

Özgün Araştırma /Original Article

İnsan Kolon Kanser Hücre Hattında (HT29) Sisplatin'in Apoptotik Etkisi

The Apoptotic Effects of Cisplatin on Human Colon Cancer Cell Line (HT29)

Venhar GÜRBÜZ, Akın YILMAZ, Özlem GÖKÇE, Ece KONAÇ

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Tıp Fakültesi, Gazi Üniversitesi, Ankara, Turkey

ÖZET

Amaç: Çalışmamızda, sisplatinin 72 saatlik farklı dozlarda insan kolon kanseri olan HT29 hücre hattındaki etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem: 5-200 µM'lık dozlar arasında sisplatin eklenen hücreler 72 saat süresince kültüre edilmiştir. EtBr-AO boyama tekniği apoptozun değerlendirilmesinde kullanılmıştır. BCL2L1, CASP3 ve CASP8 genlerinin mRNA ifade düzeyleri RTPCR yöntemi ile değerlendirilmiştir.

Bulgular: Sisplatinin 72 saatte doza bağlı sitotoksik etki gösterdiği ve uygun apoptotik dozunun yine bu saat için 50µM olduğu tespit edilmiştir. Araştırılan üç genin mRNA düzeylerinin, 5µM sisplatin uygulandığında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdiği belirlenmiştir ($p<0.05$). 50µM sisplatin uygulamasının ise BCL2L1 mRNA düzeyinde kontrole göre değişiklik oluşturmadığı ($p>0.05$), ancak aynı doz ve sürede CASP3 mRNA düzeyinin 2.2 kat, CASP8 mRNA düzeyinin 3.0 kat arttığı bulunmuştur ($p<0.05$).

Sonuç: Çalışmamızda insan kolon kanser hücrelerinde sisplatinin 72'inci saatte ve 50µM dozda en etkin değerde apoptozu uyardığı, sinyal iletim yollarından kaspaz kaskadını kullandığı ve antiapoptotik yolağı baskıladığı görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, HT29, Hücre kültürü, Kolon kanseri, Sisplatin

ABSTRACT

Objective: In this study, we aimed to investigate the apoptotic and cytotoxic effects of different doses of cisplatin administered to colon cancer cells (HT29) for 72 h.

Materials and Methods: Cells were treated with different (5-200µM) cisplatin concentrations for 72 hours. Apoptosis was determined using the EtBr- AO staining technique. The mRNA expression levels of BCL2L1, CASP3 and CASP8 were analyzed using the RT-PCR method.

Results: Cisplatin had a cytotoxic effect in a dose dependent manner for a 72 h incubation period and the optimum apoptotic dose was found to be 50µM. We found a statistically significant increase in the mRNA levels of all three genes after the 5µM cisplatin treatment compared to control cells ($p<0.05$). 50µM cisplatin treatment did not lead to a significant difference in BCL2L1 mRNA levels ($p>0.05$) when compared to the control cells. However, CASP3 and CASP8 mRNA levels rose 2.2 and 3.0 fold respectively ($p<0.05$) after treatment with the same dose and for the same period.

Conclusion: Our results showed that cisplatin effectively induced apoptosis via the caspase cascade signal pathway when it was administered to human colon cancer cells at 50µM for 72 h, and it suppressed the antiapoptotic pathway.

Keywords: Apoptosis, HT29, Cell culture, Colon cancer, Cisplatin

Başvuru tarihi / Submitted: 17.12.2010 **Kabul tarihi / Accepted:** 23.02.2011

İletişim Bilgileri: Dr. Ece Konaç, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Tıp Fakültesi, Gazi Üniversitesi, Beşevler, Ankara, Türkiye. e-mail: ecemercanoglu@yahoo.com, ecem@gazi.edu.tr

GİRİŞ

Kolon kanseri, gastrointestinal sistemin en sık rastlanan kanserlerindedir. Erkek ve kadınlarda görülen kanserlerin yaklaşık %10'unu kolorektal kanser oluşturmaktadır¹. Bu kansere genomik mutasyonlar² olduğu kadar mitokondriyel mutasyonlar da sebep olmaktadır³. Kemoterapi, kolon kanseri için çok önemli ve temel tedavi yöntemidir⁴. Sisplatin, birçok kanser türünde kullanılan en etkili kemoterapötik ilaçtır⁵. Sisplatin, neoplastik hastalıkların tedavisinde kullanılmakta ve etkisi DNA ile olan etkileşimine bağlıdır⁶. Sisplatin, en iyi bilinen DNA hasar ajanıdır ve sitotoksik aktivitesini göstermesinde DNA-platin etkileşimi ilk adımı oluşturur⁷. Aktif sisplatinin sitotoksik formu DNA zincirinde çapraz bağlar oluşturarak DNA sentezini baskılayıp bazı sinyal yollarının aktivasyonunu sağlayarak apoptozu uyandır⁸. Sisplatin, sitotoksik etkisini DNA'nın bütün bazlarına, özellikle guanin ve adeninin 7'inci pozisyonundaki azot atomuna bağlanarak gösterir⁹. Mitokondriyal DNA, RNA ve diğer hücrenel bileşenler, platin yapısı için güçlü reaktanlar içerirler¹⁰. Sisplatinin etkileri çeşitli şekillerde incelenmiştir. Buna göre bazı kanser hücre hatlarında yapılan çalışmalarda, sisplatinin ve platin bazlı diğer ajanların hücre döngüsünün G1/S ile G2/M geçişini engellediği gösterilmiştir¹¹⁻¹³. Benzer bir çalışmada Volland ve ark. oksaliplatin ve sisplatinin etkisini gen ifadesi düzeyinde çalışmışlardır. Bu çalışmada, insan kolon kanser hücre hattında (HCT-116), oksaliplatin ve sisplatinin esas olarak platin bazlı ajanlar olmasına rağmen, farklı genlerin ifadesinde değişikliğe neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca oksaliplatin'in G2'den M'ye geçişi kuvvetli bir şekilde engellediği bulunmuştur. Buna karşın sisplatinin ise G2'den M'ye geçişi ve S fazındaki hücreleri azalttığı bildirilmiştir¹⁴. Siddik ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada ise sisplatinin bağlı apoptozun, sisplatinin DNA ile olan etkileşimine bağlı olduğu gösterilmiştir⁸.

Çalışmamızda, 72 saat süre ile farklı dozlarda uygulanan sisplatinin insan kolon kanseri hücre hattı olan HT29 hücrelerindeki olası etkilerinin hücre morfolojisi ve mRNA ifade düzeyi açısından araştırılması hedeflenmiştir.

YÖNTEM

Hücre kültürü: HT29 insan kolon kanser hücreleri %10 fetal dana serumu (FCS), 200 mM L-glutamin, 100U/ml penisilin, 200 µg/ml streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) besiyerinde %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş ortamda 37°C'de kültüre edildi. Üç günde bir kültür besiyeri tazelenildi.

Apoptozun belirlenmesi: Canlı, apoptotik ve nekrotik hücrelerin oranları, Akridin Oranj (AO)/

Etidyum Bromür (EtBr) boyaması sonrasında floresan mikroskopunda (Olympus BX-50, Japonya) hücrelerin sayılması ile belirlendi. 5-200µM arasında değişen sisplatin konsantrasyonları ile muamele edilen hücreler 72 saat kültüre edildikten sonra AO/EtBr ile boyandı. Stok AO ve EtBr boyaları son konsantrasyonu 100µg/ml olacak şekilde fosfat tamponunda (PBS) hazırlandı. Hücre kültür süresinin dolması ile hücreler 3'er µl AO ve EtBr ile boyanarak floresan mikroskopunda sayılarak değerlendirildi. AO canlı hücrelerin çekirdeklerinin yeşil renkte görünmesini sağlarken, EtBr ise nekrotik hücrelerin çekirdeklerini kırmızı renkte görünmesine neden olur. Apoptotik hücreler ise karakteristik parçalanmış nükleus görünümü ile turuncu renkte gözlenir.

RNA izolasyonu ve cDNA sentezi: HT29 hücrelerine 5 ve 50µM'lık dozlarda sisplatin uygulandı ve 72 saat kültüre edildi. Hücrelerden RNA izolasyonu, "High Pure RNA Isolation Kit" (Roche, Almanya) kullanılarak, üreticinin öngördüğü protokole göre yapıldı. Elde edilen RNA'lar spektrofotometrede (NanoDrop ND-1000, NanoDrop Technologies, ABD) 260 nm dalga boyunda ölçülerek µl'deki µg değerleri belirlendi. Primer olarak random heksamerler kullanılarak Transcriptor First Strand cDNA Sentez Kiti (Roche, Almanya) ile 1µg total RNA'dan üretici firmanın protokolü takip edilerek cDNA sentezi yapıldı.

Kantitatif (niceleyici) Real-Time PCR analizi: Elde edilen cDNA örneklerinden, hücre çoğalması ile apoptotik yollarda görevli olan BCL2L1, kaspaz 3 (CASP3) ve kaspaz 8 (CASP8) genlerinin mRNA ifade düzeyleri, niceleyici Real-Time PCR yöntemi ile Light Cycler 480 (Roche Diagnostik, Almanya) cihazı kullanılarak araştırıldı. Araştırılan genlerin cDNA'larına özgül olan primer dizileri ve Universal Probe Library (UPL) prob numaraları Tablo I'de verilmiştir. Amplifikasyonlar 20 µL toplam tepkime hacmi içerisinde; cDNA, mRNA'ya özgü primerler, UPL probu, LightCycler TaqMan Master karışımı (Roche, Almanya) ve distile su kullanılarak gerçekleştirildi. BCL2L1, CASP3 ve CASP8 gen ifade miktarlarını normalize etmek için housekeeping gen olan GAPDH mRNA ifade düzeyi referans olarak alındı. Her bir konsantrasyon için deney üç kez tekrarlandı.

İstatistiksel analiz: Hücre canlılığı, apoptoz ve nekrotik oranlardaki değişimler "tek yönlü Anova" testiyle SPSS 15.0 istatistik programı kullanılarak değerlendirildi. Doza ve zamana bağlı olarak değişen, BCL2L1, CASP3 ve CASP8 mRNA ifade düzeylerindeki farklılıklar "REST (2009 V2.0.13)" istatistik programı ile karşılaştırıldı¹⁵. 0.05'den küçük olan p değerleri istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi.

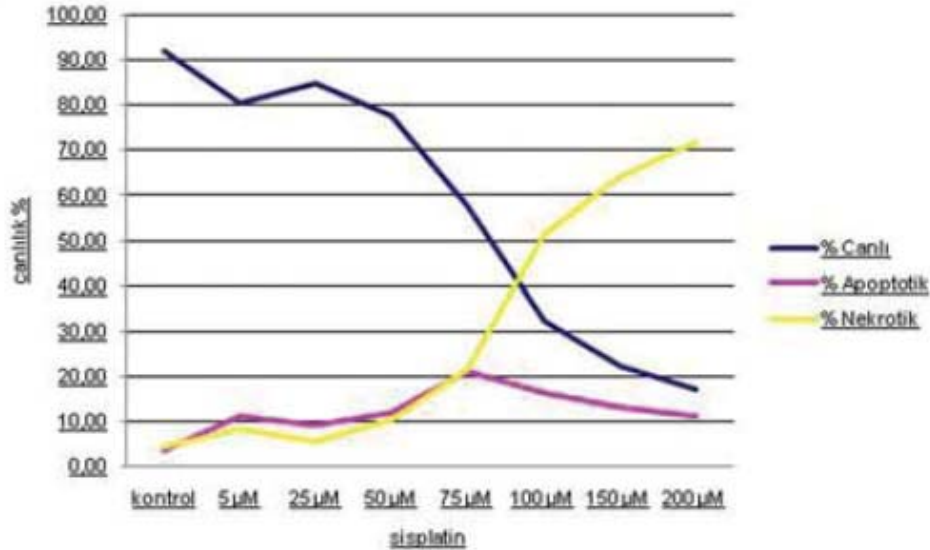
Tablo I : Real-Time PCR'da kullanılan primerler ve UPL problemleri

Gen	Forward Primer	Reverse Primer	UPL Prob No.
BCL2L1	5'-TTGGACAATGGACTGGTTGA-3'	5'-GTAGAGTGGATGGTCAGTG-3'	28
CASP3	5'-TGG AATTGATGCGTGATGTT-3'	5'-TGGCTCAGAAGCACACAAAC-3'	68
CASP8	5'- TCCAAATGCCAACTGGATGA-3'	5'- TCCCAGGATGACCCTCTTCT-3'	62
GAPDH	5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'	5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'	60

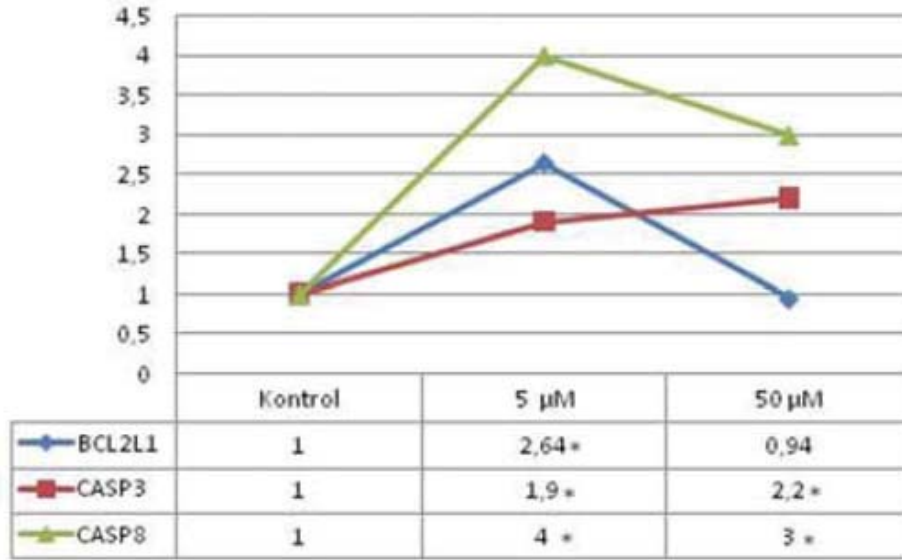
BULGULAR

72 saat süreyle sisplatin ile kültüre edilmiş HT29 hücrelerine ait canlılık, apoptoz ve nekroz oranlarına ilişkin bulgular Şekil 1'de verilmiştir. Buna göre HT29 hücrelerine 72 saat süre ile sisplatin uygulandığında 75µM konsantrasyonda hücrelerin yarısını öldürmek için gerekli olan doza karşılık gelen IC50 dozuna erişildiği belirlendi. Bu dozda gözlenen apoptotik hücrelerin oranı yaklaşık %21 olarak bulundu. 75µM'ın üzerindeki sisplatin konsantrasyonlarının ise HT29 hücrelerinde apoptotik etkiden ziyade nekrotik etki gösterdiği ve bu dozlarda nekrotik hücrelerin oranının %50'nin üzerine çıktığı belirlendi. Ayrıca yüksek dozlarda (>75µM) ise apoptotik hücrelerin oranında bir azalma olduğu dikkat çekmektedir (Şekil 1). HT29 hücrelerinin IC50 değerinin altındaki dozlarda

sisplatin (5µM ve 50µM) cevap olarak antiapoptotik (BCL2L1) ve apoptotik (CASP3 ve CASP8) genlerin mRNA ifade düzeylerindeki değişiklikleri aynı süreli inkübasyon sonrasında araştırdığımızda elde edilen bulgular Şekil 2'de verilmiştir. Buna göre 5µM sisplatin uygulanan hücrelerde ilaç uygulaması yapılmayan kontrol hücrelerine oranla BCL2L1 mRNA'sının 2.64 kat, CASP3 mRNA'sının 1.9 kat ve CASP8 mRNA'sının ise 4.0 kat arttığı bulundu (p<0.05). Sisplatinin 50µM dozda uygulandığı hücrelerde ise kontrol hücrelerine oranla BCL2L1 mRNA ifade düzeyinde istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık gözlenmezken, CASP3 mRNA'sının 2.2 kat ve CASP8 mRNA'sının ise 3.0 kat artmış olduğu bulundu (p<0.05).



Şekil 1 : 72 saat süresince sisplatin uygulanmış olan HT29 hücrelerinde gözlenen canlı, apoptotik ve nekrotik hücrelerin yüzdesel oranları.



Şekil 2 : BCL2L1, CASP3 ve CASP8 mRNA ifadenme düzeyleri.
*, p<0.05 değerini göstermektedir.

TARTIŞMA

DNA hasarının büyük ölçüde platinin sitotoksik özelliklerinden kaynaklandığı yaygın olarak kabul edilen bir fikirdir. Malign hastalıkların tedavisinde, sisplatin ve benzeri platin bazlı kemoterapötik bileşikler düzenli olarak kullanılmaya başlanmıştır⁶. Platin içeren bu bileşikler genel olarak akciğer, testis, over, serviks ile baş ve boyun kanserlerinin tedavisinde kullanılmaktadır¹⁶.

Yapılan bir çalışmada HT29 hücrelerine 12µg/ml (=4µM) dozda sisplatin uygulandığında 3 günün sonunda hücre canlılığının %75'in üzerinde olduğu belirlenmiştir¹⁷. Çalışmamızda, benzer şekilde 5µM sisplatin uygulaması sonrasında HT29 hücrelerinin canlılığının %75'in üzerinde olduğunu belirledik (Şekil 1). Suzuki ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada, kolorektal kanser hücre hattı olan DLD1 hücrelerine sisplatin uygulandığında IC50 değerinin 78.4µM olduğu bildirilmiştir¹⁸. Bu veri çalışmamızda sisplatin uygulanan HT29 hücreleri için bulduğumuz IC50 değeri olan 75µM ile benzerlik göstermektedir (Şekil 1). Bu durum kolon kanser hücre hatlarının ve dolaylı olarak kanserli dokuların, belli bir konsantrasyonun üzerindeki sisplatin'e karşı dirençli olabileceğini düşündürmektedir.

BCL2 ailesi üyelerinin ifadesinin kontrolündeki düzensizlikler kanser gelişiminde sıklıkla görülmektedir¹⁹. Çeşitli kanserlerde radyasyona ve sisplatin ile taksanlar gibi anti-tümör ajanlarına karşı gözlenen direnç, anti-apoptotik özellikte olan BCL2 ve BCL2L1 (BCL-XL) proteinlerinin ifadesi ile ilişkilidir²⁰⁻²⁶. Yapılan bir çalışmada yumurtalık kanseri hücre hattında 5µM ve 20µM sisplatin uygulandığında gözlenen direnç

BCL-XL ifadesinde azalmanın olmaması ile ilişkilendirilmiştir²⁷. Çalışmamızda, HT29 hücrelerine düşük dozda (5µM) sisplatin uygulandığında hücrelerde apoptotik oranın 50µM'a göre daha düşük olduğunu ve bu durum olası nedenlerinden birisi, 5µM dozda ilaç uygulanmayan hücrelere (kontrol) oranla, BCL2L1 mRNA'sının ifade düzeyinde azalmanın olmamasıdır. Buna karşın etkin apoptotik doz olan 50µM'da ise, BCL2L1 mRNA düzeyinde artışın olmamasının bu dozda görülen yüksek apoptotik cevaba neden olmuş olabileceğidir. CASP8'in de, radyasyon ve kemoterapötik ajanlar ile uyarılan apoptozda önemli rol oynayabileceği bildirilmiştir^{28,29}. Yapılan bir çalışmada, sisplatin'e maruz bırakılan insan testis kanseri hücre hatlarında (833K ve GCT27) CASP8 geninin mRNA miktarında artış olduğu belirlenmiştir³⁰. Çalışmamızda, sisplatin uygulanan HT29 hücrelerindeki CASP8 geninin ifade edilme düzeyine baktığımızda, 5µM sisplatin uygulanmasının genin mRNA miktarını, 50µM sisplatin uygulanmasına oranla daha fazla artırdığını belirledik (Şekil 2). 5µM dozda CASP3'ün mRNA ifade edilme düzeyini 50µM'daki ifade edilme düzeyine göre daha az bulmuş olmamız, proapoptotik yolağın başlangıcında olduğu bilinen CASP8'in efektör kaspazlardan olan CASP3'ü yeterince aktive edememesi olabileceğini düşündürmüştür. Aynı zamanda, 5µM dozda BCL2L1 mRNA ifade edilme düzeyinin artması, anti-apoptotik sinyalin daha baskın olması nedeni ile düşük oranda apoptoza neden olabileceğini de akla getirmiştir. Diğer taraftan, 50µM sisplatin uygulandığında CASP3 ve CASP8 mRNA düzeyindeki artışa eşlik eden BCL2L1 mRNA

düzeyindeki azalışın daha yüksek oranda apoptoza neden olmuştur.

Çalışmamızda, insan kolon kanser hücresi HT29'da sisplatinin 72'inci saat ve 50µM dozda apoptozu uyardığını, bu dozun üzerine çıkıldığında ise sisplatinin hücreleri nekroza götürdüğünü ve toksik etki oluşturduğunu belirledik. Ayrıca, apoptotik genler olan CASP3 ve CASP8'in artmış mRNA ifade edilme düzeyleri, kolon kanseri hücrelerinin sisplatinuyarılı apoptoza giderken kaspaz kaskadını kullandığını göstermiştir. Sonuç olarak, sisplatin direncine neden olan BCL2L1 tarafından aktifleştirilen anti-apoptotik yolağın yeni geliştirilecek olan ajanlar ile baskılanmasında ve kolon kanseri tedavisinde gözlenen sisplatin direncinin aşılarda daha verimli tedavi seçeneklerin kliniğe sunulmasında bu tarz pre-klinik moleküler düzeyde yapılan araştırmaların yararlı olabileceği inancındayız.

KAYNAKLAR

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009; 59: 225-49. doi: 10.3322/caac.20006
2. Ekmekçi A, Konaç E, Önen EI. Gen polimorfizmi ve kansere yakınlık. *Marmara Med J* 2008; 21: 282-95.
3. Aral C, Özer A. Mitochondrial DNA and cancer. *Marmara Med J* 2007; 20: 127-36.
4. Segal NH, Saltz LB. Evolving treatment of advanced colon cancer. *Annu Rev Med* 2009; 60: 207-19. doi: 10.1146/annurev.med.60.041807.132435
5. Lee CK, Park KK, Lim SS, Park JH, Chung WY. Effects of the licorice extract against tumor growth and cisplatin-induced toxicity in a mouse xenograft model of colon cancer. *Biol Pharm Bull* 2007; 30: 2191-5. doi: 10.1248/bpb.30.2191
6. Stubbert LJ, Smith JM, McKay BC. Decreased transcription-coupled nucleotide excision repair capacity is associated with increased p53- and MLH1- independent apoptosis in response to cisplatin. *BMC Cancer* 2010;10:207-10. doi: 10.1186/1471-2407-10-207
7. Ho YP, Au-Yeung SC, To KK. Platinum-based anticancer agents: innovative design strategies and biological perspectives. *Med Res Rev* 2003;23:633-55. doi: 10.1002/med.10038
8. Siddik Z H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 2003;22:7265-79. doi: 10.1038/sj.onc.1206933
9. Ho YP, Au-Yeung SC, To KK. Platinum-based anticancer agents: innovative design strategies and biological perspectives. *Med Res Rev* 2003;23:633-55. doi: 10.1002/med.10038
10. Bose RN. Biomolecular targets for platinum antitumor drugs. *Mini Rev Med Chem* 2002;2:103-11.
11. Salles B, Butour JL, Lesca C, Macquet JP. Cis-Pt(NH3)2Cl2 and trans- Pt(NH3)2Cl2 inhibit DNA synthesis in cultured L1210 leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1983;112:555-63. doi:10.1016/0006-291X(83)91500-0
12. Ormerod MG, Orr RM, Peacock JH. The role of apoptosis in cell killing by cisplatin: a flow cytometric study. *Br J Cancer* 1994;69:93-100.
13. Nguyen HN, Sevin BU, Averette HE, et al. Cell cycle perturbations of platinum derivatives on two ovarian cancer cell lines. *Cancer Invest* 1993;11:264-75.
14. Voland C, Bord A, Péleraux A, et al. Repression of cell cycle-related proteins by oxaliplatin but not cisplatin in human colon cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2006;5: 2149-57. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-05-0212
15. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in realtime PCR. *Nucleic Acids Res* 2002;30:e36.
16. Rabik CA, Dolan ME. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev* 2007;33:9-23. doi: 10.1016/j.ctrv.2006.09.006
17. Fernández de Mattos S, Villalonga P, Clardy J, Lam EW. FOXO3a mediates the cytotoxic effects of cisplatin in colon cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2008;7:3237-46. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0398
18. Suzuki K, Kokuryo T, Senga T, Yokoyama Y, Nagino M, Hamaguchi M. Novel combination treatment for colorectal cancer using Nek2 siRNA and cisplatin. *Cancer Sci* 2010;101(5):1163-9. doi: 10.1111/j.1349-7006.2010.01504.x
19. Kirkin V, Joos S, Zörnig M. The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1644 (2-3): 229-49. doi: 10.1016/j.bbamcr.2003.08.009
20. Minn AJ, Rudin CM, Boise LH, Thompson CB. Expression of bcl-xL can confer a multidrug resistance phenotype. *Blood* 1995;86:1903-10.
21. Dole MG, Jasty R, Cooper MJ, Thompson CB, Nuñez G, Castle VP. Bcl-xL is expressed in neuroblastoma cells and modulates chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 1995;55:2576-82.
22. Simonian PL, Grillot DA, Nuñez G. Bcl-2 and Bcl-XL can differentially block chemotherapy-induced cell death. *Blood* 1997;90:1208-16.
23. Lebedeva I, Rando R, Ojwang J, Cossum P, Stein CA. Bcl-xL in prostate cancer cells: effects of overexpression and down-regulation on chemosensitivity. *Cancer Res* 2000; 60:6052-60.
24. Luo D, Cheng SC, Xie H, Xie Y. Effects of Bcl-2 and Bcl-XL protein levels on chemoresistance of hepatoblastoma HepG2 cell line. *Biochem Cell Biol* 2000;78: 119-26.

25. Kyprianou N, King ED, Bradbury D, Rhee JG. bcl-2 over-expression delays radiation-induced apoptosis without affecting the clonogenic survival of human prostate cancer cells. *Int J Cancer* 1997;70:341-8. doi: 10.1002/(SICI)1097-0215(19970127)70:3<341::AID-IJC16> 3.0.CO;2-I
26. Konopleva M, Zhao S, Hu W, et. al. The anti-apoptotic genes Bcl-X(L) and Bcl-2 are over-expressed and contribute to chemoresistance of non-proliferating leukaemic CD34+ cells. *Br J Haematol* 2002;118:521- 34.
27. Villedieu M, Louis MH, Dutoit S, et. al. Absence of BclxL down-regulation in response to cisplatin is associated with chemoresistance in ovarian carcinoma cells. *Gynecol Oncol* 2007;105:31-44. doi: 10.1016/j.ygyno.2006.12.011.
28. Fulda S, Sieverts H, Friesen C, Herr I, Debatin KM. The CD95 (APO-1/Fas) system mediates drug-induced apoptosis in neuroblastoma cells. *Cancer Res* 1997;57: 3823-9.
29. Rehemtulla A, Hamilton CA, Chinnaiyan AM, Dixit VM. Ultraviolet radiation-induced apoptosis is mediated by activation of CD-95 (Fas/APO-1). *J Biol Chem* 1997;272:25783-6. doi: 10.1074/jbc.272.41.25783.
30. Duale N, Lindeman B, Komada M, et. al. Molecular portrait of cisplatin induced response in human testis cancer cell lines based on gene expression profiles. *Mol Cancer* 2007;6:53. doi: 10.1186/1476-4598-6-53.