

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MELANOM KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNE VULPİNİK ASİTİN
APOPTOTİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Sevcan YANGIN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2021**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MELANOM KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNE VULPİNİK ASİTİN APOPTOTİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Sevcan YANGIN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Emine Sümer ARAS

Melanom kanseri, deri kanserleri arasında en ölümcül olan alt tipdir. Melanom kanseri geleneksel tedavi yöntemlerine karşı direnç göstermektedir ve bunun için anti-proliferatif aktiviteye sahip toksik etkisi olmayan terapötik ajanların tedavi de kullanılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Liken sekonder metabolitlerinden biri olan vulpinik asit'in anti-proliferatif etkisi daha önceki çalışmalarla belirlenmiştir. Tez kapsamında gerçekleştirilen vulpinik asit'in A-375 melanom hücre hattı ve insan epidermal melanosit hücresi üzerinde anti-proliferatif ve apoptotik etkisinin belirlendiği ilk çalışmadır. Vulpinik asit'in A-375 melanom ve melanosit hücre hattında anti-proliferatif etkisinin değerlendirilmesinden sonra spektrofotometrik yöntemlerle Kaspaz-3 aktivitesi belirlenmiştir. Apoptotik etkinin hücresel boyutta araştırılmasından sonra mRNA boyutunda gen ifade seviyelerinin araştırılması için qRT-PCR analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlarla vulpinik asit uygulaması sonucunda A-375 melanom hücre hattı için IC_{50} değeri 125 μ M, melanosit hücre hattı için IC_{50} değeri 25 μ M hesaplanmıştır. Apoptotik etkinin belirlenmesi analizleri sonucunda vulpinik asitin'in A-375 melanom hücre hattında hücre ölüm yollarından apoptozun birçok farklı yolağını etkilediği aynı zamanda otofaji ile de ilişkili olduğu belirlenmiştir. Tez kapsamında elde edilen verilere göre vulpinik asit'in ilaç adayı molekülü olarak deri kanseri tedavisinde alternatif bir doğal bileşik olarak topikal ve transdermal yolla kullanılması için ileri araştırmalara önemli bir adım oluşturmuştur.

Ocak 2021, 120 sayfa

Anahtar Kelimeler: Melanom deri kanser, Vulpinik Asit, Apoptoz

ABSTRACT

Master Thesis

INVESTIGATION OF THE APOPTOTIC EFFECT OF VULPINIC ACID ON THE MELANOMA CANCER CELL

Sevcan YANGIN

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Emine Sümer ARAS

Melanoma cancer is the deadliest subtype of skin cancers. Melanoma cancer is resistant to traditional treatment methods and there is a need for the use of non-toxic therapeutic agents with anti-proliferative activity. The anti-proliferative effect of vulpinic acid, one of the secondary metabolites of lichen, has been determined in previous studies. This is the first study in which the anti-proliferative and apoptotic effect of vulpinic acid on the A-375 melanoma cell and human epidermal melanocyte cell was evaluated within the scope of the thesis. After evaluating the anti-proliferative effect of vulpinic acid in A-375 melanoma and melanocyte cell line, Caspase-3 activity was determined by spectrophotometric methods. After investigating the apoptotic effect at the cellular level, qRT-PCR analysis was performed to investigate the gene expression levels in mRNA level. As a result of vulpinic acid application, the IC_{50} value was calculated as 125 μ M for the A-375 melanoma cell and 25 μ M for the melanocyte cell. As a result of the analysis of the apoptotic effect, it was determined that vulpinic acid affects many different pathways of apoptosis in A-375 melanoma cells and is also associated with autophagy. According to the data obtained within the scope of the thesis, it has been an important step in further research for the use of vulpinic acid as a drug candidate molecule as an alternative natural compound in the treatment of skin cancer for topical and transdermal purposes.

January 2021, 120 pages

Key Words: Melanoma skin cancer, Vulpinic Acid, Apoptosis

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Yüksek lisansımın öncesinde ve sırasında bana laboratuvarını açan, her konuda her zaman bilgi ve tecrübelerini esirgmeden paylaşan, bana birçok şeyi öğreten, üzerimde çok fazla emeği bulunan, her zaman maddi manevi destek sunarak beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan canım hocam Doç. Dr. Demet CANSARAN DUMAN'a

Yüksek lisansım boyunca kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana destek olan çok sevgili danışman hocam Prof. Dr. Sümer ARAS'a,

Tüm tez deney süreçlerinin yürütüldüğü Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı ailesine, ekip arkadaşlarıma, Prof. Dr. Erkan YILMAZ ve Dr. Öğr. Üyesi Doruk ENGİN hocalarıma,

Hayatımın her alanında olduğu gibi yüksek lisans sürecinde de her sıkıntımı omuz omuza paylaştığım destekçilerim, dostlarım, manevi kardeşlerim Çağlanur KARAMANLI, Hülya AKBIYIK, Merve UĞUR ve Ceren MISIRLI'ya,

Bu hayattaki en büyük destekçilerim, her zaman arkamda olup beni yüreklendiren, bana inanan ve güvenen, çıktığım her yolda bana onurlu ve başı dik yürümeyi öğreten, emekleriyle beni bugünlere getiren, meleşim, mucizem annem Sevda YANGIN ve canım babam Murat YANGIN'a

Tüm kalbimle teşekkürlerimi sunuyorum.

Sevcan Yangın

Ankara, Ocak 2021

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	4
2.1 Kanser	4
2.2 Deri Kanseri.....	6
2.2.1 Normal deri yapısı.....	6
2.2.2 Deri kanseri çeşitleri	7
2.2.2.1 Bazal hücreli karsinom	7
2.2.2.2 Skuamöz hücreli karsinom.....	8
2.2.2.3 Melanom	8
2.2.2.3.1 Melanom risk faktörleri	14
2.2.2.3.1.1 Konakçı faktörler	14
2.2.2.3.1.2 Maruz kalma	16
2.2.2.3.1.3 Diğer faktörler	17
2.2.2.3.2 Melanom tedavisi	18
2.3 İlaç Uygulama Yolları.....	21
2.4 Alternatif tedavi yöntemleri doğal bileşikler	22
2.4.1 İlaç adayı molekülü : Vulpinik asit	23
2.5 Hücre Ölümü	24
2.5.1 Otofaji	24
2.5.2 Nekroptoz.....	25
2.5.3 Apoptoz	25
2.5.3.1 Dışsal yolak (Ölüm reseptör yolağı)	26
2.5.3.2 Perforin / Granzim yolağı.....	27
2.5.3.3 İçsel yolak.....	28
2.5.4 Apoptotik yolaklardaki moleküller	31

2.5.4.1 TP53.....	31
2.5.4.2 APAF-1.....	32
2.5.4.3 Bcl-2 ailesi	32
2.5.4.4 Tümör nekroz faktörü (TNF) ailesi.....	33
2.5.4.5 Apoptoz inhibitörleri (IAP) ailesi	35
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	36
3.1 Materyal	36
3.1.1 Kimyasal malzemeler	36
3.1.2 Sarf malzemeler.....	36
3.1.3 Kitler.....	36
3.1.4 Cihazlar	36
3.2 Yöntem	37
3.2.1 Hücre kültürü idamesi.....	38
3.2.1.1 Hücrelerin büyüme şartları.....	38
3.2.1.2 Hücre açılması ve besiyerinin değiştirilmesi.....	38
3.2.1.3 Hücre pasajlanması.....	39
3.2.1.4 Hücre dondurulma ve saklanması.....	39
3.2.1.5 Hücre sayımı.....	40
3.2.2 Vulpinik asit'in hazırlanması.....	40
3.2.3 xCELLigence RTCA ile hücre anti-proliferasyonunun belirlenmesi	40
3.2.4 Hücre görüntüleme	41
3.2.5 Yara iyileşme analizi	42
3.2.6 Apoptotik etkinin belirlenmesi	42
3.2.6.1 Kaspaz-3 aktivitesinin belirlenmesi.....	42
3.2.6.2 Apoptotik etkinin mRNA boyutunda belirlenmesi	44
3.2.6.2.1 RNA izolasyonu	44
3.2.6.2.2 cDNA sentezi.....	44
3.2.6.2.3 qRT-PCR ile transkript ifade düzeyinin analizi	45
3.2.7 İstatistiksel analiz	45
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	46
4.1 Hücre anti-proliferasyonunun belirlenmesi	46
4.2 Hücre görüntüleme	50
4.3 Yara iyileşme analizi.....	51
4.4 Kaspaz-3 Aktivitesinin Belirlenmesi	53
4.5 qRT-PCR ile transkript ifade düzeyinin analizi	53
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	67

KAYNAKLAR	81
EK 1.....	111
ÖZGEÇMİŞ.....	119



SİMGELER DİZİNİ

μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μM	Mikromolar
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat Derece

Kısaltmalar

ATCC	Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
BCC	Bazal hücreli karsinom
BSA	Sığır Serum Albümini
Dk	Dakika
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Ortamı
DMSO	Dimetilsülfoksit
FBS	Fetal Sığır Serum
IUPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
MGM-4	Melanosit Büyüme Besiyeri-4
PBS	Fosfat Tampon Çözeltisi
QRT-PCR	Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SCC	Skuamöz hücreli karsinom
UV	Ultraviyole
RTCA	Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Kanserin altı ana ayırt edici özellikleri	6
Şekil 2.2 A. 5-Fluorouracil kimyasal yapısı B. Imiquimod kimyasal yapısı	20
Şekil 2.3 A.Vulpinik asit B.Vulpinik asitin yapısal formülü	23
Şekil 2.4 İlaç etki mekanizması	26
Şekil 2.5 Apoptotik olayların şematik olarak gösterilmesi	31
Şekil 3.1 Deneysel iş akış şeması.....	37
Şekil 3.2 xCELLigence RTCA S16 cihazı.....	41
Şekil 3.3 İnsan apoptoz primer kütüphanesi paneli	45
Şekil 4.1 Farklı konsantrasyonlarda vulpinik asit ile muamele edilen A-375 hücrelerinin zamana bağlı normalize edilmiş hücre indeksi grafiği.....	46
Şekil 4.2 Farklı konsantrasyonlarda vulpinik asit ile muamele edilen A-375 hücrelerinin zamana bağlı normalize edilmiş hücre indeksi grafiği.....	47
Şekil 4.3 Zamana bağlı farklı konsantrasyonlarda vulpinik asit ile muamele edilen A-375 hücre indeksinin çubuk grafik ile gösterimi.....	48
Şekil 4.4 Vulpinik asit muamele edilen A-375 hücre konsantrasyonlarının logaritmasına bağlı normalize edilmiş hücre indeksi	48
Şekil 4.5 Farklı konsantrasyonlarda vulpinik asit muamele edilen melanosit hücrelerinin zamana bağlı normalize edilmiş hücre hücre indeksi grafiği.....	49
Şekil 4.6 Zamana bağlı farklı konsantrasyonlarda vulpinik asit muamele edilen melanosit hücre indeksinin çubuk grafik ile gösterimi.....	50
Şekil 4.7 A-375 ve melanosit hücrelerine vulpinik asit uygulanmış ve uygulanmamış hücre görüntüleri	51
Şekil 4.8 A-375 hücre hattı yara iyileşme analizi çizik görüntüleri.....	52
Şekil 4.9 A-375 zamana bağlı yara iyileştirme alan grafiği	52
Şekil 4.10 A-375 hücre hattında Vulpinik asit uygulaması sonucu yüzde Kaspaz-3 aktivitesi	53
Şekil 4.11 Vulpinik asit muamele edilen A-375 hücrelerinde Kaspaz gen ailesine ait transkript ifade düzeyinin qRT-PCR analizi	55
Şekil 4.12 Vulpinik asit muamele edilen A-375 hücrelerinde Kinaz gen ailesine ait transkript ifade düzeyinin qRT-PCR analizi	55
Şekil 4.13 Vulpinik asit muamele edilen A-375 hücrelerinde BCL-2 gen ailesine ait transkript ifade düzeyinin qRT-PCR analizi	56
Şekil 4.14 Vulpinik asit muamele edilen A-375 hücrelerinde TRAF gen ailesine ait transkript ifade düzeyinin qRT-PCR analizi	57
Şekil 4.15 Vulpinik asit muamele edilen A-375 hücrelerinde TNF gen ailesine ait transkript ifade düzeyinin qRT-PCR analizi	58

Şekil 4.16	Vulpinik asit muamele edilen A-375 hücrelerinde Apoptozla ilgili diğer gen ailesi üyelerine ait transkript ifade düzeyinin qRT-PCR analizi	59
Şekil 4.17	Vulpinik asit muamele edilen A-375 hücrelerinde hücre proliferasyonu ve hücre döngüsü ilgili diğer gen ailesi üyelerine ait transkript ifade düzeyinin qRT-PCR analizi	63
Şekil 4.18	Vulpinik asit muamele edilen melanosit hücrelerinde transkript ifade düzeyinin qRT-PCR analizi	65
Şekil 4.19	<i>CASP3</i> , <i>CASP8</i> , <i>BCL-2</i> , <i>TP53</i> , <i>CHEK1</i> , <i>BAX</i> , <i>TRAF1</i> genlerinin ifade seviyelerinin melanosit ve A-375 hücre hattı ile karşılaştırılması	66



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1	Yaygın kanser türleri ve 2020 yılındaki tahmini yeni vaka ve ölümler.....	2
Çizelge 2.1	Melanomda önemli genler, işlevleri ve melanomda gözüken değişiklikleri.	10
Çizelge 2.2	Melanom aşamaları ve tedavileri.....	19
Çizelge 3.1	Tez kapsamında kullanılan hücre hatları, katalog numaraları ve kullanılan besiyeri içerikleri	38
Çizelge 3.2	Kaspaz-3 aktivitesinin reaksiyon şeması	43
Çizelge 4.1	Vulpinik asit muamele edilen A-375 hücre hattının xCELLigence RTCA Software Lite yazılımı ile IC ₅₀ değerinin belirlenmesi.....	49
Çizelge 4.2	Vulpinik asit muamele edilen A-375 hücrelerinde bütün gen ailesi üyelerine ait kontrole göre gen ifade değişim oranları	59
Çizelge 4.3	Vulpinik asit muamele edilen A-375 hücrelerinde <i>MYC</i> , <i>FOXO3</i> , <i>CLSPN</i> , <i>CDKN2A</i> , <i>ACVR1B</i> , <i>E2F4</i> , <i>PPP2CA</i> genlerine ait kontrole göre gen ifade değişim oranları	64
Çizelge 4.4	Vulpinik asit muamele edilen melanosit hücrelerinde <i>CASP3</i> , <i>CASP8</i> , <i>BCL-2</i> , <i>TP53</i> , <i>CHEK1</i> , <i>BAX</i> , <i>TRAF1</i> genlerine ait kontrole göre gen ifade değişim oranları	65

1. GİRİŞ

Kanser hastalığı 21. yüzyılda dünyanın her ülkesinde ölüm vakalarının önde gelen nedeni olduğu belirtilmektedir (Bray vd. 2018). Günümüzde kanser, dünya çapında her 6 ölümden 1'ini oluşturmaktadır (Roth vd. 2018, American Cancer Society 2020). 2018 yılında dünya genelinde teşhis edilen yaklaşık 17.0 milyon kanser vakası ve 9.5 milyon kanser hastalığı kaynaklı ölüm olmuştur (Bray vd. 2018, American Cancer Society 2020). Amerikan Kanser Topluluğu verilerine göre 2040 yılında 27.5 milyon yeni kanser vakası ve sadece nüfusun büyümesi ve yaşlanmasına dayanarak 16.2 milyon kanser ölümü olacağı beklenmektedir (American Cancer Society 2020).

Melanom, yetişkinlerde (erkekler ve kadınlar) en yaygın beşinci kanser türüdür (**Çizelge 1.1**) ve deri kanseri tiplerinin en ölümcül olanıdır (NCI-SEER-Database 2019, Jenkins ve Fisher 2021). Melanom, vücutta bulunan ve fotokoruyucu bir pigment olan melanini sentezleyen hücreler olan melanositlerin kötü huylu hücrelere dönüşmesiyle oluşur (Lo ve Fisher 2014, Jenkins ve Fisher 2021). Melanom, gözde pigment üreten hücrelerden, gastrointestinal sistemden, genital bölgelerden, sinüslerden ve beyin zarlarından kaynaklanabilir ancak en yaygın olarak UV (Ultraviyole) hasarı durumunda deride ortaya çıkar (Jenkins ve Fisher 2021). Melanom görülme sıklığı Amerika Birleşik Devletleri'nde ve dünya çapında artış göstermektedir (Karimkhani vd. 2017, Schadendorf vd. 2018, Jenkins ve Fisher 2021). 2017 yılında, Amerika Birleşik Devletleri'nde melanom teşhisi konulan yaklaşık 1.245.276 kişi olduğu belirtilmektedir (NCI-SEER-Database 2019, Jenkins ve Fisher 2021). Amerika Birleşik Devletleri'nde 2019 yılında ise yaklaşık 96.480 yetişkine (57.220 erkek ve 39.260 kadın) melanom teşhisi konmuştur ve bu tüm yeni kanser vakalarının % 5.5'ini oluşturduğu ve 7.230 ölümle sonuçlandığı belirtilmiştir (Jenkins ve Fisher 2021). Ülkemizde 2018 yılında 210.537 yeni kanser vakası görülmüş ve 116.710 ölüm gerçekleşmiştir ve bu sayıların 1622 yeni vaka ve 669 ölümü melanom için bildirilmiştir (The Global Cancer Observatory 2020). Dünyada 2020 yılında 100.350 yeni deri melanom vakası olacağı ve yaklaşık 6.850 kişinin öleceği düşünülmektedir (NCI-SEER-Database 2019, Jenkins ve Fisher 2021).

Çizelge 1.1 Yaygın kanser türleri ve 2020 yılındaki tahmini yeni vaka ve ölümler (NCI-SEER-Database 2019)

Yaygın kanser türleri	2020'de tahmini yeni vakalar	2020'de tahmini ölümler
1. Meme Kanseri (Kadın)	276.480	42.170
2. Akciğer ve Bronş Kanseri	228.820	135.720
3. Prostat Kanseri	191.930	33.330
4. Kolorektal Kanseri	147.950	53.200
5. Melanom	100.350	6.850

Melanom tedavi yöntemleri arasında topikal tedavi, sentinel lenf nodu biyopsisi veya ameliyatı, adjuvan tedavi, cerrahi tedavi, kemoterapi, radyoterapi, immünoterapi, hedefe yönelik tedavi yer almaktadır (Micali vd. 2014, Abbas vd. 2019). Ancak hastalarda zaman içerisinde ilaca karşı direnç ve toksik etki nedeniyle alternatif ilaç adayı moleküllerinin araştırılması oldukça önemlidir. Melanom hücreleri geleneksel kemoterapik ilaçlara karşı direnç gösterirler ve bu yüzden antiproliferatif aktiviteye sahip yeni maddelerin terapötik etkinliğinin incelenmesi kanser araştırmaları alanında önemli bir hedef haline gelmiştir (Gray-Schopfer 2007, Hammerová vd. 2011). Doğa her zaman ilaçların geliştirilmesi için önemli bir kaynak olarak kullanılmaktadır. Araştırmacılar ölümcül hastalıkların tedavisi için doğal ürünleri araştırmaya devam etmektedirler (Newman ve Cragg 2007, Chu vd. 2020). Bitkiler, mantarlar, likenler araştırmacılar tarafından terapötik amaçlı kullanılmaktadır. Son zamanlarda liken ikincil metabolitlerinden biri olan vulpinik asit, potansiyel bir terapötik madde olarak belirlenmiştir (Yi 2019).

Bir ilaç adayı molekülü antiproliferatif etkinliğini göstermek için hücre ölüm yollarını kullanabilmektedir. Hücre ölümü doku homeostazını devam ettirmek için gerekli bir fizyolojik süreçtir çünkü hücre büyümesi ve hücre ölümü arasındaki sıkı denge vücudumuzdaki çeşitli işlevler için büyük öneme sahiptir (Bracci vd. 2014, Adewale vd 2017). Programlanmış hücre ölümü, hücre içi bir programın aracılık ettiği düzenlenmiş

hücre ölümü olarak belirlenmiştir (De Gruijl 1999, Adewale vd 2017). Programlanmış hücre ölümü olan apoptoz onlarca yıl önce belirlenmiş ve o zamandan beri çok sayıda

çalışmada tanımlanmıştır (D'Errico vd. 2007, Adewale vd 2017). Apoptoz kanserleşme sürecindeki hücrelerin hayatta kalmasını ve yayılmasını kısıtlayan doğal engel olarak tanımlanabilir. Diğer kanser hücreleri gibi Melanom hücreleri de programlanmış hücre ölümü olan apoptoz yoluyla kendi kendini yok edebilme yeteneğine sahiptirler (Hussein vd. 2003).

Tez kapsamında bir liken sekonder metaboliti olan vulpinik asitin uygulanması sonucunda insan deri maling melanomdan türetilen hücre hattı A-375 ve insan epidermal melanosit hücresi üzerinde antiproliferatif ve apoptotik etkisi araştırılmıştır. İlk olarak xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemiyle vulpinik asit uygulaması sonucu hücre proliferasyonu belirlenmiş daha sonra apoptotik etki; Kaspaz-3 aktivitesi, mRNA boyutunda analizler yapılarak belirlenmiştir. Hücre göçünü analiz etmek için ise yara iyileşme deneyi yapılmıştır. Tez çalışması ile, vulpinik asitin melanom kanserinde apoptoz mekanizması üzerinden etkisinin tanımlanıp olası terapötik etkinin rutin tedavide kullanımının önerilebilmesi amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Kanser

Karsinogenez veya onkogenez süreci, normal hücrelerin kanserli veya kötü huylu hücrelere dönüşmesi olarak adlandırılır. Kanserleşme süreci karmaşık bir süreç olması nedeniyle çok uzun süredir bu alandaki çalışmalar hızla devam etmektedir (Watson 2018).

Kanserleşme süreci **proto-onkogenler** ve **tümör baskılayıcı genler** olmak üzere iki geniş gen grubundaki mutasyonlarla ilişkilidir. Proto-onkogenlerin normal işlevi hücre canlılığı ya da çoğalmasını teşvik etmektir (Lodish vd. 2007). Onkogenler proto-onkogenlerin mutasyona uğramasıyla oluşan gen sınıfıdır ve büyümenin teşvik edilmesinde genin aşırı aktif olmasını sağlarlar (Lodish vd. 2007). Tümör baskılayıcı genler ise normalde büyümenin sınırlandırılmasına neden olurlar. Bunların mutasyonlar ile etkinliğinin kaybolması durumunda olağan dışı hücre bölünmeleri gerçekleşir. Üçüncü bir gen sınıfı olan **koruyucu genler** ise daha özelleşmişler ve çoğu zaman kanserle ilişkilendirilirler. Koruyucu genler normalde genomun bütünlüğünü korumakla görevlidirler; bu genlerin etkin olmadığı zamanlar hücreler büyümenin kontrolünü hasara uğratabilen ve kanserleşmeye neden olan mutasyonlar da içeren ek mutasyonlara uğrarlar (Lodish vd. 2007).

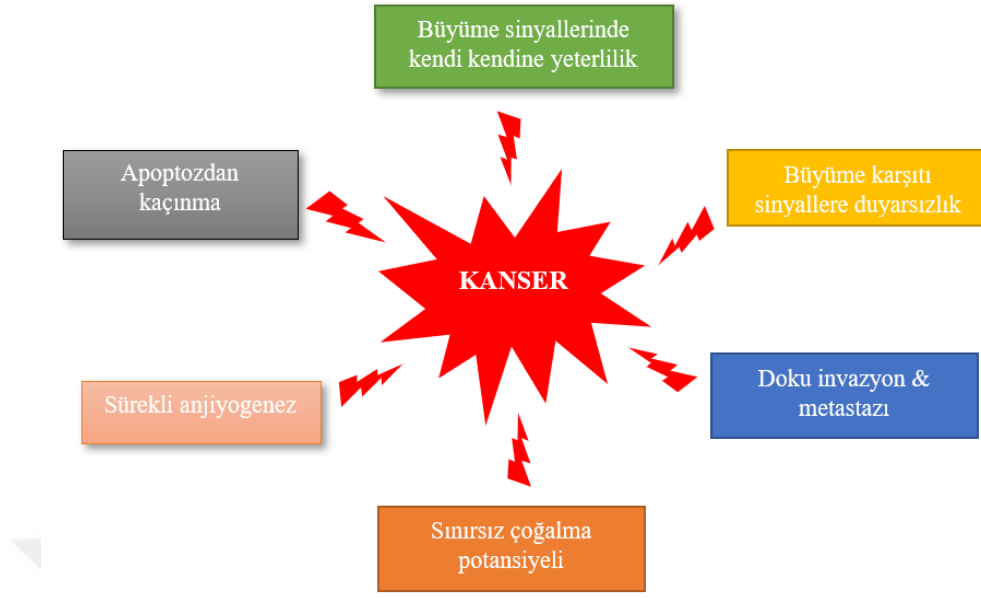
Karsinogenez teorisi kanser gelişimini üç aşamaya ayırarak açıklar: başlangıç, gelişme ve ilerleme (Watson 2018).

- **Başlangıç** aşaması ilk aşamadır ve ilk hücre mutasyonunun meydana geldiği andır. Kendiliğinden veya bir kanserojene maruz kalmak ile başlayan hücresel değişikliğin etkisi sonucu hücre ve onun yavru hücrelerinin bir kanser hücresine dönüşmesi sürecidir. Onkogenlerdeki ve tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar, hücrelerin normal vücut ihtiyaçlarının ötesinde büyümesine neden olurlar. Hücresel değişikliklerden ortaya çıkan yeni hücreler kontrolsüz bölünme

ve apoptoz veya programlanmış hücre ölümünün kaybına neden olurlar. Apoptotik yolda işlev gösteren genler, hücre ölümünü kontrol eden DNA bileşenleridir ve burada gözlenen mutasyonlar kanser hücrelerinin hücre ölümünden kaçmasına izin verirler (Watson 2018).

- **Gelişme** aşaması, dönüşümü başlatılmış olan hücrelerinin bölünmesinin uyarıldığı ikinci aşamadır. Kötü huylu hücelere dönüşüm birden fazla adımı içerebilir ve tekrar tekrar teşvik edici maddelere maruz kalınmasıyla gerçekleşir (Watson 2018).
- **İlerleme** aşamasında tümör hücreleri hayatta kalmak için birbirleriyle rekabet eder ve bu da hücreleri daha agresif hale getirerek daha fazla mutasyona neden olur. Tümör boyut olarak büyüdükçe, hücreler daha fazla mutasyona uğrar ve bu da tümör içinde mutasyona uğramış veya dönüştürülmüş hücrenin çoklu genetik varyantlarını ifade eden heterojenliğe yol açar. Heterojenliğin artmasıyla kanser hücreleri farklı görünüş ve davranış sergilerler ve bu da tanı ve tedaviyi giderek zorlaştırır (Watson 2018).

Kanserin, büyüme sinyallerinde apoptozdan kaçınma, kendi kendine yeterlilik, büyüme önleyici sinyallere duyarsızlık, kontrolsüz çoğalma, sürekli anjiyogenez ve doku istilası ve metastazı olmak üzere 6 ana ayırt edici özelliği bulunur (**Şekil 2.1**). Bu altı ana özelliğin çoğu tüm insan tümörleri tarafından ortak olarak paylaşılabilir (Hanahan ve Weinberg 2000).



Şekil 2.1 Kanserin altı ana ayırt edici özellikleri (Hanahan ve Weinberg 2000).

2.2 Deri Kanseri

2.2.1 Normal deri yapısı

Normal deri yapısı epidermis, papiller ve retiküler dermis ve deri altı yağ katmanlarından oluşmaktadır (Ulusal Kanser Enstitüsü 2005, Gordan 2013). Epidermis katmanını dört alt tabaka ve dört ana hücre tipinden meydana gelir. Bazal tabaka en derin alt tabakadır ve mevcut hücreleri daha yüksek bir tabakaya iten keratinositlerden oluşmaktadır (Gordan 2013). Bazal tabaka içinde bulunan melanositler ultraviyole radyasyondan (UVR) koruyan melanin pigmentini üretirler. Epidermisin altında bulunan dermis tabakası epidermis için destek ve besin sağlar. Dermis tabakasında saç kökleri, yağ bezleri, koku bezleri ve ter bezleri ayrıca kan damarları ve dokunma, sıcaklık ve ağrı hissine izin veren sinirler bulunur. Fibroblastlar burada bulunur ve kollajen ve elastin üretirler. Deri altı doku tabakası yağ, bağ dokusu, bazı büyük kan damarları ve sinirler içermektedirler ve kalınlığı kişiden kişiye değişir. Deri altı doku tabakası yağ depolamasına, cildin ve vücudun sıcaklığının düzenlenmesine ve şok emilimini sağlar (Gordan 2013, Watkins 2013).

Melanositler gözlerde, epidermiste, saçta, oral epitel gibi birçok hücre tipinde görülmektedir (Wan-Kee-Cheung 2001, Abbas vd. 2019). Melanin, melanositler olarak bilinen hücrelerde hipofiz bezleri tarafından üretilen pigmenttir (Abbas vd. 2019). Melanin pigmenti reaktif oksijen türlerini ve farklı güneş ultraviyole radyasyon tiplerini içeren birçok çevresel strese karşı korumamızı sağlar (Feller vd. 2014, Abbas vd. 2019).

2.2.2 Deri kanseri çeşitleri

Deri kanseri, epidermis hücrelerinin kontrolsüz bir şekilde bölünmesiyle malign bir oluşumla sonuçlanır. Üç temel deri kanseri bulunmaktadır:

- Bazal hücreli karsinom,
- Skuamöz hücreli karsinom ve
- Melanom (Abbas vd. 2019).

Hem bazal hücre hem de skuamöz hücreli karsinomlar genetik mutasyon veya değişikliklerden kaynaklanır (Feller vd. 2014, Abbas vd. 2019).

2.2.2.1 Bazal hücreli karsinom

Bazal hücreli karsinom her yıl teşhisi konulan 3,5 milyon melanom dışı deri kanseri vakasının % 80'ini kapsamaktadır (Gandhi ve Kampp 2015, Anonim 2020). BCC (Bazal hücreli karsinom), açık tenli bireylerde yaygındır (Miller ve Weinstock 1994, Gandhi ve Kampp 2015). BCC için en önemli çevresel risk faktörü UV ışığı ve aralıklı, yoğun UVB ışığına maruz kalmadır. Diğer önemli risk faktörleri arasında radyasyon tedavisi, kronik arsenik maruziyeti ve uzun süreli immünosupresyon vardır (Gandhi ve Kampp 2015). BCC'lar rutin deri muayenesinde klasik olarak pembe, inci kabarcıklar olarak görünürler, ancak bazı durumlarda normal deriden biraz farklı görünmektedirler. Pigmente BCC'a genellikle kahverengi veya siyah-mavi görünürler. BCC için mohs mikrografik cerrahi, eksizyon, elektrodikasyon ve küretaj, kriyoterapi, radyoterapi,

fotodinamik tedavi, lokal ve oral ajanlar gibi çeşitli tedavi yöntemleri kullanılır (Gandhi ve Kampp 2015).

2.2.2.2 Skuamöz hücreli karsinom

Skuamöz hücreli karsinom ikinci en yaygın melanom dışı deri kanseridir ve dünya çapında görülme sıklığı zamanla artmaktadır (Gandhi ve Kampp 2015). SCC (Skuamöz hücreli karsinom) için en önemli risk faktörü yoğun güneşe maruz kalmaktır ve UVB ışığı UVA'dan tümör başlatıcı ve promotör olarak daha büyük rol oynar. Tümör oluşumunda diğer faktörler arasında yara izleri ve kronik dermatozlar, çeşitli kimyasal bileşiklere (arsenik, böcek öldürücüler) maruz kalma, önceki radyasyon tedavisi ve insan papilloma virüsü enfeksiyonu bulunmaktadır. Transplantasyonlu hastalar, transplantasyondan 8 yıl sonra ortalama bir SCC gelişimine sahiptir ve genel popülasyona kıyasla kutanöz SCC gelişen kalp ve böbrek transplantasyonu olan bağışıklık sistemi baskılanmış hastalar için 65 kat daha fazla risk taşırlar (Jensen vd. 1999, Ramsay vd. 2000, Gandhi ve Kampp 2015). SCC açık tenli bireylerin güneşe maruz kalan cildinde pürüzlü, pullu, kırmızı-kahverengi, dayanıklı kabarcıklar ve minimal eritem ve ölçekli plakalar olarak görülür. SCC için kullanılan tedavi yöntemleri arasında Mohs mikroskopik cerrahisi, Standart cerrahi eksizyon, Elektrodikasyon ve küretaj, Kriyoterapi, Radyasyon tedavisi ve Fotodinamik tedavi bulunur. (Gandhi ve Kampp 2015).

2.2.2.3 Melanom

Melanin üreten hücrelerin içinde, anormal düzeydeki değişiklikler melanositlerin melanoma dönüşmesine neden olurlar. İki ana melanom türü bulunur. Biri kutanöz, diğeri ise malignant melanomdur. Bazı melanositlerde tümör gelişimi yerine çok düşük konsantrasyonda melanin üretimi gerçekleştirilir. Melanomlar daha az yaygın olmasına rağmen daha ölümcüldür ve diğer iki karsinomdan daha fazla yayılma oranına sahiptir (Abbas vd. 2019).

Melanomun ilerlemesinin Clark modeliyle gösterimi, melanositlerin melanoma aşamalı olarak dönüşümünü vurgular (Miller ve Mihm 2006). Bu model, ben oluşturma sürecinde melanositlerin çoğalmasını ve ardından displazi, hiperplazi, invazyon ve metastaz gelişimini gösterir (Clark vd. 1984, Miller ve Mihm 2006). Çok sayıda genomik (Curtin vd. 2005) ve proteomik (Alonso 2004) analizine dayalı yöntemler ile ortaya çıkan sonuçlar, melanom gelişimi ile ilişkilendirilmiştir (Miller ve Mihm 2006).

- 1. Aşama:** İyi huylu bene yol açan yapısal olarak normal melanositlerin proliferasyonudur. Klinik olarak, bu nevüsler, ten rengi veya koyu kahverengi bir arka planda tek tip renklenme veya düzenli bir nokta benzeri pigment modeli olarak düz veya hafif kabarık lezyonlar olarak bulunur. Histolojik olarak, bu tür lezyonlar bazal katman boyunca artan sayıda iç içe geçmiş melanositlere sahiptir.
- 2. Aşama:** Bir sonraki aşama, anormal büyümenin gelişmesidir. Bu, önceden var olan iyi huylu bir bende veya yeni bir yerde meydana gelebilir. Klinik olarak bu tür lezyonlar asimetrik olabilir, düzensiz sınırlara sahip olabilir, birden fazla renk içerebilir veya artan çaplara sahip olabilir. Histolojik olarak, bu tür lezyonların rastgele ve bitişik olmayan sitolojik yapısı vardır.
- 3. Aşama:** Radyal büyüme evresinde, hücreler intraepidermal olarak çoğalma yeteneği kazanır. Klinik olarak bazen kabarık lezyonlar şeklinde ortaya çıkarlar. Bu lezyonlar artık rastgele atipi göstermez ve bunun yerine lezyon boyunca sitomorfolojik kanser gösterir. İntraepidermal kansere ek olarak, hücreler papiller dermise tek başına veya küçük yuvalarda girebilir, ancak yumuşak agarda koloniler oluşturamaz.
- 4. Aşama:** Dikey büyüme aşamasına ilerleyen lezyonlar, dermisi istila etme ve genişleyen bir nodül oluşturma, papiller dermisi genişletme yeteneği kazanır. Hücreler aynı zamanda retiküler dermise ve yağa da uzanabilir, yumuşak agar içinde büyüyebilir ve çıplak farelere nakledildiği zaman tümör nodülleri oluşturma kapasitesine sahiptir.
- 5. Aşama:** Modeldeki son adım, hücrelerin cildin diğer bölgelerine ve diğer organlara başarılı bir şekilde yayılmasıdır, burada başarılı bir şekilde çoğalabilir ve metastatik bir odak oluşturabilirler. Bu hücreler yumuşak agar içinde

büyüyebilir ve çıplak farelere nakledildiğinde metastaz yapabilen tümör nodülleri oluşturabilir (Miller ve Mihm 2006).

Clark modeli, normal melanositlerden malign melanomaya ilerlemeye eşlik eden histolojik değişiklikleri ifade eder (Clark vd. 1984, Miller ve Mihm 2006). Bu histolojik değişikliklerin melanomdaki belirli gen mutasyonlarıyla ilişkilendirilmesi ve bu mutasyonların normal melanositlerden melanomaya ilerleme sürecinde moleküler düzeyde farklılaşması **Çizelge 2.1**'de belirtilmiştir (Miller ve Mihm 2006).

Çizelge 2.1 Melanomda önemli genler, işlevleri ve melanomda gözükten değişiklikleri (Miller ve Mihm 2006)

Yolak	Gen veya Protein	İşlev	Melanomdaki Değişiklikler
RAS ve MAPK yolu	N-RAS	Onkogen	G13R'de aralıklı aktive edici mutasyon
	BRAF	Onkogen	Nevüs ve melanomda V600E kodonunda aralıklı aktive edici mutasyon
	Mitojenle aktive olan protein kinaz - hücre dışı regüle kinaz (MEK)	Sinyal iletimi	Radyal büyüme ve dikey büyüme aşamalarında yukarı düzenleme
	Hücre dışı ilişkili kinaz 1 veya 2 (ERK1 veya ERK2) veya mitojenle aktive edilmiş protein kinaz (MAPK)	Sinyal iletimi	Artan aktivite
INK4A, CDK, ve Rb	Sikline bağımlı kinaz inhibitörü 2A veya kinaz 4A inhibitörü (CDKN2A veya INK4A)	Tümör baskılayıcı - hücre proliferasyonunun negatif düzenleyicisi	Bazı ailesel melanomlarda germ hattı mutasyonları; aralıklı delesyonlar, promotor inaktivasyonu, birçok melanomda heterozigotluk kaybı.
	Sikline bağımlı kinaz 4 (CDK4)	Hücre proliferasyonunun destekleyicisi	R24C'de nadir ailesel germ hattı mutasyonları nedeniyle INK4A tarafından inhibisyona duysız protein
	Siklin D1 (CCND1)	Hücre proliferasyonunun destekleyicisi	Akral melanomda aralıklı büyüme

Çizelge 2.1 Melanomda önemli genler, işlevleri ve melanomda gözüken değişiklikleri (Miller ve Mihm 2006) (devam)

Yolak	Gen veya Protein	İşlev	Melanomdaki Değişiklikler
	Retinoblastoma (Rb)	Tümör baskılayıcı - hücre proliferasyonunun negatif düzenleyicisi	Fosforilasyon G1'den S'ye ilerlemeye yol açma
ARF ve p53	Alternatif okuma çerçevesi (ARF)	Tümör baskılayıcı, MDM2'yi indirger	Bazı ailesel melanomlarda germ hattı mutasyonları; aralıklı delesyonlar, birçok melanomda promoter inaktivasyonu
	Tümör proteini 53 (p53)	DNA hasarından sonra apoptozu indükleyen ve proliferasyonu baskılayan tümör baskılayıcı	İfade genellikle melanomda mevcuttur
	MDM2	Her yerde bulunma ve yok etme için p53 hedefi	ARF mutasyonu varlığında yukarı regüle
	BCL-2 ile ilişkili X proteini (BAX)	Hücre ölümünün indükleyicisi	Değişken, ancak genellikle aşağı regüle
PTEN ve AKT	Fosfataz ve tensin homologu (PTEN)	Tümör baskılayıcı, PI3K'yi baskılar	Kromozomal bölgenin aralıklı silinmesi
	Fosfatidilinositol 3 kinaz (PI3K)	Birçok büyüme faktörü için sinyal molekülü	PTEN mutasyonu varlığında etkindir
	Protein kinaz B (AKT veya PKB)	PI3K tarafından aktive edilen onkogen hücre sağkalımının artmasına neden olur.	Bazı melanomlarda sağlamlaştırılmış
	BCL-2 hücre ölümü antagonisti (BAD)	Hücre ölümünün indükleyicisi	Değişken, ancak genellikle aşağı regüle

Çizelge 2.1 Melanomda önemli genler, işlevleri ve melanomda gözüken değişiklikleri (Miller ve Mihm 2006) (devam)

Yolak	Gen veya Protein	İşlev	Melanomdaki Değişiklikler
	Forkhead reseptörü (FKHR)	Büyüme baskılama	PI3 yoluna yanıt olarak aktif hale gelir
MSH ve MITF	Pro-opiomelanokortin veya α -melanosit uyarıcı hormon (POMC veya α -MSH)	Pigmentasyonda önemli olan sinyal molekülü	Artmış melanom dikey büyüme fazı
	Melanokortin reseptörü 1 (MC1R)	A-MSH için reseptör	Saç ve deri rengini etkileyen ve ultraviyole radyasyona yanıtı etkileyen polimorfik gen
	Adenilat siklaz (AC)	Döngüsel AMP üreticisi	Yukarı düzenlenmiş
	cAMP yanıt unsur bağlayıcı protein (CREB)	Transkripsiyon faktörü	Yukarı düzenlenmiş; MITF ve melanosit farklılaşmasını etkiler
	Mikroftalmi ile ilişkili transkripsiyon faktörü (MITF)	Transkripsiyon faktörü	Kromozomal bölgenin aralıklı amplifikasyonu
	Tirozinaz (TYR)	Pigment sentezi	Azalan ifade seviyesi
	Tirozinaz ile ilişkili protein 1 (TYRP1)	Pigment sentezi	Azalan ifade seviyesi
	Dopakrom tautomeraz (DCT)	Pigment sentezi	Azalan ifade seviyesi
	Melan-A (MLANA)	Melan-A tarafından tanınan antijen ve T-hücreleri 1 (MART1) antikorları tarafından tanınan melanom antijeni	Azalan ifade seviyesi

Çizelge 2.1 Melanomda önemli genler, işlevleri ve melanomda gözükten değişiklikleri (Miller ve Mihm 2006) (devam)

Yolak	Gen veya Protein	İşlev	Melanomdaki Değişiklikler
	Gümüş homolog (SILV)	HMB-45 antikoruna tarafından tanınan antijen	Azalan ifade seviyesi
	Melastatin 1 (TRPM1)	Bilinmeyen	Metastatik melanomda azalmış ifade
	BCL-2	Hücre sağ kalımı	Melanomun çeşitli evrelerinde değişken yukarı regülasyon
Hücre adezyonu	WNT ailesi	Protoonkogen, GSK3-B'yi inaktive eden salgılanan büyüme faktörü	Yolakta yukarı düzenlenir
	Glikojen sentaz kinaz 3β (GSK3β)	Bozunma için β-katenin'i hedefleyen serin-treonin kinaz	Değişken; WNT yolundan etkilenir
	β-Catenin	Bağlantı proteinini, transkripsiyonel koaktivatörü yapıştırır	Aralıklı dengeleyici mutasyonlar
	T hücre faktörü-lenfoid güçlendirici faktör (TCF-LEF)	Transkripsiyon faktörü	Yukarı düzenlenir
	E-kaderin	Hücre adezyon molekülü	Dikey büyüme aşamasında azalan ifade
	N-kaderin	Hücre adezyon molekülü	Dikey büyüme aşamasında anormal ifade
	αVβ3 integrin	Hücre adezyon molekülü oluşturan dimer	Dikey büyüme aşamasında anormal ifade

2.2.2.3.1 Melanom risk faktörleri

Melanom nedenselliği ve risk ilişkisi, bireysel risk oluşturan genetik ve çevresel faktörlerle karmaşık hale gelmiştir. Melanom gelişme riskinin artmasıyla ilişkili iyi bilinen faktörler arasında Kafkas ırkı, erkek cinsiyeti ve ileri yaş vardır. Genel olarak, melanom için risk faktörleri, kişisel konakçı faktörler veya çevresel maruziyetlerle ilişkili faktörler olarak ayrılabilir (Azoury ve Lange 2014).

2.2.2.3.1.1 Konakçı faktörler

- Melanom veya melanom dışı deri kanseri geçmişi olmasına bağlı olarak araştırmalar bu bireylerde melanom kapma riskinin yaklaşık 3 kat daha fazla olduğunu belirtmiştir (Tucker vd. 1985, Rhodes vd. 1987, Levi vd. 2003, Abern vd. 2013, Li vd. 2013, Azoury ve Lange 2014).
- Melanom riski, beyin, meme, prostat ve diğer kanserler dahil diğer yetişkin malignitelerinin kişisel öyküsü ile ilişkilendirilmiştir (Tucker vd. 1985, Levi vd. 2003, Abern vd. 2013, Li vd. 2013, Azoury ve Lange 2014).
- Çocukluk çağı sarkom, lenfoma, lösemi ve/veya merkezi sinir sistemi tümörü geçmişi olan bireyler, gelecekte melanom gelişme riski 2,5 katına kadar artmıştır (Pappo vd. 2013, Azoury ve Lange 2014).
- Kafkasyalıları arasında iyi huylu melanositik nevüslerin ve atipik nevüs sayısı melanom riskini etkilemektedir (Gandini vd. 2005, Azoury ve Lange 2014).
- Çok büyük olan doğuştan nevüsler, artmış melanom riski ile ilişkilidir (Swerdlow vd. 1995, Azoury 2014).
- Melanom için yüksek riskli iki grup, kırmızı veya sarı saçlı, çok sayıda çilli açık tenli bireyler ve daha koyu saçlı ve melanositik nevüs sayısı yüksek cilde sahip olan bireylerdir (Gandini vd. 2005, Azoury ve Lange 2014). Daha koyu tenli hastalar, kızıl saçlı, açık tenli ve mavi gözlü bireylerden daha az ışığa duyarlı olarak kabul edilir ve daha düşük kişisel melanom riski taşırlar (Gandini vd. 2005, Azoury ve Lange 2014). Saç rengiyle ilgili olarak, kızıl saç en büyük riski ifade eder, ardından sarı ve açık kahverengi saç gelmektedir (Azoury ve Lange 2014). Benzer şekilde, daha açık renkli gözler (mavi veya ela) koyu kahverengi

gözlere göre daha büyük bir risk taşırlar (Gandini vd. 2005, Azoury ve Lange 2014).

- Kızıl saç fenotipi, ayrıca kutanöz melanoma ile bağlantılı olan Melanokortin-1 reseptörü (MC1R) ile ilişkilendirilmiştir (Valverde vd. 1995, Raimondi vd. 2008, Azoury ve Lange 2014).
- Ailede melanom öyküsü pozitif olan bireylerin, aile öyküsü negatif olanlara göre göreceli riski 1.74 daha fazladır (Geller vd. 2002, Azoury ve Lange 2014).
- *MITF* genindeki mutasyon, hem ailesel hem de ara sıra olan melanoma yatkınlık kazandırır (Yokoyama vd. 2011, Azoury ve Lange 2014).
- Ailesel melanomda *CDKN2A* ve *CDK4*'teki germline mutasyonları tanımlanmıştır (Zuo vd. 1996, Haluska ve Hodi 1998, Curtin 2005, Goldstein vd. 2007, Azoury ve Lange 2014).
- Displastik nevüs sendromu olan bireylerde (aynı zamanda ailesel B-K mol sendromu, ailesel atipik çoklu mol melanom sendromu ve ailesel melanom sendromu olarak da bilinir) % 100'e varan yaşam boyu risk rapor edilmiştir (Greene vd. 1985, Rigel vd. 1988, Azoury ve Lange 2014).
- *RB1*, melanom için yüksek penetranslı bir alleldir (Fletcher vd. 2004, Azoury ve Lange 2014).
- BRCA ile ilişkili protein 1'de (*BAP1*) bir mutasyon, çok sayıda kutanöz melanom nesli olan ailelerde bulunmuştur (Njauw vd. 2012, Azoury ve Lange 2014). Benzer şekilde, *BRCA2* gen mutasyonu artmış melanom riski ile ilişkilendirilmiştir (Debniak vd. 2008, Azoury ve Lange 2014).
- Genom Çapında İlişkilendirme Çalışmalarından alınan kayıtlarla, melanoma ile ilişkili tek nükleotid polimorfizmleri ve melanomun belirli fenotipik özellikleri ifade edilmiştir (Gudbjartsson vd. 2008, Azoury ve Lange 2014).
- Xeroderma pigmentozum hastalarında melanom riskinde artış gözlenmiştir (Paszowska-Szczur 2013, Azoury ve Lange 2014).
- MikroRNA'lar, posttranskripsiyonel olarak gen ekspresyonunu düzenleyebilen kısa (yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda) kodlamayan RNA'lardır ve bunların düzensizliklerinin melanom gelişiminde etkileri olabileceği düşünülmektedir (Bennett vd. 2013, Azoury ve Lange 2014). Bu bulguların mekanizması ve etkisi tam olarak ifade edilmemiştir (Azoury ve Lange 2014).

2.2.2.3.1.2 Maruz kalma

- UV ışığı, melanom gelişimi için en iyi bilinen ve en çok araştırılan dış kaynaklı risk faktörüdür (Gilchrest vd. 1999, Noonan vd. 2001, Jhappan vd. 2003, Whiteman vd. 2003, Gandini vd. 2005, Chang vd. 2009, Zaidi vd. 2011, Berger vd. 2012, Hodis vd. 2012, Azoury ve Lange 2014, Bald vd. 2014). Kesin nedensel ilişki karmaşıktır (Azoury ve Lange 2014). Hem aralıklı, yoğun UV ışığına maruz kalma (örneğin güneş yanığı geçmişi) hem de kronik, birikmiş güneşe maruz kalma miktarının melanom patogenezinde etkisi bulunur (Gandini vd. 2005, Azoury ve Lange 2014).
- Son veriler, UV ile indüklenen melanom karsinogenezine ilişkin biyolojik kanıtlar sağlamıştır (Azoury ve Lange 2014). C> T geçişlerinden kaynaklanan *STK19*, *RAC1* ve *PPP6C*'deki önemli mutasyonlar, doğrudan UVB aracılı hasarın bir sonucu olarak belirlenmiştir (Hodis vd. 2012, Azoury ve Lange 2014). Ek olarak, birçok melanom vakasında *p53* tümör baskılayıcı gen mutasyonu rapor edilmiştir ve UV radyasyonunun mutajenezinde bir rol oynadığı düşünülmüştür (Jhappan vd. 2003 , Hodis vd. 2012, Azoury ve Lange 2014). Fare modellerinde, interferon-g'nin UVB ile indüklenen melanosit aktivasyonunu, hayatta kalmayı ve immünizasyonu desteklediği belirtilmiştir (Zaidi vd. 2011, Azoury ve Lange 2014). Benzer şekilde, tekrarlayan UV maruziyeti, anjiyogenez ve melanom metastazını destekleyebilir (Azoury ve Lange 2014, Bald vd. 2014).
- Farklı anatomik bölgelerdeki melanom riski, değişen model ve miktarlarda UV maruziyeti ile ilişkilidir (Chang vd. 2009, Azoury ve Lange 2014). Baş ve boyun melanomu olan bireyler genellikle yüksek düzeyde mesleki güneşe maruz kalmışlardır ve bu nedenle güneşe maruz kalan bu vücut kısımlarında daha sık lezyonlar oluşmuştur (Whiteman vd. 2003, Chang vd. 2009, Azoury ve Lange 2014).
- Solaryum kullanımı melanom gelişimi ile bağlantılıdır (Boniol vd. 2012, Azoury ve Lange 2014). Uluslararası Kanseri Araştırma Ajansı, doğrudan nedensel bir ilişki olduğu sonucuna ulaşmıştır (Gandini vd. 2011, Azoury ve Lange 2014).

- Diğer malignitelerde olduğu gibi, artan yaşla birlikte melanom insidansındaki artış ve daha kötü prognoz gelişmesi, zaman içinde hücrel hasarın birikmesine ve azalan konak savunması ve immün gözetimine bağlı olduğu düşünülmektedir (Curtis 1963, Balch vd. 2001, Finkel vd. 2007, Tsai vd. 2010, Lange vd. 2011, Azoury ve Lange 2014).
- Tıbbi immünosupresyonla ilişkili olduğu varsayılan organ nakli sonrası hastalarda 3 ila 4 kata kadar daha yüksek bir kutanöz malign melanom insidansı bulunmuştur (Lindelöf vd. 2000, Azoury ve Lange 2014).
- Malign melanom insidansı tüm sosyoekonomik gruplarda artış göstermiştir (Linos vd. 2009, Azoury ve Lange 2014). Bununla birlikte, en düşük sosyoekonomik beşte birlik kesimlerdeki bireyler daha ileri aşamalarda bulunur ve en düşük sosyoekonomik duruma sahip grup, kalın tümör insidansında en dik artışı (> 4 mm) göstermiştir (Linos vd. 2009, Azoury ve Lange 2014). Ek olarak, yüzeysel yayılan melanomlar daha düşük sosyoekonomik statüdeki kişilerde daha az görülürken, bu grupta agresif nodüler ve akral lentijinöz melanomlar daha yaygın olarak görülürler (Pollitt vd. 2011, Azoury ve Lange 2014).
- Düşük sosyoekonomik statüye sahip bireylerin Amerika Birleşik Devletleri'nde sağlık hizmetlerine daha zayıf erişim gösterirler (Linos vd. 2009, Azoury ve Lange 2014). Düşük sosyoekonomik durumun yüksek riskli alt gruplarını hedefleyen eğitim ve önleme stratejilerinin uygulanması, melanom kontrolüne yönelik bir halk sağlığı yaklaşımında önemli bir strateji olmayı desteklemektedir (Azoury ve Lange 2014).

2.2.2.3.1.3 Diğer faktörler

Melanom riskini etkileyen diğer olası ilişkiler veya faktörler daha az çalışılmıştır ve bazı raporlar çelişkili sonuçlar ortaya çıkarmıştır: (Azoury ve Lange 2014)

- İnflamatuvar barsak hastalığı olan hastalarda tümör nekroz faktörü a'nın 120 günden daha uzun süreli kullanımını gözden geçiren immünosüpresif tedavi üzerine bir çalışma, uzun süreli kullanımı olmayanlara kıyasla 3.93'lük bir olasılık oranı olduğunu sunmuştur (Long vd. 2012, Azoury ve Lange 2014).

- Melanom gelişimi açısından nonsteroid antiinflamatuvar ilaç kullanımının potansiyel bir koruyucu etkisi tanımlanmıştır (Johannesdottir vd. 2012, Azoury ve Lange 2014).
- Melanom karsinogenez riskinde hamilelik veya hormonların rolünü destekleyen kesin veri belirtilmemiştir (Gandini vd. 2011, Azoury ve Lange 2014).
- Bir meta-analiz, aşırı kilolu ve obez erkeklerde melanom riskinin arttığını, ancak kadınlarda belirgin bir ilişki gözlenmediğini işaret etmiştir (Sergentanis vd. 2013, Azoury ve Lange 2014).
- D vitamini seviyeleri ile melanom arasındaki ilişkinin kanıtı kesinleşmemiştir (Asgari vd. 2009, Azoury ve Lange 2014).
- Birkaç çalışma, Parkinson hastalığı ile artan melanom insidansı arasında bir ilişki olduğunu göstermişti (Fiala vd. 2003, Bajaj vd. 2010, Liu vd. 2011, Azoury ve Lange 2014).

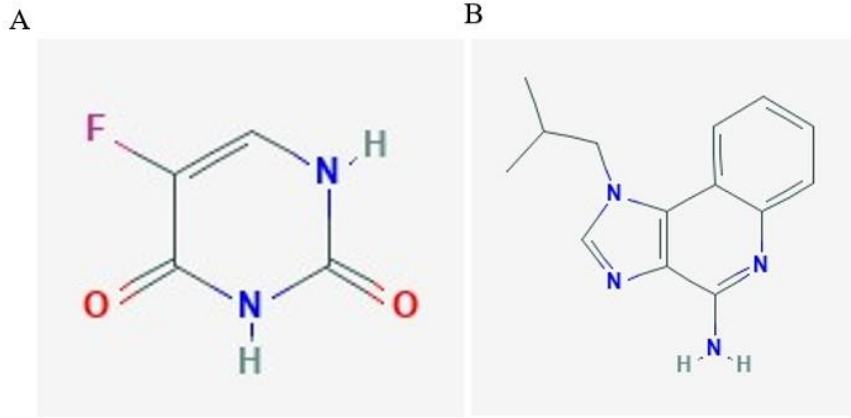
2.2.2.3.2 Melanom tedavisi

Melanom tümörlerinin grupları ve aşamaları, T, M ve N gruplarını ve ayrıca alt bölümlere ayrılan 0, I, II, III, IV aşamalarını içeren bir harf ve romen rakamları sistemi ile tanımlanmaktadır (Abbas vd. 2019). Bu aşamalar, melanomun dağılma seviyesi gibi bazı kriterlere göre gösterilir (Abbas 2019). Her aşamaya göre keşfedilen bazı tedavi yöntemleri bulunur (Berman vd. 2011, McGuire vd. 2012, Hoz vd. 2018, Abbas vd. 2019) (**Çizelge 2.2**).

Çizelge 2.2 Melanom aşamaları ve tedavileri (Abbas vd. 2019)

Melanom aşamaları	Tedavi yöntemleri
Aşama 0	Cerrahi, Imiquimod krem veya radyasyon tedavisi
Aşama I • IA • IB	Sentinel lenf nodu biyopsisi veya ameliyatı
Aşama II • IIA • IIB • IIC	Adjuvan tedavi, cerrahi veya sentinel lenf nodu biyopsisi
Aşama III • IIIA • IIIB • IIIC	Cerrahi tedavi, kemoterapi, radyoterapi, immünoterapi, hedefe yönelik tedavi
Aşama IV	Cerrahi tedavi, kemoterapi, radyoterapi, immünoterapi, hedefe yönelik tedavi

5-Fluorouracil ve Imiquimod melanom için kullanılan topikal tedavilerdir (Micali vd. 2014). 5-Fluorouracil bir Timidin analogudur ve neden olduğu yoğun inflamasyon, anti-tümöral etkilerine katkıda bulunabilir (Desai vd. 2012, Micali vd. 2014). Tedavi için % 0.5 (krem), % 1 (krem), % 2 (çözelti) ve % 5 (krem ve çözelti) 5-FU topikal formülasyonları mevcuttur (Micali vd. 2014). 5-FU onlarca yıldır kullanılmaktadır ve 2-4 hafta gibi kısa bir tedavi süreci gerektirir (Micali vd. 2014). Imiquimod yeni bir topikal immün yanıt düzenleyici sınıfının ilki olan sentetik bir imidazokinolin amin'dir (Micali vd. 2014). Imiquimod dendritik hücreler, monositler/makrofajlar ve Langerhans hücreleri gibi antijen sunan hücrelerin yüzeyinde bulunan Toll benzeri reseptörlere etki eder (Patel vd 2006, Schön ve Schön 2007, Lacarrubba vd 2008, Micali vd. 2014). Birkaç çalışma Imiquimod'in antianjiyojenik özelliklere sahip olduğunu ve yeni damarların patolojik büyümesinin inhibisyonundaki rolü için kanıt sağladığını göstermiştir (Li vd. 2005, Desai vd. 2012, Micali vd. 2014). Daha yakın zamanlarda Imiquimod'in immün hücrelerin lenfatik taşınmasında ve daha sonra tümörlerin immünolojik yıkımına neden olan faktörlerde rol oynayabileceği öne sürülmüştür (Akkilic-Materna vd. 2011, Micali vd. 2014). % 5, % 3.75 ve % 2.5 Imiquimod kreminin topikal formülasyonları şu anda mevcuttur (Micali vd. 2014).



Şekil 2.2 A. 5-Fluorouracil kimyasal yapısı (PubChem 2005) B. Imiquimod kimyasal yapısı (PubChem 2005)

Tümörün özelliklerine (konum, evre ve genetik profil) bağlı olarak, tedavi seçenekleri cerrahi, kemoterapi, radyoterapi, fotodinamik tedavi (PDT), immünoterapi veya hedefe yönelik tedavi olabilir. Evre I – IIIB melanomu olan hastalar için kullanılan birincil tedavi yöntemi cerrahidir (Batus vd. 2013, Miller vd. 2016, van Zeijl vd. 2017, Domingues vd. 2018). Cerrahi işlemler tümörün klinik-patolojik özelliklerine göre farklılık gösterir. Eksizyon, in situ melanomlar için 0,5 cm, kalınlığı 2 mm'ye kadar olan tümörler için 1 cm ve 2 mm'den daha kalın tümörler için 2 cm'lik güvenlik sınırlarını içerir (van Zeijl vd. 2017, Domingues vd. 2018). Sağkalımı iyileştirmek için hedefe yönelik tedavi ve immünoterapi gibi adjuvan tedaviler önerilir (Austin vd. 2017, van Zeijl vd. 2017, Domingues vd. 2018). Melanom metastazı olan hastalar için metastazektomi kullanılmaktadır ve bazı metastatik melanom vakalarında kemoterapi tedavisi de uygulanmaktadır (Batus vd. 2013, Austin vd. 2017, Domingues vd. 2018). Radyoterapi deri, kemik ve beyin metastazlarının tedavisinde kullanılmaktadır (Garbe vd. 2016, Domingues vd. 2018).

Tedavide bir ilacın terapötik etkisini üretebilmesi için, ilacın uygun şekilde uygulanarak organların dokuları ve doku hücreleri ile temas etmesi gerekmektedir. İlaç uygulama

yolu kolaylık, ilaçta istenen etkinin başlangıcı, ilacın doğası, hastanın durumu ve yaşı gibi faktörlerden etkilenecek seçilmektedir (Pharmapproach 2020).

2.3 İlaç Uygulama Yolları

İlaç uygulama yolu çeşitli hastalıkların ve bozuklukların teşhisi, önlenmesi ve tedavisi amacıyla bir ilacın uygun şekilde vücuda alınma yolu olarak belirlenmiştir. İlaç biyoyararlanımının farmakolojik etkinin hem başlangıcını hem de süresini belirlemesi bir ilacın uygulama yolu ile doğrudan etkilenmektedir (Pharmapproach 2020).

İlaç uygulaması Oral yol, Dilaltı/ Bukkal yol, Rektal yol, Topikal yol, Transdermal yol, İnhalasyon yolu/ pulmoner yol ve Enjeksiyon yolu olmak üzere farklı yöntemleri içermektedir (Pharmapproach 2020).

- **Oral yol:** İlaç uygulaması için en sık kullanılan yoldur ve bu yolda ilaç ağızdan alınır. Ağızdan verilen ilaçların çoğu ilacın fizikokimyasal özelliklerinin sınırları içinde çok verimli bir şekilde gastrointestinal sistemden dolaşıma emilir.
- **Dilaltı/ Bukkal yol:** Bu uygulama yolunda ilaç, dil altına (dil altı yolla) veya diş etleri ile yanağın iç astarı arasına (bukkal yol) yerleştirilir. Her iki şekilde de ilacın çözülmesine izin verilir ve mümkün olduğunca yutulmaması sağlanır. İlaç, mukozadan dolaşıma hızla emilir ve böylelikle portal dolaşımı ve karaciğerdeki ilk geçiş metabolizmasını atlar.
- **Rektal yol:** Ağız yolundan farklı olarak tahriş edici veya hoş olmayan nitelikte ilaçlar rektal yoldan verilmektedir. Bu ilaçlar fitil formunda veya sıvı formda olabilir.
- **Topikal yol:** İlaçlar göz, kulak, burun, ağız, vajina vb. deri veya mukoza zarın esas olarak lokal etki için topikal olarak uygulanabilir. Bu yol genel dolaşımı etkilemeden ilacın yüksek lokal konsantrasyonu sağlamaktadır ve krem, merhem ve damla şeklinde bulunabilir.

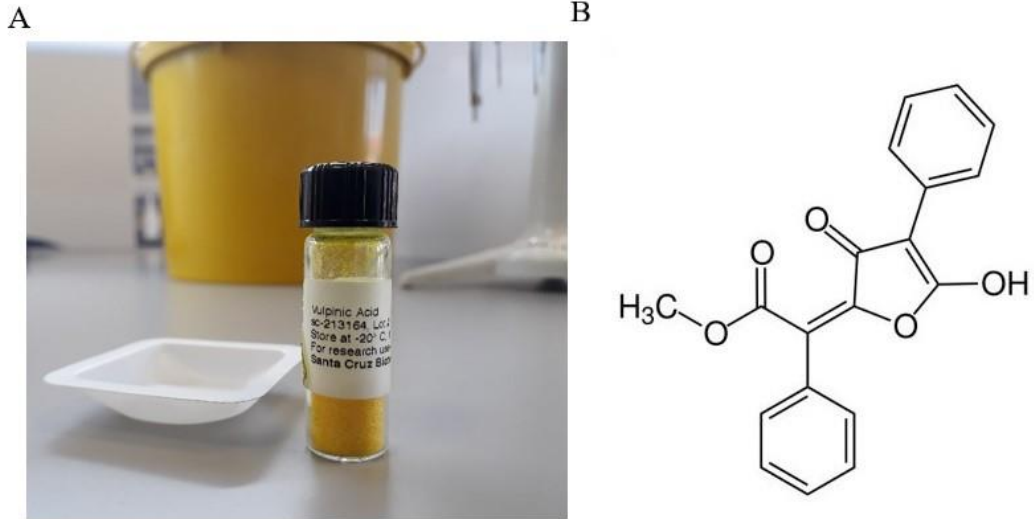
- **Transdermal yol:** İlaç deri yoluyla emilen bir yama içinde bulunmaktadır. Bu yoldan uygulanan ilaçlarda absorpsiyon yavaştır ancak uzun süreli etkiler üretmeyi sağlarlar.
- **İnhalasyon yolu/ pulmoner yol:** Bu yolda ilaçlar, gazlar (örneğin, nitroz oksit) olarak solunabilir ve alveolar membranda difüzyon yoluyla kan dolaşımına girebilir.
- **Enjeksiyon yolu:** İkinci en yaygın kullanılan ilaç yoludur. İlaç çeşitli yerlerde ve şırınga ve iğne kullanılarak çeşitli derinliklerde vücuda çözelti veya süspansiyon şeklinde verilir. Yaygın olarak kullanılan dört enjeksiyon yolu vardır: Intradermal (ID) (dermis içinde uygulama), Derialtı (SC), Intramuscular (IM) (kas içinde uygulama) ve İntravenöz (IV) (damar veya damarlar içinde veya içine uygulama) (Pharmapproach 2020).

2.4 Alternatif tedavi yöntemleri doğal bileşikler

Hastalıkları kontrol etmek amacıyla doğal ürünlerin veya ekstraktların kullanımına yönelik eğilim bulunmaktadır (Amin vd. 2012, Hussain vd. 2014, Mallhi vd. 2015, Mannan vd. 2016, Samina vd. 2016, Qadir vd. 2016, Abbas vd. 2019). Likenler terapötik amaçlı araştırılan doğal bileşiklerdir. Likenler, mantarlar (mikobiyon) ve fotoototrofik, algal partnerler (fotobiyontlar) arasındaki ortaklıktan oluşan organizmalardır. Tüm dünyada yaklaşık 18.500 farklı liken türü tanımlanmıştır (Ranković 2019). Likenler yaşadığı özel koşullar, çeşitli olumsuz fiziksel ve biyolojik etkilere karşı koruma sağlamak amacıyla birçok metaboliti üretmektedirler. Likenler tarafından sentezlenen metabolitler birincil ve ikincil metabolitler olmak üzere ikiye ayrılır (Lawrey 1986, Ranković 2019). Likenlerde bulunan organik bileşiklerin çoğu ikincil metabolitlerdir (Galun ve Shomer-Ilan 1988, Stocker-Wörgötter 2002, Solhaug vd. 2009, Ranković 2019). Liken ikincil metabolitler doğal rollerine ek olarak, antibiyotik, antimikobakteriyel, antimitojenik, antioksidan, antiviral, antipiretik, analjezik ve antitümöral aktivite göstermiş ve geleneksel tıpta çeşitli durumların tedavisinde kullanılmıştır (Boustie vd. 2011, Cardile vd. 2017).

2.4.1 İlaç adayı molekülü : Vulpinik asit

Liken ikincil metabolitlerinden biri olan Vulpinik asit tipik olarak *Letharia vulpina* liken türünden elde edilmektedir (Kwon vd. 2016) (Şekil 2.3). IUPAC ismi methyl (2E)-2-(3-hydroxy-5-oxo-4-phenylfuran-2-ylidene)-2-phenylacetate olan Vulpinik asit'in moleküler ağırlığı 322.3 g/mol'dür (PubChem 2005). Vulpinik asit, bakteri (Shrestha vd. 2016) ve mantarlara (Kwon vd. 2016) karşı antibiyotik aktivite sergilemektedirler (Yi 2019). Vulpinik asitin bir diğer özelliği olarak güçlü UV absorpsiyon yeteneği olması ve aşırı UV-B ışınlaması için filtre görevi görebildiği belirlenmiştir (Rundel 1978, Galloway 1993, Molnár ve Farkas 2010). Vulpinik asitin ek olarak **anti-anjiyogenez**, **anti-proliferatif** ve insan kanser hücrelerine karşı sitotoksiteyi içeren **anti-kanser** etkileri belirtilmiştir (Koparal 2015, Kim vd 2017, Kılıç vd. 2018). Vulpinik asitin normal hücrelere kıyasla kanserli hücreler üzerinde daha fazla sitotoksik etki gösterdiği ve kanser hücrelerinde apoptozu tetiklediği çeşitli çalışmalarla belirlenmiştir (Koparal 2015, Kim 2017, Kılıç vd. 2018). Vulpinik asit'in kanserli hücreleri hedef haline getirmesi, kanser tedavisinde ilaç aday molekülü olabileceğine dair bir göstergedir.



Şekil 2.3 A.Vulpinik asit B.Vulpinik asitin yapısal formülü (Anonymous 2018)

2.5 Hücre Ölümü

Melanom kanserinin ilerlemesi ve hayatta kalması, kanser hücresi hatlarının hücre ölüm yollarını yönlendirmesi, bağışıklık gözetiminde kaçma ve elverişsiz bir mikro ortamda hayatta kalma yeteneğine bağlıdır (Broussard vd. 2018, Mattia vd 2018). Kaza Sonucu Hücre Ölümünde (ACD) hücre ölümü, yüksek basınçlar, ozmotik kuvvetler ve aşırı sıcaklıklar gibi fiziksel stres ortamında meydana gelirken Düzenlenmiş Hücre Ölümü (RCD) önceden tanımlanmış moleküler mekanizma tarafından programlanır bu nedenle, hedeflenen farmakoterapi ve genetik modifikasyon ile modüle edilebilir. (Broussard vd. 2018, Galluzzi vd. 2018). Hücre ölümü mekanizmalarının çoğu birbiriyle kesişen sinyal yollarına sahiptir ve bu da ortaya çıkan direnç ile tedaviyi zorlaştırabilir. Enerji / ATP seviyeleri, hasar veya stres derecesi ve belirli yolak inhibitörlerinin varlığı gibi çeşitli faktörler bir hücrenin **apoptoz**, **otofaji** veya **nekroptoz** geçirme kaderini etkilemektedir (Adewale vd. 2017, Broussard vd. 2018).

2.5.1 Otofaji

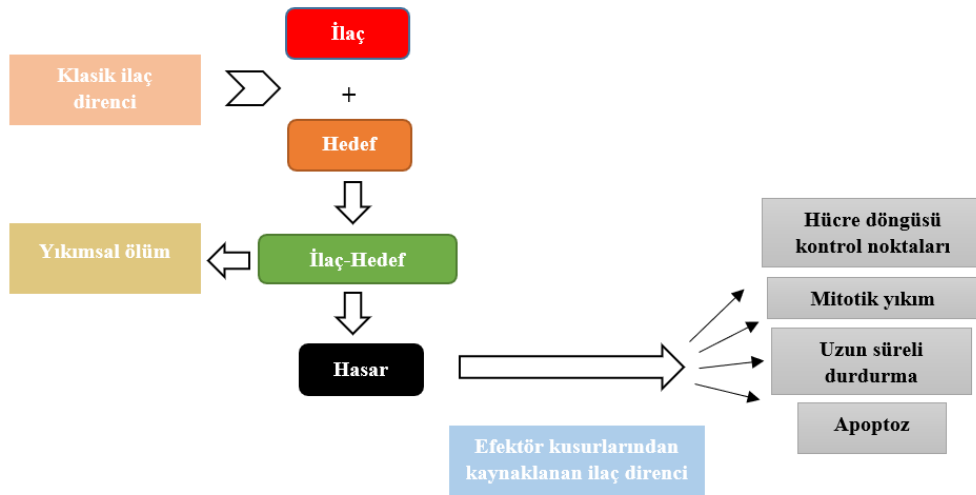
Besin stresine yanıt olarak kendi kendine bozunmayı içeren bir hücre ölüm mekanizması olan otofaji seçici olarak yanlış katlanmış proteinleri ve hasarlı organelleri ortadan kaldırması nedeniyle bir hayatta kalma mekanizmasıdır (Glick vd. 2010, Broussard vd. 2018). Otofaji süreci yüksek oranda korunan bir mekanizmadır. Sitoplazma ve protein kısımları otofagozomlar tarafından yutulur ve bunlar lizozom füzyonu ve bozunması için bağlanır ve bozunma ürünleri daha sonra protein sentezi ve enerji üretimi için substrat olarak işlev görmektedir (Duffy vd. 2015, Broussard vd. 2018). Melanom hücre hatlarında otofaji mutasyona uğramış PI3K/Akt/mTOR yolağını da kapsamak üzere birçok yolakla kontrol edilir. MTOR yukarı yönde fosforile edildiğinde otofajiyi inhibe eden bir kinaz kaskadı başlatır ve bu mekanizma ile mTOR inhibitörleri melanom hücre ölümünü modüle etmede umut vericidir. Bu inhibitörlerin aşağı yönde etkisi ise, çoğalan tümör hücrelerinde kullanılmak üzere proteinlerin ve hücre materyallerinin geri dönüştürülmesiyle kanser hücrelerinin hayatta kalmasını sağlayabilir (Duffy vd. 2015, Broussard vd. 2018).

2.5.2 Nekroptoz

Nekroptoz veya düzenlenmiş nekroz kaspazlardan bağımsız olarak meydana gelen RIPK1 ve RIPK3 kinazlarına bağlı bir hücre ölüm mekanizmasıdır ve apoptozun aksine nekroptoz genellikle yetersiz kaspaz aktivasyonu koşulları altında etkinleştirilir. Nekroptoz RIPK1/RIPK3/MLKL aktivasyon yolağı ile oluşur. Apoptoz için gerekli olan kaspazlar RIP1 ve RIP3'ün bölünmesiyle nekroptozu negatif olarak düzenler (Adewale vd. 2017, Broussard vd. 2018). Nekroptoz süreci başladığı zaman plazma membran geçirgenliği artarak hasarla ilişkili moleküler modeller (DAMPS) oluşur. Nekroptoz apoptoza benzer bir şekilde kaspaz-8'in inhibisyonuna bağlı olarak farklı bir mekanizma yoluyla TNF ailesinin üyeleri tarafından başlatılabilir (Kaczmarek vd. 2013, Broussard vd. 2018). Melanom tümör hücrelerinde RIPK3 ekspresyonunun eksikliğinden dolayı nekroptoz yolağı genellikle düzensizdir. RIPK3 ekspresyonunun nekroptotik sinyallemeyle ortaya çıkarılmasına dikkat edildiğinde bu yolağın yeniden aktivasyonu metastatik melanomda terapötik önem taşımaktadır (Geserick vd. 2015, Broussard vd. 2018).

2.5.3 Apoptoz

Kemoterapötik ajanlar, kanser hücresi proliferasyonunu ve hayatta kalmasını etkileyen birçok hücresel tepkiye neden olabilir (**Şekil 2.4**) ve bu hücresel tepkilerin en iyi çalışılanı, gelişme ve hastalık sırasında normal hücre sayılarını kontrol eden fizyolojik bir hücre ölüm mekanizması olan apoptozdur. (Lowe ve Lin 2000, Johnstone vd. 2002). Apoptoz en erken tanımlanan ve en iyi anlaşılmış hücre ölüm mekanizmasıdır. Apoptoz çeşitli hücre süreçlerinin homeostazını koruma işlevi görür ve apoptotik yoldan kaçınma tümör oluşumu ve melanom hücrelerinin kontrolsüz çoğalması ile ilgilidir. Apoptoza, hem başlatıcı hem de efektör proenzim, kaspazlar aracılık eder ve bunların bir proteolitik kaskad yayması nihai olarak hücre ölümüyle sonuçlanmaktadır (Galluzzi vd. 2018, Adewale vd. 2017, Broussard vd. 2018). Apoptoz İçsel, Dışsal ve Granzim yolları olmak üzere efektör kaspaz-3'te birleşen ve DNA ve protein parçalanmasıyla sonuçlanan üç yolla başlatılır (Broussard vd. 2018).



Şekil 2.4 İlaç etki mekanizması (Johnstone vd. 2002)

2.5.3.1 Dışsal yolak (Ölüm reseptör yolağı)

Apoptozun başlamasına neden olan dışsal sinyal yolları, transmembran reseptör aracılı etkileşimleri dahil etmektedir ve bunlar, tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör geni süper ailesinin üyelerinin ölüm reseptörlerini kapsarlar (Locksley vd. 2001, Elmore 2007). TNF reseptör ailesinin üyeleri, benzer sistein açısından çok fazla hücre dışı alanlara sahiptirler ve "ölüm alanı" adıyla isimlendirilmekte olan ortalama 80 amino asitlik bir sitoplazmik alanı oluştururlar (Ashkenazi ve Dixit 1998, Elmore 2007). Şu zamana kadar tam olarak anlaşılmış ligandlar ve bunların karşılığı ölüm reseptörleri arasında Apo2L/DR5, FasL/FasR, Apo2L/DR4, Apo3L/DR3 ve TNF- α / TNFR1 bulunur (Chicheportiche vd. 1997, Ashkenazi vd. 1998, Peter ve Kramer 1998, Suliman vd. 2001, Rubio-Moscardo vd. 2005, Elmore 2007). Dışsal yolağı açıklayan olaylar dizisi TNF- α /TNFR1 ve FasL/FasR modelleriyle ayırt edilmektedir. Bu modellerde, reseptörlerin kümelenmesi ve homolog trimerik ligand ile bağlanma oluşur. Ligand bağlanması üzerine, reseptörlere bağlanan karşılık gelen ölüm alanlarını sergileyen sitoplazmik adaptör proteinleri görevlendirilir. Fas ligandının Fas'a bağlanması, adaptör proteini FADD'nin bağlanmasıyla sonuçlanır ve TNF ligandının TNF'ye bağlanması, adaptör proteini TRADD'nin FADD ve RIP'nin görevlendirilmesiyle bitirilir (Hsu vd.

1995, Wajant 2002, Elmore 2007). FADD daha sonra, ölüm efektör alanının dimerizasyonu yoluyla procaspase-8 ile birleşir ve procaspase-8'in otomatik olarak aktif hale gelmesiyle bitirilen bir ölüm indükleyici sinyal kompleksi meydana gelir (Kischkel vd. 1995, Elmore 2007). Kaspaz-8 etkinleştirildiğinde, apoptozda yürütme basamağı harekete geçer. Ölüm reseptörü aracılı apoptoz, kaspaz-8 ve FADD'a bağlanarak c-FLIP proteini aracılığıyla inhibe edilebilir ve onları etkisiz hale getirir (Kataoka vd. 1998, Scaffidi 1999, Elmore 2007). Potansiyel apoptoz regülasyonunun farklı noktası, kaspaz-8 işleminin engellenmesi aracılığıyla T hücrelerinde Fas aracılı apoptozu engellediği belirtilen Toso proteinini kapsar (Hitoshi vd. 1998, Elmore 2007).

2.5.3.2 Perforin / Granzim yolağı

Sitotoksik T lenfositleri, hedef olan hücreleri dışsal yoldan etkileyebilir ve FasL/FasR etkileşimi, sitotoksik T lenfosit aracılı indüklenen apoptozun baskın yöntemi olarak ifade edilir (Brunner vd. 2003, Elmore 2007). Sitotoksik etkilerini tümör hücreleri ve virüsle enfekte olmuş hücreler üzerinde, transmembran gözenek oluşturan molekül perforinin salgılanmasını içeren yeni bir yolakla ve ardından sitoplazmik granüllerin gözenek yoluyla ve hedef hücreye ekzofitik salımını içeren yeni bir yolakla gerçekleştirebilir (Trapani ve Smyth 2002, Elmore 2007). Serin proteazlar Granzim A ve Granzim B, granüller içindeki en önemli bileşenler olarak görev alırlar (Elmore 2007). Granzyme B, aspartat kalıntılarındaki proteinleri bölerek prokaspaz-10'u etkinleştirir ve aynı zamanda ICAD (Kaspaz Aktifleştirilmiş DNaz İnhibitörü) gibi faktörleri bölebilir (Sakahira vd. 1998, Elmore 2007). Elde edilen bilgilere göre Granzim B'nin, Bid'nin spesifik bölünmesi ve Sitokrom-c salımının indüksiyonu yoluyla ölüm sinyalinin amplifikasyonu için mitokondriyal yolağı kullanabildiğini belirtmiştir (Barry ve Bleackley 2002, Russell ve Ley 2002, Elmore 2007). Bununla birlikte, Kaspaz-3 Granzim B tarafından etkinleştirilebilir ve apoptozun yürütme aşamasının indüksiyonu gözlenir (Elmore 2007). Hem mitokondriyal yolağın hem de Kaspaz-3'ün aktivasyonunun granzim B ile indüklenen ölüm olayı için önemli olduğu belirtilmiştir (Goping vd. 2003, Elmore 2007). Granzim A, sitotoksik T hücrelerinin neden olduğu apoptozda önemlidir ve Kaspazdan bağımsız yolları etkinleştirir. Hücreye girdikten sonra, Granzim A, DNaz NM23-H1 yoluyla DNA'yı keser (Fan vd. 2003, Elmore

2007). Bu DNAz, tümör hücresi apoptozunun indüksiyonu yoluyla kanseri önlemek için immün gözetimde önemli bir rol oluşturur. SET nükleozom birleştirme proteini normalde NM23-H1'i engellemekle görevlidir. Granzim A proteaz tarafından SET kompleksi bölünür ve apoptotik DNA bozunmasını sağlar. NM23-H1'i inhibe etmenin yanı sıra SET kompleksinin, DNA onarımı ve kromatin yapısında işlevleri vardır. Ape1, SET, HMG2 ve pp32 bu kompleksi oluşturan proteinlerdir ve DNA ve kromatin yapısını korurlar. (Lieberman ve Fan 2003, Elmore 2007). Bu kompleksin granzim A tarafından inaktivasyonu, büyük olasılıkla DNA'nın ve kromatin yapı bütünlüğünün korunmasını bloke ederek apoptoza katkı sağlar (Elmore 2007).

2.5.3.3 İçsel yolak

Apoptozun başlamasını sağlayan içsel sinyal yolları, mitokondri tarafından oluşturulan olaylar olan çeşitli reseptör aracılı olmayan ve hücre içinde sinyaller üreten bir süreci kapsar. İçsel yolağın başlamasına neden olan uyaranlar, pozitif veya negatif olarak yol alabilen hücre içi sinyal üretimini sağlarlar. Negatif olan sinyaller, belirli büyüme faktörlerinin, hormonların ve sitokinlerin yokluğunu içerir, bu da ölüm programlarının bastırılmasının başarısızlığına yol açarak apoptoza neden olur. Başka bir deyişle bu faktörlerin geri çekilmesi, apoptotik baskılamanın kaybı ve ardından apoptozun aktivasyonunu sağlar. Olumlu bir şekilde hareket eden diğer uyaranlar arasında serbest radikaller, toksin maddeler, radyasyon, hipertermi, viral enfeksiyonlar ve hipoksi yer alır (Elmore 2007). Tüm bu uyaranlar mitokondriyal transmembran potansiyelinin kaybı ve normalde sekestre edilmiş pro-apoptotik proteinlerin iki ana grubunun zarlar arası boşluktan sitozole salınmasıyla mitokondriyal geçirgenlik geçişi (MPT) gözeneginin açılmasıyla sonuçlanan iç mitokondriyal membranda değişikliklere neden olur (Saelens vd. 2004, Elmore 2007).

İlk grup Smac/DIABLO, Serin Proteaz HtrA2/Omi ve Sitokrom-c'den oluşmaktadır (Du vd. 2000, van Loo vd. 2002a, Garrido vd. 2005, Elmore 2007). Bahsedilen proteinler Kaspazla bağımlı olan mitokondriyal yolağı etkinleştirirler. APAF-1'in yanı sıra Sitokrom-c, Procaspase-9'a bağlanır ve aktive ederek bir "apoptozom" oluşturmaya neden olur (Chinnaiyan 1999, Hill vd. 2004, Elmore 2007). Procaspase-9'un bu şekilde

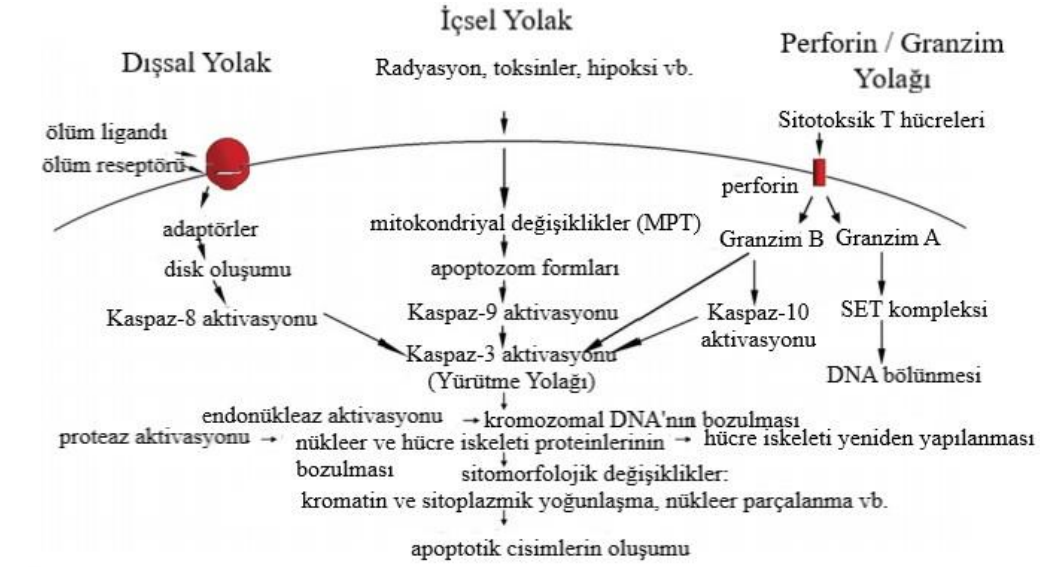
kümelenmesi, kaspaz-9 aktivasyonu sağlar. HtrA2/Omi ve Smac/DIABLO'nun IAP (apoptoz proteinlerinin inhibitörleri) etkisini engelleyerek apoptoza yönelttiği belirtilmiştir (van Loo vd. 2002a, Schimmer 2004, Elmore 2007). İkinci pro-apoptotik proteinler olan endonükleaz G, CAD ve AIF apoptoz gerçekleştiği sırada mitokondri üzerinden salınır fakat belirtilen olay hücre ölmeye karar verdikten sonra geç meydana gelir. AIF çekirdeğe yer değiştirir ve DNA fragmentasyonuna ~ 50-300 kb parçalara ve periferik nükleer kromatinin yoğunlaşmasını sağlar (Joza vd. 2001, Elmore 2007). Bu erken nükleer yoğunlaşma şekli "Aşama I" yoğunlaşma olarak ifade edilir (Susin vd. 2000, Elmore 2007). Endonükleaz-G ayrıca oligonükleozomal DNA fragmanları üretmek amacıyla nükleer kromatini parçaladığı çekirdeğe yer değiştirir (Li vd. 2001, Elmore 2007). Endonükleaz-G ve AIF Kaspazdan bağımsız olarak çalışmaktadır. CAD mitokondri üzerinden salındıktan sonra çekirdeğe geçer. Daha sonra Kaspaz-3 tarafından bölünmeden sonra oligonükleozomal DNA fragmentasyonuna ve kromatin yoğunlaşmasını sağlar (Enari vd. 1998, Elmore 2007). Bu daha belirgin olan kromatin yoğunlaşmasına "Aşama II" yoğunlaşması adı verilir (Susin vd. 2000, Elmore 2007).

Apoptozun Fas yolağındaki mitokondriyal hasara, Bid'nin Kaspaz-8 bölünmesi neden olur (Li vd. 1998, Esposti 2002, Elmore 2007). Bu, ölüm reseptörü (dışsal) yolak ile mitokondriyal (içsel) yolak arasındaki "çapraz konuşma"nın bir örneği olarak gösterilir (Igney ve Krammer 2002, Elmore 2007). Bad fosforile edildiği zaman sitozolde tutulur, Bad fosforile edilmediği zaman Sitokrom-c'yi serbest bırakmak için mitokondriye yer değiştirir (Zha vd. 1996, Elmore 2007). Bad'ın Bcl-Xl veya Bcl-2 ile heterodimerleşme, muhafaza edici özelliklerini nötralize etme ve hücre ölümünü isteklendirmek gibi görevleri vardır (Yang vd. 1995, Elmore 2007). Hem Bcl-2 hem de BclXl mitokondri üzerinden sitokrom C salınımı olayını engelleyebilir. Raporlar, Bcl-XL ve Bcl-2'nin, öncelikle Kaspaz proteazlarının etkisini denetleyerek apoptozu engellediğini belirtmektedir (Newmeyer vd. 2000, Elmore 2007). "Aven" olarak adlandırılan ek bir proteinin Bcl-Xl ve APAF-1'i bağladığı ve bunun sonucunda Procaspase-9'un etkisini önlediği gösterilmektedir (Chau vd. 2000, Elmore 2007). Bcl-2 veya Bcl Xl'in aşırı ekspresyonunun diğerini aşağı regüle edeceğine dair kanıtlar vardır, bu da bu iki protein arasında karşılıklı bir düzenleme olduğunu ifade eder (Elmore 2007).

Dışsal ve içsel yolların her ikisi de, apoptozun son yolağı olarak kabul edilen yürütme aşamasının noktasında sonlanırlar. Apoptozun bu aşamasını başlatan, uygulayıcı kaspazlarının etkin hale gelmesidir. Uygulayıcı Kaspazlar, çekirdek materyali bozan sitoplazmik endonükleazı, nükleer ve hücre iskelet proteinlerini bozan Proteazları etkinleştirirler. Sitokeratinler, Alfa Fodrin, PARP, çekirdek protein NuMA, Kaspaz-3, Kaspaz-6 ve Kaspaz-7 ve diğerleri dahil olmak üzere çeşitli substratları bölerek, efektör veya "uygulayıcı" Kaspazlar olarak işlev görür ve sonuçta morfolojik ve apoptoza uğrayan hücrelerde olan biyokimyasal farklılıkları oluşturmaktadırlar (Slee vd. 2001, Elmore 2007).

Kaspaz-3, başlatıcı kaspazlarından herhangi biri sayesinde aktif hale getirilebilir ve uygulayıcı kaspazlarının en önemlisidir. Endonükleaz CAD, Kaspaz-3 tarafından etkinleştirilir. Daha sonra CAD, ICAD ile kompleks haline gelir. Aktif olan Kaspaz-3, CAD'i serbest bırakmak için ICAD'yi böler (Sakahira vd. 1998, Elmore 2007). CAD sonraki aşamada çekirdeklerdeki kromozomal DNA'yı bozarak kromatin yoğunlaşmasını sağlar. Kaspaz-3 ayrıca hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesini ve hücrenin apoptotik cisimlere parçalanmasına neden olur. Gelsolin, aktive Kaspaz-3'ün temel substratlarından biridir (Elmore 2007).

Apoptotik hücrelerin fagositik alımı, apoptozun son tamamlayıcısıdır. Apoptoz sırasında fosfatidilserin hücrenin dış kısmına translokasyon mekanizması iyi anlaşılmamışsa da, aminofosfolipid translokaz aktivitesinin kaybı ve çeşitli sınıflardan fosfolipidlerin spesifik olmayan hareketi ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Bratton vd. 1997, Elmore 2007). Araştırmalar, Fas, Kaspaz-8 ve Kaspaz-3'ün, oksidatif olarak stresli eritrositlerde fosfatidilserin dışsallaştırılmasının düzenlenmesinde rol oynadığını, ancak kaspaz bağımsız fosfatidilserin maruziyetinin, birincil T lenfositlerin apoptozu sırasında meydana geldiğini belirtmektedir (Ferraro-Peyret vd. 2002, Mandal vd. 2005, Elmore 2007). Apoptotik hücrelerin dış kısmında fosfatidilserinin görülmesi daha sonra enflamatuar olmayan fagositik tanımayı kolaylaştırarak bunların erken alımına ve atılmasını sağlarlar (Fadok vd. 2001, Elmore 2007). Hücresel bileşenlerin serbest bırakılmadığı bu erken ve verimli alım süreci, esasen hiçbir enflamatuar tepki oluşturmazlar (Elmore 2007).



Şekil 2.5 Apoptotik olayların şematik olarak gösterilmesi (Elmore 2007)

2.5.4 Apoptotik yollardaki moleküller

2.5.4.1 TP53

TP53, 53 kDa'lık bir stres yanıt genidir ve fonksiyonel özellikleri arasında genomik dengenin korunması ve genotoksik uyarılara yanıt olarak apoptozun indüksiyonu vardır (Hall vd. 1996, Hussein vd. 2003). *P53* hasarlı DNA'nın replikasyonunu inhibe eden G1/S geçişinde hücre döngüsü tutuklamasına neden olur, kusurlu DNA'ya sahip hücreleri yok etmek için apoptozun indüksiyonunu sağlar ve bu mekanizmalara katılan diğer moleküllerle etkileşim halindedir (Donehower vd. 1992, Hussein vd. 2003). Tümör proteini *P53* mitokondriyal ve ölüm reseptörünün neden olduğu apoptotik yollarda görevli proteinlerin çeşitli mekanizmalarla ekspresyonunu uyarabilir. İlk olarak *P53*, mitokondride bulunan Bax, Noxa ve PUMA gibi birkaç proteini uyarır (Henry vd. 2002, Hussein vd. 2003). Noxa ve PUMA apoptozomu oluşturmak için APAF-1 ve Kaspaz-9 ile birleşen Sitokrom-c'nin mitokondriden salınmasını uyarır. Kaspaz 9 aktif formu en zarar verici Kaspaz olan Kaspaz-3'ü aktive eder (Wu ve Deng 2002, Hussein vd. 2003). Kaspaz-3 hedef substratlarını yani kaspaz ile aktifleştirilmiş

deoksiribonükleaz inhibitörü (ICAD) keser ve bu kaspaz ile aktifleştirilmiş deoksiribonükleazın (CAD) aktivasyonu sağlar ve ardından internükleozomal DNA bozunması ile sonuçlanır (Sakahira vd. 1998, Hussein vd. 2003). Kaspaz-3 ek olarak Prokaspaz-6 ve 7 gibi diğer kaspazları aktifleştirebilir (Hussein vd. 2003). İkinci olarak P53, FAS gibi ölüm reseptörlerinin ifadesini ve ölüm alanı içeren protein PIDD'yi (pro-apoptotik etkileşim alanı) uyarabilir ve bu apoptoz mekanizmasının aktivasyonu ile sonuçlanır (Kim vd. 2002, Hussein vd. 2003).

2.5.4.2 APAF-1

APAF-1 P53'e bağlı apoptoza aracılık etmek için Sitokrom-c ve Kaspaz-9 ile birlikte hareket eden 130 kDa hücre ölümü efektör proteindir (Soengas vd. 2001, Hussein vd. 2003). APAF-1 ifadesinin kaybı melanomda allelik delesyon ve kemoterapiye direnç ile ilişkilidir (Soengas vd. 2001, Hussein vd. 2003).

2.5.4.3 Bcl-2 ailesi

Bcl-2 protein ailesi hem inhibitörleri (Bcl-XL, Bcl-2, Mcl-1 gibi) hem de promotörleri (Bik, Bax, Bid, Bak gibi) kapsar ve bu molaküller hem çok alanlı proteinleri (Bak ve Bax) hem de yalnızca BH3 proteinlerini (Bad, Noxa ve PUMA) içermektedir. Bcl-2 proteinleri dış zarda gözenekler oluşturarak veya geçirgenlik gözeneklerinin açılıp kapanmasını düzenleyerek mitokondriyal geçirgenliğin kontrolünü sağlamaktadır. Bcl-2 protein ailesi apoptotik mitokondriyal olayların kontrolü ve düzenlenmesinde görev almaktadır (Cory ve Adams 2002, Elmore 2007). Hem normal melanositlerde hem de melanomlarda Bcl-2 ailesi molekülleri (Bax, Bak, Bad, Bcl-XL ve Mcl-1) Bcl-2'ye ek olarak ifade edilmektedir (Selzer vd. 1998, Huang ve Strasser 2000, Hussein vd. 2003).

Bcl-2 anti-apoptotik bir zar ile ilişkili proteindir (Jacobson vd. 1993, Hussein vd. 2003). Bcl-2 Sitokrom-c'nin mitokondriyal salınımını ve APAF-1'in Kaspaz-9 ile etkileşimini modüle eder, Bax'a bağlanır ve c-Myc'nin neden olduğu apoptoza engel olur (Bissonnette vd. 1992, Yin vd. 1994, Li vd. 1997, Hussein vd. 2003).

Bid bir pro-apoptotik proteindir ve sinyal iletim yollarını mitokondriyal ölüm efektör mekanizmasına bağlamakta görevlidir. TNF-R1/Fas hücre yüzeyi "ölüm" reseptörlerinin aktivasyonu ve Kaspaz-8 aracılığıyla sitoplazmik 22 kDa Bid protein kesik (tBid) 15 kDa proteinine bölünür. Daha sonra tBid mitokondriyal membrana yer değiştirir apoptoza yol açan aşağı akış Kaspaz kaskadını yayan Sitokrom-c'nin salınımını uyarır (Yamada vd. 1999, Thomas vd. 2000, Hussein vd. 2003).

Noxa ve PUMA mitokondriye yerleşen P53 aracılı apoptozda doğrudan bir hedef olan proteindir. Noxa insanlarda P53'e duyarlı bir unsur içermektedir ve bunun antisens nükleotid tarafından engellenmesi P53 aracılı apoptozu kısmen durdurur. PUMA bir P53 bağlanma yerine sahiptir ve P53'ün hem normal hem de tümör hücrelerinde aktivasyonu PUMA aktivasyonunu sağlamaktadır. PUMA indüklenmesi, Sitokrom-c'nin mitokondriyal salınımı ve Procaspase-9'un aktivasyonu ile bitirilir (Wu ve Deng 2002, Hussein vd. 2003).

Bax Bcl-2'nin koruyucu rolünü antagonize edebilen sitoplazmada veya hücre zarında bulunan Pro-apoptotik bir Bcl-2 homologu olan proteindir (Yin vd 1994, Hussein vd. 2003).

Mcl-1 ve Bcl-XL anti-apoptotik proteinlerdir ve Bax ile heterodimerizasyon veya c-Myc kaynaklı apoptozun azaltılmasında rol alırlar (Reynolds vd. 1994, Hussein vd. 2003). Bcl-XL, Bcl-2'den daha güçlü anti-apoptotik etkiler üreterek hücreleri P53 aracılı apoptoza girmekten koruyabilir (Gottschalk vd. 1994, Ogretmen ve Safa 1996, Hussein vd. 2003).

2.5.4.4 Tümör nekroz faktörü (TNF) ailesi

TNF ve lenfotoksin ilkin belirli hücre tiplerinin parçalanmasına neden olan lenfositlerin ve makrofajların ürünleri olarak belirlenmiştir ve TNF/TNF ile ilişkili süper ailesi (TNF/ TNF-R SFP'ler) olarak adlandırılan birkaç ilgili proteini kapsarlar. TNF ligandları tip 2 proteinlerdir ve hem membrana gömülü hem de bölünmüş çözünür

biçimlere sahiptirler (Locksley vd. 2001, Hussein vd. 2003). TNF ligandlarının reseptörlerine bağlanmasının ardından reseptörlerin sitoplazmik uçları TRAF'lar (TNF-reseptör ile ilişkili faktörler) ve DD (ölüm alanları) olmak üzere iki ana sinyalleme proteini sınıfı ile iç kompleksler oluştururlar. Ligandların DD ile reseptörlere bağlanması kaspaz aktivasyonuna ve hücre ölümüne neden olan FADD ve TRADD gibi adaptörlerin birleşmesini sağlar (Scaffidi vd. 1999, Hussein vd. 2003).

TRAF'lar sitoplazmik adaptör proteinlerdir ve apoptoz ve hayatta kalmada önemli rollere sahip sinyal aracı olarak görev alırlar. TRADD ve FADD gibi çeşitli adaptör proteinleri, NIK ve JNK (c-Jun N-terminal kinaz) dahil kinazlar ve kaspazlar içeren daha büyük sinyal komplekslerinin oluşumuna aracılık edebilirler (Arch vd. 2000, Hussein vd. 2003).

TRAIL TNF ailesinin yeni bir üyesi olarak tümör hücrelerine özel güçlü etkilere sahiptirler. TRAIL ligandının ölüm alanlarını kapsayan hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanması, bu reseptörlerin çapraz bağlanmasını sağlar ve ölüm alanları daha sonra FADD gibi adaptör bileşenlerinin montajına neden olur. FADD, CARD'ının bu proteazların prodomainiyle etkileşimi yoluyla kaspazları etkinleştirir (Thomas vd. 2000, Hofmann vd. 1997, Hussein vd. 2003). Normal hücreler TRAIL ligandının bağlanması için ölüm reseptörleri ile rekabet eden TRAIL tuzak reseptörlerinin varlığı ve TRAIL ligandı hem tuzağa hem de ölüm reseptörlerine bağlandığı zaman anti-apoptotik NF- κ B'nin aktivasyonu yoluyla TRAIL'in etkilerinden korunabilirler (Ashkenazi ve Dixit 1999, Zhang vd. 2000, Hussein vd. 2003). TRAIL apoptozu diğer TNF ailesi üyelerinden daha etkili bir şekilde kanser hücrelerinde seçici olarak apoptozu indüklediği için tedavide umut verici bir hedef olarak kullanılabilir (Griffith vd. 1998, Thomas vd. 1998, Hussein vd. 2003).

FasL TNF ailesinin bir tip II membran proteinidir ve T hücresi aracılı sitotoksitede rol oynar (Suda vd. 1993, Hussein vd. 2003). FasL'nin Fas'a bağlanması, Kaspaz kaskadının aktivasyonu yoluyla apoptozu indükleyen bir dizi hücre içi olayı başlatır (Raisova vd. 2000, Hussein vd. 2003). Fas aracılı apoptoz, iki yoldan oluşur. Bunların ilki kaspaz 8'in DISC'de toplanmasını ve aktivasyonunu ardından Prokaspaz-3'ün

bölünmesini kapsar ve aktif olan Kaspaz-3 ICAD gibi birçok molekülü böler. Aktive CAD, internükleozomal DNA bozulmasıyla apoptoza neden olur (Sakahira vd. 1998, Hussein vd. 2003). İkinci yolak ise Bid'in tBid'e kesilmesini kapsar ve bu da Bax'ın mitokondriyal membrana girmesine ve SMAC/DIABLO ve Sitokrom-c gibi pro-apoptotik moleküllerin salınmasını sağlayarak apoptozomu oluşturur. Kaspaz-9 ayrıca procaspase-3'ü aktif hale getirir (Gross vd. 1999, Hussein vd. 2003).

2.5.4.5 Apoptoz inhibitörleri (IAP) ailesi

IAP'ler bir anti-apoptotik protein ailesidir ve çeşitli türlerde korunurlar. IAP'ler ilk olarak böceklerde özgü bir virüs grubu olan bakulovirüslerde keşfedilmiştir ve bunların insan benzerleri arasında nöronal apoptoz inhibe edici protein (NAIP), cIAP1, cIAP2, XIAP, Livin ve Survivin bulunmaktadır. cIAP1, cIAP2, XIAP ve Survivin uç Kaspaz-3 ve 7'nin aktif formlarına bağlanabilir ve bunları inhibe edebilmektedir. cIAP1, cIAP2 ve XIAP ayrıca Kaspaz-9'un zimojen formuna bağlanır ve böylece proteolitik işlenmesinin yanı sıra Kaspaz-3, 6 ve 7 gibi aşağı akış proteazlarının işlenmesini önleyebilmektedir (Kasof ve Gomes 2001, Hussein vd. 2003). IAP ailesi proteinlerinin bazı üyeleri belirli insan kanserlerinde ifade edilir ve bu sebepten dolayı inhibitör etkilerinin ortadan kaldırılmasıyla kanser hücrelerini antikanser ilaçlara duyarlı hale getirmede fayda sağlayabilirler (Deveraux ve Reed 1999, Hussein vd. 2003).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Kimyasal malzemeler

Dulbecco's Modified Eagle Ortamı (DMEM, Sigma), MGM-4 Melanosit Büyüme Besiyeri-4 Bullet Kit (MGM-4, Lonza), Fetal Sığır Serum (FBS, Biological Industries), Penisilin / Streptomisin (Biowest), Tripsin-EDTA (Biological Industries), Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS, Capricorn Scientific), Dimetilsülfoksit (DMSO, Sigma), GENEzol Reagent (Geneaid), Tripan mavi boyası (Biorad), Vulpinik asit (Santa Cruz Biotechnology), Kloroform (MERCK), İzopropanol (EMSURE), Etanol (MERCK), SYBR Green (Roche).

3.1.2 Sarf malzemeler

T25 ve T75 Hücre kültürü flasks (SARSTEDT), Kriyovial tüp (SARSTEDT), Steril PCR tüp (Greiner Bio-One), Steril falkon tüp (SARSTEDT), Steril serelolik pipetler (JET BİOFİL), Steril filtreli pipet uçları (BioPointe Scientific), 96 ve 6 kuyulu düz tabanlı steril plaka (SARSTEDT), 384 kuyucuklu plaka (ROCHE), PVDF membran (Thermo Fisher Scientific), Hücre kazıyıcı (SARSTEDT), Filtre kağıdı (Biorad).

3.1.3 Kitler

Human Apoptosis Assay Primer (Real Time Primers), cDNA Sentez Kit (EURx), Kaspaz-3 kolorimetrik kit (Sigma).

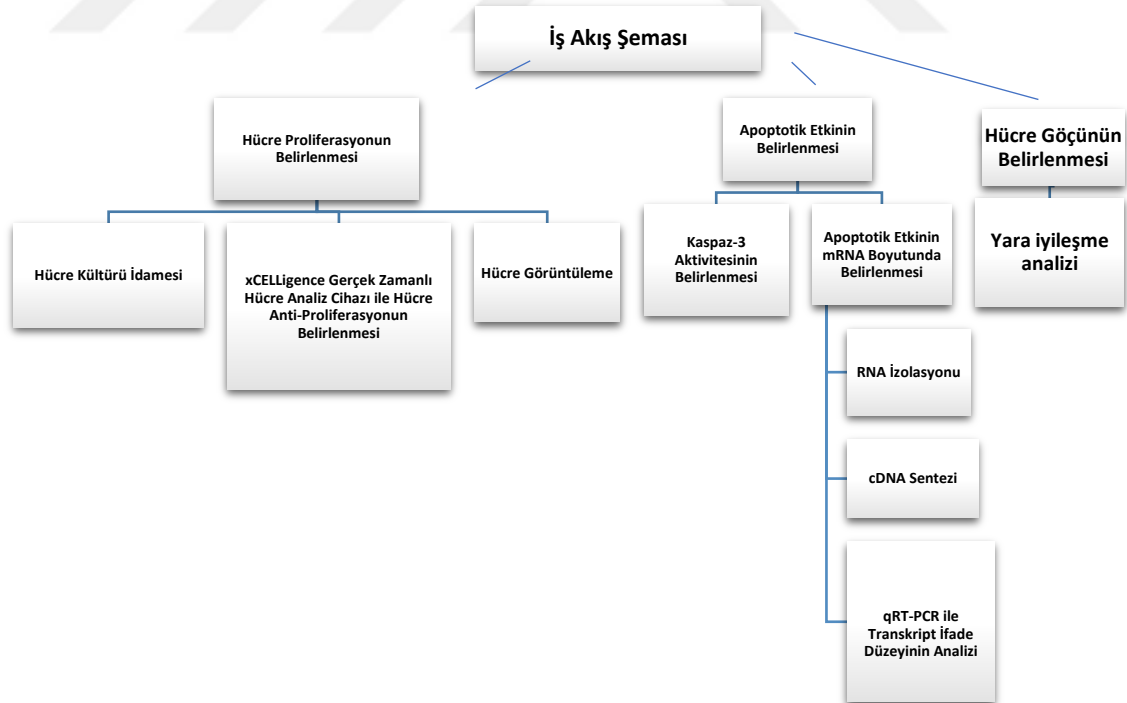
3.1.4 Cihazlar

TC20 otomatik hücre sayıcı (Bio-Rad), xCELLigence RTCA S16 (ACEA Biosciences), Laminar flow kabin (Holten LaminAir Model 1,8), Mikroskop (Leica DCF290), Su

banyosu (Lab-Line Aquabath), Otomatik pipetler 10 µl, 20 µl, 100µl, 200 µl, 1000µl (Gilson), Santrifüj (Hettich Zentrifugen Rotina 35R), CO₂ İnkübatör (Sanyo CO2 Incubator), Sıvı azot tankı (STATEBOURNE cryogenics), Real Time PCR (Roche Light Cyclers 480), Shaker (Finepcr Orbital Shaker SH30), Saf su cihazı (Millipore Synergy, 185), Nanodrop (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer), Infinite M Plex (Tecan), Kırık buz makinası (Scotsman), Terazı (Shimadzu AX200), Isı bloğu (Major Science).

3.2 Yöntem

Yapılan tez içeriğinde bir liken sekonder metaboliti olan Vulpinik asitin uygulaması sonucunda insan deri maling Melanom'dan türetilen hücre hattı A-375 ve insan epidermal melanosit hücrelerinin proliferasyonu belirlenip daha sonra hücre göçünün etkisi ve apoptotik etkisi araştırılmıştır. Deneysel iş akış şeması **Şekil 3.1**'de gösterilmektedir.



Şekil 3.1 Deneysel iş akış şeması

3.2.1 Hücre kültürü idamesi

3.2.1.1 Hücrelerin büyüme şartları

İnsan deri maling melanomdan türetilen A-375 hücre hattının (ATCC No. CRL-1619) büyümesi ve çoğaltılması için, %10 FBS, %1 penisilin / streptomisin içeren DMEM yüksek glukoz besiyeri (Sigma, Katalog No. D6429) kullanılmıştır. İnsan epidermal melanosit hücre hattının (Lonza) büyümesi ve çoğaltılması için MGM-4 Melanosit Büyüme Besiyeri-4 Bullet Kit (Lonza, Katalog No. CC-3249) kullanılmıştır. İki hücre hattı 37 °C’de %5 CO₂’li ortama sahip inkübatörde kültür edilmiştir.

Çizelge 3.1 Tez kapsamında kullanılan hücre hatları, katalog numaraları ve kullanılan besiyeri içerikleri

Hücre hattı	Hücre Katalog Numarası	Hücre için kullanılan besiyeri içeriği
A-375 (İnsan deri maling melanomdan türetilen hücre hattı)	Kat No. CRL-1619	DMEM yüksek glukoz+%10 FBS, %1 Penisilin / Streptomisin
NHEM-Ad (İnsan epidermal melanosit hücre hattı)	Kat No. CC-2586	MGM-4 Bullet Kit

3.2.1.2 Hücre açılması ve besiyerinin değiştirilmesi

Sıvı azot tankından çıkarılan hücrelerin su banyosunda 1-2 dk çözülmesi beklenmiştir ve daha sonra 5 ml uygun besiyeri bulunan 15 ml’lik falkona aktarılmıştır. Hücre eklenmiş 15 ml’lik falkon 1500 rpm’de 5 dk 4 °C’de santrifüj edilerek hücreler pellet olarak çöktürülmüştür. Santrifüj sonrası oluşan süparnatant kısmı atılmış ve pelet 5 ml taze besiyerinde çözülmüştür. 5 ml taze uygun besiyerinde çözülen hücreler T25’lik flaska alınmıştır. Hücrelerin homojenliği mikroskopta kontrol edildikten sonra flask 37

°C’de %5 CO₂’li inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Hücrelerin morfolojik yapıları, canlılıkları ve kültür ortamı her gün mikroskop ile takip edilmiştir. Her iki günde bir hücrelerin besiyerleri değiştirilmiştir ve 37 °C’de %5 CO₂’li inkübatöre kaldırılmıştır.

3.2.1.3 Hücre pasajlanması

%80-90 oranında doygunluğa ulaşan hücreler pasaj aşaması için laminar kabin içine alınmıştır. Flaskta bulunan besiyeri atıldıktan sonra 4 ml PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiş ve PBS uzaklaştırılmıştır. Flaska 1 ml Tripsin-EDTA eklenmiş ve 1-2 dk inkübatörde bekletilmiştir. Hücrelerin flask yüzeyinden tamamen ayrıldığı mikroskop ile kontrol edildikten sonra 4 ml uygun besiyeri eklenerek pipetaj yapılmıştır. Hücreler 15ml’lik falkona alınmış ve tripsinin uzaklaştırılması için 1500 rpm’de 5 dk 4 °C’de santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrasında süpernatant atılmış ve pelet 5 ml taze uygun besiyeriyle çözülmüştür. Çözülen hücreler iki ayrı T25’lik flaska eşit olarak dağıtılmış ve üzerine 2.5 ml taze besiyeri eklenerek pipetaj yapılmıştır. Flask 37 °C, %5 CO₂ şartlarda inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.1.4 Hücre dondurulma ve saklanması

Dondurma ortamı %10 DMSO ve %90 FBS kullanılarak taze olarak hazırlanmıştır. %80-90 doygunluğa ulaşan dondurulacak hücreler laminar kabin içerisine alınmıştır. Flasktaki besiyeri çekilip atılmış ve 4 ml PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. PBS uzaklaştırıldıktan sonra flaska 1 ml Tripsin-EDTA eklenmiş ve 1-2 dk inkübatörde bekletilmiştir. Hücrelerin flask yüzeyinden tamamen ayrıldığı mikroskop ile kontrol edildikten sonra 4 ml besiyeri eklenerek pipetaj yapılmıştır. Hücreler 15 ml’lik falkona alınmış ve Tripsinin uzaklaştırılması için 1500 rpm’de 5 dk 4 °C’de santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrasında süpernatant atılmış ve pelet halindeki hücreler 1 ml dondurma ortamında çözülmüştür. Dondurma ortamında çözülen hücreler krovial tüpe alınmıştır. Krovial tüp ilk olarak -20 °C’de 1 saat bekletilmiştir. Ardından -80 °C’de 24 saat tutularak kademeli bir şekilde hücre dondurma süreci gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin uzun süre muhafaza edilmesi için son olarak krovial tüp sıvı azot tankına geçirilmiştir.

3.2.1.5 Hücre sayımı

Hücre sayımı işlemi TC20 otomatik hücre sayıcı ile gerçekleştirilmiştir. Hücre sayımı aşaması için ilk olarak sayım slaytının ilk haznesine 10 µl hücre süspansiyonu yüklenmiştir. Hücre canlılığını belirlemek için Tripan mavi boyası kullanılmıştır. 10 µl tripan mavi boyası ve 10 µl hücre süspansiyonu bir ependorf tüp içerisinde pipetaj yapılarak karıştırılmıştır. Sayım slaytının diğer haznesine bu karışımdan 10 µl yüklenmiştir. Sayım slaytlarına yükleme yapıldıktan hemen sonra sayma işlemine geçilmiştir. Bunun için sayım slaytları TC20 otomatik hücre sayıcının slayt yuvasına yerleştirilmiş ve sayım alınmıştır. Her bir sayı 3 tekrarlı yapıp ortalama hücre sayısı alınmıştır.

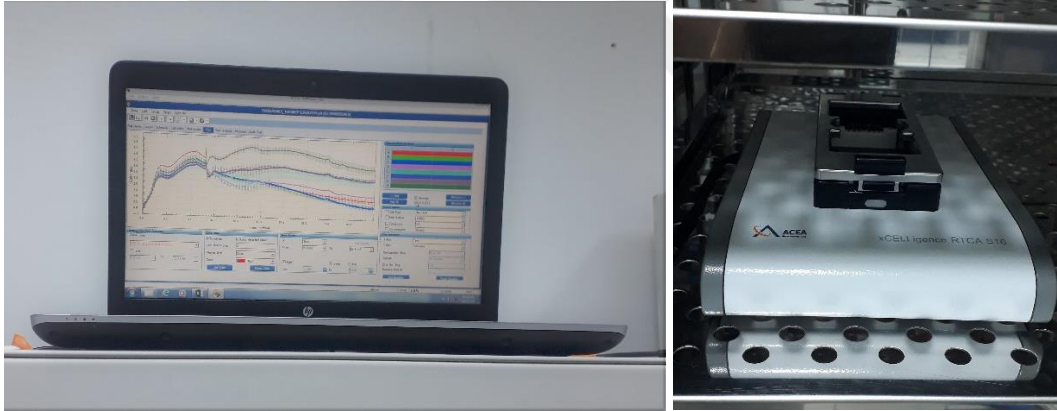
3.2.2 Vulpinik asit'in hazırlanması

Deneylerde kullanılacak ilaç adayı molekülü olan Vulpinik Asit (Santa Cruz Biotechnology) üretici firma tarafından temin edilmiştir. DMSO (% 0.05) ile Vulpinik asit stok çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra vulpinik asit stok çözeltisi uygun besiyerleri ile dilüsyon işlemi yapılarak farklı konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. A-375 hücreleri için 100, 200, 400, 600, 800 ve 1000 µM, insan epidermal melanosit hücreleri için ise 25, 50, 75, 100 ve 200 µM konsantrasyonları ileri denemeler için kullanılmıştır.

3.2.3 xCELLigence RTCA ile hücre anti-proliferasyonunun belirlenmesi

Hücre anti-proliferasyonu belirleme deneyi xCELLigence RTCA analizi ile gerçekleştirilmiştir. Deneye başlamak için ilk önce xCELLigence RTCA S16 aleti inkübatör içine yerleştirilmiştir. 16 kuyulu e-plate'de her bir kuyuya hücre hatları için uygun olan besiyerinden 100 µl eklenerek normalizasyon aşamasını gerçekleştirmek amacıyla ölçüm alınmıştır. Daha sonra 16 kuyulu e-plate cihazdan çıkarılmış ve laminal flow içerisinde A-375 ve insan epidermal melanosit hücrelerinin, kuyu başına 1×10^4 hücre olacak şekilde ekimi yapılmıştır. Ekimi yapılan hücrelerin e-plate tabanına yerleşmesi için laminal flow içerisinde yarım saat bekletilmiştir. Bu süre sonunda e-

plate tekrar inkübatör içinde bulunan xCELLigence RTCA S16 aletine yerleştirilmiştir. Ölçüm aralığı 30 dk ve toplam analiz süresi 120 saat olacak şekilde parametreler girilmiş ve program çalıştırılmıştır. 24 saatlik inkübasyondan sonra cihaz durdurulmuş ve 16 kuyulu e-plate inkübatörde bulunan xCELLigence RTCA S16 aletinden çıkarılmıştır. Çıkarılan e-plate'in her bir kuyusundan 100 µl besiyeri çekilip atılmıştır. A-375 hücreleri için kuyulara 100, 200, 400, 600, 800 ve 1000 µM konsantrasyonlarında, insan epidermal melanosit hücreleri için ise 25, 50, 75, 100 ve 200 µM konsantrasyonlarında vulpinik asit ilave edilmiştir. Kontrol olarak da her iki hücre hattı için uygun besiyeri kullanılmıştır. Uygulama aşamasından sonra e-plate inkübatör içindeki xCELLigence RTCA S16 aletine tekrar yerleştirilmiş ve program ölçüme devam edilmesi için tekrar çalıştırılmıştır. Cihaz ekranından ölçümler ve grafik sonuçları takip edilmiştir. IC₅₀ değerlerini ve zamanı hesaplamak için RTCA Software Lite yazılımı kullanılmıştır.



Şekil 3.2 xCELLigence RTCA S16 cihazı

3.2.4 Hücre görüntüleme

Hücre görüntüleme deneyi için hücreler T25 flaska 5×10^5 hücre olacak şekilde ekim yapıldıktan sonra gece boyunca kültürlenmiş ve 24 saat sonra belirlenen IC₅₀ konsantrasyonunda vulpinik asit ile muamele edilmiştir. Belirlenen IC₅₀ konsantrasyonu için belirlenen zaman aralığı boyunca canlı hücre görüntüleri Invert Microskop (TMS Nikon) kullanılarak alınmıştır.

3.2.5 Yara iyileşme analizi

Hücreler 6 kuyulu hücre plakalarına kuyu başına 3×10^5 hücre olacak şekilde ekilmiştir ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonra kuyuya steril 200 μ L'lik pipet ucuyla dik bir şekilde çizik atılmıştır ve oturmayan hücreler 500 μ L PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra kuyuya belirlenen IC_{50} konsantrasyonunda vulpinik asit hücrelere muamele edilmiştir. Hücresel boyutta yara izleri 0, 6, 12, 24, 48 ve 72. saatlerde fotoğraflanmıştır. Analiz için ImageJ programı kullanılmıştır. ImageJ programı ile yara bölgelerinin 3 tekrarlı analizinin ortalaması alınarak grafik oluşturulmuştur.

3.2.6 Apoptotik etkinin belirlenmesi

3.2.6.1 Kaspaz-3 aktivitesinin belirlenmesi

Kaspaz-3 kolorimetrik kiti kullanılarak Kaspaz aktivitesi belirlenmiştir. Kaspaz-3 kolorimetrik kit içeriğinde Kaspaz-3 Ac-DEVD-pNASubstrat, 5x Lizis Tamponu, 10x Reaksiyon Tamponu, p-Nitroanilin Standart, Ac-DEVD-CHO İnhibitör ve su bulunmaktadır. Hücreler 6 kuyulu hücre plakalarına kuyu başına 5×10^5 hücre sayısında ekilmiş ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Belirlenen IC_{50} konsantrasyonunda vulpinik asit hücrelere muamele edilmiş ve belirlenen saat hücre kültürü şartlarında inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra kuyular 1 ml PBS ile yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra 50 μ L soğutulmuş lizis tamponu ile buz üzerinde hücreler kazınmıştır. Kazınan hücreler ependorf tüplere alınarak 15-20 dk buz üzerinde inkübe edilmiş ve 15 dk 17000 g'de +4 °C'de santrifüj yapılmıştır. Oluşan süpernatant yeni bir ependorf tüpe aktarılmıştır.

Çizelge 3.2 Kaspaz-3 aktivitesinin 96 kuyulu plakada ölçülmesi için reaksiyon şeması

	Hücre Lizatı (μ l)	Kaspaz-3 5 μ g/ml (μ l)	1x Reaksiyon Tamponu (μ l)	Kaspaz-3 İnhibitör Ac-DEVD- CHO 200 μ M (μ l)	Kaspaz-3 Substrat Ac-DEVD- pNA 2 mM (μ l)
Blank	-	-	90	-	10
Apoptoz için uyarılmamış hücreler	5	-	85	-	10
Apoptoz için uyarılmamış hücreler+ inhibitör	5	-	75	10	10
Apoptoz için uyarılmış hücreler	5	-	85	-	10
Apoptoz için uyarılmış hücreler+ inhibitör	5	-	75	10	10
Kaspaz-3 pozitif kontrol	-	5	85	-	10
Kaspaz-3 pozitif kontrol+inhibitör	-	5	75	10	10

Çizelge 3.2’de gösterildiği gibi 96 kuyulu plakada uygun kuyulara 5 μ l hücre lizatı veya Kaspaz-3 pozitif kontrol yerleştirilmiştir. Kuyuların her birine 1x reaksiyon tamponu eklenmiştir. Uygun kuyucuklara Kaspaz-3 inhibitörü eklenmiştir. Her kuyucuğa kaspaz-3 substratı ekleyerek yavaşça karıştırıldıktan sonra analiz başlatılmıştır. Plaka kapatıldıktan sonra 37 °C’de 70 ila 90 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında plakanın 405 nm dalga boyunda 3 tekrarlı ölçümü alınmıştır.

3.2.6.2 Apoptotik etkinin mRNA boyutunda belirlenmesi

3.2.6.2.1 RNA izolasyonu

RNA izolasyonu için hücrelerin 6 kuyulu plakalara kuyu başına 5×10^5 hücre olacak şekilde ekimi yapılmıştır. Hücre ekimi yapıldıktan 24 saat sonra belirlenen IC_{50} konsantrasyonunda vulpinik asit hücrelere muamele edilmiştir. Vulpinik asit muamelesinden IC_{50} konsantrasyonunda belirlenen saat sonrası kuyulardaki besiyerleri atılmış ve daha sonra kuyular PBS ile yıkanmıştır. Kuyulardaki hücrelere 1 ml Trizol eklenerek hücreler ependorf tüpe alınmıştır. Trizol içeren hücrelere 200 μ l kloroform eklenmiş ve tüpler hafifçe çalkalandıktan sonra 10 dk bekletilmiştir. Tüpler $+4^{\circ}C$ 'de 12.000 rpm'de 13-15 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda berrak faz yeni bir ependorf tüpüne alınmıştır. Tüplere 500 μ l izopropanol eklenmiş ve tüpler 1 dk kadar hafifçe çalkalanmıştır. 10 dk beklemenin ardından tüplere $+4^{\circ}C$ 'de 12.000 rpm'de 8 dk santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrasında izopropanol uzaklaştırılmıştır. Daha sonra tüplere 1 ml %75'lik etanol eklenmiş ve pellet kaldırılmıştır. $+4^{\circ}C$ 'de 5 dk 7500 rpm'de santrifüj edildikten sonra dip kısımdaki pellete dikkat edilerek etanol uzaklaştırılmıştır. Tüpler kapağı açık şekilde kurumaya bırakılmış ve alkol uçtuktan sonra 35-50 μ l RNaz serbest su eklenerek pellet çözülmüştür. İzole edilen RNAlar $-80^{\circ}C$ 'de saklanmıştır.

3.2.6.2.2 cDNA sentezi

EURx sentez kiti kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen total RNA'dan cDNA sentezi için 1000 ng kullanılmıştır. 1000 ng için kullanılması gereken μ l miktarda total RNA, 5X NG cDNA Buffer (4 μ l), Primer (1 μ l), NG dART RT mix (1 μ l) ve toplam hacim 20 μ l'ye tamamlanacak şekilde Rnaz-free su tüpe eklenmiştir. Daha önceden 30-60 dk $35-65^{\circ}C$ sıcaklığa ayarlanmış PCR cihazına tüpler koyulmuştur. Reaksiyon $85^{\circ}C$ 'de 5 dk tutularak bitirilmiş ve sentezlenen cDNA hemen $-20^{\circ}C$ 'ye kaldırılmıştır.

3.2.6.2.3 qRT-PCR ile transkript ifade düzeyinin analizi

Human Apoptosis Primer Library (Bio-Rad) paneli ile apoptoz yolağına ait olan 88 farklı genin ifade seviyesi qRT-PCR ile belirlenmiş ve panelde bulunan *GAPDH* geni ile normalizasyon işlemi yapılmıştır. Deney için 96 kuyulu bir plakada her bir kuyu için 9 µl çözelti karışımı (dH₂O, SYBR Green ve 100 ng cDNA) ve ara stoktan 1 µl primer koyulmuştur. qRT-PCR koşulları ilk olarak başlangıç aktivasyonu 1 döngü, 95 °C 12 dakika, 40 döngü denatürasyon aşaması (95 °C 15 saniye), bağlanma (65 °C 30 saniye) ve uzama (72 °C 30 saniye) olarak gerçekleştirilmiştir. $\Delta\Delta C_t$ metodu kullanılarak qRT-PCR sonuçlarının gen ifadesi analizi yapılmıştır. Ayrıca 2 tekrarlı yapılan deneyler Student's t-testi ile istatistiksel olarak da değerlendirilmiştir.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	<i>APAF1</i>	<i>ATM</i>	<i>BAG1</i>	<i>BAG3</i>	<i>BAG4</i>	<i>BAK1</i>	<i>BAX</i>	<i>BCL10</i>	<i>BCL2</i>	<i>BCL2A1</i>	<i>BCL2L1</i>	<i>BCL2L11</i>
B	<i>BCL2L2</i>	<i>BFAR</i>	<i>BIK</i>	<i>BIRC1</i>	<i>BIRC2</i>	<i>BIRC3</i>	<i>BIRC4</i>	<i>BIRC5</i>	<i>BIRC6</i>	<i>BNP3</i>	<i>BRE</i>	<i>BOK</i>
C	<i>CASP1</i>	<i>CASP10</i>	<i>CASP4</i>	<i>CASP2</i>	<i>CASP3</i>	<i>CASP5</i>	<i>CASP6</i>	<i>CASP7</i>	<i>CASP8</i>	<i>CASP8AP2</i>	<i>CFLAR</i>	<i>CHEK1</i>
D	<i>CHEK2</i>	<i>CIDEA</i>	<i>CIDEB</i>	<i>CRADD</i>	<i>DAPK1</i>	<i>DAPK2</i>	<i>DFFA</i>	<i>DFFB</i>	<i>FADD</i>	<i>GADD45A</i>	<i>HRK</i>	<i>LTBR</i>
E	<i>MCL1</i>	<i>MYD88</i>	<i>CARD4</i>	<i>FAS</i>	<i>RIPK2</i>	<i>RPA3</i>	<i>TANK</i>	<i>TNF</i>	<i>TNFRSF10A</i>	<i>TNFRSF10B</i>	<i>TNFRSF10C</i>	<i>TNFRSF10D</i>
F	<i>TNFRSF11B</i>	<i>TNFRSF17</i>	<i>TNFRSF1A</i>	<i>TNFRSF21</i>	<i>CD40</i>	<i>TNFRSF8</i>	<i>TNFRSF9</i>	<i>TNFSF10</i>	<i>TNFSF1</i>	<i>TNFSF13</i>	<i>TNFSF13B</i>	<i>TNFSF15</i>
G	<i>TNFSF18</i>	<i>TNFSF4</i>	<i>CD40LG</i>	<i>FASLG</i>	<i>TNFSF7</i>	<i>TNFSF8</i>	<i>TNFRSF9</i>	<i>TP53</i>	<i>TP73L</i>	<i>TRAF1</i>	<i>TRAF2</i>	<i>TRAF3</i>
H	<i>TRAF4</i>	<i>TRAF5</i>	<i>TRAF6</i>	<i>TRIP</i>	<i>ACTB</i>	<i>B2M</i>	<i>GAPD</i>	<i>GUSB</i>	<i>HPRT1</i>	<i>PGK</i>	<i>PPLA</i>	<i>RPL13A</i>

Şekil 3.3 İnsan apoptoz primer kütüphanesi paneli

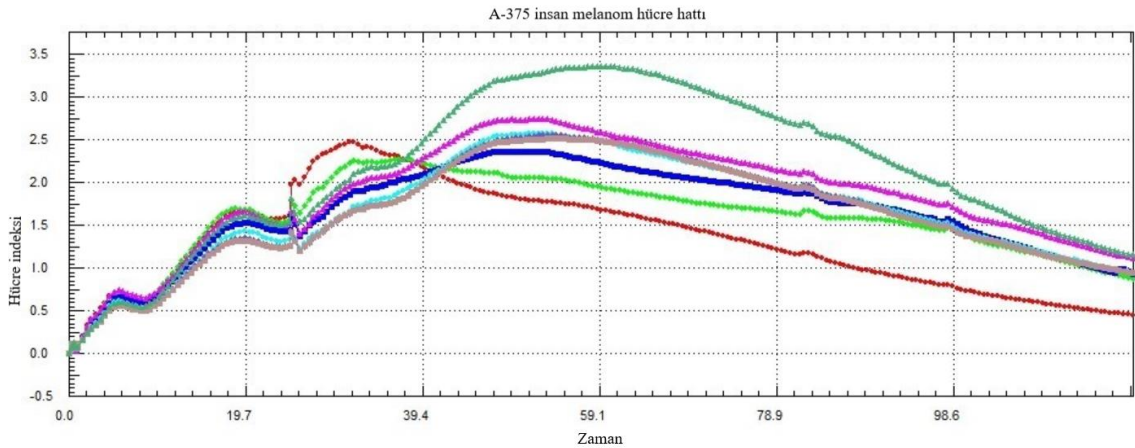
3.2.7 İstatistiksel analiz

Üç tekrarlı olarak elde edilen sonuçların istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturup oluşturmadığı ANOVA istatistiksel analiz yöntemi ile belirlenmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

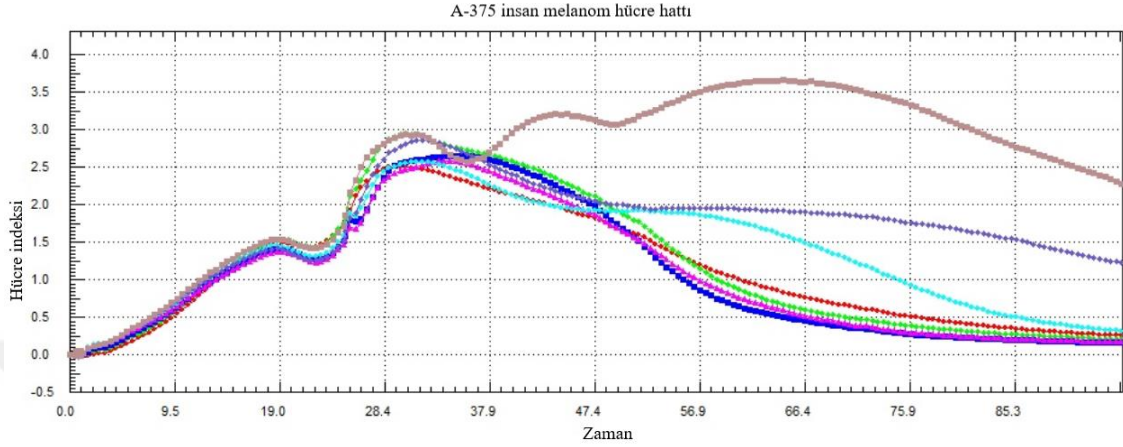
4.1 Hücre anti-proliferasyonunun belirlenmesi

İnsan deri maling melanomdan türetilen A-375 hücre hattı ve insan epidermal melanosit hücre hattının anti-proliferatif etkisini belirlemek amacıyla xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz (RTCA) sistemi kullanılmıştır. xCELLigence RTCA sistemi elektriksel empedans izleme sayesinde hücre çoğalmasının gerçek zamanlı olarak kontrolünü, izlenmesini, veri görüntülenmesini ve analizini sağlar. A-375 hücre hattına 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25.0, 50.0 ve 100.0 μM konsantrasyonlarında vulpinik asit muamele edilmiştir ve kontrol olarak uygun besiyeri kullanılmıştır (**Şekil 4.1**). A-375 hücre hattına Vulpinik asit'in bu konsantrasyonlarda uygulanarak gerçekleştirilen analizde etkin anti-proliferatif etki tespit edilememiştir.



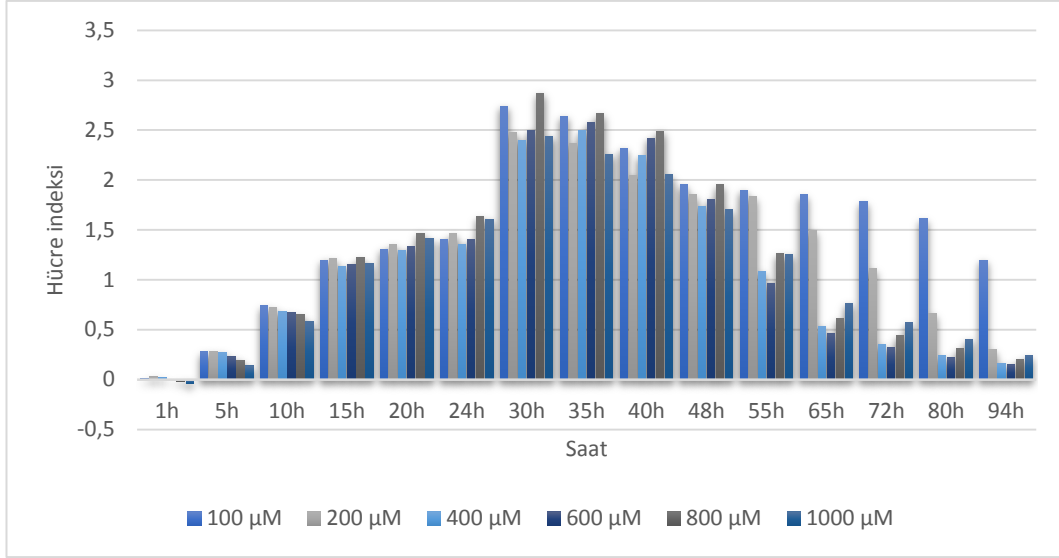
Şekil 4.1 Farklı konsantrasyonlarda (1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25.0, 50.0 ve 100.0 μM) Vulpinik asit ile muamele edilen A-375 hücrelerinin zamana bağlı normalize edilmiş hücre indeksi grafiği (Koyu yeşil: Kontrol, Lila: 1.56 μM , Mor: 3.13 μM , Turkuaz: 6.25 μM , Pembe: 12.5 μM , Lacivert: 25.0 μM , Yeşil: 50.0 μM ve Kırmızı: 100.0 μM)

Daha sonra A-375 hücre hattına 100, 200, 400, 600, 800 ve 1000 μM konsantrasyonlarında vulpinik asit muamele edilmiştir ve kontrol olarak uygun besiyeri kullanılmıştır (Şekil 4.2).



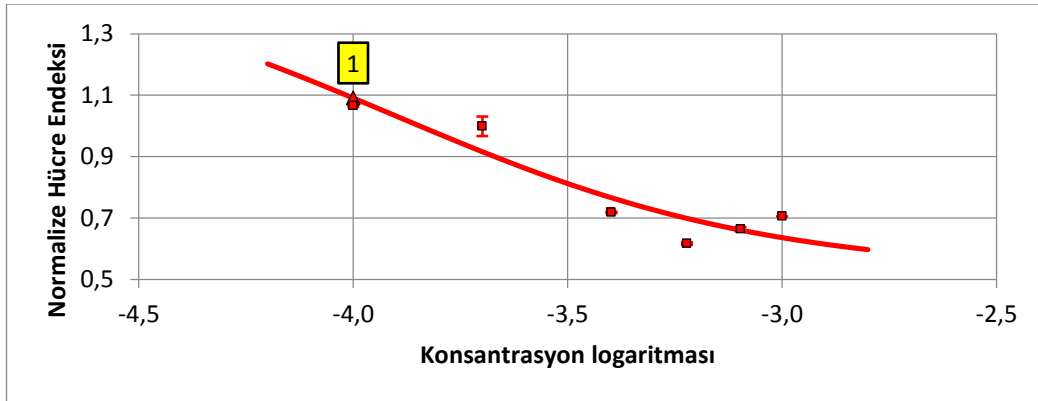
Şekil 4.2 Farklı konsantrasyonlarda (100, 200, 400, 600, 800 ve 1000 μM) Vulpinik asit ile muamele edilen A-375 hücrelerinin zamana bağlı normalize edilmiş hücre indeksi grafiği (Lila: Kontrol, Mor: 100 μM , Turkuaz: 200 μM , Pembe: 400 μM , Lacivert: 600 μM , Yeşil: 800 μM ve Kırmızı: 1000 μM)

Vulpinik asit uygulaması sonucunda xCELLigence RTCA cihazı ile elde edilen A-375 hücre indeksi verileri Microsoft Excel programı ile çubuk grafik halinde Şekil 4.3'te değerlendirilmiştir.



Şekil 4.3 Zamana bağlı farklı konsantrasyonlarda Vulpinik asit ile muamele edilen A-375 hücre indeksinin çubuk grafik ile gösterimi

RTCA Software Lite yazılımı kullanılarak A-375 hücre hattı için IC_{50} değeri 30. saatte 125,05 µM olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.4) (Çizelge 4.3). 30. saatte A-375 hücre hattı için % 93.03 ölüm oranı oluşmuştur. 200 µM'dan daha yüksek konsantrasyonlarda uygulanan vulpinik asitin sitotoksik etkisi gözlemlenmiştir.

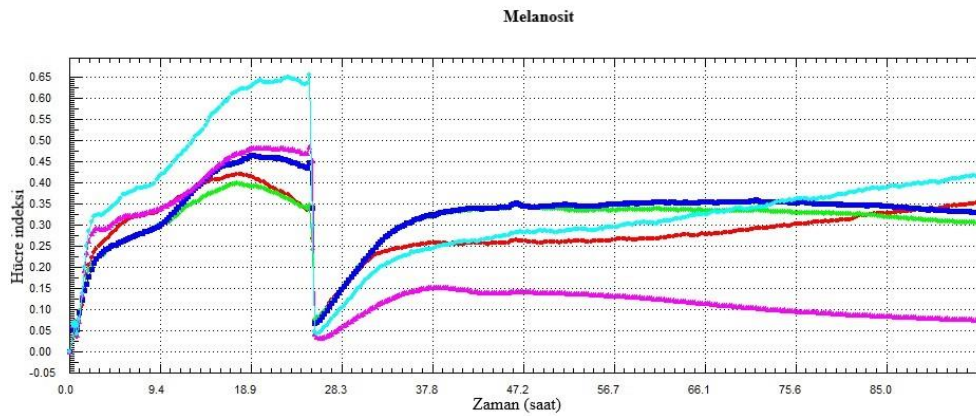


Şekil 4.4 Vulpinik asit muamele edilen A-375 hücre konsantrasyonlarının logaritmasına bağlı normalize edilmiş hücre indeksi

Çizelge 4.1 Vulpinik asit muamele edilen A-375 hücre hattının xCELLigence RTCA Software Lite yazılımı ile IC₅₀ değerinin belirlenmesi

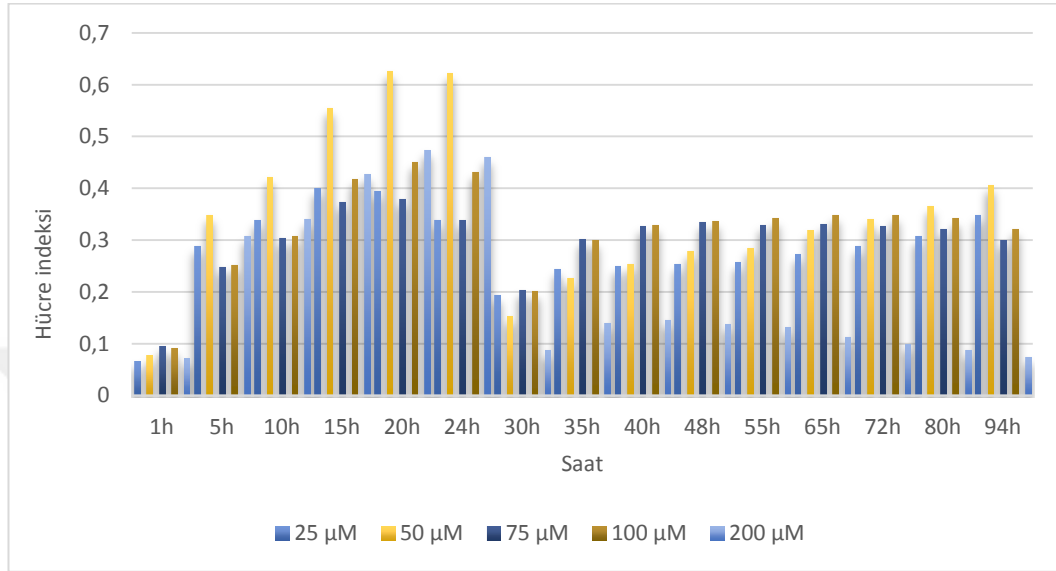
Y eksen tipi:		Normalize edilmiş hücre indeksi	
Formül:		Sigmoidal doz yanıtı-- $Y = \text{Alt} + (\text{Üst} - \text{Alt}) / (1 + 10^{(\text{Log IC}_{50} - X)})$	
Seçilen kuyucukların bileşik adı:		Vulpinik asit	
Seçilen zaman noktası:		54:18:57	
Alt:	1,5451	Üst:	0,5229
IC₅₀:		0,00012505 M	
Kare R:		0,8796	

Vulpinik asitin normal hücrelere kıyasla kanserli hücrelere etkisinin daha fazla olması nedeniyle A-375 melanom hücre hattından farklı olarak insan epidermal melanosit hücre hattı için 25, 50, 75, 100 ve 200 µM konsantrasyonlarında vulpinik asit muamele edilmiş ve xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile hücre proliferasyonu belirlenmiştir ve kontrol olarak uygun besiyeri kullanılmıştır (**Şekil 4.5**). İnsan epidermal melanosit hücre hattı için ise IC₅₀ değeri olarak 30. Saate 25 µM olarak hesaplanmıştır (**Şekil 4.6**). 30. saatte melenosit hücre hattı için % 20.17 ölüm oranı oluşmuştur.



Şekil 4.5 Farklı konsantrasyonlarda vulpinik asit muamele edilen melanosit hücrelerinin zamana bağlı normalize edilmiş hücre hücre indeksi grafiği (Kırmızı: 25 µM, Turkuaz: 50 µM, Yeşil: 75 µM, Lacivert: 100 µM ve Pembe: 200µM)

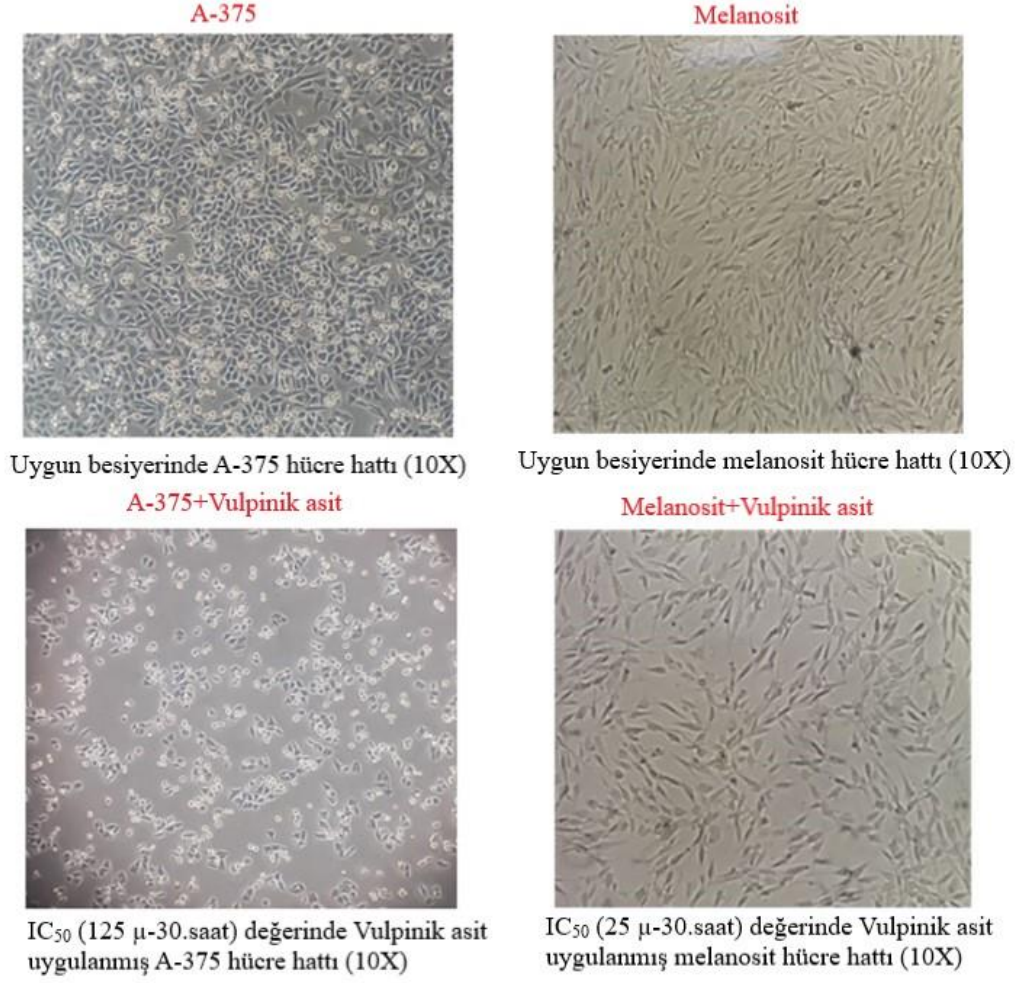
Vulpinik asit uygulaması sonucunda xCELLigence RTCA cihazı ile elde edilen melanosit hücre indeksi verileri Microsoft Excel programı ile çubuk grafik halinde **Şekil 4.6**'da değerlendirilmiştir.



Şekil 4.6 Zamana bağlı farklı konsantrasyonlarda vulpinik asit muamele edilen melanosit hücre indeksinin çubuk grafik ile gösterimi

4.2 Hücre görüntüleme

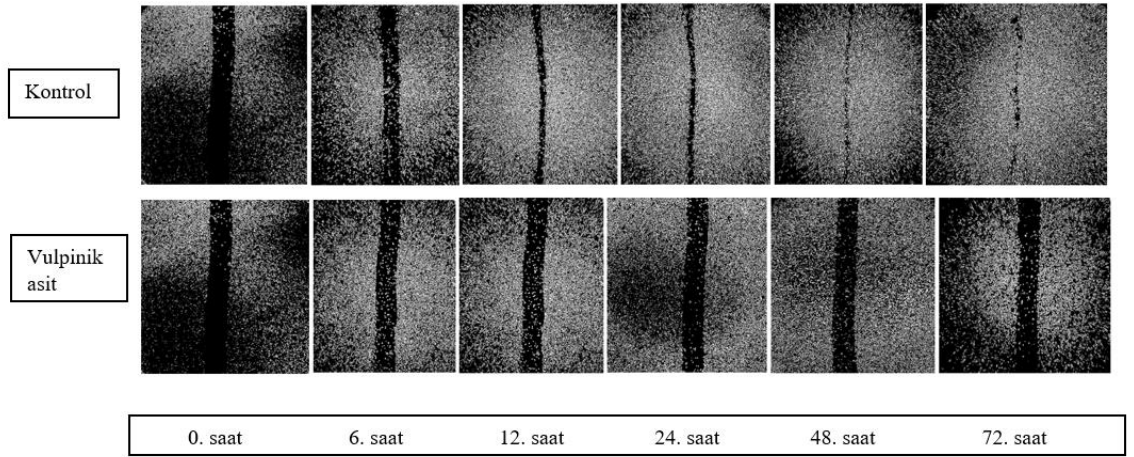
A-375 hücreleri belirlenen IC_{50} değeri $125 \mu M$ ve melanosit hücresi için belirlenen IC_{50} değeri $25 \mu M$ vulpinik asitle muamele edilmişlerdir. Kontrol olarak hücreler için uygun besiyerleri kullanılmıştır 30. saatte ışık mikroskopuyla (10X) görüntüleri alınarak morfolojik olarak değerlendirilmişlerdir. Vulpinik asit ile muamele sonrası A-375 hücrelerinin yoğunluğu vulpinik asit ile muamele edilmeyen A-375 hücrelerine göre daha azdır. Vulpinik asit muamelesi sonrası hücrelerin ölüm oranlarının arttığı ve yüzeyde yüzen hücreler gözlemlenmiştir. Melanosit hücreleri A-375 hücreleri ile karşılaştırıldığı zaman daha az morfolojik değişim görünmektedir.



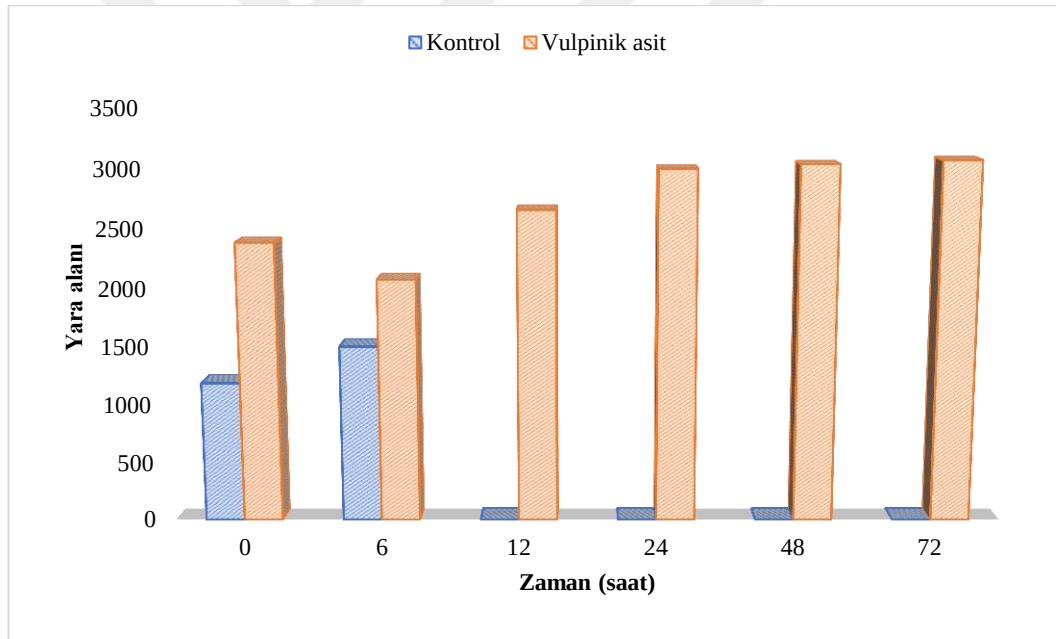
Şekil 4.7 A-375 ve melanosit hücrelerine Vulpinik asit uygulanmış ve uygulanmamış hücre görüntüleri

4.3 Yara iyileşme analizi

A-375 hücrelerinde hücre göçünü ve hücre-hücre etkileşimini analiz etmek amacıyla yara iyileşme deneyi gerçekleştirilmiştir. Vulpinik asit muamelesi sonucu 0, 6, 12, 24, 48 ve 72. saatlerdeki yara alanı sırasıyla 2387, 2075, 2660.33, 3002, 3036 ve 3071,66; kontrol grubunda ise 1193, 1506.33, 0.677, 0.459, 0.192 ve 0.187 olarak hesaplanmıştır. Vulpinik asitin A-375 melanom hücrelerinin yaralı alana göç etmesini zamana bağlı olarak engellediği belirlenmiştir (**Şekil 4.9**).



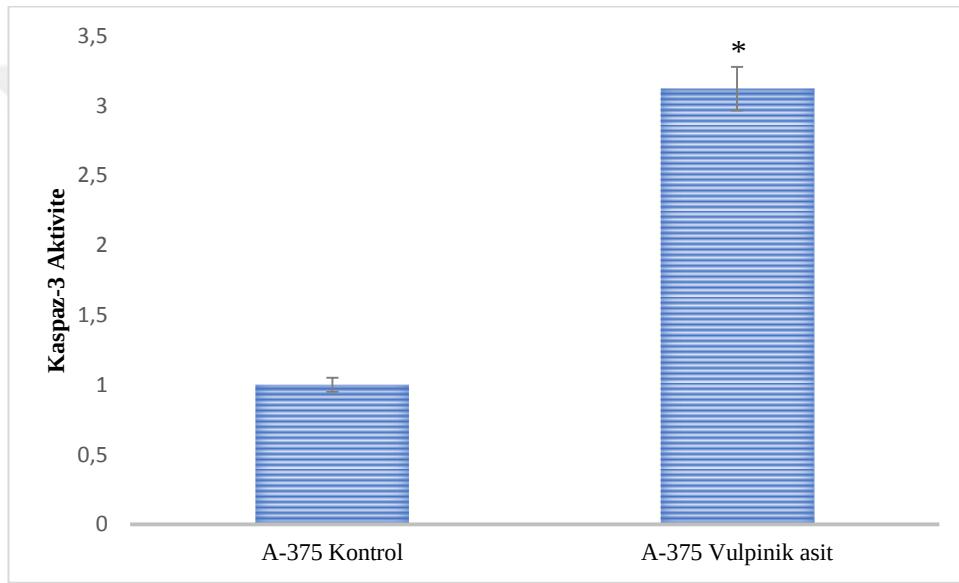
Şekil 4.8 A-375 hücre hattı yara iyileşme analizi çizik görüntüleri



Şekil 4.9 A-375 zamana bağlı yara iyileştirme alan grafiği

4.4 Kaspaz-3 Aktivitesinin Belirlenmesi

A-375 ve melanosit hücrelerine vulpinik asit muamelesi sonrası kaspaz-3 aktivitesi kaspaz-3 kolorimetrik kit kullanılarak analiz edilmiştir. Bu analiz kaspaz-3 tarafından asetil-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilidin (Ac-DEVD-pNA) hidrolizine dayanmaktadır ve p-nitroanilin (pNA) parçasının salınmasını sağlar. p-Nitroanilin, 405 nm dalga boyunda saptanır. Kaspaz-3 aktivitesi kontrole kıyasla, A-375 hücresinde 3,21 kat artış göstermiştir (Şekil 4.10).



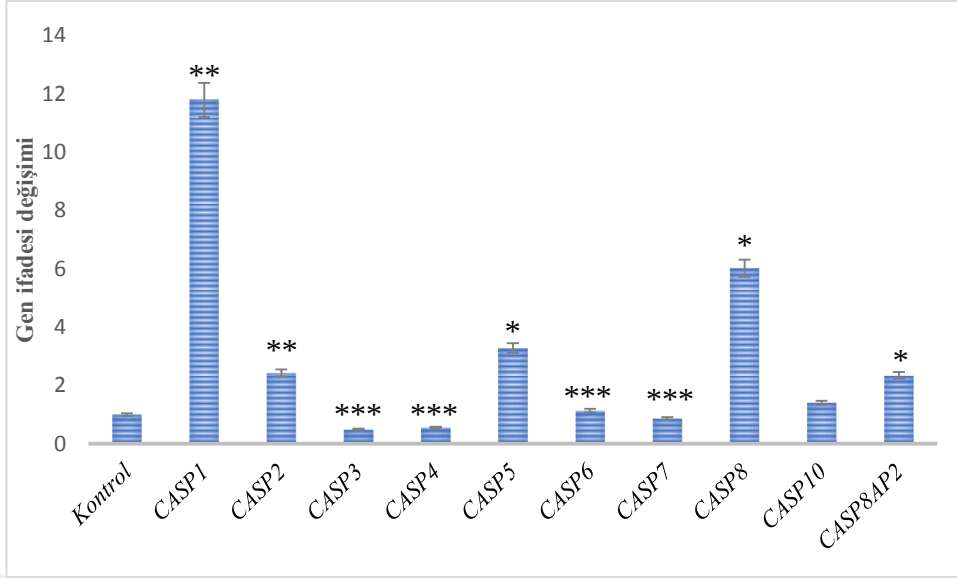
Şekil 4.10 A-375 hücre hattında Vulpinik asit uygulaması sonucu yüzde Kaspaz-3 aktivitesi (***=p<0.001, **=p<0.01, *=p<0.05)

4.5 qRT-PCR ile transkript ifade düzeyinin analizi

Vulpinik asitin A-375 hücrelerinde apoptoz yolağına ait transkript ifade düzeyinin analizi Human Apoptosis Primer Library kullanılarak qRT-PCR cihazı ile değerlendirilmiştir. Bu panelde 88 adet hedef gen ve 8 adet housekeeping gen bulunmaktadır. Housekeeping genler *GUSB*, *GAPD*, *ACTB*, *PGK*, *HPRT1*, *PPIA*, *B2M* ve *RPL13A*'dır. Tez kapsamında *GAPDH* housekeeping gen kullanılmıştır. Bu kütüphanedeki genler Kaspaz, Kinaz, Bcl-2, TRAF, TNF ve apoptoz ilişkili diğer gen ailesi üyeleri olarak kategorize edilmiştir. Kaspaz gen ailesinde *CASP1*, *CASP2*,

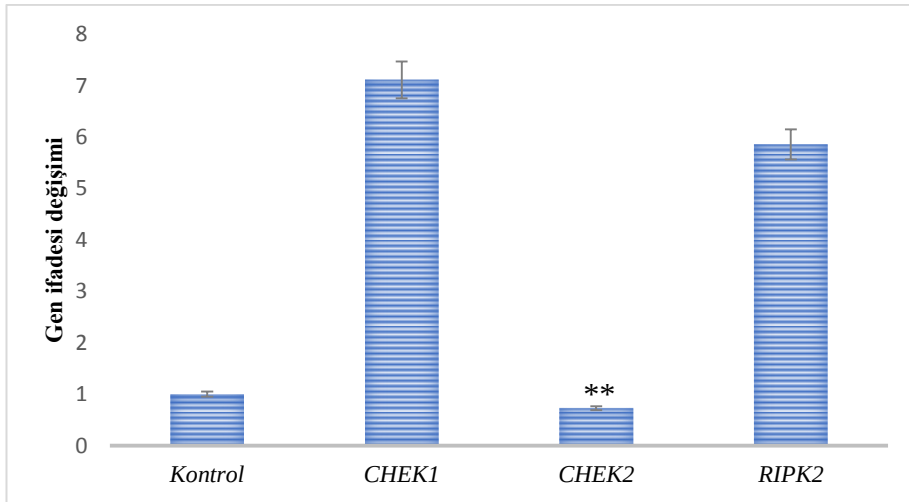
CASP7, CASP8, CASP5, CASP6, CASP3, CASP4, CASP8AP2 ve CASP10; Kinaz gen ailesinde *DAPK1, DAPK2, CHEK1, CHEK2 ve RIPK2*; Bcl-2 gen ailesinde *BIK, BAK1, BAG4, BAG1, BAG3, BAX, BCL10, BCL2, BCL2L11, BCL2L2, BCL2A1, BCL2L1, BNIP3, BOK, MCL1 ve HRK*; TRAF gen ailesinde *TRIP, TANK, TRAF4, TRAF3, TRAF1, TRAF2, TRAF6 ve TRAF5*; TNF gen ailesinde *LTBR, FAS, TNF, TNFRSF10D, TNFRSF10C, TNFRSF10A, TNFRSF10B, CD40, TNFRSF11B, TNFRSF17, TNFRSF21, TNFRSF8, TNFRSF1A, TNFRSF9, TNFSF13B, TNFSF10, TNFSF11, TNFSF13, TNFSF15, FASLG, TNFSF18, TNFSF4, TNFSF7, TNFSF9, CD40LG ve TNFSF8*; apoptoz ilişkili diğer gen ailesi üyelerinde *APAF1, ATM, BFAR, BIRC6, BIRC4, BIRC3, BIRC1, BIRC2, BIRC5, CFLAR, CRADD, DFFA, DFFB, BRE, GADD45A, MYD88, CIDEA, CIDEB, CARD4, RPA3, TP53 ve TP73L* bulunmaktadır. Bu paneldeki 80 farklı genin ifade seviyesi analiz edilmiş fakat 67 adet hedef genden sonuç alınmış ve 57 adet genin ifade analizinden istatistiksel olarak anlamlı sonuç belirlenmiştir. Analizdeki grafiklerde gen ifade seviyesinin farklılaşması 1 kat sayısına oranlanarak gösterilmiştir. Analizlerde istatistiksel anlamlılık $p<0.05$ oranına göre hesaplanarak ifade edilmiştir.

Kaspaz gen ailesinin sonuçlarına bakıldığında *CASP1* 11,79 ($p<0.01$) ve daha sonra *CASP8* 6,02 ($p<0.05$) kat artış ile gen seviyesinde en fazla artış göstermiştir. Bu gen ailesinde en az artış ise *CASP6* olup 1,14 ifade değişim oranına sahiptir ($p<0.001$). *CASP3, CASP4 ve CASP7* genlerinde sırasıyla 0,49, 0,56 ve 0,87 oranında gen ifade seviyelerinde azalma görülmüştür ($p<0.001$) (**Şekil 4.11**).



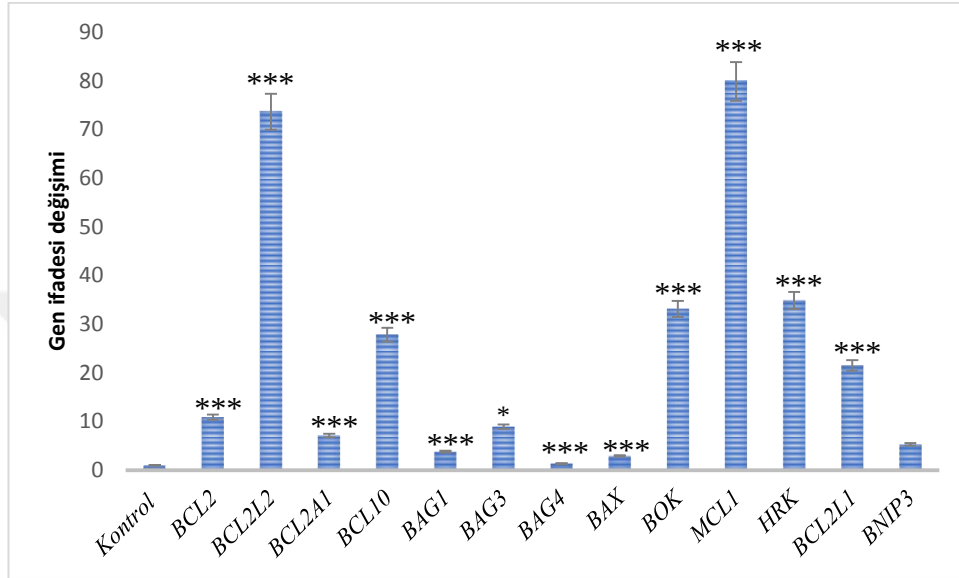
Şekil 4.11 Vulpinik asit muamele edilen A-375 hücrelerinde Kaspaz gen ailesine ait transkript ifade düzeyinin qRT-PCR analizi (***= $p<0.001$, **= $p<0.01$, *= $p<0.05$)

Kinaz gen ailesi analiz edildiğinde 3 genin anlamlı olarak ifade seviyesinde değişim gösterdiği belirlenmiştir. *CHEK1* geni 7,11 kat, *RIPK2* geni ise 5,86 kat olmak üzere gen ifade seviyelerinde artış göstermiştir. *CHEK2* geni ise 0,73 kat gen ifade seviyesinde azalma göstermiştir ($p<0.01$) (Şekil 4.12).



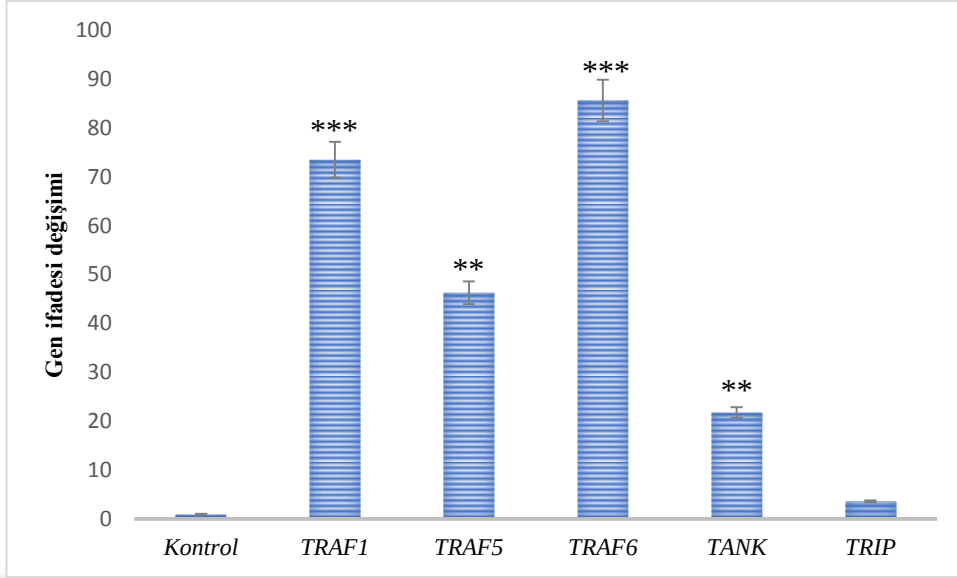
Şekil 4.12 Vulpinik asit muamele edilen A-375 hücrelerinde Kinaz gen ailesine ait transkript ifade düzeyinin qRT-PCR analizi (***= $p<0.001$, **= $p<0.01$, *= $p<0.05$)

BCL-2 gen ailesinin sonuçları değerlendirildiğinde gen ifade seviyelerinde en fazla artış 79,89 kat ile *MCL1* geninde belirlenmiştir ($p<0.001$). Bunu takiben *BCL2L2* geni 73,69 oranında bir artış ile sonuçlanmıştır ($p<0.001$). Bu gen ailesinde *BAG4* geni 1,39 kat artış ile gen ifade seviyesinde en az artışı göstermiştir ($p<0.001$) (Şekil 4.13).



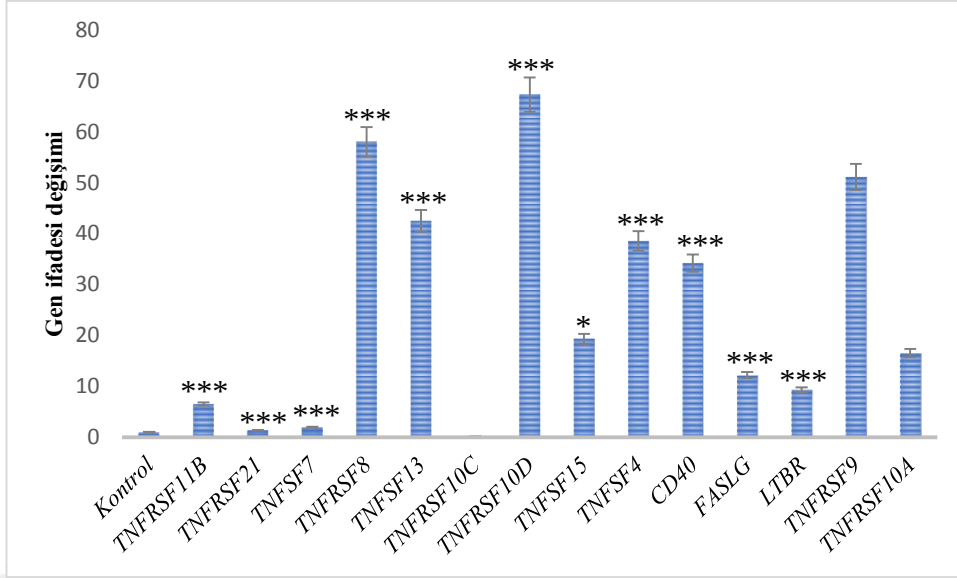
Şekil 4.13 Vulpinik asit muamele edilen A-375 hücrelerinde BCL-2 gen ailesine ait transkript ifade düzeyinin qRT-PCR analizi (***= $p<0.001$, **= $p<0.01$, *= $p<0.05$)

TRAF gen ailesinin sonuçları incelendiğinde gen ifade analizinde 5 gene ait anlamlı sonuç alınmıştır. *TRAF6* 85,63 kat ile gen ifade seviyesinde en fazla artış gösteren gen olarak tespit edilmiştir ve ardından *TRAF1* geni 73,52 kat artış göstermektedir ($p<0.001$). *TRAF* gen ailesinin üyesi *TRIP* geni 3,63 kat artış göstererek gen ifade seviyesinde en az artışı sağlamıştır (Şekil 4.14).



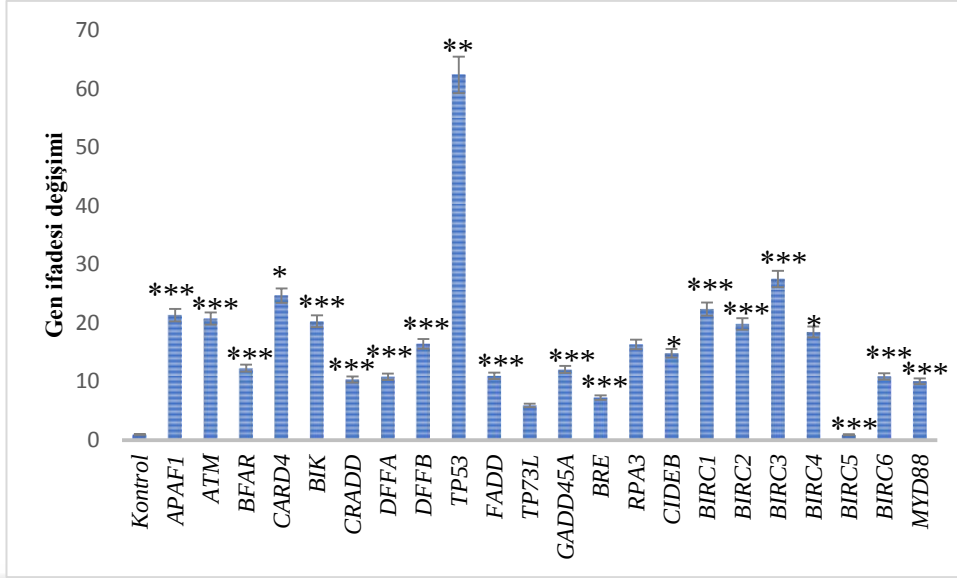
Şekil 4.14 Vulpinik asit muamele edilen A-375 hücrelerinde *TRAF* gen ailesine ait transkript ifade düzeyinin qRT-PCR analizi (***= $p<0.001$, **= $p<0.01$, *= $p<0.05$)

TNF gen ailesinin sonuçlarının analizinde *TNFRSF10D* gen üyesi 67,34 kat artış ile gen ifade seviyesi en fazla artış gösteren gen olarak sonuçlandırılmıştır ($p<0.001$). Bunu takiben *TNFRSF8*, *TNFRSF9* ve *TNFSF13* genleri sırasıyla 58,08 ($p<0.001$), 51,15 ve 42,52 ($p<0.001$) kat artış göstermiştir. TNF gen ailesinde en az gen ifade seviyesi artışı gösteren 1,38 kat ile *TNFRSF21* geni olmuştur ($p<0.001$). *TNFSF7* geni ise 1,98 kat artış göstermiştir ($p<0.001$). TNF gen ailesinde *TNFRSF10C* geninin ise 0,16 kat oranında gen ifade seviyesinde azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15 Vulpinik asit muamele edilen A-375 hücrelerinde *TNF* gen ailesine ait transkript ifade düzeyinin qRT-PCR analizi (***= $p<0.001$, **= $p<0.01$, *= $p<0.05$)

Apoptozla ilgili diğer gen ailesi üyelerinin analizlerine bakıldığında en fazla gen ifade seviyesi artışı 62,39 kat oranında *TP53* geninde tespit edilmiştir ($p<0.01$) (Şekil 4.16). Bu gen ailesinde gen ifade seviyesinde en az artış gösteren gen ise 5,95 kat ile *TP73L* geni olmuştur. Apoptozla ilgili diğer gen ailesi üyelerinden *BIRC5* geninde 0,96 kat oranıyla gen ifade seviyesinde azalma olduğu belirlenmiştir ($p<0.001$) (Şekil 4.16).



Şekil 4.16 Vulpinik asit muamele edilen A-375 hücrelerinde Apoptozla ilgili diğer gen ailesi üyelerine ait transkript ifade düzeyinin qRT-PCR analizi (***=p<0.001, **=p<0.01, *=p<0.05)

Melanom kanserine vulpinik asit uygulaması sonucu hedef gen ifadesi analizinin sonuçları **Çizelge 4.2**'de verilmiştir.

Çizelge 4.2 Vulpinik asit muamele edilen A-375 hücrelerinde bütün gen ailesi üyelerine ait kontrole göre gen ifade değişim oranları (↑ : ifade seviyesi artışı, ↓ : ifade seviyesi azalması)

Gen ailesi	Gen	İfade Değişimi Oranı	Kontrole göre ifade değişim durumu	p-değeri
Kaspaz Ailesi	CASP1	11,79	↑	p<0.01
	CASP2	2,43	↑	p<0.01
	CASP3	0,49	↓	p<0.001
	CASP4	0,56	↓	p<0.001
	CASP5	3,29	↑	p<0.05
	CASP6	1,14	↑	p<0.001
	CASP7	0,87	↓	p<0.001

Çizelge 4.2 Vulpinik asit muamele edilen A-375 hücrelerinde bütün gen ailesi üyelerine ait kontrole göre gen ifade değişim oranları (↑ : ifade seviyesi artışı, ↓ : ifade seviyesi azalması) (devam)

Gen ailesi	Gen	İfade Değişimi Oranı	Kontrolle göre ifade değişim durumu	p-değeri
	<i>CASP8</i>	6,02	↑	p<0.05
	<i>CASP10</i>	1,40	↑	-
	<i>CASP8AP2</i>	2,35	↑	p<0.05
Kinaz Ailesi	<i>CHEK1</i>	7,11	↑	-
	<i>CHEK2</i>	0,73	↓	p<0.01
	<i>RIPK2</i>	5,86	↑	-
BCL-2 Ailesi	<i>BCL2</i>	10,90	↑	p<0.001
	<i>BCL2L2</i>	73,69	↑	p<0.001
	<i>BCL2A1</i>	7,14	↑	p<0.001
	<i>BCL10</i>	27,86	↑	p<0.001
	<i>BAG1</i>	3,81	↑	p<0.001
	<i>BAG3</i>	8,92	↑	p<0.05
	<i>BAG4</i>	1,39	↑	p<0.001
	<i>BAX</i>	2,94	↑	p<0.001
	<i>BOK</i>	33,13	↑	p<0.001
	<i>MCL1</i>	79,89	↑	p<0.001
	<i>HRK</i>	34,86	↑	p<0.001
	<i>BCL2L1</i>	21,56	↑	p<0.001
	<i>BNIP3</i>	5,31	↑	-
TRAF Ailesi	<i>TRAF1</i>	73,52	↑	p<0.001
	<i>TRAF5</i>	46,31	↑	p<0.01

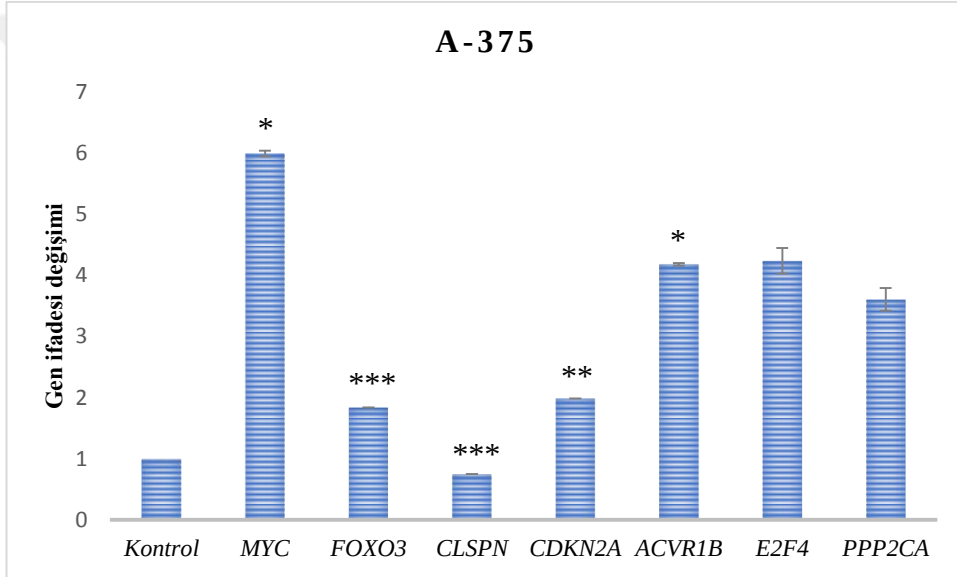
Çizelge 4.2 Vulpinik asit muamele edilen A-375 hücrelerinde bütün gen ailesi üyelerine ait kontrole göre gen ifade değişim oranları (↑ : ifade seviyesi artışı, ↓ : ifade seviyesi azalması) (devam)

Gen ailesi	Gen	İfade Değişimi Oranı	Kontrol göre ifade değişim durumu	p-değeri
	<i>TRAF6</i>	85,63	↑	p<0.001
	<i>TANK</i>	21,81	↑	p<0.01
	<i>TRIP</i>	3,63	↑	-
TNF Ailesi	<i>TNFRSF11B</i>	6,51	↑	p<0.001
	<i>TNFRSF21</i>	1,38	↑	p<0.001
	<i>TNFSF7</i>	1,98	↑	p<0.001
	<i>TNFRSF8</i>	58,08	↑	p<0.001
	<i>TNFRSF9</i>	51,15	↑	-
	<i>TNFRSF10A</i>	16,53	↑	-
	<i>TNFSF13</i>	42,52	↑	p<0.001
	<i>TNFRSF10C</i>	0,16	↓	-
	<i>TNFRSF10D</i>	67,34	↑	p<0.001
	<i>TNFSF15</i>	19,34	↑	p<0.05
	<i>TNFSF4</i>	38,59	↑	p<0.001
	<i>CD40</i>	34,22	↑	p<0.001
	<i>FASLG</i>	12,21	↑	p<0.001
	<i>LTBR</i>	9,34	↑	p<0.001
	<i>ATM</i>	20,77	↑	p<0.001
	<i>BFAR</i>	12,30	↑	p<0.001
	<i>CARD4</i>	24,70	↑	p<0.05

Çizelge 4.2 Vulpinik asit muamele edilen A-375 hücrelerinde bütün gen ailesi üyelerine ait kontrole göre gen ifade değişim oranları (↑ : ifade seviyesi artışı, ↓ : ifade seviyesi azalması) (devam)

Gen ailesi	Gen	İfade Değişimi Oranı	Kontrol göre ifade değişim durumu	p-değeri
Apoptoz ilişkili Diğer Gen Ailesi Üyeleri	<i>BIK</i>	20,30	↑	p<0.001
	<i>CRADD</i>	10,39	↑	p<0.001
	<i>DFFA</i>	10,85	↑	p<0.001
	<i>DFFB</i>	16,45	↑	p<0.001
	<i>TP53</i>	62,39	↑	p<0.01
	<i>FADD</i>	11,00	↑	p<0.001
	<i>TP73L</i>	5,95	↑	-
	<i>GADD45A</i>	12,10	↑	p<0.001
	<i>BRE</i>	7,28	↑	p<0.001
	<i>RPA3</i>	16,34	↑	p<0.001
	<i>CIDEB</i>	14,86	↑	p<0.05
	<i>BIRC1</i>	22,42	↑	p<0.001
	<i>BIRC2</i>	19,84	↑	p<0.001
	<i>BIRC3</i>	27,54	↑	p<0.001
	<i>BIRC4</i>	18,46	↑	p<0.05
	<i>BIRC5</i>	0,96	↓	p<0.001
	<i>BIRC6</i>	10,88	↑	p<0.001
	<i>MYD88</i>	10,06	↑	p<0.001

Vulpinik asit muamele edilen A-375 hücrelerinde apoptoz panaeline ilaveten hücre proliferasyonu ve hücre döngüsü yolaklarında işlev gösteren *MYC*, *FOXO3*, *CLSPN*, *CDKN2A*, *ACVR1B*, *E2F4*, *PPP2CA* genlerinin de transkript ifade düzeyinin analizi qRT-PCR cihazı ile değerlendirilmiştir. *CLSPN* gen ifade seviyesinde 0,75 ($p<0.001$) kat azalma olduğu belirlenmiştir. *MYC*, *FOXO3*, *CDKN2A*, *ACVR1B*, *E2F4* ve *PPP2CA* genlerinin ifade seviyeleri sırasıyla 5,99 ($p<0.05$), 1,84 ($p<0.001$), 1,99 ($p<0.01$), 4,18 ($p<0.05$), 4,24 ve 3,61 kat artış göstermiştir (**Şekil 4.17**). Analizdeki grafikte gen ifade seviyesinin farklılaşması 1 kat sayısına oranlanarak gösterilmiştir. Analizlerde istatistiksel anlamlılık $p<0.05$ oranına göre hesaplanarak ifade edilmiştir.

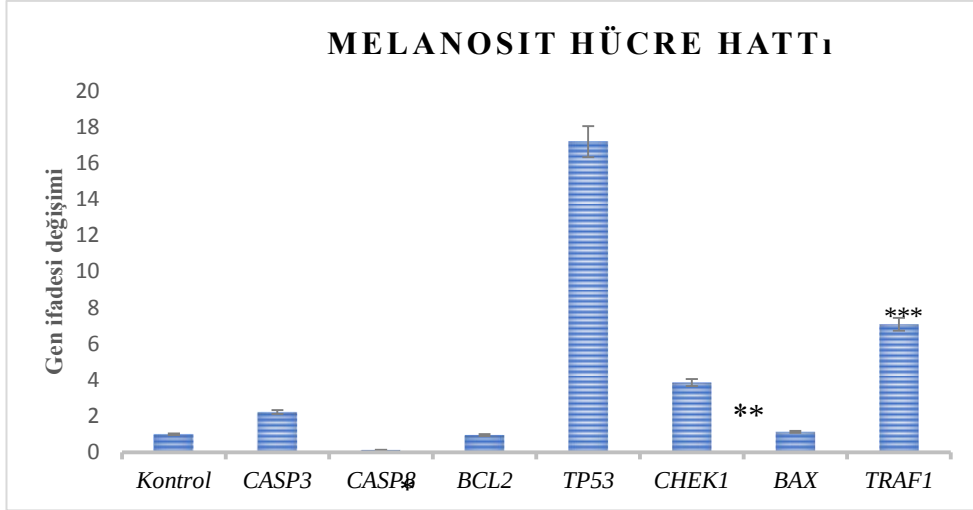


Şekil 4.17 Vulpinik asit muamele edilen A-375 hücrelerinde hücre proliferasyonu ve hücre döngüsü ilgili diğer gen ailesi üyelerine ait transkript ifade düzeyinin qRT-PCR analizi (***= $p<0.001$, **= $p<0.01$, *= $p<0.05$)

Çizelge 4.3 Vulpinik asit muamele edilen A-375 hücrelerinde *MYC*, *FOXO3*, *CLSPN*, *CDKN2A*, *ACVR1B*, *E2F4*, *PPP2CA* genlerine ait kontrole göre gen ifade değişim oranları (↑ : ifade seviyesi artışı, ↓ : ifade seviyesi azalması)

Gen ailesi	Gen	İfade Değişimi Oranı	Kontrole göre ifade değişim durumu	p-değeri
Hücre döngüsü ve hücre proliferasyonunda görevli genler	<i>MYC</i>	5,99	↑	p<0.05
	<i>FOXO3</i>	1,84	↑	p<0.001
	<i>CLSPN</i>	0,75	↓	p<0.001
	<i>CDKN2A</i>	1,99	↑	p<0.01
	<i>ACVR1B</i>	4,18	↑	p<0.05
	<i>E2F4</i>	4,24	↑	-
	<i>PPP2CA</i>	3,61	↑	-

Vulpinik asit muamelesi sonrası A-375 hücrelerinde apoptoz yolağına ait transkript ifade düzeyinin analizi qRT-PCR cihazı ile değerlendirilmesinden sonra en çok ifade değişikliği gösteren *CASP3*, *CASP8*, *BCL-2*, *TP53*, *CHEK1*, *BAX*, *TRAF1* genlerinin ifade düzeyi melanosit hücrelerinde de analiz edilmiştir. *CASP8* ve *BCL-2* genlerinde sırasıyla 0,13 (p<0.05) ve 0,95 kat gen ifade seviyesinde azalma olduğu belirlenmiştir (**Şekil 4.18**). *CASP3*, *TP53*, *CHEK1*, *BAX* ve *TRAF1* genlerinde ise sırasıyla 2,23, 17,21, 3,86 (p<0.01), 1,13 ve 7,09 (p<0.001) kat olmak üzere gen ifade seviyelerinde artış göstermiştir (**Şekil 4.18**). Analizdeki grafikte gen ifade seviyesinin farklılaşması 1 kat sayısına oranlanarak gösterilmiştir. Analizlerde istatistiksel anlamlılık p<0.05 oranına göre hesaplanarak ifade edilmiştir.

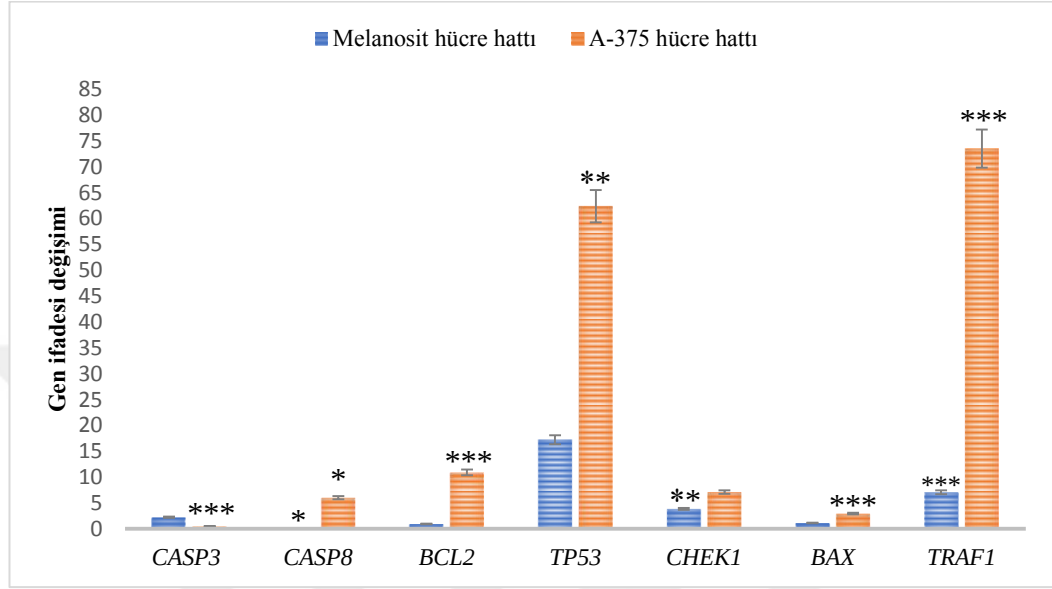


Şekil 4.18 Vulpinik asit muamele edilen melanosit hücrelerinde transkript ifade düzeyinin qRT-PCR analizi (***=p<0.001, **=p<0.01, *=p<0.05)

Çizelge 4.4 Vulpinik asit muamele edilen melanosit hücrelerinde *CASP3*, *CASP8*, *BCL-2*, *TP53*, *CHEK1*, *BAX*, *TRAF1* genlerine ait kontrole göre gen ifade değişim oranları (↑ : ifade seviyesi artışı, ↓ : ifade seviyesi azalması)

Gen ailesi	Gen	İfade Değişimi Oranı	Kontrolle göre ifade değişim durumu	p-değeri
Kaspaz Ailesi	<i>CASP3</i>	2,23	↑	-
Kaspaz Ailesi	<i>CASP8</i>	0,13	↓	p<0.05
BCL-2 Ailesi	<i>BCL2</i>	0,95	↓	-
BCL-2 Ailesi	<i>BAX</i>	1,13	↑	-
Apoptoz İlişkili Diğer Gen Ailesi Üyesi	<i>TP53</i>	17,21	↑	-
Kinaz Ailesi	<i>CHEK1</i>	3,86	↑	p<0.01
TRAF Ailesi	<i>TRAF1</i>	7,09	↑	p<0.001

A-375 ve melanosit hücre hatlarına Vulpinik asit uygulaması sonrası *CASP3*, *CASP8*, *BCL-2*, *TP53*, *CHEK1*, *BAX* ve *TRAF1* genlerinde ifade seviyeleri karşılaştırılmıştır (Şekil 4.19).



Şekil 4.19 *CASP3*, *CASP8*, *BCL-2*, *TP53*, *CHEK1*, *BAX*, *TRAF1* genlerinin ifade seviyelerinin melanosit ve A-375 hücre hattı ile karşılaştırılması (***= $p<0.001$, **= $p<0.01$, *= $p<0.05$)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Melanom, deri kanserinin en ölümcül türüdür ve görülme sıklığı oranları önlenebilir diğer kanser türlerinden daha hızlı artış göstermektedir (O'Neill ve Scoggins 2019, American Cancer Society 2019). Melanom kanserinin özellikleri ilk yıllarda bilim adamları tarafından açıklanmıştır fakat etkili terapötik ilaçlar hala eksikliğini göstermektedir (Lee vd. 2013, Liao vd. 2017). Tez kapsamında bir liken sekonder metaboliti olan vulpinik asitin insan deri malign melanomdan türetilen hücre hattı A-375 ve insan epidermal melanosit hücrelerine muamelesi sonucunda antiproliferatif ve apoptotik etkisi araştırılmıştır. xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemiyle vulpinik asitin A-375 ve melanosit hücre hatlarında antiproliferatif etkisi belirlenmiştir. Vulpinik asitin apoptotik etkisi Kaspaz-3 aktivitesi analizi, mRNA boyutunda incelenmiştir. Daha önceki literatür çalışmalarında ilaç adayı molekülü olan vulpinik asitin malignant melanom A-375 kanser hücresi üzerine etkisinin araştırılmamış olması tezin özgünlüğünü oluşturmaktadır.

Vulpinik asit daha önceki çalışmalarda farklı hücre hatlarıyla muamele edilerek hücre canlılığı ve sitotoksik etkisi belirlenmiştir. Koparal'ın 2015'de gerçekleştirdiği çalışmada HepG2 hepatokarsinom hücrelerine, NS20Y nöroblastoma hücrelerine ve HUVEC endotel hücrelerine vulpinik asit muamele ederek hücre canlılığını belirlemek için MTT analizi yapılmıştır (Koparal 2015). 24. saatte IC_{50} değerleri HUVEC hücre hattı için 1890 μ M, NS20Y hücre hattında 176 μ M, HepG2 hücre hattında ise 356 μ M bulunmuştur. 48. saatteki IC_{50} değerleri ise HUVEC, NS20Y ve HepG2 hücre hatları için sırasıyla 231, 68, 164 μ M bulunmuştur (Koparal 2015). HepG2 ve NS20Y kanser hücre hatlarına kıyasla vulpinik asidin HUVEC'ler için önemli ölçüde daha az toksik olduğunu belirlemişlerdir (Koparal 2015). Vulpinik asit HepG2 ve NS20Y kanser hücre hatları, normal HUVEC hücre hattına göre daha sitotoksik olduğunu ve vulpinik asitin güçlü anti-anjiyojenik potansiyel gösterdiğini bulmuşlardır (Koparal 2015). Tez kapsamında Literatüre uyumlu olarak A-375 hücre hattına yüksek konsantrasyonlarda Vulpinik asit muamelesi yapılmış ve Vulpinik asit için yüksek konsantrasyonlu bir IC_{50} değerinin (125 μ M) bulunması yine literatür sonuçlarına uyumlu olduğu belirlenmiştir.

Karaosmanoglu vd. 2015 yılında yapılan çalışmalarında vulpinik asitin insan hepatoselüler karsinoma hücre hattı HepG2 ve embriyonik sıçan fibroblast hücre hattı F2408 üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkileri araştırılmıştır. Vulpinik asitin sitotoksitesisi MTT ve nötral kırmızı alım yöntemi ile belirlenmiştir (Karaosmanoglu vd. 2015). Bu iki hücre hattında zamana ve doza bağlı olarak vulpinik asitin önemli derecede sitotoksik etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir (Karaosmanoglu vd. 2015). 48 saat sonra IC₅₀ değeri HepG2 hücre hattı için 300-400 µM, F2408 hücre hattı için ise 450-500 µM bulunmuştur (Karaosmanoglu vd. 2015). Böylelikle Vulpinik asitin normal ve hepatoselüler karsinom hücre büyümesini inhibe ettiği belirlenmiştir (Karaosmanoglu vd. 2015). Tez içeriğinde Vulpinik asitin A-375 melanom hücre hattına ve normal melanosit hücrelerine uygulanarak anti-proliferatif ve apoptotik etkisinin araştırılması yapılan ilk çalışmadır.

Bir diğer çalışmada Varol vd. 2016'da yayınladıkları çalışmada vulpinik asitin insan keratinosit hücre hattında (HaCaT) ultraviyole B (UVB) kaynaklı hasara karşı fotokoruyucu etkisini araştırmışlardır (Varol vd. 2016). Hücre canlılığı analizi MTT analizi ile belirlenmiştir. 2.5 J/cm² UVB HaCaT hücre hattına karşı IC₅₀ değeri olarak bulunmuştur (Varol vd. 2016). Vulpinik asitin toksik olmadığı ve hatta 800 µM vulpinik asitin UVB'nin neredeyse tüm toksik etkilerini önlediği gözlemlenmiştir (Varol vd. 2016). Böylece vulpinik asitin fotokoruyucu etkisi belirlenmiş ve bu özelliğiyle ümit verici olduğu bulunmuştur (Varol vd. 2016).

Kim vd.'nin 2017'deki çalışmalarında ise vulpinik asit dört akciğer adenokarsinom hücre hattı A549, NCI-H1264, NCI-H1299, Calu-6 hattına, iki pankreas duktal adenokarsinom hücre hattı PANC-1, MIA PaCa-2 hücre hattına ve hepatoselüler karsinom hücre hattı HepG2 hücre hattına muamele edilerek WST-1 analizi ile sitotoksik etkileri belirlenmiştir (Kim vd. 2017). IC₅₀ değerleri A549, HepG2, MIA PaCa-2, Calu-6, PANC-1, NCI-H1264 ve NCI-H1299 hücre hattı için sırasıyla 41.86, 60.35, 21.65, 79.22, 146.17, 30.67 ve 86.61 µM bulunmuştur (Kim vd. 2017). Vulpinik asit tedavisi, tedavi edilmemiş kontrollere kıyasla analiz edilen tüm kanser hücre hatlarında hücre canlılığını önemli ölçüde azalttı belirlenmiştir (Kim vd. 2017). Tez çalışmasında İnsan epidermal melanosit hücre hattı için ise IC₅₀ değeri olarak 25 µM

olarak hesaplanmıştır ve Vulpinik asit A-375 hücre hattına kıyasla melanosit hücrelerinde hücre canlılığını önemli ölçüde etkilememiştir.

Melanom hücrelerine daha önceki çalışmalarda farklı doğal bileşikler uygulanarak etkileri araştırılmıştır. Liao vd.'nin 2017'deki yayınladıkları çalışmada geleneksel bir Hint baharatı olan zerdeçaldan (*Curcuma longa*) elde edilen Curcumin'in (Jeenger 2015) insan melanomu A-375 hücrelerinin oksidatif strese bağlı apoptozunu ve altta yatan mekanizma araştırılmıştır (Liao vd. 2017). Hücre canlılığı deneyi MTT analizi ile yapılmıştır. Curcumin'in A-375 hücrelerinin zamana ve doza bağlı olarak hücre ölümünü indüklediğini belirlemişlerdir (Liao vd. 2017). 48. saatte, Curcumin'in A375 hücreleri için IC₅₀ değeri 80 µM bulunmuştur (Liao vd. 2017). Farklı literatür sonuçları Curcumin'in düşük konsantrasyonlarda antioksidan yeteneğe sahip olduğu belirtilmesine rağmen (Banerjee vd. 2008, Chen vd. 2011, Kma 2014), Liao vd.'nin 2017'deki çalışmalarında bunun aksini bulmuşlardır ve bunun farklı hücrel modellerle ilişkili olabileceğini belirlemişlerdir (Liao vd. 2017). Ek olarak bağırsak ve karaciğerdeki yaygın metabolizması nedeniyle zayıf klinik biyoaktivitesi ile curcuminin, gastrointestinal sistemde birkaç saat boyunca konsantrasyonlarını koruyamamış olduğunu belirterek (Phan 2003, Li vd. 2015, Mukkavilli vd. 2015) Curcumin'in oral uygulamasının sınırlı olduğunu ve intravenöz enjeksiyon, intramüsküler enjeksiyon, hipodermik enjeksiyon vb. yöntemlerinin (Zanella ve Haddock 2007, Chiu vd. 2011, Sinclair vd. 2013) çözüm olabileceğini tespit etmişlerdir (Liao vd. 2017). Tez kapsamında Vulpinik asitin A-375 hücre hattı için yüksek konsantrasyonlu bir IC₅₀ değerinin bulunmasının, vulpinik asitin melanom deri kanseri tedavisi için topikal yol, enjeksiyon yolu, transdermal yol (Pharmapproach 2020) gibi diğer ilaç uygulama yollarının kullanılması önerilmektedir.

Melanom hücrelerinde hücre canlılığını belirlemek için MTT analizinin yanı sıra RTCA sistemi kullanılan farklı çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Looi vd. 2013 yılında gerçekleştirdikleri çalışmada genellikle siyah kimyon olarak bilinen ve yaygın olarak körili baharat karışımları olarak kullanılan *Centratherum anthelminticum* tohumlarının kloroform fraksiyonunun (CACF) insan melanom hücreleri üzerindeki anti-kanser etkisini araştırmışlardır (Looi vd. 2013). MTT analizi ile bu bileşiğin A-375 hücreleri

üzerinde $IC_{50} < 10 \mu g / ml$ ile en yüksek sitotoksosite, normal primer melanositler için daha az toksik etki gösterdiği belirlenmiştir (Looi vd. 2013). Daha sonra RTCA analizi gerçekleştirilmiştir. RTCA analizinde CACF ile muameleden sonra A-375 hücreleri proliferasyonunun doza bağlı bir şekilde azaldığı gösterilmiştir (Looi vd. 2013). A375 hücreleri $6.25 \mu g / ml$ 'de yavaş bir hızda çoğalmış, $2.5 \mu g / ml$ CACF ile tedavi edildiğinde çoğalma durağan kalmıştır (Looi vd. 2013). Yüksek konsantrasyonda ($50 \mu g / ml$) CACF ile muameleden yaklaşık 1-2 saat sonra yüksek dozlarda akut toksisite gözlemlenmiştir. Hem MTT hem de RTCA sonuçları CACF ile tedavinin A-375 melanom hücrelerinin çoğalmasını doza ve zamana bağlı bir şekilde inhibe ettiği belirlenmiştir (Looi vd. 2013). Tez kapsamında $200 \mu M$ 'dan daha yüksek konsantrasyonlarda uygulanan Vulpinik asitin A-375 hücrelerinin canlılığını önemli ölçüde azaltması bu konsantrasyondan daha fazlasında sitotoksik etkisi olduğunu göstermiştir.

Liu vd. 2015'teki çalışmalarında deniz kaynaklı bir *Penicillium citrinum* mantarından izole edilen yeni bir alkaloid olan Penisitrin A'nın insan melanom A-375 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini ve apoptoz ve metastazı araştırılmıştır (Liu vd. 2015). RTCA analizi ile A-375 hücrelerinde penisitrin A'nın anti-proliferatif etkisi ve hücre canlılığı belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak kemoterapi ilacı 5-FU kullanılmıştır (Liu vd. 2015). Penisitrin A muamelesi sonrası A-375 hücre hattının IC_{50} değerleri 24. Saatte $30,88 \mu M$, 48. saatte $12,78 \mu M$ ve 72. saatte $7,06 \mu M$; 5-Fu muamelesi sonrası ise 24. saatte $134,86 \mu M$, 48. saatte $65,96 \mu M$ ve 72. saatte $35,23 \mu M$ olarak belirlenmiştir (Liu vd. 2015). Penisitrin A'nın A-375 hücrelerinin büyümesini doza ve zamana bağlı bir şekilde engellediği bulunmuştur ve 5-FU'dan daha güçlü antikanser aktivitesine sahip olduğunu belirlenmiştir (Liu vd. 2015). Liu vd. aynı zamanda çalışmalarında A-375 hücrelerinde penisitrin A'nın hücre göçündeki işlevini araştırmışlardır (Liu vd. 2015). Yara iyileştirme analizi ile A-375 hücreleri, penisitrin A ($5, 10$ veya $20 \mu M$) ile 24 saat süreyle inkübe edilmiş ve 0. ve 24. saatte fotoğrafları çekilmiştir (Liu vd. 2015). Hücrelerin doza bağımlı bir şekilde yaralı alana göç etmesinin önemli ölçüde engellendiğini belirlemişlerdir (Liu vd. 2015). Tez kapsamında vulpinik asitin A-375 hücrelerinde hücre göçünü ve hücre-hücre etkileşimini analiz etmek amacıyla yara iyileşme deneyi yapılmıştır. Vulpinik asitin kontrole göre A-375 hücrelerinin yaralı

alana göç etmesini zamana bağlı olarak engellediği belirlenmiştir. Vulpinik asit muamelesi sonucu 0, 6, 12, 24, 48 ve 72. saatlerdeki yara alanı sırasıyla 2387, 2075, 2660.33, 3002, 3036 ve 3071,66; kontrol grubunda ise 1193, 1506.33, 0.677, 0.459, 0.192 ve 0.187 olarak ImageJ programı ile hesaplanmıştır.

Čáňová vd.'nin 2018'de yayınladıkları çalışmada farklı melanom hücre hatları A-375, BOWES ve RPMI-7951 kullanılarak Flubendazol'un (FLU) malign melanom üzerindeki sitotoksik etkileri araştırılmıştır (Čáňová vd. 2018). WST analizi ve RTCA ile sitotoksosite belirlenmiştir (Čáňová vd. 2018). FLU, BOWES ve RPMI-7951 hücreleri için 1 μ M ve A-375 hücreleri için 5 μ M ile tedavi edildikten sonra 24. saatte konsantrasyon ve zamana bağlı sitotoksosite gösterildiği belirlenmiştir (Čáňová vd. 2018). RTCA sistemi ile bu doprulanmış ve IC₅₀ değerleri A375, BOWES ve RPMI7951 hücre hatları için sırasıyla 0.96 μ M, 0.90 μ M ve 0.25 μ M bulunmuştur (Čáňová vd. 2018).

Tez kapsamında A-375 hücre hattına 100, 200, 400, 600, 800 ve 1000 μ M konsantrasyonlarında vulpinik asit muamele edilmiş ve RTCA analizi ile hücre anti-proliferasyonu belirlenmiştir. xCELLigence RTCA sistemi elektriksel empedansa dayalı ölçüm özelliğiyle hücre canlılığı için MTT gibi analizlerden farklı olarak hücre proliferasyonu hakkında anlık olarak bilgi alınmasını sağlamaktadır. A-375 hücre hattı için IC₅₀ değeri 30. saatte 125,05 μ M olarak hesaplanmıştır. Vulpinik asitin muamelesi sonucu A-375 hücre hattında 30. saate % 93.03 oranında hücre canlılığını inhibe ettiği belirlenmiştir. Vulpinik asitin konsantrasyonun artmasıyla beraber hücre canlılığı da buna bağlı olarak azalmıştır. İnsan epidermal melanosit hücre hattı 25, 50, 75, 100 ve 200 μ M konsantrasyonlarında Vulpinik asit muamele edilmiş ve xCELLigence RTCA sistemi ile hücre proliferasyonu belirlenmiştir. İnsan epidermal melanosit hücre hattı için ise IC₅₀ değeri olarak 30. saate 25 μ M olarak hesaplanmıştır.

Kaspaz-3 aktivitesi kolorimetrik olarak çeşitli çalışmalarda belirlenmiştir. Ale vd.'nin 2011'de gerçekleştirdikleri çalışmada *Sargassum henslowianum* C.Agardh (FSAR) ve *Fucus vesiculosus* (FVES) kaynaklı Fukoz içeren sülfatlanmış polisakkarit (FCSP) ürünlerinin melanom hücrelerinin proliferasyonuna ve apoptozuna etkisini

araştırmışlardır (Ale vd. 2011). Fukoz içeren sülfatlanmış polisakkaritler (FCSP'ler) deniz yosunlarından ve özellikle kahverengi makro alglerden ekstrakte edilmektedir (Ale vd. 2011). Kaspaz-3 kolorimetrik deneyi ile kaspaz-3 aktivitesi ölçülmüş ve doza bağımlı bir şekilde artış gösterildiği belirlenmiştir (Ale vd. 2011). Bu çalışmada FCSP'lerin tümör inhibe edici etkisi kaspaz-3'ün aktivasyonu ile da gösterilmiştir (Ale vd. 2011). Bir diğer çalışmada Jiang vd. 2006 yılında HUVEC hücrelerinde nitrik oksit sentazın (NOS) endojen bir inhibitörü olan asimetrik dimetilarginin (ADMA) kaynaklı apoptozu araştırmışlardır (Jiang vd. 2006). Kolorimetrik Kaspaz-3 analizi ile Kaspaz-3 aktivitesinin kontrole kıyasla artış gösterdiği belirtilmiştir (Jiang vd. 2006). Çalışmada Kaspaz-3'ün endotel hücrelerinde ADMA kaynaklı apoptozda baskın bir hedef olarak göre aldığı düşünülmüştür (Jiang vd. 2006). Yapılan tez kapsamında ise Kaspaz-3 kolorimetrik analizi ile Kaspaz-3 aktivitesi belirlenmiştir. Vulpinik asit muamelesi sonrası A-375 hücrelerinde Kaspaz-3 aktivitesi kontrole kıyasla, A-375 hücresinde 3,12 kat artış göstermiştir. Tez çalışmasında A-375 hücre hattında Vulpinik asit aracılı apoptozun Kaspaz-3'e bağımlı olarak bir yol izlediği anlaşılmıştır.

Tümör protein 53, çeşitli pro-apoptotik proteinlerin ifade seviyesini düzenler, ölüm reseptörlerine aracılık eder ve genellikle sitoplazmada mitokondriyal yolları düzenlemekte görevlidir (Kruse ve Gu 2009, Yu vd. 2020). DNA hasarı, ultraviyole ışınlama, hipoksi, oksidatif stres ve ısı şoku gibi stresler aracılığıyla p53 hücre döngüsünü ve aynı zamanda apoptozu düzenleyen genlerin ekspresyonunu uyarır (Yee ve Vousden 2005, Riley vd. 2008, Green ve Kroemer 2009, Kim vd. 2019). Tümör baskılayıcı gen P53 çekirdekte Fas reseptörü ve TRAIL reseptörü ekspresyonunu artırarak dışsal apoptotik yolağı tetikler. Sitoplazma içindeyken ise PUMA, Bax, Bid ve Noxa gibi pro apoptotik proteinlerin ekspresyonunu artırarak sitokrom c salınımı sağlar ve içsel apoptotik yolu tetikler. TP53 ek olarak apoptozomun APAF-1'ini etkinleştirir (Fridman ve Lowe 2003, Maiuri vd. 2007, Mukhopadhyay vd. 2014). P53 aracılı apoptoz çeşitli kanser hücrelerinde araştırılmıştır. Kim vd. 2019'da yaptıkları çalışmada uzun zamandır Doğu Asya'da çeşitli rahatsızlıklar için bir gıda takviyesi ve geleneksel bitkisel ilaç olarak kullanılan *Rhus verniciflua* Stokes özütünün MCF-7 meme kanseri hücrelerinde apoptoz etkisini araştırmışlardır (Kim vd. 2019). *Rhus verniciflua* Stokes özütü muamelesi sonrası Western Blot analizi ile P53 ve P21 ekspresyonunun doza

bağımlı bir şekilde önemli ölçüde ifade seviyesinin arttığı gösterilmiştir (Kim vd. 2019). Elde edilen bu sonuçla P53 ve P21'in bu çalışmada apoptoza aracılık ettiğini belirlemişlerdir (Kim vd. 2019). Bir diğer çalışmada Yu vd. (2020) belirli bir bitkisel formül olan Renshenwuweizi kaynatma işleminin A549 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri üzerindeki etkisini araştırmışlardır (Yu vd. 2020). Bu çalışmada Renshenwuweizi kaynatma işlemi muamelesi ile P53 ifadesinin mRNA seviyesi qRT-PCR analizi ile ve protein seviyesi western blot yöntemi ile belirlenmiş ve doza bağımlı bir şekilde P53 ifade seviyesinin artış gösterdiği belirlenmiştir (Yu vd. 2020). Renshenwuweizi kaynatma işleminin A-549 hücre proliferasyonunu P53 yolu aracılığıyla apoptoz ve S-fazı hücre döngüsü durdurulmasıyla azalttığını belirlemişlerdir (Yu vd. 2020). TP53 geninin melanomun ortaya çıkması ve gelişmesinde önemli bir işleve sahip olduğu belirtilmiştir (Genov vd. 2016, Zhang vd. 2018). Li vd. 2019'da gerçekleştirdikleri çalışmada farmakolojik bileşen bufadienolidlerin A-375 melanoma hücre hattındaki etkisini ve altta yatan mekanizmayı araştırmayı amaçlamışlardır (Li vd. 2019). Western blot sonuçlarına bakıldığında Bcl-2 ve Kaspaz-3'ün ifade seviyelerinin doza bağlı bir şekilde azaldığı belirtilmiştir (Li vd. 2019). Bunun tersi olarak Bax ve P53 ekspresyon seviyeleri bufadienolidlerin konsantrasyonlarının artmasıyla birlikte önemli ölçüde artış gösterdiği raporlanmıştır (Li vd. 2019). Bu sonuçların gözlemlenmesiyle bufadienolidlerin apoptozu indükleyebildiğini ve teşvik edebildiğini ileri sürmüşlerdir (Li vd. 2019). Ramadan vd. 2019'da gerçekleştirdikleri çalışmada çay ağacı yağının insan deri kanseri tipi malign melanom (A-375) ve yassı epitel hücreli karsinom (HEp-2) hücrelerine karşı sitotoksik etkilerini araştırmışlardır (Ramadan vd. 2019). A-375 ve HEp-2 hücrelerinde çay ağacı yağı ile indüklenen apoptozun altında yatan moleküler mekanizmayı anlamak için P53, Bax ve Bcl-2 genlerinin mRNA ifade seviyelerini belirlemişlerdir (Ramadan vd. 2019). Sonuç olarak proapoptotik genler olan P53 ve Bax ifade seviyelerinin arttığı ve anti-apoptotik gen olan Bcl-2'nin gen ifade seviyesinin azaldığını belirtmişlerdir (Ramadan vd. 2019). Western blot sonuçları ise çay ağacı yağının muamelesinden sonra A-375 ve HEp-2'de P53 ve Bax pro-apoptotik proteinlerinin ifade seviyelerinin arttığı ve anti-apoptotik protein olan Bcl-2'nin ifadesi çay ağacı yağı ile muamele edilmemiş kontrol hücrelerine göre inhibe edildiği gösterilmiştir (Ramadan vd. 2019). Sonuç olarak A-375 ve HEp-2 hücrelerinde çay ağacı yağı tarafından indüklenen apoptozun P53 ve Bax ifade seviyesini arttırdığı ve

Bcl-2 gen ifade seviyesini azalttığı ve Kaspaz aktivasyonu ile ilişkilendirildiği raporlanmıştır (Ramadan vd. 2019). Tez kapsamında apoptoz yolağına ait genlerin transkript ifade düzeyi qRT-PCR analizi ile gerçekleştirilmiştir. Vulpinik asit muamelesi sonucu mRNA boyutunda *TP53* gen ifade seviyesinde 62,39 kat oranında ($p<0.01$) artış belirlenmiştir. *TP53* gen ifade seviyesindeki artışa bakıldığında A-375 melanom hücrelerine Vulpinik asit muamelesi sonrası *TP53* geninin apoptozu uyurabileceği ve teşvik edebileceği belirlenmiştir.

Survivin hücre ölümü düzenlenmesinde rol oynamaktadır ve Kaspaz bağımlı ve bağımsız yollarla apoptozu engellediği belirlenmiştir (Jaiswal vd. 2015). Aynı zamanda bir *P53* hedefidir ve *P53*, Survivin'ın anti-apoptotik aktivitesini antagonize ederek apoptozu aktif hale getirebilmektedir (Wang vd. 2004, Jaiswal vd. 2015). Survivin malignant melanomada % 67.0 oranında ifade edilmektedir (Nasr ve El-Zammar 2008, Jaiswal vd. 2015). Survivin'ın hücre bölünmesi, apoptoz ve hareketliliğindeki çeşitli işlevleri melanom tümör gelişimi ve metastazı ile ilişkilendirilmiştir (McKenzie ve Grossman 2012). Survivin inhibisyonu kemoterapinin etkinliğini artırdığı da bilinen tümör hücrelerinde kendiliğinden olan apoptozu teşvik edebilme rolüne sahiptir (Zaffaroni ve Daidone 2002, Wall vd. 2003, Wu vd. 2013). Wu vd. 2013'te gerçekleştirdikleri çalışmada *Herba epimedii*'den izole edilen icariside II'nin melanomdaki antitümör etkilerini ve apoptoz mekanizmasını araştırmışlardır (Wu vd. 2013). Western blot analizi ile Survivin ifadesinin doza bağımlı bir şekilde azaldığı görülmüştür (Wu vd. 2013). Bu çalışmada icariside II tarafından meydana gelen apoptozun azalmış Survivin tarafından da oluştuğu belirlenmiştir (Wu vd. 2013). Tez çalışmasında Vulpinik asit muamelesi sonra mRNA boyutunda gen ifade seviyesi bakılan survivin geninin 0,96 oranında ($p<0.001$) azaldığı görülmektedir. Vulpinik asit muamelesi sonrası A-375 hücrelerinde survivinin inhibe edilerek apoptozu katkı sağladığı belirlenmiştir.

Kontrol noktası kinaz 1 (*CHEK1*), hücre döngüsü düzenlemesinde ve DNA hasar tepkisinde önemli bir role sahiptir (Patil vd. 2013). *RIPK2* ise *TRAF1*, *TRAF5* ve *TRAF6*'ya bağlanan ve *TNFR-1* ve *CD40* reseptör sinyalleme komplekslerine katılarak hücre ölümünü indükleyen bir kinazdır (McCarthy vd. 1998). *CHECK2*, genomik

stabiliteyi korumak ve tümör oluşumunu baskılamak için hücre döngüsü düzenlemesine ve apoptoza aracılık eder (Mustofa vd. 2020). Tez kapsamında *CHEK1* ve *CHECK2* gen ifade seviyesi sırasıyla 7,11 ve 5,86 kat artış göstermiştir ve *CHECK2* gen ifade seviyesi ise 0,73 kat gen ifade seviyesinde azalma belirlenmiştir.

MYC onkogeni hücre döngüsü ve tümör dönüşümünde görev almasının yanı sıra apoptozun indükleyicisi olarak da belirlenmiştir (Askew vd. 1991, Evan vd. 1992, Meyer vd. 2006). *FOXO*'lar Fas ligandı ve *TNF* ile ilişkili apoptozu uyaran ligand ve Bim, bNIP3 ve *Bcl-XL* gibi *Bcl-2* gen aile üyelerinide kapsayan ölüm reseptör ligandlarının ifadesini uyararak mitokondriden hem bağımsız ve hem bağımlı bir şekilde apoptozu tetiklemekte görev almaktadırlar (Fu ve Tindall 2008). Tümör baskılayıcı gen olan *CDKN2A* hücre döngüsü ilerlemesi, hücre yaşlanma ve apoptozda rol oynamaktadırlar (Jiao vd. 2018). Tez kapsamında *MYC*, *FOXO3*, *CDKN2A* genlerinde sırasıyla 5,99 ($p<0.05$), 1,84 ($p<0.001$) ve 1,99 ($p<0.001$) kat artış belirlenmiştir. Semple vd. 2007'deki çalışmalarında *CLSPN*'nin anti-apoptotik aktivite gösterdiklerini ve *CLSPN*'nin hücrelerden yok olmasının apoptozu daha fazla tetiklediğini belirtmişlerdir (Semple vd. 2007). Tez çalışmasında da *CLSP* geninin 0.75 ($p<0.001$) kat azalarak apoptozu uyayabileceği belirlenmiştir.

Apoptotik kaskadlar dışsal ve içsel yolak olmak üzere iki ana yolağı izlemektedirler (Singh ve Bose 2015). Dışsal yolak esas olarak sitoplazmik olmasına ve içsel yolak mitokondriden kaynaklanmasına rağmen bu yollardaki moleküller birbirleriyle iletişim kurabilirler ve bu belirli terapötik müdahaleye yönelik karışıklığı çözmede katkı sağlayabilirler (Singh ve Bose 2015). Kaspazlar, apoptotik kaspazlar tarafından uygulanan apoptoz ve enflamatuar kaspazlar tarafından gerçekleştirilen piroptoz gibi hücre ölümüyle sonuçlanan sinyal olaylarını ortaya çıkarmak ve yaymakla görevli proteazlardır (Ramirez ve Salvesen 2018). Omurgalılarda apoptotik kaspazlar başlatıcı (Kaspaz-8, Kaspaz-9 ve Kaspaz-10) ve efektör (Kaspaz-3, Kaspaz-6 ve Kaspaz-7) kaspazlar olmak üzere alt bölümlere ayrılabilir (Fuentes-Prior ve Salvesen 2004, Ramirez ve Salvesen 2018). Son veriler Kaspaz-2'nin hücre döngüsü düzenlemesine katıldığını göstermiştir (Fava vd. 2012, Ramirez ve Salvesen 2018). Kaspaz-1, 4, 5 ise enflamatuar kaspaz olarak biyolojik role sahiptirler (Ramirez ve Salvesen 2018). Tez

kapsamında qRT-PCR analizi ile mRNA boyutunda Kaspazların gen ifade seviyeleri incelenmiştir. Başlatıcı Kaspazlar olan Kaspaz-8 ve Kaspaz-10'un ifade seviyeleri sırasıyla 6,02 ($p<0.05$) ve 1,40 kat artış göstermektedir. Efektör kaspazlar Kaspaz-3 ve Kaspaz-7'nin ifade seviyeleri sırasıyla 0,49 ($p<0.001$) ve 0,87 ($p<0.001$) kat azalış gösterirken Kaspaz-6'nın ifade seviyesinin 1,14 ($p<0.001$) kat artmış olduğu belirlenmiştir. Enflamatuar Kaspazlar Kaspaz-1 ve Kaspaz- 5'in ifade seviyeleri sırasıyla 11,79 ($p<0.01$), 3,29 $p<0.05$ kar artış gösterirken Kaspaz-4 ifade seviyesi 0,56 ($p<0.001$) kat azaldığı belirlenmiştir. Kaspaz-2 ifade seviyesi ise 2,43 ($p<0.01$) kat artmıştır. Tez kapsamında Kaspaz-8 ve Kaspaz-10'un gen ifade seviyesindeki artışlar vulpinik asit aracılı apoptozun başlamasında katkı oluşturduğunu, Kaspaz-6 gen ifade seviyesindeki artışın apoptozu efektör olarak etkileyebildiği belirlenmiştir. Aynı zamanda enflamatuar Kaspazlar Kaspaz-1 ve Kaspaz- 5'in ifade seviyesindeki artışlar vulpinik asit aracılı apoptozun uyarıldığını göstermektedir.

Mitokondriyal yolak olarak da bilinen apoptozun içsel yolağı, UV radyasyonu, besin yoksunluğu, oksidatif stres ve replikasyon stresi gibi olumsuz çevresel koşulları tarafından başlatılır. İçsel yolak mitokondriyal geçirgenliği ve ardından sitokrom c salımını arttırmak için etki eden *Bcl-2* ailesindeki proapoptotik ve antiapoptotik moleküller tarafından düzenlenmektedir (Wong 2011, Broussard vd. 2018). *Bcl-2* ailesinin en önemli görevi apoptozun içsel (mitokondriyal) yolaklarının başlamasını düzenlemektir (Youle ve Strasser 2008, Czabotar vd. 2014, Hatok ve Racay 2016). Son araştırmalar, *Bcl-2* ailesinin otofaji, endoplazmik retikulum (ER) stres tepkisi, hücre içi kalsiyum dinamikleri, mitokondriyal dinamikler ve enerji metabolizması ve hücre döngüsü ilerlemesi gibi hücre hayatta kalması üzerinde güçlü bir etkiye sahip diğer hücre içi yolakların düzenlenmesinde de önemli roller sergilediğini belirlemişlerdir (Rong ve Distelhorst 2008, Szegezdi vd. 2009, Rodriguez vd. 2011, Galluzzi vd. 2012, Bonneau vd. 2013, Hardwick ve Soane 2013, Urrea vd. 2013, Akl vd. 2014, Lewis vd. 2014, Lindqvist vd. 2016, Vervliet vd. 2016, Hatok ve Racay 2016). *BCL-2* proteinleri üç alt grup altında sınıflandırılır: anti-apoptotik (*BCL-2*, *MCL-1*, *BCL-xL* gibi), pro-apoptotik efektörler (*BOX* , *BAK* ve *BAX*) ve pro-apoptotik sadece BH3 proteinleri (*BAD*, *BID*, *BIM* gibi). Bu proteinlerin tümü en az bir korunmuş *BCL-2* Homoloji alanı (BH) içermektedirler (Singh ve Bose 2015). Apoptozun dışsal yolağı ise, FasL ve

TNF α 'nın ilgili reseptörleri Fas ve TNF'ye bağlanmasının aracılık ettiği ölüm reseptörüdür. Bu reseptörlerin bağlanması, Fas ile ilişkili ölüm alanı (FADD), proenzim kaspaz 8 ve TNF reseptörü ile ilişkili ölüm alanı (TRADD) gibi proteinleri birleştiren bir ölüm alanını aktif hale getirir (Wong 2011, Broussard vd. 2018).

Melanomda hem içsel hem de dışsal apoptoz yolağın aktive olduğu çalışmalar yayınlanmıştır. Hamsa ve Kuttan'ın 2011 yılında gerçekleştirdikleri çalışmada Harmin'in B16F-10 hücrelerindeki apoptozun rolünü araştırmışlardır (Hamsa ve Kuttan 2011). RT-PCR analizi ile *Bcl-2*, *P53*, *Kaspaz-3*, *8*, *9*, *Bid* ve *Bax* genlerinin ifadesi ölçülmüştür (Hamsa ve Kuttan 2011). Harmin muamelesi ile *Bcl-2* geninin ifadesinin azaldığı, *P53*, *Kaspaz-3*, *8*, *9*, *Bid* ve *Bax* genlerinin ifadesinin ise artış gösterdiğini bulmuşlar ve bu sonuçlar ile Harmin muamelesinin apoptozda, hem içsel hem de dışsal yolakta rol oynadığını belirlemişlerdir (Hamsa ve Kuttan 2011). Kwon vd.'nin 2013'te gerçekleştirdikleri bir diğer çalışmada ise Triptolide'in melanom hücresi SK-MEL-2 üzerine hücre öldürücü etkisi araştırılmıştır (Kwon vd 2013). Western blot ile Kaspaz-8 ve Kaspaz-9'un protein seviyelerine bakıldığı zaman Pro-kaspaz-8 ve Pro-kaspaz-9'un protein seviyeleri doza bağlı bir şekilde azalış gösterirken bunların bölünmüş formlarının protein seviyeleri artmıştır (Kwon vd 2013). Triptolide'in aynı zamanda Kaspaz-3'ün aktivasyonuna ve daha sonra PARP'ın bölünmesine neden olduğu bulunmuştur (Kwon vd 2013). Sonuçlar birlikte incelendiğinde Triptolide'in apoptozda iki yolağda etkilemiş olduğu belirtilmiştir (Kwon vd 2013). Dış yolakla apoptozu doğrulamak için Fas, FasL ve FADD seviyelerine bakılmış ve Fas ve FADD'nin ifade seviyeleri artış gösterirken FasL, mRNA ve proteinin ifade seviyelerinde dikkate değer bir değişiklik belirlenmemiştir (Kwon vd 2013). Aynı şekilde Bid seviyesi azalmıştır ve bunun tBid üretimiyle sonuçlandığı belirlenmiştir (Kwon vd 2013). SK-MEL-2 melanom hücrelerinde Triptolide ile apoptozun tBid aracılığıyla dışsal yolak ile içsel yolak aracılık edebileceği belirlenmiştir (Kwon vd 2013). İçsel yolakla apoptozu doğrulamak için ise Bcl-2, Bax ve Sitokrom-c seviyelerine bakılmıştır (Kwon vd 2013). Triptolide muamelesinden sonra Antiapoptotik protein olan Bcl-2 seviyesi azalırken, proapoptotik protein olan Bax seviyesi artış göstermiştir (Kwon vd 2013). Triptolide muamelesinden sonra doza bağımlı bir şekilde sitokrom c'nin mitokondriden sitozole salındığı belirlenmiştir (Kwon vd 2013). Bu sonuçlarla birlikte SK-MEL-2 melanom

hücrelerinde Triptolide ile indüklenen apoptozun içsel yolağı etkilediğı gösterilmiştir (Kwon vd 2013).

Tümör nekroz faktörü (TNF) ailesi 19 ligand ve 29 reseptörden oluşur ve vücutta oldukça çeşitli rolleri vardır (Aggarwal 2012). TNF ailesi kısmen transkripsiyon faktörü NF- κ B'nin aktivasyonu yoluyla proinflamatuvar aktivite gösterirler (Aggarwal 2012). TNF ailesinin birkaç üyesi (*TNF- α* , *TNF- β* , *GIRTL*, *BAFF*, *APRIL*, *TWEAK*, *RANKL*, *CD27L*, *CD40L*, *OX40L*, *LT- β*) çeşitli mitojenle aktifleştirilmiş kinazların aktivasyonu yoluyla hematopoietik hücreler üzerinde proliferatif aktivite sergiler, bazı üyeleri (*TNF- α* , *TNF- β* , *FasL*, *CD30L*, *CD40L*, *4-1 BBL*, *TRAIL*, *TWEAK*, *LIGHT*, *VEGI*, *EDA-A1*, *EDA-A2*) apoptozda rol oynar ve bazı üyelerinin de (*TNF- α* , *EDA-A1*, *EDA-A2*, *FasL*, *TRAIL*) morfojenetik değişikliklerde ve farklılaşmada rol oynadığı belirtilmiştir (Bhardwaj ve Aggarwal 2003, Gaur ve Aggarwal 2003, Aggarwal 2012). Tümör nekroz faktörü Reseptörle İlişkili Faktörler (*TRAF*'ler), birçok reseptörün hücre içi alanlarıyla etkileşime girerek sinyal iletiminde önemli rolleri bulunmaktadır (Arch vd. 1998, Luo vd. 2016). *TRAF6*, proinflamatuvar sitokinlere yanıt olarak NF- κ B yolağını aktive eden bir sinyal dönüştürücü olarak bilinmektedir ve onkogenik özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir (Cao vd. 1996, Beroukhim vd. 2010, Starczynowski vd. 2011, Meng vd. 2012, Sun vd. 2013, Sun vd. 2014, Luo vd. 2016). *TRAF1* ise hücre hayatta kalması, proliferasyonu, farklılaşması ve stres tepkilerinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Chung vd. 2002, Rajandram vd. 2012). *TRAF1*'in ana görevinin, TNF reseptörünün veya T hücre reseptörünün aktivasyonu ile indüklenen apoptozun bastırılması olduğu belirtilmektedir ve bu durumlarda anti-apoptotik bir role sahiptir (Sabbagh vd. 2006, Rajandram vd. 2012). Tez kapsamında apoptozun dışsal yolağında görev alan ilgili genler Kaspaz-8, TNF gen ailesi, Tümör nekroz faktörü reseptörle ilişkili faktörler (*TRAF*'ler), *CRADD*, *FADD* transkript ifade seviyeleri qRT-PCR ile analiz edilmiştir. *CASP8* ifade seviyesi 6,02 ($p<0.05$) kat artış göstermiştir. *TNF* gen ailesine ait araştırılan gen üyelerinin tümünün ifade seviyesi artmıştır örneğin *TNFRSF10D* gen üyesi 67,34 kat ($p<0.001$), *TNFRSF8* gen üyesi 58,08 kat ($p<0.001$), *TNFSF4* gen üyesi 38,59 kat ($p<0.001$), *CD40* gen üyesi 34,22 ($p<0.001$), *TNFSF13* gen üyesi 42,52 kat ($p<0.001$) ve *FasL* gen üyesi 12,21 kat ($p<0.001$) artış göstermiştir. Tümör nekroz faktörü reseptörle ilişkili faktörlerin (*TRAF*'ler) ifade seviyelerine bakıldığında *TRAF1*

73,52 kat ($p<0.001$), *TRAF5* 46,31 kat ($p<0.01$), *TRAF6* 85,63 ($p<0.001$) ve *TANK* geninde 21,81 kat ($p<0.01$) artış belirlenmiştir. *CRADD* ve *FADD* transkript ifade seviyeleri ise sırasıyla 10,39 ($p<0.001$) ve 11,00 ($p<0.001$) kat artış göstermektedir. Bu genlerin ifade seviyelerinde gözlenen artışlar vulpinik asit muamelesinin A-375 hücrelerinde apoptozun dışsal yolağını aktif hale getirdiğini belirlemektedir. Tez çalışmasında vulpinik asit muamelesinin A-375 hücrelerinde apoptozun içsel yolağını nasıl etkilediği belirlemek için *BCL-2* ailesinin gen üyelerinin ifade seviyeleri de qRT-PCR ile analiz edilmiştir. *BCL-2* ailesinin gen üyelerinden *BCL2L2*, *BCL10*, *BAX*, *BOK* ve *HRK* gen ifade seviyeleri sırasıyla 73,69 ($p<0.001$), 27,86 ($p<0.001$), 2,94 ($p<0.001$), 33,13 ($p<0.001$) ve 34,86 ($p<0.001$) kat artış göstermektedir. *APAF-1* Sitokrom-c salınımının ardından cevap olarak oligomerize olan ve apoptozom kompleksini oluşturan bir moleküldür ve apoptozun içsel yolağında görev alır (Shakeri vd. 2017). Tez çalışmasında *APAF-1* gen ifade seviyesinde ise 21,36 kat ($p<0.001$) artış belirlenmiştir. Bu sonuçlara bakıldığında vulpinik asit muamelesinin A-375 hücrelerinde apoptozun dışsal yolağının yanında içsel yolağı da etkilediği anlaşılmıştır.

İyonlaştırıcı radyasyon, ER stresi ve kemoterapötik ilaçlar gibi çeşitli uyarılar apoptozu veya otofajiyi uyarabilmektedir (Lian vd 2010). Otofaji ve apoptoz fenotipi bazen bu yaygın uyarılara yanıt olarak tespit edilebilir veya her iki süreç için değişken durumların veya iki yanıt arasındaki hücrel bir kararın sonucu olarak birbirini dışlayan bir şekilde ilerlemektedir (Lian vd 2010). Lian vd.'nin (2010) insan prostat kanseri hücreleri gerçekleştirdikleri çalışma Bcl-2 seviyesinin hücrelerin apoptozu veya otofajiye yönlendirilmesi için belirleyici rol oynadığını göstermektedir (Lian vd 2010). Çalışmalarında BH3-mimetik (-)-gossipol muamelesi üzerine otofaji yüksek Bcl-2 seviyelerine sahip apoptozu dirençli androjenden bağımsız (AI) prostat kanseri hücrelerinde indüklenmeyi tercih ederken apoptoz, androjen bağımlı veya düşük Bcl-2'ye sahip bağımsız hücrelerde indüklenmeyi tercih ettiği belirlenmiştir (Lian vd 2010). Bcl-2 inhibitörü (-) - gossipol ile muamele sonrası Bcl-2 seviyesi, prostat kanseri hücrelerinde hangi tip hücre ölümünün gerçekleşeceğini belirlemektedir (Lian vd 2010). Melanom hücreleri besin yoksunluğu, hipoksi, düşük ATP, olumsuz mikro çevre gibi metabolik stres koşullarında otofaji sergileyebilmektedirler (Broussard vd. 2018). Tez kapsamda vulpinik asit muamele sonrası A-375 melanom hücre hattında *BCL-2* geni

ifade seviyesi 10,90 kat ($p<0.001$) artış göstermektedir ve bu sonucun otofajiyle ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Tez çalışmasında elde edilen sonuçlara göre vulpinik asit etkin bir ilaç aday molekülü olarak deri kanseri tedavisinde kullanılabilirliği belirlenmiştir. Vulpinik asitin sitotoksik etkisinin deri kanseri hücrelerinde daha fazla iken, normal melanosit hücrelerinde daha az olması kanser tedavilerindeki normal hücrelere zarar vermeden kanserli hücreleri hedef alması yönünde önemli bir avantaj sağlamaktadır. Vulpinik asit A-375 melanom hücrelerinde apoptozu birçok yoldan etkilediği gibi aynı zamanda otofaji ile de ilişkisi olduğu belirlenmiştir. Melanom kanserinin tedavisinde vulpinik asitin kullanım şekli olarak topikal ve transdermal yol gibi farklı ilaç uygulaması yollarıyla ileride deri kanseri üzerinde uygulaması mümkün olabilecektir.

KAYNAKLAR

- Abbas, K., Qadir, M. and Anwar, S. 2019. The Role of Melanin in Skin Cancer. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 29(1); 17-24.
- Abern, M., Tsivian, M., Coogan, C., Kaufman, H., Polascik, T. 2013. Characteristics of patients diagnosed with both melanoma and renal cell cancer. *Cancer Causes & Control*, 24(11); 1925-1933.
- Adewale, F.O., Basiru, A.O., Ayorinde, O.O., Israel, O.I., Oluwafemi, O.A. 2017. Regulation of apoptotic and necroptotic cell death in skin cancer. *J Cancer Biol Res*, 5, 1108-17.
- Aggarwal, B.B., Gupta, S.C. and Kim, J.H. 2012. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood*, 119(3); 651-665.
- Akkilic-Materna, M., Massone, C., Komericki, P. 2011. Imiquimod and lymphatic field clearance: a new hypothesis based on a remote immune action on skin cancer. *Acta Derm Venereol*, 91, 432-5.
- Akl, H., Vervloessem, T., Kiviluoto, S., Bittremieux, M., Parys, J.B., De Smedt, H. and Bultynck, G. 2014. A dual role for the anti-apoptotic Bcl-2 protein in cancer: mitochondria versus endoplasmic reticulum. *Biochimica et biophysica acta*, 1843(10); 2240-2252.
- Ale, M.T., Maruyama, H., Tamauchi, H., Mikkelsen, J.D. and Meyer, A.S. 2011. Fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds inhibit proliferation of melanoma cells and induce apoptosis by activation of caspase-3 in vitro. *Marine drugs*, 9(12); 2605-2621.
- Alonso, S., Ortiz, P., Pollán, M., Pérez-Gómez, B., Sánchez, L., Acuña, M., Pajares, R., Martínez-Tello, F., Hortelano, C., Piris, M., Rodríguez-Peralto, J. 2004. Progression in Cutaneous Malignant Melanoma Is Associated with Distinct Expression Profiles. *The American Journal of Pathology*, 164(1); 193-203.
- American Cancer Society. 2019. Cancer facts & figures 2019. Atlanta: American Cancer Society, 1- 4.
- American Cancer Society. 2020. Cancer Facts & Figures 2020.

- Amin, N., Qadir, M.I., Khan, T.J., Abbas, G., Ahmad, B., Janbaz, K.H., Ali, M. 2012. Antibacterial activity of vacuum liquid chromatography (VLC) isolated fractions of chloroform extracts of seeds of *Achyranthes aspera*. J Chem Soc Pak, 34(3); 589-92.
- Anonim 2020. Amerikan Deri Kanseri: Deri kanseri - bazal ve skuamöz hücreli kanserler. Web Sitesi: <http://www.cancer.org/cancer>. Erişim tarihi: 22.10.2020.
- Anonymous. 2018. Vulpinic acid Structural Formula. Web Sitesi: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Vulpinic_acid_Structural_Formula_V1.svg. Erişim tarihi 01.11.2020.
- Arch, R.H., Gedrich, R.W. and Thompson, C.B. 1998. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs)---a family of adapter proteins that regulates life and death. Genes & Development, 12, 2821-2830.
- Arch, R.H., Gedrich, R.W., Thompson, C.B. 2000. Translocation of TRAF proteins regulates apoptotic threshold of cells. Biochem Biophys Res Commun, 272, 936-945.
- Asgari, M.M., Maruti, S.S., Kushi, L.H., White, E. 2009. A cohort study of vitamin D intake and melanoma risk. The Journal of investigative dermatology, 129(7); 1675-1680.
- Ashkenazi, A., Dixit, V.M. 1998. Death receptors: signaling and modulation. Science, 281, 1305-8.
- Ashkenazi, A., Dixit, V.M. 1999. Apoptosis control by death and decoy receptors. Curr Opin Cell Biol, 11, 255-260.
- Askew, D.S., Ashmun, R.A., Simmons, B.C. and Cleveland, J.L. 1991. Constitutive c-myc expression in an IL-3-dependent myeloid cell line suppresses cell cycle arrest and accelerates apoptosis. Oncogene, 6(10); 1915-1922.
- Austin, E., Mamalis, A., Ho, D., Jagdeo, J. 2017. Laser and light-based therapy for cutaneous and soft-tissue metastases of malignant melanoma: a systematic review. Arch Dermatol Res, 390(4); 229-242.
- Azoury, S., Lange, J. 2014. Epidemiology, Risk Factors, Prevention, and Early Detection of Melanoma. Surgical Clinics of North America, 94(5); 945-962.

- Bajaj, A., Driver, J.A. and Schernhammer, E.S. 2010. Parkinson's disease and cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Cancer causes & control : CCC*, 21(5); 697-707.
- Balch, C.M., Soong, S.J., Gershenwald, J.E., Thompson, J.F., Reintgen, D.S., Cascinelli, N., Urist, M., McMasters, K.M., Ross, M.I., Kirkwood, J.M., Atkins, M.B., Thompson, J.A., Coit, D.G., Byrd, D., Desmond, R., Zhang, Y., Liu, P.Y., Lyman, G.H. and Morabito, A. 2001. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 19(16); 3622-3634.
- Bald, T., Quast, T., Landsberg, J., Rogava, M., Glodde, N., Lopez-Ramos, D., Kohlmeyer, J., Riesenberger, S., van den Boorn-Konijnenberg, D., Hömig-Hölzel, C., Reuten, R., Schadow, B., Weighardt, H., Wenzel, D., Helfrich, I., Schadendorf, D., Bloch, W., Bianchi, M. E., Lugassy, C., Barnhill, R.L., Koch, M., Fleischmann, B.K., Förster, I., Kastenmüller, W., Kolanus, W., Hölzel, M., Gaffal, E. And Tüting, T. 2014. Ultraviolet-radiation-induced inflammation promotes angiogenesis and metastasis in melanoma. *Nature*, 507(7490); 109-113.
- Banerjee, A., Kunwar, A., Mishra, B. and Priyadarsini, K.I. 2008. Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin studies from AAPH induced hemolysis of RBCs. *Chemico-biological interactions*, 174(2); 134-139.
- Barry, M., Bleackley, R.C. 2002. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol*, 2, 401-9.
- Batus, M., Waheed, S., Ruby, C., Petersen, L., Bines, S.D., Kaufman, H.L. 2013. Optimal management of metastatic melanoma: current strategies and future directions. *Am J Clin Dermatol*, 14(3); 179-194.
- Bennett, P.E., Bemis, L., Norris, D.A., Shellman, Y.G. 2013. miR in melanoma development: miRNAs and acquired hallmarks of cancer in melanoma. *Physiological genomics*, 45(22); 1049-1059.
- Berger, M., Hodis, E., Heffernan, T., Deribe, Y., Lawrence, M., & Protopopov, A. et al. 2012. Melanoma genome sequencing reveals frequent PREX2 mutations. *Nature*, 485(7399); 502-506.

- Berman, B., Viera, M., Amini, S., Valins, W. 2011. Immune response modulators in the treatment of skin cancer. In: Rigel DS, editor. *Cancer of the skin*. 2nd ed. Philadelphia: Elsevier-Saunders, 477-96.
- Beroukhi, R., Mermel, C.H., Porter, D., Wei, G., Raychaudhuri, S., Donovan, J., Barretina, J., Boehm, J.S., Dobson, J., Urashima, M., Mc Henry, K.T., Pinchback, R.M., Ligon, A. H., Cho, Y.J., Haery, L., Greulich, H., Reich, M., Winckler, W., Lawrence, M.S., Weir, B. A., Tanaka, K.E., Chiang, D.Y., Bass, A.J., Loo, A., Hoffman, C., Prensner, J., Liefeld, T., Gao, Q., Yecies, D., Signoretti, S., Maher, E., Kaye, F.J., Sasaki, H., Tepper, J.E., Fletcher, J.A., Tabernero, J., Baselga, J., Tsao, M.S., Demichelis, F., Rubin, M.A., Janne, P.A., Daly, M.J., Nucera, C., Levine, R.L., Ebert, B.L., Gabriel, S., Rustgi, A.K., Antonescu, C.R., Ladanyi, M., Letai, A., Garraway, L.A., Loda, M., Beer, D.G., True, L.D., Okamoto, A., Pomeroy, S.L., Singer, S., Golub, T.R., Lander, E.S., Getz, G., Sellers, W.R. and Meyerson, M. 2010. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature*, 463(7283); 899-905.
- Bhardwaj, A., Aggarwal, B.B. 2003. Receptor-mediated choreography of life and death. *J Clin Immunol*, 23(5); 317-332.
- Bissonnette, R.P., Echeverri, F., Mahboubi, A., Green, D.R. 1992. Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. *Nature*, 359, 552-554.
- Boniol, M., Autier, P., Boyle, P., Gandini, S. 2012. Cutaneous melanoma attributable to sunbed use: systematic review and meta-analysis. *BMJ (Clinical research ed.)*, 345, 4757.
- Bonneau, B., Prudent, J., Popgeorgiev, N., and Gillet, G. 2013. Non-apoptotic roles of Bcl-2 family: the calcium connection. *Biochimica et biophysica acta*, 1833(7); 1755-1765.
- Boustie, J., Tomasi, S. and Grube, M. 2011. Bioactive lichen metabolites: alpine habitats as an untapped source, *Phytochem. Rev*, 10, 287-307.
- Bracci, L., Schiavoni, G., Sistigu, A., Belardelli F. 2014. Immune-based mechanisms of cytotoxic chemotherapy: implications for the design of novel and rationale-based combined treatments against cancer. *Cell Death Differ*, 21, 15-25.
- Bratton, D.L., Fadok, V.A., Richter, D.A., Kailey, J.M., Guthrie, L.A. and Henson, P.M. 1997. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the

aminophospholipid translocase. The Journal of biological chemistry, 272(42); 26159-26165.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A. and Jemal, A. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 68; 394-424.

Broussard, L., Howland, A., Ryu, S., Song, K., Norris, D., Armstrong, C.A. and Song, P.I. 2018. Melanoma Cell Death Mechanisms. Chonnam medical journal, 54(3); 135-142.

Brunner, T., Wasem, C., Torgler, R., Cima, I., Jakob, S., Corazza, N. 2003. Fas (CD95/Apo-1) ligand regulation in T cell homeostasis, cell-mediated cytotoxicity and immune pathology. Semin Immunol, 15, 167-76.

Čáňová, K., Rozkydalová, L., Vokurková, D. and Rudolf, E. 2018. Flubendazole induces mitotic catastrophe and apoptosis in melanoma cells. Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA, 46, 313-322.

Cao, Z., Xiong, J., Takeuchi, M., Kurama, T. and Goeddel, D.V. 1996. TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. Nature, 383, 443-446.

Cardile, V., Graziano, A., Avola, R., Piovano, M. and Russo, A. 2017. Potential anticancer activity of lichen secondary metabolite physodic acid. Chemico-biological interactions, 263, 36-45.

Chang, Y.M., Barrett, J.H., Bishop, D.T., Armstrong, B.K., Bataille, V., Bergman, W., Berwick, M., Bracci, P.M., Elwood, J.M., Ernstoff, M.S., Gallagher, R.P., Green, A.C., Gruis, N.A., Holly, E.A., Ingvar, C., Kanetsky, P.A., Karagas, M.R., Lee, T.K., Le Marchand, L., Mackie, R.M., Newton-Bishop, J.A. 2009. Sun exposure and melanoma risk at different latitudes: a pooled analysis of 5700 cases and 7216 controls. International journal of epidemiology, 38(3); 814-830.

Chau, B.N., Cheng, E.H., Kerr, D.A., Hardwick, J.M. 2000. Aven, a novel inhibitor of caspase activation, binds BclxL and Apaf-1. Mol Cell, 6, 31-40.

Chen, X., Zhong, Z., Xu, Z., Chen, L. and Wang, Y. 2011. No protective effect of curcumin on hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in HepG2 cells. Pharmacological reports : PR, 63(3); 724-732.

- Chicheportiche, Y., Bourdon, P.R., Xu, H., Hsu, Y.M., Scott, H., Hession, C., Garcia, I., Browning, J.L. 1997. TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J Biol Chem*, 272, 32401-10.
- Chinnaiyan, A.M. 1999. The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia*, 1, 5-15.
- Chiu, S.S., Lui, E., Majeed, M., Vishwanatha, J.K., Ranjan, A.P., Maitra, A., Pramanik, D., Smith, J.A. and Helson, L. 2011. Differential distribution of intravenous curcumin formulations in the rat brain. *Anticancer research*, 31(3); 907-911.
- Chu, H., Li, J., Liu, T., Miao, N. and Zhang, W. 2020. Anticancer effects of Daidzein against the human melanoma cell lines involves cell cycle arrest, autophagy and deactivation of PI3K/AKT signalling pathways. *Journal of B.U.ON. : official journal of the Balkan Union of Oncology*, 25(1); 485-490.
- Chung, J.Y., Park, Y.C., Ye, H. and Wu, H. 2002. All TRAFs are not created equal: common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction. *Journal of cell science*, 115(Pt 4); 679-688.
- Clark, W., Elder, D., Guerry, D., Epstein, M., Greene, M. and Van Horn, M. 1984. A study of tumor progression: The precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Human Pathology*, 15(12); 1147-1165.
- Cory, S., Adams, J.M. 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*, 2, 647-56.
- Curtin, J., Fridlyand, J., Kageshita, T., Patel, H., Busam, K., Kutzner, H., Cho, K., Aiba, S., Bröcker, E., LeBoit, P., Pinkel, D., Bastian, B. 2005. Distinct Sets of Genetic Alterations in Melanoma. *New England Journal of Medicine*, 353(20); 2135-2147.
- Curtis, H.J. 1963. Biological mechanisms underlying the aging process. *Science (New York, N.Y.)*, 141(3582); 686-694.
- Czabotar, P.E., Lessene, G., Strasser, A. and Adams, J.M. 2014. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15(1); 49-63.

- D'Errico, M., Lemma T., Calcagnile, A., De Santis, L.P., Dogliotti, E. 2007. Cell type and DNA damage specific response of human skin cells to environmental agents. *Mutation Res/Fundamental Mol Mech Mutagenesis*, 614, 37-47.
- De Gruijl, F. 1999. Skin cancer and solar UV radiation. *Eur J Cancer*, 35, 2003-2009.
- Debniak, T., Scott, R.J., Górski, B., Cybulski, C., van de Wetering, T., Serrano-Fernandez, P., Huzarski, T., Byrski, T., Nagay, L., Debniak, B., Kowalska, E., Jakubowska, A., Gronwald, J., Wokolorczyk, D., Maleszka, R., Kładny, J., Lubinski, J. 2008. Common variants of DNA repair genes and malignant melanoma. *European Journal Of Cancer*, 44(1); 110-114.
- Desai, T., Chen, C.L., Desai, A., Kirby, W. 2012. Basic pharmacology of topical imiquimod, 5-fluorouracil, and diclofenac for the dermatologic surgeon. *Dermatol Surg*, 38, 97-103.
- Deveraux, Q.L., Reed, J.C. 1999. IAP family proteins: suppressors of apoptosis. *Genes Dev*, 13, 239-252.
- Domingues, B., Lopes, J.M., Soares, P. and Pópulo, H. 2018. Melanoma treatment in review. *ImmunoTargets and therapy*, 7, 35-49.
- Donehower, L.A., Harvey, M., Slagle, B.L., McArthur, M.J., Montgomery, C.A., Jr, Butel, J. S. and Bradley, A. 1992. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature*, 356(6366); 215-221.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. and Wang, X. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 102(1); 33-42.
- Duffy, A., Le, J., Sausville, E., Emadi, A. 2015. Autophagy modulation: a target for cancer treatment development. *Cancer Chemother Pharmacol*, 75, 439-47.
- Elmore, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495-516.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. and Nagata, S. 1998. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, 391(6662); 43-50.

- Esposti, M.D. 2002. The roles of Bid. *Apoptosis*, 7, 433-40.
- Evan, G.I., Wyllie, A.H., Gilbert, C.S., Littlewood, T.D., Land, H., Brooks, M., Waters, C. M., Penn, L.Z. and Hancock, D.C. 1992. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell*, 69(1); 119-128.
- Fadok, V.A., de Cathelineau A, Daleke, D.L., Henson, P.M. and Bratton, D.L. 2001. Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *The Journal of biological chemistry*, 276(2); 1071-1077.
- Fan, Z., Beresford, P. J., Oh, D. Y., Zhang, D. and Lieberman, J. 2003. Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell*, 112(5); 659-672.
- Fava, L.L., Bock, F.J., Geley, S. and Villunger, A. 2012. Caspase-2 at a glance. *Journal of cell science*, 125(Pt 24); 5911-5915.
- Feller, L., Masilana, A., Khammissa, R., Altini, M., Jadwat, Y. and Lemmer, J. 2014. Melanin: the biophysiology of oral melanocytes and physiological oral pigmentation. *Head & Face Medicine*, 10, 8.
- Ferraro-Peyret, C., Quemeneur, L., Flacher, M., Revillard, J.P., Genestier, L. 2002. Caspase-independent phosphatidylserine exposure during apoptosis of primary T lymphocytes. *J Immunol*, 169, 4805-10.
- Fiala, K.H., Whetteckey, J., Manyam, B.V. 2003. Malignant melanoma and levodopa in Parkinson's disease: causality or coincidence?. *Parkinsonism & related disorders*, 9(6); 321-327.
- Finkel, T., Serrano, M., Blasco, M. A. 2007. The common biology of cancer and ageing. *Nature*, 448(7155); 767-774.
- Fletcher, O., Easton, D., Anderson, K., Gilham, C., Jay, M., Peto, J. 2004. Lifetime Risks of Common Cancers Among Retinoblastoma Survivors. *JNCI Journal Of The National Cancer Institute*, 96(5); 357-363.
- Fridman, J.S., Lowe, S.W. 2003. Control of apoptosis by p53. *Oncogene* 22; 9030-9040.

- Fu, Z. and Tindall, D.J. 2008. FOXOs, cancer and regulation of apoptosis. *Oncogene*, 27(16); 2312-2319.
- Fuentes-Prior, P. and Salvesen, G.S. 2004. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *The Biochemical journal*, 384(Pt 2); 201-232.
- Galloway D.J. 1993. Global environmental change: lichens and chemistry. *Bibl. Lichenol*, 53, 87-95.
- Galluzzi, L., Kepp, O., Trojel-Hansen, C. and Kroemer, G. 2012. Non-apoptotic functions of apoptosis-regulatory proteins. *EMBO reports*, 13(4); 322-330.
- Galluzzi, L., Vitale I., Aaronson S.A., Abrams, J.M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E.S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D.W., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A.V., Arama, E., Baehrecke, E.H., Barlev, N.A., Bazan, N.G., Bernassola, F., Bertrand, M.J.M., Bianchi, K., Blagosklonny, M.V., Blomgren, K., Borner, C., Boya, P., Brenner, C., Campanella, M., Candi, E., Carmona-Gutierrez, D., Cecconi, F., Chan, F.K.-M., Chandel, N.S., Cheng, E.H., Chipuk, J.E., Cidlowski, J.A., Ciechanover, A., Cohen, G.M., Conrad, M., Cubillos-Ruiz, J.R., Czabotar, P.E., D'Angiolella, V., Dawson, T.M., Dawson, V.L., De Laurenzi, V., De Maria, R., Debatin, K.-M., DeBerardinis, R.J., Deshmukh, M., Di Daniele, N., Di Virgilio, F., Dixit, V.M., Dixon, S.J., Duckett, C.S., Dynlacht, B.D., El-Deiry, W.S., Elrod, J.W., Fimia, G.M., Fulda, S., García-Sáez, A.J., Garg, A.D., Garrido, C., Gavathiotis, E., Golstein, P., Gottlieb, E., Green, D.R., Greene, L.A., Gronemeyer, H., Gross, A., Hajnoczky, G., Hardwick, J.M., Harris, I.S., Hengartner, M.O., Hetz, C., Ichijo, H., Jäättelä, M., Joseph, B., Jost, P.J., Juin, P.P., Kaiser, W.J., Karin, M., Kaufmann, T., Kepp, O., Kimchi, A., Kitsis, R.N., Klionsky, D.J., Knight, R.A., Kumar, S., Lee, S.W., Lemasters, J.J., Levine, B., Linkermann, A., Lipton, S.A., Lockshin, R.A., López-Otín, C., Lowe, S.W., Luedde, T., Lugli, E., MacFarlane, M., Madeo, F., Malewicz, M., Malorni, W., Manic, G., Marine, J.-C., Martin, S.J., Martinou, J.-C., Medema, J.P., Mehlen, P., Meier, P., Melino, S., Miao, E.A., Molkentin, J.D., Moll, U.M., Muñoz-Pinedo, C., Nagata, S., Nuñez, G., Oberst, A., Oren, M., Overholtzer, M., Pagano, M., Panaretakis, T., Pasparakis, M., Penninger, J.M., Pereira, D.M., Pervaiz, S., Peter, M.E., Piacentini, M., Pinton, P., Prehn, J.H.M., Puthalakath, H., Rabinovich, G.A., Rehm, M., Rizzuto, R., Rodrigues, C.M.P., Rubinsztein, D.C., Rudel, T., Ryan, K.M., Sayan, E., Scorrano, L., Shao, F., Shi, Y., Silke, J., Simon, H.-U., Sistigu, A., Stockwell, B.R., Strasser, A., Szabadkai, G., Tait, S.W.G., Tang, D., Tavernarakis, N., Thorburn, A., Tsujimoto, Y., Turk, B., Berghe, T.V., Vandenabeele, P., Heiden, M.G.V., Villunger, A., Virgin, H.W., Voutsden, K.H., Vucic, D., Wagner, E.F., Walczak, H., Wallach, D., Wang, Y., Wells, J.A., Wood, W., Yuan, J., Zakeri, Z., Zhivotovsky, B., Zitvogel, L., Melino, G. and Kroemer, G. 2018. Molecular mechanisms of cell death:

recommendations of the nomenclature committee on Cell death. *Cell Death Differ*, 25, 486-541.

Galun, M., Shomer-Ilan, A. 1988. Secondary metabolic products. In: Galun M (ed) *CRC handbook of lichenology*, vol III. CRC Press; 1st Edition, 6, Boca Raton.

Gandhi, S. and Kampp, J. 2015. Skin Cancer Epidemiology, Detection, and Management. *Medical Clinics of North America*, 99(6); 1323-1335.

Gandini, S., Autier, P., Boniol, M. 2011. Reviews on sun exposure and artificial light and melanoma. *Progress in biophysics and molecular biology*, 107(3); 362-366.

Gandini, S., Iodice, S., Koomen, E., Di Pietro, A., Sera, F., Caini, S. 2011. Hormonal and reproductive factors in relation to melanoma in women: current review and meta-analysis. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 47(17); 2607-2617.

Gandini, S., Sera, F., Cattaruzza, M., Pasquini, P., Abeni, D., Boyle, P., Melchi, C., 2005. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *European Journal of Cancer*, 41(1); 28-44.

Garbe, C., Peris, K., Hauschild, A., Saiag, P., Middleton, M., Spatz, A., Grob, J.J., Malvehy, J., Newton-Bishop, J., Stratigos, A., Pehamberger, H. and Eggermont, A. 2010. Diagnosis and treatment of melanoma: European consensus-based interdisciplinary guideline. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 46(2); 270-283.

Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P.E., Didelot, C. and Kroemer, G. 2006. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell death and differentiation*, 13(9); 1423-1433.

Gaur, U., Aggarwal, B.B. 2003. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochem Pharmacol*, 66(8); 1403-1408.

GBD 2017 Causes of Death Collaborators. 2018. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet*, 392(10159); 1736-1788.

- Geller, A.C., Miller, D.R., Annas, G.D., Demierre, M.F., Gilchrest, B.A., Koh, H.K. 2002. Melanoma Incidence and Mortality Among US Whites, 1969-1999. JAMA: The Journal of the American Medical Association, 288(14); 1719-1720.
- Genov, M., Kreiseder, B., Nagl, M., Drucker, E., Wiederstein, M., Muellauer, B., Krebs, J., Grohmann, T., Pretsch, D., Baumann, K., Bacher, M., Pretsch, A. and Wiesner, C. 2016. Tetrahydroanthraquinone Derivative ($\pm$)-4-Deoxyaustrocortilutein Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Melanoma Cells via Upregulation of p21 and p53 and Downregulation of NF-kappaB. Journal of Cancer, 7(5); 555-568.
- Geserick, P., Wang, J., Schilling, R., Horn, S., Harris, P.A., Bertin, J., Gough, P.J., Feoktistova, M. and Leverkus, M. 2015. Absence of RIPK3 predicts necroptosis resistance in malignant melanoma. Cell Death Dis, 6, e1884.
- Gilchrest, B.A., Eller, M.S., Geller, A.C., Yaar, M. 1999. The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. The New England journal of medicine, 340(17); 1341-1348.
- Glick, D., Barth, S., Macleod, K.F. 2010. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. J Pathol, 221, 3-12.
- Goldstein, A., Chan, M., Harland, M., Hayward, N., Demenais, F., Timothy Bishop, D., Azizi, E., Bergman, W., Bianchi-Scarra, G., Bruno, W., Calista, D., Cannon Albright, L., Chaudru, V., Chompret, A., Cuellar, F., Elder, D., Ghiorzo, P., Gillanders, E., Gruis, N., Hansson, J., Hogg, D., Holland, E., Kanetsky, P., Kefford, R., Teresa Landi, M., Lang, J., Leachman, S., MacKie, R., Magnusson, V., Mann, G., Newton Bishop, J., Palmer, J., Puig, S., Puig-Butlle, J., Stark, M., Tsao, H., Tucker, M., Whitaker, L., Yakobson, E. 2007. Features associated with germline CDKN2A mutations: a GenoMEL study of melanoma-prone families from three continents. Journal of Medical Genetics, 44(2); 99-106.
- Goping, I. S., Barry, M., Liston, P., Sawchuk, T., Constantinescu, G., Michalak, K.M., Shostak, I., Roberts, D.L., Hunter, A.M., Korneluk, R., and Bleackley, R.C. 2003. Granzyme B-induced apoptosis requires both direct caspase activation and relief of caspase inhibition. Immunity, 18(3); 355-365.
- Gordon, R. 2013. Skin Cancer: An Overview of Epidemiology and Risk Factors. Seminars in Oncology Nursing, 29(3); 160-169.
- Gottschalk, A.R., Boise, L.H., Thompson, C.B. and Quintáns, J. 1994. Identification of immunosuppressant-induced apoptosis in a murine B-cell line and its prevention

by bcl-x but not bcl-2. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 91(15); 7350-7354.

Gray-Schopfer, V., Wellbrock, C. and Marais, R. 2007. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* 445, 851-857.

Green, D.R. and Kroemer, G. 2009. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature*, 458(7242); 1127-1130.

Greene, M.H., Clark, W.H., Jr, Tucker, M.A., Kraemer, K.H., Elder, D.E., Fraser, M.C. 1985. High Risk of Malignant Melanoma in Melanoma-Prone Families with Dysplastic Nevi. *Annals of Internal Medicine*, 102(4); 458.

Griffith, T.S., Chin, W.A., Jackson, G.C., Lynch, D.H., and Kubin, M.Z. 1998. Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 161(6); 2833-2840.

Gross, A., Yin, X.M., Wang, K., Wei, M.C., Jockel, J., Milliman, C., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Korsmeyer, S.J. 1999. Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *The Journal of biological chemistry*, 274(2); 1156-1163.

Gudbjartsson, D.F., Sulem, P., Stacey, S.N., Goldstein, A.M., Rafnar, T., Sigurgeirsson, B., Benediktsdottir, K.R., Thorisdottir, K., Ragnarsson, R., Sveinsdottir, S.G., Magnusson, V., Lindblom, A., Kostulas, K., Botella-Estrada, R., Soriano, V., Juberías, P., Grasa, M., Saez, B., Andres, R., Scherer, D., Stefansson, K. 2008 . ASIP and TYR pigmentation variants associate with cutaneous melanoma and basal cell carcinoma. *Nature Genetics*, 40(7); 886-891.

Hall, P.A., Meek, D., Lane, D.P. 1996. p53: integrating the complexity. *J Pathol*, 180, 1-5.

Haluska, F., Hodi, F. 1998. Molecular genetics of familial cutaneous melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, 16(2); 670-682.

Hammerová, J., Uldrijan, S., Tábořská, E. and Slaninová, I. (2011). Benzo[c]phenanthridine alkaloids exhibit strong anti-proliferative activity in malignant melanoma cells regardless of their p53 status. *Journal of dermatological science*, 62(1); 22-35.

- Hamsa, T.P. and Kuttan, G. 2011. Harmine activates intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis in B16F-10 melanoma. *Chinese medicine*, 6(1); 11.
- Hanahan, D. and Weinberg R.A. 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1); 57–70.
- Hardwick, J. M. and Soane, L. 2013. Multiple functions of BCL-2 family proteins. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(2); a008722.
- Hatok, J. and Racay, P. 2016. Bcl-2 family proteins: master regulators of cell survival. *Biomolecular concepts*, 7(4); 259-270.
- Henry, H., Thomas, A., Shen, Y., White, E. 2002. Regulation of the mitochondrial checkpoint in p53-mediated apoptosis confers resistance to cell death. *Oncogene*, 21, 748-760.
- Hill, M.M., Adrain, C., Duriez, P.J., Creagh, E.M. and Martin, S.J. 2004. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *The EMBO journal*, 23(10); 2134-2145.
- Hitoshi, Y., Lorens, J., Kitada, S.I., Fisher, J., LaBarge, M., Ring, H.Z., Francke, U., Reed, J.C., Kinoshita, S., Nolan, G.P. 1998. Toso, a cell surface, specific regulator of Fas-induced apoptosis in T cells. *Immunity*, 8, 461-71.
- Hodis, E., Watson, I.R., Kryukov, G.V., Arold, S.T., Imielinski, M., Theurillat, J.P., Nickerson, E., Auclair, D., Li, L., Place, C., Dicara, D., Ramos, A.H., Lawrence, M.S., Cibulskis, K., Sivachenko, A., Voet, D., Saksena, G., Stransky, N., Onofrio, R.C., Winckler, W., Chin, L. 2012. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell*, 150(2); 251-263.
- Hofmann, K., Bucher, P., Tschopp, J. 1997. The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends Biochem Sci*, 22, 155-156.
- Hoz, S.S., Alkhaleeli, A.A., Aktham, A. 2018. Prolonged survival after surgical resection of cerebral metastasis from melanoma with multisystemic metastasis already present: a case report and literature review. *Sao Paulo medical journal = Revista paulista de medicina*, 136(4); 372-375.
- Hsu, H., Xiong, J., Goeddel, D.V. 1995. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NFkappa B activation. *Cell*, 81, 495-504.

- Huang, D.C., Strasser, A. 2000. BH3-only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell*; 103, 839-842.
- Hussain, L., Qadir, M.I., Rehman, S. 2014. Antihyperglycemic and hypolipidemic potential of *Caesalpinia decapetala* in alloxan-induced diabetic rabbits. *Bangladesh J Pharmacol*, 9(4); 529-32.
- Hussein, M.R., Haemel, A.K. and Wood, G.S. 2003. Apoptosis and melanoma: molecular mechanisms. *The Journal of pathology*, 199(3); 275-288.
- Igney, F.H., Krammer, P.H. 2002. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*, 2, 277-88.
- Jacobson, M.D., Burne, J.F., King, M.P., Miyashita, T., Reed, J.C. and Raff, M.C. 1993. Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. *Nature*, 361(6410); 365-369.
- Jaiswal, P.K., Goel, A. and Mittal, R.D. 2015. Survivin: A molecular biomarker in cancer. *The Indian journal of medical research*, 141(4); 389-397.
- Jeenger, M.K., Shrivastava, S., Yerra, V.G., Naidu, V.G., Ramakrishna, S., and Kumar, A. 2015. Curcumin: a pleiotropic phytonutrient in diabetic complications. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 31(2); 276-282.
- Jenkins, R.W. and Fisher, D.E. 2021. Treatment of Advanced Melanoma in 2020 and Beyond. *The Journal of investigative dermatology*, 141(1); 23-31.
- Jensen, P., Hansen, S., Møller, B., Leivestad, T., Pfeffer, P., Geiran, O., Fauchald, P., Simonsen, S., 1999. Skin cancer in kidney and heart transplant recipients and different long-term immunosuppressive therapy regimens. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 40(2); 177-186.
- Jhappan, C., Noonan, F. P., Merlino, G. 2003. Ultraviolet radiation and cutaneous malignant melanoma. *Oncogene*, 22(20); 3099-3112.
- Jiang, D.J., Jia, S.J., Dai, Z. and Li, Y.J. 2006. Asymmetric dimethylarginine induces apoptosis via p38 MAPK/caspase-3-dependent signaling pathway in endothelial cells. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 40(4); 529-539.

- Jiao, Y., Feng, Y. and Wang, X. 2018. Regulation of Tumor Suppressor Gene CDKN2A and Encoded p16-INK4a Protein by Covalent Modifications. *Biochemistry. Biokhimiia*, 83(11); 1289-1298.
- Johannesdottir, S.A., Chang, E.T., Mehnert, F., Schmidt, M., Olesen, A.B., Sørensen, H.T. 2012. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of skin cancer: a population-based case-control study. *Cancer*, 118(19); 4768-4776.
- Johnstone, R.W., Ruefli, A.A., Lowe, S.W. 2002. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell*, 108(2); 153-64.
- Joza, N., Susin, S.A., Daugas, E., Stanford, W.L., Cho, S.K., Li, C.Y., Sasaki, T., Elia, A.J., Cheng, H.Y., Ravagnan, L., Ferri, K.F., Zamzami, N., Wakeham, A., Hakem, R., Yoshida, H., Kong, Y.Y., Mak, T.W., Zúñiga-Pflücker, J.C., Kroemer, G. and Penninger, J.M. 2001. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*, 410(6828); 549-554.
- Kaczmarek, A., Vandenabeele, P., Krysko, D.V. 2013. Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity*, 38; 209-23.
- Karaosmanoğlu, O., Sivas, H., Tay, T. and Türk, A. 2015. The in vitro investigation of cytotoxic and apoptotic effects vulpinic acid on normal and cancer cells. *Journal Of Biotechnology*, 208, S95.
- Karimkhani, C., Green, A.C., Nijsten, T., Weinstock, M.A., Dellavalle, R.P., Naghavi, M. and Fitzmaurice, C. 2017. The global burden of melanoma: results from the Global Burden of Disease Study 2015. *Br J Dermatol*, 177(1); 134-140.
- Kasof, G.M., Gomes, B.C. 2001. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member. *J Biol Chem*, 276, 3238-3246.
- Kataoka, T., Schroter, M., Hahne, M., Schneider, P., Irmeler, M., Thome, M., Froelich, C.J., Tschopp, J. 1998. FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation. *J Immunol*, 161, 3936-42.
- Kılıç, N., Aras, S. and Cansaran-Duman, D. 2018. Determination of Vulpinic Acid Effect on Apoptosis and mRNA Expression Levels in Breast Cancer Cell Lines. *Anticancer Agents Med. Chem*, 18, 2032-2041.

- Kim, M., Lee, C., Kim, J., Lee, J. and An, W. 2019. Extract of *Rhus verniciflua* Stokes Induces p53-Mediated Apoptosis in MCF-7 Breast Cancer Cells. Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine, 1-9.
- Kim, S., So, H., Roh, H., Kim, J., Yu, J., Lee, S., Seok, S., Pang, C., Baek, K.H. and Kim, K.H. 2017. Vulpinic acid contributes to the cytotoxicity of *Pulveroboletus ravenelii* to human cancer cells by inducing apoptosis. RSC Advances, 7(56); 35297-35304.
- Kim, S.G., Ravi, G., Hoffmann, C., Jung, Y.J., Kim, M., Chen, A. and Jacobson, K.A. 2002. p53-Independent induction of Fas and apoptosis in leukemic cells by an adenosine derivative, Cl-IB-MECA. Biochemical pharmacology, 63(5); 871-880.
- Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H., Peter, M.E. 1995. Cytotoxicitydependent APO-1 (Fas/CD95)- associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. Embo J, 14, 5579-88.
- Kma, L. 2014. Plant extracts and plant-derived compounds: promising players in a countermeasure strategy against radiological exposure. Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP, 15(6); 2405–2425.
- Koparal, A.T. 2015. Anti-angiogenic and antiproliferative properties of the lichen substances (-)-usnic acid and vulpinic acid. Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of biosciences, 70(5-6); 159-164.
- Kruse, J.P. and Gu, W. 2009. Modes of p53 regulation. Cell, 137(4); 609-622.
- Kwon, H.Y., Kim, K., Baik, J.S., Moon, H.I., Lee, J.W., Kim, C.H., Cho, Y.S., Jeong, Y.K., and Lee, Y.C. 2013. Triptolide-Mediated Apoptosis by Suppression of Focal Adhesion Kinase through Extrinsic and Intrinsic Pathways in Human Melanoma Cells. Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM, 2013, 172548.
- Kwon, Y., Cha, J., Chiang, J., Tran, G., Giaever, G., Nislow, C., Hur, J.S. and Kwak, Y.S. 2016. A chemogenomic approach to understand the antifungal action of Lichen-derived vulpinic acid. Journal of applied microbiology, 121(6); 1580-1591.
- Lacarrubba, F., Nasca, M.R., Micali, G. 2008. Advances in the use of topical imiquimod to treat dermatologic disorders. Ther Clin Risk Manag, 4, 87-97.

- Lange, J.R., Kang, S., Balch, C.M. 2011. Melanoma in the older patient: measuring frailty as an index of survival. *Annals of surgical oncology*, 18(13); 3531-3532.
- Lawrey, J.D. 1986. A biological review of lichen substances. *Bryologist*, 89, 111-122.
- Lee, C., Collichio, F., Ollila, D. and Moschos, S. 2013. Historical review of melanoma treatment and outcomes. *Clinics in dermatology*, 31(2); 141-147.
- Levi, F., Te, V., Randimbison, L., La Vecchia, C. 2003. Cancer risk in women with previous breast cancer. *Annals of Oncology*, 14(1); 71-73.
- Lewis, A., Hayashi, T., Su, T.P., Betenbaugh, M.J. 2014. Bcl-2 family in interorganelle modulation of calcium signaling; roles in bioenergys and cell survival. *J Bioenerg Biomembr*, 46, 1-15.
- Li, H., Cao, X., Chen, X., Yi, X., Xia, J., Chen, J. and Yang, L. 2019. Bufadienolides induce apoptosis and autophagy by inhibiting the AKT signaling pathway in melanoma A-375 cells. *Molecular medicine reports*, 20(3); 2347-2354.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., Yuan, J. 1998. Cleavage of BID by caspase-8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, 94, 491-501.
- Li, L.Y., Luo, X., Wang, X. 2001. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*, 412, 95-9.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S. and Wang, X. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 91(4); 479-489.
- Li, V.W., Li, W.W., Talcott, K.E., Zhai, A.W. 2005. Imiquimod as an antiangiogenic agent. *J Drugs Dermatol*, 4, 708-17.
- Li, W., Qureshi, A., Ma, J., Goldstein, A., Giovannucci, E., Stampfer, M., Han, J. 2013. Personal History of Prostate Cancer and Increased Risk of Incident Melanoma in the United States. *Journal of Clinical Oncology*, 31(35); 4394-4399.
- Li, Y., Li, M., Wu, S. and Tian, Y. 2015. Combination of curcumin and piperine prevents formation of gallstones in C57BL6 mice fed on lithogenic diet: whether

- NPC1L1/SREBP2 participates in this process?. *Lipids in health and disease*, 14, 100.
- Lian, J., Karnak, D. and Xu, L. 2010. The Bcl-2-Becn1 interaction in (-)-gossypol-induced autophagy versus apoptosis in prostate cancer cells. *Autophagy*, 6(8); 1201-1203.
- Liao, W., Xiang, W., Wang, F.F., Wang, R., and Ding, Y. 2017. Curcumin inhibited growth of human melanoma A375 cells via inciting oxidative stress. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 95, 1177-1186.
- Lieberman, J., Fan, Z. 2003. Nuclear war: the granzyme A-bomb. *Curr Opin Immunol*, 15, 553-9.
- Lindelöf, B., Sigurgeirsson, B., Gäbel, H., Stern, R.S. 2000. Incidence of skin cancer in 5356 patients following organ transplantation. *The British journal of dermatology*, 143(3); 513–519.
- Lindqvist, L.M., Simon, A.K. and Baehrecke, E.H. 2015. Current questions and possible controversies in autophagy. *Cell death discovery*, 1, 15036.
- Linos, E., Swetter, S., Cockburn, M., Colditz, G., Clarke, C., 2009. Increasing Burden of Melanoma in the United States. *Journal of Investigative Dermatology*, 129(7); 1666-1674.
- Liu, Q.Y., Zhou, T., Zhao, Y.Y., Chen, L., Gong, M.W., Xia, Q.W., Ying, M.G., Zheng, Q. H. and Zhang, Q.Q. 2015. Antitumor Effects and Related Mechanisms of Penicitrinine A, a Novel Alkaloid with a Unique Spiro Skeleton from the Marine Fungus *Penicillium citrinum*. *Marine drugs*, 13(8); 4733-4753.
- Liu, R., Gao, X., Lu, Y., Chen, H. 2011. Meta-analysis of the relationship between Parkinson disease and melanoma. *Neurology*, 76(23); 2002-2009.
- Lo, J.A. and Fisher, D.E. 2014. The melanoma revolution: from UV carcinogenesis to a new era in therapeutics. *Science*, 346(6212); 945-949.
- Locksley, R.M., Killeen, N., Lenardo, M.J. 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, 104; 487-501.

- Lodish H., Berk A., Kaiser C.A., Krieger M., Scott M.P., Bretscher A., Ploegh H., Matsudaira P. 2007. MOLECULAR CELL BIOLOGY 6E. W.H. Freeman & Company, 1296, New York, USA.
- Long, M.D., Martin, C.F., Pipkin, C.A., Herfarth, H.H., Sandler, R.S., Kappelman, M.D. 2012. Risk of melanoma and nonmelanoma skin cancer among patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 143(2); 390-399.
- Looi, C.Y., Moharram, B., Paydar, M., Wong, Y.L., Leong, K.H., Mohamad, K., Arya, A., Wong, W.F. and Mustafa, M.R. 2013. Induction of apoptosis in melanoma A375 cells by a chloroform fraction of *Centratherum anthelminticum* (L.) seeds involves NF-kappaB, p53 and Bcl-2-controlled mitochondrial signaling pathways. *BMC complementary and alternative medicine*, 13, 166.
- Lowe, S.W. and Lin, A.W. 2000. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*, 21, 485-495.
- Luo, Z., Zhang, X., Zeng, W., Su, J., Yang, K., Lu, L., Lim, C. B., Tang, W., Wu, L., Zhao, S., Jia, X., Peng, C., and Chen, X. 2016. TRAF6 regulates melanoma invasion and metastasis through ubiquitination of Basigin. *Oncotarget*, 7(6); 7179-7192.
- Maiuri, M.C., Zalckvar, E., Kimchi, A. and Kroemer, G. 2007. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(9); 741-752.
- Mallhi, T.H., Sarrieff, A., Adnan, A.S., Khan, Y.H., Qadir, M.I., Hamzah, A.A., Khan, A.H. 2015. Effect of fruit/vegetable-drug interactions on CYP450, OATP and p-glycoprotein. *Trop J Pharm Res*, 14(10); 1927-35.
- Mandal, D., Mazumder, A., Das, P., Kundu, M. and Basu, J. 2005. Fas-, caspase 8-, and caspase 3-dependent signaling regulates the activity of the aminophospholipid translocase and phosphatidylserine externalization in human erythrocytes. *The Journal of biological chemistry*, 280(47); 39460-39467.
- Mannan, M., Hussain, L., Ijaz, H., Qadir, M.I. 2016. Report: antimicrobial activity of *Kalanchoe laciniata*. *Pak J Pharm Sci*, 29(4); 1321-4.
- Mattia, G., Puglisi, R., Ascione, B., Malorni, W., Carè, A. and Matarrese, P. 2018. Cell death-based treatments of melanoma: conventional treatments and new therapeutic strategies. *Cell Death Dis*, 9, 112.

- McCarthy, J.V., Ni, J. and Dixit, V.M. 1998. RIP2 is a novel NF-kappaB-activating and cell death-inducing kinase. *The Journal of biological chemistry*, 273(27); 16968-16975.
- McGuire, L.K., Disa, J.J., Lee, E.H., Busam, K.J., Nehal, K.S. 2012. Melanoma of the lentigo maligna subtype: diagnostic challenges and current treatment paradigms. *Plastic and reconstructive surgery*, 129(2); 288-299.
- McKenzie, J.A. and Grossman, D. 2012. Role of the apoptotic and mitotic regulator survivin in melanoma. *Anticancer research*, 32(2); 397-404.
- Meng, Q., Zheng, M., Liu, H., Song, C., Zhang, W., Yan, J., Qin, L. and Liu, X. 2012. TRAF6 regulates proliferation, apoptosis, and invasion of osteosarcoma cell. *Molecular and cellular biochemistry*, 371(1-2); 177-186.
- Meyer, N., Kim, S.S. and Penn, L.Z. 2006. The Oscar-worthy role of Myc in apoptosis. *Seminars in cancer biology*, 16(4); 275-287.
- Micali, G., Lacarrubba, F., Nasca, M. R. and Schwartz, R. A. 2014. Topical pharmacotherapy for skin cancer: part I. Pharmacology. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 70(6); 965.e1-978.
- Miller, A.J., Mihm, M.C. 2006. Melanoma. *The New England journal of medicine*, 355(1); 51-65.
- Miller, D. and Weinstock, M. 1994. Nonmelanoma skin cancer in the United States: Incidence. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 30(5); 774-778.
- Miller, K.D., Siegel, R.L., Lin, C.C., Mariotto, A.B., Kramer, J.L., Rowland, J.H., Stein, K. D., Alteri, R. and Jemal, A. 2016. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *CA: a cancer journal for clinicians*, 66(4); 271-289.
- Molnár, K. and Farkas, E. 2010. Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review. *Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of biosciences*, 65(3-4); 157-173.
- Mukhopadhyay, S., Panda, P.K., Sinha, N., Das, D.N. and Bhutia, S.K. 2014. Autophagy and apoptosis: where do they meet?. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 19(4); 555-566.

- Mukkavilli, R., Gundala, S. R., Yang, C., Jadhav, G. R., Vangala, S., Reid, M. D. and Aneja, R. 2015. Noscaphine recirculates enterohepatically and induces self-clearance. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 77, 90-99.
- Mustofa, M.K., Tanoue, Y., Tateishi, C., Vaziri, C. and Tateishi, S. 2020. Roles of Chk2/CHEK2 in guarding against environmentally induced DNA damage and replication-stress. *Environmental and molecular mutagenesis*, 61(7); 730-735.
- Nasr, M.R. and El-Zammar, O. 2008. Comparison of pHH3, Ki-67, and survivin immunoreactivity in benign and malignant melanocytic lesions. *The American Journal of dermatopathology*, 30(2); 117-122.
- NCI-SEER-database. 2019. Cancer Stat Facts: Melanoma of the Skin.
- Newman, D.J., Cragg, G.M. 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Products*, 70, 461-77.
- Newmeyer, D.D., Bossy-Wetzel, E., Kluck, R.M., Wolf, B.B., Beere, H.M., Green, D.R. 2000. Bcl-xL does not inhibit the function of Apaf-1. *Cell Death Differ*, 7, 402-7.
- Njauw, C.N., Kim, I., Piris, A., Gabree, M., Taylor, M., Lane, A.M., DeAngelis, M.M., Gragoudas, E., Duncan, L.M., Tsao, H. 2012. Germline BAP1 Inactivation Is Preferentially Associated with Metastatic Ocular Melanoma and Cutaneous-Ocular Melanoma Families. *Plos ONE*, 7(4); 35295.
- Noonan, F.P., Recio, J.A., Takayama, H., Duray, P., Anver, M. R., Rush, W.L., De Fabo, E. C., Merlino, G. 2001. Neonatal sunburn and melanoma in mice. *Nature*, 413(6853); 271-272.
- O'Neill, C.H., Scoggins, C.R. 2019. Melanoma. *J Surg Oncol*, 1-9.
- Ogretmen, B., Safa, A.R. 1996. Down-regulation of apoptosis-related bcl2 but not bcl-xL or bax proteins in multidrug-resistant MCF7/Adr human breast cancer cells. *Int J Cancer*, 67; 608-614.
- Pappo, A., Armstrong, G., Liu, W., Srivastava, D., McDonald, A., Leisenring, W., Hammond, S., Stovall, M., Neglia, J., Robison, L. 2013. Melanoma as a subsequent neoplasm in adult survivors of childhood cancer: A report from the childhood cancer survivor study. *Pediatric Blood & Cancer*, 60(3); 461-466.

- Paszkowska-Szczur, K., Scott, R.J., Serrano-Fernandez, P., Mirecka, A., Gapska, P., Górski, B., Cybulski, C., Maleszka, R., Sulikowski, M., Nagay, L., Lubinski, J., Dębniak, T. 2013. Xeroderma pigmentosum genes and melanoma risk. *International journal of cancer*, 133(5); 1094-1100.
- Patel, G.K., Goodwin, R., Chawla, M., Laidler, P., Price, P.E., Finlay, A.Y., Motley, R.J. 2006. Imiquimod 5% cream monotherapy for cutaneous squamous cell carcinoma in situ (Bowen's disease): a randomized, double blind, placebo-controlled trial. *J Am Acad Dermatol*, 54, 1025-32.
- Patil, M., Pabla, N. and Dong, Z. 2013. Checkpoint kinase 1 in DNA damage response and cell cycle regulation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 70(21); 4009-4021.
- Peter, M.E., Krammer, P.H. 1998. Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)- mediated apoptosis. *Curr Opin Immunol*, 10, 545-51.
- Phan, D. 2003. Compositions and methods of treatment for skin conditions using extracts of turmeric, US 6521-271.
- Pharmapproach. 2020 November 18. Pharmacology.
- Pollitt, R.A., Clarke, C.A., Swetter, S.M., Peng, D.H., Zadnick, J., Cockburn, M. 2011. The expanding melanoma burden in California hispanics: Importance of socioeconomic distribution, histologic subtype, and anatomic location. *Cancer*, 117(1); 152-161.
- PubChem. 2005. Web Sitesi: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3385>. Erişim tarihi: 19.12.2020.
- PubChem. 2005. Web Sitesi: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/57469>. Erişim tarihi: 19.12.2020.
- PubChem. 2005. Web Sitesi: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/54690323>. Erişim tarihi: 20.12.2020.
- Qadir, M.I., Perveen, A., Abbas, K., Ali, M. 2016. Analgesic, antiinflammatory and anti-pyretic activities of *Thymus linearis*. *Pak J Pharm Sci*, 29(2); 591-4.

- Raimondi, S., Sera, F., Gandini, S., Iodice, S., Caini, S., Maisonneuve, P., Fargnoli, M. 2008. MC1R variants, melanoma and red hair color phenotype: A meta-analysis. *International Journal of Cancer*, 122(12); 2753-2760.
- Raisova, M., Bektas, M., Wieder, T., Daniel, P., Eberle, J., Orfanos, C.E. and Geilen, C.C. 2000. Resistance to CD95/Fas-induced and ceramide-mediated apoptosis of human melanoma cells is caused by a defective mitochondrial cytochrome c release. *FEBS letters*, 473(1); 27-32.
- Rajandram, R., Bennett, N., Wang, Z., Perry-Keene, J., Vesey, D., Johnson, D. and Gobe, G. 2012. Patient samples of renal cell carcinoma show reduced expression of TRAF1 compared with normal kidney and functional studies in vitro indicate TRAF1 promotes apoptosis: potential for targeted therapy. *Pathology*, 44(5); 453-459.
- Ramadan, M.A., Shawkey, A.E., Rabeh, M.A. and Abdellatif, A.O. 2019. Expression of P53, BAX, and BCL-2 in human malignant melanoma and squamous cell carcinoma cells after tea tree oil treatment in vitro. *Cytotechnology*, 71(1); 461-473.
- Ramirez, M. and Salvesen, G.S. 2018. A primer on caspase mechanisms. *Seminars in cell & developmental biology*, 82, 79-85.
- Ramsay, H., Fryer, A., Reece, S., Smith, A., Harden, P. 2000. Clinical risk factors associated with nonmelanoma skin cancer in renal transplant recipients. *American Journal of Kidney Diseases*, 36(1); 167-176.
- Ranković, B. 2019. *Lichen Secondary Metabolites: Bioactive Properties and Pharmaceutical Potential*. Springer; 2nd edición, 260, Switzerland.
- Reynolds, J.E., Yang, T., Qian, L., Jenkinson, J.D., Zhou, P., Eastman, A. and Craig, R.W. 1994. Mcl-1, a member of the Bcl-2 family, delays apoptosis induced by c-Myc overexpression in Chinese hamster ovary cells. *Cancer research*, 54(24); 6348-6352.
- Rhodes, A., Weinstock M. A., Fitzpatrick T.B. Mihm Jr M.C., Sober A.J. 1987. Risk factors for cutaneous melanoma. A practical method of recognizing predisposed individuals. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 258(21); 3146-3154.
- Rigel, D., Rivers, J., Friedman, R., Kopf, A. 1988. Risk gradient for malignant melanoma in individuals with dysplastic naevi. *The Lancet*, 331(8581); 352-353.

- Riley, T., Sontag, E., Chen, P. and Levine, A. 2008. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(5); 402-412.
- Rodriguez, D., Rojas-Rivera, D. and Hetz, C. 2011. Integrating stress signals at the endoplasmic reticulum: The BCL-2 protein family rheostat. *Biochimica et biophysica acta*, 1813(4); 564-574.
- Rong, Y. and Distelhorst, C.W. 2008. Bcl-2 protein family members: versatile regulators of calcium signaling in cell survival and apoptosis. *Annual review of physiology*, 70, 73-91.
- Rubio-Moscardo, F., Blesa, D., Mestre, C., Siebert, R., Balasas, T., Benito, A., Rosenwald, A., Climent, J., Martinez, J.I., Schilhabel, M., Karran, E.L., Gesk, S., Esteller, M., deLeeuw, R., Staudt, L.M., Fernandez-Luna, J.L., Pinkel, D., Dyer, M.J., and Martinez-Climent, J.A. 2005. Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in B-cell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes. *Blood*, 106(9); 3214-3222.
- Rundel P.W. 1978. The ecological role of secondary lichen substances. *Biochem. Syst. Ecol*, 6, 157-170.
- Russell, J.H., Ley, T.J. 2002. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol*, 20, 323-70.
- Sabbagh, L., Srokowski, C.C., Pulle, G., Snell, L.M., Sedgmen, B.J., Liu, Y., Tsitsikov, E.N. and Watts, T.H. 2006. A critical role for TNF receptor-associated factor 1 and Bim down-regulation in CD8 memory T cell survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(49); 18703-18708.
- Saelens, X., Festjens, N., Vande Walle, L., van Gurp, M., van Loo, G. and Vandenabeele, P. 2004. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*, 23(16); 2861-2874.
- Sakahira, H., Enari, M., Nagata, S. 1998. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*, 391, 96-9.
- Samina, A., Bashir Ahmad, C., Javaria, S., Khurram, A., Bilal, A. and Muhammad Imran, Q. 2016. ANTIBACTERIAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF METHANOLIC EXTRACT OF ZALEYA PENTANDRA. *Acta poloniae pharmaceutica*, 73(1); 147-151.

- Scaffidi, C., Kirchhoff, S., Krammer, P.H., Peter, M.E. 1999. Apoptosis signaling in lymphocytes. *Curr Opin Immunol*, 11, 277-285.
- Scaffidi, C., Schmitz, I., Krammer, P.H., Peter, M.E. 1999. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 274, 1541-8.
- Schadendorf, D., van Akkooi, A., Berking, C., Griewank, K. G., Gutzmer, R., Hauschild, A., Stang, A., Roesch, A. and Ugurel, S. 2018. Melanoma. *Lancet*, 392(10151); 971-984.
- Schimmer, A.D. 2004. Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res*, 64, 7183-90.
- Schön, M. and Schön, M. P. 2007. The antitumoral mode of action of imiquimod and other imidazoquinolines. *Current medicinal chemistry*, 14(6); 681-687.
- Selzer, E., Schlagbauer-Wadl, H., Okamoto, I., Pehamberger, H., Pötter, R. and Jansen, B. 1998. Expression of Bcl-2 family members in human melanocytes, in melanoma metastases and in melanoma cell lines. *Melanoma research*, 8(3); 197-203.
- Semple, J.I., Smits, V.A., Feraud, J.R., Mamely, I. and Freire, R. 2007. Cleavage and degradation of Claspin during apoptosis by caspases and the proteasome. *Cell death and differentiation*, 14(8); 1433-1442.
- Sergentanis, T.N., Antoniadis, A.G., Gogas, H.J., Antonopoulos, C.N., Adami, H.O., Ekblom, A., Petridou, E.T. 2013. Obesity and risk of malignant melanoma: a meta-analysis of cohort and case-control studies. *European journal of cancer* (Oxford, England : 1990), 49(3); 642-657.
- Shakeri, R., Kheirollahi, A. and Davoodi, J. 2017. Apaf-1: Regulation and function in cell death. *Biochimie*, 135, 111-125.
- Shrestha, G., Thompson, A., Robison, R. and St Clair, L.L. 2016. *Letharia vulpina*, a vulpinic acid containing lichen, targets cell membrane and cell division processes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Pharmaceutical biology*, 54(3); 413-418.
- Sinclair, S.M., Bhattacharyya, J., McDaniel, J.R., Gooden, D.M., Gopalaswamy, R., Chilkoti, A. and Setton, L.A. 2013. A genetically engineered thermally responsive sustained release curcumin depot to treat neuroinflammation. *Journal*

of controlled release : official journal of the Controlled Release Society, 171(1); 38-47.

- Singh N., Bose K. 2015. Apoptosis: Pathways, Molecules and Beyond. In: Bose K. (eds) *Proteases in Apoptosis: Pathways, Protocols and Translational Advances*. Springer, XV, 245 p, Cham.
- Slee, E.A., Adrain, C., Martin, S.J. 2001. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem*, 276, 7320-6.
- Soengas, M.S., Capodieci, P., Polsky, D., Mora, J., Esteller, M., Opitz-Araya, X., McCombie, R., Herman, J. G., Gerald, W. L., Lazebnik, Y. A., Cordon-Cardó, C., and Lowe, S. W. 2001. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature*, 409(6817); 207-211.
- Solhaug, K.A., Lind, M., Nybakken, L. and Gauslaa, Y. 2009. Possible functional roles of cortical depsides and medullary depsidones in the foliose lichen *Hypogymnia physodes*. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 204(1); 40-48.
- Starczynowski, D.T., Lockwood, W.W., Deléhouzée, S., Chari, R., Wegrzyn, J., Fuller, M., Tsao, M.S., Lam, S., Gazdar, A.F., Lam, W.L., and Karsan, A. 2011. TRAF6 is an amplified oncogene bridging the RAS and NF- κ B pathways in human lung cancer. *The Journal of clinical investigation*, 121(10); 4095-4105.
- Stocker-Wörgötter, E., Elix, J.A. 2002. Secondary chemistry of cultured mycobionts: formation of a complete chemosyndrome by the lichen fungus of *Lobaria spathulata*. *Lichenologist*. 34, 351-359.
- Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P. and Nagata, S. 1993. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell*, 75(6); 1169-1178.
- Suliman, A., Lam, A., Datta, R., Srivastava, R.K. 2001. Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways. *Oncogene*, 20, 2122-33.
- Sun, H., Li, X., Fan, L., Wu, G., Li, M. and Fang, J. 2014. TRAF6 is upregulated in colon cancer and promotes proliferation of colon cancer cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 53, 195-201.

- Sun, H., Li, X.B., Meng, Y., Fan, L., Li, M. and Fang, J. 2013. TRAF6 upregulates expression of HIF-1 α and promotes tumor angiogenesis. *Cancer research*, 73(15); 4950-4959.
- Susin, S. A., Daugas, E., Ravagnan, L., Samejima, K., Zamzami, N., Loeffler, M., Costantini, P., Ferri, K.F., Irinopoulou, T., Prévost, M.C., Brothers, G., Mak, T.W., Penninger, J., Earnshaw, W.C. and Kroemer, G. 2000. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *The Journal of experimental medicine*, 192(4); 571-580.
- Swerdlow, A., English, J., Qiao, Z. 1995. The risk of melanoma in patients with congenital nevi: A cohort study. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 32(4); 595-599.
- Szegezdi, E., Macdonald, D.C., Ni Chonghaile, T., Gupta, S. and Samali, A. 2009. Bcl-2 family on guard at the ER. *American journal of physiology. Cell physiology*, 296(5); C941-C953.
- The Global Cancer Observatory. 2020. Web Sitesi: <https://gco.iarc.fr/>. Erişim tarihi 10.11.20.
- Thomas, W.D., Zhang, X.D., Franco, A.V., Nguyen, T. and Hersey, P. 2000. TNF-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis of melanoma is associated with changes in mitochondrial membrane potential and perinuclear clustering of mitochondria. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 165(10); 5612-5620.
- Trapani, J.A., Smyth, M.J. 2002. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol*, 2, 735-47.
- Tsai, S., Balch, C., Lange, J. 2010. Epidemiology and treatment of melanoma in elderly patients. *Nature reviews. Clinical oncology*, 7(3); 148-152.
- Tucker, M.A., Boice, J.D., Jr. and Hoffman, D.A. 1985. Second cancer following cutaneous melanoma and cancers of the brain, thyroid, connective tissue, bone, and eye in Connecticut, 1935-82. *National Cancer Institute monograph*, 68, 161-189.
- Ulusal Kanser Enstitüsü. 2005. Web Sitesi: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Layers_of_the_skin.jpg . Erişim tarihi: 21.10.2020.

- Urrea, H., Dufey, E., Lisbona, F., Rojas-Rivera, D. and Hetz, C. 2013. When ER stress reaches a dead end. *Biochimica et biophysica acta*, 1833(12); 3507-3517.
- Valverde, P., Healy, E., Jackson I, Rees, J.L., Thody, A.J. 1995. Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nat Genet*, 11(3); 328-30.
- van Loo, G., van Gurp, M., Depuydt, B., Srinivasula, S. M., Rodriguez, I., Alnemri, E. S., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Declercq, W. and Vandenabeele, P. 2002. The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell death and differentiation*, 9(1); 20-26.
- van Zeijl, M., van den Eertwegh, A., Haanen, J., Wouters, M. 2017. (Neo) adjuvant systemic therapy for melanoma. *Eur J Surg Oncol*, 43(3); 534-543.
- Varol, M., Türk, A., Candan, M., Tay, T. and Koparal, A.T. 2016. Photoprotective Activity of Vulpinic and Gyrophoric Acids Toward Ultraviolet B-Induced Damage in Human Keratinocytes. *Phytotherapy research : PTR*, 30(1); 9-15.
- Vervliet, T., Parys, J.B. and Bultynck, G. 2016. Bcl-2 proteins and calcium signaling: complexity beneath the surface. *Oncogene*, 35(39); 5079-5092.
- Wajant, H. 2002. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science*, 296, 1635-6.
- Wall, N.R., O'Connor, D.S., Plescia, J., Pommier, Y., Altieri, D.C. 2003. Suppression of survivin phosphorylation on Thr34 by flavopiridol enhances tumor cell apoptosis. *Cancer research*, 63(1); 230-235.
- Wang, Z., Fukuda, S. and Pelus, L.M. 2004. Survivin regulates the p53 tumor suppressor gene family. *Oncogene*, 23(49); 8146-8153.
- Wan-Kee-Cheung, N. 2001. The Voices Of Albinism. Masters thesis. Concordia University.
- Watkins, J. 2013. Skin rashes, part 1: Skin structure and taking a dermatological history. *Practice Nursing*, 24(1); 30-33.
- Watson, J.L. 2018. Your Guide to Cancer Prevention. Oncology Nursing Society, 210.

- Whiteman, D.C., Watt, P., Purdie, D.M., Hughes, M.C., Hayward, N.K., Green, A.C. 2003. Melanocytic nevi, solar keratoses, and divergent pathways to cutaneous melanoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 95(11); 806-812.
- Wong, R.S. 2011. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res*, 30, 87.
- Wu, J., Xu, J., Eksioglu, E.A., Chen, X., Zhou, J., Fortenbery, N., Wei, S. and Dong, J. 2013. Icariside II induces apoptosis of melanoma cells through the downregulation of survival pathways. *Nutrition and cancer*, 65(1); 110-117.
- Wu, X., Deng, Y. 2002. Bax and bh3-domain-only proteins in p53- mediated apoptosis. *Front Biosci*; 7, D151-156.
- Yamada, H., Tada-Oikawa, S., Uchida, A. and Kawanishi, S. 1999. TRAIL causes cleavage of bid by caspase-8 and loss of mitochondrial membrane potential resulting in apoptosis in BJAB cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 265(1); 130-133.
- Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L.H., Thompson, C.B., Korsmeyer, S.J. 1995. Bad, a heterodimeric partner for BclXL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell*, 80, 285-91.
- Yee, K.S. and Vousden, K.H. 2005. Complicating the complexity of p53. *Carcinogenesis*, 26(8); 1317-1322.
- Yi, S.A., Nam, K.H., Kim, S., So, H.M., Ryoo, R., Han, J.W., Kim, K.H. and Lee, J. 2019. Vulpinic Acid Controls Stem Cell Fate toward Osteogenesis and Adipogenesis. *Genes*, 11(1); 18.
- Yin, X.M., Oltvai, Z.N., Korsmeyer, S.J. 1994. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature*, 369, 321-323.
- Yokoyama, S., Woods, S., Boyle, G., Aoude, L., MacGregor, S., Zismann, V., Gartside, M., Cust, A., Haq, R., Harland, M., Taylor, J., Duffy, D., Holohan, K., Dutton-Regester, K., Palmer, J., Bonazzi, V., Stark, M., Symmons, J., Law, M., Schmidt, C., Lanagan, C., O'Connor, L., Holland, E., Schmid, H., Maskiell, J., Jetann, J., Ferguson, M., Jenkins, M., Kefferd, R., Giles, G., Armstrong, B., Aitken, J., Hopper, J., Whiteman, D., Pharoah, P., Easton, D., Dunning, A., Newton-Bishop, J., Montgomery, G., Martin, N., Mann, G., Bishop, D., Tsao, H., Trent, J., Fisher, D., Hayward, N., Brown, K. 2011. A novel recurrent

mutation in MITF predisposes to familial and sporadic melanoma. *Nature*, 480(7375); 99-103.

Youle, R.J., Strasser, A. 2008. The BCL-2 family proteins: opposite activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 47-59.

Yu, S., Zhang, W., Yang, J., Zhao, W., Liu, M., Zhao, D., Bai, X., and Wang, S. 2020. Herbal formula Renshenwuweizi decoction induces p53-mediated cell cycle arrest and apoptosis in A549 cells. *Journal of traditional Chinese medicine = Chung i tsa chih ying wen pan*, 40(5); 766-773.

Zaffaroni, N. and Daidone, M.G. 2002. Survivin expression and resistance to anticancer treatments: perspectives for new therapeutic interventions. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 5(2); 65-72.

Zaidi, M.R., Davis, S., Noonan, F.P., Graff-Cherry, C., Hawley, T.S., Walker, R.L., Feigenbaum, L., Fuchs, E., Lyakh, L., Young, H.A., Hornyak, T.J., Arnheiter, H., Trinchieri, G., Meltzer, P.S., De Fabo, E.C., and Merlino, G. 2011. Interferon- γ links ultraviolet radiation to melanomagenesis in mice. *Nature*, 469(7331); 548-553.

Zanella, J.M., Haddock S.M. 2007. Methods of treating joint pain in a subject by using an anti-angiogenic agent: US 20070293428.

Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., Korsmeyer, S.J. 1996. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell*, 87, 619-28.

Zhang, X., Fang, P., Zhao, Z., Ding, X., Xie, F., Wang, Y. and Li, C. 2018. Antitumorigenic effect of damnacanthol on melanoma cell viability through p53 and NF- κ B/caspase-3 signaling pathways. *Oncology letters*, 16(5); 6039-6044.

Zhang, X.D., Nguyen, T., Thomas, W.D., Sanders, J.E. and Hersey, P. 2000. Mechanisms of resistance of normal cells to TRAIL induced apoptosis vary between different cell types. *FEBS letters*, 482(3); 193-199.

Zuo, L., Weger, J., Yang, Q., Goldstein, A., Tucker, M., Walker, G., Hayward, N., Dracopoli, N. 1996. Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nature Genetics*, 12(1); 97-99.

EK 1

Vulpinik asitin A-375 hücre hattı ve melanosit hücre hattında apoptoz yolağına ait transkript ifade düzeyinin analizi Human Apoptosis Primer Library kullanılarak qRT-PCR cihazı ile değerlendirilmiştir. Bu kütüphanedeki genlerin 96 kuyulu Apoptoz Panelindeki yer listesi ekte verilmiştir.

EK 1 Apoptoz Kütüphanesindeki Genlerin Yer ve İsim Listesi

Kuyu	Gen Sembolü	Gen Adı
A1	<i>APAF1</i>	Apoptotik proteaz aktivasyon faktörü
A2	<i>ATM</i>	Mutasyona uğramış Ataksi telanjiyektazi
A3	<i>BAG1</i>	BCL2 ile ilişkili atanojen
A4	<i>BAG3</i>	BCL2 ile ilişkili atanojen 3
A5	<i>BAG4</i>	BCL2 ile ilişkili atanojen 4
A6	<i>BAK1</i>	BCL2-antagonist / öldürücü 1
A7	<i>BAX</i>	BCL2 ile ilişkili X proteini
A8	<i>BCL10</i>	B hücreli lenfoma / lösemi 10
A9	<i>BCL2</i>	B hücreli lenfoma / lösemi 2
A10	<i>BCL2A1</i>	BCL2- ilgili protein A1

EK 1 Apoptoz Kütüphanesindeki Genlerin Yer ve İsim Listesi (devam)

Kuyu	Gen Sembolü	Gen Adı
A11	<i>BCL2L1</i>	BCL2-benzeri 1
A12	<i>BCL2L11</i>	BCL2-benzeri 11 (apoptoz kolaylaştırıcı)
B1	<i>BCL2L2</i>	BCL2-benzeri 2
B2	<i>BFAR</i>	Çift fonksiyonlu apoptoz düzenleyici
B3	<i>BIK</i>	BCL2 ile etkileşen öldürücü (apoptosis teşvik edici)
B4	<i>BIRC1</i>	Baculoviral IAP tekrar içeren 1
B5	<i>BIRC2</i>	Baculoviral IAP tekrar içeren 2
B6	<i>BIRC3</i>	Baculoviral IAP tekrar içeren 3
B7	<i>BIRC4</i>	Baculoviral IAP tekrar içeren 4
B8	<i>BIRC5</i>	Baculoviral IAP tekrar içeren 5 (survivin)
B9	<i>BIRC6</i>	Baculoviral IAP tekrar içeren 6 (apollon)
B10	<i>BNIP3</i>	BCL2 / adenovirus E1B 19kDa etkileşen protein 3
B11	<i>BRE</i>	Beyin ve üreme organı eksprese edilen
B12	<i>BOK</i>	BCL2 ile ilişkili yumurtalık öldürücü

EK 1 Apoptoz Kütüphanesindeki Genlerin Yer ve İsim Listesi (devam)

Kuyu	Gen Sembolü	Gen Adı
C1	<i>CASP1</i>	Kaspaz 1, apoptozla ilgili sistein proteaz
C2	<i>CASP10</i>	Kaspaz 10, apoptozla ilgili sistein proteaz
C3	<i>CASP4</i>	Kaspaz 4, apoptozla ilgili sistein proteaz
C4	<i>CASP2</i>	Kaspaz 2, apoptozla ilgili sistein proteaz
C5	<i>CASP3</i>	Kaspaz 3, apoptozla ilgili sistein proteaz
C6	<i>CASP5</i>	Kaspaz 5, apoptozla ilgili sistein proteaz
C7	<i>CASP6</i>	Kaspaz 6, apoptozla ilgili sistein proteaz
C8	<i>CASP7</i>	Kaspaz 7, apoptozla ilgili sistein proteaz
C9	<i>CASP8</i>	Kaspaz 8, apoptozla ilgili sistein proteaz
C10	<i>CASP8AP2</i>	CASP8 ilişkili protein 2
C11	<i>CFLAR</i>	CASP8 ve FADD benzeri apoptoz düzenleyici
C12	<i>CHEK1</i>	CHK1 kontrol noktası homologu (S. pombe)
D1	<i>CHEK2</i>	CHK2 kontrol noktası homologu (S. pombe)
D2	<i>CIDEA</i>	Hücre ölümüne neden olan DFFA benzeri efektör a

EK 1 Apoptoz Kütüphanesindeki Genlerin Yer ve İsim Listesi (devam)

Kuyu	Gen Sembolü	Gen Adı
D3	<i>CIDEB</i>	Hücre ölümüne neden olan DFFA benzeri efektör b
D4	<i>CRADD</i>	CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor
D5	<i>DAPK1</i>	Ölümle ilişkili protein kinaz 1
D6	<i>DAPK2</i>	Ölümle ilişkili protein kinaz 2
D7	<i>DFFA</i>	DNA fragmentasyon faktörü, 45kDa, alfa polipeptit
D8	<i>DFFB</i>	DNA fragmentasyon faktörü, 40kDa, beta polipeptit
D9	<i>FADD</i>	Fas (TNFRSF6) ile ilişkili ölüm alanına sahip protein
D10	<i>GADD45A</i>	Büyümenin durdurulması ve DNA hasarına bağlı protein GADD45 alfa
D11	<i>HRK</i>	Harakiri, BCL2 etkileşimli protein
D12	<i>LTBR</i>	Lenfotoksin beta reseptörü (TNFR süper ailesi, üye 3)
E1	<i>MCL1</i>	Miyeloid hücre lösemi sekansı 1 (BCL2 ile ilgili)
E2	<i>MYD88</i>	Miyeloid farklılaşma birincil yanıtı 88
E3	<i>CARD4</i>	Kaspaz alım alan ailesi, üye 4
E4	<i>FAS</i>	Fas (TNF reseptör süper ailesi, üye 6)

EK 1 Apoptoz Kütüphanesindeki Genlerin Yer ve İsim Listesi (devam)

Kuyu	Gen Sembolü	Gen Adı
E5	<i>RIPK2</i>	Reseptörle etkileşen serin-treonin kinaz 2
E6	<i>RPA3</i>	Replikasyon proteini A3, 14kDa
E7	<i>TANK</i>	RAF ailesi üyesi ile ilişkili NF-kappa-B aktivatörü
E8	<i>TNF</i>	Tümör nekroz faktörü (TNF süper ailesi, 2)
E9	<i>TNFRSF10A</i>	Tümör nekroz faktörü reseptörü süper ailesi, üye 10a
E10	<i>TNFRSF10B</i>	Tümör nekroz faktörü reseptörü süper ailesi, üye 10b
E11	<i>TNFRSF10C</i>	Tümör nekroz faktörü reseptörü süper ailesi, üye 10c
E12	<i>TNFRSF10D</i>	Tümör nekroz faktörü reseptörü süper ailesi, üye 10d
F1	<i>TNFRSF11B</i>	Tümör nekroz faktörü reseptörü süper ailesi, üye 11b
F2	<i>TNFRSF17</i>	Tümör nekroz faktörü reseptörü süper ailesi, üye 17
F3	<i>TNFRSF1A</i>	Tümör nekroz faktörü reseptörü süper ailesi, üye 1A
F4	<i>TNFRSF21</i>	Tümör nekroz faktörü reseptörü süper ailesi, üye 21
F5	<i>CD40</i>	CD40 antijen (Tümör nekroz faktörü reseptörü süper ailesi 5)
F6	<i>TNFRSF8</i>	Tümör nekroz faktörü reseptörü süper ailesi, üye 8

EK 1 Apoptoz Kütüphanesindeki Genlerin Yer ve İsim Listesi (devam)

Kuyu	Gen Sembolü	Gen Adı
F7	<i>TNFRSF9</i>	Tümör nekroz faktörü reseptörü süper ailesi, üye 9
F8	<i>TNFSF10</i>	Tümör nekroz faktörü (ligand) süper ailesi, üye 10
F9	<i>TNFSF11</i>	Tümör nekroz faktörü (ligand) süper ailesi, üye 11
F10	<i>TNFSF13</i>	Tümör nekroz faktörü (ligand) süper ailesi, üye 12
F11	<i>TNFSF13B</i>	Tümör nekroz faktörü (ligand) süper ailesi, üye 13b
F12	<i>TNFSF15</i>	Tümör nekroz faktörü (ligand) süper ailesi, üye 15
G1	<i>TNFSF18</i>	Tümör nekroz faktörü (ligand) süper ailesi, üye 18
G2	<i>TNFSF4</i>	Tümör nekroz faktörü (ligand) süper ailesi, üye 4
G3	<i>CD40LG</i>	CD40 ligand (TNF süper ailesi, üye 5)
G4	<i>FASLG</i>	Fas ligand (TNF süper ailesi, üye 6)
G5	<i>TNFSF7</i>	Tümör nekroz faktörü (ligand) süper ailesi, üye 7
G6	<i>TNFSF8</i>	Tümör nekroz faktörü (ligand) süper ailesi, üye 8
G7	<i>TNFSF9</i>	Tümör nekroz faktörü (ligand) süper ailesi, üye 9
G8	<i>TP53</i>	Tümör proteini p53

EK 1 Apoptoz Kütüphanesindeki Genlerin Yer ve İsim Listesi (devam)

Kuyu	Gen Sembolü	Gen Adı
G9	<i>TP73L</i>	Tümör proteini p73 benzeri
G10	<i>TRAF1</i>	TNF reseptörü ile ilişkili faktör 1
G11	<i>TRAF2</i>	TNF reseptörü ile ilişkili faktör 2
G12	<i>TRAF3</i>	TNF reseptörü ile ilişkili faktör 3
H1	<i>TRAF4</i>	TNF reseptörü ile ilişkili faktör 4
H2	<i>TRAF5</i>	TNF reseptörü ile ilişkili faktör 5
H3	<i>TRAF6</i>	TNF reseptörü ile ilişkili faktör 6
H4	<i>TRIP</i>	TRAF ile etkileşen protein
H5	<i>ACTB</i>	Aktin, beta
H6	<i>B2M</i>	Beta-2-microglobulin
H7	<i>GAPDH</i>	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz
H8	<i>GUSB</i>	Glukuronidaz, beta
H9	<i>HPRT1</i>	Hipoksantin fosforibozil transferaz 1
H10	<i>PGK</i>	Fosfoglisarat kinaz 1

EK 1 Apoptoz Kütüphanesindeki Genlerin Yer ve İsim Listesi (devam)

Kuyu	Gen Sembolü	Gen Adı
H11	<i>PPIA</i>	Peptidil prolil izomeraz A
H12	<i>RPL13A</i>	Ribozomal protein L13a

