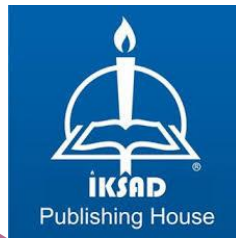


# KANSERİN MOLEKÜLER TEMELLERİ:

ENDOKRİN BOZUCULAR,  
APOPTOZ VE GENETİK  
MEKANİZMALAR



**EDİTÖR:**  
**Dr. ESRA BİLİCİ**



# **KANSERİN MOLEKÜLER TEMELLERİ: ENDOKRİN BOZUCULAR, APOPTOZ VE GENETİK MEKANİZMALAR**

## **Editör**

Dr. Esra BİLİCİ

## **Yazarlar**

Doç. Dr. Funda KARABAĞ

Doç. Dr. Senem AKKOÇ

Dr. Öğr. Üyesi Fatma YILDIZ

Öğr. Gör. Mustafa ATALAN

Ecz. Bahar ERBAY

Ecz. Büşra YAMAK

Ecz. Ceren AKINCI

Ecz. Sevgi KUNDU

Biyolog Bera AŞCI

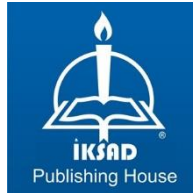
Biyolog Binnaz CANTÜRK

Biyolog Hatice ÖZDEMİR

Biyolog Müge MUŞMULA

Biyokimyager M. İbrahim YAVAN

**DOI:** <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.14235811>



Copyright © 2024 by iksad publishing house  
All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, distributed or  
transmitted in any form or by  
any means, including photocopying, recording or other electronic or mechanical  
methods, without the prior written permission of the publisher, except in the case of  
brief quotations embodied in critical reviews and certain other noncommercial uses  
permitted by copyright law. Institution of Economic Development and Social  
Researches Publications®

(The Licence Number of Publicator: 2014/31220)

TÜRKİYE TR: +90 342 606 06 75

USA: +1 631 685 0 853

E mail: iksadyayinevi@gmail.com

www.iksadyayinevi.com

It is responsibility of the author to abide by the publishing ethics rules.

Iksad Publications – 2024©

**ISBN: 978-625-367-940-8**

Cover Design: Esra BİLİCİ

December / 2024

Ankara / Türkiye

Size = 16x24 cm

## **İÇİNDEKİLER**

**ÖNSÖZ**.....1

### **BÖLÜM 1**

#### **ENDOKRİN BOZUCULAR VE KANSEROJEN ETKİLERİ**

Biyolog Hatice ÖZDEMİR

Doç. Dr. Senem AKKOÇ.....5

### **BÖLÜM 2**

#### **ENDOKRİN BOZUCULARIN ANTİKANSER ETKİLERİ**

Ecz. Büşra YAMAK

Doç. Dr. Senem AKKOÇ.....37

### **BÖLÜM 3**

#### **APOPTOTİK MEKANİZMALAR İLE İLGİLİ GENLER**

Biyolog Müge MUŞMULA

Doç. Dr. Senem AKKOÇ.....61

### **BÖLÜM 4**

#### **KANSERDE APOPTOTİK YOLAKLARIN İNHİBİSYONU**

Dr. Öğr. Üyesi Fatma YILDIZ.....103

### **BÖLÜM 5**

#### **TÜMÖR BASKILAYICI GENLER**

Ecz. Ceren AKINCI.....121

### **BÖLÜM 6**

#### **MALİGN MELANOMA VE G361 HÜCRE HATTI**

Biyolog Bera AŞCI

Doç. Dr. Funda KARABAĞ.....133

### **BÖLÜM 7**

#### **HÜCRE DÖNGÜSÜ İNHİBİTÖRLERİ**

Ecz. Sevgi KUNDU

Doç. Dr. Senem AKKOÇ.....157

## **BÖLÜM 8**

### **MELANOMADA ÖSTROJEN VE ÖSTROJEN RESEPTÖRLERİNİN ROLÜ**

Ecz. Bahar ERBAY

Doç. Dr. Senem AKKOÇ.....187

## **BÖLÜM 9**

### **KASPAZ 3 GEN EKSPRESYONU**

Doç. Dr. Funda KARABAĞ.....207

## **BÖLÜM 10**

### **SİTOTOKSİSİTE ANALİZLERİ VE METOTLARI**

Doktora Öğrencisi Binnaz CANTÜRK

Doç. Dr. Funda KARABAĞ

Biyokimyager M. İbrahim YAVAN.....221

## **BÖLÜM 11**

### **POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONUN TEMELLERİ**

Öğr. Gör. Mustafa ATALAN.....235

## Önsöz

Kanser, günümüzde dünya genelinde ölüm oranlarını en fazla etkileyen hastalıkların başında yer almakta ve sağlık araştırmalarının en yoğun ilgi gösterdiği konulardan birini oluşturmaktadır. Kanser karmaşıklığı, sadece hücresel düzeydeki değişikliklerle sınırlı kalmayıp, organizmanın genetik, epigenetik ve çevresel faktörlerinin etkileşimiyle şekillenir. Son yıllarda kanser araştırmalarında büyük bir ilerleme kaydedilse de, kanserin tam anlamıyla anlaşılması ve tedavisinin geliştirilmesi konusunda hala çözülmesi gereken pek çok bilinmeyen bulunmaktadır.

Bu kitap, kanserin moleküler temellerini derinlemesine incelemeyi amaçlamaktadır. Özellikle üç önemli ve birbirini tamamlayan alan üzerinde yoğunlaşılacaktır: **endokrin bozucular**, **apoptoz** ve **genetik mekanizmalar**. Her biri, kanserin gelişiminde önemli rol oynayan unsurlardır.

**Endokrin Bozucular** (EBK'ler), çevresel kimyasalların hücre içindeki hormon düzenini bozarak kanserin başlangıcına, ilerlemesine ve metastazına katkıda bulunan önemli bir faktördür. Son yıllarda, endokrin sistemine müdahale eden kimyasal maddelerin kansere yol açan etkileri daha fazla vurgulanmaya başlanmış ve bu bağlamda çevresel faktörlerin rolü, genetik faktörlerle birlikte ele alınmıştır. EBK'ler, hücrelerin büyüme, bölünme ve ölüm süreçlerini etkileyerek, kanser hücrelerinin çoğalmasına zemin hazırlar.

**Apoptoz**, hücresel bir ölüm süreci olarak organizmanın sağlıklı dengesini korumasında kritik bir rol oynar. Kanser hücrelerinin, genetik mutasyonlar nedeniyle apoptoz yollarını manipüle etmesi, kanserin ilerleyişinde önemli bir etkiye sahiptir. Kanser hücrelerinin hayatta kalabilmek için apoptozdan kaçınabilmesi, tedaviye direnç geliştirmelerine ve hastalığın daha zor tedavi edilir bir hale gelmesine

yol açar. Bu kitap, apoptozun kanserle ilişkisini detaylı bir şekilde ele alacak ve bu süreçte yer alan moleküler mekanizmaları derinlemesine inceleyecektir.

**Genetik mekanizmalar** ise kanserin temel yapı taşlarından biridir. Genetik mutasyonlar, kanserin başlangıcına neden olabilen en önemli etkenlerden biridir. Bu mekanizmaların ortaya çıkması, genetik mutasyonlar, kromozomal değişiklikler ve gen ekspresyonundaki bozukluklarla ilgilidir. Genetik mühendislikteki ilerlemeler, kanserin moleküler düzeyde anlaşılmasını sağlamış ve kişiselleştirilmiş tedavi stratejilerinin geliştirilmesine olanak tanımıştır. Ancak, kanserin genetik temelleri sadece bir başlangıçtır; epigenetik değişiklikler ve genetik mutasyonlar arasındaki ilişki, hastalığın seyrini anlamada önemli ipuçları sunmaktadır.

Kitapta ele alacağımız bu üç temel alan, kanserin biyolojisinin anlaşılması ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi açısından kritik öneme sahiptir. Amacımız, okuyuculara kanserin moleküler temellerini sadece teorik olarak değil, aynı zamanda klinik uygulamalara nasıl yansıtılabileceğini de göstermek ve güncel bilimsel gelişmeler ışığında bu alanda kapsamlı bir kaynak sunmaktır.

Kanserle mücadele, multidisipliner bir yaklaşım gerektiren zorlu bir alandır ve yalnızca moleküler biyoloji ve genetik değil, aynı zamanda tıp, farmakoloji ve çevre bilimleri gibi pek çok alanın kesişim noktasında çözüm aramaktadır. Bu kitabın, kanserin moleküler düzeydeki karmaşıklığını anlamada okuyuculara değerli bir rehber sunacağına inanıyorum. Bilim dünyasında kanserin önlenmesi, teşhis edilmesi ve tedavi edilmesine yönelik daha fazla bilgi edinme çabaları, sadece bilim insanları için değil, tüm insanlık için büyük bir önem taşımaktadır.

Son olarak, bu eserin kanser araştırmalarına katkı sağlayacak yeni fikirlerin doğmasına ve gelecekteki tedavi stratejilerinin geliştirilmesine ilham vermesini temenni ediyorum.

Dr. Esra BİLİCİ<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Uşak Üniversitesi, Eşme Meslek Yüksek Okulu, Laborant ve Veteriner Sağlık Programı. esra.bilici@usak.edu.tr Orcid ID: 0000-0001-6636-5975





## BÖLÜM 1

### ENDOKRİN BOZUCULAR VE KANSEROJEN ETKİLERİ

Biyolog Hatice ÖZDEMİR<sup>1</sup>

Doç. Dr. Senem AKKOÇ<sup>2,3</sup>

---

<sup>1</sup> Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Anabilim Dalı, Isparta, Türkiye. htcozdemir@gmail.com, Orcid ID: 0009-0003-8174-0317

<sup>2</sup>Süleyman Demirel Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü, Isparta, Türkiye. senemakkoc@sdu.edu.tr, Orcid ID: 0000-0002-1260-9425,

<sup>3</sup>Bahçeşehir Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, İstanbul, Türkiye. senem.akkoc@bau.edu.tr, Orcid ID: 0000-0002-1260-9425



## GİRİŞ

Endokrin bozucular (ED), çevresel kimyasal etkenler arasında öne çıkan ve sağlık üzerindeki etkileri giderek daha fazla gündeme gelen maddelerdir. Bu kimyasal bileşikler, vücutta hormon sistemini taklit ederek veya bozarak birçok sağlık sorununa neden olabilirler. Yirminci yüzyılın başlarına kadar çevresel kimyasalların sağlık üzerindeki etkileri hakkında sınırlı bilgiye sahiptik. Ancak, sentetik kimyasalların yaygınlaşmasıyla birlikte bu maddelerin insan vücudu üzerindeki olumsuz etkileri fark edilmeye başlanmıştır. Özellikle 1930'larda DDT gibi pestisitlerin etkileri gözlemlendiğinde, kimyasal maruziyetin sağlık sorunlarına yol açabileceğinin ilk ipuçları ortaya çıkmıştır (1). 1950'ler ve 1960'larda, ise bilim insanları bu kimyasalların hormonal sistemle etkileşimini daha detaylı bir şekilde incelemeye başlamışlardır. Endokrin sistemin karmaşıklığı ve hormonların vücudumuzdaki rolü üzerine yapılan araştırmalar, belirli kimyasalların hormon düzenleyici işlevleri bozabileceğini göstermeye başlamıştır (2). Bu dönemde, endokrin bozucular olarak bilinen maddelerin sağlık üzerindeki etkileri üzerinde yapılan çalışmalar, bu kimyasalların sadece bireysel sağlık değil, aynı zamanda üreme ve gelişim gibi kritik süreçler üzerinde de etkili olabileceğini ortaya koymuştur.

1980'ler ve 1990'larda, endokrin bozucular üzerine yapılan araştırmalar hız kazanmıştır. Bilim insanları, bu maddelerin genetik yapıyı etkileyebileceğini ve ekosistemlere ciddi zararlar verebileceğini gösteren geniş çaplı çalışmalar yürütmüştür. Uluslararası kuruluşlar, çevresel sağlık politikalarının ve düzenlemelerin güçlendirilmesi gerektiğini vurgulayarak bu bulgulara dikkat çekmişlerdir. Bu dönemde elde edilen veriler, endokrin bozucuların çevre ve insan sağlığı üzerindeki etkilerini anlamada önemli bir dönüm noktası olmuştur. Günümüzde, endokrin bozucuların sağlık üzerindeki etkileri hakkında daha fazla bilgiye sahibiz. Bu kimyasalların maruziyetini sınırlama ve etkilerini azaltma konusunda küresel çapta çabalar sürdürülüyor. Ancak,

bu mücadeleye rağmen, endokrin bozucuların yönetimi ve etkilerinin tam olarak anlaşılması konusunda hâlâ büyük bir yol kat etmemiz gerekmektedir.

Bu bölümde, endokrin bozucuların temel özellikleri, hangi kimyasal bileşenlerin bu gruba dahil olduğu ve bunların nasıl çalıştığı konusunda genel bir bakış sunulacaktır. Ayrıca, endokrin bozucuların kanserle ilişkili etkileri üzerine yapılan mevcut araştırmaların bir özetine yer verilecektir.

Endokrin bozucuların anlaşılması, çevresel ve toplumsal sağlık açısından hayati bir öneme sahiptir. Bu bağlamda, bu bölümdeki bilgiler, hem bireysel hem de toplumsal düzeyde bilinçlenmeyi ve eyleme geçmeyi teşvik etmeyi amaçlamaktadır.

### **Endokrin Sistemi**

Canlı organizmaların hayatta kalabilmesi ve sağlıklı işlevlerini sürdürebilmesi için vücut fonksiyonlarının hassas bir şekilde düzenlenmesi büyük önem taşır. Bu düzenin sağlanabilmesi için, vücut fonksiyonlarının koordine edilmesi, düzgün çalışabilmesi ve homeostazın korunması adına, iç ve dış ortamlardaki değişikliklere uygun yanıtların verilmesi gerekmektedir. Bunu sağlayan sistem ise endokrin sistemidir (3,4). **Endokrin sistemi**, bu düzenin korunmasında kilit rol oynar. **Bunun yanı sıra**, pek çok önemli biyolojik ve fizyolojik fonksiyonda kritik bir rolü vardır (2). Bu bağlamda, endokrin sisteminin başlıca görevleri şöyledir:

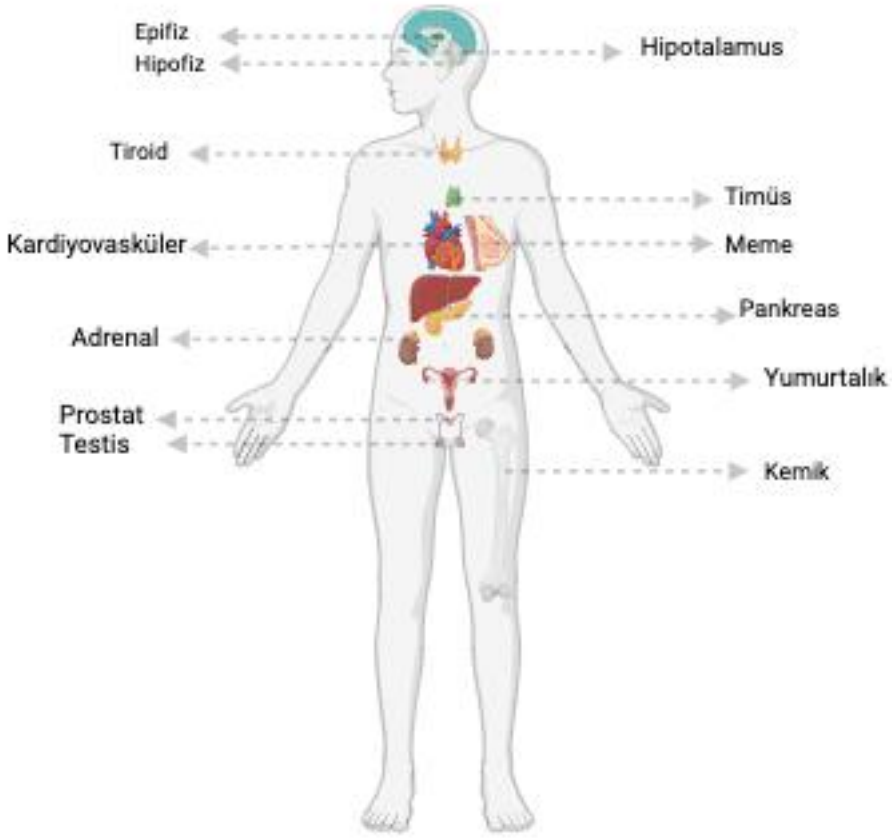
- **Büyüme ve gelişim:** Hipofiz bezinden salgılanan büyüme hormonu (GH) özellikle çocukluk ve ergenlik döneminde dokuların, kemiklerin ve kasların büyümesini ve gelişmesini destekler.
- **Biyolojik ritim:** Uyku öncesinde epifiz bezinden melatonin salınımı artar.

- **Metabolizma:** Tiroid hormonları, vücudun enerji kullanımı ve metabolik hızını kontrol eder.
- **Üreme:** Cinsiyet hormonları, üreme organlarının işlevlerini ve cinsel gelişimini düzenler.
- **Stres Tepkisi:** Adrenal bezler tarafından salgılanan hormonlar, vücudun stresle başa çıkma yeteneğini artırır.
- **Emzirme:** Hipofiz bezi, prolaktin üretir. Prolaktin memede süt üretimini uyarır.
- **Kan şekeri ve besin regülasyonu:** Pankreas, insülin ve glukagon hormonlarını üretir. İnsülin, vücutta kan şekeri seviyesini düşürerek hücrelerin glukozu almasını sağlar; glukagon ise kan şekeri seviyesini yükselterek vücudun enerji dengesini korur.
- **Kalsiyum dengesi:** Kalsiyum çok düştüğünde paratiroid bezi paratiroid hormonunu salgılar.
- **Homeostazis:** Vücudun iç dengesini korumak için Aldosteron ve Vazopressin (ADH) su-elektrolit ve kan basıncı dengesini; insülin ve glukagon ise kan şekeri seviyelerini düzenler (2,3,5,6).

Endokrin sistemi son derece karmaşıktır. Bu sistem tiroid, epifiz, paratiroid ve adrenal bezler gibi özelleşmiş endokrin bezlerin yanı sıra, ikincil endokrin işlevi gören ve çeşitli hormonlar salgılayan yağ (adipoz doku) ve kemik gibi dokulardan oluşur. Ayrıca, mikrobiyal biyomun da “sanal bir endokrin” işlevi gördüğü öne sürülmüştür (6).

Endokrin sistemi, iç salgı bezleri, hormon üreten çeşitli organ ve dokular, hormonlar ve hormon reseptörlerinden oluşmaktadır. Epifiz bezi, tiroid bezi, hipofiz bezi, timüs bezi, paratiroid bezi ve böbrek üstü bezleri gibi endokrin bezler, salgılarını(hormon) doğrudan kan dolaşımına bırakır; bu bezlerin yüksek vasküler yapısı, hormonların hızla dolaşıma salınmasına olanak tanır. Hipotalamus, kalp, mide, kemik, pankreas, yumurtalıklar ve testisler ise hormon salgılayan diğer organ ve

dokulardır (3, 6). Hormonlar, vücudun her yerinde bulunan bu endokrin bezlerin içindeki hücrelerde üretilen doğal kimyasallardır ve her hormon, işlevini yerine getirebilmek için kendi spesifik reseptörüne bağlanır (2). Vücudumuzdaki önemli bezler, dokular Şekil 1 'de ve bunların salgıladığı hormonlar ise Tablo 1'de gösterilmiştir.



**Şekil 1.** Vücudumuzdaki başlıca endokrin bez ve dokular.

**Tablo1.** Hormon salgılayan başlıca bez ve dokular.

Bez ve Dokular	Salgıladıkları Hormonlar
Hipotalamus	CRH, GHRH, TRH, Somatostatin, Dopamin, Vazopressin
Hipofiz	TSH, LH, GH, ATCH, MSH, Vazopressin, Prolaktin, Oksitosin
Epifiz	Melatonin
Timüs	Timopoietin
Tiroid, Paratiroid	PTH, T3, T4, Kalsitonin
Pankreas	İnsülin, Glukagon, Somatostatin
Adrenal bezler	Adrenalin, Kortizol, Aldosteron
Gonadlar	Östrojen, Progesteron, Testesteron

CRH (Kortikotrofin salgılatıcı hormon); GHRH (Büyüme hormonu salgılatıcı hormon); TRH (Tirotrofin salgılatıcı hormon); TSH (Tiroid uyarıcı hormon); LH (Lüteinleştirici hormon); GH (Büyüme hormonu); ATCH (Adrenokortikotrofik hormon); MSH (Melanosituyarıcı hormon); PTH (Paratiroid hormon); T3 (Triiyodotironin); T4 (Tiroksin) (2,6).

### **Endokrin Bozucular**

Modern çevre ve sağlık bilimlerinin karşı karşıya olduğu endokrin bozucular, bireyler ve toplumlar için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Bilim insanları, sağlık kuruluşları ve hükümetler, endokrin bozucuların oluşturduğu tehditlere karşı çeşitli çalışmalar yapmaktadır. Uluslararası bazı kurum ve kuruluşlar ED' ler ve EDC'leri (endokrin bozucu kimyasalları) şöyle tanımlamışlardır. A.B.D. Çevre Koruma Ajansı'na (EPA) göre bir ED, endokrin ve homeostatik sistemleri değiştirerek endojen hormonların sentezine, salgılanmasına, taşınmasına, metabolizmasına, reseptöre bağlanmasına veya ortadan kaldırılmasına

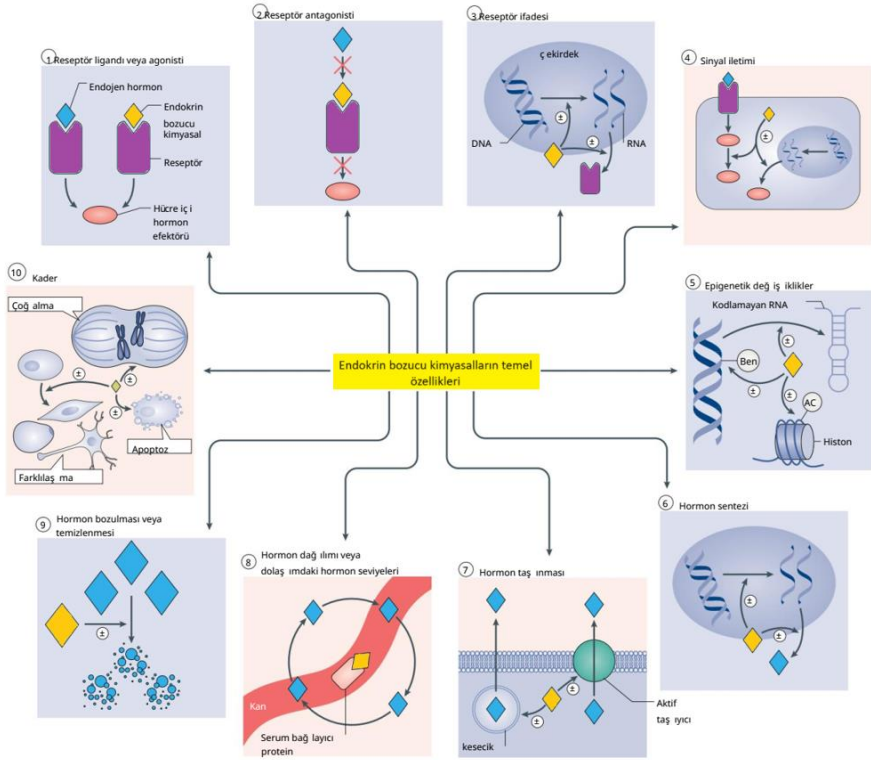


müdahale edebilen ekzojen bir bileşiktir (7). Endokrin bozucu kimyasallar (EDC) ise Endokrin Topluluğu tarafından "hormon etkisinin herhangi bir yönüne müdahale eden eksojen doğal olmayan bir kimyasal veya kimyasalların karışımı" olarak tanımlanmaktadır (2). Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) ise EDC'lerin çoğunun endokrin sisteme bağlanan hormonal reseptörlere müdahale eden ve/veya genomik ekspresyonu düzenleyen yapay maddeler olduğunu öne sürmektedir (8).

1996 yılında, Avrupa Komisyonu, Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü (OECD) ve diğer ulusal yetkililerin desteğiyle, 'Endokrin bozucular üzerindeki etki' başlıklı uluslararası bir toplantı düzenlenmiştir. 'İnsan sağlığı ve yaban hayatı üzerine' başlıklı raporda, epidemiyolojik hususların daha iyi anlaşılması ve DYE'lerin tanımlanması, izlenmesi ve test edilmesi ve taranması için yöntemlerin geliştirilmesi ihtiyaçlarına değinilmiştir (Weybridge Raporu) (5). Avrupa Komisyonu tarafından önerilen DYE kriterlerinin tanımlanması sürecinde, DYE'ler üç eylemi sergilemelidir. Bu üç eylem ise şunlardır;

- (1) Endokrin aktivite;
- (2) Zararlı ve/veya patolojik endokrin aracılı aktivite;
- (3) Maruz kalan kişilerde madde ile endokrin aktivite arasındaki neden sonuç ilişkisi (8).

Ayrıca uluslararası bir uzman grubu ise, DYE tehlikelerini tanımlamaya yardımcı olmak için on maddeden oluşan EDC temel özellikleri (KC'ler) geliştirmişlerdir. Bu temel özellikler Şekil 2 de verilmiştir (9).



**Şekil 2.** Endokrin bozucu kimyasalların temel özellikleri. Oklar, endokrin bozucu kimyasalların (EDC'ler) on spesifik temel özelliğini (KC'ler) tanımlar. ± sembolü ise, bir DVE'nin süreçleri ve etkileri artırabileceğini veya azaltabileceğini göstermektedir (9).

KC1, bir EDC'nin hormon reseptörleriyle etkileşime girebileceğini veya bunları etkinleştirebileceğini belirtmektedir.

KC2, bir EDC'nin hormon reseptörlerini antagonize edebileceğini belirtmektedir.

KC3, bir EDC'nin hormon reseptör ifadesini değiştirebileceğini belirtir.

KC4, bir EDC'nin hormona duyarlı hücrelerde sinyal iletimini (protein veya RNA ekspresyonundaki değişiklikler, translayon sonrası modifikasyonlar ve/veya iyon akışı dahil) değiştirebileceğini belirtir.

KC5, bir EDC'nin hormon üreten veya hormona duyarlı hücrelerde epigenetik modifikasyonları indükleyebileceğini belirtmektedir.

KC6, bir EDC'nin hormon sentezini değiştirebileceğini belirtmektedir.

KC7, bir EDC'nin hücre zarları boyunca hormon taşınmasını değiştirebileceğini belirtmektedir.

KC8, bir EDC'nin hormon dağılımını veya dolaşımdaki hormon seviyelerini değiştirebileceğini belirtmektedir.

KC9, bir EDC'nin hormon metabolizmasını veya klirensini değiştirebileceğini belirtmektedir. KC10, bir EDC'nin hormon üreten veya hormona duyarlı hücrelerin kaderini değiştirebileceğini belirtmektedir. Tasvir edilen DYE eylemleri, etkilerin güçlendirilmesini ve zayıflatılmasını içerir. Ac, asetil grubu; Ben, metil grubu (9).

İkinci Dünya Savaşından bu yana 140.000'den fazla sentetik kimyasal bileşik üretilmiştir. Her yıl yaklaşık binlerce yeni bileşik sentezlenmekte ve çevreye büyük miktarlarda sentetik kimyasal salınmaktadır. Bu kimyasallardan endokrin sistemini etkilediği bilinen veya şüphelenilen yaklaşık 800 kimyasal bulunmaktadır. Avrupa Birliği'ne üye 28 ülkede, 2015 yılında toplam kimyasal üretimin 323 milyon ton olduğu, bunun ise 205 milyon tonunun sağlığa zararlı olduğu kabul edilmiştir (5). Bunun yanında küresel ısınma ve iklim değişikliği, hava, toprak ve su kirliliği, biyolojik çeşitlilik kaybı, enerji sürdürülebilirliğinin sağlanması, nüfus artışı ve kaynakların aşırı tüketimi, atık yönetimi insanlığın karşılaştığı en büyük sorunlardan bazılarıdır. Bu sorunlar geleceğimizi tehlikeye atabilecek ciddi zorluklar ortaya çıkarmaktadır.



**Şekil 3.** Avrupa Birliğinin 28 ülkesinde (AB-28) 2004-2016 yılları arasında sağlığa zararlı olduğu düşünülen kimyasalların üretimi (milyon ton). Tüketim üretimden önemli ölçüde farklı değildir. Ancak ithalat nedeniyle tüketim genellikle üretimden daha fazladır (5).

Şekil 3, 2004 ile 2016 yılları arasında, sağlığa zararlı beş toksisite sınıfına göre kimyasalların üretimini göstermektedir. Üretim hızı, mutlaka çevreye salınım ve insanların maruz kalması anlamına gelmeyebilir ancak yine de insan sağlığı ve çevre üzerindeki potansiyel etkinin bir göstergesidir. Bu üretim trendleri, kimyasallarla ilgili düzenlemelerin önemini daha da artırmaktadır.

Kimyasallarla ilgili düzenleme kanserojenleri, mutajenleri, teratojenleri ve üremeyi bozan maddeleri içerir. EDC'ler, endojen hormonları taklit edebilen veya antagonize edebilen farklı kimyasal sınıfları içeren nispeten yeni bir sınıflandırmayı temsil eder. Düzenlemeleri konusunda bir fikir birliği olmamasına rağmen, EDC'ler AB hukukunda Su Çerçeve Direktifi, Kimyasalların Kaydı, Değerlendirilmesi ve İzni (REACH), Bitki Koruma Ürünleri Yönetmeliği (PPPR) ve Kozmetik Yönetmeliği gibi çeşitli durumlarda ele alınmaktadır (5).

Endokrin aktiviteleri olan sentetik kimyasalların, endüstriyel solventler/yağlayıcılar (poliklorlu bifeniller (PCB'ler), polibromlu bifeniller (PBB'ler)), plastikler (bisfenol A (BPA), plastikleştiriciler (ftalatlar), pestisitler (metoksiklor) gibi birden fazla kullanımı vardır (10).

## **Yaygın Kullanılan Endokrin Bozucular**

### **1. Pestisitler**

**Pestisit**, tarımda ve diğer alanlarda istenmeyen organizmalarla (zararlılarla) mücadele etmek amacıyla kullanılan kimyasal maddelere verilen genel bir isimdir. Zararlılar, bitkiler, hayvanlar, mikroorganizmalar veya diğer organizmalar olabilir. Organizmalardaki biyolojik birikim ve toksisite potansiyelleri nedeniyle insan sağlığı ve ekosistemler için önemli tehditlerdir. Her yıl dünya çapında en az 220.000 kişi pestisit zehirlenmesinden ölmektedir (11).

#### **1.1. Glifosat**

Glifosat, geniş spektrumlu bir herbisittir. 1996'da mısır, soya fasulyesi de dahil olmak üzere glifosata dirençli, genetiği değiştirilmiş "Roundup Ready" mahsullerin geliştirilip piyasaya sürülmesiyle glifosat kullanımı artmıştır. 2015 yılında yapılan bir analiz, glifosata dirençli mahsullerin piyasaya sürülmesinden bu yana küresel glifosat kullanımının neredeyse 15 kat arttığını tahmin etmektedir (12). Daha da önemlisi, glifosat, formülasyonları farklılık gösteren bir dizi glifosat bazlı herbisidin (GBH) aktif bileşenidir. GBH'ler şu anda yaklaşık 140 ülkede kullanılmaktadır. Glifosatın ekosistemde yaygın bir dağılımı vardır kırsal alanlardan alınan hava örneklerinde, toprakta, suda, ev tozunda ve çeşitli gıdalarda tespit edilmiştir (13). Glifosata maruz kalma, deri teması, solunum ve kontamine yiyecek ve su yoluyla meydana gelebilir. 2013-2014'te temsili bir ABD nüfusundan toplanan örneklerin analizinde, katılımcıların %81,2'sinin idrarında tespit edilebilir düzeyde glifosat tespit edilmiştir (13).

KC değerlendirmesine göre, glifosatın endokrin bozucu özellikleri üzerine kapsamlı bir inceleme yapılmış (14) ve bu kimyasalın sekiz temel endokrin bozucu özelliği üzerinde etkili olduğuna dair kanıtlar bulunduğu sonucuna varmışlardır. Bunlar arasında şunlar yer almaktadır: "hormon reseptörleriyle etkileşime girer veya onları aktive eder"; "hormon seviyesi ifadesini değiştirir"; "hormona duyarlı hücrelerde sinyal iletimini değiştirir"; "hormon üreten veya hormona duyarlı hücrelerde epigenetik modifikasyonları indükler"; "hormon sentezini değiştirir"; "hücre zarları boyunca hormon taşınmasını değiştirir"; "hormon dağılımını veya dolaşımdaki hormon düzeylerini değiştirir"; ve "hormon üreten veya hormona duyarlı hücrelerin kaderini değiştirir" (14). Bu kanıtların büyük çoğunluğu glifosatın seks steroidleri (östrojen, androjen ve progesteron) ve tiroid biyolojisi üzerindeki etkilerini tanımlayan çalışmalara odaklanmıştır (2).

## 1.2. DDT (Diklorodifeniltrikloroetan)

DDT, 1940'lı, 1950'li ve 1960'lı yıllarda dünya çapında yaygın olarak kullanılan organoklorlu bir insektisittir. Evlerde, bahçelerde, halka açık yerlerde ve kurumlarda böcek kontrolü için kullanılmaktadır. DDT'nin yaban hayatı üzerindeki zehirliliği ve kalıcılığı nedeniyle 1970'lerde çok sayıda ülke DDT üretimini yasaklamıştır ve pestisit, 2004 yılında Stockholm sözleşmesi kapsamında küresel olarak yasaklanan ilk 12 "kirli düzine" kimyasal arasında yer almıştır (15).

Stockholm Sözleşmesi ise DDT'nin yalnızca vektör kontrolü için kullanılmasına (sıtma, leishmaniasis, dang humması ve Chagas hastalığı gibi insan hastalıklarını bulaştıran böcekleri kontrol etmek için vektör kontrolü) izin verirken (1), izleme raporları Hindistan, Etiyopya ve Gana gibi bazı ülkelerde yasa dışı tarımsal kullanımın hâlâ meydana gelebileceğini göstermektedir (2).

Laboratuvar hayvanları çalışmaları ve insan gözlemleri, DDX (DDT ile ilgili kimyasallar grubu DDX olarak anılır) ile olumsuz

endokrin sağlık sonuçları arasındaki ilişkileri tutarlı bir şekilde göstermektedir ve bu da DDX'i en yaygın olarak tanınan DYE'lerden biri haline getirmektedir. Hayvanlarda ve hücre dizilerinde DDX, tiroid, östrojen, androjen, renin-anjiyotensin, insülin ve nöroendokrin sistemlerini değiştirir. DDX'in bazı etkileri östrojen taklitleri gibidir ve DDX ayrıca vücuttaki androjen (testosteron) yollarına da müdahale edebilir (16). Çoğu DYE gibi, DDX'e maruz kalmanın sağlıkla ilgili sonuçları, gelişmekte olan fetüslerde ve çocuklarda meydana geldiğinde en belirgindir. Çok sayıda çalışma, DDX'e yüksek düzeyde maruz kalmanın insanlar da dahil olmak üzere erkek ve muhtemelen kadın doğurganlığını azalttığını göstermektedir (2).

IARC, Kuzey Amerika ve Avrupa'da yapılan çalışmalarda germ hücreli (sperm üreten hücreler) testis kanseri riskinin arttığına dair kanıtların bulunduğunu ve insanlarda etkili olan kanserojenlerin temel özelliklerine ilişkin güçlü kanıtlardan dolayı DDX'in olası insan kanserojeni olduğunu belirlemiştir (2).

### **1.3 Klorpirifos**

Klorpirifos, onlarca yıldır dünya çapında en yaygın kullanılan tarımsal insektisitlerden biri olan tipik bir OP'dir (organofosforlu pestisit). Tarımda ve ev bahçelerinde düzenli kullanımı toprakta, suda, gıdada ve havada birikmesine neden olabilmektedir (17). Toprakta dört yıla kadar varlığını sürdürebilir. Bir çalışmada, termit kontrolü için uygulanmasından sekiz yıl sonra bile evlerin içindeki havada klorpirifos ölçülmeye devam edilmiştir. Pakistan, Türkiye, Tayland, İran, Senegal ve Şili'de ankete katılan 43 ülkede sebzelerde dikkate değer derecede yüksek kalıntı seviyeleri görülmüştür. Klorpirifosun belirli türlerde besin zincirinde birikebileceğine dair bazı kanıtlar vardır ve küresel taşımacılığın bir sonucu olarak Kuzey Kutbu'ndaki balıklarda dahi ölçülmüştür.

Klorpirifos insanlarda nispeten kısa ömürlüdür (yarısı sırasıyla yaklaşık 24 ve 60 saatte kandan ve yağdan uzaklaştırılır). Ancak klorpirifos vücutta birikmek yerine zarar verebilecek metabolitlere dönüşür. Klorpirifos ve metabolitleri idrarda, anne ve kordon kanında, yeni doğan bebeklerin mekonyumunda (ilk dışkı), anne sütünde, rahim ağzı sıvısında, semende ve bebeklerin saçlarında bulunmuştur (18). Klorpirifosun en güçlü etkileri beyin üzerindedir. ikincisi tiroid hormonundaki değişikliklerle ilişkilendirilmiştir. Kemirgen deneylerinde endokrin adrenal bez ağırlığı ve yapısındaki değişiklikler, sperm sayısının azalması ve östrojen ve testosteron gibi hormon düzeylerinin klorpirifos tarafından endokrin bozulmasına yol açtığı ileri sürülmektedir. Klorpirifos toksisitesi üzerine yapılan bilimsel bir panelde yer alan bilimsel uzmanların çoğunluğu, sonuçta ortaya çıkan nörolojik gelişim kusurları nedeniyle klorpirifosun evde kullanımının yasaklanması gerektiği konusunda hemfikirdir (2, 17). 2020 yılında ise Avrupa Birliği'nde yasaklanmıştır (19).

## 2. Plastikler ve Plastikleştiriciler

Plastik üretmek için EDC de dahil olmak üzere çok çeşitli kimyasallar kullanılmaktadır. Bu plastik üretimi esnasında ise insan sağlığına zararlı zehirli kimyasallar açığa çıkmaktadır. Bir çalışma, plastik üretiminde çalışan kişilerin diğer mesleklerde çalışan kişilere göre daha yüksek düzeyde ftalat maruziyetine sahip olduğunu bulmuştur. Plastik endüstrisindeki kadın işçiler üzerinde yapılan bir araştırma, bu işçilerin ftalatlar, BPA, alev geciktiriciler, ağır metaller ve diğerleri dahil çok sayıda DYE'ye maruz kalabileceğini kaydetmiştir. IPW ile 2021 IPEN (uluslararası kirleticilerin ortadan kaldırılması ağı) raporu yüksek derecede toksik malzemeler de dahil olmak üzere geri dönüştürmememiz gereken bazı malzemeler olduğunu belirtmişlerdir. Bu, Stockholm Sözleşmesinde ve KOK atıklarının geri dönüştürülmesine ilişkin genel yasağında tanınmaktadır (2,5). Okyanus çöplerinin % 90'ından fazlası plastiktir ve orada onlarca yıl veya daha uzun süre kalabilirler (2).



## **2.1. Bisfenoller**

Bisfenol A (BPA), bisfenol (bishidroksiarilalkanlar) grubunda önemli bir bileşiktir (15). Bisfenol A, F, AF ve S dahil olmak üzere endokrin bozucu özelliklere sahip başka birçok bisfenol vardır (20). Yiyecek ve içecekler için polikarbonat (PC) ve polivinil klorür (PVC) plastik) olarak kullanılır. Polikarbonat ve epoksi reçineler küresel BPA pazarının % 70'inden fazlasını oluşturmaktadır (11). BPA'ya birincil maruz kalma yolları mesleki (BPA sentezinde yer alan endüstrideki işçiler), çevresel (kirlenmiş su ortamları, toprak ve atmosfer) ve gıda tüketimi (epoksi reçineler gibi BPA içeren paketlerin kullanımı) yoluyla olmaktadır. Bazı su şişeleri ve konserve yiyeceklerin epoksi bazlı astarları dahil sert plastik gıda kapları olmak üzere çok çeşitli ürünlerde bulunur. Bisfenol içeren diğer yaygın ev ürünleri arasında polikarbonat gözlükler, termal kağıt makbuzları, elektronik cihazlar, plastik su boruları ve tankları, endüstriyel zemin kaplamaları, yapıştırıcılar, harçlar, boyalar, cilalar ve ağız protezleri dahil bazı tıbbi cihazlar yer alır. Böylelikle en çok maruz kalma yutma, soluma ve dermal temas yoluyla gerçekleşmektedir (11). Bisfenoller o kadar çok üründe kullanılıyor ki maruziyetin her yerde ve neredeyse sürekli olduğu düşünülüyor. Çevre kirliliği de yaygın bir sorundur ve BPA hava, toprak ve su da dahil olmak üzere tüm çevresel bölümlerde tespit edilmiştir. Örneğin, 2000 yılında 30 eyaletteki 139 ABD nehrinin %41'inde BPA tespit edilmiştir (2).

BPA, androjen, östrojen ve tiroid reseptörleri gibi membran ve nükleer reseptörlere bağlanarak endokrin bozulmasına, tümörlere, olumsuz üreme sonuçlarına ve nesiller arası etkilere neden olabilir (15). BPA, birkaç farklı mekanizma yoluyla östrojen sinyaline müdahale edebilir. Doğal östrojenlerle karşılaştırıldığında daha zayıf da olsa östrojen reseptörlerine (ER'ler) bağlanabilir ve onları uyarabilir (22). BPA'ya maruz kalma, düşük seviyelerde bile olsa, beyin gibi dokulardaki östrojen reseptörlerinin yoğunluğunu değiştirebilir (20). Östrojen, beyin,

meme bezi ve hatta testis de dahil olmak üzere çok sayıda dokunun gelişiminde ve cinsel farklılaşmasında kritik bir rol oynadığından, gelişim sırasında östrojen aktivitesine müdahale, yaşamın ilerleyen dönemlerinde üreme fonksiyonlarını etkileyen kalıcı değişikliklere neden olabilir. BPA nöro-endokrin yollarda DNA metilasyon değişikliklerine neden olur (22). Yapılan çalışmalar BPA'nın bir endokrin bozucu olduğunu göstermiştir ve sonuçta meme bezi kanseri vakalarında artışa yol açabileceği konusunda hemfikir olunmasına rağmen BPA düzenlemesine ilişkin tartışmalar mevcuttur (23).

Kanada, BPA içeren biberonların satışını ve ithalatını yasaklayan ilk ülke olmuştur. ABD'de ise bazı eyaletler bardaklarda, şişelerde, termoslarda, bebek maması ve bebek maması kaplarında veya termal kağıtlarda BPA kullanımını yasaklamıştır (20). Ayrıca Fransız Ulusal Meclisi ve Senatosu, gıdayla temas eden tüm uygulamalarda BPA kullanımını askıya almıştır. Buna karşılık Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi, BPA'nın her yaştaki tüketicinin sağlığı için bir tehdit olmadığı sonucuna varmıştır. Ayrıca Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi (USFDA), BPA'nın gıdalardaki mevcut seviyelerde güvenli olduğunu beyan etmiştir (15,24).

## 2.2. Ftalatlar

Ftalatlar polivinil klorür'ü (PVC'ler) yumuşatmak, bir ürüne koku eklemek veya plastik ve diğer malzemelerde esnekliği arttırmak için kullanılan yüksek hacimli üretim plastikleştiricilerinin bir sınıfıdır. En çok üretilen etilheksil ftalat (DEHP), diisononil ftalat (DiNP), bütilbenzil ftalat (BBzP), di-bütil ftalatlar (DBP'ler) ve dietil ftalat (DEP) lardır (25).

Ftalatlar kozmetikler, kişisel bakım ürünleri, oyuncaklar, gıdayla temas eden malzemeler, mum, oda spreyleri, deterjan gibi kokulu ürünler, tüpler ve kan torbaları gibi tıbbi ekipmanlar, tekstil ürünleri, inşaat malzemeleri, yapıştırıcılar, boya, balmumu ve farmasötiklerin enterik kaplamaları gibi birçok üründe bulunmaktadır. Çok sayıda

üründe bulunmaları onların “her yerdeki kimyasal” olarak adlandırılmasına sebep olmuştur. Dünya çapında ftalat üretimi 4,9 mt’u aşmaktadır (2).

Bu bileşiklerin plastiklerden gıdaya, suya, toprağa ve havaya kolayca salınması, onları gıda üretim zinciri boyunca birikebilecek küresel çapta çevre kirleticileri haline getirmektedir. Topraktaki PAE'ler bitkiler tarafından alınıp biriktirilebildiği için günlük sebze tüketimi insan sağlığına risk oluşturabilir. Seralarda yetiştirilen sebzelerin açık tarlalara göre daha fazla DBP ve DEHP içerdiği keşfedilmiştir. PAE'ler lipofildir ve genellikle yağlı gıdalarda bulunur (26). Özellikle, bahsedilen bileşiklerin seviyesinin, hayvan veya bitki kökenlerinden mandıra ürünleri (süt, peynir ve tereyağı), şarap ve yağlar gibi işlenmiş gıda maddelerine kadar besin zinciri boyunca arttığı görülmektedir. Dikkat çekici bir şekilde yenilebilir bitkiler, hayvan ve insan kullanımı için birleşik bir tehlike oluşturabilir (11).

PAE'ler ER'ler, PR'ler ve THR'ler ile etkileşime girerek hormon aktivitelerini ve mekanizmalarını olumsuz yönde etkileyebilirler. Sonuç olarak endojen steroid hormonlarla rekabet ederler (11). Bunun sonucunda endokrin ve hormonal düzensizlik, meme, rahim ve cilt kanseri, endometriozis, erken ergenlik, cinsiyet anormallikleri, kısırlık, değişen fetal büyüme, obezite, tip II diyabet, dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu, otizm spektrum bozuklukları,

hepatotoksisite, kardiyotoksisite, alerji, nefrotoksisite oluşabilmektedir (11, 15, 27). AB'de 1999'dan ve ABD'de 2008'den beri bazı ftalatların küçük çocuklara yönelik oyuncak ve ürünlerde kullanımı kısıtlanmıştır. Özellikle DEHP, DBP, DIBP ve BBP, REACH kapsamında üreme için toksik olarak sınıflandırılmış ve ECHA tarafından erkek kısırlığına ve astıma katkıda bulunduğu tespit edilmiştir. DEHP (ve onun birincil metaboliti MEHP), ABD Sağlık ve İnsani Hizmetler Bakanlığı, ABD EPA ve IARC tarafından insanlar için olası kanserojen olarak sınıflandırılmıştır (2). AB Su Çerçeve

Direktifinde DEHP, AB yönetmeliği kapsamında “öncelikli tehlikeli madde” ve “üreme açısından toksik” olarak sınıflandırılmaktadır (11).

### **2.3. Bromlu Alev Geciktiriciler**

Polibromlu difenil eterler (PBDE'ler), 1970'lerden bu yana bilgisayarlar, elektronik ve elektrikli ekipmanlar, tekstiller, köpük mobilyalar, yalıtım köpükleri ve diğer inşaat malzemeleri dahil olmak üzere tüketici ürünlerinde alev geciktirici olarak yaygın şekilde kullanılan kalıcı organik kirleticilerdir (KOK'lar) (5). 1970'lerden itibaren (yasaklanana kadar) çeşitli ürünlerde PBDE'lerin yaygın endüstriyel üretimi ve kullanımı ve eski ürünlerin tekrar tekrar geri dönüştürülmesi, PBDE'lerin çevrede geniş ve sürekli yığınmasına yol açarak insanların sürekli maruz kalmasına yol açmıştır. Bu kimyasallar üretim sırasında veya parçalanıp suya ve toprağa sızabilmektedir. PBDE'ler besin zinciri yoluyla birikebilir ve insanlar için ciddi risk oluşturabilir (11).

Bromlu alev geciktiriciler potansiyel EDC'lerdir çünkü hem orijinal bileşikler hem de bunların parçalanma metabolitleri tiroid ve östrojen hormonu reseptörlerine bağlanabilmektedir. Hamile kadınların tiroid bezinin fonksiyonunu bozabilir ve bu durum, yavrularının nörobiyolojik sağlığı üzerinde ömür boyu etkiler yaratabilir (2).

## **3. Ağır Metaller**

### **3.1. Arsenik**

Arsenik, çoklu oksidasyon durumlarında ve hem inorganik hem de organize formlarda bulunan, doğal olarak oluşan karmaşık bir metaloiddir. Arsenik, çevrede doğal olarak bulunmasının yanı sıra, volkanik aktivite, kayaların aşınması, insan faaliyetleri ve orman yangınları yoluyla aşırı derecede açığa çıkabilir (11). Arjantin, Bangladeş, Kamboçya, Çin, Hindistan, Meksika, Pakistan, Amerika Birleşik Devletleri ve Vietnam da dahil olmak üzere dünya çapında

yeraltı sularında yüksek düzeyde arsenik tespit edilmiştir. 220 milyon insan potansiyel olarak yüksek arsenik konsantrasyonlarına sahip yeraltı sularına maruz kalmaktadır (28). Arsenik doğal yayılımının yanı sıra sabunlar, boyalar, metaller, ilaçlar, yarı iletkenler, böcek ilaçları ve gübrelere içinde de bulunur (11). Arseniğe maruz kalmanın önemli bir kaynağı gıdadır, özellikle de kirliliği toprak ve suda büyüdüğünde toksik metalleri ve metaloidleri absorbe etme konusunda benzersiz bir kapasiteye sahip olan pirinçte kabul edilebilir seviyelerin üzerinde arseniğe rastlanmıştır. Ayrıca endüstriyel faaliyetlerle mesleki arseniğe maruz kalma meydana gelebilir (2). Arseniğin hipotalamik-hipofizadrenal eksen ve glukokortikoid reseptör sinyalinin yanı sıra hipotalamik-hipofizitiroid eksenini, tiroid hormon seviyelerini ve tiroid hormonu biyolojisini değiştirdiği gösterilmiştir (29). Üreme fonksiyonundaki bozulmaların yanı sıra olumsuz gebelik sonuçları ve bebek ölümleriyle ilişkilendirilmiştir (2).

### **3.2. Kurşun**

Kurşun, yer kabuğunda doğal olarak bulunan bir elementtir. Düşük erime noktalı, yüksek derecede dövülebilir bir metal olan kurşun (Pb), antik çağlardan günümüze kadar birçok farklı alanda kullanılmıştır. Kurşun içeren kaynaklar arasında gıda kutuları, su boruları, kirlenmiş içme suyu, kozmetik ürünleri, piller, boya, geleneksel ilaçlar, benzin, Pb sırlı seramikler, sigara dumanı, mücevherler, çocuk oyuncakları yer alır (30). İnsanlar tütün içerek, kurşunla kirlenmiş havayı soluyarak, kirlenmiş gıda, su ve ev tozunu yutarak kurşuna maruz kalmaktadırlar. Kurşunun yarı ömrünün değerleri kemiklerde 20-30 yıl, yumuşak dokuda 40 gün ve kanda 35 gün olarak belirlenmiştir (11). Kurşun Nörobilişsel bozukluklara, Hematolojik bozukluklara (örn. anemi) ve üreme anormalliklerine (örn. değişen üreme hormonları, gecikmiş ergenlik, erken menopoz) neden olmaktadır (30).

### 3.3. Cıva

Cıva toksik bir elementtir. Metalik cıva oda sıcaklığında sıvıdır ve kolayca buharlaşabilir, akciğerlerden emilebilir (%80) ve vücuda dağıtılabılır. Hg, doğal olaylar (volkanik aktivite ve kayaların aşınması gibi) ve insan faaliyetleri (kömür yakıtı enerji santralleri, madencilik süreçleri, metal rafinerileri, elektronik atık geri dönüşüm fabrikaları ve belediye katı atık yakma tesisleri) yoluyla çevreye salınabilir (31). Hg'ye maruz kalmanın birincil kaynakları arasında deniz ürünleri, kümes hayvanları, pestisitler, aşular, tıbbi cihazlar, diş amalgamları, cilt aydınlatıcı kremler, düğme piller, kırık termometreler ve kompakt floresan ampuller yer almaktadır. Hg nörotoksik, mutajenik, teratojenik ve endokrin bozucu etki gösterir (31). Hg, tiroid kanserlerinin oluşumunda rol oynamaktadır (32).

### 3.4. Kadmiyum

Cd, volkanik aktivite, nehir taşımacılığı, erozyon ve hava koşulları gibi doğal aktiviteler veya sigara dumanı, atık yakma, fosil yakıtlar ve metal gibi insan aktiviteleri yoluyla çevreye salınabilir (33). İnsan maruziyeti ise kirlenmiş gıdalar (balık, kabuklu deniz ürünleri, organ etleri, tahıllar, kök sebzeler ve yeşil sebzeler), su boruları ve endüstriyel kirlilik ile olmaktadır.

ATSDR, Cd'yi yedinci en toksik ağır metal olarak ilan etmiştir (31). IARC, Cd ve bileşiklerini Grup 1'e (insanlar için kanserojen) koymuştur (34). Tiroid bezi fonksiyon bozukluklarına sebep olmaktadır (11).

### 4. PFAS

PFAS, hidrofobik ve lipofobik doğal, kimyasal ve biyolojik stabilite gibi önemli özelliklere sahip, insan yapımı kimyasallardır. PFAS çok çeşitli tüketici ürünlerinde kullanılmaktadır ve çevrede

oldukça kalıcıdır, bu nedenle genellikle 'sonsuz kadar kimyasallar' olarak anılmaktadır (15,35).

PFAS, yangınla mücadele köpüklerinin üretimi, gıda ambalajı (yağa dayanıklı gıda ambalajları yapmak için kullanılır ve fast food ambalajlarında), tekstil ve inşaat malzemeleri de dahil olmak üzere çoğu endüstriyel dalda kullanılmaktadır (35). 5.000'den fazla PFAS tanımlanmıştır. PFAS her yerde bulunan su kirletici maddelerdir ve insanlar içme suları yoluyla, cilt temasıyla ve gıdayla temas eden bu malzemeler sebebiyle PFAS'a maruz kalırlar (2).

PFAS östrojen ve testosteron gibi hormonların üretimini, taşınmasını ve parçalanmasını bozabilir. Ayrıca PFAS, plazma proteinlerine bağlanarak daha sonra plasenta ve anne sütü yoluyla yavrulara aktarılabilir. Kandaki PFAS seviyeleri, estradiol, progesteron, seks hormonu bağlayıcı globulin, folikül uyarıcı hormon (FSH) ve testosteronun serum seviyelerinde azalma ile ilişkilendirilmiştir. PFAS'a maruz kalma, insanlarda ve diğer hayvanlarda artan tümör vakaları, endokrin bozulma, bozulmuş nörogelişim ve olumsuz üreme sonuçları ile ilişkilendirilmiştir (15).

## **5. Dioksinler**

Sanayileşmeden önce jeolojik süreçler ve doğal yanma nedeniyle düşük konsantrasyonlarda bulunan dioksinlerin, sanayileşmeden sonra kentsel veya evsel atıkların yakılması, tıbbi atıklar, depolama alanı, orman ve tarım alanları yangınları en büyük dioksin salınım kaynaklarıdır (37). Bilinen en zehirli kimyasallardan biridir ve Stockholm Sözleşmesi kapsamında yasaklanan orijinal “kirli düzine” kimyasallar arasında yer almaktadırlar (2). Yüksek hidrofobiklik nedeniyle dioksinler yağ dokusunda depolanma eğilimindedir ve böylelikle besin zincirine girdikçe seviyeleri artar ve sonunda kirli yiyecekleri yiyerek insan vücuduna girerler (38). USEPA'ya göre, insanların günlük yaşamda dioksinlere maruz kalmasının en az %90'ı,

birincil alım kaynakları olan et, hayvansal yağ ve süt ürünleri gibi kontamine hayvan gıda ürünlerinden kaynaklanmaktadır (34). Bu stabil lipofilik kimyasallar, immünotoksisite, karsinojenite, üreme ve gelişimsel bozukluklar dahil olmak üzere çeşitli toksik tepkiler üretebilir. Bebekler ve embriyolar dioksin maruziyetine en duyarlı bireylerdir (11).

## 6. Östrojenler

Doğal ve sentetik östrojenler çevredeki kirlenici maddelerdir (39). Bu bileşikler östrojen reseptörleri ile etkileşime girerek gonadal steroid sinyalini değiştirebilen endokrin bozuculardır. Çevrede bulunan en yaygın östrojenler estron,  $17\beta$ -estradiol,  $17\alpha$ -estradiol ve estrioldür. Bu östrojenler doğal olarak insanlar ve hayvanlar tarafından üretilmektedir (8). Östrojenlerle çevresel kirlenme, bu bileşiklerin endokrin sistemi bozabilme, üreme fonksiyonunu bozabilme ve olumsuz sağlık etkilerini tetikleyebilme yetenekleri nedeniyle bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir. Çevredeki östrojen kaynakları çeşitli olabilir. Sığır endüstrisi, özellikle endüstrinin sığır büyüme oranlarını arttırmak için büyüme düzenleyici steroidler kullanması nedeniyle çevreye salınan östrojenlerin önemli bir kaynağıdır (39). Ayrıca, hayvancılık ve tarım alanlarından gelen katı atıklarda ve atık sularında östrojenler tespit edilmiştir. Ekzojen östrojenlere maruz kalma meme kanseri riskinin artmasıyla ilişkilendirilmiştir (15).

## 7. Oral Doğum Kontrol Hapları

Hem levonorgestrel (bir progesterin) ve etinil estradiol (bir östrojen) dikkate alınır. Östrojenin etkisini taklit ederek normal üreme fonksiyonunu değiştirirler ve böylece normal hormon üretimini engellerler. Çok sayıda kanıt oral kontraseptif haplarda etinil estradiol bulunduğunu göstermiştir (15).



## **8. Fitoöstrojenler**

Fitoöstrojenler (yani izoflavonoidler, kumestanlar, lignanlar, stilbenler), böceklere karşı bir savunma mekanizması olarak bitkiler (örneğin soya fasulyesi) tarafından üretilen bir kimyasal sınıftır. Fitoöstrojenler, doğal östrojenler olan estradiol-17 $\beta$  (E2), estron veya estriol ile yapısal bir benzerliğe sahip olduğundan, türüne, dozajına ve hedef organlara bağlı olarak sağlığa hem tehdit hem de fayda sağlayabilirler. Buna göre fitoöstrojenler östrojeni taklit edebilir ve bir organizmanın östrojenik reaksiyonunu değiştirebilir (10,36,40).

### **Endokrin Bozucuların Kanserojen Etkileri**

Karsinogenez bir hücrenin kanserleşme sürecidir. Bu kanserleşme olayı genetik, enfeksiyöz (bakteriler, virüsler) ve çevresel (kimyasallar) faktörler dahil olmak üzere farklı faktörlere bağlı uzun bir sürecin sonucudur (34, 41). Endokrin bozucularında bu karsinogenez sürecinde etkili olduğuyla ilgili birçok çalışma yapılmıştır, ancak bu kimyasalların çeşitli etki mekanizmaları, düşük dozlarda bile farklı tepkilere neden olmaları ve uzun vadeli etkilerinin tam olarak anlaşılması nedeniyle uygun bir şekilde değerlendirilip sınıflandırılması zorluk oluşturmaktadır. Bu zorluğun giderilmesi ve daha güvenilir bir yol izlenmesi için Uluslararası kanser araştırma ajansı (IARC), bir grup bilim insanıyla kanserojenleri analiz ederek bu ajanların mekanistik 10 ortak özelliğine dayanan bir sınıflandırma üzerinde anlaşmışlardır (34). Bu sınıflandırmaya göre kanserojenlerin temel özellikleri şöyledir; Hücre proliferasyonunu etkiler. Hücre ölümünü veya besin tedarikini değiştirir. Genotoksiktir.

Reseptör aracılı etkileri modüle eder. Bağışıklık sistemini baskılayıcıdır. DNA onarımını değiştirir veya genomik kararsızlığa neden olur. Epigenetik değişikliklere neden olur. Oksidatif stresi indükler. Elektrofiliktir veya metabolik olarak aktive edilebilir. Kronik enflamasyona neden olur.

Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'nın (IARC) sınıflandırmasına göre, bazı ED'ler (BPA, DDT ve PCB'ler), hücre çoğalmasını, hücre ölümünü veya besin tedarikini değiştirebildikleri için insan kanserojenlerinin temel özelliklerine sahiptir; genotoksiktir; immünoşüpresif aktiviteye sahip; epigenetik değişiklikleri, oksidatif stresi ve kronik inflamasyonu indükler. Ek olarak BPA, östrojen reseptörü- $\alpha$  (ER $\alpha$ ) ile etkileşime girerek hücre proliferasyonunu indükler ve apoptoz oranını azaltarak BC hastalarının prognozunu etkiler (37). Ayrıca Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC); Ni, Cd, As, benzen, dioksinler ve PCB'leri kanserojen; DDT, OCP, Klorpirifos, Glifosat ve Kurşun'u muhtemelen kanserojen olarak sınıflandırmıştır (2,34).

Başlangıçta, EDC'lerin yalnızca östrojen, androjen, progesteron, tiroid ve retinoid reseptörleri üzerindeki etkileri üzerinde durulmuştur. Ancak, son kanıtlar, EDC'lerin etki mekanizmalarının başlangıçta düşünülen çok daha geniş olduğunu ortaya koymuştur. Araştırmalar, EDC'lerin nükleer reseptör sinyalini değiştirmesinin yanı sıra, steroid olmayan reseptörler, transkripsiyonel koaktivatörler, steroid biyosentezi ve metabolizmasında rol oynayan enzimatik yollar ve endokrin ile üreme sistemleri üzerinde de birçok mekanizma aracılığıyla etkili olabileceğini göstermektedir. Ayrıca, DNA metilasyonu ve/veya asetilasyonu ve histon modifikasyonları gibi epigenetik etkiler, endokrin bozulmasıyla ilgili mekanizmalarda rol oynayabilir (22); bunun yanı sıra, EDC'lerin bağımlılık yapıcı veya sinerjistik etkilerle endokrin sistemi de etkileyebileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Belirli EDC'ler kendi başlarına zararsız olabilir, ancak diğer EDC'lerle ilişkisi tehlikeli etkilere (yani kokteyl etkisine) neden olabilir. Karışım toksisitesinin karmaşıklığı, etkileşimi ve hassas zaman pencerelerinin varlığı, risk değerlendirme sürecini son derece karmaşık hale getirmektedir (8, 29). Ayrıca, düşük ED seviyelerine uzun süre maruz kalmakta, sonraki yıllarda kansere yakalanma riskini artırabilir (41).

EDC'lerin östrojenik aktiviteye sahip etkisi meme kanseri riskini arttırmıştır. Rahim içi ortamda EDC'ye maruz kalma, yaşamın ilerleyen dönemlerinde meme kanserine yakalanma riskini etkileyebilir. Boylamsal bir klinik çalışma, hamilelik sırasında DDT'ye maruz kalan kadınların, annenin meme kanseri öyküsünden bağımsız olarak kızlarının meme kanseri riskini arttırdığını göstermiştir. Yüksek östrojen, yüksek prostat kanseri riski ile ilişkilendirilmiştir (29).

DYE'lere maruz kalmayla ilgili en çok çalışılan kanserler meme, prostat, tiroid, rahim, testis ve yumurtalık kanserleridir. Meme, prostat, rahim ve tiroid kanserleri en sık görülen kanserler arasında ilk 10'da yer alır; meme, prostat ve rahim aynı zamanda en ölümcül kanserler arasında da ilk 10'da yer alır (23).

Tiroid kanseri; Ftalatlar, Ağır metaller, pestisitler, OSP'lerle

Meme kanseri; Bisfenol, DDT, triklosan, OP, TCDD, DES, ftalatlar ile

Rahim kanseri; Bisfenoller, DDT, PCB'ler, ftalatlar ile

Yumurtalık kanseri; Bisfenoller, Herbisitler (klorotriazin), DES, TCDD ile

Testis kanseri; DDE, benzenler, ftalatlar ile

Rahim ağzı kanseri; pestisitler, kadmiyum ile

Prostat kanseri; Bisfenoller, DES, pestisitler (endosulfanlar, malathion, vinclozolin), tarımsal kimyasallar, dioksin, arsenik, kadmiyum, PCB'ler ile ilişkili bulunmuştur (7,9,23,24,29,41).

## **Sonuç**

Endokrin bozucular, sağlık ve çevre üzerinde derin ve geniş kapsamlı etkilere sahip olan kimyasal bileşiklerdir. Tarihsel süreçte, endokrin bozucuların olumsuz etkileri giderek daha belirgin hale gelmiş ve bu durum, küresel düzeyde önemli bir farkındalık yaratmıştır. Bugün,

endokrin bozucuların kontrol altına alınması ve maruziyetin azaltılması yönünde atılan adımlar, büyük bir önem taşımaktadır. Ancak, bu mücadelede henüz kat edilmesi gereken uzun bir yol bulunmaktadır. Etkili bir koruma sağlamak için uluslararası işbirliği, daha katı düzenlemeler ve halk sağlığına yönelik bilinçlendirme çalışmaları şarttır. Bu bölümde ele alınan bilgiler, endokrin bozucuların hormon sistemimiz üzerindeki yıkıcı etkilerini ve bu etkilerin kansere yol açabilecek potansiyel mekanizmalarını gözler önüne sermektedir. Endokrin bozucular ve kanser arasındaki ilişkiyi anlamak, hem bireysel hem de küresel sağlık politikaları açısından hayati önem taşımaktadır.

## Kaynakça

- 1.) Longnecker M.P. Invited Commentary: Why DDT matters now. *American Journal of Epidemiology* 2005; 162:726-728
- 2.) Gore A.C., La Merrill M.A., Patisaul H.B., and Sargis R. *Endocrine Disrupting Chemicals: Threats to Human Health*. The Endocrine society and IPEN. February 2024. ISBN # 978-1-955400-23-7
- 3.) İmamoğlu Ş. (2019) Endokrin sistem ve hormonların fizyolojileri. İmamoğlu Ş(ed), Özyardımcı Ersoy C. Geçmişten geleceğe endokrinoloji (s 3,4,5) Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği
- 4.) Hiller-Sturmhölef S Ph.D. and Bartke A. *The Endocrine System An Overview*
- 5.) Encarnaçao T, Paiss A ACC, Campos M.G and Burrows H.D.CQC *Endocrine disrupting chemicals: Impact on human health, wildlife and the environment* Department of Chemistry, University of Coimbra, Coimbra, Portu
- 6.) Knight J. *Endocrine system I: overview of the endocrine system and hormones*. *Nursing Times* [online]; 117: 5, 38-4 (2021)
- 7.) Filippone, A.; Rossi, C.; Rossi, M.M.; Di Micco, A.; Maggioro, C.; Forcina, L.; Natale, M.; Costantini, L.; Merendino, N.; Di Leone, A.; et al. *Endocrine Disruptors in Food, Estrobolome and Breast Cancer*. *J. Clin. Med.* 2023, 12,3158. <https://doi.org/10.3390/jcm12093158>
- 8.) Loretta R, Sansone A, Sansone M, Romanelli F and Appetecchia M. *Endocrine Disrupting Chemicals: Effects on Endocrine Glands*. *Front. Endocrinol.* (2019). 10:178. doi: 10.3389/fendo.2019.00178
- 9.) La Merrill M.A., Vandenberg L.N., Smith M.T., Goodson W., Browne P., Patisaul H.B., Guyton K.Z., Kortenkamp A., Cogliano V.J., Woodruff T.J., Rieswijk L., Sone H., Korach K.S., Gore A.C., Zeise L., and Zoeller R.T. *Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification*. (2020) <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0273-8>
- 10.) Ogidi O.I., Tawariwei A.M. *Endocrine Disrupting Chemicals and their Role in Cancer-A review*. *Molecular sciences and applications*. (2023) doi:10.37394/232023.2023.3.2

- 11.) Peivasteh-roudsari L., Barzegar-bafrouei R., Sharifi K.A., Azimisalim S., Karami M., Abedinzadeh S., Asadinezhad S., Tajdar -oranj B., Mahdavi V., Alizadeh A.M., Sadighara P., Ferrante M., Conti G.O., Aliyeva A., Khaneghah A.M. Origin, dietary exposure, and toxicity of endocrine-disrupting food chemical contaminants: A comprehensive review. *Heliyon*. (2023) 2405-8440  
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e18140>
- 12.) Benbrook CM. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environ Sci Eur* (2016)28:3.Doi:10.1186/s12302-016-0070-0
- 13.) Ospina M, Schütze A, Morales-Agudelo P, Vidal M, Wong LY, Calafat AM. Exposure to glyphosate in the United States: Data from the 2013-2014 National Health and Nutrition Examination Survey. *Environ Int* (2022) 170:107620.
- 14.) gMuñoz JP, Bleak TC, Calaf GM. Glyphosate and the key characteristics of an endocrinedisruptor:Areview. *Chemosphere*(2021)270:128619.<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128619>
- 15.) Gonsioroski A., Mourikes V.E. and Flaws J.A. Endocrine Disruptors in Water and Their Effects on the Reproductive System. *J.Mol.Sci.*(2020) 21,1929.Doi:10.3390/ijms21061929
- 16.) Sohoni P, Sumpter JP. Several environmental oestrogens are also anti-androgens. *Journal of Endocrinology* (1998) 158:327-339.
- 17.) Saunders M., Magnanti B.L., Correia Carreira S., Yang A., Alamo-Hernandez U., Riojas-Rodriguez H., Calamandrei G., Koppe J.G., Krayner von Krauss M., Keune H., Bartonova A. Chlorpyrifos and neurodevelopmental effects: a literature review and expert elicitation on research and policy. *Environ Health*(2012) 11 Suppl 1:S5.
- 18.) Sanghi R., Pillai M.K., Jayalekshmi T.R., Nair A. Organochlorine and organophosphorus pesticide residues in breast milk from Bhopal, Madhya Pradesh, India. *Hum Exp Toxicol* (2003). 22:73-76
- 19.) Andersen H.R., Rambaud L., Riou M., Buekers J., Remy S., Berman T., Govarts E. Exposure Levels of Pyrethroids, Chlorpyrifos and Glyphosate in EU-An Overview of Human Biomonitoring Studies (2000). *Toxics* 2022; 10:

- 20.) Patisaul H.B. Achieving CLARITY on bisphenol A, brain and behaviour. *Journal of Neuroendocrinology* (2019) 32:e12730. Doi:10.1111/jne.12730
- 21.) Kuiper G.G., Lemmen J.G., Carlsson B., Corton J.C., Safe S.H., van der Saag P.T., van der Burg B., Gustafsson J.A. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 1998; 139:4252-4263.
- 22.) Alavian-Ghavanini A. and Rüegg J. Understanding Epigenetic Effects of Endocrine Disrupting Chemicals: From Mechanisms to Novel Test Methods Basic and clinical *Pharmacology & Toxicology*/Volume 122,issue 1/ p.38-45 (2017) <https://doi.org/10.1111/bcpt.12878>
- 23.) Macedo S., Teixeira E., Gaspar T.B., Boaventura P., Soares A.M., Alves L.M. and Soares P. Endocrine-disrupting chemicals and endocrine neoplasia: A forty-year Systematic review. *Elsevier*.(2022) 0013-9351.<https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.114869>.
- 24.) Shaleni P., den Braver-Sewradj, Rob van Spronsen & Ellen V. S. Hessel Substitution of bisphenol A: a review of the carcinogenicity, reproductive toxicity, and endocrine disruption potential of alternative substances. (2020) *Critical Reviews in Toxicology*. DOI:10.1080/10408444.2019.1701986
- 25.) Engel S.M., Patisaul H.B., Brody C., Hauser R., Zota A.R., Bennet D.H., Swanson M. and Whyatt R.M. Neurotoxicity of Ortho-Phthalates: Recommendations for Critical Policy Reforms to Protect Brain Development in Children. *Am J Public Health* 2021; 111:687-695.
- 26.) Blank R., Bura V. and Kuhlmann E. *Comparative Health Policy*, Macmillan International Higher Education. (2017)
- 27.) Eales J., et al., Human health impacts of exposure to phthalate plasticizers: an overview of reviews, *Environ. Int.* 158 (2022) 106903, <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106903>.
- 28.) Podgorski J., Berg M. Global threat of arsenic in groundwater.(2020) 368:845-850
- 29.) Ahn C., Jeung E.B. Endocrine-Disrupting Chemicals and Disease Endpoints. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 5342. <https://doi.org/10.3390/ijms24065342>

- 30.) J C, Thotakura B, M. S K, et al. Effects of Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs) on Skeletal System Development: A Review. (2023) *Cureus* 15(9): e46109. DOI10.7759/cureus.46109 IARC, IARC Monographs on the Identification of Carcinogenic Hazards to Humans, 2021. <https://monographs.iarc.who.int/agents-classified-by-the-iarc/>.
- 31.) Eskut N., Koskderelioglu A. Neurotoxic agents and peripheral neuropathy, in: *Neurotoxicity-New Advances*, IntechOpen. (2021).
- 32.) Pamphlett R., Doble P.A., Bishop D.P. Mercury in the human thyroid gland: potential implications for thyroid cancer, autoimmune thyroiditis, and hypothyroidism, *PLoS One* 16 (2) (2021), e0246748 <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0246748>
- 33.) M.R. Rahimzadeh, et al., Cadmium toxicity and treatment: an update, *Casp. J. Int. Med.* 8 (3) (2017) 135
- 34.) IARC, IARC Monographs on the Identification of Carcinogenic Hazards to Humans, 2021. <https://monographs.iarc.who.int/agents-classified-by-the-iarc/>.)
- 35.) Glüge J., Scheringer M., Cousins I.T., DeWitt J.C., Goldenman G., Herzke D., Lohmann R., Ng C.A., Trier X., Wang Z. An overview of the uses of per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS). *Environ Sci Process Impacts* (2020) 22:2345-2373
- 36.) Wan M.L.Y., Co V.A. and El-Nezami H. Endocrine disrupting chemicals and breast cancer: a systematic review of epidemiological studies, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.*(2022) 62:24, 6549-6576, DOI:10.1080/10408398.2021.1903382
- 37.) WHO/UNEP. 2012. State of the science of endocrine disrupting chemicals - 2012. Bergman A, Heindel JJ, Jobling S, Kidd KA, Zoeller RT, editors: United National Environment Programme World Health Organization. 296
- 38.) Manh H.D., et al., The relationship between dioxins and salivary steroid hormones in Vietnamese primiparae, *Environ. Health Prev. Med.* 18 (3) (2013)221–229, <https://doi.org/10.1007/s12199-012-0310-x>
- 39.) Adeel M., Song X., Wang Y., Francis D., Yuesuo Y. Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: A critical review. *Environ. Int.* (2017) 99, 107–119.



- 40.) Sibuh B.Z., Quazi S., Panday H., Parashar R., Jha N.K., Mathur R., Jha S.K., Taneja P., Jha A.K. The Emerging Role of Epigenetics in Metabolism and Endocrinology. *Biology* (2023) 12,256.<https://doi.org/10.3390/biology12020256>
- 41.) Calaf G.M., Ponce-Cusi R., Aguayo F., Munoz J.P., Bleak T.C. Endocrine disruptors from the environment affecting breast cancer (Review). *Oncology letters* (2020).20.19.32. Doi:10.3892/ol.2020.11566

## **BÖLÜM 2**

### **ENDOKRİN BOZUCULARIN ANTİKANSER ETKİLERİ**

Ecz. Büşra YAMAK<sup>1</sup>  
Doç. Dr. Senem AKKOÇ<sup>2,3</sup>

---

<sup>1</sup> Süleyman Demirel Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Isparta, Türkiye. busrayamak5@gmail.com, Orcid ID: 0009-0005-6456-1733

<sup>2</sup>Süleyman Demirel Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü, Isparta, Türkiye. senemakkoc@sdu.edu.tr, Orcid ID: 0000-0002-1260-9425,

<sup>3</sup>Bahçeşehir Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, İstanbul, Türkiye. senem.akkoc@bau.edu.tr, Orcid ID: 0000-0002-1260-9425



## GİRİŞ

Kimyasallar, günlük yaşamımızın vazgeçilmez bir parçasıdır. Ancak, endokrin bozucular olarak bilinen bazı kimyasallar, vücudun hormonal sistemi üzerinde zararlı etkiler yaratabilir. Hormonlar, çok küçük miktarlarda ve belirli zamanlarda etki göstererek vücudun gelişimini, büyümesini, üremesini, metabolizmasını, bağışıklık sistemini ve davranışlarını düzenler. Endokrin bozucular, bu doğal hormon sistemlerine müdahale eder ve sağlık üzerindeki olumsuz etkileri, maruz kalma sona erdikten uzun süre sonra bile hissedilebilir. Bu kimyasallara maruz kalmak, ömür boyu süren etkilere neden olabilir ve hatta sonraki nesiller üzerinde de sonuçlar doğurabilir. Dünya Sağlık Örgütü'ne (DSÖ) göre, endokrin bozucu kimyasallar (EDK'lar) ve potansiyel EDK'lar çoğunlukla insan yapımıdır ve pestisitler, metaller, gıda katkı maddeleri veya kirleticiler ve kişisel bakım ürünleri gibi çeşitli materyallerde bulunur. EDK'ların, erkeklerde ve kadınlarda üreme fonksiyonlarında bozulmalara, meme kanseri insidansında artışa, anormal büyüme kalıplarına ve çocuklarda nörogelişimsel gecikmelere, ayrıca bağışıklık fonksiyonlarında değişikliklere yol açtığı düşünülmektedir. İnsanlar EDK'lara yiyecek, toz ve suyun yutulması, havadaki gaz ve partiküllerin solunması ve cilt yoluyla maruz kalmaktadır. Ayrıca, EDK'lar hamile bir kadından gelişmekte olan fetüse plasenta yoluyla ve emzirme sırasında küçük çocuğa anne sütü yoluyla geçebilir. Hamile kadınlar ve çocuklar, gelişimsel maruziyetlere karşı en hassas gruplardır ve bu kimyasallara maruz kalmanın etkileri, yaşamın ilerleyen dönemlerine kadar belirgin olmayabilir. Ayrıca, araştırmalar EDK'ların bazı durumlarda kanser riskini artırabileceğini de göstermektedir (1).

ABD Çevre Koruma Ajansı (EPA) tarafından yapılan tanıma göre, endokrin bozucu bir bileşik, vücutta homeostaz, üreme, gelişim ve/veya davranışın sürdürülmesinden sorumlu olan doğal hormonların sentezi, salgılanması, taşınması, bağlanması veya atılımını engelleyen bir ajandır (2).

Basitleştirilmiş haliyle, endokrin bozucular, normal hormon işlevini bozan kimyasallar veya kimyasal karışımlardır. Endokrin bozucu kimyasallar (EBK'ler) oldukça heterojendir ve iki şekilde sınıflandırılabilir:

Endokrin bozucular, doğal olarak oluşan ve sentetik olarak üretilen kimyasallar olarak iki ana kategoriye ayrılabilir. Doğal olarak oluşan endokrin bozucular, insan ve hayvan gıdalarında bulunan doğal kimyasallardır. Örneğin, fitoöstrojenler olarak bilinen genistein ve koumestrol gibi bileşikler bu gruba dahildir. Sentetik olarak üretilen endokrin bozucular ise daha geniş bir yelpazeye sahiptir ve çeşitli alt gruplara ayrılabilir. Bu grupta yer alan bileşikler arasında, endüstriyel çözücüler veya yağlayıcılar olarak kullanılan ve yan ürünleri olan poliklorlu bifeniller (PCB'ler), polibromlu bifeniller (PBB'ler) ve dioksinler gibi kimyasallar bulunmaktadır. Ayrıca, bisfenol A (BPA) gibi plastiklerde, plastikleştiricilerde ve diklorodifeniltrikloroetan (DDT) gibi pestisitlerde kullanılan sentetik kimyasallar da bu kategoride yer alır. Mantar öldürücü vinclozolin ve bazı farmasötik ajanlar, örneğin dietilstilbestrol (DES), diğer sentetik endokrin bozucu bileşikler arasında sayılabilir. Bu bileşiklerin, hormon benzeri etkiler göstererek vücudun hormonal dengelerini bozabilme potansiyeline sahip olduğu bilinmektedir (3).

Endokrin bozucu kimyasallar, kaynaklarına göre çeşitli şekillerde sınıflandırılabilir. İlk olarak, doğal ve yapay hormonlar grubuna örnek olarak fitoöstrojenler, omega-3 yağ asitleri, doğum kontrol hapları ve tiroid ilaçları verilebilir. Bu kimyasallar, vücutta doğal olarak bulunan hormonlara benzer şekilde hareket edebilir ve hormonal dengeyi etkileyebilir. İkinci olarak, hormonal yan etkileri olan ilaçlar da endokrin bozucular arasında yer alır. Örneğin, naproksen, metoprolol ve klofibrat gibi ilaçlar, hormonal sistemde yan etkilere yol açabilir. Üçüncü grupta ise endüstriyel ve evsel kimyasallar bulunur. Ftalatlar, alkilfenoletoilat deterjanlar, yangın geciktiriciler, plastikleştiriciler, solventler ve

poliklorlu bifeniller (PCB'ler) gibi kimyasallar bu gruba dâhildir. Bu maddeler, yaygın olarak kullanılan birçok endüstriyel ve ev ürünüde bulunabilir ve hormonal sistem üzerinde bozucu etkiler yapabilir. Son olarak, endüstriyel ve evsel süreçlerin yan ürünleri de endokrin bozucular arasında sayılır. Bu yan ürünler arasında poliaromatik hidrokarbonlar (PAH'lar), dioksinler ve pentaklorobenzen gibi kimyasallar yer alır. Bu maddeler, çevreye yayıldıklarında insan sağlığı üzerinde ciddi etkiler yaratabilir (4).

Endokrin bozucular, vücutta hormonların işleyişini etkileyen kimyasallardır ve çeşitli kaynaklardan gelebilirler. Gore ve diğerlerinin yaptığı çalışmalara dayanarak, EDC'ler üç ana kategoriye ayrılmıştır:

**Pestisitler:** Pestisitler, genellikle organizmaların üreme ve sinir sistemlerine duyarlı olacak şekilde tasarlanmıştır. Ancak bu süreçlerin insan fizyolojisiyle benzerlik göstermesi nedeniyle bu kimyasallar insan vücudunu da etkileyebilir. Yaygın olarak kullanılan pestisitler arasında DDT ve klorpirifos yer alır. DDT, endokrin bozucu olarak uzun bir geçmişe sahiptir ve birçok ülkede yasaklanmış olmasına rağmen, bazı ülkelerde hala kullanılmaktadır. DDT, tiroid, östrojen, androjen, renin-anjiyotensin, insülin ve nöroendokrin sistemlere müdahale ederek insan vücudunun üreme, kardiyovasküler ve metabolik sistemlerini doğrudan etkileyebilir. Klorpirifos ise evde ve tarımda yaygın olarak kullanılan bir böcek ilacıdır ve sinir sistemine ciddi zararlar verebilir.

**Ürünlerdeki Kimyasallar:** EDC'ler günlük hayatta kullandığımız ürünlerde bulunabilir. Çocuk ürünleri, elektronik eşyalar, kişisel bakım ürünleri, tekstil/giysi ve bina yapım malzemeleri gibi ürünlerde bu kimyasallar yer alabilir. Bu kimyasalların çevreye salınma ve insanlarla temas etme olasılığı yüksektir. Özellikle çocuk ürünlerinde bulunan EDC'ler, çocukların bu ürünleri ağızlarına götürme eğilimleri nedeniyle endişe vericidir. Ayrıca, diş macunu, cilt bakım ürünleri, sabunlar gibi kişisel bakım ürünlerinde de antimikrobiyal ajanlar olarak EDC'ler bulunabilir.

**Gıda Temas Malzemeleri:** Bisfenol A (BPA) bir zamanlar plastik kaplarda ve konserve gıda kutularının epoksi esaslı kaplamalarında sıkça kullanılıyordu. Ancak, insan sağlığı üzerindeki tehlikeli etkileri nedeniyle bebek biberonlarında kullanımı yasaklanmıştır. Bununla birlikte, hala birçok kaptta ve özellikle çorba, sebze gibi konserve gıdalarda bu kaplamalar kullanılmaktadır. Bu kaplamalar, patojenlerden korunma sağlamak amacıyla kullanılsa da yiyeceklerle doğrudan temas ettikleri için yiyeceklere geçerek insanlar üzerinde zararlı etkilere yol açabilir (5).

### **Endokrin Bozucuların Biyolojik Etkileri Ve Maruz Kalma Yolları**

Endokrin bozucu kimyasallar (EDC'ler), insan ve hayvan endokrin sistemlerine müdahale edebilen ve bu nedenle organizmalar ile onların nesillerini olumsuz yönde etkileyebilen dış kaynaklı maddelerdir. Bu maddeler yaygın olarak tespit edildiği için, insan metabolizması, bağışıklık sistemi, sinir sistemi ve davranış bozuklukları ile olan ilişkileri, özellikle gebelik dönemi, bebeklik ve yaşlılık gibi dönemlerde bu maddelere maruz kalınması nedeniyle güncel bir endişe konusudur (6). Mevcut veriler, birçok EDC'nin çeşitli hormonların etkisini veya metabolizmasını farklı mekanizmalar aracılığıyla düzenleyebileceğini göstermektedir (7). Genel olarak, bu kimyasallar endokrin reseptörlere bağlanarak hormon sentezini ve yıkımını değiştirir (8). Çoğu EDC'nin kimyasal yapısı, hormonal işlevin farklı noktalarında etkilerini gösterir; hormon üretiminden sekresyonuna ve biyolojik dönüşümüne kadar, olumsuz reaksiyonların tetiklenmesi ve hücresel işlevde değişikliklerin ortaya çıkmasına neden olur (9). Araştırmalar, endokrin sisteminin organizmaların çevreye nasıl tepki verdiğini ve uyum sağladığını belirlemede önemli bir rol oynadığını göstermiştir. EDC'lerin hormonal sinyalizasyon ve metabolizmayı bozmasının yanı sıra hormonların reseptörler üzerindeki etkisi, bu kimyasalların yol açtığı fizyolojik değişimlerin temelini oluşturabilir (10).

EDC maruziyetinin olası sonuçları arasında malign tümörler, üreme ve gelişim anormallikleri bulunmaktadır (11). Aynı zamanda, bazı EDC'lerin insülini olumsuz etkileyerek tip 2 diyabet riskini artırabileceğini öne süren güncel çalışmalar da mevcuttur (12). EDC'lerin en yaygın kaynakları arasında ilaçlar, deterjanlardaki yüzey aktif maddeler, pestisitler (9), endüstriyel çözücü veya yağlayıcı olarak kullanılan sentetik kimyasallar ve bunların yan ürünleri, plastikler, plastikleştiriciler ve fungusitler yer alır (2,3)

Tablo 1'de günlük hayatta yaygın olarak bulunan birkaç endokrin bozucu kimyasalları ve bu kimyasalların yer aldığı ürünleri göstermektedir. Bu maddelerin yaygın olarak tespit edilmesi, insan metabolizması, bağışıklık sistemi, sinir sistemi ve davranış bozuklukları ile olan ilişkilerinin özellikle gebelik dönemi, bebeklik ve yaşlılık dönemlerinde beslenme ve kişisel hijyen ürünleri yoluyla insanlara geniş çapta maruz kalınması nedeniyle güncel bir endişe konusudur (6). Mevcut veriler, birçok EDC'nin çeşitli hormonların etkisini veya metabolizmasını farklı mekanizmalarla düzenleyebileceğini göstermektedir (6). Genel olarak, bu kimyasallar endokrin reseptörlerine bağlanarak hormon sentezini ve yıkımını değiştirir (8). Çoğu EDC'nin kimyasal yapısı, hormon üretiminden sekresyonuna ve biyolojik dönüşümüne kadar hormonal fonksiyonun farklı noktalarında etkili olabileceğini ve bu durumun olumsuz reaksiyonları tetikleyerek hücre fonksiyonlarında değişikliklere yol açtığını göstermektedir (9). Araştırmalar, endokrin sistemin organizmaların çevreye nasıl tepki verdiğini ve adapte olduğunu belirlemede kilit bir rol oynadığını göstermiştir. Hormon sinyalizasyonunun ve metabolizmasının bozulması, aynı zamanda hormonların reseptörler üzerindeki etkisi, EDC'lerin neden olduğu fizyolojik değişikliklerin temelini oluşturabilir (10).



**Tablo 1.** Günlük yaşamda yaygın olarak karşılaşılan bazı endokrin bozucu kimyasallar (6)

<b>Endokrin Bozucu Kimyasal (EDC)</b>	<b>Kullanım Alanları / Bulunduğu Yerler</b>
<b>Bisfenol A (BPA)</b>	Polikarbonat plastikler, yiyecek ve içecek kapları, su şişeleri, bebek biberonları, epoksi reçineler (gıda kutularının iç kaplamaları)
<b>Ftalatlar</b>	PVC ürünler, gıda ambalajları, kozmetikler, oyuncaklar, tıbbi cihazlar, bazı yapı malzemeleri
<b>Poliklorlu Bifeniller (PCB'ler)</b>	Elektrikli ekipmanlar, boyalar, yapıştırıcılar, kaplamalar, eski endüstriyel ürünler (üretimi durdurulmasına rağmen çevrede kalıcıdır)
<b>Parabenler</b>	Kozmetik ürünler (şampuan, losyon, makyaj malzemeleri), ilaçlar, gıda maddeleri (koruyucu olarak)
<b>Triklosan</b>	Antibakteriyel sabunlar, diş macunları, deodorantlar, bazı temizlik ürünleri, tekstil ürünleri (antimikrobiyal kaplamalar)

EDC'lere maruz kalma, genellikle çevresel kaynaklardan gelir. Bu maddeler, su, hava, toprak ve gıdalarda bulunabilir. İnsanlar, bu kirleticilere kontamine olmuş gıdaların tüketimi, kontamine suyun içilmesi, EDC içeren kişisel bakım ürünlerinin kullanımı ve endüstriyel atıklara maruz kalma yoluyla maruz kalabilirler. Özellikle gebelik döneminde, fetüsün bu maddelere maruz kalması, doğum öncesi gelişim üzerinde uzun vadeli etkiler yaratabilir. Bebekler ve çocuklar hem davranışsal hem de biyolojik olarak daha yüksek risk altında olabilirler çünkü gelişim aşamasında oldukları için EDC'lerin etkilerine karşı daha hassastırlar. Günümüzde endokrin bozucu kirliliği sorunuyla karşı karşıya kalındığında, yeni iyileştirme teknolojilerinin geliştirilmesi zorunlu ve acil bir gerekliliktir. Mevcut durumda, adsorpsiyon, geniş çapta incelenmiş geleneksel bir yöntem olup, çeşitli yeni adsorpsiyon malzemeleri de hâlâ geliştirilmektedir (6).

## **Kanserin Tanımı ve Antikanser Tedavi Yöntemleri**

DSÖ'ye (Dünya Sağlık Örgütü) göre kanser, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyümesi ve vücudun diğer bölgelerine yayılması ile karakterize edilen geniş bir hastalık grubudur. Normalde vücut, eski ve hasar görmüş hücreleri yenisiyle değiştirir ve yeni hücreler gerektiğinde üretilir. Sonuç olarak, metastaz yapma potansiyeline sahip malign hücrelerden oluşan tümörler meydana gelir. Bu tümörler, vücudun diğer bölgelerine yayılarak metastaz adı verilen duruma yol açabilir. Kanser, genetik faktörler, çevresel etkiler, yaşam tarzı ve bazı enfeksiyonlar gibi birçok nedene bağlı olarak gelişebilir. Antikanser terimi, kanserin oluşumunu, gelişimini veya yayılmasını önleyen, durduran ya da bu süreçleri yavaşlatan maddeler veya tedavi yöntemleri için kullanılır. Günümüzde kullanılan tedavi yöntemleri arasında kemoterapi, radyoterapi ve kimyasal olarak türetilmiş ilaçlar yer almaktadır. Bu maddeler genellikle hücrelerin anormal büyümesini engelleyerek, tümör oluşumunu inhibe ederek veya kanser hücrelerini yok ederek etkili olur (13).

## **Endokrin Bozucuların Antikanser Potansiyelleri**

Dış kaynaklı östrojenlere maruz kalma, erkeklerde gelişmekte olan üreme yolunda yapısal ve işlevsel değişikliklere neden olur. Bu değişikliklerin birçoğu kalıcıdır ve bazıları yaşamın ilerleyen dönemlerinde ortaya çıkar. Anne karnında dietilstilbestrol (DES) maruz kalan erkekler, insan organizmalarında güçlü bir nonsteroidal östrojenin etkilerine dair bilgi sağlar (14). DES kaynaklı lezyonlar, epididimal kistler gibi nispeten küçük yapısal değişikliklerden testiküler hipoplazi gibi daha belirgin değişikliklere kadar uzanır. Kriptorşidizm (inmemiş testis), testis kanseri, düşük sperm sayısı, hipospadias (idrar deliğinin penisin ucundan daha aşağıda olması), mikrofallus (küçük penis) ve büyümüş prostatik utriküllerin de DES kaynaklı lezyonlar olması muhtemeldir (14).

DES dışındaki ksenoöstrojenlerin de erkeklerde cinsel farklılaşmayı değiştirebileceği ve erkeklerde ve vahşi hayvanlarda üreme yolundaki gelişimsel bozuklukların artan insidansını açıklayabileceği olasıdır. Bitki östrojenleri, hormonal güçleri in vitro olarak değerlendirildiğinde, niceliksel olarak en önemli çevresel östrojenlerdir (15).

Teorik olarak, fitoöstrojenler ve yapısal olarak benzer bileşikler, yalnızca östrojen olarak değil, aynı zamanda antiöstrojen olarak da hareket ederek erkeklerin üreme sağlığına zarar verebilir. Östrojen reseptörü olmayan farelerle yapılan son deneyler, androjenler ve Müllertian inhibitör maddesi dışında östrojenlerin de normal erkek cinsiyet farklılaşması için gerekli olabileceğini öne sürmektedir (16). İşlevsel östrojen reseptörlerinin yokluğunda, testis ağırlığı ve sperm sayısı düşüktür ve doğurganlık azalmıştır.

Fitoöstrojen açısından zengin gıdaların veya diyet takviyelerinin meme ve prostat kanserine karşı kemopreventif ajanlar olarak artan kullanımı, erkeklerin üreme sağlığı üzerindeki fitoöstrojen maruziyeti risklerini değerlendirmeyi gerekli ve acil hale getirmiştir (17).

Fitoöstrojen açısından zengin diyetlerin, şimdye kadar hem yetişkin erkek hem de kadın organizmalarında zayıf östrojenik etkiler gösterdiği anlaşılmaktadır. Fitoöstrojen açısından zengin diyetlerin veya fitoöstrojenlerin insan organizmasında anti-östrojenik bir kapasiteye sahip olduğuna dair doğrudan bir kanıt bulunmamaktadır. Fitoöstrojenlerin, östrojen reseptörü sinyal iletim yolunda birçok adımda etkili olabileceği ve bu etkilerin kümülatif birikiminin biyolojik etkilerini açıklayabileceği olasılığı vardır. Örneğin, flavonoidler tarafından aromataz ve 17 $\beta$ -hidroksisteroid oksidoredüktaz (tip 1) inhibisyonu, düşük yağlı, yüksek lifli bir diyet tüketen vejetaryenlerde bulunan daha düşük plazma östrojen konsantrasyonlarına neden olabilir (18). Ayrıca, bazı flavonoidler östrojen reseptör fonksiyonlarını düzenleyerek anti-östrojen olarak da işlev görebilir (19).

Endokrin bozucu (ED'ler) maddelere maruz kalmanın insan sağlığı üzerindeki etkileri oldukça fazladır. ED'lerin üreme sistemi üzerinde yapı ve/veya işlev değişikliklerine yol açarak dişi ve erkek üreme organlarının yapısını veya işlevini bozabileceği görülmüştür. Özellikle, ED'lere maruz kalma; adet döngüsünde düzensizlikler, azalmış doğurganlık, polikistik over sendromu, endometriozis, erken veya geç ergenlik, meme kanseri, spermatozoa üzerinde değişiklikler (azalmış sayı, azalmış hareketlilik ve anormal morfoloji), inmemiş testis, hipospadias, prostat kanseri ve testis kanseri gibi etkilerle ilişkilendirilmiştir (20). Ayrıca, bazı ED'lerin tiroid işlevini bozabileceği ve potansiyel olarak tiroid kanseri ve bilişsel veya davranışsal bozukluklara yol açabileceği öne sürülmüştür, diğerleri ise obezite ve tip II diyabet başlangıcını tetikleyebileceğini göstermektedir (21).

ED'lerin yol açtığı alarm verici etkiler dünya genelinde birçok düzenlemenin geliştirilmesine ve benimsenmesine yol açmıştır ve bu düzenlemeler sürekli olarak iyileştirilmektedir. Ancak, bu kirleticilere maruz kalma seviyelerini azaltmak zordur çünkü bu kirleticiler çevreye yayılmış durumdadır ve insanlar, ED'lere yutma, soluma, deri teması ve plasenta veya anne sütü yoluyla transfer gibi birden fazla maruz kalma yoluyla maruz kalabilirler. Bu yollar arasında, bu maddelere maruz kalmanın ana yolu olarak kirlenmiş su ve gıda tüketimi kabul edilmektedir. Ancak, yakın zamanda soluma, özellikle uçucu ve yarı uçucu ED'ler için önemli bir ek maruz kalma yolu olarak kabul edilmiştir (22).

Kimyasal analiz yöntemleri kullanılarak bireysel ED'ler ve benzer kimyasal yapıya sahip ED alt grupları atmosferde bulunmuş ve miktarları belirlenmiştir (22). Ancak, analitik veriler kullanılarak, kompleks karışımın hangi hormonlarla etkileşime girebileceğini tahmin etmek basit olmayabilir (örneğin, östrojenler, androjenler, tiroid hormonları). Ayrıca, havadaki tüm bireysel kirleticilerin konsantrasyonlarını bilmek, kompleks ED karışımının kümülatif etkisini

tahmin etmek için yeterli olmayabilir çünkü tüm bireysel bileşiklerin aktivitesi her zaman bilinmez ve bileşikler arasında öngörülemeyen sinerjik veya antagonistik etkiler ortaya çıkabilir (23).

İncelemenin iki yazarı tarafından bağımsız olarak gerçekleştirilen bir tarama süreci sonucunda, açık hava ortamında toplanan hava kaynaklı partikül madde (PM) örneklerini in vitro analizlerle inceleyerek (anti) östrojenik veya (anti) androjenik aktiviteleri değerlendiren makaleler seçilmiştir. Bu makalelerde, PM'nin endokrin aktivitesini analiz etmek için kullanılan yöntemler arasında Soxhlet ve otomatik ekstraktörlerle gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemleri, sonikasyon ve çalkalama gibi teknikler yer almıştır. PM üzerine adsorbe olan kimyasalların ekstraksiyonu için en yaygın kullanılan çözücüler diklorometan ve (siklo)heksan-aseton karışımları olmasına rağmen, bazı makalelerde metanol, simüle akciğer sıvıları ve ultra saf su gibi alternatif çözücüler de tercih edilmiştir. Bu makalelerden beşinde, biyolojik analizlerden önce PM örnekleri farklı ekstraksiyon çözücülerini kullanılarak ekstrakte edilmiştir ve bu durum, kullanılan çözücü türünün veya fraksiyonlamanın analiz sonuçlarını etkileyebileceğini göstermiştir. Bu incelemenin bulguları, PM'nin östrojenik, antioestrojenik, androjenik ve antiandrojenik etkiler gösterebileceğini ve bu nedenle PM'nin endokrin bozucu bir potansiyele sahip olabileceğini ortaya koymaktadır. Bu potansiyel, ED'lere (endokrin bozucular) maruziyetin bir başka kaynağını temsil edebileceği için dikkate alınmalıdır. Özellikle inhalasyon yoluyla maruziyet, genellikle yutma ve deri teması yoluyla gerçekleştiği düşünülen ED maruziyet düzeylerini artırabilir. Her ne kadar inhalasyonun toplam ED yüküne ne kadar katkıda bulunabileceğini tahmin etmek zor olsa da, PM'nin endokrin aktivitesinin insan sağlığı üzerindeki riski artırabileceği görülmektedir. Ayrıca, bu inceleme, PM'nin endokrin aktivitesinin birçok farklı hava kirlenici grubundan kaynaklanabileceğini vurgulamaktadır. Bu kirlenicilerin bazıları geleneksel analitik yöntemlerle izlenmekte olsa da,

incelenen makalelerin sonuçları, bireysel kirleticilerin konsantrasyonlarından hareketle genel endokrin aktiviteyi tahmin etmenin zorluğunu ortaya koymuştur. Bu nedenle, genel endokrin bozucu potansiyelin, etkiler temelli araçlar kullanılarak değerlendirilmesi, hava kaynaklı ED'lerin sağlık riski oluşturma potansiyelini daha doğru bir şekilde belirlemek için değerli bir yaklaşım olarak görünmektedir (20).

### **Endokrin Bozucuların Farklı Kanser Türleri Üzerinde Etkileri**

Karsinogenezis, genetik, enfeksiyöz (bakteriler, virüsler) ve çevresel kimyasallar gibi çeşitli mekanizmalar ve faktörlere bağlı olarak gelişen uzun süreli bir süreçtir. Günümüzde, bazı kimyasal ajanlar günlük hayatımızda temel bir rol oynar ve günlük aktivitelerimizi kolaylaştırır. Ancak, bu maddelere uzun süreli maruziyetin insan sağlığına zararlı olabileceği iyi bilinmektedir. Uluslararası ajanslar bu konunun farkındadır ve bu nedenle, Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) uzman bir grup ile birlikte kanserojenleri analiz etmek için yeni bir yaklaşım tanıtmıştır. Bu ajans, bu ajanların mekanistik bilgileri ile ilgili 10 ortak özelliğe dayanan bir sınıflandırma üzerinde anlaşmıştır (24). Böylece, değerlendirme zorluğu ile başa çıkmak için daha güvenilir bir yol sağlanmıştır. Yapılan tartışmalar sonucunda, bu özelliklerden birden fazlasını sergileyen bir kimyasal bileşiğin insanlarda kanserojen olarak kabul edilmesi gerektiği ve dolayısıyla IARC'ye göre grup 1'e ait olduğu sonucuna varılmıştır. Her ne kadar birçok çevresel bileşik IARC sınıflandırmasına göre değerlendirilmiş olsa da, hâlâ sınıflandırılmamış birçok bileşik bulunmaktadır. Bu bileşiklerin insanlarda kanserojen olup olmadığının bilinmesi, politika yapıcılar, hükümetler, bilim insanları ve sanayi için daha az zararlı yeni bileşikler aramak ve uygulamak adına geniş bir olanak sağlayacaktır. Değerlendirilecek çevresel bileşikler arasında, meme kanseri ile ilgili

olarak önemi nedeniyle endokrin bozucu kimyasallar üzerine odaklanılmıştır (25).

Genel bir ifadeyle, endokrin bozucular, endokrin sistemin normal işleyişine müdahale edebilen, genellikle endüstriyel üretimden türetilen kimyasal bileşiklerdir (26). Bu kimyasalların çoğu tarım, sanayi ve birçok tüketici ürününde yaygın olarak kullanılmaktadır. Temel olarak, etkileri endokrin reseptörleri ile etkileşimlerinden, örneğin östrojen reseptörleri (ER'ler) ile, ya da sinyal yollarını değiştirmelerinden kaynaklanmaktadır; bu nedenle, belirli bir organın normal gelişimi ve işlevine müdahale ederek normal hücre büyümesini etkileyebilirler (27).

Östrojenin, ergenlikte gerekli olan ve cinsel farklılaşma için hayati önem taşıyan temel hormonlardan biri olduğu bilinmektedir. Ayrıca, çoğu çevresel kimyasalın östrojen bozucu veya ksenoöstrojen olarak adlandırılan çevresel kirleticiler ve aynı zamanda hormonal modülatörler olduğu ve hipotalamus-hipofiz-gonadal eksenini potansiyel olarak üreme bozuklukları veya kansere neden olacak şekilde bozabileceği dikkate alındığında, endokrin bozucuların değerlendirilmesi ve biyolojik etkilerinin anlaşılması önemlidir. Ksenoöstrojenlerin, Amerika Birleşik Devletleri'nde ve birçok diğer ülkede artan meme kanseri insidansında önemli bir rol oynadığı görülmektedir (28). Birçok çalışma, organoklorin ksenoöstrojenlerin meme kanseri üzerindeki rolünü göstermiştir. Bu nedenle, kadınların östrojenlere maruz kalmalarının kümülatif toplamı, bu kanser türü için artan bir riskle sonuçlanmaktadır; bu risk faktörleri arasında menarş yaşı, ilk doğum yaşı, doğal menopoz yaşı, doğurganlık ve obezite yer almaktadır. Yaşam tarzı ve diyet gibi diğer faktörler de bu hastalığın artan insidansında rol oynamaktadır, özellikle düşük insidansa sahip olan Asyalı kadınların Amerika Birleşik Devletleri'ne göç ettiklerinde bu hastalığa yakalanma oranlarında artış görülmektedir (29).

Çoğu bilinen EDC, östrojenik ve/veya antiandrojenik etkilere sahiptir ve sadece birkaçının androjenik veya antioestrojenik etkileri vardır. Dolayısıyla, bu maddelerin ergenliğin normal başlangıcını veya

hormon bağımlı büyümenin başka bir evresini etkilediği anlaşılmaktadır. Bu nedenle, çevresel endokrin bozucular maruz kalma ile sistemin bozulması, normal gelişimi derinden etkileyebilir. Hormon benzeri etkiler, insan sağlığının birçok yönünü, erkek ve dişi üreme organlarının bozulması, bağışıklık ve sinir sisteminin bozulması, metabolizma ve obezitenin ortaya çıkması gibi durumları ve dolayısıyla kanser riskini etkileyebilir. EDC'lerin meme, prostat, yumurtalık veya testis gibi belirli hormon bağımlı kanserler üzerindeki doğrudan etkileri konusunda bazı şüpheler bulunsa da endokrin fonksiyonun normal işleyişinin bozulmasının sadece kanserin başlamasında değil, aynı zamanda ilerlemesinde de uzun vadeli etkiler doğurabileceği açıktır. Kozmetik ürünler, yiyecekler ve ilaçlar gibi çeşitli kaynaklardan östrojenik bileşiklere maruziyet sonucu ortaya çıkan erken ergenlik vakaları hakkında birçok vaka raporu bulunmaktadır (30).

Çevremizde bol miktarda bulunan östrojen benzeri EDC'ler arasında DDT, dioksin, PCB'ler ve BPA bulunmaktadır. Bunlar, çeşitli plastik ürünlerde, alev geciktiricilerde, pestisitlerde ve günlük olarak kullanılan birçok üründe bulunan dış kaynaklı, insan yapımı kimyasallardır. Genel olarak, EDC'lerin ana etkileri, hızlı fizyolojik değişimlerin yaşandığı bir dönem olan ergenlik dönemindedir; büyüme atağı, gonadların ve beynin olgunlaşması gibi durumları etkileyerek endokrin sistemin normal işleyişini bozabilir ve doğal östrojenlerin sentezi, metabolizması ve hücresel tepkileri üzerinde çeşitli sağlık sorunlarına yol açabilirler. Özellikle, EDC'lerin yaygın varlığı, ergenliğin daha erken başlaması eğilimine katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Ayrıca, hücresel büyümenin hızlı olduğu diğer bir evre olan fetüs gelişimi de büyük ölçüde etkilenmektedir. Çevresel kirlenmeler veya kanser indükleyiciler ile ilgili olarak ergenliğin fizyolojik başlangıcını veya anne karnındaki meme bezi gelişimini düzenleyen faktörler karmaşık ve tam olarak anlaşılammıştır, bu da çevresel



kirleticilerin ve kanser indükleyicilerin olası rolünü araştırmayı zorlaştırmaktadır (31).

Prostat, erkek üreme sisteminin ana yardımcı bezi olup, erkek üremesinde önemli bir rol oynamaktadır. Bezin epitel dokusu tarafından salgılanan prostat sıvısı, sadece prostatın işlevselliğine değil, aynı zamanda sperm hareketliliği ve kapasitasyon gibi boşalma ile ilişkili adımlara ve dolayısıyla erkek doğurganlığına katkıda bulunan temel molekülleri içerir (32).

Prostat Kanseri (PCa), klinik olarak heterojen bir hastalıktır ve agresif olabileceği gibi metastaza ilerleyebilir veya asemptomatik olup yavaş seyredebilir. PCa, erkeklerde yaygın bir malignite olup, dünya genelinde beşinci en yüksek ölüm nedenidir (33). Buna rağmen, bu hastalığın yüksek görülme sıklığının altındaki mekanizma hala tam olarak anlaşılammıştır. Bu kanserin tedavisi ağırlıklı olarak cerrahi ve radyoterapiye dayanmaktadır; ancak bu tedavilere uygun olmayan hastalar, androjen ablasyon tedavisi ile tedavi edilirler (34). Ayrıca, androjenlerin yanı sıra östrojenik hormonlar da PCa gelişiminde rol oynar. Nitekim, anti-östrojenlerin kullanımının PCa yönetiminde terapötik bir rol oynadığı kabul edilmiştir (35).

PCa için belirlenmiş risk faktörleri, öncelikle yaş ve ırktır. Örneğin, Afrikalı Amerikalılar, Avrupalı bireylerden iki kat daha fazla PCa geliştirme veya PCa'dan ölme olasılığına sahiptir (36). Diğer faktörler, genetik, diyet ve çevresel faktörler de PCa riskini etkileyebilir. Bu faktörler arasında, endokrin bozucular (ED'ler) da yer alır. ED'ler düşük dozda etki gösterebilir ve birçok günlük üründe bulunabilir. Bu kirleticilere maruz kalma, büyük ölçüde kirlenmiş su ve yiyeceklerin alınması yoluyla gerçekleşir, ancak kirli havanın solunması veya doğrudan deri teması gibi diğer kaynaklar yoluyla da alınabilir (37). Çoğu ED, hormon benzeri kimyasallar olarak davranır, çoğunlukla östrojen benzeri veya antiandrojenler olarak, çünkü doğal endojen hormonlara benzer bir kimyasal yapıya sahiptirler. Bu nedenle, ED'ler

çeşitli hormonal yolları taklit edebilir veya engelleyebilir. ED'ler cinsel reseptörlerle hem ER hem de AR ile ve diğer nükleer olmayan reseptörlerle etkileşime girer (38).

İnsan prostat epitel hücrelerinde in vitro çalışmalar, hayvan modellerinde in vivo çalışmalar ve epidemiyolojik çalışmalar, ED'ler ile PCa riski arasında olası bir ilişkiyi işaret etmektedir. Ancak, belirli bir kimyasal ile insan PCa riski arasında doğrudan bir bağlantı henüz kurulmamıştır. İnsanlarda PCa riski ile ED maruziyetleri arasındaki doğrudan ilişki, bu toksik bileşiklerin kendine özgü özellikleri ve zamanla etki gösterme şekilleri nedeniyle zordur (39).

Dünya genelinde tiroid kanseri insidansı son yıllarda istikrarlı bir şekilde artmaktadır. Bu artışın bir kısmı, daha gelişmiş ve sık kullanılan görüntüleme teknolojisi sayesinde daha küçük tümörlerin erken veya tesadüfi olarak tespit edilmesiyle açıklanabilse de araştırmalar bu olguda çevresel kirleticilere maruz kalmanın potansiyel katkısını vurgulamaktadır (40). Birçok çalışma, belirli endokrin bozucu kimyasallara (EDC'ler) maruz kalmanın tiroid fonksiyonunu değiştirdiğini ve gelişimsel anormallikler, tiroid bozuklukları ve çeşitli kanser türleri de dahil olmak üzere birçok olumsuz sağlık sonucu ile ilişkili olduğunu öne sürmüştür. Bilinen ve şüphelenilen EDC'ler arasında pestisitler, alev geciktiriciler, poliklorlu bifeniller (PCB'ler), ftalatlar, perfloroalkil maddeler (PFAS) ve Bisfenol A (BPA) bulunmaktadır (41).

Tiroid kanseri insidansı son yıllarda istikrarlı bir şekilde artmıştır ve bu dönemde insanlara, muhtemel kanserojen etkileri olan çok sayıda şüpheli endokrin bozucu kimyasala maruz kalınmaktadır. EDC'lerin, hücrel ve moleküler seviyelerde endokrin sinyalleşmeyi bozduğu bilindiğinden, meme, prostat, testis ve tiroid gibi hormon duyarlı organların kanserlerine yol açma potansiyeli vardır. Belirli sentetik östrojen benzeri EDC'ler (örneğin, DDT, BPA) meme kanseri için potansiyel risk faktörleri olarak tanımlanmıştır; klorlu pestisitler ve

BPA, prostat kanseri riskinde artış ile potansiyel olarak ilişkilidir ve PFOA'nın testis kanseri riskinde artış ile ilişkili olabileceğinden şüphelenilmektedir. Mevcut derleme, farklı EDC'lerin ve tiroid bezi üzerindeki potansiyel kanserojen etkilerinin değerlendirilmesi için daha fazla araştırmaya acilen ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir, çünkü mevcut bilgilere göre bilinen EDC'lerin neredeyse tamamı hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır. Çoğu EDC, aralıklı olarak incelenmiş ve elde edilen sonuçlar tutarsızdır. Genel olarak mevcut literatür, alev geciktiriciler, PCB'ler, ftalatların bazı kongenerlerine ve belirli pestisitlere maruz kalmanın, tiroid kanseri riskinde potansiyel bir artış ile ilişkili olabileceğini öne sürmektedir. EDC maruziyetinin dünya genelindeki tiroid kanseri yükündeki rolünü araştırmanın acilen gerektiğini göstermektedir. Uzunlamasına, popülasyona dayalı maruziyet çalışmaları ile savunmasız popülasyonların çalışmaları, belirli kimyasalların potansiyel tehlikeleri hakkında bilgi düzeyini artırmak, düzenleyici eylemleri ve politikaları şekillendirmek ve nihayetinde halk sağlığını iyileştirmek için kritik öneme sahiptir (42).

Hamile kadınlar ve bebekler/çocuklar gibi belirli popülasyonların EDC'lere daha duyarlı olduğu bildirilmiştir, çünkü bu bireylerde organlar henüz oluşum aşamasında olup belirli endokrin geri bildirim mekanizmaları henüz olgunlaşmamıştır. Hamilelik sırasında EDC'lere maruz kalmanın, yaşamın ilerleyen dönemlerinde obezite ve metabolik hastalıklar gibi birçok hastalıkla ve bazı üreme kanserleriyle ilişkilendirildiği belirtilmiştir (43).

## Kaynakça

- 1) Monneret, C. (2017). What is an endocrine disruptor?. *Comptes Rendus. Biologies*, 340(9-10), 403-405.
- 2) Kavlock RJ, Daston GP, DeRosa C, Fenner-Crisp P, Gray LE, Kaattari S, Lucier G, Luster M, Mac MJ, Maczka C, Miller R, Moore J, Rolland R, Scott G, Sheehan DM, Sinks T, Tilson HA. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ Health Perspect.* 1996 Aug;104 Suppl 4(Suppl 4):715-40.
- 3) Blumberg, P., McCann, Ann., 2009. Developing Learner-Centered Teaching: A Practical Guide for Faculty, 73; 9 1125-1126
- 4) Caliman, F. A., & Gavrilesco, M. (2009). Pharmaceuticals, personal care products and endocrine disrupting agents in the environment - A review. *Clean - Soil, Air, Water*, 37(4-5), 277-303
- 5) Öksüz T, Özdal T, Şahin N, Yeşilçubuk D, Erdil N, Gıdalara Bisfenol A (BPA) Migrasyonu ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri, *Akademik Gıda* 10(3) (2012) 93-98.
- 6) Esteban R, Verborgh P, Gauffier P, Giménez J, Martín V, Pérez-Gil M, Tejedor M, Almunia J, Jepson PD, García-Tiscar S, Barrett-Lennard LG, Guinet C, Foote AD, Stephanis R, 2016. Using a multi-disciplinary approach to identify a critically endangered killer whale management unit. *Ecological Indicators* 66; 291-300.
- 7) Rochefort H. Endocrine disruptors (EDs) and hormone-dependent cancers: Correlation or causal relationship? *C R Biol.* 2017 Sep-Oct;340(9-10):439-445.
- 8) Ghosh, D., Ghosh, A. & Bhadury, P. Arsenic through aquatic trophic levels: effects, transformations and biomagnification—a concise review. *Geosci. Lett.* 9, 20 (2022).
- 9) Alves-Silva J. M., Dias dos Santos S. M., Pintado M. E., Pérez-Álvarez J. A., Fernández-López J., ViudaMartos M., (2013). Chemical Composition and In Vitro Antimicrobial, Antifungal and Antioxidant Properties of Essential Oils Obtained From Some Herbs Widely Used in Portugal. *Food Control* 32: 371-378.

- 10) Fendođlu BY, GümüŖel BK, Erkekođlu P, 2019, Endokrin Bozucu Kimyasal Maddelere ve Etki Mekanizmalarına Genel Bir BakıŖ, Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy, 39; 30-43.
- 11) L3pez-Rodr3guez D, Aylwin CF, Delli V, Sevrin E, Campanile M, Martin M, Franssen D, G3rard A, Blacher S, Tirelli E, No3l A, Lomniczi A, Parent AS. Multi- and Transgenerational Outcomes of an Exposure to a Mixture of Endocrine-Disrupting Chemicals (EDCs) on Puberty and Maternal Behavior in the Female Rat. *Environ Health Perspect.* 2021 Aug;129(8):87003.
- 12) Yılmaz, D., Düzgün, F., Dikmen, Y. (2019). HemŖirelerin kanıta dayalı hemŖireliđe y3nelik tutumlarının belirlenmesi. *Acı Badem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 10(4), 713-719.
- 13) Greenwell M, Rahman PK. Medicinal Plants: Their Use in Anticancer Treatment. *Int J Pharm Sci Res.* 2015 Oct 1;6(10):4103-4112.
- 14) Gill, O., 1988. Extending the storage life of raw chilled meats, *Meat Science*, 99-109.
- 15) Miksicek, R.J. (1995) Estrogenic Flavonoids: Structural Requirements for Biological Activity. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 208, 44-50.
- 16) Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993;90:11162–11166.
- 17) Arambula SE, Belcher SM, Planchart A, Turner SD, Patisaul HB. 2016. Impact of low dose oral exposure to bisphenol A (BPA) on the neonatal rat hypothalamic and hippocampal transcriptome: a CLARITY-BPA Consortium study. *Endocrinology* 157(10):3856–3872,
- 18) Adlercreutz, H., Bannwart, C., W3h3l3, K., M3kel3, T., Brunow, G., Hase, T., ... & Vickery, L. E. (1993). Inhibition of human aromatase by mammalian lignans and isoflavonoid phytoestrogens. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 44(2), 147-153.
- 19) Baird, D. D., Umbach, D. M., Lansdell, L. Y. L. E., Hughes, C. L., Setchell, K. D., Weinberg, C. R., ... & McLachlan, J. A. (1995). Dietary intervention study to assess estrogenicity of dietary soy among

- postmenopausal women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 80(5), 1685-1690.
- 20) Gea, M., Fea, E., Racca, L., Gilli, G., Gardois, P., & Schilirò, T. (2023). Atmospheric endocrine disruptors: A systematic review on oestrogenic and androgenic activity of particulate matter. *Chemosphere*, 140887.
- 21) Kabir, E. R., Rahman, M. S., & Rahman, I. (2015). A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environmental toxicology and pharmacology*, 40(1), 241-258.
- 22) Annamalai J, Namasivayam V. Endocrine disrupting chemicals in the atmosphere: Their effects on humans and wildlife. *Environ Int*. 2015 Mar;76:78-97.
- 23) Varticovski, L., Stavreva, D. A., McGowan, A., Raziuddin, R., & Hager, G. L. (2022). Endocrine disruptors of sex hormone activities. *Molecular and cellular endocrinology*, 539, 111415.
- 24) Walker DM, Gore AC. Epigenetic impacts of endocrine disruptors in the brain. *Front Neuroendocrinol*. 2017 Jan;44:1-26.
- 25) Calaf, G. M., Ponce-Cusi, R., Aguayo, F., Muñoz, J. P., & Bleak, T. C. (2020). Endocrine disruptors from the environment affecting breast cancer. *Oncology letters*, 20(1), 19-32
- 26) Diamanti-Kandarakis, E., Palioura, E., Kandarakis, S. A., & Koutsilieris, M. (2010). The impact of endocrine disruptors on endocrine targets. *Hormone and Metabolic Research*, 42(08), 543-552.
- 27) Macon, M. B., & Fenton, S. E. (2013). Endocrine disruptors and the breast: early life effects and later life disease. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 18, 43-61.
- 28) Lee Davis, D., & Bradlow, H. L. (1995). Can environmental estrogens cause breast cancer?. *Scientific American*, 273(4), 166-172.
- 29) Safe, S. H. (1995). Environmental and dietary estrogens and human health: is there a problem?. *Environmental Health Perspectives*, 103(4), 346-351.
- 30) Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J. P., Giudice, L. C., Hauser, R., Prins, G. S., Soto, A. M., ... & Gore, A. C. (2009). Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocrine reviews*, 30(4), 293-342

- 31) Roy, J. R., Chakraborty, S., & Chakraborty, T. R. (2009). Estrogen-like endocrine disrupting chemicals affecting puberty in humans--a review. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 15(6), RA137-45.
- 32) Verze, P., Cai, T., & Lorenzetti, S. (2016). The role of the prostate in male fertility, health and disease. *Nature Reviews Urology*, 13(7), 379-386.
- 33) Rawla, P. Epidemiology of Prostate Cancer. *World J. Oncol.* 2019, 10, 63–89.
- 34) Evans, A. J. (2018). Treatment effects in prostate cancer. *Modern Pathology*, 31, 110-121.
- 35) Di Zazzo, E., Galasso, G., Giovannelli, P., Di Donato, M., & Castoria, G. (2018). Estrogens and their receptors in prostate cancer: therapeutic implications. *Frontiers in oncology*, 8, 2.
- 36) Hur, J., & Giovannucci, E. (2020). Racial differences in prostate cancer: does timing of puberty play a role?. *British Journal of Cancer*, 123(3), 349-354.
- 37) De Falco, M., & Laforgia, V. (2021). Combined effects of different endocrine-disrupting chemicals (EDCs) on prostate gland. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(18), 9772.
- 38) Bleak, T. C., & Calaf, G. M. (2021). Breast and prostate glands affected by environmental substances. *Oncology Reports*, 45(4), 1-1
- 39) Corti, M., Lorenzetti, S., Ubaldi, A., Zilli, R., & Marcoccia, D. (2022). Endocrine disruptors and prostate cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1216.
- 40) Fiore, M., Oliveri Conti, G., Caltabiano, R., Buffone, A., Zuccarello, P., Cormaci, L. Ferrante, M. (2019). Role of emerging environmental risk factors in thyroid cancer: a brief review. *International journal of environmental research and public health*, 16(7), 1185.
- 41) Alsen, M., Sinclair, C., Cooke, P., Ziadkhanpour, K., Genden, E., & van Gerwen, M. (2021). Endocrine disrupting chemicals and thyroid cancer: an overview. *Toxics*, 9(1), 14.
- 42) Boas, M., Feldt-Rasmussen, U., & Main, K. M. (2012). Thyroid effects of endocrine disrupting chemicals. *Molecular and cellular endocrinology*, 355(2), 240-248.

- 43) Zhou, Z., Zhang, J., Jiang, F., Xie, Y., Zhang, X., & Jiang, L. (2017). Higher urinary bisphenol A concentration and excessive iodine intake are associated with nodular goiter and papillary thyroid carcinoma. *Bioscience reports*, 37(4), BSR20170678.





## BÖLÜM 3

### APOPTOTİK MEKANİZMALAR İLE İLGİLİ GENLER

Biyolog Müge MUŞMULA<sup>1</sup>

Doç. Dr. Senem AKKOÇ<sup>2,3</sup>

---

<sup>1</sup>Süleyman Demirel Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Isparta, Türkiye. mugemusmula@hotmail.com, Orcid ID: 0000-0001-9442-5058, <sup>2</sup>Süleyman Demirel Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü, Isparta, Türkiye. senemakkoc@sdu.edu.tr, Orcid ID: 0000-0002-1260-9425, <sup>3</sup>Bahçeşehir Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, İstanbul, Türkiye. senem.akkoc@bau.edu.tr, Orcid ID: 0000-0002-1260-9425



## GİRİŞ

“Apoptoz” veya “düşen yaprak” kelimesi, çeşitli bilim dallarında çalışan uzmanlar tarafından uzun zamanlardır en çok araştırma yapılan bilimsel bir terim olmuştur. Apoptoz teriminin ilk kullanımı eski Yunanistan’a uzansa da Hipokrat (~ MÖ 460-370)’ın Mochlicon adlı kitabında doku ayrışmasını tanımlamasıyla apoptozun ilk kullanımı gerçekleşmiştir. Ancak bilimsel literatürde tanıtılması ise 1972 yılını bulmuştur (1). Apoptoz, belirli durumlar altında bir dizi sinyal kaskadıyla düzenli bir şekilde düzenlenen bir programlı hücre ölümü şeklindedir (2,3). Apoptozun indüksiyonu ve yürütülmesi, sinyal molekülleri, reseptörler, enzimler ve gen düzenleyici proteinler dahil olmak üzere bir dizi molekülün düzenli çalışmasını gerektirir (3). Hücrelerin kontrollerinin sağlanmasında hücre sinyallerinin ve spesifik gen ifadesinin karmaşık yapılarının anlaşılması önemlidir. Apoptozun bir tetikleyicisi olan bir apogene maruz kalma, homeostatik süreçler sırasında ve ayrıca akut veya kronik toksisiteler sırasında apoptotik hücre kaybını önemli ölçüde artırabilir (2). Apoptotik hücre ölümü, hücrenin büzülmesi, sitoplazmanın kasılması, kromatinin yoğunlaşması ve fagositik hücreler tarafından yutulma gibi bir dizi morfolojik değişikliklerle karakterize edilir. Moleküler düzeyde, apoptotik hücre ölümü 'kaspazların' (sisteinil, aspartat-spesifik proteazlar) aktivasyonu ile karakterize edilir (4). Tamamen aktif hale geldiklerinde, bu hücre ölümü proteazları geri döndürülemez bir şekilde hücrenin ölümüne yol açan süreçleri başlatır. Nematodlarda, sineklerde ve memelilerde, kaspazların olgunlaşması ve aktivasyonu, kendi kendini aktive etmesine izin veren pro-kaspazlar için bir iskele olan 'apoptozom' tarafından kolaylaştırılır. Apoptozomlar, *Caenorhabditis elegans* durumunda CED-4, *Drosophila melanogaster* durumunda Dark ve memelilerde APAF1 olan tek bir APAF1 (APAF1, apoptozu teşvik eden faktör 1) benzeri adaptör proteinden oluşur (5,6,7,8). APAF1’in birleşmesi, mitokondrinin zarlar arası boşluğundan sitokrom c salınmasına bağlıdır. Apoptotik

sinyallere yanıt olarak BAD veya BID gibi sadece pro-apoptotik BH3 proteinleri aktive edilir ve anti-apoptotik BCL-2 benzeri proteinleri bloke ederek ve muhtemelen BAX benzeri proteinleri doğrudan aktive ederek sitokrom c salınması, apoptozom birleşmesi ve kaspaz aktivasyonu sağlanır (9).

Apoptozu tetikleyebilecek çok çeşitli fizyolojik ve patolojik uyarılar ve durumlar olmasına rağmen, tüm hücreler aynı uyarana aynı yanıtı vermezler. Örneğin, kortikosteroidler gibi bazı hormonlar timositler gibi bazı hücrelerde apoptotik ölüme yol açarken diğer hücreler bu durumdan etkilenmeyebilir hatta uyarılabilir veya kanser kemoterapisinde kullanılan ışınlama veya ilaçlar bazı hücrelerde DNA hasarına neden olarak p53'e bağlı yol aracılığıyla apoptotik hücre ölümüne yol açabilir. Kaspazlar, apoptoz inhibitörü proteinler, B hücreli lenfoma (BCL)-2 gen ailesi, tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör gen süper ailesi veya p53 geni gibi farklı gen aileleri apoptoz sürecinde rol oynar ve/veya iş birliği yapar (10,11).

### **1.Apoptozun Morfolojik ve Biyokimyasal Süreçleri**

Onarılamaz DNA hasarının da dahil olduğu birçok uyarana karşı normal fizyolojik yanıt apoptoz ile gerçekleşir (65). Apoptoz sürecinde birçok biyokimyasal olay ve bir dizi morfolojik değişiklik meydana gelir (11). Apoptoz, normalde gelişim ve yaşlanma sırasında ve dokulardaki hücre popülasyonlarını korumak için olması gereken homeostatik bir mekanizmadır. Ancak bağışıklık reaksiyonları veya hücreler hastalık veya zararlı ajanlar tarafından hasar gördüğünde bir savunma mekanizması olarak görev yapar (4). Örneğin; apoptoz, onarılamaz DNA lezyonları oluşturan sitotoksik ilaç tedavileri veya radyoterapi programları da dahil olmak üzere birçok uyarana, enfeksiyona veya hasara karşı normal fizyolojik hücre ölümü tepkisidir (12).

Apoptoz sırasında oluşan hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması veya nükleer farklılıklar gibi çeşitli morfolojik değişiklikler ışık ve

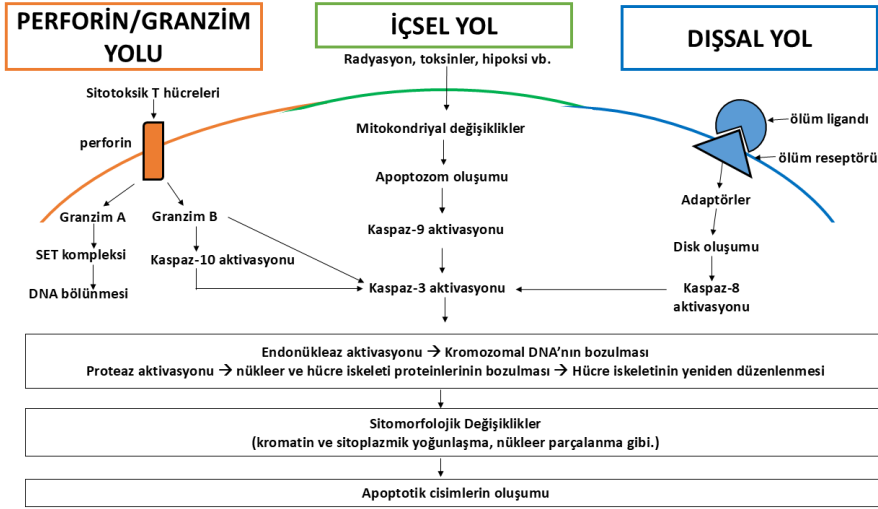
elektron mikroskopisi ile tanımlanmıştır (4,11). Apoptozun yapısal değişikliğinde ilk olarak nükleer sitoplazmik yoğunlaşmayı ve hücrenin bir dizi zarla çevrili, yapısal olarak iyi korunmuş parçalara ayrılması ile gerçekleşir. Sonradan iyi korunmuş parçalara ayrılmasına apoptotik cisimler adı verilir. Apoptotik cisimleri epitel kaplı yüzeylerden dökülen diğer hücrelerin almasıyla fagozomlar içinde in vitro otolize benzeyen bir dizi hücre değişikliğine uğrarlar ve sindirilen hücrelerden türetilen lizozomal enzimler tarafından hızla parçalanırlar (13,14,11). Apoptotik cisimler, nükleer parçalı veya parçasız sıkıca paketlenmiş organellere sahip sitoplazmadan oluşur. Organel bütünlüğü korunmaya devam eder ve bu gerçekleşen olayların hepsi sağlam bir plazma zarı içinde olur. Bu gövdeler daha sonra makrofajlar, parankimal hücreler veya neoplastik hücreler tarafından fagosite edilerek fagolizozomlar içinde parçalanır (4). Çekirdekte gözlenen başlıca değişikliklerden biri kromatinin geri döndürülemez şekilde yoğunlaşmasıdır ve bu durum hücre ölümü olduğunu gösterir. Sonrasında apoptoz sırasındaki çekirdekte gerçekleşen diğer ve son olay ise nükleer parçalanmadır (11). Apoptotik hücrelerden gelen nükleer atık parçalarına “tinible body” denir. Apoptotik hücreleri saran ve sindiren makrofajlara "tinible body makrofajları" denir ve sıklıkla lenfoid foliküllerin reaktif germinal merkezlerinde veya nadiren timik kortekste bulunurlar (4). Hücrelerde apoptoz başlar başlamaz, komşu hücreler arasındaki bağlantıyı kaybederler; zar büzülür ve hücre sitozolik bileşenlerini apoptotik cisimlere paketler. Apoptotik cisimler, normalde hücre zarının iç tarafında bulunan ve apoptoz sırasında dış zara dönen fosfatidilserini tanıyan fagositotik hücreler tarafından ortadan kaldırılır. Aynı zamanda, sitoplazmik iskele proteinleri ve aktin,  $\beta$ -katenin, spektrin veya GAS2 gibi hücre bağlantı proteinleri kesilerek deaktive edilir ve kaspazların aktive olmasıyla hücre bütünlüğünü kaybeder (15).

Apoptotik hücreler hücresel bileşenlerini çevredeki interstisyel dokuya salmazlar, çevredeki hücreler tarafından hızla fagosite edilirler

ve böylece ikincil nekrozu önlerler ve hücreler anti-inflamatuar sitokinler üretmezler gibi sebeplerden dolayı apoptoz gerçekleşmesiyle ilgili hiçbir inflamatuvar reaksiyon oluşmaz (4).

## 2.Apoptoz Mekanizmaları

Apoptoz mekanizmaları oldukça karmaşık ve enerji bağımlı moleküler olaylar dizisini içerir. Dışsal (ekstrinsik, ölüm reseptörü yolu) ve içsel (intrinsik, mitokondriyal yol) olmak üzere iki ana apoptotik yol vardır (4). Hem dış hem de iç uyarılar, dışsal ve içsel apoptoz yollarına bağlı olarak apoptozu başlatabilir. Aynı zamanda bir serin proteaz olan granzim, hedef hücrelerde apoptozla ilişkili DNA bozunmasının anahtarıdır. Apoptozun dışsal ve içsel yollarından farklı olarak, perforin/granzim aracılı apoptoz (Şekil 1) yalnızca T hücreleri aracılığıyla gerçekleşen sitotoksik hücre ölümlerinde kullanılır (16).



**Şekil 1.** Apoptotik Mekanizma Yollarının Şematik Gösterimi. Apoptozun içsel ve dışsal apoptoz yoluna ek olarak ayrıca perforin/granzim yolu da vardır. Her üç yolda kendi başlatıcı kaspazını aktive ettikten sonra her üç yol için de ortak olan kaspaz-3 aktivasyonu gerçekleşir. Perforin/Granzim yolundaki Granzim A ise kaspazdan bağımsız çalışır.

Apoptozdaki moleküler mekanizma kritik olarak, MOMP ile başlatılan içsel bir yol aracılığıyla veya FAS ve DR4/5 gibi ölüm reseptörlerinin, ölüm indükleyen ligandları, örneğin sırasıyla FASL ve TRAIL tarafından hücre yüzeyinde tetiklenen kaspaz proteazların aktivasyonunu gerektirir. Özellikle, onarılamaz genomik mutasyonlara uğrayan hücrelerin mutasyonların yavrulara geçmesini önlemek için apoptozu aktive etmesi önemli bir tümör baskılayıcı stratejidir (12).

Hücre yıkımının gerçekleştirilmesinden sorumlu kaspazların aktivasyonuna yol açan sinyal yolları aracılığıyla ölüm sinyalleri iletilir (16). Apoptoz sırasıyla kaspaz -3, -6 ve -7'nin aşağı akış aktivasyonunu yönlendiren kaspaz-9 veya kaspaz-8/-10'u aktive ederek içsel veya dışsal yollarla meydana gelir (17). Apoptoz, ölüm reseptörleri ile ligandları arasındaki etkileşim dışsal yolu veya çeşitli fiziksel veya kimyasal streslerle uyarılan MOMP içsel yolu tetikleyebilir. Her iki yolda da başlatıcı kaspazlar, çok proteinli bir sinyal kompleksine alınır ve burada dimerizasyon yoluyla aktive edilirler. Apoptozdaki başlatıcı kaspazların temel görevi, infazcı kaspazları kesmek ve aktive etmektir. Ayrıca, ölüm reseptörleri tarafından aktive edilen başlatıcı kaspaz olan kaspaz-8, yalnızca BH3 proteini BID'i keserek dışsal yolu ve içsel yolu birbirine bağlar. Kaspaz-8 tarafından bölünmesi, BAK ve BAX'ı aktive ederek veya doğrudan kendi başına MOMP'yi indükleyebilen 15 kDa'lık bir C-terminal fragmanı tBID'i üretir (18). BID'nin kesilmiş tBID'ye ayrılmasıyla tBID, sitokrom c'yi serbest bırakmak için mitokondriyal BAK'ye bağlanarak BAK'ın allosterik aktivasyonunu sağlar. Sitokrom c dışarı akış için bir mitokondriyal gözenek içerisine intramembranöz oligomerizasyonu indükler ve ölüm reseptörlerinden hücre ölümüne giden yolu tetikler (19).

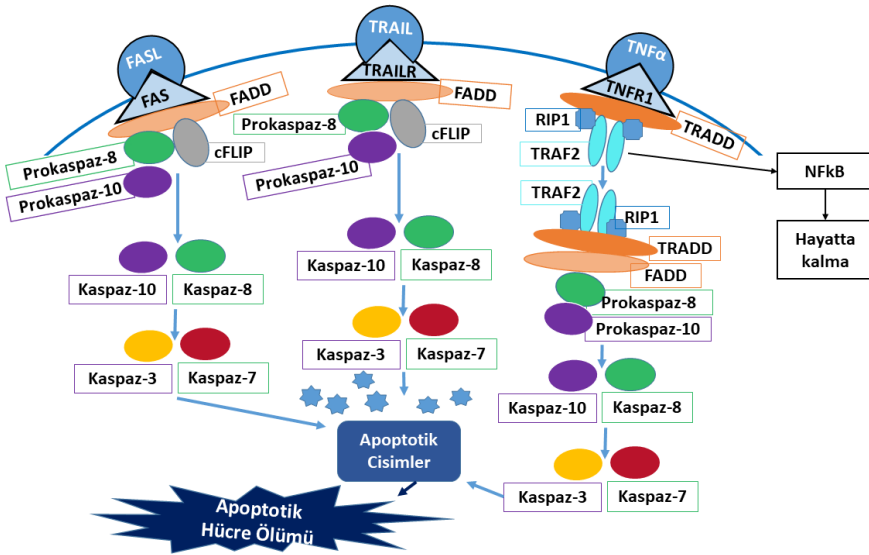
### **2.1.Dışsal Apoptoz Yolu (Ekstrinsik Apoptoz Yolu)**

Dışsal yol, apoptozun reseptör aracılı başlatılmasını ifade eder (16). Bu yolla apoptoz, öncelikle tümör nekroz faktörü (TNF) gen süper ailesine ait zarla bağlı ölüm reseptörleri aracılığıyla sinyal sağlayarak



tetiklenir (11). Apoptozun dışsal yolu, CD95 ligandı (CD95L, FASL), APO2 ligandı (APO2L, TRAIL) veya tümör nekroz faktörü- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) gibi ölüm ligandları, ölüm indükleyen sinyal kompleksinin (DISC) oluşumunu ve dışsal apoptoz yolunun yürütülmesini başlatmak için kendi kognat reseptörlerini harekete geçirir (15,11, 20). Dışsal yoldaki ölüm reseptörleri, transmembran bölgeleriyle hücre zarına bağlanır. Hücre dışı bir ligandla etkileşime girdiklerinde, zar reseptörleri ölüm sinyallerini sitoplazmik ölüm alanları aracılığıyla hücre içi boşluğa iletir. Apoptozda yer alan zar reseptörleri, aktivasyonu iki ana ligand olan TNF ve FAS'a bağlı olan tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör süper ailesine aittir. TNF reseptörüyle ilişkili ölüm alanı (TRADD) ve Fas ile ilişkili ölüm alanı proteini (FADD) ve kaspazların etkisiyle programlanmış hücre ölümünü etkiler (Şekil 2). TNF ligandları, membrandaki TNF reseptörlerine bağlanan homotrimerler oluşturur. Bağlanma üzerine, adaptör proteinler, adaptör proteinlerindeki ölüm alanlarının reseptörlerdeki karşılıklarıyla etkileşime girdiği sitoplazmik taraftaki TNF reseptörlerine (TRADD, FADD ve RIP) bağlanır. FADD, bu durumda ölüm efektör alanlarının homotipik etkileşimi (DED) yoluyla alt akış etkileşimcisi olan prokaspaz-8 daha sonra hücre ölümünün yürütme fazını başlatan aktif kaspaz-8'i üretmek için bölünür. Kaspaz-8, çeşitli hücre içi proteinlerin proteolitik bozunmasının son yürütülmesinden sorumlu aktif kaspaz-3 üretmek için proteolitik parçalanma yoluyla prokaspaz-3'ü parçalar (16). FAS aracılı yol çok benzer bir sinyalleme sürecinden geçer. FASL, FAS reseptörlerine bağlanarak yolu tetikler (11, 16). Fas reseptörleri, FADD ve prokaspaz-8 ile birlikte ölüm indükleyici sinyalleme kompleksini (DISC) oluşturur (16). DISC alımı kaspaz-8'in aktivasyonuna ve ardından efektör kaspaz-3 ve -7'nin aktivasyonuna yol açar. Birkaç ubikitin ligazı, apoptoz protein inhibitör (IAP) proteinleri de dahil olmak üzere hücre ölümünün inhibisyonunda kritik bir şekilde yer alırken, FBW7 (F-box ve WD tekrar içeren 7) ve MULE (MCL1 ubikitin ligazı E3) gibi diğerleri, E3 ligaz aktiviteleri yoluyla apoptozu teşvik eder. Apoptotik yollar genellikle

birbirine bağlıdır ve bu da sinyal amplifikasyonu için önemlidir. Örneğin, aktive edilmiş kaspaz-8, sitokrom c ve SMAC salınımını uyararak için mitokondriye taşınan aktif formu olan tBID'i oluşturmak için BID'yi kesebilir (20). BID, BCL-2 ailesinin proapoptotik üyesidir ve apoptozun içsel ve dışsal yolları arasında ortak bir moleküldür. Kaspaz-8, sitoplazmik BID proteininin kesilmesine ve miristoilasyona neden olur ve bu da mitokondri boyunca hareketine yol açar. Daha sonra, apoptozom oluşumu BAK ve BAX molekülleri aracılığıyla sitokrom c salınımı ile indüklenir (11,20). MOMP ve sitokrom c'nin salınması, apoptozomların oluşumunu ve kaspaz-3 aktivasyonunu tetikleyerek apoptotik hücre ölümü gerçekleştirir (Şekil 2) (21).



Şekil 2. Dışsal Apoptoz Yolu Mekanizması

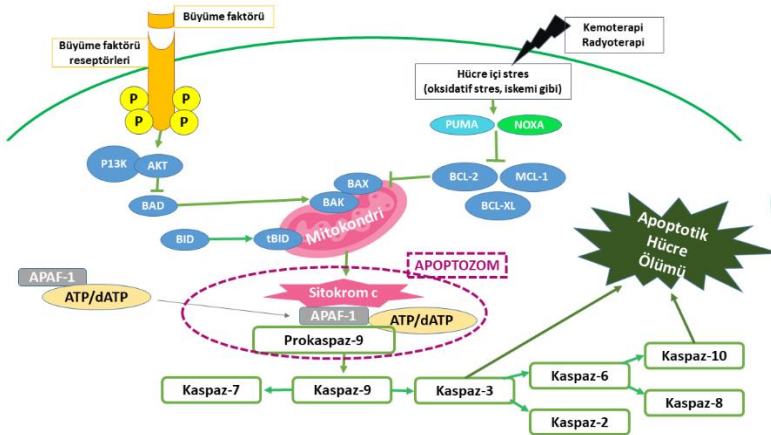
Apoptozun dışsal aktivasyonu da iki farklı yolla engellenebilir. Biri FLICE benzeri inhibitör proteininin (cFLIP) FADD ve prokaspaz-8'e bağlanması ve bunların aktivitesini bloke etmesi, diğeri ise ilk olarak T hücrelerinde tanımlanan TOSO adlı bir protein tarafından kaspaz-8 biyogenezinin engellenmesidir (11,22).

## 2.2.İçsel Apoptoz Yolu (İntrinsik Apoptoz Yolu)

Dış uyaranlara ek olarak, apoptoz DNA hasarı, kemoterapötik ajanlar, büyüme faktörleri, hipoksi veya oksidatif stres gibi iç uyaran modları tarafından da düzenlenir veya aktive edilir (15,23,20). Apoptoz yolu, reseptör aracılı olmayan başlatma ve mitokondriyal düzenleme ile karakterize edilir (16). İçsel yolda, uyarılar doğrudan hücre içinde biyokimyasal değişikliklere yol açan hücre içi sinyaller üretir (16). BAX ve BCL-2 dahil olmak üzere BCL ailesinin üyeleri, sırasıyla pro- veya antiapoptotik proteinler olarak bilinir, mitokondriyal zarında bulunur ve içsel apoptotik yolda görev alırlar (15). BCL-2 homoloji 3 (BH3)-sadece B-hücreli lenfoma 2 (BCL-2) ailesi proteinlerinin [BH3 ile etkileşen alan ölüm agonisti (BID), BCL-2 hücre ölümü antagonisti (BAD), p53 yukarı düzenlenmiş apoptoz modülatörü (PUMA), NOXA veya BCL-2 ile etkileşen hücre ölümü aracısı (BIM)] aktivasyonuna ve anti-apoptotik BCL-2 proteinlerinin [BCL-2, BCL-extra large (BCL-XL) ve miyeloid lösemi hücre farklılaşması 1 (MCL1)] nötralizasyonuna yol açar (20). Mitokondriyal geçirgenlik geçiş gözeneginin açılmasına yol açan ve mitokondriyal membran potansiyelinin kaybına ve ardından sitozole bir dizi proapoptotik proteinin salınmasına neden olan hücre içi bir sinyal üretir (23,20). Sitokrom c, SMAD veya yüksek sıcaklık gereksinim proteini A2 (HtrA2)/Omi, mitokondriden salınan ve kaspaz protein kaskadının aktivasyonuna neden olan bir grup pro-apoptotik moleküldür (11).

Bunlardan biri olan sitokrom c, apoptozom olarak bilinen APAF-1'i içeren büyük bir kompleksin oluşumunu katalize eder (11,23,20). Heptamerik APAF-1 apoptozomu, birlikte bir holoenzim oluşturarak kaspaz-9 aktivasyonu için önemlidir (24). İçsel apoptoz yolunun düzenlenmesinde merkezi olan, apoptozom ile kaspaz-9 adı verilen bir proteaz arasındaki etkileşimdir. Kaspaz-9, aktivasyonu kaspaz aracılı hücre ölümünü başlattığı için başlatıcı kaspaz olarak adlandırılır (11,23). Apoptozom, aktif kaspaz-9'u üretmek için prokaspaz-9'u keser ve bu da

efektör kaspaz olan kaspaz-3'ü aktive eder (25,26,16). Kaspaz-3 aktive olduktan sonra, son kaskad aktive olur ve nükleer membranın kırılmasıyla birlikte çekirdek parçalanır. Bu aşama, kaspaz-3'ün kinazlar, DNA kontrol proteinleri, sitoskeletal proteinler veya endonükleaz inhibitörleri gibi farklı proteinleri parçaladığı apoptozun dışsal ve içsel yollarının ilk gelişen mekanizmasıdır. DNA yoğunlaşması, plazma zarının kabarcık oluşturması ve tüm morfolojik değişimler hem içsel hem de dışsal tetikleyiciler için ortak bir mekanizma olarak kaspazlar tarafından düzenlenir (11). Kaspazların küçük mitokondri kökenli aktivatörü olarak bilinen SMAC protein grubu, sitozole salındıktan sonra IAP'ne bağlanır (25,26,16). IAP; NAIP, BIRC2, BIRC3, XIAP, BIRC5, BIRC6, BIRC7 ve BIRC8 olan sekiz üyeden oluşur ve çeşitli insan malignitelerinde yüksek oranda ifade edilir (13). SMAC'ler IAP'yi devre dışı bırakarak apoptozun ilerlemesini sağlar (16). DIABLO ve OMI gibi diğer IAP inhibitörleri de bulunur. Bu proteinler, apoptozun kaspaz bağımlı yolunda yer alır (16). Apoptozomun yokluğunda, kaspaz-9 sitozolde inaktif bir monomer olarak serbestçe bulunur, ancak apoptozoma bağlanması kaspaz-9 aktivasyonuna yol açar, bu da daha sonra proteolitik bölünme yoluyla kaspaz-3 ve kaspaz-7'yi aktive eder ve sonuçta hücre ölümüne yol açar (Şekil 3) (27,23).



Şekil 3. İçsel Apoptoz Yolu Mekanizması

Apoptoz indükleyici faktörler (AIF'ler) olarak bilinen ikinci bir protein grubu, apoptozun kaspaz bağımsız yolunda işlev görür. AIF'ler mitokondrinin iç zarına bağlanır. Kalsiyum bağımlı bir proteaz olan kalpain tarafından kesildikten sonra, AIF'ler DNA parçalanmasını ve kromatin yoğunlaşmasını indüklemek için nükleer lokalizasyon sinyali ile çekirdeğe taşınabilir (16).

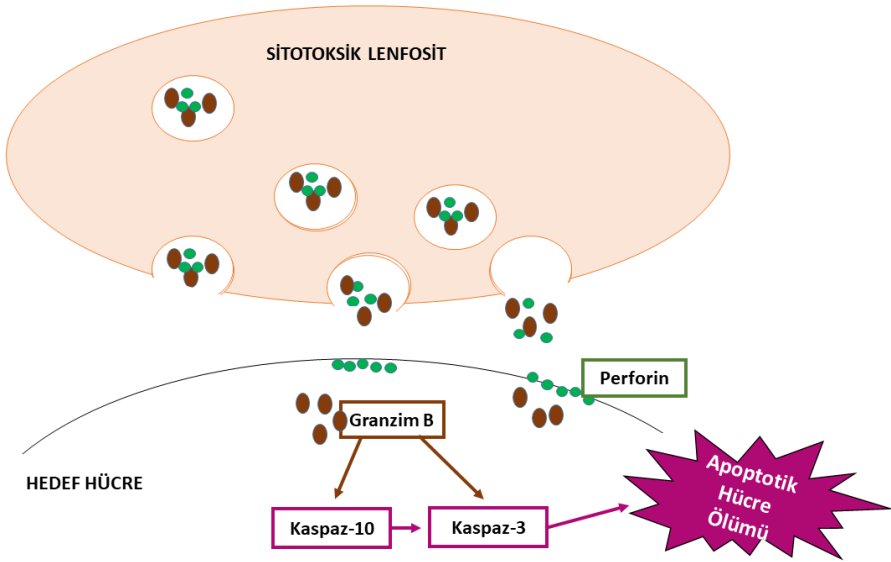
Ayrıca endoplazmik retikulum (ER)'da apoptozda rol oynar. ER içindeki proteinlerin fazla birikmesi ve kalsiyum homeostazının bozulması ER stresini ve dolayısıyla apoptozu tetikleyebilir. Bir çalışmada, kaspaz-12 geninin yok edildiği fareler apoptoza direnç göstermiştir ve bu da kaspaz-12'nin ER aracılı apoptoz yollarındaki rolünün bir göstergesidir. ER membranında bulunan kaspaz-12, ER aracılı apoptoz için gereklidir. ER yanıtı, kaspaz-12 ekspresyonunu ortaya çıkarırken sitoplazmik kaspaz-7'yi ER membranına taşır ve burada kaspaz-12 aktive olur ve apoptoz gerçekleşir (16).

Tüm içsel apoptoz olayları öncelikle BCL-2 ailesi proteinleri ve BCL-2 ailesi proteinlerinin aktivasyonunda büyük ölçüde rol oynayan p53 tümör baskılayıcı proteini tarafından kontrol edilir. BCL-2 protein ailesinin üyeleri pro-apoptotik (BAX, BAK, BID, BIM, PUMA, NOXA, BAD ve BLK) veya anti-apoptotik (BCL-2, BCL-XL, BCL-X ve BAG) olarak hareket edebilir ve ayrıca mitokondrinin zar bütünlüğünü belirler ve sitokrom c salınımı sürecinde rol oynar (10,11).

## **2.2.Perforin/Granzim Apoptoz Yolu**

Perforin/granzim, iki bileşenden oluşan başka bir ek apoptotik yoldur, yani Granzim A ve Granzim B (15). Bu salgısal apoptotik yol, patojenle enfekte olmuş hücreleri ve tümör hücrelerini çıkarmada etkilidir. Perforinler ve granzimler, sitotoksik lenfositlerin ve doğal öldürücü hücrelerinin sitoplazmik salgısal granüllerinden salınan serin proteazlardır (28,15). Hücre öldürülmesi sırasında, sitotoksik granüllerin içerikleri hedef hücrelerin zarlarına salınır. Salınan moleküller arasında

gözenek oluşturan bir protein olan perforin ve granzimler (Granzim A ve Granzim B) bulunur (15,29). Sitotoksik lenfositlerin reseptör aracılı bir hedef hücreye bağlandıktan sonra, perforinler salgılanır ve hedef hücrenin zarına yerleştirilir, burada tamamlayıcının zar saldırı kompleksine benzer dairesel bir zarı kaplayan gözenekte birleşirler. Perforin gözenekleri, sitozolik kalsiyumda hızlı bir artışa neden olur. Aynı anda salgılanan serin proteaz Granzim B, reseptör aracılı endositoz yoluyla salgısal bir vezikül içinde hedef hücreye girer. İşelleştirilmiş perforin proteini, Granzim B'yi vezikülünden serbest bırakır. Granzim B prokaspaz aktivasyonunu tetikler ve yeterli granzim B mevcutsa, her birinin büyük ve küçük alt birimleri arasındaki aspartattaki kaspazlar-3 ve -7'yi keserek kaspazları aktive eder (27, 28). Ardından DNA parçalanması ve apoptoz gerçekleşir (Şekil 4) (28).



Şekil 4. Perforin/Granzim Apoptoz Yolu Mekanizması

Bu yollar, tümör hücrelerine ve virüs bulaşmış hücrelere karşı DNA hasarı oluşturarak kaspaz bağımsız/bağımlı bir şekilde işlev görür

(15). İkinci bir salgı-granül proteaz Granzim A ise apoptotik süreçte perforinle sinerjik olarak kaspaz bağımsız yol aracılığıyla etki eder (28).

Granzimlerce indüklenen ölüm süreci substrat parçalanmasına dayalı iki büyük proteolitik unsura sahiptir. Birincisi, esas olarak hedef hücrenin ölümü ile ilgili sınırlı sayıda intraselüler molekülün parçalanmasına bağlıdır. Bu grup moleküller hedef hücrenin apoptotik olarak öldürülmesinin farklı seviyelerinde görev alan ve granzim B tarafından parçalanan kaspaz, BID ve ICAD gibi molekülleri içerir. İkincisi, hücre siklusu, hücre tamiri ve protein sentezinde görevli geniş bir intraselüler protein grubunun parçalanmasını ve inaktivasyonunu sağlar. Bu substratlar arasında Granzim A ve Granzim B tarafından parçalananlar belirlenmiştir. Granzimler hücre ölümü sürecinde intraselüler patojenlerin yaşamları için gerekli esansiyel proteinleri tanıma ve parçalama kabiliyetine sahiptirler (29).

Bu mekanizma sadece viral enfeksiyonlarla sınırlı değildir; sitotoksik lenfositlerin diğer hücre içi enfeksiyonlara verdiği bağışıklık tepkilerinin yanı sıra tümör hücrelerine ve yabancı doku greftlerine verilen tepkileri de içerir. Bu öldürme mekanizması sitotoksik lenfositlerin çalıştığı tek yol değildir ve Granzim B'nin apoptozu tetiklemek için işlev görebileceği tek yol da değildir. Ancak, bu durum apoptotik yolda kaspaz aktivasyonunun nasıl meydana gelebileceğini gösterir (27).

### **3.Apoptoz ile İlgili Genler**

Vücudun istenmeyen hücreleri bağışıklık tepkisi veya inflamatuvar reaksiyona neden olmadan silmek için kullandığı fizyolojik bir hücre ölümü olan apoptotik hücre ölümü, gen yönlendirmeli bir hücre ölümüdür. Apoptotik sürecin başarılı bir şekilde tamamlanması için apoptotik kaskadının teşvik edilmesi veya zayıflatılmasıyla ilgili anahtar gen ürünlerinin düzenli ifade edilmesine bağlıdır. Bir çalışmada, androjen türevi ratların ventral prostatında apoptozla ilişkili genlerin bir

dizisinin aşırı eksprese edildiği gösterilmiştir. Hücre ölümü veya hücre döngüsünün sürdürülmesinde önemli olan bazı genlerin aşırı ekspresyonunun hücre ölümüne yol açar. İnterlökin 3 veya serum gibi büyüme için gerekli maddelerin olmaması durumunda c-myc'nin aşırı ekspresyonu ilgili hücreler için öldürücü hale gelmektedir. Tümör baskılayıcı gen p53'ün ekspresyonu, hücrelerin apoptoza uğrama eğilimi ile ilişkilidir. BCL-2'nin yüksek ekspresyonu apoptozu inhibe eder ve böylece BCL-2 oksidatif hasara karşı koruma sağlar (2,30). Böylece hücredeki genlerin aktivasyonu veya çevreden gelen sinyallerle apoptoz başlar. Organizmada apoptozu uyaran ve engelleyen çok sayıda gen bulunmaktadır (Tablo 1) (31).

**Tablo 1.** Apoptoz ile ilgili Genler (31).

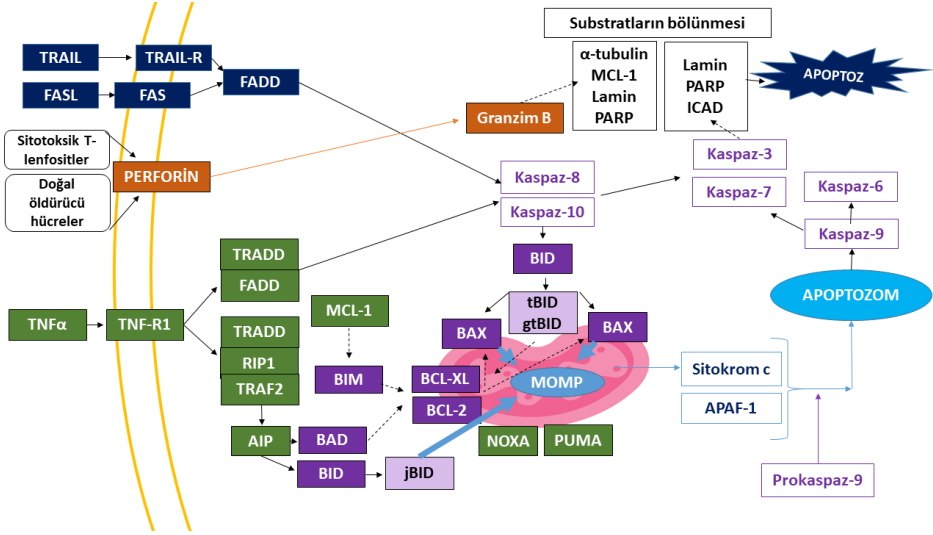
<b>Apoptozu inhibe eden genler</b>	<b>Apoptozu indükleyen genler</b>
<b>BCL-2 grubundan; BHRL-1, BCL-XL, BCL-W, BFL-1, BRAG-1, MCL-1, A1</b>	BCL-2 grubundan; BAD, BAX, BAK, BCL-XS, BID, BIK, HRK-1
<b>c-AB1 geni</b>	c-MYC
<b>RAS onkogeni</b>	p53, p21
<b>Çözünebilir FAS</b>	FAS (CD95/APO1)
<b>p35</b>	FADD/MORT, RIP, FAST
<b>A20</b>	İnterlökin dönüştürücü enzim benzeri proteinler (ICE) LOH (MTS1/CDK41)

Kyoto Genler ve Genomlar Ansiklopedisi (KEGG) (<http://www.genome.jp/kegg/>), genomları biyolojik sistemlere bağlamak için bir referans bilgi tabanı sağlar ve genomik alanda (KEGG GENES) ve kimyasal alanda (KEGG LIGAND) yapı taşları olarak kategorize edilir ve etkileşim ağları ve reaksiyon ağlarının (KEGG PATHWAY) bağlantı şemalarını sunar. Bir referans yol veri tabanı olan KEGG'e göre, apoptozda koordineli olarak çalışan 100'e yakın gen vardır. Bu



bileşenlerden birinin çıkarılması diğerini etkiler ve tüm yolu bozabilir (32,33).

Apoptoz mekanizması ile ilişkili genlerin KEGG veritabanına göre özet grafiği Şekil 4’de sunulmuştur.



Şekil 4. Apoptozla ilgili genler (düz çizgili oklar aktivasyonu gösterirken kesikli çizgili oklar inhibisyonu gösterir)

### 3.1. Kaspazların Rolü

Apoptotik hücre ölümü, içsel bir yol ve/veya dışsal bir yol aracılığıyla gerçekleşir ve apoptozun merkezi yürütücüleri olan kaspazlar olan sisteinile bağımlı aspartil-spesifik proteazların aktivasyonu ile sonuçlanır (34,20). Kaspazlar, oldukça korunan aspartat-spesifik sistein proteaz ailesine aittir ve çok hücreli organizmalarda bulunan interlökin-1beta-dönüştürücü enzim (ICE) ailesinin üyeleridir (35,11). Apoptoz, başlatıcı ve efektör kaspazlardan oluşan kaspazların hücre öldürücü proteazların aktivasyonu ile karakterize edilen ilk apoptotik yol, *C. elegans*’ta keşfedildi (36,37). N-terminal prodomain (>90 amino asit), başlatıcı kaspazları ifade eder ve 20-30 kalıntılı

prodomain dizisi olan ise efektör kaspazı ifade eder (37). *C.elegans* genomunda kaspaz benzeri proteinleri kodlayan dört gen (CED-3, kaspaz-1, kaspaz-2 ve kaspaz-3) bulunmaktadır. Bu dört gen arasında CED-3 en iyi bilinen hücre öldürücü kaspazdır (38). CED-3 geni (hücre ölümü anormali, CED) bu grupta olan tek kaspazdır. CED-3 inaktif bir zimojen olarak sentezlenir ve aktivasyonu için CED-4 apoptozomu ile bir holoenzim oluşturur. Aktifleştirilmiş CED-3, çok çeşitli substratları parçalar ve geri döndürülemez hücre ölümüne yol açar (11,39,40). Onlarca yıllık araştırmalara rağmen, CED-3'ün CED-4 ile aktifleşmesinin altında yatan mekanizma hala belirsizliğini korumaktadır (36,39).

Hücre ölümünü başlatmak için EGL-1 transkripsiyonel olarak aktive edilir ve spesifik olarak CED-9'a bağlanır (36). EGL-1, CED-3 ve CED-4 genleri hücre ölümünü teşvik ederken CED-9 geninin aktivitesi ile hücreler programlanmış hücre ölümüne uğramaktan korunur. CED-9'daki mutasyonlar, normalde yaşayan hücrelerin ektopik ölümlerinin bir sonucu olarak embriyonik ölümcül etki yaratır. CED-9, memelilerde apoptozu önlemede benzer bir rol oynayan insan proto-onkogen BCL-2 gen ürününe benzer protein kodlar. CED-9 ve BCL-2, çeşitli organizmalarda apoptozu düzenlemede önemli roller oynayan bir gen ailesinin üyeleridir. BCL-2 protein ailesinin üyeleri, BCL-2 ailesinin farklı üyeleri arasındaki etkileşimleri aracılık etmek için önemli olan bir veya birkaç karakteristik BCL-2 homoloji (BH) alanı, BH1, BH2, BH3 ve BH4 içermektedir. EGL-1, BCL-2 gen ailesinin tüm proapoptotik üyelerinde bulunan ve bu proteinlerin antiapoptotik BCL-2 üyelerine doğrudan bağlanmasını sağlayan BH3 motifli 91 amino asitlik küçük bir proteini kodlar (41). İlk olarak 8 yıl önce nematod *C. elegans'ta* keşfedilen apoptozda bir sistein proteaz olan CED-3'ten sonra yapılan çalışmalar apoptoz mekanizmasının evrimsel olarak korunduğu, substratlarındaki bir aspartik asit kalıntısını kesen bir sistein proteaz ailesi tarafından gerçekleştirildiğini ve dolayısıyla kaspaz adını aldığını

göstermiştir. En az 14 farklı memeli kaspazı tanımlanmıştır (37). 1993 yılında *C. Elegans*'ta programlı hücre ölümünün gen ürünü CED-3'ün insan kaspaz-1 ile protein dizisi ve işlevselliğinin gösterilmesi, apoptozun moleküler mekanizmalarının anlaşılmasına yönelik araştırma faaliyetlerinde büyük bir ivme kazandırmıştır (42).

İlk memeli kaspazı olan kaspaz-1 veya interlökin 1 $\beta$ -dönüştürücü enzim inflamatuvar yanıtın önemli bir düzenleyicisi olarak tanımlanmış olsada, 14 kaspazdan en az 8'i apoptoz sırasında önemli rol oynar (43). Kaspaz gen ailesi, iki ana alt aileye, yani inflamatuvar kaspazlar ve apoptotik kaspazlar olarak gruplandırılır (35,44). Apoptotik kaspazlar; başlatıcı kaspazlar ve infazcı kaspazlar olmak üzere iki alt gruba daha ayrılır (35). Kaspaz-2, -8, -9 ve -10'u içeren başlatıcı kaspazlar ve kaspaz-3, -6 ve -7'yi içeren efektör kaspazlardır. Ayrıca kaspaz-1, -4, -5, -11, -12 ve -13 dahil sitokin aktivatörleri olarak sınıflandırılır (28,11,45, 46,37).

İlk tanımlanan kaspaz olan kaspaz-1, interlökin-1b işleme enzimidir (ICE) ve Ced-3 homologu olarak bilinir. Kaspaz-1, kaspaz ailesinin sitokin aktivatör grubunda yer alır çünkü inflamasyon sitokinleri, pro-IL-1b ve pro-IL-18, kaspaz-1 için ana substratlardır (48). İkinci tanımlanan kaspaz olan ve CARD içeren kaspaz-2, DNA hasarı, metabolik anormallik ve ER stres kaynaklı apoptozda önemli rol oynar (49). Kaspaz-2 aktivasyonu, CARD ve ölüm alanına (DD) sahip RIP ilişkili ICH-1/ECD3 homolog proteini (RAIDD) ve ölüm alanına sahip p53 kaynaklı proteini (PIDD) içeren PIDDosome kompleksinin oluşumunu içerir (50). Kaspaz-3 hem dışsal hem de içsel apoptotik yollarla aktive edilir (51). Kaspaz-3'ün baskılanması apoptoz inhibisyonuyla sonuçlanırken, kaspaz-6 ve -7 baskılanması apoptotik süreci önemli ölçüde etkilemez (52). Kaspaz ailesinin işlevsel olarak iyi bilinen bir üyesi olan kaspaz-8, TNF ile uyarılan dışsal apoptotik yol için önemli bir faktördür (53). Prokaspaz-8, FADD tarafından DISC'e alınır ve dimerizasyon veya trimerizasyon, karşılıklı kesme yoluyla prokaspaz-

8 aktivasyonunu tetikler. Kaspaz-8 ise kaspaz-3, -7, BID ve ayrıca NF-kB'yi keser ve aktive eder (54,34). Başlatıcı kaspaz olan kaspaz-9, mitokondriyal yolda apoptozom kompleksinin oluşumu için önemli bir faktördür. Sitokrom c mitokondriden salındığında, sitoplazmada sitokrom c için reseptör olan APAF-1'e bağlanır (55). Sitokrom c ve APAF-1 apoptozom oluşturur ve ardından prokaspaz-9 APAF-1'e bağlanır. Daha sonra prokaspaz-9 karşılıklı bölünme yoluyla aktive edilir ve bu şekilde apoptozom kompleksi de aktive olur. Daha sonra, kaspaz-3 aktif apoptozom kompleksinde bulunan kaspaz-9 yoluyla kesilir ve aktive edilir (56).

Bir başlatıcı kaspaz, işlevi için önemli olan genişletilmiş bir N-terminal prodomain (>90 amino asit) ile karakterize edilirken, bir efektör kaspaz, prodomain dizisinde 20-30 kalıntı içerir. Tüm kaspazlar hücrelerde katalitik olarak inaktif zimogenler olarak üretilir ve apoptoz sırasında proteolitik aktivasyona uğramalıdır. Bir efektör kaspazın (kaspaz-3 veya -7 gibi) aktivasyonu, büyük ve küçük alt birimleri ayıran spesifik iç aspartik asit kalıntılarında bölünme yoluyla bir başlatıcı kaspaz (kaspaz-9 gibi) tarafından gerçekleştirilir. Ancak, başlatıcı kaspazlar kendi kendine aktive olur. Hücrelerde bir başlatıcı kaspazın aktivasyonu kaçınılmaz olarak bir aşağı akış kaspaz aktivasyonu basamağını tetiklediğinden, sıkı bir şekilde düzenlenir ve genellikle apoptotik koşullar altında çok bileşenli bir kompleksin birleştirilmesini gerektirir. Örneğin, prokaspaz-9'un aktivasyonu APAF-1 ve sitokrom c tarafından kolaylaştırılır, dATP veya ATP varlığında apoptozom adı verilen ~1,4 MDa'lık bir kompleks oluştururlar (45,37).

Kaspazlar, hücre kaderinin belirlenmesi, bağışıklığın düzenlenmesi ve hücrel çoğalma ve farklılaşma için hücre içi apoptotik sinyallerin indüksiyonu, transdüksiyonu ve amplifikasyonunda merkezi rol oynayan bir kaspaz-kaskad sistemi oluşturur. Apoptotik kaspazların substratları hücrel parçalanma ile ilişkilendirilmiştir, inflamatuvar kaspazlar ise inflamatuvar sitokinlerin proteolitik aktivasyonuna aracılık

eder (35). Bu kaspaz kaskad sinyal sisteminin aktivasyonu ve işlevleri, IAP, BCL-2 ailesi proteinleri ve kalpain gibi çeşitli düzenleyici moleküller tarafından düzenlenir (35,3).

Kaspaz aktivitesi sonucunda sitoskeletal proteinlerin kesilmesi, nükleer membranın bozulması, hücre-hücre temasının bozulması ve DNA nükleazının ilişkili protein inhibitöründen serbest kalarak DNA parçalanması görülür. Kısıtlanmış proteoliz hücrel lizise değil, zarla bağlı apoptotik cisimlere neden olur. Bu geri döndürülemez proteolitik olaylar, apoptotik hücrelerin karakteristik morfolojik değişimlerinden ve apoptozun DNA agaroz jelde merdiven deseni şeklinde görünmesini sağlar. Kaspazlar ayrıca, sitokrom c ve bazı intramitokondriyal prokaspazların daha fazla salınmasıyla mitokondriyal membranlar üzerinde etki edebilir. IAP'ler, seçici olarak efektör kaspazları inhibe ederek apoptotik süreci engeller; birçok malign hücrede aşırı ifade edilirler (28).

Tüm kaspazlar hücrelerde katalitik olarak inaktif zimogenler olarak üretilir ve apoptoz sırasında proteolitik aktivasyona uğramalıdır (24, 37). Bir başlatıcı kaspaz, spesifik bir multimerik adaptör protein kompleksine bağlı olan oto-katalitik aktivasyona uğrar (24). Prokaspaz-9 haricinde diğer kaspazların zimogenleri inaktif ve proteolitik aktivasyon gereklidir (37). Zimogende dört aktif bölge halkası vardır ve inaktif olmasının sebebi prokaspaz-7'nin son kristal yapısı ile belirlenmeye çalışılmıştır. İnhibitör bağlı kaspaz-7 ile karşılaştırıldığında, prokaspaz-7 zimogeninin çekirdek yapısal elemanları neredeyse aynıdır ve tüm hizalanmış Ca atomları için 0,8 Å'den daha az kök ortalama kare sapması vardır. Bununla birlikte, dört aktif bölge halkasından üçü büyük ölçüde farklı konformasyonlar benimser. Aktif kaspaz-7'deki katalitik oluğun tabanını oluşturan L3, tabanın üstünde çözülür ve gevşer. Aktif kaspaz-7'deki katalitik oluğun bir tarafını oluşturan L4 halkası, L3'ten daha uzakta yer alır ve aktif bölge cebini düzleştirir. En önemlisi, L2 halkası 90° döndürülür ve bu kalıntıyı

çözücüye erişilemez hale getirir. Dört halka arasında yalnızca L1 aktif bölge konformasyonunu korur. Prokaspaz-7 zimogenindeki bu yeniden düzenlemeler, substrat bağlayıcı bir oluşun oluşumuna izin vermez. Özellikle, inhibitör bağlı kaspazlarda görülen halka demeti, L2' halkası 180° çevrildiği ve "kapalı" bir konformasyonda bulunduğu için prokaspaz-7 zimogeninde yoktur. Bu yapısal yeniden düzenlemeler, prokaspaz-7 zimogeninin neden tespit edilebilir katalitik aktiviteye sahip olmadığını açıklar. Prokaspaz-9 proteolitik aktivasyondan önce neden bazal düzeyde aktivite göstermesinin sebebi, kaspaz-9'un genişletilmiş bir L2 halkası içermesi ve bu halkanın, bölgeler arası bir bölünme olmaksızın üretken konformasyonuna geçmesi için yeterli konformasyonel esnekliğe sahip olması olabilir (37).

Apoptoz gerçekleştiği sırada mitokondriden sitokrom c sitoplazmaya salındıktan sonra APAF-1'e bağlanır ve ATP varlığında apoptozom kompleksi ile birleşir (37). Apoptozomun birincil bileşeni olan APAF-1, bir N-terminal CARD alanı, bir CED-4 homoloji alanı ve C-terminal yarısında WD40'ın 13 tekrarından oluşur. Apoptozomun 27 Å çözünürlükteki üç boyutlu yapısı, APAF-1'in CARD alanlarının merkezi merkezde ve WD40 tekrarlarının uzatılmış kollarda yer aldığı tekerlek şeklinde bir heptamerik kompleks ortaya koyar (37). Apoptozom CARD-CARD etkileşimi kaspaz-9 ve APAF-1 arasında gerçekleşir ve prokaspaz-9'un kendi kendini kaspaz-9'a aktifleşmesini kolaylaştırır. Aslında burada amaç prokaspaz-9'u kaspaz-9'a aktifleştirmek değildir. Çünkü prokaspaz-9'da kaspaz-9 kadar aktiftir. Böylece kaspaz-9'un aktivitesi allosterik olarak 1000 kattan fazla artar (37). Kaspaz-9 proteazının aktivasyonu ile yetişkin bir insanda her gün 100 milyara yakın hücre ortadan kaldırılarak kontrollü hücre ölümü gerçekleşir. Bu durum çok hücreli organizmaların refahı için kritik öneme sahiptir ve apoptozla hücre homeostaz korunmuş olur (23). Apoptozun düzensizliği ise kanser ve nörodejeneratif bozukluklar dahil olmak üzere bir dizi hastalığa yol açabilir ve insan sağlığının

düzenlenmesinde apoptoz önemlidir (23,57). Apoptoz sırasında, IAP aracılı kaspaz inhibisyonu, SMAC veya DIABLO tarafından ortadan kaldırılır. Apoptoz uyarıldığında, SMAC/DIABLO, sitokrom c ile birlikte mitokondrinin zarlar arası boşluğundan sitozole salınır. Sitokrom c doğrudan APAF-1 ve kaspaz-9'u aktive ederken, SMAC/DIABLO birden fazla IAP ile etkileşime girer ve hem başlatıcı hem de efektör kaspazların IAP aracılı inhibisyonunu ortadan kaldırır (37).

### **3.2.BCL-2 Ailesi Üyelerinin Rolü**

Apoptozun düzenlenmesinde rol oynayan önemli bir protein seti Bcl-2 ailesidir. Bugüne kadar 25'ten fazla Bcl-2 aile üyesi tespit edilmiştir (58). B hücreli/lenfoma 2 (BCL-2) protein ailesinin, proapoptotik ve antiapoptotik proteinlerinin aktiviteleri yoluyla, bağımsız veya bağımlı olarak, iç ölüm sinyalleri ile hücre yüzeyi arasında bir noktada denge sağlayarak apoptoz düzenlenmesi açısından temel bir rol oynar. BCL-2 ilk olarak insan lenfomalarının B hücrelerinden tanımlandığı için BCL-2 (B hücreli lenfoma 2) adını almıştır (47). Apoptotik sinyallemenin düzenlenmesinde önemli roller oynayan BCL-2 ailesi üyeleri, (i) pro-survival alt aile üyeleri (BCL-2, BCL-XL, BCL-W, MCL1 ve BFL1/A1), (ii) sadece BH3 alt aile üyeleri (Bad, Bim, Noxa ve Puma9) ve (iii) pro-apoptotik mediatör alt aile üyeleri (BAX ve BAK) olmak üzere üç alt aileye ayrılır (59,60,46). Bu üyeler, BH olarak bilinen bir alana sahip yapısal ve işlevsel alt gruplara sahiptir. Antiapoptotik proteinin üyeleri dört BH alanına (BH1-4) sahiptir, proapoptotik olan üç veya bir alana ((BH1-3) veya BH3) sahiptir. Ayrıca BH4 alanına da sahiptir (47). Işınlama, büyüme faktörü çekilmesi veya kemoterapötik ajanlar, BH3 ile etkileşen alan ölüm agonisti (BID), BCL-2 hücre ölümü antagonisti (BAD), p53 upregüle apoptoz modülatörü (PUMA; BBC3), NOXA (PMAIP1) veya BCL-2 ile etkileşen hücre ölümü aracısı (BIM; BCL-2L11) gibi BCL-2 homoloji 3 (BH3)-sadece motif proteinlerini aktive ederek mitokondriyal yolu başlatır. Bu sadece BH3 proteinleri, apoptotik karşıtı BCL-2 ailesi

üyeleri olan BCL-2, BCL-ekstra büyük (BCL-XL; ayrıca BCL-2L1) veya miyeloid lösemi hücre farklılaşması 1'i (MCL1) nötralize ederek proapoptotik, çok-BH alanlı proteinler BAX ve BH antagonisti veya BAK'ı serbest bırakır (20). Ölümü indükleyen uyarılara yanıt olarak, ailenin proapoptotik üyeleri (BIM, PUMA, BID, BMF, NOXA, BIK, BAD ve HRK; BH3 antiapoptotik BCL-2 ailesi üyelerini (BCL-2, MCL-1, BCL-XL, BCL-W ve A1/BFL-1) inhibe eder. Bu üyelerin proapoptotik etkilileri, BAX ve BAK'ı inaktif bir durumda tutar (61).

PUMA, genotoksik stres, hipoksi, ER stresi, mitokondriyal bozulma, düzensiz onkogen ekspresyonu, toksinler, büyüme faktörü/sitokin çekilmesi, değişmiş redoks durumu ve insan ve farelerin farklı hücre tiplerinde enfeksiyon dahil olmak üzere bir dizi uyarı ile ifade edilir ve indüklenir (62). PUMA, P53'e bağımlı veya P53'ten bağımsız apoptotik bir şekilde işlev görür. Bir kez ifade edildiğinde, PUMA tüm anti-apoptotik BCL-2 üyesi proteinlere bağlanır (61). PUMA'nın BH3 alanı, mitokondriyal membrandaki BCL-2 benzeri proteinlerle doğrudan etkileşime girerek sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya taşınmasını sağlamak ve prokaspazlar-9 ve -3'ü aktive etmek için gerekli olan amfipatik bir  $\alpha$ -helisel yapı oluşturur (62). BAX ve BAK aktive olduktan sonra mitokondriyal dış zar içinde gözenekler oluştururlar, bu da MOMP ve sitokrom C ve diğer apoptojenik faktörlerin mitokondriden sitoplazmaya salınmasına yol açar. Böylece kaspaz kaskadları ve hücre apoptozuna neden olur (62,61).

Temel olarak, BCL-2 ailesi üyeleri tipik karakteristik işlevleri paylaşır. Bu işlevler; BCL-2 ailesinin diğer üyeleriyle dimerleşirler, proteinlere bağlanarak mitokondriyal homeostazın düzenlenmesine katkıda bulunurlar ve dış mitokondriyal membran gözenek oluşumuna katkıda bulunurlar (63).

BCL-2 ve BCL-XL dahil apoptoz inhibitör proteinlerdir ve BAX, BAD ve BID gibi diğerleri apoptoz promotörleridir. Yapının ortak alanları bu proteinlerin homo ve hetero dimerize olmasına izin verir.



BAX grubunun yüksek ekspresyonu apoptozu destekler; BCL-2 grubunun yüksek ekspresyonu apoptozu engeller. p53 burada BAX/BAX, BAX/BCL-2 ve BCL-2/BCL-2 gruplarının oranlarını düzenler. BCL-2 protein grubu mitokondri organeliyle ilişkilidir. Mitokondriler çift duvarlı organellerdir ve BCL-2 protein grubu, sitozole doğru yönelmiş dış mitokondriyal membranda bulunarak iyon taşınımını yönetir ve membrandaki dengesizliklere karşı koruma sağlar. BAX proteinleri sitozolde bulunur ancak apoptotik sinyal alındığında, BAX proteinleri göç eder ve mitokondriyal membran geçirgenlik geçiş gözenğine bağlanarak seçici iyon geçirgenliğinin kaybına neden olur (28). BAX ve BAK'ın mitokondriyal membrana yerleşmesiyle birlikte mitokondriyal membran potansiyeli bozulur, sitokrom *c* ve SMAC mitokondriyal intermembran boşluktan sitoplazmaya salınır (25,28,64, 26,20). Memelilerde, BCL-2 proteinleri mitokondriyal geçirgenliği ve dolayısıyla sitokrom *c*, HtrA2/Omi ve SMAC/Diablo ve EndoG ve AIF gibi belirli pro-apoptotik proteinlerin salgılanmasını düzenler. Memelilerde, sitokrom *c*, ATP'ye bağlı bir şekilde apoptozom oluşumunu kolaylaştırır. Memelilerde, AIF ve EndoG, kaspazdan bağımsız bir şekilde DNA bozunmasını destekleyen iki DNA nükleazıdır. Apoptozun uyarılması üzerine, mitokondriden çekirdeğe taşınırlar ve kromozomal DNA'yı keserler (57). AIF doğrudan çekirdeğe hareket eder ve burada kromatin yoğunlaşması ve nükleer parçalanma üretirken, sitozolik sitokrom *c*, apoptozun son olaylarını harekete geçirir. Sitokrom *c*, sitoplazmik protein APAF-1'in aktivatörüdür (28). Yeni serbest bırakılan sitokrom *c*, dATP ile birlikte, adaptör protein APAF-1 bağlanır; bu da başlatıcı kaspaz-9'u aktive eden apoptozom kompleksinin oluşumuna yol açar (20). APAF-1'e sitokrom *c* bağlanması, prokaspaz-9'un sonraki aktivasyonu için gereklidir. Kaspaz-9, apoptozun karakteristik sitolojik değişikliklerinden sorumlu olan prokaspaz-3 dahil olmak üzere prokaspaz-7'yi de aktive ederek protein substratlarının ani bir şekilde parçalanmasına ve hücre ölümüne yol açar (28,20).

Anti-apoptotik bir gen BCL-2'nin aşırı ekspresyonunda kanser hücreleri çoğalmaya devam eder ve kanserdeki rolü BCL-2 inhibisyonuyla fayda sağlayabilir. Ancak meme kanserinde BCL-2 için pozitif olan tümörler genellikle östrojen reseptörlerine ve daha olumlu prognoza sahiptir. Meme kanseri hücre hatlarında BCL-2 gen ekspresyonunun pozitif bir düzenleyicisidir (65). Pro-apoptotik gen BAX, BCL-2 ailesinin kanser için en çok çalışılan genidir (65). Apoptotik ölüm sinyalinin önemli bir alt akış düzenlenmesi BCL-2/BAX gen ailesinde bulunur (28). Apoptozun korunmasında BCL-2 ve apoptoz indüksiyonunda BAX baskındır (66). Apoptozun regülasyonu, BCL-2/BAX gen ailesi ile sağlanır. Bu ailenin 20 üyesi tanımlanmıştır; bunlardan bazıları apoptoz inhibitörüdür, bazıları ise apoptozu uyarır ve proapoptotik genler olarak tanımlanır (31). Sadece BH3 üyeleri, anti-apoptotik aile üyelerinin işlevini bloke ederek ve/veya BAX ve BAK gibi pro-apoptotik proteinlerle etkileşime girerek ve onları aktive ederek apoptozu indükler. Anti-apoptotik BCL-2 ailesi proteinleri, proapoptotik proteinlerin aktivitesini inhibe ederek ve MOMP'yi önleyerek apoptozu bloke eder (46).

### 3.3.p53'ün Rolü

p53, yaklaşık 53 kDa protein boyutuna sahip bir tetramer olarak bulunan bir tümör baskılayıcı proteindir, bu nedenle adı p53'tür (11,47). p53 proteini, genom bütünlüğünü korumadaki kritik işlevi nedeniyle "genomun koruyucusu" olarak bilinen bir transkripsiyon faktörüdür (67). p53, DNA hasarı tespiti, hücre döngüsü durması, apoptoz, DNA onarımı ve senesans dahil olmak üzere önemli hücresel süreçlerde yer alan büyük bir gen setinin ifadesini kontrol eden tetramerik transkripsiyon faktörü olarak görev yapar (68). Genotoksik olaylarla sonuçlanan hücre hasarı, bir transkripsiyon düzenleyici gen olan p53'ü aktive eder ve doğrudan DNA'ya bağlanarak DNA hasarını (tek veya çift zincir kırıkları) tanır (68). p53 geni, G1'de hücre döngüsü durmasını indükleyebilir veya apoptozu destekleyebilir (28). p53'ün apoptozu başlatabileceğine dair ilk

kanıt 1991'de yayınlanmıştır (69) P53'ün başlıca biyolojik rollerinden biri, genetik olarak anormal hücrelerde apoptozu indükleme kabiliyetidir (70,71). DNA hasarıyla tetiklenen timosit apoptozu p53'e bağımlıdır ancak deksametazon tarafından tetiklenen değildir (72).

p53 benzeri transkripsiyon faktörleri TP53, TP63 ve TP73 olmak üzere üç gen tarafından kodlanır. P53, p63 ve p73'ün protein alanı yapıları benzerdir; üç DNA bağlanma alanı da neredeyse yapısal olarak aynıdır, benzer DNA-spesifik dizilere bağlanır ve bazı özdeş genlerin ve bazı farklı genlerin transkripsiyonunu düzenler. TP53 gen ailesi, çok hücreli hayvan gelişimi boyunca 600-800 milyon yıl boyunca evrimleşmiştir. TP53 geninin insan kanserlerinde en sık mutasyona uğrayan genidir (71). TP53 geni, meme, kolon, akciğer, karaciğer, prostat, mesane ve cilt kanserleri de dahil olmak üzere tüm insan malignitelerinin yaklaşık yarısında mutasyona uğrar. DNA hasarı meydana geldiğinde, insan kromozomu 17'deki TP53 geni hücre döngüsünü durdurur. p53 proteini mutasyona uğrarsa, hücre döngüsü kısıtlanmaz ve hasarlı DNA çoğalır, bu da kontrolsüz hücre çoğalması ve kanser tümörleriyle sonuçlanır. Bu mutant p53 proteinlerinin çoğu onkojenik özelliklere sahiptir ve bu nedenle kanser hücrelerinin çoğalma, apoptozdan kaçma, istila etme ve metastaz yapma yeteneğini düzenler (67). p53 tarafından kontrol edilen birkaç gen apoptozu indüklemeye rol oynar. Bu genler arasında en önemlileri BCL-2 ailesinin üyeleri olan BAX, FAS/APO1, KILLER/DR5 ve PIG'dir. Dışsal yolda, p53 hücre zarında bulunan ölüm reseptörleri olan Fas/APO1 ve KILLER/DR5'in transkripsiyonunu başlatır; bu reseptörler de hücre apoptozuyla sonuçlanan "kaspaz kaskadı"nı aktive eder. p53 ekspresyonlu hücrelerin  $\gamma$ -radyasyonu veya kemoterapi gibi DNA'ya zarar veren ajanlara maruz kalmasından sonra KILLER/DR5 ekspresyonu artar. İçsel yolda, p53, Bax gibi pro-apoptotik proteinlerin transkripsiyonunu başlatır ve BCL-2 gibi anti-apoptotik proteinlerin transkripsiyonunu inhibe eder. Hücresel etkiler, mitokondri hasarı ve

sitokrom c salınımı ve apoptozdur. Ayrıca, içsel yolda p53, oksidatif stresi (reaktif oksijen türlerinin konsantrasyonunda artış) indükleyen ve apoptoza yol açan PIG3 proteininin transkripsiyonunu aktive eder (70). p53, sitoplazmada ve mitokondri zarında bulunan proapoptotik ve antiapoptotik proteinlerle de doğrudan etkileşime girerek apoptoz aktivatörü olarak hareket eder. Ancak, p53 ayrıca BCL-2 ve BCL-2 benzeri 1'i (BCL2L1)'de inhibe edebilir. Böylece BAX ve BAK'ın mitokondriyal dış zarına oligomerizasyonunun ardından heterodimer komplekslerinden ayrılmasını sağlar ve böylece ölüm sinyaline yanıt olarak apoptoz başlatıcılarının serbest bırakıldığı mitokondriyal dış zarında lipid açıklıkları oluşturur (69). Aktivasyonları sonucunda ya G-fazında hücre döngüsünün durmasını sağlarlar ya da onarılamaz bir DNA hasarı sonucu BAK, BAX, BAD, BID ve BIM gibi bazı apoptotik indükleyici proteinlerin aktivasyonunu tetiklerler ve aynı zamanda BCL-XS, BCL-XL ve BCL-W gibi anti-apoptotik proteinleri inhibe ederler. Ek olarak, bu sürecin gerçekleşmemesi tümör oluşumuna izin verir, son çalışmalar flavonoidlerin p53'ün BCL-2 ve BCL-XL'ı inhibe etmesiyle meme kanseri hücrelerinde apoptozu indükleyebildiğini kanıtlamıştır (47). p53, pro-apoptotik protein BAK'ı doğrudan aktive eder veya MCL-1 ve BAK kompleksini bozarak BAK'ı serbest bırakır ve apoptozu başlatır. Ayrıca, p53'ün yönlendirdiği miR34a, BCL-2 seviyelerini azaltarak hücreleri apoptotik uyaranlara karşı duyarlı hale getirir (73).

Tümör baskılayıcı p53, hücresel strese yanıt olarak hücre döngüsü durmasını, DNA onarımını ve apoptozu düzenlemede merkezi rol oynar (67) p53'ün tümör baskılayıcı işlevi, bir transkripsiyon faktörü olarak, çeşitli hücresel streslere yanıt olarak hücre döngüsü durması veya apoptozdan sorumlu bir dizi hedef geni yukarı düzenleme yeteneğinden kaynaklanır (20). Örneğin, p53 aracılı apoptoz ile yapılan çalışmada farelerde tümör oluşumunu baskılama yeteneği göstermiştir (69). Miyeloid lösemik hücrelere p53'ün aktivite göstermesi, hücre

canlılığında azalmaya ve parçalanmış çekirdekler, kromatin yoğunlaşması ve kapsamlı DNA parçalanması gibi apoptozun birden fazla ayırt edici özelliğinin indüklenmesine neden olmuştur (69). Apoptozu indüklenmesi, p53'ün tümör baskılayıcı aktivitesi için çok önemlidir. Bir nükleer transkripsiyon faktörü olarak p53, hücre apoptozunda yer alan birçok geni düzenler. Özellikle, p53'ün mitokondriye göç ettiği ve içsel apoptoz yolunu öncelikli olarak BCL-2 ailesi proteinleriyle doğrudan protein-protein etkileşimleri yoluyla düzenler. Hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotik üyeleri içeren BCL-2 ailesi proteinleri, MOMP ve buna bağlı olarak kaspaz kaskadının aktivasyonunu kontrol eder (74).

p53 geni, hücre döngüsünü durdurarak veya apoptozu aktive ederek DNA hasarından sonra hücre çoğalmasını engelleyebilir. İlaç direncini artırmak için apoptozu artırabilir veya büyümeyi durdurabilir (65). P53'e bağımlı ana genler, WAF1, BCL-2, BAX, GADD45 ve siklin G'dir. GADD45, bir hücre döngüsü inhibitörünü kodlar. WAF1, p53 radyasyona ve antikanser ilaçlara yanıt verdiğiğinde eksprese edilen bir siklin D/kinaz (cdk/D) ve siklin E/kinaz (CDK/E) inhibitörüdür. Radyasyon ve antikanser ilaçlar tarafından aşırı eksprese edildiğinde apoptozu tetikler. P53, BCL-2 antagonisti BAX'ın yukarı regülasyonu ile birlikte BCL-2'nin aşağı regülasyonunu indükler. Tümör promotörleri, p53'ün inaktivasyonu ile apoptozu engeller. Böylece kansere yatkın hücrelerin DNA onarımı yapamamasına ek olarak yok edilmeye karşı dirençli olmasını da yol açar (66). Hücre hasarında p53 ekspresyonu artar ve bu durumu p53 tarafından düzenlenen p21 indüksiyonu izler ve böylece retinoblastomanın siklinD/CDK4 fosforilasyonunun inhibisyonuna neden olur. DNA hasarının daha şiddetli ve onarılamaz olması durumunda p53, hücrenin BAX/BCL-2 yoluyla apoptozu taşımasını sağlar (28). Apoptoz ile hücrenin hayatta kalması, hem transkripsiyona bağımlı hem de bağımsız bir şekilde p53 tarafından düzenlenen BCL-2 ailesinin üyelerine bağlıdır (69). Tümör

baskılayıcı p53, ölüm reseptörü DR5 ve BCL-2 ailesi üyeleri PUMA, NOXA ve BAX gibi bazı pro-apoptotik genlerin transkripsiyonel düzenlenmesi yoluyla apoptozu aracılık edebilir (89). Transkripsiyon aktivitesine ek olarak, p53'ün anti-apoptotik üyelerle (BCL-2, BCL-XL) etkileşime girerek ve onları inhibe ederek ve ayrıca pro-apoptotik üyeleri (BAK, BAX) aktive ederek MOMP'yi doğrudan indükler (84,85). p53, APAF1 ve mitokondriden salınan ve apoptozom oluşturmak için APAF1 ve prokaspaz-9'a bağlanan sitokrom c'yi aktive edebilir (86). p53, anti-apoptotik BCL-2 proteinini inhibe ederek ve kaspaz ailesinin üyelerini aktive ederek apoptozu destekleyen pro-apoptotik faktör olan PUMA'yı aktive eder (87,30). PUMA, anti-apoptotik BCL-2 ailesi üyelerine bağlanır ve mitokondriyal membran geçirgenliğini ve kaspaz aktivasyonunu indüklemek için pro-apoptotik proteinlerin yerini alır (87,30). Tümör baskılayıcı p53, tüm insan kanserlerinin yaklaşık yarısında mutasyona uğrar. p53, anti-apoptotik proteinler BCL-XL ve BCL-2 ile etkileşime girerek ve onları antagonize ederek mitokondriyal membran geçirgenleşmesi yoluyla apoptozu indükleyebilir (74).

QSER1 geni, kanserlerde en sık değişen kromozomlardan biri olan insan kromozomu 11'in p13 bandında yer alır. QSER1, p53 hedef apoptoz genlerine bağlanarak bu genleri baskılar (88). TP53, tümör baskılayıcı gen ve genom koruyucusu olarak görev yapar, bu nedenle normal p53 işlevini koruyan hücrelerde kanser hücresi dönüşümünün meydana gelmesi olası değildir (73).

### **3.4. Apoptoz Protein İnhibitörleri (IAP)**

Apoptozis proteinlerinin inhibitörleri (IAP'ler) ilk olarak *Baculovirus*'da gen ürünleri olarak keşfedildi. Tüm IAP'ler, bir veya daha fazla çinko parmak motifinden oluşan bakulovirus IAP tekrarlarına (BIR'ler) sahiptir (75,76). BIR'ler, spesifik farklı bağlanma özelliklerine sahip protein etkileşimli modüllerdir (77). İnsan genomu, doğuştan gelen bağışıklık tepkisi, hücre bölünmesi, hücre çoğalması ve hücre ölümü yollarında yer alan IAP ailesinin 8 üyesini kodlar. İnsan IAP'leri

arasında, X'e bağlı IAP (XIAP, hILP, MIHA ve BIRC4) ve hücrel IAP1 ve 2 (cIAP1/2), BIR aracılığıyla kaspazlara ve IAP antagonistlerine bağlanma kapasitesi ve RING alanı aracılığıyla kaspazların kendi kendine ubiquitinasyonu ve neddilasyon yeteneği dahil olmak üzere DIAP1 ile birkaç özelliği aynıdır (78,79,46,80).

cIAP1, cIAP2 ve XIAP, bir UBA ve bir C -term RING alanı olmak üzere üç tandem BIR alanına sahiptir. Ek olarak, cIAP'ler merkezi bir CARD alanı içerir. BIR1, hücre sinyalleme aktivitesi için gerekli olan bir tip I BIR'dir (IBM'ye bağlanamaz). XIAP BIR1, adaptör TAB1'e [Dönüştürücü Büyüme Faktörü beta-aktive kinaz 1 (TAK1) bağlayıcı protein 1] bağlanır. TAB1, dönüştürücü büyüme faktörü  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) ve kemik morfogenetik protein sinyal yollarında yer alır ve NF- $\kappa$ B ve MAP'yi (mitogenle aktive olan protein kinaz) aktive eden sinyal yollarını kontrol eden kinaz TAK1'e (TGF- $\beta$ -aktive olan kinaz 1) bağlanır. cIAP BIR1, reseptörleri TNFR süper ailesinden aşağı akış sinyal yollarına bağlayan adaptör TRAF2'ye (TNFR ilişkili faktör 2) bağlanır. BIR2 ve BIR3, aktif tetramerik kaspazlar ve IAP antagonistlerinde açığa çıkan IBM motiflerine bağlanabilen tip II BIR'lerdir (78). survivin, en küçük IAP proteindir ve apoptozu engellemek ve gelişmekte olan dokularda proliferasyonu desteklemek için embriyonik gelişim sırasında fizyolojik olarak tanımlanır. Survivin'in anti-apoptotik mekanizması, XIAP ile bir kompleks oluşturarak XIAP'ı ubiquitin bağımlı bozunmadan korur ve böylece kaspaz inhibe edici aktivitesini artırır. Survivin'in terapötik kullanımı, kanser hücrelerine özgü bir ilaç hedefi temsil etmesi sebebiyle önemlidir (46).

Drosophila'da, IAP'ler, kaspazlar adı verilen apoptotik proteazların doğrudan düzenlenmesi yoluyla hücrenin hayatta kalmasını desteklemek için yeterli ve gereklidir (81,82). Memelilerde, IAP'ler ayrıca kaspaz aktivitesini ve kaspaz aktive edici platform oluşumunu kontrol ederek apoptozu düzenleyebilir (78). AIP protein ailesi üyeleri, içsel ve dışsal uyarılarla indüklenen apoptozu inhibe etme yeteneğine sahiptirler.

Birçok IAP, kaspazlara bağlanma kapasitesine sahiptir, ancak bu enzimlerin proteolitik aktivitesini doğrudan inhibe etme yeteneğinden yoksundur (77). Memeli IAP'leri, kaspazlara bağlanarak ve onları inhibe ederek veya kaspazdan bağımsız mekanizmalar yoluyla apoptozu engeller (83)

Memelilerde, en çok çalışılan IAP üyesi olan BIRC4/XIAP, kaspaz-3, 7 ve 9'un aktivitesini doğrudan inhibe ederek apoptozu engelleyebilirler (81,77). Memeli IAP'ları arasında NAIP apoptozomda tespit edilmiştir. Diğer IAP'lardan farklı olarak NAIP prokaspaz-9 ile etkileşime girebilir. Otokatalitik işlenmesini ve efektör kaspazın aktivasyonunu inhibe eder. Bu etkileşim NAIP'ın BIR3 alanını içerir ve IBM'den bağımsız gerçekleşir. XIAP efektör kaspazlar-3 ve -7'ye doğrudan bağlanarak kaspaz-3 ve kaspaz-7'yi inhibe edebilir (78).

#### **4. Sonuç ve Gelecekteki Kapsamı**

Bu bölüm, programlanmış bir hücre ölümü olan apoptozun indüklenmesi ve inhibe edilmesinde görev alan genler ve proteinler başta olmak üzere karmaşık yapıdaki apoptoz mekanizması hakkında yardımcı olmayı amaçlamıştır. Apoptoz, hücrelerin normal gelişimi ve büyümesinde yardımcı olan önemli bir durum olmasına rağmen aynı zamanda hücrelerdeki anormal çoğalmalara neden olan bazı istenmeyen durumların da azaltılmasını sağlar. Bir hücrenin yaşamının veya ölümünün düzenlenmesi apoptozla gerçekleşir. Bu kitap bölümünde, apoptozda kritik rol oynayan gen ailelerine, aktivasyon ve inhibisyon mekanizmalarına ve apoptoz yollarının anlaşılmasını destekleyen araştırma kanıtlarına yer verilmiştir. Apoptoz mekanizmalarının anlaşılmasıyla apoptoz sürecindeki herhangi bir hücrenin anormalliğinden kaynaklanan kanserden otoimmün hastalıklara kadar çeşitli hastalıklara terapötik potansiyel olma ihtimali yüksektir.



## **Kaynaklar**

- 1) Izadi, M., Ali, T. A., & Pourkarimi, E. (2021). Over fifty years of life, death, and cannibalism: A historical recollection of apoptosis and autophagy. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 22). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms222212466>
- 2) Corcoran, G. B. , F. L. ; J. D. P. ; M. M. T. ; N. P. ; O. F. A. ; B. R. (1994). Apoptosis: molecular control point in toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 1–13. <https://doi.org/10.1006/taap.1994.1195>
- 3) Fan, T. J., Han, L. H., Cong, R. S., & Liang, J. (2005). Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37(11), 719–727. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2005.00108.x>
- 4) Elmore, S. (2006). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death.
- 5) Danial, N. N. and K. J. (n.d.). *Cell Death: Critical Control Points*.
- 6) Lettre, G., & Hengartner, M. O. (2006). Developmental apoptosis in *C. elegans*: A complex CEDnario. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 7, Issue 2, pp. 97–108). <https://doi.org/10.1038/nrm1836>
- 7) Steller, H. (2008). Regulation of apoptosis in *Drosophila*. In *Cell Death and Differentiation* (Vol. 15, Issue 7, pp. 1132–1138). <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.50>
- 8) Youle, R. J., & Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: Opposing activities that mediate cell death. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 9, Issue 1, pp. 47–59). <https://doi.org/10.1038/nrm2308>
- 9) Conradt, B. (2009). Genetic control of programmed cell death during animal development. In *Annual Review of Genetics* (Vol. 43, pp. 493–523). <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.42.110807.091533>
- 10) Cory, S., & Adams, J. M. (2002). The BCL2 family: Regulators of the cellular life-or-death switch. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 2, Issue 9, pp. 647–656). <https://doi.org/10.1038/nrc883>
- 11) Kiraz, Y., Adan, A., Kartal Yandim, M., & Baran, Y. (2016). Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. In *Tumor Biology* (Vol. 37, Issue 7, pp. 8471–8486). Springer Science and Business Media B.V. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5035-9>

- 12) Morana, O., Wood, W., & Gregory, C. D. (2022). The Apoptosis Paradox in Cancer. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23031328>
- 13) Izumi, M., Fujii, M., Kobayashi, I. S., Ho, V., Kashima, Y., Udagawa, H., Costa, D. B., & Kobayashi, S. S. (2024). Integrative single-cell RNA-seq and spatial transcriptomics analyses reveal diverse apoptosis-related gene expression profiles in EGFR-mutated lung cancer. *Cell Death and Disease*, 15(8). <https://doi.org/10.1038/s41419-024-06940-y>
- 14) Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., & Curriet, A. R. (1972). APOPTOSIS: A BASIC BIOLOGICAL PHENOMENON WITH WIDE-RANGING IMPLICATIONS IN TISSUE KINETICS. In *Br. J. Cancer* (Vol. 26).
- 15) Kashyap, D., Garg, V. K., & Goel, N. (2021). Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis. In *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* (Vol. 125, pp. 73–120). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2021.01.003>
- 16) Xu, X., Lai, Y., & Hua, Z. C. (2019a). Apoptosis and apoptotic body: Disease message and therapeutic target potentials. In *Bioscience Reports* (Vol. 39, Issue 1). Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/BSR20180992>
- 17) Tweedell, R. E., Hibler, T., & Kanneganti, T. (2024). Defining PANoptosis: Biochemical and Mechanistic Evaluation of Innate Immune Cell Death Activation. *Current Protocols*, 4(7). <https://doi.org/10.1002/cpz1.1112>
- 18) Sun, G. (2024). Death and survival from executioner caspase activation. In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Vol. 156, pp. 66–73). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2023.07.005>
- 19) Wei, M. C., Lindsten, T., Mootha, V. K., Weiler, S., Gross, A., Ashiya, M., Thompson, C. B., & Korsmeyer, S. J. (2000). tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. [www.genesdev.org](http://www.genesdev.org)
- 20) Vucic, D., Dixit, V. M., & Wertz, I. E. (2011). Ubiquitylation in apoptosis: A post-translational modification at the edge of life and death. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 12, Issue 7, pp. 439–452). <https://doi.org/10.1038/nrm3143>
- 21) Bertheloot, D., Latz, E., & Franklin, B. S. (2021). Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. In *Cellular and Molecular*

- Immunology (Vol. 18, Issue 5, pp. 1106–1121). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00630-3>
- 22) Scaffidi, C., Schmitz, I., Krammer, P. H., & Peter, M. E. (1999). The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 274(3), 1541–1548. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.3.1541>
- 23) Sever, A. I. M., Reid Alderson, T., Rennella, E., Aramini, J. M., Liu, Z. H., Harkness, R. W., & Kay, L. E. (2023). Activation of caspase-9 on the apoptosome as studied by methyl-TROSY NMR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 120(51). <https://doi.org/10.1073/pnas.2310944120>
- 24) Li, Y., Zhou, M., Hu, Q., Bai, X. C., Huang, W., Scheres, S. H. W., & Shi, Y. (2017). Mechanistic insights into caspase-9 activation by the structure of the apoptosome holoenzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(7), 1542–1547. <https://doi.org/10.1073/pnas.1620626114>
- 25) Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., & Wang, X. (2000). Smac, a Mitochondrial Protein that Promotes Cytochrome c-Dependent Caspase Activation by Eliminating IAP Inhibition Hid, and Grim in terms of IAP neutralization and is the. In *Cell* (Vol. 102).
- 26) Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L. M., Reid, G. E., Moritz, R. L., Simpson, R. J., Vaux, D. L., Walter, T., & Hall, E. (2000). Identification of DIABLO, a Mammalian Protein that Promotes Apoptosis by Binding to and Antagonizing IAP Proteins be inhibited by antiapoptotic members of the Bcl-2 fam-ily (Hu et al and apoptosis signaled by FADD can be inhibited by FLIP (Irmiler et al., 1997). Experiments in insect and mammalian systems have. In *Cell* (Vol. 102).
- 27) Green, D. R. (2022). Caspase Activation and Inhibition. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 14(8). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a041020>
- 28) Israels, L. G., & Israels, E. D. (1999). Apoptosis. *The Oncologist*, 4(4), 332–339. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.4-4-332>
- 29) Keskin, E., & Hatipoğlu, D. (2018). Granzimlerin Apoptotik ve Non-Apoptotik Etkileri. *Kocatepe Veterinary Journal Kocatepe Vet J*, 11(1), 96–103. <https://doi.org/10.5578/kvj.66270>

- 30) Villunger, A., Michalak, E. M., Coultas, L., Müllauer, F., Böck, G., Ausserlechner, M. J., Adams, J. M., & Strasser, A. (2003). p53- and Drug-Induced Apoptotic Responses Mediated by BH3-Only Proteins Puma and Noxa. *Science*, 302(5647), 1036–1038. <https://doi.org/10.1126/science.1090072>
- 31) Akşit, H., Bildik, A., 2008. Apoptoz, YYÜ VET FAK DERG (2008) 19(1): 55-63
- 32) Kanehisa, M., Goto, S., Hattori, M., Aoki-Kinoshita, K. F., Itoh, M., Kawashima, S., Katayama, T., Araki, M., & Hirakawa, M. (2006). From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG. *Nucleic Acids Research*, 34(Database issue). <https://doi.org/10.1093/nar/gkj102>
- 33) Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 28, Issue 1). <http://www.genome.ad.jp/kegg/>
- 34) Ghavami, S., Hashemi, M., Ande, S. R., Yeganeh, B., Xiao, W., Eshraghi, M., Bus, C. J., Kadkhoda, K., Wiechec, E., Halayko, A. J., & Los, M. (2009). Apoptosis and cancer: Mutations within caspase genes. In *Journal of Medical Genetics* (Vol. 46, Issue 8, pp. 497–510). <https://doi.org/10.1136/jmg.2009.066944>
- 35) Chowdhury, I., Tharakan, B., & Bhat, G. K. (2008). Caspases - An update. In *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology* (Vol. 151, Issue 1, pp. 10–27). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.05.010>
- 36) Li, Y., Tian, L., Zhang, Y., & Shi, Y. (2023). Structural insights into CED-3 activation. *Life Science Alliance*, 9. <https://doi.org/10.26508/lsa.202302056>
- 37) Shi, Y. (2002). Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. In *Molecular Cell* (Vol. 9, Issue 3, pp. 459–470). Cell Press. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00482-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00482-3)
- 38) Lee, E. S., & Xue, D. (2014). Caspase Protocols in *Caenorhabditis elegans* (pp. 101–108). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0357-3\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0357-3_6)
- 39) Shi, Y. (2004). Caspase activation, inhibition, and reactivation: A mechanistic view. *Protein Science*, 13(8), 1979–1987. <https://doi.org/10.1110/ps.04789804>

- 40) Yuan, J., Shai Shaham, tS, Ledoux, S., Ellis, H. M., & Robert Horvitz, H. (1993). The *C. elegans* Cell Death Gene *ted-3* Encodes a Protein Similar to Mammalian Interleukin-1 p-Converting Enzyme. In *Cell* (Vol. 75).
- 41) Conradt, B., Wu, Y. C., & Xue, D. (2016). Programmed cell death during *Caenorhabditis elegans* development. *Genetics*, 203(4), 1533–1562. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.186247>
- 42) Li, J., & Yuan, J. (2008). Caspases in apoptosis and beyond. In *Oncogene* (Vol. 27, Issue 48, pp. 6194–6206). <https://doi.org/10.1038/onc.2008.297>
- 43) Nicholson, D. W. (n.d.). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. <http://www.stocktonpress.co.uk/cdd>
- 44) Riedl, S. J., & Shi, Y. (2004). Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 5, Issue 11, pp. 897–907). <https://doi.org/10.1038/nrm1496>
- 45) Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., & Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade. In *Cell* (Vol. 91).
- 46) Neophytou, C. M., Trougakos, I. P., Erin, N., & Papageorgis, P. (2021). Apoptosis deregulation and the development of cancer multi-drug resistance. In *Cancers* (Vol. 13, Issue 17). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cancers13174363>
- 47) Obeng, E. (2021). Apoptosis (Programmed cell death) and its signals-a review. In *Brazilian Journal of Biology* (Vol. 81, Issue 4, pp. 1133–1143). Instituto Internacional de Ecologia. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.228437>
- 48) Martinon, F., & Rg Tschopp, J. (2004). Review Inflammatory Caspases: Linking an Intracellular Innate Immune System to Autoinflammatory Diseases effector caspase-3,-6, and-7. However, some of the “apoptotic” caspases, in particular caspase-8, have been recently shown to have additional roles in proliferation and differentiation. For example, caspase-8 activity appears to be necessary for lymphocyte proliferation. In *Cell* (Vol. 117).

- 49) Vakifahmetoglu-Norberg, H., & Zhivotovsky, B. (2010). The unpredictable caspase-2: what can it do? In *Trends in Cell Biology* (Vol. 20, Issue 3, pp. 150–159). <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2009.12.006>
- 50) Tinel, A., & Tschopp, J. (2004). The PIDDosome, a Protein Complex Implicated in Activation of Caspase-2 in Response to Genotoxic Stress. *Science*, 304(5672), 843–846. <https://doi.org/10.1126/science.1095432>
- 51) Porter, A. G., Ja, R. U., & Nicke, E. (n.d.). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. <http://www.stockton-press.co.uk/cdd>
- 52) Slee, E. A., Adrain, C., & Martin, S. J. (2001). Executioner Caspase-3, -6, and -7 Perform Distinct, Non-redundant Roles during the Demolition Phase of Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 276(10), 7320–7326. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008363200>
- 53) Ghavami, S., Eshraghi, M., Kadkhoda, K., Mutawe, M. M., Maddika, S., Bay, G. H., Wesselborg, S., Halayko, A. J., Klonisch, T., & Los, M. (2009). Role of BNIP3 in TNF-induced cell death - TNF upregulates BNIP3 expression. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1793(3), 546–560. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.01.002>
- 54) Carrington, P. E., Sandu, C., Wei, Y., Hill, J. M., Morisawa, G., Huang, T., Gavathiotis, E., Wei, Y., & Werner, M. H. (2006). The Structure of FADD and Its Mode of Interaction with Procaspase-8. *Molecular Cell*, 22(5), 599–610. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.04.018>
- 55) Rodriguez, J., & Lazebnik, Y. (1999). Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. [www.genesdev.org](http://www.genesdev.org)
- 56) Saleem, M., Qadir, M. I., Perveen, N., Ahmad, B., Saleem, U., & Irshad, T. (2013). Inhibitors of apoptotic proteins: New targets for anticancer therapy. In *Chemical Biology and Drug Design* (Vol. 82, Issue 3, pp. 243–251). <https://doi.org/10.1111/cbdd.12176>
- 57) Sharon, A., Finkelstein, A., Shlezinger, N., & Hatam, I. (2009). Fungal apoptosis: Function, genes and gene function. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 33, Issue 5, pp. 833–854). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00180.x>
- 58) Petros, A. M., Olejniczak, E. T., & Fesik, S. W. (2004). Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. In *Biochimica et Biophysica Acta -*

- Molecular Cell Research (Vol. 1644, Issues 2–3, pp. 83–94).  
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2003.08.012>
- 59) Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A., & Adams, J. M. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: Implications for physiology and therapy. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 15, Issue 1, pp. 49–63). <https://doi.org/10.1038/nrm3722>
- 60) Gross, A., McDonnell, J. M., & Korsmeyer, S. J. (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis The BCL-2 family. [www.genesdev.org](http://www.genesdev.org)
- 61) Voss, A. K., & Strasser, A. (2020). The essentials of developmental apoptosis. In *F1000Research* (Vol. 9). F1000 Research Ltd. <https://doi.org/10.12688/f1000research.21571.1>
- 62) Li, M. (2021). The role of P53 up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) in ovarian development, cardiovascular and neurodegenerative diseases. In *Apoptosis* (Vol. 26, Issues 5–6, pp. 235–247). Springer. <https://doi.org/10.1007/s10495-021-01667-z>
- 63) Opferman, J. T., & Kothari, A. (2018). Anti-apoptotic BCL-2 family members in development. In *Cell Death and Differentiation* (Vol. 25, Issue 1, pp. 37–45). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.170>
- 64) Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R., & Wang, X. (1996). Induction of Apoptotic Program in Cell-Free Extracts: Requirement for dATP and Cytochrome c. In *Cell* (Vol. 86).
- 65) Sjöström, Johanna, & Bergh, J. (2001). How apoptosis is regulated, and what goes wrong in cancer. *BMJ*, 322(7301), 1538–1539. <https://doi.org/10.1136/bmj.322.7301.1538>
- 66) Chiarugi, V., Magnelli, L., & Cinelli, M. (1997). Complex Interplay Among Apoptosis Factors: RB, P53, E2F, TGF- $\beta$ , Cell Cycle Inhibitors and the BCL2 Gene Family. In *Pharmacological Research* (Vol. 35, Issue 4).
- 67) Marei, H. E., Althani, A., Afifi, N., Hasan, A., Caceci, T., Pozzoli, G., Morrione, A., Giordano, A., & Cenciarelli, C. (2021). p53 signaling in cancer progression and therapy. In *Cancer Cell International* (Vol. 21, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12935-021-02396-8>

- 68) Levine, A. J., & Oren, M. (2009). The first 30 years of p53: Growing ever more complex. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 9, Issue 10, pp. 749–758). <https://doi.org/10.1038/nrc2723>
- 69) Feroz, W., & Sheikh, A. M. A. (2020). Exploring the multiple roles of guardian of the genome: P53. In *Egyptian Journal of Medical Human Genetics* (Vol. 21, Issue 1). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1186/s43042-020-00089-x>
- 70) Capuozzo, M., Santorsola, M., Bocchetti, M., Perri, F., Cascella, M., Granata, V., Celotto, V., Gualillo, O., Cossu, A. M., Nasti, G., Caraglia, M., & Ottaiano, A. (2022). p53: From Fundamental Biology to Clinical Applications in Cancer. In *Biology* (Vol. 11, Issue 9). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biology11091325>
- 71) Levine, A. J. (2020). p53: 800 million years of evolution and 40 years of discovery. *Nature Reviews Cancer*, 20(8), 471–480. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-0262-1>
- 72) Bellamy, C. O. C. (2006). p53 and apoptosis. <http://bmb.oxfordjournals.org/>
- 73) Wang, H., Guo, M., Wei, H., & Chen, Y. (2023). Targeting p53 pathways: mechanisms, structures, and advances in therapy. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 8, Issue 1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01347-1>
- 74) Wei, H., Qu, L., Dai, S., Li, Y., Wang, H., Feng, Y., Chen, X., Jiang, L., Guo, M., Li, J., Chen, Z., Chen, L., Zhang, Y., & Chen, Y. (2021). Structural insight into the molecular mechanism of p53-mediated mitochondrial apoptosis. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22655-6>
- 75) Crook, N. E., Clem, R. J., & Miller, L. K. (1993). An Apoptosis-Inhibiting Baculovirus Gene with a Zinc Finger-Like Motif. In *JOURNAL OF VIROLOGY* (Vol. 67, Issue 4).
- 76) Kasof, G. M., & Gomes, B. C. (2001). Livin, a Novel Inhibitor of Apoptosis Protein Family Member. *Journal of Biological Chemistry*, 276(5), 3238–3246. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003670200>
- 77) Eckelman, B. P., Drag, M., Snipas, S. J., & Salvesen, G. S. (2008). The mechanism of peptide-binding specificity of IAP BIR domains. *Cell Death and Differentiation*, 15(5), 920–928. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.6>



- 78) Berthelet, J., & Dubrez, L. (2013). Regulation of apoptosis by inhibitors of apoptosis (IAPs). In *Cells* (Vol. 2, Issue 1, pp. 163–187). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells2010163>
- 79) Deveraux, Q. L., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., & Reed, J. C. (1999). Endogenous Inhibitors of Caspases. In *Journal of Clinical Immunology* (Vol. 19, Issue 6).
- 80) Salvesen, G. S., & Duckett, C. S. (2002). IAP proteins: Blocking the road to death's door. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 3, Issue 6, pp. 401–410). <https://doi.org/10.1038/nrm830>
- 81) Dubrez-Daloz, L., Dupoux, A., & Cartier, J. (2008). IAPs: More than just inhibitors of apoptosis proteins. In *Cell Cycle* (Vol. 7, Issue 8, pp. 1036–1046). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.4161/cc.7.8.5783>
- 82) Vucic, D., & Fairbrother, W. J. (2007). The inhibitor of apoptosis proteins as therapeutic targets in cancer. In *Clinical Cancer Research* (Vol. 13, Issue 20, pp. 5995–6000). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0729>
- 83) Nachmias, B., Ashhab, Y., & Ben-Yehuda, D. (2004). The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): An emerging therapeutic target in cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 14(4), 231–243. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2004.04.002>
- 84) Leu, J. I. J., Dumont, P., Hafey, M., Murphy, M. E., & George, D. L. (2004). Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nature Cell Biology*, 6(5), 443–450. <https://doi.org/10.1038/ncb1123>
- 85) Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., & Petrenko, O. (2003). p53 Has a Direct Apoptogenic Role at the Mitochondria shows that the type, strength, and kinetics of the target gene profiles depend on p53 levels, stress type. In *Molecular Cell* (Vol. 11).
- 86) Rozenfeld-Granot, G., Krishnamurthy, J., Kannan, K., Toren, A., Amariglio, N., Givol, D., & Rechavi, G. (n.d.). A positive feedback mechanism in the transcriptional activation of Apaf-1 by p53 and the coactivator Zac-1. <https://doi.org/10.1038/sj/onc/1205218>
- 87) Happo, L., Strasser, A., & Cory, S. (2012). BH3-only proteins in apoptosis at a glance. *Journal of Cell Science*, 125(5), 1081–1087. <https://doi.org/10.1242/jcs.090514>

- 88) Zhao, X., Fang, K., Liu, X., Yao, R., Wang, M., Li, F., Hao, S., He, J., Wang, Y., Fan, M., Huang, W., Li, Y., Gao, C., Lin, C., & Luo, Z. (2023). QSER1 preserves the suppressive status of the pro-apoptotic genes to prevent apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 30(3), 779–793. <https://doi.org/10.1038/s41418-022-01085-x>
- 89) Fridman, J. S., & Lowe, S. W. (2003). Control of apoptosis by p53. In *Oncogene* (Vol. 22, Issue 56 REV. ISS. 8, pp. 9030–9040). <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207116>



## **BÖLÜM 4**

### **KANSERDE APOPTOTİK YOLAKLARIN İNHİBİSYONU**

Dr. Öğr. Üyesi Fatma YILDIZ<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup>Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Antalya, Türkiye. fatma.yildiz@alanya.edu.tr, Orcid ID: 0000-0002-9270-9062



## GİRİŞ

Apoptoz; embriyonik gelişim ve doku homeostazında önemli rol oynayan, yaşlanma sonucu fonksiyonunu kaybetmiş veya çeşitli sebeplerle organizmada artık ihtiyaç duyulmayan hücrelerin özel mekanizmalar aracılığıyla programlı ölümüdür (1,2). Bu programlı hücre ölümü, hücre bölünmesi ve hücre ölümü arasında bir denge sağlamada önemli bir rol oynar. Apoptozun önlenmesi hücrelerin kontrolsüz çoğalmasıyla sonuçlanır ve kanser gibi farklı hastalıklara yol açar (3). Apoptoz mekanizması oldukça karmaşık olup ekstrinsik (dış) ve intrinsik (iç) olmak üzere iki ana yolak tarafından aktif hale gelmektedir. Bu iki ana yolak kaspazların aktivasyonu ile çalışmaktadır. Özellikle kanser başta olmak üzere birçok hastalığın patogeneğinde bu yolakların bozulması önemli bir rol oynamaktadır. Kanserde hücreler apoptozu gerçekleştirecek ölüm sinyallerini alamadığından, hücre ölümü ve proliferasyonu arasındaki denge bozulmaktadır. Bu durum apoptotik yolakların herhangi bir aşamasında sorun teşkil edebilmektedir. Bu bölümde, apoptozun altta yatan mekanizmaları, bu mekanizmalarda meydana gelebilecek kusurlar, apoptozdan kaçış yolları ile bu apoptotik yolakların inhibisyonuna sebep olan faktörler ve karsinogenez ile olan ilişkisi üzerine odaklanılmıştır.

## 2. Apoptoz ve Apoptoz Mekanizmaları

Apoptoz, çok hücreli organizmaların gelişimi, doku homeostazı ve bütünlüğünde önemli rol oynayan fonksiyonları bozulan, hasarlanmış veya biyolojik görevini tamamlamış hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlayan hücre ölüm şeklidir (3). Apoptotik hücre ölümünün etki mekanizması tipik olarak kromatin materyalinin yoğunlaşması, çekirdekte meydana gelen DNA parçalanması, hücre büzülmesi ve hücre dışı matrislere yapışma kaybı ile karakterize edilir (4,5). Apoptoz, kanser ve diğer ilgili hastalıkları önlemek için hücrelerde hayatta kalma ve ölüm arasındaki dengeyi koruyan hayati ve kritik bir mekanizmadır (6). Apoptoz mekanizması esas olarak apoptozu indüklemeye rol oynayan

ekstrinsik ve intrinsik yol olmak üzere iki temel yoldan oluşur. Bu iki ölüm yolundan ekstrinsik yol; ölüm ligandlarının ölüm reseptörlerine bağlanması ile aktive edilen yolu ifade ederken; intrinsik yol hücre içi sinyaller sonucu aktif olan mitokondri aracılı bir yolu ifade eder (7). Bu iki yolak bir seri kaspazı aktive ederek bu hücreleri parçalamak için anahtar hücre proteinleri hedeflemektedir (Şekil 1). (8). Birçok hastalığın patogeneğinde fikir elde etmek açısından ekstrinsik ve intrinsik yolaktaki mekanizmaları anlamak büyük önem taşımaktadır (9). Apoptotik yolda yer alan hedef molekülleri aktive veya inhibe ederek yeni tedavi seçeneklerinin oluşturulmasına imkan tanımak için apoptoz yollarını düzenleyen moleküler mekanizmaların daha detaylı araştırılmasına ihtiyaç vardır (10).

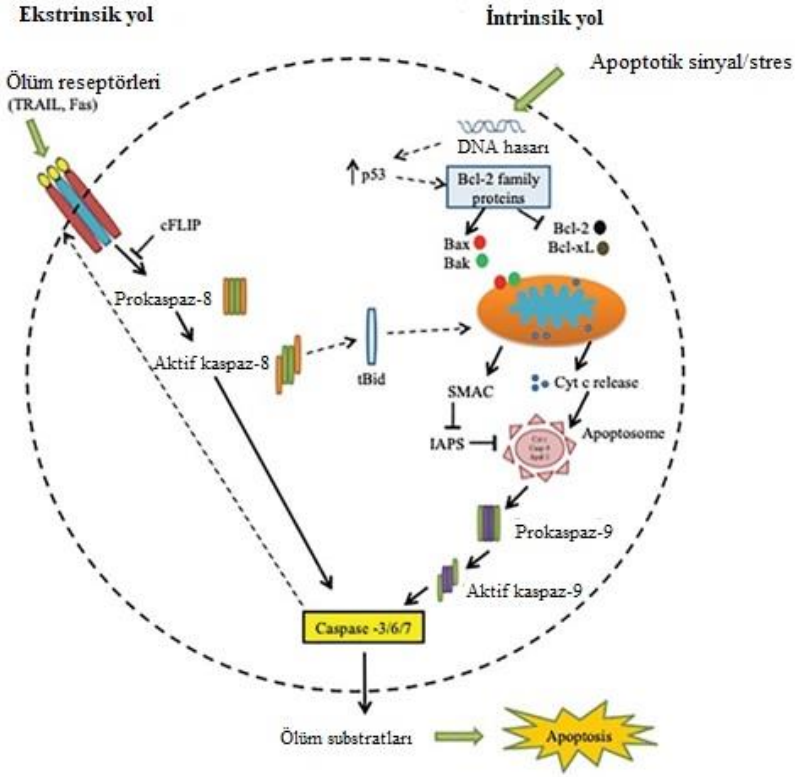
### **2.1. Ekstrinsik Apoptoz Yolu**

Ekstrinsik (dışsal) hücre ölüm yolu, hücre yüzeyinde bulunan FAS reseptörü (CD95) ve TNF reseptörü (TNFR) ile etkileşime giren Fas ligandı (FasL) ve Tümör Nekroz Faktörü (TNF) gibi ligandlar tarafından aktive edilir (11,12). Transmembran reseptörler (DR)'in DL (spesifik ölüm ligandları)'ler tarafından tetiklenmesi, bir ölüm indükleyen sinyallemeye kompleksinin (DISC) oluşumuyla sonuçlanır (13,14). Bu kompleks, Prokaspaz 8'in aktif formu olan Kaspaz 8'in oluşumu için Prokaspaz 8'in ölüm efektör alanı (DED) ile birleşir (15). Kaspaz 8 iki şekilde hücre ölümüne neden olabilir. Bunlardan birincisi Bid'in (Bcl-2 ailesinin proapoptotik üyesi) c-terminal bölgesini keserek aktif formu olan tBid'in oluşmasını sağlayarak apoptozun intrinsik yola girmesine neden olur. İkincisi ise Prokaspaz 3,6 ve 7'yi de aktive ederek hücre ölümüne neden olur (16). Decoy reseptörleri (DcR) olarak adlandırılan TNFR süper ailesinin bazı üyeleri FADD ve TRADD proteinlerine bağlanamaz (sitoplazmik ölüm alanları içermediğinden) ve proapoptotik sinyalizasyona katılamazlar. Bu durumda DcR'ler ölüm reseptörleri sinyalizasyonu ile aynı tür liganda bağlanmak için yarışmakta ve DcR'lerinin ileri ekspresyonu apoptozu zayıflatmaktadır (17) (Şekil 1).

## 2.2. İntrensik Apoptoz Yolu

Mitokondriyal apoptotik yol olarak da bilinen içsel hücre ölüm yolu, oksidatif stres, sitotoksik ilaçlarla tedavi ve DNA hasarı gibi çeşitli hücre dışı ve hücre içi stresler tarafından tetiklenir ve proteinlerin (sitokrom *c* dahil) mitokondriyal membran boşluğundan salınmasını içerir (2). Bcl-xL ve Bcl-2 (Bcl-2 ailesi üyesi), sitokrom *c*'nin salınmasını önleyen anti-apoptotik proteinlerdir (18). Sitokrom *c*, apoptozom adı verilen bir kompleksi oluşturmak için Apaf-1 ve inaktif bir başlatıcı kaspaz olan prokaspaz-9 ile birleşir (19). Bu, daha sonra kaspaz (kaspaz-3, kaspaz-6, kaspaz-7) aktivasyonu kaskadını tetikleyen kaspaz-9'un aktivasyonuna yol açar. Böylece kaspaz-9 birden fazla hücre proteinini kesilmesini teşvik ederek hücrenin parçalanmasına neden olur (20). Genellikle içsel yolda yer alan proteinler arasında; Smac/Diablo, Kaspaz-9, Nox, Bcl-2, Bcl-w ve Aven (Hücre ölümü düzenleyici) ve Myc (Onkogen) bulunur. Disfonksiyonel mitokondriyal sonuçlar, süperoksit iyonlarının aşırı üretimine, mitokondriyal biyogenezde bozulmaya, iç mitokondriyal membran potansiyelinin kaybına, matris kalsiyum glutatyonun dışarı akışına ve membran proteinlerinin salınımına neden olur (7).





**Şekil 1.** Apoptoz Yolları. Apoptoz esas olarak iki ana yoldan oluşur ve üçüncüsü apoptozun infazcı yoludur. Dışsal uyaranlar veya ligand molekülü tarafından tetiklenen ve özellikle ölüm reseptörlerini (DR'ler) içeren dışsal yol. İçsel yol, mitokondriyal membrana Bax/Bak eklenmesiyle aracılık edilir ve daha sonra Apaf-1 ve prokaspaz-9 ile birleşerek apoptozom üreten sitokrom c salınır ve ardından apoptozis kaskadının kaspaz 3 aktivasyonu gerçekleşir. TNF ilişkili apoptozis indükleyen ligand (TRAIL), hücresele FLICE inhibitör proteinleri (cFLIP), B hücreli lenfoma proteini 2 (Bcl-2), Kesik bid (tBid), Bcl-2 homolog ekleme varyantları (Bcl-xL), Sitokrom (Cyt C), Kaspazların ikinci mitokondriyal aktivatörü (SMAC), Apoptozis proteinlerinin inhibitörü (IAP'ler) (3).

### 3. Karsinogenez ve Apoptoz

Karsinogenez tek bir hücrenin tümöre dönüştüğü ve metastaz süreciyle başka bir yere hareket ettiği karmaşık çok adımlı bir süreçten oluşur. Birçok kanser hücresi, proapoptotik hücre ölüm bileşenlerinin inaktivasyonunu sağlayarak veya antiapoptotik moleküllerin seviyesini

artırarak apoptozdan kurtulmak için mekanizmalar geliştirmektedir (10). Genel olarak, apoptozdan kaçış yollarını aşağıda belirtilen şekilde gruplandırabiliriz:

- Bcl-2 protein ailesinin dengesinin bozulması,
- İnhibitör apoptoz protein ailesi (IAP) moleküllerinin ekspresyonunun artışı,
- Kaspaz fonksiyonunun azalması,
- p53 mutasyonları ve defektleri,
- Reseptör sinyal yolağının bozulması (14,12)

### 3.1 Bcl-2 Proteinleri

Bcl-2 ailesi pro- ve anti-apoptotik proteinlerden oluşmakta olup apoptozun içsel yolunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (21). Bcl-2 ailesi proteinlerinin kategorizasyonu, Bcl-2 homolojisi (BH) olarak adlandırılan, dizi homolojisinin paylaşılan bloklarının varlığına dayanmaktadır. Bugüne kadar, Bcl-2 protein ailesinin 25 üyesi tanımlanmıştır. Bu proteinler, hematopoetik hücrelerde mitokondri, düz endoplazmik retikulum ve perinükleer membranlarda lokalizedir (22). Bcl-2 ailesi proteinleri, anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-B, Bcl-w) ve proapoptotik (Bax, Bad, Bak, Bim, Bid, Bcl-xs, Bik, Hrk, Nip3, Bmf, Noxa, Puma) aile üyelerinden oluşur (23). Bcl-2, Mcl-1 ve Bcl-xL anti-apoptotik proteinlerdir ve rolleri sitokrom c'nin salınmasını önlemek ve mitokondriyal bütünlüğü korumaktır; Bax, Bak, Bad ve Bok ise Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik proteinleridir ve sitokrom c'nin mitokondriyal intermembran boşluktan sitozole salınmasını sağlayarak apoptozis indüksiyonunu teşvik eder ve sonunda kanser tedavisinde yardımcı olur (17).

Pro- ve anti-apoptotik Bcl-2 ailesi proteinleri arasındaki denge, mitokondriyal dış membran geçirgenliğinin (MOMP) başlatılması için önemli bir unsurdur (24). Pro-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin upregülasyonu ve anti-apoptotik Bcl-2'nin downregülasyonu hücre

ölümü mekanizmasıyla etkili bir şekilde bağlantılıdır. Örneğin, pro-apoptotik (Bax) ve anti-apoptotik (Bcl-2) proteinler arasındaki oran genellikle hücrenin kaderini belirlemek için kullanılır (25). Çok alanlı (Bax ve Bak) pro-apoptotik proteinlerin inaktivasyonu karsinogenezin önemli bir özelliğidir (26). Benzer şekilde, anti-apoptotik proteinlerin çok alanlı yüksek seviyeleri kanser hücrelerinde apoptozun düzensizliğini teşvik eder ve ayrıca kanser hücrelerinin bağışıklık gözetimine dirençli hale gelmesine yardımcı olur (27). Ancak, tek proapoptotik alan BH3, yani Bid, Bim, Bad, Puma (apoptozun p53 tarafından yukarı regüle edilmiş kontrolü) ve Noxa, apoptozu düzenlemede ve tetiklemede birincil rol oynar. Bcl-2'nin aşırı ekspresyonu Hodgkin dışı lenfoma, akut miyeloid lösemi, miyelom, kronik lenfositik lösemi, melanom ve hepatoselüler, akciğer, meme, prostat karsinomlarında bulunmuştur (28,29). Başka bir çalışmada, SW1990 pankreatik kanser hücrelerinde anti-apoptotik protein Bcl-2'nin aşırı ekspresyonunun kemoterapiye yanıtta olumsuz sonuçlara neden olduğu bildirilmiştir (23). Akşit ve Bildik (30), Bcl-2 ve Bax'ın lokalizasyonunu fibrosarkomda immünohistokimyasal yöntemle araştırmış ve tümör dokusunda daha fazla Bax ve Bcl-2 pozitif hücre bulunduğunu bildirmişlerdir. Cekanova ve ark., (31) in vitro meme kanseri hücrelerinde Bad molekülünün, epitelyal-mezenkimal geçişi yöneten bazı kilit molekülleri düzenleyerek Bcl-2 protein ailesi üzerinde anti-invaziv etkiler gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bunların yanı sıra anti-apoptotik ve pro-apoptotik Bcl-2 proteininin aşağı ve yukarı regülasyonunu hedefleyen, etkinliği artırılmış potansiyel terapötik ajanlar geliştirilmiştir. Bcl-2 ailesinin anti-apoptotik etkilerini engellemek için etkili stratejiler benimsenmiştir. Bunlar arasında antisens oligonükleotidlerin kullanılması, küçük ilaç moleküllerinin geliştirilmesi ve gen transkripsiyonunun inhibe edilmesi yer almaktadır (32).

### 3.2. Apoptoz İnhibitör Protein Ailesi

IAP'ler, başta kaspaz-3 ve 7 olmak üzere, yaklaşık 70 amino asit uzunluğunda olan başlatıcı ve efektör kaspazlara bağlanarak onların aktivitelerini inhibe eden ve böylece hücre ölümünü engelleyen bir protein ailesidir. IAP'lerin yükseltilmiş ifade seviyeleri, hücre sağ kalımının artması, tümör büyümesinin artması ve buna bağlı metastazla önemli ölçüde sonuçlanmıştır. IAP hedefleme stratejisi, kanser hücrelerini kemoterapiler, antikör bazlı tedaviler gibi çeşitli tedavilere karşı duyarlı hale getirmek için giderek daha çekici hale gelmiştir (33, 34). Bugüne kadar insanlarda; nöronal apoptoz inhibe edici protein, hücrel apoptoz protein inhibitörü-1 (c-IAP1), apoptoz proteininin X'e bağlı inhibitörü (XIAP), baculovirus IAP tekrar (BIR) domaini-6 (Apollon), hücrel apoptoz protein inhibitörü -2 (c-IAP2), ILP-2, Livin, ve Survivin olmak üzere sekiz farklı IAP proteini tanımlanmıştır. Örneğin bunlardan c-IAP1, c-IAP2 ve XIAP proteinlerin parçalanmasını sağlayan ubiquitinasyon olayında rol oynamaktadır (35). Bunlardan XIAP proteini, BIR1, BIR2, BIR3 ve RING olmak üzere dört önemli domainden oluşmakta olup, efektör kaspazları ve kaspaz-9'u bağlayarak apoptozu inhibe edebilmektedir. Survivin ise hücre bölünmesi ve apoptozdan korunmada rol oynayan bir IAP molekülü olup Kaspaz 3 ve 7'nin inaktivasyonuna yol açarak antiapoptotik rol oynadığı bilinmektedir (36). Ek olarak, survivin kanser hücrelerinin G2/M kontrol noktasını aşmasına yardım ederek hücrenin sınırsız çoğalmasını desteklemektedir (37).

Yapılan çalışmalara bakıldığında, IAP'nin ekspresyonunun birçok kanser türünde anormallik gösterdiği görülmektedir. Çalışmalarda kanser hücrelerinin proliferasyonunun, kanser tedavisindeki başarısızlığın ve kemoterapiye olan direncin tümör türlerindeki survivin proteininin ileri ekspresyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (36,34) pankreatik kanser hücrelerinde IAP ailesi üyelerinin ekspresyon seviyelerinin yükseldiğini ve bu durumun kemoterapiye karşı olan

dirençten sorumlu olduğunu bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada, endometriyal kanserde survivinin kodlandığı BIR içeren protein 5 (BIRC5)'in, yüksek ekspresyonunun kötü prognoz ile ilişkili olduğu ve 16 endometriyal kanser hücre hattında survivin inhibisyonunun apoptotik hücre ölümünü indükleyerek anti-tümör etki gösterdiğini göstermişlerdir (38,39).

### **3.3. Kaspaz Fonksiyonunun Azalması**

Yapısal olarak sistein-aspartik-proteazlar olarak bilinen kaspazlar, apoptozun başlatılması ve uygulanmasında kritik rol üstlenmektedir. Kaspazlar; bir sinyale karşı başlatıcı kaspazlar 2, 8, 9, 10, inflamatuvar kaspazlar 1, 4, 5 ve apoptozda yıkım aşamasını gerçekleştiren cellat (efektör) kaspazlar 3, 6, 7 olarak sınıflandırılırlar (7). Efektör kaspazlar tipik olarak bölünmüş şekilde bulunan kısa prodomainler içerirken; başlatıcı kaspazlar, protein-protein etkileşimlerini sağlayan CARD veya DED adı verilen uzun prodomainlere sahiptir (40). Başlatıcı kaspazlar kendileri aktive olabilmekte iken, efektör kaspazlar başlatıcı kaspaz 8, 9 ve 10 tarafından aktive edilirler. Efektör kaspazlar; performin/granzim yolu ile de doğrudan başlatılabilir (41). Kanser hücrelerinin apoptozdan nasıl kurtulduklarına dair açıklık getirmede ve apoptozun durdurulmasında başlatıcı ve efektör kaspazlar önemli bir göreve sahiptir. Tüm kaspazların mutasyonlarına bazı solid tümörlerde rastlanılmasına rağmen, tedaviye olan direnç ve tümör başlangıcı tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. Kaspaz 8, 21 farklı tümör çeşidi üzerinde analiz edilmiş ve özellikle baş, kolon, kol ve mide kanserlerinde büyük ölçüde değişime uğradığı bildirilmiştir (42). Yapılan çalışmaları incelediğimizde, ikinci aşama kalın bağırsak kanseri hastalarda, kaspaz-9'un down regüle olduğu; kaspaz-8 ve FADD'ın insan glioblastoma hücrelerinde, mRNA ve protein ekspresyon seviyelerinin normal beyin dokularına göre daha az eksprese olduğu görülmüştür (43,44). Benzer şekilde kaspaz-8 ekspresyonunun meme kanseri hastalarının tümör

dokularında komşu normal dokulara kıyasla önemli ölçüde azalış gösterdiği bildirilmiştir (45).

### 3.4. p53

Genomun koruyucusu olarak bilinen p53 tümör baskılayıcı protein, dışsal ve içsel apoptotik yolları başlatabilen çok sayıda pro-apoptotik gen ürününün ekspresyonunu indükleyebilir. p53; hücrede hipoksi, onkogen aktivasyonu ve DNA hasarı gibi birçok hücrel stres faktörüne karşı verilen yanıtların kontrolünü sağlamaktadır (46). p53'ün apoptoza katkıda bulunduğu mekanizmalar henüz açıklığa kavuşturulmamış olsa da, mevcut kanıtlar p53'ün düzenleyici bölgelerinde p53-bağlayıcı bölgeler içeren pro-apoptotik hedef genlerin transkripsiyonel aktivasyonu yoluyla işlev gördüğüne işaret etmektedir (47). p53, gen ekspresyonunu hem baskılayabilme hem de aktiveleştirebilme özelliği sayesinde DNA'da hasar meydana geldiğinde büyümeyi durdurarak veya apoptozu indükleyerek kanser riskini azaltmaktadır (48,49). p53'ün doğrudan hedef alabileceği çeşitli apoptotik genlerden Noxa ve Puma, pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerini eksprese eden hücre tiplerinde p53 tarafından indüklenir, ancak Noxa ve Puma da p53'ten bağımsız mekanizmalarla indüklenebilir. Noxa ve Puma'ya ek olarak, p53, Bcl-2 ailesinin apoptozu doğrudan tetikleyebilen proapoptotik bir üyesi olan Bax'ın transkripsiyonel ve transkripsiyondan bağımsız aktivasyonuna neden olur (50). Bunun yanı sıra p53, E3 ubiquitin ligaz Mdm2 (transkripsiyon faktörü) tarafından da düzenlenmektedir. Mdm2, insan kanserlerinde genellikle yüksek oranda saptanmıştır (46). Bu olay, Mdm2'nin p53'ün trans aktivasyon domainine bağlanarak onu inaktif hale getirmesi ile meydana gelmektedir (51). İnsan kanserlerinin %50'sinden fazlası p53 lokusunda mutasyonlar taşımaktadır (52). p53 mutasyonları, Li-Fraumeni sendromu (LFS) olarak adlandırılan kansere yatkınlık bozukluğuna neden olabilmektedir (52). Yapılan bir çalışmada p53 mutasyonlarının ileri evre kas invaziv mesane tümörleri ile anlamlı bir ilişkide olduğu

bulunmuştur (53). Benzer şekilde Ayed ve ark., (54) inceledikleri 90 primer gastrik karsinoma hastasında p53 ekspresyonunun 36 (%40) örnekte pozitif olduğunu bildirmişlerdir.

### **3.5. Reseptör Sinyal Yolaklarının Bozulması**

Ekstrinsik apoptotik yoldaki en kritik sinyalizasyon yollarından biri Fas/Fas ligand (FasL) sistemidir. Bu yolu etkileyen mutasyonlar bağışıklık sistemi hücrelerini baskılayarak yeni tümör hücrelerinin oluşumuna imkân vermektedir. Hepatoselüler karsinoma üzerine yapılan bir çalışmada, FasL geni-844 T/C polimorfizminin bu kanser türünü gelişimi için artan bir risk olduğu bildirilmiştir (55). Başka bir çalışmada meme kanserinin II. ve III. evresinde olan hastaların kemoterapi öncesi ve sonrasındaki FasL, granzim B ve sitokrom-c konsantrasyonları karşılaştırılmış ve kemoterapi sonrası bu moleküllerin seviyelerinde artış tespit edilmiştir (56). FAS yolağını tetikleyerek apoptoz yolağını değiştiren başka bir mekanizma daha bulunmaktadır. Bu mekanizma TNF reseptörüne benzer ekstrasellüler motifler içeren ve FAS-bağlı apoptozu inhibe eden bir protein olan DcR (TNF reseptör ailesi üyelerinden) geninde bir artışa neden olmaktadır. Bir başka çalışmada da, DcR3'ün lenf düğümleri ve vasküler endotelial hücrelerde ekspresyonu az oranda görülürken, 58 (%92,1) hastanın meme kanseri dokusunda ekspresyon seviyesinin yüksek olduğu görülmüştür (57). Yine TRAIL-dirençli meme kanseri hücrelerinin invazivlik özelliğinin arttığı, MDA-MB-231 (meme kanseri hücre hattı) hücreleri ile yapılan çalışmada gözlenmiştir (58).

## Kaynakça

- 1) Shahar, N., & Larisch, S. (2020). Inhibiting the inhibitors: Targeting anti-apoptotic proteins in cancer and therapy resistance. *Drug Resistance Updates*, 52, 100712.
- 2) Kang, M. H., & Reynolds, C. P. (2009). Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. *Clinical cancer research*, 15(4), 1126-1132.
- 3) Jan, R. (2019). Understanding apoptosis and apoptotic pathways targeted cancer therapeutics. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 9(2), 205.
- 4) Nikolettou, V., Markaki, M., Palikaras, K., & Tavernarakis, N. (2013). Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1833(12), 3448-3459.
- 5) Hudaya, T., Gul-e-Saba, T. M., Ismail, N., & Mohammad, T. S. T. (2017). Methanol extracts of four selected marine sponges induce apoptosis in human breast cancer cell line, MCF-7. *Int J Res Pharm Sci*, 8(4), 667-75.
- 6) Hassan, M., Watari, H., AbuAlmaaty, A., Ohba, Y., & Sakuragi, N. (2014). [Retracted] Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer. *BioMed research international*, 2014(1), 150845.
- 7) Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495-516.
- 8) Koff, J. L., Ramachandiran, S., & Bernal-Mizrachi, L. (2015). A time to kill: targeting apoptosis in cancer. *International journal of molecular sciences*, 16(2), 2942-2955.
- 9) Bildik, A., & Bayar, İ. (2018). Kanserde apoptotik yolların inhibisyonu. *Türkiye Klinikleri Journal of Veterinary Sciences*, 9(2), 42-51.
- 10) Nitulescu, G. M., Draghici, C., Olaru, O. T., Matei, L., Ioana, A., Dragu, L. D., & Bleotu, C. (2015). Synthesis and apoptotic activity of new pyrazole derivatives in cancer cell lines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23(17), 5799-5808.
- 11) Jin, Z., & El-Deiry, W. S. (2005). Overview of cell death signaling pathways. *Cancer biology & therapy*, 4(2), 147-171.



- 12) Wong, R. S. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of experimental & clinical cancer research*, 30, 1-14.
- 13) Bredesen, D. E., Rao, R. V., & Mehlen, P. (2006). Cell death in the nervous system. *Nature*, 443(7113), 796-802.
- 14) Favaloro, B., Allocati, N., Graziano, V., Di Ilio, C., & De Laurenzi, V. (2012). Role of apoptosis in disease. *Aging (Albany NY)*, 4(5), 330.
- 15) Yang, J., Li, G., & Zhang, K. (2016). Pro-survival effects by NF- $\kappa$ B, Akt and ERK (1/2) and anti-apoptosis actions by Six1 disrupt apoptotic functions of TRAIL-Dr4/5 pathway in ovarian cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 84, 1078-1087.
- 16) Wang, Y., & Tjandra, N. (2013). Structural insights of tBid, the caspase-8-activated Bid, and its BH3 domain. *Journal of Biological Chemistry*, 288(50), 35840-35851.
- 17) Leytin, V. (2012). Apoptosis in the anucleate platelet. *Blood reviews*, 26(2), 51-63.
- 18) Ghobrial, I. M., Witzig, T. E., & Adjei, A. A. (2005). Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA: a cancer journal for clinicians*, 55(3), 178-194.
- 19) Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D. G., Heuser, J. E., Wang, X., & Akey, C. W. (2002). Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Molecular cell*, 9(2), 423-432.
- 20) McComb, S., Chan, P. K., Guinot, A., Hartmannsdottir, H., Jenni, S., Dobay, M. P., & Bornhauser, B. C. (2019). Efficient apoptosis requires feedback amplification of upstream apoptotic signals by effector caspase-3 or-7. *Science advances*, 5(7), eaau9433.
- 21) Gross, A., McDonnell, J. M., & Korsmeyer, S. J. (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & development*, 13(15), 1899-1911.
- 22) Reed, J. C., & Pellecchia, M. (2005). Apoptosis-based therapies for hematologic malignancies. *Blood*, 106(2), 408-418.
- 23) Zhang, Y., Li, Z., Min, Q., Palida, A., Zhang, Y., Tang, R., & Li, H. (2018). 8-Chrysoeriol, as a potential BCL-2 inhibitor triggers apoptosis of SW1990 pancreatic cancer cells. *Bioorganic Chemistry*, 77, 478-484.

- 24) Fernald, K., & Kurokawa, M. (2013). Evading apoptosis in cancer. *Trends in cell biology*, 23(12), 620-633.
- 25) Naseri, M. H., Mahdavi, M., Davoodi, J., Tackallou, S. H., Goudarzvand, M., & Neishabouri, S. H. (2015). Up regulation of Bax and down regulation of Bcl2 during 3-NC mediated apoptosis in human cancer cells. *Cancer cell international*, 15, 1-9.
- 26) Ieranò, C., Chakraborty, A., Nicolae, A., Bahr, J., Zhan, Z., Pittaluga, S., & Robey, R. (2013). Loss of the proteins Bak and Bax prevents apoptosis mediated by histone deacetylase inhibitors. *Cell Cycle*, 12(17), 2829-2838.
- 27) Thomas, S., Quinn, B. A., Das, S. K., Dash, R., Emdad, L., Dasgupta, S., & Fisher, P. B. (2013). Targeting the Bcl-2 family for cancer therapy. *Expert opinion on therapeutic targets*, 17(1), 61-75.
- 28) Chinnaiyan, A. M., Prasad, U., Shankar, S., Hamstra, D. A., Shanaiah, M., Chenevert, T. L., & Rehemtulla, A. (2000). Combined effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and ionizing radiation in breast cancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(4), 1754-1759.
- 29) Belka, C., Schmid, B., Marini, P., Durand, E., Rudner, J., Faltin, H., & Budach, W. (2001). Sensitization of resistant lymphoma cells to irradiation-induced apoptosis by the death ligand TRAIL. *Oncogene*, 20(17), 2190-2196.
- 30) Akşit, H., & Bildik, A. (2012). Detection of apoptosis in experimental fibrosarcoma using DNA fragmentation and immunohistochemical methods.
- 31) Cekanova, M., Fernando, R. I., Siriwardhana, N., Sukhthankar, M., de la Parra, C., Woraratphoka, J., & Wimalasena, J. (2015). BCL-2 family protein, BAD is down-regulated in breast cancer and inhibits cell invasion. *Experimental cell research*, 331(1), 1-10.
- 32) Khan, K. H., Blanco-Codesido, M., & Molife, L. R. (2014). Cancer therapeutics: Targeting the apoptotic pathway. *Critical reviews in oncology/hematology*, 90(3), 200-219.
- 33) Finlay, D., Teriete, P., Vamos, M., Cosford, N. D., & Vuori, K. (2017). Inducing death in tumor cells: roles of the inhibitor of apoptosis proteins. *F1000Research*, 6.

- 34) Lopes, R. B., Gangeswaran, R., McNeish, I. A., Wang, Y., & Lemoine, N. R. (2007). Expression of the IAP protein family is dysregulated in pancreatic cancer cells and is important for resistance to chemotherapy. *International journal of cancer*, 120(11), 2344-2352.
- 35) Wang, P. H., Wan, D. H., Gu, Z. H., Qiu, W., Chen, Y. G., Weng, S. P., ... & He, J. G. (2013). Analysis of expression, cellular localization, and function of three inhibitors of apoptosis (IAPs) from *Litopenaeus vannamei* during WSSV infection and in regulation of antimicrobial peptide genes (AMPs). *PLoS One*, 8(8), e72592.
- 36) Yamazaki, H., Takagi, S., Hoshino, Y., Hosoya, K., & Okumura, M. (2013). Inhibition of survivin influences the biological activities of canine histiocytic sarcoma cell lines. *PLoS One*, 8(11), e79810
- 37) Xia, H., Chen, S., Huang, H., & Ma, H. (2015). Survivin over-expression is correlated with a poor prognosis in esophageal cancer patients. *Clinica chimica acta*, 446, 82-85.
- 38) Cheung, C. H. A., Huang, C. C., Tsai, F. Y., Lee, J. Y. C., Cheng, S. M., Chang, Y. C., & Chang, J. Y. (2013). Survivin—biology and potential as a therapeutic target in oncology. *OncoTargets and therapy*, 1453-1462.
- 39) Chuwa, A. H., Sone, K., Oda, K., Ikeda, Y., Fukuda, T., Wada-Hiraike, O., & Fujii, T. (2016). Significance of survivin as a prognostic factor and a therapeutic target in endometrial cancer. *Gynecologic oncology*, 141(3), 564-569.
- 40) Li, J., & Yuan, J. (2008). Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*, 27(48), 6194-6206.
- 41) D'arcy, M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell biology international*, 43(6), 582-592.
- 42) Lawrence, M. S., Stojanov, P., Mermel, C. H., Robinson, J. T., Garraway, L. A., Golub, T. R., & Getz, G. (2014). Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature*, 505(7484), 495-501.
- 43) Shen, X. G., Wang, C., Li, Y., Wang, L., Zhou, B., Xu, B., & Sun, X. F. (2010). Downregulation of caspase-9 is a frequent event in patients with stage II colorectal cancer and correlates with poor clinical outcome. *Colorectal Disease*, 12(12), 1213-1218.

- 44) Wang, H. B., Li, T., Ma, D. Z., Ji, Y. X., & Zhi, H. (2017). RETRACTED: Overexpression of FADD and Caspase-8 inhibits proliferation and promotes apoptosis of human glioblastoma cells.
- 45) Aghababazadeh, M., Dorraki, N., Javan, F. A., Fattahi, A. S., Gharib, M., & Pasdar, A. (2017). Downregulation of Caspase 8 in a group of Iranian breast cancer patients—A pilot study. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*, 29(4), 191-195.
- 46) Hong, B., Pieter J. van den Heuvel, A., V. Prabhu, V., Zhang, S., & S. El-Deiry, W. (2014). Targeting tumor suppressor p53 for cancer therapy: strategies, challenges and opportunities. *Current drug targets*, 15(1), 80-89.
- 47) Vousden, K. H., & Lu, X. (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nature Reviews Cancer*, 2(8), 594-604.
- 48) Duffy, M. J., Synnott, N. C., McGowan, P. M., Crown, J., O'Connor, D., & Gallagher, W. M. (2014). p53 as a target for the treatment of cancer. *Cancer treatment reviews*, 40(10), 1153-1160.
- 49) Kankaya, D., Kiremitci, S., Tulunay, O., & Baltaci, S. (2015). Gelsolin, NF- $\kappa$ B, and p53 expression in clear cell renal cell carcinoma: Impact on outcome. *Pathology-Research and Practice*, 211(7), 505-512.
- 50) Michalak, E. M., Villunger, A., Adams, J. M., & Strasser, A. (2008). In several cell types tumour suppressor p53 induces apoptosis largely via Puma but Noxa can contribute. *Cell Death & Differentiation*, 15(6), 1019-1029.
- 51) Vassilev, L. T. (2007). MDM2 inhibitors for cancer therapy. *Trends in molecular medicine*, 13(1), 23-31.
- 52) Muller, P. A., & Vousden, K. H. (2014). Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. *Cancer cell*, 25(3), 304-317.
- 53) Bodoor, K., Al-Ghabkari, A., Matalaka, I., Haddad, Y., Alkhateeb, A., Jaradat, S., & Jarun, Y. (2017). Assessment of p53 mutations, expression and prognosis in bladder cancer patients from Jordan: Identification of novel deletion mutations in the DNA-binding domain. *Meta Gene*, 12, 33-42.
- 54) Ayed, D. B., Khabir, A., Abid, M., Bayroui, M. I., Gargouri, A., Sellami-Boudawara, T., & Mokdad-Gargouri, R. (2014). Clinicopathological and

- prognostic significance of p53, Ki-67, and Bcl-2 expression in Tunisian gastric adenocarcinomas. *Acta Histochemica*, 116(8), 1244-1250.
- 55) Khalifa, R. H., Bahgat, D. M. R., Darwish, H. A. H., & Shahin, R. M. H. (2016). Significant association between FasL gene-844T/C polymorphism and risk to hepatocellular carcinoma in Egyptian patients. *Immunology letters*, 172, 84-88.
- 56) Kadam, C. Y., & Abhang, S. A. (2015). Serum levels of soluble Fas ligand, granzyme B and cytochrome c during adjuvant chemotherapy of breast cancer. *Clinica Chimica Acta*, 438, 98-102.
- 57) Wu, Q., Zheng, Y., Chen, D., Li, X., Lu, C., & Zhang, Z. (2014). Aberrant expression of decoy receptor 3 in human breast cancer: relevance to lymphangiogenesis. *journal of surgical research*, 188(2), 459-465.
- 58) Wang, H., Xu, C., Kong, X., Li, X., Kong, X., Wang, Y., ... & Yang, Q. (2014). Trail resistance induces epithelial-mesenchymal transition and enhances invasiveness by suppressing PTEN via miR-221 in breast cancer. *PloS one*, 9(6), e99067.

**BÖLÜM 5**  
**TÜMÖR BASKILAYICI GENLER**  
Ecz. Ceren AKINCI<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup>Süleyman Demirel Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü, Isparta, Türkiye. akinciceren29@gmail.com, Orcid ID: 0009-0004-9690-3390



## GİRİŞ

Kanser, anormal hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyümesi, normal sınırlarının ötesine geçerek vücudun bitişik kısımlarını istila etmesi ve/veya diğer organlara yayılmasıyla vücudun hemen hemen her organında veya dokusunda başlayabilen geniş bir hastalık grubudur. Kanser genetik ve genetik olmayan birçok faktöre bağlı gelişebilmektedir (1). Amerika Birleşik Devletleri ile düşük riskli popülasyonlar arasında farklılık gösteren çevresel (genetik olmayan) faktörler çok sayıda ve çeşitlidir ve yaşam seyri boyunca deneyimlenir. Bunlar arasında doğum ağırlığı; ergenlik yaşı; yaşam boyu beslenme alışkanlıkları, kilo alımı, alkol tüketimi, tütün kullanımı ve farmakolojik ajanların kullanımı; ve üreme faktörleri gibi faktörler yer almaktadır. Bu sonuç kışkırtıcıdır, çünkü o dönemde diyet, obezite ve alkol alımını kanser riskiyle ilişkilendiren ve titizlikle yürütülen epidemiyolojik çalışmalardan elde edilen veriler sınırlıdır (2).

Hücre döngüsü ile ilişkili kanser gelişiminde rol oynayan genler onkogenler ve tümör baskılayıcı genler (antionkogenler) olmak üzere başlıca iki gruba ayrılmaktadır. Onkogenler, anormal şekilde veya miktarda bulduklarında hücre bölünmesini yukarı doğru düzenleyerek (up-regulating) veya açarak (turning on) kötü huylu büyümeyi tetikleyebilen proteinleri kodlar. Tersine işleve sahip genler ise anti-onkogenler veya tümör baskılayıcı genler olarak adlandırılır (3).

Kanserin genetik temeli kabul edilmeden ve tümör baskılayıcı gen (TSG) terimi ortaya atılmadan önce, 1914 yılında, Alman biyolog Theodor Boveri tarafından "bölünmeyi engelleyen belirli kromozomların varlığını" öne sürülmüştür (4). Kanser gelişimini engelleyen "antionkogenlerin" varlığı uzun süre kanıtlanamasa da 1969'da Knudson, sporadik ve kalıtsal retinoblastomaların gelişim sürecini analiz ederek tümör baskılayıcı genlerin (TSG'ler) varlığını ilk kez öngörmüştür (5).

Tümör baskılayıcı genler (antionkogenler), hücrelerin normal büyüme ve bölünme süreçlerini kontrol eden, DNA hasarını onaran,



hücre döngüsünü düzenleyen ve hücrelerin anormal şekilde çoğalmasını önleyerek kanserin gelişmesini engelleyen genlerdir. Tümör baskılayıcı genler, tümör oluşumu sırasında kaybı düzensiz hücre çoğalmasına yol açan büyümeyi inhibe edici proteinleri kodlar (6).

Hücre çoğalmasını engelleyen ve antikanserojenik etki gösteren tümör baskılayıcı genlerin etkilerinin kaybı; büyümeyi engelleyen sinyallere karşı tolerans gelişmesine ve düzensiz hücre çoğalmasına yol açar (7). İnsan kanserlerinin çoğunun, hem kanser baskılayıcı genlerin protein ürünlerinin yokluğunu hem de onkogenlerin anormal ürünlerinin varlığını içermesi gereken genetik değişikliklerin bir kombinasyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir (3).

### **Bazı Önemli Tümör Baskılayıcı Genler**

**RB:** Keşfedilen ilk tümör baskılayıcı gen, çekirdek içindeki transkripsiyon faktörlerine bağlanan bir proteini kodlayan retinoblastoma genidir (RB). Transkripsiyon faktörleri, DNA'ya spesifik olarak bağlanan ve bağlanma bölgesi tarafından kontrol edilen bir dizi genin ifadesini başlatan proteinlerdir. Myc geninin protein ürünü bir transkripsiyon faktörüdür. Molekülün bir kısmı DNA'ya bağlanırken diğer bir kısmı da başka bir proteine bağlanır. RB ürünü myc ürününe bağlanır ve mutant RB proteini myc'yi bağlamadığı için bunun normal bir fizyolojik kontrol işlevi olduğu varsayılır (3). Retinoblastoma proteini (pRB) tümör baskılayıcısı, E2F transkripsiyon faktörlerini baskılayarak hücre çoğalmasını engeller. Retinoblastoma proteini (pRB), DNA tümör virüslerinin (örneğin adenoviral E1A) dönüştürücü proteinleri tarafından hedef alınır ve *RBI* geninin kendisinin veya onun yukarı akış düzenleyicilerinin mutasyonları nedeniyle insan tümör hücrelerinin büyük bir kısmında işlevsel olarak inaktive edilir (8).

**TP53:** TP53 proteini, hücrelerin bölünmesini kontrol eder, DNA hasarını onarır ve hasarlı hücrelerin apoptoz (programlı hücre ölümü) yoluyla yok olmasına yardımcı olmaktadır. TP53 tümör baskılayıcı geni

insan kanserlerinde sıklıkla mutasyona uğrar. Çok sayıda retrospektif çalışma, anormal p53 protein ekspresyonunu ve somatik mutasyonu, düşük sağ kalım veya tedaviye yanıtızlılıkla ilişkilendirmiştir. Meme, baş ve boyun, karaciğer, hematopoitik ve lenfoid sistem kanserleri için çalışmaların çoğunluğu TP53 mutasyonu ile kötüleşen sağ kalım arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir (9).

**BRCA1 ve BRCA2:** DNA onarım süreçlerinde kritik işlevlere sahip tümör baskılayıcı genlerdir. Genetik mutasyonları olan bireylerde özellikle meme ve over kanseri başta olmak üzere bazı kanser türlerinin gelişme riskini artırır (10).

**APC (Adenomatous Polyposis Coli):** Hücre büyümesi ve apoptozu düzenleyen tümör baskılayıcı genidir. APC geni, kolon kanserinin gelişimi ile yakından ilişkilidir. Adenomatöz polipozis koli APC genindeki germline mutasyonlar, ailesel adenomatöz polipozis koli FAP olarak bilinen kalıtsal bir kolon kanseri formundan sorumludur. FAP bireyleri erken yaşlarda kalın bağırsakta yüzlerce ila binlerce polip geliştirir ve bunların bir alt kümesi cerrahi olarak çıkarılmazsa her zaman kötü huylu kanserlere ilerler (11).

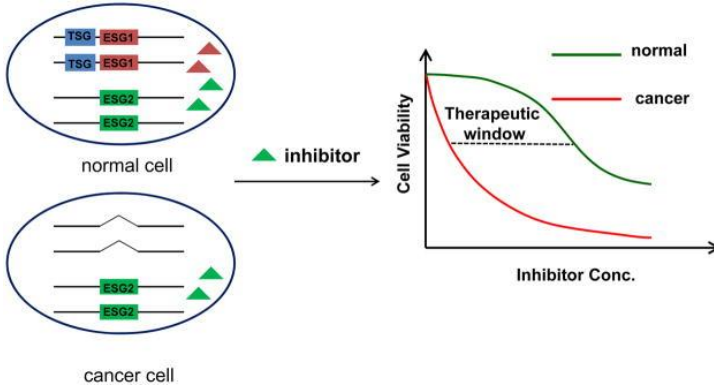
**PTEN:** İlk olarak 1997'de tanımlanan PTEN (10. kromozomda silinmiş Fosfataz ve TENsin homologue), insan kanserlerinde en sık mutasyona uğrayan tümör baskılayıcı genler arasındadır. PTEN, hücre büyümesini, çoğalmasını, hayatta kalmasını ve metabolizmasını kontrol eden fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K)/AKT kaskadının negatif bir düzenleyicisidir. Bu eksenin hassas düzenlenmesi, onkojenik dönüşümün kritik bir düğümünü temsil eder. Meme, prostat ve diğer kanser türlerinde sıkça mutasyona uğrar. PTEN mutasyonları, tümörlerin büyümesine katkıda bulunabilir. PTEN, kanser kök hücrelerinin gelişimini ve bakımını düzenler ve özellikle WNT, NOTCH, PI3K/AKT, MAPK ve NF-kB gibi aşağı akış sinyal yolları aracılığıyla bu hücrelerin kritik özelliklerini etkilemektedir (12).

**CDKN2A:** Hücre döngüsünü düzenleyen p16 proteini kodlar. Bu protein, siklin D1 ve CDK4 (siklin bağımlı kinaz 4) ile etkileşime girerek

hücrelerin bölünmesini inhibe eder. Böylece, DNA hasarına uğramış hücrelerin bölünmesi engellenir ve kanser gelişimi riski azalır.. İnsan hücre hatlarında CDKN2A'da homozigot delesyonlar ve gen içi mutasyonlar sıklıkla gözlenmektedir. Melanom ve pankreas kanseri gibi bazı kanser türlerinde mutasyonları görülür. Ailesel atipik çoklu ben/melanom'un (FAMMM) en yaygın genetik nedeni, CDKN2A genindeki mutasyonlardır (13).

**NF1 (Neurofibromin 1):** Hücre büyümesini kontrol eden sinyal yollarını düzenler. Neurofibromatozis tip 1 ile ilişkilidir ve neurofibromalar, optik sinyal gliomu, kötü huylu periferik sinir kılıfı tümörü (MPNST) gibi belirli tümörlerin riskini artırabilir. NF1 kaybı, yükseltilmiş MAPK sinyallemesi yoluyla Isı Şoku Faktörü (HSF1)'nü aktive eder. Bu nedenle NF1 geninin işlevinin kaybı, karsinogenezi kolaylaştırarak tüm organizmanın hayatta kalmasını nihayetinde bozan evrimsel olarak korunan bir hücresel hayatta kalma mekanizmasını harekete geçirmektedir (14).

**STK11 (LKB1):** Hücre metabolizmasını ve büyümesini düzenler. Peutz-Jeghers sendromu ile ilişkilidir ve çeşitli kanser türlerinin riskini artırabilir. Peutz-Jeghers sendromu (PJS), mukokutanöz pigmentli lezyonlar, gastrointestinal polipozis ve önemli kanser riski ile karakterize nadir görülen, otozomal dominant bir durumdur (15).



Şekil 1. Tümör Baskılayıcı Genlerin Homozigot Delesyonu

Tümör baskılayıcı genlerin (TSG) homozigot delesyonu, komşu temel genlerin (ESG1) da kaybına yol açarak, hücrelerin ESG2'ye bağımlı hale gelmesine neden olur. Normal hücrelerde yüksek ESG1 ekspresyonu, ESG2'yi inhibe eden bir ilaçla tedavi sırasında koruma sağlar. Ancak tümör hücrelerinde ESG2'nin ifade edilmesi, bu hücrelerin tedaviye karşı hassas hale gelmesine yol açar. Bu durum, kanser tedavisinde hedeflenmiş yaklaşımların önemini vurgular; örneğin, ESG2'yi inhibe eden ilaçların kullanımı, tümör hücrelerini etkili bir şekilde hedef alabilirken, normal hücrelerin sağkalımını koruyabilir. Bu tür moleküler hedefleme stratejileri, kanser tedavisinin özelleştirilmesine ve daha etkili yöntemler geliştirilmesine katkı sağlar (16).

**Tablo 1.** Kanserde Yaygın Olarak Bozulan TSG'ler: Normal Fonksiyon ve Fonksiyon Kaybı ile İlişkili Hastalıklar (4)

Gen	Fonksiyon	Fonksiyon kaybı ile ilişkili hastalıklar
Rb (retinoblastoma)	DNA replikasyonu ve hücre bölünmesi için gerekli genlerin transkripsiyonunun inhibisyonu; apoptoz indüksiyonunda rol alır	Retinoblastoma, osteosarkom, prostat kanseri, meme kanseri

P53	p21, bax, PIG8, mdm2, GADD45, , DR5 ve diğerlerini hedefleyen transkripsiyon faktörü; bcl02 ve PCNA ekspresyonunu baskılar; G1 ve G2 kontrol noktalarını kontrol eder; proapoptotik genlerin transkripsiyonel aktivasyonu yoluyla apoptoz indüksiyonu	Germline kalıtmımlı: Li-Fraumeni sendromu (meme kanseri, akciğer kanseri, yumuşak doku tümörleri, beyin tümörleri, osteosarkom, lösemi) Somatik mutasyonlar: Çeşitli kanserler
P16/INK4a	Kapı bekçisi gen; CDK4 ve CDK6'yı inhibe ederek ve G1/S geçişini teşvik ederek normal Rb işlevini sürdürür; mdm2'yi bağlayarak p53'ü stabilize eder ve aktive eder.	Germline kalıtsal: Ailesel melanomlar Somatik mutasyon: Pankreas kanseri, beyin kanseri
PTEN (MMAC1 veya TEP1)	Bekçi geni; lipid fosfataz olarak hareket ederek düşük PIP-3 seviyesini korur	Germline kalıtmımlı: Çoklu iyi huylu tümörler; meme, tiroid ve beyin kanserine karşı artan duyarlılık Somatik mutasyon: Glioblastoma, endometriyal kanser, prostat kanseri, melanom
BRCA1	Bekçi geni; hücre döngüsünün S fazında ifadesi artar; DNA hasar onarımında yer alan birçok proteinle etkileşime girer	Meme kanseri ve yumurtalık kanseri
BRCA2	Bekçi geni; DNA hasar onarımı	Meme kanseri ve erkek meme kanseri

APC	Çoklu hücreyel fonksiyonlar; sinyal iletimi, hücreler arası adezyon, hücre iskeleti stabilizasyonu, muhtemelen hücre döngüsü ve apoptoz düzenlemesi	Kalıtsal ve sporadik kolon kanseri
Nörofibromatozis tip 1	Wnt sinyal yolunu kontrol ederek hücre büyümesini bastırır; ras sinyal yolu	Germline kalıtsal mutasyon: İyi huylu periferik sinir kılıfı tümörleri; astrositom, glioblastom, optik gliomlar, feokromositomlar, miyeloid lösemiye yakınlık
FHIT	Anlaşılmadı	Akciğer, mide, meme, kolon, serviks, baş ve boyun dahil olmak üzere çeşitli primer tümörler; küçük hücreli akciğer tümörlerinin %80'i; küçük hücreli olmayan akciğer tümörlerinin %40'ı

Kanser ilaçları genel olarak iki kategoriye ayrılır: sitotoksik kemoterapiler ve kanserde rol oynayan bir veya daha fazla proteinin aktivitesini özel olarak düzenleyen hedefli tedaviler.

### Sonuç

Tespit edilen kanserle ilişkili mutasyonların yaklaşık %80'i tümör baskılayıcı genlerdedir. Ancak, tümör baskılayıcıları hedeflemenin bazı durumlarda uzun zamandır zor veya hatta olası olmadığı düşünülmüştür.

Geçmişteki birçok başarısız girişime rağmen, bilim insanları tümör baskılayıcıların veya başlattıkları sinyal yollarının seviyesini ve aktivitesini geri yüklemek için yeni yaklaşımlar ve teknikler bulmayı ummaktadır. Özellikle, kanser genomündeki ilerlemeler, yeni ilaç keşfi ve mevcut ilaçların ve bileşiklerin yeniden değerlendirilmesi için olasılıkları büyük ölçüde iyileştirmiştir. Hassas tıpta yeni bir çağda, gelişmiş genom dizilimi, yeni biyoformatik ve biyoistatistiksel araçlar ve insanlaştırılmış klinik öncesi modeller entegre edilerek heterojen kanserin çeşitli alt kümelerinin kapsamlı değerlendirmesini iyileştirmek için birçok çaba beklenmektedir. İlaç toksisitesi ve direnci, ilaç tanımlama ve geliştirmede ele alınması gereken temel konulardır. Dahası, hedeflenen tedavinin immünoterapi ile, örneğin bağışıklık kontrol noktası blokaj tedavisi ile etkili bir şekilde birleştirilip birleştirilemeyeceği henüz belirlenmemiştir. Bu amaçla, tümör yıkımları sırasında konak bağışıklık tepkisine neyin katkıda bulunduğunu daha iyi anlamamız gerekecektir. Tek dolaşımli tümör hücresi dizilimi, ekzosomal analiz ve gelişmiş tümör görüntüleme gibi yeni teknikler kişiselleştirilmiş tıbbi kolaylaştırıcaktır. Her bir alandaki bu atılımlar hedefli kanser tedavisi için benzeri görülmemiş bir fırsat sağlayacaktır.

## Kaynakça

- 1) Britt, K. L., Cuzick, J., & Phillips, K. A. (2020). Key steps for effective breast cancer prevention. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 20, Issue 8, pp. 417–436). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-0266-x>
- 2) Colditz, G. A., & Wei, E. K. (2012). Preventability of cancer: The relative contributions of biologic and social and physical environmental determinants of cancer mortality. In *Annual Review of Public Health* (Vol. 33, pp. 137–156). <https://doi.org/10.1146/annurev-publhealth-031811-124627>
- 3) Yarbrow, J. W. (1992). *Oncogenes and Cancer Suppressor Genes*.
- 4) Jack A. Roth and Susan F. Grammer. (n.d.). *Tumor Suppressor Gene Replacement for Cancer*.
- 5) Knudson, A. G. (1993). Antioncogenes and human cancer. In *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (Vol. 90).
- 6) Hinds, P. W., & Weinberg, R. A. (n.d.). *Tumor suppressor genes*.
- 7) Merkodanov, T. R. (2015). The molecular basis of carcinogenesis. In *Bulletin of Medical Internet Conferences* (Vol. 5). [www.medconfer.com](http://www.medconfer.com)
- 8) Ianari, A., Natale, T., Calò, E., Ferretti, E., Alesse, E., Screpanti, I., Haigis, K., Gulino, A., & Lees, J. A. (2009). Proapoptotic Function of the Retinoblastoma Tumor Suppressor Protein. *Cancer Cell*, 15(3), 184–194. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.01.026>
- 9) Robles, A. I., & Harris, C. C. (2010). Clinical outcomes and correlates of TP53 mutations and cancer. In *Cold Spring Harbor perspectives in biology* (Vol. 2, Issue 3). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001016>
- 10) Duncan, J. A., Reeves, J. R., & Cooke, T. G. (1998). Review BRCA1 and BRCA2 proteins: roles in health and disease. In *J Clin Pathol: Mol Pathol* (Vol. 51).
- 11) Polakis, P. (1997). The adenomatous polyposis coli APC tumor suppressor. In *Biochimica et Biophysica Acta* (Vol. 1332).
- 12) Luongo, F., Colonna, F., Calapà, F., Vitale, S., Fiori, M. E., & De Maria, R. (2019). Pten tumor-suppressor: The dam of stemness in cancer. In *Cancers* (Vol. 11, Issue 8). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/cancers11081076>



- 13) Foulkes, W. D., Flanders, T. Y., Pollock, P. M., & Haywardt, N. K. (n.d.). *THE CDKN2A (p16) GENE AND HUMAN CANCER*.
- 14) Dai C, Santagata S, Tang Z, Shi J, Cao J, Kwon H, Bronson RT, Whitesell L, Lindquist S. Loss of tumor suppressor NF1 activates HSF1 to promote carcinogenesis.
- 15) Duong, B. T., & Winship, I. (2017). The role of STK 11 gene testing in individuals with oral pigmentation. *Australasian Journal of Dermatology*, 58(2), 135–138. <https://doi.org/10.1111/ajd.12443>
- 16) Liu, Y., Hu, X., Han, C., Wang, L., Zhang, X., He, X., & Lu, X. (2015). Targeting tumor suppressor genes for cancer therapy. *BioEssays*, 37(12), 1277–1286. <https://doi.org/10.1002/bies.201500093>

## BÖLÜM 6

### MALİGN MELANOMA VE G361 HÜCRE HATTI

Biyolog Bera AŞCI<sup>1</sup>

Doç. Dr. Funda KARABAĞ<sup>2</sup>

---

<sup>1</sup>Uşak Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Uşak, Türkiye. Beraascii@gmail.com, Orcid ID: 0009-0003-5923-6421,

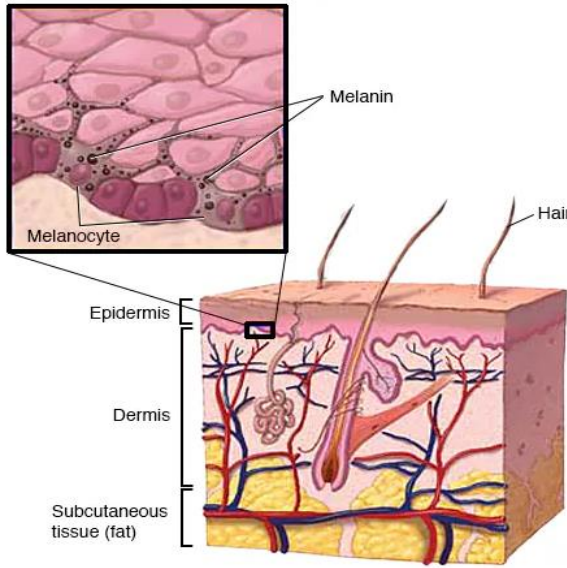
<sup>2</sup>Uşak Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Uşak, Türkiye. Funda.karabag@usak.edu.tr, Orcid ID: 0000-0002-1565-3210



## Giriş

Melanin, organizmaya güneş kaynaklı ultraviyole ışıdan koruma sağlayan ve cilt pigmentasyonunda rol oynayan moleküldür. Cildin, saçların ve gözlerin rengi melanik pigmentler tarafından belirlenir. Melanin (eumelanin ve feomelanin pigmenti) sentezi ve dağıtımı melanogenez adını taşır (1). Melanik pigmentlerinin sentezinden nöroektodermik dendritik hücrelerden köken alan melanositler sorumludur (2).

Melanositler, epiderminin bazal tabanında yaklaşık 30-40 keratinositle; uzun ve ince uzantılarıyla sayesinde etkileşim kurarak epidermal birim oluştururlar.



**Şekil 1.** Melanosit içeren epidermis yapısı (©MAYO FOUNDATION FOR EDUCATION AND RESEARCH. ALL RIGHTS RESERVED)

Melanin granülleri keratinosit çekirdeğinin üzerinde birikir ve dökülen epidermal hücrelerle birlikte uzaklaştırılır. Üçüncü tipte bir zar proteini olan tirozinaz (3), melanogenez için vazgeçilmez bir enzimdir. Sadece melanositlere özgü hücresel organeller olan melanozomların

zarında bulunur. Melanozomların sentezi ve tirozinaz aktivitesi ise L-tirozinin uyarılmasıyla gerçekleşir (4). L-tirozin ve L-DOPA konsantrasyonu, melanojenik sistemin homeostazını kontrol eder ve melanositler bu sistemi yalnızca lokal olarak değil sistemik olarak da düzenler (5). Melanomagenез çevresel, genetik ve diğer faktörlerin etkileşimde olduğu çok adımlı bir süreçtir (6). Melanositlerin melanom hücrelerine dönüşümü, yatay veya radyal büyüme fazı ile başlayan ve daha sonra invaziv fenotipe doğru ilerleyen bir süreçtir (7). Dikey büyüme aşamasını takiben, tümör hücreleri dermis / hipodermise derinlemesine girer ve sonunda kılcal damarların endoteline nüfuz eder ve kan dolaşımına girerek uzak metastaz oluşturmalarına izin verir (7). Melanom hücrelerinin geliştiği ve proliferasyon aldığı tümör stroması karmaşık ve dinamik bir mikro çevredir. Bu mikro çevre, hücre dışı matriks, mikrovaskülatür, fibroblastik hücreler ve değişen büyüme faktörleri, sitokinler, besinler (örn. glikoz) ve temel metabolik gazlar (örn. oksijen) ile etkileşimleri barındırır (6). Bu faktörlerin tümü melanomagenезde ve metastatik hastalığa doğru ilerlemede aktif katılımcılardır.

### **1. Melanogenez**

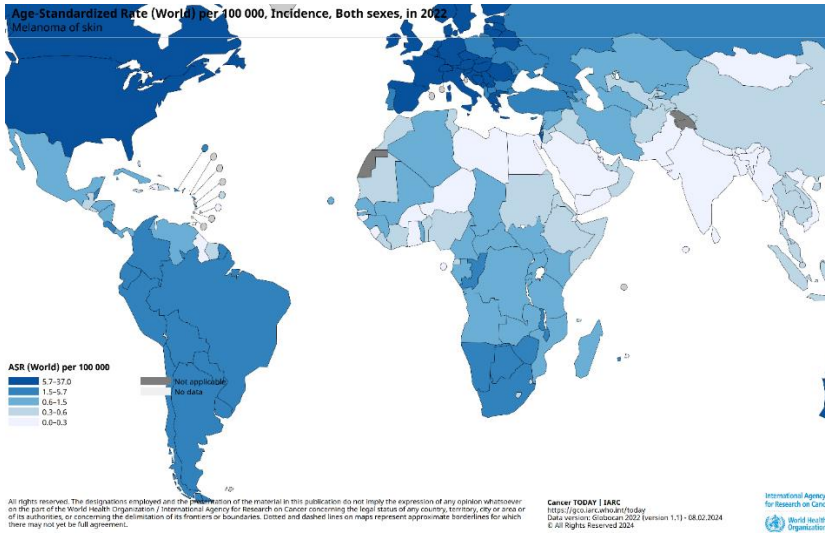
Melanogenez, melanin pigmentinin sentezlendiği yolaktır (8). Melanogenez melanositlerde, melanozom adı verilen ayrı sitoplazmik organellerde gerçekleşir (9). Melanositler, epidermis hücrelerinin %8'ini temsil eder ve melanoblastların öncülü olduğu hücrelerdir; bu hücreler embriyolojik açıdan nöral kret hücrelerinden köken alır (1). Epiderminin alt tabakasında ve kıl folikülü seviyesinde, melanoblastlar melanositlere dönüşür ve fonksiyonu olan melanin salgılama işlevini yerine getirebilir forma dönüşürler (10).

Melanositlerin göç, çoğalma ve farklılaşma süreci, nöral tüp hücreleri, ektoderm hücreleri ve keratinositlerin etkisi altında olmakla birlikte, aynı zamanda WNT glikoprotein ailesi, endotelin ve kök hücre faktörünün etkisi altındadır (11). Melanogenezde iki melanin çeşidi



## 2. Melanoma

Melanom, melanositlerin (pigment üreten hücrelerin) kontrolsüzce bölünmesinin sonucunda oluşan kötü huylu bir tümördür (15,16,17,18). Tarihsel süreçte, melanom nadir görülen bir kanser olmasının aksine son 50 yılda insidansı diğer tüm kanserlere oranla daha hızlı artmıştır (19,20,21,22). Melanom insidans oranındaki artış, etnik kökenlerin farklılığı ve coğrafi konumdaki popülasyonlar arasında aynı zamanda yaş ve cinsiyete göre popülasyonlar arasında önemli ölçüde farklılık göstermektedir (4,23,24,25,26). Melanoma yaklaşık %20' lik bir genel mortalite oranı ile, dünya çapında cilt kanserine bağlı ölümlerin %80' inden sorumludur ve bu yüksek mortalite oranı çoğunlukla diğer organlara metastaz yapma eğiliminden kaynaklanmaktadır (27,28).



Şekil 3. (ASR) tarafından Dünya çapında yaşa göre standardize edilmiş yıllık melanom insidans oranı. Oran her 100.000 kişiye ifade edilmektedir (24).

## 3. Etnik Köken

Melanom insidans bakımından, farklı etnik gruplar arasında diğer kanser türlerine kıyasla daha fazla çeşitlilik gösterir (24). Melanom, açık tenli Kafkas popülasyonları arasında daha orantısız bir şekilde rapor

edilmektedir (13,24,29,30). Bu varyasyonun sebebi kısmen azalmış melanin içeriğinden kaynaklanan foto korumanın azalmasına bağlanabilir (31). Daha koyu pigmentli bireylerde artan melanin hem ultraviyole (UV) A hem de B radyasyonunu azaltan bariyer oluşturur (31). UV radyasyonunun hem hücre ölümüne hem de cilt hücrelerinin kötü huylu transformasyonuna neden olduğu bilinmekle beraber melanom için en önemli risk faktörü olarak kabul edilirler (32,33).

#### **4. Melanomdan Sorumlu Sinyal Yolakları**

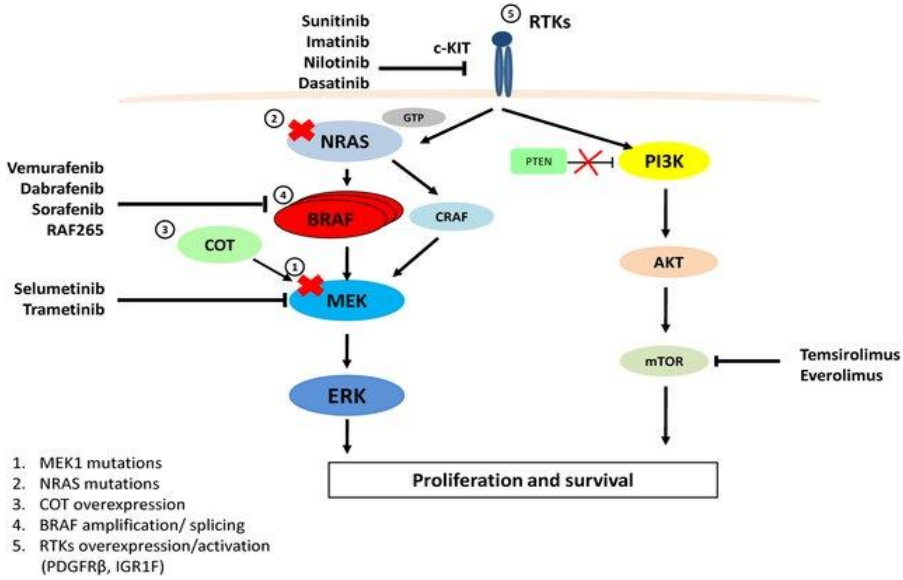
##### **4.1. MAPK Yolağı**

MAPK yolu, kanser yayılımının çeşitli aşamalarında bozulabilir. Efektör moleküllerdeki mutasyonlar, kaskad hiperaktivitesine neden olur. Kaskad hiperaktivitesi ise hücre proliferasyonu, hücrenin hayatta kalımı, invaziv davranış, metastaz ve anjiyogenez ile sonuçlanır. BRAF gen mutasyonları çeşitli malignitelere yaygındır; BRAFV600E kutanöz melanomda en yaygın olanıdır (34).

##### **4.2. Fosfoinositid 3-kinaz-AKT Yolağı**

Fosfoinositid 3-kinazlar (PI3K'ler) bir grup lipit kinazdır çeşitli fizyolojik sistemlerde düzenleyici işlevlere sahiptir. PI3K'lar stres ve çeşitli uyaranlarla bağlı olarak uyarılır. Hücre büyümesi, farklılaşması, çoğalması, transkripsiyon ve translasyon gibi çeşitli biyolojik süreçlerde rol oynar (35). PI3K-Akt patogenezi, diyabet, otoimmün, inflamasyon ve kanser gibi çeşitli hastalıklar ile ilişkilidir (35, 36). PI3K enziminin birincil inhibitörü, tümör baskılayıcı PTEN'dir. PTEN PIP3'ün PIP2'ye dönüşümünde doğal lipid fosfataz aktivitesini kullanarak PI3K enzimine karşı koyarak etki gösterir. PTEN'in yokluğu, malign melanomda tümör oluşumuyla güçlü bir şekilde bağlantılı olan Akt'ın sürekli aktivasyonuna yol açtığı bilinmektedir.



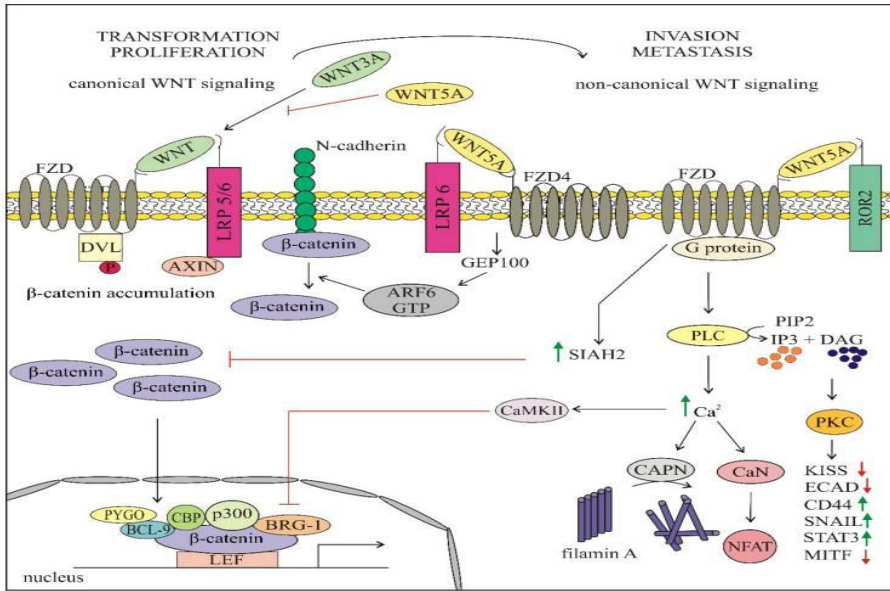


Şekil 4. Hücre Çoğalma ve Hayatta Kalma Yolakları (37)

### 4.3. WNT Sinyal Yolağı

WNT embriyonik gelişimde, yetişkin doku homeostaz ve rejenerasyonunda önemli rol oynayan, evrimsel olarak da korunan sinyal yolağıdır (38). Bunlara ek olarak, hücre farklılaşması, hücre çoğalması, hücre hareketliliği, apoptoz ve genetik stabilite için oldukça önemlidir (39). WNT sinyalinin mutasyonları, embriyonik malformasyonlar, dejeneratif hastalıklar ve kanser dahil olmak üzere bir dizi hastalıkla ilişkilidir (39,30,40).

WNT sinyalizasyonu iki yola ayrılır;  $\beta$ -katenin bağımlı, kanonik veya WNT/ $\beta$ -katenin yolu olarak da adlandırılan bağımlı ve  $\beta$ -katenin bağımsız -kanonik olmayan olarak adlandırılır (41). WNT/ $\beta$ -katenin sinyali, epidermiste melanositler ve keratinositler arasındaki homeostazın korunmasından sorumludur (42,43). Melanom hücreleri dönüşüm ve çoğalma için WNT/ $\beta$ -katenin sinyallemesini kullanırken, metastaz için kanonik olmayan sinyalleme kullandığından (44),  $\beta$ -katenin bu kanser türünde bir onkogen tanımına tam olarak uymaz (45).



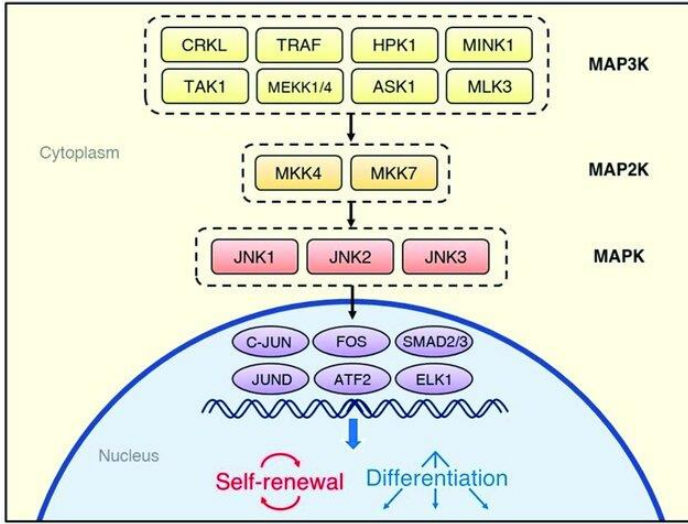
Şekil 5. Melanomdaki kanonik ve kanonik olmayan WNT sinyalizasyonu arasındaki ilişki modeli.

Kanonik WNT yolunda, WNT–FZD/LRP5/6 etkileşimi β-katenin bağımlı sinyalizasyonu başlatır. β-katenin, hedef genlerin transkripsiyonunu yönlendirmek için çekirdeğe taşınır. Bu adım, melanositlerin çoğalmaya başladığı ve böylece önce radyal sonra da melanomun dikey büyümesini teşvik ettiği dönüşümün erken adımları için önemlidir. Kanonik olmayan WNT sinyalizasyonunu aktive eden WNT5A'nın artması β-katenin sinyalizasyonunu inhibe eder ve melanomun metastatik yayılımı için hayati önemi olan melanom hücrelerinin invazivliğini artırır. Yeşil ve kırmızı oklar sırasıyla artışı ve azalışı göstermektedir (46).

#### 4.4. JNK/C-Jun Sinyal Yolu

Melanom hücrelerinin sağlığını düzenleyen ve anti-melanom tedavisi için potansiyel hedef olan moleküller; MAR kinazlar JNK (c-Jun, N-terminal kinaz) ve p38 olarak ifade edilebilir. JNK, dış stres faktörlerine, sitokinlere, büyüme faktörlerine veya hormonlara yanıt

olarak transkripsiyon faktörü AP-1'in bir bileşeni olan c-Jun'u fosforile eder. JNK'nin stresle aktive olan apoptoz ve melanom gelişimindeki ikili rolü, belirli bir hücrede çeşitli Jun ve Fos izoformlarının varlığına bağlıdır (47,48). JNK'nin rolü genellikle belirsizdir: onkogen veya tümör baskılayıcı olarak işlev görebilir.



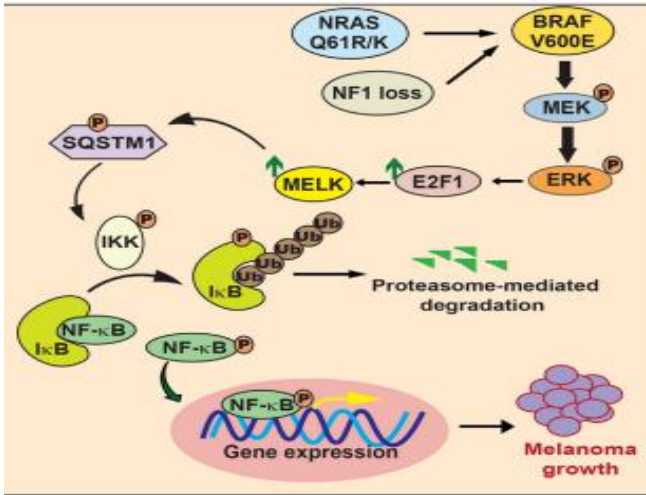
**Şekil 6.** C-JUN N-terminal kinaz (JNK) sinyal kaskadının düzenleyici sistemi. JNK'nin dış stres faktörlerine, sitokinlere, büyüme faktörlerine veya hormonlara yanıt olarak dönüştüğü izoformlarına bakış (49).

#### 4.5. JAK/STAT Sinyal Yolağı

Jak (Janus kinaz) ve STAT (sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü) protein aileleri, hücre büyümesini, hücre farklılaşmasını, patojenlere karşı direnci düzenleyen sitokinler (interlökinler, interferonlar) veya büyüme faktörleri tarafından başlatılan sinyal yollarının temel bileşenleridir. STAT3 aktivasyonu apoptozu engeller ve melanom hücrelerinin çoğalmasını destekler, STAT3 sinyalinin bozulması ise onkogenezi baskılayabilir (39,50) Melanom hücre dizilerinin çoğunda görülen hücre yoğunluğundaki artış, STAT3'ün Jak aracılı fosforilasyonuna, DNA'ya bağlanmasına ve anti apoptotik genlerin transkripsiyonuna yol açar (51).

#### 4.6. NF- $\kappa$ B Sinyal Yolağı

NF- $\kappa$ B sinyal yolağı, Transkripsiyon faktörü NF-B (nükleer faktör kappa B), stres tepkisinin oluşturulduğu her dinamikte bulunan merkezi bir entegratördür. NF-B iki alt birimden oluşur: p50 ve RelA/p65. Sitoplazmada, çekirdeğe translokasyonunu önleyen inhibitör protein IB ile aktif olmayan bir kompleks oluşturur. Stres koşulları altında, IB, IB kinaz (IKK) tarafından fosforile edilir, NF-B'yi bırakır ve sonra proteazomlarda bozunur. Apoptoz, proliferasyon, metastaz ve tümör anjiyogenezinin düzenlenmesinde rol oynayan 150' den fazla hedef genin transkripsiyonunun başlatıldığı çekirdeğe serbest NF-B, aktarılır (10,52). NF-B yolağının çeşitli bileşenlerinin regülasyonu ve yapısal aktivasyonu, melanomun ilerlemesi ve metastazı ile ilişkilidir. Bu nedenle, potansiyel olarak antikanser tedavisinde inhibitörleri olarak kullanılabilir. Melanomda yapısal IKK aktivasyonu; IB bozulmasına, NF-B'nin nükleer lokalizasyonuna, anti-apoptotik hücre korumasında bulunan genlerin gelişmiş ekspresyonuna neden olur (53).



**Şekil 7.** Aktive edilmiş MAPK sinyal yolu, transkripsiyon faktörü E2F1 yoluyla MELK ifadesinin regülasyonuna yol açar. MELK adaptör proteini SQSTM1 fosforile eder, NF- $\kappa$ B yolu aktivitesini uyarır bu uyarım melanom büyümesi ile sonuçlanır (54).

## **5. Malign Melanom Hücre Hatları**

İnsan malign melanom hücre hatları oldukça çeşitlidir. En yaygın olanlar;

- **A375**: Cilt melanomundan elde edilmiş, sık kullanılan hücre hattıdır.
- **SK-MEL-28**: Melanom araştırmalarında yaygın olarak tercih edilen bir diğer hücre hattıdır.
- **WM35**: Melanoma özgü patalojinin incelenmesinde kullanılan bir hücre hattıdır.
- **G361**: İnsan melanomundan elde edilmiş ve tedavi araştırmalarında kullanılan bir hücre hattıdır.
- **MEL-624**: Genetik çalışmalar için kullanılan melanom hücre hattıdır.
- **SK-MEL-5**: Melanomun in vitro çalışmalarını için kullanılan bir diğer hücre hattıdır.
- Nadir olarak kullanılan hücre hatlarına örnek olarak ise HMMR ve C32 hücre hatları verilebilir.

## **6. Hücre Hatlarının Çeşitliliğinin Sebepleri**

İnsan malign melanom hücre hatlarının çeşitliliği, birkaç temel esasa dayanır:

### **6.1. Genetik Ve Fenotipik Heterojenite**

Melanom, genetik olarak çeşitli mutasyonlar ve farklı gen ekspresyon profilleri gösterir. Metastatik melanom, konvansiyonel tedaviye direnciyle bilinen agresif bir hastalıktır. BRAF mutasyonları taşıyan melanomlarda hedefli tedavinin geliştirilmesi tedaviyi etkin kılmış olsa da, BRAF V600E metastatik melanomu olan önemli sayıda hasta, BRAF inhibitörü vemurafenib (55) veya MEK inhibitörü trametinib (56) ile tedaviden birkaç ay sonra tekrarlama yaşar. Melanom dahil olmak üzere farklı kanserlerin geniş ölçekli dizileme çalışmaları,

bireysel tümörler arasında kapsamlı genetik heterojenlik ortaya koymuştur (57,58).

Bir tümörün, genetik değişikliklere uğramadan mikroçevresel ipuçlarına, hastalık gelişimine, terapötik tedaviye veya ilerlemeye yanıt olarak farklı bölgelerde belirli belirteçlerin dinamik ifadesini göstermesi mümkündür. Bu, fenotipik heterojenlik olarak tanımlanmıştır. Örneğin, tek bir insan melanom hücresi, immün sistemi baskılanmış bir farede heterojen bir tümöre dönüşebilir (59).

## 6.2. Mikroçevre Etkileşimleri

Melanom hücreleri, çevresindeki stromal hücreler, immün hücreler ve ekstraselüler matrisle etkileşim içindedir. Bu etkileşimler, hücrelerin büyüme, invazyon ve metastaz yeteneklerini etkileyebilir.

Tümör mikroçevresi son derece karmaşıktır ve laminin ve kollajen gibi ekstraselüler matris (ECM) bileşenleri, vasküler endotelial büyüme faktörü de dahil olmak üzere büyüme faktörleri, glikoz gibi besinler ve değişen oksijen konsantrasyonları gibi çeşitli unsurlardan oluşur. Bu bileşenler topluca, farklılaşma, büyüme ve hayatta kalma dahil olmak üzere hücrel olayları kontrol eden sinyaller sağlar. Mitojenik sinyaller için bir depolama bölmesi ve hücrel istila için bir iskele olarak tamamen yardımcı bir role ek olarak, mikroçevre melanosit dönüşümü ve transdiferansiyasyonda önemli bir oyuncu olarak ortaya çıkmıştır.

Örneğin, son çalışmalar düşük oksijen seviyelerinin (hipoksi) melanosit dönüşümü için gerekli olabileceğini (60) ve agresif melanom hücreleri tarafından şartlandırılan ECM'nin normal melanositleri epigenetik olarak invaziv melanom hücresi benzeri bir fenotipe doğru transdiferansiyasyona uğratabileceğini (61) belirlemiştir.

## 6.3. Farklı Melanosit Kaynakları

Melanom hücre hatları, farklı bölgelerden (örneğin, cilt, göz) veya farklı evrelerdeki tümörlerden izole edilmiş olabilir. Bu, hücre hatlarının

özelliklerini çeşitlendiren bir diğer önemli faktördür. Melanositler, yüksek oranda göç eden embriyonik hücreler olan nöral krest hücrelerinden (NCC'ler) türetilir. Gastrulasyondan sonra, nöral krest ilk olarak nöral plakanın ve nöral olmayan ektodermin sınırında indüklenir ve daha sonra nöral tüpün kapanması üzerine dorsal nöral tüp ile üstteki ektoderm arasındaki bölgeden ayrılır. NCC'ler başlangıçta çok potansiyelidir ancak yavaş yavaş gelişimsel potansiyelde soy hattıyla sınırlı hale gelirler ve bu, göç ettikleri ve yerleştikleri yere göre belirlenir. NCC'ler duyuşal nöronlar ve glial hücreler, melanositler, kraniofasiyal kıkırdak ve kemik ve düz kas dahil olmak üzere bir dizi farklılaşmış hücre ve doku tipine yol açabilir (12,62).

#### **6.4. Tedaviye Yanıt**

Farklı hücre hatları, kemoterapi, immünoterapiler ve hedefe yönelik tedavilere karşı farklı yanıtlar verebilir. Bu yanıt farklılıkları, tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde önemli bir rol oynar. Farklı tedavilerle ilgili bir örnek vermek istersek; Üç geniş melanom aşısı kategorisi tanınabilir:

- (1) lenfosit kaynaklı tümör antijenlerini kullananlar
- (2) tüm tümör hücrelerinden türetilen aşılar
- (3) melanom antijenleri ile dendritik hücrelerin kullanımı.

Bu stratejiler hem tek başına hem de ortaya çıkan anti-tümör bağışıklık tepkisini artırmayı amaçlayan yeni adjuvanlarla kombinasyon halinde test edilmiştir (63).

#### **6.5. Hücre Dönüşüm Süreçleri**

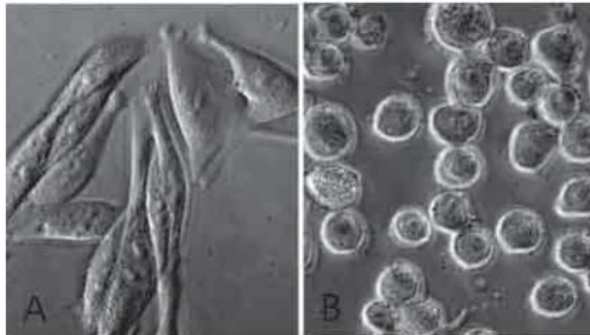
Melanom, çeşitli gelişimsel aşamalardan geçebilir ve bu süreçler, hücrelerin fenotipik farklılıklar göstermesine yol açar. Örneğin, bazı hücre hatları daha agresif ve invazif olabilirken, diğerleri daha indolent özellikler gösterebilir.

## 7. G-361 Hücre Hattı Nedir?

G361, yetişkin bir hastanın cildindeki metastatik bir bölgeden türetilen bir insan melanom hücre hattıdır. G-361, G361-mel, G361mel bu hücre hattını tanımlayan diğer isimler olarak nitelendirilir. G361 hücre hattı, melanositlerin ve melanom hücrelerinin karakteristik bir özelliği olan melanin üretimini sergiler. G361 hücreleri epitel benzeri morfolojileriyle bilinir.

Bu hücre hattı kültür ortamında Adherent büyüme gösterirler. Besiyeri ortamında glikoz, stabil glutamin, sodyum piruvat, FBS gibi kimyasallara ihtiyaç duyarlar. Pasajlama işlemi sırasında adherent hücrelerin buldukları ortamdan kaldırmak için Accusate solüsyonu; 25 cm<sup>2</sup> flasklarda ortalama 1-2 mL iken 75 cm<sup>2</sup> flasklar için 2,5 mL kullanılır. 300xg'de 3 dakika santrifüj edilirler. Besiyeri haftada 2-3 kere yenilenmeye ihtiyaç duyar. 1:2 - 1:4 bölünme oranına sahiplerdir.

İzole Edilen Organizma	İnsan
İzole Edilen Doku	Deri
Organizma Cinsiyeti	Erkek
Organizma Yaşı	31
Organizmanın Etnik Kökeni	Avrupa
Hastalık	Melanom



Şekil 8. Transmisyon ışık mikroskopunda 400x büyütme ölçekli insan melanoma G361 hücre görseli (64).



G361 hücre hattı, hücre çoğalması, göçü ve invazyonu dahil olmak üzere melanomun biyolojisini ve patogenezi için değerlidir.

## **7.1. G361 Hücrelerinin Kullanıldığı Çalışma Alanları Ve Örnekleri**

### **7.1.1 Moleküler Biyoloji Çalışmaları**

G361 hücreleri, melanomun genetik ve moleküler mekanizmalarını incelemek için kullanılır. Gen ekspresyon profilleri, mutasyon analizleri ve hücresel sinyal iletim yolları araştırmalarında önemli bir modeldir (65).

### **7.1.2 İmmünoterapiler**

Melanom tedavisi için geliştirilen immünoterapilerin etkinliğini değerlendirmek amacıyla G361 hücre hattı kullanılır. Bu hücreler, immün yanıtların değerlendirilmesi için uygun bir ortam sağlar (66).

### **7.1.3 İlaç Geliştirme**

G361 hücreleri, yeni tedavi stratejileri ve ilaçların etkinliğini test etmek için kullanılır. Özellikle hedefe yönelik tedavi ve kemoterapi ajanlarının etkileri üzerinde çalışmalar yapılır (67).

### **7.1.4 Hücre Davranışı Ve İnvazivite Çalışmaları**

Melanom hücrelerinin proliferasyon, invazyon ve metastaz yeteneklerini incelemek için G361 hücre hattı kullanılır. Bu, tümör gelişimini anlamaya yardımcı olur (68).

## Kaynakça

1. Bonaventure J, Domingues MJ, Larue L. Cellular and molecular mechanisms controlling the migration of melanocytes and melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2013;26:316–325. doi: 10.1111/pcmr.12080.
2. Seebode C, Lehmann J, Emmert S. Photocarcinogenesis and skin cancer prevention strategies. *Anticancer Res.* 2016;36(3):1371–8
3. Schadendorf D, Fisher DE, Garbe C, Gershenwald JE, Grob JJ, Halpern A, Herlyn M, Marchetti MA, McArthur G, Ribas A, et al. Melanoma. *Nat Rev Dis Primers.* 2015;1:15003. doi: 10.1038/nrdp.2015.3.
4. D'Ischia M, Wakamatsu K, Napolitano A, Briganti S, Garcia-Borron JC, Kovacs D, Meredith P, Pezzella A, Picardo M, Sarna T, et al. Melanins and melanogenesis: Methods, standards, protocols. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2013;26:616–633. doi: 10.1111/pcmr.12121.
5. Sosman JA, Kim KB, Schuchter L, et al., Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. *N Engl J Med* 2012; 366: 707–714.
6. E. Hodis, I.R.Watson, G.V. Kryukov, S.T. Arold, M. Imielinski, J.P. Theurillat, E. Nickerson, D. Auclair, et Al. A landscape of driver mutations in melanoma, *Cell* 150 (2012) 251–263.
7. Chao LX, Patterson SS, Rademaker AW, Liu D, Kundu RV. Melanoma perception in people of color: A targeted educational intervention. *Am J Clin Dermatol.* 2017;18(3):419–27. <http://dx.doi.org/10.1007/s40257-016-0244-y>
8. Slominski A, Zmijewski MA, Pawelek J. L-tyrosine and L-dihydroxyphenylalanine as hormone-like regulators of melanocyte functions. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2012;25:14–27. doi: 10.1111/j.1755-148X.2011.00898.x.
9. Semba T., Sammons, R., Wang, X., Xie, X., Dalby, K. N., & Ueno, N. T. (2020). JNK Signaling in Stem Cell Self-Renewal and Differentiation. *International journal of molecular sciences*, 21(7), 2613. <https://doi.org/10.3390/ijms21072613>
10. Cichorek M, Wachulska M, Stasiewicz A, Tymińska A. Skin melanocytes: Biology and development. *Postepy Dermatol Alergol.* 2013;30:30–41. doi: 10.5114/pdia.2013.33376.

11. Costin GE, Hearing VJ. Human skin pigmentation: Melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J.* 2007;21:976–994. doi: 10.1096/fj.06-6649rev
12. Zhan, T.; Rindtorff, N.; Boutros, M. Wnt signaling in cancer. *Oncogene* 2017, 36, 1461–1473.
13. Messina, J. L.; Yu, H.; Riker, A. I.; Munster, P. N.; Jove, R. L.; Daud, A. I. Activated stat-3 in melanoma. *Cancer Control.* 2008, 15, 196-201
14. Tsatmali M, Ancans J, Thody AJ. Melanocyte function and its control by melanocortin peptides. *J Histochem Cytochem.* 2002;50(2):125–33. <http://dx.doi.org/10.1177/002215540205000201>
15. Liu, P., Cheng, H., Roberts, T.M., Zhao, J.J., 2009. Targeting the phosphoinositide 3- kinase pathway in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8, 627–644. <https://doi.org/10.1038/nrd2926>.
16. Abdel-Malek Z, Suzuki I, Tada A, Im S, Akcali C. The melanocortin-1 receptor and human pigmentation. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;885:117–33. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb08669>.
17. Abdel-Malek Z, Swope VB, Suzuki I, Akcali C, Harriger MD, Boyce ST, et al. Mitogenic and melanogenic stimulation of normal human melanocytes by melanotropic peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(5):1789–93. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.92.5.1789>
18. Ueda, Y.; Richmond, A. NF-kappaB activation in melanoma. *Pigment Cell Res.* 2006, 19, 112-124.
19. Rzepka Z, Buszman E, Beberok A, Wrzeźniok D. From tyrosine to melanin: Signaling pathways and factors regulating melanogenesis. *Postepy Hig Med Dosw.* 2016;70:695–708
20. GLOBOCAN 2022 , Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase [Internet]. Available from: <http://globocan.iarc.fr>
21. Grumolato, L.; Liu, G.; Mong, P.; Mudbhary, R.; Biswas, R.; Arroyave, R.; Vijayakumar, S.; Economides, A.N.; Aaronson, S.A. Canonical and noncanonical Wnts use a common mechanism to activate completely unrelated coreceptors. *Genes Dev.* 2010, 24, 2517–2530.
22. J. Liu, M. Fukunaga-Kalabis, L. Li, M. Herlyn, Developmental pathways activated in melanocytes and melanoma, *Arch. Biochem. Biophys.* 563 (2014) 13–21.

23. Erdei E, Torres SM. A new understanding in the epidemiology of melanoma. *Exp Rev Anticancer Ther.* 2010;10(11):1811–23. <http://dx.doi.org/10.1586/era.10.170>
24. Grigalavicius M, Moan J, Dahlback A, Juzeniene A. Daily, seasonal, and latitudinal variations in solar ultraviolet A and B radiation in relation to vitamin D production and risk for skin cancer. *Int J Dermatol.* 2016;55(1):e23–8. <http://dx.doi.org/10.1111/ijd.13065>
25. Wu S, Han J, Vleugels RA, Puett R, Laden F, Hunter DJ, et al. Cumulative ultraviolet radiation flux in adulthood and risk of incident skin cancers in women. *Br J Cancer.* 2014;110(7):1855–61. <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2014.43>
26. Padovese V, Franco G, Valenzano M, Pecoraro L, Cammilli M, Petrelli A. Skin cancer risk assessment in dark skinned immigrants: The role of social determinants and ethnicity. *Ethn Health.* 2017:1–10. <http://dx.doi.org/10.1080/13557858.2017.1294657>
27. Nik-Zainal S, Alexandrov LB, Wedge DC, et al. Mutational processes molding the genomes of 21 breast cancers. *Cell* 2012; 149: 979–993.
28. D. Gonzalez, L. Fearfield, P. Nathan, P. Taniere, A. Wallace, E. Brown, C. Harwood, J. Marsden, S. Whittaker, BRAF mutation testing algorithm for vemurafenib treatment in melanoma: recommendations from an expert panel, *Br. J. Dermatol.* 168 (2013) 700–707.
29. Sviderskaya EV, Hill SP, Balachandar D, Barsh GS, Bennett DC. Agouti signaling protein and other factors modulating differentiation and proliferation of immortal melanoblasts. *Dev Dyn.* 2001;221:373–379. doi: 10.1002/dvdy.1153.
30. Jorgensen, K; Davidson, B.; Florenes, V. A. Activation of c-jun Nterminal kinase is associated with cell proliferation and shorter relapse-free period in superficial spreading malignant melanoma. *Mod. Pathol.* 2006, 19, 1446-1455.
31. Brenner M, Hearing VJ. The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochem Photobiol.* 2008;84(3):539–49. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-1097.2007.00226.x>
32. Seftor EA, Brown KM, Chin L, et al. Epigenetic transdifferentiation of normal melanocytes by a metastatic melanoma microenvironment. *Cancer Res* 2005; 65: 10164 –9.

33. Yang, J.; Richmond, A. Constitutive IkappaB kinase activity correlates with nuclear factor-kappaB activation in human melanoma cells. *Cancer Res.* 2001, 61, 4901-4909.
34. Alexaki, V. I.; Javelaud, D.; Mauviel, A. JNK supports survival in melanoma cells by controlling cell cycle arrest and apoptosis. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2008, 21, 429-438
35. Lopez-Bergami, P.; Lau, E.; Ronai, Z. Emerging roles of ATF2 and the dynamic AP1 network in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2010, 10, 65-76.
36. Webster, M.R.; Kugel, C.H.; Weeraratna, A.T. The Wnts of change: How Wnts regulate phenotype switching in melanoma. *Biochim. Biophys. Acta* 2015, 1856, 244–251.
37. Kosary CL, Altekruze SF, Ruhl J, Lee R, Dickie L. Clinical and prognostic factors for melanoma of the skin using SEER registries: Collaborative stage data collection system, version 1 and version 2. *Cancer.* 2014;120(Suppl 23):3807–14. <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.29050>
38. Olsen CM, Neale RE, Green AC, Webb PM, Whiteman DC. Independent validation of six melanoma risk prediction models. *J Investig Dermatol.* 2015;135(5):1377–84. <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2014.533>
39. Clevers, H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 2006, 127, 469–480.
40. Krauthammer M, Kong Y, Ha BH, et al. Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nat Genet* 2012; 44: 1006–1014
41. Guy GP, Jr., Thomas CC, Thompson T, Watson M, Massetti GM, Richardson LC. Vital signs: Melanoma incidence and mortality trends and projections – United States, 1982–2030. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2015;64(21):591–6
42. Lerner AB, McGuire JS. Melanocyte-stimulating hormone and adrenocorticotrophic hormone. Their relation to pigmentation. *N Engl J Med.* 1964;270:539–46. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM196403122701101>
43. Kumar, A.; Chalamalasetty, R.B.; Kennedy, M.W.; Thomas, S.; Inala, S.N.; Garriock, R.J.; Yamaguchi, T.P. Zfp703 Is a Wnt/ $\beta$ -Catenin Feedback Suppressor Targeting the  $\beta$ -Catenin/Tcf1 Complex. *Mol. Cell. Biol.* 2016, 36, 1793–1802.

44. Whiteman DC, Green AC, Olsen CM. The growing burden of invasive melanoma: Projections of incidence rates and numbers of new cases in six susceptible populations through 2031. *J Investig Dermatol.* 2016;136(6):1161–71. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jid.2016.01.035>
45. Lynda Chin ,Levi A. Garraway,David E. Fisher. Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. *Genes & Dev.* 2006. 20: 2149-2182. Doi: 10.1101/gad.1437206
46. Gajos-Michniewicz, A., & Czyz, M. (2020). WNT Signaling in Melanoma. *International journal of molecular sciences*, 21(14), 4852. <https://doi.org/10.3390/ijms21144852>
47. Lucero, O.M.; Dawson, D.W.; Moon, R.T.; Chien, A.J. A re-evaluation of the “oncogenic” nature of Wnt/beta-catenin signaling in melanoma and other cancers. *Curr. Oncol. Rep.* 2010, 12, 314–328.
48. Klinac, D., Gray, E. S., Millward, M., & Ziman, M. (2013). Advances in personalized targeted treatment of metastatic melanoma and non-invasive tumor monitoring. *Frontiers in oncology*, 3, 54. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00054>
49. Simon DJ , Peles D, Wakamatsu K, et al. Current challenges in understanding melanogenesis: bridging chemistry, biological control, morphology and function. *Pigment Cell Melanoma Res* 2009; 22: 563-79
50. M. Maio, Melanoma as a model tumour for immuno-oncology, *Ann. Oncol.* 23 (Suppl. 8) (2012) viii10–viii14.
51. Larue, L.; Delmas, V. The WNT/Beta-catenin pathway in melanoma. *Front. Biosci.* 2006, 11, 733–742.
52. Uzdensky, A. B., Demyanenko, S. V., & Bibov, M. Y. (2013). Signal transduction in human cutaneous melanoma and target drugs. *Current cancer drug targets*, 13(8), 843–866. <https://doi.org/10.2174/1568009611313080004>
53. Yamaguchi Y, Brenner M, Hearing VJ. The regulations of skin pigmentation. *J Biol Chem* 2007; 13: 1-11.
54. Rigel DS, Carucci JA. Malignant melanoma: Prevention, early detection, and treatment in the 21st century. *CA Cancer J Clin.* 2000;50(4):215–36; quiz 37–40. <http://dx.doi.org/10.3322/canjclin.50.4.215>

55. Stahl, J.M., Cheung, M., Sharma, A., Trivedi, N.R., Shanmugam, S., Robertson, G.P., 2003. Loss of PTEN promotes tumor development in malignant melanoma. *Cancer Res.* 63, 2881–2890.
56. Flaherty KT, Robert C, Hersey P, et al. Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med* 2012; 367: 107–114.
57. Niu, G.; Heller, R.; Catlett-Falcone, R.; Coppola, D.; Jaroszeski, M.; Dalton, W.; Jove, R.; Yu, H. Gene therapy with dominantnegative Stat3 suppresses growth of the murine melanoma B16 tumor in vivo. *Cancer Res.* 1999, 59, 5059-5063.
58. Kreis, S.; Munz, G. A.; Haan, S.; Heinrich, P. C.; Behrmann, I. Cell density dependent increase of constitutive signal transducers and activators of transcription 3 activity in melanoma cells is mediated by Janus kinases. *Mol. Cancer Res.* 2007, 5, 1331-1341
59. Radoslav J, TuKiet T. , Jianhong O., Lihua J.: MELK Promotes Melanoma Growth by Stimulating the NF-κB Pathway. 5 December 2017, cell reports, Pages 2829-2841
60. Bedogni B, Welford SM, Cassarino DS, Nickoloff BJ, Giaccia AJ, Powell MB. The hypoxic microenvironment of the skin contributes to Akt-mediated melanocyte transformation. *Cancer Cell* 2005; 8: 443–54.
61. Seiji H, Fitzpatrick TB. The reciprocal relationship between melanization and tyrosinase activity in melanosomes (melanin granules). *J Biochem* 1961; 49: 700-6.
62. M. Herlyn, *Cancer Res.*, 45 (1985), pp. 5670-5676
63. Madonna, G.; Ullman, C. D.; Gentilcore, G.; Palmieri, G.; Ascierto, P. A. NF-kappaB as potential target in the treatment of melanoma. *J. Transl. Med.* 2012, 10, 53
64. Kennedy, N. J.; Davis, R. J. Role of JNK in tumor development. *Cell Cycle.* 2003, 2, 199-201
65. Garman, Bradley et al. .Genetic and Genomic Characterization of 462 Melanoma Patient-Derived Xenografts, Tumor Biopsies, and Cell Lines. *Cell Reports*, Volume 21, Issue 7, 1936 – 1952.
66. Leven, C., Padelli, M., Carré, J. L., Bellissant, E., & Misery, L. (2019). Immune checkpoint inhibitors in melanoma: a review of

- pharmacokinetics and exposure–response relationships. *Clinical pharmacokinetics*, 58, 1393-1405.
67. Czarnecka AM, Bartnik E, Fiedorowicz M, Rutkowski P. Targeted Therapy in Melanoma and Mechanisms of Resistance. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21(13):4576. <https://doi.org/10.3390/ijms21134576>
68. Shi, X., Wang, X., Yao, W. *et al.* Mechanism insights and therapeutic intervention of tumor metastasis: latest developments and perspectives. *Sig Transduct Target Ther* 9, 192 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01885-2>.





## BÖLÜM 7

### HÜCRE DÖNGÜSÜ İNHİBİTÖRLERİ

Ecz. Sevgi KUNDU<sup>1</sup> , Doç. Dr. Senem AKKOÇ<sup>2,3</sup>

---

<sup>1</sup>Süleyman Demirel Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Temel Bilimleri Anabilim Dalı. Isparta, Türkiye. sevgikundu@gmail.com, Orcid ID: 0009-0008-0121-0882,

<sup>2</sup>Süleyman Demirel Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü, Isparta, Türkiye. senemakkoc@sdu.edu.tr, Orcid ID: 0000-0002-1260-9425,

<sup>3</sup>Bahçeşehir Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, İstanbul, Türkiye. senem.akkoc@bau.edu.tr, Orcid ID: 0000-0002-1260-9425

## **GİRİŞ**

Hücre bölünmesinin doğru bir şekilde düzenlenmesi, tüm organizmalar için hayati öneme sahiptir. Hücre replikasyonundaki normal kontrol mekanizmalarında meydana gelen bozulmalar, kanser ve benzer hastalıklarda karşılaşılan en temel sorundur (1). Bölünen hücreler, belirli bir büyüme ve bölünme sürecinden geçmektedir ki bu süreç hücre döngüsü olarak isimlendirilmektedir (2). Hücre bölünmesinin sağlıklı bir şekilde gerçekleşmesi, kontrollü işleyen bir hücre döngüsüne bağlıdır.

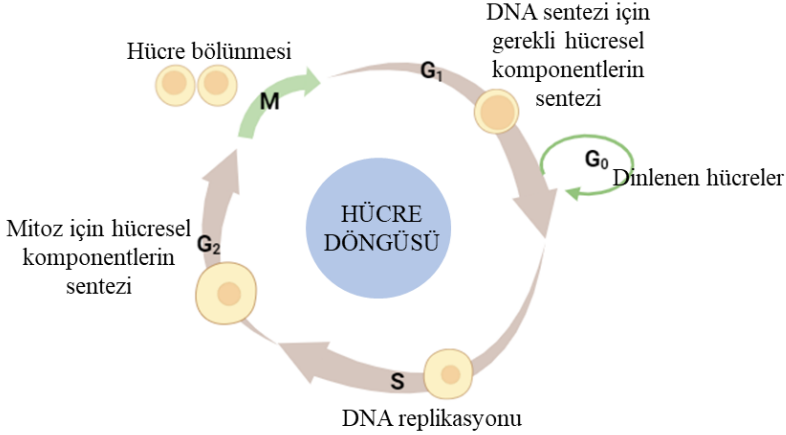
### 1. Hücre Döngüsü

Genetik bilgi, hücre döngüsü olarak bilinen son derece düzenli bir süreç aracılığıyla bir nesilden bir sonraki nesle kopyalanarak aktarılmaktadır. Bu süreçte, iki yavru hücrenin her biri her kromozomun aynı kopyalarını almalıdır, bu da hassas bir DNA replikasyonuna bağlıdır (3). Ökaryotik hücrelerde hücre döngüsü  $G_1$ , S,  $G_2$  alt fazlarını kapsayan interfaz ve mitoz (M fazı) olarak adlandırılan iki temel fazdan (Şekil.1) meydana gelmektedir (4).

DNA replikasyonunun gerçekleştiği S fazı ve hücrenin iki yeni yavru hücreye bölündüğü M fazı tartışmasız hücre döngüsünün en önemli fazlarıdır. Bu iki faz arasında  $G_1$  ve  $G_2$  olarak adlandırılan ara fazlar bulunmaktadır. Hücrenin pozitif ve negatif büyüme sinyallerine karşı hassas olduğu  $G_1$ , mitozdan sonraki ilk ara fazdır. Bu fazda DNA sentezi için gerekli olan RNA ve proteinler sentezlenmektedir. Hücreler yeterli büyüklüğe ulaşıp gerekli proteinleri sentezlediklerinde, kromozomların aktif olarak kopyalandığı S fazına girerler.

Hücrenin mitozla girmeye hazırlandığı  $G_2$ , S fazından sonra gelen ikinci ara fazdır ve bu fazda mikrofilamentler, tübülün ve mitoz düzenlenmesinde rol alan önemli faktörler gibi doğrudan mitozla ilgili RNA ve proteinler sentezlenmektedir. Aşırı hücre yoğunluğuna veya mitojen eksikliğine bağlı olarak hücreler hücre bölünme döngüsünden

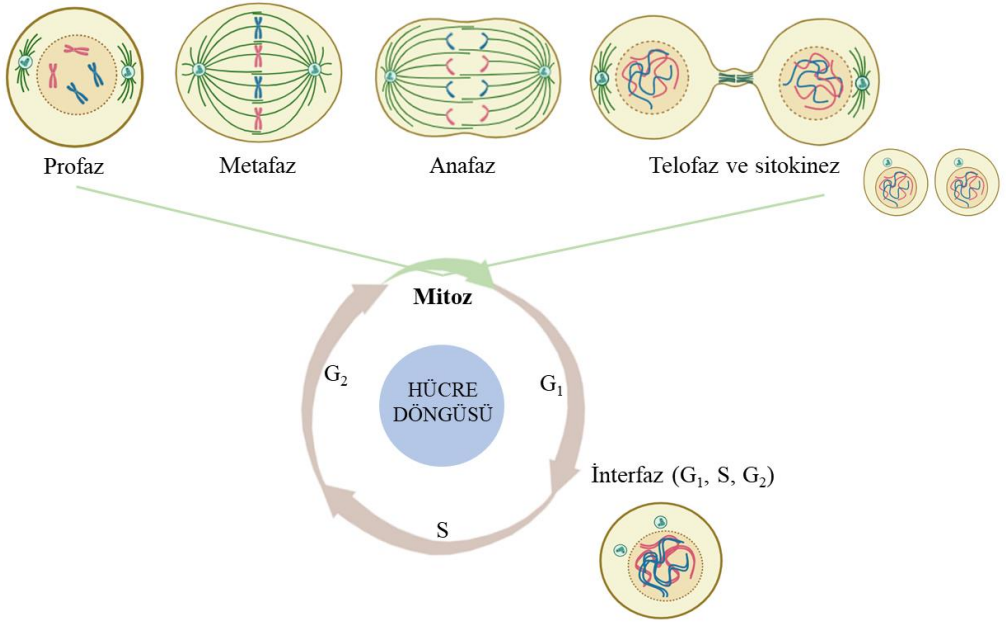
geçici olarak çekilebilmektedir, bu durum ise  $G_0$  fazı ile temsil edilmektedir (1,5,4).



Şekil 1. Hücre döngüsü fazlarının şematik gösterimi.

### 1.1. Mitoz

Hücreler, DNA replikasyonunun gerçekleştiği ve iki hücre için gerekli tüm diğer bileşenlerin uygun miktarda üretildiği interfaz döneminden geçmektedir. Bu bileşenler mitoz sürecinde (Şekil 2) yeniden düzenlenir ve sitokinezle birlikte tekrar büyüyüp bölünebilme yeteneğine sahip yavru hücreler meydana gelir (6).



**Şekil 2.** Hücre döngüsünde mitoz evrelerinin şematik gösterimi. Şekil BioRender uygulaması kullanılarak oluşturulmuştur.

Mitoz, kesintisiz devam eden bir süreç olmakla beraber daha anlaşılır olabilmesi için birkaç evreye ayrılarak anlatılmaktadır. Profaz evresinde belirgin bir şekilde kromozom yoğunlaşması gerçekleşmektedir. DNA'nın histon oktamerlerinin etrafına sarılmasıyla oluşan kromatin iplikçikleri bu yoğunlaşmadan etkilenir ve her kromozomun uzunluğunun azalması ve kalınlaşmasıyla DNA iplikçikleri görünür hale gelmeye başlar. Bu evrede transkripsiyon durmaktadır. Mikrotübül ve mikroflamentler ise interfazdaki stabilitelelerini kaybetmektedir (6).

Mikrotübül temelli iğ iplikleri hücrenin iki kutbunda yapılanmaya başlar. Çekirdek zarfı prometafaz evresinde parçalanır ve profaz evresinde yoğunlaşan kromozom çiftleri sentromer noktalarındaki kinetokorlarından iki kutuptaki iğ ipliklerine tutunmaktadır. Bu tutunma kromozomların hücrenin merkezinde toplanmasına izin vermektedir.

Daha sonra tüm kromozomların metafaz plağında dizildiği aşama olan metafaz evresi başlar. Anafaz evresi, anafaz teşvik edici kompleks/siklozomun (APC/C) aktivasyonu ile başlatılır.

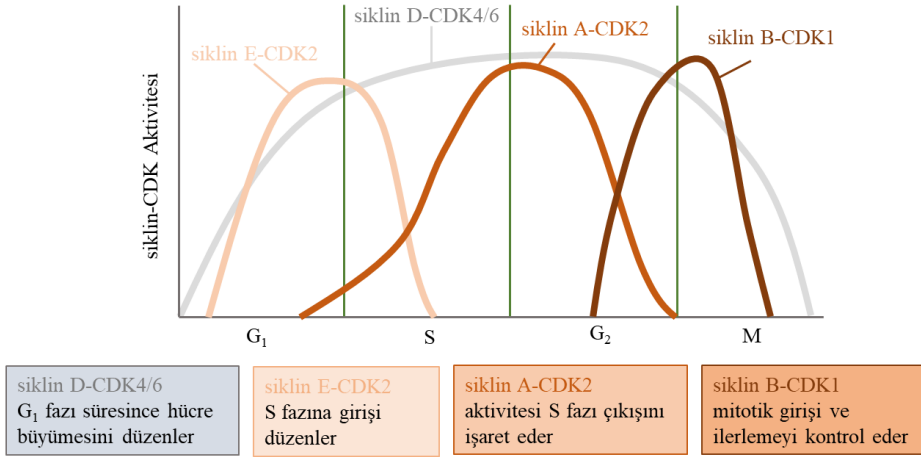
Kardeş kromatidleri bir arada tutan protein yapıları olan kohezinerler, aktif APC/C'nin aktifleşmesiyle birlikte yıkıma uğramaktadır. Anafaz A olarak bilinen bu durumda, her bir ayrılmış kromozom, kinetokorlarına bağlı mikrotübüller aracılığıyla kendilerine karşılık gelen kutbuna doğru hareket ettirilmektedir. Anafaz B evresinde iğ ipliklerinin kutupları birbirinden uzaklaşır. Kromozomlar ayrıldıktan sonra hücre telofaz evresine geçmektedir. Telofaz sırasında kromozom yoğunluğu azalır, çekirdek zarı yeniden oluşur ve sitokinez evresi ile hücre iki yeni hücreye bölünür. Döngüye devam edecek hücreler, mitozun başarılı bir şekilde tamamlanmasının ardından G<sub>1</sub> fazına girmektedir (1).

## **2. Hücre Döngüsünün Düzenlenmesi**

Hücre döngüsünün düzenlenmesi, hücre döngüsü kontrol noktalarının, regülatör siklinlerin, siklin bağımlı kinazların (CDK, cyclin-dependent kinase) ve hücre döngüsü sinyal yollarının düzenlenmesini içeren bir dizi karmaşık süreci kapsamaktadır (4).

Hücre döngüsü geçişleri genel anlamda CDK'ler tarafından kontrol edilmektedir (Şekil 3). Serin/treonin kinaz ailesinin bir üyesi olan CDK'ler ilişkili oldukları siklinlerle kompleks yapılar oluşturarak aktivite göstermektedir. İlk defa R. Timothy Hunt ve arkadaşları tarafından 1980'lerde tanımlanmış siklinler bu heterodimer kompleksin düzenleyici alt birimini oluştururken, CDK'ler katalitik alt birimi oluşturmaktadır (7,8,9). A, B, C, D, E, F, G, H, I, K, T ve bunlardan bazılarının farklı formları olmak üzere memelilerde 15'ten fazla siklin tanımlanmıştır. Tüm siklinler CDK'lere bağlanmak ve aktif kompleks oluşturabilmek için siklin kutusu olarak bilinen ortak bir homolog bölgeye sahiptir. Bazı CDK'ler (CDK1, CDK2, CDK3, CDK4, CDK6)

hücre döngüsünün düzenlenmesinde doğrudan görev almaktadır. Ancak tüm siklin ve CDK'ler hücre döngüsünün düzenlenmesiyle ilişkili doğrudan bir role sahip değildir. CDK5 mitoz sonrası işlevlere sahipken, CDK7-11 DNA sentezi ve transkripsiyonun düzenlenmesi gibi hücre döngüsünde daha dolaylı roller üstlenmektedir (10,9).



**Şekil 3.** Hücre döngüsü ilerlemesi, siklin ve CDK aktivitesindeki değişiklikler tarafından düzenlenmektedir (11).

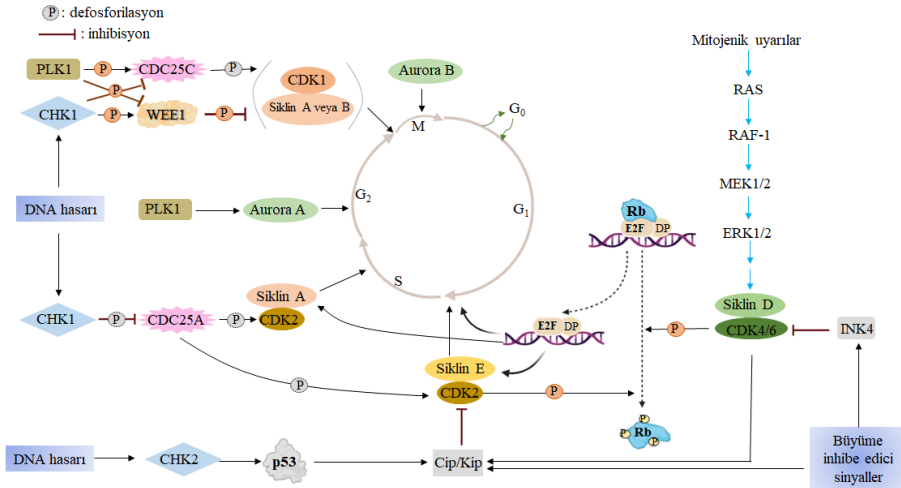
Çeşitli hücre döngüsü kontrol noktaları, DNA replikasyonunun doğruluğunu ve bütünlüğünü ayrıca kardeş kromatidlerin zamanında ve hassas bir şekilde ayrılmasını düzenlemektedir. G<sub>1</sub>/S kontrol noktası, retinoblastoma proteininin (Rb) sırasıyla siklin D-CDK4/6 ve siklin E-CDK2 tarafından fosforile edilmesiyle E2F'nin ayrışması sağlanarak rahatlatılabilir. E2F transkripsiyon faktörü ailesi ve onların dimerizasyon partner proteinleri, G<sub>1</sub>/S geçişinin transkripsiyonel düzenleyicileri olarak işlev görmektedir.

Transkripsiyonel baskılama (E2F3B, E2F4, E2F5, E2F6, E2F7 ve E2F8) veya transkripsiyonun aktivasyonu (E2F1, E2F2 ve E2F3A) E2F ailesi üyeleri ile ilişkilidir. Yeni araştırmalar baskılayıcı E2F proteinlerinin transkripsiyonu aktive edebildiğini ve aktivatör E2F proteinlerinin transkripsiyonu baskılayabildiğini ortaya koymuştur.



G<sub>2</sub>/M kontrol noktasında siklin B-CDK1 kinaz aktivitesi, Aurora A/Polo-benzeri kinaz 1 (PLK1)/CDC25 ve CHK1/WEE1 sinyallemesi tarafından hassas bir şekilde kontrol edilmektedir (Şekil 4). İğ ipliği kontrol noktası, mitotoik kontrol noktası olarak da bilinir, mitotik kontrol kompleksinin (MCC), APC<sup>Cdc20</sup> E3 ligaz aktivitesini inhibe ederek siklin B ve securin'ın yıkımını engellediği ve mitotik ilerlemenin duraklatıldığı bir süreçtir (12,13).

Hücre döngüsünün düzenli ilerlemesi, siklinlerin APC/C ve Skp1–Cullin1–F-box (SCF) E3 ligaz kompleksleri tarafından ardışık olarak yok edilmesiyle ve ardından hücre döngüsü mekanizmasının, G<sub>1</sub> fazında siklin D-CDK4/6, G<sub>1</sub> fazının sonunda siklin E-CDK2, S fazının sonunda siklin A-CDK2 ve G<sub>2</sub> fazının sonunda siklin B-CDK1 aktivasyonu ile kontrol edilmektedir (13).



Şekil 4. Hücre döngüsünün düzenlenmesinde rol oynayan temel yollar (14,15).  
CHK1/2: Kontrol noktası kinazı 1/2.

Prereplikatif G<sub>1</sub> fazı çeşitli aşamalara ayrılmaktadır. Erken G<sub>1</sub> fazında hücre ya hücre döngüsünde kalacağı ya da hücre döngüsünden çıkıp dinlenme durumuna geçeceği bir seçim aşamasından geçmektedir. Hücre döngüsü boyunca aktivitesi büyüme faktörlerince kontrol edilen

siklin D ve ilişkili CDK aktivitesi, hücrenin replikasyon başlatmasına ve yeni bir hücre döngüsüne girmesine olanak sağlayan bir karar penceresi oluşturmaktadır. Bu CDK aktivitesinin inhibe edilmesi veya yokluğu, hücreyi G<sub>1</sub> evresinden çıkarıp durağanlığa geçirebilmektedir. G<sub>0</sub> hücreleri hücre döngüsüne girmek üzere stimüle edildiğine ilk olarak D tipi siklinler indüklenir ve CDK4 ve CDK6 ile etkileşerek aktif kompleksler oluşturur. Bu kompleksler Rb ve muhtemelen cep protein ailesinin diğer üyelerinin fosforilasyonunu başlatmaktadır. Rb, E2F transkripsiyon faktörleri ailesi üyeleri de dahil olmak üzere çok sayıda hücre proteinine bağlanıp bunların aktivitesini düzenlemektedir. Rb'nin hipofosforile formu, E2F transkripsiyon faktörü ile güçlü bir kompleks oluşturarak hücrelerin replikasyonunu engellemektedir. Rb'nin fosforilasyonu, bu kompleksin ayrılmasına sebep olarak E2F'nin transkripsiyonel aktivitesinin serbest kalmasını sağlamaktadır (Şekil 4) (10,16).

Geç G<sub>1</sub> evresinde aktif siklin E-CDK2 kompleksi, ileri besleme etkisiyle Rb'yi ek bölgelerinden fosforile ederek S fazının gen ifade programını geri dönülmez bir şekilde başlatmaktadır. Kısıtlama noktası olarak bilinen bu aşama kanser gelişiminde kritik rol oynamaktadır. Bunun sebebi G<sub>1</sub>'den S fazına geçişteki kilit düzenleyicilerdeki değişimlerin, mitojenik uyarıcılara ihtiyaç duymadan hücrelerin çoğalmasına olanak tanıyabileceği şeklinde açıklanmaktadır. Siklin A-CDK2, siklin A-CDK1 ve siklin B-CDK1 komplekslerinin ardışık aktiviteleri ile kısıtlama noktasının ötesinde Rb hiperfosforile edilmiş durumda tutularak hücre döngüsünün ilerlemesi sağlanmaktadır. Diğer yandan olası bir DNA hasarı durumunda, hücre döngüsü hızla durdurulmaktadır. Bu durum ataksi telanjiektazi ve RAD3 ilişkili protein olarak bilinen serin/treonin-protein kinaz ATR, serin protein kinaz ATM olarak da bilinen ataksi telanjiektazi mutasyonu proteini ve bunların downstream efektörleri olan kontrol noktası kinaz 1 (CHK1) ve kontrol noktası kinaz 2 (CHK2) gibi ilişkili kinazların aktivasyonu ile

sağlanmaktadır. Gerçekleşen bu işlemler hücreye DNA hasarını onarması için zaman kazandırmaktadır. DNA hasar kontrol noktası gibi hücre döngüsü kontrol noktaları, genom bütünlüğünü korumak için tasarlanmış olup kanser karşısında koruyucu bariyer oluşturmaktadır. ATM-ATR kaskatına dahil olan genlerdeki mutasyonlar, DNA hasarına yanıtı bozarak kanser gelişimini destekleyebilmektedir (17).

DNA replikasyonu ile birlikte sentrozom döngüsü de başlamaktadır. Geç S fazından erken G<sub>2</sub> fazına kadar çoğalan sentrozomlar mitozun başlangıcında mitotik iğ ipliklerinin kutuplarını oluşturmak üzere ayrılmaktadır. Sonrasında, olgunlaşma olarak tanımlanan mitotik iğ ipliklerinin her iki kutbundan yayılan dinamik mikrotübüllerden oluşan aster yapılarının oluştuğu süreç başlamaktadır. Tüm bu süreçler, CDK1 ve CDK2'nin yanı sıra aurora A ve polo benzeri kinaz 1 (PLK1) dahil olmak üzere diğer serin/treonin protein kinazlar tarafından kontrol edilmektedir (18,17,19).

G<sub>2</sub> evresinde, DNA replikasyonunun geç aşamalarında S evresinden mitoz evresine geçişin sağlanabilmesi için CDK2, siklin A tarafından aktive edilir. Mitozun başlamasını kolaylaştırmak için interfazın sonunda A tipi siklinler CDK1'in aktivasyonunu sağlamaktadır. Nükleer zarın parçalanmasının ardından, A tipi siklinler yıkılarak hücrelerin mitoz boyunca ilerlemesinden sorumlu siklin B-CDK1 kompleksinin oluşumu kolaylaştırılır (20).

Profaz sırasında, sitoplazmada artan CDK1 aktivitesi sentrozomların ayrılmasını ve hücrenin yuvarlaklaşmasını tetiklemektedir. Aynı zamanda aktif siklin B-CDK1 kompleksi, kromozomların yoğunlaşmasını, nükleer zarın geçirgenliğini, APC/C'nin aktivasyonunu ve nükleolar dağılmayı sağlamaktadır. Prometafaz evresinde siklin A, APC/C<sup>Cdc20</sup> tarafından ubiquitinasyona uğradıktan sonra 26S proteazom tarafından yıkıma uğratılmaktadır. CDK1 aktivitesi, B tipi siklinlerle etkileşimi nedeniyle yüksek kalmaktadır. Metafaz evresine kromozomların merkezde hizalanmasının

ardından, mitotik çıkış APC/C<sup>Cdc20</sup> tarafından başlatılmaktadır. Bu süreçle beraber B tipi siklinler de ubiquitinasyon yoluyla proteolitik yıkıma hedeflenir. Protein fosfatazlar, geniş çapta substrat defosforilasyonu sağlayarak CDK1'in etkilerini tersine çevirir. Mitotik girişte olduğu gibi, mitozdan çıkış da hızlı ve geri döndürülemezdir. APC/C<sup>Cdc20</sup> aktivasyonu, kardeş kromatidlerin ayrılması, iğ ipliğinin uzaması ile ayrılması, hücreyi ikiye bölen aktomiyozin kontraktıl halkasının oluşumu gibi bir dizi olayı tetiklemektedir. Aynı zamanda tek kalan siklin B yok edilerek CDK aktivitesi sıfıra indirilir ve oluşan iki yeni yavru hücrede hücre döngüsü tekrar prereplikatif G<sub>1</sub> fazına sıfırlanmış olur (16).

### 3. CDK İnhibitörleri

Hücre döngüsü düzenleyicileri kanserde kritik rollere sahiptir. Kanser, hücre döngüsü proteinlerinin olağandışı aktiviteleri sonucunda ortaya çıkan kontrolsüz hücre çoğalması olarak da tanımlanabilmektedir. Bu sebeple hücre döngüsünü düzenleyen proteinler, kanser tedavisinde potansiyel hedefler olarak görülmektedir (15).

Hücre döngüsünün düzenlenmesinde Rb protein yolağı kilit rol oynamaktadır. Rb ve regülatörü olan siklinler, CDK'ler, CDK inhibitörleri kanserde normal işlevlerini kaybetmiştir. Durgun hücrelerde inaktif E2F transkripsiyon faktörlerinin sekestre edilmesi ve kromatin yeniden modelleme kompleksleri ile histon deasetilazlara bağlanması yoluyla Rb tarafından mitoz ve DNA replikasyonu için gerekli genlerin transkripsiyonu baskılanmaktadır. Hücre mitojenik uyarılarla uyarıldığında, D tipi siklinler indüklenir ve CDK4 ve CDK6'yı aktive eder. Aktif siklin D-CDK4/6 komplekslerinin Rb proteinini fosforile etmesiyle ve kısmen inaktive etmesiyle E2F tarafından hedef genlerin ekspresyonu gerçekleşir (21).

Siklin ve CDK gibi pozitif hücre döngüsü düzenleyicileri, hücre döngüsünün doğru bir şekilde ilerlemesinde önemli roller oynamaktadır.

Bunun yanı sıra CDK inhibitörleri (CKI) de hücre homeostazının korunmasında ve hücre döngüsünün düzenlenmesinde kritik öneme sahiptir. CKI'lar yapısal benzerliklerine göre iki aileye ayrılmaktadır: INK4 ve Cip/Kip ailesi. Cip/Kip ailesi G<sub>1</sub>/S fazında hücre döngüsüne bağlı siklin-CDK kompleksi oluşumunu inhibe etmektedir. INK4 ailesi de özellikle siklin D-CDK komplekslerinin aktivitesini inhibe etmektedir (21).

### 3.1. Cip/Kip Ailesi

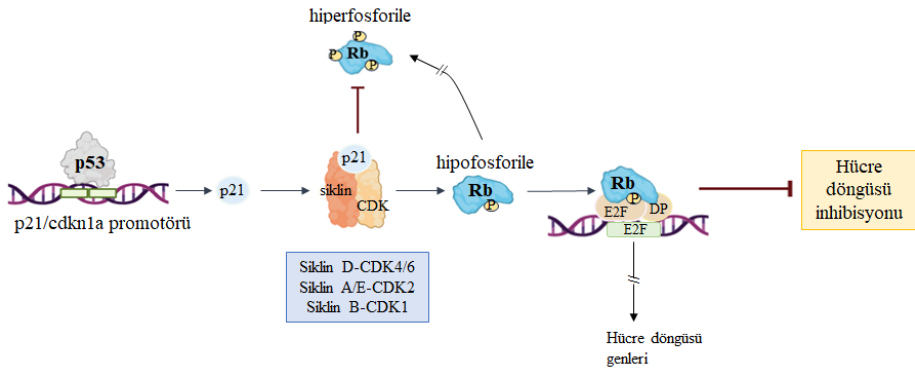
Cip (CDK interacting protein)/Kip (kinase inhibitor protein) protein ailesi hücre döngüsünün düzenlenmesinde CDK'lere bağlanıp onların etkilerini inhibe etmelerinden ötürü ilk olarak hücre döngüsü inhibitörleri olarak tanımlanmıştır. Fakat bu işlevlerinin ötesinde apoptoz, hücre kaderinin belirlenmesi, hücre iskeleti dinamikleri, hücre göçü, transkripsiyonel düzenleme gibi farklı olaylarda da önemli roller oynayan çok yönlü proteinlerdir. Stabiliteyi, hücre içi konumları ve protein-protein etkileşimindeki değişiklikler yoluyla, karmaşık bir fosforilasyon ağı Cip/Kip proteinlerinin işlevlerini düzenlemektedir. Cip/Kip ailesi üyeleri p21<sup>Cip1/WAF1</sup>, p27<sup>Kip1</sup>, p57<sup>Kip2</sup> sırasıyla cdkn1a, cdkn1b ve cdkn1c genleri tarafından kodlanmaktadır. Bu proteinler siklinler ve CDK'lere bağlanmayı sağlayan ortak bir N-terminal domainini taşımakla birlikte dizilerinin geri kalanı farklılık göstermektedir (22).

Cip/Kip ailesinin bir üyesi olan p21<sup>Cip1/WAF1</sup>, 165 aminoasitten oluşan küçük bir proteindir. N-terminalinde A, B, D ve E tipi siklinler ile CDK4/6, CDK2 ve CDK1 siklin bağımlı kinazlara bağlanmaktadır. Hücre döngüsü inhibitörlerinden olan p21<sup>Cip1/WAF1</sup>, siklin D-CDK4/6 ve siklin E-CDK2 komplekslerini inhibe ederek G<sub>1</sub>/S ve G<sub>2</sub>/M geçişlerinde hücre döngüsünün ilerlemesini durdurabilmektedir. p21'nin bu aktivitelerinin E2F aracılığıyla gerçekleştiği düşünülmektedir (23,24). p21'in siklin-CDK komplekslerinin ve proliferatif hücre nükleer antijeninin (PCNA) aktivitesini inhibe etme yeteneği, p53'ün tümör

baskılayıcı aktivitesinin modülatörü olması onu hücre döngüsü ilerlemesinin bir inhibitörü olarak ön plana çıkarmıştır. Büyümenin durması, farklılaşma ve senesens indüksiyonunda aldığı roller p21'in tümör baskılayıcı aktivitesine aracılık etmektedir. p21, protein-protein etkileşimleri aracılığıyla birtakım hücrel olayları ve gen ekspresyonunu doğrudan da düzenleyebilmektedir. Protein kinazlar, birçok transkripsiyon faktörü, ubikuitin ligazlar, p21'in transkripsiyonunu, hücrel yerleşimi ile kararlılığını düzenleyerek aktivitesini kontrol etmektedir (25).

Hücre döngüsünün düzenlenmesi ve tümör baskılanmasında p53-p21-RB sinyal yolağının önemli ölçüde katkısı bulunmaktadır. DNA hasarı, viral enfeksiyon gibi hücrel stres durumlarında p53 indüksiyonu gerçekleşmektedir. p53'ün artan konsantrasyonu hücre döngüsünde G<sub>1</sub> fazının durdurulmasına ve apoptoza yol açabilmektedir (26, 27).

p21, cdkn1a geni tarafından kodlanmaktadır ve bu gen p53'ün hedefidir. p53'ün, p21/cdkn1a promotörüne bağlanmasıyla p21 transkripsiyonu aktifleşir (Şekil 5). Aktif p21, Rb'nin hiperfosforilasyonunda rol oynayan siklin-CDK komplekslerini inhibe eder. Hipofosforile Rb E2F transkripsiyon faktörleriyle ardışık olarak kompleksler oluşturur. Rb-E2F kompleksleri hedef genlerin promotörlerinde E2F bağlanma bölgeleri ile etkileşerek hedef genlerin downregülasyonuna sebep olmaktadır. p53 aracılı bu transkripsiyonel baskılama ile hücre döngüsünün ilerlemesinden sorumlu genler baskılanmış olmaktadır (27).



Şekil 5. p53-p21-RB sinyalağı ile hücre döngüsünün inhibisyonu (27).

Tüm bu aktivitelerinin aksine p21'in siklin-CDK kompleksleri üzerindeki etkileri basit bir bağlanma indüksiyonu ile sınırlı değildir. Örneğin p21, CDK4/6 komplekslerini inhibe etmekle kalmayıp sitokiyometrik olarak bu kompleksleri uyarabilmektedir. Aynı zamanda mitojenik ve anti-apoptotik aktiviteye sahip faktörlerin transkripsiyonunu indüklemeye yeteneği, p21'in teşvik ettiği büyüme durmasından sonra tümör hücrelerindeki endoreduplikasyon ve anormal mitozun gelişmesi gibi işlevleri, p21'in kanser oluşumunu ve tümör ilerlemesini teşvik edebileceği de düşünülmektedir (28).

Siklin bağımlı kinaz inhibitörü olan p27, aynı zamanda p27<sup>Kip1</sup> olarak da ifade edilmektedir, cdkn1b geni tarafından kodlanmaktadır. Yaygın eksprese edilen p27, mitojenik ve büyüme inhibe edici sinyalleri entegre ederek normal hücre döngüsü ilerlemesini düzenlemektedir. p27, N-terminal domaini aracılığıyla hem siklin hem de CDK alt birimleriyle etkileşerek siklin A, B, D ve E-CDK komplekslerinin aktivitesini inhibe etmektedir (29). G<sub>1</sub>/S geçişinde önemli roller üstlenen p27 aynı zamanda CDK bağımlı ya da bağımsız mekanizmalar aracılığıyla G<sub>2</sub>/M geçişinin ve sitokinezin tamamlanmasının da düzenlenmesini sağlamaktadır. Hücre farklılaşması, hücre hareketliliği ve göçünün düzenlenmesi, apoptoz ve otofajinin aktivasyonu da p27'nin diğer önemli işlevlerindedir (30).

p27'nin hücre döngüsü düzenlenmesindeki aktivitesi K48 bağlantılı ubikuitinle poliubikuitinasyon, fosforilasyon, sitoplazmaya taşınma gibi postranslasyonel modifikasyonlarla düzenlenmektedir. Sitoplazmada, E2 Ubc3 ve E3 SCF<sup>SKP2</sup>, bu poliubikuitine edilmiş türlerin oluşumunu katalizler ve p27, proteazom aracılığıyla parçalanır. Degredasyon için işaretlenmemiş p27 ise, hücre geçişinin, sitoskeletonun, otofajinin, epitelyal mezenkimal geçişin düzenlenmesinde rol oynamaktadır (31).

Cdkn1c geni 316 amino asitten oluşan p57'yi, p57<sup>Kip2</sup>, kodlamaktadır. Primer dizilim seviyesinde p57 üç farklı bölgeye organize olmuş modüler bir yapıya sahiptir. Bölge I, N- terminal bölgesinde yer alan ve p21 ile p27'inkine önemli ölçüde homoloji gösteren CDK inhibitör bölgesi (KID) olarak tanımlanmaktadır. Prolin ve alanin amino asitlerinin tekrarlarından oluşan ve PAPA bölgesi olarak da isimlendirilen bölge II ve son olarak da C- terminalinde yer alan korunmuş QT bölgesini içeren bölge III p57'nin sahip olduğu diğer bölgeleridir (32).

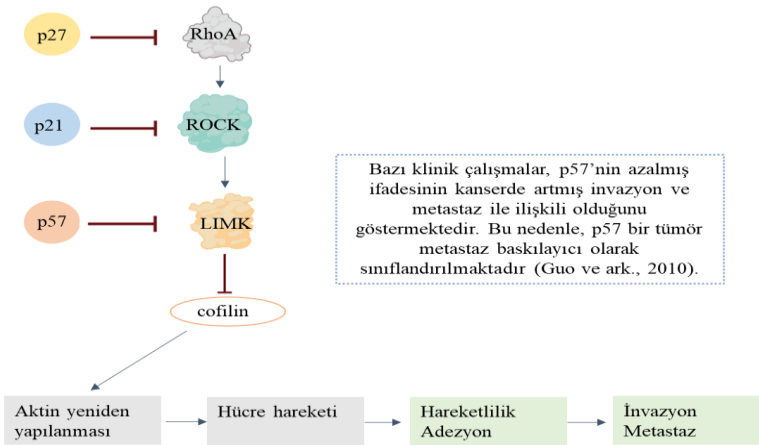
Tüm siklin-CDK komplekslerinin inhibitörü olan p57'nin, siklin B-CDK1 ve siklin D2-CDK6'ya karşı afinitesi daha düşüktür (32). G<sub>1</sub>/S ve G<sub>2</sub>/M geçişlerinde siklin-CDK komplekslerini modüle ederek hem DNA reduplikasyonunu hem de mitozu düzenleyebilmektedir. PAPA ve C-terminal bölgeleri aracılığıyla farklılaşma, gelişim, transkripsiyon, apoptoz ve migrasyon gibi farklı hücresel süreçlerin düzenlenmesinde de yer almaktadır (33). Ayrıca p57 apoptoz, hücre invazyonu, tümör farklılaşması, anjiyogenez, metastaz gibi çeşitli kanser belirteçlerinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Kanserde p57 genellikle mutasyona uğramaz fakat ifadesi, promotördeki baskılayıcı histon işaretleri ve DNA metilasyonu gibi epigenetik değişiklikler yoluyla downregüle edilir (34).

Hücre döngüsünün önemli regülatörlerinden olan p57'nin yıkımı ubikuitin proteazom yolağı ile kontrol edilmektedir. Skp1/Cul1/F-box (SCF) tipi E3 ubikuitin ligaz kompleksi SCF<sup>SKP2</sup> p57'yi ubikuitinasyona



ve proteolize hedefleyerek p57'nin hücresel seviyesini düzenlemektedir (35).

Cip/Kip ailesinin tüm üyeleri RhoA-ROCK-LIMK-cofilin yolağınının farklı seviyelerinde etki ederek hücre iskeleti organizasyonunu ve hücre göçünü düzenlemektedir (22). Bu yolda küçük GTPaz RhoA, Rho ilişkili kinazı (ROCK) aktive etmektedir. Aktifleşen ROCK, LIM kinazı (LIMK) aktive etmekte ve bu da aktin polimerleşmesini engelleyen ADF/cofilin proteinini inhibe etmektedir. CKI aracılığıyla bu yolağın düzenlenmesi, cofilin'in aktif hale gelmesine ve stres liflerinin depolimerizasyonuna yol açarak monomerik aktinin yeniden dağılımına sebep olur. Bu da hücre hareketliliğinde artışa ve morfolojik değişikliklere yol açmaktadır (Şekil 6) (Starostina ve Kipreos, 2012). LIMK1'in aşırı ekspresyonu kanser metastazında rol oynamaktadır (Bernard, 2007). RhoA-ROCK-LIMK-cofilin yolağınının p21, p27 ve p57 aracılığıyla inhibisyonu kanser hücrelerinin hareketliliğini ve dolayısıyla invazyon ve metastazı kontrol etmektedir (33).



Şekil 6. Cip/Kip ailesi üyeleri aracılı RhoA-ROCK-LIMK-cofilin yolağı inhibisyonu (36).

### 3.2. INK4 Ailesi

Hücre döngüsü inhibitörü olarak işlev görev INK4 ailesi de Cip/Kip ailesi gibi hücre yaşlanma ve tümör baskılamada rol oynamaktadır. INK4 ailesi üyeleri p16<sup>INK4a</sup>, p15<sup>INK4b</sup>, p18<sup>INK4c</sup>, p19<sup>INK4d</sup>, CDK4 ve CDK6'ya bağlanarak onların ilişkili siklinlere bağlanmasını allosterik rekabet yoluyla inhibe etmektedir (21). Özellikle p15 ve p16 amino asit düzeyinde %85 oranında benzerliğe sahiptir ve bu proteinler arasında çok az biyokimyasal ayırım yapılmıştır. INK4 ailesi üyelerinin genel etki mekanizması şu şekildedir: CDK4 ve CDK6'ya bu proteinlerin bağlanmasıyla birlikte bu kinazların D tipi siklinlere bağlanmasını engelleyen allosterik bir değişim meydana gelir. Böylece CDK4/6 aracılı Rb protein ailesi üyelerinin fosforilasyonu inhibe edilmiş olur. p15 ve p16 ifadesi Rb proteinlerini hipofosforile durumda tutmakta ve bu da E2F'nin bağlanmasını teşvik ederek hücre döngüsünün G<sub>1</sub> evresinde durması sağlanmaktadır (37). INK4 ailesi üyesi olan p18 yine CDK4/6 yollarını hedefleyerek somatik hücrelerde yeniden programlanmayı sınırlamaktadır (38). Bu ailenin diğer bir üyesi olan p19 da yalnızca hücre döngüsünü düzenlemekle kalmayıp aynı zamanda hücre yaşlanma süreçlerinde, DNA hasar onarımı, hematopoietik hücrelerde hücre farklılaşması, apoptoz gibi birtakım olayda da düzenleyici roller oynamaktadır (39).

INK4 ailesinin prototipi olan p16, 156 amino asitten oluşan bir proteindir. Hücre döngüsünün ilerlemesi ve Rb proteinin fosforilasyonu için gerekli aktif siklin D-CDK4/6 kompleksinin katalitik aktivitesini inhibe eden p16'nın, bu yeteneğinden ötürü tümör baskılayıcı aktiviteye sahip olduğu düşünülmektedir (40). p16'nın CDK4/6 inhibitör etkisi ile birlikte Rb proteini fosforilasyonu engellenmiş olur. E2F1 ile ilişkili Rb, E2F1'i sitoplazmaya lokalize eder ki bu da G1/S geçişi için kritik E2F1 hedef genlerinin transkripsiyonunu engellemektedir. Böylece hücre döngüsü G1/S geçişinde inhibe edilmiş olur (41).

p16'nın ekspresyonu normal hücre homeostazı için büyüme ve farklılaşma arasında dengelenmelidir. Bu dengenin sağlanması da p16 aktivasyon ve inaktivasyonunu içeren karmaşık bir mekanizma ile sağlanmaktadır. p53 hücre büyümesinde kontrol sağlayarak hücrelerde büyümenin duraklatılması ve DNA onarımını sağlarken p16 tümör oluşumunu önlemede kritik bir rol oynamaktadır. İnsan tümörlerinde p53'ün inaktivasyonundan sonra p16'nın inaktivasyonu en yaygın ikinci mekanizmadır. Sisplatin ve benzeri kemoterapötik ajanlar p16'nın aktivitesini hem kanserli hem de normal hücrelerde artırarak yaşlanmayı tetiklemektedir. Bu sebeple kanserli hücrelerde p16'nın artmış ekspresyonu ile yaşlanmanın sağlanması, kanser tedavisinde etkili bir yaklaşım olabilir (41).

Kromozom 9p21'de yer alan INK4a/ARF/INK4b lokusunun kaybı insan kanserinde en sık görülen sitogenetik olaylardan biridir. INK4a/ARF/INK4b lokusu, pankreatik adenokarsinom, bazı lösemiler, melanom, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, glioblastom ve mesane karsinomu dahil olmak üzere geniş bir tümör yelpazesinde silinmektedir (37).

ARF'nin tümör baskılayıcı aktivitesi büyük ölçüde anormal büyüme ve c-MYC aktivasyonu gibi onkojenik streslere yanıt olarak p53'ü düzenleme yeteneğine atfedilmektedir. ARF proteinleri MDM2 proteinine bağlanarak onu inaktive eder ve MDM2 de p53'ü negatif yönde düzenler (37).

### **3.3. WEE1**

WEE1, hücrede meydana gelen DNA hasarına yanıt olarak mitozaya geçişi önleyen, hücre döngüsünde G<sub>2</sub>/M geçişinin önemli bileşeni olan bir tirozin kinazdır (42). Aktif siklin B-CDK1 kompleksi mitotik girişi ve ilerlemeyi kontrol etmektedir. İnterfaz sırasında CDK1'in aktivitesi WEE1 ve MYT1 (miyelin transkripsiyon faktörü) kinazları tarafından kontrol edilmektedir. WEE1 ve MYT1 sırasıyla CDK1'i tirozin 15 ve

treonin 14 kalıntısında fosforile ederek CDK1'in inaktivasyonunu sağlamaktadır. Böylece herhangi bir DNA hasarında WEE1'in siklin B-CDK1 kompleksi üzerindeki inhibitör etkisi ile hücre döngüsünün G<sub>2</sub>/M geçişinde mitoz girişi engellenmiş olur (43). WEE1'in aktivitesi, PLK1 tarafından hiperfosforile edilmesiyle birlikte M fazında azalırken, S ve G<sub>2</sub> fazlarında artmaktadır. Önemli bir DNA hasarı olmayan hücrelerde WEE1'in PLK1 tarafından fosforilasyonu, WEE1'in ubikuitin ligaz kompleksi tarafından parçalanmasına yol açmaktadır. Mitoz evresine geçiş ise WEE1 parçalandıktan ve siklin B-CDK1 kompleksi CDC25 fosfataz tarafından aktifleştirilip defosforile edilmesi ile mümkün olmaktadır (Şekil 4) (44).

Melanom, meme kanseri, beyin tümörleri ve lösemi gibi çeşitli kanser türlerinde WEE1 yüksek seviyelerde ifade edilmektedir. Bu kanserlerin çoğu DNA'ya zarar veren ajanlarla tedavi edilir. Çoğu kinaz inhibisyon stratejisinin hücre döngüsünü durdurmayı hedeflemesinin aksine, WEE1 inhibisyonu mitozu teşvik etmektedir. Böylece hücre ardışık replikasyon döngülerine zorlanır ve genomik instabilite meydana gelir. Bu da nihayetinde mitotik felaketten kaynaklanan apoptozla sonuçlanır. Tüm bunlardan ötürü WEE1 kinazın inhibisyonu, mevcut geleneksel DNA'ya zarar veren tedavilerin etkinliğini artırmak amacıyla kullanılabilir bir strateji olmaktadır (42,45)

#### **4. Kanser Tedavisinde Hedef: Siklin Bağımlı Kinazlar**

Normal hücre döngüsü işleyişinde meydana gelen bozulmalar sonucu kontrolsüz hücre çoğalması kanserin en önemli özelliklerinden biridir. Hücre döngüsü kontrolünün temel işleyişini anlamak etkili kanser tedavileri geliştirilmesi açısından son derece önem arz etmektedir. Özellikle hücre döngüsü mekanizmalarını düzenleyen gen ürünleri, hücre döngüsünün düzenli bir şekilde ilerlemesini sağlayan siklin bağımlı kinazlar önemli tedavi hedefleri olarak incelenmektedir. CDK'lerin tedavi hedefi olarak görülmesinin sebebi tümör oluşum olayının, hücre döngüsünün G<sub>1</sub> fazında CDK4 ve CDK6 komplekslerini

etkileyerek kontrolsüz çoğalmayı tetiklemesidir. Kromozomal stabilitedeki bozulmalar ve S fazı ve G<sub>2</sub>/M geçişi kontrolüne CDK2 ve CDK1'in aracılık etmesi yine tümör oluşumundaki kritik noktalardandır (46).

Kanserde, siklin-CDK komplekslerinin katalitik alt birimleri genellikle mutasyona uğramaz. Ancak CDK4 ve CDK6'nın melanoma (CDK4) ve diğer tümörlerde (CDK4/6) mutasyonları belirli alt gruplarında gözlemlenmiştir. İnsan malignitelerinde daha yaygın olarak siklinlerin ve CDK'lerin düzenleyici alt birimlerinin amplifikasyonları ve endojen CDK inhibitörlerinin mutasyonları görülmektedir (17). Örneğin siklin D1'in aşırı ekspresyonu özofagus kanseri, baş ve boyun karsinomları, meme tümörleri, akciğer tümörleri, kolorektal karsinomlar gibi çeşitli neoplazilerin birçok türünde yaygın bir durumdur (47). Siklin B'in aşırı ekspresyonu göğüs kanseri, özofagus skuamöz hücreli karsinomu, böbrek kanseri, küçük hücreli dışı akciğer kanseri gibi çeşitli kanserlerde yaygındır (48).

Son zamanlarda, CDK2 deregülasyonunun belirli kanser türlerinde sıkça gözlemlendiği anlaşılmıştır. CDK2 ile kompleks yapıları oluşturan E1 veya E2 siklinlerin amplifikasyonları da özellikle uterin ve over kanserleri başta olmak üzere birçok kanserde önemli onkogenik olaylardandır (46). CDK1'in deregülasyonunun tümör oluşumuyla yakından bağlantılı olduğu gösterilmiştir. Çeşitli kanser türlerinde CDK1 aktivasyonu önemli rol oynamaktadır. CDK1'in birçok hedef proteinini fosforilasyonu, bu proteinlerin tümör gelişimindeki işlevlerini önemli ölçüde etkilemektedir (49).

CDK'ler çeşitli genetik ve epigenetik olaylar sonucunda insan kanserlerinde genellikle aşırı aktif hale gelmektedir. Bu durum kontrol noktası bütünlüğünün kaybına ve kontrolsüz hücre çoğalmasına yol açmaktadır. Bu nedenle CDK'lerin selektif olarak inhibe edilmesi, tümör hücresinin hücre döngüsünde ilerlemesini sınırlayabilir ve apoptotik yolların indüksiyonunu kolaylaştırabilir (17).

CDK inhibitörleri ile ilgili araştırmalar 1990’lardan beri yapılmaktadır. Flavopiridol (alvocidib olarak da bilinmekte) ve roscovitini (seliciclib olarak da geçmekte) (Tablo 1) içeren birinci nesil CDK inhibitörleri, pan-CDK inhibitörleri olarak isimlendirilmiştir. Bu inhibitörler CDK enzim aktivitesini engelleyerek hücre döngüsü inhibisyonuna ve hücre proliferasyonu inhibisyonuna sebep olmaktadır. Ancak çoğu birinci nesil ajan zayıf seçicilik ve yüksek toksisite özellikleri göstermelerinden ötürü klinik denemelerde başarısız olmuştur (50).

Dinaciclib, AT7519, TG02, P276-00, PHA-793887, RGB-286638, Roniciclib ve benzeri (Tablo 1) ajanlar dahil olmak üzere ikinci nesil pan-CDK inhibitörleri daha iyi seçicilik ve daha az yan etki profili hedefi ile geliştirilmiştir. Bu ajanların çoğu klinik öncesi çalışmalarda etkili antitümör aktivite göstermiştir. Bunun yanı sıra bu inhibitörlerin güvenilirliği ve etkinliği daha fazla klinik çalışmayla doğrulanmalıdır (50).

**Tablo 1.** Bazı pan-CDK inhibitörleri.

İsim	Hedef CDK türü	En yüksek klinik faz	Hedef Kanser Türü	Referanslar
<b>Flavopiridol (Alvocidib)</b>	CDK1,2,4,6,7,9	Faz II	Akut lenfoblastik lösemi, akut miyeloid lösemi, kronik lenfositik lösemi, mide kaneri, lenfoma	52,50
<b>Seliciclib (R-roscovitine)</b>	CDK1,2,4,5,6,7,9	Faz II	Akciğer kanseri, lenfositik lösemi, meme kanseri, kolon kanseri,	53

			kolorektal kanseri	
<b>Dinaciclib (SCH 727965)</b>	CDK1,2,5,9	Faz III	Kronik lenfositik lösemi, solid tümörler	54
<b>AT7519</b>	CDK1,2,4,6,9	Faz II	Kolon kanseri, meme kanseri, non-hodgkin lenfoma	55,50
<b>Roniciclib (BAY 1000394)</b>	CDK1,2,3,4,5,6,7,9	Faz II	Rahim ağzı kanseri, akciğer kanseri, anaplastik tiroid kanseri	56, 57
<b>RGB-286638</b>	CDK1,2,3,5,9	Faz I	Hematolojik maligniteler, multipl miyelom	58,50

Pan-CDK inhibitörlerinin klinik kullanımındaki en büyük sorun, selektif olmayışları ve normal hücreler üzerinde toksisiteye sebep olmalarıdır. Bundan dolayı araştırmacılar CDK4/6, CDK12/13, CDK7, CDK9 gibi sadece belirli CDK'yi hedefleyen ajanlar geliştirmeyi hedeflemektedir. Her kanser tipi kendine özgü CDK ekspresyon profiline sahiptir. Bu nedenle hastalara uygun spesifik CDK inhibitörü seçimi, terapötik etkinliği artırmak ve toksik yan etkileri en aza indirmek için kritiktir. Günümüzde, çeşitli spesifik CDK inhibitörleri, prelinik ve klinik çalışmalarda kayda değer antitümör aktivite göstermiştir (50).

Hücrelerin, hücre döngüsünün S fazına girişinde CDK4 ve CDK6 kritik role sahiptir. Bu kinazların kanserle ilişkili çeşitli düzensizlik mekanizmalarının keşfi, onları inhibisyon için cazip hedefler olarak öne çıkarmıştır (51). Abemasiklib, palbosiklib, ribosiklib klinikte kullanılan spesifik CDK4/6 inhibitörleridir.

CDK4 ve CDK6'nın potent ve seçici inhibitörü olan abemasiklib Rb fosforilasyonunu önleyerek hücre döngüsünün G<sub>1</sub> fazından S fazına ilerlemesini inhibe eder ve böylece tümör büyümesinin baskılanmasını sağlar. Abemasiklib endokrin tedavi ile kombine bir şekilde, hormon reseptörü (HR) pozitif, insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) negatif olan, yüksek nüks riski taşıyan erken evre meme kanseri hastaları için adjuvan tedavi olarak uygulanmaktadır. Palbosiklib meme kanserine letrozol veya fulvestrant ile kombine tedavi halinde kullanılmaktadır (51). Ribosiklib östrojen reseptörü pozitif, HER2 negatif metastatik meme kanserinde endikasyonu olan CDK4/6 inhibitörüdür.



## Kaynakça

- 1) Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Bretscher, A., Ploegh, H., Matsudaira, P. (2020). *Moleküler Hücre Biyolojisi*, Altıncı Baskıdan Çeviri. Çeviri Editörleri: Geçkil, H., Özmen, M., Yeşilada, Ö., *Palme Yayınevi*, 6, s.782-783, 847-849.
- 2) Hunt, T., Nasmyth, K., Novák, B. (2011). The cell cycle. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 366(1584), 3494-3497. doi:10.1098/rstb.2011.0274
- 3) Israels, E. D. ve Israels, L. G. (2000). The cell cycle. *The oncologist*, 5(6), 510-513. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.5-6-510>
- 4) Sun, Y., Liu, Y., Ma, X., Hu, H. (2021). The influence of cell cycle regulation on chemotherapy. *International journal of molecular sciences*, 22(13), 6923. <https://doi.org/10.3390/ijms22136923>
- 5) Williams, G. H. ve Stoeber, K. (2012). The cell cycle and cancer. *The Journal of pathology*, 226(2), 352-364. <https://doi.org/10.1002/path.3022>
- 6) McIntosh, J. R. (2016). Mitosis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 8(9), a023218. doi:10.1101/cshperspect.a023218
- 7) Evans, T., Rosenthal, E. T., Youngblom, J., Distel, D., Hunt, T. (1983). Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell*, 33(2), 389-396.
- 8) Sherr, C. J. (2000). The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer research*, 60(14), 3689-3695.
- 9) DiPippo, A. J., Patel, N. K., Barnett, C. M. (2016). Cyclin-dependent kinase inhibitors for the treatment of breast cancer: past, present, and future. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 36(6), 652-667. <https://doi.org/10.1002/phar.1756>
- 10) Johnson, D. G. ve Walker, C. L. (1999). Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 39(1), 295-312.
- 11) Diehl, F. F., Sapp, K. M., Vander Heiden, M. G. (2024). The bidirectional relationship between metabolism and cell cycle control. *Trends in Cell Biology*, 34(2), 136-149. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2023.05.012>

- 12) Bertoli, C., Skotheim, J. M., De Bruin, R. A. (2013). Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nature reviews Molecular cell biology*, 14(8), 518-528. doi:10.1038/nrm3629
- 13) Liu, J., Peng, Y., Wei, W. (2022). Cell cycle on the crossroad of tumorigenesis and cancer therapy. *Trends in cell biology*, 32(1), 30-44. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2021.07.001>
- 14) Whittaker, S. R., Mallinger, A., Workman, P., Clarke, P. A. (2017). Inhibitors of cyclin-dependent kinases as cancer therapeutics. *Pharmacology & therapeutics*, 173, 83-105. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.02.008>
- 15) Otto, T. ve Sicinski, P. (2017). Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 17(2), 93-115. doi:10.1038/nrc.2016.138
- 16) Matthews, H. K., Bertoli, C., de Bruin, R. A. (2022). Cell cycle control in cancer. *Nature reviews Molecular cell biology*, 23(1), 74-88. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00404-3>
- 17) Lapenna, S., ve Giordano, A. (2009). Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *Nature reviews Drug discovery*, 8(7), 547-566. doi:10.1038/nrd2907
- 18) Barr, A. R. ve Gergely, F. (2007). Aurora-A: the maker and breaker of spindle poles. *Journal of cell science*, 120(17), 2987-2996. doi:10.1242/jcs.013136
- 19) Archambault, V. ve Glover, D. M. (2009). Polo-like kinases: conservation and divergence in their functions and regulation. *Nature reviews Molecular cell biology*, 10(4), 265-275. doi:10.1038/nrm2653
- 20) Malumbres, M. ve Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature reviews cancer*, 9(3), 153-166. doi:10.1038/nrc2602
- 21) Quereda, V., Porlan, E., Canãmero, M., Dubus, P., Malumbres, M. (2016). An essential role for Ink4 and Cip/Kip cell-cycle inhibitors in preventing replicative stress. *Cell Death & Differentiation*, 23(3), 430-441. doi:10.1038/cdd.2015.112
- 22) Besson, A., Dowdy, S. F., Roberts, J. M. (2008). CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Developmental cell*, 14(2), 159-169. doi: 10.1016/j.devcel.2008.01.013

- 23) Karimian, A., Ahmadi, Y., Yousefi, B. (2016). Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. *DNA repair*, 42, 63-71. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2016.04.008>
- 24) Mansilla, S. F., De La Vega, M. B., Calzetta, N. L., Siri, S. O., Gottifredi, V. (2020). CDK-independent and PCNA-dependent functions of p21 in DNA replication. *Genes*, 11(6), 593. doi:10.3390/genes11060593
- 25) Abbas, T. ve Dutta, A. (2009). p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nature Reviews Cancer*, 9(6), 400-414. doi:10.1038/nrc2657
- 26) El-Deiry, W. S., Harper, J. W., O'Connor, P. M., Velculescu, V. E., Canman, C. E., Jackman, J., ... & Vogelstein, B. (1994). WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer research*, 54(5), 1169-1174.
- 27) Engeland, K. (2022). Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling. *Cell Death & Differentiation*, 29(5), 946-960. <https://doi.org/10.1038/s41418-022-00988-z>
- 28) Roninson, I. B. (2002). Oncogenic functions of tumour suppressor p21Waf1/Cip1/Sdi1: association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts. *Cancer letters*, 179(1), 1-14. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(01\)00847-3](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(01)00847-3)
- 29) Razavipour, S. F., Harikumar, K. B., Slingerland, J. M. (2020). p27 as a transcriptional regulator: new roles in development and cancer. *Cancer research*, 80(17), 3451-3458. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-3663>
- 30) Bencivenga, D., Stampone, E., Roberti, D., Della Ragione, F., Borriello, A. (2021). p27Kip1, an intrinsically unstructured protein with scaffold properties. *Cells*, 10(9), 2254. <https://doi.org/10.3390/cells10092254>
- 31) Weinberg, J., Whitcomb, E., Bohm, A., Chekilla, U. K., Taylor, A. (2024). The E3 ligase SMURF1 stabilizes p27 via UbcH7 catalyzed K29-linked ubiquitin chains to promote cell migration SMURF1-UbcH7 K29 ubiquitination of p27 and cell migration. *Journal of Biological Chemistry*, 300(3). <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2024.105693>

- 32) Borriello, A., Caldarelli, I., Bencivenga, D., Criscuolo, M., Cucciolla, V., Tramontano, A., ... & Della Ragione, F. (2011). p57Kip2 and cancer: time for a critical appraisal. *Molecular Cancer Research*, 9(10), 1269-1284. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-11-0220
- 33) Guo, H., Tian, T., Nan, K., Wang, W. (2010). p57: A multifunctional protein in cancer. *International journal of oncology*, 36(6), 1321-1329. doi: 10.3892/ijo\_00000617
- 34) Kavanagh, E. ve Joseph, B. (2011). The hallmarks of CDKN1C (p57, KIP2) in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1816(1), 50-56. doi: 10.1016/j.bbcan.2011.03.002
- 35) Kamura, T., Hara, T., Kotoshiba, S., Yada, M., Ishida, N., Imaki, H., ... & Nakayama, K. I. (2003). Degradation of p57 Kip2 mediated by SCF<sup>Skp2</sup>-dependent ubiquitylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(18), 10231-10236. <https://doi.org/10.1073/pnas.1831009100>
- 36) Starostina, N. G. ve Kipreos, E. T. (2012). Multiple degradation pathways regulate versatile CIP/KIP CDK inhibitors. *Trends in cell biology*, 22(1), 33-41. doi: 10.1016/j.tcb.2011.10.004
- 37) Kim, W. Y. ve Sharpless, N. E. (2006). The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell*, 127(2), 265-275. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.003>
- 38) Zhu, S., Cao, J., Sun, H., Liu, K., Li, Y., Zhao, T. (2016). p18 inhibits reprogramming through inactivation of Cdk4/6. *Scientific Reports*, 6(1), 31085. doi: 10.1038/srep31085
- 39) Han, X., Kuang, Y., Chen, H., Liu, T., Zhang, J., Liu, J. (2020). p19INK4d: more than just a cyclin-dependent kinase inhibitor. *Current Drug Targets*, 21(1), 96-102. doi: 10.2174/1389450120666190809161901
- 40) Rocco, J. W. ve Sidransky, D. (2001). p16 (MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. *Experimental cell research*, 264(1), 42-55. doi: 10.1006/excr.2000.5149

- 41) Rayess, H., Wang, M. B., Srivatsan, E. S. (2012). Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *International journal of cancer*, 130(8), 1715-1725.  
<https://doi.org/10.1002/ijc.27316>
- 42) Matheson, C. J., Backos, D. S., Reigan, P. (2016). Targeting WEE1 kinase in cancer. *Trends in pharmacological sciences*, 37(10), 872-881.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2016.06.006>
- 43) Lewis, C. W., Jin, Z., Macdonald, D., Wei, W., Qian, X. J., Choi, W. S., ... & Chan, G. (2017). Prolonged mitotic arrest induced by Wee1 inhibition sensitizes breast cancer cells to paclitaxel. *Oncotarget*, 8(43), 73705.  
doi: 10.18632/oncotarget.17848
- 44) Vakili-Samiani, S., Jalil, A. T., Abdelbasset, W. K., Yumashev, A. V., Karpishev, V., Jalali, P., ... & Jadidi-Niaragh, F. (2021). Targeting Wee1 kinase as a therapeutic approach in Hematological Malignancies. *DNA repair*, 107, 103203.  
<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2021.103203>
- 45) De Witt Hamer, P. C., Mir, S. E., Noske, D., Van Noorden, C. J., & Würdinger, T. (2011). WEE1 kinase targeting combined with DNA-damaging cancer therapy catalyzes mitotic catastrophe. *Clinical cancer research*, 17(13), 4200-4207.  
doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2537
- 46) Asghar, U., Witkiewicz, A. K., Turner, N. C., Knudsen, E. S. (2015). The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. *Nature reviews Drug discovery*, 14(2), 130-146. doi: 10.1038/nrd4504
- 47) Ortega, S., Malumbres, M., Barbacid, M. (2002). Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1602(1), 73-87.  
[https://doi.org/10.1016/S0304-419X\(02\)00037-9](https://doi.org/10.1016/S0304-419X(02)00037-9)
- 48) Aaltonen, K., Amini, R. M., Heikkilä, P., Aittomäki, K., Tamminen, A., Nevanlinna, H., Blomqvist, C. (2009). High cyclin B1 expression is associated with poor survival in breast cancer. *British journal of cancer*, 100(7), 1055-1060.  
doi: 10.1038/sj.bjc.6604874

- 49) Wang, Q., Bode, A. M., Zhang, T. (2023). Targeting CDK1 in cancer: mechanisms and implications. *NPJ precision oncology*, 7(1), 58. <https://doi.org/10.1038/s41698-023-00407-7>
- 50) Zhang, M., Zhang, L., Hei, R., Li, X., Cai, H., Wu, X., ... Cai, C. (2021). CDK inhibitors in cancer therapy, an overview of recent development. *American journal of cancer research*, 11(5), 1913.
- 51) Heptinstall, A. B., Adiyasa, I. W. S., Cano, C., & Hardcastle, I. R. (2018). Recent advances in CDK inhibitors for cancer therapy. *Future Medicinal Chemistry*, 10(11), 1369-1388. <https://doi.org/10.4155/fmc-2017-0246>
- 52) Wiernik, P. H. (2016). Alvocidib (flavopiridol) for the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Expert opinion on investigational drugs*, 25(6), 729-734. <http://dx.doi.org/10.1517/13543784.2016.1169273>
- 53) Khalil, H. S., Mitev, V., Vlaykova, T., Cavicchi, L., Zhelev, N. (2015). Discovery and development of Seliciclib. How systems biology approaches can lead to better drug performance. *Journal of biotechnology*, 202, 40-49. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.02.032>
- 54) Kumar, S. K., LaPlant, B., Chng, W. J., Zonder, J., Callander, N., Fonseca, R., ... & Stewart, A. K. (2015). Dinaciclib, a novel CDK inhibitor, demonstrates encouraging single-agent activity in patients with relapsed multiple myeloma. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 125(3), 443-448. doi: 10.1182/blood-2014-05-573741.
- 55) Squires, M. S., Feltell, R. E., Wallis, N. G., Lewis, E. J., Smith, D. M., Cross, D. M., ... & Thompson, N. T. (2009). Biological characterization of AT7519, a small-molecule inhibitor of cyclin-dependent kinases, in human tumor cell lines. *Molecular cancer therapeutics*, 8(2), 324-332. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0890
- 56) Ayaz, P., Andres, D., Kwiatkowski, D. A., Kolbe, C. C., Lienau, P., Siemeister, G., ... & Stegmann, C. M. (2016). Conformational adaption may explain the slow dissociation kinetics of roniciclib (BAY 1000394), a type I CDK inhibitor with kinetic selectivity for CDK2 and CDK9. *ACS chemical biology*, 11(6), 1710-1719. doi: 10.1021/acscchembio.6b00074

- 57) Lin, S. F., Lin, J. D., Hsueh, C., Chou, T. C., & Wong, R. J. (2017). Effects of roniciclib in preclinical models of anaplastic thyroid cancer. *Oncotarget*, 8(40), 67990. doi: 10.18632/oncotarget.19092
- 58) Cirstea, D., Hideshima, T., Santo, L., Eda, H., Mishima, Y., Nemani, N., ... & Raje, N. (2013). Small-molecule multi-targeted kinase inhibitor RGB-286638 triggers P53-dependent and-independent anti-multiple myeloma activity through inhibition of transcriptional CDKs. *Leukemia*, 27(12), 2366-2375. doi:10.1038/leu.2013.194

## BÖLÜM 8

### MELANOMADA ÖSTROJEN VE ÖSTROJEN RESEPTÖRLERİNİN ROLÜ

Ecz. Bahar ERBAY<sup>1</sup>

Doç. Dr. Senem AKKOÇ<sup>2,3</sup>

---

<sup>1</sup>Süleyman Demirel Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Isparta, Türkiye.  
baharerbay@anadolu.edu.tr, Orcid ID: 0009-0007-5696-9311,

<sup>2</sup>Süleyman Demirel Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bilimleri  
Bölümü, Isparta, Türkiye. senemakkoc@sdu.edu.tr, Orcid ID: 0000-0002-1260-9425,

<sup>3</sup>Bahçeşehir Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, İstanbul, Türkiye.  
senem.akkoc@bau.edu.tr, Orcid ID: 0000-0002-1260-9425





## GİRİŞ

Yumurtalıklar, testisler ve adrenal korteks tarafından üretilen östrojen yağda çözünen bir steroid hormon olmakla beraber vücutta önemli fizyolojik görevler üstlenmektedir. Östrojenler temelde bitkilerde fitoöstrojenler (genistein, kumesterol vb.) de dahil olmakla birlikte hayvanların hücre ve bezlerinden salgılanan endojen östrojenler ile yiyecek ve ilaçlardan sentetik olarak elde edilen eksojen östrojenler olarak ikiye ayrılırlar (1).

İnsanlarda estron (E1), 17  $\beta$ -estra-diol (E2), estriol (E3) ve estetrol (E4) olmak üzere dört adet östrojen tanımlanmıştır. Tüm östrojen türevleri vücutta benzer fizyolojik işlevler üstlenmekte olup 18 karbon atomundan oluşmaktadırlar. E1 ve E2 yumurtalıklar tarafından üretilirken E3 ve E4 sırasıyla plasenta ve fetüs karaciğeri tarafından çoğunlukla hamilelik döneminde üretilmektedir. Östrojen reseptörü- $\alpha$  (ER $\alpha$ ) ve östrojen reseptörü- $\beta$  (ER $\beta$ ) sırasıyla 6. ve 14. kromozomlar üzerindeki *esr1* ve *esr2* genleri tarafından kodlanmaktadırlar. Östrojen terimi yaygın olarak doku, organlarda yerleşimi ve önemli fizyolojik görevleri nedeniyle E2'yi ifade etmektedir. İkincil kadın cinsiyet faktörlerinin geliştirilmesi, menstrual siklusun düzenlenmesi, menarştan menopoza kadar endometriyumun olgunlaşması E2'nin görevleri arasında yer almaktadır. Bununla beraber E2, E1'den farklı olarak ER $\alpha$  ve ER $\beta$  için yüksek afinitelidir (2).

Başlıca eksojen östrojenler, endokrin bozukluklarında ER için hedeflendirilmiş seçici östrojen reseptör modülatörlerini (SERMs) (dietilstilbestrol ve raloksifen), endüstriyel ve tarımsal aktiviteler sonucunda ortaya çıkan çevresel kirlilikleri (polisiklik aromatik hidrokarbonlar vb.) ve canlı organizmaların metabolize edip çevreye salgıladıkları östrojenleri kapsamaktadırlar (3,4).

## ER'lerin ekspresyonu ve sinyal yolları

ER $\alpha$ , ER $\beta$  ve G-proteinine bağılı östrojen reseptör 1 (GPER1) üç baskın östrojen reseptörü olarak tanımlanmaktadır. ER $\alpha$ 'nın başlıca eksprese edildiği yerler arasında rahim ve yumurtalık gibi üreme organları, kemik yağ dokusu, karaciğer, böbrek ve meme dokusu yer almaktadır. ER $\beta$  ise erkek üreme organları, merkezi sinir sistemi, akciğer, bağışıklık sistemi, kardiyovasküler sistem ve kolonda eksprese edilmektedir (5). GPER1 farklı olarak yaygın bir dağılım göstererek iskelet kası, nöronlar, vasküler endotelyum ve ek olarak meme, yumurtalık ve akciğer kanseri dokularında eksprese edildiği bildirilmektedir (6).

Östrojenlerin hücre içinde ER'lere bağlanmasıyla östrojen-reseptör dimer kompleksi meydana gelir ve hücre içinde genomik veya genomik olmayan olaylar zincirini başlatılmış olur. Östrojen yanıt elemanları (ERE) veya aktivatör protein-1 (Ap1) östrojen kompleksine bağlandıktan sonra gen transkripsiyonunun düzenlenmesinden sorumlu transkripsiyon faktörü olarak görev almaktadırlar (7). Böylelikle östrojenik yapılar hücre içinde otofaji, apoptoz, farklılaşma gibi fonksiyonlar üzerinde etkinlik gösterirler. Bunlara ek olarak östrojenler (E2) hematopoetik kök hücrelerinin kendini yenilemesinde görev alarak bağışıklık tepkisini düzenlemektedir (8).

İnsan dokusunda *esr1* en fazla B hücrelerinde eksprese edilirken GPER1 de T hücresi, B hücresi, makrofaj, nötrofil gibi immün sistem hücrelerinde eksprese edilmektedir. Bu veriler kapsamında östrojen hormonu ER'lerin konsantrasyonları derecesinde immün yanıtları indükleyebileceği anlamına gelmektedir (9).

## Hastalıklarda Östrojen ve ER'lerin rolü

### Meme kanserinde ER'ler

Meme kanseri dünya çapında cinsiyet seçilimli bir kanser türü olması nedeniyle kadınları etkileyen kanserler arasında ilk sıralarda yer almaktadır. Meme kanseri ER, progesteron reseptör ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) ekspresyon durumlarına göre luminal A/B (ER+, PR+, HER2-), HER2 pozitif (ER-, PR-, HER2+) ve üçlü negatif (ER-, PR-, HER2-) olmak üzere üç alt tipe ayrılmaktadır. Meme kanserleri %80'e varan oranlarda luminal veya ER pozitifdir. ER'lerin meme kanserinde hücrelerin canlılığını koruması, çoğalması ve tümör gelişimi vb. birçok süreçte yer almasından dolayı anti-östrojenik tedaviler luminal gibi ER pozitif meme kanseri alt tiplerinde altın standart olarak kabul görmektedir (1).

Sağlıklı dokularda %10 civarı eksprese edilen ER $\alpha$ , meme kanseri dokularında % 50-80 oranlarında eksprese edilmektedir (10). Bununla beraber vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), insülin benzeri büyüme faktörü 1 reseptörü (IGF1R), siklin D1, anti-apoptotik BCL-2 proteini gibi tümör hücre büyümesini sağlayan genlerin transkripsiyonunda rol üstlenen ER $\alpha$ 'nın meme kanseri gelişimine katkı sunduğu bilinmektedir (11).

Meme kanserinde birinci basamak tedavilerden olan tamoksifen, ER $\alpha$  aracılı transkripsiyonel regülasyonu baskılayarak anti-hormonal tedavi sağlamaktadır. Anti-östrojenik etki sonucu kalp damar ve iskelet sistemi üzerinde ciddi yan etkilere sahip olması, tedavi sonucunda nükslerin görülmesi ve direnç gelişimi tamoksifenin olumsuz etkileri arasında yer almaktadır (12). Tamoksifenden daha az yan etki profiline sahip raloksifen ve ek olarak toremifen, fulvestrant, anastrozol, letrozol da ER $\alpha$  antagonist etkili meme kanserinde onaylı ilaçlar arasında bulunmaktadır (5).

Günümüzde ER $\beta$ 'nin meme kanserinde üstlendiği rol halen tartışma konusu olmakla beraber meme kanseri esnasında ER $\beta$  düzeylerinin %80'lere varan oranlarda azaldığı bilgisi mevcuttur (10). *İn-vitro* olarak gerçekleştirilmiş çalışmalarda ER $\beta$ 'nin meme kanserindeki rolü ER $\beta$ 'nin yeniden ekspresyonunun hücrelerin proliferasyonunu baskılayıp hücre apoptik sistemlerini uyardığı ve tümör hücrelerini kemoterapötik ajanlara duyarlaştırması ile ilişkilendirilmiştir (13).

Yüzde altmış meme kanseri dokusunda saptanan GPER1 düzeylerindeki azalma tümörlü dokuya sahip meme kanseri hastalarında sağ kalım oranlarını düşürmekte olup meme kanserine karşı olumlu bir aktivite sağladığı tahmin edilmektedir (1).

### **Endometriozis ve yumurtalık kanserinde ER'ler**

Yumurtalık kadınlarda birincil östrojen ve progesteron kaynağıdır ve ER'ler endometriozis ve yumurtalık kanserini gelişmesini desteklemektedir (1). Yumurtalık kanserine benzer bir fenotip sergileyen endometriozis rahim haricindeki endometriyal benzeri dokularda gelişen lezyonlar ile karakterizedir. Üreme çağındaki kadınların %10'a yakın kısmında görülen iyi huylu ve sık rastlanan jinekolojik bir hastalıktır. Çoğunlukla pelvik ağrısıyla karakterize olup dismenore, doğurganlık sorunları hastalığın semptomları arasında yer almaktadır (14).

17 $\beta$ -Estradiol, endometriyal dokuların büyümesinde rol oynamasına ek olarak iltihaplanma ve ağrı patogeneğinde anahtar bir hormon olarak görev almaktadır. Estradiol dolaşım yoluyla endometriyazise ulaşmasının yanı sıra lokal üretim yeri endometriozistir. Böylece ER'ler östrojen tarafından tutunmuş olup endometriyatik lezyon gelişimi sağlanır. Bu sentez estradiol biyosentezi ve inaktivasyonunda görev alan enzimlerin aktivitelerini değiştirmektedir (15). Endometriyatik dokularda yüksek ekspresyon gösteren sitokrom P450 süper ailesinden (CYP19A1) aromataz ve steroidojenik akut düzenleyici

protein (StAR) östrojenin biyosentezinde önemlidir. StAR sitozoldeki kolesterolün mitokondriye girişini kolaylaştırarak ilk basamakta görev alırken aromataz androjenlerin östrojenlere dönüşüm basamağında yer almaktadır (16).

Normal endometriyum dokusu ana östrojen reseptörü olan ER $\alpha$  ekspresyonu ER $\beta$ 'ya kıyasla yüksek seyretmektedir (17). Kronik pelvik inflamasyonu endometriyozisin en belirgin patogenetik özelliklerindedir. Bu durumda endometriyumda östrojen üretimi ve inflamasyon pozitif geri besleme döngüsü olan aromataz ve siklooksijenaz (COX<sub>2</sub>'nin) kronik sürekli aşırı ekspresyonuyla desteklenmektedir. E<sub>2</sub> ve ER $\beta$ , COX ve prostaglandin (PGE<sub>2</sub>) ekspresyonunu arttırırken PGE<sub>2</sub> de östrodiol sentezini uyarmaktadır (19).

Endometriyozis tedavisi ağrının kontrolü, hastalığın tekrar nüksünün önlenmesi, doğurganlık faaliyetlerinin sürdürülmesi ve girişimsel müdahalenin azaltılmasını hedeflemektedir. Östrojen endometriyal inflamasyonun önemli tetikleyicisi olduğundan yumurtalık estradiolünü inhibe eden kontraseptif steroidler, GnRH agonistleri, progestinler ve aromataz inhibitörler semptomatik endometriyozis tedavisinde kullanılmaktadır (15).

Yumurtalık kanseri 2020 yılında 20 binden fazla kadının ölümüne neden olması sebebiyle jinekolojik onkoloji alanının en çok ilgilendiği konular arasında yer almaktadır. Tüm kanserlerde olduğu gibi erken tanı mortaliteyi önemli ölçüde azaltmaktadır. Yumurtalık kanseri kökenlerine göre başta epitelyal olmak üzere stromal ve germ hücreleri baz alınarak sınıflandırılabilir (20). Yumurtalık kanserinin ileri aşamalarında ER $\alpha$  ekspresyonları artarken, ER $\beta$  ekspresyonları azaldığı görülmektedir. Yumurtalık kanserinde GPER1 aktivitesi tartışmalı olsa da potansiyel yumurtalık tümörlerini teşvik edici role sahip olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (21).

## **Prostat kanserinde ER'lerin rolü**

Prostat kanseri batı ülkelerinde çoğunlukla 45-60 yaş civarındaki erkeklerde kansere bağlı ölümler arasında ilk sırada yer almaktadır. Melanomun gelişmesinde yer alan başlıca risk faktörleri arasında genetik faktörler, yaş, obezite vb. yer almaktadır. Hastalığın tanısı prostat spesifik antijen testi (PSA), dijital rektal muayene, manyetik rezonans görüntüleme (MRI) aracılığıyla sağlanmaktadır. Mevcut tedaviler arasında kemoterapi, hormonal tedavi, cerrahi ve kriyoterapidir (22).

Prostat kanseri steroid hormonları tarafından yönlendirilmesi nedeniyle hormon bağımlı olarak kabul edilmektedir. Östrojen prostat doku büyümesi, farklılaşması ve hemeostazında görev alır ve cinsiyet hormonlarının salgılanmasında önem arz eder. Dokudaki östrojenleri kullanmak için steroid sülfataz (STS) katalizasyon mekanizmalar bulunduran prostat dokusu aromataz ve 3 $\beta$ - ve 17 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrojenaz gibi lokal östrojen sentezinde gerekli olan enzimleri eksprese etme özelliğine sahiptir. Malign prostat dokusunda normal prostat dokusuna kıyasla bu enzim ekspresyonunun artışı tümör ilerlemesinde östrojenlerin önemini vurgulamaktadır (23). ER $\alpha$  prostatik stroma ile sınırlı ve epitel hücreleri üzerinde sınırlı bir etkinlik göstermektedir. ER $\beta$  ise epitel alan içinde eksprese edilmekte olup epitel proliferasyonu ve farklılaşmaya katkı sağladığı bilinmektedir. Prostat kanserinde onkojenik bir role sahip olan ER $\alpha$  östrojenin enflamasyon, proliferasyon ve prostat karsinojenini içeren zararlı etkilerini yönlendirmektedir. Ayrıca ER $\alpha$  prostat kanser hastalarında yüksek Gleason skoru ve kötü sağ kalım ile yakından ilişkili bulunmuştur. Tam tersi ER $\beta$ 'nin ise prostat kanserinde koruyucu ve anti-apoptotik etkileri düzenlediği bilinmektedir (24). Prostat epiteli üzerinde ER $\beta$  aracılı doğrudan etki gösteren E2 ER $\beta$ 'nin androjen reseptörü (AR) sinyalini, indüklenebilir nitrik oksit sentazı (NOS), antioksidan glutatyon peroksidaz 3 genini, interlökin (IL)-6'yı azaltarak AR sinyalini,

inflamasyonu ve hücre proliferasyonunu inhibe ettiği bildirilmektedir (25).

GPER1 ekspresyonu ve sinyalizasyonunun prostat kanserindeki işlevi belirsiz olsa da mevcut veriler ışığında meme ve endometriyozis kanserlerindeki teşvik edici işlevinin yanı sıra normal ve malign mesane ürotelyal hücrelerinin büyümesini inhibe etmektedir (26). Ayrıca GPER1 aktivasyonunun baskılanması prostat kanser hücrelerinin büyümesini indüklediği sonucu mevcuttur. Böylelikle GPER1 prostat kanserine karşı koruyucu işlevsellik göstermektedir (26).

### **Kemikteki ER'lerin Rolü**

Östrojen kemik matrisinin sentezlenmesinde ve parçalanmasında rol alan osteoblast ve osteoklastların aktivitelerini düzenleyerek kemik mineral yoğunluğunu koruyan önemli bir hormondur. E2 T hücrelerinde pro-osteoklastik sitokinleri inhibe ederken osteoblastlarda anti-apoptik aktiviteyi artırır ve böylece kemiğin yeniden şekillenmesi aşamasında kemik kütlelerini korumuş olur. Post-menapozal dönemdeki kadınlarda kırık riskinin artması bu dönemde östrojen seviyelerinin azalması ile ilişkilidir (27).

ER $\alpha$  ve ER $\beta$  osteoblast, osteoklast ve osteositlerde yüksek oranda eksprese edilmektedir. Bununla beraber kemik hücre regülasyonunda görev alan bağışıklık hücrelerinde de eksprese edildiği bilinmektedir. ER $\alpha$  kortikal kemikte, ER $\beta$  ise trabeküler kemikte önem arz etmektedir (28).

### **Akciğer Kanserinde ER'lerin rolü**

Akciğer kanseri tüm kanser türleri arasında 2018 yılı verilerine göre 2,1 milyon yeni vaka ve 1,8 milyon mortaliteyle hem insidans hem de ölüm oranları arasında ilk sıralarda yerini korumaya devam etmektedir. Bu oran tüm kansere bağılı ölümlerin yaklaşık 5'te 1'inin akciğer kanseri sebebiyle gerçekleştiği anlamına gelmektedir (29).



Akciğer kanseri genel olarak boyut ve görünüm açısından küçük hücreli akciğer karsinomu (KHAK) ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (KHDAK) olarak iki ana gruba ayrılmaktadır. Akciğer kanserinin tüm histolojik alt tiplerini ilişkilendirildiği tütün kullanımı akciğer kanserinin oluşumunda başlıca risk faktörüdür (30). Kadınlarda tütün kullanımından bağımsız olarak akciğer kanseri görülme oranları erkeklere göre daha fazladır. Bununla beraber kadınların sigaranın olumsuz etkilerine karşı gösterdikleri fazla duyarlılıkta östrojen aracılı tepkiler olduğu düşünülmektedir (31). Bunu destekleyen bir diğer durum ise post-menopozal dönemdeki akciğer karsinomuna sahip kadınların erkek meslektaşlarına kıyasla kayda değer şekilde fazla sağ kalım oranlarına sahip olmalarıdır (32).

ER $\alpha$  esas olarak akciğer karsinom hücrelerinin stoplazmasında konumlanır ve kötü sağ kalım oranları ile ilişkilendirilmektedir (33). ER $\beta$  ise sağlıklı akciğer pnömositlerinde ve bronşiyal epitel hücrelerinde yüksek oranlarda ekprese edilmekte olup hücre dışı matrisini korumak için gereklidir (32). GPER1 ekspresyonu akciğer kanseri hücrelerinin sitoplazmalarında arttığı görülmüştür (33).

### **Melanomda Doğal ERB Ligandları**

Östrojen reseptörlerine bağlanarak östrojen gibi davranan, bitkilerde sentezlenen fitoöstrojenler östrojen reseptörü alt tip agonistleri olarak bilinmektedirler (34). Aynı östrojen gibi kalp hastalıkları, osteoporoz, postmenopozal sendromun önlenmesi ve tedavisinde yer almaktadırlar. Bununla beraber farklı biyokimyasal yollar aracılığıyla antiproliferatif özellik göstererek kanserler üzerinde antitümoral aktiviteleri bulunmuştur (35). Bu etki esasen ER ekspresyonuna, etkinliğine ve tümör hücrelerinin hormon ortamına göre şekillenmektedir. Östrojenlerde olduğu gibi genomik ve genomik olmayan mekanizmalar fitoöstrojenlerin etkilerinde rol almaktadırlar. Böylece epigenetik etkiler, antioksidan mekanizmalar, kromatin bağlanma yollarındaki etkiler östrojen aktivitesinde epigenetiğin

etkisini düşündürmektedir. Polifenolik yapıdaki daidzein ve genistein izoflavonları Asya diyetinin temel taşı olan soya fasulyesinde bulunmaktadır. Yapılan epidemiyolojik çalışmalara göre Asya ülkelerinde belirli malignitelere insidans düşüklüğünde Asya diyeti önemli bir etmendir (36). Yapılan çalışmada genistein insan melanom hücrelerinin (M14) gelişimini baskıladığı ve ultraviyole ışını kaynaklı DNA ve lipit membran hasarını inhibe ettiği bulunmuştur (37).

### **Melanomda ER'lerin rolü**

Bazal hücreli karsinom, skuamöz hücreli karsinom ve melanom olmak üzere üç ana cilt kanseri bulunmaktadır. Deri kanserine bağlı olan ölümlerin yaklaşık % 80'inde sorumlu olan melanom deri kanserleri arasında % 4'lük dilime sahiptir ve genç nüfusta yüksek insidans göstermektedir. Melanom en fazla mutasyon geçiren tümörlerden biridir. Mitojenle aktive olmuş protein kinaz (MAPK) ve Fosfoinositol-3-kinaz (PI3K) yollarında konumlanan genler somatik mutasyonlarla ilişkilendirilmektedir. Yapılan epidemiyolojik çalışmalar sonucunda ultraviyole-B (UVB) melanomda ana risk faktörü olarak yer almaktadır (38). İnsidans oranı ırk ile ilişkili olan melanom beyaz popülasyonlarda yaklaşık on kat daha sık rastlanılmaktadır. Böylelikle fenotip en önemli risk faktörlerinden olup açık tenli, sarı- kıvıllı saçlı, mavi gözlü ve çilli bireyler cilt kanserlerinde yüksek risk taşımaktadırlar (36).

### **Deride cinsiyete bağlı fizyolojik farklılıklar**

Deri, enfeksiyon ajanlardan korunma, duyum, UV koruma, yara bölgesinin onarılması hususlarında fiziksel geçirgenlik bariyeri olarak görev alan hücre, doku ve matris elemanlarının entegre bir düzenlemesidir. Bu işlevlerin sağlıklı şekilde yürütülmesinde epidermis, dermis ve deri altı yağı görev almaktadır (41). Deri kalınlığı her yaşta erkeklerde kadınlara kıyasla daha fazla miktarda bulunmakta olup iki cinsten de 45 yaşından sonra cilt kalınlığı azalmaktadır. Menopoz ise kadınlarda cilt incelmesinde %10 azalma ile etkinlik göstermektedir.

Erkek ve kadınlarda farklı hormonal sistemler nedeniyle ana farklar ortaya çıkmaktadır. Örneğin östrojenlerin yara iyileşmesini hızlandırması, enflamatuvar bozuklukları iyileştirmesi, epidermal kalınlığı arttırması ve cildi foto yaşlanmaya karşı koruması ciltte cinsiyete bağlı farklılıkların temelini oluşturmaktadır (42). Melanom epidemiyolojisi incelenmesi sonucunda kişinin yaşamı boyunca melanom geliştirme olasılığı kadınlarda %1.72 iken erkeklerde %1.22 olarak bulunmuştur (43).

Kutanöz melanomun gelişiminde temel mekanizma cildin melanin üreten melanosit hücrelerinde gerçekleşen malign transformasyondur. Kahverengi melanin olarak adlandırılan Eumelanin cildi UV ışınlarından koruyan fotoprotektif bir pigmenttir. UV ışınlaraya yanıt olarak ciltte keratinosit ve melanositlerin yapısının korunmasını sağlayan faktörler salgılamakta ve genlerde bazı mutasyonlar meydana gelmektedir (40,36).

### **BRAF Mutasyonları**

Melanomların yaklaşık olarak yarısı bu mutasyona uğramıştır. BRAF mutasyonları proteinlerin düzenleyici alanı üzerindeki mutasyonları taklit ederek protein kinaz aktivitesini arttırmaktadır. Böylece MEK ve ERK aktivasyonu gerçekleşir bununla beraber siklin D1 sentezi ve hücre döngüsü inhibitörü olan P27'nin negatif regülasyonu hücre döngüsünde G1/S geçişini tetiklemektedir (44).

### **RAS Mutasyonları**

Melanomlarda tanımlanan ilk onkogen olmakla beraber G proteininin yapısal aktivasyonuna neden olur ve tümör hücrelerinin hem proliferatif hem de metastatik davranışlarını kontrol eder. Bu kontrol MAPK/ERK ve PI3K yollarının hiperaktivasyonu ile gerçekleşir (45).

## İleri melanom için güncel tedaviler

Erken evre melanomları (*in-situ* melanomlar) cerrahi girişimlerle çıkarılarak tedavi edilebilmektedir. Ancak agresif, geç evre melanom prognozları kötü seyretmektedir (44). Tedavide klasik olarak dakarbazin ve ön ilacı olan temozolamid gibi alkilleyici ajanlar FDA (food and drug organization) tarafından onaylıdır. Dakarbazin ve IL-2 veya IFN alfa-2b ile kombine tedaviler melanomda progresyonsuz sağ kalımı iyileştirmiş olup genel sağ kalım üzerinde etkisiz olduğu bilinmektedir. Son zamanlarda melanom tedavisine güncel yaklaşım olarak özellikle BRAF ve NRAS mutasyonu gösteren melanomlarda hedefe yönelik tedaviler geliştirilmiştir (36).

Cinsiyet melanomun tüm evrelerinde ilerlemesini etkilemektedir. Kadınlarda erkeklere oranla düşük melanom insidansı, düşük lenf nodu invazyonu ve viseral metastaz riski görülmektedir (48). Yapılan çalışmalarla ileri evre melanomlu kadın hastaların kombinasyon tedavisine erkek hastalara kıyasla daha iyi bir cevap sergilemesinde biyobelirteç olarak östrojenin rolü olduğu gösterilmiştir (49). Östrojen/ER sinyalizasyonu tümör mikroçevesini (TME) etkilemekte olup bazı tümörler için tedavi etkinliğinde rol oynamaktadır (50). Melanomda TME immün hücreleri ile tümör hücreleri arasında tedavilere yanıtı etkileyen karmaşık bir etkileşim bulunmaktadır (36). Yakın zamanda yapılan bir çalışma östrojen sinyal inhibisyonunun melanomda intratümöral makrofaj polarizasyonlarını etkileyerek tedavinin etkinliğini arttırdığını göstermiştir (46). Östrojen sinyali hem miyeloid türevli baskılayıcı hücrelerin mobilizasyonunu sağlaması hem de içsel immüno-supresif aktivitelerini artırarak deregüle miyelpoeze katkıda bulunmakla başka östrojene duyarsız tümör modellerinin ilerlemesini hızlandırır (47). ER $\beta$ 'nın melanomda baskın ER alt tipi olduğu ve metastatik potansiyel ve prognoz için biyobelirteç olabileceği bildirilmiştir. ER $\beta$  aktivasyonu PI3K/Akt yolağının inhibisyonu yoluyla

melanom gelişimini bozabilir ve metastatik süreçte koruyucu bir rol gösterir (36).

Yapılan bir çalışmayla 17- $\beta$ -estradiol inkübasyonu sayesinde insan metastatik melanom hücrelerinin büyümesi *in-vitro* olarak inhibe edildiği ve bununla beraber yapısal IL-8 ve mRNA sentezini azalttığı görülmüştür. Sonrasında IL-8 ile östrojen tarafından baskılanmış melanom hücresi büyümesi üzerindeki etki inhibe edilmiştir. Böylece östrojenin IL-8 ekspresyonunu baskılaması aracılığıyla melanom hücre büyümelerini inhibe ettiği anlaşılmaktadır (51).

## Kaynakça

- 1) Chen, P., Li, B., & Ou-Yang, L. (2022). Role of estrogen receptors in health and disease. *Frontiers in endocrinology*, 13, 839005. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.839005>.
- 2) Kumar RS, Goyal N. Estrogens as regulator of hematopoietic stem cell, immune cells and bone biology. *Life Sci* (2021) 269:119091. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119091.
- 3) Bolger R, Wiese TE, Ervin K, Nestich S, Checovich W. Rapid screening of environmental chemicals for estrogen receptor binding capacity. *Environ Health Perspect* (1998) 106(9):551–7. doi: 10.1289/ehp.98106551.
- 4) Shang Y. Molecular mechanisms of oestrogen and SERMs in endometrial carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* (2006) 6(5):360–8. doi: 10.1038/nrc1879
- 5) Jia M, Dahlman-Wright K, Gustafsson J. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* (2015) 29(4):557–68. doi: 10.1016/j.beem.2015.04.008.
- 6) Mizukami Y. *In vivo* functions of GPR30/GPER-1, a membrane receptor for estrogen: from discovery to functions *in vivo*. *Endocr J* (2010) 57(2):101–7. doi: 10.1507/endocrj.K09E-332.
- 7) Fuentes N, Silveyra P. Estrogen receptor signaling mechanisms. *Adv Protein Chem Struct Biol* (2019) 116:135–70. doi: 10.1016/bs.apcsb.2019.01.001.
- 8) Klein SL, Flanagan KL. Sex differences in immune responses. *Nat Rev Immunol* (2016) 16(10):626–38. doi: 10.1038/nri.2016.90.
- 9) Pelekanou V, Kampa M, Kiagiadaki F, Deli A, Theodoropoulos P, Agrogiannis G, et al. Estrogen anti-inflammatory activity on human monocytes is mediated through cross-talk between estrogen receptor ER $\alpha$ 36 and GPR30/GPER1. *J Leukoc Biol* (2016) 99(2):333–47. doi: 10.1189/jlb.3A0914-430RR.
- 10) Huang B, Omoto Y, Iwase H, Yamashita H, Toyama T, Coombes RC, et al. Differential expression of estrogen receptor  $\alpha$ ,  $\beta$ 1, and  $\beta$ 2 in lobular and ductal breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2014) 111(5):1933–8. doi: 10.1073/pnas.1323719111.

- 11) Anbalagan M, Rowan BG. Estrogen receptor alpha phosphorylation and its functional impact in human breast cancer. *Mol Cell Endocrinol* (2015) 418 Pt 3:264–72. doi: 10.1016/j.mce.2015.01.016.
- 12) Droog M, Beelen K, Linn S, Zwart W. Tamoxifen resistance: from bench to bedside. *Eur J Pharmacol* (2013) 717(1-3):47–57. doi: 10.1016/j.ejphar.2012.11.071.
- 13) Treeck O, Juhasz-Boess I, Latrich C, Horn F, Goerse R, Ortmann O, et al. Effects of exon-deleted estrogen receptor  $\beta$  transcript variants on growth, apoptosis and gene expression of human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* (2008) 110(3):507–20. doi: 10.1007/s10549-007-9749-7.
- 14) Chapron, C., Marcellin, L., Borghese, B. *et al.* Rethinking mechanisms, diagnosis and management of endometriosis. *Nat Rev Endocrinol* **15**, 666–682 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0245-z>.
- 15) Bulun S.E., Monsavais D., Pavone M.E., Dyson M., Xue Q., Attar E., Tokunaga H., Su E.J. Role of estrogen receptor-beta in endometriosis. *Semin. Reprod. Med.* 2012;30:39–45. doi: 10.1055/s-0031-1299596.
- 16) Mori T., Ito F., Koshiha A., Kataoka H., Takaoka O., Okimura H., Khan K.N., Kitawaki J. Local estrogen formation and its regulation in endometriosis. *Reprod. Med. Biol.* 2019;18:305–311. doi: 10.1002/rmb2.12285.
- 17) Enmark E., Pelto-Huikko M., Grandien K., Lagercrantz S., Lagercrantz J., Fried G., Nordenskjold M., Gustafsson J.A. İnsan östrojen reseptörü beta-gen yapısı, kromozomal lokalizasyon ve ekspresyon paterni. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1997; 82:4258–4265. doi: 10.1210/jcem.82.12.4470.
- 18) Bulun, S. E. (2009). Mechanisms of disease endometriosis. *New England Journal of Medicine*, 360(3), 268-279.
- 19) Chantalat, E., Valera, M. C., Vaysse, C., Noirrit, E., Rusidze, M., Weyl, A., Vergriete, K., Buscail, E., Lluel, P., Fontaine, C., Arnal, J. F., & Lenfant, F. (2020). Estrogen Receptors and Endometriosis. *International journal of molecular sciences*, 21(8), 2815. <https://doi.org/10.3390/ijms21082815>.

- 20) World Cancer Research Fund International Ovarian Cancer Statistics. [(accessed on 22 June 2024)]. Available online: <https://www.wcrf.org/cancer-trends/ovarian-cancer-statistics/>.
- 21) Fujiwara S., Terai Y., Kawaguchi H., Takai M., Yoo S., Tanaka Y., Tanaka T., Tsunetoh S., Sasaki H., Kanemura M., et al. GPR30, EGFR-Akt kaskadını düzenler ve yumurtalık kanseri olan hastalarda daha düşük sağkalımı öngörür. *J. Yumurtalık Arş.* 2012; 5:35. doi: 10.1186/1757-2215-5-35.
- 22) Sekhoacha, M., Riet, K., Motloug, P., Gumenku, L., Adegoke, A., & Mashele, S. (2022). Prostate Cancer Review: Genetics, Diagnosis, Treatment Options, and Alternative Approaches. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(17), 5730. <https://doi.org/10.3390/molecules27175730>
- 23) Rahman, H. P., Hofland, J., & Foster, P. A. (2016). In touch with your feminine side: how oestrogen metabolism impacts prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 23(6), R249-R266. Retrieved Jul 13, 2024, from <https://doi.org/10.1530/ERC-16-0118>
- 24) Di Zazzo, E., Galasso, G., Giovannelli, P., Di Donato, M., & Castoria, G. (2018). Estrogens and their receptors in prostate cancer: therapeutic implications. *Frontiers in oncology*, 8, 2.
- 25) Bonkhoff H. Estrogen receptor signaling in prostate cancer: Implications for carcinogenesis and tumor progression. *Prostate* (2018) 78(1):2–10. doi: 10.1002/pros.23446
- 26) Chan QK, Lam HM, Ng CF, Lee AY, Chan ES, Ng HK, et al. Activation of GPR30 inhibits the growth of prostate cancer cells through sustained activation of Erk1/2, c-jun/c-fos-dependent upregulation of p21, and induction of G(2) cell-cycle arrest. *Cell Death Differ* (2010) 17(9):1511–23. doi: 10.1038/cdd.2010.20.
- 27) Jilka RL, Hangoc G, Girasole G, Passeri G, Williams DC, Abrams JS, et al. Increased osteoclast development after estrogen loss: Mediation by interleukin-6. *Science* (1992) 257(5066):88–91. doi: 10.1126/science.1621100.
- 28) Bord S, Horner A, Beavan S, Compston J. Estrogen receptors alpha and beta are differentially expressed in developing human bone. *J Clin Endocrinol Metab* (2001) 86(5):2309–14. doi: 10.1210/jcem.86.5.7513.



- 29) Siegfried JM. Women and lung cancer: does oestrogen play a role? *Lancet Oncol* (2001) 2(8):506–13. doi: 10.1016/S1470-2045(01)00457-0.
- 30) Hsu LH, Liu KJ, Tsai MF, Wu CR, Feng AC, Chu NM, et al. Estrogen adversely affects the prognosis of patients with lung adenocarcinoma. *Cancer Sci* (2015) 106(1):51–9. doi: 10.1111/cas.12558.
- 31) He M, Yu W, Chang C, Miyamoto H, Liu X, Jiang K, et al. Estrogen receptor  $\alpha$  promotes lung cancer cell invasion *via* increase of and cross-talk with infiltrated macrophages through the CCL2/CCR2/MMP9 and CXCL12/CXCR4 signaling pathways. *Mol Oncol* (2020) 14(8):1779–99. doi: 10.1002/1878-0261.12701.
- 32) Brandenberger AW, Tee MK, Lee JY, Chao V, Jaffe RB. Tissue distribution of estrogen receptors alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNA in the midgestational human fetus. *J Clin Endocrinol Metab* (1997) 82(10):3509–12. doi: 10.1210/jcem.82.10.4400.
- 33) Jala VR, Radde BN, Haribabu B, Klinge CM. Enhanced expression of G-protein coupled estrogen receptor (GPER/GPR30) in lung cancer. *BMC Cancer* (2012) 12:624. doi: 10.1186/1471-2407-12-624.
- 34) Leitman, D. C., Paruthiyil, S., Vivar, O. I., Saunier, E. F., Herber, C. B., Cohen, I., Tagliaferri, M., & Speed, T. P. (2010). Regulation of specific target genes and biological responses by estrogen receptor subtype agonists. *Current opinion in pharmacology*, 10(6), 629–636. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2010.09.009>.
- 35) Christoforou P, Christopoulos PF, Koutsilieris M. The role of estrogen receptor  $\beta$  in prostate cancer. *Mol Med Camb Mass*. 2014; **20**: 427-434.
- 36) Marzagalli M, Casati L, Moretti RM, Montagnani Marelli M, Limonta P. Estrogen receptor  $\beta$  agonists differentially affect the growth of human melanoma cell lines. *PLoS One*. 2015; **10**:e0134396.
- 37) Russo A, Cardile V, Lombardo L, Vanella L, Acquaviva R. Genistin inhibits UV light-induced plasmid DNA damage and cell growth in human melanoma cells. *J Nutr Biochem*. 2006; **17**: 103-108.
- 38) Longvert, C., & Saiag, P. (2019). Actualités dans le mélanome cutané [Melanoma update]. *La Revue de medecine interne*, 40(3), 178–183. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2018.11.005>.
- 39) Marzagalli, M., Montagnani Marelli, M., Casati, L., Fontana, F., Moretti, R. M., & Limonta, P. (2016). Estrogen Receptor  $\beta$  in Melanoma: From

- Molecular Insights to Potential Clinical Utility. *Frontiers in endocrinology*, 7, 140. <https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00140>.
- 40) Zhang, T., Dutton-Regester, K., Brown, K. M., & Hayward, N. K. (2016). The genomic landscape of cutaneous melanoma. *Pigment cell & melanoma research*, 29(3), 266–283. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12459>.
- 41) Sandby-Møller, J., Poulsen, T., & Wulf, H. C. (2003). Epidermal thickness at different body sites: relationship to age, gender, pigmentation, blood content, skin type and smoking habits. *Acta dermato-venereologica*, 83(6), 410–413. <https://doi.org/10.1080/00015550310015419>.
- 42) Roh, M. R., Eliades, P., Gupta, S., Grant-Kels, J. M., & Tsao, H. (2017). Cutaneous melanoma in women. *International journal of women's dermatology*, 3(1 Suppl), S11–S15. <https://doi.org/10.1016/j.ijwd.2017.02.003>.
- 43) Tremblay, G. B., Tremblay, A., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Labrie, F., & Giguère, V. (1997). Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 11(3), 353–365. <https://doi.org/10.1210/mend.11.3.9902>.
- 44) Uzdensky, A. B., Demyanenko, S. V., & Bibov, M. Y. (2013). Signal transduction in human cutaneous melanoma and target drugs. *Current cancer drug targets*, 13(8), 843–866. <https://doi.org/10.2174/1568009611313080004>.
- 45) Funck-Brentano, E., Hélias-Rodzewicz, Z., Longvert, C., Mokhtari, K., Saiag, P., & Emile, J. F. (2016). Increase in NRAS mutant allele percentage during metastatic melanoma progression. *Experimental dermatology*, 25(6), 472–474. <https://doi.org/10.1111/exd.13001>.
- 46) Chakraborty B, Byemerwa J, Shepherd J, Haines CN, Baldi R, Gong W, et al.. Inhibition of estrogen signaling in myeloid cells increases tumor immunity in melanoma. *J Clin Invest* (2021) 131(23). doi: 10.1172/JCI151347.
- 47) Svoronos N, Perales-Puchalt A, Allegrezza MJ, Rutkowski MR, Payne KK, Tesone AJ, et al.. Tumor cell-independent estrogen signaling drives disease progression through mobilization of myeloid-derived suppressor

- cells. *Cancer Discovery* (2017) 7(1):72–85. doi: 10.1158/2159-8290.CD-16-0502.
- 48) Joosse A, de Vries E, Eckel R, Nijsten T, Eggermont AMM, Hölzel D, et al.. Gender differences in melanoma survival: female patients have a decreased risk of metastasis. *J Invest Dermatol* (2011) 131(3):719–26. doi: 10.1038/jid.2010.354 .
- 49) Jang SR, Nikita N, Banks J, Keith SW, Johnson JM, Wilson M, et al.. Association between sex and immune checkpoint inhibitor outcomes for patients with melanoma. *JAMA Netw Open* (2021) 4(12):e2136823. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2021.36823.
- 50) Wang T, Jin J, Qian C, Lou J, Lin J, Xu A, et al.. Estrogen/ER in anti-tumor immunity regulation to tumor cell and tumor microenvironment. *Cancer Cell Int* (2021) 21(1):295. doi: 10.1186/s12935-021-02003-w.
- 51) Kanda, N., & Watanabe, S. (2001). 17beta-estradiol, progesterone, and dihydrotestosterone suppress the growth of human melanoma by inhibiting interleukin-8 production. *The Journal of investigative dermatology*, 117(2), 274–283. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2001.01422.x>.

## **BÖLÜM 9**

### **KASPAZ 3 GEN EKSPRESYONU**

Doç. Dr. Funda KARABAĞ<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup>Uşak Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Uşak, Türkiye. Funda.karabag@usak.edu.tr, Orcid ID: 0000-0002-1565-3210



## GİRİŞ

Apoptozis (a-po-toe-sis) terimi başlangıçta morfolojik olarak farklı bir hücre ölümü biçimini açıklamak için kullanılmıştır. Apoptozis, gen düzenlemesi tarafından tetiklenen kendi kendine düzenlenen bir hücre ölümüdür (1). Genetik veya dış faktör kaynaklı apoptozise uğramayan hücrelerde kötü huylu tümörlerin gelişimi muhtemeldir (2). DNA hasarı DNA parçalanmasına yol açar ve bu parçalar apoptotik süreç için önemli olan genleri indükler. Kaspazlar (sistein-aspartik proteaz), inflamasyonu ve hücre ölümünü düzenleyen hücre düzenleyici ağlarda önemli rollere sahip bir endoproteaz aktiviteye sahip hücre içi proteinlerdir (3).

Apoptozis, apoptotik uyarılara bağlı olarak içsel ve dışsal olarak iki farklı yolla başlatılmaktadır. İntrinsik yol, hücre stresi, DNA kırılmaları, hücre döngüsünün bozulması veya hipoksinin varlığıyla aktive olur (4). The essentials of developmental apoptosis. Bu uyarılar, mitokondrinin geçirgenleştirilmiş zarından sitokrom C (CytC) dahil olmak üzere proapoptotik faktörleri serbest bırakır. CytC, kaspaz-9'u hedef alan ve onu aktive eden apoptoz oluşturmak için apoptotik proteaz aktive edici faktör 1'e (Apaf-1) bağlanır. Kaspaz-9, kaspaz-3 dahil olmak üzere efektör kaspazları aktive eder. Memeli hücrelerinde apoptotik ölümün nihai uygulayıcısı olan kaspaz-3, çeşitli temel yapısal ve işlevsel proteinleri doğrudan kesebilen önemli bir proteazdır (5).

### Hücre Ölüm Mekanizmaları

Hücre ölümü fizyolojik ve patolojik olarak iki tür ölüm mekanizması vardır. Bunlar nekroz ve apoptoz olarak ayrılır. Hücre, dış koşullara maruz kaldığında, membran bütünlüğünü bozulmasından dolayı sitoplazmik içeriğin dış ortama sızdığı görülmektedir. Nekroz durumunda, lizozomal litik enzimlerin hücreden sızması ile daha çok sayıda hücre hasar görmekte ve inflamatuvar cevap ortaya çıkmaktadır. Fagositoz yoluyla nekroz sırasında ölen hücreler yok olmaktadır (6,7).

Apoptozis de hücrelerde bulunan proteazların aktivasyonu ile gerçekleşmektedir. Bu aktivasyon hücre içi sinyallerle yapılır. Bu süreç iki farklı yol üzerinden ilerleyebilmektedir. Genelde hipoksi kaynaklı indüklenen intrinsik (iç) yani mitokondriyal yol veya tümör nekroz faktör kaynaklı ekstrinsik (dış) yolak üzerinden süreç aktive edilip hücre ölümüne gidilir (8).

### **İntrinsik (iç) Yol**

İntrinsik apoptotik yolak, hücre içi sinyallerle, pH azalmasına bağlı olarak çeşitli iyonlaştırıcı etkenlerin neden olduğu gen seviyesindeki toksik hasar, endoplazmik retikulum stresi, DNA hasarına bağlı hücre siklus bozuklukları, mitokondriyal hasar kaynaklı hücre ölümü ya da çeşitli büyüme faktörleri gibi bazı uyarıların yokluğunda aktive olan yoldur (9). Bcl-2 (B-cell lymphoma-2) ailesi üyeleri mitokondriyal yolağın merkezi düzenleyicileridir. Hücrenin apoptozise gidiceğine karar veren Bcl-2 sınıfı karar verip aktivasyonları başlatmakta görev alırlar. Bcl-2 sınıf proteinler hep apoptozu kontrol eden (proapoptotik) hem de hücrelerin apoptoza girmesini engelleyebilen (antiapoptotik) bir gen ailesidir (10).

### **Ekstrinsik (dış) Yol**

Ekstrinsik yol iç yoldan farklı olarak hücre içi sinyallerle aktive edilen T hücreleri, doğal öldürücü (natural killer) (NK) hücreler ve makrofajların hedef hücrelerinin zarında bulunan ölüm reseptörlerine tutunması ile başlar (3). Hücre zarı integral proteinlerinden olan tümör nekroz faktör (TNF) ve FAS reseptörlerine ölüm aktivatörleri olan FasL ve tümör nekroz faktör alfa (TNF- $\alpha$ ) ile bağlanarak, prokaspaz-8' kaspaz-8' e farklılaşır. Sonuçta kaspaz kaskadı aktivasyonu başlatılır. Ekstrinsik yol, CD95L/FasL dahil olmak üzere ekstraselüler ligandlarla başlatılır. Ölüm alanı olan Fas ile ilişkili protein, başlatıcı kaspazlara bağlanır. Aktive edilmiş kaspazlar, kaspaz-3 dahil olmak üzere uyarıcı kaspazları daha da aktive eder (11).

Hem intrinsik hem de ekstrinsik yollar, apoptotik aktivasyon için kaspaz-3 ve kaspaz-9'u aktive eder.



## İntrinsik Ve Ekstrinsik Yolakların Ortak Yolu

Apoptozun uygulama aşaması, bir dizi kaspazın aktivasyonunu içerir. İçsel yolağın temel kaspazı, kaspaz 9 iken, dışsal yolağın kaspaz 8'dir. İki yolağın ortak noktası, kaspaz 3'te birleşir. Kaspaz 3, nükleer apoptozdan sorumlu olan, kaspaz ile aktive olan deoksiribonükleazın inhibitörünü ayırır (10). Ek olarak, protein kinazların, hücre iskelet proteinlerinin, DNA onarım proteinlerinin ve endonükleaz ailesinin inhibe edici alt birimlerinin bölünmesini indükler. Ayrıca; hücre iskeleti, hücre döngüsü ve sinyal yolları üzerinde de etkileri vardır.

## Kaspazlar

Kaspazlar başlangıçta inaktif zimogenler (prokaspazlar olarak adlandırılır) olarak üretilir ve daha sonra çok çeşitli belirli iç ve/veya dış sinyaller tarafından aktivasyona tabi tutulur. Kaspazlar işlevlerine göre 3 grup altında incelenmektedir. Kaspaz protein ailesi en az 14 üye içeren büyük bir protein sınıfıdır (12).



- **İnflamatuar kaspazlar:** C1-4-5-11-12-13-14 olup uzun prodomain içerirler ve inflamatuvar süreçlerde görev alırlar.
  - **Başlatıcı kaspazlar (initiator):** C2, C8, C9, C10 olup inaktif monodimer olarak sentezlenirler (prokaspaz); aktifleşmesi için dimerizasyon gereklidir (örn: C8'in homodimer yapısı en aktif halidir; cFLIP ile heterodimer oluşturması halinde işlevi değişir).
  - **İnfazcı Kaspazlar (efektör; executioner, effector):** C3, C6, C7 olup başlatıcı kaspazlardan sonraki basamaklarda görev alırlar; inaktif dimer olarak sentezlenip bağlayıcı subunitelerin ayrılması ile aktiflenirler. Bunu genellikle başlatıcı kaspazlar sağlar.
1. Kaspaz 1 ile ilgili olanlar (örneğin kaspaz-1, -4, -5, -13 ve -14). Bunlar esas olarak inflamatuvar süreçler sırasında sitokin işlemede yer alırlar.
  2. Apoptozda merkezi bir rol oynayanlar (örn. kaspaz-2, -3, -6, -7, -8, -9 ve -10). Bu ikinci grup ayrıca, apoptotik yolun başlamasından öncelikli olarak sorumlu olan **1) Başlatıcı kaspazlar** (örneğin kaspaz-2, -8, -9 ve -10) ve **2) Efektör kaspazları** (kaspaz-3, -6 ve -7) olarak sınıflandırılabilir (16).

Kaspazlar apoptozun başlatılması ve yürütülmesinde önemli elemanlardan biridir. Bu nedenle, düşük kaspaz seviyelerinin veya kaspaz fonksiyonundaki bozulmanın apoptoz seviyelerinde bir azalmaya, karsinojenezde artmaya yol açabileceğini düşünmek mantıklıdır.

Sistein-aspartik asit proteazı olan kaspaz-3, doku farklılaşması, rejenerasyonu ve sinir gelişimindeki temel rolleri nedeniyle son zamanlarda araştırmalarda sıkça ele alınan bir mekanizmanın parçasıdır. Bu enzim, hücre apoptozunda önemli bir zimgendir ve apoptotik akış

sırasında başlatıcı kaspazlar tarafından parçalanana kadar aktive olmaz (12).

Kaspaz-3, bir sistein proteazdır (CPP32) neredeyse tüm hücrelerde inaktif zimojen ve hücre döngüsünde apoptotik hücre ölümünün gelişiminde rol oynar (10). Aktivasyona yol açan en az 2 yol keşfedilmiştir bunlardan biri mitokondriye bağımlı bir yol Bcl-2 ailesi proteinleri ve tümör nekroz faktörünün aktivasyonunu içeren paralel bir yol tarafından yönetilir. Her ne kadar yaygın olarak ifade edilse de kaspaz-3 immünoaktivitesinde çarpıcı farklılıklar bazı hücre türleri arasında doku özgüllüğüne işaret eder.

Kaspaz-3, belirli hedef proteinlerin parçalanmasını aracılık etme yetenekleriyle bilinen bir Sistein-ASPartik proteASES (sistein proteazları) ailesinin üyesidir (13). Prokaspaz-3'ün moleküler yapısı bir N-terminal prodomain ve biri büyük (p20) diğeri küçük (p10) olmak üzere iki alt birim içerir. Bu iki alt birim birlikte olgun proteazın katalitik olarak aktif bölgesini oluşturur.

### **Kaspaz-3'ün Transkripsiyonel Düzenlenmesi**

İnsan kaspaz-3'ünü kodlayan gen, kromozom 4'teki 2.635 baz çiftinden q33-q35.1'e eşlenir. Gen bölgesi yedi ekzondan oluşmaktadır. Kaspaz-3 transkriptlerinin iki farklı formu bildirilmiştir; ana transkript 834 bp uzunluğunda olup, 277 amino asitten oluşan bir prokaspaz-3 proteinini kodlamaktadır (5). Alternatif ekleme nedeniyle ekson 6'da kodlanan amino asitlerden yoksun olan ve kaspaz-3s olarak adlandırılan daha kısa bir izoform da tanımlanmıştır ve potansiyel olarak proteolitik aktivasyonunu engellemek için prokaspaz-3 ile doğrudan etkileşim yoluyla apoptozu inhibe edebilir. Diğer kaspazlar (örneğin, kaspaz 6 veya 7), kaspaz-3'ün apoptozdaki geç rolü için gereken genel proteolitik işlevini sağlayabilmelidir.

Kaspaz-3 gen promotörü birkaç Sp1 benzeri dizi içerir ve mRNA ekspresyonu Sp1 ve p73 dahil olmak üzere birkaç transkripsiyon faktörü

tarafından düzenlenebilir. Örneğin, insan hücrelerinin sisplatin ile tedavisi, p73 ve Sp1'e bağlı bir şekilde kaspaz-3 transkript seviyelerinde bir artışa neden olur. Yapılan çalışmalardan bazılarında Sp1 veya Sp1 benzeri proteinlerin kaspaz-3 promotörünün p73 ile indüklenen aktivasyonu için gerekli olduğunu göstermektedir. Hipoksiye bağlı faktör  $1\alpha$ , Stat3, FOXO1 ve c-Jun: ATF2 dahil olmak üzere diğer transkripsiyon faktörleri, promotörüne bağlanarak fare kaspaz-3'ün ekspresyonunu düzenler (3). Ancak, fare ve insan kaspaz-3 promotörleri arasında önemli bir benzerliğe rağmen, aynı transkripsiyon faktörlerinin insan kaspaz-3 promotörüne bağlanmasına dair doğrudan bir kanıt bulunmamaktadır.

Kaspaz-3 normal dokularda her yerde ifade edilebilir fakat değişken seviyelerde olduğu yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Örneğin, kaspaz-3 ifadesini düzenleyen yaşlanmayla ilişkili bir epigenetik mekanizma, kaspaz-3 transkriptlerinin genç sıçan beyin dokularına kıyasla yaşlı sıçan beyin dokularında azaldığı ve yaşlı dokulardaki bu transkripsiyonel susturmanın yaşa bağlı DNA metilasyonunda artış ve kaspaz-3 promotörünün histon 4 asetilasyonunda azalma ile ilişkili olduğu bulgusundan çıkarılmıştır. Kanserlerde, prokaspaz-3 transkripti ve proteininin artan ifadesi gözlemlenmiş ve pRb/E2F yolunun düzensizliği ile ilişkilendirilmiştir (9).

### **Apoptozis İndükleyicisi Olarak Kaspaz-3'ün Rolü**

Hücre ölümü çeşitli farklı mekanizmalarla sağlanabilir. Gelişim sırasında ve hücre yenilenme dokularında yaşam boyunca, birçok hücre apoptozu indükleyen mekanizmalarla sürekli olarak ortadan kaldırılır.

Apoptozis hem hücre dışı faktörlerle etkileşimler hem de içsel (hücre içi) olaylarla tetiklenebilir. Dışsal faktörler steroid hormonlar ve tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör süper ailesinin çeşitli ligandları (örneğin, FASL, TRAIL, TNF- $\alpha$ ) olabilir. Bu ölüm reseptörlerinden

birine hücre dışı aracılı ligand bağlanması, kaspaz-8'in Fas ile ilişkili ölüm alanı (FADD) adaptör proteinine bağlanmasına neden olur ve böylece bir ölüm indükleyen sinyal kompleksi (DISC) oluşturur. Kaspaz-8'in DISC'e alınması, kendi kendini kesme yoluyla oligomerizasyonunu ve aktivasyonunu kolaylaştırır. Kesilen kaspaz-8 daha sonra aktiviteleri daha sonra apoptotik hücre ölümünün son aşamalarını getiren aşağı akış efektör kaspazlarının aktivasyonunu indükler.

Apoptoza yol açan içsel veya mitokondriyal yol, viral enfeksiyonlar, hipoksi, hipertermi, oksidatif stres ve örneğin kemoterapi veya radyoterapi gören kanser hastalarında olduğu gibi toksik kimyasal veya radyasyona maruziyetten kaynaklanan içsel olarak algılanan stres sinyalleri dahil olmak üzere çeşitli uyarılarla başlatılabilir. Bu tür pro-apoptotik hücrel stresörlerin bir sonucu, mitokondriyal dış zarın geçirgenleşmesi ve sitokrom c gibi apoptojenik faktörlerin mitokondriyal zarlar arası boşluktan sitozole salınmasıdır. Daha sonra, kaspaz-3/7 dahil olmak üzere efektör kaspazların aktivasyonunu tetikleyen bir apoptozomal kompleks (sitokrom c / Apaf-1 / kaspaz-9 içeren) oluşur. Benzer şekilde, birçok hücre tipinin canlılığının bağlı olduğu belirli dış büyüme faktörlerine, sitokinlere, hormonlara veya hücre-hücre etkileşimlerine maruziyetinin azaltılması da apoptozisin içsel yolunu aktive edebilir ve böylece bu dış faktörlerin normalde apoptotik yanıt mekanizmasının varsayılan aktivasyonunu engellemede oynadığı hayati rolü ortaya çıkarabilir.

### **Apoptozisin Morfolojik Ve Biyokimyasal Özellikleri**

Apoptozis sırasında aktive edilmiş kaspaz-3, apoptotik hücrelerde tipik morfolojik değişikliklere yol açan çok çeşitli alt akış substratlarını keser. Örneğin, kaspaz-aktive DNase inhibitörünün (ICAD) kaspaz-3 aracılı kesilmesi, kaspaz-aktive DNase (CAD) aktivasyonu ile sonuçlanır. CAD'nin bu aktivasyonu daha sonra nükleozomlar arasındaki internükleozomal bağlayıcı bölgelerde DNA'yı keserek kromatin

yoğunlaşmasını ve DNA parçalanmasını ve bunun sonucunda 180 bp DNA parçalarının ve bunların katlarının oluşumunu indükler. Bu tür DNA parçalanmasının kanıtı genellikle bir DNA merdivenleme testi ile tespit edilir; bu, apoptozis geçiren hücrelerin bir özelliğidir. Apoptozisin erken bir aşamasının belirteci, plazma membranının iç tabakasından fosfatidilserinin hücre dışına salınımıdır. Bu, fagositlerin yakınlarındaki apoptotik hücreleri ve parçalarını tanınmasını ve fagosite etmesini sağlar.

Anneksinler, fosfatidilserin kalıntılarına bağlanan proteinlerdir ve bu nedenle bu tür dışsallaştırılmış fosfatidilserin formları için tanıma ligandları olarak görev yapabilirler. Anneksin V'in hücre yüzeyine bağlanması bu nedenle artık apoptozisin erken aşamalarındaki hücreleri tespit etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Apoptotik hücrelerdeki diğer morfolojik değişiklikler arasında hücre büzülmesi ve sitoplazmik kabarcıkların oluşumu ve apoptotik cisimlerin salınması yer alır. Kaspaz-3'ün diğer hedeflerinin (örneğin, ROCK1) kesilmesi, hücre büzülmesi ve aktinomyosin kasılması da dahil olmak üzere bu ve diğer dramatik morfolojik özelliklerle sonuçlanır.

### **Kaspaz-3'ün Apoptotik Olmayan Etkileri: İki Mekanizma**

Artan kanıtlar, kaspaz-3 aktivitelerinin hücre ölümünün başarılı bir uygulayıcısı olarak içsel işlevine ek olarak hem normal hem de kötü huylu hücre ve dokuların hayatta kalmasını, çoğalmasını ve farklılaşmasını da etkileyebileceğini göstermektedir. Kaspaz-3'ün (ve diğer ilgili kaspazların) artık canlı hücre ve dokuların davranışını etkilediği bilinen ek yollar, aşağıda tartışıldığı gibi hem "otonom olmayan" hem de "hücre otonom" (veya doğrudan) başlatma ve yürütme mekanizmalarını içerir (13).

Burada kullanılan otonom olmayan terimi, kaspaz-3 aracılı apoptoz geçiren diğer hücrelere bitişik hücrelerin telafi edici çoğalmasının indüklenmesini sağlayan mekanizmaları ifade eder. Bunun aksine, hücre-otonom (veya doğrudan) terimi, hücre ölümüyle

sonuçlanmayan kaspaz-3'ün içsel olarak aracılık ettiği aktiviteleri ifade eder. İkinci durumda, kaspaz-3'ün doğrudan hücre içi sinyal yollarıyla ve nihayetinde kaspaz-3'ün ifade edildiği hücrede kök hücrelik, farklılaşma ve çoğalma aktivitesindeki değişiklikleri ortaya çıkaran gen ifadesi profilleriyle etkileşime girdiği düşünülmektedir. (14).

### **Kaspaz-3 Aktivitesini Düzenleyen Mekanizmalar**

Önemli olarak, kaspaz-3'ün proteolitik fonksiyonunun hücre canlılığı veya diğer ilgili aktiviteler üzerinde olumlu etkileri olduğu durumlarda, bunların proteolitik aktivitesinin azaltılmış indüksiyonuyla ilişkili olması muhtemeldir. Bu yeteneğe sahip olduğu bilinen proteinler arasında BID, NOXA, BIM, BAX ve BAK bulunur (14). Kaspazın, hem aktive lenfositler tarafından Fas/FasL yoluyla hem de kemoterapi ajanları tarafından uyarılan kanser hücresi ölümünü düzenlemede önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Kaspaz 3 veya cpp32, efektör kaspazların temel üyesidir. Kaspaz 3, B hücreli kronik lenfositik lösemide (B-CLL), akut miyeloid lösemide (AML), foliküler küçük kesilmiş hücreli non-Hodgkin B hücreli lenfomalarda, insan meme kanseri hücre dizilerinde ve primer meme tümörlerinde ve nöroblastomlarda gibi hücre döngüsüyle ilgili genler de dahil olmak üzere geniş bir substrat ölçeğini kesebilen güçlü bir proteazdır. p21<sup>WAF1</sup>, siklin bağımlı bir kinaz inhibitörüdür ve DNA hasarı kaynaklı büyüme durmasında önemli bir rol oynar. p21<sup>WAF1</sup> aşırı ekspresyonu G1 hücre döngüsü durmasına neden olabilir ve kaspaz 3 aktivasyonundan yukarı bir noktada apoptotik süreci daha da kesintiye uğratabilir (Sun et al.,2000).

### **Sonuç**

Yapılan çalışmalar ve apoptoz hakkında elde edilen bilgiler, hücre ölümünün nasıl kontrol edildiği konusundaki bütün bu bilgi birikimi halen karmaşık bir tablo ortaya koymaktadır. Apoptozdaki işleyiş bozukluklarının kanser, enfeksiyon hastalıkları, nörodejeneratif hastalıklar (Örn. Alzheimer hastalığı), iskemik hastalıklar (Örn. inme,

miyokart enfarktüsü) gibi pek çok hastalıkla olan bağlantısı hala daha araştırılan yaygın konular arasındadır. Apoptozun hem temel bilimde hem de klinik bilimlerde daha iyi anlaşılması, yeni ilaç, tanı, takip ve tedavi araçlarının bulunmasına ve insan sağlığını tehdit eden önemli hastalıklara yeni, bilinçli ve temelli çözümler üretilmesine yol açacaktır.

## **Kaynaklar**

- 1) Obeng, E. (2020). Apoptosis (programmed cell death) and its signals-A review. *Brazilian Journal of Biology*, 81(4), 1133-1143.
- 2) Carneiro, B. A., & El-Deiry, W. S. (2020). Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nature reviews Clinical oncology*, 17(7), 395-417.
- 3) Porter, A. G., & Jänicke, R. U. (1999). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell death & differentiation*, 6(2), 99-104.
- 4) Voss, A. K., & Strasser, A. (2020). The essentials of developmental apoptosis. *F1000Research*, 9.
- 5) Dirican, E., Özcan, H., Uzunçakmak, S. K., & Takım, U. (2023). Evaluation expression of the caspase-3 and caspase-9 apoptotic genes in schizophrenia patients. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*, 21(1), 171.
- 6) Bertheloot, D., Latz, E., & Franklin, B. S. (2021). Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. *Cellular & molecular immunology*, 18(5), 1106-1121.
- 7) O'Donovan, N., Crown, J., Stunell, H., Hill, A. D., McDermott, E., O'Higgins, N., & Duffy, M. J. (2003). Caspase 3 in breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 9(2), 738-742.
- 8) Hussar, P. (2022). Apoptosis regulators bcl-2 and caspase-3. *Encyclopedia*, 2(4), 1624-1636.
- 9) Zaib, S., Hayyat, A., Ali, N., Gul, A., Naveed, M., & Khan, I. (2022). Role of mitochondrial membrane potential and lactate dehydrogenase a in apoptosis. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 22(11), 2048-2062.
- 10) Asadi, M., Taghizadeh, S., Kaviani, E., Vakili, O., Taheri-Anganeh, M., Tahamtan, M., & Savardashtaki, A. (2022). Caspase-3: structure, function, and biotechnological aspects. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 69(4), 1633-1645. 11111
- 11) Asadi, M., Taghizadeh, S., Kaviani, E., Vakili, O., Taheri-Anganeh, M., Tahamtan, M., & Savardashtaki, A. (2022). Caspase-3: structure, function, and biotechnological aspects. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 69(4), 1633-1645.



- 12) Choudhary, G. S., Al-Harbi, S., & Almasan, A. (2015). Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis. *Apoptosis and Cancer: Methods and Protocols*, 1-9.
- 13) Krysko, D. V., Berghe, T. V., D'Herde, K., & Vandenabeele, P. (2008). Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods*, 44(3), 205-221.
- 14) Eskandari, E., & Eaves, C. J. (2022). Paradoxical roles of caspase-3 in regulating cell survival, proliferation, and tumorigenesis. *Journal of Cell Biology*, 221(6), e202201159.
- 15) Sun, B. H., Zhang, J., Wang, B. J., Zhao, X. P., Wang, Y. K., Yu, Z. Q., ... & Yang, D. L. (2000). Analysis of in vivo patterns of caspase 3 gene expression in primary hepatocellular carcinoma and its relationship to p21WAF1 expression and hepatic apoptosis. *World journal of gastroenterology*, 6(3), 356.
- 16) Nguyen, T. T. M., Gillet, G., & Popgeorgiev, N. (2021). Caspases in the developing central nervous system: Apoptosis and beyond. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 702404.

## BÖLÜM 10

### SİTOTOKSİSİTE ANALİZLERİ VE METOTLARI

Biyolog Binnaz CANTÜRK<sup>1</sup>

Doç. Dr. Funda KARABAĞ<sup>2</sup>

Biyokimyager M. İbrahim YAVAN<sup>3</sup>

---

<sup>1</sup>Uşak Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Uşak, Türkiye. canturkbinnaz@gmail.com Orcid ID: 0009-0004-6507-2803

<sup>2</sup>Uşak Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Uşak, Türkiye. funda.karabag@usak.edu.tr, Orcid ID: 0000-0002-1565-3210

<sup>3</sup>Uşak Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Uşak, Türkiye Orcid ID: 0000-0002-8089-2373, m.ibrahimyavan@gmail.com



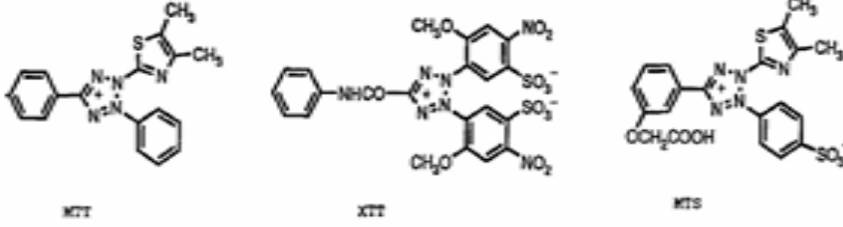
## GİRİŞ

Sitotoksosite testleri; hücrelerin fiziksel, biyolojik veya kimyasal yollarla görmüş olduğu zararı belirlemek için kullanılan metodlardır. Sitotoksik testler, çalışma sonunda hücrelerin sağkalım miktarı hakkında bilgi verir (1). Ayrıca bu testler enzim aktivitesi, hücre zarı geçirgenliği, hücre yapışması, ATP üretimi, ko-enzim üretimi ve nükleotid alım aktivitesi gibi farklı hücre aktivitelerini içermektedir. Sitotoksosite belirleme yöntemleri farklılık gösterebiliyor; bunlar kolorimetrik, lüminesans ve enzimatik yöntemlerdir (2). Renk değişimi esasına dayanan kolorimetrik yöntemde, MTT, MTS, XTT, WST gibi tetrazolyum tuzları etken madde olurken, nötral kırmızısı gibi boya maddeleri kullanılarak a ölçüm yapılabilir. Sitotoksosite belirlemede kullanılan bir diğer yöntem ise luminometrik metodlardır. Bu metodun floresans ve biyolüminesans olmak üzere iki çeşidi vardır. Floresans metodlarda, ışıkla etkileşime girebilen maddeler kullanılırken, biyolüminesans metodlarda lusiferaz adlı enzimler ve bu enzimlerin substratları kullanılarak hücrelerdeki canlılık miktarı belirlenebilmektedir. Canlı hücre sayısı belirlemede thoma lamı ve triptan mavisi ile boyama yapılarak da hücreler mikroskopta sayılabilir ancak fazla zaman alıcı bir yöntem olduğundan tercih edilmemektedir (2,3).

### Tetrazolyum İndirgeme Analizleri

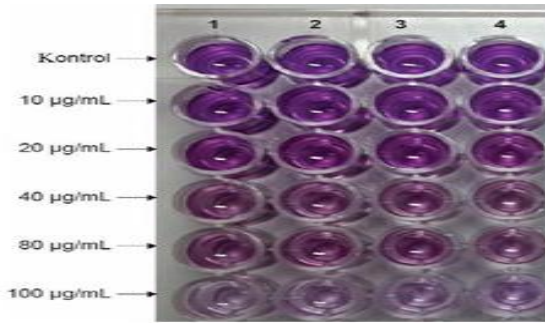
Canlı hücreleri tespit etmek için çeşitli tetrazolyum bileşikleri kullanılmıştır. En yaygın kullanılan bileşikler MTT, MTS, XTT ve WST-1'dir. Bu bileşiklerden MTT pozitif yüklü olup ökaryotik hücre membranından kolaylıkla geçebilirken MTS, XTT ve WTS-1 negatif yüklü olup hücre membranından geçemez. Bu yüzden negatif yüklü bu bileşikler tetrazolyumu indirgemek için sitoplazmadan veya plazma membranından elektron transfer edebilen bir ara elektron alıcısıyla birlikte kullanılır. Tetrazolyum halkası mitokondriyal dehidrogenaz ve redüktaz tarafından parçalanabilir dolayısıyla bu analiz, mitokondriyal

enzimlerin aktivitesini ölçerek hücrelerin mitokondriyal fonksiyonunun belirlenmesi yoluyla esas olarak hücre canlılığını belirler (4,5,6).



Şekil 1. MTT, XTT ve MTS bileşiklerinin kimyasal yapıları (2)

MTT deneyinin prensibi, metabolik olarak aktif canlı hücrelerin dehidrogenaz sistemi tarafından suda çözünen sarı tetrazolyum tuzunun suda çözünmeyen mor renkli formazan kristallerine indirgenmesidir. Formazan suda çözünmez ve hücreler içerisinde mor renkli iğne şeklinde kristaller oluşturur. Bu kristaller absorbans ölçümü yapılmadan önce dimetil sülfoksit (DMSO) veya izopropanol gibi organik bir çözücüyle çözdürülür. Bu ürün belirli bir dalga boyundaki ışık Emilimi ile ölçülebilir. Ayrıca bu yöntem kullanımının kolay olması, güvenilir ve yüksek tekrarlanabilirliğe sahip olmasından dolayı çokça tercih edilmektedir (7,5,6).



Şekil 2. MTT testinde oluşan renk değişimi (8).

MTT ile karşılaştırıldığında negatif yüke sahip olan MTS, XTT ve WST-1 reaktifleri, hücre membranından doğrudan geçemedikleri için ara elektron (fenazin metil sülfat, fenazin etil sülfat) taşıyıcısına ihtiyaç

duyarlar (3,9). Ayrıca bu grubun oluşturdukları formazan kristalleri suda çözünebildikleri için ek bir çözelti adımı gerektirmez Tetrazolyum bileşikleri ile yapılan testlerde önce hücrelerin toksik bir maddeyle etkileşimi gerçekleştirilir (7). Daha sonra ortamdan toksik madde uzaklaştırılıp tetrazolyum bileşiği eklenir ve eklenen tetrazolyum bileşiğinin çeşidine göre 1-4 saat inkübasyona bırakılır. Bu aşamada canlı hücrelerin indirgeme reaksiyonlarıyla oluşturduğu formazan renk değişikliğini sağlar. Son olarak oluşan renk değişimi spektrofotometrik yöntemle ölçülerek canlı/ölü hücre sayısı belirlenir (2,4,7).

### **LDH Enzim Salıverilmesi Testi**

LDH (laktat dehidrogenaz) sitotoksosite testi, hücresel sitotoksisiteyi ölçmek için kullanılan bir kolorimetrik yöntemdir. Hatta sadece hücre aracılı sitotoksisiteyi ölçmek için değil, aynı zamanda toksik kimyasallar ve diğer test bileşiklerinin aracılık ettiği sitotoksisiteyi değerlendirmek için de farklı hücre tiplerinde kullanılabilir (5). Laktat dehidrogenaz enzimi bütün hücrelerde ve sitoplazmada bulunur ve toksik etki maruziyetinde plazma membran bütünlükleri bozulur ve LDH enzimi hücrelerden salınır ve kültür ortamına geçer (2). Salınan LDH, diaforaz tarafından bir tetrazolyum tuzunun (iyodonitrotetrazolium (INT)) kırmızı renkli bir formazana dönüştürülmesiyle sonuçlanan bir eşleştirilmiş enzimatik reaksiyonla ölçülür (4,5). Ölçümün ilk adımında LDH, laktatın pirüvata dönüşümünü katalize eder ve böylece NAD, NADH/H<sup>+</sup>'a indirgenir. İkinci adımda ise katalizör (diaforaz) H/H<sup>+</sup>'yi NADH/H<sup>+</sup>'den tetrazolyum tuzu 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5 feniltetrazolyum klorüre (INT) aktarır ve bu da kırmızı formazana indirgenir. Ortaya çıkan kırmızı formazan, 492 nm'de maksimum emilir ve 490 nm'de kantitatif olarak ölçülebilir. Bu test güvenilir, hızlı ve basit değerlendirmeye sahiptir çünkü hücre içi LDH kaybı ve kültür ortamına salınması, hücre zarı hasarı nedeniyle geri döndürülemez hücre ölümünün bir göstergesidir. Hücre membran bütünlüğü bozulduktan ya da öldükten sonra kültür ortamına geçen

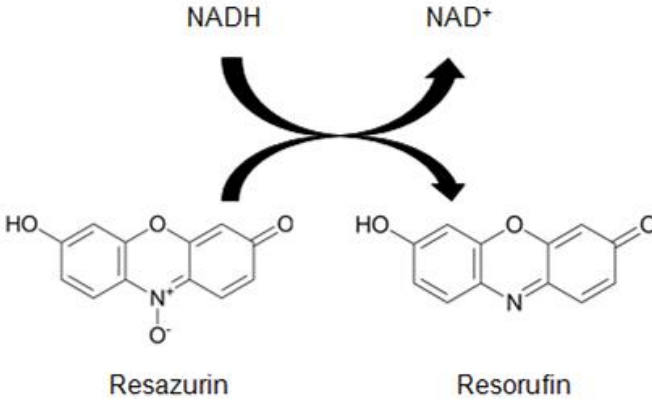
LDH'nın yarılanması yaklaşık 9-10 saat kadardır. Toksik maddeye uzun süre maruz kalınması durumunda, LDH'nın yarı ömrü ve proliferasyona devam eden hücrelerin LDH oranını değiştirmesi gibi sebepler testin sınırlılığdır.

## **Lüminesans Metodlar**

### **Alamar Mavisi Floresans Testi ve Diğer Floresans Metodlar**

Bu metodlarda Resazurin bileşiği, tetrazolium bileşiklerinin kullanıldığı protokollere benzer şekilde canlı hücre sayısını izlemek için kullanılabilen bir redoks göstergesidir. Resazurin, hücre membranından kolayca geçebilen ve aktif metabolizmaya sahip canlı hücrelerde pembe renkli resorufine dönüşebilen bir bileşiktir. Bu analizlerin dikkat çekici bir özelliği, reaktif eklendikten sonra üretilen kalıcı ve kararlı parıltı tipi sinyaldir. Bu özellik hem canlılık hem de sitotoksisite değerleri belirlemek için kullanılabilir. Kültürdeki canlılık arttıkça floresans sinyalin şiddeti de artar. (2,5). Resazurin PBS içerisinde çözülebilmektedir. Hücrelere toksik madde ilave edildikten sonra resazurin bileşiği eklenir ve hücreler inkübasyona bırakılır. Hücre hatlarında inkübasyon süreci 1-4 saat değişiklik göstermekle birlikte metabolik aktivitesi düşük olanlarda sinyal oluşumunu artırmak için inkübasyon süresi uzatılabilir. İnkübasyon sonrası ölçüm yapılır ve test sonlandırılır (2).

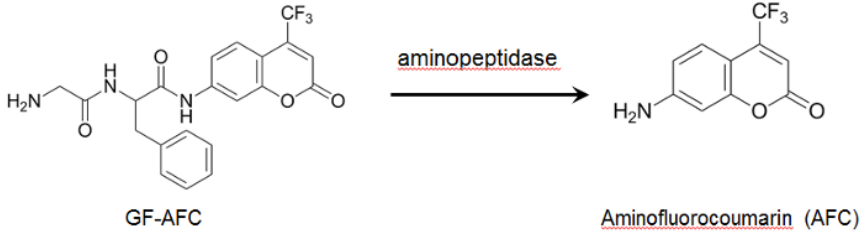
Alamar mavisi testinde, metabolik aktiviteye sahip hücreler resazurin bileşiğini indirgeyip renk değişikliğini sağladıktan sonra hücreler ölseler dahi metabolitleri ortamda kalacağından renk değişikliği sabit kalır. Boyanma gerçekleşikten sonra ölen hücrelerin belirlenememesi bu testin olumsuz bir özelliğidir (2).



**Şekil 3.** Canlı hücrelerde oluşan resazurin substratının ve pembe floresanlı resorufin ürününün yapısı (6).

Diğer floresans ışımaya esasına dayanan metodlar ise proteaz ve esteraz enzim aktivitesidir (6). Proteaz enzim aktivitesine dayanan metotta; hücre geçirgen bir florojenik proteaz substratı (glisilfenilalanil aminoflorokumarin; GF-AFC) canlı hücrelerle sınırlı proteaz aktivitesini seçici olarak tespit eder (3). GF-AFC substratı, sitoplazmik aminopeptidaz aktivitesi glisin ve fenil amino asitlerini uzaklaştırarak aminoflorokumarini (AFC) oluşturur ve canlı hücre sayısına orantılı bir floresan sinyal üretimini sağlar. Hücreler öldüğünde proteaz aktivitesi hızlı bir şekilde kaybolur ve canlı hücre sayısının belirlenmesini sağlar. Ayrıca proteaz analizinde üretilen sinyalin, ATP analizi gibi hücre canlılığını belirlemeye yönelik diğer yöntemlerle de iyi bir korelasyon gösterdiği bilinmektedir. GF-AFC substratının avantajlarından biri, kültürdeki hücreler için nispeten toksik olmamasıdır (2,6). Hücrelerin tetrazolyuma maruz kalmasının tersine, GF-AFC substrat hücrelerinin uzun süreli maruziyeti hücrelerin canlılığında çok az değişikliğe neden olur. Ayrıca, inkübasyon süresi tetrazolyum analizleri için gereken 1-4 saate kıyasla çok daha kısadır (30 dak-1 saat) (5).





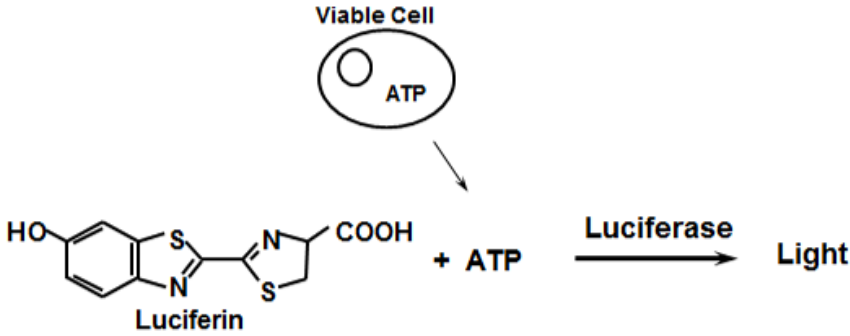
**Şekil 4.** Hücre geçirgen glisilfenilalanil-aminofloroumarin (GF-AFC) substratı, sitoplazmik aminopeptidaz aktivitesiyle dönüştürülerek floresan aminofloroumarin (AFC) üretilir (6).

CFDA-AM (5-karboksifluorescein diasetat, asetoksimetil ester), sitotoksosite tayini için kullanılan başka bir florojenik boyadır. Plazma membran bütünlüğünün göstergesidir. Boya CFDA-AM, canlı hücrelerin nonspesifik esterazları tarafından, zardan geçirgen, polar olmayan, floresan olmayan bir maddeden polar, floresan boya olan karboksifluorescein'e (CF) dönüştürülebilen toksik olmayan bir esteraz substratıdır. Hücreler tarafından CFDA-AM'nin CF'ye dönüştürülmesi, plazma membranının bütünlüğünü gösterir, çünkü yalnızca sağlam bir membran, esteraz aktivitesini desteklemek için gereken sitoplazmik ortamı koruyabilir. CFDA-AM ve alamar mavisi analizleri ile aynı hücre setinde paralel olarak uygulanabilir olduğu gösterildi. Çünkü her ikisi de hücreler için toksik değildir, benzer inkübasyon süreleri gerektirir ve farklı dalga boylarında girişim olmadan tespit edilebilir (5,9).

### ATP Biyoluminesans Testi

ATP (adenozin trifosfat), hücrelerdeki en önemli kimyasal enerji deposudur ve biyolojik sentez, sinyalleme, taşıma ve hareket süreçlerinde kullanılır. Bu nedenle hücresel ATP, hücre canlılığını ölçmede en hassas uç noktalardan biridir. Hücreler ölümcül şekilde hasar gördüğünde ve membran bütünlüğünü kaybettiğinde, ATP sentezleme yeteneğini kaybederler ve hücrelerin ATP seviyesi önemli ölçüde azalır. ATP testi, lüsiferinin oksilüsiferine reaksiyonuna dayanır. Enzim lüsiferaz,  $Mg^{2+}$  iyonları ve ATP varlığında bu reaksiyonu katalize ederek

bir lüminesans sinyali üretir. Lüminesans sinyalinin yoğunluğu ile ATP konsantrasyonu veya hücre sayısı arasında doğrusal bir ilişki vardır. Işıma yapan sinyal, reaktif eklendikten sonra 10 dakika içinde sabit bir duruma ulaşır ve stabilize olur ve tipik olarak 5 saatten daha uzun bir yarı ömürle parlar. ATP testinde, bir substratı (örneğin tetrazolyum veya rezasurin) renkli bir bileşiğe dönüştürmek için hücreler bir inkübasyon adımına da ihtiyaç duymaz. Bu ayrıca, hücreleri sinyal üretmek için inkübatöre geri döndürmeniz gerekmediği için bir plaka işleme adımını da ortadan kaldırır. Ancak ATP analizi kimyası genellikle kuyu başına 10'dan az hücreyi tespit edebilir ve bu nedenle yaygın olarak 1536 kuyulu plaka formatı kullanılır. 1536 kuyulu plaka okuyucusu her laboratuvarında olmadığından pahalı olması ve pipetleme zorluğundan bu testin en önemli dezavantajı olarak ortaya çıkmaktadır (2,5,6).

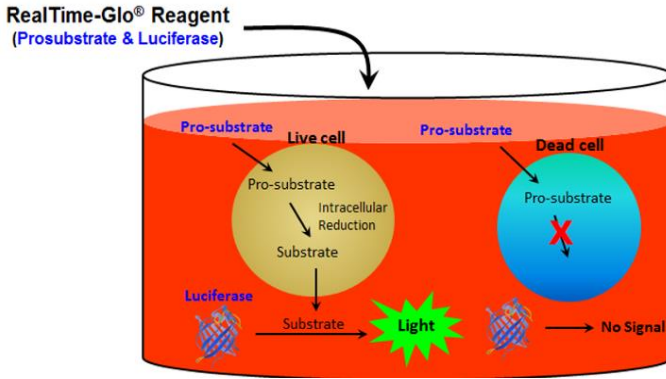


Şekil 5. Lusiferazın ışık üretmesi için ATP ve lüsiferinin substrat olarak kullanıldığı basitleştirilmiş reaksiyon şeması (6)

### Gerçek Zamanlı (Real Time) Biyölüminesans Testi

Canlı hücre sayısını "gerçek zamanlı" olarak ölçmek için yakın zamanda geliştirilen bir yaklaşım, deniz karidesinden türetilen tasarlanmış bir lüsiferaz ve küçük bir molekül pro-substrat kullanır. Pro-substrat ve lüsiferaz, kültür ortamına doğrudan bir reaktif olarak eklenir. Pro-substrat, lüsiferaz için bir substrat değildir (4). Aktif metabolizmaya sahip canlı hücreler, pro substratı, kültür ortamına yayılan ve lüsiferaz tarafından lüminesan bir sinyal üretmek için kullanılan bir substrata

indirger. Şekil 6'da gösterilmiştir. Reaktif hücreler tarafından iyi tolere edilir ve 37°C'de tam hücre kültürü ortamında en az 72 saat stabildir, bu da pro-substratı yenilemeden aynı numuneden günlerce ölçüm yapılmasını sağlar (8). Deneme iki formatta gerçekleştirilebilir: sürekli okuma veya uç nokta ölçümü. Sürekli okuma formatında, lüminesans sinyali, "gerçek zamanlı" olarak canlı hücre sayısını ölçmek için aynı numune kuyularından uzun bir süre boyunca tekrar tekrar kaydedilebilir.



**Şekil 6.** Gerçek zamanlı reaktif bileşenleri, hücre geçirgen bir pro substrat ve karides türevi bir lüsiferazın tasarlanmış kararlı bir formunu içerir. Reaktif bileşenleri doğrudan kültürdeki hücrelere eklenir. Aktif bir metabolizmaya sahip canlı hücreler, ışık üreten lüsiferaz için bir substrat oluşturmak üzere pro substratı azaltır. Metabolik aktiviteden yoksun ölü hücreler, lüsiferaz substratı üretmez ve bu nedenle bir lüminesans sinyaline katkıda bulunmaz (2,5,6).

Gerçek zamanlı denemenin bir sınırlaması, metabolik olarak aktif hücreler tarafından pro-substratın nihai tükenmesinden kaynaklanır. Genellikle, üretilen lüminesans sinyal, metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı ile ilişkilidir (5). Ancak, lüminesans sinyalinin hücre sayısı ile doğrusal olacağı zaman uzunluğu, kuyu başına hücre sayısına ve metabolik aktivitelerine bağlı olacaktır. Bu nedenle, doğrusallığı korumak için maksimum inkübasyon süresinin her hücre tipi ve yoğunluğu için deneysel olarak belirlenmesi önerilir.

## **Sonuç**

Sitotoksosite analizleri, hücre kültüründeki hücrelerin canlılığını belirlemeye ya da toksik olduğu düşünülen bir maddenin etkisini ölçmeye yarar. Bu testlerin genellikle avantajı yanında dezavantajı da bulunmaktadır. Özellikle dezavantajların testin güvenilirliğini düşürmemesi için birbiriyle korelasyon sağlayan testleri birlikte uygulamakta fayda vardır. Test içerisindeki bileşik ile hücredeki canlılığı belirleyecek maddenin etkileşimi, birbiriyle uyumlu çalışıyor olması oldukça önemlidir. Hücreye uygun in-vitro canlılık ve/veya sitotoksosite testi seçmek, testin performansını ve güvenilirliğini etkilemektedir. Bu nedenle farklı birkaç test denenerek en uygun olan test seçilmelidir. Bunun haricinde önemli olan diğer hususlar ise testi yapacak uzmanın bilgi ve becerisi, ortam şartları, kültür ortamının içeriği vb. değişkenlerdir. Bu testlerin seçilmesinde hızlı olması, etkin sonuçlar vermesi, zaman ve maliyet açısından etkili olması da önemli çıktılardır (2,5,10,6).

## Kaynakça

- 1) Niles, A.L., Moravec, R.A., Hesselberth, P.E., Scurria, M.A., Daily, W.J., Riss, T.L., (2007). A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers. *Anal Biochem*, (Vol. 336: 2, pp. 197-206)
- 2) Tokur, O., Aksoy, A., (2017). In vitro sitotoksosite testleri. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, (Vol. 6, Issue 1, pp.112-118)
- 3) Lazarski, C. A., Hanley, P., J., (2023). Review of flowcytometry as a tool for cell and gene therapy. *International Society for Cell & Gene Therapy* (Vol. 26, pp. 103-112). <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2023.10.005>
- 4) Taşkın, A., Ulusal, H., Taşkın, S., Tarakçıoğlu, M., (2020). Tetrazolium-Based cytotoxicity tests may not always reflect accurate results. *Journal of Harran University Medical Faculty* ( Vol. 17, Issue 1, pp. 6-12) DOI: 10.35440/hutfd.600652
- 5) Aslantürk, Ö., S., (2018). In vitro cytotoxicity and cell viability assays: principles, advantages, and disadvantages. *IntechOpen. Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World*. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.71923>
- 6) Karakaş, D., Arı, F., Ulukaya, E., (2017). The MTT viability assay yields strikingly false-positive viabilities although the cells are killed by some plant extracts. *Turkish Journal of Biology*, (Vol. 41, No. 6, pp. 919-925) <https://doi.org/10.3906/biy-1703-104>
- 7) Riss, T.L., Moravec, R.A., Niles, A.L., et al. (2013). Cell viability assays. *U.S. national library of medicine*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/>
- 8) Aravinthan, A., Govarthanan, M., Selvam, K., Praburaman, L., Selvankumar, T., Balamurugan, R., Kamala-Kannan, S., Kim, J.H., (2015). Sunroot mediated synthesis and characterization of silver nanoparticles and evaluation of its antibacterial and rat splenocyte cytotoxic effects. *Int J Nanomedicine*. (pp.1977-1983).
- 9) Özdemir, Ö., (2018). Cell- mediated cytotoxicity assays. *Asthma allergy immunol* (Vol. 16, pp. 1-10) doi: 10.21911/aa.403

- 10) Adan, A., Kiraz, Y., Baran, Y., (2016). Cell proliferation and cytotoxicity, Current pharmaceutical Biotechnology. (Vol. 17, issue 14, pp. 1213-1221). **doi:** 10.2174/1389201017666160808160513



## **BÖLÜM 11**

### **POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONUN TEMELLERİ**

Öğr. Gör. Mustafa ATALAN<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup>Uşak Üniversitesi, Eşme Meslek Yüksekokulu, Eczane Hizmetleri Bölümü Uşak, Türkiye. mustafa.atalan@usak.edu.tr, Orcid ID: 0000-0001-8543-6951





## GİRİŞ

Bir DNA parçasının üstel olarak çoğaltılması mekanizmasına polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) adı verilir. PCR tek bir molekül hassasiyet sınırına sahip olduğundan, nadir DNA dizilerini kesin olarak tanımlamak için harika bir yöntemdir. Bir DNA molekülü iki, dört, sekiz ve benzeri kopyalar halinde üretilebilir. Bu sürekli iki katına çıkma, DNA parçalarını birleştirerek uzun moleküler zincirler (iplikler) oluşturabilen enzimler olan polimerazlar olarak bilinen belirli proteinler tarafından meydana gerçekleştirilir. DNA'yı oluşturan dört nükleotid baz olan adenin (A), timin (T), sitozin (C) ve guanin (G), polimerazların işlev görmesi için gereklidir. Yeni iplik oluşturulurken, şablon görevi görecek daha büyük bir DNA molekülüne ve yapı taşlarını bağladıkları primer adı verilen küçük bir DNA parçasına ihtiyaç vardır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) işlemi kullanılarak belirli bir nükleik asit zinciri çoğaltılarak, daha büyük miktarlarda yapılar oluşturulabilir (1). Doğru koşullar altında, çoğaltılan DNA'nın verimi orijinal hedef moleküllerin miktarıyla orantılı olduğundan, PCR nicel bir analitik araçtır. PCR, 1985 yılında ilk kez tanımlanmasından bu yana, çevre testleri, adli tıp, gıda teknolojisi, biyoteknoloji, klinik araştırmalar, adli biyoloji, arkeoloji ve antropoloji gibi alanlarda kullanılan çeşitli metodolojilerin bir araya gelmesiyle oluşmuştur. Alternatif yöntemlere rağmen, PCR hala en popüler nükleik asit çoğaltma tekniği olarak ilk sırada kullanılmaktadır (2).

Kapsamlı uygulaması nedeniyle, PCR'nin temellerini ve uygulamasının karmaşık genom ve gen analizine izin verecek şekilde nasıl değiştirilebileceğini anlamak kritik öneme sahiptir. PCR tabanlı teknikler, bilim insanlarının DNA ile çalışmasını kolaylaştırarak moleküler biyolojiyi ileri taşıyarak, “İnsan Genomu Projesi” gibi büyük projelerin ve klonlama gibi işlemlerin hayata geçirilmesine imkan vermiştir. Hassas bir teknik olan PCR, konvansiyonel laboratuvar analizleri için yeterli kopya oluşturmak amacıyla sadece eser miktarda

DNA'ya ihtiyaç duyar. Enfeksiyonların tespiti, geleneksel PCR teknolojisinin en önemli tıbbi kullanımlarından biridir. Bu tekniğin duyarlılığı, özgülüğü, hızı ve kullanım kolaylığı nedeniyle birçok farklı uygulamada kullanılmıştır. Bu uygulamalar arasında hastalığa neden olan genleri ve patojenleri tanımlamak, genlerin yapısını ve ifadesini karakterize etmek, kalıtsal hastalıkları rahim içinde teşhis etmek ve adli tıp, tarım ve arkeolojide DNA parmak izini kullanmak yer almaktadır. Ayrıca, adli tıpta suçluların tespiti amacıyla da PCR testi kullanılmaktadır. Söz konusu uygulamaların büyük bir çoğunluğu kantitatif olarak ta adlandırılan ve nükleik asitleri ölçmek için sıklıkla kullanılan “gerçek zamanlı PCR” tekniği ile mümkün olmuştur. Gerçek zamanlı PCR’ın birincil amacı belirli nükleik asit dizilerini doğru bir şekilde tanımlamak ve ölçmektir. Gerçek zamanlı PCR, bir örnekteki belirli bir hedef diziyi çoğaltmak için floresan teknolojisini kullanır ve ardından çoğaltmanın ilerlemesini izler (3-5).

### **PCR Türleri**

RNA gibi araştırmada önemli olan çeşitli moleküllerin amplifikasyonunu elde etmek, performans ve seçiciliği artırmak için son zamanlarda temel PCR sürecinin modifikasyonları veya varyantları oluşturulmuştur (6). Bu varyasyonlar:

- Multiplex (Çoklu) PCR
- Nested (İç içe) PCR
- Semiquantative (Yarı kantitatif) PCR
- Reverse transcription-polymerase chain reaction (Ters transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu) (RT-PCR)
- Real Time (Gerçek zamanlı) PCR,
- Digital (Dijital) PCR.

### **Multipleks-PCR,**

Maliyet ve büyük bir test örneği hacminin bulunması, PCR'nin tanı laboratuvarlarında kullanılmasının önündeki başlıca engellerdir. Tüm bu sorunların üstesinden gelmek ve PCR'nin tanı potansiyelini artırmak için “Multipleks PCR” olarak adlandırılan alternatif bir PCR yöntemi önerilmiştir. Reaksiyonda birden fazla primer çifti kullanan multipleks PCR birkaç hedef dizinin çoğaltılmasına olanak tanır.

Multipleks PCR, tek bir test çalışmasında aynı anda birçok geni hedef alır ve birden fazla reaktif seti gerektirmez, bu da zamandan ve iş gücünden tasarruf etmemizi sağlar. Multipleks PCR, gen delesyon analizi, mutasyon ve polimorfizm analizi, kantitatif analiz ve RNA tespiti gibi çok sayıda nükleik asit tanısında etkili bir biçimde kullanılmaktadır. Yöntem aynı zamanda bulaşıcı enfeksiyonları tedavi etmenin etkili bir yolu olarak ta görülmektedir (7,8).

### **Nested PCR**

Bu teknik düşük duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir. Hedef gen, iki ardışık PCR'nin ilk turunda dış primer seti kullanılarak çoğaltılır ve bu PCR'den gelen ampliconlar daha sonra ikinci turda iç primer seti kullanılarak tekrar çoğaltılır (9). Bu yöntem hedef DNA'ya benzer, istenmeyen veya beklenmeyen bölgelere primer bağlanması sonucu çoğaltılabilen nonspesifik ve yanlış PCR ürünlerinin miktarını azaltmayı amaçlamaktadır (10).

### **Semiquantitative PCR**

Yarı kantitatif PCR veya qPCR olarak bilinen bu teknik, bir DNA veya RNA örneğinde bulunan hedef genin oranını belirlemek için kullanılmaktadır. Bu teknik, hedef nükleik asitteki belirli bir genin miktarı veya yoğunluk derecesiyle ilgili detaylı bilgi elde edilmesini amaçlar (11). Yöntem aynı zamanda, bir örnekte bulunan nükleik asitlerin bağıl miktarının tahminini de sağlar (7). Yarı kantitatif PCR,

gen ifade düzeylerinin karşılaştırılmasına olanak sağlar, ancak ürün miktarı analizi için doğrudan kantitatif veri sunmaz. Biyomedikal araştırmalarda, özellikle hastalıkla bağlantılı genleri değerlendirmek ve gen ifadesi varyasyonlarını karşılaştırmak gibi uygulamalar için bu yöntem sıklıkla başvurulur (11).

### **Ters transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR)**

Ağırlıklı olarak mRNA ve gen ifadesi çalışmalarında kullanılan ve oldukça hassas olan ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu veya RT-PCR, çağdaş biyomoleküler araştırmalarda önemli bir yere sahiptir. RT-PCR, RNA'dan DNA sentezler ve tamamlayıcı DNA (cDNA) üretmek için PCR kullanır. Bu yöntemde ters transkriptaz enzimi ile RNA önce cDNA'ya dönüştürülür, ardından çoğaltılır ve daha sonra oluşan ürün PCR analizine tabi tutulur. RT-PCR, gen ifadesindeki değişiklikleri RNA düzeyinde hassas bir şekilde ölçmeyi mümkün kılar. Özellikle düşük bolluktaki şablonlar için kullanılan RT-PCR, mRNA'yı tespit etmek ve ölçmek için kullanılan en doğru tekniktir (12). RT-PCR tekniği sıklıkla viral yük analizi ve hastalık tespiti için kullanılmaktadır. RT-PCR, kullanım kolaylığı, yüksek doğruluğu ve ucuz olması nedeniyle, COVID-19 salgını sırasında SARS-CoV-2 virüsünü teşhis etmek için yaygın olarak kullanılmış ve “Altın Standart Yaklaşım” olarak kabul edilmiştir (13,14).

### **Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonunun (PCR)**

Temelleri, Kary Mullis tarafından atılan bu yöntem, orijinal PCR'dan daha üstün bir performansa sahiptir (15). Bu yöntem, belirli DNA parçalarının bir milyardan fazla kez büyütülmesine olanak sağlamaktadır. Yüksek duyarlığa sahip özgül bir yöntem oluşu, onu hem nitel hem de nicel analizler için oldukça kullanışlı hale getirmektedir. Bu teknik çok sayıda seçilmiş genin ifade modellerini tanımlamak ve ölçmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Gerçek zamanlı PCR, PCR'ın hassasiyetini, PCR ürünlerinin oluşturuldukları anda gerçek

zamanlı olarak izlenmesinin hassasiyetiyle birleştirdiği için, oldukça güvenilir bir tekniktir. (5,16).

### **Dijital PCR**

Dijital PCR (dPCR), orijinal PCR'den geliştirilen teknolojilerden biridir. Bu teknik ile bir PCR örneğini binlerce, hatta bazen milyonlarca alt örneğe bölerek, referans DNA'yı veya bu DNA'dan oluşturulmuş havuzdaki kopyaları ölçmek mümkündür. dPCR damlacık veya çip tabanlı ve mikroakışkan platforma dayalı bir sistemdir. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında geniş bir kullanım imkanı bulan dPCR, qPCR kıyasla avantajları nedeniyle bir dizi örnek test uygulaması için tercih edilen bir testtir. Zaman alıcı qPCR yöntemi ile DNA/RNA kopya sayısının kantifikasyonu yerine dPCR yöntemi kullanılarak daha kısa sürede ve daha doğru bir biçimde DNA/RNA kopya sayısının kantifikasyonu gerçekleştirilebilir. Bu yöntem kısa sürede gerçekleştirildiği için kontaminasyon riskini de azaltır. Bunlara ek olarak dPCR, standart eğriye ihtiyaç duyulmadan mutlak kantifikasyona imkan vermesi, iyileştirilmiş hassasiyete sahip olması, inhibitörlerin varlığında ve düşük amplifikasyon verimliliğinde bile yüksek doğrulukta sonuçlar vermesi yöntemin sağladığı avantajlar arasında görülmektedir (17).

dPCR ayrıca multipleks PCR'nin sağladığı dezavantajları da ortadan kaldırarak DNA örneklerinin kopya sayısını artırmayı mümkün kılar (18).

### **PCR Tekniğinin Avantajları ve Dezavantajları**

Moleküler biyolojide, hedef nükleik asit dizilerinin miktarının belirlenmesine yönelik çok sayıda teknik vardır. Bu teknikler arasında Kuzey ve Güney hibridizasyonları, HPLC, sintilasyon yakınlık testi, PCR-ELISA, RNase koruması testi, in situ hibridizasyon ve çeşitli jel elektroforezi PCR uç nokta sistemleri bulunmaktadır. Bununla birlikte, bu tekniklerin bir çoğu radyoaktif madde kullanımına ihtiyaç duymaları, yoğun emek gerektirmeleri, zaman alıcı olmaları, düşük hassasiyete

sahip olmaları ve yüksek çapraz kontaminasyon riski barındırmaları gibi pek çok dezavantaja sahiptirler. Araştırmacılar tüm bu dezavantajların üstesinden gelmek için kullanım kolaylığı sağlaması, hızlı sonuç vermesi, inanılmaz derecede geniş bir dinamik aralıkta (en az 5 log birimi) nükleik asitleri ölçme kapasitesine sahip olması gibi avantajlarından dolayı gerçek zamanlı PCR tekniğini geliştirmişlerdir. Gerçek zamanlı PCR tekniğinin sağlamış olduğu diğer avantajlar arasında; aşırı saflaştırmaya gerek kalmadan nispeten temiz örneklerden DNA çoğaltmak için kullanılabilmesi, çevrim süresinin daha kısa olması, reaksiyonun amplifikasyon sırasında görülebilmesi, ekstra emek ve zaman gerektiren amplifikasyon sonrası adımların olmaması ve florojenik belirteçlerin kullanımı nedeniyle kısa analiz sürelerine sahip olması yer almaktadır. Amplifikasyonun boyutunun küçültülmesi, verimliliği ve reaksiyon süresini artırdığı için avantajlıdır. PCR işleminde şablon olarak hemen hemen her tür DNA kullanılabilir (2,19,20).

Gerçek zamanlı PCR tekniklerinin avantajlarının yanında birkaç dezavantajı da bulunmaktadır. Bu dezavantajların çoğu tüm PCR veya RT-PCR tabanlı yöntemlerde görülür. Bazı biyolojik örnekler, gerçek zamanlı PCR'de PCR'yi bloke edebilen kimyasallar içerir. Örneğin, vücut sıvılarında bulunan üre ve hemoglobin gibi bazı bileşikler gerçek zamanlı PCR'nin klinik ve adli uygulamaları üzerinde olumsuz bir etkiye neden olabilir (21). Gerçek zamanlı PCR artık enstrümental hatadan ziyade çoğunlukla insan hatasıyla sınırlıdır; bunun nedeni büyük olasılıkla yetersiz test oluşturma, hatalı veri işleme veya gerekçelendirilmemiş sonuçlardır (5). PCR çok hassas bir yöntem olduğu için, numunedeki DNA kontaminasyonu çok düşük seviyelerde olsa bile yanlış sonuçların alınmasına neden olabilir (4).

PCR'nin etkinliğini azaltan veya tamamen ortadan kaldıran beklenmedik mutasyonlar sıklıkla mikroorganizmaların genomlarında yer almaktadır. Taşıma kontaminasyonundan kaynaklanan yanlış

pozitifler, tarihsel olarak tanı laboratuvarlarında PCR'nin rutin kullanımında ciddi sorunlara yol açmış ve PCR'ye özgü laboratuvarların düzeni konusunda katı düzenlemelere yol açmıştır. Dahası, PCR oldukça hassas bir teknik olduğu için, patojenik olmayan konsantrasyonlarda dahi mikropaları tanımlama potansiyeli oldukça yüksektir. Sonuç olarak, bir PCR deneyi formüle edilirken ve sonuçlar değerlendirilirken dikkatli olunmalıdır (12).

### **Sonuç**

Bu bölümde ele alınan PCR teknolojisi, biyoteknoloji uygulamalarında geniş bir kullanım alanı bulan, moleküler biyolojinin ileri teknolojiye sahip bir yaklaşımdır. PCR'nin temelleri, uygulamaları ve bu alanda gerçekleşen teknolojik gelişmeler araştırmamızın ana konularıydı. Araştırmalardan elde edilen veriler, PCR'nin hedef DNA bölgelerini çoğaltmadaki doğruluğunun genetik analiz ve teşhis uygulamaları için önemli olduğunun kanıtıdır. Yüksek hassasiyet ve özgüllüğü nedeniyle PCR, tarım ve çevre bilimleri, adli tıp ve genetik hastalık teşhisi alanlarında kullanılan popüler bir tekniktir. Bu özellikler, PCR'nin klinik, endüstriyel ve akademik araştırmalar için bir araç olarak paha biçilmez doğasını göstermektedir.

PCR teknolojisi pek çok yönden avantajlı olmasına rağmen sınırlılıkları da olan bir yöntemdir. PCR'da yanlış pozitif veya yanlış negatif bulgular alma olasılığı nedeniyle primer yapılar dikkatlice tasarlanmalıdır. PCR kontaminasyon oldukça duyarlı olması nedeniyle analitik prosedür sırasında sıkı bir laboratuvar disiplini gereklidir. Daha hassas ve güvenilir bulguların üretilmesini sağlayan multipleks PCR ve dijital PCR gibi yeni nesil PCR teknolojileri ile bu kısıtlamaların ortadan kaldırılması beklenmektedir. Sonuç olarak, her geçen gün uygulama alanları daha da büyümekte olan PCR'nin temel biyoteknolojik gelişmelerle birleştirilmesi daha hızlı, daha doğru ve daha hassas çalışmalara olanak tanıyacaktır. Bu bağlamda, PCR teknolojisi, çevresel



DNA analizi, kişiselleştirilmiş tedavi ve genom düzenleme gibi hızla gelişen alanlarda gün geçtikçe daha fazla uygulama alanı bulacaktır.

## Kaynakça

- 1) Joshi, M., & Deshpande, J. D. (2010). Polymerase chain reaction: methods, principles and application. *International Journal of Biomedical Research*, 2(1), 81-97.
- 2) Wages Jr, J. M. (2005). Polymerase chain reaction. *Encyclopedia of analytical science*, 243.
- 3) Newton, C. R., Graham, A., & Ellison, J. S. (1997). *PcR* (p. 192). Oxford, UK: BIOS Scientific Publishers.
- 4) Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). Research techniques made simple: polymerase chain reaction (PCR). *The Journal of investigative dermatology*, 133(3), e6.
- 5) Valasek, M. A., & Repa, J. J. (2005). The power of real-time PCR. *Advances in physiology education*, 29(3), 151-159.
- 6) Ehtisham, M., Wani, F., Wani, I., Kaur, P., & Nissar, S. (2016). Polymerase chain reaction (PCR): back to basics. *Indian Journal of Contemporary Dentistry*, 4(2), 30.
- 7) Hayden, M. J., Nguyen, T. M., Waterman, A., & Chalmers, K. J. (2008). Multiplex-ready PCR: a new method for multiplexed SSR and SNP genotyping. *BMC genomics*, 9, 1-12.
- 8) Elnifro, E. M., Ashshi, A. M., Cooper, R. J., & Klapper, P. E. (2000). Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clinical microbiology reviews*, 13(4), 559-570.
- 9) Gow, I., Smith, N. C., Stark, D., & Ellis, J. (2022). Laboratory diagnostics for human Leishmania infections: a polymerase chain reaction-focussed review of detection and identification methods. *Parasites & Vectors*, 15(1), 412.
- 10) Haff, L. A. (1994). Improved quantitative PCR using nested primers. *Genome Research*, 3(6), 332-337.
- 11) Wang, F. (2021). Semi-quantitative RT-PCR: An effective method to explore the regulation of gene transcription level affected by environmental pollutants. In *Environmental Toxicology and Toxicogenomics: Principles, Methods, and Applications* (pp. 95-103). New York, NY: Springer US.

- 12) Mackay, I. M. (2004). Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical microbiology and infection*, 10(3), 190-212.
- 13) Mo, Y., Wan, R., & Zhang, Q. (2012). Application of reverse transcription-PCR and real-time PCR in nanotoxicity research. *Nanotoxicity: methods and protocols*, 99-112.
- 14) Dutta, D., Naiyer, S., Mansuri, S., Soni, N., Singh, V., Bhat, K. H., ... & Mansuri, M. S. (2022). COVID-19 diagnosis: a comprehensive review of the RT-qPCR method for detection of SARS-CoV-2. *Diagnostics*, 12(6), 1503.
- 15) Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., ... & Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine*, 27(2-3), 95-125.
- 16) Artika, I. M., Dewi, Y. P., Nainggolan, I. M., Siregar, J. E., & Antonjaya, U. (2022). Real-Time Polymerase Chain Reaction: Current Techniques, Applications, and Role in COVID-19 Diagnosis. *Genes* 2022, 13, 2387.
- 17) Kuypers, J., & Jerome, K. R. (2017). Applications of digital PCR for clinical microbiology. *Journal of clinical microbiology*, 55(6), 1621-1628.
- 18) Zhu, H., Zhang, H., Xu, Y., Laššáková, S., Korabečná, M., & Neuzil, P. (2020). PCR past, present and future. *Biotechniques*, 69(4), 317-325.
- 19) Reischl, U., Wittwer, C., & Cockerill, F. (Eds.). (2012). *Rapid cycle real-time PCR—methods and applications: microbiology and food analysis*. Springer Science & Business Media.
- 20) Sergeevich, O. A., Bachelor, L. N., Erbolatovich, D. A., Alikulov, Z., & Kairbekovich, M. Z. (2024, May). Real-time PCR: advantages and limitations. In *Publisher. agency: Proceedings of the 6th International Scientific Conference «Reviews of Modern Science»(May 16-17, 2024). Zürich, Switzerland, 2024. 394p.* (p. 285). Universität Luzern.
- 21) Wilson, I. G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and environmental microbiology*, 63(10), 3741-3751.



**ISBN: 978-625-367-940-8**