

**T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ BİLİM DALI**

**PRİON PROTEİN ANLATIMI BASKILANMIŞ İLACA DİRENÇLİ
H69 HÜCRE HATTINDA HÜCRE ÖLÜM TİPLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Zübeyde ÖZTEL

**Danışman
Prof.Dr. Erdal BALCAN**



MANİSA-2018

Zübeyde
ÖZTEL

**PRION PROTEİN ANLATIMI BASKILANMIŞ İLAÇA DİRENÇLİ H69
HÜCRE HATTINDA HÜCRE ÖLÜM TIPLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

2018

TEZ ONAYI

Zübeyde ÖZTEL tarafından hazırlanan " PRİON PROTEİN ANLATIMI BASKILANMIŞ İLACA DİRENÇLİ H69 HÜCRE HATTINDA HÜCRE ÖLÜM TİPLERİNİN ARAŞTIRILMASI" adlı tez çalışması xx/xx/xxxx tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri önünde Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak savunulmuş ve oyçokluğu / oybirliği ile başarılı olarak kabul edilmiştir.

Danışman

Prof. Dr.Erdal BALCAN
Manisa Celal Bayar Üniversitesi

Jüri Üyesi

Doç. Dr.Harika ATMACA
Manisa Celal Bayar Üniversitesi

Jüri Üyesi

Doç. Dr. Savaş İZZETOĞLU
Ege Üniversitesi

TAAHHÜTNAME

Bu tezin Celal Bayar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde, akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Zübeyde ÖZTEL



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	I
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	III
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
TABLolar DİZİNİ	VIII
TEŞEKKÜR.....	IX
ÖZET.....	X
ABSTRACT.....	XII
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1.Kanser	3
2.2.Akciğer Kanseri	3
2.3.Kanserde Direnç Mekanizmaları	5
2.3.1 ABC Taşıyıcı Ailesi	6
2.3.2. p-glikoprotein (p-gp, ABCB1, Çoklu İlaç Direnç Proteini 1, MDR1)..	7
2.3.3. MRP-1 (ABCC1, Çoklu ilaç Direnci İle İlişkili Protein 1).....	8
2.3.4. BCRP (ABCG2, Meme Kanseri Direnci Proteini)	8
2.4. Dokсорubisin.....	8
2.5. Hücre Ölüm Mekanizmaları	9
2.5.1. Apoptosis	9
2.5.2. Otofaji:	11
2.6. Apoptosis, Otofaji ve Kanser Arasındaki İşbirliği	12
2.7. Prion Proteini	14

3.MATERYAL VE YÖNTEM	19
3.1 Çalışmada Kullanılan Malzemeler.....	19
3.2.Hücre Hattının Alınması ve İdamesi	20
3.3.Hücre Sayımı	22
3.4.Stok Solüsyonların Hazırlanması.....	22
3.5.MTT [3-(4, 5- dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] Sitotoksisite Testi ve Grupların Oluşturulması.....	22
3.6.siRNA Transfeksiyonu ile PrP Susturulması.....	24
3.7.İmmunositokimya Uygulaması.....	26
3.8.Monodansilkadaverin (MDC) Boyaması.....	27
3.9. İmmunofloresan Yoğunlukların Ölçümü.....	28
3.9.İstatistiksel Analiz.....	28
4.BULGULAR	30
4.1. MTT	30
4.2. İmmunositokimya Bulguları	32
4.2.1. PrP	32
4.2.2. Bax	36
4.2.3. CD44	40
4.2.4. Beclin-1	43
4.3. Monodansilkadaverin (MDC) Uygulamaları.....	47
5.TARTIŞMA	51
6.SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	64
7.KAYNAKLAR	66
ÖZGEÇMİŞ	81

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABC	ATP Bağlayan Kaset Protein
ABCC1	Çoklu İlacı Direnç Protein-1
ABCG2	Meme Kanseri Direnç Protein-2
ATCC	American Type Culture Collection
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
BCLP	Breast Cancer Resistance Protein
BH	Bcl-2 Homoloji Domain
BSE	Bovine Spongiform Ensefalopati
Chk2	C checkpoints Factor 2
CI	Hata Aralığı
CIAP	Cellular İnhibitor of Apoptosis Protein-1
CJD	Creutzfeldt-Jacop Hastalığı
COX2	Siklojenaz-2
DAPI	4'6-Diamidina-2-Phelindole Dihydrochloride
DD	Ölüm Domaini
DED	Ölüm Efektör Domaini
DISK	Ölüm İndükleyici Sinyal Kompleksi
DMSO	Dimetilsülfoksit
DTHF	Düzeltilmiş Total Hücre Floresan Yoğunluğu
EDTA	Etilndiamin tetraasetik asit

EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörleri
EMT	Epidermal-Mezenşimal Geçiş
ER-MAM	Endoplazmik Retikulum-Mitokondri İle İlişikili Membran
FBS	Fötal buzağı serumu
FFI	Fatal Familiar İnsamnia
FITC	Floresanizotiyosiyanat
GPI	Glikozilfosfotidilinozitol
GSS	Gertsmann-Straussler-Scheinker
Hh	Hedgehog
IAP	Apoptozisi İnhibe Edici Protein
LRP1	Low-density lipoprotein receptor-related protein1
MDC	Monodansilcadaverin
MDM-2	Mouse Double Minute-2
MDR	Çoklu İlaça Direnç
MTT	3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NBD	Nükleotid Bağlama Domaini
NF-κB	Nükleer Faktör kappa B
NSCLC	KüçükHücreli Olmayan Akciğer Kanseri
PARP	Poli ADP Riboz Polimeraz
PBS	Fosfatlanmış tampon çözeltisi
p-gp	p-glikoprotein
PI3K	Fosfotidil İnozitol 3-kinaz

PI3P	Fosfotidil İnoзит 3-Fosfat
PrP	Prion Proteini
Prp^{sc}	Scrapie Prion
SCLC	Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
SH3GLB1/BIF-1	SH3-domain GRB-2 like endophilin B1
TMDs	Transmembran Domainleri
TP53	Tümör protein p53
TSCR	Tuberous sclerosis kompleks 2
TSE	Transmissible Spongiform Enselopati
TUNEL	Treminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
UVRAG	UV Radyasyon Rezistan İle İlişkili

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2-1 Doksorubisin yapısı	9
Şekil 2-2 Dış ve iç apoptotik yollar.....	10
Şekil 2-3 Temel otofajik süreç.	11
Şekil 2-4 PrP'nin rol aldığı fizyolojik olaylar.....	15
Şekil 2-5 PrP'nin rol aldığı downstream olaylar.....	16
Şekil 3-1 H69AR hücre hattının mikroskopik görüntüsü	21
Şekil 3-2 Doksorubisinin MTT testi ile belirlenen IC50 dozu grafiği.....	23
Şekil 4-1 Farklı doz doksorubisin uygulanan H69AR hücrelerindeki canlılığın zamana bağlı değişimi.....	30
Şekil 4-2 Farklı doz MTT uygulamasına ait grafiksel veriler.....	31
Şekil 4-3 Grup 1'deki PrP ekspresyonları	32
Şekil 4-4 Grup 1'de yüzeyel eksprese olan PrP molekülleri.....	32
Şekil 4-5 Grup 2'de PrP ekspresyonları.....	33
Şekil 4-6 Grup 2'de diffüz ve yüzeyel dağılım gösteren PrP molekülleri.....	33
Şekil 4-7 siRNA uygulaması ile azalan PrP ekspresyonları	34
Şekil 4-8 Grup4'de azalan PrP ekspresyonları.....	34
Şekil 4-9 PrP immunofloresan yoğunluklarının sayısal verileri	35
Şekil 4-10 PrP immunfloresan yoğunluklarının gruplara göre dağılımı.....	36
Şekil 4-11 Grup 1'deki Bax ekspresyonları	37
Şekil 4-12 Grup2'deki Bax ekspresyonları	37

Şekil 4-13 siRNA transfeksiyonu ile Bax’da görülen hafif azalmalar.....	37
Şekil 4-14 Grup 4’te görülen Bax ekspresyonları.....	38
Şekil 4-15 Gruplarda Bax’ın immunofloresan yoğunluklarının sayısal verileri.....	38
Şekil 4-16 Bax immunfloresan yoğunluklarının gruplara göre dağılımı	39
Şekil 4-17 Grup 1’de CD44 molekülünün ekspresyon düzeyleri	40
Şekil 4-18 Grup 2’de CD44 molekülündeki değişiklikler	40
Şekil 4-19 siRNA transfeksiyonu sonucunda CD44’de görülen değişiklikler.....	41
Şekil 4-20 Grup 4’de CD44 ekspresyonları	41
Şekil 4-21 Gruplarda CD44’ün immunofloresan yoğunluklarının sayısal verileri....	42
Şekil 4-22 CD44 immunfloresan yoğunluklarının gruplara göre dağılımı	43
Şekil 4-23 Grup 1’de Beclin-1 ekspresyonları.....	43
Şekil 4-24 Grup 2’de görülen Beclin-1 ekspresyonları.....	44
Şekil 4-25 siRNA transfeksiyonunun Beclin-1 ekspresyonu üzerine etkisi	44
Şekil 4-26 Grup 4’de Beclin-1 ekspresyonları.....	45
Şekil 4-27 gruplarda Beclin-1’in immunofloresan yoğunluklarının sayısal verileri .	45
Şekil 4-28 Beclin-1 immunfloresan yoğunluklarının gruplara göre dağılımı	46
Şekil 4-29 Gruplardaki MDC boyanmaları	47
Şekil 4-30 MDC uygulaması ile gruplardaki vakuol sayılarının analizi.....	48
Şekil 4-31 Grup 4’de MDC sarasında belirlenen apoptotik hücre	49
Şekil 4-32 Grup 4’de immunositokimya ile belirlenen apoptotik hücreler.....	50

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 3-1 Çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler.....	19
Tablo 3-2 Çalışmalarda kullanılan cihazlar ve sarf malzemeler.....	20
Tablo 3-3 İmmunositokimya uygulaması için kullanılan antikorlar.....	27
Tablo 4-1 PrP'nin gruplardaki immunfloresan yoğunluğu verileri.....	35
Tablo 4-2 Bax'nın gruplardaki immunfloresan yoğunluğu verileri	39
Tablo 4-3 CD44'nın gruplardaki immunfloresan yoğunluğu verileri	42
Tablo 4-4 Beclin-1'nin gruplardaki immunfloresan yoğunluğu verileri	45
Tablo 4-5 MDC uygulaması sonunda gruplara göre vakuol dağılımı.....	48
Tablo 4-6 MDC ile belirlenen vakuol (+) ve vakuol (-) hücrelerin istatistiği.....	49
Tablo 4-7 Apoptotik morfolojiye benzeyen hücrelerin gruplara göre dağılımı.....	50

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans programım boyunca benden desteklerini esirgemeyen başta danışmanım Prof.Dr.Erdal BALCAN’a ve aileme teşekkürlerimi borç bilirim. Çalışmalarında laboratuvar imkanlarından faydalanmama müsaade eden DEFAM kurumuna ve çalışmam da gerekli finansal desteği 2016/160’nolu projeyle sağlayan Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri komisyonuna teşekkürlerimi sunarım.

Zübeyde ÖZTEL

Manisa, 2018

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Prion Protein Anlatımı Baskılanmış İlaça Dirençli H69 Hücre Hattında Hücre Ölüm Tiplerinin Araştırılması

Zübeyde ÖZTEL

Manisa Celal Bayar Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof.Dr. Erdal BALCAN

Prion (PrP) çok çeşitli hücre tiplerinde eksprese olan ve hücre sinyalleme, farklılaşma ve programlanmış hücre ölümü gibi çok sayıda hücreyel olayda rol alan, oldukça korunmuş bir hücre yüzey glikoproteinidir. Birçok önemli çalışma PrP'nin tümör biyolojisindeki rolünü araştırmış olsa da kanserde bu proteinin biyolojik aktivitesi ile ilişkili mekanizmalar büyük ölçüde keşfedilmemiştir. Son bulgular PrP'nin metastazı ve çoklu ilaca direnci (MDR) ile ilgili olduğunu öne sürmektedir. Bununla birlikte, kanserde PrP ile ilişkili MDR'nin altında yatan mekanizma tam olarak anlaşılamamıştır. Bu çalışmada iki hipotetik soru üzerine odaklandık: ilk olarak PrP'nin RNA interference ile baskılanmasının ilaca dirençli kanser hücrelerinin yaşamı ya da ölümü üzerine olası etkisi nedir? İkinci nokta, "siRNA transfeksiyonu sonrasında hangi tip hücre ölümü görülebilir" sorusudur. Bu sorulara açıklık getirmek için doksorubisine dirençli küçük hücreli akciğer kanseri hücre hattı H69AR'de siRNA ile PrP baskılanmasını içeren bir deneysel bir dizayn oluşturduk. PrP, CD44, Beclin-1 ve Bax moleküllerinin ekspresyon düzeylerini, uygulama yapılmamış grup [Dokso (-); Grup 1], doksorubisinin %50 azalmaya neden olan inhibitör konsantrasyonu (IC₅₀) ile muamele edilen grup [Dokso (+); Grup 2], PrP'yi hedefleyen siRNA ile transfekte edilen grup [siRNA/Dokso (-); Grup 3] ve son

olarak siRNA ile transfeke ve doksorubisin IC₅₀ dozu ile muamele edilen grup [siRNA/Dokso (+); Grup 4] şeklinde oluşturulmuş deney gruplarında immunositokimya ile araştırdık. Ayrıca, otofojiyi monodansilkadaverin ile monitorize ettik. Immunositokimyasal analizler ile PrP ve Bax düzeylerinin doksorubisin uygulamasıyla artış gösterdiğini, bununla birlikte Grup 3 ve 4’de Bax düzeyinin doksorubisin uygulanmış gruba göre hafifçe azaldığını ortaya koydu ($p > 0.05$). CD44 ekspresyon düzeylerinin gruplar arasında önemli bir değişiklik olmadığı görüldü. Bu sonuç, CD44 ekspresyonunun H69AR hücrelerde PrP- ve doksorubisin-bağımsız olarak gerçekleştiğini düşündürmüştür. Beclin-1 ekspresyonunun, doksorubisin uygulama grubunda (Grup 2) ($p < 0.05$), siRNA transfeksiyon grubunda (Grup 3) ve siRNA transfeksiyon + doksorubisin uygulama grubunda (Grup 4) ($p < 0.05$) artış göstermesi ilginçtir. Bu gruplarda monodansilkadaverin boyaması ile görülen otofajik vakuol artışı bu bulguyu kısmen destekleyebilir. Bu sonuçlar göz önüne alındığında PrP’nin kemoterapiye dirençte önemli bir rolü olduğunu ve bu proteinin baskılanmasının H69AR hücrelerde bir hücre ölüm mekanizmasını, apoptozisten çok otofajiyi, indüklediği sonucuna vardık. Sonuç olarak, PrP’nin downregülasyonu kemoterapötiklerle kombine edildiğinde yeni bir anti-kanser stratejisi gibi durmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Kanser, Çoklu ilaca direnç, PrP, Programlanmış hücre ölüm tipleri

ABSTRACT

M.Sc

Investigation of the Cell Death Types on Prion Protein Expression Supressed Multigrug Resistant Cell Line, H69

Zübeyde ÖZTEL

**Manisa Celal Bayar University
Graduate School of Applied and Natural Sciences
Department of Biology**

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Erdal BALCAN

Prion (PrP) is a highly conserved cell surface glycoprotein expressed in a wide range cell types and plays a critical role in many cellular events including cell signalling, differentiation and programmed cell death. Despite many significant works have been investigated the involvement of PrP in tumor biology, the mechanisms associated with biological activity of this protein in cancer remains largely unexplored. Recent findings suggested that PrP could promote metastasis and multidrug resistance (MDR). However, the exact mechanism underlying PrP-associated MDR in cancers have not been fully elucidated. In the present study, we focused two hypothetical questions: first, what is the possible effect of the knockdown of PrP by RNA interference to survival of drug-resistant cancer cells? The second point is the question of “which type of cell death progress can be seen after the siRNA transfection?” To clarify these questions, we therefore created an experimental design including knockdown of PrP by siRNA in a doxorubicin-resistant small cell lung cancer cell line, H69AR. The expression levels of PrP, CD44, Beclin-1 and Bax molecules in experimental groups, including the untreated group [Doxo (-); Group 1], the group were treated with doxorubicin at half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) [Doxo (+); Group 2], the group were transfected with siRNA targeting PrP [siRNA/Doxo (-); Group 3] and finally the group were transfected with siRNA plus treated with doxorubicin IC₅₀ [siRNA/Doxo (+); Group

4], were evaluated by immunocytochemistry. Also, autophagy monitored by monodansylcadaverine dye. Our immunocytochemical analyses indicated that PrP and Bax levels increased upon doxorubicin treatment, however the expression levels of Bax slightly decreased in the Groups 3 and 4 versus doxorubicin treated group ($p > 0.05$). When the CD44 expression levels were evaluated, non-critical differences between the groups was seen. This result suggest that CD44 expression in H69AR cells occurs PrP- and doxorubicin-independent manner. Interestingly, Beclin-1 expression levels were increased upon doxorubicin treatment (Group 2) ($p < 0.05$) and siRNA transfection (Group 3) as well as siRNA transfection + doxorubicin treatment (Group 4) ($p < 0.05$). Increased levels of autophagic vacuoles in these groups observed with monodansylcadaverine stainings could partially confirmed this result. Given this intriguing results we conclude that PrP has an important role in chemoresistance and knockdown of this protein induces a cell death mechanism, espacially autophagy rather than apoptosis in drug resistant H69AR cells. In conclusion, downregulation of PrP seems to be a new anti-cancer strategy when it combined with chemotherapeutics.

Keywords: Cancer, Multidrug resistance, PrP, Programmed cell death types

1. GİRİŞ

Son 20 yıllık süreçte yapılan araştırmalar kanser biyolojisi ve genetiği ile ilgili önemli bilgiler elde edilmesine olanak sağlamıştır. Tümör oluşumunda kabul gören iki görüş vardır: birincisi, kanser ardışık genetik değişiklikler ile normal hücrelerin malignant forma dönüşmesi sonucu ortaya çıktığı yönündedir. Bu model “çok adımlı karsinogenez” olarak isimlendirilir [1]. İkinci olarak bir takım biyolojik olaylar tümör gelişimi sırasında yeniden düzenlenerek tümör oluşumu sürecine katkı sağlar. “Kanser özellikleri” (hallmark of cancer) olarak betimlenen [2] bu iki görüşe ek olarak hücre ölümünden kaçış, günümüzde malign transformasyon ve tümörün idamesi için gerekli bir mekanizma olarak kabul edilmektedir [3]. Bu önemli adımlar arasında programlanmış hücre ölüm tipleri (apoptozis, otofaji ve programlanmış nekroz) ve bu mekanizmaları kontrol eden genlerin malign fenotip üzerine etkisi ön plana çıkmaktadır. Malign neoplazmalarda programlanmış hücre ölüm tipleri hücrelerin “kaderini” belirleyen en önemli etkenlerdir. Apoptozis ve programlanmış nekroz sürekli olarak hücre ölümünü düzenlerken otofaji tümör hücresinin ölümü ya da hayatta kalma seçeneklerinde rol oynar [4]. Dolayısıyla hastalık durumlarında programlanmış hücre ölüm tipleri altında yatan nedenlerin anlaşılması, hastalığın patogenezi anlama ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle programlanmış hücre ölüm tipleri kanser biyolojisi ile kanser tedavisi arasında önemli bir köprü oluşturmaktadır [5]. Bu köprüde yer aldığını düşündüğümüz Prion proteini (PrP), üstlendiği hücre rolleri nedeniyle son yıllarda özellikle tümör biyolojisinde önemi gittikçe artan bir profil sergilemektedir. Hücre ölüm tiplerine ait mekanizmalarla bugüne kadar keşfedilmiş olan ilişkileri, bu proteini yeni bir anti-kanser odağı haline getirmektedir. Ancak PrP’nin gerek fizyolojik ve gerekse kanser gibi hastalıklardaki rolü tam olarak anlaşılamamıştır.

Günümüzde küçük hücreli akciğer kanseri modellerinde PrP’nin potansiyel rolü üzerine ayrıntılı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma, ilaca dirençli küçük hücreli akciğer kanseri hücre hattında (H69AR) PrP’nin Bax ve Beclin-1 gibi ölüm belirteçleri ve CD44 gibi ilaca direnç fenotipiyle ilişki moleküllerin ekspresyonları üzerine etkisinin araştırılarak bu molekülün ilaca dirençli küçük hücreli akciğer

kanserinde hangi tip programlanmış hücre ölümü ile ilişkili olabileceğini belirlemek üzerine kurulmuştur.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Normal çok hücreli bir organizma sadece hücreleri bir uyum halinde büyüme sinyallerine yanıt verebilirse gelişebilir. Bir takım moleküler olaylarla normal özellikleri değişen hücreler herhangi bir büyüme ya da bölünme sinyaline gerek duymaksızın kontrolsüz olarak çoğalma eğilimi gösterirler ve yapısal değişiklik, hücresel bağlantılarda azalma ve yeni bir takım ürünlerin sentezlenmesi gibi yeni özellikler geliştirmeye başlar. Bu kalıtılan değişiklikler kontrolsüz çoğalan kanser hücrelerin komşu normal hücrelerin büyümesini ve çoğalmasını engelleyerek diğer dokulara yayılmasına olanak sağlar.

Kanser 100'den fazla türü olan bir sendrom olmasına karşın bütün kanser hücreleri, normal hücre bölünmesi mekanizmasını kontrol eden süreçlerin bozulduğu anormal hücrelerdir. Kanserdeki anormalliklerin temel nedenlerinden bir tanesi, hücre bölünmesini kontrol eden proteinleri kodlayan genlerin mutasyonudur. Bunun yanında ultraviyole, X-ışınları, çeşitli kimyasallar, tütün ve viruslar gibi çevresel faktörler de kanser etkeni olabilir [6].

İnsan genomunda yaklaşık 35000 gen kanser ile ilişkilidir. Bu genler hücre kabaca üç gruba ayrılır. İlk grupta bölünmesini arttırılmasını sağlayan normal protein ürünleri kodlayan proto-onkogenler ve bu genlerin mutant formları olan onkogenler yer alır. İkinci grup hücre bölünmesini engelleyen ve hücre ölümüne neden olan normal proteinlerin kodlandığı tümör baskılayıcı genlerden oluşur. Üçüncü grup ise kansere neden olacak mutasyonlara engel olan DNA tamir genleridir [7-8].

2.2. Akciğer Kanseri

Dünyada, akciğer kanseri en sık görülen ve en yaygın kanser kaynaklı ölüm nedenlerinden biridir. Hesaplanan beş yıllık sağkalım oranı %17,8 olan akciğer kanseri diğer kanser türlerine nazaran çok daha hızlı ölüme neden olmaktadır. Başlıca akciğer kanser türleri arasında adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom, küçük hücreli ve büyük hücreli karsinom vardır [9].

Bütün akciğer kanseri türleri arasında ortak olan ana risk faktörü tütün kullanımıdır. Akciğer kanseri hastalarının %98'inde tütün kullanımı öyküsü yer almaktadır [10]. Tütünde bulunan kanserojen maddeler nedeniyle maruz kalma oranına göre risk durumu değişmektedir. Diğer risk faktörleri mesleki maruz kalmaya göre asbest, ağır metal ve radon gibi maddeler olabilmektedir

Küçük hücreli akciğer kanseri (SCLC), tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %20'sini oluşturmaktadır. Hızlı büyüme ve erken metastatik karakter gösteren bu tür agresif bir maligniteye sahiptir [11-12]. Sitogenetik olarak SCLC DNA kopya sayısında çeşitli anormallikler vardır. Mikroarray analizler ile SCLC'nin çok sayıda spesifik gen anlatımı özellikleri olduğu belirlenmiştir [13]. Protoonkogen aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin kaybı ya da inaktivasyonu gibi önemli genetik ve moleküler özellikler SCLC'de belirlenmiştir [14]. SCLC'li hastaların neredeyse tümünde tümör baskılayıcı retinoblastoma geni RB1 kaybı ve NSCLC hastalarına göre artan TP53 mutasyonu görülmüştür. Bu mutasyonlar SCLC tümörögenezinde proapoptotik aktiviteyi azaltarak karsinojenik hücrelerin agresif çoğalmasına neden olmaktadır [2].

İnsülin benzeri büyüme faktörü 1 [15], bombesin [16], hepatosit büyüme faktörü [17] ve fibroblast büyüme faktörü 2 [18] gibi çeşitli büyüme faktörlerinin SCLC'de otokrin sinyalleme mediatörleri olduğu bilinmektedir. Bu büyüme faktörlerinin bazılarının inhibitörleri klinikte kullanılmaktadır. Örneğin fibroblast büyüme faktörü 2 SCLC hücrelerinin proliferasyonuna olanak sağlayarak Bcl-2, Bcl-X_L ve XIAP gibi anti-apoptotik proteinlerin upregülasyonu ve proapoptotik Bad baskılanması üzerinden etoposid'e¹ karşı direnç oluşumuna yardımcı olmaktadır. SCLC hücre hatları ve primer ksenograft modelleriyle yapılan çalışmalarda ilaca direnç mekanizmasının pro-apoptotik Bax, Bim, NOXA konsantrasyonlarında artış ya da anti-apoptotik Mcl-1 düzeyindeki azalma ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür [14]. Bu nedenle SCLC'de mitokondriyal apoptozisi hedefleyen terapötik stratejiler üzerinde durulmaktadır [14]. Anti-

¹ DNA topoizomerez II inhibitörü.

apoptotik Bcl-2 SCLC hücre hatlarında ve primer dokularda yoğun olarak eksprese olmaktadır [19-21] ve pro-apoptotik Bax ve Bak proteinlerini inhibe etmektedir. Apoptotik süreçte bu iki protein mitokondri dış zarında porlar açarak sitokrom c gibi pro-apoptotik faktörlerin salınmasına, kaspazların aktivasyonuna ve böylelikle apoptozisin başlamasına neden olur. Pro-apoptotik bir protein olan defosforile olduğunda Bcl-2, Bcl-X_L ve Bcl-W gibi anti-apoptotik proteinlerin aktivitesini inhibe ederek Bax/Bak aracılı apoptozisin tetiklenmesine neden olur. Son yıllarda ABT-737 adı verilen bir Bad² mimetiği SCLC hastalarında denenmeye başlanmıştır [22].

SCLC, aynı zamanda oldukça hipoksik bir tümördür. Hastaların %60'ından fazlasında şiddetli hipoksi gelişmektedir [23]. Bu durum aynı zamanda ilaca ve radyoterapiye direnci de beraberinde getirmekte ve metastaz riskini arttırmaktadır. Dolayısıyla, hipoksi toleransının engellenmesi SCLC'de bir tedavi yöntemi olarak düşünülmektedir [24]. Bu amaçla hipoksi indükleyici faktör-1 ve otofajinin baskılanmasını içeren metotlar üzerinde durulmaktadır [25-26].

2.3. Kanserde Direnç Mekanizmaları

İlaç direnci genel anlamda hastalığın farmasötik tedaviye toleran hale gelmesi durumudur. İlk olarak bakterilerin bazı antibiyotiklere direnç oluşturmaları üzerine gündeme gelen bu konsept benzer mekanizmalarla kanser dahil olmak üzere birçok hastalıkta da görülmektedir. İlaça direnç bazı tipleri hastalığa özgü iken mikroplarda ve ilaca dirençli kanser hücrelerinde görülen ilaçların hücre dışına atılması gibi bazı mekanizmalar evrimsel olarak korunmuştur. Birçok kanser tipi başlangıçta ilaca duyarlı iken DNA mutasyonları, ilaç inhibisyonu ve yıkımını başlatacak metabolik değişiklikler gibi çeşitli mekanizmalar aracılığı ile zaman içerisinde ilaca direnç kazanmaktadır [27]. Çoklu ilaca direnç mekanizmasının altında yatan olası moleküler değişiklikler özetle ilaç hedeflerinde görülen mutasyonlar, ilaç transportunda ve metabolizmasındaki değişiklikler, hücresel sistemde kansere özgü

² Proapoptotik bir Bcl-2 ailesi üyesi.

moleküler değişiklikler ya da tümör ortamının ve lokal hücre fizyolojisinin değişmesi olabilir [28].

2.3.1 ABC Taşıyıcı Ailesi

Cerrahi müdahaleler, kemoterapi ve radyoterapi gibi tedaviler kanserde hayatta kalma sürelerini arttırsa da bu tedaviler yan etkileri doğurmaktadır. Tümör hücreleri kemoterapötik ilaçların ATP-bağlayıcı kaset proteinler (ABC) aracılığı ile hücre dışına atımını sağlarlar [29]. ABC taşıyıcıları ailesi, tüm organizmalarda ifade edilen, birçok biyolojik fonksiyonda ilişkilerini gösteren, yüksek oranda korunmuş bir protein ailesidir. ABC ailesi üyelerini kodlayan 48 insan geni ve bir psödogen tanımlanmış ve sekanslarına ve yapısal benzerliğine göre 7 alt aileye (ABCA-ABCB-ABCC-ABCD-ABCE-ABCF-ABCG) ayrılmıştır. Aynı zamanda bu aile üyeleri farklı sayılarda da alt üyeler barındırırlar. ABC taşıyıcılarının yapısı yüksek ölçüde korunmaktadır ve sitoplazmada lokalize olmuş iki hidrofilik nükleotid bağlama domainine (NBD) bağlı substrat bağlama ortamı meydana getiren iki hidrofobik transmembran domaininden (TMDs) oluşur. ABC taşıyıcılarının, amino asitler, peptidler, vitaminler, şekerler, hormonlar, iyonlar, lipidler ve ksenobiyotikler dahil olmak üzere çok çeşitli yapısal olarak farklı endojen ligandları ihraç ettiği belirlenmiştir [30]. ABC transporterlerinin düzenlenmesinde çeşitli genler ve sinyalleme yolları vardır. Bunlardan bazıları ABCC1 ve ABCC4, *MYCN* geni ile transkripsiyonel olarak düzenlenirken ABCC3 *MYCN* tarafından negatif olarak düzenlenmektedir. Transkripsiyon faktörü *OCT4*, ABC süper ailesinin proteinlerini kodlayan genleri kontrol edebilir. Kök hücre yenilenmesi ve farklılaşmasında rol alan sinyal yolları, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), Hedgehog (Hh) ve Wnt-katenin gibi sinyal yolaklarını içerir. Nükleer faktör kappa B (NF-κB), Akt, fosfotidil inozitol 3-kinaz (PI3K), siklooksijenaz 2 (COX2) ve ABC transporterleri gibi onkojenik sinyaller kök hücre yenilenmesini, hayatta kalmayı, farklılaşmayı ve kemoterapiyi düzenleyen bir rol oynar [31].

Kemoterapide başarısızlığın asıl nedenlerinden biri bu proteinlerin aşırı ekspresyonuyla anti kanser ilaçlarının hücre dışına atılması sonucu çoklu ilaca direnç

mekanizmasının (MDR) meydana gelmesidir. MDR familyası proteinlerinin en çok çalışılan üyeleri, ABCB1 (MDR1 veya p-glikoprotein, p-gp olarak da bilinir), ABCC1 (çoklu ilaca dirençle ilişkili protein 1, MRP1), ABCG2 (göğüs kanseri direnç proteini, BCRP) . Bu taşıyıcılar, ilaca dirençli tümörlerin çoğunda ifade edilir.

2.3.2. p-glikoprotein (p-gp, ABCB1, Çoklu İlaça Direnç Proteini 1, MDR1)

p-glikoprotein (p-gp), çoklu ilaca direnç genleri olarak isimlendirilen MDR genlerinden 7q21 lokasyonuna sahip *MDR1* geni tarafından kodlanmaktadır. İlk defa 1976’ da kolşisine dirençli hamster ovaryum hücreleriyle yapılan bir çalışmada hücre yüzeyinde keşfedilmiştir. Transmembran taşıyıcısı olarak görev yapan p-gp 1280 aminoasitten meydana gelmiştir. p-gp enerjiye bağımlı olarak işlev görmektedir. İlaça direnç mekanizmasındaki görevi ilacın hücre dışına pompalanmasını sağlamak olan p-gp’nin anti-kanser ajanlar (doksorubisin, dosetaksel vb.), steroid hormonlar (aldosteron), antimikrobiyal ajanlar (eritromisin) gibi çok farklı substratları olabilir [32].

Kanserin ölümcül bir hastalık halini almasının altında iki mekanizmanın oluşumu yatmaktadır. Bunlar hücrelerin metastaz yapabilme yeteneği kazanması ve ilaca direnç gösterebilmesidir. Hücre çoğalması, yaşamı, farklılaşması ve göçü gibi çok çeşitli süreçlerde yer alabilen bir transmembran glikoproteini olan ve kimi çalışmalarda p-glikoprotein 1 olarak adlandırılan [33] CD44, hücre dışı matriks için önemli bir adezyon molekülüdür [34-36]. Başta hyaluronik asit olmak üzere osteopontin, kollajenler ve matriks metaloproteinazlar gibi çok sayıda molekülün reseptörü olarak davranabilen ve bazı tip kök hücrelerde marker olarak bulunabilen CD44 invazyon ve tümör hücresi metastazı gibi süreçlerde rol oynamaktadır [37]. Kanser hücrelerinde olan ilaca direnç gösterme ve metastaz yapabilme fenotipleri p-gp ve CD44 proteini arasında bir bağlantı olabileceğinin düşündürmüştür. Yapılan bir çalışmada iki malign fenotip olan CD44 ve p-gp arasında metastaz ve MDR’nin eş zamanlı ekspresyonu ile sonuçlanan bir etkileşim olduğu belirlenmiştir [38-39].

2.3.3. MRP-1 (ABCC1, Çoklu ilaç Direnci İle İlişkili Protein 1)

p-gp gibi MRP de ATP-bağlayan kaset proteini ailesi üyesidir ve çoklu ilaca direnç mekanizmasında rol aldığı sanılmaktadır [40-41]. MRP gen ürünleri ilk olarak H69AR akciğer kanseri hücre hattından kopyalanmıştır. MRP1 190 kDa'lık bir proteindir ve 1531 amino asit içermektedir. Hücre membranında hidrofobik ilaç molekülleri, stereiodler ve organik anyonların geçişi ile ilişkilidir. MRP1 ve p-gp arasında düşük bir yapısal özdeşlik olmasına rağmen, H69AR hücrelerinin ve p-gp sentezleyen hücrelerin arasında önemli bir benzerlik bulunmaktadır [42].

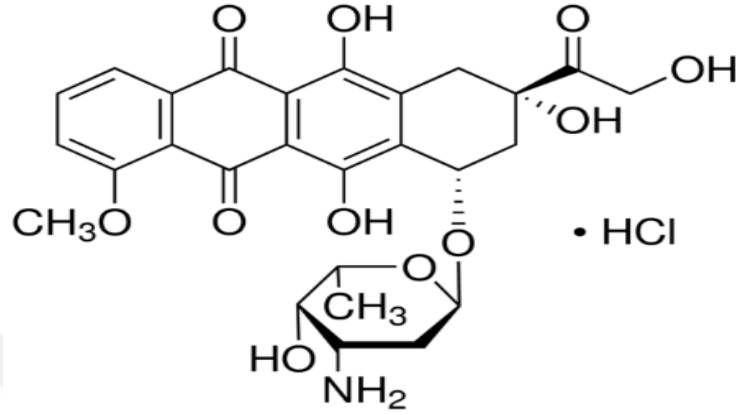
2.3.4. BCRP (ABCG2, Meme Kanseri Direnci Proteini)

İlaça direnç ailesinin bir üyesi olan BCRP proteini, 4q22 kromozomunda bulunan ABCG2 geni kodlanır. BCRP'nin p-gp ve MRP-1 proteinlerinden farkı, çok geniş bir substrat ve inhibitör özgünlüğüne sahip olmasıdır. Buna bağlı olarak da geniş bir doku dağılımı göstermektedir [43].

2.4. Doksorubisin

Kanser çeşitlerinin fazlalığı ve tedavilere farklı şekillerde reaksiyon vermesi araştırmacıları ilaç geliştirme üzerine çalışmalara itmiştir. Güçlü bir antikanser ilacı olan doksorubisin 1960'lı yılların sonunda *Streptomyces peucetius*'un bir kültüründen izole edilmiş bir antrasiklidir (Şekil 2-1) [44]. Doksorubisin, özellikle meme kanserinin erken ve geç evrelerinde başarıyla kullanılan antrasiklin temelli bir kemoterapötik ajandır. Doksorubisinin kanser hücrelerindeki etkisi pasif difüzyon ile hücre içerisine girmesiyle başlar. Kanser hücresinin sitoplazmasında doksorubisin bir semikinon radikale dönüşür ve reaktif oksijen türlerinin üretilmesine neden olur. Hücre içinde artan reaktif oksijen türleri oksidatif strese neden olur. Sitosolde doksorubisin mitokondriye girerek mitokondriyal DNA hasarına ve mitokondriyal enerjetik strese neden olur ve kaspaz kaskadını başlatacak sitokrom c salınımını tetikler. Ayrıca, nukleusa transloke olabilen doksorubisin topoizomerez I ve II enzimlerinin inhibisyonuna neden olur. Bu inhibisyon DNA hasarı, serebst radikal üretimi, alkilasyon ve p53 yolağının aktivasyonunu başlatır. Bu süreç, hücre

proliferasyonunun inhibisyonuna ve apoptozisin indüksiyonu ile sonuçlanır. Aynı zamanda doksorubisin nuklear poli ADP riboz polimeraz (PARP)-1 enziminin inhibisyonu üzerinden hücresel enerjinin azalmasına ve otofajinin aktivasyonuna katılır [45-46].



Şekil 2-1 Doksorubisin bir glikozit antibiyotiktir ve aminoşeker daunosamin yapısına bağlı tetrasiklik “quinoid” aglikon adriamisinon (14-hidrosidaunomisinin) içerir [44].

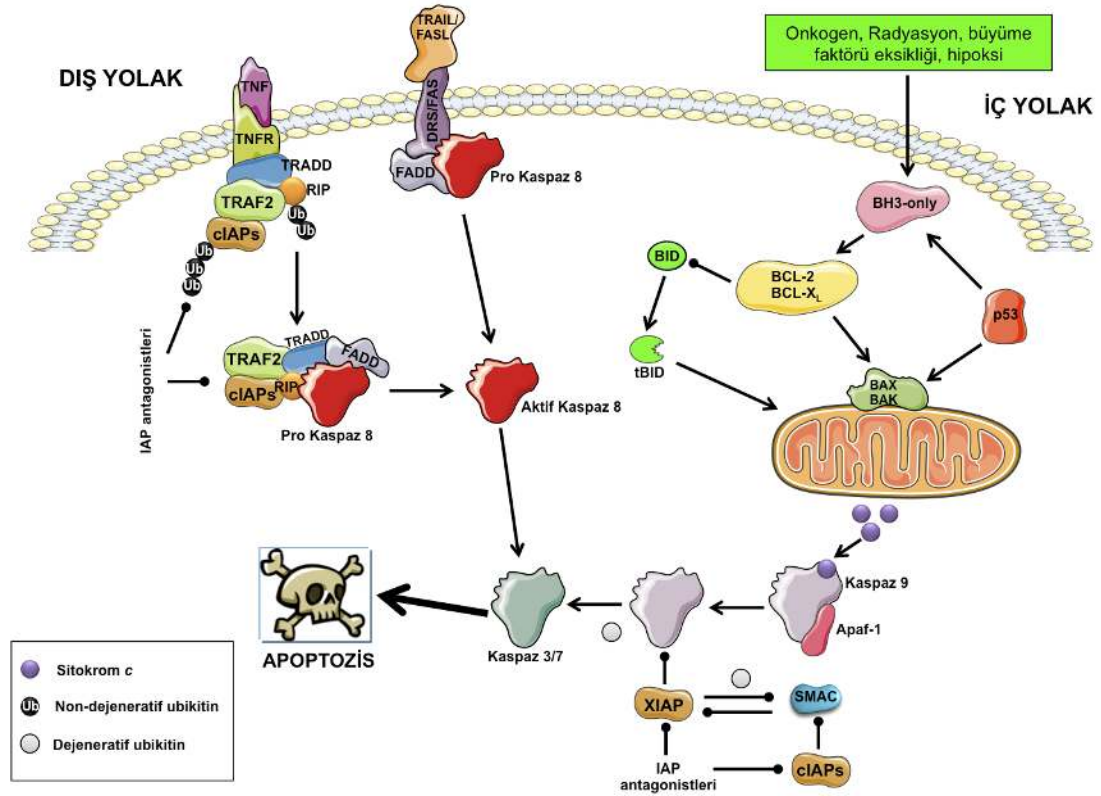
2.5. Hücre Ölüm Mekanizmaları

Prokaryotik ve ökaryotik organizmalarda ortak olan mekanizmalardan biri hücre ölümüdür. Embriyonik süreçte ve erişkin dönemde doku homeostazisi için yeni hücre oluşurken, var olan diğer hücrelerinde ortadan kalkması gerekmektedir. Bunun için canlı organizmalar üç farklı yol izler; apoptozis, otofaji ve nekroz. Apoptozis, organizmada hasar görmüş veya organizma için artık gerekli olmayan hasar görmüş hücrelerin yok edilmesinde görev alır. Nekroz ölüm tipi dokuda hasar oluşmasıyla meydana gelen toksik bir süreçtir. Otofaji ise hücre içi makromolekül veya organellerin lizozomlar yardımıyla parçalamasına yol açan bir mekanizmadır. Tüm bu ölüm süreçlerinde meydana gelebilecek herhangi bir hasar organizmada var olan düzenin bozulmasına ve hatta kansere neden olabilmektedir.

2.5.1. Apoptozis

Apoptozis, özel bir takım uyarılara yanıt olarak özelleşmiş sinyal transdüksiyon yollarıyla aktive olan programlanmış bir hücre ölüm çeşididir [47]. Apoptotik hücre ölümü bir dizi biyokimyasal ve morfolojik değişimi içerir ve hücre büzüşmesi, nuklear kondensasyon ve DNA fragmentasyonu ile karakterizedir [48] (Şekil 2-2).

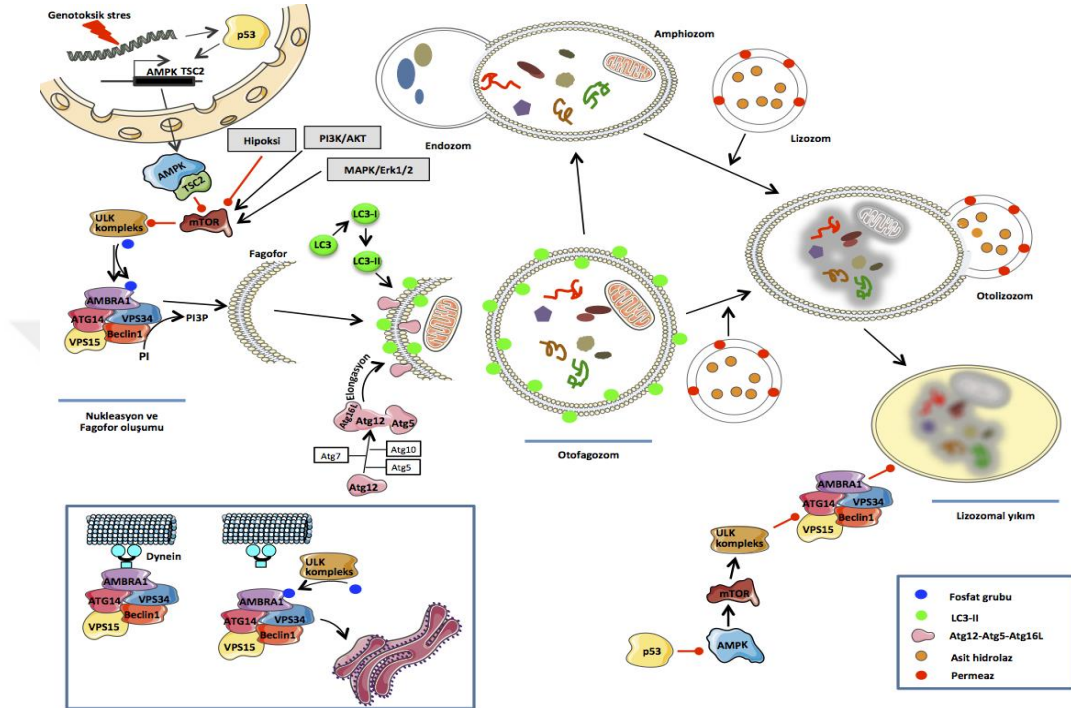
Bu süreçte, sitoplazmada kaspaz aktivasyonu ve mitokondriden sitokrom *c* salınımı [49-50], mitokondride Bcl-2 ailesinin pro- ve anti-apoptotik üyelerinin görülmesi [51] ve plazma membranında fosfatidilserin eksternalizasyonu da söz konusudur [52].



Şekil 2-2 Dış ve iç apoptotik yollar. Dış yolda hücre dışı faktörler etkindir. Ligandın (FasL, TNF alfa, TRAIL) bağlanması ile trimerik ölüm reseptörü (Fas, TNFRF1, DR5) sitoplazmik ölüm domainleri (DD) aracılığı ile adaptör moleküllerini (FADD, TRADD) çağırır. DD'lere sahip olmanın yanında adaptör proteinler komplekse prokaspaz-8'i getirecek death effector domain (DED)'ler içerir. Prokaspaz-8 ile birlikte tüm yapı Death-Inducing Signalling Complex (DISC) adını alır. Prokaspaz 8 otoproteolitik etki ile aktive olur ve Aktif Kaspaz 8'e dönüşür. Hücre içerisinde bir hasar olduğunda iç apoptotik yolk devreye girer. Onkogenler, direk DNA hasarı, hipoksi ve yaşam sinyallerinin kesilmesi gibi hücre içi stresler iç yolağı tetikler. DNA kontrol proteinleri ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated protein) ve Chk2 (Checkpoints Factor-2) p53'ü fosforilleyerek stabilize eder ve p53'ün MDM2 (Mouse Double Minute-2 Homolog) aracılı ubiquitinasyonunu bloke eder. MDM2, p53'e bağlanarak nuklear translokasyonunu sağlar. p53 proapoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinin transkripsiyonel aktivasyonunu artırarak ve anti-apoptotik Bcl-2 proteinleri ve CIAP'ları baskılayarak apoptozisi aktive eder. Diğer p53 hedefleri Bax, NOXA, PUMA ve BID'dir. P53 aynı zamanda apoptozisin gerçekleşmesinde etkin olan PTEN, Apaf-1, Perp, p53AIP1 ve gibi genleri ve oksidatif hasara neden olacak genleri aktive eder. Oksidatif hasar sonucu mitokondriden sitokrom *c* dışında SMAC/Diablo, Arts ve Omi/HTRA2 salınarak apoptozisi inhibe eden proteinlerin (IAP'lar) etkisini inhibe eder [53-57].

2.5.2. Otofaji:

Hücresel bileşenlerin bir membranla kuşatıldıktan sonra lizozomlar tarafından yıkılmasını içeren genetik olarak programlanmış katabolik bir yıkım süreci olan otofaji hücre ölümü ile yaşamı arasında bir denge mekanizması olarak görülmektedir [58-61](Şekil2-3).



Şekil 2-3 Temel otofajik süreç mTORC1'in downregülasyonu sonucunda Ulk başlangıç kompleksinin (Ulk1/2, Atg13-FIP200-Atg101) aktivasyonu sonucu fagofor oluşumu ile başlar [62]. VPS34, Beclin-1, Atg14, AMBRA1 ve VPS15 ile birlikte otofagozom nukleasyonu için kritik bir öneme sahip bir sınıf III fosfatidilinozitol 3-OH kinaz kompleksi kor oluşturur [63-66]. Otofaji indüklendiği zaman ULK1 AMBRA1'i fosforiller ve kor kompleksinin dynein proteininden ayrılmasına neden olur. Ardından, AMBRA1, otofagozomu oluşturmak için Beclin-1 ve VPS34 ile birlikte endoplazmik retikulumla transloke olur (kutu) [67]. Fagoforun iki ubiquitin benzeri protein konjugat sistemi (Atg12-Atg5 ve LC3-II) aracılığı ile genişlemesinin ardından otofagozomlar oluşur. Oluşan otofagozomlar endozomlar veya endozom kaynaklı veziküllerle kaynaşarak Amfiozomları oluşturur ya da otofagozomal yıkım kargolarını oluşturmak üzere lizozomlarla kaynaşır [62]. Çeşitli stres koşullarında hücre döngüsünün duraklatılması, apoptozis ve otofaji nuklear p53 tarafından kontrol edilir (sol üst panel). p53'ün transkripsiyonel olarak TSC2 (tuberous sclerosis kompleks 2) ve AMPK (AMP-aktive protein kinaz) düzeylerini arttırmasıyla mTOR baskılanır ve ULK kompleksinin downstream aktivasyonu ile kanonik otofajik yolağı indüklenir [68]. Bazal koşullarda sitoplazmik p53 ubiquitin spesifik peptidazlar USP10 ve USP13 üzerinden ya da AMPK-mTOR-ULK sinyalleme yolağı aracılığı ile Beclin1 yıkımını başlatarak otofajik hücre ölümünü inhibe eder (sağ alt panel) [68].

2.6. Apoptozis, Otofaji ve Kanser Arasındaki İşbirliği

Yakın zamanlı çalışmalar otofaji ve apoptozis arasında bir ilişki olduğunu ve her iki sistem üyelerinin yollar arasında ortak roller üstlenebileceğini ortaya konmuştur [69-74]. Apoptotik intrinsik yolağın düzenleyici üyeleri hem mitokondri dış zar potansiyelini hem de otofajiyi etkilerken pro-apoptotik Bcl-2 proteinler sadece mitokondriyel permeabilizasyona neden olmaz aynı zamanda otofajiyi de tetikler. Buna karşın, anti-apoptotik Bcl-2 proteinler mitokondri dış membran potansiyelini ve otofajiyi inhibe edebilmektedir ya da otofajinin inhibisyonu apoptozisi tetikleyebilmektedir [75]. Dolayısıyla mitokondri otofaji-apoptozis yollarının bir kesişme noktası olarak durmaktadır [76]. Otofaji ve apoptozis arasındaki bu karşılıklı etkileşimin en bilinen örneği Bcl-2/Bcl-X_L ile Beclin-1 arasındaki bağlantıdır [77]. Ayrıca otofaji yollarına ait moleküller de intrinsik apoptotik yolağı etkileyebilir. Örneğin DNA hasarı ile tetiklenen ve calpain-aracılı olarak bölünen ATG5'in Bcl-X_L'ye bağlanarak sitokrom c salınımını arttırdığı belirlenmiştir [78]. Benzer şekilde ATG12-ATG3 kompleksinin mitokondriyel bir genişlemeye neden olarak intrinsik apoptotik yolağı inhibe ettiği gösterilmiştir [79]. Otofaji ve apoptozisin karşılıklı etkileşimlerine bir başka örnek ise Beclin-1 ve ULK1 (ATG1) proteinlerinin pro-apoptotik Bad'ı aktive eden AKT substratları olmasıdır [80-82]. TRAIL [83], TNF [84] ve FADD [85] gibi pro-apoptotik sinyaller otofajiyi de tetiklerken PI3K/AKT/mTOR yolağı otofajiyi negatif olarak etkileyerek kanser gelişimini kolaylaştırmaktadır [76]. Son çalışmalar bu yolağın prostat kanserlerinde, tümör baskılayıcı PTEN kaybıyla birlikte, %30-50 artış gösterdiğini belirlemiştir [86]. Öte yandan son yapılan çalışmalarda tümör hücrelerinde p53 eksikliğinin ya da mutant p53 varyantlarının sitoplazmada birikmesinin otofajiyi aktive ettiği bu nedenle de p53'ün tümör hücrelerinde otofajik yolağın önemli bir düzenleyicisi olduğu ileri sürülmüştür [68]. Apoptotik mekanizmalardaki herhangi bir düzensizlik ökaryotik hücrelerde fizyolojik yaşamı tehlikeye atar. Bu nedenle apoptotik mekanizmalar oldukça sıkı biçimde düzenlenmektedir. Birçok kanser hücresi pro-apoptotik hücre ölümü bileşenlerini inaktive ederek ya da anti-apoptotik bileşenleri aktive ederek bu sıkı düzenlemeleri aşabilmektedir [78]. Kanser hücrelerinin apoptozisten kaçmak için çeşitli stratejiler geliştirdiği ve bu stratejilerin bazılarının tümör-spesifik olduğu günümüzde bilinmektedir [87]. Tüm apoptotik

inhibitörler ve aktivatörler kanser hücre hatlarında ekspresyon sınırlarının dışında yer almaktadır. Örneğin bütün kanser tiplerinin neredeyse yarısında Bcl-2 ekspresyonları artış göstermektedir [88]. FAS gibi apoptotik sinyallerin ve DR5 yanıtının bozulması, pro-apoptotik ve anti-apoptotik Bcl-2 proteinleri arasındaki dengesizlik, IAP proteinlerinin düzensizliği ve azalan kaspaz aktivitesi gibi stratejilerle ilgili mutasyonlar, çeşitli kanser tiplerinde tümör progresyonu sırasında invazivliği arttırabilir, anjiyogenezi uyarabilir, hücre proliferasyonunu düzensizleştirebilir ya da farklılaşmayı engelleyebilir [87, 89].

Ticari anti-kanser ilaçlarının büyük bir kısmı kanser hücrelerine Bcl-2/Bax aracılı mekanizmalar ile etki etmektedir [88]. Bu mekanizmalar bozulur ya da değişirse hücreler intrinsik apoptozise direnç kazanır [88]. Kanser hücrelerinin besin yetersizliği ya da hipoksi gibi çevresel strese maruz kaldığı için apoptozise daha duyarlı olduğu ileri sürülmektedir [90]. Genel kanı tümör hücrelerinin dış yolağa iç yolaktan daha duyarlı oldukları yönündedir [91]. Bu nedenle dış apoptotik yolak kanser tedavisi için bir hedef olarak görülmektedir [92].

Otofajinin kanserde tümörün tipine ve evresine göre değişiklik gösterebilen ve tümör oluşumunu teşvik eden ya da baskılayan bir rolü vardır [93]. Tümör hücreleri, DNA hasarı ve hipoksi gibi metabolik stres koşullarında yaşamlarını ve metastatik aktivitelerini arttırmak için otofajiyi kullanır [94-96]. Örneğin otofaji baskılanır ya da anormal bir hale dönüşürse hücre içerisinde hasarlanmış yapılar ya da zararlı bileşenler hücreden temizlenemez ve bu durum kanser gelişimine neden olacak çevresel bir oksidatif stresi tetikler [97]. Örneğin, pankreatik tümörler gibi Ras-aktif tümörlerde bazal otofajinin oldukça yüksek bir düzeyde yer aldığı gösterilmiştir [98-99]. Bu tümörlerde otofajinin inhibisyonu ile tümör hücresel proliferasyon azalmaktadır [98, 100]. Benzer şekilde otofajinin mitokondriyal fonksiyonlara destek vererek ve lipid dengesini koruyarak Ras-aktif küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin progresyonuna katıldığı ortaya konmuştur [101]. Buna karşın, otofajik yolda yer alan proteinlerin mutasyonları otofajinin tümör baskılayıcı bir role sahip olduğunu ortaya koymuştur. Beclin-1 ile ilişkili bir protein olan ve fagofor oluşumunu başlatan BIF-1'in akciğer, kolorektal ve gastrik

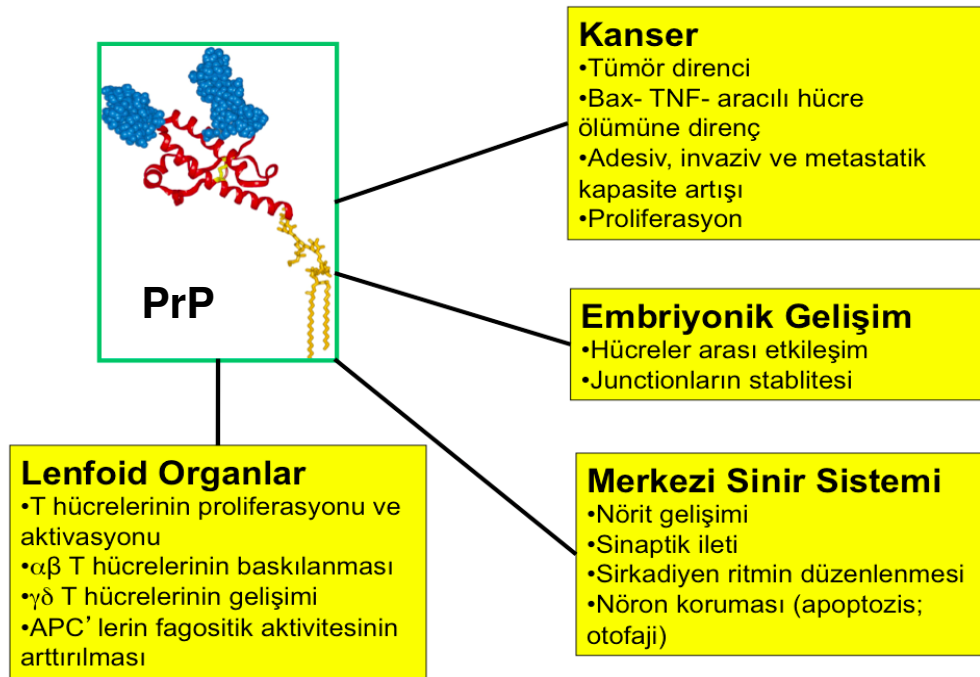
kanserlerde eksprese olmadığı belirlenmiştir [102-105]. Benzer şekilde bir otofaji regülatörü olarak Beclin-1'in etkileşim partnerlerinden olan UVRAG mutasyonlarında kolorektal kanserde otofajinin azaldığı ve buna karşılık tümör hücresi proliferasyonunun artış gösterdiği bulunmuştur [106]. Özetle, bazı kanser hücreleri otofajik genler susturulduğunda apoptozise giderken bazı kanser hücrelerinde ise otofajik süreç apoptotik hücre ölümünü tetikleyebilir [107]. Geçici ya da düşük doz stresin apoptozisi baskılayarak otofajiyi indüklediği ve böylece hücresel dengenin sağlandığı buna karşın kalıcı ya da yüksek doz stresin apoptozisi indükleyebileceği ileri sürülmektedir [108]. Otofajinin bu iki zıt fonksiyonu arasındaki keskin olmayan ancak çok yönlülüğe sahip olan sınırın kanser gelişimi ve ilaca direnç mekanizmalarında rol alan yaşam ve ölüm sinyallerinin ince bir şekilde düzenlenmesi ile belirlendiği düşünülmektedir [109]. Bu nedenle otofaji inhibisyonu kanser tedavisi için alternatif bir strateji gibi durmaktadır [97, 110-111] ve bu konuda bazıları hydroxychloroquine gibi tümör metabolizması odaklı [112] ya da küçük moleküllü [62] çeşitli terapötik ajanlar denenmektedir [113].

2.7. Prion Proteini

Günümüzde prion proteinlerinin kanser biyolojisinde önemli bir rol üstlendiği çok sayıda çalışma ile kanıtlanmıştır. Bu proteinlerin özellikle, glioblastoma [114], meme [115-117], prostat [118] ve kolorektal kanserlerde [119-120] kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. “Prion” sözcüğü, “PROteinimsi INFeksiyöz ajan” ifadesinin kısaltılmışı olarak, memelilerde çeşitli nörodejeneratif hastalıklardan sorumlu ajayı betimlemek üzere ilk kez Stanley Prusiner tarafından kullanılmıştır [121]. İnsanlarda 20. kromozomun p12/p13 bölgesinde lokalize olan ve *Prnp* geninden kodlanan prion proteininin endojen, hücresel varyant olan PrP^c (sitosolik prion³) ile onun patojen, yanlış katlanmış ve agrege konformerleri olan PrP^{Sc} (Scrapie prion) olmak üzere iki konformasyonel izoformu vardır. Normal hücresel formun (PrP^c) otokatalitik bir mekanizmayla patojen izoforma (PrP^{Sc}) dönüşümü transmissible spongiform ensefalopatiler (TSE'ler) ya da prion hastalıkları olarak adlandırılan, insanlarda kuru,

³ Bu çalışmada “PrP” olarak ifade edilmektedir.

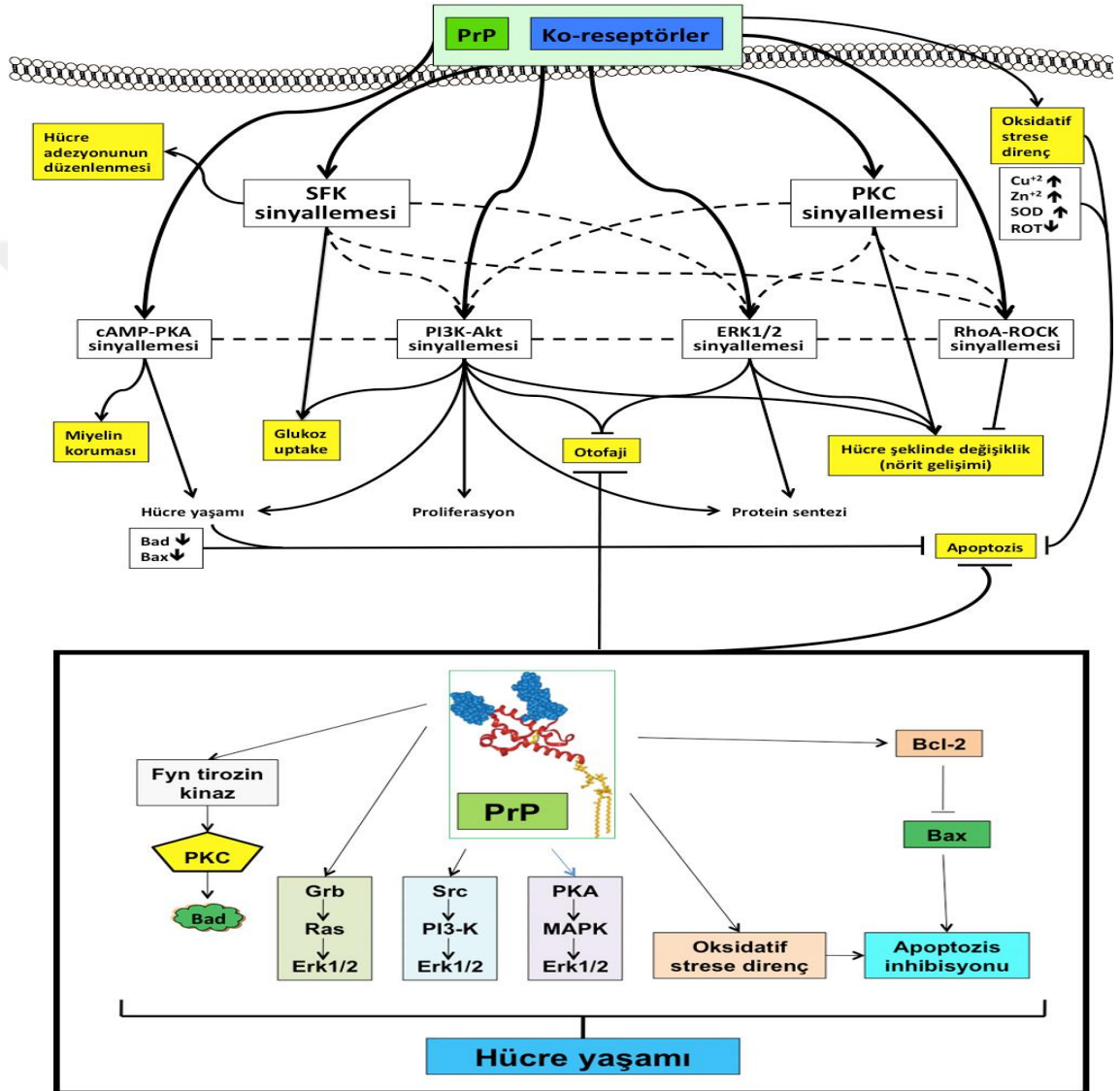
Creutzfeldt-Jakob (CJD), Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS) ve fatal ailesel insomnia (FFI), hayvanlarda scrapie, bovine spongiform ensefalopati (BSE) gibi bir dizi nörodejeneratif hastalığa neden olmaktadır [121-126]. PrP^C'nin PrP^{Sc} izoformuna dönüşümü sırasında görülen yapısal modifikasyonlar hücresel fonksiyonu ve DNA'da her hangi bir değişiklik olmaksızın, tıpkı bir genetik mutasyon gibi, hücresel fenotipi etkileyebilir. Dolayısıyla, prionlar, kromozomal elementler dışında kendini çoğaltabilme yeteneğine sahip ender proteinlerdir [127-130]. PrP hücre membranına glikozilfosfatidilinozitol (GPI) çapasıyla bağlanmış 254 amino asitlik sialillenmiş bir proteindir [131]. Başta merkezi sinir sistemi ve bağışıklık sistemi olmak üzere çok çeşitli dokularda eksprese edilen PrP'nin, sinyalleme molekülleri, laminin, çeşitli membran proteinleri, sitoskelet elemanları, adezyon molekülleri gibi çok sayıda protein partneri ile etkileşerek hücre proliferasyonu, farklılaşması, göçü ve adezyonu gibi temel biyolojik olaylarda rol almasının yanı sıra özelleşmiş dokularda nöro-koruma, sinaptik aktivite, bağışıklık yanıt ve epitelyal ya da endotelial bariyer gibi özel fonksiyonlarda da rolü vardır (Şekil 2-4) [132-138].



Şekil 2-4 PrP'nin rol aldığı fizyolojik olaylar [132, 138-144].

Hücreleri oksidatif stres [145] ve programlanmış hücre ölümünden [146] koruması, PrP'nin fonksiyonel özellikleri arasında en ilgi çekici olanlarıdır. PrP'nin amino terminalinde yer alan oktapeptid domaini pro-apoptotik ve anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinde bulunan Bcl-2 homoloji domaini (BH2) ile önemli oranda amino

asit dizi benzerliği gösterir. Bu benzerlik PrP'yi hücre ölümü ve/veya yaşamında önemli bir noktaya taşımaktadır [147]. Bax aktive olduğunda yapısal değişikliğe giderek mitokondri dış zarını sitokrom *c* ve diğer apoptojenik faktörler için geçirgen hale getirir [148-149]. PrP'nin BH-2 homoloji domaini ise Bax'ın apoptotik aktivite için yapısal değişikliğe gitmesine engel olarak anti-apoptotik bir etki yaratır (Şekil 2-5).



Şekil 2-5 PrP'nin rol aldığı downstream olaylar. PI3-kinaz/Akt, cAMP/PKA, PKC, Fyn ve Erk1/2 gibi çeşitli hücresel sinyalleme yollarının PrP ekspresyonları ile düzenlendiği gösterilmiştir [150-151]. Dolayısıyla endojen olarak eksprese edilen PrP proliferasyon, farklılaşma, hücre adezyonu, hücre trafiği, transmembran sinyalleme ve oksidatif strese yanıt gibi çok sayıda hücresel olayda rol almaktadır [132-133, 147, 152-153]. Moleküler düzeyde PrP'nin anti-Bax aktivitesi nöronlarda ve diğer hücrelerde gösterilmiştir. Nöronlarda ve MCF-7 hücrelerinde PrP Bax ile spesifik olarak etkileşerek Bax'ın aktivasyonu için gerekli olan konformasyonel değişiklik yapmasına ve mitokondri membranına bağlanarak sitokrom *c* salınımı yapmasına engel olur. Böylece PrP^c, Bcl-2 ile birlikte Bax'ı inaktif halde tutar [117, 146]. SFK: Src family kinaz.

Normal prion proteinleri N-terminal oktapeptit tekrarları aracılığı ile bakır iyonlarına bağlanarak oksidatif strese yanıt oluşturlar [145, 154-155]. Dolayısıyla PrP'de fonksiyon kaybı, oksidatif strese hassasiyeti de arttırırken aşırı PrP ekspresyonu oksidatif strese dirençli bir fenotip oluşmasına neden olur [145, 156]. PrP'nin oktapeptit tekrarlarının gastrik kanser hücre hatlarında çoklu ilaca direnç fenotipinin artmasına neden olduğu gösterilmiştir [141]. PrP'nin patojen form PrP^{Sc}'ye transformasyonu ile artan ROT üretimine bağlı olarak antioksidan aktivitenin kaybolduğu ve mitokondriyal hasar, MAPK aktivasyonu ve kaspaz-3 aktivasyonu üzerinden apoptotik sürecin başladığı bilinmektedir [157-158].

PrP'nin programlanmış hücre ölümü ile ilişkisi hücre tipine ve bu molekülün hücrel yerleşimine göre değişiklik gösterebilir. PrP bazı koşullarda hücre zarının dışında, sitoplazma, nükleus, nöronal sinaps ve mitokondride de yerleşim göstermektedir [159-164]. Kanser hücrelerinde aşırı PrP ekspresyonu hücrelere çoklu ilaca direnç fenotipi kazandırarak programlanmış hücre ölümüne direnç gelişimine neden olurken özellikle nöronlarda tam tersi bir durum söz konusudur: örneğin aşırı miktarda PrP eksprese eden transgenik farelerde mitokondride lokalize olan PrP'nin mitokondriyal membran potansiyelini azalttığı, sitokrom *c* salınımına neden olarak özellikle hipokampal nöronlarda kaspaz-3 aracılı apoptozisi tetiklediği bulunmuştur [163]. Ayrıca, hücre içerisinde PrP sitosolik yığınlar ve mitokondriyal kümeler oluşturarak mitokondriyal membran depolarizasyonu, sitokrom *c* salınımı ve kaspaz aktivasyonu üzerinden apoptotik süreci başlatmaktadır [165]. PrP'nin oktapeptit tekrarları ile Bax aracılı apoptozisi inhibe ettiğine dair çok sayıda rapor olmasına karşın [117, 141, 146, 166-169] PrP ile Bax arasında fiziksel bir etkileşim henüz gösterilebilmiş değildir. Bazı çalışmalar PrP'nin Bax-aracılı apoptozis inhibisyonundan sitosolik formunun [169] ya da α -heliks 3 domaininin sorumlu olduğunu ileri sürmüştür [170]. Bax, pro-apoptotik etkisini gösterebilmesi için mitokondride lokalize olmak durumunda olduğu için [171-172] mitokondri ile ilişkili PrP'nin direkt ya da dolaylı olarak Bax aracılı apoptozise karıştığı bir gerçektir [167] ve PrP^c'nin mitokondriye trafiğinin apoptozis ile ilişkisi [163, 173-174] bu molekülün mitokondride fonksiyonel bir rol üstlendiğini düşündürmektedir.

Mitokondrinin kanser hücrelerinin kemoterapötik eliminasyonunda öncelikli hedef olduğu son derece açıktır. Bu hedef içerisinde yer alan PrP'nin her ne kadar apoptotik uyarı ile mitokondri membran raftlarına lokalize olduğu gösterilmiş [173] olsa da kanser hücrelerinde bu proteinlerin mitokondri lokalizasyonları ve hücre ölüm süreçlerine dahil olup olmadığı henüz bilinmemektedir.

Nöronlarda PrP^c'nin oktapeptit tekrarlarının otofajinin kontrol edilmesinde önemli olduğu, bu etkinin PrP'nin anti-oksidan aktivitesinden kaynaklandığı ve PrP ile otofajik flux arasında bir ilişki olduğu sürülmüştür [175-177]. İnsan kanser hücre hatlarında PrP'nin susturulmasının LC3-II ve Beclin-1 upregülasyonu ve p62 ve Bcl-2 yıkımı üzerinden otofaji ile ilişkili bir hücre ölümünü gerçekleştirdiği [178] ya da Bax aktivasyonu ve Bcl-2 downregülasyonu üzerinden ilaca direnç mekanizmasının baskılandığı ileri sürülmüştür [115].

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Çalışmada Kullanılan Malzemeler

Çalışmalarda kullanılan cihazlar, kimyasal maddeler ve sarf malzemeler aşağıdaki tablolarda belirtilmiştir.

Tablo 3-1 Çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler.

Kimyasal Maddeler	Katalog Numaraları	Üretici Firma
H69AR	CRL-11351	ATCC
RPMI-1640	30-2001	ATCC
FBS	A3840002	ThermoFisher
Penisilin-Streptomisin	15070063	ThermoFisher
%0,025 Tripsin-EDTA	2520056	Gibco
DMSO	276855	Sigma
Tripan mavisi	T8154	Sigma
Doksorubisin hidroklorit	D1515	Sigma
Dansilkadaverin	30432	Sigma
MTT	M5655	Sigma
PrP siRNA	AM1670	Ambion
Lipofektamin RNAi Max	13778150	ThermoFisher
Opti-MEM	31985062	ThermoFisher
siRNA Transfeksiyon Medyumu	Sc36868	SantaCruz
siRNA Transfeksiyon Çözeltilisi	Sc29528	SantaCruz
Kontrol siRNA (FITC conjugate)-A	Sc36869	SantaCruz
Triton X-100	00212	Pluko
Keçi serumu	G9023	Gibco
HardSet Mounting Medium	H-1500	VECTOR
Primer AB to Human PrP	sc398451	SantaCruz
Primer AB to Human Bax	ab77566	Abcam
Primer AB to Beclin-1	ab118148	Abcam
Primer AB to Human CD44	ab2212	Abcam
Secondary Goat anti-mouse FTIC	ab7064	Abcam

Tablo 3-2 Çalışmalarda kullanılan cihazlar ve sarf malzemeler.

Cihazlar ve Sarf Malzemeler	Üretici Firma
Laminar Hava Akımlı Class II Kabin	METISAFE, Türkiye
Hücre Sayım Cihazı	İnvitrogen, ABD
Inverted Mikroskop	ZEISS, Almanya
CO ₂ Inkübatör	NuAire, ABD
Santrifuj	Hettich, Almanya
Mikroplaka Okuyucu	Tecan, İsviçre
Floresan Mikroskop	Olympus, Japonya
Hücre Kültür Flaskları (25, 75 cm ²)	Orange Sci. Belçika
Hücre Kültür Plakaları (6, 24, 96 kuyucuklu)	Orange Sci. Belçika
Steril Plastik Pipet (1, 5, 10, 25 ml)	Orange Sci. Belçika
Pipetörler (10, 20, 100, 1000 µl)	Eppendorf, ABD
Konik Tüp (15, 50 ml)	Orange Sci. Belçika

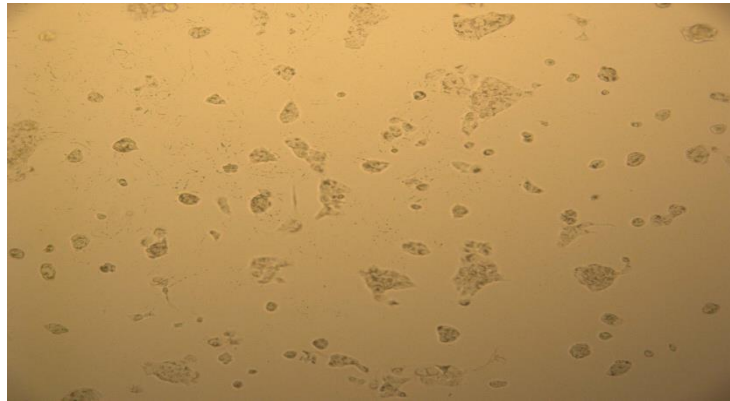
3.2. Hücre Hattının Alınması ve İdamesi

Çalışmada kullanılan H69AR (CRL-11351) çoklu ilaca direnç gösteren küçük hücreli akciğer kanser hücre hattı, American Type Culture Collection (ATCC) firmasından temin edildi. Toplam 14 ay boyunca artan doksorubisin konsantrasyonları etkisiyle büyütülen NCI-H69 hücrelerinden oluşturulan bu hücre hattının ilaca direnci 50 kat daha fazladır. İlaça dirençli olan H69AR hücre hattı adeziv özellik gösterirken, ilaca direnç göstermeyen formu süspanse bir özellik gösterir. Ayrıca çoğu çoklu ilaca dirençli hücre dizilerinden farklı olarak H69AR, gelişmiş seviyelerde p-gp ifade etmemektedir [179].

Hücre kültürü yapılacak olan Sınıf II biyogüvenlik kabininde (Metisafe, Türkiye) UV ışığı yardımıyla 10 dakika yüzey sterilizasyonu yapıldıktan sonra %70 alkol yardımı ile temizlendi. Sıvı azot içerisinde muhafaza edilen hücreler -80 °C’de bir gece bekletildikten sonra 37°C olan sıcak su banyosunda çözündürüldü. Çözünen hücreler, içerisinde 9 ml besiyeri olan santrifüj tüpüne alındı ve 1000 x rpm de 10

dakika santrifüjlenerek çökmeleri sağlandı. Santrifüj tüpündeki süpernatant atılarak üzerine taze besiyeri eklenen hücreler flaska alındı.

Hücre hattı canlılık, çoğalma ve enfeksiyon açısından inverted mikroskopta (Primovet, ZEISS, Almanya) günlük olarak izlendi (Şekil 3.1). Hücrelerin çoğaltılması aşamasında hücrelerin büyüme ortamını hazırlamak için RPMI-1640 (30-2001, ATCC) besiyerinin içerisine %20 fetal buzağı serumu (FBS) (10270106, Gibco) ve %1 Penisilin-Streptomisin (15140122, Gibco) eklendi. Hücreler 37 °C sıcaklık, %5 karbondioksit ve %95 nem içeren inkübatörde (Nuair, ABD) bekletilerek iki günde bir besiyeri tazelandı. Flasklarda %60-80'in üzerinde hücre yoğunluğu gözlemlendiğinde hücreler pasajlanarak yeni büyüme ortamına aktarıldı. Pasaj yapılması için flasklardaki besiyeri dökülerek 4 ml %0,025 Tripsin-EDTA (25200072, Gibco) eklendi ve flaska tutunan hücrelerin kalması için yaklaşık 4 dakika beklendi. İçerisinde tripsin bulunan flaska 4 ml besiyeri eklenerek tripsinin etkisi nötralize edildi ve bu karışım santrifüj tüpüne alındı. Santrifüjden sonra süpernatant atıldı üzerine taze besiyeri eklenen hücreler iki ayrı 75ml'lik flaska alınarak 37 °C sıcaklık ve %5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırıldı. Hücrelerin dondurulması işlemi öncesinde freezing-mix hazırlanması gerekmektedir. Bunun için %95 FBS %5 dimetilsülfoksit (DMSO) kullanıldı. Santrifüj aşamasından sonra süpernatant atıldı ve üzerine hazırlanan freezing-mix'den 1 ml eklendi. Daha sonrasında bu karışım soğuğa karşı dayanıklı olan (cryo) tüplere alındı ve -20 °C'de bir gece bekletildi. Donan hücreler uzun süreli muhafaza için -80 °C derin dondurucu ve sıvı azot tankında stoklandı.



Şekil 3-1 Çalışmada kullanılan H69AR hücre hattının inverted mikroskop altındaki görüntüsü (40X büyütme)

3.3. Hücre Sayımı

Hücre sayımı için tripan mavisi (T8154, Sigma) kullanılmıştır. Bu sayım yönteminde esas olan belirteç boyanın membranı geçip geçmediğidir. Canlı hücrelerde membran bütünlüğü bozulmadığı için boya hücrenin etrafını boyarken, bütünlüğü bozulan ölü hücrelerde hücrenin içine girerek tamamını boyar. Mikroskop altında da görülmesi kolay olduğundan hücre canlılık yüzdesi belirlenmesi açısından yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Hücreler tutundukları flasktan 4 ml %0,025 Tripsin-EDTA yardımıyla kaldırıldıktan sonra 4ml besiyeri ile tripsinin etkisi nötrlendi. 10 dakika santrifüj sonunda süpernatant atıldı ve hücreler 10ml taze besiyeri ile homojenize edildi. Hücre süspansiyonundan 10µl, tripan boyasından 10µl alınarak 1:1 oranında karıştırıldı. Bu karışımdan 10µl alınarak hücre sayım cihazının (Invitrogen' ABD) lamina aktarıldı ve mililitredeki hücre sayısı elde edildi.

3.4. Stok Solüsyonların Hazırlanması

1mM'lık ilaç (doksorubisin) hazırlamak için 10 mg doksorubisin hidroklorit (D1515, Sigma) 17,242 ml DMSO içerisinde çözöldü. Hazırlanan ilaç + DMSO çözeltisi sterilizasyon için 0.22 µm'lik filtreden geçirildi. Daha sonra 10 µl, 100 µl ve 200 µl'lik alikotlar halinde -20 °C ve -80 °C'de stoklandı.

Monodansilkadaverin (MDC) (30432, Sigma) otofajik vakuollerin görüntülenmesinde kullanılan floresan bir boyadır. Ana stok hazırlamak için 0,017g MDC 1ml DMSO içerisinde çözöldü. 50 mM olan ana stoktan 10µl'lik alikotlar oluşturuldu ve -20°C'de muhafaza edildi.

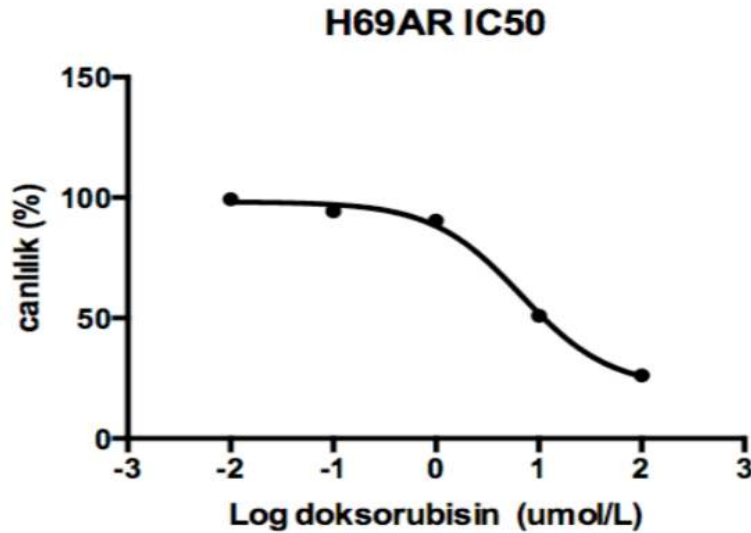
3.5. MTT [3-(4, 5- dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]

Sitotoksisite Testi ve Grupların Oluşturulması

Canlı hücrelerin kantitatif analizi genellikle MTT gibi tetrazolium tuzlarının formazan boya oluşturma prensibi ile yapılır. MTT canlılık testi bu çalışmada doksorubisinin %50 azalmaya neden olan inhibitör konsantrasyonu (IC₅₀) belirlenmesinde kullanılmıştır. Bunun için öncelikle çalışılacak olan doz aralıkları sırasıyla 100µM, 10µM, 1µM, 0,1µM ve 0,01µM olarak belirlendi. MTT testi için

ilk gün 96 kuyucuklu plakalara 100'er µl 1×10^4 derişiminde hücre ekildi. Pozitif kontrol olarak belirlenen ilk üç kuyucuğa 100'er µl besiyeri eklenerek toplam hacim 200 µl'ye tamamlandı. Hücreler 37 °C sıcaklık, %5 CO₂ ve %95 nem içeren inkübatörde bir gece bekletilerek plakaya tutunmaları sağlandı. İkinci gün 3'er tekrarlı olarak içerisinde hücre olan kuyucuklara belirlenen dozlarda 100µl doksorubisin uygulaması yapıldı ve inkübatörde 48 saat bekletildi. En olası IC₅₀ değerini belirmeyebilmek için 24 ve 72 saatlik dilimlerde de doksorubisin uygulaması yapıldı. Pozitif kontrol olarak belirlenen örneklerin ve 48 saat ilaç uygulanan örneklerin üzerine 20 µl MTT (M5655, Sigma) boyası eklenerek inkübatörde 4 saat bekletildi. Daha sonrasında kuyucuklarda bulunan süpernatant çekildi ve her bir kuyucuğa 200µl DMSO konuldu. Ayrıca background absorbans değerleri belirlenmesi amacıyla 3 kuyucuğa 200µl DMSO eklendi. Renk oluşumu için çalkalayıcıda 5 dakika çalkalandıktan sonra ELISA okuyucuda (Tecan, İsviçre) 570 nm absorbans değerinde ölçüm yapıldı. Çıkan sonuçlar GraphPad Prism (Ver. 6.0; GraphPad Software, La Jolla, CA, ABD) programı ile değerlendirildi ve IC₅₀ dozu 6.70 µmol/L olarak belirlendi (Şekil 3-2). Yüzde canlılık hesabı için aşağıdaki formül kullanılmıştır:

$$\text{Yüzde Canlılık} = (\text{Deneyisel Absorbans} - \text{Background Absorbans}) / (\text{Pozitif Kontrol Absorbans} - \text{Background Absorbans}) \times 100\%$$



Şekil 3-2 MTT testi sonucunda IC₅₀ değeri 6.70 µmol/L olarak belirlenmiştir (GraphPad Prism, Ver. 6.0).

Doksorubisinin IC₅₀ dozu belirlendikten sonra kontrol ve uygulama grupları şu şekilde oluşturuldu:

1. Kontrol grubu (herhangi bir uygulama yapılmaksızın) [Dokso (-); Grup 1]
2. Doksorubisin IC₅₀ uygulama grubu [Dokso (+); Grup 2]
3. PrP siRNA uygulama grubu (Prion proteini anlatımı baskılanmış grup) [siRNA/Dokso (-); Grup 3]
4. PrP siRNA + doksorubisin IC₅₀ kombine uygulama grubu [siRNA/Dokso (+); Grup 4]

Buna göre oluşturulan 4 hücre grubunda immunositokimya ve otofajik akışı belirlemek için MDC uygulamaları gerçekleştirilmiştir.

3.6. siRNA Transfeksiyonu ile PrP Susturulması

siRNA uygulamaları için PrP siRNA⁴ (AM16708, siRNA ID: 8299, Ambion) ana stoğu hazırlandı. Bunun için 5 nmol PrP siRNA üzerine 50µl nükleaz-free su eklenerek 100 µM (100pmol/ml) olan ana stok, 1:10 dilue edilerek 10 µM'lık ara stok elde edildi. Uzun süreli saklamak için bu ara stoklar 10 µl'lik alikotlar halinde -20 °C' de muhafaza edildi.

Prp siRNA transfeksiyonu için her bir kuyucuğa 500 µl 2 x 10⁵ hücre antibiyotiksiz besiyeri içerisinde ekildi ve tutunmaları için %5 CO₂ ve %95 nem içeren 37°C'lik inkübatörde 24 saat bekletildi. 24'lük platelerde her kuyucuk için ayrı ayrı transfeksiyon solüsyonu ve siRNA solüsyonu hazırlandı. Üretici firmanın önerisi doğrultusunda, transfeksiyon solüsyonu için, 3 µl Lipofektamin[®] RNAi Max (13778150, Thermo) ve 50 µl Opti-MEM[®] (31985062, Thermo) karıştırıldı. siRNA solüsyonu için, 1 µl PrP siRNA duplexi ve 50µl Opti-MEM[®] karıştırıldı. Transfeksiyon solüsyonu ile siRNA solüsyonlarından 50'şer µl alınarak 1:1 oranında

⁴ Sense: GGCAGCUGAAAAGUAAAUUtt; Antisense: AAUUUACUUUUCAGCUGCCtt; NCBI UniGen ID: Hs. 472010; OMIM ID:176640

bir karışım elde edildi ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. Pozitif kontrol olarak belirlenen kuyucuklara herhangi bir işlem uygulanmadı. Diğer kuyucukların her birine 100'er µl siRNA-Lipit kompleksinden damla damla eklendi. 24'lük plate 37 °C'de %95 nem ve %5 CO₂'de içeren inkübatöre kaldırılarak 48 saat bekletildi. Ardından doksorubisin uygulanmış ve uygulanmamış olarak gruplandırılmış siRNA transfekte hücrelere immunositokimya ve MDC işlemleri yapıldı.

PrP siRNA transfeksiyonu için ikinci bir yol olarak SantaCruz firmasından alınan PrP siRNA duplesi (sc36318, Santa Cruz) ve çözeltiler kullanıldı. Her bir kuyucuğa 500 µl 2x10⁵ hücre antibiyotiksiz besiyeri içerisinde ekildi ve tutunmaları için 37 °C'de %95 nem ve %5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat bekletildi. 24'lük plâtelere 8 kuyucuk için ayrı solüsyonlar hazırlandı. Solüsyon A için PrP siRNA stoktan 6 µl, siRNA transfeksiyon medyumundan (sc36868, Santa Cruz) 100 µl alınarak karıştırıldı. Solüsyon B için siRNA transfeksiyon çözeltisinden (sc29528, Santa Cruz) 6 µl, siRNA transfeksiyon medyumundan 100 µl alınarak bir karışım elde edildi. Solüsyon A ve solüsyon B 1:1 oranında karıştırıldı ve iyice çalkalanarak oda sıcaklığında 45 dakika inkübe edildi. Bu arada kontrol amaçlı olarak 2 kuyucuğa PrP siRNA duplesi yerine FITC işaretli kontrol siRNA⁵ (sc36869, SantaCruz) eklenerek yeni bir A+B solüsyon karışımı elde edildi⁶. Hücreler 2 ml siRNA transfeksiyon medyumunu ile yıkandıktan sonra transfeksiyon işlemine geçildi. Kuyucukların her birine 200 µl siRNA:Transfeksiyon çözeltisi karışımı (A+B) eklendikten sonra her bir kuyucuk için 800 µl transfeksiyon medyumunu konuldu ve yavaşça karıştırıldı. Ardından hücreler inkübatörde 37 °C'de ve %5 CO₂'de 6 saat inkübe edildi. Kontrol siRNA ile transfekte edilen hücrelerin oluşturduğu kontrol grubu floresan mikroskop altında incelenerek siRNA transfeksiyonunun gerçekleşip gerçekleşmediği belirlendi. Geri kalan kuyucukların üzerine 250 µl taze besiyeri eklenerek 18-24 saat 37 °C'de ve %5 CO₂'de inkübatörde bekletildi. Ardından süpernatant tamamen çekilip taze

⁵ Bilinen hiçbir hücresel mRNA'nın spesifik yıkımını başlatmayacak karışık diziden oluşmaktadır.

⁶ **Solüsyon A:** FITC işaretli kontrol siRNA (sc36869) 3µl + siRNA transfeksiyon medyumunu (sc36868, SantaCruz) 50µl alınarak pipetör yardımıyla yavaşça karıştırıldı.

Solüsyon B: siRNA transfeksiyon çözeltisi (sc29528, SantaCruz) 3µl + siRNA transfeksiyon medyumundan 50µl alınarak pipetör yardımıyla yavaşça karıştırıldı.

besiyeri eklendi. 24-72 saat inkübatörde bekletildikten sonra immunositokimya ve MDC protokolleri uygulandı.

3.7. İmmunositokimya Uygulaması

Bu yöntem için steril 12 mm çaplı yuvarlak lameller 6 kuyucuklu plakalara yerleştirildi. Her bir kuyucuğun üzerine 1ml 1×10^4 hücre ekildi ve konfluent seviyeye gelmesi için 37 °C sıcaklık ve %5 CO₂ içeren inkübatörde bir gece bekletildi. Ertesi gün belirlenen IC₅₀ dozunda doksorubisin 1'er ml olacak şekilde kuyucukların üzerine eklendi. Bir kuyucuğa kontrol amaçlı ilaç eklenmedi. Uygulama sonrası hücreler 37 °C'de %95 nem ve %5 CO₂ içeren inkübatörde 48 saat bekletildi. Sonrasında kuyucuklarda bulunan ortam aspire edildi ve fosfatlanmış tampon çözeltisi (phosphate buffered solution, PBS) ile 3 x 5 dakika yıkandı. Hücrelerin fiksasyonu soğuk metanolün her bir kuyucuğa 1 ml gelecek şekilde eklenmesi ve -20 °C'de 10 dakika bekletilmesiyle gerçekleştirildi. PBS ile yıkama işleminden sonra permeabilizasyon için %0,5'lik Triton X-100'den (00212, Fluka) 1'er ml eklendi ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi ve 3 x 5 dakika PBS ile yıkama yapıldı. Bloklama işlemi için %10 keçi serumu (G9023, Gibco) + PBS içeren solüsyondan 1'er ml eklendi ve oda sıcaklığında 1 saat bekletildi. PBS tamponu ile 3 x 5 dakika yıkama yapıldı ve primer antikor aşamasına geçildi. Bu aşamada primer antikor konsantrasyonu 1:50 olarak belirlendi ve her kuyucuğa 1'er ml %10 keçi serumu + PBS içeren solüsyonla dilüe edilmiş primer antikor eklendi (Tablo 3-3). Platelere +4 °C de ve nemli bir ortamda bir gece bekletildi. Bir sonraki gün 3 x 5 dakika PBS yıkaması yapıldıktan sonra sekonder antikor uygulamasına geçildi. Primer antikor ile aynı şekilde ancak 1:100 konsantrasyonda FITC işaretli sekonder antikor uygulandı. Sekonder antikor uygulanan hücreler karanlıkta ve oda sıcaklığında 2 saat bekletildi. PBS ile yıkama yapıldıktan sonra 6'lık plateler içerisindeki lameller alındı. İçerisinde mavi floresan bir DNA boyası olan DAPI⁷ içeren HardSet Mounting Medium (Vectashield®H-1500, Vector Lab) damlatılmış olan lamın üzerine hücrelerin bulunduğu yüzey aşağıya gelecek şekilde kapatıldı.

⁷ 365/440 $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$

Kuruması beklendikten sonra floresan mikroskop⁸ (CX21, Olympus) ile görüntüleme yapıldı.

Tablo 3-3 İmmunositokimya uygulaması için kullanılan primer ve sekonder antikorlar.

Antikor	Katalog No	Üretici
PrP (primer)	sc398451	SantaCruz
Bax (primer)	ab77566	Abcam
Beclin-1 (primer)	ab118148	Abcam
CD44 (primer)	ab2212	Abcam
FTIC işaretli keçi anti-fare (sekonder)	ab7064	Abcam

3.8. Monodansilkadaverin (MDC) Boyaması

H69AR hücre hattına doksorubisin uygulaması sonrasında otofajik vakuollerin görüntülenmesi için kullanılan otofloresan özellik gösteren MDC (30432, Sigma) boyanması yapılmıştır. Bunun için 24'lük plakalara her bir kuyucuğa 1 x 10⁵ olacak şekilde 500 µl hücre ekildi ve tutunmaları için 37 °C'de %95 nem ve %5 CO₂'lik geri kalan kuyucuklara IC₅₀ dozunda doksorubisin uygulandı ve 48 saat inkübatörde bekletildi. İnkübasyon süresi dolduktan sonra kuyucuklar PBS ile 3 x 5 dakika yıkandı. Yıkamanın ardından fiksasyon işlemi için soğuk metanol içerisinde -20 °C'de 10 dakika bekletildi ve 3 x 5 dakika PBS ile yıkama yapıldı. 50 mM olan MDC ana stoğundan 0,005 mM'lık ara stoklar serumsuz besiyeri içerisinde hazırlandı ve her bir kuyucuğa 500 µl eklendi. İnkübatörde 10 dakika bekletildikten sonra PBS ile yıkama yapılarak floresan mikroskopta (Olympus, Japonya) görüntüleme yapıldı.

Gruplardaki vakuol yoğunluğunu kantifiye etmek için floresan mikroskopta farklı alanlardan vakuol içeren ve içermeyen hücreler sayıldı ve aşağıdaki formül kullanılarak bir vakuol indeksi çıkartıldı:

$$\text{Vakuol indeksi} = \text{vakuol (+) hücre sayısı} / \text{total hücre sayısı} \times 100$$

⁸ Cıva lambalı, FITC için 485/530 $\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}$

3.9. İmmunofloresan Yoğunlukların Ölçümü

Gruplar arasında istatistiksel olarak fark olup olmadığını belirlemek amacıyla immunofloresan yoğunluklar ImageJ yazılımı (versiyon 1.46c, NIH, Bethesda, MD, ABD, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) kullanılarak sayısal değerlere dönüştürülmüştür. Her bir çalışma grubuna ait immunositokimya görüntüleri ImageJ yazılımına aktarıldı. Floresan yoğunluk ölçümü için rastgele seçilen 10'ar hücre değerlendirmeye alındı. Yazılım içerisinde sırasıyla *Analyze>Set Measurement* sekmeleri tıklanara açılan pencerede “Area”, Standart deviation”, “Min. & Max. Gray value”, “Integrated density” ve “Mean gray value” kutucukları işaretlendi. Ardından “Polygon” çizim aracı ile floresan ışına yapan alanlar işaretlendi ve *Analyze>Measure* sekmeleri kullanılarak her bir hücre için yoğunluk alanları sayısal veriye döküldü. Arkaplan reaksiyonunu ekarte etmek için floresan ışına göstermeyen kısımlardan 70 x 52 piksel boyutlarında alanlar (en az 5 tekrarlı olacak şekilde) aynı sekme ile ölçüldü ve “Düzeltilmiş Total Hücre Floresan Yoğunluğu (DTHF)” aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı:

$$DTHF = \text{Integrated density}^9 - (\text{Seçilen hücrenin alanı} \times \text{Ortalama arkaplan yoğunluğu})$$

Elde edilen sayısal veriler daha sonra istatistiksel olarak değerlendirmeye alındı.

3.9. İstatistiksel Analiz

Canlılık testleri ve immunofloresan yoğunluk ölçümlerinin gruplara göre istatistiksel analizi için ticari bir yazılım (SPSS, versiyon 21.0; SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) kullanıldı. Doksorubisinin doza ve zamana bağımlı etkisi için tek yönlü varyans analizi (One way ANOVA) testi ve pos-hoc için Tukey kullanıldı. PrP, CD44, Bax ve Beclin-1'in gruplar arasındaki immunofloresan yoğunluk farkını incelemek için ANOVA ve Tukey kullanıldı. Benzer şekilde MDC uygulaması ile

⁹ Seçilen alandaki piksel değerlerinin toplamını gösteren bir ifadedir ve sayısal olarak seçilen alan ile ortalama gri değeri çarpımına eşittir (ImageJ yazılımında ortalama gri değeri “Mean” olarak gözükmektedir).

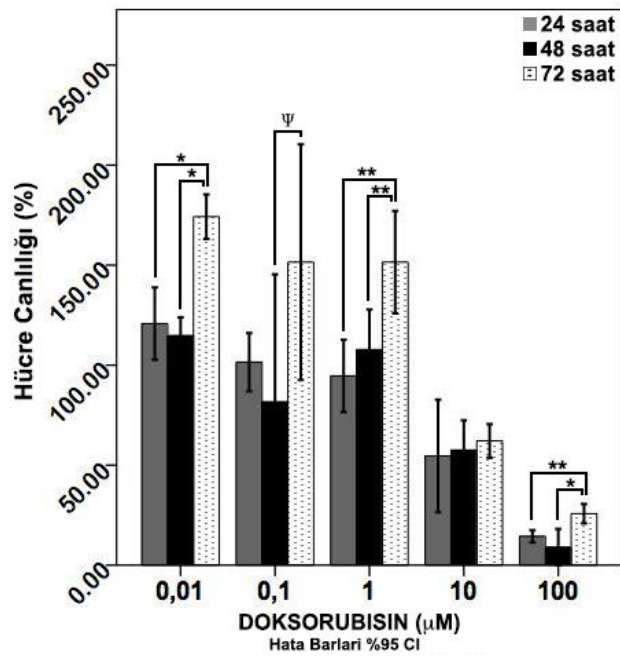
gruplar arasında vakuol (+) hücre dağılımı ANOVA ve Tukey yöntemi ile istatistiksel olarak incelenmiştir. Yazılım aracılığı ile elde edilen verilerin ortalamaları ve standart hataları hesaplandı, 0.05'ten küçük p değeri gruplar arasında anlamlı fark olarak yorumlandı.



4. BULGULAR

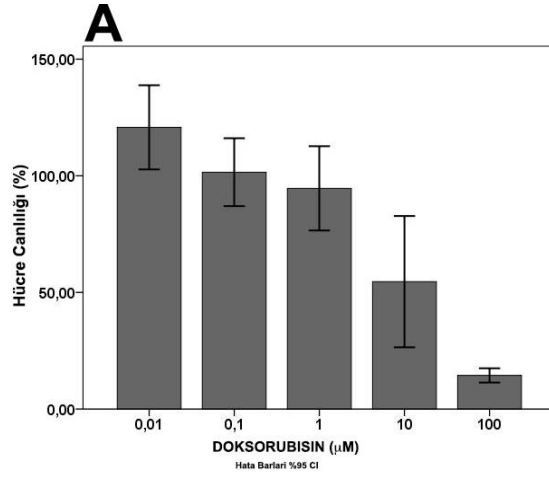
4.1. MTT

Doksorubisinin H69AR ilaca dirençli küçük hücreli akciğer kanseri hücrelerinin çoğlması üzerine etkisini belirlemek amacıyla hücre canlılık profillerine bakılmıştır. Bu amaçla farklı dozlarda (0.01, 0.1, 1, 10 ve 100 μ M) 24, 48 ve 72 saat doksorubisin uygulanan hücreler MTT testine tabi tutulmuşlardır. Doksorubisin uygulamasının H69AR hücrelerde doza ve zamana bağlı olarak azaldığı bulunmuştur (Şekil 4-1).



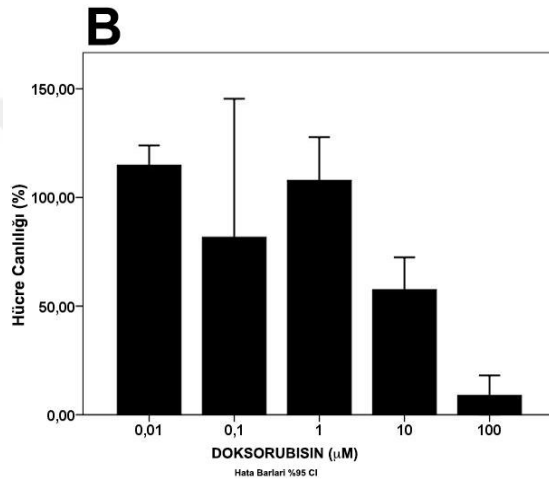
Şekil 4-1 Farklı doz doksorubisin uygulanan H69AR hücrelerindeki canlılığın zamana bağlı değişimi. İlacın 10 ve 100 μ M'lık konsantrasyonlarının özellikle 48 saat inkübasyonda proliferasyonu büyük ölçüde etkilediği görülmektedir. *: $p < 0.01$, **: $p < 0.05$, Ψ : $p = 0.05$ CI: Hata payı

Doksorubisinin 0.01, 0.1 ve 1 μ M'lık dozlarının 24 saatlik inkübasyonu sonucu ilacın hücrelerin sitotoksitesi üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı, sitotoksik etkinin 10 μ M'dan sonra başladığı belirlenmiştir (Şekil 2A). Benzer şekilde 48 saatlik ilaç uygulaması sonunda 10 ve 100 μ M'lık konsantrasyonlarda sitotoksik etkinin anlamlı olarak artış gösterdiği (Şekil 2B), bu etkinin -aynı dozlarda- 72 saatlik inkübasyonlarda da devam ettiği görülmüştür (Şekil 2C).



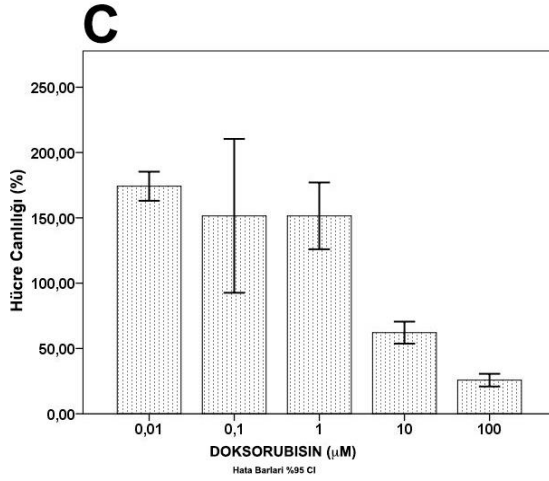
24 saatlik doxorubisin uygulama dozları (µM) arasındaki ilişki

	0.01	0.1	1	10	100
0.01	-	p > 0.05	p > 0.05	p < 0.01	p < 0.01
0.1	p > 0.05	-	p > 0.05	p < 0.01	p < 0.01
1	p > 0.05	p > 0.05	-	p = 0.05	p < 0.01
10	p < 0.01	p < 0.01	p = 0.05	-	p < 0.05
100	p < 0.01	p < 0.01	p < 0.01	p < 0.05	-



48 saatlik doxorubisin uygulama dozları (µM) arasındaki ilişki

	0.01	0.1	1	10	100
0.01	-	p > 0.05	p > 0.05	p < 0.01	p < 0.01
0.1	p > 0.05	-	p > 0.05	p > 0.01	p < 0.01
1	p > 0.05	p > 0.05	-	p > 0.05	p < 0.01
10	p < 0.01	p > 0.01	p > 0.05	-	p > 0.05
100	p < 0.01	p < 0.01	p < 0.01	p > 0.05	-



72 saatlik doxorubisin uygulama dozları (µM) arasındaki ilişki

	0.01	0.1	1	10	100
0.01	-	p > 0.05	p > 0.05	p < 0.01	p < 0.01
0.1	p > 0.05	-	p > 0.05	p < 0.01	p < 0.01
1	p > 0.05	p > 0.05	-	p < 0.01	p < 0.01
10	p < 0.01	p < 0.01	p < 0.01	-	p > 0.05
100	p < 0.01	p < 0.01	p < 0.01	p > 0.05	-

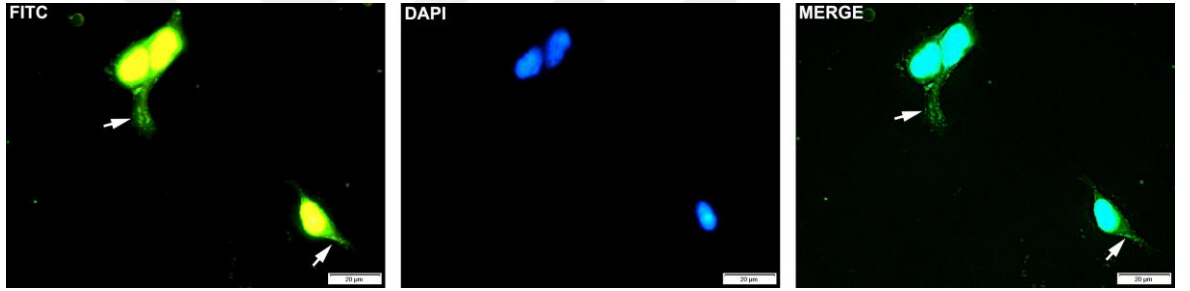
Şekil 4-2 MTT uygulaması sonucunda farklı inkübasyon periyotlarında (A, B, C) doxorubisinin özellikle 10 ve 100 µM'lık konsantrasyonlarının diğer konsantrasyonlara göre anlamlı olarak sitotoksik aktiviteye sahip olduğu görülmüştür.

4.2. İmmunositokimya Bulguları

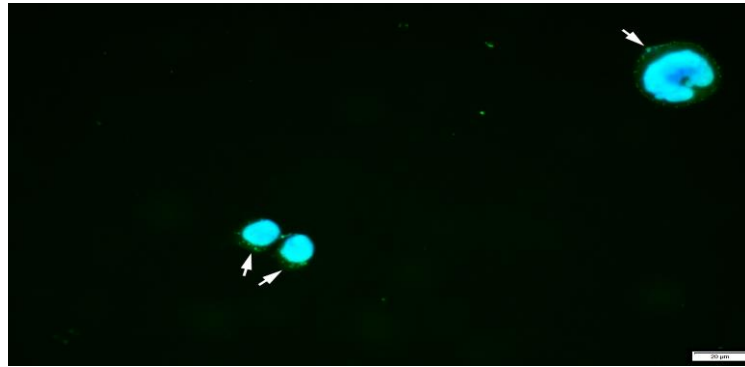
İlaça dirençli küçük hücreli akciğer kanseri hücre hattı H69AR'de hücreyel prion proteini mRNA'sını susturulması sonucu görülen olası hücre ölüm tiplerini belirlemek amacıyla oluşturulan gruplarda ¹⁰ PrP, CD44, Bax ve Beclin-1 ekspresyonları immunositokimyasal olarak araştırıldı.

4.2.1. PrP

Doksorubisin uygulanmamış grupta [Dokso (-); Grup 1], PrP proteinlerinin yoğun bir şekilde sitosolik ve yüzeyel yerleşimler gösterdikleri belirlenmiştir (Şekil 4-3). Bipolar karakterdeki hücrelerde PrP'nin genellikle sitosolik, küre şeklindeki hücrelerde ise daha çok hücre yüzeyinde eksprese oldukları ayırt edilmektedir (Şekil 4-4).



Şekil 4-3 Doksorubisin uygulanmayan grupta PrP molekülleri genellikle hücre yüzeylerinde ya da sitosolde keskin immunofloresan reaksiyonlar vermektedir (oklar).



Şekil 4-4 PrP genellikle Grup 1'de küresel hücrelerin yüzeyel kısımlarında eksprese olmaktadır (oklar).

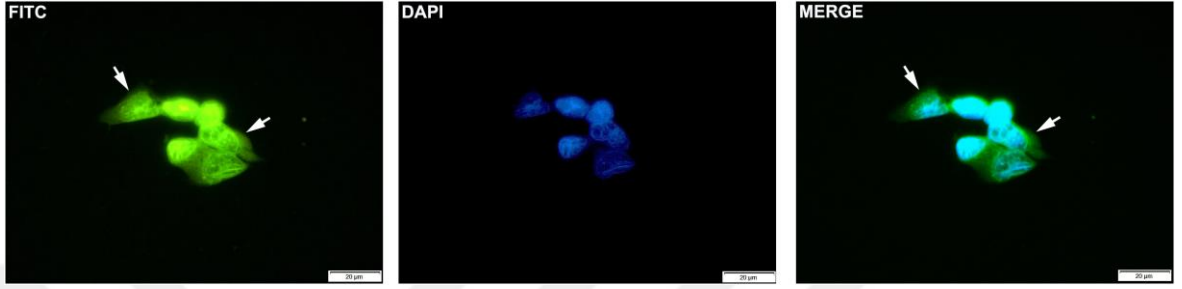
¹⁰ Grup 1: doksorubisin uygulanmamış grup [Dokso (-)]

Grup2 : 48 saat IC₅₀ doksorubisin uygulanmış grup [Dokso (+)]

Grup 3: PrP mRNA'sının spesifik siRNA ile 48 saat inkübasyonu ile susturulduğu grup [siRNA/Dokso (-)]

Grup 4: PrP mRNA'sının spesifik siRNA ile 48 saat inkübasyonu ile susturulduğu ve ardından 48 saat doksorubisin IC₅₀ uygulanmış grup [siRNA/Dokso (+)].

Kırksekiz saat doksorubisinin IC₅₀ dozuna maruz kalan hücrelerde [Dokso (+); Grup 2], PrP ekspresyonlarının kısmen arttığı ancak bu artışın ilaç ile muamele edilmemiş [Dokso (-); Grup 1] hücrelerle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$) (Şekil 4-5). İlaç uygulanmış grupta PrP'nin genellikle sitosolik bir yerleşim göstermekle birlikte bazı hücrelerin yüzeyel PrP ekspresyonlarının devam ettiği görülmektedir (Şekil 4-6).

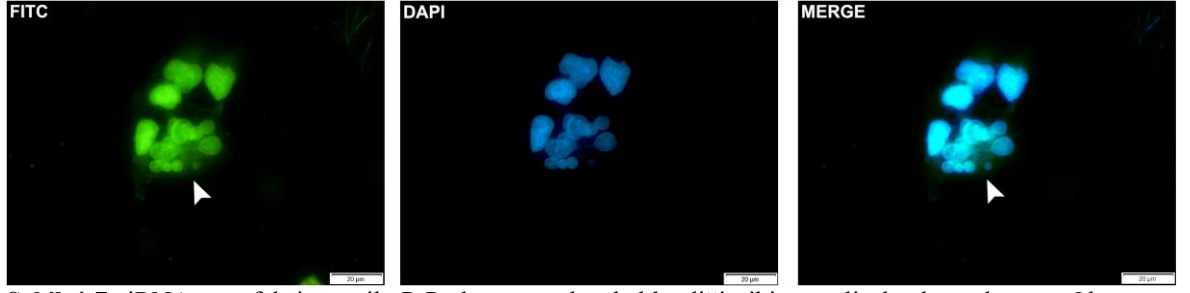


Şekil 4-5 IC₅₀ doksorubisin uygulanmış grupta PrP sitoplazmada genel olarak diffüz bir dağılım göstermektedir.



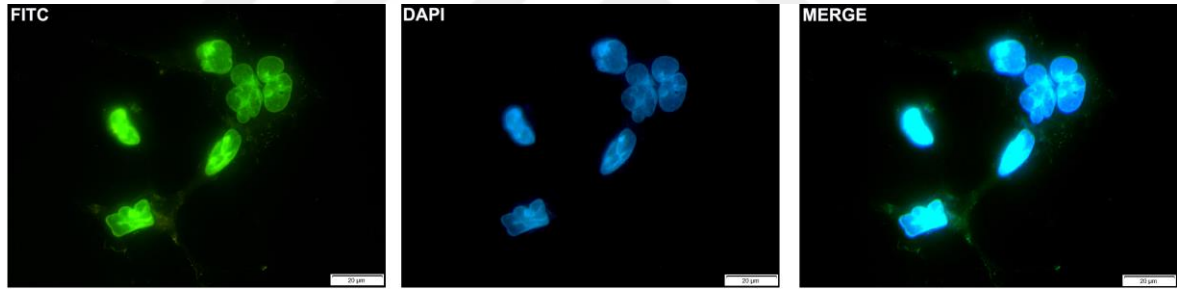
Şekil 4-6 Grup 2'de PrP'nin diffüz sitoplazmik dağılımının yanında bazı hücrelerde yüzeyel ekspresyonlar görülmüştür.

PrP'ye özgü rekombinant siRNA ile yapılan 24 saatlik uygulama sonunda [siRNA/Dokso (-); Grup 3] beklendiği üzere hücrelerde PrP ekspresyonları büyük ölçüde azalma göstermiştir (Şekil 4-7). Bu azalma doksorubisin uygulanmamış ve uygulanmış gruplar ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak gözükmemektedir (sırasıyla $p<0.01$ ve $p<0.01$).



Şekil 4-7 siRNA transfeksiyonu ile PrP ekspresyonları beklendiği gibi önemli ölçüde azalmıştır. Okucu apoptotik hücreyi göstermektedir.

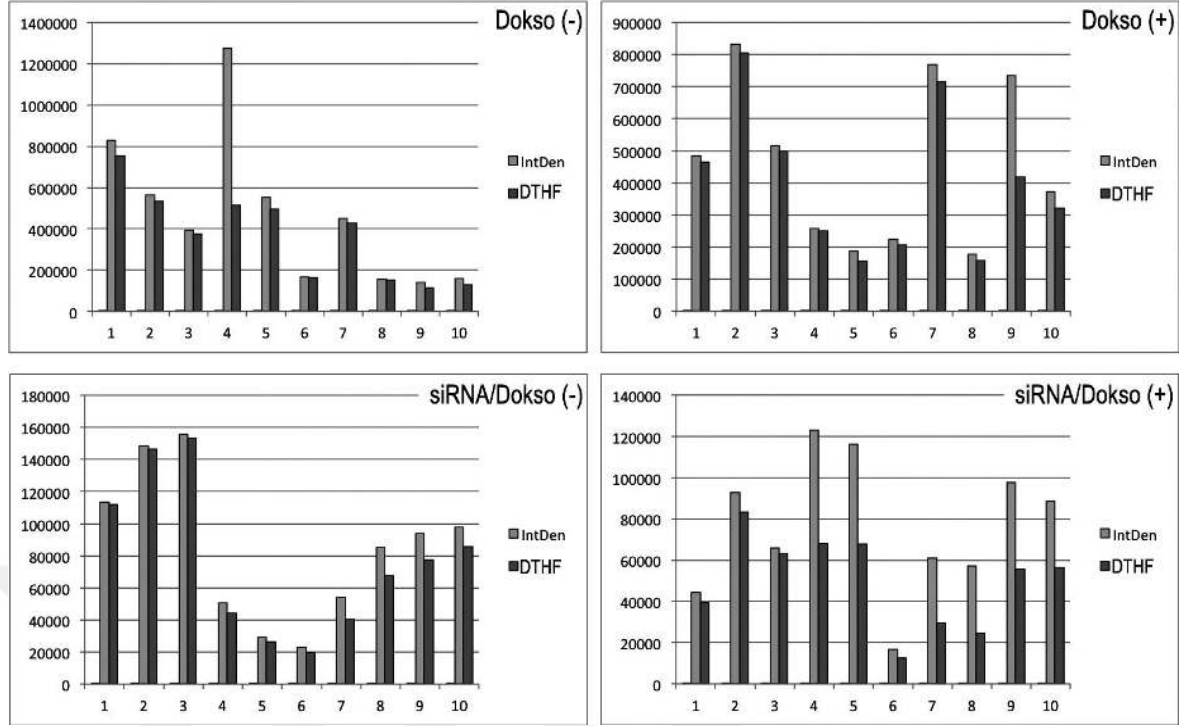
Yirmi dört saat PrP siRNA'sı muamelesi ardından 48 saat doksorubisin IC_{50} dozu uygulanan grupta [siRNA/Dokso (+); Grup 4] PrP ekspresyonu daha da azalmaktadır (Şekil 4-8). Bu gruptaki ekspresyon düzeylerinin doksorubisin uygulanmış ve uygulanmamış grupta anlamlı olarak farklı olduğu ($p < 0.01$ ve $p < 0.01$) ancak sadece PrP siRNA'sı uygulanan grup [siRNA/Dokso (-); Grup 3] ile arasında istatistiksel bir fark olmadığı belirlenmiştir ($p > 0.05$).



Şekil 4-8 siRNA transfeksiyonu ardından doksorubisin IC_{50} dozu uygulanan grupta PrP immunfloresan yoğunluğu büyük ölçüde azalmıştır.

Yapılan floresan mikroskobu analizlerinde farklı hücresel alanlarda gruplardaki hücrelerin PrP floresan yoğunluklarının sayısal analizleri ve belirleyici istatistiksel verileri sırasıyla Şekil 4-9 ve Tablo 4-1'de verilmiştir.

PrP



Şekil 4-9 Her grup içinden rastgele seçilen 10 farklı hücredeki PrP immunofloresan yoğunluklarının ImageJ yazılımı ile elde edilmiş sayısal verileri (IntDen: integrated density; DTHF: düzeltilmiş total hücre floresan yoğunluğu).

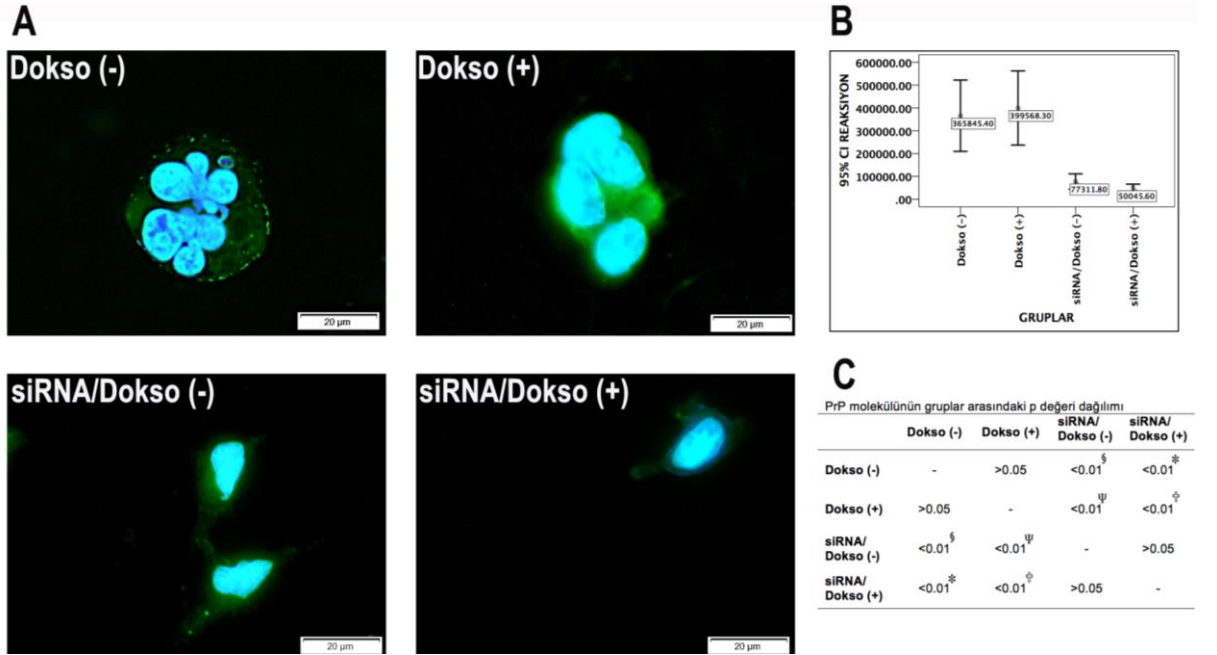
Tablo 4-1 PrP molekülünün hücrelerde gruplara göre gösterdiği floresan yoğunluğunun istatistiksel verileri

	N	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata	%95 Güven Aralığı		Min	Maks
					Alt Sınır	Üst Sınır		
Dokso (-)	10	365845.4	218251.18	69017.08	209717.9	521972.9	113730	753366
Dokso (+)	10	399568.3	226838.88	71732.75	237297.5	561839.1	155221	806047
siRNA/Dokso (-)	10	77311.8	47543.74	15034.65	43301.05	111322.5	19491	153400
siRNA/Dokso (+)	10	50045.6	22588.73	7143.18	338865.6	66204.6	12435	83150
Total	40	223192.8	223258.74	35300.31	151791.2	294594.4	12435	806047

Sonuç olarak,

- doksorubisinin IC₅₀ dozu uygulanmayan hücrelerde [Dokso (-), Grup 1], PrP ekspresyonları belirgin olduğu,
- ilaç uygulamasıyla kısmen arttığı (p >0.05) [Dokso (+), Grup 2],

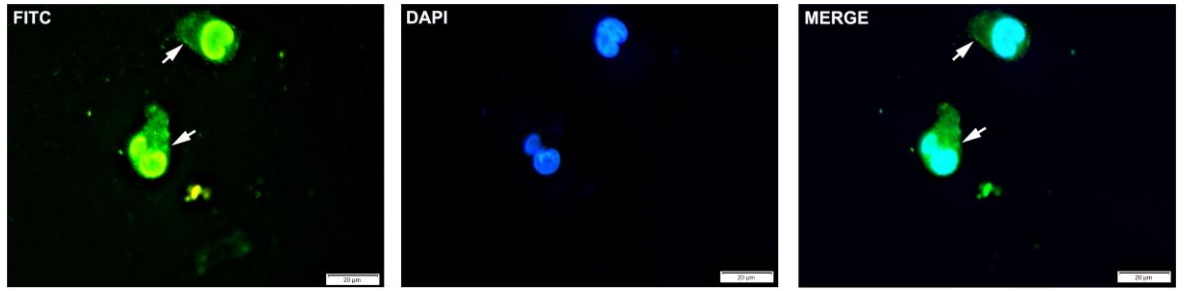
- siRNA uygulaması ile PrP ekspresyonları ilaç uygulanmayan ve IC₅₀ doksorubisin uygulanan gruplara göre anlamlı olarak azaldığı (sırasıyla $p < 0.01$ ve $p < 0.01$),
- siRNA ile birlikte doksorubisin uygulanan grupta ise siRNA uygulaması yapılan grup ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunamamış ancak, ilaç uygulanmayan [Dokso (-), Grup 1] ve IC₅₀ doksorubisin uygulanan [Dokso (+), Grup 2] gruplara göre anlamlı olarak azaldığı ($p < 0.01$ ve $p < 0.01$) bulunmuştur (Şekil 4-10).



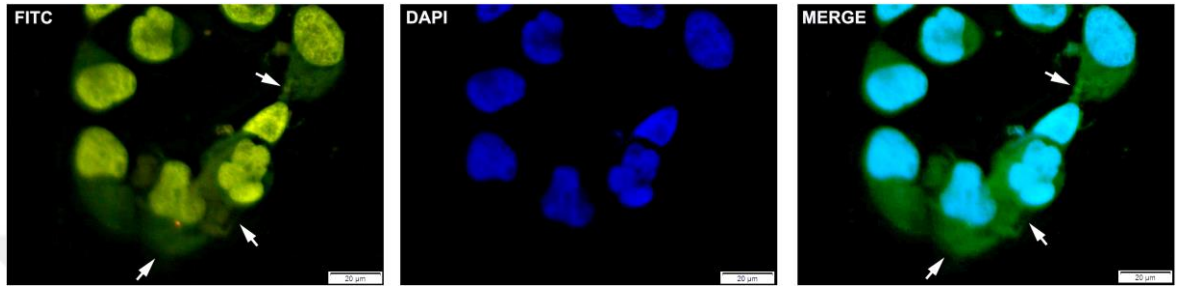
Şekil 4-10 PrP immunfloresan yoğunluklarının gruplara göre dağılımı (A). İlaç uygulanmamış grupta PrP yüzeyel ve sitoplazmik yerleşimler göstermektedir. İlaç uygulamasının ardından sitoplazmik ve diffüz bir ekspresyon profili gösteren PrP, siRNA transfeksiyonu yapılan Grup 3 ile transfeksiyon ardından doksorubisin uygulanan Grup 4'te büyük ölçüde azalmıştır (B ve C).

4.2.2. Bax

Yapılan immunositokimyasal uygulamalarla doksorubisin uygulanmamış grupta [Dokso (-), Grup 1], yer yer Bax ekspresyonları görülmektedir (Şekil 4-11). IC₅₀ doksorubisin uygulamasıyla [Dokso (+), Grup 2] Bax düzeyinde bir artış olmasına karşın iki grup arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (Şekil 4-12).

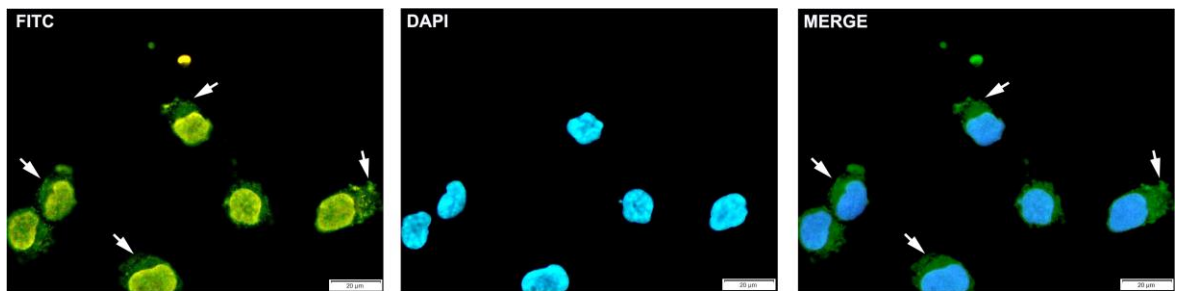


Şekil 4-11 Grup 1’de zayıf Bax immunofloresan reaksiyonları görülmektedir (oklar).



Şekil 4-12 Dokсорubisin uygulamasıyla Bax reaksiyonlarında hafif bir artış (oklar) olmasına karşın Grup 1’e göre anlamlı değildir.

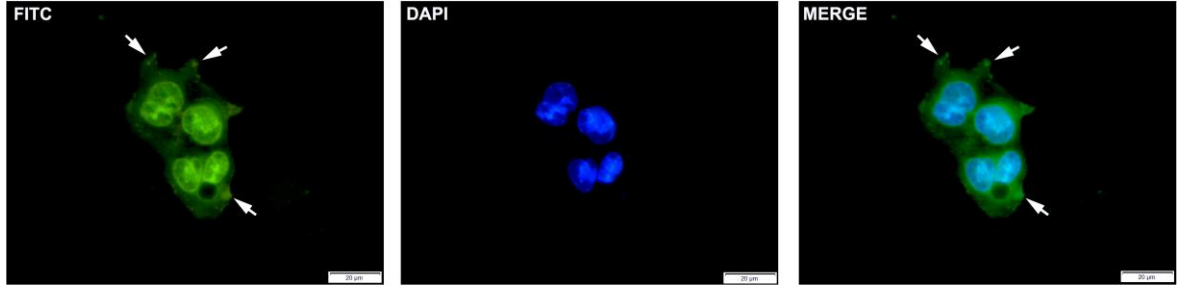
PrP siRNA’sı ile PrP ekspresyonları susturulan ancak dokсорubisin uygulanmayan hücrelerde [siRNA/Dokso (-), Grup 3], Bax ekspresyonunun hafif azaldığı ancak önceki iki grupta istatistiksel bir fark bulunmadığı belirlenmiştir ($p > 0.05$; $p > 0.05$) (Şekil 4-13). Bununla birlikte, siRNA uygulamasının ardından Bax immunoreaktivitesinin önceki gruplarda görülen zayıf diffüz sitosolik ekspresyonlarından daha çok keskin işaretlenmeler gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4-13).



Şekil 4-13 siRNA transfeksiyonu Bax ekspresyonlarında hafif bir azalmaya neden olurken önceki gruplarda görülen diffüz immunofloresan reaksiyonlar bu grupta keskin sitosolik görüntüler vermektedir (oklar).

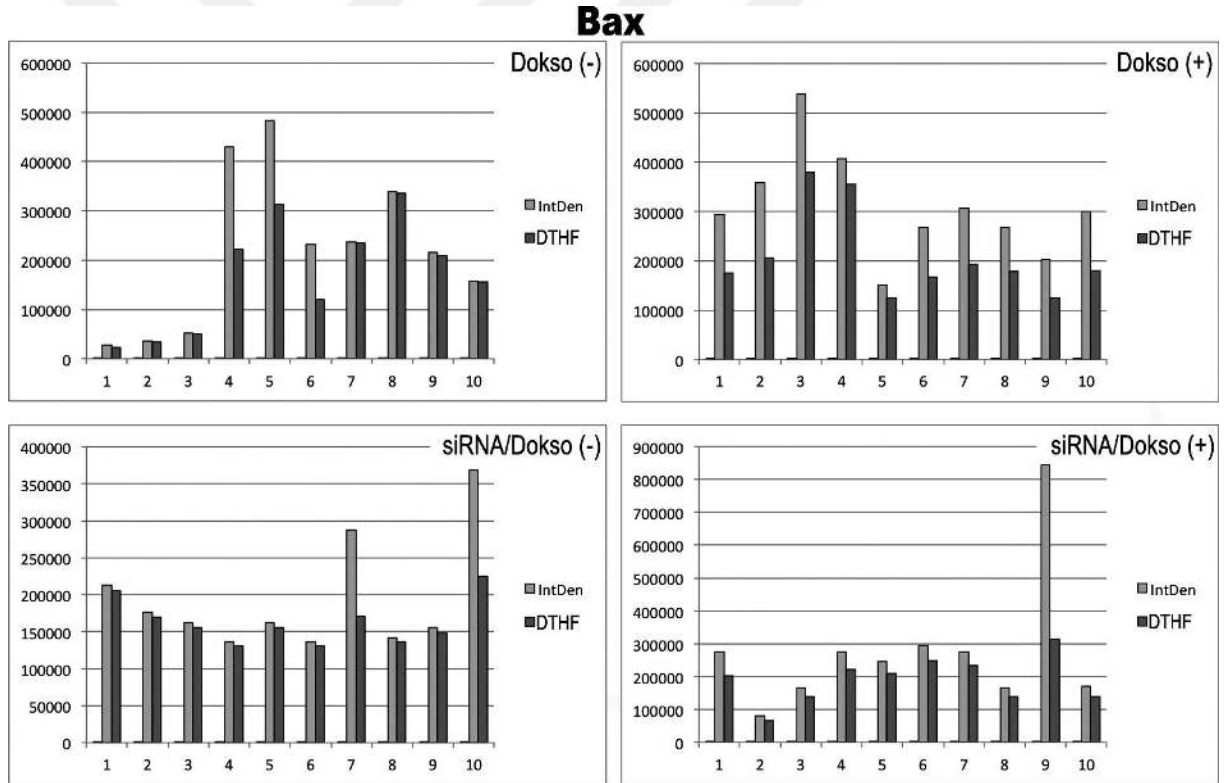
PrP siRNA’sı ile muamele edilen ve ardından dokсорubisin uygulaması yapılan hücrelerde [siRNA/Dokso (+), Grup 4] Bax düzeyinin hafifçe azaldığı ancak bu

azalmanın istatistiksel bir önem oluşturmadığı belirlenmiştir ($p > 0.05$; $p > 0.05$; $p > 0.05$). Ancak, Bax immunoreaktivitesinin keskin işaretlenmeleri bu grupta da yer aldığı görülmüştür (Şekil 4-14).



Şekil 4-14 Grup 4'te Bax ekspresyonlarında hafif bir azalma olmasına karşın keskin immunfloresan reaksiyonlar göze çarpmaktadır (oklar).

Gruplardaki hücrelerin Bax floresan yoğunluklarının sayısal analizleri ve belirleyici istatistiksel verileri sırasıyla Şekil 4-15 ve Tablo 4-2'de verilmiştir.



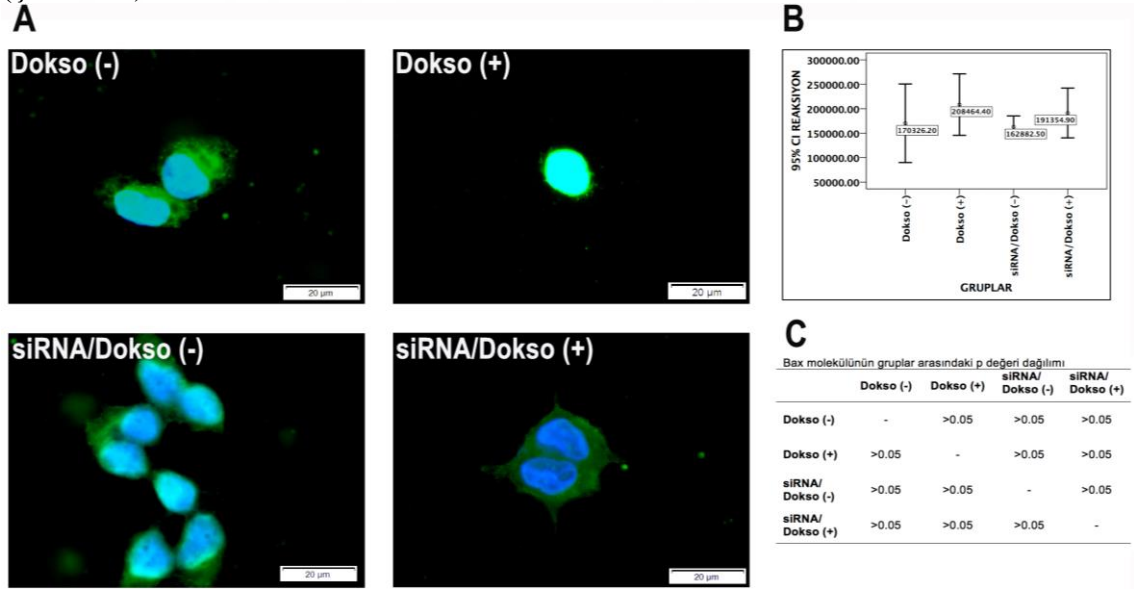
Şekil 4-15 Gruplara ait 10 farklı hücredeki Bax molekülünün immunofloresan yoğunluklarının ImageJ yazılımı ile elde edilmiş sayısal verileri (IntDen: integrated density; DTHF: düzeltilmiş total hücre floresan yoğunluğu).

Tablo 4-2 Bax molekülünün hücrelerde gruplara göre gösterdiği floresan yoğunluğunun istatistiksel verileri

	N	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata	%95 Güven Aralığı		Min	Maks
					Alt Sınır	Üst Sınır		
Dokso (-)	10	170326,2	112262,81	35500,61	90018,2	250634,2	23811	336598
Dokso (+)	10	208464,4	87907,31	27798,73	145579,3	271349,5	124819	379233
siRNA/Dokso (-)	10	162882,5	31351,79	9914,31	140454,8	185310,2	131011	224599
siRNA/Dokso (+)	10	191354,9	71128,69	22492,87	140472,5	242237,3	65591	314094
Total	40	183257,0	80094,31	12664,02	157641,6	208872,4	23811	379233

Sonuç olarak,

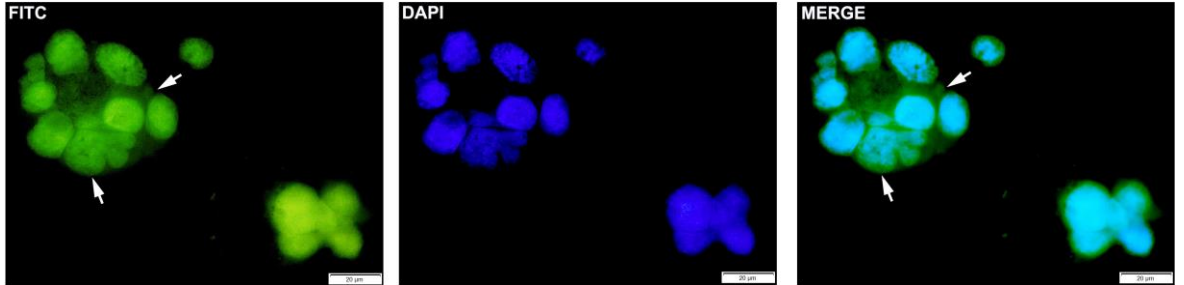
- doksorubisinin IC₅₀ dozu uygulanmayan hücrelerde [Dokso (-), Grup 1], sitosolik olarak görülebilen Bax ekspresyonlarının ilaç uygulamasıyla [Dokso (+), Grup 2], kısmen arttığı ancak bu artışın anlamlı boyutta olmadığı (p> 0.05),
- siRNA ve siRNA/doksorubisin uygulamalarının hücrelerde ilaç uygulanmış ve uygulanmamış gruplara göre önemli bir etki göstermediği belirlenmiştir (Şekil4.16).



Şekil 4-16 İlaç uygulanmamış grupta hafif bir reaksiyon gösteren Bax ekspresyonlarının doksorubisin uygulamasıyla hafif bir artış göstermektedir. Grup 3 ve 4'te hafif bir azalma ile birlikte keskin immunofloresan ekspresyonlar göze çarparken (A) gruplar arasında Bax ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler anlamlı değildir (B ve C). Bu bulgular PrP siRNA transfeksiyonunun Bax ekspresyonları üzerine bir etkisinin olmadığını, dolayısıyla PrP ve Bax arasında herhangi bir etkileşim olamayacağını öne sürmektedir.

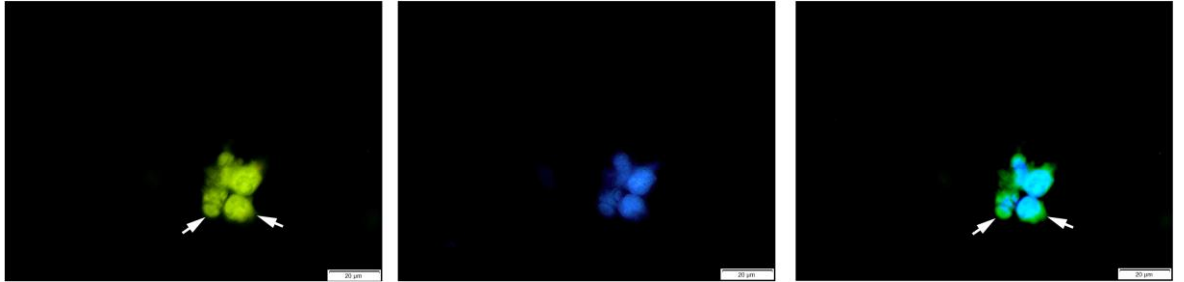
4.2.3. CD44

PrP molekülü ile birlikte eksprese olduğu bilinen CD44, ilaç uygulanmamış grupta [Dokso (-), Grup 1], yüzeyel ve sitosolik yerleşimler göstermektedir (Şekil 4-17).



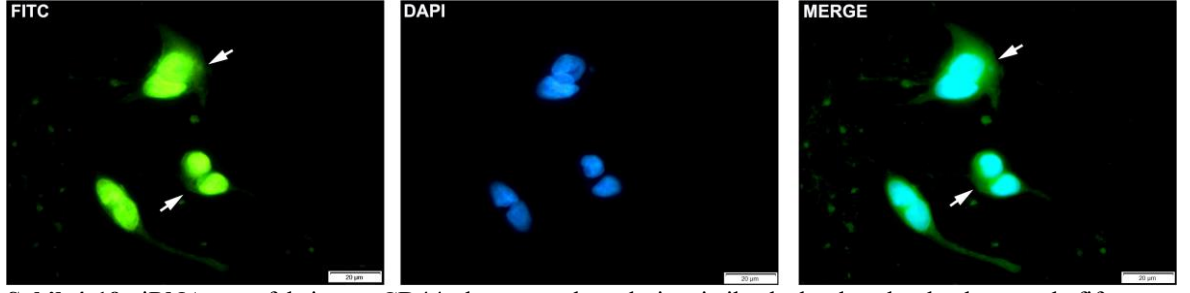
Şekil 4-17 Grup 1’de CD44 molekülleri yüksek immunofloresan reaksiyonlar vermektedir (oklar).

Dokso rubisinin IC_{50} dozunun uygulandığı grupta [Dokso (+), Grup 2], CD44 ekspresyonunun kısmen azaldığı ancak bu azalmanın ilaç uygulanmamış gruba göre anlamlı olmadığı bulunmuştur (Şekil 4-18).

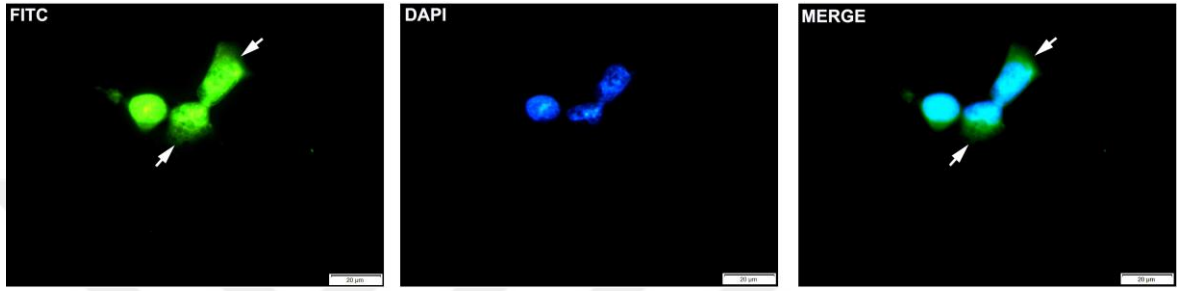


Şekil 4-18 Dokso rubisinin IC_{50} dozunun uygulandığı Grup 2’de CD44 ekspresyonlarının hafif bir azalma göstermesine karşın Grup 1’e benzer olduğu görülmektedir (oklar).

PrP siRNA’sı uygulamasının [siRNA/Dokso (-)], CD44 ekspresyonunda çok hafif bir artışa neden olduğu, siRNA/dokso rubisin uygulanması ile ekspresyon düzeyinin azaldığı ancak bu değişikliklerin anlamlı farklılıklar oluşturmadığı belirlenmiştir (sırasıyla, $p > 0.05$ ve $p > 0.05$) (Şekil 4-19 ve 4-20).



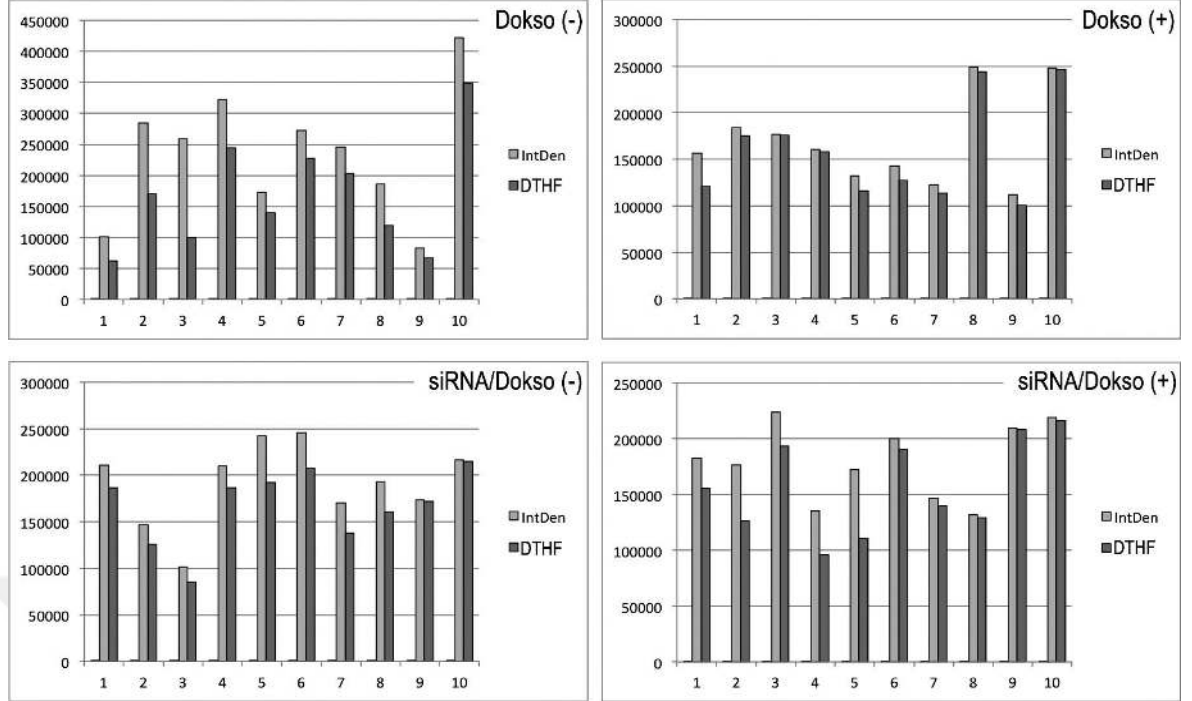
Şekil 4-19 siRNA transfeksiyonu CD44 ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı olmayan hafif bir artışa neden olmaktadır (oklar). Bu durum H69AR hücrelerde CD44 ekspresyonlarının büyük ölçüde PrP'ye bağımlı olmadığını düşündürmüştür.



Şekil 4-20 PrP susturulmasının ardından doxorubisin uygulanmış grupta CD44 moleküllerinin hafif azaldığı görülmektedir (oklar). İstatistiksel açıdan önemli olmayan bu azalmanın doxorubisinden kaynaklandığı düşünülebilir.

Gruplardaki hücrelerin CD44 molekülüne ait floresan yoğunluklarının sayısal analizleri ve belirleyici istatistiksel verileri sırasıyla Şekil 4-21 ve Tablo 4-3'de görülmektedir.

CD44



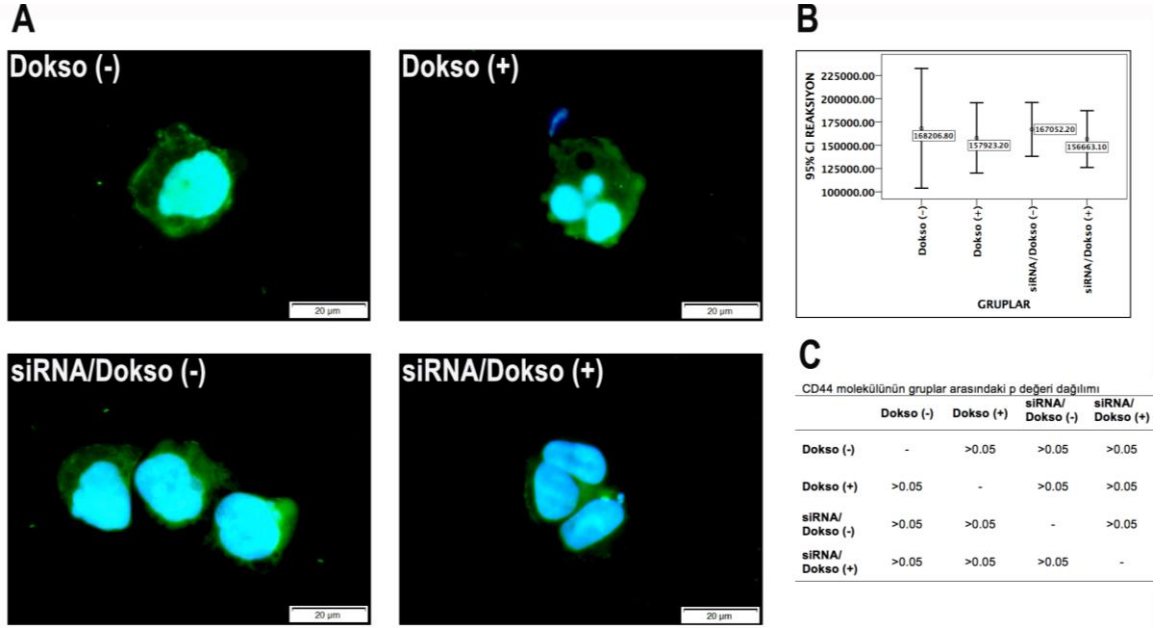
Şekil 4-21 Gruplardan rastgele elde edilen 10 farklı hücre görüntüsünde CD44'ün immunofloresan yoğunluklarının ImageJ yazılımı ile elde edilmiş sayısal verileri (IntDen: integrated density; DTHF: düzeltilmiş total hücre floresan yoğunluğu).

Tablo 4-3 CD44 molekülünün hücrelerde gruplara göre gösterdiği floresan yoğunluğunun istatistiksel verileri

	N	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata	%95 Güven Aralığı		Min	Maks
					Alt Sınır	Üst Sınır		
Dokso (-)	10	168206.8	89849.81	28413.00	103932.1	232481.5	61693	348680
Dokso (+)	10	157923.2	52781.12	16690.86	120165.8	195680.5	100935	246194
siRNA/Dokso (-)	10	167052.2	40395.31	12774.12	138155.1	195949.3	85381	215141
siRNA/Dokso (+)	10	156663.1	42630.00	13480.8	126167.4	187158.8	96100	216180
Total	40	162461.3	57702.69	9123.60	144007.1	180915.5	61693	348680

Sonuç olarak,

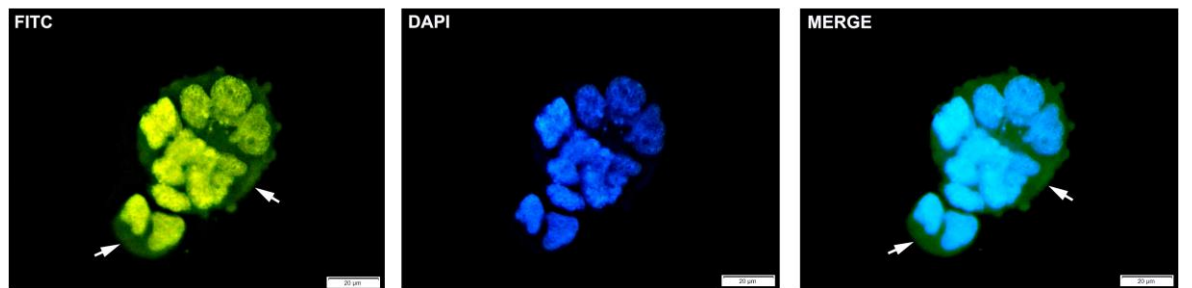
- PrP ile birlikte bulunan CD44 molekülünün ekspresyon düzeylerinin doksorubisin, PrP siRNA'sı ve siRNA/Doksorubisin uygulamaları sonucunda doksorubisin uygulanmamış gruba göre belirli bir değişiklik göstermediği belirlenmiştir (sırasıyla, $p > 0.05$, $p > 0.05$, $p > 0.05$) (Şekil 4-22).



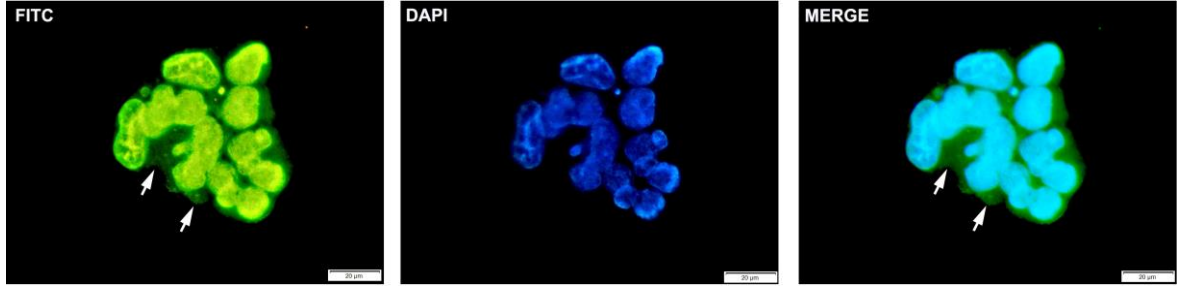
Şekil 4-22 CD44 molekülü gruplar arasında küçük ekspresyon farklılıkları gösterse de (A) bu farkların anlamlı olmadığı görülmektedir (B ve C). PrP susturulmasının ardından CD44 molekülü düzeyinde önemli bir değişiklik olmaması bu molekülün çalışmaya konu hücrelerde (H69AR) PrP'den bağımsız bir ekspresyon paterni sergilediğini düşündürmüştür.

4.2.4. Beclin-1

Doksorubisinin uygulamasına maruz bırakılmayan hücrelerde [Dokso (-), Grup 1] yer yer Beclin-1 ekspresyonlarına rastlanmıştır (Şekil 4-23). Buna karşın ilaç uygulanmış grupta [Dokso (+), Grup 2] Beclin-1 ekspresyonu anlamlı olarak artmıştır ($p < 0.05$) (Şekil 4-24).

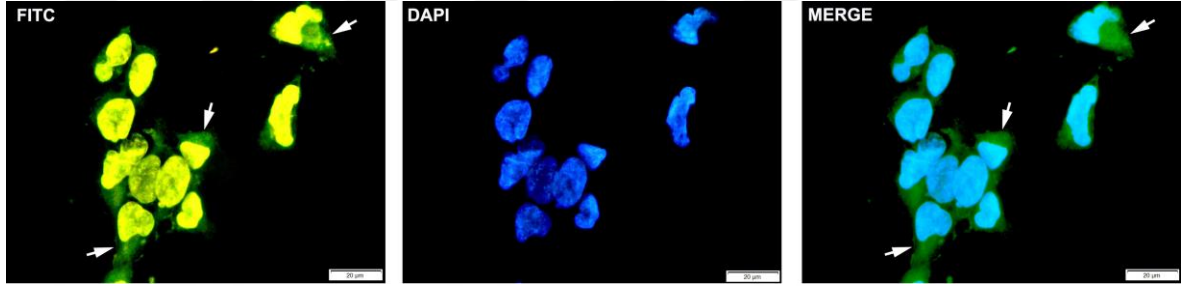


Şekil 4-23 Doksorubisin uygulanmamış grupta düşük Beclin-1 ekspresyonları görülmektedir (oklar).



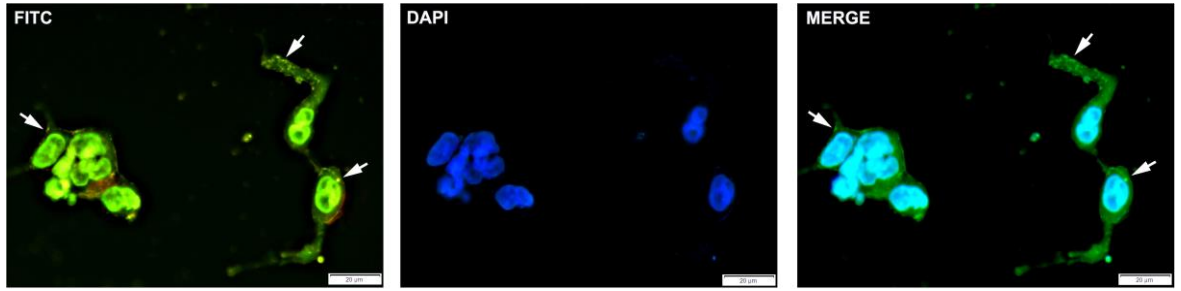
Şekil 4-24 Beclin-1 immunoreaktivitesi doksorubisin uygulamasıyla belirgin bir artış ve genellikle diffüz sitosolik yerleşimler göstermektedir (oklar).

Hücreler PrP siRNA'sı ile muamele edildiğinde [siRNA/Dokso (-), Grup 3] Beclin-1 ekspresyonunun doksorubisin uygulanmış gruba [Dokso (+), Grup 2] göre biraz azaldığı, ancak bu değişikliğin anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$) (Şekil 4-25).



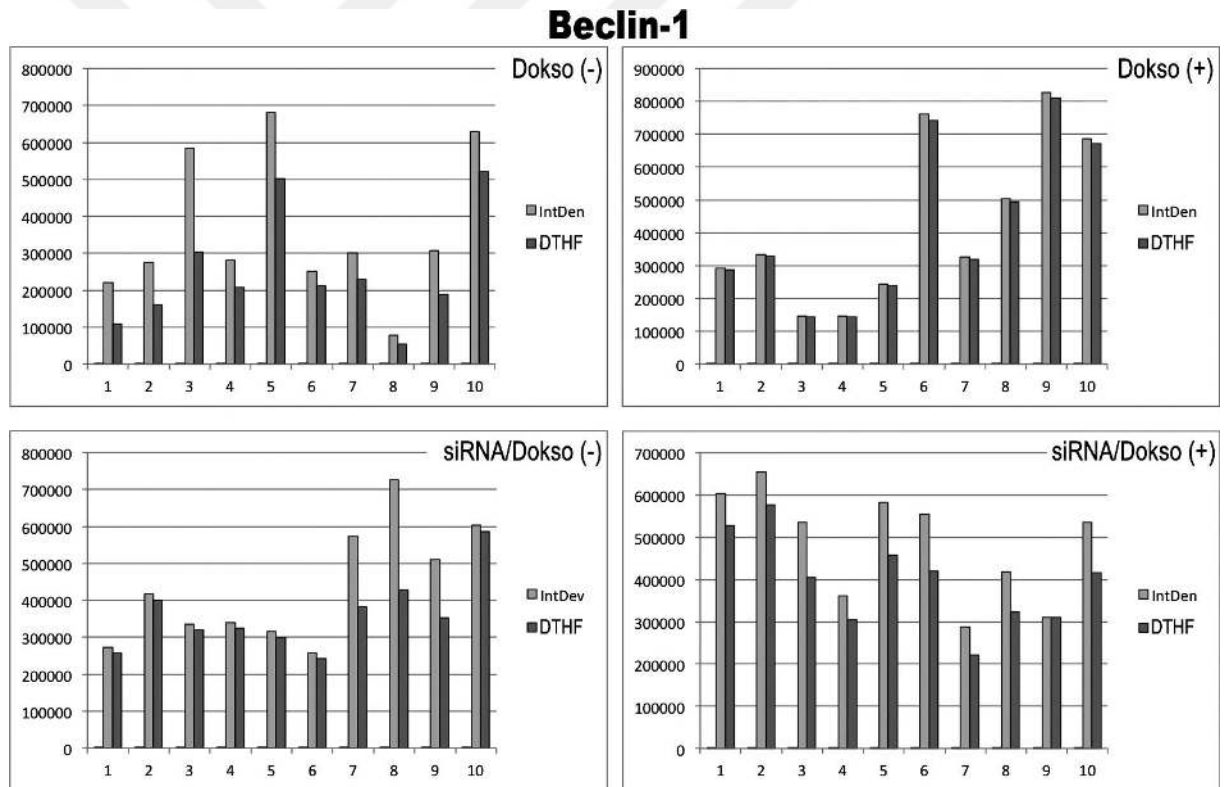
Şekil 4-25 siRNA uygulamasıyla PrP ekspresyonları susturulan hücrelerde Beclin-1 düzeyinin hafif bir düşüş gösterdiği ancak yine de Grup 1'e göre (istatistiksel olarak anlamlı olmasa da) daha yüksek olduğu bulunmuştur (oklar).

PrP siRNA'sı uygulamasının ardından doksorubisin uygulanan hücrelerde [siRNA/Dokso (+), Grup 4] Beclin-1 düzeyinin yeniden artış gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4-26). Çok büyük olasılıkla doksorubisin uygulaması nedeniyle görülen bu artışın ilaç uygulanmamış gruba göre anlamlı olarak farklı olduğu ($p<0.05$), diğer gruplar açısından anlamlı bir fark oluşturmadığı ($p>0.05$; $p>0.05$) belirlenmiştir.



Şekil 4-26 Beclin-1 düzeyi PrP transfekte edilen ve ardından doksorubisin ile muamele edilen hücrelerde artış göstermiştir. Her ne kadar bu artış sadece doksorubisin uygulanan grup ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak gözükme de immunositokimyasal analizlerde bu moleküllerin siRNA ve doksorubisin uygulaması sonrası keskin sitosolik görüntüleri (oklar) Beclin-1 ile PrP arasında fonksiyonel bir ilişki olabileceğini düşündürmüştür.

Gruplardaki hücrelerin Beclin-1 molekülüne ait floresan yoğunluklarının sayısal analizleri ve belirleyici istatistiksel verileri sırasıyla Şekil 4-27 ve Tablo 4-4’de görülmektedir.



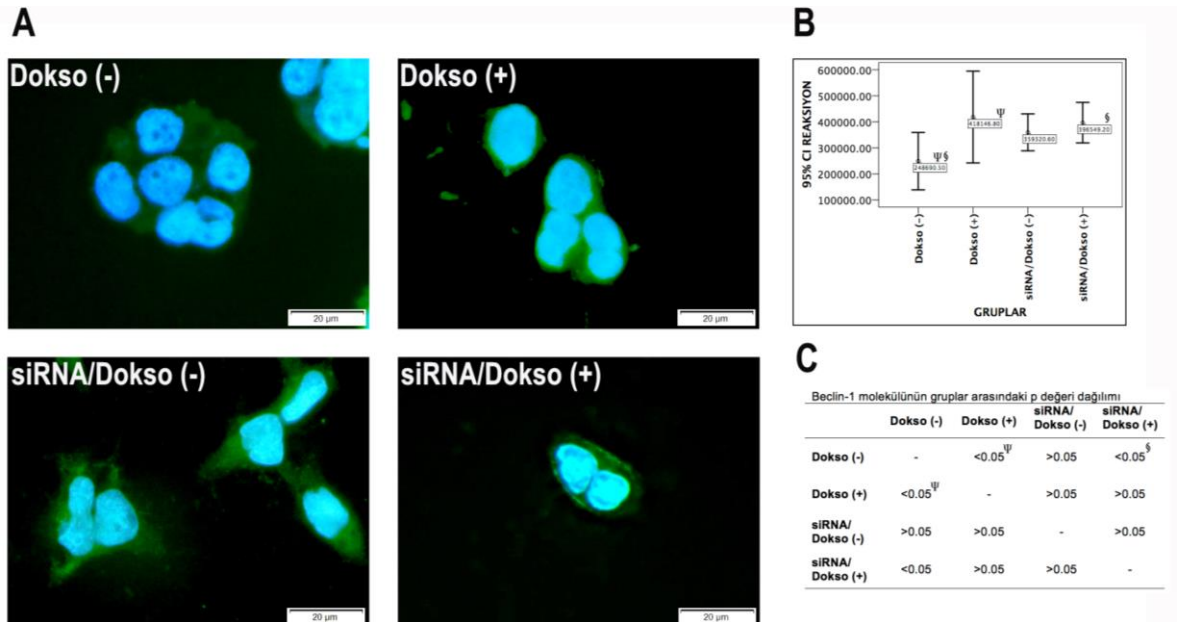
Şekil 4-27 Her bir gruba ait 10 farklı hücre görüntüsünde Beclin-1 molekülünün immunofloresan yoğunluklarının ImageJ yazılımı ile elde edilmiş sayısal verileri (IntDen: integrated density; DTHF: düzeltilmiş total hücre floresan yoğunluğu).

Tablo 4-4 Beclin-1 molekülünün hücrelerde gruplara göre gösterdiği floresan yoğunluğunun istatistiksel verileri

	N	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata	%95 Güven Aralığı		Min	Maks
					Alt Sınır	Üst Sınır		
Dokso (-)	10	248690.5	153975.15	48691.22	138543.3	358837.7	53575	520336
Dokso (+)	10	418146.8	246486.01	77945.72	241821.3	594472.2	144171	810458
siRNA/Dokso (-)	10	359320.6	99130.97	31347.97	288406.6	430234.6	242230	585447
siRNA/Dokso (+)	10	396549.2	108904.25	34438.55	318643.8	474454.6	221099	576836
Total	40	355676.8	169892.96	26862.44	301342.4	410011.2	53575	810458

Sonuç olarak,

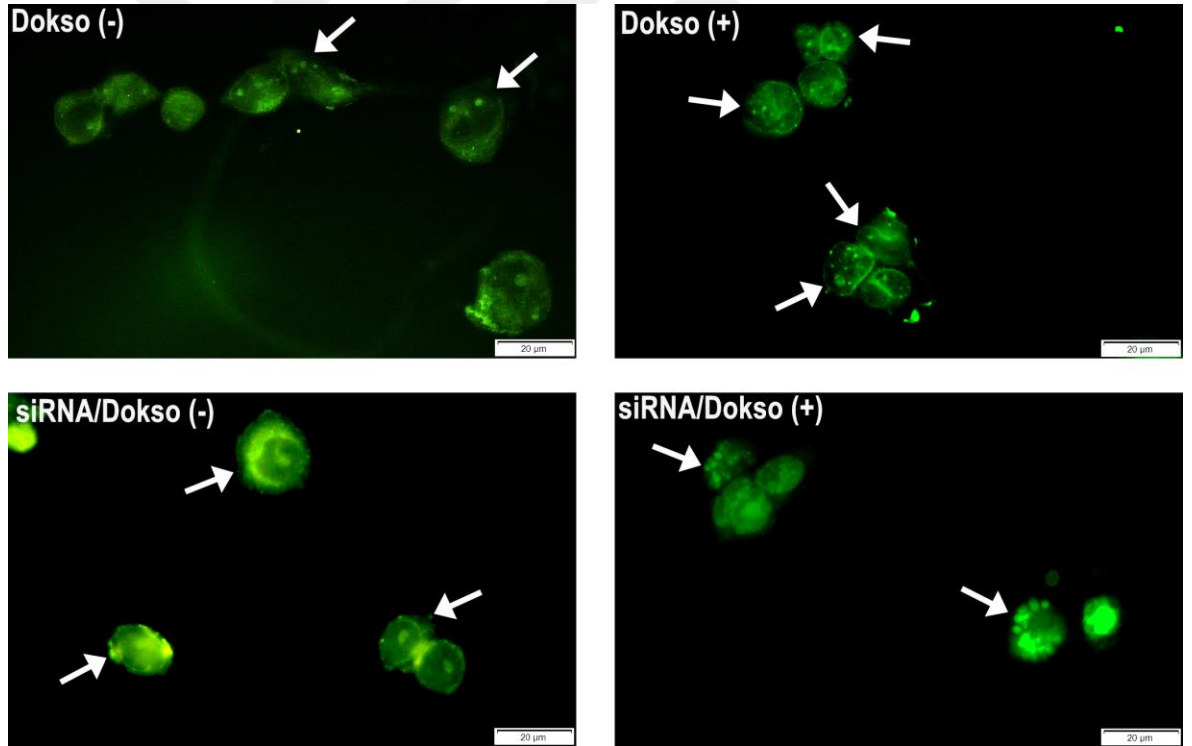
- Beclin-1 düzeylerinin doksorubisin uygulamasıyla arttığı,
- Sadece PrP siRNA uygulamasının Beclin-1 düzeyini hafif bir şekilde arttırdığı ancak bu artışın istatistiksel bir anlam içermediği,
- Hücrelerin PrP siRNA muamelesi ardından doksorubisin uygulamasına maruz kaldığında ise sadece doksorubisin uygulanmış hücrelerdekine [Dokso (+), Grup 2] benzer bir ekspresyon profili gösterdiği ($p < 0.05$) belirlenmiştir (Şekil 4-28).



Şekil 4-28 Doksorubisin uygulanmayan grupta oldukça düşük düzeyde bulunan Beclin-1 molekülü doksorubisin uygulanan ve siRNA transfeksiyonu ardından dokso uygulanan gruplarda anlamlı olarak artış göstermiştir (A-C). Grup 3 ile 4 arasında istatistiksel olarak bir benzerlik olmamasına (B, C) karşın bu moleküllerin özellikle Grup 4'teki sitoplazmik keskin immunoreaktiviteleri Beclin-1 ile PrP arasında doksorubisin aracılı bir fonksiyonel ilişki olabileceğini düşündürmüştür.

4.3. Monodansilkadaverin (MDC) Uygulamaları

Gruplarda otofajik vakuolleri belirlemek amacıyla yapılan MDC uygulamalarında doksorubisin uygulanmamış grupta [Dokso (-), Grup 1] az sayıda otofajik vakuole rastlanırken doksorubisin uygulamasıyla otofajik vakuol sayısının artış gösterdiği belirlenmiştir. siRNA uygulanmış grupta [siRNA/Dokso (-), Grup 3] vakuol içeren hücre sayısının Grup 1'e oranla daha fazla olmasına karşın ilaç uygulaması yapılmış Grup 2'den daha az olduğu görülmektedir. siRNA uygulaması ardından doksorubisin ile muamele edilen hücrelerde [siRNA/Dokso (+), Grup 4] vakuol içeren hücrelerin sayısının sadece doksorubisin ile muamele edilmiş hücrelere (Grup 2) göre daha az olduğu, ancak morfolojik olarak bu gruptaki hücrelerde vakuollerin diğer gruplardaki hücrelere göre daha belirgin ve gelişmiş olduğu göze çarpmaktadır (Şekil 4-29).



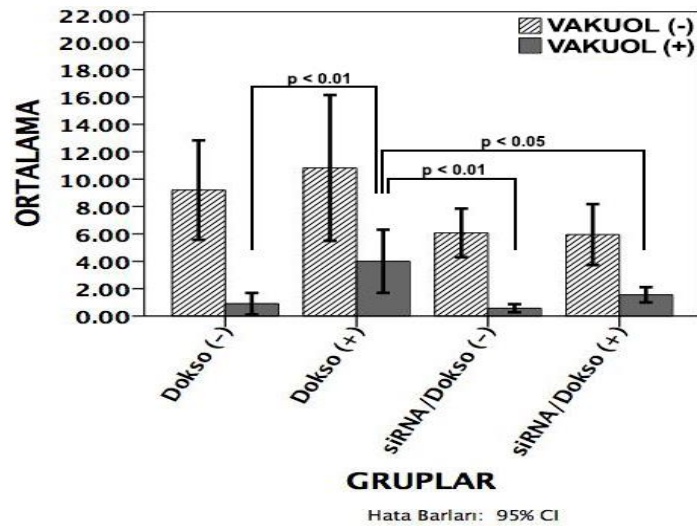
Şekil 4-29 MDC uygulamasıyla özellikle Grup 2 ve 4'te vakuol sayısının artış gösterdiği belirlenmiştir. Özellikle siRNA transfeksiyonu ile kombine edilen doksorubisin uygulaması sonucunda mikroskopik olarak vakuollerin daha gelişmiş olması etkin bir otofajik süreci de beraberinde getirdiğini düşündürmüştür.

Gruplardaki vakuol yoğunluğunu kantifiye etmek için floresan mikroskopta farklı alanlardan çıkartılan vakuol indeksine göre ilaç uygulaması yapılmayan grupta [Dokso (-), Grup 1] vakuol oranı %9 olarak bulunurken ilaç uygulanan grupta [Dokso (+), Grup 2] oran %27 olarak gözükmemektedir. PrP siRNA'sı ile muamele edilen ancak ilaç uygulanmayan grupta [siRNA/Dokso (-)] vakuol yoğunluğunun azaldığı (% 8.6) ve Grup 1 ile yaklaşık aynı düzeylerde olduğu, siRNA uygulaması ardından doksorubisin ile muamele edilen grupta [siRNA/Dokso (+), Grup 4] vezikül yoğunluğunun artış göstererek % 21'lik orana çıktığı belirlenmiştir (Tablo 4-5).

Tablo 4-5 MDC uygulaması sonunda gruplara göre vakuol dağılımı

	VAKUOL (+) HÜCRE SAYISI	VAKUOL (-) HÜCRE SAYISI	TOPLAM HÜCRE SAYISI	VAKUOL (+) HÜCRE (%)
Dokso (-)	9	91	100	9
Dokso (+)	44	119	163	27
siRNA/Dokso (-)	8	85	93	8.6
siRNA/Dokso (+)	31	119	150	21

Monitörize edilen hücrelerden elde edilen verilerin istatistiksel analizi yapıldığında doksorubisin uygulanmış grup [Dokso (+), Grup 2] ile diğer gruplar arasında otofajik vakuol yoğunluğu açısından anlamlı bir fark olduğu görülmüştür (Grup 1, Grup 3 ve Grup 4 için sırasıyla, $p = 0.001$; $p < 0.001$; $p < 0.005$) (Şekil 4-30; Tablo 4-6).



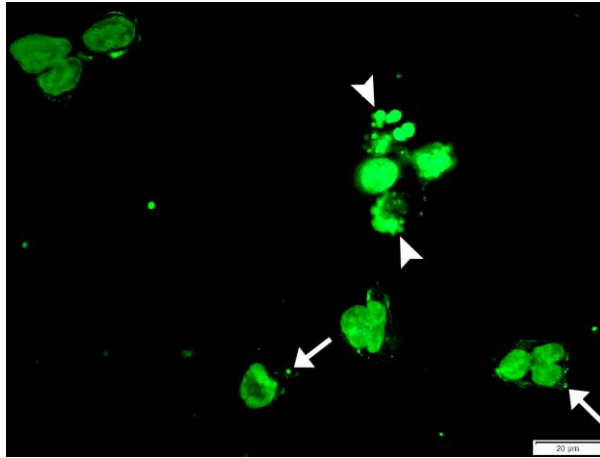
Şekil 4-30 Gruplardaki vakuol sayılarının istatistiksel analizi yapıldığında Grup 2 ile diğer gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu, Grup 4'te ise önemli bir fark olmamasına karşın otofajik vakuollerdeki belirginlik siRNA + doksorubisin kombinasyonunun H69AR hücrelerde otofajik süreç açısından önemli olabileceğini düşündürmüştür (CI: hata aralığı).

Tablo 4-6 MDC uygulamaları ile belirlenen vakuol (+) ve vakuol (-) hücrelerin istatistiksel dağılımları.

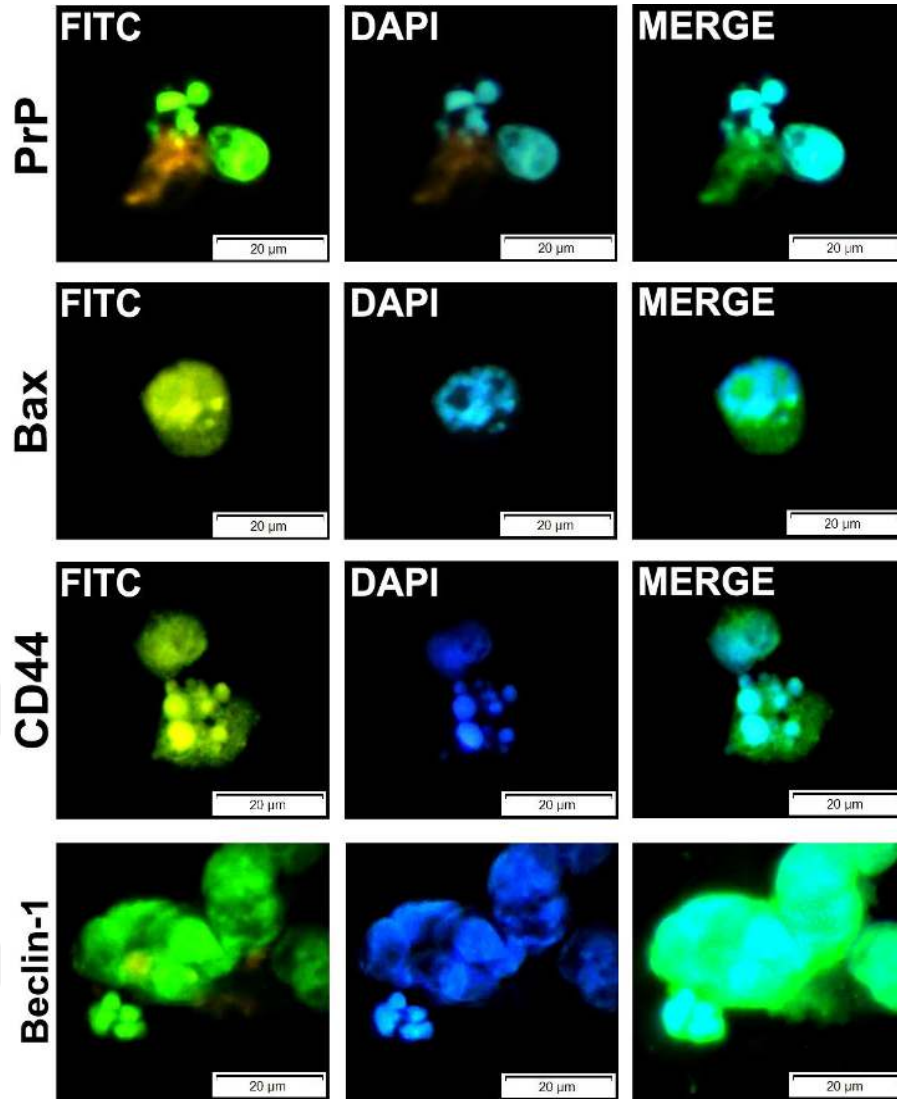
		N	n	Ort.	Std. Sapma	Std. Hata	95% Güven Aralığı		Min	Mak
							Alt	Üst Sınır		
VAKUOL (+)	Dokso (-)	10	9	0.90	110.05	0.35	0.11	16.87	0.00	3.00
	Dokso (+)	11	44	4	343.51	103.57	16.92	63.08	1.00	13.00
	siRNA/Dokso (-)	14	8	.57	0.51	0.14	0.27	0.87	0.00	1.00
	siRNA/Dokso (+)	20	31	1.55	119.09	0.27	0.99	21.07	0.00	4.00
	Total	55	92	1.67	211.74	0.29	11.00	22.45	0.00	13.00
VAKUOL (-)	Dokso (-)	10	91	9.10	507.28	160.42	55.71	128.29	4.00	19.00
	Dokso (+)	11	119	10.82	792.24	238.87	54.96	161.41	2.00	26.00
	siRNA/Dokso (-)	14	85	6.07	307.51	0.82	42.96	78.47	2.00	13.00
	siRNA/Dokso (+)	20	119	5.95	475.15	106.25	37.26	81.73	1.00	22.00
	Total	55	418	75.455	550.70	0.74	60.56	90.34	1.00	26.00

N: rastgele seçilen alan sayısı, n: monitörize edilen hücre sayısı

Öte yandan, siRNA uygulamasının ardından doksorubisinin IC₅₀ dozu ile muamele edilen grupta MDC uygulamaları (Şekil 4-31) ve immunositokimya uygulamaları sırasında gözlemlenen apoptotik morfolojiye benzeyen hücreler dikkat çekmiştir (Şekil 4-32; Tablo 4-7). Ancak sözü edilen bu hücrelerin gerçekten apoptotik olup olmadığını belirlemek için özgün bir apoptozis testi yapılması daha doğru olacaktır.



Şekil 4-31 Grup 4'te MDC uygulaması sırasında belirlenen ve apoptotik hücre morfolojisi ile örtüşen hücreler (oklar).



Şekil 4-32 Grup 4’te immunositokimyasal uygulamalar ile belirlenen apoptotik morfolojiye benzer özellikler gösteren hücreler.

Tablo 4-7 Apoptotik morfolojiye benzer özellik gösteren hücrelerin gruplara göre yüzde olarak dağılımı

	Dokso (-)	Dokso (+)	siRNA/Dokso (-)	siRNA/Dokso (+)
PrP	-	%4	%2	%4
Bax	-	%2	-	%3
CD44	-	%2	-	%3
Beclin-1	-	%2	-	%2

5. TARTIŞMA

Meme, prostat ve kolon kanserlerinden daha ölümcül bir etkiye sahip olan akciğer kanseri, neredeyse tüm kanser nedeni ölümle arasında %18.4'lik bir oranla başı çekmektedir. Tüm akciğer kanseri hastalarının 5 yıllık sağkalım oranı sadece %18'lerde kalmaktadır [180]. 2018 yılında tüm Dünya genelinde 2,093,876 akciğer kanseri vakası kayıt edilmiş ve 1,761,007 akciğer kanserli hasta hayatını kaybetmiştir [181]. Cerrahi, radyasyon ve kemoterapi gibi konvansiyonel çok sayıda tedavi yöntemi diğer kanser tiplerinde olduğu gibi akciğer kanserlerinde de uygulanıyor olsa da bu tarz tedaviler çok sayıda istenmeyen yan etkileri de beraberinde getirmektedir. Günümüzde yan etkilere neden olmaksızın moleküler olarak hedeflenmiş terapiler özellikle kanser hücrelerine spesifisitelerinden ötürü önemli bir odak noktası haline gelmiştir [182]. Özellikle çeşitli reseptör tirozin kinazlara özgü moleküler hedefli güncel terapiler oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan tirozin kinaz inhibitörleri reseptör tirozin kinazlarla etkileşerek bu moleküllerin hücre büyümesi ve çoğalmasına neden olacak sinyalleme kaskadlarını bloke etmektedir [183]. Ancak, tirozin kinaz inhibitörlerinin uzun süreli kullanımı kanser hücrelerinde ilaç direncini de beraberinde getirmektedir.

İlaç inaktivasyonu, ilacın hedefinin değişmesi ya da hücre dışına atılması, DNA hasarının tamiri, hücre ölümü mekanizmalarının inhibisyonu, epitelyal-mezenşimal geçiş (EMT) ve epigenetik gibi çeşitli mekanizmalar çok sayıda sinyal transduksiyon yolları ile kombine ve/veya bağımsız olarak hareket ederek kanser hücrelerine ilaca direnç fenotipini kazandırabilmektedirler [27]. Birçok kanser tipinde ilaçların hücre dışına atılması ile kazanılan ilaca direnç mekanizmasında 3 ATP-bağlayan kaset transporterleri [çoklu ilaca direnç proteini 1 (multidrug resistance protein 1, MDR1, pgp-1), çoklu ilaca direnç ile ilişkili protein 1 (multidrug resistance-associated protein 1, MRP1) ve meme kanseri direnç proteini, breast cancer resistance protein 1 (BCRP) rol almaktadır [27]. Bu transporterler geniş bir substrat özgüllüğü göstererek vinca alkaloidleri, antrasiklinler, taksanlar ve kinaz inhibitörleri gibi çok sayıda ksenobiyotik hücre dışına atılmasına neden olur [27]. Normal anatomi kolon, böbrek ve karaciğer olan MDR1'in kanserli dokularda artış gösterdiği bilinmektedir. Örneğin, normal akciğer hücreleri ile karşılaştırıldığında doksorubisin

ile muamele edilen akciğer kanseri hücrelerinde MDR1 ekspresyonunun büyük ölçüde artış gösterdiği belirlenmiştir [184]. Dolayısıyla, çoklu ilaca direnç mekanizması ile tümör metastazı arasında fiziksel, fonksiyonel ve genetik bir ilişki olduğu ve bu durumun kanser hastalarında tedaviyi güçleştirerek kanser temelli ölümleri arttırdığı kanıtlanmıştır [185-187]. Çoklu ilaca direnç fenotipine sahip kanser hücrelerinde CD44 molekülü ile p-gp arasında yakın bir ilişki olduğu ve bu ilişkinin çoklu ilaca direnç ve kanser hücrelerinin invaziv potansiyeli arasında bir kesişme noktası oluşturduğu ileri sürülmektedir [38, 188]. Hücrel prion proteini PrP, p-gp ile birlikte kanser hücrelerinin metastatik fenotipi ile yakından ilişkilidir [189-191]. PrP'nin p-gp ekspresyonunu arttırarak [189, 192] ya da PI3K-AKT sinyalleme yolağını aktive ederek [193] çoklu ilaca direnç fenotipini geliştirdiği ve gastrik kanserde apoptozisi baskıladığı belirlenmiştir. Ayrıca, PrP'nin CD44 ile arasındaki fiziksel ve fonksiyonel ilişki meme kanserinde [194] ve kolorektal kanserde [120] gösterilmiş ve yüksek metastatik kapasite ile ilişkilendirilmiştir.

Prionlar biyoloji ve tıp alanında önemleri gün geçtikçe artan proteinlerdendir. Bu proteinlerin çeşitli kanser hücrelerinde migrasyonu, metastatik kapasiteyi ve invazivliği arttırdığı [195], anti-oksidan aktivite göstererek programlanmış hücre ölümüne direnç gösterdiği [196] ve ilaca direnç ile korele olduğu gösterilmiştir [139, 189]. Prionlarda olduğu gibi bozulmuş proteinler, hücre içerisinde agregasyonu başlatarak sadece nörodejeneratif hastalıklara ya da amiloidozise neden olmazlar, aynı zamanda p53 mutasyonları ile ilişkili tümör gelişimini de indüklerler [197]. Özetle genel kanı, fonksiyonel PrP'nin, metastazı, sitotoksositeye direnci ve sonucunda kanser gelişimini arttırdığı yönündedir [115-117, 120, 188, 194]. Ancak, bu proteinlerin kanser hücrelerindeki etkileri yapılan çok sayıda çalışmaya karşın henüz netlik kazanmamıştır. Görünen o ki PrP'nin susturulması ile kanser ilaçları arasında sinerjik ya da karşılıklı bir ilişki vardır [198].

Bu çalışmada çoklu ilaca direnç fenotipine sahip küçük hücreli akciğer kanseri hücre hattı H69AR'de PrP ekspresyonunun baskılanmasının hücre ölümüne katkısının olup olmadığı belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışmamızda doksorubisinin farklı dozlarında 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlarında sitotoksik etkinin H69AR

hücrelerinde doza ve zamana bağımlı olarak değişim gösterdiğini belirledik. İlacın düşük dozlarında (0.01, 0.1 ve 1 μ M) çoklu ilaca direnç fenotipinden kaynaklı olarak hücre proliferasyonu stabil kalmakta ya da kısmen artmaktadır, yüksek dozlarda (10 ve 100 μ M) ise direnç mekanizmasının kırılarak sitotoksitenin artış gösterdiği bulunmuştur. Dokso (-) ilaç uygulaması yapılmayan gruptaki hücrelerin (Grup 1) ilaç uygulaması ile uzantılı bipolar yapıdan morfolojik olarak küresel forma değişmesi sitotoksik etkinin doza ve zamana bağımlı olarak değişiklik gösterdiğini kısmen doğrulamaktadır. Ancak, yüksek dozların normalde ilaca direnç fenotipine sahip H69AR hücrelerdeki direnç mekanizmasını nasıl kırıp sitotoksik etkiye dönüştüğü ve bu etkinin altında yatan moleküler mekanizmaların neler olduğu incelenmesi gereken bir konudur. Yapılan bir çalışmaya göre MCF7 meme kanseri hücre hattında doksorubisin düşük ve yüksek konsantrasyonlarda sırasıyla otofaji ve apoptozise neden olmaktadır [199]. Daha önceki bir çalışmada [194] H69AR hücrelerin ilaca sensitif formlarına göre yüksek oranda PrP ve CD44 molekülü eksprese ettikleri ortaya konmuştur. Çalışmamızda Dokso (-) grupta hem PrP hem de CD44 ekspresyonlarının yüksek olduğu görülmektedir. İlaç uygulanmamış Dokso (-) gruptaki bu yüksek ekspresyon düzeyleri doksorubisinin 48 saatlik IC₅₀ dozu ile PrP’de istatistiksel olarak anlam içermeyen hafif bir artışa, CD44’de ise hafif bir azalmaya neden olmaktadır. *Cladosiphon okamuranus* ve *Fucus evanescens* gibi kahverengi deniz yosunu türlerinden elde edilen ve heparin benzeri bir doğal ürün olan fucoidan’ın HT29 kolon kanseri hücrelerinde PrP ekspresyonlarını azalttığı bulunmuştur [198]. Buna karşın ilaca dirençli ve sensitif MCF7 meme kanseri hücre hatlarında doksorubisin uygulamasının hem PrP hem de CD44 düzeylerinde herhangi bir değişiklik yapmadığı ve bu moleküllerin ekspresyonlarının doza bağımlı olmadığı ileri sürülmüştür [194]. Ayrıca aynı çalışmada, ilaca dirençli MCF7/ADR hücrelerde CD44 molekülünün sessizleştirilmesinin PrP ekspresyonunu azalttığı ancak PrP sessizleştirilmesinin CD44 ekspresyonlarında herhangi bir değişikliğe neden olmadığı belirlenmiştir. PrP ve CD44 ekspresyonlarının ilaca- ve/veya hücreye-bağımlı farklı yanıtların temelinde eksprese ettikleri ilaca direnç fenotipi farklılıkları olabilir. Öyle ki örneğin H69AR hücrelerinin MRP1 eksprese ettikleri bilinmektedir [41]. İmmunositokimya bulgularında Dokso (-) grupta PrP moleküllerinin özellikle hücre zarlarında keskin immunofloresan reaksiyon verdikleri görülmektedir. Dokso

(+) grupta (Grup 2) ise moleküllerin yüzeyel yerleşimleri ile birlikte sitosolde diffüz bir dağılım gösterdiği de belirlenmiştir. PrP moleküllerinin çoğu normal fizyolojik koşullarda hücre zarına bir glikozilfosfatidilinozitol çapasıyla bağlanmış olarak bulunur [131]. Sitosolik olarak da yerleşim gösterebileceği belirlenmiş olan [162] PrP, hücrenin farklı kısımlarında fonksiyon gösteren çok sayıda membran bileşeniyle ilişkilidir [147] ve subcellular kısımlar ile döngüsel bir trafik içerisinde. Bu döngüsel sürecin PrP'nin fonksiyonlarının düzenlenmesi açısından önemli olabileceği sanılmaktadır [200]. Diğer glikozillenmiş proteinler gibi PrP de endoplazmik retikulum ve Golgi'de bir takım post-translasyonel düzenlemeler geçirerek hücre yüzeyine çıkar. Yapılan son çalışmalar PrP'nin p-gp lokalizasyonları ile ilişkili olarak kaveol ya da kaveol benzeri bölgelerde yer aldığını göstermektedir [201-202]. Adriamisine¹¹ dirençli meme kanseri hücre hattı MCF7'de PrP, p-gp ile kolokolize bir durumdadır ve PrP susturulduğunda bir p-gp substratı olan paclitaxel¹² hücrelerin invazyon yeteneğini azaltmaktadır [188]. Her ne kadar bu çalışmada kullanılan hücre hattı p-gp ekspresyonu açısından zengin olmasa da [179] membranda eksprese olan PrP molekülleri p-gp olmaksızın, belki de MRP1 ile birlikte, direnç mekanizmasında rol alıyor olabilir. Küçük hücreli akciğer kanserinde MRP1 ekspresyonu ile doksorubisine direnç arasında bir ilişki olduğu ve küçük hücreli akciğer kanserlerinde ilaca direncin tek bir mekanizma ile açıklanamayacağı önceki çalışmalarda ortaya konmuştur [203]. Doksorubisine dirençli MCF7 hücrelerinde ise PrP'nin p-gp ile birlikte ekspresyonunun hücrelerin anti-apoptotik aktivitelerinde önemli olabileceği ileri sürülmüştür [188]. Çok büyük olasılıkla çalışmamızda kullanılan H69AR hücrelerde apoptozise direnç, olası PrP/MRP1 ilişkisinden kaynaklanıyor olabilir. Her ne kadar günümüzde herhangi bir kanser modelinde PrP'nin MRP1 ile ilişkili olduğuna dair bir bilgi bulunmuyor olsa da PrP'nin astrositlerde MRP1 ile ilişkili olduğu ve bu ilişkinin stres altında astroglial ve nöronal glutatyon metabolizmasını düzenlediği, ayrıca nöronlara metabolik destek sağladığı öne sürülmüştür [204]. Bu bulgular PrP'nin kemorezistan özelliğinin hücreye ve/veya ilaca özgü olabileceğini düşündürmektedir [152].

¹¹ Doksorubisinin ticari ismi

¹² Mikrotübül stabilizasyonuna neden olan taksan ailesine ait bir kemoterapötik ajan

Doksorubisin uygulanmış grupta (Grup 2) PrP moleküllerinin hem diffüz sitosolik hem de yüzeyel keskin immunfloresan görüntü vermesi, molekülün olasılıkla ilaca bağımlı olarak hücre zarından sitosole transloke olduğunu düşündürmüştür. PrP'nin doksorubisine yanıt olarak hücre içine translokasyonunda henüz mekanizması tam olarak aydınlatılamamış olmasına karşın, kaveol ve klatrin bağımlı bir sürecin rol aldığı sanılmaktadır [139]. Bu süreçte, 'düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör ile ilişkili protein' (1- Low-density lipoprotein receptor-related protein 1, LRP1) isimli bir proteinin PrP'nin biyosentetik ve endositik trafiğini kontrol ettiği bulunmuştur [205-206]. Yapılan çalışmalarda [207] insan hücre hatlarında PrP tarafından tetiklenen p53'e bağımlı kaspaz aktivasyonunun direkt olarak PrP endositozu ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür. Ancak günümüzde tümör hücrelerinde PrP'nin endositozunun kaveol aracılığı ile gerçekleşip gerçekleşmediği bilinmemektedir. Bununla birlikte, tümör hücrelerinde bu olası rotanın PrP'nin hücre ölümüne bir direnç oluşturabileceği sanılmaktadır [139]. H69AR hücrelerde PrP'nin doksorubisine yanıt olarak sitosole translokasyonu bu düşüncüyü doğrulamaktadır. PrP'nin apoptotik sinyalleme yollarına katıldığı çeşitli araştırmacılar tarafından dile getirilmiş olsa da bu molekülün bir apoptozisteki rolü ile ilgili karşıt bulgular vardır [163, 165, 167, 174, 208]. Örneğin, PrP'nin aşırı ekspresyonunun staurosporine indüklü kaspaz-3 aktivasyonuna neden olduğu [208] ve transgenik farelerde mitokondri aracılı nöronal apoptozise yol açtığı gösterilmiştir [163]. Buna karşın, PrP^{-/-} hücrelerde apoptozis ile ilişkili proteinlerin düzeylerinin arttığı ve PrP'nin mitokondride kaspaz-bağımlı apoptotik yolda önemli bir anti-apoptotik protein olabileceği [167], insan ve fare nöronal hücrelerde ve MCF7 meme kanseri hücrelerinde mitokondriden sitokrom *c* salınımı için gerekli olan Bax molekülündeki konformasyonel değişikliği geciktirdiği ileri sürülmüştür [117]. PrP'nin Bax aracılı apoptozisi inhibe ettiğine dair bulgular olmasına karşın [117, 141, 146, 166-169] bu iki molekül arasında fiziksel bir etkileşim henüz gösterilebilmiş değildir. Hatta Bax'ın PrP ile pre-inkübasyonun herhangi bir anti-apoptotik mekanizmayı başlatmadığı gösterilmiştir [140]. Çalışmamızda doksorubisin uygulamasıyla Bax immunoreaktivitesinde önemli bir değişiklik olmadığını belirledik. Benzer şekilde, PrP ekspresyonları susturulmuş grupta (Grup 3) ve siRNA + doksorubisin grubunda (Grup 4) Bax düzeylerinde herhangi belirgin bir değişiklik görülmemekle birlikte

keskin immunofloresan işaretlenmeler dikkati çekmiştir. Bu bulgular PrP ile Bax ekspresyonları arasında bir ilişki olmadığını ortaya koymaktadır. Sonuç olarak doksorubisin uygulamasına yanıt olarak sitosolik dağılım gösteren PrP moleküllerinin hücresel yerleşimlerinin tam olarak belirlenmesi ilaca dirençli kanser hücrelerinde PrP'nin etki mekanizmasını anlamak açısından önemli olabilir.

Gastrik kanserde PrP, Bcl-2 ile sinerjistik etki göstererek apoptozisi baskıladığı ve ilaca direnç fenotipinin gelişmesine neden olduğu [209], ilaca dirençli meme kanseri hücrelerinde ise PrP sessizleştirilmesinin kaspaz aktivasyonu, Bax'ın upregülasyonu ve Bcl-2 downregülasyonu ile ilişkili olarak apoptozisi indüklediği bulunmuştur [139]. Çalışmamızda PrP sessizleştirilmesi ardından doksorubisin uygulanmış grupta (Grup 4) Bax ekspresyonunda belirgin bir artış olmamasına karşın apoptotik morfolojiye sahip hücre sayısında bir artış belirledik. Bununla birlikte hem siRNA (Grup 3) hem de siRNA + doksorubisin uygulamasıyla (Grup 4) ortaya çıkan keskin Bax immunreaktiviteleri, bu moleküllerin PrP downregülasyonu ile mitokondrilerde yığınlar oluşturabileceğini düşündürmüştür. Çalışmamızda belirlenen keskin Bax immunoreaktivitelerinin mitokondriyal yerleşimler ile ilişkili olup olmadığını anlamak için mitokondriyel markerler kullanarak immunositokimya ve western blotting gibi yöntemlerin kullanılması, ayrıca mitokondri membran potansiyelinin test edilmesi uygun gözükmemektedir. Görünen o ki, PrP'nin Bax gibi apoptozis ile ilişkili proteinler üzerine etkisinde mitokondri, odak organel gibi durmaktadır. Yapılan bir çalışmada apoptotik uyarı üzerine PrP'nin mitokondri dış zarındaki raft-benzeri bölgelere ve endoplazmik retikulum-mitokondri ile ilişkili membranlara (ER-MAM) göç ederek mitokondri membran potansiyelini azaltıp sitokrom c salınımını arttırarak apoptozise neden olduğu belirtilmiştir [173].

Her ne kadar PrP susturulması meme kanseri MDA-MB-435 hücrelerini doksorubisine karşı daha dirençli yaptığı ileri sürülmüş olsa da [210], PrP'nin siRNA ile susturulmasının ardından doksorubisin uygulanan grupta (Grup 4) apoptotik morfolojiye benzer özellik gösteren hücre sayısında görülen artış, bu durumun H69AR için geçerli olmadığını düşündürmüştür. Ancak bu hücrelerin gerçekten

apoptotik olup olmadığını belirlemek ve bu düşüncüyü doğrulamak için TUNEL ya da Annexin V gibi ek yöntemlere gereksinim vardır.

CD44, çok sayıda biyolojik fonksiyonda rol alan önemli bir hücre yüzey glikoproteinidir. Pankreas, meme ve akciğer kanseri gibi çeşitli solid tümörlerde aşırı ekspresyon gösteren bu molekül tümör gelişimi [211], metastaz [37], ilaca direnç [211] ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir [212]. CD44, hücrenin çevresiyle etkileşimini düzenleyen önemli bir moleküldür ve bu molekülün farklı izoformlarının ekspresyonu kanser hücrelerinde metastaz ve ilaca ve apoptozise direnç ilişkilidir [213]. CD44'ün tümör metastazı ve invazyonunu kendine has motilite, aktivasyon, adezyon ve lokalizasyon özellikleri ile gerçekleştirdiği bilinmesine karşın ilaca direnç mekanizmasındaki rolünü nasıl gerçekleştirdiği henüz bilinmemektedir [214]. Bu konuda bilinenler spesifik bazı CD44 izoformlarının pankreas [215] ve prostat [216] kanserlerinde p-gp ile ilişkili olduğudur. CD44 ile p-gp arasındaki fiziksel ve fonksiyonel ilişkinin ilaca dirençli meme kanseri hücrelerinde çoklu ilaca direnç ile invaziv potansiyel arasındaki ilişkiyi kolaylaştırdığı ileri sürülmüştür [38, 217]. Bununla birlikte, CD44'ün çoklu ilaca direnç fenotipine sahip ovaryum kanseri hücre hattında (NCI-ADR-RES) p-gp'den bağımsız olarak ilaca direnç oluşturduğu gösterilmiştir [218]. PrP'nin çoklu ilaca direnç gösteren hücrelerin proliferasyonu, invazyonu ve göçünde CD44 ile birlikte rol aldığı, yakın zamanlı çalışmalarla gösterilmiştir [194]. Benzer şekilde kolorektal kanserde CD44⁺ kök hücrelerinde PrP'nin MAPK1 yolağı üzerinden epitelyal-mezenşimal geçişi indükleyerek metastatik kapasiteyi arttırdığı gösterilmiştir [120]. Dolayısıyla, PrP kanser metastazı ile birlikte hücre göçü açısından da önemli bir protein gibi durmaktadır. Ancak H69AR hücrelerde CD44 ile PrP arasındaki olası ilişkinin küçük hücreli akciğer kanserindeki anlamı henüz bilinmemektedir. Bu nedenle bu kanser tipinde her iki molekülün karşılıklı etkileşimlerinin olası patolojik sonuçları kaderinler, hyaluronik asit, β -katenin ve epitelyal mezenşimal geçiş transkripsiyon faktörleri gibi geniş bir belirteç paneli ile değerlendirilebilir. İlaça dirençli insan meme kanseri hücre hattı MCF7/ADR ve H69AR hücrelerle yapılan bir çalışmada CD44 ve PrP'nin, hücrelerin sensitif formlarına oranla senkronize olarak aşırı eksprese olduğu, doksorubisine bağımlı olmayan bir ekspresyon gösterdikleri, CD44 ekspresyonunun

susturulmasının MCF7/ADR hücrelerde PrP ekspresyonunu azalttığı, ancak PrP susturulmasının CD44 ekspresyonunda herhangi bir değişikliğe neden olmadığı gösterilmiş ve PrP ile CD44 arasında, EGFR, CD147 ve MMP'leri düzenleyerek invaziv ve metastatik süreçleri uyaracak fiziksel bir etkileşimin olduğu ileri sürülmüştür [194]. Çalışmamızda doksorubisin uygulamamış grup (Grup 1) ile uygulanmış grup (Grup 2) arasında PrP ve CD44 ekspresyonlarının değişiklik göstermediğini belirledik. Bu durum yukarıda da belirtildiği gibi her iki molekülün de ekspresyon düzeylerinin ilaca bağımlı olmadığını ortaya koymuştur. siRNA uygulamasıyla PrP ekspresyonları susturulan hücrelerde (Grup 3) CD44 molekülü ekspresyonunda herhangi bir değişiklik olmaması CD44 molekülü ile PrP ekspresyonları arasında bir ilişki olmadığını göstermiştir ve daha önceki bulguları desteklemektedir. Aynı çalışmada MCF7/ADR hücrelerde CD44 ya da PrP moleküllerinin downregülasyonunun p-gp ekspresyonunu inhibe ettiği ancak MRP1'de herhangi bir değişiklik yapmadığı gösterilmiştir. Ancak, MCF7/ADR hücreler MDR1 fenotipine sahiptir. Çalışmamızda H69AR hücrelerde eksprese edilen MRP1 düzeylerinin PrP susturulmasıyla değişiklik gösterip göstermediği bulgusu yer almamaktadır ancak yukarıda da belirtildiği gibi bu iki molekül arasında ilaca direnç fenotipinin oluşmasına neden olabilecek bir karşılıklı etkileşim söz konusu olabilir.

Ölüm reseptörü uyarısına yanıt olarak gelişen DISC ve kaspaz-8 düzeylerindeki değişikliğe göre iki tip dış apoptotik sinyal belirlenmiştir. Yüksek düzeydeki DISC ve kaspaz-8 aktivasyonu apoptozisi başlatacak başlatıcı ve efektör kaspazların aktivasyonu için yeterlidir (tip I). Düşük düzey DISC aktivasyonu apoptozisin gerçekleşmesi için ölüm sinyallerinin amplifikasyonuna gerksinim duyar (tip II). Bu amplifikasyon Bid'in aktive formu tBid üzerinden gerçekleşir ve Bax ya da Bak aracılığı ile iç yolak kaspaz aktivitesine neden olur [219]. PrP Bax-aracılı apoptozise engel olurken Bak ya da tBid aracılı apoptozisi inhibe edemez [117]. Bu nedenle PrP Bax inhibisyonu üzerinden sadece tip II apoptozise engel olurken tip I apoptozise herhangi bir etkisi olmamaktadır. PrP'nin tip I apoptozise dirençli olabilmesi için DISC oluşumunu da inhibe etmesi gerekir ancak, PrP'nin DISC oluşumu ile bir ilişkisinin olmadığı gösterilmiştir [115]. Buna karşın PrP'nin tip I apoptozis

inhibisyonu için kaspazlar ile ilişkili olabileceği ileri sürülmüş olmasına karşın bu konuda çelişkili bilgiler vardır [220-222].

Otofaji, başlangıç, nukleasyon, otofagozom ve lizozom füzyonu ve hidrolizasyon basamaklarını içeren ve besin açlığı, organel hasarı, hipoksi, reaktif oksijen türleri, endoplazmik retikulum stresi ve ilaç tedavisi gibi olası stres durumlarına yanıt olarak gelişen bir oto-yıkım sürecidir [74]. Otofajinin fonksiyonel sonuçları sadece otofajiye giden hücrenin hücre içi bileşenlerine sınırlı olmadığı, lokal ya da sistemik olarak ekstrasellüler ortamı da etkilediği son yıllarda kabul görmektedir [223]. Dolayısıyla, otofajiye giden bir hücre dinamik bir otofajik şebeke içerisinde hücre içi homeostazisi sağlamanın ötesine geçebilir [223]. Bu durum özellikle kanser için oldukça önemlidir. İçinde kanserin de bulunduğu çok çeşitli hastalıklarda otofaji düzensizleşir. Örneğin tümör gelişimi sırasında otofaji iki yönlü bir rol oynar: tümör oluşumunun ilk evrelerinde bir tümör baskılayıcı mekanizma gibi davranırken kanser gelişiminin sonraki evrelerinde bir tümör aktiveleştiricisi gibi hareket eder [224-225]. Otofajinin prosurvival (onkogenik) bir süreç mi yoksa bir tümör baskılayıcı yolak mı olduğu hala tartışma konusudur [226-230]. Günümüzde genel kanı, otofajinin tümör gelişimine destek olduğu yönündedir [112]. Otofajinin tümörün hipoksik bölgelerinde artış gösterdiği ve besin ve oksijen eksikliği, kemoterapi, radyoterapi ve çeşitli anti-kanser ajanlarının oluşturduğu stres koşullarının tümör hücresinin survivalini arttırarak terapötik bir direnç oluşturduğu ortaya konmuştur [96, 231-235]. Dolayısıyla tümör hücrelerinde otofajinin inhibisyonu kemoterapötik ilaçlara dirençli kanserlerin tedavisinde önemli bir strateji gibi gözükmemektedir [236]. Otofajinin özellikle tümör dormansisi sırasında tümör kök hücrelerinin devamlılığını sağlayarak tedaviye direnç mekanizmasını ve tümör nüksünü başlatabileceği kabul edilmektedir [237].

Beclin-1, otofajide (makrootofaji) ve vakuolar protein taşınımında rol alan maya Atg6/vacuolar protein sorting 30 (Vps30) proteininin memeli homologudur ve normal memeli gelişiminde ve kanser gibi patogenezlere kritik görevler üstlenir [238-241]. Ekstrasellüler matriks yıkımı, epitelyal-mezenşimal geçiş, tümör anjiyogenezi ve tümör mikroçevresindeki değişimler gibi çok sayıda patolojik olayı

etkileyerek kanser progresyonunu düzenleyen [242] Beclin-1 molekülünün aşırı ekspresyonunun MCF7 meme karsinom hücrelerinin proliferasyonunun engellediğinin bulunması, bu molekülün kanser gelişiminde rol aldığını düşündürmüştür [243]. Fare modelleri ve klinik veriler de Beclin-1 ekspresyonundaki azalmanın kanserin gidişini hızlandırdığını doğrulamıştır [244-245]. Bu molekül otofajik süreçte sınıf III fosfatidilinozitol-3 kinaz (PI3KC3/Vps34) ve fosfatidilinozitol-3 kinaz p150 alt ünitesini (p150/Vps15) içeren bir kor kompleks içerisinde yer alır [246]. Beclin-1, PI3KC3 aktivitesini arttırarak otofajik süreçte vezikül nükeasyonunun ilk aşaması için gerekli olan fosfatidil inozitol 3 fosfat (PI3P) oluşumunu sağlar [247]. Son yıllarda PI3KC3 kompleks üzerinden çeşitli otofajik süreçleri regüle eden ATG14 (BARKOR), UVRAG (UV radyasyon rezistan ile ilişkili), AMBRA (otofaji/Beclin-1 regulator) ve SH3GLB1/BIF-1 (SH3-domain GRB2-like endophilin B1) gibi Beclin-1 etkileşim partnerleri belirlenmiştir [248]. PrP'nin de otofaji ile ilişkili olarak Beclin-1 ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Çalışmamızda Beclin-1 ekspresyonlarının doksorubisin uygulamasına bağlı olarak artış gösterdiğini belirledik. PrP'nin Beclin-1 ekspresyonu üzerinde herhangi bir etkisinin olup olmadığını belirlemek amacıyla siRNA ile muamele edilmiş hücrelerde (Grup 3) ve siRNA uygulaması ardından doksorubisin ile muamele edilen hücrelerdeki (Grup 4) Beclin-1 ekspresyonlarını karşılaştırdık. PrP ekspresyonu baskılanan hücrelerin doksorubisin uygulanmadan da Beclin-1 ekspresyonlarını arttırdığını belirledik. Bu bulgu, H69AR hücrelerde PrP ekspresyonu ile Beclin-1 arasında bir ilişkinin olduğunu ortaya koymaktadır. Yakın tarihli bir çalışmada PrP'nin Beclin-1 ile etkileşerek PI3KC3 kompleksini lipit raftlarına topladığı ve Amiloid- β_{42} 'ye yanıt olarak otofajiyi aktive ettiği bulunmuştur [247]. Dolayısıyla PrP, lipit raftlarında Beclin-1/PI3KC3 kompleksinin pozitif düzenleyicisi olarak gözükmemektedir. Glioma hücre hatlarında PrP sessizleştirilmesinin LC3-II indüksiyonu, Beclin-1 artışı, p62 ve Bcl-2 yıkımı ile ilişkili otofajik süreci başlattığı bildirilmiştir [178].

Hipokampal nöronlarda PrP aracılı otofajinin oksidatif strese yanıt olarak gelişen koyucu bir mekanizma olarak görülmektedir [176]. Bununla birlikte PrP eksikliği oksidatif stres koşullarında otofajik akışı bozarak nöronal hücre ölümüne neden

olduğu gösterilmiştir [176]. Otofajik aktivitenin tam olarak gösterilebilmesi için otofajik akışı monitörize etmek en önemli noktalardan birisidir [249]. MDC, otolizozomların [250] ve erken otofajik kısımların karakterize edilmesi için kullanılan bir markerdir [251-252]. Kültüre hücrelerde ve dokularda MDC-pozitif veziküller otofajiyi karakterize etmek için kullanılabilir [253]. Çalışmamızda MDC uygulamasıyla doksorubisin uygulanmış grupta (Grup 2) doksorubisin uygulanmamış gruba (Grup 1) göre MDC-pozitif hücre sayısının anlamlı olarak artış gösterdiğini belirledik ($p < 0.01$). Bu bulgu doksorubisinin otofajik vezikül oluşumunu arttırdığını düşündürmüştür. PrP eksresyonu susturulmasının doksorubisin uygulanmayan grupta (Grup 3) otofajik vakuol oluşumu üzerine bir etkisi olmadığı, doksorubisin uygulamasıyla (Grup 4) artış gösterdiği görülmüştür. Bu artışın PrP ekspresyonu baskılanmış hücrelerde doksorubisinden kaynaklanabileceğini düşündürmüştür. Bu bulgular H69AR hücrelerde MDC-pozitif hücre sayısının doksorubisine bağımlı artış gösterdiğini, PrP susturulmasının bu sürece çok fazla etki etmediğini göstermektedir. Öte yandan PrP ile Beclin-1 arasında bir ilişkinin varlığı bu hücrelerin otofajiye gittiğini düşündürebilir ancak otofajik vakuol sayısında artış otofajinin indüksiyonu yerine otofajik akışın inhibisyonu ile de ilişkili olabilir [254]. Dolayısıyla yukarıda sözü edilen düşünceleri netleştirmek için LC3-II ve p62 temelli immunoblotting çalışmalarına gereksinim vardır ve ilerleyen dönemde bu çalışmaların yapılması planlanmıştır. Görünen o ki, PrP otofajiden bağımsız bir biçimde Beclin-1 ile bir ilişki içindedir. Bu olası ilişkinin anlamının ne olduğu hakkında bilgiler oldukça yetersizdir. Beclin-1'in aşırı ekspresyonunu ile LC3-I/II transformasyonunun artış gösterdiğini, anti-apoptotik faktör Bcl-X_L ekspresyonunun azaldığı bulunmuştur [255]. Bu bulgular Beclin-1'in hem otofaji hem de apoptozis ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Otofaji ve apoptozis hücrel homeostazisin sürdürülmesinde önemli iki oyuncudur [256]. Her iki süreç de Beclin-1 ve Bcl-2 arasındaki ilişki ile düzenlenmektedir [240, 257]. Önceki çalışmalar Beclin-1 yapısında bulunan BH3 domaini ile Bcl2 ve Bcl-X_L'deki BH3 domainler arasında bir kombinasyon olduğunu belirlemiştir [77, 258]. Üstelik karaciğer, akciğer ve diğer bazı tümör tiplerinde yüksek Bcl-2/Bcl-X_L ekspresyon düzeylerinin düşük Beclin-1 ekspresyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [259-260]. Yapılan bir çalışmada ise Beclin-1'in upregülasyonunun gastrik kanser hücrelerinde apoptozisi indüklediği

bulunmuştur [255]. Olası mekanizma, Beclin-1'in aşırı ekspresyonunun Bcl-X_L gibi anti apoptotik faktörleri inhibe ederek apoptotik süreci başlattığı yönündedir. Çalışmamızda sadece doksorubisin uygulanmış grup ile (Grup 2) siRNA transfeksiyonu ardından doksorubisin uygulanmış grupta (Grup 4) apoptotik morfolojiye sahip hücre sayılarının artış göstermesi, Beclin-1 ekspresyonunda artış ve Bax moleküllerinde önemli bir değişikliğin olmaması PrP'ye bağımlı ya da bağımsız iki olası senaryoyu düşündürmektedir. İlk senaryoya göre doksorubisin ve siRNA + doksorubisin uygulaması ile Beclin-1'in artan ekspresyonu ve Bcl-2 downregülasyonunu (bu çalışmada gösterilmemiştir) takiben otofajik aktivasyona neden olabilir. MDC uygulamaları ile özellikle bu iki grupta otofajik vakuol sayısının belirli ölçüde artış göstermesi, bu senaryoyu doğrulamaktadır. Ancak otofajinin ilaç direncine karşı tumor gelişimini baskılama ya da arttırma "paradoksu" [261] nedeniyle belirlediğimiz otofajik sürecin hangi yönde olduğu net olarak anlaşılamamıştır. MCF7 hücrelerde düşük doz doksorubisin uygulaması Bcl-2 susturulması ile kombine edildiğinde otofajinin arttığı ve tümör gelişiminin azaldığı gösterilmiştir [199]. Benzer şekilde Bax, Bak ya da kaspazlar gibi apoptozis düzenleyici moleküllerini yitirmiş tümör hücrelerinin etoposide, fenretinidine ve deksametazon gibi kemoterapi ajanları ile muamele edildiğinde otofajik ölüm sürecine girdikleri belirlenmiştir [262-264].

İkinci olarak Beclin-1 ekspresyonu artışı proapoptotik Bax ya da Bak moleküllerinin mitokondriye transloke olmasına ve burada apoptotik süreci başlatmasına neden olabilir. Bu translokasyonda PrP susturulmasının bir rolü olabilir. İlaça dirençli MCF7/ADR meme kanseri hücrelerinde PrP sessizleştirmesinin hücreleri Bax aktivasyonunu kolaylaştırarak TRAIL-aracılı apoptozise yönlendirdiği daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir [115]. Öte yandan, bir başka meme kanseri hücrelerinde (MDA-MB-435) ise PrP baskılanmasının doksorubisine direnci arttırdığı ileri sürülmüştür [210]. Buna karşın, PrP downregülasyonunun glioma hücrelerde LC3-II indüksiyonu, Beclin-1 ekspresyon düzeyi artışı ve p62 baskılanması üzerinden otofajiye gittiği belirlenmiştir [178]. Sonuç olarak düşüncemiz PrP susturulmasının Beclin-1 düzeyini arttırarak H69AR hücrelerde doksorubisinin otofajiyi tetiklediği yönündedir. Ancak bu düşüncemizi doğrulama

için otofaji belirteçlerini kullanalacağı western blotting çalışmalarına gereksinim vardır.

Son yıllarda otofaji ve apoptozis arasında karşılıklı etkileşimler olduğu yönünde makaleler yayımlanmaktadır [265-267]. Beclin-1-Bcl2 etkileşimi [268], kaspaz aracılı Beclin-1 bölünmesi [269-271], UVRAG-Bax etkileşimi [272], ATG5-FADD etkileşimi [273] gibi çeşitli moleküler etkileşimler apoptozis ve otofajinin karşılıklı etkileşim içerisinde olduğunu ortaya koymaktadır.



6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Sonuç olarak PrP'nin, programlanmış hücre ölüm yollarındaki düzenleyici moleküller ile direkt ya da dolaylı olarak etkileşim gösterdiği ortadadır. Bu nedenle bu “özel” proteinin hem otofaji hem de apoptozisin düzenlenmesinde kilit bir role sahip olduğu gözükmemektedir.

Günümüzde otofaji ile apoptozis arasında bir “köprü” olduğu yakın zamanlı yapılan birçok değerli çalışma ile ortaya konmuş olsa da [274-275] hangi ölüm tipinin hangi koşul(lar)da indükleneyeceği henüz netlik kazanmamıştır. Oluşturulan senaryolardan bir tanesi nekroz da dahil olmak üzere ölüm tiplerinin birbirlerinden bağımsız hareket ettiği yönündedir. Bu senaryoya göre hücre ölüm sinyalinin gücü ölüm tipini apoptozis ya da otofaji olarak belirlemektedir. Eğer her iki ölüm tipi de aynı anda ortaya çıkarsa her birinin dışavurumu daha az olacaktır. İkinci olasılık otofaji ve apoptotik yolların koordineli olarak etkileşerek hücre ölümünü gerçekleştirmesidir. Bu durum ölümü indükleyen sinyalin gücüne bağlı olarak apoptozis ya da otofaji ile sonuçlanacaktır. Üçüncü senaryoya göre eğer otofaji hücre yaşamı yönünde bir role sahipse apoptozis ve otofajinin sinyal gücüne bağlı olarak hücre yaşmaya devam edecek ya da apoptotik aktivite ile ölecektir [276]. Çalışmamızda doksorubisin uygulanan grupta (Grup 2) ve PrP'si susturulduktan sonra doksorubisin uygulanan grupta (Grup 4) apoptotik morfolojiye sahip hücre sayısının ve Beclin-1 ekspresyonlarının artış göstermesi yukarıda sözü edilen senaryoları desteklemektedir.

Kanser gelişimi sırasında otofajinin tümör baskılayıcı ya da tümörün yaşamını sağlayıcı iki zıt yol izlediği bilinmektedir [277]. Ancak, kanserde otofaji regülasyonunun altında yatan moleküler mekanizmalar ve bu süreçlerin tümör hücreleri üzerindeki etkileri henüz tam olarak anlaşılabilmiş değildir.

PrP'nin farklı hücre tiplerinde farklı downstream olayları düzenlediği son yıllarda kabul edilen bir gerçektir. Çalışmamızda doksorubisine dirençli küçük hücreli akciğer kanseri hücre hattında bu molekülün hangi tip hücre ölümünün düzenlenmesinden sorumlu olabileceğini araştırdık. Bulgularımız PrP'nin bu hücre

tipinde otofaji indüklenmesi ile yakından ilişkili olabileceğini göstermektedir. Literatürde bulgularımızı destekleyen ve bulgularımızla örtüşmeyen farklı kanser türleri ya da nörodejenerasyon ile ilgili in vivo ve in vitro çalışmalar yer almaktadır. Ancak, bugüne kadar ilaca dirençli küçük hücreli akciğer kanseri hücre hattı H69AR'de PrP susturulmasının downstream yanıtları ile ilgili ayrıntılı bulgular birkaç makale dışında literatürde yer almamaktadır. Görünen o ki, PrP'nin susturulması farklı kanser hücrelerinde farklı hücre içi yolların aktivasyonuna ve/veya inaktivasyonuna neden olmaktadır. PrP'nin kanser biyolojisindeki bu pleiotropik etkisi nedeniyle bu proteinin fizyolojisinin daha net anlaşılmasının özellikle ilaca direnç gösteren kanserlerde kanser tipine özel, PrP odaklı ve özellikle otofajik mekanizmalara müdahale edebilecek yeni anti-tümör stratejilerinin geliştirilmesine olanak sağlayacağı düşüncesindeyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Harris, C.C., Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. *Cancer Res*, 1991. 51(18 Suppl): p. 5023s-5044s.
2. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000. 100(1): p. 57-70.
3. Labi, V. and M. Erlacher, How cell death shapes cancer. *Cell Death Dis*, 2015. 6: p. e1675.
4. Ouyang, L., et al., Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif*, 2012. 45(6): p. 487-98.
5. Evan, G. and T. Littlewood, A matter of life and cell death. *Science*, 1998. 281(5381): p. 1317-22.
6. Haber, D.A. and J. Settleman, Cancer: drivers and passengers. *Nature*, 2007. 446(7132): p. 145-6.
7. Gatenby, R.A. and T.L. Vincent, An evolutionary model of carcinogenesis. *Cancer Res*, 2003. 63(19): p. 6212-20.
8. Nowell, P.C., J.D. Rowley, and A.G. Knudson, Jr., Cancer genetics, cytogenetics--defining the enemy within. *Nat Med*, 1998. 4(10): p. 1107-11.
9. Wong, M.C.S., et al., Incidence and mortality of lung cancer: global trends and association with socioeconomic status. *Sci Rep*, 2017. 7(1): p. 14300.
10. Bhutani, M., et al., Small cell lung cancer: an update on therapeutic aspects. *Indian J Chest Dis Allied Sci*, 2006. 48(1): p. 49-57.
11. Wang, L., et al., Tumor size and lymph node metastasis are prognostic markers of small cell lung cancer in a Chinese population. *Medicine (Baltimore)*, 2018. 97(31): p. e11712.
12. Nong, J., et al., Circulating tumor DNA analysis depicts subclonal architecture and genomic evolution of small cell lung cancer. *Nat Commun*, 2018. 9(1): p. 3114.
13. Meyerson, M., W.A. Franklin, and M.J. Kelley, Molecular classification and molecular genetics of human lung cancers. *Semin Oncol*, 2004. 31(1 Suppl 1): p. 4-19.
14. van Meerbeeck, J.P., D.A. Fennell, and D.K. De Ruyscher, Small-cell lung cancer. *Lancet*, 2011. 378(9804): p. 1741-55.
15. Warshamana-Greene, G.S., et al., The insulin-like growth factor-I receptor kinase inhibitor, NVP-ADW742, sensitizes small cell lung cancer cell lines to the effects of chemotherapy. *Clin Cancer Res*, 2005. 11(4): p. 1563-71.
16. Cuttitta, F., et al., Bombesin-like peptides can function as autocrine growth factors in human small-cell lung cancer. *Nature*, 1985. 316(6031): p. 823-6.
17. Ma, P.C., et al., Downstream signalling and specific inhibition of c-MET/HGF pathway in small cell lung cancer: implications for tumour invasion. *Br J Cancer*, 2007. 97(3): p. 368-77.
18. Pardo, O.E., et al., Fibroblast growth factor-2 induces translational regulation of Bcl-XL and Bcl-2 via a MEK-dependent pathway: correlation with resistance to etoposide-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 2002. 277(14): p. 12040-6.
19. Ikegaki, N., et al., Expression of bcl-2 in small cell lung carcinoma cells. *Cancer Res*, 1994. 54(1): p. 6-8.

20. Jiang, S.X., et al., Expression of bcl-2 oncogene protein is prevalent in small cell lung carcinomas. *J Pathol*, 1995. 177(2): p. 135-8.
21. Kaiser, U., et al., Expression of bcl-2--protein in small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 1996. 15(1): p. 31-40.
22. Oltersdorf, T., et al., An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature*, 2005. 435(7042): p. 677-81.
23. Ioannou, M., et al., Hypoxia inducible factor-1 alpha and vascular endothelial growth factor in biopsies of small cell lung carcinoma. *Lung*, 2009. 187(5): p. 321-9.
24. Lee, S.T. and A.M. Scott, Hypoxia positron emission tomography imaging with 18f-fluoromisonidazole. *Semin Nucl Med*, 2007. 37(6): p. 451-61.
25. Jacoby, J.J., et al., Treatment with HIF-1alpha antagonist PX-478 inhibits progression and spread of orthotopic human small cell lung cancer and lung adenocarcinoma in mice. *J Thorac Oncol*, 2010. 5(7): p. 940-9.
26. Rouschop, K.M., et al., The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5. *J Clin Invest*, 2010. 120(1): p. 127-41.
27. Housman, G., et al., Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers (Basel)*, 2014. 6(3): p. 1769-92.
28. Stavrovskaya, A.A. and E.Y. Rybalkina, Recent Advances in the Studies of Molecular Mechanisms Regulating Multidrug Resistance in Cancer Cells. *Biochemistry (Mosc)*, 2018. 83(7): p. 779-786.
29. Komoto, T.T., et al., Chalcones Repressed the AURKA and MDR Proteins Involved in Metastasis and Multiple Drug Resistance in Breast Cancer Cell Lines. *Molecules*, 2018. 23(8).
30. Adamska, A. and M. Falasca, ATP-binding cassette transporters in progression and clinical outcome of pancreatic cancer: What is the way forward? *World J Gastroenterol*, 2018. 24(29): p. 3222-3238.
31. Begicevic, R.R. and M. Falasca, ABC Transporters in Cancer Stem Cells: Beyond Chemoresistance. *Int J Mol Sci*, 2017. 18(11).
32. Gül ÇETİN and B. TRAŞ, İlaç Davranışında P-glikoprotein'in Rolü. 2011.
33. Senbanjo, L.T. and M.A. Chellaiah, CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells. *Front Cell Dev Biol*, 2017. 5: p. 18.
34. Nagano, O. and H. Saya, Mechanism and biological significance of CD44 cleavage. *Cancer Sci*, 2004. 95(12): p. 930-5.
35. Cheng, C. and P.A. Sharp, Regulation of CD44 alternative splicing by SRm160 and its potential role in tumor cell invasion. *Mol Cell Biol*, 2006. 26(1): p. 362-70.
36. Vigetti, D., et al., Hyaluronan-CD44-ERK1/2 regulate human aortic smooth muscle cell motility during aging. *J Biol Chem*, 2008. 283(7): p. 4448-58.
37. Hiraga, T., S. Ito, and H. Nakamura, Cancer stem-like cell marker CD44 promotes bone metastases by enhancing tumorigenicity, cell motility, and hyaluronan production. *Cancer Res*, 2013. 73(13): p. 4112-22.
38. Miletto-Gonzalez, K.E., et al., The CD44 receptor interacts with P-glycoprotein to promote cell migration and invasion in cancer. *Cancer Res*, 2005. 65(15): p. 6660-7.

39. Ravindranath, A.K., et al., CD44 promotes multi-drug resistance by protecting P-glycoprotein from FBXO21-mediated ubiquitination. *Oncotarget*, 2015. 6(28): p. 26308-21.
40. Grant, C.E., et al., Overexpression of multidrug resistance-associated protein (MRP) increases resistance to natural product drugs. *Cancer Res*, 1994. 54(2): p. 357-61.
41. Cole, S.P., et al., Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells. *Cancer Res*, 1994. 54(22): p. 5902-10.
42. Dhasmana, D., et al., Targeting Nucleotide Binding Domain of Multidrug Resistance-associated Protein-1 (MRP1) for the Reversal of Multi Drug Resistance in Cancer. *Sci Rep*, 2018. 8(1): p. 11973.
43. Mao, Q. and J.D. Unadkat, Role of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in drug transport--an update. *AAPS J*, 2015. 17(1): p. 65-82.
44. Carvalho, C., et al., Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Curr Med Chem*, 2009. 16(25): p. 3267-85.
45. Tacar, O., P. Sriamornsak, and C.R. Dass, Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J Pharm Pharmacol*, 2013. 65(2): p. 157-70.
46. Franco, Y.L., T.R. Vaidya, and S. Ait-Oudhia, Anticancer and cardio-protective effects of liposomal doxorubicin in the treatment of breast cancer. *Breast Cancer (Dove Med Press)*, 2018. 10: p. 131-141.
47. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 1972. 26(4): p. 239-57.
48. Granville, D.J., et al., Apoptosis: molecular aspects of cell death and disease. *Lab Invest*, 1998. 78(8): p. 893-913.
49. Chang, H.Y. and X. Yang, Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2000. 64(4): p. 821-46.
50. Cohen, G.M., Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*, 1997. 326 (Pt 1): p. 1-16.
51. Korsmeyer, S.J., BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res*, 1999. 59(7 Suppl): p. 1693s-1700s.
52. Fadok, V.A., et al., Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol*, 1992. 148(7): p. 2207-16.
53. Haupt, S., et al., Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci*, 2003. 116(Pt 20): p. 4077-85.
54. Ashe, P.C. and M.D. Berry, Apoptotic signaling cascades. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2003. 27(2): p. 199-214.
55. Ameisen, J.C., On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. *Cell Death Differ*, 2002. 9(4): p. 367-93.
56. Appella, E., Modulation of p53 function in cellular regulation. *Eur J Biochem*, 2001. 268(10): p. 2763.
57. Borner, C., The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol*, 2003. 39(11): p. 615-47.
58. Saeki, K., et al., Bcl-2 down-regulation causes autophagy in a caspase-independent manner in human leukemic HL60 cells. *Cell Death Differ*, 2000. 7(12): p. 1263-9.

59. Baehrecke, E.H., Autophagy: dual roles in life and death? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005. 6(6): p. 505-10.
60. Debnath, J., E.H. Baehrecke, and G. Kroemer, Does autophagy contribute to cell death? *Autophagy*, 2005. 1(2): p. 66-74.
61. Chen, N. and V. Karantza, Autophagy as a therapeutic target in cancer. *Cancer Biol Ther*, 2011. 11(2): p. 157-68.
62. Das, C.K., M. Mandal, and D. Kogel, Pro-survival autophagy and cancer cell resistance to therapy. *Cancer Metastasis Rev*, 2018.
63. Suzuki, K. and Y. Ohsumi, Molecular machinery of autophagosome formation in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, 2007. 581(11): p. 2156-61.
64. Itakura, E., et al., Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Mol Biol Cell*, 2008. 19(12): p. 5360-72.
65. Levine, B. and G. Kroemer, Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 2008. 132(1): p. 27-42.
66. Zhong, Y., et al., Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex. *Nat Cell Biol*, 2009. 11(4): p. 468-76.
67. Di Bartolomeo, S., et al., The dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy. *J Cell Biol*, 2010. 191(1): p. 155-68.
68. Mrakovcic, M. and L.F. Frohlich, p53-Mediated Molecular Control of Autophagy in Tumor Cells. *Biomolecules*, 2018. 8(2).
69. Green, D.R., L. Galluzzi, and G. Kroemer, Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science*, 2011. 333(6046): p. 1109-12.
70. Gump, J.M. and A. Thorburn, Autophagy and apoptosis: what is the connection? *Trends Cell Biol*, 2011. 21(7): p. 387-92.
71. Lum, J.J., et al., Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell*, 2005. 120(2): p. 237-48.
72. Kroemer, G. and B. Levine, Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. 9(12): p. 1004-10.
73. Levine, B. and J. Yuan, Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest*, 2005. 115(10): p. 2679-88.
74. Chen, Q., J. Kang, and C. Fu, The independence of and associations among apoptosis, autophagy, and necrosis. *Signal Transduct Target Ther*, 2018. 3: p. 18.
75. Boya, P., et al., Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol*, 2005. 25(3): p. 1025-40.
76. Gozuacik, D. and A. Kimchi, Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene*, 2004. 23(16): p. 2891-906.
77. Maiuri, M.C., et al., Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J*, 2007. 26(10): p. 2527-39.
78. Yousefi, S., et al., Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat Cell Biol*, 2006. 8(10): p. 1124-32.
79. Radoshevich, L., et al., ATG12 conjugation to ATG3 regulates mitochondrial homeostasis and cell death. *Cell*, 2010. 142(4): p. 590-600.

80. Datta, S.R., et al., Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, 1997. 91(2): p. 231-41.
81. Wang, R.C., et al., Akt-mediated regulation of autophagy and tumorigenesis through Beclin 1 phosphorylation. *Science*, 2012. 338(6109): p. 956-9.
82. Bach, M., et al., The serine/threonine kinase ULK1 is a target of multiple phosphorylation events. *Biochem J*, 2011. 440(2): p. 283-91.
83. Mills, K.R., et al., Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is required for induction of autophagy during lumen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(10): p. 3438-43.
84. Prins, J., et al., Tumour necrosis factor induced autophagy and mitochondrial morphological abnormalities are mediated by TNFR-I and/or TNFR-II and do not invariably lead to cell death. *Biochem Soc Trans*, 1998. 26(4): p. S314.
85. Thorburn, J., et al., Selective inactivation of a Fas-associated death domain protein (FADD)-dependent apoptosis and autophagy pathway in immortal epithelial cells. *Mol Biol Cell*, 2005. 16(3): p. 1189-99.
86. Su, Z., et al., Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. *Mol Cancer*, 2015. 14: p. 48.
87. Koff, J.L., S. Ramachandiran, and L. Bernal-Mizrachi, A time to kill: targeting apoptosis in cancer. *Int J Mol Sci*, 2015. 16(2): p. 2942-55.
88. Yip, K.W. and J.C. Reed, Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene*, 2008. 27(50): p. 6398-406.
89. Hassan, M., et al., Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed Res Int*, 2014. 2014: p. 150845.
90. Lopez, J. and S.W. Tait, Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. *Br J Cancer*, 2015. 112(6): p. 957-62.
91. Danial, N.N. and S.J. Korsmeyer, Cell death: critical control points. *Cell*, 2004. 116(2): p. 205-19.
92. Pfeffer, C.M. and A.T.K. Singh, Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *Int J Mol Sci*, 2018. 19(2).
93. Kimmelman, A.C., The dynamic nature of autophagy in cancer. *Genes Dev*, 2011. 25(19): p. 1999-2010.
94. Karantza-Wadsworth, V., et al., Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. *Genes Dev*, 2007. 21(13): p. 1621-35.
95. Zhang, H., et al., Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J Biol Chem*, 2008. 283(16): p. 10892-903.
96. Degenhardt, K., et al., Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell*, 2006. 10(1): p. 51-64.
97. Wilde, L., et al., Autophagy in cancer: a complex relationship. *Biochem J*, 2018. 475(11): p. 1939-1954.
98. Yang, S., et al., Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. *Genes Dev*, 2011. 25(7): p. 717-29.
99. Perera, R.M., et al., Transcriptional control of autophagy-lysosome function drives pancreatic cancer metabolism. *Nature*, 2015. 524(7565): p. 361-5.
100. Yang, A., et al., Autophagy is critical for pancreatic tumor growth and progression in tumors with p53 alterations. *Cancer Discov*, 2014. 4(8): p. 905-13.

101. Guo, J.Y. and E. White, Autophagy is required for mitochondrial function, lipid metabolism, growth, and fate of KRAS(G12D)-driven lung tumors. *Autophagy*, 2013. 9(10): p. 1636-8.
102. Takahashi, Y., et al., Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nat Cell Biol*, 2007. 9(10): p. 1142-51.
103. Coppola, D., et al., Down-regulation of Bax-interacting factor-1 in colorectal adenocarcinoma. *Cancer*, 2008. 113(10): p. 2665-70.
104. Bonner, A.E., et al., Molecular profiling of mouse lung tumors: association with tumor progression, lung development, and human lung adenocarcinomas. *Oncogene*, 2004. 23(5): p. 1166-76.
105. Lee, J.W., et al., Decreased expression of tumour suppressor Bax-interacting factor-1 (Bif-1), a Bax activator, in gastric carcinomas. *Pathology*, 2006. 38(4): p. 312-5.
106. He, S., et al., Truncating mutation in the autophagy gene UVRAG confers oncogenic properties and chemosensitivity in colorectal cancers. *Nat Commun*, 2015. 6: p. 7839.
107. Jain, M.V., et al., Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development. *J Cell Mol Med*, 2013. 17(1): p. 12-29.
108. Liu, G., et al., Role of Autophagy and Apoptosis in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Int J Mol Sci*, 2017. 18(2).
109. Aredia, F., et al., Autophagy and cancer. *Cells*, 2012. 1(3): p. 520-34.
110. Livesey, K.M., et al., Autophagy inhibition in combination cancer treatment. *Curr Opin Investig Drugs*, 2009. 10(12): p. 1269-79.
111. Yang, Z.J., et al., The role of autophagy in cancer: therapeutic implications. *Mol Cancer Ther*, 2011. 10(9): p. 1533-41.
112. Kimmelman, A.C. and E. White, Autophagy and Tumor Metabolism. *Cell Metab*, 2017. 25(5): p. 1037-1043.
113. El-Khattouti, A., et al., Identification and analysis of CD133(+) melanoma stem-like cells conferring resistance to taxol: An insight into the mechanisms of their resistance and response. *Cancer Lett*, 2014. 343(1): p. 123-33.
114. Kikuchi, Y., et al., G1-dependent prion protein expression in human glioblastoma cell line T98G. *Biol Pharm Bull*, 2002. 25(6): p. 728-33.
115. Meslin, F., et al., Silencing of prion protein sensitizes breast adriamycin-resistant carcinoma cells to TRAIL-mediated cell death. *Cancer Res*, 2007. 67(22): p. 10910-9.
116. Meslin, F., et al., Efficacy of adjuvant chemotherapy according to Prion protein expression in patients with estrogen receptor-negative breast cancer. *Ann Oncol*, 2007. 18(11): p. 1793-8.
117. Roucou, X., et al., Cellular prion protein inhibits proapoptotic Bax conformational change in human neurons and in breast carcinoma MCF-7 cells. *Cell Death Differ*, 2005. 12(7): p. 783-95.
118. Sauer, H., et al., Redox-regulation of intrinsic prion expression in multicellular prostate tumor spheroids. *Free Radic Biol Med*, 1999. 27(11-12): p. 1276-83.

119. Antonacopoulou, A.G., et al., Prion protein expression and the M129V polymorphism of the PRNP gene in patients with colorectal cancer. *Mol Carcinog*, 2010. 49(7): p. 693-9.
120. Du, L., et al., CD44-positive cancer stem cells expressing cellular prion protein contribute to metastatic capacity in colorectal cancer. *Cancer Res*, 2013. 73(8): p. 2682-94.
121. Prusiner, S.B., Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, 1982. 216(4542): p. 136-44.
122. Pastore, A. and A. Zagari, A structural overview of the vertebrate prion proteins. *Prion*, 2007. 1(3): p. 185-97.
123. Makarava, N., et al., Genesis of mammalian prions: from non-infectious amyloid fibrils to a transmissible prion disease. *PLoS Pathog*, 2011. 7(12): p. e1002419.
124. Prusiner, S.B., Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(23): p. 13363-83.
125. Dormont, D., Prion diseases: pathogenesis and public health concerns. *FEBS Lett*, 2002. 529(1): p. 17-21.
126. Moore, R.A., L.M. Taubner, and S.A. Priola, Prion protein misfolding and disease. *Curr Opin Struct Biol*, 2009. 19(1): p. 14-22.
127. Wickner, R.B., et al., Yeast prions: evolution of the prion concept. *Prion*, 2007. 1(2): p. 94-100.
128. Shkundina, I.S. and M.D. Ter-Avanesyan, Prions. *Biochemistry (Mosc)*, 2007. 72(13): p. 1519-36.
129. Inge-Vechtomov, S.G., G.A. Zhouravleva, and Y.O. Chernoff, Biological roles of prion domains. *Prion*, 2007. 1(4): p. 228-35.
130. Grassmann, A., et al., Cellular aspects of prion replication in vitro. *Viruses*, 2013. 5(1): p. 374-405.
131. Stahl, N., et al., Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell*, 1987. 51(2): p. 229-40.
132. Westergard, L., H.M. Christensen, and D.A. Harris, The cellular prion protein (PrP(C)): its physiological function and role in disease. *Biochim Biophys Acta*, 2007. 1772(6): p. 629-44.
133. Linden, R., et al., Physiology of the prion protein. *Physiol Rev*, 2008. 88(2): p. 673-728.
134. Petit, C.S., et al., Roles of the cellular prion protein in the regulation of cell-cell junctions and barrier function. *Tissue Barriers*, 2013. 1(2): p. e24377.
135. Mouillet-Richard, S., et al., Signal transduction through prion protein. *Science*, 2000. 289(5486): p. 1925-8.
136. Morel, E., et al., The cellular prion protein PrP(c) is involved in the proliferation of epithelial cells and in the distribution of junction-associated proteins. *PLoS One*, 2008. 3(8): p. e3000.
137. Santuccione, A., et al., Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth. *J Cell Biol*, 2005. 169(2): p. 341-54.
138. Castle, A.R. and A.C. Gill, Physiological Functions of the Cellular Prion Protein. *Front Mol Biosci*, 2017. 4: p. 19.
139. Mehrpour, M. and P. Codogno, Prion protein: From physiology to cancer biology. *Cancer Lett*, 2010. 290(1): p. 1-23.

140. Antony, H., et al., Potential roles for prions and protein-only inheritance in cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 2012. 31(1-2): p. 1-19.
141. Wang, J.H., et al., Octarepeat peptides of prion are essential for multidrug resistance in gastric cancer cells. *J Dig Dis*, 2012. 13(3): p. 143-52.
142. Zhou, L., et al., Overexpression of PrPc, combined with MGr1-Ag/37LRP, is predictive of poor prognosis in gastric cancer. *Int J Cancer*, 2014. 135(10): p. 2329-37.
143. Halliez, S., et al., To develop with or without the prion protein. *Front Cell Dev Biol*, 2014. 2: p. 58.
144. Martin-Lannere, S., et al., PrP(C) from stem cells to cancer. *Front Cell Dev Biol*, 2014. 2: p. 55.
145. Brown, D.R., et al., Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp Neurol*, 1997. 146(1): p. 104-12.
146. Bounhar, Y., et al., Prion protein protects human neurons against Bax-mediated apoptosis. *J Biol Chem*, 2001. 276(42): p. 39145-9.
147. Zomosa-Signoret, V., et al., Physiological role of the cellular prion protein. *Vet Res*, 2008. 39(4): p. 9.
148. Martinou, J.C. and D.R. Green, Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. 2(1): p. 63-7.
149. Roucou, X., et al., Bax oligomerization in mitochondrial membranes requires tBid (caspase-8-cleaved Bid) and a mitochondrial protein. *Biochem J*, 2002. 368(Pt 3): p. 915-21.
150. Sakudo, A., T. Onodera, and K. Ikuta, Prion protein gene-deficient cell lines: powerful tools for prion biology. *Microbiol Immunol*, 2007. 51(1): p. 1-13.
151. Martins, V.R., et al., Prion protein: orchestrating neurotrophic activities. *Curr Issues Mol Biol*, 2010. 12(2): p. 63-86.
152. Yang, X., et al., Prion protein and cancers. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2014. 46(6): p. 431-40.
153. Zeng, L., W. Zou, and G. Wang, Cellular prion protein (PrP(C)) and its role in stress responses. *Int J Clin Exp Med*, 2015. 8(5): p. 8042-50.
154. Brown, D.R., et al., The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature*, 1997. 390(6661): p. 684-7.
155. Brown, D.R., Prion and prejudice: normal protein and the synapse. *Trends Neurosci*, 2001. 24(2): p. 85-90.
156. Sakudo, A., et al., Prion protein suppresses perturbation of cellular copper homeostasis under oxidative conditions. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. 313(4): p. 850-5.
157. Brown, D.R., C. Clive, and S.J. Haswell, Antioxidant activity related to copper binding of native prion protein. *J Neurochem*, 2001. 76(1): p. 69-76.
158. Brown, D.R., et al., PrP and beta-amyloid fragments activate different neurotoxic mechanisms in cultured mouse cells. *Eur J Neurosci*, 1997. 9(6): p. 1162-9.
159. Jaegly, A., et al., Search for a nuclear localization signal in the prion protein. *Mol Cell Neurosci*, 1998. 11(3): p. 127-33.
160. Lorenz, H., O. Windl, and H.A. Kretzschmar, Cellular phenotyping of secretory and nuclear prion proteins associated with inherited prion diseases. *J Biol Chem*, 2002. 277(10): p. 8508-16.

161. Gu, Y., et al., Identification of cryptic nuclear localization signals in the prion protein. *Neurobiol Dis*, 2003. 12(2): p. 133-49.
162. Mironov, A., Jr., et al., Cytosolic prion protein in neurons. *J Neurosci*, 2003. 23(18): p. 7183-93.
163. Hachiya, N.S., et al., Mitochondrial localization of cellular prion protein (PrPC) invokes neuronal apoptosis in aged transgenic mice overexpressing PrPC. *Neurosci Lett*, 2005. 374(2): p. 98-103.
164. Faris, R., et al., Cellular prion protein is present in mitochondria of healthy mice. *Sci Rep*, 2017. 7: p. 41556.
165. Wang, X., et al., Cytosolic prion protein induces apoptosis in human neuronal cell SH-SY5Y via mitochondrial disruption pathway. *BMB Rep*, 2009. 42(7): p. 444-9.
166. Roucou, X., et al., Cytosolic prion protein is not toxic and protects against Bax-mediated cell death in human primary neurons. *J Biol Chem*, 2003. 278(42): p. 40877-81.
167. Kim, B.H., et al., The cellular prion protein (PrPC) prevents apoptotic neuronal cell death and mitochondrial dysfunction induced by serum deprivation. *Brain Res Mol Brain Res*, 2004. 124(1): p. 40-50.
168. Li, A. and D.A. Harris, Mammalian prion protein suppresses Bax-induced cell death in yeast. *J Biol Chem*, 2005. 280(17): p. 17430-4.
169. Lin, D.T., et al., Cytosolic prion protein is the predominant anti-Bax prion protein form: exclusion of transmembrane and secreted prion protein forms in the anti-Bax function. *Biochim Biophys Acta*, 2008. 1783(10): p. 2001-12.
170. Laroche-Pierre, S., J. Jodoin, and A.C. LeBlanc, Helix 3 is necessary and sufficient for prion protein's anti-Bax function. *J Neurochem*, 2009. 108(4): p. 1019-31.
171. Jurgensmeier, J.M., et al., Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(9): p. 4997-5002.
172. Antonsson, B., et al., Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem J*, 2000. 345 Pt 2: p. 271-8.
173. Mattei, V., et al., Recruitment of cellular prion protein to mitochondrial raft-like microdomains contributes to apoptosis execution. *Mol Biol Cell*, 2011. 22(24): p. 4842-53.
174. Sorice, M., et al., Trafficking of PrPc to mitochondrial raft-like microdomains during cell apoptosis. *Prion*, 2012. 6(4): p. 354-8.
175. Shin, H.Y., J.M. Oh, and Y.S. Kim, The Functional Role of Prion Protein (PrPC) on Autophagy. *Pathogens*, 2013. 2(3): p. 436-45.
176. Oh, J.M., et al., Oxidative stress impairs autophagic flux in prion protein-deficient hippocampal cells. *Autophagy*, 2012. 8(10): p. 1448-61.
177. Dias, M.V., et al., PRNP/prion protein regulates the secretion of exosomes modulating CAV1/caveolin-1-suppressed autophagy. *Autophagy*, 2016. 12(11): p. 2113-2128.
178. Barbieri, G., et al., Silencing of cellular prion protein (PrPC) expression by DNA-antisense oligonucleotides induces autophagy-dependent cell death in glioma cells. *Autophagy*, 2011. 7(8): p. 840-53.

179. Mirski, S.E., J.H. Gerlach, and S.P. Cole, Multidrug resistance in a human small cell lung cancer cell line selected in adriamycin. *Cancer Res*, 1987. 47(10): p. 2594-8.
180. Schrank, Z., et al., Current Molecular-Targeted Therapies in NSCLC and Their Mechanism of Resistance. *Cancers (Basel)*, 2018. 10(7).
181. Bray, F., et al., Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 2018.
182. Gadgeel, S.M., S.S. Ramalingam, and G.P. Kalemkerian, Treatment of lung cancer. *Radiol Clin North Am*, 2012. 50(5): p. 961-74.
183. Domvri, K., et al., Molecular Targeted Drugs and Biomarkers in NSCLC, the Evolving Role of Individualized Therapy. *J Cancer*, 2013. 4(9): p. 736-54.
184. Abolhoda, A., et al., Rapid activation of MDR1 gene expression in human metastatic sarcoma after in vivo exposure to doxorubicin. *Clin Cancer Res*, 1999. 5(11): p. 3352-6.
185. Hennequin, E., et al., Expression of *mdr1* gene in human breast primary tumors and metastases. *Breast Cancer Res Treat*, 1993. 26(3): p. 267-74.
186. Isonishi, S., et al., Expression of the c-Ha-ras oncogene in mouse NIH 3T3 cells induces resistance to cisplatin. *Cancer Res*, 1991. 51(21): p. 5903-9.
187. Yang, J.M., A. Vassil, and W.N. Hait, Involvement of phosphatidylinositol-3-kinase in membrane ruffling induced by P-glycoprotein substrates in multidrug-resistant carcinoma cells. *Biochem Pharmacol*, 2002. 63(5): p. 959-66.
188. Li, Q.Q., et al., The role of P-glycoprotein/cellular prion protein interaction in multidrug-resistant breast cancer cells treated with paclitaxel. *Cell Mol Life Sci*, 2009. 66(3): p. 504-15.
189. Pan, Y., et al., Cellular prion protein promotes invasion and metastasis of gastric cancer. *FASEB J*, 2006. 20(11): p. 1886-8.
190. Triller, N., et al., Multidrug resistance in small cell lung cancer: expression of P-glycoprotein, multidrug resistance protein 1 and lung resistance protein in chemo-naïve patients and in relapsed disease. *Lung Cancer*, 2006. 54(2): p. 235-40.
191. Wang, B., et al., Immunohistochemical expression and clinical significance of P-glycoprotein in previously untreated extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type. *Am J Hematol*, 2008. 83(10): p. 795-9.
192. Du, J., et al., Overexpression and significance of prion protein in gastric cancer and multidrug-resistant gastric carcinoma cell line SGC7901/ADR. *Int J Cancer*, 2005. 113(2): p. 213-20.
193. Lee, J.H., C.W. Yun, and S.H. Lee, Cellular Prion Protein Enhances Drug Resistance of Colorectal Cancer Cells via Regulation of a Survival Signal Pathway. *Biomol Ther (Seoul)*, 2018. 26(3): p. 313-321.
194. Cheng, Y., et al., CD44/cellular prion protein interact in multidrug resistant breast cancer cells and correlate with responses to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Mol Carcinog*, 2014. 53(9): p. 686-97.
195. Gil, M., et al., Cellular prion protein regulates invasion and migration of breast cancer cells through MMP-9 activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016. 470(1): p. 213-219.

196. Yap, Y.H. and Y.H. Say, Resistance against apoptosis by the cellular prion protein is dependent on its glycosylation status in oral HSC-2 and colon LS 174T cancer cells. *Cancer Lett*, 2011. 306(1): p. 111-9.
197. Silva, J.L., et al., Prion-like aggregation of mutant p53 in cancer. *Trends Biochem Sci*, 2014. 39(6): p. 260-7.
198. Yun, C.W., et al., Silencing Prion Protein in HT29 Human Colorectal Cancer Cells Enhances Anticancer Response to Fucoidan. *Anticancer Res*, 2016. 36(9): p. 4449-58.
199. Akar, U., et al., Silencing of Bcl-2 expression by small interfering RNA induces autophagic cell death in MCF-7 breast cancer cells. *Autophagy*, 2008. 4(5): p. 669-79.
200. Negro, A., et al., The metabolism and imaging in live cells of the bovine prion protein in its native form or carrying single amino acid substitutions. *Mol Cell Neurosci*, 2001. 17(3): p. 521-38.
201. Sarnataro, D., et al., PrPC is sorted to the basolateral membrane of epithelial cells independently of its association with rafts. *Traffic*, 2002. 3(11): p. 810-21.
202. Taraboulos, A., et al., Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform. *J Cell Biol*, 1995. 129(1): p. 121-32.
203. Campling, B.G., et al., Expression of the MRP and MDR1 multidrug resistance genes in small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 1997. 3(1): p. 115-22.
204. Guitart, K., et al., Prion protein regulates glutathione metabolism and neural glutamate and cysteine uptake via excitatory amino acid transporter 3. *J Neurochem*, 2015. 133(4): p. 558-71.
205. Taylor, D.R. and N.M. Hooper, The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) mediates the endocytosis of the cellular prion protein. *Biochem J*, 2007. 402(1): p. 17-23.
206. Parkyn, C.J., et al., LRP1 controls biosynthetic and endocytic trafficking of neuronal prion protein. *J Cell Sci*, 2008. 121(Pt 6): p. 773-83.
207. Sunyach, C. and F. Checler, Combined pharmacological, mutational and cell biology approaches indicate that p53-dependent caspase 3 activation triggered by cellular prion is dependent on its endocytosis. *J Neurochem*, 2005. 92(6): p. 1399-407.
208. Paitel, E., et al., Overexpression of PrPc triggers caspase 3 activation: potentiation by proteasome inhibitors and blockade by anti-PrP antibodies. *J Neurochem*, 2002. 83(5): p. 1208-14.
209. Wang, J.H., et al., Dynamic changes and surveillance function of prion protein expression in gastric cancer drug resistance. *World J Gastroenterol*, 2011. 17(35): p. 3986-93.
210. Yu, G., et al., Silencing prion protein in MDA-MB-435 breast cancer cells leads to pleiotropic cellular responses to cytotoxic stimuli. *PLoS One*, 2012. 7(11): p. e48146.
211. Hiscox, S., et al., Overexpression of CD44 accompanies acquired tamoxifen resistance in MCF7 cells and augments their sensitivity to the stromal factors, heregulin and hyaluronan. *BMC Cancer*, 2012. 12: p. 458.

212. Gvozdenovic, A., et al., CD44 enhances tumor formation and lung metastasis in experimental osteosarcoma and is an additional predictor for poor patient outcome. *J Bone Miner Res*, 2013. 28(4): p. 838-47.
213. Louderbough, J.M. and J.A. Schroeder, Understanding the dual nature of CD44 in breast cancer progression. *Mol Cancer Res*, 2011. 9(12): p. 1573-86.
214. Mattheolabakis, G., et al., Hyaluronic acid targeting of CD44 for cancer therapy: from receptor biology to nanomedicine. *J Drug Target*, 2015. 23(7-8): p. 605-18.
215. Kiuchi, S., et al., Pancreatic cancer cells express CD44 variant 9 and multidrug resistance protein 1 during mitosis. *Exp Mol Pathol*, 2015. 98(1): p. 41-6.
216. Hao, J.L., et al., CD147/EMMPRIN and CD44 are potential therapeutic targets for metastatic prostate cancer. *Curr Cancer Drug Targets*, 2010. 10(3): p. 287-306.
217. Li, J., et al., Synergistic inhibition of migration and invasion of breast cancer cells by dual docetaxel/quercetin-loaded nanoparticles via Akt/MMP-9 pathway. *Int J Pharm*, 2017. 523(1): p. 300-309.
218. Cain, J.W., et al., Identification of CD44 as a surface biomarker for drug resistance by surface proteome signature technology. *Mol Cancer Res*, 2011. 9(5): p. 637-47.
219. Ashkenazi, A. and R.S. Herbst, To kill a tumor cell: the potential of proapoptotic receptor agonists. *J Clin Invest*, 2008. 118(6): p. 1979-90.
220. Liang, J., et al., Overexpression of PrPC and its antiapoptosis function in gastric cancer. *Tumour Biol*, 2006. 27(2): p. 84-91.
221. Guillot-Sestier, M.V., et al., The alpha-secretase-derived N-terminal product of cellular prion, N1, displays neuroprotective function in vitro and in vivo. *J Biol Chem*, 2009. 284(51): p. 35973-86.
222. Kristiansen, M., et al., Disease-related prion protein forms aggregates in neuronal cells leading to caspase activation and apoptosis. *J Biol Chem*, 2005. 280(46): p. 38851-61.
223. Rybstein, M.D., et al., The autophagic network and cancer. *Nat Cell Biol*, 2018. 20(3): p. 243-251.
224. White, E., Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2012. 12(6): p. 401-10.
225. White, E., The role for autophagy in cancer. *J Clin Invest*, 2015. 125(1): p. 42-6.
226. Kroemer, G. and M. Jaattela, Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat Rev Cancer*, 2005. 5(11): p. 886-97.
227. Ogier-Denis, E. and P. Codogno, Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer. *Biochim Biophys Acta*, 2003. 1603(2): p. 113-28.
228. Scott, R.C., G. Juhasz, and T.P. Neufeld, Direct induction of autophagy by Atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death. *Curr Biol*, 2007. 17(1): p. 1-11.
229. Dalby, K.N., et al., Targeting the prodeath and prosurvival functions of autophagy as novel therapeutic strategies in cancer. *Autophagy*, 2010. 6(3): p. 322-9.
230. Edinger, A.L. and C.B. Thompson, Defective autophagy leads to cancer. *Cancer Cell*, 2003. 4(6): p. 422-4.

231. Amaravadi, R. and J. Debnath, Mouse models address key concerns regarding autophagy inhibition in cancer therapy. *Cancer Discov*, 2014. 4(8): p. 873-5.
232. Amaravadi, R., A.C. Kimmelman, and E. White, Recent insights into the function of autophagy in cancer. *Genes Dev*, 2016. 30(17): p. 1913-30.
233. Amaravadi, R.K., et al., Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment. *Clin Cancer Res*, 2011. 17(4): p. 654-66.
234. Rebecca, V.W. and R.K. Amaravadi, Emerging strategies to effectively target autophagy in cancer. *Oncogene*, 2016. 35(1): p. 1-11.
235. Thorburn, A., D.H. Thamm, and D.L. Gustafson, Autophagy and cancer therapy. *Mol Pharmacol*, 2014. 85(6): p. 830-8.
236. Kim, K.Y., et al., Inhibition of Autophagy Promotes Salinomycin-Induced Apoptosis via Reactive Oxygen Species-Mediated PI3K/AKT/mTOR and ERK/p38 MAPK-Dependent Signaling in Human Prostate Cancer Cells. *Int J Mol Sci*, 2017. 18(5).
237. Sosa, M.S., P. Bragado, and J.A. Aguirre-Ghiso, Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. *Nat Rev Cancer*, 2014. 14(9): p. 611-22.
238. Seaman, M.N., et al., Endosome to Golgi retrieval of the vacuolar protein sorting receptor, Vps10p, requires the function of the VPS29, VPS30, and VPS35 gene products. *J Cell Biol*, 1997. 137(1): p. 79-92.
239. Kametaka, S., et al., Apg14p and Apg6/Vps30p form a protein complex essential for autophagy in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 1998. 273(35): p. 22284-91.
240. Yue, Z., et al., Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(25): p. 15077-82.
241. Qu, X., et al., Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest*, 2003. 112(12): p. 1809-20.
242. Gallagher, L.E., L.E. Williamson, and E.Y. Chan, Advances in Autophagy Regulatory Mechanisms. *Cells*, 2016. 5(2).
243. Liang, X.H., et al., Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*, 1999. 402(6762): p. 672-6.
244. Rohatgi, R.A. and L.M. Shaw, An autophagy-independent function for Beclin 1 in cancer. *Mol Cell Oncol*, 2016. 3(1).
245. Ozpolat, B. and D.M. Benbrook, Targeting autophagy in cancer management - strategies and developments. *Cancer Manag Res*, 2015. 7: p. 291-9.
246. Wirawan, E., et al., Beclin1: a role in membrane dynamics and beyond. *Autophagy*, 2012. 8(1): p. 6-17.
247. Nah, J., et al., BECN1/Beclin 1 is recruited into lipid rafts by prion to activate autophagy in response to amyloid beta 42. *Autophagy*, 2013. 9(12): p. 2009-21.
248. Fimia, G.M., et al., Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature*, 2007. 447(7148): p. 1121-5.
249. Yoshii, S.R. and N. Mizushima, Monitoring and Measuring Autophagy. *Int J Mol Sci*, 2017. 18(9).

250. Biederbick, A., H.F. Kern, and H.P. Elsasser, Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles. *Eur J Cell Biol*, 1995. 66(1): p. 3-14.
251. Iwai-Kanai, E., et al., A method to measure cardiac autophagic flux in vivo. *Autophagy*, 2008. 4(3): p. 322-9.
252. Munafo, D.B. and M.I. Colombo, A novel assay to study autophagy: regulation of autophagosome vacuole size by amino acid deprivation. *J Cell Sci*, 2001. 114(Pt 20): p. 3619-29.
253. Murugan, S. and R.K. Amaravadi, Methods for Studying Autophagy Within the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol*, 2016. 899: p. 145-66.
254. Yang, L.J., et al., Betulinic acid inhibits autophagic flux and induces apoptosis in human multiple myeloma cells in vitro. *Acta Pharmacol Sin*, 2012. 33(12): p. 1542-8.
255. Wang, Y., et al., Beclin-1 suppresses gastric cancer progression by promoting apoptosis and reducing cell migration. *Oncol Lett*, 2017. 14(6): p. 6857-6862.
256. Nikolettoulou, V., et al., Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta*, 2013. 1833(12): p. 3448-3459.
257. Zhao, G.X., et al., The critical molecular interconnections in regulating apoptosis and autophagy. *Ann Med*, 2015. 47(4): p. 305-15.
258. Pattingre, S., et al., Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*, 2005. 122(6): p. 927-39.
259. Luo, S. and D.C. Rubinsztein, Apoptosis blocks Beclin 1-dependent autophagosome synthesis: an effect rescued by Bcl-xL. *Cell Death Differ*, 2010. 17(2): p. 268-77.
260. Kang, R., et al., The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ*, 2011. 18(4): p. 571-80.
261. Chen, C., et al., Autophagy and doxorubicin resistance in cancer. *Anticancer Drugs*, 2018. 29(1): p. 1-9.
262. Fazi, B., et al., Fenretinide induces autophagic cell death in caspase-defective breast cancer cells. *Autophagy*, 2008. 4(4): p. 435-41.
263. Grander, D., et al., Autophagy as the main means of cytotoxicity by glucocorticoids in hematological malignancies. *Autophagy*, 2009. 5(8): p. 1198-200.
264. Laane, E., et al., Cell death induced by dexamethasone in lymphoid leukemia is mediated through initiation of autophagy. *Cell Death Differ*, 2009. 16(7): p. 1018-29.
265. Lowe, S.W. and A.W. Lin, Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*, 2000. 21(3): p. 485-95.
266. Levine, B., Unraveling the role of autophagy in cancer. *Autophagy*, 2006. 2(2): p. 65-6.
267. Liu, E.Y. and K.M. Ryan, Autophagy and cancer--issues we need to digest. *J Cell Sci*, 2012. 125(Pt 10): p. 2349-58.
268. Liang, X.H., et al., Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. *J Virol*, 1998. 72(11): p. 8586-96.
269. Wirawan, E., et al., Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria. *Cell Death Dis*, 2010. 1: p. e18.

270. Rohn, T.T., et al., Depletion of Beclin-1 due to proteolytic cleavage by caspases in the Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Dis*, 2011. 43(1): p. 68-78.
271. Li, Z.Y., et al., Mitochondrial ROS generation for regulation of autophagic pathways in cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011. 414(1): p. 5-8.
272. Rubinstein, A.D., et al., The autophagy protein Atg12 associates with antiapoptotic Bcl-2 family members to promote mitochondrial apoptosis. *Mol Cell*, 2011. 44(5): p. 698-709.
273. Pyo, J.O., et al., Essential roles of Atg5 and FADD in autophagic cell death: dissection of autophagic cell death into vacuole formation and cell death. *J Biol Chem*, 2005. 280(21): p. 20722-9.
274. Green, D.R. and B. Levine, To be or not to be? How selective autophagy and cell death govern cell fate. *Cell*, 2014. 157(1): p. 65-75.
275. Lu, J.V. and C.M. Walsh, Programmed necrosis and autophagy in immune function. *Immunol Rev*, 2012. 249(1): p. 205-17.
276. Noguchi, M., Hirata, N., Edamura, T., Ishigaki, S., Suizu, F., Intersection of Apoptosis and Autophagy Cell Death Pathways. *Austin Journal of Molecular and Cellular Biology*, 2015. 2(1): p. 1-7.
277. Salazar-Ramírez, K., Molinares-Rodríguez, J., Bolívar-González, S. , Molecular mechanisms of autophagy and its role in cancer development. *Rev. Fac. Med. ,* 2016. 64(3): p. 529-535.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Zübeyde ÖZTEL

Doğum Yeri ve Yılı : Trabzon, 1992

Medeni Hali : Bekâr

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : zubeydeoztel@cbu.edu.tr

Eğitim Durumu

Lise :Nevzat Ayaz Anadolu Meslek Lisesi, Ankara 2006-2010

Lisans :Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Biyoloji Bölümü 2011-2015

Yüksek Lisans :Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,
Biyoloji Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji Bilim Dalı 2015-
2018

Mesleki Deneyim

Kurum Bilgisi :Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Deneysel Fen Bilimleri
Araştırma ve Uygulama Merkezi (DEFAM) (Kısmi zamanlı)
2016-2017

Yayınları

1. Birkan T., Şahin M., Öztel Z., Balcan E. Do prion protein gene polymorphisms induce apoptosis in non-mammals? J. Biosciences. (Accepted for publication; doi: 10.1007/s12038-015-9584-7 (2016).