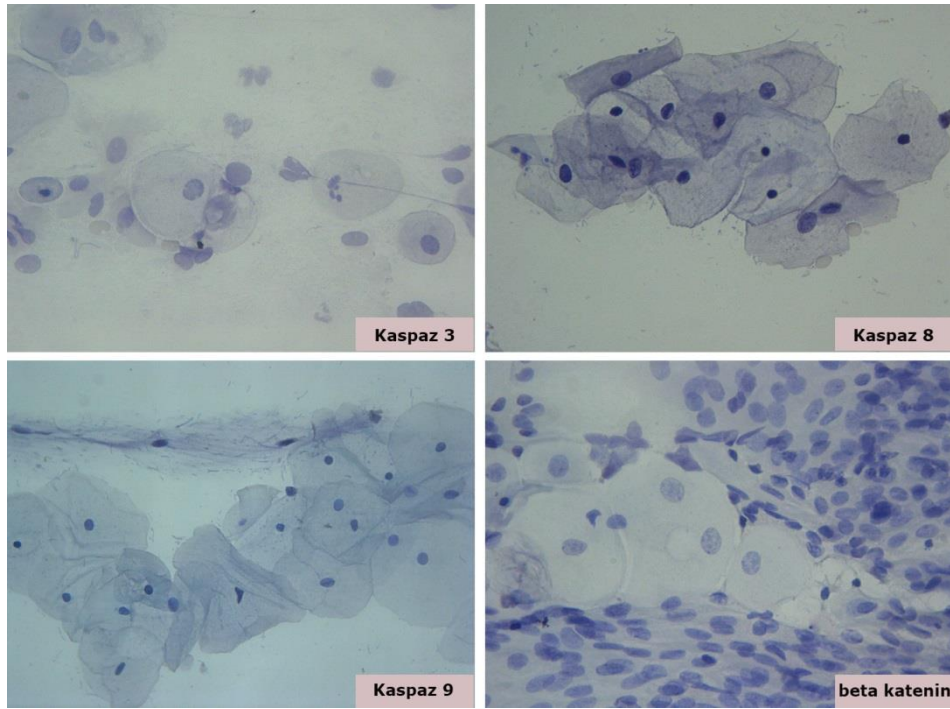
**Şekil 3. 17.** Normal bir epitel hücresinin küçük piknotik çekirdekli bir yapıyı hücre içine almak üzere yalancı ayaklar (ok başı) uzattığı tespit edilmiştir (PAP, x1000).



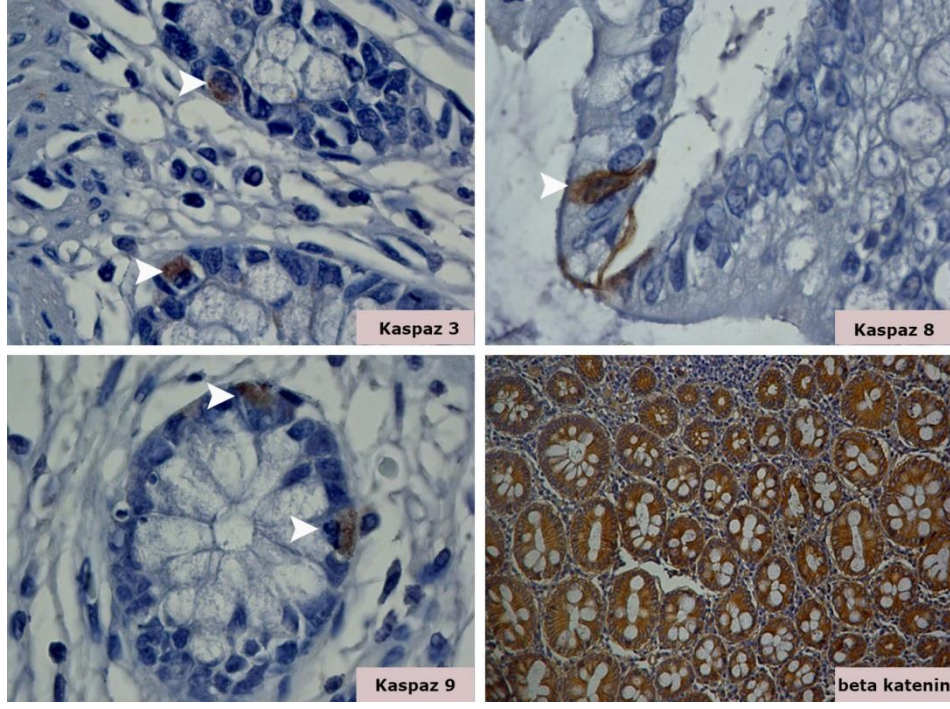
**Şekil 3. 18.** Küçük piknotik çekirdekli bir yapının (ok başı) tamamının epitel hücresi (E) içine alınmış olduğu dikkati çekmektedir (PAP, x1000).

### 3.2. Servikovajinal örneklerin immünohistokimyasal olarak incelenmesi

Servikovajinal örnekler  $\beta$ -katenin, aktif kaspaz 3, aktif kaspaz 8 ve aktif kaspaz 9 antikoları ile immünohistokimyasal yöntem kullanılarak boyanmıştır. İmmünohistokimyasal incelemede bu proteinlerin hücrede bulunması pozitif (+), bulunmaması ise negatif (-) olarak değerlendirilmiştir. İmmünohistokimyasal değerlendirme yapılırken, proteinlerin hücredeki varlığının yanı sıra boyanma yoğunluğu da zayıf (+), orta (++) , kuvvetli (+++) ve çok kuvvetli (++++ ) olarak derecelendirilmiştir. Pozitif olan hücrelerin yüzdesi (%) ile boyanma yoğunluğunun çarpılması sonucu her olguya ait H-skorlar hesaplanmış ve bu skorlar birbirleri ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Ayrıca boyama yönteminin doğruluğunu test etmek için uygulanmış olan negatif kontrollerde herhangi bir boyanma gözlenmezken (Şekil 3.19), pozitif kontrolde DAB nedeniyle kahverengi renkte boyanmalar görülmüştür (Şekil 3.20).



Şekil 3. 19. Negatif kontrol örnekleri (x400)



**Şekil 3. 20.** Pozitif kontrol örnekleri (x400)

### 3.2.1. $\beta$ -katenin proteininin immünositokimyasal olarak değerlendirilmesi

İmmünositokimyasal incelemede  $\beta$ -katenin proteininin çok katlı yassı epitel hücrelerinde hücre zarı, sitoplazma ve çekirdekteki varlığı ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Araştırma kapsamındaki 224 hastanın 200'ünde (%89,3) çok katlı yassı epitel hücre zarlarının pozitif olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.21). Işık mikroskopik inceleme sırasında epitel hücrelerinin birbirlerine temas ettikleri noktaların daha koyu boyandığı dikkati çekmiştir (Şekil 3.22). Apoptotik morfolojiye sahip hücreler incelendiğinde, hücre zarlarının  $\beta$ -katenin proteini açısından negatif olduğu önemli bir bulgu olarak kaydedilmiştir (Şekil 3.23).

Çalışmamızda,  $\beta$ -katenin proteininin epitel hücre zarındaki pozitifliğinin yanı sıra sitoplazma ve çekirdekteki pozitifliği de değerlendirilmiştir (Şekil 3.24). Apoptotik hücrelerde sitoplazma ve çekirdeğin  $\beta$ -katenin proteini açısından negatif olduğu dikkat çekici bir bulgu olarak kaydedilmiştir (Şekil 3.25)

Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunun inaktif olduğunu belirten durum sadece hücre zarının ve/veya sitoplazmanın zayıf (+) olarak boyanması iken, sinyalin aktif olduğu durumlar sitoplazmanın orta (++) , kuvvetli (+++), çok kuvvetli (++++ ) ve/veya çekirdeğin ise pozitif (+) boyandığı durumlar olarak kabul edilmiştir. Çalışma

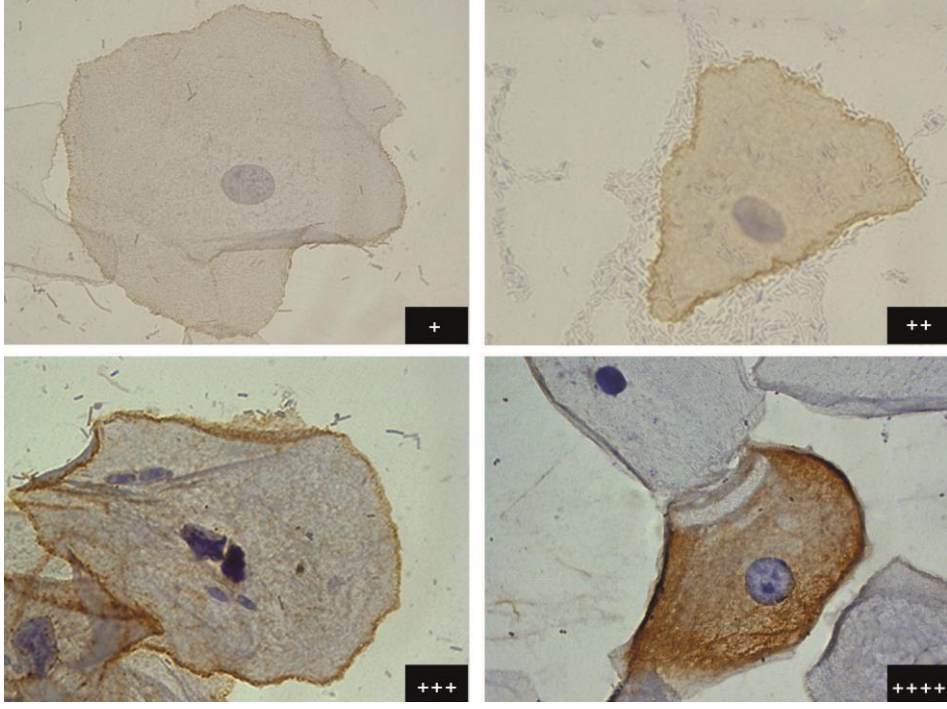
kapsamına alınan olgular Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunun aktif ve inaktif olduğu durumlar açısından incelendiğinde; 224 olgunun 44'ünde (%19,6) Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunun aktif, 180'inde (%80,4) ise inaktif olduğu saptanmış ve Çizelge 3.4'te gösterilmiştir.

Sinyal yolunun pozitif olduğu 44 hastanın 21'inde (%47,7) sitoplazmanın yanı sıra çekirdekte de pozitiflik gözlenmiştir. Bu gözlemlerden Şekil 3.26'da görüldüğü gibi bazı olgularda çekirdeğin tümünde pozitiflik görülürken, bazı olguların çekirdek zarında pozitiflik olduğu (Şekil 3.27), hatta bazı çekirdeklerin kromatininin bir kısmında pozitiflik görülürken diğer tarafının negatif olduğu ilginç bir bulgu olarak kaydedilmiştir (Şekil 3.28).

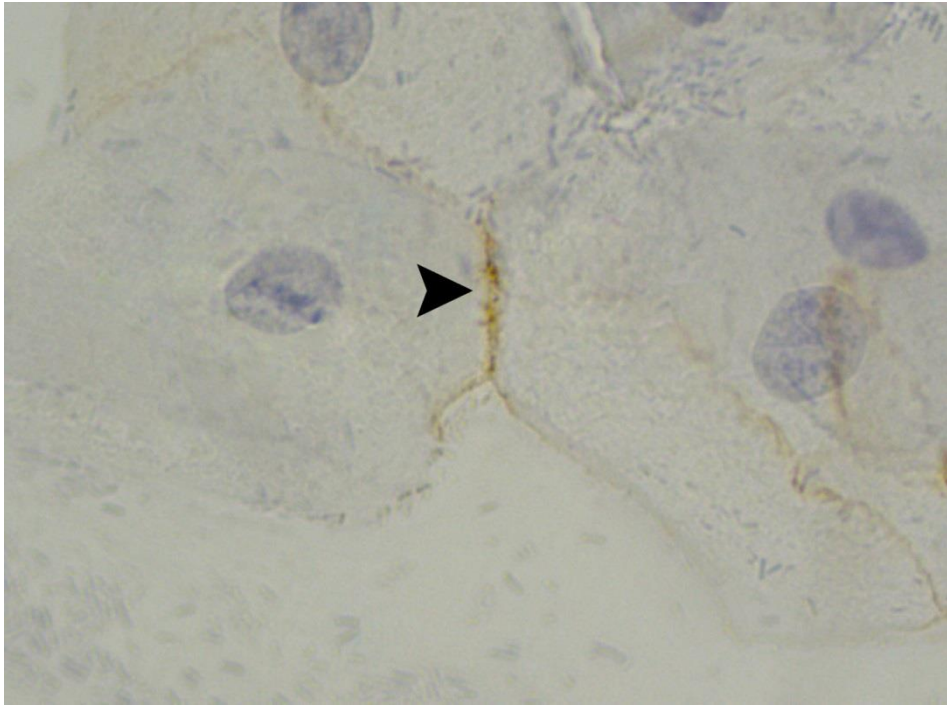
Atipik hücrelerde  $\beta$ -katenin proteininin varlığı incelendiğinde, Şekil 3.29 ve Şekil 3.30'da görüldüğü gibi bazı HSIL hücrelerinde sitoplazma ve çekirdeğin kuvvetli pozitif boyandığı, LSIL hücrelerinde ise sitoplazmanın kuvvetli pozitif, çekirdeğin ise negatif olduğu belirlenmiştir.

**Çizelge 3. 4.** Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu aktivitesinin immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi

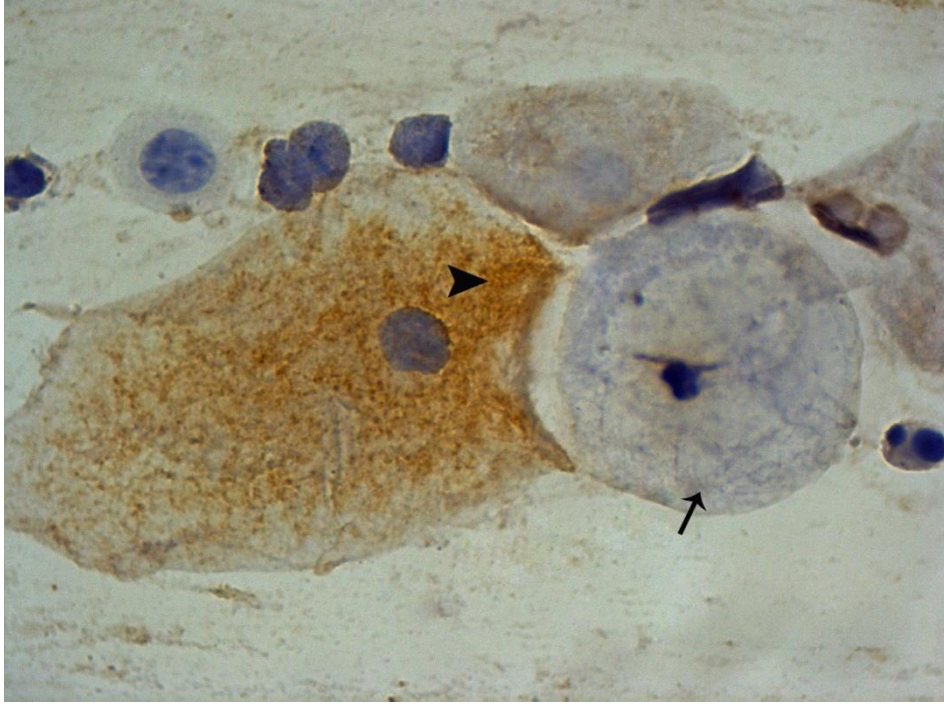
İmmünohistokimyasal sonuçlar	Toplam Hasta sayısı (n=224, %100)	
	Hasta sayısı	Yüzde (%)
Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu aktif	44	19,6
Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu inaktif	180	80,4
<b>TOPLAM</b>	224	100



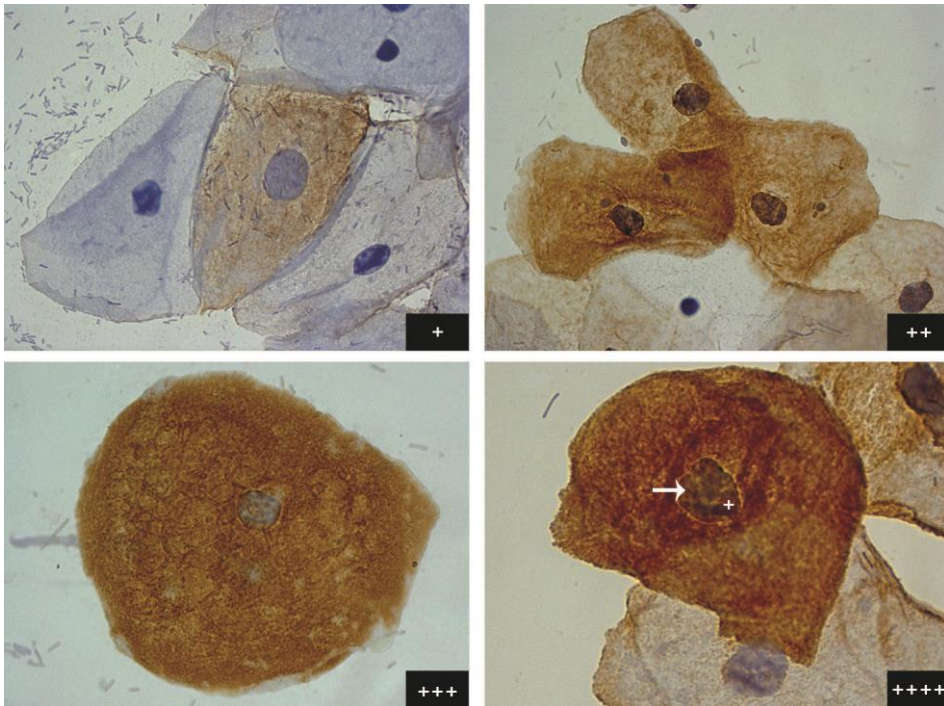
**Şekil 3. 21.** Epitel hücrelerin zarlarında zayıf (+), orta (++) , kuvvetli (+++) ve çok kuvvetli (++++ ) pozitiflikler görülmektedir (x1000).



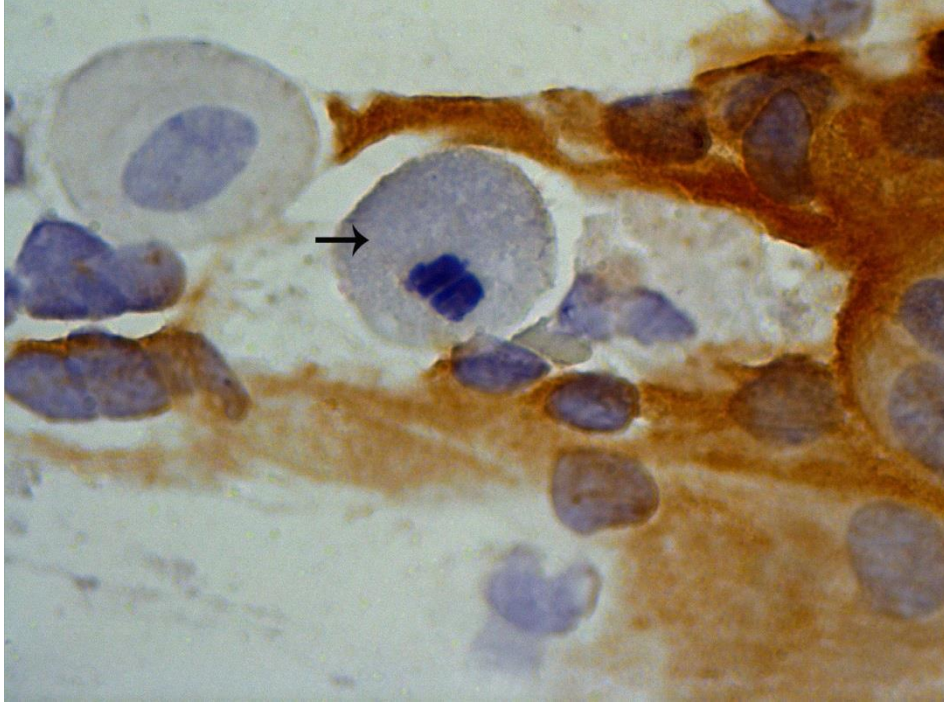
**Şekil 3. 22.** Epitel hücrelerin birbirlerine temas ettikleri noktanın daha koyu boyandığı (ok başı) dikkati çekmektedir (x1000).



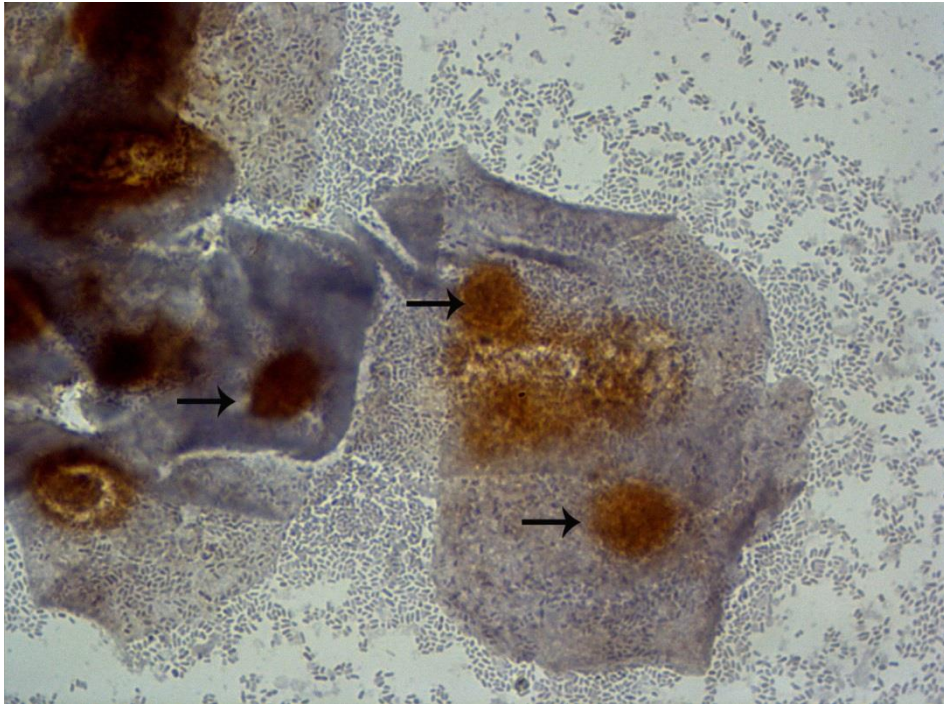
**Şekil 3. 23.** Pozitif (ok başı) bir normal çok katlı yassı epitel hücrenin yanında, piknotik çekirdekli, hücre zarı, sitoplazma ve çekirdeği (ok)  $\beta$ -katenin proteini açısından negatif bir hücre görülmektedir (x1000).



**Şekil 3. 24.** Epitel hücrelerin sitoplazmalarında zayıf (+), orta (++) , kuvvetli (+++) ve çok kuvvetli (++++) pozitiflikler görülmektedir. Ayrıca çekirdekteki pozitiflik de (ok) dikkati çekmektedir (x1000).

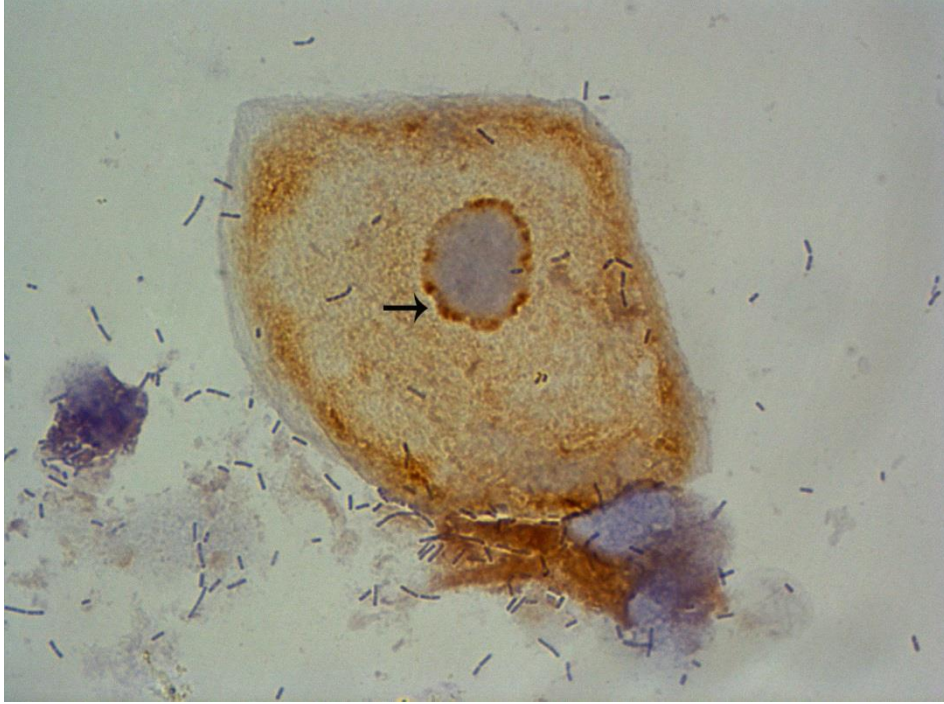


**Şekil 3. 25.** Pozitif hücrelerin arasında, hücre zarı, sitoplazması ve çekirdeği  $\beta$ -katenin proteini açısından negatif (ok), piknotik çekirdekli bir apoptotik hücre görülmektedir (x1000).

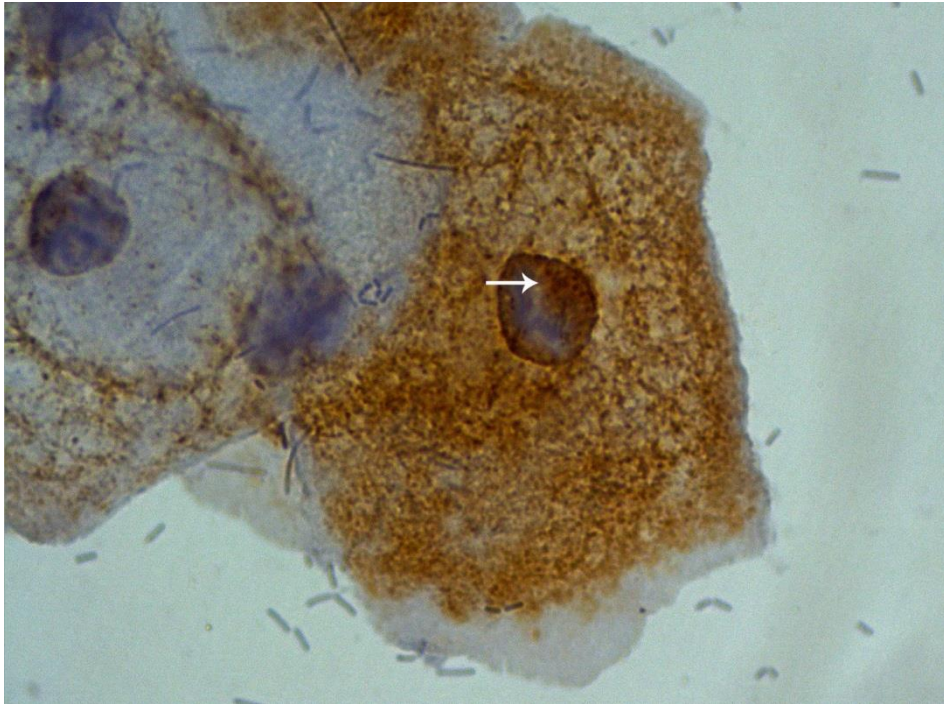


**Şekil 3. 26.** Çekirdeklerinin tamamı  $\beta$ -katenin proteini açısından pozitif (ok) hücreler görülmektedir (x1000).

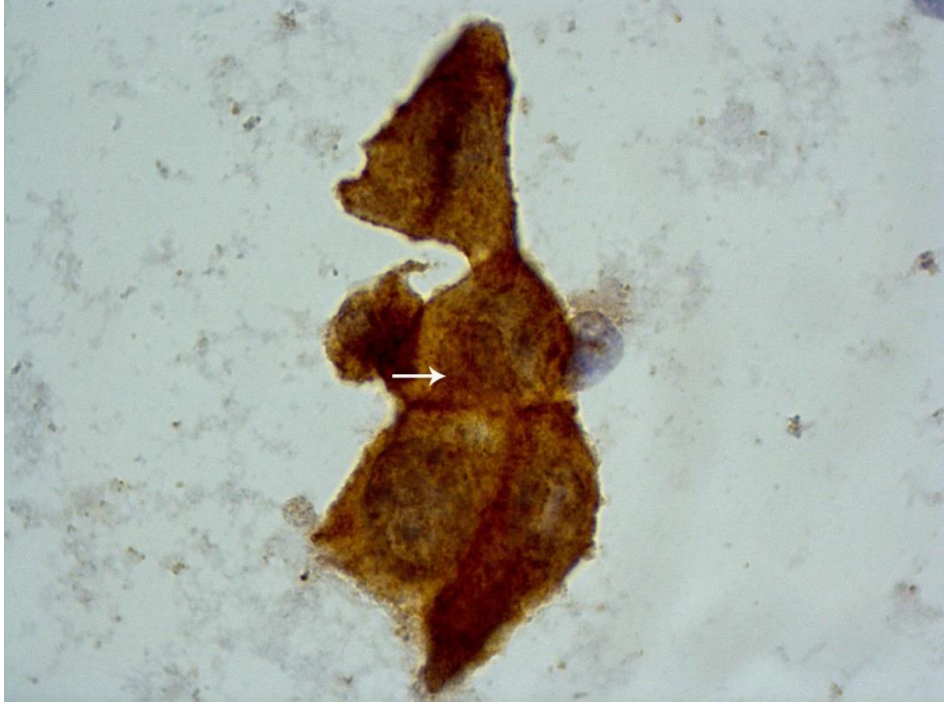




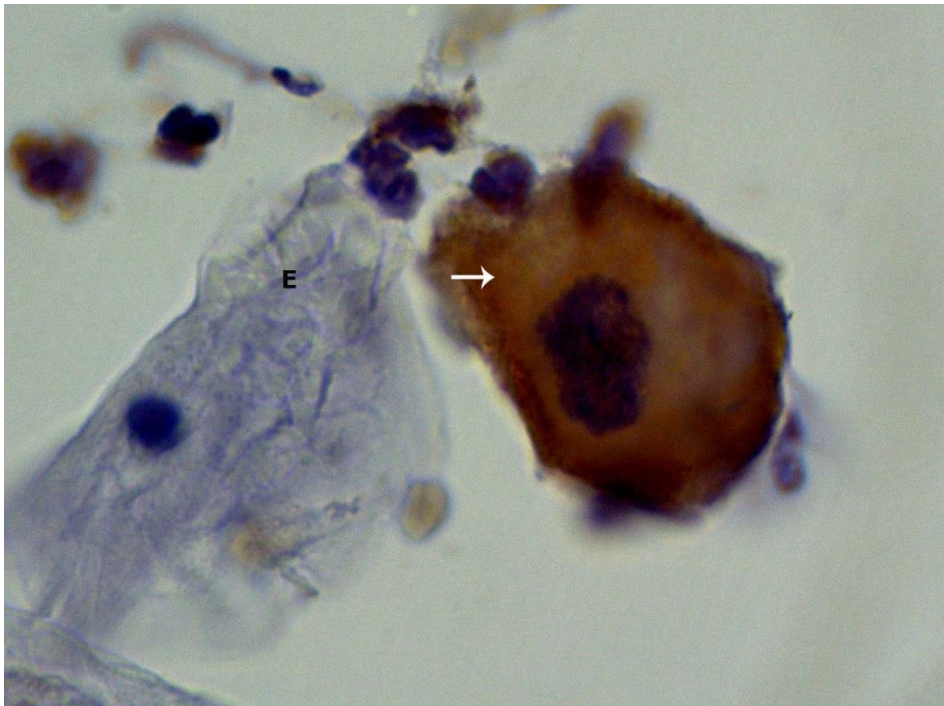
**Şekil 3. 27.** Çekirdek zarında (ok)  $\beta$ -katenin proteini açısından pozitiflik görülen bir hücre dikkati çekmektedir (x1000).



**Şekil 3. 28.** Sitoplazması  $\beta$ -katenin proteini açısından pozitif olan bir hücrenin çekirdeğinde kromatininin bir kısmında pozitiflik (ok) görülürken diğer tarafının negatif olduğu dikkati çekmektedir (x1000).



**Şekil 3. 29.** HSIL varlığı belirlenen olguda sitoplazması oldukça koyu (++++) ve çekirdeği pozitif (ok) olan atipik hücreler dikkati çekmektedir (x1000).



**Şekil 3. 30.** LSIL varlığı belirlenen olguda  $\beta$ -katenin proteini açısından negatif (E) bir hücrenin yanında sitoplazması oldukça kuvvetli (++++), çekirdeği negatif atipik bir hücre görülmektedir (x1000).

### 3.2.2. Aktif kaspaz 3 enziminin immünositokimyasal olarak değerlendirilmesi

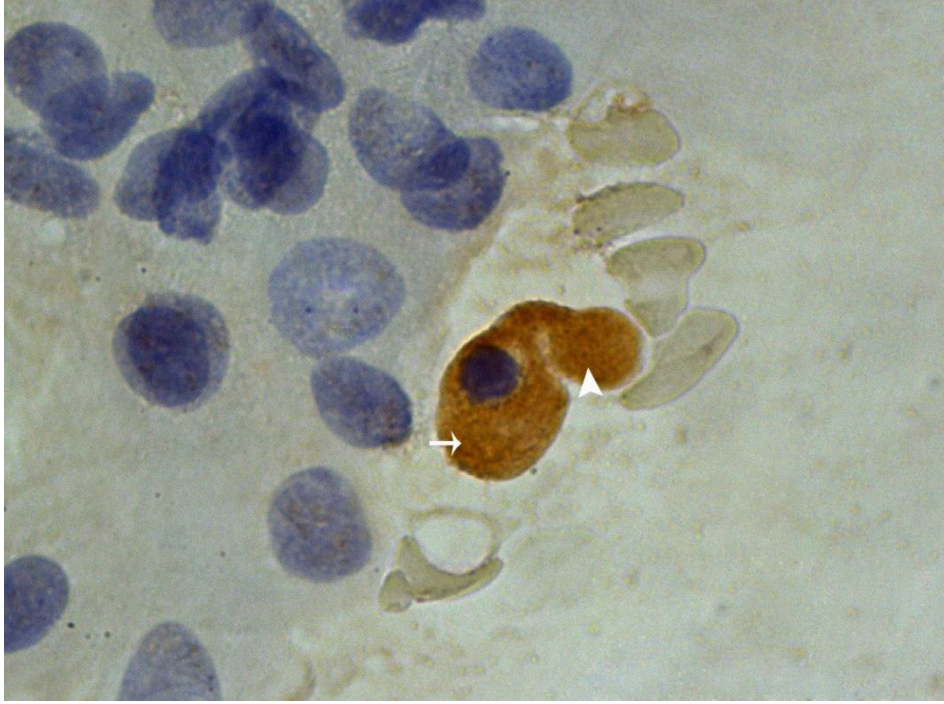
Servikovajinal örneklerin apoptozis pozitifliği açısından immünositokimyasal olarak incelenmesinde, aktif kaspaz 3 antikoru kullanılmıştır. Çalışma kapsamındaki 224 olgunun 95'inde (%42,4) apoptozisin pozitif, 129'unda (%57,6) ise negatif olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 3.5.).

Apoptozis pozitif olgulardan birinde Şekil 3.31'de görüldüğü gibi bir hücrenin tüm sitoplazmasının aktif kaspaz 3 ile kahverengi renkte boyandığı, hatta pozitif bir hücrenin bir kısmının yuvarlak bir şekil alarak, kopmak üzere olabileceği gözlenmiştir. İlginç bir bulgu olarak hücre zarında tomurcuklanmanın olduğu bölgelerde aktif kaspaz 3 enziminin pozitif olduğu (Şekil 3.32), Şekil 3.33'de ise tomurcuklanma olmadığı halde hücre zarında yer yer kümelenmiş pozitifliğin olduğu gözlenmiştir. Bazı hücrelerde ise noktacıklar şeklinde kümelenme göstermeyip, zarın tümüne birden dağılan ve devamlılık gösteren kalın bir pozitifliğin olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.34). Bazı hücrelerde hem sitoplazma hem de çekirdeğin tümünün (Şekil 3.35), bazı hücrelerde ise çekirdek zarının aktif kaspaz 3 açısından pozitif olduğu saptanmıştır (Şekil 3.36).

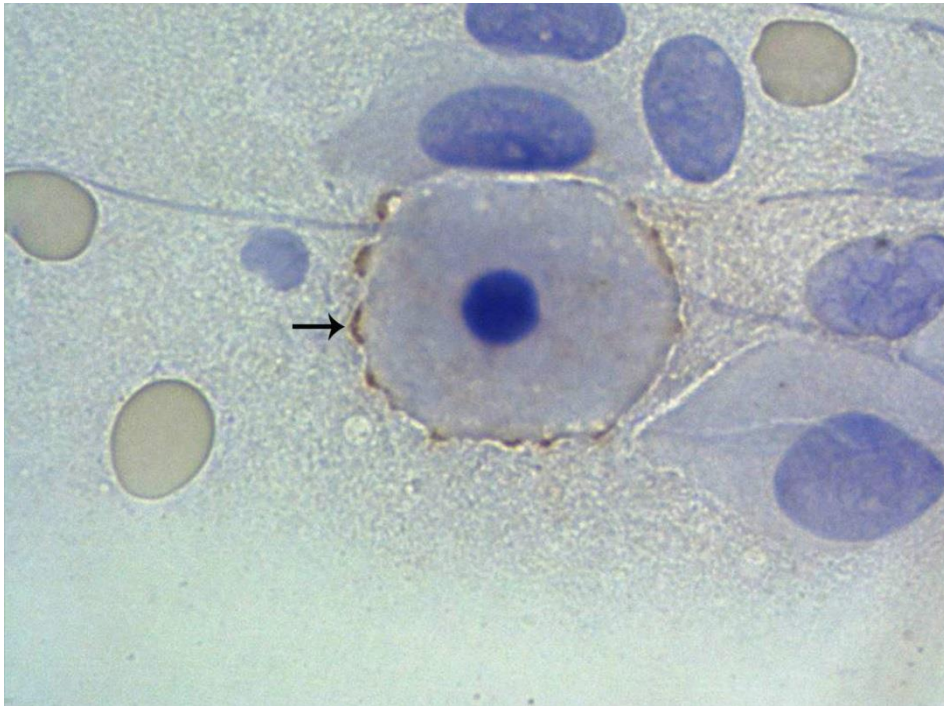
Çok katlı yassı epitel hücrelerin apoptotik hücrelerle olan ilişkisi değerlendirildiğinde Şekil 3.37'de aktif kaspaz 3 açısından negatif olan bir hücrenin yalancı ayaklar oluşturarak aktif kaspaz 3 pozitif olan bir apoptotik hücreyi fagosite etmek üzere olduğu, Şekil 3.38'de ise apoptotik hücre parçacıklarını fagosite ettiği görülmüştür. Apoptotik hücrelerin makrofajlarla ilişkisi incelendiğinde ise bol köpüklü sitoplazmalı aktif kaspaz 3 negatif olan makrofajların, aktif kaspaz 3 pozitif olan apoptotik hücre parçacıklarını fagosite ettiği Şekil 3.39'da gösterilmiştir.

**Çizelge 3. 5.** Apoptozis varlığının immünositokimyasal olarak değerlendirilmesi

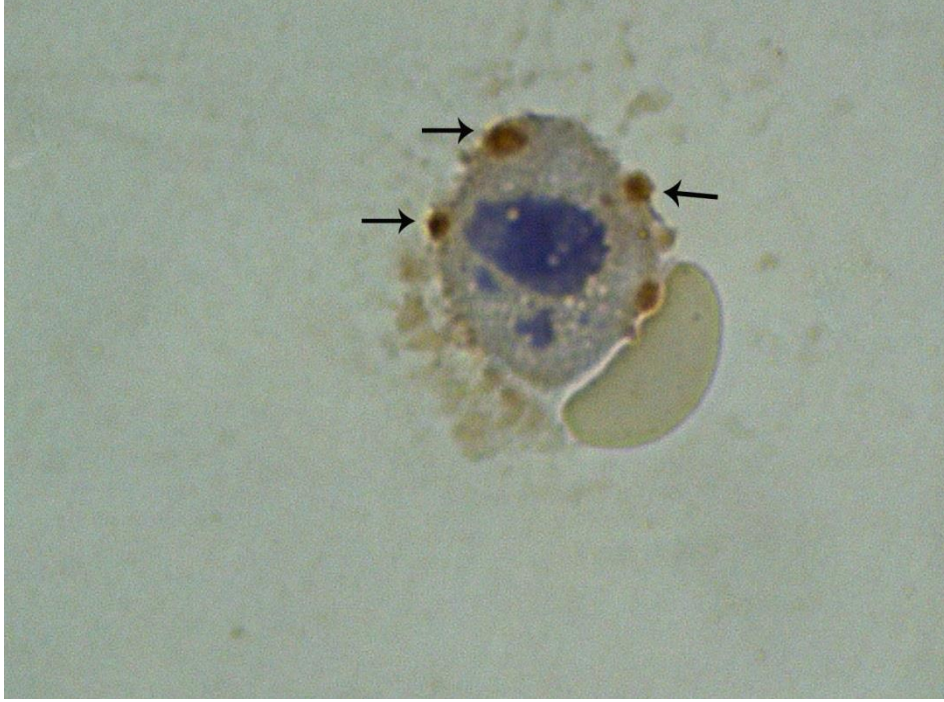
İmmünositokimyasal sonuçlar	Toplam Hasta sayısı (n=224, %100)	
	Hasta sayısı	Yüzde (%)
<b>Aktif kaspaz 3 (Apoptozis) (+)</b>	95	42,4
<b>Aktif kaspaz 3 (Apoptozis) (-)</b>	129	57,6
<b>TOPLAM</b>	224	100



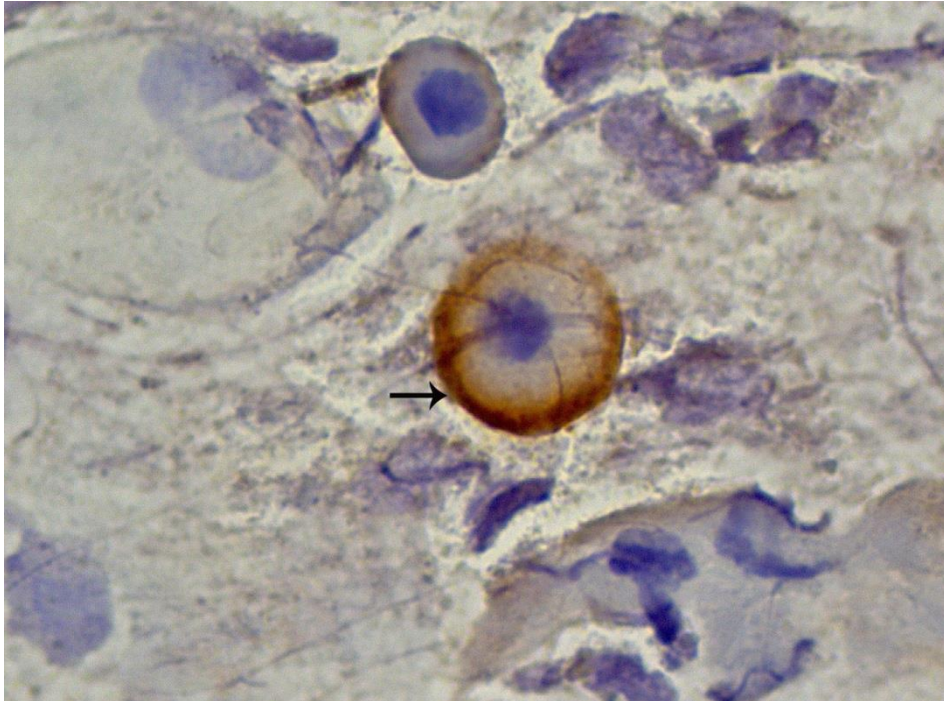
**Şekil 3. 31.** Apoptozis pozitif olgulardan birinde bir hücrenin tüm sitoplazmasının (ok) aktif kaspaz 3 ile pozitif boyandığı, hücrenin bir kısmının (ok başı) yuvarlak bir şekil alarak, kopmak üzere olabileceği dikkati çekmektedir (x1000).



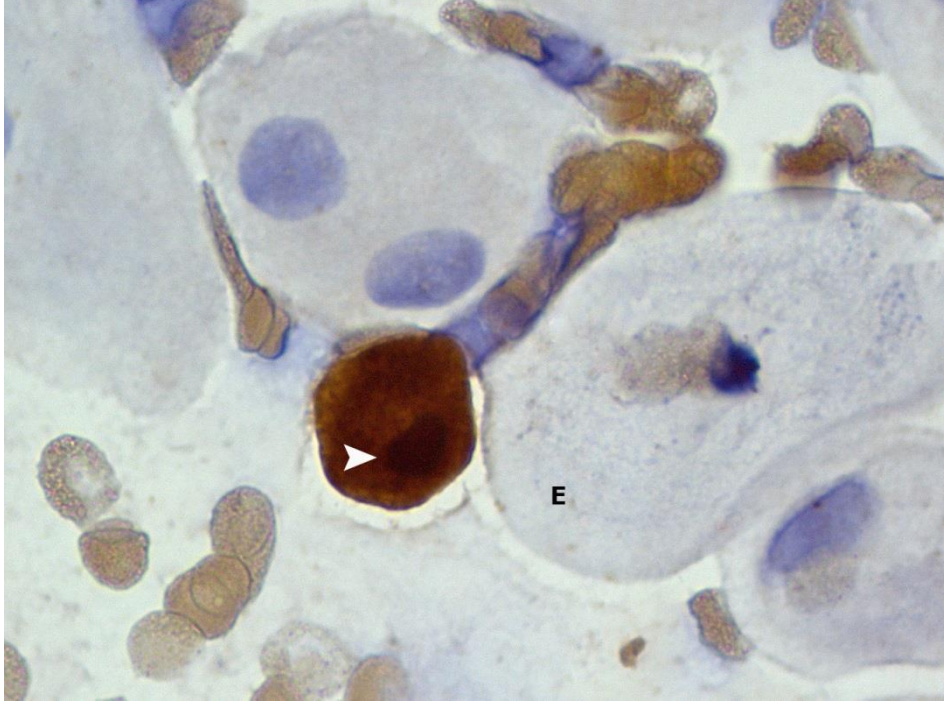
**Şekil 3. 32.** Hücre zarında tomurcuklanma olduğu belirlenen bir apoptotik hücrede, tomurcuklanmanın olduğu bölgelerde aktif kaspaz 3 enziminin pozitif (ok) olduğu dikkati çekmiştir (x1000).



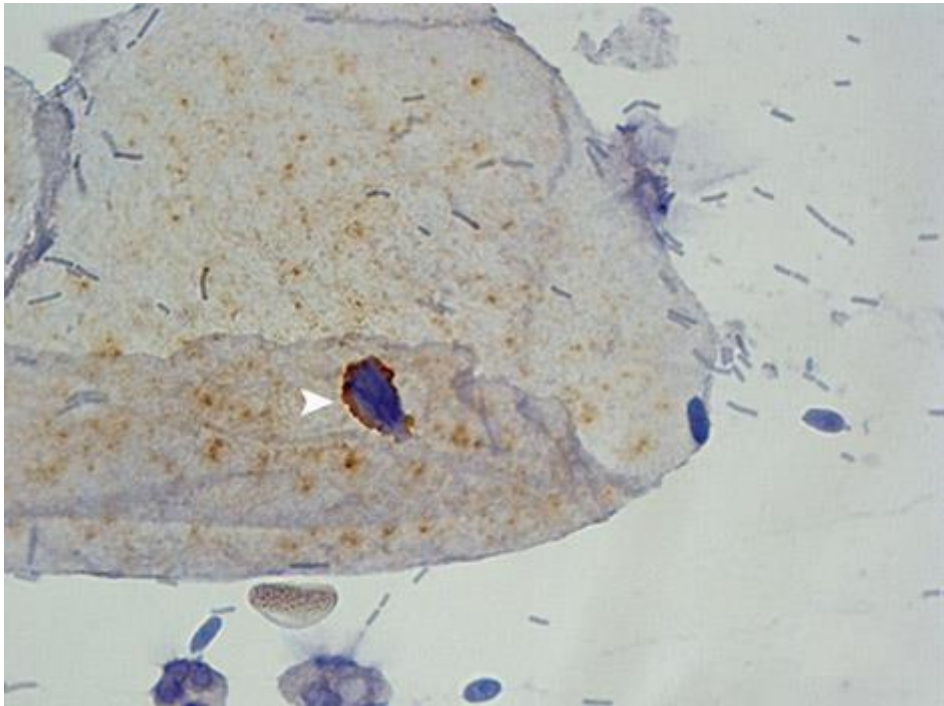
**Şekil 3. 33.** Tomurcuklanma olmadığı halde hücre zarında yer yer kümelenmiş (ok) pozitifliğin olduğu apoptotik bir hücre dikkati çekmektedir (x1000).



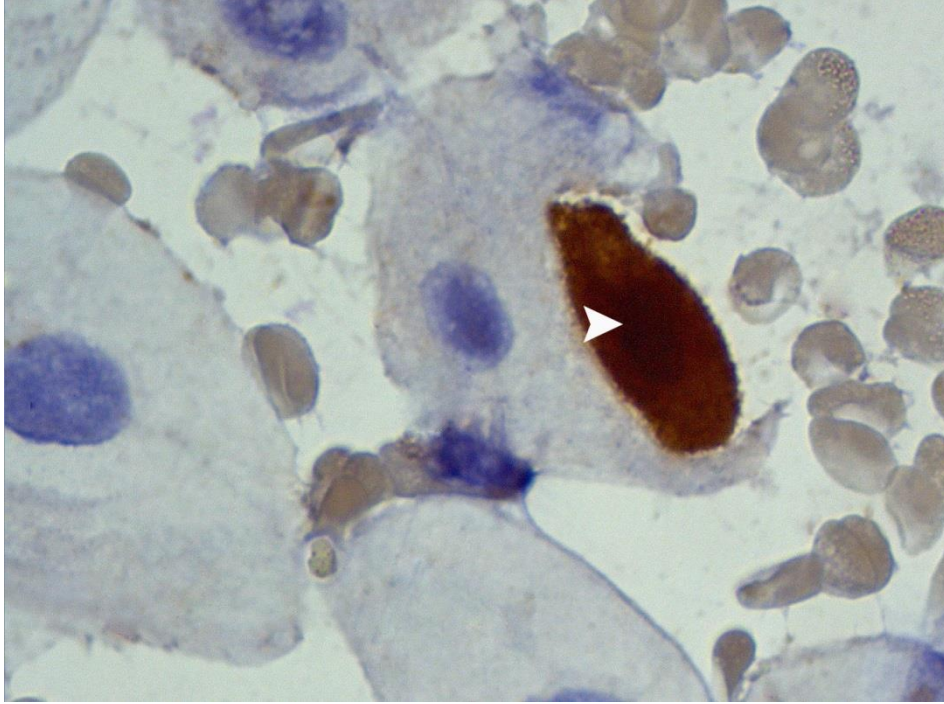
**Şekil 3. 34.** Hücre zarının çevresinde (ok) aktif kaspaz 3 enzimi açısından kalın bir pozitiflik olduğu dikkati çekmektedir (x1000).



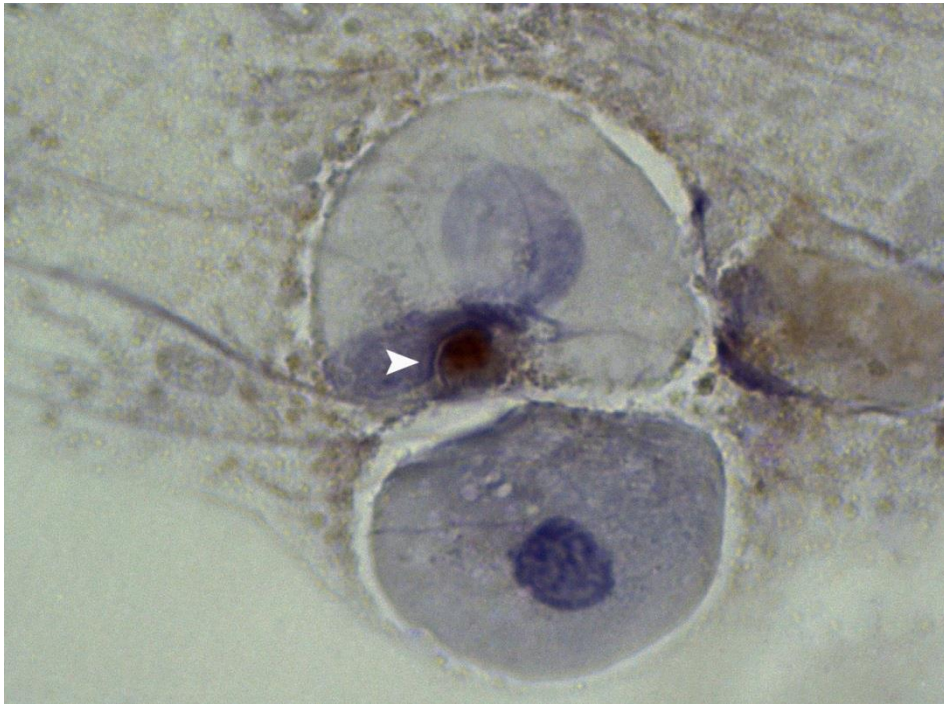
**Şekil 3. 35.** Aktif kaspaz 3 açısından negatif olan hücrelerin (E) arasında sitoplazması ve çekirdeği (ok başı) oldukça koyu boyanan (++++) bir apoptotik hücre görülmektedir (x1000).



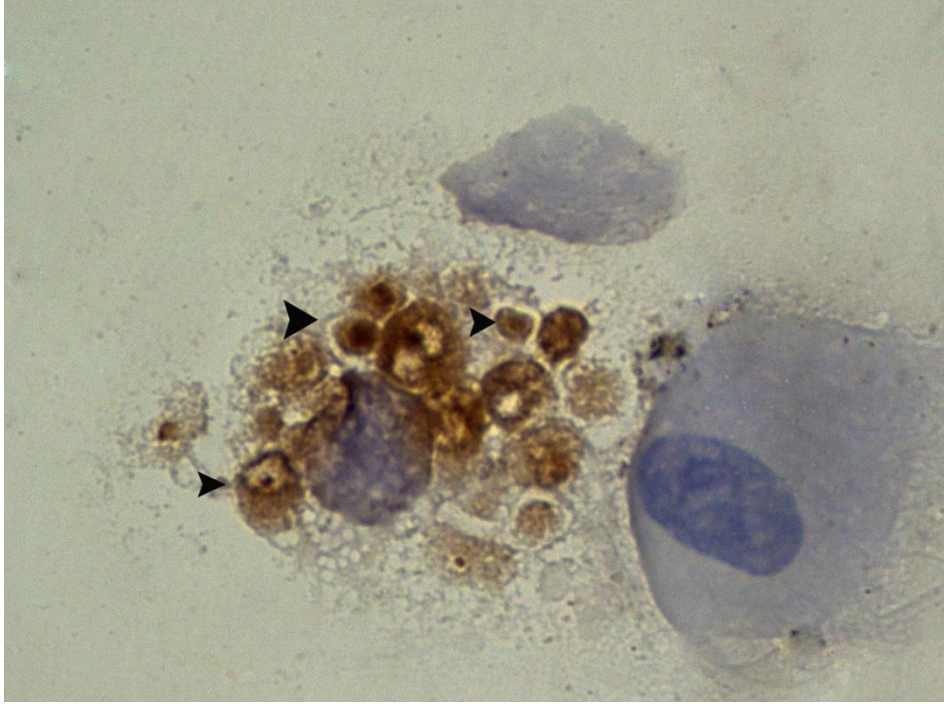
**Şekil 3. 36.** Aktif kaspaz 3 açısından çekirdek zarı (ok başı) pozitif olan bir hücre görülmektedir (x1000).



**Şekil 3. 37.** Aktif kaspaz 3 açısından negatif olan bir hücrenin yalancı ayaklar oluşturarak sitoplazması ve çekirdeği aktif kaspaz 3 pozitif olan (ok başı) bir apoptotik hücreyi fagosit etmek üzere olduğu dikkati çekmektedir (x1000).



**Şekil 3. 38.** Aktif kaspaz 3 açısından negatif olan bir epitel hücrenin içinde aktif kaspaz 3 açısından pozitif olan (ok başı) az sitoplazmalı piknotik çekirdekli bir apoptotik yapı dikkati çekmektedir (x1000).



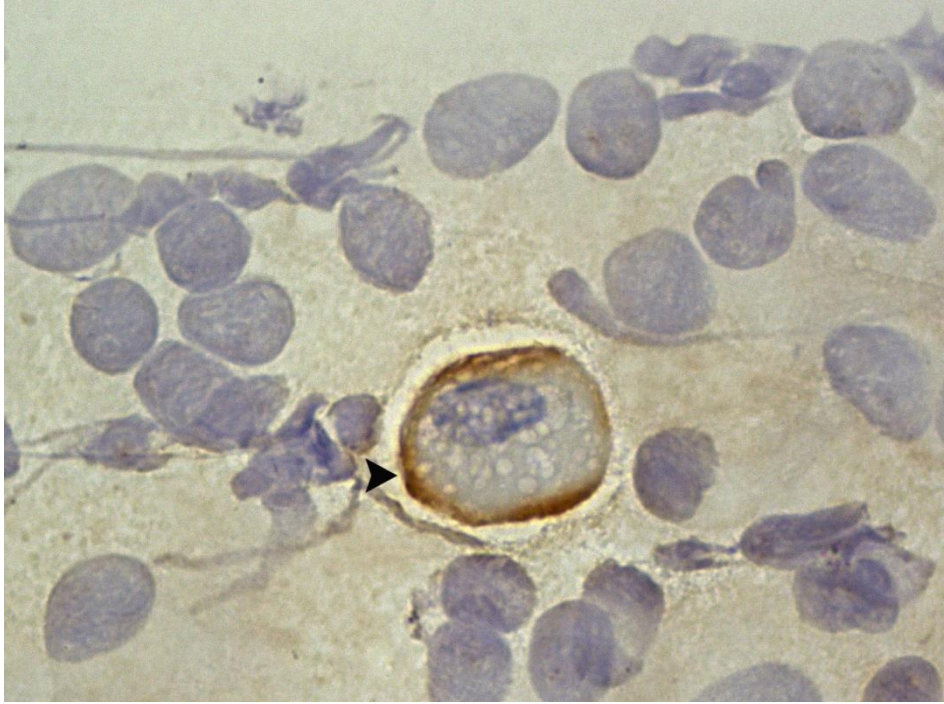
**Şekil 3. 39.** Makrofaj sitoplazması içinde aktif kaspaz 3 açısından pozitif olan çok sayıda apoptotik yapı (ok başı) dikkati çekmektedir (x1000).

### **3.2.3. Aktif kaspaz 8 enziminin immünositokimyasal olarak değerlendirilmesi**

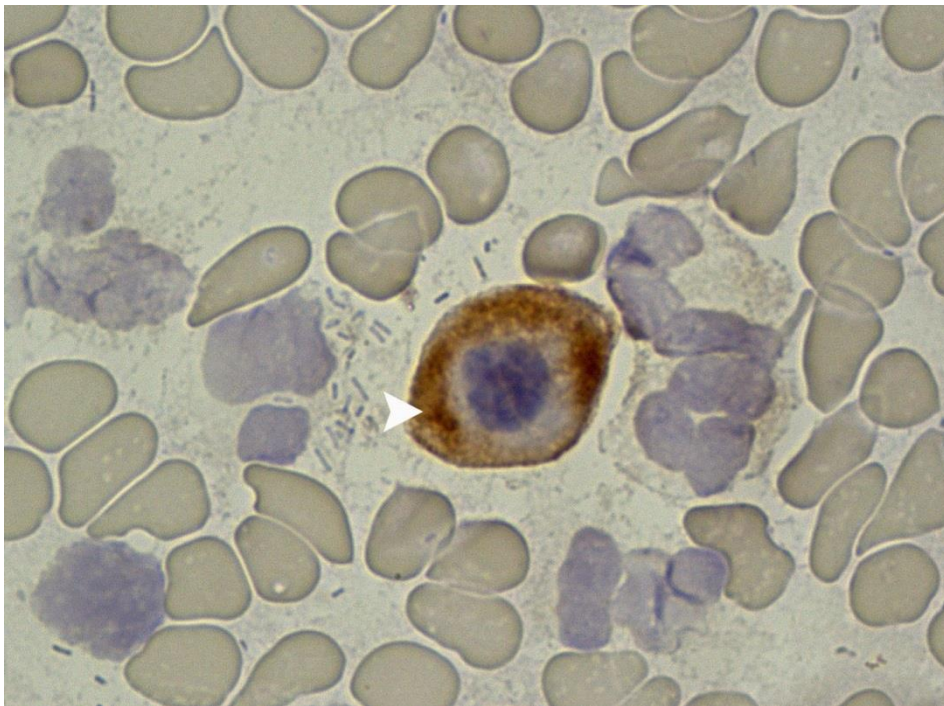
Servikovajinal örnekler aktif kaspaz 8 pozitifliği açısından immünositokimyasal olarak incelendiğinde; bazı hücrelerin zarında pozitiflik olduğu (Şekil 3.40), bu pozitifliğin gittikçe sitoplazmaya yayıldığı (Şekil 3.41), bazı hücrelerin sitoplazmasında kuvvetli pozitiflik olduğu, bazı hücrelerde ise hem sitoplazmanın tümünde hem de çekirdekte kuvvetli pozitiflik olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.42). Şekil 3.43'de görüldüğü gibi çekirdeğinde karyolizis görülen bir hücrenin sitoplazmasının tümünde orta (++) pozitiflik olduğu çekirdeğin ise negatif olduğu saptanmıştır.

Çok katlı yassı epitel hücrelerin aktif kaspaz 8 pozitif olan apoptotik hücrelerle ilişkisi incelendiğinde, aktif kaspaz 8 açısından negatif olan epitel hücrelerin zarında, aktif kaspaz 8 pozitif hücrelerin şekline uygun bir çöküntü oluştuğu ve apoptotik hücrenin epitel hücre içine girmek üzere olduğu dikkatimizi çekmiştir (Şekil 3.44). Şekil 3.45'da görüldüğü gibi aktif kaspaz 8 enzimi açısından pozitif olan bir hücrenin etrafının bir makrofaj ve nötrofil lökosit tarafından sarıldığı, makrofajın apoptotik hücreyi hücre içine almak üzere olduğu görülmüştür.

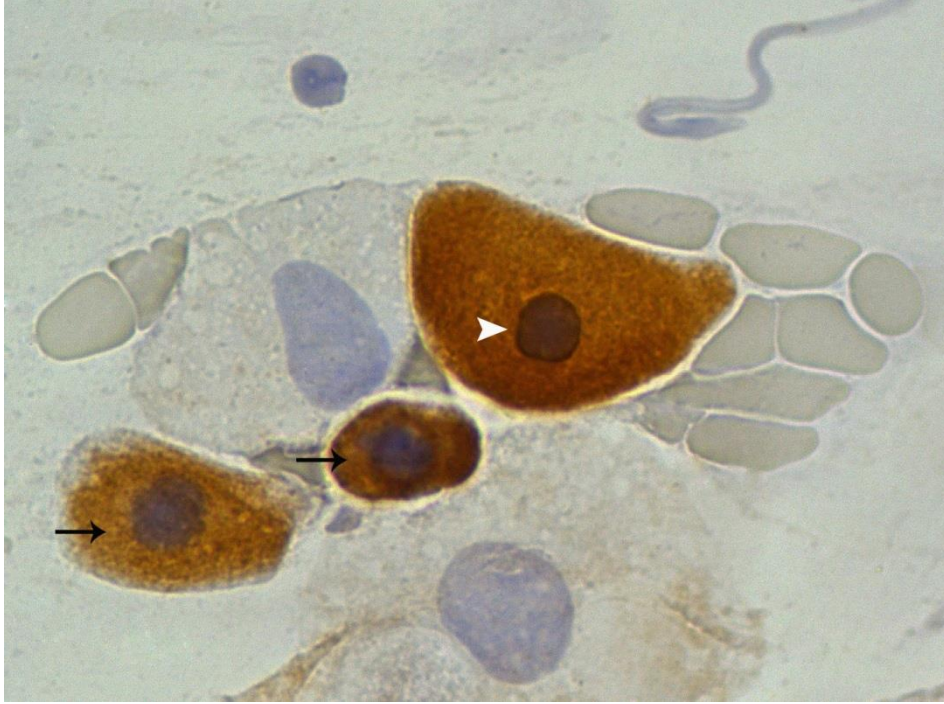




**Şekil 3. 40.** Hücre zarının aktif kaspaz 8 enzimi açısından pozitif (ok başı) olduğu görülmektedir (x1000).



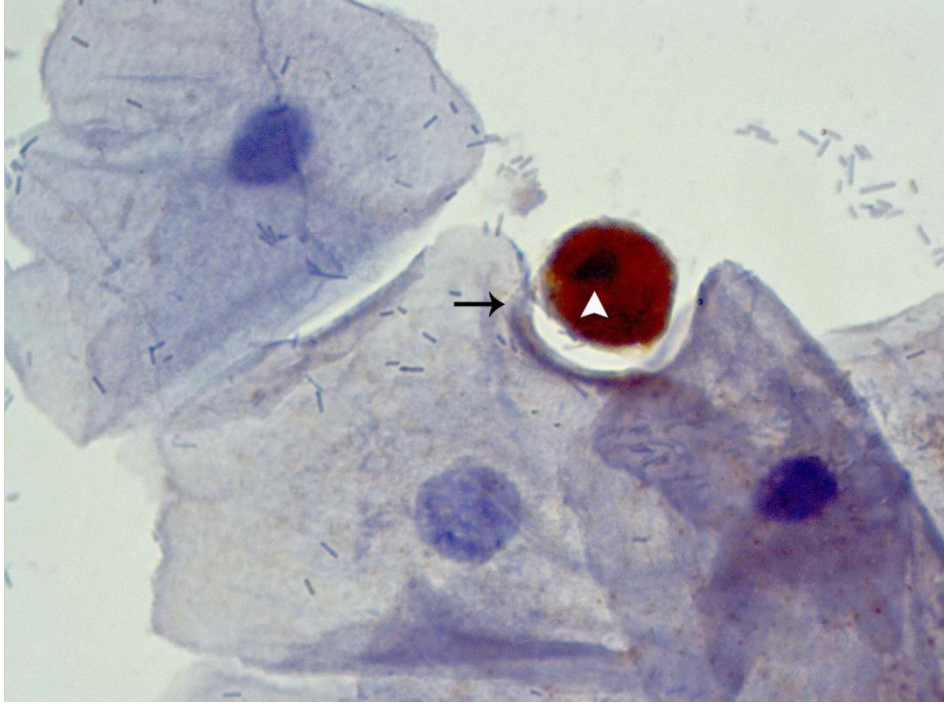
**Şekil 3. 41.** Hücre zarındaki pozitifliğin gittikçe sitoplazmaya yayıldığı (ok başı) dikkati çekmektedir (x1000).



**Şekil 3. 42.** İki apoptotik hücrenin sitoplazmasının aktif kaspaz 8 açısından pozitif olduğu (ok), bir hücrede ise hem sitoplazmanın tümünde, hem de çekirdekte pozitiflik olduğu (ok başı) görülmektedir (x1000).



**Şekil 3. 43.** Çekirdeğinde karyolizis görülen (ok başı) apoptotik bir hücrenin sitoplazmasının tümünde orta (++) derecede pozitiflik olduğu, çekirdeğin ise negatif olduğu dikkati çekmektedir (x1000).



**Şekil 3. 44.** Aktif kaspaz 8 açısından negatif olan bir epitel hücrenin zarında aktif kaspaz 8 enzimi açısından pozitif (ok başı) apoptotik bir hücrenin şekline uygun bir çöküntü (ok) oluştuğu ve apoptotik hücrenin epitel hücre içine girmek üzere olduğu dikkati çekmektedir (x1000).



**Şekil 3. 45.** Aktif kaspaz 8 enzimi açısından pozitif olan bir hücrenin etrafı bir makrofaj (m) ve nötrofil lökosit (n) tarafından sarılmıştır. Makrofajın apoptotik hücreyi, hücre içine almak üzere olduğu görülmektedir (x1000).

### 3.2.4. Aktif kaspaz 9 enziminin immünositokimyasal olarak değerlendirilmesi

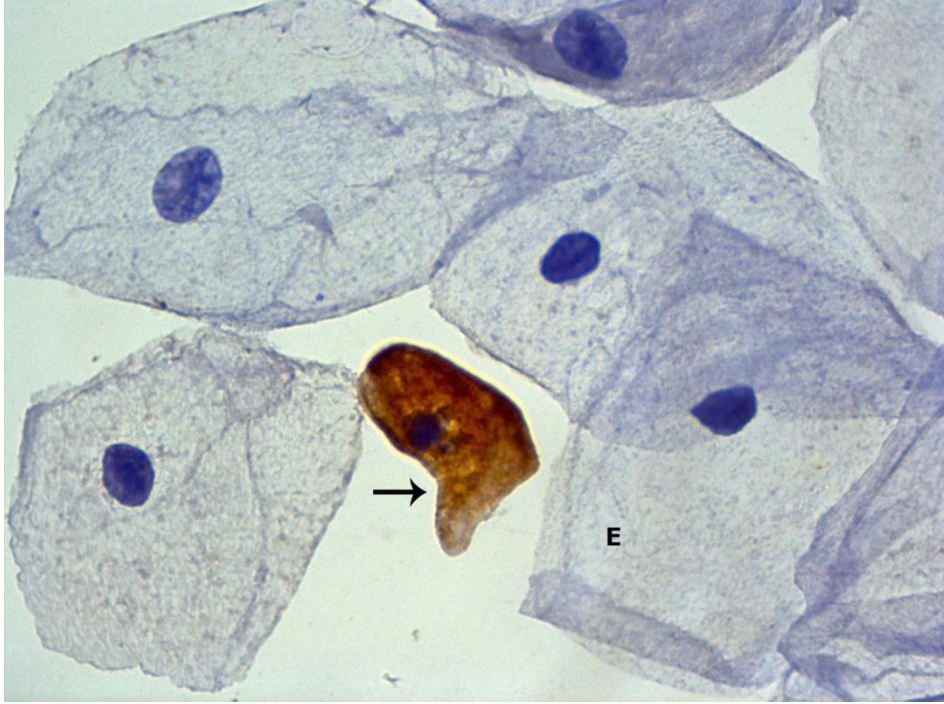
Apoptotik hücreler incelendiğinde bazı apoptotik hücrelerde diffüz koyu bir boyanma görülürken (Şekil 3.46), apoptotik olmayan normal hücrelerin ise negatif olduğu görülmüştür. Bazı hücrelerde ise zar etrafı ile çekirdek çevresinde orta derecede pozitiflik olduğu saptanmıştır (Şekil 3.47). Normal epitel hücre çekirdeğini kenara iterek, orta (++) derece pozitif olan apoptotik bir hücrenin negatif hücre içine girdiği, hatta aynı hücrenin yalancı ayak oluşturarak ikinci bir apoptotik hücreyi de içine almak istediği önemli bir bulgu olarak belirlenmiştir (Şekil 3.48).

Aktif kaspaz 3, aktif kaspaz 8 ve aktif kaspaz 9 enzimlerinin birlikte olgularda bulunabilirliği incelenmiş, veriler Çizelge 3.6'da sunulmuştur. Beş olguda (%2,2) hem aktif kaspaz 3, hem aktif kaspaz 9 enziminin, 23 olguda (%10,3) aktif kaspaz 3 ve aktif kaspaz 8 enziminin, 56 olguda (%25) ise hem aktif kaspaz 3, hem aktif kaspaz 8 ve hem de aktif 9 açısından pozitif olduğu belirlenmiştir.

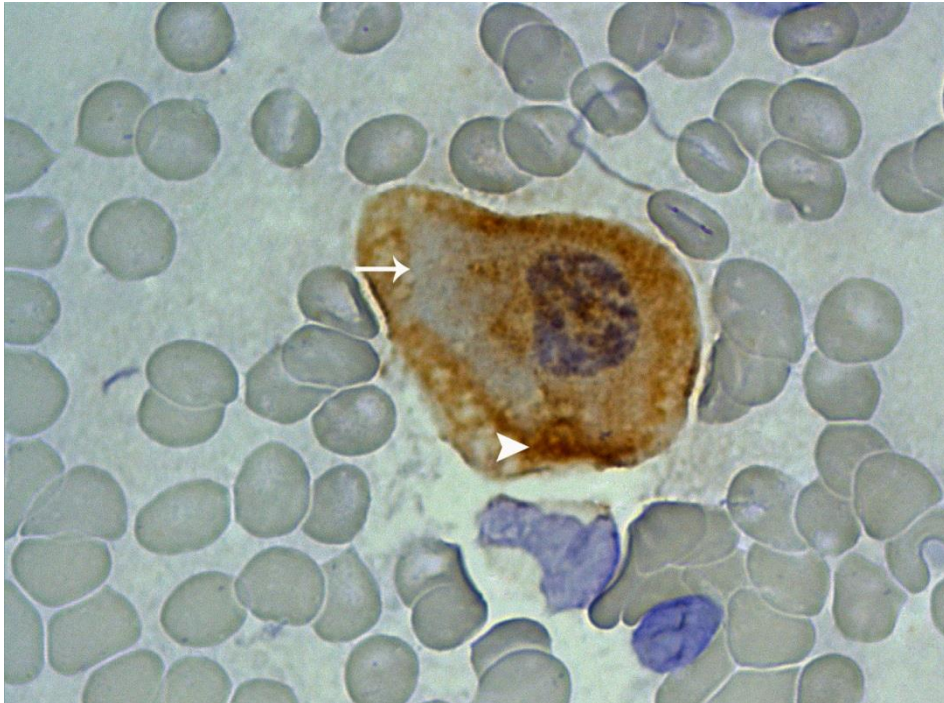
**Çizelge 3. 6.** Aktif kaspaz 3, aktif kaspaz 8 ve aktif kaspaz 9 enzimlerin immünositokimyasal olarak değerlendirilmesi

İmmünositokimyasal sonuçlar		Toplam Hasta sayısı (n=224, %100)	
		Hasta sayısı	Yüzde (%)
<b>*Grup 1</b> Ölüm Res. Aracılı apoptozis (n=79)	Aktif kaspaz 3 ve aktif kaspaz 8 pozitif	23	10,3
	Aktif kaspaz 3, aktif kaspaz 8 ve aktif kaspaz 9 pozitif	56	25
<b>*Grup 2</b> Mitokondri Aracılı apoptozis (n=5)	Aktif kaspaz 3 ve aktif kaspaz 9 pozitif	5	2,2

\* Bundan sonraki tablolarda bu 2 grup sırasıyla ölüm reseptörleri aracılı apoptozis ve mitokondri aracılı apoptozis olarak incelenmiştir.



**Şekil 3. 46.** Aktif kaspaz 9 enzimi açısından negatif epitel hücrelerinin (E) arasında, sitoplazması aktif kaspaz 9 enzimi açısından kuvvetli pozitif olan (ok) bir apoptotik hücre dikkati çekmektedir (x1000).



**Şekil 3. 47.** Hücre zarı etrafı (ok başı) ile çekirdek çevresinde aktif kaspaz 9 enzimi açısından orta derecede pozitiflik olduğu, sitoplazmanın diğer kısımlarının ise negatif olduğu (ok) görülmektedir (x1000).



grubu olguları ile karşılaştırılmıştır (Çizelge 3.8). Bu değerlendirme sonucunda LSIL ve HSIL olgularında kontrol grubu olgularına kıyasla sinyal aktivitesinin artmış olduğu görülürken ( $p<0,05$ ), ASCUS olgularında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa rastlanmamıştır ( $p>0,05$ ). Atipik ilerleme ile sinyal yolu aktivitesi arasındaki ilişkiyi belirlemek için ASCUS, LSIL ve HSIL olguları kendi aralarında eşleştirilerek değerlendirilmiş, bulgular Çizelge 3.9'da gösterilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda her grubun kendi içinde istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık bulunmadığı görülmüştür ( $p>0,05$ ).

**Çizelge 3. 7.** Kontrol grubu olguları ile atipik olguların Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu aktivitesinin varlığı açısından karşılaştırılması

Gruplar	Sinyal aktif (n=34)	Sinyal inaktif (n=127)
Kontrol grubu (n=144)	26 (%18,1)	118 (%81,9)
Atipik olgular (n=17)	8 (%47,1)*	9 (%52,9)

\*:  $p<0,05$

**Çizelge 3. 8.** Kontrol grubu olguları ile ASCUS, LSIL ve HSIL olgularının Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu aktivitesinin varlığı açısından karşılaştırılması

Gruplar		Sinyal aktif (n=34)	Sinyal inaktif (n=127)
Atipik hücresel değişiklikler (n=17)	ASCUS (n=5)	1 (%20) <sup>ns</sup>	4 (%80)
	LSIL (n=8)	4 (%50)*	4 (%50)
	HSIL (n=4)	3 (%75)*	1 (%25)
Kontrol grubu (n=144)		26 (%18,1)	118 (%81,9)

ns:  $p>0,05$ , \*:  $p<0,05$

**Çizelge 3. 9.** ASCUS, LSIL ve HSIL olgularının Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu aktivitesinin varlığı açısından karşılaştırılması

Gruplar (n=17)	Sinyal aktif (n=8)	Sinyal inaktif (n=9)
LSIL (n=8)	4 (%50) <sup>ns</sup>	4 (%50)
ASCUS (n=5)	1 (%20)	4 (%80)
HSIL (n=4)	3 (%75) <sup>ns</sup>	1 (%25)
ASCUS (n=5)	1 (%20)	4 (%80)
LSIL (n=8)	4 (%50) <sup>ns</sup>	4 (%50)
HSIL (n=4)	3 (%75)	1 (%25)

ns: p>0,05

**ii. Kontrol grubu olguları ile enfeksiyonlu olguların sinyal yolu aktivitesi açısından karşılaştırılması:** Enfeksiyonlu olgular da Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu aktivitesi açısından kontrol grubu olguları ile karşılaştırılmış, ancak Çizelge 3.10'da görüldüğü gibi istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanamamıştır (p>0,05). Sitolojik olarak belirlenmiş olan 63 enfeksiyon olgusu Çizelge 3.3'de detaylı olarak gösterilmiştir. Bu olgular ayrı ayrı sinyal yolu aktivitesi açısından kontrol grubu olguları ile karşılaştırılmış (Çizelge 3.11), ancak istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (p>0,05).

**Çizelge 3. 10.** Normal olgularla enfeksiyon olgularının Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu aktivitesi varlığı açısından karşılaştırılması

Gruplar	Sinyal aktif (n=36)	Sinyal inaktif (n=171)
Kontrol grubu (n=144)	26 (%18,1)	118 (%81,9)
Enfeksiyon olguları (n=63)	10 (%15,9) <sup>ns</sup>	53 (%84,1)

ns: p>0,05



**Çizelge 3. 11.** Kontrol grubu olguları ile BV, Fungal enfeksiyon, TV, SV ve inflamasyon olgularının Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu aktivitesinin varlığı açısından karşılaştırılması

Gruplar		Sinyal aktif (n=36)	Sinyal inaktif (n=171)
Enfeksiyon olguları (n=63)	BV (n=11)	1 (%9,1) <sup>ns</sup>	10 (%90,9)
	Fungal enf (n=17)	4 (%23,5) <sup>ns</sup>	13 (%76,5)
	TV (n=3)	0 (%0) <sup>ns</sup>	3 (%100)
	SV (n=6)	0 (%0) <sup>ns</sup>	6 (%100)
	İnflamasyon (n=26)	5 (%19,2) <sup>ns</sup>	21 (%80,8)
Kontrol grubu (n=144)		26 (%18,1)	118 (%81,9)

ns: p>0,05

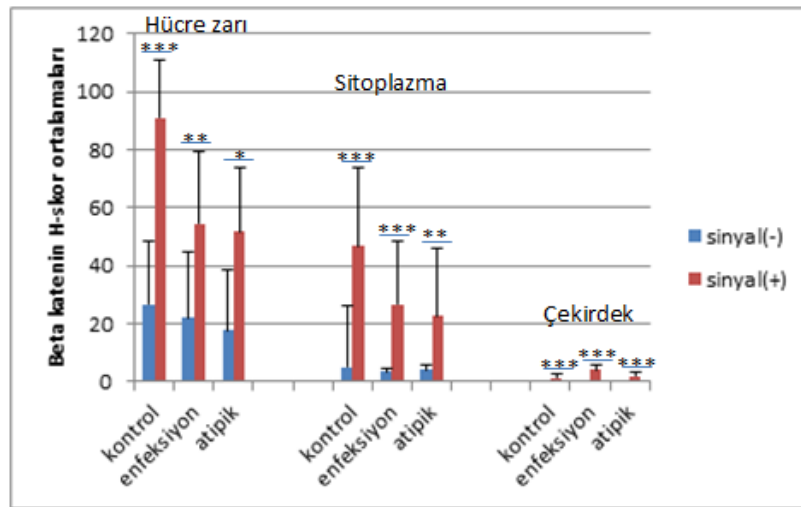
**iii. H-skorerlerin karşılaştırılması:** Kontrol grubu olguları ile çalışma grubundaki atipik ve enfeksiyonlu olgular  $\beta$ -katenin proteininin hücre zarı, sitoplazma ve çekirdekteki H-skor ortalamaları açısından da karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma sonucunda Çizelge 3.12'de görüldüğü gibi, Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu aktif olan olguların tamamında zar, sitoplazma ve çekirdekteki H-skor ortalamalarının, sinyal inaktif olan olgulara göre daha fazla olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.13). Yapılan istatistiksel analizler sonucunda bu artışın istatistiksel olarak da anlamlı olduğu saptanmıştır (p<0,05).

**Çizelge 3. 12.** Kontrol grubu olguları ile atipik ve enfeksiyonlu olguların  $\beta$ -katenin proteininin hücre zarı, sitoplazma ve çekirdekdeki H-skor ortalamaları açısından karşılaştırılması

Hücre kompartmanları	Gruplar (n=224)	H skor ortalamaları	
		Sinyal aktif (n=44)	Sinyal inaktif (n=180)
$\beta$ -katenin hücre zarı	Kontrol grubu (n=144)	91***	26,6
	Enfeksiyon (n=63)	54,4**	21,9
	Atipik (n=17)	51,7*	17,7
$\beta$ -katenin sitoplazma	Kontrol grubu (n=144)	46,6***	5,1
	Enfeksiyon (n=63)	25,6***	3,5
	Atipik (n=17)	22,7**	4
$\beta$ -katenin çekirdek	Kontrol grubu (n=144)	1,4***	0
	Enfeksiyon (n=63)	4,2***	0
	Atipik (n=17)	2***	0

\*: p<0,05, \*\*: p<0,01, \*\*\*:p<0,001

**Çizelge 3. 13.** Kontrol grubu, atipik ve enfeksiyonlu olgularda sinyal aktivitesi açısından  $\beta$ -katenin proteininin hücre zarı, sitoplazma ve çekirdekdeki H-skor ortalamalarına ait histogram



### 3.3.2. Kontrol grubu olguları ile çalışma grubundaki atipik ve enfeksiyonlu olguların apoptozis, ölüm reseptörleri aracılı apoptozis ve mitokondri aracılı apoptozis açısından karşılaştırılması

Çalışma kapsamında kontrol grubu olguları ile atipik ve enfeksiyonlu olgular; apoptozis, ölüm reseptörleri aracılı apoptozis ve mitokondri aracılı apoptozis varlığı açısından ayrı ayrı incelenmiştir.

**i. Kontrol grubu olguları ile atipik olguların karşılaştırılması:** İlk olarak, kontrol grubu olguları ( $n=144$ ) ile atipik olgular ( $n=17$ ) apoptozis varlığını gösteren aktif kaspaz 3 varlığı açısından karşılaştırılmıştır. Atipik hücrel değişliğe sahip 17 olgunun 3'ünde (%17,6), kontrol grubundaki 144 olgunun ise 57'sinde (%39,6) aktif kaspaz 3 enziminin pozitif olduğu tespit edilmiştir. Yapılan istatistiksel incelemede atipik hücrel değişliğe sahip olgularla kontrol grubu olguları arasında apoptozis pozitifliği açısından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkiye rastlanmamıştır ( $p>0,05$ ).

Kontrol grubu olguları ve atipik hücrel değişliğe sahip olgular ölüm reseptörleri aracılı apoptozis (aktif kaspaz 3 ve aktif kaspaz 8 pozitif olgular ile aynı anda aktif kaspaz 3, aktif kaspaz 8 ve aktif kaspaz 9 pozitif olgular) ve mitokondri aracılı apoptozis (aktif kaspaz 3 ve aktif kaspaz 9 pozitif olgular) varlığı açısından ayrı ayrı incelendiğinde de gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ( $p>0,05$ ). Tüm bulgular, Çizelge 3.14'de sunulmuştur. Atipik hücrel değişiklikler grubunu oluşturan ASCUS, LSIL ve HSIL olguları apoptozis, ölüm reseptörleri ve mitokondri aracılı apoptozis varlığı açısından kontrol grubu olguları ile ayrı ayrı karşılaştırıldığında da gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir ( $p>0,05$ ). Bu bulgular Çizelge 3.15, Çizelge 3.16 ve Çizelge 3.17'de detaylı olarak verilmiştir.

**Çizelge 3. 14.** Kontrol grubu olguları ile atipik olguların apoptozis, ölüm reseptörleri aracılı apoptozis ve mitokondri aracılı apoptozis varlığı açısından karşılaştırılması

Gruplar		Kontrol grubu (n=144)	Atipik olgular (n=17)
Apoptozis	(+)	57 (%39,6)	3 (%17,6) <sup>ns</sup>
	(-)	87 (%60,4)	14 (%82,4)
Ölüm res. aracılı apoptozis	(+)	45 (%31,3)	3 (%17,6) <sup>ns</sup>
	(-)	99 (%68,7)	14 (%82,4)
Mitokondri aracılı apoptozis	(+)	5 (%3,5)	0 (%0) <sup>ns</sup>
	(-)	139 (%96,5)	17 (%100)

ns: p>0,05

**Çizelge 3. 15.** Kontrol grubu olguları ile ASCUS olgularının apoptozis, ölüm reseptörleri aracılı apoptozis ve mitokondri aracılı apoptozis varlığı açısından karşılaştırılması

Gruplar		Kontrol grubu (n=144)	ASCUS (n=5)
Apoptozis	(+)	57 (%39,6)	2 (%40) <sup>ns</sup>
	(-)	87 (%60,4)	3 (%60)
Ölüm res. aracılı apoptozis	(+)	45 (%31,3)	2 (%40) <sup>ns</sup>
	(-)	99 (%68,7)	3 (%60)
Mitokondri aracılı apoptozis	(+)	5 (%3,5)	0 (%0) <sup>ns</sup>
	(-)	139 (%96,5)	5 (%100)

ns: p>0,05

**Çizelge 3. 16.** Kontrol grubu olguları ile LSIL olgularının apoptozis, ölüm reseptörleri aracılı apoptozis ve mitokondri aracılı apoptozis varlığı açısından karşılaştırılması

Gruplar		Kontrol grubu (n=144)	LSIL (n=8)
Apoptozis	(+)	57 (%39,6)	1 (%12,5) <sup>ns</sup>
	(-)	87 (%60,4)	7 (%87,5)
Ölüm res. aracılı apoptozis	(+)	45 (%31,3)	1 (%12,5) <sup>ns</sup>
	(-)	99 (%68,7)	7 (%87,5)
Mitokondri aracılı apoptozis	(+)	5 (%3,5)	0 (%0) <sup>ns</sup>
	(-)	139 (%96,5)	5 (%100)

ns: p>0,05

**Çizelge 3. 17.** Kontrol grubu olguları ile HSIL olgularının apoptozis, ölüm reseptörleri aracılı apoptozis ve mitokondri aracılı apoptozis varlığı açısından karşılaştırılması

Gruplar		Kontrol grubu (n=144)	HSIL (n=4)
Apoptozis	(+)	57 (%39,6)	0 (%0) <sup>ns</sup>
	(-)	87 (%60,4)	4 (%100)
Ölüm res. aracılı apoptozis	(+)	45 (%31,3)	0 (%0) <sup>ns</sup>
	(-)	99 (%68,7)	4 (%100)
Mitokondri aracılı apoptozis	(+)	5 (%3,5)	0 (%0) <sup>ns</sup>
	(-)	139 (%96,5)	4 (%100)

ns: p>0,05

**ii. Kontrol grubu olguları ile enfeksiyonlu olguların karşılaştırılması:** Kontrol grubu olguları ile enfeksiyonlu olgular arasında apoptozis varlığını gösteren aktif kaspaz 3 açısından bir farklılık olup olmadığı araştırılmıştır. Bu değerlendirme sonucunda enfeksiyonlu olguların %55,6'sında (35/63), kontrol grubu olgularının

ise %39,6'sında (57/144) aktif kaspaz 3 enziminin pozitif olduğu saptanmış, enfeksiyonlu olgular ile kontrol grubu olguları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görülmüştür ( $p<0,05$ ). Elde edilen veriler Çizelge 3.18'de sunulmuştur.

Kontrol grubu olguları ile enfeksiyonlu olgular arasında ölüm reseptörleri ve mitokondri aracılı apoptotik mekanizmalar açısından bir farklılık olup olmadığı araştırıldığında ise, enfeksiyonlu olguların %49,2'sinde (31/63) ölüm reseptörleri aracılı apoptozis pozitif bulunurken, bu oran kontrol grubu olgularında %31,3 (45/144) olarak bulunmuştur (Çizelge 3.18). Bu sonuçlar doğrultusunda enfeksiyonlu olgularda ölüm reseptörleri aracılı apoptozis pozitifliğinin kontrol grubu olgularından daha yüksek bir yüzde gösterdiği ve bu farklılığın istatistiksel olarak da anlamlı olduğu belirlenmiştir ( $p<0,05$ ). Ancak kontrol grubu olguları ile enfeksiyonlu olgular arasında mitokondri aracılı apoptozis pozitifliği açısından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ( $p>0,05$ )

**Çizelge 3. 18.** Kontrol grubu olguları ile enfeksiyon olgularının apoptozis, ölüm reseptörleri aracılı apoptozis ve mitokondri aracılı apoptozis varlığı açısından karşılaştırılması

Gruplar		Kontrol grubu (n=144)	Enfeksiyon olguları (n=63)
Apoptozis	(+)	57 (%39,6)	35 (%55,6)*
	(-)	87 (%60,4)	28 (%44,4)
Ölüm res. aracılı apoptozis	(+)	45 (%31,3)	31 (%49,2)*
	(-)	99 (%68,7)	32 (%50,8)
Mitokondri aracılı apoptozis	(+)	5 (%3,5)	0 (%0) <sup>ns</sup>
	(-)	139 (%96,5)	63 (%100)

ns:p>0,05, \*: p<0,05

Enfeksiyon grubunda bulunan tüm etkenler ayrı ayrı apoptozis, ölüm reseptörleri aracılı apoptozis ve mitokondri aracılı apoptozis açısından kontrol grubu olguları ile karşılaştırılmış, sonuçlar Çizelge 3.19, Çizelge 3.20 ve Çizelge 3.21, Çizelge 3.22 ve Çizelge 3.23'de sunulmuştur.

BV ile kontrol grubu olguları apoptozis, ölüm reseptörleri aracılı apoptozis ve mitokondri aracılı apoptozis açısından karşılaştırıldığında, hem apoptozis hem de ölüm reseptörleri aracılı apoptozis pozitifliklerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı ortaya konmuştur ( $p < 0,05$ ). Mitokondri aracılı apoptozis pozitifliği açısından 2 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ( $p > 0,05$ ). Işık mikroskopik değerlendirmede bir ipucu hücrenin aktif kaspaz 3 ile apoptozis varlığı açısından pozitif boyandığı (Şekil 3.49), Şekil 3.50'de görüldüğü gibi aktif kaspaz 8 pozitif olan bir apoptotik hücrenin etrafında serbest kokobasiller olduğu görülmüştür.

İnflamasyon ile kontrol grubu olguları apoptozis, ölüm reseptörleri aracılı apoptozis ve mitokondri aracılı apoptozis açısından karşılaştırıldığında ise, hem apoptozis ( $p < 0,01$ ), hem de ölüm reseptörleri aracılı apoptozis pozitifliklerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı ortaya konmuştur ( $p < 0,001$ ). Ancak, mitokondri aracılı apoptozis pozitifliği açısından 2 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa rastlanmamıştır ( $p > 0,05$ ). Işık mikroskopik değerlendirmede bol PMNL görülen alanlarda aktif kaspaz 3 ve 8 açısından pozitif hücrelerin varlığı dikkatimizi çekmiştir (Şekil 3.51 ve Şekil 3.52).

Fungal enfeksiyon ile kontrol grubu olguları apoptozis, ölüm reseptörleri aracılı apoptozis ve mitokondri aracılı apoptozis açısından karşılaştırıldığında ise apoptozis, ölüm reseptörleri aracılı apoptozis ve mitokondri aracılı apoptozis açısından 2 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ( $p > 0,05$ ).

SV ile kontrol grubu olguları apoptozis, ölüm reseptörleri aracılı apoptozis ve Mitokondri aracılı apoptozis açısından kıyaslandığında da apoptozis, ölüm reseptörleri aracılı apoptozis ve mitokondri aracılı apoptozis açısından 2 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa rastlanmamıştır ( $p > 0,05$ ).

TV ile kontrol grubu olguları apoptozis, ölüm reseptörleri aracılı apoptozis ve mitokondri aracılı apoptozis açısından karşılaştırıldığında apoptozis, ölüm

reseptörleri aracılı apoptozis ve mitokondri aracılı apoptozis açısından 2 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ( $p>0,05$ ).

**Çizelge 3. 19.** Kontrol grubu olguları ile BV olgularının apoptozis, ölüm reseptörleri aracılı apoptozis ve mitokondri aracılı apoptozis varlığı açısından karşılaştırılması

Gruplar		Kontrol grubu (n=144)	BV (n=11)
Apoptozis	(+)	57 (%39,6)	8 (%72,7)*
	(-)	87 (%60,4)	3 (%27,3)
Ölüm res. aracılı apoptozis	(+)	45 (%31,3)	7 (%63,6)*
	(-)	99 (%68,7)	4 (%36,4)
Mitokondri aracılı apoptozis	(+)	5 (%3,5)	0 (%0) <sup>ns</sup>
	(-)	139 (%96,5)	11 (%100)

ns:  $p>0,05$ , \*:  $p<0,05$  istatistiksel olarak anlamlıdır.

**Çizelge 3. 20.** Kontrol grubu olguları ile Fungal enfeksiyon olgularının apoptozis, ölüm reseptörleri aracılı apoptozis ve mitokondri aracılı apoptozis varlığı açısından karşılaştırılması

Gruplar		Kontrol grubu (n=144)	Fungal enfeksiyon (n=17)
Apoptozis	(+)	57 (%39,6)	6 (%35,3) <sup>ns</sup>
	(-)	87 (%60,4)	11 (%64,7)
Ölüm res. aracılı apoptozis	(+)	45 (%31,3)	5 (%29,4) <sup>ns</sup>
	(-)	99 (%68,7)	12 (%70,6)
Mitokondri aracılı apoptozis	(+)	5 (%3,5)	0 (%0) <sup>ns</sup>
	(-)	139 (%96,5)	17 (%100)

ns:  $p>0,05$



**Çizelge 3. 21.** Kontrol grubu olguları ile TV olgularının apoptozis, ölüm reseptörleri aracılı apoptozis ve mitokondri aracılı apoptozis varlığı açısından karşılaştırılması

Gruplar		Kontrol grubu (n=144)	TV (n=3)
Apoptozis	(+)	57 (%39,6)	1 (%33,3) <sup>ns</sup>
	(-)	87 (%60,4)	2 (%66,7)
Ölüm res. aracılı apoptozis	(+)	45 (%31,3)	1 (%33,3) <sup>ns</sup>
	(-)	99 (%68,7)	2 (%66,7)
Mitokondri aracılı apoptozis	(+)	5 (%3,5)	0 (%0) <sup>ns</sup>
	(-)	139 (%96,5)	3 (%100)

ns: p>0,05

**Çizelge 3. 22.** Kontrol grubu olguları ile SV olgularının apoptozis, ölüm reseptörleri aracılı apoptozis ve mitokondri aracılı apoptozis varlığı açısından karşılaştırılması

Gruplar		Kontrol grubu (n=144)	SV (n=6)
Apoptozis	(+)	57 (%39,6)	1 (%16,7) <sup>ns</sup>
	(-)	87 (%60,4)	5 (%83,3)
Ölüm res. aracılı apoptozis	(+)	45 (%31,3)	0 (%0) <sup>ns</sup>
	(-)	99 (%68,7)	6 (%100)
Mitokondri aracılı apoptozis	(+)	5 (%3,5)	0 (%0) <sup>ns</sup>
	(-)	139 (%96,5)	6 (%100)

ns: p>0,05

**Çizelge 3. 23.** Kontrol grubu olguları ile inflamasyon olgularının apoptozis, ölüm reseptörleri aracılı apoptozis ve mitokondri aracılı apoptozis varlığı açısından karşılaştırılması

Gruplar		Kontrol grubu (n=144)	İnflamasyon (n=26)
Apoptozis	(+)	57 (%39,6)	19 (%73,1)**
	(-)	87 (%60,4)	7 (%26,9)
Ölüm res. aracılı apoptozis	(+)	45 (%31,3)	18 (%69,2)***
	(-)	99 (%68,7)	8 (%30,8)
Mitokondri aracılı apoptozis	(+)	5 (%3,5)	0 (%0) <sup>ns</sup>
	(-)	139 (%96,5)	26 (%100)

ns:p>0,05, \*\*: p<0,01, \*\*\*:p<0,001

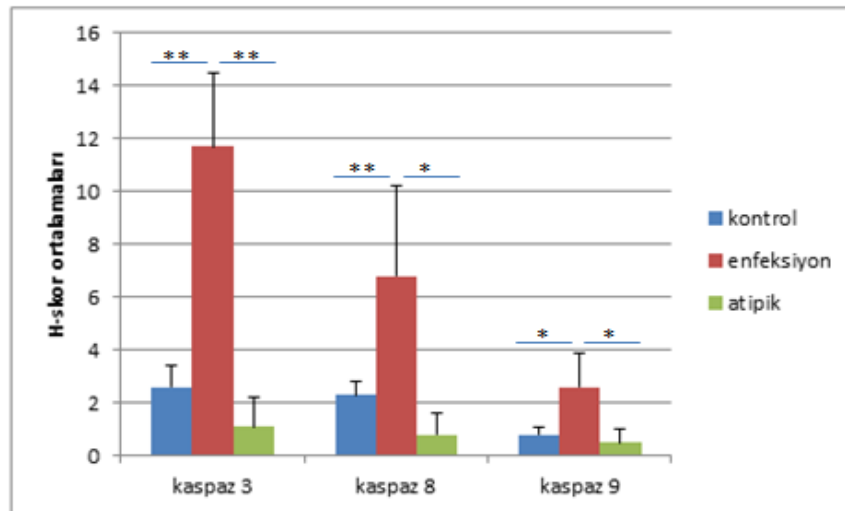
**iii. H-skorerlerin karşılaştırılması:** Çizelge 3.24 ve Çizelge 3.25'de görüldüğü gibi kontrol grubu olguları ile çalışma grubundaki enfeksiyon olguları ve atipik olgular aktif kaspaz 3, aktif kaspaz 8 ve aktif kaspaz 9 enzimlerine ait H-skor ortalama değerleri açısından karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma sonucunda 3 grubun aktif kaspaz 3, aktif kaspaz 8 ve aktif kaspaz 9 enzimlerine ait H-skor ortalama değerleri açısından istatistiksel olarak birbirinden farklı olduğu belirlenmiştir. Daha sonra bu farklılığın hangi gruplar arasında olduğu araştırıldığında ise kontrol grubu olguları ile enfeksiyon olguları arasında aktif kaspaz 3 (p<0,01), aktif kaspaz 8 (p<0,01) ve aktif kaspaz 9 (p<0,05) enzimlerine ait H-skor ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu görülmüştür. Ayrıca, enfeksiyon olguları ile atipik olgular arasında da aktif kaspaz 3 (p<0,01), aktif kaspaz 8 (p<0,05) ve aktif kaspaz 9 (p<0,05) enzimlerine ait H-skor ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu saptanmıştır. Ancak atipik olgulara ait H-skor ortalamalarının kontrol grubu olgularına kıyasla azalmasına rağmen, bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir (p>0,05). Bu bulgular Çizelge 3.26'da sunulmuştur.

**Çizelge 3. 24.** Kontrol grubu olguları ile enfeksiyon ve atipik olguların kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 H-skor ortalamaları açısından karşılaştırılması

Gruplar	Kaspaz 3 H skor ortalamaları
Kontrol grubu (n=144)	2,6
Enfeksiyon olguları (n=63)	11,7**
Atipik olgular (n=17)	1,1**
Gruplar	Kaspaz 8 H skor ortalamaları
Kontrol grubu (n=144)	2,3
Enfeksiyon olguları (n=63)	6,8**
Atipik olgular (n=17)	0,8**
Gruplar	Kaspaz 9 H skor ortalamaları
Kontrol grubu (n=144)	0,8
Enfeksiyon olguları (n=63)	2,6*
Atipik olgular (n=17)	0,5*

\*: p<0,05, \*\*:p<0,01, \*\*\*:p<0,001

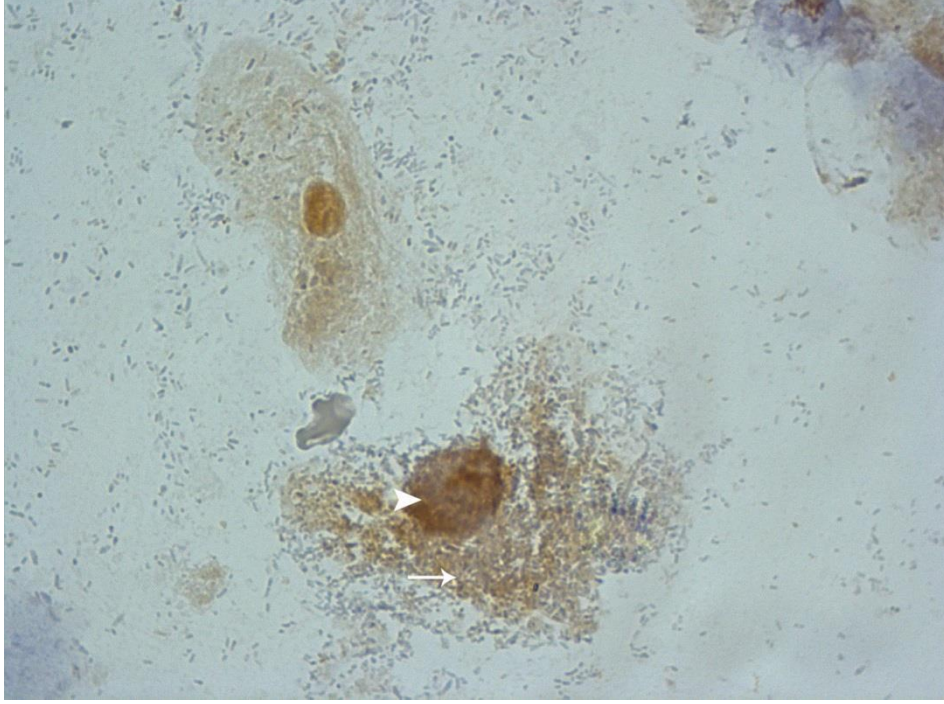
**Çizelge 3. 25.** Kontrol grubu, enfeksiyon olguları ve atipik olguların aktif kaspaz 3, aktif kaspaz 8 ve aktif kaspaz 9 enzimlerine ait H-skor ortalamaları arasındaki farklılığı gösteren histogram



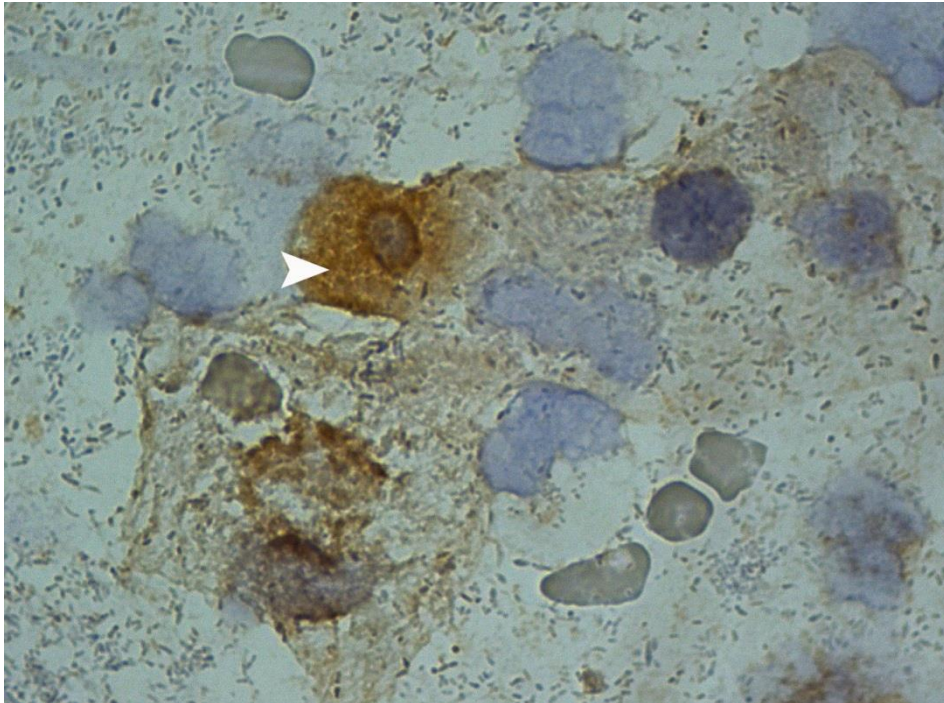
**Çizelge 3. 26.** Kontrol grubu olguları ile enfeksiyon ve atipik olguların aktif kaspaz 3, aktif kaspaz 8 ve aktif kaspaz 9 enzimlerine ait H-skor ortalamaları açısından birbirleri ile ayrı ayrı karşılaştırılması

<b>Kaspaz 3 H-skorlarının karşılaştırılması</b>	<b>p değeri</b>
Kontrol grubu -Enfeksiyon olguları	0,006**
Kontrol grubu -Atipik olguları	0,358 <sup>ns</sup>
Enfeksiyon olguları-Atipik olguları	0,005**
<b>Kaspaz 8 H-skorlarının karşılaştırılması</b>	<b>p değeri</b>
Kontrol grubu -Enfeksiyon olguları	0,007**
Kontrol grubu -Atipik olguları	0,684 <sup>ns</sup>
Enfeksiyon olguları-Atipik olguları	0,014*
<b>Kaspaz 9 H-skorlarının karşılaştırılması</b>	<b>p değeri</b>
Kontrol grubu -Enfeksiyon olguları	0,024*
Kontrol grubu -Atipik olguları	0,362 <sup>ns</sup>
Enfeksiyon olguları-Atipik olguları	0,036*

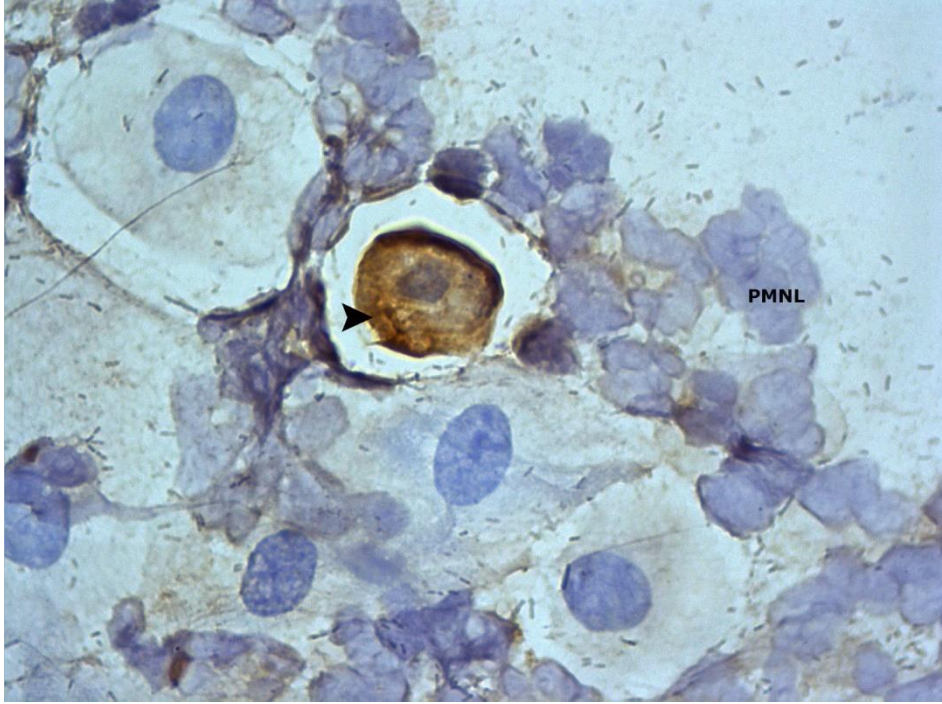
ns:p>0,05, \*: p<0,05, \*\*:p<0,01



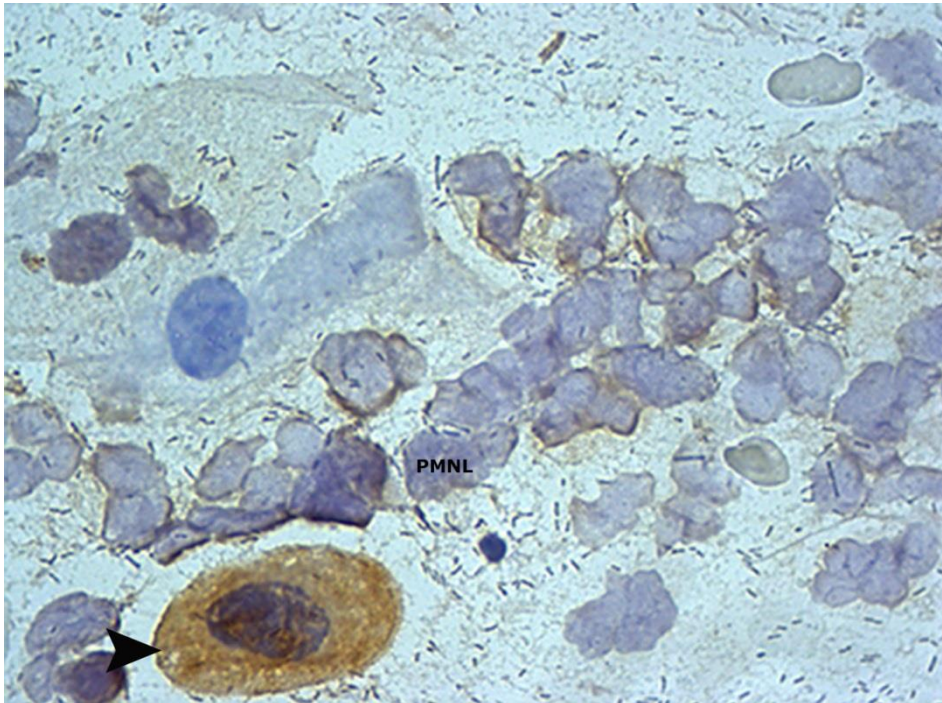
**Şekil 3. 49.** BV pozitif olan bir olguda hücre yüzeyi tamamen mikroorganizmalarla kaplı, sitoplazması yer yer dejenere olmuş bir ipucu hücresinin sitoplazma (ok) ve çekirdeğinde (ok başı) aktif kaspaz 3 enzimi açısından pozitiflik olduğu görülmektedir (x1000).



**Şekil 3. 50.** BV pozitif olan bir olguda etrafında bol miktarda serbest kokobasil tarzı mikroorganizmalar bulunan aktif kaspaz 8 enzimi açısından pozitif (ok başı) bir apoptotik hücre görülmektedir (x1000).



**Şekil 3. 51.** İnflamasyon pozitif olan bir olguda etrafında bol miktarda PMNL bulunan aktif kaspaz 3 enzimi açısından pozitif (ok başı) bir apoptotik hücre görülmektedir (x1000).



**Şekil 3. 52.** İnflamasyon pozitif olan bir olguda etrafında bol miktarda PMNL bulunan aktif kaspaz 8 enzimi açısından pozitif (ok başı) bir apoptotik hücre görülmektedir (x1000).

### **3.3.3. $\beta$ -katenin proteini ile apoptozis, ölüm reseptörleri aracılı apoptozis ve mitokondri aracılı apoptozis varlığı arasındaki ilişkinin araştırılması**

Apoptozis, ölüm reseptörleri aracılı apoptozis ve mitokondri aracılı apoptozis varlığı ile  $\beta$ -katenin proteininin pozitifliği arasında ilişki olup olmadığı incelenmiş, bu değerlendirme yapılırken Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu aktivitesi ve hücre zarındaki  $\beta$ -katenin pozitifliği ayrı ayrı gösterilmiştir.

**i. Apoptozis, ölüm reseptörleri aracılı apoptozis ve mitokondri aracılı apoptozis ile Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu aktivitesi arasındaki ilişkinin incelenmesi:** Yapılan ışık mikroskopik incelemede Şekil 3.53 ve Şekil 3.54'de görüldüğü gibi apoptotik hücrelerin  $\beta$ -katenin proteini açısından negatif olduğu belirlenmiş, apoptotik olmayan diğer hücrelerde ise sitoplazmanın orta (++), kuvvetli (+++), veya çok kuvvetli (++++)) boyandığı ve Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunun aktif durumda olduğu önemli bir bulgu olarak kaydedilmiştir.

Apoptozis ile Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu aktivitesi arasındaki ilişkiyi tam olarak gözlemleyebilmek için sadece kontrol grubu olgularında sinyal aktivitesi ile apoptozis, ölüm reseptörleri aracılı apoptozis ve mitokondri aracılı apoptozis varlığı karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda bulunan 144 olgunun 26'sında (%18,1) Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu aktif, 118'inde (%81,9) ise inaktif olarak bulunmuştur. Sinyal yolu aktif durumda olan 26 olgunun 18'inde (%69,2) apoptozis pozitif iken, 8 (%30,8) olguda ise negatif olduğu saptanmıştır (Çizelge 3.27). Sinyal yolu inaktif durumda olan 118 olgu incelendiğinde 39 (%33,1) olgu apoptozis varlığı açısından pozitif olarak saptanmış olup, apoptozis varlığı ile Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu aktivitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu belirlenmiştir ( $p < 0,01$ ).

Ölüm reseptörleri ve mitokondri aracılı apoptotik mekanizmalar da Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu aktivitesi ile ayrı ayrı kıyaslanmıştır. Bu değerlendirme sonucunda ölüm reseptörleri aracılı apoptozis ile Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu aktivitesi arasında bir ilişki olduğu ve bu ilişkinin istatistiksel olarak da anlamlı olduğu belirlenmiş ( $p < 0,001$ ), mitokondri aracılı apoptozis ile sinyal yolu aktivitesi arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkiye rastlanamamıştır ( $p > 0,05$ ). Elde edilen bulgular Çizelge 3.27'de sunulmuştur.

**Çizelge 3. 27.** Kontrol grubu olgularında apoptozis ile Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu aktivitesinin varlığı arasındaki ilişkinin incelenmesi

Gruplar		Kontrol grubu (n=144)	
		Sinyal aktif (n=26)	Sinyal inaktif (n=118)
Apoptozis (n=57)	(+)	18 (%69,2)**	39 (%33,1)
	(-)	8 (%30,8)	79 (%69,9)
Ölüm res. aracılı apoptozis (n=45)	(+)	17 (%65,4)***	28 (%23,7)
	(-)	9 (%34,6)	90 (%76,3)
Mitokondri aracılı apoptozis (n=5)	(+)	0 (%0) <sup>ns</sup>	5 (%100)
	(-)	26 (%100)	113 (%95,8)

ns:p>0,05, \*\*: p<0,01, \*\*\*:p<0,001

Kontrol grubunda Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu aktivitesi ile apoptozis pozitifliği arasındaki ilişki değerlendirilirken, aktif kaspaz 3, 8 ve 9 enzimlerine ait H skorlar sinyal aktif ve inaktif hastalarda birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma sonucunda sinyal aktif olan olgularda; aktif kaspaz 3, 8 ve 9 enzimlerinin H skor ortalamalarının, sinyal inaktif olan olgulara kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.28 ve Çizelge 3.29). Yapılan istatistiksel analizlerde de sinyal aktivitesi aktif kaspaz 3 (p<0,001), aktif kaspaz 8 (p<0,001) ve aktif kaspaz 9 (p<0,01) enzimlerine ait H-skor ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu belirlenmiştir.

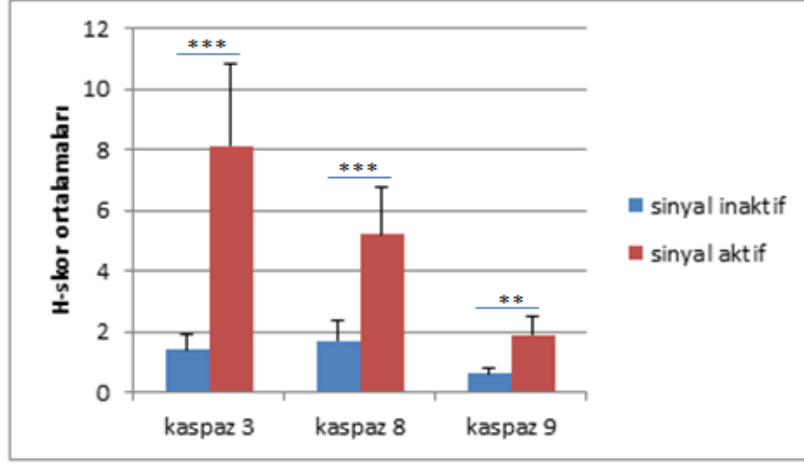
**Çizelge 3. 28.** Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu aktif olan olguların aktif kaspaz 3, aktif kaspaz 8 ve aktif kaspaz 9 enzimlerine ait H-skor ortalamaları ile sinyal yolu inaktif olgularda belirlenen H-skor ortalamalarının karşılaştırılması

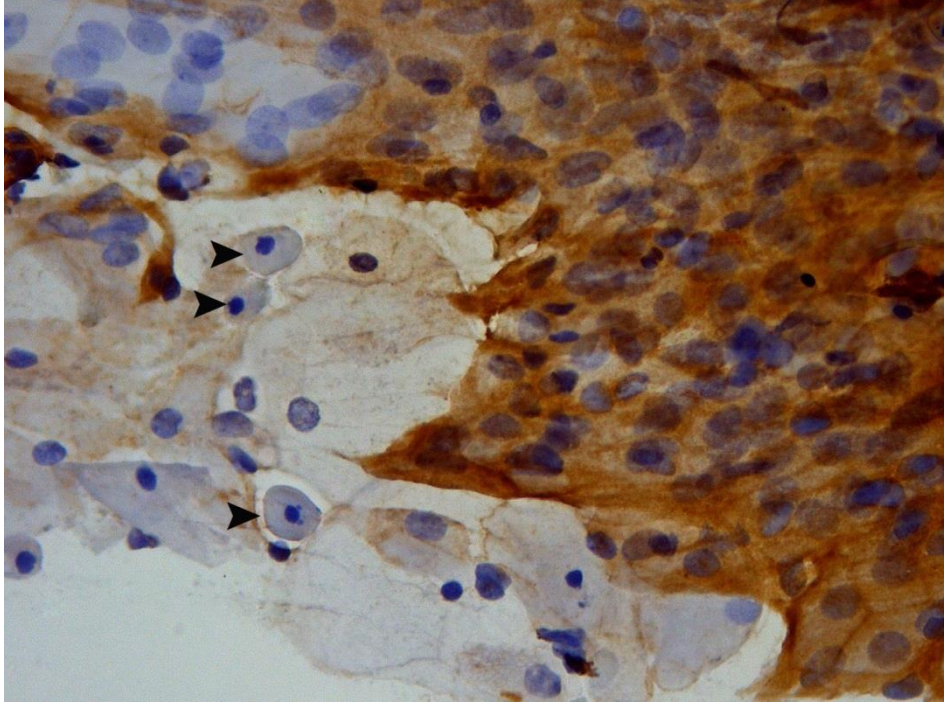
Kontrol grubu (n=144)	Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu aktivitesi	
	Sinyal aktif (n=26)	Sinyal inaktif (n=118)
Aktif kaspaz 3 H-skor ortalamaları	8,1***	1,4
Aktif kaspaz 8 H-skor ortalamaları	5,2***	1,7
Aktif kaspaz 9 H-skor ortalamaları	1,9**	0,6

\*\* : p<0,01, \*\*\*:p<0,001

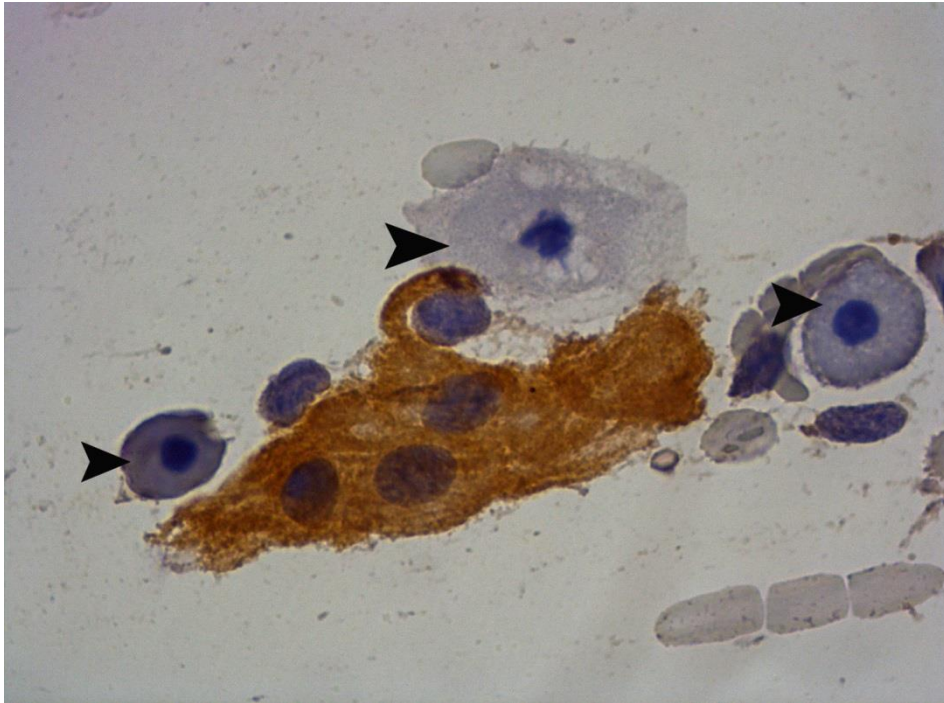


**Çizelge 3. 29.** Sinyal aktif ve inaktif olgularda aktif kaspaz enzimlerine ait H-skor ortalamalarının karşılaştırıldığı histogram





**Şekil 3. 53.** Küçük büyütmede, hücre zarı, sitoplazma ve çekirdeği negatif olan ve buna dayanarak Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu inaktif durumda olan apoptotik hücreler (ok başı) ve çevrede sinyal yolu aktif apoptotik olmayan epitel hücreleri görülmektedir (x400).



**Şekil 3. 54.** Hücre zarı, sitoplazma ve çekirdeği negatif olan ve buna dayanarak Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu inaktif durumda olan apoptotik hücreler (ok başı) ve sitoplazması kuvvetli boyanan sinyal yolu açısından aktif apoptotik olmayan epitel hücreleri görülmektedir (x1000).

**ii. Apoptozis, ölüm reseptörleri aracılı apoptozis ve mitokondri aracılı apoptozis ile hücre zarındaki  $\beta$ -katenin pozitifliği arasındaki ilişkinin incelenmesi:** Apoptozis, ölüm reseptörleri aracılı ve mitokondri aracılı apoptozis pozitif ve negatif olan kontrol grubunda  $\beta$ -katenin proteininin hücre zarı H-skor ortalamaları da karşılaştırılmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda Çizelge 3.30'da görüldüğü gibi apoptozis, ölüm reseptörleri aracılı ve mitokondri aracılı apoptozis pozitif olan olgularda zaradaki  $\beta$ -katenin pozitifliğinin azaldığı belirlenmiş olup, yapılan istatistiksel değerlendirme sonucu bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ( $p>0.05$ ).

**Çizelge 3. 30.** Kontrol grubunda, apoptozis, ölüm reseptörleri aracılı apoptozis ve mitokondri aracılı apoptozis pozitif ve negatif olan olgularda  $\beta$ -katenin proteininin hücre zarı H-skorlarının karşılaştırılması

Kontrol grubu (n=144)	$\beta$ -katenin zar H-skor ortalamaları	
	(+)	(-)
Apoptozis	34,7 <sup>ns</sup>	40,5
Ölüm reseptörleri aracılı apoptozis	18,2 <sup>ns</sup>	38,2
Mitokondri aracılı apoptozis	12 <sup>ns</sup>	40,7

ns:p>0,05

### 3.3.4. Apoptotik belirleyicilerin birbirleri ile karşılaştırılması

Çalışma kapsamında değerlendirilen toplam 224 hastada aktif kaspaz 3, aktif kaspaz 8 ve aktif kaspaz 9 enzim aktiviteleri H-skorlar kullanılarak birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Bu 224 hastada uygulanan korelasyon analizleri sonucunda aktif kaspaz 3 ile aktif kaspaz 8 arasındaki ilişkiyi gösteren Spearman's rho korelasyon katsayısı 0,842, aktif kaspaz 3 ile aktif kaspaz 9 arasındaki ilişkiyi gösteren Spearman's rho korelasyon katsayısı 0,748, aktif kaspaz 8 ve aktif kaspaz 9 arasındaki ilişkiyi gösteren Spearman's rho korelasyon katsayısı ise 0,726 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 3.31 ve Çizelge 3.32). Tüm bu sonuçlar ışığında aktif kaspaz 3, aktif kaspaz 8 ve aktif kaspaz 9 enzimleri arasında istatistiksel olarak

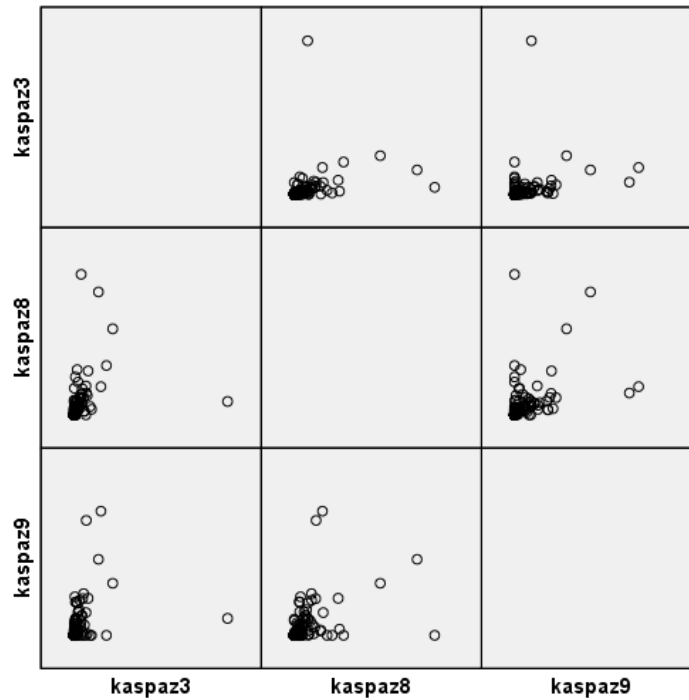
anlamli pozitif bir korelasyon olduğu belirlenmiş olup, bu üç enzimden birindeki artışın diğerlerinde de artışa neden olduğu sonucuna gidilmiştir ( $p < 0,001$ ).

**Çizelge 3. 31.** Aktif kaspaz 3, aktif kaspaz 8 ve aktif kaspaz 9 enzimlerine ait H-skor ortalamaları arasındaki korelasyon analizi

			kaspaz3	kaspaz8	kaspaz9
Spearman's rho	Kaspaz 3	Korelasyon katsayısı	1,000	,842	,748
		İstatistiksel önem	.	,000***	,000***
		N	224	224	224
	Kaspaz 8	Korelasyon katsayısı	,842	1,000	,726
		İstatistiksel önem	,000***	.	,000***
		N	224	224	224
	Kaspaz 9	Korelasyon katsayısı	,748	,726	1,000
		İstatistiksel önem	,000***	,000***	.
		N	224	224	224

\*\*\*:  $p < 0,001$

**Çizelge 3. 32.** Aktif kaspaz 3, aktif kaspaz 8 ve aktif kaspaz 9 enzimlerine ait H-skor ortalamalarının korelasyon analizi sonu oluşturulan matris grafiği



## 4. TARTIŞMA

$\beta$ -katenin proteini ilk olarak adezyon kemerinde görev alan temel moleküllerden biri olarak tanımlanmış [11], daha sonra yapılan çalışmalarda bu proteinin hücre adezyonunun yanı sıra, Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunda da görev yaptığı ortaya konulmuştur [1]. Sinyal yolunda görev alan biyomoleküllerde meydana gelen mutasyonlar sonucu sinyal yolu kontrolsüz şekilde aktive olmaktadır. Bu kontrolsüz aktivasyonun başta kolorektal kanser olmak üzere over, endometrium, akciğer, karaciğer ve serviks kanserleri ile Alzheimer, osteoporoz, diyabet, tetra-amelia gibi hastalıkların oluşumunda rol oynadığı belirlenmiştir [210], [636], [637], [638], [639], [640]. Hastalıklardaki bu rolü nedeniyle Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu ile ilgili çalışmalar giderek önem kazanmaktadır. Apoptozis ise biyolojik görevini tamamlamış ya da hasarlı hücrelerin zararsız bir şekilde ortadan kaldırılmasını sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı bir hücre ölümüdür. Erken embriyonik dönemden itibaren apoptozis, fizyolojik ve patolojik birçok olayda önemli rol oynamaktadır [641].

$\beta$ -katenin ile apoptozis arasındaki ilişkinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda hayvan modelleri, doku örnekleri ve hücre hatları kullanılmış, bu ilişkiyi servikovajinal örnekler kullanarak ve immünohistokimyasal olarak gösteren bir çalışmaya ise rastlanmamıştır [642], [643], [644]. Ayrıca yapılan literatür taramasında apoptozis varlığını saptamaya yönelik çalışmalarda doku örnekleri, hücre hatları, ince iğne aspirasyon sıvıları, imprint simirler gibi farklı örnekler kullanılmış olmasına rağmen insan servikovajinal sıvı örneklerinde aktif kaspaz enzimlerinin kullanıldığı bir çalışma ise bulunmamıştır [645], [646], [647], [648]. Bu nedenlerden dolayı orijinal olduğunu düşündüğümüz çalışmamızda servikovajinal örneklerde  $\beta$ -katenin proteini ile apoptozis arasındaki ilişkinin sitolojik ve immünohistokimyasal olarak araştırılması amaçlanmıştır.

Sitolojik inceleme sırasında apoptotik hücresel değişiklikler değerlendirilmiş, apoptotik gelişim sürecini gösteren tüm basamaklar ışık mikroskopik düzeyde gösterilmiştir. Bu basamaklardan ilki Şekil 3.9'da görülmektedir. Burada bir apoptotik hücre, etrafında da apoptotik olmayan hücreler bulunmaktadır. Apoptotik hücrelerin normal hücrelerden ayrılması ve yuvarlaklaşması birçok çalışmada gösterilmiştir [641], [649]. Bizim bulgumuzda da apoptotik hücrenin yuvarlaklaştığı ve normal hücreler arasında yer aldığı görülmektedir. Burada görülen hücreler

eksfoliyeye hücreler olduğundan hücrelerin tam olarak birbirinden uzaklaştığını söyleyememekle birlikte, normal hücrelerin birbirleri ile sıkı ilişkide olduğu apoptotik hücrenin ise onlardan uzaklaşmış olduğu dikkatimizi çekmiştir. Bu bulgumuzun da apoptotik hücrelerin normal hücrelerden uzalaştığını gösteren bir bulgu olduğu düşünülmüştür. Hücrelerin birbirlerinden uzaklaşmasının apoptotik hücre ile normal hücre arasında bulunan yan yüz bağlantılarından sıkı bağlantılar, adezyon kemeri ve desmozom tipi hücre bağlantılarının bozulmasından kaynaklandığı gösterilmiş, bizim gözlemlerimiz de bu bulgularla uyum göstermiştir [511], [512], [517], [650].

Apoptotik hücreler normal hücrelerden ayrıldıktan sonra hücrenin hacminde azalma olduğu enterositlerle yapılan hücre kültürü çalışmalarında Antico ve çalışma grubu tarafından gösterilmiştir [651]. Bizim bulgularımızda da apoptotik hücre zarının etrafında kalın bir boşluk oluştuğu bu boşluğun apoptotik hücrenin hücre büzülmesine bağlı olarak hacim kaybetmesinden kaynaklandığı düşünülmüştür (Şekil 3.9). Yapılan çalışmalarda apoptotik hücrenin iyon kanallarının bozulduğu, bunlardan voltaj kapılı  $K^+$  kanallarının aktifleştiği ve buna bağlı olarak da sitoplazmik  $K^+$  iyonu konsantrasyonunun azaldığı belirlenmiştir [523]. Normal koşullarda hücre içinde  $K^+$  iyonu azaldığında  $Na^+/K^+$ -ATPaz pompası enerji harcayarak hücre içinden dışına 3 molekül  $Na^+$  iyonu taşıırken, hücre dışından içine 2 molekül  $K^+$  iyonu taşımaktadır. Ancak apoptotik hücrelerde  $Na^+/K^+$ -ATPaz pompasının inhibe olduğu ve hücrede azalan  $K^+$  iyonunun ekstrasellüler matriksten geri alınarak yerine konulamadığı belirlenmiştir [525].  $K^+$  iyonunun hücreden çıkışı ile bozulan iyon dengesi nedeniyle aktive olan  $K^+/Cl^-$  simport taşıyıcı proteini  $Cl^-$  iyonunu hücreden dışarı atar. Böylece, hücre çevresinde ozmotik basıncın arttığı ve artan ozmotik basınç nedeniyle, suyun da difüzyon ile hücreden dışarı çıktığı belirlenmiştir. Suyun dışarı çıkışı ile apoptotik hücrenin hacminin azaldığı ve hücrenin büzüldüğü çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir [525], [524]. Bizim bulgumuzda da apoptotik hücrenin etrafında bulunan bu boşluğun suyunu kaybeden hücrenin hacmindeki azalmadan kaynaklandığı düşünülmüştür.

Apoptotik hücrelerde görülen bir diğer özellik de hücre zarı tomurcuklanması (blebbing) olarak adlandırılan değişikliklerin meydana gelmesidir. Bu tür apoptotik hücresel değişikliklerin meydana geldiği Norman [652], Zeligs [653] ve Tinevez

[654] tarafından endotel hücrelerde, tiroid folikül hücrelerinde ve fibroblastlarda hücre kültürü ve elektron mikroskopik yöntemler kullanılarak gösterilmiştir. Bizim bulgumuzda da apoptotik hücre zarında küçük yuvarlaklar olduğu, bu yuvarlak şekillerin literatürdeki çalışmalarda belirtilen sonuçlar gibi apoptotik hücre zarındaki tomurcuklanmayı (blebbing) gösterdiği düşünülmüştür (Şekil 3.10).

Tomurcuklanmalara dikkatle bakıldığında ise apoptotik hücre zarındaki tomurcuklanma oluşumlarının uç kısımlarında kalınlaşmanın görüldüğü ve bu kısımların koyu boyandığı, sitoplazmadan içeri doğru girildiğinde de kalın bir sitoplazma kısmının maviye boyanmadığı, çekirdeğe yakın sitoplazma kısmının ise mavi renkte boyandığı görülmüştür (Şekil 3.10). Tomurcuklanma sırasında apoptotik hücrelerin periferinde aktin filamentlerinin biriktiği ve bu aktin filamentlerinin de apoptotik hücre zarlarının çıkıntı oluşturmada rol oynadığı Charras ve çalışma grubu [535] tarafından konfokal ve elektron mikroskobu kullanılarak yapılan detaylı çalışmada bildirilmiştir. Bizim ışık mikroskopik olarak elde ettiğimiz bulguda tomurcuklardaki kalınlaşmanın aktin filamentlerinin o bölgedeki birikiminden kaynaklanabileceği düşünülmüş, bulgumuz literatür bilgileri ile uyum göstermiştir. Boyanmanın olmadığı sitoplazma bölgesinde ise granüler endoplazmik retikulum (GER) ve ribozomların aktivitesini kaybettiği dolayısıyla bazik boyalarla boyanmadığı düşünülmüş, bu bulgumuz ise Santin [531], Taylor [552] ve Soldani [655] tarafından yapılan çalışmalarda irdelenmiştir. Bu araştırmacılar apoptotik hücrelerdeki ER'lerin önce genişleyerek şiştiği ve tüm hücre sitozolünü kapladığı, daha sonra ise parçalandığını belirtmişlerdir. King ve çalışma grubu [656] tarafından yapılan bir çalışmada ise 28S ribozomların apoptozis ile birlikte parçalandığı gösterilmiştir. Bizim ışık mikroskopik düzeyde saptamış olduğumuz bu bulgu araştırmacıların detaylı bulguları ile doğrulanmıştır. Çekirdeğe doğru olan sitoplazmanın maviye boyanması ise henüz o bölgede GER ve ribozomların aktif olduğunu düşündürmektedir.

Apoptotik hücrelerin çekirdeğinde de apoptozise bağlı olarak çeşitli değişiklikler oluşmaktadır. Şekil 3.11'de görüldüğü gibi apoptotik bir hücrenin çekirdeğinde kromatinin kümeler oluşturarak çekirdek periferinde biriktiği ve adeta bir saat yüzü görünümü oluşturduğu saptanmıştır. Bu hücrenin çekirdeğine dikkat edildiğinde, çekirdeğin çekirdek çevresindeki sitoplazma ile bağlantısını kaybettiği ve küçülmeye başladığı da görülmektedir. Literatür bilgisine bakıldığında apoptotik

uyarı ile birlikte hücrenin çekirdeğinde DNA'nın kümelendiği ve parçalara ayrıldığı yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Bizim ışık mikroskopik olarak gözlemlemiş olduğumuz bulgular Tone [503], Oberhammer [504] ve Widlak [657], tarafından yapılan elektron mikroskopik ve moleküler biyolojik çalışmalarda detaylı bir biçimde incelenmiştir. Bu araştırmaların bulgularına göre, öncelikle çekirdek zarında toplanan DNA'nın, çekirdek kılıfına tutunduğu bölgedeki adenin ve timin nükleik asit bazlarınca zengin bölgenin aktif kaspaz enzimleri tarafından kesilerek, çekirdek kılıfı ile DNA arasındaki bağlantının koptuğu, ardından DNAaz'lar tarafından kesilen DNA'nın yüksek molekül ağırlıklı DNA parçacıkları oluşturduğu ortaya konmuştur. Bizim çekirdek çevresinde saat yüzü şeklinde biriken DNA parçacıklarını Tone çalışma grubu [503] adeta inci bir gerdanlığa benzetmişler ve araştırmalarında rapor etmişlerdir. Bu aşamada çekirdeğin suyunu kaybederek büzüşmeye başladığı da ifade edilmiştir. Bizim bulgularımızda karyopiknozis (küçülme), karyolizis (erime) ve karyorekzis (kırılma) olayları da ışık mikroskopik olarak belirlenmiştir (Şekil 3.12, Şekil 3.13 ve Şekil 3.14). Kromatin yoğunlaşması sonucu oluşan yüksek molekül ağırlıklı DNA parçalarının çekirdeğin merkezinde biraraya gelerek piknotik çekirdekleri oluşturduğu yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur [503]. Ayrıca apoptozisin başlaması ile birlikte aktif hale gelen kaspaz enzimlerinin DNA'nın parçalanmasından sorumlu DNA fragmentasyon faktörünü (DFF40), endonükleaz ve nükleaz enzimlerini aktifleştirdiği, çekirdekte fragmentasyonlara ve erimelere neden olduğu rapor edilmiştir [658], [659]. Bazı çalışmalarda bu tip çekirdeğe ait değişikliklerin apoptozise özgü olmadığı, nekroz durumunda da görüldüğü belirtilmektedir. Bu nedenle karyopiknozis, karyolizis ve karyorekzis varlığının apoptozis pozitifliğini saptanamada yeterli olmadığı, ek bir yöntem kullanılarak olguların apoptotik olarak nitelendirilmesi gerektiği bildirilmiştir [660], [661]. Buna bağlı olarak çalışmamızda Papanicolaou boyalı örneklerin sitolojik olarak incelenmesinin yanı sıra apoptotik hücreleri belirlemek amacıyla aktif kaspaz enzimlerinin varlığı immünositokimyasal olarak değerlendirilmiştir.

Apoptotik sürecin son aşamasında ise apoptotik cisimcikler adı verilen çekirdek ve organel parçalarını içeren zarla çevrili yapıların olduğu elektron mikroskopik çalışmalarla gösterilmiştir [563], [662]. Çalışmamızda, ışık mikroskopik olarak içinde piknotik görünümde çekirdek parçaları içeren bir hücre ve bu parçanın da hücreden ayrılmak üzere olduğu saptanmıştır (Şekil 3.14). Apoptotik cisimcikler



denilen bu yapıların piknotik çekirdekli, az sitoplazmalı küçük parçacıklar halinde ortamda bulunduğu da dikkatimizi çekmiştir (Şekil 3.15).

Apoptozisin son aşamasında oluşan apoptotik cisimciklerin, içeriklerini etrafa vermedikleri için inflamasyonu uyarmaksızın, makrofajlar tarafından ortadan kaldırıldığı yapılan birçok çalışma ile ortaya konulmuştur [663], [664]. Işık mikroskopik inceleme sırasında makrofaj sitoplazmalarında apoptotik hücrelere ait olduğunu düşündüğümüz apoptotik cisimcikler görülmüş (Şekil 3.15), bir dev histiyositin tek bir makrofaj tarafından sindirilemeyecek büyüklükteki apoptotik hücreyi fagosite etmek üzere yalancı ayaklar uzattığı (Şekil 3.16) tespit edilmiştir. Ayrıca, bizim bulgularımızda apoptotik olmayan epitel hücre zarlarında apoptotik hücrenin şekline uygun bir çöküntü oluşarak hücrenin yalancı ayaklar oluşturduğu (Şekil 3.17) ve hücrenin tamamının epitel hücresi içine alındığı belirlenmiştir (Şekil 3.18). Monks ve çalışma grubu [606] tarafından meme bezi ile yapılan histolojik bir çalışmada hematoksilen eozin ile boyanmış kesitlerde sitoplazmasında apoptotik cisimcikler bulunan epitel hücreleri saptamış ve epitel hücrelerinin apoptotik hücrelerin ortadan kaldırılmasında görev yaptığını ifade edilmiştir. Hatta bu örnekler sitokeratin 18 ile immünohistokimyasal olarak incelenmiş fagositoz ile hücre içine alınmış olan bu apoptotik hücrelerin pozitif boyandığı görülmüştür. Ayrıca araştırmacılar aynı örnekleri elektron mikroskopunda da incelemiş, bu epitel hücrelerinin sitoplazmasında görülen cisimciklerin apoptotik cisimciklere ait olduğu gözlenmiştir. Meme bezi dışında, düz kas hücrelerinin, hepatositlerin ve endotel hücrelerinin de apoptotik hücreleri fagositoz yaptığı farklı çalışmalarda gösterilmiştir [603], [604], [605]. Bu şekilde literatürdeki çalışmalarla uyumlu olarak epitel hücrelerinin fagositoz ile apoptotik hücrelerin ve apoptotik cisimciklerin inflamasyonu uyarmaksızın ortamdaki uzaklaştırılmasında görev yaptığı sonucuna gidilmiştir.

Sitolojik incelemenin ardından, çalışma kapsamına alınan 224 olgu  $\beta$ -katenin proteininin hücredeki varlığı ile hücre zarı, sitoplazma ve çekirdekteki lokalizasyonu açısından immünohistokimyasal olarak incelenmiştir. Bu 224 olgunun 200'ünde (%89,3) epitel hücre zarlarının  $\beta$ -katenin proteini açısından pozitif olduğu saptanmıştır (Şekil 3.21).  $\beta$ -katenin proteininin hücre-hücre bağlantılarından adezyon kemeri görev yaptığı Ozawa ve çalışma grubunun [11] fibroblast hücre hatları olan NIH 3T3 ve L hücreleri kullanarak yaptıkları bir hücre kültürü

çalışmasında ortaya konmuştur. Hücre zarının hemen altındaki sitoplazma kısmında bulunan  $\beta$ -katenin proteininin bir ucuna hücreler arası bağlayıcı protein olan E-kaderin proteininin bağlandığı, diğer ucuna ise aktin bağlayıcı proteinlerin bağlandığı gösterilmiştir. Bu aktin bağlayıcı proteinlere de aktin filamentlerinin bağlandığı saptanmıştır. Bu şekilde hücreyi çepeçevre kuşatan aktin filamentlerinin, komşu epitel hücrelerin bir arada tutulmasında görev yaptığı belirlenmiştir [665], [666]. Bizim bulgularımızda da immünohistokimyasal olarak belirlediğimiz, çok katlı yassı epitel hücre zarındaki zayıf (+), orta (++) , kuvvetli (+++) ve çok kuvvetli (++++)  $\beta$ -katenin pozitifliğinin, bu proteinin hücre-hücre bağlantılarındaki varlığını ışık mikroskopik olarak gösterdiği sonucuna varılmıştır. İnceleme sırasında, epitel hücrelerinin birbirleri ile temas ettikleri bölgelerde daha kuvvetli pozitiflik olduğu görülmüş (Şekil 3.22), bu bölgelerde hücrelerin birbirine daha sıkı bağlandığı ve bulgumuzun  $\beta$ -katenin proteininin hücre-hücre adezyonunda görev yaptığını belirten çalışmalarla uyum gösterdiği belirlenmiştir.

Apoptotik hücrelerin hücre zarları  $\beta$ -katenin proteini açısından değerlendirildiğinde ise boyanma olmadığı görülmüştür. Şekil 3.23'te görüldüğü gibi normal çok katlı yassı epitel hücrelerinin  $\beta$ -katenin proteini açısından pozitif olduğu, tam karşısındaki apoptotik hücrede ise boyanma olmadığı saptanmıştır. Boyanma olmamasının nedenleri yapılan çalışmalarda şöyle özetlenmiştir.  $\beta$ -katenin proteininin aktif kaspaz 3 enziminin substratı olduğu ve apoptozis ile birlikte bu enzim tarafından kesildiği çeşitli araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur [203], [204], [205], [667].  $\beta$ -katenin proteininin hangi bölgeden kesildiğinin belirlenmesi amacıyla, proteinin 3 farklı bölgesini tanıyan farklı antikolar kullanılmış, bu çalışma sonucunda  $\beta$ -katenin proteininin hem N-terminal, hem de C-terminal bölgelerine yakın iki farklı bölgeden kesildiği gösterilmiştir [668].  $\beta$ -katenin proteininin N-terminal bölgesinden kesimi sonucu adezyon kemerinden ayrıldığı, bu nedenle bu bağlantının bozulduğu ve apoptotik olmayan hücreler ile apoptotik hücrelerin birbirinden ayrıldığı belirlenmiştir [204], [513], [669]. Bizim bulgularımızda görülen apoptotik hücre zarlarının  $\beta$ -katenin proteini açısından negatif oluşu  $\beta$ -katenin proteininin apoptotikse bağlı olarak parçalanmasından kaynaklandığı düşünülmüş, bulgumuz literatür bilgileri ile paralellik göstermiştir.

$\beta$ -katenin proteininin hücre zarındaki pozitifliğinin yanı sıra sitoplazma ve çekirdekteki pozitifliği de immünohistokimyasal olarak değerlendirilmiştir (Şekil

3.24).  $\beta$ -katenin proteininin sitoplazma ve/veya çekirdekdeki varlığının Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu aktivitesinin gösterilmesinde belirleyici (marker) olarak kullanılabileceği ifade edilmektedir [142], [177].  $\beta$ -katenin proteininin sadece hücre zarında görülmesi ve/veya sitoplazmanın zayıf (+) olarak boyanması Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunun inaktif durumda olduğunu göstermektedir. Hücrelerin sitoplazmasında  $\beta$ -katenin proteini sürekli yapılıp yıkılmaktadır; ancak düşük miktarda da olsa sitoplazmada bir miktar serbest  $\beta$ -katenin proteininin bulunduğu rapor edilmiştir [168], [670]. Bu nedenle sitoplazmadaki zayıf pozitiflik sinyal aktivitesi açısından önemli kabul edilmemiştir. Sitoplazmanın orta (++) , kuvvetli (+++), veya çok kuvvetli (++++), çekirdeğin ise pozitif (+) boyandığı durumlarda ise sinyal yolunun aktif olduğu kabul edilmiştir. Bu bilgilere dayanarak 224 olgunun 44'ünde (%19,6) Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunun aktif, 180'inde (%80,4) ise inaktif olduğu saptanmıştır.

Sinyal yolunun pozitif olduğu 44 olgunun 21'inde (%47,7) çok katlı yassı epitel hücrelerinde sitoplazmanın yanı sıra çekirdeğin de pozitif olduğu gözlenmiştir. Çekirdeğin bir kısmı (Şekil 3.28) ve çekirdeğin tümünde (Şekil 3.26) görülen bu pozitifliğin yanı sıra, dikkat çekici bir bulgu olarak çekirdek zarlarının pozitif olduğu, ancak çekirdek için negatif olarak boyandığı saptanmıştır (Şekil 3.27).  $\beta$ -katenin proteininin hem molekül ağırlığının 92 kDa olması, hem de çekirdeğe giriş için gerekli olan çekirdeğe giriş sinyali (nuclear localisation signal, NLS) içermemesine rağmen, çekirdeğe girdiği literatür bilgisinde belirtilmiştir [176], [177]. Bu iki olumsuz özelliğe rağmen  $\beta$ -katenin proteininin çekirdeğe girişi ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda, bu proteinin NLS sinyali içeren TCF/LEF-1, APC, Axin gibi proteinlere bağlanarak çekirdeğe girme özelliğine sahip olduğu ve bu şekilde çekirdek porlarından çekirdek içine girdiği, çekirdekten de sitoplazmaya geçebildiği yapılan çalışmalarda öne sürülmüştür [142], [179], [180], [181]. Bir başka görüşe göre ise sitoplazmadaki  $\beta$ -katenin proteininin çekirdek por kompleksinin yapısında bulunan "Nükleoporin 62 (Nup 62)", Nup 153 ve Nup 358 proteinlerine direkt olarak bağlandığı zaman çekirdek içine geçebildiğini öne sürülmüştür. Ancak  $\beta$ -katenin proteininin bu proteinleri neden tercih ettiğine ve nasıl içeri girdiğine dair kesin bir bilgiye rastlanmamıştır [178]. Bizim ışık mikroskopik olarak çekirdek zarında kalın bir şerit şeklinde  $\beta$ -katenin proteinini pozitif olarak görmüş olmamız (Şekil 3.27) bu proteinin çekirdek içine girerken por komplekslerindeki reseptörlere

bağlanarak henüz içeri girdiğini ve periferde toplandığını, diğer kısmın da bu nedenle negatif olabileceğini bize düşündürmüştür.

Çalışmamızda immünohistokimyasal olarak incelenen apoptotik hücreler sitoplazma ve çekirdekdeki  $\beta$ -katenin proteininin pozitifliği açısından değerlendirildiğinde ise hücrelerin negatif olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.25). Apoptotik hücrelerin hem sitoplazma hem de çekirdekdeki bu  $\beta$ -katenin negatifliğinin nedenleri üzerine çeşitli görüşler bulunmaktadır. Bunlardan, Canterella ve çalışma grubu tarafından insan nöroblastoma hücreleri (SH-SY5Y) ile yapılan çalışmada apoptozisin indüklenmesinin ardından  $\beta$ -katenin proteininin sitoplazmadaki yıkımının arttığı gösterilmiştir [671]. Steinhusen ve çalışma grubu [205] tarafından yapılan çalışmada ise apoptozisle birlikte aktifleşen aktif kaspaz 3 enziminin sitoplazmadaki  $\beta$ -katenin proteinini belirli bölgelerden keserek bozduğu saptanmıştır. Böylece  $\beta$ -katenin proteininin çekirdekdeki TCF/LEF-1 transkripsiyon faktörlerini aktiveleştiremediği ve buna bağlı olarak da Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunu aktiveleştirme özelliğinin ortadan kaldırıldığı bildirilmiştir. Bu bilgilerle uyumlu olarak kaspaz 3 aktivitesi ile birlikte kesilen  $\beta$ -katenin proteininin sitoplazma ve çekirdekte birikmediği bu nedenle apoptotik hücrelerde Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunun inaktif durumda olduğu belirlenmiştir.

İstatistiksel olarak yapılan değerlendirmede immünohistokimyasal olarak belirlediğimiz Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu aktivitesinin kontrol ile çalışma grubundaki atipik ve enfeksiyonlu olgular arasında farklılık gösterip göstermediği araştırılmış, kontrol grubu olgularının %18,1'inde (26/144), atipik olguların %47,1'inde (8/17), enfeksiyonlu olguların ise %15,9'unda (10/63) sinyal yolunun aktif olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.7 ve Çizelge 3.10). Yapılan analizlerde atipik olgularda sinyal yolu aktivitesinin kontrol grubu olgularına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı belirlenirken ( $p < 0,05$ ), enfeksiyon olgularında ise anlamlı bir farklılık bulunmadığı görülmüştür ( $p > 0,05$ ).

Servikal kanser gelişiminde ilk aşamada servikal intraepitelyal lezyonlar (cervical intraepithelial lesions; CIN) oluşmaktadır [672]. Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu aktivitesinin servikal kanser öncesi intraepitelyal lezyonlarda etkisini araştıran çeşitli çalışmalar bulunmaktadır [643], [673]. Shinonara ve araştırma grubunun [642] 2001 yılında servikal biyopsileri kullanarak yaptığı bir immünohistokimyasal çalışmada, intraepitelyal lezyonlar (displazi) ile *in situ* ve invaziv kanser

olgularında  $\beta$ -katenin proteininin ifadesi araştırılmış ve çalışma sonucunda Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu aktivitesinin normal dokulara kıyasla displazi, in situ ve invaziv kanser olgularında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı ve bu sinyal aktivitesinin servikal kanser oluşumunda önemli rolü olabileceği ifade edilmiştir. Bu çalışmalarla uyumlu olarak, bizim çalışmamızda da atipik hücrel değişikliklerin varlığı belirlenmiş 17 olgunun %47,1'inde (8/17) sinyal yolunun aktif durumda olduğu kontrol grubu olgularında ise bu oranın %18,1 (26/144) olduğu görülmüştür. Atipik hücrelerde gerçekleşen sinyal yolu aktivitesindeki bu artış istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Bu bulgulara dayanarak atipik hücrel değişikliklerin oluşumunda Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunun etkisi olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca  $\beta$ -katenin proteininin sitoplazma ve/veya çekirdekdeki lokalizasyonunun atipik hücrelerin saptanmasında belirleyici (marker) olarak kullanılabileceği yorumu yapılmış, her bir olgu grubuyla olgu sayısı artırılarak çalışma yapılmasının bu ilişkinin tam olarak gösterilebilmesi açısından önemli olduğu sonucuna gidilmiştir. Yaptığımız literatür taramasında daha önce servikojenital simirlerde servikal kanser öncülü lezyonlar ile  $\beta$ -katenin proteininin varlığı ve lokalizasyonu arasındaki ilişkiyi araştıran başka bir çalışmaya ise rastlanmamıştır. Bu nedenle orijinal olan bu bulgunun sonraki çalışmalar için temel oluşturabileceği önemli bir sonuç olarak kaydedilmiştir.

Histolojik olarak intraepitelyal lezyonlar (CIN) şeklinde adlandırılan hücrel değişiklikler Papanicolaou boyalı servikojenital simirlerde ASCUS, LSIL ve HSIL olarak adlandırılan değişikliklerle tanımlanmaktadır [674]. Çalışmamızda, sitolojik olarak ASCUS, LSIL ve HSIL olarak belirlenmiş olan atipik hücrel değişiklikler ayrı ayrı sinyal yolu aktivitesi açısından kontrol grubu olguları ile karşılaştırılmıştır (Çizelge 3.8). LSIL ve HSIL olgularında kontrol grubu olgularına kıyasla sinyal aktivitesinin artmış olduğu saptanırken ( $p < 0,05$ ), ASCUS olgularında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa rastlanmamıştır ( $p > 0,05$ ).

LSIL ve HSIL tanılarının HPV enfeksiyonu ile ilişkili olduğu literatürde bildirilmektedir [675], [676]. HPV epitel hücrelerini enfekte ettiğinde ya konak hücre sitoplazmasında kopya sayısını artırarak kondilom oluşumunda rol oynadığı ya da kendi genomunu konak hücre genomuna entegre ederek hücrelerin onkojenik transformasyonuna neden olduğu bildirilmektedir. HPV, konak hücre genomuna fiziksel olarak entegre olduğunda kendi proteinlerini sentezlemeye başlar. Bu

proteinlerden E6 ve E7 onkoproteinleri, sırasıyla tümör baskılanmasından sorumlu p53 ve Retinoblastoma (Rb) proteinlerine bağlanarak bu proteinleri inaktif hale getirmektedir. Bu şekilde hücre siklusunun kontrolünün bozulduğu ve hücrelerde kontrolsüz proliferasyonun gerçekleştiği belirlenmiştir [677], [678], [679], [680]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda HPV'nin servikal kanser oluşumunda tek başına bir etken olmadığı, Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunun kontrolsüz aktivasyonunun da bu dönüşümde rol oynayabileceği ortaya konmuştur [681], [682]. HPV E6 ve E7 proteinleri ile yapılan *in vitro* çalışmalarda, bu proteinlerin  $\beta$ -katenin proteininin sitoplazma ve/veya çekirdekte birikmesine ve Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunun aktivasyonuna neden olduğu gösterilmiş, ancak mekanizma tam olarak ortaya konulamamıştır [673], [683]. Bu mekanizmanın aydınlatılması amacıyla Chung ve çalışma grubu tarafından yapılan iki ayrı araştırmada, HPV'nin virulans aktivitesinde rol oynayan E6 ve E7 proteinlerinin, Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunun aktivasyonunu önleyen "Secreted Frizzled-related protein (sFRP)" inhibitör proteinlerini kodlayan SFRP genlerinin promoter bölgelerini hipermetilasyona uğrattığı gösterilmiştir. Bu hipermetilasyonlar nedeniyle sFRP inhibitör proteinlerinin ifadesinin engellediği ve Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunun kontrolsüz olarak aktifleştiği çalışmalar sonucunda ortaya konmuştur. Bizim elde ettiğimiz bulgularla uyumlu olarak, Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu aktivitesinin LSIL ve HSIL olgularında kontrol grubu olgularına kıyasla arttığı da bu çalışmalarda ortaya konmuştur [684], [685]. Bu bilgiler ışığında servikal kanser oluşumunda HPV enfeksiyonunun başlatıcı bir faktör olduğu ancak kanser gelişiminde Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal mekanizmasının kontrolsüz şekilde aktifleşmesinin de epitel hücrelerinin anormal proliferasyon ve farklılaşmasında etkili olabileceği düşünülmüştür.

ASCUS servikovajinal simirlerde önemi belirlenemeyen atipik skuamoz hücreleri göstermektedir. ASCUS tanısı hücrelerdeki değişikliklerin derecesinin tam olarak ayırtedilemediği durumlarda verilmektedir [686]. Çalışmamızda ASCUS tanısı almış 5 olgudan 1'inde (%20) sinyal yolunun aktif, 4'ünde (%80) ise inaktif durumda olduğu belirlenmiştir. Yapılan istatistiksel analizlerde de kontrol grubu olguları ile ASCUS olguları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ( $p>0,05$ ). Literatürde,  $\beta$ -katenin proteininin varlığı ve lokalizasyonundaki değişikliklerin ASCUS olguları ile ilişkisini araştıran herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Elde ettiğimiz bulgularda sinyal yolu inaktif durumda

olan 4 olguda, atipik hücrel değişikliklerin inflamatuvar sebeplere bağlı olarak oluşmuş olabileceği, sinyal yolu aktif olan diğer hastanın ise simir takibi ile daha ileri hücrel değişikliklerin varlığı açısından değerlendirilmesi gerektiği düşünölmüştür.

Atipik hücrel değişikliklerin ilerleyişi ile Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu aktivitesi arasında bir ilişi olup olmadığının belirlenmesi amacıyla izelge 3.9'da göröldüğü gibi ASCUS, LSIL ve HSIL olguları birbirleri ile sinyal aktivitesi açısından ayrı ayrı karşılaştırılmış, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişi tespit edilememiştir ( $p>0,05$ ). Yapılan çalışmalarda  $\beta$ -katenin proteini ile hastalıkların seyri arasındaki ilişi araştırılmıştır. Kolorektal kanserli hastalarda yapılan bir meta analizde  $\beta$ -katenin proteininin sitoplazma ve/veya çekirdekdeki birikiminin hastalığın seyrini ve sağ kalımı olumsuz önde etkilediği bildirilmiştir [235]. Buna karşın çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular sonucu  $\beta$ -katenin proteininin varlığı ve lokalizasyonundaki değişikliklerin, servikal atipik hücrel değişikliklerin ilerleyişinin anlaşılmasında belirleyici olarak göz önüne alınamayacağı, ancak olgu sayısının arttırılarak bu ilişinin detaylı olarak değerlendirilmesinin gerektiği sonucuna varılmıştır.

Kontrol grubu olguları ile çalışma grubundaki atipik ve enfeksiyonlu olgular  $\beta$ -katenin proteininin hücre zarı, sitoplazma ve ekirdekdeki H-skorları açısından da karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma sonucunda Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu aktif olan olguların tamamında zar, sitoplazma ve ekirdekdeki H-skor ortalamalarının, sinyal inaktif olan olgulara kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir (izelge 3.12 ve izelge 3.13). Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunun hedefi hücre zarı, sitoplazma ve çekirdekdeki  $\beta$ -katenin miktarının düzenlenmesidir. Yapılan alışmalarda Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunun sinyal molekülö olan Wnt'nin hedef hücre zarında bulunan reseptörlerine bağlanmasıyla sitoplazma ve çekirdekte bulunan  $\beta$ -katenin düzeyinin hızla arttığı belirlenmiştir [182], [687]. Bununla birlikte, Cox [175] ve Hendriksen [688] alışma gruplarının ayrı ayrı yaptıkları çalışmalar sonucunda sinyal aktivitesine bağlı olarak sitoplazmada birikmeye başlayan  $\beta$ -katenin proteininin zarda bulunan E-kaderin molekülleri tarafından kuvvetle hücre zarına çekildiği rapor edilmiştir. Zardaki tüm E-kaderin molekülleri  $\beta$ -katenin proteini ile bağlandıktan sonra, sitoplazma ve çekirdekdeki  $\beta$ -katenin miktarının arttığını rapor etmişlerdir. Tüm bu yayınlarla uyumlu olarak, bizim bulgularımızda da Wnt/ $\beta$ -

katenin sinyal yolu aktivitesine bağlı olarak  $\beta$ -katenin proteininin zardaki, sitoplazmadaki ve çekirdekdeki H-skor ortalamalarının sinyal yolu inaktif olgulara oranla arttığı belirlenmiş, bu artış istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Çalışmamızda  $\beta$ -katenin proteininin yanı sıra hücrelerde apoptozis varlığının belirlenmesi amacıyla aktif kaspaz 3, aktif kaspaz 8 ve aktif kaspaz 9 antikorlarının varlığı immünohistokimyasal olarak değerlendirilmiştir. Apoptotik hücreler aktif kaspaz 3 antikoruna açısından incelendiğinde apoptotik hücrelerin hücre zarı (Şekil 3.34), sitoplazma (Şekil 3.31, Şekil 3.35 ve Şekil 3.37), çekirdek zarı (Şekil 3.36) ve çekirdeğinde (Şekil 3.35 ve Şekil 3.37) aktif kaspaz 3 enziminin pozitif olduğu saptanmıştır. Hücrelerde normalde inaktif proenzim olarak sentezlenen kaspaz 3 enzimi, apoptotik uyarının ardından başlatıcı kaspazlar (kaspaz 8 ve kaspaz 9) tarafından kesilerek aktif kaspaz 3 haline gelmektedir. Aktif kaspaz 3 enzim aktivitesi, dokularda immünohistokimyasal hücrelerde ise immünohistokimyasal olarak belirlenebilmektedir. Bu yöntemlerin dışında Western blot, ELISA ve akım sitometri yöntemleri de kaspaz 3 aktivitesinin tayini için kullanılmaktadır [689], [690], [691]. Bu yöntemler uygulanırken antikor seçiminde kaspaz 3 enziminin sadece aktif formuna bağlanan ve inaktif proenzim kaspaz 3 ile diğer kaspaz enzimlerine bağlanmayan antikorun seçimi yöntemin özgüllüğü için önem taşımaktadır. Bu nedenle aktif kaspaz 3 enziminin varlığı apoptozis mekanizmasının aktivitesini gösterdiğinden özgüllüğü oldukça yüksek bir yöntemdir ve apoptozis tayininde altın standartlardan biri olarak gösterilmektedir [692], [693], [694]. Bu bulgulara dayanarak çalışmamızda apoptotik hücrelerin tayini için sadece aktif kaspaz 3 enzimini tanıyan monoklonal bir tavşan antikoruna kullanılmış, bu antikor ile sitoplazmanın boyanması apoptozis açısından pozitif olarak kabul edilmiştir.

Bu bulguların yanı sıra hücre zarına bakıldığında apoptozis pozitif olgularda hücre zarı ve hemen altında bulunan sitoplazma kısmının aktif kaspaz 3 enzimi açısından pozitif olduğu dikkatimizi çekmiştir (Şekil 3.34). Apoptozis, ölüm reseptörleri ve mitokondri aracılı apoptozis olmak üzere iki farklı sinyal yolu ile aktifleşmektedir. Hücre zarında bulunan ölüm reseptörlerine ligandları bağlandığında ölüm reseptörleri aracılı apoptozis aktifleşir ve bu aktivasyon kaspaz 3 enziminin aktif duruma geçmesi ile sonuçlanır [695]. Bizim



bulgularımızda hücre zarı ve altındaki sitoplazma bölgesinde aktif kaspaz 3'ün pozitif olması apoptozis mekanizmasının ölüm reseptörlerine bağlı olarak henüz aktifleştigi şeklinde yorumlanmıştır.

Apoptotik hücre zarında immünohistokimyasal olarak ilginç bulgular elde edilmiştir. Bunlardan biri apoptotik hücrenin zarında yuvarlaklar şeklinde çıkıntılar oluşması ve bu yuvarlakların aktif kaspaz 3 enzimi açısından immünohistokimyasal olarak reaksiyon vermesidir (Şekil 3.32). Diğer önemli bir bulgu da apoptotik hücrenin hücre zarında tomurcuklar göstermediği halde düz hücre zarında yer yer yuvarlaklar şeklinde birikim göstermiş olan pozitif alanlara rastlanmış olmasıdır (Şekil 3.33). Hücre zarında meydana gelen bu tomurcuklanma mekanizmasında Rho ilişkili kinaz (ROCK I) aktivitesinin önemli olduğu belirlenmiştir. Apoptozis ile birlikte aktifleşen kaspaz 3 enziminin substratlarından biri de ROCK I enzimidir. Normal şartlar altında sitoplazmada inaktif halde bulunan bu enzim apoptozis ile birlikte aktif kaspaz 3 tarafından kesilerek aktif ROCK I haline gelmektedir. Aktif ROCK I enzimi ise miyozin hafif zincirinin (MLC) aşırı şekilde fosforillenmesine neden olmaktadır. Bu fosforillenme sonucu aktifleşen MLC'nin, apoptotik hücrelerin periferinde rastgele dağılım gösteren aktin filamentlerinin kasılmasına ve kasılan aktin filamentlerinin de hücre zarında bu tomurcuklanmaların oluşumunda rol oynadığı gösterilmiştir [536], [564], [696]. Bizim bulgularımızda hücre zarında yer yer kümelenmiş ve tomurcuklanan hücrelerin çıkıntılarında immünohistokimyasal olarak gözlediğimiz aktif kaspaz 3 aktivitesinin tomurcuklanma evresinin erken basamağını gösterdiği düşünülmüştür.

Apoptotik hücrelerde hücre zarı ve sitoplazma dışında çekirdek zarı ve çekirdekte de aktif kaspaz 3 enziminin pozitif olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.35, Şekil 3.36 ve Şekil 3.37). Literatür incelendiğinde çekirdek zarındaki aktif kaspaz 3 pozitifliğini gösteren herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır ancak Buendia ve çalışma grubunun [697] elektron ve florasan mikroskopi teknikleri kullanarak yaptıkları çalışmada apoptozisin uyarılması ile birlikte çekirdek kılıfı ve çekirdek por kompleksinin yapısında bulunan proteinlerin aktif kaspaz 3 enzimi tarafından parçalandığı belirlenmiştir. Buna bağlı olarak çekirdek zarında görülen aktif kaspaz 3'ün çekirdek kılıfı ve çekirdek por kompleksinde bulunan proteinlerin parçalanması için orada birikmiş olabileceği düşünülmüş, mekanizmanın tam olarak aydınlatılabilmesi için daha ayrıntılı çalışmalar yapılması gerektiği

yorumuna gidilmiştir. Çekirdeğin bütünündeki aktif kaspaz 3 pozitifliği ise çeşitli araştırmacılar tarafından araştırılmıştır. Ramuz ve çalışma grubu [698] tarafından konfokal mikroskop kullanılarak yapılan bir çalışmada apoptozisin başlangıç evrelerinde sitoplazmada az miktarda bulunan aktif kaspaz 3 enziminin apoptozisin ilerlemesiyle birlikte sitoplazmadaki miktarının arttığı ve apoptozisin son evrelerinde ise çekirdekte bulunduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda bulgularımızda çekirdekte görülen aktif kaspaz 3 pozitifliğinin apoptozisin geç evrelerindeki hücreleri gösterdiği düşünülmüştür.

Apoptotik hücreler aktif kaspaz 8 enzimi açısından immünohistokimyasal olarak incelendiğinde, apoptotik hücrelerin hücre zarı (Şekil 3.40 ve Şekil 3.41) sitoplazma (Şekil 3.42) ve çekirdeğinde (Şekil 3.42 ve Şekil 3.45) pozitifliğe rastlanmıştır. FasL ve TNF $\alpha$  gibi apoptozisi uyaran ligandların TNFR1 ve Fas gibi hücre zarında bulunan reseptörlerine bağlanması hücrelerde ölüm reseptörleri aracılı apoptozisin uyarılmasını sağlamaktadır [462]. Yapılan çalışmalarda prokaspaz 8 enziminin ölüm reseptörlerinin sitozol içindeki adaptör protein bağlı kısmına tutunarak “reseptör-adaptör protein ve prokaspaz 8 enziminden” oluşan bir “Ölüm indükleyici sinyal kompleksi (DISC)” meydana getirdiği gösterilmiştir [463], [464], [465]. Böylece bu kompleks prokaspaz 8 enziminin aktif hale geçmesi için uyarıcı olarak görev yapmaktadır. Bu aktifleşmiş olan prokaspaz 8 enziminin diğer prokaspaz 8 enzimlerinin kompleks oluşumuna gerek olmaksızın aktif kaspaz 8 haline dönüşmesini sağladığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [466]. Bizim bulgularımızda da aktif kaspaz 8 enziminin Şekil 3.40’da görüldüğü gibi hücre zarında saptanmış olmasının ölüm reseptörleri aracılı apoptotik mekanizmanın erken evresini gösterdiğini, sitoplazmadaki pozitifliğin (Şekil 3.41 ve Şekil 3.42) ise aktifleşen kaspaz 8 enziminin sitoplazmaya yayıldığını ve ölüm reseptörleri aracılı apoptotik mekanizmayı devam ettirdiğini düşündürmüştür.

Şekil 3.43’de görüldüğü gibi çekirdeğinde karyolizis görülen bir hücrenin sitoplazmasının tümünde orta (++) pozitiflik olduğu, çekirdeğin ise negatif olduğu saptanmıştır. Karyolizis sadece apoptozis varlığında değil, programsız bir hücre ölümü tipi olan nekrozis varlığında da hücrelerde gözlenmektedir [699]. Çalışmamızda karyolizis görülen bir hücrede apoptozis varlığında spesifik olarak aktifleşen bir enzimin pozitif olarak görülmesi, bu karyolizis değişikliğinin

apoptozise bağlı olarak gerekleŖtięi ancak nekroza bağlı olmadığı Ŗeklinde yorumlanmıŖtır.

Apoptotik hücreslerde çekirdek için yapılan gözlemlerimizde sitoplazmanın tümünde görülen pozitifliğin çekirdekte de saptandığı (Ŗekil 3.42 ve Ŗekil 3.44) gsterilmiŖtir. Benchoua ve alıŖma grubu [700] tarafından fare modeli kullanılarak yapılan alıŖmalarda nöron hücrelerinde aktif kaspaz 8 enziminin çekirdek içine girdiği gsterilmiŖtir. Bu enzimin çekirdek içinde DNA tamirinden sorumlu “Poli (ADP-riboz) polimeraz-2 (PARP-2)” enzimini keserek, inaktif hale getirdiği ve apoptozisin ilerlemesinde görev yaptığı bildirilmiŖtir. Bu bilgiler iŖıęında apoptotik hücrelerde gzlemiŖ olduğumuz sitoplazma yanı sıra çekirdekteki pozitifliğin, sitoplazmada biriken aktif kaspaz 8 enziminin belirli bir süre sonra çekirdeğe girdiği muhtemelen de PARP-2 enzimini keserek DNA onarımını engellediği ve bu Ŗekilde ekirdek içinde aktivite gösterdiği dŖnlmŖtir.

Apoptotik hücreler aktif kaspaz 9 enzimi açısından immünositokimyasal olarak incelendiğinde, apoptotik hücrelerin sitoplazmasında pozitiflik olduğu belirlenmiŖtir (Ŗekil 3.46, Ŗekil 3.47 ve Ŗekil 3.48). Kaspaz 9 enzimi ile ilgili olarak yapılan alıŖmalarda kaspaz 9 enzimi bulunmayan (mutant) embriyonik hücreler, timositler ve fibroblastlarda mitokondriye bağlı hücre ölümünün gerekleŖmedięi, buna bağlı olarak da mitokondri aracılı apoptotik mekanizmanın oluŖabilmesi için kaspaz 9 enziminin gerekli olduğu bildirilmiŖtir [701], [702]. Mitokondri aracılı apoptozis olayında, apoptotik uyarı ile birlikte Sitokrom c mitokondriden sitozole salınır. Sitozolda Sitokrom c, Apaf-1 adı verilen bir proteine bağlanmaktadır. Bu bağlanma 7 adet Apaf-1, 7 adet sitokrom c ve 7 adet ATP molekl bir araya gelerek “apoptozom” olarak adlandırılan tekerlek benzeri kompleksi (Wheel like) oluŖturur. Sitozolda bulunan prokaspaz 9 apoptozoma bağlanır ve aktif kaspaz 9 haline gelir. Aktif kaspaz 9, ise kaspaz 3 enziminin aktifleŖmesini sağlayarak hücrelerin ölümünde rol oynar [486], [487], [488]. Bizim bulgularımızda da apoptotik hücrelerin sitoplazmalarında aktif kaspaz 9 pozitifliği grlmŖ ve bu pozitifliğin mitokondri aracılı apoptozisten kaynaklandığı dŖnlmŖtir.

Apoptotik hücrelerin ortadan kaldırılmasında epitel hücrelerin görev yaptığı eŖitli alıŖmalarla ortaya konmuŖtur [606], [703]. Bu alıŖmaların sonuçlarına göre apoptotik hücrenin zarında, apoptotik olmayan epitel hücre tarafından tanınmasını sağlayan sinyal moleküllerinin bulunduğu, bu sinyal moleküllerini tanıyan epitel

hücrelerinin de apoptotik hücelere yalancı ayaklar uzatarak bağlandığı ve fagositoz ile hücre içine aldığı apoptotik hücreyi ortadan kaldırdığı gösterilmiştir [569], [606], [703]. Bizim yaptığımız ışık mikroskopik incelemede Şekil 3.37, Şekil 3.44 ve Şekil 3.48'de görüldüğü gibi aktif kaspaz 3, 8 ve 9 enzimleri açısından negatif apoptotik olmayan epitel hücrelerin, bu enzimler açısından pozitif olan apoptotik hücreleri yalancı ayaklar uzatarak hücre içine aldığı, Şekil 3.38'de ise aktif kaspaz 3 açısından pozitif olan bir cisimciğin fagositoz ile hücre içine alındığı saptanmıştır. Apoptotik hücrelerin ortadan kaldırılmasında epitel hücrelerin fagositozunun yanı sıra makrofajların da görev yaptığı birçok çalışmada gösterilmiştir Bu çalışmalara göre apoptotik hücrelerin fagositoz ile hücre içine alındığı ve sindirilerek ortamdaki uzaklaştırıldığı belirlenmiştir [704], [705]. Bizim bulgularımızda da Şekil 3.45'de görüldüğü gibi yalancı ayaklar uzatmış bir makrofaj, aktif kaspaz 8 enzimi açısından pozitif bir apoptotik cisimciği hücre içine almak üzereyken tespit edilmiş, bu görüntüde ayrıca bir nötrofil lökositin de bu apoptotik cisimciğe çok yaklaşmış olduğu dikkatimizi çekmiştir. Bu apoptotik cisimciğin hem nötrofil lökosit hem de bir makrofaj tarafından fagosite edilmek istenirken, makrofajın içine girmek üzere olduğu belirlenmiştir. Bir diğer Şekil 3.39'da ise aktif kaspaz 3 enzimi açısından pozitif olan birçok apoptotik cisimciğin, büyük bir makrofaj içine girmiş olduğu ve makrofaj sitoplazmasının dejenere olduğu, hatta belki bu makrofajın belli bir süre sonra ölüme gidebileceği düşünülmüştür.

İstatistiksel olarak yapılan değerlendirmede immünohistokimyasal olarak belirlediğimiz aktif kaspaz enzimlerine ait bulgular incelenmiştir. Çalışma kapsamındaki 224 olgunun 95'inde (%42,4) aktif kaspaz 3 [apoptozis (+)], 79'unda (%35,3) aktif kaspaz 3, 8 ve aktif kaspaz 3, 8, 9 [ölüm reseptörleri aracılı apoptozis (+)], 5'inde (%2,2) ise aktif kaspaz 3 ve 9 [Mitokondri aracılı apoptozis (+)] enzimlerinin pozitif olduğu saptanmıştır.

Aktif kaspaz 3 tayini literatürde yaygın olarak apoptozisi göstermek amacıyla kullanılan, özgüllüğü oldukça yüksek bir yöntemdir. Apoptozis olmadığı durumda, hücrede inaktif formu ile bulunan bu enzim, apoptotik uyarıya bağlı olarak aktifleşmektedir [692], [693], [694]. Bu nedenle aktif kaspaz 3 ile boyanmış hücreler apoptozis (+) olarak sınıflandırılmıştır. Kaspaz 8 enzimi ise ölüm reseptörleri aracılı apoptotik yolda görev alan bir başlatıcı kaspazdır. Çeşitli

sitokinler, büyüme faktörlerindeki eksiklikler veya ölüm reseptörlerine bağlanabilecek ligandların varlığı ölüm reseptörü aracılı apoptotik mekanizmayı aktif hale getirmektedir. Bunun sonucunda sitozolde inaktif prokaspaz 8 halinde bulunan enzim, aktifleşerek aktif kaspaz 8 enzimi halini alır. Aktif kaspaz 8 enziminin prokaspaz 3 enzimini keserek, aktifleşmesinde rol oynadığı belirlenmiştir [461], [470]. Bu bilgiler ışığında çalışmamızda aktif kaspaz 3 enzimine ek olarak aktif kaspaz 8 açısından pozitif olan olgular ölüm reseptörleri aracılı apoptozis açısından pozitif olarak kabul edilmiştir. Aktif kaspaz 8 enziminin substratlarından bir diğeri ise proapoptotik bir Bcl-2 üyesi olan Bid proteinidir. Aktif kaspaz 8 etkisi ile kesilen bu protein, mitokondride bulunan Sitokrom c'nin sitozole salınmasını sağlamaktadır. Sitozole salınan sitokrom c'de apoptozom oluşumu ve prokaspaz 9 enziminin aktif kaspaz 9 haline dönüşümünde rol oynamaktadır. Bu nedenle aktif kaspaz 9 enzimi hem ölüm reseptörleri aracılı apoptozis hem de mitokondri aracılı apoptozis mekanizmalarında ortak olarak bulunmaktadır [706], [707], [708]. Dolayısıyla çalışmamızda aktif kaspaz 3 ve aktif kaspaz 8 enzimine ek olarak, aktif kaspaz 9 enziminin varlığı belirlenmiş olgular ölüm reseptörleri aracılı apoptozis açısından pozitif olarak değerlendirilmiştir. Hücreler, iyonize radyasyon, viral enfeksiyon, serbest radikallerden dolayı oluşan oksidatif hasar, hücre içinde  $Ca^{+2}$  iyonu konsantrasyonunun artışı, pH'nın azalması ve DNA hasarı sonucunda mitokondri aracılı apoptotik yol ile ölmektedir [709], [477]. Aktif kaspaz 9 enzimi mitokondri aracılı apoptotik yolun aktivitesi ile aktif duruma geçen ve inaktif durumdaki kaspaz 3 enziminin aktifleşmesine neden olan bir başlatıcı kaspaz enzimidir [491]. Bu nedenle, çalışmamızda aktif kaspaz 3 enzimine ek olarak aktif kaspaz 9 enziminin pozitif olduğu olgular mitokondri aracılı apoptozis bakımından pozitif olarak tanımlanmıştır.

Kontrol grubu ile çalışma grubundaki atipik olgular apoptozis varlığı açısından birbirleri ile karşılaştırıldığında, atipik hücrel değişikliğe sahip 17 olgunun 3'ünde (%17,6) apoptozis varlığı tespit edilirken, kontrol grubunda ise bu oranın %39,6 (57/144) olduğu saptanmıştır (Çizelge 3.14). Atipik olgularda apoptozis varlığının kontrol grubundaki olgulara kıyasla daha düşük bir yüzde ile görüldüğü belirlenmiş olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkiye rastlanmamıştır ( $p>0,05$ ). Atipik hücrel değişiklikler grubunu oluşturan ASCUS, LSIL ve HSIL olguları apoptozis varlığı açısından ayrı ayrı değerlendirildiğinde ise ASCUS (2/5, %40) ve

LSIL (1/8, (%12,5) olgularında az sayıda olguda da olsa apoptozis pozitifliği saptanırken, daha ileri düzeyde değişiklikleri gösteren HSIL (0/4, %0) olgularının hiçbirinde apoptozis pozitifliğine rastlanmamıştır (Çizelge 3.15, Çizelge 3.16 ve Çizelge 3.17). Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde, Shi [710] ve Zanotti [711] çalışma grupları tarafından servikal biyopsi örnekleri kullanılarak yapılan çalışmalarda normal hücrelerden kansere doğru ilerleyen süreçte aktif kaspaz 3 aktivitesinin azaldığı rapor edilmiştir. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar ışığında atipik hücresele değişiklikliğe sahip olgularda kaspaz 3 aktivitesindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen, ASCUS ve LSIL olgularında henüz apoptotik aktivitenin tamamen ortadan kalkmadığı, HSIL'de bu apoptotik mekanizmanın ortadan kalktığı düşünülmüştür. Kontrol grubu ve çalışma grubundaki atipik olgular ölüm reseptörleri aracılı apoptozis ve mitokondri aracılı apoptozis varlığı açısından birbirleri ile karşılaştırıldığında da, atipik olgularda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa rastlanmamıştır ( $p>0,05$ ).

Kontrol grubu ile çalışma grubundaki enfeksiyonlu olgular arasında apoptozis varlığı açısından bir farklılık olup olmadığı araştırıldığında, enfeksiyonlu olguların %55,6'sında (35/63), kontrol grubu olguların ise %39,6'sında (57/144) apoptozisin pozitif olduğu saptanmış ve apoptozis varlığı açısından enfeksiyonlu olgular ile kontrol grubu olguları arasında istatistiksel olarak da anlamlı bir farklılık olduğu görülmüştür ( $p<0,05$ ). Enfeksiyonlu olgularda ölüm reseptörleri aracılı apoptozis pozitifliğinin kontrol grubu olgulardan daha yüksek olduğu görülmüş, 2 grup arasındaki bu farklılık istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Mitokondri aracılı apoptozis incelendiğinde ise enfeksiyon olgularının hiçbirinde bu tür apoptozise rastlanmamıştır (Çizelge 3.18).

Enfeksiyon olguları içinde yer alan BV olguları apoptozis açısından ayrıca değerlendirildiğinde, 63 enfeksiyonlu olguda bulunan 11 (%17,5, 11/63) BV olgusunun 8'inde (%72,7, 8/11) immünohistokimyasal olarak apoptozisin pozitif olduğu, apoptozis pozitif olan 8 olgunun 7'sinde (%87,5) ise ölüm reseptörleri aracılı apoptozisin pozitif olduğu saptanmıştır. Bu olguların hiçbirinde mitokondri aracılı apoptozis varlığına rastlanmamıştır. Şekil 3.49'da görüldüğü gibi bir ipucu hücresinin aktif kaspaz 3 ile apoptozis varlığı açısından pozitif boyandığı, Şekil 3.50'de görüldüğü gibi aktif kaspaz 8 pozitif olan bir apoptotik hücrenin etrafında

serbest kokobasiller olduğu görülmüştür. BV bulgularımızı literatür bulgularıyla irdelediğimizde BV ile apoptozis arasındaki ilişkiyi direkt olarak gösteren immünohistokimyasal bir çalışmaya rastlanmamış olmasına rağmen, Mirmonsef [712], Pybus [713] ve Luhr [714] çalışma grupları tarafından yapılan çalışmalarda, BV'ye neden olan mikroorganizmalardan salınan "kısa zincirli yağ asitlerinin (short chain fatty acid-SCFA)" ve amonyağın epitel hücrelerinde ve savunma hücrelerinde apoptozise neden olduğunu gösterilmiştir. Ayrıca Zarrifard ve çalışma grubu [715] ölüm reseptörleri aracılı apoptozisin uyarılmasında görev alan TNF $\alpha$  varlığını, vajinal sıvıları çalışarak gözlemlemiş ve apoptozis oluşumunda görev alan bu molekülün ortamda BV varlığında epitel hücre ve savunma hücreleri tarafından salındığını öne sürmüşlerdir. Bizim çalışmamızda ise BV varlığında apoptotik hücrelerin varlığı immünohistokimyasal olarak ortaya konmuş ve orijinal bulgu olarak kaydedilmiştir. Bu sonuçlara göre de BV'nin apoptozis oluşumuna neden olabileceği düşünülmüştür. İstatistiksel olarak da BV olgularında hem apoptozisin hem de ölüm reseptörleri aracılı apoptozisin arasında anlamlı bir ilişki olduğu saptanmıştır ( $p<0,05$ ) (Çizelge 3.19).

Enfeksiyon olgularının 26'sında (%41,3) ise hiçbir enfeksiyon etkeni bulunmamasına rağmen, hücrelerde inflamasyon varlığını belirten bulgular saptanmıştır. Bu 26 olgunun 19'unda (%73,1) apoptozisin pozitif olduğu, apoptozis pozitif olan bu 19 olgunun 18'inde (%94,7) ise ölüm reseptörleri aracılı apoptozis mekanizmasının pozitif olduğu belirlenmiştir. Bizim bulgularımızda gerek sitolojik gerek immünohistokimyasal olarak, bol PMNL'ler, hücrelerde perinükleer haleler ve hücresel değişiklikler saptanmış olup (Şekil 3.8), immünohistokimyasal olarak da aktif kaspaz 3 ve 8 açısından pozitif hücreler görülmüştür (Şekil 3.51 ve Şekil 3.52). Literatür bilgisine bakıldığında TNF $\alpha$ 'nın ölüm reseptörleri aracılı apoptozis aktivasyonundan sorumlu olduğu, inflamasyon varlığında da epitel hücreleri ve savunma hücreleri tarafından çeşitli sitokinlerin ve TNF $\alpha$ 'nın salındığı bildirilmektedir [283], [358], [716]. Bizim çalışmamızda da inflamasyon olgularında hem apoptozis hem de ölüm reseptörleri aracılı apoptozis açısından pozitifliğin saptanmış olması nedeniyle bu hücrelerin sitokinler ve TNF $\alpha$  aracılığı ile apoptozise gittiği düşünülmüştür. İstatistiksel olarak da inflamasyon olguları ile hem apoptozis ( $p<0,01$ ), hem de ölüm reseptörleri aracılı apoptozis ( $p<0,001$ )

arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkinin bulunması bu düşüncemizi doğrulamıştır (Çizelge 3.23).

Bu bulgularımız H-skorlar açısından değerlendirildiğinde, kontrol grubu, enfeksiyon olguları ve atipik olgu gruplarının, aktif kaspaz 3, aktif kaspaz 8 ve aktif kaspaz 9 enzimlerine ait H-skor ortalamaları açısından istatistiksel olarak birbirinden farklı olduğu saptanmıştır. Bu farklılığın hangi gruplar arasında olduğu araştırıldığında ise kontrol grubu olguları ile enfeksiyon olguları, enfeksiyon olguları ile de atipik olgular arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu görülmüştür ( $p < 0,05$ ). Ancak atipik olgulara ait H-skor ortalamalarının kontrol grubu olgularına kıyasla azalmasına rağmen, bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir ( $p > 0,05$ ). H-skorlardan elde ettiğimiz tüm bu bulgular da yukarıda açıkladığımız istatistiksel sonuçları destekler niteliktedir (Çizelge 3.24, Çizelge 3.25 ve Çizelge 3.26).

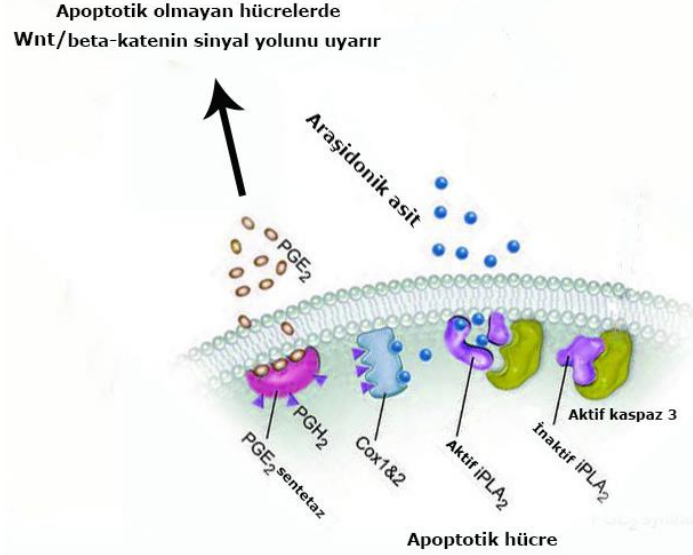
Apoptozis ile Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu arasındaki ilişki incelendiğinde kontrol grubundaki 144 olgunun 26'sında (%18,1) Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu aktif, 118'inde (%81,9) ise inaktif olduğu immünositokimyasal olarak belirlenmiştir. Bu bulgular belirlenirken sadece kontrol grubundaki olgularla çalışılmış, çalışma grubu değerlendirilmemiştir çünkü apoptotik mekanizmalar incelenirken enfeksiyon ve atipik hücrel değişikliklerin  $\beta$ -katenin proteini ve dolayısıyla Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu aktivitesi üzerine etkisi olabileceği düşünülmüş, bu nedenle çalışma grubu gözardı edilmiştir. Sinyal yolu aktif durumda olan 26 olgunun 18'inde (%69,2) apoptozis pozitif olarak bulunurken, 8 (%30,8) olguda ise apoptozis negatif olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 3.27). Apoptozis varlığı ile Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu aktivitesinin varlığı arasında istatistiksel olarak da anlamlı bir ilişki olduğu saptanmıştır ( $p < 0,01$ ). Literatürde Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu ile apoptozis arasındaki ilişkiyi inceleyen çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birinde *Drosophila melanogaster*'de Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu aktivasyonunun retinal nöronlarda apoptozise neden olduğu gösterilmiştir [196], [197]. Bağırsak epitel hücreleri ile yapılan bir diğer çalışmada ise Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu aktivitesinin az veya orta olduğu hücrelerde proliferasyonun uyarıldığı, sinyal aktivitesinin yüksek oranda görüldüğü hücrelerde ise apoptozisin pozitif olduğu görülmüştür [717], [718]. Bu çalışmaların aksine bazı araştırmacılar, Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu aktivitesinin hücre proliferasyonunu arttırdığını ancak mitokondri ve ölüm



reseptörleri aracılı apoptozisi inhibe ettiğini yaptıkları araştırmalarda rapor etmişlerdir [200], [201], [202]. Yapılan çalışmalarda Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu aktive edildiğinde, bu sinyal yoluna ait hedeflenen genlerin bazılarının apoptozisi önlediği bildirilmiştir [719], [720]. Tüm bu sonuçlar doğrultusunda Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal mekanizması ile apoptozis arasındaki ilişkinin hala tam olarak belirlenmediği anlaşılmıştır. Bu nedenle de şimdiye kadar çalışılmamış olan servikovajinal sıvı örnekleri kullanılarak hem sitolojik hem de immünohistokimyasal olarak Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu ile apoptozis arasında bir ilişki olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır ve çalışmamız bu amaçlar doğrultusunda sonuçlandırılmıştır.

Bizim çalışmamızda daha önce değinildiği gibi apoptotik hücrelerin sitoplazma ve/veya çekirdeğinde  $\beta$ -katenin proteininin negatif olduğu, buna bağlı olarak da Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunun apoptotik hücrelerde inaktif durumda olduğu gösterilmiştir (Şekil 3.23 ve Şekil 3.25). Bu bulgumuz apoptotik hücrelerde  $\beta$ -katenin proteininin aktif kaspaz aktivitesine bağlı olarak parçalandığını söyleyen Brancolini [203] ve Steinhunsen [205] araştırma gruplarının yaptıkları çalışmalar ile uyum göstermiştir. Işık mikroskopik incelememiz sırasında apoptotik hücrelerde sinyal yolu inaktif olmasına rağmen dikkat çekici bulgu olarak apoptotik hücrelerin çevresinde bulunan ve apoptotik olmayan epitel hücrelerde ise Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunun aktif durumda olduğu immünohistokimyasal olarak saptanmıştır (Şekil 3.53 ve Şekil 3.54). Literatürde, Perez-Garijo [721] ve Ryoo araştırma grupları [722] tarafından *Drosophila*'da yapılan çalışmalar sırasında apoptotik hücrelerin, çevresinde bulunan ve apoptotik olmayan diğer hücrelerde Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunu uyardığı ifade edilmiştir. Benzer bir bulgu Chera ve çalışma grubu [723] tarafından *Hydra*'da yapılan bir başka çalışmada apoptotik hücrelerin Wnt3A salgılayarak çevredeki hücrelerde sinyal yolunu aktive ettiği şeklinde ortaya konmuştur. Daha sonra Li ve çalışma grubu [724] tarafından fare modeli kullanılarak yapılan bir çalışmada ise apoptotik hücrelerde aktif hale geçen kaspaz 3 enziminin inaktif durumdaki "Kalsiyumdan bağımsız fosfolipaz A<sub>2</sub> (calcium-independent phospholipases A(2); iPLA<sub>2</sub>)" enzimini keserek aktif hale getirdiği belirlenmiştir. Aktif duruma geçen iPLA<sub>2</sub> enziminin de bir eikozanoid olan araşidonik asidi sentezlediği, araşidonik asidin ise siklooksijenaz 1 ve 2 (COX1 ve COX2) enzimlerinin etkisi ile "prostaglandin H<sub>2</sub>'ye (PGH<sub>2</sub>)", PGH<sub>2</sub>'nin ise PGE sentetaz enziminin aktivitesi ile "prostaglandin E<sub>2</sub>'ye (PGE<sub>2</sub>)" dönüştüğü

saptanmıştır. Sonuçta, sentezlenen PGE<sub>2</sub>'nin apoptotik hücrelerden ekstrasellüler matrikse salındığı ve apoptotik olmayan hücrelerde Wnt/β-katenin sinyal yolunun aktivasyonuna neden olduğu öne sürülmüştür (Şekil 4.1).



**Şekil 4. 1.** Apoptotik hücrede aktif kaspaz 3 enzimi aktivitesine bağlı olarak iPLA<sub>2</sub> ve PGE<sub>2</sub> sentezi görülmektedir. PGE<sub>2</sub> ise apoptotik olmayan hücrelerde Wnt/β-katenin sinyal yolunun aktivasyonuna neden olmaktadır [724].

Tüm bu çalışmalarda, apoptotik hücreler tarafından uyarılan Wnt/β-katenin sinyal mekanizmasının hücre proliferasyonunu artırarak apoptozis sonucu azalan hücre sayısının tamamlanmasında ve dokunun eksilen hücrelerinin yerine konulmasında görevi olduğu bildirilmiştir. Bizim bulgularımızda da literatür bilgileri ile uyumlu olarak apoptozis varlığı ile sinyal yolu aktivitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu görülmüş (Çizelge 3.27), bu şekilde apoptozis sonucu azalan epitel hücrelerin yerine yeni epitel hücrelerinin oluşumunun sağlandığı ve epitel dokunun bütünlüğünün korunduğu düşünülmüştür. Literatürde bu mekanizmayı göstermek amacıyla yapılan çalışmalarda, hayvan modelleri ve hücre hatları kullanılmış, insanlardan alınan servikovajinal akıntı örneklerinin kullanıldığı immünohistokimyasal bir çalışmaya ise rastlanmamıştır. Bu nedenle orijinal olduğunu düşündüğümüz bu bulgumuzun sonraki çalışmalar için temel oluşturabileceği önemli bir sonuç olarak kaydedilmiştir.

Çalışmamızda, Wnt/β-katenin sinyal yolu aktivitesi ile ölüm reseptörleri aracılı apoptozis varlığı arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu tespit

edilmiş ( $p < 0,001$ ), mitokondri aracılı apoptozis ile sinyal yolu aktivitesi arasında ise anlamlı bir farklılığa rastlanmamıştır ( $p > 0,05$ ). Apoptotik hücrelerin Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu aktivasyonunu uyardığını ifade eden çalışmalar incelendiğinde, sadece Li ve çalışma grubu [724] tarafından yapılan çalışmada ölüm reseptörleri ve mitokondri aracılı apoptotik yolların, sinyal aktivasyonu üzerine etkisi araştırmacıların kendi görüşü olarak sunulmuş, deneysel olarak bir sonuç verilmemiştir. Bu araştırmacılar, apoptozis mekanizması ister ölüm reseptörlerine, ister mitokondriye bağlı olarak gerçekleşsin, apoptotik hücrelerin sinyal yolu aktivitesini uyarabilmesi için gerekli olan PGE<sub>2</sub> sentezinin gerçekleştiğini ve bu şekilde sinyal yolu aktivitesinin uyarılabileceğini öne sürmüşlerdir. Buna karşın çalışmamızda olgu sayısı az olmakla birlikte mitokondri aracılı apoptozis pozitif olan hiçbir olguda sinyal yolunun aktif durumda olmadığı, bu nedenle sadece ölüm reseptörleri aracılı apoptozis mekanizması sonucu ölen hücrelerin sinyal yolunu aktive etme etkisi olabileceği düşünülmüştür. Ancak olgu sayısının artırılarak bu ilişkinin detaylı olarak değerlendirilmesinin gerektiği sonucuna gidilmiştir.

Bu bulgularımız H-skorlar açısından değerlendirildiğinde, Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu aktif olan olgularda aktif kaspaz 3, 8 ve 9 enzimlerinin H-skor ortalamalarının sinyal inaktif olgulara kıyasla arttığı görülmüştür. Bu artış istatistiksel açıdan da anlamlı bulunmuştur (Çizelge 3.28 ve Çizelge 3.29). Elde ettiğimiz bu sayısal veriler yukarıda açıkladığımız istatistiksel sonuçları desteklemektedir.

$\beta$ -katenin proteininin hücre zarındaki varlığını gözlemek amacıyla H-skorları değerlendirmeye alınıp, bu değerlerin apoptozis, ölüm reseptörleri aracılı apoptozis ve mitokondri aracılı apoptozis olgularında karşılaştırılması amaçlanmıştır.  $\beta$ -katenin proteini varlığının H-skorlar açısından değerlendirilebilmesi için hem apoptotik hem apoptotik olmayan hücrelerde pozitifliğe bakılmış ve bu pozitiflik için hücreler sayılmıştır. Bu nedenle yapılan istatistiksel incelemede  $\beta$ -katenin proteininin hücre zarındaki H-skor ortalamaları apoptotik olgularda azalmasına rağmen, bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ( $p > 0,05$ ). Bu apoptotik ve apoptotik olmayan hücreler incelendiğinde apoptotik hücre zarlarındaki  $\beta$ -katenin pozitifliği açısından hepsinin negatif olduğu, ancak diğer hücrelerin zayıf (+), orta (++) , kuvvetli (+++) ve çok kuvvetli (++++ ) pozitif olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.23, Şekil 3.25, Şekil 3.53 ve Şekil 3.54).  $\beta$ -katenin proteininin apoptotik hücre zarlarında birikmediği, ancak

apoptotik hücrenin salgıladığı maddelerin apoptotik olmayan diğer hücreleri uyararak  $\beta$ -katenin proteini birkimini sağladığı çalışmalarda yer almaktadır [721], [723], [724]. Bizim bulgularımızda da Şekil 3.53 ve Şekil 3.54'de görüldüğü gibi apoptotik hücrelerin çevresinde bulunan ve apoptotik olmayan hücrelerde  $\beta$ -katenin proteininin pozitif olduğu görülmüş ve bu bulgumuz literatür bilgilerini doğrulamıştır. Bu zardaki  $\beta$ -katenin pozitifliğin ise Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu aktivasyonundan kaynaklandığını düşünülmüştür (Çizelge 3.12 ve Çizelge 3.13).

Çalışma kapsamında değerlendirilen 224 hastada apoptotik mekanizmaların belirlenmesi amacıyla uygulanan aktif kaspaz 3, aktif kaspaz 8 ve aktif kaspaz 9 enzimlerine ait H-skor ortalamaları da birbirleri ile karşılaştırılmıştır (Çizelge 3.31 ve Çizelge 3.32). Literatürde apoptotik uyarı ile aktif duruma geçen başlatıcı kaspaz enzimleri kaspaz 8 ve kaspaz 9'un, aktif kaspaz 3'ün aktivasyonuna neden olduğu, buna bağlı olarak bu enzim aktivitelerinin birbirleriyle ilişkili olduğu ve apoptoze bağlı olarak oluşan kaspaz aktivasyonunun bir şelale reaksiyonu şeklinde geliştiği yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur [725]. Çalışmamızda yapılan korelasyon analizleri de aktif kaspaz 3, aktif kaspaz 8 ve aktif kaspaz 9 enzimlerine ait H-skor ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif bir korelasyon olduğu belirlenmiş, bu enzimlerin birbirlerini etkileyerek, apoptotik mekanizmayı başlatıp ilerlettiği sonucuna gidilmiştir ( $p < 0,001$ ).

Sonuç olarak; çalışmamızda  $\beta$ -katenin proteini ile apoptozis arasındaki ilişkinin sitolojik ve immünohistokimyasal yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda yapılan sitolojik incelemeyle apoptotik hücreler saptanmış, immünohistokimyasal incelemeyle de  $\beta$ -katenin proteininin hücre zarı, sitoplazma ve çekirdekteki pozitifliği ile aktif kaspaz 3, 8 ve 9 enzimleri açısından örnekler incelenmiştir.  $\beta$ -katenin proteininin apoptotik hücrelerde negatif olduğu ve buna bağlı olarak da apoptotik hücrelerde Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunun inaktif durumda olduğu saptanmıştır. Bir diğer önemli bulgu olarak, apoptotik hücrelerin bulunduğu preparatlarda apoptotik olmayan hücrelerin  $\beta$ -katenin proteini açısından kuvvetle boyandığı, buna bağlı olarak da Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunun aktif durumda olduğu görülmüştür. Bu apoptotik hücrelerin aktif kaspaz 3, 8 veya aktif kaspaz 3, 8, 9 grubunun dahil olduğu ölüm reseptörleri aracılı apoptozis açısından pozitif olduğu, buna karşın aktif kaspaz 3 ve 9'un dahil olduğu mitokondri aracılı apoptozis açısından ise aktif durumda olmadığı görülmüştür. İstatistiksel

değerlendirmede Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu ile hem apoptozis hem de ölüm reseptörleri aracılı apoptozis arasında anlamlı bir ilişki olduğu belirlenmiş, mitokondri aracılı apoptozis ile bir farklılık görülmediği saptanmıştır. Tüm bu bulgular ışığında, apoptotik hücrelerin, apoptozis sonucu azalan epitel hücrelerini telafi etmek için apoptotik olmayan hücrelerde Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu aktivitesini uyardığı ve bu şekilde eksik hücreleri tamamlayarak epitel dokunun bütünlüğünün korunduğu yorumu yapılmıştır.

## 5. KAYNAKLAR

- [1] Willert, K., Nusse, R., Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling, *Current opinion in genetics & development*, 8, 95-102, **1998**.
- [2] Xu, W., Kimelman, D., Mechanistic insights from structural studies of  $\beta$ -catenin and its binding partners, 120, 3337-44, **2007**.
- [3] Munemitsu, S., Albert, I., Rubinfeld, B., Polakis, P., Deletion of an amino-terminal sequence beta-catenin in vivo and promotes hyperphosphorylation of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor protein, *Molecular and cellular biology*, 16, 4088-94, **1996**.
- [4] Peifer, M., Berg, S., Reynolds, A.B., A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles, *Cell*, 76, 789-91, **1994**.
- [5] Huber, H., Nelson, W.J., Weis, W.I., Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin, *Cell*, 90, 871-82, **1997**.
- [6] Riggleman, B., Wieschaus, E., Schedl, P., Molecular analysis of the armadillo locus: uniformly distributed transcripts and a protein with novel internal repeats are associated with a Drosophila segment polarity gene, *Genes & development*, 3, 96-113, **1989**.
- [7] Andrade, M.A., Perez-iratzeta, C., Ponting, C.P., Protein repeats: structures, functions, and evolution, *Journal of Structural Biology*, 131, 117-131, **2001**.
- [8] Andrade, M.A., Petosa, C., Donoghue, S.I.O., Mu, C.W., Delbru, M., Comparison of ARM and HEAT Protein Repeats, *Journal of Molecular Biology*, 309, 1-18, **2001**.
- [9] Choi, H., Huber, A.H., Weis, W.I., Thermodynamics of  $\beta$ -Catenin-Ligand interactions: the roles of the n- and c-terminal tails in modulating binding affinity, *The Journal of Biological Chemistry*, 281, 1027-1038, **2006**.
- [10] Vleminckx, K., Kemler, R., Hecht, A., The C-terminal transactivation domain of beta-catenin is necessary and sufficient for signaling by the LEF-1/beta-catenin complex in *Xenopus laevis*, *Mechanisms of development*, 81, 65-74, **1999**.
- [11] Ozawa, M., Baribault, H., Kemler, R., The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species, *The EMBO journal*, 8, 1711-7, **1989**.
- [12] Mbom, B.C., Nelson, W.J., Barth, A.,  $\beta$ -catenin at the centrosome: discrete pools of  $\beta$ -catenin communicate during mitosis and may co-ordinate centrosome functions and cell cycle progression, *BioEssays*, 35, 804-9, **2013**.
- [13] Daugherty, R.L. Gottardi, C.J., Phospho-regulation of Beta-catenin adhesion and signaling functions, *Physiology*, 22, 303-309, **2007**.
- [14] Tepass, U., Adherens junctions: new insight into assembly, modulation and function, *BioEssays*, 24, 690-5, **2002**.
- [15] Meng, W. Takeichi, M., Adherens junction: molecular architecture and regulation, *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1, a002899, **2009**.
- [16] Ogou, S.I., Yoshida-Noro, C., Takeichi, M., Calcium-dependent cell-cell adhesion molecules common to hepatocytes and teratocarcinoma stem cells, *The Journal of cell biology*, 97, 944-8, **1983**.

- [17] Gallin, W.J., Edelman, G.M., Cunningham, B.A., Characterization of L-CAM, a major cell adhesion molecule from embryonic liver cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80, 1038-42, **1983**.
- [18] Peyri ras, N., Hyafil, F., Louvard, D., Ploegh, H.L., Jacob, F., Uvomorulin: a nonintegral membrane protein of early mouse embryo, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80, 6274-7, **1983**.
- [19] Schuh, R., Vestweber, D., Riede, I., Ringwald, M., Rosenberg, U.B., J ckle, H., Kemler, R., Molecular cloning of the mouse cell adhesion molecule uvomorulin: cDNA contains a B1-related sequence, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83, 1364-8, **1986**.
- [20] Nose, A. Takeichi, M., A novel cadherin cell adhesion molecule: its expression patterns associated with implantation and organogenesis of mouse embryos, *The Journal of cell biology*, 103, 2649-58, **1986**.
- [21] Pe cina- slaus, N., Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells, *Cancer cell international*, 3, 17, **2003**.
- [22] Shimoyama, Y., Yoshida, T., Terada, M., Shimosato, Y., Abe, O., Hirohashi, S., Molecular cloning of a human Ca<sup>2+</sup>-dependent cell-cell adhesion molecule homologous to mouse placental cadherin: Its low expression in human placental tissues, *Journal of Cell Biology*, 109, 1787-94, **1989**.
- [23] Miyatani, S., Shimamura, K., Hatta, M., Nagafuchi, A., Nose, A., Matsunaga, M., Hatta, K., Takeichi, M., Neural cadherin: role in selective cell-cell adhesion, *Science*, 245, 631-5, **1989**.
- [24] Ali, J., Liao, F., Martens, E., and Muller, W.A., Vascular endothelial cadherin (VE-cadherin): cloning and role in endothelial cell-cell adhesion., *Microcirculation*, 4, 267-77, **1997**.
- [25] Berx, G., Staes, K., van Hengel, J., Molemans, F., Bussemakers, M.J.G., van Bokhoven, A., van Roy, F., Cloning and characterization of the human invasion suppressor gene E-cadherin (CDH1), *Genomics*, 26, 281-9, **1995**.
- [26] Nollet, F., Kools, P., van Roy, F., Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members, *Journal of molecular biology*, 299, 551-72, **2000**.
- [27] Shapiro, L., Kwong, P.D., Fannon, A.M., Colman, D.R., Hendrickson, W.A., Considerations on the folding topology and evolutionary origin of cadherin domains, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 6793-7, **1995**.
- [28] Shapiro, L. Weis, W.I., Structure and biochemistry of cadherins and catenins, *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1, 1-21, **2009**.
- [29] Overduin, M., Harvey, T., Bagby, S., Tong, K., Yau, P., Takeichi, M., Ikura, M., Solution structure of the epithelial cadherin domain responsible for selective cell adhesion, *Science*, 267, 386-9, **1995**.
- [30] Takeichi, M., Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins, *The Journal of Cell Biology*, 75, 464-74, **1977**.
- [31] Nagar, B., Overduin, M., Ikura, M., Rini, J.M., Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization, *Nature*, 380, 360-4, **1996**.

- [32] Troyanovsky, R.B., Klingelhöfer, J., Troyanovsky, S., Removal of calcium ions triggers a novel type of intercadherin interaction, *Journal of cell science*, 112, 4379-87, **1999**.
- [33] Tomschy, A., Fauser, C., Landwehr, R., Engel, J., Homophilic adhesion of E-cadherin occurs by a co-operative two-step interaction of N-terminal domains, *The EMBO journal*, 15, 3507-14, **1996**.
- [34] Stepniak, E., Radice, G.L., Vasioukhin, V., Adhesive and signaling functions of cadherins and catenins in vertebrate development, *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1, a002949, **2009**.
- [35] Zhang, Y., Sivasankar, S., Nelson, W.J., Chu, S., Resolving cadherin interactions and binding cooperativity at the single-molecule level, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 109-14, **2009**.
- [36] Lutz, K.L. Siahaan, T.J., E-cadherin peptide sequence recognition by anti-E-cadherin antibody, *Biochemical and biophysical research communications*, 211, 21-7, **1995**.
- [37] Huber, O., Kemler, R., Langosch, D., Mutations affecting transmembrane segment interactions impair adhesiveness of E-cadherin, *Journal of cell science*, 112, 4415-23, **1999**.
- [38] Nagafuchi, A., Takeichi, M., Cell binding function of E-cadherin is regulated by the cytoplasmic domain, *The EMBO journal*, 7, 3679-84, **1988**.
- [39] Serra, S., Chetty, R., Revision 2: an immunohistochemical approach and evaluation of solid pseudopapillary tumour of the pancreas, *Journal of clinical pathology*, 61, no. 11, pp. 1153–1159, **2008**.
- [40] Reynolds, A.B., Carnahan, R.H., Regulation of cadherin stability and turnover by p120ctn: implications in disease and cancer, *Seminars in cell & developmental biology*, 15, 657-63, **2004**.
- [41] Xiao, K., Oas, R.G., Chiasson, C.M., Kowalczyk, A.P., Role of p120-catenin in cadherin trafficking, *Biochimica et biophysica acta*, 1773, 8-16, **2007**.
- [42] Yanagisawa, M., Kaverina, I.N., Wang, A., Fujita, Y., Reynolds, A.B., Anastasiadis, P.Z., A novel interaction between kinesin and p120 modulates p120 localization and function, *The Journal of biological chemistry*, 279, 9512-21, **2004**.
- [43] Stehbens, S.J., Paterson, A.D., Crampton, M.S., Shewan, A.M., Ferguson, C., Akhmanova, A., Parton, R.G., Yap, A.S., Dynamic microtubules regulate the local concentration of E-cadherin at cell-cell contacts, *Journal of cell science*, 119, 1801-11, **2006**.
- [44] Yap, A.S., Niessen, C.M., Gumbiner, B.M., The juxtamembrane region of the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening, and interaction with p120ctn, *The Journal of cell biology*, 141, 779-89, **1998**.
- [45] Ireton, R.C., Davis, M. A., van Hengel, J., Mariner, D.J., Barnes, K., Thoreson, M. A., Anastasiadis, P.Z., Matrisian, L., Bundy, L.M., Sealy, L., Gilbert, B., van Roy, F., Reynolds, A.B., A novel role for p120 catenin in E-cadherin function, *The Journal of cell biology*, 159, 465-76, **2002**.
- [46] Baum, B., Georgiou, M., Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling, *The Journal of cell biology*, 192, 907-17, **2011**.
- [47] Cavey, M., Rauzi, M., Lenne, P.F., Lecuit, T., A two-tiered mechanism for stabilization and immobilization of E-cadherin, *Nature*, 453, 751-6, **2008**.



- [48] Tewari, R., Bailes, E., Bunting, K.A., Coates, J.C., Armadillo-repeat protein functions: questions for little creatures, *Trends in cell biology*, 20, 470-81, **2010**.
- [49] Butz, S., Kemler, R., Distinct cadherin-catenin complexes in Ca(2+)-dependent cell-cell adhesion, *FEBS letters*, 355, 195-200, **1994**.
- [50] Tian, X., Liu, Z., Niu, B., Zhang, J., Tan, T.K., Lee, S.R., Zhao, Y., Harris, D.C.H., Zheng, G., E-cadherin/ $\beta$ -catenin complex and the epithelial barrier, *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2011, 567305, **2011**.
- [51] Pokutta, S., Weis, W.I., Structure of the dimerization and beta-catenin-binding region of alpha-catenin, *Molecular cell*, 5, 533-43, **2000**.
- [52] Desai, R., Sarpal, R., Ishiyama, N., Pellikka, M., Ikura, M., Tepass, U., Monomeric  $\alpha$ -catenin links cadherin to the actin cytoskeleton, *Nature cell biology*, 15, 261-73, **2013**.
- [53] Drees, F., Pokutta, S., Yamada, S., Nelson, W.J., Weis, W.I., Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly, *Cell*, 123, 903-15, **2005**.
- [54] Dos Remedios, C.G., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I. V, Tsubakihara, M., Berry, D.A., Nosworthy, N.J., Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments, *Physiological reviews*, 83, 433-73, **2003**.
- [55] Yamada, S., Pokutta, S., Drees, F., Weis, W.I., Nelson, W.J., Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex, *Cell*, 123, 889–901, **2005**.
- [56] Nelson, W.J., Regulation of cell-cell adhesion by the cadherin-catenin complex, *Biochemical Society transactions*, 36, 149-55, **2008**.
- [57] Daugherty, R.L., Serebryanny, L., Yemelyanov, A., Flozak, A.S., Yu, H.-J., Kosak, S.T., deLanerolle, P., Gottardi, C.J.,  $\alpha$ -Catenin is an inhibitor of transcription, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111, 5260-5, **2014**.
- [58] Hulsken, J., E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton, *The Journal of Cell Biology*, 127, 2061-9, **1994**.
- [59] Bahmanyar, S., Kaplan, D.D., Deluca, J.G., Giddings, T.H., O'Toole, E.T., Winey, M., Salmon, E.D., Casey, P.J., Nelson, W.J., Barth, A.I.M., beta-Catenin is a Nek2 substrate involved in centrosome separation, *Genes & development*, 22, 91-105, **2008**.
- [60] Kaplan, D.D., Meigs, T.E., Kelly, P., Casey, P.J., Identification of a role for beta-catenin in the establishment of a bipolar mitotic spindle, *The Journal of biological chemistry*, 279, 10829-32, **2004**.
- [61] Huang, P., Senga, T., Hamaguchi, M., A novel role of phospho-beta-catenin in microtubule regrowth at centrosome, *Oncogene*, 26, 4357-71, **2007**.
- [62] Chilov, D., Sinjushina, N., Rita, H., Taketo, M.M., Mäkelä, T.P., Partanen, J., Phosphorylated  $\beta$ -catenin localizes to centrosomes of neuronal progenitors and is required for cell polarity and neurogenesis in developing midbrain, *Developmental biology*, 357, 259-68, **2011**.
- [63] Suh, E., Gumbiner, B.M., Translocation of  $\beta$ -catenin into the nucleus independent of interactions with FG-rich nucleoporins, *Experimental cell research*, 290, 447-456, **2003**.
- [64] Eisenmann, D.M. and County, M.B., The online review of C.elegans Biology, [http://www.wormbook.org/chapters/www\\_wntsignaling/wntsignaling.html](http://www.wormbook.org/chapters/www_wntsignaling/wntsignaling.html) (Mayis, 2015).

- [65] Willert, K., Nusse, R., Wnt proteins, *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4, 1-14, **2012**.
- [66] He, T., Sparks, A.B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., Costa, L.T., Morin, P.J., Vogelstein, B., Kinzler, K.W., Identification of c- MYC as a Target of the APC Pathway, *Science*, 281, 1509-12, **1998**.
- [67] Shtutman, M., Zhurinsky, J., Simcha, I., Albanese, C., D'Amico, M., Pestell, R., Ben-Ze'ev, A., The cyclin D1 gene is a target of the  $\beta$ -catenin/LEF-1 pathway, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 5522-7, **1999**.
- [68] Sharma, R.P., Chopra, V.L., Effect of the Wingless (wg1) mutation on wing and haltere development in *Drosophila melanogaster*, *Developmental biology*, 48, 461-5, **1976**.
- [69] Nusse, R., Varmus, H.E., Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome, *Cell*, 31, 99-109, **1982**.
- [70] Nusse, R., Insertional mutagenesis in mouse mammary tumorigenesis., *Current topics in microbiology and immunology*, 171, 43-65, **1991**.
- [71] Adamska, M., Degnan, S.M., Green, K.M., Adamski, M., Craigie, A., Larroux, C., Degnan, B.M., Wnt and TGF-beta expression in the sponge *Amphimedon queenslandica* and the origin of metazoan embryonic patterning, *PLoS one*, 2, e1031, **2007**.
- [72] Miller, J.R., The Wnts, *Genome biology*, 3, REVIEWS3001, **2002**.
- [73] Saito-diaz, K., Chen, T.W., Wang, X., Thorne, C.A., Wallace, H.A., Page-mccaw, A., Lee, E., *NIH Public Access*, 31, 1-31, **2013**.
- [74] Nusse, R., Fuerer, C., Ching, W., Harnish, K., Logan, C., Zeng, A., ten Berge, D., Kalani, Y., Wnt signaling and stem cell control, *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 73, 59-66, **2008**.
- [75] Povelones, M., Nusse, R., The role of the cysteine-rich domain of Frizzled in Wingless-Armadillo signaling, *The EMBO journal*, 24, 3493-503, **2005**.
- [76] Coudreuse, D., Korswagen, H.C., The making of Wnt: new insights into Wnt maturation, sorting and secretion, *Development*, 134, 3-12, **2007**.
- [77] Forte, G.M.A., Pool, M.R., Stirling, C.J., N-terminal acetylation inhibits protein targeting to the endoplasmic reticulum, *PLoS biology*, 9, e1001073, **2011**.
- [78] Komekado, H., Yamamoto, H., Chiba, T., Kikuchi, A., Glycosylation and palmitoylation of Wnt-3a are coupled to produce an active form of Wnt-3a., *Genes to cells: devoted to molecular & cellular mechanisms*, 12, 521-34, **2007**.
- [79] Bause, E., Structural requirements of N-glycosylation of proteins, *The Biochemical journal*, 209, 331-6, **1983**.
- [80] Mohorko, E., Glockshuber, R., Aebi, M., Oligosaccharyltransferase: the central enzyme of N-linked protein glycosylation, *Journal of inherited metabolic disease*, 34, 869-78, **2011**.
- [81] Katoh, M., Molecular evolution of Wnt2b orthologs, *International journal of oncology*, 26, 1135-9, **2005**.
- [82] Yamamoto, H., Awada, C., Hanaki, H., Sakane, H., Tsujimoto, I., Takahashi, Y., Takao, T., Kikuchi, A., The apical and basolateral secretion of Wnt11 and Wnt3a in polarized epithelial cells is regulated by different mechanisms, *Journal of cell science*, 126, 2931-43, **2013**.

- [83] Mason, J.O., Kitajewski, J., Varmus, H.E., Mutational analysis of mouse Wnt-1 identifies two temperature-sensitive alleles and attributes of Wnt-1 protein essential for transformation of a mammary cell line, *Molecular biology of the cell*, 3, 521-33, **1992**.
- [84] Tanaka, K., Kitagawa, Y., Kadowaki, T., *Drosophila* segment polarity gene product porcupine stimulates the posttranslational N-glycosylation of wingless in the endoplasmic reticulum, *The Journal of biological chemistry*, 277, 12816-23, **2002**.
- [85] Gao, X., Hannoush, R.N., Single-cell imaging of Wnt palmitoylation by the acyltransferase porcupine, *Nature chemical biology*, 10, 61-8, **2014**.
- [86] Ke, J., Xu, H.E., Williams, B.O., Lipid modification in Wnt structure and function, *Current opinion in lipidology*, 24, 129-33, **2013**.
- [87] Zhai, L., Chaturvedi, D., Cumberledge, S., *Drosophila* wnt-1 undergoes a hydrophobic modification and is targeted to lipid rafts, a process that requires porcupine, *The Journal of biological chemistry*, 279, 33220-7, **2004**.
- [88] Janda, C.Y., Waghray, D., Levin, A.M., Thomas, C., Garcia, K.C., Structural basis of Wnt recognition by Frizzled, *Science*, 337, 59-64, **2012**.
- [89] Herr, P., Basler, K., Porcupine-mediated lipidation is required for Wnt recognition by Wls, *Developmental biology*, 361, 392-402, **2012**.
- [90] Willert, K., Brown, J.D., Danenberg, E., Duncan, A.W., Weissman, I.L., Reya, T., Yates, J.R., Nusse, R., Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors, *Nature*, 423, 448-52, **2003**.
- [91] Johnson, M.L., Harnish, K., Nusse, R., Van Hul, W., LRP5 and Wnt signaling: a union made for bone, *Journal of bone and mineral research*, 19, 1749-57, **2004**.
- [92] Buechling, T., Chaudhary, V., Spirohn, K., Weiss, M., Boutros, M., p24 proteins are required for secretion of Wnt ligands, *EMBO reports*, 12, 1265-72, **2011**.
- [93] Kaiser, C., Thinking about p24 proteins and how transport vesicles select their cargo, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 3783-5, **2000**.
- [94] De Groot, R.E.A., Rappel, S.B., Lorenowicz, M.J., Korswagen, H.C., Protein kinase CK2 is required for Wntless internalization and Wnt secretion, *Cellular signalling*, 26, 2601-5, **2014**.
- [95] Bänziger, C., Soldini, D., Schütt, C., Zipperlen, P., Hausmann, G., Basler, K., Wntless, a conserved membrane protein dedicated to the secretion of Wnt proteins from signaling cells, *Cell*, 125, 509-22, **2006**.
- [96] Hardin, J., King, R.S., The long and the short of Wnt signaling in *C. elegans*, *Current opinion in genetics & development*, 18, 362-7, **2008**.
- [97] Bartscherer, K., Boutros, M., Regulation of Wnt protein secretion and its role in gradient formation, *EMBO reports*, 9, 977-82, **2008**.
- [98] Strigini, M., Cohen, S.M., Wingless gradient formation in the *Drosophila* wing, *Current biology*, 10, 293-300, **2000**.
- [99] Hausmann, G., Bänziger, C., Basler, K., Helping Wingless take flight: how WNT proteins are secreted, *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8, 331-6, **2007**.
- [100] Zhu, X., Zhu, H., Zhang, L., Huang, S., Cao, J., Ma, G., Feng, G., He, L., Yang, Y., Guo, X., Wls-mediated Wnts differentially regulate distal limb

- patterning and tissue morphogenesis, *Developmental biology*, 365, 328-38, **2012**.
- [101] Galli, L.M., Szabo, L.A., Li, L., Htaik, Y.M., Onguka, O., Burrus, L.W., Concentration-dependent effects of WNTLESS on WNT1/3A signaling, *Developmental dynamics*, 243, 1095-105, **2014**.
- [102] Port, F., Kuster, M., Herr, P., Furger, E., Bänziger, C., Hausmann, G., Basler, K., Wingless secretion promotes and requires retromer-dependent cycling of Wntless, *Nature cell biology*, 10, 178-85, **2008**.
- [103] Attar, N. Cullen, P.J., The retromer complex, *Advances in enzyme regulation*, 50, 216-36, **2010**.
- [104] Bonifacino, J.S. Hurley, J.H., Retromer, *Current opinion in cell biology*, 20, 427-36, **2008**.
- [105] De Groot, R.E.A., Farin, H.F., Macůrková, M., van Es, J.H., Clevers, H.C., Korswagen, H.C., Retromer dependent recycling of the Wnt secretion factor Wls is dispensable for stem cell maintenance in the mammalian intestinal epithelium, *PloS one*, 8, e76971, **2013**.
- [106] Baeg, G.-H., Selva, E.M., Goodman, R.M., Dasgupta, R., Perrimon, N., The Wingless morphogen gradient is established by the cooperative action of Frizzled and Heparan Sulfate Proteoglycan receptors, *Developmental biology*, 276, 89-100, **2004**.
- [107] Binari, R.C., Staveley, B.E., Johnson, W.A., Godavarti, R., Sasisekharan, R., Manoukian, A.S., Genetic evidence that heparin-like glycosaminoglycans are involved in wingless signaling, *Development*, 124, 2623-32, **1997**.
- [108] Häcker, U., Lin, X., Perrimon, N., The *Drosophila* sugarless gene modulates Wingless signaling and encodes an enzyme involved in polysaccharide biosynthesis, *Development*, 124, 3565-73, **1997**.
- [109] Franch-Marro, X., Marchand, O., Piddini, E., Ricardo, S., Alexandre, C., and Vincent, J.-P., Glypicans shunt the Wingless signal between local signalling and further transport, *Development*, 132, 659-66, **2005**.
- [110] Wu, Y., Belenkaya, T.Y., and Lin, X., *Dual roles of Drosophila glypican Dally-like in Wingless/Wnt signaling and distribution*, 1st ed., Elsevier Inc., **2010**.
- [111] Han, C., Yan, D., Belenkaya, T.Y., Lin, X., *Drosophila glypicans Dally and Dally-like shape the extracellular Wingless morphogen gradient in the wing disc*, *Development*, 132, 667-79, **2005**.
- [112] Port, F. Basler, K., Wnt trafficking: new insights into Wnt maturation, secretion and spreading, *Traffic*, 11, 1265-71, **2010**.
- [113] Häcker, U., Nybakken, K., Perrimon, N., Heparan sulphate proteoglycans: the sweet side of development., *Nature reviews. Molecular cell biology*, 6, 530-41, **2005**.
- [114] Hsiung, F., Ramirez-Weber, F.A., Iwaki, D.D., Kornberg, T.B., Dependence of *Drosophila* wing imaginal disc cytonemes on Decapentaplegic, *Nature*, 437, 560-3, **2005**.
- [115] Chen, X., Yang, J., Evans, P.M., Liu, C., Wnt signaling: the good and the bad, *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 40, 577-94, **2008**.
- [116] Bovolenta, P., Esteve, P., Ruiz, J.M., Cisneros, E., Lopez-Rios, J., Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease, *Journal of cell science*, 121, 737-46, **2008**.

- [117] Kawano, Y., Kypta, R., Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway, *Journal of cell science*, 116, 2627-34, **2003**.
- [118] Niehrs, C., Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators, *Oncogene*, 25, 7469-81, **2006**.
- [119] Semënov, M., Tamai, K., He, X., SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor, *The Journal of biological chemistry*, 280, 26770-5, **2005**.
- [120] Mao, B., Wu, W., Davidson, G., Marhold, J., Li, M., Mechler, B.M., Delius, H., Hoppe, D., Stannek, P., Walter, C., Glinka, A., Niehrs, C., Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling, *Nature*, 417, 664-7, **2002**.
- [121] Cadigan, K.M. Liu, Y.I., Wnt signaling: complexity at the surface, *Journal of cell science*, 119, 395-402, **2006**.
- [122] Huang, H.C. Klein, P.S., The Frizzled family: receptors for multiple signal transduction pathways, *Genome biology*, 5, 234, **2004**.
- [123] Yan, J., Jia, H., Ma, Z., Ye, H., Zhou, M., Su, L., Liu, J., Guo, A.Y., The evolutionary analysis reveals domain fusion of proteins with Frizzled-like CRD domain, *Gene*, 533, 229-39, **2014**.
- [124] He, X., Semenov, M., Tamai, K., Zeng, X., LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way, *Development*, 131, 1663-77, **2004**.
- [125] Wehrli, M., Dougan, S.T., Caldwell, K., O'Keefe, L., Schwartz, S., Vaizel-Ohayon, D., Schejter, E., Tomlinson, A., DiNardo, S., arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling, *Nature*, 407, 527-30, **2000**.
- [126] Goel, S., Chin, E.N., Fakhraldien, S. A, Berry, S.M., Beebe, D.J., Alexander, C.M., Both LRP5 and LRP6 receptors are required to respond to physiological Wnt ligands in mammary epithelial cells and fibroblasts, *The Journal of biological chemistry*, 287, 16454-66, **2012**.
- [127] Herz, J. Strickland, D.K., Multiligand receptors LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor, *The Journal of clinical investigation*, 108, 779-784, **2001**.
- [128] Tamai, K., Zeng, X., Liu, C., Zhang, X., Harada, Y., Chang, Z., Mechanism for Wnt Coreceptor Activation, *Molecular Cell*, 13, 149-156, **2004**.
- [129] Mikels, A.J., Nusse, R., Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context, *PLoS biology*, 4, e115, **2006**.
- [130] Lu, W., Yamamoto, V., Ortega, B., Baltimore, D., Mammalian Ryk is a Wnt coreceptor required for stimulation of neurite outgrowth, *Cell*, 119, 97-108, **2004**.
- [131] Rey, J.P. Ellies, D.L., Wnt modulators in the biotech pipeline, *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 239, 102-14, **2010**.
- [132] Ybe, J.A., Novel clathrin activity: developments in health and disease, *Biomolecular concepts*, 5, 175-182, **2014**.
- [133] Feng, Q. Gao, N., Keeping Wnt Signalosome in Check by Vesicular Traffic, *Journal of cellular physiology*, **2014**.
- [134] Blitzer, J.T., Nusse, R., A critical role for endocytosis in Wnt signaling, *BMC cell biology*, 7, 28, **2006**.

- [135] Axelrod, J.D., Miller, J.R., Shulman, J.M., Moon, R.T., Perrimon, N., Differential recruitment of Dishevelled provides signaling specificity in the planar cell polarity and Wingless signaling pathways, *Genes & development*, 12, 2610-22, **1998**.
- [136] Wallingford, J.B., Habas, R., The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity, *Development*, 132, 4421-36, **2005**.
- [137] Couso, J.P., Bishop, S.A., Martinez Arias, A., The wingless signalling pathway and the patterning of the wing margin in *Drosophila*, *Development* 120, 621-36, **1994**.
- [138] Wong, H.C., Bourdelas, A., Krauss, A., Lee, H.J., Shao, Y., Wu, D., Mlodzik, M., Shi, D.L., Zheng, J., Direct binding of the PDZ domain of Dishevelled to a conserved internal sequence in the C-terminal region of Frizzled, *Molecular cell*, 12, 1251-60, **2003**.
- [139] Bernatik, O., Ganji, R.S., Dijksterhuis, J.P., Konik, P., Cervenka, I., Polonio, T., Krejci, P., Schulte, G., Bryja, V., Sequential activation and inactivation of Dishevelled in the Wnt/beta-catenin pathway by casein kinases, *The Journal of biological chemistry*, 286, 10396-410, **2011**.
- [140] Davidson, G., Wu, W., Shen, J., Bilic, J., Fenger, U., Stannek, P., Glinka, A., Niehrs, C., Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction, *Nature*, 438, 867-72, **2005**.
- [141] Stamos, J.L., Weis, W.I., The  $\beta$ -catenin destruction complex., *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5, a007898, **2013**.
- [142] Cong, F., Varmus, H., Nuclear-cytoplasmic shuttling of Axin regulates subcellular localization of beta-catenin, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 2882-7, **2004**.
- [143] Zhang, N., Jiang, Y., Zou, J., Zhuang, S., Jin, H., Yu, Q., Insights Into Unbinding Mechanisms Upon Two Mutations Investigated by Molecular Dynamics Study of GSK3  $\beta$ -Axin Complex: Role of Packing Hydrophobic Residues, *Proteins*, 949, 941-9, **2007**.
- [144] Kikuchi, A., Roles of Axin in the Wnt Signalling Pathway, *Cellular Signalling*, 11, 777-88, **1999**.
- [145] Behrens, J., Jerchow, B.A., Würtele, M., Grimm, J., Asbrand, C., Wirtz, R., Kühl, M., Wedlich, D., Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3 $\beta$ , *Science*, 280, 596-9, **1998**.
- [146] Bijur, G.N., Jope, R.S., Glycogen synthase kinase-3 beta is highly activated in nuclei and mitochondria, *Neuroreport*, 14, 2415-9, **2003**.
- [147] Jope, R.S., Yuskaitis, C.J., Beurel, E., Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics, *Neurochemical research*, 32, 577-95, **2007**.
- [148] Dajani, R., Fraser, E., Roe, S.M., Yeo, M., Good, V.M., Thompson, V., Pearl, L.H., Structural basis for recruitment of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  to the axin-APC scaffold complex, *The EMBO journal*, 22, 494-501, **2003**.
- [149] Polakis, P., The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor, *Biochimica et biophysica acta*, 1332, 127-47, **1997**.
- [150] Schneikert, J., Ruppert, J.G., Behrens, J., Wenzel, E.M., Different roles for the axin interactions with the SAMP versus the second twenty amino acid repeat of adenomatous polyposis coli, *PloS one*, 9, e94413, **2014**.

- [151] McCartney, B.M., Näthke, I.S., Cell regulation by the Apc protein Apc as master regulator of epithelia, *Current opinion in cell biology*, 20, 186-93, **2008**.
- [152] Kimelman, D., Xu, W.,  $\beta$ -Catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective, *Oncogene*, 25, 7482-91, **2006**.
- [153] Tolwinski, N.S., Wieschaus, E., Armadillo nuclear import is regulated by cytoplasmic anchor Axin and nuclear anchor dTCF/Pan, *Development*, 128, 2107-17, **2001**.
- [154] Hamada, F., Bienz, M., The APC tumor suppressor binds to C-terminal binding protein to divert nuclear beta-catenin from TCF, *Developmental cell*, 7, 677-85, **2004**.
- [155] Sierra, J., Yoshida, T., Joazeiro, C.A., Jones, K.A., The APC tumor suppressor counteracts beta-catenin activation and H3K4 methylation at Wnt target genes, *Genes & development*, 20, 586-600, **2006**.
- [156] Knippschild, U., Gocht, A., Wolff, S., Huber, N., Löhler, J., Stöter, M., The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes, *Cellular signalling*, 17, 675-89, **2005**.
- [157] Jho, E. h, Lomvardas, S., Costantini, F., A GSK3beta phosphorylation site in axin modulates interaction with beta-catenin and Tcf-mediated gene expression, *Biochemical and biophysical research communications*, 266, 28-35, **1999**.
- [158] Yamamoto, H., Kishida, S., Kishida, M., Ikeda, S., Takada, S., Kikuchi, A., Phosphorylation of axin, a Wnt signal negative regulator, by glycogen synthase kinase-3beta regulates its stability, *The Journal of biological chemistry*, 274, 10681-4, **1999**.
- [159] Xing, Y., Clements, W.K., Le Trong, I., Hinds, T.R., Stenkamp, R., Kimelman, D., Xu, W., Crystal structure of a beta-catenin/APC complex reveals a critical role for APC phosphorylation in APC function, *Molecular cell*, 15, 523-33, **2004**.
- [160] Amit, S., Hatzubai, A., Birman, Y., Andersen, J.S., Ben-Shushan, E., Mann, M., Ben-Neriah, Y., Alkalay, I., Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway, *Genes & development*, 16, 1066-76, **2002**.
- [161] Liu, C., Li, Y., Semenov, M., Han, C., Baeg, G., Tan, Y., Zhang, Z., Lin, X., He, X., Control of  $\beta$ -Catenin Phosphorylation Degradation by a Dual-Kinase Mechanism, *Cell*, 108, 837-47, **2002**.
- [162] Xing, Y., Clements, W.K., Kimelman, D., Xu, W., Crystal structure of a beta-catenin/axin complex suggests a mechanism for the beta-catenin destruction complex, *Genes & development*, 17, 2753-64, **2003**.
- [163] Orford, K., Crockett, C., Jensen, J.P., Weissman, A.M., Byers, S.W., Serine Phosphorylation-regulated Ubiquitination and Degradation of  $\beta$ -Catenin, *Journal of Biological Chemistry*, 272, 24735-8, **1997**.
- [164] Thrower, J.S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., Pickart, C.M., Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal, *The EMBO journal*, 19, 94-102, **2000**.
- [165] Mani, A., Gelmann, E.P., The ubiquitin-proteasome pathway and its role in cancer, *Journal of clinical oncology*, 23, pp. 4776-89, **2005**.
- [166] Hart, M., Concordet, J., Lassot, I., Albert, I., Santos, R.L., Durand, H., Perret, C., Rubinfeld, B., Margottin, F., Benarous, R., Polakis, P., Ad, G., The F-box protein  $\beta$ -TrCP associates with phosphorylated  $\beta$ -catenin and regulates its activity in the cell, *Current Biology*, 9, 207-11.

- [167] Myung, J., Kim, K.B., Crews, C.M., The ubiquitin-proteasome pathway and proteasome inhibitors, *Medicinal research reviews*, 21, 245-73, **2001**.
- [168] Aberle, H., Bauer, A., Kispert, A., Kemler, R.,  $\beta$ -catenin is a target for the ubiquitin- proteasome pathway, *EMBO Journal*, 16, 3797-804, **1997**.
- [169] Ehebauer, M.T., Arias, A.M., The structural and functional determinants of the Axin and Dishevelled DIX domains, *BMC structural biology*, 9, 70, **2009**.
- [170] Fiedler, M., Mendoza-Topaz, C., Rutherford, T.J., Mieszczanek, J., Bienz, M., Dishevelled interacts with the DIX domain polymerization interface of Axin to interfere with its function in down-regulating  $\beta$ -catenin, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 1937-42, **2011**.
- [171] Piao, S., Lee, S.H., Kim, H., Yum, S., Stamos, J.L., Xu, Y., Lee, S.-J., Lee, J., Oh, S., Han, J.K., Park, B.J., Weis, W.I., and Ha, N.C., Direct inhibition of GSK3 $\beta$  by the phosphorylated cytoplasmic domain of LRP6 in Wnt/ $\beta$ -catenin signaling, *PloS one*, 3, e4046, **2008**.
- [172] Stambolic, V., Woodgett, J.R., Mitogen inactivation of glycogen synthase kinase-3  $\beta$  in intact cells via serine 9 phosphorylation, *The Biochemical journal*, 303, 701-4, **1994**.
- [173] Van Amerongen, R., Nawijn, M., Franca-Koh, J., Zevenhoven, J., van der Gulden, H., Jonkers, J., Berns, A., Frat is dispensable for canonical Wnt signaling in mammals, *Genes & development*, 19, 425–30, **2005**.
- [174] Wnt signaling, [http://www.wormbook.org/chapters/www\\_wntsignaling/wntsignaling.html](http://www.wormbook.org/chapters/www_wntsignaling/wntsignaling.html) (Haziran,2015).
- [175] Cox, R.T., Kirkpatrick, C., Peifer, M., Armadillo is required for adherens junction assembly, cell polarity, and morphogenesis during Drosophila embryogenesis, *The Journal of cell biology*, 134, 133-48, **1996**.
- [176] Fagotto, F., Glück, U., Gumbiner, B.M., Nuclear localization signal-independent and importin/karyopherin-independent nuclear import of  $\beta$ -catenin, *Current biology*, 8, 181-90, **1998**.
- [177] Krieghoff, E., Behrens, J., Mayr, B., Nucleo-cytoplasmic distribution of  $\beta$ -catenin is regulated by retention, *Journal of cell science*, 119, 1453-63, **2006**.
- [178] Sharma, M., Jamieson, C., Johnson, M., Molloy, M.P., Henderson, B.R., Specific armadillo repeat sequences facilitate  $\beta$ -catenin nuclear transport in live cells via direct binding to nucleoporins Nup62, Nup153, and RanBP2/Nup358, *The Journal of biological chemistry*, 287, 819-31, **2012**.
- [179] Henderson, B.R., Nuclear-cytoplasmic shuttling of APC regulates  $\beta$ -catenin subcellular localization and turnover, *Nature cell biology*, 2, 653–60, **2000**.
- [180] Henderson, B.R., Fagotto, F., The ins and outs of APC and  $\beta$ -catenin nuclear transport, *EMBO reports*, 3, 834–9, **2002**.
- [181] Huber, O., Korn, R., McLaughlin, J., Ohsugi, M., Herrmann, B.G., Kemler, R., Nuclear localization of  $\beta$ -catenin by interaction with transcription factor LEF-1., *Mechanisms of development*, 59, 3-10, **1996**.
- [182] MacDonald, B.T., Tamai, K., He, X., Wnt/ $\beta$ -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases, *Developmental cell*, 17, 9-26, **2009**.
- [183] Shitashige, M., Hirohashi, S., Yamada, T., Wnt signaling inside the nucleus, *Cancer science*, 99, 631-7, **2008**.



- [184] Mulholland, D.J., Dedhar, S., Coetzee, G. A, Nelson, C.C., Interaction of nuclear receptors with the Wnt/beta-catenin/Tcf signaling axis: Wnt you like to know?, *Endocrine reviews*, 26, 898-915, **2005**.
- [185] Hatzis, P., van der Flier, L.G., van Driel, M.A., Guryev, V., Nielsen, F., Denissov, S., Nijman, I.J., Koster, J., Santo, E.E., Welboren, W., Versteeg, R., Cuppen, E., Clevers, H., Stunnenberg, H.G., Genome-wide pattern of TCF7L2/TCF4 chromatin occupancy in colorectal cancer cells, *Molecular and cellular biology*, 28, 2732-44, **2008**.
- [186] Graham, T.A., Weaver, C., Mao, F., Kimelman, D., Xu, W., Crystal structure of a beta-catenin/Tcf complex, *Cell*, 103, 885-96, **2000**.
- [187] Goentoro, L., Kirschner, M.W., Evidence that fold-change, and not absolute level, of beta-catenin dictates Wnt signaling, *Molecular cell*, 36, 872-84, **2009**.
- [188] Goentoro, L., Shoval, O., Kirschner, M.W., Alon, U., The incoherent feedforward loop can provide fold-change detection in gene regulation, *Molecular cell*, 36, 894-9, **2009**.
- [189] Lustig, B., Behrens, J., The Wnt signaling pathway and its role in tumor development, *Journal of cancer research and clinical oncology*, 129, 199-221, **2003**.
- [190] Ishitani, T., Ninomiya-Tsuji, J., Clevers, H., Shibuya, H., Matsumoto, K., The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between beta-catenin and transcription factor TCF, *Nature*, 399, 798-802, **Jun. 1999**.
- [191] Hendriksen, J., Fagotto, F., van der Velde, H., van Schie, M., Noordermeer, J., Fornerod, M., RanBP3 enhances nuclear export of active (beta)-catenin independently of CRM1, *The Journal of cell biology*, 171, 785-97, **2005**.
- [192] Hikasa, H., Sokol, S.Y., Phosphorylation of TCF proteins by homeodomain-interacting protein kinase 2, *The Journal of biological chemistry*, 286, 12093-100, **2011**.
- [193] Lepourcelet, M., Chen, Y.N.P., France, D.S., Wang, H., Crews, P., Petersen, F., Bruseo, C., Shivdasani, R.A., Small-molecule antagonists of the oncogenic Tcf/beta-catenin protein complex, *Cancer cell*, 5, 91-102, **2004**.
- [194] Jang, G.B., Hong, I.S., Kim, R.J., Lee, S.Y., Park, S.J., Lee, E.S., Park, J.H., Yun, C.H., Chung, J.U., Lee, K.J., Lee, H.Y., Nam, J.S., Wnt/ $\beta$ -catenin small molecule inhibitor CWP232228 preferentially inhibits the growth of breast cancer stem-like cells, *Cancer research*, 75, 1671-702, **2015**.
- [195] Li, F., Chong, Z.Z., Maiese, K., Winding through the WNT pathway during cellular development and demise, *Histology and histopathology*, 21, 103-24, **2006**.
- [196] Ahmed, Y., Hayashi, S., Levine, A., Wieschaus, E., Regulation of armadillo by a Drosophila APC inhibits neuronal apoptosis during retinal development, *Cell*, 93, 1171-82, **1998**.
- [197] Lin, H. V., Wingless eliminates ommatidia from the edge of the developing eye through activation of apoptosis, *Development*, 131, 2409-18, **2004**.
- [198] Ellies, D.L., Church, V., Francis-West, P., Lumsden, A., The WNT antagonist cSFRP2 modulates programmed cell death in the developing hindbrain, *Development*, 127, 5285-95, **2000**.
- [199] Kim, K., Pang, K.M., Evans, M., Hay, E.D., Overexpression of beta-catenin induces apoptosis independent of its transactivation function with LEF-1 or

- the involvement of major G1 cell cycle regulators, *Molecular biology of the cell*, 11, 3509-23, **2000**.
- [200] Ueda, Y., Hijikata, M., Takagi, S., Takada, R., Takada, S., Chiba, T., Shimotohno, K., Wnt/beta-catenin signaling suppresses apoptosis in low serum medium and induces morphologic change in rodent fibroblasts, *International journal of cancer*, 99, 681-8, **2002**.
- [201] You, Z., Saims, D., Chen, S., Zhang, Z., Guttridge, D.C., Guan, K.-L., MacDougald, O. A, Brown, A.M.C., Evan, G., Kitajewski, J., Wang, C.-Y., Wnt signaling promotes oncogenic transformation by inhibiting c-Myc-induced apoptosis, *The Journal of cell biology*, 157, 429-40, **2002**.
- [202] Chen, S., Guttridge, D.C., You, Z., Zhang, Z., Fribley, A, Mayo, M.W., Kitajewski, J., Wang, C.Y., Wnt-1 signaling inhibits apoptosis by activating beta-catenin/T cell factor-mediated transcription, *The Journal of cell biology*, 152, 87-96, **2001**.
- [203] Brancolini, C., Sgorbissa, A., Schneider, C., Proteolytic processing of the adherens junctions components beta-catenin and gamma-catenin/plakoglobin during apoptosis, *Cell death and differentiation*, 5, 1042-50, **1998**.
- [204] Van de Craen, M., Berx, G., Van den Brande, I., Fiers, W., Declercq, W., Vandenabeele, P., Proteolytic cleavage of beta-catenin by caspases: an in vitro analysis, *FEBS letters*, 458, 167-70, **1999**.
- [205] Steinhilber, U., Badock, V., Bauer, A, Behrens, J., Wittman-Liebold, B., Dörken, B., Bommert, K., Apoptosis-induced cleavage of beta-catenin by caspase-3 results in proteolytic fragments with reduced transactivation potential, *The Journal of biological chemistry*, 275, 16345-53, **2000**.
- [206] Fischer, U., Jänicke, R.U., Schulze-Osthoff, K., Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates, *Cell death and differentiation*, 10, 76-100, **2003**.
- [207] Zhang, H., Gao, X., Yan, Z., Ren, C., Shimohata, T., Steinberg, G.K., Zhao, H., Inhibiting caspase-3 activity blocks beta-catenin degradation after focal ischemia in rat, *Neuroreport*, 19, 821-4, **2008**.
- [208] Li, Q., Wang, X., Wu, X., Rui, Y., Liu, W., Wang, J., Wang, X., Liou, Y.-C., Ye, Z., Lin, S.C., Daxx cooperates with the Axin/HIPK2/p53 complex to induce cell death, *Cancer research*, 67, 66-74, **2007**.
- [209] Morin, P.J., Vogelstein, B., Kinzler, K.W., Apoptosis and APC in colorectal tumorigenesis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 7950-4, **1996**.
- [210] Polakis, P., Wnt signaling in cancer, *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4, a008052, **2012**.
- [211] Samowitz, W.S., Powers, M.D., Spirio, L.N., Nollet, F., van Roy, F., Slattery, M.L., Beta-catenin mutations are more frequent in small colorectal adenomas than in larger adenomas and invasive carcinomas, *Cancer research*, 59, 1442-4, **1999**.
- [212] Fukuchi, T., Sakamoto, M., Tsuda, H., Maruyama, K., Nozawa, S., Hirohashi, S., Beta-catenin mutation in carcinoma of the uterine endometrium, *Cancer research*, 58, 3526-8, **1998**.
- [213] Clements, W.M., Wang, J., Sarnaik, A., MacDonald, J., Fenoglio-Preiser, C., Groden, J., Lowy, A.M., {beta}-Catenin Mutation Is a Frequent Cause of Wnt Pathway Activation in Gastric Cancer, *Cancer Res.*, 62, 3503-6, **2002**.

- [214] De La Coste, A., Romagnolo, B., Billuart, P., Renard, C.A., Buendia, M.A., Soubrane, O., Fabre, M., Chelly, J., Beldjord, C., Kahn, A., Perret, C., Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 8847-51, **1998**.
- [215] Rubinfeld, B., Stabilization of beta -Catenin by Genetic Defects in Melanoma Cell Lines, *Science*, 275, 1790-2, **1997**.
- [216] Wright, K., Wilson, P., Morland, S., Campbell, I., Walsh, M., Hurst, T., Ward, B., Cummings, M., Chenevix-Trench, G., beta-catenin mutation and expression analysis in ovarian cancer: exon 3 mutations and nuclear translocation in 16% of endometrioid tumours, *International journal of cancer*, 82, 625-9, **1999**.
- [217] Voeller, H.J., Truica, C.I., Gelmann, E.P., Beta-catenin mutations in human prostate cancer, *Cancer research*, 58, 2520-3, **1998**.
- [218] Garcia-Rostan, G., Tallini, G., Herrero, A., D'Aquila, T.G., Carcangiu, M.L., Rimm, D.L., Frequent Mutation and Nuclear Localization of {beta}-Catenin in Anaplastic Thyroid Carcinoma, *Cancer Research*, 59, 1811-5, **1999**.
- [219] Austinat, M., Dunsch, R., Wittekind, C., Tannapfel, A., Gebhardt, R., Gaunitz, F., Correlation between beta-catenin mutations and expression of Wnt-signaling target genes in hepatocellular carcinoma, *Molecular cancer*, 7, 21, **2008**.
- [220] The Wnt Homepage, <http://web.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/>. (Haziran, 2015).
- [221] Liu, Y., Ye, X., Zhang, J.-B., Ouyang, H., Shen, Z., Wu, Y., Wang, W., Wu, J., Tao, S., Yang, X., Qiao, K., Zhang, J., Liu, J., Fu, Q., Xie, Y., PROX1 promotes hepatocellular carcinoma proliferation and sorafenib resistance by enhancing  $\beta$ -catenin expression and nuclear translocation, *Oncogene*, doi: 10.1038/onc.2015, **2015**.
- [222] El-Serag, H.B., Rudolph, K.L., Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis, *Gastroenterology*, 132, 2557–76, **2007**.
- [223] Feng, G.J., Cotta, W., Wei, X.Q., Poetz, O., Evans, R., Jardé, T., Reed, K., Meniel, V., Williams, G.T., Clarke, A.R., Dale, T.C., Conditional disruption of Axin1 leads to development of liver tumors in mice, *Gastroenterology*, 143, 1650-9, **2012**.
- [224] Csepregi, A., Röcken, C., Hoffmann, J., Gu, P., Saliger, S., Müller, O., Schneider-Stock, R., Kutzner, N., Roessner, A., Malfertheiner, P., Ebert, M.P.A., APC promoter methylation and protein expression in hepatocellular carcinoma, *Journal of cancer research and clinical oncology*, 134, 579-89, **2008**.
- [225] Takagi, H., Sasaki, S., Suzuki, H., Toyota, M., Maruyama, R., Nojima, M., Yamamoto, H., Omata, M., Tokino, T., Imai, K., Shinomura, Y., Frequent epigenetic inactivation of SFRP genes in hepatocellular carcinoma, *Journal of gastroenterology*, 43, 378-89, **2008**.
- [226] Llobet, D., Pallares, J., Yeramian, A., Santacana, M., Eritja, N., Velasco, A., Dolcet, X., Matias-Guiu, X., Molecular pathology of endometrial carcinoma: practical aspects from the diagnostic and therapeutic viewpoints, *Journal of clinical pathology*, 62, 777–85, **2009**.
- [227] Banno, K., Yanokura, M., Iida, M., Masuda, K., Aoki, D., Carcinogenic mechanisms of endometrial cancer: Involvement of genetics and

- epigenetics., *The journal of obstetrics and gynaecology research*, 40, 1957-67, **2014**.
- [228] Liu, Y., Patel, L., Mills, G.B., Lu, K.H., Sood, A.K., Ding, L., Kucherlapati, R., Mardis, E.R., Levine, D.A., Shmulevich, I., Broaddus, R.R., Zhang, W., Clinical Significance of CTNNB1 Mutation and Wnt Pathway Activation in Endometrioid Endometrial Carcinoma., *Journal of the National Cancer Institute*, 106, 245, **2014**.
- [229] Heuberger, J., Birchmeier, W., Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling, *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2, a002915, **2010**.
- [230] Kalluri, R. Weinberg, R.A., The basics of epithelial-mesenchymal transition., *The Journal of clinical investigation*, 119, no. 6, pp. 1420–8, **Jun. 2009**.
- [231] Kalluri, R., EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells, *The Journal of clinical investigation*, 119, 1417-9, **2009**.
- [232] Huber, M.A., Kraut, N., Beug, H., Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression, *Current opinion in cell biology*, 17, 548-58, **2005**.
- [233] Lin, S.Y., Xia, W., Wang, J.C., Kwong, K.Y., Spohn, B., Wen, Y., Pestell, R.G., Hung, M.C., Beta-catenin, a novel prognostic marker for breast cancer: its roles in cyclin D1 expression and cancer progression, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 4262-6, **2000**.
- [234] Bodnar, L., Stanczak, A., Cierniak, S., Smoter, M., Cichowicz, M., Kozłowski, W., Szczylik, C., Wieczorek, M., Lamparska-Przybysz, M., Wnt/ $\beta$ -catenin pathway as a potential prognostic and predictive marker in patients with advanced ovarian cancer, *Journal of ovarian research*, 7, 16, **2014**.
- [235] Chen, Z., He, X., Jia, M., Liu, Y., Qu, D., Wu, D., Wu, P., Ni, C., Zhang, Z., Ye, J., Xu, J., Huang, J.,  $\beta$ -catenin overexpression in the nucleus predicts progress disease and unfavourable survival in colorectal cancer: a meta-analysis, *PloS one*, 8, e63854, **2013**.
- [236] Kim, J.-S., Crooks, H., Foxworth, A., Waldman, T., Proof-of-principle: oncogenic beta-catenin is a valid molecular target for the development of pharmacological inhibitors, *Molecular cancer therapeutics*, 1, 1355–9, **2002**.
- [237] Minke, K.S., Staib, P., Puetter, A., Gehrke, I., Gandhirajan, R.K., Schlösser, A., Schmitt, E.K., Hallek, M., Kreuzer, K.-A., Small molecule inhibitors of WNT signaling effectively induce apoptosis in acute myeloid leukemia cells, *European journal of haematology*, 82, 165-75, **2009**.
- [238] Gandhirajan, R.K., Staib, P.A., Minke, K., Gehrke, I., Plickert, G., Schlösser, A., Schmitt, E.K., Hallek, M., and Kreuzer, K.-A., Small molecule inhibitors of Wnt/beta-catenin/lef-1 signaling induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells in vitro and in vivo, *Neoplasia*, 12, 326-35, **2010**.
- [239] Leow, P.C., Tian, Q., Ong, Z.Y., Yang, Z., Ee, P.L.R., Antitumor activity of natural compounds, curcumin and PKF118-310, as Wnt/ $\beta$ -catenin antagonists against human osteosarcoma cells, *Investigational new drugs*, 28, 766-82, **2010**.
- [240] Hallett, R.M., Kondratyev, M.K., Giacomelli, A.O., Nixon, A.M.L., Girgis-Gabardo, A., Ilieva, D., Hassell, J.A., Small molecule antagonists of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway target breast tumor-initiating cells in a Her2/Neu mouse model of breast cancer, *PloS one*, 7, e33976, **2012**.

- [241] Ewan, K., Pajak, B., Stubbs, M., Todd, H., Barbeau, O., Quevedo, C., Botfield, H., Young, R., Ruddle, R., Samuel, L., Battersby, A., Raynaud, F., Allen, N., Latinkic, B., Workman, P., McDonald, E., Blagg, J., Aherne, W., Dale, T., A useful approach to identify novel small-molecule inhibitors of Wnt-dependent transcription, *Cancer research*, 70, 5963-73, **2010**.
- [242] He, B.-C., Gao, J.L., Zhang, B.Q., Luo, Q., Shi, Q., Kim, S.H., Huang, E., Gao, Y., Yang, K., Wagner, E.R., Wang, L., Tang, N., Luo, J., Liu, X., Li, M., Bi, Y., Hu, N., Zhou, Q., Luu, H.H., Haydon, R.C., Zhao, Y., He, T.C., Tetrandrine inhibits Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and suppresses tumor growth of human colorectal cancer, *Molecular pharmacology*, 79, 211-9, **2011**.
- [243] Park, C.H., Hahm, E.R., Park, S., Kim, H.K., Yang, C.H., The inhibitory mechanism of curcumin and its derivative against beta-catenin/Tcf signaling, *FEBS letters*, 579, 2965-71, **2005**.
- [244] Zhang, X., Yin, W., Shi, X., Li, Y., Curcumin activates Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway through inhibiting the activity of GSK-3 $\beta$  in APPswe transfected SY5Y cells, *European journal of pharmaceutical sciences*, 42, 540-6, **2011**.
- [245] Ziegler, U., Morphological Features of Cell Death, *News in Physiological Sciences*, 19, 124-8, **2004**.
- [246] Diamantis, A., Beloukas, A.I., Kalogeraki, A.M., Magiorkinis, E., A brief chronicle of cytology: from Janssen to Papanicolaou and beyond, *Diagnostic cytopathology*, 41, no. 6, pp. 555-64, **2013**.
- [247] Vogt, K.C., *Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkroete (Alytes obstetricans)* (Google eBook), Jent & Gassmann, **1842**.
- [248] Clarke, P.G.H., Clarke, S., Nineteenth century research on cell death, *Experimental oncology*, 34, 139-45, **2012**.
- [249] Gerschenson, L.E., Geske, F.J., Virchow and apoptosis, *The American journal of pathology*, 158, 1543, **2001**.
- [250] Pelengaris, S., *The Molecular Biology of Cancer: A Bridge from Bench to Bedside*, John Wiley & Sons, **2013**.
- [251] Reyes, R., Haendel, M., Grant, D., Melancon, E., Eisen, J.S., Slow degeneration of zebrafish Rohon-Beard neurons during programmed cell death, *Developmental dynamics*, 229, 30-41, **2004**.
- [252] Schmaus, H., Ueber Karyorrhesis, *Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medizin*, 138, 1–80, **1894**.
- [253] Glücksmann, A., Cell deaths in normal vertebrate ontogeny, *Biological Reviews*, 26, 59-86, **1951**.
- [254] Lockshin, R.A., Zakeri, Z., Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory, *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2, 545-50, **2001**.
- [255] Kerr, J.F.R., A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes, *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 90, 419-35, **1965**.
- [256] Lizarbe2007-English, <http://www.celldeath-apoptosis.org/classics/about-apoptosis/lizarbe2007-eng.html>. (Haziran,2015).
- [257] Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R., Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *British journal of cancer*, 26, 239-57, **1972**.

- [258] Sulston, J.E., Post-embryonic development in the ventral cord of *Caenorhabditis elegans*, *Philosophical transactions of the Royal Society of London*, 275, 287-97, **1976**.
- [259] Brenner, S., The genetics of *Caenorhabditis elegans*, *Genetics*, 77, 71-94, **1974**.
- [260] Hedgecock, E.M., Sulston, J.E., Thomson, J.N., Mutations affecting programmed cell deaths in the nematode *Caenorhabditis elegans*., *Science*, 220, 1277-9, **1983**.
- [261] Ellis, H.M., Horvitz, H.R., Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*, *Cell*, 44, 817-29, **1986**.
- [262] Kroemer, G., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Peter, M.E., Vaux, D., Vandenabeele, P., Zhivotovsky, B., Blagosklonny, M. V, Malorni, W., Knight, R.A., Piacentini, M., Nagata, S., Melino, G., Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death, *Cell death and differentiation*, 12 Suppl 2, 1463-7, **2005**.
- [263] Duprez, L., Wirawan, E., Vanden Berghe, T., Vandenabeele, P., Major cell death pathways at a glance, *Microbes and infection/Institut Pasteur*, 11, 1050-62, **2009**.
- [264] Meier, P., Finch, A., Evan, G., Apoptosis in development, *Nature*, 407, 796-801, **2000**.
- [265] Saraste, A., Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis, *Cardiovascular Research*, 45, 528-37, **2000**.
- [266] Loos, B., Engelbrecht, A.M., Lockshin, R. A, Klionsky, D.J., Zakeri, Z., The variability of autophagy and cell death susceptibility: Unanswered questions, *Autophagy*, 9, 1270-85, **2013**.
- [267] Ryter, S.W., Nakahira, K., Haspel, J.A., Choi, A.M.K., Autophagy in pulmonary diseases, *Annual review of physiology*, 74, 377-401, **2012**.
- [268] Kesidou, E., Lagoudaki, R., Touloumi, O., Poulatsidou, K.N., Simeonidou, C., Autophagy and neurodegenerative disorders, *Neural regeneration research*, 8, 2275-83, **2013**.
- [269] Mizushima, N., Autophagy: process and function, *Genes & development*, 21, 2861-73, **2007**.
- [270] Benbrook, D.M., Long, A., Integration of autophagy, proteasomal degradation, unfolded protein response and apoptosis, *Experimental oncology*, 34, 286-97, **2012**.
- [271] Li, W., Li, J., Bao, J., Microautophagy: lesser-known self-eating, *Cellular and molecular life sciences*, 69, 1125-36, **2012**.
- [272] Cuervo, A.M., Wong, E., Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging, *Cell research*, 24, 92-104, **2014**.
- [273] Abada, A. Elazar, Z., Getting ready for building: signaling and autophagosome biogenesis, *EMBO reports*, 15, 839-52, **2014**.
- [274] Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X.H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M.D., Levine, B., Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy, *Cell*, 122, 927-39, **2005**.
- [275] Wirawan, E., Vande Walle, L., Kersse, K., Cornelis, S., Claerhout, S., Vanoverberghe, I., Roelandt, R., De Rycke, R., Verspurten, J., Declercq, W., Agostinis, P., Vanden Berghe, T., Lippens, S., Vandenabeele, P., Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria, *Cell death & disease*, 1, e18, **2010**.

- [276] Gordy, C., He, Y.W., The crosstalk between autophagy and apoptosis: where does this lead?, *Protein & cell*, 3, 17-27, **2012**.
- [277] Giampietri, C., Starace, D., Petrunaro, S., Filippini, A., Ziparo, E., Necroptosis: molecular signalling and translational implications, *International journal of cell biology*, 2014, 490275, **2014**.
- [278] Vercammen, D., Beyaert, R., Denecker, G., Goossens, V., Van Loo, G., Declercq, W., Grooten, J., Fiers, W., Vandenabeele, P., Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor, *The Journal of experimental medicine*, 187, 1477-85, **1998**.
- [279] Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, A., Valitutti, S., Bodmer, J.L., Schneider, P., Seed, B., Tschopp, J., Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule, *Nature immunology*, 1, 489-95, **2000**.
- [280] Roach, H.I., Clarke, N.M., Physiological cell death of chondrocytes in vivo is not confined to apoptosis. New observations on the mammalian growth plate, *The Journal of bone and joint surgery*, 82, 601-13, **2000**.
- [281] Hitomi, J., Christofferson, D.E., Ng, A., Yao, J., Degtarev, A., Xavier, R.J., Yuan, J., Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway, *Cell*, 135, 1311-23, **2008**.
- [282] Degtarev, A., Hitomi, J., Germscheid, M., Ch'en, I.L., Korkina, O., Teng, X., Abbott, D., Cuny, G.D., Yuan, C., Wagner, G., Hedrick, S.M., Gerber, S.A., Lugovskoy, A., Yuan, J., Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins, *Nature chemical biology*, 4, 313–21, **2008**.
- [283] Christofferson, D.E., Yuan, J., Necroptosis as an alternative form of programmed cell death, *Current opinion in cell biology*, 22, 263-8, **2010**.
- [284] Sun, X., Yin, J., Starovasnik, M.A., Fairbrother, W.J., Dixit, V.M., Identification of a novel homotypic interaction motif required for the phosphorylation of receptor-interacting protein (RIP) by RIP3, *The Journal of biological chemistry*, 277, 9505-11, **2002**.
- [285] Wu, X.N., Yang, Z.H., Wang, X.K., Zhang, Y., Wan, H., Song, Y., Chen, X., Shao, J., Han, J., Distinct roles of RIP1-RIP3 hetero- and RIP3-RIP3 homo-interaction in mediating necroptosis, *Cell death and differentiation*, 21, 1709-20, **2014**.
- [286] Cai, Z., Jitkaew, S., Zhao, J., Chiang, H.-C., Choksi, S., Liu, J., Ward, Y., Liu, Z.G., Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required for TNF-induced necroptosis, *Nature cell biology*, 16, **2014**.
- [287] Wu, W., Liu, P., Li, J., Necroptosis: an emerging form of programmed cell death, *Critical reviews in oncology/hematology*, 82, 249-58, **2012**.
- [288] Ye, Y.C., Wang, H.J., Yu, L., Tashiro, S.I., Onodera, S., and Ikejima, T., RIP1-mediated mitochondrial dysfunction and ROS production contributed to tumor necrosis factor alpha-induced L929 cell necroptosis and autophagy, *International immunopharmacology*, 14, 674-82, **2012**.
- [289] Marshall, K.D., Baines, C.P., Necroptosis: is there a role for mitochondria?, *Frontiers in physiology*, 5, 323, **2014**.
- [290] Oberst, A., Dillon, C.P., Weinlich, R., McCormick, L.L., Fitzgerald, P., Pop, C., Hakem, R., Salvesen, G.S., Green, D.R., Catalytic activity of the caspase-8-FLIP(L) complex inhibits RIPK3-dependent necrosis, *Nature*, 471, 363-7, **2011**.

- [291] Molz, L., Booher, R., Young, P., Beach, D., cdc2 and the regulation of mitosis: six interacting mcs genes, *Genetics*, 122, 773-82, **1989**.
- [292] Castedo, M., Perfettini, J.-L., Roumier, T., Andreau, K., Medema, R., Kroemer, G., Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition, *Oncogene*, 23, 2825-37, **2004**.
- [293] Nabha, S.M., Mohammad, R.M., Dandashi, M.H., Coupaye-Gerard, B., Aboukameel, A., Pettit, G.R., Al-Katib, A.M., Combretastatin-A4 prodrug induces mitotic catastrophe in chronic lymphocytic leukemia cell line independent of caspase activation and poly(ADP-ribose) polymerase cleavage, *Clinical cancer research*, 8, 2735-41, **2002**.
- [294] Proksch, E., Brandner, J.M., Jensen, J.M., The skin: an indispensable barrier, *Experimental dermatology*, 17, 1063-72, **2008**.
- [295] Presland, R.B., Function of Filaggrin and Caspase-14 in Formation and Maintenance of the Epithelial Barrier, *Dermatologica Sinica*, 27, 1-14, **1959**.
- [296] Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Golstein, P., Green, D.R., Hengartner, M., Knight, R.A., Kumar, S., Lipton, S.A., Malorni, W., Nuñez, G., Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009, *Cell death and differentiation*, 16, 3-11, **2009**.
- [297] Hoste, E., Kemperman, P., Devos, M., Denecker, G., Kezic, S., Yau, N., Gilbert, B., Lippens, S., De Groote, P., Roelandt, R., Van Damme, P., Puppels, G., Caspers, P., Vandenabeele, P., and Declercq, W., Caspase-14 is required for filaggrin degradation to natural moisturizing factors in the skin, *The Journal of investigative dermatology*, 131, 2233–41, **2011**.
- [298] Brinkmann, V., Zychlinsky, A., Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin?, *The Journal of cell biology*, 198, 773-83, **2012**.
- [299] Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., Weinrauch, Y., Zychlinsky, A., Neutrophil extracellular traps kill bacteria, *Science*, 303, 1532–5, **2004**.
- [300] Urban, C.F., Ermert, D., Schmid, M., Abu-Abed, U., Goosmann, C., Nacken, W., Brinkmann, V., Jungblut, P.R., Zychlinsky, A., Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*, *PLoS pathogens*, 5, p. e1000639, **2009**.
- [301] Remijnsen, Q., Kuijpers, T.W., Wirawan, E., Lippens, S., Vanden Berghe, T., Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality, *Cell death and differentiation*, 18, 581-8, **2011**.
- [302] Steinberg, B.E., Grinstein, S., Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death, *Science's STKE*, 2007, pe11, **2007**.
- [303] Fuchs, T.A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Weinrauch, Y., Brinkmann, V., Zychlinsky, A., Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps, *The Journal of cell biology*, 176, 231-41, **2007**.
- [304] Remijnsen, Q., Vanden Berghe, T., Wirawan, E., Asselbergh, B., Parthoens, E., De Rycke, R., Noppen, S., Delforge, M., Willems, J., Vandenabeele, P., Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation, *Cell research*, 21, 290-304, **2011**.



- [305] Sperandio, S., Poksay, K., de Belle, I., Lafuente, M.J., Liu, B., Nasir, J., Bredesen, D.E., Paraptosis: mediation by MAP kinases and inhibition by AIP-1/Alix., *Cell death and differentiation*, 11, 1066-75, **2004**.
- [306] Danaila, L., Popescu, I., Pais, V., Riga, D., Riga, S., Pais, E., Apoptosis, paraptosis, necrosis, and cell regeneration in posttraumatic cerebral arteries, *Chirurgia*, 108, 319-24, **2013**.
- [307] Sperandio, S., de Belle, I., Bredesen, D.E., An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 14376-81, **2000**.
- [308] Frisch, S.M., Francis, H., Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis, *The Journal of cell biology*, 124, 619-26, **1994**.
- [309] Chiarugi, P., Giannoni, E., Anoikis: a necessary death program for anchorage-dependent cells, *Biochemical pharmacology*, 76, 1352-64, **2008**.
- [310] Gilmore, A.P., Anoikis, *Cell death and differentiation*, 12 Suppl 2, 1473-7, **2005**.
- [311] Wang, L.H., Molecular signaling regulating anchorage-independent growth of cancer cells, *The Mount Sinai journal of medicine*, 71, 361-7, **2004**.
- [312] Mormone, E., Matarrese, P., Tinari, A., Cannella, M., Maglione, V., Farrace, M.G., Piacentini, M., Frati, L., Malorni, W., Squitieri, F., Genotype-dependent priming to self- and xeno-cannibalism in heterozygous and homozygous lymphoblasts from patients with Huntington's disease, *Journal of neurochemistry*, 98, 1090-9, **2006**.
- [313] Qian, Y., Shi, Y., Natural killer cells go inside: entosis versus cannibalism., *Cell research*, 19, 1320-1, **2009**.
- [314] Overholtzer, M., Mailleux, A.A., Mouneimne, G., Normand, G., Schnitt, S.J., King, R.W., Cibas, E.S., Brugge, J.S., A Nonapoptotic Cell Death Process, Entosis, that Occurs by Cell-in-Cell Invasion, *Cell*, 131, 966-79, **2007**.
- [315] Vaheri, A., Carpén, O., Heiska, L., Helander, T.S., Jääskeläinen, J., Majander-Nordenswan, P., Sainio, M., Timonen, T., Turunen, O., The ezrin protein family: membrane-cytoskeleton interactions and disease associations, *Current opinion in cell biology*, 9, 659-66, **1997**.
- [316] Wang, S., Guo, Z., Xia, P., Liu, T., Wang, J., Li, S., Sun, L., Lu, J., Wen, Q., Zhou, M., Ma, L., Ding, X., Wang, X., Yao, X., Internalization of NK cells into tumor cells requires ezrin and leads to programmed cell-in-cell death, *Cell Research*, 19, 1350-62, **2009**.
- [317] Fais, S., Cannibalism: a way to feed on metastatic tumors, *Cancer letters*, 258, 155-64, **2007**.
- [318] Fink, S.L., Cookson, B.T., Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells, *Infection and immunity*, 73, 1907-16, **2005**.
- [319] Bergsbaken, T., Fink, S.L., Cookson, B.T., Pyroptosis: host cell death and inflammation, *Nature reviews. Microbiology*, 7, 99-109, **2009**.
- [320] Hu, Z.Q., Zhao, W.H., Type 1 interferon-associated necroptosis: a novel mechanism for Salmonella enterica Typhimurium to induce macrophage death, *Cellular & molecular immunology*, 10, 10-2, **2013**.
- [321] Bergsbaken, T., Cookson, B.T., Macrophage activation redirects yersinia-infected host cell death from apoptosis to caspase-1-dependent pyroptosis, *PLoS pathogens*, 3, p. e161, **2007**.

- [322] Özyurt, U.S., Asli, D., and Kaptanoğlu, F., Dermatolojik Terimlerin ve Hastalık Adlarının Kökenleri, *Dermatoz*, 4, 111-3, **2013**.
- [323] Røkke, O., Nesvik, I., Søndena, K., Traumatic and postoperative ischemic liver necrosis: causes, risk factors and treatment, *Digestive surgery*, 17, 595-601, **2000**.
- [324] Bulger, R.E., Renal Damage Caused by Heavy Metals, *Toxicologic Pathology*, 14, 58-65, **1986**.
- [325] Vanlangenakker, N., Vanden Berghe, T., Krysko, D. V, Festjens, N., Vandenabeele, P., Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death, *Current molecular medicine*, 8, 207-20, **2008**.
- [326] Berger, N.A., Poly(ADP-ribose) in the cellular response to DNA damage, *Radiation research*, 101, 4-15, **1985**.
- [327] Ha, H.C., Snyder, S.H., Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 13978-82, **1999**.
- [328] Zong, W.X., Thompson, C.B., Necrotic death as a cell fate, *Genes & development*, 20, 1-15, **2006**.
- [329] Turk, B., Turk, V., Lysosomes as “Suicide Bags” in Cell Death: Myth or Reality?, *Journal of Biological Chemistry*, 284, 21783-7, **2009**.
- [330] Aggarwal, B.B., Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword, *Nature reviews. Immunology*, 3, 745-56, **2003**.
- [331] O'Malley, W.E., Achinstein, B., Shear, M.J., Action of Bacterial Polysaccharide on Tumors. II. Damage of Sarcoma 37 by Serum of Mice Treated With *Serratia Marcescens* Polysaccharide, and Induced Tolerance, *J Natl Cancer Inst*, 29, 1169-75, **1962**.
- [332] Carswell, E.A., Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N., Williamson, B., An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72, 3666–70, **1975**.
- [333] Beutler, B., Greenwald, D., Hulmes, J.D., Chang, M., Pan, Y.-C.E., Mathison, J., Ulevitch, R., Cerami, A., Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin, *Nature*, 316, 552-4, **1985**.
- [334] Caput, D., Beutler, B., Hartog, K., Thayer, R., Brown-Shimer, S., Cerami, A., Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83, 1670–4, **1986**.
- [335] Kieszko, R., Krawczyk, P., Chocholska, S., Dmoszyńska, A., Milanowski, J., TNF-alpha and TNF-beta gene polymorphisms in Polish patients with sarcoidosis. Connection with the susceptibility and prognosis, *Sarcoidosis, vasculitis, and diffuse lung diseases*, 27, 131-7, **2010**.
- [336] Pennica, D., Nedwin, G.E., Hayflick, J.S., Seeburg, P.H., Derynck, R., Palladino, M.A., Kohr, W.J., Aggarwal, B.B., Goeddel, D. V., Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin, *Nature*, 312, 724-9, **1984**.
- [337] Işık G., Demirezen, Ş., Beksaç M.S., Tümör Nekroz Faktör ve Servikal Kanser Bağlantısı, *BİBAD*, 1, 55-61, **2008**.
- [338] Apostolaki, M., Armaka, M., Victoratos, P., Kollias, G., Cellular mechanisms of TNF function in models of inflammation and autoimmunity, *Current directions in autoimmunity*, 11, 1-26, **2010**.

- [339] Chaka, W., Verheul, A.F., Vaishnav, V. V, Cherniak, R., Scharringa, J., Verhoef, J., Snippe, H., Hoepelman, I.M., Cryptococcus neoformans and cryptococcal glucuronoxylomannan, galactoxylomannan, and mannoprotein induce different levels of tumor necrosis factor alpha in human peripheral blood mononuclear cells, *Infection and immunity*, 65, 272-8, **1997**.
- [340] Scheller, J., Chalaris, A., Garbers, C., Rose-John, S., ADAM17: a molecular switch to control inflammation and tissue regeneration, *Trends in immunology*, 32, 3807, **2011**.
- [341] Dong, J., Jimi, E., Zeiss, C., Hayden, M.S., Ghosh, S., Constitutively active NF-kB triggers systemic TNF $\alpha$ -dependent inflammation and localized TNF $\alpha$ -independent inflammatory disease, *Genes&development*, 1709-1717, **2010**.
- [342] Sosna, J., Voigt, S., Mathieu, S., Lange, A., Thon, L., Davarnia, P., Herdegen, T., Linkermann, A., Rittger, A., Chan, F.K.-M., Kabelitz, D., Schütze, S., Adam, D., TNF-induced necroptosis and PARP-1-mediated necrosis represent distinct routes to programmed necrotic cell death, *Cellular and molecular life sciences*, 71, 331-48, **2014**.
- [343] Rath, P.C., Aggarwal, B.B., TNF-induced signaling in apoptosis, *Journal of clinical immunology*, 19, 350–64, **1999**.
- [344] Ehrenschwender, M., Wajant, H., The role of FasL and Fas in health and disease, *Advances in experimental medicine and biology*, 647, 64-93, **2009**.
- [345] Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P., Nagata, S., Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family, *Cell*, 75, 1169-78, **1993**.
- [346] Tanaka, M., Suda, T., Haze, K., Nakamura, N., Sato, K., Kimura, F., Motoyoshi, K., Mizuki, M., Tagawa, S., Ohga, S., Hatake, K., Drummond, A.H., Nagata, S., Fas ligand in human serum, *Nature medicine*, 2, 317-22, **1996**.
- [347] O'Connell, J., Bennett, M.W., O'Sullivan, G.C., Collins, J.K., Shanahan, F., The Fas counterattack: cancer as a site of immune privilege, *Immunology Today*, 20, 46-52, **1999**.
- [348] Song, E., Chen, J., Ouyang, N., Su, F., Wang, M., Heemann, U., Soluble Fas ligand released by colon adenocarcinoma cells induces host lymphocyte apoptosis: an active mode of immune evasion in colon cancer, *British journal of cancer*, 85, 1047-54, **2001**.
- [349] Wiley, S.R., Schooley, K., Smolak, P.J., Din, W.S., Huang, C.P., Nicholl, J.K., Sutherland, G.R., Smith, T.D., Rauch, C., Smith, C.A., Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis, *Immunity*, 3, 673-82, **1995**.
- [350] Pitti, R.M., Marsters, S.A., Ruppert, S., Donahue, C.J., Moore, A., Ashkenazi, A., Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family, *The Journal of biological chemistry*, 271, 12687-90, **1996**.
- [351] Spierings, D.C., Tissue Distribution of the Death Ligand TRAIL and Its Receptors, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 52, 821-31, **2004**.
- [352] Shin, J.N., Park, S.Y., Cha, J.H., Park, J.Y., Lee, B.R., Jung, S.A., Lee, S.T., Yun, C.W., Seol, D.W., Kim, T.H., Generation of a novel proform of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) protein that can be reactivated by matrix metalloproteinases, *Experimental cell research*, 312, 3892-8, **2006**.

- [353] Gura, T., Cancer research: how trail kills cancer cells, but not normal cells, *Science*, 277, 768, **1997**.
- [354] Walczak, H., Miller, R.E., Ariail, K., Gliniak, B., Griffith, T.S., Kubin, M., Chin, W., Jones, J., Woodward, A., Le, T., Smith, C., Smolak, P., Goodwin, R.G., Rauch, C.T., Schuh, J.C., Lynch, D.H., Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo, *Nature medicine*, 5, 157-63, **1999**.
- [355] Lemke, J., von Karstedt, S., Zinngrebe, J., Walczak, H., Getting TRAIL back on track for cancer therapy, *Cell death and differentiation*, 21, 1350-64, **2014**.
- [356] Steinwede, K., Henken, S., Bohling, J., Maus, R., Ueberberg, B., Brumshagen, C., Brincks, E.L., Griffith, T.S., Welte, T., Maus, U.A., TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) exerts therapeutic efficacy for the treatment of pneumococcal pneumonia in mice, *The Journal of experimental medicine*, 209, 1937-52, **2012**.
- [357] Hameed, A.G., Arnold, N.D., Chamberlain, J., Pickworth, J.A., Paiva, C., Dawson, S., Cross, S., Long, L., Zhao, L., Morrell, N.W., Crossman, D.C., Newman, C.M.H., Kiely, D.G., Francis, S.E., Lawrie, A., Inhibition of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) reverses experimental pulmonary hypertension, *The Journal of experimental medicine*, 209, 1919–35, **2012**.
- [358] Hehlhans, T. Pfeffer, K., The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games, *Immunology*, 115, 1-20, **2005**.
- [359] Cabal-Hierro, L. Lazo, P.S., Signal transduction by tumor necrosis factor receptors, *Cellular signalling*, 24, 1297-305, **2012**.
- [360] Brazil, M., TNFR superfamily trimers, *Nature Reviews Drug Discovery*, 5, 20, **2006**.
- [361] Aggarwal, B.B., Gupta, S.C., Kim, J.H., Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey, *Blood*, 119, 651-65, **2012**.
- [362] Cheng, J., Liu, C., Koopman, W.J., Mountz, J.D., Characterization of human Fas gene. Exon/intron organization and promoter region, *Journal of immunology*, 154, 1239-45, **1995**.
- [363] Nagao, M., Nakajima, Y., Hisanaga, M., Kayagaki, N., Kanehiro, H., Aomatsu, Y., Saiho, K., Yagita, H., Yamada, T., Okumura, K., Nakano, H., The alteration of Fas receptor and ligand system in hepatocellular carcinomas: How do hepatoma cells escape from the host immune surveillance in vivo?, *Hepatology*, 30, 413-21, **1999**.
- [364] Orlinick, J.R., Vaishnav, A.K., Elkon, K.B., Structure and function of Fas/Fas ligand, *International reviews of immunology*, 18, 293-308, **1999**.
- [365] Schneider, P., Bodmer, J.L., Holler, N., Mattmann, C., Scuderi, P., Terskikh, A., Peitsch, M.C., Tschopp, J., Characterization of Fas (Apo-1, CD95)-Fas Ligand Interaction, *Journal of Biological Chemistry*, 272, 18827–33, **1997**.
- [366] Scott, F.L., Stec, B., Pop, C., Dobaczewska, M.K., Lee, J.J., Monosov, E., Robinson, H., Salvesen, G.S., Schwarzenbacher, R., Riedl, S.J., The Fas-FADD death domain complex structure unravels signalling by receptor clustering, *Nature*, 457, 1019–22, **2009**.
- [367] Pan, G., An Antagonist Decoy Receptor and a Death Domain-Containing Receptor for TRAIL, *Science*, 277, 815-8, **1997**.

- [368] MacFarlane, M., TRAIL-induced signalling and apoptosis, *Toxicology Letters*, 139, 89-97, **2003**.
- [369] Wang, S., El-Deiry, W.S., TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors, *Oncogene*, 22, 8628-33, **2003**.
- [370] Ashkenazi, A., Dixit, V.M., Apoptosis control by death and decoy receptors, *Current opinion in cell biology*, 11, 255-60, **1999**.
- [371] Thornberry, N.A., Lazebnik, Y., Caspases: enemies within, *Science*, 281, 1312-6, **1998**.
- [372] Barnhart, B.C., Lee, J.C., Alappat, E.C., Peter, M.E., The death effector domain protein family, *Oncogene*, 22, 8634-44, **2003**.
- [373] Aravind, L., Dixit, V.M., Koonin, E. V, The domains of death: evolution of the apoptosis machinery, *Trends in biochemical sciences*, 24, 47-53, **1999**.
- [374] Park, H.H., Lo, Y.C., Lin, S.C., Wang, L., Yang, J.K., Wu, H., The death domain superfamily in intracellular signaling of apoptosis and inflammation, *Annual review of immunology*, 25, 561-86, **2007**.
- [375] Fairbrother, W.J., Gordon, N.C., Humke, E.W., O'Rourke, K.M., Starovasnik, M.A., Yin, J.P., Dixit, V.M., The PYRIN domain: a member of the death domain-fold superfamily, *Protein science*, 10, 1911-8, **2001**.
- [376] Hofmann, K., Bucher, P., Tschopp, J., The CARD domain: a new apoptotic signalling motif, *Trends in biochemical sciences*, 22, 155-6, **1997**.
- [377] Day, C.L., Dupont, C., Lackmann, M., Vaux, D.L., Hinds, M.G., Solution structure and mutagenesis of the caspase recruitment domain (CARD) from Apaf-1, *Cell death and differentiation*, 6, 1125-32, **1999**.
- [378] Hong, G.S. Jung, Y.K., Caspase recruitment domain (CARD) as a bi-functional switch of caspase regulation and NF-kappaB signals, *Journal of biochemistry and molecular biology*, 35, 19-23, **2002**.
- [379] Weber, C.H., Vincenz, C., The death domain superfamily: a tale of two interfaces?, *Trends in biochemical sciences*, 26, 475-81, **2001**.
- [380] Lahm, A., Paradisi, A., Green, D.R., Melino, G., Death fold domain interaction in apoptosis, *Cell death and differentiation*, 10, 10-2, **2003**.
- [381] Valmiki, M.G. Ramos, J.W., Death effector domain-containing proteins, *Cellular and molecular life sciences*, 66, 814-30, **2009**.
- [382] Huang, B., Eberstadt, M., Olejniczak, E.T., Meadows, R.P., Fesik, S.W., NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain, *Nature*, 384, 638-41, **1996**.
- [383] Bertin, J., DiStefano, P.S., The PYRIN domain: a novel motif found in apoptosis and inflammation proteins, *Cell death and differentiation*, 7, 1273-4, **2000**.
- [384] Pop, C., Salvesen, G.S., Human caspases: activation, specificity, and regulation, *The Journal of biological chemistry*, 284, 21777-81, **2009**.
- [385] Chang, H.Y., Yang, X., Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases, *Microbiology and molecular biology reviews*, 64, 821-46, **2000**.
- [386] Lamkanfi, M., Declercq, W., Depuydt, B., Kalai, M., Saelens, X., Vandenabeele, P., The Caspase Family, 3, 1-40, **2002**.
- [387] Sollberger, G., Strittmatter, G.E., Kistowska, M., French, L.E., Beer, H.-D., Caspase-4 is required for activation of inflammasomes, *Journal of immunology*, 188, 1992-2000, **2012**.
- [388] Koenig, U., Eckhart, L., Tschachler, E., Evidence that caspase-13 is not a human but a bovine gene, *Biochemical and biophysical research communications*, 285, 1150-4, **2001**.

- [389] Fuentes-Prior, P., Salvesen, G.S., The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition, *Biochemical journal*, 384, 201-32, **2004**.
- [390] Sakamaki, K., Satou, Y., Caspases: evolutionary aspects of their functions in vertebrates, *Journal of fish biology*, 74, 727-53, **2009**.
- [391] Denecker, G., Ovaere, P., Vandenabeele, P., Declercq, W., Caspase-14 reveals its secrets, *The Journal of cell biology*, 180, 451-8, **2008**.
- [392] Boatright, K.M. Salvesen, G.S., Mechanisms of caspase activation, *Current opinion in cell biology*, 15, 725-31, **2003**.
- [393] Cain, K., Brown, D.G., Langlais, C., Cohen, G.M., Caspase activation involves the formation of the aposome, a large (approximately 700 kDa) caspase-activating complex, *The Journal of biological chemistry*, 274, 22686-92, **1999**.
- [394] Peter, M.E., Krammer, P.H., The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond, *Cell death and differentiation*, 10, 26-35, **2003**.
- [395] Janssens, S., Tinel, A., The PIDDosome, DNA-damage-induced apoptosis and beyond, *Cell death and differentiation*, 19, 13-20, **2012**.
- [396] Chai, J., Wu, Q., Shiozaki, E., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Shi, Y., Crystal structure of a procaspase-7 zymogen: mechanisms of activation and substrate binding, *Cell*, 107, 399-407, **2001**.
- [397] Stennicke, H.R., Deveraux, Q.L., Humke, E.W., Reed, J.C., Dixit, V.M., Salvesen, G.S., Caspase-9 can be activated without proteolytic processing, *The Journal of biological chemistry*, 274, 8359-62, **1999**.
- [398] Stroh, C., Schulze-Osthoff, K., Death by a thousand cuts: an ever increasing list of caspase substrates, *Cell death and differentiation*, 5, 997-1000, **1998**.
- [399] Lüthi, A.U., Martin, S.J., The CASBAH: a searchable database of caspase substrates, *Cell death and differentiation*, 14, 641-50, **2007**.
- [400] Crawford, E.D., Wells, J. A, Caspase substrates and cellular remodeling, *Annual review of biochemistry*, 80, 1055-87, **2011**.
- [401] Crook, N.E., Clem, R.J., Miller, L.K., An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif, *Journal of Virology*, 67, 2168-74, **1993**.
- [402] Richter, B.W., Duckett, C.S., The IAP proteins: caspase inhibitors and beyond, *Science's STKE: signal transduction knowledge environment*, 2000, pe1, **2000**.
- [403] Fulda, S., Inhibitor of Apoptosis Proteins in Pediatric Leukemia: Molecular Pathways and Novel Approaches to Therapy, *Frontiers in oncology*, 4, 3, **2014**.
- [404] Verhagen, A.M. Vaux, D.L., Cell death regulation by the mammalian IAP antagonist Diablo/Smac, *Apoptosis*, 7, 163-6, **2002**.
- [405] Martinez-Ruiz, G., Maldonado, V., Ceballos-Cancino, G., Grajeda, J.P.R., Melendez-Zajgla, J., Role of Smac/DIABLO in cancer progression, *Journal of experimental & clinical cancer research*, 27, 48, **2008**.
- [406] Van Loo, G., Saelens, X., van Gurp, M., MacFarlane, M., Martin, S.J., Vandenabeele, P., The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet, *Cell death and differentiation*, 9, 1031-42, **2002**.
- [407] Safa, A.R., Day, T.W., Wu, C.-H., Cellular FLICE-like inhibitory protein (C-FLIP): a novel target for cancer therapy, *Current cancer drug targets*, 8, 37-46, **2008**.

- [408] Sakamaki, K., Nozaki, M., Kominami, K., Satou, Y., The evolutionary conservation of the core components necessary for the extrinsic apoptotic signaling pathway, in Medaka fish, *BMC genomics*, 8, 141, **2007**.
- [409] Gupta, S., Kim, C., Yel, L., Gollapudi, S., A role of fas-associated death domain (FADD) in increased apoptosis in aged humans, *Journal of clinical immunology*, 24, 24-9, **2004**.
- [410] Chen, N.J., Chio, I.I.C., Lin, W.J., Duncan, G., Chau, H., Katz, D., Huang, H.-L., Pike, K.A., Hao, Z., Su, Y.-W., Yamamoto, K., de Pooter, R.F., Zúñiga-Pflücker, J.C., Wakeham, A., Yeh, W.C., Mak, T.W., Beyond tumor necrosis factor receptor: TRADD signaling in toll-like receptors, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 12429-34, **2008**.
- [411] Öztürk, F., Apopitoz, *İnönü üniversitesi tıp fakültesi dergisi*, 9, 5-8, **2002**.
- [412] Bradley, J.R., Pober, J.S., Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs), *Oncogene*, 20, 6482–91, **2001**.
- [413] Mayer, A., Neupert, W., Lill, R., Translocation of apocytochrome c across the outer membrane of mitochondria, *The Journal of biological chemistry*, 270, 12390–7, **1995**.
- [414] Cai, J., Yang, J., Jones, D., Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1366, 139-149, **1998**.
- [415] Orrenius, S., Zhivotovsky, B., Cardiolipin oxidation sets cytochrome c free, *Nature Chemical Biology*, 1, 188-9, **2005**.
- [416] Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R., and Wang, X., Induction of Apoptotic Program in Cell-Free Extracts: Requirement for dATP and Cytochrome c, *Cell*, 86, 147-157, **1996**.
- [417] Boehning, D., van Rossum, D.B., Patterson, R.L., Snyder, S.H., A peptide inhibitor of cytochrome c/inositol 1,4,5-trisphosphate receptor binding blocks intrinsic and extrinsic cell death pathways, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 1466-71, **2005**.
- [418] Krippner, A., Matsuno-Yagi, A., Gottlieb, R.A., Babior, B.M., Loss of function of cytochrome c in Jurkat cells undergoing fas-mediated apoptosis, *The Journal of biological chemistry*, 271, 21629-36, **1996**.
- [419] Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X., Bid, a Bcl2 Interacting Protein, Mediates Cytochrome c Release from Mitochondria in Response to Activation of Cell Surface Death Receptors, *Cell*, 94, 481-90, **1998**.
- [420] Pegoraro, L., Palumbo, A., Erikson, J., Falda, M., Giovanazzo, B., Emanuel, B.S., Rovera, G., Nowell, P.C., Croce, C.M., A 14;18 and an 8;14 chromosome translocation in a cell line derived from an acute B-cell leukemia, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81, 7166-70, **1984**.
- [421] Bakhshi, A., Jensen, J.P., Goldman, P., Wright, J.J., McBride, O.W., Epstein, A.L., Korsmeyer, S.J., Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18, *Cell*, 41, 899-906, **1985**.
- [422] Chen-Levy, Z., Cleary, M., Membrane topology of the Bcl-2 proto-oncogenic protein demonstrated in vitro, *Journal of Biology and Chemistry* 265, 4929-33, **1990**.

- [423] Burlacu, A., Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 7, 249-57, **-2003**.
- [424] Oltvai, Z.N., Milliman, C.L., Korsmeyer, S.J., Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death., *Cell*, 74, -609-19, **-1993**.
- [425] Kelekar, A., Thompson, C.B., Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis, *Trends in Cell Biology*, 8, 324-30, **1998**.
- [426] Akao, Y., Otsuki, Y., Kataoka, S., Ito, Y., Tsujimoto, Y., Multiple Subcellular Localization of bcl-2: Detection in Nuclear Outer Membrane, Endoplasmic Reticulum Membrane, and Mitochondrial Membranes, *Cancer Res.*, 54, 2468-71, **1994**.
- [427] Portier, B.P., Tagliatela, G., Bcl-2 localized at the nuclear compartment induces apoptosis after transient overexpression, *The Journal of biological chemistry*, 281, 40493-502, **2006**.
- [428] Terrano, D.T., Upreti, M., Cyclin-dependent kinase 1-mediated Bcl-xL/Bcl-2 phosphorylation acts as a functional link coupling mitotic arrest and apoptosis, *Molecular and cellular biology*, 30, 640-56, **2010**.
- [429] Ruvolo, P.P., Deng, X., May, W.S., Phosphorylation of Bcl2 and regulation of apoptosis, *Leukemia*, 15, 515-22, **2001**.
- [430] Shimizu, S., Konishi, A., Kodama, T., Tsujimoto, Y., BH4 domain of antiapoptotic Bcl-2 family members closes voltage-dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 3100-5, **2000**.
- [431] Oltval, Z.N., Milliman, C.L., Korsmeyer, S.J., Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programed cell death, *Cell*, 74, 609–19, **1993**.
- [432] BAX Gene -<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BAX>. (Haziran,2015).
- [433] Vogel, S., Raulf, N., Bregenhorn, S., Biniossek, M.L., Maurer, U., Czabotar, P., Borner, C., Cytosolic Bax: does it require binding proteins to keep its pro-apoptotic activity in check?, *The Journal of biological chemistry*, 287, 9112–27, **2012**.
- [434] Er, E., Oliver, L., Cartron, P.F., Juin, P., Manon, S., Vallette, F.M., Mitochondria as the target of the pro-apoptotic protein Bax, *Biochimica et biophysica acta*, 1757, 1301-11, **2006**.
- [435] Walensky, L.D., Gavathiotis, E., BAX unleashed: the biochemical transformation of an inactive cytosolic monomer into a toxic mitochondrial pore, *Trends in biochemical sciences*, 36, 642-52, **2011**.
- [436] Hsu, Y.T., Youle, R.J., Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations, *The Journal of biological chemistry*, 273, 10777-83, **1998**.
- [437] Tatulian, S.A., Garg, P., Nemecek, K.N., Chen, B., Khaled, A.R., Molecular basis for membrane pore formation by Bax protein carboxyl terminus, *Biochemistry*, 51, 9406-19, **2012**.
- [438] Dewson, G., Kratina, T., Sim, H.W., Puthalakath, H., Adams, J.M., Colman, P.M., Kluck, R.M., To trigger apoptosis, Bak exposes its BH3 domain and homodimerizes via BH3:groove interactions, *Molecular cell*, 30, 369-80, **2008**.



- [439] Zong, W.X., Li, C., Hatzivassiliou, G., Lindsten, T., Yu, Q.C., Yuan, J., Thompson, C.B., Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis, *The Journal of cell biology*, 162, 59-69, **2003**.
- [440] BAK1 Gene - GeneCards | BAK Protein | BAK Antibody. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BAK1> (Haziran,2015).
- [441] Moldoveanu, T., Liu, Q., Tocilj, A., Watson, M., Shore, G., Gehring, K., The X-ray structure of a BAK homodimer reveals an inhibitory zinc binding site., *Molecular cell*, 24, 677-88, **2006**.
- [442] Westphal, D., Kluck, R.M., Dewson, G., Building blocks of the apoptotic pore: how Bax and Bak are activated and oligomerize during apoptosis, *Cell death and differentiation*, 21, 196-205, **2014**.
- [443] Chittenden, T., Flemington, C., Houghton, A.B., Ebb, R.G., Gallo, G.J., Elangovan, B., Chinnadurai, G., Lutz, R.J., A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions, *EMBO Journal*, 14, 5589-96, **1995**.
- [444] Dai, H., Meng, X.W., Lee, S.H., Schneider, P.A., Kaufmann, S.H., Context-dependent Bcl-2/Bak interactions regulate lymphoid cell apoptosis, *The Journal of biological chemistry*, 284, 18311-22, **2009**.
- [445] Connor, L.O., Strasser, A., Reilly, L.A.O., Hausmann, G., Adams, J.M., Cory, S., Huang, D.C.S., Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis, 17, 384-95, **1998**.
- [446] O'Reilly, L. A, Cullen, L., Visvader, J., Lindeman, G.J., Print, C., Bath, M.L., Huang, D.C., Strasser, A, The proapoptotic BH3-only protein bim is expressed in hematopoietic, epithelial, neuronal, and germ cells, *The American journal of pathology*, 157, 449-61, **2000**.
- [447] Tong, T., Ji, J., Jin, S., Li, X., Fan, W., Song, Y., Wang, M., Liu, Z., Wu, M., Zhan, Q., Gadd45a expression induces Bim dissociation from the cytoskeleton and translocation to mitochondria, *Molecular and cellular biology*, 25, 4488–500, **2005**.
- [448] Puthalakath, H., Huang, D.C., O'Reilly, L.A., King, S.M., Strasser, A., The Proapoptotic Activity of the Bcl-2 Family Member Bim Is Regulated by Interaction with the Dynein Motor Complex, *Molecular Cell*, 3, 287-96, **1999**.
- [449] Wang, K., Yin, X.M., Chao, D.T., Milliman, C.L., and Korsmeyer, S.J., BID: a novel BH3 domain-only death agonist, *Genes & Development*, 10, 2859-69, **1996**.
- [450] Chiang, C.W., Kanies, C., Kim, K.W., Fang, W.B., Parkhurst, C., Xie, M., Henry, T., Yang, E., Protein Phosphatase 2A Dephosphorylation of Phosphoserine 112 Plays the Gatekeeper Role for BAD-Mediated Apoptosis, *Molecular and Cellular Biology*, 23, 6350-62, **2003**.
- [451] BAD Gene - GeneCards | BAD Protein | BAD Antibody. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BAD> (Haziran,2015).
- [452] Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., Greenberg, M.E., Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery, *Cell*, 91, 231-41, **1997**.
- [453] Basu, S., Bayoumy, S., Zhang, Y., Lozano, J., Kolesnick, R., BAD enables ceramide to signal apoptosis via Ras and Raf-1, *Journal of Biological Chemistry*, 273, 30419-26, **1998**.
- [454] George, P., P53 How Crucial Is Its Role in Cancer ?, *International journal of current pharmaceutical research*, 3, 19-25, **2011**.

- [455] DeLeo, A.B., Jay, G., Appella, E., Dubois, G.C., Law, L.W., Old, L.J., Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76, 2420-4, **1979**.
- [456] Bai, L., Zhu, W.-G., p53 : Structure, Function and Therapeutic Applications, *Journal of Cancer Molecules*, 2, 141-153, **2006**.
- [457] Middeler, G., Zerf, K., Jenovai, S., Thulig, A., Tschödrich-Rotter, M., Kubitscheck, U., Peters, R., The tumor suppressor p53 is subject to both nuclear import and export, and both are fast, energy-dependent and lectin-inhibited, *Oncogene*, 14, 1407-17, **1997**.
- [458] Liang, S.H. Clarke, M.F., Regulation of p53 localization, *European Journal of Biochemistry*, 268, 2779-83, **2001**.
- [459] Momand, J., Zambetti, G.P., Olson, D.C., George, D., Levine, A.J., The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation, *Cell*, 69, 1237-45, **1992**.
- [460] Amaral, J.D., Xavier, J.M., Steer, C.J., Rodrigues, C.M., The role of p53 in apoptosis, *Discovery medicine*, 9, 145–52, **2010**.
- [461] Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S., Peter, M.E., Apoptosis signaling by death receptors, *European journal of biochemistry FEBS*, 254, 439-59, **1998**.
- [462] Holler, N., Tardivel, A., Kovacsovics-Bankowski, M., Hertig, S., Gaide, O., Martinon, F., Tinel, A., Deperthes, D., Calderara, S., Schulthess, T., Engel, J., Schneider, P., Tschopp, J., Two adjacent trimeric Fas ligands are required for Fas signaling and formation of a death-inducing signaling complex, *Molecular and cellular biology*, 23, 1428-40, **2003**.
- [463] Thomas, L.R., Johnson, R.L., Reed, J.C., and Thorburn, A., The C-terminal Tails of Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL) and Fas Receptors Have Opposing Functions in Fas-associated Death Domain (FADD) Recruitment and Can Regulate Agonist-specific Mechanisms of Receptor Activation, *Journal of Biological Chemistry*, 279, 52479-86, **2004**.
- [464] Carrington, P.E., Sandu, C., Wei, Y., Hill, J.M., Morisawa, G., Huang, T., Gavathiotis, E., Wei, Y., Werner, M.H., The structure of FADD and its mode of interaction with procaspase-8, *Molecular cell*, 22, 599-610, **2006**.
- [465] Wang, L., Yang, J.K., Kabaleeswaran, V., Rice, A.J., Cruz, A.C., Park, A.Y., Yin, Q., Damko, E., Jang, S.B., Raunser, S., Robinson, C. V, Siegel, R.M., Walz, T., Wu, H., The Fas-FADD death domain complex structure reveals the basis of DISC assembly and disease mutations, *Nature structural & molecular biology*, 17, 1324–9, **2010**.
- [466] Schleich, K., Krammer, P.H., Lavrik, I.N., The chains of death: a new view on caspase-8 activation at the DISC, *Cell cycle*, 12, 193-4, **2013**.
- [467] Zhao, Y., Sui, X., Ren, H., From procaspase-8 to caspase-8: revisiting structural functions of caspase-8, *Journal of cellular physiology*, 225, 316-20, **2010**.
- [468] Lavrik, I., Krueger, A., Schmitz, I., Baumann, S., Weyd, H., Krammer, P.H., Kirchhoff, S., The active caspase-8 heterotetramer is formed at the CD95 DISC, *Cell death and differentiation*, 10, 144-5, **2003**.
- [469] Walker, N.P., Talanian, R. V, Brady, K.D., Dang, L.C., Bump, N.J., Ferenz, C.R., Franklin, S., Ghayur, T., Hackett, M.C., Hammill, L.D., Crystal

- structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)<sub>2</sub> homodimer, *Cell*, 78, 343-52, **1994**.
- [470] Lavrik, I.N., Caspases: pharmacological manipulation of cell death, *Journal of Clinical Investigation*, 115, 2665-72, **2005**.
- [471] Ntuli T.M., *Apoptosis and Medicine*, InTech, 2012.
- [472] Miki, K., Eddy, E.M., Tumor Necrosis Factor Receptor 1 Is an ATPase Regulated by Silencer of Death Domain, 22, 2536-43, **2002**.
- [473] Banner, D.W., D'Arcy, A., Janes, W., Gentz, R., Schoenfeld, H.J., Broger, C., Loetscher, H., Lesslauer, W., Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation, *Cell*, 73, 431-45, **1993**.
- [474] Hsu, H., Shu, H.B., Pan, M.G., and Goeddel, D.V, TRADD–TRAF2 and TRADD–FADD Interactions Define Two Distinct TNF Receptor 1 Signal Transduction Pathways, *Cell*, 84, 299-308, **1996**.
- [475] Crow, M.T., The Mitochondrial Death Pathway and Cardiac Myocyte Apoptosis, *Circulation Research*, 95, 957-970, **2004**.
- [476] Kroemer, G., Mitochondrial control of apoptosis: An introduction, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 304, 433-5, **2003**.
- [477] Tait, S.W.G., Green, D.R., Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond, *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11, 621–32, **2010**.
- [478] Landes, T. and Martinou, J.C., Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: The role of mitochondrial fission, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1813, 540-5, **2011**.
- [479] Atagün, G., Apoptoziste Mitokondrinin Rolü Role of Mitochondria in Apoptosis, 4, 49-53, **2011**.
- [480] Chevrollier, A., Loiseau, D., Reynier, P., Stepien, G., Adenine nucleotide translocase 2 is a key mitochondrial protein in cancer metabolism, *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1807, 562-7, **2011**.
- [481] Kushnareva, Y., Andreyev, A.Y., Kuwana, T., Newmeyer, D.D., Bax activation initiates the assembly of a multimeric catalyst that facilitates Bax pore formation in mitochondrial outer membranes, *PLoS biology*, 10, e1001394, **2012**.
- [482] Kuwana, T., Mackey, M.R., Perkins, G., Ellisman, M.H., Latterich, M., Schneider, R., Green, D.R., Newmeyer, D.D., Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane, *Cell*, 111, 331-42, **2002**.
- [483] Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A., and Wang, X., Apaf-1, a Human Protein Homologous to *C. elegans* CED-4, Participates in Cytochrome c–Dependent Activation of Caspase-3, *Cell*, 90, 405–413, **1997**.
- [484] Benedict, M.A., Expression and Functional Analysis of Apaf-1 Isoforms. Extra wd-40 repeat is required for cytochrome c binding and regulated activation of procaspase-9, *Journal of Biological Chemistry*, 275, 8461-8, **2000**.
- [485] Zou, H., Li, Y., Liu, X., Wang, X., An APAF-1{middle dot}Cytochrome c Multimeric Complex Is a Functional Apoptosome That Activates Procaspase-9, *Journal of Biological Chemistry*, 274, 11549-56, **1999**.
- [486] Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D.G., Heuser, J.E., Wang, X., Akey, C.W., Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation, *Molecular cell*, 9, 423-32, **2002**.

- [487] Purring-Koch, C. and McLendon, G., Cytochrome c binding to Apaf-1: the effects of dATP and ionic strength, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 11928-31, **2000**.
- [488] Kim, H.-E., Du, F., Fang, M., and Wang, X., Formation of apoptosome is initiated by cytochrome c-induced dATP hydrolysis and subsequent nucleotide exchange on Apaf-1, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102, 17545-50, **2005**.
- [489] Zhou, P., Chou, J., Olea, R.S., Yuan, J., Wagner, G., Solution structure of Apaf-1 CARD and its interaction with caspase-9 CARD: a structural basis for specific adaptor/caspase interaction, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 11265-70, **1999**.
- [490] Pop, C., Timmer, J., Sperandio, S., Salvesen, G.S., The apoptosome activates caspase-9 by dimerization, *Molecular cell*, 22, 269-75, **2006**.
- [491] Cai, J., Yang, J., Jones, D.P., Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c., *Biochimica et biophysica acta*, 1366, 139-49, **1998**.
- [492] Hejmadi, M., *Introduction to cancer biology*. BoonBooks.com, Frederiksberg, Denmark, **2010**.
- [493] Arnoult, D., Tatischeff, I., Estaquier, J., Girard, M., Sureau, F., Tissier, J.P., Grodet, A., Dellinger, M., Traincard, F., Kahn, A., Ameisen, J.C., Petit, P.X., On the evolutionary conservation of the cell death pathway: mitochondrial release of an apoptosis-inducing factor during Dictyostelium discoideum cell death, *Molecular biology of the cell*, 12, 3016-30, **2001**.
- [494] Candé, C., Vahsen, N., Garrido, C., Kroemer, G., Apoptosis-inducing factor (AIF): caspase-independent after all, *Cell Death and Differentiation*, 11, 591-5, **2004**.
- [495] Masson, D., Zamai, M., Tschopp, J., Identification of granzyme A isolated from cytotoxic T-lymphocyte-granules as one of the proteases encoded by CTL-specific genes, *FEBS Letters*, 208, 84-8, **1986**.
- [496] Chowdhury, D. Lieberman, J., Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death, *Annual review of immunology*, 26, 389-420, **2008**.
- [497] Shresta, S., Graubert, T. A., Thomas, D. A., Raptis, S.Z., Ley, T.J., Granzyme a initiates an alternative pathway for granule-mediated apoptosis, *Immunity*, 10, 595-605, **1999**.
- [498] Cooper, G.M., *The Endoplasmic Reticulum*. Sinauer Associates, **2000**.
- [499] Sano, R., Reed, J.C., ER stress-induced cell death mechanisms, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1833, 3460-70, **2013**.
- [500] Nishitoh, H., CHOP is a multifunctional transcription factor in the ER stress response, *Journal of biochemistry*, 151, 217-9, **2012**.
- [501] Martinez, J.A., Zhang, Z., Svetlov, S.I., Hayes, R.L., Wang, K.K., Lerner, S.F., Calpain and caspase processing of caspase-12 contribute to the ER stress-induced cell death pathway in differentiated PC12 cells, *Apoptosis*, 15, 1480-93, **2010**.
- [502] Martelli, A.M., Zweyer, M., Ochs, R.L., Tazzari, P.L., Tabellini, G., Narducci, P., Bortul, R., Trieste, Á., Umana, M., Nuclear Apoptotic Changes: An Overview, *Journal of cellular biochemistry*, 646, 634-46, **2001**.
- [503] Toné, S., Sugimoto, K., Tanda, K., Suda, T., Uehira, K., Kanouchi, H., Samejima, K., Minatogawa, Y., Earnshaw, W.C., Three distinct stages of apoptotic nuclear condensation revealed by time-lapse imaging,

- biochemical and electron microscopy analysis of cell-free apoptosis, *Experimental cell research*, 313, 3635–44, **2007**.
- [504] Oberhammer, F., Wilson, J.W., Dive, C., Morris, I.D., Hickman, J.A., Wakeling, A.E., Walker, P.R., Sikorska, M., Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and / or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation, *EMBO Journal*, 12, 3679-84, **1993**.
- [505] Kivinen, K., Taimen, P., Kallajoki, M., Silencing of Nuclear Mitotic Apparatus protein (NuMA) accelerates the apoptotic disintegration of the nucleus, *Apoptosis*, 15, 936-45, **2010**.
- [506] Barres, B.A., Hart, I.K., Coles, H.S., Burne, J.F., Voyvodic, J.T., Richardson, W.D., Raff, M.C., Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage, *Cell*, 70, 31-46, **1992**.
- [507] Arends, M.J., Morris, R.G., Wyllie, A.H., Apoptosis. The role of the endonuclease, *The American journal of pathology*, 136, 593-608, **1990**.
- [508] Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Nagata, S., A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD, *Nature*, 391, 43–50, **1998**.
- [509] Aleksandrushkina, N.I., Vanyushin, B.F., Endonucleases and Apoptosis in Animals, *Biochemistry*, 77, 1436-51, **2012**.
- [510] Nagata, S., Nagase, H., Kawane, K., Mukae, N., Fukuyama, H., Degradation of chromosomal DNA during apoptosis, *Cell death and differentiation*, 10, 108-16, **2003**.
- [511] Suzanne, M., Steller, H., Letting go: modification of cell adhesion during apoptosis, *Journal of biology*, 8, 49, **2009**.
- [512] Brancolini, C., Lazarevic, D., Rodriguez, J., Schneider, C., Harbor, C.S., York, N., Biomediche, T., Dismantling Cell–Cell Contacts during Apoptosis Is Coupled to a Caspase-dependent Proteolytic Cleavage of  $\beta$ -Catenin, *Journal of cell biology*, 139, 759-71, **1997**.
- [513] Herren, B., Levkau, B., Raines, E.W., Ross, R., Cleavage of beta-catenin and plakoglobin and shedding of VE-cadherin during endothelial apoptosis: evidence for a role for caspases and metalloproteinases, *Molecular biology of the cell*, 9, 1589–601, **1998**.
- [514] Schmeiser, K. Grand, R.J., The fate of E- and P-cadherin during the early stages of apoptosis, *Cell Death and Differentiation*, 6, 377-86, **1999**.
- [515] Kessler, T., Müller, H.A.J., Cleavage of Armadillo/beta-catenin by the caspase DrICE in Drosophila apoptotic epithelial cells, *BMC developmental biology*, 9, 15, **2009**.
- [516] Steinhilber, U., Weiske, J., Badock, V., Tauber, R., Bommert, K., Huber, O., Cleavage and shedding of E-cadherin after induction of apoptosis, *The Journal of biological chemistry*, 276, 4972-80, **2001**.
- [517] Weiske, J., Schöneberg, T., Schröder, W., Hatzfeld, M., Tauber, R., Huber, O., The Fate of Desmosomal Proteins in Apoptotic Cells, *Journal of Biological Chemistry*, 276, 41175-81, **2001**.
- [518] Burg, M.B. and Ferraris, J.D., Intracellular organic osmolytes: function and regulation, *The Journal of biological chemistry*, 283, 7309-13, **2008**.
- [519] Dubyak, G.R., Ion homeostasis, channels, and transporters: an update on cellular mechanisms, *Advances in physiology education*, 28, 143-54, **2004**.

- [520] Remillard, C. V and Yuan, J.X., Activation of K<sup>2</sup> channels : an essential pathway in programmed cell death, *American journal of physiology, Lung cellular and molecular physiology*, 286, 49-67, **2004**.
- [521] Yu, S.P., Yeh, C.H., Sensi, S.L., Gwag, B.J., Canzoniero, L.M., Farhangrazi, Z.S., Ying, H.S., Tian, M., Dugan, L.L., Choi, D.W., Mediation of neuronal apoptosis by enhancement of outward potassium current, *Science*, 278, 114-7, **1997**.
- [522] Szabò, I., Zoratti, M., Gulbins, E., Contribution of voltage-gated potassium channels to the regulation of apoptosis, *FEBS letters*, 584, 2049-56, **2010**.
- [523] Krick, S., Platoshyn, O., Sweeney, M., Kim, H., Yuan, J.X.-J., Activation of K<sup>+</sup> channels induces apoptosis in vascular smooth muscle cells, *Am J Physiol Cell Physiol*, 280, C970-9, **2001**.
- [524] Okada, Y., Maeno, E., Apoptosis, cell volume regulation and volume-regulatory chloride channels, *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 130, 377-83, **2001**.
- [525] Bortner, C.D., Cidlowski, J. a, Apoptotic volume decrease and the incredible shrinking cell, *Cell death and differentiation*, 9, 1307-10, **2002**.
- [526] Xu, J., Schwarz, W.H., Käs, J.A., Stossel, T.P., Janmey, P.A., Pollard, T.D., Mechanical Properties of Actin Filament Networks Depend on Preparation, Polymerization Conditions, and Storage of Actin Monomers, *Biophysical Journal*, 74, 2731-40, **1998**.
- [527] Desouza, M., Gunning, P.W., Stehn, J.R., The actin cytoskeleton as a sensor and mediator of apoptosis, *Bioarchitecture*, 2, 75-87, **2012**.
- [528] Rosenblatt, J., Raff, M.C., Cramer, L.P., An epithelial cell destined for apoptosis signals its neighbors to extrude it by an actin- and myosin-dependent mechanism, *Current Biology*, 1847-57, **1847**.
- [529] Mashima, T., Naito, M., Tsuruo, T., Caspase-mediated cleavage of cytoskeletal actin plays a positive role in the process of morphological apoptosis, *Oncogene*, 18, 2423-30, **1999**.
- [530] Hall, A.K., Thymosin beta-10 accelerates apoptosis, *Cellular & molecular biology research*, 41, 167-80, **1995**.
- [531] Santin, G., Scietti, L., Veneroni, P., Barni, S., Bernocchi, G., Bottone, M.G., Effects of Cisplatin in neuroblastoma rat cells: damage to cellular organelles, *International journal of cell biology*, 2012, 424072, **2012**.
- [532] Caulín, C., Salvesen, G.S., and Oshima, R.G., Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis, *The Journal of cell biology*, 138, 1379-94, **1997**.
- [533] Byun, Y., Chen, F., Chang, R., Trivedi, M., Green, K.J., and Cryns, V.L., Caspase cleavage of vimentin disrupts intermediate filaments and promotes apoptosis, *Cell death and differentiation*, 8, 443-50, **2001**.
- [534] Goldman, R.D., Gruenbaum, Y., Moir, R.D., Shumaker, D.K., and Spann, T.P., Nuclear lamins: building blocks of nuclear architecture, *Genes & development*, 16, 533-47, **2002**.
- [535] Charras, G.T., Hu, C.K., Coughlin, M., Mitchison, T.J., Reassembly of contractile actin cortex in cell blebs, *The Journal of cell biology*, 175, 477-90, **2006**.
- [536] Sebbagh, M., Renvoizé, C., Hamelin, J., Riché, N., Bertoglio, J., Bréard, J., Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing, *Nature cell biology*, 3, 346-52, **2001**.

- [537] Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J., Receptor Tyrosine Kinases and Ras, *Molecular cell biology*, WH Freeman, **2000**.
- [538] Khalil, R.A., *Rho Kinase in Vascular Smooth Muscle*, Morgan & Claypool Life Sciences, **2010**.
- [539] Street, C.A. Bryan, B.A., Rho kinase proteins--pleiotropic modulators of cell survival and apoptosis, *Anticancer research*, 31, 3645-57, **2011**.
- [540] Coleman, M.L. Olson, M.F., Rho GTPase signalling pathways in the morphological changes associated with apoptosis, *Cell death and differentiation*, 9, 493-504, **2002**.
- [541] Sebbagh, M., Renvoizé, C., Hamelin, J., Riché, N., Bertoglio, J., Bréard, J., Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing, *Nature cell biology*, 3, 346-52, **2001**.
- [542] Mills, J.C., Stone, N.L., Erhardt, J., Pittman, R.N., Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation, *The Journal of cell biology*, 140, 627-36, **1998**.
- [543] Cunningham, C.C., Actin polymerization and intracellular solvent flow in cell surface blebbing, *The Journal of cell biology*, 129, 1589-99, **1995**.
- [544] Tinevez, J.Y., Schulze, U., Salbreux, G., Roensch, J., Joanny, J.F., Paluch, E., Role of cortical tension in bleb growth, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 18581-6, **2009**.
- [545] Bovellan, M., Fritzsche, M., Stevens, C., Charras, G., Death-associated protein kinase (DAPK) and signal transduction: Blebbing in programmed cell death, *FEBS Journal*, 277, 58-65, **2010**.
- [546] Lee, S.-H., Meng, X.W., Flatten, K.S., Loegering, D.A., Kaufmann, S.H., Phosphatidylserine exposure during apoptosis reflects bidirectional trafficking between plasma membrane and cytoplasm, *Cell death and differentiation*, 20, 64-76, **2013**.
- [547] Suzuki, J., Denning, D.P., Imanishi, E., Horvitz, H.R., Nagata, S., Xk-related protein 8 and CED-8 promote phosphatidylserine exposure in apoptotic cells, *Science*, 341, 403-6, **2013**.
- [548] Borisenko, G.G., Matsura, T., Liu, S.X., Tyurin, V.A., Jianfei, J., Serinkan, F.B., Kagan, V.E., Macrophage recognition of externalized phosphatidylserine and phagocytosis of apoptotic Jurkat cells--existence of a threshold, *Archives of biochemistry and biophysics*, 413, 41-52, **2003**.
- [549] Bottone, M.G., Santin, G., Aredia, F., Bernocchi, G., Pellicciari, C., Scovassi, A.I., Morphological Features of Organelles during Apoptosis: An Overview, *Cells*, 2, 294-305, **2013**.
- [550] Cheng, J.P.X., Lane, J.D., Organelle dynamics and membrane trafficking in apoptosis and autophagy, *Histology and histopathology*, 25, 1457-72, **2010**.
- [551] Ogden, C.A., deCathelineau, A., Hoffmann, P.R., Bratton, D., Ghebrehiwet, B., Fadok, V.A., Henson, P.M., C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells, *The Journal of experimental medicine*, 194, 781-95, **2001**.
- [552] Taylor, R.C., Cullen, S.P., Martin, S.J., Apoptosis: controlled demolition at the cellular level, *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9, 231-41, **2008**.
- [553] Sesso, A., Fujiwara, D.T., Jaeger, M., Jaeger, R., Li, T.C., Monteiro, M.M.T., Correa, H., Ferreira, M.A., Schumacher, R.I., Belisário, J., Kachar,

- B., Chen, E.J., Structural elements common to mitosis and apoptosis, *Tissue and Cell*, 31, 357-71, **1999**.
- [554] Mancini, M., Caspase-2 Is Localized at the Golgi Complex and Cleaves Golgin-160 during Apoptosis, *The Journal of Cell Biology*, 149, 603–612, **2000**.
- [555] Chiu, R., Novikov, L., Mukherjee, S., Shields, D., A caspase cleavage fragment of p115 induces fragmentation of the Golgi apparatus and apoptosis, *The Journal of cell biology*, 159, 637-48, **2002**.
- [556] Chwieralski, C.E., Welte, T., Bühling, F., Cathepsin-regulated apoptosis, *Apoptosis*, 11, 143-9, **2006**.
- [557] Kågedal, K., Johansson, A.C., Johansson, U., Heimlich, G., Roberg, K., Wang, N.S., Jürgensmeier, J.M., Ollinger, K., Lysosomal membrane permeabilization during apoptosis--involvement of Bax?, *International journal of experimental pathology*, 86, 309-21, **2005**.
- [558] Perfettini, J.L., Roumier, T., Kroemer, G., Mitochondrial fusion and fission in the control of apoptosis, *Trends in cell biology*, 15, 179-83, **2005**.
- [559] Arnout, D., Mitochondrial fragmentation in apoptosis, *Trends in Cell Biology*, 17, 6-12, **2007**.
- [560] Martelli, A.M., Robuffo, I., Bortul, R., Ochs, R.L., Luchetti, F., Cocco, L., Zweyer, M., Bareggi, R., Falcieri, E., Behavior of nucleolar proteins during the course of apoptosis in camptothecin-treated HL60 cells, *Journal of cellular biochemistry*, 78, 264-77, **2000**.
- [561] Soldani, C., Bottone, M.G., Pellicciari, C., and Scovassi, A. I., Nucleolus disassembly in mitosis and apoptosis: Dynamic redistribution of phosphorylated-c-Myc, fibrillarin and Ki-67, *European Journal of Histochemistry*, 50, 273-80, **2006**.
- [562] Lane, J.D., Allan, V.J., Woodman, P.G., Active relocation of chromatin and endoplasmic reticulum into blebs in late apoptotic cells, *Journal of cell science*, 118, 4059-71, **2005**.
- [563] Dini, L., Lentini, a, Diez, G.D., Rocha, M., Falasca, L., Serafino, L., and Vidal-Vanaclocha, F., Phagocytosis of apoptotic bodies by liver endothelial cells, *Journal of cell science*, 108, 967-73, **1995**.
- [564] Coleman, M.L., Sahai, E.A., Yeo, M., Bosch, M., Dewar, A., and Olson, M.F., Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I, *Nature Cell Biology*, 3, 339-45, **2001**.
- [565] Cotter, T.G., Lennon, S. V, Glynn, J.M., Cells, T., Apoptosis, U., Green, D.R., Microfilament-disrupting Agents Prevent the Formation of Apoptotic Bodies in Tumor Cells Undergoing Apoptosis Microfilament-disrupting Agents Prevent the Formation of Apoptotic Bodies intumor cells undergoing apoptosis, *Cancer research*, 15, 997-1005, **1992**.
- [566] Silva, M.T., Secondary necrosis: the natural outcome of the complete apoptotic program, *FEBS letters*, 584, 4491-9, **2010**.
- [567] Hoepfner, D.J., Hengartner, M.O., Schnabel, R., Engulfment genes cooperate with ced-3 to promote cell death in *Caenorhabditis elegans*, *Nature*, 412, 202-6, **2001**.
- [568] Krysko, D. V, Vanden Berghe, T., D'Herde, K., Vandenabeele, P., Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis, *Methods*, 44, 205-21, **2008**.



- [569] Hochreiter-Hufford, A., Ravichandran, K.S., Clearing the dead: Apoptotic cell sensing, recognition, engulfment, and digestion, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5, 1-20, **2013**.
- [570] Ravichandran, K.S., Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums, *The Journal of experimental medicine*, 207, 1807-17, **2010**.
- [571] Horino, K., Nishiura, H., Ohsako, T., Shibuya, Y., Hiraoka, T., Kitamura, N., Yamamoto, T., A monocyte chemotactic factor, S19 ribosomal protein dimer, in phagocytic clearance of apoptotic cells, *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 78, 603-17, **1998**.
- [572] Knies, U.E., Behrendorf, H.A., Mitchell, C.A., Deutsch, U., Risau, W., Drexler, H.C., and Clauss, M., Regulation of endothelial monocyte-activating polypeptide II release by apoptosis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 12322-7, **1998**.
- [573] Ravichandran, K.S., Beginnings of a Good Apoptotic Meal: The Find-Me and Eat-Me Signaling Pathways, *Immunity*, 35, 445-55, **2011**.
- [574] Truman, L., Ford, C., Pasikowska, M., CX3CL1/fractalkine is released from apoptotic lymphocytes to stimulate macrophage chemotaxis, *Blood*, 112, 5026-36, **2008**.
- [575] Lauber, K., Bohn, E., Kröber, S.M., Xiao, Y., Blumenthal, S.G., Lindemann, R.K., Marini, P., Wiedig, C., Zobywalski, A., Baksh, S., Xu, Y., Autenrieth, I.B., Schulze-Osthoff, K., Belka, C., Stuhler, G., Wesselborg, S., Apoptotic Cells Induce Migration of Phagocytes via Caspase-3-Mediated Release of a Lipid Attraction Signal, *Cell*, 113, 717-30, **2003**.
- [576] Kabarowski, J.H., G2A and LPC: regulatory functions in immunity, *Prostaglandins & other lipid mediators*, 89, 73-81, **2009**.
- [577] Gude, D.R., Alvarez, S.E., Paugh, S.W., Mitra, P., Yu, J., Griffiths, R., Barbour, S.E., Milstien, S., Spiegel, S., Apoptosis induces expression of sphingosine kinase 1 to release sphingosine-1-phosphate as a “come-and-get-me” signal, *FASEB journal*, 22, 2629-38, **2008**.
- [578] Elliott, M.R., Cheken, F.B., Trampont, P.C., Lazarowski, E.R., Kadl, A., Walk, S.F., Park, D., Woodson, R.I., Ostankovich, M., Sharma, P., Lysiak, J.J., Harden, T.K., Leitinger, N., Ravichandran, K.S., Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance, *Nature*, 461, 282-6, **2009**.
- [579] Poon, I.K.H., Chiu, Y.-H., Armstrong, A.J., Kinchen, J.M., Juncadella, I.J., Bayliss, D.A., Ravichandran, K.S., Unexpected link between an antibiotic, pannexin channels and apoptosis, *Nature*, 507, 329-34, **2014**.
- [580] Hanayama, R., Tanaka, M., Miwa, K., Shinohara, A., Iwamatsu, A., Nagata, S., Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes, *Nature*, 417, 182-7, **2002**.
- [581] Miksa, M., Amin, D., Wu, R., Dong, W., Ravikumar, T.S., Wang, P., Fractalkine-Induced MFG-E8 Leads to Enhanced Apoptotic Cell Clearance by Macrophages, *Molecular Medicine*, 13, 553-60, **2007**.
- [582] Arur, S., Uche, U.E., Rezaul, K., Fong, M., Scranton, V., Cowan, A.E., Mohler, W., Han, D.K., Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment, *Developmental cell*, 4, 587-98, **2003**.
- [583] Barclay, A. N. van den Berg, T.K., The Interaction Between Signal Regulatory Protein Alpha (SIRP  $\alpha$ ) and CD47: Structure, Function, and Therapeutic Target, *Annual Review of Immunology*, 32, 25-50, **2014**.

- [584] Grimsley, C. Ravichandran, K.S., Cues for apoptotic cell engulfment: Eat-me, don't eat-me and come-get-me signals, *Trends in Cell Biology*, 13, 648-56, **2003**.
- [585] Tripathi, A. Gupta, C.M., Transbilayer translocation of membrane phosphatidylserine and its role in macrophage invasion in *Leishmania promastigotes*, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 128, 1-9, **2003**.
- [586] De Freitas Balanco, J.M., Costa Moreira, M.E., Bonomo, A., Bozza, P.T., Amarante-Mendes, G., Pirmez, C., and Barcinski, M. A., Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity, *Current Biology*, 11, 1870-73, **2001**.
- [587] Freire-de-Lima, C.G., Nascimento, D.O., Soares, M.B., Bozza, P.T., Castro-Faria-Neto, H.C., de Mello, F.G., DosReis, G. a, and Lopes, M.F., Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages, *Nature*, 403, 199-203, **2000**.
- [588] May, R.C., Machesky, L.M., Phagocytosis and the actin cytoskeleton, *Journal of cell science*, 114, 1061-77, **2001**.
- [589] Kinchen, J.M., Ravichandran, K.S., Journey to the grave: signaling events regulating removal of apoptotic cells, *Journal of cell science*, 120, 2143-49, **2007**.
- [590] Kinchen, J.M., Cabello, J., Klingele, D., Wong, K., Feichtinger, R., Schnabel, H., Schnabel, R., Hengartner, M.O., Two pathways converge at CED-10 to mediate actin rearrangement and corpse removal in *C. elegans*, *Nature*, 434, 93-9, **2005**.
- [591] Erwig, L.P., Henson, P.M., Clearance of apoptotic cells by phagocytes, *Cell death and differentiation*, 15, 243-50, **2008**.
- [592] Orth, J.D. McNiven, M. A., Dynamin at the actin-membrane interface, *Current Opinion in Cell Biology*, 15, 31-9, **2002**.
- [593] Kinchen, J.M., Doukometzidis, K., Almendinger, J., Stergiou, L., Tosello-Tramont, A., Sifri, C.D., Hengartner, M.O., Ravichandran, K.S., A pathway for phagosome maturation during engulfment of apoptotic cells, *Nature cell biology*, 10, 556-66, **2008**.
- [594] Ellson, C.D., Anderson, K.E., Morgan, G., Chilvers, E.R., Lipp, P., Stephens, L.R., Hawkins, P.T., Phosphatidylinositol 3-phosphate is generated in phagosomal membranes, *Current Biology*, 11, 1631-5, **2001**.
- [595] Vieira, O. V, Bucci, C., Harrison, R.E., Trimble, W.S., Lanzetti, L., Gruenberg, J., Schreiber, A.D., Stahl, P.D., Grinstein, S., Modulation of Rab5 and Rab7 recruitment to phagosomes by phosphatidylinositol 3-kinase, *Molecular and cellular biology*, 23, 2501-14, **2003**.
- [596] Purdy, G.E., Owens, R.M., Bennett, L., Russell, D.G., Butcher, B. A., Kinetics of phosphatidylinositol-3-phosphate acquisition differ between IgG bead-containing phagosomes and Mycobacterium tuberculosis-containing phagosomes, *Cellular Microbiology*, 7, 1627-34, **2005**.
- [597] Kinchen, J.M. Ravichandran, K.S., Phagosome maturation: going through the acid test, *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9, 781-95, **2008**.
- [598] Sasaki, A., Nakae, I., Nagasawa, M., Hashimoto, K., Abe, F., Saito, K., Arl8 / ARL-8 functions in apoptotic cell removal by mediating phagolysosome formation in *Caenorhabditis elegans*, *Molecular Biology of the Cell*, 24, 1584-92, **2013**.

- [599] Zimmerli, S., Majeed, M., Gustavsson, M., Stendahl, O., Sanan, D. A., Ernst, J.D., Phagosome-lysosome fusion is a calcium-independent event in macrophages, *Journal of Cell Biology*, 132, 49-61, **1996**.
- [600] Parnaik, R., Raff, M.C., Scholes, J., Differences between the clearance of apoptotic cells by professional and non-professional phagocytes, *Current Biology*, 10, 857-60, **2000**.
- [601] Henson, P.M., Bratton, D.L., Fadok, V. A., Apoptotic cell removal, *Current Biology*, 11, 795-805, **2001**.
- [602] Savill, J., Smith, J., Sarraf, C., Ren, Y., Abbott, F., Rees, A., Glomerular mesangial cells and inflammatory macrophages ingest neutrophils undergoing apoptosis, *Kidney international*, 42, 924-36, **1992**.
- [603] Bennett, M.R., Gibson, D.F., Schwartz, S.M., Tait, J.F., Binding and phagocytosis of apoptotic vascular smooth muscle cells is mediated in part by exposure of phosphatidylserine, *Circulation research*, 77, 1136-42, **1995**.
- [604] Dini, L., Recognizing death: liver phagocytosis of apoptotic cells, *European journal of histochemistry : EJH*, 44, 217-27, **2000**.
- [605] Hess, K.L., Babcock, G.F., Askew, D.S., Cook-Mills, J.M., A novel flow cytometric method for quantifying phagocytosis of apoptotic cells, *Cytometry*, 27, 145-52, **1997**.
- [606] Monks, J., Rosner, D., Geske, F.J., Lehman, L., Hanson, L., Neville, M.C., Fadok, V. A., Epithelial cells as phagocytes: apoptotic epithelial cells are engulfed by mammary alveolar epithelial cells and repress inflammatory mediator release, *Cell death and differentiation*, 12, 107-114, **2005**.
- [607] Sexton, D.W., Blaylock, M.G., and Walsh, G.M., Human alveolar epithelial cells engulf apoptotic eosinophils by means of integrin- and phosphatidylserine receptor-dependent mechanisms: A process upregulated by dexamethasone, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 108, 962-9, **2001**.
- [608] Renehan, A.G., Booth, C., Potten, C.S., What is apoptosis, and why is it important?, *British medical journal*, 322, 1536-8, **2001**.
- [609] Zhang, N., Hartig, H., Dzhagalov, I., Draper, D., He, Y.W., The role of apoptosis in the development and function of T lymphocytes, *Cell research*, 15, 749-69, **2005**.
- [610] Öktem, S., Özhan, M.H., Özol, D., Apoptozisin Önemi, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 19, 55-63, **2001**.
- [611] Potten, C.S. Grant, H.K., The relationship between ionizing radiation-induced apoptosis and stem cells in the small and large intestine, *British journal of cancer*, 78, 993-1003, **1998**.
- [612] Kokawa, K., Shikone, T., Nakano, R., Apoptosis in the human uterine endometrium during the menstrual cycle, *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 81, 4144-7, **1996**.
- [613] Walker, N.I., Bennett, R.E., Kerr, J.F., Cell death by apoptosis during involution of the lactating breast in mice and rats, *The American journal of anatomy*, 185, 19-32, **1989**.
- [614] Narayanan, V., Apoptosis in development and disease of the nervous system: 1. Naturally occurring cell death in the developing nervous system, *Pediatric neurology*, 16, 9-13, **1997**.
- [615] Bozanić, D., Tafra, R., Saraga-Babić, M., Role of apoptosis and mitosis during human eye development, *European journal of cell biology*, 82, 421-9, **2003**.

- [616] Cecconi, F., Alvarez-Bolado, G., Meyer, B.I., Roth, K.A., Gruss, P., Apaf1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development, *Cell*, 94, 727-37, **1998**.
- [617] Pampfer, S. Donnay, I., Apoptosis at the time of embryo implantation in mouse and rat, *Cell death and differentiation*, 6, 533-45, **1999**.
- [618] Koçyiğit, A., Çevik, M., Memeli Reprodüktif Dokuları, Gamet Hücreleri ve Embriyolarında Apoptozis, *Erciyes Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 8, 33-41, **2011**.
- [619] Manczak, M., Anekonda, T.S., Henson, E., Park, B.S., Quinn, J., and Reddy, P.H., Mitochondria are a direct site of A $\beta$  accumulation in Alzheimer's disease neurons: Implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression, *Human Molecular Genetics*, 15, 1437-49, **2006**.
- [620] Ghavami, S., Shojaei, S., Yeganeh, B., Ande, S.R., Jangamreddy, J.R., Mehrpour, M., Christoffersson, J., Chaabane, W., Moghadam, A.R., Kashani, H.H., Hashemi, M., Owji, A.A., Łos, M.J., Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders, *Progress in neurobiology*, 112, 24-49, **2014**.
- [621] Wagreich, H., Lasky, M.A., Elkan, B., Some Biochemical Studies in Retinitis Pigmentosa, *Clinical Chemistry*, 7, 143-8, **1961**.
- [622] Al-Gayyar, M.M. Elsherbiny, N.M., Contribution of TNF- $\alpha$  to the development of retinal neurodegenerative disorders, *European Cytokine Network*, 24, 27-36, **2013**.
- [623] Alimonti, J.B., Mechanisms of CD4+ T lymphocyte cell death in human immunodeficiency virus infection and AIDS, *Journal of General Virology*, 84, 1649-61, **2003**.
- [624] Ahr, B., Robert-Hebmann, V., Devaux, C., Biard-Piechaczyk, M., Apoptosis of uninfected cells induced by HIV envelope glycoproteins, *Retrovirology*, 1, 12, **2004**.
- [625] Krijnen, P.A.J., Simsek, S., Niessen, H.W.M., Apoptosis in diabetes, *Apoptosis*, 14, 1387-8, **2009**.
- [626] Liadis, N., Murakami, K., Eweida, M., Elford, A.R., Sheu, L., Gaisano, H.Y., Hakem, R., Ohashi, P.S., Woo, M., Caspase-3-dependent beta-cell apoptosis in the initiation of autoimmune diabetes mellitus, *Molecular and cellular biology*, 25, 3620-9, **2005**.
- [627] Jurgens, C.A., Toukatly, M.N., Fligner, C.L., Udayasankar, J., Subramanian, S.L., Zraika, S., Aston-Mourney, K., Carr, D.B., Westermarck, P., Westermarck, G.T., Kahn, S.E., Hull, R.L.,  $\beta$ -cell loss and  $\beta$ -cell apoptosis in human type 2 diabetes are related to islet amyloid deposition, *The American journal of pathology*, 178, 2632-40, **2011**.
- [628] Hotchkiss, R.S., Tinsley, K.W., Karl, I.E., Role of apoptotic cell death in sepsis, *Scandinavian journal of infectious diseases*, 35, 585-92, **2003**.
- [629] Lowe, S.W. Lin, A.W., Apoptosis in cancer, *Carcinogenesis*, 21, 485-95, **2000**.
- [630] Matovina, M., Sabol, I., Grubisić, G., Gasperov, N.M., Grce, M., Identification of human papillomavirus type 16 integration sites in high-grade precancerous cervical lesions, *Gynecologic oncology*, 113, 120-7, **2009**.
- [631] Lechner, M.S., Laimins, L.A., Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins, *Journal of virology*, 68, 4262-73, **1994**.

- [632] Liu, Y., Klimberg, V.S., Andrews, N.R., Hicks, C.R., Peng, H., Chiriva-Internati, M., Henry-Tillman, R., Hermonat, P.L., Human papillomavirus DNA is present in a subset of unselected breast cancers, *Journal of human virology*, 4, 329-34, **2001**.
- [633] Cheng, Y.W., Chiou, H.L., Sheu, G.T., Hsieh, L.L., Chen, J.T., Chen, C.Y., Su, J.M., Lee, H., The Association of Human Papillomavirus 16/18 Infection with Lung Cancer among Nonsmoking Taiwanese Women, *Cancer Research*, 61, 2799-2803, **2001**.
- [634] Termine, N., Panzarella, V., Falaschini, S., Russo, A., Matranga, D., Lo Muzio, L., Campisi, G., HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck squamous cell carcinoma biopsies: a meta-analysis (1988-2007), *Annals of oncology*, 19, 1681-90, **2008**.
- [635] Detre, S., Saclani Jotti, G., Dowsett, M., A “quickscore” method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas, *Journal of Clinical Pathology*, 48, 876-8, **1995**.
- [636] Krausova, M. Korinek, V., Wnt signaling in adult intestinal stem cells and cancer, *Cellular signalling*, 26, 570–9, **2014**.
- [637] Arend, R.C., Londoño-Joshi, A.I., Straughn, J.M., Buchsbaum, D.J., The Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in ovarian cancer: a review, *Gynecologic oncology*, 131, 772-9, **2013**.
- [638] Canalis, E., Wnt signalling in osteoporosis: mechanisms and novel therapeutic approaches, *Nature reviews. Endocrinology*, 9, 575-83, **2013**.
- [639] Bordonaro, M., Role of Wnt signaling in the development of type 2 diabetes., *Vitamins and hormones*, 80, 563-81, **2009**.
- [640] Niemann, S., Zhao, C., Pascu, F., Stahl, U., Aulepp, U., Niswander, L., Weber, J.L., Müller, U., Homozygous WNT3 mutation causes tetra-amelia in a large consanguineous family, *American journal of human genetics*, 74, 558-63, **2004**.
- [641] Elmore, S., Apoptosis: a review of programmed cell death, *Toxicologic pathology*, 35, 495-516, **2007**.
- [642] Shinohara, A, Yokoyama, Y., Wan, X., Takahashi, Y., Mori, Y., Takami, T., Shimokawa, K., Tamaya, T., Cytoplasmic/nuclear expression without mutation of exon 3 of the beta-catenin gene is frequent in the development of the neoplasm of the uterine cervix, *Gynecologic oncology*, 82, 450-5, **2001**.
- [643] Üren, A., Fallen, S., Yuan, H., Usubu, A., Schlegel, R., Toretsky, J. a, Activation of the Canonical Wnt Pathway during Genital Keratinocyte Transformation: A Model for Cervical Cancer Progression Activation of the Canonical Wnt Pathway during Genital Keratinocyte Transformation: A Model for Cervical Cancer Progression, *Cancer research*, 65, 6199-206, **2005**.
- [644] Bulut, G., Fallen, S., Beauchamp, E.M., Drebing, L.E., Sun, J., Berry, D.L., Kallakury, B., Crum, C.P., Toretsky, J. A., Schlegel, R., Üren, A., Beta-catenin accelerates human papilloma virus type-16 mediated cervical carcinogenesis in transgenic mice, *PLoS ONE*, 6, e27243, **2011**.
- [645] Holubec, H., Payne, C.M., Bernstein, H., Dvorakova, K., Bernstein, C., Waltmire, C.N., Warneke, J. A, Garewal, H., Assessment of apoptosis by immunohistochemical markers compared to cellular morphology in ex vivo-stressed colonic mucosa, *The journal of histochemistry and cytochemistry*, 53, 229-35, **2005**.

- [646] Cheah, F.C., Hampton, M.B., Darlow, B. A, Winterbourn, C.C., Vissers, M.C.M., Detection of apoptosis by caspase-3 activation in tracheal aspirate neutrophils from premature infants: relationship with NF-kappaB activation, *Journal of leukocyte biology*, 77, 432-7, **2005**.
- [647] Bressenot, A., Marchal, S., Bezdetnaya, L., Garrier, J., Guillemin, F., Plénat, F., Assessment of apoptosis by immunohistochemistry to active caspase-3, active caspase-7, or cleaved PARP in monolayer cells and spheroid and subcutaneous xenografts of human carcinoma, *The journal of histochemistry and cytochemistry*, 57, 289-300, **2009**.
- [648] Yaoxian, W., Hui, Y., Yunyan, Z., Yanqin, L., Xin, G., Xiaoke, W., Emodin induces apoptosis of human cervical cancer hela cells via intrinsic mitochondrial and extrinsic death receptor pathway, *Cancer cell international*, 13, 71, **2013**.
- [649] Kulkarni, G. V., McCulloch, C.A., Serum deprivation induces apoptotic cell death in a subset of Balb/c 3T3 fibroblasts, *Journal of cell science*, 107 1169-79, **1994**.
- [650] Bojarski, C., Weiske, J., Schöneberg, T., Schröder, W., Mankertz, J., Schulzke, J.D., Florian, P., Fromm, M., Tauber, R., Huber, O., The specific fates of tight junction proteins in apoptotic epithelial cells, *Journal of cell science*, 117, 2097-107, **2004**.
- [651] Antico, S., Lionetto, M.G., Giordano, M.E., Caricato, R., Schettino, T., Cell volume regulation and apoptotic volume decrease in rat distal colon superficial enterocytes, *Cellular Physiology and Biochemistry*, 32, 1551-65, **2013**.
- [652] Norman, L.L., Bruges, J., Sengupta, K., Sens, P., Aranda-Espinoza, H., Cell blebbing and membrane area homeostasis in spreading and retracting cells, *Biophysical Journal*, 99, 1726-33, **2010**.
- [653] Zeligs, J.D. Wollman, S.H., Ultrastructure of blebbing and phagocytosis of blebs by hyperplastic thyroid epithelial cells in vivo, *Journal of Cell Biology*, 72, 584-94, **1977**.
- [654] Tinevez, J.Y., Schulze, U., Salbreux, G., Roensch, J., Joanny, J.F., and Paluch, E., Role of cortical tension in bleb growth, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 18581-6, **2009**.
- [655] Soldani, C., Croce, A.C., Bottone, M.G., Fraschini, A., Biggiogera, M., Bottiroli, G., Pellicciari, C., Apoptosis in tumour cells photosensitized with Rose Bengal acetate is induced by multiple organelle photodamage, *Histochemistry and cell biology*, 128, 485-95, **2007**.
- [656] King, K.L., Jewell, C.M., Bortner, C.D., Cidlowski, J.A., 28S ribosome degradation in lymphoid cell apoptosis: evidence for caspase and Bcl-2-dependent and -independent pathways, *Cell death and differentiation*, 7, 994-1001, **2000**.
- [657] Widlak, P., Palyvoda, O., Kumala, S., Garrard, W.T., Modeling apoptotic chromatin condensation in normal cell nuclei. Requirement for intranuclear mobility and actin involvement, *Journal of Biological Chemistry*, 277, 21683-90, **2002**.
- [658] Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Nagata, S., A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD, *Nature*, 391, 43-50, **1998**.

- [659] Yuste, V.J., Sánchez-López, I., Solé, C., Moubarak, R.S., Bayascas, J.R., Dolcet, X., Encinas, M., Susin, S.A., Comella, J.X., The contribution of apoptosis-inducing factor, caspase-activated DNase, and inhibitor of caspase-activated DNase to the nuclear phenotype and DNA degradation during apoptosis, *The Journal of biological chemistry*, 280, 35670-83, **2005**.
- [660] Bălăşescu, E., Rusu, M.C., Vrapciu, A.D., Mirancea, N., Mănoiu, V.S., Stan, C.I., Early onset of podocytes apoptosis - a TEM study in streptozotocin-induced diabetic rats, *Romanian journal of morphology and embryology*, 55, 71-5, **2014**.
- [661] Van Cruchten, S., Van den Broeck, W., Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis, *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 31, 214-23, **2002**.
- [662] Zhan, S.S., Jiang, J.X., Wu, J., Halsted, C., Friedman, S.L., Zern, M.A., Torok, N.J., Phagocytosis of apoptotic bodies by hepatic stellate cells induces NADPH oxidase and is associated with liver fibrosis in vivo, *Hepatology*, 43, 435-43, **2006**.
- [663] Aderem, A., Underhill, D.M., Mechanisms of phagocytosis in macrophages, *Annual review of immunology*, 17, 593-623, **1999**.
- [664] Fadok, V.A., Bratton, D.L., Rose, D.M., Pearson, A., Ezekewitz, R.A., Henson, P.M., A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells, *Nature*, 405, 85-90, **2000**.
- [665] Huber, A.H. Weis, W.I., The Structure of the  $\beta$ -Catenin/E-Cadherin Complex and the Molecular Basis of Diverse Ligand Recognition by  $\beta$ -Catenin, *Cell*, 105, 391-402, **2001**.
- [666] Choi, H.J., Huber, A.H., Weis, W.I., Thermodynamics of beta-catenin-ligand interactions: the roles of the N- and C-terminal tails in modulating binding affinity, *The Journal of biological chemistry*, 281, 1027-38, **2006**.
- [667] Brancolini, C., Lazarevic, D., Rodriguez, J., Schneider, C., Dismantling cell-cell contacts during apoptosis is coupled to a caspase-dependent proteolytic cleavage of beta-catenin, *The Journal of cell biology*, 139, 759-71, **1997**.
- [668] Hunter, I., McGregor, D., Robins, S.P., Caspase-dependent cleavage of cadherins and catenins during osteoblast apoptosis, *Journal of bone and mineral research*, 16, 466-77, **2001**.
- [669] Kessler, T., Müller, H.A.J., Cleavage of Armadillo/beta-catenin by the caspase DrICE in Drosophila apoptotic epithelial cells, *BMC developmental biology*, 9, 15, **2009**.
- [670] Fadare, O., Reddy, H., Wang, J., Hileeto, D., Schwartz, P.E., Zheng, W., E-Cadherin and beta-Catenin expression in early stage cervical carcinoma: a tissue microarray study of 147 cases, *World journal of surgical oncology*, 3, 38, **2005**.
- [671] Cantarella, G., Di Benedetto, G., Pezzino, S., Risuglia, N., Bernardini, R., TRAIL-related neurotoxicity implies interaction with the Wnt pathway in human neuronal cells in vitro, *Journal of neurochemistry*, 105, 1915-23, **2008**.
- [672] Francine, Adle-biassette, H., Madelenat, P., Increased Apoptosis in Cervical Intraepithelial Neoplasia Associated with HIV Infection: Implication of Oncogenic Increased Apoptosis in Cervical Intraepithelial Neoplasia Associated with HIV Infection: Implication of Oncogenic Human Papillomavirus, *Clinical Cancer Research*, 11, 2451-59, **2005**.

- [673] Bonilla-Delgado, J., Bulut, G., Liu, X., Cortes-Malagon, E.M., Schlegel, R., Flores-Maldonado, C., Contreras, R.G., Chung, S.-H., Lambert, P.F., Uren, a., and Gariglio, P., The E6 Oncoprotein from HPV16 Enhances the Canonical Wnt/  $\beta$ -Catenin Pathway in Skin Epidermis In Vivo, *Molecular Cancer Research*, 10, 250-8, **2012**.
- [674] Frost, M., Jarboe, E. A., Orlicky, D., Gianani, R., Thompson, L.C., Enomoto, T., Shroyer, K.R., Immunohistochemical localization of survivin in benign cervical mucosa, cervical dysplasia, and invasive squamous cell carcinoma, *American Journal of Clinical Pathology*, 117, 738-44, **2002**.
- [675] Schlecht, N.F., Platt, R.W., Duarte-Franco, E., Costa, M.C., Sobrinho, J.P., Prado, J.C.M., Ferenczy, A., Rohan, T.E., Villa, L.L., Franco, E.L., Human papillomavirus infection and time to progression and regression of cervical intraepithelial neoplasia, *Journal of the National Cancer Institute*, 95, 1336-43, **2003**.
- [676] ASCUS-LSIL Triage group, Results of a randomized trial on the management of cytology interpretations of atypical squamous cells of undetermined significance, *American journal of obstetrics and gynecology*, 188, 1383-92, **2003**.
- [677] Münger, K., Phelps, W.C., Bubb, V., Howley, P.M., Schlegel, R., The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes, *Journal of virology*, 63, 4417-21, **1989**.
- [678] Scheffner, M., Werness, B.A., Huibregtse, J.M., Levine, A.J., Howley, P.M., The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53, *Cell*, 63, 1129-36, **1990**.
- [679] Chhieng, D., *Cytology and Surgical Pathology of Gynecologic Neoplasms*, Springer Science & Business Media, **2010**.
- [680] Yim, E.K., Park, J.S., The role of HPV E6 and E7 oncoproteins in HPV-associated cervical carcinogenesis, *Cancer research and treatment*, 37, 319-24, **2005**.
- [681] Perez-Plasencia, C., Duenas-Gonzalez, A., Alatorre-Tavera, B., Second hit in cervical carcinogenesis process: involvement of wnt/beta catenin pathway, *International archives of medicine*, 1, 10, **2008**.
- [682] Pérez-Plasencia, C., Vázquez-Ortiz, G., López-Romero, R., Piña-Sanchez, P., Moreno, J., Salcedo, M., Genome wide expression analysis in HPV16 cervical cancer: identification of altered metabolic pathways, *Infectious agents and cancer*, 2, 16, **2007**.
- [683] Rampias, T., Boutati, E., Pectasides, E., Sasaki, C., Kountourakis, P., Weinberger, P., Psyrris, A., Activation of Wnt signaling pathway by human papillomavirus E6 and E7 oncogenes in HPV16-positive oropharyngeal squamous carcinoma cells, *Molecular cancer research*, 8, 433-43, **2010**.
- [684] Chung, M.T., Sytwu, H.K., Yan, M.D., Shih, Y.L., Chang, C.C., Yu, M.H., Chu, T.Y., Lai, H.C., Lin, Y.W., Promoter methylation of SFRPs gene family in cervical cancer, *Gynecologic Oncology*, 112, 301-6, **2009**.
- [685] Chung, M.T., Lai, H.C., Sytwu, H.K., Yan, M.D., Shih, Y.L., Chang, C.C., Yu, M.H., Liu, H.S., Chu, D.W., Lin, Y.W., SFRP1 and SFRP2 suppress the transformation and invasion abilities of cervical cancer cells through Wnt signal pathway, *Gynecologic Oncology*, 112, 646–53, **2009**.



- [686] Tewari, L.C.R., Chaudhary, C. A, Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance : A follow study, *Medical Forces medical journal in India*, 66, 225-227, **2010**.
- [687] Gerlach, J.P., Emmink, B.L., Nojima, H., Kranenburg, O., Maurice, M.M., Wnt signalling induces accumulation of phosphorylated  $\beta$ -catenin in two distinct cytosolic complexes, *Open biology*, 4, 140120, **2014**.
- [688] Hendriksen, J., Jansen, M., Brown, C.M., van der Velde, H., van Ham, M., Galjart, N., Offerhaus, G.J., Fagotto, F., Fornerod, M., Plasma membrane recruitment of dephosphorylated beta-catenin upon activation of the Wnt pathway, *Journal of cell science*, 121, 1793-802, **2008**.
- [689] Saunders, P.A., Cooper, J.A., Roodell, M.M., Schroeder, D.A., Borchert, C.J., Isaacson, A.L., Schendel, M.J., Godfrey, K.G., Cahill, D.R., Walz, A.M., Loegering, R.T., Gaylord, H., Woyno, I.J., Kaluzhny, A.E., Krzyzek, R.A., Mortari, F., Tsang, M., Roff, C.F., Quantification of active caspase 3 in apoptotic cells, *Analytical biochemistry*, 284, 114-24, **2000**.
- [690] Nestal de Moraes, G., Carvalho, É., Maia, R.C., Sternberg, C., Immunodetection of caspase-3 by Western blot using glutaraldehyde, *Analytical biochemistry*, 415, 203-5, **2011**.
- [691] Belloc, F., Belaud-Rotureau, M. A., Lavignolle, V., Bascans, E., Braz-Pereira, E., Durrieu, F., Lacombe, F., Flow cytometry detection of caspase 3 activation in preapoptotic leukemic cells, *Cytometry*, 40, 151-160, **2000**.
- [692] Duan, W.R., Garner, D.S., Williams, S.D., Funckes-Shippy, C.L., Spath, I.S., Blomme, E.A.G., Comparison of immunohistochemistry for activated caspase-3 and cleaved cytokeratin 18 with the TUNEL method for quantification of apoptosis in histological sections of PC-3 subcutaneous xenografts, *The Journal of pathology*, 199, 221-8, **2003**.
- [693] Fox, R. and Aubert, M., Flow cytometric detection of activated caspase-3., *Methods in molecular biology*, 414, 47-56, **2008**.
- [694] Hadjiloucas, I., Gilmore, A.P., Bundred, N.J., and Streuli, C.H., Assessment of apoptosis in human breast tissue using an antibody against the active form of caspase 3: relation to tumour histopathological characteristics, *British journal of cancer*, 85, 1522-6, **2001**.
- [695] Zimmermann, K.C., Bonzon, C., Green, D.R., The machinery of programmed cell death, *Pharmacology & therapeutics*, 92, 57-70, **2001**.
- [696] Leverrier, Y. Ridley, A.J., Apoptosis: caspases orchestrate the ROCK 'n' bleb, *Nature cell biology*, 3, E91-3, **2001**.
- [697] Buendia, B., Santa-Maria, A., Courvalin, J.C., Caspase-dependent proteolysis of integral and peripheral proteins of nuclear membranes and nuclear pore complex proteins during apoptosis, *Journal of cell science*, 112, 1743-53, **1999**.
- [698] Ramuz, O., Isnardon, D., Devilard, E., Charafe-Jauffret, E., Hassoun, J., Birg, F., Xerri, L., Constitutive nuclear localization and initial cytoplasmic apoptotic activation of endogenous caspase-3 evidenced by confocal microscopy, *International Journal of Experimental Pathology*, 84, 75-81, **2003**.
- [699] Gujral, J.S., Bucci, T.J., Farhood, a., Jaeschke, H., Mechanism of cell death during warm hepatic ischemia-reperfusion in rats: Apoptosis or necrosis?, *Hepatology*, 33, 397-405, **2001**.
- [700] Benchoua, A., Couriaud, C., Guégan, C., Tartier, L., Couvert, P., Friocourt, G., Chelly, J., Murcia, J.M. De, Onténiente, B., Active caspase-8

- translocates into the nucleus of apoptotic cells to inactivate poly(ADP-ribose) polymerase-2, *Journal of Biological Chemistry*, 277, 34217-22, **2002**.
- [701] Hakem, R., Hakem, A., Duncan, G.S., Henderson, J.T., Woo, M., Soengas, M.S., Pompa, L. De, Elia, A., Kagi, D., Khoo, W., Potter, J., Yoshida, R., Kaufman, S.A., Lowe, S.W., Penninger, J.M., Mak, T.W., Differential Requirement for Caspase 9 in Apoptotic Pathways In Vivo, *Cell*, 94, 339-52, **1998**.
- [702] Kuida, K., Haydar, T.F., Kuan, C.Y., Gu, Y., Taya, C., Karasuyama, H., Su, M.S.-S., Rakic, P., Flavell, R.A., Reduced Apoptosis and Cytochrome c-Mediated Caspase Activation in Mice Lacking Caspase 9, *Cell*, 94, 325-37, **1998**.
- [703] Chauss, D., Brennan, L.A., Teng, B., Kantorow, M., Lens epithelial cells use phagocytosis as a mechanism to remove apoptotic cellular debris, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 55, 3568, **2014**.
- [704] Reddy, S.M., Hsiao, K.-H.K., Abernethy, V.E., Fan, H., Longacre, A., Lieberthal, W., Rauch, J., Koh, J.S., Levine, J.S., Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages induces novel signaling events leading to cytokine-independent survival and inhibition of proliferation: activation of Akt and inhibition of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2, *Journal of immunology*, 169, 702-13, **2002**.
- [705] Scott, R.S., McMahon, E.J., Pop, S.M., Reap, E.A., Caricchio, R., Cohen, P.L., Earp, H.S., Matsushima, G.K., Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER, *Nature*, 411, 207-11, **2001**.
- [706] Gross, A., Yin, X.-M., Wang, K., Wei, M.C., Jockel, J., Milliman, C., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Korsmeyer, S.J., Caspase Cleaved BID Targets Mitochondria and Is Required for Cytochrome c Release, while BCL-XL Prevents This Release but Not Tumor Necrosis Factor-R1/Fas Death, *Journal of Biological Chemistry*, 274, 1156-63, **1999**.
- [707] Schug, Z.T., Gonzalvez, F., Houtkooper, R.H., Vaz, F.M., Gottlieb, E., BID is cleaved by caspase-8 within a native complex on the mitochondrial membrane, *Cell death and differentiation*, 18, 538-48, **2011**.
- [708] Li, H., Zhu, H., Xu, C., Yuan, J., Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis, *Cell*, 94, 491-501, **1998**.
- [709] Crow, M.T., Mani, K., Nam, Y.J., Kitsis, R.N., The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis, *Circulation Research*, 95, 957-70, **2004**.
- [710] Lu, S., Zhang, B., Wang, Z., Expression of survivin, cyclinD1, p21(WAF1), caspase-3 in cervical cancer and its relation with prognosis, *Journal of Huazhong University of Science and Technology*, 25, 78-81, **2005**.
- [711] Zanotti, S., Fisseler-Eckhoff, A., Mannherz, H.G., Changes in the topological expression of markers of differentiation and apoptosis in defined stages of human cervical dysplasia and carcinoma, *Gynecologic Oncology*, 89, 376-84, **2003**.
- [712] Mirmonsef, P., Zariffard, M.R., Gilbert, D., Makinde, H., Landay, A.L., Spear, G.T., Short-Chain Fatty Acids Induce Pro-Inflammatory Cytokine Production Alone and in Combination with Toll-Like Receptor Ligands, *American Journal of Reproductive Immunology*, 67, 391-400, **2012**.

- [713] Pybus, V., Onderdonk, A.B., Evidence for a commensal, symbiotic relationship between *Gardnerella vaginalis* and *Prevotella bivia* involving ammonia: potential significance for bacterial vaginosis, *The Journal of infectious diseases*, 175, no. 2, pp. 406–13, **Feb. 1997**.
- [714] Lührs, H., Kudlich, T., Neumann, M., Schaubert, J., Melcher, R., Gostner, A., Scheppach, W., Menzel, T.P., Butyrate-enhanced TNF $\alpha$ -induced apoptosis is associated with inhibition of NF- $\kappa$ B, *Anticancer research*, 22, 1561-8, **2002**.
- [715] Zariffard, M.R., Novak, R.M., Lurain, N., Sha, B.E., Graham, P., Spear, G.T., Induction of tumor necrosis factor-  $\alpha$  secretion and toll-like receptor 2 and 4 mRNA expression by genital mucosal fluids from women with bacterial vaginosis, *The Journal of infectious diseases*, 191, 1913-21, **2005**.
- [716] Boccardo, E., Lepique, A.P., Villa, L.L., The role of inflammation in HPV carcinogenesis, *Carcinogenesis*, 31, 1905-12, **2010**.
- [717] Wong, M.H., Huelsken, J., Birchmeier, W., Gordon, J.I., Selection of multipotent stem cells during morphogenesis of small intestinal crypts of Lieberkuhn is perturbed by stimulation of Lef-1/ $\beta$ -catenin signaling, *The Journal of biological chemistry*, 277, 15843-50, **2002**.
- [718] Zeilstra, J., Joosten, S.P.J., Wensveen, F.M., Dessing, M.C., Schütze, D.M., Eldering, E., Spaargaren, M., Pals, S.T., WNT signaling controls expression of pro-apoptotic BOK and BAX in intestinal cancer, *Biochemical and biophysical research communications*, 406, 1–6, **2011**.
- [719] Huang, M., Wang, Y., Sun, D., Zhu, H., Yin, Y., Zhang, W., Yang, S., Quan, L., Bai, J., Wang, S., Chen, Q., Li, S., Xu, N., Identification of genes regulated by Wnt/ $\beta$ -catenin pathway and involved in apoptosis via microarray analysis, *BMC cancer*, 6, 221, **2006**.
- [720] Ioannidis, V., Beermann, F., Clevers, H., Held, W., The  $\beta$ -catenin--TCF-1 pathway ensures CD4(+)CD8(+) thymocyte survival, *Nature immunology*, 2, 691-7, **2001**.
- [721] Pérez-Garijo, A., Shlevkov, E., Morata, G., The role of Dpp and Wg in compensatory proliferation and in the formation of hyperplastic overgrowths caused by apoptotic cells in the Drosophila wing disc, *Development*, 136, 1169-77, **2009**.
- [722] Ryoo, H.D., Bergmann, A., The role of apoptosis-induced proliferation for regeneration and cancer, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4, a008797, **2012**.
- [723] Chera, S., Ghila, L., Dobretz, K., Wenger, Y., Bauer, C., Buzgariu, W., Martinou, J.C., and Galliot, B., Apoptotic cells provide an unexpected source of Wnt3 signaling to drive hydra head regeneration, *Developmental cell*, 17, 279-89, **2009**.
- [724] Li, F., Huang, Q., Chen, J., Peng, Y., Roop, D.R., Bedford, J.S., Li, C.-Y., Apoptotic cells activate the “phoenix rising” pathway to promote wound healing and tissue regeneration, *Science signaling*, 3, 13, **2010**.
- [725] Fan, T.J., Han, L.H., Cong, R.S., Liang, J., Caspase family proteases and apoptosis, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37, 719-27, **2005**.

# ÖZGEÇMİŞ

## Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Hanife Güler DÖNMEZ

Doğum Yeri : Altındağ/Ankara

Medeni Hali : Evli

E-posta : [hnftnr@gmail.com](mailto:hnftnr@gmail.com)

Adresi : Mutlukent mah. 1920. Cad. Makiş sitesi, 46-9 Ümitköy Ankara

## Eğitim

Lise : Cumhuriyet Anadolu Lisesi

Lisans : Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü

Doktora : Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü

## Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce, iyi

## İş Deneyimi

Araştırma görevlisi, 2010-devam ediyor

## Deneyim Alanları

Uygulamalı Sitoloji, Histoloji

## Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

Wnt/Beta-katenin Sinyal Yolu ile Apoptozis İlişkisinin Sitolojik ve İmmünohistokimyasal Yöntemlerle Araştırılması (Proje Numarası: 013D07601001-308), Bütçe: 12,595 TL.

## Tezden Üretilmiş Yayınlar

## Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar