

PINAR BAŞI

DOKTORA TEZİ

2025-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI

**K562 HÜCRE HATTININ TRAIL DİRENÇLİLİĞİNDE
TRAIL-R2 TİROZİN FOSFORİLASYONUNUN
ROLÜNÜN İNCELENMESİ**

Pınar BAŞI

DOKTORA TEZİ

2025-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI

**K562 HÜCRE HATTININ TRAIL DİRENÇLİLİĞİNDE
TRAIL-R2 TİROZİN FOSFORİLASYONUNUN
ROLÜNÜN İNCELENMESİ**

Pınar BAHŞİ

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Sezin YAKUT UZUNER

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2023-6299 proje numarası ile ve TÜBİTAK tarafından 223Z013 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2025-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Tıbbi Genetik Programında doktora tezi olarak kabul edilmiştir. 27/07/2025

İmza

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Sezin YAKUT UZUNER
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Ozan Salim
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Nilgün GÜRBÜZ
Süleyman Demirel Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Duygu SAĞ
Dokuz Eylül Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Fatma Zehra HAPİL ZEVLİLER
Akdeniz Üniversitesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Öğrencinin
Adı SOYADI
İmza

Tez Danışmanı
Ad SOYAD
İmza

TEŞEKKÜR

Ne demişler, hiçbir şey için geç değil yeter ki başla... İşte tam da başlamak istediğim anda elimden tutan, bilgisi ve tecrübesini zerre esirgemeyip desteğini hep hissettiğim; bocaladığımda, düştüğümde elimden tutup birlikte yürümemizi sağlayan, hayattaki duruşu ve enerjisine hep hayran kaldığım, beni kendi öğrencisi gibi görüp yetiştiren canım hocam, ablam, arkadaşım, süt annem Dr. Öğr. Üyesi Fatma Zehra HAPİL ZEVLİLİLER' e ne kadar teşekkür etsem az. Kendisine bir ömür boyu minnettar kalacağıma, her koşulda yanında olacağıma söz veriyorum.

Bu süreçte en büyük teşekkürümden biri de yüksek lisansa başladığım andan itibaren yanımda olup, bilgisini tecrübesini benden esirgemeyen, her zaman isteklerimi can-ı gönülden dinleyip hep destek olan, bugünlere gelmem için gerekli bütün kapıları açmama izin veren, yanımda olan biricik danışman hocam Doç. Dr. Sezin YAKUT UZUNER' e sonsuz teşekkür ediyorum. İyi ki varsınız ve hayatıma dokundunuz.

Tez dönemim boyunca birlikte öğrenip ilerlediğim, elinden gelenin fazlasını yapan ve deneylerimde desteğini hiç esirgemeyen, duygusal çöküşlerimde hep yanımda olan canım arkadaşım, yoldaşım Şeyma Nur POLAT' a; aramıza sonradan katılsa da ekibimizin hemen parçası olan ve desteğini benden esirgemeyen, yardımına koşan Düriye Nur DAĞDELEN' e ve tüm anabilim dalımız asistanlarına;

Tez deneylerimi yürütebilmem için laboratuvarlarının kapılarını sonuna kadar açan hocam Prof. Dr. Nuray ERİN' e ve ekibine, özellikle her anımda yanımda olup iyi niyetini kalbimde hissettiğim canım arkadaşım Arş. Gör. Dr. Esra TAVŞAN' a;

Her canım sıkıldığında, endişelendiğimde varlığı ve eylemleri ile beni kendime getiren, gece gündüz hep yanımda olan dostlarım Şükran DEVECİ ÖZEN, Cansu TEZGEL ve Zeynep Ahsen KILLI' ya;

Hayatımın her alanında maddi manevi bana emek veren, eğitim hayatımı ve beni her zaman destekleyen, hep yanımda olan, ayaklarımın üzerinde güçlü durabilmeyi öğreten, sevgilerini her koşulda dile getiren ve benimle gurur duyan, benim de gurur duyduğum babam AHMET BAHŞİ, annem AYTEN BAHŞİ ve kız kardeşim MERVE BAHŞİ KARAHAN 'a tüm sevgi ve saygılarımla sonsuz teşekkür ederim.

ÖZET

Amaç: Ölüm reseptörleri, immün sistemin malignant hücreleri elimine etmede kullandığı en önemli silahlardan biridir. TRAIL, reseptörleri aracılığıyla çeşitli insan kanser hücre hatlarında etkin olarak apoptozu tetiklemektedir. Ancak bazı tümör hücrelerinin TRAIL dirençli olması, bazılarının uzun süreli maruz kalım sonucunda TRAIL'e dirençlilik geliştirebilmesi hücrelerin apoptozdan kaçmasına sebep olmaktadır. İnsan KML hücre hattı olan K562 hücreleri, normalde TRAIL dirençli iken, uzun süreli imatinib muamelesi sonucunda TRAIL'e duyarlılık kazanmaktadır. Dolayısıyla TRAIL-R2 dirençliliğinde TRAIL-R2'nin, henüz bilinmeyen bir kinaz tarafından tirozin fosforilasyonu, proliferatif yolların aktivasyonunda rol oynayabilir. Biz, K562 hücre hattında TRAIL-R2 tirozin fosforilasyonunu, bu fosforilasyonu sağlayan tirozin kinazı ve TRAIL-R2 fosforilasyonunun TRAIL duyarlılığındaki etkilerini açığa çıkarmayı amaçladık.

Yöntem: K562 ve HeLa hücre hattındaki TRAIL-R2 tirozin fosforilasyonu ile bu fosforilasyonda rol oynayabilecek kinazların inhibitörleriyle muamele sonrasındaki lizatlarda TRAIL-R2 ve Py20 immünopresipitasyonu sonrasında western blot yöntemi ile, bu inhibitörlerin, sodyum ortavanadatın ve tirozin fosforilasyonunu taklit eden ve önleyen mutantların TRAIL duyarlılığına etkileri ise Resazurin testi ile belirlendi.

Bulgular: K562 hücre hatlarında TRAIL-R2 tirozin fosforilasyonu TRAIL muamelesi ile sabit kalmaktadır. TRAIL-R2, c-Src, JAK2 ve Abl ile aynı protein kompleksinde bulunmakta; TRAIL-R2 tirozin fosforilasyonunun Abl kinazına doğrudan bağımlı olmayıp, bu modifikasyonun ağırlıklı olarak JAK2 ve c-Src ailesi tarafından düzenlenmektedir. Imatinib, Dasatinib, Jak inhibitörleri ve PP1 fosforilasyonda belirgin bir azalma sağlarken, Imatinib dirençli hücrelerde Abl aktivitesi oldukça az olup tirozin fosforilasyonu korunmuştur. Ayrıca, Na_3VO_4 'ün TRAIL ve Imatinib ile birlikte kullanımı, yabancı tip hücrelerde hücre ölümünü anlamlı düzeyde artırırken; TRAIL-R2 nakavt hücrelerde bu etki gözlenmemiştir.

Sonuç: K562 hücre hattında TRAIL-R2 tirozin fosforilasyonu sürekli olup, Abl'dan ziyade Src ve JAK2 kinazlar tarafından regüle edilmektedir. Na_3VO_4 'ün K562 hücrelerinde toksik etki göstermesinde, TRAIL-R2 ve Abl tirozin kinazı içeren bir mekanizmanın rol oynadığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: TRAIL-R2, tirozin fosforilasyonu, K562 TRAIL dirençliliği.

ABSTRACT

Objective: Death receptors are the key mediators used by immune system to eliminate malignant cells. TRAIL, effectively induces apoptosis in various human cancer cells through its receptors. However, TRAIL-resistance in some tumor cells, or development of resistance following prolonged exposure, allow cells to evade apoptosis. K562 cells are normally TRAIL-resistant, but can acquire TRAIL-sensitivity following prolonged treatment with imatinib. Therefore, tyrosine phosphorylation of TRAIL-R2, potentially mediated by an as-yet unidentified kinase, may contribute to the activation of proliferative pathways and TRAIL-resistance. In this study, we aimed to investigate the tyrosine phosphorylation of TRAIL-R2 in K562 cells, to identify the tyrosine kinase responsible, and to evaluate the impact of this phosphorylation on TRAIL sensitivity.

Method: TRAIL-R2 tyrosine phosphorylation in K562 and HeLa, and potential associated kinases were assessed through immunoprecipitation using TRAIL-R2 and PY20 antibodies, followed by western blotting. The effects of sodium orthovanadate, inhibitors and TRAIL-R2 mutants mimicking or blocking tyrosine phosphorylation, on TRAIL sensitivity were evaluated via Resazurin assay.

Results: TRAIL-R2 tyrosine phosphorylation in K562 cells remained constant upon TRAIL treatment. TRAIL-R2 is found to be part of complexes with c-Src, JAK2, and Abl. However, tyrosine phosphorylation appears to be largely regulated by JAK2 and Src family kinases, rather than directly by Abl. Treatment with imatinib, dasatinib, JAK inhibitors, and PP1 resulted in significant decreased phosphorylation. In contrast, Abl activity was found to be low in imatinib-resistant cells, yet tyrosine phosphorylation of TRAIL-R2 was preserved. Moreover, co-treatment with Na_3VO_4 and TRAIL or imatinib significantly enhanced cell death in wild-type cells, while no such effect was observed in TRAIL-R2 knockout cells.

Conclusion: In K562 cells, TRAIL-R2 tyrosine phosphorylation is constitutive, predominantly regulated by Src and JAK2 kinases rather than Abl. The cytotoxic effect of Na_3VO_4 in K562 cells appears to involve mechanism dependent on TRAIL-R2 and Abl tyrosine kinase activity.

Key words: TRAIL-R2, tyrosine phosphorylation, TRAIL resistance in K562 cells.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. TRAIL	2
2.1.1. TRAIL Lokalizasyonu, Formları ve Yapısı	2
2.2. TRAIL Reseptörleri, Yapısı ve Genel Fonksiyonları	3
2.3. TRAIL Reseptör Sinyal Yolakları	5
2.3.1. Apoptoz ve Nekroptoz Sinyal Yolaklarının Başlatılması	5
2.3.2. Hücre Sağkalım Yolaklarının Başlatılması	10
2.4. TRAIL Dirençliliği	13
2.5. Kronik Miyeloid Lösemi (KML)	15
2.5.1. KML’ de TRAIL Direnci	16
3. GEREÇ ve YÖNTEM	20
3.1. Malzemeler ve Solüsyonlar	20
3.2. Hücre Kültürü	23
3.3. İmatinib Dirençli-K562 (IR-K562), BCR/Abl Geninin Susturulduğu (Nakavt, Ko) K562 (BCR/Abl Ko-K562) ve DR5 Geninin Susturulduğu K562 (DR5 Ko-K562) Hücre Hatlarının Elde Edilmesi	24
3.3.1. IR-K562 Hücre Hattının Oluşturulması	24
3.3.2. Puromisin Öldürme Dozunun Belirlenmesi	24
3.3.3. BCR/Abl Geninin Susturulduğu (Nakavt) K562 (BCR/Abl Ko-K562) Hücre Hattının Elde Edilmesi	24
3.3.4. TRAIL-R2 (DR5) Geninin Susturulduğu K562 ve Hela Hücre Hatlarının Elde Edilmesi	27

3.4. K562 ve Hela Hücrelerinin TRAIL ile Muamelesi	27
3.5. Western Blot İçin Hücresel Lizatların Hazırlanması	27
3.6. Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi (Bradford)	28
3.7. Western Blot (WB)	28
3.7.1. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)	
İçin Jelin Hazırlanması	28
3.7.2. Örneklerin Hazırlanması ve Jelde Yürütülmesi	29
3.7.3. Örneklerin PVDF Membrana Transferi	29
3.7.4. PVDF Membranın İşaretlenmesi	29
3.8. Mild Strip Off İşlemi	30
3.9. İmmünopresipitasyon (IP)	30
3.9.1. DR5-IP Optimizasyonu	30
3.9.2. Py20-IP Optimizasyonu	31
3.10. K562 ve Hela Hücre Hattında TRAIL-R2 Y383D ve Y383F Mutantını	
Kodlayan Lentiviral Vektörlerin Üretilmesi	32
3.11. TRAIL-R2 Nakavt K562 (K562-DR5 Ko) ve Hela Hücre Hattının	
Lentivirus Transdüksiyonu	33
3.12. Eşit Kopya Sayısına Sahip Mutant Hücrelerin Q-PZR ile Belirlenmesi	33
3.13. Eşit Kopya Sayısına Sahip Mutant Hücrelerde mRNA Ekspresyon	
Seviyelerinin Belirlenmesi	34
3.14. İnhibitör Muamelesi ve Resazurin Testi	34
3.15. Grafikler ve İstatistiksel Analizler	35
4. BULGULAR	36
4.1. TRAIL-R2 Tirozin Fosforilasyonunun TRAIL dirençli K562 ve HeLa	
Hücre hatlarında incelenmesi	36
4.1.1. TRAIL-R2 İmmünopresipitasyonunun Optimizasyonu	36
4.1.2. Tirozin Fosforile Proteinlerin İmmünopresipitasyon Koşullarının	
Optimize Edilmesi	38
4.1.3. K562 Hücre Hattında TRAIL-R2 Tirozin Fosforilasyonunun	
Gösterilmesi	39
4.1.4. Hela Hücre Hattında TRAIL-R2 Tirozin Fosforilasyonunun	
Gösterilmesi	41
4.2. BCR/Abl Nakavt K562 Hücre Hattının Elde Edilmesi	43

4.2.1. BCR/Abl Genine Yönelik gRNA Tasarımı ve Etkinliğinin Tespiti	43
4.2.2. BCR/Abl'ı Hedefleyen gRNA'nın Cas9 Plazmidine Klonlanması	44
4.3. Imatinib Dirençli K562 Hücre Hattında TRAIL-R2 Tirozin Fosforilasyon Seviyesinin İncelenmesi	45
4.4. TRAIL-R2'ye Bağlanan Tirozin Kinazların Belirlenmesi	47
4.4.1. K562 Hücre Hattında TRAIL-R2'ye Bağlanan Tirozin Kinazların Belirlenmesi	47
4.4.2. HeLa Hücre Hattında TRAIL-R2'ye Bağlanan Tirozin Kinazların Belirlenmesi	49
4.5. Tirozin Kinaz İnhibitörlerinin TRAIL-R2 Tirozin Fosforilasyonuna Etkilerinin Belirlenmesi	51
4.5.1. K562 Hücre Hattında Tirozin Kinaz İnhibitörlerinin TRAIL-R2 Tirozin Fosforilasyon Seviyesine ve TRAIL-R2 Ekspresyon Seviyesine Etkilerinin Western Blot ile Belirlenmesi	51
4.5.2. K562 Hücre Hattında Tirozin Kinaz İnhibitörlerinin TRAIL-R2 Tirozin Fosforilasyon Seviyesine Etkilerinin İmmunopresipitasyonla Belirlenmesi	53
4.5.3. HeLa Hücre Hattında Tirozin Kinaz İnhibitörlerinin TRAIL-R2 Tirozin Fosforilasyon Seviyesine Etkilerinin İmmunopresipitasyonla Belirlenmesi	54
4.6. TRAIL-R2 Tirozin Fosforilasyonunu Engelleyen ve Taklit Eden Mutantları Eksprese Eden K562 ve HeLa Hücre Hatlarının Elde Edilmesi	56
4.6.1. TRAIL-R2 Nakavt K562 ve HeLa Hücre Hatlarının Elde Edilmesi	56
4.6.2. TRAIL-R2 Tirozin Fosforilasyonunu Taklit Eden ve Engelleyen Mutantlarının Oluşturulması ve Doğrulanması	57
4.6.3. TRAIL-R2 Nakavt HeLa ve K562 Hücre Hatlarının TRAIL-R2 Mutantlarını Eksprese Eden Lentiviral Vektörler ile Transdüksiyonu ve Seçilimi	60
4.7. TRAIL-R2 Tirozin Fosforilasyonunun Fonksiyonel Etkilerinin İncelenmesi	64
4.7.1. Tirozin Kinaz İnhibitörlerinin TRAIL Duyarlılığına Etkilerinin Belirlenmesi	64

4.7.2. Tirozin Fosfatazların İnhibisyonunun TRAIL Duyarlılığına Etkilerinin Belirlenmesi	66
4.7.3. TRAIL-R2 Tirozin Fosforilasyonunu Engelleyen ve Taklit Eden Mutasyonların TRAIL-R2 Protein Seviyesine Etkilerinin Belirlenmesi	68
4.7.4. TRAIL-R2 Tirozin Fosforilasyonunu Engelleyen ve Taklit Eden Mutasyonların Hücre Proliferasyonuna Etkilerinin Belirlenmesi	69
5. TARTIŞMA	71
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	77
KAYNAKLAR	80
ÖZGEÇMİŞ	90

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1.	SDS poliakrilamid jel hazırlama ölçüsü.	28
Tablo 4.1.	Dr5-IP optimizasyon koşulları.	37
Tablo 4.2.	Py20-IP optimizasyon koşulları.	38
Tablo 4.3.	Seçilmiş olan kolonilerdeki TRAIL-R2 ve Albumin CT değerleri.	63



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1: TRAIL homo-trimer yapısı	3
Şekil 2.2: Tip 1 transmembran protein olan DR5' in yapısı.	5
Şekil 2.3: TRAIL sinyal yollarından apoptoz ve nekroptozun şematik gösterimi	6
Şekil 2.4: TRAIL'in ekstrinsik yollarından nekroptozun şematik gösterimi	7
Şekil 2.5: İntersik ve ekstrinsik yolların şematize edilmesi	9
Şekil 2.6: TRAIL aracılı hücre sağkalım yolları	13
Şekil 2.7: TRAIL-R1 ve TRAIL-R2'nin DD bölgelerinin aminoasit dizisi	17
Şekil 2.8: Phosphosite.org veritabanından elde edilmiş TRAIL-R1 ve TRAIL-R2 DD posttranslasyonel modifikasyon verisi.	17
Şekil 2.9: TRAIL-R2 tirozin fosforilasyon motifi türler arasında korunmuştur.	18
Şekil 4.1. DR5-IP optimizasyon koşullarına göre elde edilen immünopresipitatların western blot görüntüsü.	37
Şekil 4.2: Fosfotirozin immunopresipitasyonunun optimizasyon deney sonucu.	38
Şekil 4.3. K562 hücre hattında bazal koşullarda ve TRAIL muamelesi sonrasında TRAIL-R2 tirozin fosforilasyonu	39
Şekil 4.4. Sodyum ortovanadat ile muamele edilmiş hücrelerde TRAIL muamelesi sonucunda TRAIL-R2'nin tirozin fosforilasyonu	40
Şekil 4.5: 10 ng TRAIL ile muamele edilmiş yabancı tip HeLa hücre hattından elde edilen farklı sürelerdeki lizatlarda TRAIL-R2 tirozin fosforilasyonunun gösterilmesi.	41

Şekil 4.6. 10ng/ml TRAIL ile muamele edilen HeLa hücre hatlarından alınan lizatlarda fosfotirozin immunopresipitasyonu sonrasında TRAIL-R2 western blot işaretlemesi.	42
Şekil 4.7: Tasarlanan gRNA'nın etkinliğinin tespiti	42
Şekil 4.8: Tasarlanan gRNA'nın hedef dışı etkilerinin CRISPR RGEN TOOLS Cas-OFFinder ile tespiti	43
Şekil 4.9: BCR/Abl gRNA klonlaması sonrasında koloni PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntüsü.	43
Şekil 4.10: Pozitif bant veren koloniden elde edilen plazmidin agaroz jel ile doğrulanması.	44
Şekil 4.11: 10uM imatinibe dirençli K562 hücre hattının mikroskop görüntüsü	45
Şekil 4.12: Imatinib Dirençli K562 hücre hattında TRAIL-R2 tirozin fosforilasyon seviyesi	45
Şekil 4.13: K562 hücre hattı TRAIL-R2 immunopresipitatlarında BCR/Abl füzyon protein.	46
Şekil 4.14: K562 ve Imatinib dirençli K562 hücrelerinde TRAIL-R2 ve Abl arasındaki fiziksel etkileşimin mukayesesi	47
Şekil 4.15: K562 hücre hattında TRAIL-R2 immunopresipitatlarında c-Src işaretlemesi.	47
Şekil 4.16: K562 hücre hattında, TRAIL-R2 ve JAK2 fiziksel olarak aynı kompleksin içindedir.	48
Şekil 4.17: HeLa hücre hattında TRAIL-R2 immunopresipitasyonunda JAK2 ve c-Src western blot işaretlemeleri.	49
Şekil 4.18: HeLa hücre hattında TRAIL-R2 immunopresipitasyonunda EGFR'ın aktif formunun TRAIL-R2 kompleksindeki varlığının tespiti.	49

- Şekil 4.19:** Tirozin kinaz inhibitörlerinin K562 hücre hattında TRAIL-R2 tirozin fosforilasyonuna etkisinin belirlenmesi. 51
- Şekil 4.20:** Tirozin Kinaz inhibitörlerinin K562 hücre hattında TRAIL-R2 tirozin fosforilasyonuna etkilerinin incelenmesi 53
- Şekil 4.21:** PP1, Erlotinib ve Imatinib mesilat ile muamele edilen hücrelerde TRAIL-R2 immunopresipitasyonu sonrasında Fosfotirozin (üst blot) ve TRAIL-R2 (alt blot) işaretlemesi. 54
- Şekil 4.22:** K562 ve HeLa hücre hattında DR5 geninin nakavt (ko) edildiğinin western blot yöntemi ile doğrulanması. 56
- Şekil 4.23:** Y383F TRAIL-R2 fragmenti elde edilirken yapılan PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü. 57
- Şekil 4.24:** Y383D TRAIL-R2 fragmenti elde edilirken yapılan PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü. 57
- Şekil 4.25:** Yabancı tip TRAIL-R2, TRAIL-R2 Y383D ve Y383F mutantlarının klonlanmış olduğu plazmidlerle transforme kolonilerde elde edilen TRAIL-R2 PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü. 58
- Şekil 4.26:** Y383D mutasyonunun Sanger Sekanslama ile doğrulanması. GTA>GTC dönüşümü, karyogram üzerinde işaretlenmiştir. 58
- Şekil 4.27:** Y383F mutasyonunun Sanger sekanslama ile doğrulanması. GTA>GAA dönüşümü, karyogram üzerinde işaretlenmiştir. 59
- Şekil 4.28:** HeLa DR5KO hücre hattına Y383D, Y383F ve yabancı tip TRAIL-R2 kodlayan lentiviral vektörlerle transdüksiyonu ve seçim sonrası hücrelerin görünümü. Üstte HeLa DR5ko Y383D, ortada HeLa DR5ko Y383F ve alttaki resim ise HeLa DR5ko wt hücreleri göstermektedir. 60
- Şekil 4.29:** K562 DR5ko hücre hattında Y383D, Y383F ve WT transdükte edildikten sonra elde edilen hücrelerin görüntüsü. 62

Şekil 4.30: K562 hücre hattında tirozin kinaz inhibitörlerinin TRAIL duyarlılığına etkilerinin Resazurin testi ile araştırılması	64
Şekil 4.31: Imatinib dirençli K562 hücrelerinin TRAIL duyarlılığının incelenmesi	65
Şekil 4.32: K562 hücrelerinde fosfataz inhibisyonunun hücrelerin Imatinib ve TRAIL duyarlılığına etkilerinin incelenmesi	66
Şekil 4.33: TRAIL-R2 nakavt K562 hücrelerinde Na ₃ VO ₄ , Imatinib ve TRAIL muamelesinin hücre proliferasyonuna etkisinin incelenmesi	67
Şekil 4.34: Y383D ve Y383F mutasyonlarının TRAIL-R2 protein stabilitesine etkisinin incelenmesi	67
Şekil 4.35: K562 wt, K562 DR5ko, K562 DR5ko YD, K562 DR5ko YF ve K562 DR5ko wt hücre hatlarının TRAIL duyarlılığına etkisinin resazurin testi ile gösterilmesi.	69
Şekil 4.36: TRAIL-R2 fosforilasyonunu taklit eden ve engelleyen mutantların hücre proliferasyonuna etkisi.	70

SİMGELER ve KISALTMALAR

ABL: Abelson Murine Leukemia Virüs Geni

APAF-1: Apoptotik Proteaz-Aktive edici Faktör 1

Bcl-2: B-Hücre Lenfoma 2

BCR: Breakpoint Cluster Region

BID: BH3-Etkileşimli Domaine Sahip Bcl-2

BRUCE: BIR Tekrarları İçeren Ubikitin Konjugasyon Enzim

cFLIP: Hücresel FADD-Benzeri IL1 β Dönüştüren Enzim İnhibe Edici Protein

CRD: Sisteince Zengin Domain

DcR1: Yalancı Reseptör 1

DcR2: Yalancı Reseptör 2

DD: Ölüm Domaini

DED: Ölüm-Etkili Domaini

DIABLO: Doğrudan IAP Bağlayıcı Protein

DISC: Ölüm-İndükleyici Sinyal Kompleksi

DR4: Ölüm Domaini İçeren Reseptör 4

DR5: Ölüm Domaini İçeren Reseptör 5

FADD: Fas-İlişkili Ölüm Domaini

HSC: Hematopoetik Kök Hücre

IAP: İnhibitör Apoptoz Proteinleri

Kaspaz: Sistein-Aspartik Asitçe Zengin Proteaz

kDa: Kilodalton

KML: Kronik Miyeloid Lösemi

MAPK: Mitojen-Aktive Protein Kinaz

MLKL: Karışık Soy Kinaz Domain-Benzeri Protein

MOMP: Mitokondriyal Dış Zarın Geçirgenliği

mTRAIL: Membran-Lokelize TRAIL

NAIP: Nöronal Apoptoz İnhibitör Protein

NEMO: NF- κ B Esansiyel Modülatör

NF- κ B: Nükleer Faktör kappa B

NSCLC: Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri

OPG: Osteoprotegrin

Ph Kromozomu: Philadelphia Kromozomu

PI3K: Fosfoinositid-3 Kinaz

RIP1: Reseptör-Etkileşimli Protein 1

RIPK: Serine/Threonin Protein İle Etkileşime Giren Reseptör Kinazlar

SMAC: İkinci Mitokondriyal-İlişkili Kaspaz Aktivatörü

sTRAIL: Çözünür TRAIL

TAK1: TGF- β Aktive Kinaz-1

TKI: Tirozin Kinaz İnhibitörü

TNF: Tümör Nekroz Faktör

TRAF2: Tnf-RESEPTÖR İLİŞKİLİ PROTEİN 2

TRAIL: Tümör Nekroz Faktör-İlişkili Apoptoz İndükleyici Ligand

XIAP: X'e Bağlı Apoptoz İnhibitörü

α : Alfa

β : Beta

γ : Gamma

μ l : Mikrolitre

ml: Mililitre



1. GİRİŞ

Ölüm reseptörleri, immün sistemin malignant hücreleri yok etmede kullandığı en önemli silahlardan biridir. En iyi bilinen üç ligand ise Tümör Nekroz Faktör (TNF), Fas Ligandı (FasL) ve TNF-ilişkili apoptozis indükleyici ligand (TRAIL) dır. TRAIL'in hem intrinsik hem ekstrinsik apoptozis yolaklarını aktive edebilmesi hem de daha tümör-spesifik etki göstermesi sebebiyle, ölüm reseptörleri olan TRAIL-R1 ve TRAIL-R2' ye karşı birçok agonist antikör geliştirilmiştir. Ancak bazı tümör hücrelerinin TRAIL' e dirençli olması, bazılarının uzun süreli maruz kalıma bağlı olarak direnç geliştirmesi TRAIL ile kanser tedavisi arasında önemli bir engel oluşturmıştır. TRAIL dirençliliğinin nedenleri konusunda öne çıkan en önemli faktörlerden biri, TRAIL-R2 endositozu ve özellikle de nükleusa göçüdür. Hem TRAIL-R2 endositozunun nedenlerini anlayabilmek, hem de TRAIL duyarlılığını etkileyen faktörleri ortaya çıkartıp TRAIL ile kanser tedavisinin önünü açabilmek için öncelikle TRAIL-R2 sinyal iletimi, bilhassa da post-translasyonel modifikasyonları tam olarak anlaşılmalıdır.

İnsan kronik miyeloid lösemi hücre hattı olan K562 hücreleri, normalde TRAIL dirençli olduğu halde, uzun süre BCR-Abl tirozin kinaz inhibitörü İmatinib ile muamelesi sonrasında TRAIL' e duyarlılık kazanabilmektedir. K562 hücre hattında, TRAIL-R2'nin Y383 aminoasitinden fosforile olduğu proteomik tekniklerle gösterilmiş olup, bu konudaki veri Phosphosite veritabanında mevcuttur. TRAIL-R2'nin tirozin fosforilasyonu, SH2 bölgesi barındıran ve hücre sağkalımını indükleyen proteinler için bağlanma bölgesi oluşturabilir. Bu yolla, TRAIL sinyal iletimi apoptozis yerine hücre sağkalım yolaklarına yönlenebilir. Dolayısıyla, TRAIL-R2'nin, henüz bilinmeyen bir kinaz tarafından tirozin fosforilasyonu, proliferatif yolakların aktivasyonunda rol oynuyor olabilir. Biz, doktora tez projemizde, TRAIL-R2'nin tirozin fosforilasyonunu ıslak lab teknikleri ile doğrulamayı, TRAIL-R2'yi fosforile eden tirozin kinazı belirlemeyi ve bu tirozin kinazın inhibisyonu durumunda TRAIL duyarlılığının indüklenip indüklenmediğini açığa çıkarmayı amaçlıyoruz.

2. GENEL BİLGİLER

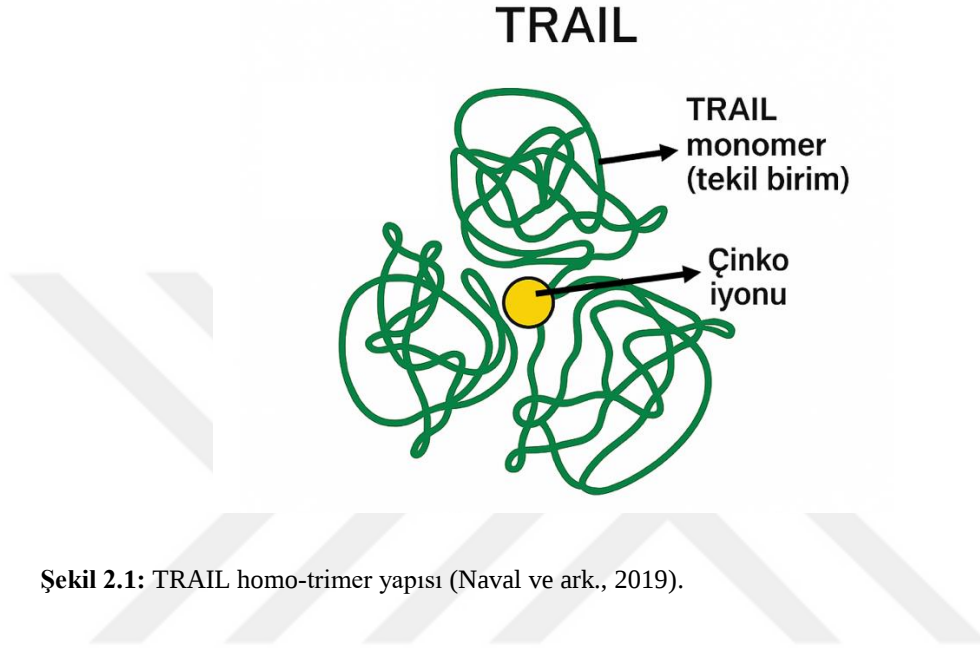
2.1. TRAIL

Tümör Nekroz Faktör (TNF) süper ailesine ait sitokinler, immün regülasyonda ve enflamatuvar yanıtların oluşmasında öncü rol oynamakta olup bir düzineden fazla protein bu aileye aittir (Cosman, 1994). Tümör Nekroz Faktör-İlişkili Apoptoz İndükleyici Ligand (TRAIL), TNF süper ailesine ait önemli bir sitokinlerden biri olup; çeşitli insan kanser hücre hatlarında etkin olarak apoptozu tetiklemektedir. İlk olarak 1995 yılında Wiley ve arkadaşları, TRAIL cDNA'sının tüm dizisini çıkarmış (Wiley ve ark., 1995), çok geçmeden aynı proteini tanımlayan Pitti ve ekibi ise bu proteine Apo-2 ligand adını vermiştir (Pitti ve ark., 1996). TNF ailesine ait diğer ligandlarla arasındaki homoloji benzerliği her ne kadar düşük olsa da, monomerik TRAIL' in kristal yapısı incelendiğinde bu ailedeki TNF ve CD40L ile çok benzediği tespit edilmiştir (Cha ve ark., 1999). TRAIL monomerleri birbirine antiparalel formda iki β -plakadan oluşmakta olup, bu plakalar bir nevi sandviç modelinde toplanmakta ve bu sayede baştan sona (head-to-tail) etkileşime girerek çan şeklinde üçlü bir yapı oluşturmaktadır. Bu da TRAIL aktivitesinin artmasına katkıda bulunur (Cha ve ark., 1999). TRAIL'in fonksiyonu incelendiğinde ise aslında TNF ailesinin diğer üyelerinde olmayan ancak TRAIL'e özgü iki büyük farklılık bulunmaktadır. Bunlardan birincisi TRAIL, sağlıklı hücrelere zarar vermezken, farklılaşan ya da transforme olan hücreleri seçerek bu hücrelerde apoptozu tetiklemektedir (Wiley ve ark., 1995). İkincisi ise TRAIL, lenfositler, dalak, timus, prostat, over (yumurtalık), ince bağırsak, kalın bağırsak ve plasenta gibi birçok farklı doku tipinde eksprese edilirken, TNF ailesinin diğer üyelerinin ekspresyonu ise sıkı bir kontrole tabidir ve genellikle bu ekspresyon geçicidir (Wiley ve ark., 1995).

2.1.1. TRAIL Lokalizasyonu, Formları ve Yapısı

TRAIL, *TNFSF10* geni tarafından kodlanan tip 2 transmembran protein olup, 3. kromozomun 3q26 bölgesinde lokalizedir (Q. Wang ve ark., 2000). 281 aminoasitten oluşan bir polipeptit zincirine sahip olup, moleküler ağırlığı 32.5 kilodalton (kDa)'dur. Glikozillenerek olgun forma dönüştüğünde ise moleküler ağırlığı 41 kDa olmaktadır (Q. Wang ve ark., 2000). TRAIL iki forma sahiptir. Membran-lokale TRAIL (membran-bound, mTRAIL) ve çözünür TRAIL (soluble, sTRAIL). mTRAIL, aminoasit zincirinin 114. Pozisyonunda potansiyel bir kırılma noktası

barındırdığından, bu noktada kırılmaya uğradığında 24 kda moleköl ağırlığında sTRAIL salınmaktadır (Pitti ve ark., 1996). TRAIL, homo-trimer yapıdadır ve reseptör bağlanma bölgesiyle etkileşime girebilen 12-16 aminoasit bir loopa sahiptir (Şekil 2.1). Bu loop TRAIL'in sitotoksik aktivitesi açısından oldukça önemli bir yapıdır. (Cha ve ark., 1999; Naval ve ark., 2019).



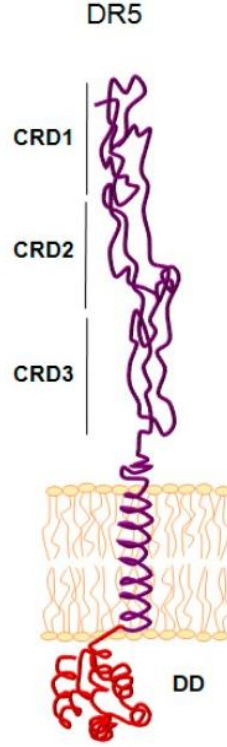
TRAIL'in bu trimerik yapısının kararlılığı, üçlü yapının merkezinde yer alan sistein aminoasitlerine çinko (Zn^{2+}) bağlanmasıyla gerçekleşir. Bu da TRAIL'in stabilitesi, çözünürlüğü ve biyolojik aktivitesi için oldukça önemlidir (Hymowitz ve ark., 2000).

2.2. TRAIL Reseptörleri, Yapısı ve Genel Fonksiyonları

1990'lı yılların ortasında TRAIL' in keşfedilmesiyle beraber TRAIL 'in bağlandığı reseptörlerle ilgili yapılan çalışmalar da artmıştır. TRAIL' in etkileşime girdiği bilinen beş reseptörü vardır. Bu reseptörlerden hangisine bağlandığı da hücrenin kaderini belirler. Bunlar; ölüm domaini içeren reseptör 4 (Death domain-containing receptor, DR4)/TRAIL-R1 (Pan, O'Rourke, ve ark., 1997), ölüm domaini içeren reseptör 5 (Death domain-containing receptor, DR5)/TRAIL-R2 (Chaudhary ve ark., 1997), yalancı reseptör 1 (Decoy receptor, DcR1)/TRAIL-R3 (Degli-Esposti, Smolak, ve ark., 1997), yalancı reseptör 2 (Decoy receptor, DcR2)/ TRAIL-R4 (Marsters ve ark., 1997) ve membran bağlı olmayan yani çözünür halde bulunan Osteoprotegrin (OPG) (Emery ve ark., 1998) reseptörüdür. Bu reseptörler arasında DR4 ve DR5 fonksiyonel sitozolik

ölüm domaini (DD) içerdiğinden TRAIL'in bağlanmasıyla apoptotik sinyal yolağını başlatabilirken (Degli-Esposti, Smolak, ve ark., 1997; Hymowitz ve ark., 1999); DcR1'in hücre içi ölüm domaini içermemesi ve DcR2' nin de işlevsel olmayan (truncated) ölüm domaini içermesinden ötürü TRAIL bu reseptörlere bağlansa bile hücre içi sinyal iletimini başlatamaz. Dolayısıyla bu iki reseptörün TRAIL-aracılı apoptozu kontrol etmesi, aslında bir nevi koruma mekanizmasıdır (Sheridan ve ark., 1997). Bu sebeple TRAIL ve geniş reseptör portföyü, güçlü tümör öldürücü etki göstermesi ve normal hücreleri koruyabilme özelliği sebebiyle oldukça ilgi görmüştür (Testa, 2010). Bu reseptörlerin dördü (DR4, DR5, DcR1 ve DcR2), 8. kromozomun q21.3 bölgesinde lokalize olan genlerden (sırasıyla TNFRSF10A (Pan, O'Rourke, ve ark., 1997), TNFRSF10B (Walczak ve ark., 1997), TNFRSF10C (Degli-Esposti, Smolak, ve ark., 1997) ve TNFRSF10D (Degli-Esposti, Dougall, ve ark., 1997) genleri) eksprese edilirken; OPG ise 8. kromozomun q24.12 bölgesindeki TNFRSF11B (Guerrache ve Micheau, 2024) geninden ifade edilir.

DR4 ve DR5'in her ikisi de, tip 1 transmembran proteinler olup, ekstraselüler yapısında sisteince zengin (cystein-riched domain, CRD) bölgelerden, tek bir transmembran domaininden ve intraselüler yapısında ölüm domaini (death domain, DD) olarak adlandırılan domaininden oluşurlar (Şekil 2.2) (Itoh ve ark., 1993; Tartaglia ve ark., 1993). Bu DD'ler, apoptotik sinyalin iletimi için gerekli olan, altı alfa heliks yapısında organize olmuş yaklaşık 80 amino asitten oluşan homotipik protein etkileşim modülleridir (Sprick ve ark., 2000).



Şekil 2.2: Tip 1 transmembran protein olan DR5' in yapısı. CRD: Sisteince zengin domain (Cysteine-rich domain), DD: Ölüm Domaini (Death domain) ifade eder (Naval ve ark., 2019).

2.3. TRAIL Reseptör Sinyal Yolakları

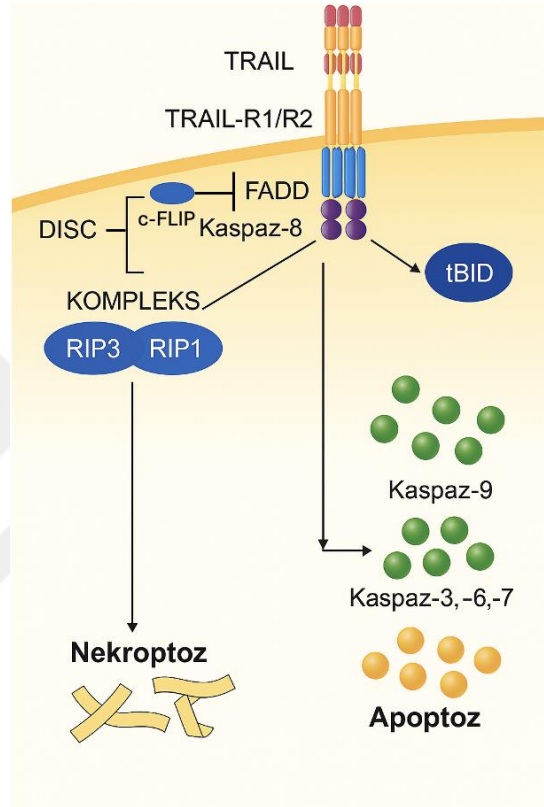
TRAIL, özellikle kanser hücrelerinde apoptozu indükleyerek selektif hücre ölümü sağlar. Bu etki, TRAIL'in DR5 gibi ölüm reseptörleriyle etkileşime girmesiyle başlatılır. DR5, hem apoptoz hem de hayatta kalma sinyallerini iletebilen çok yönlü bir reseptördür (Shlyakhtina ve ark., 2017).

2.3.1. Apoptoz ve Nekroptoz Sinyal Yolaklarının Başlatılması

- **Ekstrinsk Yolak ile Apoptoz ve Nekroptozun Başlatılması**

Trimerik yapıda olan ölüm ligandı TRAIL'in üç reseptöre bağlanmasıyla, homotrimerik bir kompleks oluşur ve reseptörün hücre yüzeyinde konformasyonel bir değişim meydana gelir. Bu değişikliği takiben, ölüm reseptörünün hücre içi ölüm bölgeleri, yeniden düzenlenerek DD içeren adaptör proteinleri çağırıp yapısına katar (Chinnaiyan ve ark., 1995; Hsu ve ark., 1995). Fas-ilişkili ölüm domaini (Fas-related death domain, FADD) adı verilen bu adaptör protein, TRAIL reseptörleriyle etkileşime girer ve ölüm-etkili domaini (death-effector domain, DED) sayesinde de sistein-aspartik asitçe zengin proteaz (cystein-aspartic protease, caspase, kaspaz) pro-kaspaz-8/-10'u çağırır. Prokaspaz-8'in de bu komplekse katılmasıyla ölüm-indükleyici sinyal

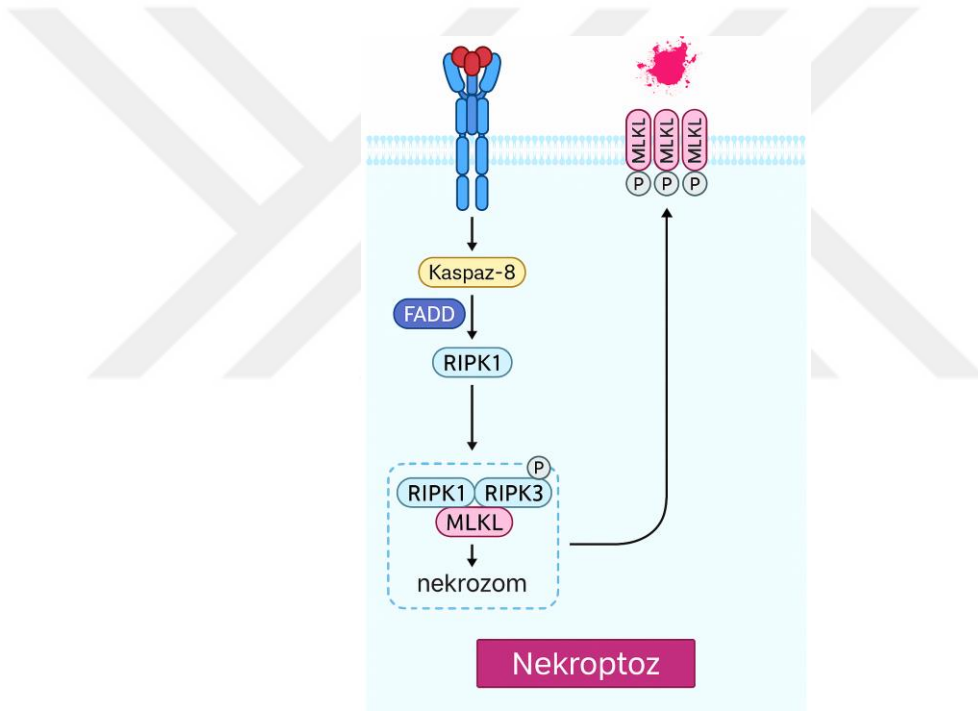
kompleksi (death-inducing signaling complex, DISC) oluşur. Böylece inaktif formdaki prokaspaz parçalanarak aktif kaspaz-8'e dönüştürülüp, sitozole salınır. Sitozolda aktif kaspaz-8, efektör kaspaz-3, -6 ya da -7'yi yine proteolitik kırımla aktive eder ve bu sayede, apoptotik yolak aktif hale getirilmiş olur (Şekil 2.3) (Hirata ve ark., 1998; Kischkel ve ark., 2000; Sprick ve ark., 2000).



Şekil 2 3: TRAIL sinyal yollarından apoptoz ve nekroptozun şematik gösterimi (Azijli ve ark., 2013).

Prokaspaz-8'in fonksiyonel olmayan analogu hücreSEL FADD-benzeri IL1 β dönüştüren enzim inhibe edici protein (cellular FADD-like IL-1 β -converting enzyme inhibitory protein, cellular FLICE caspase8-like inhibitory protein, cFLIP), DISC içerisinde yer alan FADD'a bağlanmak için prokaspaz8 ile her zaman bir yarış içerisinde. FADD, prokaspaz-8 yerine cFLIP bağlandığında apoptotik süreç tetiklenmez ve hücre diğer bir ölüm yolağı olan nekroptozu yönlendirilir (Scaffidi ve ark., 1999; Azijli ve ark., 2013). Yine ekstraselular pH'ın asidik olması da hücreyi apoptozu değil nekroptozu yönlendiren bir başka etkidir (Meurette ve ark., 2007). Hücre nekroptozu yönlendiğinde devreye serin/treonin protein ile etkileşime giren reseptör kinazlar (RIPK) girer (Jouan-Lanhout ve ark., 2012). RIPK1 protein kinaz

aktivitesine sahip aracı bir molekül olup, yapısında bulunan DD sayesinde, DD içeren reseptörler tarafından komplekse dahil edilir. RIPK1, RIPK3'ü çağırır ve onu fosforile ederek ripoptozom kompleksini oluşturur (Cho ve ark., 2009; D. W. Zhang, Shao, ve ark., 2009; Bertrand ve Vandenabeele, 2011; Orozco ve ark., 2014). Bu kompleks daha sonra MLKL (Karışık Soy Kinaz Domain-Benzeri Protein, Mixed Lineage Kinase Domain-Like) proteinini fosforilleyerek aktive eder. Bu aktivasyon MLKL' nin oligomerizasyonunu ve membrana taşınmasını tetikleyerek plazma membranında porlar oluşturur. Oluşan bu porlardan iyonların hücre içine geçmesiyle hücre şişer ve nekrotik membran parçalanması gerçekleşmiş olur (Şekil 2.4) (Dondelinger ve ark., 2014; Galluzzi ve ark., 2014; H. Wang ve ark., 2014).

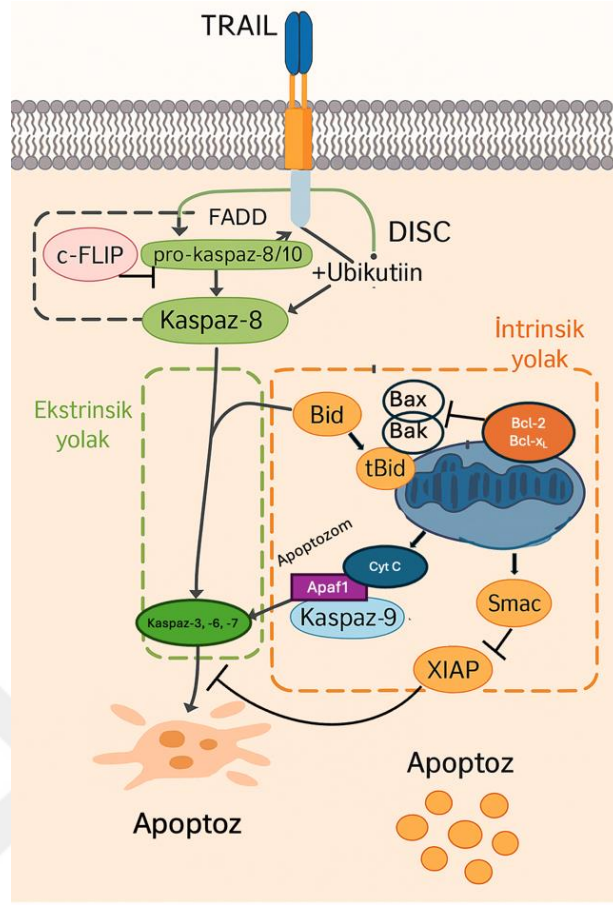


Şekil 2.4: TRAIL'in ekstrinsik yollarından nekroptozun şematik gösterimi (Kundu ve ark., 2022).

- **İntrinsik (Mitokondriyal) Yolak ile Apoptozun Başlatılması**

Apoptotik süreç ekstrinsik yolakla doğrudan gerçekleşebileceği gibi dolaylı yoldan yani intrinsik (mitokondriyal yolak olarak da bilinir) yolak ile de tamamlanır. Tip 1 hücrelerde aktif kaspaz-8, yani ekstrinsik yolak apoptozun başlaması için yeterliyken, tip 2 hücrelerde apoptozun başlatılması için mitokondriyal yolağın da devreye girmesi gerekmektedir (Barnhart ve ark., 2003). B-hücre lenfoma 2 (B-cell lymphoma 2, Bcl-2), intrinsik yolağı proapoptotik ve antiapoptotik proteinler aracılığıyla düzenleyen bir

protein ailesi (Czabotar ve ark., 2014) olup; Tip 2 hücrelerde apoptoz, aktif kaspaz-8 oluşumu ile başlayan kaskad sonrasında Bcl-2 protein ailesi aracılığıyla gerçekleşir. İntrinsik yolak aktive olduğunda BIM, BAD, PUMA gibi proapoptotik proteinler, BCL-2, BCL-xL, BCL-w, ve MCL1 gibi antiapoptotik proteinleri üzerinde antagonistik etki gösterir (Cragg ve ark., 2009; Czabotar ve ark., 2014). Aktif kaspaz-8, BID (BH3-etkileşimli domaine sahip Bcl-2) proteinini kırarak kırpılmış-Bid (truncated Bid, tBid) formuna dönüştürür. Bu form mitokondriye aktarılır, BAK ve BAX proteinlerine bağlanarak mitokondriyal dış zarın geçirgenliğinin (mitochondrial outer membrane permeabilization, MOMP) bozulmasına yol açar. Mitokondriyal dış zarın geçirgenliği, sitokrom C'nin ve ikinci mitokondriyal-ilişkili kaspaz aktivatörü (second mitochondria-derived activator of caspase, SMAC)/Düşük izoelektrik noktaya sahip Doğrudan IAP Bağlayıcı Protein (DIABLO) salınmasına sebep olur (Luo ve ark., 1998; Du ve ark., 2000). Sitokrom c, APAF-1 (Apoptotik Proteaz-Aktive edici Faktör 1)' e 2:1 oranında bağlanarak apoptozom kompleksini oluşturur (Du ve ark., 2000) ve kaspaz-9'u aktive eder. Aktif olan kaspaz-9, efektör kaspaz-3, -6 ve -7'yi aktive ederek apoptozu indükler (Li ve ark., 1997; Schulze-Osthoff ve ark., 1998). Şekil 2.5. de intrinsik yolak özetlenmiştir.



Şekil 2.5: İntrinsik ve ekstrinsik yolların şematize edilmesi (Dai ve ark., 2015).

IAP (inhibitör apoptoz proteinleri) proteinleri ise efektör kaspazların (örneğin kaspaz-3 ve -7) katalitik aktivitesini inhibe ederek ya da apoptozom kompleksi aracılığıyla aktive olan kaspaz-9'un aktif bölgesiyle doğrudan etkileşip aktivasyonunu engelleyerek apoptotik olayları durdurabilir (L. Zhang ve Fang, 2005). Her bir IAP, evrimsel olarak korunmuş bir alan olan bakülovirüs inhibitör tekrarı (baculovirus inhibitory repeat, BIR) adını taşıyan bir veya üç ardışık tekrar içermektedir ve farklı BIR bölgelerinin, belirli kaspazlara karşı farklı tercihleri olduğu düşünülmektedir. Bugüne kadar memelilerde cIAP1, cIAP2, X'e bağlı apoptoz inhibitörü (XIAP), nöronal apoptoz inhibitör proteini (NAIP), survivin ve BIR tekrarları içeren ubiquitin konjugasyon enzimi (BRUCE) olmak üzere altı IAP tanımlanmıştır (Duckett ve ark., 1996; McEleny ve ark., 2001). Üç insan IAP proteini olan XIAP, c-IAP-1 ve c-IAP-2'nin, prokaspaz-9'a bağlanarak aktivasyonunu engellediği gösterilmiş olup, bu proteinler ayrıca aktif kaspazlara doğrudan bağlanarak da onların aktivitesini inhibe edebilir (Deveraux ve ark., 1998). IAP proteinlerinin aktivitesi, apoptoz süreci sırasında mitokondriden sitozole salınan SMAC/DABLO tarafından kontrol

edilmektedir. SMAC/DIABLO, IAP proteinlerinin BIR bölgeleriyle etkileşime girerek kaspazların aktivasyonunu destekler. Özetle; SMAC/DIABLO, kaspazlar üzerindeki IAP inhibisyonunu ortadan kaldırarak hücre ölümünü teşvik eder (Du ve ark., 2000; Verhagen ve ark., 2000).

2.3.2. Hücre Sağkalım Yolaklarının Başlatılması

- **Nükleer Faktör Kappa B (NF- κ B) Yolağı**

TRAIL, reseptörleri dolayısıyla da aktive ettiği farklı mekanizmalar aracılığıyla hem apoptoz hem de hücrenin canlılığını korumasında devreye giren birtakım yolakları aktive eder. Bunlardan biri de NF- κ B sinyal yolağıdır (Hu ve ark., 1999). Eugene ve arkadaşları DISC oluşumunun ardından bir sekonder kompleksin oluştuğunu ve bunun da apoptotik olmayan, hücrenin canlılığını koruyabildiği sinyal yolaklarını tetiklendiğini belirtmişlerdir (Varfolomeev ve ark., 2005). Sekonder kompleksin ise yapısında FADD, kaspaz-8, reseptör-etkileşimli protein (RIP1), TNF-reseptör ilişkili protein 2 (TRAF2) ve NF- κ B esansiyel modülatör (NEMO) bulunur (Dai ve ark., 2015). Sekonder komplekste bulunan NEMO/IKK γ , IKK α/β ' yı bu komplekse çağırır. IKK α/β , I κ B α ' yı fosforilleyip NEMO/ IKK γ 'nin degradasyonunu sağlar. I κ B α 'nın degrade olmasıyla NF- κ B serbest kalır ve nükleusa göç eder. NF- κ B, hücrenin canlılığının korunmasında ve inflamasyonda rol oynayan birçok genin transkripsiyonunu düzenleyen bir transkripsiyon faktörü olup; p65, Rel A, cRel, p50, and p52 üyelerinden oluşur. NF- κ B aracılığı ile ekspresyonu indüklenen hedef genlerden bazıları *Bcl-xl*, *Mcl-1*, *cFLIP*, ve *cIAP* gibi anti-apoptotik genlerdir (Ehrhardt ve ark., 2003; Braeuer ve ark., 2006). Dolayısıyla NF- κ B aktivasyonu hücreleri TRAIL-indüklü apoptoza dirençli hale getirebilirken; NF- κ B inhibisyonu ise TRAIL'in hücredeki apoptotik etkilerini potansiyel olarak arttırır (Jeremias ve ark., 1998; Wajant, 2004). NF- κ B yapısındaki Cre1 ve Rel A ile, TRAIL-R1 ve TRAIL-R2 ekspresyonunu tetiklemesi ya da baskılaması sebebiyle hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotik etkiye sahip olabileceği gösterilmiştir (Ravi ve ark., 2001; X. Chen ve ark., 2003).

- **Mitojen-Aktive Protein Kinaz (MAPK) Yolağı**

Proliferasyon, farklılaşma ve apoptoz gibi hücrenel olaylarda önemli rol oynayan bir diğer yolak ise MAPK sinyal yolağıdır (E. K. Kim ve Choi, 2010; S. X. Chen ve ark., 2018; Guo ve ark., 2020) . MAPK ailesi ERK1/2, ERK3/4, ERK5, ERK7/8, JNK1/2/3

ve p38-MAPK olmak üzere altı üyeden oluşurken; TRAIL' in bu üyelerden JNK, p38 ve ERK1/2' yi aktive ettiği bilinmektedir. Bu yolaklardan JNK' nin aktivasyonu sekonder komplekste RIP ve TRAF2'nin birlikte bulunmasıyla gerçekleşebildiği gibi; TRAF2–MEKK1–MKK4 sinyal yolağı ile de aktive olabilir (Hu ve ark., 1999; Lin ve ark., 2000; Varfolomeev ve ark., 2005). JNK1 α 2 ve JNK1 β 2' nin uzun izoformları sayesinde uzun süreli JNK aktivasyonu apoptozu indükleyebilirken, JNK1 α 2 ve JNK1 β 2' nin kısa formları ile geçici aktivasyonu hücreleri apoptozdan koruyabilir. Bu da JNK' nin farklı hücre hatlarında hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotik bir molekül olarak rol alabileceğini göstermektedir (Ventura ve ark., 2006; Mahalingam ve ark., 2009).

TRAIL aracılı p38 aktivasyonu ise yine sekonder komplekste RIP1 ve TRAF2' nin yanına TGF- β aktive kinaz-1 (TAK1) ve MKK4/MKK6 gibi kinazların çekilmesi ile gerçekleşir (Varfolomeev ve ark., 2005; Son ve ark., 2010). TRAIL aracılı apoptozda p38 MAPK'ın rolü literatürde tartışmalıdır ve hücre tipine göre değişiklik göstermektedir. Hela hücrelerinde p38 aktivasyonunun TRAIL indüklü apoptozdan sorumlu olduğu gösterilmiştir. (M. W. Lee ve ark., 2002). Prostat kanseri hücrelerinde ise TRAIL' in p38'i aktive ettiği, aktif p38'in tBid'in mitokondriye göçünü engelleyerek *Mcl-1* gen ekspresyonunu artırıp mitokondriyal membran geçirgenliğini inhibe ederek anti-apoptotik etki yarattığını göstermişlerdir (Ortiz-Ferron ve ark., 2006; Son ve ark., 2010). Öte yandan meme kanseri hücrelerinde ise p38 inhibisyonun bu hücreleri TRAIL' e duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir (Weldon ve ark., 2004). İnsan kolorektal kanser hücre hattı DLD1 gibi bazı tümör hücrelerinde ise p38'in TRAIL-indüklü apoptozda belirgin bir rolünün olmadığı bildirilmiştir (L. Zhang ve ark., 2004). Birbirinden farklı bu bulgular, p38'in TRAIL ile indüklenen apoptozdaki rolünün hücre tipine ve hücre iç dinamiklerine bağlı olabileceğini göstermektedir.

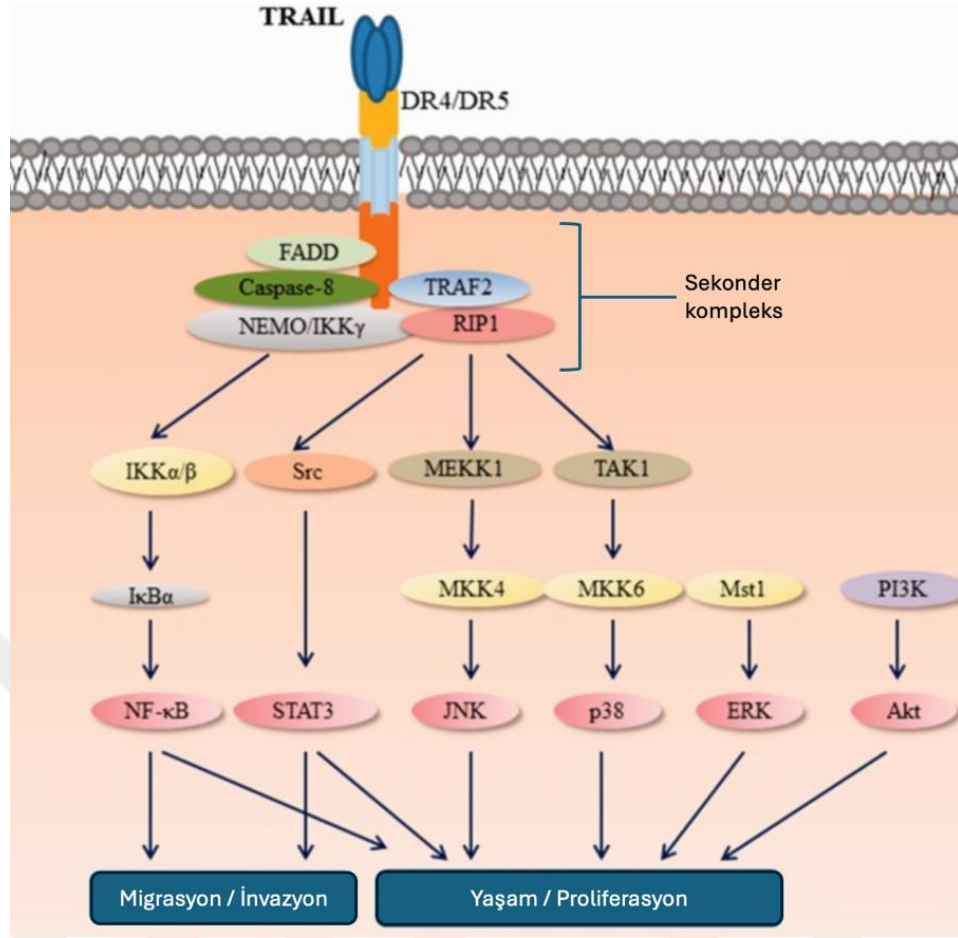
ERK1/2 yolağı, temel olarak hücre canlılığının korunmasında ve proliferasyonda etkilidir. Bu yolağın TRAIL aracılı indüklendiği farklı hücre tiplerinde rapor edilmiş olup, aktivasyonun ise Mst1 bağımlı olduğu gösterilmiştir (Milani ve ark., 2003; X. D. Zhang ve ark., 2003; Song ve Lee, 2008). Mitokondriden SMAC/DIABLO salınımı, TRAIL ile indüklenen apoptozu düzenleyen önemli bir yoldur. Melanoma hücrelerinde, Smac/DIABLO'nun salınımının ERK1/2 aktivasyonu ile baskılandığı ve bunun sonucunda TRAIL'e bağlı apoptozun azaldığı gösterilmiştir (X. D. Zhang ve ark., 2003). ERK1/2'nin inhibisyonu, meme kanseri hücreleri ve HT-29 kolon kanseri

hücrelerinde TRAIL ile indüklenen apoptoza karşı hücreleri daha duyarlı hale getirmiştir. Bu durum, ERK1/2'nin kritik bir proliferasyon düzenleyicisi olduğunu da göstermektedir (Vaculova ve ark., 2006).

- **PI3K/AKT**

Akt, fosfoinositid-3 kinaz (PI3K) ile aktive edilen bir protein kinazdır ve hücre büyümesi, apoptoz ve hayatta kalma gibi hücresel işlevlerin düzenlenmesinde rol oynar (Fresno Vara ve ark., 2004). TRAIL ile indüklenen Akt aktivasyonu, çeşitli kanser türlerinde gösterilmiştir. TRAIL'e duyarlı prostat kanseri hücre hattı DU145'te, TRAIL'in Akt'yi c-Src ve c-Cbl aracılığıyla aktive ettiği; Akt'ın baskılanması ile de TRAIL indüklü apoptoza duyarlılığın arttırdığı gösterilmiştir (Song ve ark., 2010). Kemirgen pankreatik beta hücrelerinde, TRAIL'in özellikle DR5 aracılığıyla yaptığı Akt aktivasyonunun, hücre proliferasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Kahraman ve ark., 2021). Akt aktivasyonu, aynı zamanda TRAIL direncinin gelişimine de katkıda bulunabilir; çünkü TRAIL ile indüklenen Akt fosforilasyonunun inhibisyonu, TRAIL'e dirençli küçük hücre dışı akciğer kanseri (NSCLC) hücrelerini TRAIL'e karşı duyarlı hale getirmiştir (Azijli ve ark., 2012). Benzer bir durum, TRAIL'e dirençli over ve meme kanseri hücre hatlarında da gözlemlenmiştir (Xu ve ark., 2010).

Dolayısıyla TRAIL, apoptozu indüklemenin yanı sıra, buna bir direnç mekanizması olarak, birçok farklı hücre sağkalım yolağını da aktive edebilmektedir (Şekil 2.6) (Dai ve ark., 2015).



Şekil 2.6: TRAIL aracılı hücre sağkalım yolları (Dai ve ark., 2015).

2.4. TRAIL Dirençliliği

Pek çok kanser hücresi TRAIL-indüklü apoptoza karşı farklı direnç mekanizmaları geliştirir. Ölüm reseptörleri, adaptör proteinler ya da kaspazların fonksiyonlarını kaybetmesi (L. Zhang ve Fang, 2005) ya da Bcl-2 ve IAP gibi anti-apoptotik proteinlerin aşırı ekspresyonu bu direncin gelişmesinde rol oynamaktadır (Van Geelen ve ark., 2004). TRAIL pek çok dokuda eksprese edildiği gibi (Wiley ve ark., 1995), TRAIL' in membran bağlı reseptörlerinin de eksprese edildiği hücre ve doku yelpazesi oldukça geniştir ve her bir reseptörün TRAIL'e bağlanma affinitesi birbirine benzerdir (Degli-Esposti, Dougall, ve ark., 1997; Degli-Esposti, Smolak, ve ark., 1997). Dolayısıyla, yalancı reseptörler olan DcR1 ve DcR2'nin TRAIL'e bağlanmak için DR4 ve DR5 ile rekabet ederek TRAIL sinyal yolağını negatif şekilde düzenlediği başlangıçta öne sürülmüştür (Marsters ve ark., 1997; Pan, Ni, ve ark., 1997; Sheridan ve ark., 1997; Pan ve ark., 1998). TRAIL duyarlı hücrelerde bu reseptörlerin aşırı

ekspresyonu, apoptozu baskılamıştır. Özellikle TRAIL-R3'ün gastrointestinal sistem tümörlerinde (Sheikh ve ark., 1999) ve TRAIL-R4'ün insan meme kanseri hücrelerinde (Sanlioglu ve ark., 2005) fazla eksprese edildiği gösterilmiştir. TRAIL-R4 ekspresyonunun siRNA ile azaltılması, akciğer ve prostat tümör hücrelerinde TRAIL'in tümör öldürücü etkisini artırmıştır (Aydin ve ark., 2007; Sanlioglu ve ark., 2007). Ancak, bazı doku analizlerinde TRAIL-R3 ifadesi sadece beyin, kalp, karaciğer ve testis ile sınırlı bulunmuştur (Spierings ve ark., 2004). Ayrıca, bazı çalışmalarda yalancı reseptör ekspresyonu ile TRAIL direnci arasında doğrudan bir ilişki kurulamazken, TRAIL-R1 ve TRAIL-R2'nin yüzey ekspresyonunun apoptoz ile ilişkili olduğu saptanmıştır (Zhang XD). Bu da TRAIL duyarlılığının yalnızca reseptör ekspresyonuna değil, hücre yüzeyine taşınma düzeylerine de bağlı olabileceğini düşündürmektedir.

TRAIL direncinin yalnızca reseptörlerle değil, hücre içi moleküler yollarla ve TRAIL reseptörlerinin post-translasyonel modifikasyonlarıyla da ilişkili olduğu gösterilmiştir. GALNT14 enziminin yüksek ekspresyonu, TRAIL duyarlılığı ile korele bulunmuş; bu enzim TRAIL-R1 ve TRAIL-R2'nin O-glikozilasyonunu artırarak ligand bağlı reseptör kümelenmesini ve kaspaz-8 aktivasyonunu kolaylaştırmıştır (Wagner ve ark., 2007). TRAIL-R2 geninde, özellikle ölüm domaini bölgesinde, çeşitli kanser türlerinde mutasyonlar saptanmıştır (Arai ve ark., 1998; S. H. Lee ve ark., 1999; S. H. Lee ve ark., 2001; W. S. Park ve ark., 2001; Shin ve ark., 2001). Bu mutasyonlar reseptörün sinyal iletme kapasitesini bozarak hücrelerin direnç geliştirmesine sebep olur. Yapılan bir başka çalışmada ise kolon ve akciğer kanseri hücrelerinde hücre döngüsünün G0'dan G1'e geçiş evresinde durdurulmasının, bu hücrelerin TRAIL'e duyarlılığını arttırdığını gösterilmiştir (Jin ve ark., 2002). Bu durumun, anti-apoptotik proteinlerin hücre döngüsü evrelerine göre farklı ekspresyonuna bağlı olabileceği düşünülmektedir. Örneğin, G1 fazında aktif T hücrelerinde cFLIP düzeyleri yüksektir ve bu durum, apoptoz duyarlılığını etkileyebilir (Algeciras-Schimnich ve ark., 1999). Direnç gelişiminde en çok öne çıkan teori ise tümör hücrelerindeki pro-apoptotik ve anti-apoptotik genlerin ekspresyon seviyelerindeki farklılıktır. TRAIL reseptöründen gelen sinyallerin etkinliği de, hücredeki cFLIP, Bcl-2 ailesi üyeleri, IAP proteinleri, ERK, Akt ve Toso gibi çeşitli proteinlerin ifadesine bağlıdır (Griffith ve ark., 1998; Fulda ve ark., 2002; Y. H. Kim ve ark., 2008). Özellikle DISC düzeyinde cFLIP, FADD'e bağlanarak kaspaz aktivasyonunu engeller (Irmeler ve ark., 1997). Dolayısıyla

cFLIP' in baskılanması TRAIL duyarlılığını artırabilir (Geserick ve ark., 2008). XIAP gibi IAP' ların yüksek ekspresyonu ise kaspaz-3, -7 ve -9'u inhibe ederek TRAIL' e karşı direnç oluşturabilir (Deveraux ve ark., 1997; Schimmer ve ark., 2004). Ayrıca, Bcl-2 ve Mcl-1 gibi anti-apoptotik proteinlerin aşırı ekspresyonu da hücreleri TRAIL' e karşı dirençli hale getirebilir (Hinz ve ark., 2000; Clohessy ve ark., 2006).

2.5. Kronik Miyeloid Lösemi (KML)

Kronik Miyeloid Lösemi (KML), ilk kez 1845 yılında bazı splenomegali, anemi ve masif granülositoz vakalarının gösterilmesiyle tanımlanmış, pluripotent bir kök hücrenin klonal miyeloproliferatif bozukluğudur. Kemik iliği orijinli olduğu için bu hastalık Neumann tarafından “miyeloid lösemi” olarak adlandırılmıştır (Bennett, 1985). 1960'lı yıllarda Philadelphia (Ph) kromozomunun tespit edilmesi, hastalığın patogenezinin daha iyi anlaşılmasına ışık tutmuştur (Neumann, 1878). 1973 yılında Ph kromozomunun, 9. ve 22. kromozomlar arasında gerçekleşen bir translokasyon sonucu olduğu gösterilmiştir (Rowley, 1973). Teknolojinin gelişmesi ve bilginin artması ile yaklaşık on yıl sonra BCR-ABL füzyon onkogeni tanımlanmıştır (Faderl ve ark., 1999). 9. kromozomda bulunan Abelson Murine Leukemia virüs (ABL) geni ile 22. kromozomdaki Breakpoint Cluster Region (BCR) arasında gerçekleşen resiprokal translokasyon t(9;22)(q34;q11) sonucu füzyon BCR-ABL onkogeni kimerik P210 onkoproteini üretir. Bu protein hem Ras/MAPK, PI-3kinaz, c-Abl ve Crk yolağı, JAK-STAT ve Src gibi sinyal yollarını aktive edip apoptozu inhibe ederek hücrenin transformasyonuna ve proliferasyonuna hem de tirozin kinaz aktivitesini artırarak hematopoetik kök hücrelerin (HSC) klonal çoğalmasına ve KML patogenezinin sebep olur (Cortez, 1997; Skorski ve ark., 1997; Goldman ve Melo, 2003; Jain ve ark., 2016). Tüm yeni lösemi vakalarının %15'ini oluşturan KML yetişkinlerde sık gözlenmektedir ve bu hastalarında yaşam sürelerinin beklenenden daha uzun olması Tirozin Kinaz İnhibitörleri'nin (TKI) geliştirilmesiyle sağlanmıştır (Lancet, 2015). Günümüzde KML tedavisi için onaylanmış beş TKI bulunmaktadır. Bunlar imatinib, dasatinid, nilotinib, bosutinib ve ponatinib olup, ilk dördü The Food and Drug Administration (FDA) ve European Medicines Agency (EMA) tarafından onaylanan güncel birinci basamak tedavilerdir (Jabbour ve Kantarjian, 2020). Birinci nesil TKI olan imatinib, KML'nin tedavisinde sıklıkla tercih edilmekte olup; BCR-ABL'ın fosforilasyonunu inhibe eder. Ancak KML hastalarının % 25'inden fazlasında imatinib intoleransı veya direnci gelişir ve bu hastaların ~%50'sinde BCR-ABL füzyon geninde nokta

mutasyonları bulunur (Huang ve ark., 2018). İkinci ve üçüncü nesil TKI' ların bu mutasyonlara karşı sensitivitelere vardır ancak bu ilaçların ekonomik yükü ağırdır ve ters ilaç reaksiyonlarını arttırmaktadır. Dolayısıyla ikinci ve üçüncü nesil tedaviler uzun süreli ilaç kullanımı gerektirir. Bu sebeple TKI' ların kullanıma girmesiyle KML tedavisindeki büyük ilerlemeye rağmen, bazı hastalar hastalık seyri sırasında tedaviye primer veya sekonder direnç göstermektedir ve TKI' lara direnç, KML tedavisinde hala çözülmesi gereken birincil sorundur (Huang ve ark., 2018; Alves ve ark., 2021).

2.5.1. KML' de TRAIL Direnci

TRAIL'in hem intrinsik hem ekstrinsik apoptozis yollarını aktive edebilmesi hem de daha tümör-spesifik etki göstermesi sebebiyle, TRAIL-R1 ve TRAIL-R2' ye karşı birçok agonist antikor geliştirilmiştir. Ancak bazı tümör hücrelerinin TRAIL' e dirençli olması bazılarının uzun süreli maruz kalıma bağlı olarak direnç geliştirmesi sebebiyle, klinikten beklenen verim alınamamıştır (Kwakkenbos ve ark., 2010; Lemke ve ark., 2014). Bugüne kadar aydınlatılan dirençlilik mekanizmaları arasında Prokaspaz 8/10'un FADD'a bağlanmasının c-FLIP tarafından engellenmesi (L. Zhang ve Fang, 2005), Bcl-2 protein ailesinin anti-apoptotik üyelerinin aşırı ekspresyonu (Bauer ve ark., 2015), yalancı reseptörlerin (DcR1/2) yüksek ekspresyonu (Degli-Esposti, Dougall, ve ark., 1997; L. Zhang ve Fang, 2005; Lalaoui ve ark., 2011), ölüm reseptör endositozu (X. Zhang ve ark., 2008) ve TRAIL-R2'nin nükleusa translokasyonu (Khaidar ve ark., 2012) yer almakta olup; bu dirençliliğin gelişmesinde fosforilasyon-defosforilasyon mekanizmalarının rol oynaması oldukça muhtemeldir ve literatürde buna yönelik bir çalışma henüz mevcut değildir.

İnsan kronik miyeloid lösemi hücre hattı olan K562 hücreleri, normalde TRAIL dirençli olduğu halde, uzun süre BCR-Abl tirozin kinaz inhibitörü İmatinib ile muamelesi sonrasında TRAIL' e duyarlılık kazanabildiği rapor edilmiştir (S. J. Park ve ark., 2009). K562 hücrelerinin normalde TRAIL dirençli olduğu halde, imatinible uzun süre muamele sonrasında TRAIL'e duyarlı hale gelebilmesi, TRAIL reseptörlerinin tirozin fosforilasyonu yoluyla regüle olup olmadığına dair bir soru işareti oluşturmaktadır. TRAIL'in iki ölüm reseptörü TRAIL-R1 ve TRAIL-R2'nin apoptozu indükleyen DD'lerinin aminoasit dizisine baktığımızda, her iki reseptörün de DD'sinde muhtemel bir tirozin fosforilasyon bölgesi (YxxL) bulunduğunu görmekteyiz (Şekil 2.7).

>Homo sapiens DR4 (TRAIL-R1)

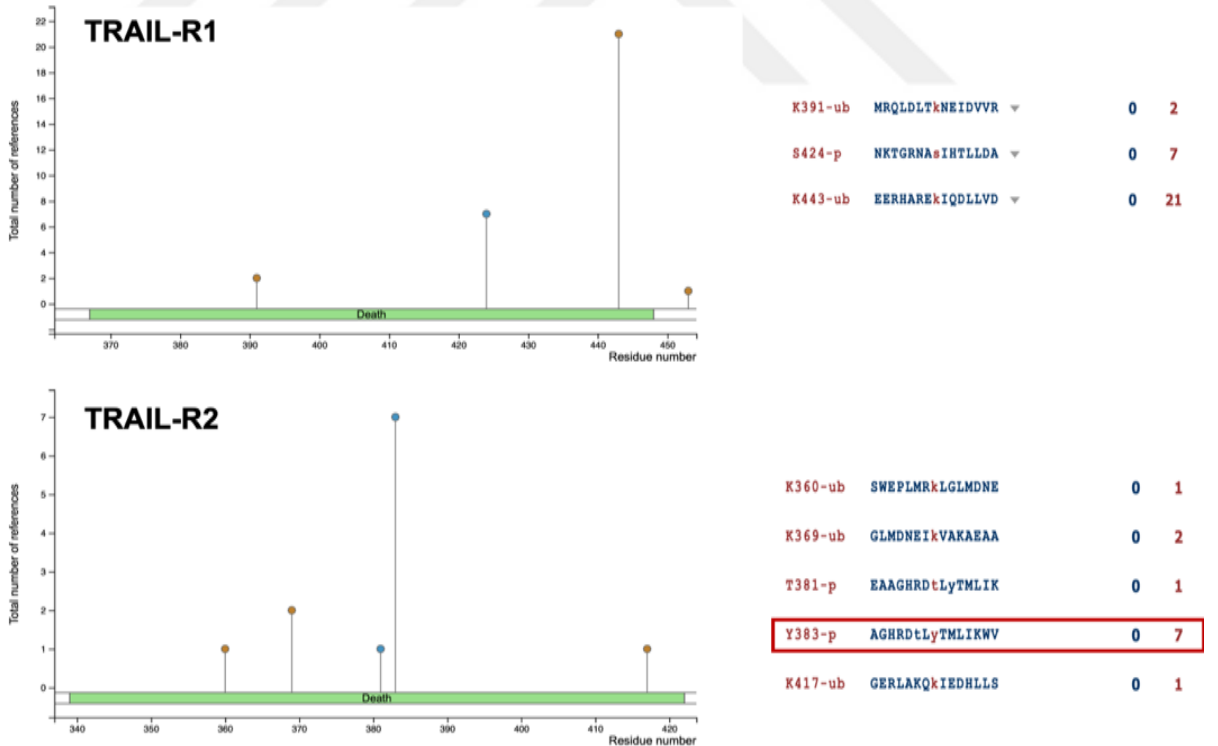
MLFFDKFANIVPFDSWDQLMRQLDLTKNEIDVVRAGTAGPGDA
LY₄₀₉AMLMKWVNKTGRNASIHTLLDALERMEERHAREKIQDLL

> Homo sapiens DR5 (TRAIL-R2)

RQCFDDFADLVPFDSWEPLMRKLGLMDNEIKVAKAEAAAGHRDT
LY₃₈₃TMLIKWVNKTGRDASVHTLLDAETLGERLAKQKIEDHL

Şekil 2.7: TRAIL-R1 ve TRAIL-R2'nin DD bölgelerinin aminoasit dizisi . Potansiyel tirozin fosforilasyon motifleri altı çizili ve kırmızı olarak işaretlenmiştir.

Bunun ardından, TRAIL-R1 ve TRAIL-R2'nin her ikisi için de DD'lerinde tirozin fosforilasyonuna dair mass spektrometri verisi bulunup bulunmadığını anlamak için phosphosite.org veritabanında tarama yaptık. Phosphosite.org veritabanına göre (Hornbeck ve ark., 2015)., TRAIL-R1 DD'sinde tirozin fosforilasyonu saptanmamışken, TRAIL-R2 Y383 aminoasidinde tirozin fosforilasyonu saptanmıştır (Şekil 2.8).



Şekil 2.8: Phosphosite.org veritabanından elde edilmiş TRAIL-R1 ve TRAIL-R2 DD posttranslasyonel modifikasyon verisi. TRAIL-R2'de proteomik yöntemlerle gözlemlenmiş olan tirozin fosforilasyonu işaretlenmiştir.

TRAIL-R2'nin Y383 rezidüsünden tirozin fosforilasyonuna uğruyor olabileceğini gösteren bu proteomik verinin varlığı nedeniyle, 383.pozisyondaki tirozin (Y383) aminoasidinin içerisinde bulunduğu tirozin fosforilasyon motifinin (YxxL) protein fonksiyonu açısından önemini anlayabilmek için evrimsel süreçte türler arasında korunup korunmadığını inceledik. Farklı türlere ait TRAIL-R2 DD dizilerini ClustalW Omega veritabanını kullanarak hizaladığımızda, Y383'ün içerisinde olduğu tirozin fosforilasyon motifinin (YxxL), türler arasında korunmuş olduğunu görmekteyiz (Şekil 2.9).

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

Chelonia	-----DWRRFGRALLLSENEIEIAERSDKYSQEPHYQMLCTWLNKAGIGAS	46
Mesocricetus	-----SWNNLMRQMGGLTDNDIQMVRVAVTQVPEDAIYQMLMKWLNQTGRSAS	46
Mouse	KFIFEYCSDIVPFDSWNRRLMRQLGLTDNQIQMVAETLVREAIYQMLKWRHQGRSAS	60
Rattus	-----SWDRLMRHMGGLTDNQIQMVAETQVPCEVLYQMLLKWLYQTGLGAS	46
Equus	-----SWKRLMRQLGLTQNEIDVMEAEITSHQDAIYEMLTIWLLKKTGRSAS	46
Sus	-----WDKLMRKMDLTQNDILQSRDRARNTGDALYEMLETWVRRKGREAS	45
Homo	-----SWEPLMRKLGMDNEIKVAKAEAAGHRDTLYTMLIKWVNKTGRDAS	46
Pan	-----SWEPLMRKLGMDNEIKVAKAEAAGHRDTLYTMLIKWVNKTGRDAS	46
Physeter	-----SWDSLMRQLGLTRNEILLAREAVRVPDAIYEMLETWVSNKGREAS	46
	* : * : * * : * . : * * * * . * * *	
Chelonia	VNHLLETLDKIDLRGVADIICSKL	70
Mesocricetus	INSLLEALETIGERYARDTIEDHA	70
Mouse	INHLLDALEAVEERDAMEKIEDYA	84
Rattus	INHLLGALEAVGERCALEEIEDYA	70
Equus	VNTLLDALETLGKEYAKETIQDHL	70
Sus	VNDLLDALEALGQSAKEEIEDKL	69
Homo	VHTLLDALETLGERLAKQKIEDHL	70
Pan	VHTLLDALETLGERLAKQKIEDHL	70
Physeter	VNTLLDALETLGERLAKQKIQDHL	70
	:: * * : * : : : : * .	

Şekil 2.9: TRAIL-R2 tirozin fosforilasyon motifi türler arasında korunmuştur. Yukarıdan aşağıya: yeşil deniz kaplumbağası, altın hamster, fare, sıçan, at, evcil domuz, insan, şempanze, ispermeçet balinası.

TRAIL-R2'nin ölüm bölgesindeki tirozin fosforilasyon motifinin türler arası korunmuş olması, bu bölgenin protein fonksiyonu açısından önemli olduğunu düşündürmektedir. Dolayısıyla, bu bölgeden gerçekleşen bir fosforilasyon, protein fonksiyon ya da stabilitesinin korunmasında rol oynuyor olabilir.

Protein fosforilasyonu, geri döndürülebilir ve hızlı bir süreç olduğu için, sinyal mekanizmalarının regülasyonunda ve özellikle de bir proteinin farklı sinyal yolları arasında seçim yapabilmesinde rol alabilmektedir. TRAIL'in, TRAIL-R2 aracılığı ile apoptozis ve nekroptozis gibi hücre ölüm yollarına ek olarak hücre proliferasyonunda ve hatta hücre invazyonunda rol alan birçok farklı yolağı da etkileyebiliyor olması, TRAIL-R2'nin bu yollar arası seçiminde tirozin

fosforilasyonunun rol oynuyor olabileceğini düşündürmektedir. Zira, tirozin fosforilasyonu, SH2 bölgesi barındıran proteinler için bağlanma bölgesi oluşturmak suretiyle, reseptörün bağlanma partnerlerini değiştirebilir. SH2 bölgesi barındıran proteinlerden biri olan c-Src'ın TRAIL yolağının düzenlenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir (Garimella ve ark., 2014). c-Src'ın, TRAIL muamelesi ile aktive olup, prokaspaz-8'i fosforile etmek suretiyle apoptozisi inhibe ederek (Xu ve ark., 2013) veya Stat3 (Azijli ve ark., 2012) ve Akt (X. H. Zhang, Wang, ve ark., 2009) aktivasyonunu nasıl sağladığı henüz aydınlatılabilmemiş değildir. Teorik olarak, TRAIL muamelesi sonrasında TRAIL-R2'nin ölüm domaininde oluşan fosfotirozin rezidüsü, c-Src otoinhibitör SH2 bölgesi için ya da c-Src'ın 527. aminoasidindeki inhibitör fosforilasyonunu uzaklaştıracak bir fosfataz için bağlanma bölgesi oluşturabilir ve bu yollarla c-Src aktivasyonunu sağlayabilir. Ayrıca, TRAIL-R2 DD üzerindeki tirozin fosforilasyon motifi (YTML), klatrin bağımlı endositoz motifi (YXXØ)(Kozik et al. 2010) ile de tam uyum göstermektedir. TRAIL-R2 endositozunun ve çekirdeğe göçünün ligand- ve klatrin-bağımlı olduğu (Mert et al. 2019) da göz önüne alındığında, TRAIL-R2'nin bu bölgeden fosforilasyon-defosforilasyonunun, internalizasyon sinyali gibi görev görmesi ihtimali söz konusudur. Dolayısıyla, TRAIL-R2'nin tirozin fosforilasyonu –eğer sahiden mevcutsa- TRAIL-R2'nin hücre içerisindeki yerini, miktarını, bağlanma partnerlerini değiştirerek TRAIL sinyal iletimini modüle edebilir. Bu nedenle biz de bu doktora tez projesinde, TRAIL-R2 tirozin fosforilasyonunun TRAIL dirençliliğinde rol oynuyor olabileceğini hipoteze ettik. Hipotezimize göre, K562 hücre hattının TRAIL dirençliliğinde TRAIL-R2'nin tirozin fosforilasyonu rol oynuyor olabilir ve K562 hücre hattının uzun süre İmatinib ile tedavi edilmesi sonucunda TRAIL duyarlılığının gelişmesi, bu noktadaki fosforilasyonun defosforilasyon ile geri dönüştürülmesine bağlı olabilir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Malzemeler ve Solüsyonlar

- Antikorlar ve inhibitörler

Bcr (Proteintech, 22585-1-AP), EGFR (CST, #4267S), p-EGFR (CST, #2234), c-Src (SC, B-12, #sc-8056), Jak1 (SC, A-9, #sc-1677), Jak2 (SC, C-20, #sc-294), Fosfotirozin Monoklonal Antibody (Invitrogen, #03-7799), TRAIL-R2 (CST, #69400), GAPDH (Meridien Biosciences, #H86504M), Anti-Mouse-HRP (CST, #7076S), Anti-Rabbit-HRP (CST, #7074S), Normal Rabbit IgG (CST, #2729S), Normal Mouse IgG (CST, #5415S), AC-DR5 (SC, D-6, sc-166624), AC-py20 (SC, PY99, #7020), ProteinA/G konjuge boncuklar (sc2003 ve thermo 20421), Erlotinib (MedChemExpress, #HY-50896) 500 nM Ruxolutinib (MedChemExpress #HY-50856) 10 uM, İmatinib (Novartis, Glivec 400 mg)) 1 uM, PP1 (Biomol, #EI-275) 1uM, AZD1480 (SC, #sc-364735) 1 uM, GSK1904529 (MedChemExpress, #HY-10524 500 nM

- **Luria Bertoni (LB) Sıvı Besiyeri:** 25 gr LB (Biobasic, #N/A MD28), 1 L distile su içerisinde çözüldü. Kullanılacak miktarlara göre bölünüp, 121 °C, 1 atm basınçta, 15 dakika otoklavlandı.

- **LB-Agar Katı Besiyeri:** 1 L distile su içersine 40 g LB agar toz (#N/A MD30) tartılıp eklendi ve otoklavlandı. Agar soğutulup, donmadan, 40-45 °C sıcaklığa geldiğinde, 100 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde Amfisilin (Thermo Scientific, #69-53-4) eklendi ve bakteriyolojik petri kaplarına 25 ml olacak şekildi dağıtıldı, donmasına izin verildi.

- **10X TBE (Tris-Borate-EDTA) Elektroforez Tamponu:** 108gr Tris Base (Amresco, #77-86-1), 55gr Borik Asit (Merck, #1.00165.1000) ve 9.3 gr EDTA (Sigma, #E-5134) karıştırılıp, toplam hacim bidistile su ile 1 litreye tamamlandı.

- **1X TBE Elektroforez Tamponu:** 100ml 10X TBE, 900 ml bidistile su ile 1litreye tamamlandı.

- **%2'lik Agoroz Jel:** 1X 100 ml TBE tamponuna 2 gr Agoroz (Sigma Cat. A5093) tartılıp mikrodalga fırında çözündürüldü. 50 °C 'ye soğutulduktan sonra 0,5

$\mu\text{g/ml}$ etidyum bromür (Sigma E87519) ilave edildi. Sıcak agoroz jel, elektroforez küvetine taraklar yerleştirildikten sonra dökülüp, oda sıcaklığında 20-30 dakika polimerizasyonu sağlandı.

- **Triton-X (TRX) Lizis Tamponu:** 100mM Sodyum Florür (NaF-Sigma S7920), 50mM HEPES (Sigma H3375), 150mM Sodyum Klorür (NaCl-Merck1.06404.1000), %10 Gliserol (Sigma G2025), %1,2 Triton-X100 (Amresco, #0694), 1mM Magnezyum Klorür (MgCl_2 -Sigma M8266), 1mM EGTA (Amresco 0732), 1mM Sodyum-o-vanadate (Sigma S6508) ve 1x proteaz inhibitör kokteyli (Merck, no: 11 697 498 001) eklenip solüsyonun pH'ı 7,4'e ayarlandı. -20°C ' de saklandı.

- **5X PBS:** 20 gr NaCl, 0,5 gr KCl, 3,6 gr Na_2HPO_4 (Riedel-de- Haën, #04273), 0,675 gr KH_2PO_4 (Merck, #104877) tartılıp, 400 ml bidistile su içerisinde çözündürülerek pH 7.4'e ayarlandı. Daha sonra hacim 500 ml'ye tamamlandı ve otoklavlandı.

- **1X PBS:** 200 ml 5X PBS, 800 ml bidistile su ile karıştırılıp total hacim 1L' ye tamamlandı.

- **1X PBS-T:** 1X 1L PBS tamponu içerisinde 1 ml Tween-20 (Amresco, #0777) eklenerek çözünmesi sağlandı.

- **10 mg/ml BSA (Bovine Serum Albumin):** 100 mg BSA (GoldBio, #A420-250) tartılıp, 10ml steril distile su içerisinde çözündürüldü. 0,2 μm porlu filtrelerden geçirilerek 1ml alikotlandı ve -20°C 'de saklandı.

- **1 $\mu\text{g/ul}$ BSA:** 100 μl 10 mg/ml BSA' dan alınıp 900 μl steril distile su içerisinde çözündürüldü. -20°C 'de saklandı.

- **5X Bradford Reaktifi:** 100 mg Coomassie Brilliant Blue, G-250 (Merck, #1.15444) 50 ml %95 Etanol-EtOH (Riedel-de- Haën, #32221) içerisinde çözündürüldü. Daha sonra 100 ml %85 Ortho-phosphoric Acid (Isolab, #959.062.2500) eklenip total hacim 1L' ye distile su ile tamamlandı. Kahverengi şişede, $+4^\circ\text{C}$ ' de saklandı.

- **%10 SDS:** 5gr Sodyum Dodesil Sülfat-SDS (Merck, #8.22050.1000) tartılıp 30ml bidistile suda çözündürüldü. Hacim bidistile su ile 50ml'ye tamamlanıp, 0,2µm porlu vakum filtreden geçirildi. Oda sıcaklığında saklandı.

- **1M Tris-HCl:** 121,1g Tris Base tartılıp, 800ml bidistile su ile çözündürüldü. HCl ile pH 8.5'a ayarlanıp, bidistile su ile hacim 1litreye tamamlandı.

- **SDS Yükleme Tamponu (2X Laemmli Buffer):** 1ml gliserol (Isolab, #927.043.1000), 3ml %10 SDS (Merck 8.22050.1000), 1,25 ml (1M) Tris-HCl pH:6,7, 1-2 µg bromofenol mavisi (MedChemExpress, # 115-39-9) eklendi. 0,45µm porlu filtreden geçirilip 950 ul olacak şekilde ependorflara alikotlandı ve - 20 °C'de saklandı. Kullanmadan önce 1ml'ye 50 µl β-merkaptotanol (Sigma, M3148) ilave edildi.

- **Ayırıcı (Resolving) Tampon (1,5M Tris Baz, pH8.8):** 45,41 gr Tris Baz, 200 ml bidistile suda çözündürüldü. HCl ile pH 8.8'e ayarlanıp, total hacim 250 ml'ye tamamlandı. 0,2 um filtreden geçirilip, +4 °C' de saklandı.

- **29:0.8 Akrilamid/Bisakrilamid:** 14,5gr Akrilamid (Sigma, #A-9099) ve 0,4 gr Bisakrilamid (Sigma, #M-7279) 40 ml bidistile suda çözündürüldü. Hacim 50 ml'ye tamamlanarak 0,2 um filtreden geçirildi ve şişenin etrafı alüminyum folyo ile sarılıp +4 °C' de saklandı.

- **%10 Amonyum Persülfat (APS):** 0,1gr APS (Biobasic, #7727-54-0) 1ml distile suda çözündürüldü. Taze hazırlanıp maksimum 2 gün +4 °C' de saklandı.

- **%1 SDS:** 1 ml %10 SDS üzerine 9 ml steril bidistile su eklenerek hazırlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

- **10X Yürütme Tamponu (10X Running Buffer):** 7,5 gr Tris Baz ve 47 gr Glisin (Isolab, #927.032.1000) tartıldı. 400 ml bidistile suda çözöüldü. Üzerine 25 ml %10 SDS eklendi ve total hacim 500 ml olacak şekilde bidistile su ile tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

- **1X Yürütme Tamponu:** 100 ml 10X yürütme tamponu, 900 ml bidistile su ile karıştırıldı. Yürütme yapılmadan hemen önce hazırlandı.

- **4X Transfer Tamponu (Hızlı Islak Transfer için):** 2,9 gr Tris baz ve 14 gr glisin tartılıp 400 ml bidistile suda çözündürüldü. Toplam hacim daha sonra 500 ml'ye tamamlandı.

- **1X Transfer Tamponu (Hızlı Islak Transfer için):** Cihazın bir bölmesi için 100 ml 4X transfer tamponu, 260 ml bidistile su ile çözündürülüp 40 ml Metanol (MetOH) (Riedel-de- Haën, #24229) eklendi. Total hacim 400 ml'ye tamamlandı.

- **1X Transfer Tamponu (Gece boyu ıslak transfer için):** 5,8 gr Tris baz ve 3 gr Glycine tartıldı. 900 ml bidistile suda çözündürüldü ve kullanılmadan önce 100 ml MetOH eklendi. Böylece total hacim bir litreye tamamlandı.

- **%1 BSA (Blokla Solüsyonu):** 1gr BSA, 100ml 1X PBS-T içerisinde çözündürülüp, iki kat kağıt filtreden geçirilerek süzdürüldü.

- **%5 Süt Tozu (Blokla solüsyonu):** 5gr yağsız süt tozu, 100ml PBS-T içerisinde çözündürülüp, iki kat kağıt filtreden geçirilerek süzöldü.

- **Mild Strip Off Solüsyonu:** 1,5 gr glisin ve 0,1 gr SDS tartılıp, 80 ml bidistile suda çözöndüröldü. Solüsyonun pH'ı 2.2 'ye ayarlandıktan sonra, total hacim 100 ml'ye bidistile su ile tamamlandı. Solüsyona 1 ml Tween-20 eklenerek yavaşça karıştırıldı. Kullanılmadan hemen önce hazırlandı.

- **Resazurin:** Stok Resazurin (Sigma, #R7017-1G) 0,15 mg/ml olacak şekilde steril 1X PBS ile çözöndüröldü. Bunun için 1.8 mg resazurin tartılıp, 12 ml steril PBS ile çözöndüröldü. 0.22 um porlu filtreden geçirildi. 6'şar ml alikotlanıp alüminyum folyoya sararak -20 °C'de saklandı.

3.2. Hücre Kültürü

Çalışmamız insan kronik miyeloid lösemi hücre hattı K562 ve insan rahim ağzı kanseri HeLa kullanılarak gerçekleştirildi. Hücreler, L-glutamin, esansiyel olmayan aminoasitler, %10 Fetal Dana Serumı (FBS- Gibco, #10270-106) ve %1 Penisilin/Streptomisin (Nutri Culture, #PS100) eklenmiş RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute-1640, Nutri Culture, #RPMI500) içinde süspanse halde (K562) ve DMEM (Dulbecco's Modifeid Eagle Medium – Gibco, #2828781) içinde yüzeye tutunan (adherent) halde (HeLa); %5 CO₂'lik atmosfer, %95 nem ve 37 °C'lik ortamda çoğaltıldı.

3.3. İmatinib Dirençli-K562 (IR-K562), BCR/Abl Geninin Susturulduğu (Nakavt, ko) K562 (BCR/Abl ko-K562) ve DR5 Geninin Susturulduğu K562 (DR5 ko-K562) Hücre Hatlarının Elde Edilmesi

3.3.1. IR-K562 Hücre Hattının Oluşturulması

İmatinib dirençli K562 hücre hattı İzmir Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik bölümü araştırma görevlisi Dr. Merve Soğancı tarafından hediye edilmiş olup, bu hücreler %20 FBS, %1 Pen/strep eklenmiş RPMI-1640 besiyerinde çoğaltılmıştır. 10 uM imatinib dozuna karşı dirençli olan bu hücre hattı, üç günde bir imatinibe maruz bırakılmıştır. Hücreler süspanse değil yüzeye tutunan formda olup, pasaj sırasında hücreleri kaldırmak için scraper kullanıldı. 1400 rpm 5 dakika santrifüj edildikten sonra taze besiyeri eklenerek hücrelerin canlılığını koruması devam ettirildi. Her pasajdan sonra 10 uM konsantrasyonda imatinib eklendi.

3.3.2. Puromisin Öldürme Dozunun Belirlenmesi

Bunun için 24 kuyulu tabakaya kuyu başı 1×10^5 olacak şekilde yabancı tip K562 hücreler ekildi. 24 saat sonra 0,125 ug/ml – 5 ug/ml arasında artan dozlarda puromisin (0,125 ug/ml, 0,25 ug/ml, 0,5 ug/ml, 1 ug/ml, 1,5 ug/ml, 2 ug/ml, 2,5 ug/ml, 3 ug/ml, 4 ug/ml, 5 ug/ml) eklendi. Hücrelerin öldürme dozu 0.5 ug/ml olarak belirlendi.

3.3.3. Bcr/Abl Geninin Susturulduğu (Nakavt) K562 (Bcr/Abl Ko-K562) Hücre Hattının Elde Edilmesi

- **BCR/Abl gRNA Tasarımı, Oligo Fosforilasyonu ve Yapışma (Annealing)**

Öncelikle Bcr/abl genine yönelik rehber RNA (guide RNA, gRNA) tasarlandıktan sonra hedef dışı etkilerinin olup olmadığı CRISPR RGEN TOOLS Cas-OFFinder ile tespit edildi. Bcr/abl genine yönelik ve Bbs1 kesim enzimi tanıma bölgesi dizisi eklenmiş ileri primer 5'-caccGTTGTTTCAGATGACCACGGGA-3' ve 5'-aaacTCCCGTGGTCATCTGAACAAC-3' geri primer dizileri ile oligoların fosforilasyonu ve yapışma reaksiyonu gerçekleştirildi. Bunun için 10 uM ileri primerden 1ul, 10 uM geri primerden 1ul, T4-DNA Ligaz tamponundan 1 ul ve Polinükleotit Kinaz (PNK)' dan 0.5 ul eklenip, total hacim 10 ul'ye enjeksiyonluk su ile tamamlandı. 37 °C' de 60 dakika inkübasyon sonrası, 95 °C' de 5 dakika inkübe edildi. 0.1C/sn düşüş ile oda sıcaklığına soğuması beklendi. Konsantrasyonu Quawell Q9000 cihazı ile ölçülüp 894 ng/ul bulunduktan sonra, -20 °C' ye kaldırıldı.

- **Boş Plazmidin BbsI Enzimi ile Kesilmesi ve Defosforilasyonu**

Boş SaCas9v3-Puro (katalog no #178813) plazmidine istediğimiz gRNA dizilerini yerleştirebilmek için, bu plazmide restriksiyon enzimi ile kesim protokolü uygulandı. 1 ug plazmid DNA, rCutSmart (10x) tamponundan 5 ul, QuickCHIP (Neb #M0525) 1 ul, BbsI enzimi (#R3539S) 1 ul eklenip total hacim enjeksiyonluk su ile 50 ul' ye tamamlandı. Her 24 saatte bir 1 ul BbsI enzimi eklenerek üç gün boyunca 37 °C' de kesim gerçekleştirildi. Üçüncü günün sonunda 65 °C' de 20 dakika enzim inaktif edildikten sonra, pürifikasyon protokolü uygulandı. Konsantrasyon 21 ng/ul olarak ölçüldükten sonra -20 °C' ye kaldırıldı.

- **Ligasyonun Başlatılması**

Üç gün boyunca enzim kesimine tabi tutulmuş 50 ng konsantrasyonunda plazmid, fosforillenerek birbirine yapıştırılmış 50-100 ng konsantrasyonunda oligo, T4 ligaz Buffer (10x) 2 ul, T4 DNA ligaz 1ul olacak şekilde eklenip; toplam hacim 20 ul olacak şekilde enjeksiyonluk su ile tamamlandı. +4 °C' de gece boyu inkübe edildikten sonra, 25 °C' de 30 dakika, 65 °C' de 10 dakika inkübe edildikten sonra transformasyona kadar +4 °C' de saklandı.

- **Plazmidin Kompetan Hücrelere Aktarılması**

-80 °C' de stok halinde bulunan kompetan hücrelerin (Stbl3) buz üzerinde çözünmesi sağlandıktan sonra, steril 1.5 ml ependorf tüpe kompetan hücreden 50 ul ve ligasyon ürününün tamamı (50-100 ng plazmid DNA) eklendi. Buz üzerinde yarım saat beklettikten sonra, 42 °C' de 1 dakika ısı şoku uygulandı ve hemen buz üzerine geri alındı. Üzerine, 950 ul antibiyotiksiz LB eklenip 37 °C' de çalkalamalı inkübatörde 1 saat çoğaltıldı. Daha sonra, 100 ug/ml Amfisilin eklenmiş (antibiyotikli) LB-Agar plakalara 150 ul yayma yapıldı. Gece boyu 37 °C' de inkübe edilip kolonilerin oluşması beklendi.

- **Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Plazmidi Alan Koloninin Belirlenmesi**

PZR yapılacak koloniler belirlendikten sonra, pipet ucuyla bir miktar koloniden alınıp 20 ul enjeksiyonluk suda çözdürüldü. Bundan 2 ul kalıp DNA olarak kullanıldı. 10X Qiagen tampondan 1ul, dNTP (10 mM karışım) den 0.2 ul, U6 ileri dizi primerden (F: 5'-GAGGGCCTATTTCCCATGATTC-3') 0.4 ul ve BCR/Abl genine yönelik geri primerden (Rev: 5'-aaacTCCCGTGGTCATCTGAACAAC-3') 0,4 ul, Taq DNA

Polimeraz' dan 0.25 ul eklenip total hacim 10 ul'ye enjeksiyonluk su ile tamamlandı. 95 °C 5 dakika ön denatürasyondan sonra, 95 °C'de 30 saniye – 60 °C'de 30 saniye – 72 °C' de 1 dakika ve 35 döngü olacak şekilde birleşme koşulları ayarlandı ve son uzama için ise 72 °C' de 5 dakika, +4 °C'de ∞ ayarlanıp PZR reaksiyonu tamamlandı.

- **Agaroz Jel Elektrofrez ile Koloni Doğrulaması**

Hazırlanan %2'lik agaroz jelin polimerizasyonu sağlandıktan sonra taraklar jelden çıkarıldı ve elektroforez tankına (BIORAD) yerleştirildi. Kolonilerden elde edilen PZR ürünleri jele yüklendikten sonra; pozitif bant veren koloniden tip ucuyla alınan bakterilerden mini kültür kuruldu. Önce 3 mL LB besiyerinde 37 °C'de gece boyu çalkalamalı inkübatörde çoğaltıldıktan sonra %10 gliserol olacak şekilde yani 900 ul bakteri kültürü 100 ul gliserol olacak şekilde 2 tüp stok alındı. -80 °C' ye kaldırıldı.

- **Plazmid İzolasyonu**

Gliserol stok olarak saklanmış olan bakteriden 100ul alınıp, 100ml 100µg/ml Amfisilin eklenmiş (antibiyotikli) LB besiyerine ekildi ve gece boyu çalkalamalı inkübatörde çoğaltıldı. Ertesi gün, kültürler 50 ml'lik falkonlara alınıp, 4500rpm'de +4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar atılıp, elde edilen çökeltiden Ecotech Plasmid Isolation Midi Kit (#MDP1050) ile plazmid izolasyonu gerçekleştirildi. 300 ul kitin sağladığı elüsyon tamponunda çözdürülen DNA konsantrasyonu ölçülüp agaroz jelde doğrulaması yapıldı.

- **K562 Yabanıl Tip (Wt) Hücre Hattında BCR/Abl Geninin Susturulması**

100 ul serum içermeyen RPMI, 1 ug plazmid ve 2 ul Turbofect (Thermo Scientific, #EP0531) transfeksiyon ajanı 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra, 24 kuyulu tabakada üzerine kuyu başı 100.000 olacak şekilde hücre eklendi. Wt ve BCR/Abl ko kuyuları iki gün inkübe edildikten sonra öldürme dozu 0.5 ug olarak belirlenen puromisin, iki günde bir wt hücreler tamamen ölene kadar eklendi. Wt hücrelerin öldüğü doğrulandıktan sonra, transfeksiyonun gerçekleştiği kuyudaki hücreler T25 flaska alınarak çoğaltılması sağlandı. Transfeksiyon işlemi iki kez gerçekleştirildi.

3.3.4. TRAIL-R2 (DR5) Geninin Susturulduğu K562 ve Hela Hücre Hatlarının Elde Edilmesi

Bunun için Stuttgart Üniversitesi'nden Markus Morrison'un cömert hediyesi olan (Stöhr vd., 2020), TRAIL-R2'ye yönelik gRNA ile beraber Cas9 kodlayan plazmidin izolasyonu gerçekleştirildi. K562 hücre hattı için 100 ul serum içermeyen RPMI, 1 ug plazmid ve 2 ul Turbofect transfeksiyon ajanı kullanılarak oluşturulan transfeksiyon miksi 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra, 24 kuyulu tabakada üzerine kuyu başı 100.000 olacak şekilde hücre eklendi. Wt ve DR5ko kuyuları iki gün inkübe edildikten sonra öldürme dozu 0.5 ug olarak belirlenen puromisin, iki günde bir wt hücreler tamamen ölene kadar eklendi. Wt hücrelerin öldüğü doğrulandıktan sonra, transfeksiyonun gerçekleştiği kuyudaki hücreler T25 flaska alınarak çoğaltılması sağlandı. Transfeksiyon işlemi iki kez gerçekleştirildi.

Hela hücre hattı için ise ters transfeksiyon gerçekleştirildi. 100 ul serum içermeyen DMEM, 1 ug plazmid ve 2 ul Turbofect transfeksiyon ajanı kullanılarak oluşturulan transfeksiyon miksi 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edilirken, 10 cm'lik petride çoğaltılmış % 85-90 yoğunlukta olan Hela yabanıl tip hücrelerinden besiyeri uzaklaştırıldı. 750 ul Trypsin (Nutri Culture, #TE025) kullanılarak kaldırılan hücreler sayıldı. Kuyu başı 100.000 hücre ekildi. 20 dk sonunda transfeksiyon miksi hücrelerin üzerine damla damla verildi. İki gün inkübe edildikten sonra 0.5 ug/ml puromisin eklenerek wt olan hücrelerin ölmesi beklendi. Yabanıl tip hücrelerin tamamı öldükten sonra DR5ko kuyularındaki hücreler çoğaltıldı.

3.4. K562 ve HeLa Hücrelerinin TRAIL ile Muamelesi

K562 süspanse hücreler T75 flaskta çoğaltıldıktan sonra 1ml olacak şekilde ependorflara bölündü. Hem 1 ul Sodyum Orthovanadate (Na_3VO_4) eklenip 1 saat inkübe edildikten sonra hem de Na_3VO_4 eklenmemiş hücreler 10 ng/ml konsantrasyonda olacak şekilde TRAIL (#...) ile muamele edildi. % 80-85 yoğunlukta olan HeLa hücrelerinde ise 5 ml besiyeri uzaklaştırılıp, hücreler 10 ng/ml olacak şekilde TRAIL ile muamele edildi. Hücresel lizat toplandı.

3.5. Western Blot İçin Hücresel Lizatların Hazırlanması

-20 °C' deki TRX lizis tamponunun buz üzerinde çözünmesi sağlandıktan sonra hücrelerden besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler 1X PBS ile yıkandı. Ardından, 500-750 ul arası proteaz inhibitör kokteyli eklenmiş TritonX lizis tamponu eklendi. K562 hücresel lizatı soğuk TRX eklenip pipetaj yapılarak, Hela hücresel lizatı ise cell scraper

ile hücreler kazınarak, 1.5ml'lik ependorf tüplerine alındı. – 80 °C' de saklandı. Kullanılmadan önce, en az 1 dakika vortekslenerek çözdürüldü ve 10000rpm'de 1 dakika santrifüjlendi. Süpernatant, steril tüpe alınıp – 80 °C' de saklandı. Deney günü, protein konsantrasyonu belirlendi.

3.6. Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi (Bradford)

Toplanan hücre lizatlarının protein miktarı, Bradford reaktifi kullanılarak BSA standardına karşı gerçekleştirildi. Standart eğrinin çizilmesi için 1 ug/ul BSA solüsyonundan üçlü tekrarlar olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara 0, 0.5, 1, 3, 5, 7 ve 9 µg olacak şekilde eklendi. Yine -80 °C'deki hücre lizatlar buzda eritilerek devamına üçer tekrar olacak şekilde 1 µl eklendi. Tüm kuyulara 100 ul Bradford reaktifi eklenip, 96 kuyucuklu plakadaki tüm örnekler spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda okutuldu. Üçlü tekrarların ortalama verisi alınarak oluşturulan standart eğrinin formülüne göre örneklerin protein konsantrasyonları belirlendi.

3.7. Western Blot (WB)

3.7.1. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) İçin Jelin Hazırlanması

Önce yürütme için gerekli camlar ayarlanarak sıkıştırıldı. Daha sonra resolving (Ayrıştırıcı) jel, incelenecek proteinin büyüklüğüne göre Tablo 3.1 baz alınarak hazırlandı. APS ve TEMED eklenir eklenmez hızlıca karıştırılıp, ayarlanmış camların arasına belirlenen hizaya kadar döküldü. Hemen üzeri %1 SDS ile kapatıldı. Alt jel donduktan sonra, stacking (hizalayıcı) jel hazırlandı. Bir jel için 3ml su, 1.25ml stacking tampon, 625µl Akrilamid/Bisakrilamid (29/0.8), 50 µl %10 SDS, 50µl APS ve 5µl TEMED koyulup hazırlanan karışım, jelin üzerindeki SDS atılıp suyla yıkandıktan sonra resolving jelin üstüne döküldü. Taraklar baloncuk oluşturmaktan takılıp, jelin polimerize olması için 1 saat beklendi.

Tablo 3.1.: SDS poliakrilamid jel hazırlama ölçüsü.

Resolving jel	%7	%10	%12
ddH2O	4,5 ml	3,85 ml	2,65 ml
Resolving Tampon	2,25 ml	2,5 ml	1,875 ml
Acr:BisAcr (29:08)	2,2 ml	3,5 ml	3 ml
%10 SDS	90 ul	100 ul	75 ul
%10 APS	90 ul	100 ul	75 ul
TEMED	9 ul	10 ul	7,5 ul

3.7.2. Örneklerin Hazırlanması ve Jelde Yürütülmesi

Invitrogen™ Mini Gel (#A25977) yürütme tankının her iki bölmesine donmuş jel içeren camlar yerleştirilip 1X yürütme tamponu ile dolduruldu. Taraklar dikkatlice çıkarılıp kuyuların içi uygun tipte temizlenerek herhangi bir jel atığının kalmadığından emin olundu. Daha sonra Bradford yöntemiyle protein miktarı belirlenen örneklerden 40-50 ug hazırlanıp üzerine yarı hacimde, SDS yükleme tamponu (β -merkaptoetanol içeren) eklendi. 95°C’ de ya da kaynamış suda ara ara vorteksleyecek şekilde 5 dakika bekletildi. Kısa bir hızlı spin edildikten sonra, örnekler uygun tiplerle stacking jeli yüklendi. Marker olarak protein ladder (PageRuler™ Plus Prestained Protein ladder, #26619) kullanıldı. Yürütme işlemi +4 °C’ de, 40 voltta bir saat (örnekler stacking jeli geçene kadar), 100 voltta ise yaklaşık iki buçuk saat yürütüldü (Cihaz adı ve modeli). Yürütme sonunda PVDF membrana transfer aşamasına geçildi.

3.7.3. Örneklerin PVDF Membrana Transferi

Örnekler yürütüldükten sonra tercih edilen transfer cihazının transferde kullanılan süngerleri 1X transfer tamponunda ıslatıldı. Transfer aparatının siyah veya negatif yüklü olacak kısmına süngerlerden biri yerleştirildi. Üzerine 1X transfer tamponunda ıslatılmış whatman kağıdı (Sigma Z691011) yerleştirildi. Bunun üzerine de örneklerin yürütüldüğü jel, cam plakalar arasından dikkatli bir şekilde çıkarılarak konuldu. Jel üzerine saf metanolde 1-2 dakika aktive edilmiş PVDF membran (Advansta, Westernbright PVDF-FL, Membrane roll, 0,45 um, #L-08025-001) yerleştirilip hava kabarcığı kalmaması için rulo ile üzerinden geçildi. Üzerine transfer tamponuyla ıslatılmış whatman kağıdı ve diğer sünger konularak transfer aparatı kapatıldı. Bekletmeden transfer tamponuyla doldurulan transfer cihazına yerleştirildi. Invitrogen™ Mini Gel tankı için örneklerin transferi +4 °C’ de, 20 voltta bir saat olacak şekilde gerçekleştirildi. Biorad (#1658040) cihazında ise örneklerin transferi +4 °C’ de, 40 voltta gece boyu gerçekleştirildi.

3.7.4. PVDF Membranın İşaretleme

Transferin sonunda, membranlar metanolde 1 dakika fikse edildikten sonra, işaretleme kabına alınıp 2 saat uygun bloklama solüsyonu ile bloklandı. Hangi bloklama solüsyonu ile membranın bloklanacağına kullanılacak antikorun özelliğine göre karar verildi. Örneğin, arka plan işaretleme (non-spesifik bantlar) veren antikorlar kullanılacağında %5 süt tozu, özellikle fosfo-tirozin işaretleme gibi işaretlemelemlerde ise %1 BSA tercih edildi.

Bunun ardından, %1 BSA içerisinde hazırlanmış 1:1000 ya da 1:2000 dilüsyonda hazırlanan antikorlarla oda sıcaklığında 1 saat ya da gece boyu +4 °C’de işaretlendikten sonra primer antikorlar geri toplandı ve membranlar 1X PBS-T ile 15’er dakikadan 3 defa toplam 45 dakika boyunca yıkandı. Ardından yine %1 BSA içerisinde 1/5000 ya da 1:10000 dilüsyonda hazırlanmış sekonder antikor ile 1 saat oda sıcaklığında işaretlendi. Süre sonunda sekonder antikorlar toplandı ve membranlar yine 1X PBS-T ile 15’er dakikadan 3 defa toplam 45 dakika boyunca yıkandı. ECL reaktifi membranı kaplayacak şekilde ilave edilip, 3 dakika beklendikten sonra kimyasal ışımaya ile (Azure Biosystems, #c280) görüntüleme yapıldı.

Membranlarda fosforilasyon seviyeleri belirlenen proteinlerin, bazal seviyelerinin de belirlenmesi amacıyla yapılacak antikor işaretlemelerinden önce membranlara “mild strip off” yapıldı. Total proteini tanıyan antikorlarla yukarıda anlatıldığı şekilde yeniden işaretleme yapıldı.

3.8. Mild Strip Off İşlemi

Bu solüsyon ile membranlar önce 5’er dakikadan iki kez çalkalandıktan sonra 1X PBS ile 10’ar dakikadan 2 kez yıkaması yapıldı. Daha sonra 5’er dakikadan yine iki kez 1X PBS-T ile yıkama gerçekleştirildi. Böylece bir önceki antikor işaretlemesinden arınan membranlar, total protein işaretlemesine hazır hale getirildi.

3.9. İmmünopresipitasyon (IP): Öncelikle IP yaparken kullanılacak minimum antikor miktarı ve optimum koşulları belirleyebilmek adına optimizasyon deneyi gerçekleştirildi.

3.9.1 DR5-IP Optimizasyonu

Hücrelerden western blot için toplandığı şekilde lizatlar protez inhibitör kokteyli bulunan TRX lizis tamponuna alındı. Lizatlar -80 °C’ye kaldırıldı. Çalışılacağı zaman lizatlar buz üzerinde çözündürüldü. 10000 rpm/1 dk santrifüjden sonra süpernatant steril ependorf tüpe alındı. Lizatların protein konsantrasyonları Bradford ile belirlendi. Optimizasyon sırasında lizis tamponları ve örnekler buzda çözündürülüp, tüm çalışma buz üzerinde gerçekleştirildi. DR5-IP optimizasyonu sonucunda en uygun koşulun 1 mg protein lizatı için 5 ul TRAIL-R2-AC antikorunu kullanılarak ve santrifüjlerin ise 3000 rpm/30 sn olacak şekilde yapılmasına karar verildi. İstenen protein miktarı kadar lizat steril ependorfa alındı. Örneklerin hacmi proteaz inhibitör kokteyli içeren TRX

lizis buffer ile 500 ul'ye tamamlandı. Her bir örnek için ayrı tüplere protein A/G agoroz boncuklardan (Thermo sc2003) 20 ul ve üzerine 50 ul proteaz kokteyl bulunmayan TRX'den eklenip 500 rpm, 1 dakika, +4 °C' de santrifüjlenip süpernatant uzaklaştırıldı. Lizatlar yıkanan agoroz boncukların üzerine eklendi. 1 saat, +4 °C' de, nutator üzerinde yatay bir şekilde inkübe edildikten sonra 3000 rpm, 1 dakika, +4 °C' de santrifüj edildi. Böylece pre-clearing aşaması tamamlanmış oldu. Santrifüj sonrası süpernatantlar temiz tüplere alındı ve IgG hariç 1 mg protein lizatına TRAIL-R2-AC olacak şekilde antikor eklendi. Ertesi sabah örnekler proteaz inhibitör kokteyli içermeyen TRX lizis tamponundan 900 ul eklenerek üçer defa yıkandı. Üçüncü yıkamadan sonra dipte kalan peletlere taze beta-merkaptoetanol eklenmiş 2X SDS yükleme boyası (2X Laemmli Buffer) dan 40 ul eklendi. Örnekler 5 dakika boyunca her 1.5 dakikada bir vorteksenerek kaynatıldı. Daha sonra buz üstüne alınıp, kısa bir hızlı spin yapıldıktan sonra dibe değmeden 10 ul alınıp %7'lik SDS jele yüklendi. Sonrasında western blot ile analiz gerçekleştirildi. Presipitasyon yapılan antikor hangi organizmadan ise (fare ya da tavşan) o organizmanın IgG' si ile de bir tüpte IP yapılarak, IgG kontrol örneği sağlandı.

3.9.2. py20-IP optimizasyonu

Hücrelerden western blot için toplandığı şekilde lizatlar proteaz inhibitör kokteyli bulunan TRX lizis tamponuna alındı. Lizatların protein konsantrasyonları Bradford ile belirlendi. Optimizasyon sırasında lizis tamponları ve örnekler buzda çözündürülüp, tüm çalışma buz üzerinde gerçekleştirildi. Py20-IP optimizasyonu sonucunda optimum AC-py20 antikorunun miktarının 30 ul olduğuna karar verildi. IP koşulları, DR5-IP ile aynı şekilde yapıldı.

3.10. K562 ve Hela Hücre Hattında TRAIL-R2 Y383D ve Y383F Mutantını Kodlayan Lentiviral Vektörlerin Üretilmesi

pAAV-U6-gRNA-CBh-mCherry vektörüne, 5'-TCGTGTACAAGGTGTCCCTG-3' gRNA dizisini kullanarak klonlama yapıldı. Bu plazmidten aşağıdaki primer setleri kullanılarak PZR gerçekleştirildi.

YD PZR 1: (50ng plazmid kalıp olarak kullanılmıştır)

F: 5'-GTAT- GAA TTC- GCCGCC-ATGGAACAACGGGGACAGAACGCCC-3'

R: 5'- GACCCACTTTATCAGCATCGTGTCCAAGGTGTCCCTGTGGC-3'

YD PZR2: (50ng plazmid kalıp olarak kullanılmıştır)

F: 5'-GCC ACA GGG ACA CCT TGG ACA CGA TGC TGA TAA AGT GGG TC-3'

R: 5'-CAAT- GCGGCCGC- GGAGATGGCAGAGTCTGCATTACCTTCTAG-3'

YD PZR3: (SOEING) (84ng YD-PXR1 ürünü ve 16ng YD-PZR2 ürünü kalıp olarak kullanılarak yapılmıştır)

F: 5'-GTAT- GAA TTC- GCCGCC-ATGGAACAACGGGGACAGAACGCCC-3

R: 5'-CAAT- GCGGCCGC- GGAGATGGCAGAGTCTGCATTACCTTCTAG-3'

YF PZR1: (50ng plazmid kalıp olarak kullanılmıştır)

F: 5'-GTAT- GAA TTC- GCCGCC-ATGGAACAACGGGGACAGAACGCCC-3'

R: 5'-GACCCACTTTATCAGCATCGTGAACAAGGTGTC CCTGTGGCC-3'

YF PZR2: (50ng plazmid kalıp olarak kullanılmıştır)

F: 5'-GGC CAC AGG GAC ACC TTG TTC ACG ATG CTG ATA AAG TGG GTC-3'

R: 5'-CAAT- GCGGCCGC- GGAGAT GGCAGAGTCTGCATTACCTTCTAG-3

YF PZR3: (SOEING) (84ng YF-PZR1 ürünü ve 16ng YF-PZR2 ürünü kalıp olarak kullanılarak yapılmıştır)

F: 5'-GTAT- GAA TTC- GCCGCC-ATGGAACAACGGGGACAGAACGCCC-3

R: 5'-CAAT- GCGGCCGC- GGAGATGGCAGAGTCTGCATTACCTTCTAG-3'

WT TRAIL-R2 PZR (yabanıl tip vektör eldesi için, 50ng plazmid kalıp olarak kullanılmıştır)

F: 5'-GTAT- GAA TTC- GCCGCC-ATGGAACAACGGGGACAGAACGCCC-3

R: 5'-CAAT- GCGGCCGC- GGAGATGGCAGAGTCTGCATTACCTTCTAG-3'

PZR, Q5 DNA polimeraz kullanılarak gerçekleştirildi. Hem YF PZR1 hem de YD PZR1 için, beklenen bant boyutu 1089 baz çifti, YF-PZR2 ve YD-PZR2 için beklenen bant boyutu ise 203 baz çifti olup; bu ürünler birleştirildiğinde, 1264 baz çifti uzunluğunda PZR3 ürününün elde edilmesi beklendi. Hem Y383F mutasyonu hem de Y383D mutasyonu elde etme reaksiyonlarında bant boyutları beklenen şekilde elde edildi. Mutagenез yapılmış olduğu umulan PCR3 ürünleri elde edildikten sonra, bu ürünler PZR purifikasyon kiti ile saflaştırıldı, EcoRI ve NotI enzimleri ile kesilip, PZR purifikasyon kiti ile tekrar saflaştırıldı. Aynı zamanda N174-MCS iskeleti de EcoRI ve

NotI enzimleri ile enzim kesimine tabi tutuldu ve kesim ürünü agaroz jelden saflaştırıldı. Ardından, 1:3 vektör:iskelet oranında bir reaksiyon karışımı kurularak, T4 DNA ligaz ile 16 °C’de gece boyu ligasyon gerçekleştirildi. Ligasyon ürünleri Stbl3 kompetan bakterilere transforme edildi ve ertesi gün kontrol edildiğinde, Y383F mutagenез reaksiyonunda 1, Y383D mutagenез reaksiyonunda ise 3 koloni tespit edildi. Elde edilen kolonilerden mini prep yaptıktan sonra TRAIL-R2 PZR’ si gerçekleştirilip PZR ürünlerinden hizmet alımı ile Sanger sekanslama gerçekleştirildi.

3.11. TRAIL-R2 Nakavt K562 ve Hela Hücre Hattının Lentivirus Transdüksiyonu

Virüs üretimi için gerekli olan paketleme plazmidleri kullanılarak viral süpernatantlar elde edildi. Bir gün öncesinde pasaj 15’ den düşük 293t hücreleri 24-kuyulu plakaya pasajlandı. Pasajdan bir gün sonra, YD, YF ve WT mutantlarından 13 ug, VSVg 2 ug, Gag 1 ug, Pol 1 ug ve TAT 1 ug olacak şekilde konsantrasyonları belirlendi. 500 ul serum içermeyen DMEM içerisinde karışım hazırlandı. 54 ul PEI eklenip, plazmid:pei kompleksi oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi. Bir gün önce pasajlanan 293t hücrelerinin üzerine damla damla verilerek hangi kuyuda hangi mutantın olduğu not edildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra besiyeri uzaklaştırıldı ve 5 mL DMEM (%10 FBS, %1P/S) eklendi. Transfeksiyondan 48 saat sonra Hela ve K562 DR5ko hücreleri 24 kuyulu plakaya pasajlandı. Transfeksiyondan 72 saat sonra üç mutant için tüm medium falkona toplandı. 3000xg, +4 °C’ de 5 dk santrifüjlendi. 0.45 um’lik filtreden geçirilerek viral süpernatantlar +4 °C’ ye kaldırıldı. Aynı petrilere 3.5 ml besiyeri eklenip ertesi sabah yeniden viral süpernatantlar toplandı. Santrifüjlenip, filtrelendikten sonra -80 °C’ ye kaldırıldı. 72. Saate denk gelecek şekilde pasajlanan HeLa DR5ko ve K562 DR5ko hücrelerine her bir viral süpernatanttan 150 ul eklendi. Puromisin seçilimin ardından YD, YF ve wt ile transdükte edilmiş nakavt hücreler normal besiyeri ile çoğaltıldı.

3.12. Eşit Kopya Sayısına Sahip Mutant Hücrelerin Q-Pzr ile Belirlenmesi

Transdükte hücrelerin 96 kuyulu plakaya her kuyuya bir hücre düşecek şekilde ekimi yapıldı ve tek hücre düşen kuyular belirlendi. Bu hücreler çoğaltıldıktan sonra eşit miktarda virüs alan kolonilerin belirlenmesi için hücrelerden direk q-PZR kuruldu. Öncelikle eşit sayıda (~60.000 hücre) hücre ependorfa alındı ve mikrosantrifüjle maksimum hızda 1 dk santirfüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılıp pelete 50 µl 5-10 mM Tris Tamponu (pH: 8.5) eklendi. Yine maksimum hızda 1 dk santirfüj edildikten sonra

süpernatant uzaklaştırıldı. Aynı Tris tamponundan 10 µl pelete eklendi. 99 °C’ de 15 dk ünkübe edildikten sonra hızlıca buz üzerine alındı. 1-2 dk buzda inkübe edildikten sonra maksimum hızda 1 dk santrifüj edildi. Süpernatant PZR’ de doğrudan kalıp DNA olarak kullanıldı. WPRE için Fw: 5’-TCCTGGTTGCTGTCTCTTTATG-3’ ve Rev: 5’-CGATGAGTTCCGCCGTG -3’; Fw: 5’TGAAACATACGTTCCCAAAGAGTTT -3’ ve Rev: 5’-CTCTCCTTCTCAGAAAGTGTGCATAT-3’ primerleri ise Albümin için kullanıldı. Hem WPRE hem de Albümin için örnek başı Ecotech SYBR Green kiti kullanıldı. Her bir örnek için iki tekrarlı olacak şekilde SYBR Green Master Mix 10 ul, Fw primer 1 ul, Rev primer 1 ul, kalıp DNA 1 ul eklenip total hacim 25 ul’ye distile su ile tamamlandı. Reaksiyon koşulları da 95 °C’ de 20 sn, 95 °C’ de 5 s 58 °C’de 30 sn ve 40 döngü olacak şekilde, erime eğrisi ise 60 °C’de 1 dk, her adımda %3 sıcaklık artışı ile 95°C’ de 15 sn ayarlandı. StepOne Plus cihazında okutma yapıldı.

3.13. Eşit Kopya Sayısına Sahip Mutant Hücrelerde mRNA Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi

Eşit kopya sayısı belirlenen mutantlarda TRAIL-R2’ nin transkripsiyonel olarak benzer ekspresyon seviyesi gösterdiğini doğrulamak için TRAIL-R2 ve Albümin primerleri kullanılarak Luna Universal OneStep RT-qPCR Kit(#E3005G) ile reaksiyon kuruldu. TRAIL-R2 için Fw: 5’-CAGGTGTGATTCAGGTGAAGTG-3’ ve Rev: 5’-CCCACTGTGCTTTGTACCTG-3, Fw: 5’TGAAACATACGTTCCCAAAGAGTTT -3’ ve Rev: 5’-CTCTCCTTCTCAGAAAGTGTGCATAT-3’ primerleri ise Albümin için kullanılarak 3.12. de belirtilen koşullar ile reaksiyon kuruldu.

3.14. İnhibitör Muamelesi ve Resazurin Testi

Hücreler kuyu başı 10.000 hücre olacak şekilde 96 kuyulu plakaya ekildi. IC50 ve literatür taraması sonucunda inhibitör konsantrasyonları belirlendi. 6’şar tekrar olacak şekilde planlaması yapıldı. Sadece inhibitör olan kuyulara 10 ul olacak şekilde belirlenen dozlarda inhibitörler verildi, toplam hacim 100 ul’ ye besiyeri ile tamamlandı ve 1 saat sonrasında inhibitör + TRAIL kuyularına ise 10 ng olacak şekilde 10 ul dağıtıldı. 37 °C sıcaklık ve %5 CO₂’li kültür ortamında 72 saat inkübasyona bırakıldı. 72 saatin sonunda kuyu başı 20 ul Resazurin eklendi. 570 nm’de Thermo Scientific Multiscan Go cihazında okutma yapıldı.

3.15. Grafikler ve İstatistiksel Analizler

Western Blot sonuçları Image J yazılımı ile analiz edildi. Grafikler, GraphPad Prism yazılımı ile oluşturulup, istatistiksel analizlerde yine aynı yazılımdan faydalanıldı.



4. BULGULAR

4.1. TRAIL-R2 Tirozin Fosforilasyonunun TRAIL Dirençli K562 ve HeLa Hücre Hatlarında İncelenmesi

Hipotezimizi test etmek için, öncelikle, TRAIL dirençli hücre hatları olan K562 ve HeLa'da TRAIL-R2'nin tirozin fosforilasyonuna uğrayıp uğramadığını sorguladık. Bunun için en ideal yöntem, hücresel lizatlarda önce TRAIL-R2'yi çöktürüp fosfotirozin antikoru ile işaretlemek, ardından tirozin fosforile proteinleri yine immunopresipitasyonla çöktürüp, bu tirozin fosforile proteinler arasında TRAIL-R2'nin olup olmadığını western blot ile incelemektir. Bu nedenle biz de, öncelikle TRAIL-R2 ve fosfotirozin immunopresipitasyonunu optimize ettik.

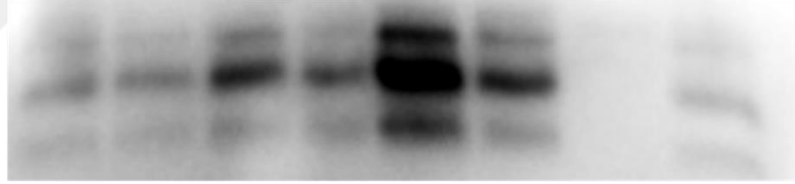
4.1.1. TRAIL-R2 İmmunopresipitasyonunun Optimizasyonu

TRAIL-R2 immunopresipitasyonunda en etkin yöntemi saptayabilmek için, HeLa hücre hattından, TRX ve RIPA tamponları içerisinde ayrı ayrı hücresel lizat aldık. Ardından, Tablo 4.1'de listelendiği şekilde, farklı reaksiyon koşulları hazırladık. Tablo 4.1'e göre 1.-6. örnekler arası lizatların hacmini TRX lizis tamponu ile, 7. ve 8. örneklerin hacmini ise RIPA ile 500 µl'ye tamamladık. Her bir örnek için ayrı tüplere protein A/G agaroz boncuklardan (Thermo sc2003) 20 µl ve üzerine 50 µl TRX ekleyip 500 rpm, 1 dakika, +4 °C'de santrifüjledik ve süpernatantı uzaklaştırdık. Lizatları yıkanan agaroz boncukların üzerine ekledik. 1 saat, +4 °C'de, yatay bir şekilde çalkalayarak inkübe ettikten sonra 3000 rpm, 1 dakika, +4 °C'de santrifüj ettik. Böylece pre-clearing yapılmış olan süpernatantları temiz tüplere aldık ve IgG hariç Tablo 4.1'de belirtilen miktarlarda agaroz konjuge-TRAIL-R2 antikoru ekledik. Tüm tüpleri +4 °C'de, yatay bir şekilde çalkalayarak gece boyu inkübasyona bıraktıktan sonra ertesi sabah örnekleri Tablo 4.1'de belirtilen tamponlardan 900 µl ekleyerek üçer defa yıkadık. Üçüncü yıkamadan sonra dipte kalan peletlere 40 µl, taze beta-merkaptotanol eklenmiş 2X SDS yükleme boyası (2X Laemmli Buffer) ekledik. Örnekleri 5 dakika boyunca her 1.5 dakikada bir vorteksleyerek kaynattık. Daha sonra buz üstüne alıp, kısa bir hızlı spin yaptıktan sonra dibe değmeden 10 µl örneği, %7'lik SDS jeli yükledik. Sonrasında western blot ile analizini gerçekleştirdik (Şekil 4.1.)

Tablo 4.1.: Dr5-IP optimizasyon koşulları.

Örnek	Lizat protein miktarı	Antikor miktarı	Yıkama yapılan lizis tamponu	Yıkama için santrifüj hızı ve süresi
1	500 ug lizat	5 ul TRAIL-R2-AC	TritonX lizis tamponu	3000rpm/30sn
2	500 ug lizat	5 ul TRAIL-R2-AC	TritonX lizis tamponu	500 rpm/1 dk
3	500 ug lizat	5 ul TRAIL-R2-AC	TBS	3000rpm/30sn
4	500 ug lizat	5 ul TRAIL-R2-AC	TBS	500 rpm/1 dk
5	1 mg lizat	5 ul TRAIL-R2-AC	TritonX lizis tamponu	3000rpm/30 sn
6	500 ug lizat	10 ul TRAIL-R2-AC	TritonX lizis tamponu	3000rpm/30 sn
7	500 ug lizat	5 ul TRAIL-R2-AC	RIPA	3000rpm/30 sn
8	500 ug lizat	5 ul TRAIL-R2-AC	TBS	3000rpm/30 sn
9(IGG)	500 ug lizat	2 ug rabbit ıgg	TritonX lizis tamponu	3000rpm/30 sn

Örnek : 1 2 3 4 5 6 7 8



Şekil 4.1. DR5-IP optimizasyon koşullarına göre elde edilen immünopresipitatların western blot görüntüsü. Tablo 4.1’de listelenen örnekler yürütüldükten sonar, TRAIL-R2 primer antikor ve konformasyon spesifik anti-fare seconder antikor ile western blot gerçekleştirilmiştir.

Western blot sonrasında, en keskin TRAIL-R2 bandını 5 numaralı reaksiyonda (1mg lizata 5ul antikor koyulan örnekte) elde ettiğimiz için, doktora tez deneyleri boyunca TRAIL-R2 immunopresipitasyonunda bu yöntemi kullanmaya karar verdik.

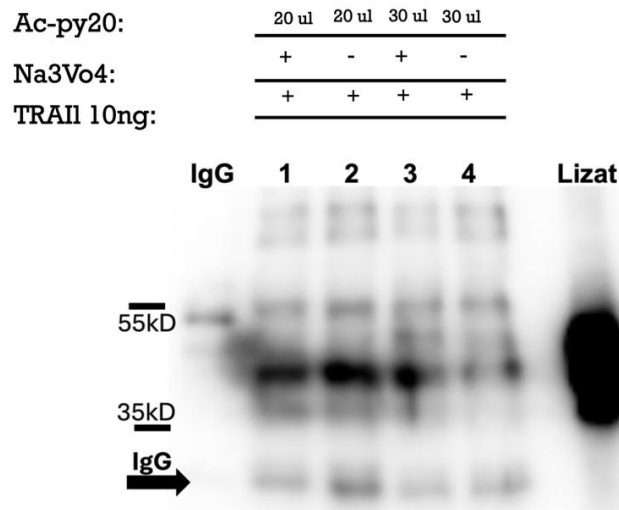
4.1.2. Tirozin Fosforile Proteinlerin İmmunopresipitasyon Koşullarının Optimize Edilmesi

Proteaz inhibitör kokteyli içeren TRX lizis tamponu ile elde edilen hücresel lizatlarda, Bradford yöntemi ile protein konsantrasyonunu belirledikten sonra; 1 mg protein lizatın hacmini yine proteaz inhibitör kokteyli içeren TRX lizis tamponu ile 750 ul’ ye

tamamladık. DR5-IP optimizasyonunda belirtildiği şekilde preclearing aşamasını gerçekleştirdik ve temiz tüplere aldığımız süpernatantların üzerine Tablo 4.2’ de belirtilen miktarda agaroz konjüge-py90 (pY90-AC) antikor ekleyerek tüm tüpleri +4 °C’ de, yatay bir şekilde gece boyu çalkalamalı inkübasyona bıraktık. Yine DR5-IP optimizasyonundaki gibi yıkama aşamalarından sonra ve örnekleri SDS jele yükleyip western blot ile analizini gerçekleştirdik. IgG kontrol örneğini ise, fare IgG’si ile immunopresipitasyon gerçekleştirecek hazırlamış olduk.

Tablo 4.2.: py20-IP optimizasyon koşulları.

Örnek	NA3VO4 muamelesi	10 ng TRAIL muamelesi	AC-py20 antikor miktarı
1	+	Na3Vo4 sonrası 45 dakika	20 ul
2	-	Na3Vo4 sonrası 45 dakika	20 ul
3	+	Na3Vo4 sonrası 45 dakika	30 ul
4	-	Na3Vo4 sonrası 45 dakika	30 ul

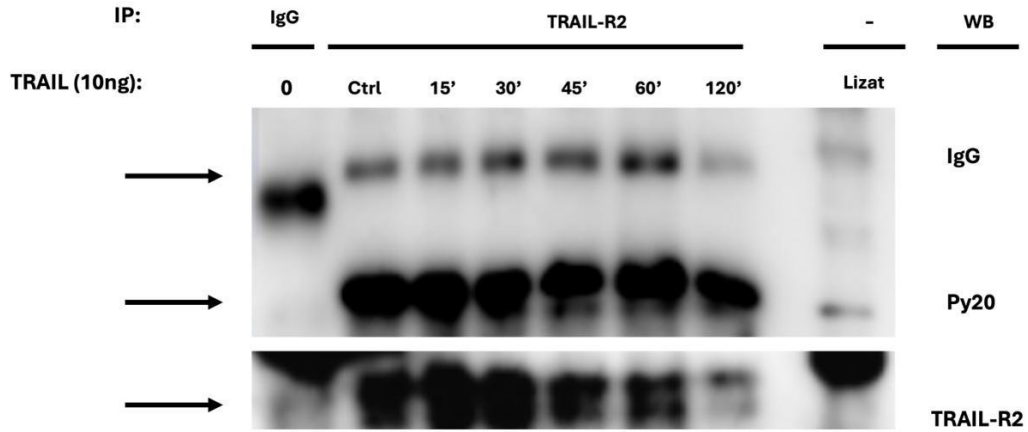


Şekil 4.2: Fosfotirozin immunopresipitasyonunun optimizasyon deney sonucu. Fosfotirozin immunopresipitasyonunun ardından, TRAIL-R2 antikor ile western blot gerçekleştirilmiştir.

Şekil 4.2’de de verilen western blot sonucuna göre TRAIL-R2’nin hem uzun hem kısa formu fosforile olabilmekte fakat uzun formun fosforilasyonu sadece sodyum ortovanadat ile muamele edilmiş hücrelerde gözlemlenebilmektedir.

4.1.3. K562 Hücre Hattında TRAIL-R2 Tirozin Fosforilasyonunun Gösterilmesi

TRAIL-R2, Phosphosite veritabanına göre K562 hücrelerinde bazal koşullarda tirozin fosforile olan proteinler arasındadır (<https://www.phosphosite.org/proteinAction.action?id=14083923&showAllSites=true> Erişim tarihi: 7 Haziran 2025). TRAIL-R2'nin bazal koşullarda hücrede gerçekten tirozin fosforile durumda olup olmadığını ve TRAIL-R2 fosforilasyonunun –eğer mevcutsa- TRAIL muamelesinden etkilenip etkilenmediğini belirleyebilmek için, öncelikle, farklı süreler boyunca TRAIL ile muamele edilmiş hücrelerde TRAIL-R2'yi immunopresipitasyonla çöktürüp fosfotirozin antikoru ile işaretledik. Bunun için, K562 hücrelerini 10 ng/ml TRAIL ile 5 dakika, 15 dakika, 30 dakika ve 60 dakika muamele ettikten sonra hücresel lizatları topladık. TRAIL muamelesi yapmaksızın toplamış olduğumuz lizat da kontrol lizatı olacak şekilde, elde ettiğimiz lizat setinde TRAIL-R2'yi agaroz konjüge antikorlarla çöktürdükten sonra, western blot ile önce fosfotirozin (Py20) işaretlemesi gerçekleştirdik. Görüntü aldıktan sonra ise aynı blot' ın mild strip off'u ile TRAIL-R2 işaretlemesi gerçekleştirdik. Şekil 4.3' de görülebildiği gibi, TRAIL-R2 bazal koşullarda fosforile halde olup TRAIL-R2 fosforilasyon seviyesi 10ng/ml TRAIL muamelesi sonrasında da sabit kalmaktadır.

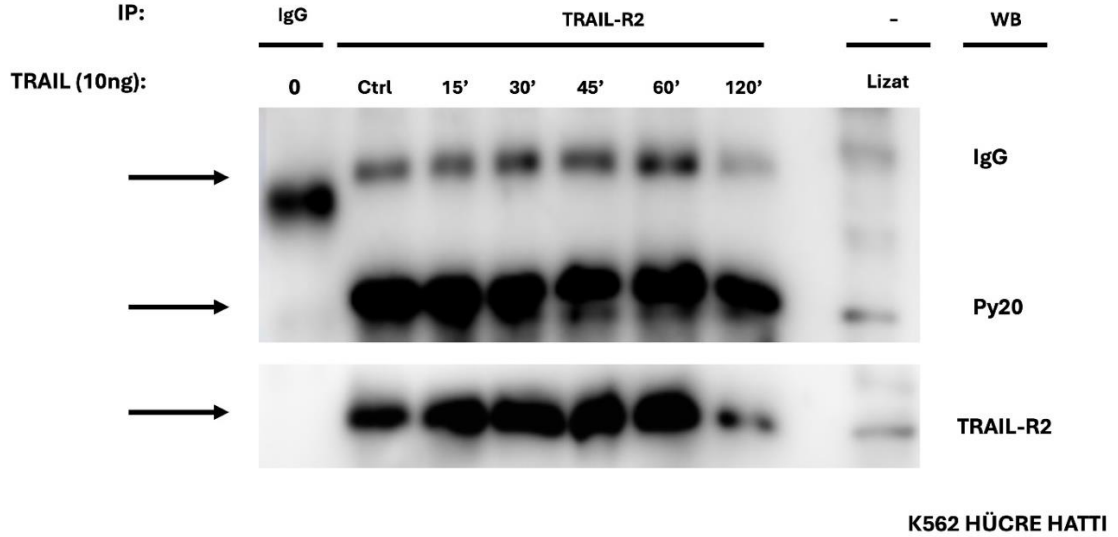


K562 HÜCRE HATTI

Şekil 4.3. K562 hücre hattında bazal koşullarda ve TRAIL muamelesi sonrasında TRAIL-R2 tirozin fosforilasyonu

TRAIL-R2'nin, K562 hücre hattında bazal koşullarda fosforile olduğunu, TRAIL muamelesi ile ise fosforilasyonun artmak ya da azalmak yerine sabit kaldığını gözlemlediğimiz için, bu süreçte fosforilasyon seviyesinin herhangi bir fosfatazin

sürece dahil mi sabit tutulduğunu incelemek istedik. Bu nedenle, tirozin fosfatazların genel inhibitörü olan sodyum ortovanadat (Na_3VO_4) (H. G. Kim ve ark., 2022) ile muamele edilmiş hücrelerde de TRAIL muamelesi gerçekleştirilerek hücreli lizatlardan topladık ve bu lizatlarda TRAIL-R2'yi immunopresipite ettik. Bu örneklerde fosfotirozin antikoru ile işaretleme yaptığımızda da, TRAIL-R2 fosforilasyonunun süreç içerisinde sabit kaldığını gözlemledik (Şekil 4.4)



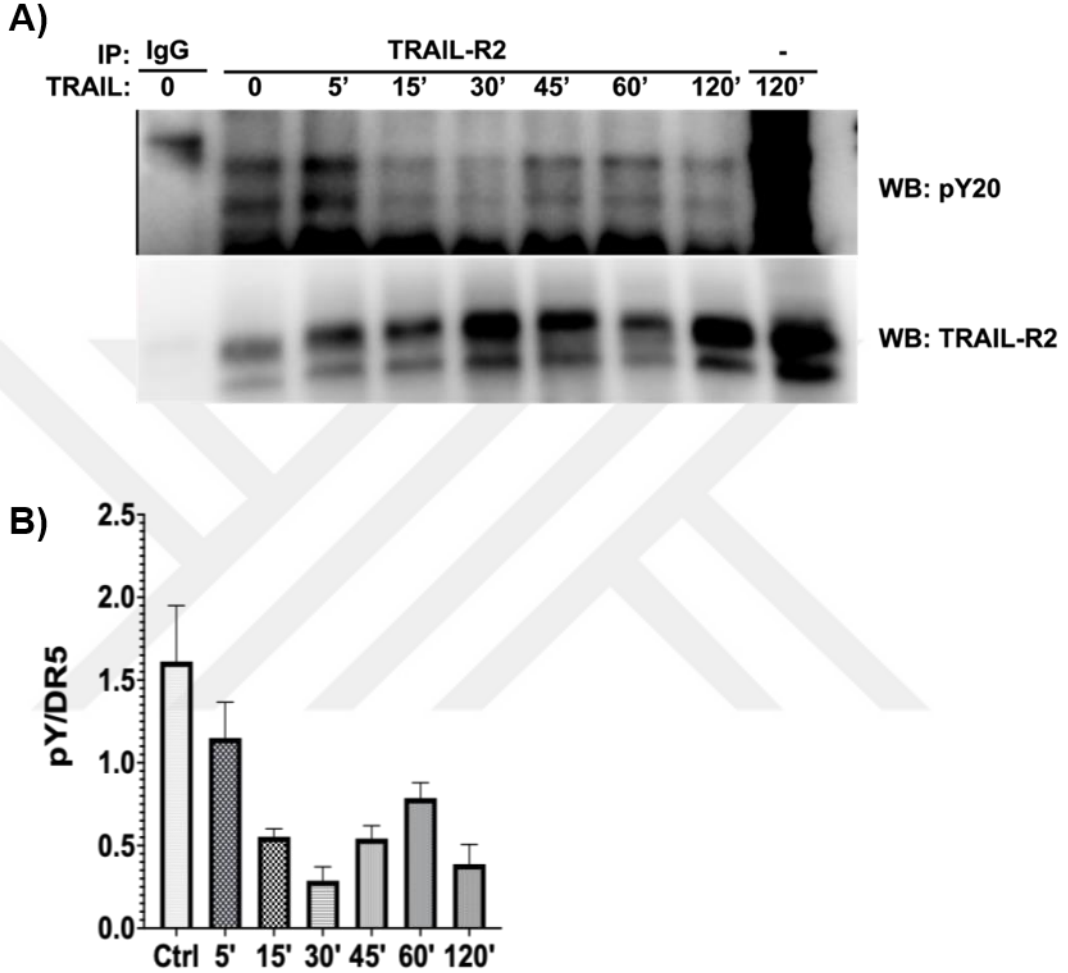
Şekil 4.4. Sodyum ortovanadat ile muamele edilmiş hücrelerde TRAIL muamelesi sonucunda TRAIL-R2'nin tirozin fosforilasyonu

TRAIL-R2 tirozin fosforilasyonunun hem sodyum ortovanadat muamelesi yapılmış hücrelerde, hem de yapılmamış hücrelerde TRAIL muamelesi ile değişimsiz sabit ve belirgin olduğunu gözlemlemiş olmamız, reseptörün sürekli fosforile olduğunu ve bu fosforilasyonun sabit olmasında herhangi bir tirozin fosfatazın dahilinin olmadığını göstermektedir.

4.1.4. Hela Hücre Hattında TRAIL-R2 Tirozin Fosforilasyonunun Gösterilmesi

Bir başka TRAIL dirençli hücre hattı olan Hela' da da TRAIL-R2'nin tirozin fosforile olup olmadığını belirleyebilmek için 0, 15 dakika, 30 dakika, 45 dakika, 60 dakika ve 120 dakika boyunca 10 ng/ml TRAIL ile muamele edilen hücrelerden toplanan lizatlarda TRAIL-R2 immunopresipitasyonu gerçekleştirdik. Elde ettiğimiz çöktürülmüş TRAIL-R2 örneklerini %10 SDS-PAGE'de yürüttükten sonra, western blot ile önce fosfotirozin, ardından ise aynı blotta strip off yaparak TRAIL-R2 işaretlemesi gerçekleştirdik. Şekil 4.5' de gösterildiği üzere, HeLa hücre hattında da

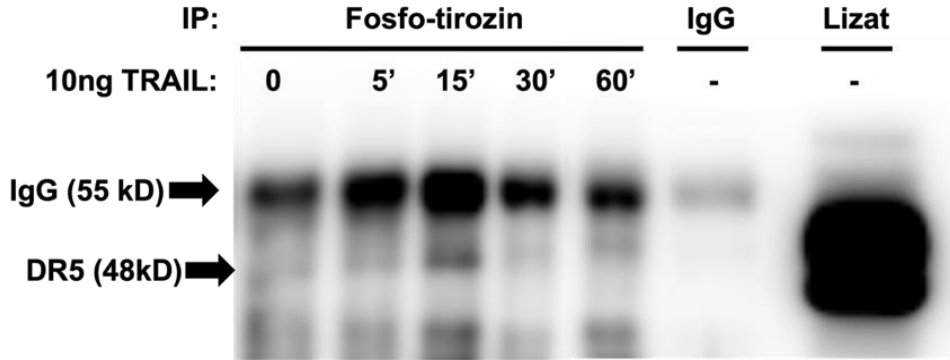
TRAIL-R2 bazal koşullarda (TRAIL muamelesi yapılmamış hücreslerde) fosforile iken, TRAIL muamelesi ile bu fosforilasyonun zamana bağlı olarak azaldığı gözlemledik.



şekil 4.5: 10 ng TRAIL ile muamele edilmiş yabani tip HeLa hücre hattından elde edilen farklı sürelerdeki lizatlarda TRAIL-R2 tirozin fosforilasyonunun gösterilmesi. A) TRAIL-R2 immunopresipitasyonu sonrası fosfotirozin işaretlenmiş, strip off ile daha sonra TRAIL-R2 işaretlenmiştir. İlk kuyucuk immunopresipitasyon negatif kontrolü (IgG ile immunopresipitasyon), son kuyucukta ise işaretleme pozitif kontrolü (immunopresipitasyon yapılmamış hücreli lizat) bulunmaktadır. B) Bağımsız deneylerin sonuçları, ImageJ yazılımı ile analiz edilmiş, pY/DR5 bant intensiteleri TRAIL'siz örneklerde 1 kabul edilerek normalize edilmiştir. Grafik çiziminde, GraphPad prism yazılımından faydalanılmıştır.

Bunun ardından, hücre içi tirozin fosforile proteinleri çöktürerek, gerçekten TRAIL-R2'nin HeLa hücre hattında da fosforile olduğundan emin olmak istedik. şekil 4.6'da da gösterildiği üzere, TRAIL-R2, HeLa hücre hattında da tirozin fosforilasyonuna uğramaktadır. Her ne kadar TRAIL muamelesinin 15. dakikasında maksimum fosforilasyon seviyesine ulaşmış gibi görölse de; TRAIL-R2 bant intensitesini,

yükleme kontrolü olarak IgG bant intensitesine oranladığımızda, aslında TRAIL-R2 tirozin fosforilasyon seviyesinin sabit olduğunu tespit ettik.



Şekil 4.6. 10ng/ml TRAIL ile muamele edilen HeLa hücre hatlarından alınan lizatlarda fosfotirozin immunopresipitasyonu sonrasında TRAIL-R2 western blot işaretlemesi.

TRAIL-R2, iki farklı TRAIL dirençli hücre hattı olan K562 ve HeLa'da da tirozin fosforile olduğu halde, K562 hücre hattında tirozin fosforilasyonu TRAIL muamelesi ile de sabit kalmakta iken, HeLa hücre hattında TRAIL muamelesi ile zamanla azalmakta idi. K562 hücre hattında BCR/Abl füzyon proteinin varlığı nedeniyle Abl başta olmak üzere, birçok tirozin kinaz sürekli aktif olduğundan, Imatinib dirençli hale gelmiş olan K562 hücre hattında ya da BCR/Abl füzyon proteininin susturulduğu K562 hücre hattında da TRAIL-R2'nin tirozin fosforile olup olmadığını incelemek istedik.

4.2. BCR/Abl Nakavt K562 Hücre Hattının Elde Edilmesi

4.2.1. BCR/Abl Genine Yönelik gRNA Tasarımı ve Etkinliğinin Tespiti

Öncelikle BCR/Abl genine yönelik rehber RNA (guide RNA, gRNA) tasarladık. 5'-GTTGTTTCAGATGACCACGGGA-3' gRNA etkinliği CRISPR Efficiency Predictor (<https://www.flyrnai.org/evaluateCrispr/input> , Erişim tarihi: 15 Ocak, 2025) ile tespit ettik (Şekil 4.7).

Identifier	Input Sequence	Input Sequence Length	Analyzed Sequence	Analyzed Sequence Length	Number of Bases Analyzed	Start Index	End Index	Score	Comments	U6 Terminator
1	GTTGTTTCAGATGACCACGGGA	21	GTTGTTTCAGATGACCACGGG	20	20	1	20	5.76694	None	None

Şekil 4.7: Tasarlanan gRNA'nın etkinliğinin tespiti (<https://www.flyrnai.org/evaluateCrispr/input>).

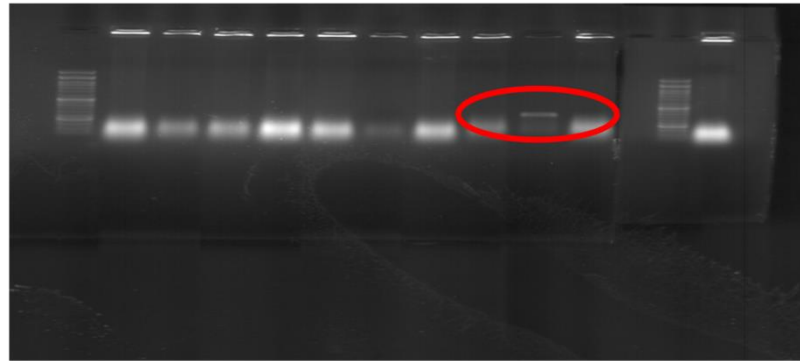
Bu gRNA'nın hedef dışı etkilerinin olup olmadığı ise CRISPR RGEN TOOLS Cas-OFFinder (<http://www.rgenome.net/cas-offinder/>) ile sorguladık. Buna göre, belirlediğimiz etkinliği en yüksek (Şekil 4.7), hedef dışı etkinlik potansiyeli ise en düşük olan gRNA'da 1 ve 2 baz uyumsuzluklu hiç potansiyel hedef yokken, 3 baz uyumsuzluklu sadece bir hedef bulunmaktaydı (Şekil 4.8). Literatürde kullanılan diğer gRNA'larda hedef dışı etkiler daha yüksek olduğu için, bu gRNA ile nakavt deneylerini gerçekleştirmeye karar verdik.

Target Sequence	Bulge Type	Bulge Size	Mismatch	Number of Found Targets
GTTGTTTCAGATGACCACGGGANNRRT	X	0	3	1

Şekil 4.8: Tasarlanan gRNA'nın hedef dışı etkilerinin CRISPR RGEN TOOLS Cas-OFFinder ile tespiti (<http://www.rgenome.net/cas-offinder/>).

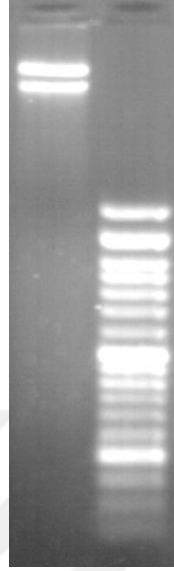
4.2.2. BCR/Abl'ı hedefleyen gRNA'nın Cas9 plazmidine klonlanması

4.2.1 kısmında belirlemiş olduğumuz gRNA dizisini eksprese eden CRISPR/Cas9 plazmidini elde etmek için, gRNA dizisini anlamlı ve zıt-anlamlı oligolar olarak sentezlettik. Yöntemler kısmında anlatıldığı gibi klonlamayı gerçekleştirdikten sonra, klonlama sonucunda elde edilmiş olan kolonilerde yine yöntemlerde anlatıldığı şekilde koloni PZR gerçekleştirdik. 10 ul PZR ürünleri ve 100 baz çiftlik (bc) marker, yükleme tamponu kullanarak kuyulara yükledik. 100 voltta bir saat yürüttükten sonra PopBio Vü UV Transilüminatör cihazı ile görüntülediğimizde, elimizdeki kolonilerden birinde başarılı bir şekilde gRNA'nın klonlandığını belirledik (Şekil 4.9.).



Şekil 4.9: BCR/Abl gRNA klonlaması sonrasında koloni PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntüsü. Kırmızı daire içerisinde gösterilen bant pozitif koloniye göstermektedir.

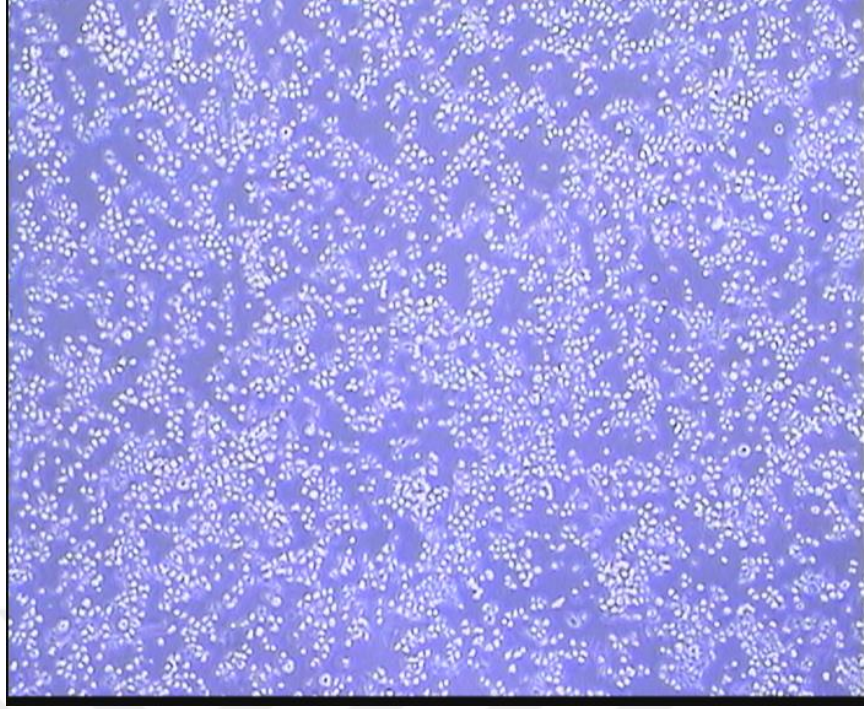
Şekil 4.9’ de pozitif bant veren koloniden mini kültür ve sonrasında midi kültür kurarak plazmid izolasyonu yaptık. Elde ettiğimiz plazmidi agoroz jelde yürüterek doğruladık (Şekil 4.10).



Şekil 4.10: Pozitif bant veren koloniden elde edilen plazmidin agoroz jel ile doğrulanması.

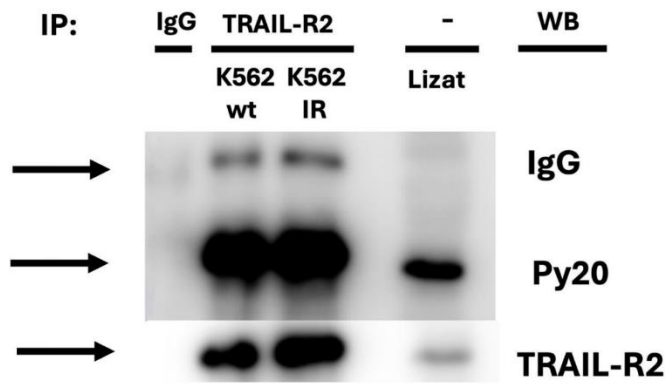
4.3. Imatinib Dirençli K562 Hücre Hattında TRAIL-R2 Tirozin Fosforilasyon Seviyesinin İncelenmesi

Yabanıl tip K562 hücre hattı süspanse halde iken, imatinib dirençli hücre hattı adherent form göstermektedir. 10 uM imatinibe dirençli hücre hattının görüntüsü Şekil 4.11’ de gösterilmiştir.



Şekil 4.11: 10uM imatinibe dirençli K562 hücre hattının mikroskop görüntüsü

Imatinib dirençli ve sürekli imatinib ile muamele edilmekte olan K562 hücre hattında, TRAIL-R2 tirozin fosforilasyon seviyesinin normal K562 hücrelerine göre azalmış olup olmadığını belirlemek için, hem normal K562 hücre hattından hem de imatinib dirençli K562 hücre hattından hücresel lizatları elde ettik. Bu lizatlarda protein konsantrasyonunu belirledikten sonra, TRAIL-R2'yi immunopresipitasyonla çöktürüp fosfotirozin antikoru ile işaretledik. Şekil 4.12'de görüldüğü üzere, hipotezimizin aksine, imatinib dirençli K562 hücre hattında TRAIL-R2 tirozin fosforilasyonu azalmamakta, normal K562 hücre hattı ile aynı seviyede gözlemlenmekteydi.

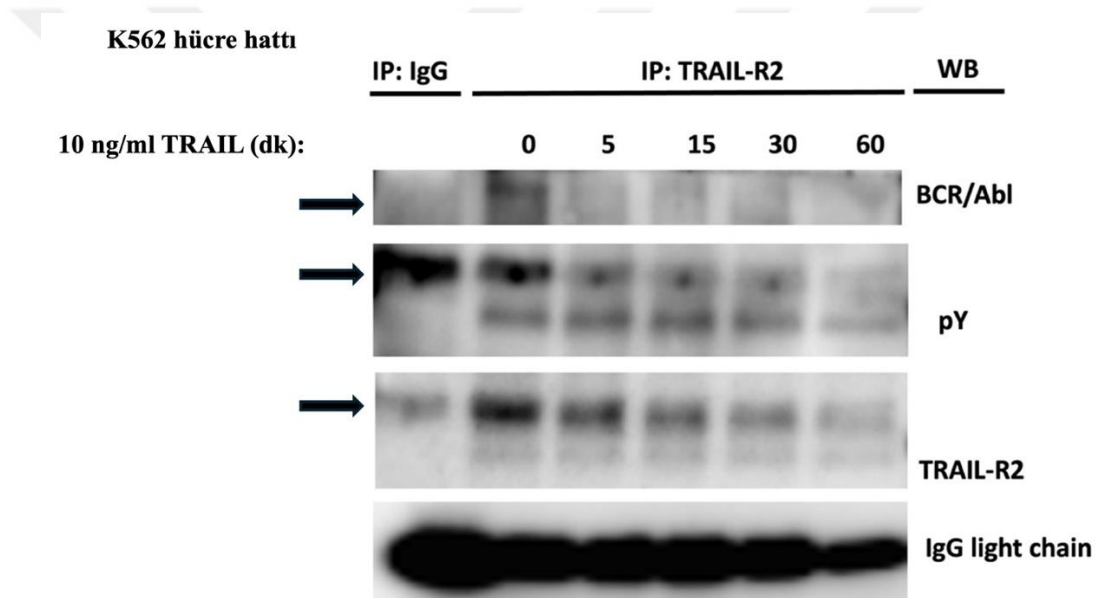


Şekil 4.12: Imatinib Dirençli K562 hücre hattında TRAIL-R2 tirozin fosforilasyon seviyesi

4.4. TRAIL-R2'ye Bağlanan Tirozin Kinazların Belirlenmesi

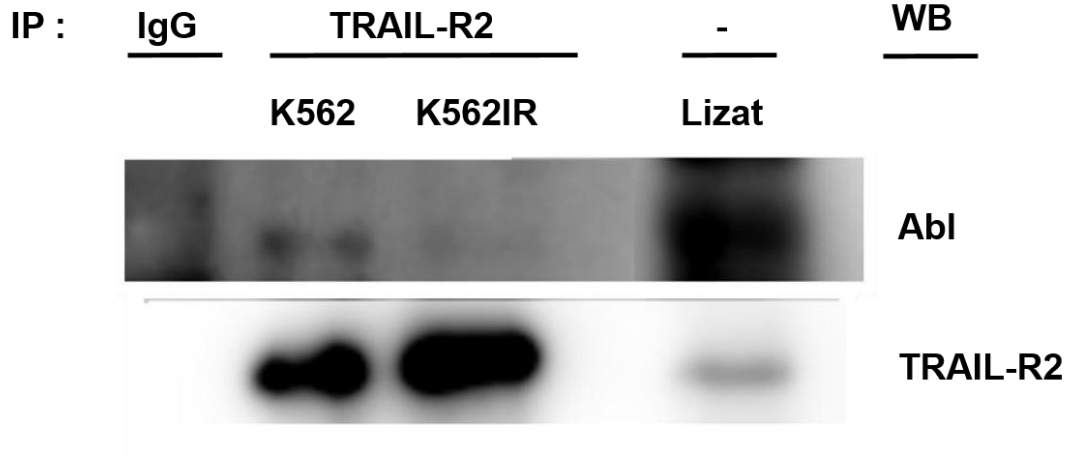
4.4.1. K562 Hücre Hattında TRAIL-R2'ye Bağlanan Tirozin Kinazların Belirlenmesi

Sürekli (constitutive) tirozin fosforilasyonu gözlemlediğimiz K562 hücre hattından elde ettiğimiz TRAIL-R2 immunopresipitatlarında Bcr, c-src, Jak2 tirozin kinaz antikorları ile işaretleme yapılarak hangi tirozin kinazların TRAIL-R2 ile bir protein kompleksi içerisinde olduğunu sorguladık. Şekil 4.13'e göre TRAIL-R2, henüz TRAIL muamelesi yapılmadığında Bcr/Abl füzyon proteini ile fiziksel etkileşim halinde olduğunu; TRAIL muamelesi sonrasında ise özellikle 15. dakikadan sonra bağlantının zayıfladığını tespit ettik.



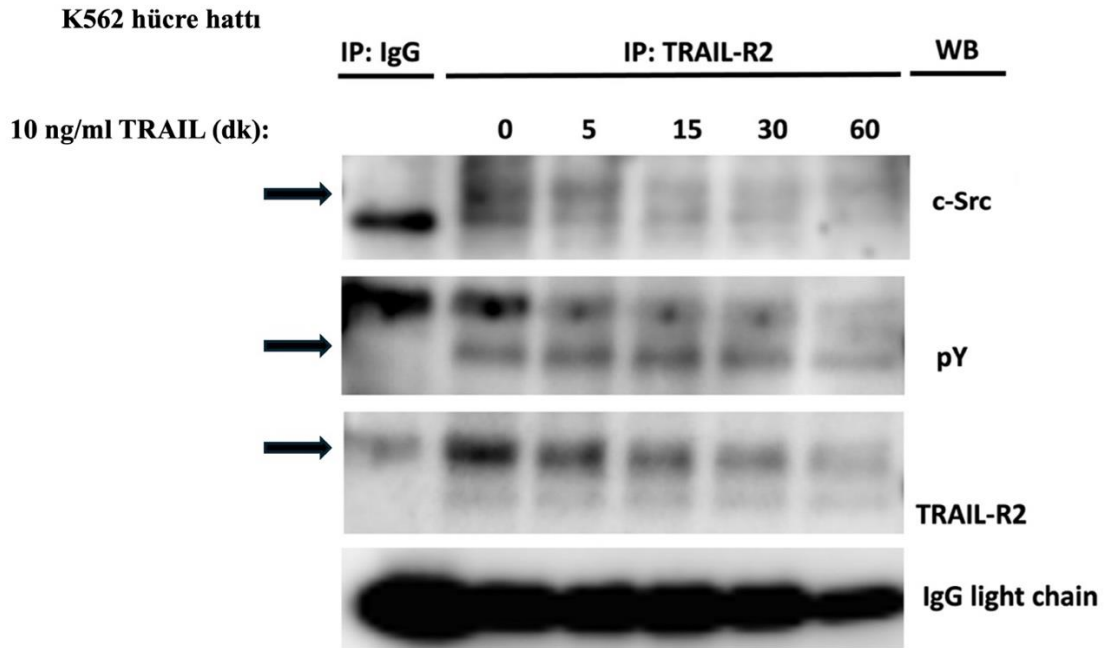
Şekil 4.13: K562 hücre hattı TRAIL-R2 immunopresipitatlarında BCR/Abl füzyon protein. 10 ng TRAIL ile muamele edilmiş hücrelerden elde edilen lizatlarda TRAIL-R2 immünopresipitatlarında BCR, pY ve TRAIL-R2 western blot işaretlemesi gerçekleştirilmiştir.

K562 hücre hattında, BCR/Abl füzyon proteini ile TRAIL-R2 etkileşimini göstermiş olduğumuz için, TRAIL-R2 ile Abl arasındaki etkileşimin, imatinib dirençliliği gelişmiş K562 hücre hattında nasıl etkilendiğini sorguladık. Bunun için, yabanıl tip K562 hücre hattı ve Imatinib dirençli K562 hücre hattından topladığımız hücresel lizatlarda, TRAIL-R2 immunopresipitasyonu yapıp TRAIL-R2 western blot gerçekleştirdik. Beklediğimiz gibi, Imatinib ile sürekli muamele edilerek Imatinib dirençli hale gelmiş K562 hücre hattında, TRAIL-R2 ve Abl arasındaki fiziksel etkileşimin zayıfladığını gözlemledik (Şekil 4.14).



Şekil 4.14: K562 ve Imatinib dirençli K562 hücrelerinde TRAIL-R2 ve Abl arasındaki fiziksel etkileşimin mukayesesi

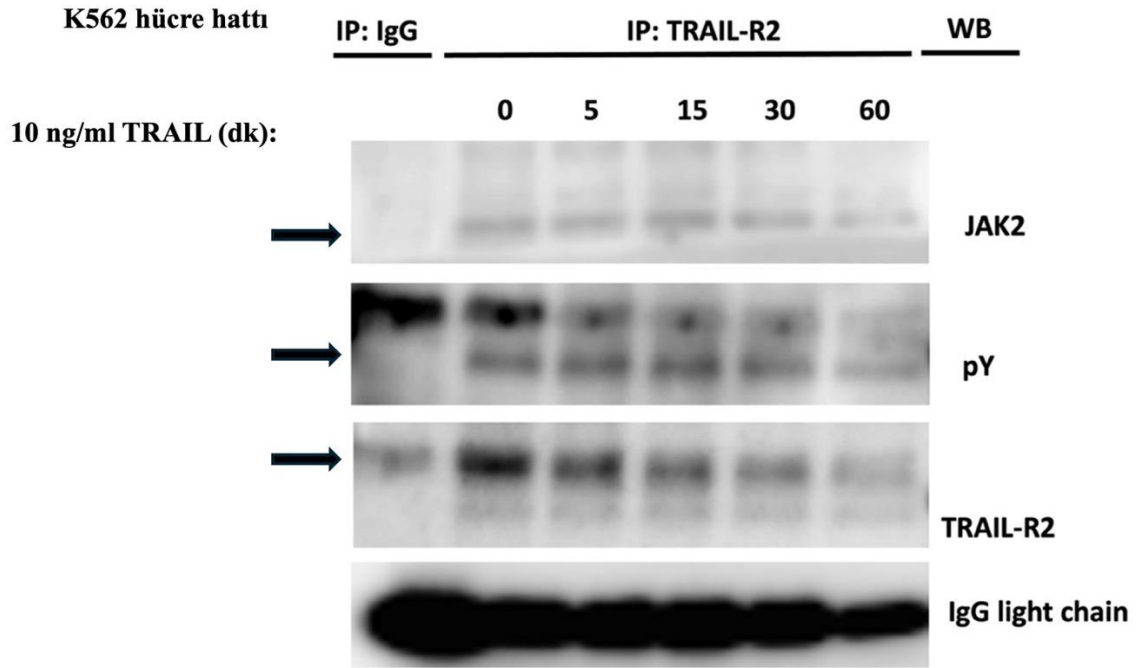
Benzer şekilde, yine TRAIL ile muamele edilmemiş hücrelerde TRAIL-R2'nin, c-Src ile de bir kompleks halinde olduğunu ve TRAIL muamelesinden sonra ise c-Src bağlantısının zayıfladığını gösterdik (Şekil 4.15).



Şekil 4.15: K562 hücre hattında TRAIL-R2 immunopresipitatlarında c-Src işaretlemesi. 10 ng TRAIL ile muamele edilmiş hücrelerden elde edilen lizatlarda TRAIL-R2 immünopresipitatlarında c-Src, pY ve TRAIL-R2 western blot işaretlemesi.

TRAIL-R2 tirozin fosforilasyonundan sorumlu olabilecek olası bir diğer tirozin kinaz da JAK2 olduğu için, TRAIL-R2 ve JAK2 arasında bir fiziksel etkileşim olup

olmadığını da sorguladık. TRAIL-R2, c-Src gibi, JAK2 ile de sürekli fiziksel etkileşim halindeydi (Şekil 4.16).

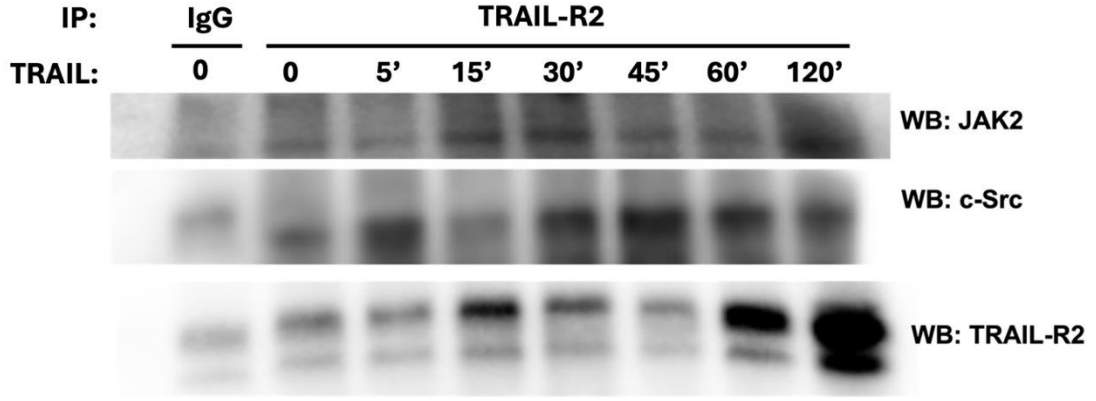


Şekil 4.16: K562 hücre hattında, TRAIL-R2 ve JAK2 fiziksel olarak aynı kompleksin içindedir. 10 ng TRAIL ile muamele edilmiş hücrelerden elde edilen lizatlarda TRAIL-R2 immünopresipitatlarında JAK2, pY ve TRAIL-R2 western blot işaretlemesi gerçekleştirilmiştir

Elde edilen veriler ışığında, K562 hücre hattında TRAIL-R2'nin c-Src, JAK2 ve Abl ile aynı protein kompleksinde bulunduğunu, bunlardan Abl'ın (BCR/Abl füzyon proteini) TRAIL muamelesini takiben kompleksten ayrıldığını tespit ettik.

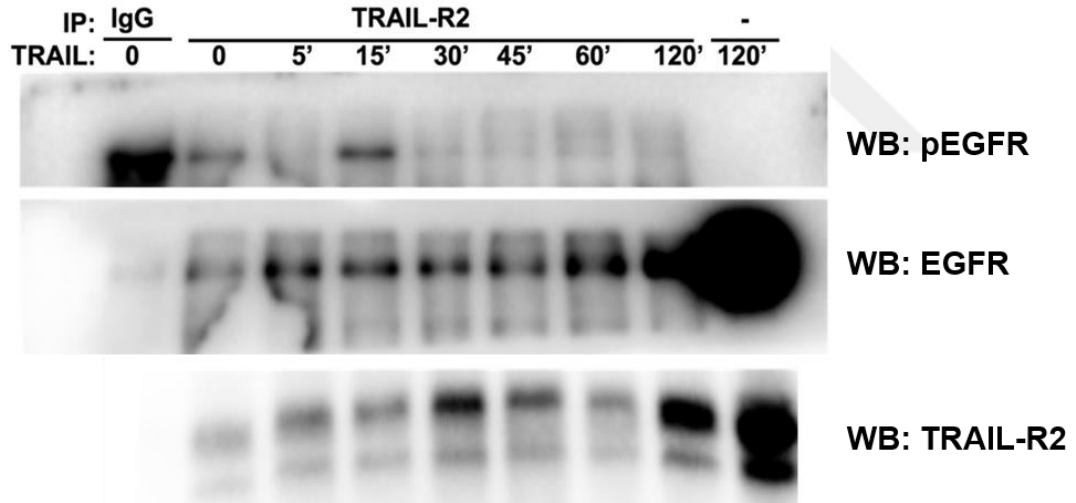
4.4.2. HeLa Hücre Hattında TRAIL-R2'ye Bağlanan Tirozin Kinazların Belirlenmesi

HeLa hücre hattında da TRAIL-R2'nin tirozin fosforilasyonundan sorumlu kinazın belirlenmesi için, farklı süreler boyunca TRAIL ile muamele edilmiş HeLa hücrelerinden aldığımız lizatlarda gerçekleştirdiğimiz TRAIL-R2 immunopresipitasyonunda JAK2, c-Src, EGFR ve p-EGFR antikorları ile işaretleme yaptık. Şekil 4.17'ye göre TRAIL-R2, hem c-Src, hem de JAK2 ile fiziksel etkileşime girmektedir.



Şekil 4.17: HeLa hücre hattında TRAIL-R2 immunopresipitasyonunda JAK2 ve c-Src western blot işaretlemeleri.

Bu enzimler tirozin fosforilasyonu ile aktif hale geldiklerinden, TRAIL-R2'nin bu enzimlerden hangisinin aktif formuyla ve hangi zaman diliminde etkileşime girdiğinin tespiti için EGFR'ın aktif formu olan p-EGFR ile TRAIL-R2 immunopresipitatlarda p-EGFR western blot işaretlemesi gerçekleştirdik.



Şekil 4.18: HeLa hücre hattında TRAIL-R2 immunopresipitasyonunda EGFR'ın aktif formunun TRAIL-R2 kompleksindeki varlığının tespiti.

Şekil 4.18'de de görülebildiği üzere, TRAIL-R2 protein kompleksinde JAK2 ve c-Src'ın yanı sıra, EGFR da bulunmaktadır. Bu enzimler tirozin fosforilasyonu ile aktif hale geldiklerinden, TRAIL-R2'nin bu enzimlerden hangisinin aktif formuyla ve hangi zaman diliminde etkileşime girdiğini tespit etmek için EGFR'ın aktif formu olan p-EGFR ile TRAIL-R2 immunopresipitatlarda p-EGFR western blot işaretlemesi gerçekleştirdik. Şekil 4.18'e göre ilk 15 dakika EGFR aktif olmakta, daha sonra

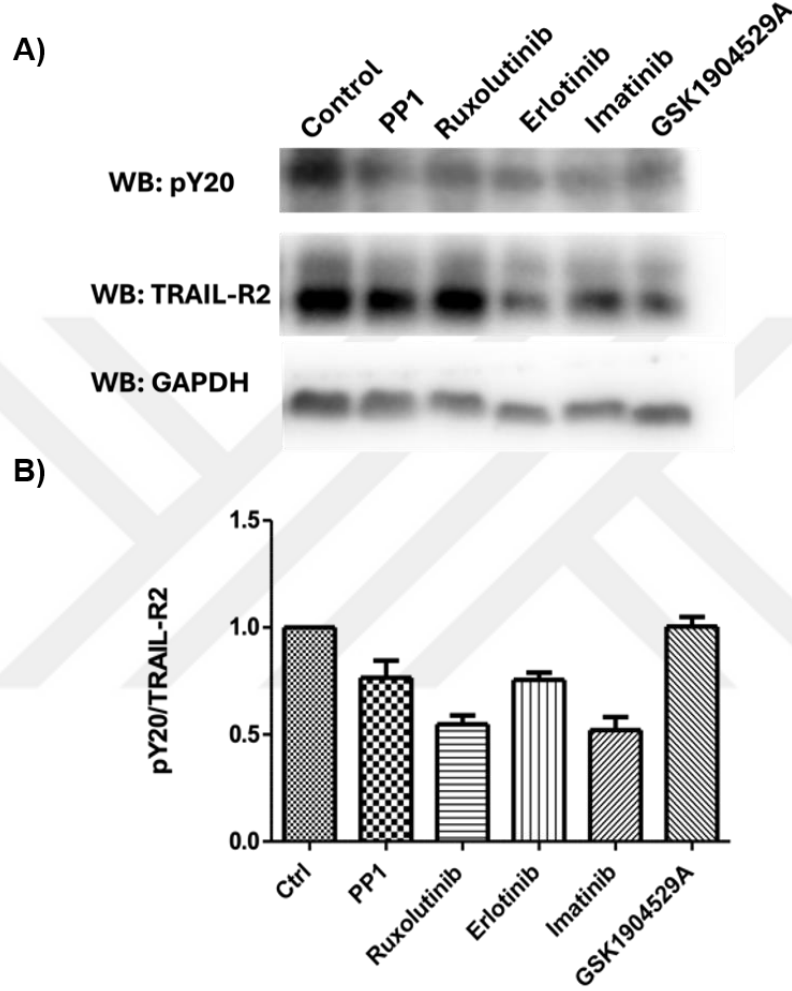
defosforile olmaktadır. Yine 15. dakikada EGFR aktif formunda iken, c-Src ise defosforile halde olup daha sonra yeniden fosforile olmaktadır.

4.5. Tirozin Kinaz İnhibitörlerinin TRAIL-R2 Tirozin Fosforilasyonuna Etkilerinin Belirlenmesi

4.5.1. K562 Hücre Hattında Tirozin Kinaz İnhibitörlerinin TRAIL-R2 Tirozin Fosforilasyon Seviyesine ve TRAIL-R2 Ekspresyon Seviyesine Etkilerinin Western Blot ile Belirlenmesi

K562 hücre hattında, BCR/Abl füzyon proteini nedeniyle Abl tirozin kinaz aktivitesi süreklilik gösterir (Sampaio ve ark., 2021). Bu sebeple, TRAIL-R2 tirozin fosforilasyonunda akla gelen ilk şüpheli Abl olsa da, imatinib dirençli ve bu nedenle de sürekli Imatinib ile muamele edilen hücrelerde de TRAIL-R2'nin tirozin fosforile olduğunu gözlemlemiş olmamız, diğer olası kinazların da göz önüne alınmasını gerekli kılmaktadır. Öte yandan, TRAIL-R2 tirozin fosforilasyonunu hem K562 hem de HeLa hücre hattında gözlemlemiş olduğumuz için, her iki hücre hattında da aktivitesi yüksek olan kinazları daha olası şüpheliler haline getirmektedir. K562 hücre hattında, Abl'ın yüksek aktivitesi sebebiyle, JAK1/2 ve c-Src da genellikle aktif durumdadır (de Groot ve ark., 1999; A. Samanta ve ark., 2011; Fahmideh ve ark., 2022). Bu durum, Src ve JAK protein ailelerini de TRAIL tirozin fosforilasyonuna yol açan potansiyel şüpheliler arasına yerleştirmektedir. TRAIL-R2 ile aynı protein ailesine mensup olan Tümör Nekroz Faktör Reseptör-1 (TNFR1)'in, JAK2, c-Src ve EGFR tarafından fosforile edilebildiği gösterilmiştir (Chakrabandhu ve ark., 2016; Ta ve ark., 2018; Hapil Zevkliler ve ark., 2024; Nam ve ark., 2024). Yine aynı protein ailesine ait olan bir diğer ölüm reseptörü Fas'ın da c-Src ve EGFR tarafından tirozin fosforilasyonuna uğratıldığı bilinmektedir (Chakrabandhu ve ark., 2016; Ta ve ark., 2018; Hapil Zevkliler ve ark., 2024; Nam ve ark., 2024). Bu nedenle, TRAIL-R2'nin tirozin fosforilasyonundan da c-Src ve EGFR sorumlu olabilir. Olası tirozin kinaz listesinin kalabalık olmasından dolayı, biz çalışmamızda TRAIL-R2 tirozin fosforilasyonunun, olası tirozin kinazların inhibitörlerinin varlığından nasıl etkilendiğini belirleyerek, sorumlu tirozin kinazı ortaya çıkartabilmeyi hedefledik. Bunun için, PP1 (Src inhibitörü), Ruxolutinib (Jak1/2 inhibitörü), Erlotinib (EGFR inhibitörü), İmatinib Mesilat (c-kit, abl inhibitörü) ve GSK1904529A (IGFR ve insülin reseptör inhibitörü) tirozin kinaz inhibitörleriyle muamele ettiğimiz hücrelerden elde ettiğimiz lizatları SDS PAGE ile yürütüp western blot analizini gerçekleştirdik. Şekil 4.19' da

Ruxolutinib ve İmatinib ile muamele olan hücrelerde, TRAIL-R2 tirozin fosforilasyonunun kontrol hücrelere göre anlamlı şekilde engellediğini belirledik. İlginç bir şekilde, Erlotinib ve GSK1904529A muamelesi, K562 hücre hattında TRAIL-R2 ekspresyon seviyesinde de gözle görülür bir azalmaya yol açıyordu (Şekil 4.19)



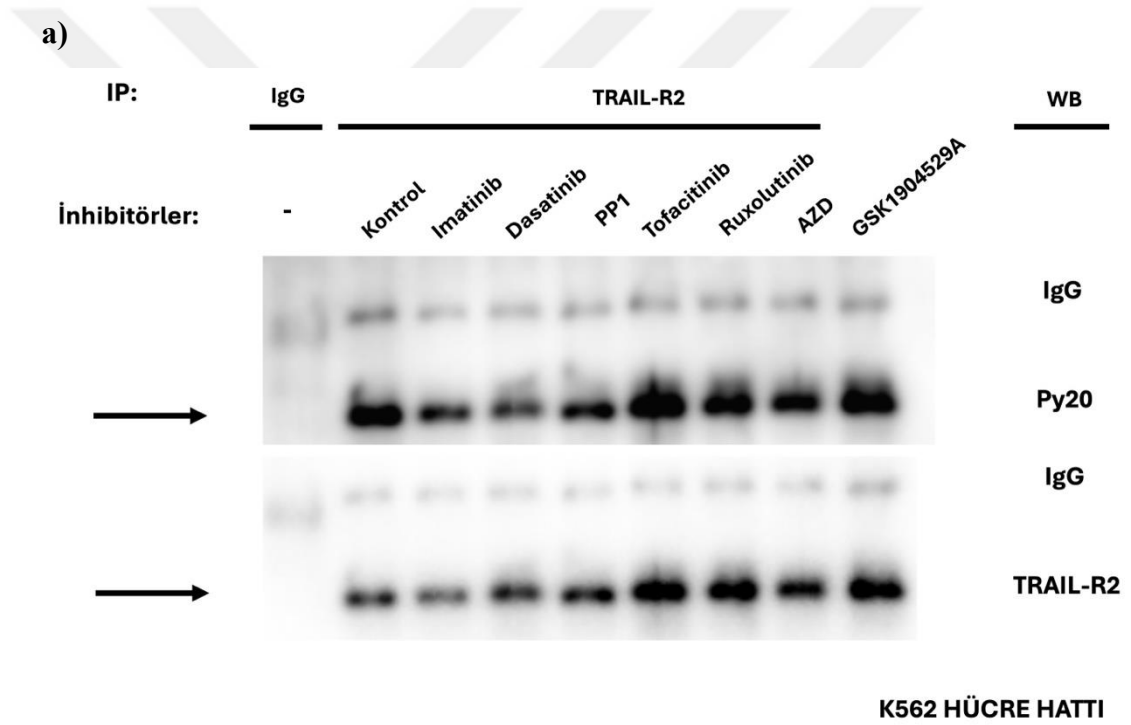
Şekil 4.19: Tirozin kinaz inhibitörlerinin K562 hücre hattında TRAIL-R2 tirozin fosforilasyonuna etkisinin belirlenmesi. a) PP1, Ruxolutinib, Erlotinib, İmatinib ve GSK1904529A ile muamele edilen hücrelerden elde edilen lizatlarda western blot sonrası fosfotirozin, TRAIL-R2 ve GAPDH işaretlemeleri. b) Bağımsız deneylerin sonuçları, ImageJ yazılımı ile analiz edilmiş, pY20/TRAIL-R2 bant intensiteleri TRAIL'siz örneklerde 1 kabul edilerek normalize edilmiştir. Grafik çiziminde, GraphPad prism yazılımından faydalanılmıştır.

4.5.2. K562 Hücre Hattında Tirozin Kinaz İnhibitörlerinin TRAIL-R2 tirozin fosforilasyon seviyesine Etkilerinin İmmunopresipitasyonla Belirlenmesi

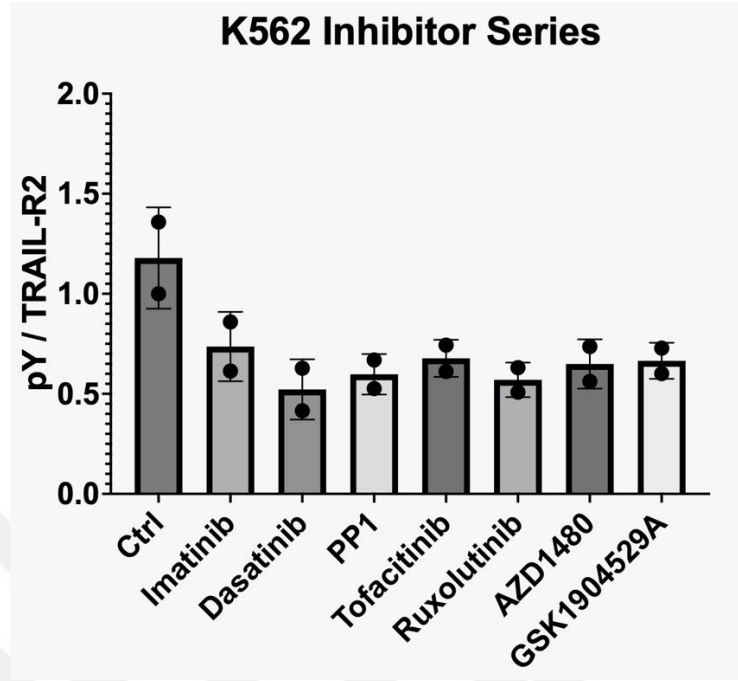
TRAIL-R2 tirozin fosforilasyonunun sorumlu tirozin kinazı belirleyebilmek amacıyla, bazal durumda da tirozin fosforilasyonunu bariz gözlemlediğimiz K562

hücre hattını, Imatinib Mesilat (Abl inhibitörü), Dasatinib (Src ve Abl inhibitörü), PP1 (Src inhibitörü), Tofacitinib (JAK1 inhibitörü), Ruxolutinib (JAK2 inhibitörü), AZD1480 ve GSK1904529A (IGFR ve insülin reseptör inhibitörü) ile muamele ettik. Tirozin kinaz inhibitörleri ile 2 saat muamele sonrasında topladığımız lizatlarda TRAIL-R2 immunopresipitasyonu sonrasında fosfotirozin işaretleme gerçekleştirdik.

Şekil 4.20’ de görüldüğü üzere, hem Src hem de Abl inhibitörü olan Dasatinib en fazla inhibisyonu göstermesinin yanı sıra, PP1 (Src inhibitörü) ve Ruxolutinib (Jak1/2 inhibitörü) de TRAIL-R2 fosforilasyonunu azaltmaktadır.



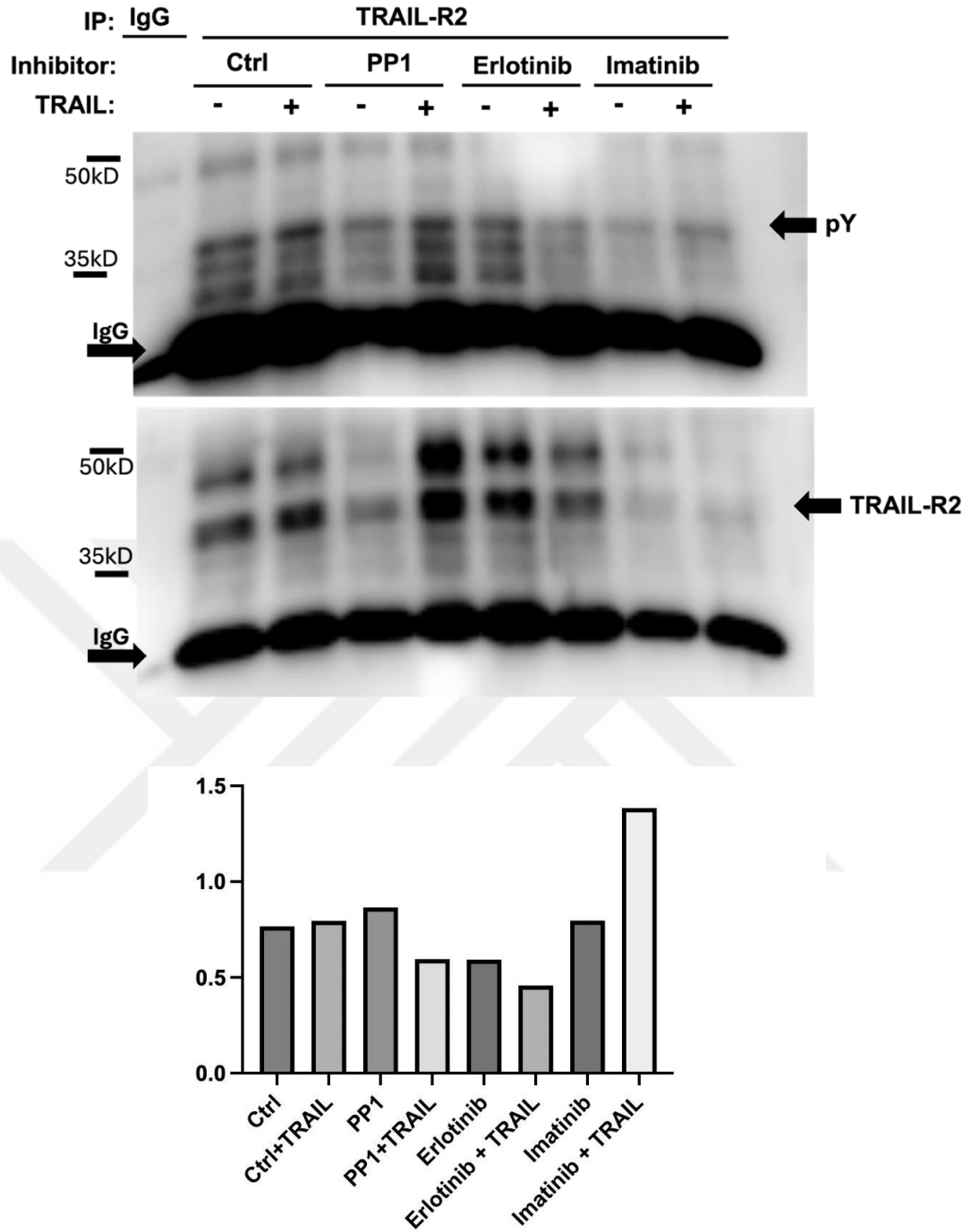
b)



Şekil 4.20: Tirozin Kinaz inhibitörlerinin K562 hücre hattında TRAIL-R2 tirozin fosforilasyonuna etkilerinin incelenmesi. a) Imatinib, Dasatinib, PP1, Tofacitinib, Ruxolutinib, AZD ve GSK1904529A ile muamele edilen hücrelerden elde edilen lizatlarda gerçekleştirilen TRAIL-R2 immünopresipitasyonu sonrası fosfotirozin işaretlemesi. b) Bağımsız deneylerin sonuçları, ImageJ yazılımı ile analiz edilmiş, pY20/TRAIL-R2 bant intensiteleri TRAIL'siz örneklerde 1 kabul edilerek normalize edilmiştir. Grafik çiziminde, GraphPad prism yazılımından faydalanılmıştır.

4.5.3. HeLa Hücre Hattında Tirozin Kinaz İnhibitörlerinin TRAIL-R2 Tirozin Fosforilasyon Seviyesine Etkilerinin İmmünopresipitasyonla Belirlenmesi

HeLa hücre hattında tirozin kinaz inhibitörlerinin TRAIL-R2 tirozin fosforilasyonuna etkilerini belirleyerek TRAIL-R2 tirozin fosforilasyonundan sorumlu muhtemel kinazın belirlenebilmesi için, hücreleri farklı inhibitörlerle 1 saat 15 dakika muamele ettik. Bunun ardından, bu hücrelerden TRAIL muamelesi yapılmaksızın ya da 45 dakika 10ng/ml TRAIL ile muamele ederek (bütün hepsinde inhibitörlerle toplam muamele süresi 2 saat olacak şekilde) hücresel lizatları topladık. Elde ettiğimiz hücresel lizatlarda, TRAIL-R2 immünopresipitasyonu yapıp ardından fosfotirozin işaretlemesi gerçekleştirdik.



Şekil 4.21: PP1, Erlotinib ve Imatinib mesilat ile muamele edilen hücrelerde TRAIL-R2 immunopresipitasyonu sonrasında Fosfotirozin (üst blot) ve TRAIL-R2 (alt blot) işaretlemesi. Yükleme eşitliğinin görünebilir olması için IgG hafif zincir görüntüsü kırılmadan verilmiştir. Fosfotirozin bant intensiteleri ve TRAIL-R2 bant intensiteleri ImageJ yazılımı ile hesaplandıktan sonar, GrapPad Prizm yazılımı ile grafik haline getirilmiştir.

Şekil 4.21’de görüldüğü gibi, Imatinib muamelesi, K562 hücre hattında olduğu gibi HeLa hücre hattında da TRAIL-R2 protein miktarını düşürmüştü. Fakat protein miktarı düştüğü halde, tirozin fosforilasyon miktarını protein miktarına oranladığımızda, kalan proteinlerin tirozin fosforilasyonunun aslında kontrole göre azalmamış olduğunu – hatta hafifçe artmış olduğunu- gözlemledik. Öte yandan, c-Src inhibitörü olan PP1 ile muamele edilen hücrelerde, TRAIL muamelesi sonrasında TRAIL-R2 tirozin fosforilasyonu biraz azalmakta, Erlotinib muamele hücrelerde ise hem bazal koşullarda hem de TRAIL muamelesi sonrasında TRAIL-R2 tirozin fosforilasyonu kontrol hücrelere göre daha düşük gözlemlenmekteydi. Yine de bu tirozin kinazların hiçbiri, TRAIL-R2 tirozin fosforilasyonunu tamamen engellememiştir.

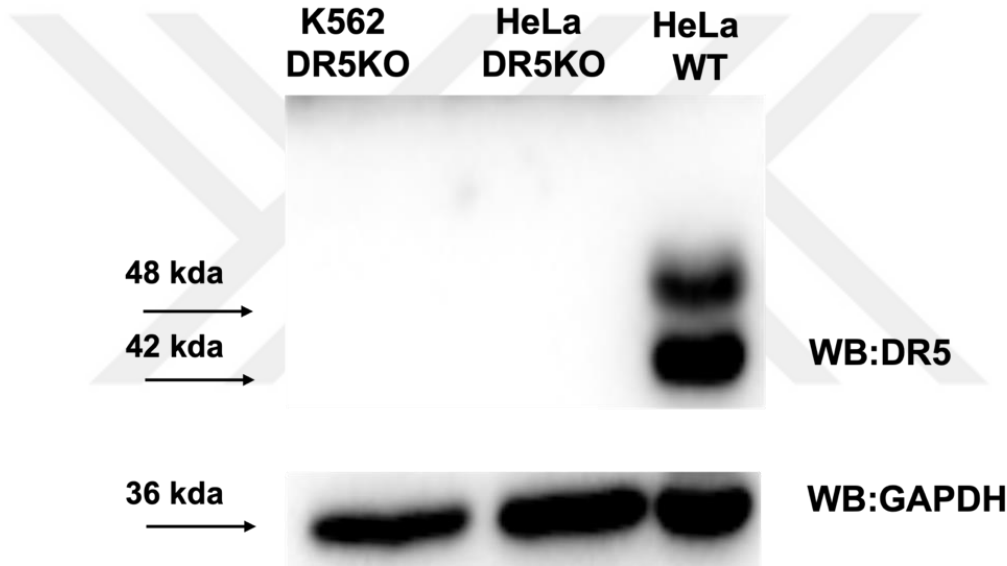
4.6. TRAIL-R2 Tirozin Fosforilasyonunu Engelleyen ve Taklit Eden Mutantları Eksprese Eden K562 ve HeLa Hücre Hatlarının Elde Edilmesi

TRAIL-R2 fosforilasyonunun TRAIL sinyal iletimine ve hücre biyolojisine etkilerini inceleyebilmek için, tez projemizde çalıştığımız TRAIL dirençli hücre hatlarındaki TRAIL-R2 proteinlerini, tirozin fosforilasyonunu –tirozin aminoasidinin halkalı yapısını dolayısıyla da boyutunu bozmaksızın- engelleyen fenilalanin (F) ve tirozin fosforilasyonunu negatif yükü sayesinde taklit eden aspartik asit (D) ile değiştirdik. Bunun için öncelikle, hücre içi endojen TRAIL-R2 ekspresyonunu CRISPR/Cas9 genom düzenleme yöntemi ile nakavt ettik, ardından ise oluşturmuş olduğumuz TRAIL-R2 Y383D ve Y383F mutantlarını eksprese eden lentiviral vektörler ile bu hücreleri transdükte ettik. Transdükte hücrelerin seçilimi sonrasında ise, bu hücrelerden tek hücre kolonileri oluşturup lentiviral vektörü eşit kopya sayısında almış kolonileri seçtik. Sonrasında bu kolonilerde, TRAIL-R2 transkript seviyelerinin eşit olduğunu doğrulayarak, mutant TRAIL-R2 kodlayan dizilerin, benzer transkripsiyonel aktivasyon seviyesinde bölgelere girdiğinden emin olduk.

4.6.1. TRAIL-R2 nakavt K562 ve HeLa Hücre Hatlarının Elde Edilmesi

TRAIL-R2’nin fosforilasyonunu taklit eden ve engelleyen mutantların ekspresyonunu sağlattığımız zaman, endojen TRAIL-R2’nin arka plan etkisinin verilerimizi etkilememesi için, öncelikle HeLa ve K562 hücre hatlarında endojen TRAIL-R2 ekspresyonunu ortadan kaldırmamız yani nakavt hücreler elde etmemiz gerekmektedir. Bunun için, HeLa ve K562 hücre hatlarını, CRISPR/Cas9 yöntemi ile, TRAIL-R2’nin ilk ekzonuna yönelik gRNA ve Cas9 kodlayan plazmidlerle transfekte

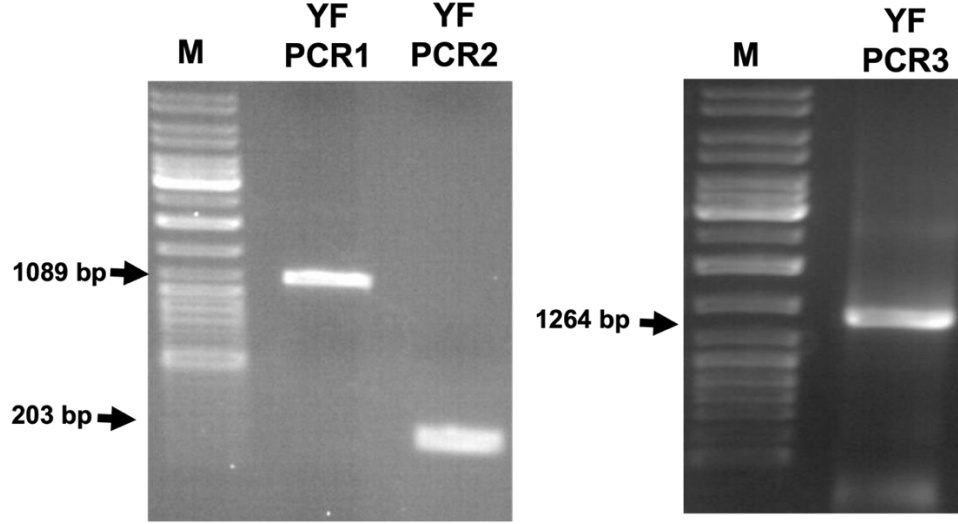
ettik. Transfeksiyon serisi sonrasında nakavt hücre hattı elde ettiğimizi doğrulamak için hem yabancı tip hem de TRAIL-R2 nakavt olduğunu düşündüğümüz hücrelerden western blot için lizat alındıktan sonra 50 ug olacak şekilde konsantrasyonları ayarladık ve %7'lik SDS PAGE ile lizatları yürütüp gece boyu ıslak transferini gerçekleştirdik. TRAIL-R2 antikoru ve ona uygun sekonder antikor ile işaretlemesini yaptık ve görüntüledik. Hem HeLa hem K562 hücrelerimiz nakavt olmuş görünüyordu. GAPDH' lerinin de eşit olduğunu gördükten sonra bu hücre hatlarında TRAIL-R2'yi nakavt ettiğimizi göstermiş olduk (Şekil 4.22). Bu blot'larda, görüntüleme süresi ne kadar uzun tutulursa tutulsun, nakavt kuyucuklarda DR5 ekspresyonu gözlemlenmiyordu.



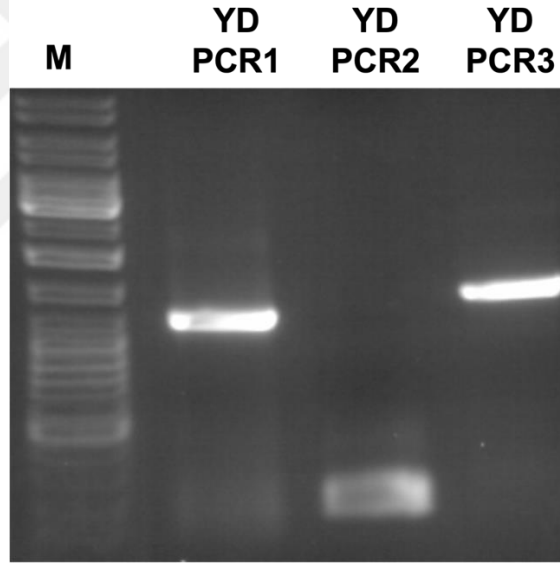
Şekil 4.22: K562 ve HeLa hücre hattında DR5 geninin nakavt (ko) edildiğinin western blot yöntemi ile doğrulanması.

4.6.2. TRAIL-R2 Tirozin Fosforilasyonunu Taklit Eden ve Engelleyen Mutantlarının Oluşturulması ve Doğrulanması

TRAIL-R2 açık okuma çerçevesinde, 383'ncü aminoasidi kodyalan TAC kodonunun, aspartik asit (D) kodlayan GAC ve fenil alanin (F) kodlayan TTC dizileri ile değiştirilmesi için, yöntemler kısmında anlatıldığı şekilde SOEing polimeraz zincir reaksiyonlarını kurduk. Y383D ve Y383F mutantlarını kodlayan vektörlerin üretimi için gerekli PZR ürünlerini 1080 baz çifti ve 203 baz çifti uzunluğunda elde ettikten sonra bunların birleştirilmesiyle 1264 baz çifti uzunluğunda mutant PZR ürünlerini elde ettik (Şekil 4.23 ve Şekil 4.24).

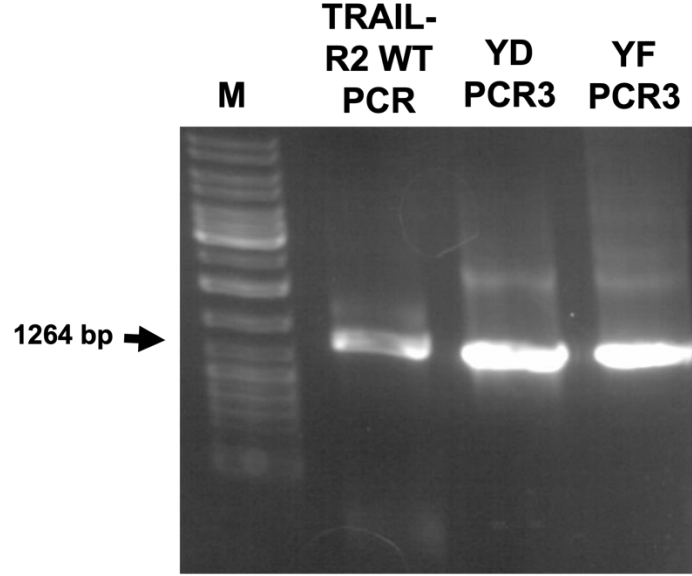


Şekil 4.23: Y383F TRAIL-R2 fragmenti elde edilirken yapılan PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü. Solda 1089 ve 203bp uzunluğundaki fragmentler, sağda ise bunların birleştirilmesi ile elde edilen 1264bp uzunluğundaki fragment görülmektedir.



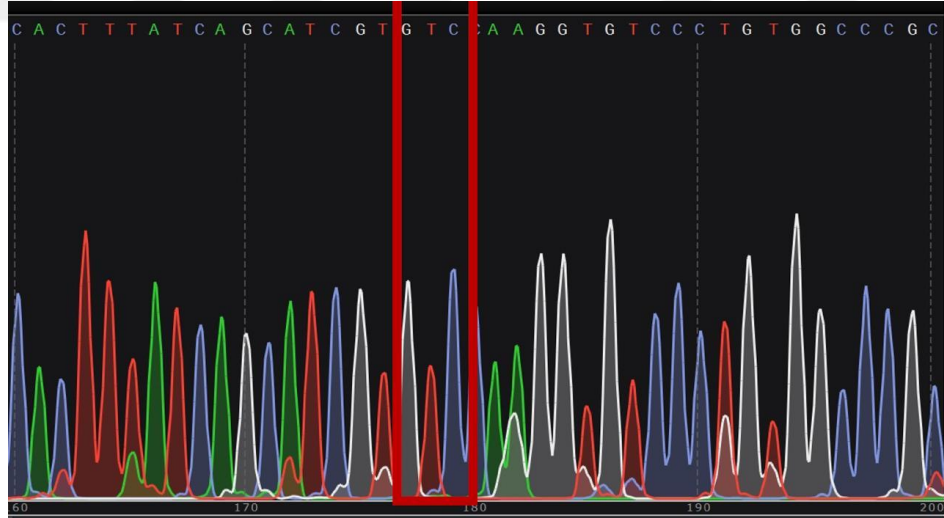
Şekil 4.24: Y383D TRAIL-R2 fragmenti elde edilirken yapılan PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.

Mutagenез yapılmış olduğunu umduğumuz PZR3 ürünlerini elde ettikten sonra, bu ürünleri PZR purifikasyon kiti ile saflaştırdık. N174-MCS iskeletini ve bu ürünleri de EcoRI ve NotI enzimleri ile kestikten sonra, 1:3 vektör:iskelet oranında bir reaksiyon karışımı kurduk. Ligasyon ürünlerini Stbl3 kompetan bakterilere transforme ettik ve ertesi gün elde edilen kolonilerden TRAIL-R2 PZR' si gerçekleştirdik (Şekil 4.24).

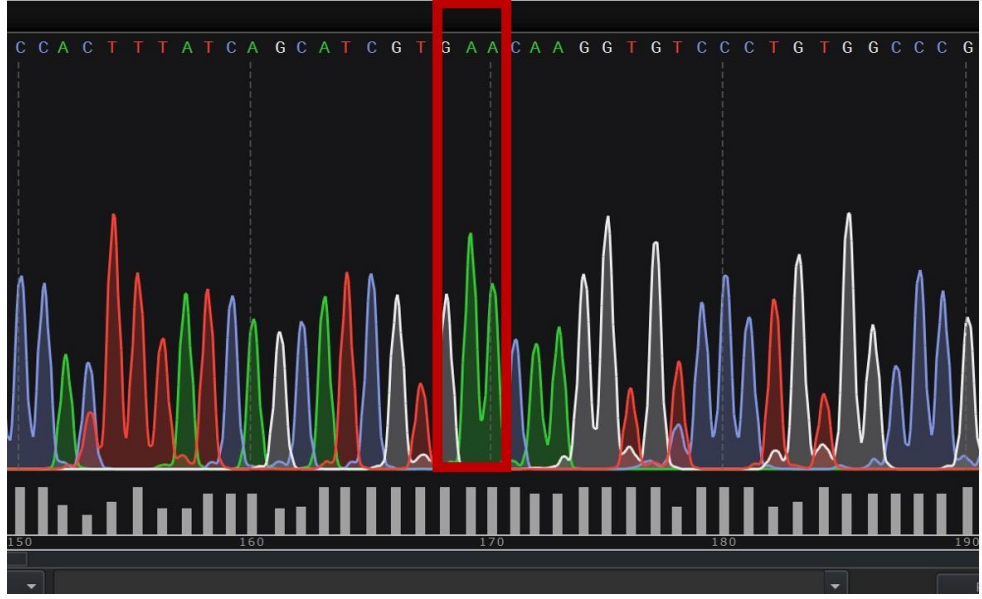


Şekil 4.25: Yabancı tip TRAIL-R2, TRAIL-R2 Y383D ve Y383F mutantlarının klonlanmış olduğu plazmidlerle transforme kolonilerde elde edilen TRAIL-R2 PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü. (Sekans analizi için bu PZR ürünleri gönderilmiştir)

Daha sonra Bu PZR ürünlerinden hizmet alımı ile Sanger sekanslama gerçekleştirdik. Y383D ve Y383F mutantlarını oluşturduğumuzu doğruladık (Şekil 4.25 ve 4.26).

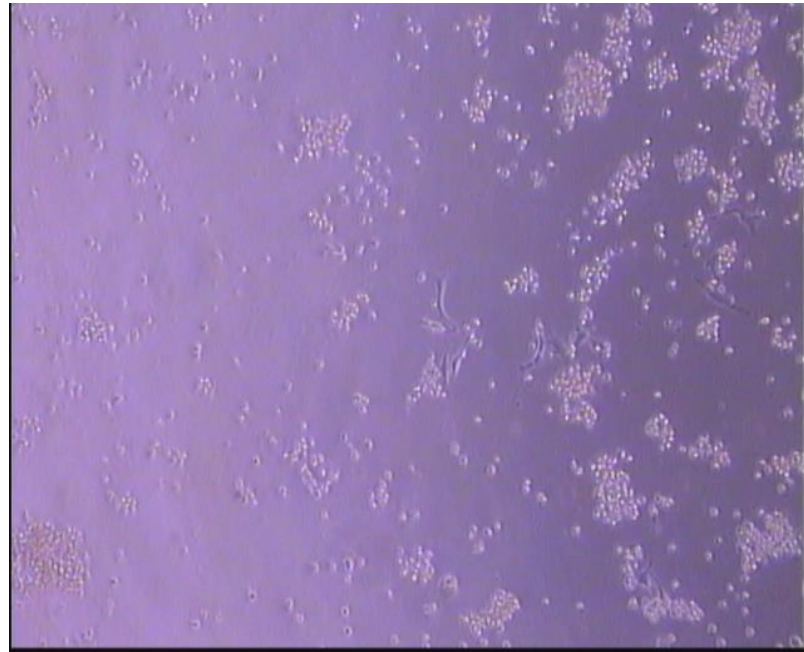


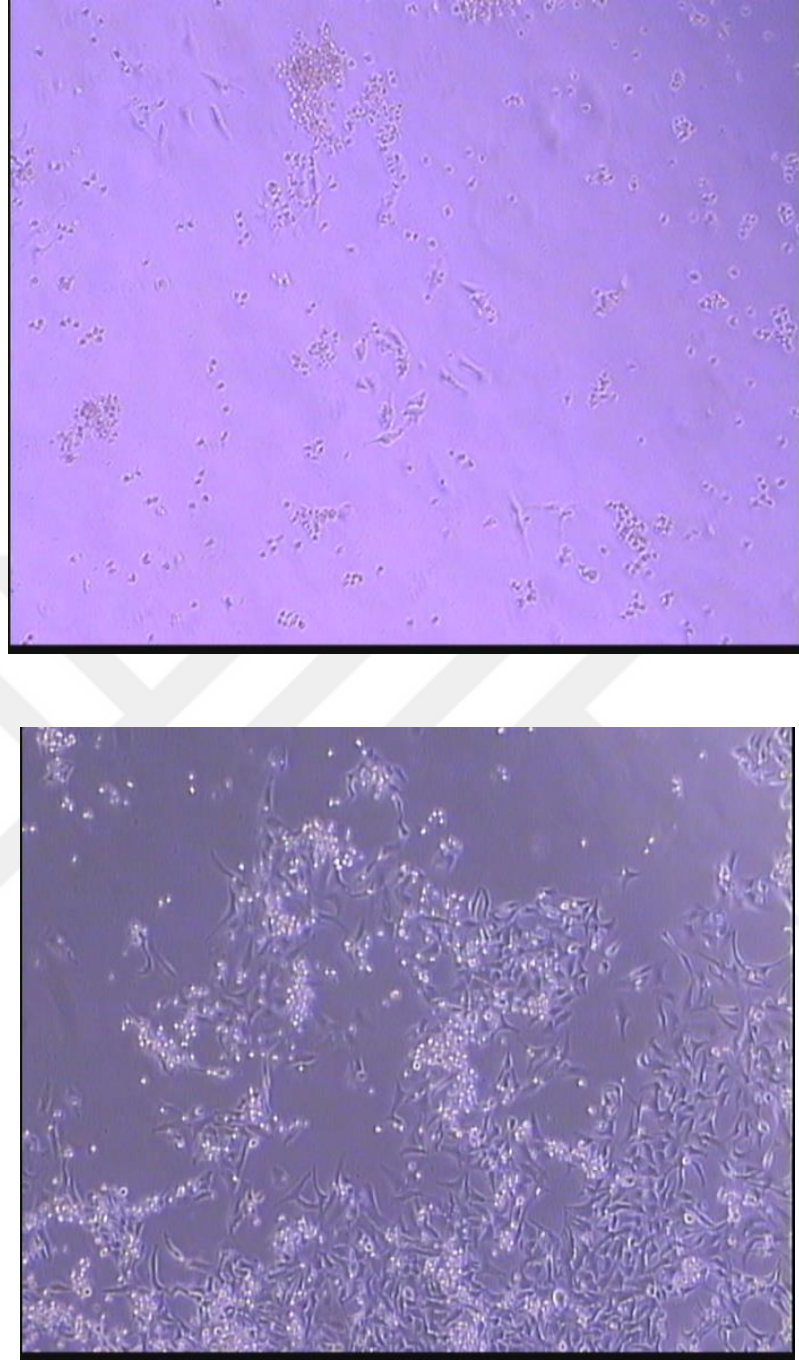
Şekil 4.26: Y383D mutasyonunun Sanger Sekanslama ile doğrulanması. GTA>GTC dönüşümü, karyogram üzerinde işaretlenmiştir.



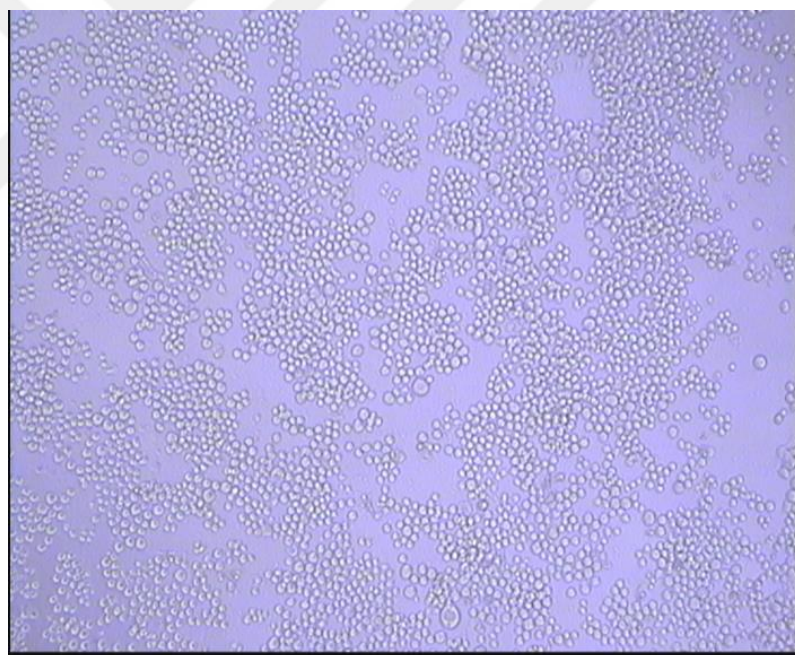
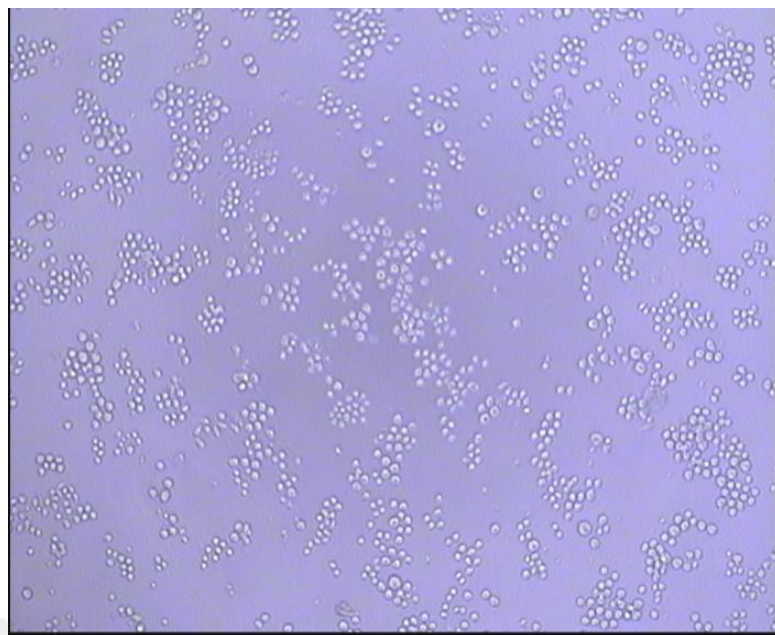
Şekil 4.27: Y383F mutasyonunun Sanger sekanslama ile doğrulanması. GTA>GAA dönüşümü, karyogram üzerinde işaretlenmiştir.

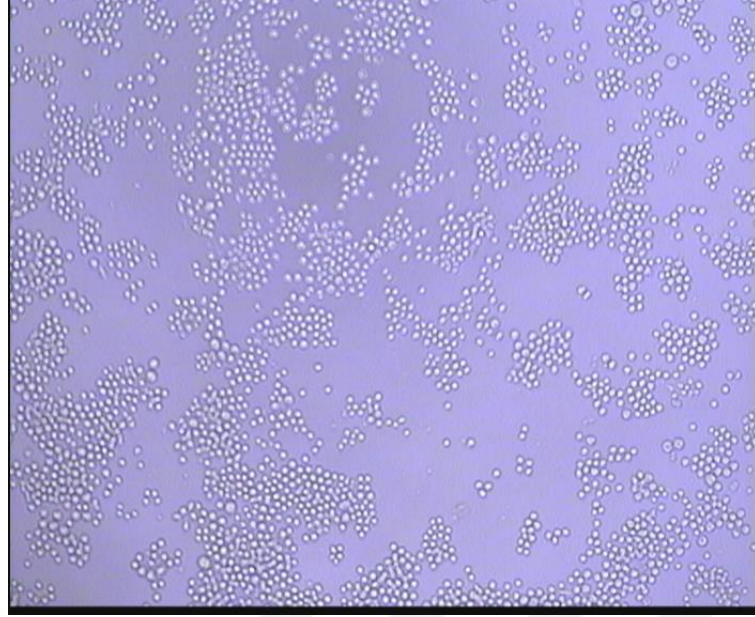
4.6.3. TRAIL-R2 Nakavt HeLa ve K562 Hücre Hatlarının TRAIL-R2 Mutantlarını Eksprese Eden Lentiviral Vektörler ile Transdüksiyonu ve Seçilimi
TRAIL-R2 YD, YF ve wt mutantlarının lentivirüs aracılığıyla çoğaltılmasından sonra elde edilen viral süpernatantlarla K562 ve HeLa DR5 nakavt hücre hatlarını transdükte ettik. Puromisin seçiliminin ardından hücreleri çoğaltmaya başladık (Şekil 4.27 ve 4.28).





Şekil 4.28: HeLa DR5KO hücre hattına Y383D, Y383F ve yabancı tip TRAIL-R2 kodlayan lentiviral vektörlerle transdüksüyonu ve seçim sonrası hücrelerin görünümü. Üstte HeLa DR5ko Y383D, ortada HeLa DR5ko Y383F ve alttaki resim ise HeLa DR5ko wt hücreleri göstermektedir.





Şekil 4.29: K562 DR5ko hücre hattında Y383D, Y383F ve WT transdükte edildikten sonra elde edilen hücrelerin görüntüsü. Üstte K562 DR5ko Y383D, ortada K562 DR5ko Y383F ve alttaki resim ise K562 DR5ko wt hücreleri göstermektedir.

Çoğaltılan hücreleri, 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına kuyucuk başına birer hücre düşecek şekilde ekip, ertesi gün tek hücre düşen kuyucukları işaretledik. Bu kuyucuklardaki hücreler çoğaldığında, bu hücrelerde lentiviral vektörün yapısında bulunan WPRE elementinin kopya sayısını kantitatif PZR ile belirleyip, albumin kopya sayısı ile oranladık. Bu oranın birbirine benzer olduğu kolonilerde, eşit kopya sayısında vektör girdiğini düşünerek, sonrasında bu vektörlerin transkripsiyonel aktivasyon seviyesi benzer konumlara girmiş olduğundan emin olmak için, bu kolonilerden RNA izolasyonu yapıp TRAIL-R2 mRNA seviyesini qRT-PZR ile belirledik. Tablo 4.3’de, TRAIL-R2/Albumin ekspresyon miktarları benzer olduğu için çalışmanın devamında kullanılmak üzere seçilmiş kolonilerin TRAIL-R2 ve Albumin Ct değerleri verilmiştir.

Tablo 4.3. Seçilmiş olan kolonilerdeki TRAIL-R2 ve Albumin CT değerleri.

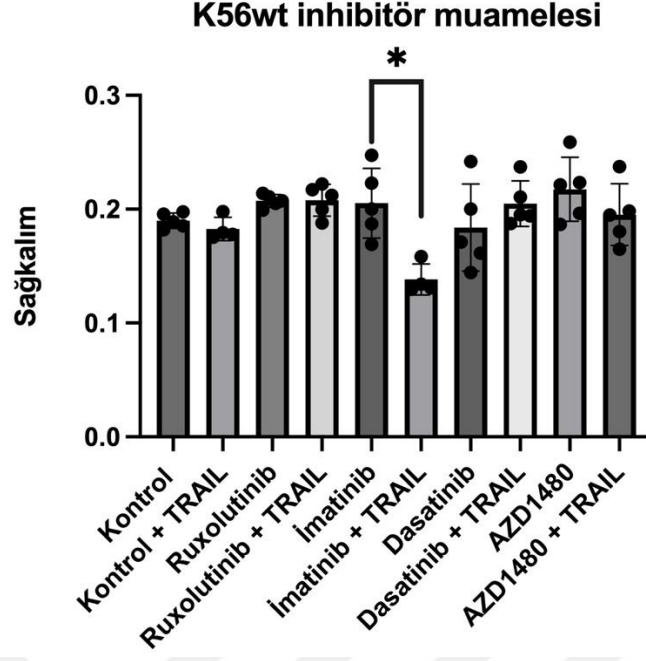
	TRAIL-R2	ALBUMİN	ΔC_T	$2^{-\Delta C_T}$
YD-8F	19,83	20,48	0,65	0,63728
YF-4C	21,97	22,32	0,35	0,784584
WT-8C	22,56	22,51	-0,05	1,035265

4.7. TRAIL-R2 Tirozin Fosforilasyonunun Fonksiyonel Etkilerinin İncelenmesi

4.7.1. Tirozin Kinaz İnhibitörlerinin TRAIL Duyarlılığına Etkilerinin Belirlenmesi

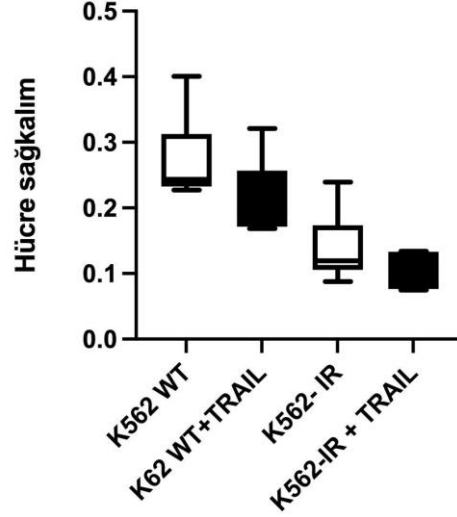
TRAIL-R2'nin tirozin fosforilasyonuna uğradığı hem proteomik verilerle, hem de yukarıda sunmuş olduğumuz ıslak lab verileri ile gösterilmiştir. TRAIL'in diğer ölüm reseptörü TRAIL-R1'de ise, tirozin fosforilasyonuna dair bir veri proteomik çalışmalarda mevcut olmasa da, bu proteinde de olası bir tirozin fosforilasyon motifi bulunduğu için, öncelikle TRAIL dirençli K562 hücre hattının TRAIL duyarlılığının tirozin kinaz inhibitörlerinin varlığında nasıl etkilendiğini inceledik. Bu şekilde, tirozin fosforilasyon olaylarının hücrenin TRAIL duyarlılığına etkisi ile ilgili büyük resmi görebilmeyi hedefledik.

Tirozin kinaz inhibitörlerinin TRAIL duyarlılığına etkisini incelemek için, kuyu başı 5000 hücre ektiğimiz K562 wt hücre hattında TRAIL-R2 tirozin fosforilasyonunu engelleyen inhibitörler ve 10ng/ml TRAIL ile muamele ettiğimiz hücreleri 72 saat inkübe ettikten sonra Resazurin ile TRAIL duyarlılığını gözlemledik. İmatinib ile muamele hücrelerin, TRAIL'e duyarlılık kazandığını tespit ettik (Şekil 4.29)



Şekil 4.30: K562 hücre hattında tirozin kinaz inhibitörlerinin TRAIL duyarlılığına etkilerinin Resazurin testi ile araştırılması

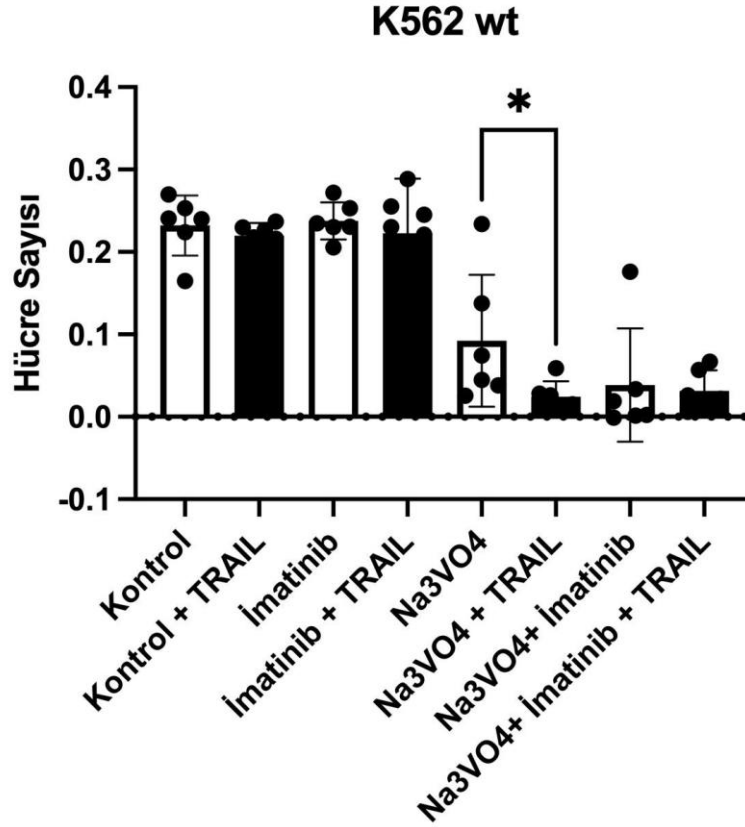
İncelediğimiz tirozin kinazlardan sadece İmatinib TRAIL duyarlılığı sağlamaktaydı. Dolayısıyla biz de, İmatinib dirençli hale gelmiş olan K562 hücrelerinin de TRAIL duyarlı hale gelmiş olup olmadığını sorguladık. Bunun için İmatinib dirençli hücre hattını yine 10ng/ml TRAIL ile muamele ettik ve hücre sağkalımını Resazurin testi ile ölçtük. Beklendiği üzere, İmatinib dirençli K562 hücre hattı, normal K562 hücre hattına göre daha düşük proliferasyon sergilemekteydi. Öte yandan, beklediğimizin aksine, İmatinib dirençli hücreler, 10ng/ml TRAIL'e duyarlı hale gelmemişti (Şekil 4.30).



Şekil 4.31: Imatinib dirençli K562 hücrelerinin TRAIL duyarlılığının incelenmesi.

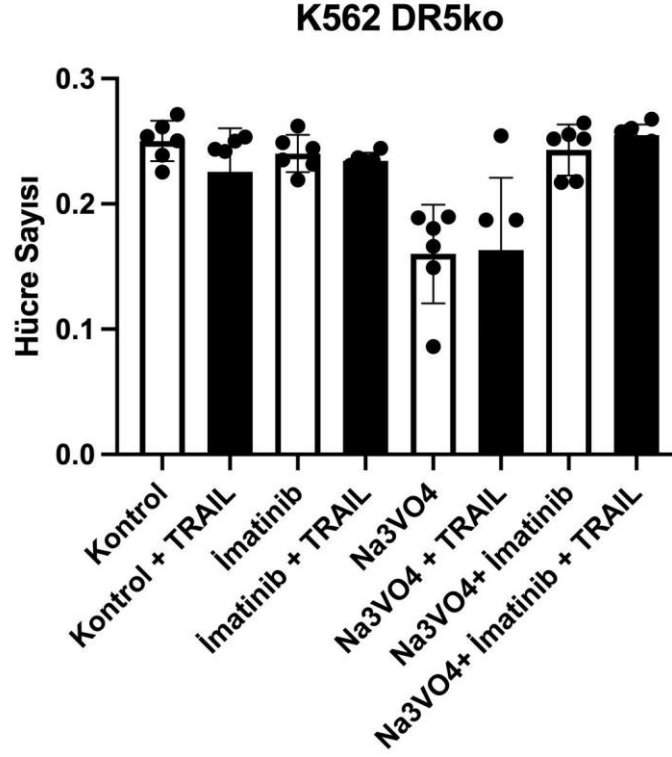
4.7.2. Tirozin Fosfatazların İnhibisyonunun TRAIL Duyarlılığına Etkilerinin Belirlenmesi

Hücre içi tirozin fosforilasyon olaylarının TRAIL duyarlılığındaki etkisi ile ilgili büyük resmi görebilmek için, tirozin kinaz inhibitörlerine ek olarak, tam tersi durumu, yani tirozin fosfatazların inhibisyonu ile hücre içi tirozin fosforilasyonların arttığı durumda TRAIL duyarlılığının nasıl etkilendiğini de inceledik. Bunun için hücreleri tirozin fosfatazların genel inhibitörü olan sodyum ortovanadat (Na_3VO_4) ile ve – TRAIL duyarlılığı sağladığı belirlenmiş olan tek tirozin kinaz inhibitörü imatinib ile- ayrı ayrı ve kombine şekilde tedavi ettik. Şekil 4.31’de de görüldüğü üzere, 72 saat boyunca 100uM Na_3VO_4 ile muamelesi, K562 hücrelerinde toksik etki göstermiş, hücre proliferasyonunu yaklaşık %70 civarında baskılamıştır. Hücrelerin Na_3VO_4 ile aynı anda TRAIL ya da İmatinib ile muamelesi hücre ölümünü daha da arttırmış, Na_3VO_4 ile aynı anda 10ng/ml TRAIL ile muamele edilen hücrelerde sağ kalan hücre oranı %10’a, Na_3VO_4 ile aynı anda 10uM Imatinib mesilat ile muamele edilen hücrelerde ise %5’e düşmüştür.



Şekil 4.32: K562 hücrelerinde fosfataz inhibisyonunun hücrelerin Imatinib ve TRAIL duyarlılığına etkilerinin incelenmesi

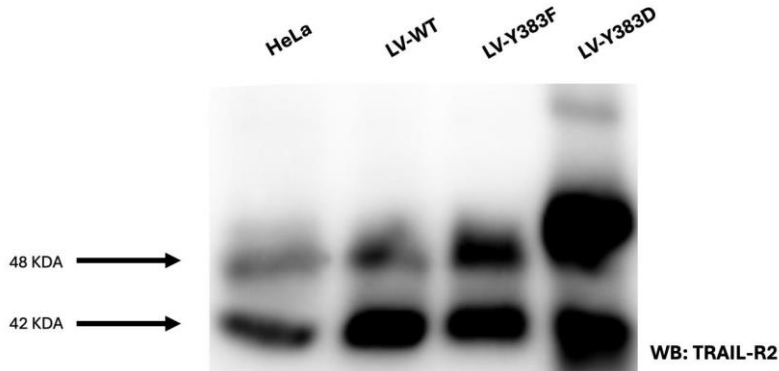
Na3VO4'ün K562 hücrelerinde gösterdiği toksisitede TRAIL-R2'nin bir rolü olup olmadığını anlamak için, Na3VO4, imatinib ve TRAIL muamelelerini, bir kez de TRAIL-R2 nakavt K562 hücrelerinde gerçekleştirdik (Şekil 4.32). Şekil 4.31'de de gözlemlenebildiği üzere, TRAIL-R2 nakavt K562 hücrelerinde, yabancı tip K562 hücrelerine göre Na3VO4 toksisitesi daha düşük (~%35) gözlemlenmekteydi. Yabancı tip K562 hücrelerde gözlemlenen, Na3VO4 muamelesi sonrasında hücrelerin TRAIL duyarlı hale gelmesi ise, TRAIL-R2 nakavt K562 hücrelerinde gözlemlenmemekteydi. İlginç bir şekilde, TRAIL-R2 nakavt hücrelerin Imatinib ile muamele edilmesi, Na3VO4 toksisitesini tamamen önlemekte, bu hücreler Na3VO4 ile muamele edilmemiş hücrelerle aynı proliferasyon oranını sergilemekteydi (Şekil 4.33)



Şekil 4.33: TRAIL-R2 nakavt K562 hücrelerinde Na₃VO₄, İmatinib ve TRAIL muamelesinin hücre proliferasyonuna etkisinin incelenmesi

4.7.3. TRAIL-R2 Tirozin Fosforilasyonunu Engelleyen ve Taklit Eden Mutasyonların TRAIL-R2 Protein Seviyesine Etkilerinin Belirlenmesi

TRAIL-R2 mutantları ile K562 ve HeLa hücre hatları transdükte edildikten sonra, yabancı tip, Y383D ve Y383F mutasyonlu TRAIL-R2 ekspresyon kasetlerini taşıyan lentiviral vektörleri aynı sayıda almış ve TRAIL-R2 mRNA ekspresyon seviyesi aynı olan HeLa hücre hatlarında, TRAIL-R2 protein seviyesini western blot ile inceledik.



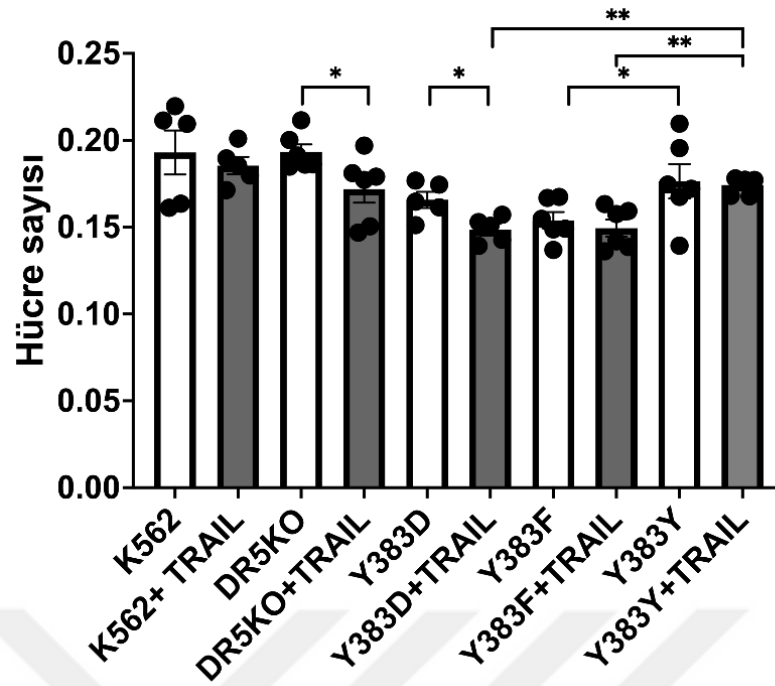
Şekil 4.34: Y383D ve Y383F mutasyonlarının TRAIL-R2 protein stabilitesine etkisinin incelenmesi.

Şekil 4.34'te gözlemlenebildiği gibi, yabancı tip TRAIL-R2 ile ve Y383F mutanlığı ile transdükte TRAIL-R2 nakavt hücrelerde TRAIL-R2 protein ekspresyon seviyeleri benzer bulunmuştur. Öte yandan, Y383D mutanlığı, yani Y383 fosforilasyonunun taklit edildiği mutanlığın protein seviyesi yabancı tip ve Y383F mutanlığına göre hem daha yüksek gözlemlenmiş, hem de TRAIL-R2 uzun izoformunda hafif bir boyut artışı gözlemlenmiştir. Buna ek olarak, 67kD civarında ek bir bant daha gözlemlenmiştir.

4.7.3. TRAIL-R2 Tirozin Fosforilasyonunu Engelleyen ve Taklit Eden Mutasyonların Hücre Proliferasyonuna Etkilerinin Belirlenmesi

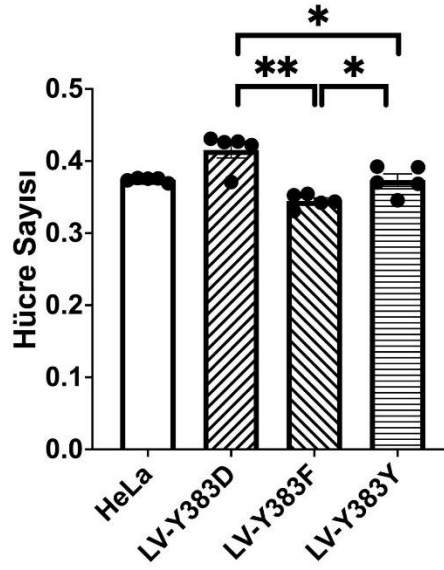
TRAIL-R2 tirozin fosforilasyonunun hücre proliferasyonuna ve TRAIL duyarlılığına etkilerini inceleyebilmek için, öncelikle TRAIL-R2 mutanlığı ile transdükte edilmiş ya da edilmemiş K562 hücrelerini ve yabancı tip K562 hücre hattını sayıp, her birinden eşit sayıda ve 12'şer tekrar olacak şekilde 96 kuyucuklu kültür kaplarına ektik. Sonrasında bu hücrelere TRAIL içeren ya da içermeyen besiyeri ekleyip 72 saat sonra hücre proliferasyonunu Resazurin testi ile ölçtük.

Kuyu başı 5000 hücre ektiğimiz K562 wt, K562 DR5ko, K562 DR5ko YD, K562 DR5ko YF ve K562 DR5ko wt hücre hatlarını 10ng/ml TRAIL ile muamele edip, 72 saat inkübe ettikten sonra Resazurin ile TRAIL duyarlılığını gözlemledik. TRAIL-R2 nakavt hücrelerde TRAIL'e bir yanıt oluştuğunu ve bu yanıtın anlamlı olduğunu tespit ettik (Şekil 4.27). Bunun yanı sıra, TRAIL-R2 tirozin fosforilasyonunu taklit eden Y383D mutanlığı ile transdükte edilmiş TRAIL-R2 nakavt K562 hücreleri de TRAIL duyarlı hale gelmişti. Hem Y383D mutanlığı hem de Y383F mutanlığı ile transdükte hücrelerde TRAIL muamelesi sonrası sağkalan hücre sayısı, yabancı tip TRAIL-R2 ile transdükte edilmiş hücrelerde TRAIL muamelesi sonrasında sağkalan hücre sayısına göre anlamlı bir şekilde daha düşüktü. Öte yandan, TRAIL-R2 tirozin fosforilasyonunun engellendiği Y383F mutanlığı ile transdükte hücreler TRAIL'e duyarlı değillerdi ve bu hücreler, yabancı tip TRAIL-R2 ile transdükte hücrelere göre anlamlı derecede azalmış hücre proliferasyonuna sahipti.



Şekil 4.35: K562 wt, K562 DR5ko, K562 DR5ko YD, K562 DR5ko YF ve K562 DR5ko wt hücre hatlarının TRAIL duyarlılığına etkisinin resazurin testi ile gösterilmesi. DR5KO: TRAIL-R2 nakavt K562 hücre hattı, Y383D: TRAIL-R2 tirozin fosforilasyonunu taklit eden mutant eksprese eden lentiviral vektörle transdükte TRAIL-R2 nakavt K562 hücre hattı, Y383F: TRAIL-R2 tirozin fosforilasyonunu engelleyen mutantı eksprese eden lentiviral vektörle transdükte TRAIL-R2 nakavt K562 hücre hattı, Y383Y: Yabanıl tip TRAIL-R2 eksprese eden lentiviral vektörle transdükte TRAIL-R2 nakavt K562 hücre hattı *: $p<0.05$, **: $p<0.005$.

K562 hücre hattına ek olarak, TRAIL-R2 mutantları ya da yabanıl tip TRAIL-R2 ile transdükte edilmiş ve sonrasında eşit kopya sayısında vektör içerdiği belirlenmiş TRAIL-R2 nakavt HeLa hücre hattında da Resazurin testi gerçekleştirdik.



Şekil 4.36. TRAIL-R2 fosforilasyonunu taklit eden ve engelleyen mutantların hücre proliferasyonuna etkisi. HeLa, yabancı tip HeLa hücre hattını, LV-Y383Y: yabancı tip TRAIL-R2 kodlayan lentiviral vektörle transdükte TRAIL-R2 nakavt HeLa hücre hattı, LV-Y383D: TRAIL-R2 tirozin fosforilasyonunu taklit eden mutant eksprese eden lentiviral vektörle transdükte TRAIL-R2 nakavt HeLa hücre hattı, LV-Y383F: TRAIL-R2 tirozin fosforilasyonunu engelleyen mutantı eksprese eden lentiviral vektörle transdükte TRAIL-R2 nakavt HeLa hücre hattı. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.005$.

Şekil 4.36’da gösterildiği gibi, TRAIL-R2 nakavt edildikten sonra yabancı tip TRAIL-R2 ile transdükte edilmiş hücrelerde hücre proliferasyon seviyesi hiç nakavt edilmemiş yabancı tip HeLa hücrelerine benzerken, TRAIL-R2’nin Y383D mutanı, yani TRAIL-R2 tirozin fosforilasyonunu taklit eden mutantla transdükte hücrelerde hücre proliferasyonu yabancı tip TRAIL-R2 eksprese eden hücrelere göre anlamlı şekilde artmıştır. TRAIL-R2 Y383F mutanı, yani TRAIL-R2 tirozin fosforilasyonunu engelleyen mutantı eksprese eden hücrelerde ise, hücre proliferasyonu anlamlı şekilde azalmıştır.

5. TARTIŞMA

Tümör Nekroz Faktör-İlişkili Apoptoz İndükleyici Ligand (TRAIL), sağlıklı hücrelere zarar vermeden, farklılaşan hücreleri seçerek bu hücrelerde apoptozu tetikleyen (Wiley ve ark., 1995) ve birçok farklı doku tipinde eksprese edilen TNF ailesine ait önemli bir sitokindir (Cosman, 1994; Wiley ve ark., 1995) sTRAIL ve mTRAIL formlarının olması TRAIL' in aktivitesi açısından önemlidir (Pitti ve ark., 1996). TRAIL' in geniş reseptör portföyü, TRAIL-aracılı apoptoz ve bunun kontrolünde yani güçlü tümör öldürücü etki göstermesinin yanı sıra normal hücreleri koruyabilme özelliğine sahiptir (Chaudhary ve ark., 1997; Degli-Esposti, Smolak, ve ark., 1997; Marsters ve ark., 1997; Pan, Ni, ve ark., 1997; Pan, O'Rourke, ve ark., 1997; Emery ve ark., 1998; Cha ve ark., 1999; Testa, 2010). TRAIL' in, reseptörleri aracılığıyla DISC oluşumunu takriben hücreleri apoptozu yönlendirirken; sekonder kompleks oluşturarak hücre sağkalım yollarını aktive ettiği bilinmektedir. Ancak pek çok kanser hücresi TRAIL-indüklü apoptozu karşı farklı direnç mekanizmaları geliştirir. Ölüm reseptörleri, adaptör proteinler ya da kaspazların fonksiyonlarını kaybetmesi (L. Zhang ve Fang, 2005) ya da Bcl-2 ve IAP gibi anti-apoptotik proteinlerin aşırı ekspresyonu bu direncin gelişmesinde rol oynamaktadır (Van Geelen ve ark., 2004). TRAIL direncinin yalnızca reseptörlerle değil, hücre içi moleküler yollarla ve TRAIL reseptörlerinin post-translasyonel modifikasyonlarıyla da ilişkili olabileceği gösterilmiştir (Arai ve ark., 1998; Algeciras-Schimmich ve ark., 1999; Shin ve ark., 2001; Wagner ve ark., 2007). Bu güne kadar aydınlatılan dirençlilik mekanizmaları arasında Prokaspaz 8/10'un FADD'a bağlanmasının c-FLIP tarafından engellenmesi (L. Zhang ve Fang, 2005), Bcl-2 protein ailesinin anti-apoptotik üyelerinin aşırı ekspresyonu (Bauer ve ark., 2015), yalancı reseptörlerin (DcR1/2) yüksek ekspresyonu (Degli-Esposti, Dougall, ve ark., 1997; L. Zhang ve Fang, 2005; Lalaoui ve ark., 2011), ölüm reseptör endositozu (X. Zhang ve ark., 2008) ve TRAIL-R2'nin nükleusa translokasyonu (Khaidar ve ark., 2012) yer almakta olup; bu dirençliliğin gelişmesinde fosforilasyon-defosforilasyon mekanizmalarının rol oynaması oldukça muhtemeldir ve literatürde buna yönelik bir çalışma henüz mevcut değildir. İnsan kronik miyeloid lisemi hücre hattı olan K562 normalde TRAIL dirençli iken, uzun süre imatinibe (BCR/Abl tirozin kinaz inhibitörü) maruz kalması sonucunda TRAIL' e duyarlılık kazanabilmektedir (S. J. Park ve ark., 2009). TRAIL-R2'nin Y383 aminoasitinden fosforile olduğu proteomik tekniklerle gösterilmiş olup (Hornbeck ve ark., 2015), ıslak lab teknikleriyle henüz

gösterilmemiştir. Ayrıca fosforilasyon ve defosforilasyonun hızlı moleküler olaylar olması, TRAIL-R2 yolak tercihlerinde ölüm domaininin tirozin fosforilasyonunun bir tür açma-kapama düğmesi görevi görmesini sağlıyor olabileceğinden, TRAIL-R2'nin ölüm bölgesi üzerinden tirozin fosforilasyonunun TRAIL direncinde ya da duyarlılığında rol oynayabileceği düşüncesi, bu doktora tez çalışmasının ana hipotezini teşkil etti.

TRAIL-R2'nin bazal koşullarda tirozin fosforile olup olmadığını ve eğer böyleyse TRAIL muamelesinden etkilenip etkilenmeyeceğini belirlemek için gerçekleştirdiğimiz deneyler sonucunda, TRAIL-R2'nin sahiden de tirozin fosforile bir protein olduğunu, sTRAIL ile muamele sonucunda ise bu fosforilasyonun seviyesinin değişmediğini gözlemledik. sTRAIL dirençli hücrelerde gözlemlediğimiz bu sonuç, sahiden TRAIL-R2 tirozin fosforilasyonunun TRAIL dirençliliğine yol açıyor olabileceğine dair destekleyici bir veri olabileceği gibi, TRAIL-R2 tirozin fosforilasyonu, aslında hücrelerde bulunan endojen mTRAIL aracılığıyla gerçekleşiyor da olabilir. Zira literatürde, TRAIL-R2'nin mTRAIL'e, sTRAIL'den daha yüksek afinite gösterdiğine dair bir rapor bulunmaktadır (Wajant ve ark., 2001). Süspanse hücreler olan K562 hücrelerinde hücrel lizatları topladığımız ortamda, hücreler birbiri ile fiziksel temas kurabilecek yoğunlukta olduğu için, mTRAIL aracılı tirozin fosforilasyonunu da bu hücrelerde yoğun gözlemlemiş olabiliriz. Nitekim, adheran hücreler olan HeLa hücre hattında da TRAIL-R2 tirozin fosforilasyonu gözlemlediğimiz halde, bu hücrelerde TRAIL-R2 tirozin fosforilasyonu sTRAIL muamelesi ile artmaktaydı. Dolayısıyla, K562 hücre hattında, mTRAIL aracılığıyla TRAIL-R2'nin tirozin fosforilasyonu açısından doygunluğa ulaşması nedeniyle, sTRAIL muamelesi ile artan bir tirozin fosforilasyonu gözlemleyememiş olabiliriz. HeLa hücre hattında ise hücreler birbiri ile tamamen fiziksel temasta bulunamadıkları için, sTRAIL muamelesi bazal seviyede de gözlemlenmiş olan tirozin fosforilasyonunu daha da arttırmış olabilir. Öte yandan bu fark, hücre içi tirozin kinaz repertuarının farklılığı nedeniyle oluşmuş da olabilir.

K562 hücre hattı, BCR/Abl füzyon proteini nedeniyle, yüksek Abl tirozin kinaz aktivitesi göstermektedir (Sampaio ve ark., 2021). Dolayısıyla akla bu fosforilasyondan sorumlu olabilecek tirozin kinaz Bcr/Abl gelmektedir. Ayrıca hem HeLa hücre hattında tirozin fosforilasyonunu görmüş olmamız hem de K562' de JAK1/2 ve c-Src aktivitesinin de yüksek olduğunun bilinmesi sebebiyle (de Groot ve

ark., 1999; A. Samanta ve ark., 2011; Fahmideh ve ark., 2022), bu fosforilasyondan sorumlu olabilecek şüpheliler Abl, JAK ve c-Src'dır. Ayrıca TNFR1 ve Fas'ın tirozin fosforilasyonunda EGFR'ın da yer almasından ötürü (Chakrabandhu ve ark., 2016; Ta ve ark., 2018; Hapil Zevkliler ve ark., 2024; Nam ve ark., 2024), hangi tirozin kinazın etkili olduğunu gösterebilmek için K562 hücre hattını farklı tirozin kinaz inhibitörleri ile muamele ettik. Elde ettiğimiz veriler ışığında, Abl inhibitörü olan imatinibin yanı sıra hem Src inhibitörü olan PP1 hem de JAK inhibitörlerinin TRAIL-R2 tirozin fosforilasyonunu anlamlı şekilde azalttığını gördük. Bununla beraber hem Src'yi hem de Abl'ı inhibe eden Dasatinib'in ise en fazla inhibisyonu gösteren tirozin kinaz inhibitörü olduğunu da tespit ettik. Bu durum, TRAIL-R2'nin tirozin fosforilasyonunun, bu üç kinaz yolundan en az biri tarafından düzenlendiğini düşündürmektedir. K562 hücre hattında TRAIL muamelesi sonucu farklı zaman dilimlerinde elde ettiğimiz lizatlarda gerçekleştirdiğimiz TRAIL-R2 IP' de hem c-Src hem de JAK2' nin sürekli bağlandığını görmüştük. Abl bağlantısı ise çok daha zayıf ve zamanla kayboluyor gibiydi. Dolayısıyla TRAIL-R2 tirozin fosforilasyonuna aslında Src ve JAK2' nin yol açıyor olabileceğini, sürekli aktif Abl'ın ise bunların aktivasyon sebebi olduğunu düşünmek makul olabilir. Zaten literatürde ABL kinazının BCR/Abl füzyon proteini nedeniyle aşırı aktive olduğu ve Src ile JAK2' nin BCR/Abl tarafından aktive edilebildiği bilinmektedir (Danhauser-Riedl ve ark., 1996; Ptasznik ve ark., 2002; A. K. Samanta ve ark., 2006; Hantschel, 2012). Dolayısıyla Abl kendi başına fosforile edemiyor olsa da Abl'ın inhibisyonu, fosforilasyondan sorumlu tirozin kinazların aktivasyonunu engelleyerek TRAIL-R2 fosforilasyonunu engellemiş olabilir. PP1 sadece c-Src'ı inhibe ederken Dasatinib hem Abl hem de c-Src'ı inhibe edebilmektedir. Dasatinib' de daha yüksek gözlenen inhibisyon, aslında bu hücre tipinde JAK2'nin aktivasyonu Abl aracılı gerçekleştiğinden, TRAIL-R2' nin hem JAK2 hem de c-Src tarafından fosforile ediliyor olabileceğini ve bu iki kinazın birbirlerinin yokluğunda telafi edici rol de üstleniyor olabileceklerini düşündürmektedir. Elbette ki bunun iddia edilebilmesi için, daha fazla deneye ihtiyaç vardır. Öte yandan tirozin kinaz inhibitörlerinin varlığında TRAIL-R2 ekspresyonunun da azalması, tirozin fosforilasyonunun TRAIL-R2 protein stabilitesinde rol oynama ihtimalini düşündürebileceği gibi, tirozin kinazların protein-protein etkileşimi yoluyla TRAIL-R2 stabilitesini sağlaması ihtimali de söz konusudur.

TRAIL-R2'nin tirozin fosforilasyonundan sorumlu kinazı ararken, hangi tirozin kinazların TRAIL-R2 ile fiziksel etkileşimde olduğunu belirlemek de önemliydi. K562 hücre hattında yaptığımız çalışmalarda, TRAIL-R2 protein kompleksinde JAK1 proteinine rastlamadık. Abl varlığını araştırırken, BCR antikoru ile yaptığımız western blot'ta TRAIL-R2'nin henüz TRAIL muamelesi yapılmadığında BCR/Abl füzyon proteini ile fiziksel etkileşim halindeydi olduğunu, TRAIL muamelesi ile, özellikle 15. Dakikadan sonra bağlantının zayıfladığını gözlemledik. Imatinib dirençli K562 hücre hattında ise, Abl ve TRAIL-R2 arasındaki fiziksel etkileşim gözlemlenememekteydi. Fakat Imatinib dirençli K562 hücre hattında TRAIL-R2 yine de tirozin fosforile durumdaydı. Imatinib dirençli hücre hattında TRAIL-R2 tirozin fosforilasyonunun hala mevcut olması, Abl'ın TRAIL-R2 tirozin fosforilasyonundan sorumlu tirozin kinaz olması ihtimalini zayıflatır da, imatinib dirençli hücre hattında diğer tirozin kinazların aktivasyon seviyesini bilmediğimizden, bu koşullar altında TRAIL-R2 tirozin fosforilasyonunu hangi tirozin kinazın yapıyor olabileceğine dair bir sav öne sürememekteyiz.

TRAIL ile muamele edilmemiş K562 hücrelerinde, TRAIL-R2, c-Src ve JAK2 ile de aynı komplekste yer almaktadır. Fakat Abl'dan farklı olarak c-Src ve TRAIL-R2 arasındaki fiziksel etkileşim, sTRAIL muamelesi ile azalmamakta, sabit kalmaktadır.

K562 gibi TRAIL dirençli olan bir diğer hücre hattı HeLa'da da aynı durumun geçerli olup olmadığını belirlemek için, farklı süreler boyunca TRAIL ile muamele edilmiş HeLa hücrelerinden alınan lizatlarda gerçekleştirdiğimiz TRAIL-R2 immunopresipitasyonunda TRAIL-R2'nin hem c-Src, hem EGFR hem de JAK2 ile fiziksel etkileşime girdiğini gözlemledik. TRAIL-R2, EGFR ile sabit bir bağlantı halindeyken, EGFR'in aktivasyon fosforilasyonuna uğramış versiyonuna yönelik fosfo-EGFR antikoru ile işaretleme yaptığımızda, TRAIL-R2 kompleksinde ilk 15 dakika EGFR aktif formunda iken, 30. Dakikadan itibaren defosforile olduğunu gözlemledik. EGFR'in 15. dakikada aktif olduğu noktada c-Src sinyalinin azalması ve daha sonra yeniden artması bu protein kompleksinde tam da bu zaman diliminde devreye giren bir fosfatazın olması ihtimalini akla getirmektedir. Bu noktadaki defosforilasyonda rol oynayan fosfatazın kimliği ilerleyen çalışmalarda gösterilebilir.

TRAIL-R2'nin yanı sıra TRAIL'in diğer ölüm reseptörü olan TRAIL-R1'de aslında bir tirozin fosforilasyon motifi bulunması nedeniyle, tirozin fosforilasyon olaylarının

hücrelerin TRAIL duyarlılığını nasıl etkilediğini incelemek istedik. Bunun için, hem tirozin kinaz inhibitörleri ile, hem de tirozin fosfataz inhibitörü sodyum ortovanadat ile K562 hücrelerini ayrı ayrı muamele edip bunların K562 hücrelerini TRAIL duyarlı hale getirip getirmediğini inceledik. Hücrelere uyguladığımız tirozin kinaz inhibitörlerinden, sadece Imatinib K562 hücrelerini TRAIL duyarlı hale getirmişti. Bu durum, elimizdeki imatinib dirençli K562 hücrelerinde gözlemlediğimiz TRAIL duyarlılığı ile de uyumluydu.

Doktora tez projemizin ana hipotezi TRAIL-R2 tirozin fosforilasyonunun TRAIL dirençliliğine yol açabileceği olduğu için, hücre içi tirozin fosforilasyon olaylarının TRAIL duyarlılığına etkisini araştırırken incelediğimiz bir diğer şey ise tirozin fosfataz inhibitörü olan Na₃VO₄ ile muamelenin hücreleri TRAIL duyarlı hale getirip getirmediği idi. Öngördüğümüz şekilde, Na₃VO₄ muamele hücreler, TRAIL duyarlı hale gelmişti. Fakat şaşırtıcı bir şekilde, Na₃VO₄ tek başına da K562 hücrelerinin proliferasyonunu yaklaşık %70 oranında azaltmıştı. Na₃VO₄ muamelesi ile oluşan toksisite, imatinib muamelesi ile de, TRAIL muamelesi ile de artıyorken, Na₃VO₄ ile beraber hem imatinib hem de TRAIL'in verilmesi ise proliferasyonu hafif şekilde kurtarmıştı. Na₃VO₄ aracılı toksisite hücreleri TRAIL duyarlı hale getirdiği için, bu duyarlılıkta TRAIL-R2'nin rol oynayıp oynamadığını anlamak için aynı deneyi TRAIL-R2 nakavt K562 hücrelerinde gerçekleştirdiğimizde ise, TRAIL-R2 eksprese etmeyen hücrelerde Na₃VO₄ toksisitesinin daha düşük seviyelerde (yaklaşık %35) olduğunu ve Na₃VO₄ ile oluşan TRAIL duyarlılığının ortadan kalktığını gözlemledik. İlginç bir şekilde, TRAIL-R2 nakavt hücreler imatinib ile muamele edildiğinde, Na₃VO₄ hücre proliferasyonunu hiç baskılayamıyordu. Dolayısıyla, elde ettiğimiz bu veriler, Na₃VO₄'ün K562 hücreleri üzerindeki toksik etkisinde, TRAIL-R2 ve Abl tirozin kinazı içeren bir mekanizmanın rol oynadığını göstermektedir.

TRAIL-R2'yi nakavt ettikten sonra TRAIL-R2 ekspresyonunu yabanıl tip, Y383D ve Y383F mutantları ile yeniden oluşturduğumuz HeLa hücrelerinde TRAIL-R2 ekspresyon seviyelerini mRNA düzeyinde incelediğimizde, umduğumuz gibi benzer mRNA seviyeleri gözlemledik. Bu ulaşmayı hedeflediğimiz sonuçtu, zira bu sayede protein seviyelerini inceleyerek, fosforilasyonun taklit edilmesinin ve engellenmesinin TRAIL-R2 stabilitesine etkisini belirleyebilecektik. Bu mutant hücre hatlarında TRAIL-R2 western blot gerçekleştirdiğimizde, yabanıl tip ve Y383F mutantı birbirine benzer ekspresyon gösterirken, Y383D mutantının ekspresyonunun daha yüksek

olduğunu gözlemledik. Dahası, Y383D mutantının uzun izoformu, western blot'da yukarı doğru bir kayma göstermişti. Yine Y383D mutantında, 67kD civarında bir bant daha gözlemlenmiş olması, tirozin fosforilasyonunun TRAIL-R2'de glikolizasyon ya da ubikinasyon gibi bir başka post-translasyonel modifikasyona zemin hazırladığını gösteriyor olabilir. İlerleyen aşamalarda, TRAIL-R2 mutantlarının hücre yüzeyinde ve nükleustaki ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi, TRAIL-R2'nin Y383'den tirozin fosforilasyonunun proteinin hücre içi yerleşiminde oynadığı rolün aydınlatılabilmesini sağlayacaktır.

TRAIL-R2 tirozin fosforilasyonunun hücre sağkalımına etkisini incelediğimizde, Y383D mutantını eksprese eden hücrelerin yabanıl tip TRAIL-R2 eksprese eden hücrelere göre daha yüksek, Y383F mutantını eksprese eden hücrelerin ise daha düşük hücre proliferasyonuna sahip olduğunu gözlemledik. K562 hücrelerinde de yaptığımız deneylerde, yine Y383D mutantında Y383F mutantına göre anlamlı derecede daha yüksek proliferasyon gözlemledik. Bu durum, TRAIL-R2'nin Y383' den fosforilasyonunun hücreyi sağkalıma yönlendiren bir rol oynadığına işaret etmektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

- TRAIL dirençli K562 yabancı tip hücre hattında TRAIL-R2 bazal koşullarda fosforile halde olup, sodyum ortavanadat muamelesi yapılan ve yapılmayan hücrelerde TRAIL-R2 fosforilasyon seviyesi 10ng/ml sTRAIL muamelesi sonrasında da sabit kalmaktadır. Bu veri TRAIL-R2'nin Y383 aminoasitinden fosforile olduğunun proteomik yöntemlerle gösterilse bile ıslak lab teknikleriyle gösterilmediğinden TRAIL dirençliliğinin anlaşılması açısından önem arz etmektedir.
- Yabancı tip K562 hücre hattında Dasatinib (Src ve Abl inhibitörü) en fazla inhibisyonu gösteren tirozin kinaz inhibitörü olmakla beraber; Imatinib (abl inhibitörü), PP1 (Src inhibitörü) ve JAK inhibitörleri de TRAIL-R2 tirozin fosforilasyonunu anlamlı şekilde azaltmaktadır.
- Yabancı tip K562 hücre hattında gerçekleştirilen TRAIL-R2 imünopresipitasyonu ile TRAIL-R2'nin c-Src, JAK2 ve Abl gibi tirozin kinazlar ile aynı protein kompleksinde yer almaktadır. Bunlardan Abl (BCR/Abl füzyon proteini) bağlantısının oldukça zayıf olup, sTRAIL muamelesini takiben kompleksten ayrılırken, Abl'dan farklı olarak c-Src ve TRAIL-R2 arasındaki fiziksel etkileşim, sTRAIL muamelesi ile azalmamakta, sabit kalmaktadır.
- Imatinib ile sürekli muamele edilerek Imatinib dirençli hale gelmiş K562 hücre hattında TRAIL-R2 fosforilasyon seviyesi beklenenin aksine artış göstermekte olup, TRAIL-R2 ve Abl arasındaki fiziksel etkileşim zayıflamaktadır. Imatinib dirençli klonların her zaman TRAIL dirençli olamayabileceği de göz önüne alındığında Abl'ın komplekste doğrudan etkili olamayabileceği gösterilmiş olup Abl dışında hangi tirozin kinazların bu fosforilasyonda etkili olup olmadığının ek deneylerle desteklenmesi gerekmektedir.
- TRAIL dirençli olan bir diğer hücre hattı HeLa' da da gerçekleştirilen TRAIL-R2 imünopresipitasyonunda TRAIL-R2 hem c-Src, hem EGFR hem de JAK2 ile fiziksel etkileşime girmektedir. TRAIL-R2, EGFR ile sabit bir bağlantı halinde olup, bu komplekste EGFR ilk 15 dakika aktif formunda ve 30.'cu

dakikadan itibaren defosforile olmaktadır. EGFR'ın aktif olduğu noktada c-Src sinyalinin azalması ve daha sonra yeniden artması bu protein kompleksinde tam da bu zaman diliminde devreye giren bir fosfatazın olması ihtimalini akla getirmektedir. Bu noktadaki defosforilasyonda rol oynayan fosfatazın kimliği ilerleyen çalışmalarda gösterilebilir.

- Tirozin kinaz inhibitörlerinin TRAIL duyarlılığı incelendiğinde, sadece Imatinibin K562 hücrelerini duyarlı hale getirdiği tespit edilmiştir.
- Tirozin fosfataz inhibisyonunun TRAIL duyarlılığına olan etkileri incelenirken K562 yabancı tip hücreler fosfatazların genel inhibitörü olan sodyum ortovanadat (Na_3VO_4) ile tek başına, imatinib ve TRAIL ile kombine şekilde muamele edilmiştir. Na_3VO_4 aracılı toksisite sonucu K562 yabancı tip hücreler TRAIL duyarlı hale gelmiş olup, tek başına da yabancı tip K562 hücrelerinde hücre proliferasyonunu anlamlı şekilde azaltmıştır.
- TRAIL-R2 eksprese etmeyen (nakavt) hücrelerde ise Na_3VO_4 toksisitesi yabancı tipe göre daha düşük olup, Na_3VO_4 ile oluşan TRAIL duyarlılığı TRAIL-R2 navakt hücrelerde ortadan kalkmıştır. Ayrıca bu hücreler Na_3VO_4 ve Imatinib ile birlikte muamele edildiğinde Na_3VO_4 toksisitesi tamamen ortadan kalkmış olup, hücre proliferasyonunu baskılamamıştır. Dolayısıyla Na_3VO_4 'ün K562 hücrelerinde toksik etki göstermesinde, TRAIL-R2 ve Abl tirozin kinazı içeren bir mekanizmanın rol oynadığını göstermektedir.
- TRAIL-R2 tirozin fosforilasyonunu engelleyen (Y383F) ve taklit eden (Y383D) mutantların TRAIL-R2 stabilitesine etkisi incelendiğinde, yabancı tip ve Y383F mutantı birbirine benzer ekspresyon gösterirken, Y383D mutantının ekspresyonunun daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir.
- Yine Y383D mutantında, 67kD civarında bir bant daha gözlemlenmiş olup, tirozin fosforilasyonunun TRAIL-R2'de glikolizasyon ya da ubikinasyon gibi bir başka post-translasyonel modifikasyona zemin hazırladığını gösteriyor olabilir. Dolayısıyla, TRAIL-R2 mutantlarının hücre yüzeyinde ve nükleustaki ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi, TRAIL-R2'nin Y383' den tirozin fosforilasyonunun proteinin hücre içi yerleşiminde oynadığı rolün aydınlatılabilmesini sağlayacaktır.

- TRAIL-R2 nakavt hücrelerde TRAIL' e oluşan yanıt anlamlı olmakla beraber, Y383D mutantını eksprese eden TRAIL-R2 nakavt K562 hücreler de TRAIL duyarlı hale gelmiştir. Y383F mutantını eksprese eden hücreler ise daha düşük hücre proliferasyonuna sahiptir.
- Hem Y383D mutantı hem de Y383F mutantı ile transdükte K562 hücrelerinde TRAIL muamelesi sonrası sağkalan hücre sayısı, yabancı tip TRAIL-R2 ile transdükte edilmiş hücrelerde TRAIL muamelesi sonrasında sağkalan hücre sayısına göre anlamlı bir şekilde daha düşüktür.
- TRAIL-R2 mutantları ya da yabancı tip TRAIL-R2 ile transdükte edilmiş Hela hücre hattında ise Y383D mutantında Y383F mutantına göre anlamlı derecede daha yüksek proliferasyon gözlenmiştir. Bu durum, TRAIL-R2'nin Y383' den fosforilasyonunun hücreyi sağkalıma yönlendiren bir rol oynadığına işaret etmektedir.

KAYNAKLAR

- Algeciras-Schimnich, A., Griffith, T. S., Lynch, D. H., & Paya, C. V. Cell cycle-dependent regulation of flip levels and susceptibility to fas-mediated apoptosis. *J Immunol.* 1999; 162 (9): 5205-5211.
- Alves, R., Goncalves, A. C., Rutella, S., Almeida, A. M., De Las Rivas, J., Trougakos, I. P., & Sarmiento Ribeiro, A. B. Resistance to tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia-from molecular mechanisms to clinical relevance. *Cancers (Basel).* 2021; 13 (19).
- Arai, A., Naruse, M., Naruse, K., Tanabe, A., Yoshimoto, T., Iwama, T., . . . Demura, H. Cardiac malignant pheochromocytoma with bone metastases. *Intern Med.* 1998; 37 (11): 940-944.
- Aydin, C., Sanlioglu, A. D., Karacay, B., Ozbilim, G., Dertsiz, L., Ozbudak, O., . . . Sanlioglu, S. Decoy receptor-2 small interfering rna (sirna) strategy employing three different sirna constructs in combination defeats adenovirus-transferred tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance in lung cancer cells. *Hum Gene Ther.* 2007; 18 (1): 39-50.
- Azijli, K., Weyhenmeyer, B., Peters, G. J., de Jong, S., & Kruyt, F. A. Non-canonical kinase signaling by the death ligand trail in cancer cells: Discord in the death receptor family. *Cell Death Differ.* 2013; 20 (7): 858-868.
- Azijli, K., Yuvaraj, S., Peppelenbosch, M. P., Wurdinger, T., Dekker, H., Joore, J., . . . Kruyt, F. A. Kinome profiling of non-canonical trail signaling reveals rip1-src-stat3-dependent invasion in resistant non-small cell lung cancer cells. *J Cell Sci.* 2012; 125 (Pt 19): 4651-4661.
- Barnhart, B. C., Alappat, E. C., & Peter, M. E. The cd95 type i/type ii model. *Semin Immunol.* 2003; 15 (3): 185-193.
- Bauer, C., Hees, C., Sterzik, A., Bauernfeind, F., Mak'Anyengo, R., Duewell, P., . . . Schnurr, M. Proapoptotic and antiapoptotic proteins of the bcl-2 family regulate sensitivity of pancreatic cancer cells toward gemcitabine and t-cell-mediated cytotoxicity. *J Immunother.* 2015; 38 (3): 116-126.
- Bennett, J. (1985). *Case of hypertrophy of the spleen and liver in which death tookplace from suppuration of the blood.* Retrieved from Edinb. Med. Surg. J.:
- Bertrand, M. J., & Vandenabeele, P. The ripoptosome: Death decision in the cytosol. *Mol Cell.* 2011; 43 (3): 323-325.
- Braeuer, S. J., Buneker, C., Mohr, A., & Zwacka, R. M. Constitutively activated nuclear factor-kappab, but not induced nf-kappab, leads to trail resistance by up-regulation of x-linked inhibitor of apoptosis protein in human cancer cells. *Mol Cancer Res.* 2006; 4 (10): 715-728.
- Cha, S. S., Kim, M. S., Choi, Y. H., Sung, B. J., Shin, N. K., Shin, H. C., . . . Oh, B. H. 2.8 a resolution crystal structure of human trail, a cytokine with selective antitumor activity. *Immunity.* 1999; 11 (2): 253-261.
- Chakrabandhu, K., Huault, S., Durivault, J., Lang, K., Ta Ngoc, L., Bole, A., . . . Hueber, A. O. An evolution-guided analysis reveals a multi-signaling regulation of fas by tyrosine phosphorylation and its implication in human cancers. *PLoS Biol.* 2016; 14 (3): e1002401.

- Chaudhary, P. M., Eby, M., Jasmin, A., Bookwalter, A., Murray, J., & Hood, L. Death receptor 5, a new member of the tnfr family, and dr4 induce fadd-dependent apoptosis and activate the nf-kappab pathway. *Immunity*. 1997; 7 (6): 821-830.
- Chen, S. X., Zhao, F., & Huang, X. J. [mapk signaling pathway and erectile dysfunction]. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 2018; 24 (5): 442-446.
- Chen, X., Kandasamy, K., & Srivastava, R. K. Differential roles of rela (p65) and c-rel subunits of nuclear factor kappa b in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand signaling. *Cancer Res*. 2003; 63 (5): 1059-1066.
- Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M., & Dixit, V. M. Fadd, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of fas and initiates apoptosis. *Cell*. 1995; 81 (4): 505-512.
- Cho, Y. S., Challa, S., Moquin, D., Genga, R., Ray, T. D., Guildford, M., & Chan, F. K. Phosphorylation-driven assembly of the rip1-rip3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell*. 2009; 137 (6): 1112-1123.
- Clohessy, J. G., Zhuang, J., de Boer, J., Gil-Gomez, G., & Brady, H. J. Mcl-1 interacts with truncated bid and inhibits its induction of cytochrome c release and its role in receptor-mediated apoptosis. *J Biol Chem*. 2006; 281 (9): 5750-5759.
- Cortez, D., Reuther, G., Pendergast, A.M. The bcr-abl tyrosine kinase activates mitogenic signaling pathways and stimulates g1-to-s phase transition in hematopoietic cells. *Oncogene* 15. 1997: 2333-2342.
- Cosman, D. A family of ligands for the tnfr receptor superfamily. *Stem Cells*. 1994; 12 (5): 440-455.
- Cragg, M. S., Harris, C., Strasser, A., & Scott, C. L. Unleashing the power of inhibitors of oncogenic kinases through bh3 mimetics. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9 (5): 321-326.
- Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A., & Adams, J. M. Control of apoptosis by the bcl-2 protein family: Implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014; 15 (1): 49-63.
- Dai, X., Zhang, J., Arfuso, F., Chinnathambi, A., Zayed, M. E., Alharbi, S. A., . . . Sethi, G. Targeting tnfr-related apoptosis-inducing ligand (trail) receptor by natural products as a potential therapeutic approach for cancer therapy. *Exp Biol Med* (Maywood). 2015; 240 (6): 760-773.
- Danhauser-Riedl, S., Warmuth, M., Druker, B. J., Emmerich, B., & Hallek, M. Activation of src kinases p53/56lyn and p59hck by p210bcr/abl in myeloid cells. *Cancer Res*. 1996; 56 (15): 3589-3596.
- de Groot, R. P., Raaijmakers, J. A., Lammers, J. W., Jove, R., & Koenderman, L. Stat5 activation by bcr-abl contributes to transformation of k562 leukemia cells. *Blood*. 1999; 94 (3): 1108-1112.
- Degli-Esposti, M. A., Dougall, W. C., Smolak, P. J., Waugh, J. Y., Smith, C. A., & Goodwin, R. G. The novel receptor trail-r4 induces nf-kappab and protects against trail-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity*. 1997; 7 (6): 813-820.
- Degli-Esposti, M. A., Smolak, P. J., Walczak, H., Waugh, J., Huang, C. P., DuBose, R. F., . . . Smith, C. A. Cloning and characterization of trail-r3, a novel member of the emerging trail receptor family. *J Exp Med*. 1997; 186 (7): 1165-1170.

- Deveraux, Q. L., Roy, N., Stennicke, H. R., Van Arsedale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S. M., . . . Reed, J. C. Iap block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J.* 1998; 17 (8): 2215-2223.
- Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S., & Reed, J. C. X-linked iap is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature.* 1997; 388 (6639): 300-304.
- Dondelinger, Y., Declercq, W., Montessuit, S., Roelandt, R., Goncalves, A., Bruggeman, I., . . . Vandenabeele, P. Mkl compromises plasma membrane integrity by binding to phosphatidylinositol phosphates. *Cell Rep.* 2014; 7 (4): 971-981.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., & Wang, X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating iap inhibition. *Cell.* 2000; 102 (1): 33-42.
- Duckett, C. S., Nava, V. E., Gedrich, R. W., Clem, R. J., Van Dongen, J. L., Gilfillan, M. C., . . . Thompson, C. B. A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. *EMBO J.* 1996; 15 (11): 2685-2694.
- Ehrhardt, H., Fulda, S., Schmid, I., Hiscott, J., Debatin, K. M., & Jeremias, I. Trail induced survival and proliferation in cancer cells resistant towards trail-induced apoptosis mediated by nf-kappab. *Oncogene.* 2003; 22 (25): 3842-3852.
- Emery, J. G., McDonnell, P., Burke, M. B., Deen, K. C., Lyn, S., Silverman, C., . . . Young, P. R. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand trail. *J Biol Chem.* 1998; 273 (23): 14363-14367.
- Faderl, S., Talpaz, M., Estrov, Z., O'Brien, S., Kurzrock, R., & Kantarjian, H. M. The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 1999; 341 (3): 164-172.
- Fahmideh, H., Shapourian, H., Moltafeti, R., Tavakol, C., Forghaniesfidvajani, R., Zalpoor, H., & Nabi-Afjadi, M. The role of natural products as inhibitors of jak/stat signaling pathways in glioblastoma treatment. *Oxid Med Cell Longev.* 2022; 2022: 7838583.
- Fresno Vara, J. A., Casado, E., de Castro, J., Cepas, P., Belda-Iniesta, C., & Gonzalez-Baron, M. Pi3k/akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev.* 2004; 30 (2): 193-204.
- Fulda, S., Meyer, E., & Debatin, K. M. Inhibition of trail-induced apoptosis by bcl-2 overexpression. *Oncogene.* 2002; 21 (15): 2283-2294.
- Galluzzi, L., Kepp, O., & Kroemer, G. Mkl regulates necrotic plasma membrane permeabilization. *Cell Res.* 2014; 24 (2): 139-140.
- Garimella, S. V., Gehlhaus, K., Dine, J. L., Pitt, J. J., Grandin, M., Chakka, S., . . . Lipkowitz, S. Identification of novel molecular regulators of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (trail)-induced apoptosis in breast cancer cells by rna screening. *Breast Cancer Res.* 2014; 16 (2): R41.
- Geserick, P., Drewniok, C., Hupe, M., Haas, T. L., Diessenbacher, P., Sprick, M. R., . . . Leverkus, M. Suppression of cflip is sufficient to sensitize human melanoma cells to trail- and cd95l-mediated apoptosis. *Oncogene.* 2008; 27 (22): 3211-3220.
- Goldman, J. M., & Melo, J. V. Chronic myeloid leukemia--advances in biology and new approaches to treatment. *N Engl J Med.* 2003; 349 (15): 1451-1464.

- Griffith, T. S., Chin, W. A., Jackson, G. C., Lynch, D. H., & Kubin, M. Z. Intracellular regulation of trail-induced apoptosis in human melanoma cells. *J Immunol.* 1998; 161 (6): 2833-2840.
- Guerrache, A., & Micheau, O. Tnf-related apoptosis-inducing ligand: Non-apoptotic signalling. *Cells.* 2024; 13 (6).
- Guo, Y. J., Pan, W. W., Liu, S. B., Shen, Z. F., Xu, Y., & Hu, L. L. Erk/mapk signalling pathway and tumorigenesis. *Exp Ther Med.* 2020; 19 (3): 1997-2007.
- Hantschel, O. Structure, regulation, signaling, and targeting of abl kinases in cancer. *Genes Cancer.* 2012; 3 (5-6): 436-446.
- Hapil Zevkliler, F. Z., Copuroglu, F. E., Ertosun, M. G., Mert, U., Ozes, D., & Ozes, O. N. Tnfr1 signaling is positively regulated by jak-2 and c-src via tyrosine phosphorylation. *Turk J Biol.* 2024; 48 (1): 1-12.
- Hinz, S., Trauzold, A., Boenicke, L., Sandberg, C., Beckmann, S., Bayer, E., . . . Ungefroren, H. Bcl-xl protects pancreatic adenocarcinoma cells against cd95- and trail-receptor-mediated apoptosis. *Oncogene.* 2000; 19 (48): 5477-5486.
- Hirata, H., Takahashi, A., Kobayashi, S., Yonehara, S., Sawai, H., Okazaki, T., . . . Sasada, M. Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in fas-induced apoptosis. *J Exp Med.* 1998; 187 (4): 587-600.
- Hornbeck, P. V., Zhang, B., Murray, B., Kornhauser, J. M., Latham, V., & Skrzypek, E. Phosphositeplus, 2014: Mutations, ptms and recalibrations. *Nucleic Acids Res.* 2015; 43 (Database issue): D512-520.
- Hsu, H., Xiong, J., & Goeddel, D. V. The tnfr1-associated protein tradd signals cell death and nf-kappa b activation. *Cell.* 1995; 81 (4): 495-504.
- Hu, W. H., Johnson, H., & Shu, H. B. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptors signal nf-kappa b and jnk activation and apoptosis through distinct pathways. *J Biol Chem.* 1999; 274 (43): 30603-30610.
- Huang, N., Huang, Z., Gao, M., Luo, Z., Zhou, F., Liu, L., . . . Feng, W. Induction of apoptosis in imatinib sensitive and resistant chronic myeloid leukemia cells by efficient disruption of bcr-abl oncogene with zinc finger nucleases. *J Exp Clin Cancer Res.* 2018; 37 (1): 62.
- Hymowitz, S. G., Christinger, H. W., Fuh, G., Ultsch, M., O'Connell, M., Kelley, R. F., . . . de Vos, A. M. Triggering cell death: The crystal structure of apo2l/trail in a complex with death receptor 5. *Mol Cell.* 1999; 4 (4): 563-571.
- Hymowitz, S. G., O'Connell, M. P., Ultsch, M. H., Hurst, A., Totpal, K., Ashkenazi, A., . . . Kelley, R. F. A unique zinc-binding site revealed by a high-resolution x-ray structure of homotrimeric apo2l/trail. *Biochemistry.* 2000; 39 (4): 633-640.
- Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., . . . Tschopp, J. Inhibition of death receptor signals by cellular flip. *Nature.* 1997; 388 (6638): 190-195.
- Itoh, N., Tsujimoto, Y., & Nagata, S. Effect of bcl-2 on fas antigen-mediated cell death. *J Immunol.* 1993; 151 (2): 621-627.
- Jabbour, E., & Kantarjian, H. Chronic myeloid leukemia: 2020 update on diagnosis, therapy and monitoring. *Am J Hematol.* 2020; 95 (6): 691-709.
- Jain, P., Kantarjian, H., Patel, K. P., Gonzalez, G. N., Luthra, R., Kanagal Shamanna, R., . . . Cortes, J. Impact of bcr-abl transcript type on outcome in patients with

- chronic-phase cml treated with tyrosine kinase inhibitors. *Blood*. 2016; 127 (10): 1269-1275.
- Jeremias, I., Kupatt, C., Baumann, B., Herr, I., Wirth, T., & Debatin, K. M. Inhibition of nuclear factor kappaB activation attenuates apoptosis resistance in lymphoid cells. *Blood*. 1998; 91 (12): 4624-4631.
- Jin, Z., Dicker, D. T., & El-Deiry, W. S. Enhanced sensitivity of g1 arrested human cancer cells suggests a novel therapeutic strategy using a combination of simvastatin and trail. *Cell Cycle*. 2002; 1 (1): 82-89.
- Jouan-Lanhout, S., Arshad, M. I., Piquet-Pellorce, C., Martin-Chouly, C., Le Moigne-Muller, G., Van Herreweghe, F., . . . Dimanche-Boitrel, M. T. Trail induces necroptosis involving ripk1/ripk3-dependent parp-1 activation. *Cell Death Differ*. 2012; 19 (12): 2003-2014.
- Kahraman, S., Yilmaz, O., Altunbas, H. A., Dirice, E., & Sanlioglu, A. D. Trail induces proliferation in rodent pancreatic beta cells via akt activation. *J Mol Endocrinol*. 2021; 66 (4): 325-338.
- Khaider, N. G., Lane, D., Matte, I., Rancourt, C., & Piche, A. Targeted ovarian cancer treatment: The trails of resistance. *Am J Cancer Res*. 2012; 2 (1): 75-92.
- Kim, E. K., & Choi, E. J. Pathological roles of mapk signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1802 (4): 396-405.
- Kim, H. G., Jeong, S. G., Kim, J. H., & Cho, J. Y. Phosphatase inhibition by sodium orthovanadate displays anti-inflammatory action by suppressing akt-ikkbeta signaling in raw264.7 cells. *Toxicol Rep*. 2022; 9: 1883-1893.
- Kim, Y. H., Lee, D. H., Jeong, J. H., Guo, Z. S., & Lee, Y. J. Quercetin augments trail-induced apoptotic death: Involvement of the erk signal transduction pathway. *Biochem Pharmacol*. 2008; 75 (10): 1946-1958.
- Kischkel, F. C., Lawrence, D. A., Chuntharapai, A., Schow, P., Kim, K. J., & Ashkenazi, A. Apo2l/trail-dependent recruitment of endogenous fadd and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity*. 2000; 12 (6): 611-620.
- Kundu, M., Greer, Y. E., Dine, J. L., & Lipkowitz, S. Targeting trail death receptors in triple-negative breast cancers: Challenges and strategies for cancer therapy. *Cells*. 2022; 11 (23).
- Kwakkenbos, M. J., Diehl, S. A., Yasuda, E., Bakker, A. Q., van Geelen, C. M., Lukens, M. V., . . . Beaumont, T. Generation of stable monoclonal antibody-producing b cell receptor-positive human memory b cells by genetic programming. *Nat Med*. 2010; 16 (1): 123-128.
- Lalaoui, N., Morle, A., Merino, D., Jacquemin, G., Lessi, E., Morizot, A., . . . Micheau, O. Trail-r4 promotes tumor growth and resistance to apoptosis in cervical carcinoma hela cells through akt. *PLoS One*. 2011; 6 (5): e19679.
- Lancet, H. Chronic myeloid leukaemia: Time to push for a cure? *Lancet Haematol*. 2015; 2 (5): e175.
- Lee, M. W., Park, S. C., Yang, Y. G., Yim, S. O., Chae, H. S., Bach, J. H., . . . Kim, S. S. The involvement of reactive oxygen species (ros) and p38 mitogen-activated protein (map) kinase in trail/apo2l-induced apoptosis. *FEBS Lett*. 2002; 512 (1-3): 313-318.
- Lee, S. H., Shin, M. S., Kim, H. S., Lee, H. K., Park, W. S., Kim, S. Y., . . . Yoo, N. J. Alterations of the dr5/trail receptor 2 gene in non-small cell lung cancers. *Cancer Res*. 1999; 59 (22): 5683-5686.

- Lee, S. H., Shin, M. S., Kim, H. S., Lee, H. K., Park, W. S., Kim, S. Y., . . . Yoo, N. J. Somatic mutations of trail-receptor 1 and trail-receptor 2 genes in non-hodgkin's lymphoma. *Oncogene*. 2001; 20 (3): 399-403.
- Lemke, J., von Karstedt, S., Zinngrebe, J., & Walczak, H. Getting trail back on track for cancer therapy. *Cell Death Differ*. 2014; 21 (9): 1350-1364.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., & Wang, X. Cytochrome c and datp-dependent formation of apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. 1997; 91 (4): 479-489.
- Lin, Y., Devin, A., Cook, A., Keane, M. M., Kelliher, M., Lipkowitz, S., & Liu, Z. G. The death domain kinase rip is essential for trail (apo2l)-induced activation of ikappab kinase and c-jun n-terminal kinase. *Mol Cell Biol*. 2000; 20 (18): 6638-6645.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., & Wang, X. Bid, a bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*. 1998; 94 (4): 481-490.
- Mahalingam, D., Keane, M., Pirianov, G., Mehmet, H., Samali, A., & Szegezdi, E. Differential activation of jnk1 isoforms by trail receptors modulate apoptosis of colon cancer cell lines. *Br J Cancer*. 2009; 100 (9): 1415-1424.
- Marsters, S. A., Sheridan, J. P., Pitti, R. M., Huang, A., Skubatch, M., Baldwin, D., . . . Ashkenazi, A. A novel receptor for apo2l/trail contains a truncated death domain. *Curr Biol*. 1997; 7 (12): 1003-1006.
- McEleny, K. R., Watson, R. W., & Fitzpatrick, J. M. Defining a role for the inhibitors of apoptosis proteins in prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2001; 4 (1): 28-32.
- Meurette, O., Rebillard, A., Huc, L., Le Moigne, G., Merino, D., Micheau, O., . . . Dimanche-Boitrel, M. T. Trail induces receptor-interacting protein 1-dependent and caspase-dependent necrosis-like cell death under acidic extracellular conditions. *Cancer Res*. 2007; 67 (1): 218-226.
- Milani, D., Zauli, G., Rimondi, E., Celeghini, C., Marmioli, S., Narducci, P., . . . Secchiero, P. Tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand sequentially activates pro-survival and pro-apoptotic pathways in sk-n-mc neuronal cells. *J Neurochem*. 2003; 86 (1): 126-135.
- Nam, Y. W., Shin, J. H., Kim, S., Hwang, C. H., Lee, C. S., Hwang, G., . . . Song, J. Correction: Egfr inhibits tnfr1-mediated pathway by phosphorylating tnfr1 at tyrosine 360 and 401. *Cell Death Differ*. 2024.
- Naval, J., de Miguel, D., Gallego-Lleyda, A., Anel, A., & Martinez-Lostao, L. Importance of trail molecular anatomy in receptor oligomerization and signaling. Implications for cancer therapy. *Cancers (Basel)*. 2019; 11 (4).
- Neumann, E. Uber myelogene leukemia. *Berliner Klinische Wochenschr*. 1878: 69-72.
- Orozco, S., Yatim, N., Werner, M. R., Tran, H., Gunja, S. Y., Tait, S. W., . . . Oberst, A. Ripk1 both positively and negatively regulates ripk3 oligomerization and necroptosis. *Cell Death Differ*. 2014; 21 (10): 1511-1521.
- Ortiz-Ferron, G., Tait, S. W., Robledo, G., de Vries, E., Borst, J., & Lopez-Rivas, A. The mitogen-activated protein kinase pathway can inhibit trail-induced apoptosis by prohibiting association of truncated bid with mitochondria. *Cell Death Differ*. 2006; 13 (11): 1857-1865.

- Pan, G., Ni, J., Wei, Y. F., Yu, G., Gentz, R., & Dixit, V. M. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for trail. *Science*. 1997; 277 (5327): 815-818.
- Pan, G., Ni, J., Yu, G., Wei, Y. F., & Dixit, V. M. Trundd, a new member of the trail receptor family that antagonizes trail signalling. *FEBS Lett*. 1998; 424 (1-2): 41-45.
- Pan, G., O'Rourke, K., Chinnaiyan, A. M., Gentz, R., Ebner, R., Ni, J., & Dixit, V. M. The receptor for the cytotoxic ligand trail. *Science*. 1997; 276 (5309): 111-113.
- Park, S. J., Kim, M. J., Kim, H. B., Kang, C. D., & Kim, S. H. Sensitization of imatinib-resistant cml cells to trail-induced apoptosis is mediated through down-regulation of bcr-abl as well as c-flip. *Biochem J*. 2009; 420 (1): 73-81.
- Park, W. S., Lee, J. H., Shin, M. S., Park, J. Y., Kim, H. S., Kim, Y. S., . . . Lee, J. Y. Inactivating mutations of killer/dr5 gene in gastric cancers. *Gastroenterology*. 2001; 121 (5): 1219-1225.
- Pitti, R. M., Marsters, S. A., Ruppert, S., Donahue, C. J., Moore, A., & Ashkenazi, A. Induction of apoptosis by apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem*. 1996; 271 (22): 12687-12690.
- Ptasznik, A., Urbanowska, E., Chinta, S., Costa, M. A., Katz, B. A., Stanislaus, M. A., . . . Gewirtz, A. M. Crosstalk between bcr/abl oncoprotein and cxcr4 signaling through a src family kinase in human leukemia cells. *J Exp Med*. 2002; 196 (5): 667-678.
- Ravi, R., Bedi, G. C., Engstrom, L. W., Zeng, Q., Mookerjee, B., Gelinas, C., . . . Bedi, A. Regulation of death receptor expression and trail/apo2l-induced apoptosis by nf-kappab. *Nat Cell Biol*. 2001; 3 (4): 409-416.
- Rowley, J. D. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronicmyelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and giemsa staining. *Nature*. 1973; 243: 290-293.
- Samanta, A., Perazzone, B., Chakraborty, S., Sun, X., Modi, H., Bhatia, R., . . . Arlinghaus, R. Janus kinase 2 regulates bcr-abl signaling in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2011; 25 (3): 463-472.
- Samanta, A. K., Lin, H., Sun, T., Kantarjian, H., & Arlinghaus, R. B. Janus kinase 2: A critical target in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Res*. 2006; 66 (13): 6468-6472.
- Sampaio, M. M., Santos, M. L. C., Marques, H. S., Goncalves, V. L. S., Araujo, G. R. L., Lopes, L. W., . . . de Melo, F. F. Chronic myeloid leukemia-from the philadelphia chromosome to specific target drugs: A literature review. *World J Clin Oncol*. 2021; 12 (2): 69-94.
- Sanlioglu, A. D., Dirice, E., Aydin, C., Erin, N., Koksoy, S., & Sanlioglu, S. Surface trail decoy receptor-4 expression is correlated with trail resistance in mcf7 breast cancer cells. *BMC Cancer*. 2005; 5: 54.
- Sanlioglu, A. D., Karacay, B., Koksai, I. T., Griffith, T. S., & Sanlioglu, S. Dcr2 (trail-r4) sirna and adenovirus delivery of trail (ad5htrail) break down in vitro tumorigenic potential of prostate carcinoma cells. *Cancer Gene Ther*. 2007; 14 (12): 976-984.
- Scaffidi, C., Schmitz, I., Krammer, P. H., & Peter, M. E. The role of c-flip in modulation of cd95-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 1999; 274 (3): 1541-1548.

- Schimmer, A. D., Welsh, K., Pinilla, C., Wang, Z., Krajewska, M., Bonneau, M. J., . . . Reed, J. C. Small-molecule antagonists of apoptosis suppressor xiap exhibit broad antitumor activity. *Cancer Cell*. 2004; 5 (1): 25-35.
- Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S., & Peter, M. E. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem*. 1998; 254 (3): 439-459.
- Sheikh, M. S., Huang, Y., Fernandez-Salas, E. A., El-Deiry, W. S., Friess, H., Amundson, S., . . . Fornace, A. J., Jr. The antiapoptotic decoy receptor trid/trail-r3 is a p53-regulated DNA damage-inducible gene that is overexpressed in primary tumors of the gastrointestinal tract. *Oncogene*. 1999; 18 (28): 4153-4159.
- Sheridan, J. P., Marsters, S. A., Pitti, R. M., Gurney, A., Skubatch, M., Baldwin, D., . . . Ashkenazi, A. Control of trail-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science*. 1997; 277 (5327): 818-821.
- Shin, M. S., Kim, H. S., Lee, S. H., Park, W. S., Kim, S. Y., Park, J. Y., . . . Yoo, N. J. Mutations of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (trail-r1) and receptor 2 (trail-r2) genes in metastatic breast cancers. *Cancer Res*. 2001; 61 (13): 4942-4946.
- Shlyakhtina, Y., Pavet, V., & Gronemeyer, H. Dual role of dr5 in death and survival signaling leads to trail resistance in cancer cells. *Cell Death Dis*. 2017; 8 (8): e3025.
- Skorski, T., Bellacosa, A., Nieborowska-Skorska, M., Majewski, M., Martinez, R., Choi, J. K., . . . Calabretta, B. Transformation of hematopoietic cells by bcr/abl requires activation of a pi-3k/akt-dependent pathway. *EMBO J*. 1997; 16 (20): 6151-6161.
- Son, J. K., Varadarajan, S., & Bratton, S. B. Trail-activated stress kinases suppress apoptosis through transcriptional upregulation of mcl-1. *Cell Death Differ*. 2010; 17 (8): 1288-1301.
- Song, J. J., Kim, J. H., Sun, B. K., Alcala, M. A., Jr., Bartlett, D. L., & Lee, Y. J. C-cbl acts as a mediator of src-induced activation of the pi3k-akt signal transduction pathway during trail treatment. *Cell Signal*. 2010; 22 (3): 377-385.
- Song, J. J., & Lee, Y. J. Differential cleavage of mst1 by caspase-7/-3 is responsible for trail-induced activation of the mapk superfamily. *Cell Signal*. 2008; 20 (5): 892-906.
- Spierings, D. C., de Vries, E. G., Vellenga, E., van den Heuvel, F. A., Koornstra, J. J., Wesseling, J., . . . de Jong, S. Tissue distribution of the death ligand trail and its receptors. *J Histochem Cytochem*. 2004; 52 (6): 821-831.
- Sprick, M. R., Weigand, M. A., Rieser, E., Rauch, C. T., Juo, P., Blenis, J., . . . Walczak, H. Fadd/mort1 and caspase-8 are recruited to trail receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by trail receptor 2. *Immunity*. 2000; 12 (6): 599-609.
- Ta, N. L., Chakrabandhu, K., Huault, S., & Hueber, A. O. The tyrosine phosphorylated pro-survival form of fas intensifies the egf-induced signal in colorectal cancer cells through the nuclear egfr/stat3-mediated pathway. *Sci Rep*. 2018; 8 (1): 12424.
- Tartaglia, L. A., Ayres, T. M., Wong, G. H., & Goeddel, D. V. A novel domain within the 55 kd tnfr receptor signals cell death. *Cell*. 1993; 74 (5): 845-853.
- Testa, U. Trail/trail-r in hematologic malignancies. *J Cell Biochem*. 2010; 110 (1): 21-34.

- Vaculova, A., Hofmanova, J., Soucek, K., & Kozubik, A. Different modulation of trail-induced apoptosis by inhibition of pro-survival pathways in trail-sensitive and trail-resistant colon cancer cells. *FEBS Lett.* 2006; 580 (28-29): 6565-6569.
- Van Geelen, C. M., de Vries, E. G., & de Jong, S. Lessons from trail-resistance mechanisms in colorectal cancer cells: Paving the road to patient-tailored therapy. *Drug Resist Updat.* 2004; 7 (6): 345-358.
- Varfolomeev, E., Maecker, H., Sharp, D., Lawrence, D., Renz, M., Vucic, D., & Ashkenazi, A. Molecular determinants of kinase pathway activation by apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *J Biol Chem.* 2005; 280 (49): 40599-40608.
- Ventura, J. J., Hubner, A., Zhang, C., Flavell, R. A., Shokat, K. M., & Davis, R. J. Chemical genetic analysis of the time course of signal transduction by jnk. *Mol Cell.* 2006; 21 (5): 701-710.
- Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L. M., Reid, G. E., . . . Vaux, D. L. Identification of diablo, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing iap proteins. *Cell.* 2000; 102 (1): 43-53.
- Wagner, K. W., Punnoose, E. A., Januario, T., Lawrence, D. A., Pitti, R. M., Lancaster, K., . . . Ashkenazi, A. Death-receptor o-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand apo2l/trail. *Nat Med.* 2007; 13 (9): 1070-1077.
- Wajant, H. Trail and nf-kappa-b signaling--a complex relationship. *Vitam Horm.* 2004; 67: 101-132.
- Wajant, H., Moosmayer, D., Wuest, T., Bartke, T., Gerlach, E., Schonherr, U., . . . Pfizenmaier, K. Differential activation of trail-r1 and -2 by soluble and membrane trail allows selective surface antigen-directed activation of trail-r2 by a soluble trail derivative. *Oncogene.* 2001; 20 (30): 4101-4106.
- Walczak, H., Degli-Esposti, M. A., Johnson, R. S., Smolak, P. J., Waugh, J. Y., Boiani, N., . . . Rauch, C. T. Trail-r2: A novel apoptosis-mediating receptor for trail. *EMBO J.* 1997; 16 (17): 5386-5397.
- Wang, H., Sun, L., Su, L., Rizo, J., Liu, L., Wang, L. F., . . . Wang, X. Mixed lineage kinase domain-like protein mlkl causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by rip3. *Mol Cell.* 2014; 54 (1): 133-146.
- Wang, Q., Ji, Y., Wang, X., & Evers, B. M. Isolation and molecular characterization of the 5'-upstream region of the human trail gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 276 (2): 466-471.
- Weldon, C. B., Parker, A. P., Patten, D., Elliott, S., Tang, Y., Frigo, D. E., . . . Burow, M. E. Sensitization of apoptotically-resistant breast carcinoma cells to tnfr and trail by inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase signaling. *Int J Oncol.* 2004; 24 (6): 1473-1480.
- Wiley, S. R., Schooley, K., Smolak, P. J., Din, W. S., Huang, C. P., Nicholl, J. K., . . . et al. Identification and characterization of a new member of the tnfr family that induces apoptosis. *Immunity.* 1995; 3 (6): 673-682.
- Xu, J., Xu, Z., Zhou, J. Y., Zhuang, Z., Wang, E., Boerner, J., & Wu, G. S. Regulation of the src-pp2a interaction in tumor necrosis factor (tnfr)-related apoptosis-inducing ligand (trail)-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2013; 288 (46): 33263-33271.

- Xu, J., Zhou, J. Y., Wei, W. Z., & Wu, G. S. Activation of the akt survival pathway contributes to trail resistance in cancer cells. PLoS One. 2010; 5 (4): e10226.
- Zhang, D. W., Shao, J., Lin, J., Zhang, N., Lu, B. J., Lin, S. C., . . . Han, J. Rip3, an energy metabolism regulator that switches tnfr-induced cell death from apoptosis to necrosis. Science. 2009; 325 (5938): 332-336.
- Zhang, L., & Fang, B. Mechanisms of resistance to trail-induced apoptosis in cancer. Cancer Gene Ther. 2005; 12 (3): 228-237.
- Zhang, L., Zhu, H., Davis, J. J., Jacob, D., Wu, S., Teraishi, F., . . . Fang, B. Lack of p38 map kinase activation in trail-resistant cells is not related to the resistance to trail-mediated cell death. Cancer Biol Ther. 2004; 3 (3): 296-301.
- Zhang, X., Zhang, G., Zhang, H., Karin, M., Bai, H., & Cai, D. Hypothalamic ikkbeta/nf-kappab and er stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. Cell. 2008; 135 (1): 61-73.
- Zhang, X. D., Borrow, J. M., Zhang, X. Y., Nguyen, T., & Hersey, P. Activation of erk1/2 protects melanoma cells from trail-induced apoptosis by inhibiting smac/diablo release from mitochondria. Oncogene. 2003; 22 (19): 2869-2881.
- Zhang XD, F. A., Myers K, Gray C, Nguyen T and Hersey P. . 1999 Cancer Res. 59: 2747–2753.
- Zhang, X. H., Wang, Q., Gerald, W., Hudis, C. A., Norton, L., Smid, M., . . . Massague, J. Latent bone metastasis in breast cancer tied to src-dependent survival signals. Cancer Cell. 2009; 16 (1): 67-78.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	PINAR	Uyruğu	T.C.
Soyadı	BAHŞİ	Tel no	
Doğum tarihi		e-posta	

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	Tepecik Hüsnü Özyeğin Lisesi	2011
Lisans	İnönü Üniversitesi	2016
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi	2019
Doktora	Akdeniz Üniversitesi	2025

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Arş. Gör.	Akdeniz Üniversitesi	2017- Devam ediyor

--	--	--

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İNGİLİZCE	YDS	70
İNGİLİZCE	YÖK DİL	90

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Battalgazi Belediyesi 4007 TÜBİTAK Bilim Şenliği	BATTALGAZİ BELEDİYESİ	2016-2016
Prader-Willi Sendromu Bulgularını Taşıyan Normal Karyotipe Sahip Olgularda Metilasyon ve Uniparental Dizomi (UPD) Profillerinin Araştırılması	BAP	2017-2019
Fasiyal sinir hasarı sonrası rejenerasyon süresince ultrason terapinin VEGF ve VEGF reseptörlerinin ekspresyonu üzerine etkisi	BAP	2018-2020
Bilimsel Araştırmalarda Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalının Yeri ve Önemi	BAP	2019-2020
Prader-Willi Benzeri Sendrom fenotipi gösteren olgularda 6q161-q21 bölgesinin aCGH yöntemi ile incelenmesi	BAP	2022-2024
DNA Hasar Tamir Proteinleri ATM ve DNA-PK'nin Cas9 nükleaz ile ilişkisinin incelenmesi	BAP	2023-2025
K562 hücre hattının TRAIL dirençliliğinde TRAIL-R2 Tirozin Fosforilasyonunun Rolünün İncelenmesi	BAP	2023-2025
TRAIL Sinyal İletiminde TRAIL-R2 Tirozin Fosforilasyonunun Rolünün Aydınlatılması	TÜBİTAK	2024-2027

Burslar-Ödüller:

- TÜBİTAK-BİDEB Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2250-Lisansüstü Bursları Performans Programı, 2025 - 1.
- TÜBİTAK-2224-B Yurt İçi Bilimsel Etkinliklere Katılımı Destekleme Programı- 2025-2. Dönem

Yayınlar ve Bildiriler:

- Ailesel amiloidozis polinöropatisi olduğu düşünülen olgularda *TTR* gen mutasyonlarının araştırılması, XV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi (Uluslararası Katılımlı), Poster Sunumu, 2017.
- Prader-Willi Sendromu bulgularını taşıyan normal karyotipe sahip olgularda metilasyon ve uniparental dizomi profillerinin araştırılması, ULUSLARARASI KATILIMLI TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK KONGRESİ, Sözlü Sunum, 2019.
- A. HİZAY, U. ÖZSOY, K. SAVAŞ, S. Y. UZUNER, Ö. Ö. ÜNLÜ, S. S. AKKAN & P. BAŞİ. Effect of Ultrasound Therapy on Expression of Vascular Endothelial Growth Factor, Vascular Endothelial Growth Factor Receptors, CD31 and Functional Recovery After Facial Nerve Injury. Ultrasound in Medicine & Biology (2022) Cilt : 48 Sayı : 8 Sayfa : 1453-1467.
- P. BAŞİ, S. YAKUT UZUNER, S. KARAÜZÜM, B. NUR, E. MIHÇI, F.Z. HAPİL ZEVLİLİLER. Evaluation of Clinically Overlapping Prader-Willi and Prader-Willi-Like Syndromes Using MS-MLPA and CGH Akdeniz Tıp Dergisi (2025, kabul. Yayın sürecinde).
- P. Başİ, S.N. Polat, D.N. Dağdelen, F.Z. Hapil. TRAILR2 and Abl Are Key Mediators of Sodium Orthovanadate Toxicity in K562 Cells. The 49th FEBS Congress, Poster Sunumu, 5-9 Haziran 2025.